

다양한 페놀성 물질과 Folin-Ciocalteu 시약과의 반응성에 미치는 단백질의 영향

박경아 · 최유미 · 강스미 · 김미리 · 홍정일*
서울여자대학교 식품공학과

Effects of Proteins on the Reactivity of Various Phenolic Compounds with the Folin-Ciocalteu Reagent

Kyung A Park, Yoo-mi Choi, Smeek Kang, Mi-Ri Kim, and Jungil Hong*

Department of Food Science and Technology, College of Natural Science, Seoul Women's University

Abstract The Folin-Denis assay using the Folin-Ciocalteu (F-C) reagent has been commonly used for analyzing the total phenolic compound content in various food products. In the present study, the effects of proteins on the reactivity of the F-C reagent with different phenolic compounds were investigated. Bovine serum albumin (BSA) or skim milk proteins showed a concentration-dependent increase in color response in the Folin-Denis assay; these proteins decreased the color response of most phenolic compounds tested. The reactivity of phenolic compounds was significantly less pronounced in the presence of BSA and this interference was greater at higher concentrations of phenolic compounds. The reactivity of phenolic compounds with the F-C reagent was reduced significantly by their oxidation; the reaction of the oxidized products with the F-C reagent was more severely affected by BSA. The interfering effects in the Folin-Denis assay might be attributable to binding interactions of phenolic compounds with proteins.

Keywords: phenolic compound, Folin-Denis assay, protein, bovine serum albumin, Folin-Ciocalteu reagent

서 론

최근 건강에 대한 소비자의 관심이 높아지면서 기능성 식품에 대한 소비가 증가하고 있다. 이에 따라 생리활성을 조절하는 식품 내 기능성 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 식물과 식품 등 자연계에 많이 존재하는 파이토케미컬인 페놀성 식품성분들이 주목 받고 있다(1,2). 페놀성 화합물은 항산화, 항염 외에도 다양한 작용을 통해 우리 몸의 생리활성을 돕기 때문에(3-5), 기능성 식품성분으로서의 연구는 물론 상품화에 대한 관심 또한 높아지고 있다.

페놀성 화합물의 연구와 상품화가 활발해지면서 식품소재 및 추출물에서 페놀성 물질 함량이 식품의 기능성 평가에 중요한 기준이 되고 있다(6). 이에 따라 각종 기능성 식품 소재 중의 페놀성 성분의 정량이 보편적인 기술로서 대두되고 있으며(7), 페놀성 물질 함량은 각종 기능성 물질의 규격에 중요한 기준이 되고 있다(8). 다양한 페놀성 물질을 정량방법이 보고되었지만 그 중 Folin-Ciocalteu (F-C) 시약을 사용하는 Folin-Denis 방법이 가장 빈번하게 사용되고 있다(9). F-C시약은 sodium molybdate와 sodium tungstate의 혼합용액으로 페놀성 화합물 정량을 위한 비색법에

주로 사용된다. Sodium molybdate와 sodium tungstate의 혼합을 통하여 phosphotungstomolybdic acid complex를 생성하게 되는데, 이 complex 물질이 알칼리 조건에서 다양한 페놀성 화합물에 의해 환원되어 청자색 환원물을 생성하게 되는 원리이다(9,10).

이 방법은 간단하면서도 비교적 감도가 높아 가장 널리 사용되고 있지만, F-C시약과 반응할 수 있는 다양한 화합물이 시료의 페놀 물질 정량에 간섭요인으로 작용하여 문제가 된다. 이러한 요인들은 페놀성 물질들의 F-C시약과의 반응성을 저해 또는 상승시키거나, 또는 자신이 직접 F-C시약과 반응하여 페놀성 물질 정량의 정확도를 감소시킨다. 특히 단백질, 핵산, 각종 thiol성 물질 등 다양한 환원성 물질은 F-C시약과 반응하여 발색반응을 나타내므로 페놀 물질 정량에 영향을 미친다고 보고되고 있다(7,11-13). 그 중에서도 단백질은 F-C시약과 직접적으로 반응함은 물론 다양한 페놀성 화합물과도 상호작용하는 것으로 알려져 있으며 이러한 상호작용에 영향을 주는 요인들도 연구되고 있다.

단백질의 F-C시약과의 반응성과 각종 페놀성 물질과의 상호작용 가능성으로 인해 F-C시약을 이용한 폴리페놀 물질의 정량에 단백질이 혼입된 경우 필연적으로 오류가 발생할 것으로 예상되지만 이와 관련된 체계적인 연구는 거의 진행된 바 없다. 예를 들어 단백질의 혼입 시 폴리페놀류의 F-C시약과의 반응에 의한 발색도의 감소 및 증가 여부, 발색반응 패턴, 페놀성 물질 구조에 따른 단백질의 영향 및 발색도의 변화 양상 등은 지금까지 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 각종 식품소재 중 총 페놀 함량 측정에 가장 널리 사용되는 Folin-Denis 방법에서 단백질의 존재에 의한 페놀성 물질의 발색도 변화를 측정하였고, F-C시약과의 반응 시 총 9종의 페놀성 물질의 구조에 따른 단백질의 간

*Corresponding author: Jungil Hong, Department of Food Science & Technology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea
Phone: 82-2-970-5639
Fax: 82-2-970-5977
E-mail: hjil@swu.ac.kr
Received January 28, 2015; revised March 25, 2015;
accepted March 25, 2015

섭정도 및 반응성 차이를 조사하여, 페놀성 물질 정량에 단백질이 미치는 영향에 대한 기본정보를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

