

들깨잎 polyphenol oxidase의 세포내 분포 및 특성

김안근*·김유경

숙명여자대학교 약학대학, 서울특별시 용산구 청파동

(Received August 7, 1999)

Subcellular Distribution and Characteristics of Polyphenol Oxidase from *Perilla frutescens* Leaves

An Keun Kim and Yoo Kyung Kim*

Collage of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul, 140-742, Korea

Abstract — Polyphenol oxidase (PPO) activity in 200×g (cell wall), 4,000×g (plastid), 100,000×g (mitochondrial) and soluble fractions of the perilla leaves was monitored in the upper, middle and lower sections of the plant. In the course of plant growth, PPO activities in plastid and mitochondrial fractions were decreased, while those in cell wall fraction were maintained. During growing process, specific activities and PPO activities of each fraction were decreased, while total phenol content were decreased in middle (middle) and then increased in later stage (lower). Cell wall, plastid, mitochondrial (pellet) and soluble fraction had slightly different pH optima and substrate specificities. Isoenzyme patterns were identical in two bands for PPO activity in different subcellular fractions. Their molecular weights were 37KD and 48KD respectively.

Keywords □ Polyphenol oxidase, *Perilla frutescens*.

Polyphenol oxidase(PPO, EC 1.14.18.1, monophenol monooxygenase 또는 tyrosinase; EC 1.10.3.2, *o*-diphenol : O₂ oxidoreductase)는 자연계에 광범위하게 분포하고 있으며 특히 식물체에서는 효소적 갈변에 관여하여 monophenol류나 diphenol류와 반응하여서 이에 일치하는 *o*-quinone을 형성하고 형성된 *o*-quinone은 중합반응으로 갈색색소를 형성한다. 식물체에 노화가 일어나기 이전에는 일반적으로 PPO는 세포내에서 기질과 격리되어 있어 활성을 나타내지 않으나 세포손상이나 노화에 의해 기질과 반응하므로써 활성을 나타낸다.¹⁾ 갈변현상은 식물이 갖는 외부침입에 대한 방어 기전이기도 하지만 신선도와 품질을 떨어뜨리는 중요한 요인으로 작용하기도 한다.

이 효소는 불활성형 혹은 잠재적 형태로 존재하는

경우도 있는데 산·염기 처리, 요소, sodium lauryl sulfate(SDS) 같은 음이온 계면활성제 처리, 단백분해효소 등에 의해 활성형으로 전환되며²⁻⁶⁾ Triton X-114는 잠재적인 형태를 활성화하거나 변성을 야기하지 않고 추출할 수 있으며⁷⁻⁸⁾ 이 추출액은 SDS 등에 의해 활성형으로 전환된다고 알려져있다.

또한 PPO는 식물 조직의 노화, 과일이나 채소의 수확 후 저장 과정 중에 PPO의 활성이 감소하는 것으로 알려져 있으며,¹⁾ 특히 사과와 성숙 과정에서 페놀성 물질의 함량과 PPO 활성이 감소하며⁹⁾ 감자 괴경(tuber)에서는 성장 과정 동안 효소 활성이 증가하고 성숙한 잎에서는 어린 잎에 비해 낮은 활성을 나타냈다.¹⁰⁾

이 효소의 기질인 phenol성 화합물이 돌연변이원성도 있는 것으로 알려져 있어 식물의 성장, 노화됨에 따라 phenol성 물질의 함량변화 및 PPO의 활성변화와의 관계를 알아보기 위하여 일차적으로 세포내 분획에서의 PPO의 분포 및 특성, 또한 식물 성장에 따른

