

들깨잎 폴리페놀 산화효소의 pH 및 온도에 의한 영향

김유경* · 김안근#

숙명여자대학교 약학대학, *서울시보건환경연구원
(Received October 25, 2004; Revised December 3, 2004)

Influence of pH and Temperature on Polyphenol Oxidase in the Leaves of *Perilla frutescens* var. *japonica*

Yoo Kyung Kim* and An Keun Kim#

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

*Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Seoul 137-734, Korea

Abstract — Polyphenol oxidase-catalyzed oxidation of substrates (*t*-butylcatechol, 4-methylcatechol, chlorogenic acid, caffeic acid and pyrocatechol) were performed in the pH range 4~8. Concentrations of substrate's major oxidation products were monitored by high performance liquid chromatograph. The nature and amounts of products formed were highly pH dependent. They also were influenced by kinds of substrates. Major oxidation product of 4-methylcatechol appeared the maximum value at pH 5, them of chlorogenic acid, caffeic acid and pyrocatechol at pH 6.0 and that of *t*-butylcatechol at pH 5~7. Time-dependent PPO activity was determined at 4°C and 30°C. PPO extracted by phosphate buffer containing triton X-114 (t-PPO) was more stable than PPO by phosphate buffer (b-PPO). The result of electrophoresis, at first PPO was showed only a band at 48 kd. After 1~3 days a partial degrade band was appeared in b-PPO and three partial degrade bands in t-PPO. No activity band was appeared in PPOs at 30°C and b-PPO at 4°C after 4 days. And a band (37 kDa) in t-PPO was remained finally and disappeared. PPO from *Perilla* leaves has two activity bands at 48 and 37 kDa in previous paper. It was supposed that PPO in the leaves of *Perilla frutescens* was a protein having one molecular weight as 48 kDa. And 37 kDa protein, relatively proteolysis-resistant, was a proteolyzed form of a major form.

Keywords □ polyphenol oxidase, pH, temperature

Polyphenol oxidase(이하 PPO, EC 1.14.18.1, monophenol monooxygenase 또는 tyrosinase EC 1.10.3.2, *o*-diphenol : O₂ oxidoreductase)는 자연계에 광범위하게 분포하고 있으며 monophenol류나 diphenol류에 반응하여 *o*-quinone을 형성하고 또한 *o*-quinone은 중합반응으로 갈변반응의 특성인 갈색색소를 생성한다.^{1,2)} PPO는 구리를 함유하는 효소로서 두 가지 다른 반응을 촉매한다. Monophenol류를 가수분해하여 *o*-dihydroxyphenol류를 형성하는 반응과 이를 또 다시 산화하여 *o*-quinone을 형성하는데 이 때 분자산소를 필요로 한다.³⁾ Phenol류를 산화하는 반응은 PPO의 아미노산 서열에서 히스티딘이 풍부한 부분에 결합된 두개의 구리 원소가 관여하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾

PPO는 그 생리학적인 작용은 아직 자세히 규명되어 있지 않으나 병원체의 침입에 의해 활성화되어 숙주의 방어에 관여한다고 하며,⁵⁾ 그 기전은 세포손상에 의해 유도된 이미 생성된 PPO의 활성화, PPO 수준과 PPO m-RNA의 증가에 의한 것으로 보고 되어 있다.^{6,7)} 또한 기질에 대한 PPO의 작용은 pH의 영향을 많이 받으며, pH 4 이하의 낮은 pH에서는 일반적으로 효소는 기질과 반응하여 무색의 생성물을 형성하고 280 nm에서 검출이 가능하며, 높은 pH에서는 385~415 nm에서 황색을 띤 물질이 많이 생성된다고 한다.⁸⁾ 식물 중의 PPO는 쉽게 분해된다고 알려져 있으며, 특히 정제 후에는 분해가 더욱 잘 일어난다고 한다. 이 효소에 염화나트륨, tween 20, 에칠렌글리콜 등의 안정화제를 첨가함으로써 분해를 억제하는 효과를 나타내고 안정화제가 제거되면 자체적으로 천천히 분해된다고 한다.⁹⁾ Protease inhibitor를 사용하여 당근 중의 PPO를 정제한 경우 정제된 효소는 59,000의 분자량을 나타내었으나, 저해제가 없는 경우 더

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9561 (팩스) 02-710-9871
(E-mail) akkim@sookmyung.ac.kr

작은 분자량의 형태로 전환되었다.¹⁰⁾

최근에 PPO는 유해한 페놀성 물질의 해독,¹¹⁾ 치을 화합물을 비롯한 환경 오염 물질의 악취 제거,¹²⁾ 방향족 물질의 부위특이적 가수분해¹³⁾ 및 PPO의 효소적 갈변반응 생성물에 의한 항돌연변이 효과¹⁴⁾가 보고되어 있다.

