

AOT/이소옥тан/역미셀계에서의 Tyrosinase 반응

한대석 · 신유정 · 정승원 · 송효남*
한국식품개발연구원, *세명대학교 한방식품영양학과

Tyrosinase Reaction in AOT/Isooctane/Reverse Micelles

Daeseok Han, Yu Jung Shin, Sung-Won Jung and Hyo Nam Song
Korea Food Research Institute, *Semyung University

Abstract

It is difficult to accurately evaluate the effect of lipophilic compounds in aqueous reaction system of enzymes because they are immiscible with water. To screen lipophilic inhibitors of tyrosinase which catalyzes the synthesis of melanin *in vivo*, an optically clear organic system composed of organic solvent, surfactant, and water, often called reverse micelles(RM), was introduced. Optimal RM to let tyrosinase act normally was composed of isoocetane as an organic solvent and dioctyl sulfosuccinate(AOT) of 100 mM as a surfactant. When a molar ratio of water to surfactant was 15, tyrosinase(105.3 units) in RM showed a similar reactivity toward 3,4-dihydroxyphenylalanine(0.18 mM) as in the aqueous assay system. In the presence of cinnamic acid, the product formation of tyrosinase reaction was proportional to the reaction time. This indicates that the inhibitory effect of lipophilic compounds could be analyzed in RM.

Key words: tyrosinase, reverse micelles, surfactant, inhibitor

서 론

멜라닌은 생물체에 매우 널리 분포되어 있는 색소로 quinone과 hydroquinone monomer unit의 중합체이다. 주로 암갈색 또는 적갈색이며 tyrosinase (mono-phenol, dihydroxy-L-phenylalanine: oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)의 작용에 의한 quinone의 생성이 선행된 후에 아미노산 혹은 단백질과의 중합 반응에 의해 합성된다⁽¹⁾. 멜라닌은 생물체의 생육이나 발달에 필수 불가결한 물질은 아니지만 생물의 이태, 성의 구별 및 은녀에 이용되고 빛으로부터 피부를 보호하는 역할을 하는⁽²⁾등 생물체의 생존력과 경쟁력을 높여주기도 한다. 그러나 멜라닌이 비정상적이고, 과다하게 생성(hyper-pigmentation)될 경우 피부에 기미, 주근깨 및 노인성 검버섯 등을 생성하여⁽³⁾ 미용학적인 문제를 유발한다. 더욱이 멜라닌은 화학적·물리적으로 매우 안정한 물질⁽⁴⁾이어서, 일단 생성된 색소는 피부에

커다란 손상 없이 단기간에 분해하여 제거하기가 거의 불가능하기 때문에 이를 방지 및 치료하기 위한 방법으로 피부 미백제로서 멜라닌의 합성을 저해하는 물질을 사용하고 있다.

Tyrosinase는 식품의 효소적 갈변을 일으키고 생체내에서는 멜라닌 생합성을 촉매하는 효소로서 광의의 폐놀화합물을 기질로 이용하는 구리합유효소이며 구리이온에 의해 활성이 증가되고 염화이온에 의해 억제된다. 기질 특이성에 따라 polyphenol oxidase, polyphenolase, cresolase, catechol oxidase, catecholase 및 monophenol oxidase 등의 관용명으로 혼용되고 있으며, 작용 기작은 hydroxylation과 oxidation(dehydrogenation)으로 구분되고 있다⁽⁵⁾. 멜라닌 생합성을 억제하기 위한 tyrosinase 저해제로 약 20~30년 전에는 hydroquinone⁽⁶⁾이나 hydroquinone monobenzylether가 사용되었고, 그 밖에 인체의 hyper-pigmentation 치료에 사용되는 4-hydroxyanisole을 비롯하여, 4-hexylresorcinol, tropolone, thiourea, cinnamic acid, benzoic acid, kojic acid 등⁽⁶⁾이 보고되어 있으나, 안전성과 경제성 등의 문제점이 있는 경우가 많아서 보다 효과적이고 안전하며, 경제적인 대체물질의 발굴이 계속 요구되고 있는 형편이다.

