

## 모델시스템에 있어서 무지개 송어 지방질의 산화에 대한 Lipoxygenase의 영향

김혜경 · 엄수현 · 최홍식<sup>†</sup>

부산대학교 식품영양학과

## Effect of Lipoxygenase on the Oxidation of Rainbow Trout Lipid in Model system

Hae-Gyoung Kim Su-Hyon, Um and Hong-Sik Cheigh<sup>†</sup>

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

### Abstract

The effect of lipoxygenase(LOX) on the oxidation and co-oxidation of lipid fraction was studied in the model system of rainbow trout. For the reaction in model system 1 g of lipid fraction and 50mL of enzyme extract(LOX, 140 unit in 50mL phosphate buffer solution at pH 7.4)), which were obtained from rainbow trout, were homogenized in the presence of Tween 20 and kept at 23°C for 3 days. The activity of LOX was decreased to 43% of its initial level during the reaction in the model system. The initial composition of rainbow trout lipid was showed to be consisted of triglyceride(TG : 82%) and free fatty acid(FFA : 0.1%), while this converted to 59% of TG and 20% of FFA, respectively after reaction in model system. Change of fatty acid composition was also observed and the content of linoleic acid, one of the major fatty acids, was decreased to 13% from 54% in the content of total fatty acids after reaction. The carotenoids in rainbow trout were composed of 0.4% α-carotene, 1.6% β-carotene, 80% canthaxanthin, 7% lutein and 11% zeaxanthin, thus the canthaxanthin was the major component. This canthaxanthin was the most degraded carotenoid by lipoxygenase catalyzed co-oxidation during the reaction. On the other hand the tocopherol isomers found in the rainbow trout were α- and β-tocopherol, and α-tocopherol had a higher degradation rate by the lipoxygenase catalyzed co-oxidation than that of β-tocopherol in the reaction of model system.

Key words : rainbow trout lipid, lipoxygenase, oxidation and co-oxidation, tocopherol, carotenoid

### 서 론

식품속에 존재하는 리폭시케나아제는 필수지방산의 산화

는 물론, 이 효소에 의해 생성된 유리기로 인해 지용성 비타민을 포함한 다른 성분들의 손상을 초래한다고 알려져 있다<sup>1)</sup>. 어류의 경우 살갗의 붉은 색소를 구성하는 것은 주로

† Corresponding author

## 모델시스템에 있어서 무지개 송어 지방질의 산화에 대한 Lipoxygenase의 영향

astaxanthin과 tunaxanthin과 같은 카로티노이드이며, 모델 시스템에서 탈지된 살갗 추출물과 불포화지방산의 영향에 의한 카로티노이드의 변색에 관해 보고된 바 있다<sup>2,3)</sup>. 또한 송어아가미에서 얻어진 리폭시게나아제가 아라키돈산에 작용하여 12-hydroxyeicosapentaenoic acid로 전환시키므로 이 효소를 12-lipoxygenase라고 명명한 바 있다.<sup>4)</sup> 무지개 송어의 살갗에 있는 리폭시게나아제는 불포화지방산을 산화하여 특이한 hydroperoxide를 생성하며 이 hydroperoxide는 분해되어 산페취를 내는 carbonyl을 생성한다는 보고가 있다<sup>5)</sup>. 이외에도 송어의 살에는 카로티노이드인 canthaxanthin과 베타-카로틴이 있으며<sup>6)</sup> 토코페롤 중에서는 알파-와 갑마-토코페롤이 함유되어 있다고 보고하였다.<sup>7)</sup> 이와 같이 무지개 송어는 카로티노이드 및 토코페롤의 co-oxidation에 미치는 리폭시게나아제의 영향과 지방질 구성 성분의 변화를 관찰하기 위한 좋은 생체 모델 시스템이라 생각되었다. 따라서 본 연구에서는 무지개 송어에서 리폭시게나아제를 추출하여 이것을 무지개 송어 지방질과 반응시켜 반응경과에 따른 카로티노이드 및 토코페롤의 산화양상과 지방질 조성의 변화 등을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에서 사용한 무지개 송어는 경남 양산 소재 전문 양어장에서 직접 분양받아 분석시료로 사용하였다. 그리고 사용한 표준효소는 Sigma Chemical Co.,(ST. Louise, MO. USA)에서 그리고 기타 시약들은 Fluka Chemical Corp. (Ronkonkoma, NY, USA)에서 구입하였다.

