

모델계에서 지방산 산화에 의한 효소 활성 감소

최갑성·김재욱*·문태화**

순천대학교 식품공학과, *서울대학교 식품공학과, **한림대학교 식품영양학과

초록: 자동 산화된 지방질이 효소 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각기 다른 수분활성도하에서 산화시킨 모델 시료에 대하여 산화 정도를 측정하고 분리된 단백질의 용해도 및 효소 활성도를 분석한 결과 산화가 진행되면서 과산화물가와 thiobarbituric acid(TBA)가는 증가한 반면 단백질의 용해도는 감소되고 효소 활성은 수분활성도가 높을수록 크게 감소되었다 (1991년 2월 1일 접수, 1991년 3월 25일 수리).

대부분의 식품에 존재하는 지방질은 비교적 높은 습도하에서 쉽게 산화되어 과산화물을 생성하며 이것의 분해나 부산물로 생긴 aldehyde, alcohol, epoxide, ketone 및 acid 등은 식품의 다른 성분과 반응하여 발암을 비롯한 노화, 동맥경화등의 성인병에도 관여되고 있어 많은 연구자들의 관심이 되고 있다^{1,2)}.

Zirlin과 Karel³⁾은 methyl linoleate와 함께 냉동 건조한 젤라틴이 산화가 진행되면서 분자량이 감소됨을 보고한 바 있으며 Porkorny등⁴⁾은 어류 지방산과 근육 단백질로 이루어진 모델 시스템에서 비효소적 갈변 현상이 일어난다고 보고하였다.

본 실험에서는 지방질 산화 생성물이 효소 단백질에 미치는 영향을 알기 위하여 지방질로서 리놀레산과 단백질로서 pepsin과 β -amylase를 사용하여 냉동 건조 시료와 현탁 시료를 제조하고 비교적 온화한 조건에서 산화를 유도한 후 단백질을 분리하여 지방산 산화물과의 상호작용으로 나타난 결과를 분석하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 지방산은 리놀레산이었으며 단백질 시료로 사용한 효소는 Sigma사의 β -amylase(EC 3.2.1.2, 3 \times crystallized)와 pepsin(EC 3.4.23.1, 2 \times crystallized)이었다.

모델 시료의 제조

냉동 건조 시료는 linoleate 1ml를 50ml증류수에 sonication하여 현탁시키고 pepsin 및 β -amylase를 1g씩 칭량한 후 증류수에 녹여 리놀레산 현탁액과 혼합하고 -50°C 로 예비냉동 후 동결 건조하여 제조하였다. 용액 시료는 동일 농도의 상기 리놀레산 현탁액에 효소액을 첨가하여 제조하였다. 한편, 대조구를 위한 단백질 시료는 냉동 건조 시료의 경우 리놀레산만을 제외한 것으로 하였고 용액 시료의 경우에는 리놀레산 현탁액 대신 동일 부피의 증류수를 첨가한 것으로 하였으며 지방질 시료의 대조구는 상기 리놀레산 현탁액만으로 하였다.

모델 시료의 산화와 분석 시료의 준비

제조된 모델 시료중 냉동 건조 시료는 수분활성도 0.76이 유지되도록 데시케이터에 넣어 산소를 공급하면서 대조구와 함께 30°C 에서 10일간 산화시키고 경시적으로 시료를 채취하여 지방산과 단백질을 분리한 다음 분리된 지방질 분획과 단백질 분획을 분석 시료로 사용하였다. 용액 시료는 미리 제조한 반응조에서 냉동 건조 시료와 동일 온도를 유지하도록 하고 이하는 냉동 건조 시료의 방법과 동일하게 실시하였다. 한편, 수분활성도에 따른 효소 활성 변화를 조사할 경우에는 동결 건조한 시료를 Table 1에 제시한 포화 용액을 이용하여 수분활성도가 0.33~0.92로 유지되도록 데시케이터에 넣어 30°C 에서 10일간 산화시키면서 상술한 방법에 의거 지방질과 단백질을 분리하였다.

Table 1. Water activity of saturated salt solution used in freeze-dried model system at 30°C

Salt solution	Water activity(Aw)
Magnesium chloride(MgCl ₂ · 6H ₂ O)	0.33
Sodium dichromate(Na ₂ Cr ₂ O ₇ · 2H ₂ O)	0.54
Sodium chloride(NaCl)	0.76
Potassium nitrate(KNO ₃)	0.92

지방질 산화 정도의 측정

추출된 지방질의 과산화물가는 Asakawa와 Matsu-shita의 미량 비색법⁵⁾에 의해 측정하였으며 TBA가는 Tsoukalas와 Grosch의 방법⁶⁾에 따라 행하였다.

