KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 6, No. 4, (1974)

보일드 굴 통조림의 저장에 따르는 변색원인에 관한 연구

제 1 보 · 굴의 갈변 원인 색소의 분리 및 그 분광학적 성질

이 태 녕*·장 유 경**·최 춘 언***

서울대학교 사범대학 화학과*·한양대학교 사범대학 가정과**·농어촌 개발공사***

(1974년 11월 16일 수리)

Studies on the Mechanism of Pigmentation during Storage of Canned Boiled Oysters

I. Isolation and Spectroscopic Characterization of Pigments Isolated from Brown Oysters

by

T.Y.Lee, Y.K.Chang* and C.H.Choi**

Seoul National University*·Hanyang University**·Agricultural and Fishery Development Institute***

(Received November 16, 1974)

Abstract

Pigments were extracted by aqueous acetone from the boiled canned oyster colored during storage and then the components were separated by thin layer chromatography.

Totally eleven pigments could be isolated including one yellow, one red, five orange or reddish orange and four green components, and their UV-visible spectra were measured. It can be envisioned from the electronic spectral study and color reaction on the indivisual pigments isolated from the brown acetone extracts that the green pigments as well as most of the yellow orange ones may be porphyrin derivatives originated probably from the chlorophyll and some of the orange pigments contains ketocarotenoids. In particular, the pigment of band 8 which is expected to be pheophytin a or its derivatives and the carotenoid band 7 seem to be the major pigment.

The close resemblance of the chromatogram of the colored muscle extract to that of the viscera suggests that the brown coloring material is probably originated from the viscera pigments.

서 론

1970년경 부터 남해안지방에서 굴양식이 성행됨에 따라 1973년에는 약 78,602 M/T(껍질채 무게)의 양식 생산고[1]를 나타나게 되었고 이에 따라 그 가공도 활발해졌다.

현재 굴의 가공품은 대부분 통조림으로서 훈제기름통조림, 보일드 통조림 합해서 1973년도 가공실적은 5,326 M/T[2]이 되고 있다. 그러나 굴 통조림 특히 보일드 굴통조림의 품질상 문제점으로 크게 부각된것은 제품 저장시의 변색 문제이다.

통조림후 시간경과에 따라 점차 황색, 황갈색, 적갈색(赤褐色) 때로는 녹갈색(綠褐色)으로 변색되어 보일드굴 통조림의 품질을 저하시키고 있다. 굴 통조림의 변색 그중에서도 녹변(綠變) 현상은 일찍이 알려졌으나 이에 대한 연구는 비교적 최근에 시도 되었다. 즉 Iyama

etal,[3] Yamasaki[4] 등은 녹변이 내장에서 이행된 chlorophyll이라 추정한바 있고 Kimura[5] 등은 chlorophyll-a 유사물질, Osada 등[6~8]은 chlorophyll-a 유도체 내지 그의 Cu유도체가 아닌가 추측하였다. 한편 황갈변 굴의 변색에 대해서는 식품의 일반 갈변 현상의 원인과 같이 Yamasaki[4]의 Maillard reaction product를 가정한 실험, Fujii[9]의 tyrosine에서 유래된 polyphenol을 가정한 검토가 있으나, 갈변을 이르키는 색소 물질을 규명한 보문은 별로 없다.

저자들은 남해산 양식굴로 만든 황변 보일드 통조림으로 부터 황변 원인물질이라 생각되는 색소들을 분리하고 그 성질을 검토하여 새 지견(知見)을 얻었음으로 그 결과를 보고하고저 한다.

실 험

1. 실험재료 및 기구

1) 시료 : 굴통조림은 전남(全南) 여천군(麗川郡) 화정면(華井面) 개도리(蓋島里) 소재의 굴양식장에서 채취한 산란(產卵)전의 양식굴(*Crassostrea gigas*)을 여수(麗水)지방 통조림 공장에서 일반표준 가공법에 따라서 제조한 시제품(試製品)을 사용하였다.

