

효소적 갈변 생성물의 DNA 손상에 대한 효과

김안근*, 이지은

숙명여자대학교 약학대학

Effects of Browning Reaction Products on DNA Damage

An Keun Kim* and Ji Eun Lee

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

Abstract – Antimutagenicity profiles of the enzymatic browning reaction products (EBRP) were investigated. The rec-assay with *Bacillus subtilis* strains H17(rec⁺) and M45(rec⁻) was carried out using their spores. The biological activities were evaluated for seven different enzymatic browning reaction products, which resulted from the reactions of seven polyphenols with polyphenol oxidase isolated from *Ginkgo biloba* leaves. In the spore rec⁻ assay, most of the polyphenolic compounds tested were positive, whereas their enzymatic browning reaction products were tested negative. The mutagenicity of enzymic browning mixtures of the polyphenols and the enzymes obtained from *Ginkgo biloba* leaves showed negative results in the mutagenicity test using *Bacillus subtilis* strains H17(rec⁺) and M45(rec⁻). In the case where polyphenol oxidase inhibitors were added in the enzymatic reaction mixtures with polyphenols, the polyphenols showed mutagenic effect in the spore rec⁻ assay. This suggests that the activity of polyphenol oxidase is decreased.

Key words – polyphenol oxidase, *Ginkgo biloba*, rec⁻ assay, enzymatic browning reaction product

서 론

Polyphenol oxidase(PPO)는 monophenol이 *o*-diphenol로 hydroxylation되는 반응을 촉매(cresolase, tyrosinase, monophenol monooxygenase [E.C. 1.14.18.1.])할 뿐만 아니라 *o*-dihydroxyphenol이 *o*-quinone으로 산화되는 것도 촉매(catecholase, diphenol oxygen oxidoreductase[E.C. 1.10.3.2.])하는 효소이다.¹⁾ Polyphenol oxidase는 세포의 crushing, aging 과정에서 활성이 조절되며 polyphenol 물질의 산화결과로 갈변 현상이 나타나게 된다.

많은 polyphenol 화합물이 강한 돌연변이원성이 있는 것으로 나타났으나 이들 polyphenol 화합물이 효소와 반응하여 생성된 quinonoid 반응 생성물은 강력한 친전자성을 가지기 때문에 자동산화, 교차(cross-linking), melanin 형성 등의 다양한 반응이 이차적으로 일어나서 효소적 갈변반응물질을 생성²⁾하게 되는 데 이와 같이 polyphenol 물질이 갈변된 화합물은 변

이원성이 급격히 저하되는 것으로 보고되어 있다.³⁾ 본 연구에서는 7종의 polyphenol 화합물의 반응 갈변 생성물이 고초균의 DNA 손상에 미치는 영향을 검토하기 위해 은행나무 잎으로부터 polyphenol oxidase를 추출하여 효소액으로 하고, polyphenol 물질 자체와 이들 polyphenol 화합물이 polyphenol oxidase에 의한 효소반응 결과 생성되는 갈변물질, 또한 polyphenol 물질 및 polyphenol oxidase에 효소저해제를 첨가하여 고초균의 DNA손상에 미치는 영향을 spore rec-assay를 통해 검토하여 약간의 지견을 얻었으므로 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료 – 본 실험에 사용된 은행나무(*Ginkgo biloba* L.) 잎은 서울의 일정 지역에서 채취하여 -70°C에서 보관하였다가 사용하였다.

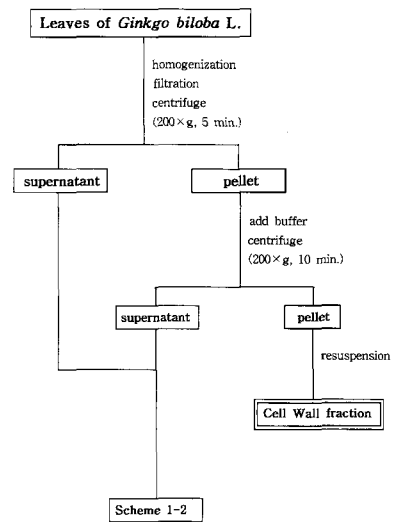
시약 및 기기 – 실험에 사용한 시약은 sodium dodecylsulfate, gallic acid (Junsei), bovine serum albumin, *tert*-butylcatechol, tris(hydroxymethyl)aminome-