Corresponding author : Daeseok Han, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Kyunggi-do, 463-420 Korea.
Tel : 82-342-780-9012
Fax : 82-342-780-9234
E-mail : dshan@kfra.re.kr

따라서 tyrosinase의 저해제를 안전한 천연물로부터 얻기 위한 연구가 진행되어 왔으나, 현재까지는 그 대상을 수용성 물질에 국한하는 학제를 보이고 있다. 그러나, 지용성 물질 중에서도 tyrosinase를 저해할 수 있는 물질이 존재할 가능성이 있으며 이는 대체소재를 개발할 수 있는 유용한 방안으로 평가되고 있다. 다만 효소 반응이 주로 수용액 중에서 이루어지므로 물에 용해되지 않는 지용성 물질의 저해 효과는 평가하기 어려운 문제가 있어 아직은 지용성 물질을 대상으로 한 tyrosinase 저해제에 관한 연구가 거의 없는 실정이다.

지용성 물질은 물에 용해되지 않으므로 수용액에서 tyrosinase 활성 저해능을 측정하기는 매우 어렵다. 계면활성제를 첨가하여 지용성 소재를 유화상태로 수용액에 분산시켜도 유적(oil droplet)의 크기가 약 수십~수백 μm 정도에 불과하므로⁽⁷⁾ 유적 내부의 물질은 반응에 참여하지 못하며, 또한 유적을 싸고 있는 계면활성제가 물질간의 충돌에 있어 장애요인으로 작용하기 때문에⁽⁸⁾ 유화상태의 경우는 특정 지용성 성분의 tyrosinase 저해 효과가 실제보다는 낮게 평가될 것으로 생각된다.

이러한 문제는 지용성 물질을 효율적으로 분산, 용해시키는 역미셀을 이용하는 방법으로 해결할 수 있다. 즉, 유기용매에 계면활성제를 용해시키고 소량의 물을 첨가하면 계면활성제의 소수기는 유기용매를 향하고, 친수기는 흐소와 기질 쪽으로 향하여 물을 내포한 집합체(water pool)를 형성하는데, 이를 역미셀(reverse micelles, RM)⁽⁹⁾이라 한다. 다시 말해 RM은 비극성 용매 내에서 계면활성제의 소수성 부분은 외부로 향하고, 친수성 부분은 내부로 향하도록 배열되어⁽¹⁰⁾ 안정화된 수~수십 nm 크기의 입자를 형성하며, 여기에 물을 첨가하면 계면활성제 내부에 물분자들이 포집된 형태를 이루는 것이다. 이러한 RM은 240 nm 이상에서는 광 분산(light scattering)이 일어나지 않아 광학적으로 투명한 계를 이루기 때문에 이를 이용한 광학적 연구가 가능한 특징이 있다. 본 연구에서는 역미셀계 내에서의 tyrosinase 반응이 수용액에서와 유사한 걸보기 거동을 나타내는 조건을 발견하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약

Mushroom tyrosinase(4,400 units/mg solid) 및 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-Dopa), dioctyl sulfo-

succinate(AOT), trioctylmethylammonium chloride (TOMAC), Triton X-100[®] 등은 Sigma사(MO, USA) 제품을 사용하였으며, tween-80은 Junsei사(Tokyo, Japan), isoctane 등 유기용매는 Burdick & Jackson(MI, USA)의 HPLC급을 사용하였다. p-Xylool은 Merck사(Darmstadt, Germany), petroleum ether는 Showa Chemicals(Tokyo, Japan), sodium sulfate anhydrous는 Shinyo Pure Chemicals(Osaka, Japan), absolute alcohol은 Hayman Ltd.(Essex, England)로부터 구입하여 사용하였다. Brij 56[®], hexadecyltrimethylammonium bromide(CTAB)는 Fluka사(Buchs, Switzerland) 제품을 사용하였다. Tyrosinase의 활성은 L-tyrosine을 기질로 하여 인산완충용액(25 mM, pH 6.5)에서 반응(25°C)시키면서 280 nm에서 흡광도를 측정하였을 때 1분당 0.001의 흡광도를 변화시키는 양을 1 unit로 정의하였다.

유기용매, 계면활성제 및 완충용액의 선정

Isooctane, cyclohexane, chloroform, *n*-hexane, heptane 및 p-xylool에 계면활성제로서 AOT를 100 mM로 고정하여 용해시키고, 각 유기용매 3 mL에 인산완충용액(25 mM, pH 8.0)을 54 μL 첨가하여 RM의 형성과 안정성을 살펴보았다. 또한 인산완충용액(25 mM, pH 8.0)에 흐소 105.3 units를 용해시키고 L-Dopa 0.18 mM를 첨가하여 초기 흡광도 값의 안정성과 1 분간의 반응 속도 등을 비교하여 안정한 RM을 형성할 수 있고 흐소 반응이 수용액에서와 유사한 거동을 나타내는 유기용매를 선정하였다.

