

## 액상 모델 시스템에서 베타-카로틴의 Co-oxidation에 대한 리폭시게나아제 및 기타 관련 인자들의 영향

김혜경 · 최홍식<sup>†</sup>

부산대학교 식품영양학과

### Effect of Lipoxygenase and Other Factors on the Co-oxidation of $\beta$ -Carotene in Aqueous Model System

Hae-Gyoung Kim and Hong-Sik Cheigh<sup>†</sup>

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

#### Abstract

The effects of lipoxygenase, linoleic acid, tocopherol and pH on the co-oxidation of  $\beta$ -carotene in the aqueous system were studied. It showed that the co-oxidation of  $\beta$ -carotene was noticeable at both pH 7.4 and 9.0. As the concentrations of linoleic acid and  $\beta$ -carotene increased, the rate of oxidation of  $\beta$ -carotene tended to be increased. However,  $\alpha$ - and  $\delta$ -tocopherol retarded the co-oxidation of  $\beta$ -carotene. As the concentrations of tocopherols increased,  $\beta$ -carotene was more stabilized, generally. But low concentration of  $\alpha$ -tocopherol ( $10^{-4}$ M) acted more effective antioxidant than high concentration of it ( $10^{-3}$ M) at pH 7.4. The antioxidant effect of tocopherol greatly depended on pH; it was outstanding at pH 7.4.

Key words :  $\beta$ -carotene, aqueous system, lipoxygenase, co-oxidation, linoleic acid, tocopherol

#### 서 론

카로티노이드의 안전성은 식품의 종류에 따라 다양하게 나타나지만 자신이 불포화된 구조를 가지기 때문에 대체적으로 산화되기 쉬운 특성을 가지고 있다. 특히 리폭시게나아제에 의한 베타-카로틴의 파괴 또는 탈색 현상은 공존하고 있는 리놀레산의 산화시 만들어지는 유리기에 의해 카로티노이드가 함께 산화되기 때문에 일어나는 co-oxidation에 의한 것으로 알려졌다<sup>1,2</sup>. 이와 같이 베타-카로틴은 자신이 산화됨으로써 분해되기까지 지방질을 절약하는 항산화제 역할을 하며 이외에도 항암작용, 노화방지 등의 생리적 활성을 나타낸다고 하여 많은 연구가 진행되고 있다<sup>3</sup>. 카로티노이드의 co-oxidation에는 대두 Type I 리폭시게나아제 보다 Type II 리폭시게나아제가 더 영향을 미친다고 하며 이들 효소를 혼합하게 되면 상승효과를 나타낸다고 하였다<sup>4</sup>. 식물조직에서의 리폭시게나아제에 의한

카로티노이드 bleaching (탈색) 활성은 잘 알려져 있고<sup>5</sup> 또한 액상 모델 시스템에서 대두 리폭시게나아제에 의한 베타-카로틴 co-oxidation 양상을 관찰하였을 때 반응속도는 카로틴 농도와 함께 증가한다고 보고된 바 있다<sup>6</sup>. 이와 같이 베타-카로틴의 co-oxidation에 대해서는 부분적으로 알려져 있지만, 리폭시게나아제 촉매 하에서 베타-카로틴의 co-oxidation 반응에 영향을 줄 수 있는 여러 가지 인자들에 대해서는 체계적으로 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구는 액상 모델 시스템에서 베타-카로틴의 산화 속도에 대한 리폭시게나아제, pH, 리놀레산 농도, 토코페롤 동족체의 영향에 대해서 검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 시약

베타-카로틴과 알파-토코페롤 그리고 99%-리놀레산은 Sigma Chemical Co.(USA)의 것을 각각 사용하였으며 리폭시게나아제도 같은 회사의 Soybean Type I

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

을 사용하였다.

### 각 용액의 조제

리놀레산용액은 리놀레산을 7.5% 농도로 에탄올에 녹이고 Tween 80을 10% 농도로 에탄올에 녹인 다음 위의 용액들을 각각 1ml와 0.3ml를 취하여 혼합한 후, 0.5% EDTA용액 5ml를 이 혼합용액에 가하고 난 뒤, 1M NaOH로서 pH 9로 조정하였다.

베타-카로틴용액은 베타-카로틴 25mg과 Tween 80 0.9ml를 25ml의 chloroform에 완전히 녹여 농축한 다음 0.25% EDTA용액 10ml를 가하여 만들었다.

