

## 한국산 재래종 담배잎에서 정제한 Polyphenol Oxidase의 성상에 관한 연구

박 수 선 · 김 안 근 · 박 금 영  
숙명여자대학교 약학대학

### Some Properties of Polyphenol Oxidase Purified from Korean Native Tobacco Variety Leaves

Soo Sun Park, An Geun Kim and Geum Young Park  
College of Pharmacy, Sook Myung Womens University, Seoul 140-742, Korea

**Abstract**—Purification of polyphenol oxidase(PPO) from Korean native tobacco variety leaves was carried out through the procedure of acetone precipitation, ammonium sulfate fractionation, and Sephadex G-150 gel filtration, resulting in a 84-fold increase in specific activity. The enzyme was stable in a range of pH 7.5 to 8.0 with an optimum of pH 7.5. The optimum temperature for the enzymic reaction was about 60°. It was thermostable with a half-life equal to 20 min at 70°. *K<sub>m</sub>* values for (+)-catechin and pyrogallol were  $1.6 \times 10^{-3}$  and  $0.5 \times 10^{-3}$  M, respectively. It possesses high catecholase activity but little or no cresolase activity. Lineweaver-Burk analysis of inhibition data revealed that the inhibition of (+)-catechin oxidation by potassium cyanide, 4-nitrocatechol, cystein and 2-mercaptoethanol was competitive with *K<sub>i</sub>* values of  $1.1 \times 10^{-6}$ ,  $1.8 \times 10^{-6}$ ,  $8.9 \times 10^{-6}$  and  $1.3 \times 10^{-5}$  M, respectively.

**Keywords**—Korean native tobacco variety leaves • polyphenol oxidase • enzyme purification

신선한 과실이나 채소등은 자극 또는 손상을 받았을 때 흔히 갈변 현상을 나타낸다. 이러한 갈변 현상은 식물 조직 중에 존재하는 phenol성 물질이 polyphenol oxidase(PPO)에 의해서 산화되어 quinone으로 되고, 이들이 서로 중합하거나 또는 다른 phenol 성 물질과 반응하여 melanin 색소를 생성하기 때문이라고 알려져 있다.<sup>1)</sup>

주로 식물계에 널리 분포하는 효소군으로서 산화적 갈변을 촉매하는 PPO는 copper를 함유하고 있으며, 비교적 기질 특이성이 높지 않고 phenol성 물질을 이용하여 아래와 같은 두가지 상이한 반응을 촉매한다. 즉 monophenol의 ortho 위치를 hydroxylation 시키는 반응으로서 mono-

phenol hydroxylase, tyrosinase 또는 cresolase activity등으로 불리우며 o-diphenol을 o-quinone으로 산화시키는 반응으로서 흔히 polyphenol oxidase, p-diphenol oxidase, catecholase activity 등 다양한 용어로서 불리운다. PPO는 그 종류에 따라 위의 반응 중 하나 또는 두가지 반응을 동시에 일으키나, laccase와는 달리 어떠한 조건 하에서도 p-diphenol의 산화를 촉매할 수 없다는 것이 특징적이다.<sup>2)</sup> Wichers등<sup>3)</sup>은 위의 두가지 활성 중 cresolase activity는 효소의 정제 과정에서 매우 쉽게 불활성화되었다고 보고하였다.

효소 연구에 protein fractionation이 도입되면

서 부터는 PPO의 isozyme에 대한 연구가 활발히 이루어 졌다. Tobacco leaf 중의 PPO가 다양한 기질 특이성과 촉매 활성을 갖는 여러개의 isozyme으로 이루어졌으며, 몇몇 isozyme은 조직 특이성인 것이 입증된 바 있다. Sheen<sup>4)</sup>은 담배의 여러 부위 중 특히 씨방에서 매우 높은 PPO활성을 발견하였고, 담배의 꽃 추출물 중에서는 전기 영동에 의해서 6개의 isozyme을 분리하였다.<sup>5)</sup> Van Huynh과 Jerumanis<sup>6,7)</sup>는 barley로 부터 PPO를 정제하여 그 이화학적 성상에 대해 고찰한 바 있다.

본 연구에서는 식물체 중의 PPO에 관한 연구의 일환으로, 국내에서 재배되는 담배의 잎 중에서 phenol성 물질을 산화시키는 효소를 정제하고 그 이화학적 성상을 검토하여 약간의 지견을 얻었으므로 보고하고자 한다.

## 실험 방법

### 실험 재료

경기도 수원에 소재한 한국인삼연초연구소 경작시험장에서 재배한 재배종 담배중 광초(*Nicotiana tabacum* L.)의 잎 부위를 실험에 사용하였다. 성숙한 담배엽을 밭에서 채취하여 냉동보관하였다가 실험에 사용하였다.