계면활성제 선정을 위하여 isoctane에 AOT, Triton X-100[®], Brij 56[®], CTAB 및 TOMAC를 각각 100 mM이 되도록 용해시켜 보수력이 높고 RM 형성이 용이한 계면활성제를 조사하였다.

완충용액은 농도를 각각 25 mM로 고정하여 pH 3~5는 citric acid-Na₂HPO₄ 완충용액, pH 6~8은 sodium phosphate 완충용액, pH 8~10은 glycine-NaOH 완충용액을 사용하여 RM 형성이 잘되고 흐소반응에 유도기간이 필요 없는 완충용액을 선택하고자 하였다. 또한 1분간 흡광도의 변화가 가장 크게 나타나는 완충용액을 선정의 기준으로 삼아 RM에서 tyrosinase 반응에 가장 적절한 조건을 설정하였다.

RM의 형성

유기용매 및 계면활성제를 각각 달리하여 물을 가하고, RM이 가장 잘 형성되는 조건을 살펴보았다. 이 때 사용한 물의 양은 기질과 흐소가 용해될 수 있고,

기질과 효소가 반응할 수 있으며 RM이 파괴되지 않는 양이어야 한다. 우선 기질과 효소가 반응할 수 있는 적정 농도를 찾아 계면활성제의 농도, 완충용액의 pH 및 물의 양을 달리하여, RM 형성이 용이하고 tyrosinase 활성 측정이 가능한 적정 조건을 찾고자 하였다.

W값이 효소반응에 미치는 영향

RM 형성을 위한 물의 양을 결정하기 위하여 isoctane과 100 mM의 AOT로 이루어진 유기용매계에 수용성인 tyrosinase를 용해시키고, 사용한 계면활성제의 mole 농도에 대해 물의 mole 농도를 달리하여 안정한 RM이 형성되는 물의 농도를 결정하였다. 이때 계면활성제의 mole 농도에 대한 물의 mole 농도 비율을 W라 약칭하여 결과를 표시하였다.

$$W = \frac{[\text{water}]}{[\text{surfactant}]}$$

[water]: 물의 mole 농도

[surfactant]: 계면활성제의 mole 농도

AOT/0|소옥탄/액미셀계내에서의 tyrosinase 반응

Isooctane에 AOT가 100 mM이 되도록 용해시키고 W = 15인 RM에서 L-Dopa 농도 (0.036~0.36 mM)와 효소 농도(17.6~351.0 units)의 변화에 따른 반응속도를 측정하였다. 이때 반응속도는 475 nm에서 반응 초기 1분간의 흡광도 변화로 표시하였다.

결과 및 고찰

유기용매와 계면활성제의 선정

AOT 100 mM을 용해시킨 여러 가지 유기용매에서의 tyrosinase반응 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Cyclohexane의 경우 완충용액만 첨가하면 혼탁하게 되어 RM이 잘 형성되지 않았으며, 1분간 측정한 이 혼합물의 흡광도도 점차 감소하는 경향을 나타내었다. Tyrosinase와 L-Dopa를 함께 첨가하여 반응시켰을 때는 완충용액만 첨가하였을 때보다 감소속도가 더 빠르게 나타났으며 전체적인 색깔은 분홍색을 띠었다. 즉, 반응은 일어나지만 RM이 잘 형성되지 않아 초기에는 산란(scattering)에 의해 흡광도가 높지만 이후 점차 RM이 형성되면서 흡광도가 점차 감소하는 것으로 사료된다. Chloroform은 cyclohexane과는 반대로 완충용액만 첨가하였을 때 혼탁한 상태로 초기 흡광도가 증가하는 경향을 보였으며, tyrosinase와 L-Dopa를 함께 첨가

