

## 들깨잎 Polyphenol oxidase의 특성에 관한 연구

김안근, 박수선, 장영수\*

숙명여자대학교 약학대학

## Studies on the Characteristics of Polyphenol Oxidase from Perillae Folium

An Keun Kim, Soo Sun Park and Young Soo Chang\*

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-132, Korea

**Abstract** - Effects of hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ) on polyphenol oxidase (PPO) in Perillae Folium were investigated. The inactivation of this enzyme was dependent on  $H_2O_2$  concentration, and the initial lag period was not shown. Preincubation of Perillae Folium PPO with  $H_2O_2$  in the absence of a substrate resulted in rapid loss of enzymatic activity. The inactivation of PPO by  $H_2O_2$  depends on temperature and pH.  $OH^\cdot$  radical scavengers such as mannitol and sodium formate did not protect the enzyme against inactivation by  $H_2O_2$ . Substrate analogue such as phenylalanine protected the enzyme against inactivation by  $H_2O_2$ , and copper chelator such as sodium azide also protected the enzyme.

**Key words** - *Perilla frutescens*; polyphenol oxidase; hydrogen peroxide.

식물체가 외부로부터 손상을 받았을 때 일어나는 효소적 갈변현상은 주로 polyphenol oxidase (PPO: *o*-diphenol oxidoreductase, E.C.1.10.3.1)라는 Cu를 함유한 효소에 의해 일어난다고 알려져 있다.<sup>1,2)</sup> PPO는 곰팡이 뿐만 아니라 식물중에 많이 존재하는 것으로 보고되어 있다.<sup>1-4)</sup> 본 실험실에서도 식물체중의 PPO에 관한 연구의 일환으로 들깨(*Perilla frutescens* Britton)잎에서 PPO를 분리정제하여 몇가지 효소학적 성상을 검토한 바 있다.<sup>5,6)</sup> 들깨잎에서 분리정제한 PPO는 다른 식물체에서 분리한 PPO와 유사한 성질들을 갖고 있으며, 저해제인 copper chelator, reducing reagent, 그리고 기질 유사체와 여러가지 아미노산 등이 들깨잎 PPO에 미치는 영향등에 관해서도 보고되었다.<sup>5,6)</sup> 이러한 저해제에 관한 연구는 효소의 생리적 기능과 입체구조 및 효소활성부위를 알아내는데 주요한 연

구 수단이 된다고 할 수 있다.

Hydrogen peroxide( $H_2O_2$ )는 식물체내에서 대사산물로서 생산된다고 알려져 있다. 호기적 조건하에서 식물조직에서는 oxygen free radical이 생성되는데, 이 radical은 불안정하여 산소가 환원된 형태인 비교적 안정한  $H_2O_2$ 로 쉽게 전환된다.<sup>7,8)</sup> 또한  $H_2O_2$ 는 dopamine  $\beta$ -monooxygenase,<sup>9)</sup>  $Cu^{2+}$ -superoxide dismutase,<sup>10-12)</sup> mushroom tyrosinase,<sup>13,14)</sup> avocado PPO<sup>7)</sup> 그리고 cherimoya PPO<sup>15)</sup> 등과 같은 몇몇 Cu를 함유하는 효소의 inactivator로 알려져 있다.  $H_2O_2$ 에 의한 dopamine  $\beta$ -monooxygenase의 불활성화는 효소상에 존재하는  $Cu^{2+}$ 의 존재 때문이며,<sup>9)</sup>  $Cu^{2+}$ -superoxide dismutase는  $OH^\cdot$  radical 때문이라고 보고하고 있다.<sup>10-12)</sup> Mushroom tyrosinase는 고농도의  $H_2O_2$ 와 반응시 monohydroxyphenolase와 *o*-dihydroxyphenolase activity 모두 불활성화 된다고 보고되었다.<sup>13)</sup> Avocado PPO의 경우, 저농도의  $H_2O_2$ 와

\*교신저자 : Fax 02-745-7690

반응시 tyrosine hydroxylation의 lag period가 단축되며, 일단 lag period가 지나면  $H_2O_2$ 의 농도 증가에 따라 dopachrome 형성속도가 증가되지만, 고농도의  $H_2O_2$ 와 반응시에는 효소를 불활성화 시킨다고 보고하였다.<sup>7)</sup> Cherimoya PPO도  $H_2O_2$ 에 의해 불활성화 된다고 보고되었다.<sup>15)</sup>  $H_2O_2$ 는 간접적으로 식물체내에서 phenol성 화합물의 산화에 대한 조절, 혹은 갈변 산물의 생성이나 저해에 기여하는 활성PPO 효소의 조절에 대한 역할을 한다고 할 수 있다.