### 무지개 송어 리폭시게나아제 추출

무지개 송어의 살갗 부분만을 취하여 살갗 100g에 대해 0.05M-인산 원총용액(pH 7.4) 400ml를 가한 후 균질화한 다음 15000xg에서 15분동안 원심분리하였으며 이 때 온도는 4°C를 유지하였다. 원심분리하여 얻어진 상등액을 millipore로 여과하여 조효소액으로 이용하였다<sup>8)</sup>.

### 무지개 송어의 지방질 및 효소반응 모델시스템

무지개 송어의 살갗에 대한 5배량의 용매(chloroform : methanol=2 : 1)로 16시간 동안 지방질을 추출하여 용매를

회발시켰다. 모델시스템은 추출한 지방질 1g과 무지개 송어의 살갗에서 추출한 조효소액 50ml(140 unit로 조정)를 삼각 플라스크에 담고 여기에 Tween20을 0.5%농도가 되도록 첨가한 후 혼합하여 잘 유화 균질화시킨 다음 23°C의 항온기에서 3일간 반응시켰다. 대조군으로는 효소액 50ml를 열처리하여 불활성화 시킨 다음 위와 동일하게 실험하였다.

카로티노이드와 토코페롤의 추출 및 HPLC 분석조건  
카로티노이드 및 토코페롤의 추출과 이들의 HPLC 분석조건은 Kinsella 등에서의 방법에서와 같이 실시하였다<sup>9)</sup>.

### 지방질의 분석

지방산의 분석은 藤野<sup>10)</sup>등의 방법에 의하였으며 중성지방질의 성분조성분석은 Stahl<sup>11)</sup>의 방법에 준하여 각각 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 리폭시게나아제의 활성 변화

무지개 송어의 살갗에서 리폭시게나아제를 추출한 뒤

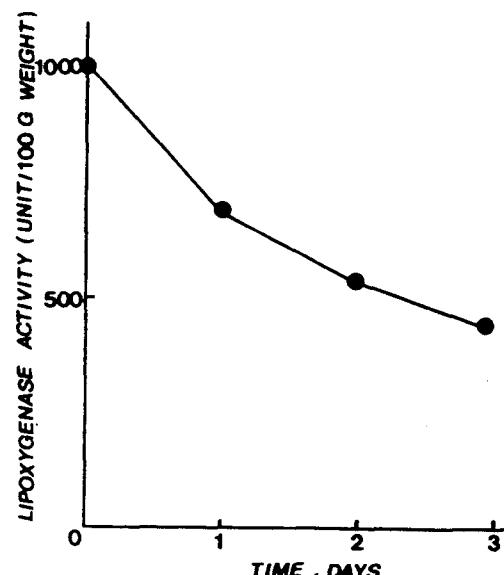


Fig. 1. Changes of lipoxygenase activity in crude enzyme extracts from rainbow trout skin during the reaction at pH 7.3, 23°C and for 3 days in model system.

