

일부 아미노산이 Linoleic acid의 산화반응에 미치는 영향

李 準 鎬 · 李 恩 熙

忠南大學校 理科學部 家政教育科
(1983년 10월 21일 수리)

Effect of Amino acids on the Oxidation of Linoleic acid

Joon Ho Lee and Eun Hee Lee

Dept. of Home Economic Education, College of Sci., Chungnam National University
(Received October 21, 1983)

Abstract

A study on the oxidation effect of some amino acids (glutamic acid, phenylalanine, alanine) addition to the linoleic acid emulsion was conducted.

Amino acid solutions in concentrations of 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} M were mixed with equal volume of linoleic acid emulsions. The prepared samples were incubated at $60 \pm 1^\circ\text{C}$ and the extent of diene conjugation and TBA values were measured by using the UV visible spectrophotometer.

The results were as follows:

- 1) From the extent of diene conjugation, we found that the addition of phenylalanine and alanine prolonged the induction period and the addition of glutamic acid shortened. There was an optimum concentration for each amino acid to act as an antioxidant during the induction period. The optimum concentration of alanine was 10^{-3} M and that of phenylalanine was 10^{-2} M.
- 2) The results of TBA values showed that three amino acids possessed antioxidant activity after the induction period. There was also an optimum concentration to act as antioxidant after the induction period. The optimum concentrations of glutamic acid, phenylalanine, and alanine were 10^{-2} , 10^{-3} , and 10^{-3} M, respectively.

I. 序 論

최근 합성抗酸化劑의 유독성에 대한 많은 論議가 이루어지고 있으며 이에 천연抗酸化劑에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.

α -tocopherol, citric acid, ascorbic acid 같은 물질은 이미 자연계에 存在하는 천연抗酸化劑로 널리 알려져 있으며, 이밖에도 단백질, 단백질의 가수분해산물, 단백질의 유도물질에도 抗酸化 효과가 있는 것으로 나타나 있다.¹⁻⁵⁾

1966년 Karel et al.⁶⁾은 amino 화합물에 抗酸化 효과가 있으며 酸化기간중 induction period(유도기간)와 산화의 초기단계에 영향을 미친다고 보고하였으며 Koch et al.⁷⁾은 linoleic acid와 염기성 아미노산으로 이루어진 amine salts에 抗酸化 효과가 있다고 보고하였다.

그밖에 Taylor와 Richardson^{8,9)}, Takizawa et al.¹⁰⁾, Rhee, Ziprin과 Rhee¹¹⁾와 Gupta, Sukhija와 Bhatia¹¹⁾등도 아미노산에 抗酸化 효과가 있다고 보고하였다.

그러나 1978년 Farag et al.^{12,13)}은 oil-in-water emulsions와 oil 内, 그리고 freeze-dried system 内에서 아미노산이 酸化에 미치는 영향을 관찰한 결과 freeze-dried system 内에서는 아미노산이 抗酸化劑로 作用하지만 oil-in-water emulsions와 oil 内에서는 오히려 산화촉진제로 作用한다고 보고하였으며, 1980년 Riisom 등도 freeze-dried emulsions에서는 抗酸化 効果가 있지만 liquid emulsions에서는 抗酸化 効果가 거의 없다고 하였다.

Linoleic acid의 산화정도를 측정하는 方法에는 산소흡수율의 측정, 요드價, peroxide value등이 있는데 Karel et al.⁹⁾, Privette와 Blank¹⁵⁾ 그리고 Lundberg와 Chipault¹⁶⁾등은 linoleic acid가 산화될 때 나타나는 diene conjugation의 정도를 UV absorption에 의해 측정하였다. 이들은 233nm에서 linoleic acid의 산화가 진행됨에 따라 UV absorption이 계속 증가하다가 plateau(평평한 상태)가 형성되는데 plateau가 끝날 때 까지를 induction period(유도기간)로 정하였다.

本實驗에서는 linoleic acid의 liquid-emulsion 상태에서 일부 아미노산(glutamic acid, phenylalanine 및 alanine)의 抗酸化 效果를 측정하였다.

