

高等 植物中の Polyphenol 成分에 관한 연구(IV)

朴 秀 善 · 韓 貞 順

숙명여자대학교 약학대학

Studies on Polyphenols in Higher Plants(IV)

Soo Sun PARK and Jung Soon HAN

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

Polyphenol substances involved in the browning of *Malus asiatica* NAKAI ("Hong-ok") were examined. It was found that chlorogenic acid was the principal substance. The estimation of polyphenol oxidase activity in *Malus asiatica* revealed that its browning reaction was caused by enzymatic oxidation of chlorogenic acid.

서 론

Polyphenol 성분중 식물생리에 주요한 위치를 차지하고 있는 chlorogenic acid는 식물의 갈변에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. chlorogenic acid는 식물에 널리 분포되어 있으며¹⁻⁴⁾ URITANI 등은 흑반병에 걸린 고구마에 특히 많은 양의 chlorogenic acid가 축적되어 있다는 것을 보고하였으며⁵⁾ IMASEKI는 *Viburnum*속 식물에서 chlorogenic acid 및 그 이성체를 검출하고 그 식물에서 갈변은 chlorogenic acid의 산화중합에 의해서 일어나며 특히 세포의 단백질이 갈변반응에 관여하고 있다고 보고하고 있다.⁶⁾ 또 NAKABAYASHI, HORIKAWA 등은 국광에서 polyphenol물질을 추출하고 과육의 갈변을 검토하였다.^{7,8)}

저자는 국산 홍옥과육의 갈변도 polyphenol 성분의 산화반응에 기인되는 것으로 추측하고 홍옥에서 polyphenol 성분을 검출하고 또 산화효소를 추출하여 그 활성을 측정하여 홍옥의 갈변에 관하여 위의 양자의 관련성을 검토하여 그 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

실 험

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 재료는 신선한 국산시판 홍옥 품종을 사용하였다.

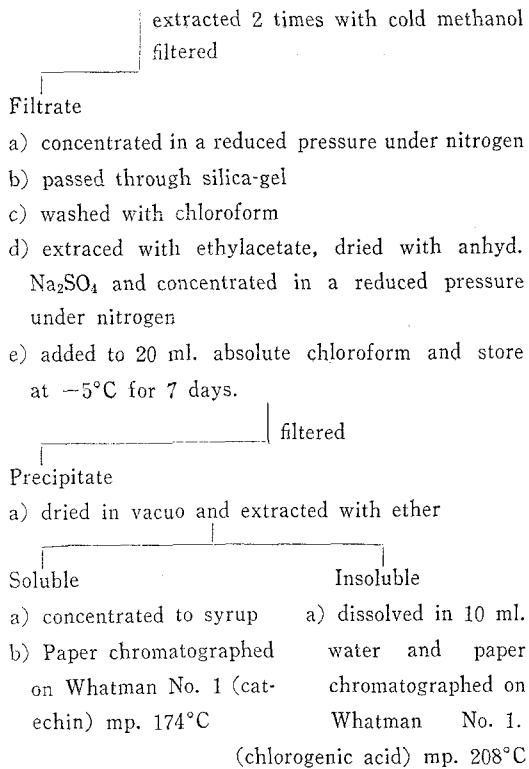
2. Polyphenol 성분의 추출

홍옥 3.0kg을 껍질과 씨를 제거한 후 과육을 세절하여 2배량의 빙냉 methanol에 넣고 빙냉하면서 blender로 마쇄하여 여과한다. 잔사는 다시 2회 같은 방법으로 처리하고 전 추출액을 합하여 여과하여서 황색 투명의 여액을 얻었다. 이것을 N₂ 기류중에서 감압 농축하여 그 농축용액을 구조토층을 통과시키고 그 여액을 chloroform으로 2회 세척하여 황색색소를 제거하고 ethylacetate로 반복 추출하였다.

