

수산 미이용자원 중에 존재하는 효소적 산화 억제제의 검색 2. 감자 Lipoxygenase-II에 의한 효소적 산화에 대한 억제

조순영* · 유병진 · 장미화 · 이수정¹ · 성낙주¹ · 이응호²

*강릉대학교 식품과학과, ¹경상대학교 식품영양학과

²부산수산대학교 식품공학과

초록 : 수산 미이용자원을 의약품화 등 고부가가치적으로 이용하기 위한 기초자료 수집을 위해 본 감자 lipoxygenase-II 활성을 조절해 줄 수 있는 천연 저해제의 존재유무를 8종의 수산 미이용자원을 대상으로 각각 순차용매 추출한 후 그들 용매 추출물들에 대해 검색 시도해 보았다. 시험 대상 시료는 별불가사리(*Asterina pectinifera*), 우렁쟁이(*Holocynthia rotetzi*)껍질, 오징어(*Nototodarus sloani*) 먹죽, 성게(*Anthocidaris crassispina*)껍질, 팽생이모자반(*Sargassum horneri*), 구멍쇠미역(*Agarum cribrosum*), 참빗풀(*Odonthalia corymbifera*) 및 산말(*Desmarestia ligulata*) 등이었다. 모자반은 물 추출구, 에테르 추출구, 아세톤 추출구 및 메탄올 추출구 모두에서 IC₅₀이 각각 320, 18, 9.5 및 100 µg/mL로 나타나 낮은 농도의 첨가로도 높은 감자 lipoxygenase-II 저해능을 나타내었다. 또한, 불가사리 에테르 추출구와 오징어 먹죽 아세톤 추출구에서도 IC₅₀이 각각 29.5, 14.3 µg/mL로 비교적 높은 저해능을 보였으나, 전체적으로 모자반, 구멍쇠미역, 참빗풀, 산말 등 4종의 시험 대상 해조류에 불가사리, 성게, 우렁쟁이 껍질, 오징어 먹죽 등 4종의 대상 수산 미이용동물자원에서 보다 저해제가 많이 내재해 있었다. 더욱이, 전반적으로 각 대상 시료의 에테르나 아세톤 등의 비극성용매 추출구쪽에서 물이나 메탄올과 같은 극성용매쪽보다 많은 유용물질의 용출경향을 나타내었다(1994년 9월 2일 접수, 1994년 11월 21일 수리).

서 론

5-Lipoxygenase의 생체내 역할은 이미 잘 밝혀져 있듯이, 리놀레인산이나 아라키도닌산과 같은 n-6계 지방산에 작용하여 여러 가지 만성병을 유발하는 leukotrien류를 생성하여 n-6계 지방산 섭취가 많은 미국 등 서양에서는 큰 문제로 대두되고 있는 실정이다.¹⁾ 지금 그대로 식이 리놀레인산과 아라키도닌산의 섭취 함량을 유지하면서 이들 만성병 방지를 위해선 생체내 5-lipoxygenase의 활성을 5-lipoxygenase저해제로써 저하시키는 수 밖에 없는데, 현재까지 알려져있는 5-lipoxygenase저해제로는 대부분이 합성 의약품류²⁾이고, n-3계 고도불포화지방산,³⁾ α-tocopherol 및 flavonoid류 등⁴⁾ 몇가지 천연물이 알려져 있을 뿐이다. 최근 이런 lipoxygenase inhibitor를 미생물에 의해 생산하려는 움직임⁵⁾도 있으나, 불가사리, 패류 껍질, 해조류 등 기존 미이용되고 있는 수산생물에는 여러 생리활성물질이 존재해 있어서 이와

같은 lipoxygenase inhibitor 존재여부 탐색대상으로 적격이라 생각되었다.