본 실험에서는 들깨잎을 재료로 하여 식물에 광범위하게 분포되어 있는 갈변효소인 PPO를 triton X-114를 포함하는 buffer로 추출하여 부분정제한 효소를 사용하여 pH에 따른 영향을 알아보고 완충액으로만 추출한 효소와 triton X-114로 처리한 효소에 대하여 온도에 따른 영향을 검토하였다.

실험 방법

실험재료

들깨잎은 개화시기에 따른 분류로 만생중에 속하며 잎의 앞면은 녹색, 뒷면은 자색을 약간 띠며 줄기는 녹색을 띤다. 실험에 사용한 들깨잎은 동절기에 서울 근교에서 재배된 잎 중 일반적으로 식용으로 사용하는 부위를 -70°C에서 냉동시켜 보관하여 실험에 사용하였다.

시약 및 기기

시약은 ascorbic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, pyrocatechol, acrylamide, ammonium persulfate, N,N'-methylene bisacrylamide는 Sigma 제품을 사용하였으며 *t*-butylcatechol, 4-

methylcatechol, triton X-114는 특급을 사용하였다.

기기로는 초저온냉동고는 Revco-70(USA) 제품을, 자외부-가시부 분광광도계는 Bechman DU-650(Germany) 제품을, 전기영동장치는 Novex Xcell II mini-cell(USA) 제품을, 고속액체크로마토그래프는 Waters(USA) 제품을 사용하였다.

효소 추출

-70°C에 보관된 들깨잎을 미리 분쇄한 후 10 mM 아스코르빈산과 2% 염화나트륨, 3% triton X-114를 포함하는 50 mM 인산완충액(pH 6.0)을 4배량 가하여 브렌더에서 1분간 분쇄하여 3시간동안 가끔 교반한 후 8겹의 거즈로 여과하였다. 여액을 35°C에서 15분간 방치한 후 10,000×g로 상온에서 15분간 원심분리하여 상층을 취하여 효소액(t-PPO)으로 사용하였다(Fig. 1). 한편 triton X-114를 포함하지 않는 인산완충액으로 추출·여과 후 바로 원심분리하여 상층을 취하여 효소액(b-PPO)으로 사용하였다(Fig. 2).

수득율 및 정제도 측정

두 효소에 대하여 추출한 효소의 용량을 측정하고, 효소 활성과 단백질 양을 측정하여 총활성 및 비활성을 비교하여 추출방법에 따른 수득율과 정제도를 구하였다. 효소 활성 측정방법은 spectrophotometer로 400 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 5 mM *t*-butylcatechol를 포함하는 50 mM phosphate buffer(pH 6.0) 0.95 ml와 효소액 50 μl를 30°C에서 10분간 반응시키고 20%

Perillae leaves

homogenized with 4 volumes of 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) contained 10 mM ascorbic acid, 2% sodium chloride and 3% triton X-114 for 1 min
stand for 3 hr
filtered through 8 layers of gauze

Filtrate

stand for 15 min. at 35°C
centrifuged at 10,000 × g for 10 min at room temperature

Supernatant

dialyzed overnight with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)

t-PPO (partially purified PPO)

Perillae leaves

homogenized with 4 volumes of 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) contained 10 mM ascorbic acid and 2% sodium chloride for 1 min
stand for 3 hr
filtered through 8 layers of gauze

Filtrate

centrifuged at 10,000 × g for 10 min at 4°C

Supernatant

dialyzed overnight with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)

b-PPO (crude PPO)

Fig. 1 - Preparation of PPO from Perilla leaves (triton X-114).

Fig. 2 - Preparation of PPO from Perilla leaves (no triton X-114).

