

중합도별 gum류 가수분해 올리고당과 urea 관련화합물과의 반응혼합물이 항산화능에 미치는 영향

김상우¹ · 박귀근*

¹일본 오사카대학 단백질연구소, 경원대학교 공과대학 생명공학부

(2004년 11월 22일 접수; 2004년 12월 17일 수리)

100°C에서 반응시켜 2, 4, 6, 8시간의 갈변도 변화는 β -1,4-mannobiose와 urea의 반응혼합물이 시간의 경과함에 따라 강한 착색도의 증가를 나타냈으나 phenylthiourea, thiourea의 반응액은 착색속도가 늦었다. 같은 조건하에서 Gal³Man₄와 urea 관련화합물의 각 반응혼합물의 갈변도를 나타낸 것으로 urea가 강한 착색도의 증가를 보였고 phenylthiourea, thiourea의 반응액은 비교적 높은 착색도를 보였다. DP 7의 galactosyl manooligosaccharide와의 각 반응혼합물의 갈변도는 urea의 반응액이 강한 착색을 보였으며 phenylthiourea, thiourea의 반응액의 순으로 착색을 나타내었다. 반응혼합물의 TLC 결과에서 β -1,4-mannobiose와 urea의 반응혼합물 이외에 phenylthiourea, thiourea의 반응액은 새로운 화합물이 생성되었고, Gal³Man₄와 D.P 7 galactosyl manooligosaccharide와의 반응혼합물에서는 모든 반응액에서 새로운 화합물이 출현되었다. 반응혼합물의 환원력은 urea 관련화합물 중에서 특히 phenylthiourea, thiourea가 β -1,4-mannobiose, Gal³Man₄, DP 7의 galactosyl manooligosaccharide와의 반응혼합물에서 강한 환원력이 나타났다. Linoleic acid에 대한 반응혼합물의 항산화력 측정에서 β -1,4-mannobiose와 thiourea의 반응혼합물의 항산화력이 Ascorbic acid(AsA)수준의 항산화력을 나타내었고, Gal³Man₄와 thiourea, phenylthiourea의 반응혼합물은 AsA와 유사한 항산화능을 나타내었다. DP 7의 galactosyl manooligosaccharide와 thiourea, phenylthiourea의 반응혼합물의 항산화력은 AsA에 미치지 못하는 듯하였다. β -1,4-Mannobiose와 thiourea, phenylthiourea의 반응혼합물이 강한 전자공여능을 나타내고 있고, Gal³Man₄와 phenylthiourea의 반응혼합물 및 D.P 7의 galactosyl manooligosaccharide와 phenylthiourea와의 반응혼합물이 전자공여능을 나타내고 있다.

Key words: antioxidant action, galactosyl manooligosaccharides

서 론

생리활성에 관여하는 hemicellulose계열 oligosaccharides의 응용범위로서 식품에서 일어나는 amino carbonyl 반응은 carbonyl 화합물과 amino 화합물이 자연발생적으로 일어나는데 amino carbonyl 반응은 중성부근의 용액 중에서 활발히 진행되어 schiff's base 혹은 amino reductone 등의 반응중간체를 형성한다.¹⁾ 이와 유사한 반응으로 galactomannan 가수분해물인 manooligosaccharide를 이용하면 산성조건하에서 여러 amino 화합물에 반응하여 reductone류를 얻을 수 있다.

Reductone류는 강한 환원성을 가지고 있는 화합물로서 구조 내에는 enediol, enaminal, enediamine, thiol-enol, enamine-thiol group을 가지고 있으며 이들 group에 기초를 둔 enediol, amino-thiol reductone 등으로 분류된다. Amino reductone은 amino carbonyl 반응²⁾이나 strecker's degradation^{2,3)}과 같은 갈색화 반응^{4,5)}에서 반응중간체로 형성되며 식품 중에서 색의 변화나 풍미를 형성하고 갈변물질의 항산화제로서의 이용에 관한 연구 등에 사용되고 있다. 식품 제조·가공 중에 유지의 항산화성이 문제가 되는데 법정 항산화제인 BHA, BHT는 자외선 조사 등에 의한 광분해작용에 의하여 생성되는 물질이 인체에

