

아미노산류가 들깨잎 폴리페놀 옥시다제 활성저해에 미치는 영향

박수선 · 김안근 · 손은수*

숙명여자대학교 약학대학

(Received September 27, 1995)

Effects of Amino Acids on the Inhibition of Polyphenol Oxidase Activity from Perillae Folium

Soo Sun Park, An Keun Kim and Eun Soo Sohn*

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

Abstract—Characterization of Polyphenol oxidase (PPO) in Perillae Folium, particularly inhibitor studies were investigated. This enzyme was stable at pH 5.0 and the residual activity of PPO at \geq pH 5.5 was estimated to be very low. PPO activity was decreased slightly by adding amino acid with catechol as a substrate, particularly PPO activity was inhibited markedly by cystein, histidine, lysine and arginine. In the absorption spectra of the product formed when catechol was oxidized by PPO, with a λ_{\max} at 410 nm, the peak shifted toward λ_{\max} 520 nm by addition of L-proline. At relatively low concentrations (10^{-3} M), sulfite and dithiothreitol completely inhibited PPO activity. Inhibition of PPO activity by amino acids and inhibitors increased or decreased depending on the pH used to measure it.

Keywords □ *Perilla frutescens*, Polyphenol oxidase, Inhibitors, Amino acids.

식물체가 외부적 자극이나 손상을 받았을 때 나타나는 갈변현상은 polyphenol oxidase(PPO : *o*-diphenol oxidoreductase, E.C.1.10.3.1)라는 Cu를 함유한 효소에 의해 일어나는 것으로, 이 효소는 두가지 다른 O₂-의존성 반응을 촉매한다(cresolase activity, catecholase activity). 결국 페놀성 물질이 산화하여 생긴 quinone 중합체가 갈변현상을 일으킨다고 알려져 있다.¹⁻⁴⁾

PPO는 fungi뿐만 아니라 여러 식물의 엽록체 속에 흔히 분포하며 고등식물체 내에서 순수하게 분리하기가 어렵고, 그 양도 적어서 PPO중에 존재하는 Cu는 추출 정제과정에서 소실되기가 쉬워 Cu를 둘러싼 고차구조 및 작용기전, 생리적 기능에 관한 보고는 드물다.

식물생리 측면에서 볼 때, PPO에 의한 식물체의 갈

변은 바람직하지 못한 현상으로 보여지고 있어, 최근 식품공업 측면에서도 상업적으로 좀더 유용하고 안전한 저해제에 대한 연구가 주시되고 있으며, 이는 그 효소의 생리적 기능과 입체구조 및 효소활성부위를 알아내는데 주요한 연구수단이 된다고 할 수 있다.

또한 PPO의 catechol oxidase에 대한 저해작용은 일반적으로 저해제가 효소내 copper와 내부작용하는 것과 페놀성 기질에 대한 활성자리에 영향을 주는 것으로 분류되어 연구되었다.¹⁾

우리나라에서 재배된 들깨(*Perilla frutescense* Britton)잎은 임엽(荏葉)이라 하여 주로 食用하며, 주성분인 elscholtzia ketone 이외에 phenolic acid로서 caffeic acid, chlorogenic acid 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 들깨잎 PPO에 대해서는 그 이화학적 성상이 보고된 바 있다.⁵⁾

본 연구에서는 들깨잎(Perillae Folium)으로부터 분리제한 PPO의 효소학적 특성에 관한 연구의 일환으

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-710-9566 (팩스) 02-710-9561

로, 아미노산류와 수종의 저해제가 PPO 활성에 미치는 영향을 검토하여 약간의 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

실험방법

실험기기 및 시약 - Hitachi double beam spectrophotometer(Model 200-20), centrifuge (Sorvall RC 2-B), pH meter(Orion research digital pH millivolt meter 611), Sephadex G-150(40~120 μ , Sigma), dialysis sacks(250~7 μ , Sigma)를 사용하였으며, 기타 본 실험에 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

실험재료 - 본 실험에 사용한 들깨(*Perilla frutescens* Britton)은 서울근교에서 6~8월 중에 채취하여 사용하였다.