실험에 사용된 ferulic acid (FeA), 3,4-dimethoxy-4-hydroxycinnamic-acid (sinapinic acid, SiA), caffeic acid (CaA), 3,4-dihydroxy-hydrocinnamic-acid (DHC), gallic acid (GA), (-)-catechin (Ctc), quercetin (Qct)과 tannic acid (TA)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)는 Rutgers university의 Dr. Chung S. Yang (Piscataway, NJ, USA)으로부터 제공받았다. F-C시약과 bovine serum albumin (BSA)은 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하였으며, 탈지우유 단백질(skim milk protein, SMP)은 Bio Basic Inc. (Markham, Ontario, Canada)에서 구하였다. 각 페놀성 화합물들은 200 mM의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 분취(aliquot)한 후, -80°C 초저온 냉동고(DF8520, IIShinBioBase, Dongduchen, Korea)에 저장하여 사용하였다. 실험 시료로 사용된 함초종자는 산들함초(Shinan, Korea)에서 구입하여 전보의 방법에 따라 추출 분획하였다(14). 그 중 함초 종자의 아세트산에틸(ethyl acetate) 분획물을 200 mg/mL 농도로 DMSO에 용해한 다음, -80°C 초저온 냉동고에 보관하여 사용하였다. 이 외에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich Co. 제품 및 일반특급시약을 사용하였다.

단백질의 F-C시약과의 반응성 및 페놀성 화합물의 F-C시약과의 반응성에 미치는 영향 분석

먼저 총 페놀성 물질 정량을 위해 가장 빈번히 사용되는 Folin-Denis 방법으로 단백질의 반응성을 조사하였다(15). 증류수에 희석하여 농도를 달리한 BSA 또는 SMP용액 80 μ L에 50% F-C시약 20 μ L를 첨가하여 암소에서 3분간 반응시킨 다음, 2% Na₂CO₃ 용액을 100 μ L씩 가하였다. 이 후, 상온의 암소에서 30분간 추가로 반응시키고, microplate reader (SpectraMax 250, Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질이 각종 페놀성 물질 또는 실험 시료로서 함초종자 추출물과 F-C시약과의 반응성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 이들 시료와 BSA 및 SMP 단백질을 각각 농도를 달리하여 혼합한 다음, 상기의 방법으로 반응시킨 후, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

산화된 페놀성 물질과 단백질의 반응에 따른 페놀함량 변화 측정

페놀성 물질을 각각 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 용해한 후, 37°C 배양기에서 저장 시간을 달리하여 산화시켰다. 이 후, 각 시간별 저장한 페놀성 시료를 단독 또는 0.25와 0.5 mg/mL 농도의 BSA와 혼합하여 상기의 Folin-Denis 정량법을 이용하여 반응성 변화를 측정하였다.

BSA과 페놀성 물질 간의 반응성 분석

단백질과 페놀성 물질들 간의 상호작용을 조사하기 위하여, BSA의 형광 특성과 페놀성 물질 존재 시의 변화를 분석하였다(16-18). BSA 단독(0.125-0.5 mg/mL) 또는 각 페놀성 물질을 증류수에 녹여 혼합물을 제조한 후, 이를 280 nm에서 excitation시키고 350-500 nm에서의 emission spectrum을 fluoro-microplate reader (SpectraMax M3, Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 이

용하여 분석하였다. 또한 페놀성 물질 정량 시의 환경 조건이 단백질과 페놀성 물질의 상호작용에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 먼저 BSA 단독 또는 페놀성 물질과 혼합한 후, F-C시약의 산성조건과 유사하도록 0.1N HCl와 1% Na₂CO₃가 되도록 하여 상기와 동일한 방법으로 BSA의 형광 특성과 페놀성 화합물에 의한 변화를 조사하였다.

결과 분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 각 실험군별 유의차 분석은 SAS 프로그램(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 Student's *t*-test 또는 일원분산분석(one-way ANOVA)과 Tukey's HSD test를 실시하였고 95와 99%의 유의수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

Folin-Denis 정량법에서 단백질에 의한 발색반응

Folin-Denis 방법에 의한 발색과정에서 F-C시약과 페놀성 물질의 반응에 영향을 주는 다양한 요인들이 존재하며, 특히 단백질 및 여러 환원성 물질이 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(11-13,19). 따라서 단백질 등 간섭물질의 제거 후 정량반응을 실시하는 것이 추천되지만, 대부분의 실험에서는 이 영향요인의 제거가 쉽지 않아 다양한 물질이 혼합된 추출물 상태에서 페놀성 물질의 정량을 실시하는 경우가 빈번하다. 따라서 본 실험에서는 단백질이 Folin-Denis 방법을 이용한 페놀성 물질의 정량에 미치는 영향을 조사하였고, FeA, SiA 등의 mono-hydroxy phenolic acid류, CaA, DHC와 같은 dihydroxy phenolic acid류, Qct, Ctc, EGCG 등의 플라보노이드(flavonoid)류 및 GA, TA 등의 구조적으로 다양한 페놀성 물질을 사용하여 각 화합물의 정량반응에 미치는 단백질 영향의 차이를 분석하였다.

우선 BSA와 SMP 단백질을 단독으로 첨가하여 Folin-Denis 방법에서의 반응성을 조사한 결과, 두 단백질 모두 농도에 비례하여 발색도가 증가하였으며 SMP보다 BSA가 더 민감하게 반응하는 것으로 나타났다(Fig. 1A). BSA에 대한 농도별 발색반응 속도를 측정한 결과 농도에 관계없이 초기 5분 이내에 발색이 신속하게 진행되었으며, 30분 이후에는 현저하게 반응속도가 지연되었으나 8시간 이후까지도 여전히 발색도는 계속해서 증가하였다(Fig. 1B). 폴리페놀 정량에 사용되는 F-C시약은 단백질 정량을 위한 Lowry법에도 사용되며, 단백질과 반응하여 발색을 나타낸다(11). Lowry법에서는 Cu²⁺ 이온과 단백질 펩티드 결합간의 complex 형성에 의한 Biuret 반응과 아미노산 중 트립토판(Trp), 타이로신(Tyr) 등에 의한 직접적 F-C시약의 환원반응에 의해 청자색으로의 발색이 진행되는데(11), Biuret 반응환경이 조성되지 않는 본 페놀정량 방법을 고려할 때 후자의 직접적 환원반응을 통하여 단백질에 의한 발색이 이루어 지는 것으로 보인다.

