

베타카로틴과 알파-토코페롤의 산화안정성에 대한 리폭시게나아제의 영향

김혜경 · 최홍식

부산대학교 식품영양학과

Effect of Lipoxygenase on Oxidative Stability of β -Carotene and α -Tocopherol

Hae-Gyoung Kim and Hong-Sik Cheigh

Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University

Abstract

Starch solid system was used to investigate the effects of lipoxygenase, linoleic acid and water activity on the oxidation of β -carotene or α -tocopherol. β -Carotene or α -tocopherol was co-oxidized severely with linoleic acid by lipoxygenase, and these were reduced to 19% and 5% of initial concentration, respectively, after 2 days storage at a_w 0.72 in the system. The concentration of β -carotene and the destruction rates were linearly correlated. However, the β -carotene was very stable in the system without linoleic acid and lipoxygenase. The oxidation products of α -tocopherol were considered as α -tocopheryl quinone and α -tocopheryl dimer, and the level of α -tocopheryl quinone increased as the reaction time increased.

Key words: co-oxidation, β -carotene, α -tocopherol, lipoxygenase, water activity

서 론

지용성 비타민인 카로티노이드나 토코페롤은 동·식물 등의 생체계에서 지질과산화 과정으로 인해 현저하게 산화되어 이들의 영양적인 손실과 생리적 활성을 상실하게 된다고 알려져 있다^(1,2). 고형상에서 베타-카로틴의 산화양상은 지지체의 종류, 수분활성, 각종 항산화제와의 반응에 의해 달라진다는 여러 연구보고가 있었으며^(3,4), 알파-토코페롤 역시 지질과산화의 억제과정에서 자신은 산화되어 다른 생성물로 전환된다는 보고도 있지만 이에 대해서는 아직 불명확한 점이 많다고 하였다^(5,6,7). 특히, 리폭시게나아제에 의한 카로티노이드와 토코페롤의 산화, 분해현상은 공존하고 있는 리놀레산 등이 산화할 때 만들어지는 유리기에 의해 카로티노이드와 토코페롤이 co-oxidation을 일으키기 때문으로 알려져 있다⁽⁸⁾. 그러나 베타-카로틴과 알파-토코페롤의 co-oxidation에 대해서는 부분적인 연구가 되어 있지만 고형상에서 리폭시게나아제 촉매하에서 일어나는 co-oxidation 반응속도나 산화양상에 대해서는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 전분을 이용한 고형상의 모델에서 베타-카로틴과

알파-토코페롤의 산화안정성에 미치는 여러가지 인자들의 영향에 대해 알아보았으며 특히 리폭시게나아제 촉매하에서 일어나는 베타-카로틴과 알파-토코페롤의 산화양상과 산화생성물 등을 중점적으로 검토하였다.

재료 및 방법

시약

전분은 Sigma Chemical Co.(USA)의 Wheat Type III을, 리폭시게나아제는 같은 회사의 Soybean Type I을 사용하였다. 그리고 베타-카로틴과 알파-토코페롤도 같은 회사의 것을 각각 사용하였다. 또한 리놀레산 조성물은 linoleic acid mixture(지방산조성: linoleic acid 64.6%, oleic acid 27.4%, palmitic acid 5.0%, Fluka Co., Switzerland)를 사용하였다.

모델시스템의 조제

모델시스템은 Kanner⁽⁹⁾의 방법에 준하여 조제하였다. 지지체로 사용한 전분은 미리 75°C 진공건조기에서 수분을 완전히 제거한 뒤 포화염용액으로 수분활성도를 조정함($K_2CO_3 \cdot 2H_2O$; a_w 0.25, KCl; a_w 0.72) 데시케이터에서 3일 동안 방치한 후 실험에 이용하였다. 그리고 리놀레산과 베타-카로틴 혹은 알파-토코페롤을 핵산에 녹인 뒤 수분활성이 조정된 전분을 함께 회전진공증발기에서 30분 동안 혼합하였으며 이때 리폭시게나아제는

Corresponding author: Hong-Sik Cheigh, Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, 30 Jangjun-Tong, Keumjung-Ku, Pusan 609-735, Korea

리놀레산과 베타-카로틴이나 알파-토코페롤을 반응시키기 전에 전분과 30분 정도 미리 혼합하였다. 혼합 후 진공하에서 빠르게 농축한 뒤 균일한 가루를 얻기 위해 마쇄하여 일정량을 petri dish에 담아 포화염용액이 있는 데시케이터에 방치한 후 25°C에서 반응시켰다. 또한 반응에 사용한 베타-카로틴, 알파-토코페롤, 리놀레산 농도는 전분 1g당 각각 0.7~1.4 mg, 1.6 mg, 0.2g으로 하였다.