효소추출 및 정제 - 朴 등⁵⁾의 방법에 준하여 실시하였다. Waring blender에 신선한 *Perillae Folium* 100 g과 빙냉시킨 0.05 M phosphate buffer(2% NaCl과 0.5% sodium ascorbate 함유, pH6.0)를 넣고 1분간 마쇄한 후, 전량 2 l로 하여 1~4°C에서 4시간 동안 추출하였다. 이 액을 1~4°C, 6000 rpm에서 30분간 원심분리하고, 그 상층액을 polyvinylpyrrolidone으로 농축하였다. 농축액에 고체 ammonium sulfate를 40% 포화시킨 후, 15000 rpm에서 30분간 원심분리하고, 그 상층액을 다시 고체 ammonium sulfate로 50% 포화시킨 후 같은 조건에서 원심분리하여 침전을 얻었다. 0.05 M phosphate buffer(pH6.0) 소량으로 이 침전물을 용해시키고 투석한 후, 1~4°C, 15000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액 2 ml을, 미리 0.05 M phosphate buffer(pH6.0)로 평형시킨 Sephadex G-150 column(2.1×85 cm)의 상단에 조심스럽게 가하고, 유출속도 8.3 ml/hr로 하여 동일 완충액으로 유출시켰다.

효소활성 측정 - Sephadex G-150 분획 중 활성이 가장 큰 분획을 효소액 시료로 사용하였고, 0.05 M phosphate buffer(pH6.0) 2.3 ml에 효소액 0.2 ml을 가하고 30°C에서 2분간 pre-incubation 시킨 후, 기질로서 0.01 M catechol 0.5 ml을 가해 30°C에서 10분간 반응시켜 기질산화로 인한 흡광도의 증가율을 측정하였다.⁶⁾ 효소활성 1단위는 420 nm에서 1분당 흡광도 0.001을 변화시키는 효소량으로 정하였다.

Incubation time에 따른 효소활성 변화 - 전항의 효

소활성 측정법에 따라 0.01 M catechol 기질액의 첨가를 반응시작 시간으로 하여 흡광도를 측정하였다.

pH 안정성 - 0.05 M phosphate buffer(pH4.5~8.0)에 0.01 M catechol과 효소액을 가해 30°C에서 48시간 반응시킨 후 각 pH에서의 효소의 잔존활성을 측정하였다.

아미노산의 영향

아미노산 농도별 효소활성 저해도 - 18종의 아미노산 0.01 M에 효소액을 가해 30°C에서 2분간 pre-incubation 시킨 후, 0.01 M catechol을 넣고 10분간 반응시켜 효소활성을 측정하였다.

Pre-incubation time에 따른 효소활성 변화 - 7종의 아미노산(His, Lys, Gly, Arg, Phe, Pro 각각 0.01 M, Cys 5×10^{-5} M)과 효소액과의 혼합액의 pre-incubation time을 변화시키면서 0.01 M catechol을 가하여 10분후의 효소활성을 측정하였다.

Incubation time에 따른 효소활성 변화 - Cys, His, Arg의 농도를 달리하여 효소액 및 0.01 M catechol과 혼합 후 반응시간 경과에 따른 효소활성 변화를 측정하였다.

Proline의 영향 - 7종의 아미노산(Pro, Ser, His, Arg, Lys, Gly, Phe) 0.01 M에 효소액을 가해 2분간 pre-incubation 시킨 후 0.01 M catechol을 넣어 spectrophotometer를 사용하여 300 nm/min로 350 nm에서 900 nm까지 scanning 하였다.

pH-dependent inhibition - Cys, His, Arg, Pro 각각 0.01 M에 0.05 M phosphate buffer를 pH4.5~8.0까지 변화시키면서 효소활성을 측정하였다.