Table I – Condition of enzyme reaction in buffer and triton X-114 treated PPO

Item	Enzyme	Substrate (5 mM)	Buffer	Add
Effect of pH	t-PPO	<i>t</i> -butylcatechol 4-methylcatechol chlorogenic acid caffeic acid pyrocatechol	citrate (pH 4~6) phosphate (pH 5~8)	-
Time-dependent	t-PPO b-PPO	<i>t</i> -butylcatechol	phosphate (pH 6.0)	incubate at 4°C and 30°C

t-PPO : Triton X-114 treated PPO; b-PPO : Buffer treated PPO.

trichloroacetic acid 0.2 ml를 가하여 반응을 정지시킨 후 기질산화에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소활성 1단위는 400 nm에서 분당 흡광도 0.001을 변화시키는 광학밀도로 정하였다. 단백질양은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 TCA-Lowery법¹⁵⁾으로 측정하였다.

효소 반응액 조제

Table I에 의한 조건으로 5 mM 기질을 포함하는 50 mM 완충액 0.95 ml와 효소액 50 µl를 30°C에서 10분간 반응시키고 20% 삼염화초산 0.2 ml를 가하여 반응을 정지시켜서 효소 반응액을 조제하였다.

pH에 의한 영향

Triton X-114를 첨가한 완충액으로 추출한 효소에 대하여 *t*-butylcatechol, 4-methylcatechol, chlorogenic acid, caffeic acid, pyrocatechol을 기질로 하여 pH를 변화시키면서 효소 반응액을 만들고, Table II의 조건으로 분석하여 효소와 기질과의 반응산물의 양과 반응산물의 양상을 비교하였다. 그리고 동일조건으로 처리한 효소 반응액에 대해 흡광도를 측정하여 기질에 따른 활성을 비교하였다.

보존온도 및 보존시간에 의한 영향

완충액으로 추출한 효소(b-PPO)와 triton X-114를 첨가한 완

Table II – Analytical condition of HPLC in pH-dependent substrate oxidation products in partially purified PPO

Column	µ-Bondapak C ₁₈
Flow rate	0.9 ml/min
Detector	UV 290 nm, Visible 400 nm
Mobile phase	1% acetic acid : acetonitrile = 72 : 28

Table III – Total activity and purification ratio of PPO in *Perillae* leaves

Purification procedure	Enzyme activity (Units/ml)	Protein (mg/ml)	Volume (ml)	*total activity (Units)	Yield	Specific activity (Units/mg)	Purification ratio
b-PPO (crude PPO)	153±3.1	0.114±0.004	50	7,650	1	1,390	1
t-PPO (partially purified PPO)	770±13.2	0.091±0.002	13	10,010	1.3	8,460	6

*total activity = volume (ml) × enzyme activity (unit/ml).

충액으로 추출한 부분정제효소(t-PPO)에 대하여 서로 다른 온도에서 보관하여 시간에 따른 활성을 비교하였다. 30°C에서 보관하였을 때 즉시, 1, 5, 10시간, 1, 2, 4, 5일 경과 후, 4°C에 보관한 경우에는 즉시, 1, 2, 4, 10, 20일 경과 후 효소활성 측정하였다. 동일한 온도 조건에서 보관한 효소액을 즉시, 1, 2, 4, 30, 40, 50일 경과 후 SDS-PAGE를 이용하여 10 mM *t*-butylcatechol을 기질로 효소의 활성단백질 띠를 확인하여 활성을 나타내는 띠의 변화를 관찰하였다.

실험결과 및 고찰

효소 추출에 따른 수득율 및 정제도

3% Triton X-114를 포함하는 50 mM 인산완충액(pH 6.0)을 사용하여 가용성 효소와 막결합 효소를 동시에 추출하여 온도에 따른 분배로 부분정제한 효소(t-PPO)와 완충액으로만 추출한 조효소(b-PPO)를 실험에 사용하였다. Table III에서 보는 바와 같이 triton X-114를 포함하는 완충액으로 추출한 효소는 완충액으로만 추출한 효소에 비하여 26% 정도 추출액의 양이 감소하였으며, 효소활성은 5배 정도 증가하여 총활성을 비교하였을 때 수득율은 1.3배 정도 컸으며, 정제도는 약 6배 증가하였다.