본 연구는 들깨잎 PPO에 관한 연구의 일환으로서, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )가 들깨잎(*Perillae Folium*)으로부터 얻은 PPO에 미치는 영향 등을 검토하여 약간의 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험기기 및 시약**-Potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, sodium chloride, sodium ascorbate, ammonium sulfate (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 제품), Polyvinylpyrrolidone, catechol, 4-methylcatechol, sephadex G-150 (bead size 40-120  $\mu$ ), dialysis "sack" (250-7  $\mu$ ) (Sigma Chemical Co. 제품), Hydrogen peroxide, sodium azide, mannitol, sodium formate (Junsei Chemical Co., Ltd. 제품), L-Phenylalanine (Phe) (Kanto Chemical Co., Inc. 제품), pH meter (Orion research digital pH millivolt meter 611), Centrifuge (Sorvall, RC 2-B), Double-beam spectrophotometer (Hitachi model 200-20, Perkin Elmer (Lamda 4A Operating Software Enhanced Scan)), 기타 시약들은 시판 특급(guaranteed reagent) 및 1급 시약을 사용하였다.

**실험재료**-본 실험에 사용된 들깨(*Perilla frutescens* Britton)잎은 서울 근교에서 채취하여 신선한 상태에서 세절하여 사용하였다.

**효소추출 및 정제**-들깨잎으로부터의 효소의 추출과 정제는 박 등<sup>5)</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. 신선한 들깨잎 100 g과 빙냉시킨 50 mM pot. phosphate buffer(2% NaCl과 0.5% Sod. as-

corbate 함유, pH 6.0)를 넣고 1분간 마쇄한 후, 전량 2L로 하여 4시간 동안 냉장상태에서 교반하면서 추출하였다. 추출액을 원심분리(6000 rpm, 1-4 °C, 30분)하여 상층액을 dialysis sack에 넣고 polyvinylpyrrolidone을 사용하여 농축하였다. 농축액에 ammonium sulfate를 가하여 40% 포화시킨 액을 1-4 °C, 15000 rpm에서 30분간 원심분리하고, 그 상층액을 취해 다시 ammonium sulfate로 50% 포화시킨 후, 같은 조건에서 원심분리하여 침전을 얻었다. 빙냉시킨 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.0) 소량으로 침전물을 용해시키고 72시간 투석한 후, 1-4 °C, 15000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 sephadex G-150 column(2.1×85 cm)에 유출속도 8.3 ml/hr로 하여 gel-filtration시켰다. 유출액중 효소활성이 높은 분획을 모아 *Perillae Folium* PPO 효소액으로 하고 효소활성 측정법에 준하여 효소활성을 측정하는 때 실험단계에서 사용하였다.

**효소 활성도 측정**-PPO활성 측정은 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.0) 2.3 ml에 10 mM의 기질액 0.5 ml를 가하고, 마지막으로 효소액 0.2 ml를 가해 총 3 ml로 하여 30 °C에서 10분간 반응시키고, 기질 산화로 인한 흡광도의 증가율을 410 nm에서 측정하였다.<sup>5,6,16)</sup> 본 실험에 사용한 효소액은 10 mM catechol을 기질로 하여 30 °C에서 10분간 반응시켰을 때 410 nm에서 흡광도가 1.000( $\pm$  0.050)이 되도록 50 mM pot. phosphate buffer (pH 6.0)로 조정하여 사용하였다.