분석

반응 후 시료에 대한 20배량의 hexan으로 30분 동안 stirrer에서 추출한 다음 여과, 농축하였으며 농축된 시료는 성분 분석을 위해 적당한 농도로 다시 희석하였다. 베타-카로틴의 산화반응은 흡광도 450 nm에서 측정하였으며 알파-토코페롤과 이것의 산화생성물을 정량하기 위한 High Performance Liquid Chromatography(HPLC) 조건은 다음과 같다. 알파-토코페롤의 함량을 측정하기 위해 사용한 칼럼은 8 mm×10 cm i.d., μ -Porasil, 유량은 2 ml/min, 용매조건은 hexan : 디에틸 에테르=95 : 5였으며 검출은 파장 280 nm에서 하였다⁽¹⁰⁾. 그리고 알파-토코페롤의 산화생성물인 α -tocopheryl quinone을 정량하기 위해 사용한 칼럼은 8 mm×10 cm i.d., μ -Bondapak C₁₈, 유량은 2 ml/min, 용매조건은 메탄올 : 물=95 : 5였으며 검출은 229 nm에서 하였다⁽¹¹⁾. α -tocopheryl dimer를 정량하기 위해 사용한 칼럼은 8 mm×10 cm i.d., μ -Porasil, 유량은 2 ml/min, 용매조건은 hexan : 클로로포름 : 이소프로판올=95 : 4.5 : 0.5였으며 검출은 파장 280 nm에서 하였다⁽¹²⁾.

결과 및 고찰

베타-카로틴의 산화안정성에 대한 리놀레산, 수분활성 및 리폭시게나아제의 영향

높은 수분활성도인 a_w 0.72에서 베타-카로틴의 산화안정성에 미치는 리놀레산과 리폭시게나아제의 영향을 살펴본 결과는 Fig. 1과 같다. 베타-카로틴 단독으로는 반응 48시간 경과 후에도 상당히 안정하지만 리놀레산을 반응시켰을 때는 베타-카로틴의 산화가 현저하였다. 또한 리폭시게나아제 반응 유무에 따라서도 베타-카로틴의 산화속도가 다름을 관찰할 수 있었다. 베타-카로틴에 리놀레산을 반응시켰을 때 반응 24시간까지 1차 반응의 양상을 나타내고 있었는데 특히 이 시스템에 리폭시게나아제를 반응시켰을 경우 베타-카로틴이 3.1%/hr로 산화되는 데 반해 리폭시게나아제가 없는 경우에는 2.1%/hr의 산화속도를 보였다. 그러나 반응 24시간 이후로는 양쪽 반응 모두에서 베타-카로틴의 산화속도가 아주 둔화되는 경향을 보였으며 이중에서도 리폭시게나아제가 존재하는 반응계에서는 0.48%/hr의 느린 산화속도를 나타내었다. 즉, 베타-카로틴이 리놀레산의 산화시 생성된 유리기에 의해 자발적으로 산화되어 베타-카로틴의

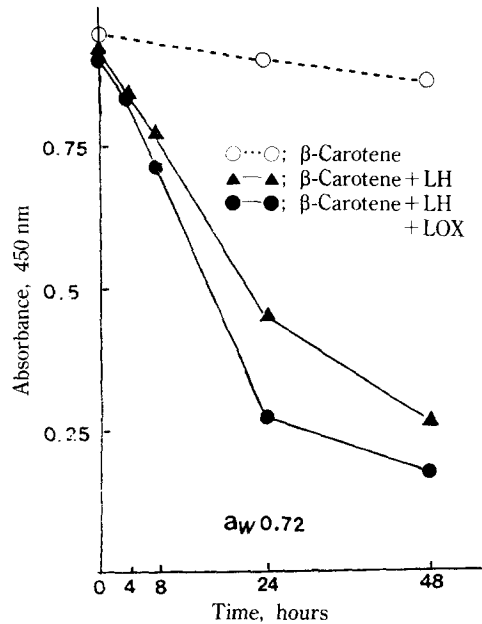


Fig. 1. Effect of linoleic acid and lipoxigenase on the stability of β -carotene(1.32~1.35 mg β -carotene/g dry solid) in starch-solid model system during reaction at 25°C and a_w 0.72