pH에 의한 영향

부분정제한 효소에 대하여 pH에 의한 영향을 기질을 달리하여 UV(290 nm)와 400 nm 두 파장에서 고속액체크로마토그래프를 이용하여 검토하였다. 일반적으로 황색을 흡수하는 400 nm에서 측정된 기질산화물의 양은 4-methylcatechol의 경우에는 pH 5, caffeic acid, pyrocatechol, chlorogenic acid을 기질로 하였을 때는 pH 6에서 가장 많고 pH 7 이후 급격하게 감소하는 경향을 보인 반면, *t*-butylcatechol의 경우에는 pH 5~7에서 기질산

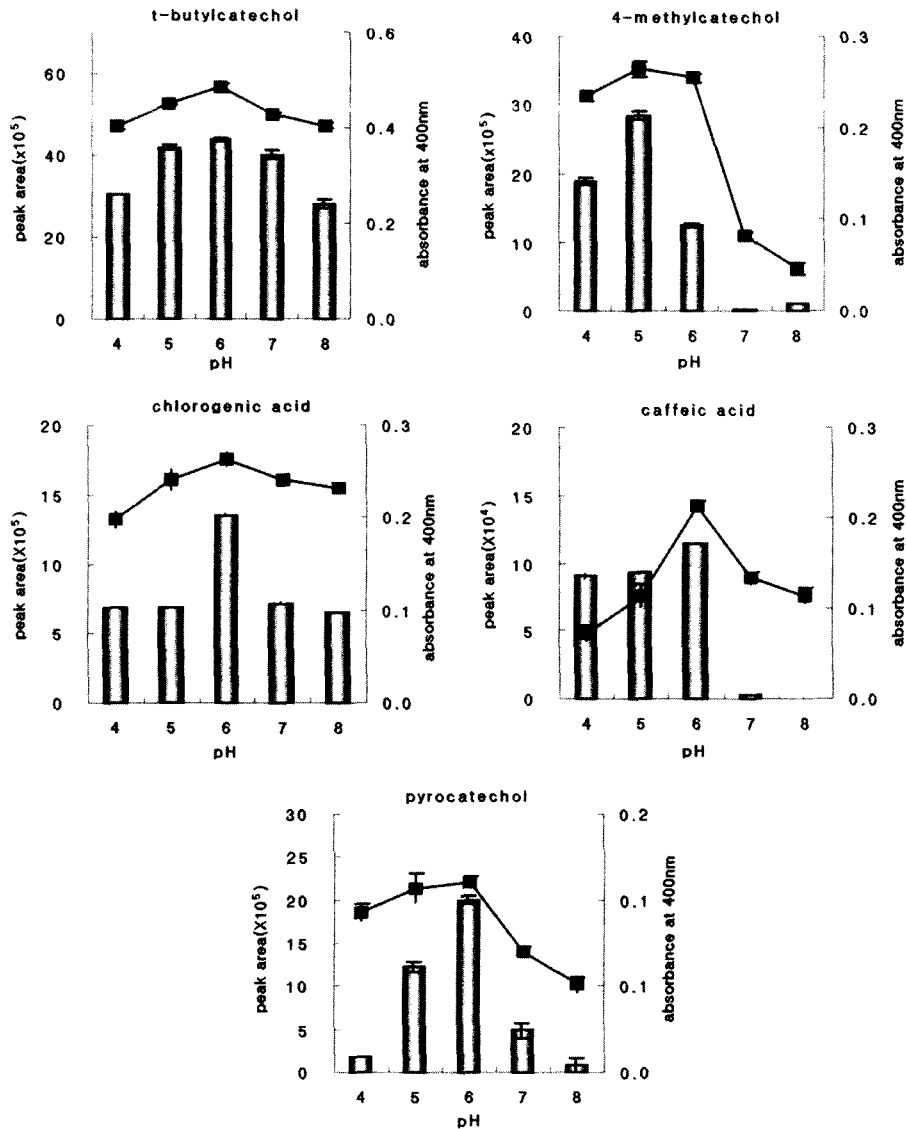


Fig. 3 - Influence of pH on PPO activity according substrates.

