

물이 Tyrosinase의 活性度에 미치는 影響

이병철 · 이종용* · 이덕수** · 김 일

워터스 생명환경 연구소, 중앙대학교 화학과*, 경원대학교 화학과**

Drinking Water's Effects on Tyrosinase Activities

Byung Chul Rhee, Zong Liong Lee*, Duk Soo Lee**, and Yil Kim

Waters Life Environment Research Center

*Dep. of Chemistry, Chung Ang Univ.**

*Dep. of Chemistry, Kyung Won Univ.***

ABSTRACT

I have conducted two testings to find out which water is better for drinking water.

First, I made 20 mM L-DOPA solutions by solving L-DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanine) in tap water, Waters' mineral water and reverse osmotic water. Then I measured activities after adding Tyrosinase (purified enzyme, step 3), which was extracted from Salanum melongena (mad apple), in each L-DOPA solution. Second, I solved 0.1, 0.5 and 0.9% salt in each 20 mM L-DOPA distilled water to measure activity of each salt solution.

The results of the testings are as follows:

1. 10 minutes after adding Salanum melongena (mad apple) tyrosinase in each L-DOPA solution, activity of Waters' mineral water was 0.867; tap water 0.777; and reverse osmotic water 0.742.
2. Activity of Waters' mineral water was higher than that of tap water by 10.4% and higher than reverse osmotic by 14.4%.
3. Activity of Waters' mineral water was much higher than that of 0.9% salt water by 41.8%.
4. The optimum pH of Salanum melongena (mad apple) tyrosinase is 9.0. Most enzymes working in the human metabolism are alkaline and body fluids' pH also alkaline.

In conclusion, an alkaline water is believed better than an acidic water for drinking.

Keywords : Tyrosinase, activity, DOPA solution, salt solution, alkaline water.

I. 서 론

Tyrosinase (EC 1. 10. 3. 1)는 L-tyrosine에서 L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine)로, L-DOPA를 L-DOPA quinone으로 변화시키는데 관여한다.¹²⁾

여기서 phenol 성 화합물이 quinone으로 산화되고 quinone 류가 중합되어 갈변현상을 나타낸다. 갈변현상은 일반적으로 과일이나 채소 등의 품질을 저하시키거나 커피, 차, 담배 등은 품질을 향상시키기도 한다.

Tyrosinase의 systematic name으로 1,2-Benzenediol : oxygen oxydoreductase (EC 1. 10. 3. 1), recommended name은 diphenol oxidase, catechol oxidase, phenolase, polyphenol oxidase, O-diphenolase라 불리운다. 버섯류, 감자, 옷나무, 사과,

생강 등 식물, 포유류의 melanocyte 에 포함³⁾되어 있으며, 그 밖에 여러가지 식물, 곤충, 동물 등 생물계에 널리 분포되어 색소형성에 관여한다. Tyrosinase는 melanin 합성에 유일한 효소이며, albinism (白皮症, 선천성 색소 결핍증)은 포유류에서 이효소의 선천적 결손에 의하여 생긴다. albinism은 모든 인종에서 발생되며 빈도는 10,000~20,000명에 1명 정도이다. Tyrosinase는 cu^+ 를 함유한 protein (cu-protein)이고 monophenol monooxygenase (EC 1. 14. 18. 1)의 일부이며, HCN, CO, diethyl-dithiocarbamate 등에 의하여 저해된다. 이 효소는 사람에서 표피기저층 (表皮基低層) 또는 모근 (毛根)에 존재하는 색소세포 melanocyte 중의 색소과립 (顆粒) melanosome에 존재한다. Francisco,⁴⁾ Mak-

