

화학발광분석기를 이용한 동결건조 난황분말의 산패도 측정법

변장원 · 홍고은 · 장순홍 · 김종민 · 김수기¹ · 이치호*
건국대학교 축산식품생물공학과, ¹건국대학교 동물생산 · 환경학과

A Method for Measuring Lipid Peroxidation of Freeze-dried Egg Yolk by Using Chemiluminescence Analyzer

Chang-Won Pyun, Go-Eun Hong, Soon-Hong Jang, Jong-Min Kim, Soo-Ki Kim¹, and Chi-Ho Lee*
Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
¹Department of Animal Science and Environment, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract

The aim of this study was to investigate the relationship between a simple method for measuring lipid peroxidation by using a chemiluminescence analyzer and traditional methods, such as 2-thiobarbituric acid reactive substances or peroxide value of solid food samples. Freeze-dried egg yolk powder was kept on 25°C, under dark condition. The peroxidation value was measured during certain storage period by using 3 methods, and the chemiluminescence value was compared with 2-thiobarbituric acid reactive substances or peroxide value. For comparison, 3 kinds of freeze-dried egg yolk were prepared from whole eggs purchased from a local market. The chemiluminescence value was significantly correlated with both the peroxide value and the 2-thiobarbituric acid related substances during storage, and showed a high correlation to the real sample test. It showed a little higher correlation with peroxide value. These results suggest that using a chemiluminescence analyzer may provide the ability to measure the lipid peroxidation of high lipid content solid-food samples, instead performing both the 2-thiobarbituric acid reactive substances test and measuring the peroxide value.

Key words: lipid peroxidation, chemiluminescence analyzer, 2-thiobarbituric acid, peroxide value, freeze-dried egg yolk

서 론

식품 또는 생물조직 중의 지질 산패도를 측정하기 위한 일반적인 방법으로 특정 과산화물과의 반응생성물의 최대 흡수과장을 이용한 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)법과 적정을 통한 총과산화물의 함량을 측정하는 Peroxide value(PV)법을 주로 이용한다.

하지만 이러한 TBARS법이나 PV법은 그 시험법의 조 작이 까다롭고 복잡하여, 동일한 시료에 대하여 조작하는 사람 또는 주변 환경에 따라 결과의 차이가 나타나기도 한다. 특히 축산식품과 같이 단백질 함량이 많은 식품의 경우 시험조작 중 식품 내에 존재하는 유리아미노산과 산화된 유지간의 반응에 의해 새로운 물질이 형성(Gardner, 1979; Kikugawa *et al.*, 1991)되기도 하며, 다가불포화지방

산이 다량 포함된 식품 등의 시료에서는 시험 조작 중에 산화가 더 빨리 진행되어 시험 결과에 영향을 미치기도 한다(Cho *et al.*, 1987; Cho *et al.*, 1989).

Hermes-lima(1995) 등은 Fe(III) xylenol orange complex 의 형성원리를 이용하여 조직 추출물 중에서의 과산화물 (hydroperoxide)을 정량하는 법을 개발하여 보고하였으며, 이 방법을 응용하여 식품 중의 과산화물을 측정하여 산패도를 결정하는 방법도 보고되었다(Galobart *et al.*, 2001). Hasegawa(1994) 등은 시료의 지질추출물을 분광형광광도계에 직접 넣고 측정된 값을 이용한 방법을 보고하였다. 이러한 방법들은 기존의 TBA나 PV법의 재연성이나 반복성, 그리고 미세한 차이를 극복할 수 있었으나 복잡한 유지추출법이나 고가의 시약 등을 사용해야 하는 또 다른 문제점들이 발견되었다.

화학발광분석기(chemiluminescence analyzer; CLA)는 발광을 동반한 화학반응의 특성을 이용한 분석기로 생물공학, 식품공학 등의 분야에서 널리 이용되고 있다. 특히 HPLC와 연결하여 생체분자중의 지질과산화물을 측정하는

*Corresponding author: Chi-Ho Lee, Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: 82-2-450-3681, Fax: 82-2-453-1948, E-mail: leech@konkuk.ac.kr

데 아주 유용하게 이용되고 있다(Miyazawa *et al.*, 1989; Miyazawa *et al.*, 1992, 1994b).