화물의 양이 크게 나타났다. 동일한 조건에서 흡광도를 측정한 결과, *t*-butylcatechol, chlorogenic acid에서는 pH 전반에 걸쳐 활성이 유지되었고, pH 7 이후에도 비교적 높은 활성을 보였다 (Fig. 3). 고속액체크로마토그래프법으로 기질산화물을 측정한 결과와 동일과장에서 흡광도를 측정한 결과는 최적 pH에서는 일치한 결과를 보였으나, 흡광도를 측정하였을 때 pH가 높아짐에 따라 비교적 높은 수치를 유지하는 것은 PPO에 의한 기질의 산화로 인해 형성된 *o*-quinone이 pH의 증가와 더불어 감소하고 황색을 나타내는 다른 물질이 생성되는 것과 관련이 있는 것으로 생각된다. 4-Methylcatechol을 기질로 400 nm에서 측정한 경우 pH 4일 때 retention time 2.5분에서 기질산화물이 확인, pH 5에서 가장 크고 pH 6 이후 감소하면서 retention time 3.1분에서 새로 갈변물질이 생성되었으며, 흡광도에서도 pH 6~7에서

비교적 크게 나타난 결과를 보였다. UV(290 nm)에서 측정한 경우 400 nm에서 분석한 결과에서 기질산화물이 1~3개 정도 나타난 것에 비해서, pH가 낮은 쪽에서는 검출되거나 pH가 증가하면 감소하거나 소멸되는 물질, pH의 증가에 따라 증가하는 물질 등 다양한 양상으로 다수의 무색생성물이 검출되었다(Fig. 4).

Guyot 등은 PPO가 기질인 catechin과 반응하였을 때 pH 4 이하에서는 대부분 무색의 물질이 생성되고, 높은 pH에서 황색의 물질이 우세하게 나타난다고 하였는데⁸⁾ 들깨잎의 PPO에서는 황색의 물질이 흡수하는 400 nm에서는 일치한 결과를 보였으나, 290 nm에서의 무색생성물은 다양한 결과를 보였다.

들깨잎 PPO에서 기질에 따라 최적 pH가 다소 달라지는 양상을 보였으며, 돼지의 채장 알파아밀라제는 기질 특성에 따라 효소에 대한 결합부위가 달라지고 이에 의해 최적 pH가 영향을 받

