

## L-Ascorbic acid 가열갈변물질의 항산화성

유병진 · 장미화 · 정인학\*

강릉대학교 식품과학과, \*강릉대학교 수산자원개발학과

### Antioxygenic Effects of Browning Reaction Product Obtained from L-Ascorbic Acid Solution

Byeong-Jin You, Mi-Hwa Chang and \*In-Hak Jeong

Department of Food Science, Kangreung National University

\*Department of Fisheries Resource Development, Kangreung National University

#### Abstract

Antioxygenic effects of browning reaction product(BRP) obtained from 2M L-ascorbic acid(AsA) solution by heating at 85°C were investigated. BRP obtained from AsA solution(pH 2.30) without pH adjusting showed slightly antioxygenic effect. As heating time increased, powers of antioxygenic activity of BRP did not increase. Retained AsA after heating did not effect antioxygenic activity of AsA solution. After adjusting pH of AsA solution to 2.3, 4.0, 7.0, 9.0 and 11.5 respectively, BRP were obtained from these AsA solution by heating at 85°C for 15 hrs. Among these BRPs, BRPs of pH 2.3 and 4.0 showed no antioxygenic effect, lower browning degree and higher retained AsA, but had stronger reducing power. While those of pH 7.0, 9.0 and 11.5 had stronger antioxygenic activity, higher browning degree and lower retained AsA, but showed weaker reducing power. After adjusting pH of AsA solution to 7.0, antioxygenic activities of BRP which was obtained from this AsA solution by heating respectively at 85°C for 0, 3, 5, 10, 15 and 25 hrs increased in proportion to heating time.

Key words: antioxygenic activity, L-ascorbic acid, browning reaction product

## 서 론

식품의 가공·저장 중에 지방산화는 변색과 냄새 등으로 인한 식품의 열화인인<sup>(1,2)</sup>일 뿐 아니라 산패된 지방을 섭취할 경우 성장억제와 설사를 유발하는 것<sup>(3, 5)</sup>으로 알려져 있다. 그러므로 지방의 산화방지를 위한 항산화제에 대한 연구가 많이 진행되어져 왔다<sup>(6, 10)</sup>.

L-Ascorbic acid(AsA)는 식품, 음료 및 과일쥬스 등에 항산화제 및 항갈변제로 인정되어 첨가<sup>(11)</sup>되어 왔으나, 오히려 지방산화를 촉진한다고 발표한 연구보고<sup>(12, 16)</sup>가 있는 등 아직 그 기구가 명확하지 않다. 특히 Velisek 등<sup>(17)</sup>은 AsA가 다른 갈변물질과 같이 사용될 때 항산화력의 상승효과가 있다고 하였으나, 10% ethanol을 포함하는 buffer 용액에서는 산화촉진 효과가 있으며 20% 이상의 ethanol buffer 용액상에서는 항산화 효과를 나타낸다고 한 보고<sup>(12)</sup>도 있다. 또한 AsA의 유도체인 dehydro-L-ascorbic acid(DHA), 6-O-acetyl-ascorbic acid 및 6-O-acetyl-dehydro-L-ascorbic acid는 10% ethanol

용액에서는 산화촉진 효과가 있으나 20%에서는 항산화 효과가 있으며 6-O-palmitoyl-ascorbic acid와 6-O-palmitoyl-dehydro-L-ascorbic acid는 10% ethanol 용액에서도 강한 항산화 효과가 있다고 발표<sup>(12,13)</sup>하고 있는 등 AsA의 유도체 중 비교적 저분자물질의 항산화 효과에 대하여는 비교적 많은 연구가 진행되어 왔으나 실험조건에 따라서 그 결과가 상이하게 보고되어 있다.

