

수산 미이용자원 중에 존재하는 효소적 산화 억제제의 검색 1. 감자 Lipoxygenase-I에 의한 효소적 산화에 대한 억제

조순영[†] · 유병진 · 장미화 · 이수정* · 성낙주*

강릉대학교 식품과학과

*경상대학교 식품영양학과

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

Soon-Yeong Cho[†], Byeong-jin You, Mi-Hwa Chang, Soo-jung Lee* and Nak-ju Sung*

Dept. of Food Science, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

* Dept. of Food and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 601-701, Korea

Abstract

To detect bioactive compounds present in unused marine resources, the screening for the 5-lipoxygenase inhibitors in *Asterina pectinifera*, *Halocynthia roretzi* skin, *Nototodarus sloani* ink, *Anthocidaris crassispina* skin, *Sargassum horneri*, *Agarum cribrosum*, *Odonthalia corymbifera* and *Desmarestia ligulata* was carried out. The ether and acetone extracts of *Sargassum horneri* had the strongest antioxygenic activity on lipid oxidation by potato lipoxygenase-I (one of 5-lipoxygenase) among the tested marine samples and their IC₅₀ were 0.3 and 1.1 μg/ml, respectively. The ether and acetone extracts of *Asterina pectinifera*, the acetone extracts of *Halocynthia roretzi*, and the acetone extracts of *Nototodarus sloani* ink had strong inhibitory activity and their IC₅₀ were 72.5, 65, 13.3 and 13.3 μg/ml, respectively. In addition, the IC₅₀ of the acetone extracts of *Agarum cribrosum* and *Desmarestia ligulata*, and the ether extracts of *Desmarestia ligulata* were 15.5, 35 and 30.5 μg/ml, respectively. The nonpolar solvent (ether, acetone) extracts of tested marine organisms had more antioxygenic effect against 5-lipoxygenase than the polar solvent(water) extracts.

Key words : potato lipoxygenase-I, 5-lipoxygenase inhibitor, unused marine resources

서 론

감자 괴경(塊莖)에는 두 종류의 lipoxygenase가 존재하는데, 이들을 보통 각각 감자 lipoxygenase(이후 Lox로 약함)-I 및 II로 명명해 부른다. 이들은 이미 많이 연구되어 있는 soybean lipoxygenase isozyme들과 근본적으로는 같으나 여러 다른 효소 반응 특성적으로 cis,cis-1,4-pentadiene 구조를 가지는 불포화지방산이나 불포화지방에 분자상 산소를 첨가하여 hydroperoxide를 생성하는 과정에서 상이한 점들도 많다¹⁾. 즉, 콩 유래나 감자 유래나 모두 산소분자 첨가효소로서 지방 또는 지방산에 직접적으로 공격한다는 점은

같으나, 내부적으로 보아 지방산의 공격 위치특이성, 기질특이성 및 산화반응시 최적 pH, 가열변성속도는 각각 서로 상이하어^{2,3)}, 심지어 같은 감자 Lox isozyme 들끼리 비교했을 때 II는 chlorophyll이나 carotene 등 색소를 유효적절하게 탈색시키나 I은 그 탈색효과가 그다지 크지않다^{4,5)}. 그렇지만, 일반 효소적 산화면에서는 Lox-I이 II 보다 훨씬 강하였다^{4,5)}. 한편 생리적으로 감자유래 Lox isozyme들은 아라키돈산 cascade상에서 아라키돈산의 5번째 위치 탄소에 분자상 산소부착반응이 일어나 5-hydroperoxy 불포화지방산을 형성하여 일련의 대사물질을 생성해 나간다는 면에선 공통점이 있다. 그러나 감자 Lox-I과 II는 여러 효소반응 특이성이 다른 것과 같이²⁻⁵⁾ 엄연히 다른 생리작용을 생체내에서 수행하리라 기대되어지나⁶⁾ 아직 확실히 규