Linoleic acid의 diene conjugation의 정도와 TBA value를 spectrophotometer로 측정하여 抗酸化 效果의 存在 여부를 확인하고 抗酸化 效果가 존재하는 경우 酸化 단계중 induction period(유도기간)에 영향을 미치는지 혹은 그 이후의 단계에 영향을 미치는지를 살펴 보고자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 시료의 준비

A. Linoleic acid emulsions의 調製

Linoleic acid emulsion의 調製는 Farag et al.¹³⁾의 方法에 의해 調製하였다.

Linoleic acid 0.706g과 Tween 20(polyoxyethylene sorbitan monolaurate) 0.5ml을 250ml volumetric flask에 넣은 後 소량의 증류수를 첨가하여 수분간 흔들어 emulsion을 만들었다. 이 emulsion에 증류수를 첨가하여 250ml로 희석하였다.

B. 아미노산 용액의 調製

각 아미노산(glutamic acid, phenylalanine, alanine)을 증류수에 녹여 $10^{-2}M$, $10^{-3}M$, $10^{-4}M$ 의 농

도로 만들었다.

C. 시료의 調製

Linoleic acid emulsion 溶液과 同量의 아미노산 溶液을 섞어 1분간 흔든 다음 각 농도와 시간別로 2개의 시험관에 5ml씩 넣고 $60 \pm 1^{\circ}C$ 로 incubator(국제 과학, DO)에 방치하였다. Control group의 경우에는 linoleic acid emulsion 溶液과 同量의 증류수를 넣어 제조하였으며 그 외의 처리는 다른 group과 동일하게 하였다.

Sample중 하나는 測定 시간別로 꺼내어 diene conjugation의 정도를 측정하는데 使用하였고 다른 하나는 3日後에 꺼내어 TBA값을 측정하는데 使用하였다.

2. 항산화 효과의 측정

A. UV 흡광도에 의한 diene conjugation 정도 측정

Privett와 Blank¹⁵⁾의 方法에 의해 linoleic acid의 diene conjugation 정도를 측정하였다.

Incubator에서 시간別로 꺼낸 sample을 UV spectrophotometer(Varian techtron 634)에 의해 scanning 해 본 결과 diene conjugation의 최대 peak가 233nm에서 나타났으므로 233nm에서 흡광도를 測定 하고 시간이 지남에 따라 흡광도가 계속 증가하다가 plateau(평평한 상태)를 형성한 후 급격히 증가하는데 plateau가 끝나는 시간까지를 유도기간으로 정하였다.

B. TBA value 測定

TBA값은 Jacobson et al.¹⁷⁾의 方法을 수정하여 測定하였다.

3일간 $60 \pm 1^{\circ}C$ 에서 incubation 시킨 시료 1ml와 50% ethanol용액(absolute ethanol 10ml과 iso-octane 10ml을 섞어 조제하였다.) 2ml를 30ml용 분액 깔대기에 첨가한 다음 iso-octane 5ml와 TBA용액(thiobarbituric acid 0.33g에 증류수 10ml과 isopropanol 90ml을 넣어 $50^{\circ}C$ steam bath위에서 녹여 調製하였다.) 3ml을 넣고 1분간 흔든 다음 층이 분리될 때까지 방치하였다.

분리된 수용액층을 시험관에 옮겨 담은 後 $60 \pm 1^{\circ}C$ water bath에서 30분간 방치하여 발색시킨 後 꺼내어 냉각시켰다.

발색된 용액은 UV spectrophotometer(Varian

techron 634)에 의해 scanning해 본 결과 최대 흡수 파장이 533nm였으므로 533nm에서 흡광도를測定하였다.

II. 結果 및 考察

1. Diene conjugation 정도의 測定

Privett와 Blank¹⁵⁾는 linoleic acid의 산화가 진행됨에 따라 233nm에서 UV absorption이 계속 증가

하다가 plateau(평평한 상태)를 형성한 後 흡광도가 갑자기 증가하는데 이때 plateau가 끝날 때까지를 유도기간으로 정하였으므로 이 방법에 의해 각시료의 induction period(유도기간)를 결정하고 이에 따라 抗酸化 효과를 비교하였다.

아미노산의 종류와 濃도에 따른 linoleic acid emulsion의 UV absorption을 233nm에서 測定한 결과는 Fig. 1, 2, 3과 같다.