2) 시약 : 특별한 언급이 없는한 모든 시약은 화학용 순품(純品)을 사용하였다. 사용한 용매는 아세톤, 메탄올, 에탄올, 에테르, 에틸아세테이트, 헥산, 메틸렌 크로라이드 등이며 후자의 경우 과산화물을 제거하기 위하여 환원철(還元鐵) 존재하에 차광(遮光)상태에서 증류하여 정제한 것을 사용하였다. 크로마토그라프(thin layer chromatograph)용 용매와 스펙트럼 측정에 사용한 용매는 모두 분별 증류후 실리카겔 칼럼(silica gel column)을 통과시켜 정제한 것이다. TLC용 실리카겔은 Merck AG Darmstadt 제의 Kieselgel G Nach Stahl 및 Type 60 형을 사용하였다. 질소는 뉴코리아제 특수 순수품을 사용하였다.

3) 기구 : 가시부흡수(可視部吸收) 스펙트럼은 Cary Model 14 Recording Spectrophotometer로 측정하였고 진공 농축은 Fisher Scientific Rotary Evaporator를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 굴색소의 추출 : 제조후 2개월 경과된 굴 통조림 한통중에서 굴내장(消化盲囊) 16 g과 변색된 굴의 살부분 7 g을 각각 따로 분리하여 아세톤 100 ml에 각각넣고 하룻밤 방치하였다. 이 아세톤 추출액을 rotary evaporator로 감압 농축시킨후 질소를 주입시켜 상압에 이르게 한다음 증류수로 희석하여 분액 깔대기(separatory funnel)에서 에테르로 추출한 다음 증류수로 3회 세척하였다. 다음 에테르층을 무수(無水)황산 나트륨으로 건조시켜 재 농축 시킨다음 TLC로 색소를 분리하였다.

2) Thin Layer Chromatography에 의한 굴색소의 분리 : 20×20 cm의 TLC용 유리판에 1 mm두께의 실리카겔을 도포(塗布)한후 105°C에서 30분간 활성화시키고 차광(遮光)상태에서 질소 가스를 흘리며 헥산(*n*-hexane) 및 아세톤(100 : 4) 혼합용매로 전개시키여 세척한 후 건조시켰다. 이렇게 제조한 TLC판에 위의 추출 농축액을 spot한후 질소로 채운 전개조(24×24×12 cm)에 넣고 차광상태에서 전개(development)시킨다. 실리카겔판에 사용한 전개용매는 가장 분리가 잘 되었던 메틸렌 크로라이드, 에틸아세테이트(85 : 15 v/v)혼합용매를 사용하였다. 전개가 끝나면(약 30분) 질소 기류하에서 용매를 날려보낸 다음 TLC판에 분리된 각 색소대를 감압분취(減壓分取)장치를 사용하여 작은 유리칼럼에 모아 메탄올로 용출(溶出)시킨다.

이 메탄올 용액을 저온(40°C 이하)에서 rotary evaporator로 감압농축 시킨후 질소 환경하에서 무수 에탄올에 녹여 가시부 흡수 스펙트럼을 측정하였다.

3) 발색반응(發色反應) : TLC에 의하여 분리된 굴색소 크로마토그람 위에 다음의 각 발색시약을 굴색소가 전개 분리된 TLC판에 직접 분무(噴霧)한 후 서서히 가열하면서 변색(變色)을 관찰하였다.

가) 0.1% *n*-bromosuccinimide의 크로로포름용액
나) 삼염화 아티몬($SbCl_3$)의 크로로포름 포화용액
다) $NaBH_4$의 1% 메탄올 용액
라) 0.4% 2,4-dinitrophenyl hydrazine의 염산산성 메탄올 용액

결과 및 고찰

1. 굴단면의 형태와 색소 분포

가공조건 또는 저장기간에 따르는 색의 변화는 저장기간이 오래될수록 변색 정도가 심한 경향이 있는것은 사실이지만 가공조건 여하를 막론하고 저장기간 2개월 이내에 이미 변색되기 시작하고 있었다.

통조림 굴의 단면을 보면 굴 중심부의 내장(消化盲囊)부분은 청록색을 띄고 있으며 그 주위는 황갈색 색소가 방사상(放射狀)으로 확산되고 있는듯 내부에서 외부로 향하여 농도가 엷어지고 있으며 색소가 굴 표면부위까지 번지고 있음을 관찰할 수 있었다. 이 부분은 굴의 살(貝肉)부분이 황갈색 반점(斑點)으로 착색(着色)된 부위에 해당된다.

