KOREAN J. SOC. FOOD SCI.
Vol. 10, No. 4, November, 1994

마의 Polyphenol oxidase의 특성과 효소갈변생성물의 항돌연변이 효과

정승희 · 이임선 · 구성자
경희대학교 식품영양학과

Studies on Characteristics of Polyphenol Oxidase in Yam and Antimutagenic effect of Enzymatic Browning Reaction Products

Seung-Hee Jeong, Im-Sun Lee and Sung-Ja Koo
Department of Food and Nutrition, Kyunghee University

Abstract

Polyphenol oxidase in Yam was partially purified through ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose column chromatography. The specific activity of purified PPO was 138.22 unit/mg protein. The optimum pH and temperature of purified PPO were respectively 7.0 and 30℃. The heat treatment at 80℃ for 6 min, decreased PPO activity to 50%. The enzyme showed high substrate specificity toward catechol. The Km value for catechol was 5 mM. In the Ames test using *S. typhimurium* TA98 and TA100 catechol-YEBRP, pyrogallol-YEBRP, chlorogenic-YEBRP showed strong antimutagenicity on sodium azide and MECF excepting hydroquinone-YEBRP showed killing effect on both strains.

I. 서 론

Dioscorea과(family), Dioscorea속(genus)에 속하는 마(Yam)는 다년생 초본으로 600여종이 있으나 이들중 약 10여종이 식량자원으로 활용되고 있으며 가장 널리 재배되는 것은 Dioscorea rutundata poir (white yam), Dioscorea cayenensis Lam(yellow yam)그리고 Discorea alata L.(water yam)이며 거의 서부 아프리카에서 생산된다[1,2].

우리나라와 일본에서는 참마(chinese yam, D batatas D)와 장마(D rotundata D, D alata L) 등이 야생 또는 재배되고 있다[3]. 마는 부식용이나 건강식으로 찌거나 튀기거나 생으로 갈아 섭취되고 최근에는 flake나 가루형태로 가공되어 instant 식품으로 이용되기도 하는데[4] 이때 발생하는 갈변은 polyphenol oxidase의 작용에 의한 것으로 효소학적 측면에서나 억제하는 차원에서는 활발한 연구가 이루어졌지만 이의 생리적인 규명은 최근에 들어 효소적, 비효소적 갈변생성물들의 항돌연변이 효과를 검토함으로써 새로운 관점에서 관찰되고 있다.

본 실험에서는 마에서 polyphenol oxidase를 추출하여 생화학적 특성을 확인하고, 검출된 돌연변이물들과 발암물질간의 상관관계가 높음을 이용하여 항돌연변이 검색에도 적용되고 있는 Ames법으로 마의 갈변생성물의 항돌연변이 효과를 검토하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 장마(Dioscorea rotundata D, Yam)는 경동시장에서 구입하여 사용하였고 Polyphenol 화합물들은 Sigma사와 Junsei사로 부터 구입하여 사용하였으며 DEAE-Cellulose는 Pharmacia사로부터 그리고 변이원으로 사용된 sodium azide는 Junsei사로부터 구입하여 사용하였다.

2. 시험균주

Ames test에 사용한 Salmonella typhimurium TA 98과 100은 유전공학 센터의 유전자 은행에서 분양받아 사용하였다.

3. Polyphenol oxidase의 정제

(1) Polyphenol oxidase(PPO)의 추출[5-6]

PPO의 추출 및 정제과정은 Fig. 1과 같이 실시하였다.

(2) DEAE-Cellulose column chromatography

DEAE-Cellulose는 Work[7] 등의 방법에 따라 준비하였고 4℃에서 유리 column(3.5×35 cm)에 충진한 다음 10 mM 인산완충액으로 15시간 평형화 시켰다. Column에 효소액을 주입하고 동일완충액으로 흡착되지 않은 단백질을 제거한 후 0~0.5M NaCl로 linear gradient를 걸어주어 용출시키면서 100방울씩 fraction collector로 분취하여 활성부분을 취하였다.