토코페롤용액으로는  $\alpha$ -토코페롤과  $\delta$ -토코페롤을 사용하였으며 농도에 따른 토코페롤 함량을 소량의 0.5% Tween 80-에탄올용액으로 녹인 다음 3차 증류수로 희석하여 사용하였다.

### 모델 시스템의 조제 및 분석<sup>7)</sup>

액상 모델 시스템으로는 리놀레산용액과 베타-카로틴용액과 토코페롤용액을 각각 0.5ml씩 취하고 여기에 완충용액 8.5ml를 넣어서 혼합한 뒤 25°C에서 반응시켰다. 사용한 완충용액 종류로는 pH 5의 경우는 acetate 완충용액, pH 7.4는 citrate-phosphate 완충용액, pH 9는 borate 완충용액이었다. 반응시킨 용액 1.5ml를 spectrophotometer(Cecil CE 599, England) 상에 넣고 리폭시게나아제용액 0.1ml를 넣은 즉시, 흡광도 450nm에서 베타-카로틴의 산화 양상을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### pH 및 리놀레산 농도에 따른 영향

액상 시스템에서 리폭시게나아제 촉매 하에서 베타-카로틴의 co-oxidation에 미치는 pH의 영향을 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. pH 7.4와 pH 9.0에서는 리폭시게나아제에 의한 베타-카로틴의 co-oxidation 현상이 현저하여 베타-카로틴의 감소가 뚜렷한 반면, pH 5.0에서는 리폭시게나아제가 실패했거나 반응 시스템에서 활성을 나타내지 않은 것으로 생각되었다. pH 7.4와 pH 9.0에서 베타-카로틴의 co-oxidation 양상은 두 pH 간에 큰 차이를 보이지 않았으며, 또한 Fig. 1에는 나타내지 않았지만 리폭시게나아제와 리놀레산이 존재하지 않을 때는 측정된 모든 pH에서 베타-카로틴의 산화는 일어나지 않았다. 대두 Type I 리폭시게나아제는 대두에 가장 많이 존재하는 isoenzyme이며 또한 Type II 나 Type III 리폭시게나아제에 비해 매우 안정하기 때문

에 co-oxidation 반응에 대해 Type I 리폭시게나아제가 매우 중요한 촉매제가 될 수 있다는 여러 보고가 있었다<sup>8,9)</sup>. 실험에 사용한 리폭시게나아제는 대부분이 대두 Type I 리폭시게나아제이므로 pH 9.0에서 베타-카로틴의 탈색 효과가 뛰어난 것으로 보여진다<sup>10)</sup>. 그러나 pH 7.4의 반응 시스템에서와 큰 차이가 나지 않는 점으로 보아 Type II 나 Type III 리폭시게나아제가 미량 존재하더라도 이들의 효과를 기대할 수 있으며 또한 Type I 리폭시게나아제의 pH에 대한 specificity가 강한 것은 아니라고 생각되었다.

베타-카로틴의 co-oxidation에 미치는 리놀레산의 영향을 농도를 달리하여 pH 7.4와 pH 9.0에서 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 리놀레산의 농도가 가장 높았던  $10^{-2}$ M에서는 co-oxidation 현상이 현저한 반면, 이보다 농도가 낮은  $1.4 \times 10^{-4}$ ~ $5.5 \times 10^{-4}$ M에서는 베타-카로틴의 산화가 뚜렷하지 않았다. 이것으로 보아 리놀레산의 농도가 높을수록 베타-카로틴의 산화 양상이 심함을 알 수 있었다. Ikediobi와 Synder<sup>11)</sup>의 연구에서는 베타-카로틴과 리놀레산이 리폭시게나아제에 대해 경쟁적 저해제로 작용하여 베타-카로틴에 대해서 리폭시게나아제가 직접적으로 공격할 수 있다고 보고하였다. 그러나 최근의 연구들에 의하면 베타-카로틴이 리폭시게나아제에 대한 직접적인 기질이 될 수는 없으며