Fig. 1, 2, 3을 살펴 보면 linoleic acid의 diene conjugation의 정도가 아미노산의 종류와 濃도에 따

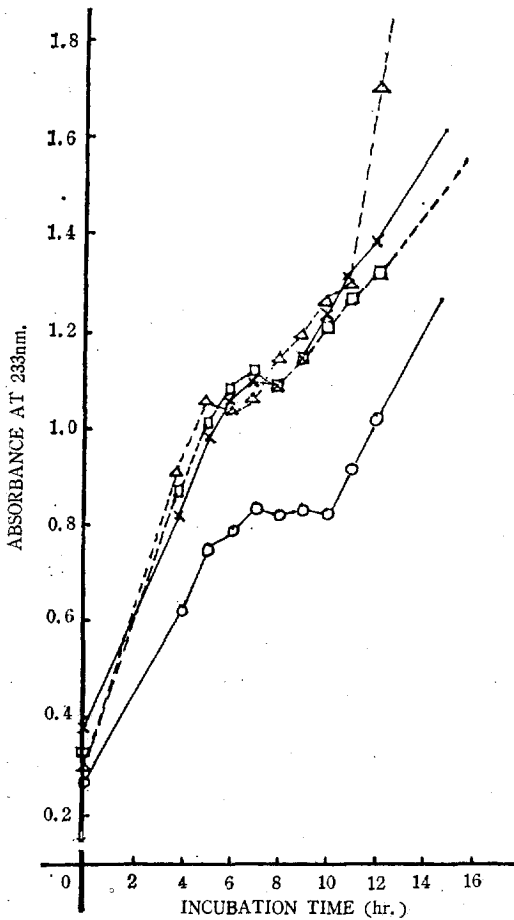


Fig. 1. UV absorptivity of glutamic acid at various concentration during the incubation(incubation temperature $60 \pm 1^\circ\text{C}$).

- : Control group(emulsion of linoleic acid)
- △-△: Emulsion of linoleic acid + 10^{-2}M glutamic acid
- : " " + 10^{-3}M "
- ×-×: " " + 10^{-4}M "

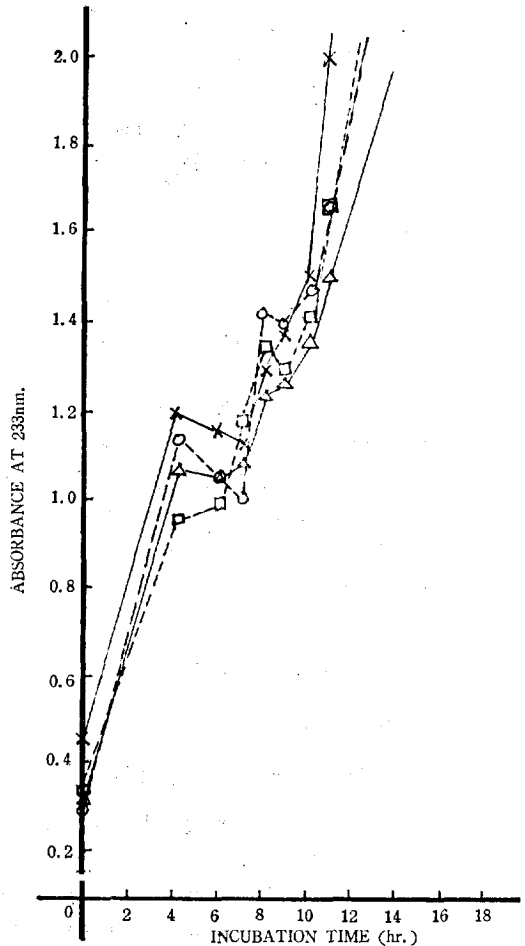


Fig. 2. UV absorptivity of phenylalanine at various concentration during the incubation(incubation temperature: $60 \pm 1^\circ\text{C}$).

