

갈근 중의 Polyphenol Oxidase에 관한 연구

박 수 선 · 김 안 근 · 이 정 신
숙명여자대학교 약학대학

Studies on Polyphenol Oxidase from Puerariae Radix

Soo Sun Park, An Keun Kim and Jeong Sin Lee

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

Abstract—Polyphenol oxidase(PPO) was purified from an extract of Puerariae Radix by ammonium sulfate fractionation followed by Sephadex G-150 column chromatography, which resulted in a 56-fold increase in specific activity. The enzyme was optimum of pH 6.5. The optimum temperature of enzymic reaction was about 40°. The enzyme was thermostable with a half-life equal to 32 min at 70°. Km values of the PPO for catechol and pyrogallol from Lineweaver Burk plots were 1.3×10^{-2} M, 1.16×10^{-2} M, respectively. The substrate specificity of the Puerariae Radix PPO showed high affinity toward pyrogallol. Reducing reagents such as cysteine, potassium metabisulfite, ascorbic acid, 2-mercaptoethanol completely inhibited the PPO activity at 10^{-2} M level. Lineweaver-Burk analysis of inhibition data revealed that the inhibition by cysteine, 2-mercaptoethanol, 4-nitrocatechol, potassium cyanide was competitive with Ki values of 4.3×10^{-2} M, 0.73×10^{-6} M, 6.9×10^{-6} M, 6.4×10^{-7} M, respectively. The browning reaction by PPO was observed to decrease temporarily with the addition of sodium diethyl dithiocarbamate, a well known copper chelating agent. Among the divalent cations, Cu^{2+} ion was strong activator on PPO and Mn^{2+} , Co^{2+} ions was effect on PPO activity. Zn^{2+} , Mg^{2+} ions was inhibitor on PPO.

Keywords—Polyphenol oxidase · sodium diethyldithiocarbamate · pyrogallol · Puerariae Radix

식물의 생리 현상에 중요한 위치를 차지하고 있는 효소의 하나인 polyphenol oxidase (PPO, *o*-diphenol; oxygen oxidoreductase)는 copper를 함유하는 효소이며, 식물체가 외부의 자극이나 손상을 받았을 때 흔히 갈변을 나타낸다. 이것은 PPO가 이 갈변 현상에 작용한다고 알려져 있다. 이러한 갈변 현상은 식물 조직 중에 존재하는 phenolic 화합물이 PPO에 의해서 산화되어 quinone으로 되고 이들이 서로 반응하거나 또는 다른 phenol성 물질과 반응하여 melanin색

소를 생성하기 때문이라고 알려져 있다.¹⁾

PPO는 두 가지의 특징적인 생화학적 반응을 촉매한다. 즉, 그 반응은 아래와 같다.

(A) $\text{monophenol} + \text{O}_2 + \text{AH}_2 \xrightarrow{\text{mono-phenolase}} \text{o-dihydroxyphenol} + \text{H}_2\text{O} + \text{A}$
(B) $\text{2o-dihydroxyphenol} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{o-dihydroxyphenolase}} \text{2o-quinone} + 2\text{H}_2\text{O}$
 AH_2 는 reductant (Co-substrate)를 말한다. 반응 A와 B는 각각 PPO의 monophenolase와 *o*-dihydroxyphenolase 활성에 의해서 촉매된다.^{2,3)} 외인성 환원제가 없을 때에는 monophe-

nols의 hydroxylation은 initial lag period에 의해서 특징지워진다고 보고되었으며, 또한 외부에서 환원제를 첨가할 때 lag period를 없애버릴 수도 있다고 한다.⁴⁾

PPO의 활성과 polyphenols의 총 함량은 갈변 현상에 관여하는 주요인자이다.⁴⁾

PPO는 그 종류에 따라 A와 B의 활성을 모두 가지고 있거나 또는 그 중 하나의 활성만을 나타내는 경우가 있다.¹¹⁾

효소적 갈변 현상은 식물체의 색깔, 맛, 향기, 영양가에 유해한 변화를 가져온다고 보고되었다. 효소적 갈변을 막기 위한 많은 방법이 연구되었다. 즉, 갈변 효소인 PPO의 열 변성, 환원제의 첨가, pH 조절, 냉동 처리, 그리고 gibberellic acid(GA)와 ethephon과 같은 식물 성장 조절자의 첨가로 갈변 현상이 저해된다고 보고된 바 있다.⁵⁾

지금까지 PPO에 관한 많은 연구 결과가 보고되었고^{6~11)} 최근에는 protein fractionation이 효소 연구에 도입되면서 PPO의 isozyme에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며¹²⁾ PPO의 작용 기전과 multiple form, 효소 내의 copper의 기능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.^{13~15)} 그러나 PPO 내의 copper는 추출, 정제과정에서 쉽게 소실되어 그 기능과 효소 내에 있는 정확한 양을 결정하는 데는 어려움이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ mushroom PPO는 *o*-dihydroxyphenol을 *o*-quinones으로 산화시키는 동안 비가역적으로 불활성화되는데 이 과정에서 효소에 결합된 copper가 유리되는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 많은 식물체로부터 얻은 PPO는 multiple form 또는 isozyme 형태로 존재하는 경우가 많으며 그 분자량은 매우 다양하다.¹⁸⁾

Montgomery와 Sgabieri는 brazilian banana PPO에서 8~10개의 isozyme을 분리하였고¹⁹⁾ Van Huynh 등은 barley의 PPO를 분리 정제하여 그 이화학적 성상을 밝혔고,^{20,21)} Takeo 등은 tea leaves의 PPO는 3개의 isozyme이 존재한다고 보고하였다.²²⁾

본 실험에 재료로 사용한 갈근(Puerariae Radix)은 오래 전부터 우리 나라에서 민간약으로 이용되었으며 오늘날에도 그 효능이 인정되어

여러 가지 의약품으로 개발되고 있다.

