

고형상의 모델시스템에 있어서 리놀레산의 산화에 미치는 리폭시게나아제, 카로틴, 토코페롤 및 수분활성의 영향

김혜경 · 최홍식[†] · 송영옥

부산대학교 식품영양학과

Effect of Lipoxygenase, β -Carotene, α -Tocopherol and Water Activity on the Oxidation of Linoleic Acid in Starch-Solid Model System

Hae-Gyoung Kim, Hong-Sik Cheigh[†] and Yeong-Ok Song

Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

Starch solid model system was employed to investigate the effect of lipoxygenase, β -carotene, α -tocopherol and water activity on the oxidation of linoleic acid. The rate of oxidation of linoleic acid by lipoxygenase was increased with the increase in water activity. Addition of β -carotene and α -tocopherol to this system has been shown to inhibit the oxidation of linoleic acid and α -tocopherol was more effective antioxidant than β -carotene. However, an increase in the concentration of β -carotene was found to have a strong antioxidant effect in the solid model system. And also the antioxidative action of β -carotene was increased with increasing water activity in this system.

Key words : lipid oxidation, lipoxygenase, water activity, α -tocopherol, β -carotene, solid model system

서 론

지방질 산화는 유리기의 연쇄반응으로 인해 일어나며 이러한 반응을 촉매하는 인자로 가열, 광선, 산소, 효소, 금속이온등을 들 수 있지만 특히 산화효소인 리폭시게나아제의 역할이 아주 크다고 알려져 있다. 리폭시게나아제는 cis, cis-penta-1,4-diene 단위를 가지는 지방산에 대해서만 특이성을 가지므로 비타민 F라 불리는 불포화지방산의 산화에 크게 관여하고 있다고 할 수 있다¹⁾. 또한 고형상에서 리폭시게나아제에 의한 지방산의 산화는 수분활성도의 영향을 크게 받으며 Labuza²⁾는 리놀레산 모델시스템에서 항

산화제 효과에 대한 수분활성의 영향에 대해 연구하였다. 지용성 비타민 중 항산화제로 알려진 β -카로틴과 α -토코페롤은 지질 과산화반응을 억제하는 반면 자신은 산화된 후 분해되어 생리적 활성을 잃어버리게 된다고 한다³⁻⁵⁾. 이와같이 지방산의 산화에 미치는 항산화제와 수분활성도의 영향에 대해서는 부분적인 연구가 되어있지만 고형상의 모델에서 리폭시게나아제 촉매하의 리놀레산 산화양상에 대해서는 거의 연구가 되어있지 않다.

따라서 본 연구에서는 전분을 이용한 고형상의 모델에서 리폭시게나아제 촉매하의 리놀레산의 산화반응에 영향을 줄 수 있는 수분활성도와 항산화제인 α -토코페롤과 β -카로틴에 대해 살펴보았으므로 이를 보고하고자 한다.

[†]To Whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

시약

전분은 Sigma 회사(USA)의 Wheat Type III를 사용하였고 효소 lipoxygenase는 Sigma 회사의 Soybean Type I 을 사용하였다. 리놀레산은 linoleic acid mixture(지방산 조성 : linoleic acid 64.6%, oleic acid 27.4%, palmitic acid 5.0%, Fluka Co., Switzerland)를, β -carotene은 Sigma 회사(USA)의 합성품을, α -tocopherol은 Sigma 회사(USA)의 것을 각각 사용하였다.

모델시스템의 조제

모델시스템은 Kanner⁶⁾의 방법에 준하여 조제하였다. 지지체로 사용한 전분은 미리 75°C 진공건조기에서 수분을 완전히 제거한 뒤 포화염용액으로 수분활성도를 조정한($K_2CO_3 \cdot 2H_2O$; a_w 0.25, KCl; a_w 0.72) 데시케이터에서 3일 동안 방치한 후 실험에 이용하였으며 조제방법은 다음과 같다. 리놀레산과 β -카로틴 혹은 α -토코페롤을 헥산(hexane)에 녹인 뒤 수분활성이 조정된 전분을 함께 회전진공증발기에서 30분 동안 혼합하였으며 이때 리폭시게나아제는 리놀레산과 β -카로틴이나 α -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 리폭시게나아제, β -카로틴, α -토코페롤, 리놀레산 농도는 전분 1g당 각각 1mg, 0.7~1.4mg, 1.6mg, 0.2g으로 하였다.