용해도의 측정

분리된 단백질의 용해도는 Lowry 변법⁷⁾에 의거 단백질을 정량하고 단백질의 상대 함량 퍼센트로 나타내었다.

효소 활성도의 측정

Pepsin의 활성도는 Herriott의 방법⁸⁾에 준하여 측정하였으며 β-amylase의 활성도는 Hyun과 Zeikus의 방법⁹⁾에 따라 측정하였다. 활성도의 단위는 pepsin의 경우 분당 흡광도 0.001 증가를 이루게 하는 효소의 양을, β-amylase 경우 1μmole의 maltose를 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였으며 효소활성은 ml당 unit 수로 표시하였다.

결과 및 고찰

과산화물가(POV) 및 TBA가의 변화

리놀레산의 산화 정도를 알기 위해서 각 효소로 구성된 두가지의 모델시스템에서 분리한 지방질의 과산화물가(POV)를 일정시간 간격으로 측정한 결과가 Fig. 1, 2와 같다.

즉, 냉동건조 시료와 용액 시료의 POV는 반응 초기에 급격히 상승하였고 3일에서 4일 사이에 최고치를 보여 pepsin으로 이루어진 냉동건조 시스템의 경우 반응 3일째에는 2,105neq./mg lipid, 용액상의 에멀전 시스템에서는 4일째에 2,230neq./mg lipid 값을 보였고 β-amylase의 경우에도 그와 비슷한 수치를 보여 용액 시료에서는 4일째에 2,090neq./mg lipid 값을 나타냈다.

냉동건조 시료가 용액 시료보다 과산화물이 약간

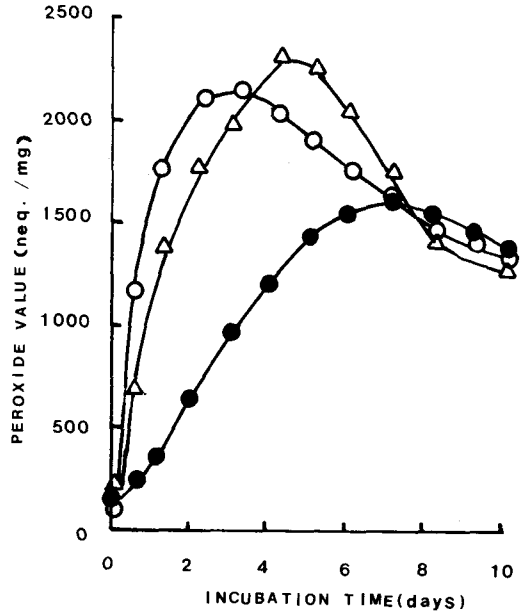


Fig. 1. Changes of peroxide value in model systems containing pepsin.

○ : Freeze-dried system, △ : Aqueous system, and ● : Control.

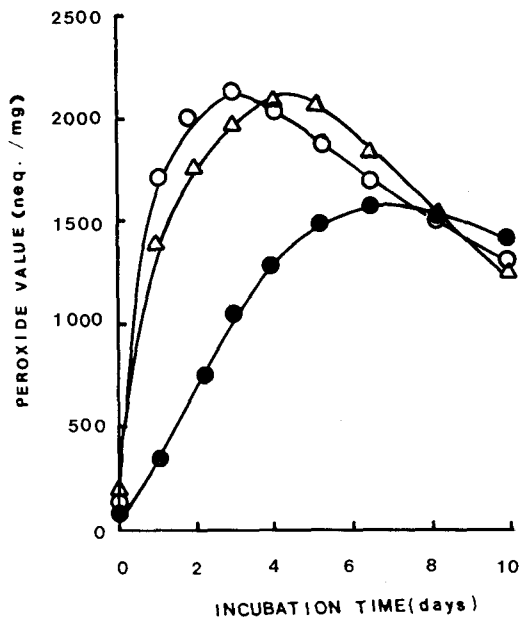


Fig. 2. Changes of peroxide value in model systems containing β-amylase.

○ : Freeze-dried system, △ : Aqueous system, and ● : Control.