생굴의 내장색은 굴의살 부분을 통해서 보면 흑색으로 보이지만 절개(切開)하여 관찰하면 다갈색(茶褐色)

을 띄고 있다. 그러나 열변성(熱變性)된 것은 통조림 굴 단면에서 관찰된것과 같이 중심부는 암녹색(暗綠色)이며 그 주변에는 황갈색을 띄고 있음을 볼수 있었다. 이사실로 미루어서 원래 생굴에서는 다갈색이였던 내장색소가 열에 의해서 변성되면서 대부분은 청록색으로 변하고 일부분은 황갈색 색소로 변화하였던가 또는 일단 열변성된 청록색 색소중의 일부가 황색으로 변화되는 것이 아닌가 추측된다.

절단(切斷)한 통조림 굴표면에 아세톤을 떨어뜨려보면 굴의 살 부분에 확산침투되어 있는 것으로 보이는 황갈색 색소가 재빨리 용출되어 굴의 살 부분은 탈색이되고 아세톤 용액은 황갈색을 띄움을 관찰할 수 있었다. 이러한 점으로 미루어 보아 굴의 살부분의 황갈색으로 변화되는 형상(形狀)은 앞서 열변성에 따르는 단면의 색상변화 관찰의 결과와 함께 내장부위의 색소가 용출(溶出)확산된 결과라고 볼수 있다. 그리고 굴의살을 물들이고 있는 황갈색 색소는 함수(含水) 아세톤(굴중의 물에 의하여 희석되고 있음)에 잘녹는 색소임을 알 수 있었다. 또한 이 색소는 헥산(*n*-hexane)벤젠등에도 용해되는 지용성(脂溶性)색소이며 함수 아세톤, 에탄올, 메탄올 등에 잘녹는 사실로 보아 극성(極性)이 비교적 큰 색소임을 추측할 수 있다.

2. 아세톤추출액의 크로마토그람(chromatogram)

굴 내장(消化盲囊) 및 살 부분으로부터 함수(含水)아세톤에 추출된 암황갈색(暗黃褐色) 농축액(濃縮液)을 각각 실리카겔 크로마토그라피에 의해서 얻은 크로마토그람은 그림 1 a, b와 같다.

시료도포(試料塗布)에 앞서 헥산(*n*-hexane)과 아세톤(100 : 4 v/v) 혼합용매로 전개시켜 세척시킨 실리카겔판을 사용하면 사전에 용매로 세척처리를 하지않은 실리카겔 TLC에 비해 분리상태가 보다 양호함을 알수 있었다.

위의 그림에서 보는바와 같이 황변패육(黃變貝肉)을 추출하여 얻은 분리 색소의 크로마토그람은 청록색 소화맹랑(消化盲囊)에서 얻은 색소의 그것과 아주 유사(類似)하였으며 단지 각 색소대(色素帶)의 상대적인 농도에만 차이(差異)를 관찰할 수 있었다.

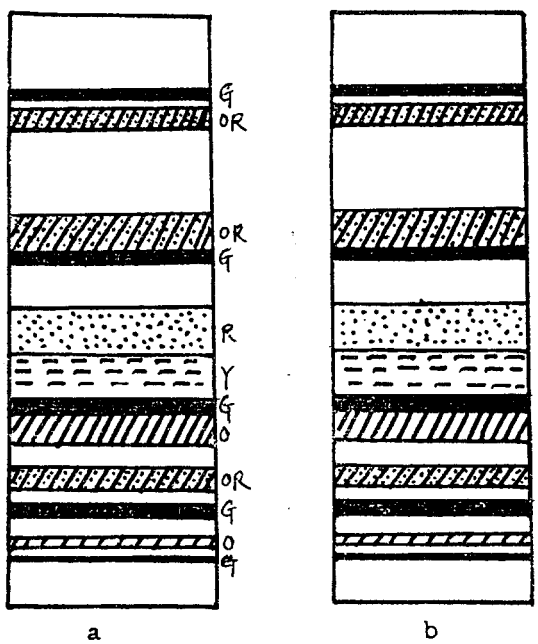

Fig. 1. Thin layer chromatograms of pigments extracted with aqueous acetone from canned boiled oyster:
(a), muscle; (b), viscera.
Adsorbent : Silica gel G
Solvent : Methylene chloride: ethyl acetate=80 : 20