(3) 효소활성의 측정

PPO의 활성은 효소가 기질에 작용하여 quinone류를 형성하는 초기속도의 변화로 420 nm에서의 흡광도를 측정하여 효소활성으로 정하였다. 즉 10 mM catechol 용액 2 ml와 10 mM 인산완충액 2 ml, 조효소액 1 ml를

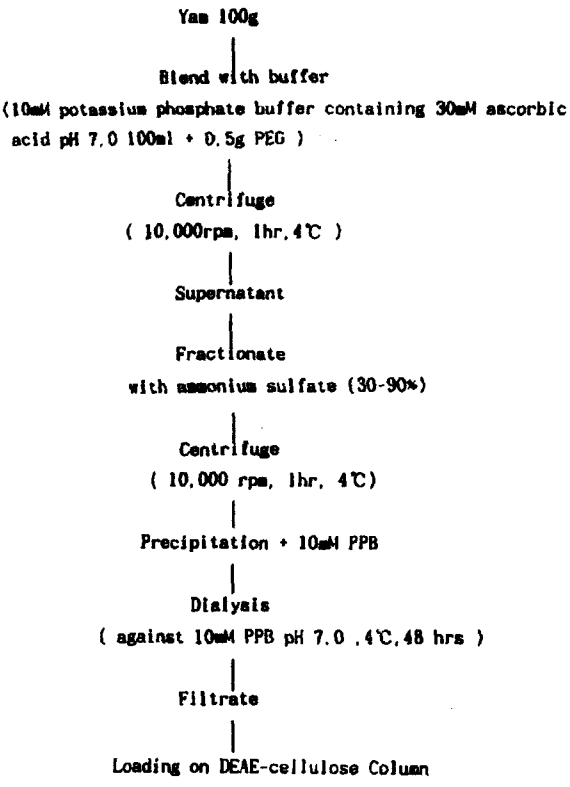

Fig. 1. Procedure for purification of polyphenol oxidase from Yam.

가하여 30℃ 에서 반응시키면서 반응시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소 1 unit는 분당 0.001의 흡광도를 변화시키는 효소의 양으로 정하였다.

(4) 단백질 농도의 측정

단백질 농도는 Lowry[8]의 방법에 따라 albumin bovine을 표준물로 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

4. 정제효소의 특성

(1) 활성최적 pH

각 pH별(pH 3.0~11.0)로 10 mM catechol을 조제한 후 효소액과 30℃ 에서 5분 반응시킨 후 그 활성을 측정하였으며 효소의 활성은 상대활성도로 나타내었다.

(2) pH 안정도

각 pH별(pH 4.0~11.0) 완충액 2 ml에 효소액 1 ml를 가하여 혼합한 후 4℃ 에서 24시간 보존후 10 mM 인산완충액에 10 mM 되게 catechol을 용해하여 이 기질용액에 보존된 효소액 1 ml를 반응시켜 잔존활성을 측정하였다.

(3) 작용최적 온도

10 mM 인산완충액(pH 7.0) 2.5 ml에 효소액 0.6 ml를 넣고 각 온도의 수욕상(20~70℃ 까지 10℃ 간격)에서 20분간 항온시킨 후 효소활성을 측정하였다.

(4) 열안정성

효소액 1 ml를 50~80℃ 에서 20분간 보존하면서 경시적으로 효소액을 취하여 곧 얼음물에 냉각한 다음 30℃ 에서 효소활성을 측정하였다.

(5) 온도별 저장기간에 따른 효소활성 측정

효소액을 4℃ 와 25℃ 에 각각 저장하면서 24시간 간격으로 7일 동안 잔존 효소활성을 측정하였다.

(6) 기질 특이성

o-Diphenol류인 catechol, chlorogenic acid와 *m*-diphenol류인 resorcinol, *p*-diphenol류인 hydroquinone, trihydroxyphenol류인 pyrogallol, monophenol류인 L-tyrosine을 10 mM 인산완충액에 용해시켜 10 mM 기질용액으로하여 효소의 활성을 측정하였다.

(7) 기질농도의 영향

Catechol의 농도를 1 mM에서 40 mM까지 각 농도별로 조제하여 효소활성을 측정하였으며 Michaelis 정수는 Lineweaver-Burk plot으로 구하였다[9].

5. Ames test

(1) 갈변물질의 조제

PPO에 의한 효소적 갈변반응 생성물들의 조제 과정은 Fig. 2와 같이 실시하였다. 갈변물질을 조제하기 위해서 사용된 기질로는 polypheol 화합물중 catechol(Ca), hydroquinone(HQ), pyrogallol(Py), chlorogenic acid(Ch) 등이며 기질용액의 농도는 Chlorogenic acid만 10 mM농도로 조제하였고 나머지 기질들은 모두 50 mM 농도로 조제하였으며 반응은 기질용액 100 ml당 효소용액 5 ml의 비율로 하여 혼합한 후 pH 7.0으로 조절하여 30℃ 에서 4일간 진탕하면서 반응시킨 후 48시간 동결건조하였다. 건조된 갈변물질은 일정량 취하여 증류수에 용해하여 0.22 μm pore size filter에 여과하여 멸균한 후 실험에 사용하였다.