유해함⁶⁾이 증명되어 무해한 항산화제의 개발이 요구되고 있다.^{7,8)}

본 연구는 galactomannan 가수분해효소인 *Bacillus* sp. 유래 β -mannanase로 gum류 가수분해 올리고당을 중합도별로 분리·조제·동정하여 식품의 생리활성물질로 관여하는 urea 관련화합물과의 반응물에 대한 항산화능을 비교하고 최종적으로 항물연변이 효과를 규명하기 위한 기초연구로서 coloration, 환원력을 측정하였고 반응혼합물의 linoleic acid에 대한 항산화력을 검토하였다. 또한 반응혼합물의 전자공여성 여부를 관찰하기 위하여 Blois의 방법⁹⁾에 따라 DPPH(2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)에 의한 수소공여능 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

Gum류 가수분해 올리고당의 분리. 효소액 300 ml(10 units)에 대해 0.5% gum류를 24시간 가수분해해 TLC로 pattern을 검토한 후 activated carbon column chromatography(4×90 cm)를 이용해 250 ml/hr유속으로 tube당 50 ml씩 ethanol 0~30%의 linear gradient하여 당을 분리한다. 또, Sephadex G-25(2×100 cm)를 이용해 manooligosaccharides 및 galactosyl manooligosaccharides를 분리하였다. Activated carbon column chromatography와 Sephadex G-25에 의한 당용액은 phenol-sulfuric acid법¹⁰⁾에 의해 검출하였다. 즉, 당용액 0.2 ml와 5% phenol 0.2 ml, Conc-H₂SO₄ 1 ml를 가하여 혼합한 후 20분간 방치하여 490 nm로 흡

*연락자

Phone: 82-31-750-5383, Fax: 82-31-750-5383

E-mail: ggpark@mail.kyungwon.ac.kr

광도를 측정하였다.

Coloration. 50 mM galactosyl manooligosaccharide와 같은 mole의 urea관련화합물을 용매인 0.1 M HCl-99.8% ethanol에 혼합한 후 oil bath에서 100°C로 2, 4, 6, 8시간 반응시켜 UV-Spectrophotometer(Shimadzu UV-1201, Japan)로 450 nm에서 갈변도를 측정하였다.¹¹⁾

환원력 측정. 반응혼합물의 환원력은 반응액을 2, 6-dichlorophenol indophenol(DPI)-butyl alcohol 방법에 의해 측정하였으며 ascorbic acid(AsA)의 양으로 표시하였다. 즉, Tillman 방법¹²⁾을 개량한 DPI 용액을 사용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPI-butyl alcohol 용액 조제는 2,6-dichlorophenol indophenol(DPI)-sodium salt 60 mg을 소량의 n-butyl alcohol에 용해하여 여과한 후 불용물을 제거하여 여액에 n-butyl alcohol을 가하여 100 ml로 한 저장모액을 n-butyl alcohol로 20배 희석하여 3 mg% 용액으로 사용하여 냉암소에 보존하며 비색용 용액으로 사용하였다. 표준 Ascorbic acid(AsA) 용액 조제는 순수한 AsA 결정 4 mg을 2% metaphosphoric acid 100 ml에 용해하여 10~15 γ /ml 농도로 요오드 적정법에 의해 정확한 농도를 측정하였다. Metaphosphoric acid 용액 조제; Metaphosphoric acid를 2%(w/v)의 농도가 되도록 물에 용해하여 사용하였다. Acetate buffer solution 조제는 Sodium acetate 60 g을 70 ml의 물에 용해하여 acetic acid 100 ml를 가하여 pH3.5~3.6으로 하였다. 측정법으로서는 Table 1와 같이 비색법 조작에 의하여 얻은 상등액을 정확히 3분 후에 530 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 의하여 AsA 함량을 구하였다.

$$\gamma/ml = \{D_1 - (D_2 - D_3)\} \cdot f$$

f: 표준 AsA 용액의 농도

항산화력 측정.

