

국산 다엽의 Polyphenol Oxidase에 관한 연구

심 현근·박 수선·김 안근

숙명여자대학교 약학대학

(Received October 2, 1986)

Polyphenol Oxidase of Tea Leaf in Korea

Hyeon Keun Shim, Soo Sun Park and An Keun Kim

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

Abstract—Polyphenol oxidase was purified from an extract of tea leaf by ammonium sulfate fractionation followed by Sephadex G-150 column chromatography, which resulted in a 67-fold increase in specific activity. The enzyme had optimum pH 6.5 and was relatively heat stable. The substrate specificity of the tea leaf PPO showed high affinity toward pyrogallol and catechol. Potassium cyanide, sodium diethyldithiocarbamate, L-cysteine, 2-mercaptoethanol and ascorbic acid were potent inhibitors.

Polyphenol oxidase(PPO, o-diphenol; O₂ oxidoreductase; EC. 1.10.3.1)는 copper를 함유한 효소이며 monophenol을 hydroxylation하여 o-dihydroxy 화합물로 또한 o-dihydroxy 화합물을 quinone으로 산화하는 효소이다.

Takeo¹⁾는 신선한 다엽중에는 소량의 가용성 PPO와 달랑의 불용성 PPO가 존재하고 있으며, chloroplast 막질구조에 결합되어 있는 이 효소는 Tween-80이나 polyvinylpyrrolidon(PVP) 등으로 처리함으로써 가용성으로 된다고 하였다. 이러한 가용화는 엽단백과 결합되어 있는 다엽성분의 하나인 polyphenol 물질이 Tween-80에 의해 흡착제거된 때문이라고 추정하였다.

Sato²⁾는 다엽 chloroplast중에는 tyrosine을 hydroxylation시켜 dopa로 만드는 효소가 존재한다고 하였으며 사탕무우 엽의^{3,4,5)} chloroplast중의 PPO는 trypsin의 처리로서 활성화되며, 시금치 chloroplast중의 latent PPO도 trypsin 처리로 그 활성이 커진다고 보고하고 있다.⁶⁾

과실, 야채에 gamma irradiation을 함으로써, 생리적인 변화가 일어나는 동시에 갈변 현상이 수반된다고 하였으며, 이러한 현상은 PPO의 활성증가와 관련되어 있을 것이라고 하였다.⁷⁾

감자 Potato PPO는 11개의 isozyme의 형태로 존재하며, 역시 gamma선 조사로 isozyme의 상대 활성의 변화가 일어나며 cresolase 활성은 증가되고, catecholase 활성은 감소된다고 하였다.⁸⁾

또한, 다엽중의 PPO는 흥차 발효의 생화학적 반응에 있어서, 가장 중요한 부분을 차지하고 있는 것으로 알려져 있다.

저자는 국산 다엽중의 갈변과 밀접한 관계를 가지고 있는 PPO를 확인하기 위해 전남 보성지방에서 재배하고 있는 재래종 다엽을 채취하여 PPO를 용출 정제하여 그 효소학적 성질을 검토하였다.

실험 방법

시약—Potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, sodium chloride., ascorbic acid, ammonium sulfate, tyrosine, m-cresol, p-cresol, thiourea, potassium cyanide, ethylenediamine tetraacetic acid, glutathione(reduced form) (Wako pure chemical industries, LTD제품), sodium diethyldithiocarbamate, Tween-80(Kanto Chemical Co. 제품), chlorogenic acid, pyrocate-

chol, caffeic acid, d-catechin, protocatechuic acid (Tokyo kasei chemical industries, LTD 제품), 2-mercaptoethanol, gallic acid, saccharose (Junsei chemical Co., LTD 제품), L-cysteine (E. Merck AG. Darmstadt 제품), Sephadex G-150 (Bead size 40-120 μ) (Pharmacia Fine Chemicals Co. 제품) Dialysis "sacks" (750-9 μ , 750-7 μ) (Sigma 제품) 등의 시약은 특급(Guaranteed reagent)을 사용하였다.

