

붉은 서나물 잎 (*Erechitites hieracifolia* Raf.) 에서의 Polyphenoloxidase 활성측정 및 항산화효소 특성분석

김안근 · 이상은* · 김국환** · 권영이*#

숙명여자대학교 약학대학, *STC 생명과학연구원 신약개발연구소, **동덕여자대학교 약학대학

(Received April 25, 2002; Revised July 22, 2002)

Properties of Polyphenoloxidase and Antioxidant Enzymes in the Leaves of *Erechitites hieracifolia*

Kim An-Keun, Lee Sang-Eun*, Kim Kuk-Hwan** and Kwon Young-Ee*#

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

*Drug Discovery Institute STC Life Science Center Seoul 121-042 Korea

**College of Pharmacy Dongduk Women's University Seoul 136-714 Korea

Abstract — Polyphenoloxidase activity (PPO) in the leaves of *Erechitites hieracifolia* was estimated by Warburg's manometric method. The enzyme was most reactive toward chlorogenic acid followed by caffeic acid. Diethyldithiocarbamate and potassium cyanide were shown powerful inhibition rate to the polyphenoloxidase from the leaves of *Erechitites hieracifolia*. We confirmed antioxidant activity of the leaves of *Erechitites hieracifolia* by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging method. Electrophoretic isoenzyme banding patterns of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) were observed by native PAGE. The correlation of PPO and antioxidant enzymes is not investigated yet. That is need to further study.

Keywords □ Polyphenol oxidase, DPPH, Superoxide dismutase, Peroxidase, Catalase, *Erechitites hieracifolia*

상떡잎 식물 초롱꽃목 국화과에 속하는 붉은 서나물(*Erechitites hieracifolia*)은 미국이 원산지인 귀화 식물로 높이 1~2 m이며, 9~10월에 개화하며 두화는 산방상으로 배열한다. 포조각은 1줄로 배열하고 줄 모양이며 관모는 흰색이며, 일본에서는 어린 순을 나물로 식용한다.¹⁾

Polyphenol oxidase(PPO, EC 1.10.3. 1 o-diphenol : O₂ oxidoreductase 또는 tyrosinase와도 혼용)는 자연계에 광범위하게 분포되어 있으며 식물의 갈변반응에 있어서 기질인 monophenol류나 diphenol류와 반응하여 o-quinone을 만들고 이것이 중합반응을 일으켜 갈색으로의 변화를 유도한다. 식물에 있어 일반적으로 PPO는 세포내 기질과 격리되어 있어 활성을 나타내기 않으나 세포가 손상을 입거나 노화가 오는 경우 기질과 반응하여 활성을 나타낸다.²⁾ Polyphenol 물질은 polyphenoloxidase의 양호한 기질로서 식물조직의 갈변은 주로 이것의 산화에 기

인되는 것으로 알려져 있다. PPO의 활성은 식물조직의 노화와 도연관이 있는 것으로 알려져 있는데, 사과는 성숙해가는 과정에서 폐놀성 물질과 PPO의 활성이 감소하고,³⁾ 감자는 성숙해가면서 효소활성이 증가하고,⁴⁾ 들깨잎은 성장함에 따라 감소하는 것으로 보고되어 있다.⁵⁾

Superoxide dismutase(SOD; EC 1.15.1.1)는 생체에 매우 유해한 superoxide anion radical(O²⁻)과 반응하여 hydrogen peroxide(H₂O₂)를 생성하는 효소로, 산소를 소비하는 모든 생물종에 존재하여 생체 내에서 활성산소 종에 대한 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제이다. SOD는 그들이 가지고 있는 metal cofactor에 따라 Cu/Zn SOD, Mn SOD, Fe SOD의 3종류가 있으며 Cu/Zn SOD는 세포질에, Mn SOD는 미토콘드리아에 그리고 Fe SOD는 식물의 엽록체에 존재한다. Catalase(CAT; EC 1.11.1.6)는 hydrogen peroxide(H₂O₂)과 반응하여 물을 생성하는 효소로, 식물의 엽록체에 다양 함유되어 있어 peroxidase(POD; EC 1.11.1.7)와 함께 산화에 직접 관여하는 효소이다.⁶⁾

