

들깨잎중의 폴리페놀 산화효소의 정제 및 특성

박수선 · 김안근 · 노진희 · 심미옥
숙명여자대학교 약학대학
(Received May 6, 1991)

Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from *Perillae Folium*

Soo Sun Park, An Keun Kim, Jin Hee Roh and Mi Ok Shim
College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-132, Korea

Abstract—Polyphenol oxidase (PPO) was purified from an extract of *Perillae Folium* by ammonium sulfate fractionation and sephadex G-150 gel filtration, which molecular weight estimated $65,000 \pm 1,000$ in SDS-gel electrophoresis, and pI value was 4.8. The pH and temperature optima were 6.0 and 30°C respectively. K_m values of the PPO for various phenolics derived from Lineweaver-Burk plots were 4.0×10^{-4} M, caffeic acid; 4.2×10^{-3} M, 4-methylcatechol. The inhibition by 4-nitrocatechol, potassium cyanide, cysteine, 2-mercaptoethanol was competitive with K_i values of 7.6×10^{-5} M, 7.2×10^{-5} M, 3.6×10^{-5} M, 2.2×10^{-5} M, respectively. Among the divalent cations, Cu^{2+} ion was strong activator on PPO and Zn^{2+} , Ni^{2+} ions were little effect on PPO activity. In comparing the amino acid composition of *Perillae Folium* PPO with that of wheat isozyme, grape, spinach showed similarity. But the content of glycine phenylalanine was abundant relatively.

Keywords □ *Perilla frutescens*, polyphenol oxidase, amino acid composition, substrate specificity, inhibitors, isoelectrofocusing

Polyphenol oxidase(PPO, *o*-diphenol : oxygen oxidoreductase, E.C. 1, 10, 3, 1)는 식물체가 외부적 자극이나 손상을 받았을 때 식물체 중의 phenol성 물질을 quinone으로 산화시키는 효소로 알려져 있다.¹⁻⁵⁾ PPO에 대한 최근의 연구는 효소의 작용기전과 isoenzyme^{6,7)} 효소내의 copper의 기능^{3,8)} 등에 대해 활발히 진행되고 있다. Kahn은 아미노산이 mushroom, avocado, banana 중의 PPO에 대해 저해작용을 갖는다고 하였으며⁹⁾ Thomas 등은 thin layer isoelectric focusing으로 banana PPO의 isoenzyme를 분리 확인하였고¹⁰⁾ 또한 mushroom PPO는 *o*-dihydroxyphenols를 *o*-quinones으로 산화시키는 동안 효소 중의 copper가 유리된다고 보고된 바 있다.³⁾

본 연구에서는 식물체 중의 PPO에 관한 연구의 일환으로 들깨(*Perilla frutescens* Britton)잎 중에서

PPO를 분리, 정제하여 그 효소학적 성상을 검토하여 얻은 지견을 보고하고자 한다.

실험방법

실험기기 및 시약—Hitachi double beam spectrophotometer(Model 200-20), centrifuge(sorvall RC 2-B), pH meter(Orion research digital pH millivolt meter 611), multipurpose electrophoresis kit(Korea Manhattan Co.), auto amino acid analyser(Hitachi model 835), sephadex G-150(bead size 40~120 μ), dialysis sacks(250-7 μ), pharmlalyte[®] (Sigma Co.), HPLC용 amino acid mixer standard(Ajinomoto Co.)를 사용하였으며, 본 실험에 사용한 모든 시약은 특급이다.

실험재료—본 실험에 사용한 들깨(*Perilla frutescens* Britton) 잎은 서울 근교에서 6월~8월 중에 채취하여 사용하였다.

효소추출 및 정제—신선한 *Perillae Folium* 100g을 waring blender에 넣고 빙냉시킨 0.05 M phosphate buffer(0.35 M NaCl과 0.5% sodium ascorbate 함유, pH 6.0)를 가하여 1분간 마쇄한 후 전량 2l로 하여 4시간 동안 추출하였다. 이 액을 냉동 원심분리기로 1~4°C, 6000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 polyvinyl pyrrolidone으로 농축하였다. 농축액에 고체 ammonium sulfate를 40% 포화시킨 후 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 침전을 제거한 상등액을 다시 고체 ammonium sulfate로 50% 포화시킨 후 같은 조건에서 원심분리하여 침전을 얻었다. 이 침전을 약 2 ml의 0.05 M phosphate buffer(pH 6.0)에 용해시켜 투석 후 다시 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 미리 sephadex G-150 column (2.1×85 cm)을 phosphate buffer(pH 6.0)로 평형시킨 다음 위의 정제과정을 통해 얻은 효소액 2 ml를 gel 상층에 조심스럽게 가하고 유출속도 8.3 ml/hr로 하여 각각의 fraction(volume 6 ml)을 동일 완충액으로 유출시켰다.