무수망초로서 탈수후 N₂ 기류중에서 감압농축하고 이것에 무수 chloroform을 적가하면 담갈색 침전이 생긴다. 잠시후 액이 백탁되기 시작하면 무수 chloroform의 주가를 그만두고 -5°C에서 1주간 방치후 생긴 침전을 모아 진공 데시케타에서 건조후 분쇄하여 soxhlet 장치를 사용하여 ether로서 추출한다. 먼저 ether추출

불용성분을 소량의 물에 녹여서 황성탄을 넣어 탈색후 N₂ 기류중에서 감압농축하여 냉장하면 결정이 생긴다. 이것을 ethylacetate로 추출하여 반복 재결정하여 백색 물질①을 얻었다. 다음 ether추출액을 무수 망초로서 탈수후 ether을 유기하여 잔사를 소량의 물에 녹여서 냉장하여 무수관상 물질②를 얻었다.⁷⁾

Malus asiatica NAKAI "Hong-ok" 3.0 kg



Scheme 1. Method of isolation of chlorogenic acid from *Malus asiatica* NAKAI "Hong-ok"

3. Polyphenol 성분의 분리 및 확인

1) P.P.C.법에 의한 확인 :

2-2에서 얻은 물질①을 소량 취하여 methanol에 용해하여 P.P.C.법을 실시하였다. 여지는 Whatman No. 1을 사용하였고 18°C에서 일차원 이차원 상승법으로 전개하였다.

일차원시의 전개 용매로는 n-butanol: acetic acid: water (4:1:2), 6% acetic acid, ethylacetate: formic acid: water (10:2:3)으로 전개하였고 2차원의 전개용매로는 n-butanol: acetic acid: water (4:1:2)로서 전개한후 6% acetic acid로 전개하였다.

여지를 풍건한 후 자외선 하에서 관찰하면 chlorogenic acid 유사 물질은 청색형광을 나타내었다. 이 부분을 spot I 이라하고 그 Rf치 및 Rc치를 측정하였다. chromatogram상에 alcohol성 FeCl₃, hoefner's reagent를 분무하고 또 uv-fluorescence, uv-fluorescence with NH₃를 통하여 그 정색을 관찰하여 확인하였다. 또 mp도 측정하여 확인하였다⁸⁾.

2) UV Absorption Spectrum:

이차원 P.P.C.에서 얻은 chromatogram을 충분히 풍건시킨 후 자외선 하에서 청색 형광을 나타내는 부분 즉 Spot I의 Rf치에 해당하는 부분을 절취하여 methanol로서 추출 여과하여 이 여액을 Beckman Model DU Spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 비교확인하였다.

3) IR Absorption Spectrum:

2-2에서 얻은 물질①을 KBr 정제법으로 하여 적외선 흡수대를 측정하였으며 표준품 chlorogenic acid도 동일한 방법으로 측정하여 비교하였다⁹⁾.

4. Polyphenol oxidase의 실험

1) Polyphenol oxidase의 조제 :

홍옥 300g을 껍질을 벗기고 씨를 제거한 후 과육을 세절하여 2배량의 빙냉 무수 acetone으로 빙냉하면서 blender로 마쇄여과하고 잔사를 70% acetone으로 3회 위와 같은 방법으로 처리하고 잔사를 다시 빙냉 무수 acetone으로 처리하여 잔사를 진공 데시케타에서 건조시켜 백색분말의 조효소를 얻었다.

2) Polyphenol oxidase activity의 측정 :

효소활성의 측정은 비색법에 의하여 측정하였다. 반응 조건은 polyphenol 물질 5×10⁻⁴ M을 mcilvaine buffer pH 4 10ml에 용해하고 조효소 70mg을 첨가한 후 즉시 공기를 넣으면서 30°C에서 반응시켜 여과하고 그 여액을 420mμ에서 그 흡광도를 Beckman Model DU Spectrophotometer로 측정하였다¹⁾.

가) 최적 pH

chlorogenic acid(5×10⁻⁴M)을 각각의 pH (3, 4, 5, 6)의 mcilvaine buffer 10ml에 용해하고 조효소 70mg을 첨가하여 즉시 공기를 넣으면서 30°C에서 10분간 반응시킨후 흡광도를 측정하였다.

나) 최적온도

chlorogenic acid (5×10⁻⁴M)을 pH 4의 mcilvaine buffer 10ml에 용해하고 조효소를 첨가후 10°C 간격으로 10~40°C의 온도에서 위와 동일한 방법으로 반응시킨 후 반응액의 흡광도를 측정하였다.