LH; linoleic acid, LOX; lipoxigenase

감소를 초래하는 것으로 생각되었다. 보고⁽¹³⁾에 의하면 지방질 존재시의 카로티노이드는 coupled-oxidation을 일으키므로 증가된 과산화물 농도가 카로티노이드의 산화속도를 증가시킨다고 하여 본 결과와 일치하는 경향을 보였다. 또한 Kanner⁽⁹⁾의 연구에서는 카로틴 산화는 리놀레산과의 반응에 의해 현저하게 증가하며 리놀레산의 농도를 50, 100, 200 mg으로 증가시키에 따라 카로틴의 유도기간이 각각 16, 4, 2시간으로 감소되며 리놀레산을 반응시키지 않은 카로틴의 경우에는 유도기간이 32시간임을 보고하였다.

낮은 수분활성도인 a_w 0.25에서 베타-카로틴의 산화에 미치는 리놀레산 그리고 리폭시게나아제의 영향을 살펴본 결과는 Fig. 2와 같다. a_w 0.72에서의 경우와 유사한 경향을 보였지만 리폭시게나아제와의 반응 유무에 따라 베타-카로틴의 산화속도에 큰 차이를 보이지 않는 것은 리폭시게나아제의 활성이 a_w 의 영향을 크게 받기 때문으로 생각되었다. 즉 수분활성도가 낮음으로 인하여 반응시스템내에서 리폭시게나아제의 기질이 되는 리놀레산의 유동성이 원활하지 못하게 되고 따라서 효소-기질 복합체의 형성이 잘 되지 않는 것으로 사료되었다. 리놀레산 존재하에서 베타-카로틴의 산화는 1차 반응을 따르며 반응 24시간까지 리폭시게나아제 첨가군에서는 산화속도가 2.49%/hr인 반면 리폭시게나아제가 없는 반응계에서는 산화속도가 2.22%/hr로 리폭시게나아제

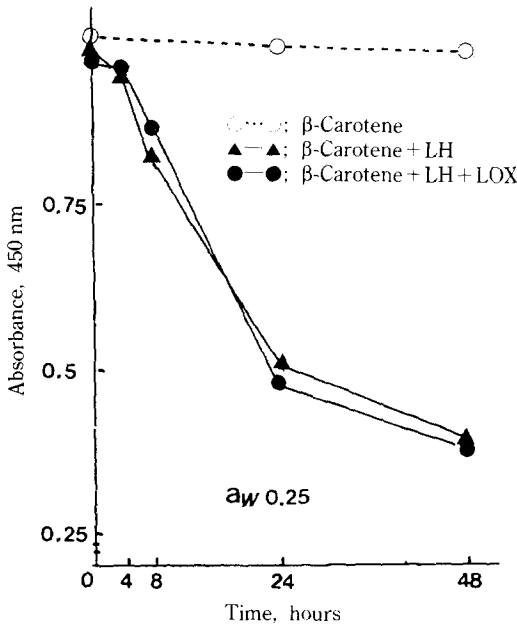


Fig. 2. Effect of linoleic acid and lipoxygenase on the stability of β -carotene(1.40~1.43 mg β -carotene/g dry solid) in starch model system during reaction at 25°C and a_w 0.25

LH; linoleic acid, LOX; lipoxygenase

반응 유무에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 리폭시게나제와 리놀레산이 있는 반응계에서 베타-카로틴의 산화에 대한 수분활성도의 영향을 비교해 보면 a_w 0.72에서는 베타-카로틴의 산화속도가 3.1%/hr였고 a_w 0.25에서는 2.49%/hr로 a_w 0.72에서 산화속도가 약 1.2배 정도 빨랐다. 냉동 건조된 당근의 경우 수분활성이 증가할수록 당근중의 카로티노이드 산화속도가 증가하는 것은 촉매제의 증가된 용해성과 용해도에 따라 고형상에서 새로운 부위가 노출되기 때문이라고 한다¹³⁾. 그러나 다른 연구에서는 지방질 산화시 만들어지는 유리가 물과 결합하기 때문에 수분함량이 증가할수록 카로티노이드의 산화속도가 감소된다고 하여 상반된 보고¹⁴⁾를 하였다.