붉은 서나물 잎(*Erechitites hieracifolia* Raf.)에 상처를 입혔을 때 강한 갈변이 일어나는 것을 보고 붉은 서나물 잎 중의

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-3270-2600 (팩스) 02-718-3766
(E-mail) yekwon@stc365.com

polyphenol 물질 및 polyphenoloxidase의 존재를 추정하고 이를 규명하고자 하였다. PPO가 많은 식물의 경우 일반적으로 항산화물질을 함유하고 있으므로, 이와 상반되는 작용인 항산화효능을 측정하기 위하여 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), peroxidase(POD)와 catalase(CAT)는 전기영동을 통한 native PAGE 분석을 통해 동위효소 밴드 패턴을 확인하였고, 붉은 서나물 신선한 잎에서 자유 라디칼(free radical) 소거 활성을 측정하였다.

실험방법

실험재료 – 본 실험에 사용된 붉은 서나물 잎(*Erechtites hieracifolia* Raf.)은 서울시 용산구 숙명여자대학교 주변에서 채집하여 사용하였다.

시약 및 기기 – 시약은 acetic acid, formic acid, citric acid, sodium phosphate dibasic, chlorogenic acid, caffeic acid, pyrocatechol, *d*-catechin, rutin, tyrosin, *m*-cresol, *p*-cresol, sodium diethyldithiocarbamate, potassium cyanide 등으로 특급(guaranteed reagent)을 사용하였고, 일반적인 유기용매는 일급시약을 사용하였다. 완충용액 조제 및 pH 조건은 pH meter(Fisher Titrimeter, USA)를 사용하였고, 효소활성은 spectrophotometer (Beckmann DU-650, Germany), Warburg apparatus(B. Braun Melsungen)로 측정하였다. 또한 native PAGE 분석을 위해서 acrylamide, riboflavin, nitro blue tetrazolium, horseradish, diaminobenzidine은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

Polyphenol 성분의 분리 및 확인 – 신선한 붉은 서나물 잎 111 g을 70% methanol로 추출하여 동양여지 NO. 51을 사용하여 18 °C에서 전개용매 *n*-butanol : acetic acid : water(4 : 1 : 2), 6% AcOH : ethylacetate : formic acid : water(10 : 2 : 3)을 사용하여 전개하였다. 전개한 여지를 풍건 후 자외선에서 청색형광을, 암모니아를 조사했을 때 황록색 spot을 관찰할 수 있었으며 각각의 Rf치와 Rc치를 측정하였다. 알콜성 FeCl₃, Hopfner's 시약을 분무하여 그 정색반응을 확인하였다. 그 후에 2차원 paper chromatography(1차시 *n*-butanol : acetic acid : water=4 : 1 : 2, 2차시 6% AcOH)에서 얻은 chromatogram을 풍건시킨 후 자외선 하에서 표준 chlorogenic acid 의 Rf치에 해당하는 부분을 오려내어 세절한 후 ethanol로서 추출, 여과한 그 여액을 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

효소의 추출 – PPO를 추출하기 위하여 신선한 붉은 서나물 잎 500 g을 세절하여 냉동한 2 배량의 acetone을 가하여 waring blender로 마쇄 여과하고 잔사를 다시 냉동 acetone으로 처리하여 -20°C에서 냉동 건조시켜 얻었다.

Warburg 장치를 이용한 효소 활성 측정 – 효소의 활성을

Warburg장치로 측정하였다. 반응조건은 반응플라스크의 부실에 roll paper를 넣은 다음 20% KOH 0.2 ml를 가하고 일정량의 기질 및 저해제를 완충액 0.5 ml에 녹여 측실에 넣고 주실에는 효소 5 mg 을 완충액 2.5 ml에 혼탁 시켜 넣었다. 산소를 주입시킨 후 10 분 동안 항온조에서 항온 시키고 매분 120 회전으로 반응시켜 산소 흡수량을 측정하였다.