### 실험 기기 및 시약

UV 측정에는 Hitachi double beam spectrophotometer model 200-20을, centrifuge는 Sorvall RC 2-B를, pH meter는 Orion research digital pH milivolt meter 611을 사용하였고, Sephadex G-150 (bead size 40-120  $\mu$ )과 dialysis sacks(250-7  $\mu$ )은 Sigma 제품을 사용하였다. 기타 본 실험에 사용한 시약들은 모두 특급이다.

따로 언급이 없는 한 모든 조작은  $4 \pm 1^\circ$ 에서 실시하였다.

### 효소의 추출 및 정제

냉동 상태의 담배엽 600 g을 Waring blender에 넣고, 2% NaCl과 0.5% sodium ascorbate를 함유한 빙냉시킨 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5) 9,000 ml를 가하여 1분간 마쇄하였다. 이때 세포막에 결합된 효소를 유리시킬 목적으로 tween-80을 1% 가하여 specific activity를 비교

하였으나, tween-80을 넣지 않았을 때가 더욱 높게 나타났으므로, 상기의 저해제만을 가하여 추출하였다. 마쇄한 액을 4시간 동안 교반하면서 추출한 후, 이 액을 6,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 상등액을 모아 dialysis sack에 넣고 polyvinylpyrrolidone을 사용하여 농축하였다.

농축액에 약 2배량의 빙냉시킨 acetone을 서서히 가하여 1시간 방치한 다음 생성된 침전을 Toyo No. 2 여지로 여과하여 분리하였다. 침전을 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5) 약 35 ml에 용해시킨 후, 미세한 분말 상태로 같은 ammonium sulfate를 소량씩 가하여 40~70%로 포화시켰다. 이 때 30% 포화액을 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 제거하였고 그 상등액을 다시 70%로 포화시켜 역시 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전을 얻었다.

이 침전을 약 2ml의 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5)에 용해시켜 48시간 동안 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5) 중에서 투석액을 자주 갈아 주면서 투석하였다. 투석 후, 다시 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거하였다. 이 액을 Sephadex G-150 column에서 chromatography 시켰다. 즉 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5)로 column(2.1  $\times$  85 cm)의 평형을 유지시켰으며, 효소액을 넣은 다음 동일 buffer로 column을 유출시켰다. 이때 유출 속도는 4.1 ml/hr로 하였다. 유출된 분획을 280 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질량을 결정하였고, 아래의 효소 활성 측정법에 따라 효소 활성을 측정하였다.

### 단백질 정량

단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 Lowry-Folin법<sup>8)</sup>으로 측정하였다

### 효소활성 측정

효소 활성은 spectrophotometer로 420 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 기질 0.5 ml, 0.05 M phosphate buffer(pH 7.5) 2.3 ml, 효소액 0.2 ml를 잘 혼합한 반응액을 60°에서 10분간 반응시킨 후, 기질 산화로 인한 흡광도의 증가율을 측정하였다. 효소 활성 1단위는 420 nm에서 1분당 흡광도 0.001을 변화시키는 효소량

으로 정하였다.

#### 최적 온도

(+)-catechin ( $10^{-3}$  M)을 기질로 하여 반응액을  $30\sim 75^\circ$  범위 내에서 각각 10분씩 반응시킨 후, 효소 활성을 측정하였다.

#### 열안정성

효소를 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5)에 용해시킨 후,  $60\sim 75^\circ$  범위의 주어진 온도에서 10분 간격으로 1시간까지 방치하였다. 일정시간 방치한 효소액은 곧 얼음 중에 넣어 냉각하였다. 이 효소액에 기질로서  $10^{-3}$  M (+)-catechin을 넣고  $60^\circ$ 에서 10분간 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다.

#### 최적 pH

(+)-catechin ( $10^{-3}$  M)을 기질로 하여 반응액의 pH를  $5.0\sim 9.0$  범위내에서 각각 10분씩 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다.

#### 기질 농도의 영향

기질로서 (+)-catechin과 pyrogallol을 사용하였으며, 기질 농도 범위는  $10^{-4}\sim 10^{-5}$  M로 하였다.  $K_m$ 치와  $V_{max}$ 치를 Lineweaver Burk plots에 의해서 결정하였다.