[†]To whom all correspondence should be addressed

명된 적은 없다. 게다가 본 5-Lox는 아라키돈산이나 리놀산 다량 함유 식이에서 생체내에서 활발히 작용하여 leukotrien류와 같은 생리활성 대사산물을 과량 생성하여 천식, 동맥경화증, 심근경색, 관절염 등 만성병의 주원인이 된다고한다⁶⁾. 물론 리놀산이나 아라키돈산이 적게 함유된 어유 등의 식이를 취하면 상술한 병의 발병을 줄일 수 있으나 그들 생성물의 양을 조절하는 방법의 근본책으로서 역시 5-Lox 활성저해물질의 섭취를 권하고 있다⁷⁾. 그러나, 이런 5-Lox 활성저해물질로서 nonsteroid anti inflammatory analgesic drugs의 일종인 indomethacin 등 몇몇 합성 의약품류⁸⁾가 있을 뿐이고, 천연물로는 α -tocopherol⁹⁾이나 조와 Kinsella¹⁰⁾가 보고한 herb 유래 플라보노이드류 이외는 찾아볼 수 없었다.

그러므로, 본 연구에서는 감자 lipoxygenase-1을 생체내 5-Lox 모델로¹¹⁾ 생각하고 우리가 n-6계 지방산을 자주 식이한다는 가정하에 이 효소작용을 저해하여 적절한 양의 leukotrien류가 생체내에서 생성되도록 조절해 줄 천연 저해제 탐색을 수산생물 특히 수산 미이용자원을 대상으로 시도해 보았다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 조제

시험 재료로는 별불가사리 (*Asterina pectinifera*), 우렁쟁이 (*Holocynthia rotetzii*) 껍질, 오징어 (*Nototodarus sloani*) 먹줄, 성게 (*Anthocidaris crassispina*) 껍질 등 비식용 수산폐기물과 켈생이모자반 (*Sargassum horneri*), 구멍쇠미역 (*Agarum cribrosum*), 참빗풀 (*Odonthalia corymbifera*), 산말 (*Desmarestia ligulata*) 등의 식용, 비식용 해조류를 사용하였다.

채취된 각 시료는 수세하여 이물질을 제거한 후 진공 동결건조기 (FTS system Inc. U.S.A.)에서 건조시킨 뒤 20mesh 이하가 되도록 마쇄하여 냉동실 (-20°C)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

생리활성 물질의 용매추출 및 수율측정

각 시료별 생리활성 물질 추출은 5°C의 저온실에서 전보¹²⁾에서와 같이 실시하였다. 즉, 미리 진공 동결건조해둔 시료 100g을 증류수 2,000ml로 24시간 교반추출한 후 원심분리 (7,000rpm, 4°C, 15min)하여 추출액과 잔사를 얻었다. 이 추출액은 진공 동결건조시켜 water fraction으로 하였으며 잔사에 대해서는 diethyl ether, acetone, methanol의 순으로 추출하여 ether fraction,

acetone fraction, methanol fraction을 얻어 회전식 진공증발기 (Heidolph, Germany)로 농축시켜 DMSO (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.

효소적 지방산화 저해능 검사

5-Lox의 일종인 감자 lipoxygenase-1을 감자로 부터 문 등⁴⁾의 방법에 따라 분리정제하여 효소적 지방산화용 모델효소로 사용하고, 효소적 지방산화 저해능 검정은 oxygen electrode와 oxygen monitor (Yellow Spring Instrument Co., Yellow Spring, U.S.A.)가 부착되어있는 밀폐된 용기내에서 polarographic method¹³⁾에 의해 행하였다. 즉, 0.2M potassium phosphate 완충액 (pH 5.7) 2ml에 50 μ l의 potato lipoxygenase-1 효소액을 녹여 넣고, 시료 추출액을 넣지 않거나 (control) 넣거나 하여 불로써 부피를 일정하게 맞춘 후 magnetic stirring 반응시키면서 용존산소 수준이 일정해지는 지점에서 기질로서 0.167mM가 되도록 linoleic acid (LA)를 주입시켜 용존산소 변화를 추적하여 control구의 초기 최대기율기와 시료추출액 첨가구의 초기 최대기율기의 차에 대한 control구의 초기 최대기율기로써 산화억제율 (Inhibition ratio, IR, %)을 구하였으며, 동시에 산화억제율이 50%되는 시료 추출액의 농도 (IC₅₀, μ g/ml)를 구하였다. 이때 반응온도는 25°C로 유지하였으며 밀폐된 용기내의 총 부피는 3ml로 일정하게 하였다.