최적 pH – 기질 chlorogenic acid(5×10^{-3} M)와 효소 5 mg과 pH 4, 5, 6, 7, 온도 30°C에서 매분 120 회 회전시켜 10 분 간격으로 60 분간 산소 흡수량을 측정하였다.

최적온도 – Chlorogenic acid(5×10^{-3} M)와 효소 5 mg를 pH 6, 온도 20, 25, 30, 35°C에서 매분 120 회 회전시켜 10 분 간격으로 60 분간 산소 흡수량을 측정하였다.

기질에 대한 특이성 – 최적온도 30°C, 최적 pH 6에서 각종 polyphenol 물질(5×10^{-3} M) 즉 chlorogenic acid, caffeic acid, pyrocatechol, *d*-catechin, rutin, tyrosine, *m*-cresol, *p*-cresol을 기질로 하여 효소 활성 측정시와 동일한 방법으로 측정하였다.

저해제의 영향 – 붉은 서나물 잎에서 추출한 polyphenoloxidase에 대한 저해제의 영향을 검토하기 위해 chlorogenic acid를 기질로 하여 저해제 sodium diethyldithiocarbamate 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M, potassium cyanide 10^{-2} M, 10^{-3} M을 각각 가해 위와 동일한 방법으로 산소 흡수량을 측정하였다.

항산화 효소 및 전기영동을 위한 효소액 추출 – 붉은 서나물 잎 1 g을 0.05 M 인산 완충액(pH 7.0) 0.5 ml과 함께 얼음 위의 유발에서 파쇄한 후, 14,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 하였다. 단백질 정량은 Bradford 방법으로 하였다.⁷⁾

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용한 항산화능 측정 – 시료 100 ml에 0.1 mM DPPH ethanol 용액 1.9 ml을 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 37°C에서 30 분 동안 항온 시킨다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었으며, 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다.⁸⁾

Native PAGE – SOD의 native gel 전기영동은 Beauchamp와 Fridovich의 방법을 약간 변형하여 실시하였다.⁹⁾ 붉은 서나물 잎 1 g을 K.P. buffer와 함께 얼음 위의 유발에서 파쇄한 후, 14,000 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 효소액으로 사용하였다. 추출한 효소액을 일정액 취하여 동량의 단백질 농도가 되도록 조정한 다음 13% polyacrylamide gel을 사용하여 4 °C에서 단백질을 215 V로 40분간 전개시켰다. SOD의 검출은 gel을 염색액(50 mM KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 0.2% TEMED, 0.026 mM riboflavin, 0.25 mM nitro blue tetrazolium의 혼합액)에 넣고 30분간 암상태에서 진탕하는 방법에 따라 실시하였다. CAT의 native gel 전기영동은 Clare 등의 방법에 따라 실시

하였 다.¹⁰⁾ 9.8% polyacrylamide gel을 사용하여 4°C에서 80 V로 4시간동안 전개시켰다. 염색액(50 ug/ml horseradish POD, 5.0 mM H₂O₂, 2.3 mM diaminobenzidine)에 gel을 90분간 암상태에서 진탕하여 CAT을 검출하였다. POD native gel 전기영동은 상등액을 취해 12.5% acrylamide gel을 사용하여 4°C에서 100 V로 40분간, 200 V로 1시간 20분간 전개시켰다. POD 발색반응은 benzidine용액(benzidine 1 g, 빙초산 9 ml, 중류수 36 ml)과 3% 과산화수소 용액을 1:1로 섞은 후, gel 상에서 반응시켜 수행하였다.

실험결과 및 고찰

Polyphenol 성분의 분리 및 확인 – Table I에 나타난 바와 같이 PPC에서 얻은 spot는 UV하에서 청색형광을 나타내며 암모니아에서 황록색, Hopfner's 시액에 의해 적갈색으로 변하며 각

Table I – (A). Rf values of polyphenol in *Erechtites hieracifolia* Raf.