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

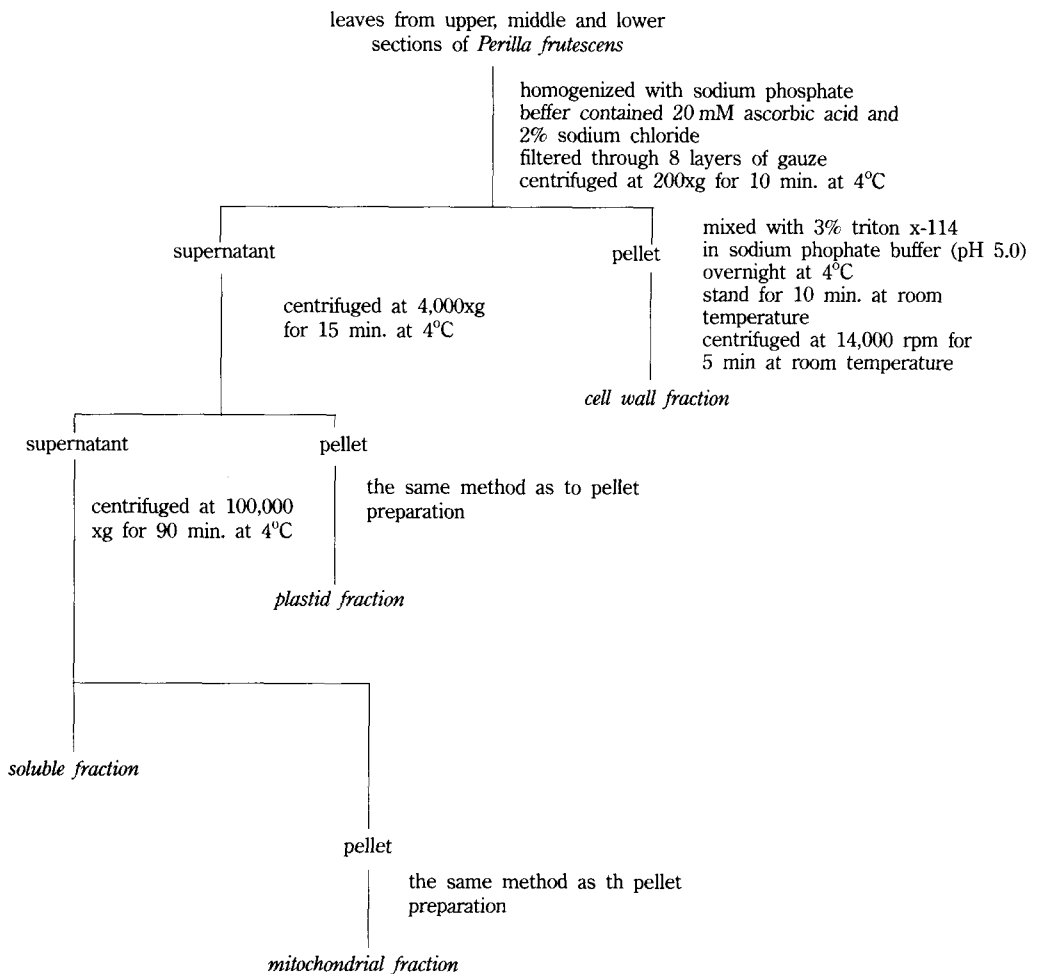
PPO의 활성 변화 및 phenol성 화합물의 함량 변화를 검토하고자 하였다.

실험방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 들깨잎은 개화시기에 따른 분류로 후생중에 속하며 줄기가 녹색을 띤다. 실험에 사용된 들깨잎은 성장단계에 따른 활성과 phenol 함량, 활성위치, 단백질패턴을 조사하기 위해 착엽 위치에 따라 각각 1-3엽은 상, 4-5엽은 중, 7-8엽은 하엽으로 구분하여 실험에 사용하였으며 효소특성은 상, 중, 하엽 추출물을 동량 혼합하여 사용하였다.

시약 및 기기 - 시약은 sodium phosphate mono-basic, sodium phosphate dibasic, sodium chloride,

sodium carbonate anhydrous(Wako pure chemical industries), sodium bicarbonate, copper(II) sulfate, sodium hydroxide, citric acid, sodium citrate, hydrochloric acid, tannic acid(Yakuri pure chemical Co.), trichloroacetic acid, ascorbic acid, *tert*-butylcatechol, bovine serum albumin, chlorogenic acid, acrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide, ammonium persulfate, TEMED, brilliant blue R-250, bromophenol blue, tris(hydroxymethyl)aminomethane, pyrocatechol (Sigma chemical Co.), triton X-114, folin-denis reagent, caffeic acid, hydrocaffeic acid(Fruka AG), folin & ciocalteu's reagent(Ajax chemicals), methanol, glacial acetic acid, sodium lauryl sulfate(Junsei chemical Co.), molecular weight standards(Bio-rad)를



Scheme 1-Subcellular fractionation of *Perilla frutescens* leaf PPO.