페놀성 화합물의 F-C시약과의 반응성에 미치는 단백질의 영향

서로 다른 페놀성 화합물의 F-C시약과의 발색반응에 미치는 단백질의 영향을 평가하기 위해, 9종의 페놀성 화합물과 BSA 또는 SMP를 함께 섞어 Folin-Denis 방법에 의한 발색반응을 진행시켰다. 두 물질이 함께 존재하는 상태에서 단백질과 페놀성 화합물 모두 F-C시약과 반응하기 때문에 두 물질 각각의 반응성만큼 흡광도 값이 증가할 것으로 예상했으나, 오히려 FeA를 제외한 대부분의 경우에 BSA와 혼합 시 페놀성 물질 단독으로 존재할 때 보다 발색도가 유의적으로 감소하였다(Fig. 2A). 또 다른

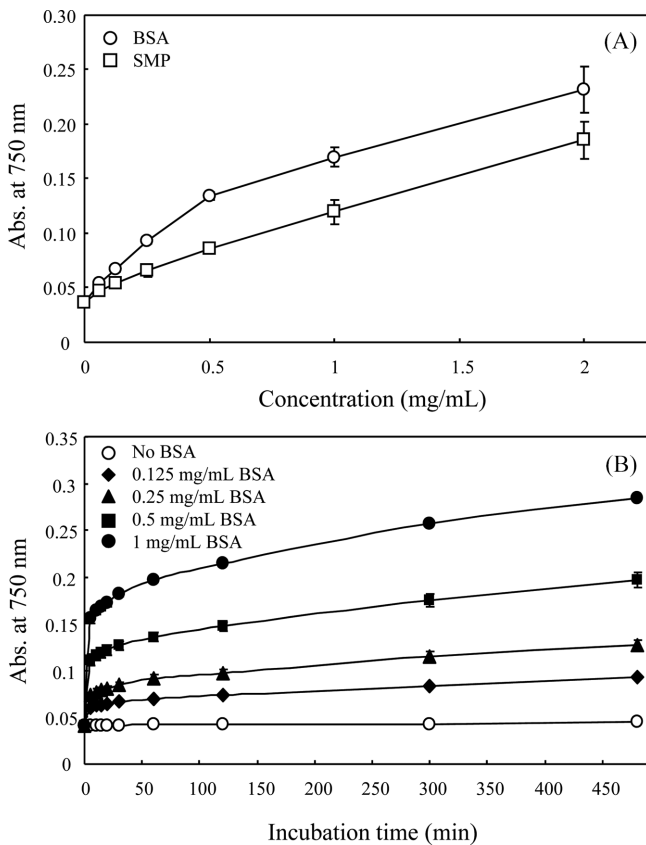


Fig. 1. Reactivity of BSA and SMP in the Folin-Denis assay. Concentration-dependent color responses of BSA or SMP (A) and time-dependent color development of BSA at different concentration (B) in Folin-Denis assay were analyzed. The result represents the mean±SD (*n*=6-9).

단백질인 SMP를 첨가하여 각 페놀성 화합물의 반응성을 조사한 결과 BSA만큼 현저한 발색도의 감소현상은 나타나지 않았으나, 역시 FeA를 제외한 페놀성 화합물에서 여전히 SMP에 의한 부가적인 흡광도 상승효과는 볼 수 없었다(Fig. 2B).

한편 천연물 연구에 빈번하게 수행되는 실험으로서 실제 시료 추출물 중의 페놀 함량 측정에 미치는 BSA 단백질의 영향을 조

사하였다. 함초 종자 추출물 중 페놀성 물질의 함량이 가장 높았던 아세트산에틸 분획에 BSA를 첨가하여 Folin-Denis 방법으로 발색도를 조사한 결과, 시료 농도에 따라 단백질에 의한 간섭도가 변화하는 것으로 나타났다(Fig. 2C). 즉, 저농도 시료(0.125와 0.25 mg/mL)에서는 단백질과 시료의 혼합에 의해 시료 자체의 발색도 보다 증가하였으나 고농도(1 mg/mL)에서는 단일 페놀류 화합물에서 나타난 바와 같이 시료 자체에 의한 발색보다도 BSA 혼합에 의해 전체적인 반응성이 감소하였다.

단백질과 페놀성 화합물의 농도에 따른 반응성 변화

Folin-Denis 정량반응계에 각 페놀성 물질의 농도(페놀산류 0-400 μM, 플라보노이드류 0-200 μM, TA 0-100 μM) 및 BSA 단백질 농도(0, 0.25 및 0.5 mg/mL)를 변화시키면서 F-C시약과의 반응성을 조사하였다. 그 결과 전반적으로 BSA 존재 시에 페놀성 물질 단독으로 존재할 때보다 반응성이 감소하였으며, BSA 농도가 증가함에 따라 반응성의 감소 양상이 더 크게 나타났다(Fig. 3). 한편 그래프 상에서 페놀성 물질의 농도구간별로 보았을 때, 높은 농도영역에서 발색의 민감도가 더 낮아졌으며 따라서 고농도 페놀성 물질에 의한 반응성이 단백질에 의한 간섭에 더 크게 영향 받는 것으로 보인다(Fig. 3).