Solvent	Spot		Authentic chlorogenic acid		
	Rf	Rc	Rf	P.	P. C.
n-Butanol acetic acid Water 4:1:2	0.71	1	0.71		
6% HAc				"	
ethyl acetate Formic acid Water 10:2:3	0.53 0.91	1	0.53 0.91		"

(B). Color reaction of polyphenol in *Erechtites hieracifolia* Raf

Reagent	Spot	Authentic chlorogenic acid
FeCl ₃	gray green	gray green
UV-F uorescence	blue	blue
UV-F uorescence with NH ₃	yellowish green	yellowish green
Hopfner's reagent	red brown	red brown

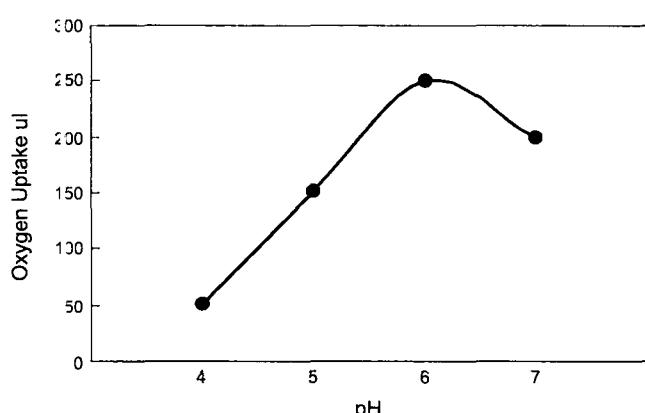


Fig. 1 – Effect of pH on PPO activity. The concentration of chlorogenic acid is 5×10^{-3} M. PPO 5 mg and McIlvaine's buffer 5 ml were used this test. Temperature of this reaction is 30°C.

종 용매에서 표준 chlorogenic acid와 동일한 Rf치를 나타내고 그 Rc치도 1이다. 또한 UV spectrum도 표준 chlorogenic acid의 그것과 동일하여 λ_{max} 는 324~325 nm이었다. 따라서 붉은 서나물 잎 중에도 chlorogenic acid가 존재한다고 추정된다.

Warburg 장치를 이용한 PPO 활성 – Fig. 1, 2는 각각 효소활성에 미치는 pH 및 온도의 영향을 검토한 결과이다. pH 6, 온도 30°C에서 산소의 흡수가 가장 크므로 각각 최적에 해당된다.

기질에 대한 특이성 – Fig. 3B, Table II는 붉은 서나물 잎에서 얻은 효소인 polyphenoloxidase의 기질에 대한 특이성을 나타낸

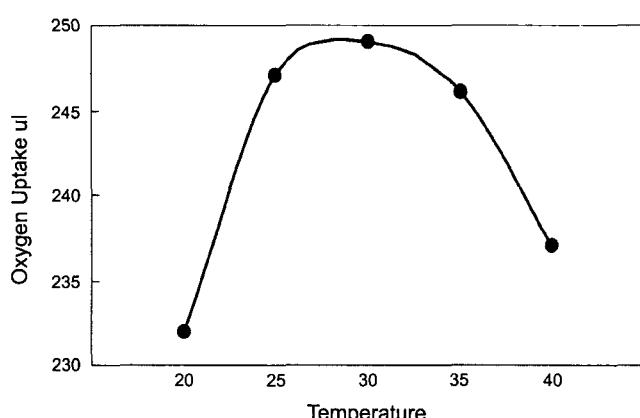


Fig. 2 – Effect of temperature on PPO activity (pH 6). The concentration of chlorogenic acid is 5×10^{-3} M. The extracted PPO 5 mg and McIlvaine's buffer 5 ml were used this test.