Miyazawa(1994a) 등은 Chemiluminescence analyzer(CLA)를 이용하여 대두유의 열발광도(thermoluminescence)를 측정하여 기존의 산패도 측정법 중의 하나인 과산화물가와 비교하여 정의 상관관계에 있음을 확인하였다. 또한 지방산과 아마씨유의 유화물로부터 과산화물의 양을 화학발광 분석기를 이용하여 측정할 수 있는 방법에 대한 연구도 보고된 바가 있다(Rolewski *et al.*, 2009). 하지만 아직까지 고형 식품을 시료로 화학발광도 측정을 이용한 산패도 검사법에 대한 연구보고는 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구는 고형식품에서도 이러한 화학발광도를 이용한 지질산패도 측정법이 유효한지 조사를 하고자 동결건조 난황분말을 일정기간 동안 저장하며 시료의 TBARS와 PV 및 화학발광도를 측정하고 각 시험 결과를 통계학적으로 비교 분석하였다.

재료 및 방법

시료 및 지방함량 분석

저장 기간 중의 산패도의 변화를 측정하기 위한 동결건조 난황은 S&D Co., Ltd.(Korea)로부터 공급받아 25°C, 암소의 조건에 저장하며 일정한 시간(0, 12, 24, 48, 72, 144 h)에 시료를 채취하여 실험에 이용하였다.

실제시료시험(real sample test)에 이용된 시료는 일반 대형마트에서 세 종류의 계란을 무작위로 구입하여 이로부터 분리한 난황을 동결건조하여 시험에 사용하였으며, 모든 시험은 동일한 시료에 대하여 3회 이상 반복 실시하였다.

각각의 시료에 대한 조지방 함량은 고속지방추출장치(FE-6SN, MRK-NAKAYAMA RIKA, Saitama, Japan)를 이용하여 조지방을 추출하여 측정하였다.

TBA가(2-Thiobarbituric acid value) 측정

시료의 TBA가는 Pikul 등(1989)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 시료를 5 g씩 시험관에 취하여 에탄올에 녹인 3% BHT용액 0.3 mL와 pH 2.0의 과염소산용액 45 mL를 가한다. 그 후에 시험관을 6,000 g로 원심분리하여 상등액을 종이여과 하였다. 걸러진 여액 중 5 mL를 유리 시험관에 옮긴 후 TBA시약(99.5% glacial acetic acid에 2-thiobarbituric acid 0.69%를 용해시킨 용액) 5 mL를 각각의 시험관에 가하였다. 이를 100°C에서 35분 동안 증탕가열하고 침지 냉각한 후에 분광광도계 531 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 공시험도 같은 방법으로 시행하고, 산출된 흡광도를 이용하여 다음 식에 대입하여 시료 kg당 malonaldehyde의 양을 mg으로 표시하였다.

$$\text{TBARS (mg/kg)} = (a - b) \times 3 \times 100/s$$

a : 본시험의 531 nm에서의 흡광도

b : 공시험의 531 nm에서의 흡광도

s : 시료무게(g)

과산화물가(Peroxide Value: PV) 측정

과산화물가는 AOAC(1995)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 시료 1 g을 취하여 초산-클로로포름 혼합액 25 mL에 녹인 후 KI 포화용액 1 mL을 가하여 5분간 교반한 후 원심분리 하였다. 상등액을 여과지로 여과한 다음 증류수 30 mL을 가하여 진탕 혼합 하였다. 여기에 전분용액 1 mL을 지시약으로 하여 0.01 N-Na₂S₂O₃·5H₂O용액으로 적정하였다. 공시험도 같은 과정을 통해 실시한 후 다음의 식에 대입하여 과산화물가를 kg당 밀리당량으로 환산하였다.

$$\text{과산화물가(meq/kg)} = \{(a - b) \times f\} / s \times 100$$

a : 본시험의 적정량(mL)

b : 공시험의 적정량(mL)

f : 0.01N-Na₂S₂O₃·5H₂O용액의 역가

s : 시료무게(g)

화학발광도(chemiluminescence) 측정

난황분말시료를 스테인레스 용기(직경 50 mm, 높이 10 mm)에 정확히 1 g씩 취하여 고르게 분포시킨 후에 화학발광분석기(CLA-1100, Tohoku Electronic Industrial Co., LTD, Japan)를 이용하여 총 계수(total count)를 측정하였다. 분석조건은 반응온도 40°C, 감도(gain) 10, 감쇠(attenuation) 16의 조건으로 하였으며, 1시간 동안 측정하였다.

