

배果實의 Polyphenol Oxidase 의 分離 精製 및 그 特性

康潤漢 · 孫泰華 · 崔鍾旭

慶北大學校 農科大學 食品加工學科

Isolation, Purification and Some Properties of Polyphenol Oxidase from Pear.

Kang, Yoon Han · Sohn, Tae Hwa · Choi, Jong Uck

Dept. of Food Science and Technology, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

Polyphenol oxidase in japanese pear (*Pyrus communis var. mansamkil*) was isolated, partially purified and its some properties were investigated. Polyacrylamide disc gel electrophoresis indicated two bands with polyphenol oxidase activity in the extract from acetone dry powder of pear flesh.

These two polyphenol oxidases (PPO A and PPO B) were purified through acetone precipitation and diethylaminoethyl cellulose column chromatography. PPO A and B were purified 7.8 fold and 8.7 fold by the present procedure, respectively. The Rm values of partially purified PPO A and B were estimated to be 0.58 and 0.68, respectively.

The optimum temp. and pH of PPO A activity were 33°C and pH 7.0, while those of PPO B were 30°C and pH 4.2, respectively. Two PPO were unstable over the temperature of 60°C. The substrate specificity of pear PPO showed high affinity toward o-diphenolic compounds, especially catechol in PPO A and chlorogenic acid in PPO B, but inactive toward m-diphenol, p-diphenol and monophenols.

PPO A showed affinity toward the trihydroxyphenolic compound. Zn⁺⁺ activated the PPO A activity but Fe⁺⁺ inhibited PPO B activity, while Fe⁺⁺ and Zn⁺⁺ activated the PPO B activity, while Fe⁺⁺ and Zn⁺⁺ activated the PPO B activity but K⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ and Hg⁺⁺ inhibited at 10 mM concentration. Cu⁺⁺ activated the enzyme action at low concentrations but inhibited at high concentration.

Inhibition studies indicated that L-ascorbic acid, L-cysteine and thiourea were most potent.

The Km values of PPO A and PPO B for catechol were 20 mM and 14.3 mM, respectively.

緒 論

果實이나 菜蔬類에 廣範圍하게 分布되어 있는 polyphenol oxidase (PPO; O₂ oxidoreductase,

E. C. I. 10. 3. 1)는 組織이 破損될때에 組織에 있는 polyphenol 性 物質에 作用하여 褐變을 일으키며, 食品의 調理 加工時에 일어나는 酵素的 褐變의 主役을 담당한다.

Polyphenol oxidase (이하 PPO로 略稱)는 p-henolase, phenol oxidase, catechol oxidase 및 tyrosinase 등으로 알려져 있으며 Cu를 함유하고 있는 酵素로서 monophenol의 hydroxylation에 의한 o-dihydroxy compounds 形成反應 및 o-dihydroxy compounds의 quinone 類로서의 酸化反應을 觸媒하는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ 또한 PPO는 單一蛋白質이 아니라 性質이 유사한 수종 酵素의 混合物로서 酵素的 特性이 果菜類 및 그 品種에 따라 差異가 있다.

酵素的 褐變反應의 主要因子인 果實의 polyphenol 含量³⁾과 果菜類 및 그 加工品의 PPO에 대한 分離 및 特性에 對해서 사과,¹⁷⁾ 감자,³³⁾ 차,¹¹⁾ 바나나,¹⁰⁾ 아보카도,¹⁷⁾ 버섯³⁸⁾ 등에서 많은 研究가 되어 있다.

배 (*Pyrus communis*)는 生果用이외에 加工用으로 많이 利用되며, 冷蔵後 加工時에 適當한 성숙을 유지하기 위해 追熟期가 필요하다고 報告되어 있다.²⁴⁾ 이 냉장과 추숙기에 PPO에 의한 褐變으로 식품으로서의 嗜好性 뿐만이 아니라 新鮮度를 저하시키고 있는데 이러한 加工前과 加工中의 통조림배와 배濃縮의 改變도 효소적 改變과 聯關된다. 효소적 改變의 주역인 PPO에 關한 性質 究明은 改變이 심한 上記의 사과果實 等에서는 보고된 바 많으나 배의 PPO에 對해서는 Halim等¹²⁾과 Rivas等³⁶⁾에 의해 西洋배에 關한 性질은 報告가 되어 있으나 우리나라에서 많이 생산되고 있는 日本배에 對한 연구는 거의 없는 實情이다.

本 研究는 배 (晚三吉)의 酵素的 褐變에 重要한 역할을 담당하고 있는 PPO의 分離, 精製 및 정제된 효소의 性질을 調査하여 몇가지 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料

慶北 星州郡 所在 果樹園에서 栽培되고 있는 저장성이 우수한 배인 晚三吉을 1984年 10月 17日에 收穫하여 외관이 健全한 中果를 選別하여 供試材料로 使用했다.

2. 實驗方法

Acetone 건조분말의 調製

Wong等⁴¹⁾과 Flurkey等⁷⁾의 方法에 準하여 Fig. 1과 같이 실시하였다. 즉 배果肉部 50g에 1g polyethylene glycol과 冷 acetone (-20°C) 300 ml를 加하고 blending (Philip Harris Limited, Homogenizer MSE)시킨 다음 減壓濾過한 後, 固形物에 polyethylene glycol을 除外시키고 위의 操作을 反復하여 acetone powder를 조제했다.