Linoleic acid 용액 조제 및 자동산화. Linoleic acid 2.53 g (2×10^{-2} M)을 ethyl alcohol 80 ml에 용해하여 0.1 M phosphate buffer solution(pH7.0)으로 500 ml이 되게 혼합하여 사용한다. 이 용액에서 5 ml를 취하고 반응혼합물 1 ml, 0.1 M phosphate buffer solution 4 ml를 취하여 38°C에서 incubation하였다. Control은 amino carbonyl 반응시에 사용한 용매를 동량 가하여 비교하였다.

반응혼합물의 항산화력 측정방법은 ferrous chloride-ammonium thiocyanate법^{13,14)}에 따라 실시하였다. 즉, 75% ethyl alcohol 4.7 ml, 30% ammonium thiocyanate 0.1 ml,

Table 1. Protocol of reducing power

	Test tube 1	Test tube 2	Test tube 3
1	3 mg% DPI butanol 용액 5 ml	3 mg% DPI butanol 용액 5 ml	3 mg% DPI butanol 용액 5 ml
2	Acetate buffer solution 각각 1 ml		
3	2% Metaphosphoric acid 5 ml	Sample 5 ml	Sample 5 ml
4	원심분리		
5	원심분리후 butanol층을 분리하여 취한다.		
6	Butanol층의 흡광도를 측정한다(3번 조작후 5~30분).		
7	흡광도 D ₁	흡광도 D ₂	흡광도 D ₃

3.5% HCl에 용해된 20 mM ferrous chloride 0.1 ml, linoleic acid 용액 0.1 ml를 혼합하여 정확히 3분 후에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH(2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl)에 의한 수소공여능. 반응혼합물의 전자공여성 여부를 관찰하기 위하여 Blois's 방법⁹⁾에 따라 실시하였다. 즉, 반응혼합물 0.5 ml, 0.1 M phosphate buffer solution(pH 6.5) 2 ml, 99% ethyl alcohol 1.5 ml, ethyl alcohol에 용해한 DPPH(0.5 mM) 용액 1 ml를 혼합하여 정확히 30초 후에 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Gum류 가수분해 올리고당의 분리 및 조제. 저자가 보고한 방법^{15,16)}에 의하여 gum류 가수분해 올리고당은 중합도 2와 5는 β -1,4-mannobiose, Gal³Man₄(6³-mono- α -D-galactopyranosyl- β -mannotetraose)로 동정되었으며, 중합도 7의 galactosyl manooligosaccharide은 현재 동정중에 있으나 Gal^{2,3}Man₅, Gal^{3,4}Man₅, Gal^{2,4}Man₅ 중 하나로 추정되고 있다.

Coloration. Fig. 1은 50 mM의 Gal³Man₄와 식물의 생리활성 물질로 존재하는 urea관련화합물인 urea, thiourea, phenylthiourea의 혼합물을 각각 0.1 M HCl-99.8% ethanol(1 : 1) 중에 용해한 후 100°C에서 반응시켜 2, 4, 6, 8시간의 갈변도 변화를 나타내었는데 urea가 강한 착색도의 증가를 보이고 phenylthiourea,

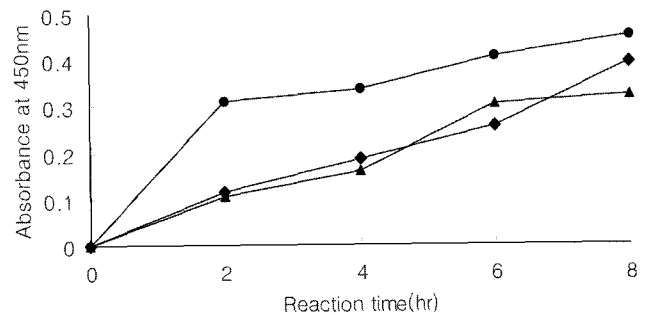


Fig. 1. Change of browning of the reaction mixtures of Gal³Man₄ and ureas at 100°C for 8 hrs in 50 mM HCl-ethanol (1 : 1). ●: Gal³Man₄ + urea, ▲: Gal³Man₄ + phenylthiourea, ◆: Gal³Man₄ + thiourea