BSA 단백질 존재 하에 페놀성 물질의 농도 변화에 따른 반응성 변화 양상을 계량화하기 위해, Folin-Denis 반응계에서의 페놀성 물질 당량 당 흡광도의 증가도를 기울기로 계산하여 나타내었다(Table 1). 모든 페놀성 화합물에서 BSA 존재 시 기울기의 유의적인 감소현상이 나타났으며 전반적으로 0.5 mg/mL BSA에서 0.25 mg/mL 보다 더 저하된 기울기를 보였다. 특히 SiA, Ctc, EGCG 등에서 크게 감소하였고, BSA가 없을 때에 비해 0.25와 0.5 mg/mL BSA 존재 시 각각 80%대 및 70%대의 기울기 감소를 나타내었다(Table 1). 이상의 결과는 단백질 자체가 F-C시약과 반응하여 발색할 수 있음에도 불구하고, 단백질이 페놀성 물질들과 같이 존재할 경우 페놀류와 F-C시약 간의 반응의 간섭을 통해 전체적인 발색도를 감소시키는 것을 나타낸다. BSA와 같은 단백질과 페놀성 물질과의 다양한 상호작용을 고려해볼 때, 이들 간의 직접적인 결합(binding)이 페놀성 물질의 F-C시약과의 반응성 감소에 주요 원인으로 보이며(17,18,20) 이에 대한 면밀한 검토가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Table 1. Changes in reaction properties of different phenolic compounds by BSA in the Folin-Denis assay

| | Range (μM) | Slope without BSA (S1) ¹⁾ | Slope with 0.25 mg/mL BSA (S2) | Slope with 0.5 mg/mL BSA (S3) | S2/S1 ²⁾ | S3/S1 ²⁾ |
|-------------------|------------|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|
| FeA ³⁾ | 0-200 | 1.865±0.026a ⁴⁾ | 1.670±0.073b | 1.538±0.007c | 0.910 | 0.825 |
| SiA | 0-200 | 2.318±0.024a | 1.902±0.023b | 1.741±0.016c | 0.821 | 0.751 |
| CaA | 0-200 | 3.088±0.024a | 2.623±0.020b | 2.600±0.154b | 0.849 | 0.841 |
| DHC | 0-200 | 2.603±0.064a | 2.188±0.085b | 2.055±0.013b | 0.841 | 0.789 |
| GA | 0-200 | 2.895±0.018a | 2.583±0.049b | 2.357±0.113c | 0.919 | 0.838 |
| Ctc | 0-100 | 3.997±0.023a | 3.317±0.092b | 3.001±0.130c | 0.830 | 0.750 |
| Qct | 0-100 | 4.500±0.399a | 4.300±0.421a | 3.520±0.155b | 0.956 | 0.782 |
| EGCG | 0-100 | 5.533±0.123a | 4.810±0.080b | 4.187±0.085c | 0.869 | 0.757 |
| TA | 0-50 | 17.04±0.022a | 14.43±0.987b | 13.65±0.571b | 0.847 | 0.800 |

¹⁾A slope calculated from linear correlation between color development at 750 nm and molar concentration at a range indicated (absorbance change at 750 nm/mM polyphenol)

²⁾Ratio of slope 1 vs slope 2 or 3

³⁾Abbreviation of compounds are described in materials and methods

⁴⁾Different letters indicate a significantly different slope of each compound (*p*<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (*n*=3)