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

CS : control구의 초기 최대 기율기

TS : 시료추출구의 초기 최대 기율기

결과 및 고찰

각 용매추출 구간별 5-Lox에 의한 지방산화의 억제효과

8종의 수산 미이용자원에 대한 순차적으로 극성을 올리는 용매추출법¹⁴⁾에 의해 추출된 각 추출 구간별 감자 lipoxygenase-1(감자 Lox 1)에 대한 효소적 지방산화 억제능은 Fig. 1, 2, 3 및 4에 나타내었다. 먼저, 물추출구중 (Fig. 1)에서는 오징어먹줄, 산말, 참빗풀의 경우는 항산화 효과가 없는 것으로 나타났으며, 불가사리,

우렁쉥이 껍질, 성게 껍질에서는 IC₅₀이 각각 2,325, 10,500 및 1,500 μ g/ml로 항산화 효과가 낮았으나, 구

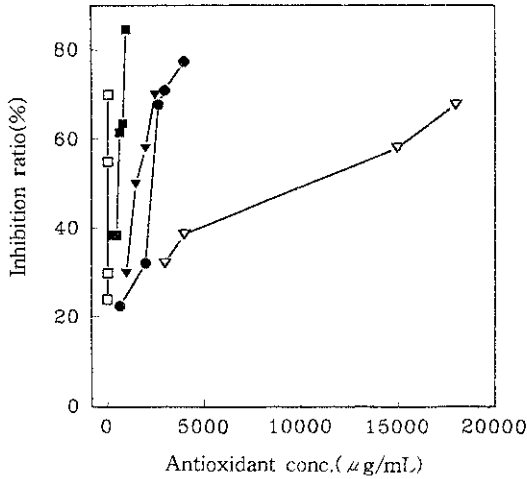


Fig. 1. Inhibitory efficacy of water fractions extracted from unused marine resources on lipid oxidation by potato lipoxygenase-I.

- : *Asterina pectinifera*
- ▽—▽ : *Halocynthia roretzi* skin
- ▼—▼ : *Anthocidaris crassispina* skin
- : *Sargassum horneri*
- : *Agarum cribratum*

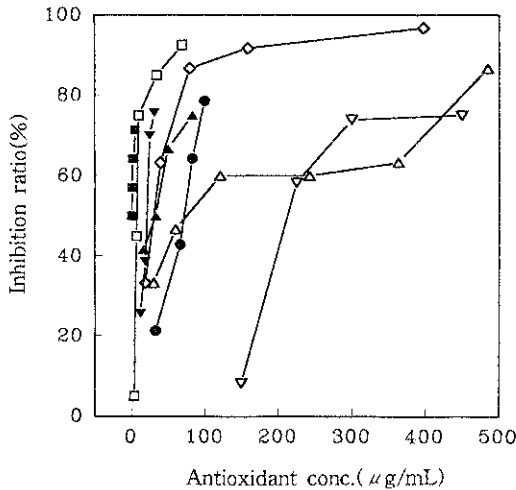


Fig. 2. Inhibitory efficacy of ether fractions extracted from unused marine resources on lipid oxidation by potato lipoxygenase-I.

- : *Asterina pectinifera*
- ▽—▽ : *Halocynthia roretzi* skin
- ▼—▼ : *Nototodarus sloani* ink
- : *Anthocidaris crassispina* skin
- △—△ : *Agarum cribratum*
- ▲—▲ : *Odonthalia corymbifera*
- ◇—◇ : *Desmarestia ligulata*

