

철과 구리 이온으로 산화 촉진시킨 난황유 모델시스템에서 Phosvitin의 항산화 효과

이성기·김용재¹

강원대학교 축산가공학과, ¹롯데 햄·우유(주)

The Influence of Phosvitin on the Inhibition of Iron-, and Copper- catalyzed Oxidation in Egg Oil Model System

S. K. Lee and Y. J. Kim¹

Department of Animal Food Science and Technology, Kangwon National University,
Chunchon, Korea, 200-701

¹Lotte Ham & Milk Co., Ltd

ABSTRACT : Phosvitin, an iron chelating protein in egg yolk, was measured for its ability to inhibit lipid oxidation in egg oil model system. Phosvitin(75 μ M) could inhibit both iron(50~150 μ M) and copper(5~15 μ M) catalyzed oxidation of egg oil, and much more effective in the presence of iron than copper. The antioxidant activity of phosvitin in egg oil decreased with increasing temperature up to 121 $^{\circ}$ C. But phosvitin was relatively heat stable maintaining 79 and 73% of its antioxidant activity after being heated for 6 min at 100 $^{\circ}$ C and 2 min at 121 $^{\circ}$ C, respectively.

(Key words: phosvitin, antioxidant activity, egg oil, iron and copper catalyzed oxidation)

서 론

Phosvitin은 계란의 노란자에 함유된 단백질로서 인산과 결합되었으며 체내에서 철을 운반하는 역할을 한다. Phosvitin의 분자량은 36,000 ~ 40,000으로 난황 단백질을 초원심 분리할 경우 침전물(granule)중 고밀도의 단백질이며, 이 침전물중 약 16%를 차지하고 있다(Bernardi와 Cook, 1960). 0.1M MgSO₄에 침전되며 전체 난황중의 인(P)의 80%에 해당되는 10%의 인을 함유한다(Causeret 등, 1991).

Phosvitin은 철이온을 강력하게 결합하는 능력이 있고, 이외 금속이온인 구리, 마그네슘도 결합하는 성질을 지니고 있다. 철에 대한 phosvitin의 결합능력은 고온고압(autoclaving)에서도 쉽게 유리되지 않는다(Albright 등, 1984). 따라서 금속이온의 봉쇄작용(chelation) 때문에 지방산화가 촉진되는 것을 방지할 수 있어 천연 산화방지제로서 이용 가능성이 높아지고 있다. 그러나 phosvitin의

Fe²⁺ 촉매작용 저해능력은 식품의 살균온도(61.2 $^{\circ}$ C, 4min)에서는 별 영향을 받지 않으나, 멸균온도(121 $^{\circ}$ C, 10min)에는 영향을 받는다고 하였다(Lu, 1986). Lu와 Baker(1986)는 기계발골육(mechanically deboned meat)으로 제조된 패티에 1, 2, 3%의 난황유와 0.0625%의 phosvitin을 첨가하여 163 $^{\circ}$ C에서 가열한 후 1~2 $^{\circ}$ C에 보관하며 thiobarbituric acid(TBA)를 측정된 결과 조리 또는 비조리구 모두에서 산화가 억제되었다고 결론을 내린 바 있다.

이와 같이 계란 난황속에 있는 phosvitin이 항산화 작용이 있다고 보고되었지만 식품의 첨가제로서의 가능성에 대한 구체적인 정보는 지금까지 매우 제한적이다. 따라서 본 연구는 의도적으로 철과 구리 이온으로 산화를 촉진시킨 난황유 모델시스템에서 금속이온의 농도, 가열 정도, 저장시간에 따른 phosvitin의 지방산화 억제효과를 구명하기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난황과 Phosvitin

시료로 사용된 계란은 4℃에서 보관하면서 저장 10일 이내의 것만 사용하였다. Phosvitin은 Sigma(P-1253)에서 구입하여 -20℃에서 보관하며 실험에 사용하였다. 산화 촉진용 금속물질(metallic oxidation catalysts)로 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 를 사용하였다. 기타 모든 시약은 특급으로 사용하였다.