*교신저자 : Fax : 02-715-9498

thane, ammonium persulfate, 3-methyl-2-benzo-thiazolinone hydrazone, pyrocatechol, chlorogenic acid, polyvinyl pyrrolidone (PVP), hydrocaffeic acid, 4-nitroquinoline-N-oxide (Sigma), 4-methylcatechol (Aldrich), Nutrient Broth, Bacto agar, Beef Extract, Dextrose (Difco), 사용기기는 Ultracentrifuge (Beckman Optima™ XL-100K), Dialysis sacks (Sigma Diagnostics), pH Meter (Mettler Delta 340), Centrifuge (Hanil Supra 21K), Freeze Dry System (Labconco), Labo Autoclave (Sanyo), Vortex mixer: Thermolyne MaxiMix II, MultiTemp III, Spectrophotometer (Pharmacia Biotech.), Microcuvettes (Kartell), Waterbath (Buchi Laboratoriums-Technik AG), Microcentrifuge (Hanil Micro-12), Haemacytometer (Superior, Germany), Plate (Becton Dickinson Labware), 기타 시약들은 시판 특급(guaranteed reagent) 및 1급 시약을 사용하였다.

효소의 추출 - 은행잎을 성장 및 노화 정도가 다른 시기(잎의 나이: 10, 20, 40, 120, 160일)에 채취하여 각 단계마다 Diane 등⁴⁾의 방법을 응용하여 'cell wall'(200×g), 'plastid'(4,000×g), 'mitochondria'(100,000×g), soluble fraction으로 분리하였다. 냉동상태의 은행잎 20 g을 blender에 넣고 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), 1 mM benzamidine HCl을 함유한 빙냉시킨 100 mM phosphate buffer(pH 7.3) 100 mL를 가하여 1분간 마쇄하였다. 마쇄한 액을 8겹의 거즈로 여과한 후, 200×g에서 5분간 원심분리하여 상등액은 따로 보관하고 침전에 100 mM phosphate buffer(pH 7.3) 20 mL를 더 가하여 약하게 저어준 후, 200×g에서 10분간 다시 원심분리하였다. 200×g, 'cell wall' fraction을 포함하는 침전은 100 mM phosphate buffer(pH 7.3) 5 mL에 재현탁시키고, 상등액은 처음 얻어진 상등액과 함께 보관하여 두었다(Scheme 1-1).

'Plastids'를 포함하는 fraction은 따로 보관해 두었던 위의 상등액을 4,000×g에서 15분간 원심분리하여 얻었다. 침전은 100 mM phosphate buffer(pH 7.3) 20 mL를 더 가하여 잘 씻어내고 4,000×g에서 15분간 다시 원심분리하였다. 상등액은 처음 얻어진 상등액과 함께 보관하고 침전은 100 mM phosphate buffer(pH 7.3) 5 mL에 재현탁시켰다. 마지막으로, 따로 보관해 두었던 상등액을 100,000×g에서 1시간 동안 원심분리하여 얻어진 'mitochondria' fraction을



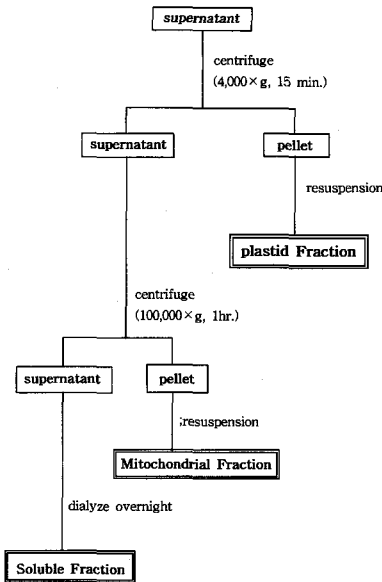
Scheme 1-1. Subcellular fractionation of *Ginkgo biloba* L. leaves-Cell wall fraction.

포함하는 침전을 100 mM phosphate buffer(pH 7.3) 2 mL에 재현탁시켰다. 최종적으로 얻어진 상등액 soluble fraction은 하룻밤 동안 약 20배의 100 mM phosphate buffer(pH 7.3)로 투석한 후 실험에 사용하였다(Scheme 1-2).

단백질 정량 - 단백질의 함량은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 trichloroacetic acid와 Folin-Ciocalteu 시약을 사용하는 TCA-Lowry 법으로 측정하였다.