단백질 정량—단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry-folin법¹¹⁾으로 측정하였다.

효소활성 측정—Sephadex G-150 분획중 활성이 가장 큰 분획을 효소활성 측정의 시료로 사용하였다. 기질은 catechol(10^{-2} M) 0.5 ml, 0.05 M phosphate buffer(pH 6.0) 2.3 ml, 효소액 0.2 ml를 가해서 30°C에서 10분간 반응시킨 후 기질산화로 인한 흡광도의 증가율을 측정하였다.¹²⁾ 효소활성 1단위는 420 nm에서 1분당 흡광도 0.001을 변화시키는 효소량으로 정하였다.

최적온도 및 최적 pH—Catechol(10^{-2} M)을 기질로 하여 반응온도는 15~45°C로, 반응액의 pH는 5.0~7.5범위까지 변화시키면서 효소액을 가해 10분간 반응시킨 후 420 nm에서 효소활성을 측정하였다.

열안정성—온도를 40~70°C로 변화시키고 각각의 온도에서 3분~30분까지 방치 후 기질로써 10^{-2} M catechol을 넣고 30°C에서 10분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

기질농도의 영향—기질로써 농도를 caffeic acid 3

$\times 10^{-4}$ M~ 5×10^{-3} M, chlorogenic acid와 4-methyl catechol 5×10^{-4} M~ 3×10^{-3} M, catechol 3×10^{-3} M~ 3×10^{-2} M, pyrogallol 3×10^{-3} M~ 5×10^{-2} M까지 변화시키면서 효소활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plots에 의하여 K_m 치와 V_{max} 치를 결정하였다.

기질에 대한 특이성—기질로서 mono, di, polyhydroxy 화합물(caffeic acid, chlorogenic acid, 4-methylcatechol, catechol, pyrogallol, hydrocaffeic acid, epinephrine, protocatechualdehyde, protocatechuic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid)을 각각 10^{-3} M의 농도로 하여 효소에 대한 기질 특이성을 검토하였다.

효소저해제의 영향—효소저해제로서 reducing agents(glutathione, cysteine, potassium metabisulfite, ascorbic acid, 2-mercaptoethanol), metal chelators (potassium cyanide, sodium azide, sodium diethyldithiocarbamate) 등을 사용하였다. 이 때 기질은 catechol과 4-methylcatechol을 사용하였고, 이들 각각에 대해 저해제의 농도를 변화시키면서 저해력을 비교하였다.

Sodium dodecylsulfate(SDS) - Polyacrylamide gel electrophoresis—0.1% SDS를 포함한 10% acrylamide slab gel(17×16×0.1 cm)을 사용하여 효소를 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol이 포함된 0.125 M tris-HCl buffer(pH 6.8)에 녹여 100°C water bath 상에서 90초간 pre-incubation시킨 후 gel에 loading하였다. 전기영동은 2.5 mA/well로 약 3시간 실시하였고, electrode buffer는 0.1% SDS를 포함한 0.025 M tris-0.192 M glycine buffer(pH 8.3)를 사용하였다. 염색제로서 coomassie brilliant blue G를 사용하였으며 marker protein으로는 bovine serum albumin(66,000 dalton), egg ovalbumin(45,000 dalton), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle(36,000 dalton), trypsinogen from bovine pancreas(24,000 dalton), trypsin inhibitor from soybean(20,100 dalton)를 사용하였다.

Isoelectrofocusing—Thin layer isoelectrofocusing은 1.2% sorbitol을 포함한 0.1% agarose gel(20×20 cm, 0.5 mm thick)을 사용하였고, agarose 현탁액은 ampholyte [pH 3~10, 최종농도 6.3%(v/v)]를 포함시켜 pH gradient를 형성시켰다. Focusing은 2 mA/cm로 90분간 실시하였고, 염색제로서 coomassie bril-

Table I—Purification of *Perillae Folium* enzyme

Purification procedure	Enzyme activity (Units*/ml)	Protein content (mg/ml)	Specific activity (Units*/mg)	Purification (fold)
Crude extract**	3260	4.8	679.2	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation (40~50%)	859	0.42	2045.2	3
Sephadex G-150	633	0.02	31650.0	47

*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 *Perillae Folium* with phosphate buffer containing inhibitors.