- : Control group(emulsion of linoleic acid)
- : Emulsion of linoleic acid + 10^{-2}M phenylalanine
- △-△: " " + 10^{-3}M "
- ×-×: " " + 10^{-4}M "

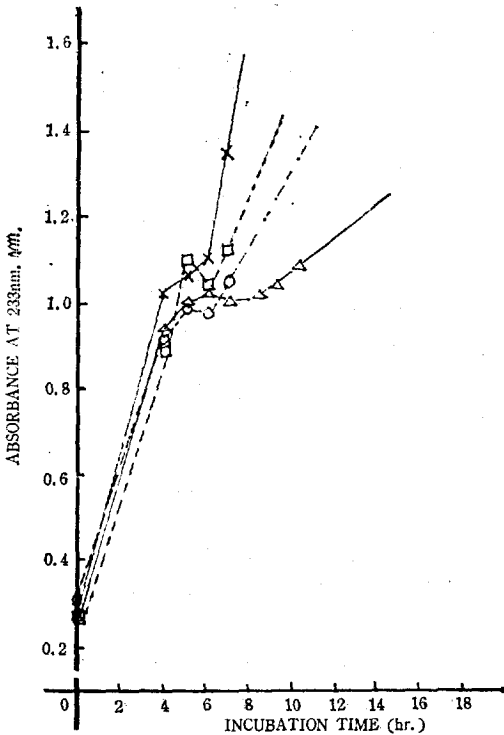


Fig. 3. UV absorptivity of alanine at various concentration during the incubation (incubation temperature: $60 \pm 1^\circ\text{C}$).

- : Control group (emulsion of linoleic acid)
- : Emulsion of linoleic acid 10^{-2}M alanine
- △--△: " " $+10^{-3}\text{M}$ "
- ×--×: " " $+10^{-4}\text{M}$ "

라 서로 다르며 흡수곡선은 일정기간 증가하다가 약간 감소 또는 plateau(평명한 상태)를 형성한 후 급격히 증가함을 알 수 있다.

Glutamic acid의 경우 phenylalanine이나 alanine과는 달리 UV absorptivity를 보면 control group이 glutamic acid를 첨가한 경우보다 훨씬 낮았는데 이는 glutamic acid의 첨가가 linoleic acid의 산화를 촉진시킨 것으로 생각된다.

UV absorption에 의해 induction period(유도 기간)를 결정한 값이 Table 1에 나타나 있다.

Glutamic acid의 경우 control group의 induction period가 10시간으로 제일 길며 10^{-2}M 의 glutamic acid 농도에서는 7시간, 10^{-3}M 에서는 8시간, 10^{-4}M 에서는 8시간으로 glutamic acid의 첨가에 의해 induction period가 단축되었다.

이러한 사실은 glutamic acid가 이 기간중에 prooxidant로 작용했음을 나타내고 있다.

Table 1. Induction period of control and linoleic acid emulsions containing the equal volume of amino acid solutions at various concentration (Incubation temp.: $60 \pm 1^\circ\text{C}$)

Amino acids	Induction period (hr.)				Relative induction period (t_c/t_s)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Glutamic acid	10	7	8	8	1	1.43	1.25	1.25
Phenylalanine	7	9	7	7	1	0.78	1	1
Alanine	6	6	8	6	1	1	0.75	1

t_c : Induction period of control

t_s : Induction period of sample

1: control group,

2: 10^{-2}M amino acid solution,

3: 10^{-3}M amino acid solution,

4: 10^{-4}M amino acid solution

그러나 phenylalanine과 alanine의 경우 phenylalanine은 10^{-2}M 의 농도로 첨가한 시료의 induction period가 9시간으로 제일 길고 control group과 10^{-3}M , 10^{-4}M 로 첨가한 시료의 induction period는 모두 7시간이었다. 그리고 alanine을 첨가한 경우에는 10^{-3}M 의 농도로 첨가한 시료가 8시간으로 제일 길고 그 밖의 시료는 6시간으로 나타났다.

이러한 사실은 이들 두 아미노산의 첨가가 linoleic acid emulsion의 induction period를 지연시킴으로써 抗酸化作用을 했음을 나타내고 있다.

Relative induction period의 값을 비교해 보면 alanine의 경우 10^{-3}M 에서 0.75이고 phenylalanine의 경우 10^{-2}M 에서 0.78로써 alanine의 값이 phenylalanine보다 약간 적게 나타났다.