(2) MECF 조제(Methanol extract of charred fish)

생선을 통째로 중간불에서 1시간 직화하여 구워서 탄부분만 긁어모아 methanol 500 ml에 24시간 추출하여 감압농축 시킨 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 변이원 물질로 사용하였다.

(3) Mutagenicity test

Ames test를 개량한 Preincubation법[10]을 적용시켰다. HQ-YEBRP는 1 μg/μl의 농도로 Ca-YEBRP, Ch-YEBRP의 경우는 1.6 μg/μl의 농도로 조제하였으며 이들 갈변물질을 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 각각 50, 100, 150, 200 μl씩 가하고 여기에 미리 nutrient broth 배지에서 하룻밤 배양시킨 균 배양액 100 μl를 가한다음 37℃ 에서20분 preincubation시켜 histidine/biotin이 첨가된 top agar(45℃)를 2 ml씩 가하여 잘 혼합한 후에 미리 조제해 놓은 minimal glucoue agar plate상에 도말하여 평판 고형화시켜 48시간 배양하여 생긴 his^+ revertant colony를 계측하여 돌연변이원성 유무를 판정하였다.

(4) Antimutagenicity test

Table 1. Partial purification of polyphenol oxidase from Yam

Stage	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)
Crude extract	11,340	101.47	111.76
90% ammonium sulfate	8,400	64.68	130.32
DEAE-Cellulose chromatography	2,748	19.88	138.22

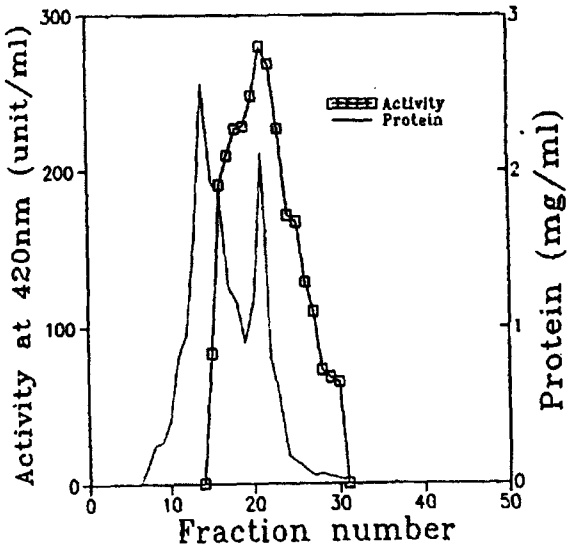

Fig. 2. DEAE-Cellulose column chromatogram of Yam polyphenol oxidase.

갈변물질의 농도는 상기와 같고 변이원 물질의 농도는 sodium azide 경우 TA 98에서는 98 μg/plate, TA 100에서는 1.5 μg/plate를 사용하였으며 MECF의 경우 TA98에서는 10 mg/plate, TA100에서는 15 mg/plate를 사용하였다.

실험절차는 우선 건열멸균시킨 glass cap tube에 갈변물질을 각각 50, 100, 150, 200 μl씩 첨가하고 변이원 물질을 100 μl씩 첨가한 다음 여기에 하룻밤 배양시킨 TA98과 TA100을 100 μl씩 주입한 후에 0.2M sodium phosphate buffer를 가하여 전 용적이 700 μl가 되도록 하였다.

이것을 37℃에서 20분간 진탕배양한 다음 상기의 돌연변이원성 실험과 같은 방법으로 실험하여 생성된 colony를 계측하여 항돌연변이성 유무를 검토하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Polyphenol oxidase의 정제

마의 polyphenol oxidase는 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)으로 추출하여 원심분리 한 것을

