

# 松栂버섯 [*Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing.]의 Polyphenol Oxidase에 관하여

梁熙天 · 洪載植\* · 李泰圭 · 孫姬淑

全州又石大學 · \*全北大學校

(1983년 2월 2일 수리)

## Studies on Polyphenol Oxidase of *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing.

H.C. Yang, J.S. Hong,\* T.K. Lee and H.S. Sohn

Jeonju Woosuk College, Jeonbuk National University, Jeonju, Korea

### Abstract

The characteristics of crude polyphenol oxidase extracted from mushroom [*Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing.] were investigated.

The enzyme showed highest affinity to pyrogallol among trihydroxyphenols. Except for o-diphenols the enzyme was inactive in di- and monophenols. The optimum pH was about 4 and the optimum temperature ranged from 45 to 55°C. The enzyme activity was completely inhibited by 70°C heat treatment for 2 min.  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$  activated the enzyme at low concentration ( $10^{-1}\text{mM}$ ), but inhibited at high concentration (1mM). The most potent inhibitors were Na-diethylthiocarbamate, L-ascorbic acid, L-cysteine and NaCl. The  $K_m$  value with pyrogallol was 0.88mM.

### 緒 論

松栂버섯 [*Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing.]은 韓國 日本 및 中國南部 등 各地方의 소나무에 活物寄生하고 있으며 40~60年生 소나무群에서 가장 旺盛하게 發生한다.

이러한 松栂버섯은 주로 生松栂로서 사용되어 48시간 이내에 소비자들의 손에 들어가야 하기 때문에 이의 신선도 유지가 큰 문제로 대두되고 있다.<sup>1)</sup> 특히 生松栂의 變色은 품질에 큰 영향을 미치며 갈변이 쉽게 일어나 이를 억제할 수 있는 방법 연구가 요청되고 있다. 따라서 본 연구에서는 식품의 효소적 갈변에 주역을 하고 있는 polyphenol

oxidase에 대하여 일차적 실험을 행하여 보았다.

Polyphenol oxidase (PPO; o-diphenol; oxidoreductase, E.C. 1. 10. 3. 1)는 phenolase, phenol oxidase, catechol oxidase 및 tyrosinase 등으로 알려져 있고 自然界에 널리 分布하며 Cu를 함유하고 있는 酵素로서 monophenol의 hydroxylation에 의한 o-dihydroxy 化合物의 形成反應 및 o-dihydroxy 化合物의 quinone類로의 酸化反應을 觸媒하며<sup>2)</sup>, polyphenol oxidase 및 이에 基因한 褐變反應에 대해서는 버섯<sup>2-8)</sup>, 사과<sup>9)</sup>, 바나나<sup>10, 11)</sup>, 복숭아<sup>12)</sup>, 배<sup>13, 14)</sup>, 토란<sup>15)</sup>, 마늘<sup>16)</sup>, 포도<sup>17)</sup> 및 밀감類<sup>18, 19)</sup> 등에서 分離 精製되어 그 特性이 究明되어 있다.

그러나 松栂버섯의 褐變現象에 대하여서는 具體적인 研究가 없으므로 이를 效果의으로 抑制할 수

있는 基礎資料를 얻기 위하여 松栢버섯 중의 polyphenol oxidase를 抽出, 그 性質을 檢討하여 몇가지 結果를 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

### 材料 및 方法

本 實驗에 使用한 松栢버섯은 1982年 9月 全北南原에서 採取하여 acetone粉末을 調製하여 冷凍室에 保管, 供試材料로 하였다.

#### 1. Acetone粉末의 調製 및 polyphenol oxidase의 抽出

Fig. 1과 같은 方法으로 acetone粉末을 調製 密封하여 冷凍室에 保管, 粗酵素液으로 하였다.

