KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 19, No. 6 (1987)

Linoleic acid의 酸化에 의한 活性酸素種의 生成

姜珍壎·廉東敏·崔守安*·金善奉·朴榮浩

釜山水産大學 食品工學科, *釜山敎育大學 科學敎育科

Formation of Active Oxygens by Linoleic Acid Peroxidation

Jin-Hoon Kang, Dong-Min Yeum, Su-An Choi*, Seon-Bong Kim and Yeung-Ho Park

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan
**Department of Natural Science Education, Pusan Teacher's College, Pusan*

Abstract

The formation of superoxide anion ($\cdot O_2^-$)and hydrogen peroxide (H_2O_2) during linoleic acid peroxidation were investigated in linoleic acid-aqueous system at 37°C. Superoxide anion was rapidly generated in the early stage of peroxidation, marked to 0.375 (absorbance at 560*nm*) in the 12mM linoleic acid (POV below 80 millieq./*kg*) incubated for 1 day and then decreased with time-elapsed. Hydrogen peroxide was also rapidly generated in the early stage of peroxidation regardless of linoleic acid concentration. And, superoxide dismutase (SOD) and catalase greatly inhibited the formation of superoxide anion and hydrogen peroxide, respectively.

서 론

지질이 산화하게 되면 과산화물을 비롯하여 저분자의 지방족카르보닐화합물 뿐만 아니라 각종의 활성 radical화합물이 생성되는데, 이들 활성radical화합물은 生體內에서도 생성되어 단백질, DNA 등 生體成分에 대하여 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있어 많은 연구자들에 의하여 관심의 대상이 되어 오고 있다. 이들 활성화합물의 생성이나 지질산화에 대한 반응기구는 반응계에 따라서 각각 다른 것으로 나타나 있는데 활성화합물중 그 수명이 극히 짧은 것으로 알려져 있는 일중항산소는 基底狀態의 산소가 光增感劑의 작용을 받아 빛에너지에 의하여 활성화됨으로써 생성되는데[1], 불포화지질에 대한 일중항산소의 반응은 allyl 수소기를 가지는 olefin에 대한 "ene"반응형부가[2]와 환상부가반응[3]이 있다고 한다. 또한 Kellog와 Fridovich[4]는 xanthine oxidase系에 있어서의 지질산화반응에는 일중항산소와 水酸radical이 개시인자로 작용한다고 보고하였으며, 水酸radical과 과산화수소, 그리고 양자간의 반응생성물은 지질산화의 개시반응에 관여하지 않는다고 한다.[5]

이 밖에, 活性酸素種의 생성과 그 반응 기구에 대하여서 宮川[6]와 Svingen등[7]등의 보고가 있으나 그 결과가 연구자들에 따라 반드시 일치하지 않고 있다.

前報[8]에서 著者등은 linoleic acid의 산화에 의한 DNA의 손상에는 活性酸素種이 크게 관여한다는 것을 밝혔다.

따라서, 본 연구에서는 linoleic acid의 산화중의 活性酸素種의 생성정도를 정량적으로 검토하기 위하여 linoleic acid를 37℃에서 저장시켜서 superoxide anion ($\cdot O_2^-$)과 과산화수소(H_2O_2)의 생성을 경시적으로 조사하고 이들의 생성에 대한 superoxide dismutase (SOD)와 catalase의 영향을 아울러 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 superoxide dismutase(SOD)는 Toyobo Chem. Co.(日本)에서, catalase는 Sigma Chem. Co.(美國)에서, titanium sulfate는 Junsei Chem. Co.(日本)에서 각각 구입하여 사용하였다.

Superoxide anion($\cdot O_2^-$)의 측정

Superoxide anion의 생성은 Ponti등 [9]의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 반응액 10μl를 취하여 SOD (100$\mu g/ml$ potassium phosphate buffer, pH 7.8) 20μl를 첨가한 후 2mM nitroblue tetrazolium, 100*mM* EDTA와 0.6%의 tritonX-100을 함유하는 potassium phosphate buffer(pH 7.5) 2.5*ml*를 가하여 혼화하고 560*nm* 에서 흡광도(Shimadzu double spectrophotometer)를 측정하였다.

과산화수소(H_2O_2)의 정량

과산화수소의 정량은 Hozumi[10]의 방법에 따라 행하였다.

