

마늘 (*Allium sativum* L.) Polyphenol Oxidase의 特性

金 銅 淵 · 李 鍾 旭 · 金 良 培

全南大學校 農科大學 食品加工學科

(1981년 7월 29일 수리)

Characteristics of Polyphenol Oxidase from Garlic (*Allium sativum* L.)

Dong-Youn Kim, Chong-Ouk Rhee and Yang-Bae Kim

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Chon-nam National University Kwang-Ju, KOREA.

Abstract

Crude enzyme of polyphenol oxidase was obtained from garlic. This enzyme actively oxidized triphenols such as pyrogallol and gallic acid, although it showed very weak activity on diphenols such as catechol and chlorogenic acid among the phenolic compounds tested. The optimum pH of the enzyme was 6.5 which was slightly higher than that of the garlic itself (pH 6.0). The enzyme was stable relatively at heat treatment. Sodium metabisulfite inhibited the enzyme activity at the concentration of 1mM, and KCN, L-ascorbic acid and thiourea also inhibited the enzyme action. Mg^{++} activated the enzyme activity. Cu^{++} activated slightly the enzyme action at low concentration (1mM), but inhibited at high concentration (10mM).

緒 論

果實이나 菜蔬類에 存在하는 phenol化合物에 polyphenol oxidase가 作用을 하여 褐變을 일으키며, 이것이 調理, 加工時에 일어나는 褐變現象의 한 原因이 되고 있다. 一般적으로 polyphenol oxidase는 單一蛋白質이 아니라 보통 性質이 비슷한 수종 酵素의 混合物로서 基質特異性이나 最適 pH, 最適溫度, 失活溫度등의 범위가 엄밀하지 않은 것으로 알려져 있다.

polyphenol oxidase는 生物體中에 널리 分布되어 있어 지금까지 많은 研究^{1,2,3,4)}가 이루어졌는데 그중에서 動物性 酵素와 植物性 酵素의 性狀에 큰 차이가 있음도 밝혀졌다. 그러나 이 中 植

物性 酵素, 특히 果實中에 含有되어 있는 polyphenol oxidase는 果實의 加工에 있어서 褐變에 관여하기 때문에 加工中에 褐變現象이 심한 복숭아,⁵⁾ 버섯^{6,7)}, 사과^{8,9)}, 감자¹⁰⁾, 자두¹¹⁾, 바나나¹²⁾ 등에 있어서 polyphenol oxidase의 精製와 性質에 關係서는 많은 研究가 이루어져 있다.

마늘(Garlic, *Allium sativum* L.)은 우리 食生活에 重要な 調味料로서 오랜 세월에 걸쳐 愛用되어 왔으며, 또한 最近에는 粉末製品이 나와 앞으로 이의 利用이 많아질 것으로 생각된다.

그러나 果實이나 菜蔬에서와 마찬가지로 마늘도 切斷등의 傷害로 因하여 變色을 일으키고, 으깨어 貯藏하면 短時間에 褐變이 일어나며, 收穫後 김장철까지의 長期貯藏時에는 상당량의 褐變이 일어난다.

또 마늘 貯藏을 위한 polyethylene film包裝貯藏時는 發芽率과 腐敗率은 低下되나 翌年 四月以後에 甚한 褐變이 일어난다는 報告¹³⁾도 있다.

그러나 이 褐變現象이 酵素的 褐變인지 非酵素的 褐變인지 아직 究明된 바 없으며 마늘의 allin lyase¹⁴⁾와 anthocyanins¹⁵⁾에 關한 研究等이 있을 뿐이다.

따라서 本 研究은 마늘의 褐變現象의 一環으로 酵素的 褐變現象에 關與하는 마늘의 polyphenol oxidase(PPO, O₂-oxidoreductase, EC 1, 10, 3, 1)를 抽出하여 몇가지 結果를 얻었으므로 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料

全南 務安郡 務安邑에서 栽培된 마늘을 1980年 8月에 產地에서 직접 購入하여 冷藏庫에 保管하고 試料로서 使用하였다.