본 연구에서는 5-lipoxygenase의 일종인 potato lipoxygenase-II⁶⁾를 효소적 지방산화의 모델로 취하여 8종의 수산 미이용자원내에 5-lipoxygenase 저해제가 존재하는 지 여부를 탐색 시도해 보았다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 조제

불가사리, 오징어먹죽, 우렁쟁이, 성게 껍질, 모자반, 구멍쇠미역, 산말, 참빗풀 등 8종의 수산 미이용자원을 시료로 사용하였고, 전보⁶⁾와 같이 분석준비용 시료를 조제하였다.

생리활성물질의 용매추출 및 추출수를 측정

전보⁶⁾와 같이 5°C의 저온실에서 각 시료별 생리활성

Key words : Potato lipoxygenase-II inhibitor, unused marine resources, nonpolar solvent extracts.

Corresponding author : S.-Y. Cho

물질 추출을 행하였다. 즉, 미리 진공동결건조해둔 시료 100g을 증류수 2,000 mL로 24시간 교반추출한 후 원심 분리(Hitachi RPR 20, 8,700×g, 4℃, 15 min)하여 추출액과 잔사를 얻었다. 이 추출액은 진공동결건조시켜 water fraction으로 하였으며 잔사에 대해서는 diethyl ether, acetone, methanol의 순으로 추출하여 ether fraction, acetone fraction, methanol fraction을 얻어 회전식 진공증발기(Heidolph, Germany)로 농축시켜 dimethyl sulfoxide(sigma제)에 녹인 후 냉장고에 보관하면서 검색용 시료로 사용하였다.

추출수율의 측정은 추출에 사용한 시료의 건물중량에 대한 추출물의 총 soluble solid 함량의 백분비로 하였다.

효소적지방산화저해능 검사

5-Lipoxygenase의 일종인 감자 lipoxygenase-II(이하 감자 Lox-II라 칭함⁹⁾)를 감자로부터 문 등⁷⁾의 방법에 따라 분리정제하여 효소적 지방산화용 모델효소로 사용하고, 효소적 지방산화저해능 검정은 oxygen electrode와 oxygen monitor(Yellow Spring Instrument Co., Yellow Spring, U.S.A.)가 부착되어 있는 밀폐된 용기내에서 polarographic method⁸⁾에 의해 행하였다. 즉, 0.2 M potassium phosphate 완충액(pH 5.7) 2ml에 200 μl의 potato lipoxygenase-II 효소액을 녹여 넣고, 시료추출액을 넣지

않든가(control) 넣든가 하여 몰로써 부피를 일정하게 맞춘 후 magnetic stirring 교반 반응시키면서 용존산소 수준이 일정해지는 지점에서 기질로서 0.167 mM가 되도록 linoleic acid(LA)를 주입시켜 시간당 용존산소 변화를 추적하였다. Control구의 초기 최대기울기값에 대한 control구의 초기 최대기울기값과 시료추출액 첨가구의 초기 최대기울기값의 차에 대한 산화억제율(inhibition ratio, IR %)을 구하였으며, 동시에 그 산화억제율이 50% 되는 시료 추출액의 첨가농도(IC₅₀, μg/ml)를 구하였다. 이 때 반응온도는 25℃로 유지하였으며 밀폐된 용기내의 총부피는 3 ml로 일정하게 하였다.

$$\text{Inhibition ratio (\%)} = \frac{\text{CS} - \text{TS}}{\text{CS}} \times 100$$

단, CS : control구의 초기 최대기울기값
TS : 시료추출구의 초기 최대기울기값

결과 및 고찰

8종의 수산 미이용자원의 순차용매 추출구들의 5-lipoxygenase의 일종인 감자 Lox-II에 의한 지방산화에 대한 억제능을 Figs. 1, 2, 3 및 4에 나타내었으며, 각 시료 추출구별 수율 및 IC₅₀은 Table 1에서와 같다.