#### 2. 酵素活性度 測定<sup>5,12)</sup>

Polyphenol oxidase의 活性은 酵素가 基質에 作用하여 quinone類를 形成하는 initial rate를 420nm

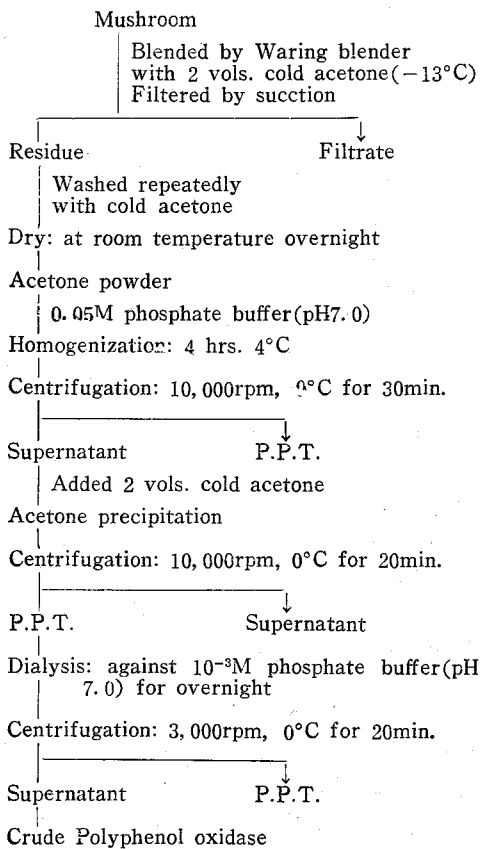


Fig. 1. Diagrammatic representation of sample preparation and extraction of polyphenol oxidase

에서 吸光度의 變化로 測定하였다. 즉 0.1M citrate-0.2M phosphate buffer(pH4.0)로 15mM 基質溶液을 만들어 이 溶液 3.7ml에 粗酵素液 0.3ml를 加하여 50°C에서 反應시켜, 反應時間에 따른 吸光度의 變化를 測定하였다. 酵素 1 unit는 酵素液 1ml가 分當 0.001의 吸光度 變化를 誘發하는 量으로 定하였다.

#### 3. 酵素의 特性

1) 基質特異性: 酵素의 基質特異性を 調査하기 위하여 o-diphenol類(catechol, chlorogenic acid, (+)-catechin, caffeic acid 및 DL-DOPA), m-diphenol類(resorcinol), p-diphenol類(hydroquinone), trihydroxyphenol類(pyrogallol, gallic acid 및 phloroglucinol)와 monophenol類(p-cresol 및 L-tyrosine)를 0.1M citrate-0.2M phosphate buffer(pH4.0)에 各各 15mM이 되게 調製, 酵素液을 加하여 50°C에서 反應시키면서 活性을 測定하였다. 단 L-tyrosine은 溶解度가 낮기 때문에 2.5 mM로 調製하여 使用하였다.

2) 最適 pH 및 溫度: 最適 pH는 緩衝液(pH 2.6 ~7.0)으로 15mM pyrogallol基質溶液을 調製하여 50°C에서, 最適溫度는 15mM pyrogallol溶液을 使用하여 20~80°C에서 調査하였다.

3) 熱安定性: 粗酵素液을 55, 60, 65 및 70°C에서 一定時間 加熱한 후 冷却하여 殘存酵素活性을 測定하였다.

4) 金屬 ion의 影響: polyphenol oxidase에 대한 各種 金屬 ion의 影響을 調査하기 위하여 CuSO<sub>4</sub>의 最終濃度를 10, 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> 및 10<sup>-3</sup>mM, FeSO<sub>4</sub>와 MgSO<sub>4</sub>는 各各 1, 10<sup>-1</sup> 및 10<sup>-2</sup>mM이 되게 反應混液중에 添加, 酵素活性을 測定하여 相對值로 나타내었다.

5) 阻害劑의 影響: 阻害劑들이 polyphenol oxidase에 미치는 影響을 調査하기 위하여, L-ascorbic acid는 0.1, 1 및 5mM, L-cysteine은 0.1, 1 및 10mM, Na-bisulfate와 NaCl은 10, 50 및 200mM, Na-DETC(diethyldithiocarbamate)는 0.05, 0.1 및 1mM, thiourea는 10, 25 및 50mM, EDTA는 50 및 200mM되게 反應混液중에 添加, 酵素活性을 測定하여 相對值를 percent inhibition으로 表示하였다.

