

갯에서 Chlorophyll 유도체 및 β -Carotene의 분리와 이들의 항산화 작용

송은승 · 전영수 · 최홍식[†]

부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

Isolation of Chlorophyll Derivatives and β -Carotene from Mustard Leaf and Their Antioxidative Activities on the Lipid Autoxidation

Eun-Seung Song, Yeong-Soo Jeon and Hong-Sik Cheigh[†]

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

Abstract

Chlorophyll a and b, pheophytin a and b and β -carotene, crude chlorophylls and carotenoids (CCC) extracts of mustard leaf *kimchi* were isolated by DEAE-sepharose CL-6B and Sepharose CL-6B column and TLC. The effects of chlorophyll a and b, pheophytin a and b and β -carotene on linoleic acid autoxidation were examined by the determination of peroxide value and conjugated dienoic acid content. Among them, chlorophyll a showed greater antioxidative activity than others, followed by chlorophyll b, pheophytin a, pheophytin b and β -carotene. Degradation of pheophytin b was observed to be slower than others and β -carotene showed highest degradation level during the autoxidation reaction of linoleic acid.

Key words: chlorophyll, pheophytin, β -carotene, mustard leaf, autoxidation, antioxidative activity

서론

Chlorophyll은 carotenoids와 함께 세포내 염록체에 존재하며, 자연상태에서는 단백질 또는 리포프로테인과 결합한 상태로 존재한다(1) Chlorophyll은 porphyrin 핵 중심에 Mg^{2+} 이온을 가진 tetrapyrrole환으로 된 기본구조를 가지며 chlorophyll a의 유도체에는 pheophytin a, chlorophyllide a, pheophorbide a 등이 있고, chlorophyll b의 유도체로는 pheophytin b, chlorophyllide b, pheophorbide b 등이 있다(2). 식물의 염록체내에 있는 chlorophyll a와 b는 3:1의 비율로 존재하며 갯에는 chlorophyll a와 b가 1 g당 각각 620 μ g, 146 μ g 함유되어 있다(3). Chlorophylls 및 그 유도체들은 빛이 존재할 때는 감광체(photosensitizer)로 작용하여 안정한 triplet oxygen (3O_2)으로부터 singlet oxygen (1O_2)을 생성한다(4,5). 반면에, 광선이 차단된 상태에서 chlorophylls와 pheophytins는 methyl linoleate의 자동산화에서 항산화효과를 보였다고 보고되었다(6,7). 자동산화의 초기단계에서 생성된 유리기와 반응하는 chlorophyll의 기본적인 항산화 효과는 porphyrin구조에 의한 것이며 마그네슘은 chelate형일 때만 porphyrin 화합물의 항산화력을 증가시킨다고 하였다(8).

Carotenoids는 생물체 특히 식물조직에 널리 퍼져 있는 지용성 황색색소 물질로 식품의 천연색소와 생체대사 등에 중

요한 역할을 하는 vitamin A의 전구체이기도 하다(9) Carotenoids는 isoprene unit 8개가 결합하여 형성된 공액이중결합(conjugated double bond)을 가지고 있는 tetraterpene의 기본구조를 갖고 있으며, 많은 공액이중결합이 singlet oxygen quencher로서의 특성을 부여하는 것으로 알려져 있다(10, 11) Carotenoids중 생물학적 활성과 항산화성이 가장 큰 β -carotene은 450 nm 부근에서 최대 흡광도를 나타내며 갯에는 1 g 당 23 μ g이 함유되어 있다(3). β -carotene은 chlorophyll과 마찬가지로 지질 산화과정에서 생성된 peroxy radical과 반응하여 불활성물(inactive products)을 형성하게 되어 free radical에 의한 연쇄반응이 중단된다(12).

갯을 주재료로 하는 갯김치는 다른 경엽채소류에 비하여 숙성 중에 생성된 여러 가지 함황성분과 그 관련 물질이 항균 작용을 갖게 되어 김치의 저장성을 향상시켜 주고, 장기저장에도 색소안정성이 우수하다(13). 갯 및 갯김치의 색소, 구성 성분, 항산화물질, 미생물 등에 관한 연구(3,13-16)가 다수 보고되어 있다. 전보(17)에서 갯김치의 crude chlorophylls와 carotenoids(CCC) 분획의 항산화성을 연구한 바 있으나 CCC 분획 중 어떤 성분이 항산화성에 가장 큰 영향을 주는지 살펴 보지 못했다. 따라서 본 연구에서는 갯김치 CCC분획 중 김치 담금 직후와 발효적기 및 발효후기의 주요한 성분인 chlorophyll a와 b, pheophytin a와 b, 그리고 β -carotene을 분리하

