

## 은행잎에서 분리한 Polyphenol Oxidase의 정제 및 특성

설지연, 박수선, 김안근\*

숙명여자대학교 약학대학

### Purification and Some Properties of Polyphenol Oxidase from *Ginkgo biloba* Leaves

Ji Yeon Seol, Soo Sun Park and An Keun Kim\*

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

**Abstract** – Polyphenol oxidase (PPO) was purified from an extract of *Ginkgo biloba* leaves by ammonium sulfate fractionation followed by sephadex G-150 column chromatography, which resulted in a 18-fold increase in specific activity. The enzyme was most active at pH 8.5 and the temperature optimum for the PPO catechol oxidation reaction was 45°C. Heat inactivation studies showed that heating for 7, 9 and 48 min. at 80, 70 and 60°C respectively caused a 50% loss in enzymatic activity and that the enzyme was completely inactivated after heat treatment at 90°C for 60 min. Km values of the PPO for catechol, hydroquinone and 4-methylcatechol derived from Lineweaver-Burk plots were  $6.06 \times 10^{-4}$ M,  $1.02 \times 10^{-3}$ M,  $1.41 \times 10^{-3}$ M respectively. Of the substrates tested, 4-methylcatechol was oxidized most readily and the enzyme did not oxidize monophenols. The enzyme catalyzed browning reaction was completely inhibited in the presence of reducing reagents, namely ascorbic acid, cysteine, glutathione, 2-mercaptoethanol, potassium metabisulfite at 0.5 mM level. Sodium chloride showed very little inhibition effect on *Ginkgo biloba* leaves PPO. Lineweaver-Burk analysis of inhibition data revealed that the inhibition by cysteine, 2-mercaptoethanol, potassium cyanide was competitive with ki values of  $1.1 \times 10^{-5}$ M,  $2.4 \times 10^{-5}$ M,  $8 \times 10^{-5}$ M, respectively. Among the divalent cations,  $\text{Cu}^{2+}$  ion was a strong activator on PPO and  $\text{Mn}^{2+}$  ion was little or no effect on PPO activity.  $\text{Ni}^{2+}$  ion was an inhibitor on PPO.

**Key words** – Catecholase activity; polyphenol oxidase; *Ginkgo biloba*; Ginkgoaceae.

Polyphenol oxidase (이하 PPO: *o*-diphenol oxygen oxidoreductase, catechol oxidase, phenolase, E.C.1.10.3.1.)는 분자산소를 이용하여 monohydroxyphenol을 *o*-dihydroxyphenol로 hydroxylation (cresolase activity)시킬 뿐 아니라 *o*-dihydroxyphenol을 *o*-diquinone으로 산화시키는 반응(catecholase activity)을 촉매하는 효소로서 활성 부위에 구리를 함유하고 있다.<sup>1)</sup>

특히, 과일이나 야채가 성숙, 노화하거나, 가공, 포장 등의 과정에서 외인적인 손상을 받게 되면 갈변 현상을 일으키며, 이것은 결국 색깔, 맛, 향기 및 영

\*교신저자 : Fax 02-710-9566

양가에 좋지 못한 변화를 가져 오게 된다.<sup>2,3)</sup> 식물의 정상적인 life cycle에서의 기능적 갈변은 서서히 일어나기 때문에 food processing에서도 크게 중요한 것은 아니지만, 기계적인 손상으로 인한 갈변반응은 빠르고 강하게 발생하기 때문에 상업적으로 크게 문제시되고 있다.<sup>2,4)</sup>

PPO의 활성은 식물이 성장하는 동안에 현저하게 달라지고, 성장조건에 의해 상당히 영향을 받을 수 있으며, homogenization 과정에 따라서도 영향을 받는다고 보고되어 있다.<sup>5,6)</sup> PPO가 촉매하는 산화적 갈변 즉, PPO가 phenol성 화합물과 반응하는 것을

