

가시부영역의 흡수 스펙트럼 변화에 의한 L-Ascorbic Acid와 Ferritin과의 상호작용

김미옥^{1*} · 나재철¹ · 장상문²

¹대구보건대학 보건다이어트과

²대구보건대학 호텔조리음료계열

Chemical Interaction of L-Ascorbic Acid with Ferritin Molecule

Mi-Ok Kim^{1*}, Jae-Chul Na¹ and Sang-Moon Jang²

¹Dept. of Health Diet, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea

²Dept. of Hotel Cooking and Beverage, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea

Abstract

This study consisted of designing a sensitive assay to measure the rate of L-ascorbic acid (AsA)-prompted release of ferritin iron, the use of ferrozine as a chelating agent to trap released Fe(II). The initial rate of iron release was measured in the appearance of Fe(ferrozine)₃²⁺ at 562 nm. The release of iron from ferritin by AsA was dependent on time and AsA conditions under aerobic and anaerobic conditions. Effect of oxygen on the release of iron from ferritin was also confirmed. It was suggested that the release of iron from ferritin was participate not only AsA but also O₂⁻. In this study, it was found that iron can be released from ferritin and chelate as Fe(ferrozine)₃²⁺ and the release was more than 50% in the presence of AsA without O₂⁻. Based on the findings, the following can be assumed (1) AsA is diffused into ferritin (2) ferric ion is reduced to ferrous ion (3) is diffused from ferritin.

Key words: L-ascorbic acid, ferritin, Fe(II), ferrozine

서 론

L-ascorbic acid(AsA)는 식품 및 생체계에 있어서 대단히 중요한 역할을 하고 있으며, 특히 AsA대사와 철의 대사는 상호간에 상당히 밀접하게 연결되어 있다고 알려져 있지만(1,2), 상세한 것에 대해서는 아직 밝혀지지 않은 점이 많다. AsA는 생체 내에서 여러 수산화반응 등에 관여하는 경우 각종 금속이온, 특히 철(Fe) 혹은 동(Cu)이온 등의 중금속 이온과의 킬레이트 형성을 매개하여 전자를 주고 받는 경우가 많다(3,4). 그 반응기구는 AsA의 작용기작을 이해하는 데에 중요하다고 생각되지만, 상세한 것은 밝혀지고 있지 않다. 일반적으로 철은 생명을 유지하기 위하여 필수 불가결한 미량 원소의 하나로 2가 혹은 3가 이온의 상태로 되기 쉽고, 전자의 주고 받음이나 전자이동이 잘 이뤄져 많은 생체반응에 관여하고 있다(4,5). 식품 중에 포함되어 있는 철은 주로 Fe(III)로, 3가 철은 체내로의 흡수가 쉽지 않기 때문에 AsA와 같은 환원제로 Fe(II)로 환원되어 십이지장이나 공장 상부에서 흡수된다. 흡수된 철은 Fe(III)로 산화되어 apotransferrin과 결합하여 transferrin으로 된다. 이것은 철의 운송체이고 용이하게 세포질 내에 운반되어 Fe(III)을 유리한다. 계속해서

복잡한 산화환원 반응을 반복하여 재차 Fe(III)로 되어 apoferritin과 결합하여 철 저장체인 ferritin으로 된다(6). 이 ferritin으로부터 필요에 따라 방출된 철은 환원되어 Fe(II)로 되고, 이것이 porphyrin환을 갖는 단백질과 결합하여 hemoglobin으로 된다. 이와같이 철은 생체내에서 항상 단백질과 결합한 철단백질 형태로 존재하고 있다. 더욱이 ferritin은 분자량 46만의 수용성 단백질인 apoferritin 1분자가 2000개의 3가 철과 결합한 것이다. Ferritin은 철을 완전하게는 포화하고 있지 않고, 각종 환원제, 즉 dithionite(7), thiols(7,8), AsA(8,9), dihydroflavins(10), O₂⁻(11-15) 등의 움직임에 의해 철이 Fe(II)의 형태로 유리되는 것이 보고되어 있다. 지금까지 O₂⁻에 의한 ferritin으로부터 철의 유리추진에 관한 보고가 많고, AsA의 자동산화반응에 있어서 중금속 이온 존재의 유무에 관계없이 O₂⁻가 생성하는 것이 밝혀져 있다(16-18). 한편, Bienfait와 Van Den Briel(9)은 AsA의 산화에 의해 생성하는 monodehydro L-ascorbic acid(MDAsA)가 환원제로서 작용하고, ferritin으로부터 철을 환원하는 AsA의 메카니즘에 대해서 O₂⁻가 중요한 환원제로서 움직이는 것을 보고하였다. 여기서, ferritin으로부터 철을 유리하는 메카니즘과 그때 AsA의 역할을 확실하게 밝힐 필요가 있다고 사료된다.

*Corresponding author. E-mail: mokim@mail.thc.ac.kr
Phone: 82-53-320-1366, Fax: 82-53-320-1369

본 연구에서는 ferritin으로부터 철을 유리하는 메카니즘을 밝히는 것을 목적으로 하였고, 특히 AsA에 주목하여 AsA에 의한 Fe(III)로부터 Fe(II)로 환원되는 과정에서 ferritin 외부로의 Fe(II)의 유리에 대해서 조사하였다.

