

고들빼기의 갈변에 관한 연구

朴 秀 善 · 金 安 根

淑明女子大學校 藥學大學

Studies on the Browning of *Ixeris sonchifolia*

Soo Sun PARK and An Keun KIM

College of Pharmacy, Sook Myung Women's University, Seoul 140, Korea

Abstract—Polyphenol oxidase was purified from acetone powder extract of the root of *Ixeris sonchifolia*. The enzyme obtained by ammonium sulfate fractionation and sephadex G-200 gel filtration gave 51-fold purification over the crude extract. The purified enzyme showed activity toward chlorogenic acid, caffeic acid and pyrocatechol. The kinetics of thermal inactivation of the enzyme followed first-order reaction. Potassium cyanide and cysteine were potent inhibitors.

Keywords—*Ixeris sonchifolia* · polyphenol oxidase · purification · chlorogenic acid · caffeic acid · pyrocatechol · potassium cyanide · cysteine

Polyphenol oxidase(PPO, E.C.: 1.10.3.1)는 식물조직의 갈변을 촉매하는 효소이다. 갈변반응은 polyphenol성분이 PPO에 의해 quinone으로 되고 이것이 중합되어 색소물질이 생성되는 것이라고 알려져 있다. 일반적으로 고등식물의 각 조직에는 polyphenol물질이 존재하고 있으며, 또한 PPO가 공존하고 있다. polyphenol물질과 PPO의 생체내에서의 기능과 의의에 관하여서는 아직 잘 알려져 있지 않은 부분이 많으나 PPO 활성의 유도는 식물세포내의 어떤 생리적인 변화와 상관성이 있는 것으로 보고된 바 있다.¹⁻³⁾

Ponting 등(1948)⁴⁾은 사과조직 추출물중의 PPO가 ascorbic acid를 산화하며 Uritani 등(1952)⁵⁾은 흑반병균의 침범을 받은 고구마는 현저하게 변색되며 그 피해입은 부분의 인접조직층에서는 호흡효소의 활성이 커지고 동시에 이산화사가 일어나며 특히 polyphenol의 축적이 크게 증가된다고 보고하였다.

Imeseki(1959)⁶⁾는 *Viburnum* 속의 갈변현상에 관한 연구에서 갈변은 *Viburnum* 속의 polyphenol

성분인 chlorogenic acid가 산화효소에 의해 산화중합될 뿐 아니라 어떤 종류의 아민, 아미노산 특히 세포단백질도 갈변반응에 관여한다고 추정하였다.

Bouchilloux 등(1962)⁷⁾은 mushroom tyrosinase의 multiple form을 preparative electrophoresis와 hydroxyapatite chromatography법으로 분리하였다. 많은 종류의 과일, 예컨대 banana(Palmer, 1963)⁸⁾, avocado(Knapp, 1965)⁹⁾, pear(Rivas and Whitaker, 1973)¹⁰⁾, apple(Stelzig et al., 1972)¹¹⁾, cherry(Benjamin and Montgomery, 1973)¹²⁾, d'anjou pear(Halim and Montgomery, 1978)¹³⁾ 등은 PPO에 의한 산화로 갈변이 일어나는 것이라고 보고하고 있다.

Burnett(1971)¹⁴⁾는 mouse melanoma tissue의 crude homogenate를 urea가 함유되어 있는 polyacrylamide gel system으로 전기영동을 반복하여 tyrosinase를 분리정제 하였다. 또한 Balasingam 등(1970)¹⁵⁾은 고구마에서 o-diphenol oxidase를 분리하고, Loon(1971)¹⁶⁾은 tobacco

