

비정제유 첨가가 참치유 보강 에멀전의 산화방지활성에 미치는 영향

안소진·최은옥[†]
인하대학교 식품영양학과

Effects of Adding Unrefined Oil on the Antioxidant Activity of a Tuna Oil-Enriched Emulsion

Sojin An and Eunok Choe[†]

Department of Food and Nutrition, Inha University, Incheon, Korea

Abstract

This study was conducted to evaluate the effects of adding unrefined oil on the antioxidant activity of a tuna oil-enriched emulsion by determining DPPH radical scavenging activity, reducing power, and inhibition of low-density lipoprotein (LDL) oxidation *in vitro*. The emulsion consisted of tocopherol-stripped canola (18.3 g) and tuna (9.1 g) oil, one of the unrefined oils (4.6 g), such as extra virgin olive, mustard, perilla, or sesame oil, 0.5% acetic acid (64 g), and egg yolk powder (4 g). The control emulsion contained only canola (21.4 g) and tuna oil (10.6 g), as oil sources, with the same composition of the remaining ingredients. The emulsion with added unrefined oil, particularly mustard oil, showed higher radical scavenging activity and reducing power than those of the control emulsion. The radical scavenging activity and reducing power of the emulsion with added unrefined oil were

higher at 1,000 ppm than at 500 ppm thus, the effect was concentration-dependent. Adding sesame or perilla oil to the tuna oil-enriched emulsion resulted in higher inhibition of LDL oxidation whereas adding olive oil increased LDL oxidation. The results clearly showed that adding roasted mustard, sesame, or perilla oil improved the antioxidant activity of a tuna oil-enriched emulsion by increasing free radical scavenging activity, reducing power, and inhibiting LDL oxidation. The results also suggest that adding unrefined oils produces a healthier fish oil-enriched salad dressing recipe.

Key words : tuna oil-enrichment, O/W emulsion, unrefined oil, antioxidant activity

1. 서론

어유는 다중불포화지방산(polyunsaturated fatty acids, PUFA)이며 오메가-3 지방산인 에이코사펜타엔(eicosapentaenoic acid,

EPA)과 도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid, DHA)을 다량 함유하고 있다(An S 등 2011). 오메가-3 지방산은 체내에서 혈액 중성지방 수준과 혈소판 응집을 감소시키며 항부정맥 효과 등을 통하여 심혈관계 질환을 예방하는 유익한 지방산으로 알려져 있다(Rissanen T 등 2000, Frank B 등 2002). 그러나, PUFA를 많이 함유한 식품은 가공, 저장, 또는 유통 중 쉽게 산화되어 알킬라디칼, 과산화라디칼 등 여러 가지 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 과산화물은 물론 이들의 분해에 의해 반응성이 높은 카보닐 화합물 등의 off-flavor 화합물 생성을 초래하여 제품의 품질과 기호도를

[†]Corresponding author: Eunok Choe, Department of Food and Nutrition Inha University 253 Younghyundong Namku Incheon 402-751 Korea
Tel: 82-32-860-8125
Fax: 82-32-873-8125
E-mail: eochoe@inha.ac.kr

저하시킨다(Choe E와 Min DB2005, Mette B 등 2007). 특히 어유는 자체에서 유래하는 좋지 않은 어취(fishy flavor)로 인해 샐러드드레싱 등 다른 식품에 어유를 원료로 적용시키는데 큰 걸림돌이 되어왔다(An S와 Choe E 2011). 그러므로 심혈관계질환 예방 효과 등의 기능성을 가진 유익한 PUFA를 다량 함유한 어유를 이용하여 제품을 개발하기 위해서는 제품의 산화안정성 확보와 어취 개선이 우선되어야 한다. An S와 Choe E(2011)는 겨자씨유와 참기름 등의 비정제유를 어유 보강 에멀전에 첨가함으로써 에멀전의 광산화안정성과 어취를 개선하였음을 보고한 바 있다.

한편, 심혈관계 질환과 관련한 동맥경화의 진행은 동맥 세포에서의 지방질 산화 과정으로 이해되고 있으며, 산화방지 활성을 가진 식품의 섭취는 심혈관계 질환 예방 효과를 증가시킬 수 있다(Kris-Etherton PM 등 2004). 겨자씨유와 참기름과 같은 비정제유에는 정제유와 달리 토코페롤, 폴리페놀, 카로테노이드, 인지질, 클로로필 등 유지 산화에 영향을 주는 미량 성분들이 함유되어 있으므로(Chung JS 등 2006, Vaidya B와 Choe E 2011), 어유를 함유한 식품에서 비롯된 심혈관계 질환 예방 등 기능성에 이들이 영향을 줄 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 포화지방산 함량이 낮고 이미는 물론 이취가 없으며 낮은 온도에서 잘 응결되지 않아 샐러드유로 많이 이용되는 카놀라유와 오메가-3 지방산을 다량 함유한 참치유를 기본으로 하여 아세트산을 섞어 참치유 보강 에멀전을 조제하고 이에 비정제유인 압착올리브유, 겨자씨유, 들기름, 참기름을 첨가한 후 어유 보강 에멀전의 산화방지 활성을 평가함으로써, 어유 보강 샐러드드레싱의 산화방지 활성 개선 방안을 모색하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

카놀라유와 참치유는 정제유로 각각 CJ 사(Seoul, Korea)와 네오메가(Daejeon, Korea)로부터 공여 받았으며, 알루미늄 킬럼 크로마토그래피(Lee J와 Choe E 2009)를 이용하여 토코페롤을 제거하여 카놀라유와 참치유에 자체 존재하는 토코페롤에 의한 산화방지활성 영향을 배제하고 비정제유에

의한 효과만을 평가하도록 하였다. 즉, 카놀라유 및 참치유 100 g을 활성화된 실리산(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 10 g, 알루미늄(activated, neutral; Sigma-Aldrich Co.) 70 g, 셀라이트(celite 545; Junsei Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) 10 g이 순서대로 충전되어 있는 유리관 (30 × 2.5 cm)에 넣어 n-헥산으로 용출시켰다. 용출액 중 n-헥산은 회전진공증발기(N-N series, Eyela, Tokyo, Japan)를 사용하여 40℃에서 완전히 제거하여 토코페롤이 제거된 카놀라유(tocopherol-stripped canola oil; TSCO) 및 참치유(tocopherol-stripped tuna oil; TSTO)를 얻은 후, 알루미늄 호일로 빛을 차단한 병에 넣고 질소를 충전하여 -50℃에서 사용할 때까지 보관하였다.

