J. KOREAN SOC. FOOD NUTR.
15(2) 158~164 (1986)

사과(골덴) Polyphenol Oxidase의 酵素學的 性質

鄭基澤 · 徐承敎 · 韓聖淑

慶北大學校 食品加工學科

(1986, 4. 28 접수)

Some Properties of Polyphenol Oxidase from Apple (Golden Delicious)

Ki-Taek Chung, Seung-Kyo Seu and Sung-Sook Han

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu, Korea.

(Received April, 28. 1986)

Abstract

Polyphenol oxidase in apple (Golden Delicious) was extracted, partially purified and its properties were found as follows;

Polyphenol oxidase showed optimum pH for activity at 6.5 and optimum temperature at 30℃ and high affinity to o-diphenol compounds. Cysteine, ascorbic acid and sodium metabisulfite appeared to be most effective inhibitors. EDTA showed a slight inhibition. During the enzyme was kept in test tube at 4℃ and 20℃ for a week, polyphenol oxidase activity decreased sharply during the first four days at 20℃, then decreased slowly as the storage was prolonged. At 4℃, the polyphenol oxidase activity appeared to be relatively stable during the first two days before activity began to decline sharply.

Polyacrylamide disc gel electrophoresis indicated four bands with polyphenol oxidase activity. Three bands and one band of the active bands were observed after heating for 1hr at 60℃ and 70℃ respectively. The enzyme activity was observed 40% after treatment at 60℃ and 5% after treatment at 70℃. Therefore, no difference in the thermal stability was observed beween active bands and the enzyme activity.

緖 論

果實이나 果菜類에 대부분 含有되어 있는 Polyphenol oxidase(EC 1. 10. 3. 1 이하 PPO로 略함)는 phenol化合物에 作用하여 quinone이 生成되며 이것이 酸化 重合되어 褐變의 한 原因이 되고있다.[1,2]

PPO는 Cu^{++}을 含有하는 酵素로서 100餘年前에 버섯에서 처음 確認되었고[3] 그 後대부분의 果實 및 果菜類에 널리 分布하고 있는 것으로 報告되었다.[4~6] 그리고 PPO는 各 品種에 따라 그 一般的 性質인 基質特異性, 最適 pH, 最適溫度, 熱安定性 및 isoenzyme의 數 等에 큰 差異가 있으므로 各 品種에 따른 性質을 調査함으로서 褐變을 抑制할 수 있을 것이다.

PPO의 一般的 性質에 對하여 많은 硏究가 되고[7~9] 있으나 골덴 PPO에 관하여서는 Constantinides와 Bedford[10]가 골덴 PPO의 multiple form

에 관한 硏究가 報告되어 있다.

그러므로 본 實驗에서는 골덴으로 부터 PPO를 抽出 및 粗精製하여 그 一般的 性質을 調査하였으며 活性 band의 數에 있어서 다소 相異한 結果을 얻었기에 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材 料

慶北大學校 附屬農場 果樹園에서 栽培되고있는 골덴을 1984年 9月 30日에 收穫하여 냉장고에 保管하면서 供試材料로 使用하였다.

2. 酵素의 抽出 및 精製

酵素의 抽出 및 粗精製는 前報[11]와 같은 方法으로 粗酵素液을 調製하였으나 최종 ammonium sulfate 添加量은 80%로 하였다.

3. 酵素活性의 測定 및 蛋白質 定量

酵素活性 測定은 前報[11]와 同一하게 하였으며 蛋白質 定量은 Lowry等[12]의 方法에 따라 測定하였다.

4. 電氣泳動

Davis等[13]의 方法에 準하여 7% running gel (pH9.0) 8*cm*와 2% stacking gel(pH 6.8) 1*cm*인 acrylamide disc gel를 使用하였다. 電氣泳動用試料는 酵素液(150$\mu g/m\ell$ protein)을 sucrose로 10% 飽和시켰으며 bromophenol blue 溶液을 少量添加하였다. 電氣泳動은 電氣泳動用 試料 100μl을 gel 위에 注入시켜 running pH 8.3 電壓은 tube(0.5×10*cm*)當 2.5mA 溫度는 4℃에서 泳動하였으며 maker dye가 gel tube 하단으로부터 1*cm*가까이 도달하였을 때 泳動을 중지하였다.

