

감자 lipoxygenase가 밀가루반죽의 지질분포, 지방산조성, 카로테노이드 및 색도 변화에 미치는 영향

문정원 · 서명자*

부산여자전문대학 가정과, *부산대학교 식품영양학과

The Effect of Potato Lipoxygenase on the Change of Lipid Distribution, Fatty Acid Composition, Carotenoids Content and Color Value in Wheat Flour Dough

Jung-Won Moon and Myung-Ja Suh*

Department of Home Economics, Busan Women's Junior College, Busan

*Department of Food Science and Nutrition, Busan National University, Busan

Abstract

This study was designed to investigate the effect of potato lipoxygenase on the change of dough chemical composition including lipid distribution, fatty acid composition, carotenoids content and color value in wheat flour dough. For the study, the potato lipoxygenase was added to wheat flour at a level of 6.5×10 unit/g flour. The addition of potato lipoxygenase to wheat flour dough was found to cause an increase in free lipid content, an effect apparently related to the decrease in linoleic acid content and increase in peroxide value. This phenomena might be due to the enzymatic oxidation of polyunsaturated fatty acid. Also, the bleaching effect of lipoxygenase was observed as the decrease in carotenoids content of wheat flour dough. In comparison of color value, it was shown that redness, yellowness and total color difference(ΔE) were lower by addition of lipoxygenase.

Key words: potato lipoxygenase, lipid distribution, fatty acid composition, carotenoids, wheat flour dough

서 론

cis,cis-penta-1,4-diene 구조를 가진 불포화지방산을 산화시켜 과산화물을 형성하는 lipoxygenase는 동식물, 미생물 등 자연계에 널리 분포되어 있으며^(1, 2) 특히 식품중의 불포화지방산에 작용하여 식품의 풍미에 영향을 미치고 식품을 가공·저장할 경우 이취를 생성시키는 주요 원인인 것으로 알려져 있다⁽³⁾. 그러나 몇몇 연구자들^(4, 5)은 lipoxygenase 활성을 갖는 대두가루를 1% 정도 밀가루에 첨가하면 대두 중의 lipoxygenase에 의해 기질인 불포화지방산이 산화되는 동안 색소가 쉽게 cooxidation 되기 때문에 밀가루의 탈색효과가 나타남을 밝혀내는 한편 흰빵을 생산하기 위해 사용하는 화학제 대신에 대두가루를 밀가루에 사용했다. 밀가루에 대두가루를 첨가하여 제빵하는 경우 대두가루의 lipoxygenase에 의해 나타나는 효과로서 밝혀진 것은 첫째 필수지방산과 카로테노이드 및 글루텐과의 cooxidation에 의해 반죽과 빵의 색깔이 증진되고 반죽내의 유리지질양을 증가시켜

빵의 부피를 증진시키고 질감을 부드럽게 한다^(6, 7). 또한 lipoxygenase는 노화속도에도 영향을 미쳐 효소활성이 있는 대두가루를 함유한 빵은 밀가루빵에 비해 시간의 경과와 더불어 빵의 속살이 더디게 굳는다고 보고되었다⁽¹¹⁾. 둘째 반죽과정에 있어서는 글루텐이 최대로 발달한 후 계속된 혼합에 의해 일어나는 글루텐의 분해를 다소 방지하여 반죽의 혼합내성(mixing tolerance)과 안정성을 증진시키는 것으로 알려져 있다⁽¹²⁾. 저자의 앞선 연구⁽¹³⁾에서도 감자 lipoxygenase의 밀가루에의 첨가는 밀가루반죽의 케리노그래프 특성을 향상시키는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구는 감자 lipoxygenase가 밀가루반죽의 물리적 특성에 미치는 영향에 이어 밀가루반죽의 지질분포, 지방산조성, 카로테노이드, 색도 등의 화학적 성분 변화에 미치는 영향에 대하여 실험하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 밀가루는 무처리된 강력분으로서 제일제당으로부터 구입했으며, 감자는(*Solanum tuberosum*, Variety Dejima)는 부산시 금정구 장전동에 위치한

Corresponding author: Jung-Won Moon, Department of Home Economics, Busan Women's Junior College, Busan-jungu Yangjungdong 74, Busan 614-734, Korea

장전시장에서 구입했다. Linoleic acid는 Sigma 제품을 사용했다.