효소 저해제의 영향

저해제 농도별 효소활성 변화 - 저해제로서 sulfite 류 화합물(sodium hydrosulfite, sodium bisulfite, sodium sulfite, sodium metabisulfite) 및 reducing agents(dithiothreitol), metal chelators(sodium cyanide, sodium thiosulfate) 등의 농도를 달리하고 0.01 M catechol을 기질로 하여 효소저해력을 측정하였다.

Dithiothreitol(DTT)이 효소활성에 미치는 영향 - DTT 농도(1×10^{-5} ~ 9×10^{-5} M)와 pre-incubation time(2~30분)을 변화시켜 효소활성을 측정하였다.

pH-dependent inhibition - 저해제로서 sodium

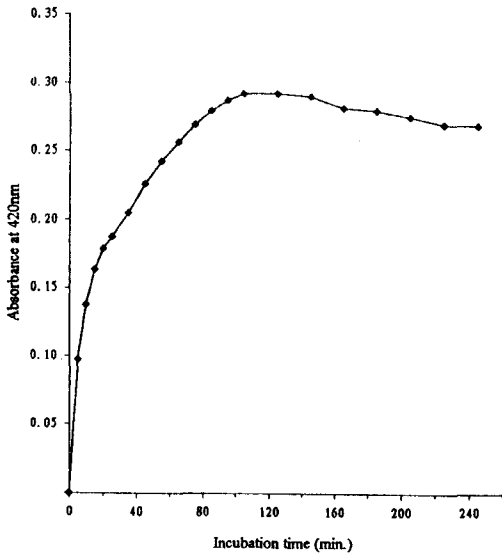


Fig. 1 — The time course of PPO from Perillae Folium.

Table I — Effect of pH on the stability of Perillae Folium PPO

pH	Residual activity (%)
4.5	94
5.0	97
5.5	9
6.0	3
6.5	1
7.0	1
7.5	1
8.0	1

hydrosulfite, glutathione, potassium metabisulfite, dithiothreitol, sodium ascorbate, sodium diethyldithiocarbamate, sodium thiosulfate(이상 5×10^{-5} M), sodium azide(5×10^{-4} M), sodium chloride(0.01 M)를 사용하여 0.01 M catechol을 기질로 하여 저해방식을 비교하였다.

결과 및 고찰

Incubation time에 따른 효소활성 변화 - Incubation time 경과에 따라 흡광도가 증가함으로써 quinone 중합체의 형성증가를 보였다(Fig.1). 15분까지는 직선적인 활성증가를 보임으로써 반응생성물에 의한 feed back inhibition을 받지 않았으나, 그 이후는 비교적 완만한 증가를 보였고, 105분 경과후에는 정상상태에 도달하여 활성이 유지되거나 아주 서서히 감소하였

Table II — Effect of amino acids on Perillae Folium PPO activity

Amino acids (0.01 M)	R.A.* (%)	Amino acids (0.01 M)	R.A.* (%)
Cys	0	Ile	63
Pro	38	Val	65
Lys	42	Thr	68
Arg	43	Leu	69
His	45	Asn	71
Trp	57	Ser	75
Gly	62	Ala	80
Met	62	Glu	87
Phe	63	Asp	93

* The enzyme activities were expressed relative to the control (no amino acid added).

다. 식물의 cresolase는 효소작용 발현 전에 특징적인 잠복기(lag period)를 나타내는 것으로 알려져 있으나⁷⁾ Fig. 1에서 보는 바와 같이 catecholase 활성을 가진 들깨잎 PPO⁵⁾는 잠복기 없이 효소작용을 나타내었다.

pH 안정성 - 30°C에서 48시간 저장한 PPO 효소액은 pH5.0에서 97%의 높은 잔존활성을 보였으며, 이 효소의 최적 pH인 6.0에서는⁵⁾ 3%만의 잔존활성을 보였고, pH6.5~8.0에서는 활성을 상실하였다(Table I). 따라서 들깨잎 PPO는 pH5.0에서 가장 안정함으로써 감자 PPO와 유사성을 보였다.⁸⁾

