

## 금속이온이 솔잎 tyrosinase의 활성에 미치는 영향

이중용\* · 이덕수\*\* · 김 일

워터스 물연구소 · 중앙대학교 화학과\* · 경원대학교 화학과\*\*

### Metal Ions' Effect on Activity of Pine Needle Tyrosinase

Zong-Liong Lee\* · Duk-Soo Lee\*\* · Yil Kim

*Waters Research Institute*

*Dept. of Chemistry, Chung Ang Univ.\*, Dept. of Chemistry, Kyung Won Univ.\*\**

#### Abstract

The purpose of this study is to explain the relations between pine needle tyrosinase's activity and quantity of minerals in the Waters' mineral water. Pine needle tyrosinase's activity was measured by metal ions' concentration like Ca, Mg, Na, K, and Fe in different kinds of drinking water.

1. Pine needle tyrosinase has the highest activity when Ca's concentration is 14.40 mg/L while the activity decreases by 92 % when it is 108.10 mg/L. Therefore, the reasonable range of Ca concentration for drinking water is 10.0-100.0 mg/L.
2. Mg has higher pine needle tyrosinase's activity than Ca by three times. The reasonable range of Mg concentration for drinking water is 3.0-10.0 mg/L.
3. Pine needle tyrosinase has the highest activity when Na's concentration is 15.70 mg/L. The reasonable range of Na concentration for drinking water is less than 15mg/L.
4. The activity increases as K concentration rises. In normal kinds of drinking water, K concentration is less than 10 mg/L. Since K has impacts on the activity only when its concentration is more than 10 mg/L, no problem is expected.
5. Fe has some impacts on the activity when its concentration is more than 10 mg/L. As most kinds of drinking water contain less than 0.3 mg/L, no problem is expected.

With above-mentioned observations, it is concluded that Waters' mineral water contains reasonable levels of minerals like Ca, Mg, K and Na.

#### I. 서 론

Tyrosinase 는 활성 부위에 구리 이온을 함유하는 metaloprotein<sup>1,2)</sup> 이며, monohydroxyphenol을

수산화하여 o-dihydroxyphenol로 변화시키고, o-dihydroxyphenol 을 산화하여 o-quinone으로 변화시키는 촉매 역할을 한다.

Tyrosinase의 生體內에서 주요기능은 식물에서는 갈변현상, 動物에서는 melanin 生合成에 관여

하며, 동물, 식물, 박테리아 등에 널리 분포되어 있다. 식물의 갈변현상은 커피, 차, 담배 등에는 향을 좋게하고, 가공할 때의 갈변현상은 맛과 영양가를 감소시키는 양면성을 띠우기도 한다. 그리고 tyrosinase는 오래 전부터 생화학, 의학, 약학, 식물학, 식품 화학 등 여러 분야에서 연구되어 왔으며, 특히 생리 기능에 관하여 폭넓게 연구되어 왔다<sup>3)</sup>.

지금까지 음용수의 정도와 질병 특히 심혈관계 질환과 골다공증 등에 대한 연구는 상당히 진행되었으나 기초 연구가 아직 충분하지 못한 실정이며, 또한 생리 및 영양학적 연구도 많이 이루어졌으나 금속 이온을 함유하는 음용수인 mineral water만 sample로 효소와의 이화학적 연구는 김 등<sup>4)</sup> 이외에는 별로 보고된 바 없다. 따라서, 본 연구에는 솔잎(pine needle)에서 솔잎 tyrosinase를 추출, 정제하여 mineral water 속에 들어 있는 주요 이온인  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  및  $\text{Fe}^{+3}$  이온들의 농도에 따른 솔잎 tyrosinase의 활성도 값을 측정하여 워터스 mineral water에 들어 있는 mineral 양과의 관계를 밝히는 데 연구 목적을 두었다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용한 솔잎(pine needle)은 충남 아산에서 채집한 신선한 재래 송, 솔잎을 사용하였다.

L-DOPA(L-dihydroxyphenyl alanine), DEAE-sephacel은 sigma제품(st, Lewis, U.S.A), Sephadex G-150은 pharmacia (Uppsala, sweden) 사용하였다. 이외의 다른 시약들도 특급시약을 사용하였다.

pH 미터기는 Fisher Accumet 620(U.S.A)을 Spectrometer은 U-2000 Spectrometer(HITACHI, Japan)을 냉동원심 분리기는 HMVC-250IV(한일)을 사용하였다.