분석

시료에 대한 20배량의 헥산으로 30분 동안 stirrer에서 추출한 다음 여과 농축하였으며 농축된 시료는 성분분석을 위해 적당한 농도로 다시 희석하였다. 반응 전후의 리놀레산의 산화정도는 conjugated diene value로 측정하였으며 방법은 다음과 같다. 즉 100ml 용량 플라스크에 약 0.1g의 시료를 넣은 다음 실온에서 isooctane에 용해(0.01g/L)하여 234nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

리놀레산의 산화에 미치는 리폭시게나아제와 수분활성도의 영향

고형상에서 리놀레산의 산화속도는 수분활성도(a_w)의 영향을 크게 받았으며 수분활성도가 클수록 리놀레산의 산화속도도 빠른 경향을 보였다. (Fig. 1) 리폭시게나아제 촉매하의 리놀레산의 산화에서는 반응 24시간 경과후의 conjugated dienoic acid (CAD) 함량이 a_w 0.25에서는 4.5%인데 반해 a_w 0.72에서는 6.4%이었다. 자동산화에서도 a_w 에 따라 차이를 보이는데 a_w 0.25에서는 3.8%, a_w 0.72에서는 5.5%를 나타냈다. 또한 a_w 0.25에서 리폭시게나아제 촉매하의 리놀레산의 산화속도보다 a_w 0.72에서 리놀레산의 자동산화 속도가 빠른것으로 보아 이 반응계에서의 리놀레산의 산화양상은 효소보다 수분활성도의 영향을 더 크게 받는 것으로 생각되었다. 보고⁷⁾에 의하면 리폭시게나아제활성은 수분활성이 증가할수록 커지며 이

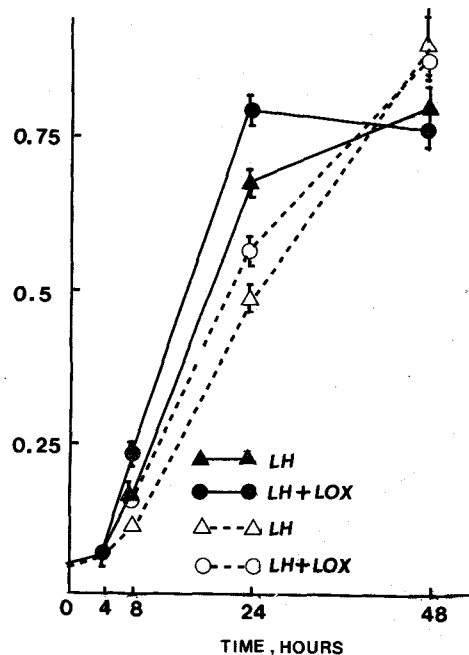


Fig. 1. Effect of water activity on the formation of conjugated dienoic acid in starch-solid model system at 25°C

Symbols : a_w 0.72(●—●, ▲—▲)

a_w 0.25(○--○, △--△)

Abbreviations : LH ; linoleic acid, LOX ; lipoxygenase

것은 기질유동성이 증가하기 때문이라고 하여 본 연구와 일치하는 경향을 보였다. 일반적으로 수분활성도가 낮은 경우에 일어나는 물의 항산화 효과는 물과 hydroperoxide가 결합하거나 금속촉매계의 수화현상에 기인되며 수분활성도가 높은 경우에 일어나는 물의 pro-oxidant 효과는 반응물의 유동성이 증가되기 때문이라고 알려져 있다⁷⁾.

높은 수분활성도에서 리놀레산의 산화에 대한 β -카로틴의 영향

리놀레산의 산화에서 높은 농도의 β -카로틴을 반응시켰을 때의 항산화 효과를 관찰한 결과는 Fig. 2A와 같다. β -카로틴을 반응시키지 않은 리놀레산만의 산화에서는 CDA함량이 24시간 경과후에 최대치에 달했다가 그 후는 서서히 감소하는 경향을 보였는데 이것은 기질이 모두 소모되어 버렸기 때문에 hydro-