통계 분석

반복된 모든 실험에 대한 결과는 SAS program(Statistics Analytical System, USA, 1999)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였으며, 화학발광도 측정법에 의한 결과와 TBA법 및 PV법에 의한 결과와의 상관관계를 조사하기 위하여 상관계수로써 피어슨의 상관계수(Pearson's correlation coefficient, r^2)를 동일한 프로그램을 이용하여 환산하였다.

결과 및 고찰

시료의 저장 중 화학발광도 및 TBA가의 비교

저장기간 중의 화학발광도 및 TBA가를 3회 반복 측정된 결과에 대한 평균값을 Fig. 1에 나타내었다. TBA가와 화학발광도는 모두 저장기간이 지나면서 증가하는 경향을 나타내었고, 이 두 시험법 간의 상관계수 r^2 값은 0.874로 유의

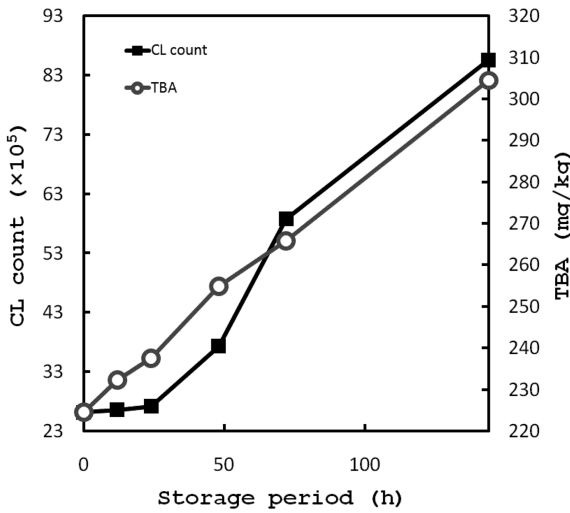


Fig. 1. Time courses of chemiluminescence total count and 2-thiobarbituric acid value during storage periods at 25°C in a dark condition ($r^2=0.874$).

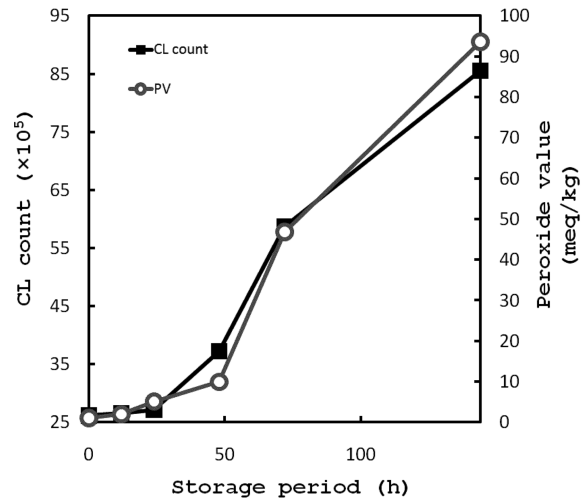


Fig. 2. Time courses of chemiluminescence total count and peroxide value during storage periods at 25°C in a dark condition ($r^2=0.987$).

적인 상관관계를 나타내었다. 이는 기존에 phosphatidylcholine을 이용한 연구에서 TBA가와 화학발광도간의 유의적인 상관관계가 없다는 보고(Singh *et al.*, 1996)와 다른 결과를 나타내었는데, 식품을 이용한 본 연구의 시료의 특성상 구조가 단순한 phosphatidylcholine시료 보다 상대적으로 복잡하고 지질의 함량이 높아(53.5-54.8%, Table 1), 산화 진행 후 여러 가지 산물이 생성되는 과정에서 오는 차이로 사료된다. 실제로 건조시키지 않은 난황(지질 함량 20-25%)을 이용한 선행 연구 결과(Botsoglou *et al.*, 1997)에 비하여 TBA가의 수치가 현저하게 높게 나타났음을 확인 할 수 있었다.

시료의 저장 중 화학발광도 및 과산화물가의 비교

Fig. 2는 과산화물가 측정 결과와 화학발광도의 측정 결과를 비교하여 나타낸 그림이다. 과산화물가 또한 저장기간이 지날수록 수치가 증가하는 경향을 나타내었는데, 이 두 시험법의 상관관계수 r^2 값은 0.987로 TBA가와 비교하였을 때 보다 높은 상관관계를 나타내었다. 이는 다른 시료를 이용한 선행연구와 동일한 결과로(Miyazawa *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1996) 화학발광도 및 과산화물가는 모든 과산화물에 대하여 반응을 하여 측정이 되지만, TBA가의 경우는 특정한 과산화물에 대하여 측정하는 방법이기에 이러한 측정 기본원리의 차이에 기인한 것으로 사료된다(Singh *et al.*, 1996).

