

Amino 산-Xylose 갈변반응 물질의 항산화성

2. TLC와 투석을 이용한 항산화성 갈변물질의 분리

유 병 진 · 이 강 호* · 이 중 호**

강릉 대학 식품영양학과 *부산수산대학 식품공학과 **경상대학교 식품영양학과
(1986년 3월 22일 수리)

Antioxidant Activity of Amino Acid-Xylose Browning Reaction Products

2. Isolation of Antioxigenic Substrates from Browning Reaction Products by TLC and Dialysis

Byeong-Jin YOU

Department of Food and Nutrition, Kangnung National University, Kangnung 210, Korea

Kang-Ho LEE

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608, Korea
and

Jong-Ho LEE

Department of Food and Nutrition, Gyongsang National University, Chinju 620, Korea

(Received March 22, 1986)

In order to isolate antioxigenic substrates, the browning reaction products of xylose and various amino acids were analysed by TLC and dialysis.

Rf values of browning reaction products of xylose and hydrophobic amino acids separated on silica gel TLC plate were shown in the range of 0.38 to 0.56 and that of basic amino acids was around 0.2.

Browning reaction products made from xylose and Trp were separated on TLC into four bands with Rf values of 0.25, 0.55, 0.81 and 0.91 respectively. Among these the bands with Rf values of 0.25 and 0.55 appeared having strong antioxidant activity. The band of Rf 0.55 which showed the highest activity was positive to Procházka reagent and had an absorption maximum at 275 nm.

In dialysis of the xylose-Trp browning reaction products, the undialysed fraction (inner solution) was responsible to the antioxidant activity, which was separated into two bands with Rf values of 0.25 and 0.55 on TLC. The inner fractions of the browning products of xylose and His or Arg were also apparent in antioxidant activity.

서 론

식품열화의 원인이 되는 지질의 산화를 방지하기 위하여 사용되어지는 propyl gallate, BHA 및 BHT 등의 합성항산화제는 그 독성이 문제가 되어 각국에서 그 사용량을 규제하거나 잠정적인 사용금지를 취

하게 됨에 따라 천연항산화제의 연구·개발에 대한 관심이 높아지고 있다.

Yamaguchi 등(1964)은 갈변반응물질이 지질에 대한 항산화성이 있다고 보고한 이후로 이들을 항산화제로 이용하려는 연구가 진행되어 Frank와 Iwainky(1954)는 glucose와 glycine혼합용액을 가열하여 얻

은 갈변반응물질의 항산화성에 대하여 조사하였고 Anderson 등(1963)과 Yamaguchi 와 Koyama(1967a, b)는 포도당과 여러가지 아미노산을 첨가하여 배소한 과자에 lard를 첨가하여 그 안정성을 실험한 결과를 보고 하였으며 Maruyama 등(1970)은 산화지질과 아미노산을 반응시켜 얻은 갈변반응물질의 항산화성을 인정하였으며 Kawashima(1981)는 xylose와 peptide와의 갈변반응물질의 항산화성을 조사한 바 있다.

그러나 이들 대부분의 연구는 갈변반응물질의 항산화기구에 대해서는 언급하지 않고 있는데 Griffith와 Johnson(1957), Yamaguchi 등(1964)은 갈변반응물질의 항산화성은 reductone의 수소공여능에 의한 것이라고 추정하였고, Hwang과 Kim(1974)에 의하면 Maillard 반응물질이 경시적으로 증가하지 않으므로 항산화성물질은 갈변반응초기에 거의 형성된다고 생각하고 있는 반면에 Kirigaya 등(1968, 1969)은 갈변도가 증가함에 따라 항산화력이 증가한다고 하여 고분자물질이 주된 항산화성물질이라고 하여 서로 상충된 보고를 하고 있다.

그러므로 본 연구는 갈변반응물질중 항산화성 원인물질을 밝히기 위하여 갈변반응 물질중 항산화성이 있는 부분을 TLC 및 투석막을 이용하여 분리하고 그의 성질을 조사하였으므로 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 갈변반응물질의 조제

前報(You 등, 1986)에서 적은 바와 동일한 방법으로 갈변물질을 조제하였다.

