Korean J. Food & Nutr. Vol. 17. No. 3, 294~301 (2004)

THE KOREAN JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION
한국식품영양학회

비타민 C 산화반응에 대한 단백질의 공존효과

†김 미 옥 · 장 상 문*

대구보건대학 보건다이어트과, *대구보건대학 호텔조리음료계열

Effects of Various Proteins on the Autoxidation of L-Ascorbic Acid

† Mi-Ok Kim and Sang-Moon Jang*

Department of Health Diet, Daegu Health College

**Department of Hotel Cooking and Beverage, Daegu Health College*

Abstract

Effects of superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), and such other proteins as bovine serum albumin(BSA), ovalbumin, lysozyme, and γ-globulin on the autoxidation rates of L-ascorbic acid(AsA) in the absence of heavy metal ions and in the presence of Fe(Ⅲ) or Cu(Ⅱ) ions in water were examined. AsA was dissolved in a ultra-refined water at a concentration of 50 μM and 5 μM Fe(Ⅲ) or 0.1 μM Cu(Ⅱ) were added, and a oxygen gas was bubbled through the solution at a flow rate of 200 ml/min at 35℃. The amount of remaining AsA in the reaction mixture was determined by using a UV spectrophotometer(at 265 nm). It was found that the Cu(Ⅱ) at a concentration of 0.1 μM had a more accelerated for the autoxidation of AsA than Fe(Ⅲ) at 5 μM. Moreover, it was confirmed that the ratio of remaining AsA was significantly larger in the presence of SOD, CAT, BSA, ovalbumin, lysozyme, and γ-globulin than in the absence of proteins. The stabilization of AsA by various proteins were confirmed during the autoxidation of AsA in the presence of Fe(Ⅲ) or Cu(Ⅱ) in water. It was suggested that the non-enzymatic effects of SOD, CAT and some other proteins might be involves in the stabilization of AsA.

Key words: L-ascorbic acid, autoxidation, protein, heavy metal ions.

서 론

비타민 C, 즉 아스코르빈산(L-ascorbic acid, AsA)은 항괴혈성인자로서 인간에게 있어서는 필수 미량원소이며, 식품 및 생체계에 존재하는 주요한 수용성 항산화물질로 잘 알려져 있다. 현재 우리나라에 있어서 비타민 C의 하루 필요권장량은 남녀 구별없이 영아의 경우 35 mg, 1~3세까지는 40 mg, 4~6세까지는 50 mg, 7~9세까지의 아동은 60 mg, 10세 이후부터는 70 mg이다. 이것은 다른 비타민과 비교해서 상당히 많은 양이며, 이 수용성 비타민의 (생)화학적, 생리학적 특성을 반영하는 것으로 대단히 중요한 관심분야라 할 수 있다.

AsA의 산화반응 속도에 영향을 미치는 요인으로서는 산소농도[1], 중금속 이온[2,3], 공존물질(아미노산)[4], 당질[5], 환원제[6] 등에 대하여 보고되어 있다. 중금속 이온과 관련해서는 AsA의 자동산화 반응에 있어서 철(Fe)이나 동(Cu) 등이 존재하지 않는 경우에는 비교적

† Corresponding author : Mi-Ok Kim, Dept. of Health Diet, Daegu Health College, San 7, Taejeon-Dong, Daegu, 702-722, Korea.

Tel : 82-53-320-1366, Fax : 82-53-320-1366, E-mail : mokim@mail.dhc.ac.kr

반응하기 어렵지만, 존재하는 경우에는 그들의 촉매반응에 의해 쉽게 반응하는 것이 잘 알려져 있다[7]. AsA는 보통 생체 내에서는 음이온의 상태로 존재하고 있고, 생체 내에서 산화되는 경우, 처음의 과정에서 전자 1개가 빠져나간 산화중간체인 monodehydro-L-ascorbic acid(MDAsA)가 생성된다. MDAsA는 부대전자를 가진 유리기이기 때문에 대단히 반응성이 커서, 생체내에 존재하는 각종 활성산소를 불활성하는 작용을 갖고 있다[8,9]. 이처럼 예전부터 AsA의 산화적 분해경로는 MDAsA를 경유해서 disproportionation 반응에 의해 DAsA(dehydro-L-ascorbic acid)의 생성을 거쳐 분해해 가는 경로가 잘 알려져 있지만, 아직 밝혀지지 않은 점이 많다. 최근에 중금속 이온 비존재 하에서의 AsA 자동산화 반응경로로 지금껏 잘 알려진 반응경로 이외에 AsA의 산소 부가물을 경유해서 C(2)-C(3) 개열반응 생성물이 생성되는 반응경로가 존재하는 것이 보고되어 있다[10,11]. 또한, 중금속 이온 존재 하에서의 AsA 자동산화반응의 경우는 AsA와 금속이온 그리고 산소분자가 반응중간체를 만들어 각각 환원제, 촉매제, 그리고 산화제로 작용하여 반응이 진행한다고 보고[9]되어 있지만 불분명한 점이 많다.