다) 기질에 대한 특이성

최적온도, 최적 pH에서 각종 polyphenol 물질 즉 D-catechin, caffeic acid, pyrogallol과 ascorbic acid, tyrosine, phenol ($5 \times 10^{-4}M$)을 기질로 하여 10분 간격으로 30분 동안 조효소와 반응시켜 그 활성을 측정하였다.

라) 저해물의 영향

최적온도 최적 pH에서 polyphenol oxidase에 대한 저해물의 영향을 조사하기 위해 polyphenol 물질인 D-catechin을 기질로 하여 ascorbic acid, thiourea, NaCl, $MgCl_2$, KCl등을 가하여 위의 동일한 방법으로 반응시켜 그 활성을 측정하였다.

마) Polyphenol 물질의 Polyphenoloxidase에 의한 산화 반응의 Paperchromatography

최적온도, 최적 pH에서 chlorogenic acid($5 \times 10^{-4}M$)을 McIlvaine buffer 10ml에 용해시켜 조효소 70mg을 첨가후 공기를 넣으면서 반응시켜 Whatman No. 1여지에 즉시 점적하고 다시 5분 10분후에 점적하여 n-butanol: acetic acid: water (4:1:2), 6% acetic acid에 전개하여 polyphenol oxidase에 의하여 산화되는 chlorogenic acid와 시간이 경과함에 따라 형성되는 갈색 색소를 관찰하였다.

또한 동일한 방법으로 chlorogenic acid($2.5 \times 10^{-4}M$)와 D-catechin($2.5 \times 10^{-4}M$)의 혼합효소 반응액에 대해서도 시험하였다.

5. 아선약에서 D-catechin의 추출 및 확인

시판 아선약 150g을 70~80°C에서 충분히 건조시킨 후 분쇄하여 3배량의 두수 ethylacetate로 10시간 추출한다. 추출액을 N_2 기류중에서 감압농축하여 ethylacetate를 유거하고 잔류액에 소량의 증류수를 가하여 ethylacetate를 완전히 유거하여 D-catechin의 조결정을 얻었다. 이것을 황성탄을 가하여 열수에서 반복 재결정하여 D-catechin의 결정을 얻었다. 이 결정의 mp는 174°C로서 표준품의 D-catechin과 동일하였다.

6. Caffeic acid ethyl ester의 조제 및 효소산화 반응

caffeic acid 200mg을 ethanol(99.5%) 10ml에 용해하고 c- H_2SO_4 3ml를 가하여 70~80°C에서 3시간 ester화 시켰다. ethanol을 유거하고 수용액을 증성~약 알칼리로 하고 soxhlet 추출기를 사용하여 ethyl ether로서 10시간 추출하여 ether 추출액을 망초로 탈수후 ether를 유거하면 caffeic acid ethyl ester의 조결정이 생긴다.

이것을 70% alcohol에서 반복 재결정하여 caffeic acid ethyl ester의 회황색 결정을 얻었다. 위에서 얻은 결

정의 mp는 147°C이고 표준품의 caffeic acid ethyl ester의 mp와 동일하였다.

caffeic acid ethyl ester의 효소 산화 반응을 보기 위하여 위에서 얻은 caffeic acid ethyl ester ($5 \times 10^{-4}M$)을 기질로 하여 mcilvaine buffer(30°C pH 4) 10ml에 용해하여 조효소 70mg을 첨가후 즉시 공기를 넣으면서 30분간 반응시켜 반응액의 갈변 유무를 관찰하였다. 또한 quinic acid도 동일한 방법으로 반응시켜 반응액의 색조로 비교 관찰하였다.

결 과 및 고 찰

Table I-A에서와 같이 spot I은 각종 용매에서 chlorogenic acid와 동일한 Rf치를 나타내며 그 Rc치도 1이다.

Table I-B에 표시한 바와 같이 그 경색 반응도 동일하다. 2-2에서 얻은 물질①의 mp는 208°C이었고 표준품 chlorogenic acid와 혼용 시험에도 융점의 강하가 없었다.

