

아스코르빈산과 티올류 및 유기산이 폴리페놀 산화효소 활성에 미치는 영향

김안근 · 김유경*#

숙명여자대학교 약학대학, *서울시보건환경연구원
(Received June 14, 2001; Revised July 5, 2001)

Effects of Ascorbic Acid, Thiols and Organic Acid on Polyphenol Oxidase Activity

An Keun Kim and Yoo Kyung Kim*#

Collage of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul, 140-742,
*Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health
and Environment, Seoul, 137-130, Korea

Abstract — The effects of ascorbic acid, thiols such as cysteine, *n*-acetyl-L-cysteine, glutathione, thiourea, 2-mercaptoethanol and dithiotreitol and organic acids such as malic acid, citric acid, glycolic acid, taurine and kojic acid on polyphenol oxidase (PPO) activity were studied in order to establish if it reacts with oxidized product and/or directly inhibits the enzyme. To investigate the mechanism, the quantification of *t*-butylcatechol and 4-methylcatechol (phenolic compounds) as substrates, their oxidized product and sulphhydryl colorless additional compounds were determined by high performance liquid chromatograph (HPLC) method. Chromatographic results indicate that ascorbic acid, organic acids and lower level of cysteine reduced oxidized product of substrates back to their respective positions of *o*-diphenols. On the other hand, other thiols and high level of cysteine reacted with oxidative product of *o*-diphenols and then produced sulphhydryl colorless compounds. Cysteine appears to have two types of mechanism of actions in the formation of oxidative products of substrates depending on its concentration; ascorbic acid-type and other thiols-types. The effect of ascorbic acid with thiols on polyphenol oxidase was determined by same method. Chromatographic results indicate that ascorbic acid was more reactive with oxidized product of substrates than thiols.

Keywords □ Polyphenol oxidase, ascorbic acid, thiols

Polyphenol oxidase(PPO)는 구리를 함유하는 metalloenzyme으로서¹⁻³⁾ 동물에서는 melanization에 관여하며 식물에서는 효소적 갈변에 관여하는 것으로 알려져 있다. 많은 식물중에서 PPO는 잠복적 형태로 존재하며 활성화되기 위해서는 단백질 가수분해나 계면활성제, 산 또는 염기 처리등이 필요하다.⁴⁾ PPO는 그 생리학적인 작용은 아직 자세히 규명되어 있지 않으나 잠복적 형태로 존재하는 PPO가 병변에 의해 활성화

되므로서 숙주방어기전에 관여하기도 하고,⁵⁻⁶⁾ photosystem II particle에서 PPO가 발견되는 것으로 보아 광합성 전자전달의 매개체로서 작용한다고 추정된다.⁷⁾ 이 효소는 과일이나 야채에 존재하여 갈변을 일으키는데 L-cysteine과 glutathione, sodium bisulfite 등은 효소의 반응생성물에 반응하여 무색의 안정한 중합체(quinone coupler)을 형성하므로써 갈변방지 효과를 나타낸다고 알려져 있다. Ascorbic acid와 glutathione, cysteine이 tyrosinase 활성에 미치는 영향에 관한 연구로 고속액체크로마토그래프(ECD; electrochemical detector)로 검출하는 방법이 보고되어 있다.⁸⁻⁹⁾

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-710-9561 (팩스) 02-715-9498

Ascorbic acid와 glutathione은 반응산소와의 상호작용으로 redox buffer의 역할을 하는 주요한 세포내 수용성 항산화물질로서 phenoxy radical의 oxidative stress에 방어작용을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 또한 organic acid 중 kojic acid는 포유류의 tyrosinase의 melanogenesis에 대한 강한 저해작용을 갖고 있다고 한다.¹¹⁻¹²⁾

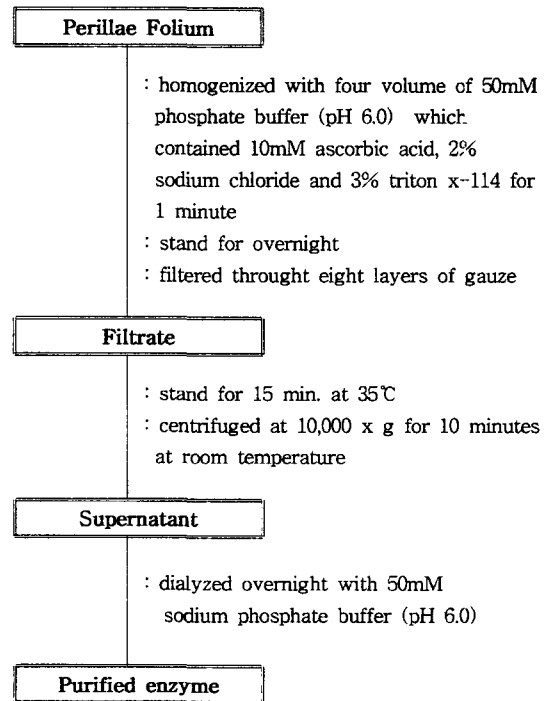
이에 본 실험에서는 ascorbic acid와 thiol류 및 organic acid이 어떤 방법으로 PPO의 활성에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 들깨잎에서 추출된 PPO를 이용하여 HPLC법으로 분석한 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료 - PPO를 얻기 위한 재료는 서울 근교에서 채배된 들깨잎을 채취하여 실험에 사용하였다.