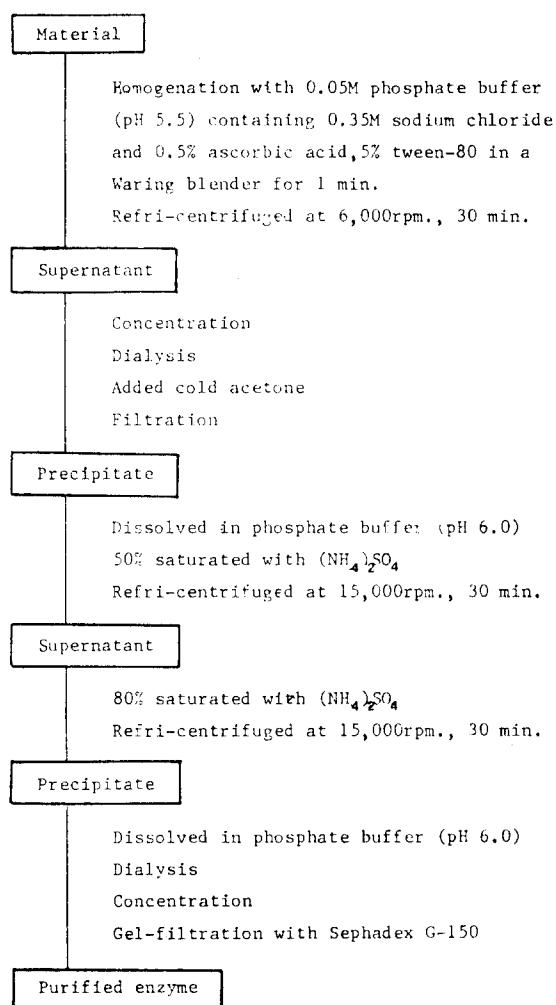
기기—pH meter(Orion research digital pH millivolt meter 611), centrifuge (Sorvall, RC 2-B), double-beam spectrophotometer (Hitachi model 200-20).

실험재료—1985년 7월 전남 보성지방에 있는 다원에서 재래종 다엽의 신선한 어린 잎을 위에서 3~5cm 채취하여 본 실험의 재료로 사용하였다.

효소추출 및 정제—신선한 다엽 100g을 Waring blender에 넣고 빙냉시킨 0.35M sodium chloride액과 0.5% ascorbic acid를 함유한 0.05M 인산염 완충액(pH5.5) 1,000ml를 가하여 자주 혼들어주면서 전량 2000ml로 추출하였다. 이것을 냉동 원심분리기로 6,000rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상정액을 saccharose를 사용하여 농축하고 2차 중류수로 투석한 후에 cold acetone을 가하고 방치한 후 여과하였다. 이때에 얻은 침전을 인산염 완충액(pH6.0)에 녹이고 고체 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 소량씩 가하여 50% 포화시킨 후 15,000rpm에서 30분간 원심분리하여 침전을 제거한 여액을 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 80% 포화시킨 후 원심분리하여 침전을 얻었다. 이 침전을 인산염 완충액(pH 6.0)에 녹이고 72시간 투석한 액을 농축시킨 후 sephadex G-150 column에서 gel filtration시켰다(Scheme 1).

칼람 크로마토그라피—효소 활성이 있는 분획을 얻기 위해서 sephadex G-150 column(2.1×85cm)을 인산염 완충액(pH6.0)로 평형시킨 다음 위의 정제 과정을 통해 얻은 효소액 2ml를 gel 상층에 조심스럽게 가하고 용출 속도 5.5ml/hr로 하여 같은 완충액으로 용출시켰다.

효소활성도 측정—효소활성도 측정은 Ponting



Scheme 1—Preparation of tea leaf polyphenol oxidase.