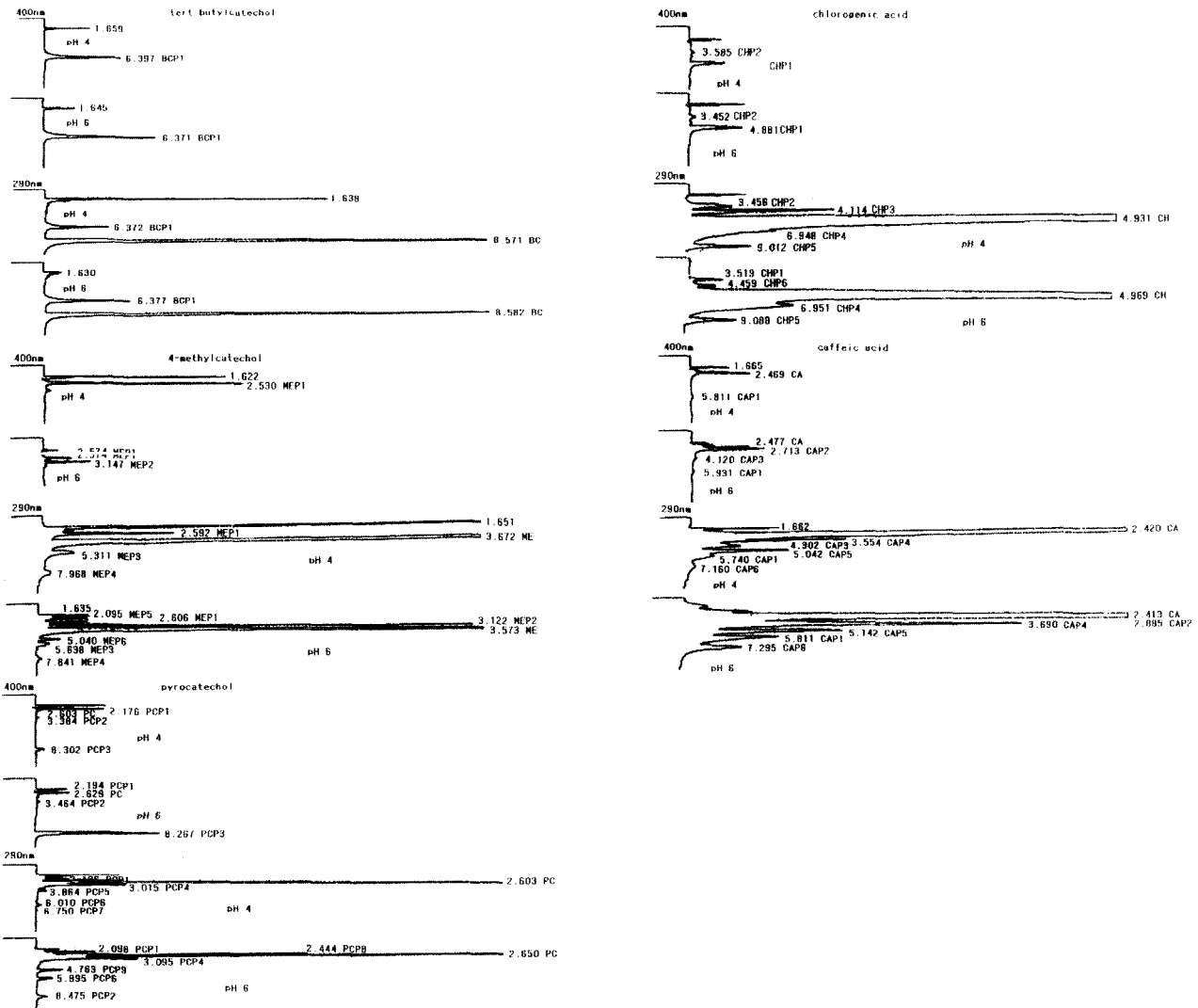


Fig. 4 - Chromatogram of 290 nm and 400 nm of enzymatic substrate oxidation mixture at pH 4 (up) and pH 6 (down).

는다고 하였는데¹⁶⁾ 들깨잎 PPO도 이와 같은 현상일수도 있다고 생각된다. 썩갯에서 정제된 PPO는 chlorogenic acid를 기질로 했을 때 최적 pH는 4.0이었으며, 기질을 epicatechin으로 하였을 때는 pH 8.0으로 보고되어 있다.¹⁷⁾ 이전에 들깨잎으로부터 완충액으로 추출한 PPO에 대한 최적 pH는 catechol을 기질로 할 때 6.0이며,¹⁸⁾ 부분정제 효소의 경우에도 같은 결과를 보여서 추출 방법에 따른 차이는 보이지 않았다.

온도에 의한 영향

Triton X-114를 포함하는 phosphate buffer로 추출한 부분정제 효소(t-PPO)와 buffer로만 추출한 조효소(b-PPO)를 사용하여 시간경과와 온도에 따른 활성의 변화를 비교한 결과, 부분정제 효소의 경우 4°C에서는 시간에 따른 활성의 변화가 거의 없었으며 30°C에서 incubation한 경우 4일 만에 활성이 소실되었고, buffer

만으로 추출한 효소는 4°C와 30°C에서 5일 이내에 활성이 모두 소실되었다(Fig. 5).

효소작용이 정지되는 온도인 4°C에 보관했을 때 전기영동 결과(Table IV)는 부분정제효소는 초기에는 48 kDa에서만 활성이 나타나고 점차 42, 39, 37 kDa에서 활성을 보이고, 시간이 더 경과하면 48 kDa와 37 kDa에서만 활성이 나타나고 이후에는 37 kDa에서만 활성이 나타났다. 30°C에서는 48 kDa의 활성단백질이 분자량이 작은 단백질로 분해되면서 2일까지는 상당히 높은 활성을 유지하다가 이후 급격히 활성이 소실되고 활성 띠도 나타나지 않았다. 완충액으로만 추출한 조효소의 경우 처음에는 48 kDa의 활성만 나타나고 차츰 처음의 활성 띠는 감소되고 42 kDa의 작은 분자량의 띠가 보이다가 활성 띠 소실과 동시에 활성도 거의 소실되는 것으로 보아 triton X-114를 포함한 추출액으로 추출하여 냉장에 보관하는 것이 효소활성을 유지하는데 상당히