2. 갈변반응물질의 분리와 정제

항산화효과가 있는 갈변반응물질을 분리·정제하기 위하여 앞에서 조제한 갈변반응물질의 희석용액을 Silica gel-P(Wako gel G-100)로써 0.5 mm 두께로 도포한 TLC plate 상에 spotting하여 acetone/chloroform/acetic acid/H₂O (40:40:20:5 v/v)의 혼합용매로써 전개한 후 ninhydrin 시약을 분무하여 110°C에서 1시간 가열발색시켜 발색된 반점의 위치를 확인하고 별도의 plate에 같은 조작으로 전개시켜 Procházka 시약을 분무하고 100°C에서 5분간 가열·발색시켜서 위치를 확인하였고 일부 갈변반응물질을 투석막(Sigma 250-7 U)에 넣고 10배량의 증류수 속에서 12시간마다 외액을 갈아주면서 48시간 투석하

였다. 투석후 내액물질은 진공동결건조시킨 후 항산화성을 측정하는 시료로 사용하였다.

3. Methyl linoleate의 조제 및 반응계의 조성

Methyl linoleate의 조제방법과 반응계의 조성방법은 前報(You 등, 1986)과 동일하게 하였다.

4. 실험방법

(1) 과산화물가, Carbonyl가 및 환원력의 측정
과산화물가의 측정은 AOAC(1980)법에 준하였고 Carbonyl가는 Hernick(1954)법에 따라 측정하였으며 환원력은 Maruyama 등(1970)의 방법에 따라 측정하였다.

(2) 갈변도의 측정

1% 갈변반응물질 수용액을 1 cm cell에 주입하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 흡광 스펙트럼의 측정

시료 2 mg을 95% ethanol 용액에 용해시켜 UV-Vis spectrophotometer(Varian 634)로 측정하였다. 이때의 Scan rate는 50 nm/min 이었고 slit의 크기는 0.2 mm 이었다.

결과 및 고찰

1. 갈변반응물질의 TLC에 의한 분리

Fig. 1과 2는 아미노산의 갈변반응물질을 silica gel TLC 상에서 전개하여 ninhydrin 시약과 Procházka 시약으로 발색시킨 결과이다. ninhydrin 시약에 의해서 보라색의 양성반응을 나타낸 물질의 Rf치는 소수성아미노산의 갈변반응물질의 경우는 0.39~0.56 부근이었고 극성아미노산과 염기성아미노산의 갈변반응물질은 0.2부근인 것으로 보아 갈변반응물질의 극성도 반응아미노산의 극성에 좌우된다는 것을 알 수 있다. 前報(You 등, 1986)에서 보고한 바와 같이 강한 항산화력을 나타낸 Trp의 갈변반응 물질은 TLC전개 후 ninhydrin 시약으로 발색시켰을 때 Rf치 0.54부근에서 양성반응을 나타내었고 Procházka 시약으로 반응시켰을 때에도 ninhydrin과 동일한 위치에 황색의 양성반응을 나타내었다. Kaldway(1973)에 의하면 indole기를 함유하는 화합물은 ninhydrin 시약과 Procházka 시약에 의해서 각각 주황색과 황색으로 발색되며 Rf치가 0.56과 0.63으로