#### 기질 특이성

기질로서 monophenols (tyrosine, 1-naphthol, *p*-coumaric acid, ferulic acid, *m*-cresol), diphenols ((+)-catechin, epinephrine, DOPA, 4-methylcatechol, chlorogenic acid, hydrocaffeic acid, catechol, caffeic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, resorcinol, hydroquinone), polyphenols (pyrogallol, gallic acid, quinic acid)를 기질로 사용하여 효소에 대한 기질 특이성을 검토하였다. 물에 대한 용해도가 썩 좋지 않은 (+)-catechin, DOPA, caffeic acid 등은 1% ethanol 수용액에 용해하였다.

#### 효소 저해제의 영향

효소 저해제로서 reducing agents (ascorbic acid, glutathione, cysteine, 2-mercaptoethanol, potassium metabisulfite), metal chelators (potassium cyanide, sodium diethyldithiocarbamate, thiourea, sodium azide, EDTA), 산화가 거의 되지 않는 phenol성 화합물 (4-nitrocatechol,

*o*-nitrophenol, 3,4-dihydroxybenzoic acid) 및 기타 화합물 (polyvinylpyrrolidone, sodium chloride)들이 효소 활성을 저해하는 정도를 측정하였다. 이때 기질로서는  $10^{-3}$  M (+)-catechin과 pyrogallol을 사용하였고, 이들 각각에 대해서 각 저해제 마다 5가지 농도 ( $5\times 10^{-3}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5\times 10^{-4}$ ,  $5\times 10^{-5}$ ,  $5\times 10^{-6}$  M)에서 그 저해력을 비교하였다.

## 실험 결과 및 고찰

### 효소의 추출 및 정제

Table I에 각 단계별로 정제도를 나타내었다. 2% NaCl과 0.5% sodium ascorbate를 함유한 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5)로 추출하고 원심분리하여 얻은 조(粗)효소에 비하여 acetone 처리 후에는 정제도가 8.3배,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  포화 후에는 22.4배로 증가하였다.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  포화시 40~70% 포화 분획에서의 specific activity가 비교적 크게 나타났으므로 이 효소 분획을 모아 Sephadex G-150 column으로 chromatography를 실시하였다.

Fig. 1는 ammonium sulfate 40~70% 포화 분획을 Sephadex G-150으로 chromatography한 결과이다. 이때 specific activity는 조(粗)효소에 비하여 약 84배 증가하였다. Tube number 43을 전후로 하여 PPO 활성을 나타내었고, 단백질은 280 nm에서 흡광도를 측정할 때 tube number

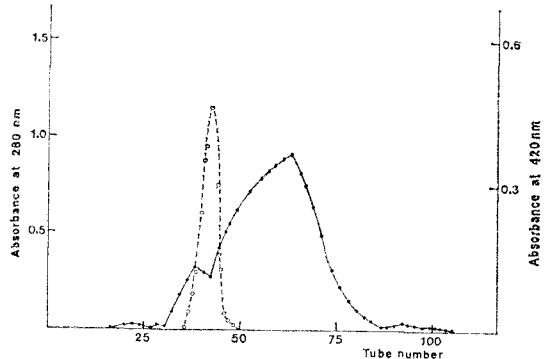


Fig. 1—Chromatography of the tobacco leaf polyphenol oxidase on Sephadex G-150 column eluted with 0.05 M phosphate buffer at pH 7.5 (flow rate 4.7 ml/hr.) —●— protein, —○— enzyme activity.

**Table I**—Purification of polyphenol oxidase from tobacco leaf

Steps	Enzyme activity* (units/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (units/mg·protein)	Activity recovery (%)	Purification (fold)
Crude** extract	67.5	2.70	25.0	100	1
Acetone treatment	650.0	3.12	208.3	64	8.3
40~70% saturated with (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	578.0	1.03	561.2	42	22.4
Sephadex G-150	295.0	0.14	2107.1	22	84.3

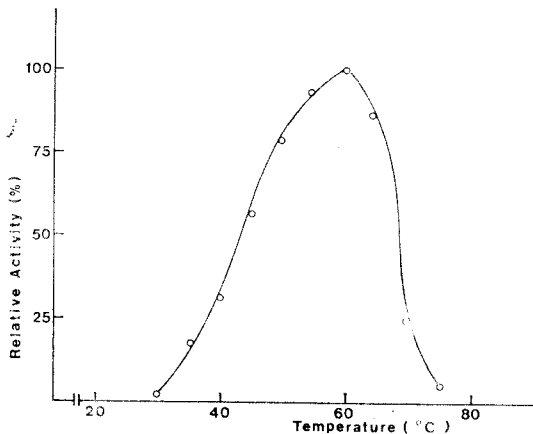
\* Enzyme activity at pH 7.5 using 10<sup>-3</sup>M (+)-catechin as substrate. (0.001 change in absorbance at 420 nm/min=1 unit activity)

\*\* Six hundred grams of tobacco leaves were homogenized for 1 min with 9 l of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5) containing 2% NaCl and 0.5% sod. ascorbate and the homogenate was centrifuged for 30 min at 3000 rpm.