과 Joslyn에 의해 확립된 정색반응을 수정하였다.⁹⁾ Sephadex G-150 분획중에서 활성이 가장 높은 분획을 효소활성측정의 시료로 하였다. polyphenol oxidase의 활성측정시 기질은 pyrocatechol(10^{-1}M) 0.5ml, 0.05M 인산염 완충액(pH6.5) 2.3ml, 효소액 0.2ml를 가해서 총용량을 3ml로 하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질의 정량—단백질의 함량은 Lowry-Folin 법¹⁰⁾에 의해 측정하였다.

최적온도—온도가 효소의 활성에 미치는 영

향을 관찰하기 위하여 pyrocatechol ($10^{-1}M$) 0.5ml를 기질로 하여 인산염 완충액(최적 pH 6.5) 2.3ml, 효소액 0.2ml을 가해 총 3ml로 하여 반응온도만을 20°C 에서 55°C 까지 변화시켜 가면서 10분간 반응시켜 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

최적 pH—pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 기질 및 모든 조건은 최적온도와 동일한 방법으로 하였으며, pH는 5.0~8.0까지 변화시켜 40°C 에서 10분간 반응시켜 흡광도를 측정하였다.

열 안정성—polyphenol oxidase의 열 안정성을 검토하기 위하여 2분~60분까지의 시간을 변화시키고 온도는 $50\sim 80^{\circ}\text{C}$ 로 변화시켜 가면서 pyrocatechol($10^{-1}M$)을 기질로 하여 pH6.5와 40°C 에서 흡광도를 측정하여 효소활성을 측정하였다.

기질에 대한 특이성—Polyphenol oxidase의 특이성을 관찰하기 위하여 기질로서 mono, di, polyhydroxy 화합물(pyrogallol, pyrocatechol, epinephrine, d-catechin, p-phenylenediamine, gallic acid, dopa, chlorogenic acid, caffeic acid, protocatechuic acid, tyrosine, m-cresol, p-cresol)을 사용하였다. 이때 각 기질의 농도는 $10^{-1}M$ 하여 효소활성을 측정하였다.

저해제의 영향—Polyphenol oxidase의 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 저해제로 cysteine($10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 2\times 10^{-5}, 10^{-5}$), glutathione($10^{-2}, 10^{-3}, 5\times 10^{-4}, 2\times 10^{-4}$), ascorbic acid ($10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 5\times 10^{-5}, 2\times 10^{-5}$), sodium diethyldithiocarbamate($10^{-2}, 10^{-3}, 5\times 10^{-4}, 2\times 10^{-4}, 10^{-4}$), potassium cyanide($10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$), 2-mercaptopethanol ($10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$), thiourea($10^{-2}, 10^{-3}$), ethylenediaminetetraacetic acid($10^{-1}, 10^{-2}$)를 사용하였고, 이때 기질은 pyrocatechol($10^{-1}M$) 0.5ml를 사용하여 효소활성을 측정하였다.

실험결과 및 고찰

효소추출—Takeo는 상술한 바와 같이 다엽에

서 PPO를 추출할 때 Tween-80, 혹은 PVP 등을 마쇄액에 첨가하면 추출물중의 polyphenol 농도가 낮아지고 효소단백질의 응고가 감소된다고 하였다. 또 Tween-80에는 막질구조에 결합한 효소를 용출시키는 효과외에 polyphenol과 결합하여 제거시키는 효과가 있어서 Tween-80을 다엽 PPO 추출에 사용하면 대부분의 효소가 가용화되어 추출된다고 하였다.

0.35M sodium chloride와 0.5% ascorbic acid를 함유한 인산염 완충액과 5% Tween-80액으로 추출하여 농축하고 cold acetone으로 처리한 효소액은 crude extract에 비하여 비활성이 14배나 증가하였다.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 분획화—다엽에서 얻은 PPO를 정제하기 위하여 고체 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 분획시켜서 얻은 결과를 Table I에 나타내었다.