씩 빠르게 측정되는 것은 냉동건조의 것이 산소와

접촉이 쉽게 일어나기 때문인 것으로 생각되었다. 한편, 리놀레산만을 산화시킨 대조구의 경우에는 다른 모델 시료의 것보다 산화 속도가 늦어지며 과산화물 축적량도 비교적 적어 7일째의 POV는 1,560neq./mg lipid이었다. Fischer와 Deng¹⁰⁾의 보고에 의하면 단백질은 지방 산화의 prooxidant로서 작용할 수 있다고 하였는데 리놀레산만의 현탁액이 단백질이 포함된 다른 시료구에서보다 POV가 낮았던 것은 상기 이유로 추측되며 계의 수분에 의한 영향도 있었을 것으로 사료된다.

일정 시간 간격으로 채취한 시료중 지방질을 분리하여 MDA를 TBA method로 측정된 결과는 Fig. 3 및 4와 같다. 즉, 시간이 경과됨에 따라 MDA 양은 증가되었으며 과산화물이 생성되어 최고치를 보인 후에는 더욱 빠른 속도로 증가되었다.

이러한 결과를 casein, egg albumin과 methyl linoleate를 사용하여 냉동건조 시스템으로 실험한 Matoba 등의 결과¹¹⁾와 비교해 보면 지방산 산화로 생성되는 MDA의 변화 경향은 비교적 유사하였으나 생성된 함량은 달랐다. 이것은 지방질의 추출 방법과 시료중

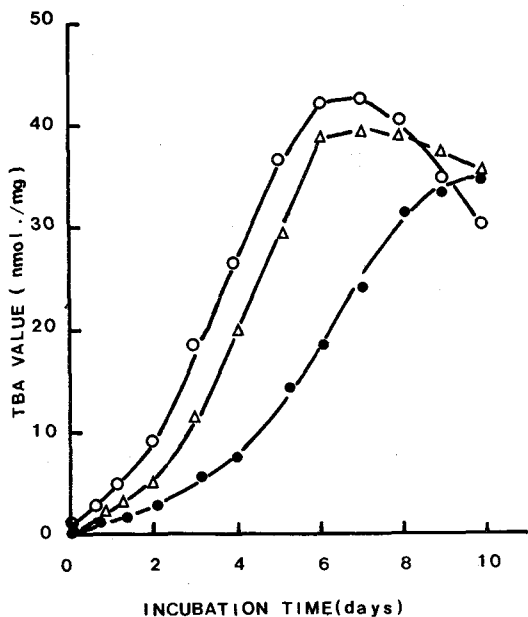


Fig. 3. Changes of TBA value in model systems containing pepsin.

○ : Freeze-dried system, △ : Aqueous system, and ● : Control.

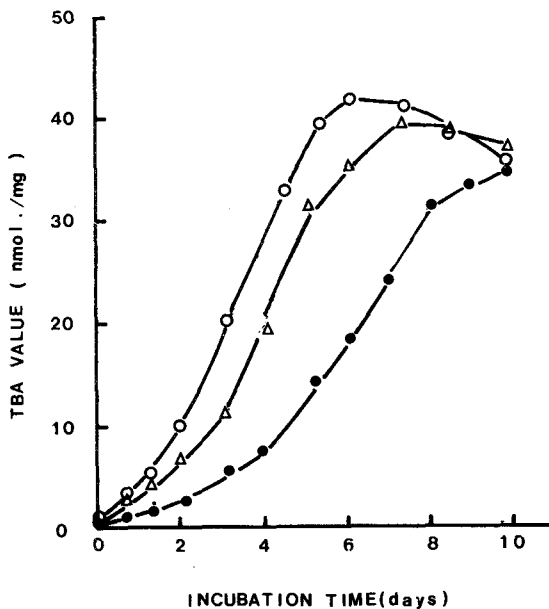


Fig. 4. Changes of TBA value in model systems containing β -amylase.

○ : Freeze-dried system, △ : Aqueous system, and ● : Control.

지방산의 양에서 뿐만 아니라 단백질 시료가 다른데에 그 원인이 있었을 것으로 생각되었다. 이상의 결과에서 모델계에 존재했던 수분과 단백질은 지방질의 산화속도에 크게 영향을 주는 요인이 확인되었다.

단백질 용해도의 변화

모델계에서 리놀레산 산화중 시료를 취하여 지방질을 제거하고 남은 단백질 희분의 용해도 변화를 조사한 결과는 Fig. 5 및 6과 같다. 즉, 전체적으로 볼 때 산화가 진행됨에 따라 용해도는 약간씩 감소되었다.