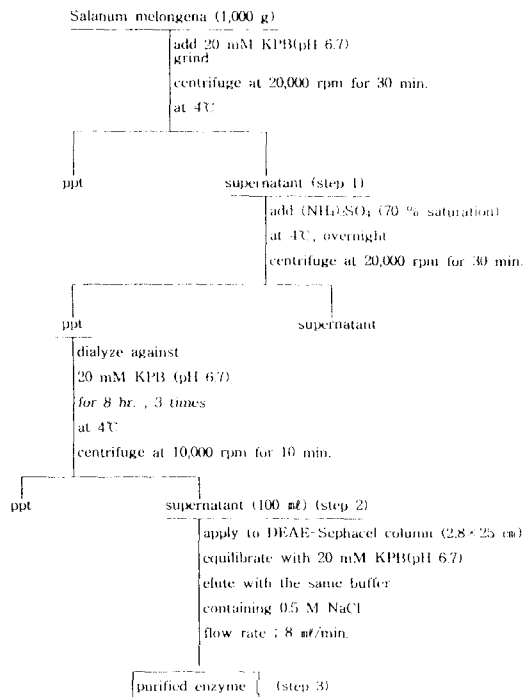


Fig. 1. Purification steps of salanum melongena tyrosinase.

ino,⁵⁾ Lerch⁶⁾ 등에 의하여 갈변현상과 산화현상 등이 밝혀져 있다.

근년에 와서 음용수에 대한 많은 논란이 있고, 음용수에 따른 효소의 활성도에 대하여 연구, 보고된 바가 없어 본연구에서는 가지 (salanum melongena)에 들어 있는 tyrosinase를 정제하여 여러 종류의 음용수와 소금물에 L-DOPA를 녹여 우리들이 매일 마시고 생을 영유하는데 없어서는 안될 물이 활성도에 미치는 영향을 밝히고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 본실험에 사용한 가지 (Salanum melongena)는 신선한 것을 시중에서 구입하여 사용하였다.

2. 효소의 활성도 및 단백질 양 측정

Fling⁷⁾방법에 따라 효소액 0.1 ml에 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 6.7) 1.9 ml를 첨가하여 30°C에서 5분 동안 반응시키고, 20 mM L-DOPA 0.5 ml를 가하고 30°C, 5분, 475 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 측정하였

Table 1. Amounts of protein in purified enzyme

Step	Protein(mg/l)	Volume(ml)	Total
3	2.514	30	75.42

Table 2. Activities of salanum melongena tyrosinase

Step	Activity(u)	Total activity(u)	Specific activity (u/mg)
3	0.348	10.44	0.138

다. 효소의 1단위는 (unit) 1분 동안에 기질 1 mol을 변화시키는 효소의 양으로 정하였다. 그리고, 단백질의 정량은 Lowry⁸⁾법에 따라 280 nm에서 흡광도를 측정하고, BSA (bovine serum albumin)를 표준물질로 표준곡선을 작성하여 정량하였다.

III. 효소의 정제

검질을 벗기지 않은 가지 1 Kg을 증류수로 세척한 후 분쇄하면서 20 mM potassium phosphate buffer 용액 (pH 6.7)을 넣고, 20,000 rpm, 30분 동안 (at 5°C) 원심분리한다.

상층액 (step 1)을 (NH₄)₂SO₄ 70% 포화시켜 4°C에서 overnight 시킨 후, 20,000 rpm으로 30분 동안 (at 4°C) 원심분리하여 얻은 침전물을 20 mM potassium phosphate buffer 용액 (pH 6.7)에서 1회 8시간씩 3회 투석하고 10,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 step2라 하였다.

가DEAE-sephacel (column 2.8×25 cm)을 20 mM potassium phosphate buffer 용액 (pH 6.7)으로 씻고 평형시켜서, 0.5 M NaCl을 포함한 같은 buffer 용액으로 용출속도 8.0 ml/min.로 용출시켜 3 ml 씩 수집하였다. 각 분획에서 활성도가 높은 분획들을 정제효소 (step 3)로 하였다.

IV. 결과

1. 정제효소의 단백질 정량

step 3)의 양은 Table 1과 같다. (280 nm에서 측정)

2. 정제효소의 활성도 측정

정제효소(step 3) 0.1 ml에 20 mM L-DOPA 0.5 ml를 가하여 반응시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하여 활성도를 측정한 결과는 Table 2와 같다.