본 식물은 그 조직이 상처를 입었을 때 수분 안에 강한 갈색을 나타내는 것으로 보아 식물체 중에 갈변을 일으키는 효소가 존재하고 있을 것이라 추정되어 저자 등은 갈변을 일으키는 효소를 분리하고 그 이화학적 성상을 검토하여 약간의 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

실 험

시약 및 기기

Potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, sodium chloride, sodium ascorbate, ammonium sulfate, tyrosine, *m*-cresol, thiourea, cinnamic acid, ethylenediaminetetraacetic acid, potassium cyanide, sodium citrate, L-cysteine monohydrochloride는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 제품을, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, 4-methylcatechol, polyvinylpyrrolidone, (+)-catechin, quinic acid, 4-nitrocatechol, *o*-nitrophenol Sigma Chemical Co. 제품을, caffeic acid, hydrocaffeic acid, protocatechuic acid, protocatechualdehyde, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid는 Fluka AG 제품을 pyrocatechin, pyrogallol은 Showa Chemical Co., Ltd. 제품을, sodium diethyldithiocarbamate는 Kanto Chemical Co., Inc. 제품을 hydroquinone, gallic acid, 1-naphthol, sodium azide, 2-mercaptoethanol은 Junsei Chemical Co., Ltd. 제품을, Sephadex G-150 (bead size 40~120 μ)은 Pharmacia Fine Chemicals Co. 제품을 사용하였으며, dialysis "sacks"(250-7 μ)는 Sigma Chemical Co. 제품을, pH meter는 Orion research digital pH milivolt meter 611을, centrifuge는 Sorvall, RC 2-B를, double-beam spectrophotometer는 Hitachi model 200-20을 사용하였다.

실험방법

실험 재료—본 실험에 사용된 갈근(Puerariae Radix)은 전라남도 승주군에 위치한 오성산에서 7월에 채취하여 냉동 보관하였다가 실험에 사용하였다.

효소의 추출 및 정제—냉동 상태의 칩 뿌리

100 g을 Waring blender에 넣고 1% NaCl과 0.25% sodium-ascorbate를 함유한 빙냉시킨 phosphate buffer (pH 6.5)를 가하여 1분간 마쇄시킨 뒤 4시간 동안 교반하면서 추출하였으며, 이 때 tween 80을 1% 가하여 비활성을 비교하였을 때 tween 80을 넣지 않았을 때와 거의 차이가 없었으므로 상기의 저해제만을 가하여 추출하였다. 이 액을 냉동 원심 분리기로 1~4°에서 4,000 rpm으로 30분간 원심 분리하였다. 상등액을 모아 dialysis sack에 넣고 polyvinylpyrrolidone을 사용하여 농축하였다.

농축액에 미세한 분말 상태로 만든 ammonium sulfate를 소량씩 가하여 70% 포화시킨 액을 15,000 rpm에서 30분간 원심 분리하고 침전을 제거한 상등액을 다시 ammonium sulfate로 80% 포화시킨 후 같은 조건에서 원심 분리하여 침전을 얻었다. 이 침전을 약 2 ml의 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5)에 용해시켜 48시간 동안 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5) 중에서 투석액을 자주 갈아 주면서 투석하였다. 투석 후 다시 12,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 불용성 물질을 제거하였다.

Sephadex G-150 gel filtration chromatography—Column (2.1×85 cm)을 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5)로 평형을 유지시킨 다음 위의 정제 과정을 통해 얻은 효소 2 ml를 gel 상층에 조심스럽게 가하고 유출 속도를 8.3 ml/hr로 하여 같은 완충액으로 용출시켰다. 유출액을 280 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 결정하였고, 효소 활성 측정법에 따라 효소 활성을 측정하였다.

단백질 정량—단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry-Folin법에 의해 측정하였다.

효소 활성 측정—효소 활성은 spectrophotometer로 420 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. Sephadex G-150 분획 중 활성이 가장 큰 분획을 효소 활성 측정의 시료로 사용하였다. 기질은 catechol 0.5 ml, 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5) 2.3 ml, 효소액 0.2 ml를 가하여 총 용량을 3 ml로 하여 40°에서 10분간 반응시킨 후 기질 산화로 인한 흡광도의 증가율을 측정하였

Puerariae Radix

1. Homogenize with 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5) containing 1% NaCl and 0.25% sodium ascorbate in a Waring blender for 1 min.
2. Centrifuge at 4,000 rpm for 30 min.

Supernatant

1. Concentrate with polyvinylpyrrolidone
2. 70% (NH₄)₂SO₄ Saturation
3. Centrifuge at 12,000 rpm. for 30 min.

Supernatant

1. 80% (NH₄)₂SO₄ Saturation
2. Centrifuge at 12,000 rpm. for 30 min.

Precipitate

1. Dissolve in 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5)
2. Dialyze against 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5)
3. Centrifuge at 12,000 rpm. for 30 min.

Supernatant

1. Chromatography on Sephadex G-150 column

Purified Enzyme

Scheme 1. Purification steps of the Puerariae Radix enzyme.

다. 효소 활성 1단위는 420 nm에서 1분간 흡광도 0.001을 변화시키는 효소량으로 정하였다.

최적 온도—효소 활성에 미치는 온도의 영향을 관찰하기 위해 pyrocatechol (10⁻²M) 0.5 ml를 기질로 하여 phosphate buffer (pH 6.5) 2.3 ml, 효소액 0.2 ml를 가해 총 3 ml로 하여 반응 온도를 15~60°까지 변화해 가면서 10분간 반응시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

열에 대한 안정성—모든 조건은 최적 온도 때와 동일한 방법으로 하고 50~70°까지 주어진 온도에서 3분에서 40분까지 5분 간격으로 흡광도를 측정하여 효소에 대한 안정성을 검토하였다.

최적 pH—모든 조건을 최적 온도 때와 동일한 방법으로 하고 반응액의 pH를 5.0~8.0까지 0.5간격으로 변화시켜 가면서 40°에서 각각 10분간 반응시켜 효소 활성을 측정하였다.