Pepsin의 경우(Fig. 5) 냉동건조 시료에 있어서는 10일 후 대조구의 것은 18% 감소되었고 지방산과 반응된 시료는 29%가 감소되었으며 용액 시료는 각각 43%, 50% 감소되어 시스템간의 대조구에 비교한 감소폭은 비슷하였으나 모델계의 모든 시료구는 대조구보다 단백질의 용해도가 낮았다. β -Amylase의 경우(Fig. 6)에도 pepsin의 결과와 비슷한 경향을 나타내었지만 대조구와의 용해도 감소 차이는 적게 나타

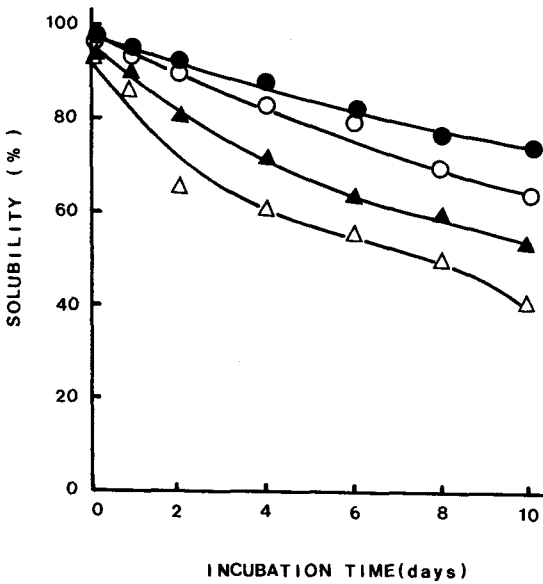


Fig. 5. Changes of solubility for pepsin in model systems.
○ : Freeze-dried system, △ : Aqueous system, and ● : Control.

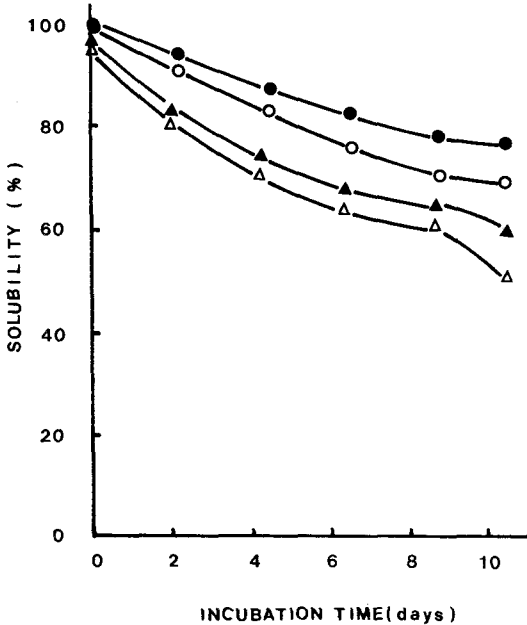


Fig. 6. Changes of solubility for β -amylase in model systems.
○ : Freeze-dried system, △ : Aqueous system, and ● : Control.

났다. 이러한 경향은 Funes^등의 methyl linoleate 산화 생성물에 의한 lysozyme 등의 단백질 불용화 실험 결과와 유사하였다.

효소 활성도의 변화

냉동건조 시료와 용액 시료중 존재하는 효소의 활성 변화를 알아보기 위하여 분리된 효소의 활성도를 경시적으로 측정 한 결과는 Fig. 7, 8과 같다.

즉, 시스템의 산화가 진행됨에 따라 효소의 활성은 크게 떨어졌다. 효소 활성은 모델 시스템에 투입되기 전의 활성을 기준한 잔여 활성도로서 나타냈는데 냉동건조 시료중 pepsin의 경우 10일 후 측정 한 활성을 대조구와 비교하면 대조구는 처음에 비해 7%가 감소된 반면 리놀레산과 같이 존재한 시료에서는 83%나 감소되어 대조구를 감하면 76%의 활성 감소를 나타낸 것이며 용액 시료는 대조구와 58%의 감소 차이를 보였다. β -Amylase 경우에는 10일 후 냉동건조 시료중 효소의 활성도가 대조구에 비해 58% 감소되었으며 용액 시료의 것은 56%의 활성 감소를 가져왔다.