### 2. 효소의 활성도 및 단백질양 측정

효소의 활성도는 Filing 등<sup>5)</sup>의 방법을 사용하여, L-DOPA가 갈변 생성물인 dopachrome으로 변화

되는 것을 광학적으로 측정하였다. 활성도 측정은 효소액 0.1ml에 20mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0) 1.9ml을 첨가하고, 2mM L-DOPA를 0.5ml 가하여 잘 혼합하고 475nm에서 5분 동안 흡광도의 변화를 측정하였다. Table 2.는 0.1M Tris-HCl 완충액(pH 8.0) 1.8ml을 첨가, 30°C 항온조에서 5분동안 평형시킨후, 20mM L-DOPA를 0.5ml 가하여 잘 혼합하고 30°C, 475nm에서 5분동안 흡광도의 변화를 측정하였다.

효소 단위는 위 측정 방법에서 분당 기질이 1μ mole 변화하는 것을 1 unit로 정하였다. 그리고, 단백질의 정량은 Lowry<sup>6)</sup> 법에 따라 750nm에서 흡광도를 측정하고, BSA(bovine serum albumin)를 표준물질로 표준곡선을 작성하여 정량 하였다.

## III. 효소의 정제

### 1. 효소의 추출

솔잎 1 kg을 증류수로 세척한 후 5 mM poly-ethylene glycol이 포함된 100 mM potassium phosphate 완충액(pH 7.0) 1 L를 가하여, Mixer기로 1 분간 분쇄시키고, Warling blender로 1분 동안 균질화 시켰다. 이 혼합물을 냉동원심 분리기로 30 분 동안 원심분리하여 1,200 ml의 crude 추출물을 얻었다.

### 1) Sephacryl s-200 Column chromatography

Sephacryl S-200을 20 mM potassium phosphate 완충액으로 한 시간동안 상온에서 부풀린 후, 분류관 (25 × 300 mm)에 충전시키고, 20 mM potassium(pH 7.0) 완충액으로 평형시켰다. 이 때 유출 속도는 0.25 ml/min.으로 하였고, 용출액은 4 ml씩 각 시험관에 받았다. 이의 각 용출액은 280 nm에서 단백질을 확인하였고, 이어서 475 nm에서 효소활성도를 측정한 다음, 활성도가 큰 부분만을 수집하여 냉동 건조시켜 다음 정제 과정의 효소 시료로 사용하였다.

### 2) Sephadex G-75 Column chromatography

Sephadex G-75을 20 mM potassium phosphate

완충액(pH7.0)으로 30분동안 상온에서 부풀린 후, 100℃에서 water bath안에 넣고 1시간 동안 끓여서 Gel 안의 공기를 제거한 후 분류관(15×500 mm)에 충전시키고, 20 mM potassium phosphate 완충액 (pH7.0)으로 평형시켰다. 이 때 유출 속도는 0.25 ml/min.으로 하였고, 유출액은 4 ml씩 각 시험관에 받았다. 이 용출액은 280 nm에서 단백질을 확인 하였고, 이어서 475 nm에서 효소 활성도를 측정한다. 다음, 활성도가 큰 부분만을 수집하여 냉동건조시켜 다음 정제 과정의 효소시료로 사용하였다.

**3) DEAE - Sephacel Column Chromatography**

DEAE-Sephacel을 20mM potassium phosphate 완충액(pH7.0)로 씻은 다음, 분류관(25×200 mm)에 충전시키고, 20 mM potassium phosphate 완충액(pH7.0)으로 평형시켰다. 이 분류관에 Sephadex G-75 Column Chromatography에서 수집된 효소를 흡착시킨 후, 0.5 M NaCl로 linear gradient 농도 조건하에서 용출 시켰다. 이 때 용출속도는 0.25 ml/min.으로 하였고 활성도가 큰 부분을 모아 20 mM potassium phosphate 완충액으로 투석 하였다.