Polyphenol Oxidase의 抽出

배의 acetone powder 1g을 50ml의 50mM sodium phosphate 緩衝液 (pH 7.0)을 加해 30分間 均질화 시킨 다음 棉布로 濾過한 後 濾液을 10,000 × g (Hitachi 20PR-52D)에서 15分間 低溫遠心 分離하여 얻은 上澄液을 粗酵素液으로 하였다.

배 PPO의 部分精製

배 果肉部의 PPO isozymes의 分離 및 精製는 Wong等,⁴¹⁾ Rivas等,³⁶⁾ Bentamin等²⁾의 方法을 변형시켜 아래와 같이 하였다.

Acetone 沈澱에 의한 蛋白質 分離

上記 操作에서 얻어진 粗酵素液에 그 倍量의 冷

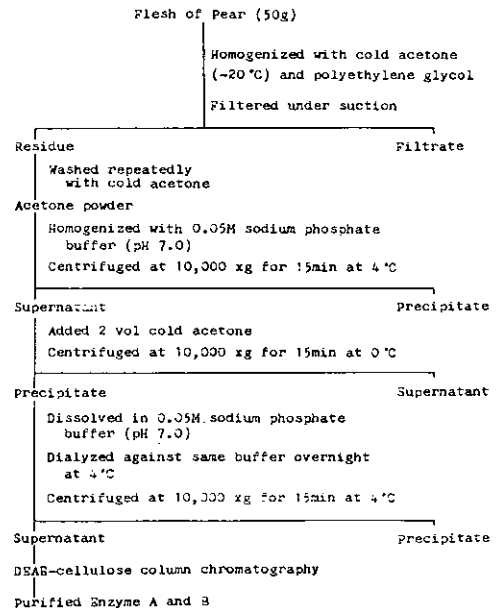


Fig. 1. Purification procedure of polyphenol oxidase from pear.

acetone (-20°C)을 가하여 $10,000 \times g$ 에서 15 분간 원심분리 후 침전물을 0.05M sodium phosphate緩衝液 (pH 7.0)에 용해시켜 동일한緩衝液에서 하룻밤透析시켰다.透析이 끝난 용액의 불용성物質은 원심분리하여除去하고上澄液을 다음의精製用酵素液으로 하였다.

DEAE-Cellulose Column Chromatography

DEAE-cellulose를 再蒸溜水에 현탁시킨 다음 0.1 N HCl, 再蒸溜水, 0.1N NaOH, 再蒸溜水의 順序로 洗滌하고 微粒子를 除去시켜 $2.2 \times 50 \text{ cm}$ 의 column에 DEAE-cellulose를 充填한 후 1 mM sodium phosphate緩衝液으로 平衡시켰다. 이 column에 透析하여 얻은 上記 효소액을 넣고 1 mM sodium phosphate緩衝液 (pH 7.0) 170 ml와 250 mM의 sodium phosphate緩衝液 (pH 7.0) 170 ml를 사용하여 直線濃度勾配法으로 chromatography하였다. 이때의 流出速度는 時間당 36 ml로 溶出시켰으며, 용출액은 分割當 3 ml씩 모았다. 이상의 모든 조작은 4°C 이하의 저온에서 행하였다.

酵素活性的 測定

PPO活性은 Wong等⁴¹⁾과 Zenin等⁴²⁾의 方法에 準하여 酵素가 基質에 作用하여 quinone類를 形成하는 초기속도의 변화를 420 nm (Cecil CE393)에서 吸光度의 變化로 測定하였다. 즉 배과육의 두 PPO인 PPO A와 PPO B에 대해 각각 0.05M sodium phosphate緩衝液 (pH 7.0)과 0.05M sodium phosphate緩衝液 (pH 4.2)에 10 mM catechol을 함유하는 용액을 만들고, 이액 2.8 ml에 효소액 0.2 ml를 가하여 反應液을 3 ml로 하여 PPO A, B의 최적온도인 33°C 와 30°C 에서 반응시키면서 反應時間에 따른 吸光度의 變化를 測定하였다. 이때 酵素 1 ml가 分當 0.001의 吸光度를 變化시키는 것을 酵素 1 unit로 나타냈다. 酵素의 比活性 (specific activity)은 단백질 mg당 효소의 單位 (units)로 表示했다.

蛋白質의 定量

粗酵素液, 精製過程中的의 各 分割 및 部分精製된 효소의 蛋白質含量은 Bradford에 의한 方法³⁾에 따라 測定하였으며 이때 標準物質로는 bovine serum albumin (Sigma製)을 使用하였다. 그리고 DEAE-cellulose chromatogram의 各 分割 蛋白質의 濃度는 UV/VIS spectrophotometer (Pye Unicam Pu

8600)로 280 nm 波長에서 吸光度를 測定하여 算出하였다.