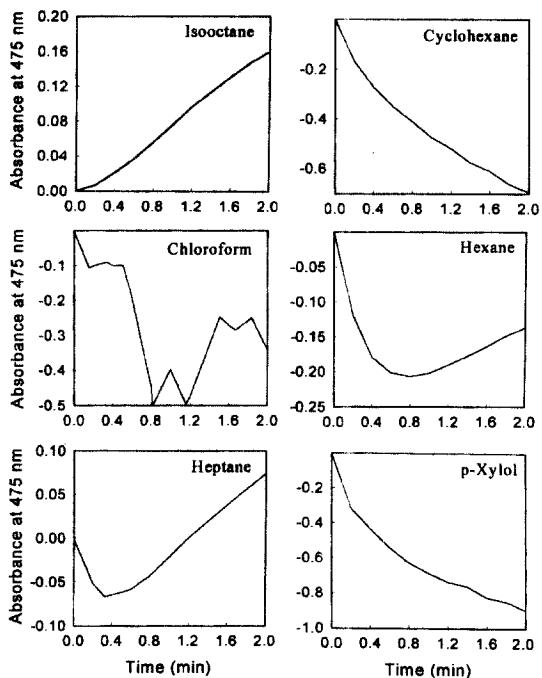


Fig. 1. Tyrosinase reaction on various organic solvents for RM.

하였을 때는 혼탁한 상태로 상층에 갈색 부유물이 나타났다. 이는 반응물과 용매 사이의 비중차(1 : 1.8)가 크기 때문에 갈색 반응물이 chloroform 상층부에 모이면서 불용성 물질을 형성하여 흡광도가 불규칙하게 변화되는 것으로 판단되었다. Hexane의 경우 완충용액만 첨가하였을 때 초기에는 흡광도는 떨어지나 약 1분 후에 안정되는 것을 관찰할 수 있었다. 효소와 기질을 첨가하여 반응시키면 약 1분 후에 안정되어 완만한 기울기를 나타내었다. Heptane은 완충용액만 첨가하였을 때 초기 약 30초간 흡광도가 감소했다가 안정된 것을 볼 수 있었으며, 효소와 기질을 첨가하면 약 20초 후에 안정되어 완만하게 증가하였다. p-Xylo은 완충용액만 첨가하였을 때 흡광도가 감소하였으며 tyrosinase와 L-Dopa를 첨가하였을 때는 완충용액만 첨가하였을 때보다 감소 속도는 느리나 현저히 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 p-xylo도 cyclohexane과 같이 RM 형성속도가 느린 편이기 때문인 것으로 보인다. Isooctane의 경우 완충용액만 첨가하였을 때 초기값이 안정하였으며, tyrosinase와 L-Dopa를 첨가하였을 때도 초기 흡광도의 감소 현상이 없이 완만한 기울기의 직선을 나타내었을 뿐 아니라 용매의 상태도 혼탁함 없이 투명하였다. 이상과 같은 결과에 따라 RM 형성에 적합한 용매로서 isoctane을 선정하였다.

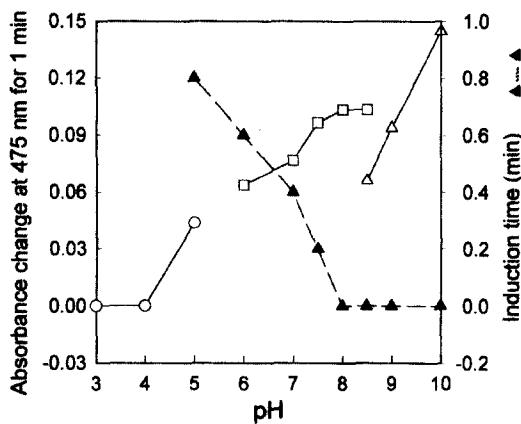


Fig. 2. Effect of pH on tyrosinase reaction in RM.

RM was composed of isoctane(3 mL), AOT(100 mM) and phosphate buffer(25 mM, pH 8.0) containing tyrosinase (105.3 units) and L-Dopa(0.18 mM). Water concentration in RM was 1.5 M. Absorbance change was determined from a slope of absorbance at 475 nm for the initial 1 min at 35°C. ○-○: citric acid-Na₂HPO₄ buffer, □-□: sodium phosphate buffer, ▲-▲: glycine-NaOH buffer, ▲-▲: induction time for the initiation of tyrosinase reaction when phosphate buffer was used.

한편, isoctane에 여러 가지 계면활성제를 첨가하고 RM 형성을 관찰한 결과, Triton X-100®과 CTAB는 isoctane내에서 층 분리가 일어났으며, TOMAC과 Brij 56®은 isoctane에 잘 용해되지 않았다. 반면에 AOT는 isoctane내에서 층 분리 없이 잘 용해되었다. 따라서 RM 형성에 적합한 계면활성제로 AOT를 선정하였다.