**4) 효소의 특성**

**1) 최적 pH**

pH의 변화가 효소 활성에 미치는 영향을 측정하기 위하여, pH4.0-6.0은 0.1 M citrate-0.2 M sodium phosphate 완충액, pH6.0-7.5는 0.1 M potassium phosphate 완충액, pH7.5-9.5는 0.1 M tris-HCl 완충액, pH9.5-10.5는 0.1 M carbo-

nate-bicarbonate 완충액을 조제하여 각각 1.9 ml에 20 mM L-DOPA 0.5 ml을 넣은 다음 정제된 효소액 0.1 ml를 가하여 각각의 pH에서 그 활성도를 측정하였다.

**2) 최적 온도**

솔잎 tyrosinase의 최적온도는 0.1mM tris-HCl 완충액 (PH 8.0) 1.8 ml에 정제된 효소액 0.1 ml를 넣고 이 용액의 온도를 30℃ 에서 85℃까지 변화시키면서 20 mM L-DOPA 0.5 mL를 가하여 활성도를 측정하였다.

**3) 금속 이온의 영향**

0.04%, 0.3%, 0.5%의 NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub> 및 FeCl<sub>3</sub>용액 0.1ml에 0.1mM Tris-HCl(pH 8.0) 1.8 ml와 정제된 효소액 0.1 ml 및 20 mM L-DOPA 0.5 ml을 가하고 30℃에서 효소활성을 측정하였다.

**IV. 실험 결과**

**1. Tyrosinase의 정제**

솔잎 효소 정제 결과는 Table 1.에 요약되어 있다. 솔잎을 20 mM potassium phosphate 완충액으로 균질화 시키고, polyethylene glycol이 5 mM 되게 만들어 원심분리 시켰다. Sephadex S-200 chromatography로 crude solution 을 흡착시켜 용출시켰을 때 활성도가 넓은 peak로 나타났다. 이 fraction을 Sephdex G-75 column을 통과 시키고, 활성 fraction을 모아서 투석하여 동결 건조시켰다. 그 활성은 3개의 peak로 나타났다. 활성 fraction을 DEAE-sephacel column에 흡착시키고,

Table 1. Purification of tyrosinase from pine needle

purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	purification (fold)	Yield (%)
1. Crude extract	17.5	510	0.034	1.0	100
2. Sephacryl S - 200	11.2	91	0.123	3.6	64
3. Sephadex G-75	9.8	38	0.258	7.6	56
4. DEAE- Sephacel p 1	3.2	1.3	2.5	73.5	18
p 2	0.5	0.3	1.7	50.0	2.9
p 3	0.8	0.4	2.0	58.8	4.9

0.5M NaCl linear gradient로 용출 시켰다. Fig. 1. 은 이렇게 얻어진 도표이다. Tyrosinase의 specific activity는 L-DOPA를 사용했을 때 주 band인 P<sub>1</sub> fraction에서 0.034 units/mg가 2.5 units/mg으로 증가 했고, 그결과 73.5배 정제되었다. 그리고 P<sub>2</sub>는 50배 정제되었고, P<sub>3</sub>는 58.8배 정제되었다.

**2. 최적 pH**

효소의 L-DOPA 산화에 의한 pH의 영향은 Fig. 2.에서 L-DOPA에 대한 효소의 최적 활성도는 pH 9.5이다.

**3. 최적 온도**

효소 활성에 대한 온도 영향을 알아보기 위하여 온도를 10 °C ~ 80 °C범위 내에서 효소활성을 측정 한 결과는 Fig. 3.과 같다. 이 때 최적온도는 60 °C이다.

**4. 금속 이온의 영향**

솔잎 tyrosinase의 활성에 대한 금속이온의 영향의 결과는 Table 2.와 같다.

**1) Na<sup>+</sup>의 영향**

none ion일 때 솔잎 tyrosinase의 활성도는

0.063이다.

Na<sup>+</sup>이 15.7ppm에서 none ion보다 1.21배, 117.9 ppm에서 1.11배 증가하였고, 196.6 ppm에서 1.00배이고, Na<sup>+</sup>양이 증가함에 따라 활성도가 감소됨을 알 수 있었다.

워터스 mineral water에 Na<sup>+</sup>이 3.04 ppm정도 함유하고 있으므로 Na<sup>+</sup>양이 보다 증가되어도 활성도에는 별로 변화가 없음을 Table 2.에서 알 수 있었다.