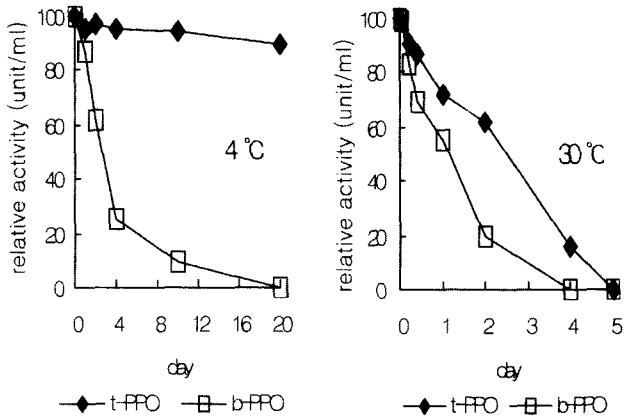


Fig. 5 - Change in activity of PPO according temperature and time.

Table IV - Pattern of time-dependent electrophoresis in PPO

		t-PPO										
Temp.		4°C				30°C						
day	band	0	1	2	4	30	40	50	0	1	2	4
48 kDa		***	***	***	**	*	*-	ND	**	***	**	ND
42 kDa			*-	*	*-					**	*	
39 kDa				*-	*-						*	
37 kDa			*	**	**	**	*			**	*	

		b-PPO							
Temp.		4°C				30°C			
day	band	0	1	2	4	0	1	2	4
48 kDa		***	**	**	ND	**	**	*-	ND
42 kDa				*-				*	

Activity band intensity.

*** strong, ** medium, * weak, *- very weak. ND : non-detected.

중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

Protease inhibitor를 첨가하여 당근 중의 latent PPO를 추출한 결과 분자량이 59 kDa인 가용성 효소를 얻었으며, 이 효소를 protease inhibitor를 사용하지 않고 실온에서 보관하였을 때 더 작은 분자량의 형태로 전환된다고 하였다.¹⁰⁾ 시금치의 thylakoid에 존재하는 Protease의 경우 전구체의 분자량은 60 kDa이고, 이를 4°C에 보관할 때 39 kDa와 21 kDa로 분해된다고 하였다.¹⁹⁾

들깨잎 PPO의 경우에도 48 kDa가 우선적으로 검출되고 단백질 분해에 의해 42, 39 및 37 kDa의 작은 분자량의 조각으로 분해되는데, 그 중 37 kDa는 장기간 활성이 유지되는 것으로 보아 상당히 안정한 분해산물인 것으로 생각된다.

결 론

PPO는 구리를 함유하며 자연계에 널리 존재하며 식물에서는

갈변현상에 관여하는 효소로서, 그 생리학적인 작용은 명확하지 않으나 외부침입에 의한 숙주의 방어기전으로 알려져 있으며, 또한 식물의 신선도와 품질을 저하하는 요인으로 작용하기도 한다.

이 논문에서는 들깨잎 PPO를 triton X-114를 첨가한 추출액으로 부분 정제하여 여러 기질에서 pH에 의한 영향을 검토하고, 부분 정제 효소와 조효소를 사용하여 보존기간과 온도에 따른 PPO 활성의 변화를 관찰하였다.

pH에 의한 영향은 PPO에 의한 기질산화물을 액체크로마토그래피로 분석한 결과 기질의 종류와 pH에 따라 기질산화물은 다소 차이를 보여서 4-methyl catechol에서는 pH 5, caffeic acid와 pyrocatechol, chlorogenic acid에서는 pH 6에서 가장 크고 pH 7 이후 급격히 감소한 반면, *t*-butylcatechol의 경우 pH 5~7에서 크게 나타났다. 흡광도로 PPO의 활성을 측정한 경우도 거의 비슷한 결과를 보였으나 pH가 높아지면서 기질생성물에 비해 다소 높은 값을 유지하는 것은 크로마토그램에서 보는 바와 같이 생성된 *o*-quinone이 pH의 증가에 따라 원래의 기질생성물이 감소하고 다른 물질이 생성되는 것과 관련이 있는 것으로 보인다.