기질 농도의 영향—기질로서 pyrocatechin과 pyrogallol을 사용하였으며 기질 농도의 범위는

pyrocatechin은 $10^{-1}M \sim 3 \times 10^{-3}M$, pyrogallol은 $3 \times 10^{-2} \sim 10^{-3}M$ 까지 변화시키면서 효소 활성 측정 때와 같은 방법으로 측정하여 반응 속도의 변화를 관찰하여 Lineweaver Burk plots로 K_m 치를 결정하였다.

기질 특이성—기질로서 monophenols (tyrosine, 1-naphthol, *p*-coumaric acid, feruric acid, *m*-cresol, cinnamic acid), diphenols (catechol, (+)-catechin, L-dopa, epinephrine, 4-methyl catechol, chlorogenic acid, hydrocaffeic acid, caffeic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde), *m*-diphenol (resorcinol), *p*-diphenol (hydroquinone), polyphenols (pyrogallol, gallic acid, quinic acid)를 사용하여 효소에 대한 기질 특이성을 검토하였다.

물에 대한 용해도가 썩 좋지 않은 (+)-catechin, DOPA, caffeic acid 등은 1% ethanol 수용액에 용해하였다.

위의 각 기질의 농도를 $10^{-2}M$ 로 하여 pH 6.5, 40° 에서 10분간 반응시켜 효소활성을 측정하였다.

저해제의 영향—효소의 활성에 미치는 저해제의 영향을 관찰하기 위하여 저해제로서 reducing agents (ascorbic acid, cysteine, 2-mercaptoeth-

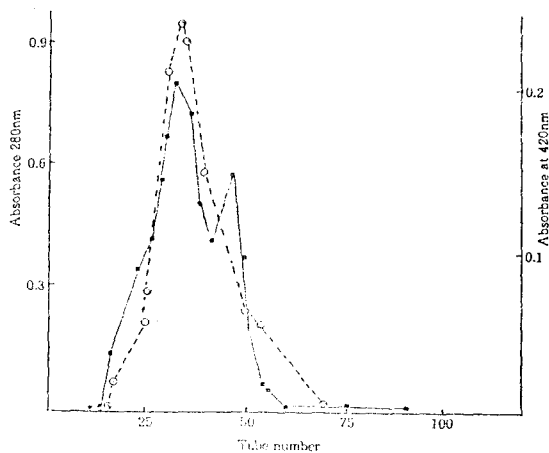


Fig. 1. Chromatography on Sephadex G-150 column of the Puerariae Radix. Polyphenol oxidase was eluted with 0.05 M phosphate buffer at pH 6.5 (flow rate 8.3 ml/hr).
—■— protein ····· enzyme activity.

anol, potassium metabisulfite) metal chelators (potassium cyanide, sodium, diethyldithiocarbamate, thiourea, sodium azide, EDTA), 산화가 거의 되지 않는 phenol성 화합물 (4-nitrocatechol, *o*-nitrophenol, 3,4-dihydroxybenzoic acid) 및 기타 화합물 (polyvinylpyrrolidone, sodium chloride) 등이 효소 활성을 저해하는 정도를 측정하였다.

2가 양이온의 영향—PPO에 대한 2가 양이온의 영향을 관찰하기 위하여 Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} 등을 사용하여 다음과 같은 농도 ($2 \times 10^{-3}M$, $1 \times 10^{-3}M$, $0.25 \times 10^{-3}M$, $10^{-4}M$)에서 효소 활성을 측정하였다. 기질로는 pyrogallol ($10^{-2}M$)을 사용하였다.

실험결과 및 고찰

효소의 추출 및 정제

1% sodium chloride와 0.25% sodium ascorbate를 함유한 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5)로 추출하여 원심 분리한 후 얻은 조효소를 농축하여 고체 ammonium sulfate 70~80%로 분획시켜 얻은 효소액의 specific activity는 15배로 증가하였으며 그 결과는 Table I에 나타난 바와 같다.

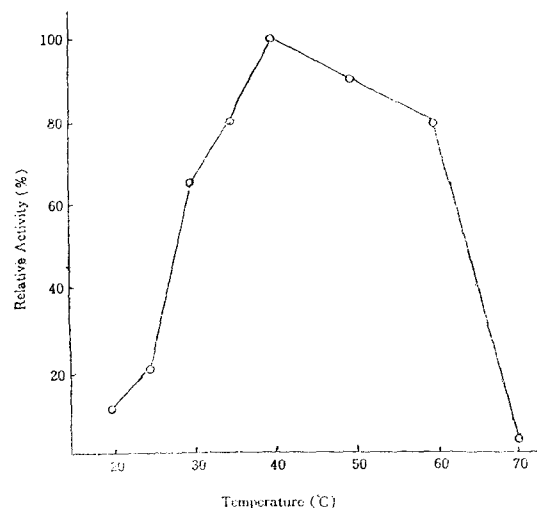


Fig. 2. Effect of temperature on enzyme activity. The Enzyme activity as a function of temperature was determined with $10^{-2}M$ catechol as the substrate in phosphate buffer at pH 6.5 at various temperature from 20° to 70° .

Table I. Purification of the Puerariae Radix enzyme

Purification procedure	Enzyme activity (units*/ml)	Protein content (mg/ml)	Specific activity (units*/mg)	Purification (fold)
Crude extract	1060	5.9	180	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 70% satu.	370	0.15	2467	14
(NH ₄) ₂ SO ₄ 80% satu.	130	0.05	2600	15
Sephadex G-150	100	0.01	10000	56.7

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

△ The crude extract was prepared by homogenizing Puerariae Radix with phosphate buffer containing inhibitors.

(NH₄)₂SO₄ 포화한 결과 80% 포화시킨 분획의 specific activity가 Table II에 나타난 바와 같이 가장 컸으므로 70% 포화시킨 침전을 제거한 후 80% 포화시킨 분획을 모아 Sephadex G-150 column으로 chromatography를 실시하였다.

Sephadex G-150 column chromatography

Fig. 1은 ammonium sulfate로 70~80% 분획한 후 Sephadex G-150 column chromatography로 gel filtration한 결과이다.