김 등<sup>4)</sup>의 가지 tyrosinase에서 활성도는 0.075(6 분동안 반응 시켰을 때 0.451)인데 본 연구에서 솔잎 tyrosinase의 활성도는 0.84배임을 알 수 있었다.

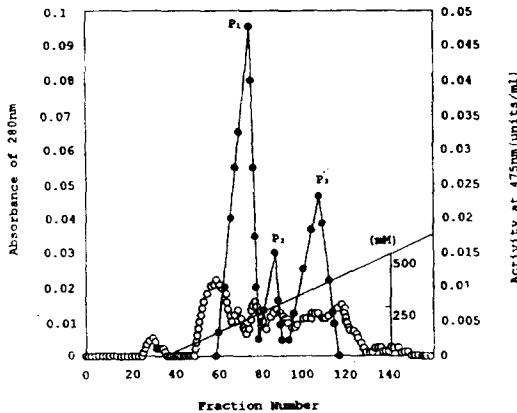


Fig. 1. Elution profile on DEAE-Sephacel column chromatography (15 × 50mM). An aliquot of each fraction was assayed for protein (—○—) and (—●—). A linear gradient indicated by the solid line: 0-500 mM NaCl.

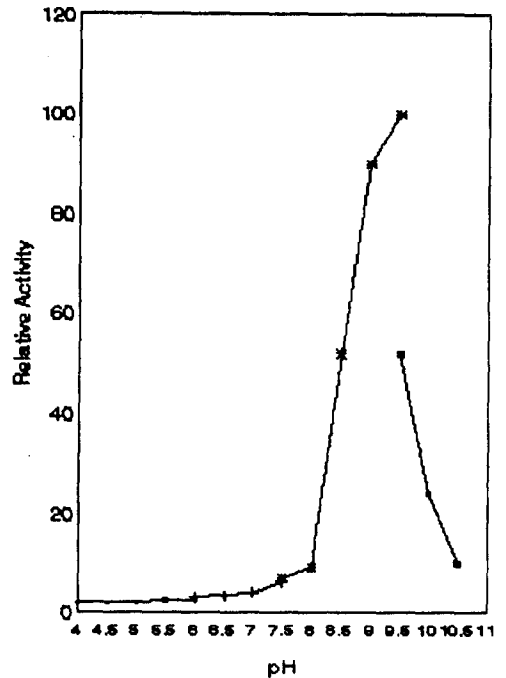


Fig. 2 Effector pH pine needle. The maximum activity was expressal as 100%  
 pH 4.0-8.0: 100mM Citmore-200mM sodium phosphate buffer  
 pH 6.0-7.5: 100mM Potasium phosphate buffer  
 pH 7.5-8.5: 100mM Tris-HCl buffer  
 pH 8.5-10.5: 100mM Carbonate biomr - bonate buffer

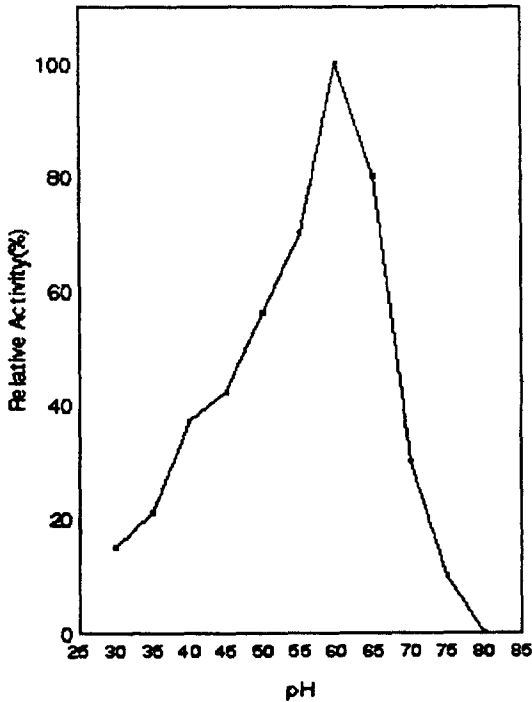


Fig. 3. Effect of tempe reture on pine needle tyrosirese.