polyphenol oxidase의 isozyme의 존재를 확인하였고, 또한, tobacco mosaic virus(T.M.V.)에 감염된 tobacco 식물에는 PPO의 활성이 증가된다고 했으며, Sheen 등(1974)¹⁷⁾은 *nicotiana* 식물의 nodal tumor에 많은 chlorogenic acid의 축적이 일어난다고 보고하고 있다. Tripathi 등(1975)¹⁸⁾은 chlorogenic acid와 caffeic acid의 산화물은 세균에 대한 저항성에 중요한 역할을 하는 것으로 추정하고 있다. Park 등(1980)¹⁹⁾은 mango(*Mangifera indica* var. Haden)의 PPO를 85° 및 80°C에서 2, 4분 처리하였을 때 활성이 1/2로 감소되었고, sodium metabisulfite는 이 효소에 대한 가장 강력한 저해제이며, 이것에 반하여 ascorbic acid의 저해작용은 약하다고 하였다. Prabha 등(1980)²⁰⁾은 avogado (*Persea americana*)의 갈변은 catechin, epicatechin이 PPO에 의해 산화되어 일어나며 leuco-anthocyanidin도 갈변에 관여하는 것으로 보고하고 있다. 특히 polyphenol 함량이 큰 다엽은 홍차의 발효과정에서 catechin이 PPO의 작용으로 산화되어 홍차의 향기와 색소형성에 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

본 실험에 재료로 사용한 고들빼기 (*Ixeris sonchifolia* Hance)는 우리나라에서 옛부터 민간약으로도 이용되었으며, 또한 현재까지 식용으로 많이 이용되고 있다. 저자들은 이 식물의 물추출액과 알콜추출액이 Ehrlich carcinoma에 대한 항암성이 있다는 것을 추정할 바 있으며, chlorogenic acid를 T.L.C., P.P.C., G.L.C.로 확인한 바 있다. 본 식물을 식용으로 이용할 때는 장시간 물에 담가 두었다가 사용하며 그 수침액은 강한 갈색을 나타낸다. 이러한 현상은 이 식물체중에 갈변을 일으키는 효소가 존재하고 있을 것이라고 추정하게 하였다. 저자들은 이 갈변을 일으키는 효소를 분리하고 그 이화학적 성상을 검토하여 약간의 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

실험 방법

1) 재 료

신선한 고들빼기 (*Ixeris sonchifolia* Hance)를

서울 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

2) 시약 및 사용기기

Acetone, ammonium sulfate, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, pyrocatechol, pyrogallol, L-tyrosine, *m*-cresol, *p*-cresol, thiourea, potassium cyanide, disodium ethylenediamine tetraacetate는 Wako Pure Chemical Indust. Ltd. 제품을 사용하였고 chlorogenic acid, caffeic acid, *d*-catechin, protocatechuic acid, *o*-coumaric acid, *p*-coumaric acid는 Tokyo Kasei Chemical Industries, Ltd. 제품, quercetin은 E, Merck AG. Darmstadt 제품, adrenalin, L-Dopa, sephadex G-200, dialysis "sacks" (250-9U)은 Sigma 제품을 사용하였다.

본 실험에 사용한 기기는 pH meter (Orion Research), centrifuge (Sorvall, RC2-B), U.V. Spectrophotometer (Hitachi model 200-20), 냉동건조기 (Refrigeration for Science, Inc.) 등이다.

3) 방 법

i) 효소추출 및 정제

Acetone powder 제조는 신선한 고들빼기 뿌리를 -20°C에 저장한 후 사용하였다. 이 재료를 100g에 2배량의 빙냉한 아세톤을 넣고 blender로 2분간 마쇄하고 계속 아세톤으로 수회 씻어내려 여과한 후 냉동건조시켰다 (건조아세톤 powder 28g). 위의 acetone powder 25g을 potassium phosphate buffer (pH 6.5) 500ml 넣고 잘 혼합하여 추출한 후 여과하였다. 이 여액에 포화 (NH₄)₂SO₄를 소량씩 가하여 60% 포화시킨 후 10,000rpm에

Material (*Ixeris sonchifolia*, RT)

blended and washed with cold acetone

Acetone powder

extracted with 500ml of 0.05M potassium phosphate buffer (pH 6.5).

Extract

added with saturation ammonium sulfate to 60% saturation and centrifuged at 10,000 rpm for 30 min at 0°C.

Precipitation

added phosphate buffer (pH 6.5) and dialysis for 72 hrs. lyophilization.

Gelfiltration sephadex G-200

Scheme 1. Preparation of the polyphenol oxidase from the root of *Ixeris sonchifolia*

서 30분간 원심분리한 다음, 이것을 투석하여 냉동건조하고 0.05M phosphate buffer 소량에 녹여 gelfiltration에 사용하였다.