電氣泳動

Davis의 方法⁴³⁾에 準하여 polyacrylamide disc gel electrophoresis를 行하였다. 이때 사용된 running gel은 7% acrylamide (pH 9.0)이었고 spacer gel은 1.25% acrylamide (pH 6.8)였으며 marker dye로 bromophenol blue을 使用하여 tube ($0.7 \times 10 \text{ cm}$)當 3 mA의 一定한 전류로 4°C 에서 3시간 전기영동하였다. 종료후, PPO활성 bands를 관찰하기 위하여 菊谷의 方法¹⁹⁾에 따라 gel을 蒸溜水로 洗滌한 다음 10 mM catechol 基質溶液에 40分間 反應시켰다. 酵素活性 bands의 表示는 bromophenol blue에 대한 相對的 移動度 (R_m ; relative mobility value)로 나타냈다. 蛋白質의 염색은 Chrambach 등의 方法⁴⁴⁾에 따라 Coomassie Brilliant Blue R-250를 使用해 2시간 실행했으며 탈색은 7% acetic acid로 行하였다.

試藥

Catechol은 Wako Pure Chemicals, LTD., acrylamide 등의 電氣泳動시약과 PPO의 基質인 chlorogenic acid 등의 試藥은 주로 Sigma Co., U.S.A에서 구입한 것을 使用하였다.

結 果

배 PPO의 Acetone 分別沈澱

本酵素의 精製에 가장 알맞는 最適 acetone添加量を 調査하기 위하여 acetone을 酵素液에 대하여 同量, 2培量, 3培量を 加해 比活性을 測定한 結果는 Table 1과 같다. 표에서 보는 바와 같이 4區分 중 2培量の acetone을 가했을때 比活性이 가장 높게 나타났다. 따라서 本實驗에서는 2培量の acetone을 加해 단백질을 침전시켰다.

Table 1. Changes of the protein content and specific activity of polyphenol oxidase by different amounts of acetone.

Acetone	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)
1 Volume	20,430	3.3	6,190
2 Volumes	81,178	5.5	14,760
2.5 Volumes	55,384	5.8	9,549
3 Volumes	58,862	6.4	9,197

Isoenzyme 의 分離와 精製

배果肉部位의 PPO를 分離하기 위하여 acetone 沈澱으로 蛋白質 分劃을 얻은 後 DEAE-cellulose column chromatography한 結果는 Fig. 2와 같으며, PPO의 精製를 要約한 것은 Table 2와 같다.

2 培量의 acetone 沈澱 分劃物을 모아 透析한 다음 DEAE-cellulose column을 通過시킨 結果는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 하나의 큰 peak를 얻었다. 이 중 첫번째 peak인 分劃 30번에서 43번

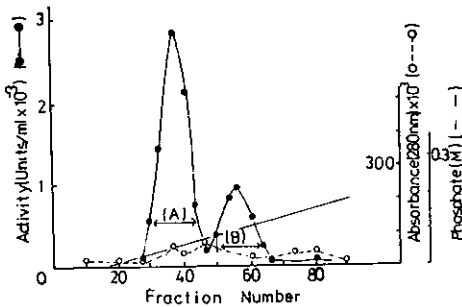


Fig. 2. Chromatography of polyphenol oxidase on DEAE-cellulose. The column size was 2.2 x 50.0 cm. Fraction volume collected was 3 ml with flow rate of 36 ml per hr.

까지를 모아서 Fraction A 또는 PPO A로 하였으며 두번째 peak인 分劃 50번에서 64번까지는 모아서 Fraction B 또는 PPO B로 하였다. 精製 各段階別 精製度와 回收率은 Table 2에서 보는 바와 같이 粗酵素液을 acetone 沈澱시키면 比活性도가 16,050 units/mg protein으로 1.9 培 정제되었고 이를 다시 DEAE-cellulose column chromatography를 하여 얻은 isozyme A 혹은 PPO A는 약 7.8 배 정제되었고 isozyme B인 PPO B는 8.7배 정제되었다. 回收率은 PPO A와 PPO B 各各 52.8

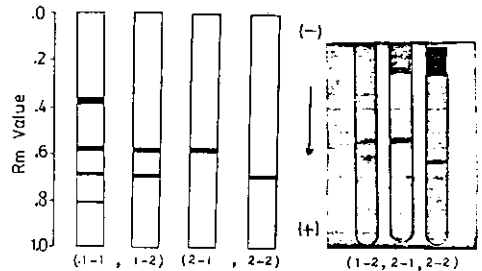
Table 2. Purification of PPO A and B from pear

Procedure	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Buffer extract	125,172	14.82	8,446	100	
Acetone precipitate	84,744	5.28	16,050	67	1.9
DEAE-cellulose chromatography					
Fraction A	66,150	1.01	65,821	52.8	7.8
Fraction B	14,140	0.19	73,646	11.3	8.7

%, 11.3%였다.

電氣泳動

Acetone powder에서 얻은 粗酵素液을 電氣泳動한 結果 단백질 bands가 4개, 活性 bands는 2개가 관찰되었다. 따라서 DEAE-cellulose column chromatography로 精製한 結果 2개의 活性 peak 중 첫번째 peak인 Fraction A와 두번째 peak인 Fraction B의 activity 分離帶는 各各 1개로서 Rm 값은 0.58, 0.68이었다. 이는 精製하기 전의 粗酵素液을 電氣泳動하였을 때의 같은 Rm값을 나타내었다. 배의 두 PPO는 isozyme 임이 관찰되었다.



