

## 연근의 polyphenol oxidase 정제 및 특성조사

문상미 · 김현진<sup>1</sup> · 함경식\*  
목포대학교 식품생물공학전공  
<sup>1</sup>미국 클렘슨 대학교 식품과학과

### Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Lotus Root (*Nelumbo nucifera* G.)

Sang-Mi Moon, Hyun-Jin Kim<sup>1</sup> and Kyung-Sik Ham\*

Department of Food Biotechnology, Mokpo National University

<sup>1</sup>Department of Food Science and Human Nutrition, Clemson University, USA

Polyphenol oxidase isoforms were purified from the lotus roots using 50% acetone precipitation, conventional chromatographies of Q-Sepharose and hydrophobic interaction, and high performance liquid chromatographies of Mono-Q and Superdex 75 gel-filtration. Molecular mass of a purified PPO isoform (LP-III-2) was determined to be 56 kDa using gel-filtration chromatography. The active form of LP-III-2 appeared to be a heterodimer, as purified LP-III-2 on SDS-PAGE gel showed two bands that were determined to be 28 kDa and 26 kDa. To further characterize PPO, partially purified PPO isoforms (LP-II, LP-III) were obtained from Q-Sepharose anion-exchange chromatography. In substrate specificity, the partially purified PPO isoform LP-II showed a high affinity to catechol, while LP-III showed a high affinity to pyrogallol. The optimum pH of LP-II and LP-III was pH 7.0. Interestingly, the partially purified PPO isoforms showed high activities at low temperatures (0~5°C), and as temperatures rose, the activities decreased. Both PPO isoforms were stable at 40°C and were inactivated by incubation at 60°C for 40 min.

**Key words:** lotus root, polyphenol oxidase, purification, characterization

## 서 론

연근(*Nelumbo nucifera* G.)은 연못이나 깊은 논을 이용하여 재배하는 수련과 연속의 다년생 초본으로 원산지는 여러 설이 있는데 중국원산 설과 이집트원산 설이 가장 유력하며 근대에 이르러 비대경(연뿌리)을 식용으로 많이 이용하게 되었고 혈압강하효과, 지혈효과, 치매예방, 니코틴 해독효과, 감기, 심장병 예방, 진정작용 등의 효과가 있는 것으로 보고되어 있다<sup>(1,2)</sup>. 국민의 생활수준 향상과 더불어 신선식품에 대한 소비자의 선호도가 증가하면서 신선 채소류에 대한 소비가 꾸준히 증가하고 있으며<sup>(3)</sup>, 이에 따라 최소가공이라는 가공기술이 대두되게 되었다.

가공 및 저장 시 갈변이 쉽게 일어나는 채소류인 연근은 전처리가 완료된 식품의 상태로 많이 유통이 되고 있으며 연근을 비롯하여 많은 채소류가 즉시 조리 이용될 수 있는

제품의 형태로의 수요가 증가할 것이다<sup>(4)</sup>. 그러나 연근을 비롯하여 과채류를 최소가공하는 과정에서 발생하는 대표적인 현상 중 박피 및 절단에 의해 조직의 절단면이 공기 중에 노출됨에 따라 손상 부위에 존재하는 각종 성분들의 산화에 따른 갈변이 대표적인 변화이며 이러한 갈변 현상은 맛뿐만 아니라 외관 등의 품질 저하를 가져올 수 있으며 유통 중 반품의 요인이 되기도 한다<sup>(5-12)</sup>. 과채류에서 발생하는 갈변현상은 크게 효소적 갈변과 비효소적 갈변으로 나누어지는데 최소가공시 발생하는 갈변현상은 대부분 효소적 갈변에 의해 일어나는 경우가 많다. 효소적 갈변에 관여하는 효소로는 polyphenol oxidase(PPO)와 peroxidase가 있는데 자연계에 널리 존재하는 PPO는 Cu<sup>2+</sup>를 함유하고 있는 효소로 산소 존재 하에서 phenol 화합물을 산화시켜 quinon compound를 만들고 이 quinon compound가 중합되어 갈색 또는 적색 갈변 물질을 생성한다<sup>(13-15)</sup>. 이러한 갈변현상을 일으키는 PPO는 과채류에서 상처를 비롯한 스트레스에 의해 합성이 증가하거나 비활성화된 상태에서 활성화된 PPO로 바뀐다고 보고되고 있으며 PPO의 분자량은 18 kDa에서 130 kDa까지 다양하게 존재한다고 보고되었다<sup>(16-25)</sup>.