Maillard 갈변반응에 의해서 생성된 갈변반응물질이 항산화 효과가 있다고 보고<sup>(18, 22)</sup>되어 있는데 그 중 항산화 효과가 강한 것은 저분자의 reductone류 라고 발표<sup>(23,24)</sup>하고 있으나 최근 갈변반응 중간생성물인 저분자의 reductone류보다 분자량이 비교적 크고 갈색도가 높은 축합 혹은 중합생성물의 항산화력이 훨씬 크다는 연구결과<sup>(25, 28)</sup>들이 보고되고 있으며 Namiki 등<sup>(29)</sup>은 DHA와 tryptophan을 반응시켜 얻은 갈변물질 중에서 강한 항산화성의 주된 성분은 DHA와 tryptophan의 축합물로서 비교적 고분자물질이라고 발표하였고, AsA의 분해물질의 일종인 2,3-diketo-L-gulonic acid의 분해산물이 산소를 포획하는 라디칼을 형성한다는 결과<sup>(14)</sup>도 있다. 그러므로 자신이 완전히 산화되고 나면 스스로 갈변반응을 일으키는 AsA의 갈변반응에 의한 생성물 중에 항산화 효과가 존재할 것으로 예측될 뿐 아니라

Corresponding author: Byeong-Jin You, Department of Food Science, Kangreung National University, San-1, Jib-yen-dong, Kangreung 210-702, Korea

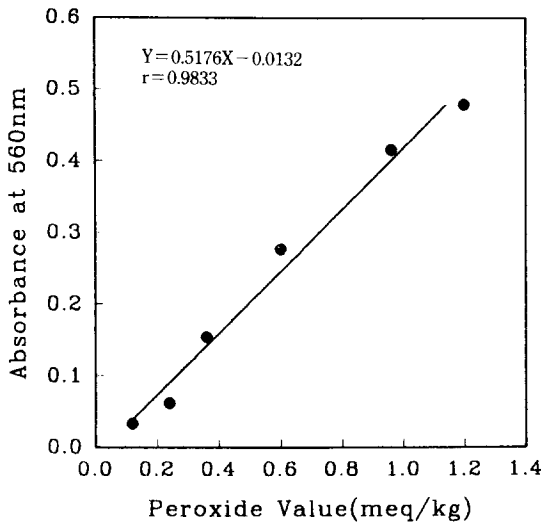


Fig. 1. Standard curve for determination of peroxide value

AsA 갈변반응물 중 비교적 고분자물질의 항산화성에 대한 연구가 거의 보고된 것이 없으므로 본 연구는 AsA 용액을 가열반응시켜 생성된 갈변반응물질의 항산화성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### AsA의 갈변반응물질의 조제

2 M의 AsA(Sigma Co.) 수용액을 5 N HCl 및 5 N NaOH 용액으로 pH를 조절하고 환류냉각시키면서 일정시간 동안 85°C로써 가열한 후 진공동결 건조하여 갈변반응물질로 사용하였다.

### 반응계 조성

갈변반응물질의 항산화성을 측정하기 위하여는 You 등<sup>(28)</sup>의 방법을 약간 변형시켜 methyl linoleate 5g을 DEAE-Cellulose 10g에 흡착시키고 여기에 다시 AsA의 갈변반응물질을 methyl linoleate에 대하여 1%가 되도록 흡착시켜 반응계를 조성하였으며 이 반응계는 35°C에 보관하면서 보관기간에 따른 과산화물가를 측정하였다.

### Peroxide value 측정

반응계 1~0.1g을 취하여 Asakawa and Matsushita<sup>(30)</sup>의 방법에 따라 n-hexane 1 ml, 2% KI-ethanol 용액(w/v) 0.5 ml 및 2% AlCl<sub>3</sub>-ethanol 용액(w/v)을 가하여 37°C에서 5분 동안 반응시킨 후 0.01 N HCl 용액 15 ml와 1% Starch 용액 0.5 ml를 가하여 진탕하고 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층의 hexane층을 제거하고 아래층의 부분을 560 nm에서 흡광도를 측정하여 Fig. 1에 도시한 검량곡선을 통하여 과산화물가를 계산하였다.