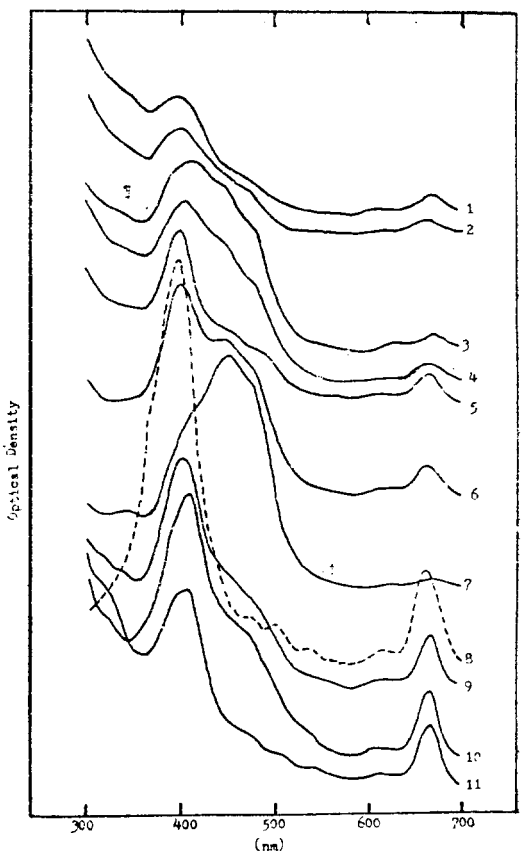

Fig. 2. Absorption spectra of each pigment isolated from canned boiled oyster viscera. Optical density is not to scale. The spectral numbers (1-11) are in order of increasing Rf values.

Table 1. Electronic absorption spectral characteristics of pigments isolated from canned boiled oyster viscera

No. of bands in order of increasing Rf value	Color	Absorption maxima in ethanol (in nm)
1	Orange	400, 665
2	Green	400, 665
3	Orange-red	417, 445, 665
4	Orange	402, 665
5	Green	400, 665
6	Yellow	402, 445, 470, 665
7	Red	450
8	Green	400, 470, 500, 530, 610, 665
9	Orange-red	403, 445, 665
10	Orange-red	400, 445, 667
11	Green	410, 540, 610, 667

분리된 색소의 수는 원점(原點)에 남아있는것 이외에 11종류였다. 그중 4종은 녹색 내지 청색 물질이며 남어지의 것은 황색, 등색 또는 적색을 나타내었다.

3. 단리(單離)된 각색소의 흡수 스펙트럼

크로마토그람상에서 4개의 녹색 색소와 5개의 등색, 1개씩의 황색과 엷은적색 색소로 분리된 각 색소를 에탄올 용액에서 흡수스펙트럼을 측정한 결과는 그림 2와 표 1에서 보는 바와 같다.

밴드 7을 제외하고는 모두 400 nm 근방에 큰 흡수극대(吸收極大)와 665nm 내지 667 nm에 작은 흡수극대를 보여주고 있다. 665 nm 근방의 장파장부(長波長部)의 흡수와 더부터 400 nm 또는 410 nm의 큰 흡수극대는 18개의 컨주게이트(conjugate)된 π-전자를 갖고있는 18 annulene인 tetrapyrrol를 함유(含有)하는 porphyrin화합물의 특징을 나타내는 스펙트럼[10,11]으로써 400 nm내지 410 nm의 흡수는 소위 Soret band임을 알수 있다.

따라서 밴드 7의 색소를 제외한 모든 황색, 등색 및 청록색 색소들은 주로 porphyrin 유도체가 아닌가 추정된다. 이중에서 밴드 8은 400 nm의 Soret band 이외에 498, 533, 612 및 667 nm의 흡수대를 갖는 pheophytin a[12,13] 내지 이것과 구조가 유사한 porphyrin 화합물로 추측된다.

4. 각색소의 발색반응(color reaction)

등색(橙色)의 밴드7 색소는 450 nm에 흡수극대를 갖는 비 porphyrin 화합물로써 $SbCl_3$의 크로로포름 포화용액에 의해 적갈색(赤褐色)을 띄었다가 서서히 가열함에 따라 청자색(靑紫色)을 나타낸다. 그리고 이것을 메탄올 용액에서 $NaBH_4$로 환원시키면 황색으로 변색하며 2,4-dinitrophenyl hydrazine에 의하여 색이 진해짐을 관찰할 수 있었다. 이러한 성질로 미루어 보아 밴드 7은 카르보닐 원자단을 갖고있는 carotenoid 색소로 추정되며 *n*-bromosuccinimide를 작용시켜도 색상 변화가 없는 것으로 보아 β-ionone 고리를 갖인 구조가 아닌화합물로 생각된다.[14]