[†]Corresponding author. E-mail: hscheigh@hyowon.pusan.ac.kr
Phone: 82-51-510 2838, Fax: 82-51-583-3648

여 지방산 자동산화에 대한 이들 각각의 항산화 양상을 비교, 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 갓은 전라남도 여천군 돌산면에서 1997년 4월 10일 파종하여 5월 30일에 수확한 돌산 갓(mustard leaf, *Brassica juncea*)인 만생편경대엽(晩生片梗大葉) 품종으로 길이 25~30 cm, 무게 2 kg 내외의 것을 사용하고, 조단백질 2.6%, 조지질 0.1%, 조회분 1.2%, 수분함량은 91.6%였다. 갓은 동결 건조기(Freeze Dryer-5, Ilshin Engineering, Korea)를 이용하여 동결 건조시킨 후 마쇄하여 병에 넣어 질소 가스로 충전한 뒤 -20°C를 유지하는 냉동고에 넣어 보관하면서 사용하였다.

chlorophyll a와 b의 분리

동결 건조시킨 갓 10 g을 200 mL acetone, 0.5 g Na₂HPO₄로 추출하여 흡인 여과한 후 30 mL의 dioxane을 acetone추출액에 첨가한다. 여기에 증류수 약 30 mL를 녹색 침전물이 보일 때까지 조금씩 떨어뜨린 후 -20°C에서 1시간 방치하여 원심분리에 의해서 Fig. 1과 같이 녹색 침전물을 모아서 ethanol에 녹여 불순물을 제거하고 감압 농축시켜 crude chloro-

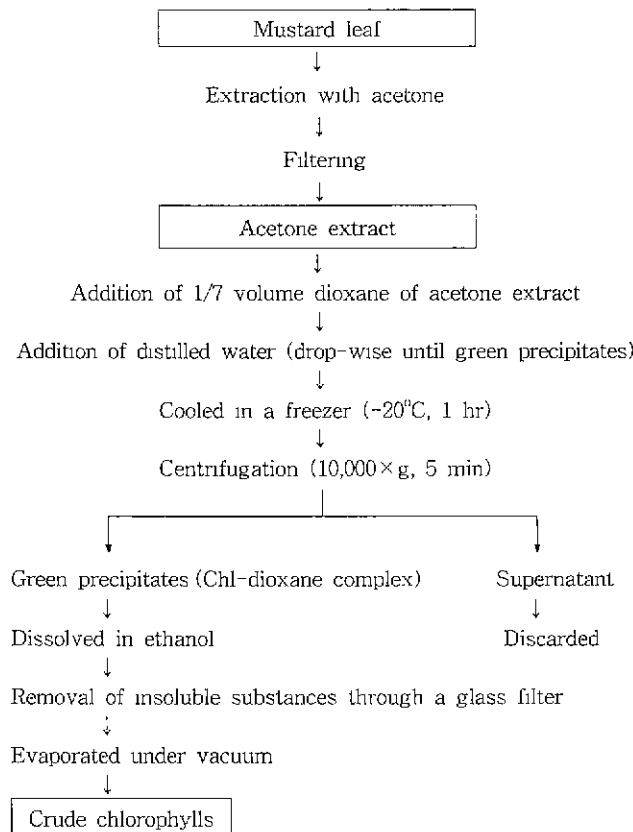


Fig. 1. Schematic diagram for crude chlorophyll preparation.

phylls를 얻었다(18). 이 crude chlorophylls를 Fig 2와 같이 DEAE-Sepharose CL-6B와 Sepharose CL-6B column chromatography에 의해서 pheophytins와 carotenoids를 제거하고 chlorophyll a, chlorophyll b를 전개 용매를 달리하여 차례대로 분리하였다(19).

Pheophytin a와 b의 조제

Column에 의해 분리된 chlorophyll a와 b를 각각 acetone에 녹인 후 1 N HCl을 drop으로 첨가하여 초록색에서 갈색으로 되면 pheophytin으로의 변환은 완성된다. 여기에 ethyl ether를 첨가하고 여분의 HCl은 물로 여러번 씻어 내고 무수 황산나트륨에 의해 건조시키고 ether층을 감압 농축시켜서 pheophytin a와 b를 각각 조제하였다(20).