단백질은 280 nm에서, 효소 활성은 420 nm에서, 각각 측정하였다. 단백질 함량이 큰 fraction에서 효소 활성도 컸으며, 이 때 specific activity는 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 조 효소에 비해 56배 증가하였다.

최적 온도 및 열 안정성

Fig. 2에서와 같이 Puerariae Radix PPO의 최적 반응 온도는 40°이다. 40°에서 40분 경과 후

Table II. Fractionation of the Puerariae Radix enzyme by solid ammonium sulfate

(NH ₄) ₂ SO ₄ saturation (%)	Enzyme* activity (units/ml)	Protein content (mg/ml)	Specific activity (units/mg)
30	119	0.5	238
40	72	0.3	240
50	52	0.09	577.8
60	47	0.06	783.3
70	50	0.05	1000
80	24	0.01	2400
90	17	0.008	2125

* Enzyme activity at pH 6.5 using 10⁻² M catechol as a substrate. (0.001 change in absorbance at 420 nm/min=1 unit activity).

효소의 활성은 가장 높았으며, 80분 방치했을 때 75.6%의 활성이 남아 있었다. Fig. 3은 본 효소의 온도에 대한 안정성을 나타낸 것이다. 50°, pH 6.5에서 본 효소를 20분 방치 후에도 효소 활성의 80%가 유지되었으며 50°에서 반감기는 32분으로 나타났다. 60°에서는 10분이 경과한 후 36%의 활성이 남아 있었고 65°에서 10분 경과 후에는 약 10%의 활성만이 남아 있었다. 70°에서는 5분이 지난 후에 활성이 거의 소실되었다.

Benjamin 등은 cherry polyphenol oxidase는 75°에서 그 활성의 20%가 남아 있었고, Hasegawa 등²³⁾은 dates PPO는 61°에서 그 활성에 아무런 영향이 없었고 67°에서는 본래 활성의 50%가 감소되었고 80°에서는 100%가 소실되었다고 보고하였다. Smith 등²⁴⁾은 table beets PPO

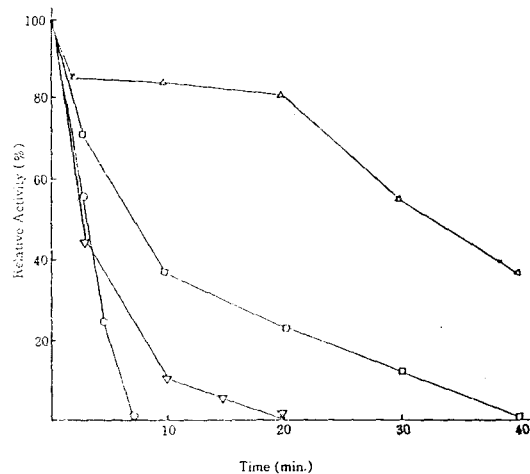


Fig. 3. Residual activity of the Puerariae Radix PPO after various incubation time at different temperatures. —△— 50°, —□— 60°, —▽— 65°, —○— 70°.

의 최적 온도가 25°이며 60°에서 9.1분 동안 방치한 후 50%의 활성이 소실됐고 70°에서는 6.8분, 90°에서는 2.6분 후 50%의 활성이 소실되었다고 보고한 바 있다. Takeo 등²⁵⁾은 tea leaf PPO의 최적 온도는 35°라고 하였다. 위에서 본 바와 같이 PPO는 각각 그 식물 중에 따라 최적 온도와 열 안정성이 조금씩 다르다는 것을 알 수 있으며 같은 종의 효소는 비교적 열에 안정하다는 것을 알 수 있다.

최적 pH

Fig. 4는 Puerariae Radix PPO 활성의 최적 pH를 나타낸 것이다. pH 6.5에서 최대 PPO의 활성을 나타내었으며 pH 6 이하에서는 활성이 급격히 감소되었다.

Cryptococcus neoformans PPO와 peaches PPO의 pH는 모두 6.5^{26,27)} table beet PPO pH는 7.0²⁴⁾ barley PPO pH는 6.5~7.5로 보고되었다.²¹⁾ 또한, Mango PPO의 pH는 5.6~6.5,²⁸⁾ cling peaches PPO의 최적 pH는 6.2이며²⁹⁾ Cacao PPO의 최적 pH는 6.0이다.³⁰⁾

위의 같은 최적 pH는 다른 식물 중의 최적 pH와 유사함을 알 수 있다.

기질 농도의 영향

Fig. 5는 Km치를 Lineweaver—Burk plot로 나타낸 것이다. catechol과 pyrogallol을 기질로 사용하여 Puerariae Radix PPO에 대한 Michaelis

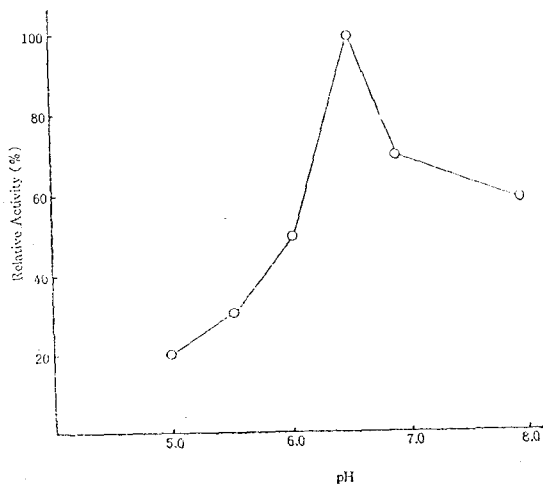


Fig. 4. Effect of pH on 10⁻² M catechol oxidation catalysed by the Puerariae Radix PPO.