사용하였다. pH meter(Fisher scientific AR50)를 이용하여 조제한 완충액으로 추출하여 각 분획을 low temperature centrifuge(Hanil supra 28k) 및 ultra-centrifuge(Beckman optimatm xl-100k)로 분리한 후 침전은 재추출하여 microcentrifuge(Hanil HM-150 IV)로 분리하여 spectrophotometer(Bechman DU-650)로 활성 및 단백질량을 측정하였고, electrophoresis cell(Novex Xcell II)을 사용하여 단백질과 활성 부분의 분자량을 측정하였다.

효소의 추출 - PPO는 Diane 등⁸⁾의 방법을 응용하여 'cell wall'(200×g), 'plastid' (4,000×g), 'mitochondrial' (100,000×g), soluble fraction으로 분리하였다.

신선한 상태의 들깨잎을 바로 채취하여 2% sodium chloride, 20 mM ascorbic acid를 포함하는 50 mM phosphate buffer (pH6.0)를 가하여 blender에서 1분간 마쇄하였다. 그 마쇄액을 8겹 거즈로 여과한 후, 200×g에서 10분간 원심분리하여 침전은 따로 보관하고 그 상등액은 4,000×g에서 15분간 원심분리하여 침전은 따로 보관하고 그 상등액은 100,000×g에서 90분간 원심분리하여 침전은 따로 보관하고 상등액은 soluble fraction으로 보관하고, 이전에 얻은 침전을 3% Triton X-114를 포함하는 50 mM phosphate buffer (pH 6.0)로 추출하여 10,000 rpm에서 원심분리한 상등액을 각각 'cell wall', 'plastid', 'mitochondrial' 분획으로 하였다(Scheme 1). 최적 pH와 기질특이성에 사용된 효소액은 상, 중, 하엽의 추출액을 각각 균등하게 혼합하여 사용하였다.

단백질 정량 - bovine serum albumin을 표준품으로 하여 TCA-Lowery법¹¹⁾으로 측정하였다.

효소 활성 측정 - 분광광도계로 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 5 mM *tert*-butylcatechol를 포함하는 50 mM phosphate buffer(pH6.0) 0.95 mL와 효소액 50 μl를 30°C에서 10분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid 0.2 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후 기질 산화에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소활성 1 단위는 400 nm에서 분당 흡광도 0.001을 변화시키는 광학밀도로 정하였다.

페놀성 물질 정량 - 80% ethanol로 추출하여 Folin-Denis법¹²⁾으로 측정하였다.

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis - 각 분획별 활성을 측정한 액을 32 μl씩 10% SDS polyacrylamide gel에 주입하여 125 mV에서 약 90-100

분간 전기영동한 후 gel을 100 mM *tert*-butylcatechol에서 약 30분간 반응시키고, 한편은 coomassie blue로 60분간 염색한 후 탈색액에서 overnight하여 활성부위와 단백질 띠를 확인하였다.

최적 pH - *tert*-butylcatechol을 기질로 하여 최종농도가 5 mM가 되도록 하고 50 mM citrate buffer와 50 mM phosphate buffer로 pH를 3.5-8.0 범위로 변화시키면서 각 분획별 효소액을 10분씩 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

기질 특이성 - 각 분획의 최적 pH에서 기질로서 *tert*-butylcatechol, 4-methyl-catechol, pyrocatechol, chlorogenic acid, caffeic acid, hydrocaffeic acid를 사용하여 효소에 대한 기질 특이성 검토하였다.