50~90% 포화로 얻은 각 분획의 침전의 비활성이 각각 732, 963.6, 808.5, 806.8, 529.7이었으므로 50% 포화 침전을 제거한 후 80%까지 포화시킨 분획을 취하였다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 분획시켜서 얻은 효소액은 crude extract에 비해 비활성이 27배 증가되었고, Tween-80과 cold 아세톤으로 처리한 효소액에 비해서는 2배 비활성의 증가가 나타났다.

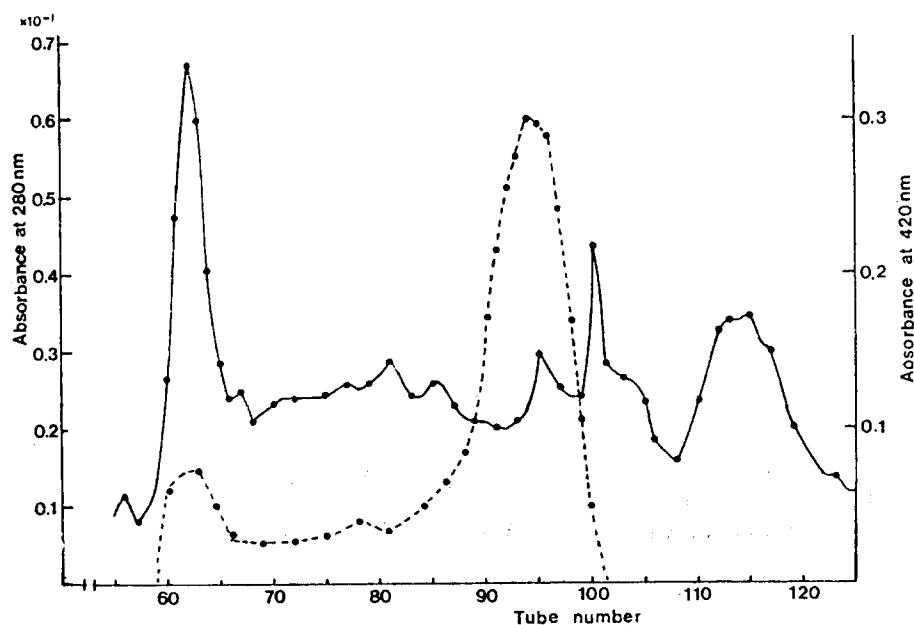
칼립크로마토그라피—Fig. 1에서와 같이 Sephadex G-150 칼립크로마토그라피를 행하여 각각의 분획을 가지고 효소활성을 측정해 본 결과

Table I—Fractionation of polyphenol oxidase by solid ammonium sulfate.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration (% saturation)	PPO activity (Units*/ml)	Protein content (mg/ml)	Specific activity (Units/mg)
50	83.5	0.114	732
60	177.3	0.184	963.6*
70	190	0.235	808.5*
80	188.8	0.234	806.8*
90	183.8	0.347	529.7

The polyphenol oxidase activities of precipitate were determined with catechol as substrate at pH6.5 and 40°C .

* One unit of PPO activity is defined as the amount of enzyme that cause a 0.001 extinction change in absorbance per min. at 420nm.

**Fig. 1**—Sephadex G-150 column chromatography.

Column size; 2.1×85cm, flow rate; 5.5ml/hr. elution; 0.05M phosphate buffer (pH6.0)
 ●—● protein peak at 280nm, ●····● enzyme activity peak at 420nm.

tube number 93~96에서 효소활성이 큰 것으로 나타났다. Sephadex G-150에서 분획하여 얻은 효소액의 단백질 함량은 0.05mg/ml이었으며 그 비활성이 1720이었으므로, crude extract에 비해서 비활성이 67배 증가되었고 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 분획시켜서 얻은 효소액에 비해서는 2.5배의 비활성의 증가를 보였다(Table II). Uritani 등은 조효소를 Sephadex G-200 칼람크로마토그라피를 실시한 후 DEAE, CM-cellulose 칼람을 통한 결과 3가지 성분으로 분리됨을 알았다. 효소단

백이 결합한 polyphenol의 분리에는 DEAE-cellulose 칼람을 이용하면 효과적이며 다엽 polyphenol의 경우에는 pH7.0의 인산염완충액으로 평형시킨 후에 같은 완충액으로 용출 시키면 효소단백은 칼람을 그대로 통과하여 그 효소활성의 80~90%는 회수된다. 따라서 PPO에 결합되었던 polyphenol을 효과적으로 분리할 수 있다.