연근의 갈변 억제를 위해 여러 갈변 저해제 중 초산과 껌

\*Corresponding author : Kyung-Sik Ham, Mokpo National University, Muan, Chonnam 534-729, Korea  
Tel: 82-61-450-2425  
Fax: 82-61-454-1521  
E-mail: ksham@mokpo.ac.kr

산이 효과가 있다는 보고가 있다<sup>(4)</sup>. 그러나 갈변의 주원인 효소인 PPO에 관하여는 거의 연구가 안되어 있는 상태이다. 본 연구에서는 연근의 효소적 갈변을 효과적으로 제어하기 위하여 PPO를 정제하고 PPO isoforms의 최적 반응온도, pH, 열안정성, 기질특이성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에 사용된 연근은 전남 목포에서 구입하여 수세, 절단 후 4°C에서 24시간 저장하여 효소적 갈변의 원인 효소인 PPO의 함량을 증가시켜 사용하였다(Fig. 1).

### 조효소액의 제조

조효소액의 제조를 위하여 연근 3 kg을 수세 절단하여 24시간 동안 4°C에 저장한후 0.1 M Na-phosphate(pH 6.8) 6,000 mL를 넣고 1시간 동안 균질화시켰다. 4°C에서 20분(10,000×g)간 원심분리하여 동량의 acetone으로 단백질을 침전시킨 후 단백질을 분리하여 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)로 투석시켜 조효소액으로 사용하였다.

### 효소활성 측정

효소활성은 0.1 M Na-phosphate(pH 6.8) 450 µL와 효소액 50 µL를 넣은 용액에 기질인 10 mM catechol 500 µL를 넣어 4°C에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader(Molecular Devices Co., USA)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며 PPO활성 1 unit은 흡광도를 분당 0.001 증가시키는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

### 단백질 정량

단백질은 Bradford 방법<sup>(26)</sup>에 따라 증류수로 적절하게 희석한 효소액 800 µL에 dye reagent 200 µL를 넣어 상온에서 15분 동안 정치시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는  $\gamma$ -globulin을 사용하였다.

### 효소의 정제

Fast flow Q-Sepharose anion-exchange resin(Sigma Co., USA)을 충전시킨 column(2.5×20 cm)을 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)로 equilibrium시킨 후 조효소액을 주입하였으며 gradient mixer(Pharmacia Biotech, Sweden)를 이용하여 0~0.5 M NaCl로 농도변화를 주어 유출속도를 4 mL/min으로 120분간 실시하였으며 한 분획당 5 mL씩 유출액을 채취하였다.

Q-Sepharose anion-exchange chromatography에서 효소활성을 보이는 부분을 모아 Centriprep-10(Amicon Inc., USA; molecular mass cut off, 10 kDa)을 이용하여 효소액을 농축한 후 3.4 M 황산암모늄 용액과 혼합하여 황산암모늄 농도가 1.2 M이 되게 하였다. Phenyl Sepharose 6-fast flow column(Sigma Co., USA; 2.5×20 cm)을 이용하여 1.2 M 황산암모늄이 녹아있는 20 mM Na-phosphate(pH 6.8)로 equilibrium시킨 후 1.2 M 황산암모늄 농도로 조정된 효소액을 주입하였으며 1.2~0 M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 농도변화를 주어 100분 동안 실시하였다. 이때 유출속도는 4 mL/min이었고 5 mL씩 분취하였다.

효소활성을 보이는 부분을 모아 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)로 투석시킨 후 농축하여 Mono-Q anion-exchange column(Pharmacia Biotech., Sweden; HR 5/5)을 이용하여 더 정제하였다. 유출속도는 1 mL/min으로 하여 0~0.5 M NaCl 농도변화를 주어 40분간 실시하였으며 한 분획당 0.5 mL씩 채취하였다. Mono-Q chromatography에서 활성을 보이는 부분을 모아 Superdex 75 gel-filtration column(Pharmacia Biotech., Sweden; HR 10/30)에 주입하여 유출속도를 0.5 mL/min로 하여 최종 정제하였다.

