

Chrysanthemum indicum var. *indica* Max. (f. sin-dong-a)의 꽃잎 및 *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max. 잎의 갈변에 관한연구

金 安 根 · 朴 秀 善

숙명여자대학교 약학대학

(Received may 4, 1981)

Ahn Keun Kim and Soo Sun Park

College of Pharmacy, Sookmyung Women's Univesity, Seoul 140, Korea.

Studies on the Browning in the Petals of *Chrysanthemum indicum* var. *indica* Max. (f. sin-dong-a) and leaves of *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max.

Abstract—Polyphenol oxidase activity in the petals of *Chrysanthemum indicum* var. *indica* Max. (f. sin-dong-a) and the leaves of *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max was estimated by means of Warburg's manometric method.

The browning reaction in owing to the oxidation of chlorogenic acid with polyphenol oxidase.

식물조직중의 polyphenol oxidase에 의한 polyphenol 물질의 산화에는 대개 갈변이 수반된다는 사실에 대하여 많은 보고가 있다.

Nelson과 Dawson⁵⁾은 비섯의 효소적인 갈변에 관하여, Reyes⁶⁾ 등은 복숭아 polyphenolase, Ruh⁷⁾ 등은 배의 polyphenol oxidase, Sakamura⁸⁾ 등은 비섯 및 가지 polyphenol oxidase에 관한 연구를 하였다. Skalski⁹⁾ 등은 catechol, caffeic acid는 포도의 polyphenol oxidase의 양호한 기질이 되며 Kahler¹⁰⁾ 등은 복숭아의 polyphenol oxidase는 catecholase의 성질만을 나타낸다고 보고하였다. Arnon¹¹⁾, Knapp¹²⁾ 등은 polyphenol oxidase가 copper-chelating agent인 1-phenyl-2-thiourea 및 sodium diethyldithiocarbamate에 의해 그 작용이 저해된다고 발표하였다.

또 Nakabayashi¹³⁾ 등은 사과 polyphenol oxidase는 NaCl에 의해 그 작용이 저해를 받으나 peroxidase는 활성화되는 경향이 있다고 하였으며 Imaseki¹⁴⁾는 잎의 갈변은 chlorogenic acid의 산화, 중합이외에 세포단백질도 관하여한다고 추정하였다. 저자는 국화의 꽃잎 및 쑥잎의 물추출물의 갈변을 규명하기 위하여 위의 양 식물체에서 polyphenol 물질 및 polyphenol oxidase에 관한 실험을 실시하여 약간의 지견을 얻었으므로 보고코저 한다.

實 驗 方 法

실험재료—실험에 사용한 재료는 신선한 *Chrysanthemum indicum* var. *indica* Max. (f. sin-dong a) 꽃잎과 *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max. 잎을 사용하였다.

Polyphenol 성분의 분리 및 확인— P.P.C. 및 T.L.C. 법에 의한 확인 : 신선한 국화꽃잎과 쑥

잎 각각 50g을 80% MeOH로 추출하여 P.P.C, T.L.C법으로 실시하였다. cellulose powder T.L.C에서 n-BuOH : AcOH:H₂O (4:1:2)를 전개용매로 사용할 때 자외선하에서 청색형광을 나타내고 암모니아를 조사할 때 황록색을 나타내는 두개의 spot 중 chlorogenic acid와 동일한 R_f치를 나타내는 것을 spot I, 그보다 큰 R_f치를 가진 spot를 spot II 라고 하였다.

2) UV Absorption Spectrum : 이차원 P.P.C (일차시 n-BuOH: AcOH: H₂O (4:1:2) 이차시 6% AcOH)에서 얻은 chromatogram을 충분히 풍건시킨 후 자외선하에서 spot I, spot II의 R_f치에 해당하는 부분을 오려내어 세절한 후 EtOH로서 추출여과하여 이 여액을 사용하여 흡광도를 측정하였다.