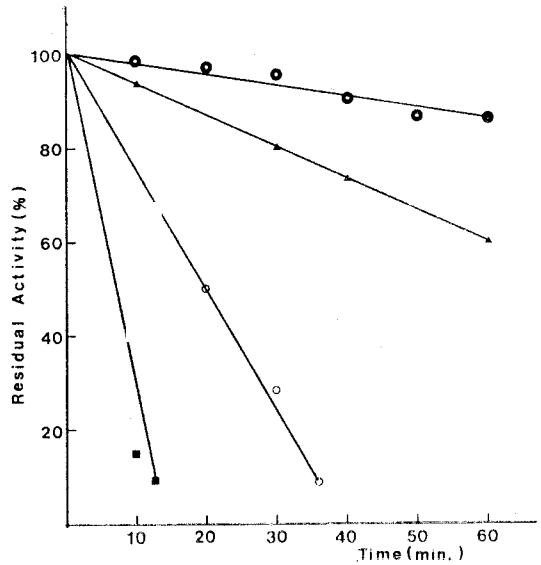
65를 전후로 하여 높은 함량을 나타내었다.

**최적 온도 및 열안정성**

Tobacco leaf PPO의 최적 반응 온도는 60°인 것으로 나타났다. (Fig. 2) Fig. 3는 본 효소의 열에 의한 불활성화 정도를 나타낸 것이다. 60°, pH 7.5에서 본 효소를 1시간 동안 방치하였을 때, 85% 이상의 활성이 그대로 남아 있었다. 70°에서 20분 방치 후에는 원래 활성의 50%가 유지되었으며 75°에서는 12분이 지난 후에 활성이 거의 소실되었다. 이상의 결과로 보아 tobacco leaf PPO는 열에 대한 안정성이 비교적 양호한 것으로 나타났는데 이러한 결과는 반감기가 65°에서 1시간으로 나타난 barley PPO의 높은 열안정성과 매우 유사하다.<sup>7)</sup>



**Fig. 2**—Effect of temperature on (+)-catechin (10<sup>-3</sup>M) oxidation catalysed by the tobacco leaf polyphenol oxidase.



**Fig. 3**—Residual activity of the tobacco leaf polyphenol oxidase after various incubation times at different temperatures. —○— 60°, —▲— 65°, —○— 70°, —■— 75°.

**최적 pH**

Fig. 4에 tobacco leaf PPO 활성의 최적 pH를 나타내었다. pH 7.5에서 최대 PPO 활성을 나타내었으며 pH 7.5~8.0에서의 활성은 거의 유사하였는데, 이러한 결과는 barley PPO (pH 6.5~7.5),<sup>7)</sup> drum wheat PPO (pH 7.3~7.7),<sup>9)</sup> cherry PPO (pH 7.3~7.8)<sup>10)</sup> 및 mango PPO (pH 5.6~6.0)<sup>11)</sup>에서 나타난 결과와 매우 유사하다. pH 7.5 이상에 비하여, pH 7.5 이하에서는 급속한 활성 저하를 나타냈으며, pH 5.0에

서는 효소 활성이 완전히 소실되었다. Egg plant,<sup>12)</sup> cling stone peach,<sup>13)</sup> cranberry,<sup>14)</sup> bean leaf<sup>15)</sup> 등의 과실류에서는 최적 pH가 거의 중성인 것으로 보고되었으며 tobacco 중 burley 종<sup>7)</sup>의 최적 pH는 6.5~7.5인 것으로 보고되었다.

즉 과실류에 비하여 tobacco의 최적 pH가 알칼리쪽임을 알 수 있으며, tobacco 중에서도 barley 종 보다는 본 실험에 사용한 한국산 재래종이 더욱 알칼리쪽에서 최대 활성을 나타내었다.

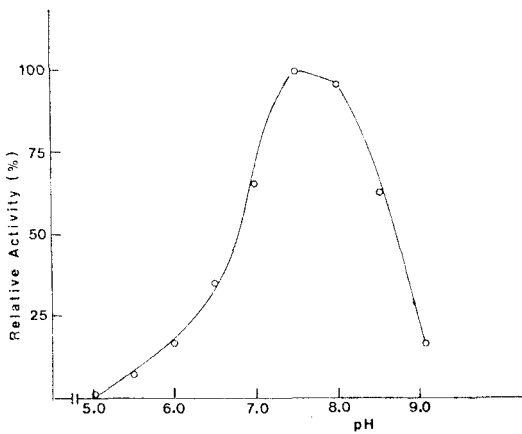


Fig. 4—Effect of pH on (+)-catechin ( $10^{-3}M$ ) oxidation catalysed by the tobacco leaf polyphenol oxidase.