Gelfiltration은 phosphate buffer(pH 6.5)로 평형시킨 Sephadex G-200(column size 2.9×85 cm)에 위의 sample액 2.5ml를 가하여 위와 같은 buffer로 용출시켰다. 용출속도는 2.25ml/hr., 3ml/tube로 하였다.

ii) 효소활성도 측정

Sephadex G-200 분획중 활성이 가장 높은 분획을 효소활성 측정의 시료로 하였다.

최적온도는 pyrocatechol 0.5ml(최종농도 $5 \times 10^{-2}M$)을 기질로 하여 phosphate buffer (pH 6) 2.4ml, 효소액 0.1ml를 가해 총 3ml로 하여 15°C에서 40°C까지의 범위에서 5분간 반응시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

또한 열에 대한 안정성은 효소액 일정량을 반응관에 넣어 50, 60, 70, 80, 90°C 수욕에서 각각을 2, 4, 6, 10분 동안 가온한 후 즉시 병수에서 냉각시킨 후 위와 같은 방법으로 흡광도를 측정하였다.

최적 pH 측정은 모든 조건은 최적온도를 측정할 때와 동일한 방법으로 하였으며 pH는 5.0에서 8.0까지 변화시켜 25°C에서 측정하였다.

기질에 대한 특이성은 기질로서 mono, di, polyhydroxy 화합물을 사용하였다. 이들 화합물

중에서 chlorogenic acid, caffeic acid, pyrocatechol, *d*-catechin, protocatechuic acid, adrenalin, pyrogallol, *m*-cresol, *p*-cresol은 각각 최종농도 5 mM, tyrosine, Dopa, quercetin, *o*-coumaric acid, *p*-coumaric acid는 용해도가 적어 녹을 수 있는 농도로 하여 효소활성을 측정하였다.

저해제의 효소활성에 미치는 영향을 검토하기 위해서 저해제로는 KCN(10, 1mM), cysteine(10, 1mM), thiourea(10, 1mM), EDTA(100, 10mM)을 사용하였다. chlorogenic acid($4 \times 10^{-3}M$), pyrocatechol($3 \times 10^{-2}M$)을 기질로 하여 위의 저해제들을 각각 넣어 반응시켜 위와 같은 방법으로 측정하였다.

단백질의 함량은 Lowry-Folin법(1951)²¹⁾에 의하여 측정하였다.

결과 및 고찰

1) 효소정제

Fig. 1, Table I에서와 같이 여러 과정을 거쳐 정제된 고들빼기 효소는 crude extract에 비해 그 비활성이 약 51배나 더 커졌다.

2) 최적온도와 열에 대한 안정성

Fig. 2, 3은 효소활성에 대한 최적온도와 열에 대한 안정성을 검토한 결과이다. 도시된 바와

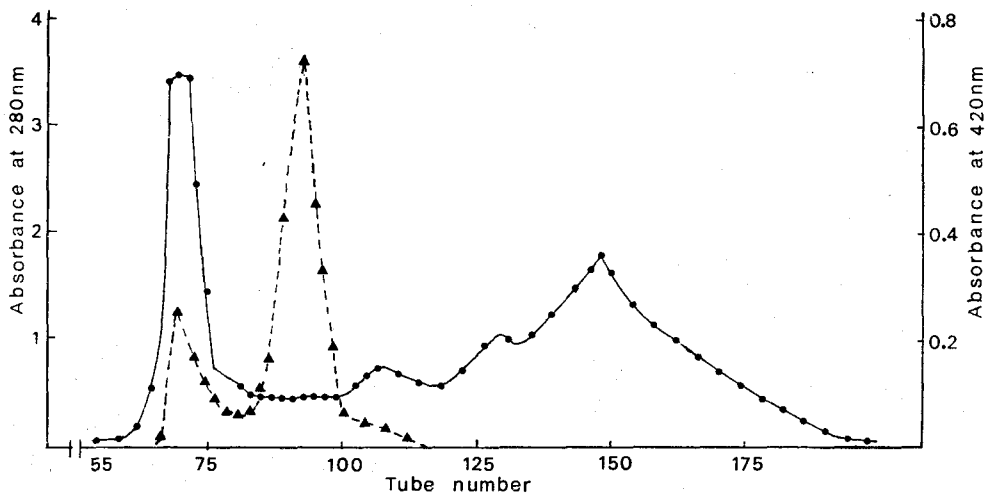


Fig. 1. Sephadex G-200 column chromatogram, column size, 2.9×85cm, flow rate, 2.25ml/hr., elution, 0.05M potassium phosphate buffer, pH 6.5, 3ml/tube.