(1) Protein bands (1-1) and activity bands (1-2) of buffer extract.
(2) Activity bands of the partially purified two isozymes, PPO A (2-1) and PPO B (2-2).

Fig. 3. Polyacrylamide disc gel electrophoretic profiles of polyphenol oxidases from pear.

酵素의 特性

最適 pH

배의 두 PPO의 最適 pH는 Fig. 4와 같다. 이때 pH 3.0에서 pH 7.0까지는 McIlvaine 氏緩衝液으로 pH 7.0에서 pH 8.5까지는 Tris-HCl 緩衝液을 使用하였다. 그 結果 PPO A는 pH 7에서 PPO B는 pH 4.2 부근에서 最高의 活性度를 나타내었다.

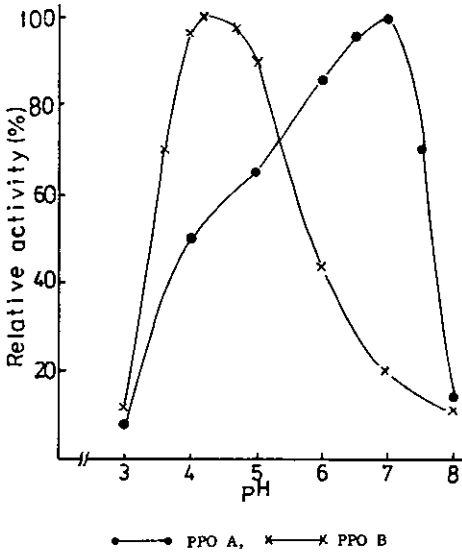


Fig. 4. Effect of pH on the activities of PPO A and PPO B.

最適溫度

作用 最適溫度를 알아보기 위하여 反應液의 溫度를 10 ~ 60 ℃로 調整하여 효소활성에 미치는 溫度의 影響을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. PPO A와 B는 각각 33 ℃, 30 ℃에서 最高의 活性度를 나타내었다.

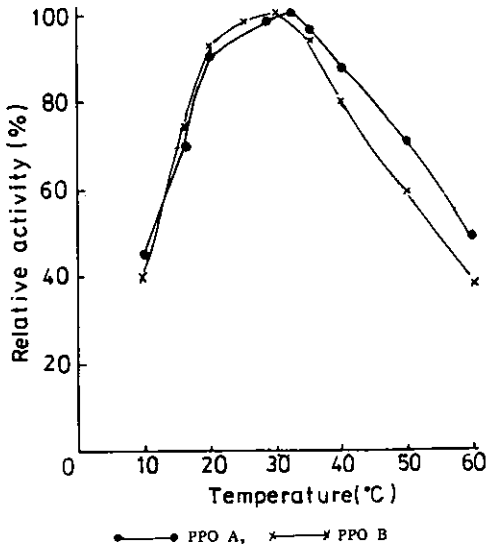


Fig. 5. Effect of temperature on the activities of PPO A and B.

熱 安定性

熱 安定性을 調査하기 爲하여 효소액을 30 ℃에서 80 ℃까지 各種 溫度에서 5 分間 및 30 分間 保存한 後 急冷하여 酵素活性를 測定한 結果는 Fig. 6과 같다. 그 결과 Fig. 6과 같이 PPO A, B 공히 60 ℃ 30 分間 保存時 50 % 이상의 殘存活性을 나타내었다. 그러나 60 ℃이상의 온도에서 活性은 급격히 감소하는 경향이였다.

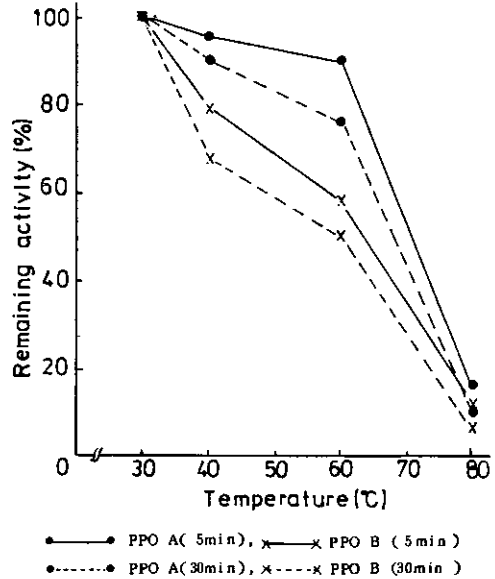


Fig. 6. Heat stabilities of PPO A and B.

基質特異性

PPO의 기질 특이성을 조사하기 위하여 o-diphenol 類인 DL-DOPA, catechol, chlorogenic acid, 4-methyl catechol, m-diphenol 類인 resorcinol, p-diphenol 類인 hydroquinone, trihydroxyphenol 類인 pyrogallol, gallic acid, monophenol 類인 p-cresol, L-tyrosine 등을 기질로 하고 이들을 10 mM (단 monophenol 類는 2.5 mM)로 하여 이에 대한 효소의 活性度를 測定하였다. 그 결과 o-diphenol 이 主 基質이며 PPO A와 B는 각각 catechol, chlorogenic acid에 높은 활성을 나타냈으며 PPO A의 경우 pyrogallol 에도 活性을 나타내었다. PPO A, B 공히 m-diphenol, p-diphenol 및 monophenol 類에 대해서 活性을 나타내지 않았다.