한편, AsA 산화반응의 억제와 관련하여 중금속 이온 비존재 하에서의 AsA 자동산화반응에 있어서 superoxide dismutase(SOD) 및 catalase(CAT)의 존재에 따른 AsA 산화반응에 대한 안정성 효과가 강하게 나타나는 것을 이미 보고한 바 있다[12]. 이처럼, AsA와 단백질과의 직접적인 상호작용에 의한 AsA의 안정화와 관련된 연구와 함께 AsA의 자동산화반응 경로에 있어서 $O_2^{\cdot-}$나 H_2O_2 등의 활성산소종 생성이 지적되고 있다[13,14]. 특히, $O_2^{\cdot-}$에 의해서 AsA의 산화가 진행하는 것으로 보아 이 $O_2^{\cdot-}$를 소거하는 SOD의 존재 하에서는 AsA의 산화가 억제되는 것이 보고되어 있다[10].

본 연구에서는 AsA의 산화반응을 촉진하는 인자로서 중금속 이온, 특히, Fe(Ⅲ)이온 및 Cu(Ⅱ)이온을 이용하여 수용액 중에서 AsA 산화반응을 일으켜 단백질의 존재 여부에 따른 산화반응 정도를 비교·검토하였다. 또한, 산화반응을 충분히 진행시키기 위해서 산소가스 통기 하에서 AsA의 자동산화 반응을 일으키고, 효소 단백질로서 SOD와 CAT, 그리고 비효소 단백질로서 bovine serum albumin(BSA), ovalbumin, lysozyme, γ-globulin을 사용하여 AsA 자동산화 반응에 미치는 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

AsA은 和光純藥(株)製의 특급시약을 사용하고, SOD 및 CAT는 각각 和光純藥(株)製 시약의 소 적혈구유래 Cu, Zn-SOD(생화학용), 소 간장 유래 CAT(생화학용)를 사용하였다. BSA(생화학용)은 Sigma化學(株)製, 卵製 albumin(ovalbumin), 난백 유래의 lysozyme(생화학용), 그리고 사람 혈청 유래의 γ-globulin은 각각 和光純藥(株)製를 사용하였다. 물은 미량의 불순물을 모두 제거하기 위하여 탁상형 超純水장치 Pulic-Z(올레간(株))에서 정제한 물(ultra refined water 저항율 : 18 MΩ·㎝)을 사용하였다.

2. AsA 자동산화반응

AsA 용액의 농도는 50 μM로 하고, 주로 사용된 Fe(Ⅲ)이온의 농도는 5 μM, Cu(Ⅱ)이온의 농도는 0.1 μM로 하였다. 반응액의 미량 불순물을 완전히 제거하기 위하여 반응액에 미리 정제수를 통해 산소가스를 200 mℓ/min의 유속으로 통기하면서, 일정시간 산화반응을 행하였다[13]. 반응 후, 반응액을 2배로 희석해서 265 nm에서 흡광도를 측정해서 AsA 잔존량을 구하였다.

AsA 자동산화 반응에 있어서 SOD와 CAT의 공존효과에 관한 실험은 Scarpa 등[10]에 의해 보고된 것에 따라 (2×10^{-6}) M SOD 혹은 (2×10^{-7}) M CAT를 첨가시켜 중금속 이온 비존재, Fe(Ⅲ)이온 및 Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서 각각 실험하였다. 또한, 활성산소 소거효소의 하나인 CAT를 가지고 AsA 산화반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 CAT를 90℃에서 5분간 가열한 것을 불활성 CAT로 사용하여 그 농도는 (2×10^{-7}) M로 하였다. 그리고, 다른 단백질에 대한 효과에 대해서는 (5×10^{-7}) M 농도의 BSA, ovalbumin, lysozyme, 그리고 33 mg/mℓ의 γ-globulin을 첨가하여 AsA 자동산화 반응에 미치는 영향에 대해서 조사하였다.

그리고, AsA 산화반응에 대한 H_2O_2 영향을 조사하기 위하여 중금속 이온 비존재, 5 μM Fe(Ⅲ)이온 및 0.1 μM Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서 AsA 수용액에 AsA과 같은 농도인 50 μM H_2O_2를 첨가하여 35℃에서 산소가스를 통기시키지 않고 5분, 10분, 15분간 산화반응을 일으켰다. 또한, 대조군으로서 H_2O_2를 첨가하지 않고 동일한 조건에서 AsA 산화반응을 행하고 AsA 잔존율을 구하였다.

3. 수용액 중의 AsA 잔존율 정량 및 산출방법

AsA 수용액 중에서 시간의 경과에 따라 산화반응을 일으킨 후, 각 용액의 흡수극대 265 nm에서의 흡광도를 double beam 분광광도계 UV-180(島律 제작소)를 가

지고 각각 측정하여 잔존하는 AsA량을 정량하였다. 산출방법은 AsA 용액을 가지고 반응시간 0분의 AsA 농도를 100%로 하고, 각 반응시간에서의 AsA 농도를 %로 나타낸 것을 AsA 잔존율로 하였다. 각치의 유의차 검증은 Student의 t 검증에 의해 구하고, 위험율 $p<0.05$ 수준 이하를 유의하다고 판정하였다.