6) Michaelis 定數: pyrogallol 濃度를 0.2~20 mM까지 調製하여 酵素活性을 測定하고, 基質濃度에 따른 反應速度를 Lineweaver-Eurk方法으로

**Table 1.** Activity of crude polyphenol oxidase at various kinds of substrates<sup>1)</sup>

Substrate <sup>2)</sup>	Relative activity (%)	Enzyme activity (unit/ml. min.)
Trihydroxyphenol		
Pyrogallol	100	569
Gallic acid	18	10
Phloroglucinol	0	0
o-diphenol		
Chlorogenic acid	47	265
Catechol	42	239
(+)-catechin	16	93
Caffeic acid	22	13
DL-DOPA	3	17
m-diphenol		
Resorcinol	0	0
p-diphenol		
Hydroquinone	0	0
Monophenol		
p-cresol	0	0
L-tyrosine	0	0

1) Activity was determined as the initial rate of change in absorbance at 420nm and one unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that caused a change in absorbance of 0.001 per ml. min. Each activity was compared with that of pyrogallol and expressed as relative activity at 50°C. The 4ml reaction mixture contained 3.7ml 0.1M citrate-0.2M phosphate buffer (pH 4.0) and 0.3ml of the crude enzyme solution.

2) Concentration of each substrate was 15mM, except for L-tyrosine which was regulated at 2.5mM.

圖示하여 Michaelis 定數를 求하였다.

### 結果 및 考察

#### 1. 基質特異性

各種 phenolic 化合物에 대한 基質特異성을 調査한 結果는 Table 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 松栢버섯의 polyphenol oxidase는 phloroglucinol를 除外한 trihydroxy phenol과 o-diphenol類에 活性을 보였으며, 이들 基質중에서 pyrogallol, chlorogenic acid, catechol 순으로 活性이 낮아졌다.

m-diphenol, p-diphenol과 monophenol類에 대해서는 活性을 보이지 않았다.

이상의 結果에서 松栢버섯의 polyphenol oxidase는 diphenol과 trihydroxy phenol類중에서도 OH基가 ortho-位置에 結合되어 있는 경우에만 酵素의 基質로 利用되는 基質特異성을 보였는데, 이에 관하여는 보다 더 깊은 研究가 있어야 할 것으로 생각된다.

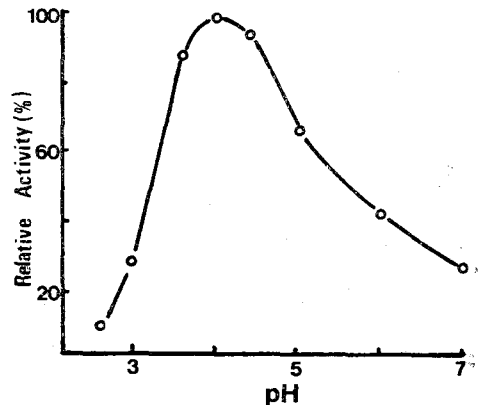
一般 果實이나 菜蔬類에서도 o-diphenol과 trihydroxyphenol類에 活性을 나타내며, 배<sup>14)</sup>나 포도<sup>17)</sup>는 o-diphenol類에 높은 活性을, 마늘<sup>16)</sup>이나 감귤類<sup>18,19)</sup>는 trihydroxy phenol類에 높은 活性을 나타낸다고 알려져 있다.

#### 2. 最適 pH 및 溫度

松栢버섯 polyphenol oxidase의 最適 pH와 溫度를 險討한 結果는 Fig. 2, 3과 같다.

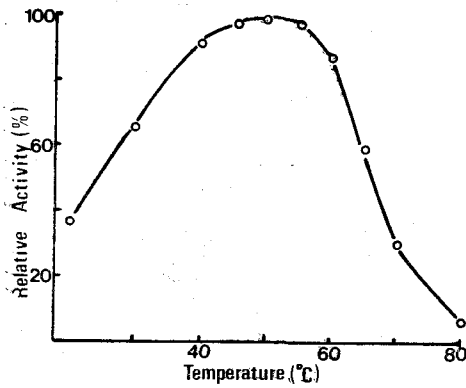
Fig. 2에서 보는 바와 같이 松栢버섯의 polyphenol oxidase는 pH 4.0 부근에서 最高活性을 보였고, pH 4.0을 중심으로 pH 3.0과 pH 5.0까지는 급격히 減少하다가 pH 5.0 이후부터는 서서히 減少하였다.