Polyphenol oxidase의 실험—polyphenol oxidase의 조제는 신선한 국화꽃잎과 썩잎 각각 300g을 세절하여 dry ice로 빙냉한 2배량의 acetone으로 빙냉하면서 blender로 마쇄여과하고 잔사를 다시 빙냉 acetone으로 처리하여 잔사를 진공데시케타에서 건조시켜 조효소를 얻어 -20°C에서 보존하였다.

Warburg 장치에 의한 polyphenol oxidase activity의 측정에서의 반응조건은 일정량의 기질을 McIlvaine's buffer 1ml에 녹여 반응푸라스크의 측실에 넣고 주실에는 효소(국화 20mg, 썩 10mg)를 완충액에 현탁시키고 부실에는 roll paper를 넣고 20%KOH 0.25ml를 가하고 매분 120회전으로 반응시켜 산소흡수량을 측정하였다.

최적 pH 실험은 pyrocatechol ($4 \times 10^{-3}M$)을 각 pH[국화 : 5, 6, 7, 8, 9 (pH 9는 glycine+NaCl +NaOH buffer), 썩 : 5, 6, 7, 8]의 완충액에 용해하여 측실에 넣고 효소(국화 20mg, 썩 10mg)를 2ml의 완충액에 현탁시킨 액을 주실에 넣은 다음 기질과 효소액을 섞어 국화는 20°C, 썩은 30°C에서 매분 120회 회전시켜 10분 간격으로 60분간 산소 흡수량을 측정하였다.

최적온도는 pyrocatechol ($4 \times 10^{-3}M$)을 국화는 pH 8, 썩은 pH 6 (mcilvaine's buffer)에 녹이고 효소 (국화 20mg, 썩 10mg)을 같은 완충액 2ml에 현탁시킨 다음 국화는 15~30°C, 썩은 20~35°C의 온도에서 매분 120회 회전시켜 10분 간격으로 60분간 산소흡수량을 측정하였다.

기질에 대한 특이성에서는 다음과 같은 조건 (국화 : 20°C, pH 8, 썩 : 30°C, pH 6)에서 각종 polyphenol 물질 (국화 $10^{-3}M$ 의 pyrocatechol, chlorogenic acid, caffeic acid, quinic acid, shikimic acid, phenol, guercetine, gallic acid, resorcinol과 $10^{-2}M$ 의 m-cresol. 썩 : $4 \times 10^{-3}M$ 의 pyrocatechol, chlorogenic acid, caffeic acid와 $10^{-2}M$ 의 m-cresol)을 기질로 하여 10분 간격으로 60분간 산소흡수량을 측정하였다.

또한 국화와 썩에서 얻은 각 효소와 chlorogenic acid를 위와 같은 방법으로 반응시켜 처음 반응액과 10분 경과한 다음의 반응액에 대하여 P.P.C.를 실시하여 chlorogenic acid의 함량변화를 자외선하에서 관찰하였다 (BuOH: AcOH:H₂O (4 : 1:2)).

저해물의 영향을 검토하기 위한 실험에서는 국화(20°C, pH 8)와 썩(30°C, pH 6)의 polyphenol oxidase에 pyrocatechol을 기질로 하여 저해제[국화 : thiourea ($10^{-2}M$ 과 $10^{-3}M$), sodium diethyldithiocarbamate ($10^{-3}M$), NaCl (1M), KCN ($10^{-4}M$), 썩 : thiourea ($10^{-2}M$) NaCl(1M), KCN($10^{-3}M$)]를 가해 위와 같은 방법으로 반응시켜 그 활성을 측정하였다.

實驗結果 및 考察

Table I-(A), (-B)에 표시된 바와 같이 국화 및 썩의 spot I은 각종 용매에서 chlorogenic acid와 동일한 R_f치를 나타내며 그 R_c치도 1이다.

Table. I—(A) R_f values of polyphenols in *Chrysanthemum indicum* var. *indica* Max.