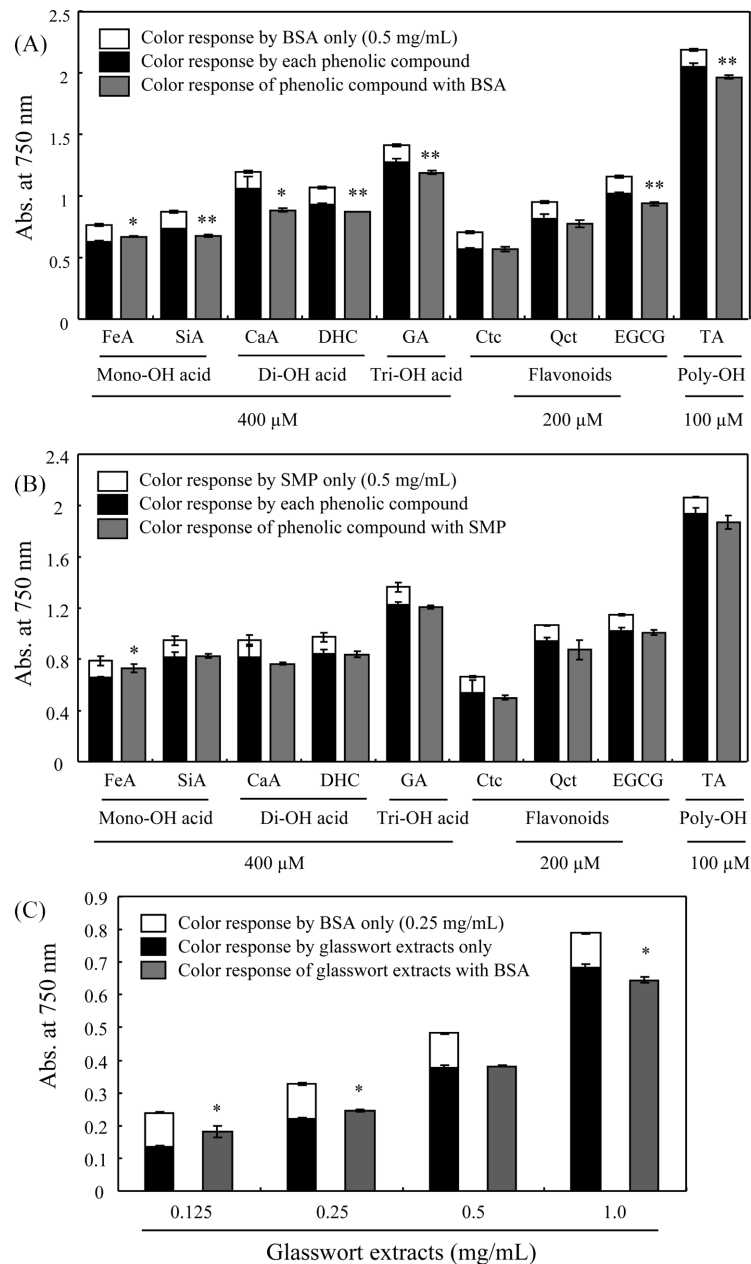


Fig. 2. Effects of proteins on color response of different phenolic compounds or glasswort extracts in the Folin-Denis assay using the F-C reagent. Changes in the reactivity of each phenolic compound with F-C reagent by 0.5 mg/mL BSA (A) and 0.5 mg/mL SMP (B) were analyzed. Effects of BSA (0.25 mg/mL) on color response of different concentrations of glasswort extracts in the Folin-Denis assay were also analyzed (C). Each value represents the mean \pm SD ($n=6-9$). *, **Significantly different color response of each phenolic compound or glasswort extracts from one in the presence of BSA according to Student's *t*-test (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

페놀성 화합물의 산화와 단백질 존재 시 F-C시약과의 반응성 변화

대부분의 페놀성 화합물은 강한 환원력을 가지고 있어 쉽게 산화되며 이러한 산화반응은 중성 이상의 pH에서 신속하게 일어난다(21). Folin-Denis 방법에서 페놀성 화합물의 정량이 이들의 환원성에 근거하여 이루어지는 바, 페놀성 화합물의 산화가 진행되면서 F-C시약과의 반응성이 현저하게 감소할 것으로 예상되었다. 따라서 각 페놀성 화합물을 PBS (pH 7.4)에 저장하면서 산화를 유도하여 각 시간별 산화물에 대해 Folin-Denis 정량법 상에서의 반응성 변화를 측정하였다. 그 결과 FeA 및 SiA와 같은 mono-phenolic acid를 제외한 모든 페놀성 물질의 24시간 산화물에서

20% 이상의 유의적인 흡광도 감소현상이 나타났으며(자료 미제시), 특히 TA, GA, EGCG와 같은 벤젠고리구조에 3개 이상의 hydroxyl기를 가진 폴리페놀류의 반응성 감소가 두드러지게 나타났다. GA 24시간 산화물의 경우 70%이상 반응성이 감소하였고, TA와 EGCG의 경우에도 처음 상태와 비교했을 때 각각 64 및 52% 정도의 발색도를 보였다(Fig. 4A).

이들 산화물과 F-C시약과의 반응성에 미치는 BSA의 영향을 평가하기 위하여 페놀성 화합물의 각 시간별 산화물에 BSA를 첨가하여 Folin-Denis 정량법에 의한 발색도의 변화를 측정하였다. 산화에 의해 가장 흡광도 감소의 변화가 컸던 GA, TA, EGCG로 실험을 진행한 결과, BSA 존재 시 각 페놀성 물질 산화물의 반