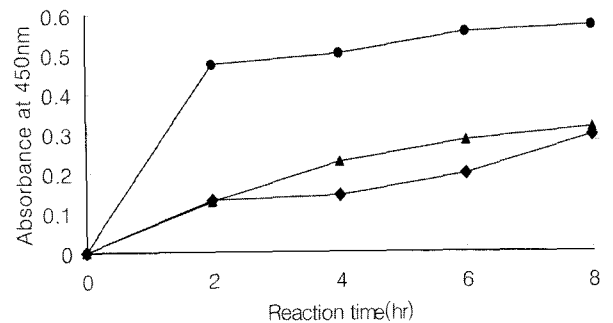


Fig. 2. Change of browning of the reaction mixtures of β -1,4-mannobiose and ureas at 100°C for 8 hrs in 50 mM HCl-ethanol (1 : 1). ●: β -1,4-mannobiose + Urea, ▲: β -1,4-mannobiose + phenylthiourea, ◆: β -1,4-mannobiose + thiourea

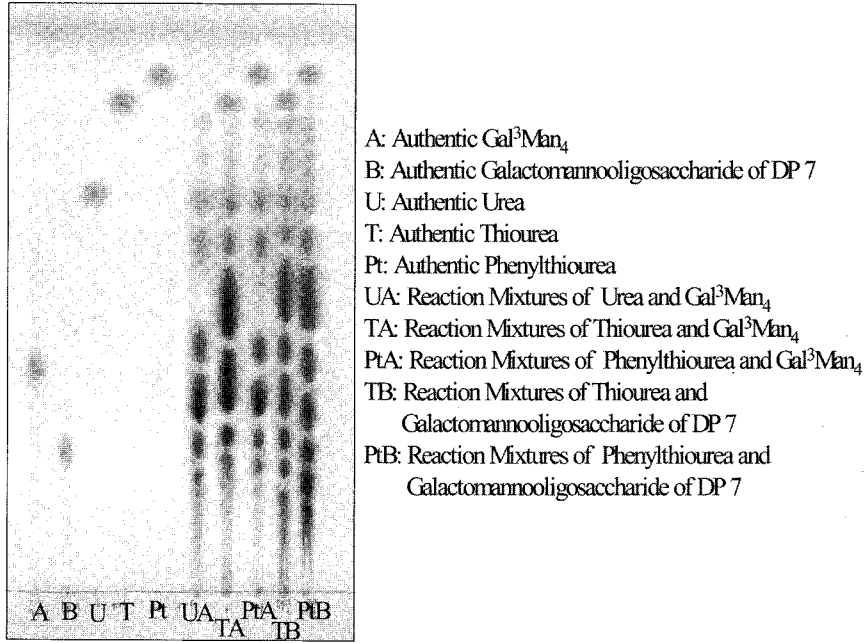


Fig. 3. TLC of the reaction mixtures of Gal³Man₄, D.P 7 and ureas.