시약 및 기기 - 시약은 sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, sodium chloride, thiourea, 2-2-mercaptoethanol Wako사(Japan) 제품을, glutathione, ascorbic acid, l-cysteine, n-acetyl-l-cysteine, dithiothreitol, sodium octanesulfonate, phosphoric acid, citric acid, malic acid, glycolic acid, kojic acid, taurine, tartaric acid는 Sigma사(U.S.A)에서 구입하였다. Triton x-114는 Fluka사(German) 제품을 사용하였다. High performance liquid chromatograph(Waters; U6k injector, 510 pump, 486 tunable absorbance detector), pH meter(Metrohm 654), Centrifuge(Hanil Supra 28K), spectrophotometer (Hewlett packard 8452A), water bath(S Lauda)를 사용하였다.

효소의 추출 및 정제 - Scheme 1에 따라 추출 및 정제를 한 효소(2589 unit/ml)를 실험에 사용하였으며 기질은 *o*-diphenol류 중 PPO에 대해 활성이 높게 나



Scheme 1 - Preparation of Perillae folium polyphenol oxidase.

타나는 *t*-butylcatechol과 4-methylcatechol을 사용하였다. 5 mM 기질(혹은 저해제를 첨가한 기질)에 정제한 효소를 10 μ l 가하여 혼화한 후 30°C circulating water bath에서 10분간 반응시켜서 효소반응액으로 사용하였다.

HPLC 분석조건 - Table I의 조건으로 분석하였다.

저해제의 영향 - Ascorbic acid와 thiol류 6종(cysteine, n-acetyl-l-cysteine, glutathione, thiourea, 2-mercaptoethanol, dithiotreitol) 및 organic acid류 6종(malic acid, citric acid, glycolic acid, taurine, kojic acid)을 다양한 농도로 기질 5 mM에 첨가하여 효소와 반응시킨 후 효소반응액을 Table I 조건으로 분석하여

Table I - Analytical condition of High liquid chromatograph

	<i>t</i> -butylcatechol as substrate	4-methylcatechol as substrate
column	μ -Bondapak C ₁₈	μ -Bondapak C ₁₈
flow rate	0.7 ml/min.	0.7 ml/min.
detector	UV 214 nm	UV 214 nm
mobile phase	50% methanol with 50 mM sodium octanesulfonate (pH 2.0)	40%(or *25%) methanol with 50 mM sodium octanesulfonate (pH 2.0)

*25% was used for analysis of product of n-acetyl-l-cysteine with 4-methylcatechol

저해제의 농도에 따른 기질과 효소와의 반응산물의 양과 저해제에 의해 형성되는 생성물의 양의 변화를 측정하였다.

따른 thiol류의 저해율을 비교하였다.

실험결과 및 고찰

Ascorbic acid 첨가에 따른 thiol류의 저해를 비교 - 기질 5 mM에 thiol류 3 mM과 0.5, 1, 3 mM 세가지 농도의 ascorbic acid를 첨가한 후 효소와 반응시킨 후 그 효소반응액을 Table I 조건으로 분석하여 기질과 thiol류의 생성물의 변화를 관찰하므로써 ascorbic acid 첨가에

PPO 활성에 저해작용을 한다고 알려진 ascorbic acid와 thiol류 및 organic acid의 PPO 활성에 대한 영향을 조사하기 위하여 들깨잎 PPO에 높은 활성을 나타내는 diphenol 물질인 t-butylcatechol 및 4-methylcatechol을