마늘<sup>16)</sup>의 polyphenol oxidase는 pH 6.5, 배<sup>14)</sup>, 사과<sup>20)</sup> 및 Cranberry<sup>21)</sup>는 pH 7.0, 포도<sup>17)</sup>는 pH 5.5, 포코버섯<sup>6)</sup>은 pH 4.8에서 各各 最高活性을 나타낸다고 하였는데 松栢버섯의 polyphenol oxidase는 이들보다 훨씬 더 酸性측에서 最高活性을 나타



**Fig. 2.** Effect of pH on activity of crude polyphenol oxidase

Relative activity as a function of pH was determined with 15mM pyrogallol in 0.1M citrate-0.2M phosphate buffer at 50°C.



**Fig. 3.** Effect of temperature on activity of crude polyphenol oxidase  
The reactions were carried out with 15mM pyrogallol in 0.1M citrate-0.2M phosphate buffer (pH 4.0).

내었다.

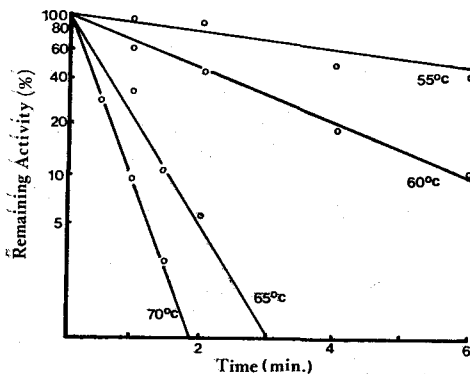
Fig. 3에서 보는 바와 같이 最適溫度는 45~55°C의 비교적 넓은 溫度범위를 나타내, 포도<sup>17)</sup>의 25°C, 토란<sup>15)</sup>의 27°C보다 越等히 높았다.

**3. 熱安定性**

松栞버섯 polyphenol oxidase의 熱安定性を 檢討한 結果는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 殘存活性度는 6分후 55°C에서 42%, 60°C에서 10.9%, 2分후 65°C에서 5.3%, 70°C에서는 거의 완전히 失活되었다.

바나나<sup>10)</sup>의 polyphenol oxidase가 65°C에서 15分 加熱로 90%, 배<sup>14)</sup>가 75°C에서 60分 加熱로 30%, 마늘<sup>16)</sup>이 80°C에서 5分 加熱로 90%의 殘存



**Fig. 4.** Heat stability of crude Polyphenol oxidase

率을 보이고, 표고버섯<sup>6)</sup>이 80°C에서 1分 加熱로 酵素活性이 쉽게 失活된다고 報告하였는데, 本實驗의 結果에서는 이들보다 훨씬 더 熱安定性이 낮았다.

**4. 金屬 ion의 影響**

各種 金屬 ion이 polyphenol oxidase의 活性에 미치는 影響을 調査한 結果는 Table 2와 같다. Table 2에서 보는 바와 같이 Cu<sup>++</sup>은 10mM 濃度에서는 polyphenol oxidase의 活性을 阻害했으나 10<sup>-2</sup>mM에서는 17% 酵素力이 增加되었고, Fe<sup>++</sup>은 1mM에서는 阻害하였으나, 10<sup>-1</sup>mM에서는 10% 酵素力이 增加되었으며, Mg<sup>++</sup>은 1mM에서는 다소 阻害하였으나 10<sup>-1</sup>~10<sup>-2</sup>mM에서는 큰 變化가 없었다. 이들 ion중 Cu<sup>++</sup>는 polyphenol oxidase의 prosthetic site에 必要한 金屬 ion이기 때문에 이를 一定濃度 添加했을 경우 prosthetic group를 補充해줌으로써 酵素活性이 增加된 것으로 생각된다.<sup>23)</sup>

**5. 阻害劑의 影響**

各種 阻害劑가 polyphenol oxidase의 活性에 미치는 影響을 調査한 結果는 Table 3과 같다.

Table 3에서 보는 바와 같이 L-ascorbic acid는 0.1mM에서 36%, 1mM에서 99%, 5mM에서는 100%, L-cysteine은 10mM에서 100%, Na-bisulfate는 200mM에서 98%를 阻害시켰다.