이효소의 최적온도인 23°C에서 저장하면서 활성의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 처음에는 살갗 100g당 1008 Unit의 활성을 보이던 것이 모델시스템 조건의 저장 1일째에는 685Unit를 나타내어 초기 활성의 58%만이 잔존하였다. 리폭시게나아제의 활성은 저장 1일째까지 불활성화의 정도가 가장 커으며 그뒤로는 다소 둔화되는 양상을 보여, 저장 3일째에는 잔존하는 리폭시게나아제 활성이 초기의 43%인 433Unit를 나타냈다. 또한, 그림에는 나타나지 않았지만, 저장온도를 2°C로 한 뒤 리폭시게나아제의 활성 변화를 측정했을 때는 20일 경과후에도 초기활성의 62%를 유지하여 온도에 대해 아주 민감한 효소임을 알 수 있었다. 무지개 송어의 리폭시게나아제 활성은 일반적으로 살갗과 아가미에서 높다고 알려져 있으며 기질이 되는 지방산중 리놀레산에 대해서는 활성이 낮은 반면 아라키돈산에 대해서는 활성이 높다고 하였다.<sup>12)</sup> 또한 German<sup>4)</sup>의 연구에서는 송어의 아가미 조직에 존재하는 리폭시게나아제가 아라키돈 산에 작용하며 12-hydroperoxide 형태로 전환시킨다고 하였다.

#### 지방질 구성 성분의 변화

무지개 송어 지방질과 추출한 효소를 반응시킨 뒤 지방질의 성분 변화를 대조군과 비교하여 나타낸 결과는 Table 1과 같다. 모델시스템에서 효소를 반응시키기 전의 무지개

Table 1. Changes of lipid composition in rainbow trout lipid after 3 days of reaction at 23°C in model system

| Lipids            | Initial* | Heat-treated enzyme** | Enzyme** |
|-------------------|----------|-----------------------|----------|
| Diglyceride       | 0.7      | 0.7                   | 7.5      |
| Unknown           | 4.7      | 4.2                   | 3.3      |
| Free fatty acid   | 0.1      | 0.6                   | 19.6     |
| Triglyceride      | 82.3     | 83.4                  | 59.1     |
| Esterified sterol | 11.8     | 10.7                  | 10.5     |

\* Originals : before the enzyme treatment

\*\* Enzyme extract or heat treated enzyme extract from rainbow trout was added in model system.

송어의 지방질의 구성성분은 triglyceride 82%, esterified sterol 12%, diglyceride 1% 이던 것이 효소액과 3일간

반응후에는 triglyceride가 59%로 감소한 반면, 유리 지방산이 20%로 크게 증가하였다. 즉 효소액 중에 존재하는 활성이 강한 lipase가 작용하여 ester결합의 triglyceride를 가수분해하여 유리 지방산으로 전환시키는 것으로 여겨지며 이렇게 전환된 유리지방산은 리폭시게나아제의 좋은 기질이 될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 대조군의 중성지방질 구성성분은 반응전의 무지개 송어 지방질 구성성분과 거의 유사한 점으로 보아 대조군에서는 효소가 열처리에 의해 완전히 불활성화되어 효소의 작용은 기대하기 어려운 것으로 보였다.

한편, Yamaguchi<sup>3)</sup>등은 어패추출물중에 있는 효소가 리놀레산의 산화를 가속화시킨다고 보고한 바 있다. 모델시스템에서 효소를 반응시킨 군과 대조군사이의 지방산 조성의 차이를 살펴본 결과는 Table 2과 같다. 무지개 송어 지방

Table 2. Changes of fatty acid composition in rainbow trout lipid after 3 days of reaction at 23°C in model system

| Fatty acids | Initial* | Heat-treatment enzyme* | enzyme* |
|-------------|----------|------------------------|---------|
| 12:0        | 1.4      | 0.2                    | 0.9     |
| 14:0        | 0.2      | 0.1                    | 3.2     |
| 15:0        | 0.2      | trace                  | 0.1     |
| 16:0        | 18.8     | 17.7                   | 21.5    |
| 16:1        | 0.2      | 0.2                    | 10.7    |
| 18:0        | 0.9      | 0.6                    | 4.6     |
| 18:1        | 15.9     | 15.4                   | 34.3    |
| 18:2        | 54.3     | 57.3                   | 12.7    |
| 20:0        | 0.1      | trace                  | 0.3     |
| 20:1        | 7.4      | 8.0                    | 4.9     |
| 20:2        | 0.2      | 0.2                    | 4.3     |
| 20:4        | 0.3      | 0.3                    | 2.0     |
| 22:5        | 0.1      | trace                  | 0.5     |

\* See legend in Table 1.