peroxide의 분해가 진행되고 있음을 나타낸다고 할 수 있다. 그러나 이 시스템에 β -카로틴을 반응시키게 되면 CDA함량은 현저하게 감소되며 24시간의 유도기간을 보여주므로 β -카로틴이 이 반응 시스템에서 항산화제 역할을 하는 것으로 볼 수 있었다. 보통 지방질의 산화반응에서 β -카로틴은 항산화제로 작용한다고 알려져 있지만 때로는 pro-oxidant로 작용한다고도 보고되어 있다⁸⁾. 식품중에 존재하는 카로티노이드가 산화될 때는 일반적으로 불포화지방산과 관련되어 있으며 이때의 반응은 보통 자발적으로 일어난다고 알려져 있는데 이외에도 카로티노이드의 산화는 수분활성, 열, 금속, 산소 등과도 직접적으로 관련되어 있다고 보고되어 있다⁹⁾. β -카로틴은 지질 과산화 반응으로 생성되는 유리기와 반응성이 상당히 크기때문에 이 유리기들을 포획하여 항산화작용을 한다고 알려져 있으므로¹⁰⁾ 따라서 본 연구와 일

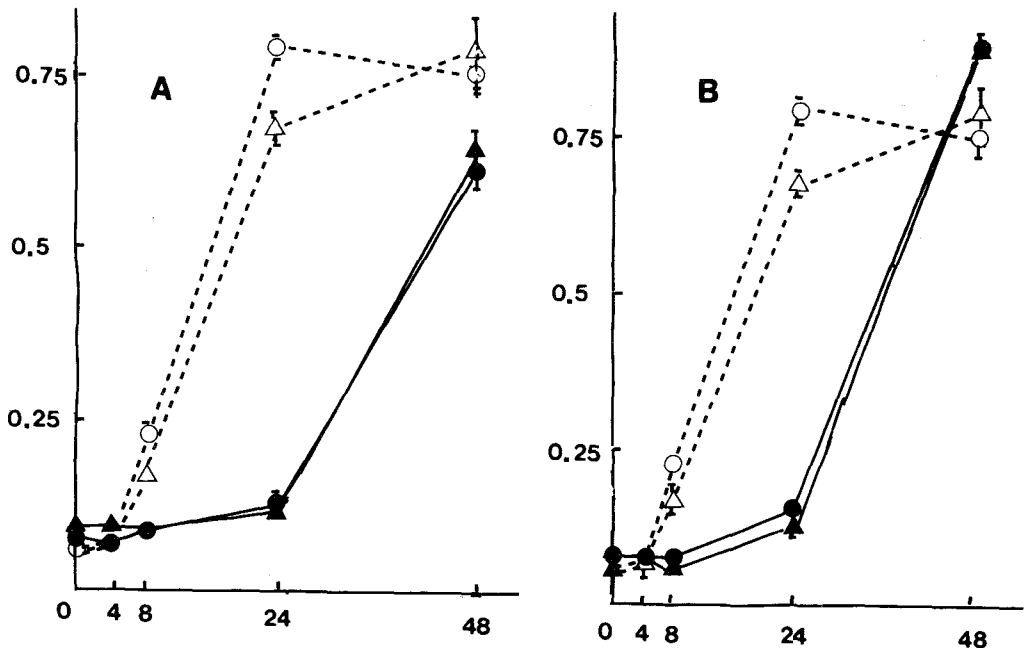


Fig. 2. Effect of different concentrations of β -carotene(A : 1.32-1.35mg β -carotene/g dry solid, B : 0.78-0.80mg β -carotene/g dry solid) on the formation of conjugated dienoic acid in starch-solid model system during reaction at 25°C and a_w 0.25.

- Symbols : \triangle -- \triangle LH
- \circ -- \circ LH+LOX
- \blacktriangle -- \blacktriangle LH+ β -carotene
- \bullet -- \bullet LH+ β -carotene

Abbreviations : LH ; linoleic acid, LOX ; lipoxygenase

치하는 경향을 보였다.

낮은 농도의 β -카로틴을 리놀레산에 반응시켰을 때 생성되는 CDA함량으로 항산화 효과를 비교한 결과는 Fig. 2B와 같다. β -카로틴의 농도가 높을 때 (Fig. 2A)보다 낮은 경우에 (Fig. 2B) 생성되는 CDA함량이 24시간 이후에 더 많았고 이것으로 보아 이 반응시스템에서는 β -카로틴의 농도가 높을수록 항산화제 역할이 뛰어난 것을 알 수 있었다. 즉 β -카로틴의 농도가 높은 경우에는 24시간의 유도기간을 나타낸 반면 농도가 낮을 때는 반응 8시간 이후부터 조금씩 CDA생성이 진행되어 반응 24시간 이후로는 CDA생성이 급격하였다. 이것은 β -카로틴의 농도가 낮을 때는 높을 때보다 지방질 과산화 반응에 대한 항산화제로서의 기능이 떨어짐을 나타내 주는 결과였다. Barimalaa¹¹의 연구에서는 리폭시게나아제 촉매하에서