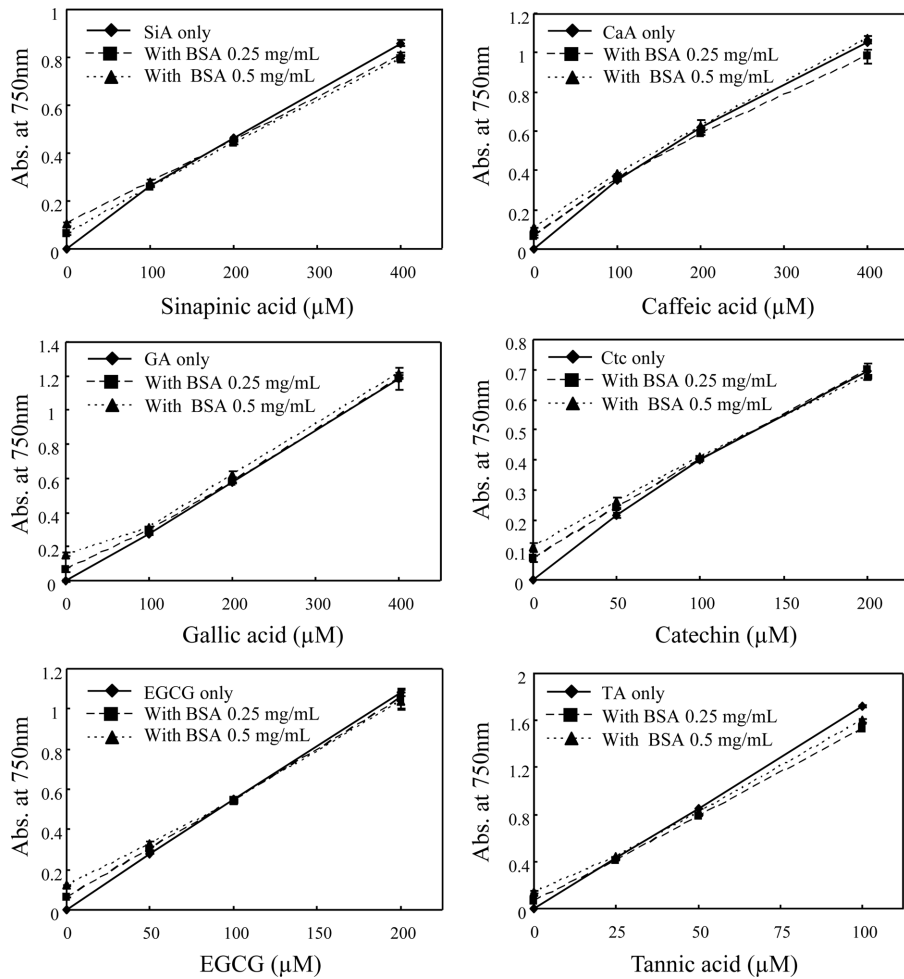


Fig. 3. Changes in color responses of different phenolic compounds by BSA in the Folin-Denis assay using the F-C reagent. Color responses of each phenolic acid at different concentrations were analyzed in the presence of 0, 0.25, and 0.5 mg/mL BSA based on the Folin-Denis assay. Among 9 compounds analyzed, a representative pattern from 6 compounds is present. The result represents the mean±SD ($n=3$ or 4).

응성(BSA가 없을 때와 비교한 상대적 발색도)도 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4). GA의 경우 24시간 산화물에서 현저한 흡광도의 감소반응을 나타내었고, 8시간 이내의 산화물 간에는 유의적 차이가 나타나지 않았다(Fig. 4B). EGCG와 TA의 경우에도 산화유도시간의 증가에 따라 BSA 존재 하에 점진적인 F-C시약과의 반응성 감소양상을 나타내었고, EGCG에서는 유의적인 차이가 발견되지 않았으나 TA의 8, 24시간 산화물에서 유의적인 상대적 반응성의 감소양상을 보였다(Fig. 4C and D). 이러한 현상은 폴리페놀류의 산화가 진행됨에 따라 상호 친화력 증가 등 단백질과의 상호작용이 증가하며, 이에 따라 F-C시약과의 반응성이 감소하기 때문으로 사료된다.

페놀성 화합물과 BSA의 결합양상 평가

Folin-Denis 방법에서 단백질에 의한 페놀성 물질들의 발색도 변화는 단백질이 페놀성 물질들과 결합하여 F-C시약과의 반응성을 저하시키기 때문으로 사료된다. 따라서 페놀성 물질들의 단백질과의 결합양상을 형광변화를 통해 간접적으로 조사하였다. BSA를 비롯한 단백질은 트립토판 등의 아미노산 잔기로 인해 나타나는 형광특성을 가지며, 폴리페놀류들이 BSA 단백질과의 결합 등의 상호작용을 통해 BSA의 형광특성을 변화시키고 emission 형광을 감소시킨다는 결과가 보고된 바 있다(17,18). 본 실험에서

도 BSA를 증류수에 녹여 형광특성을 조사한 결과, 280 nm에서 excitation시켰을 때 370 nm 부근에서 emission의 피크(peak)를 보이며 전체적으로 형광강도가 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5A). 그러나 TA와 EGCG의 존재 시, BSA의 형광강도는 현저하게 감소하였으며 특히 TA는 50 μ M 이하에서 대부분의 형광을 소거시켰다(Fig. 5B). BSA의 peak emission 파장은 EGCG에 의해 장파장 쪽으로 이동(shift)되면서 역시 유의적인 형광도의 감소를 초래하였다(Fig. 5C). Folin-Denis 방법에 의한 정량반응 시, 시료에 강산성의 F-C시약($pH < 1$)을 첨가한 후 다시 염기성 용액인 Na_2CO_3 를 첨가하여 최종적으로 약알칼리 상태의 조건이 만들어진 상태에서 반응이 일어나게 되며, 각 상태의 pH 조건을 전보에서 보고한 바 있다(15). 이러한 반응 조건을 모방하여 0.1 N HCl용액과 2% Na_2CO_3 를 반응조건과 같은 비율로 섞은 환경에서 BSA의 형광스펙트럼을 조사한 결과 증류수에서와 유사한 경향을 나타내었다. 이 반응계에 TA 또는 EGCG를 첨가하여 BSA의 형광도를 평가하였을 때, EGCG에 의해 BSA 형광이 대부분 소거되었으며, TA 존재 시에도 이 반응환경에서의 BSA 형광성이 더 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5C and D). 하지만 이러한 BSA 형광성의 감소는 TA나 EGCG의 농도변화에 따른 명백한 의존성 효과를 나타내지 않았으며(Fig. 5D), GA에 의해서도 농도와 관계없이 최대 20% 내외의 감소에 그쳐(자료