최적온도와 최적 pH—Fig. 2, 3에서 나타난 바와 같이 다엽에서 얻은 PPO의 최적온도는

Table II—Purification of tea leaf polyphenol oxidase.

Purification procedure	PPO activity (Units*/ml)	Protein(mg/ml)	Specific activity (Units/mg)	Purification (fold)
Crude extract**	104.5	4.08	25.6	1
Treated with tween-80, cold acetone	253.5	0.70	362	14
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation(50~80%)	256	0.37	692	27
Sephadex G-150.	86	0.05	1,720	67

* One unit of PPO activity is defined as the amount of enzyme that cause a 0.001 extinction change in absorbance per min. at 420nm.

** The crude extract was prepared by homogenizing Tea leaf with phosphate buffer (pH6.5).

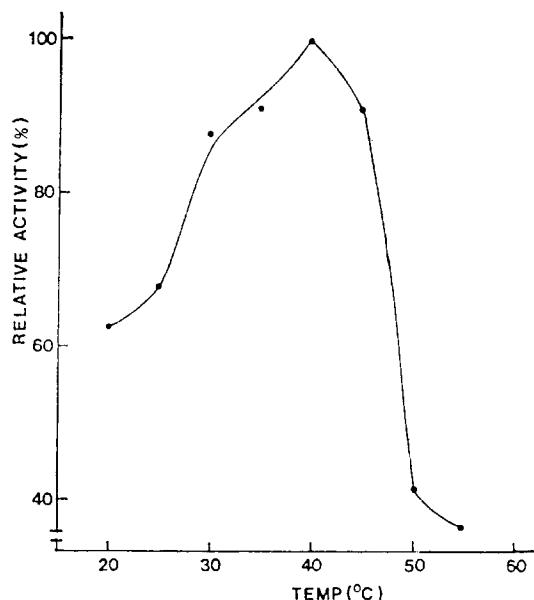


Fig. 2—Effect of temperature on enzyme activity.
The PPO activity as a function of temperature was determined with 6×10^{-1} M catechol as the substrate in phosphate buffer at pH6.5 at various temperatures from 20~55°C.

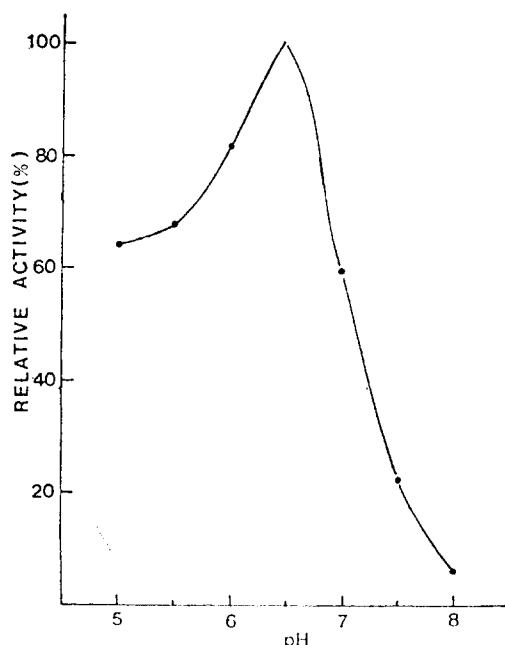


Fig. 3—Effect of pH on enzyme activity.
The PPO activity as a function of pH was determined with 6×10^{-1} M catechol as the substrate in 0.05M phosphate buffers ranging from pH5.0~8.0 at optimum temperature 40°C.