泳動終了後 gel을 tube로부터 꺼내 증류수로 세척한 다음 30mM Catechol(pH 6.0) 溶液에 담그어 30℃에서 20分間 反應시킨後 7% methanol과 5% acetic acid가 含有된 溶液으로 脫色시켜 이때 生成된 band을 PPO의 活性 band로 하였다. PPO의 活性 band의 數와 位置를 確認하기 위하여 Gelman社의 densitometer(ACD—18)을 使用하여 420nm에서 測定하였으며 Rm값은 band의 移動거리를 maker dye의 移動거리로 나눈 값으로 標示하였다.

結 果

1. 最適 pH

McIlvaine氏 緩衝溶液을 使用하여 各 pH別로 10mM Catechol溶液을 調製한 後 酵素活性을 測定해 본 結果 Fig.1에서와 같이 pH6.5 最大活性을 나타내었다.

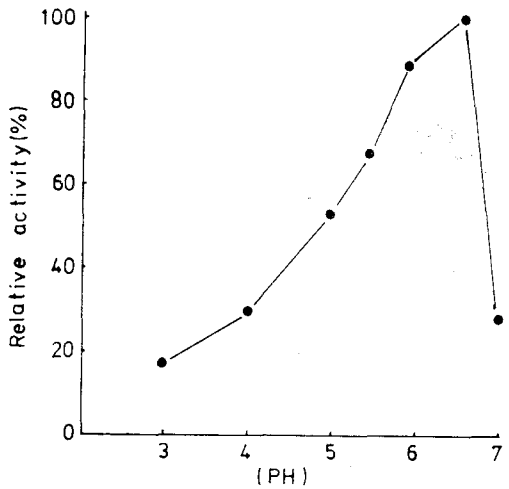

Fig. 1. Effect of pH on the activity of polyphenol oxidase.

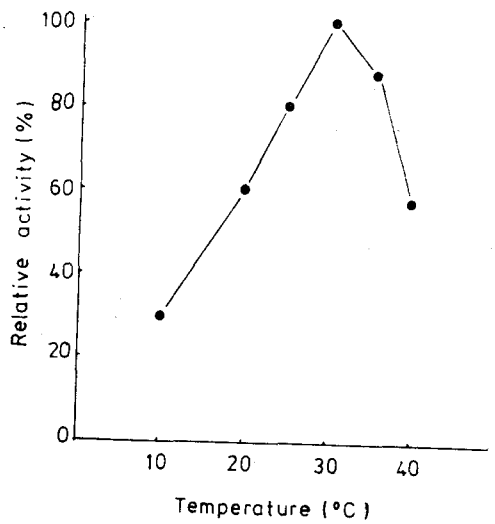

Fig. 2. Effect of temperature on the activity of polyphenol oxidase.

2. 最適溫度

最適溫度는 反應液의 溫度를 10~40℃로 調整하여 酵素活性을 測定한 結果 Fig.2에서와 같이 30℃에서 最大活性을 나타내었다.

3. 熱 安定性

酵素液을 40, 50, 60 및 70℃로 熱 處理하여 時間에 따른 殘存活性을 測定하였다.

Fig.3에서 보는 바와 같이 殘存活性度는 1時間後 40℃에서 70%, 50℃에서 60%, 60℃에서 40% 및 70℃에서 5%程度였다.

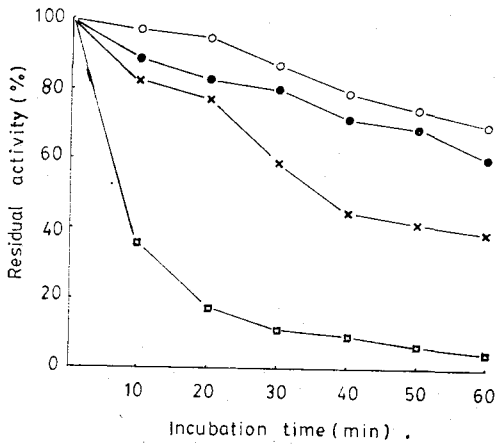

Fig. 3. Effect of temperature on the stability of polyphenol oxidase.
○—○40℃ ●—●50℃
×—×60℃ □—□70℃

4. 基質特異性

基質特異性을 調査하기 위하여 o-diphenol類(catechol, chlorogenic acid, (+)-catechin), m-diphenol(resorcinol), trihydroxyphenol類(pyrogallol, gallic acid) 및 monophenol (L-tyrosine)를 10mM(단 L-tyrosine은 1mM)이되게 0.01M燐酸緩衝溶液(pH6.0)으로 溶解시켜 基質液으로 使用하였다.