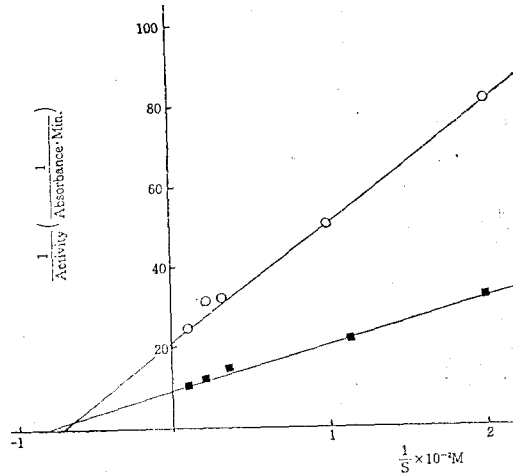


Fig. 5. Double reciprocal plots for the Puerariae Radix PPO.

Substrate: catechol —○—, pyrogallol —■—
 Buffer: 0.05 M phosphate (pH 6.5) enzyme 0.2 ml in 3 ml reaction mixture.
 Temperature: 40±0.5°.
 Km value: catechol 1.3×10⁻² M, pyrogallol 1.16×10⁻² M.

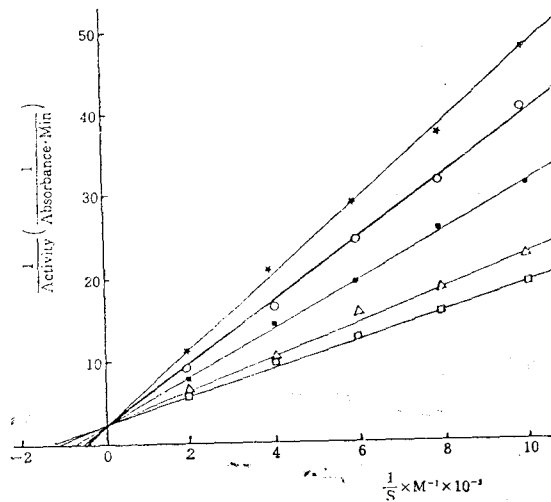


Fig. 6. Double reciprocal plots showing inhibition of the Puerariae Radix PPO catalysis of pyrogallol oxidation by various inhibitors.

—□— no inhibitor,
 —○— 2-mercaptoethanol 10⁻⁶ M,
 —■— cysteine 10⁻⁵ M,
 —△— potassium cyanide 5×10⁻⁷ M,
 —★— 4-nitrocatechol 5×10⁻⁶ M.
 Ki value: cysteine 4.3×10⁻⁵ M,
 4-nitrocatechol 6.9×10⁻⁶ M,
 potassium cyanide 6.4×10⁻⁷ M,
 2-mercaptoethanol 0.73×10⁻⁶ M.

constants(Km)를 구하였다. 본 실험에서 얻은 효소의 catechol에 대한 Km치는 1.3×10^{-2} M, pyrogallol에 대한 Km치는 1.16×10^{-2} M이다. Barley PPO의 Km치는 *p*-cresol이 4.5×10^{-3} M, catechol 2.2×10^{-2} M이고²⁰⁾ Yam tuber PPO는 pyrogallol이 6.3×10^{-3} M,³¹⁾ apple의 Km 치는 caffeic acid 0.2×10^{-3} M, chlorogenic acid 5.9×10^{-3} M, 4-methyl catechol 3.2×10^{-3} M,³²⁾ carrot callus PPO는 pyrocatechol 0.22×10^{-2} M, chlorogenic acid 0.80×10^{-4} M로 보고하고 있다.³³⁾

기질 특이성

본 실험에 사용한 Puerariae Radix PPO의 기질 특이성에 관한 연구 결과를 Table III에 나타내었다. pyrogallol을 기질로 사용했을 때 가장 산화가 많이 된 것으로 나타났는데, 이것은 royal ann cherries와 비슷한 현상이다³⁴⁾. 또한 catechol, caffeic acid, L-dopa에서도 비교적 높은 활성을 나타냈으며 (+)-catechin, 4-methylcatechol, chlorogenic acid 등에서는 활성이 적었고 *m*-cresol, tyrosine, resorcinol 등에 대한 활성은 없었다. Niagara grape와 Ravat 51의 PPO는 pyrogallol에 대하여 높은 친화력을 가진다고 보고되었다.³⁵⁾ Tea leaves에서 분리한 효소는 quinol과 *p*-phenylenediamine, pyrogallol를 산화한다고 하였다.²²⁾ 또한, 동물 조직안의 catechol oxidase는 tyrosine과 dopa에 비교적 높은 특이성을 갖는 반면 fungal과 고등식물은 mono-와 *o*-diphenols의 넓은 범위에 걸쳐 작용한다고 보고된 바 있다.³⁶⁾ Mango peel의 PPO는 catechin, epicatechin, catechol에 대해서는 활성이 컸으나 hydroquinone, tyrosine, *p*-coumaric acid 등에는 활성이 없는 것으로 보고되었다. *Papaver somniferum* PPO는 catechol과 pyrogallol에 대해 기질 특이성이 높았으며 monophenols 쪽으로는 활성이 없었다.³⁷⁾ Wheat의 *o*-diphenolase는 4-methyl catechol과 epicatechin에 활성이 매우 컸고 dopa와 protocatechuic acid, phenylalanine에는 중간 정도의 활성이 나타났으며 caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-hydroxycinnamic acid에는 활성이 작았으며 tyrosine에는 활성이 없었다.³⁸⁾

Table III. Substrates specificity of Puerariae Radix enzyme

Substrate(10^{-2} M)	Relative activity(%)
Monophenols	
Tyrosine	0
1-Naphthol	2.7
<i>p</i> -Coumaric acid	0
Feruric acid	43
<i>m</i> -Cresol	0
Cinnamic acid	2.7
<i>o</i>-Diphenols	
Catechol	20
(+)-catechin	3
L-Dopa	13.8
4-Methyl catechol	8
Chlorogenic acid	5.4
Hydrocaffeic acid	1.4
Caffeic acid	16.2
Epinephrine	0
3,4-Dihydroxybenzoic acid	0
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	1.4
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	0.2
<i>m</i>-Diphenol	
Resorcinol	0
<i>p</i>-Diphenol	
Hydroquinone	1
Polyphenols	
Pyrogallol	100
Gallic acid	2.7
Quinic acid	0

Activities are expressed relative to pyrogallol, which is taken as 100.