효소액과 갈변반응 생성물의 조제 - Scheme 1-1에서 분획하여 polyphenol oxidase의 활성이 가장 큰 분획인 leaf age가 20일째 되는 cell wall fraction을 효소액으로 하여 기질 특이성 실험에 사용하였던 7종의 polyphenol 화합물들(pyrogallol, 4-methylcatechol, pyrocatechol, tert-butylcatechol, chlorogenic acid, gallic acid, hydrocaffeic acid)과 24시간 동안 최적온도(45°C)에서 반응시켜 갈변반응액을 얻었다. 이 반응액을 No. 2 여과지로 여과한 후 투석막에 넣어 48시간 동안 투석하였다. 투석 후 동결건조하고, 동결건조된 갈변반응 생성물을 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 실험에 사용하였다.

Spore rec assay - Kada 등의 방법^{5,6)}에 의하여 *Bacillus subtilis* H17(Rec⁺) 및 M45(Rec⁻) 두 균주의 포자를 조제하였으며, 포자 형성에 사용한 배지는 우선, Difco nutrient broth 16 g을 적당량의 증류수에 용해하고 Difco bacto agar 15 g을 가해 autoclave 중에서 가열용해한 후, 50°C 정도로 냉각시키고



Scheme 1-2. Subcellular fractionation of *Ginkgo biloba* L. leaves-Plastid, Mitochondria, Soluble fraction.

여기에 KCl 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, MnCl₂ 10.8 mg, FeSO₄ · 7H₂O 278 µg, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 236 mg, glucose 1 g의 stock solution을 가하여 1L가 되게 만들었다. 포자 한천 배지의 조제는 8 g의 Difco nutrient broth를 1 L의 증류수에 완전히 용해한 후 15 g의 Difco bacto agar를 가하여 autoclave에서 가열용해 하였다. 같은 배지를 2분 조제하여 용해한 broth agar가 50°C 정도까지 냉각되면 포자액을 1 L 당 10 mL 가해 H17 및 M45 한천을 각각 조제한 후 plate 상에 10 mL씩 분주하여 H17 및 M45 포자 한천 배지를 고화시켰다. 고화된 포자 한천 배지 위에 직경 6 mm, 두께 1 mm의 paper disc를 plate 당 3개씩 올려놓고 시료 용액을 15 µl, 10 µl, 5 µl씩 가한 다음 37°C에서 20시간 배양시킨 후 paper disc 주위에 생성된 생육저지대의 직경을 측정하여 M45균 포자 한천 배지에 생성된 생육저지대와 H17균 포자 한천 배지에 나타난 생육저지대 간의 차이를 계산하여 실험에 사용된 시료가 고초균의 DNA에 미치는 손상정도에 대한 강도로 표시하였다.

결과 및 고찰

효소의 추출 - PPO에 관한 연구는 90년 이상의 역사를 갖고 있으나, 그 생리학적 기능과 세포내 위치

에 대해서 잘 알려져 있지 않는데 그 이유 중의 하나는 효소의 추출과 정제의 어려움⁷⁾일 것으로 사료된다. 따라서 최근에 triton X-114를 이용한 temperature-induced phase separation으로써 phenol성 물질과 chlorophyll이 다량 제거된 latent form의 PPO를 부분정제하는^{7,12)} 등 다양한 정제법에 대한 연구^{13,14)}가 계속되고 있어서 본 실험에서는 7종의 polyphenol 화합물과 반응할 polyphenol oxidase를 추출, 분리하기 위하여 원심 분리를 이용하였으며 은행잎의 다양한 leaf age(10, 20, 40, 120, 160일)로부터 'cell wall' (200×g), 'plastid'(4,000×g), 'mitochondria'(100,000×g), soluble fraction으로 각각 분리하였다. 본 실험에 사용된 효소액은 가장 활성이 높게 나왔던 leaf age가 20일째 되는 cell wall fraction을 효소액으로 사용하였다. 이 효소의 중요한 기질로 사용되고 있는 7종의 polyphenol 화합물과 각각 반응시켜 얻은 효소 반응 생성물이 고초균의 DNA에 미치는 손상정도를 검토해본 결과, polyphenol 화합물 단독으로는 고초균의 DNA에 대부분 손상을 주었으나 이들이 PPO의 작용을 받아 생성된 효소반응 생성물(enzymatic reaction product)에는 이러한 손상능력이 없었다(Fig. 1).