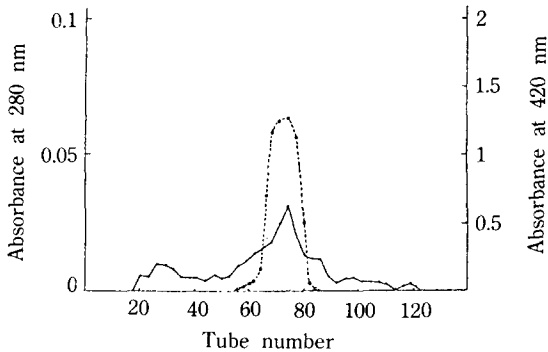


Fig. 1—Sephadex G-150 column chromatography. column size 2.1×85 cm, flow rate 8.3 ml/hr., elution, 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0)
 —○— protein peak at 280 nm
 - - -○- - enzyme activity peak at 420 nm

liant blue R-250을 사용하였다.

2가 양이온의 영향—2가 양이온으로써 Cu²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺를 사용하였으며, 기질로는 catechol(10⁻² M)을 사용하였다.

Amino acid composition—Sephadex G-150 gel-filtration chromatography에 의해 얻은 효소에 6 N-HCl을 가한 후 N₂ gas로 치환시켜 110±1°C에서 24 시간 동안 가수분해 시켰다. 이 반응액을 50~55°C에서 감압 증류시킨 후 HPLC용 증류수로 2회 반복 증류하여 완전히 건조시켜 시료로 사용했다. 따로 아미노산 혼합 표준용액(0.3 μmol/ml)을 사용하여 auto amino acid analyser로써 ninhydrin 시약을 사용하여 실험하였다.

결과 및 고찰

효소의 추출 및 정제—(NH₄)₂SO₄ 40~50% 포화 분획에서의 specific activity가 가장 컸으며, sephadex

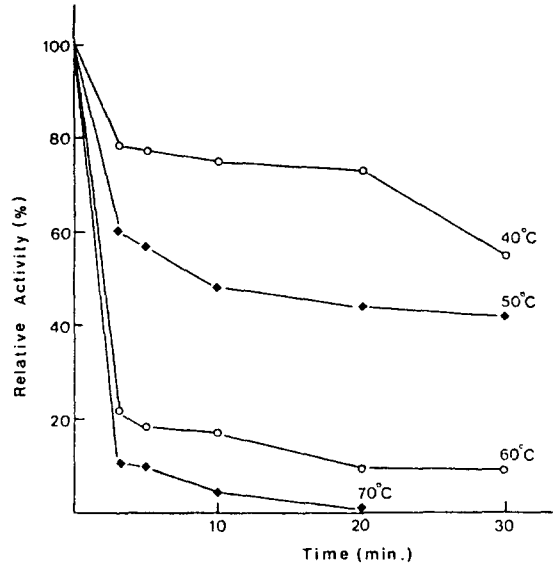


Fig. 2—Thermostability of *Perillae Folium* enzyme solutions were heated at various temperature (40-70°C) for 3-30 min.. After heating, the remaining activities were determined with catechol as substrate at pH 6.0 and 30°C.

G-150에서의 정제도는 조효소에 비해 47배 었다(Table I). 단백질은 280 nm에서 효소활성은 420 nm에서 각각 측정하였을 때 단백질 함량이 많은 분획에서 효소활성도 컸으며(Fig. 1) *Perillae Folium* PPO의 최적온도는 30°C이고 최적 pH는 6.0이며 열안정성은 40°C에서 20분 경과 후 활성이 약 78%, 50°C에서 30분 경과 후 약 42%, 60°C에서 30분 경과 후에는 약 10% 유지되었으며, 70°C에서 20분 경과 후 활성이 완전히 소실되었다(Fig. 2).

기질농도의 영향 및 기질 특이성—Phenol성 기질에 대한 *Perillae Folium* PPO의 K_m value는 caffeic acid가 가장 작았으며(Fig. 3), *o*-diphenol인 caffeic