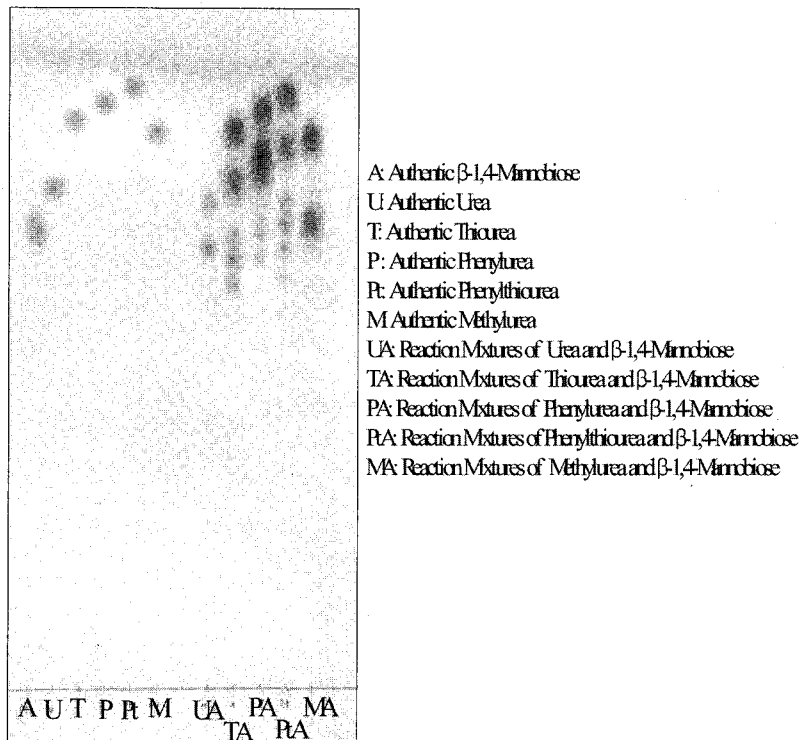


Fig. 4. TLC of the reaction mixtures of β-1,4-mannobiose and ureas.

thiourea의 반응액은 비교적 높은 착색도를 보였다.

Gum류 가수분해 올리고당중 β-1,4-mannobiose 경우 urea, phenylurea, methylurea의 반응혼합물은 시간의 경과에 따라 강한 착색도의 증가를 나타냈으나 phenylthiourea, thiourea의 반응액은 착색도가 낮았다(Fig. 2). 또한 중합도 7의 galactosyl manooligosaccharide의 경우 phenylthiourea, thiourea보다는 urea의 반응액이 강한 착색도를 보였다. 공통적으로 gum류 가수분

해 올리고당은 중합도 및 구조식에 관계없이 urea와의 반응혼합물에서 높은 착색도가 나타나는 공통점이 있었다.

반응혼합물의 Thin Layer Chromatography. TLC의 시료는 50 mM의 Gal³Man₄의 galactosyl manooligosaccharide와 urea 화합물과 100°C에서 8시간 반응시킨 반응혼합물을 사용했다. Fig. 3는 Gal³Man₄와 DP 7의 galactosyl manooligosaccharide와 urea관련 화합물의 반응혼합물의 TLC로 나타낸 것으로 모

Table 2. Reducing power (AsA mg/ml) of the reaction mixtures of oligosaccharides and ureas

Urea derivatives	β -1,4-mannobiose	Gal ³ Man ₄	D.P 7
urea	1.01	9.02	-
methylurea	6.30	-	-
phenylurea	13.10	-	-
thiourea	17.56	1.84	1.91
phenylthiourea	17.93	17.93	21.86

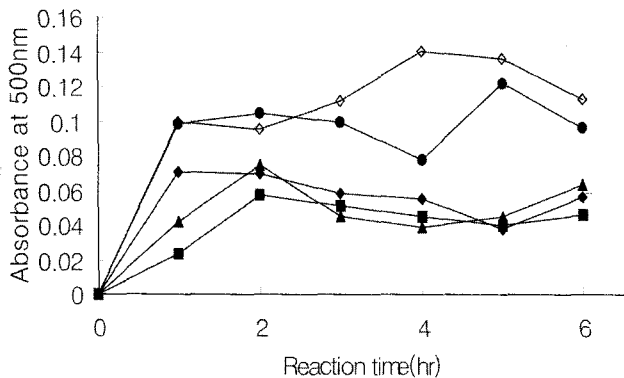


Fig. 5. Antioxidant activity of the reaction mixtures of Gal³Man₄ and ureas. -■-: AsA, -◇-: control, -●-: Gal³Man₄+ urea, -▲-: Gal³Man₄+ phenylthiourea, -◆-: Gal³Man₄+ thiourea