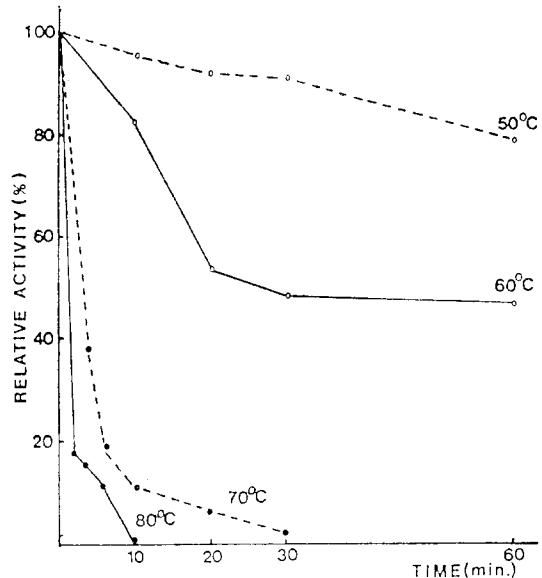


Fig. 4—Thermostability of tea leaf polyphenol oxidase.
Enzyme solutions were heated at various temperature (50~80°C) for 2~60 min. After heating, the remaining enzyme activities were determined with catechol as substrate at pH6.5 and 40°C.

분리한 PPO의 mono, di, polyphenol에 대한 활 40°C이고 pH6.5에서 최대 활성을 나타내었다.

위의 최적 pH는 Mango PPO의 pH5.6~6.0,¹¹⁾ Peach PPO의 pH6.2¹²⁾ 등과 거의 비슷한 pH라고 생각한다.

열에 대한 안정성—Fig. 4에 나타난 바와 같이 다엽에서 열은 효소는 50°C에서 60분후에 78.6%의 활성이 유지되었다. 60°C에서는 10분 후에는 83%의 활성이 60분후에는 활성의 47% 정도가 유지되는 것을 알 수 있었다. 80°C에서는 가열 10분에 효소활성이 상실되었다. 따라서 다엽 PPO는 60°C에서는 50% 정도의 효소활성이 남아있고 70~80°C에서는 거의 효소활성이 상실되는 것을 알 수 있다.

그러나, 많은 과실중의 PPO의 열에 의한 불활성은 1차속도반응을 나타낸다고 하였다.¹³⁾

기질특이성—본 실험에 사용한 재래종 다엽에서 성을 검토하여 Table III에 나타내었다. 즉

Table III—Substrate specificity of tea leaf polyphenol oxidase

Substrate (10^{-4} M)	Formula	Relative activity (%)
Pyrogallol		100
Pyrocatechol		85.6
Epinephrine		29.5
d-Catechin		10.8
D-Phenylenediamine		7.2
Gallic acid		2.9
Dopa		0
Chlorogenic acid		0
Caffeic acid		0
Protocatechuic acid		0
Tyrosine		0
m-Cresol		0
p-Cresol		0

The PPO activity as a function of substrate was determined at 420nm.

chlorogenic acid, caffeic acid, protocatechuic acid에 대해서는 낮은 활성을 나타냈고, 또한 monophenol 물질인 tyrosine, m-cresol, p-cresol 등에는 활성을 나타내지 않았다. 위의 실험 결과를 종합해 보면 재래종 다엽종에 있는 PPO는 diphenolic acid 보다 pyrogallol, pyrocatechol 같은 diphenol 물질에 대하여 큰 친화력을 보이고, monophenol 물질에는 친화력이 거의 없는

것을 알 수 있었다.

위의 실험 결과와 같이 Date,¹⁴⁾ peach,¹²⁾ banana¹⁵⁾ 및 Niagara grape, Ravat 51¹⁶⁾ 등에서 일은 PPO도 공통적으로 o-diphenol 화합물에 대하여 높은 친화력을 나타낸다. 이러한 현상은 그식물체중에 그 효소와 친화성이 큰 polyphenol 성분이 존재하고 있기 때문인 것으로 여겨진다.