2) K<sup>+</sup>의 영향

워터스 mineral water에는 K<sup>+</sup>이 약 2.26 ppm 함유 되어있다. K<sup>+</sup>농도가 20.9 ppm에서 활성도가 감소하고, 그리고 K<sup>+</sup>양이 증가할수록 활성도가 증가한다.

3) Ca<sup>2+</sup>의 영향

Table 2.에 의하면 None ion일 때 활성도와 14.4 ppm일 때 활성도는 거의 같다. Ca<sup>2+</sup>이 180.2 ppm 이상 들어 있을 때 활성도가 점차로 약간 감소됨을 알수 있다. 워터스 mineral water에는 약 18.46 ppm이 들어 있으므로 솔잎 tyrosinase는 Table 2.에 의하면 Ca<sup>+</sup>농도가 약 10배들어 있는 mineral water일지라도 활성도는 별로 변화를 받지 않음을 알 수 있었다.

4) Mg<sup>2+</sup>의 영향

Mg<sup>2+</sup>은 워터스 mineral water에 3.38 ppm정도 함유하고 있다. none ion일 때의 활성도 보다 Mg<sup>2+</sup>가 10.1 ppm일 때 약 2.60배의 활성도를 나타내었다. 그리고 다른 금속보다 Mg<sup>2+</sup>의 농도에 따라 활성도 차가 큼을 알 수 있었다.

Table 2. Effect of metal ions on pine needle Tyrosinase's activity in water

Metal ion (%)	Activity (Units/mg)	Relative activity (%)	Quantity (ppm)
None ion	0.063	100	00.0
0.04% NaCl	0.076	121	15.70 (Na <sup>+</sup> )
0.30% NaCl	0.070	111	117.90 (Na <sup>+</sup> )
0.50% NaCl	0.063	100	196.60 (Na <sup>+</sup> )
0.04% CaCl <sub>2</sub>	0.065	103	14.40 (Ca <sup>2+</sup> )
0.30% CaCl <sub>2</sub>	0.058	92	108.10 (Ca <sup>2+</sup> )
0.50% CaCl <sub>2</sub>	0.055	87	180.20 (Ca <sup>2+</sup> )
0.04% KCl	0.062	98	20.90 (K <sup>+</sup> )
0.30% KCl	0.064	102	157.00 (K <sup>+</sup> )
0.50% KCl	0.067	106	261.70 (K <sup>+</sup> )
0.04% MgCl <sub>2</sub>	0.164	260	10.10 (Mg <sup>2+</sup> )
0.30% MgCl <sub>2</sub>	0.101	160	75.80 (Mg <sup>2+</sup> )
0.50% MgCl <sub>2</sub>	0.065	103	126.30 (Mg <sup>2+</sup> )
0.04% FeCl <sub>2</sub>	0.081	129	17.60 (Fe <sup>2+</sup> )
0.30% FeCl <sub>2</sub>	0.050	79	132.30 (Fe <sup>2+</sup> )
0.50% FeCl <sub>2</sub>	0.000	0	220.50 (Fe <sup>2+</sup> )
0.04% FeCl <sub>3</sub>	0.088	140	13.80 (Fe <sup>3+</sup> )
0.30% FeCl <sub>3</sub>	0.027	43	103.40 (Fe <sup>3+</sup> )
0.50% FeCl <sub>3</sub>	0.016	25	172.30 (Fe <sup>3+</sup> )

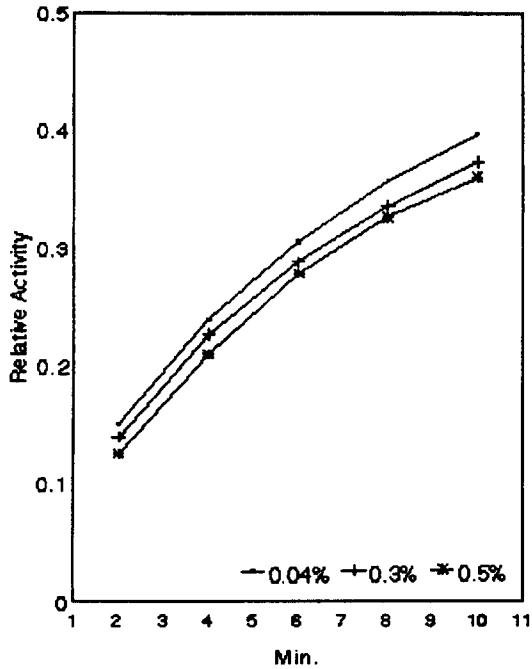


Fig. 4. Pine needle tyrosinase activity vs. NaCl concentration.