—●— protein peak at 280nm ▲..... enzyme activity peak at 420nm

Table I. Purification of *Ixeris sonchifolia* polyphenol oxidase

Sample	PPO activity (Units ^{a)} /ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (Units/mg)	Purification (fold)
Crude extract ^{b)}	211	2.24	94	1.0
Acetone powder buffer extract	465	2.0	233	2.5
Ammonium sulfate fractionation(60%)	1,517	5.34	284	3.0
Gel-filtration using sephadex G-200	1,146	0.24	4,775	50.8

^{a)} One unit of PPO activity is defined as the amount of enzyme that caused a 0.001 extinction change in absorbance per min. at 420nm.

^{b)} The crude extract was prepared by homogenizing root of *Ixeris sonchifolia* with phosphate buffer (pH 6.5).

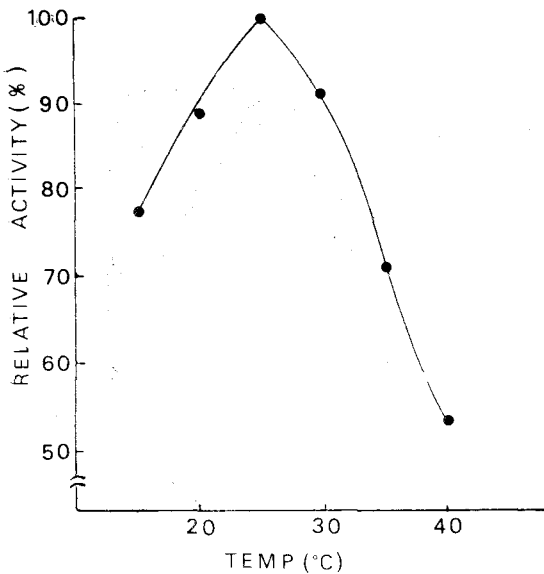


Fig. 2. Effect of temperature on enzyme activity.

같이 고들빼기에서 얻은 효소는 25°C에서 그 활성이 가장 크다. 또한 이 효소의 열에 대한 안정성은 비교적 높다고 할 수 있다. 이 효소의 활성은 60°C에서 약 32%, 70°C에서 57%, 80°C에서는 약 90%가 각각 감소되었으며 90°C에서는 그 활성이 완전히 소실되었다.

Benjamin 등은 cherry polyphenol oxidase는 75°C에서 그 활성의 20%가 남아있다고 하였으며, Hasegawa 등²²⁾은 dates polyphenol oxidase는 61°C에서는 그 활성에 아무런 영향이 없었으며, 67°C에서는 50%가 감소되고, 80°C에서는 100% 감소되었다고 보고한 바 있다.

Fig. 3.에서와 같이 열에 의한 효소 불활성의 속도는 온도상승과 비례되는 것으로 나타나 있으며 다른 식물에서의 PPO의 경우와 같이 열에

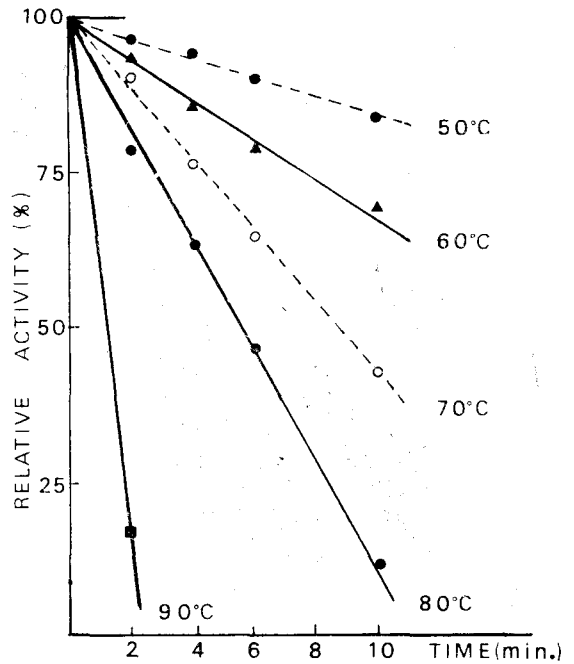


Fig. 3. Thermal inactivation on enzyme activity.