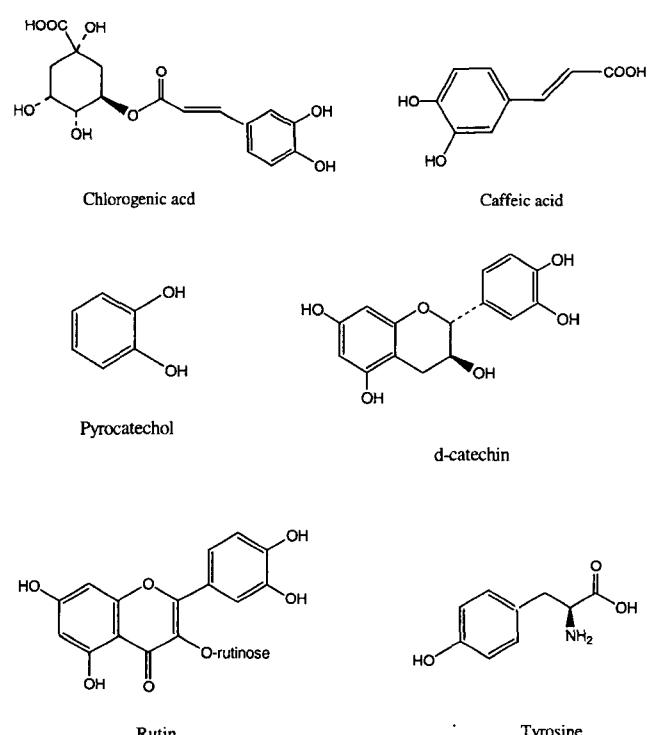


Fig. 3A – Structures of Substrates for Polyphenoloxidase.

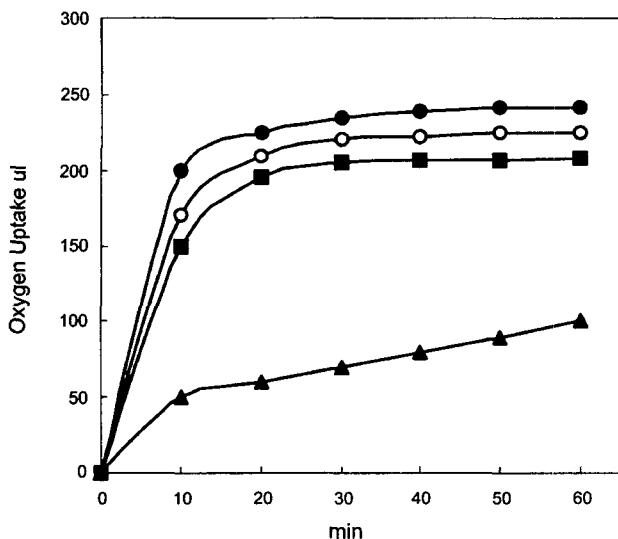


Fig. 3B – Oxygen uptake of phenolic substrates during the oxidation by PPO (enzyme 5 mg, McIlvaine's buffer 5 mL, pH 6).
-●-; chlorogenic acid 5×10^{-3} mol, -○-; caffeic acid 5×10^{-3} mol, -■-; pyrocatechol 5×10^{-3} mol, -▲-; catechin 5×10^{-3} mol

Table II – Effect of phenolic substrate on polyphenoloxidase activity

Substrate	Relative activity %
Chlorogenic acid	100**
Caffeic acid	83.35
Pyrocatechol	29.75
d-catechin	13.72
Rutin	0
Tyrosine	0
m-Cresol	0
p-Cresol	0

**Activity at 30°C, pH 6, 5×10^{-3} M

것이다. 붉은 서나물 잎 중에 있는 PPO의 기질의 구조는 Fig. 3A에 나타내었으며, 이를 기질에 대한 효소활성이 chlorogenic acid가 가장 크며 그 다음으로 caffeic acid, pyrocatechol, d-catechin의 순이었다. Monophenol인 tyrosine, m-cresol, p-cresol과 rutin에 대한 활성은 전혀 나타나지 않았다. 붉은 서나물잎에 존재하는 PPO는 1, 2위치에 OH기를 가진 pyrocatechol에 대한 친화성보다 4위치에 α,β -unsaturated carboxylate를 가진 caffeic acid에 대한 친화도가 약 2.8 배 높은 것으로 나타났다. 구조적으로 α,β -unsaturated carboxylate에 OH기가 치환된 알킬기가 있는 chlorogenic acid에 대한 친화도가 가장 높은 것으로 나타나 폴리페놀성 OH뿐만 아니라 산화될 수 있는 조건의 구조를 가진 기질에 대한 친화도가 있을 것으로 예상된다. d-Catechin은 pyro-catechol의 약 46% 정도로 친화도를 나타내었는데 입체적인 구조로 인하여 PPO와 결합하는 데 있어서 방해