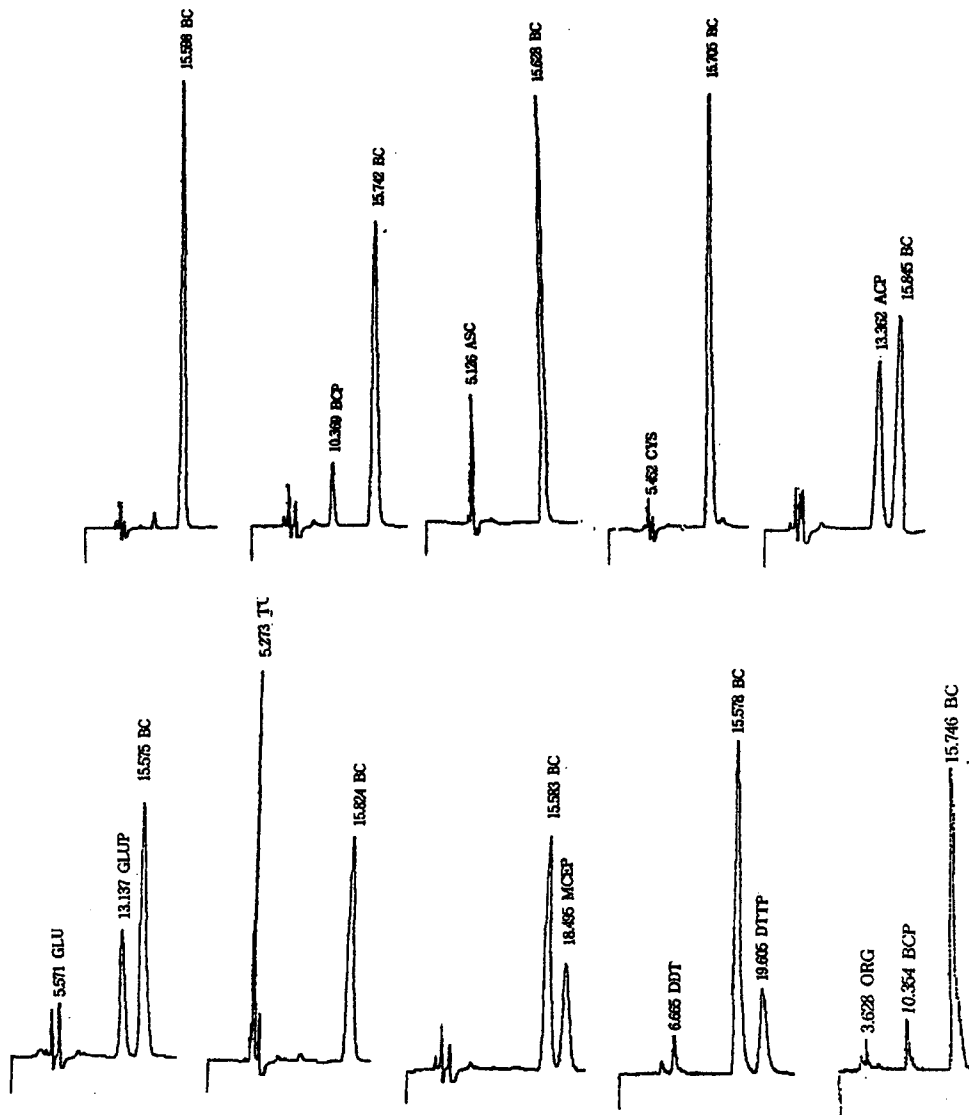


Fig. 1 - Chromatogram of *t*-butylcatechol(BC) and either ascorbic acid (ASC), cysteine (CYS), n-acetyl-l-cysteine (AC), thiourea (TU), glutation (Glu), 2-mercapto-ethanol (MCE), dithiotheithol (DTT) or organic acid (ORG) and their products (-P) on PPO-catalyzed oxidation of *t*-butylcatechol.