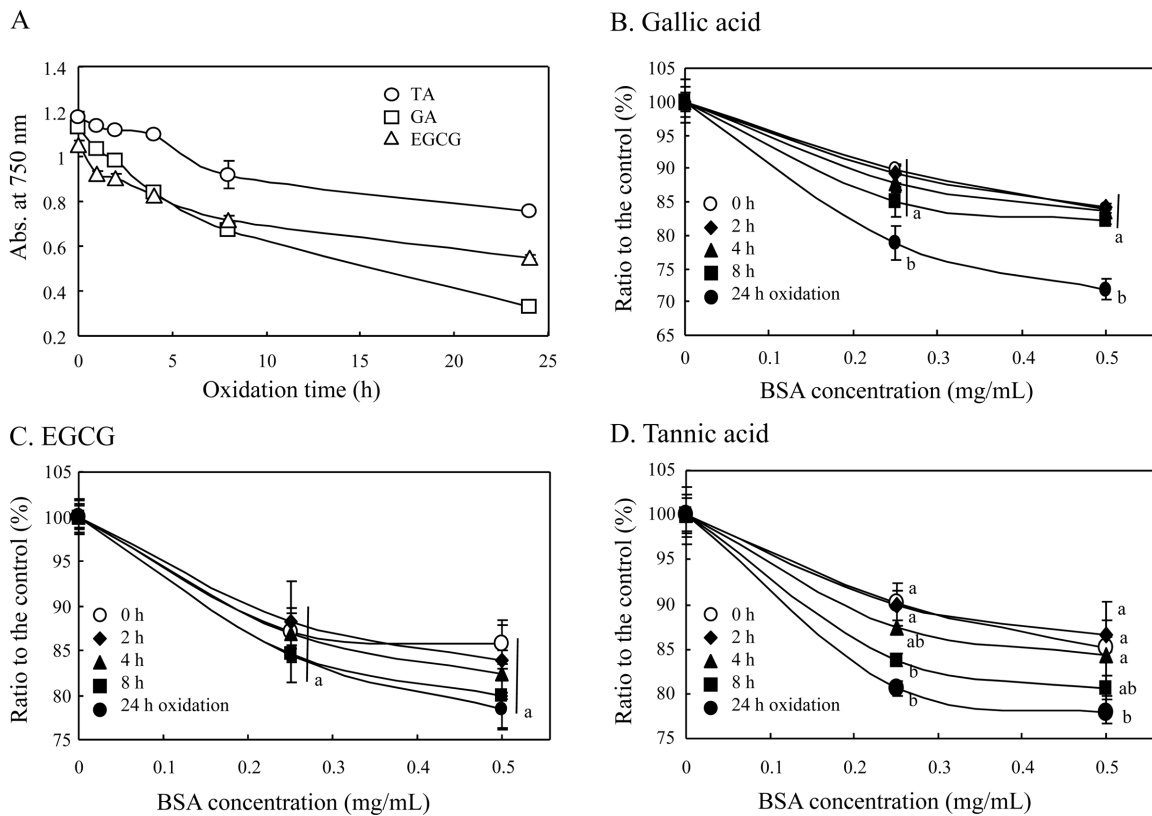


Fig. 4. Changes in reactivity of oxidized phenolic compound with F-C reagent by BSA. TA (50 μ M), GA (400 μ M), or EGCG (200 μ M) dissolved in PBS were incubated during different time periods indicated. Reactivity of the oxidized phenolic compounds formed at different incubation periods was analyzed by the Folin-Denis assay (A). Effects of BSA (0.25 and 0.5 mg/mL) on the color responses of the oxidized GA (B), EGCG (C), and TA (D) were also assessed. Each value represents the mean \pm SD ($n=3-6$). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) among different period incubation products based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test (B-D).

미체시) BSA 형광도 측정에 의한 폴리페놀류 결합양상의 정량적 파악은 한계가 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서 나타난 단백질에 의한 페놀성 물질의 반응성 감소는 이들이 단백질과 같이 존재 시, 결합 등의 다양한 형태로 상호작용할 수 있음을 의미하며, 이러한 현상을 통해 페놀류의 생리활성이나 생체 이용률에도 영향을 미칠 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 향후 페놀성 물질의 정량에 있어서 단백질에 의한 간섭 등에 대한 연구뿐만 아니라 페놀성 물질의 구조에 따른 단백질과의 상호작용 패턴 등이 다양한 접근방법을 통해 면밀히 검토되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 기능성 소재 등의 페놀성 성분 함량 분석에 널리 이용되는 Folin-Denis 정량반응에서 단백질이 미치는 영향을 조사하였다. BSA와 SMP는 Folin-Denis 페놀정량반응에서 농도의존적인 발색반응을 나타내었고 BSA가 SMP보다 더 민감한 반응성을 나타내었다. 그러나 BSA는 각종 페놀성 물질과 같이 존재할 경우 페놀성 물질 자체에 의한 발색도 이하로 반응성을 감소시켰으며, 0.25보다 0.5 mg/mL의 BSA 농도에서 더 저하된 발색도를 유도하였다. BSA에 의한 서로 다른 페놀성 물질 간의 반응성 차이는 크게 나타나지 않았으나, SiA, Ctc, 및 EGCG 등에서 물질 당량 당 흡광도 증가의 기울기가 비교적 크게 감소하였다. 이들은 BSA가 없을 때에 비해 0.25와 0.5 mg/mL BSA 존재 시

각각 80%대 및 70%대의 기울기 감소율을 나타내었다. 한편, 페놀성 화합물들의 산화를 유도하여 F-C시약과 반응시킨 결과, TA, GA 및 EGCG에서 반응성의 감소가 크게 나타났으며, BSA 존재 시 이들 산화물의 상대적 발색도는 산화시간의 증가 및 BSA 농도 증가에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. BSA의 형광강도가 TA, EGCG에 의해 유의적으로 감소하는 것으로 보아, BSA에 의한 페놀성 물질의 F-C시약과의 반응성 감소는 페놀성 물질과 BSA의 결합특성에 의한 것으로 사료된다. 이상의 결과는 단백질이 페놀성 물질과의 상호작용을 통해 이들의 정량에 간섭할 뿐만 아니라 페놀성 물질의 다양한 생리활성에도 영향을 미칠 수 있다는 것으로 시사하며, 보다 정확한 기작검토를 위하여 관련 연구가 지속적으로 수행 되어야 할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 2014년 서울여자대학교 자연과학연구소 교내학술연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

References

- Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352 (2010)
- Jacobo-Velázquez DA, Cisneros-Zevallos L. Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: A new