**$H_2O_2$ 농도와 incubation time에 따른 효소 활성 변화**-50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.0)에  $H_2O_2$ 의 농도를 달리하여 가하고 기질(catechol, 4-methylcatechol)을 최종 농도가 10 mM이 되게 가하고 마지막으로 효소액 0.2 ml를 가하여 반응액이 총 3 ml가 되게 한 후, 반응시간의 경과에 따른 효소 활성 변화를 측정하여  $H_2O_2$ 첨가로 인한 효소 반응 속도와 초기 잠복기를 알아보았다.

**$H_2O_2$ 농도와 preincubation time에 따른 효소 활성 변화**-기질을 첨가하지 않은 상태에서 PPO와  $H_2O_2$ 와의 작용시간에 따른 효소 활성변화를 관찰하기 위해, 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.0)에 여러농도의  $H_2O_2$ 와 효소액 0.2 ml를 혼합하여 30 °C에서 각 preincubation time동안 반응시키

고 난 후, 기질(catechol, 4-methylcatechol(10 mM))을 가하고 즉시 혼화하여 10분 후의 흡광도를 410 nm에서 측정하였다.<sup>5,6,16)</sup>

**반응 온도의 영향**-반응액의 온도변화가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 효소 활성 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각 반응온도에서 반응용액을 10분간 반응시킨 후 즉시 효소활성을 측정하였다.

**반응 pH의 영향**-반응액의 액성변화가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 효소 활성 변화에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험으로, pH 4.5에서 8.0까지의 50 mM pot. phosphate buffer를 사용하여 반응액을 30°C에서 10분간 반응시킨 후 즉시 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>5,6,16)</sup>

**투석 영향**-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 효소의 불활성화반응이 가역적인지 비가역적인지 알아보기 위하여, 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.0)에 효소를 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 30분간 preincubation시켜 불활성화시킨 후, 0-4°C에서 buffer(pH 6.0)로 24시간 투석하였다. 투석액 2.5 ml를 취해 효소의 활성회복 정도를 10 mM catechol을 기질로 사용하여 측정하고, 나머지는 다시 24시간 더 투석후 2.5 ml를 취해 활성을 측정하였다.

**OH·radical scavenger의 영향**-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 효소의 불활성화 반응이 bulk phase에서 생성된 OH·radical에 의한 것인지를 알아보기 위한 실험으로서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와는 반응하지 않으면서 OH·radical을 제거하는 mannitol과 sod. formate를 각각 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.0), 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같이 혼화한 후 효소액 0.2 ml를 넣고 30°C에서 10분간 preincubation한 후 10 mM catechol을 기질로 사용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**기질유사체의 영향**-기질유사체가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 효소의 불활성화 반응을 억제시킬 수 있는가를 실험해 봄으로써 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 효소의 촉매부위에 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위한 실험을 실시하였다. 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.0)에 phenylalanine과 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 같이 혼화한 후 효소액 0.2 ml를 넣고 30°C에서 각 preincubation time동안 반응시키고 난후 10 mM catechol을 기질로 가하여 10분후의 흡광도를 410 nm에서 측정하였다. 또한 이 억제는 phenylalanine

과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 동시에 효소와 반응시켰을 때와 phenylalanine을 먼저 효소와 반응시켰을때 그 억제 정도가 차이가 있는지를 알아보기 위해, 한 시험관에는 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.0)에 phenylalanine과 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 같이 혼화한 후 효소액 0.2 ml를 넣고 30°C에서 3분간 반응시키고 난 후 10 mM catechol을 사용하여 흡광도를 측정했다. 그리고 다른 시험관에는 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.0)에 phenylalanine을 넣고 효소액 0.2 ml를 가해 3분간 preincubation시킨후 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가해 다시 3분간 반응시키고 즉시 10 mM catechol을 사용하여 흡광도를 측정하여 비교하였다.