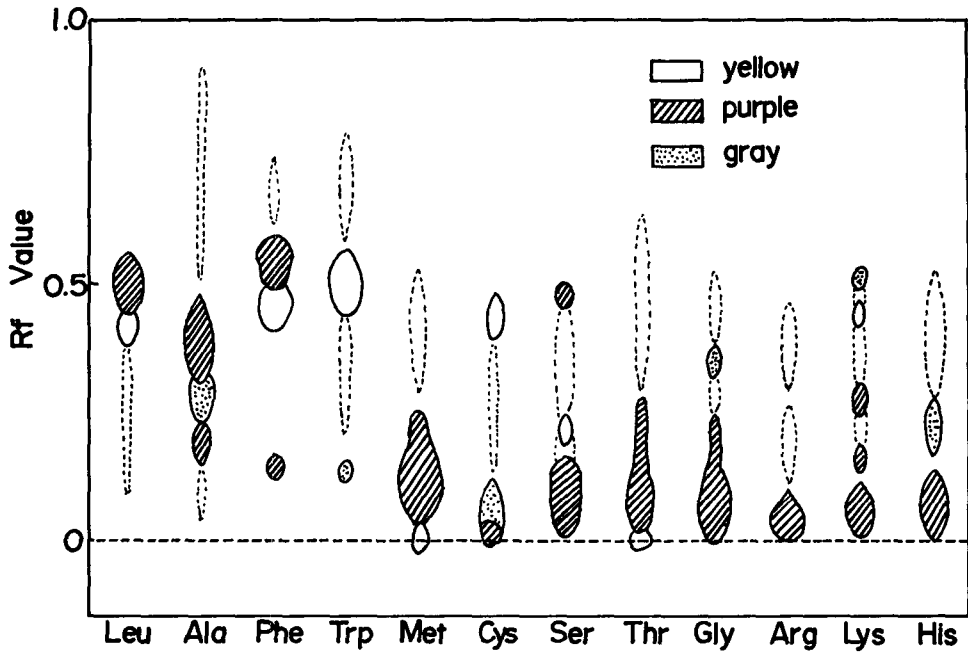


Fig. 1. TLC chromatogram of browning reaction mixture formed by xylose and amino acids (ninhydrin treated, developer; acetone/chloroform/acetic acid/H₂O=40:40:20:5, v/v) soln.

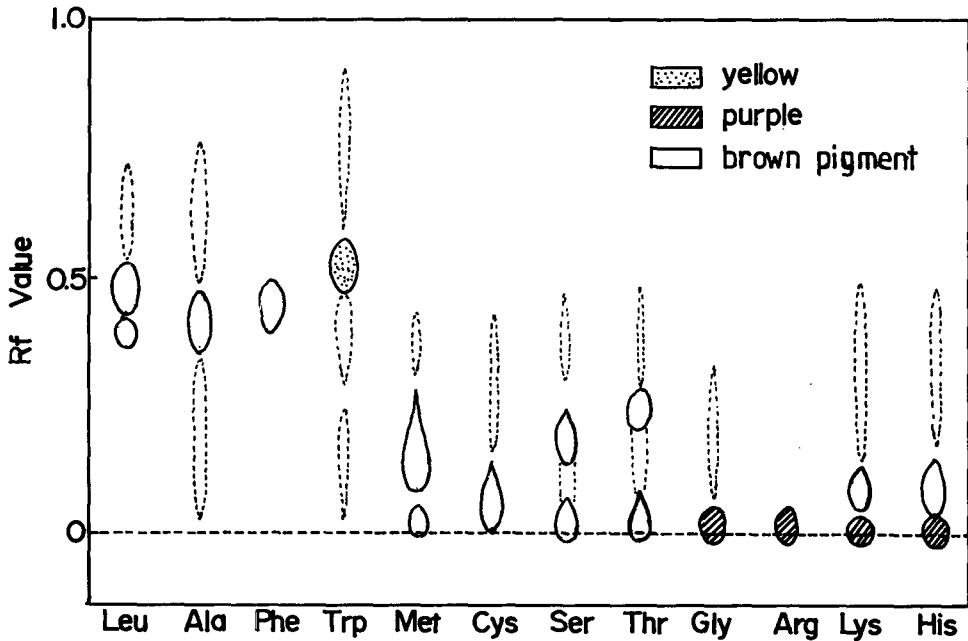


Fig. 2. TLC chromatogram of browning reaction mixture formed by xylose and amino acids (Prochaska reagent treated, developer; acetone/chloroform/acetic acid/H₂O=40:40:20:5, v/v) soln.

나타난다고 하였는 데 이를 미루어 볼 때 Trp의 갈변반응물질에는 indole기가 존재하고 있음을 알 수 있었다.