Table I. (A): Rf Values of polyphenol in *Malus asiatica* NAKAI

Solvent	Spot I		Chlorogenic acid	
	Rf	Rc	Rf	Rc
n-butanol: acetic acid: water (4 : 1 : 2)	0.62	1.00	0.62	1.00
6% acetic acid	0.60	1.00	0.60	1.00
ethylacetate:formic acid:water (10 : 2 : 3)	0.88	1.00	0.88	1.00

(B): Color reaction of polyphenol in *Malus asiatica* NAKAI

Reagent	Spot I	Chlorogenic acid
$FeCl_3$	gray green	gray green
UV-fluorescence	blue	blue
UV-fluorescence with NH_3	yellowish green	yellowish green
HOEFNER's reagent	red brown	red brown

Fig. 1. 및 Fig. 2에서와 같이 spot I의 UV흡수 spectrum, IR 흡수 spectrum도 chlorogenic acid의 그것과 유사하며 UV흡수 spectrum에서 $\lambda_{max} = 324m\mu$ 이었다. 이상과 같은 실험 결과에서 spot I은 chlorogenic acid라고 확인 된다.

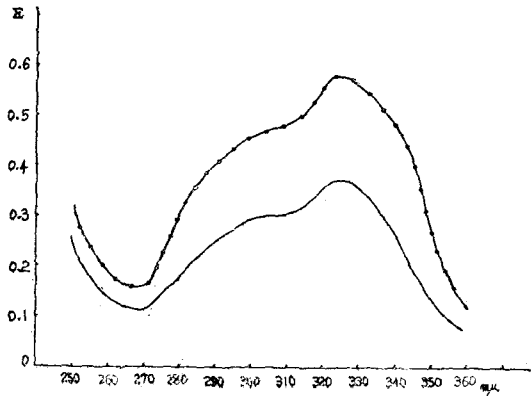


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectra of eluate of spot I in *Malus asiatica* NAKAI "Hong-ok" and chlorogenic acid

— = Spot I
 + + + + = Chlorogenic acid

250 300 350 400 450 500 550 600 650

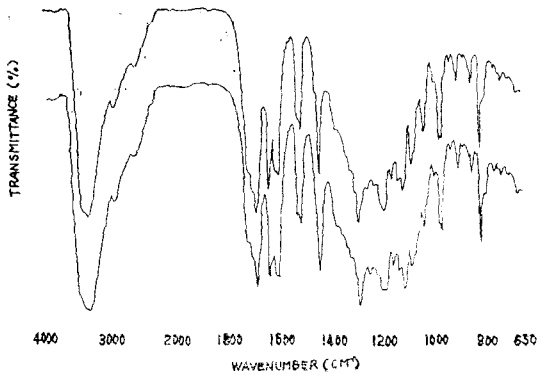


Fig. 2. Infrared absorption spectra
 upper curve=chlorogenic acid
 lower curve=spot I of *Malus asiatica* NAKAI

신선한 홍옥과즙의 pH는 거의 3.5~4이며 즉시 갈변된다. 그러므로 chlorogenic acid를 기질로 하며 10분간 각종 PH(3,4,5,6) 각각의 온도(10°C, 20°C, 30°C, 40°C)에서 조효소와 반응시켜 흡광도를 측정하여 Fig. 3과 같은 pH곡선과 온도 곡선을 얻었다. Fig. 3,4에서 보는 바와 같이 최적 pH는 4이고 최적온도는 30°C이다. 또 pH 3,5,6에서도 반응액의 상당한 갈변이 인정되었고 10°C 20°C 40°C에서도 반응액의 갈변이 인정되었다.

pH 4 30°C에서 각종 polyphenol물질을 기질로 하여 조효소와 30분간 반응시켜 효소의 활성을 측정하여 polyphenol oxidase에 대한 각 기질에 대한 특이성은 Fig. 5.에 나타내었다. Fig. 5.에서 보는 바와 같이 본