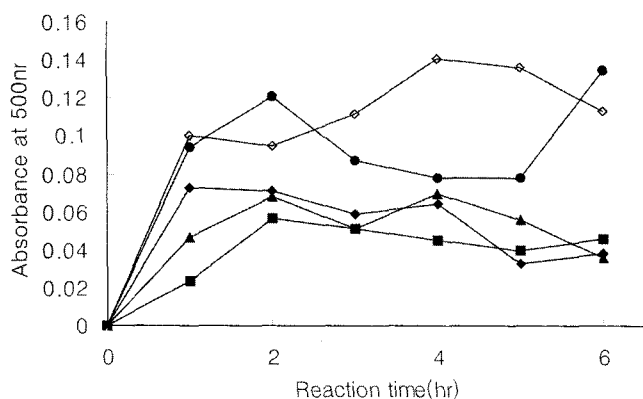


Fig. 6. Antioxidant activity of the reaction mixtures of β -1,4-mannobiose and ureas. -■-: AsA, -◇-: Control, -●-: β -1,4-mannobiose + urea, -▲-: β -1,4-mannobiose + phenylthiourea, -◆-: β -1,4-mannobiose + thiourea

든 urea 화합물의 spot 이외의 여러개의 새로운 spot이 형성되어 새로운 반응생성물이 형성되었음을 시사하고 있다. 또한 β -1,4-mannobiose와 urea 화합물의 반응혼합물의 TLC에서는 urea는 β -1,4-mannobiose와 urea 화합물의 spot만 나온 반면, thiourea, phenylurea, phenylthiourea는 다른 여러개의 spots가 형성되었으며 이 spot의 형성은 새로운 반응생성물이 형성되었다는 것을 시사하고 있다(Fig. 4).

환원력. Table 2은 gum류 가수분해 올리고당과 ureas 화합물과의 100°C에서 8시간 반응시킨 Tillman 방법¹²⁾에 의한 환원력을 나타낸 것으로 이 환원력은 AsA의 양으로 표시하였다. urea 관련화합물 중에서 특히 phenylthiourea는 모든 가수분해 oligosaccharides와 thiourea는 β -1,4-mannobiose와의 반응혼합물에서 강한 환원력이 나타났다.

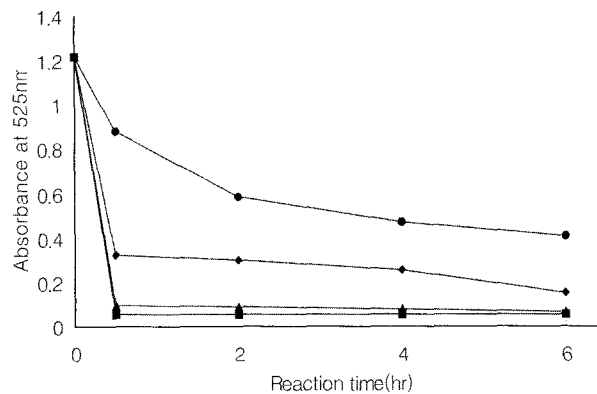


Fig. 7. Reactivities of the reaction mixtures of Gal³Man₄ and ureas with DPPH. -■-: AsA, -●-: Gal³Man₄+ Urea, -▲-: Gal³Man₄+ phenylthiourea -◆-: Gal³Man₄+ thiourea

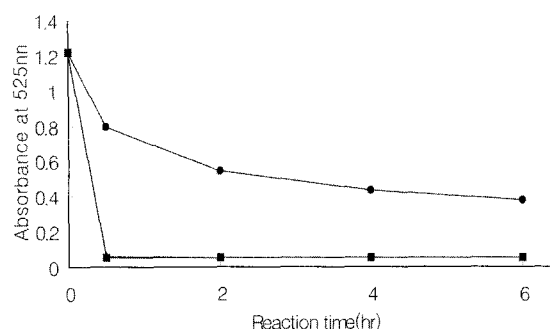


Fig. 8. Reactivities of the reaction mixtures of β -1,4-mannobiose and ureas with DPPH. -■-: AsA, -●-: β -1,4-mannobiose + urea, -▲-: β -1,4-mannobiose + phenylthiourea, -◆-: β -1,4-mannobiose + thiourea