2. Xylose-Trp 갈변반응물질중의 황산화성구분의 분리 및 정제
- 1) 갈변반응물질의 TLC에 의한 분리

Amino 산-Xylose 갈변반응 물질의 항산화성

0.5 M의 Xylose 용액과 Trp 용액을 동량 혼합하여 100°C에서 32시간 가열하여 얻은 반응물질중에서 항산화성을 나타내는 갈변반응물질을 분리하기 위하여 TLC 상에서 전개한 후 자외선으로 검색하였다

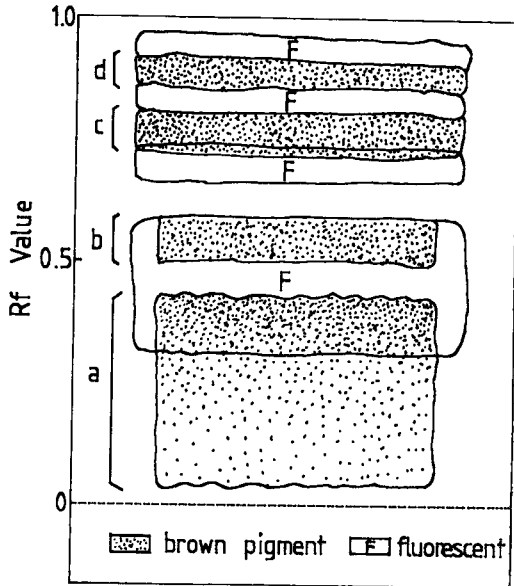


Fig. 3. TLC chromatogram of browning reaction mixture formed by xylose and tryptophan developed with acetone/chloroform/acetic acid/H₂O(40:40:20:5, v/v) soln.

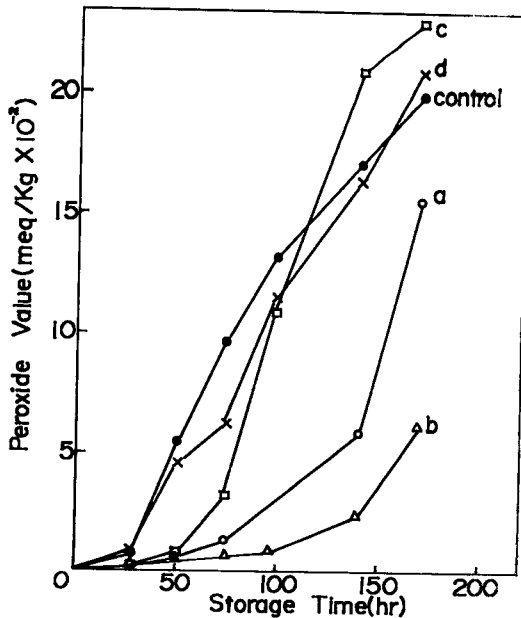


Fig. 4. Changes of peroxide value of methyl linoleic ester added with brown pigments isolated on TLC plate.

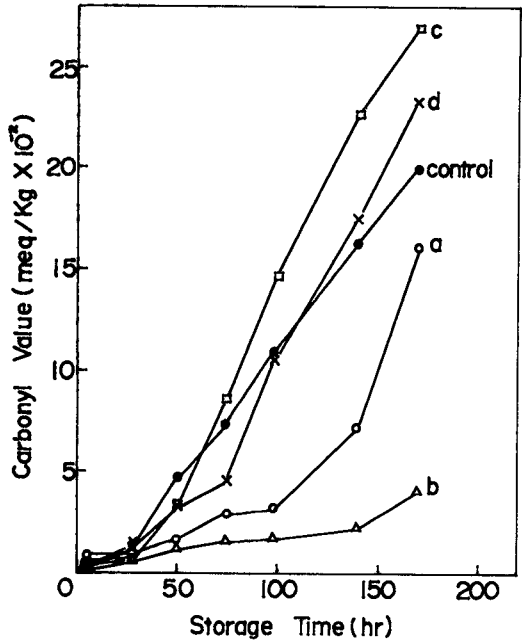


Fig. 5. Changes of carbonyl value of methyl linoleic ester added with brown pigments isolated on TLC plate.