재료 및 방법

재료

AsA와 소 비장에서 유래한 ferritin 그리고 MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid]는 Sigma 화학(주) 특급시약을 사용하였다. Ferrozine [3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p,p'-disulfonic acid, monosodium salt hydrate, 97%]은 Aldrich 화학(주)의 제품을 사용하였다.

완충용액으로서는 0.1 M의 MOPS에 0.1 M의 NaOH를 첨가하여 pH 7.0에 조제하고, Chelex-100(100~200 mesh, 바이올렛(주)의 column(column size; 0.9×18 cm)을 통과시켜 중금속류를 제거한 것을 이용하였다(18). 한편, 혐기적 조건 하에서의 실험에서는 그 완충액을 재차 탈기하여 사용하였다. 실험에서 주로 사용한 AsA농도는 0.05 mM, ferrozine은 1 mM, ferritin은 0.6 μM의 농도를 사용하였다.

호기적 조건 하에서 AsA에 의한 ferritin으로부터 철의 유리

AsA(0.05 mM)와 ferrozine(1 mM)의 0.1 M MOPS 완충용액(pH 7.0) 중에 ferritin(0.6 μM)을 첨가하여 산소가스는 통기시키지 않고 27°C에서 일정시간 방치하고, 시간의 경과에 따른 철의 유리를 조사하였다.

혐기적 조건 하에서 ferritin으로부터 철의 유리

pH 7.0 MOPS 완충용액에 용존하는 산소를 제거하기 위하여 완충용액을 재차 탈기한 것을 이용하여 sample을 조제하고 질소가스를 200 mL/min의 유속으로 일정기간 통기하여, 호기적 조건 하에서의 경우와 동일한 실험을 행하였다.

Ferritin으로부터 유리한 철의 측정법

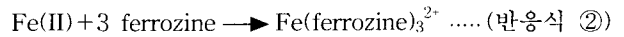
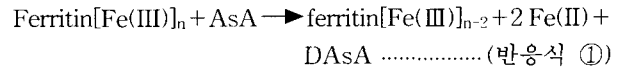
철의 유리속도는 ferrozine의 2가 철의 복합체 형성을 측정하였다. 즉, AsA가 ferritin으로부터 철을 환원하고, 유리된 Fe(II)의 킬레이트제로서 ferrozine을 사용하였고, 흡광도 562 nm에서의 Fe(ferrozine)₃²⁺을 U-3210 spectrophotometer (Hitachi)를 이용해서 측정하였다. 철의 유리속도는 문헌에 기재되어 있는 tris ferrozine complex의 분자흡광계수 27,900 cm⁻¹을 사용하여 계산하였다(5).

결과 및 고찰

호기적 조건 하에서의 ferritin으로부터 철의 유리

Ferritin(6,19)으로부터 철의 유리를 측정하기 위하여 유리된 Fe(II) chelate제로서 ferrozine(20)을 사용하여 실험을 행하였다. Ferrozine을 사용한 이유로서는 기존의 iron chelate

제 중에서 제일 높은 흡광계수를 가지기 때문이며, Fe(ferrozine)₃²⁺의 1 cm에 대한 분자흡광계수는 17,900이다. 또한, 이 ferrozine은 ferritin으로부터 철의 유리에 대하여 ferrozine 농도(0.2 mM~5.0 mM)에 의존하지 않는 점이나 낮은 유리를 측정도 가능하여 Fe(III)에 대하여 낮은 친화성을 갖는 장점 등으로 실험에 이용하였다. 이에 따른 분석방법은 다음의 반응식(①, ②)으로 나타내었다.



반응식 ①에서 보면 AsA는 전자 2개를 환원하여, 그때의 철의 유리는 흡광도 562 nm에서 Fe(ferrozine)₃²⁺의 형태로 측정된다. 철의 유리는 ferrozine의 농도(0.2 mM~5 mM)에는 의존하지 않는 것이 보고되어 있고, 또한 ferrozine은 pH 4~9시간에서는 안정한 것도 보고되어 있다(5).

반응식 ①과 반응식 ②가 일어나고 있는 사이의 흡수 스펙트럼 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 각각의 반응액을 혼합하고 나서 곧바로 가시부 영역의 흡수 스펙트럼 변화를 측정할 경우를 0분(실선표시)으로 하고 27°C에서 1시간 방치한 경우(점선표시)와 비교하였다. 흡수 스펙트럼 변화는 흡광도를 10 nm마다 측정하여 그래프로 나타내었다. 먼저, ferritin만을 측정할 경우(A)를 살펴보면, 반응시간 0분에서는 562 nm에서 흡수극대를 갖지 않고, 1시간이 경과한 후에도 그 변화가 보이지 않는 것을 알 수 있었다. 즉 그래프 상에서 실선과 점선표시가 겹쳐져 나타나 있음을 알 수 있다. 또한, ferritin에 ferrozine을 혼합하여 수시간이 지나도 스펙트럼의 변화를 보이지 않는 것(B)이나, AsA에 ferritin을 첨가한 경우(C)도 스펙트럼의 변화는 나타나지 않았다. 이 결과는 Boyer와 McCleary(5)의 결과와 일치하였다. 또한, AsA와 ferrozine의 완충용액 중에서 ferritin을 첨가한 경우(D)는 반응시간이 경과함에 따라 562 nm에 흡수극대를 갖는 것을 알 수 있었다. 이것은 Fe(ferrozine)₃²⁺의 생성이 시간에 의존한다는 것과 AsA에 의해 ferritin으로부터 철을 유리시켰다는 것을 시사하고 있다. 또한 AsA와 ferrozine을 혼합한 경우(E)는 562 nm에 흡수극대를 나타내지 않고 1시간 경과해서도 스펙트럼 변화는 나타나지 않았다. 이들 결과로 보아 562 nm에서의 흡수극대는 AsA에 의해 ferritin으로부터 유리된 철을 ferrozine이 trop한 결과로 말할 수 있겠다. Boyer와 McCleary(5)는 호기적인 상태에 있어서 AsA에 의해 ferritin으로부터 철의 유리를 보고하고 있다. 다음으로 Boyer와 McCleary(5)의 연구를 참고로 하여 호기적 및 혐기적 조건 하에서 AsA에 의한 ferritin으로부터 철의 유리를 조사하였다.