저해제의 영향

Puerariae Radix PPO에 대한 각종 저해제의 영향을 Table IV와 V에 나타냈다. 기질로는 catechol과 pyrogallol를 사용하였다. Reducing reagent인 ascorbic acid, cysteine, 2-mercaptoethanol, potassium metabisulfite, 그리고 metal chelating reagent인 potassium cyanide, sodium diethyldithiocarbamate는 10^{-3} M에서 완전히 효소 활성을 저해하였으며 phenolic compounds인 4-nitrocatechol, *o*-nitrophenol도 비교적 높은

Table IV. Effect of various inhibitors on Puerariae Radix enzyme activity

Inhibitors	% Inhibition at (M)				
	10 ⁻²	5×10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Reducing agents:					
Ascorbic acid	—	—	100	86.5	84
Cysteine	—	100	81	69	68
2-Mercaptoethanol	—	—	100	94	92
Potassium metabisulfite	—	—	100	90	85
Metal chelators:					
Potassium cyanide	—	—	100	81.3	55
Sodium diethyldithiocarbamate	—	—	100	94	76
Thiourea	81	77	69	54	23
Sodium azide	43	36	0	—	—
EDTA	13	0	—	—	—
Phenolic compounds:					
4-Nitrocatechol	—	100	86	73	64
<i>o</i> -Nitrophenol	—	100	77	69	46
3,4-Dihydroxybenzoic acid	21	18	6	0	—
Miscellaneous compound:					
Polyvinylpyrrolidone	100	62.5	38	25	12
Sodium chloride	24	12	0	—	—

Catechol was used as a substrate (10⁻² M).

저해 작용을 나타냈다. 그러나 EDTA, sodium chloride 등은 약한 저해 작용을 나타냈을 뿐이다.

Cryptococcus neoformans PPO는 mercaptoethanol, tetrahydrofolic acid, phenylthiourea와 같은 reducing agents에 의해 90% 이상 억제되었다.²⁵⁾ *Papaver somniferum* PPO는 sodium cyanide, β-mercaptoethanol 등에 의해서 저해되었다고 보고하고 있으며³⁶⁾ 그 밖에 -SH 화합물과 reducing agents에 의한 억제작용도 많이 보고된 바 있다.³⁹⁾

White Yam Tuber PPO는 L-cysteine, sodium diethyldithiocarbamate, sodium metabisulfite, dithiothreitol, 2-mercaptoethanol, L-ascorbate 등을 저해제로 사용했을 때는 1mM에서도 효소 활성이 완전히 저해된다고 보고되었다.⁴⁰⁾

Cling peach,²⁴⁾ egg plant,⁴¹⁾ yam tuber,⁴²⁾ *solanum melongena*⁴³⁾ 등에서 분리한 PPO에 대

Table V. Effect of various inhibitors on Puerariae Radix enzyme activity

Inhibitors	% Inhibition at (M)				
	10 ⁻²	5×10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Reducing agents:					
Ascorbic acid	—	—	100	93	80
Cysteine	—	100	91	89	80
2-Mercaptoethanol	—	—	—	100	98
Potassium metabisulfite	—	—	—	100	94
Metal chelators:					
Potassium cyanide	—	—	100	92	85
Sodium diethyldithiocarbamate	—	—	—	100	64
Thiourea	86	70	35	26	15
Sodium azide	35	12	0	—	—
EDTA	17	—	—	—	—
Phenolic compounds:					
4-Nitrocatechol	100	96	85	70	53
<i>o</i> -Nitrophenol	—	100	83	82	50
3,4-Dihydroxybenzoic acid	28	21	18	9	0
Miscellaneous compound:					
Sodium chloride	13	8	0	—	—

Enzyme 0.2 ml was pre-incubated with a mixture of inhibitors and 0.05 M phosphate buffer pH 6.5 for 2 min at 40°.

Reaction was started by addition of the substrate (pyrogallol, 10⁻² M).

해서 고농도의 EDTA를 사용했으나 그 저해력이 별로 크지 않다고 보고되었다. 이러한 결과는 반응액의 pH가 PPO 중의 copper와 EDTA 사이의 친화력에 영향을 미치는 것으로 추정하고 있다.

Reducing agents인 cysteine, 2-mercaptoethanol과 metal chelating compounds인 potassium cyanide, 4-nitrocatechol에 의한 PPO의 활성 저하를 추정하여 Lineweaver-Burk식에 따라 나타낸 결과는 Fig. 6과 같다. 위의 저해제들은 pyrogallol을 사용했을 때 PPO에 대해 경쟁적 저해를 나타냈으며, 각각의 Ki치는 4.3×10⁻⁵ M, 0.73×10⁻⁶ M, 6.4×10⁻⁷ M, 6.9×10⁻⁶ M이었다.

Steep Barley PPO는 4-nitrocatechol에 의해서 경쟁적으로 억제되며 Ki치는 6.5×10⁻³ M이다. 그리고 sodium cyanide는 non-competitive inhibitor이다.²⁰⁾

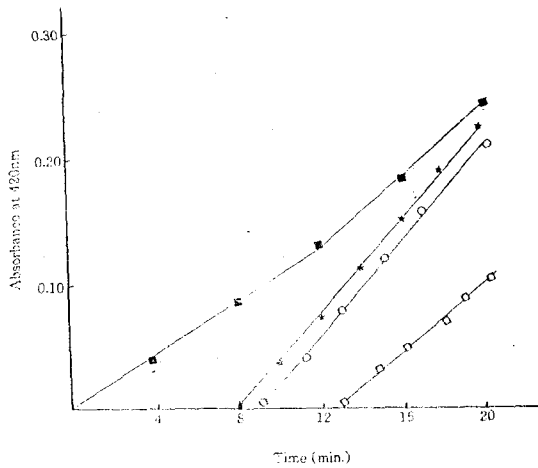


Fig. 7. Effect of sodium diethyldithiocarbamate on *Puerariae Radix* PPO activity. Substrate: 10^{-2} M pyrogallol; BF: 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.5). Enzyme: 0.2 ml in 3 ml reaction mixture, Temp: $25 \pm 0.5^\circ$.
 ■: Control SDDC ★: 5×10^{-5} M
 ○: 6×10^{-5} M □: 8×10^{-5} M