실험결과 및 고찰

효소의 추출 - 본 실험에서는 세포내 분획에서의 효소 활성의 변화를 검토하기 위해서 원심 분리를 이용하여 들깨잎의 상, 중, 하엽으로부터 'cell wall' (200 ×g), 'plastid' (4,000×g), 'mitochondrial' (100,000×g), soluble fraction으로 분리하였다.⁸⁾ 원심분리할 때 pellet으로 분리되는 fraction(cell wall, plastid, mitochondria)은 50 mM sodium phosphate buffer로 추

Table I-PPO activity in the leaves from the upper section of *Perilla frutescens*

Fraction	volume (ml)	Enzyme Activity (units/ml)	Total activity (units)	Protein content (mg/ml)	Specific Activity (units/mg)
200×g	1.5	3165	4848	0.371	8531
4000×g	1.5	2943	4415	0.386	7624
100,000×g	1.0	2676	2676	0.305	8774
Soluble	39	12773	498148	2.860	4466
Total activity			510,087		

Table II - PPO activity in the leaves from the middle section of *Perilla frutescens*

Fraction	volume (ml)	Enzyme Activity (units/ml)	Total activity (units)	Protein content (mg/ml)	Specific Activity (units/mg)
200×g	1.5	3344	5016	0.707	4830
4000×g	1.5	2222	3333	0.344	6459
100,000×g	1	1249	1249	0.293	4263
Soluble	41	8732	358012	5.720	1527
Total activity			367,610		

Table III—PPO activity in the leaves from the lower section of *Perilla frutescens*

Fraction	volume (ml)	Enzyme Activity (units/ml)	Total activity (units)	Protein content (mg/ml)	Specific Activity (units/mg)
200×g	1.5	3043	4565	0.804	3785
4000×g	1.5	1799	2699	0.305	5898
100,000×g	1	607	607	0.276	2199
Soluble	40	5550	222000	6.871	808
Total activity			229,871		

출한 액에서는 활성을 나타내지 않고 triton X-114를 이용한 temperature-induced phase separation method⁶⁻⁷⁾로 추출한 액에서 활성을 나타내었고 이 분획에 sodium lauryl sulfate를 가하여도 활성에 변화가 없었다.

효소활성 및 총페놀함량 - 들깨잎의 상, 중, 하엽의 분획별 효소활성을 측정된 결과는 각각 Table 1, 2, 3

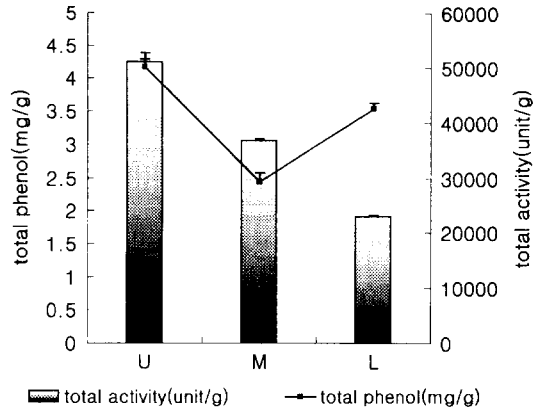


Fig. 1 - Total PPO activity and phenolic content in the leaves of *Perilla frutescens*.

에 나타내었다. 효소활성은 성장의 초기단계인 상엽이 cell wall, plastid, mitochondria, soluble fraction 모