질의 주요 지방산은 리놀레(54%), 올렌산(16%), 팔미틴산(19%)이었으며, 효소를 반응시켰을 때 이와같은 지방산 조성은 현저하게 변화하였다. 즉, 리놀레산이 13%로 크게 감소한 반면 올렌산이 34%로 상대적으로 크게 증가하였다. 이와 같은 지방산 조성의 결과는 반응시스템에서 리폭

## 모델시스템에 있어서 무지개 송어 지방질의 산화에 대한 Lipoxygenase의 영향

시계나아제의 작용을 더욱 확실하게 나타내 주는 것으로서 리폭시계나아제는 팔미틴산에는 작용하지 않지만 리놀레산은 리폭시계나아제의 좋은 기질이 됨은 이미 잘 알려져 있다.<sup>18) 20)</sup> 송어 아가미에서 얻어진 12-리폭시계나아제의 기질에 대한 특이성을 보면 20:4, 20:5, 22:6 지방산에 대해서는 활성이 큰 반면 리놀레산에 대해서는 활성이 상대적으로 떨어진다고 보고되었지만<sup>12)</sup> 본 실험에 사용된 무지개송어 중에는 20:4, 20:5, 22:6 지방산이 아주 비량 존재하거나 없으므로 Hsieh의 보고<sup>12)</sup>와 비교하기는 어려운 것으로 사료되었다.

### 카로티노이드의 변화

무지개송어 지방질 중의 카로티노이드 구성성분들 HPLC 크로마토그램으로 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 무지개송

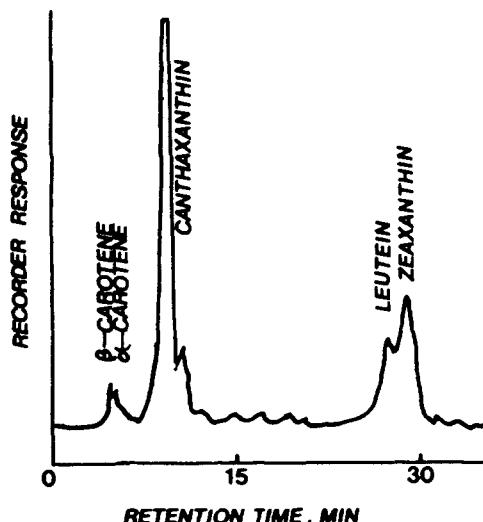


Fig. 2. Typical HPLC chromatogram of carotenoids in rainbow trout lipid.

어의 카로티노이드를 구성하는 성분들로는 canthaxanthin, lutein, zeaxanthin, 베타-카로틴, 알파-카로틴 등이 있었다. 각 카로티노이드의 함유량을 보면 송어지방질 1g당 canthaxanthin 4467mg(80%), zeaxanthin이 616mg(11%), lutein이 424mg(7%), 카로틴이 91mg(2%)이었다. 민물송어의 살부분에 존재하는 카로티노이드는 canthaxanthin과 β-carotene이 있다고 하였으며 양식한 무지개송어의 카로티노이드의 분포를 보고한 연구에서는 베타-카로틴,

canthaxanthin, lutein, zeaxanthin 이 각각 11.5%, 22.2%, 28.8%, 19.8%로 구성되어 있다고 하였다. 하지만 동일 어종이라도 환경요인 즉, 양식장소나 사료등에 따라서도 카로티노이드의 조성비가 달라진다고 알려져 있다.<sup>13)</sup> 송어지방질과 송어에서 추출한 효소액을 모델시스템에서와 같이 반응시킨 반응경과에 따른 카로티노이드의 변화를 살펴 본 결과는 Fig. 3과 같다. 송어지방질에 있는 카로티노이드 함