기질 농도의 영향

기질로서 (+)-catechin과 pyrogall에 대한 PPO의 Michaelis constants( $K_m$ ) 및 maximal velocities( $V_{max}$ )를 Table II에 나타내었다.

$K_m$  및  $V_{max}$ 치는 Lineweaver-Burk plot으로 나타내었다. (Fig. 5) 본 실험에서 얻은 효소의 (+)-catechin에 대한  $K_m$ 치인  $1.6 \times 10^{-3}M$ 은 이미 보고된 Bartlett pear PPO와 동일하였고,<sup>16)</sup> mango PPO의  $2.0 \times 10^{-3}M$ ,<sup>17)</sup> barley PPO의  $2.8 \times 10^{-3}M$ <sup>7)</sup>과 비교하면 거의 유사한 결과를 나

Table II—Michaelis constants and maximum velocities of tobacco leaf PPO

Substrates	$K_m$ (M)	$V_{max}$ (units/mg)
(+)-catechin	$1.6 \times 10^{-3}$	52.6
pyrogallol	$0.5 \times 10^{-3}$	35.4

타내었다. 그러나 pyrogallol에 대한  $K_m$  치는  $0.5 \times 10^{-3}M$ 로서 yam tuber PPO의  $6.3 \times 10^{-3}M$ <sup>18)</sup>보다 훨씬 작은 수치를 나타내었다. 즉 tobacco leaf PPO는 pyrogallol에 대하여 yam tuber PPO보다 강력한 친화력을 나타내는 것을 알 수 있다.

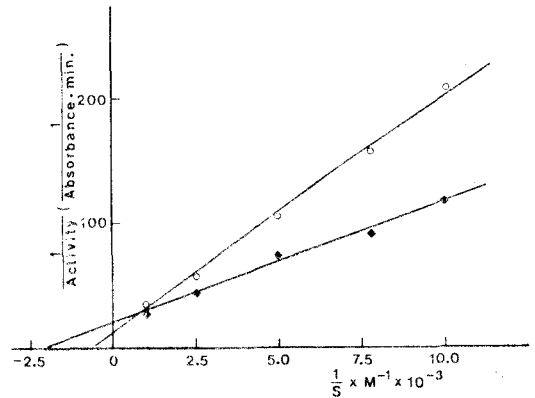


Fig. 5—Double reciprocal plots for the tobacco leaf polyphenol oxidase. substrates: (+)-catechin -o-; pyrogallol -♦-, buffer: 0.05 M phosphate (pH 7.5), enzyme 0.2 ml in 3 ml reacting mixture, temperature:  $60.0 \pm 0.5^\circ$ ,  $K_m$  values: (+)-catechin  $1.6 \times 10^{-3}M$ ; pyrogallol  $0.5 \times 10^{-3}M$ .

기질 특이성

Tobacco leaf PPO의 기질 특이성에 관한 연구 결과를 Table III에 나타내었다. 일반적으로 PPO의 기질로서 알려진 많은 phenol성 물질 (mono-, di-, polyphenols)을 사용하여 기질 특이성을 관찰해 본 결과 주로 *o*-diphenols와 polyphenols에 대하여 높은 활성이 있었다. 그 중에서도 pyrogallol과 (+)-catechin이 본 효소에 대하여 각각 양호한 기질임을 알 수 있었다. 그러나 *o*-diphenols 중에서 4-substituted catechols(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde)에 대해서는 전혀 활성이 없었다. 이러한 실험 결과는 4-substituted catechols이 PPO에 의해서 산화되지 않고, 오히려 경쟁적 저해제로서 작용한다는 보고를<sup>19,20)</sup> 뒷받침해 주는 것으로 사료된다. 또한 Hasegawa 등<sup>21)</sup>은 3,4-dihydroxybenzoic acid가 PPO의 기질로서 작용하지 않는다고 하였는데 이것은 C-1에 치환된 carboxyl기가 효소 활성을 방해하기 때문이라고 설명하였다, 반면에 mono-

**Table III**—Substrate specificities of the tobacco leaf enzyme

Substrates( $10^{-3}M$ )	Relative Activity (%)
<b>Monophenols</b>	
Tyrosine	3.2
1-Naphthol	0
<i>p</i> -Coumaric acid	0
Ferulic acid	0
<i>m</i> -Cresol	0
<b><i>o</i>-Diphenols</b>	
(+)-Catechin	100.0
Epinephrine	44.5
L-DOPA	23.4
4-Methylcatechol	15.6
Chlorogenic acid	11.6
Hydrocaffeic acid	10.5
Catechol	6.2
Caffeic acid	4.8
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	0
3,4-Dihydroxybenzoic acid	0
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	0
<b><i>m</i>-Diphenol</b>	
Resorcinol	0
<b><i>p</i>-Diphenol</b>	
Hydroquinone	0
<b>Polyphenols</b>	
Pyrogallol	106.0
Gallic acid	44.5
Quinic acid	0

phenols에 대해서는 tyrosine에 약간의 활성이 있을 뿐, 거의 활성이 없었다.