멍쇠 미역과 모자반은 IC₅₀이 각각 585와 46.5 μ g/ml 낮은 농도에서도 항산화 효과가 높은 것으로 나타났다. 에테르 추출구 (Fig. 2)에 있어서는 불가사리, 우렁쉥이 껍질, 오징어먹춤, 성게 껍질, 구멍쇠미역, 산말 및 참빗풀의 IC₅₀이 각각 72.5, 215, 21.3, 7.5, 80, 30.5 및 33.3 μ g/ml로서 모든 시료의 IC₅₀이 250 μ g/ml 이하로 되어 항산화 효과가 높았으며, 특히 모자반의 경우 IC₅₀이 0.3 μ g/ml로 나타나 항산화 효과가 매우 강한 것으로 나타났다. 아세톤 추출구 (Fig. 3)는 참빗풀과 불가사리의 IC₅₀이 995 μ g/ml와 65 μ g/ml로 나타난 것을 제외하고는 우렁쉥이 껍질, 오징어먹춤, 성게 껍질, 구멍쇠미역, 모자반 및 산말 등 전 시료에서 IC₅₀이 각각 13.3, 13.3, 49, 15.5, 1.1, 및 35 μ g/ml로서 모두 50 μ g/ml 이하로 나타나 가장 항산화 효과가 높은 용매 추출 구였다. 메탄올 추출구에 (Fig. 4) 있어서도 불가사리와 성게껍질의 경우 IC₅₀이 각각 570 μ g/ml와 315 μ g/ml로 나타났으며, 구멍쇠미역, 모자반, 산말, 참빗풀 등의 해조류에서도 IC₅₀이 각각 310, 390, 740 및 1,700 μ g/ml로서 전 시료에 걸쳐 항산화 효과가 있는 것으로 나타났으며 특히, 우렁쉥이 껍질과 오징어먹춤에서 IC₅₀이 각각 16.5 μ g/ml와 75 μ g/ml로서 특히 항산화 성이 높은 것으로 나타났다. 더우기, 본 추출물들은 아직 순수분리된 것이 아니라 3~4종 이상의 물질의 혼합

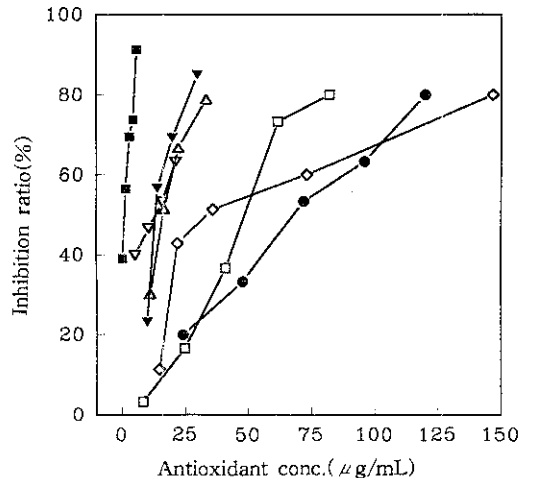


Fig. 3. Inhibitory efficacy of acetone fractions extracted from unused marine resources on lipid oxidation by potato lipoxygenase-I.

- : *Asterina pectinifera*
- ▽—▽ : *Halocynthia roretzi* skin
- ▼—▼ : *Nototodarus sloani* ink
- : *Anthocidaris crassispina* skin
- △—△ : *Agarum cribratum*
- : *Sargassum horneri*
- ◇—◇ : *Desmarestia ligulata*

불인자라 순수 합성 항산화제와 직접 비교하긴 힘들지만 참고로 butylated hydroxyanisole (BHA) 및 butylated hydroxytoluene (BHT)를 본 연구와 동일 산화 시스템 내에 첨가하였을 때 IC₅₀ 값이 각각 4, 95µg/ml로 나왔다.

용매추출 구간들의 수율과 효소적 지방산화 억제율 비교

전 용매추출 시료별 감자 Lox-I에 대한 항산화 효과를 보면 (Table 1), 대상 시료 모두에서 전반적으로 효

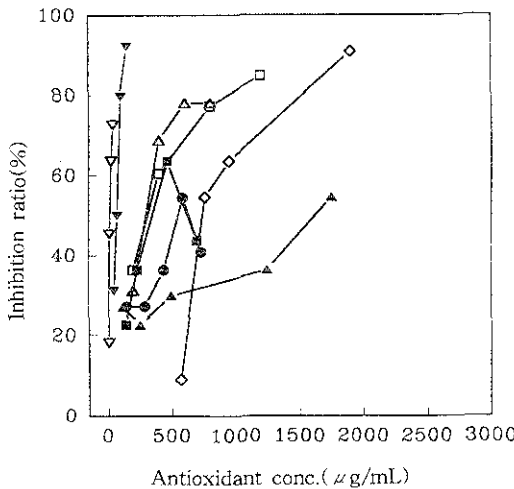


Fig. 4. Inhibitory efficacy of methanol fractions extracted from unused marine resources on lipid oxidation by potato lipoxygenase-I