(Fig. 3) 그 결과 갈변반응물질은 Rf치 0.25, 0.55, 0.81 및 0.90의 4구분으로 분리되었으며 각 band를 a, b, c, d로 분리·채취하여 항산화성을 측정 한 결과는 Fig. 4와 5에서와 같다. a, b, c, d 각 band의 갈변반응물질을 2% 첨가한 methyl linoleate의 과산화물가는 보존 170시간 후에 각각 1,564, 612, 2,330 및 2,098 meq/kg 이었고 Carbonyl가는 1,581, 407, 2,680 및 2,203 meq/kg 으로 나타나 a와 b band가 항산화작용을 나타내었는데 특히 band b가 강한 효과가 있음을 보여주었고 c와 d band는 거의 항산화성이 없는 것으로 나타났다. 이들 각 band의 항산화성에 관계되는 구조적 특징을 알아보기 위해 각 band의 자외선 흡수스펙트럼(Fig. 6)을 검토해보면 모든 band가 216 nm에서 최대흡수를 보였고 강한 항산화성을 나타내었던 band b는 독특하게 275 nm에서도 강한 흡수를 보여 Namiki 등(1982a)이 Trp과 ascorbic acid의 갈변반응물질에 대한 항산화효과에서도 지적한 바와 같이 Trp의 indole기가 갈변반응물질속에 존재하고 있음을 시사하며 또한 indole기가 아미노산 및 갈변반응물질의 항산화성에 관계하고 있는 것으로 추정되었다.

2) 갈변반응물질의 투석

갈변반응물질을 저분자부분과 고분자부분으로 분

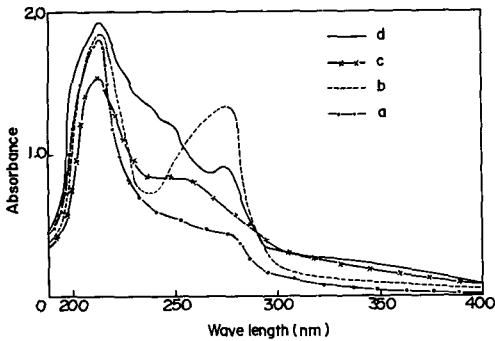


Fig. 6. UV spectra of brown pigments isolated by TLC.

리하기 위하여 수중에서 48시간 투석하여 내액물질(DI), 외액물질(DO)로 분리하고 투석전의 갈변반응물질(BD)과 항산화성을 비교·검토하였다(Fig. 7, 8). DI, DO 및 BD를 첨가한 methyl linoleate의 보존 190시간 후의 과산화물가는 220, 1,545와 1,181 meq/kg이며 carbonyl가는 176, 2,012와 1,498 meq/kg으로 갈변반응물질의 투석내액이 투석전의 물질보다 강한 항산화작용을 나타내었으므로 갈변반응물질의 항산화효과는 반응생성물중 고분자물질구분에 기인된 것으로 생각되었다. Kirigaya 등(1969)은 비투석성

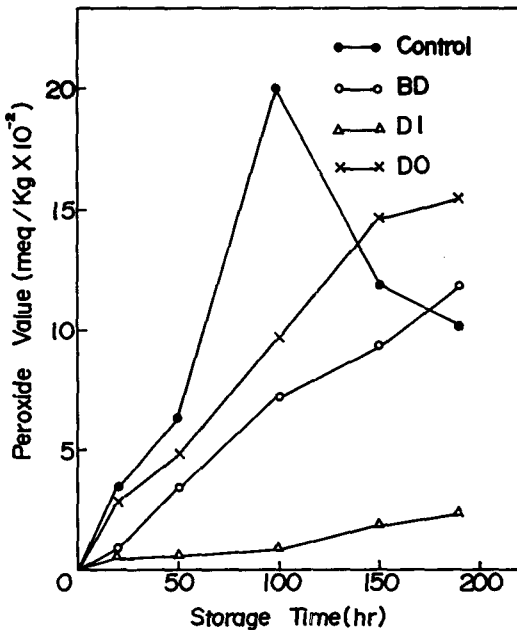


Fig. 7. Changes of peroxide value of methyl linoleic ester added with dialyzed and nondialyzed browning reaction mixture formed by xylose and tryptophan.