2. 난황유의 추출 및 모델시스템 제조

계란을 할란한 후 난황의 vitellin membrane을 제거하고 내용물을 분리하였다. 난황중의 지방 추출은 Bligh와 Dyer(1959)의 방법을 약간 수정하여 실시하였다. 즉, 난황 5g에 추출 용매(chloroform : methanol = 2 : 1)를 20배 넣어 Ace homogenizer(model AM-7, Nissei Co. Japan; 10,000rpm/2min)에서 균질시켰다. 균질한 용액을 여과지(Whatman No.4)에 통과시킨 후 여액의 0.2배에 해당하는 증류수를 첨가하여 separated funnel에서 흔들어 정지한 후 chloroform층을 분리 회수하였다. 다시 동량의 증류수를 첨가하고 원심분리(Jouan, C312, Japan; 2,000rpm/10min)시켜 지방외 다른 물질을 제거하였다. 회수된 용액은 회전식 농축기(Heidolph, WB 2,000, Germany)로 농축하여 지방을 회수하였다. 추출된 난황유의 단백질 함량은 0%이었고 pH는 6.3이었다. 추출 난황유를 삼각플라스크에 넣고 질소가스로 충전한 후 밀봉하고 -20℃에 저장하면서 15일 이내에 실험의 재료로 사용하였다. 난황유 모델시스템은 추출한 난황유에 chloroform과 methanol(2 : 1)으로 용해하여 제조하였다.

3. Phosvitin의 산화억제력

난황유 모델시스템에 Fe^{2+} 50, 100, 150 μM 과 Cu^{2+} 5, 10, 15 μM 을 각각 첨가하여 산화를 촉진시키거나(Fe^{2+} -, Cu^{2+} -catalyzed oxidation), 여기에 75 μM 의 phosvitin을 첨가하여 산화억제력을 측정하였다. Phosvitin의 열안정성을 구명하기 위해 5 mM phosphate buffer(pH 6)에서 각각 100℃/6min, 121℃/2min 동안 열처리한 후 얼음 물에서 냉각시킨 다음 각각 75 μM 을 난황유 모델시스템에 첨가하여 실시하였다. 모든 산화시험은 공기가 있는 조건의 38℃ 수조(Yamato, BT-25, Cont. motor, Japan)에서 진탕하면서 24시간 동안 실시하였다.

4. Thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)

측정

Buege와 Aust(1978)의 방법을 수정하여 실시하였다. 즉, 시료 1ml에 0.06M thiobarbituric acid 용액 2 ml를 넣은 후 15분 동안 끓는 물에서 정치하였다. 이후 흐르는 수돗물에서 약 10분간 냉각시키고 나서 흡광계(spectrophotometer)의 535nm에서 흡광도를 측정하였다. TBARS값은 malondialdehyde의 양(10^{-5} mole/mg lipid)으로 산출하였다. Phosvitin 첨가에 의한 산화억제율은 아래와 같은 계산방법으로 계산하였다.

Inhibition rate(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{TBARS in presence of phosvitin}}{\text{TBARS in absence of phosvitin}} \right) \times 100$$

5. 통계분석

모든 시험은 3반복으로 2회 실시한 후 그 중 1회만 선택하여 시험 자료로 이용하였다. 자료는 SAS(Statistics Analytics System, USA)를 이용한 ANOVA 분석으로 실시하였다. 계산된 평균값은 Duncun의 다중 검사법(Duncan's multiple range test)에 의해 0.05% 수준에서 유의성 검사를 실시하였다.

결과 및 고찰

난황유 모델시스템에 철이온 농도별로 첨가하여 산화를 촉진시키면서 phosvitin의 산화 억제효과를 구명하였다.

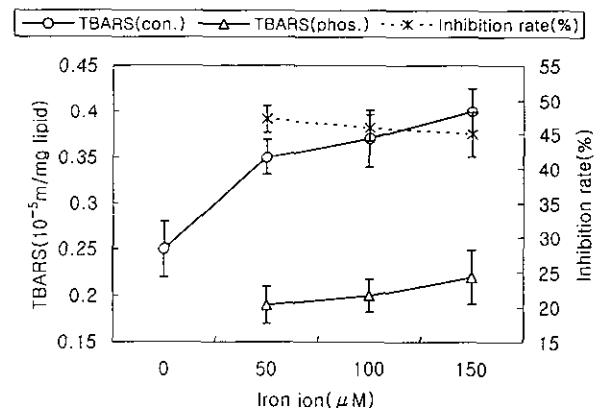


Fig. 1. The effect of Fe concentration on the ability of phosvitin(75 μM) to inhibit lipid oxidation of egg oil model system which stored for 24 hrs at 38℃.