보존기간과 온도에 따른 활성의 변화를 관찰한 결과 triton X-114를 첨가한 완충액으로 추출한 PPO를 냉장에서 보관하였을 때 활성이 오래 유지되는 것을 확인하였다. 시간별로 전기영동하여 활성 띠의 변화를 살펴본 결과 처음에는 48 kDa에서만 활성을 나타내었고, 이후 48 kDa와 37 kDa에서 활성을 유지하다가, 이후 37 kDa에서 활성이 오래 지속되는 것으로 보아 48 kDa의 활성을 나타내는 단백질이 mature PPO로 생각되며, 37 kDa의 단백질은 상당히 안정적인 분해산물로 여겨진다.

일반적으로 PPO는 냉장에서 보관하는 경우 활성이 쉽게 감소하는 결과를 보였으나, 들깨잎 PPO를 triton X-114로 처리하였을 때에는 활성이 거의 소실되지 않으면서 장기간 보관이 가능하므로 이 효소를 이용하는 다양한 실험에 사용가능하리라고 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2003년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- 1) Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. and Garcia-Carmona, F. : Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in triton X-114. *Plant Physiol.* **91**, 1481 (1989).
- 2) Constabel, C. P., Daniel, R. B. and Clarence, A. R. : Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 407 (1995).

- 3) Haruta, M., Murata, M., Hiraide, A., Kadokura, H., Yamasaki, M., Sakuta, M., Shimizu, S. and Homma, S. : Cloning genomic DNA encoding apple polyphenol oxidase and comparison of the gene product in escherichia coli and in apple. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 358 (1998).
- 4) Gupta, M., Mathur, P. and Butcher, R. J. : Synthesis, crystal structure, spectral studies, and catechol oxidase activity of trigonal bipyramidal Cu(II) complexes derived from a tetradentate diamide bisbenzimidazole ligand. *Inorg. Chem.* **40**, 878 (2001).
- 5) Mayer, A. M. : Polyphenol oxidase in plants-review. *Phytochemistry* **26**, 11 (1987).
- 6) Vaughn, K. C., Lax, A. R. and Buke S. O. : Polyphenol oxidase: the chloroplast enzyme with no established function. *Physiol. Plant.* **72**, 659 (1988).
- 7) Thipyapong, P., Hunt, M. D. and Steffens, J. C. : Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry* **40**, 673 (1995).
- 8) Guyot, S., Cheynier, V., Souquet, J. M. and Moutounet, M. : Influence of pH on the enzymatic oxidation of (+)-catechin in model systems. *J. Agric. Food. Chem.* **43**, 2458 (1995).
- 9) Kuwabara, T. and Katoh, Y. : Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* **40**, 1029 (1999).
- 10) Soderhall, I. : Properties of carrot polyphenoloxidase. *Phytochemistry* **39**(1), 33 (1995).
- 11) Wada, S., Ichikawa, H. and Tatsumi, K. : Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase. *Biotechnology and Bioengineering* **42**, 854 (1993).
- 12) Negishi, O. and Ozawa, T. : Effect of polyphenol oxidase on deodorization. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 2080 (1997).
- 13) Doddema, H. J. : Site-specific hydroxylation of aromatic compounds by polyphenol oxidase in organic solvents and in water. *Biotechnology and Bioengineering* **32**, 716 (1988).
- 14) 오홍석, 함승시 : 양송이 유래 polyphenoloxidase에 의한 polyphenol 화합물의 효소적 갈변생성물의 돌연변이 억제효과. 한국식품과학회지 **24**, 341 (1992).
- 15) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 16) Ishikawa, K., Matsui, I. and Honda, K. : Optimum pH control mechanism for porcine pancreatic α -amylase. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1175 (1995).
- 17) Nkya, E., Kouno, C., Li, Y. J., Yang, C. P., Hayashi, N. and Fujita, S. : Purification and characterization of polyphenol oxidase from garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.). *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5467 (2003).
- 18) 박수선, 김안근, 노진희, 심미옥 : 들깨잎중의 폴리페놀 산화효소의 정제 및 특성. 약학회지 **35**, 222 (1991).
- 19) Kuwabara, T. and Katoh, Y. : Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* **40**, 1029 (1999).