아미노산의 영향 - Table II에서 보는 바와 같이 실험에 사용된 18종의 아미노산은 들깨잎 PPO의 활성을 다소 낮추었고, 특히 cystein은 효소활성을 완전히 상실시켰다.⁵⁾ Copper chelators로 알려진 Lys, His은 활성을 각각 58%, 55% 저하시켰고, Arg은 57%를 저하시켰다. 또다른 copper chelator인 Gly과 기질유사체 아미노산인 Phe은 각각 38%, 37%를 억제시킴으로써 His, Lys에 비해 저해효과가 크지 않았고, Met 역시 이와 비슷하였다.

Fig. 2는 아미노산 농도별 효소활성 변화를 나타낸 것으로 Lys, Arg이 0.1 M에서 81% 활성이 감소함으로써 높은 저해도를 나타내었고, 이는 Arg, His, Cys, Trp, Lys, Met, Thr이 antioxidant activity에 영향을 준다는 보고⁹⁾와 거의 일치하였다. 그러나 Phe, His, Gly, Lys 순으로 저해도를 보고한 mushroom tyrosinase¹⁰⁾의 경우와는 다소 차이를 보였다.

아미노산은 대체로 PPO 활성에 강력한 저해력을 나타내지는 않으나 인체에 무독하고 안전하여 좋은 저해제로서의 가능성을 지닌다고 볼 수 있다.

PPO 활성에 대한 아미노산의 저해작용은 아미노산

과 PPO와의 pre-incubation time의 변화만으로는 영향을 거의 받지 않았다(Table III).

Table IV는 Cys, His, Arg 각각의 농도별 활성변화를 incubation time의 경과에 따라 측정함으로써 효소 반응 초기속도와 작용발현까지의 lag period를 알아본 것이다. Cys는 농도가 5×10^{-5} M까지 증가함에 따라 initial rate($\Delta OD_{420}/\text{min}$)가 0.032에서 0.002로 감소하였고, lag period는 5분으로 증가하였으며, His의 경우 8×10^{-3} M에서 1분이었고, Arg은 lag period를 나

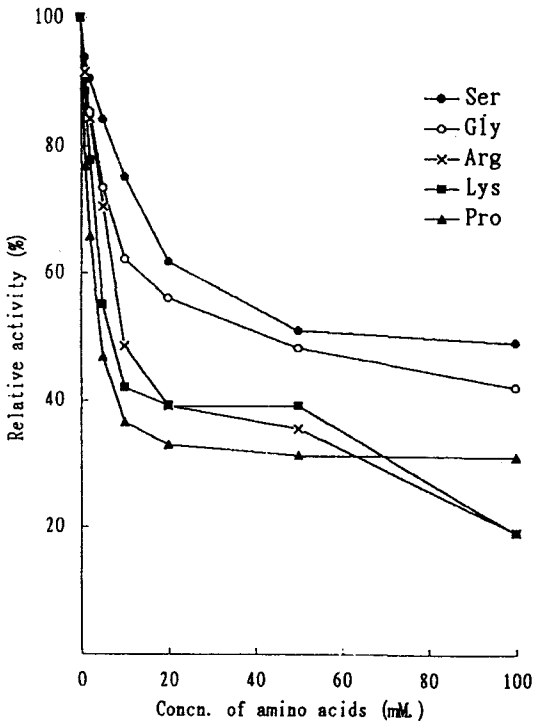


Fig. 2 — Effect of Ser, Gly, Pro, Lys and Arg on Perillae Folium PPO activity.

타내지 않았다.