그 結果 Table 1에서 보는 바와 같이 o-diphenol類에 對하여 높은 活性을 나타내었으며 特히 chlorogenic acid는 catechol에 比하여 約 3培 程度의 높은 活性을 보여 주었다.

Table 1. Substrate specificity of polyphenol oxidase.

Substrates	Conc. (mM)	Relative activity (%)
o-Diphenols		
Catechol	10	100
Chlorogenic acid	10	295
(+)-catechin	10	160
m-Diphenol		
Resorcinol	10	0
Trihydroxyphenols		
Pyrogallol	10	27
Gallic acid	10	0
Monophenol		
L-tyrosine	1	0

5. 沮害劑의 影響

PPO의 沮害劑로 알려져 있는 것들 中에서 sodium metabisulfite, cysteine, ascorbate 및 EDTA를 0.05, 0.1 및 0.5mM로 反應液에 加하고 酵素活性을 測定하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 EDTA를 除外하고는 各 濃度에서의 沮害效果가 비슷하였으며 0.5mM에서 거의 完全히 酵素 活性을 沮害하였다.

Table 2. Effect of inhibitors on the activity of polyphenol oxidase.

Inhibitors	Concentration (mM)		
	0.05	0.1	0.5
None	100	100	100
Cysteine	84	54	0
Na-metabisulfite	92	77	3
Ascorbic acid	94	77	0
EDTA	100	95	90

6. 貯藏中 活性 變化

골덴 PPO의 安定性을 調査하기 爲하여 酵素液을 4℃, 20℃에서 貯藏하면서 酵素 活性의 變化를 調査하였다.

Fig.4에서와 같이 酵素 活性은 4℃에서 2日 정

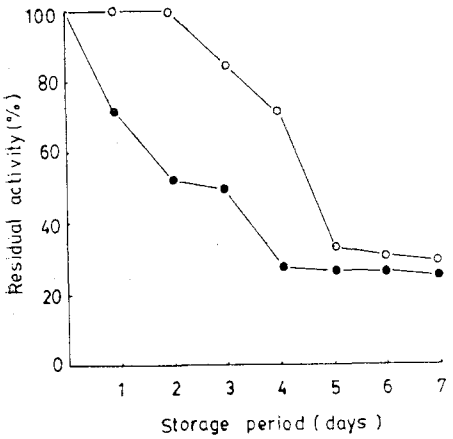

Fig. 4. Stability of polyphenol oxidase during storage.
○—○4℃ ●—●20℃

도 安定하였으나 그 後 급격히 活性이 減少되어 7日에는 約 30%의 殘存活性을 보여 주었고 20℃에서는 初期 4日까지는 급격히 活性이 減少되었으나 그 後부터는 徐徐히 減小되어 7日째에는 約 25%의 殘存活性을 나타내었다.

7. 電氣泳動

골덴 PPO의 活性 band의 數와 位置는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 Rm값이 0.21, 0.3, 0.4, 0.44인 a, b, c, d의 4個의 band가 分離되었으며 gel內의 酵素活性은 c, d, a, b 順으로 나타났다.

그리고 活性 band의 熱 安定性을 調査하기 爲하여 酵素液을 60℃와 70℃에서 各各 1時間동안 處理 後 電氣泳動한 結果 Fig. 6., Fi. 7에서와 같이 60℃에서는 a, c, d band, 70℃에서는 c band가 觀察되었다.

또한 沮害劑의 影響을 調査하기 爲하여 電氣泳動이 끝난 gel을 沮害劑로 0.5mM과 5mM 濃度의 sodium metabisulfite, ascorbic acid 및 cysteine 溶液에 1時間동안 放置 시킨 後 gel을 發色시켜 活性 band를 觀察한 結果 모든 沮害劑에 對하여 5mM에서는 band가 形成되지 않았으며 0.5 mM에서는 Fig. 8에서 보는 바와 같이 a, c band만이 弱하게 觀察되었다.