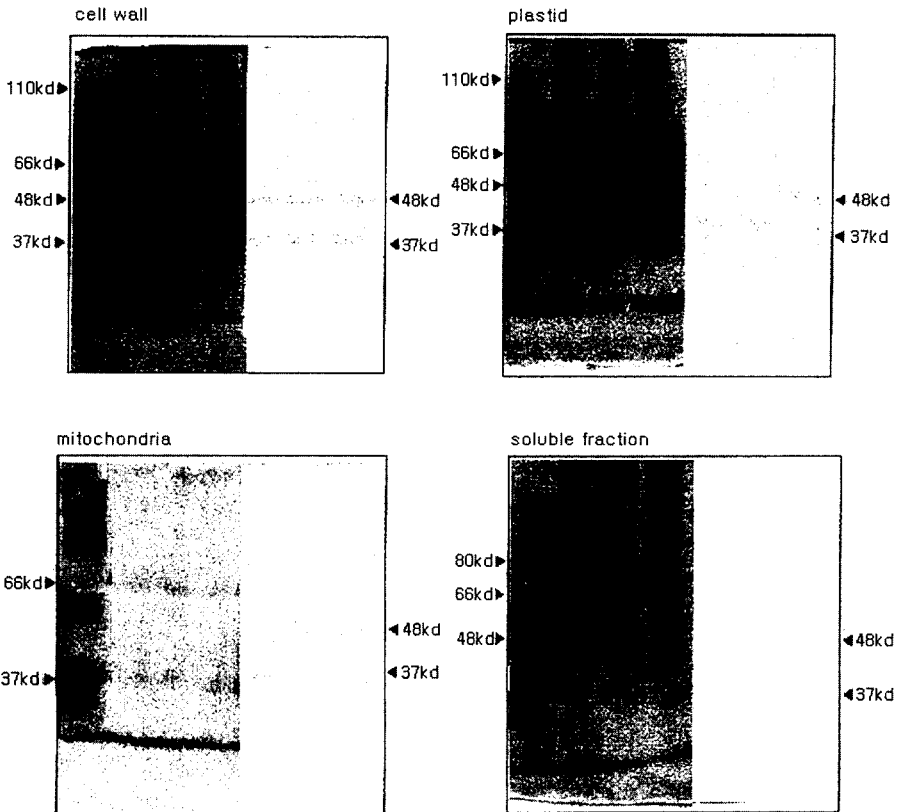


Fig. 2 - Electrophoretic analysis of PPO in the leaves of *Perilla frutescens*. Isoenzyme patterns of PPO were obtained in each fraction of the leaves from each section (lane 1, 4, upper; lane 2, 5, middle; lane 3, 6, lower). Electrophoresis were performed as described in the experimental. (lane 1, SDS-PAGE standard; lane 2, 3, 4, gel stained with coomassie blue for protein; lane 5, 6, 7, gel stained with tert-butylcatechol for PPO activity).

두에서 비활성과 총효소활성이 가장 높고 중엽, 하엽 순으로 감소하였다. 반면 총페놀함량은 중엽에서는 감소하나 하엽에서는 다시 약간 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 1). 분획별로 효소활성과 단백질량과의 관계를 보면 plastid와 mitochondria fraction의 경우 효소활성은 잎이 성장하면서 감소하고 단백질량은 그대로 유지되는 반면 cell wall은 활성은 큰 변화없이 단백질량이 2배정도 증가하고, soluble 분획의 경우 활성이 지속적으로 감소하고 단백질은 계속 증가하는 양상을 보였다. 들깨잎이 성장함에 따라 PPO 활성의 감소가 나타나는 것은 잎이 노화됨에 따라 세포내 막의 붕괴 등에 의해 PPO 소비증가로 활성이 저하되거나 PPO

생성 저하 등에 의해 효소활성이 감소하는 것으로 추정된다.⁸⁾ 노화가 진행됨에 따라 mitochondria와 plastid에서 활성이 감소하는 반면 cell wall에서는 활성이 유지되는 것은 mitochondria와 plastid에서 cell wall로 효소이동이 있지 않을까 생각된다.

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis - 들깨잎의 각 분획에 대하여 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 기질로 염색하여 활성위치를 확인한 결과 모든 분획에서 48KD와 37KD의 활성을 가진 2개의 띠가 나타났으며 coomassie blue 염색을 하여 단백질 띠를 확인한 결과 cell wall과 plastid fraction의 경우에는 활성부위와