Fig. 1과 같이 38°C에서 24시간에 지방산화 정도를 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)로 측정 한 결과 철이온 농도가 증가할수록 산화가 촉진되었다. 저장 24시간에 있어서 철과 phosvitin을 첨가하지 않은 구의 TBARS가 $0.25 \times 10^{-5} \text{m/mg}$ 이었는데 비해 50 μM 의 철 이온 첨가구는 $0.36 \times 10^{-5} \text{m/mg}$ 으로 1.44배나 급증하였다($P < 0.05$). 그러나 여기에 phosvitin(75 μM)을 첨가할 경우 모든 농도별 철이온 첨가구에서 TBARS는 현저히 줄어들었다. 50 μM 의 철이온 첨가구에 phosvitin을 첨가했을 때 TBARS는 $0.19 \times 10^{-5} \text{m/mg}$ 로 대조구(철만 첨가하고 phosvitin을 첨가하지 않은 구)의 $0.36 \times 10^{-5} \text{m/mg}$ 보다 더 낮았다($P < 0.05$). 이와 같은 결과는 철이 함유된 난황유에 phosvitin이 첨가되어 혼합과정에 이미 철과 강력히 결합하고 있음을 시사해준다. 무첨가구에 비해 phosvitin 첨가로 인한 지방산화 억제율을 보면 47.2~45.0%로 농도가 증가할수록 약간 감소하는 경향을 보였으나 현저한 차이는 없었다.

Fig. 2는 철대신 구리이온을 첨가하여 38°C에서 24시간 동안 인위적으로 산화를 촉진시키면서 phosvitin의 금속이온 봉쇄능력을 TBARS로 나타낸 것이다. 구리이온도 5에서 15 μM 로 증가할수록 난황유의 지방산화가 촉진되었지만, phosvitin을 첨가한 구에서 현저히 억제됨을 알 수 있었다. 5 μM 구리와 phosvitin 첨가구의 TBARS는 $0.23 \times 10^{-5} \text{m/mg}$ 로 대조구(구리만 첨가하고 phosvitin을 첨가하지 않은 구)의 $0.29 \times 10^{-5} \text{m/mg}$ 보다 낮았다($P < 0.05$). 대조구의 산화 정도는 구리농도 15 μM 에 phosvitin을 첨가한 구와 같은 수준을 유지하였다. Phosvitin은 혼합초기부터 강력하게 구리이온과 결합하여 지방산화를 억제시키는

것으로 나타났다. 구리이온에 대한 phosvitin의 지방산화 억제율을 보면 20.4~34.2%의 수준으로 농도가 증가할수록 높았다. 이와 같이 phosvitin이 철과 구리이온과 결합함으로써 금속이온에 의해 촉진되는 지방산화를 억제시킬 수 있었다. 그러나 동일한 농도가 아니어서 직접적인 비교는 어렵지만 철 첨가구가 구리 첨가구보다 phosvitin에 의한 지방산화 억제율이 더 높음을 알 수 있다. 이것은 phosvitin이 인지질 유화물에서 구리보다 철에서 산화억제력이 강하다는 Lu와 Baker(1986)의 보고와 유사한 결과이다.

Fig. 3은 철(100 μM)과 구리이온(10 μM)을 첨가한 난황유에서 38°C에서 24시간 동안 산화를 촉진시키면서 phosvitin에 의한 산화억제율을 나타낸 것이다. 두 첨가구 모두 저장 0일 때 억제율이 45.0%와 41.2%였으나 철은 12시간만에, 구리는 6시간만에 급격히 감소하였다. 24시간만에 철 첨가구의 억제율은 45.9%로 저장초기 수준으로 회복되었으나 구리 첨가구는 20.0%로 초기에 비해 약 반 정도의 수준에 머물렀다. 이와 같이 저장기간중에도 금속이온별 산화억제율은 구리에 비해 철 첨가구에서 높았다($P < 0.05$). 따라서 phosvitin은 구리보다 철에 대해 결합능력이 좋은 것으로 확인할 수 있었다. 저장 0일 때 억제율이 높은 이유는 phosvitin이 혼합되는 과정에서 이미 다량의 금속과 결합된 상태라고 생각할 수 있고, 6~18시간에 억제율이 낮았다가 24시간에 증가한 이유는 금속이온을 첨가한 난황유가 저장 초기에 급속히 산화가 증가한 후 24시간에 이르러 완만하게 유지하였기 때문이다. 반면 phosvitin을 첨가한 구는 저장기간 동안 계속적으로 금속이온을 봉쇄하고 있어 TBARS는 상당히 낮은 상태였기 때

