

고초균에서 폴리페놀로 유도된 DNA 손상에 대한 폴리페놀산화효소의 억제효과

김안근[#] · 김유경 · 강영숙

숙명여자대학교 약학대학

(Received July 21, 2005; August 19, 2005)

The Inhibitory Effect of Polyphenol Oxidase on Polyphenol-Induced DNA Damage of *Bacillus subtilis*

An Keun Kim[#], Yoo Kyung Kim and Young-Sook Kang

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

Abstract — Antimutagenic activity of the enzymatic browning reaction products (EBRPs) was investigated by using the spore rec-assay with *Bacillus subtilis* strains H17 (rec⁺) and M45 (rec⁻). The EBRPs tested were prepared from the reactions of five different kinds of polyphenols with polyphenol oxidase isolated from the leaves *Perilla frutescens*. In the spore rec-assay, most of the polyphenolic compounds tested showed positive, whereas only their tested compound showed negative respectively. In addition of polyphenol oxidase inhibitors such as cysteine, glutathione and ascorbic acid to the reaction mixtures consisted with the polyphenol oxidase and polyphenols, the mutagenic effects were increased in the spore rec-assay. These results show that the activity of polyphenol oxidase may play an important role in the reduction of mutagenicity of polyphenols.

Keywords □ polyphenol oxidase, *Perilla frutescens*, rec-assay, enzymatic browning reaction product

Polyphenol oxidase(PPO)는 copper를 함유한 metalloprotein으로 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⁾

PPO는 세포의 파괴(crushing), 노화 과정에서 활성이 조절되며 폴리페놀 물질의 산화 결과로 갈변현상이 나타나게 된다. 많은 폴리페놀 화합물이 항산화 작용이 있는 것으로 알려져 있으나 폴리페놀¹ 화합물이 강한 돌연변이원성이 있는 것으로도 보고되어 있다. 폴리페놀 화합물이 효소와 반응하여 quinonoid를 생성하게 되면 이 물질은 강력한 친전자성을 지니기 때문에 자동산화, 교차(cross-linking) 및 melanin 형성 등의 다양한 반응이

이차적으로 일어나서 효소적 갈변반응물질을 생성²⁾하게 된다. 이와 같이 폴리페놀 물질이 산화되어 갈변되면 변이원성이 급격히 저하되는 것으로 보고되어 있다.³⁾ 저자 등은 고초균에서 페놀성 물질에 의한 DNA 손상이 PPO의 작용에 의해 억제 되는 현상은 PPO 효소의 작용으로 페놀성 물질의 감소에 의한 것인지 또는 생성된 갈변물질의 작용에 의한 것인지를 알아보기 위하여 연구에 착수하였다. 폴리페놀 물질 단독과 이들 폴리페놀 화합물이 PPO에 의한 효소반응 결과 생성되는 갈변물질, 또한 폴리페놀 물질 및 PPO에 효소 저해제를 첨가시켜 얻은 결과를 검토하여 고초균의 DNA 손상에 미치는 영향에 대해 일부의 지견을 얻었으므로 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 PPO 효소를 얻는데 사용된 들깨(*Perilla frutescens*) 잎은 서울 근교에서 채취하여 -70°C에서 보관한 후 사용하였다.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9561 (팩스) 02-710-9871
(E-mail) akkim@sookmyung.ac.kr

시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 sodium dodesylsulfate, gallic acid (Junsei), bovine serum albumin, *t*-butylcatechol, tris(hydroxymethyl)aminomethane, 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)이고, 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)이며, 기타 시약들은 시판 특급(guaranteed reagent) 및 1급 시약을 사용하였다.

효소의 추출

70°C에 보관된 들깨잎을 교반기에 넣고 10 mM ascorbic acid 와 2% sodium chloride, 3% Triton X-114를 포함하는 50 mM phosphate buffer(pH 6.0)를 4배량 가하여 교반기에서 1분간 분쇄한 후 하루밤 방치하여 8겹의 거어지로 여과하였다. 여액을 35°C에서 15분간 방치한 후 10,000×g로 상온에서 원심 분리하여 상층을 취하여 이를 50 mM phosphate buffer(pH 6.0)로 하루 밤 동안 투석하여 효소로 사용하였다.

단백질 정량

단백질의 함량은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 trichloroacetic acid와 Folin-Ciocalteu 시약을 사용하는 TCA-Lowry 법⁴⁾으로 측정하였다.