Table III – Effect of inhibitory factor on enzyme activity

Inhibitors	Concentration (final) Mol.	Rate*	Inhibition (%)
None**	-	4.14	
Sodium diethyldithiocarbamate	10^{-2}	0	100
Sodium diethyldithiocarbamate	10^{-3}	3.83	7.49
Sodium diethyldithiocarbamate	10^{-4}	4.03	2.66
Potassium cyanide	10^{-2}	0	100
Potassium cyanide	10^{-3}	1.72	58.45

*Oxygen uptake per min.

**Chlorogenic acid (5×10^{-3} M) as a substrate.

를 받은 것으로 예측되었다. Rutin은 dihydroxyphenyl 구조를 가지고 있으나 quinone의 영향으로 resonance를 이루어 활성 상태에서는 1 위치의 OH가 carbonyl의 형태로 바뀌어 monophenol이 됨으로써 PPO에 대한 친화도가 나타나지 않은 것으로 생각된다. 따라서 붉은 서나물 잎에 있는 PPO는 dihydroxyphenyl 기에 산화받기 쉬운 OH기가 많은 alkyl기로 치환된 α,β -unsaturated carboxylate 기가 연결된 catechol에 대한 친화도가 높은 것으로 나타났다. Tyrosine에 대한 기질 특이성이 없는 점으로 보아 붉은 서나물 잎에 monophenolase는 존재하지 않을 것으로 추정된다. Polyphenoloxidase는 식물종에 따라 기질 특이성이 다르며 이것은 해당 식물의 polyphenol 물질과 연관이 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 식물에 있는 polyphenoloxidase의 chlorogenic acid에 대한 활성이 가장 큰 것은 본 식물 중에 chlorogenic acid의 존재와도 관계가 있는 것으로 볼 수 있으며 본 식물의 polyphenoloxidase는 catecholase임을 알 수 있었다.

PPO 활성에 대한 저해제의 영향 – Table III에 효소 활성에 대한 저해제의 영향을 나타내었다. Sodium diethyldithiocarbamate, potassium cyanide 각각 10^{-2} M의 농도에서 붉은 서나물 잎의 PPO를 강력히 저해하며 농도가 낮을수록 저해작용이 약한 것으로 나타났다. 실험 결과 potassium cyanide, sodium diethyldithiocarbamate 같은 copper chelating 시약에 의해서 본 식물에서 얻은 효소의 작용이 강한 저해를 받는다는 것은 이 효소가 동을 함유한 polyphenoloxidase임을 알 수 있으며 또한 이 효소는 o-diphenol 화합물중에서도 chlorogenic acid에 대한 친화력이 가장 큰 것으로 나타났다. PPO는 산화효소로써 식물뿐만이 아니라 동물에도 광범위하게 존재하여 노화를 촉진하는 주효소이므로 기질특이성과 저해제에 대한 영향을 규명하는 것은 노화 연구의 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

DPPH를 이용한 항산화 작용 – 농도 변화에 따른 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 62% 소거율을 보였으며 $75 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 85%의 소거율을 보여 농도 의존적으로 라디칼 소거 활성이 나타났음을 알 수 있었다. 50% 라디칼 소거활성을 나타내는 IC_{50} 은 $40.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ (ascorbic acid $IC_{50}=3.46 \mu\text{g}/\text{mL}$)으로 유