2. 實驗方法

가. 酵素液의 調製

1) 酵素의 抽出

Fig. 1에서와 같이 마늘 50g에 100ml의 0.1M

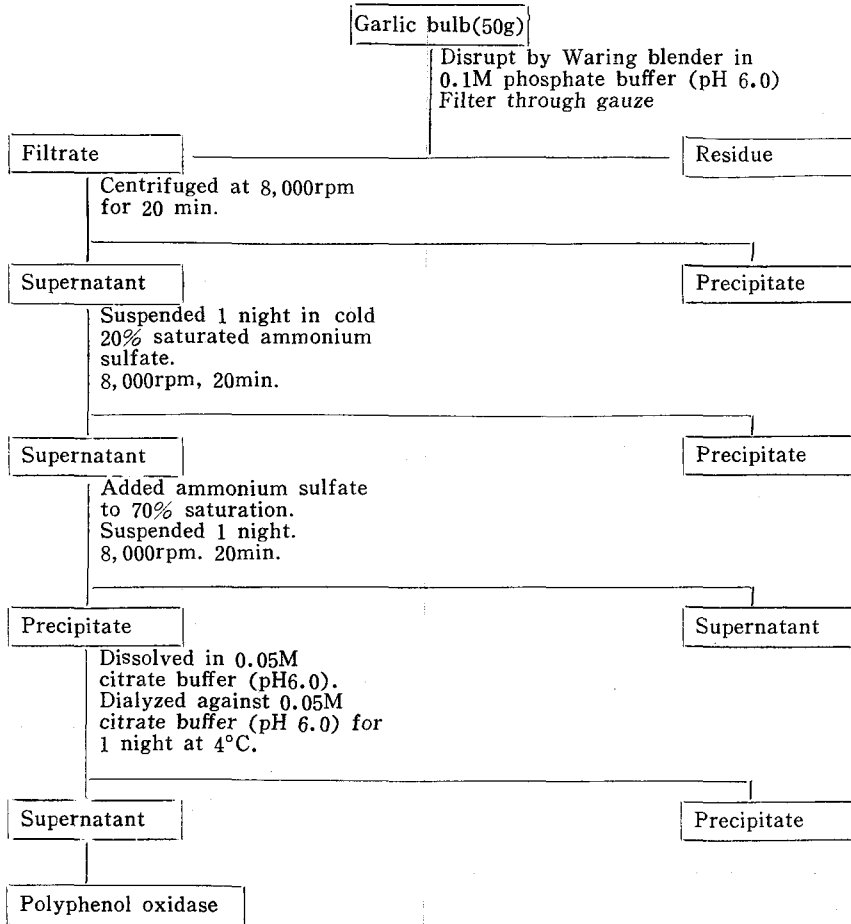


Fig. 1. Diagrammatic representation of the extraction of polyphenol oxidase from garlic

phosphate buffer(pH 6.0)을 加하여 미리 氷冷시킨 Waring blender로 磨碎하였다. 磨碎液을 綿布로 濾過한 後 濾液을 遠心分離(8,000r.p.m., 20 min)하여 그 上澄液을 粗抽出液으로 하였다. 이

後의 操作은 약 4°C에서 行하였다.

2) Ammonium sulfate分劃: 粗抽出液에 ammonium sulfate를 20% 포화되도록 加하고 冷暗所에서 一夜 放置시켜 이를 遠心分離하여 沈澱物을

除去하였다. 이 上澄液에 70% 포화가 되도록 ammonium sulfate를 加하여 一夜 放置한 後 遠心分離하여 沈澱物을 모았다. 이를 少量의 0.05M citrate buffer(pH 6.0)에 溶解시켜 visking tube를 使用하여 同一緩衝液에서 24時間 透析시켰다. 膜內液을 遠心分離하여 不溶物을 除去시킨 다음 그 上澄液을 粗酵素液으로써 35ml를 얻었다.

나. 酵素活性的의 測定

polyphenol oxidase活性的의 測定은 比色法으로 行하였다. pyrogallol을 基質로 使用하였으며 試驗管에 pH 6.5, 0.1M phosphate buffer液과 10 mM의 pyrogallol을 含有하는 反應液에 酵素溶液을 0.3ml 加하여 全量을 3ml로 하고 30°C에서 一定時間 incubation시켜 420nm에서 吸光度를 測定하였다.

다. 酵素活性에 미치는 各 要因의 影響

1) 基質 特異性: catechol, pyrogallol, gallic acid, resorcinol, *p*-cresol, catechin, chlorogenic acid를 各各 10mM로 하여 活性을 測定하였다.

2) pH의 影響: 0.1M acetate buffer(pH 4.0~6.0), 0.1M phosphate buffer(pH 6.0~8.0)을 使用하여 polyphenol oxidase의 最適 pH를 調査하였다.