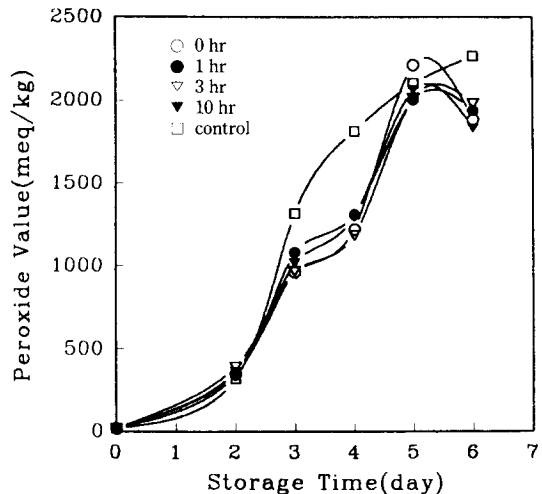


Fig. 2. Antioxygenic activity of browning reaction product (BRP) of 2 M ascorbic acid solution by heating at 85°C without pH adjusting

AsA 갈변반응액의 AsA 잔류량, 갈변도 및 환원력의 측정

AsA 갈변반응액 중의 AsA 잔류량을 측정하기 위하여 Farhatulla Quadri 등<sup>(31)</sup>의 방법에 따라 반응액을 일정비율로 희석하여 245 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 갈변도는 420 nm에서 흡광도로써 표시하였고, 환원력은 1% indophenol blue-ethanol 용액 1 ml에 갈변반응액 5 ml를 가한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하여 갈변반응액을 넣지 않는 시료의 흡광도를 1.000으로 하였을 때와 갈변반응액을 첨가한 것의 흡광도의 비로써 환원력을 표시하였다.

## 결과 및 고찰

AsA 용액 갈변반응물질의 가열시간에 따른 항산화성과 갈변도

가열시간에 따른 AsA 용액 갈변반응물질의 항산화성을 알기위해 2 M의 AsA 용액을 pH를 조절치 않고 0, 1, 3 및 10시간 동안 가열하여 갈변반응을 일으킨 후 이 용액의 갈변반응물질을 1% 흡착시켜 만든 반응계의 Peroxide value (POV) 변화를 Fig. 2에 도시하였다. 이 그림에서 알 수 있듯이 0, 1, 3 및 10시간 동안 가열한 시료의 POV는 저장 5일만에 2005.4~2213.1 meq/kg으로 최고치에 달하였다가 그 후로는 감소하는 경향을 보였으나 AsA 용액을 가하지 않는 경우는 저장 6일 때에도 2266.2 meq/kg으로 계속 증가하는 경향을 나타내었다. AsA를 첨가하지 않은 control과 첨가한 시료와의 POV 차이는 다소 나타났었지만 가열치 않은 AsA와 여러 시간 가열한 갈변반응물의 항산화성의 차이는 크게 나타나지 않았다.

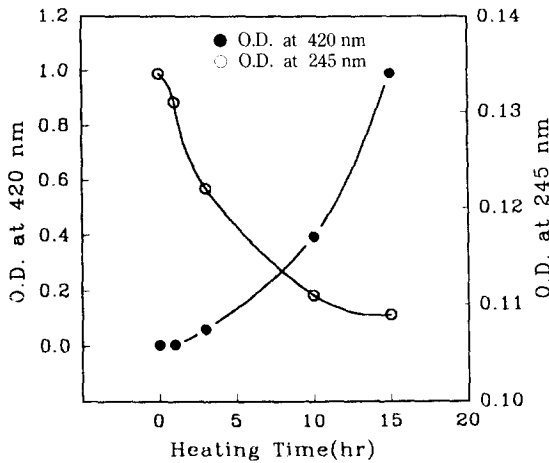


Fig. 3. Browning development and retained amounts of ascorbic acid solution of 2 M ascorbic acid solution by heating at 85°C

가열시간에 따른 AsA 용액의 갈변진행도와 AsA의 잔존정도를 Fig. 3에 나타내었다. 이 그림에서 알 수 있듯이 갈변도는 가열 3시간에서는 0.062에서 15시간 가열 후에는 0.992로 증가하는 반면 AsA 잔존량은 가열시간이 증가함에 따라 감소하였다. 앞의 Fig. 2의 결과에서 가열시간에 따른 항산화효과가 차이가 나지 않는 것을 보면 열에 의해 파괴되지 않고 남아있는 AsA는 항산화력에 큰 영향을 주지않는 것으로 나타나 Takagi 등<sup>(12)</sup>이 AsA가 산화하기 전에는 항산화 효과가 있다 완전히 산화하고 난 뒤는 산화촉진 효과가 있다고 한 보고와 상이한 결과를 보여주었다. 이것은 AsA의 항산화력보다는 오히려 AsA가 완전히 산화된 뒤 생성되어지는 갈변물질이 더 큰 항산화력을 가지기 때문<sup>(15)</sup>으로 사료되었다.