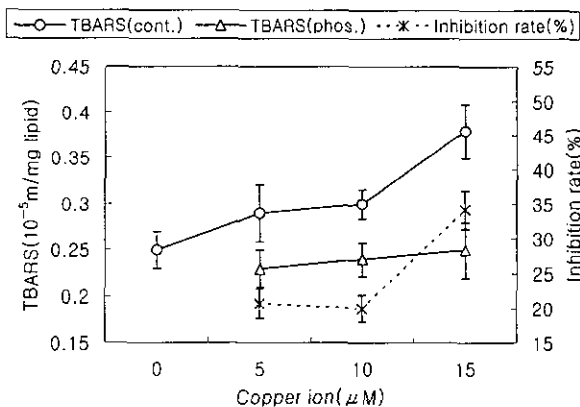


Fig. 2. The effect of Cu concentration on the ability of phosvitin(75 μM) to inhibit lipid oxidation of egg oil model system which stored for 24 hrs at 38°C.

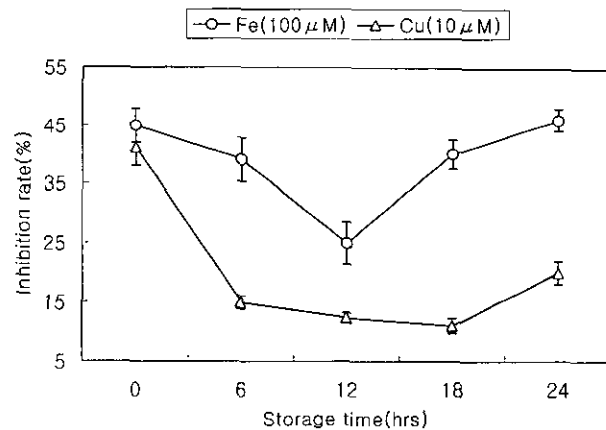


Fig. 3. The ability of phosvitin(75 μM) to inhibit iron(100 μM) and copper(10 μM) promoted oxidation of egg oil model system during storage for 24 hrs at 38°C.

문이다.

Phosvitin의 열안정성을 구명하기 위하여 100℃와 121℃에서 각각 6분 및 2분간 가열한 후에 철과 구리이온이 함유된 난황유의 산화정도를 측정하였다 (Table 1). 38℃에서 24시간만에 TBARS를 보면 비가열구에 비해 가열구가 더 증가하였고($P<0.05$), 철과 구리이온 함량이 높을수록 더 증가하는 경향을 보였다. 금속이온간 비교를 해보면 난황유의 TBARS는 Cu이온을 첨가한 구가 Fe이온을 첨가한 구보다 TBARS가 조금 더 높은 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 Fig. 1과 2에서 phosvitin을 첨가하지 않은 구에서 TBARS 형성과 반대경향을 보였다. 본 시험에서는 난황유에서 첨가한 phosvitin이 구리보다는 철을 더 강력하게 결합하는 성질 때문에 지방산화를 덜 촉진시킨 것으로 판단된다. 열에 의한 phosvitin의 산화억제력을 비가열구에 비해 100℃ 가열구에서 TBARS가 Fe 첨가구인 경우 112.5~135.0%, Cu첨가구인 경우 112.5~120.0%, 121℃ 가열구는 각각 126.3~131.8%와 100.0~107.7% 만큼 증가하였다. 따라서 비가열구에 산화능력을 100을 기준으로 할 때 100℃구가 평균 79%, 121℃가 평균 73% 정도의 산화력을 유지하였다. 이와 같은 결과는 phosvitin이 phosphatidylcholine liposome에서 100℃에 15.6%, 121℃에 34.1% 만큼 산화억제율이 감소하였다고 유사한 경향을 보고한 바 있다 (한, 2000). 지금까지 발표된 보고에 의하면 phosvitin은 비교적 열에 강한 단백질이라고 한다. Phosvitin을 110℃에서 40분간 가열하여도 철이온이 유리되지 않았다고 하였고 (Albright 등, 1984), 100℃에서 10분간 가열하여도 전기영동상에서 단백질 밴드가 변하지 않았다고 보고한 바 있다 (Itoh 등, 1983). Lu와