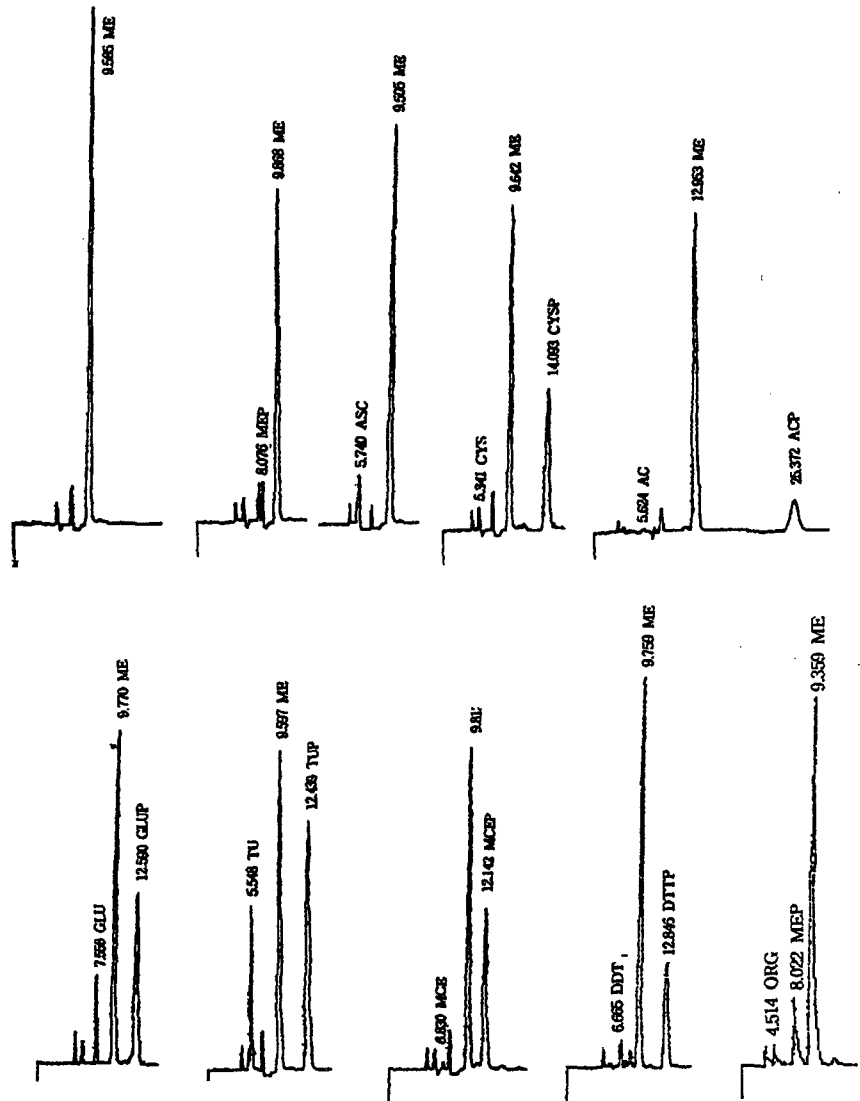


Fig. 2 - Chromatogram of 4-methylcatechol (ME) and either ascorbic acid (ASC), cysteine (CYS), n-acetyl-l-cysteine (AC), thiourea (TU), glutathion (Glu), 2-mercaptoethanol (MCE), dithiotheithol (DTT) or organic acid (ORG) and their products (-P) on PPO-catalyzed oxidation of 4-methylcatechol.

기질로 사용하여 그 기질 및 기질과 효소와의 반응산물, 반응산물과 thiol류에 의한 반응에서 얻어진 무색의 생성물에 대한 크로마토그램을 HPLC로 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Fig. 1, 2).

Ascorbic acid와 thiol류 및 organic acid의 영향 - 5 mM *t*-Butylcatechol을 기질로 사용한 경우 ascorbic acid와 0.5 및 1 mM cysteine은 기질과 효소와의 반응산물인 *o*-quinone을 다시 환원하여 기질이 재생성된다. 특히 cysteine의 경우에는 0.5 mM 이하

에서는 *o*-quinone이 첨가된 cysteine 농도에 반비례하여 감소하고 다른 화합물을 생성하지 않으며, 1 mM 이상에서 *o*-quinone과의 무색의 반응산물(quinone coupler)인 SH-product가 생성된다. 반면, 다른 thiol류는 첨가된 thiol류 농도와 반비례하여 *o*-quinone이 감소하는 동시에 SH-product의 양이 비례적으로 증가한다. 다만 2-mercaptoethanol의 경우에는 농도가 3 mM로 높아지면 SH-product의 양이 도리어 감소하는 양상을 보아 생성된 *o*-quinone을 모두 소비한 후 그

이상 농도의 2-mercaptoethanol에 의해서는 이 방법으로 검출되지 않는 다른 성분으로 전환되는 것으로 추정된다. 그리고 thiourea의 경우에는 420 nm에서 흡광도를 측정하여 갈변정도에 따른 저해율을 측정하는 실험에서와 일치하여¹³⁾ 10 mM 농도로 증가하여도 *o*-quinone이 계속 검출이 된다. Triton x-114로 처리하지 않은 이전의 들깨잎 효소에서는 기질로서 catechol

과 4-methylcatechol를 사용하여 cysteine과 glutathione의 저해율을 측정한 결과 100% 저해를 나타내는 농도가 같다고 보고되어 있는데, 본 실험에서는 저해율이 크게 나타나는 cysteine과 glutathione에서는 첨가량에 따른 기질량의 변화가 유의성있게 나타났으며 cysteine이 0.5 mM 농도에서 기질과 효소와의 반응산물이 검출되는 반면 glutathione의 경우에는 0.2 mM

Table II – The effect of ascorbic acid on PPO-catalyzed oxidation of *t*-butylcatechol

		<i>t</i> -butylcatechol (mM)	oxidative product (%)	SH-product (peak areax10 ⁷)
<i>t</i> -butylcatechol and enzyme ^c		5.0 ± 0.10	-	-
	mM	4.2 ± 0.08	100 ± 2.85	-
ascorbic acid	3	4.9 ± 0.07*	-	-
	1	4.9 ± 0.06*	-	-
	0.5	4.7 ± 0.10*	49 ± 0.99**	-
	0.1	4.3 ± 0.09	82 ± 2.33**	-

The data were expressed as means ± S.D. for 3 experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group^c (*p<0.05 and **p<0.01)

Table III – The effect of thiols on PPO-catalyzed oxidation of *t*-butylcatechol

		<i>t</i> -butylcatechol (mM)	oxidative product (%)	SH-product (peak areax10 ⁷)
<i>t</i> -butylcatechol and enzyme ^c		5.0 ± 0.10	-	-
	mM	4.2 ± 0.08	100 ± 2.85	-
cysteine	3	4.2 ± 0.05	-	8.05 ± 0.22
	1	4.8 ± 0.07*	-	1.24 ± 0.05
	0.5	4.9 ± 0.08**	41 ± 1.27**	-
	0.3	4.2 ± 0.10	56 ± 1.31**	-
	0.1	3.8 ± 0.09*	82 ± 1.59**	-
n-acetyl-l-cysteine	3	4.3 ± 0.15	-	6.56 ± 0.15
	1	4.1 ± 0.09	-	4.39 ± 0.12
	0.5	4.0 ± 0.13	56 ± 1.00**	2.08 ± 0.07
glutathione	1	3.7 ± 0.07*	-	3.55 ± 0.10
	0.5	3.8 ± 0.09	-	3.36 ± 0.08
	0.3	3.8 ± 0.08*	-	0.66 ± 0.02
	0.1	3.7 ± 0.11*	47 ± 1.33**	0.45 ± 0.02
thiourea	10	4.4 ± 0.09	25 ± 0.91**	0.07 ± 0.003
	3	4.2 ± 0.09	50 ± 1.47**	0.06 ± 0.003
	1	4.2 ± 0.10	95 ± 2.25	0.04 ± 0.002
2-mercapto-ethanol	3	4.2 ± 0.07	-	3.22 ± 0.09
	1	4.2 ± 0.04	-	4.09 ± 0.05
	0.5	4.3 ± 0.08	94 ± 1.72*	1.07 ± 0.04
dithiotreitol	3	4.4 ± 0.10	-	4.96 ± 0.15
	1	4.3 ± 0.14	-	3.34 ± 0.10
	0.5	4.3 ± 0.08	9 ± 0.26**	-