TLC에 의한 β-carotene의 분리

60% KOH에 의해서 검화하여 얻은 carotenoids를 petroleum ether에 녹여서 TLC plate(Silicagel G, Merck Co.)에 line spotting하여 acetone : petroleum ether(3 : 7)의 전개용매로서 분리하였다. Rf치 0.95의 오렌지색의 band가 표준의 β-carotene과 co-TLC한 결과 단일대가 얻어졌고 흡수 spectrum 측정결과 흡수극대치가 β-carotene과 일치하였으므로 β-carotene으로 동정하여 실험에 사용하였다(3).

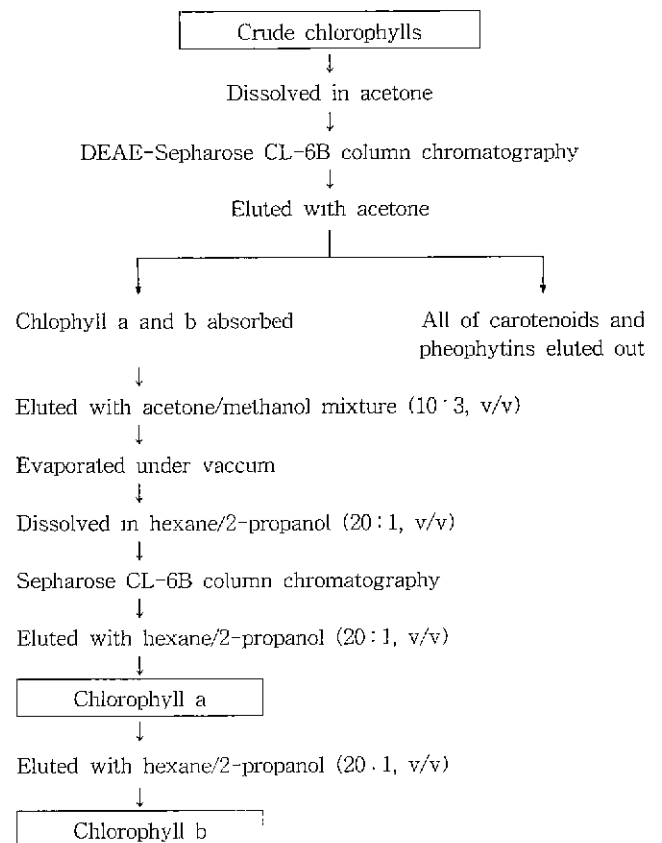


Fig. 2. Schematic diagram for the separation of chlorophyll a and chlorophyll b by DEAE-Sepharose CL-6B and Sepharose CL-6B column chromatography.

지방산 자동산화 반응의 model system

Linoleic acid(60%, Sigma Chemical Co., USA)에 대하여 chlorophyll a와 b, pheophytin a와 b, β -carotene 및 α -tocopherol, BHA는 각각 0.01% 농도가 되도록 시료를 조제하였다. 각 시료를 광선을 차단하기 위해서 알루미늄박으로 싸여진 20 mL screw cap vial에 10 mL씩 넣어 30°C로 유지된 항온기에 저장하면서 4일마다 과산화물가와 공액이중산함량을 측정하였다. 과산화물가는 AOCS 공정법 Cd 8-53(21)으로, 공액이중산함량은 AOCS 공정법 Ti la-64(22)로 측정하였다.

결과 및 고찰

Column chromatography에 의한 chlorophyll a와 b의 분리

갯김치의 chlorophylls와 carotenoids 중 김치 담금 직후와 발효 적기 및 발효 후기의 주요한 성분은 chlorophyll a와 b, pheophytin a와 b 그리고 β -carotene이라는 것을 이들 성분의 함량 분석에 의해서 이미 확인한 바 있다(17). 따라서 chlorophyll a와 b를 DEAE-Sepharose CL-6B와 Sepharose CL-6B column에 의해서 hexane과 2-propanol 용액의 비율을 달리하여 분리하였고, 650 nm에서 흡광도를 측정된 결과 Fig 3과 같았다. 이 때 chlorophyll a는 청록색을, chlorophyll b는 황록색을 띠고 있었다. Chlorophyll a와 b분획으로부터 1 N HCl을 첨가하여 pheophytin a와 b를 조제하였다. 또한 β -carotene은 silica gel TLC에 의해서 분리하였다. 동결 건조 갯 10 g당 chlorophyll a와 b는 각각 60 mg, 14 mg이, β -

carotene은 2.6 mg 함유되어 있었다

지방산의 자동산화에 미치는 항산화작용

갯김치 담금직후, 발효적기 및 후기의 CCC분획의 주성분인 chlorophyll a와 b, pheophytin a와 b, β -carotene이 지방질의 자동산화에 각각 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위해서 0.01%의 농도로 linoleic acid에 첨가하여 암소에서 30°C로 유지된 항온기에 저장하면서 4일 간격으로 과산화물가와 공액이중산 함량을 측정된 결과를 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다. CHL a는 페놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxy anisole(BHA)와 항산화 효력이 비슷하였으며 chlorophyll a, b, pheophytin a, b, β -carotene의 순으로 항산화성이 높았다.