호기적 및 혐기적 조건 하에서의 AsA에 의한 영향

AsA에 의한 ferritin으로부터 철의 유리를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에 나타난 것처럼 흡수극대 562 nm에서 AsA에 의한 ferritin으로부터 철의 유리가 밝혀졌다. 반응시간 0분

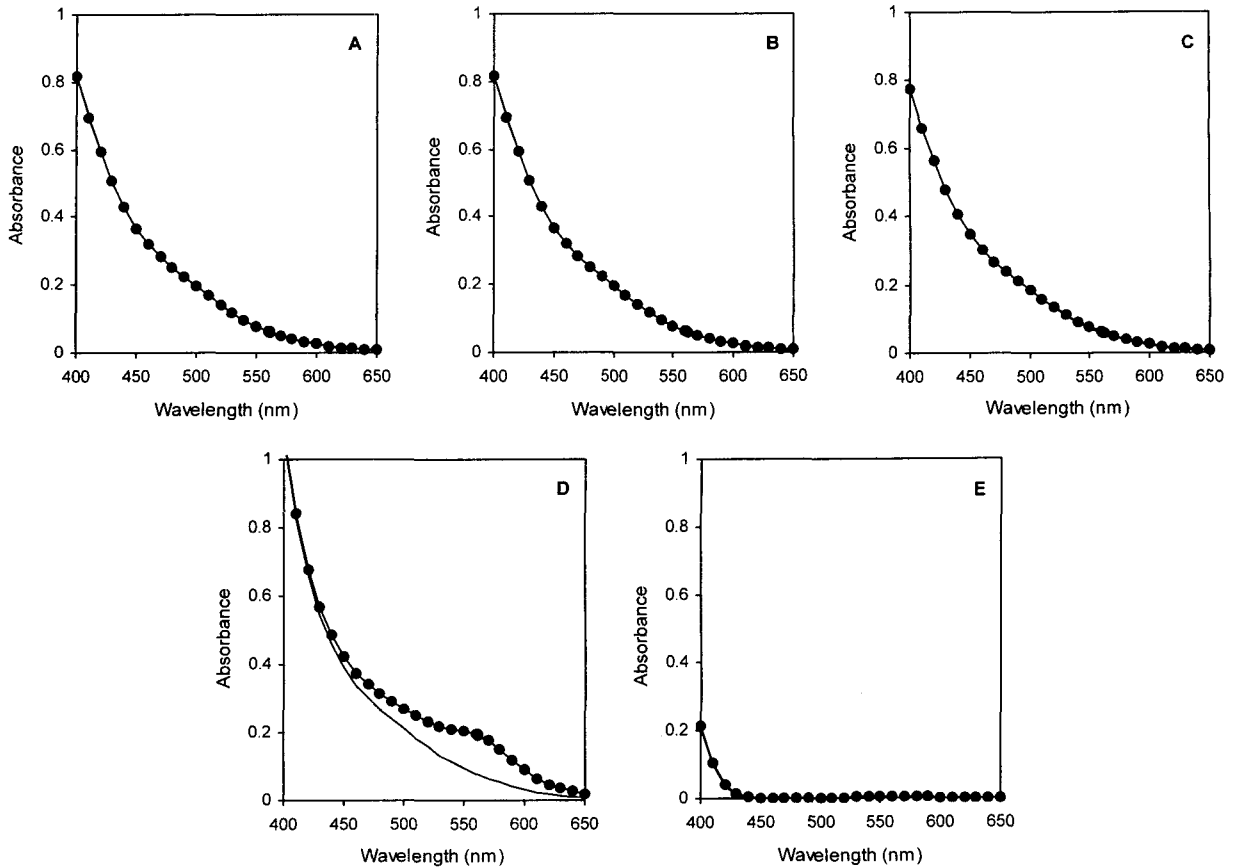


Fig. 1. Spectral changes of ferritin iron release.

A: 0.6 μ M ferritin in MOPS buffer, B: 1 mM ferrozine+0.6 μ M ferritin in MOPS buffer, C: 50 μ M AsA+0.6 μ M ferritin in MOPS buffer, D: 50 μ M AsA+1 mM ferrozine+0.6 μ M ferritin in MOPS buffer, E: 50 μ M AsA+1 mM ferrozine in MOPS buffer. Reaction time: 0 min (a solid line), 60 min (a dotted line). Reaction temperature: 27°C.