Baker(1986)에 의하면 phosvitin을 121℃에서 10분간 가열하면 낮은 철이온 농도(50 μM 이하)에서만 항산화력이 감소한다고 하였지만 본 연구에서는 50 μM 이상의 농도에서도 감소경향이 나타났다. 결론적으로 가열처리로 인해 phosvitin은 항산화 능력을 일부 상실하지만 대체로 열에 안정한 금속이온 봉쇄성 항산화제이고 고온처리한 통조림 식품에서도 사용이 가능하다고 할 수 있다.

적 요

난황 phosvitin의 산화능력을 구명하기 위하여 난황유를 추출하여 모델시스템을 제조한 후 철과 구리 이온을 첨가하였다. Fe과 Cu는 난황유의 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 형성을 촉진시켰지만 phosvitin의 첨가로 산화가 억제되었다. Phosvitin은 Cu보다 Fe이 함유된 난황유에서 더 크게 산화를 지연시켰다. 따라서 phosvitin은 구리보다 철이온을 더 강하게 봉쇄시키는 항산화제이다. 가열에 의한 phosvitin의 산화안정성은 비가열구에 비해 각각 79%(100℃, 6분)와 73%(121℃, 2분)의 산화력을 유지하여 비교적 열에 안정한 것으로 나타났다.

(색인어 : phosvitin, 항산화작용, 난황유, 철 · 구리촉매 산화촉진)

인용문헌

Albright KJ, Gorden DT, Cotterill OJ 1984 Release of

Table 1. Effect of heat processing on the ability of phosvitin to inhibit iron and copper promoted oxidation of egg oil model system during storage for 24 hrs at 38 °C¹

Metal ions	Con(μM)	TBARS(10^{-5}m/mg lipid)			Unstability of oxidation(%)		
		Uncooked (A)	100 °C (B)	121 °C (C)	B/A	C/A	C/B
Control	0	ND	0.20	0.21	ND	ND	104.8
	50	0.19 ^b	0.23 ^a	0.24 ^a	121.1	126.3	104.3
Fe	100	0.20 ^b	0.27 ^a	0.28 ^a	135.0	140.0	103.7
	150	0.22 ^b	0.28 ^a	0.29 ^a	127.3	131.8	103.6
Cu	5	0.23 ^c	0.26 ^b	0.28 ^a	113.0	121.7	107.7
	10	0.24 ^c	0.27 ^b	0.29 ^a	112.5	120.8	107.4
	15	0.25 ^b	0.30 ^a	0.30 ^a	120.0	120.0	100.0

¹, Means with different superscripts within a column are significantly different ($p<0.05$). ND, not detected.

- iron from phosvitin by heat and food additives. *J Food Sci* 49:78 - 81.
- Bernardi G, Cook WH 1960 An electrophoretic and ultracentrifugal study on the proteins of the high density fraction of egg yolk. *Biochim Biophys Acta* 44:86 - 96.
- Bligh EG, Dyer WJ 1959 A rapid method total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911 - 917.
- Buege JA, Aust, SD 1978 Microsomal lipid peroxidation. *In* *Method in Enzymology*. Fleischer S, Packer L(ed). vol. 52. Academic Press Inc New York NY.
- Causeret D, Matringe E, Lorient, D 1991 Ionic strength and pH effects on composition and microstructure of yolk granules. *J Food Sci* 66:1532 - 1536.
- Itoh T, Abe Y, Adachi S 1983 Comparative studies on the α - and β - phosvitin from hen's egg yolk. *J Food Sci* 48:1755 - 1757.
- Lu CL 1986 Characterization and a selected application of hen's phosvitin and egg yolk as a metal - chelator antioxidant. *Dissertation Abstr Inter* 47:2699.
- Lu CL, Baker RC 1986 Characteristics of egg yolk as an antioxidant for inhibiting metal - catalyzed phospholipid oxidations. *Poultry Sci* 65:2065 - 2070.
- 한정희 2000 식육 model system에서의 phosvitin, carnosine의 항산화 효과. 강원대학교 석사학위 논문.