완충용액의 선정

RM에서의 tyrosinase 반응에 citric acid-Na₂HPO₄ 완충용액을 사용한 경우 pH 3, 4에서는 반응이 일어나지 않았으며, pH 5에서는 반응이 일어났으나 반응 유도시간이 0.8분이 소요되었다. 인산완충용액의 경우 pH 6, pH 7 및 pH 7.5에서 반응 유도시간이 각각 0.6분, 0.4분 및 0.2분이 소요되었다. 한편, pH 8의 경우 인산완충용액에서는 반응 유도시간이 나타나지 않았고 1분간의 흡광도 변화도 높게 나타났으나, glycine-NaOH 완충용액에서는 1분 후의 흡광도는 높았으나 그 반응 속도가 점차 감소하는 양상을 나타내었다. 반응속도는 효소의 양과 활성이 비례관계에 있는 반응 초기 단계에 측정해야 정확한 분석이 가능하므로⁽¹¹⁾, 완충용액의 pH는 반응의 유도시간이 나타나지 않고 반응속도도 일정한 pH 8로 정하였으며, 반응속도 및 1분 후의 흡광도가 더 높게 나타난 pH 8의 인산완충용액을 효소와

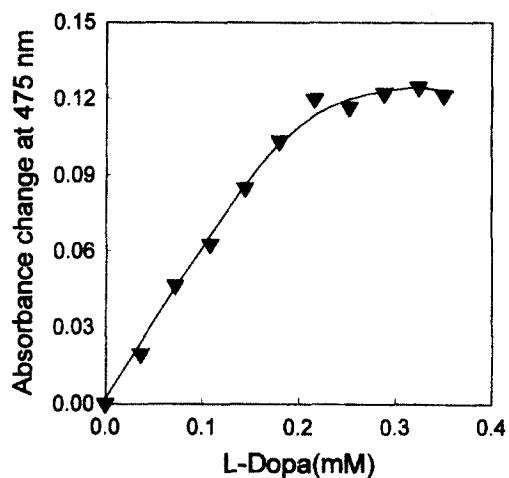


Fig. 3. Dependence of tyrosinase reaction on L-Dopa concentration in RM.

RM was composed of isoctane(3 mL), AOT(100 mM) and phosphate buffer(25 mM, pH 8.0) containing tyrosinase (105.3 units). Water concentration in RM was 1.5 M. Absorbance change was determined from a slope of absorbance at 475 nm for the initial 1 min at 35°C.

기질을 용해시킬 완충용액으로 선정하였다(Fig. 2). Bru 등⁽⁹⁾은 RM에서 4-methylcatechol이 4-methyl-*o*-benzoquinone으로 산화되는 반응을 촉매하는 tyrosinase의 최적 pH가 수용액에서보다 알칼리 쪽으로 약 1 단위 이동하였다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었으며, 이는 유기용매 내에서의 tyrosinase 반응에 보편적인 현상인 것으로 생각된다.

기질(L-Dopa) 농도의 효과

Tyrosinase의 기질로서 0.036 mM~0.36 mM의 L-Dopa를 사용하여 측정한 흡광도의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. L-Dopa의 농도가 0.18 mM에 이르기까지는 농도의 증가와 함께 반응 1분간의 흡광도도 점차 증가하는 경향을 보였으나 그 이상의 농도에서는 기질의 양과 반응속도 사이에는 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 이는 기질이 포화 농도에 이르렀기 때문이며 또한 L-Dopa가 주어진 RM에 완전히 용해되지 않았기 때문인 것으로 생각된다. L-Dopa 농도가 0.216 mM일 때 반응 1분간 흡광도의 변화가 가장 높은 것으로 나타났으나 이 농도에서도 기질이 완전히 용해되지 않은 상태였다. 따라서 기질이 완전히 용해되면서 반응 초기의 흡광도 변화가 높은 농도인 0.18 mM이 RM에서 tyrosinase 반응 연구에 적정한 조건으로 판단되었다.

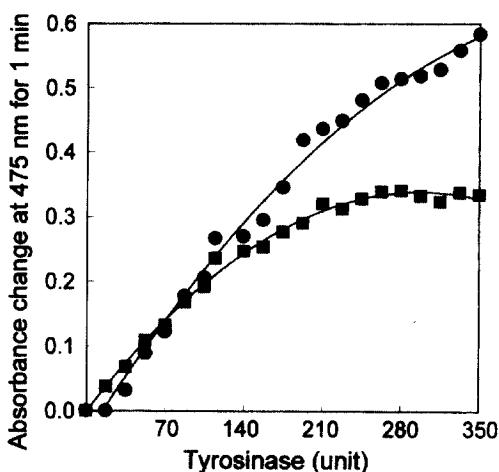


Fig. 4. Dependence of tyrosinase reaction on enzyme content in RM.