Solvent			Spot I		Spot II		Authentic chlorogenic acid.		
			R _f	R _c	R _f	R _c	R _f	R _c	
n-BuOH	ACOH	H ₂ O	0.75	1	0.87	1.16	0.75	1	T.L.C.
4	:	1 : 2							
6% HAC			0.41	1	0.1	0.24	0.41	1	T.L.C.
Ethylacetate	Formic acid	H ₂ O	0.76	1	0.93	1.2	0.76	1	T.L.C.
10	:	2 : 3							
n-BuOH	AcOH	H ₂ O	0.56	1	0.71	1.27	0.56	1	P.P.C.

(B) R_f values plyphenols in *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max.

Solvent			Spot I		Spot II		Authentic chlorogenic acid.		
			R _f	R _c	R _f	R _c	R _f	R _c	
n-BuOH	AcOH	H ₂ O	0.66	1	0.80	1.21	0.66	1	T.L.C
4	:	1 : 2							
n-BuOH	AcOH	H ₂ O	0.62	1	0.86	1.33	0.62	1	P.P.C
4	:	1 : 2							
6% HAC			0.54	1	0.17	0.31	0.54	1	P.P.C

(C) Color reaction of polyphenols in materials

Reagent	<i>Chrysanthemum indicum</i> var. <i>indica</i>		<i>Artemisia vulgaris</i> var. <i>indica</i>		Authentic chlorogenic acid
	Spot I	Spot II	Spot I	Spot II	
FeCl ₃	gray green	gray green	gray green	gray green	gray green
UV-Fluorecence	blue	blue	blue	blue	blue
UV-Fluorecence with NH ₃	yellowish green	yellowish green	yellowish green	yellowish green	yellowish green
Hoepfner's reagent	red brown	red brown	red brown	red brown	red brown

국화와 씨에 있어서의 정색반응은 Table I-(c)에서 표시된 바와 같이 spot I, spot II 모두가 chlorogenic acid와 동일하게 나타났다.

Fig 1, 2에서와 같이 국화와 씨의 spot I과 spot II의 자외선 흡수곡선이 chlorogenic acid의 그것과 유사하며 $\lambda_{max}=324$ nm이다.

이상의 실험결과에서 국화와 씨의 spot I은 chlorogenic acid라고 확인되며 spot II는 R_f치는 다르지만 자외선 흡수곡선과 정색반응을 볼 때 chlorogenic acid의 이성체라고 추정된다.

Fig. 3은 국화 및 씨의 pH에 대한 영향을 나타낸 것이다. 국화는 20°C, pH 8, 씨는 30°C, pH 6에서 산소의 흡수량이 가장 컸다. 따라서 국화의 최적 pH는 8이며 씨는 6이다.

또한 국화 및 씨의 온도에 대한 영향은 Fig. 4에서와 같이 각각 최적 pH에서 온도에 따라 산소 흡수량을 측정한 결과 국화는 20°C 씨는 30°C에서 가장 크므로 이 온도가 최적 온도에 해당된다.

그리고 국화와 씨의 최적 pH와 온도에서 반응시켰을 때 반응액의 갈변정도도 가장 컸다.

Fig. 5는 국화에서 얻은 효소의 각종 phenol 화합물에 대한 특이성을 조사한 결과이다.

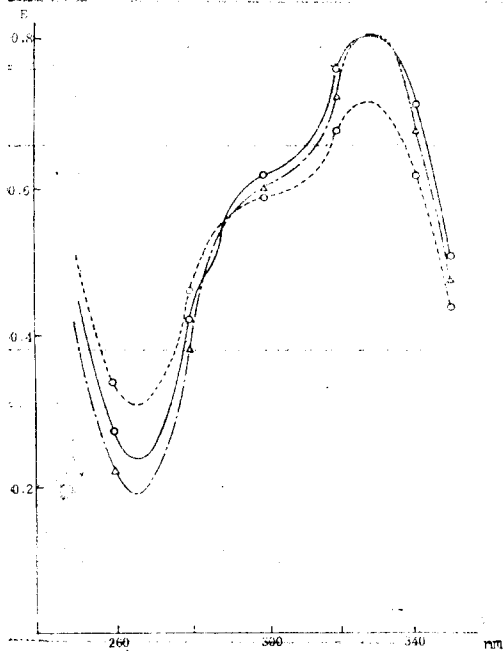


Fig. 1—Ultraviolet absorption spectra of eluate of spots from *Chrysanthemum indicum* var. *indica* Max. and chlorogenic acid.