지질, 지방산, 카로테노이드, 색도 분석을 위한 반죽 (dough) 제조

밀가루와 lipoxygenase를 밀가루 g당 6.5×10 unit 수준으로 첨가한 밀가루를 farinograph bowl에서 최적반죽상태가 되도록 반죽한 후 즉시 동결건조시켰다. 건조된 가루는 갈아서 100메쉬체를 통과시킨 후 성분분석에 사용했다.

Lipoxygenase 추출 및 활성측정

감자에서의 lipoxygenase 추출은 Park 등⁽¹⁴⁾이 사용한 방법에 준했으며 효소의 활성측정은 modified Surrey's diene conjugation 방법⁽¹⁵⁾에 따라 lipoxygenase에 의해 생성되는 과산화물의 양을 측정하기 위해 234 nm에서의 흡광도를 분광광도계(Shimadzu UV 2100)를 사용하여 측정했다.

유리 및 결합지질 정량

시료중의 유리지질은 Soxhlet 장치에 의해 석유 에테르로 16시간 동안 추출한 후 정량하였다. 결합지질은 Tsen 등의 신속법⁽¹⁶⁾을 채택한 Daniels 등⁽¹⁷⁾의 방법에 의해 추출한 후 정량하였다. 즉 유리지질을 추출하고 남은 잔사 20g을 chloroform-methanol-water(2:1:0.8, v/v/v)의 혼합용매 95 ml와 함께 Homogenizer(Model virtis 45, USA)로 마쇄한 다음 클로로포름 25 ml를 가하여 마쇄하고 여기에 물 25 ml 가하여 계속 마쇄했다. 마쇄된 혼합물은 혼합물의 온도가 8°C 이하가 될 때까지 ice-water bath에서 냉각시킨 후 1,100×g에서 30분간 원심분리하여 클로로포름층을 분리 회수한 다음 회전진공 증발기로 농축건조시킨 후 함량을 구하여 정량하였다.

과산화물과 지방산 분석

각 시료에 10배의 chloroform:methanol(2:1, v/v) 용액을 가해 지질을 추출한 후 AOCsTM 상법에 따라 과산화물가를 측정했다. 또한 추출된 조지질 일부를 취해 1.0 N-KOH 95% ethanol로 비누화한 다음 14% BF-methanol을 가하여 95°C에서 30분간 환류가열하여 지방산 methyl ester로 만든 다음 gas chromatography(Varian Star 3600)로 분석했다. 컬럼은 HP-5 capillary column(25 m×0.2 mm ID×0.11 μm)을 사용했으며, 컬럼온도는 170°C에서 5°C/min.로 270°C까지 승온시켰다. 주입구 및 검출기(FID)온도는 각각 250°C, 300°C로 하였고, 운반기체는 질소가스를 35 ml/min.으로 주입하였다. 분리된 각 지방산의 동정은 표준 지방산의 머무름 시간과 비교하여 확인했다.