7종의 polyphenol 화합물 중 *Bacillus subtilis* H 17 및 M45 균주에 대해서 양성을 나타낸 것은 pyrogallol 이었고, 그 뒤로 4-methylcatechol > pyrocate-

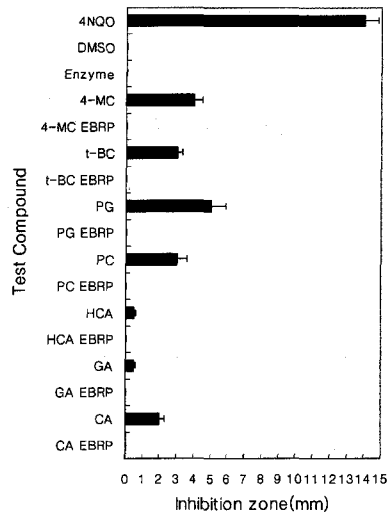


Fig. 1. Results of the spore rec assay on the polyphenol and enzymatic browning reaction products (EBRP). (4-MC: 4-methylcatechol, t-BC: tert-butylcatechol, PG: pyrogallol, PC: pyrocatechol, HCA: hydrocaffeic acid, GA: gallic acid, CA: chlorogenic acid, DMSO: dimethyl sulfoxide, 4NQO: 4-nitroquinoline-N-oxide).

chol > *tert*-butylcatechol > chlorogenic acid > gallic acid > hydrocaffeic acid 순으로 DNA에 손상을 일으켰으나, 이들 polyphenol 화합물의 효소적 갈변물질들은 모두 음성을 나타내어 DNA 손상을 일으키지 않는다는 것을 알 수 있었다. 또한, 양성 대조물질로는 발암물질로 알려진 4-nitroquinoline-N-oxide를 사용한 결과, 고초균의 DNA에 많은 손상을 일으켰다. 음성 대조물질로서는 효소반응 생성물을 용해하는데 사용한 dimethyl sulfoxide(DMSO)와 효소만의 단독 작용을 알아보기 위해 실험한 결과, 이들은 *Bacillus subtilis* H17 및 M45 균주에 대해서 아무런 영향도 미치지 않았다.

본 실험에서 나타난 이러한 결과들은 사과¹⁵⁾나 곰취, 참취 및 참나물¹⁶⁾, 적색자두(*Prunus salicina*)¹⁷⁾ 등의 효소반응 생성물에서 밝혀진 사실들과도 일치하는 것으로 보아 많은 polyphenol 화합물이 대부분 돌연변이원성이 있는 것으로 나타났으나 이러한 특성을 가진 polyphenol 화합물이 이들을 산화시키는 효소와 반응하여 갈색화되면 변이원성이 급격히 저하되는 것으로 나타난다¹⁷⁾는 이전의 보고들을 뒷받침해준다. 또한 DNA에 손상을 일으키는 polyphenol 화합물이 PPO라는 효소의 작용에 의해 손상능력이 달라지는지를 확인하기 위해 polyphenol 화합물과 PPO 혼합물에 PPO 활성 저해물질인 cysteine, glutathione, ascorbic acid 각각을 농도를 변화시켜 첨가하여 DNA 손상을 검토한 결과 저해제의 양을 증가시키므로써 DNA의 손상이 증가하는 것으로 보아 이것은 저해제로 인한 polyphenol oxidase의 활성 저하로 polyphenol 화합물이 PPO의 작용을 받지 못한 데 기인한다고 볼 수 있다(Table I).

이상의 실험결과로부터 rec⁻ assay 시험에서 polypheno-

l 화합물 단독일 때보다 이들 화합물과 polyphenol oxidase와의 반응 생성물인 경우가 DNA에 대한 손상 능력이 낮아지는 것은 효소적 갈변 반응에 의해 polyphenol 화합물의 함량이 감소하는 것 때문이라고 볼 수 있으며 polyphenol 화합물에 이 화합물의 반응 생성물인 갈변생성물의 농도를 달리하여 첨가하였을 때는 아무런 영향을 미치지 못하였다. 그러므로 polyphenol 화합물로 인한 DNA 손상을 감소시키는 데는 PPO가 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다. 포자 rec⁻ assay에서는 pyrogallol, hydroxyhydroquinone, 3,4-dihydroxytoluene, chlorogenic acid의 갈변반응 생성물은 모두 DNA 손상 능력이 없었다.