Endo 등(6,7)의 보고에 의하면 chlorophyll a, butylated hydroxy toluene(BHT), chlorophyll b, pheophytin a, b의 순으로, 그리고 농도가 높을 수록 methyl linoleate 자동 산화에 대한 항산화성이 크다고 하여 본 실험 결과와 일치하고 있다. BHA는 항산화 효력이 높아서 지방질 식품에 널리 사용되고 있는데 chlorophyll a 자체의 안정성, 식품 위생상의 문제, 소화 흡수율이 고려된다면 BHA 못지 않은 천연 항산화제로 이용되어질 수 있으리라고 여겨진다.

지방산 자동산화 동안 chlorophyll 유도체 및 β -carotene의 함량변화

지방산의 자동산화가 일어나는 동안 chlorophyll a와 b, pheophytin a와 b, β -carotene의 잔존율을 chlorophyll a 662 nm, chlorophyll b 646 nm, pheophytin a 665 nm, pheophytin b 653 nm, β -carotene 450 nm에서 흡광도 변화를 측정하여

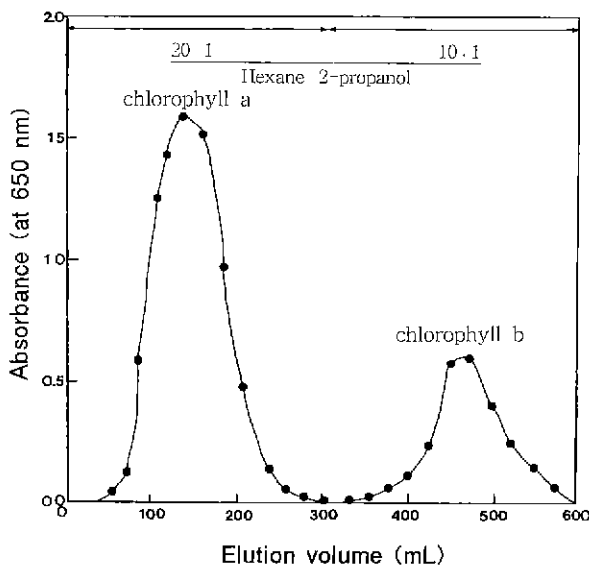


Fig. 3. Elution pattern of column chromatography with Sepharose CL-6B of chlorophyll a and chlorophyll b mixture. The column was 20 cm high \times 2.5 cm internal diameter. The flow rate was 8 mL/min. The eluent was hexane/2-propanol with a ratio of 20:1 (v/v) and then 10:1 (v/v). Elution of chlorophyll a and b was monitored at 650 nm.

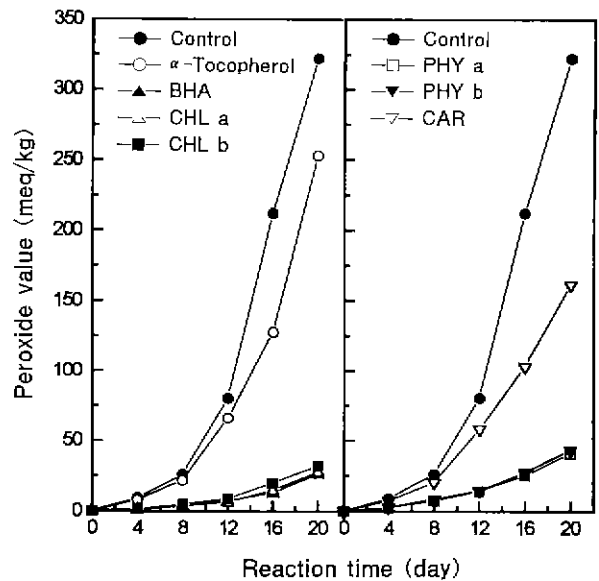


Fig. 4. Changes of peroxide values during the autoxidation of linoleic acid mixture with addition of chlorophyll (CHL) a and b, pheophytin (PHY) a and b, β -carotene (CAR) at 30°C for 20 days. Each extract was added 0.01% respectively.