Table 1. Total lipid content of freeze dried egg yolk in real samples

Sample No.	#1	#2	#3
Total lipid content (%)	53.99±0.11	54.12±0.30	54.35±0.58

All values are mean±SD.

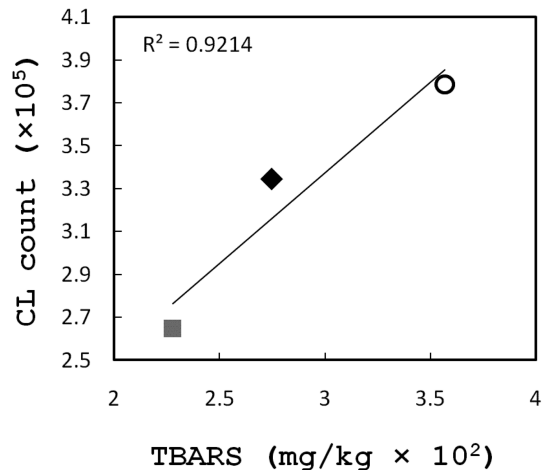


Fig. 3. The correlation between chemiluminescence total count and TBARS (2-thiobarbituric acid reactive substances) of freeze-dried egg yolk real samples ($r^2=0.9214$).

실제시료(real sample)의 산패도 측정 결과 비교

실제로 시판되고 있는 시료에 대한 시험 결과는 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. TBA가 및 과산화물가의 결과와 화학발광도의 결과를 비교한 결과 두 결과간에 유의적인 상관관계가 나타났다. 즉, 저장기간 중의 산패도의 증가에 따른 화학발광도의 수치도 함께 증가하였는데, 실제 시료를 이용한 시험에서도 같은 결과를 얻을 수 있었으며, 이 경우에 있어서도 화학발광도는 TBA가($r^2=0.9214$)보다 과산화물가($r^2=0.9599$)와 다소 높은 상관관계를 나타내었다. 이렇듯 저장기간 중의 시험과 실제 시료에서의 시험에서 각각의 시험법 간에 유의적인 상관관계가 나타난 것은 산화물의 생성으로 인해 높은 수치가 나타나는 다른 시험법과 마찬가지로 불안정한 구조의 산화물들에 열을 가하여 산화를 촉진시키면서 이러한 들뜬 상태의 불안정한 구조가 안정된 구조를 이루는 과정에서 화학적 발광을 하게

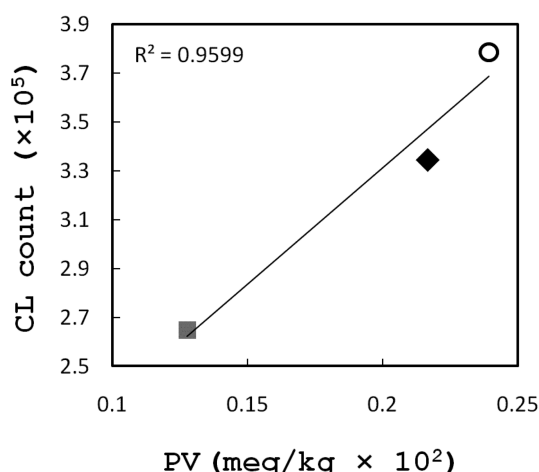


Fig. 4. The correlation between chemiluminescence total count and peroxide value of freeze-dried egg yolk real samples ($r^2=0.9599$).

되는 기본적인 화학발광도의 측정 원리와 정의 상관관계를 나타내기 때문이라고 사료되며, 본 연구에서는 이를 입증할 수 있는 기초자료를 제공하였다. 이상의 결과를 종합하였을 때 동결건조난황의 산패도 측정에 있어서 화학발광도는 과산화물가를 대체하기에 적절할 것으로 사료되며 TBA에 대해서도 시료의 특성에 따라 동시에 대체가 가능할 것으로 기대가 된다.