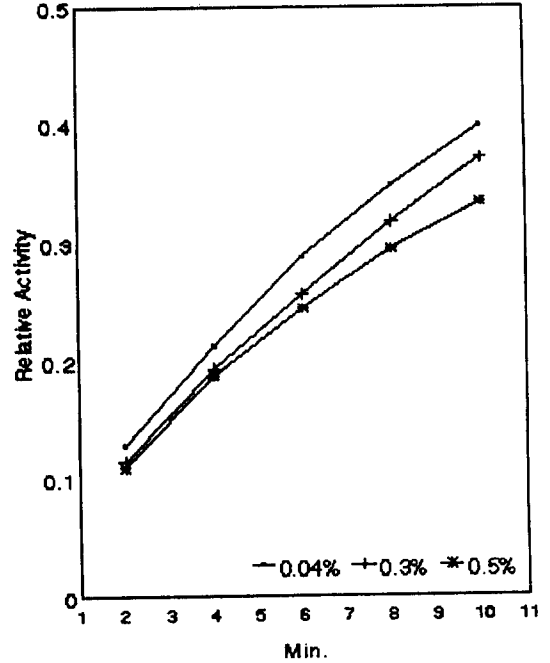


Fig. 6. Pine needle tyrosinase activity vs. CaCl<sub>2</sub> concentration.

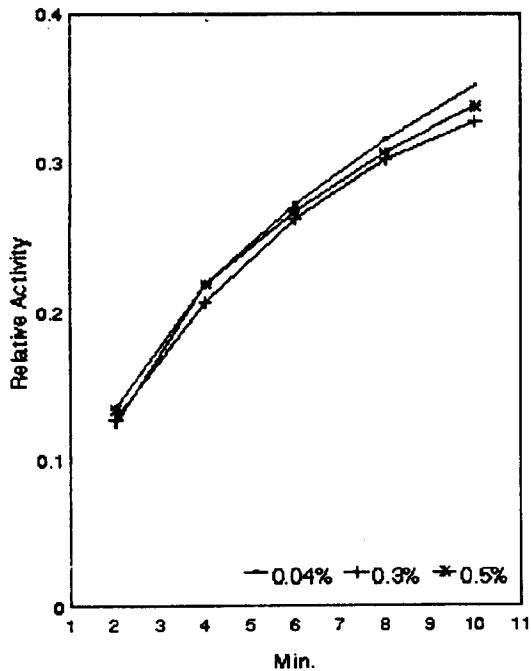


Fig. 5. Pine needle tyrosinase activity vs. KCl concentration.

### 5) Fe<sup>2+</sup>의 영향

Fe<sup>2+</sup> 용액에서 Fe<sup>2+</sup> 17.6ppm 보다 큰 농도에서는 활성도 값이 점차 감소하고, 0.3% 이상의 용액부터는 활성도 값이 급격히 감소된다.

### 6) Fe<sup>3+</sup>의 영향

0.04%용액에서 Fe<sup>3+</sup>용액의 활성도값이 Fe<sup>2+</sup> 용액보다 약 1.1배 크고, 철의 농도가 증가할수록 활성도 값은 감소됨을 Table 2.에서 볼 수 있다.

## 5. 음용수 성분함량의 비교

물에 녹아 있는 성분중 맛을 좋게 하는 것은 주로 칼슘, 칼륨, 규산이고 마그네슘, 황산이온 염소이온, 철, 망간, 아연 등은 불쾌감을 준다.

우리 나라는 수질 기준으로 경도 300 mg/L 이하로 규정하고 있다. 경도는 물속에 용존하고 있는 Ca, Mg, Fe 등 2가 금속의 함량을 CaCO<sub>3</sub> ppm으로 환산 표시한 값이다.

서울시 수도물의 경도는 51~71, 국내제품 64~68, 예비양 282~285, 불빅 54~56정도이다.