3) 溫度의 影響: 酵素溶液을 0.1M phosphate buffer(pH 6.5)에 넣어 40, 60, 80, 100°C의 各 溫度에서 5分間 및 30分間 加熱處理한 後, 얼음에 넣어 식힌 後 殘存 酵素活性을 測定하였다. 熱處理하지 않은 酵素液의 活性을 100으로 하고 各各을 相對值로 表示하였다.

4) 各種 化合物의 影響: 各種 化合物을 여러 濃度(0.01~100mM)로 加하여 10mM의 pyrogallol과 0.1M phosphate buffer(pH 6.5) 酵素溶液을 넣어 全量을 3ml로 調整한 後, 酵素活性을 測定하여 이의 影響을 調査하였다. 無添加인 때를 100으로 하고 各各을 相對值로 表示하였다.

5) Cu²⁺ ion의 影響: CuSO₄를 各 濃度(0.01~10mM)로 調整하여 酵素活性을 測定하였다.

6) Michaelis 定數: pyrogallol의 濃度를 0.1 mM로부터 30mM까지 調整하고 酵素活性을 測定하였다.

結果 및 考察

1. 基質 特異性

酵素活性에 미치는 基質의 影響은 Fig.2와 같다.

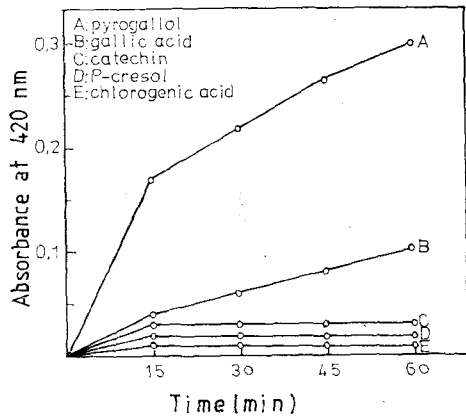


Fig. 2. Time course curve of polyphenol oxidase from garlic with various substrates. The reaction was carried out at 30°C in a total volume of 3ml consisting of 1.5ml 0.2M Na-phosphate buffer (pH 6.5), substrate at a final concentration of 10mM, and 0.3ml of enzyme solution.

pyrogallol, gallic acid 등의 triphenol에서는 活性을 보였으며, 特別 pyrogallol에서는 높은 活性을 보였고, catechol, chlorogenic acid, resorcinol과 같은 diphenol에서는 別로 活性을 보이지 않았으며, monophenol인 *p*-cresol은 活性이 매우 낮았다.

대부분의 果實, 菜蔬類의 polyphenol oxidase는 diphenol類에 대해서는 낮은 活性을 나타낸다(16,17,18,19). 그러나 무²⁰⁾, 감귤류^{21,22)}처럼 diphenol類보다 triphenol類에 높은 活性을 나타내는 polyphenol oxidase도 있음이 밝혀졌다. 따라서 triphenol類에 對한 活性을 나타낸 마늘의 polyphenol oxidase도 triphenol oxidase라고 생각되며 마늘 증에 triphenol類의 含量이 많은지의 여부는 밝혀지지 못했다.

2. 酵素活性에 미치는 pH의 影響

polyphenol oxidase의 活性에 미치는 pH의 影響은 다음 Fig. 3과 같다.

이것으로 보아 마늘의 polyphenol oxidase의 最適 pH는 6.5로 생각된다. 복숭아³⁴⁾와 양송이 버섯²⁴⁾의 polyphenol oxidase 最適 pH가 中性부근인데 마늘도 이와 비슷하게 最適 pH가 中性부근에 있었다.

또한 果菜類의 polyphenol oxidase의 最適 pH

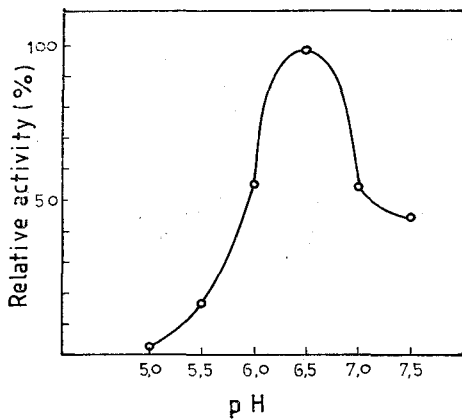


Fig. 3. Effect of pH on the polyphenol oxidase activity.

The reactions were carried out for 20min at 30°C in 0.1M acetate buffer (pH 4.0~6.0) 0.1M phosphate buffer (pH 6.0~8.0). The reaction mixture was the same as in Fig. 2.