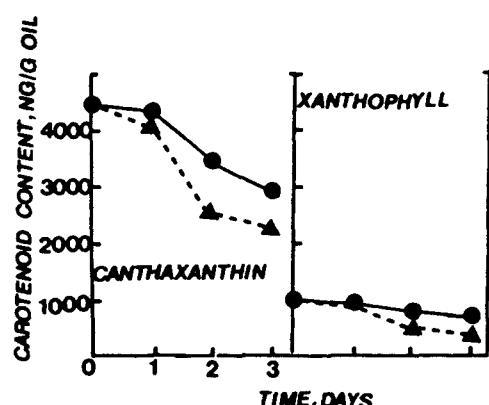
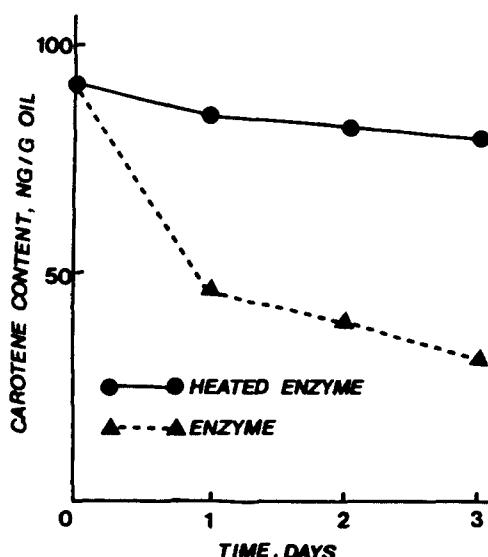


Fig. 3. Effect of lipoxygenase related co-oxidation on the contents of total carotenoids (above) and canthaxanthin or xanthophyll(below) in rainbow trout during the reaction in model system(see condition in Fig. 1 and legend in Table 1)

유량은 효소와의 반응에 의해 크게 감소하여 반응 3일 경과후에는 잔존량이 초기함량의 48% 인데 반해 대조군에서는 68%의 잔존량을 보였다. 특히 카로틴은 반응 24시간에서 급속한 감소를 보였는데 효소를 반응시킨 군에서는 1.84mg/hr., 대조군에서는 0.26mg/hr.의 감소율을 보여 효소와의 반응에 의해 카로틴이 7배정도 빨리 산화되었다. Carotenoid ketone 형태인 canthaxanthin은 반응 1일째까지는 대조군과 큰 차이를 보이지 않다가 그 이후로는 다소의 차이를 보였다. 가장 감소율이 큰 반응 1일 ~ 2일사이에 효소를 반응시킨 군에서는 67mg/hr, 대조군에서는 37mg/hr의 감소율을 나타내었으며, xanthophyll류인 lutein과 zeaxanthin도 반응 3일 후에는 효소첨가군과 대조군에서 각각 초기함량의 39%, 73%의 잔존율을 보였다.

한편, 그림에는 나타내지 않았지만 무지개송어의 살부분만을  $-10^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에서 30일 동안 저장한 뒤 카로티노이드의 구성성분을 분석했을때 lutein과 zeaxanthin은 특히 현저하게 파괴되어 흔적량만이 존재하였다. 이것으로 보아 xanthophyll류는  $-10^{\circ}\text{C}$ 에서도 자동산화되므로 카로틴류에 비해 그 산화안정성이 떨어짐을 알 수 있었다. Stone<sup>14)</sup>은 불포화지방산의 존재 하에서 송어아가미에 있는 리폭시개나아제에 의한 베타-카로틴의 bleaching현상에 대해 연구했는 데 기질이 되는 지방산중 리놀레산보다는 아라키돈산이 반응계에 존재할 때 베타-카로틴의 bleaching현상이 더 현저하게 나타난다고 하였다. Tsukuda<sup>15)</sup>는 어류중의 붉은 색소는 일반적으로 불안정하여, 저장동안 빠르게 사라진다고 하였으며, 카로티노이드를 변색시킬 수 있는 효소의 활성은 지용성 항산화제에 의해 저해된다고 보고하였다. 또한 무지개 송어를 구성하는 주요 카로티노이드인 canthaxanthin은 비타민 A의 전구체로서의 영양적인 가치는 없지만 다른 중요한 생리적인 활성을 가진다고 알려져 있다.<sup>16)</sup>