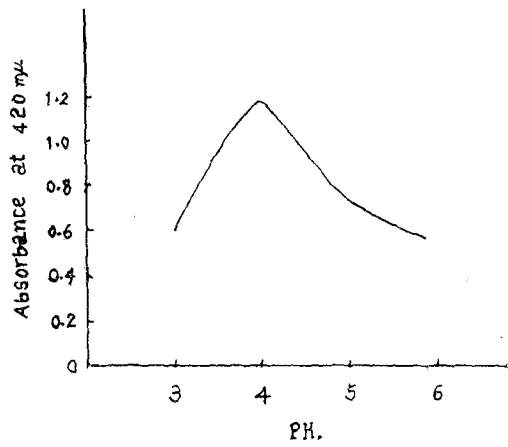


Fig. 3. Optimum pH of chlorogenic acid by crude enzyme (polyphenol oxidase) from *Malus asiatica* NAKAI

chlorogenic acid 5×10^{-4} M
 crude enzyme (polyphenol oxidase) 70mg
 mcilvaine buffer 10ml (pH 3, 4, 5, 6)
 temp. 30°C 10min.

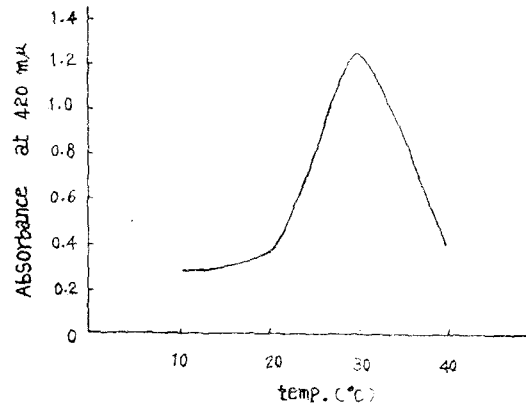


Fig. 4. Optimum temp. of chlorogenic acid by crude enzyme (polyphenol oxidase) *Malus asiatica* NAKAI

chlorogenic acid 5×10^{-4} M
 crude enzyme (polyphenol oxidase) 70mg
 mcilvaine buffer 10ml (10°C, 20°C, 30°C, 40°C)
 pH4 10min.

효소제는 D-catechin, chlorogenic acid등의 o-diphenol 등을 강하게 산화시키고 그중에서도 chlorogenic acid의 산화가 가장 크다. 시간이 경과함에 따라 반응액의 갈색도는 증가하고 효소제의 갈색도도 증가하는 것을 볼 수 있다.

chlorogenic acid의 갈색도는 사과 과즙의 갈색도와 매우 유사하였다.

D-catechin의 효소 반응액은 황색을 띤 갈색이며 효

소제는 등황색을 나타내었다. tyrosine, phenol, ascorbic acid의 효소 반응액과 효소제는 시간이 경과함에도 조도 변화하지 않았고 거의 산화되지 않았다.

caffeic acid, pyrogallol의 산화는 약하며 두 효소반응액 색조는 chlorogenic acid의 갈색도와 유사하였다.

위 반응에서 polyphenol oxidase는 pyrogallol 같은 triphenol류를 약하게 산화시킨다는 것을 알 수 있다. 또한 caffeic acid ethyl ester의 효소 반응액도 caffeic acid의 효소 반응액의 색조와 유사 하였다.

chlorogenic acid의 구성 성분인 quinic acid도 동일한 효소 반응을 하여 관찰하였더니 반응액과 효소제는 아무런 변화가 없었다. 이상과 같은 여러 종류의 효소반응액의 색조를 비교하여 Table II에 명시하였다.

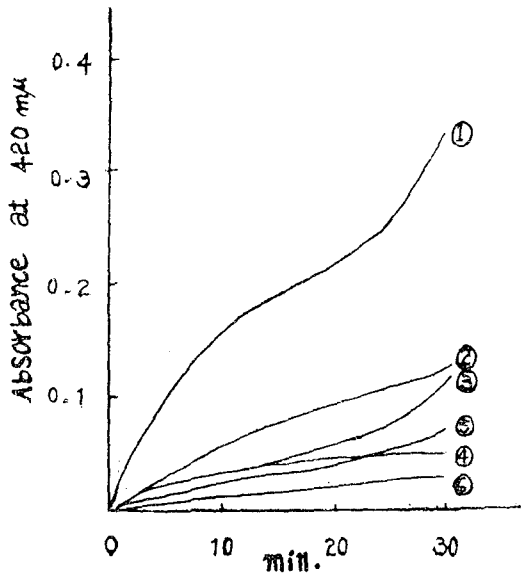


Fig. 5. Oxidation of some substrates by the polyphenol oxidase from *Malus asiatica* NAKAI substrate $5 \times 10^{-4}M$