결과 및 고찰

1. AsA 자동산화 반응

AsA 수용액 중에서 중금속이온 비존재 그리고 5 μM Fe(Ⅲ) 이온과 0.1 μM Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서의 AsA 산화 반응 정도를 비교한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. AsA 산화 분해 반응에 대한 단백질의 영향을 알아보기 위한 본 연구에서 주로 사용되어진 중금속이온 농도는 Fe(Ⅲ)이온이 5 μM, Cu(Ⅱ)이온이 0.1 μM로 상당히 미량의 농도인데 이들 중금속 이온 농도는 지금까지 연구에 사용되어진 농도와는 다르다. 1940년대에는 Weissberger 등[15,16]이 (2×10^{-5}) M의 Cu 이온을 가지고, 1950년대 후반에는 Scaife 등[17]이 약 0.2 M~2 M 정도의 고농도 Cu 이온을 가지고, 1960년대 후반에 Khan 등[1]은 (2×10^{-5}) M~(12×10^{-5}) M 농도의 중금속 이온을 가지고 AsA의 산화반응의 촉매작용을 실험하였다. 또한, 1980년도 후반에는 Buettner[18,19]는 (6×10^{-4}) M과 (1×10^{-5}) M, 1990년대 초기에는 Burkitt과 Gilbert[20]는 (1×10^{-4}) M로 연구하여 본 연구에서 사용한 농도보다 약 10배 이상 높은 것을 가지고 실험하였다. 이처럼, 주로 사용되어지고 있는 중금속이온의 농도는 50 μM AsA에 대해서 약 10~50배 정도 낮은 농

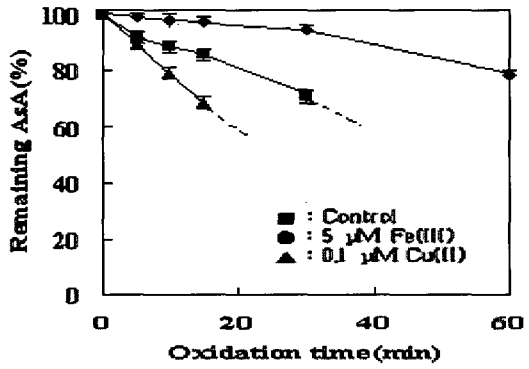

Fig. 1. Effect of heavy metal ions on the autoxidation of AsA in water.

Data represent Mean±SD(n=5) and are expressed as ratio, with the initial amounts of AsA regarded as 100%. AsA concentration : 50 μM, Reaction solution : ultra refined water(resistivity = 18 MΩ · cm), Reaction temperature : 25℃.

도인 5 μM Fe(Ⅲ) 이온과 0.1 μM Cu(Ⅱ) 이온을 가지고 AsA의 자동산화를 일으켰다. Fig. 1과 같이 수용액 중에서는 중금속이온의 존재 하에서 AsA 산화반응이 촉진되는 것과 반응시간 15분에 있어서 5 μM Fe(Ⅲ) 이온의 농도의 약 50배 정도 낮은 농도인 0.1 μM Cu(Ⅱ) 이온 쪽이 5 μM Fe(Ⅲ)이온보다 낮은 잔존율을 나타내고, 수용액 중에서는 Fe(Ⅲ)이온보다도 Cu(Ⅱ)이온 쪽이 AsA 산화촉매 능력이 큰 것을 알 수 있었다. 이 결과는 Fe이온 및 Cu 이온존재 하에서의 AsA 자동산화 반응에 있어서, 금속이온의 종류 및 농도의 증가, 그리고 용매의 종류에 따라 AsA의 산화반응 과정이 다르다는 보고와 일치하는 것을 알 수 있었다[3].

2. SOD 및 CAT의 존재 효과

AsA 수용액 중에 5 μM 농도의 Fe(Ⅲ)이온 및 0.1 μM 농도의 Cu(Ⅱ)이온을 첨가하여 산화반응을 촉진시킨 후, 단백질 공존 효과를 조사하기 위하여 먼저, 효소 단백질로서 SOD 및 CAT를 이용하여 AsA 산화반응 정도를 비교 · 검토하였다. 본 연구에 사용된 SOD[10]는 $O_2^{\cdot-}$의 불균화 반응(disproportionation)을 촉매하는 효소로 SOD를 미리 첨가해 두고, 무첨가의 경우와 비교해서 반응이 현저하게 저해, 또는 완전히 억제되면 그 반응계에서의 $O_2^{\cdot-}$ 생성을 확인할 수 있는 특성을 이용하였다. 또한, CAT는 $O_2^{\cdot-}$의 불균화 반응에 의해 H_2O_2와 O_2가 생성되고, 생성된 H_2O_2에 의해 반응성이 높은 ·OH 생성 등 다른 반응을 유발할 가능성을 배제하기 위해 사용하였다.