카로테노이드 및 색도 측정

카로테노이드 분석은 Evelyn에 의한 방법⁽¹⁸⁾을 사용

했다. 각 시료에서 추출된 지질 1g에 에탄올 100 ml를 가하여 혼합한 다음 90°C의 건조기에서 10분동안 가열하였다. 80% KOH 1 ml를 첨가하여 90°C에서 10분동안 비누화시킨 후 증류수 50 ml와 핵산 50 ml를 혼합하여 20초동안 섞은 후 여과지로 불용해물을 걸러냈다. 분액 여두에 증류수 100 ml와 여과액을 옮긴다음 핵산 50 ml로 3회 반복하여 추출했다. 핵산층을 모두 모은 후 잔존하는 KOH를 제거하기 위해 증류수로 여러번 씻어내고 여기에 무수황산나트륨을 가하여 수분을 완전히 제거한 다음 회전 진공증발기에서 농축시켰다. 건조물을 석유 ether 10 ml에 용해시킨 후 카로테노이드의 흡광도를 분광광도계를 사용하여 440 nm에서 측정했다. 또한 각 시료의 색깔 측정은 Hunter color difference meter로서 white standard(L=91.6 a=0.2 b=2.6)를 표준으로 하여 L, a, b값을 각각 구하여 white standard에 대한 total color difference를 계산하였다.

결과 및 고찰

밀가루반죽의 지질 분포, 지방산조성에 lipoxygenase가 미치는 영향

밀가루에 있어서 지질은 소량(약 2%)이긴 하지만 빵에 있어서 중요한 역할을 한다. 반죽과정중 밀가루가 물과 접촉하게 되고 밀가루 지방질이 단백질과 결합하여 글루텐 구조를 형성한다. 반죽이 형성되면 에테르로 추출가능한 유리지질량은 감소되며 혼합하는 동안 더 많이 감소되지만 산소가 존재하면 결합지질의 형성이 다소 감소되면서 유리지질이 증가된다. 이러한 유리지질의 증가는 밀가루에 lipoxygenase 활성을 갖는 소량의 대두 가루가 첨가되었을 때 더욱 현저하며 결합지질의 감소는 글루텐의 산화반응과 관련되어 일어나는 것으로 보고되었다⁽²⁰⁾. 본 실험에서도 lipoxygenase에 의해 반죽내에서의 유리지질량이 증가되었음이 확인되었다. 밀가루와 반죽 및 lipoxygenase가 첨가된 반죽에서의 유리 및 결합지질의 함량을 정량한 결과는 Table 1과 같다. 밀가루 유리지질중 50% 이상이 반죽하는 동안 타 성분과 결합하여 결합지질의 양이 현저하게 증가하였으나 lipoxygenase가 첨가된 반죽에서는 결합지질의 양이 다소 저하되었다. 총 지질에 대한 유리지질 비율은 밀가루의 경우 70.4%, 반죽은 34.1%, lipoxygenase 첨가 반죽은 39.2%였다. Lipoxygenase 첨가에 의한 유리지질량의 증가는 효소의 기질이 되는 불포화지방산의 산화에 기인한 것으로 생각되어 lipoxygenase에 의한 산화정도와 지방산 조성 변화를 살펴보았다. 밀가루와 반죽의 과산화물가를 측정된 결과 밀가루가 3.2 meq/kg, 반죽의 경우 lipoxygenase가 첨가되지 않은 반죽은 3.9 meq/kg, lipoxygenase 첨가반죽은 8.5 meq/kg로서 lipoxygenase 첨가로 과산화물가가 현저하게 증가되어 산화가 많이 진행되었음을 알 수 있다. 밀가루와 lipoxygenase에 의한 반죽의 지방산 조성 변화는 Table 2에 나타낸 바와 같다. 밀가

Table 1. Effect of lipoxygenase(LOX) on the distribution of free and bound lipid in wheat flour and doughs¹⁾

Ingredient	Free lipid ²⁾ (dry wt. %)	Bound lipid ³⁾ (dry wt. %)
Wheat flour	1.26	0.53
Dough	0.61	1.18
Dough + LOX	0.69	1.07

All values are means of duplicate determinations

¹⁾Expressed on dry weight basis

²⁾Extracted with petroleum ether (PE) on a Soxhlet

³⁾Extracted with the mixture of chloroform/methanol/water (2.0 : 1.0 : 0.8, v/v/v) after PE-extraction