비정제유인 압착 올리브유, 참기름(볶은 참깨 압착유)은 CJ사, 볶은 들깨를 압착한 들기름은 오뚜기사(Seoul, Korea)의 제품이었다. 겨자씨유는 Vaidya B와 Choe E(2010)의 방법을 따라 오뚜기사에서 구입한 겨자씨(캐나다산 오리엔탈종)를 165℃에서 30분 동안 Gene Café' coffee bean roaster(Genesis Co. Ltd., Suwon, Korea)에서 볶은 후 스크류 타입의 채유기(NJE-2500, NUC Electric Co. Ltd., Daegu, Korea)를 이용하여 기름을 추출하였다. 추출한 기름은 빛을 차단하여 실온에서 24 시간 동안 정치시키고 다시 Büchner 깔대기와 여과지(Whatman No. 42; Kent, UK)를 사용하여 감압 여과한 후 알루미늄 호일로 빛을 차단한 병에 넣고 질소 충전하여 -50℃에서 사용할 때까지 보관하였다.

달걀 노른자 분말은 인투프드사(Incheon, Korea)의 제품이었고, DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), LDL(low densitylipoprotein from human), 아스코르브산, α -, γ -, δ -토코페롤, β -카로틴, 루테인, 카페산, Folin-Ciocalteu 시약과 TCA(trichloroacetic acid)는 Sigma-Aldrich사 제품이었다. HPLC용 n-헥산, 이소프로판올은 J.T. Baker 사(Phillipsburg, NJ, USA)로부터, EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)는 Junsei Chemical사로부터 구입하였다. PBS(phosphate buffer saline, pH 7.4)는 바이오세상(Sungnam, Korea) 제품이었고 그 외 모든 시약은 일급 시약이었다.

2. 에멀전 제조 및 냉동건조

어유 보강 에멀전은 An S와 Choe E(2011)의 방법에 준하여 TSCO(18.3 g), TSTO(9.1 g), 비정제유인 압착올리브유,

겨자씨유, 들기름, 또는 참기름(4.6 g), 달걀노른자 분말(4 g), 0.5% 아세트산 수용액(64 g)의 조성으로 제조하였다. 즉, TSCO, TSTO와 비정제유를 혼합하고 달걀노른자 분말을 섞은 후 0.5% 아세트산 수용액을 첨가하여 S25N-25F dispersing tool이 부착된 Ultra-Turrax T25 균질기(IKA Instruments, Staufen, Germany)로 6분 동안균질화하여 에멀전을 제조하였다. 이때, 대조군으로는 비정제유를 첨가하지 않고 TSCO(21.4 g), TSTO(10.6 g), 달걀노른자 분말(4 g), 0.5% 아세트산 수용액(64 g)의 비율로 제조된 에멀전으로 하였다.

제조된 에멀전은 You JK 등(2009)의 방법에 준하여 -80℃ 냉동고에서 1시간 냉동한 후 동결건조기(Ilshinbiobase Co., Yangju, Korea)를 이용하여 -50℃에서 5 Pa의 압력으로 2시간 동안 건조시켰다.

3. 원료기름의 지방산 조성 및 미량 성분 분석

원료기름의 지방산 조성은 기름을 14% BF₃-메탄올로 에스테르화시키고 헥산으로 추출한 후 가스크로마토그래피법(gas chromatography, GC)으로 분석하였다(Lee J와 Choe E 2009). 자동시료주입기(YL6100 Autosampler, Younglin, Anyang, Korea)를 이용하여 1 μL를 HP-Innowax 컬럼(30 m x 0.53 mm, 1.0 μm Agilent, Böblingen, Germany)과 불꽃이온화검출기가 장착된 Younglin M600D GC(Anyang, Korea)에 주입하였고, 오븐, 주입기, 검출기의 온도는 각각 200, 270, 280℃이었다. 운반기체인 헬륨의 속도는 분당 10 mL, split ratio는 10:1이었다. 지방산 동정 및 정량은 표준지방산의 가스 크로마토그램의 머무름 시간과 피크 면적을 이용하여 구하였다.

올리브유, 겨자씨유, 들기름, 참기름에 존재하는 토크페롤, 카로테노이드, 폴리페놀 등의 미량성분은 각각 고속액체크로마토그래피법(high performance liquid chromatography, HPLC), 가시광선분광법에 의해 분석하였다. 토크페롤은 Lee J와 Choe E(2009)의 방법에 따라 기름 0.1 g을 n-헥산 1 mL에 녹이고 hydrophobic membrane filter(polypropylene syringe filter; 0.2 μm x 13 mm, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)를 통과시킨 후, 자동시료주입기(YL 9150, Younglin)를 이용하여 20 μL를 Younglin 9100 HPLC에 주입하였다. μ-Porasil™ 컬럼(3.9 x 300 mm, 10 μm i.d., Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고, n-헥산과 이소프로

판올의 혼합용액(99.8:0.2, v/v)을 사용하여 분당 2.0 mL의 속도로 용출시켰다. 이때 형광검출기(G1321A, Agilent 110 series, Böblingen, Germany)의 파장은 excitation 290 nm, emission 330 nm 이었으며, 시료의 토크페롤 함량은 표준 토크페롤 검량 곡선을 이용하여 구하였다.

카로테노이드 함량은 AOAC 970.64법에 의해 시료를 비누화 시킨 후(AOAC 2000) HPLC로 분리, 정량 하였다(Kim HG와 Cheigh HS 1995). 즉, 기름 (2 g)을 n-헥산, 아세톤, 에탄올, 톨루엔(10:7:6:7, v/v/v/v)의 혼합용매를 넣어 PTFE syringe filter(0.2 μm x 13 mm; Tokyo roshi kaisha, Ltd.)를 이용하여 여과한 후 자동시료주입기(YL9150, Younglin)를 이용하여 20 μL 를 HPLC에 주입하였다. μ-Porasil™ 컬럼(3.9 x 300 mm, 10 μm ID, Waters)을 사용하였고, n-헥산과 이소프로판올의 혼합용매(97:3, v/v)를 사용하여 분당 1 mL의 속도로 용출시켰으며, UV 검출기 파장은 436 nm 이었다. 시료의 카로테노이드 함량은 표준 β-카로텐과 루테인의 검량곡선을 이용하여 구하였다.