- : *Asterina pectinifera*
- ▽—▽ : *Halocynthia roretzi* skin
- ▼—▼ : *Nototodarus sloani* ink
- : *Anthocidaris crassispina* skin
- : *Sargassum horneri*
- △—△ : *Agarum cribrosum*
- ▲—▲ : *Odonthalia corymbifera*
- ◇—◇ : *Desmarestia ligulata*

소적 지방산화에 대한 항산화 효과가 나타났으나, 그 대상 미이용 수산생물 중에서도 특히 불가사리의 에테르 추출구와 아세톤 추출구, 우렁쉥이 껍질의 아세톤 추출구 및 오징어먹물의 아세톤 추출구와 메탄올 추출구에서 1% 이상의 수율로 IC₅₀이 각각 72.5, 65, 13.3, 13.3 및 75µg/ml로 좋은 항산화 효과를 나타냈으며, 해조류에서는 구멍퇴머리의 아세톤 추출구, 모자반의 물 추출구, 에테르 추출구 및 아세톤 추출구, 산말의 에테르 추출구와 아세톤 추출구에서 수율 1% 이상으로 IC₅₀이 각각 15.5, 46.5, 0.3, 1.1, 30.5 및 35µg/ml로서 매우 높은 항산화능을 보였다. 특히 모자반에서는 물 추출구에서 수율 30%, IC₅₀ 46.5µg/ml로서, 일부 수산 미이용자원의 물 추출구에서도 항산화능이 매우 크게 나타났으며, 그 모자반의 에테르 추출구에서는 IC₅₀이 0.3µg/ml로 나타나 대상 수산 미이용자원 시료 중 감자 Lox-I에 대하여 가장 강한 지방산화 억제 물질이 존재하는 것으로 생각되었다. 또한 8종의 대상 수산 미이용자원의 감자 Lox-I에 의한 지방산화 억제능 검색에서도 에테르 추출구와 아세톤 추출구가 물 추출구와 메탄올 추출구에 비해 항산화 효과가 높았다. 이와같이, 대상 수산 미이용자원내의 5-Lox에 대한 저해 효과를 지닌 주성분은 물에 추출되는 한산화 단백질이나 효소 등²⁶⁾의 고분자 물질이 아니라, ether나 acetone 등의 유기용매에 쉽게 추출되는 지방성 물질인 것을 알 수 있다. 현재 이들 각 활성물질에 대한 본 연구에서 기술한 항산화 검증법과 chromatography 분리 수단을 이용하여 가장 큰 효과를 내는 단일물질이 어떤 구조를 지녔는지 알아보기 위해 순수분리를 행한 뒤, 그 동정을 시도하고 있는 중이다. 이런 지속적인 연구에 의해 동정되는 천연 5-Lox 저해제는 항성인병 인자로서도 사용 가능하리라²⁷⁾ 생각되어 의의가 크다고 판단된다.

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

	Water		Ether		Acetone		Methanol	
	Yield (%)	IC ₂₀ (µg/ml)	Yield (%)	IC ₂₀ (µg/ml)	Yield (%)	IC ₂₀ (µg/ml)	Yield (%)	IC ₂₀ (µg/ml)
<i>Asterina pectinifera</i>	17.7	2,325	2.5	72.5	1.8	65	1.1	570
<i>Halocynthia roretzi</i> skin	8.6	10,500	1.8	215	1.2	13.3	0.2	16.5
<i>Nototodarus sloani</i> ink	14.9	N.D.	0.4	21.3	2.4	13.3	1.5	75
<i>Anthocidaris crassispina</i> skin	5.9	1,500	0.5	7.5	0.4	49	0.6	315
<i>Agarum cribrosum</i>	22.8	585	1.6	80	6.7	15.5	2.4	310
<i>Sargassum horneri</i>	30.0	46.5	1.6	0.3	3.6	1.1	1.4	390
<i>Desmarestia ligulata</i>	25.0	N.D.	1.6	30.5	3.3	35	0.3	740
<i>Odonthalia corymbifera</i>	32.0	N.D.	1.0	33.3	2.9	995	1.2	1,700