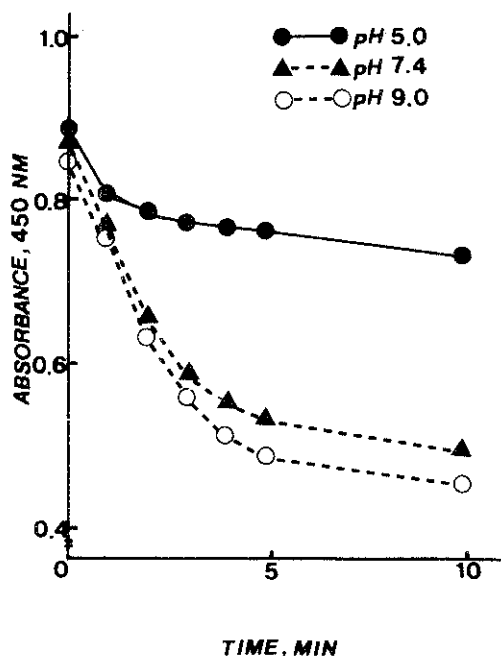


Fig. 1. Effect of pH on the co-oxidation of  $\beta$ -carotene by lipoxygenase in the presence of linoleic acid.

지방질 산화에서 생성된 peroxide로 인해 카로티노이드가 산화되므로 peroxide 농도가 증가할수록 카로티노이드의 산화 속도가 빨라진다고 하였다<sup>11)</sup>. 또한 Kanner와 Budowski<sup>12)</sup>의 연구에 의하면 카로틴 산화는 리놀레산과의 반응에 의해 현저하게 증가하며 리놀레산의 농도를 증가시키면 따라 베타-카로틴의 유도 기간이 감소한다고 하여 본 연구와 일치하는 경향을 보였다. pH 7.4와 pH 9.0 반응시스템의 경우를 서로 비교해 보면 비슷한 양상을 보이기는 하나 pH 7.4의 경우 보다

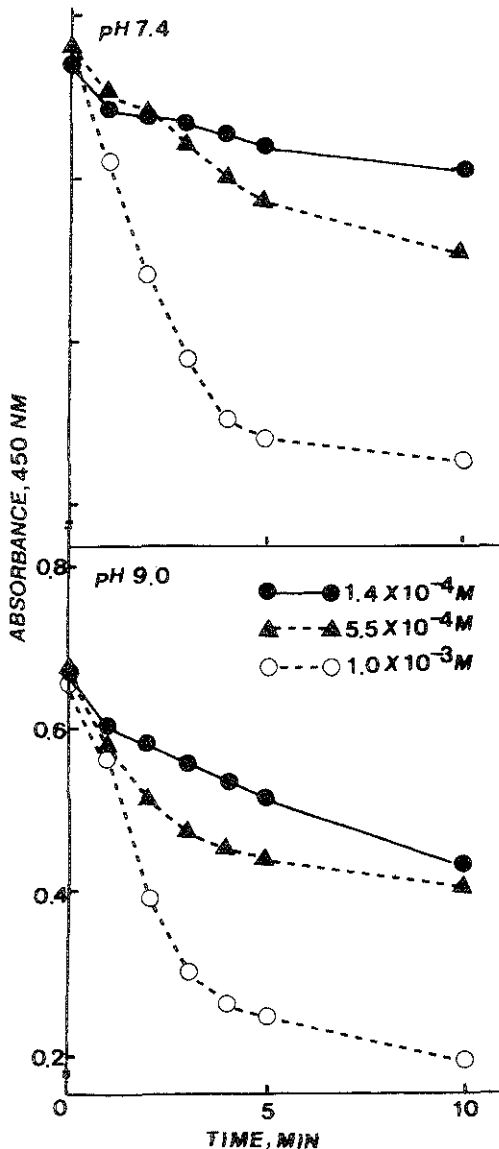


Fig. 2. Effect of linoleic acid concentration on  $\beta$ -carotene degradation by lipoxygenase in the aqueous system.

는 pH 9.0에서 베타-카로틴의 산화 속도가 조금 빠름을 볼 수 있었다. 이것은 대두 Type I 리폭시게나아제의 pH에 대한 특이성으로 Fig. 1과 유사한 경향이라 사료된다. Barimalaa와 Gordon<sup>7)</sup>은 대두 리폭시게나아제 중에서 Type II 리폭시게나아제가 베타-카로틴의 co-oxidation 반응을 촉매하는 주요 효소라고 한 반면 Ramadoss 등<sup>8)</sup>의 연구에서는 카로틴의 산화는 두 isoenzyme을 조합하여 사용할 때 가장 잘 일어나지만 단독의 경우는 Type I이 베타-카로틴의 co-oxidation에 대해 가장 활성이 크다고 하여 서로 상반된 보고를 하였다. 그러나 본 실험에 사용한 리폭시게나아제는 Type I이므로 대두 중에 가장 많이 존재하며 반응 결과가 pH 9에서 활성도가 가장 높은 것으로 나타났기 때문에 베타-카로틴의 co-oxidation을 관찰하기에는 적합한 Type의 리폭시게나아제라고 사료되었다.