아미노산 존재하에서 들깨잎 PPO에 의한 catechol 산화반응 산물의 최대흡수파장(λ_{max}) 이동양상은 Fig. 3과 같다. 실험에 사용된 7종의 아미노산은 control에 비해 모두 λ_{max} 을 장파장 쪽으로 이동시켰으며, 특히 proline 첨가로 인해 λ_{max} 이 410 nm에서 520 nm로 이동하여, 산화반응 산물인 o-benzoquinone의 형성을 확인할 수 있었다. 이는 mushroom PPO에서 반응생성물인 quinone에 L-proline이 첨가되어 형성된 4-N-prolyl-o-quinone의 λ_{max} 과 일치하였다.¹¹⁾

아미노산 첨가시 반응액의 pH에 따른 효소활성 저해 양상은 Cys이 pH의 영향을 받지 않는 것에 반해 His, Pro, Arg은 pH-dependent inhibition을 뚜렷이 나타내었고 중성에서 큰 저해력을 보였다(Fig. 4).

Table IV — Effect of different concentrations of Cys, His, Arg on the rate of catechol oxidation by Perillae Folium PPO

Inhibitor	Concentration (mM)	Initial rate ($\Delta OD_{420}/\text{min}$)	Lag period (min.)
Cys	0.00	0.032	0.0
	0.02	0.021	0.5
	0.03	0.011	2.0
	0.04	0.004	3.5
	0.05	0.002	5.0
His	0.0	0.032	0.0
	1.0	0.025	0.3
	2.0	0.020	0.3
	5.0	0.014	0.5
Arg	8.0	0.009	1.0
	0.0	0.032	0.0
	1.0	0.028	0.0
	2.0	0.023	0.0
	5.0	0.017	0.0
	8.0	0.014	0.0
	10.0	0.012	0.0

Table III — Effect of pre-incubation of PPO with some amino acids on its enzyme activity

Amino acid (10 mM)	Activity (% control)*							
	0 min.	1 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	150 min.	180 min.
His	58	57	56	54	53	57	58	55
Lys	50	49	46	45	47	48	46	46
Gly	67	65	61	59	62	63	60	63
Arg	48	49	53	52	50	53	55	55
Phe	68	70	69	67	63	66	68	68
Pro	45	45	47	45	44	46	47	47
Cys (0.05 mM)	0 min.	1 min.	2 min.	10 min.	20 min.	30 min.	40 min.	50 min.
	80	79	77	77	80	77	80	80

* The activities were expressed relative to the control(no amino acid added) at each pre-incubation time.

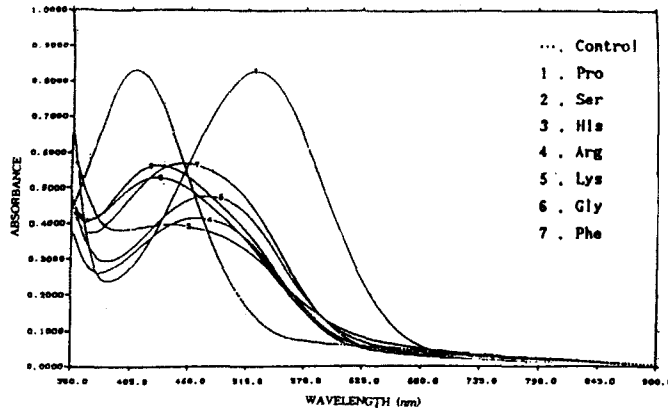


Fig. 3 — Changes in the spectra of catechol oxidation products caused by PPO in the absence and presence of some amino acids.