—△— Chlorogenic acid
 -○- Spot I
 —○— Spot II

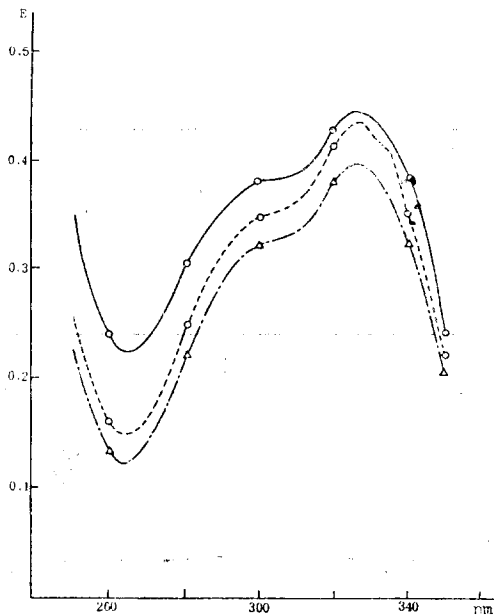


Fig. 2—Ultraviolet absorption spectra of eluate of spots from *Artemisia vulgaris* var. *indica* and chlorogenic acid.

—△— Chlorogenic acid
 -○- Spot I
 —○— Spot II

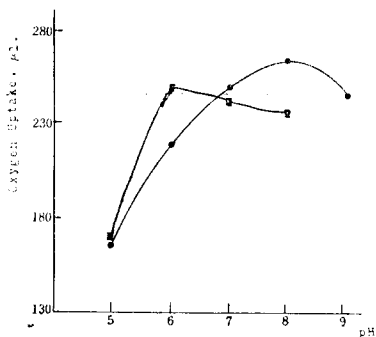


Fig. 3—Effect of pH on the activity of polyphenol oxidase from *Chrysanthemum indicum* var. *indica* Max. (—●—) and *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max. (—■—)
 Pyrocatechol 4×10^{-3}
Chrysanthemum indicum var. *indica* Max. (Enz. 20mg, 20°C) *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max. (Enz. 10mg, 30°C) McIlvaine's buffer 3ml

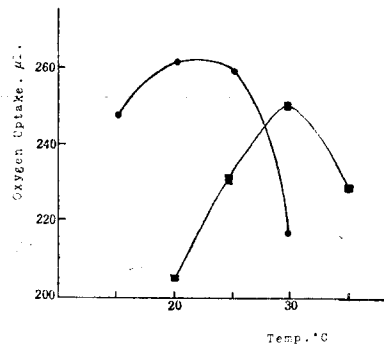


Fig. 4—Effect of temperature on the activity of polyphenol oxidase from *Chrysanthemum indicum* var. *indica* Max. (—●—) and *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max. (—■—)
 Pyrocatechol 4×10^{-3} M
Chrysanthemum indicum var. *indica* Max. (Enz. 20mg, pH 8) *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max. (Enz. 10mg, pH 6) McIlvaine's buffer 3ml