먼저, 중금속 이온이 존재하지 않는 상태 하에서 AsA 산화반응에 미치는 SOD 및 CAT의 영향을 Fig. 2에 나타내었다. 반응시간 30분에서 SOD 및 CAT의 공존이 SOD 또는 CAT가 전혀 존재하지 않는 경우와 비교해서 수용액 중에서는 약 $p<0.001$ 수준 이하의 위험율로 유의하게 AsA는 안정화한 것이 밝혀졌다. 이 결과는 중금속 이온 비존재 하에서의 AsA의 자동산화반응에 있어서 수용액 중에서 SOD 또는 CAT가 공존하는 경우는 AsA 산화가 현저하게 억제되는 것으로 밝혀졌다.

Fe(Ⅲ)이온이 존재하는 경우, AsA 산화반응에 있어서 SOD 및 CAT가 존재하지 않는 경우(none)는 AsA 잔존율이 약 32%인데 반해서 SOD가 존재하는 경우에는 약 85%, CAT가 존재하는 경우에는 약 91%, 그리고 SOD 및 CAT가 모두 존재하는 경우에는 약 95%를 나타내었다. 이처럼 이들 효소단백질의 존재에 따라 AsA 잔존율이 증가하여 이들 효소 단백질이 존재하지 않는 경우에 비하여 약 $p<0.001$ 수준 이하의 위험율

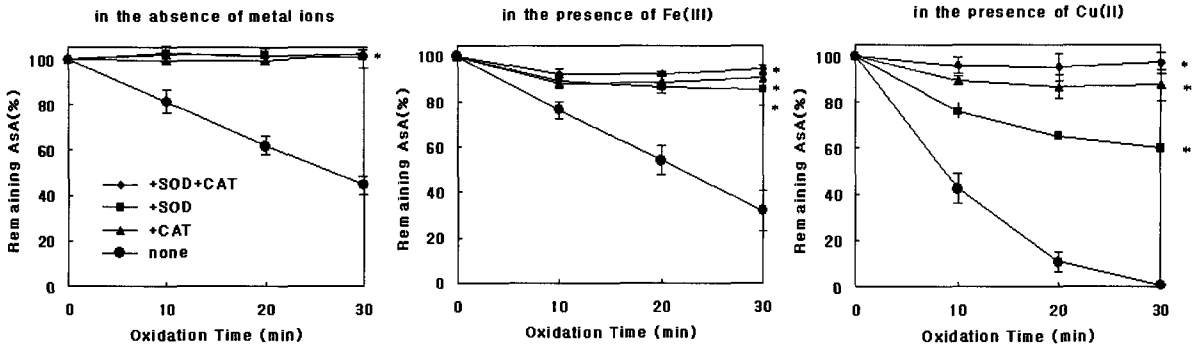

Fig. 2. Effect of SOD or CAT on the autoxidation rate of AsA.

Data represent Mean±SD(n=4) and are expressed as ratio, with the initial amounts AsA regraded as 100%. Concentrations; AsA: 50 μM, Fe(Ⅲ): 5 μM, Cu(Ⅱ): 0.1 μM, SOD: (1×10^{-6}) M, CAT: (2×10^{-7}) M, Reaction solution: ultra refined water(resistivity = 18 MΩ · cm), Reaction temperature: 35℃. * $p<0.001$ significantly different from control (without protein).

로 유의하게 AsA 산화반응에 대한 안정화 작용이 나타났음을 알 수 있다.

그리고, Cu(Ⅱ)이온이 존재하는 상태에서 수용액 중에서 AsA 산화반응에 미치는 SOD 및 CAT의 영향에 대한 결과는 Fe(Ⅲ)이온 존재 하에서와 마찬가지로 반응시간 30분에 있어서 SOD, CAT, 그리고 SOD 및 CAT의 공존에 의해 존재하지 않는 경우에 비해 약 $p<0.001$ 수준 이하의 위험율로 AsA의 산화반응이 억제되고 있음을 알 수 있다. 더욱이, 반응시간 30분에 있어서 수용액 중에서의 AsA 잔존율을 살펴보면, Fe 이온이 존재하는 경우(약 32%) 보다 Cu 이온이 존재하는 경우(약 $p<0.01$ 수준 이하) AsA의 산화속도가 더욱 촉진되는 것을 확인할 수 있었고, 이는 예전 보고[6]와 동일한 경향을 나타내는 것을 알 수 있었다.

이처럼 수용액 중, Fe(Ⅲ)이온 및 Cu(Ⅱ) 이온 존재하는 경우, AsA의 산화분해 반응에 있어서 SOD 및 CAT의 공존에 의해 AsA의 산화분해 반응이 억제되는 것을 알 수 있었다. 특히, SOD 및 CAT가 모두 존재하는 경우, AsA의 안정성에 미치는 영향이 상당히 큰 것을 알 수 있는데, 그 이유로서는 SOD가 AsA의 산화반응에서 생긴 $O_2^{\cdot-}$를 제거하고, CAT가 $O_2^{\cdot-}$의 불균화 반응에 의해서 생기는 H_2O_2를 제거하는 것 등을 생각할 수 있다.