의 β -카로틴의 산화속도가 카로틴 농도와 함께 증가한다고 하여 본 결과와 일치하는 경향을 보였다. β -카로틴을 다른 항산화제와 비교해 볼 때 구조적 형태는 같지 않지만 β -카로틴 분자를 구성하는 공액 이중결합으로 인해 반응시스템에 따라서 pro-oxidant 성질을 가지기도 하며 또 한편으로는 과산화반응으로 인해 생성되는 유리기들의 공격에 매우 영향을 받기 쉽다고 한다⁹. 또한 카로틴의 산화속도는 리놀레산과의 반응에 의해 현저하게 증가한다고 알려져 있지만⁶ 수박중에 존재하는 카로티노이드의 안정성에 미치는 지방질에 대한 연구에서는 methyl palmitate, methyl oleate 등이 오히려 카로티노이드의 안정성을 증가시킨다는 보고가 있었다¹².

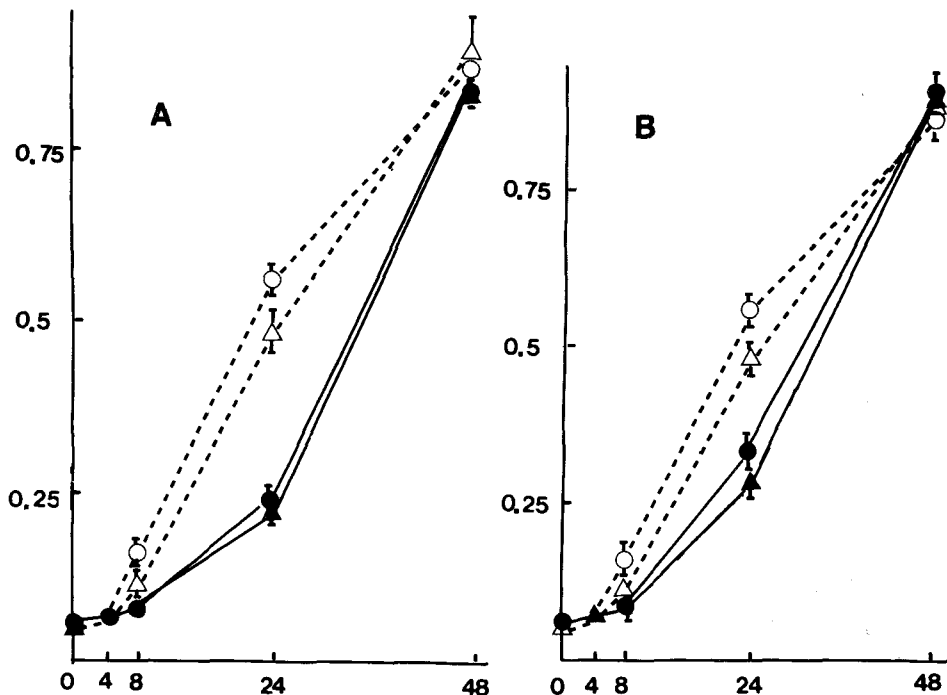


Fig. 3. Effect of different concentrations of β -carotene (A : 1.40~1.43mg β -carotene/g dry solid, B : 0.72~0.75mg β -carotene/g dry solid) on the formation of conjugated dienoic acid in starchsolid model system during reaction at 25°C and a_w 0.25.

Symbols : \triangle --- \triangle LH
 \circ --- \circ LH+LOX
 \blacktriangle --- \blacktriangle LH+ β -carotene
 \bullet --- \bullet LH+LOX+ β -carotene