The data were expressed as means ± S.D. for 3 experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group^c (*p<0.05 and **p<0.01)

농도에서도 효소반응생성물이 불검출되어 glutathione 이 cysteine에 비해 저해율이 더 큼을 알 수 있었다 (Table II, III).

5 mM 4-Methylcatechol을 기질로 사용한 경우에는 ascorbic acid와 cysteine의 경우 *t*-butylcatechol을 기질로 한 경우와 비슷한 결과를 보이며, 2-mercaptoethanol의 경우 다른 thiol류와 동일한 결과를 보여서 SH-product의 양이 비례적으로 증가하며, thiourea의

경우에 1 mM 이하에서 효소와 기질과의 반응산물이 검출되어 *t*-butylcatechol에 비해 저해율이 큼을 알 수 있었다 (Table V, VI).

Mushroom tyrosinase에서는 thiol류와 *o*-diphenol의 효소반응생성물과의 sulfhydryl conjugate를 형성한다고 하고 ascorbic acid의 경우에는 기질과 효소의 반응생성물을 다시 환원시킨다고 하였는데,⁹⁾ 들깨잎의 PPO에서는 ascorbic acid의 경우에는 mushroom

Table IV - The effect of organic acid on PPO-catalyzed oxidation of *t*-butylcatechol

		<i>t</i> -butylcatechol (mM)	oxidative product (%)	SH-product (peak areax107)
t-butylcatechol and enzyme ^c		5.0 ± 0.07	-	-
	mM	4.2 ± 0.08	100 ± 2.85	-
malic acid	25	5.0 ± 0.12**	5 ± 0.13**	-
	10	4.6 ± 0.16**	79 ± 2.17**	-
	5	4.3 ± 0.12	91 ± 2.06**	-
citric acid	25	5.0 ± 0.19**	2 ± 0.05**	-
	10	4.5 ± 0.16**	18 ± 0.51**	-
	5	4.4 ± 0.08*	70 ± 1.63**	-
glycolic acid	25	5.0 ± 0.16**	34 ± 1.18**	-
	10	4.8 ± 0.14**	79 ± 2.36**	-
	5	4.4 ± 0.17*	90 ± 2.57**	-
tartaric acid	25	4.9 ± 0.13**	14 ± 0.47**	-
	10	4.4 ± 0.16**	21 ± 0.67**	-
	5	4.2 ± 0.11	74 ± 2.22**	-
taurine	50	4.5 ± 0.17*	63 ± 1.59**	-
	25	4.4 ± 0.14*	82 ± 1.78**	-
	10	4.4 ± 0.16*	85 ± 2.00**	-
	5	4.3 ± 0.16	88 ± 1.89**	-
kojic acid	5	5.0 ± 0.12**	4 ± 0.11**	-
	1	5.0 ± 0.10**	14 ± 0.64**	-
	0.5	4.5 ± 0.19*	58 ± 1.46**	-

The data were expressed as means ± S.D. for 3 experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group^c (*p<0.05 and **p<0.01)

Table V - The effect of ascorbic acid on PPO-catalyzed oxidation of 4-methylcatechol

		4-methylcatechol (mM)	oxidative product (%)	SH-product (peak areax107)
4-methylcatechol and enzyme ^c		5.0 ± 0.11	-	-
	mM	4.2 ± 0.10	100 ± 2.39	-
ascorbic acid	3	4.9 ± 0.07*	-	-
	1	4.5 ± 0.10**	-	-
	0.5	4.3 ± 0.05	43 ± 1.28**	-
	0.1	4.1 ± 0.09	69 ± 1.62**	-

The data were expressed as means ± S.D. for 3 experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group^c (*p<0.05 and **p<0.01)