Table 2. Major fatty acid composition in wheat flour and dough with and without lipoxygenase(LOX)

Fatty acids ¹⁾	Flour (%) ²⁾	Dough (%) ²⁾	Dough with LOX (%) ²⁾
16 : 0	18.3	18.1	19.8
18 : 0	1.9	1.7	2.9
18 : 1	16.8	17.6	18.9
18 : 2	60.6	56.8	53.0
18 : 3	2.4	5.8	5.4

¹⁾Trace quantities of 12 : 0, 14 : 0 and acids above 20 : 0 are not included

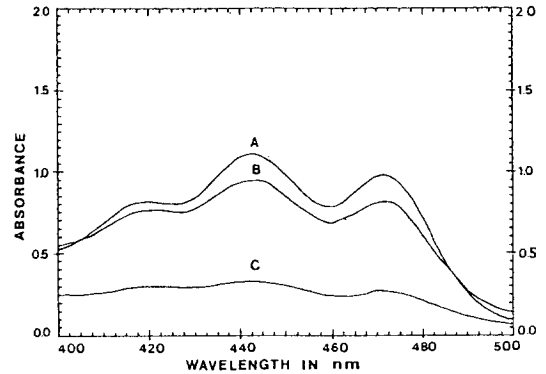
²⁾As a percentage of the sum of the gas chromatography peak areas for the five fatty acids listed.

루의 주요 지방산 중 linoleic acid가 60.6%로 가장 많았고 그다음 palmitic acid, oleic acid, linolenic acid, stearic acid의 함량순이었다. 반죽의 경우 lipoxygenase가 첨가된 반죽이 첨가되지 않은 반죽보다 전체 지방산 중 불포화지방산이 차지하는 비율이 낮았다. 이는 lipoxygenase에 의해 불포화지방산이 보다 많이 산화되었기 때문이라고 생각된다.

한편 감자 lipoxygenase에 의해 유리된 지질은 제빵의 부피를 증가시키고 질감을 부드럽게 하는데 기여할 것으로 기대된다. 따라서 계속하여 제빵과정에서의 감자 lipoxygenase의 기능을 구체적으로 규명하여 밀가루의 일부를 감자가루로 대체한 감자가루복합물의 활용시 lipoxygenase 활성이 높은 감자가루의 활용 가능성에 대한 연구도 의미가 있을 것으로 사료된다.

밀가루반죽의 카로테노이드 및 색도 변화에 lipoxygenase가 미치는 영향

Lipoxygenase가 색소탈색에 관여하고 있다는 것은 오래전부터 알려진 사실이었으며 카로텐⁽⁷⁾, 켈토피⁽²¹⁾, 클로로필⁽²²⁾, 폴레스테롤⁽²³⁾, 루테인⁽²⁴⁾ 등을 기질로 하여 효소의 탈색능이 연구되어 왔다. 더우기 Haas와 Bohn⁽⁶⁾이 lipoxygenase 활성이 있는 대두가루를 밀가루에 첨가하므로써 보다 흰빵을 생산한 후 lipoxygenase가 밀가루의 색을 개선한다는 것은 널리 알려져 왔다. 본 실험에서도 밀가루에 lipoxygenase를 첨가한 반죽과 첨가하지 않은

**Fig. 1. Changes of absorption spectra of carotenoid in wheat flour and dough with and without lipoxygenase (LOX)**

A: Wheat flour, B: Dough, C: Dough + LOX

Table 3. Effect of lipoxygenase on carotenoids content and color in wheat flour doughs

Sample	Hunter	Color Reading		Total color difference (ΔE)	Carotenoids content (mg%)
	L	a	b		
Control dough	92.3	0.8	9.7	7.1	1.29
Dough + LOX	92.7	0.5	7.8	5.4	0.43

L: Measures lightness and varies from 100 for perfect white to zero for black.

a: Measures redness when plus, gray when zero, and greenness when minus.

b: Measures yellowness when plus, gray when zero, and blueness when minus.

