

Fe ion과 활성산소 관련 지방산화반응에 미치는 솔잎 추출물의 영향

김수민 · 조영석*

경산대학교 생명자원공학부, *영남대학교 식품가공학과

Effect of Pine Needle Extract on Fe ion and Active Oxygen Related Lipid Oxidation in Oil Emulsion

Soo-Min Kim and Young-Suk Cho*

Faculty of Life Resources Engineering, Kyungsan University

*Department of Food Science and Technology, Yeungnam University

Abstract

This study was carried out to investigate the effect of Pine needle extract on lipid oxidation and free radical reaction in iron sources reacted with active oxygen species. The results were summarized as follow; The pine needle extracts didn't show a distinct effect on reduction of lipid oxidation if the iron ion didn't exist in oil emulsion. The pine needle extracts played role as a strong chelating agents to bind iron ion if Ferrous iron(Fe^{2+}) exist in oil emulsion. Ferric iron(Fe^{3+}) was lower effect than Ferrous iron(Fe^{2+}) on free radical reaction in oil emulsion. And also, the Fe^{3+} reacted with pine needle extract did not show distinct effect on free radical reaction, compared to Fe^{2+} reacted with pine needle extract. And also, Pine needle extracts reacted with H_2O_2 were tended to show a low oxygen scavenging ability in case of H_2O_2 only was existed, compared to those of $H_2O_2 + Fe^{2+}$ complex. Pine needle extracts were the most powerful Fe^{2+} binding agents, compared to other strong synthetic antioxidants such as EDTA and DTPA.

Key words : pine needle extract, active oxygen species, free radical, oil emulsion

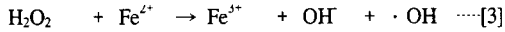
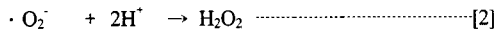
서 론

식품의 가공 및 저장중에 일어나는 지방질의 산화는 식품에 있어서 영양가의 저하 등 품질저하 요인 뿐만아니라 산화에 의해 생성되는 각종 산화 생성물은 암이나 노화에 알려져 있다(1). 특히, free radical은 생체 물질인 DNA, RNA, 단백질, 지질등과 반응하여 세포나 조직에 손상을 유발하며 생체의 방어능력을 감소시켜 인체에 악영향을 끼친다고 한다(2). 이를 방지하기 위해 수많은 합성 또는 천연항산화 물질이

개발되어 왔으나, 그 효과와 경제성 및 안전성 때문에 실제로 많이 사용되고 있는 것은 합성 항산화제로서 BHA, BHT, EDTA 등이 있으며, 천연 항산화제로서는 tocopherol 등이 있는데 이는 식물성 기름에 효과가 낮고(3) 가격이 대단히 고가인 것이 결점이다. 그러나, 합성항산화제는 간비대, 간장중 microsomal enzyme activity의 증가, 체내 흡수물질의 일부가 독성물 혹은 발암성 물질화 한다는 연구결과(4-7)에 따라 천연으로부터 산화반응 및 radical의 반응성을 억제할 수 있는 항산화물질을 찾는 연구가 활발히 이루어지고 있고(8, 9), 일부는 상품화 되고 있다. 그런데 유지의 지방산화에서 알 수 있듯이 어느 산화방지제가 모든 종류의 유지류에 같은 산화방지 효과를 나타내지는 못하듯이 특정 물질이 생체의 산화반응 또는

Corresponding author : Soo-Min Kim, Faculty of Life Resources Engineering, Kyung-San University, Kyung-San, Kyungbuk, 712-240 Korea.

radical 반응 전반에 걸쳐 반응성을 억제하지는 못한다고 판단되어지며, 활성산소의 종류나 radical source에 따라 또한 반응기작에 따라 반응성을 억제할 수 있는 항산화 물질의 연구가 필요하다고 생각되어진다. 또한, 우리들의 일상적으로 섭취하고 있는 식용 식물에는 vitamin, minerals, polyphenol류 등 건강유지에 중요한 광합성 대사산물이 포함되어 있으며(10), 이러한 대사 산물이 발암과 노화를 예방한다는 기능성 연구가 보고 되어 있다(11). 그러나, 지방산화 기작에 대한 연구는 연구자 마다 다소 차이가 있으나, Haber-Weiss 반응으로 요약된다.