Table 3. Substrate specificity of PPO A and B

Substrate	Conc. (mM)	Relative activity (%)	
		PPO A	PPO B
o-Diphenol			
DL-DOPA	10	9.41	9.5
Catechol	10	100	100
Chlorogenic acid	10	77.3	202
m-Diphenol			
Resorcinol	10	0	0
p-Diphenol			
Hydroquinone	10	0	0
Trihydroxyphenol			
pyrogallol	10	17.6	0
Gallic acid	10	0	0
Monophenol			
p-Cresol	2.5	0	0
L-Tyrosine	2.5	0	0

金屬 ion의 影響

各種 無機鹽의 濃度를 조절한 後 효소액에 添加한 뒤 일정시간 反應시켜서 活性를 測定한 結果는 Table 4 와 같이 비교적 高농도인 10 mM에서 Zn⁺⁺은 PPO의 活性를 약간 增加시킨 반면 K⁺, Hg⁺⁺, Ca⁺⁺ 등의 cation은 특히 PPO B의 活性를 阻害시켰다.

Table 4. Effect of metal salts on the activities of PPO A and B

Salts	Relative activity (%)	
	PPO A	PPO B
None	100	100
CuSO ₄	98	90
FeSO ₄	76	150
MgCl ₂	98	48
CaCl ₂	91	68
HgCl ₂	80	75
ZnSO ₄	119	115
KCl	98	35

*Concentration of salts was 10 mM

Cu⁺⁺의 影響

PPO가 Cu⁺⁺를 含有하고 있는 酵素¹⁾이므로 Cu-SO₄의 濃度에 따른 活性의 變化를 알아보기 위하여 CuSO₄를 0.1 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM로 調整하여 添加하고 酵素活性를 測定한 結果는 Table 5 와 같다. PPO A, B는 10 mM농도에서 활성이 5 mM에 비해 각각 22%, 53% 감소되었다.

阻害劑에 의한 影響

阻害劑로 L-cysteine, thiourea, potassium cyanide, ascorbic acid, boric acid, sodium chloride 및 EDTA를 1 mM, 10 mM, 20 mM 濃

Table 5. Effect of Cu⁺⁺ on the activities of PPO A and B

Concentration of Cu ⁺⁺ (mM)	Relative activity (%)	
	PPO A	PPO B
None	100	100
10 ⁻¹	94	155
1	104	145
5	120	143
10	98	90

度로 調製後 0.2 ml를 反應液에 加해 PPO의 活性에 미치는 影響을 調査한 結果는 Table 6 과 같다. 즉 L-ascorbic acid, L-cysteine, thiourea 등이 阻害작용이 강했는데 10 mM농도에서 PPO A에 대한 阻害率은 각각 95%, 92%, 67%였다. thiourea와 L-cysteine은 PPO B에 강한 阻害效果가 있었다.

Table 6. Effect of inhibitors on the activities of PPO A and B

Inhibitors	Concentration (mM)	Inhibition (%)	
		PPO A	PPO B
L-Cysteine	1	42	63
	10	92	84
	20	90	100
Thiourea	1	5	45
	10	67	93
	20	78	100
Potassium cyanide	1	12	0
	10	79	0
	20	81	38
Ascorbic acid	1	20	29
	10	95	93
	20	96	92
Boric acid	1	0	0
	10	12	0
	20	100	7
Sodium chloride	1	2	0
	10	12	0
	20	11	21
EDTA	1	0	0
	10	6	0
	20	7	5

基質濃度의 影響

基質濃度에 따라 PPO의 反應速度를 測定함으로써 Michaelis 定數 (Km值)를 밝히코저 catechol의 濃도를 1 mM에서 40 mM까지 調整했다. 효소활성도를 測定하여 基質濃度와 反應速度와의 關係를 Lineweaver-Burk의 方法으로 PPO A, B에 대해 各各 圖示하면 Fig. 7 및 8과 같다. Double reciprocal plot에 의해 求한 PPO A와 PPO B의 Km값은 각각 20 mM, 14.3 mM이었다.

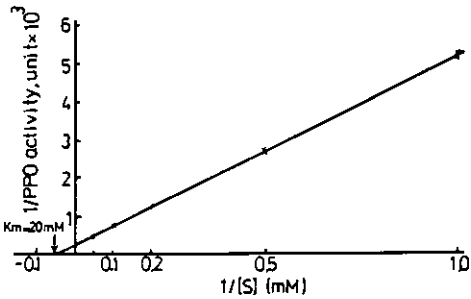


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of activity of PPO A by catechol.

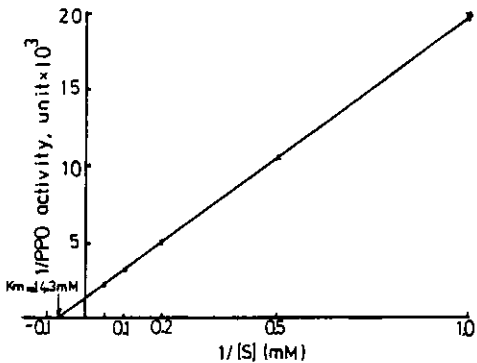


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of activity of PPO B by catechol.

