光州保健專門大學 論文集 第17輯 (1992)
The Journal of Kwangju Health
Junior College Vol. XVII.

리포옥시게나제에 의한 인지질의 과산화물생성에 미치는 알파토코페롤과 탄닌산의 억제효과

식품영양과
교 수 남 현 근

Ⅰ. 서 론

음식물에 포함되어 있는 지질의 산화현상에 관하여 많은 연구보고가 있다. 영양손상, 독성물질의 생성, 식용유로 부터 많은 향기성분과 좋지않은 성분들의 생성이 불포화지방산들의 자동산화에 의한다.[1-6] 또한 lipoxygenase에 의하여 지질과산화물 생성이 진행됨도 보고 되었다.[7]

지질과산화물의 생성을 감소시키는데 carotenoid, tocopherol, thiol 등이 항산화제로서 쓰이고 있다. 이것들은 free radical, hydroxyl radical, singlet oxygen molecule, superoxide anion radical 생성을 감소시켜 과산화반응의 연쇄적인 반응을 정지시킨다.[8-14]

Tocopherol은 chromane ring에 있는 유리수산기에 영향을 미치며 연쇄반응을 일으킬 수 있는 free redical에 하나의 수소원자를 공여하여 반응의 연쇄성을 막는 항산화제로 잘 알려지고 있다.[15-17]

Tannin은 지질산화를 억제하는 작용을 하고 있다.[18] 그러나 tannic acid의 산화억제효과에 대한 연구는 거의 없어 지질과산화물 생성에 작용하는 lipoxygenase의 억제제로서의 α-tocopherol과 tannic acid의 영향을 검토하여 좋은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

본 실험에 사용한 재료는 Sigma chemical Co., St., Louis, Missouri, U.S.A.에서 구입하였다. 즉 Dimyristoyl phosphatidyl choline (DMPC), phospholipids : PC와 PE, PI는 pig liver에서 얻은 것이고 PS는 beef brain에서 얻은 것이다. Lipoxyenase는 콩에서 얻은 것이다.

HPLC로 분석하였는데 DMPC용액 9μM과 PL용액 1μM을 마개가 있는 시험관에 넣고 용매는 질소가스로 완전히 휘발시킨다. pH 7.4, 0.01M Tris-HCl 완충액 0.9 ml를 첨가하고 deoxycholate 100mM을 가하여 준다. vortex mixer로 60초동안 잘 섞어준다. 그리고 효소용액(효소 10mg/ml 완충액) 0.1 ml를 가하여 37°C 수욕상에서 흔들어 주면서 반응시

킨다.

반응액 0.1ml를 취하고 반응을 정지시키기 위하여 choloroform 0.1ml와 methanol 0.1 ml 혼합액을 가하여 준다. 잘 흔들어 준 다음 3,500rpm에서 5분간 원심분리한다. 하층부에서 50 μl를 취하여 질소가스로 용액을 증발시킨다. n-hexane 0.1ml로 녹인 다음 10 μl를 HPLC column에 주입하여 인지질의 과산화물을 정량하였다.[12,13]

HPLC 분석 조건은 shimadzu SPD-2A model, pump는 TOSO CCPD, column은 YMC C8 (150 mm × 6 mm), Flow rate는 1.5ml/min, Detector는 UV detector, wavelength는 235nm, solvent는 PC, PE, PI가 각각 methanol/H_2O (95/5, 90/10, 80/20)에 triethylamine 0.01%를 함유하도록 하였다.

한편 lipoxygenase가 α-tocopherol과 tannic acid에 의하여 활성억제 효과를 측정하기 위하여 포화 phosphatidyl choline과 불포화 인지질 혼합액에 억제제인 α-tocopherol 및 tannic acid를 1 μM 첨가하고, lipoxygenase 0.1ml를 가하여 준다음 37°C수욕상에서 흔들어 주면서 1시간동안 반응시켰다.[7]

Ⅲ. 결과 및 고찰

인지질(PC, PE, PI)이 deoxycholate 존재하에서 과산화반응이 진행되는 정도를 조사하여 Fig.1과 같은 결과를 얻었다.