수분활성도 0.25에서 리놀레산과 리폭시게나제가 존재할 때 반응경과별 베타-카로틴의 산화양상을 스펙트럼 상으로 Fig.3에 나타내었다. 반응 전에 비해 반응 48시간 경과 후 흡광도는 현저히 낮아졌지만 최대파장의 변화는 일어나지 않았다. 이것으로 보아 베타-카로틴이 산화는 되었지만 trans형에서 cis형으로의 이성화반응은 일어나지 않았으며 또한 베타-카로틴이 산화된 형태로만 전환되었을 뿐 이들 산화생성물의 분해 현상은 아직 일어나지 않은 것으로 생각되었다. 일반적으로 시료를 가공처리할 때 카로티노이드의 이성화반응이 일어나 최대파장이 이동된다고 알려져 있다¹⁵⁾. 그러나 고형상의

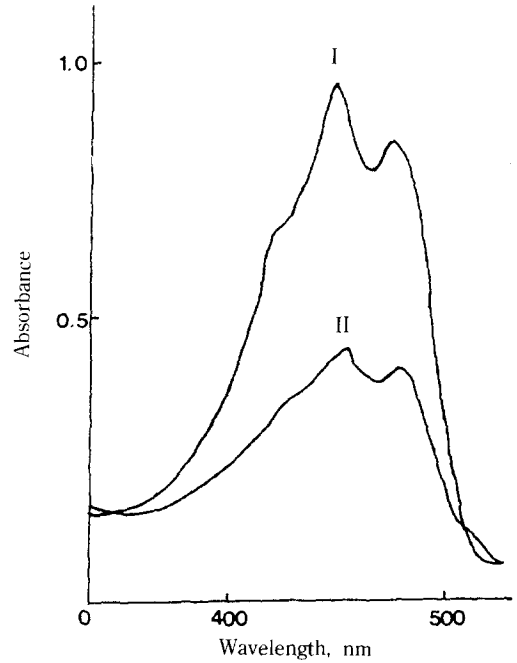


Fig. 3. Absorption spectra of β -carotene in starch-solid model system

(I and II are absorption spectra after 0 and 2 days reaction respectively in the presence of linoleic acid and lipoxygenase)

시스템에서 베타-카로틴의 산화양상을 관찰했을 때는 베타-카로틴의 최대파장의 변화는 일어나지 않았다는 보고가 있었으므로 이것은 본 연구와 일치하는 경향이 었다.

수분활성도 0.72에서 리놀레산과 리폭시게나제가 존재할 때 베타-카로틴의 산화속도에 미치는 베타-카로틴 농도의 영향을 Fig.4에 나타내었다. 베타-카로틴 농도가 증가할수록 산화속도도 비례적으로 빨라짐을 관찰할 수 있었는데 즉 전분 1g당 베타-카로틴이 0.8 mg으로 반응 시스템에 존재할 때는 22 μ g/hr의 산화속도를 보였고 1.2 mg일 때는 33 μ g/hr의 산화속도를 나타내었다. 결과적으로 이와같은 조건하에서는 베타-카로틴의 농도가 높을수록 또한 수분활성도가 클수록 베타-카로틴의 산화안정성도 떨어지는 경향을 보였다. Barimalaa와 Gordon¹⁶⁾은 카로틴 농도가 증가할수록 co-oxidation 속도도 빨라진다고 하여 본 연구와 일치하는 보고를 하였다.