RM was composed of isoctane(3 mL), AOT(100 mM) and phosphate buffer(25 mM, pH 8.0) containing L-Dopa(0.18 mM). Water concentration in RM was 1.5 M. Absorbance change was determined from a slope of absorbance at 475 nm for the initial 1 min at 35°C. ●: absorbance during 1 min of reaction determined from the slope of the absorbance change within 0.2 min after initiation of the reaction, ■: absorbance after 1 min of the reaction

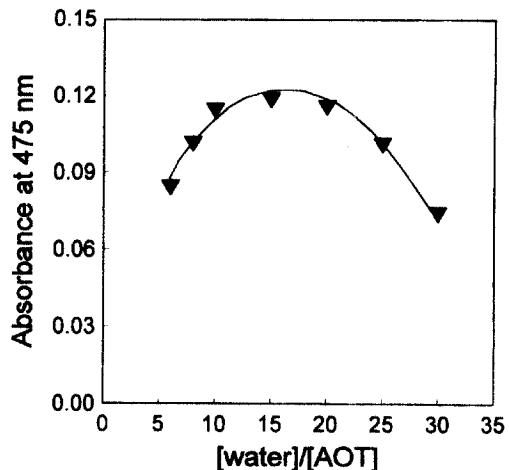


Fig. 5. Dependence of tyrosinase reaction on the molar ratio of water to surfactant in RM.

RM was composed of isoctane(3 mL), AOT(100 mM) and phosphate buffer(25 mM, pH 8.0) containing tyrosinase (105.3 units) and L-Dopa(0.18 mM). Absorbance change was determined from a slope of absorbance at 475 nm for the initial 1 min at 35°C.

Tyrosinase 농도의 효과

반응에 필요한 효소의 적정농도를 알아보기 위하여 tyrosinase의 농도를 17.6 units~351.0 units(효소용액 제조시 완충용액에서의 농도는 650~13,000 units/mL)로 변화시키면서 흡광도의 변화를 측정하였다(Fig. 4). 반응 개시후 0.2분까지의 흡광도 변화의 기울기로부터 1분간의 흡광도(A)를 측정하였고, 실제 반응 1분 후의 흡광도(B)를 측정하였다. 효소의 농도가 증가할수록 흡광도 A와 흡광도 B의 차이, 즉, 반응속도의 차이가 커졌으며 이는 반응초기에 기질과의 반응이 너무 빨리 일어나 반응속도가 감소한 것으로 생각된다. 따라서 흡광도 B의 값도 높고, 흡광도 A와 흡광도 B의 차이도 적은 농도인 105.3 units를 tyrosinase의 적정농도로 사용하였다.

계면활성제와 물의 mole 농도비의 효과

RM 형성에 필요한 물의 양을 결정하는데 있어 W값이 너무 낮으면 반응을 유도할 수 있는 물의 양이 적어 반응이 잘 일어나지 않고 기질과 효소를 용해시킬 수 있는 충분한 양의 물을 공급할 수 없는 문제가 있으며, 반면에 W값이 너무 높으면 반응속도가 지나치게 빨라서 흡광도를 측정하려는 순간 이미 일정범위를 벗어나게 되고, RM 형성시간이 증가하며, RM의

안정도도 낮아진다. RM에서 W값에 따른 tyrosinase 반응속도를 측정한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. W = 15에 이르기까지는 반응속도 및 1분간의 흡광도가 증가하였으나, 그 이상에서는 RM을 형성하는데 장시간(RM이 투명하게 형성되기 전에 이미 초기반응이 일어남)이 소요되었으며, 반응속도도 다시 감소하였다. 일반적으로 W값이 커짐에 따라 RM의 크기도 커지는 것으로 보고⁽¹²⁾되어 있으나, 본 실험결과에 의하면 반응에 필요한 RM의 크기가 클수록 반응이 항상 잘 일어나는 것은 아니고 일정 크기 이상에서는 오히려 반응이 잘 일어나지 않는 것으로 사료된다. 따라서 RM 형성이 용이하고 반응이 안정적으로 일어나며 재현성이 높은 값인 W값 15를 RM에서의 tyrosinase 저해제 분석 조건으로 결정하였다. 한편, RM에서 효소 반응은 거의 예외 없이 최적 W값⁽¹³⁾을 나타내며 Bru 등⁽⁹⁾은 AOT-isoctane RM에서 tyrosinase 활성이 W = 37에서 가장 높게 나타난 것으로 보고하여 본 결과와 최적 W값이 차이가 있으나, 이는 AOT 농도가 달라 유기용매 내 물 함량이 다르고 사용한 기질이 다르기 때문인 것으로 생각된다.