3. CAT의 효소적 특성 검증 실험

AsA의 안정성에 영향을 미치는 SOD 또는 CAT의 영향은 상당히 크지만, 그 이유로서는 SOD가 AsA 산화반응에 의해 생성하는 $O_2^{\cdot-}$를 제거하고, CAT가 $O_2^{\cdot-}$의 불균화 반응 등에서 생기는 H_2O_2를 제거하는 것 등으로 생각된다. 여기서 더욱이 SOD 및 CAT에 의한 산화억제 효과가 이들 효소단백질에 특이적으로 작용하는지의 여부를 조사하기로 하였다.

먼저, CAT를 가지고 중금속 이온 존재 하에서의 AsA 산화반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 CAT를 90℃에서 5분간 가열한 것을 불활성 CAT로 하고, CAT와 불활성 CAT에 의한 AsA 산화반응에 미치는 효과를 비교 · 검토하였다. AsA 산화반응 시간 30분에 있어서 중금속 이온 비존재, Fe(Ⅲ)이온 및 Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서의 결과를 Fig. 3에 각각 나타내었다. AsA 수용액 중에서 중금속 이온 존재 및 비존재 어느 경우에서도 CAT 및 불활성 CAT의 공존이 각각 $p<0.001$ 수준 이하의 위험율로 AsA의 잔존율이 유의하게 높은 것을 확인할 수 있었다. 이처럼 AsA 산화반응에 있어서 CAT 존재 및 불활성 CAT 존재 모두에서 AsA의 안정화작용이 보여져 중금속 이온 비존재 하에서 뿐만 아니라 Fe(Ⅲ)이온 및 Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서도 AsA 산화반응에 대한 CAT의 비특이적인 억제효과가 나타나는 것을 알 수 있었다. 또한, SOD에 의한 AsA 산화억제 효과에 대해서는 완충용액 중에서 SOD에 의한 AsA 안정화에는 특이적인 효소작용이 나타나고 있음을 보고한 바 있다[12].

4. H_2O_2의 영향

AsA의 산화분해에 미치는 H_2O_2 영향을 살펴보기 위하여 50 μM AsA 수용액에 50 μM H_2O_2를 첨가하여 산소가스는 통기하지 않고 산화반응을 행한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 중금속 이온 촉매 하에서는 H_2O_2와 Fenton 반응계에 의해 반응성이 높은 · OH가 생성되기 때문에 AsA의 산화 반응은 상당히 촉진되는 것이 알려져 있다[9]. 중금속 이온 비존재, Fe(Ⅲ)이온 및 Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서의 AsA 산화분해에 미치는 H_2O_2 영향을 각각 조사한 결과, 중금속 이온 비존재 하

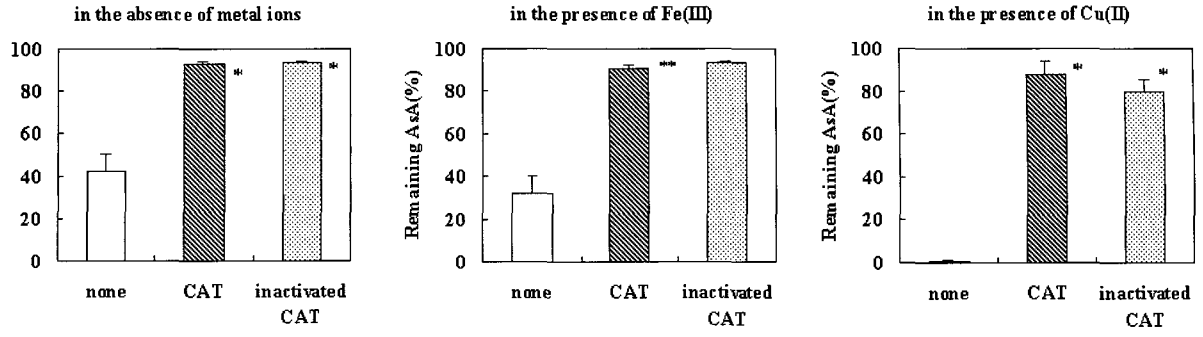

Fig. 3. Effect of CAT on the autoxidation rate of AsA.

Data represent Mean±SD(n=4) and are expressed as ratio, with the initial amounts AsA regraded as 100%. The reaction was carried out for 30 min. Concentrations; AsA: 50 μM, Fe(Ⅲ): 5 μM, Cu(Ⅱ): 0.1 μM, CAT and inactivated CAT: (2×10^{-7}) M, Reaction solution: ultra refined water(resistivity = 18 MΩ · cm), Reaction temperature: 35℃. * $p<0.001$ significantly different from control (without protein).