#### 베타-카로틴과 토코페롤 농도에 따른 영향

액상 시스템에서 베타-카로틴의 co-oxidation에 미치는 베타-카로틴 농도의 영향을 pH를 달리하여 살펴 본 결과는 Fig. 3과 같다. pH 7.4 반응 시스템에서는  $1.4\mu\text{M}$ 의 베타-카로틴 보다 농도가 높은  $2.8\mu\text{M}$ 과  $7\mu\text{M}$ 에서는 베타-카로틴의 산화 속도가 더 빨랐지만  $2.8\mu\text{M}$ 과  $7\mu\text{M}$ 의 베타-카로틴 농도간에는 차이를 보이지 않았다. 이것으로 보아 베타-카로틴의 농도가 높을수록 산화 속도도 증가하지만 그 농도에는 한계가 있는 것으로 생각되었다. 가장 산화 속도가 빨랐던 반응 초기 3분까지의 베타-카로틴 산화 속도는  $1.4\mu\text{M}$  농도에서는 12.5%/min인 반면  $7\mu\text{M}$  농도에서는 18.3%/min로 베타-카로틴의 농도가 높을수록 산화 속도도 빠름을 보여주었다. pH 7.4에서 보다는 베타-카로틴 농도를 낮춘 pH 9.0 반응 시스템에서는  $0.7\mu\text{M}$ 에서  $2.8\mu\text{M}$ 로 농도가 증가함에 따라 반응 초기 3분까지의 베타-카로틴의 산화 속도가 각각 11%/min, 21.7%/min로 베타-카로틴의 농도가 증가할수록 산화 속도도 급속히 빨라지는 경향을 보였다. Barimalaa와 Gordon<sup>7)</sup>의 연구에서는 카로틴 산화 속도가 카로틴 농도와 함께 증가하며 이것은 형성된 peroxy radicals에 대해 베타-카로틴과 리놀레산이 경쟁하기 때문으로 카로틴 산화 속도와 카로틴 농도간에는 비례 관계에 있다고 하였다.

베타-카로틴의 산화에 대해 가장 효과가 있다고 알려진 항산화제인 토코페롤의 영향을 관찰하기 위해 알파-토코페롤과 델타-토코페롤 두 종류를 실험에 사용하였다. 리폭시게나아제 촉매 하에서 베타-카로틴의 co-oxidation에 미치는 알파-토코페롤의 영향을 pH를 달리하

여 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 알파-토코페롤을 반응시키게 되면 베타-카로틴의 co-oxidation 속도는 현저히 떨어지지만 pH의 조건에 따라 아주 다른 양상을 보였다. 즉 pH 7.4 반응 시스템에서는  $10^{-3}M$  보다 농도가 낮은  $10^{-4}M$ 과  $10^{-5}M$ 에서 항산화능이 뛰어나며, 또한  $10^{-3}M$  보다는  $10^{-4}M$ 에서 항산화능이 좋음을 나타내었다. 즉 알파-토코페롤의 농도가 높을수록 항산화 효과는 반드시 뛰어난 것은 아니며, 적정 수준의 알파-토코페롤 농도에서 가장 뛰어난 항산화능을 보여주었다. 알파-토코페롤과의 반응 유무에 따라 가장 큰 차이를 보이는 반응 시간 4분대에서 살펴보면 알파-토코