의한 효소의 불활성은 first-order kinetics를 보여주고 있다고 하겠다.

3) 최적 pH

Fig. 4는 PPO 활성에 대한 pH의 영향을 나타낸 것이다. 최적 pH는 6이다. 또한 Luh 등²³⁾은 peach PPO는 pH 6.2, Lee 등²⁴⁾은 beat PPO의 pH는 7, Balasingam 등²⁵⁾은 potato에서 얻은 효소의 pH는 5, green olive 효소²⁶⁾는 pH 4.5 등이 보고된 바 있다. 이러한 실험 결과를 통하여 PPO의 최적 pH는 식물종에 따라 다르다는 것을 알 수 있다.

4) 기질특이성

Table II는 고들빼기에서 분리한 효소의 mono,

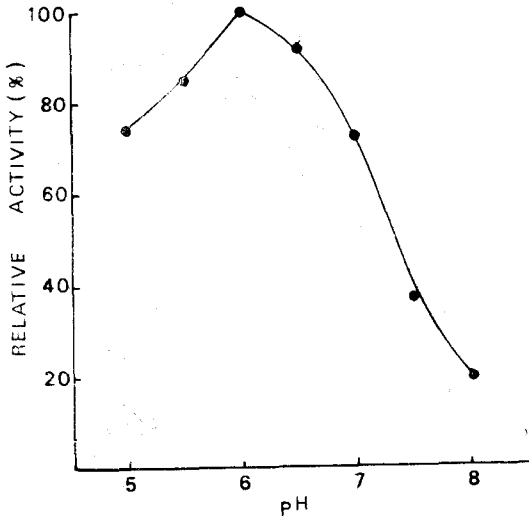


Fig. 4. Effect of pH on enzyme activity.

Table II. Substrate specificity

Substrate	Relative activity ^{a)}
Chlorogenic acid	100
Caffeic acid	92.5
Pyrocatechol	75.3
<i>d</i> -Catechin	19.1
Tyrosine	19.1
Protocatechuic acid	18.5
Adrenalin	6.9
<i>L</i> -Dopa	0
Pyrogallol	0
<i>m</i> -Cresol	0
<i>p</i> -Cresol	0
Quercetin	0
<i>o</i> -Coumaric acid	0
<i>p</i> -Coumaric acid	0

a) Activity is relative to that of chlorogenic acid oxidation

di, polyphenol에 대한 활성을 검토한 결과이다. 표에서 나타난 바와 같이 chlorogenic acid는 가장 양호한 기질인고로 각종 기질에 대한 활성은 chlorogenic acid의 활성을 100으로하여 비교하였다. 많은 식물에서 분리된 PPO의 그 기질에 대한 특이성은 광범위하다.

본 식물에서 분리한 효소는 monophenolic compounds에 대한 친화력이 거의 없는 것으로 나타났으며 그것에 비해 chlorogenic acid, caffeic

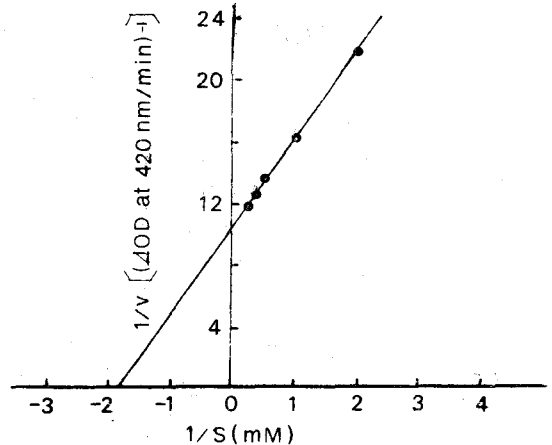


Fig. 5. Double reciprocal plot of the oxidation of chlorogenic acid.