즉, superoxide는 Fe^{3+} 를 Fe^{2+} 으로 환원[1]시키고, Fe^{2+} 는 반응[2]에 생성된 H_2O_2 를 분해시켜서 hydroxyl radical을 만들고 지방산화를 촉진시키는 것으로 짐작된다. 그러나, Miller 등(12)은 전통적인 Fenton 반응을 거부하면서 지방산화 촉진인자는 Fe^{2+} 이온과 Fe^{3+} 이온 복합체라는 사실을 제안하였다. 이에 대해 많은 연구자(13-15)들도 지방산화의 시발물질은 $\cdot OH$ 가 아니라 ferryl이나 perferryl radical이라고 주장하였다. 또한, Ahn과 Kim(16)도 superoxide는 자유철의 환원제로서 보다는 산화제로서 작용하였고, Fe^{3+} 와 ferritin은 환원제가 존재할 때 만이 oil emulsion에서 산화촉진제 역할을 가졌다고 보고하여 Haber-Weiss 반응과는 부분적으로 다른 견해를 밝혔다. 이렇게 연구자들 마다 반응과정에 차이를 보이고 있으나, 최종산물인 $\cdot OH$ 의 생성은 일치된 견해이다. 이렇게 생성된 $\cdot OH$ 은 정상 세포를 공격하여 세포손상을 입혀 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 광합성 대사산물을 다량 함유하고 있는 솔잎의 산화반응 및 radical 반응에 미치는 영향을 비교 함으로써 천연항산화 물질의 탐색과 유해산소에 대한 치료제 개발을 하는데 기초자료로 사용하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

재 료

경산대학교 인근에서 채취한 솔잎을 수세후 건조·마쇄하여 솔잎 30g에 300ml를 가해 3회 반복 추출한 후 whatman paper No. 1으로 여과하여 그 여액을 시료로 사용하였다.

Oil emulsion 제조

Oil emulsion은 사용하기전에 만들고 maleic acid buffer(8ml, 1M) pH 6.5로 보정한 다음 50 μ l Tween-20, 0.5ml 정도의 아마인유를 넣고 15분간 교반한 후 KOH 2~3조각 넣고 교반 하면서 0.1N KCl로 pH 6.5로 제조 사용하였다.

시료조제

시료 조제는 oil emulsion 0.5ml에 50 ppm의 Fe^{2+} , Fe^{3+} 을 각각 0.1 ml씩 가한 후 솔잎추출물과 산소종 {40mM H_2O_2 , Potassium superoxide(KO_2), 40mM H_2O_2 + $Fe^{2+}(\cdot OH)$ }과 각종항산화제를 각각 0.1 ml씩 첨가하여 전체 1ml가 되도록 증류수로 조정하여 4반복 실시 하였다.

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)분석

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 Buege와 Aust의 방법(17)에 따라 측정하였다. 1ml 반응 혼합물이 채워진 시험관을 37 $^{\circ}C$ water bath에서 1시간 동안 반응 시켰다. 반응이 끝나자마자 50 μ l dibutyl hydroxy toluene(BHT) 7.2%를 시료에 가하여 산화반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 잘 섞은 다음 2ml TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는물에서 15분간 가열시켰다. 가열 후 찬물에서 시킨 후 2,000 \times g의 속도로 15분간 원심분리 시켰다. 상등액을 흡광도 531nm에서 측정하였고 공시료는 시료대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. TBARS값은 ml 반응혼합물에 대해서 μ g malondialdehyde(MDA)로 표시하였다.

통계분석

각각의 시료에 대해 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 각 군에 따른 유의차 검증은 분산분석을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

솔잎 추출물이 지방산화에 미치는 영향

Fig. 1은 oil emulsion의 지방산화에 있어서 산소종과 반응한 솔잎 추출물의 효과를 나타낸 결과이다. 대조구와 솔잎 추출물의 지방산화 정도를 비교하기 위하여 TBARS값을 비교한 결과 거의 비슷한 지방산화 정도를 나타내었다. 이러한 결과는 솔잎추출물이 oil emulsion 상태에서는 지방산화에 아무런 영향을 미치지 않음을 나타내는 것이다. 그러나, 활성산소인

H₂O₂와의 반응에서는 대조구보다 약간 높은 TBARS 값을 나타내었다. 또한, H₂O₂에 솔잎 추출물을 첨가하여 활성산소종에 대한 포집능력을 검토한 결과, H₂O₂에 대해 솔잎 추출물의 포집능력이 없는 것으로 나타났다. 그러나, 다른 산소종인 KO₂와 hydroxyl radical, 솔잎 추출물과의 반응은 H₂O₂에서의 반응과는 달리 TBARS값의 변화가 미미하지만, 약간의 포집효과를 나타내었다(P<0.05). 이러한 산소종에 따른 솔잎 추출물의 포집능력의 차이에 대해 좀 더 상세한 연구가 필요하고 아직까지 그 기작에 대해서는 명확하지 않다.