폴리페놀 화합물 함량은 Lee J 등(2007)의 방법을 변형하여 구하였다. 즉 기름 3 g을 n-헥산 10 mL에 완전히 녹이고 메탄올과 물(60:40, v/v)의 혼합용매 6 mL를 넣어 30 초 동안 섞어 준 후 4℃에서 11,872 × g로 20 분 동안 원심분리기(Avanti J, Beckman, Fullerton, CA, USA)하여 층을 분리하였다. 하층액(3 mL)을 취하여 증류수로 희석하고, 희석액의 1 mL에 Folin's Ciocaltau 시약 0.3 mL를 넣고 3분 후 Na₂CO₃ 포화 용액 0.5 mL를 넣고 증류수로 5 mL까지 맞추었다. 다시 1 시간 동안 정치시킨 후 분광계(Thermo spectronic 20 Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY, USA)로 725 nm에서의 흡광도를 측정하여 카페산의 검량곡선을 이용하여 폴리페놀 화합물을 정량하였다.

4. 원료기름 및 에멀전의 산화방지활성 평가

식품의 심혈관계질환 예방에 대한 기능성 지표로서 라디칼 소거능, 환원력, LDL 산화억제력 등 산화방지 활성으로 평가하였으며 표준물질로는 아스코르브산과 α-토코페롤을 이용하였다.

1) DPPH 라디칼 소거작용

원료 기름 및 냉동건조 에멀전의 라디칼 소거활성은 Blois

MS(1958)의 방법에 따라 각 시료의 DPPH 라디칼에 대한 환원력을 측정하였다. 즉, 각 원료기름 및 냉동 건조 에멀전을 500 또는 1,000 ppm 농도로 첨가한 에탄올 용액 600 μ L에 DPPH(1.5×10^{-4} M) 200 μ L를 첨가하여 빛을 차단한 상태로 실온에서 30분간 반응시킨 후 분광계(Thermo spectronic 20)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거능은 시료를 첨가하지 않은 무첨가군의 흡광도에 대한 원료 기름 또는 냉동건조 에멀전 첨가군의 흡광도 비(%)로 나타내었다.

2) 환원력

원료 기름 및 냉동 건조 에멀전의 환원력은 Oyaizu M(1986)의 방법에 따라 평가 하였다. 즉, 각 원료 기름 및 냉동 건조 에멀전을 500 또는 1,000 ppm 농도로 첨가한 에탄올 용액(2.5 mL)에 sodium phosphate buffer(200 mM, pH 6.6) 2.5 mL와 1% potassium ferrocyanide 2.5 mL를 차례로 가하여 섞은 후 50°C의 항온기(LBI-250, Daihan Labtech Co., Seoul, Korea)에서 20분간 반응시켰다. 10% TCA 용액 2.5 mL를 가하고 200 \times g 에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액 2 mL에 증류수 1 mL와 0.1% ferric chloride 1 mL를 가하여 혼합한 후 분광계(Thermo spectronic 20)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) LDL 산화

LDL 산화에 대한 원료 기름 및 냉동 건조 에멀전의 영향은 Liu K 등(1992)의 방법에 따라 평가하였다. LDL(1 mg/mL) 100 μ L 에 원료 기름 또는 냉동 건조 에멀전의 에탄올 용액(500 또는 1,000 ppm) 5 μ L, 5 μ M CuSO₄ 5 μ L 그리고 PBS 890 μ L씩 차례로 가하여 섞은 후 37°C 의 항온기(LBI-250, Daihan Labtech Co.)에서 4시간 반응시켜 LDL 산화를 유발시켰다. EDTA 용액(1 mM) 20 μ L를 첨가하여 산화를 중지시킨 후 클로로포름과 메탄올 (2:1, v/v) 혼합용액 3 mL를 첨가하여 지용성 부분만 취하여 질소로 용매를 증발시켰다. 이것을 다시 사이클로헥산 1 mL로 녹인 후 UV-Vis spectrophotometer(HP 8453, Hewlett Packard, Wilmington, DE, USA)로 234 nm에서 흡광도를 측정하여 LDL 산화생성물인 공액이중산 (conjugated dienoic acid, CDA)의 농도를 몰 흡광 계수 2.95×10^4 M/cm 을 사용하여

나타내었다.

5. 자료의 통계처리

자료는 통계처리용 소프트웨어인 SAS/PC(SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 분석하였으며, 다중범위검정(Duncan's multiple range test)과 회귀분석(regression analysis)을 포함하였다. 이때 유의수준은 5%로 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 원료 기름의 특성

참치유 보강 에멀전 제조에 사용된 원료기름들의 지방산 조성은 Table 1과 같다. TSTO와 겨자씨유를 제외한 원료 기름들의 주된 지방산은 스테아르산, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산이었으며, 특히 TSCO와 올리브유는 단일불포화지방산(monounsaturated fatty acids, MUFA)인 올레산이, 들기름은 PUFA 일종인 리놀렌산이 50% 이상을 차지하였다. 참기름은 올레산과 리놀레산이 전체 지방산의 각각 40% 이상을 차지하였다. 심혈관계 질환 예방 효과가 주장되는 오메가-3 지방산은 TSTO와 들기름에 많았으나, 리놀렌산만이 검출된 들기름과는 달리 TSTO에는 EPA와 DHA 등이 다량 함유되어 있었다. TSTO는 다른 기름에 비해 팔미트산을 많이 함유하였으며(21.62%), 겨자씨유에는 올레산 이외에도 에이코센산(eicosenoic acid)과 에루스산(erucic acid) 등의 MUFA함량이 비교적 높았다 (>56%).