pH조절 후 가열에 의한 AsA 용액 갈변반응물질의 항산화성

2 M의 AsA용액을 pH 2.3, 4.0, 7.0, 9.0, 11.5로 조절한 뒤 85°C에서 15시간 가열하여 갈변시킨 갈변반응물질의 항산화성을 Fig. 4에 도시하였다. pH 2.3과 4.0의 POV는 저장 2일째 각각 3376.9 및 3482.5 meq/kg으로 최고치에 도달하였다가 그 이후 감소하는 경향을 보였고, pH 7.0, 9.0 및 11.5 시료의 경우는 전체 저장 14일 동안 POV가 45.5 meq/kg 이상을 증가하지 않았다. 이 그림에서 알 수 있듯이 pH 7.0 이상으로 조절한 후 가열하여 얻은 갈변반응물질의 항산화성은 매우 강하게 나타났다. 또한 Takagi 등<sup>(14)</sup>이 pH를 조절치 않은 용액상태(pH 2.0~2.4)의 Dehydroascorbic acid 분해산물이 지방산화를 촉진한다고 발표한 결과를 미루어 볼 때 AsA의 갈변반응생성물의 종류와 항산화력은 갈변반응계의 pH에 따라 달라진다는 것을 알 수 있다.

pH를 달리하여 가열 갈변시킨 AsA 갈변반응물질의

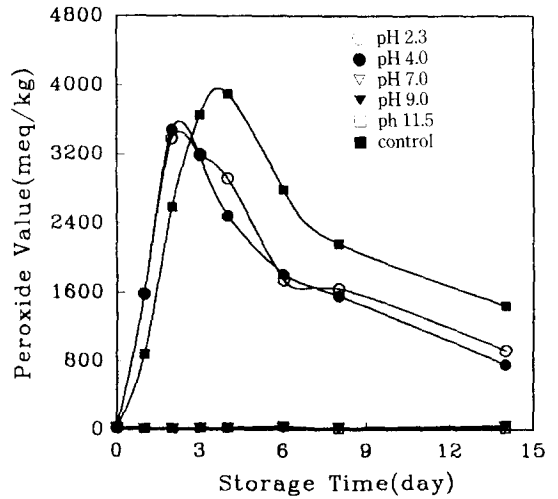


Fig. 4. Antioxygenic activity of BRP of 2 M ascorbic acid solution by heating for 15 hrs at 85°C after pH adjusting

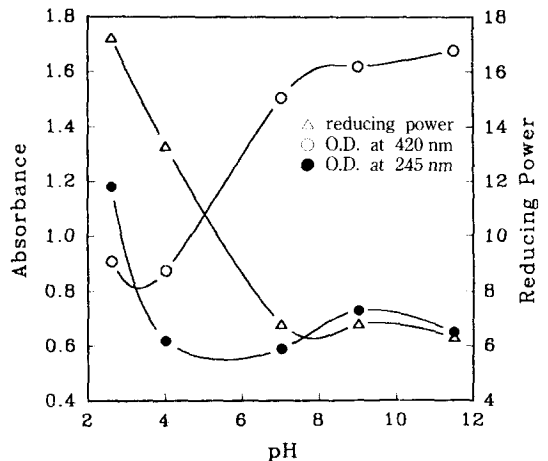


Fig. 5. Browning development and change of reducing power of 2 M ascorbic acid solution by heating for 15 hrs at 85°C after pH adjusting