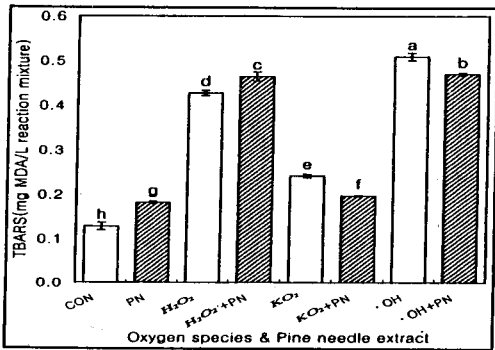


Fig. 1. Effect of pine needle extract reacted with oxygen species on lipid oxidation in oil emulsion. CON: control, PI: Pine needle a-h: Means in the same column bearing different superscripts are different(P<0.05).

Fe²⁺이온에 대한 솔잎 추출물의 영향

지방산화에 있어서 촉매제 역할을 하는 Fe²⁺ ion에 대하여 솔잎 추출물의 지방산화억제 효과는 솔잎 추출물을 첨가하지 않은 대조구 3.93 MDA ppm 보다 솔잎 추출물을 첨가한 처리구가 1.45 MDA ppm을 나타내어 높은 지방산화억제 효과를 나타내었다(Fig. 2). 이러한 결과는 솔잎 추출물이 Fe²⁺ ion을 binding시키는 능력이 우수함을 나타내는 것이다(P<0.05). 그리고, H₂O₂는 Fe²⁺ ion과 반응하여 hydroxyl radical을 형성하면서 산화작용을 일으키는데 Fig. 1보다도 높은 TBARS값을 나타낸 것은 H₂O₂의 산화반응에 있어서 hydroxyl radical의 영향과 ferryl complex인 iron 복합체를 형성하였기 때문인 것으로 사료된다. 여기에 작용한 솔잎 추출물 첨가구 역시 강력한 억제효과를 나타내었다(P<0.05). Fig. 1에서는 H₂O₂에 대하여 저해작용이 없던 솔잎 추출물 첨가구가 Fe²⁺ ion이 존재할 때에는 강한 저해효과를 보이는 것은 역시 H₂O₂가 Fe²⁺ ion과 반응하면서 생성된 ferryl complex를 솔잎 추출물이 binding 함으로서 나타나는 결과라고 사료

된다. 이러한 결과는 김등(18)이 보고한 한약재료 추출물들의 iron binding 결과를 뒷받침하고 있다. 그러나, KO₂와 hydroxyl radical에서는 Fe²⁺ ion에 의한 산화작용이 명확히 나타나지 않았다. 이러한 결과에 대하여 KO₂와 hydroxyl radical이 Fe²⁺ ion과 반응하면서 Fe²⁺ ion을 Fe³⁺ ion으로 환원시켜 각각의 구에 Fe²⁺ ion은 존재하지 않고, Fe³⁺ ion이 존재하기 때문에 솔잎의 binding 능력이 감소한 것으로 사료된다. 예컨대, Fe²⁺ ion이 각각의 구에 존재한다면, 솔잎 추출물의 Fe²⁺ ion binding능력에 의해 KO₂와 hydroxyl radical 첨가구에서 낮은 TBARS값을 나타내었을 것으로 사료된다.

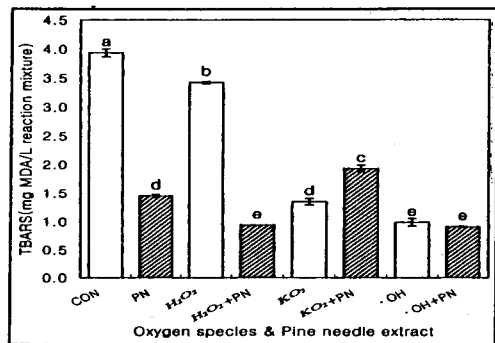


Fig. 2. Effect of pine needle extract reacted with oxygen species and ferrous iron on lipid oxidation in oil emulsion. Symbols are the same as Fig.1. a-e: Means in the same column bearing different superscripts are different(P<0.05).