참치유 보강 에멀전 제조에 사용된 TSCO, TSTO, 올리브유, 겨자씨유, 들기름, 참기름의 산화방지성분 함량은 Table 2와 같다. 정제유인 TSCO와 TSTO에서는 토코페롤, 폴리페놀 화합물, 리그난이 검출되지 않았으며, 미량(0.16 mg/kg)의 베타-카로틴이 TSTO에서 검출되었다. 비정제유 중 압착 올리브유는 가장 적은 양의 총 토코페롤을 함유하였으며(315.89 mg/kg), 이 중 96.1%(303.48 mg/kg)가 α -토코페롤이었다. 겨자씨유에는 α -, γ -, δ -토코페롤이 각각 252.01, 292.46, 21.64 mg/kg 함유되어 있어 총 토코페롤 함량은

Table 1, Fatty acid compositions (%) of oils

Fatty acid	Oils					
	TSCO ¹⁾	TSTO ²⁾	Extra virgin Olive	Mustard	Perilla	Sesame
14:0	n.d. ³⁾	4.30±0.12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16:0	4.55±0.06	21.62±0.14	10.43±0.10	4.00±0.04	6.47±0.02	10.28±0.04
16:1	n.d.	6.68±0.95	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18:0	2.02±0.04	4.33±0.14	3.89±0.01	1.73±0.07	2.14±0.01	5.34±0.06
18:1	66.00±0.06	20.75±0.27	79.21±0.04	30.23±0.18	19.56±0.09	41.04±0.04
18:2	20.41±0.04	2.20±0.04	6.44±0.01	28.75±0.37	13.67±0.04	43.34±0.05
18:3	7.02±0.01	0.35±0.04	0.03±0.05	9.48±0.05	58.16±0.14	n.d.
20:1	n.d.	6.93±0.06	n.d.	11.84±0.10	n.d.	n.d.
20:5	n.d.	12.08±0.05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22:1	n.d.	n.d.	n.d.	13.96±0.40	n.d.	n.d.
22:6	n.d.	20.76±0.27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Saturated	6.57	30.25	14.32	5.73	8.61	15.62
Unsaturated	93.43	69.75	85.68	94.26	91.39	84.38
Monounsaturated	66.00	34.36	79.21	56.03	19.56	41.04
Polyunsaturated	27.43	35.39	6.47	38.23	71.83	43.34
Omega-3	7.02	33.19	0.03	9.48	58.16	n.d.

¹⁾ Tocopherol-stripped canola oil

²⁾ Tocopherol-stripped tuna oil

³⁾ Not detected

Table 2, Antioxidant contents of oils

Antioxidants	Oils					
	TSCO ¹⁾	TSTO ²⁾	Extra virgin Olive	Mustard	Perilla	Sesame
Tocopherol (mg/kg)						
α -	n.d. ³⁾	n.d.	303.48±3.47	252.01±13.32	53.06±2.73	n.d.
γ -	n.d.	n.d.	12.41±0.54	292.46±11.32	601.98±14.31	607.37±28.46
δ -	n.d.	n.d.	n.d.	21.64±0.26	26.27±0.29	n.d.
Total	n.d.	n.d.	315.89±2.93	566.12±24.91	681.32±11.86	607.37±28.46
Carotenoid (mg/kg)						
-carotene	n.d.	0.16±0.02	4.49±0.29	4.80±0.10	0.78±0.02	0.40±0.03
lutein	n.d.	n.d.	0.93±0.03	7.24±0.31	0.20±0.08	n.d.
Total	n.d.	0.16±0.02	5.41±0.25	12.05±0.21	0.98±0.02	0.40±0.03
Polyphenol (mg/kg)						
n.d.	n.d.	n.d.	130.67±0.55	117.81±0.41	62.85±0.48	n.d.
Lignan (mg/kg)						
Sesamol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	157.9±0.76
Sesamin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,685.9±8.02
Sesamolin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	353.5±0.25
Total	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,197.3±9.03

¹⁾ Tocopherol-stripped canola oil

²⁾ Tocopherol-stripped tuna oil

³⁾ Not detected

566.12 mg/kg 이었다. 들기름의 총 토코페롤 함량은 681.32 mg/kg으로 이 중 88.4%(601.98 mg/kg)를 γ -토코페롤이 차지하였다. 참기름은 γ -토코페롤만을 607.37 mg/kg 농도로 함유하였다.

카로테노이드는 비정제유 중 겨자씨유에 가장 많이 함유되어 있었으며(12.05 mg/kg), 그 뒤를 올리브유(5.41 mg/kg)가 이었고, 들기름과 참기름에는 소량 함유되어 있었다. 에멀전 제조에 사용한 기름 중 β -카로텐과 루테인을 각각

4.80, 7.24 mg/kg 함유한 겨자씨유를 제외하고는 모든 비정제유가 루테인에 비해 베타카로텐을 많이 함유하였다. 폴리페놀 화합물은 올리브유와 겨자씨유에 각각 130.67, 117.81 mg/kg, 들기름에 62.85 mg/kg이 함유되었으며, 참기름에는 세사몰, 세사민, 세사몰린의 리그난화합물이 각각 157.9, 1,685.9, 353.5 mg/kg 함유되어 있었다.

이와 같이 비정제유인 압착올리브유, 겨자씨유, 들기름, 참기름에는 정제유인 TSCO, TSTO와는 달리 토코페롤, 카로테노이드, 폴리페놀이 다량 함유되어 있었으며, 이들은 참치유 보강 에멀전의 산화방지 활성에 영향을 미칠 것으로 생각되었다.

2. 원료기름 및 에멀전의 DPPH 라디칼 소거 활성

표준 물질인 아스코르브산과 α -토코페롤 및 원료기름의 DPPH 라디칼 소거 활성은 Figure 1과 같다. DPPH 라디칼 소거 활성은 안정한 라디칼 형태인 DPPH 라디칼이 산화방지제로부터 전자 또는 수소를 공여받아 라디칼이 소거되면서 보라색의 DPPH 라디칼 용액이 탈색되는 정도로 평가하며, 라디칼 소거활성이 큰 물질일수록 산화방지활성이 큰 것으로 알려져 있다(Andres M 등 2001, Szabo MR 등 2007, Villano D 등 2007). 500, 1,000 ppm의 아스코르브산의 DPPH 라디칼 소거 활성은 각각 92.3, 94.3%로 α -토코페롤에 비해(각각 89.9, 90.8%) 높았으나 유의한 차이는 보이지 않았다.

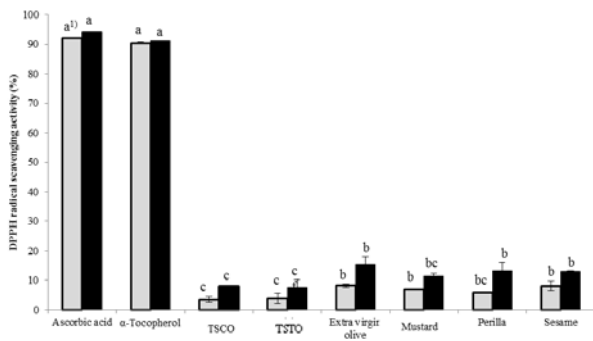


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity (%) of oils as compared to ascorbic acid and α -tocopherol as reference antioxidants (□ 500 ppm, ■ 1,000 ppm)

¹⁾ Different letters mean significant differences among samples at the same concentration at 5% level of significance.