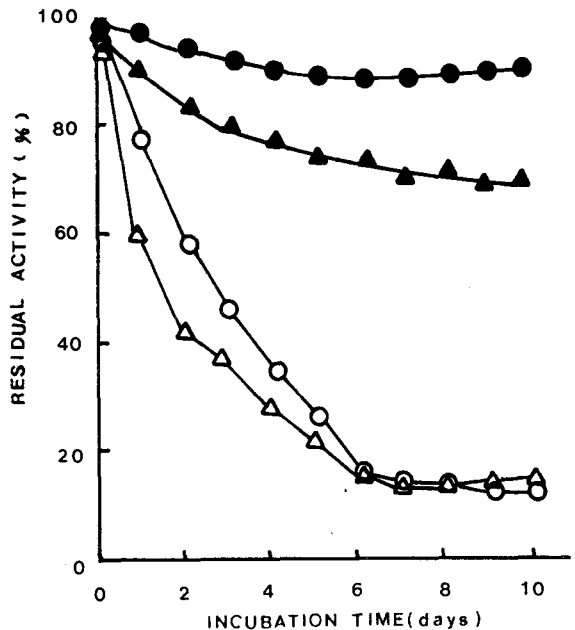


Fig. 7. Changes of pepsin activity in model systems.
○ : Freeze-dried system, △ : Aqueous system, and ● : Control.

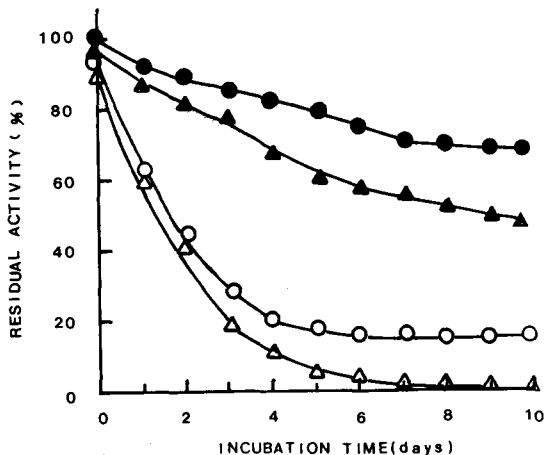


Fig. 8. Change of β -amylase activity in model systems.

○ : Freeze-dried system, Δ : Aqueous system, and ● : Control.

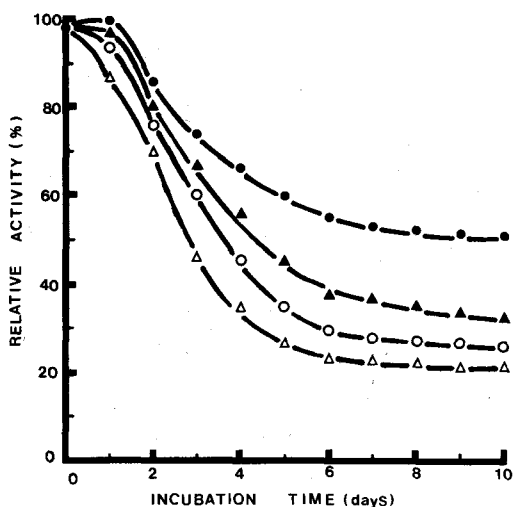


Fig. 9. Effect of water activity on pepsin activity after incubation with linoleate hydroperoxide in freeze-dried model system.

● : Aw 0.33, ▲ : Aw 0.54, ○ : Aw 0.76, and △ : Aw 0.92.

Linoleate의 산화 생성물에 의한 효소 활성의 감소는 몇몇 연구자들에 의해 보고된 바 있는데 Gamage 등¹³⁾은 지방산의 2차 산화생성물에 의해 trypsin등의 proteolytic enzyme이 활성 감소를 보였다고 하였으며 Chio와 Tappel¹⁴⁾은 RNase가, Funes 등^{12,15)}은 lysozyme이 지방산 산화 생성물에 의해 활성이 감소되었다고 하였다.