考 察

果實이나 菜蔬類의 褐變現象의 主役인 PPO의 分離 및 特性에 關하여 많은 研究가 遂行되었으며 PPO의 isozyme의 有無와 세포내 分布는 果實의 種類와 品種에 따라 다르다.^{27, 28)} PPO를 分離·精製하기 위해 必要한 acetone 添加量은 2배 量이 가장 適合했으며 이는 Wong等,⁴¹⁾ Kim等²⁰⁾의 報告와 일치했다.

Table 2에서 보는 바와 같이 DEAE-cellulose를 이용해 精製한 결과 精製度에 있어 PPO A와 PPO B 각각 7.8 배, 8.7 배였다. 이는 복숭아⁴¹⁾를 acetone precipitation에 의한 精製度 1.6과 DEAE-cellulose chromatography에 의한 精製度가 PPO A, B, C, D 각각 1.6, 11.0, 1.3, 2.8보다 다소 높은 값을 얻었다. Fraction A 즉 PPO A와 Fraction B인 PPO B를 PAGE한 결

과 活性 分離帶가 각각 1개로서 Rm치가 상이했으며 Fraction A, B를 혼합해 電氣泳動한 결과도 같은 Rm치를 나타내어 이는 粗酵素液의 Rm치와도 동일해 isozymes인 것으로 나타났다.

배果肉에서 分離한 두 PPO는 最適 pH, 熱安定性, 基質特異性, 金屬이온의 影響, 阻害劑등의 影響과 電氣泳動型, chromatographic behavior 등이 相異했다. 배 PPO의 諸性質을 調査한 바 酵素反應의 最適 pH는 PPO A, B에 있어 각각 pH 7, pH 4.2; 最適溫度는 PPO A, B 각각 33°C, 30°C로 나타났다. Pifferi等³⁴⁾은 sweet cherry PPO의 isozyme의 最適 pH가 각각 pH 6.5와 pH 4.2로 보고했으며, 배의 最適 pH를 Tate等³⁹⁾은 pH 6.2, Halim과 Montgomery는 pH 7이라 報告하여 本實驗과 상이하었다. 品種別로는 사과가 pH 6.2,²⁰⁾ pH 7.0,¹⁾ 포도가 pH 5.1,³⁾ pH 5.5⁴⁰⁾ 복숭아가 pH 6.2,²⁵⁾ pH 6.8³⁵⁾로 最適 pH가 다르게 報告되고 있는데 이는 品種, 基質 등을 포함한 反應條件 및 使用한 緩衝液 등의 차이 때문인 것으로 思料되어 진다.

Fig. 5에서와 같이 最適溫度는 table beet²³⁾ 포도⁴⁰⁾ 보다는 높고 버섯⁴²⁾의 45~55°C 보다는 낮은 것으로 나타났으나 살구,²¹⁾ guava²⁹⁾ 등과 일치했다.

熱安定性은 McFarlin cranberry⁴³⁾의 50°C, 1.7 min 만에 50% 失활되는 것 보다는 熱에 安定했으나 마늘¹⁹⁾의 80°C, 30 min 加熱시 50%만 失활되는 것 보다는 열에 不安定하였다.

Table 3의 결과로 볼때 두 PPO는 o-diphenol에 강한 活性을 나타냈다. 이는 많은 果菜類의 PPO가 diphenol類에 대해서 높은 활성을 나타낸다는 보고와 일치했다.^{21, 26)} PPO A는 pyrogallol에 대해 활성을 보였으나 PPO B는 총이버섯,⁴²⁾ 마늘¹⁹⁾ 감귤¹⁴⁾ 등이 pyrogallol에 대해 높은 活性을 보였다는 報告와는 서로 상이한 결과를 얻었다.

各種 金屬이온이 PPO의 活性에 미치는 影響을 調査한 結果, Hg⁺⁺와 Ca⁺⁺이온에 의해 두 PPO는 阻害되었다. Cu⁺⁺이온의 影響에서 저농도시 PPO의 prosthetic group에 不足한 ion을 補充하여 주기 때문에 活性이 증가되었고 반면, 10 mM에서 PPO의 활성이 감소한 것은 더이상 Cu⁺⁺를 要求하지 않게 되어 오히려 阻害作用의 結果로 생각된다.

배 PPO가 L-cysteine, thiourea 및 ascorbic acid에 의해沮害되는現象은 바나나,²⁸⁾ 포도,⁴⁰⁾ 망고,³²⁾에서도報告되어 있다. Mathew等²⁶⁾에 의하면 thiourea, EDTA 등은 酵素의 prosthetic group인 Cu와 結合하여 沮害作用을 나타내는 chelator로 알려져 있다. EDTA는 Halim과 Montgomery,²⁷⁾ Wisseman과 Lee⁴⁰⁾에 의해서도 沮害效果가 거의 없는 것으로報告되어 있으며 배삼의 경우²²⁾ 100 mM 농도에서도 沮害현상을 보이지 않은것 등으로 볼때 本實驗의 結果와 일치했다. Cysteine은 生成되는 quinone과 결합해 o-hydroxyphenols의 산화에 의해 生成되는 酵素的 褐變을 沮해하며 tyrosine이 dopa로의 산화도 沮해한다. amino acid의 일종인 L-cysteine의 배 PPO의 沮해 結果로 볼때 대부분의 生果에 있어 生理적 손상으로 야기되는 酵素的 褐變의 지연책으로 사용함으로써 效果가 있을 것으로 思料된다. Borate는 PPO B보다는 A에 강한 沮해효과를 나타냈는데 이는 borate가 酵素觸媒 산화의 부위인 polyphenol의 di-OH와 複합체를 형성하는 inhibitor이며 이 複合體 形成反應은 낮은 산성보다는 중성 부근에서 가장 잘 일어난다.¹⁾