$\Delta E: \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$

밀가루 반죽의 색깔 차이를 Hunter 색차계와 카로테노이드 함량으로서 비교해 보았다. Fig. 1은 밀가루와 반죽 및 lipoxygenase가 첨가된 반죽의 카로테노이드 변화양상을 스펙트럼으로 나타낸 것이다. 반죽은 밀가루에 비해 흡광도가 저하되었으며 lipoxygenase 첨가 반죽은 더욱더 현저한 감소를 보여주고 있다. 즉 카로테노이드 함량은 lipoxygenase가 첨가되지 않은 반죽은 1.29 mg%이고, lipoxygenase가 첨가된 반죽은 0.43 mg%를 나타내어 효소에 의해 카로테노이드가 탈색되었음을 보여주었다(Table 3). Lipoxygenase에 의한 카로테노이드의 파괴 또는 탈색현상은 공존하고 있는 linoleic acid의 산화시 형성되는 유리기에 의해 카로테노이드가 함께 산화되기 때문에 일어나는 현상으로 보고⁽²⁵⁾된 바 있지만 lipoxygenase에 의한 지질산화력과 탈색능에 대한 효소 활성이 서로 다르기 때문에 탈색에 관한 정확한 기구와 이론은 아직까지 정립되어 있지 않다. 한편 이에 수반하여 색차계에 의해 측정된 색도 역시 Table 3에 나타난

바와 같이 lipoxygenase가 첨가된 반죽의 적색도, 황색도가 첨가되지 않은 반죽보다 낮아 전체적으로 보아 색깔이 옅었다. 이것은 카로테노이드 함량이 더 낮기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 감자가루복합분을 활용하여 제빵하는 경우 이미 복합분의 색깔이 밀가루에 비해 매우 짙은 것으로 밝혀진⁽²⁶⁾ 천일건조감자가루 복합분보다는 lipoxygenase 활성이 높은 감자가루를 이용하면 더욱 흰빵을 생산할 수 있으리라 생각된다.

요 약

감자 lipoxygenase가 밀가루반죽의 지질분포, 지방산 조성, 카로테노이드 및 색도 등의 화학적 성분 변화에 미치는 영향을 연구하기 위해 감자 lipoxygenase를 밀가루 g당 6.5×10 unit 수준으로 첨가하여 실험하였다. 밀가루에 감자 lipoxygenase를 첨가함으로써 밀가루 반죽의 과산화물가가 증가하고 지방산조성 중 linoleic acid의 현저한 감소와 함께 유리지질함량이 증가하였다. 효소의 첨가에 의한 유리지질의 증가는 효소에 의한 불포화지방산의 산화와 관련이 있는 것으로 보여진다. 또한 lipoxygenase 첨가에 의해 밀가루 반죽내의 카로테노이드 함량이 낮아져서 효소에 의한 탈색효과가 관찰되었다. 색차계에 의해 측정된 색도 역시 효소첨가로 밀가루 반죽의 적색도와 황색도가 낮아져서 색깔이 옅어졌다.