그림에서 알 수 있는 바와 같이 인지질들이 lipoxygenase에 의하여 산화반응이 진행되어 과산화물이 생성됨을 알 수 있었다. 즉 phosphatidylcholine (PC)의 과산화물생성은 반응시작

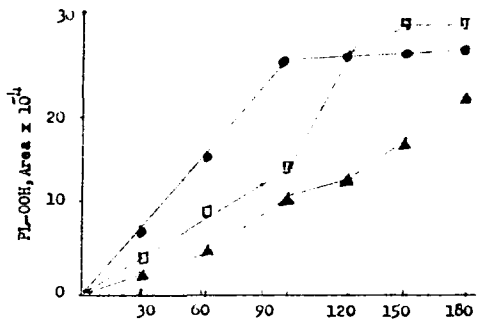

Fig.1. The formation of phospholipid hydroperoxide in a mixture of phospholipid 1 μM, DMPC 9 μM, deoxycholate 100 μM and lipoxygenase 0.1 ml.
○ : PC-OOH, □ : PE-OOH, △ : PI-OOH

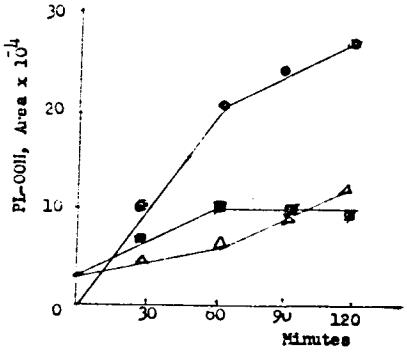

Fig.2. The formation of phospholipid hydroperoxide in a mixture of DMPC 9 μM, phospholipid 1 μM, tannic acid 0.1ml, α-tocopherol 0.1ml and lipoxygenase 0.1ml.
○ : Control, △ : Tannic acid, □ : α-Tocopherol

부터서 90분까지는 증가하여 28% 정도의 PC-OOH가 생성되었다가 90분후에는 거의 변동없이 일정함을 보였다. 그리고 phosphatidylethanolamine (PE)의 과산화물생성은 반응시작후 90분까지는 15%까지 완만하게 증가하였다가 급격하게 증가되었으며 120분에는 28%로 증가되었다가 180분에는 30%까지 증가함을 보였다. 또한 phosphatidylinositol (PI)의 과산화물생성은 반응후 60분까지 완만하게 증가하여 5%정도였으나 그후 급격히 증가하여 90분에는 12%로 증가하였고, 180분에는 23%까지 증가함을 보였다. 인지질들이 lipoxygenase에 의하여 산화반응은 120분후에는 PE>PC>PI 순으로 나타났다. 이러한 점으로 미루어 생체내에서도 이같은 과산화반응은 진행되며 생체막인지질에 과산화물의 생성은 당연히 일어나므로 효소의 활성억제를 위한 황산화제를 연구할 필요가 있다.

Fig.2에서 볼 수 있는 바와 같이 lipoxygenase의 활성을 억제할 수 있는가를 조사하기 위하여 tannic acid와 α-tocopherol을 사용하였다. control의 과산화물생성량에 비하여 효소활성 억제효과가 있음을 알 수 있다. 반응시작후 60분까지는 α-tocopherol이 tannic acid보다 억제효과가 적었지만 그후 120분까지 α-tocopherol의 억제효과는 일정하게 유지되었으나 tannic acid의 경우는 반응시작 60분후에는 억제효과가 감소되어 120분에는 12%를 보였다. α-tocopherol은 hydroxyl radicals, alkoxyl radicals, peroxyl radicals, singlet oxygen등에 의한 과산화반응을 억제할 수 있어서 지질과산화 연쇄성을 차단할 수 있다.[14-17] α-tocopherol은 monohydroxy기를 가지고 있으므로 single hydrogen atom을 생산하여 monohydrogen atom 공여체가 되어서 과산화반응의 연쇄성을 차단하게 된다.[13,14,20] 그러나 tannic acid는 multyhydroxy기를 가지고 있으며, 수소원자를 3개 줄 수 있어서 trihydrogen atom 공여체로 작용하는 것 같다.[18] 반응시간이 길면 공여된 수소원자에 의하여 인지질과산화물의 안정성이 감소되는 것 같다.