페롤이 없는 시스템에서는 베타-카로틴 잔존량이 41%인데 반해  $10^{-4}M$  알파-토코페롤 반응군에서는 85%로 알파-토코페롤과의 반응에 의해 44% 정도의 베타-카로틴이 더 많이 잔존함을 관찰할 수 있었다. pH 9.0 반응 시스템에서는 가장 농도가 높은  $10^{-3}M$  농도에서 베타-카로틴이 가장 안정함을 나타내어 pH 7.4 시스템과는 현저히 다른 결과를 보여주었다. 그러나 이 보다 농도가 낮은  $10^{-4}M$ 과  $10^{-5}M$  농도에서는 큰 항산화 효과를 기대하기는 어려웠다. 이와같이 베타-카로틴의 co-oxidation에 대한 알파-토코페롤의 작용이 pH 7.4와 pH 9.0 반응 시스템에서 현저히 다른 양상을 보이는 것

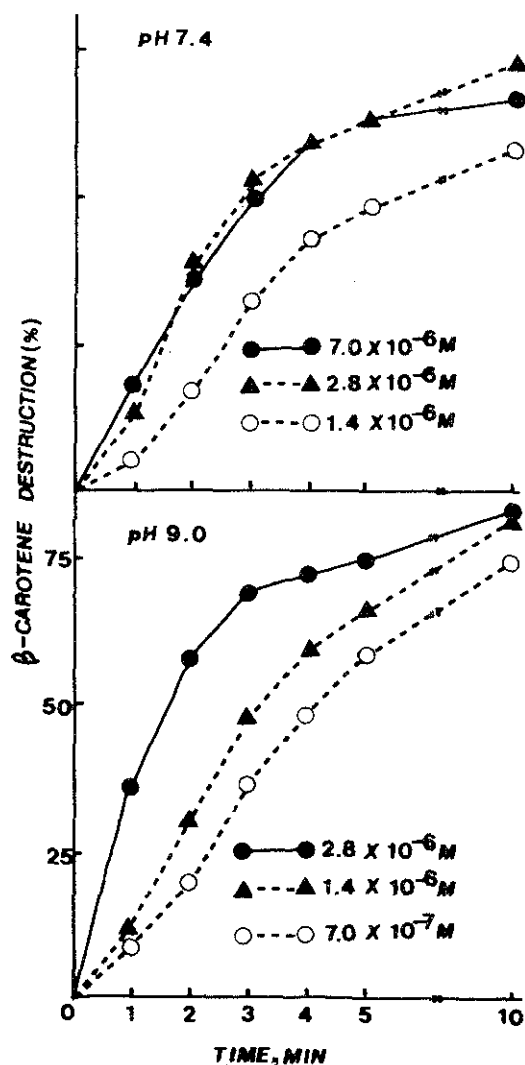


Fig. 3. Effect of  $\beta$ -carotene concentration on the co-oxidation of  $\beta$ -carotene by lipoygenase in the presence of linoleic acid.

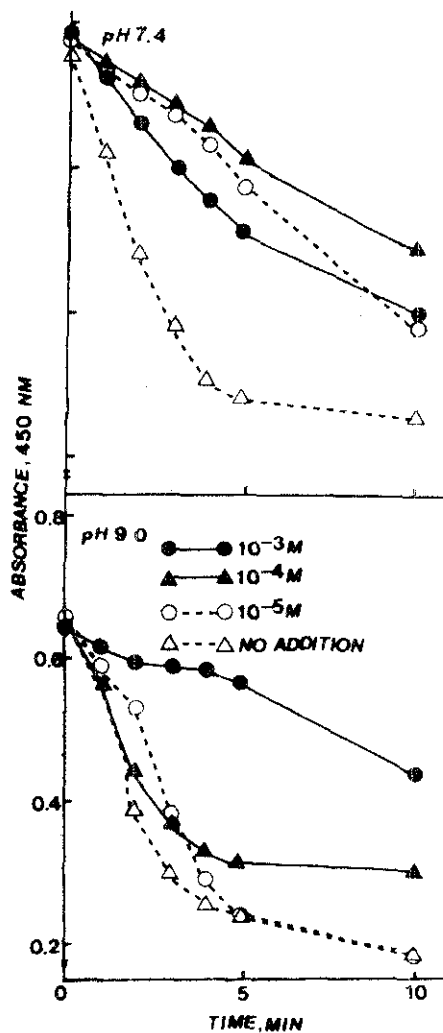


Fig. 4. Effect of  $\alpha$ -tocopherol concentration on the co-oxidation of  $\beta$ -carotene by lipoygenase in the presence of linoleic acid.