알파-토코페롤의 산화안정성에 대한 리놀레산 및 리폭시게나제의 영향

알파-토코페롤의 산화에 미치는 리놀레산과 리폭시게나제의 영향을 살펴본 결과는 Fig.5와 같다. 반응 전에는 알파-토코페롤의 함량이 전분 1g당 1.57 mg이었지만 24시간 경과 후에는 리폭시게나제를 첨가한 반응계에서는 0.35 mg 첨가하지 않은 반응계에서는 0.38

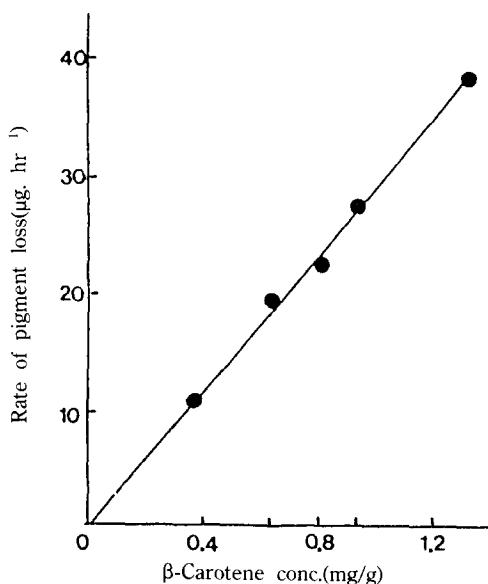


Fig. 4. Effect of β -carotene concentration on the maximum rate of loss of β -carotene in the presence of linoleic acid and lipoxygenase for 24 hours

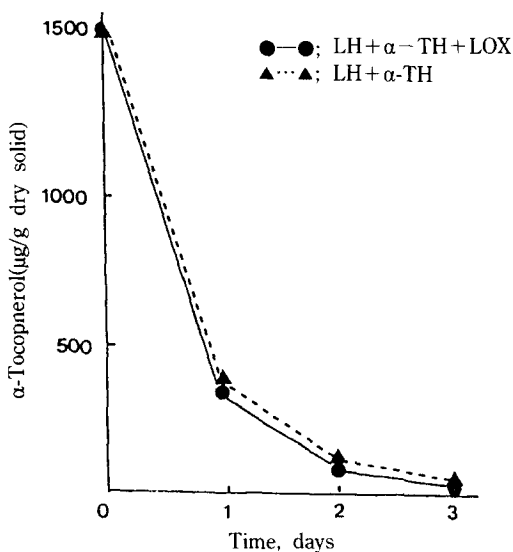


Fig. 5. Effect of linoleic acid and lipoxygenase on the degradation of α -tocopherol in starch-solid model system during reaction at 25°C

LH; linoleic acid, LOX; lipoxygenase, α -TH; α -tocopherol

mg의 잔존량을 나타내었다. 리폭시게나아제 반응 유무에 따라서는 약간의 차이만을 보였지만 리놀레산과의 반응에 의해 알파-토코페롤은 현저하게 산화되는 양상을 보였다. 그림에는 나타내지 않았지만 리놀레산을 반응시

Table 1. Degradation of α -tocopherol and its relative¹⁾ productions of α -tocopheryl quinone and α -tocopheryl dimer in starch-solid model system (a_w 0.72) during reaction at 25°C

Reaction days	α -TH(μ g/g)		α -tocopheryl quinone		α -tocopheryl dimer	
	LH+LOX	LH	LH+LOX	LH	LH+LOX	LH
0	1569	1569	ND ²⁾	ND	0.8	0.8
1	345	377	60.3	60.0	17.0	4.2
2	83	110	95.0	83.6	32.9	9.8
3	12	42	120.5	102.2	43.3	10.8

¹⁾peak area $\times 10^{-5}$, ²⁾none detected

LH; linoleic acid, LOX; lipoxygenase, α -TH; α -tocopherol

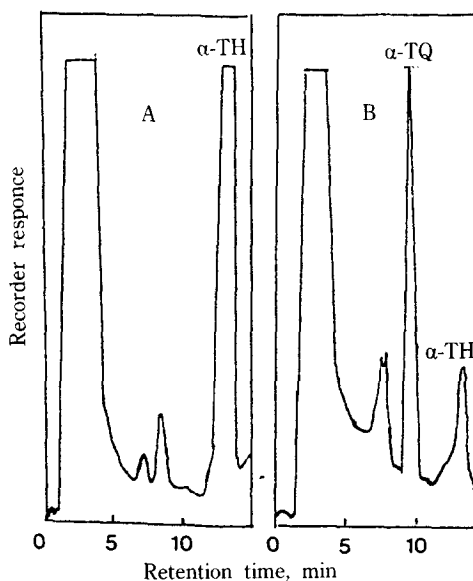


Fig. 6. HPLC chromatograms of α -tocopherol and α -tocopheryl quinone from starch-solid model system containing linoleic acid and lipoxygenase