즉, 반응액 5μl를 취하여 dimethylsulfoxide 0.5ml, 물 1.5ml와 50mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) 2ml와 함께 혼화하였다. 9,000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액 1.6ml를 취하여 0.4ml의 catalase (1mg/ml sodium phosphate buffer, pH 7.2)를 가하고 10分동안 항온조에서 반응시켰다. 반응이 끝난 용액 0.5ml를 취하여 1% titanium sulfate 용액 2ml를 가하고 410nm 에서 흡광도를 측정하였다. 대조실험으로서 1% titamium sulfate 대신 0.25N H_2SO_4 2ml와 catalase 대신에 물 2ml를 취하였다. 한편, 과산화수소의 정량은 市販하는 과산화수소(35%, Shinyo Chem. Co.)를 2, 4, 6, 8 및 10mM의 농도로 조제하고 上記와 동일한 방법으로 실험하여 얻은 검량선으로 부터 구하였다.

Linoleic acid의 저장

Linoleic acid를 0.1×SSC buffer(15mM NaCl과 1.5mM Sodium citrate를 함유하는 Standard sodium citrate buffer, pH 7.2)에 대하여 2, 6, 10 및 12mM의 농도로 조제하고 각각 37°C의 항온조내에서 저장시켰다.

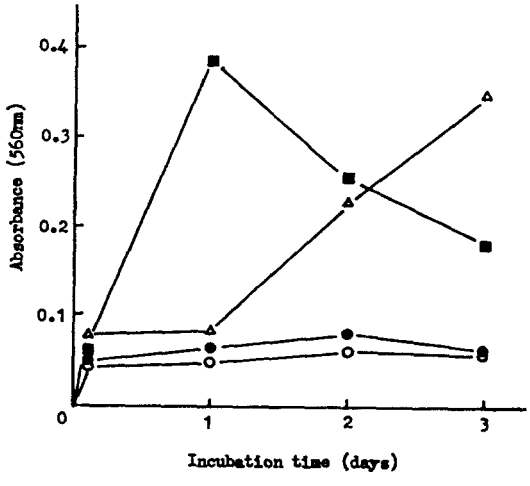

Fig. 1. Formation of superoxide anion ($.O_2^-$) during the peroxidation of linoleic acid at 37°C
Two millimoles (O---O), 6mM (●---●), 10mM(△---△) or 12mM(▲---▲) of linoleic acid was maintained at 37°C.
Forty microliters of each concentraction of linoleic acid was incubated at 37°C, and then 10μl of aliquot was used for superoxide anion analyses.

결과 및 고찰

活性酸素種의 생성

Fig. 1은 linoleic acid를 2, 6, 10 및 12mM의 농도로 37°C에서 저장시키고 superoxide anion의 생성을 측정한 결과이다.

전반적으로 linoleic acid의 농도가 증가함에 따라 superoxide anion의 생성량이 많았는데 12mM의 경우 저장1일째 최고치인 0.375에 달하였다가 이후 급속하게 감소하였으며 10mM의 농도에서는 저장1일 이후 superoxide anion의 생성량이 급격하게 증가하여 저장4일째는 0.35를 나타내었다.

한편, Fig. 1과 동일한 방법으로 과산화수소의 생성을 측정하였는데 그 결과는 Fig. 2와 같다. Superoxide anion의 경우와 마찬가지로 linoleic acid의 농도가 증가함에 따라 과산화수소의 생성속도가 빨랐으나 전반적으로 저장초기에 급격히 생성하였다가 저장2일째에 최고치에 달한 이후 빠르게 감소하였다. 즉 12mM의 경우는 저장1일, 그외의 농도에서는 저장2일째에 최고치에 달하여 superoxide anion의 생성양식과는 다소 다른 것으로 나타났다. 이와같이 과산화수소의 초기생성이 superoxide anion보다 빠른 것으로 보아 과산화수소가 지질산화나 DNA손상에 미치는 영향은 반응초기에 나타날 것으로 생각된다.

Table 1은 linoleic acid 산화중의 과산화수소의 생성을 정량적으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

Linoleic acid가 12mM의 경우 과산화수소생성량이

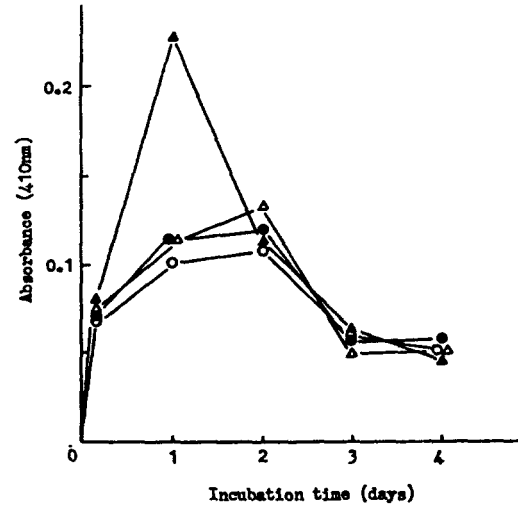

Fig. 2. Formation of hydrogen peroxide (H_2O_2) during the peroxidation of linoleic acid at 37°C
Experimental conditions are the same as in Fig. 1.