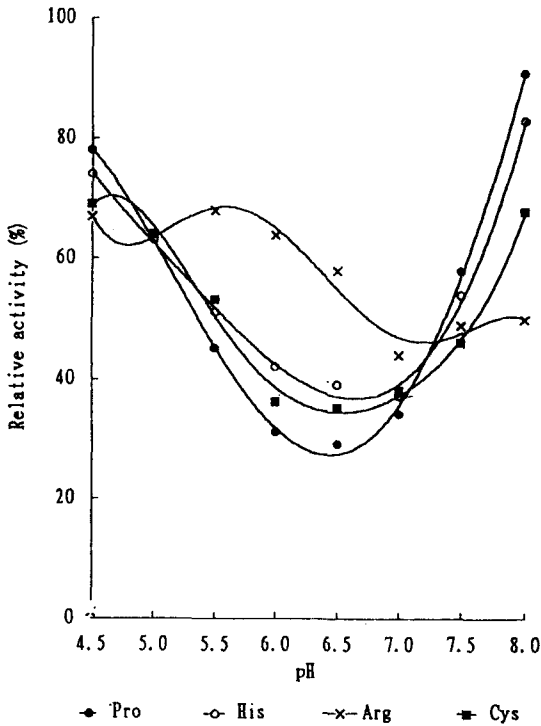


Fig. 4 — Effect of pH on *Perillae Folium* PPO activity by His, Pro, Cys and Arg.

이상의 결과들은 아미노산이 다른 항산화제에 비해 인체에 무독하여 식품공업적인 측면에서 볼 때, 과일 및 야채채주스, 주류(포도주등), 견과류 등 다양한 식품군에서 첨가물로 사용됨으로써 갈변을 방지하고 식품의 저장기능을 높일 수 있다는 점을 시사해 주며, 특히 Cys, His, Lys, Arg, Gly 등의 아미노산이 그 유용성이 높다고 볼 수 있다.

Table V — Effect of some inhibitors on *Perillae Folium* PPO activity

Inhibitor	Concentration (mM)	Inhibition (%)
Sod. thiosulfate (Na ₂ S ₂ O ₃)	10.0	89.5
	1.0	88.8
	0.1	73.3
	0.05	34.6
Sod. hydrosulfite (Na ₂ S ₂ O ₄)	10.0	88.8
	1.0	44.7
	0.1	5.3
	0.05	1.9
Sod. metabisulfite (Na ₂ S ₂ O ₅)	10.0	100.0
	1.0	100.0
	0.1	17.8
	0.01	2.3
	0.005	1.8
Sod. sulfite (Na ₂ SO ₃)	10.0	100.0
	1.0	100.0
	0.1	13.9
	0.01	3.6
	0.005	3.0
Sod. bisulfite (NaHSO ₃)	10.0	100.0
	1.0	100.0
	0.1	15.4
	0.01	5.3
	0.005	2.8
Sod. cyanide	100.0	100.0
	10.0	99.2
	1.0	69.7
	0.1	18.9
	0.05	8.8
Dithiothreithol	10.0	100.0
	1.0	100.0
	0.1	58.8
	0.01	5.1
Pyrogallol	10.0	47.1
α-naphthol	10.0	77.6
Hydroquinone	10.0	90.3

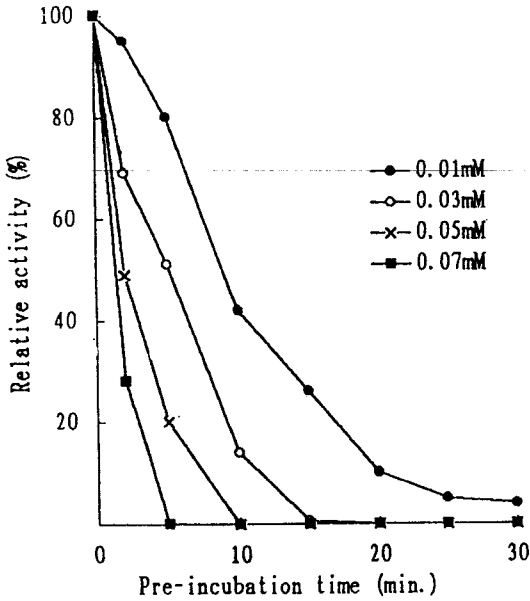


Fig. 5—The time course of inactivation of PPO by di-thiothreitol (DTT).