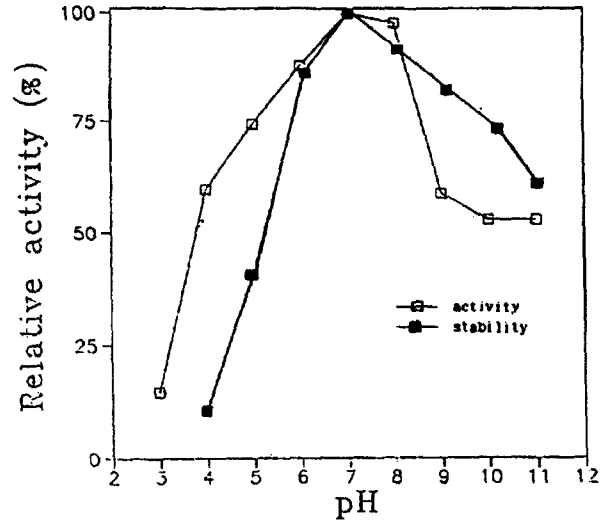

Fig. 3. Effect of pH on Yam polyphenol oxidase activity and stability.

30~90% ammonium sulfate fractionation, DEAE-Cellulose column chromatography에 의하여 부분적으로 정제한 결과는 Table 1과 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 효소의 정제도는 ammonium sulfate처리 후에는 1.17배로 증가하였으며 DEAE-Cellulose column으로 정제하였을 때는 주입한 효소액에 비해 1.22배였다. 갈변방지를 위해 ascorbic acid와 효소를 불활성화 시키는 phenol화합물의 제거를 위하여 polyethylene glycol 6,000을 첨가하였지만 정제과정 중 부분적으로 갈변이 진행되어 column material과 갈변 중합체들이 결합되어 활성 수율이 높지않게 나타난 것으로 사려된다.

2. 정제효소의 특성

(1) 최적 pH

Catechol을 기질로 하여 PPO의 활성에 영향을 미치는 pH의 영향을 조사한 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 pH 7.0에서 최대활성을 보였고 pH 7~8의 범위에서는 90%의 활성을 유지하였으나 이 범위를 벗어났을 때에는 활성이 급격히 감소하였고 pH 3에서 잔존활성이 15%까지 감소되어 산성에서 불안정함을 보여준다. PPO의 최적 pH는 과일의 종류에 따라 달라서 사과의 경우 pH 6.5~7.5, 감자 6.5, 올리브 4.8, 포도는 8.0이었다. 또한 사용한 기질과 완충액의 종류에 따라서도 최적 pH가 달라짐이 보고된 바 있다.

(2) pH안정성

각 pH별로 효소액을 4℃에서 보존한 후 효소활성 변화를 측정한 결과는 pH 7.0에서 안정하였고 pH 11까지 활성의 50% 이상을 유지하여 비교적 alkali쪽에서 안정됨을 보였으며 pH 6 이하에서 활성이 급격히 감소하였다.

(3) 최적온도

PPO의 활성은 Fig. 4와 같이 20~25℃ 범위에서는 온

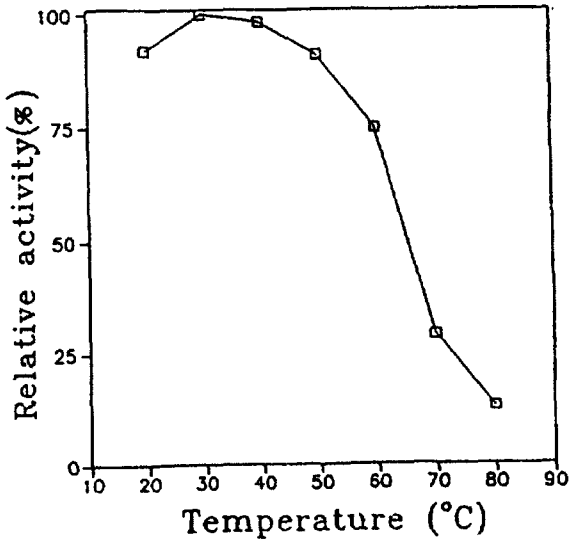

Fig. 4. Effect of temperature on Yam polyphenol oxidase activity.

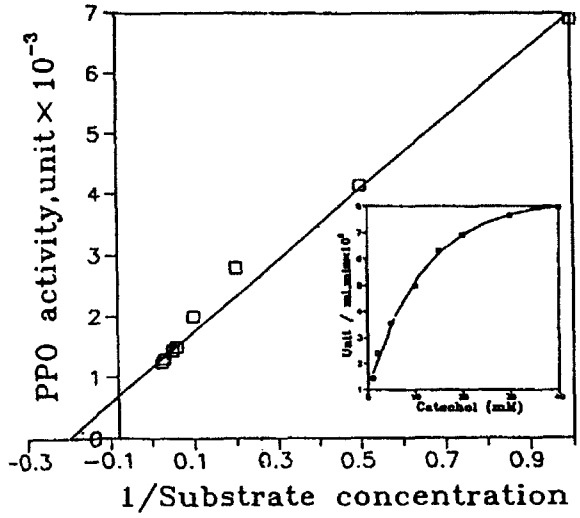

Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of catechol oxidation by Yam polyphenol oxidase.