Table 1. Formation of hydrogen peroxide (H_2O_2) during linoleic acid peroxidation at 37°C

(mM)

Concentrations of linoleic acid		Incubation time				
		2 hrs	1 day	2 days	3 days	4 days
Linoleic acid	2mM	1.00	1.40	1.60	0.80	0.67
	6mM	0.95	1.60	1.73	0.80	0.73
	10mM	1.00	1.60	1.87	0.67	0.67
	12mM	1.07	3.13	1.67	0.83	0.60

Forty microliters of each concentration of linoleic acid was incubated at 37°C, and then 10μl of aliquot was used for the hydrogen peroxide analyses.

저장1일째에 3.13mM로 최고이었으며 저장4일째에는 0.6mM로 약 80%나 감소하여 과산화수소의 생성속도와 함께 그 분해도 빠르게 진행되는 것을 알 수 있다.

이러한 지질산화중의 **活性酸素種**의 생성에 대하여 Kellog와 Fridovich[4]는 과산화수소, 일중항산소 등이 지질의 산화반응에 관여하였으나 水酸radical은 그다지 영향을 미치지 않았다고 보고하였는데 superoxide anion과 과산화수소는 식(1)과 같은 반응으로 일중항 산소를 생성하는 것으로 알려져 있다.

$$\cdot O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH^- + \cdot OH + {}^1O_2 \cdots\cdots (1)$$

이상의 결과로 미루어 보아 과산화수소의 생성이 superoxide anion의 생성보다 빠르게 진행됨과 동시에 superoxide anion이 4일동안 계속 증가 또는 일정한 량으로 유지되는데 반하여 과산화수소는 그 최고치에 달한 이후 급속하게 감소함으로써 분해도 빠르게 진행되는 것을 알 수 있는데 이같은 결과는 前報[8]에서 나타난 과산화수소의 DNA손상작용이 약하다는 사실과 견주어 보면 과산화수소가 지질의 산화나 DNA손상작용에 대하여 반응초기에 관여하는 것으로 추정할 수 있다.

活性酸素種의 생성에 대한 superoxide dismutase (SOD)와 catalase의 영향

각종의 산화환원반응에 의하여 생성되는 活性酸素種은 **生體內**에서도 생성되는 것으로 알려져 있는데 superoxide anion과 과산화수소는 生體內에 이미 존재하는 SOD와 catalase에 의하여 不均一化하여 소거 또는 그 활성이 봉쇄된다고 한다.[11]

그래서 superoxide anion과 과산화수소의 생성에 대한 SOD와 catalase의 영향을 조사하였는데 그 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같다. 즉, linoleic acid의 농도를 2, 6, 10 및 12mM로 조절한 용액에 SOD 1μg을 혼합시키고 경시적으로 superoxide anion의 생성을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 1의 결과와는 달리 생성한 superoxide anion이 SOD의 첨가로 크게 소거되었는데 linoleic acid의 농도가 12mM인 경우 반응1일에 최고치가 0.045로 SOD를 첨가하지 않은 대조구의 0.375에 비하여 약 12%에 불과하였다. 이러한 SOD의 superoxide anion의 소거작용은 생성된 superoxide anion을 식(2)와 같이 과산화수소와 O_2로 不均一化시키며 여기서 생성된 과산화수소는 다시 catalase에 의하여 분해되는 형태의 반응경로를 통하여 이루어진다고[13] 생각된다.

$$\cdot O_2^- + \cdot O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \quad (2)$$

또한, Fridovich[14]는 superoxide anion은 分子狀酸素의 생물학적인 환원에 의하여 보편적으로 생성되고

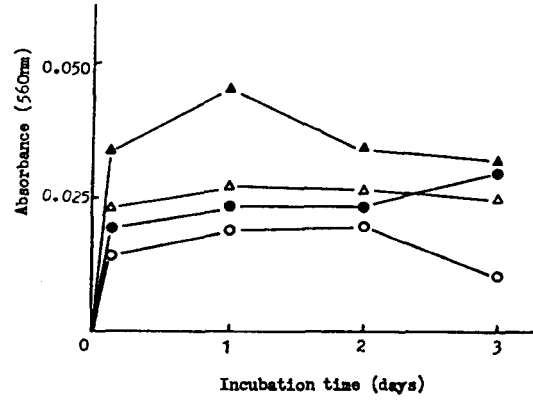

Fig. 3. Effects of superoxide dismutase (SOD) on the formation of superoxide anion($.O_2^-$) during linoleic acid peroxidation at 37°C

Forty microliters of each concentration of linoleic acid was incubated at 37°C, and then 10μl of aliquot was used for superoxide anion analyses