은 순수한 pH의 영향으로 사료되었다. 즉 pH 9.0에서는 알파-토코페롤의 농도가 높을수록 항산화 효과가 큰 반면 pH 7.4에서는 적정 수준의 알파-토코페롤 농도에서 최대의 항산화능을 보임을 알 수 있었다. 리놀레산과 알파-토코페롤이 공존하는 반응계에서는 이들의 몰비 (mol 알파-토코페롤/mol linoleic acid)가  $5 \times 10^{-3}$  이상일 때 알파-토코페롤은 pro-oxidant로 작용한다고 보고되어 있으나<sup>13)</sup> 본 실험에서는 이러한 효과가 나타나지 않았다. 또한 생체 내에서 적정 수준의 토코페롤은 소장벽 내에 있는 베타-카로틴이 효소에 의해 산화될 때 베타-카로틴을 보호할 수 있지만 고농도의 토코페롤은 카로틴의 파괴를 증가시킬 수도 있다고 보

고하였다<sup>14)</sup>. 베타-카로틴의 co-oxidation에 미치는 델타-토코페롤의 농도별 영향을 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다. 대체적으로 델타-토코페롤의 농도가 높을수록 베타-카로틴의 산화 안정성이 큰 경향을 보였다. pH 7.4 시스템에서는 베타-카로틴의 co-oxidation에 대한 델타-토코페롤의 농도별 효과가 뚜렷하지만 pH 9.0 시스템에서는 두 농도간에 큰 차이를 보이지 않았으며 pH 7.4 시스템에서 보다 항산화 효과가 훨씬 미약함을 나타내었다. 이러한 결과는 Fig. 4의 알파-토코페롤의 항산화 효과와 비교해 볼 때 델타-토코페롤의 농도가 낮았다는 점과 또한 토코페롤과 pH 사이의 어떤 상호작용으로 보여졌으며 이 부분에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하리라고 생각된다. pH 9.0 시스템에서  $10^{-4}M$ 과  $10^{-5}M$  델타-토코페롤 두 농도간의 항산화제 효과는 반응 초기 3분까지는 큰 차이를 보이지 않다가 그 후의 반응 시간에서는 다소 차이를 보였다. 어떤 연구에서는 알파-토코페롤은 낮은 농도에서 항산화제 역할을 하는 반면 감마-토코페롤이나 델타-토코페롤은 높은 농도에서 항산화제로 작용한다고 보고된 바 있으므로<sup>15)</sup> 본 연구와 일치하는 경향을 보였다. 그러나 또 다른 연구에서는 알파-토코페롤에 비해 델타-토코페롤의 항산화능이 크다고 하여 본 결과와는 다른 보고를 하였다<sup>16)</sup>.

결론적으로 이와같은 기초적인 모델 시스템에서 얻은 자료들을 참고로 하여 식품 중에 존재하는 카로티노이드의 산화 안정성에 대한 리폭시게나아제의 영향에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다고 사료되었다.

## 요 약

액상 모델 시스템에서 베타-카로틴의 co-oxidation에 대한 리폭시게나아제, pH, 리놀레산과 베타-카로틴 그리고 토코페롤의 영향에 대해 검토하였다. pH 9.0에서 리폭시게나아제에 의한 베타-카로틴의 co-oxidation 현상이 특히 현저하였다. 그리고 리놀레산과 베타-카로틴의 농도가 증가할수록 베타-카로틴의 산화 속도도 이에 비례하는 경향을 보였으며 pH 9.0 반응 시스템에서 이러한 산화 현상이 더 뚜렷하였다. 베타-카로틴의 co-oxidation에 대한 토코페롤의 항산화 효과에서는 pH 조건에 따라 아주 다른 양상을 보였다. 즉 알파-토코페롤의 경우, pH 7.4 시스템에서는  $10^{-4}M$  농도에서, pH 9.0 시스템에서는  $10^{-5}M$  농도에서 가장 효과적인 항산화제로 작용했다. 델타-토코페롤의 항산화 효과도 알파-토코페롤과 유사하게 pH의 영향을 많이 받았으며 대체