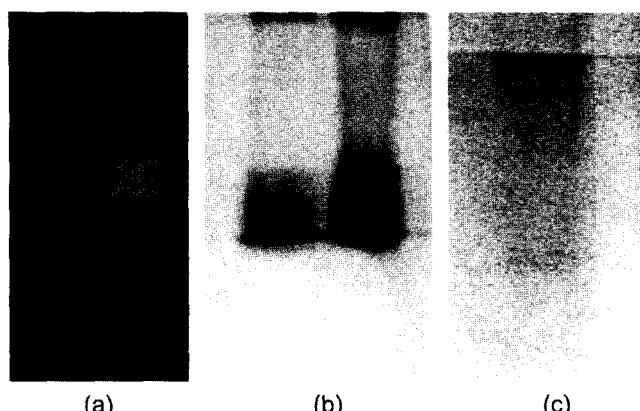


Fig. 4 - Zymogram showing the native PAGE pattern of *Erechites hieracifolia* Raf. 6.33 µg and 12.66 µg protein was loaded to each lane. SOD pattern; (a), POD pattern; (b), CAT pattern; (c).

으론 있는 활성을 나타내었다.

전기영동을 통한 항산화효소의 밴드 패턴 – 각 well 당 농도가 각각 6.33 µg, 12.66 µg인 시료를 점적하였다. Fig. 4의 (a)는 SOD의 native PAGE 밴드 패턴을 보여주고 있으며, 그 결과 4 개의 동위효소를 갖고 있었으며, H₂O₂와 CN-에 의한 저해능 실험을 통해 각각 한 개가 Mn SOD, Fe SOD이고 두개가 Cu/Zn SOD임이 동정되었다. (b)는 POD의 native PAGE로 4 개의 동위 효소가, (c)는 CAT의 native PAGE로 2 개의 동위 효소가 동정되었다.

결 론

붉은 서나물잎의 polyphenol 성분중 paper chromatography 법으로 chlorogenic acid를 분리 확인하였으며, polyphenoloxidase의 기질에 대한 특이성은 chlorogenic acid에 대한 활성이 가장 크고 그 다음이 caffeic acid이며 monophenol류에 대한 활성은 없었고, 붉은 서나물 잎에 있는 PPO는 sodium diethyldithiocarbamate, potassium cyanide에 의해서 그 활성이 크게 저하되었다. DPPH 라디칼 소거활성 IC₅₀은 40.6 µg/mL로 유의성 있는 활성을 나타내었다. 붉은 서나물 잎에서 항산화 효소인 SOD, POD, CAT의 동위효소를 Native PAGE banding을 통하여 각각

4개, 4개, 2개로 본 논문에서 처음으로 동정되었다. 산화효소와 항산화효소는 노화를 촉진하고, 억제한다는 상반되는 개념의 효소이므로, 산화효소에 대한 기질특이성이나 저해제의 영향을 규명하는 것은 노화연구의 기초자료로 활용될수 있을 것이다. 또한 한 식물체내에 존재하는 산화효소와 항산화효소의 상관 관계는 앞으로 더 연구되어야 할 과제이다.

문 헌

- 1) 이영노, 원색한국식물도감, 교학사, p.804 (1998).
- 2) 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).
- 3) Soto-Valdez H, Trejo-Gonzalez A. : Isolation and partial characterization of phenoloxidase from apples (*Malus domestica*, var. Anna). *Arch. Latinoam Nutr.* **39**(2), 171 (1989).
- 4) Thygesen P. W., Dry I. B., Robinson S. P. : Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiology* **109**(2), 525 (1995).
- 5) 김안근, 김유경 : 들깨잎 polyphenol oxidase의 세포내 분포 및 특성. *약학회지* **43**, 709 (1999).
- 6) John G. S. : Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**, 225 (1974).
- 7) Bradford M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 8) Beauchamp C., Fridovich I. : Superoxide dismutase; improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276 (1971).
- 9) Clare D. A., Duong M. N., Darr D., Archibald E., Fridovich I. : Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Anal. Biochem.* **140**, 532 (1984).
- 10) Inal, M. and Kanbak, G. : Antioxidant status and lipid peroxidation in red blood cells of *p*-aminophenol-treated rats. *Med. Sci. Res.* **25**, 323 (1997).