방지하기 위한 가장 효과적인 방법중에 polycaprolactam powder, PEG, insoluble PVP, Amberlite XAD resin, 및 anion exchange resin과 같은 phenol complexing agent를 사용하는 것이 있다. 그러나 모든 식물들이 함유하고 있는 phenol성 화합물의 종류가 다르고 함유량도 다르므로 적절한 방법으로 효소를 추출하고 단백질과 phenol성 화합물의 상호작용을 최소화하기 위해서는 개개의 plant system이 연구되어야 한다.<sup>7)</sup> Vaughn과 Duke<sup>8)</sup>는 최근의 자료들을 바탕으로 하여 고등식물에서 PPO의 생리학적 기능을 다음과 같이 요약하고 있다. 첫째는 PPO가 핵으로부터 암호화된 plastidic enzyme으로서 색소체로 도입될 때까지는 불활성화 상태로 있으며, 둘째는 healthy green tissue에서 PPO는 thylakoid membrane에 latent form으로 존재하여 phenol성 화합물을 합성할 때에는 참여하지 않는다고 하였다. 셋째는 PPO가 *in vivo*에서 노화 혹은 손상된 세포에만 phenol oxidase로 기능을 하는 것으로 보고하였다.

최근에는 protein fractionation이 효소연구에 도입되면서 PPO의 isozyme에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며,<sup>9-11)</sup> 갈변에 대한 저해제의 연구개발도 중요시되고 있다. 또한 PPO는 효소적 갈변반응 생성물에 의한 항돌연변이 효과,<sup>12)</sup> 암에 대한 melanocytotoxic substance로서 의학적 이용가능성<sup>13)</sup>에 관한 연구가 보고되어 있으며, 그 외에도 유해한 페놀성 물질의 해독,<sup>14)</sup> 환경오염물질의 악취제거,<sup>15)</sup> 방향족 화합물의 위치 특이적인 수산화 반응<sup>16)</sup> 등에 응용가능성을 보이고 있어 PPO에 관한 연구가 더욱 요구된다고 볼 수 있다.

은행나무(*Ginkgo biloba* L.)는 은행나무과(*Ginkgoaceae*)에 속하는 낙엽교목으로써<sup>17)</sup> 많은 성분들이 밝혀졌는데 그 중에서 flavonoid에 관한 연구가 근래에 들어 활발해지면서 다양한 생리 활성과 약리 작용이 밝혀지고 임상실험을 통해 의약품으로도 많이 개발·시판되고 있다.<sup>18)</sup> 본 실험에서는 은행잎에서 PPO의 존재를 추정하고 생리활성에 미치는 영향을 알아보고자, 효소를 추출, 정제한 후 이화학적 성상을 검토하여 약간의 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 본 실험에 사용된 은행나무잎은 숙명여과대학교 교정에서 봄에 채취하여 사용하였다.

**시약 및 기기** - 실험에 사용한 시약은 potassium

phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, sodium ascorbate(Junsei), ammonium sulfate (Wako), polyvinylpyrrolidone, 4-methylcatechol(Sigma), hydrocaffeic acid(Fluka), sephadex G-150 (beadsizes 40-120 $\mu$ , Sigma), dialysis sack (250-7 $\mu$ , Sigma) 등이며 기타 시약들은 특급 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기는 pH meter(Orion research digital pH millivolt meter 611), Refrigerator(Sorvall, RC 2-B), Double-beam spectrophotometer(Perkin Elmer : Lambda 4A Operating Software Enhanced Scan) 등을 사용하였다.