에멀전의 기본 정제유인 TSCO와 TSTO의 DPPH 라디칼 소거활성은 500 ppm 농도에서 각각 3.61, 3.91%, 1,000 ppm 농도에서 각각 7.96, 7.78%로 표준물질에 비해 매우 낮았다. 비정제유의 DPPH 라디칼 소거 활성은 500, 1,000 ppm 농도에서 모두 정제유인 TSCO와 TSTO의 그것에 비해 유의하게 높았으나, 표준 물질에 비해 매우 낮았는데 이것은 표준 물질 농도에 비해 기름에 함유된 산화방지 성분 농도가 매우 낮았던 것과 관련 있을 것으로 보인다. DPPH 라디칼 소거 활성은 비정제유의 종류에 따라 유의한 차이는 보이지 않았으나, 비정제유의 농도가 500 ppm 일때에 비해 1,000 ppm일때 DPPH 라디칼 소거 활성이 높았으며 이것은 올리브유, 겨자씨유, 들기름, 참기름의 첨가량이 증가함에 따라 이들에게서 유래한 산화방지 성분 함량이 증가한 것과 관련 있다. 토코페롤은 벤젠 구조에 수산기와 메틸기가 치환된 chroman 유도체로 수산기의 수소를 DPPH와 과산화라디칼 등의 라디칼에 공여하고 자신은 비교적 안정한 토코페록실 라디칼로 전환된다(Choe E와 Min DB 2005). 또한 공액이중결합 구조를 가진 카로테노이드도 이들 라디칼에 수소를 주어 반응성이 높은 라디칼을 소거하고 자신은 비교적 안정한 카로텐 라디칼을 생성함으로써 산화를 억제할 수 있다(Goulson MJ와 Warthesen JJ 1999, Choe E와 Min DB 2005). 폴리페놀 화합물은 토코페롤과 마찬가지로 벤젠고리의 수산기 수소를 alkyl 라디칼, alkylperoxy 라디칼, 수산 라디칼, superoxide 라디칼 등에 공여하여 이들 라디칼을 소거함으로써 산화를 억제한다(Labuza TP 1971, Torel J 등 1986, Hussain SR 등 1987, Afanasalev IB 등 1989, Weidner S 등 2007). 따라서 정제유인 카놀라유와 참치유에 비해 비정제유인 압착올리브유, 겨자씨유, 들기름, 참기름에 많이 함유되어 있는 토코페롤, 카로테노이드, 폴리페놀 화합물이 정제유에 비해 비정제유에서 높게 나타난 라디칼 소거 활성에 기여했을 것으로 사료된다.

참치유 보강 에멀전의 DPPH 라디칼 소거 활성은 Figure 2와 같다. 비정제유를 첨가하지 않은 참치유 보강 에멀전 500 ppm의 라디칼 소거활성은 2.01%이었으며, 겨자씨유를 제외한 비정제유의 첨가에 의해서 참치유 보강 에멀전의 라디칼 소거 활성은 유의한 변화를 보이지 않았다. 겨자씨유를 첨가한 참치유 보강 에멀전 500 ppm의 라디칼 소거활성은 6.01%로, 다른 에멀전에 비해 유의하게 높은 라디칼 소

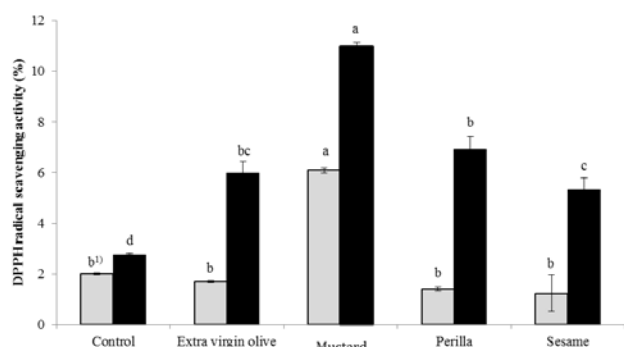


Fig. 2. Effects of unrefined oil addition (4.6%) on the DPPH radical scavenging activity (%) of the tuna oil-enriched emulsion as compared to control emulsion without unrefined oil addition (□ 500 ppm, ■ 1,000 ppm)

¹⁾ Different letters mean significant differences among samples at the same concentration at 5% level of significance.

거 활성을 나타냈다. 500 ppm 농도에서와는 달리 비정제유가 첨가된 참치유 보강 에멀전의 1,000 ppm은 비정제유를 첨가하지 않은 대조군 에멀전에 비해 유의하게 높은 라디칼 소거활성을 보여 주었다. 즉, 대조군 1,000 ppm의 라디칼 소거활성은 2.76%이었던데 비하여, 올리브유, 겨자씨유, 들기름, 참기름을 첨가한 참치유 보강 에멀전 1,000 ppm의 라디칼 소거 활성은 각각 5.98, 10.96, 6.91, 5.32%로 대조군보다 유의하게 높았다. 이 결과는 참치유 보강 에멀전에 비정제유를 첨가함으로써 DPPH 라디칼을 더 많이 소거할 수 있으며 특히 겨자씨유의 첨가가 DPPH 라디칼 소거 활성 증가에 효과적이었음을 의미하였다. 참치유 보강 에멀전의 DPPH 라디칼 소거 활성이 비정제유의 종류에 따라 차이가 났던 것은 비정제유에 함유된 산화방지제 특성과 일부 관련 있는 것으로 생각된다. 즉 bulk 기름상에서 기름 내부에 퍼져 있는 친유성 산화방지제에 비해 친수성 산화방지제는 기름-공기 계면에 위치해 있으므로 산화가 활발한 계면에서 유지의 산화를 억제시키는데 더 효과적이다. 그러나 수중유적형 에멀전에서는 친유성 산화방지제가 기름-물 계면에 분배되어 있어 물에 주로 분배되어 있는 친수성 산화방지제보다 유지의 산화방지에 더 효과적이다(Frankel EN 등 1994). 그러므로, 수중유적형인 본 연구의 참치유 보강 에멀전에서는 폴리페놀 화합물에 비해 친유성인 토코페롤과 카로테노이드가 더 효과적인 산화방지제 역할을 수행하여, 토코페롤 함량이 높은 들기름과 토코페롤과 카로테노이드 함량이 높은 겨자

씨유를 첨가한 참치유 보강 에멀전이 이들 함량이 상대적으로 낮은 올리브유를 첨가한 에멀전에 비해 우수한 DPPH 라디칼 소거 활성을 보인 것으로 사료된다. 또한 올리브유는 참기름에 비해 토코페롤 함량이 적었지만 카로테노이드와 폴리페놀 함량이 높아 참기름과 비슷한 정도의 DPPH 라디칼 소거 활성을 보인 것으로 생각된다.