White yam tuber PPO에 대한 cysteine, 2-mercaptoethanol, potassium cyanide의 작용이 경쟁적 저해로 나타났다.⁴⁴⁾

Fig. 7과 8은 sodium diethyldithiocarbamate (SDDC)의 PPO에 대한 작용을 실험한 결과이다. SDDC는 copper chelating agents로써 Reyes와 Luh는 SDDC가 free-stone peaches의 PPO를 강하게 저해할 뿐 아니라 iron containing enzyme인 peroxidase의 활성도 저해한다고 보고하였다.⁴⁵⁾

Fig. 7은 PPO에 의한 갈변 현상은 얼마간의 잠복기가 있음을 보여 준다. 이러한 현상은 enzyme oxidation의 산물로 인한 갈변이 SDDC에 의해서 일시적으로 억제된 것으로 보이며 SDDC 소실 후에는 기질의 산화로 인한 갈변이 계속됨을 보여준다.

Fig. 8은 SDDC는 농도가 8×10^{-5} M일 때 약 9분의 잠복기가 있는 후 갈변이 나타나며 다시 8×10^{-5} M씩 더 넣었을 때 흡광도가 떨어지나 약 10분만에 원래의 상태로 회복됨을 보여준 이 결과로써 작용 기전은 확실히 알 수 없으

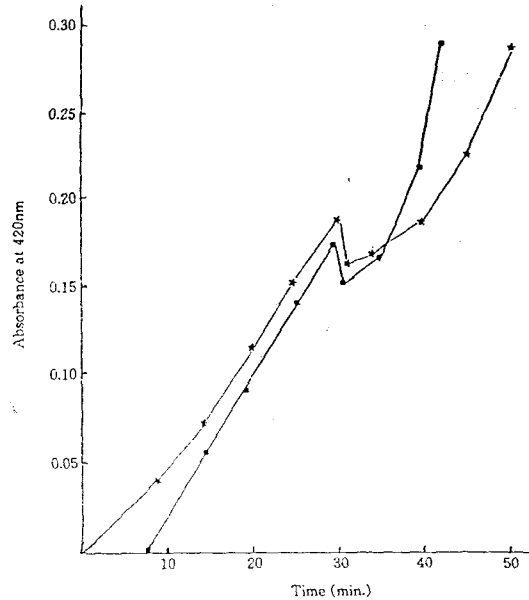


Fig. 8. Effect of SDDC on *Puerariae Radix* PPO activity.
 ★: Control SDDC added to the reaction mixture at 30 min. to make solution 8×10^{-5} M.
 ■: The reaction mixture containing 8×10^{-5} M SDDC was allowed to incubate for 30 min. Additional SDDC then added as in control. Substrate; 10^{-2} M pyrogallol. BF: 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5).

나 SDDC가 반응액을 일시적으로 decolorization 시킨다는 연구 보고와 유사함을 알 수 있다.²⁹⁾

N.D. Benjamin는 M.W. Montgomery는 royal ann cherries의 PPO에서 sodium diethyldithiocarbamate(SDDC), dithiothreitol, potassium metabisulfite가 반응 시작을 2~5분까지 지연시킨다고 보고하였다.³⁴⁾

2가 양이온의 영향

본 효소의 활성에 영향을 미치는 2가 양이온의 영향을 Table VI에 나타내었다. Cu^{2+} 이온의 첨가는 PPO의 활성을 강하게 증가시켰으며 Mn^{+2} , Co^{+2} 도 얼마간 PPO의 활성을 촉진시켰다. Ni^{+2} 는 거의 영향을 미치지 않았고 Zn^{+2} , Mg^{+2} 은 저해 작용을 나타내었다.

Vincent 등²⁵⁾은 *cryptococcus neoformans*에서 Cu^{2+} 와 Fe^{2+} 가 phenol oxidase activity를 증가시

Table VI. Effect of divalent cations on the Puerariae Radix enzyme activity

Metals	Relative ratio (%) at			
	10 ⁻⁴ M	0.25×10 ⁻³ M	1×10 ⁻³ M	2×10 ⁻³ M
None	100	100	100	100
Cu ⁺²	170	175	208	475
Mn ⁺²	100	147	188	—
Co ⁺²	100	169	156	81
Ni ⁺²	100	97	85	82
Zn ⁺²	75	46	38	—
Mg ⁺²	82	79	74	74

Activity was determined at 420 nm after reaction for 5 min. at 40±0.5° and pH 6.5 with pyrogallol (0.01 M) as a substrate.

킨다고 보고하였다.

Root forming carrot callus tissues로부터 추출한 PPO에 대해서 Cu⁺²는 강한 활성촉진 작용을 나타냈으며 Co⁺², Mn⁺²에 의한 효소 활성 증가는 약하다고 보고되었다.⁴⁶⁾

2가 양이온에 대해 본 효소는 위와 같이 다른 식물의 경우와 비슷한 결과를 나타냄을 알 수 있다.

이상의 실험결과를 종합, 고찰하여 볼 때 Puerariae Radix 중에도 갈변을 일으키는 polyphenol oxidase가 존재하고 있다는 것을 알 수 있다.