지방산화에 대한 ferryl complex의 영향

Fig. 3은 ferryl complex에 관한 증명실험으로 oil emulsion 지방산화에 H₂O₂에 대해 Fe²⁺ ion을 넣은 후, oil emulsion을 넣은 것과 oil emulsion을 먼저 넣고 Fe²⁺ ion을 넣은 것의 반응정도를 TBARS값으로 나타내었다. 대조구에서는 Fe²⁺ ion과 반응할 수 있는 산소종이 존재하지 않기 때문에 전자와 후자의 경우에 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 활성산소인 H₂O₂와 반응한 경우 전자는 Fe²⁺ ion과 H₂O₂의 반응이 급속히 일어나기 때문에 Fe²⁺ ion이 모두 H₂O₂와 반응하여 낮은 TBARS값을 나타내었다. 후자는 Fe²⁺ ion과 H₂O₂의 반응보다는 H₂O₂와 Fe²⁺ ion 각각의 반응으로 Fe²⁺ ion이 H₂O₂에만 반응하는 것이 아니라, oil emulsion에도 반응하여 oil emulsion의 지방산에 있는 수소분자를 탈취할 만큼 강력한 ferryl complex를 형성하게 되어 높은 TBARS값을 나타내게 된 것으로 판단된다. 이러한 결과는 Halliwell과 Gutteridge(14)가

보고한 지방산화의 시발물질은 ferryl 물질이라는 보고를 뒷받침하고 있다. 따라서, 본 실험은 후자의 방법으로 행하였으므로 이와 같은 ferryl complex가 형성되었을 것으로 사료된다.

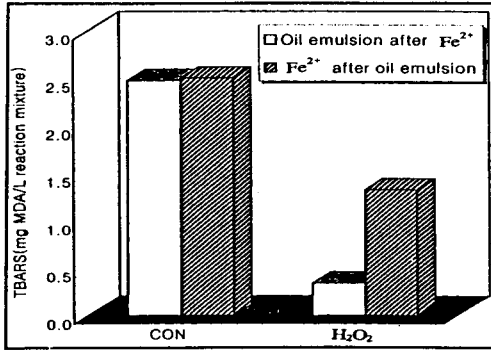


Fig. 3. Effect of hydrogen peroxide and ferrous iron on lipid oxidation in oil emulsion.

Fe³⁺이온에 대한 솔잎 추출물의 영향

Fig. 4는 Fe²⁺ ion 대신에 Fe³⁺ ion을 첨가하여 솔잎 추출물의 반응을 살펴본 결과이다. Fe³⁺ ion의 대조구가 Fig. 2의 Fe²⁺ ion 대조구보다 낮은 TBARS값을 나타내었다. 따라서, Fe³⁺ ion이 oil emulsion의 산화반응에는 작용력이 없음을 나타내며, 이에 대한 솔잎 추출물 첨가구의 경우 역시 Fe³⁺ ion에 대해서는 지방산화 억제효과가 없음을 나타내었다. 또한, 각종 산소종에 대해서도 Fe³⁺ ion이 존재할 경우에는 뚜렷한 작용이 없었으며, 솔잎 추출물 첨가구 역시 효과가 없었다. 즉, Fe³⁺ ion이 존재할 경우의 산화반응에서는 Fe²⁺ ion에서의 반응과는 달리 솔잎 추출물 첨가구가 산화반응 및 산소종들과의 반응을 억제하는 효과가 나타나지 않은 것으로 보아 Fe³⁺ ion에 대해서는 binding 효과가 없는 것으로 사료된다.

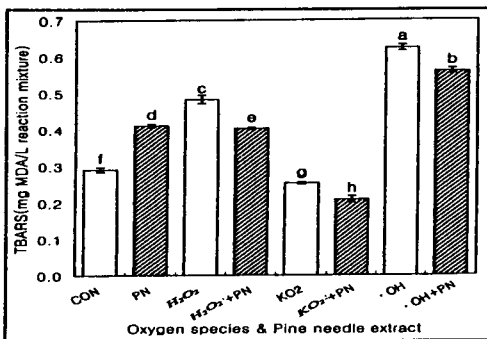


Fig. 4. Effect of pine needle extract reacted with oxygen species and ferric iron on lipid oxidation in oil emulsion. Symbols are the same as Fig.1. a-h: Means in the same column bearing different superscripts are different (P<0.05).