**Copper chelator의 영향**-Copper chelator가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 효소의 불활성화반응을 억제시킬수 있는지를 실험해 봄으로써 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 효소를 불활성화시키는 데 효소상의 Cu와 어떻게 관계하는가를 알아보기 위한 실험이다. 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.0)에 sodium azide와 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 같이 혼화한 후 효소액 0.2 ml를 넣고 30°C에서 각 preincubation time동안 반응시키고 난 후 10 mM catechol을 기질로 가하여 10분 후의 흡광도를 410 nm에서 측정하였다

## 결과 및 고찰

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>농도와 incubation time에 따른 효소 활성 변화**-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 증가함에 따라 *o*-diphenol의 *o*-quinone으로의 변환속도와 생성물이 감소되었으며, 초기 lag period는 생기지 않았다(Fig. 1). Martinez-Cayuela 등<sup>15)</sup>은 cherimoya PPO의 경우 비교적 낮은 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 monophenol인 tyramine과 diphenol인 DOPA로부터 형성된 최종갈변산물의 농도를 증가시키나 diphenol인 catechol로부터 형성된 최종 갈변산물의 농도는 control과 비교시 감소시킨다고 하였다. 반면에 고농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 tyramine의 hydroxylation과 DOPA와 catechol의 산화 속도를 모두 감소시켰다고 보고하였다. Avocado PPO는 저농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 tyrosine hydroxylation의 lag period가 단축되고, diphenol인 DOPA도 저농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 dopachrom으로의 전환속도가 증가되었으며, 고농

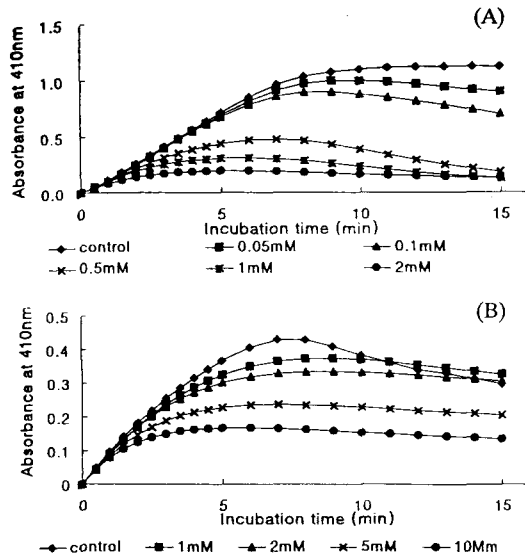


Fig. 1. Effect of different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on Perillae Folium PPO activity.

The reaction mixture contained, in a total volume of 3 ml, 50 mM pot. phosphate buffer (pH 6.0), enzyme extract (added last), 10 mM substrate ((A) catechol, (B) 4-methylcatechol) and the indicated concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Reaction was started by addition of enzyme extract at zero time incubation.

도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해서는 오히려 산화속도와 최종 dopachrom 생성이 감소되었다고 보고하였다.<sup>7)</sup>

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도와 preincubation time에 따른 효소 활성 변화** - Catechol을 기질로 사용한 경우, 1-2분 이내에 0.05 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 약 10%, 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 20%, 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 75%, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 80%, 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 90% 정도 효소활성이 저해되었고, 2분 이후 부터는 저해정도가 아주 서서히 증가하였다. 반면에 4-methylcatechol을 기질로 사용한 경우, 1 mM과 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 들깨잎 PPO를 preincubation시켰을 때는 거의 직선상으로 그 활성이 감소하나, 5 mM과 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 효소를 preincubation하였을 때는 catechol을 기질로 사용하였을 경우, 0.5-2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 PPO를 preincubation했을 때처럼 1-2분 이내에 각각 약 60%, 80%저해를 나타내었고, 이후 서서히 저해정도가 증가하였다(Fig. 2). 이러한 저해양상은 avocado PPO<sup>6)</sup>와 mushroom tyrosinase<sup>13)</sup>에서와 비슷하다. Avocado PPO를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 preincubation하여 monophenol인 tyrosine과 diphenol인 DOPA와

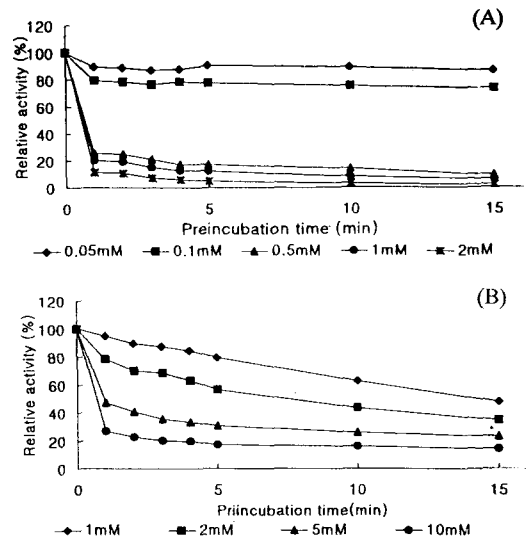


Fig. 2. Effect of different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the rate of Perillae Folium PPO inactivation.