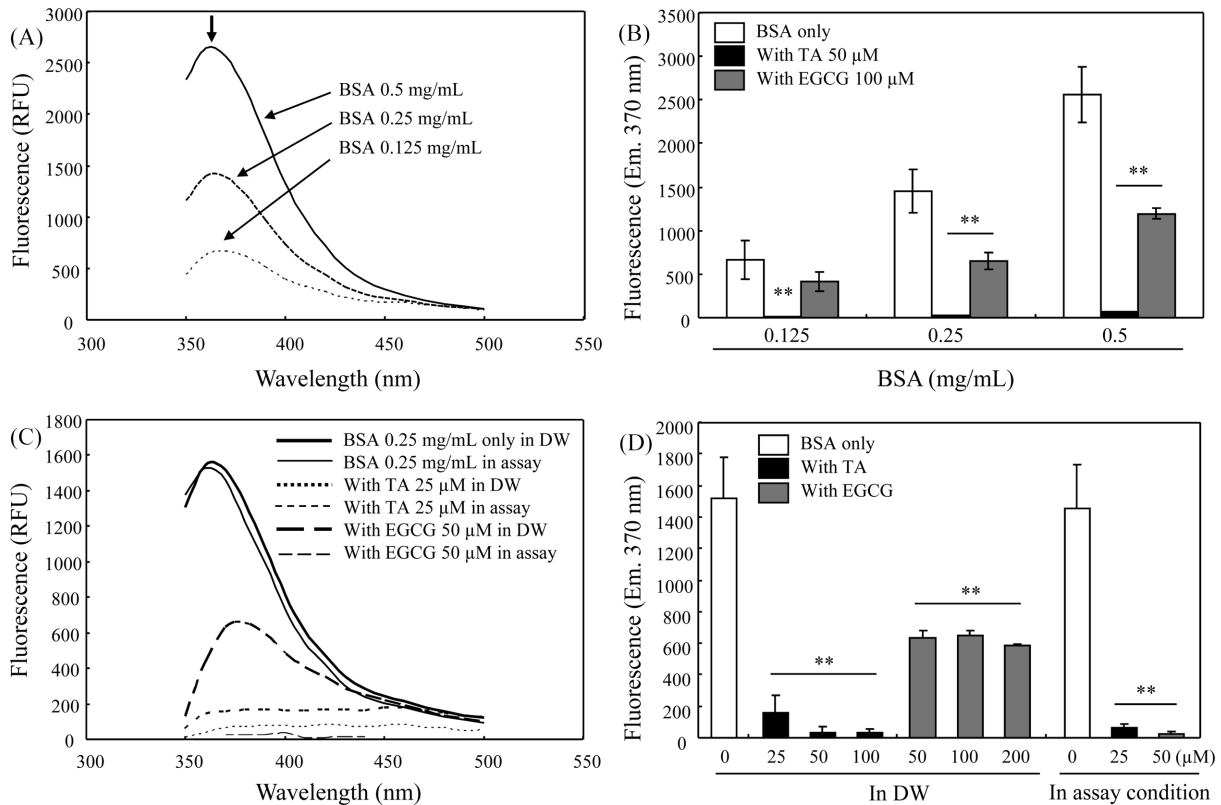


Fig. 5. Changes in fluorescence property of BSA by TA and EGCG. Emission fluorescence spectrum (350-500 nm at excitation 280 nm) of BSA at 0.125, 0.25, and 0.5 mg/mL dissolved in DW were analyzed (A). Effects of TA or EGCG on emission fluorescence intensity (at 370 nm) of different concentrations of BSA were analyzed (B). Changes in emission fluorescence spectrum (C) and emission fluorescence intensity at 370 nm (D) by TA or EGCG in DW and in the Folin-Denis assay reaction condition were also compared. **Significantly different from its corresponding BSA only control according to Student's *t*-test (** $p < 0.01$) (B and D).

approach in data analysis for food and medicinal plants. *J. Food Sci.* 74: R107-R113 (2009)

- Scalbert A, Manach C, Morand C, Révész C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crc. Cr. Rev. Food Sci.* 45: 287-306 (2005)
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2: 152-159 (1997)
- Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more? *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 2900-2916 (2007)
- Ministry of Food and Drug Safety. Standardized Guidelines of Functional Food Materials. Available from: <http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=1161&seq=4409&cmd=v>. Accessed Jan. 15, 2015.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agr. Food Chem.* 53: 4290-4302 (2005)
- Ministry of Food and Drug Safety. Korea Food Additives Code. Available from: http://fa.kfda.go.kr/standard/egongjeon_standard_view.jsp?SerialNo=104&GoCa=2. Accessed Jan. 23, 2015.
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12: 239-243 (1912)
- Bray HG, Thorpe WV. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. *Method. Biochem. Anal.* 1: 27-52 (1954)
- Peterson GL. Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr, and randall. *Anal. Biochem.* 100: 201-220 (1979)
- Box JD. Investigation of the folin-ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters.

Water Res. 17: 511-525 (1983)

- Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ. Utilization of folin-ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agr. Food Chem.* 51: 1811-1815 (2003)
- Kang S, Kim D, Lee BH, Kim MR, Chiang M, Hong J. Antioxidant properties and cytotoxic effects of fractions from glasswort (*Salicornia herbacea*) seed extracts on human intestinal cells. *Food Sci. Biotechnol.* 20: 115-122 (2011)
- Hong JI, Kim HJ, Kim JY. Factors affecting reactivity of various phenolic compounds with the folin-ciocalteu reagent. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 205-213 (2011)
- Teale FWJ. The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution. *Biochem. J.* 76: 381-388 (1960)
- Rawel HM, Frey SK, Meidtner K, Kroll J, Schweigert FJ. Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Mol. Nutr. Food Res.* 50: 705-713 (2006)
- Papadopoulou A, Green RJ, Frazier RA. Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *J. Agr. Food Chem.* 53: 158-163 (2005)
- Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using folin-ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2: 875-877 (2007)
- Haslam E. Polyphenol-protein interactions. *Biochem. J.* 139: 285-288 (1974)
- Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch. Biochem. Biophys.* 476: 107-112 (2008)