는 原料의 pH에 가까운데²⁵⁾, 마늘 汁液의 pH가 6.0이고 마늘 polyphenol oxidase²⁶⁾의 最適 pH는 6.5로 原料 pH와 相異한 最適 pH를 나타냈다. 이는 표고버섯 polyphenol oxidase²⁶⁾의 最適 pH가 原料의 pH보다 더 酸性쪽인 것과는 정반대의 結果이었다.

마늘의 酵素液을 넣지 않은 blank test에서는 溶液의 pH가 alkali側으로 갈수록 吸光度가 增加하고 pH 8 이상에서는 基質을 넣는 즉시 褐變이 생겨 活性을 測定할 수 없었다. 이는 藤田²²⁾ 등의 報告에서와 같이 基質 자체의 自動酸化가 alkali側으로 갈수록 심하게 이루어지기 때문으로 생각된다. 이로서 마늘의 pH가 弱酸性일 때는 酵素에 依한 褐變이 主가 되나 alkali側으로 移行하면 酵素의 褐變보다 自動酸化에 依한 褐變이 主가됨을 알 수 있다.

3. 溫度의 影響

酵素活性에 미치는 溫度의 影響은 Fig. 4에서 보여주는 것처럼 100°C에서 5分間 加熱한 것은 70% 殘存率을 보여주었으며 30分間 加熱한 것은 거의 活性을 나타내지 않았다.

버섯²⁶⁾의 polyphenol oxidase는 80°C 數分 加熱로도 쉽게 失活된데 비해 마늘의 경우에는 80°C 5分 加熱시는 90%의 殘存率을 나타내어 熱에 매

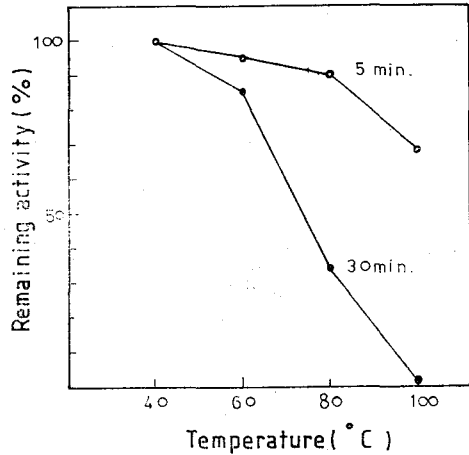


Fig. 4. Thermal stability of polyphenol oxidase

우 安定하였다.

4. 各種 化合物의 影響

各種 化合物이 酵素活性에 미치는 影響은 다음 Table 1과 같다.

Table 1. Effect of various compounds on polyphenol oxidase activity

Compounds	conc. (mM)	Relative activity(%)
None		100
Sodium metabisulfite	0.1	74
	1.0	0
	10	0
Thiourea	0.1	101
	1.0	93
	10	24
	100	3
Potassium cyanide	0.01	66
	0.1	14
Sodium fluoride	10	100
Dithiothreitol	10	43
EDTA	10	66
Urea	100	100
L-ascorbic acid	10	9
MgCl ₂	10	148

The reactions were carried out for 20 min at 30°C in the 0.1M phosphate buffer(pH 6.5) containing substrate (final concentration 10 mM) and various compounds (various concentrations).

還元劑의 하나인 Na-metabisulfite를 各濃度와 時間別로 調査한 結果는 Fig. 5에서 보여 주는 것과 같이 0.1mM의 低濃度에서 25% 阻害하였으며 1mM 이상의 濃度에서는 完全한 阻害를 하였다 Na-metabisulfite 外에 또 다른 還元劑인 dithiothreitol은 10mM로 polyphenol oxidase의 活性을 60%정도 阻害하였다. 이 Na-metabisulfite나 dithiothreitol은 o-diquinone를 還元시키는 能力때문에 polyphenol oxidase의 活性을 阻害한다고 한다²⁷⁾.