Enzyme extract was preincubated with different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mM pot. phosphate buffer (pH 6.0). Samples were taken after various preincubation times and enzyme activities were determined with (A) 10 mM catechol, (B) 10 mM 4-methylcatechol as a substrate at 30 °C.

반응시켰을 때 들깨 효소의 활성이 점진적으로 상실되는데, tyrosine을 hydroxylatoin시키는 능력이 DOPA를 산화시키는 능력보다 빨리 상실되었다고 보고하였다.<sup>7)</sup>

**반응 온도의 영향** - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가하지 않았을 때 각 온도에서의 효소활성에 대해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가했을 때의 상대활성을 비교해보면 저온(1-10 °C)에서는 거의 영향이 없으나, 그보다 고온으로 해줄수록(20-60 °C) 저해가 더 많이 되는 것으로 나타났다. 다만 4-methylcatechol을 기질로 한 경우, 반응액의 온도가 60 °C일 때 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 상대적인 효소활성 저해가 50 °C의 경우보다 작게 나타났다.(Table I) 기질을 10 mM catechol을 사용한 경우는 최적온도, 즉 효소활성이 가장 크게 나온 온도는 30 °C이나, 4-methylcatechol을 기질로 한 경우는 20 °C에서 활성이 크게 나타났다. 또한 기질로 catechol이나 4-methylcatechol을 사용한 경우 모두 비교적 고온에서 효소활성이 빨리 떨어지는 것을 볼 수 있었다.

**반응 pH의 영향** - Catechol을 기질로 하였을 경우는 액성이 알칼리성쪽으로 갈수록 저해가 많이 되나, 4-methylcatechol을 기질로 하였을 경우는

**Table I.** Effect of temperature on the inactivation of *Perillae Folium* PPO by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Temperature(°C)	Relative activity(%)	
	catechol	4-methylcatechol
1	95	100
10	95	100
20	82	96
30	69	82
40	46	55
50	32	44
60	28	28

**Table II.** Effect of pH on the inactivation of *Perillae Folium* PPO by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

pH	Relative activity(%)	
	catechol	4-methylcatechol
4.5	97	82
5.0	96	81
5.5	88	82
6.0	76	80
6.5	62	79
7.0	51	94
7.5	41	100
8.0	28	100

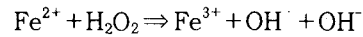
pH 4.5-pH 6.5까지는 거의 비슷한 저해정도를 유지하다가 좀더 알칼리성으로 가면 거의 저해가 되지 않는 것으로 나타났다(Table II). 저해제의 종류에 따라 pH의 영향을 받기도 하고(pH-dependent inhibition), 그렇지 않은 경우도 있어서(pH-independent inhibition) pH 변화에 따른 저해양상이 다르게 나타남을 알 수 있으나,<sup>6,17,18)</sup> 한가지 저해제에 대해 기질을 달리 했을 때 pH영향에 대한 비교 실험은 거의 되고 있지 않아 여러 저해제에 대해서 좀더 많은 고찰이 필요한 것으로 사료된다.

**투석 영향**-효소를 불활성화 시키고나서 buffer로 충분히 투석한 후 잔존 효소활성을 측정해본 결과(Table III), 48 시간 투석 후에도 거의 활성이 회복되지 않음이 나타났다. 이것은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 들깨잎 PPO에 대한 저해가 비가역적으로 이루어짐을 나타내는 것으로, mushroom tyrosinase<sup>13)</sup>의 경우와 같다.