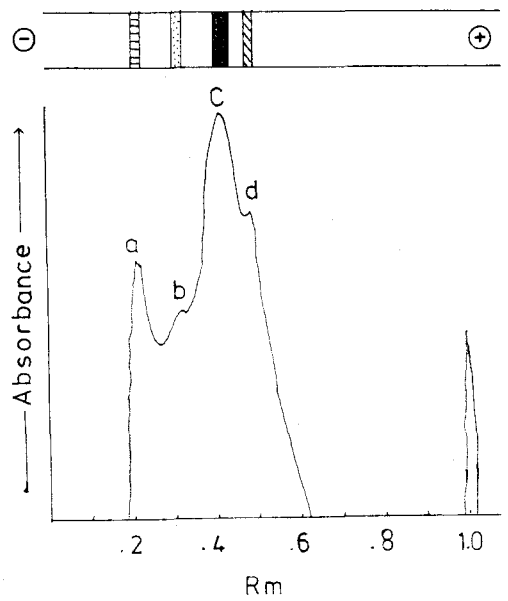

Fig. 5. Detection of polyphenol oxidase activity in polyacrylamide gel at 420nm in a Gelman scanning densitometer.

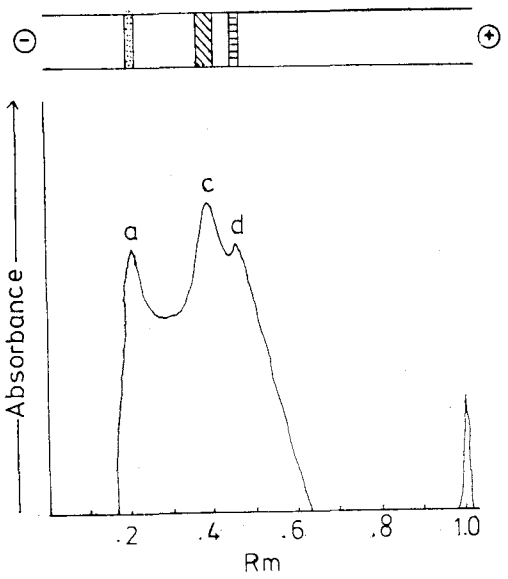

Fig. 6. Electrophoretic pattern of polyphenol oxidase after heating at 60℃ for 1 hr.

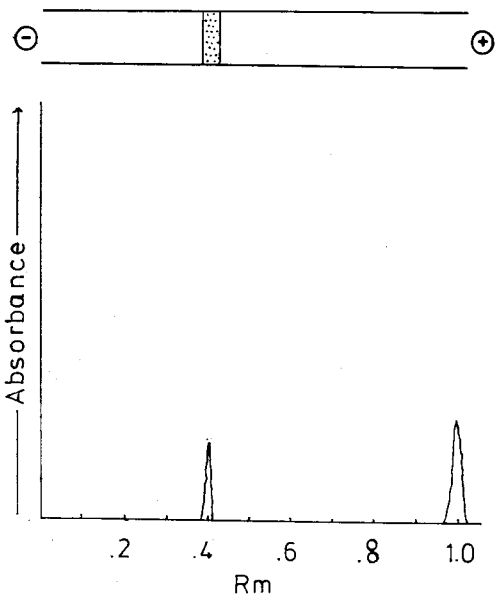

Fig. 7. Electrophoretic pattern of polyphenol oxidase after heating at 70℃ for 1 hr.

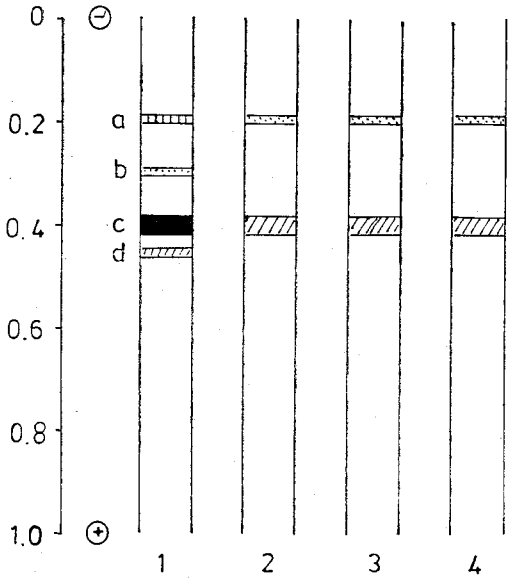

Fig. 8. Electrophoretic patterns of polyphenol oxidase treated with different inhibitors. (0.5mM).