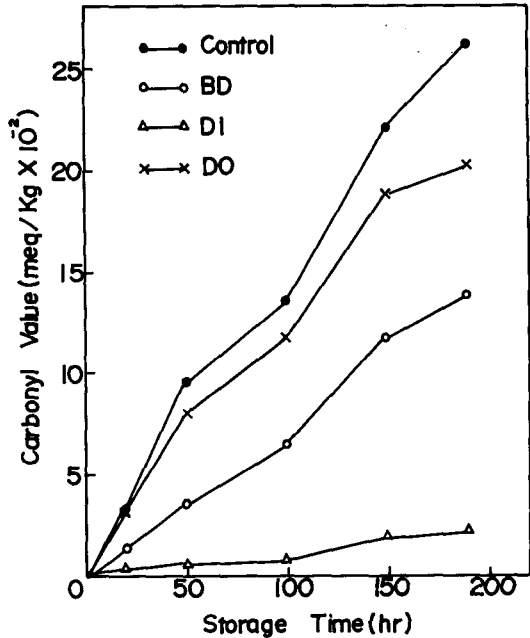


Fig. 8. Changes of carbonyl value of methyl linoleic ester added with dialyzed and nondialyzed browning reaction products formed by xylose and tryptophan.

melanoidin의 수율이 많을수록 항산화력이 증가하였다고하여 본 실험의 결과와 일치하는 결과를 보고하는 반면 Hwang과 Kim(1973)은 저분자물질구분이 효과가 있다고 상반되는 결과를 발표한 바 있다. 투석내액물질의 항산화효과가 Trp 이외의 아미노산 갈변반응물질에서도 동일하게 나타나는 가를 조사하기 위하여 Trp과 Xylose와의 갈변반응물질제조와 동일한 조건으로 Ser, His과 Arg의 갈변반응물질을 제조, 투석하여 그 내액의 항산화성을 Trp과 비교·측정하였다(Fig. 9). 그 결과 보존 200일 후의 과산화물가는 Trp 356, Ser 5,904, His 508 및 Arg 451 meq/kg으로 나타나 Ser의 경우를 제외하고는 모두 강한 항산화력을 나타내었다. 따라서 갈변반응물질의 항산화성은 반응아미노산의 종류에 따라 Ser과 같이 특이한 예외도 있으나 비투석성인 고분자물질구분에 의한 것으로 생각되어진다.

Trp과 Xylose의 갈변반응물질을 투석한 후의 BD, DI와 DO를 TLC 상에서 분리한 결과(Fig. 10) BD에서는 Rf치 0.25, 0.55, 0.81 및 0.90 등 4개의 갈색 spot가 나타났으며 Rf치 0.40, 0.50, 0.71, 0.86 및 0.92에 형광물질이 분리되었으나 투석한 후의 내액에서는 Rf치 0.25와 0.55의 갈변색소와 Rf치 0.50인 형광물질만 존재하였고 나머지 갈변색소

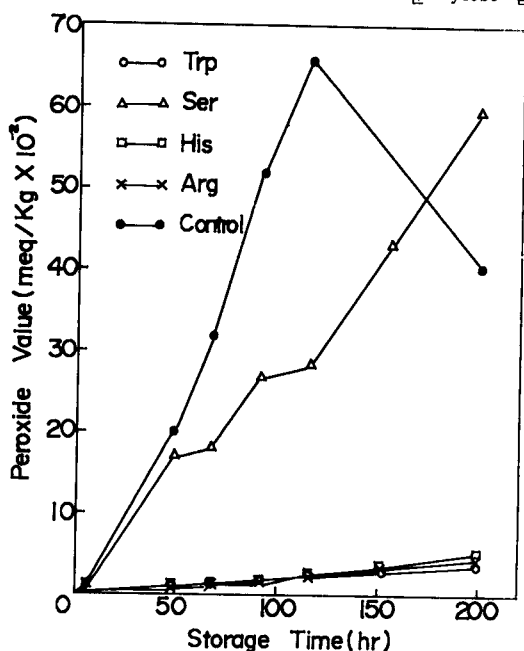


Fig. 9. Changes of peroxide value of methyl linoleic ester added with nondialyzed browning reaction products formed by xylose and various amino acids.