L-ascorbic acid와 Na-bisulfate는 還元劑로 作

**Table 2.** Effect of various metallic ions on crude polyphenol oxidase activity

Metallic ion	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None		100
Cu <sup>++</sup>	10 <sup>-3</sup>	105
	10 <sup>-2</sup>	117
	10 <sup>-1</sup>	100
	1	100
Fe <sup>++</sup>	10	79
	10 <sup>-2</sup>	107
	10 <sup>-1</sup>	110
Mg <sup>++</sup>	1	76
	10 <sup>-2</sup>	103
	10 <sup>-1</sup>	105
	1	97

**Table 3.** Effect of inhibitors on the activity of crude polyphenol oxidase

Inhibitor	Concentration (mM)	Percent inhibition
L-ascorbic acid	0.1	36
	1	99
	5	100
L-cysteine	0.1	31
	1	73
	10	100
Na-bisulfate	10	34
	50	91
	200	98
Sodium chloride	10	72
	50	94
	200	99
Na-dithyldithiocarbamate	0.05	1
	0.1	51
	1	100
Thiourea	10	32
	25	81
	50	97
	100	100
Ethylendiaminetetraacetic acid. 2Na	50	11
	200	22

用하여 酵素作用으로 生成된 quinone類를 다시 o-diphenol類로 還元시킴으로써 酵素作用을 阻害하고<sup>22)</sup>, L-cysteine은 還元劑로서 뿐만 아니라 生成된 quinone類와 結合하여 다음 褐變反應을 阻害하는 것으로 알려져 있다.<sup>23)</sup>

Na-DETC는 1mM에서 100%, thiourea는 50mM에서 97%, EDTA는 이들보다 훨씬 높은 濃度인 200mM에서도 22%밖에 阻害시킬 수 없었다.

이들 化合物들은 polyphenol oxidase의 prosthetic group인 Cu와 結合하여 阻害作用을 나타내는 chelating agent로 알려져 있다.<sup>23)</sup>

NaCl의 경우 10mM에서 72%, 50mM에서 94%, 200mM에서 99%을 阻害하였다.

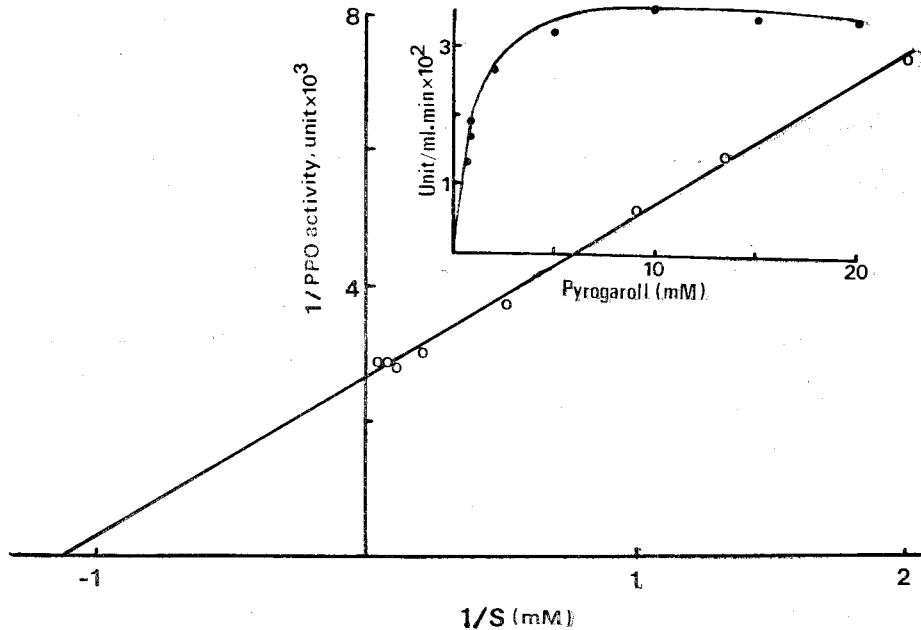
이상의 結果로 보면 食品에 使用 가능한 L-ascorbic acid, L-cysteine, NaCl등이 阻害作用이 優秀하였는데, 이는 應力可能性을 提示하고 있다.

**6. Michaelis 定數**

基質濃度에 따른 polyphenol oxidase의 反應速度를 測定하여 Lineweaver-Burk 方法으로 圖示한 結果는 Fig. 5와 같다.

이로부터 求한  $k_m$ 값은 0.88mM이었다.