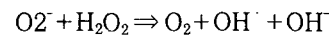
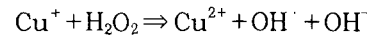
**OH<sup>-</sup> radical scavenger의 영향**-OH<sup>-</sup> radical은 효소를 이용하지 않고 다음과 같은 경로를 통해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로부터 생성된다.<sup>13)</sup>

**Table III.** Effect of dialysis on *Perillae Folium* PPO inactivation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	Preincubation time	Activity after dialysis		
		0	24 hrs.	48 hrs.
none	30	1.043	0.914	0.759
2	30	0.013	0.031	0.032



(the Fenton reaction)



(the Haber-Weiss reaction)

이렇게 생성된 free radical은 papain이나 lactate dehydrogenase 등의 효소를 불활성화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>13)</sup>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와는 반응하지 않으면서 OH<sup>-</sup> radical을 제거하는 mannitol과 sodium formate의 부가가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 효소의 불활성화에 미치는 영향을 관찰해 보았다(Table IV). OH<sup>-</sup> radical scavenger의 부가는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 효소의 불활성화에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Andrawis 등은 mushroom tyrosinase에 관한 연구에서 OH<sup>-</sup> radical 생성을 촉진시키거나, 또는 OH<sup>-</sup> radical scavenger의 첨가하여도 효소활성의 저해에 영향을 미치지 않는 것으로 보아, bulk phase에서 생성된 free OH<sup>-</sup> radical이 mushroom tyrosinase를 저해하는 것은 아니라고 보고하였다.<sup>13)</sup>

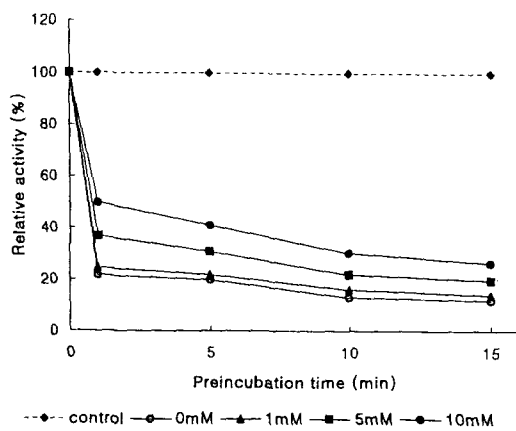
**기질유사체의 영향**-들깨잎 PPO의 기질유사체로 알려진 phenylalanine<sup>6)</sup>의 농도별 저해정도를 Table V에 나타내었다. Phenylalanine과 효소의 반응액을 control로 하고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 phenylalanine을 동시에 효소와 반응시킨 후 catechol을 기질로 하여 흡광도를 측정하였을 때, Fig. 3에서 보는 바와 같이 phenylalanine이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 효소의 저해를 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 억제는 들깨잎 PPO와 phenylalanine을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>보다 3분 먼저 반응을 시키거나, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 동시에 반응을 시키거나 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(Table VI). Andrawis 등<sup>13)</sup>은 mushroom tyrosinase는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 불활성화 되는데, 효소촉매부위에 작용하는

**Table IV.** Effect of addition of OH radical scavengers on the inactivation of Perillae Folium PPO by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Radical scavenger added	concentration (mM)	Relative activity(%) after 10 min. preincubation
Mannitol	0	20.0
	1	20.3
	5	20.2
	10	20.2
Sodium formate	0	21.0
	1	18.9
	5	21.1
	10	21.0

**Table V.** Effect of inhibitors on Perillae Folium PPO activity.

Inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity(%)
L-Phenylalanine	0	100
	1	92.2
	5	67.8
	10	49.5
Sodium azide	0	100
	0.1	90.3
	1	44.6
	5	6.4



**Fig. 3.** L-Phenylalanine as a protector against inactivation of Perillae Folium PPO by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

The preincubation mixture contained 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.0), enzyme extract (added last), and phenylalanine as indicated. Control mixtures had no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while experimental mixtures contained 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Samples were Taken after various preincubation times and enzyme activities were determined with 10 mM catechol as a substrate at 30°C. The activities were expressed relative to the control(no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added) at each preincubation time.