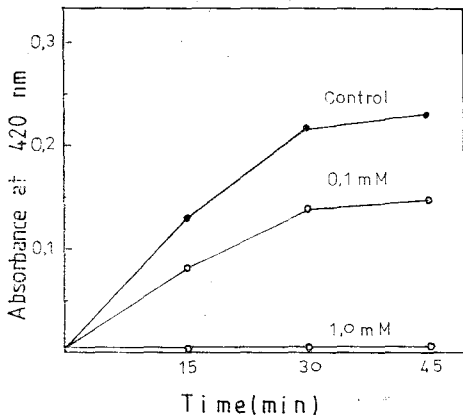


Fig. 5. The effect of Na-metabisulfite on polyphenol oxidase activity. In a total volume of 3ml, the reaction mixture contained 10mM pyrogallol, 0.1M phosphate buffer(pH 6.5), 0.3ml of enzyme solution, and Na-metabisulfite at indicated concentrations.

thiourea는 低濃度에서는 그 作用이 顯著하지 않았지만 高濃度로 갈수록 상당한 阻害作用을 하여 10mM에서는 75%, 100mM에서는 거의 完全하게 阻害作用을 보였다. 이는 polyphenol oxidase의 Cu²⁺ion과 結合함으로써 阻害作用을 한다²⁸⁾고 한다.

EDTA는 10mM에서 polyphenol oxidase의 活性을 44% 阻害하였는데 EDTA는 chelating agent로 알려져 있어 阻害作用을 보였다.

또한 potassium cyanide는 0.1mM에서 85%의 阻害를 보여주었고 L-ascorbic acid는 10mM에서 90%의 阻害作用을 나타냈고 blank test의 自動酸化도 抑制를 하였다. 그러나 Yoshihiro¹¹⁾ 등이 자두 polyphenol抽出液에 ascorbic acid를 添加하여 放置하면 10일 이내에서는 褐變을 抑制하였으나 20일 이후에는褐變을 促進한다는 報告가 있다. 이

로써 L-ascorbic acid는 初期에는 還元劑로 作用하나 後期에는 自動酸化로 褐變이 促進되는 것 같다.

MgCl₂에 의해 polyphenol oxidase는 10mM에서 148%의 活性을 보였는데 Mg는 거의 모든 polyphenol oxidase에 活性劑로서 잘 알려진 바와 같이 本 研究에서도 높은 活性을 나타냈다.

5. Cu²⁺ ion의 影響

Cu²⁺ ion의 酵素活性에 미치는 影響은 다음 Table 2와 같다.

Table 2. Effect of Cu⁺⁺ on polyphenol oxidase activity

Concentration of Cu ⁺⁺ (mM)	Relative activity(%)
None	100
10 ⁻²	145
10 ⁻¹	158
1	137
10	88

Reactions were carried out for 20 min at 30°C in the 0.1M phosphate buffer(pH 6.5) containing substrate(10mM), and Cu⁺⁺ at indicated concentrations.

즉 1mM 이하의 낮은 濃度에서는 polyphenol oxidase가 活性化하여 0.1mM에서 無添加의 約 1.5배정도 높은 活性을 보여준 반면 10mM의 濃度에서는 10%정도 阻害시키는 傾向을 보여주었다 이처럼 polyphenol oxidase에 Cu²⁺가 兩面作用을 나타낸은 低濃度에서는 polyphenol oxidase에 不足되는 prosthetic group인 Cu²⁺를 補充하므로 活性을 높이는 반면 高濃度の Cu²⁺는 polyphenol oxidase가 더 이상 prosthetic group을 要求하지 않게 되고 오히려 polyphenol oxidase의 活性을 抑制한다고 생각된다.

6. Michaelis 상수(Km)

基質濃度を 달리 했을 때의 polyphenol oxidase의 反應速度를 測定함으로써 最適反應 基質濃度(michaelis 定數: Km)를 밝히고자 pyrogallol의 濃도를 0.1mM에서부터 30mM까지 調整하고 調査하여 基質濃도와 反應速度와의 關係를 Lineweaver-Burk의 方法으로 作圖하면 Fig. 6과 같다.

이것으로부터 구한 Km値는 0.4mM이었다. 이러한 Km値는 温州밀감(Satsuma mandarin)²²⁾의

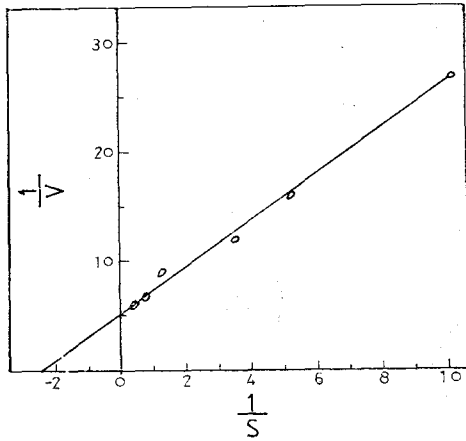


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of pyrogallol oxidation by polyphenol oxidase (PPO). The reactions were carried out for 20 min with various concentrations of pyrogallol (0.1~30mM) in 0.1M phosphate buffer (pH 6.5) at 30°C.