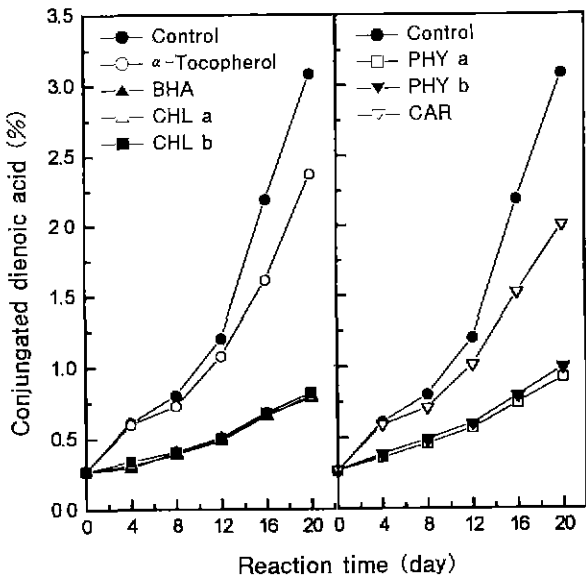


Fig. 5. Changes in the formation of conjugated dienoic acid during the autoxidation of linoleic acid mixture with addition of chlorophyll (CHL) a and b, pheophytin (PHY) a and b, β-carotene (CAR) at 30°C for 20 days. Each extract was added 0.01% respectively

Fig. 6에 나타내었다. Chlorophyll a와 b는 반응 시간이 길어짐에 따라 점차 감소하였으나 pheophytin a와 b는 거의 변화가 없이 일정하게 유지되다가 반응 16일째부터 약간 감소하였다 Chlorophylls 및 pheophytins에 비하여 항산화성이 낮았던 β-carotene은 지방질의 자동산화 동안 크게 감소하여 반응 20일째에는 초기 함량의 10%의 잔존율을 보였다.

Usuki 등(6)은 30°C에서 methyl linoleate가 자동산화되는

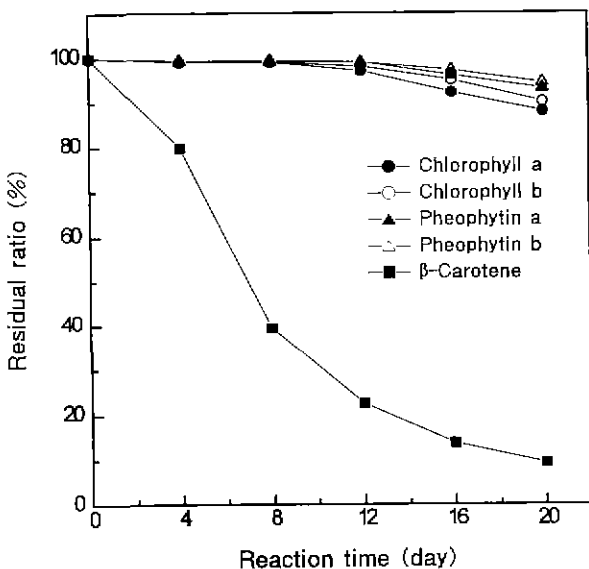


Fig. 6. Degradation of chlorophylls, pheophytins and β-carotene during the autoxidation of linoleic acid mixture at 30°C for 20 days. Each extract was added 0.01% respectively.

동안 chlorophyll a와 b는 약간 감소하고 pheophytin a와 b는 일정하게 유지되었으나 50°C에서는 chlorophylls 뿐만 아니라 pheophytins도 열에 불안정하여 탈색된다고 하여 본 실험 결과와 유사한 경향을 보고한 바 있다

요 약

갓김치 CCC분획 중 김치 담금 직후의 주요성분인 chlorophyll a와 b 및 β-carotene, 발효 초기와 후기의 주요 성분인 pheophytin a와 b를 갖으로부터 분리하여 지방산의 자동산화 model system에서 항산화작용 특성을 알아보았다 Chlorophyll a와 b는 DEAE-Sephacel CL- 6B와 Sepharose CL-6B column에 의해, β-carotene은 TLC에 의해서 분리하였으며 pheophytin a와 b는 chlorophyll a와 b에 1 N HCl을 첨가하여 조제하였다. Chlorophyll a와 b, pheophytin a와 b, β-carotene의 지방산 자동산화에 대한 항산화성을 과산화물가와 공액이중산 함량을 측정하여 나타내었을 때, chlorophyll a의 항산화성이 가장 높았으며 그 다음 chlorophyll b, pheophytin a, pheophytin b, β-carotene의 순이었다. 지방산의 자동산화가 일어나는 동안 pheophytin b의 잔존율이 가장 높았으며 β-carotene이 가장 크게 감소하였다.