결 론

한국산 갈근에서 분리 정제한 PPO는 최적 반응 온도가 40°였으며 pH 6.5에서 활성이 가장 컸다. 친화력이 가장 높은 기질은 pyrogallol이었으며 catechol과 pyrogallol에 대한 Km치는 각각 1.3×10⁻² M, 1.16×10⁻² M이다. 여러 가지 저해제 중 reducing agents에 의한 저해가 높았으며 mercaptoethanol, cysteine, 4-nitrocatechol, potassium cyanide는 효소 활성을 경쟁적으로 저해하였으며 각각의 Ki치는 4.3×10⁻⁵ M, 0.73×10⁻⁶ M, 6.9×10⁻⁶ M, 6.4×10⁻⁷ M이었다. 2가 양이온 중 Cu²⁺는 PPO에 대해 강한 activator로써 작용하였으며 Mn²⁺와 Co²⁺도 얼마간 활성을 촉진시켰다. Zn²⁺, Mn²⁺는 저해 작용을 나타냈

다. Copper chelating agents로 잘 알려진 sodium diethyldithiocarbamate는 PPO에 의해 생성된 갈변 현상을 일시적으로 감소시켰다.

(1991년 5월 7일 접수 : 5월 30일 수리)

문 헌

1. Mayer, A.M. and Harel, E.: *Phytochem.* 18, 193 (1979).
2. Wichers, H.J., Peetsma, G.J., Malingre, T.M. and Huizing, H.J.: *Planta* 162, 334 (1984).
3. Kertesz, D. and Zito, R.: in *Oxygenases* Academic Press, New York, 307 (1962).
4. Varda Kahn: *Phytochem.* 22, 2155 (1983).
5. A.T. Paulson, J. Vanderstoep and S.W. Porritt: *J. Food Sci.* 45, 341 (1980).
6. Palmer, J.K.: *Plant Physiol.* 38, 508 (1963).
7. Montgomery, M.W. and Sgarbieri, V.C.: *Phytochem.* 14, 1245 (1975).
8. Patil, S.S. and Zucker, M.: *J. Biol. Chem.* 240, 3839 (1965).
9. Matheis, G. and Belitz, H.D.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 163, 186 (1977).
10. Wong, T.C., Luh, B.S. and Whitaker, J.R.: *Plant Physiol.* 48, 19 (1971).
11. Park, Y.K., Sato, H.H., Almeida, T.D. and Moretti, R.H.: *J. Food Sci.* 45, 1619 (1980).
12. F.S. Interesse, Pacifico Ruggiero, Gerolmina D'Avella and Francesco Lamparelli: *Phytochem.* 22, 1885 (1983).
13. Vanneste, W.H. and Zuberbühler, A.: in *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation* Academic Press, New York, 371 (1974).
14. Thomas, P. and Javane, M.T.: *J. Food Sci.* 51, 384 (1986).
15. Holwerda, R.A., Wherland, S. and Gray, H.B.: *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 5, 363 (1976).
16. Duckworth, H.W. and Coleman, J.E.: *J. Biol. Chem.* 245, 1611 (1970).
17. Avigolan-Goldhirsh and Whitaker, J.R.: *J. Mol. Cata.* 32, 141 (1985).
18. Prabha, T.N. and Patwardhan, M.V.: *J. Bio. Sci.* 4, 69 (1982).
19. Maria, A.M., Galeazzi, Valemiro, C., Sgabieri

- Spiros, M. and Constantinides: *J. Food Sci.* 46 (1981).
20. Van Huynh, N. and Jeramanis, J.: *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* 35, 153 (1977).
21. Van Huynh, N. and Jeramanis, J.: *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* 36, 18 (1978).
22. Takeo, T. and Uritari, I.: *Agr. Biol. Chem.* 30, 155 (1966).
23. Hasegawa, M.: *J. Agric. Food Chem.* 28, 5 (1980).
24. Lee, C.Y. and Smith, N.L.: *J. Food Sci.* 44, 1 (1979).
25. Tadakazu Takeo and Ikuzo Uritani: *Agr. Biol. Chem.* 30, 15 (1966).
26. Itzhack Polacheck, Vincent J. Hearing, and Kyung J. Kwonchung: *J. Bacterio.* 3, 1212 (1982).
27. Rakesh, C.S. and Rashid Ali: *Phytochem.* 19, 1597 (1980).
28. Park, Y.K., Helia H.S., Tania D.A. and Roberto H.M.: *J. Food Sci.* 44, 1619 (1980).
29. Luh, B.S. and Phithakpol, B.: *J. Food Sci.* 37, 264 (1972).
30. Quesnel, V.C. and Jugmohansingh, K.: *J. Sci. Fd. Agr.* 21, 537 (1970).
31. Anosike, E.O. and Ayaebene, A.O.: *Phytochem.* 20, 2625 (1981).
32. Goodenough, P.W., Kessell, S., Lea, L.G.H. and Loeffler, T.: *Phytochem.* 22, 359 (1983).
33. Habaguchi, K.: *Plant Cell Physiol.* 20, 9 (1979).
34. Benjamin, N.D. and Montgomery, M.W.: *J. Food Sci.* 38, 799 (1973).
35. Wissemann, K.W. and Lee, C.Y.: *J. Food Sci.* 46, 506 (1981).
36. Alfred M.M. and Eitan Harel: *Phytochem.* 18, 193 (1979).
37. AN-Fei Hsu, Edwin, B.K. and Donald D.B.: *Plant Science Letters* 34, 315 (1984).
38. Francesco S.I., Pacifico R., Gerolmina D'Avella and Francesco L.: *J. Sci. Food Agric.* 31, 459 (1980).
39. Palmer, J.K. and Roberts, J.B.: *Science* 157, 200 (1967).
40. Christopher, O.I. and Helen, N.O.: *Phytochem.* 21, 2815 (1982).
41. Knapp, F.W.: *Florida State Hort. Soc.* 74, 256 (1961).
42. Ikediobi, C.O. and Obasuyi, H.N.: *Phytochem.* 21, 2815 (1982).
43. Sharma, R.C. and Ali, R.: *Phytochem.* 19, 1597 (1980).
44. Jolley, R.L., Jr, Robb D.A. and Mason, H.S.: *J. Biol. Chem.* 244, 1593 (1969).
45. Reyes, P. and Luh, B.S.: *J. Food Sci.* 29, 829 (1960).
46. Kazuo Habaguchi: *Plant & Cell Physiol.* 20, 9 (1979).