### 분자량 측정

최종 분리정제된 효소의 분자량을 측정하기 위하여 SDS-PAGE<sup>(23)</sup>와 Superdex 75 gel-filtration chromatography를 실시하였다. gel-filtration chromatography를 위한 분자량 표준물질로는 bovine serum albumin(66 kDa), carbonic anhydrase(29 kDa), cytochrome C(12.4 kDa), aprotinin(6.5 kDa)을 이용하여 검정곡선을 작성하였으며 alcohol dehydrogenase(150 kDa)로 gel-filtration column의 void volume을 결정하였다.

### pH 및 반응 온도에 따른 효소활성

pH 변화에 따른 효소활성 변화를 측정하기 위하여 0.1 M Na-succinate(pH 3.0~6.0), 0.1 M Na-phosphate(pH 6.0~7.5), 0.1 M Tris-HCl(pH 7.5~8.5)을 사용하여 기질용액인 10 mM catechol을 넣어 효소활성을 측정하였다.

반응의 최적온도를 알아보기 위하여 반응온도를 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50°C로 하되 기질 용액은 10 mM catechol을 넣어 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

### 효소의 열 안정성 및 기질특이성

효소액을 heating block을 사용하여 20, 40, 60, 80°C로 10, 20, 40, 60분간 가열처리 후 얼음에 넣어 식힌 다음 원심분리시킨 후 효소활성을 측정하였다. 기질특이성을 조사하기 위하여 사용된 기질은 monohydroxy phenol로 vanillic acid, dihydroxy phenol인 L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA), catechol, chlorogenic acid, trihydroxy phenol로 pyrogallol, gallic acid를 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mM의 농도로 제조하여 5°C와 30°C에서 효소활성을 측정하였다.

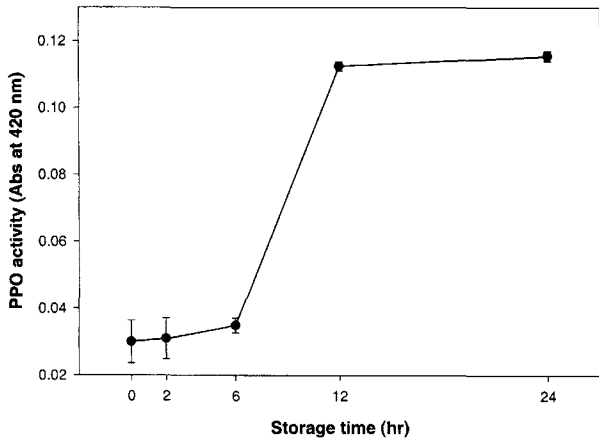
## 결과 및 고찰

### 박피, 절단에 의한 PPO 함량의 증가

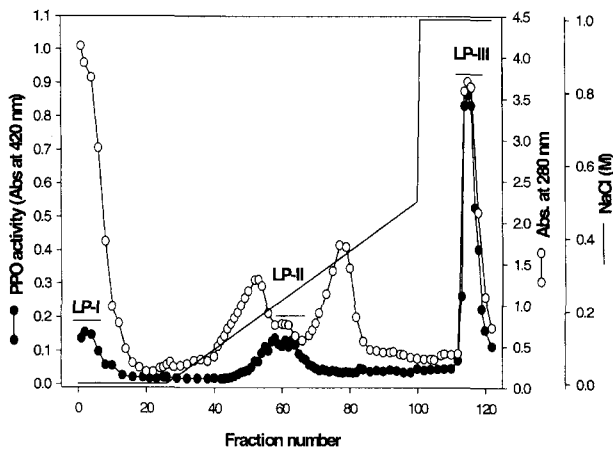
연근의 박피 후 일어나는 갈변은 박피 시 생기는 상처에 의해 발현이 증가하는 PPO가 주원인 효소일 가능성이 높다. Fig. 1은 박피된 연근 절편에서 시간에 따른 PPO 활성의 변화를 측정한 결과이다. PPO 활성이 보관 6시간 이후에 급속히 증가하여 보관 12시간 이후에는 거의 최고점에 이르는 것을 알 수 있었다. 그러므로 PPO 정제를 위한 조효소는 24시간 보관된 박피 연근 절편으로부터 추출되었다(Fig. 1).

### 효소의 정제

연근으로부터 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)을 이용하여 조효소를 추출하였으며, 조효소액과 동량부피의 acetone을 이용하여



**Fig. 1. Changes of PPO activity of sliced lotus root.** Lotus root was washed, peeled, and sliced. Then, the sliced Lotus root was stored at 4°C.