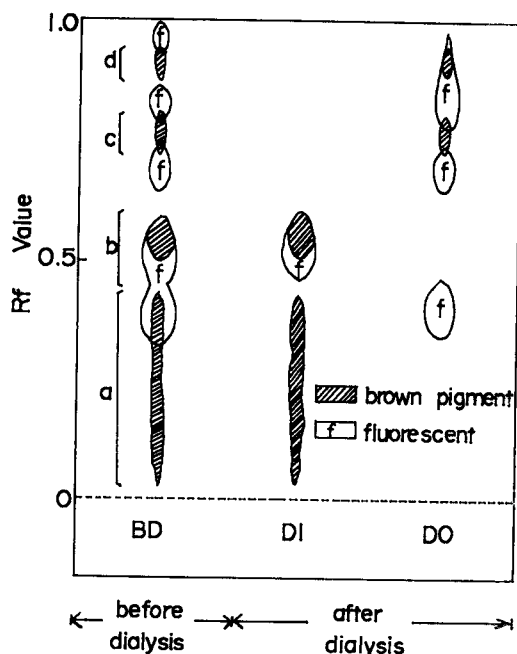


Fig. 10. TLC chromatogram of dialyzed and nondialyzed browning reaction products formed by xylose and tryptophan (developer; acetone/chloroform/acetic acid/H₂O=40:40:25:5, v/v soln.).

와 형광물질은 모두 외액에서 나타났다. 갈변반응물질중의 형광성물질에 대하여 Malshet와 Tappel (1974)에 의하면 Schiff's base 중의 전자공여체와 imino 기와의 공유결합에 기인한다고 보고한 바 있다. 그리고 갈변반응물질의 TLC에서 분리된 항산화력이 있는 band a, b는 투석내액의 TLC에서 동일한 Rf치로 나타났다.

항산화력과 갈변도 및 환원력과의 관계를 살펴보면 Fig. 11에 나타난 바와 같이 BD, DO와 DI의 흡광도는 각각 0.783, 0.080과 0.963이었고 환원력은 1.86, 1.80 및 2.03으로 모든 구분이 강한 것으로 나타나 갈변반응물질의 항산화효과는 갈변반응물질의 환원력보다 갈변색소의 영향이 더 큰 것으로 추정되었다.

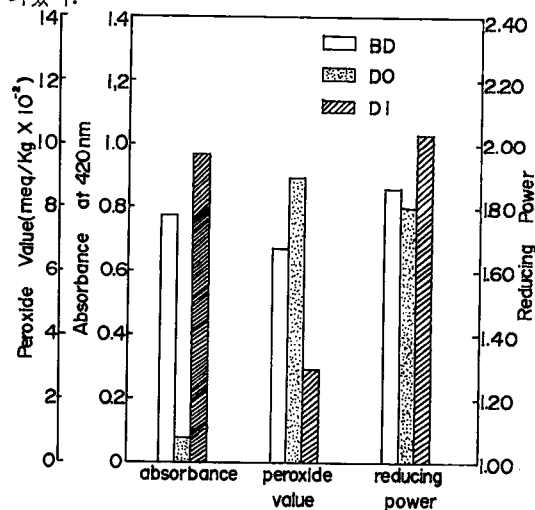


Fig. 11. Comparison of color intensity and reducing power with antioxidant effects in dialyzed and nondialyzed browning reaction product formed by xylose and tryptophan.

결론 및 요약

각종 아미노산과 Xylose를 반응시켜 얻어진 갈변반응물질중 항산화성을 나타내는 물질을 분리하기 위하여 TLC 및 투석막을 이용하여 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 각종 아미노산과 Xylose를 반응시켜 얻어진 갈변반응물질중 소수성아미노산의 갈변반응물질의 경우는 Rf치가 0.38~0.56 부근이었고 극성 아미노산과 염기성아미노산의 경우는 0.2부근이었다.

2. Trp와 Xylose의 갈변반응물질은 Procházka 시

약에 양성반응을 나타내었고 UV 스펙트럼 조사결과 275 nm 에서 강한 흡수를 나타내었다.