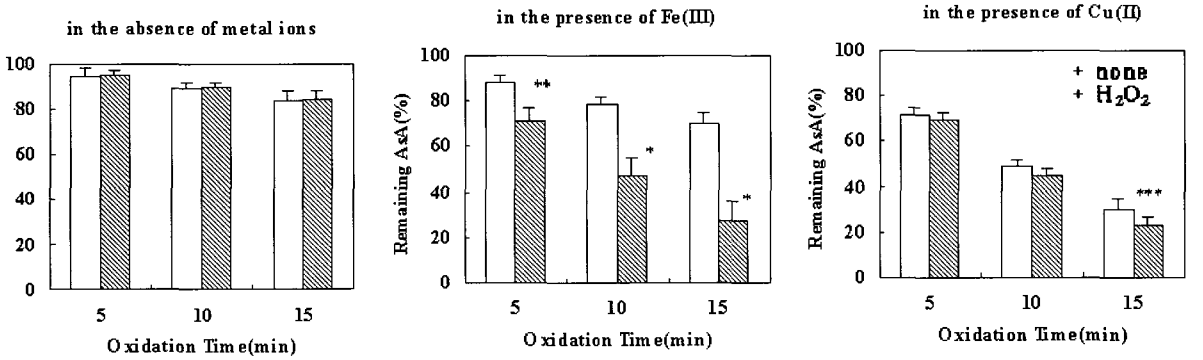

Fig. 4. Effect of H_2O_2 on the degradation of AsA.

Data represent Mean±SD(n=4) and are expressed as ratio, with the initial amounts of AsA regarded as 100%. Concentrations; AsA: 50 μM, Fe(Ⅲ): 5 μM, Cu(Ⅱ): 0.1 μM, H_2O_2: 50 μM, Reaction solution: ultra refined water(resistivity = 18 MΩ · cm), Reaction temperature: 35℃. *$p<0.001$, **$p<0.01$, ***$p<0.05$ significantly different from control.

에서는 AsA와 H_2O_2와의 반응성이 상당히 낮은 것을 알 수 있다. 이 반응계에서 최대한 AsA와 같은 농도인 50 μM H_2O_2가 발생한 경우를 가정해도 H_2O_2를 첨가하지 않은 경우와 비교해서 볼 때 AsA와 H_2O_2와의 반응은 거의 무시 할 수 있다고 추정된다.

또한, 5 μM Fe(Ⅲ)이온 존재 하에서는 H_2O_2는 반응시간 5분, 10분, 그리고 15분에 각각 $p<0.01$, $p<0.001$, 그리고 $p<0.001$ 수준 이하의 위험율로 유의하게 AsA 산화가 촉진되는 것을 알 수 있었다. 한편, 0.1 μM Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서는 H_2O_2 존재의 유무에 따라 반응시간 5분과 10분에서 유의차는 나타나지 않았고, 반응시간 15분에서 약 $p<0.05$ 수준 이하의 위험율로 유의하게 AsA 산화가 촉진되는 것으로 나타났다.

이와 같이 본 실험에서 Fe(Ⅲ)이온 존재 하에서는 SOD 혹은 CAT가 존재하지 않는 경우의 AsA 분해 속도에 H_2O_2의 영향은 상당히 크게 관여하고, Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서는 H_2O_2존재의 유무에 관계없이 AsA 분해속도는 상당히 크고 이들 반응은 CAT 존재에 의해 현저하게 억제되는 것을 밝혔다. 이처럼, Fe(Ⅲ)이온 및 Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서 AsA 산화반응에 대한 CAT의 영향은 금속의 종류에 따라 그 효과가 다르고, 불활성 CAT 존재 하에서도 AsA 안정화 작용이 나타난 것으로 보아 중금속 이온 존재 하에서의 AsA 산화반응에 대한 CAT 비특이적인 억제효과가 생각되어졌다.

5. AsA 산화반응에 대한 기타 단백질의 공존효과

AsA 산화반응에 있어서 단백질의 공존효과를 살펴보기 위하여 비효소단백질로서 BSA, ovalbumin, γ-globulin, 그리고 lysozyme을 이용하여 중금속이온 비존재 및 존재 하에서 AsA 산화반응에 미치는 영향을 조사하였다. 우선, 중금속이온 비존재 하에 있어서 이들 비효단백질 존재에 따라 AsA 산화반응이 억제되는

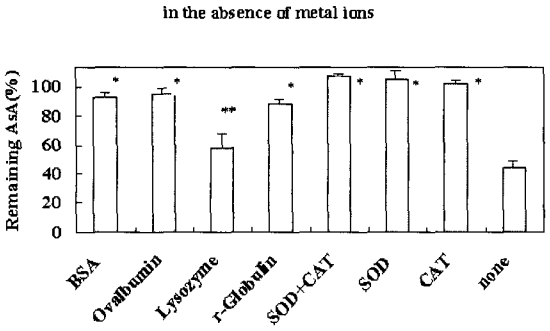

Fig. 5. Effect of the various proteins on the autoxidation rate of AsA in the absence of heavy metal ions.

Data represent Mean±SD(n=4) and are expressed as ratio, with the initial amounts AsA regraded as 100%. The reaction was carried out for 30 min.

* $p<0.001$ significantly different from control (without protein).

것이 밝혀졌다(Fig. 5). BSA, ovalbumin, γ-globulin은 $p<0.001$ 수준 이하의 위험률로, lysozyme은 $p<0.05$ 수준 이하의 위험률로 AsA 잔존율이 유의하게 높은 것으로 나타났다.