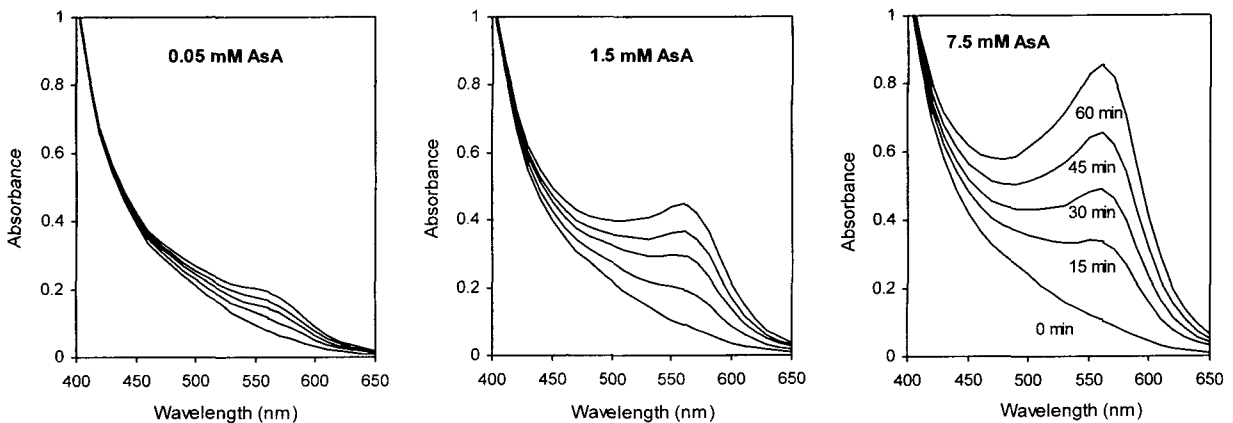


Fig. 2 Iron release from ferritin by AsA under aerobic condition.

Concentrations: 0.05 mM, 1.5 mM, 7.5 mM AsA, 1 mM ferrozine, 0.6 μ M ferritin. Reaction solution: 0.1 M MOPS buffer, pH 7.0 (treated-Chelex 100). Reaction time: 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min. Reaction temperature: 27°C.

에 있어서는 562 nm에서 흡수극대는 나타나지 않고, AsA의 완충용액에 ferrozine을 혼합하고 나서 ferritin을 첨가한 후 즉시 AsA에 의한 철의 유리는 나타나지 않았지만, 15분 정도 시간이 경과하는 것에 의해 ferritin으로부터 철의 유리가 확인되었다. 0.05 mM AsA의 경우, 반응시간 15분, 30분, 45분,

그리고 60분 시간의 경과와 함께 562 nm 흡광도는 각각 0.04, 0.07, 0.09, 그리고 0.12였다. 즉, AsA에 의한 ferritin으로부터 철의 유리는 시간에 의존하는 것을 잘 알 수 있었다. 또한, AsA의 농도를 0.05 mM, 1.5 mM 그리고 7.5 mM을 사용하여 반응시간 1시간 후에 흡수극대 562 nm에서의 흡광도가

각각 0.12, 0.37, 그리고 0.77를 나타내었으므로 ferritin으로부터 철의 유리에 대해서 AsA의 농도에도 의존하는 것을 알 수 있었다.

또한, Fig. 3에는 시간의 경과와 함께 증가하는 Fe(ferrozine)₃²⁺의 유리 속도를 나타내었다. AsA의 농도가 0.05 mM, 1.5 mM, 그리고 7.5 mM의 경우, AsA에 의한 ferritin으로부터 유리된 Fe(ferrozine)₃²⁺는 1분간 각각 0.07 μmole, 0.2 μmole, 그리고 0.5 μmole이었다. 따라서, AsA 농도의 증가에 의해, 또 시간의 경과에 의해 ferritin으로부터 철의 유리가 증가하는 것은 Boyer와 McCleary(5)의 연구결과와 유사한 경향을 나타내는 것이 확인되었다.

그리고, 혐기적 조건 하에서의 AsA에 의한 ferritin으로부터 철의 유리를 조사하기 위하여 실험에 사용한 완충용액은 전부 탈기한 것을 사용하였다. Fig. 4는 질소가스를 1분간 200 mL의 유속으로 일정시간 반응시키며 혐기적 조건 하에서 ferritin으로부터 철의 유리를 조사한 결과이다. 혐기적 조건 하에서 AsA의 농도를 0.05 mM, 1.5 mM 그리고 7.5 mM로 하였을때 1시간 반응시킨 경우 562 nm에서의 흡광도는 각각 0.08, 0.21 그리고 0.45이었다. 이 결과에서 혐기적 조건에

있어서도 AsA 농도의 증가에 의해, 또 시간의 경과에 의해 ferritin으로부터 철의 유리가 증가하는 것이 밝혀졌다. 또한, 혐기적 조건 하에서는 0.05 mM, 1.5 mM 그리고 7.5 mM 각각의 ferritin으로부터 철의 유리는 1분간에 각각 0.05 μmole, 0.13 μmole 그리고 0.2 μmole인 것이 확인되었다(Fig. 5).