DEAE-sephacel (28×250 mm) 칼럼을 20 mM

Table 3. Effects of various drinking water on sananum melongena tyrosinase activity

min.	5	6	7	8	9	10
Tap water	0.611	0.650	0.686	0.719	0.750	0.777
Waters' mineral water	0.680	0.724	0.765	0.802	0.836	0.867
Reverse osmotic water	0.581	0.620	0.655	0.686	0.715	0.742

Table 5. Effects of various salt water on sananum melongena tyrosinase activity

min	5	6	7	8	9	10
Water's mineral water	0.680	0.724	0.765	0.802	0.836	0.867
0.1% NaCl	0.532	0.563	0.593	0.621	0.647	0.670
0.5% NaCl	0.430	0.451	0.471	0.490	0.509	0.526
0.9% NaCl	0.427	0.443	0.461	0.477	0.491	0.505

Table 4. Decreasing ratio of sananum melongena tyrosinase activity

Act.	Activity(%)	Decreasing ratio (Activity, %)
Water's mineral water	100.0	0.0
Tap water	89.6	10.4
Tap water	85.6	14.4

potassium phosphate 완충용액 (pH 6.7)으로 세척하고 평형시킨 다음, 조효소용액 (step 2) 100 ml를 주입하고 0.1 M potassium phosphate 완충용액 (pH 6.7)으로 조제한 0.1~0.5 M NaCl 용액을 가하여 용출시켜 활성도가 높은 분획을 취하고, 정제효소용액 (step 3)으로 하여 단백질양과 효소활성도를 측정하였다.

3. 물에 따른 Salanum melongena tyrosinase 의 활성도

Tap water, waters' mineral water 및 Reverse osmotic water에 L-DOPA를 녹여서 20 mM L-DOPA 용액을 만들고, 정제효소 (step 3), salanum melongena tyrosinase와 반응시켜 활성도를 측정한 결과는 Table 3, 4와 같다.

4. 소금물에 따른 salanum melongena tyrosinase 의 활성도

L-DOPA를 소금물에 녹여 0.1%, 0.5%, 0.9% 소금물을 만들어 정제효소(step 3)로 활성도를 측정한 결과는 Table 5, 6과 같다.

5. 최적 pH

pH 수치가 효소활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 정제한 효소 (step 3)을 0.1 M citrate sodium

Table 6. Decreasing ratio of sananum melongena tyrosinase activity

Act.	Activity(%)	Decreasing ratio (Activity, %)
Waters' mineral water	100.0	0.0
0.1% NaCl	77.3	22.7
0.55 NaCl	60.7	39.3
0.9% NaCl	58.2	41.8

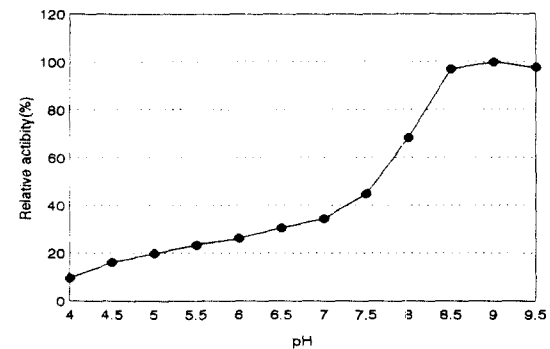


Fig. 2. Effect of pH on salanum melongena tyrosinase.

The maximum activity was expressed as 100%.

pH 4.0~6.0 : 0.1 M citrate-sodium phosphate buffer

pH 6.5~7.5 : 0.1 M potassium phosphate buffer

pH 8.0~9.5 0.1 M tris buffer

phosphate buffer 용액 (pH 4.0~6.0), 0.1 M potassium phosphate buffer 용액 (pH 6.5~7.5) 및 0.1 M tris buffer 용액 (pH 8.0~9.5)에 각각 녹여 기질 L-DOPA에 대한 최적 pH를 조사하였다.