수용액 중에서 반응시간 30분에서의 Fe(Ⅲ)이온 존재 하에서의 AsA 잔존율을 살펴보면(Fig. 6), 단백질이 존재하지 않는 경우의 AsA 잔존율은 약 32%를 나타내었다. 반면에 수용액 중에서 CAT, SOD, CAT와 SOD, BSA, ovalbumin, γ-globulin, 그리고 lysozyme가 존재하는 경우는 AsA 잔존율이 각각 91%, 85%, 95%, 76%, 57%, 92%, 그리고 86%를 나타내어 각각 $p<0.001$ 수준 이하의 위험율로 단백질 비존재하의 경우와 비교해서 유의적으로 AsA 잔존율이 높은 것으로

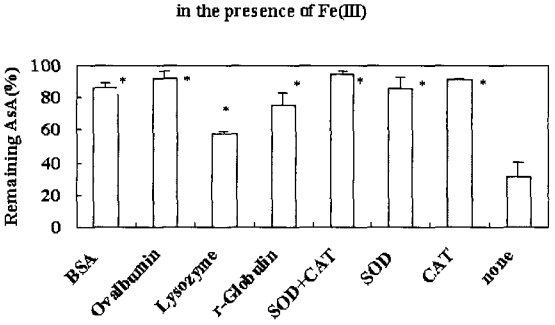

Fig. 6. Effect of the various proteins on the autoxidation rate of AsA in the presence of Fe (Ⅲ).

Data represent Mean±SD(n=4) and are expressed as ratio, with the initial amounts AsA regraded as 100%. The reaction was carried out for 30 min.

* $p<0.001$ significantly different from control (without protein).

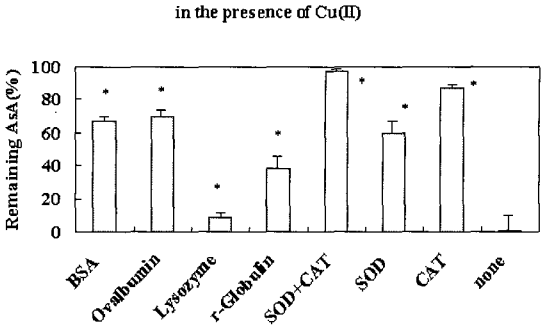

Fig. 7. Effect of the various proteins on the autoxidation rate of AsA in the presence of Cu(Ⅱ).

Data represent Mean±SD(n=4) and are expressed as ratio, with the initial amounts AsA regraded as 100%. The reaction was carried out for 30 min.

* $p<0.001$ significantly different from control (without protein).

나타났다.

또한, Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서의 경우는(Fig. 7) 단백질이 존재하지 않는 경우의 수용액 중에서의 AsA 잔존율이 약 $p<0.01$ 수준 이하로 나타나, Cu(Ⅱ)이온이 존재하는 경우가 Fe(Ⅲ)이온이 존재하는 경우의 AsA 산화반응보다 AsA 산화촉진 능력이 더욱 큰 것을 알 수 있었다. 또한, 수용액 중에서 BSA, ovalbumin, γ-globulin, 그리고 lysozyme가 각각 $p<0.001$ 수준 이하의 위험율로 AsA 산화율이 유의하게 높게 나타나, AsA에 대한 안정화 작용이 밝혀졌다. 이러한 결과는 중금속 이온 비 존재 하에서의 경우와 유사한 경향을 나타내어, Fe(Ⅲ)이온 존재 하에서도 Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서도 비존재 하에서의 경우와 마찬가지로 수용액 중에서 AsA의 산화반응에 대한 강한 안정화 작용이 나타났다.

요 약

AsA 수용액 중에서 중금속이온 비존재, Fe(Ⅲ)이온 존재, 그리고 Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서의 AsA 자동산화 반응에 대한 단백질 공존 효과에 대하여 살펴보았다. 수용액 중에서의 AsA 산화반응은 중금속 이온이 존재하지 않는 경우보다 Fe(Ⅲ)이온 및 Cu(Ⅱ)이온이 존재하는 경우에 AsA 잔존율이 낮은 것으로 나타났다. 또한 5 μM Fe(Ⅲ)이온 보다 약 50배 낮은 농도인 0.1 μM Cu(Ⅱ)이온이 존재하는 경우가 AsA 산화반응 정도가 더욱 큰 것을 알 수 있었다. 이러한 AsA 자동산화 반응에 대해 효소 단백질로서는 SOD 및 CAT, 비효소 단백질로서는 BSA, ovalbumin, γ-globulin, lysozyme를 이용하여 AsA 산화반응에 미치는 영향을 조사하였다.