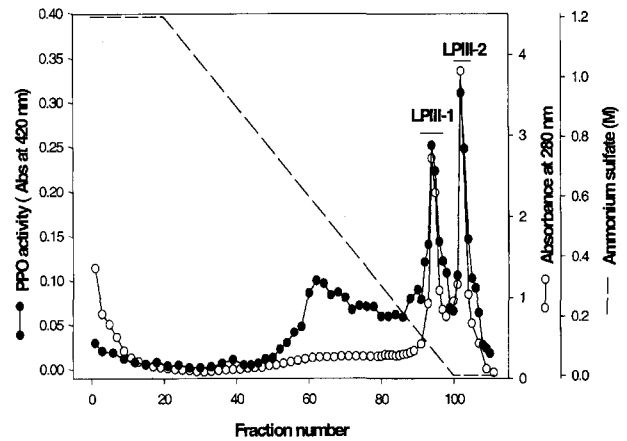
**Fig. 2. Q-Sepharose anion-exchange chromatography of crude enzymes prepared from lotus root.**

The column(2.5 × 20 cm) was equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0). The crude enzymes were loaded onto the column and eluted with a 0.5 L linear gradient of 0~0.5 M NaCl in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0). Then, the column was washed with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 M NaCl. The fraction volume was 5 mL.

PPO를 침전시켰다. 이 조효소액을 이용하여 Q-Sepharose anion-exchange chromatography를 실시한 결과 효소활성을 보이는 3개의 peak를 얻어 LP-I, LP-II, LP-III라 명명하였다 (Fig. 2). 이중 가장 활성이 높은 LP-III peak의 분획을 모아 hydrophobic interaction chromatography를 실시하여 3개의 peak를 얻었으며 그 중 활성이 높은 2개의 peak를 각각 LPIII-1, LPIII-2라 명명하였다(Fig. 3). 효소활성이 높은 LPIII-2 부분을 모아 투석, 농축의 과정을 거쳐 HPLC상에서 Mono-Q를 실시하였다. 효소활성을 보이는 부분을 농축하여 Superdex 75 gel-filtration chromatography를 실시한 결과 1개의 peak를 얻었으며 단백질 peak와 효소활성이 일치한 것으로 나타났다.

**분자량 측정**

Superdex 75 gel-filtration chromatography와 SDS-PAGE를 이용하여 분리 정제된 PPO isoform의 분자량을 측정 하였다.



**Fig. 3. Hydrophobic interaction chromatography using Phenyl Sepharose 6 fast flow resin of LP-III obtained from Q-Sepharose anion-exchange chromatography.**

Fractions in the peak LP-III of Q-Sepharose anion-exchange chromatography were pooled and adjusted to 1.2 M ammonium sulfate, and then loaded onto a Phenyl Sepharose 6 fast flow column (2.5 × 20 cm) that had been equilibrated with 20 mM Naphosphate (pH 6.8) containing 1.2 M ammonium sulfate. Proteins were eluted with a linear gradient decreasing from 1.2 to 0 M ammonium sulfate in the same buffer. Flow rate and fraction volume were 4 mL/min and 5 mL, respectively.

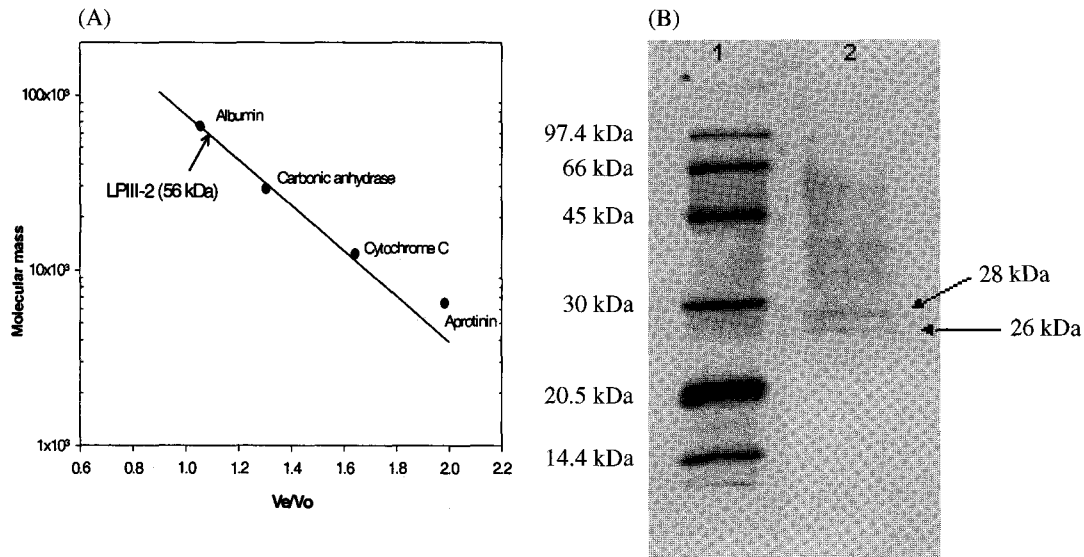
LPIII-2는 gel-filtration chromatography에서 1개의 peak를 보였으며 분자량은 56 kDa인 것으로 나타났다(Fig. 4A).