松栉버섯 polyphenol oxidase의 最適基質에 대한 親和性은 마늘<sup>16)</sup>의 0.4mM, velvet bean<sup>24)</sup>의



**Fig. 5.** Lineweaver-Burk plot of pyrogallol oxidation by crude Polyphenol oxidase

0.55mM보다는 적으나, 마나나<sup>11)</sup>의 44mM, 溫州 밀감<sup>19)</sup>의 7.4mM, avocado<sup>25)</sup>의 3.7mM보다는 큰 경향을 보였다.

抄 錄

松茸버섯[*Tricholoma matsutake*(S. Ito et Imai Sing.)에서 polyphenol oxidase 粗酵素液을 抽出, 그 性質을 調査하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

Trihydroxyphenol類와 o-diphenol類에 活性을 보였고 이들중 pyrogallol이 最高活性을 보였으며 m-diphenol, p-diphenol 그리고 monophenol類에서는 活性을 보이지 않았다.

最適 pH는 4.0 부근이었고, 最適溫度는 45~55 °C였으며, 酵素의 活性이 70°C에서 2分 加熱로 完全히 失活되었다.

Cu<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup> 및 Mg<sup>++</sup>은 10<sup>-1</sup>mM以上 濃度에서는 酵素力이 增加되었으나, 그 以上の 濃度에서는 오히려 低下되었다.

阻害劑로는 Na-DETC, L-ascorbic acid, L-cysteine 및 NaCl이 良好하였다.

pyrogallol에 대한 km値는 0.88mM이었다.

參 考 文 獻

1. 山林組合中央會 : 山林, 6 : 25(1982).
2. Joslyn, M.A. and Ponting J.D.: *Adv. Food Res.*, 3 : 1(1951).
3. Jolly, R.L. Jr., Nelson R.M. and Robb D.A.: *J. Biol. Chem.*, 8 : 3251(1969).
4. Jolly, R.L. Jr., Robb D.A. and Mason H.S.: *J. Biol. Chem.*, 244 : 1593(1969).
5. Ponting, J.D. and Joslyn M.A.: *Arch. Biochem.*, 19 : 47(1948).
6. 藤本健四郎, 宮代正子, 金田尚志 : 營養と食糧 23 : 336(1970).
7. Kertesz, D. and Zito R.: *Biochem. Biophys.*

- Acta.*, 64 : 153(1965).
8. Nakamura, R., Sho. S. and Ogura Y.: *J. Biochem.*, 59 : 481(1966).
9. Shannon, C.T. and Pratt D.E.: *J. Food Sci.*, 32 : 479(1967).
10. Caleazzi, A.M., Sagarbieri V.C. and Constantindes S.M.: *J. Food Sci.*, 46 : 150(1981).
11. Palmer, J.K.: *Plant Physiol.*, 38 : 508(1963).
12. Wong, T.C., Luh B.S. and Whitaker J.R.: *Plant Physiol.*, 48 : 19(1971).
13. Ravas, N.J. and J.R. Whitaker: *Plant Physiol.*, 52 : 501(1973).
14. Halim, D.H. and Montgomery M.W.: *J. Food Sci.*, 43 : 603(1978).
15. Kim, Y.H., Jang, J.C. Lee T.K. and Yoo K.S.: *Bull. Agri. Col., Jeonbug Nat'l. Univ.*, 3 : 100(1982).
16. 金銅淵, 李鍾旭, 金良培 : 韓國農化學會誌, 24 : 167(1981).
17. Kimberly, W., Wissemann and Lee C.Y.: *J. Food Sci.*, 46 : 506(1981).
18. 東野哲三, 藤日修二, 小宮博喜 : 營養と食糧, 31 : 95(1978).
19. 藤日修二, 東野哲三 : 日本農化學會誌, 53 : 233(1979).
20. Betrosian, K., Steinberg M.P. and Nelson A.T.: *Food Technol.*, 14 : 480(1960).
21. Chan, H.J. and Yang H.Y.: *J. Food Sci.*, 35 : 169(1971).
22. Benjamin, N.D. and Montgomery M.W.: *J. Food Sci.*, 38 : 799(1973).
23. Mathew, A.G. and Parpia A.B.: *Food Res.*, 19 : 75(1971).
24. Zenin, C.T. and Park Y.K.: *J. Food Sci.*, 43 : 646(1973).
25. Varda Kan: *J. Food Sci.*, 42 : 38(1977).