AsA 수용액에 CAT 및 SOD가 존재하는 경우는 Fe(Ⅲ)이온 및 Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서도 존재하지 않는 경우와 마찬가지로 AsA 산화반응이 억제되는 것을 알 수 있었다. 이는 SOD가 AsA의 산화반응에서 생긴 $O_2^{\cdot-}$를 제거하고, CAT가 $O_2^{\cdot-}$의 불균화반응에 의해서 생기는 H_2O_2를 제거하는 것 등을 생각할 수 있다. 더욱이, AsA 산화반응에 있어서의 CAT 혹은 실활 CAT의 존재 하에서도 AsA의 안정화작용이 나타나 Fe(Ⅲ)이온 및 Cu(Ⅱ)이온 존재 하에서도 AsA의 산화반응에 대한 CAT의 비특이적인 억제효과를 확인할 수 있었다. 또한, AsA의 산화분해에 미치는 H_2O_2 영향을 살펴보기 위하여 50 μM AsA 수용액에 50 μM H_2O_2를 첨가하여 산소가스는 통기하지 않고 산화반응을 행한 결과, H_2O_2 존재의 유무에 관계없이 AsA 분해속도는 크고 이들 반응은 CAT 존재에 의해 현저하게 억제되는 것을 밝혔다. 그리고, 비효소 단백질로서 BSA, ovalbumin, γ-globulin, lysozyme를 이용하여 AsA 산화반응을 살펴본 결과 이들 단백질의 공존과 더불어 AsA의 산화율이 낮아지는 경향을 나타내어 AsA에 대한 비특이적인 꽤 강한 안정화작용이 관여하고 있을 것으로 시사되었다. 본 연구는 식품 · 생체계에 있어서 AsA의 항산화기전, 특히 중금속이온이 존재하는 경우에 있어서 항산화반응 기전을 해명하기 위한 일부분으로서 AsA 대사와 단백질 대사와의 반응에 도움을 주는 중요한 기초자료를 얻을 수가 있었다.

참고문헌

1. Khan, MMT and Martell, AE. Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. I. Cupric and ferric ion catalyzed oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 89:4176-4185. 1967
2. Buettner, GR. Ascorbate autoxidation in the presence of iron and copper chelates. *Free Rad. Res. Comms.* 1:349-353, 1986
3. Kim, M. Effects of Fe(Ⅲ) and Cu(Ⅱ) ions on the autoxidation of L-ascorbic acid. *J. Food Sci. Nutr.* 6:83-86. 2001
4. Fleming, JE and Bensch, KG. Effect of amino acids, peptides and related compounds on the autoxidation of ascorbic acid. *Int. J. Peptide Protein Res.* 22:355-36. 1983
5. Kalus, WH and Filby, WG. Stopped flow ESR study of the action of carbohydrates on ascorbic acid oxidation in aqueous solution. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 55:85-89. 1985
6. Levine, M and Morita, K. Ascorbic acid endocrine systems. *Vitamins and Hormones* 42:1-64, 1985
7. Miller, DM, Buettner, GR and Aust, SD. Transition metals as catalysts of ::Autoxidation:: reactions. *Free Radical Biol. Med.* 8:95-108. 1990
8. Bielski, BH. Chemistry of ascorbic acid radicals. In: Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses., pp.81-100. ACS Advances in Chemistry Series No. 200, eds. Seib, PA and Tolbert, BM. American Chemical Society, Washington. DC. 1982
9. Martell, AE. Chelates of Ascorbic acid: Formation and catalytic properties. In: Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses., pp.153-178. ACS Advances in Chemistry Series No. 200, eds. Seib, PA and Tolbert, BM. American Chemical Society, Washington. DC. 1982
10. Scarpa, M, Stevanato, R, Viglino, P and Rigo, A. Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecular oxygen. *J. Biol. Chem.* 258:6695-6697. 1983
11. Miyake, N, Kim, M and Kurata, T. Formation mechanism of monodehydro-L-ascorbic acid and superoxide anion in the autoxidation of L-ascorbic acid. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61:1693-1695.1997
12. Miyake, N, Kim, M and Kurata, T. Stabilization of L-ascorbic acid by superoxide dismutase and catalase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:54-57. 1999
13. Kim, M. 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. 2001
14. Gatellier, P, Anton, M and Renerre, M. Lipid peroxidation induced by H_2O_2-activated metmyoglobin and detection of a myoglobin-derived radical. *J. Agric. Food Chem.* 43: 651-656. 1995
15. Weissberger, AE, Luvalle, JE and Thomas, J. Oxidation processes. XVI. The autoxidation of ascorbic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 65:1934-1939. 1943
16. Weissberger, AE and Luvalle, JE. Oxidation processes. XVII. The autoxidation of ascorbic acid in the presence of copper. *J. Am. Chem. Soc.* 66: 700-705. 1944
17. Scaife, JF. The catalysis of ascorbic acid oxidation by copper and its complexes with amino acids, peptides

and proteins. *Can. J. Biochem. Phys.* 37. 1049-1067. 1959

18. Buettner, GR. In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate as a test for catalytic metals. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 16:27-40. 1988
19. Buettner, GR. Ascorbate oxidation : UV absorbance of ascorbate and ESR spectroscopy of the ascorbyl radical as assays for iron. *Free Rad. Res. Comms.* 10:5-9. 1990
20. Burkitt, MJ and Gilbert, BC. Model studies of the iron-catalysed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction. *Free Rad. Res. Comms.* 10:265-280. 1990

(2004년 8월 11일 접수)