- ① D-catechin
- ② pyrogallol
- ③ caffeic acid
- ④ ascorbic acid
- ⑤ phenol
- ⑥ tyrosine

crude enzyme (polyphenol oxidase)
Mcilvaine buffer 10ml (30°C pH 4)
30 min.

또 polyphenol oxidase의 저해제에 의해서 일어나는 그 같은 반응과 효소 활성에 미치는 영향을 보기 위해서 기질로는 D-catechin ($5 \times 10^{-4}M$)을 사용하고 30°C

pH 4에서 여러가지 저해제를 첨가하여 조효소를 가한 후 효소활성을 측정하여 Fig. 5에서 나타내었고 그 효소저해율(%)을 Table III에 나타내었다.

Table II. The color of the reaction mixture (30°C pH 4, 30 min)

Substrate $5 \times 10^{-4}M$	Buffer sol.	Polyphenol oxidase
Chlorogenic acid	reddish brown	brown
D-catechin	yellowish brown	yellow
Pyrogallol	reddish brown	dark brown
Ascorbic acid	nil	nil
Phenol	nil	nil
Tyrosine	nil	nil
Caffeic acid	pale brown	brown
Quinic acid	nil	nil
Caffeic acid ethyl Ester	pale brown	brown

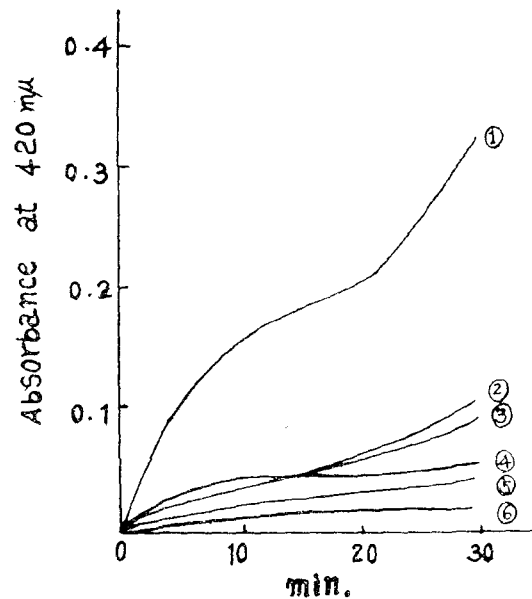


Fig. 6. The inhibition of some substances on the polyphenol oxidase from *Malus asiatica* NAKAI substrate $5 \times 10^{-4}M$

- ① D-catechin
- inhibitor
- ② $MgCl_2$ ($5 \times 10^{-4}M$)
- ③ KCl ($5 \times 10^{-2}M$)
- ④ ascorbic acid ($5 \times 10^{-4}M$)
- ⑤ NaCl (1M)
- ⑥ thiourea ($5 \times 10^{-4}M$)

crude enzyme (polyphenol oxidase) 70mg
 mcilvaine buffer 10ml(30°C pH 4)
 30min.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 MgCl₂, ascorbic acid, NaCl, KCl, thiourea와 같은 저해제에 의하여 polyphenol-oxidase의 활성이 크게 감소됨을 보였으며 Table III에서와 같이 thiourea가 polyphenol oxidase의 활성을 가장 많이 저해하였으며 반응액과 효소제는 조금도 변화

지 않았다. KCl과 MgCl₂는 효소 반응 용액과 효소제가 약간 갈변하였으며 이 갈변은 시간이 경과함에 따라 조금씩 진해지는 것을 볼 수 있었다. 이 색조는 D-catechin효소 반응액의 색조와 유사했으며 그것보다는 색조가 옅었다.