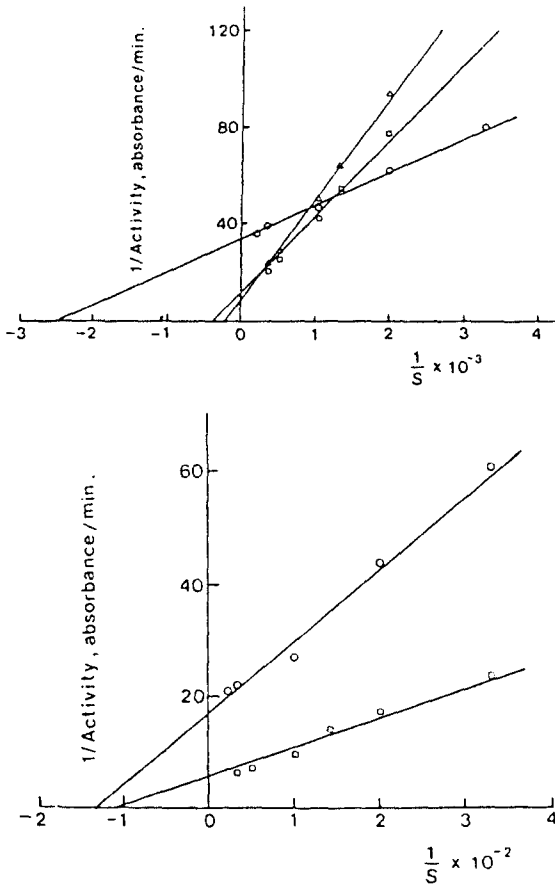


Fig. 3—Double reciprocal plots for Perillae Folium enzyme

Michaelis Menten's constant
 caffeic acid: 4.0×10^{-4} M (—○—)
 4-methylcatechol: 4.2×10^{-3} M (—□—)
 chlorogenic acid: 4.4×10^{-3} M (—△—)
 pyrogallol: 7.6×10^{-3} M (—○—)
 catechol: 8.7×10^{-3} M (—□—)

acid, catechol, 4-methylcatechol, chlorogenic acid에 대한 활성이 크게 나타났고 diphenol성 기질 중에서 4-substituted catechol에 대해서는 전혀 활성이 없었다(Table II).

저해제의 영향—여러 가지 저해제에 의한 Perillae Folium PPO 활성의 저해정도를 Table III, IV에 나타내었다. Glutathione, cysteine, potassium metabisulfite, ascorbic acid, 2-mercaptoethanol 그리고 sodium diethyldithiocarbamate는 10^{-3} M에서 효소활성을 완전히 저해하였다. 저해력 실험에 관한 데이

Table II—Substrate specificity of Perillae Folium enzyme.

Substrates (10^{-3} M)	Relative activity(%)
Caffeic acid	112
Catechol	100
4-Methylcatechol	78
Chlorogenic acid	70
Pyrogallol	33
Hydrocaffeic acid	28
Epinephrine	7.5
Protocatechualdehyde	1.9
Protocatechuic acid	1.7
Cinnamic acid	0
<i>p</i> -Coumaric acid	0
<i>m</i> -Cresol	0
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	0
Dopa	0
Ferulic acid	0
Gallic acid	0
Hydroquinone	0
1-Naphthol	0
Phenylalanine	0
<i>p</i> -Phenylenediamine	0
Quinic acid	0
Resorcinol	0
Tyrosine	0

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

타를 Lineweaver-Burk식에 따라 나타낸 결과, cysteine, 2-mercaptoethanol, potassium cyanide, 4-nitrocatechol 등은 효소활성을 경쟁적으로 저해하였다(Fig. 4).

Fig. 5, 6은 copper chelating agent인 sodium diethyldithiocarbamate(SDDC)의 Perillae Folium PPO에 대한 저해작용을 실험한 결과이다. Fig. 5는 PPO에 의한 갈변현상이 나타나는데 있어서 SDDC에 의해 잠복기(lag period)가 생김을 보여주며 SDDC의 고갈 후에는 기질의 산화로 인한 갈변현상이 계속 나타나서 흡광도가 90% 정도 회복됨을 보여주었다(Fig. 6). 이상의 실험결과에서 SDDC의 환원작용은 PPO의 갈변을 일시적으로 감소시킨다는 연구보고들과 같은 결과가 나타났다.¹³⁾

Sodium dodecylsulfate(SDS)—polyacrylamide electrophoresis—Perillae Folium PPO의 전기영동

Table III—Effect of various inhibitors on *Perillae Folium* enzyme

Inhibitor	Catechol as substrate (3×10^{-2} M)						
	% inhibition at						
	1 M	0.5 M	0.1 M	0.01 M	1 mM	0.1 mM	0.05 mM
Glutathione	—	—	—	—	100	21	11
Cysteine	—	—	—	—	100	37	18
Potassium metabisulfite	—	—	—	—	100	25	3
Ascorbic acid	—	—	—	—	100	14	6
Potassium cyanide	—	—	—	100	89	20	9
Sodium azide	—	—	100	92	35	8	0
Sodium diethyldithiocarbamate	—	—	—	—	100	29	15
Thiourea	—	—	—	100	81	19	7
2-Mercaptoethanol	—	—	—	—	100	23	9
Polyvinylpyrrolidone	—	—	—	—	53	8	0
Sodium chloride	95	84	46	25	18	9	4