항산화력. Linoleic acid에 대한 반응혼합물의 항산화력은 50 mM gum류 가수분해 oligosaccharides와 같은 mole수의 amino 화합물과의 8시간 반응시킨 원액으로 항산화력을 측정하였다. Fig. 5는 Gal³Man₄와 amino 화합물과의 반응혼합물의 항산화력을 나타낸 것으로 Gal³Man₄와 thiourea, phenylthiourea의 반응혼합물의 순서로 항산화력이 높어져 AsA와 비슷한 수준으로 나타났다. β -1,4-mannobiose에서는 thiourea의 반응혼합물의 항산화력은 β -1,4-mannobiose 및 thiourea의 항산화력보다 강한 항산화력을 보여주어 AsA수준의 항산화력을 나타내었으며(Fig. 6), DP 7의 galactosyl manno oligosaccharide와 thiourea, phenylthiourea의 반응혼합물의 항산화력은 AsA에 미치지 못하는 낮은 항산화력이 나타났다. 따라서 중합도의 크기가 낮고, homo type일수록 항산화능이 큰것으로 비교되었다.

DPPH(2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl)에 의한 수소공여능. 반응혼합물의 항산화작용의 mechanism을 조사하기 위해 DPPH를 사용하여 100°C에서 8시간 반응한 반응혼합물의 전자공여능을 검토하였다. Fig. 7는 Gal³Man₄와 amino 화합물과의 반응혼합물의 전자공여능을 나타낸 것으로 Gal³Man₄와 phenylthiourea의 반응혼합물이 비교적 높은 전자공여능을 나타내고 있다. β -1,4-Mannobiose와 amino 화합물과의 반응혼합물의 전자공여능은 β -1,4-mannobiose, amino 화합물 각각의 전자 공여능보다 강한 전자공여능을 나타내고 있고, β -1,4-mannobiose와 thiourea,

phenylthiourea의 반응혼합물이 강한 전자공여능을 나타내었다 (Fig. 8). 중합도 7의 galactosyl manno oligosaccharide와 amino 화합물과의 반응혼합물의 전자공여능에서는 중합도 7의 galactosyl manno oligosaccharide와 phenylthiourea의 반응혼합물이 강한 전자공여능을 나타내고 있다. 또한 중합도가 상이한 gum류 가수분해 올리고당과 AsA, 각각의 ureas 관련 화합물 자신의 전자공여능에서는 DPPH를 첨가한 후 시간경과에 따른 변화를 검토해보면 대부분의 ureas 관련 화합물과 galactosyl manno oligosaccharide는 약한 전자공여능을 나타내고 있는 반면 AsA, thiourea, phenylthiourea는 강한 전자공여능을 나타내고 있음이 검토되었다.