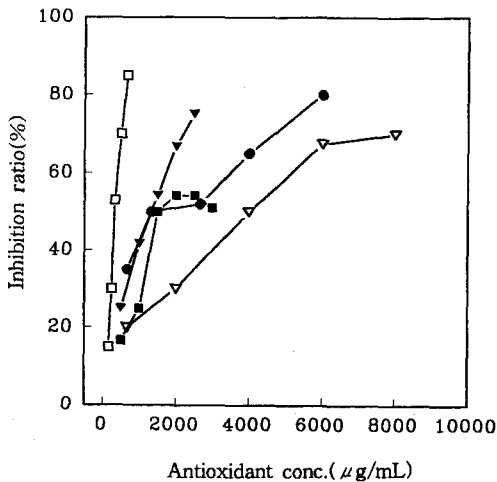


Fig. 1. Inhibitory efficacy of water fractions extracted from unused marine resources on enzymatic lipid oxidation by potato lipoxygenase-II. ●—● *Asterina pectinifera*, ▽—▽ *Halocynthia roretzi* skin, ▼—▼ *Anthocidaris crassispina* skin, □—□ *Sargassum horneri*, ■—■ *Agarum cribrosum*.

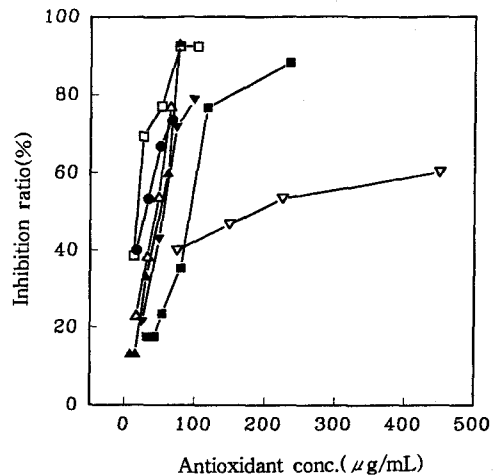


Fig. 2. Inhibitory efficacy of ether fractions extracted from unused marine resources on enzymatic lipid oxidation by potato lipoxygenase-II. ●—● *Asterina pectinifera*, ▽—▽ *Halocynthia roretzi* skin, ▼—▼ *Nototodarus sloani* ink, □—□ *Sargassum horneri*, ■—■ *Agarum cribrosum*, △—△ *Odonthalia corymbifera*, ▲—▲ *Desmarestia ligulata*.

물 추출물들의 효과

Lox-II에 대한 물 추출물들(Fig. 1)의 저해능을 보면 오징어먹죽, 산딸 및 참빗풀의 물추출구는 항산화능이 없는 것으로 나타났으며, 불가사리, 우렁쉥이 껍질, 성게껍질, 구멍쇠미역에서도 IC₅₀이 각각 1,333, 4,000, 1,350 및 1,500 µg/mL로서 효소적 지방산화를 50%까지 억제할 수 있는 농도가 비교적 높아 이들 시료의 물 추출구의 항산화능은 낮은 것으로 나타났다. 그러나 모자반의 경우

물 추출구의 IC₅₀이 320 µg/mL로 그 항산화능은 다른 시료에 비하여 비교적 높았다.

유기용매 추출물들의 효과

Fig. 2에서 볼 수 있듯이, 성게껍질을 제외한 대상 시료 모두의 에테르 추출구에서는 감자 Lox-II 저해효과가 있는 것으로 나타났으며, 불가사리, 우렁쉥이껍질, 오징