한편 밴드 9는 $NaBH_4$에 의하여 환원되어 황색으로 변하며 2,4-dinitrophenyl hydrazine에 양성(陽性)임에 비추어 역시 카르보닐 원자단을 갖는 화합물로 추측된다. 또한 $SbCl_3$ 시약에 의하여 황등색에서 녹색으로 변하는 사실로 보아 conjugated polyene chain을 갖고 있음을 짐작할수 있다. 그러나 스펙트럼의 모양을 고려하면 아마도 밴드 9는 carotenoid가 혼재(混在)된 porphyrin 유도체로 판단된다. 밴드 3, 4 및 6의 색소도 carotenoid가 혼재된 porphyrin 유도체로 추정된다.

요 약

저장중에 변색(變色)된 굴통조림의 황변패육부위(黃變貝肉部位, 生殖巢) 및 청록색 내장(주로 消化有囊)을 각각 함수(含水) 아세톤으로 추출하여 얻은 색소 물질을 실리카겔 크로마토그라피로 분리하였다.

함수 아세톤으로 추출한 색소 추출액으로 부터 11종의 황색(1종), 적색(1종), 등색 또는 적등색(赤燈色)(5종) 및 녹청(綠靑)(4종) 색소를 분리하고 각각의 가시부 흡수 스펙트럼을 얻었다.

전자 흡수 스펙트럼 및 몇가지 발색반응(發色反應)에 의하여 함수 아세톤에 의해 추출되는 황갈색(黃褐色) 색소액의 성분을 검토한 결과는 다음과 같다. 즉 청록색색소에 있어서는 물론 대부분의 황등색 색소들도 클로로필(chlorophyll)의 분해로 유래되었다고 생각되는 포르피린(porphyrin) 유도체이며 일부의 황등색 색소는 carbonyl 원자단을 갖인 캐로틴오이드(carotenoid)로 추정되었다. 특히 피오피틴(pheophytin) a 내지 그 유연체(類緣體)라고 생각되는 밴드 8의 색소와 캐로틴오이드라 추정되는 밴드 7의 색소가 함량이 높은 주요 색소들이다.

황변패육(黃變貝肉)의 추출물의 크로마토그람이 내장의 추출액의 그것과 정성적으로 유사한 점으로 미루어 보아 패육(貝肉)의 황변물질(黃變物質)은 내장 색소에서 유래되며 이 황갈 변색을 이르키는 phorphyrin 유도체 및 carotenoid들은 함수 아세톤에 잘 용해되는 성질의 것임을 알수 있었다.

참 고 문 헌

1) 어업 생산량 통계 : 1973 4/4분기(수산청) (1974).

2) 수산검사자료 : 9~12(중앙수산검사소) (1973~74).

3) 井山滿雄・山崎潤・砂川滿男・前梶健治・今井寬 : 罐詰時報, **44**, (2) 53 (1965).

4) a. 山崎潤・井山滿雄・砂川滿男・今井寬 : 罐詰時報, **44**, (3) 39 (1965).

b. 山崎潤・井山滿雄・砂川滿男・今井寬 : 罐詰時報, **44**, (3) 44 (1965).

5) 木村知博 : 日本水產學會誌, **35**, (1) 67 (1969).

6) 長田博志・大塚滋・志賀岩雄 : 日本食品工業學會誌, **16**, 197 (1969).

7) a. 長田博志・大塚滋 : 日本食品工業學會誌, **17**, (6) 237 (1970).

b. 長田博志 : 日本食品工業學會誌, **17**, (7) 286 (1970).

c. 長田博志 : 日本食品工業學會誌, **17**, (7) 292 (1970).

d. 長田博志 : 日本食品工業學會誌, **17**, (12) 565 (1970).

8) 長田博志 : 日本食品工業學會誌, **19**, (7), 304 (1972).

9) 藤井實・藤村清二・罐詰時報, **44**, (2) 50 (1965).

10) Gonterman M.: *J. Chem. Phys.*, **30**, 1139 (1959).

11) Gonterman, M.: *J. Mol. Spect.*, **6**, 138 (1961).

12) Holt, A.S. and Morley, H.V.: *Can. J. Chem.*, **37**, 507 (1959).

13) Kang-Ho Lee: *Bull. Korean Fish. Soc.*, 2 (2) 105 (1969).

14) Petracek, F.J. and Zechmeister, L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1427 (1956).