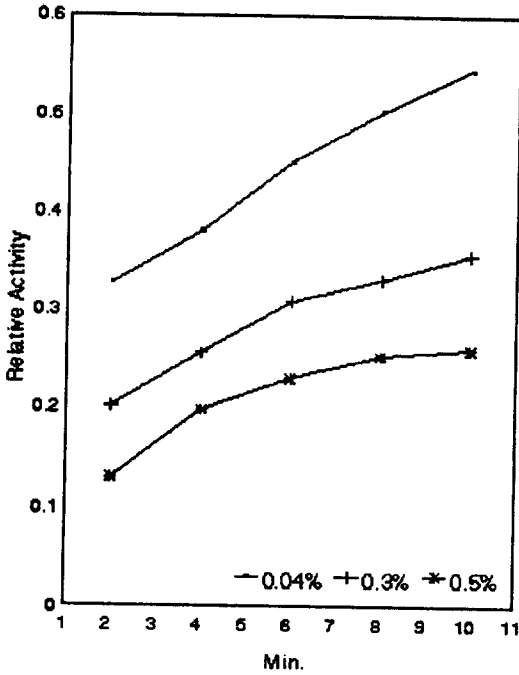


Fig. 7. Pine needle tyrosinase activity vs. MgCl<sub>2</sub> concentration.

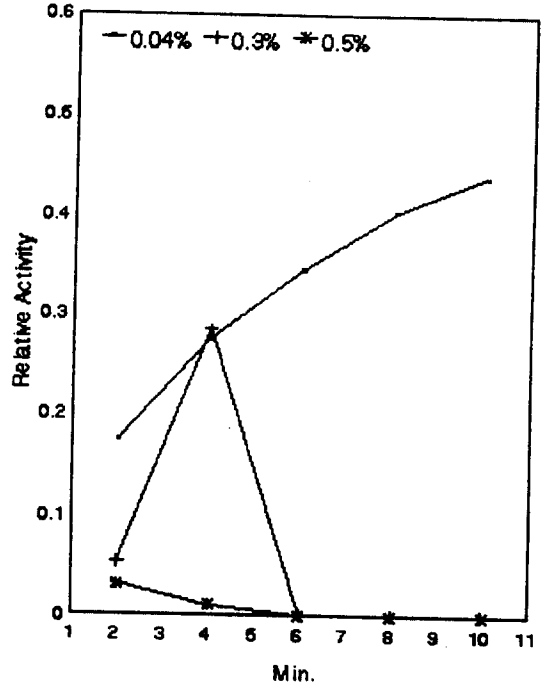


Fig. 9. Pine needle tyrosinase activity vs. FeCl<sub>3</sub> concentration.

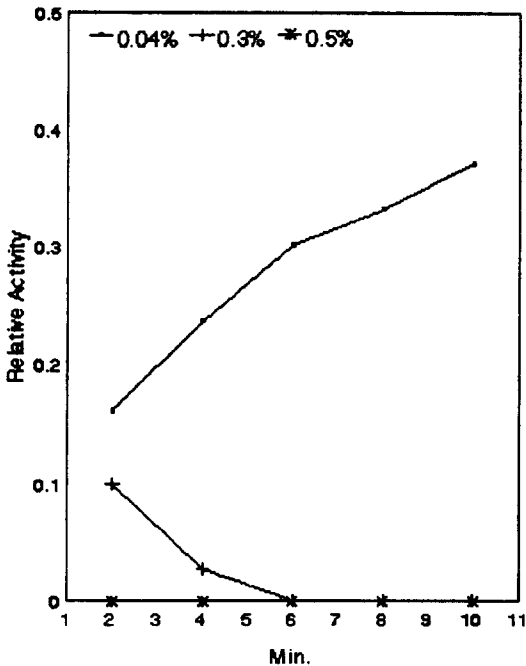


Fig. 8. Pine needle tyrosinase activity vs. FeCl<sub>2</sub> concentration.