계면활성제 농도의 효과

W값을 일정하게 하고 계면활성제의 농도를 달리하여 결과적으로 유기용매 내 물의 함량을 변화시킨 결과를 Fig. 6에 나타내었다. AOT 농도를 40~400 mM까-

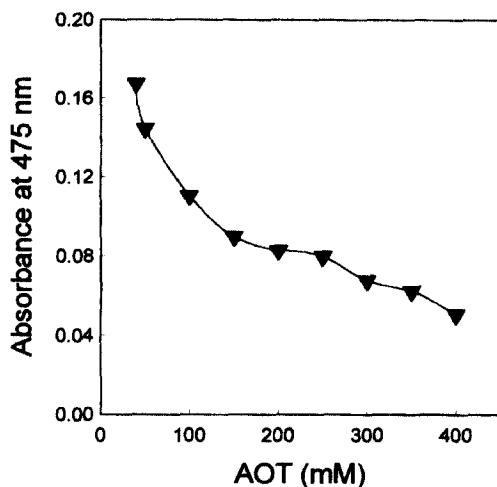


Fig. 6. Dependence of tyrosinase reaction on AOT concentration in RM.

RM was composed of isoctane(3 mL), AOT and phosphate buffer(25 mM, pH 8.0) containing tyrosinase(105.3 units) and L-Dopa(0.18 mM). W was 15. Absorbance change was determined from a slope of absorbance at 475 nm for the initial 1 min at 35°C.

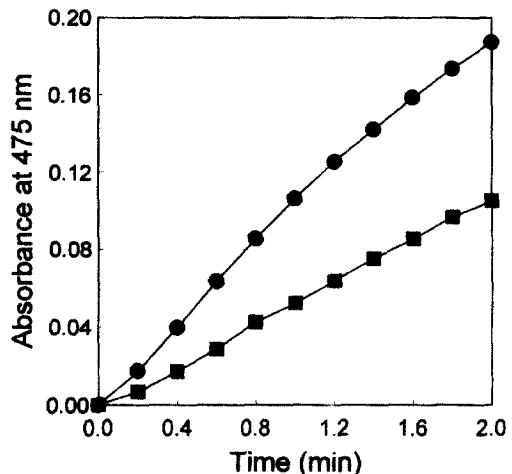


Fig. 7. Tyrosinase reaction in RM in the absence and presence of cinnamic acid.

Control(●) is the tyrosinase-catalyzed reaction in RM composed of isoctane (3 mL), AOT(100 mM) and phosphate buffer(25 mM, pH 8.0) containing tyrosinase (105.3 units) and L-Dopa(0.18 mM). W was 15. Absorbance change was determined from a slope of absorbance at 475 nm for the initial 1 min at 35°C. Tyrosinase reaction was inhibited in the presence of cinnamic acid(0.05 mM, ■).

지 달리하여 측정한 결과 AOT 농도가 낮을수록 1분간의 흡광도 변화는 높게 나타났다. 그러나 40 mM과 50 mM에서는 초기 0.2분에서의 흡광도를 연장하여 나타낸 연장선에서의 흡광도와 실제 1분 후 흡광도는 차이가 있어, 1분 후의 흡광도는 높으나 반응속도는 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 계면활성제의 농도는 1분 후의 흡광도가 높고, 반응속도의 변화도 적은 100 mM로 선정하였다.