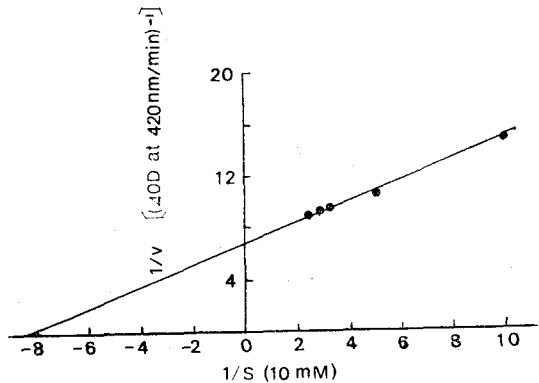


Fig. 6. Double reciprocal plot of the oxidation of pyrocatechol.

acid, pyrocatechol에 대한 친화력은 큰 것으로 나타났다. 또한 protocatechuic acid는 약간 산화되었을 따름이다. 이와 같이 cresolase활성은 거의 없었다. 이런 현상은 단백질의 정제과정중 단백질 구조에 어떤 변화가 일어날 가능성도 있으며, 또한 monophenol의 hydroxylation이 늦게 일어나기 때문일 것이라고도 추정하고 있다.

Chlorogenic acid의 K_m 값은 $5.4 \times 10^{-4}M$ 이며, pyrocatechol의 K_m 값은 $1.2 \times 10^{-3}M$ 이다. 이 K_m 값은 Habaguchi²⁷⁾의 carrot callus에서 얻은 효소의 chlorogenic acid에 대한 K_m 값($0.80 \times 10^{-4}M$) 보다는 크며 pyrocatechol의 K_m 값은 carrot callus의 pyrocatechol K_m ($0.22 \times 10^{-2}M$) 값보다는 약간 적다.

5) 저해제의 영향

Table III은 chlorogenic acid, catechol을 기질로 하여 효소활성에 대한 저해제의 영향을 검토한 결과로서, KCN, cysteine은 효소활성에 대한 강력한 저해제이나, 한편 농도가 높은 EDTA의 효소 활성에 대한 저해는 가장 낮다.

Thiourea도 비교적 높은 저해율을 보이고 있으나, 이것을 제외하고는 chlorogenic acid가 기질일 경우보다 pyrocatechol을 기질로 하였을 때 그 저해율이 높다.

Table III. Inhibitors of *Ixeris sonchifolia* polyphenol oxidase

Inhibitor	Concentration (final)mM	Chlorogenic acid as substrate (4mM) % inhibition	Pyrocatechol as substrate (40mM) % inhibition
KCN	10	100	100
	1	69.9	93.6
L-Cysteine	10	86.1	98.6
	1	78.0	95.9
Thiourea	10	69.9	67.9
	1	53.2	33.5
EDTA	100	22.2	31.2
	10	11.8	26.1

Enzyme 0.1ml was pre-incubated with a mixture of the inhibitor and 0.05M phosphate buffer pH 6 for 5 min, at 25°C

Benjamin 등은 sodium diethyldithiocarbamate, dithiothreitol, potassium metabisulfite 등은 cherry polyphenol oxidase의 반응을 지연시킨다고 보고한 바 있다.

또한 Anosike²⁸⁾ 등은 *D. bulbifera*의 PPO도 저농도의 L-cysteine(0.5mM), KCN(0.2mM)에 의해 저해된다고 하였다.

Chelating agent인 EDTA는 eggplant, peach, *D. bulbifera*의 PPO도 위의 경우와 같이 효소의 활성에 미치는 영향은 극히 약하나, Luh 등은 반응혼합물의 pH는 PPO의 중요한 부분인 Cu²⁺와 EDTA의 친화력에 영향을 미칠 것이라고 하였다. copper chelator일지라도 thiol기를 가지지 않을 경우에는 그 농도가 높아도 효소의 활성에 대한 저해율은 극히 낮으나, thiol기를 가진 저해제는 그 효소의 활성에 필요한 Cu²⁺와 covalent Cu-S bond를 형성함으로써 그 효소의 활

성이 저해될 것이라고 추정하고 있다²⁹⁾.

또한 cyanide이온은 non-competitive inhibitor이며 낮은 농도에서도 효소 단백질로부터 Cu²⁺이온을 제거 할 수 있을 것이며 따라서 cyanide이온은 irreversible inhibitor로서 작용한다. cyanide에 의해 potato polyphenol oxidase로부터 Cu²⁺이온이 제거 된다는 것은 오래 전부터 보고 된 바 있다³⁰⁾.