저해제의 영향—Table IV에서와 같이 재래종

Table IV—Effect of various inhibitors on tea leaf polyphenol oxidase.

Inhibitor	Concen- tration	Catechol as substrate (10^{-1} M, % inhibition)	Pyrogallol as substrate (10^{-1} M, % inhibition)
L-Cysteine	10^{-2}	100	100
	10^{-3}	100	92.7
	10^{-4}	100	0
	2×10^{-5}	93.6	—
	10^{-6}	14.1	—
Glutathione	10^{-2}	100	90.8
	10^{-3}	100	15.5
	5×10^{-4}	100	0
	2×10^{-4}	2.3	—
Ascorbic acid	10^{-2}	100	100
	10^{-3}	100	88.8
	5×10^{-5}	12.4	0
	2×10^{-5}	0	—
Sodium diethyldi-thiocarbamate	10^{-2}	100	100
	10^{-3}	100	6.8
	5×10^{-4}	98.7	6.0
	2×10^{-4}	57.7	5.7
Potassium cyanide	10^{-4}	3	4.9
	10^{-3}	100	94.2
	10^{-4}	94	84
	10^{-5}	44	48.1
2-Mercaptoethanol	10^{-2}	100	100
	10^{-3}	100	29.1
	10^{-4}	41.9	3.4
	10^{-5}	19.8	0
Thiourea	10^{-2}	71.5	20.4
	10^{-3}	20.8	6.3
Ethylenediamine	10^{-1}	53	61.6
tetraacetic acid	10^{-2}	17.1	29.6

Reaction mixture: 0.2ml of the enzyme preparation, 0.5ml of substrate solution, 1.8ml of 0.05M phosphate buffer, 0.5ml of inhibitors.

다엽에서 얻은 PPO는 potassium cyanide, sodium diethyldithiocarbamate, L-cysteine, 2-mercaptopethanol, ascorbic acid, glutathione, thiourea 등에 의해 강력한 저해를 받는 것으로 나타났다. 위의 저해제들은 많은 식물체에서 얻은 PPO에 대하여서도 강한 저해작용을 나타낸다. 또한 이

저해 작용은 catechol을 기질로 사용하였을 때가 pyrogallol을 기질로 사용하였을 때보다 강한 저해 작용을 나타냈으며, *D. bulbifera*의 PPO의 경우에도 같은 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾

그러나 chelating agent인 EDTA는 약한 저해 작용을 나타냈는데, egg plant,¹⁸⁾ peach,¹²⁾ *D. bulbifera*¹⁷⁾의 PPO도 재래종 다엽의 PPO와 같이 효소의 활성 저해에 미치는 영향은 극히 약하였다. 또한 EDTA와의 반응 혼합물의 pH는 PPO의 중요한 부분인 Cu^{+2} 와 EDTA의 친화력에 영향을 미칠 것이라고 하였다. L-cysteine의 경우에는 cysteine이 quinone과 복합체를 형성 하므로서 식물체중에서 효소로 인한 갈변을 감소시키고, sodium diethyldithiocarbamate는 metal-complexing agent이고, PPO의 copper prosthetic group과 반응한다.

Table V에서와 같이 ascorbic acid의 강한 저해 작용으로 다엽 PPO의 효소활성이 나타나지 않는 것으로 보아 다엽 PPO에 혼재하기 쉬운 산화성 효소인 ascorbate oxidase가 본 실험에서 얻은 다엽 PPO에는 혼재하지 않는다는 것을 알 수 있었으며 위의 실험결과들을 총괄하여 볼 때 재래종 다엽종에서도 copper protein인 PPO가 존재하고 있다는 것을 알 수 있다.

결 론

국산다엽을 Tween-80, cold 아세톤으로 처리하고, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 분획, Sephadex G-150 젤에 과 과정으로 정제하여 얻은 효소는 그 비활성이 crude extract에 비해 67배나 증가되었다.