문 헌

- Gross, J : *Pigments in vegetables* : chlorophylls and carotenoids. An AVI Book, New York, p.3-66 (1991)
- Lichtenthaler, H.K : Chlorophylls and carotenoids : Pigments of photosynthetic biomembranes *Methods Enzymol*, **148**, 350-355 (1987)
- Cho, Y.S., Ha, B.S, Park, S.K., and Cheon, S.S : Contents of carotenoids and chlorophylls in *dolsan* mustard leaf *Korean J Dietary Culture*, **8**, 153-157 (1993)
- Endo, Y, Usuki, R and Kaneda, T. : The photooxidative alteration of chlorophylls in methyl linoleate and prooxidant activity of their decomposition products. *Agric. Biol Chem*, **48**, 985-988 (1994)
- Tan, Y.A. Chlorophylls and vegetable oils *Porim Bulletin*, **28**, 30-45 (1994)
- Usuki, R., Endo, Y. and Kaneda, T. : Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. I. Comparison of the inhibitory effects. *JAOCs*, **62**, 1375-1378 (1985)
- Endo, Y., Usuki, R and Kaneda, T : Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidant action of chlorophyll. *JAOCs*, **62**, 1387-1390 (1985)
- Tanielian, C. and Wolff, C : Mechanism of physical quenching of singlet molecular oxygen by chlorophylls and related compounds of biological interest. *Photochem. Photobiology*, **48**, 277-280 (1988)
- Adriana, Z.M. and Delia, B.R. : Carotenoid composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1094-1097 (1991)
- Burton, G.W. : Antioxidant action of carotenoids. *J Nutr.*, **119**, 109-112 (1989)
- Lee, E.C. and Min, D.B : Quenching mechanism of β-carotene

- tene on the soybean oil. *J. Food Sci.*, **53**, 1894-1897 (1988)
12. Terao, J. : Antioxidant activity of β -carotene related carotenoids in solution. *Lipids*, **24**, 657-660 (1989)
 13. Cho, Y.S., Park, S.K., Cheon, S.S., Moon, J.S. and Ha, B.S. : Proximate sugar and amino acid composition of during *dolsan* mustard leaf. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**, 48-52 (1993)
 14. Park, S.K., Cho, Y.S., Park, J.R., Cheon, S.S. and Moon, J.S. : Changes in the contents of sugar, organic acid, free amino acid and nucleic acid-related compounds during fermentation of mustard leaf *kimchi*. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 48-53 (1995)
 15. Kang, S.G., Sung, N.G., Sin, S.C., Su, J.S., Choi, G.S. and Park, S.K. : Screening of antimicrobial activity of mustard leaf (*Brassica juncea*) extract. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**, 1008-1013 (1994)
 16. Kim, J.I. : Studies on the antioxidative flavonoids and nucleoside of mustard leaf *kimchi*. *Ph.D Dissertation*, Pusan National University (2000)
 17. Song, E.S., Jeon, Y.S. and Cheigh, H.S. : Changes in chlorophylls and carotenoids of mustard leaf *kimchi* during fermentation and their antioxidative activities on the lipid oxidation. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **26**, 563-568 (1997)
 18. Iriyama, K., Ogura, N. and Takamita, A. : A simple method for extraction and partial purification of chlorophyll from plant material using dioxane. *J. Biochem.*, **76**, 901-904 (1974)
 19. Omata, T. and Murata, N. : Preparation of chlorophyll a, chlorophyll b and bacteriochlorophyll a by column chromatography with DEAE-sepharose CL-6B and SEpharose CL-6B. *Plant and Cell Physiol.*, **24**, 1093-1097 (1983)
 20. Omata, T. and Murata, N. : A rapid and efficient method to prepare chlorophyll a and b from leaves. *Photochem. Photobiol.*, **31**, 183-189 (1979)
 21. AOCS *Official and Tentative Method*, 2nd ed., Method Cd 8-53, Am. Oil Chem. Soc., Chicago, p.413 (1989)
 22. AOCS : *Official and Tentative Method* 2nd ed., Method T1 la-64, Am. Oil Chem. Soc., Chicago, p.365 (1989)

(2001년 3월 13일 접수)