Table VI – The effect of thiols on PPO-catalyzed oxidation of 4-methylcatechol

		4-methylcatechol (mM)	oxidative product (%)	SH-product (peak area $\times 10^7$)
4-methylcatechol and enzyme ^c		5.0 \pm 0.11	-	-
	mM	4.2 \pm 0.10	100 \pm 2.39	-
cysteine	3	4.2 \pm 0.14	-	7.26 \pm 0.16
	1	4.8 \pm 0.12**	-	2.12 \pm 0.07
	0.5	4.9 \pm 0.19**	27 \pm 0.65**	-
	0.1	4.1 \pm 0.07*	100 \pm 2.31	-
n-acetyl-l-cysteine	3	4.2 \pm 0.13	-	4.86 \pm 0.15
	1	4.1 \pm 0.16	-	4.10 \pm 0.11
	0.5	4.3 \pm 0.18	58 \pm 1.37**	1.60 \pm 0.05
glutathione	3	3.8 \pm 0.14**	-	7.78 \pm 0.19
	1	3.8 \pm 0.17**	-	7.04 \pm 0.18
	0.5	3.9 \pm 0.16**	-	3.65 \pm 0.12
	0.1	3.9 \pm 0.14*	12 \pm 0.35**	1.25 \pm 0.04
thiourea	3	4.2 \pm 0.18	-	11.5 \pm 0.29
	1	4.1 \pm 0.12	14 \pm 0.47**	3.65 \pm 0.12
	0.5	4.2 \pm 0.19	40 \pm 1.30**	0.55 \pm 0.01
2-mercapto-ethanol	3	4.1 \pm 0.16	-	4.86 \pm 0.14
	1	4.3 \pm 0.18	-	4.10 \pm 0.12
	0.5	4.3 \pm 0.13	58 \pm 1.36**	1.60 \pm 0.04
dithiotreithol	3	4.4 \pm 0.09	-	5.03 \pm 0.13
	1	4.3 \pm 0.13	-	1.36 \pm 0.04
	0.5	4.3 \pm 0.11	-	-
	0.1	4.2 \pm 0.16	12 \pm 0.35**	-

The data were expressed as means \pm S.D. for 3 experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group^c (*p<0.05 and **p<0.01)

tyrosinase와 동일한 기전으로 저해작용을 하며 cysteine을 제외한 다른 thiol류는 sulfhydryl conjugate를 형성하여 저해효과가 나타남을 확인 할 수 있었다.⁹⁾ 기질로서 4-methylcatechol를 사용한 Palmito PPO의 l-cysteine에 의한 저해작용의 연구에서 반응액에 quinone이 존재하지 않는 lag period가 보여지며 300 nm에서 측정된 결과 무색의 thiol-quinone 복합체를 형성함이 관찰되었다.¹⁴⁾ 들깨잎 PPO의 경우에는 cysteine의 저해작용은 저농도에서는 ascorbic acid와 유사한 작용과 1 mM 이상 고농도에서 sulfhydryl conjugate를 형성하는 두가지 반응이 나타났다.

Organic acid을 두가지 기질 모두에서 ascorbic acid에서와 유사한 방법으로 저해를 하는 것으로 보여지나, PPO의 저해제로 알려진 kojic acid를 제외하고는 ascorbic acid에 비해 매우 높은 농도에서 저해작

용을 볼 수 있었으며(25 mM에서도 완전 저해되지 않음), 특히 taurine의 경우에는 50 mM 이상에서도 효소활성이 완전히 저해되지 않아서 저해작용이 대부분 약하게 나타났다(Table IV, VII).

Ascorbic acid 첨가에 따른 thiol류의 저해율 – thiol류의 농도를 3 mM로 하고 ascorbic acid를 3, 1, 0.5 mM로 첨가한 경우 두가지 기질에서 유사한 결과를 나타내었는데 ascorbic acid 농도가 thiol류와 동일한 농도일 때 ascorbic acid가 우선적으로 소비되고 1 mM, 0.5 mM에서는 thiol류의 소비가 다시 증가하였다. 특히 저해정도가 약하다고 알려진 thiourea는 0.5 mM ascorbic acid에서 t-butylcatechol의 반응산물과의 무색의 생성물이 검출되고 4-methylcatechol에서는 전혀 검출되지 않았다(Table VIII, IX).

Rat tyrosinase를 항암제로 이용되는 etoposide를 기질로 하여 glutathione, ascorbic acid를 혼합하여

Table VII – The effect of organic acid on PPO-catalyzed oxidation of 4-methylcatechol

		4-methylcatechol (mM)	oxidative product (%)	SH-product (peak areax10 ⁷)
4-methylcatechol and enzyme ^c		5.0 ± 0.11	-	-
	mM	4.2 ± 0.10	100 ± 2.39	-
malic acid	25	4.8 ± 0.09**	17 ± 0.51**	-
	10	4.4 ± 0.15*	60 ± 1.48**	-
	5	4.3 ± 0.16	62 ± 1.33**	-
citric acid	25	5.0 ± 0.16**	14 ± 0.53**	-
	10	4.7 ± 0.19**	31 ± 0.89**	-
	5	4.3 ± 0.13	70 ± 1.75**	-
glycolic acid	25	4.9 ± 0.11**	31 ± 0.95**	-
	10	4.6 ± 0.16**	59 ± 1.28**	-
	5	4.4 ± 0.16*	70 ± 1.48**	-
tartaric acid	25	4.8 ± 0.19**	25 ± 0.85**	-
	10	4.6 ± 0.16**	56 ± 1.65**	-
	5	4.2 ± 0.17	100 ± 2.97	-
taurine	50	4.6 ± 0.18**	41 ± 1.45**	-
	25	4.4 ± 0.11**	49 ± 1.32**	-
	10	4.3 ± 0.10	76 ± 2.18**	-
	5	4.2 ± 0.16	96 ± 2.66	-
kojic acid	5	4.6 ± 0.14**	15 ± 0.51**	-
	1	4.3 ± 0.12	44 ± 1.17**	-
	0.5	4.2 ± 0.17	69 ± 1.71**	-