3. 원료기름 및 에멀전의 환원력

표준 물질 및 원료기름들의 환원력을 700 nm에서의 흡광도로 측정된 결과를 Figure 3에 나타내었다.

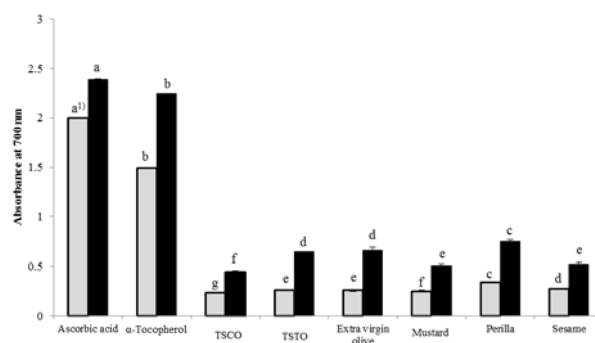


Fig. 3. Reducing power (as represented by A_{700}) of oils as compared to ascorbic acid and α -tocopherol as reference antioxidants (□ 500 ppm, ■ 1,000 ppm)

¹⁾ Different letters mean significant differences among samples at the same concentration at 5% level of significance.

환원력은 시료가 Fe^{3+} 을 Fe^{2+} 으로 환원시키는 능력으로, 시료가 전자를 공여하는 정도가 클수록 환원력과 산화방지활성이 강한 것을 의미한다(Kim SH 등 2010). 500, 1,000 ppm 아스코르브산의 환원력은 모두 α -토코페롤의 그것보다 유의하게 높았다. 또한 원료기름 중 500, 1,000 ppm 농도에서 들기름의 환원력이 가장 높았고, 카놀라유가 가장 낮았다. 또한 500 ppm에 비해 1,000 ppm 농도에서 원료 기름들의 환원력이 유의하게 높았다. 원료기름의 환원력은 DPPH 라디칼 소거활성과 마찬가지로 유지에 함유되어 있는 토코페롤, 카로테노이드, 폴리페놀 화합물의 수소 공여능과 관련 있으며(Weidner S 등 2007), 기름 자체의 불포화도 또한 부분적으로 영향을 미칠 것으로 생각된다. 즉, 불포화도가 높을수록 자신이 산화되기 쉬우므로(Choe E와 Min DB 2005)

다른 물질을 환원시키는 활성이 강할 것으로 사료된다.

참치유 보강 에멀전의 환원력 측정 결과는 Figure 4와 같다. 참치유 보강 에멀전 500 ppm의 환원력은 DPPH 라디칼 소거활성 결과와 마찬가지로 비정제유를 첨가하지 않은 참치유 보강 에멀전에 비해 겨자씨유와 들기름을 첨가한 참치유 보강 에멀전에서 유의하게 높았다. 에멀전 농도가 1,000 ppm일 때는 모든 비정제유의 첨가가 유의하게 참치유 보강 에멀전의 환원력을 증가시켰다. 즉, 올리브유, 겨자씨유, 들기름, 참기름을 첨가한 참치유 보강 에멀전 1,000 ppm의 환원력은 비정제유를 첨가하지 않은 참치유 보강 에멀전 1,000 ppm 환원력의 각각 120, 135, 130, 125%로 유의하게 높았다. 이 결과는 참치유 보강 에멀전에 비정제유를 첨가함으로써 환원력을 증진시킬 수 있음을 나타낸다.

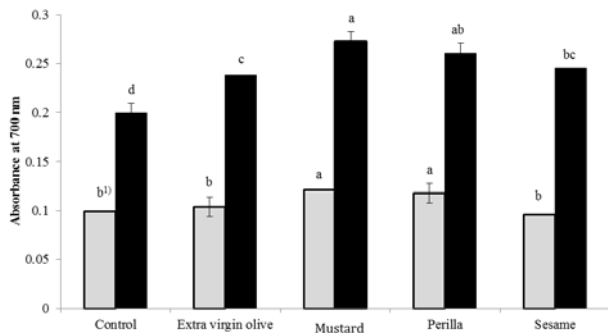


Fig. 4. Effects of unrefined oil addition (4.6%) on the reducing power (as represented by A_{700}) of the tuna oil-enriched emulsion as compared to control emulsion without unrefined oil addition (□ 500 ppm, ■ 1,000 ppm)

¹⁾ Different letters mean significant differences among samples at the same concentration at 5% level of significance

4. LDL 산화에 대한 원료 기름 및 에멀전의 영향

LDL의 과산화 후 CDA 함량은 Figure 5와 같이 표준물질인 아스코르브산과 α -토코페롤과 에멀전의 원료 기름인 카놀라유, 참치유, 올리브유, 겨자씨유, 들기름, 참기름의 첨가에 의해 차이를 나타냈다. 표준 물질 또는 원료 기름을 넣지 않고 LDL만을 산화시켰을 때 13.95 μ M의 CDA가 생성되었다. 그러나 표준 물질인 아스코르브산과 α -토코페롤을 500 ppm 농도로 첨가하였을 때 LDL 산화에 의해 각각

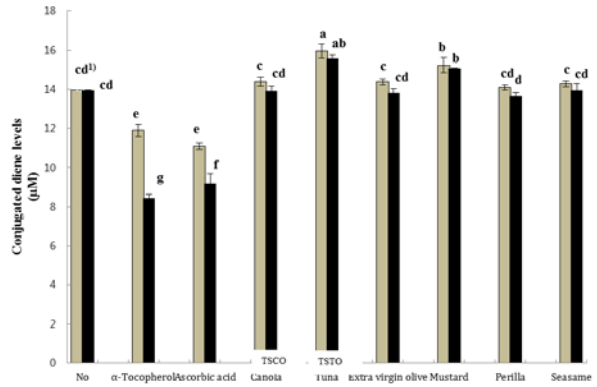


Fig. 5. LDL oxidation (as represented by conjugated diene level, μ M) affected by oil as compared to ascorbic acid and α -tocopherol as reference antioxidants (□ 500 ppm, ■ 1,000 ppm); 'No' means that there was no oil nor standard antioxidant, thus only LDL was present.