Fe²⁺, Fe³⁺이온 binding 능력에 대한 각종항산화제와 솔잎 추출물과의 비교

Fig. 5는 솔잎 추출물의 Fe²⁺ ion binding 능력을 천연항산화제인 sesamol, phytic acid, caffeic acid, ferulic acid, galic acid, tocopherol, tyrosine, carnosine, ascorbic acid, GSH(glutathione)과 합성항산화제인 EDTA, DTPA와 비교한 결과 iron chelating 화합물로 널리 알려진 EDTA나 DTPA 보다도 낮은 TBARS값을 나타내었다. 이것은 솔잎 추출물이 Fe²⁺ ion binding능력이 아주 우수하다는 것을 나타내는 것인데(P<0.05), 이것은 솔잎 추출물에 존재하는 강력한 항산화물질이 존재함을 시사하는 것이다. 이에 대해 부등(19)은 솔잎으로부터 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone이라는 항산화성 물질을 분리하였다고 보고 하였다.

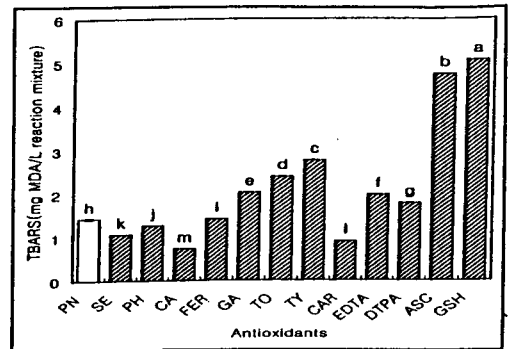


Fig. 5. Comparison of various antioxidants and pine needle extract reacted with ferrous iron on lipid oxidation in oil emulsion.

PI: pine needle, SE: sesamol, PH: Phytic acid, CA: caffeic acid, FER: ferulic acid, GA: gallic acid, TO: tocopherol, TY: tyrosine, CAR: carnosine, EDTA: ethylene diamine tetra acetic acid, DTPA: diethylene triamine penta acetic acid, ASC: ascorbic acid, GSH: glutathion. a-m: Means in the same column bearing different superscripts are different(P<0.05).

Fig. 6은 Fe²⁺ ion 대신에 Fe³⁺ ion과 반응한 솔잎 추출물의 항산화효과를 각종 항산화제와 비교한 결과이다. 솔잎 추출물은 농도에 따라 항산화작용이 바뀌는 ascorbate와 환원제로 작용하는 GSH 보다도 높은 항산화작용을 가졌으며, sesamol등의 다른 강력한 항산화제 보다는 약간 낮은 항산화력을 나타내었다 (Fig. 4). 그중에서도 carnosine이 가장 낮은 TBARS값을 나타내어 iron binding 능력이 우수하였다. 이러한 결과는 Lee 등(20)이 보고한 carnosine과 phytic acid의 항산화력 측정실험에서 carnosine도 금속이온을 착염화하여 강력한 항산화력을 나타낸다는 보고와 일치하는 것이다. 본 연구는 식품뿐만이 아니라 생체에 악영향을 미치는 산화반응 또는 radical 반응 전반에 걸쳐 반응성을 억제할 수 있는 항산화성 물질을 찾

는 것이며, 노화를 방지하는 기능이 있다고 알려진 솔잎추출물의 기능성을 평가하는 것이다. Iron source와 각종 산소종과 반응한 솔잎 추출물은 Fe²⁺ ion binding에 탁월한 효과를 나타내었다. 이러한, 솔잎추출물의 효과는 Fe²⁺ ion 의한 산화작용 및 그 밖의 iron 과다증으로 인한 질병인 hemochromatosis와 같은 철색소증 치료약 개발에 이용될 수 있는 가능성이 있으며, Fe²⁺ ion의 작용을 억제시키는 항산화제로의 개발도 앞으로 연구되어야 할 것으로 사료된다.

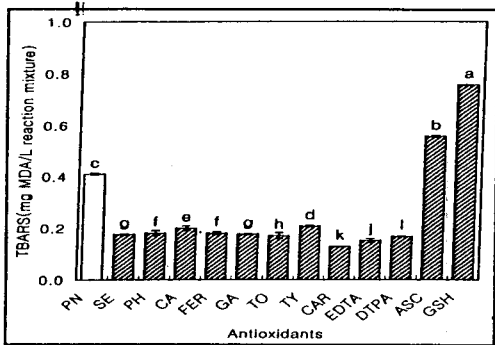


Fig. 6. Comparison of various antioxidants and pine needle extract reacted with ferric iron on lipid oxidation in oil emulsion. Symbols are the same as Fig.5. a-k: Means in the same column bearing different superscripts are different (P<0.05).