A; initiation of reaction period(0 day), B; after reaction of(2 days at 25°C, a_w 0.72)

α -TH; α -tocopherol, α -TQ; α -tocopheryl quinone

키지 않은 알파-토코페롤 단독으로는 상당히 안정하여 반응 72시간까지도 알파-토코페롤의 산화를 관찰할 수 없었다. 알파-토코페롤의 산화율이 가장 높았던 반응 24 시간까지 리폭시게나아제를 반응시킨 시스템에서는 51 μ g/hr의 산화속도를 보인 반면 리폭시게나아제가 없는 경우에는 50 μ g/hr의 산화속도를 나타내었다. 이러한 현저한 산화는 이 반응시스템에서 알파-토코페롤이 peroxy radical과 반응하여 항산화제로 작용했기 때문인 것으로 사료되었다. Widicus⁽¹⁷⁾는 모델시스템에서 지방질의 존재유무에 따른 알파-토코페롤의 산화정도를 측정했을 때 알파-토코페롤의 산화생성물은 동일하지만 지방질이 없을 때의 경우와 비교해 보면 불포화지방질이 존재할 때의

알파-토코페롤의 산화속도가 빠르다고 하였으며 또한 알파-토코페롤의 농도가 높을수록 산화되는 정도는 크다고 하였다. 알파-토코페롤의 산화생성물인 α -tocopheryl quinone과 α -tocopheryl dimer의 함량 변화를 반응경과에 따라 관찰한 결과를 Table 1에 나타내었다. 이 중에서 주요 산화생성물인 α -tocopheryl quinone 함량 변화를 크로마토그램상으로 나타낸 것은 Fig. 6과 같다. α -Tocopheryl quinone 함량은 반응 24시간 이후부터 리폭시게나아제와의 반응 유무에 따라 차이를 보였는데 특히 리폭시게나아제를 반응시킨 시스템에서는 반응 72시간 경과 후에는 반응 24시간째 생성되는 α -tocopheryl quinone 함량의 약 2배로 증가하였다. α -Tocopheryl dimer의 경우 α -tocopheryl quinone 보다는 함량이 적었지만 반응 경과에 따라 점차 증가하는 경향을 보였으며 리폭시게나아제를 반응시킨 시스템에서 그 함량이 많음을 보여주었다. 이와같이 리폭시게나아제 반응 유무에 따라 생성되는 산화생성물 함량면에서는 차이를 보이지만 산화생성물 종류에는 차이가 없다는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 in vivo에서 토코페롤 대사의 주된 산물은 α -tocopheryl quinone이라고 하였으며 이것은 in vitro에서도 알파-토코페롤의 산화과정으로 인해 쉽게 형성되는 산물이라고 보고된 바 있다¹⁸⁾. 식품 중에서 알파-토코페롤의 항산화 기구를 밝히기 위해 methyl linoleate에 알파-토코페롤을 반응시켜서 알파-토코페롤의 산화 생성물을 분석한 결과 알파-토코페롤의 항산화 초기과정에서 α -tocopheryl dimer가 생성되며 연이어 α -tocopheryl trimer가 축적된다고 보고하였다¹⁹⁾.