따라서 앞으로 화학발광도를 이용한 지질 산패도 측정법 확립을 위하여 시료의 특성에 따른 측정법에 대한 분석 조건 및 전처리법 등에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 TBARS 및 PV 등의 식품중의 지질산패도 측정법을 대체할 수 있는 간단한 측정법을 개발하고자 시행되었다. 이를 위해 선행 연구에서 식용유지의 산패도 측정법 대체가능성을 나타낸 화학발광도 측정법을 고체시료 중에서 축산식품인 동결건조 난황분말에 적용하여 기존의 산패도 측정법과의 상관관계를 조사하여 대체 가능성을 확인하였다. 암소의 25°C에서 저장기간(0, 12, 24, 48, 72, 144시간) 별로 시료를 채취해 TBARS와 PV 및 화학발광도를 측정하여 비교하였다. 저장시간에 따른 화학발광도 측정 결과는 특히 과산화물가 측정치와 유의적으로 높은 상관관계를 나타내었으며($r^2=0.987$), 상대적으로 높지는 않지만($r^2=0.874$) TBA와도 유의적으로 상관관계가 있다고 조사되었다. 또한 실제 표준시료를 이용한 분석 결과에서도 유의적으로 높은 상관관계($r^2=0.9214, 0.9599$)를 나타내었다. 따라서 화학발광도를 이용한 지질 산패도 측정법은 여러 식품 등의 지질 산패도 측정에 있어서 POV를 대체할 수 있을 것으로 기대가 되며, 경우에 따라서는 TBARS

에 대해서도 대체가 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 건국대학교 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. AOAC (1995) Official Methods of Analysis, 16th ed., Association of Official Analytical Chemists International, Washington, DC.
2. Botsoglou, N. A., Yannakopoulos, A. L., Fletouris, D. J., Tserveni-Goussi, A. S., and Fortomaris, P. D. (1997) Effect of dietary thyme on the oxidative stability of egg yolk. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3711-3716.
3. Cho, S. Y., Miyashita, K., Miyazawa, T., Fujimoto, K., and Kaneda, T. (1987) Autoxidation of ethyl eicosapentaenoate and docosahexaenoate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**, 876-879.
4. Cho, S. Y., Endo, Y., Fujimoto, K., and Kaneda, T. (1989) Autoxidation of ethyl eicosapentaenoate in a defatted fish dry model system. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi (J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.)* **55**, 545-552.
5. Galobart, J., Barroeta, A. C., Baucells, M. D., and Guardiola, F. (2001) Lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with $\omega 3$ and $\omega 6$ polyunsaturated fatty acids during storage as affected by dietary vitamin E and canthaxanthin supplementation. *Poultry Sci.* **80**, 327-337.
6. Gardner, H. W. (1979) Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 220-229.
7. Hasegawa, K., Endo, Y., and Fujimoto, K. (1994) Assessment of lipid oxidation in freeze-dried pork and egg yolk by solid sample spectrofluorometry. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi (J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.)* **40**, 150-153.
8. Hermes-lima, M., Willmore, W. G., and Storey, K. B. (1995) Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. *Free Radical Biol. Med.* **19**, 271-280.
9. Kikugawa, K., Kato, T., and Hayasaka, A. (1991) Formation of dityrosine and other fluorescent amino acids by reaction of amino acids with lipid hydroperoxides. *Lipids* **26**, 922-929.
10. Miyazawa, T. (1989) Determination of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma by a chemiluminescence-HPLC assay. *Free Radical Biol. Med.* **7**, 209-217.
11. Miyazawa, T., Fujimoto, K., Kinoshita, M., and Usuki, R. (1994a) Rapid estimation of peroxide content of soybean oil by measuring thermoluminescence. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**, 343-345.
12. Miyazawa, T., Fujimoto, K., Suzuki, T., and Yasuda, K. (1994b) Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence-high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* **233**, 324-332.

13. Miyazawa, T., Suzuki, T., Fujimoto, K., and Yasuda, K. (1992) Chemiluminescence simultaneous determination of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide in the liver and brain of the rat. *J. Lipid Res.* **33**, 1051-1059.
14. Rolewski, P., Siger, A., Nogala-Kalucka, M., and Polewski, K. (2009) Chemiluminescent assay of lipid hydroperoxides quantification in emulsions of fatty acids and oils. *Food Res. Int.* **42**, 165-170.
15. Pikul, J., Leszczynski, D. E., and Kummerow, F. A. (1989) Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1309-1313.
16. Singh, S. K., Suurkuusk, M., Eldsäter, C., Karlsson, S., and Ann-Christine, A. (1996) Chemiluminescence is a rapid and sensitive method to assess phosphatidylcholine oxidation. *Int. J. Pharm.* **142**, 199-213.

(Received 2011.7.21/Revised 1st 2011.12.29, 2nd 2012.1.31/
Accepted 2012.1.31)