The data were expressed as means ± S.D. for 3 experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group^c (*p<0.05 and **p<0.01)

반응시킬 때 ascorbic acid가 우선 소비된 이후 glutathione이 소비되고, glutathione이 거의 소비된 이후에 기질인 etoposide가 소비되는 것으로 나타났다.¹⁵⁾

이러한 결과와 일치하여 들깨잎 PPO에 ascorbic acid와 thiol류를 혼합하여 반응한 결과, ascorbic acid는 동일한 농도에서는 thiol류에 비해 우선적으로 효소 반응산물을 환원하여 기질이 재생성되도록 한다. 반면 thiol류는 효소와 기질과의 반응산물과 2차로 반응하여 무색의 반응산물을 생성한다. ascorbic acid와 thiol 화합물 둘 다 효소와 기질의 반응산물에 대해 2차로 반응하므로 반응시간동안에는 무색을 유지하는 경우도 시간이 경과함에 따라 다시 갈색 혹은 적색(4-methylcatechol의 경우)을 띄게 된다. 그러므로 저해제로 알려진 이들 물질은 직접 PPO의 활성을 억제하는 것이 아니라 그 반응산물에 작용하여 저해작용을 나타냄을 알 수 있었다. organic acid의 경우에는 PPO에 저해작용이 있다고 알려진 kojic acid를 제외하고는 저해작용이 약하게 나타내었으며 반응기전은 ascorbic

acid와 유사한 것으로 생각된다.

결론

1. 갈변효소인 PPO에 대한 저해물질로 알려진 ascorbic acid와 thiol류 6종, organic acid 6종을 PPO의 두가지 기질(t-butylcatechol, 4-methylcatechol)에 각각 첨가하여 기질, 저해제, 각각의 반응생성물의 양을 HPLC법으로 측정하므로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 두가지 기질 모두에서 ascorbic acid과 0.5 및 1 mM의 cysteine에서는 기질과 효소의 반응산물의 환원에 의해 저해작용을 나타냈으며, 다른 thiol 화합물과 3 mM 이상의 cysteine에서는 기질의 양이 효소와 기질만 반응했을 때의 기질의 양과 일치하여 이는 반응산물이 기질로 재생성되지 않고 무색의 생성물로 전환되었다.

- 유기산 첨가시에는 kojic acid를 제외하고는 저해

Table VIII - The effect of ascorbic acid on thiols as inhibitors in PPO-catalyzed oxidation of *t*-butylcatechol

thiols (3 mM)	<i>t</i> -butylcatechol (mM)				SH-product (%)			
	added ascorbic acid (mM)				added ascorbic acid (mM)			
	0	0.5	1	3	0 ^c	0.5	1	3
<i>t</i> -butylcatechol and enzyme ^c	5.0 ± 0.10							
cysteine	4.2 ± 0.08	4.4 ± 0.08*	4.6 ± 0.12**	5.0 ± 0.16**	100 ± 2.63	76 ± 1.97**	45 ± 1.27**	0**
<i>n</i> -acetyl- <i>l</i> -cysteine	4.1 ± 0.11	4.4 ± 0.11*	4.8 ± 0.14**	4.8 ± 0.14**	100 ± 3.42	48 ± 1.46**	25 ± 0.93**	5 ± 0.15**
glutathione	4.2 ± 0.09	4.6 ± 0.09**	4.8 ± 0.09**	5.0 ± 0.17**	100 ± 2.01	83 ± 2.25**	56 ± 1.32**	7 ± 0.23**
thiourea	3.9 ± 0.12	4.9 ± 0.10**	5.0 ± 0.13**	4.9 ± 0.13**	100 ± 2.33	10 ± 0.35**	0**	0**
2-mercaptoethanol	4.1 ± 0.09	4.7 ± 0.07**	5.0 ± 0.11**	5.0 ± 0.16**	100 ± 3.27	49 ± 1.16**	37 ± 0.98**	19 ± 0.65**
dithiothreitol	4.2 ± 0.07	4.8 ± 0.13**	5.0 ± 0.12**	5.0 ± 0.13**	100 ± 1.71	73 ± 1.94**	63 ± 1.21**	30 ± 0.81**

The data were expressed as means ± S.D. for 3 experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group^c (*p<0.05 and **p<0.01)