### 토코페롤의 변화

무지개 송어 지방질과 효소를 반응시킨 뒤 반응경과에 따른 토코페롤 함량 변화를 관찰하였으며 Fig. 4와 같이 토코페롤 동족체로는 알파-토코페롤과 베타-토코페롤이 검출되었다. 송어지방질 1g당 알파-토코페롤은 22.4ug, 베타-토코페롤은 47.1ug이었으며, 특히 효소를 반응시킨 군에서는 알파-토코페롤이 현저히 감소하여 초기 함량의 16%의 잔존량을 보인데 반해 대조군에서는 81%를 나타

내었다. 베타-토코페롤은 반응 2일째에서 3일째사이에 두 반응계간에 다소 차이를 보였으며 효소를 반응시킨 군에서는 71%, 대조군에서는 81%를 나타내었다. 그러나 두 반응계간의 차이를 알파-토코페롤과 비교해 볼때는 다소 미미한 경향을 보여주었다. 바다송어의 살부분에는 알파-토코페롤과 gamm-토코페롤이 함유되어 있다고 알려져 있으며<sup>17)</sup> 일반적으로 토코페롤의 비타민 E로서의 활성은  $\alpha > \beta > \gamma$  순이나 항산화력의 크기는  $\delta > \gamma > \beta > \alpha$  순으로 알려져 있다<sup>18~20)</sup>. 또한 Koskas<sup>17)</sup>등은 linoleic acid 인산 완충용액에서 토코페롤의 감소경향은 농도에 따라 다소 차이가 있으나  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$  순으로 됨을 보고한바 있고 이것은 본 실험결과와도 일치하였다.

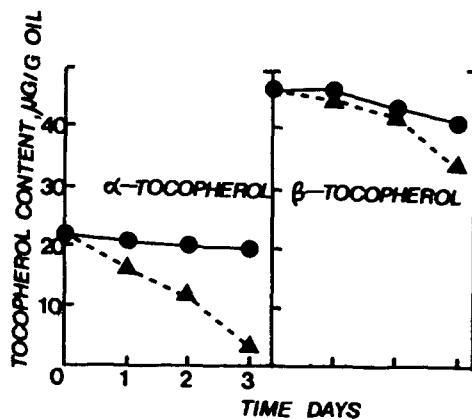


Fig. 4. Effect of lipoygenase related co-oxidation on the tocopherol contents in rainbow trout during the reaction in model system(See condition in Fig. 1 and legend in Table 1)

### 요약

무지개 송어의 지방질 산화에 미치는 리폭시개나아제의 영향을 모델시스템을 이용하여 살펴 보았다. 이를 위한 모델시스템은 무지개 송어에서 추출한 지방질과 리폭시개나아제를 함께 Tween 20의 존재하에 균질화 한 후 pH 7.4, 온도  $23^{\circ}\text{C}$  3일간 반응시켰다. 이와같은 모델시스템의 조건에서 3일 경과후의 리폭시개나아제는 초기활성의 43% 만이 잔존하였다. 송어지방질 구성성분으로서 반응시키기 전에는 나타나지 않던 유리 지방산이 3일간 반응시킨 후에는 20%로 증가한 반면 triglyceride함량은 반응전 82%에서 59

## 모델시스템에 있어서 무지개 송어 지방질의 산화에 대한 Lipoxygenase의 영향

%로 감소하였다. 지방산중에서는 특히 리놀레산 함량이 효소와 반응전에는 54%이던 것이 반응후에는 13%로 크게 감소하였다. 카로티노이드는 베타-카로틴, 알파-카로틴, canthaxanthin, lutein, zeaxanthin 등으로 구성되어 있었고 이중 80%가 canthaxanthin이였으며 이 성분이 효소촉매에 의한 산화정도가 함량면에서 가장 컸다. 또한 카로틴의 경우 모델시스템에서의 효소를 반응시킨 군에서는 최대 산화 속도가 1.84ng hr. 대조군에서는 0.26ng hr.를 나타내어 효소와의 반응이 7배정도 빨랐다. 토코페롤로는 알파-토코페롤과 베타-토코페롤이 검출되었으며 알파-토코페롤이 베타-토코페롤에 비해 효소 촉매에 의한 반응에서 산화정도가 빠른 경향을 보였다.