본 연구실에서는 중합도 7의 올리고당의 구조식을 규명하여 식물의 생리활성물질로 존재하는 urea 관련 화합물과의 반응혼합물에 대한 항돌연변이 효과를 올리고당의 구조식별 · 중합도별 미치는 영향에 대하여 연구를 수행할 예정이다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 2002년도 지역대학 우수과학자 지원연구사업(과제번호: R05-2002-000-01034-0)의 일환으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Tohyama, K., Kobayashi, Y., Kan, T., Yazawa, K., Terashima, T. and Futai, M. (1985) Effect of *Lactobacillus* on urinary indican excretion in gnotobiotic rats and man. *Microbiol. Immunol.* **26**, 101-112.
- Kato, H. (1963) Chemical studies on amino-carbonyl reaction. Part II. Identification of D-glucosone formed by oxidative browning degradation of N-glucosides. *Agr. Biol. Chem.* **27**, 461-465.
- Hashiba, H. (1982) The browning reaction of amadori compounds derived from various sugars. *Agric. Biol. Chem.* **42**, 547-552.
- Haugaard, G., Tumerman, L. and Silvestri, H. (1951) A study on the reaction of aldoses and amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 4594-4599.
- Ellis, G. P. (1959) The maillard reaction. *Adv. Carbohydr. Chem.* **14**, 163-167.
- Kim, Y. N., Kim, C. M., Han, K. W. and Oh, S. K. (1982) Effect of temperature on amino-carbonyl reaction. *Korea J. Nutr. Food.* **1**, 51-61.
- Pintauro, S. J., Page, G. V., Solberg, M., Lee, T. C. and Chichester, C. O. (1980) Absence of mutagenic response from extracts of maillard browned egg albumin. *J. Food Sci.* **46**, 1433-1436.
- Powrie, W. D., Wu, C. H., Rosin, M. P. and Stich, H. F. (1981) Clastogenic and mutagenic activities of maillard reaction model systems. *J. Food Sci.* **46**, 1433-1438.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- McCleary, B. V. (1982) Purification and properties of a mannoside mannohydrolase from guar. *Carbohydr. Res.* **101**, 74-92.
- Palombo, R., Gertler, A. and Saguy, I. (1984) A simplified method for determination of browning in dairy powders. *J. Food Sci.* **49**, 1609-1613.
- Craig, J. C., Acets, N. C. and Della Monica, E. S. (1961) Occurrence of 5-hydroxymethylfurfural in vacuum foam dried whole milk and its relation to processing and storage. *J. Dairy Sci.* **44**, 1827-1835.
- Della Monica, E. S. (1968) Error in the analysis of hydroxymethylfurfural in processed milk. *J. Dairy Sci.* **51**, 352-356.
- Hodge, J. E. and Rist, C. E. (1953) The amadori rearrangement under new conditions and its significance for non-enzymatic browning reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 316-320.
- Choi, J. Y. and Park, G. G. (2004) Metabolism activity of *Bifidobacterium* spp. by D.Ps of konjac glucomannan hydrolysates. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 1186-1191.
- Choi, J. Y. and Park, G. G. (2004) Purification of *Bacillus* sp. β -mannanase and the growth activity of *Bifidobacterium* spp. by guar gum hydrolysates. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 117-122.

Antioxidant Action of Reaction Mixtures of Gums Hydrolysates and Urea Derivatives

Sang-Woo Kim¹ and Gwi-Gun Park* (¹*Institute of Protein Engineering, University of Osaka, 1-1 Yamadaoka Suita, Osaka 565-0871, Japan, Dept. of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Seoungnam 461-701, Korea*)

Abstract: The purified β -mannanase hydrolyzed various gums to mannose, β -1,4-mannobiose, Gal³Man₄, and D.P 7 of galactosyl mannoooligosaccharide, and isolated from the enzymatic hydrolysate for 24 hrs reaction by activated carbon column chromatography and Sephadex G-25 column chromatography. For the elucidate of antioxidant action of β -1,4-mannobiose, Gal³Man₄ and DP 7 of galactosyl mannoooligosaccharide and urea derivatives, coloration, reducing power, antioxidant activity and DPPH test were accomplished. The coloration was high at reaction mixture of β -1,4-mannobiose, Gal³Man₄, D.P 7 and urea. TLC of reaction mixture of β -1,4-mannobiose, Gal³Man₄, D.P 7 and ureas showed new reaction products, respectively. but except reaction mixture of β -1,4-mannobiose and urea. The reducing power was high at reaction mixture of β -1,4-mannobiose, Gal³Man₄, D.P 7 and phenylthiourea. The reaction mixture of β -1,4-mannobiose, Gal³Man₄, D.P 7 and thiourea showed similar radical scavenging activities on DPPH to activity of AsA. The reaction mixture of β -1,4-mannobiose, Gal³Man₄, D.P 7 and thiourea, phenylthiourea shown strong antioxidative activities on the oxidation of linoneic acid.

Key words: antioxidant action, galactosyl mannoooligosaccharides, β -1,4-mannobiose

*Corresponding author