¹⁾ Different letters mean significant differences among samples regardless of the concentration at 5% level of significance.

11.07, 11.89 μ M의 CDA를 생성하였고, 1,000 ppm 농도로 첨가하였을 때는 각각 9.17, 8.43 μ M을 생성하여 기름이나 에멀전 첨가 없이 LDL만을 산화시킨 경우에 비하여 CDA 생성이 유의하게 낮았다. 원료기름 중 TSCO와 겨자씨유의 첨가는 LDL 산화에 있어서 CDA 값을 증가시켰고 TSCO, 압착 올리브유, 들기름, 참기름이 첨가된 경우 농도에 관계없이 LDL만의 산화에 의한 CDA 값과 유의한 차이를 보이지 않았다. 원료 기름이 토코페롤, 폴리페놀 등 산화방지제를 함유하고 있었음에도 불구하고 이와 같은 결과를 보인 것은 이들 미량 성분 외에도 원료 기름의 지방산 조성에 의한 복합적인 요인에 기인한 것으로 보인다. 즉, TSCO, TSTO는 물론 비정제유의 PUFA함량이 비교적 높아 철 이온에 의한 LDL 산화 조건에서 LDL의 PUFA는 물론 이들 지방산들이 함께 산화되어 CDA생성을 증가시킬 수 있었던 반면, 비정제유에 함유되어 있던 토코페롤, 폴리페놀 등은 LDL 산화를 억제시킬 수 있으므로 이들간의 balance에 의한 결과로 생각된다. Steinbrecher UP 등(1984)에 의하면 자유라디칼에 의해 LDL의 PUFA가 산화되어 과산화물이 생성되며, Sparrow CP와 Olszewski J(1992), 그리고 Rankin SM 등(1991)은 페놀 화합물이 LDL의 산화를 억제한다고 하였다. Isabelle M 등(1993)은 페놀 화합물을 비롯한 각종의 산화방지제들이 유리상태

의 Fe, Cu 이온과 안정한 금속복합체를 형성하거나 직접 여러 자유라디칼들을 소거함으로써 산화방지효과를 나타낸다고 하였다. 특히 EPA와 DHA함량이 높았던 TSTO에서는 이들의 산화가 CDA값을 유의하게 증가시키는데 크게 기여한 것으로 보이며, 겨자씨유의 경우 다른 기름에 비해 많이 함유된 베타카로틴이 234 nm에서 강한 흡수를 보이는 공액 이중결합 구조를 갖고 있으므로(Woodward RB 1942) 겨자씨유가 첨가된 경우 CDA 값이 유의하게 높았을 것으로 생각된다. 따라서 겨자씨유가 첨가된 에멀전에 의한 CDA값 증가는 LDL의 PUFA산화에 의해 생성된 CDA는 물론 베타카로틴에 의한 234nm에서의 흡광도가 기여하였을 것으로 생각되었다.

LDL 과산화에 대한 참치유 보강 에멀전 효과는 Figure 6과 같이 비정제유 첨가에 의해 차이를 나타냈다. 원료 기름에서와 비슷하게 순수한 LDL에 비해 에멀전이 첨가된 LDL에서 유의하게 높은 CDA 값을 나타냈고 500 ppm에 비해 1,000 ppm에서 더 높은 CDA값이 나타나, 에멀전을 구성하고 있는 원료기름들의 공산화(co-oxidation)가 CDA값 증가에 기여하고 있음을 암시하였다. 비정제유를 첨가하지 않은 참치유 보강 에멀전(control)을 500 ppm 농도로 첨가하여 LDL을 산화시켰을 때 CDA농도는 15.30 μM 이었으며, 압착올리브유, 겨자씨유, 들기름, 참기름을 첨가한 참치유 보강 에멀전을 500 ppm 농도로 첨가하였을 때는 각각 17.31, 15.18, 13.58, 13.20 μM 의 CDA값을 나타내, 올리브유를 제외한 비정제유를 참치유 보강 에멀전에 첨가하였을 때 비정제유가 첨가되지 않은 참치유 보강 에멀전에 비해 LDL산화 후 CDA생성이 낮았음을 알 수 있었다. 참치유 보강 에멀전의 1,000 ppm 농도에서도 이와 유사한 결과를 보여 비정제유의 첨가가 참치유 보강 에멀전에 의한 LDL 과산화를 억제할 수 있으며, 특히 참기름과 들기름의 첨가가 유의한 효과를 보였다. 참치유 보강 에멀전에 첨가된 비정제유의 종류에 따른 LDL산화의 차이는 비정제유에 함유된 산화방지제의 종류 및 함량과 관련 있는 것으로 보인다. 즉, 올리브유에 비해 폴리페놀 함량은 매우 낮았으나 높은 함량의 토코페롤을 함유한 참기름과 들기름이 첨가된 참치유 보강 에멀전이 다른 에멀전에 비해 CDA함량이 낮았던 것은 친수성인 폴리페놀 화합물보다는 친유성인 토코페롤의 산화 방지 효과가 친유성인 LDL의 과산화 억제에 더 중요하게 작용하였음을 시사한다.

이상의 결과는 참치유 보강 에멀전에 겨자씨유, 들기름, 참기름 등의 비정제유를 첨가함으로써 에멀전의 산화방지활성을 개선시킬 수 있음을 명확하게 보여주었다.

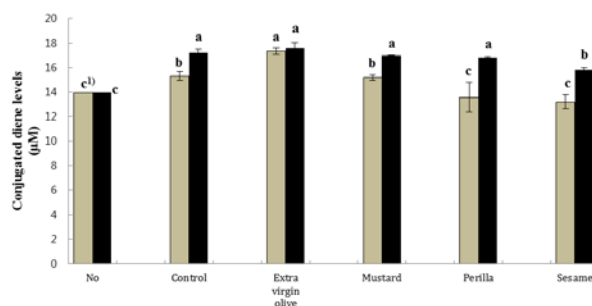


Fig. 6. Effects of unrefined oil addition (4.6%) at to the tuna oil-enriched emulsion on the conjugated diene levels (μM) after LDL oxidation (\square 500 ppm emulsion, \blacksquare 1,000 ppm emulsion); 'No' means that there was no oil nor standard antioxidant, no emulsion, thus only LDL was present, 'Control emulsion' did not contain any unrefined oil.