Bienfait와 Van Den Briel(9)은 호기적 조건 하 pH 8에서 AsA에 의한 ferritin으로부터 철의 유리를 보고하였다. 그들은 특히, 환원에 의한 ferritin으로부터 철의 유리는 MDAsA가 관여하고, 철의 유리는 산소의 지속적인 공급이나 radical의 농도 등이 영향을 미친다고 보고하였다. 또한, 철은 dithionite, thioglycolate와 같은 환원제에서 ferritin으로부터 유리하여(21) 킬레이트제에 의해 축적되지만, 킬레이트제만으로는 ferritin으로부터 철의 유리는 상당히 늦어지던가 혹은 전혀 효과가 없다고 전해지고 있다(21,22). 더구나 AsA, cysteine 및 환원제 glutathione은 *in vivo*에서(21) 환원제로서 유효하지만, ferritin으로부터 철이 유리되었을 가능성은 낮다고 보고되어 있다. 본 연구에 있어서는 ferritin으로부터 철의 유리에 관여하는 AsA의 효과는 꽤 크다는 것이 밝혀졌다. 일반적으로 ferritin은 분자의 내경으로부터 외부에 통하는 비교적

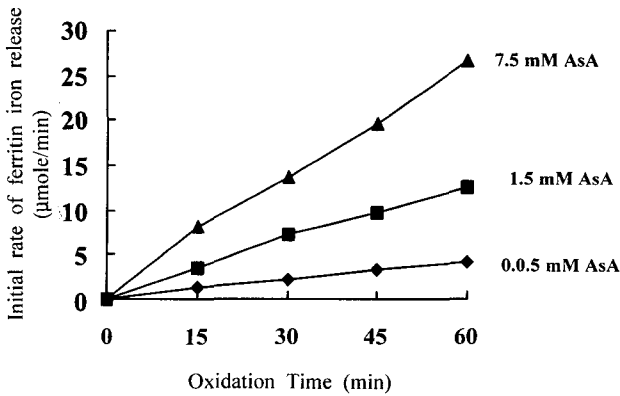


Fig. 3. Initial rate of ferritin iron release as a function of AsA concentration under aerobic condition.

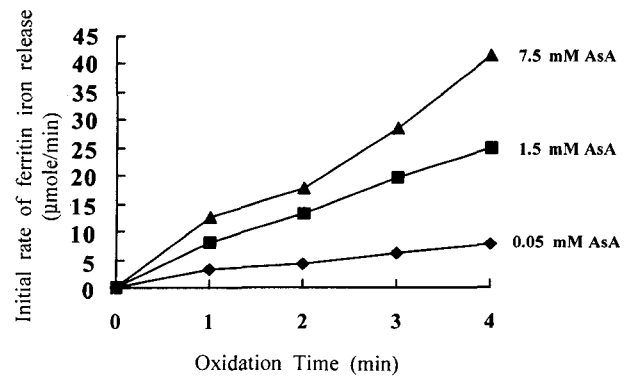


Fig. 5. Initial rate of ferritin iron release as a function of AsA concentration under anaerobic condition.

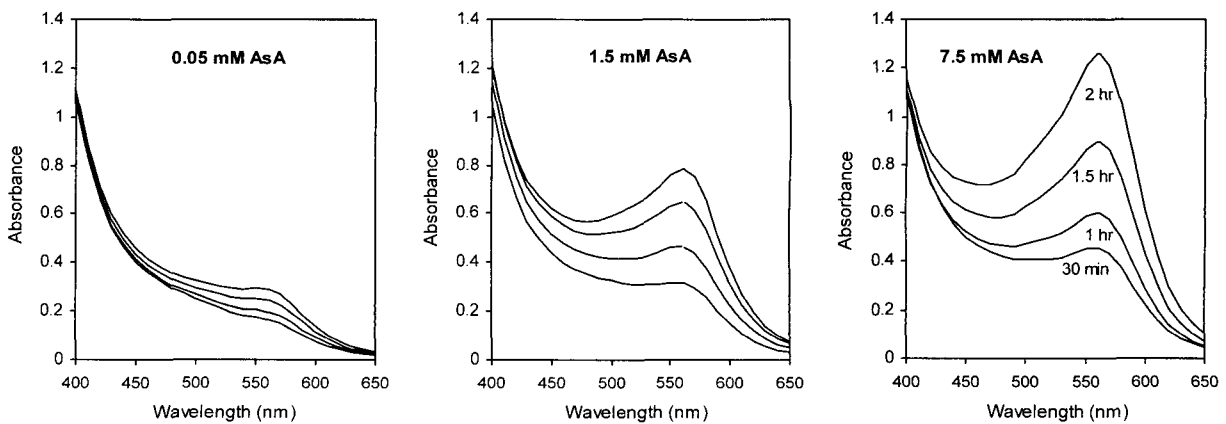


Fig. 4 Iron release from ferritin by AsA under anaerobic condition.

Concentrations: 0.05 mM, 1.5 mM, 7.5 mM AsA, 1 mM ferrozine. 0.6 μM ferritin. Reaction solution: 0.1 M MOPS buffer, pH 7.0 (treated-Chelex 100). Reaction time: 30 min, 1 hr, 1.5 hr, 2 hr. Reaction temperature: 27°C.