6. 온도에 의한 응용수의 pH 변화

Table 7는 distilled water, tap water 및 Waters' mineral water를 섞어 온도 5~30°C 사이에서

Table 7. Changes of drinking water's pH by temperature

Distilled water	Tap water	Water'	water
°C	pH[H ⁺]	°C	pH[H ⁺]
5.0~5.1	5.66 2.19~10 ⁻⁶	5.2-5.4	7.57 2.70×10 ⁻⁸
10.0~10.1	5.59 2.57×10 ⁻⁶	10.1-10.5	7.43 3.72×10 ⁻⁸
15.0~15.2	5.55 2.82×10 ⁻⁶	16.7-17.1	7.37 4.27×10 ⁻⁸
20.0~20.3	5.53 2.95×10 ⁻⁶	21.2-21.4	7.35 4.47×10 ⁻⁸
25.0~25.5	5.52 3.01×10 ⁻⁶	24.9-25.0	7.30 5.01×10 ⁻⁸
30.0~30.6	5.52 3.01×10 ⁻⁶	30.0-30.6	7.25 5.62×10 ⁻⁸

5°C 간격으로 pH를 측정 결과이다. 그리고 [] 속에는 수소이온 농도를 나타낸다.

V. 결 론

(1) Distilled water는 5~30°C에서 pH 5.66~5.52, Waters' mineral water 7.99~7.48, 는 미달되는 것으로 나타났다.

(2) 5~30°C에서 distilled water의 수소이온 농도는 2.19×10⁻⁶~3.01×10⁻⁶, Tap수 수질기준 값 수소이온농도 1.58×10⁻⁶~3.16×10⁻⁶에 비하면 distilled water는 30°C 부근에서 925.5배 산성이 강한 것으로 나타났다.

(3) Tap water, reverse osmotic water에 L-DOPA를 녹여 sananum melongena tyrosinase의 활성도를 구하고, Waters' mineral water에 녹여 비교해보면 reverse osmotic water의 경우가 가장 낮은 활성도를 나타내고 있다.

즉, sananum melongena tyrosinase의 활성도를 100으로 할 때 tap water 89.6%, Reverse Osmotic water 85.6%로 activity가 감소됨을 알 수 있다.

(4) L-DOPA을 Waters' mineral water에 녹여 sananum melongena tyrosinase의 활성도 값을 구하여 100이라 할 때 0.1% 소금물에서는 77.3%, 0.5% 소금물 60.7%, 0.9% 소금물 58.2%로 소금농도가 높아질수록 Activity가 감소하는 현상을 볼 수 있다.

(5) Sananum melongena tyrosinase의 최적 pH 9.0로 Benjamin⁹⁾ 등의 Cherry와 Halim¹⁰⁾ 등의 배에서는 pH 7.0, 그리고 Nakamura¹¹⁾ 등은 누에 (silkworm) tyrosinase의 최적 pH 8.3에 비하여 높

은 값을 보였다. 인체의 신진대사에 관여하는 효소들의 최적 pH가 대부분 알칼리성이고, 체액의 pH도 알칼리성이므로 음용수로는 산성보다 pH 값이 유사한 알칼리성이 좋으리라 사료된다.

이상과 같은 결과로 sananum melongena tyrosinase의 활성도는 소금이 좋지 않으며, 순수한 distilled water 보다는 mineral이 적당히 들어있는 물이 좋다는 결론을 얻을 수 있었다.

참고문헌

- 1) Butt, V. S. : Recent Adv. phytochemistry, 12, 433, 1979
- 2) Makino, N., McMahill, P. and Mason, H. S. : J. Biol. Chem., 249, 6062, 1973
- 3) Lerch, K. : Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 75, 3635, 1978
- 4) Francisco, G. C., Edelmira, V. and Juana, C. : phytochemistry, 27, 1961, 1988
- 5) Makino, N., McMahill, P. and Mason, H. S. : J. Biol. Chem., 249, 6062, 1973
- 6) Lerch, K. : Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 75, 3635, 1978
- 7) Fling, M., Horowitz, N. H. and Heinemann, S. F. : J. Biol. Chem., 238, 2045, 1963
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. Farr, A. L. and Randall, R. J. : J. Biol. Chem., 193, 265, 1951
- 9) Benjamin, N. D. and Montgomery, M. W. : J. Food Sci., 38, 799, 1973
- 10) Halim, D. H. and Montgomery, M. W. : J. Food Sci., 43, 604, 1978
- 11) Nakamura, T. and Sho, S. : J. Biochem., 55, 510, 1964