항산화력의 세기가 달리 나타나는 이유를 추정해 보기 위하여 각 pH별로 조정하여 15시간 가열반응시킨 AsA 갈변용액의 갈변도, AsA 잔존율 및 환원력을 측정하여 Fig. 5에 도시하였다. 이 결과에 의하면, 갈변도는 pH 4와 7 사이에서 0.857 및 1.507로써 급격히 증가하다가 그 이상의 pH에서는 다소 완만하게 증가하였고 AsA 잔존율은 pH 2.2와 7 사이에서 각각 1.18과 0.5를 나타내어 급격히 감소하였다가 그 이상의 pH에서는 큰 변화를 보이지 않았다. 그리고 환원력도 pH 2.2와 7 사이에서 급격히 감소하였다가 그 이상에서는 큰 변화를 나타내지 않아 AsA 잔존율과 비슷한 경향을 나타내었다. 앞의 Fig.

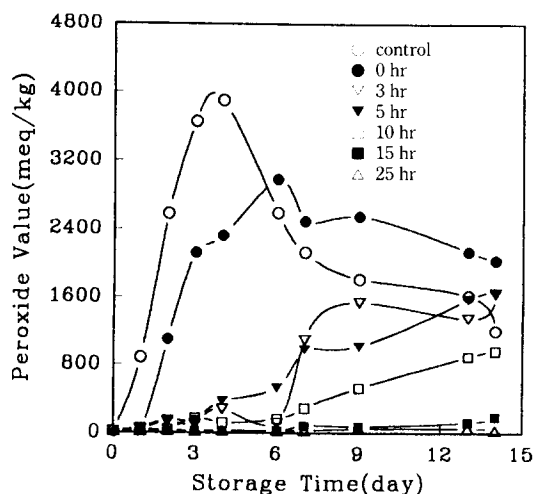


Fig. 6. Antioxygenic activity of BRP of 2 M ascorbic acid solution by heating at 85°C after adjusting pH 7.0

4의 결과에서 이미 도시한 바와 같이 pH 2.3 및 4.0에서 형성된 갈변반응물질은 갈변도가 낮고 AsA 잔존율과 환원력은 강하지만 항산화성을 거의 나타내지 않았고 pH 7.0 이상의 경우에는 갈변도가 높고 AsA 잔존율과 환원력은 약하지만 강한 항산화성을 나타내고 있으며 Maillard 반응에서 강한 항산화력을 나타내는 주된 물질은 갈변도가 낮은 저분자물질 보다는 갈변도가 높은 고분자물질이라고 발표한 연구<sup>(21,25-27,29)</sup>로 미루어보아 AsA 갈변반응물질의 항산화성은 AsA 자신의 환원력 혹은 갈변반응에 의해 생성된 저분자의 reductone류에 의한 것보다 갈변반응에 의해 생성된 갈변도가 높고 비교적 고분자물질에 의해서 나타나는 것으로 생각된다.

#### pH 7.0으로 조절한 후 AsA 용액의 가열시간에 따른 갈변반응물질의 항산화성

2 M AsA 용액의 pH를 7.0으로 조절한 후 85°C에서 0, 3, 5, 10, 15 및 25시간 동안 가열하였을 때 생성된 갈변반응물질의 항산화성을 Fig. 6에 도시하였다. AsA 용액을 전혀 첨가하지 않은 control과 가열치 않은 경우 저장 초기부터 POV가 급격히 증가하여 저장 4일, 6일만에 각각 3898.5 meq/kg 및 2987.5 meq/kg으로 최고치에 도달하였다가 그 이후 감소하여 지방산화의 유도기간이 거의 나타나지 아니하였으나 3시간 및 5시간 가열한 것에서는 저장 6일에 POV가 각각 119.6 meq/kg 및 531.6 meq/kg으로 다소 낮은 값을 나타내었다가 그 이후 비교적 급히 증가하는 경향을 나타내어 지방산화의 유도기간이 control과 0시간의 경우보다 길게 나타났다. 그리고 15시간 및 25시간의 경우에는 전체 저장기간 동안 POV가 200 meq/kg을 초과하지 않아 강한 항산화력이 있는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 비효소적 갈변반응에서는 가열시간이 길어짐에 따라 갈변물질의

중합도가 높아져 갈색도가 증가하는 고분자물질의 생성이 증가되며 갈변반응물질 중 주된 항산화력을 나타내는 물질은 저분자물질 보다는 중합도가 높은 고분자물질로 보고하고 있는 결과<sup>(20,25-29)</sup>와도 일치하고 있다.