요 약

본 연구는 식품뿐만이 아니라 생체에 악영향을 미치는 산화반응 또는 radical 반응 전반에 걸쳐 반응성을 억제할 수 있는 항산화성 물질을 찾고자, 발암 및 노화를 방지하는 기능이 있다고 알려진 솔잎추출물로 각종 산소종과의 반응성을 검토한 결과 iron이 존재하지 않는 상태의 산화작용에 대해서는 솔잎 추출물의 뚜렷한 작용이 나타나지 않았으며, free radical 반응에 중요한 매개체가 되는 Fe²⁺ ion이 존재하는 산화반응에 솔잎 추출물은 강력한 binding 효과를 나타내었다. 그러나, Fe³⁺가 존재하는 산화반응에는 Fe²⁺ ion이 존재하는 산화반응에서 보다 그 반응성이 매우 낮았으며, 이에 솔잎 추출물의 작용도 효과가 나타나지 않았다. 그러나, 솔잎 추출물과 활성산소종과의 반응은 솔잎 추출물이 H₂O₂ 단독으로만 존재할 때는 산소포집능력이 없었으나, H₂O₂와 Fe²⁺이온이 공동으로 존재시 높은 항산화활성을 나타내었다. Fe²⁺ ion에 대한 binding 효과가 인정되는 솔잎 추출물의 항산화능력을 비교하기 위하여 iron chelating에 우수한 합성

항산화제인 EDTA, DTPA 보다 더욱 뛰어난 Fe²⁺ ion binding 효과를 나타내었다.

문 헌

1. 藤券正生. (1988) 食品機能, 機能性 食品創製の基盤. 學會出版セソタ-, p.344.
2. Haumann, B.F. (1990) Antioxidants; Firms seeking products they can label as 'natural'. Inform, 1, 1002.
3. Corl, M.M. (1974) Antioxidant activity of tocopherols and ascorbyl palmitate and their mode of action. JAOCS, 51, 321.
4. Farag, R.S., badei, A.Z.M.A. and Baroty, G.S.A. (1989) Influence of thyme and clove essential oils in cotten seed oil oxidation. JAOCS, 66, 800.
5. Branen, A.L. (1975) Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. JAOCS, 52, 59.
6. Farag, R.S., Ali, M.N. and Taka, H.S. (1990) Use of some essential oils as natural preservatives for butter. JAOCS, 68, 188.
7. Osawa, T. and Namiki, M. (1981) A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. Agric. Biol. Chem., 45, 735.
8. Kasuga, A., Aoyagi, Y. and Sugahara, T. (1988) Antioxidants activities of edible plants. 日本食品工業學會誌, 35, 22.
9. Larson, R.A. (1988) The antioxidants of higher plants. Phytochemistry, 27, 969.
10. 築原和毅 (1992) 食用植物中の生理的 機能成分. 食品と開發, 27, 29.
11. 강운한, 박용근, 오상룡, 문광덕 (1995) 솔잎과 쑥 추출물의 기능성 검토. 한국식품과학회지, 27(6), 978.
12. Miller, D.M., Buettner, G.R. and Aust, S.D. (1990) Transition metals as catalysts of autoxidation reactions. Free Rad. Biol. Med., 8, 95.
13. Kanner, J. and Harel, S. (1985) Initiation of lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. Arch. Biochem. Biophys., 237, 314.
14. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: an overview. Methods Enzymol., p.186.
15. Shen, X., Tian, J. and Chen, Y. (1992) Formation of the excited ferryl species following Fenton reaction. Free Rad. Biol. Med., 13, 585.

16. Ahn, D.U. and Kim, S.M. (1998) Effect of superoxide and superoxide generating systems on the prooxidant effect of iron in oil emulsion and raw turkey homogenates. *Poultry Sci.*, **77**, 1428.
17. Buege, J.A. and Aust, S.D.: Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymol*, **105**, 302 (1978)
18. 김수민, 조영석, 김은주, 배만중, 한준표, 이신호, 성삼경 (1998) 단삼, 도인, 당귀미 및 솔잎의 열수추출물이 지방산화에 미치는 영향. *한국식품영양과학회*, **27**, 399.
19. 부용출, 전채옥, 오지연 (1994) 솔잎으로부터 항산화성분인 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone의 분리. *한국농화학회지*, **37**, 310.
20. Lee, B.J., Hendricks, D.G. and Cornforth, D.P. (1998) Antioxidant effects of carnosine and phytic acid in a model beef system. *J. Food Sci.*, **63**, 394.

(1999년 1월 28일 접수)