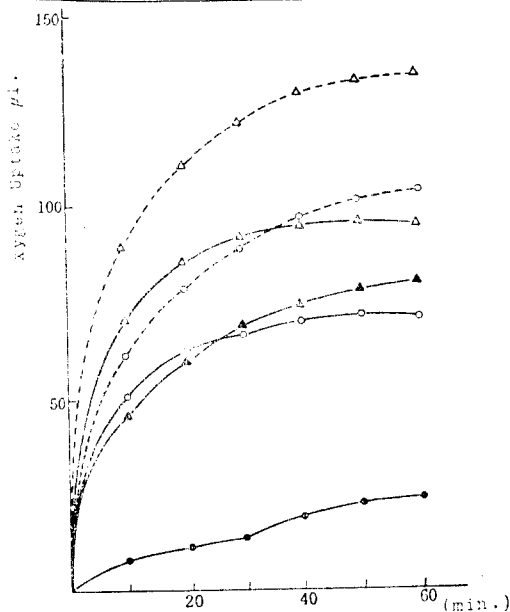


Fig. 5—Oxygen uptake of some polyphenolic substances during the oxidation by the polyphenol oxidase from *Chrysanthemum indicum* var. *indica* Max.

...○... Pyrocatechol $10^{-3}M$
 —○— Chlorogenic acid $10^{-3}M$
 ...△... Caffeic acid $10^{-3}M$
 —△— m-Cresol $10^{-2}M$
 Enzyme 20mg
 McIlvaine's buffer 3ml.(pH8)
 Temp. 20°C

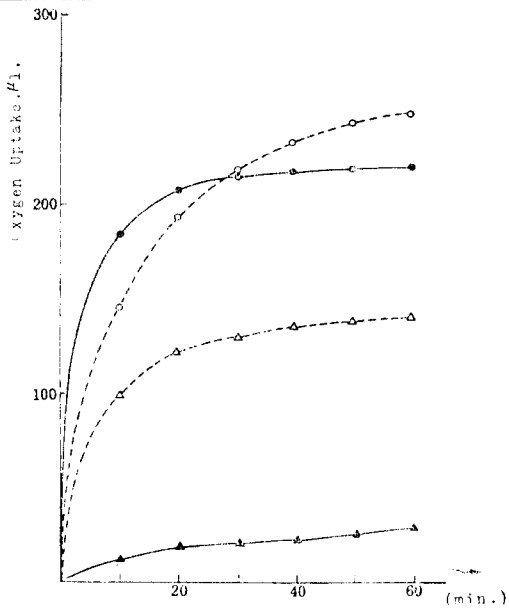


Fig. 6—Oxygen uptake of some polyphenolic substances during the oxidation by the polyphenol oxidase from *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max.

...○... Pyrocatechol $4 \times 10^{-3}M$
 —●— Chlorogenic acid $4 \times 10^{-3}M$
 ...△... Caffeic acid $4 \times 10^{-2}M$
 —▲— m-Cresol $10^{-2}M$
 Enzyme 10mg
 McIlvaine's buffer 3ml. (pH 6)
 Temp. 30°C

도시된 바와 같이 pyrocatechol의 산소 흡수량이 가장 컸고 chlorogenic acid, caffeic acid순이다. 또한 chlorogenic acid의 반응액의 갈색도는 국화꽃잎의 갈변의 색과 유사하였다. chlorogenic acid의 구성성분인 quinic acid도 동일한 효소반응을 보았으나 반응액의 색은 갈색으로 변화하지 않았다.

이외에도 shikimic acid, phenol, quercetin, gallic acid, resorcinol 등도 산소흡수를 측정해 봤으나 거의 산소흡수가 없었다.

썩에서 얻은 효소의 기질에 대한 특이성은 Fig. 6에서 나타낸 바와 같이 pyrocatechol의 산소 흡수는 chlorogenic acid 보다 약간 컸으며 다음 caffeic acid 순이며 m-cresol이 가장 낮았다. 국화 및 썩에서 얻은 각 효소는 o-diphenol 화합에 대해서는 처음 10분 사이에서 산소흡수량이 가장 컸으며 m-cresol은 점차적으로 흡수량이 증가했다. 또, 그 반응액은 시간이 경과함에 따라 갈색, 적갈색으로 변했다.

국화에서 얻은 효소의 pyrocatechol과 chlorogenic acid에 대한 반응은 처음 30분간의 산소흡수량을 비교해 보면 pyrocatechol이 크나 썩에서 얻은 효소에서는 chlorogenic acid의 산소흡수량이 컸다.