이것은 alanine이 phenylalanine보다 抗酸化效果가 크다는 것을 나타내지만 그 차이가 적으므로 항산화효과에 미치는 영향의 차이는 극히 미비하다고 하겠다.

1966년 Karel et al.¹⁰⁾은 alanine은 抗酸化效果가 있으며 relative induction period의 값이 0.77정도 라고 보고한 반면 phenylalanine에서는 抗酸化效果를 발견하지 못했다고 보고하였다.

그러나 1977년 Gupta et al.¹¹⁾은 freeze-dried system에서 phenylalanine, alanine 모두에 抗酸化效果가 있다고 보고하였다.

2. TBA value 測定

TBA value를 測定한 結果는 Table 2에 표시된 바와 같다.

Table 2. TBA value of linoleic acid emulsion with or without amino acids in concentration of $10^{-2}M$, $10^{-3}M$ and $10^{-4}M$ (Samples were incubated at $60 \pm 1^\circ C$ for 3 days)

Sample	Amino acid Glutamic acid	Alanine	Phenylalanine
Control	0.76	0.82	0.40
$10^{-2}M$	0.37	0.58	0.28
$10^{-3}M$	0.59	0.28	0.24
$10^{-4}M$	0.48	0.77	0.25

TBA값을 보면 전반적으로 control group이 각 아미노산을 첨가한 경우보다 높은 값을 나타내었으며 glutamic acid의 경우에는 $10^{-2}M$ 농도에서 phenylalanine의 경우에는 $10^{-3}M$ 농도에서, 그리고 alanine의 경우에도 $10^{-3}M$ 농도에서 가장 낮은 값을 나타내었는데 이는 linoleic acid의 산화가 이들 아미노산의 첨가에 의해 지연됨을 나타내었다.

또한 각 아미노산이 抗酸化인 작용을 하는데에는 최적 濃度가 존재한다는 것을 알 수 있다.

이러한 사실은 1961년 Marcuse¹⁹⁾가 보고한 내용과 一致하는 것으로 그는 각 아미노산은 抗酸化劑로 작용할 때 최적 濃度가 있으며 이보다 높은 농도에서는 오히려 prooxidant로 작용한다고 하였다.

Glutamic acid를 첨가했을 때 linoleic acid emulsion의 induction period는 연장시켜 주지 못하지만 TBA 값이 control group보다 낮은 것으로 보아 glutamic acid의 항산화작용은 일단 형성된 과산화물의 propagation을 저지시키는 것으로 사려된다.

Phenylalanine과 alanine의 항산화작용은 linoleic acid의 induction period를 연장시켜 주고 형성된 과산화물의 propagation을 저지함으로써 뚜렷한 항산화효과를 나타내고 있다.

Alanine의 경우 induction period의 측정에서나 TBA 값 측정에서 모두 $10^{-3}M$ 濃度에서 가장 큰 抗酸化작용을 나타내어 그 효과가 더욱 명확하였다.

그러나 장기간 저장食品인 경우에는 glutamic acid, phenylalanine, alanine 모두 효과적인 抗酸化작용을 할 수 있을 것으로 생각된다.

Farag et al.^{12,13)}은 아미노산이 freeze-dried system 내에서는 항산화효과가 있지만 oil-in-water emulsions와 oil-emulsions에서는 오히려 prooxidant로 작용한다고 보고하였으나 본 實驗에서는 oil-in-water emulsions에서 抗酸化효과가 있는 것으로 나타났으며 이러한 결과는 아미노산이 유화상태인 牛

脂에 항산화효과가 있다고 한 Gupta et al.¹¹⁾의 보고와 일치하고 있다.

이상의 結果를 綜合해 보면 glutamic acid의 경우에는 induction period는 연장시켜주지 못하지만 그 이후의 단계에서 항산화효과가 있으며 alanine과 phenylalanine은 induction period와 그 이후의 단계에서 모두 영향을 미쳐 効果인 抗酸化劑로 작용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

본 實驗에서는 glutamic acid, phenylalanine, alanine만 다루었으나 그 밖의 아미노산에 대해서도 抗酸化효과 존재 여부를 조사하고 그 항산화 mechanism을 규명하기 위해선 보다 많은 연구를 요하고 있다.