효소액과 갈변반응 생성물의 조제

추출한 효소를 기질 특이성 실험에 사용하였던 5종의 폴리페놀 화합물(pyrogallol, 4-methylcatechol, pyrocatechol, *t*-butylcatechol, gallic acid)과 24시간 동안 최적온도(45°C)에서 반응시켜 갈변반응액을 얻었다. 이 반응액을 Whatman No. 2 여과지로 여과한 후 투석막에 넣어 48시간 동안 물로 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 가열 용해한 후, 50°C 정도로 냉각시키고 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 1 l가 되게 만들었다. 포자 한천 배지의 조제는 8 g의 Difco nutrient broth를 증류수에 완전히 용해한 후 15 g의 Difco bacto agar를 가하여 autoclave에서 가열 용해하였다. 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 plate당 3개씩 올려놓고 시료 용액을 15 µl, 10 µl, 5 µl씩 가한 다음 37°C에서 27시간 배양시킨 후 paper disc 주위에 생성된 생육저지대의 직경을 측정하여 M45 균 포자 한천 배지에 생성된 생육저지대와 H17균 포자 한천 배지에 나타난 생육저지대 간의 차이를 계산하여 실험에 사용된 시료가 고초균의 DNA에 미치는 손상정도에 대한 강도로 표시하였다.

자료분석 및 통계처리

모든 시험결과는 평균±표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

PPO에 관하여 많은 연구가 수행되어 왔으나 그 생리학적 기능과 세포내 위치에 대해서 잘 알려져 있지 않는데 그 이유 중의 하나는 효소의 추출과 정제의 어려움일 것으로 사료된다. 따라서 최근에 Triton X-114를 이용한 temperature-induced phase separation으로서 페놀성 물질과 클로로필이 다량 제거된 latent form의 PPO를 부분정제⁷⁻¹²⁾하는 등 다양한 정제법에 대한 연구^{13,14)}가 계속되고 있다. 이에 본 실험에서는 PPO를 추출하는데 phosphate buffer에 Triton X-114를 3% 첨가하여 35°C에서 15분간 방치함으로써 온도에 따라서 층이 분리되는 정제법을 이용하여 효소가 함유된 상층의 액을 취하여 그 액을 원심 분리하여 효소액으로 사용하였다(Table I).

일반적으로 PPO의 기질로 사용되는 5종의 폴리페놀 화합물만을 가한 경우(Table II)와 폴리페놀1 화합물에 PPO를 각각 반응시켜 얻은 갈변반응물, 즉 효소반응 생성물(enzymatic reaction product)이 고초균의 DNA에 미치는 손상정도를 검토해 본 결과(Table III), 기질로 사용된 5종의 폴리페놀 화합물만을 가한 경

Table I – Extraction of the polyphenol oxidase from the leaves of *Perilla frutescens*

Purification procedure	Enzyme activity (Units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (Units/mg)	Purification (fold)
Crude enzyme	12,884	5.3	2,431	1
Temperature-induced phase separation (upper phase)	2,589	0.058	44,538	18

Table II – Results of the spore rec-assay on the polyphenol

Test compound	Inhibition zone (mm)		Difference	Conclusion
	H17(Rec ⁺)	M45(Rec ⁻)		
4-Methylcatechol	2.0±0.2	6.4±0.2	4.4±0.5**	±
<i>t</i> -Butylcatechol	4.4±0.1	7.3±0.2	2.9±0.3**	±
Pyrogallol	2.2±0.3	7.1±0.6	4.9±0.9*	+
Pyrocatechol	1.1±0.1	4.4±0.7	3.3±0.6*	±
Gallic acid	0.53±0.06	1.0±0.1	0.47±0.10*	±
Dimethyl sulfoxide ^c	0	0	0	-
Enzyme	0	0	0	-
4-Nitroquinoline-N-oxide	1±0.10	15±0.67	14±0.77**	++

-, No inhibition zone; ±, Length of inhibition zone is less than 5 mm; +, 5~10 mm of inhibition zone; ++, 10~15 mm of inhibition zone; +++, more than 15 mm of inhibition zone.

The data were expressed as means±S.D. for 3 experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group^c (*p<0.05 and **p<0.01).