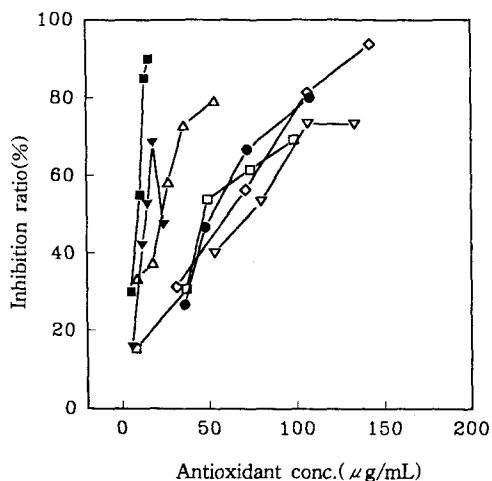
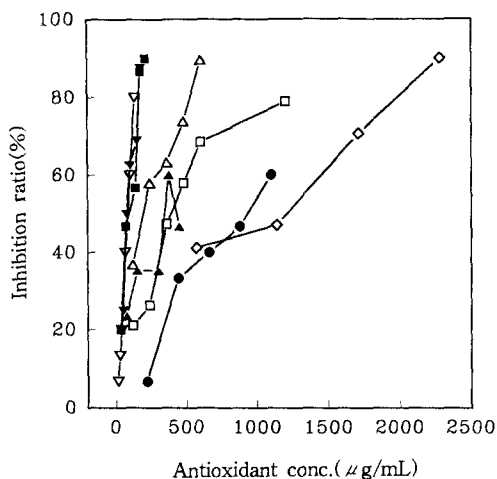


Fig. 3. Inhibitory efficacy of acetone fractions extracted from unused marine resources on enzymatic lipid oxidation by potato lipoxygenase-II. ●—● *Asterina pectinifera*, ▽—▽ *Halocynthia roretzi* skin, ▼—▼ *Nototodarus sloani* ink, □—□ *Anthocidaris crassispina* skin, ■—■ *Sargassum horneri*, △—△ *Agarum cribrosum*, ◇—◇ *Desmarestia ligulata*. Fig. 4.



Inhibitory efficacy of methanol fractions extracted from unused marine resources on enzymatic lipid oxidation by potato lipoxygenase-II.

●—● *Asterina pectinifera*, ▽—▽ *Halocynthia roretzi* skin, ▼—▼ *Nototodarus sloani* ink, □—□ *Anthocidaris crassispina* skin, ■—■ *Sargassum horneri*, △—△ *Agarum cribrosum*, ▲—▲ *Odonthalia corymbifera*, ◇—◇ *Desmarestia ligulata*.

Table 1. Inhibitory effect of several organic solvent fractions prepared from unused marine resources on lipid oxidation by potato lipoxygenase-II

	Water		Ether		Acetone		Methanol	
	Yield (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	Yield (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	Yield (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	Yield (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Asterina pectinifera</i>	17.7	1,333	2.5	29.5	1.8	52	1.1	950
<i>Halocynthia roretzi</i> skin	8.6	4,000	1.8	190	1.2	74	0.2	85
<i>Nototodarus sloani</i> ink	14.6	N.D.	0.4	55	2.4	14.3	1.5	75
<i>Anthocidaris crassispina</i> skin	5.9	1,350	0.5	N.D.	0.4	47.5	0.6	395
<i>Agarum cribrosum</i>	22.8	1,500	1.6	95	6.7	23.5	2.4	200
<i>Sargassum horneri</i>	30.0	320	1.6	18	3.6	9.5	1.4	100
<i>Desmarestia ligulata</i>	25.0	N.D.	1.6	49.5	3.3	62	0.3	1,200
<i>Odonthalia corymbifera</i>	32.0	N.D.	1.0	44.5	2.9	385	1.2	345

N.D.: not detected

IC₅₀ means the sample concentration to inhibit 50% of control lipid oxidation rate.