다엽중의 polyphenol oxidase는 최적 pH6.5,

Table V—Assay for ascorbate oxidase.

Substrates	Concentrations	Activity(%)
Pyrocatechol	10^{-1} M	14.8
+ Ascorbic acid	$+10^{-4}$ M	
Pyrogallol	10^{-1} M	98.1
+ Ascorbic acid	$+10^{-4}$ M	
Ascorbic acid	10^{-4} M	0

최적온도 40°C이다. 이 효소는 pyrogallol 및 catechol에 대해서 높은 친화성을 나타내고 monophenol 물질에는 친화성이 거의 없었다.

Potassium cyanide, sodium diethyldithiocarbamate, L-cysteine, 2-mercaptopropanol, ascorbic acid 등은 polyphenol oxidase의 활성을 강력하게 저해하였다.

문 헌

- 1) Takeo, T.: Solubilization and properties of the structurally bound polyphenol oxidase in Tea Leaves. *Agr. Biol. Chem.* 29, 558 (1965).
- 2) Sato, M., Kato, N. and Hasegawa, M.: Metabolism of phenolic substances by chloroplasts. *Botanical Magazine (Tokyo)*. 81, 356 (1968).
- 3) Katz, Y., and Mayer, A.M.: Changes in properties of catechol oxidase from chloroplasts following liberation from membranes. *Israel J. Bot.* 18, 11 (1969).
- 4) Mayer, A.M.: Factors controlling activity of phenolase in chloroplasts from Sugar beets. *Israel J. Bot.* 13, 74 (1964).
- 5) Mayer, A.M.: Catechol oxidase, enzymic liberation from Sugar beet chloroplasts. *Phyto-chem.* 5, 1297 (1966).
- 6) Tolbert, N.E.: Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant physiol.* 51, 234 (1973).
- 7) Pendharkar, M.B. and Madhusudanan Nair P.: Alterations in *Solanum Tuberosum* polyphenol oxidase activity induced by gamma irradiation. *Phytochem.* 13, 1373 (1974).
- 8) Constantinides, S.M. and Bedford, C.L.: Multiple forms of phenol oxidase. *J. Food Sci.* 32, 446 (1967).
- 9) Ponting, J.D. and Joslyn, M.A.: Ascorbic acid oxidation and the browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem.* 19, 47 (1948).
- 10) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.I. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
- 11) Park, Y.K., Sato, H.H., Alneida, T.D. and Moretti, R.H.: Polyphenol oxidase of *Mango*. *J. Food Sci.* 45, 1619 (1980).
- 12) Luh, B.S. and Bulan, P.: Characteristics of polyphenol oxidase related to browning in *Cling peaches*. *J. Food Sci.* 37, 264 (1972).
- 13) Mowlah, G., Takano, K., Kamoi, I. and Obava, T.: Kinetics of heat inactivation and some physico-chemical properties of Banana polyphenol oxidase. *農學集報*. 26, 311 (1981).
- 14) Hasegawa, M.: Polyphenol oxidase of *Dates*. *J. Agric. Food Chem.* 28, 5 (1980).
- 15) Galeazzi, A.M., Sgarbieri, V.C. and Constantinides, S.M.: Isolation, purification and physico-chemical characterization of polyphenol oxidase from a dwarf variety of Banana (*Musa cavendishii*, L.). *J. Food Sci.* 46, 150 (1981).
- 16) Wissemann, K.W. and Lee, C.Y.: Characterization of polyphenol oxidase from *Ravat 51 and Niagara Grapes*. *J. Food Sci.* 46, 506 (1981).
- 17) Anoskie, E.O. and Ayaebene: Purification and some properties of polyphenol oxidase from the *Yam tubers*, *Dioscorea Bulbifera*. *Phytochem.* 20, 2625 (1981).
- 18) Knapp, F.W.: Some Characteristics of eggplants and avocados polyphenol oxidases. *J. Food Sci.* 30, 930 (1965).