## 요 약

2 M의 AsA 용액을 85°C에서 일정시간 갈변반응시켜서 생성된 갈변물질의 항산화성을 조사하였다. pH를 조절치 않고 가열한 AsA 용액(pH 2.30)의 갈변반응물질은 AsA를 첨가치 않은 것에 비해 약간의 항산화 효과를 나타내었고 가열시간에 따라서 항산화력의 차이는 거의 나타나지 않았으며, AsA의 잔존량이 항산화력의 세기에 영향을 미치지 않았다. 2 M의 AsA 용액의 pH를 2.3, 4.0, 7.0, 9.0 및 11.5로 조절한 뒤 85°C에서 15시간 가열시켜 생성된 갈변물질 중에서 pH 2.3, 4.0의 경우는 항산화 효과가 거의 나타나지 않았으며 환원력과 AsA 잔존율은 높았으나 갈변도는 낮았다. 반면 pH 7.0, 9.0 및 11.5의 경우는 매우 강한 항산화성을 가지고 있었으며, 이 AsA 갈변용액은 환원력과 AsA 잔존율은 낮았으나 갈변도는 높았다. AsA 용액을 pH 7.0으로 조절한 후 85°C에서 0, 3, 5, 10, 15 및 25시간 동안 갈변시켜 얻은 갈변물질의 항산화성은 가열시간이 증가할수록 증가하였다.

## 문 헌

1. Labuza, T.P., Heidelbaugh, N.P., Silver, M. and Karel, M.: Oxidation at intermediate moisture content. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **48**, 86(1971)
2. Kim, M.N., Choi, H.Y. and Lee, K.H.: Nonenzymatic browning reactions in dried Alaska pollack stored at different water activities. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **2**, 41(1973)
3. Kaunitz, H. et al.: Biological effects of the polymeric residues isolated from autoxidized fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **33**, 630(1956)
4. Kaunitz, H., Slanetz, C.A. and Johnson, R.E.: Utilization of food for weight maintenance and growth. *J. Nutr.*, **62**, 551(1957)
5. Matano, K.: Toxicity of oxidized and heated fats. *J. Japan. Oil Chem. Soc.*, **19**, 197(1970)
6. Bishov, S.J., Masuaka, Y. and Kapsalis, J.G.: Antioxidant effect of spices, herbs and protein hydrolyzates in freeze-dried model systems; Synergistic action with synthetic phenolic antioxidants. *J. Food Processing and Preservation.*, **1**, 153(1977)
7. Lim, D. and Shipe, W.F.: Proposed mechanism for the antioxygenic action of trypsin in milk. *J. Dairy Sci.*, **55**, 753(1972)
8. Marcuse, R. and Frederikson, P.O.: Fat oxidation at low oxygen pressure. 11. Kinetic studies on linoleic acid oxidation in emulsions in the presence of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **46**, 262(1969)
9. Hammerschmidt, P.A. and Pratt, D.E.: Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.*, **43**, 556(1978)