큰 6개의 채널을 갖고 있다고 하지만(21), 채널은 분자의 내외부에서 약 1 nm, 중간부에서 약 0.7 nm의 모래시계형을 하고 있어, 물질을 통과시킬 때마다 압착하기 쉽도록 구조되어져 있다고 알려져 있다. 이 채널은 비선택적으로 Fe(II)를 포함하여 각종 소분자를 자유롭게 통과시킨다. 여기서 본 연구 결과는 John 등(23)의 보고처럼 AsA는 ferritin의 철 중심 부분까지 들어가 Fe(III)로부터 Fe(II)로의 환원을 행하고, 생성한 Fe(II)이 ferritin의 외부로 유리하는 것을 추정할 수 있다.

Ferritin으로부터 철의 유리에 있어서 산소의 영향

혐기적 조건에서 호기적 조건으로 변하는 것에 의해 산소의 영향이 어느 정도 관여하고 있는가를 조사한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 실선으로 표시된 부분은 혐기적 조건하, 점선은 호기적 조건 하에서의 결과를 나타내고 있으며, A는 혐기적 조건 하에서만 각각 1시간 간격으로 1~4시간 사이의 시간 경과에 따른 변화를 나타내었고, B는 1시간동안 질소가스를 200 mL/min의 유속으로 혐기적 조건을 유지한 후(실선표시) 계속해서 공기 중에 방치한(점선표시) 결과 산소

의 영향을 나타내고 있다. 그 결과, 562 nm에서 흡수극대를 혐기적 조건 하에서도 호기적 조건 하에서도 나타나는 것으로 보아 산소의 영향이 있음이 확실하였고, ferritin으로부터 철의 유리가 증가하는 것이 확인되었다. 이 결과에 의해, ferritin으로부터 철을 유리하는데는 O₂⁻가 관여할 가능성이 나타났다.

AsA에 의한 반응시간 1시간 경과 후의 호기적 및 혐기적 조건 하에서 ferritin으로부터 철의 유리를 비교하여 Fig. 7에 각각 나타내었다. Fig. 7에 나타내었듯이 반응시간 1시간 후 호기적 조건 하에서도 혐기적 조건 하에서도 AsA에 의한 ferritin으로부터 철의 유리를 확인할 수 있었다. 이들 흡수 스펙트럼에서 나타나는 흡수극대인 562 nm에서의 흡광도를 Table 1에 나타내었다. 0.05 mM AsA의 경우, 호기적 조건 하에서 1시간 반응시킨 경우의 562 nm에서의 흡수극대는 0.12, 혐기적 조건 하에서는 0.08을 나타내었고, 호기적 조건 하에서의 ferritin으로부터 철의 유리를 100%로 하였을 때 혐기적 조건 하에서의 ferritin으로부터 철의 유리는 그것에 비교해서 약 66%를 나타내었다. 즉, AsA에 의한 ferritin으로부터 철의 유리는 66%에 달하는 것을 의미하고, 나머지 34%는 다른 메커니즘을 거쳐 ferritin으로부터 철을 유리했다고 생각되어진다. 또한, 1.5 mM 및 7.5 mM AsA의 경우는 각각 약 60%가 혐기적 조건 하에서 ferritin으로부터 철의 유리를 의미하고, AsA의 농도가 높아져도 0.05 mM AsA의 경우와 거의 유사하게 나머지 약 40%가 다른 메커니즘을 거쳐 ferritin으로부터 철을 유리했다고 생각되어진다.

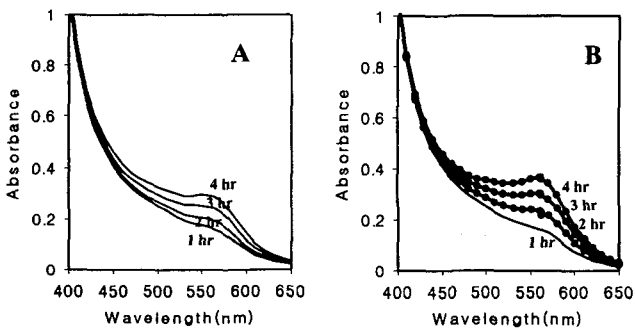


Fig. 6. Changes in the iron release from ferritin under aerobic and anaerobic conditions by AsA.
Concentrations: 0.05 mM AsA, 1 mM ferrozine, 0.6 μM ferritin. Reaction solution: 0.1 M MOPS buffer, pH 7.0 (treated-Chelex 100). Reaction time: 1 hr, 2 hr, 3 hr, 4 hr. Reaction temperature: 27°C. A: anaerobic condition (a solid line), B: aerobic condition (a dotted line).

Table 1. Iron release from ferritin by AsA under aerobic and anaerobic conditions

	Aerobic condition (A)	Anaerobic condition (B)	B/A (%)
0.05 mM AsA	0.117	0.077	66.0
1.5 mM AsA	0.350	0.211	60.3
7.5 mM AsA	0.748	0.452	60.4

λ max = 562 nm. Reaction time: 60 min.