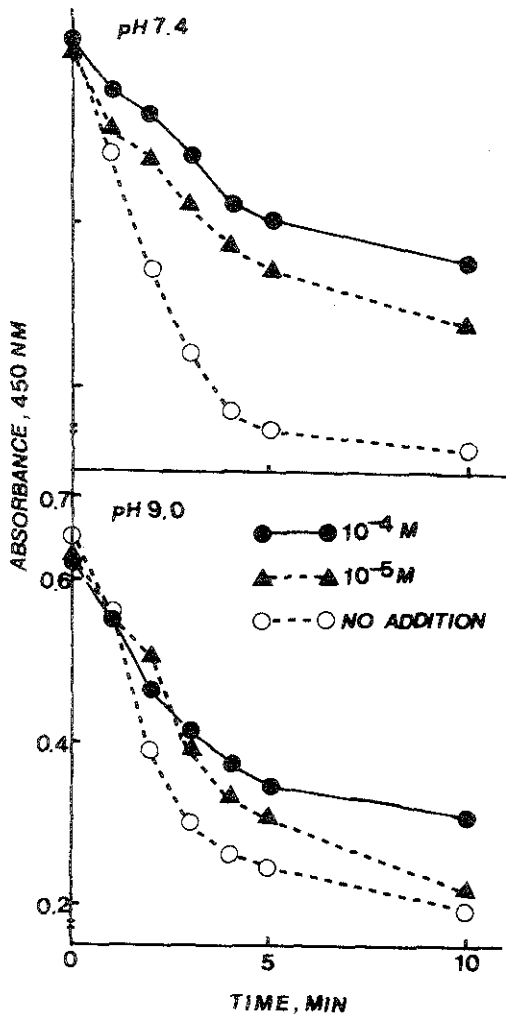


Fig. 5. Effect of  $\delta$ -tocopherol concentration on the co-oxidation of  $\beta$ -carotene by lipoxygenase in the presence of linoleic acid.

적으로 농도가 높을수록 베타-카로틴의 산화 안정성이 큰 경향을 보였다.

## 문 헌

1. 김혜경, 최홍식 : 베타-카로틴과 알파-토코페롤의 산화 안정성에 대한 리폭시게나아제의 영향. 한국식품과학회지, **24**, 37(1992)
2. 김혜경, 최홍식, 송영옥 : 고형상의 모델 시스템에 있어서 리놀레산의 산화에 미치는 리폭시게나아제, 카로틴, 토코페롤 및 수분 활성의 영향. 한국영양식량학회지, **21**, 23(1992)
3. George, B. and Goodwin, T. W. : Carotenoid chemistry and biochemistry. Pergamon Press, p.316(1981)
4. Stumpf, P. K. and Conn, E. E. : *The biochemistry of plants*. Academic Press, New York, Vol.4, p.132(1980)
5. Kahl, G. : Biochemistry of wounded plant tissue. Walter de Gruyter, Berlin · New York, p.174(1978)
6. Toshiro, H., Sunao, K., Yasuo, N. and Seiichiro, N. : Partial purification and properties of pumpkin lipoxigenase with carotene-bleaching activity. *J. Food Biochemistry*, **10**, 55(1986)
7. Barimalaa, I. S. and Gordon, M. H. : Cooxidation of  $\beta$ -carotene by soybean lipoxigenase. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 685(1988)
8. Ramadoss, C. S., Pistorius, E. K. and Axelrod, B. : Coupled oxidation of carotene by lipoxigenase requires two isoenzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **190**, 549(1978)
9. Ikediobi, C. O. and Snyder, H. E. : Cooxidation of  $\beta$ -carotene by an isoenzyme of soybean lipoxigenase. *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 124(1977)
10. Min, D. B. and Smouse, T. H. : Flavor chemistry of fats and oils. American Oil Chemists' Society, p.175(1985)
11. El-Tinay, A. H. and Chichester, C. O. : Oxidation of  $\beta$ -carotene. Site of initial attack. *J. Org. Chem.*, **35**, 2290(1979)
12. Kanner, J. and Budowski, P. : Carotene oxidizing factors in red pepper fruits (*Capsicum annum* L.) : Effect of ascorbic acid and copper in a  $\beta$ -carotene-linoleic acid solid model. *J. Food Sci.*, **43**, 524(1978)
13. Cillard, J., Cillard, P. and Cormier, M. : Effect of experimental factors on the prooxidant behavior of  $\alpha$ -tocopherol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **57**, 255(1980)
14. Chandra, R. K. : *Nutrition and immunology*. Alan R. Liss, Inc., New York, p.139(1988)
15. 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**, 1466(1984)

(1994년 11월 29일 접수)