**효소의 추출 및 정제** - Waring blender에 은행잎 100 g과 빙냉시킨 50 mM pot. phosphate buffer (0.5% sod. ascorbate함유, pH 8.0)를 넣고 1분간 마쇄한 후, 전량 2l로 하여 8시간 동안 냉장상태에서 교반하면서 추출하였다. 이 액을 저온원심분리기로 6,000 rpm에서 30분간 원심분리하고, 그 상층액을 dialysis sack에 넣고 polyvinylpyrrolidone을 사용하여 농축하였다. 이후 농축액에 미세한 분말의 고체 ammonium sulfate를 소량씩 가하여 60% 포화시킨 액을 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하고, 그 상층액을 취해 다시 고체 ammonium sulfate로 90%까지 포화시킨 후, 같은 조건에서 원심분리하여 침전을 얻었다. 빙냉시킨 50 mM pot. phosphate buffer(pH 8.0)소량으로 침전물을 용해시키고 72시간 정도 투석한 후, 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거하고 남은 상층액을 sephadex G-150 column에 gel-filtration시켰다. 위의 조작은 4 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C에서 실시하였다.

**Sephadex G-150 gel-filtration chromatography** - 효소 활성이 높은 분획을 얻기 위해 sephadex G-150으로 충전한 column (2.1 $\times$ 85 cm)을 미리 50 mM pot. phosphate buffer (pH 8.0)로 평형시킨 다음, 위의 정제과정을 통해 얻은 조효소액 2 ml를 gel상단에 조심스럽게 가하고, 유출속도 8.2 ml/hr로 하여 동일 완충액으로 유출시켰다.

**효소 활성도 측정** - 효소액은 sephadex G-150 Gel-filtration을 통해 얻은 효소활성이 큰 분획을 사용하였고, 기질로서 10 mM catechol을 사용하였다. PPO활성 측정은 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.0 ml에 기질액 0.5 ml, 효소액 0.5 ml를 가해 총 3 ml로 하여 45 $^{\circ}$ C에서 정확히 30분간 반응시키고, 기질 산화로 인한 흡광도의 증가율을 420 nm에서 측정하였다. 이때, 효소활성의 1단위는 420 nm에

서 1분당 흡광도 0.001을 변화시키는 효소량으로 정하였다.

**단백질의 정량** - 단백질의 함량은 bovine serum albumin을 standard로 사용하여 Lowry-Folin법<sup>19)</sup>에 의해 측정하였다.

**최적 온도 및 최적 pH** - 효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 관찰하기 위하여 catechol (10 mM) 0.5 ml를 기질로 하여 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.0 ml, 효소액 0.5 ml를 가해 3 ml로 하고, 반응온도를 15-70°C까지 변화시켜 가면서 30분간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최적 pH측정은 기질 및 모든 조건은 최적 온도때와 동일한 방법으로 하고 pH는 5.0-9.0까지 0.5간격으로 변화시켜 가면서 45°C에서 30분간 반응시켜 흡광도를 측정하였다. pH 5-8을 맞추기 위하여 50 mM pot. phosphate buffer를, pH 8.5와 9를 위하여는 50 mM tris-HCl buffer를 각각 사용하였다.

**열에 대한 안정성** - 효소액을 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.5)에 용해시킨 후, 10분-120분까지 시간을 변화시키고 온도를 50-90°C까지 변화시켜 가면서 방치하였다. 일정한 온도에서 일정시간 방치한 효소액은 곧 얼음중에 넣어 냉각하였다. 이 효소액에 기질로서 catechol(10 mM)을 가하고 45°C에서 30분간 반응시킨 후 활성을 측정함으로써 열이 효소의 안정성에 미치는 영향을 검토하였다. 이때 열처리하지 않고 측정된 효소활성과 비교하여 잔존활성치를 구하였다.

**기질농도의 영향 및 기질특이성** - 기질의 농도를 다양하게 변화시켜 효소의 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. 기질로서 catechol, hydroquinone 및 4-methylcatechol을 사용하였으며 농도 범위는  $1 \times 10^{-2}$  -  $4 \times 10^{-4}$ M로 하여 효소활성 측정때와 동일한 방법으로 측정하여 반응 속도의 변화를 관찰하였다. Mono, di, polyhydroxy 화합물(caffeic acid, chlorogenic acid, 4-methylcatechol, catechol, hydrocaffeic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde등)을 기질로 사용하여 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.5)에 각 기질을 최종농도가 1 mM이 되도록 가하고, 효소액 0.5 ml를 가하여 반응액이 총 3 ml가 되게한 후, 45°C에서 30분간 반응시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**저해제의 영향** - Reducing reagents(ascorbic acid, cysteine, 2-mercaptoethanol, potassium metabisulfite), metal chelators(potassium cyanide, sodium diethyldithiocarbamate, thiourea, sodium