10. Herrmann, K., Schutte, M., Muller, H. and Bismar, R.: Ueber die antioxidative Wirkung von Gewuizen. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **77**, 134(1981)
11. John, M.S. and Steven, N.: Effects of storage temperature and duration on total Vitamin C content of canned single-strength grapefruit juice. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 417(1980)
12. Takagi, M., Higashioka, H., Tamura, K. and Morita, N.: Effects of L-Ascorbic acid on the peroxidation of linoleic acid in neutral phosphate buffer containing alcohol. *Agric. Biol. Chem.*, **50**(1), 41(1986)
13. Takagi, M., Higashioka, H. and Morita, N.: Effects of liophillic derivatives of L-ascorbic acid and Dehydro-ascorbic acid on the peroxidation of linoleic acid on the peroxidation of Linoleic acid in neutral phosphate buffer containing alcohol. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 389(1986)
14. Takagi, M., Miyamoto, I. and Morita, N.: Effects of active oxygen scavengers on the peroxidation of Linoleic acid catalyzed by Dehydro-L-ascorbic acid or Its degradation products. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **34**, 141(1988)
15. Takagi, M., Kawajiri, A., Nakata, K. and Morita, N.: Behavior of 3,4-Endiol from of 2,3-Diketo-Gluono- $\delta$ -Lactone formed from Dehydro-L-ascorbic acid in deoxygenated and neutral solution. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **35**, 61(1989)
16. Kanner, J., Mendel, H. and Budowski, P.: Prooxidant and antioxidant effects of ascorbic acid and metal salts in  $\alpha,\beta$ -Carotene-linoleate model system. *J. Food Sci.*, **42**, 60(1977)
17. Verisek, J., Davidek, J., El-Zeany, B.A., Pokorny, J. and Janicek, G.: Antioxidant activity of some brown pigments in L-ascorbic acid solutions. *Z. Lebensm. Unter. Forsch.*, **154**, 151(1974)
18. El-Zeany, B.A., Pokorny, J., Verisek, J., Davidek, J. and Janicek, G.: Antioxidant activity of some brown pigments in Lipids. *Z. Lebensm. Unter. Forsch.*, **153**, 316(1973)
19. Yamaguchi, N.: Effects of 3-deoxy-xylose and its browning reaction product on the stabilities of fat and oil. *J. Food Sci. & Technol.(Japan)*, **16**, 94(1969)
20. Yamaguchi, N. and Fujimaki, M.: Studies on beowning reaction products from reducing sugars and amino acids. Part 10. Fractionation of browning reaction products on of antioxidative activities of browning reaction products between D-xylose and L-amino acids or amines during storage. *J. Food Sci. Technol.(Japan)*, **20**, 485(1970)
21. Namiki, M., Shigeta, A. and Hayashi, T.: Antioxidant effect of the reaction mixture of dehydroascorbic acid with tryptophan. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1207(1982)
22. Lingnert, H. and Waller, G.R.: Stability of antioxidants formed from histidine and glucose by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 27(1983)
23. Evans, C.D., Moser, H.A., Cooney, P.M. and Hodge, J.E.: Amino-hexose-reductones as antioxidants. 1. Vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **35**, 84(1958)
24. Griffith, T. and Johnson, J.A.: Relation of the browning reaction to storage stability of sugar cookies. *Cereal Chem.*, **34**, 159(1957)
25. Kirigaya, N., Kato, H. and Fujimaki, M.: Studies on antioxidant of nonenzymatic browning reaction products. Part 1. Relations of color intensity and reductones with antioxidant activity of browning reaction products. *Agric.(Japan)*, **3**, 287(1968)
26. Kirigaya, N., Kato, H. and Fujimaki, M.: Studies on antioxidant of nonenzymatic browning reaction products. Part 2. Antioxidant activity of nondialyzable browning reaction products. *J. Agric. Chem. Soc.(Japan)*, **43**, 484(1969)
27. Kirigaya, N., Kato, H. and Fujimaki, M.: Studies on antioxidant of nonenzymatic browning reaction products. Part 3. Fractionation of browning reaction solution between ammonia and D-glucose and antioxidant activity of resulting fractions. *J. Agric. Chem. Soc.(Japan)*, **45**, 292(1971)
28. You, B.J., Lee, K.H. and Lee, J.H.: Antioxidant activity of Amino acid-Xylose browning reaction products. 2. Isolation of Antioxygenic substances from browning reaction products by TLC and dialysis. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **19**(3), 212(1986)
29. Namiki, M., Hayashi, T. and Shigeta, A.: Isolation and identification of an antioxidant product from the reaction mixture of dehydroascorbic acid with tryptophan. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1207(1982)
30. Askawa, T. and Matsushita, S.: A colometric microdetermination of peroxide values utilizing Aluminum chloride as the catalyst. *Lipids.*, **15**, 965(1980)
31. Farhatulla Quadri, S., Liang, Y.T., Seib, P.A., Deyoe, C.W. and Hosney, R.C.: Stability of L-Ascorbate 2-sulfate and L-Ascorbate in wheat foods and milk. *J. Food Sci.*, **40**, 837(1975)

---

(1991년 8월 20일 접수)