IV. 要 約

本 연구는 linoleic acid emulsion에 아미노산용액을 첨가했을 경우 이들 아미노산에 항산화효과가 존재하는지를 알아보고 만약 항산화효과가 있다면 산화기간 중 어느 단계에 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

Linoleic acid emulsion과 $10^{-2}M$, $10^{-3}M$, $10^{-4}M$ 의 glutamic acid, phenylalanine, alanine용액을 부피비로 同量 섞어 시료를 준비하였으며 아미노산용액 대신 증류수를 넣은 control group과 함께 $60 \pm 1^\circ C$ 에서 incubation 시켰다.

Incubation 시킨 sample은 UV visible spectrophotometer에 의해 흡광도를 측정하여 diene conjugation의 정도와 TBA 값을 정하였으며 이 값으로 induction period와 그후의 산화정도를 알아보았다. 그 결과는 다음과 같다.

1) Diene conjugation의 測定結果 glutamic acid의 첨가는 induction period를 감소시켜 prooxidant로 작용하며 alanine과 phenylalanine은 induction period를 연장시켜 주므로 항산화효과가 있다고 할 수 있다.

2) Induction period 중 아미노산이 항산화적인 작용을 하는데에는 최적 濃度가 필요하며 alanine과 phenylalanine의 최적 濃度는 각각 $10^{-3}M$ 과 $10^{-2}M$ 이었다.

3) Induction period 측정 이후에 TBA값의 測定 결과 glutamic acid, alanine, phenylalanine을 첨가한 group이 control group에 비해 그 값이 낮으므로 induction period 이후의 단계에서 抗酸化효과가 있음을 알 수 있다.

이때 抗酸化인 作用을 하는 최적 濃度가 glutamic acid의 경우 $10^{-2}M$ 이었으며 alanine과 phenylalanine의 경우에는 각각 $10^{-3}M$ 이었다.

參 考 文 獻

1. Rhee, K.S., Ziprin, Y.A. and Rhee, K.C. : *J. of Food Sci.*, **44**, 1132(1979).
2. Bishove, S.J. and Henick, A.S. : *J. of Food Sci.*, **37**, 873(1972).
3. Hayes, R.E., Bookwalter, G.N. and Bagley, E.B. : *J. of Food Sci.*, **42**(6), 1527(1977).
4. Kawashima, K., Itoh, H. and Chibata, I. : *Agric. Biol. Chem.*, **43**(4), 827(1979).
5. Bishove, S.J. and Henick, A.S. : *J. of Food Sci.*, **40**, 345(1975).
6. Karel, M., Tannenbaum, S.R. and Wallace, D.H. : *J. of Food Sci.*, **31**, 892(1966).
7. Koch, S.D., Hyatt, A.A. and Lopiekes, D. V. : *J. of Food Sci.*, **36**, 477(1971).
8. Taylor, M.J. and Richardson, T. : *J. of Am. Oil Chem. Soc.*, **58**(5), 622(1981).
9. Taylor, M.J. and Richardson, T. : *J. of Food Sci.*, **45**, 1223(1980).
10. Takizawa, Y., Ootani, A., Makabe, Y. and Mitsuhashi, T. : *J. of Japan Oil Chem. Soc.*, **29**(3), 59(1980).
11. Gupta, S., Sukhiju, P.S. and Bhatia, I.S. : *J. Dairy Sci.*, **30**(4), 319(1977).
12. Farag, R.S., Osman, S.A., Hallabo, S.A. S., Grigis, A.N. and Nasr, A.A. : *J. of Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 708(1978).
13. Farag, R.S., Osman, S.A., Hallabo, S.A. S. and Nasr, A.A. : *J. of Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 703(1978).
14. Riisom, T., Sims, R.J. and Fioriti, J.A. : *J. of Am. Oil Chem. Soc.*, **57**(10), 354(1980).
15. Privett, O.S. and Blank, M.L. : *J. of Am. Oil Chem. Soc.*, **39**, 465(1962).
16. Lundberg, W.O. and Chipault, J.R. : *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 833(1947).
17. Foriti, A., Kanuk, M.J. and Sims, R.J. : *J. of Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 219(1974).
18. Marcuse, R. : *Fette Sci fen Anstrichmittel.*, **63**, 940(1961).