¹⁾ Different letters mean significant differences among samples regardless of the concentration at 5% level of significance.

IV. 요약 및 결론

원료 기름 및 비정제유가 첨가된 참치유 보강 에멀전의 산화방지활성을 평가하기 위하여 DPPH 라디칼 소거 활성, 환원력, LDL 산화를 측정하였다. 참치유 보강 에멀전에 비정제유인 압착올리브유, 겨자씨유, 들기름, 참기름을 첨가함으로써 산화방지활성을 향상시켰으며, 특히 겨자씨유, 들기름, 참기름을 첨가한 참치유 보강 에멀전에서 우수한 산화방지활성을 나타내었다. 따라서 겨자씨유, 들기름, 참기름의 첨가는 참치유 보강 에멀전에서의 산화방지활성을 증진시키는 좋은 방법으로 생각된다.

V. 감사의 글

이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한

국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(2009-0064547)의 일
부로 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Afanaslev IB, Dorozhko AI, Bordskll AV. 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 38:1763-1769
- Andres M, Jose M, Cruz D, Franco J, Manuel D, Jorge S, Herminia D, Maria J, Nunez J, Carlos P. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 72:145-171
- An S, Choe E. 2011. Effects of unrefined vegetable oil addition on the flavor acceptability and oil oxidation of tuna oil-enriched emulsion under singlet oxygen. *Food Sci Biotechnol*. Accepted
- An S, Lee E, Choe E. 2011. Effects of solubility characteristics of sensitizer and pH on the photooxidation of oil in tuna oil-added acidic O/W emulsions. *Food Chem* 128:358-363
- AOAC. 2000. Official methods of analysis of AOAC International, 17th ed, Arlington, Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemists
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Choe E, Min DB. 2005. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *J Food Sci* 70(9):R142-159
- Chung JS, Lee YS, Choe E. 2006. Effects of sesame oil addition to soybean oil during frying on the lipid oxidative stability and antioxidants contents of the fried dough during storage in the dark. *J Food Sci*. 71:222-226
- Frank B, Hu LB, Walter C, Willett MJ, Kathryn M, Rexrode CM, Albert DH, Joann EM. 2002. Fish and Omega-3 Fatty Acid Intake and Risk of Coronary Heart Disease in Women. *JAMA (The Journal of American Medical Association)* 287(14):1875-1876.
- Frankel EN, Huang SW, Kanner J, German JB. 1994. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils vs Emulsions. *J Agric Food Chem* 42:1054-1059
- Goulson MJ, Warthesen JJ. 1999. Stability and antioxidant activity of beta carotene in conventional and high oleic canola oil. *J Food Sci* 64:969-999
- Hussain SR, Gillard J, Collard P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem* 26:2489-2491
- Isabelle M, Gérard L, Pascale C, Odile S, Nicole P, Pierre B, Pierre C, Josiane C. 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* 45(1):13-19
- Kim HG, Cheigh HS. 1995. Oxidative stability of wheat germ lipid and changes in the concentration of carotenoid and tocopherol during oxidation. *Kor J Food Sci Technol* 27:478-482
- Kim SH, Chung MJ, Jang HD, Ham SS. 2010. Antioxidative activities of the codonopsis lanceolata extract in vitro and in vivo. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 39:193-202
- Kris-Etherton PM, Lichtenstein AH, Howard BV, Steinberg D, Witztum JL. 2004. Antioxidant Vitamin Supplements and Cardiovascular Disease. *Circulation*. 110:637-641
- Labuza TP. 1971. Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Crit Rev Food Technol* 2:335-405
- Lee J, Choe E. 2009. Effects of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine on the photooxidation of canola oil. *J Food Sci* 74:C481-C486
- Lee J, Lee Y, Choe E. 2007. Temperature dependence of the autoxidation and antioxidants of soybean, sunflower, and olive oil. *Eur Food Res Technol* 226:239-246
- Liu K, Cuddy TE, Pierce GN. 1992. Oxidative status of lipoproteins in coronary disease patients. *Amer Heart J* 123:285-290
- Mette B, Charlotte J, Anne S. 2007. Ascorbyl palmitate, γ -tocopherol, and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently. *J Agric Food Chem* 55:2369-2375
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44:307-315
- Rankin SM, Parthasarathy S, Steinberg D. 1991. Evidence for a dominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophages. *J Lipid Res* 32:449-456
- Rissanen T, Voutilainen S, Nyyssönen K, Lakka TA, Salonen JT. 2000. Fish oil-derived fatty acids, docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid, and the risk of acute coronary events. *Circulation* 102:2677-2679
- Sparrow CP, Olszewski J. 1992. Cellular oxidative modification of low density lipoprotein does not require lipoxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(1):128-131
- Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D.

1984. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(12):3883-3887
- Szabo MR, Idrisoiu C, Chambre D, Lupea AX. 2007. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. Chem Pap 61 (3):214-216
- Torel J, Gillard J, Gillard P. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radicals. Phytochem 25:383-385
- Vaidya B, Choe E. 2011. Effects of seed roasting on tocopherols, carotenoids, and oxidation in mustard oil during heating. J Am Oil Chem Soc 88:83-90
- Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moy ML, Troncoso AM, Garcia-Panilla MC. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. J Talanta 71:230-235
- Weidner S, Karamac M, Amarowicz R, Szyplulska E, Górgowska A. 2007. Changes in composition of phenolic compounds and antioxidant properties of *Vitis amurensis* seeds germinated under osmotic stress. Acta Physiol Plant 29:283-290
- Woodward RB. 1942. Structure and Absorption Spectra. III. Normal Conjugated Dienes. J Am Chem Soc 64 (1):72-75
- You JK, Chung MJ, Kim DJ, Choe M. 2009. Change of Antioxidant Activities in Preparing Freeze Dried Wild Vegetable Block for the Long-term Storage. J Korean Soc Food Sci Nutr 38(12):1649-1655