결론

은행잎으로부터 polyphenol oxidase를 추출하여 7종의 polyphenol 화합물과 반응시켜 얻어진 효소적 갈변반응생성물에 대한 돌연변이원성을 검토하기 위하여 *in vitro* 실험을 통하여 돌연변이 유기작용의 여부를 검토하였다. Spore rec⁻ assay 결과를 통해 polyphenol 화합물인 pyrogallol, 4-methylcatechol, pyrocatechol, *tert*-butylcatechol, chlorogenic acid, gallic acid, hydrocaffeic acid 단독으로는 대부분 고초균의 DNA에 손상을 일으키며, 대체적으로 polyphenol 농도가 증가함에 따라 생육 저지력도 촉진되는 경향을 보였다. 그러나 polyphenol 화합물들이 PPO의 작용을 받아서 갈변물질로 변한 경우에는 DNA 손상을 거의 일으키지 않았다. PPO의 활성 저해물질인 cysteine, glutathione, ascorbic acid의 농도를 증가시키기에 따라 DNA 손상도 증가되는 것으로 나타났다.

Table I. Effects of PPO inhibitors on DNA damage reduced by PPO

Inhibitor	Concentration(mM)	Inhibition Zone(mm)		Difference
		H17(Rec ⁺)	M45(Rec ⁻)	
Cysteine	1	0	2	2
	0.5	0	1	1
	0.25	0	0	0
Glutathione	10	0	2	2
	5	0	1	1
	2.5	0	0	0
Ascorbic acid	0.05	0	2	2
	0.025	0	1	1
	0.0125	0	0	0

*Composition of the reaction mixtures are as follows: substrate: 4-methylcatechol enzyme: polyphenol oxidase isolated from *Ginkgo biloba* leaves enzyme inhibitors: cysteine, glutathione, ascorbic acid.

사 사

본 연구는 숙명여자대학교 1998년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 또한 본 연구를 하는데 많은 도움을 주신 강원대학교 함승시 교수님께 감사드립니다.

인용문헌

- Hind, G., Marshak, D.R., and Coughlan, S.J. (1995) Spinach thylakoid polyphenol oxidase: Cloning, characterization, and relation to a putative protein kinase. *Biochemistry* 34: 8157.
- Mayer, A. M. (1987) Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry* 26: 11.
- Ham, S.S., Hong, E.H. and Omura, H. (1987) Desmutagenicity of enzymatically browned substances obtained from the reaction of *Prunus salicina* (Red) enzyme and polyphenols. *Korean J. Food Sci. Technol.* 19(3): 212.
- Barrett, D.M., Lee, C.Y., and Liu, F.W. (1990) Changes in the activity and subcellular distribution of PPO in 'delicious' apples during controlled atmosphere storage. *J. Food Biochem.* 15: 185.
- Kada, T., Tutikawa, K., and Sadaie, Y. (1972) *In vitro* and host mediated "rec⁻assay" procedures for screening chemical mutagens. *Mutation Res.* 16: 165.
- Kada, T., Hirano, K., Hagiwara, T., Ohta, Y., and Matsumoto, T. (1982) rec⁻Assay with spores of *Bacillus subtilis* with and without metabolic activation. *Mutation Res.* 97: 339.
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., and Garcia-Carmona, F. (1989) Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenol oxidase using temperature-induced phase separation in triton x-114. *Plant Physiol.* 91, 1481.
- Sanchez-Ferrer, A., Alba, J.V., and Garcia-Carmona, F. (1989) Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 28(5): 1321.
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., and Garcia-Carmona, F. (1990) Partial purification of a thylakoid-bound enzyme using temperature-induced phase partitioning. *Anal. Biochem.* 184: 279.
- Sanchez-Ferrer, A., Laveda, F., and Garcia-Carmona, F. (1993) Substrate-dependent activation of latent potato polyphenol oxidase by anionic surfactants. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1583.
- Chazarra, S., Cubanes, J., Escribano, J., and Garcia-Carmona, F. (1996) Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 44: 984.
- Bordier, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in triton x-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256: 1604.
- Raymond, J., Rakariyatham, N., and Azanza, J. (1993) Purification and some properties of polyphenol oxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry* 34(4): 927.
- Partinton, J.C. and Bolwell, G.P. (1996) Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein patatin from potato tuber. *Phytochemistry* 42(6): 1499.
- Baik, C.W., Ham, S.S. (1990) Antimutagenic effects of browning products reacted with polyphenol oxidase extracted from apple by using SOS chromotest. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22(6): 618.
- Ham, S.S., Kim, S.W., and Kim, Y.M. (1990) Studies on antimutagenic effects and gene repair of enzymatic browning reaction products. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22(6): 632.
- Ham, S.S., Hong, E.H. and Omura, H. (1987) Desmutagenicity of enzymatically browned substances obtained from the reaction of *Prunus salicina* (Red) enzyme and polyphenols. *Korean J. Food Sci. Technol.* 19(3): 212.

(2000년 5월 11일 접수)