한편 Superdex 75 gel-filtration chromatography에서 1개의 peak로 나타난 LPIII-2를 SDS-PAGE 실시 후 silver staining 하였을 때 2개의 band를 나타내었고 각각의 분자량은 28 kDa, 26 kDa으로 나타났다(Fig. 4B). 이 결과로부터 PPO isoform LPIII-2는 heterodimer로 존재할 것으로 추정된다.

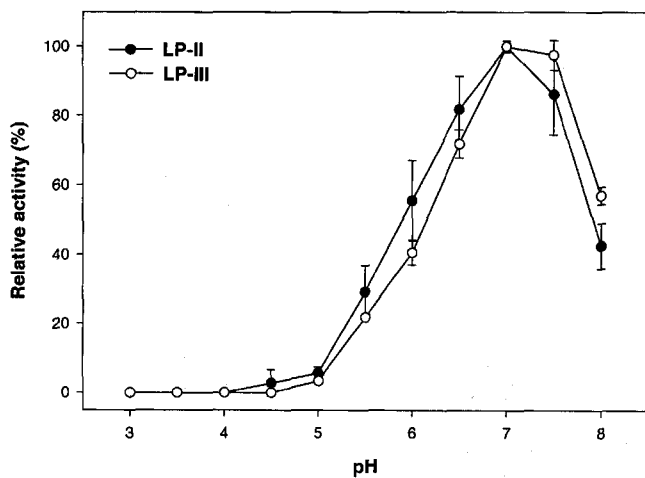
**pH 및 반응 온도에 따른 효소활성**

PPO isoform의 특성 조사를 위하여 Q-Sepharose anion-exchange chromatography(Fig. 2)로부터 얻은 부분 정제된 2개의 isoform(LP-II, LP-III)를 이용하여 특성조사를 하였다. 2개의 isoform 모두 pH의 변화에 따른 효소활성은 pH 7.0에서 가장 높았으며 산성이나 알칼리로 갈수록 효소활성이 감소하였다. 최적 pH를 7.0로 하여 이보다 pH 1.0이 낮거나 높으면 효소 활성이 약 60%로 감소하였다(Fig. 5). 복숭아<sup>(27)</sup>와 양송이<sup>(28)</sup>의 PPO 최적 pH가 중성부근인데 연근도 이와 비슷하게 최적 pH가 중성부근에 있었다.

반응온도에 따른 효소활성 변화에 있어서 부분 정제된 PPO LP-II, LP-III 둘다 일반적인 과채류의 PPO 활성을 측정하는 온도인 30°C에서는 오히려 활성이 감소한다는 것을 알 수 있었으며 활성감소는 LP-II의 경우가 더 심하였다(Fig. 6). 특이하게 PPO isoform LP-II와 LP-III는 낮은 온도인 5°C에서 효소활성이 매우 높게 나타났다. 이 결과로부터 연근 절편을 낮은 온도에 보관하는 것은 갈변을 더욱 촉진시킬 수도 있다는 것을 알 수 있다. 그러나 연근의 PPO isoform이 다른 PPO와 온도에 대한 특성이 왜 이렇게 다른지는 깊이 연구 되어야 할 것이다.