Table 2. Substrate specificities of polyphenol oxidase from Yam

Substrate	Concentration (mM)	Relative Activity (%)
o-Diphenol		
Catechol	10	100
Chlorogenic acid	10	32.69
m-Diphenol		
Resorcinol	10	29.04
p-Diphenol		
Hydroquinone	10	26.92
Tryhydroxyphenol		
Pyrogallol	10	34.23
Monophenol		
L-Tyrosin	10	0

도에 따른 변화는 크지 않았고 30℃에서 최대 활성을 나타냈다. 그러나 70℃가 되면서 활성이 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 사과, 인삼, 감자의 최적온도와 일치하는 경향을 보였으며 버섯의 경우 25~40℃에서는 효소활성이 거의 동일하고 70℃에서 불활성화 되었다고 보고되었다[11].

(4) 열 안정성

50~80℃에서 20분간 보존하면서 경시적으로 잔존활성을 측정한 결과 50℃에서는 10분에 25%, 60℃에서는 5분에 24%로 불활성화 되었고 20분까지 잔존활성 50% 이상으로 유지하였다. 70℃에서 50% 불활성되는데 걸린 시간은 14.2분 이었고 80℃에서는 6분이었다. 이같은 결과는 80℃에서 배의 활성이 50% 감소되는데는 2.25분[12], 망고의 4분에[13] 비해 열 안정성이 훨씬 높음을 알 수 있었다.

(5) 온도별 저장기간에 따른 효소 활성 변화

효소액을 4℃와 25℃의 항온기에 1주일 저장하면서 24시간마다 효소의 활성 변화를 측정한 결과 저장 2일까지 4℃와 25℃ 모두 활성의 90%를 유지하였고 4℃에서는 저장 7일까지 50% 이상의 활성을 보였으며 25℃에서는 3일째부터 급격히 활성이 감소되어 7일째는 잔존활성이 38%로 감소되었다.

(6) 기질 특이성

효소의 활성에 영향을 미치는 기질특이성에 대한 측정은 Table 2와 같다. *o*-phenol류인 cathechol, chlorogenic acid, *m*-diphenol류인 resocinol, *p*-diphenol류인 hydroquinone, trihydroxyphenol류인 pyrogallol에는 활성을 보였지만 monophenol류인 L-tyrosine에는 활성을 나타내지 않았다. 본 효소는 catechol에 대한 친화력이 가장 높게 나타났으며 이는 사과, 감자, 복숭아와 일치하는 결과이며 한편 홍옥, 국광 등은 chlorogenic acid에 가장 높은 친화력을 보였고 국광의 PPO는 tyrosin에도 활성이 있음이 보고된 바 있다.

(7) 기질 농도의 영향

Catechol을 기질로 하여 1 mM에서 40 mM까지 각 농도별로 PPO의 활성을 측정하고 기질 농도와의 관계를 Lineweaver-Burk의 방법에 따라 plot한 결과는 Fig. 5와 같이 Michaelis상수(Km값)가 5 mM로 나타났으며 이는 감자의 5.3 mM, 배의 48 mM[12]보다는 높은 친화력을 보이고, 아보카도의 2.4 mM[14] 돼지감자의 3.9 mM[15]에 비해서는 친화력이 낮았다.

3. Ames test

마의 PPO에 의한 갈변반응 생성물(YEBRP)의 항돌연변이원성을 실험하기 위해 우선 변이원성 유무를 조사한 결과는 Fig. 6과 7에서와 같이 test strain control의

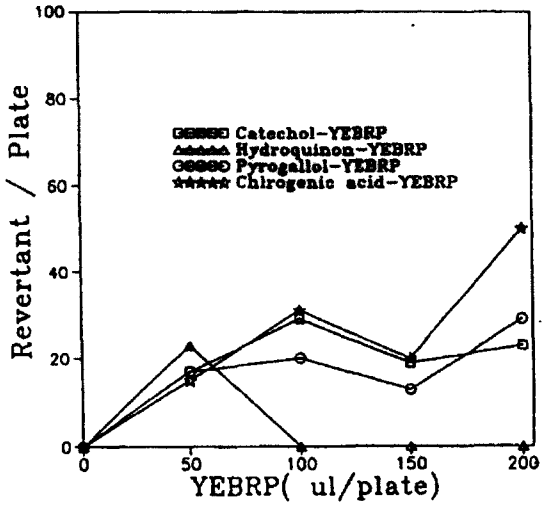

Fig. 6. Mutagenicity test of Yam enzymatic browing reaction product(YEBRP) in Salmonella typhimurium TA98.