(1) no inhibitor (2) ascorbic acid
(3) sodium matabisulfite (4) cysteine.

考 察

골덴 PPO의 몇가지 性質을 調査한 結果 酵素反應의 最適 pH는 6.5였고 最適溫度는 30℃였다.

Walker와 Hulmn[14]은 사과 PPO의 最適 pH가 4.8~5.0 Bedrosian等[15]은 pH7.0이라 報告하여 本 實驗과 相異하였는데 이는 배[16,17] 포도[18,19] avocado等[20]에서도 最適 pH가 서로 다르게 報告되어 있으며 이와 같은 原因은 品種의 差異때문이거나 使用한 緩衝溶液 및 反應條件等의 差異때문으로도 最適 pH가 달라진다는 報告[20,21]가 되어 있다. 最適溫度는 梅實[22]의 最適溫度와 一致하였으나 포도[18] 25℃ 토란[23] 27℃보다는 다소 높았으며 송이버섯[26]의 45~55℃보다는 매우 낮았다.

PPO의 沮害劑에 對한 영향은 cysteine, ascorbate, sodium metabisulfite는 濃度가 增加할수록 沮害率도 增加하여 0.5mM 濃度에서 完全히 沮害하였으나 EDTA는 별效果가 없었다.

沮害劑들이 PPO의 活性에 미치는 영향은 배[17] 바나나,[24,25] 포도,[18] 인삼,[27] 송이버섯,[26] 梅實[22] 마늘[32] 等에서도 報告되어 있으며 이들의 沮害作用은 反應生成物과 附加化合物을 生成하거나 還元시키기 때문이며 또한 sodium metabisulfite는 용존산소의 除去作用도 있음이 報告되어있다.[28,30] EDTA의 경우는 Kahn,[34] Luh와 Phithakpol,[29] Wisseman와 Lee 및 Wong[8] 等에 依해서도 沮害效果가 거의 없는 것으로 報告되어 本 實驗과 一致하였으나 Constantinides와 Bedford[10]는 4% Kim[27]等은 100mM 添加로 沮害效果를 인정하였다.

한편 酵素液의 貯藏中 活性 變化는 貯藏溫度에 따라 큰 差異가 있었으며 4℃에서 2日 程度 安定한 結果가 있었으므로 PPO는 粗精製한 後 2日 以內에 使用하였다. 이는 梅實[27]이 4日, 배[17]는 2日 程度 安定하므로 梅實보다 골덴 PPO는 安定性에 있어서 매우 不安定하였지만 배와는 비슷한 結果를 나타내었다.

Polyacrylamide disc gel 電氣泳動으로 確認된 活性 band의 數와 位置는 0.21, 0.3, 0.4, 0.44인 a, b, c, d의 4個 band가 確認되었다. 이것은 Harel과 Mayer[31]等이 사과에서 抽出한 PPO의 multiple form의 數가 3個라고 報告한것 보다 1個가 더 많았으나 鄭 等[33]이 報告한 홍옥에서의

multiple form의 數 4個와는 같았다.

各 band의 熱 安定性에 있어서도 各各 差異가 있었는데 酵素液을 60℃ 및 70℃에서 1時間동안 處理한 後 活性 band는 60℃에서 a, c, d 3個 band가 70℃에서는 c band 1個가 觀察된것을 볼때 b band는 熱에 아주 不安定하며, c band는 熱에 安定한 것으로 나타났다. 이와 같은 結果는 酵素의 熱 安定性과 比較해 볼때 60℃ 및 70℃에서 1時間씩 熱 處理 後에 各各 40% 및 5% 程度의 相對 活性이 나타난 것과 거의 一致하였다.

要 約

골덴에서 polyphenol oxidase를 抽出 및 粗精製하여 그 性質을 調査한 結果는 다음과 같다.

最適 pH는 6.5, 最適溫度는 30℃였으며 酵素의 基質特異性은 o-diphenol에 높은 活性을 나타내었다. 沮害劑의 效果는 Cysteine이 가장 效果가 좋았고 ascorbate와 sodium metabisulfite는 거의 비슷하였으며 EDTA는 아주 낮은 沮害效果를 보였다.