**Fig. 4. Molecular mass determination of the purified LP-III-2 using SDS-PAGE and Superdex 75 gel-filtration chromatography.** (A) LP-III-2 obtained from Mono-Q anion-exchange chromatography was loaded onto a Superdex 75 gel-filtration column and eluted with 20 mM Na-phosphate (pH 6.8) at a flow rate of 0.5 mL/min. The molecular mass standards were aprotinin (6.5 kDa), cytochrome C (12.4 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), albumin (66 kDa), and alcohol dehydrogenase (150 kDa). (B) SDS-PAGE of LP-III-2 obtained from Superdex 75 gel-filtration chromatography was performed by the method of Moore<sup>(23)</sup> on 12.5% running gel and 5% stacking gel. The proteins were stained with silver as described elsewhere<sup>(30)</sup>. Molecular mass standards are in lane 1 and were composed of phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.5 kDa), and  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kDa). LP-III-2 was applied onto lane 2.



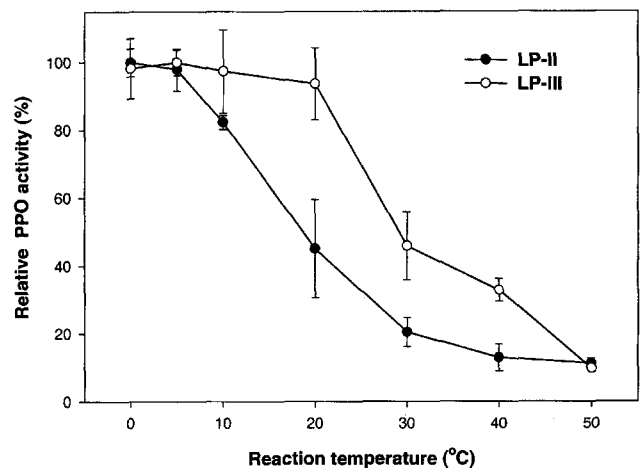
**Fig. 5. Effects of pH on the activities of partially purified PPO isoforms.**

PPO activity was determined in the pH range of 3.0~8.0. The used buffers were 0.1 M Na-succinate (pH 3.0~6.0), 0.1 M Na-phosphate (pH 6.0~7.5), and 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5~8.0).

#### 효소의 열 안정성 및 기질특이성

온도 변화에 따른 PPO isoforms의 효소활성은 20, 40°C에서 60분간 가온하였을 경우 거의 변화가 없었지만 60°C에서 40분간 가온하였을 경우 효소활성이 거의 불활성화되었다. 80°C에서 가온하였을 경우 LP-III는 10분 안에 활성을 잃는다는 것을 알 수 있었다(Fig. 7). 배의 PPO<sup>(29)</sup>는 55°C에서 1시간 이상 안정한 것으로 보고되었다.

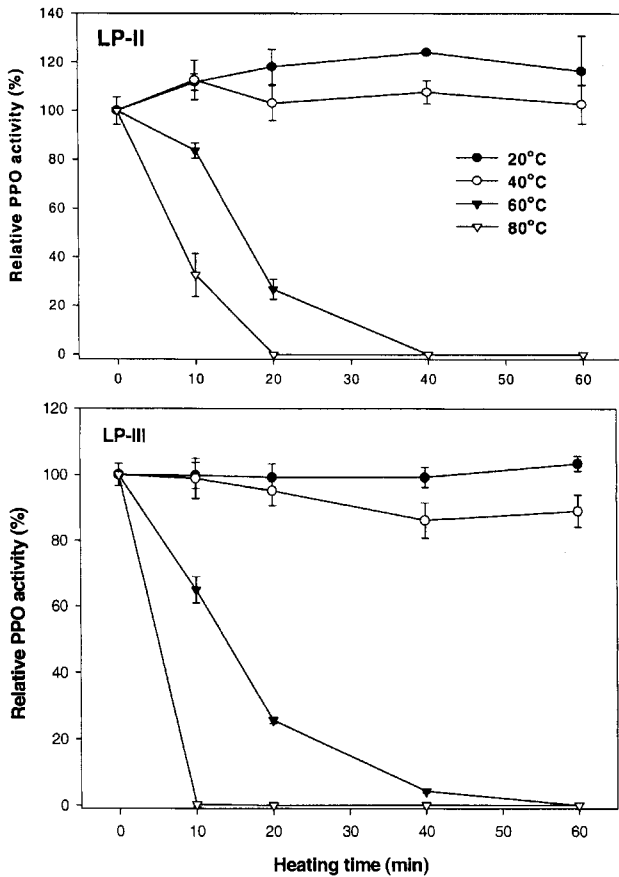
몇 가지 기질에 대한 PPO isoforms의 기질특이성을 알아



**Fig. 6. Effects of reaction temperature on the activities of partially purified PPO isoforms.**

The partially purified PPO isoforms(LP-II & LP-III) were incubated with a substrate at 0~50°C for 10 min and then analyzed for the activities.