Fig. 7, Fig. 8에서 보는 바와 같이 배果肉의 PPO의 Km치는 Elberta free stone 복숭아³⁵⁾의 120 mM, Red havens 복숭아¹⁵⁾의 29 mM, Bartlett 배³⁶⁾의 33.9 mM, 20.9 mM 보다는 적어서 기질과의 親和性이 강했으나 살구²¹⁾의 9.9 mM, olive의 8.3 mM보다는 큰 값을 나타내어 기질에 대한 親和性이 이들보다 작다.

摘 要

배果實의 PPO를 分離·精製한 後 그 特性을 調

査한 結果는 다음과 같다. 粗酵素液을 전기영동한 結果 2개의 活性分離帶가 觀察되었으며, 이 粗酵素液을 acetone 沈澱과 DEAE-cellulose chromatography로 部分精製한 結果 PPO A 分離과 PPO B 分離을 얻었다. 각 구분을 電氣泳動한 結果 PPO A, B 각각 Rm치가 0.58, 0.68인 단일 活性分離帶가 觀察되었다. PPO A와 PPO B의 최종 精製度는 각각 7.8와 8.7 倍였다.

PPO A의 最適 pH와 溫度는 pH 7, 33℃인 반면 PPO B의 最適 pH와 溫度는 pH 4.2, 30℃로 나타났다.

PPO A, B의 熱 安定性은 60℃ 以上の 溫度에서는 급격히 活性이 감소했으며 PPO B보다 PPO A가 더 安定하였다.

배의 두 PPO는 o-diphenol에 강한 활성을 나타냈으며 특히 PPO A는 catechol에 PPO B는 chlorogenic acid에 활성이 강했다. 또한 PPO A는 pyrogallol에도 활성을 나타냈다. 그러나 두 PPO는 m-diphenol, p-diphenol과 monophenol에는 活性을 나타내지 않았다.

無機鹽의 影響을 본 結果는 10 mM濃度에서 Zn⁺⁺은 PPO A의 活性을 增加시켰으나 Fe⁺⁺는 沮害했고 반면 Fe⁺⁺, Zn⁺⁺는 PPO B는 活性을 增加시켰으나 K⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Hg⁺⁺는 沮害했다. Cu⁺⁺는 低濃度에서는 酵素를 活性化시켰으나 10 mM의 高濃度에서는 沮害作用을 했다. 沮害劑의 作用을 調査한 結果, L-ascorbic acid, L-cysteine, thiourea 등이 沮害作用이 강했다.

PPO A와 PPO B의 catechol에 대한 Km치는 각각 20 mM과 14.3 mM이었다.

引 用 文 獻

1. Bedrosian, K., Steinberg, M.P. and Nelson, A. I.:1960, Effect of borates and other inhibitors on enzymatic browning in apple tissue. II. Food Tech., 14:480-483.
2. Benjamin, N. D. and Montgomery, M. W.: 1973, Polyphenol oxidase of royal ann cherries: Purification and characterization, J. Food Sci., 38:799-806.