요 약

고형상의 모델시스템에서 베타-카로틴과 알파-토코페롤의 산화에 미치는 리폭시게나아제, 리놀레산, 수분활성도의 영향에 대해 검토하였다. 리놀레산 존재하에서 리폭시게나아제에 의한 베타-카로틴과 알파-토코페롤의 산화반응은 높은 수분활성도에서 잘 일어났으며 반응 48시간 경과 후에는 베타-카로틴의 경우 초기함량에 대해 19% 잔존량만을 보였고 알파-토코페롤은 5%를 나타내어 현저히 감소되는 경향을 보였다. 이와같이 동일 조건에서 알파-토코페롤은 베타-카로틴보다 더 많은 감소량을 보여 peroxy radical과의 반응성이 베타-카로틴보다 뛰어난 것을 알 수 있었다. 또한 베타-카로틴의 농도가 높을수록 베타-카로틴의 산화속도도 비례적으로 빨라지는 양상을 보였다. 그러나 스펙트럼상으로 볼 때 베타-카로틴의 산화로 인한 최대파장의 이동은 일어나지 않았다. 알파-토코페롤의 산화생성물로는 α -tocopheryl quinone과 α -tocopheryl dimer가 검출되었으며 주요 산화생성물은 α -tocopheryl quinone으로서 반응경과에 따라 크게 증가하였다. 또한 이들 산화생성물은 리폭시게나아제와의 반응에 의해 그 함량이 훨씬 많음을 나타내었다.

문 헌

1. 福場博保: 過酸化脂質と 榮養. 光生館, 東京, p.77(1986)
2. 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝: 過酸化脂質と 生體. 學會出版センター, 東京, p.59(1985)
3. Kanner, J., Mendel, H. and Budowski, P.: Carotene oxidizing factors in red pepper fruits(Capsicum annum L.): Oleoresin-cellulose solid model. *J. Fd. Sci.*, **43**, 709(1978)
4. Premavalli, K.S. and Arya, S.A.: Stability of watermelon carotenoid extract in isolated model systems. *J. Fd. Technol.*, **20**, 359(1985)
5. Baloch, A.K., Buckle, K.A. and Edwards, R.A.: Effect of processing variables on the quality of dehydrated carrot. *J. Fd. Technol.*, **12**, 295(1977)
6. Terao, J. and Matsushita, S.: The peroxidizing effect of α -tocopherol on autoxidation of methyl linoleate in bulk phase. *Lipids*, **21**(4), 225(1986)
7. 山内亮: トコフェロールの 脂質過酸化抑制作用と 酸化生成物. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **62**(2), 163(1988)
8. Whitaker, J.R.: *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker, inc., New York, p.607(1972)
9. Kanner, J. and Budowski, P.: Carotene oxidizing factors in red pepper fruits(Capsicum annum L.): Effect of ascorbic acid and copper in a β -carotene-linoleic acid solid model. *J. Fd. Sci.*, **43**, 524(1978)
10. Bieri, J.G., Tolliver, T.J. and Catignani, G.L.: Simultaneous determination of α -tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Clin. Nutr.*, **32**, 2143(1979)
11. Weenen, H. and Porter, N.A.: Autoxidation of model membrane systems: Cooxidation of polyunsaturated lecithins with steroids, fatty acids, and α -tocopherol. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5216(1982)
12. Ha, Y.L. and Scallany, A.S.: Separation of α -tocopherol and its oxidation products by high performance liquid chromatography. *Lipids*, **23**(4), 359(1988)
13. Arya, S.S., Natesan, V., Parihar, D.B. and Vijayaraghavan, P.K.: Stability of carotenoids in dehydrated carrots. *J. Fd. Technol.*, **14**, 579(1979)
14. Goldman, M., Horev, B. and Saguy, I.: Decolorization of β -carotene in model systems simulating dehydrated foods. Mechanism and kinetic principles. *J. Food Sci.*, **48**, 751(1983)
15. Eskin, N.A.M.: *Plant Pigment, Flavors and Textures*. Academic Press, New York, p.17(1981)
16. Barimalaa, I.S. and Gordon, M.H.: Cooxidation of β -carotene by soybean lipoxygenase. *J. Agric. Food Chem.*, **36**(4), 685(1988)
17. Widicus, W.A., Kirk, J.R. and Gregory, J.F.: Storage stability of α -tocopherol in a dehydrated model food system containing no fat. *J. Fd. Sci.*, **45**, 1015(1980)
18. Anthony, T.D.: *Fat-Soluble Vitamins*. Heinemann, London, p.160(1985)
19. Widicus, W.A. and Kirk, J.R.: Storage stability of α -tocopherol in a dehydrated model food system containing methyl linoleate. *J. Food Sci.*, **46**, 813(1981)