**Table VI.** Effect of Perillae Folium PPO inactivation by Phe and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

	Concentration Phe(mM)	Relative activity(%) after 3 min. preincubation
The substrate analogue (Phe) and 0.5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> were added at the same time to the enzyme.	0	20.0
	1	20.4
	5	31.7
	10	41.9
Preincubation of the enzyme with substrate analogue was done for 3 min prior to the addition of 0.5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	0	19.0
	1	20.1
	5	29.1
	10	39.1

경쟁적 저해제인 기질유사체를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같이 효소반응액에 첨가하였을 때 효소의 불활성화가 억제되는 것으로 보아 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 효소의 촉매부위에 작용하는 것이라고 했다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 저해에 대해 기질유사체의 억제정도는 효소에 대한 기질유사체의 저해능력과 직접적인 관련이 있는 것으로 보이며, 또한 기질유사체를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>보다 먼저 효소에 preincubation시키는 것이 동시에 preincubation시키는 것보다 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 효소저해를 더 많이 억제시키는 것은 기질유사체가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>보다 효소 활성자리에 더 잘 결합하기 때문이라고 주장했다.

**Copper chelator의 영향** - 들깨잎 PPO의 copper chelator로 알려진 sodium azide<sup>6,19)</sup>의 농도별 저해정도를 Table V에 나타내었다. Sodium azide와 효소의 반응액을 control로 하고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 sodium azide를 동시에 효소와 반응시킨 후 catechol을 기질로 하여 흡광도를 측정하였을때, Fig. 4에서 보듯이 sodium azide가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 효소의 저해를 억제하는 것으로 나타났다. Mushroom tyrosinase의 경우 holotyrosinase와 apotyrosinase를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응시켰을 때 holotyrosinase는 저해가 되지만 apotyrosinase는 그렇지 않다는 것과, copper chelator가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 저해를 억제한다는 것은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 mushroom tyrosinase의 불활성화는 효소상의 Cu의 존재가 필요

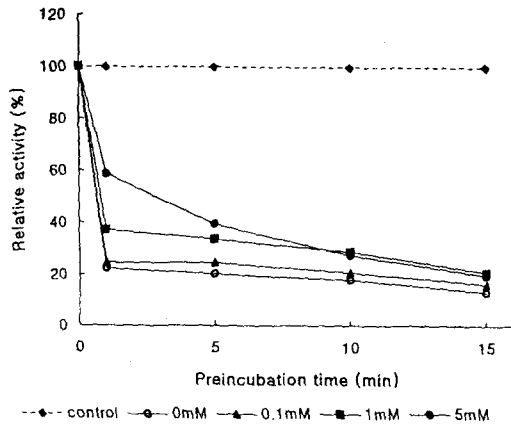


Fig. 4. Sodium azide as a protector against inactivation of *Perillae Folium* PPO by  $H_2O_2$ .

The preincubation mixture contained 50 mM pot. phosphate buffer (pH 6.0), enzyme extract (added last), and sodium azide as indicated. Control mixtures had no  $H_2O_2$ , while experimental mixtures contained 0.5 mM  $H_2O_2$ . Samples were taken after various preincubation times and enzyme activities were determined with 10 mM catechol as a substrate at 30°C. The activities were expressed relative to the control (no  $H_2O_2$  added) at each preincubation time.

하다는 것을 나타낸다고 주장하였다.<sup>13)</sup> Cu 함유 효소인 dopamine  $\beta$ -monooxygenase 역시  $H_2O_2$ 에 의해 불활성화 되며, 0.25 mM  $H_2O_2$ 에 의해 holoenzyme은 저해되지만 apoenzyme은 저해가 되지 않는 것으로 보아  $H_2O_2$ 에 의한 dopamine  $\beta$ -monooxygenase의 불활성화도 효소에 결합된 Cu의 존재에 의존한다고 보고하였다.<sup>9)</sup>