3. Trp 와 Xylose 의 갈변반응물질은 TLC 상에서 Rf 치 0.25, 0.55, 0.81 및 0.90의 4부분으로 분리되었는데 가장 강한 항산화효과를 나타낸 것은 Rf 치 0.55의 갈변반응물질이었다

4. Trp 과 Xylose 의 갈변반응물질을 투석하여 분리한 내액의 성분은 TLC 상에서 Rf 치 0.25와 0.55의 항산화성 갈변반응물질로 나타났고 외액의 성분은 항산화성이 없는 갈변반응물질과 형광물질이었다. His 및 Arg 과 Xylose 갈변반응물질의 투석내액도 강한 항산화성을 보였다.

문 헌

- Anderson, R.H., D.H. Moran, T.E. Huntly and J.L. Holahan. 1963. Responses of cereals to antioxidants. Food Technol. 17, 1587—1590.
- AOAC. 1980. "Official Method of Analysis", 13 thed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Franzk, Cl. and H. Iwainy. 1954. Deut. Lebensmittel. Rundschau 50, 252—257.
- Griffith, T. and J.A. Johnson. 1957. Relation of the browning reaction to storage stability of sugar cookies., Cereal Chem. 34, 159.
- Hernick, A.S., M.F. Benca and J.H. Mitchell Jr. 1954. Estimating carbonyl compounds in rancid fats and foods. J. Am. Oil Chem. Soc. 31, 38—41.
- Hwang, C.I. and D.H. Kim. 1973. The antioxidant oxidants. Wld. Hlth. Org. Techn. Rept. Ser. 228—233.
- Kaldeway, H. 1973. Thin-layer Chromatography a Laboratory book 2nd. George Allen & Uniwinn Ltd. London pp. 471—493.
- Kawashima, K.H. Itoh and I. Chibata. 1981. Antioxidant effect of peptidein combination with sugar on autoxidant of edible oils. Agric. Biol. Chem. 45, 987—992.
- Kirigaya, N., H. Kato and M. Fujimaki. 1968. Studies on antioxidant of nonenzymatic browning products. part 1, Relations of color intensity and reductones with antioxidant activity of browning reaction products. Agric. (Japan) 32(3), 289—290.
- Kirigaya, N., H. Kato and M. Fujimaki. 1969. Studies on antioxidant activity of nonenzymatic browning reaction products. Part 2. Antioxidant activity of nondialyzable browning reaction products. J. Agric. Chem. Soc. (Japan) 43(7), 484—491.
- Malshet, V. G. and Al L. Tappel. 1973. Fluorescent products of lipid peroxidation. 1. Structural requirement for fluorescence in conjugated Schiff bases. Lipids 8(4), 194—197.
- Maruyama, M., K. Fujimoto and T. Kaneda. 1970. Antioxidative activity of browning products derived from autoxidized oil. Part I. Comparison of antioxidative activity in several model system. J. Food Sci. & Technol. (Japan) 17(1), 281—285
- Namiki, M., A. Shigeta and T. Hayashi. 1982a. Antioxidant effect of the reaction mixture of dehydroascorbic acid with tryptophan. Agric. Biol. Chem. 46, 1207—1212.
- Yamaguchi, N. and Y. Koyama. 1967a. Studies on the browning reactor products yielded by reducing sugar and amino acid. Part 1. Effect of the substance extracted from biscuits and cookies by several organic solvents on the stability of fat. J. Food Sci. & Technol. (Japan) 14, 106—112.
- Yamaguchi, N. and Y. Koyama. 1967b. Studies on the browning reaction products yielded by reducing sugar and amino acid. Part IV. Relationship between reducing power of Sephadex column and antioxidant activity of the fractionated material(I). J. Food Sci. & Tech. (Japan), 17, 136—141.
- Yamaguchi, N., Y. Yokoo and Y. Koyama. 1964. Studies on the browning reaction product yielded by reducing sugar and amino acid. Part 1. Effect of browning reaction products on the stability of fats contained in biscuits and cookies. J. Food Sci. & Technol. (Japan) 11, 184—189.
- You, B.-J., K-H. Lee, C.Y. Kim and J. H. Lee. 1986. Antioxidant activity of amino acid-xylose browning reaction products. 1 Antioxidant activities of various amino acids and their browning reaction products. Bull. Korean Fish. Soc. 19(1), 1—9.