어머죽, 구멍쇠미역, 모자반, 산말 및 참빗풀의 IC₅₀은 각각 29.5, 190, 55, 95, 18, 49.5 및 44.5 µg/mL이었다. 또한 아세톤 추출구(Fig. 3)에서는 모자반이 수율 3.6%에 IC₅₀이 9.5 µg/mL로 나타난 것을 비롯하여, 구멍쇠미역, 산말, 참빗풀 등의 IC₅₀은 각각 23.5, 62, 385 µg/mL, 불가사리, 우렁쟁이껍질, 오징어머죽 및 성게껍질의 IC₅₀은 각각 52, 74, 14.3 및 47.5 µg/mL로 나타나 모든 시료에서 높은 항산화효과를 나타내었다. 메탄올 추출구들의 IC₅₀을 보면(Fig. 4), 불가사리, 우렁쟁이껍질, 오징어머죽 및 성게껍질에서 각각 950, 85, 75 및 395 µg/mL였으며, 구멍쇠미역, 모자반, 산말, 참빗풀에서는 각각 200, 100, 1,200, 345 µg/mL로 나타나, 상기의 물 추출구에 비해서는 항산화 효과가 높았으나, 에테르 추출구나 아세톤 추출구에 비해서는 전체적으로 낮은 항산화 효과를 가지는 것으로 나타났다. 따라서, 저자 등⁹⁾이 행했던 이들 8종의 수산 미이용자원으로부터의 여러 순차용매추출물들의 감자 Lox-I 산화에 대한 항산화능 검색 결과와 마찬가지로 에테르 추출구나 아세톤 추출구와 같은 비극성 용매쪽으로 유용 5-lipoxygenase 저해(효소적 산화억제 가능) 물질이 많이 용출되는 것으로 나타났으며, 특히 모자반의 물, 에테르, 아세톤 및 메탄올 추출구들 모두에서 IC₅₀이 각각 320, 18, 9.5 및 100 µg/mL로 나타나 낮은 농도의 첨가라도 매우 큰 항산화능을 기대할 수 있었다. 또한 불가사리의 에테르 추출구와 오징어머죽의 아세톤 추출구의 IC₅₀이 각각 29.5, 14.3 µg/mL로 비교적 항산화능이 높은 것으로 나타났으나, 전체적으로 전보⁷⁾의 비효소적 항산화능 검색 결과와도 마찬가지로 불가사리 등의 수산동물 보다는 모자반 등의 해조류에 효소적 지방산화억제물질이 많이 내재해 있는 것으로 보였다. 각 시료 용매추출구 첨가농도별 감자 Lox-II 저해능 검사 결과, 추출액의 첨가 농도를 증가시킬수록 저해율이 증가하는 것으로 나타났으나 시료에 따라서는 첨가 농도를 지나치게 증가시키면 저해율의 증가폭이 감소하거나 오히려 저해율의 감소하는 경향을 보였다. 이처럼 추출물의 첨가량을 증가시켜도 항산화 효과가 비례하지 않는 것은 추출물 자체의 특성이거나 용해도가 갑자기 낮아지는데 기인하는 현상으로 추론된다.¹⁰⁾ 한편, 합성항산화제임과 동시에 5-lipoxygenase 저해제로 알려져 있는 BHA와 BHT에 대해,²⁾ 본 연구와 동일한 시스템에서 그 활성저해를 위한 IC₅₀값을 측정해 본 결과, 280과 49 µg/mL로 각각 나타났다. 즉, 전보⁶⁾의 감자 Lox-I는 BHA와 BHT에 대해 IC₅₀이 4와 95 µg/mL로 각각 나타나 감자 Lox-I과 II가 BHA와 BHT의 저해능의 정도에 있어서 서로 정반대되는 효과를 나타내었는데,

수산 미이용자원의 여러 용매추출물에 있어서는 우렁쟁이 아세톤 및 메탄올 추출구, 구멍쇠미역 물 추출구, 산말·참빗풀의 메탄올 추출구 등의 IC₅₀ 값 역시 두 효소간에 현저한 차이를 보여 각 효소에 작용하는 기작이 다름을 시사하고 있으나, 보다 상세한 작용기작에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다. 그러므로, 적어도 실제 식품 내지는 의약산업적사용을 위한 천연저해제로서의 개발을 위해서는 본연구에서의 활성구분에 대한 분리 정제를 더욱 행한 뒤, 아울러 그것에 대한 확실한 동정까지 시도되어 성공하여야만 할 것으로 생각된다. 그러나, 어떤 수산 가공폐기물 또는 미이용 해조자원의 유효적절한 이용이란 측면에선 본 연구에서와 같은 정도의 순도의 추출물로도 의미있는 후후적용시험이 가능하리라 생각되므로 효소적산화가 문제되는 식품업계 및 항성인병 인자로서 기능성 식품화에서 충분히 이용가능하리라 사료된다.