Fig. 6.에서 보는 바와 같이 polyphenol oxidase에 의한 chlorogenic acid의 효소반응액의 chromatogram에서 시간이 경과함에 따라 chlorogenic acid가 polyphenol

Table III. Inhibition of some substances on the polyphenol oxidase from *Malus asiatica* NAKAI.

Inhibitors	Concentration(M)	Reaction time(min)	Absorbance at 420m μ	Inhibition (%)
Thiourea	5×10^{-4}	10	0.01	93.75
		20	0.017	91.72
		30	0.025	92.54
Ascorbic acid	5×10^{-4}	10	0.045	71.9
		20	0.055	73.2
		30	0.065	80.6
NaCl	1	10	0.022	86.25
		20	0.035	82.93
		30	0.045	86.57
MgCl ₂	5×10^{-1}	10	0.037	78.9
		20	0.07	65.9
		30	0.115	65.7
KCl	5×10^{-2}	10	0.035	79.4
		20	0.06	70.7
		30	0.095	71.2

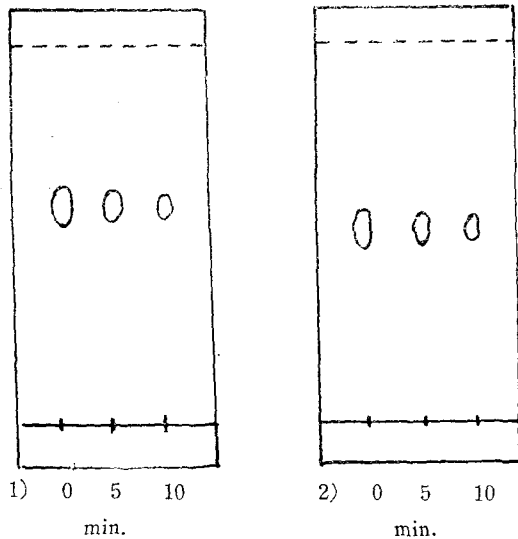


Fig. 7. Paper chromatogram of the reaction mixture
 1) 2) substrate
 chlorogenic acid $5 \times 10^{-4}M$
 crude enzyme (polyphenol oxidase) 70mg
 mcilvaine buffer 10ml(30°C pH 4)
 developing solvent 1) n-butanol: acetic acid:
 water(4:1:2)
 2) 6% acetic acid

oxidase에 의하여 산화되어 양이 점점 적어진 것을 볼 수 있고 chlorogenic acid와 D-catechin의 혼합 효소 반응액의 chromatogram에서도 동일하게 나타났다.

이상의 실험을 종합고찰하던 홍옥의 껍질을 벗긴 후의 갈변 현상은 과육중에 있는 chlorogenic acid의 polyphenol oxidase에 의한 산화 반응이 주요한 원인인 것으로 추정된다.

결 론

1. 국산 *Malus asiatica* NAKAI "Hong-ok"에서 chlorogenic acid 및 polyphenol oxidase를 확인하였다.
2. 홍옥의 갈변 현상은 chlorogenic acid가 polyphenol oxidase에 의해 산화되는 반응이 주요한 원인의 하나라고 추정된다.

<1975. 1. 6 접수>

문 헌

- 1) HULME, A.C.: *J. Biochem.* 53, 337 (1953).
- 2) CORSE, J.: *Nature* 172, 771 (1953).
- 3) SONDERHEIMER, E.: *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 131 (1956).
- 4) HERRMANN, K.: *Pharmazie* 11, 433 (1956).
- 5) URITANI, I., and MIYANO, M.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 29, 156 (1955), Part II.
- 6) IMASEKI, H.: *Bot. Mag. Tokyo.* 72, 316 (1959).
- 7) NAKABAYASHI, T.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 27: (1953) Part I.
- 8) 平田政雄, 堀川博朗, 村井幸代: 東京家政大學 研究紀要, 43~49 (1969).
- 9) URITANI, I., and MIYANO, M.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* (1954), Part I.
- 10) NAKABAYASHI, T.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 27, (1953), Part II.
- 11) URITANI, I. HOSHIYA, I. TAKITA, S.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* (1953), Part II.