Table III – Results of the spore rec-assay on the enzymatic browning reaction product (EBRP)

Test compound	Inhibition zone (mm)		Difference	Conclusion
	H17(Rec ⁺)	M45(Rec ⁻)		
4-Methylcatechol EBRP	0	0	0	-
<i>t</i> -Butylcatechol EBRP	0	1±0.10	1±0.10**	±
Pyrogallol EBRP	0	0	0	-
Pyrocatechol EBRP	0	0	0	-
Gallic acid EBRP	0	0	0	-
Dimethyl sulfoxide ^c	0	0	0	-
Enzyme	0	0	0	-
4-Nitroquinoline-N-oxide	1±0.10	15±0.67	14±0.77**	++

-, No inhibition zone; ±, Length of inhibition zone is less than 5 mm; +, 5~10 mm of inhibition zone; ++, 10~15 mm of inhibition zone; +++, more than 15 mm of inhibition zone.

The data were expressed as means±S.D. for 3 experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group^c (**p<0.01).

우에는 *Bacillus subtilis* H17 및 M45 균주에 대해서 pyrogallol>4-methylcatechol>pyrocatechol, *t*-butylcatechol>gallic acid 순으로 양성을 나타내어 고초균의 DNA에 손상을 주었으나 (Table II), 이들 폴리페놀 화합물의 효소적 갈변물질들은 *t*-butylcatechol 에서 약한 양성이 나타나는 것을 제외하고는 전부 음성을 나타내어 (Table III), PPO를 폴리페놀 화합물에 가하여 갈변물질이 형성되면 DNA 손상을 일으키지 않는다는 것을 알 수 있었다. 양성 대조물질로는 발암물질로 알려진 4-nitroquinoline-N-oxide를 사용하였고, 효소반응 생성물을 용해하는데 사용한 dimethyl sulfoxide(DMSO)와 효소만의 단독 작용을 알아보기 위해 효소를 불활성화 시킨 후 실험한 결과, 이들은 *Bacillus subtilis* H17 및 M45 균주에 대해서 아무런

영향도 미치지 않았다 (Table III).

본 실험에서 나타난 이러한 결과들은 사과¹⁵⁾나 곰취, 참취 및 참나물,¹⁶⁾ 적색자두²⁾의 효소반응 생성물에서 밝혀진 사실들과도 일치하는 것으로 보아 많은 폴리페놀 화합물이 대부분 돌연변이원성이 있는 것으로 나타났으나 이러한 특성을 가진 폴리페놀 화합물이 이들을 산화시키는 효소와 반응하여 갈색화 되면 변이원성이 급격히 저하되는 것으로 나타난다는 이전의 보고들^{3,15,16)}을 뒷받침해준다. 또한 DNA에 손상을 일으키는 폴리페놀 화합물이 PPO에 의해 손상능력이 달라지는지를 확인하기 위해 폴리페놀 화합물과 PPO의 혼합물에 PPO 활성 저해물질로 잘 알려져 있는 cysteine, glutathione 및 ascorbin acid 등의 항산화제를 각각 세 가지 농도로 첨가하여 DNA 손상을 검

Table IV – Effects of PPO Inhibitor on DNA Damage reduced by PPO from *Perilla frutescens* Leaves

Inhibitor	Concentration (mM)	Inhibition zone (mm)		Difference
		H17(Rec ⁺)	M45(Rec ⁻)	
Cysteine	1	0	1±0.10	1±0.10**
	0.5	0	0.5±0.05	0.5±0.05**
	0.25	0	0	0
Glutathione	10	0	1±0.02	1±0.02**
	5	0	0.5±0.05	0.5±0.05**
	2.5	0	0	0
Ascorbic acid	0.05	0	1±0.10	1±0.09**
	0.025	0	0.5±0.08	0.5±0.08**
	0.0125	0	0	0

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

The data were expressed as means±S.D. for 3 experiments. Asterisks denote a significant difference compared with the control group (**p<0.01).

또한 결과 저해제에 의해 농도 의존적으로 DNA의 손상이 증가되는 것으로 나타났다(Table IV). 이는 저해제의 첨가에 의하여 기질인 폴리페놀 화합물이 PPO와 반응하여 생성된 *o*-quinone류 중 일부가 환원력을 가진 ascorbic acid에 의하여 다시 DNA 손상을 주는 폴리페놀 물질로 환원되거나 cysteine이나 glutathione 등의 thiol 화합물과 *o*-quinone이 2차 반응물을 생성하기 때문이라고 사료된다. 갈변물질 자체가 DNA 손상 감소 능력이 있는지를 검토하기 위해 폴리페놀 화합물에 이 화합물의 효소 반응 생성물인 갈변생성물의 농도를 다양하게 변화시켜 첨가하였을 때에도 DNA 손상 정도에는 아무런 변화가 없는 것으로 나타났다.