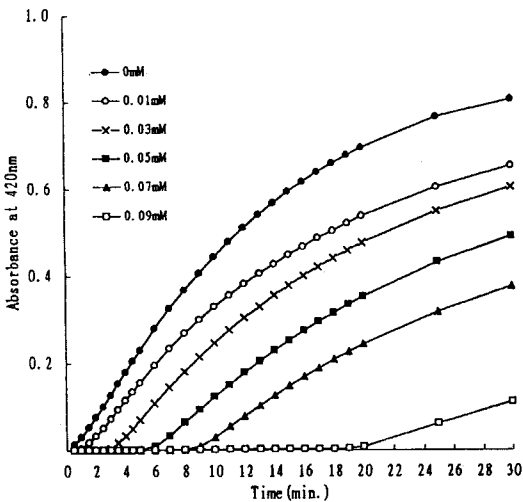


Fig. 6—Effect different concentrations of DTT on Perillae Folium PPO activity.

저해제의 영향 - Sulfite류 화합물 및 DTT는 10^{-3} M에서 완전히 효소활성을 저해하여 강력한 PPO 저해제로 확인되었으며, 기타 metal chelators인 sodium cyanide, sodium thiosulfate 및 phenolic inhibitors인 pyrogallol, α -naphthol, hydroquinone, phenylhydrazine도 비교적 높은 저해력을 나타내었다(Table V).

Reducing agent인 DTT의 농도가 클수록 효소활성

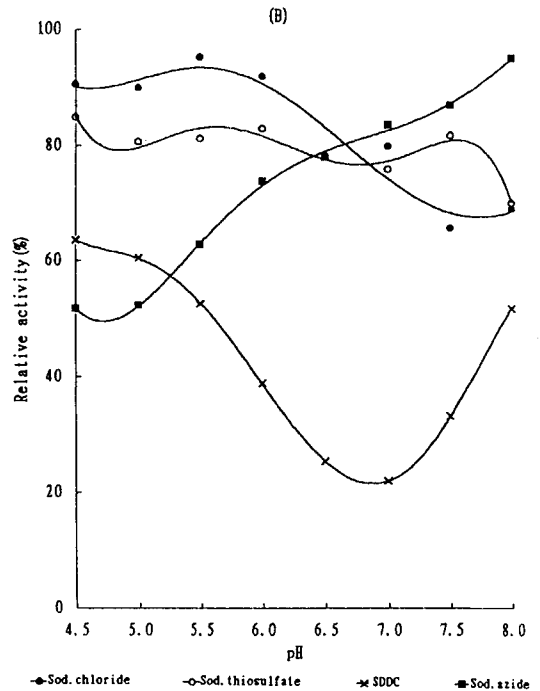
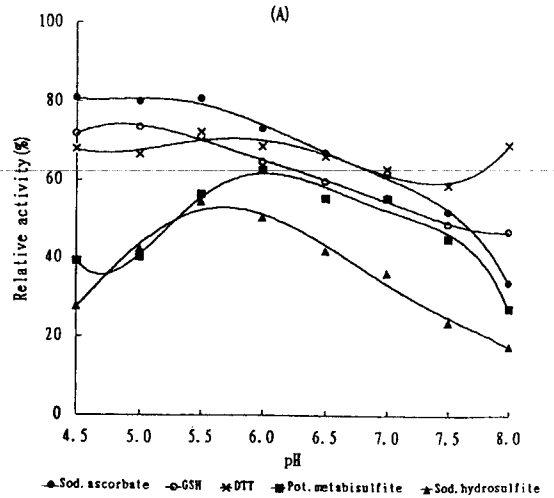


Fig. 7—Effect of pH on Perillae Folium PPO activity by (A) reducing agents (B) copper chelators and sod. chloride

을 완전 상실하는데 필요한 pre-incubation time이 감소하여 3×10^{-5} M에서 5분간 pre-incubation 시켰을 때 50%의 저해도를 나타내었다(Fig. 5). 또한 DTT 농도증가에 따라 initial rate($\Delta OD_{420}/min$)가 감소하여 9×10^{-5} M에서는 거의 0에 이르렀고, 10~20분간의 initial lag phase를 가진 후 효소작용을 나타냈었다(Fig. 6).