azide, EDTA), 산화가 거의 되지 않는 phenol성 화합물(o-nitrophenol, 4-nitrocatechol) 및 기타 화합물(polyvinylpyrrolidone, sodium chloride)등의 농도를 달리하여 그 각각에 대한 저해정도를 비교하였다. 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.5)에 각 농도의 저해제를 가하고, 효소액 0.5 ml를 가해 45°C에서 2분간 pre-incubation시킨 후, 기질(4-methylcatechol, hydrocaffeic acid)을 최종 농도가 1 mM이 되게 가하고 30분 반응시킨 후의 흡광도를 측정하였다. 이것을 저해제를 가하지 않고 실험한 결과와 비교하여 그 상대활성을 백분율로 나타내었다.

**2가 양이온의 영향** - 2가 양이온이 은행잎 PPO의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ion등을 사용하여 각각 5가지 농도(0.05 mM, 0.1 mM, 0.25 mM, 1 mM, 2 mM)에서 효소활성을 측정하였다. 4-Methylcatechol (1 mM)을 기질로 사용하였으며, 효소활성도 측정법에 준하여 효소활성 변화를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

**효소추출** - 은행잎 PPO를 추출함에 있어 먼저 추출용매의 액성을 pH 5-9까지 변화시켜 screening한 결과 pH 5와 pH 6에서 얻은 추출액에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. pH 7에서는 약간의 활성이 나타났으며, pH 9보다는 pH 8에서 활성이 더 크게 나타나는 것으로 보아 은행잎 PPO는 추출용매의 pH에 크게 영향을 받는 것으로 사료된다.

Table II는 은행잎 PPO를 0.5% sodium ascorbate를 함유한 50 mM pot. phosphate buffer (pH 8.0)로 추출하여 정제한 결과를 나타낸 것이다. 조효소에 비해 고체 ammonium sulfate 60-90% 분획시켜 얻은 효소액의 specific activity가 9.6배로 증가하였다. Ammonium sulfate로 분획한 결과는 Table I에서 보는 바와 같이 30% 포화시켰을 경우에 대부분의 단백질이 침전으로 떨어졌으나 효소활성이 낮아서 specific activity는 적었고, 90% 포화시킨 분획의 specific activity가 비교적 크게 나타났으므로 60% 포화시킨 침전을 제거한 후 90%까지 포화시킨 분획을 취하여 다음 정제과정을 실시하였다.

**Sephadex G-150 column chromatography** Fig. 1은 ammonium sulfate로 60-90% 분획한 후, sephadex G-150 column chromatography로 gel-filtration한 결과이다. 단백질은 280 nm에서, 효소활성

**Table I.** Fractionation of *Ginkgo biloba* leaves polyphenol oxidase by solid ammonium sulfate

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentration (%saturation)	Enzyme activity (Units*/ml)	Protein content (mg/ml)	Specific activity (Units*/mg)
30	92.0	146.4	0.6
60	114.0	18.0	6.3
90	100.0	3.6	27.8

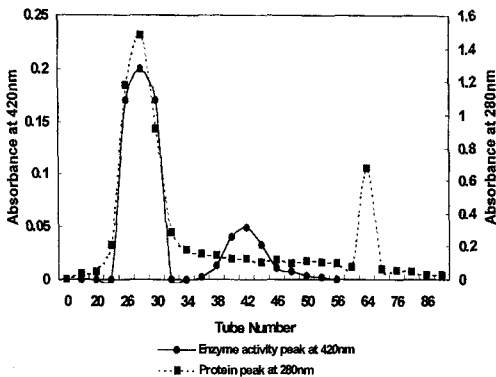
\* One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that cause a 0.001 extinction change in absorbance per min. at 420 nm.