Abbreviations : LH ; linoleic acid, LOX ; lipoxygenase

낮은 수분활성도에서 리놀레산의 산화에 대한 β -카로틴의 영향

a_w 0.25에서 리놀레산의 산화에 대한 높은 농도의 β -카로틴의 항산화 효과를 관찰한 결과는 Fig. 3A와 같다. β -카로틴을 반응시키지 않은 대조군에서 리폭시게나아제의 반응유무에 따라 리놀레산의 산화정도가 큰 차이를 보이지 않는것은 수분활성도가 낮음으로 해서 리폭시게나아제 활성도가 떨어지기 때문이며 이로인해 수분활성도가 낮은 경우에는 리놀레산의 산화가 다소 천천히 일어나는 것으로 사료되었다. Arya¹³⁾의 연구에서는 수분활성도가 낮은 경우에는 기질 유동성이 충분치 못해 효소활성이 제한된다고 하여 본 결과와 일치하는 경향을 보였다. 이 시스템에 β -카로틴을 반응시키게 되면 CDA생성은 저하되지만 높은 수분활성도에서 보다는 유리기와 결합이 잘 일어나지 않아서 β -카로틴의 항산화 작용이 미약한 것으로 보여지며, 이와같이 과산화과정에서 생성된 유리기와 β -카로틴의 반응성이 좋지 않았기 때문에 잔존하는 β -카로틴 함량은 많음이 관찰됐다. 이것으로 보아 고형상의 모델시스템에서 리폭시게나아제에 의한 카로틴과 리놀레산의 산화양상은 수분활성도의 영향을 크게 받는 것을 알 수 있었다. Karel은 수분활성이 증가함에 따라 단백질과 유리기 사이의 결합력이나 생성되는 과산화물 함량은 증가한다고 보고 하여 본 연구와 일치함을 보여준 반면 Labuza는 리놀레산 모델시스템에서 항산화제 효과에 미치는 수분활성의 영향에 대해 연구한 결과 유리기와 결합하는 지용성 항산화제는 수분함량에 의해 반드시 큰 영향을 받지 않는다고 보고하였다¹²⁾.

낮은 농도의 β -카로틴을 리놀레산에 반응시켰을 때 생성되는 CDA함량을 비교한 결과는 Fig. 3B와 같다. 낮은 농도의 β -카로틴을 반응시킬 경우에는 유도기간이 8시간으로서 항산화능이 현저히 저하되는 것을 관찰할 수 있었다. 즉 반응 8시간 후 부터 과산화반응이 진행되기 시작하여 특히 24시간에서 48시간 사이에 CDA생성속도가 빠른 양상을 보여주었다. 결과적으로 β -카로틴의 항산화 효과는 β -카로틴 농도와 수분활성도가 높을수록 뛰어남을 관찰할 수 있었다.

리놀레산의 산화에 대한 α -토코페롤의 영향

리놀레산의 산화양상에 대한 α -토코페롤 및 리폭시게나아제의 영향을 a_w 0.72에서 살펴 본 결과는

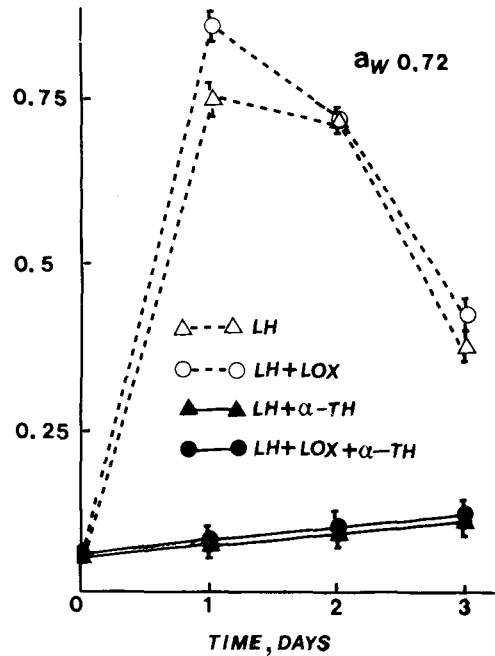


Fig. 4. Effect of α -tocopherol (1.6mg/g dry solid) on the formation of conjugated dienoic acid in starch-solid model system during reaction at 25°C.