Ⅳ. 결 론

Lipoxygenase에 의하여 인지질의 과산화물 생성과 효소 억제제로서 α-tocopherol과 tannic acid의 억제효과를 HPLC로 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

인지질이 lipoxygenase에 의하여 과산화물 즉 phosphatidylcholine hydroperoxide(PC-OOH), phosphatidylethanolamine hydroperoxide (PE-OOH)과 phosphatidylinositol hydroperoxide (PI-OOH)를 생성하였다.

Lipoxygenase의 과산화반응 촉매역할은 α-tocopherol과 tannic acid로 억제할 수 있음을 알았다.

감사의 말

일본농수산청식품종합연구소 Terao, J.께 감사를 드린다.

References

1. Crampton, EW., Common, RH., Pritchard, ET., and Farmer, FA.: Studies to determine the nature of the damage to the nutritive value of some vegetable oils from heat treatment. *J. Nutrition*, **60**, 13(1956)
2. Dahl, LK., Hill, EG. and Holman, RT.: The thiobarbituric acid reaction and the autoxidation of polyunsaturated fatty acid methylesters. *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 253 (1962)
3. Labuza, TP.: CRC Critical Rev. *Food Technol.*, **2**, 355 (1971)
4. Sherwin, ER.: Autoxidation and antioxidants for food fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**, 468(1972)
5. Frankel, EN.: *Autoxidation in Food and Biology*, Simic, NG. and Karel, M.(eds), Plenum Press, New York, p.141 (1980)
6. Porter, NA., Weber, BA., Weenen, H. and Khan, JA.: Autoxidation of polyunsaturated lipids. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5597(1980)
7. Wong, YJ., Miller, LA. and Addis, PB.: Effect of heat inactivation of lipoxygenase on lipid oxidation in lake Herring. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 752 (1991)
8. Rawis, HR. and Van Santen, PJ.: A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **47**, 121 (1970)
9. Pryor, WA.: Free radical reaction and their importance in biochemical system. *Fed. Proc.*, **32**, 1852 (1973)
10. Tappel, AI.: *Free radical in Biology*, Pryor, WA. (ed.), Academic Press, New York, p.1 (1980).
11. Tien, M., Swingen, BA. and Aust, SD.: Superoxide dependent lipid peroxidation. *Fed. Proc.*, **40**, 179 (1981)
12. Terao, J. and Matsushita, S.: The peroxidizing effect of α-tocopherol on autoxidation of methyl linoleate in bulk phase. *Lipids*, **21**, 255 (1986)
13. Terao, J.: Antioxidant activity of β-carotene related carotenoids in solution. *Lipids*, **24**, 659 (1989)
14. Palo Di Mascio and Murphy, ME.: Antioxidant defense system : the rate of carotenoids, tocopherol and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**, 1948 (1991)
15. Foote, CS. and Denny, RW.: β-carotene as a singlet oxygen quencher. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6233 (1968
16. Burton, GW. and Ingold, KU.: Vitamin E. the only lipid-soluble chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6472 (1981)
17. Esterbauer, H.: *Free radicals, Lipid peroxidation and Cancer*. McBrien, DCH. and Slater, TF. (eds), Academic Press, New York, p.100 (1980)
18. Cho, JS. and Shin, DH.: Antioxidative activity of various extracts of Quercisemen to linoleic acid. *J. Kor. Oil Chem. Soc.*, **8**, 79 (1991)
19. Kwon, TW., Synder, HE. and Brown, HD.: Oxidation stability of soybean oil different stages of refining. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 184 (1984)
20. Niki, E., Saito, T., Kawakami, A. and Kamiya, Y.: Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E. *J. Bio. Chem.*, **259**, 4177 (1984)

Inhibition Effect of α-Tocopherol and Tannic Acid on the Formation on Phospholipid Hydroperoxides by Lipoxygenase

Hyun Keun Nam

Department of Food and Nutrition

〉*Abstract*〈

In order to investigate the effect of tannic acid or α-tocopherol on phospholipid peroxidation by lipoxygenase, HPLC was performed. The results obtained are as follows :

Phospholipids hydroperoxide such as phosphatidylcholine hydroperoxides (PC-OOH), phosphatidylethanolamine hydroperoxides (PE-OOH), and phosphatidyl inositol (PI-OOH) were produced by lipoxygenase.

Tannic acid or α-tocopherol reacts on as an inhibitor of lipoxygenase for the formation of phospholipid hydroperoxides.