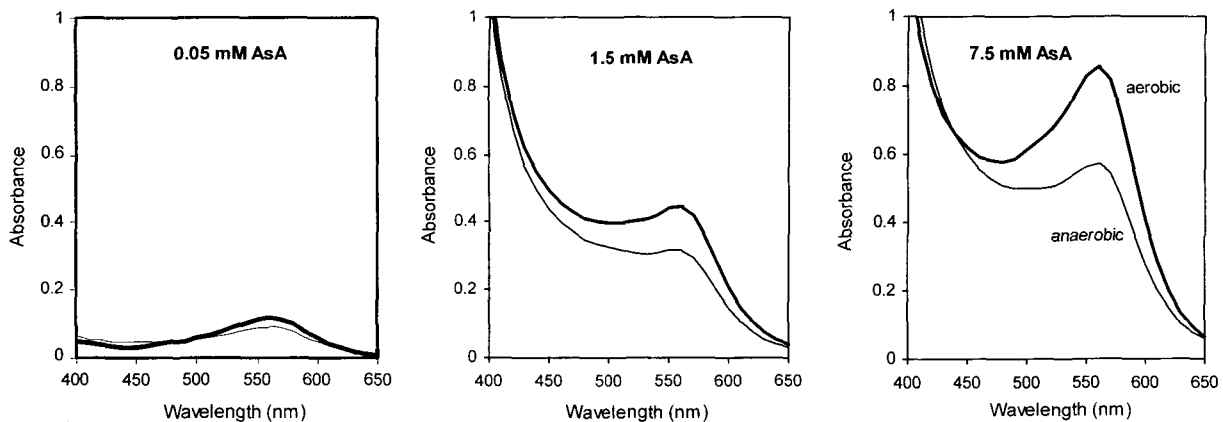


Fig. 7. Iron release from ferritin by AsA under aerobic and anaerobic conditions.
Concentrations: 0.05 mM, 1.5 mM, 7.5 mM AsA, 1 mM ferrozine, 0.6 μM ferritin. Reaction solution: 0.1 M MOPS buffer, pH 7.0 (treated-Chelex 100). Reaction time: 60 min. Reaction temperature: 27°C. Aerobic condition (thick line), anaerobic condition (thin line).

O_2^- 에 의한 ferritin으로부터 철의 유리에 관한 보고는 Bolann과 Ulvik(24)이 superoxide dismutase(SOD)를 이용해서 ferritin으로부터 철의 유리에 대해서 O_2^- 에 의존하는 메카니즘에 의해 약 70% 유리하고 그외는 O_2^- 비의존성 메카니즘에 의해 철이 유리된다고 보고하였다. 또한, Thomas 등(12)은 O_2^- 에 의한 철의 유리에 대하여 중점적으로 보고하는 한편 ferritin으로부터 철의 유리가 SOD에 의해 최고 85%까지 억제되었지만, apoSOD나 bovine serum albumin(BSA)에 의해서는 전혀 효과가 없었던 것으로 나타나 SOD에 의한 ferritin으로부터 철의 유리에 대한 억제는 특이적인 단백질의 효과 때문이라고 보고하였다. 그리고, Bienfait와 Van Den Briel(9)은 호기적 조건 하에서는 AsA의 강한 환원력에 의해 유리되지만, 혐기적 조건 하에서는 AsA의 첨가에 의한 철의 유리는 유의적이지는 않다고 보고하여, 본 실험 결과와는 일치하지 않았다. 그러나, 호기적 조건 하에서 AsA에 의한 ferritin으로부터 철의 유리에 있어서 ferritin의 내부로 AsA가 들어가, AsA에 의해 Fe(III)이 Fe(II)로 환원되어, Fe(II)을 ferritin의 외부로 유리하는 것을 보고하여 본 연구 결과와 유사한 결론으로 밝혀졌다. 더욱이 Boyer와 McCleary(5)는 이처럼 유리된 2가 철은 ferrozine이 ferritin channel을 통과하여 유리된다고 추정하였다.

지금까지 ferritin으로부터 철의 유리에 관한 연구는 다양한 의견이 많고 그 상세한 것에 대해서는 아직 밝혀지지 않은 점이 많다. AsA와 ferritin과의 상호작용에 관한 본 연구 결과로부터 ferritin으로부터 철의 유리에 관하여 호기적 조건 하에서 유리된 철의 약 50% 이상이 AsA 자신에 의해서, 또 나머지는 AsA와 산소 분자와의 반응에 의해서 생성된 O_2^- 에 의하여 이뤄지는 것으로 밝혀졌다.

요 약

생체 내에 있어서 AsA 대사와 철 대사는 상호 밀접하게 연결되어 있다고 생각하여, 본 연구에서는 철단백질의 하나인 ferritin을 이용해서 AsA와의 상호작용의 유무를 조사하였다. Ferritin으로부터 철의 유리를 측정하기 위하여 ferrozine을 사용하여 AsA에 의한 ferritin으로부터 철의 유리를 흡광도 562 nm에서 $Fe(ferrozine)_3^{2+}$ 의 형태로 측정하는 방법을 사용하였다. 호기적 및 혐기적 조건 하에서 AsA에 의한 영향을 살펴본 결과, ferritin으로부터 철의 유리에 대해서 AsA의 농도 및 시간의 증가에 의존하는 것을 알 수 있었다. 또한 ferritin으로부터 철의 유리에 있어서 산소의 영향을 살펴본 결과, 가시부영역의 흡수 스펙트럼변화의 측정 결과에 의해 호기적 및 혐기적 조건 하 모두에서 ferritin으로부터 철의 유리를 확인하여 산소의 영향이 나타났고, 혐기적 조건 하에서 보다 호기적 조건 하에서의 ferritin으로부터 철의 유리가 증가하는 것이 확인되었다. 즉, ferritin으로부터 철을 유리하는데 O_2^- 가 관여할 가능성이 나타났다. 그러나, 본 연