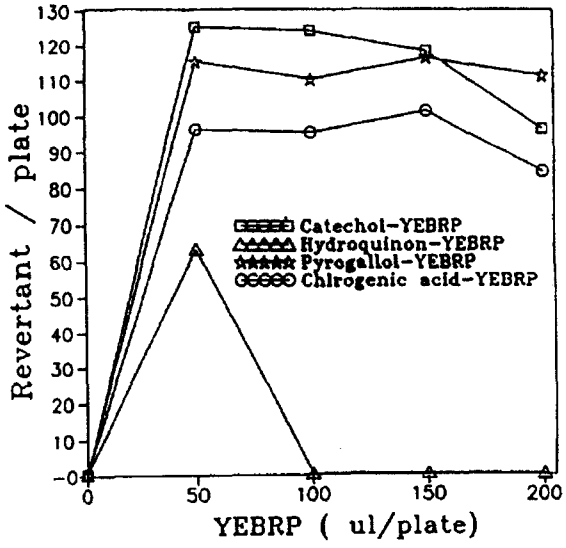

Fig. 7. Mutagenicity test of Yam enzymatic browing reaction product(YEBRP) in Salmonella typhymurium TA100.

his$^+$ revertant colony수와 비교해서 농도를 증가시킴에 따라 균수의 뚜렷한 증가를 보이지 않았으므로 갈변물질 자체의 돌연변이성은 없는 것으로 판명되었다. 특기할 사항으로 HQ-YEBRP는 50 μl 첨가시에만 colony가 관찰되었고 그 이상의 농도에서는 his$^+$ vevertant colony가 관찰되지 않았다. 이는 phenol화합물인 hydroquinone 자체의 항균효과에서 기인한 것으로 사려된다. 따라서 2가지 변이원에 대한 이들 갈변반응 생성물들의 억제활성 효과를 검토하여 Inhibition Percentage(%)로 항돌연변이원성을 나타내었다.

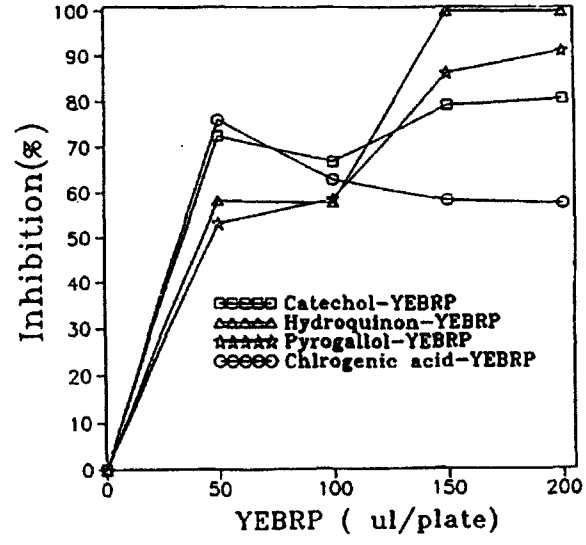

Fig. 8. Antimutagenic effect of the YEBRP on mutagenicity on Sodium azide in Salmonella typhimurium TA 100.

$$\text{Inhibition percentage of activity} = \frac{a-b}{a-c} \times 100$$

a is NO. of histidine revertants induced by mutagen in the absence of the YEBRP

b is NO. of histidine revertants induced by mutagen in the presence of the YEBRP

c is NO. of spontaneously occuring histidine revertants observed on untreated control plate.