Abbreviations : LH ; linoleic acid, LOX ; lip-oxygenase, α -TH ; α -tocopherol

Fig. 4과 같다. α -토코페롤을 반응시키지 않은 리놀레산의 산화에서는 CDA함량이 24시간 경과 후 최대치에 달했다가 그 후 서서히 감소하는 경향을 보였으며 24시간째 최대치에 달했을 때 CDA함량은 리폭시게나아제와의 반응 유무에 따라 다소 차이를 보이고 있었다. 그러나 α -토코페롤을 반응시킨 군에서는 72시간까지도 과산화물이 형성되지 않고 계속 유도기간으로 머물러 있었다. 이것으로 보아 이 모델시스템에서 리놀레산의 산화에 대한 항산화작용은 β -카로틴보다는 α -토코페롤이 뛰어남을 알 수 있었다. 즉 지질 과산화 반응에서 만들어지는 유리기와 반응이 α -토코페롤이 좋기때문에 반응하지 않고 남아있는 α -토코페롤의 함량이 훨씬 적었다. Yasumoto¹⁴⁾의 연구에서는 리폭시게나아제가 필수지방산의 산화를 촉매하여 비타민의 손실이나 산패취를 내는데 관여한다고 하였으며 효소의 작용을 저해하는 항산화제는 효소에 대한 길항적인 저해제로서 혹은 효소-기질 복합체에 대한 전자나 수소공여체로서 작용함으로써 항산화제의 역할을 한다고 하였다. 또한 리놀레산과

α -토코페롤이 공존하는 반응계에서는 이들의 몰비 (mol α -tocopherol/mol linoleic acid)가 5×10^{33} 이상일 때 α -토코페롤은 pro-oxidant로 작용한다고 보고¹⁵⁾되어 있으나 본 연구에서는 그러한 영향은 찾아볼 수 없었다.

요 약

고형상의 모델시스템에서 리놀레산의 산화에 영향을 미치는 여러가지 인자들 즉 리폭시게나아제, 수분활성도, β -카로틴, α -토코페롤등에 대해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 리폭시게나아제에 의한 리놀레산의 산화반응은 aw 0.72에서 aw 0.25에 보다 잘 일어났다. 그러나 이 시스템에 β -카로틴이나 α -토코페롤을 반응시키게 되면 리놀레산의 산화를 크게 저해하였으며 β -카로틴보다는 α -토코페롤이 지질과 산화 과정에서 항산화작용이 더 컸다. 즉, 유사한 조건에서 β -카로틴은 24시간의 유도기간을 보여 준 반면 α -토코페롤은 72시간까지도 유도기간이 지속되었다. β -카로틴의 항산화작용은 수분활성도의 영향을 크게 받았으며 수분활성도가 높을수록 항산화 작용이 뛰어났고 또한 β -카로틴의 농도가 높을수록 CDA 생성이 적었다.

문 헌

- Whitaker, J. R. : *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker Inc., New York, p.607(1972)
- Duckworth, R. B. : *Water Relations of Foods*. Academic Press, New York, p.461(1975)
- Belitz, H. D. and Grosch, W. : *Food Chemistry*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, p.168(1987)
- Simic, M. G. and Karel, M. : *Autoxidation in Food and Biological Systems*. Plenum Press, New York, p.447(1980)
- Koskas, J. P., Cillard, J. and Cillard, P. : Autoxidation of linoleic acid and behavior of its hydroperoxides with and without tocopherols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61(9), 1466(1984)
- Kanner, J. and Budowski, P. : Carotene oxidizing factors in red pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) : Effect of ascorbic acid and copper in a β -carotene-linoleic acid solid model. *J. Fd. Sci.*, 43, 524(1978)
- Rockland, L. B. and Beuchat, L. R. : *Water activity : Theory and Applications to Food*. Marcel Dekker Inc., New York, p.44(1987)
- Warner, K. and Frankel, E. N. : Effects of β -carotene on light stability of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64(2), 213(1987)
- Olson, J. A. : Biological actions of carotenoids. *J. Nutri.*, 119(1), 94(1989)
- Burton, G. W. and Ingold, K. U. : β -Carotene : An unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224, 569(1984)
- Barimalaa, I. S. and Gordon, M. H. : Co-oxidation of β -carotene by soybean lipoxygenase. *J. Agric Food Chem.*, 36(4), 685(1988)
- Premavalli, K. S. and Arya, S. S. : Stability of watermelon carotenoid extract in isolated model systems. *J. Fd. Technol.*, 20, 359(1985)
- Arya, S. S., Natesan, V., Parihar, D. B. and Vijayaraghavan, P. K. : Stability of carotenoids in dehydrated carrots. *J. Fd. Technol.*, 14, 579(1979)
- Yasumoto, K., Yamamoto, A. and Mitsuda, H. : Effect of phenolic antioxidants on lipoxygenase reaction. *Agr. Biol. Chem.*, 34(8), 1162(1970)
- Cillard, J., Cillard P. and Cormier, M. : Effect of experimental factors on the prooxidant behavior of α -tocopherol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 57, 255(1980)

(1991년 10월 12일 접수)