Table IV—Effect of various inhibitors on *Perillae Folium* enzyme

Inhibitor	4-Methylcatechol as substrate (4×10^{-3} M)						
	% inhibition at						
	1 M	0.5 M	0.1 M	0.01 M	1 mM	0.1 mM	0.05 mM
Glutathione	—	—	—	—	100	32	13
Cysteine	—	—	—	—	100	45	12
Potassium metabisulfite	—	—	—	—	100	48	0
Ascorbic acid	—	—	—	—	100	21	10
Potassium cyanide	—	—	—	100	92	37	19
Sodium azide	—	—	100	84	29	0	0
Sodium diethyldithiocarbamate	—	—	—	—	100	68	18
Thiourea	—	—	—	100	94	40	26
2-Mercaptoethanol	—	—	—	—	100	20	5
Polyvinylpyrrolidone	—	—	—	—	100	11	6
Sodium chloride	82	73	36	22	10	7	3

분석에 의한 실험결과를 Photo 1에 나타내었고, 분자량을 측정된 결과 약 $65,000 \pm 1,000$ 이었다. 본 효소는 0.1% SDS 존재하에서는 효소활성을 상실하는 것으로 나타났다.

PPO는 서로 다른 기질 특이성과 분자량은 갖는 isozyme으로 존재함이 많은 연구보고를 통해 밝혀졌는데 Harel 등은 apple로부터 각각 30,000~40,000, 60,000~70,000, 120,000~130,000의 분자량을 갖는 3개의 isozymes을 발견했고 이들은 상호전환이 가능함을 보여주었다.¹⁴⁾ PPO의 isozymes은 association-dissociation reaction, partial denaturation, fragmentation, proteolysis, latent form의 활성화에 의해 multiple form으로 존재하는 것으로 알려지고 있다.¹⁵⁾

Isoelectrofocusing—Sephadex G-150 gel filtration

chromatography로 정제된 *Perillae Folium* PPO를 agarose gel isoelectric focusing을 실시한 결과는 Photo 2에 나타낸 바와 같다. 들깨잎을 위와 같은 방법으로 정제하여 얻은 효소는 1 band로 나타났으며 standard pH proteins의 mobility에 의한 calibration curve에 의해 측정된 isoelectric point(pI)는 4.8이었다.

Thomas와 Janave는 “dwarf carvendish” banana의 미성숙 과육으로부터 효소를 부분 정제한 것을 sephadex G-75 superfine gel isoelectric focusing을 실시한 결과 14개의 isozyme으로 분리되었으며 pI는 4~5.5였다.¹⁰⁾ 그리고 Delincee와 Radola의 연구에서 PPO와 혼재하기 쉬운 peroxidase는 주로 acidic(pI 3.2~3.5) 또는 alkaline(pI 7.3~9.3) pI값을 갖는

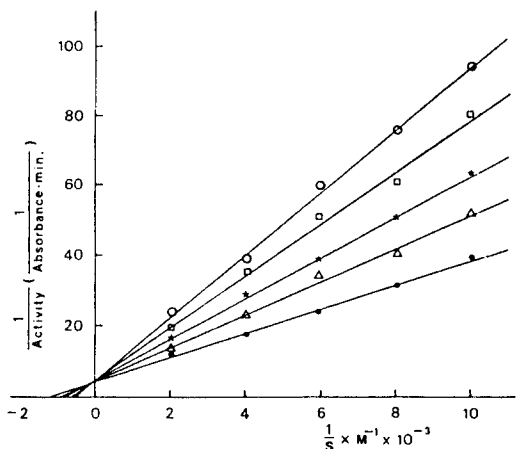


Fig. 4—Double reciprocal plots showing inhibition of the *Perillae Folium* polyphenol oxidase catalysis of catechol by various inhibitors.

—●— no inhibitor, —△— 2-mercaptoethanol(10^{-5} M), —★— potassium cyanide(5×10^{-5} M), —□— 4-nitrocatechol(10^{-4} M) —○— cysteine(5×10^{-5} M).

K_i values: 2-mercaptoethanol 2.2×10^{-5} M; potassium cyanide 7.2×10^{-5} M; 4-nitrocatechol 7.6×10^{-5} M; cysteine 3.6×10^{-5} M.