Cinnamic acid의 tyrosinase 저해활성 측정

이상과 같은 실험에서 결정한 유기용매 내에서의 tyrosinase assay 조건을 이용하여, 25°C에서 물에 대한 포화용해도가 0.05%로 낮고 tyrosinase의 저해제로 알려진 cinnamic acid가 tyrosinase 반응에 미치는 영향을 Fig. 7에 나타내었다. Tyrosinase는 유기용매 내에서도 반응시간에 따라 비례적으로 반응 생성물을 형성하여 반응속도의 측정이 가능하였으며, cinnamic acid를 첨가한 후 반응속도가 현저히 낮아져 tyrosinase에 대한 효과적인 저해제임을 확인할 수 있었다. 이때 저해작용 역시 반응생성물이 시간에 따라 비례적으로 생성되어 저해활성의 분석이 가능하였으며, tyrosinase 활성을 약 50% 저해하는 cinnamic acid의 농도는 5×10^{-2} mM인 것으로 나타났다.

결론적으로 RM은 수용성인 효소와 기질 그리고 지

용성인 저해제를 모두 하나의 상(phase)에 용해시킬 수 있어 지용성 물질의 tyrosinase 저해 효과를 분석할 수 있는 유용한 수단인 것으로 판단되었다.

요약

지용성 물질은 물에 용해되지 않아 수용액 효소반응계에서의 특정효과를 평가하기가 어렵다. 생체내에서 멜라닌을 합성하는 효소인 tyrosinase의 지용성 저해제를 탐색하고자 유기용매, 계면활성제 및 물로 구성된 광학적으로 투명한 RM을 도입하였다. Tyrosinase의 걸보기 반응이 물에서와 유사한 RM의 형성조건 중 유기용매는 isoctane, 계면활성제는 100 mM의 dioctyl sulfosuccinate(AOT)가 적절하였다. RM에서 물과 AOT의 물 농도 비율이 15일 때 tyrosinase(103.5 units)는 기질인 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine(0.18 mM)에 대하여 수용액에서와 유사한 거동을 나타내었다. 또한 tyrosinase 저해제인 cinnamic acid 존재 하에서도 tyrosinase 촉매 반응의 반응 생성물이 반응 시간에 비례하여 형성됨이 확인되어 지용성 물질도 RM에서는 tyrosinase 저해활성이 가능함을 시사하였다. 따라서 RM은 수용성인 효소와 기질 그리고 지용성인 저해제를 모두 하나의 상(phase)에 용해시킬 수 있어 지용성 물

질의 tyrosinase 저해 효과를 분석할 수 있는 중요한 수단으로 활용할 수 있을 것으로 판단되었다.

문 헌

1. Pawelek, J.M. and Körner, A.M. The biosynthesis of mammalian melanin. *Am. Sci.* 70: 136-158 (1982)
2. Lerner, A.B. and Fitzpatrick, T.B. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* 30: 91-126 (1950)
3. Prota, G. and Thompson, R.H. Melanin pigmentation in mammals. *Endeavor*. 35: 32-38 (1976)
4. Blois, M.S. The melanins; Their synthesis and structure. pp. 115-134. In *Photochemical and Photobiological Reviews*. Vol. 3, Smith, K.C. (eds.). Plenum Press, New York/London (1979)
5. Hearing, V.J. and Ekel, T.M. Mammalian tyrosinase; A comparison of tyrosinase hydroxylation and melanin formation. *Biochem. J.* 157: 549-557 (1976)
6. Vámos-Vigyázó, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 15: 49-127 (1981)
7. Lang, J., Jada, A. and Malliaris, A. Structure and dynamics of water-in-oil droplets stabilized by sodium

- bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate. *J. Phys. Chem.* 92: 1946-1953 (1988)
8. Fletcher, P.D.I. and Robinson, B.H. Dynamic processes in water-in-oil microemulsions. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 85: 863-866 (1981)
9. Bru, R., Sanchez-Ferrer, A. and Garcia-Carmona, F. A theoretical study on the expression of enzymic activity in reverse micelles. *Biochem. J.* 259: 355-361 (1989)
10. D'Aprano, A., Lizzio, A., Liveri, V.T., Aliotta, F., Vasi, C. and Migliardo, P. Aggregation states of water in reversed AOT micelles: Raman Evidence. *J. Phys. Chem.* 92: 4436-4439 (1988)
11. Allison, R.D. and Purich, D.L. Practical considerations in the design of initial velocity enzyme rate assays. *Method. Enzymol.* 63: 3-22 (1979)
12. Zalauf, M. and Eicke, H.-F. Inverted micelles and microemulsions in the ternary system H₂O/aerosol-OT/isoctane as studied by photon correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem.* 83: 480-486 (1979)
13. Luisi, P.L. and Magid, L.J. Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 20: 409-473 (1986)

(1999년 10월 13일 접수)