식물체에서 분리한 PPO는 동물조직으로부터 분리한 PPO에 비하여 기질 특이성이 다양하고, 일반적으로 cresolase activity 보다는 catecholase activity가 높은 것으로 알려져 있다.<sup>3,7,13,21-23)</sup>

#### 효소 저해제의 영향

여러가지 저해제에 의한 tobacco leaf PPO 활성의 저해 정도를 Table IV, V에 나타내었다. Reducing agents인 ascorbic acid, glutathione, cysteine, 2-mercaptoethanol과 potassium metabisulfite는 기질인 (+)-catechin에 대한 효소 활

성을  $5 \times 10^{-4}M$  농도에서 완전히 저해시켰다. Pyrogallol에 대한 효소 활성은 cysteine을 제외하고는  $5 \times 10^{-3}M$ 에서 완전히 저해되었다. 여러가지의 저해제 유형 중 일반적으로 reducing agents에 의한 저해 정도가 가장 큰 것으로 나타났다.

Metal chelating compounds로서 potassium cyanide와 sodium diethyldithiocarbamate는 저농도에서도 그 저해력이 매우 컸으나 thiourea, sodium azide, EDTA는 비교적 저해력이 약한 것으로 나타났다. 특히 EDTA는 고농도에서조차 그 저해력이 매우 약한데 이것과 유사한 결과가 cling peach,<sup>24)</sup> egg plant,<sup>25)</sup> yam tuber,<sup>23)</sup> solanum melongena<sup>26)</sup> 등에서 분리한 PPO에 대해서도 보고된 바 있다. 이러한 결과에 대해서 Luh와 Bulan<sup>24)</sup>은 반응액의 pH가 PPO 중의 copper와 EDTA 사이의 친화력에 영향을 미치는 것으로 추정하였으며,<sup>24)</sup> Ikediobi와 obasuyi<sup>23)</sup>는 EDTA의 약한 저해력을 다음과 같이 설명하였다. 즉 copper prosthetic group이 enzyme protein의 3차 구조 내에 숨겨져 있거나 또는 enzyme protein과 copper ion complex의 stability가 EDTA와 copper complex의 stability 보다 훨씬 강하기 때문이다.

Electron withdrawing group으로 치환된 phenol성 물질 중 4-nitrocatechol과 *o*-nitrophenol은 특히 (+)-catechin을 기질로 했을 때, 저농도 ( $5 \times 10^{-6}M$ )에서도 효소 활성을 완전히 저해하였다. 3,4-dihydroxybenzoic acid는 비교적 약한 저해력을 나타내었다. 산화 속도가 대단히 느린 기질인 4-nitrocatechol<sup>27)</sup>이나 산화는 되지 않으나 기질과 구조가 매우 유사한 화합물인 benzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid<sup>16,28,29)</sup>은 phenol성 기질에 대한 경쟁적 저해제로서 작용하는 것으로 알려져 있다.

기타 화합물로서 polyvinylpyrrolidone(PVP)은 특히 (+)-catechin을 기질로 하는 효소 활성을 크게 저해하였다. PVP는 PPO-기질 complex와 결합함으로써 효소 활성을 저해하는데 이때 complex의 phenol성 기질 부분에 결합하는 것으로 추정된다.<sup>30)</sup> PVP가 phenol성 화합물을 흡착하는 성질이 있으므로 phenol성 화합물 또는

**Table IV**—Effect of various inhibitors on the tobacco leaf enzyme activity using (+)-catechin ( $10^{-3}$ M) as substrate

Inhibitors	% Inhibition at(M)				
	$5 \times 10^{-3}$	$10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$
Reducing agents:					
Ascorbic acid	—	—	—	100	59
Glutathione	—	—	—	100	38
Cysteine	—	—	100	20	0
2-Mercaptoethanol	—	—	100	57	10
Potassium metabisulfite	—	—	100	98	18
Metal chelators:					
Potassium cyanide	—	—	—	—	100
Sodium diethyldithiocarbamate	—	—	100	83	34
Thiourea	81	55	48	27	21
Sodium azide	38	12	0	—	—
EDTA	15	0	—	—	—
Phenolic compounds:					
4-Nitrocatechol	—	—	—	—	100
<i>o</i> -Nitrophenol	—	—	—	—	100
3,4-Dihydroxybenzoic acid	15	10	4	0	—
Miscellaneous compounds:					
Polyvinylpyrrolidone	—	—	—	—	100
Sodium chloride	4	0	—	—	—

Enzyme 0.2 ml was pre-incubated with a mixture of inhibitor and 0.05 M phosphate buffer pH 7.5 for 2 min at 30°.