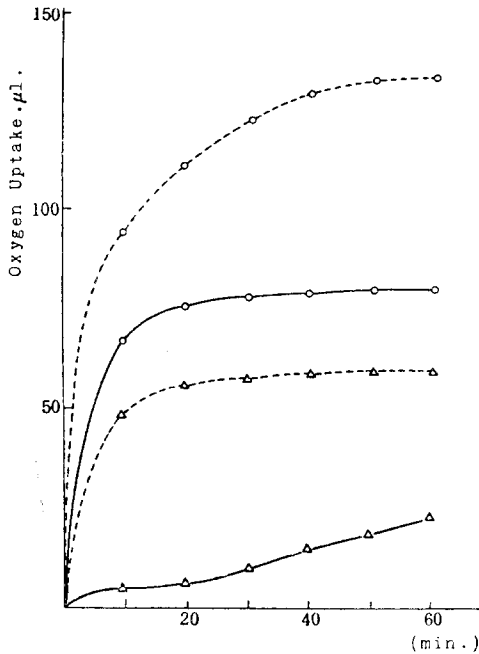


Fig. 7—Inhibition by inhibitors of oxidation of pyrocatechol by *Chrysanthemum indicum* var. *indica* Max. polyphenol oxidase.
 ...△... Pyrocatechol
 Inhibitors
 ...○... Thiourea $10^{-3}M$
 —▲— Thiourea $10^{-2}M$
 —△— Sodium diethyldithiocarbamate $10^{-3}M$
 —○— NaCl 1M
 —●— KCN $10^{-4}M$
 Enzyme 20mg
 McIlvaine's buffer 3ml (pH 8)
 Temp. $20^{\circ}C$

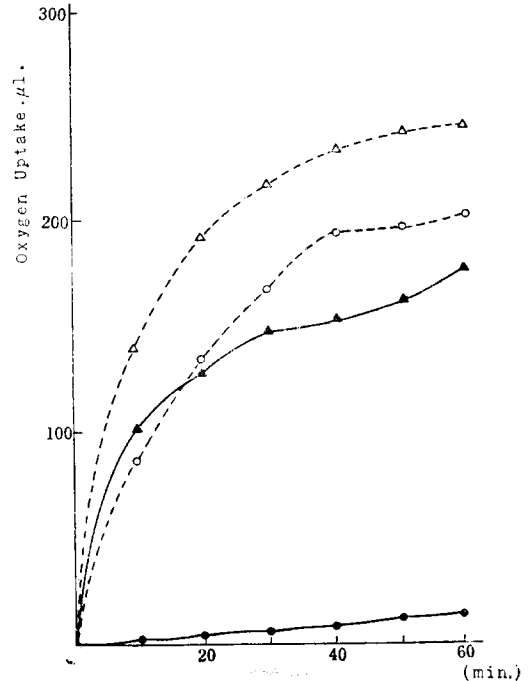


Fig. 8—Inhibition by inhibitors of oxidation of pyrocatechol by *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max. polyphenol oxidase.
 ...△... Pyrocatechol
 Inhibitors
 —▲— Thiourea $10^{-2}M$
 ...○... NaCl 1M
 —●— KCN $10^{-3}M$
 Enzyme 10mg
 McIlvaine's buffer 3ml (pH 6)
 Temp. $30^{\circ}C$

또, 국화 및 쪽에서 얻은 효소와 chlorogenic acid의 반응액의 P.P.C에서는 처음액은 chlorogenic acid의 함량이 컸으나 그것에 비해 10분 경과후의 chlorogenic acid는 거의 소실된 것으로 나타났다.