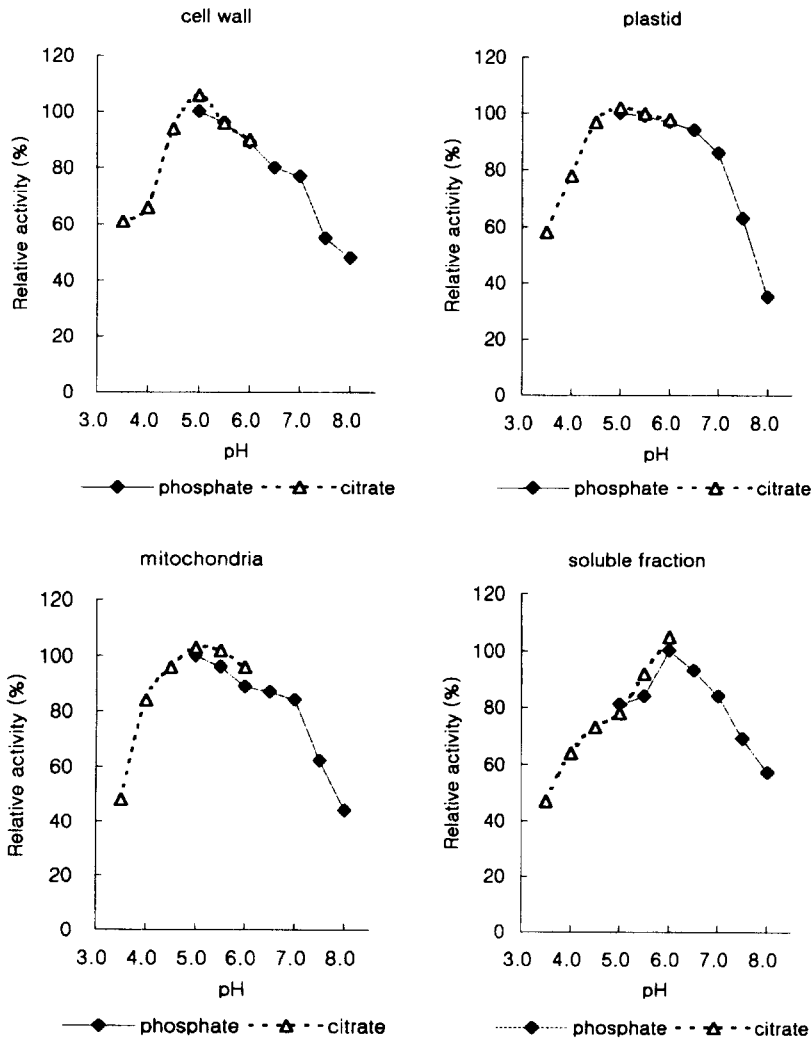


Fig. 3 - Effect of pH on PPO activity in each fraction of leaves from *Perilla frutescens*.

일치하는 위치에 단백질 띠가 나타났고 그 외 66KD와 110KD 에서도 띠가 보였다. mitochondria fraction에서는 37KD와 일치하는 띠와 66KD에 단백질 띠가 나타났고, soluble fraction에서는 37KD 위치에 띠가 거의 보이지 않고 48KD 위치에 희미한 띠가 나타나고 66KD 위치에 띠가 강하게 나타났다. Simon 등¹³⁾에 의하면 broad bean에서는 단일한 60KD의 단백질을 검출되고 proteolytic cleavage(C-말단)에 의해 활성의 소실없이 42KD으로 검출된다고 하였고 spinach의 경우에도 64KD의 polypeptide가 luminal PPO⁶⁾로서 이전에 보고된 42.5KD PPO의 precursor라고 하였다.

최적 pH - 각 분획의 최적 pH는 *tert*-butylcatechol을 기질로 하여 pH3.5-8.0 범위에서 활성을 측정 한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. cell wall, plastid, mitochondria fraction(membrane)에서는 pH5.0에서 최대활성을 나타내었고, soluble fraction의 경우에는 pH6.0에서 최대활성을 나타내었다. 사과, 배, 복숭아, 포도, 바나나, 아보카도, 감자, 버섯 등 많은 식물의 PPO에서 최적 pH는 5.0에서 7.0 사이로 보고되어 있다.¹⁴⁾

기질특이성 - 각 분획의 효소를 6가지 기질에 대해 실험한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. *tert*-butylcatechol에 대하여 모두 상대적으로 높은 기질 특이성을 나타내었고 cell wall, plastid, mitochondria (membrane) fraction은 4-methylcatechol, chlorogenic acid, pyrocatechol 순으로, soluble fraction은 chlorogenic acid, 4-methylcatechol, pyrocatechol 순으로 활성이 감소하여 차이를 보였다.