Two millimoles (○---○), 6mM (●---●), 10mM(△---△) or 12mM (▲———▲) of linoleic acid was incubated with SOD (1μg) at 37°C

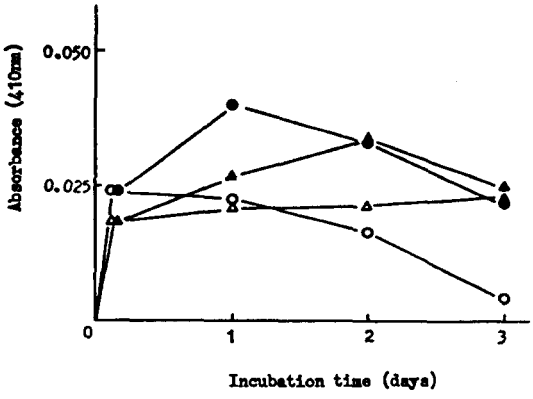

Fig. 4. Effects of catalase on the formation of hydrogen peroxide (H_2O_2) during linoleic acid peroxidation at 37°C
Experimental conditions are the same as in Fig. 3. except that catalase concentration is 40 μg

이의 세포독성에 대하여 SOD가 일차적인 방어작용을 한다고 보고하였다.

Fig. 4는 과산화수소의 생성에 대한 catalase의 영향을 나타낸 것인데 SOD와 마찬가지로 catalase의 첨가로 H_2O_2가 상당히 소거되는 것을 알 수 있다.

이러한 catalase의 과산화수소소거작용에 대하여 美濃[11]는 catalase가 2전자환원상태인 과산화수소를 물과 分子狀酸素를 생성(식3)한다고 보고하였다.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2 \quad (3)$$

요 약

Linoleic acid의 산화에 의한 DNA의 손상작용기구를 구명하기 위하여 linoleic acid를 37℃에 저장시키고 superoxide anion($\cdot O_2^-$)과 과산화수소(H_2O_2)의 경시적인 생성을 측정함과 아울러 이들의 생성에 대한 superoxide dismutase(SOD) 와 catalase의 영향을 조사하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

Superoxide anion의 생성량은 linoleic acid의 농도가 많아질수록 급격하게 증가하였는데 12mM의 경우 저장1일째 최고치인 0.375에 달하였다가 이후 급격하게 감소하였으며 10mM의 경우에서는 저장1일이후 급격하게 증가하여 저장4일째 0.35에 달하였다. 과산화수소의 생성도 superoxide anion의 경우와 비슷한 경향을 나타내었으나 全농도에 걸쳐 저장초기에 급격하게 생성되여 12mM의 경우는 저장1일째, 그외의 농도에서는 저장2일째 최고치에 달하였다가 이후 감소하는 경향을 나타내어 superoxide anion의 생성양식과는 다소 다른 것을 알 수 있었다. 한편, superoxide anion과 과산화수소의 생성에 대한 SOD와 catalase의 소거작용을 살펴본 결과 이들 효소의 소거능이 아주 강한 것으로 나타났는데 superoxide anion의 경우 linoleic acid의 농도가 12mM일 때 그 최고치가 반응1일에 0.045로 SOD無添加의 대조구의 0.375에 비하여 약 12%에 불과하였다.

문 헌

1. 宮川高明 : New Food Industry, **26**(10), 49~64(1984)
2. Gollnick, K. and H.J. Kuhn; *Murry eds.*, p. 287, Academic press, New York(1979)
3. Terao, J. and S. Matsushita; *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 587-593(1981)
4. Kellog, E.W. and I. Fridovich; *J. Biol. Chem.*, **250**(22), 8812-8817(1975)
5. Tien, M., B.A. Svingen and S.D. Aust; *Federation Proceeding*, **40**(2), 179-182(1981)
6. 宮川高明 : New Food Industry, **26**(10), 76~88(1984)
7. Svingen, B.A., F.O. O'neal and S.D. Aust; *Photochem. Photobiol.*, **28**, 803-809(1978)
8. 金善奉·姜珍壎, 李鬥雨·金仁洙·朴榮浩 : 한국식품과학회지, **19**, 311(1987)
9. Ponti, V., M.U. Dianzani, K. Cheeseman and T.F. Slater; *Chem. Biol. Interaction*, **23**, 281-291(1978)
10. Hozumi, M.; *Gann*, **28**, 733-741(1969)
11. 美濃眞 : 老化, pp. 27~52, 化學同人, 東京(1985)
12. McCord, J.M. and I. Fridovich; *J. Biol. Chem.*, **244**, 6056(1969)
13. Fridovich, I.: *Photochem. Photobiol.*, **28**, 733-741(1978)

(1987년 3월 16일접수)