위의 실험결과로 부터 고들빼기중에는 polyphenol oxidase가 존재하고 있다는 것을 알 수 있다.

결 론

고들빼기 (*Ixeris sonchifolia* Hance) 뿌리의 acetone powder를 (NH₄)₂SO₄ fractionation, sephadex G-200 gel filtration 과정으로 정제하여 얻은 효소는 그 비활성이 crude extract에 비해 51배나 더 크다.

이 효소의 최적 pH는 6, 최적온도는 25°C이다. 또한 열에 대한 안정성은 first-order kinetics를 보였다. 이 효소의 기질에 대한 특이성은 chlorogenic acid에 대한 활성이 가장 컸으며 다음 caffeic acid, pyrocatechol순이다. KCN, cysteine으로 효소활성이 현저하게 저해되었다.

감사의 말씀—이 연구는 1983년도 문교부 학술 연구 조성비로 이루어진 것으로 이에 감사하는 바입니다.

〈1984년 4월 10일 접수 ; 5월 17일 수리〉

문 헌

1. Szent-Györgi, A., and Vietorisz, K.: *Biochem. Z.*, **233**, 236 (1931).
2. Deverall, B.J. and Wood, R.K.S.: *Ann. Appl. Biol.*, **49**, 473 (1961)
3. Uritani, I., in Rich S. (Editor): Perspectives of biochemical plant pathology, Connecticut Agricultural Experiment Station Bulletin, 663, p. 4, (1963).
4. Ponting, J.D. and Joslyn, M.A.: *Arch. Biochem.*, **19**, 47 (1948).

5. Uritani, I. and Muramatsu, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 29 (1952).
6. Imaseki, H.: *Bot. Mag.*, Tokyo, **72**, 853 (1959).
7. Bouchilloux, S., McMahonill, P. and Mason, H.S.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 1699 (1963).
8. Palmer, J.K.: *Plant Physiol.*, **38**, 508 (1963).
9. Knapp, F.W.: *J. Food Sci.*, **30**, 930 (1965).
10. Rivas, N.J. and Whitaker, J.R.: *Plant Physiol.*, **52**, 501 (1973).
11. Stelzig, D.A., Akhtar, S.A. and Ribeiro, A.: *Phytochem.*, **11**, 535 (1972).
12. Benjamin, N.D. and Montgomery, M.W.: *J. Food Sci.*, **38**, 799 (1973).
13. Halim, D.H. and Montgomery, M.W.: *J. Food Sci.*, **43**, 603 (1978).
14. Burnett, J.B.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 3079 (1971).
15. Balasingam, K. and Ferdinand, W.: *Biochem. J.*, **118**, 15 (1970).
16. Van Loon, L.C.: *Phytochem.*, **10**, 503 (1971).
17. Sheen, S.J., and Andersen, R.A.: *Can. J. Bot.*, **52**, 1379 (1974).
18. Tripathi, R.K. and Verma, M.N.: *Indian J. Exp. Biol.*, **13**, 414 (1975).
19. Park, Y.K., Sato, H.H., Alneida, T.D. and Morett, R.H.: *J. Food Sci.*, **45**, 1619 (1980).
20. Prabha, T.N. and Patwardham, M.V.: *J. Food Sci, Technol.*, **17**, 215 (1980).
21. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
22. Hasegawa, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 5, (1980).
23. Luh, B.S. and Bulan, P.: *J. Food Sci.*, **37**, 264 (1972).
24. Lee, C.Y. and Smith, N.L.: *J. Food Sci.*, **44**, 1, (1979).
25. Balasingam, K. and Ferinand, W.: *Biochem. J.*, **118**, 15 (1970).
26. Ben-Shalon, N., Kahn, V., Harel, E. and Mayer, A.M.: *Phytochem.*, **16**, 1153 (1977).
27. Habaguchi, K.: *Plant and Cell Physiol.*, **20**, 9 (1979).
28. Anosike, E.O. and Ayaebene, A.O.: *Phytochem.*, **20**, 12, 2625 (1981).
29. Vaughan, D., Jones, D. and Ord, B.G.: *Trans, Br. Mycol. Soc.*, **77**, (1981).
30. Kubowitz, F.: *Biochem., Z.*, **299**, 32 (1939).
31. Ackermann, W.W. and Potter, V.R.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **72**, 1 (1946).