Fig. 7은 국화에서 얻은 효소활성에 미치는 저해제의 영향을, Table II-(A)는 그 저해작용을 나타낸 것이다. 가장 낮은 농도의 KCN은 가장 높은 저해작용을 보이며 같은 Mol 농도의 thiourea와 sodium diethyldithiocarbamate를 비교해보면 sodium diethyldithiocarbamate의 저해작용이 약간 크다. 농도가 큰 thiourea $10^{-2}M$ 은 그것의 $10^{-3}M$ 보다 약 18%나 그 저해율이 크며 한편 가장 큰 농도의 NaCl(1M)은 thiourea $10^{-2}M$ 에 비해 약 7.4%의 저해율의 증가를 보였다.

Fig. 8은 쪽에서 얻은 효소활성에 미치는 저해제의 영향을 Table II-(B)는 그 저해작용을 표시한 것이다. 이 경우에도 국화에서 얻은 효소와 같이 농도가 가장 낮은 KCN 10^{-3} 이 가장 큰 저해율을 나타내고 있다. 그 다음 그것보다 농도가 큰 thiourea $10^{-2}M$ 은 위의 KCN보다 저해작용이 낮았으며 가장 큰 농도의 NaCl(1M)은 가장 낮은 저해율을 보였다.

Table II. (A) Effects of inhibitors on the polyphenol oxydase from *Chrysanthemum indicum* var. *indica* Max.

Inhibitors	Concentration (M)	Rate*	% Inhibition
None		2.17	0
ourea	10^{-3}	1.72	20.74
Thiourea	10^{-2}	1.34	38.25
Sodium diethyldithiocarbamate	10^{-3}	1.59	26.73
NaCl	1	1.18	45.62
KCN	10^{-4}	0.40	81.57

Pyrocatechol (10^{-3} M) is used as a substrate.

*Oxygen uptake per min.

(B) Effects of inhibitors on the polyphenol oxidase from *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max.

Inhibitors	Concentration (M)	Rate*	% Inhibition.
None		4.14	0
Thiourea	10^{-2}	2.83	31.64
NaCl	1	3.38	18.36
KCN	10^{-3}	0.21	95

Pyrocatechol (4×10^{-3} M) is used as a substrate.

*Oxygen uptake per min.

이상의 실험결과로서 국화 및 속 식물체중에는 각각 polyphenol oxydase가 존재하며 그 갈변은 chlorogenic acid의 polyphenol oxydase에 의한 산화에 기인되는 것으로 추정된다.

結 論

국화 *Chrysanthemum indicum* var. *indica* Max. (f. sin-dong-a) 꽃잎 및 속 *Artemisia vulgaris* var. *indica* Max. 잎 식물조직의 갈변현상은 polyphenol oxydase에 의한 chlorogenic acid의 산화에 기인되는 것으로 추정된다.

文 獻

1. 平田政雄, 堀川博朗, 村井幸代, 東京家政大學 研究紀要, 43(1969)
2. T. Nakabayashi, *J. Agr. Chem. Soc., Japan* 27, part I.(1953).
3. A. Esen, K. R. Soost, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 99, 484(1974).
4. S. Bouchilloux, P. McMahill and H. S. Mason, *J. Biol. Chem.*, 235, 1699(1963).
5. J. M. Nelson and C. R. Dawson, Tyrosinase, *Advances in Enzymol.* 499(1944).
6. P. Reyes and B. S. Luh, *Food Technol.* 14, 570(1960).
7. J. N. Tate, B. S. Luh and G. K. York *J. Food Sci.* 29, 829(1964).
8. S. Sakamura, S. Wathanabe and Y. Obata, *Agr. Biol. Chem.*, 29 181(1965).
9. S. Cynthla and W. A. Sistrunk, *J. Food sci.*, 38, 1060(1974).
10. Kahler and R. Kristi, *Hortscience*, 9(6, sect. 1), 590(1974).
11. I. Arnon, *Plant physiol.* 24, 1(1949).
12. F. W. Knapp, *J. Food Sci.*, 28, 829(1965).
13. T. Nakabayashi, *J. Agr. Chem. Soc., Japan* 28, 212(1954).
14. H. Imaseki, *Bot. Mag. Tokyo*, 72, 316(1959).