Fig. 8은 변이원 물질로 대사활성 물질인 S-9 mix 필요치 않은 direct mutagagen인 sodium azide를 변이원으로 하여 *S. typhimurium* TA100에 대한 각시료의 항돌연변이원성을 나타낸 것으로 적은 양으로도 큰 억제효과를 보였으며 최고 농도로 첨가할 때 Ca-YEBRP는 80.8%, Py-YEBRP는 91.3%, Ch-YEBRP는 57.5%의 억제활성을 나타내었다. sodium azide에 대한 *S. typhymurium* TA98균주의 spontaneous colony수와 TA98의 test strain수에 있어 his$^+$ revertant colony수가 별다른 차이를 보이지 않았으므로 sodium azide가 변이원으로서 TA98에 부적합 함이 보고된 결과와 일치한다[40]. 또한 돌연변이 실험에서와 마찬가지로 모든 항돌연변이원성 실험에서 HQ-YEBRP은 50 μl 첨가시에만 억제활성을 보이고 그 이상의 농도에서는 his$^+$ revertant colony가 전혀 관찰되지 않았으며 Ch-YEBRP는 농도가 증가함에 따라 his$^+$ revertant colony수가 증가됨을 보여 오히려 돌연변이능을 가능성을 시사함에 따라 chlorogenic acid, YEBRP, sodium azide간의 명확한 대사과정 규명이 요구된다. Fig. 9는 *S. typhimurium* TA98균주를 이용해서 발암물질로 알려진 태운생선의 methanol 추출물(MECF)

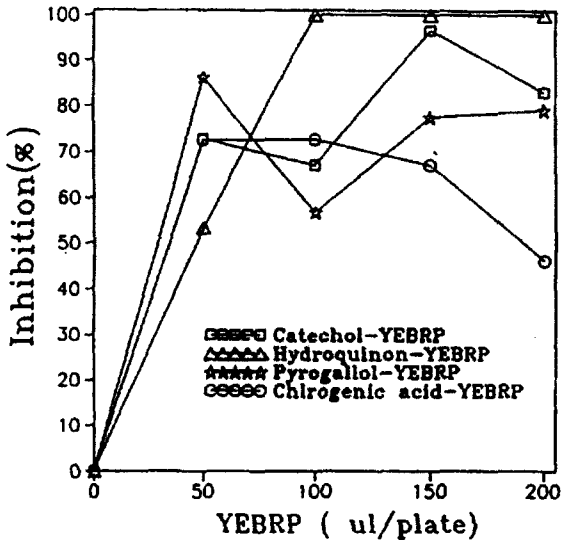

Fig. 9. Antimutagenic effect of the YEBRP on mutagenicity of methanol extract of charred fish(MECF) in Salmonella typhimurium TA98.

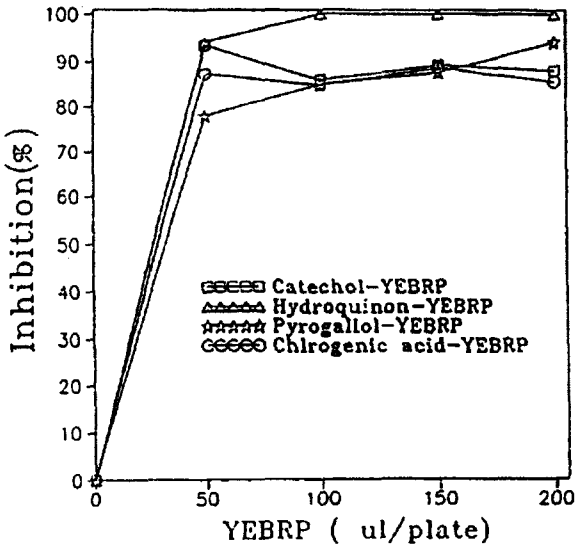

Fig. 10. Antimutagenic effect of the YEBRP on mutagenicity of methanol extract of charred fish(MECF) in Salmonella typhimurium TA100.

을 변이원으로 하여 억제활성을 검토한 결과로서 모두 억제활성을 보였지만 농도를 증가시킴에 따라 억제활성도 증가되는 경향을 보이지 않아 이 MECF는 S-9 mix 대사활성 물질이 필요함을 시사했다. Fig. 10은 *S. typhimurium* TA100균주를 이용하여 MECF에 대한 돌연변이 억제효과를 검토한 것으로써 최고 농도 첨가시 Ca-YEBRP는 88%, Py-YEBRP는 94.2%로서 농도가 증가함에 다라 억제활성도 증가됨을 보였으며 Ch-YEBRP는 85.5%의 억제활성을 보여 Sodium azide에 비해 높은 억제활성을 나타냈다. 이같은 결과로, 갈변물이변원에 따라 억제정도가 다르고, 효소의 기질이 되는 phenol화합물의 종류에 따라서도 억제효과에 차이를 보이며 또한 효소의 추출원에 따라서도 차이를 보임을 알 수 있다. 그러나 이들 효소적갈변반응 생성물들의 mutagen에 대한 정확한 기작은 알려져 있지 않다.