Km值인 7.4mM보다 약 20배나 낮아 마늘의 polyphenol oxidase가 基質에 대한 親和性이 더 크을 알 수 있었다.

要 約

마늘의 褐變現象中 酵素의 褐變에 關與하는 polyphenol oxidase 粗酵素液을 抽出하여 그 性質을 몇가지 調査하였다. 基質로서는 여러 phenol化合物들을 使用해본 結果, diphenol類와 monophenol類는 거의 褐變되지 않았으나 triphenol인 pyrogallol, gallic acid는 크게 褐變되는 것으로 보아 마늘의 polyphenol oxidase는 triphenol oxidase로 보인다. 이 효소의 最適 pH는 6.5 부근으로 弱酸性側에 있었으며 熱安定성은 80°C, 5分 加熱로 90%의 殘存率을 보여 熱에 매우 安定하였다. Na-metabisulfite는 1mM의 濃度에서 完全한 阻害를 하였고, potassium cyanide, L-ascorbic acid, thiourea順으로 酵素活性을 阻害하였다. Mg²⁺는 酵素活性을 增加시켰고 Cu²⁺는 低濃度(1mM)에서는 polyphenol oxidase가 活性化하는데 비해 高濃度(10mM)에서는 阻害作用을 하였다. 마늘의 polyphenol oxidase의 Km值는 0.4mM이었다.

參 考 文 獻

1. Pitzpatrick, T.B. and Seiji, M.: New Eng.

J. Med., 265 : 328(1961).
 2. Kubowitz, F.: Biochem., 295 : 221(1937).
 3. Inabe, T. and Fumatsu, M.: Agr. Biol. Chem., 28 : 206(1964).
 4. Smith, J.L. and Kreuger, R.C.: J. Biol. Chem., 37 : 1121(1962).
 5. Wang, T.C., Luh, B.S. and Whitaker, J.R.: Plant Physiol., 48 : 19(1971).
 6. Kertesz, D. and Zito, R.: Biochem. Biophys. Acta., 64 : 153(1962).
 7. Nakamura, T., Sho, S. and Ogura, Y.: J. Biochem., 59 : 481(1966).
 8. Walker, J.R.L. and Hulme, A.C.: Phytochem., 5 : 259(1966).
 9. Shannon, C.T. and Pratt, D.E.: J. Food Sci., 32 : 479(1967).
 10. Patil, S.S. and Zucker, M.: J. Biol. Chem., 240 : 3938(1965).
 11. Yoshihiro, K., Mamoru, H. and Masao, T.: 日本食品工業學會誌, 26 : 325(1979).
 12. Palmer, J.J.K.: Plant Physiol., 28 : 508(1963).
 13. 송정춘, 한관주: 농공이용연구소, '79 시험연구보고서, 농촌진흥청(1979).
 14. Mazelis, M. and Crews, L.: Biochem. J., 108 : 725(1968).
 15. Chan, T.D. and Francis, F.J.: J. Food Sci., 40 : 1101(1975).
 16. 小田圭昭, 大江昭一, 渡邊天雄: 日本農化學會誌, 47 : 301(1973).
 17. Benjamin, N.D. and Montgomery, M.W.: J. Food Sci., 38 : 799(1973).
 18. 尊田民喜, 大村浩久: 榮養と食糧, 26 : 531(1973).
 19. 東野哲三, 藤田修二: 榮養と食糧, 29 : 125(1976).
 20. 東野哲三, 藤田修二, 小宮博喜: 榮養と食糧, 31 : 95(1978).
 21. 藤田修二, 東野哲三: 昭和 52年度 日本農藝化學會, 西日本支部大會講演要旨集, 佐賀, p.18(1977).
 22. 藤田修二, 東野哲三: 日本農化學會誌, 53 : 233(1979).
 23. 中林敏郎, 鶯飼暢雄: 日本食品工業學會誌, 10 : 211(1963).

24. Ponting, J.D. and Joslyn, M.A.: Arch. Biochem., 19 : 47(1948).
25. 이성우 : 최신식품화학, p.350, 수확사(1977)
26. 藤本健四郎, 宮代正子, 金田正志 : 栄養と食糧, 23 : 236(1970).
27. Baldry, C.W., Bucke, C. and Coombs, J.: Planta(Berl), 94 : 124(1970).
28. Mathew, A.G. and Parpia, A.B.: Advan. Food Res., 19 : 75(1971).