반응액의 pH가 효소활성 저해에 미치는 영향을 실험한 결과(Fig. 7-A, B), 저해제의 종류에 따라 pH-dependent 또는 pH-independent inhibition의 양상을 보였다. Sodium thiosulfate와 DTT는 액성에 의존하지 않았으며, glutathione, sodium ascorbate는 중성과 알칼리성으로 갈수록 상대활성이 감소하였고, sodium hydrosulfite와 potassium metabisulfite 역시 pH 영향을 강하게 받고 있음을 알 수 있었다. Copper chelators인 sodium azide, sodium diethyldithiocarbamate도 다른 양상으로 pH-dependent inhibition을 나타내었다. 또한 sodium chloride는 산성보다는 중성과 알칼리성에서 저해력이 강하게 나타나 halide에 의한 저해작용이 pH 의존적이며, 낮은 pH에서 안정하다는 올리브 PPO의 경우¹²⁾와 유사함을 보여 주었다.

결 론

Perillae Folium에서 분리정제한 PPO는 약산성(pH5.0)에서 안정하였고, pH5.5 이상에서 급격히 효소활성을 상실하였다.

각종 아미노산은 PPO 활성을 다소 낮추었으며, 특히 Cys, His, Lys, Arg 등이 효소활성을 크게 저해하였다. Cys과 His의 첨가는 그 농도가 증가할수록 효소의 초기반응속도를 감소시켰으며 초기 잠복기를 보였으나, Arg의 경우는 잠복기 없이 효소작용이 나타났다.

효소와 기질 작용산물인 quinone형 중합체의 λ_{max} 은 proline의 첨가로 410 nm에서 520 nm로 이동하였다.

Sulfite 화합물과 dithiothreitol(DTT)은 낮은 농도(10^{-3} M)에서도 PPO활성을 완전 저해하였다.

반응액의 pH가 효소활성의 저해효과에 미치는 영향을 검토한 결과, sodium thiosulfate와 DTT는 pH-independent inhibition을 보였고, 아미노산 및 glutathione 등의 저해제는 pH-dependent inhibition을 나타내었다.

문 헌

- 1) Mayer, A. M. and Harel, E.: Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry* **18**, 193 (1979).
- 2) Mayer, A. M.: Polyphenol oxidase in plants-recent progress. *Phytochemistry* **26**, 11 (1987).
- 3) Vaughn, K. C. and Duke, S. O.: Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant* **60**, 106 (1984).
- 4) Vaughn, K. C. and Duke, S. O.: Polyphenol oxidase-The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant* **72**, 659 (1988).
- 5) 박수선, 김안근, 노진희, 심미옥: 들깨잎 중의 폴리페놀 산화효소의 정제 및 특성. *약학회지* **35**, 222 (1991).
- 6) Ponting, T. D. and Joslyn, M. A.: Ascorbic acid oxidation and the browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem.* **19**, 49 (1948).
- 7) Valero, E., Varon, R. and Garcia-Carmona, F.: Characterization of polyphenol oxidase from Airen grapes. *J. Food Sci.* **53**, 1482 (1988).
- 8) 하영득, 이미옥: 감자 Polyphenol oxidase의 효소학적 성질 및 아황산염에 의한 활성억제 효과. *한국영양 식량학회지* **17**, 198 (1988).
- 9) Richard, A. L.: The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**, 969 (1988).
- 10) Kahn, V.: Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on *o*-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado and banana. *J. Food Sci.* **50**, 111 (1985).
- 11) Rzepecki, L. M. and Waite, J. H.: A chromogenic assay for catechol oxidase based on the addition of L-proline to quinone. *Anal. Biochem.* **179**, 375 (1989).
- 12) Ben-shalom, N., Kahn, V., Harel, E. and Mayer, A. M.: Catechol oxidase from green olives-properties and partial purification. *Phytochemistry* **16**, 1153 (1977).