IV. 요 약

마(Yam)의 원심분리 상등액에 ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose column chromatography를 행하여 specific activity가 138.22 unit/mg protein인 polyphenol oxidase를 분리 정제하였다. 정제된 효소액의 최적 pH는 7.0, 최적온도는 30℃ 였고, 30~40℃ 와 pH 6.5~7.0사이에서 비교적 안정하였으며 80℃ 에서 50% 불활성화 되는데 걸리는 시간은 6분이었다. 효소의 기질로서 *o*-Diphenol류인 catechol에 가장 높은 활성을 보였고 *o*-diphenol류인 chlorogenic acid, *m*-diphenol류인 resocinol, *p*-diphenol류인 hydroquinone, trihydroxyphenol류인 pyrogallol에는 활성을 보였지만 monophenol류인 L-tyrosin에는 활성을 나타내지 않았으며 catechol에 대한 Km値는 5 mM이었다. 또한 효소액과 4종의 polyphenol 화합물을 반응시켜 얻은 마효소 갈변생성물(YEBRP)들의 항돌연변이원성을 검토하기 위하여 *S. typhimurium* TA98, TA100을 이용하여 변이원으로서 sodium azide, 태운 생선 추출물(MECF)에 대한 돌연변이 억제효과를 검토하였다. catechol-YEBRP, pyrogallol-YEBRP, chlorogenic acid-YEBRP는 TA100에서 sodium azide에 50% 이상의 억제효과를 보였고 MECF에 대해서는 TA98, TA100 모두 80% 이상의 높은 억제효과를 보였으나 Ch-YEBRP는 sodium azide에 대해 농도가 증가할 때 오히려 돌연변이 억제능이 감소되었고 Hydroquinone-YEBRP는 균주에 대한 항균 효과를 보였다.

감사의 글

본 연구는 1994년 경희대학교 교내연구지원으로 수행한 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김일혁: 약품 식물학 개론, 학창사, 107 (1988).
2. O. Onayemi: Some chamical factors affecting the quality of prossed yam., *J. Food Sci.*, 51(1) (1986).
3. 조재선: 식품재료학, 도서출판 광장, 100 (1984).
4. O.N. Ozo, J.C. caygill and D.G. Coursey: Phenolics of five yam species. *Pytochem.* 23, 329-331 (1984).
5. L.C. Katwa, M. Ramakrishna, and M.R. Raghavendra Rao: Purification and properties of polyphenoloxidase from mango peel., *J. Food Biochem.*, 6, 217-228 (1982).
6. William, H.F. and Joseph, J.J.: Purification of peach polyphenol oxidase in the pesence of added protease

inhibitors., *J. Food Biochem.*, 4, 29-41 (1980).
7. Work, T.S. and E. Work: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, 2nd, North-Holland Biochemistry press. 2, 228 (1980).
8. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.L. Randall: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
9. Segal, I.H.: Biochem. Calculation, 2nd ed. 214-265
10. Ames B.N. and Maron, D.M.: revised method for the salmonella typhimurium mutagenicity test. Mutation res. 113, 173 (1983).
11. J.D. McCord and A. Kilara: Control of enzymetic browing in prossed mushroom, *J. Food Sci.*, 48, 1479 (1983).
12. Halim, D.H. and Montgomery, M.W.: Polyphenol oxidase of d'Anjou pears. *J. Food Sci.*, 43, 603 (1978).
13. Park, Y.K., Sato, H.H., Almeida, T.D. and Moretti, R. H.: Polyphenol oxidase of mango. *J. Food Sci.*, 45, 1619 (1980).
14. Kahn, V.: Some biochemical prorerties of polyphenol oxidase from two avocado varieties differing in their browning rates *J. Food Sci.*, 42, 38 (1977).
15. Zawistowski, J., Biliaderis, C.G. and Murray, E.D.: Purification and characterization of Jerusalem artichoke polyphenol oxidase. *J. Food Biochem.*, 12, 1 (1988).
16. R.A. Nilan, E.G. Sideris, A. Klelinhofs, C. Sander and C.F. Konzak: Azide-a potent mutagen., *Mutation Res.*, 17, 142 (1973).