Table IX - The effect of ascorbic acid on thiols as inhibitors in PPO-catalyzed oxidation of 4-methylcatechol

thiols (3 mM)	<i>t</i> -butylcatechol(mM)				SH-product (%)			
	added ascorbic acid (mM)				added ascorbic acid (mM)			
	0	0.5	1	3	0 ^c	0.5	1	3
4-methylcatechol and enzyme ^c	5.0 ± 0.11							
cysteine	4.2 ± 0.10	4.7 ± 0.11**	4.8 ± 0.14**	5.0 ± 0.13**	100 ± 2.45	44 ± 1.27**	29 ± 0.87**	15 ± 0.51**
<i>n</i> -acetyl- <i>l</i> -cysteine	4.2 ± 0.13	4.6 ± 0.14**	4.9 ± 0.12**	5.0 ± 0.14**	100 ± 2.82	31 ± 0.75**	21 ± 0.90**	0**
glutathione	4.0 ± 0.12	4.7 ± 0.08**	4.8 ± 0.11**	4.8 ± 0.14**	100 ± 2.48	32 ± 1.15**	26 ± 0.75**	80 ± 0.23**
thiourea	3.8 ± 0.12*	4.6 ± 0.12**	4.8 ± 0.13**	4.9 ± 0.16**	100 ± 3.03	0**	0**	0**
2-mercaptoethanol	4.2 ± 0.11	4.4 ± 0.10*	4.7 ± 0.16*	4.9 ± 0.10**	100 ± 2.99	49 ± 1.42**	37 ± 0.81**	19 ± 0.55**
dithiothreitol	4.2 ± 0.09	4.3 ± 0.16	4.8 ± 0.12**	4.8 ± 0.13**	100 ± 1.93	73 ± 1.80**	63 ± 1.73**	30 ± 0.75**

The data were expressed as means ± S.D. for 3 experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group^c (*p<0.05 and **p<0.01)

작용이 약하게 나타났고 작용기전은 ascorbic acid와 유사하였다.

2. 3 mM 일정 농도의 thiol류와 0.5, 1, 3 mM ascorbic acid을 첨가하여 두가지 기질에서 기질과 무색생성물의 양을 측정 한 결과는 다음과 같다.

Thiol류의 농도와 동일한 3 mM ascorbic acid에서는 ascorbic acid의 소비가 우세한 반면 무색생성물이 적게 검출되었고, 1 mM, 0.5 mM에서는 무색생성물의 양이 현저히 증가하는 경향을 보인다. 다만 thiourea의 경우에는 0.5 mM ascorbic acid 농도에서도 무색생성물이 검출되지 않았다.

감사의 말씀

본 연구의 일부는 숙명여자대학교 1999년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

- 1) Hunt, M. D., Eannetta, N. T., Yu, H., Newman, S. M. and John C. S. : cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase *Plant Molecular Biology* **21**, 59 (1993).
- 2) Newman, S. M., Eannetta, N. T., Yu, H., Prince, J. P., Vicente, M. C., Tanksley, S. D. and John C. S. : Organisation of the tomato polyphenoloxidase gene family. *Plant Molecular Biology* **21**, 1035 (1993).
- 3) Sherman, T. D., Vaughn K. C. and Duke S. O. : A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase. *Phytochemistry* **30**, 2499 (1991).
- 4) Asaka, M., Aoyama, Y., Nakanishi, R. and Hayashi, R. : Purification of a latent form of polyphenoloxidase La France pear fruit and its pressure-activation. *Biosci. Biotech, Biochem.* **58**(8), 1486 (1994).
- 5) Mayer A. M. : Polyphenol oxidase in plants - recent progress. *Phytochemistry* **26**, 11(1987).
- 6) Vaughn K. C., Lax A. R. and Duke S. O. : Polyphenol oxidase - the chloroplast enzyme with no established function. *Plant Physiol.* **72**, 659(1988).
- 7) Lax, A. R. and Vaughn, K. C. : Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* **96**, 26 (1991).
- 8) Robinson, S. P. and Dry, I. B. : Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiol.* **99**, 317(1992).
- 9) Nappi, A. J. and Vass, E. : Chromatographic analyses of the effects of glutathione, cysteine and ascorbic acid on the monophenol and diphenol oxidase activities of tyrosinase. *J. Liquid Chromat.* **17**(4), 793(1994).
- 10) Kagan, V. E., Talowich, J. C., Day, B. W., Goldman, R., Gantchev, T. G. and Stoyanovsky, D. A. : ascorbate in the primary reductant of the phenoxyl radical of etoposide in the presence of thiols both in cell homogenates and model systems. *Biochemistry* **33**, 9651 (1994).
- 11) Victoria M. V., Nobuhiko, K., Jun, M. and Mincent, J. H. : A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. *Analytical Biochemistry* **270**, 207 (1999).
- 12) Ernest, V. C., Cecil, K., Heino, H., Hansrue, G. : Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: In vitro comparisons of alkyl ester of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology* **57**, 663(1999).
- 13) 노진희 : Perilla frutescens britton 엽 중의 Phenolic acid의 산화 효소에 관한 연구. 숙명여대 석사학위논문. p. 22 (1987).
- 14) Robert, C., Richardforget, F., Pabion, M. and cadet, F. : A kinetic study of the inhibition of palmito polyphenol oxidase by l-cysteine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**(4), 1357(1996).
- 15) Kagan, V. E., Talowich, J. C., Day, B. W., Goldman, R., Gantchev, T. G. and Stoyanovsky, D. A. : Ascorbate is the primary reductant of the phenoxyl radical of etoposide in the presence of thiols both in cell homogenates and in model systems. *Biochemistry* **33**, 9651(1994).