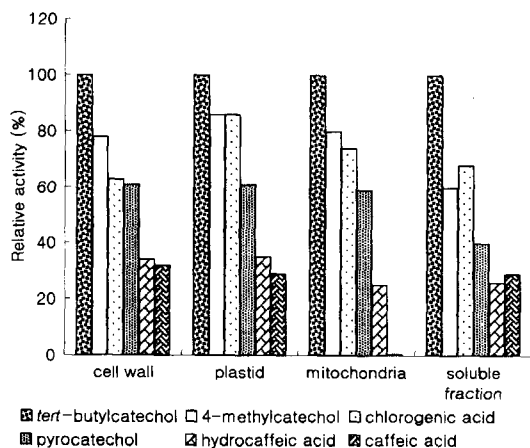


Fig. 4 - Substrate specificities of PPO in each fraction of leaves from *Perilla frutescens*.

결론

들깨잎의 PPO의 활성과 페놀성 물질의 함량은 어린 잎의 경우에 가장 높고 성장함에 따라 활성과 페놀성 물질 함량이 동시에 감소하는 경향을 보이나 노화 단계에서 활성은 계속 감소하고 페놀성물질은 다시 증가하는 양상을 나타내는데 여러 식물종에 따라 다양한 결과를 나타내는 것으로 보고되어 있다.

원심분리시 침전으로 분리되는 분획은 triton x-114로 추출하므로써 바로 활성을 나타내고 SDS에 의한 활성화 등의 영향이 없는 것으로 보아 활성형으로 막과 결합되었다고 생각되며 막과 가용성 분획에서의 최적 pH와 기질특이성이 다소 다르게 나타나는 것은 막에 결합된 형태로 존재하는 PPO와 가용성 PPO과의 특성에 따른 것으로 사료된다. 분획에 따른 전기영동 결과 모든 분획에서 PPO 활성을 나타내는 동일한 2개의 띠를 확인했고 분자량은 각각 37KD와 48KD 이었다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 여자대학교 연구기반확충사업(kistep)의 지원금에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Diane, M. B., Lee, C. Y. and Frank W. L. : Changes in the activity and subcellular distribution of PPO in 'delicious' apples during controlled atmosphere storage. *J. Food Biochem.* **15**, 185 (1990).
- 2) Mayer, A. M. and Harel, E. : Polyphenol oxidase in plants-review. *Phytochemistry* **26**, 11 (1979).
- 3) Swain, T., Mapson, L. W. and Robb, D. A. : Activation of *Vicia faba*(L) tyrosinase as effected by denaturing agents. *Phytochemistry* **5**, 469 (1966).
- 4) Jimenez-Atienzar, M., Pedreno, M. A. and Garcia-Carmona, F. : Activation of polyphenol oxidase by polyamines. *Biochem. Int.* **25**, 861(1991).
- 5) Sanchez-Ferrer, A, Laveda, F. and Garcia-Carmona, F. : Substrate-dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactans *J. Agric Food Chem.* **41**, 1583 (1993).

- 6) Sanchez-Ferrer, A, Villalba, J. and Garcia-Carmona, F : Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase *Phytochemistry* **91**, 1321 (1989).
- 7) Golbeck, J. H. and Cammarata, K. V. : Spinach thylakoid polyphenoloxidase. Isolation, activation and properties of native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* **67**, 977 (1981).
- 8) Sanchez-Ferrer, A, bru, R. and Garcia-Carmona, F : Partial purification of a thylakoid-bound enzyme using temperature-induced phase partitioning. *Anal. Biochem.* **184**, 279 (1990).
- 9) Masatsune, M., Mie, T, Masami, T., Seiichi, H. and Katsuyoshi, K. : Relationship between apple ripening and browning: Changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **43**(5), 1115 (1995).
- 10) Peter, W. T., Ian, B. D. and Simon, P. R. : Polyphenol oxidase in potato. *Plant Physiol.* **109**, 525 (1995).
- 11) Bailey, J. J. : *Techniques in protein chemistry*, Elsevier Publishin Co., New York (1967).
- 12) Kidron, M., Harel, E. and Mayer, A. M. : Catechol oxidase activity in grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **29**(1), 30 (1977).
- 13) Simon P. R. and Lan B. D. : Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiol.* **99**, 317 (1992).
- 14) Zawistowski, J., Costas G. B. and Eskin N. A. M. : Polyphenol oxidase. In: Robinson D. S., Eskin N. A. M. (ed) : *Oxidative enzymes in foods*, Elsevier-applied science p. 217 (1992).