감사의 글

본 논문은 1991년도 한국과학재단의 특정기초연구과제 연구비 지원(연구과제번호: 91-0700-14-03-3)에 의한 연구결과의 일부로서, 이에 깊이 감사드립니다.

참고 문헌

1. Lands, E. E. M. (1986). *Fish and Human Health*, p.1, Academic Press, New York
2. Curtis-Prior, P. B. (1988). In "Prostaglandins; Biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids", p.55, Churchill living Stone, London.
3. Kinsella, J. E. (1988). Food lipids and fatty acids-Importance in food quality, *Food Technology*, '88-10, 124-144
4. 조순영 and J. E. Kinsella (1990). n-3계 고도불포화지방산의 면역기능 및 Flavonoid류의 약리작용. 한국식품과학회 영남지부 학술강연회 요지집, p.6
5. Hwang, J. S., Y. K. Jeong and Lee, T. H.(1993). Purification and characterization of lipoxygenase inhibitor produced by *Penicillium* sp. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 22, 833.
6. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이응호 (1994). 수산 미이용자원중에 존재하는 항균성 물질의 검색, 한국식품과학회지, 26, 261-265
7. 문정원, 조순영, 서명자 (1993). 감자 Lipoxygenase Isoenzymes의 베타-카로틴 탈색효과, 한국영양식품학회지, 22, 777-784

8. 藤本健四郎 (1993). 過酸化脂質實驗法(金田尚志 . 植田伸夫編). p.43, 醫齒藥出版株式會社, 東京
9. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주 (1994). 수산미이용자원 중에 존재하는 효소적 산화억제제의 검색 1. 감자 lipoxygenase에 의한 효소적 산화에 대한 억제, 한국영양식량학회지, 23(투고중)
10. 최웅, 신동화, 장영상, 신재익 (1992). 식물성 천연항산화물질의 검색과 그 항산화력 비교, 한국식품과학회지, 24, 142-148

Screening for Potato Lipoxygenase-II Inhibitor in Unused Marine Resources by the Polarographic Method

Soon-Yeong Cho*, Byeong-Jin You, Mi-Hwa Chang, Soo-Jung Lee¹, Nak-Ju Sung¹ and Eung-Ho Lee²(*Department of Food Science, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea, ¹Department of Food and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 601-701, Korea, ²Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea)

Abstract : To detect naturally occurring bioactive compounds from unused marine resources, the screening for the 5-lipoxygenase(potato lipoxygenase-II) inhibitors in *Asterina pectinifera*, *Halocynthia roretzi* skin, *Nototodarus sloani* ink, *Anthocidaris crassisipina* skin, *Sargassum horneri*, *Agarum cribrosum*, *Odonthalia corymbifera* and *Desmarestia ligulata* was carried out. Water, ether, acetone and methanol fractions extracted from *Sargassum horneri* had strong inhibitory effect on enzymatic lipid oxidation by potato lipoxygenase-II, and their IC₅₀ were 320, 18, 9.5 and 100 µg/mL, respectively. The IC₅₀ of ether fraction extracted from *Asterina pectinifera* and acetone fraction extracted from *Nototodarus sloani* ink were 29.5 and 34.3 µg/mL, and these extracts showed relatively excellent inhibitory activity. Non-polar solvent (ether, acetone) extracts of tested marine organisms had more inhibitory effect against 5-lipoxygenase than the polar solvent(water) extracts.