Reaction was started by addition of the substrate.

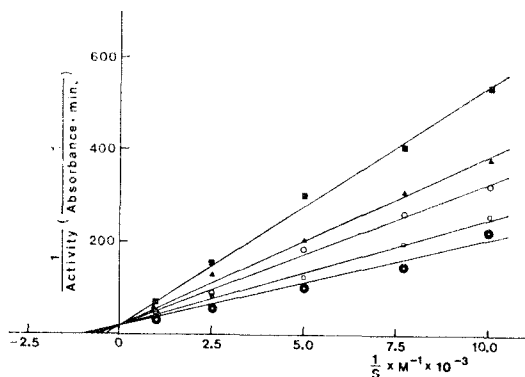
**Table V**—Effect of various inhibitors on the tobacco leaf enzyme activity using pyrogallol ( $10^{-3}$ M) as substrate

Inhibitors	% Inhibition at(M)				
	$5 \times 10^{-1}$	$10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$
Reducing agents:					
Ascorbic acid	—	100	91	20	8
Glutathione	100	79	48	5	0
Cysteine	74	46	41	5	0
2-Mercaptoethanol	100	88	56	13	0
Potassium metabisulfite	100	84	64	12	0
Metal chelators:					
Potassium cyanide	—	100	93	83	54
Sodium diethyldithiocarbamate	100	84	62	6	0
Thiourea	31	18	14	10	8
Sodium azide	25	0	—	—	—
EDTA	13	0	—	—	—
Phenolic compounds:					

4-Nitrocatechol	94	92	91	0	—
<i>o</i> -Nitrophenol	100	96	77	14	9
3,4-Dihydroxybenzoic acid	17	8	7	4	0
Micellaneous compounds:					
Polyvinylpyrrolidone	—	31	28	15	0
Sodium chloride	11	6	0	—	—

Enzyme 0.2 ml was pre-incubated with a mixture of inhibitor and 0.05 M phosphate buffer pH 7.5 for 2 min at 30°.

Reaction was started by addition of the substrate.



**Fig. 6**—Double reciprocal plots showing inhibition of the tobacco leaf polyphenol oxidase catalysis of (+)-catechin oxidation by various inhibitors. —○— no inhibitor, —●—  $10^{-6}$ M potassium cyanide, —▲—  $5 \times 10^{-6}$ M 2-mercaptoethanol, —○—  $5 \times 10^{-6}$ M cysteine, —□—  $10^{-6}$ M 4-nitrocatechol,  $K_i$  values: potassium cyanide  $1.1 \times 10^{-6}$ M; 2-mercaptoethanol  $1.3 \times 10^{-6}$ M; cysteine  $8.9 \times 10^{-6}$ M; 4-nitrocatechol  $1.8 \times 10^{-6}$ M.

이들의 산화 생성물을 불활성화하여 식물체 중의 효소를 보호할 목적으로 널리 이용되고 있다. 본 실험에 사용한 여러가지 저해제 중 sodium chloride가 tobacco leaf PPO에 대하여 그 저해력이 가장 약하였다.

저해력 시험에 관한 데이터를 Lineweaver-Burk 식에 따라 나타낸 결과, potassium cyanide, 4-nitrocatechol, cystein, 2-mercaptoethanol 등은 효소 활성을 경쟁적으로 저해하였으며, 각각의  $K_i$ 치는  $1.1 \times 10^{-6}$ ,  $1.8 \times 10^{-6}$ ,  $8.9 \times 10^{-6}$ ,  $1.3 \times 10^{-5}$ M 이었다.

이상의 실험 결과, 본 실험 방법으로 정제한 효소는 주로 *o*-diphenol을 산화시키는 polyphenol oxidase라고 생각된다.