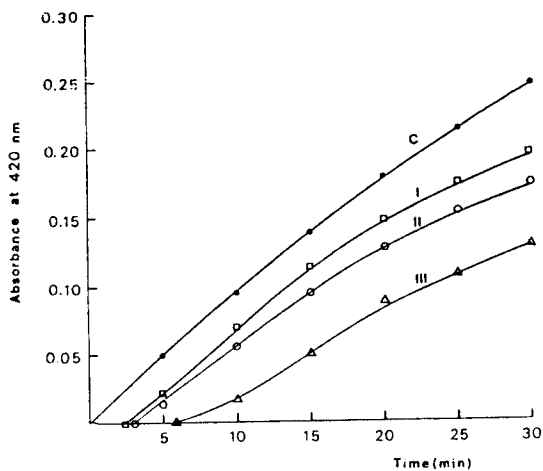


Fig. 5—Effect of sodium diethyldithiocarbamate on *Perillae Folium* PPO activity.

substrate: 10^{-2} M catechol, buffer: 0.05 M phosphate buffer pH 6.0, enzyme: 0.2 ml in 3 ml reaction mixture, temperature $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$: control contains 0 M SDDC, I: contains 5×10^{-5} M, II: contains 6×10^{-5} M, III: contains 8×10^{-5} M.

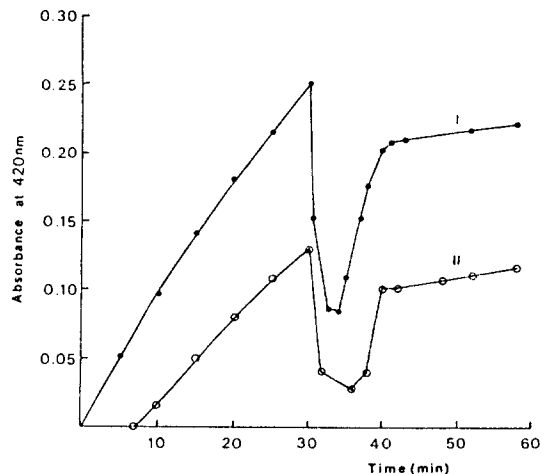


Fig. 6—Effect of sodium diethyldithiocarbamate on *Perillae Folium* enzyme activity

I-control: sodium diethyldithiocarbamate added to the reaction mixture at 30 min. to make solution 8×10^{-5} M

II-The reacting mixture containing 8×10^{-5} M sodium diethyldithiocarbamate allowed to incubate 30 min.

Additional sodium diethyldithiocarbamate then added as in control substrate: 10^{-2} M catechol, buffer: 0.05 M phosphate buffer pH 6.0.

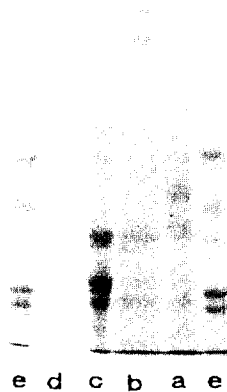


Photo 1—Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of different fractions obtained during purification of *Perillae Folium* polyphenol oxidase.

- (a) crude extract
- (b) 40% ammonium sulfate fraction
- (c) 40~50% ammonium sulfate fraction
- (d) sephadex G-150 fraction
- (e) marker proteins

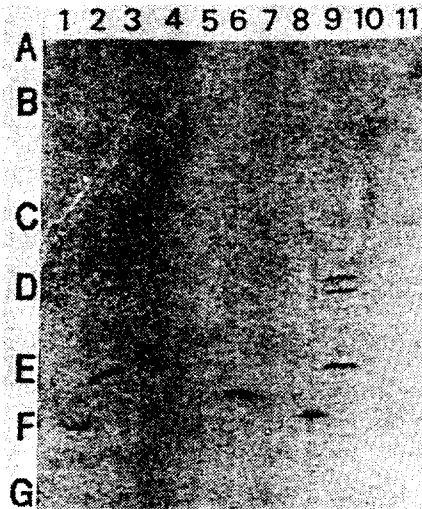


Photo 2—Thin layer isoelectrofocusing of *Perillae Folium* polyphenol oxidase on agarose containing 6.3% ampholytes (pH 3~10)
A, B, C, D, E, F, G: pH marker proteins
1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11: pH marker proteins
5, 6, 7: *Perillae Folium* polyphenol oxidase

Table V—Effect of divalent cations on the *Perillae Folium* 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}	107	135	163	—
Mn^{+2}	100	98	98	86
Ni^{+2}	99	97	95	93
Zn^{+2}	96	95	88	86
Co^{+2}	84	84	80	78
Mg^{+2}	81	78	76	71

*Activity was determined at 420 nm after reaction for 5 min at $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and pH 6.0 with catechol (0.01 M) as a substrate.