## V. 결 론

본 연구에서는 음용수에 들어 있는 mineral 성분 Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> 및 Fe<sup>3+</sup> 이온들의 농도에 따라 솔잎 tyrosinase의 활성도를 측정하고, 워터스 mineral water에 들어 있는 주요 mineral양과 비교 검토한 결과로 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 워터스 mineral water에는 Ca 18.46 mg/L 들어 있다. 솔잎 tyrosinase는 Ca 14.40 mg/L에서 활성도 값이 가장 크다. Ca이 전혀 들어 있지 않을 때보다 Ca 14.40 mg/L에서 활성도는 103%증가되었다. 따라서 Ca양을 화학적 측면에서만 볼 때, 솔잎 tyrosinase에서는 Ca 108.10 mg/L에서 92%로 감소되므로 Ca 10.0 - 100.0 mg/L 사이의 calcium 농도가 음용수로는 적당하다고 사료된다.
2. 워터스 mineral water에는 Mg 3.88 mg/L 들어 있다. Mg은 Ca보다 솔잎 tyrosinase 활성도값의 약 3배정도 큰 값을 나타낸다. Mg은

Table 3. Quantity of metal ions in various kinds of water

Unit : ppm

Metal ion	수돗물*	워터스 mineral water*	진로 석수**	일화 초정**	고로쇠 수액*	에비앙*	볼빅 <sup>o</sup>	스파클* (제일제당)	역삼투 정수기*
Na <sup>+</sup>	3.46	3.04	3.6	15.1	0.14	5.14	9.4	11.71	< 0.01
K <sup>+</sup>	2.17	2.26	1.5	1.3	97.65	1.02	5.7	1.63	< 0.01
Mg <sup>2+</sup>	3.78	3.38	2.4	6.6	6.25	33.92	6.1	10.02	< 0.01
Ca <sup>2+</sup>	10.26	18.46	22.0	31.2	46.03	75.60	9.9	31.26	0.42
Fe <sup>3+</sup>	0.24	0.02			< 0.2	< 0.2		< 0.2	< 0.01

\* : 워터스 물연구소, 미국 Dionex 4500 I Ion chroma. 사용.

\*\* : 소비자보호원 한국시험검사소(수자원 환경, 제 100호 33p, 97년 4월)

o : 제품사 Label 참고.

솔잎 tyrosinase의 활성도에 크게 영향을 주므로 미량 Mg 3.00 mg/L-10.00 mg/L이 음용수의 Mg양으로 적당하다고 본다.

3. Na은 워터스 mineral water에서 3.04 mg/L 들어있다. Na양은 15.70mg/L에서 솔잎-tyrosinase의 활성도 값이 가장 크다. 따라서 Na 15 mg/L 이하가 음용수로는 적당하다고 사료된다.
  4. Ca, Mg, Na, Fe 등은 양이 증가할수록 활성도는 감소하나, K양은 양이 증가할수록 솔잎-tyrosinase의 활성도 값이 증가된다. K양은 100mg/l 이상에서 솔잎-tyrosinase의 활성도 값에 영향을 주므로 일반 음용수에는 대부분 K 함량이 10 mg/L 이하이므로 문제될 것이 없다.
  5. 우리 나라 수질 기준으로 iron은 0.3 mg/L 이하로 제한하고 철은 10 mg/L 이상일 때 활성에 영향을 준다. Fe 0.3 mg/L 이하일 때는 활성에 별로 영향을 주지않으므로 문제가 되지 않는다.
- 이상과 같은 결과로 워터스 mineral water에

함유된 Ca, Mg, Na, K 및 Fe 등의 양은 솔잎-tyrosinase의 활성도로 볼 때 비교적 적당량이 고루 함유된 음용수라고 결론을 지운다. 이와 같은 결론은 어디까지나 솔잎 tyrosinase로부터 음용수의 mineral 양과 활성도를 비교 검토한 결과를 이화학적 견지에서 판단한 것이다.

## 참고 문헌

1. Mayer, A . M : polyphenoloxidases in plants. Recent progress. Phytochem. 26, 11-20, 1987.
2. Enzyme Nomenclature : Recommendations of the nomenclature committee of the union of bio chemistry, 1992.
3. Riley, P. A : pigmint cell. Research 6. 182, 1993.
4. 이병철, 이종용, 이덕수, 김일 : 물이 tyrosinase의 활성도에 미치는 영향, 한국 환경위생학회지, 제 22권 제1호 1996.



5. Fling, M., Horowitz, N. H. and Henenmann, S. F. : J. Biol. chem. 238, 2045, 1963.
6. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A. and Randall, R. J. : J. Biol. chem. 193, 265, 1951.