## 결 과

한국산 재래종 담배엽에서 분리하여 정제시킨 PPO는 최적 반응 온도가 60°였으며 열에 대하여 비교적 안정하였다. 최적 반응 pH는 7.5였고, 가장 친화력이 높은 기질은 pyrogallol과 (+)-catechin 이었으며 각각의  $K_m$ 치는  $0.5 \times 10^{-3}$ ,  $1.6 \times 10^{-3}$ M이었다. 일반적으로 catecholase 활성에 비하여 cresolase 활성은 거의 없었다. 여러가지 저해제 중 reducing agents에 의한 저해가 높았고, potassium cyanide, 4-nitrocatechol, cysteine, 2-mercaptoethanol은 효소 활성을 경쟁적으로 저해하였으며 각각의  $K_i$ 치는  $1.1 \times 10^{-6}$ ,  $1.8 \times 10^{-6}$ ,  $8.9 \times 10^{-6}$ ,  $1.3 \times 10^{-5}$ M이었다.

이상의 결과, 본 실험 방법으로 정제한 효소는 주로 *o*-diphenols를 산화시키는 polyphenol oxidase라고 생각된다.

<1989년 5월 29일 접수 : 6월 15일 수리>

## 문 헌

1. Eskin, N.A.M., Henderson, H.M., Townsend, R.J.: "Biochemistry of Foods" Academic Press, New York (1971).
2. Mayer, A.M. and Harel, E.: *Phytochem.* 18, 193 (1979).
3. Wichers, H.J., Peetsma, G.J., Malingre, T.M. and Huizing, H.J.: *Planta* 162, 334 (1984).
4. Sheen, S.J. and Rebagay, G.R.: *Bot. Gaz.* 131, 297 (1970).
5. Sheen, S.J.: *Plant Physiol.* 51, 839 (1973).



6. Van Huynh, N. and Jerumanis, J.: *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* **35**, 153 (1977).
7. Van Huynh, N. and Jerumanis, J.: *J. Amer. Soc. Brew. Chem.* **36**, 81 (1978).
8. Lowry, O.H., Rosebrugh, N.J., Farr, A.L. and Randall, K.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
9. Interesse, F.S., Ruggiero, P., Lamparelli, F. and D'Avella, G.: *J. Agric. Food Chem.* **30**, 1198 (1982).
10. Benjamin, N.D. and Montgomery, M.W.: *J. Food Sci.* **38**, 799 (1973).
11. Park Y.K., Sato, H.H., Almeida, T.D. and Morretti, R.H.: *J. Food Sci.* **45**, 1619 (1980).
12. Rhoades, J.L. and Chen, T.T.: *Proc. Louisiana Acad. Sci.* **31**, 121 (1968).
13. Wong, T.C., Luh, B.S. and Whitaker, J.R.: *Plant Physiol.* **48**, 19 (1971).
14. Chan, H.T. Jr. and Yang, H.Y.: *J. Food Sci.* **35**, 169 (1971).
15. Racusen, D.: *Can. J. Bot.* **48**, 1029 (1970).
16. Rivas, N.J. and Whitaker J.R.: *Plant Physiol.* **52**, 501 (1973).
17. Prabha, T.N. and Patwardhan, M.V.: *J. Biosci.* **4**, 69 (1982).
18. Anosike, E.O. and Ayaebene, A.O.: *Phytochem.* **20**, 2625 (1981).
19. Yoshiaki, O., Shoichi, Oh-E., Genya, S., and Hiroyuki, M.: *Agric. Biol. Chem.* **42**, 253 (1978).
20. Bonner, J. and Wildman, S.G.: *Arch. Biochem.* **10**, 497 (1946).
21. Hasegawa, S. and Maier, V.P.: *J. Agric. Food Chem.* **28**, 891 (1980).
22. Interesse, F.S. and Ruggiero, P.: *J. Sci. Food Agric.* **31**, 459 (1980).
23. Ikediobi, C.O. and Obasuyi, H.N.: *Phytochem.* **21**, 2815 (1982).
24. Luh, B.S. and Bulan, P.: *J. Food Sci.* **37**, 264 (1972).
25. Knapp, F.W.: *Florida State Hort. Soc.* **74**, 256 (1961).
26. Sharma, R.C. and Ali, R.: *Phytochem.* **19**, 1597 (1980).
27. Lerch, K. and Ettlinger, L.: *Eur. J. Biochem.* **31**, 427 (1972).
28. Duchworth, H.W. and Coleman, J.E.: *J. Biol. Chem.* **245**, 1611 (1970).
29. Pifferi, P.G., Baldassari, L. and Cultrere, R.: *J. Sci. Food Agric.* **25**, 263 (1974).
30. Hulme, A.C., Jones, J.D. and Wolltorton, L. S.C.: *Nature* **201**, 795 (1964).
31. Anderson, J.W.: *Phytochem.* **7**, 1973 (1968).