N.D. : not detected, IC₅₀ means the sample concentration to inhibit 50% of control lipid oxidation rate

요 약

성인병 예방물질의 가능성을 지닌 5-lipoxygenase 활성 저해제가 8종의 수산 미이용자원의 순차 용매 추출구간들 중에 존재하는지 여부를 수산 미이용자원의 고부가 가치적 이용 방안 모색을 위해 시도해 보았다. 그 결과, 대상시료에 대한 여러 용매 추출구들의 거의 대부분의 경우에 있어서 5-lipoxygenase 효소저해능을 나타내었다. 그 중 수산동물의 경우, 불가사리의 에테르 추출구와 아세톤 추출구, 우렁쉥이 껍질의 아세톤 추출구, 오징어먹집의 아세톤 추출구와 메탄올 추출구에서 IC₅₀이 각각 72.5, 65, 13.3, 13.3 및 75 μ g/ml로 높은 5-lipoxygenase 활성저해 효과를 나타내었다. 시험대상 해조류 중 구멍쇠미역의 아세톤 추출구, 모자반의 물 추출구, 에테르 추출구 및 아세톤 추출구, 산말의 에테르와 아세톤 추출구에서 IC₅₀이 각각 15.5, 46.5, 5.03, 1.1, 30.5 및 35 μ g/ml로서 매우 높은 저해효과를 보였다. 이상의 활성물질에 대한 보다 더 순수한 분리 후 동정을 행하여 대량 생산만 된다면, 효소적 산화방지제로서 뿐 아니라 생체내 산화조절제로서도 이용가능할 것이므로 수산 미이용자원의 고부가 가치적 이용방안의 하나가 되리라 여겨진다.

감사의 글

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

문 헌

1. Kitamura, K. : Breeding for soybean cultivars having

- low lipoxygenase levels for utilization of soybean. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **31**, 751 (1984)
2. Galliard, T. and Phillips, D. R. : Lipoxygenase from potato tubers-partial purification and properties of an enzyme that specifically oxygenates the 9-position of linoleic acid. *Biochem. J.*, **124**, 431 (1971)
3. 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)
4. 문정원, 조순영, 서명자 : 감자 lipoxygenase isoenzymes의 β -카로텐 탈색효과. *한국영양식량학회지*, **22**, 777 (1993)
5. 문정원, 조순영, 서명자 : 감자 lipoxygenase isoenzymes의 클로로필 탈색효과. *한국영양식량학회지*, **23**, 955 (1994)
6. Lands, E. E. M. : Fish and human health. Academic Press, New York, p.1 (1986)
7. Kinsella, J. E. : Food lipids and fatty acids-Importance in food quality, nutrition, and health. *Food Technology*, **88**, 124 (1988)
8. Curtis-Prior, P. B. : Prostaglandins-biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids. Churchill living stone, London, p.55 (1988)
9. Curtis-Prior, P. B. : Prostaglandins-biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids. Churchill living stone, London, p.62 (1988)
10. 조순영, Kinsella, J. E. : n-3계 고도불포화지방산의 면역기능 및 flavonoid류의 약리 작용. 1990년도 한국식품과학회 영남지부 학술강연회 요지집, p.6 (1990)
11. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이용호 : 수산 미이용자원 중에 존재하는 항균성물질의 검색. *한국식품과학회지*, **26**, 261 (1994)
12. 藤本健四郎 : 過酸化脂質實驗法. 金田尚志, 植田伸夫編, 醫齒藥出版株式會社, 東京, p.43 (1983)
13. 野崎一彦 : プロタミンの抗菌性とその利用. *フードケミカル*, **88**, 15 (1988)
14. 松浦先軍男 : 酸素酸化反應. 丸善株式會社, 東京, p. 17 (1977)

(1994년 9월 3일 접수)