3. Bradford, M.M.: 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
4. Chan, H. T. and Yang, H. Y.: 1971, Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the MC fallin cranberry, *T. Food Sci.*, 35:169-173.
5. Chrambach, A., Reisfeld, R. A., Wyckoff, M. and Zaccari, J.: 1967, A procedure for rapid sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal. Biochem.*, 20:150-157.
6. Davis, B. J.: 1964, Disc electrophoresis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121:404-427.
7. Flurkey, W. H. and Jen, J. J.: 1978, Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches, *J. Food Sci.*, 43: 1826-1831.
8. Friend, J. and Rhodes, M. J. C.: Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables, Academic Press, (1981) pp.164-165.
9. Galeazzi, M. A. M., Sgarbieri, V. C. and Constantinides, S. M.: 1981, Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oxidase from a dwarf variety of banana, *J. Food Sci.*, 46:150-155.
10. Galeazzi, M. A. M. and Sgarbieri, V. C.: 1981, Substrate specificity and inhibition of polyphenol oxidase from a dwarf variety of banana, *J. Food Sci.*, 46:1404-1406.
11. Gregory, R. P. F. and Bendal, D. S.: 1966, The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis L.*), *Biochem. J.*, 101:569-581.
12. Halim, D. H. and Montgomery, M. W.: 1978, Polyphenol oxidase of d'anjou pears (*Pyrus communis L.*), *J. Food Sci.*, 43:603-608.
13. Harel, E. and Mayer, A. M.: 1971, Partial purification and properties of catechol oxidases in grapes, *Phytochem.*, 10:17-22.
14. 東野哲三, 藤田修仁: 1976, 温州ミカン未熟果の褐變とホリフエノール酸化酵素活性, *栄養と食糧*, 29:125-130.
15. Jen, J. J. and Kahler, K. R.: 1974, Characterization of polyphenol oxidase in peaches grown in the southeast, *Hort Sci.*, 9(6): 590-591.
16. Joslyn, M. A. and Ponting, J. D.: 1951, Enzyme catalized oxidative browning of fruit product, *Adv. Food Res.*, 3:1-44.
17. Kahn, V.: 1976, Polyphenol oxidase isoenzymes in avocado, *Phytochem.*, 15:267-272.
18. 菊谷元資: 1969, Disc 電気泳動法(その), *化学と生物*, 7:620-627.
19. 金銅淵, 李鍾旭, 金良培: 1981, 마늘 (*Allium sativum, L.*) polyphenol oxidase 의 特性, *韓國農化學會誌*, 9(3):167-172.
20. 金玉淵, 孫泰華: 1983, 貯藏中 사과의 polyphenol oxidase 의 變化에 對하여, *慶北大學校 農大論文集*, 1:141-150.
21. 金鋪揮, 張在哲, 吳錫興: 1984, 梅實中の polyphenol oxidase 에 關한 研究, *全北大學校 農大論文集*, 15:73-83.
22. 金鋪揮, 張在哲, 柳光錫: 1983, 白蔘의 褐變에 關한 研究, *全北大學校 農大論文集*, 14:84-90.
23. Lee, L. Y. and Smith, N. L.: 1979, Blanching effect on PPO activity in table beets. *J. Food Sci.*, 44:82-86.
24. Leonard, S., Luh, B. S., Hinreiner, E. and Simone, M.: 1954, Maturity of bartlett pears for canning, *Food Technol.*, 8:478-482.
25. Luh, B. S. and phithakpol, B.: 1972, Characteristics of polyphenol oxidase related to browning in cling peaches, *J. Food Sci.*, 37:264-268.
26. Mathew, A. G. and Darpia, A. B.: 1971, Food browning as a polyphenol reaction, *Adv. Food Res.*, Academic Press, New York, 19:75-132.
27. Mayer, A. M. and Harel, E.: 1979, Polyphenol oxidases in Plants, *Phytochem.*, 18:

- 198-215.
28. Montgomery, M. W. and Sgarbieri, V. C.: 1975, Isoenzymes of banana polyphenol oxidase, *Phytochem.*, 14:1245-1249.
 29. Mowlah, G. and Itoo, S.: 1982, Quantitative changes in guava polyphenol and the polyphenol oxidase at different stages of maturation, ripening and storage, 29:413-417.
 30. Muneta, P. and Walradt, J.: 1968, Cysteine inhibition of enzymatic blackening with polyphenol oxidase from potatoes, *J. Food Sci.*, 33:606-608.
 31. 中林敏郎: 1968, 果實および野菜類のタンニン成分, *日本食品工業學會誌*, 15:73-78.
 32. Park, Y. K., Sato, H. H., Almeida, T. A. and Moretti, R. H.: 1980, Polyphenol oxidase of mango, *J. Food Sci.*, 45:1619-1621.
 33. Patil, S. S. and Zucker, M.: 1965. Potato phenolases, *J. Bio. Chem.*, 240:3938-3943.
 34. Pifferi, P. G. and Cultrera, :1974, Enzymic degradation of anthocyanins: The role of sweet cherry polyphenol oxidase, *J. Food Sci.*, 39:786-791.
 35. Reyes, P. and Luh, B. S.: 1960, Characteristics of browning enzymes in elberta free stone peaches, *Food Tech.*, 14:570-575.
 36. Rivas, N. D. J. and Whitaker, J. R.: 1973, Purification and some properties of two polyphenol oxidase from bartlett pears, *Plant Physiol.*, 52:501-507.
 37. Satjawatcharaphong, C., Rymal, K.S., Dozierjr, W. A. and Smith R. C.: 1983, Polyphenol oxidase system in red delicious apples, *J. Food Sci.*, 48:1879-1880.
 38. Smith, J. L. and Krueger, R. C.: 1982, Separation and purification of the phenolases of the common mushroom, *J. Bio. Chem.*, 237:1121-1128.
 39. Tate, J. N., Luh, B. S. and York, G. K.: 1964, Polyphenol oxidase in bartlett pears, *J. Food Sci.*, 29:829-836.
 40. Wissemann, K. W. and Lee, C. Y.: 1981, Characterization of polyphenol oxidase from ravat 51 and niagara grapes, *J. Food Sci.*, 46:506-508.
 41. Wong, T. C., Luh, B. S. and Whitaker, J. R.: 1971, Isolation and characterization of polyphenol oxidase of clingstone peach, *Plant Physiol.*, 48:19-23.
 42. 梁熙天, 洪載植, 李泰圭, 孫姬淑: 1983, 송이버섯 [*Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing]의 polyphenol oxidase 에 관하여, *韓國農化學會誌*, 1:41-46.
 43. Zenin, C. T. and Park, Y. K.: 1978, Isoenzymes of polyphenol oxidase from high L-dopa containing velvet bean, *J. Food Sci.*, 43:646-647.