## 결론

들깨잎(*Perillae Folium*)에서 분리정제한 Polyphenol oxidase(PPO)에 대한 hydrogen peroxide( $H_2O_2$ )의 영향에 관하여 실험한 결과, 본 효소는  $H_2O_2$ 의 농도가 클수록 저해가 많이 되며, 여러농도의  $H_2O_2$ 에 의해서도 initial lag period없이 효소 작용이 나타났다. 또한 효소와  $H_2O_2$ 를 preincubation했을 때 그 활성은 수분 이내에 감소되었다. 이러한  $H_2O_2$ 에 의한 들깨잎 PPO의 활성저해는 반응 온도와 pH에 따라 다르게 나타나며, 비가역적인 반응이다. 그리고  $H_2O_2$ 에서 생성가능한 OH radical은 효소활성 저해에 영향을 미치지 않는 것으로

보인다. 기질유사체인 phenylalanine은  $H_2O_2$ 에 의한 효소의 활성저해를 억제시켰으며, copper chelator인 sodium azide도 효소활성저해를 억제시키는 것으로 나타났다.

이러한 결과로 미루어  $H_2O_2$ 에 의한 들깨잎 PPO의 활성저해는 촉매자리에서 일어나며, 효소상의 Cu의 존재가 반응에 필요하다는 것을 보여주는 것으로 추정된다. 또한 조직내에서  $H_2O_2$ 는 들깨잎 PPO 작용에 간접적으로 영향을 미치는 것으로 생각된다.

## 인용문헌

- Mayer, A. M. and Harel, E. (1979) Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry* 118: 193-215.
- Mayer, A. M. (1987) Polyphenol oxidase in plants—recent progress. *Phytochemistry* 26: 11-21.
- Vaughn, K. C. and Duke, S. O. (1984) Function of Polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant* 60: 106-112.
- Vaughn, K. C. and Duke, S. O. (1988) Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant* 72: 659-665.
- 박수선, 김안근, 노진희, 심미옥 (1991) 들깨잎 중의 폴리페놀 산화효소의 정제 및 특성. *약학회지* 35: 222-230.
- 박수선, 김안근, 손은수 (1996) 아미노산류가 들깨잎 polyphenol oxidase 활성저해에 미치는 영향. *약학회지* 40: 65-71.
- Kahn, V. (1983) Multiple effect of hydrogen peroxidase on the activity of Avocado polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 22: 2155-2159.
- Warm, E. and Laties, G. G. (1982) Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemilluminescence reaction with luminol. *Phytochemistry* 21: 827-831.
- Skotland, T. and Ljones, T. (1980) Inactivation of dopamine  $\beta$ -monooxygenase by hydrogen peroxide and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 201: 81-87.
- Bray, R. C., Cockle, S. A., Fielden, E. M., Roberts, P. B., Rotilio, G. and Calabrese, L. (1974) Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 139: 43-48.
- Hodgson, E. K. and Fridovich, I. (1975) The

- inactivation of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: Inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 14: 5294-5299.
12. Sinet, P. M. and Garber, P. (1981) Inactivation of the human CuZn superoxide dismutase during exposure to  $O_2^-$  and  $H_2O_2$ . *Arch. Biochem. Biophys.* 212: 411-416.
  13. Andrawis, A. and Kahn, V. (1985) Inactivation of mushroom tyrosinase by hydrogen peroxide. *Phytochemistry* 24: 397-405.
  14. Jolley, R. L., Evans, L. H., Makino, N. and Mason, H.S. (1974) Reversible oxidation of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 249: 335-645.
  15. Martínez-Cayuela, M., Faus, M. J. and Gil, A. (1988) Effect of some reductants on the activity of cherimoya polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 27: 1589-1592.
  16. Ponting, T. D. and Joslyn, M. A. (1948) Ascorbic acid oxidation and the browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem.* 19: 47-52.
  17. Luh, B. S. and Bulan, P. (1972) Characteristics of polyphenol oxidase related to browning in cling peaches. *J. Food Sci.* 37: 264-268.
  18. Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E. and Mayer, A. M. (1977) Catechol oxidase from green olives: Properties and partial purification. *Phytochemistry* 16: 1153-1158.
  19. Kahn, V. and Andrawis, A. (1985) Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. *Phytochemistry* 24: 905-908.

(1996년 11월 9일 접수)