것으로 보고되었는데, 들깨잎의 PPO는 pI가 4.8로서 peroxidase가 혼재하지 않음을 알 수 있다.¹⁶⁾

2가 양이온의 영향—본 효소의 활성화에 미치는 2가 양이온의 영향에 대하여 실험한 결과, Cu^{2+} ion의 첨가는 PPO의 활성을 강하게 증가시켰으며 Ni^{2+} ion은 거의 영향을 미치지 않았다. Mn^{2+} , Zn^{2+} ion에 의해서는 2×10^{-3} 정도의 높은 농도에서 약간의 활

Table VI—Amino acid composition of *Perillae Folium* polyphenol oxidase and other plants polyphenol oxidase.⁴⁾

Amino acid	<i>Perillae Folium</i> (our result)	Wheat	Grape	Spinach beet	Potato
Lysine	4.5	5.2	4.5	4.5	5.6
Histidine	2.4	1.7	1.5	2.0	1.7
Arginine	3.7	3.5	2.8	2.5	3.3
Aspartic acid	11.9	9.4	9.8	10.3	9.2
Threonine	3.6	5.2	4.5	4.8	4.7
Serine	10.3	7.7	6.0	6.0	6.1
Glutamic acid	11.0	10.4	7.0	4.5	8.6
Proline	3.0	6.3	6.5	7.0	4.7
Glycine	12.4	8.3	5.5	6.5	6.9
Alanine	4.3	7.7	6.3	5.8	6.7
Half-cystine	2.6	1.4	0.1~0.3	1.8	1.4
Valine	4.7	5.6	4.5	6.5	5.8
Methionine	2.6	1.4	—	1.8	1.7
Isoleucine	6.4	3.5	4.3	3.5	4.7
Leucine	4.9	6.6	5.3	7.5	7.8
Tyrosine	4.2	3.5	4.5	2.0~2.3	2.8~3.1
Phenylalanine	7.5	3.5	3.0	4.3	3.9
Tryptophan	N.D.	1.0	N.D.	0.5	N.D.
MW	65,000*	115,000 ⁺	80,000 ⁺⁺	40,000*	36,000 [§]

*From SDS electrophoresis, ⁺From gel filtration, ⁺⁺From sedimentation equilibrium, [§]From amino acid values, N.D. Not detected

성저하가 나타났으며, Co^{2+} , Mg^{2+} ion은 낮은 농도에서 약한 저해작용을 하였다. 위의 결과는 root-forming carrot callus tissue로부터 추출한 PPO에 대한 Cu^{2+} ion의 강한 활성 촉진작용과는 같았으나 Co^{2+} , Mn^{2+} ion이 약하게 활성을 증가시키는 것과는 약간의 차이가 있는 것으로 나타났다.¹⁷⁾(Table V)

Cu^{2+} ion의 첨가로 인한 PPO의 활성증가는 Cu^{2+} ion이 apoenzyme의 holoenzyme으로의 전환을 촉진시키는 데 기인하는 것으로 설명되어지고 있다.⁸⁾

Amino acid composition—본 효소의 아미노산 구성과 wheat isozyme, grape, spinach beet, potato에서 추출한 PPO의 아미노산 구성과의 비교를 Table VI에 나타내었다.⁴⁾ 본 효소의 아미노산중 basic(lysine, arginine, histidine) residue와 hydrophobic(proline, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine) residue의 함량은 각각 10.6%와 26.5%였고 sulphur amino acid(cysteine, methionine)의 함량은 5.2%로 나타났다. 이것은 wheat isozyme의 basic residue 11.4%, hydrophobic residue 27.7%, sulphur amino acid 3.0%와 유사함을 보여주었다.⁴⁾ 본 효소는 glycine 함량이 다른 식물들에 비해서 약간 많았으며 그 다음으로는 aspartic acid, glutamic acid, serine 등의 순서로 양이 많게 나타났다. 그리고 여러 아미노산 중에서도 phenylalanine이 특이하게 많이 함유되어 있었다.