보기 위해 가장 높은 활성을 보였던 5°C와 일반적으로 과채류 PPO 활성을 측정하는 온도인 30°C에서 각각 Michaelis-Menten 상수( $K_M$ )값을 측정하였다. 그 결과 연구의 PPO isoforms LP-II의 경우 5°C와 30°C 모두 catechol이 가장 기질 친화력이 높았으며 LP-III의 경우 5, 30°C 모두 pyrogallol이 기질 친화력이 높았다. 그러나 vanillic acid, gallic acid는 기질 친화력이 낮은 것으로 나타났다(Table 1).



**Fig. 7. Heat stability of partially purified PPO isoforms.** The partially purified PPO isoforms were incubated at 20~80°C for 10~60 min. Then the remaining PPO activities were measured.

**Table 1.  $K_M$  values of PPO isoforms for the various substrates**

Temperature (°C)	Substrate	$K_M$ <sup>1)</sup> value (mM)	
		LP-II	LP-III
5	Catechol	2.6	2.5
	L-DOPA	ND <sup>2)</sup>	ND
	Pyrogallol	10.6	0.7
30	Catechol	2.2	0.8
	L-DOPA	4.5	0.9
	Pyrogallol	3.0	0.5

<sup>1)</sup> $K_M$  values were obtained using Lineweaver-Burk plot<sup>(31)</sup>.

<sup>2)</sup>ND: Not determined.

**요 약**

박피된 절편 연근의 갈변억제를 효과적으로 하기 위한 기초연구로 갈변의 주원인 효소인 polyphenol oxidase(PPO)를 분리, 정제하여 특성을 조사하였다. 박피된 절편 연근을 24 시간 동안 4°C에 방치하여 PPO 활성을 증가시켜 조효소액을 제조하였으며 PPO 조효소액을 acetone으로 침전시킨 후 Q-Sepharose anion-exchange column, Phenyl-Sepharose hydrophobic interaction column의 conventional column과 Mono-Q anion-exchange column, Superdex 75 gel-filtration column의 HPLC column을 이용하여 PPO 활성이 가장 높은

한 개의 PPO isoform LP-III-2를 최종 분리 정제하였다. 분리 정제된 LP-III-2의 분자량을 gel-filtration chromatography를 이용하여 측정된 결과 56 kDa이었으며 SDS-PAGE를 실시한 후 silver staining한 결과 LP-III-2의 분자량은 28 kDa와 26 kDa으로 2개의 band를 형성하는 것으로 보아 heterodimer인 것으로 추정되었다. PPO isoform의 특성 조사를 위하여 Q-Sepharose anion-exchange chromatography를 이용하여 부분 분리 정제된 2개의 isoforms(LP-II, LP-III)를 가지고 기질 특이성을 조사한 결과 LP-II의 경우 5°C와 30°C 모두 catechol에 대한 기질 친화력이 높았으며 LP-III의 경우 5°C와 30°C 모두에서 pyrogallol에 기질 친화력이 높았다. 그리고 pH 7에서 최적 pH를 보였으며 열안정성은 40°C에서 60분간 열처리했을 때 안정하였지만 60°C에서 40분, 80°C에서 10분간 열처리했을 때 효소가 불활성화되었다. 특히하게도 연근의 PPO는 다른 과채류의 PPO와 반응온도에 따른 특성이 달랐는데 여러 반응온도에서 효소 활성을 측정된 결과 연근 PPO isoform LP-II와 LP-III 모두 5°C의 반응온도에서 높은 효소 활성을 보였으며 온도가 올라갈수록 반응속도가 떨어지는 특성을 보였다.