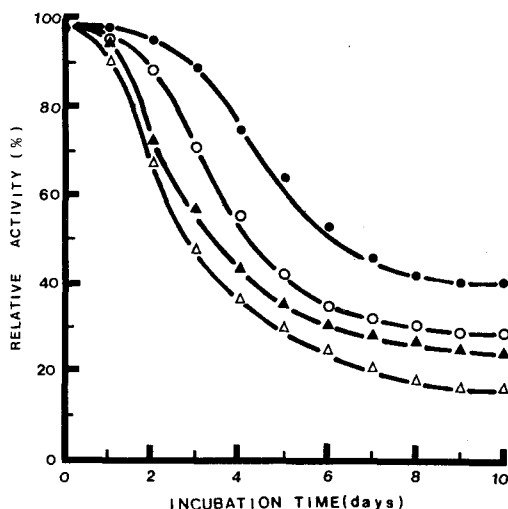


Fig. 10. Effect of water activity on β -amylase activity after incubation with linoleate hydroperoxide in freeze-dried model system.

● : Aw 0.33, ▲ : Aw 0.54, ○ : Aw 0.76, and △ : Aw 0.92.

계의수분 활성도가 효소 활성 감소에 미치는 영향 냉동건조 시스템에서의 수분활성도는 리놀레산 산화에 의한 효소 활성도의 감소에 상당한 영향을 미칠 것으로 생각되었으므로 수분활성도에 따른 효소 활성을 일정 시간 간격으로 측정하였는데 그 결과는 Fig. 9, 10과 같다.

즉, 대조구와의 차이로 표시된 효소의 상대활성도는 수분 활성도가 높은 시스템의 것일수록 크게 감소하였다. Pepsin의 경우 산화 10일째에는 수분활성도 0.92의 시료가 0.33의 시료의 것보다 상대 활성도가 35.5% 더 감소되었으며 β -amylase의 경우에는 23% 더 감소되었다. 동일한 효소로 실험한 결과는 아니지만 본 실험과 유사한 시스템을 사용한 Schaich와 Karel의 실험 결과에서는 비교적 수분활성도가 높았던 Aw 0.75인 시료의 경우 26일간 지방산 산화물과 함께 보존하였던 lysozyme의 활성이 76%의 감소하였다^{16,17)}. 그들은 수분활성도가 높을 때 지방질 라디칼이 단백질로의 내포빈도가 높아질 수 있다고 하였다.

사의

본 연구는 1990년도 문교부 학술 연구 조성비의 지원으로 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Karel, M. : "Autoxidation in food and biological systems", Plenum Press, New York, 191(1980)
2. Cheftel, J.C. : "Food proteins", AVI, Westport, 401 (1977)
3. Zirlin, A. and Karel, M. : J. Food Sci., 34 : 160 (1969)
4. Porkorny, J., El-Zeany B.A. and Janicek, G. : Food Sci. Technol., 1 : 217(1974)
5. Asakawa, T. and S. Matsushita, S. : Lipids, 15 : 965 (1987)
6. Tsoukalas, B. and Grosch, W. : J. Am. Oil Chem. Soc., 54 : 490(1977)
7. Cadman, E., Bostwick, J.R. and Eichberg, J. : Anal. Biochem., 131 : 499(1979)
8. Herriott, R.M. : Adv. Protein Chem., 3 : 169(1947)
9. Hyun, H.H. and J.G. Zeikus, : Appl. Environ. Microbiol., 49 : 1168~1173(1985)
10. Fischer, J. and Deng, J.C. : J. Food Sci., 41 : 610 (1977)
11. Matoba, T., Yishida, H. and Yonezawa, D. : Agric. Biol. Chem., 46(4) : 979(1982)
12. Funes, J., Yong, S. and Karel, M. : J. Agric. Food Chem., 28 : 794(1980)
13. Gamage, R.T., Mori, T. and Matsushita, S. : Agric. Biol. Chem., 35 : 33(1971)
14. Chio, K.S. and Tappel, A.L. : 8 : 2827(1969)
15. Funes, J., Weiss, U. and Karel, M. : J. Agric. Food Chem., 30 : 1204(1981)
16. Schaich, K.M. and Karel, M. : J. Food Sci., 40 : 456 (1975)
17. Schaich, K.M. and M. Karel : Lipids, 11 : 392 (1976)

Effect of peroxidized fatty acid on enzyme activity in model system

Kap-Seong Choi, Ze-Uook Kim* and Tae-Wha Moon**(Department of Food Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon, Korea, *Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea, **Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon, Korea)

Abstract : In order to investigate interactions of autoxidizing lipids with protein, enzyme and peroxidizing linoleate were reacted in freeze-dried and emulsion systems at various level of water activities. Peroxide value, TBA value of oxidized linoleate increased during incubation. Solubilities and the activities of enzymes decreased as water activity increased.