### 참고문헌

1. Weenen, H. and Porter, N. A. : Autoxidation of model membrane systems : Cooxidation of polyunsaturated lecithins with steroids, fatty acids, and  $\alpha$ -tocopherol. *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 5216(1982)
2. Tsukuda, N. and Amano, K. : Studies on the discoloration of red fishes, IV. discoloration of astaxanthin, tunaxanthin, and  $\beta$ -carotene by the tissue hemoglyconates of fishes. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 33 (10), 962(1967)
3. 山口邦子・豊水正道：魚皮抽出液の脂質酸化促進作用. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 50(12), 2049(1984)
4. German, J. B., Bruckner, G. G. and Kinsella, J. E. : Lipoxygenase in trout gill tissue acting on arachidonic, eicosapentanoic and docosahexanoic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 875, 12(1986)
5. Josephson, D. B., Lindsay, R. C. and Stuiver, D. A. : Enzymic hydroperoxide initiated effects in fresh fish. *J. Food. Sci.*, 52(3), 596(1987)
6. George, B. and Goodwin, T. W. : *Carotenoid Chemistry and Biochemistry*. Pergamon Press, p. 316(1981)
7. Syvaaja, E. L., Salmoninen, K., Pillronen, V., Varo, P., Kerojoki, O. and Kovistoinen, P. : Tocopherols and Tocotrienols in finnish foods : fish and fish products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62(8), 1245(1985)
8. Hsieh, R. J. and Kinsella, J. E. : Lipoxygenase-catalyzed oxidation of N-6 and N-3 polyunsaturated fatty acids : relevance to and activity in fish tissue. *J. Food. Sci.*, 51(4) 940(1986)
9. Weber, E. J. : Carotenoids and tocots of corn grain determined by HPLC. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64(8) 1129(1987)
10. 藤野安产：脂質分析法入門.學會出版セント-, 東京, p. 155(1980)
11. Stahl, E. : *Thin Layer Chromatography*. Academic Press, New York, p. 1(1969)
12. Hsieh, R.J., German, J.B. and Kinsella, J.E. : Lipoxygenase in fish tissue : some properties of the 12-Lipoxygenase from trout gill. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 68(1988)
13. 秦滿夫, 片山輝久, 松野隆南：水産動物のカロテノイド, 日本水產學會編, p. 34(1987)
14. Stone, R.A. and Kinsella, J. E. : Bleaching  $\beta$ -carotene by trout gill lipoxygenase in the presence of polyunsaturated fatty acid substrate. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 806(1989)
15. Tsukuda, N. : Studies on the discoloration of red fishes. *Bull. Tokai. Reg. Fish Res. Lab.*, No.70, 103 (1972)
16. Olson, J. A. : Biological actions of carotenoids. *J. Nutri.*, 119(1), 94(1989)
17. 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)
18. 김혜경, 최홍식 : 베타-카로틴과 알파-카로틴의 산화 안정성에 대한 리폭시제나제의 영향. *한국식품과학회지*, 24, 37(1992)
19. 김혜경, 최홍식, 송영옥 : 고형상의 모델시스템에 있어서 리놀레산의 산화에 미치는 리폭시제나제, 카로틴, 토코페롤 및 수분활성의 영향. *한국식품과학회지*, 21, 23 (1992)
20. 김혜경, 최홍식 : 액상모델시스템에서 베타-카로틴의 co-oxidation에 대한 리폭시제나제 및 기타 관련 인자의 영향. *한국영양식량학회지*, 24, 202(1995)