**감사의 글**

이 연구는 2001년도 목포대학교 학술 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**문 헌**

- Kim, Y.-S., Chun, S.-S., Jung, S.-T. and Kim, R.-Y. Effect of lotus root powder on the quality of dough. Korean J. Soc. Food Cookery Sci. 18: 573-578 (2002)
- Kim, Y.-S., Jeon, S.-S. and Jung, S.-T. Effect of lotus root powder on the baking quality of wheat bread. Korean J. Soc. Food Cookery Sci. 18: 413-425 (2002)
- Park, W.P., Cho, S.H. and Lee, D.S. Screening of antibrowning agents for minimally processed vegetable. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 278-282 (1998)
- Park, S.-Y., Hwang, T.-Y., Kim, J.-H. and Moon, K.-D. Quality changes of minimally processed lotus root (*Nelumbo nucifera*) with browning inhibitors. Korean J. Postharvest Sci. Technol. 8: 164-168 (2001)
- Kim, D.M. Minimal processing technology of fruits and vegetables. Food Sci. Ind. 30: 95-102 (1997)
- Kim, D.M. Extension of freshness of minimally processed fruits and vegetable. Korean J. Hort. Sci. Technol. 17: 790-795 (1999)
- Jang, J.-S. and Hong, G.-H. The effects of storage temperature and pH on color change in garlic puree. Korean J. Postharvest Sci. Technol. 5: 211-216 (1998)
- Choi, S.-T., Chang, K.-S., Lim, B.-S., Lee, C.-S. and Kim, Y.-B. Effect of storage and marketing condition on biochemical property changes of garlic (*Allium sativum* L.). Korean J. Postharvest Sci. Technol. 5: 111-117 (1998)
- Seo, J.H., Hwang, Y.S., Chun, J.P. and Lee, J.-C. Change of phenolic compounds and occurrence of skin browning, and characterization of partially purified polyphenol oxidases in oriental pear fruits. J. Korean Soc. Hort. Sci. 42: 184-188 (2001)
- Espín, J.C., Morales, M., Gracin-Ruíz, P.A., Tedela, J. and García-Cánovas, F. Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem. 45: 1084-1090 (1997)

11. Kubo, E., Kinst-Hori, I., Kubo, Y., Yamagiwa, Y., Kamikawa, T. and Haraguchi, H. Molecular design of antibrowning agents. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1393-1399 (2000)
12. Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H. and Wichers, H.J. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45: 1309-1323 (1997)
13. Mayer, A.M. Polyphenol oxidase in plants-recent progress. *Phytochemistry* 26: 11-20 (1987)
14. Friedman, M. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1523-1540 (1997)
15. Van Geledr, C.W.G., Flurkey, W.H. and Wichers, H.J. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45: 1309-1323 (1997)
16. Burton, K.S., Love, M.E. and Smith, J.F. Biochemical changes associated with mushroom quality in *Agaricus spp.*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 15: 736-741 (1993)
17. Valero, E. and Garcia-Carmona, F. pH-dependent effect of sodium chloride on latent grape polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2447-2451 (1998)
18. Espin, J.C., van Leeuwen, J. and Wichers, H.J. Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3509-3517 (1999)
19. Rathjen, A.H. and Robinson, S.P. Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. *Plant Physiol.* 99: 1619-1625 (1992)
20. Södfrhäll, J. Properties of carrot polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 39: 33-38 (1995)
21. Thipyapong, P. and Steffens, J.C. Tomato polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 115: 409-418 (1997)
22. Sánchez-Ferrer, A., Laveda, F. and García-Carmona, F. Substrate-dependent activation of latent leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1583-1586 (1993)
23. Moore, B.M. and Flurkey, W.H. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenol oxidase: Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenol oxidase. *J. Biol. Chem.* 265: 4982-4988 (1990)
24. Burton, S.G. and Duncan, J.R. Activation of mushroom polyphenol oxidase in organic medium by the detergent SDS. *Biotechnol. Lett.* 17: 627-630 (1995)
25. Espin, J.C. and Wichers, H.J. Kinetics of activation of latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3503-3508 (1999)
26. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
27. Pyo, H.-F., Son, D.-Y. and Lee, C. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Flammulina velutipes*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 552-558 (2002)
28. Kim, D.-Y., Rhee, C.-O. and Kim, Y.-B. Characteristics of polyphenol oxidase from garlic (*Allium sativum L.*). *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 24: 167-173 (1981)
29. Kahn, V. Polyphenol oxidase isoenzymes in avocado. *Phytochemistry* 15: 267-272 (1976)
30. Ham, K.-S., Kauffmann S., Albersheim, P. and Darvill, A.G. Host-pathogen interactions XXXIX. A soybean pathogenesis-related protein with  $\beta$ -1,3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragments from fungal walls. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 4: 545-552 (1991)
31. Donald, V. and Judith, G.V. *Biochemistry*, pp. 345-370. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA (1995)

---

(2003년 6월 25일 접수; 2003년 8월 14일 채택)