구 결과에서 반응시간 1시간 후의 호기적 및 혐기적 조건 하에서 562 nm에서의 흡광도를 살펴본 결과 호기적 조건 하에서 유리된 철의 50% 이상이 AsA 자신에 의해, 나머지는 AsA와 산소분자와의 반응에 의해 생긴 O_2^- 에 의한다고 생각되어졌다. 지금까지 ferritin으로부터 철의 유리는 O_2^- 에 의한 것이라는 보고가 많았지만, 이 결과에 의해 ferritin으로부터 철의 유리에 O_2^- 가 관여하지만, 그것과 같은 정도 혹은 그 이상 AsA가 중요하다는 것이 밝혀졌다.

문 헌

1. Bielski B. H. 1982. *Ascorbic acid: Chemistry, metabolism, and uses*. Seib PA, Tolbert BM, eds. American Chemical Society, Washington. p 81-100.
2. Harel S. 1994. Oxidation of ascorbic acid and metal ions as affected by NaCl. *J Agric Food Chem* 42: 2402-2406.
3. Martell AE. 1982. *Ascorbic acid: Chemistry, metabolism, and uses*. Seib PA, Tolbert BM, eds. American Chemical Society, Washington. p 153-178.
4. Buettner GR. 1986. Ascorbate autoxidation in the presence of iron and copper chelates. *Free Rad Res Comms* 1: 349-353.
5. Boyer RF, McCleary CJ. 1987. Superoxide ion as a primary reductant in ascorbate-mediated ferritin iron release. *J Free Rad Biol Med* 3: 389-395.
6. Crichton RR. 1973. Structure and function of ferritin. *Angew Chem Internat Edit* 12: 57-65.
7. Funk F, Lenders J, Crichton RR, Schneider W. 1985. Reductive mobilization of ferritin iron. *Eur J Biochem* 152: 167-172.
8. Mazur A, Baez S, Shorr E. 1955. The mechanism of iron release from ferritin as related to its biological properties. *J Biol Chem* 213: 147-160.
9. Bienfait HF, Van Den Briel ML. 1980. Rapid mobilization of ferritin iron by ascorbate in the presence of oxygen. *Biochemical et Biophysica Acta* 631: 507-510.
10. Jones T, Spencer R, Walsh C. 1978. Mechanism and kinetics of iron release from ferritin by dihydroflavin analogues. *Biochemistry* 17: 4011-4017.
11. Biemond P, van Eijk Hg, Swaak AJG, Koster JF. 1984. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 73: 1576-1579.
12. Thomas CE, Morehouse LA, Aust SD. 1985. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 260: 3275-3280.
13. Saito M, Thomas CE, Aust SD. 1985. Paraquat and ferritin-dependent lipid peroxidation. *J Free Rad Biol Med* 1: 179-185.
14. Thomas CE, Aust SD. 1986. Release of iron from ferritin by cardiotoxic anthracycline antibiotics. *Arch Biochem Biophys* 248: 684-689.
15. Biemond P, Swaak AJG, Beindorff CM, Koster JF. 1986. Superoxide-dependent and -independent mechanism of iron mobilization from ferritin by xanthine oxidase. *Biochem J* 239: 169-173.
16. Scarpa M, Stevanato R, Viglino P, Rigo A. 1983. Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecular oxygen. *J Biol Chem* 258: 6695-6697.
17. Miyake N, Kim M, Kurata T. 1997. Formation mechanism of monodehydro-L-ascorbic acid and superoxide anion in

- the autoxidation of L-ascorbic acid. *Biosci Biotech Biochem* 61: 1693-1695.
18. Kim M. 2001. Formation of superoxide anion in the autoxidation of L-ascorbic acid in the presence of heavy metal ions. *Korean J Food Sci Technol* 33: 378-383.
 19. Harrison PM. 1986. The structure and function of ferritin. *Biochemical Education* 14: 154-162.
 20. Stookey LL. 1970. Ferrozine-A new spectrophotometric reagent for iron. *Anal Chem* 42: 779-781.
 21. Sirivech S, Frieden E, Osaki S. 1974. The release of iron from horse spleen ferritin by reduced flavins. *Biochem J* 143: 311-315.
 22. Harrison PM, Hoy TG, Macara IG, Hoare RJ. 1974. Ferritin iron uptake and release. *Biochem J* 143: 445-451.
 23. John T, Spencer R, Walsh C. 1978. Mechanism and kinetics of iron release from ferritin by dihydroflavin analogues. *American Chemical Society* 17: 4011-4017.
 24. Bolann BJ, Ulvik RJ. 1987. Release of iron from ferritin by xanthin oxidase role of the superoxide radical. *Biochem J* 243: 55-59.

(2003년 10월 31일 접수; 2004년 2월 10일 채택)