이상의 실험결과로부터 폴리페놀 화합물 단독일 때보다 이들 페놀성 화합물과 PPO와의 반응 생성물인 경우가 DNA에 대한 손상능력이 낮아지는 것은 효소적 갈변 반응에 의해 폴리페놀 물질의 함량이 감소하기 때문이라고 볼 수 있으며, 또한 폴리페놀 화합물에 이 화합물의 반응 생성물인 갈변생성물의 농도를 달리 하여 첨가하였을 때에도 DNA 손상 정도에는 아무런 변화가 없었으므로 폴리페놀 화합물로 인한 DNA 손상을 감소시키는 데는 PPO가 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다.

결 론

페놀성 물질로 인한 DNA손상에 있어서 폴리페놀 산화효소(PPO)의 억제효과를 spore rec-assay 결과를 통해 검토하였다. 폴리페놀 화합물인 pyrogallol, 4-methylcatechol, pyrocatechol, *t*-butylcatechol 및 gallic acid 단독으로는 대부분 고초균의 DNA에 손상을 일으키며, 대체적으로 폴리페놀 농도가 증가함에 따

라 생육저지력도 촉진되는 경향을 보였다. 그러나 폴리페놀 화합물들이 PPO의 작용을 받아서 갈변물질로 변한 경우에는 DNA 손상을 거의 일으키지 않았다. PPO의 활성 저해물질인 cysteine, glutathione 및 ascorbic acid 등의 농도를 증가시키기에 따라 DNA 손상도 증가되는 것으로 나타나 PPO가 페놀성 물질에 대한 고초균의 DNA 손상을 감소시키는데 중요한 역할을 하는 것이라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2004년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Hind, G., Marshak, D. R. and Coughlan, S. J. : Spinach thylakoid polyphenol oxidase: Cloning, characterization and relation to a putative protein kinase. *Biochemistry* **34**, 8157 (1995).
- Mayer, A. M. : Polyphenol oxidases in plants - recent progress. *Phytochemistry* **26**, 11 (1987).
- Ham, S. S., Hong, E. H. and Omura, H. : Desmutagenicity of enzymatically browned substances obtained from the reaction of *Prunus salicina* (Red) enzyme and polyphenols. *Korean J. Food Sci. Technol.* **19**(3), 212 (1987).
- Bailey, J. L. : *Technique in Protein Chemistry*, Elsevier Publisheng Co., New York (1967).
- Kada, T., Tutikawa, K. and Sadaie, Y. : *In vitro* and host mediated "rec-assay" procedures for screening chemical mutagens. *Mutation Res.* **16**, 165 (1972).
- Kada, T., Hirano, K., Hagiwara, T., Ohta, Y. and Matsumoto, T. : rec-Assay with spores of *Bacillus subtilis* with and without metabolic activation. *Mutation Res.* **97**, 339 (1982).
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. and Garcia-Carmona, F. : Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenol oxidase using temperature-induced phase separation in triton X-114. *Plant Physiol.* **91**, 1481 (1989).
- Sanchez-Ferrer, A., Alba, J. V. and Garcia-Carmona, F. : Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase. *Phytochemistry* **28**(5), 1321 (1989).
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. and Garcia-Carmona, F. : Partial purification of a thylakoid-bound enzyme using temperature-induced phase partitioning. *Anal. Biochem.* **184**, 279 (1990).
- Sanchez-Ferrer, A., Laveda, F. and Garcia-Carmona, F. : Substrate-dependent activation of latent potato polyphenol oxidase by anionic surfactants. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1583 (1993).

- 11) Chazarra, S., Cubanes, J., Escribano, J. and Garcia-Carmona, F. : Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* **44**, 984 (1996).
- 12) Bordier, C. : Phase separation of integral membrane proteins in triton x-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**, 1604 (1981).
- 13) Raymond, J., Rakariyatham, N. and Azanza, J. : Purification and some properties of polyphenol oxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry* **34**(4), 927 (1993).
- 14) Partinton, J. C. and Bolwell, G. P. : Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein patatin from potato tuber. *Phytochemistry* **42**(6), 1499 (1996).
- 15) Baik, C. W. and Ham, S. S. : Antimutagenic effects of browning products reacted with polyphenol oxidase extracted from apple by using SOS chromotest. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**(6), 618 (1990).
- 16) Ham, S. S., Kim, S. W. and Kim, Y. M. : Studies on antimutagenic effects and gene repair of enzymatic browning reaction products. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**(6), 632 (1990).