PPO의 아미노산 구성에 대한 다른 연구보고와 비교하면 basic amino acid의 구성비와 threonine, serine, glycine, alanine, isoleucine의 구성비에 있어서 비슷하며 sulphur amino acid의 양이 상대적으로 적게 함유되어 있는 점 등이 유사하다고 볼 수 있다.¹⁴⁾

결 론

Perillae Folium에서 분리하여 정제시킨 PPO는 최적 반응온도가 30°C이고 최적반응 pH는 6.0이며 여러 기질에 대한 K_m value는 caffeic acid 4.0×10^{-4} M, 4-methylcatechol 4.2×10^{-3} M, chlorogenic acid 4.4×10^{-3} M, pyrogallol 7.6×10^{-3} M, catechol 8.7×10^{-3} M이었다. Glutathione, cysteine, ascorbic acid, potassium metabisulfite 등은 효소활성을 크게 저해하였고, 2-mercaptoethanol, cysteine, potassium cyanide, 4-nitrocatechol은 효소활성을 경쟁적으로 저해하였으며, 각각의 K_i 치는 2.2×10^{-5} M, 3.6×10^{-5} M,

7.2×10^{-5} M, 7.6×10^{-5} M이었다.

Copper chelating agent인 sodium diethyldithiocarbamate는 PPO에 의해 생성된 갈변현상을 일시적으로 감소시키는 것으로 추정된다.

Sephadex gel-filtration으로 정제시킨 효소를 SDS-gel electrophoresis로 분자량을 측정한 결과 $65,000 \pm 1,000$ 이었고 agarose gel isoelectrofocusing에 의해 측정된 등전점(pI)은 4.8이었다.

2가 양이온 중 Cu^{2+} 는 PPO에 대해 강한 activator로서 작용하였다.

또한 아미노산의 분석결과는 다른 식물종의 PPO와 그 구성비가 유사함을 보여주었고 glycine과 phenylalanine이 상대적으로 많이 함유되어 있다.

문 헌

- 1) Goodenough, P.W., Kessell, S., Andrew, G.H. Lea and Loeffler, T.: Mono and diphenolase activity from fruit of *Malus pumila*. *Phytochemistry* **22**, 359 (1983).
- 2) Wichers, H.J., Peetsma, G.J., Malinger'e, T.M. and Huizing, H.J.: Purification and properties of phenol oxidase derived from suspension cultures of *Mucuna pruriens*. *Planta* **162**, 334(1984).
- 3) Avigolan-Goldhirsh, and Whitaker, J.R.: K_{CAT} inactivation of mushroom polyphenoloxidase. *J. Mol. Cata.* **32**, 141(1985).
- 4) Interesse, F.S., Ruggiero, P., D'Avella, G. and Lamparelli, F.: Studies on the phenolase enzymatic system in Durum wheat. *J. Agric. Food Chem.* **30**, 1199(1982).
- 5) Interesse, F.S., Ruggiero, P., D'Avella, G. and Lamparelli, F.: Characterization of wheat *o*-diphenolase isoenzyme. *Phytochemistry* **22**, 1885(1983).
- 6) Sheen, S.J.: Changes in amount of polyphenols and activity of related enzymes during growth of tobacco flower and capsule. *Plant Physiol.* **51**, 839 (1973).
- 7) Anhleton, E.L. and Flurkey, W.H.: Activation and alteration of plant and fungal polyphenoloxidase isoenzymes in sodium dodecylsulfate electrophoresis. *Phytochemistry* **23**, 2723(1984).
- 8) Kertesz, D.: *In the biochemistry of copper*, Academic Press, p.359(1966).

- 9) Kahn, V.: Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on *o*-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado and banana. *J. Food Sci.* **50**, 111(1985).
- 10) Thomas, P. and Janave, M.T.: Isoelectric focusing evidence for banana isoenzymes with mono and diphenolase activity. *J. Food Sci.* **51** (1986).
- 11) Lowry, O.H., Rosebrugh, N.J., Farr, A.L. and Randall, K.J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265(1951).
- 12) Ponting, J.D. and Joslyn, M.A.: Ascorbic acid oxidation and the browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem.* **19**, 49(1948).
- 13) Luh, B.S. and Phithakpol, B.: Characteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peaches. *J. Food Sci.* **37**, 264(1972).
- 14) Mayer, A.M. and Harel, E.: Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry* **18**, 193(1979).
- 15) Smith, D.M. and Montgomery, M.W.: Improved methods for the extraction of polyphenoloxidase from d'Anjou pears. *Phytochemistry* **24**, 901(1985).
- 16) Delincee, H. and Radola, B.J.: Detection of peroxidase by the print technique in thin layer isoelectric focusing. *Anal. Biochem.* **48**, 536(1972).
- 17) Habaguchi, K.: Purification and some properties of polyphenol oxidase from root-forming carrot callus tissue. *Plant Cell Physiol.* **20**, 9(1972).