문 헌

1. Tapple, A.L.: Lipoxidase. In *The Enzymes* Boyer, P.D., Lardy, H. and Myrback, K. (eds.), Academic Press, New York, **8**, 275 (1963)
2. Matsuda, Y., Beppu, T. and Arim, K.: Isolation of lipoxygenase-like enzyme from *Fusarium Oxysporum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **530**, 439 (1978)
3. Wlodawer, P. and Samuelsson, B.: On the organization and mechanism of prostaglandin synthetase. *J. Biol. Chem.*, **248**, 5673 (1973)
4. Nutgeren, D.H.: Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 299 (1975)
5. Eskin, N.A.M.: Biochemistry of lipoxygenase in relation to food quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, p.1 (1977)
6. Haas, L.W. and Bohn, R.M.: Bleaching bread dough. U.S. Patents 1,957,333: Cited from *Chem. Abstr.*, **28**, 4137 (1934)
7. Summer, J.B. and Summer, R.J.: The coupled oxidation of carotene and fat by carotene oxidase. *J. Biol. Chem.*, **134**, 531 (1940)
8. Daniels, N.W.R., Wood, P.S., Eggitt, P.W.R. and Coppock, J.B.M.: Studies on the lipids of flour. V. Effect of air on lipid binding. *J. Sci. Food Agric.*, **21**, 377 (1970)
9. Daniels, N.W.R., Richmond, J.J., Eggitt, P.W.R. and Coppock, J.B.M.: Studies on the lipids of flour. IV. Factors affecting lipid binding in breadmaking. *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 129 (1969)
10. Frazier, P.J., Leigh-Dugmore, F.A., Daniels, N.W.R., Eggitt, P.W.R. and Coppock, J.B.M.: The effect of lipoxygenase action on the mechanical development of wheat flour doughs. *J. Sci. Food Agric.*, **24**, 421 (1973)
11. Frazier, P.J.: Lipoxygenase action and lipid binding in breadmaking. *Bakers Dig.*, December, 8 (1979)
12. Hosoney, R.C., Faubion, J. and Sidhu, J.S.: Mixograph studies. IV. The mechanism by which lipoxygenase increase mixing tolerance. *Cereal Chem.*, **57**, 163 (1980)
13. 문정원, 서명자: 감자 lipoxygenase가 밀가루반죽의 페리노그래프 특성에 미치는 영향. *한국영양식량학회지*, **23**, 110 (1994)
14. Kim, Y.M., Lee, C.W. and Park, K.H.: Purification and thermal inactivation of two lipoxygenase isoenzymes from potato tubers. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **19**, 397 (1987)
15. Holmer, G., Ory, R.L. and Hoy, C.E.: Changes in lipid composition of germinating barley embryo. *Lipids*, **8**, 277 (1973)
16. Tsen, C.C., Levi, I. and Hlynka, I.: A rapid method for the extraction of lipids from wheat products. *Cereal Chem.*, **39**, 195 (1962)
17. Daniels, N.W.R., Richmond, J.W., Eggitt, P.W.R., Coppock, J.B.M.: Studies on the lipids of flour. III. Lipid binding in breadmaking. *J. Sci. Food Agric.*, **17**, 20 (1966)
18. Am. Oil Chem. Soc.: Official and Tentative Method. Illinois: *Ame. Oil Chem. Soc.* (1980)
19. Evelyn, J.W.: Carotenoids and tocopherols of corn grain determined by HPLC. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 1129 (1987)
20. Daniels, N.W.R., Frazier, P.J. and Wood, P.S.: Flour lipids and dough development. *Bakers Dig.*, August, 20 (1971)
21. Bohn, R.M. and Haas, L.W.: Bleaching bread dough. In *Chemistry and methods of Enzymes* Summer, J.B., Somer, G.F., eds., 3rd Academic Press, New York, p.118 (1953)
22. Yoon, S., Barbara, P.K.: Some properties of pea lipoxygenase isoenzymes. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 955 (1979)
23. Teng, J.I. and Smith, L.L.: Cholesterol peroxidation by soybean lipoxygenase. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **31**, 913 (1972)
24. McDonald, C.E.: Lipoxygenase and lutein bleaching activity of durum wheat semolina. *Cereal Chem.*, **56**, 84 (1979)
25. Simic, M.G. and Karel, M.: Autoxidation in food and biological systems. Plenum Press, New York, p.447 (1980)
26. 김형수, 이관영, 김성기, 이서래: 국산원료를 활용한 복합분 및 제품개발에 관한 연구 제 1보 원료분의 이화학적 성상 및 영양시험. *한국식품과학회지*, **5**, 6 (1973)