골덴 PPO를 20℃ 및 4℃에서 貯藏했을때 酵素活性의 變化는 20℃에서는 初期 4日째까지 活性이 급격히 減少되었으며 4℃에서는 初期 2日까지는 活性의 變化가 거의 없었으나 3日째 부터는 급격히 減少하기 始作하였다.

Polyacrylamide disc gel로 電氣泳動한 結果 4個의 活性 band가 確認되었고 熱 處理한 後에는 各各 3個 및 1個의 活性 band가 觀察되었다. 그리고 酵素의 熱 安定性에 있어서 同一 處理後에 殘存活性이 40% 및 5% 程度였으므로 各 band의 熱 安定性은 酵素의 熱 安定性과 거의 一致하였다.

參 考 文 獻

1. Mayer, A.M. and Harel, E.: *Phytochem.*, **18**, 193 (1979)
2. Joslyn, M.A. and Ponting, T.D.: *Adv. Food Res.*, **3**, 1 (1951)
3. Harel, E, Mayer, A.M. and Shain, Y.: *Phytochem.*, **4**, 783 (1965)
4. Jolly, R.L.Jr., Nelson, R.M. and Robb, D.A.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 3251 (1969)
5. Jollet, R.L., Robb, D.A. and Mason, H.S.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 1593 (1969)
6. Galeazzi, M.A.M., Sagarbier, V.C. and Constantinides, S.M.: *J. Food Sci.*, **46**, 150 (1981)
7. Rivas, N.J. and Whitaker, J.R.: *Plant Physiol.*, **52**, 501 (1973)
8. Wong, T.C., Luh, B.C. and Whitaker, J.R.: *Plant Physiol.*, **48**, 19 (1971)
9. Shannon, C.T. and Pratt, D.E.: *J. Food Sci.*, **32**, 479 (1967)
10. Constantinides, S.M. and Bedford, C.L.: *J. Food Sci.*, **32**, 446 (1967)
11. 鄭基澤, 徐承教, 宋亨翼: 한국영양식량학회지, **12**, 316 (1983).
12. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
13. Davis, B.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
14. Walker, J.R.L. and Hulme, A.C.: *Phytochem.*, **4**, 677 (1965)
15. Bedrosian, K., Steinberg, M.E. and Nelson, A.I.: *Food Technol.*, **14**, 480 (1960)
16. Tate, J.N., Luh, B.S. and York, G.K.: *J. Food Sci.*, **29**, 829 (1964)
17. Halim, D.H. and Montgomery, M.W.: *J. Food Sci.*, **43**, 603 (1978)
18. Wisseman, K.W. and Lee, C.Y.: *J. Food Sci.*, **46**, 506 (1981)
19. Harel, E. and Mayer, A.M.: *Phytochem.*, **10**, 17 (1971)
20. Knapp, F.W.: *J. Food Sci.*, **30**, 930 (1965)
21. Reyes, P. and Luh, B.S.: *Food Technol.*, **14**, 570 (1960)
22. 金鏞揮, 張在哲, 吳錫興: 全北大學校 農大論文集, 第15輯: 73 (1984)
23. 金鏞揮, 張在哲, 李泰圭, 柳光錫: 全北大學校 農大論文集, 第13輯: 100 (1982)
24. Galeazzi, M.A.M. and Sgarbieri, V.C.: *J. Food Sci.*, **46**, 1404 (1981)
25. Montgomery, M.W. and Sgarbieri, V.C.:

Phytochem., **14**, 1245 (1975)
26. 梁熙天, 洪載植, 李泰圭, 孫姬淑: 한국농화학회지, **26**, 41 (1983)
27. 金鏞揮, 張在哲, 柳光錫: 全北大學校 農大論文集, 第14輯: 84 (1983)
28. David, D.J.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **27**, 42 (1976)
29. Luh, B.S. and Phithakpol, B.: *J. Food Sci.*, **37**, 264 (1976)
30. Embs, R.J. and Markakis, P.: *J. Food sci.*, **30**, 753 (1965)
31. Harel, E., Mayer, A.M. and Shain, Y.: *Phytochem.*, **4**, 783 (1965)
32. 金銅淵, 李鍾旭, 金良培: 한국농화학회지, **24**: 167 (1981)
33. 鄭基澤, 徐承教, 宋亨翼: 한국영양식량학회지, **13**: 397 (1984)
34. Kahn, V.: *Phytochem.*, **15**, 267 (1976)