**Table II.** Purification of *Ginkgo biloba* leaves polyphenol oxidase

Purification procedure	Enzyme** activity (Units/ml)	Protein content (mg/ml)	Specific activity (Units/mg)	Purification (fold)
Crude*** extract	40.8	14.2	2.9	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation (60-90%)	100.0	3.6	27.8	9.6
Sephadex G-150	7.4	0.14	52.9	18.2

\*\* Enzyme activity at pH 8.5 using 10 mM catechol as a substrate (0.001 change in absorbance at 420 nm/min. = 1 unit activity)

\*\*\* The crude extract was prepared by homogenizing *Ginkgo biloba* leaves with 50 mM pot. phosphate buffer (pH 8.0) containing inhibitors. Enzymatic activity of the crude extract was assayed after dialysis against 50 mM pot. phosphate buffer, pH 8.0



**Fig. 1.** Chromatography on sephadex G-150 column of partially purified polyphenol oxidase from *Ginkgo biloba* leaves

은 420 nm에서 각각 측정하였을 때, tube number 26-30은 옅은 황색의 혼탁한 용액으로 약간의 효소 활성과 높은 단백질 함량을 나타냈고, tube number 42를 전후로 하여는 효소활성이 크게 나타났다. 본 실험에서는 효소활성이 큰 분획을 사용하였으며 이 때, specific activity는 조효소에 비해 18배 증가하였다.

**최적온도 및 최적 pH** - 이상의 방법으로 분리·정제한 은행잎 PPO는 40-50°C사이에서 가장 활성이 크며 최적 반응 온도는 45°C였다. 이 효소에 대한

pH의 영향을 검토한 결과, pH 8.5에서 효소활성이 가장 컸으며 pH 7에서는 최대 활성의 50%를 나타냈다. 일반적으로, polyphenol oxidase는 pH 5-8사이에 활성이 있는 것으로 알려져 있는데,<sup>20)</sup> 은행잎 PPO는 약alkali성 효소로서 45°C에서 최적 pH가 7.9인 sunflower seed PPO와 유사한 특성을 보였다.<sup>21)</sup>

**열에 대한 안정성** - 50-90°C에서 은행잎 PPO의 열에 대한 안정성을 알아보았을 때, 60, 70, 80 그리고 90°C에서 10분 열처리했을 때는 은행잎 PPO가 빠르게 불활성화 되었으나, 10분 후에는 시간의 경과에 따라 완만하게 효소활성이 감소하였다. 60°C에서 48분, 80°C에서 7분 동안 열처리한 후에는 50%의 활성이 유지되었고 90°C에서 60분 경과 후에 활성이 완전히 소실되는 것으로 보아 비교적 열에 안정한 것으로 추정된다(Fig. 2).

**기질농도의 영향 및 기질특이성** - Fig. 3은 catechol, hydroquinone 및 4-methylcatechol을 기질로 하여 은행잎 PPO의 Michaelis constant(Km)를 Lineweaver-Burk plot으로 나타낸 것이다. 각각의 Km value는 6.06×10<sup>-4</sup>M, 1.20×10<sup>-3</sup>M, 그리고 1.41×10<sup>-3</sup>M이었다.

Table III은 여러 가지 phenol성 화합물에 대한 은행잎 PPO의 특이성을 실험한 결과이다. 각 기질의

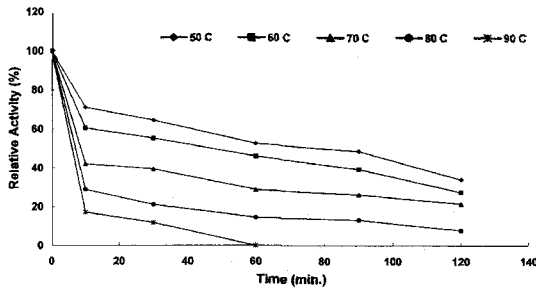


Fig. 2. Thermostability of *Ginkgo biloba* leaves Enzyme.

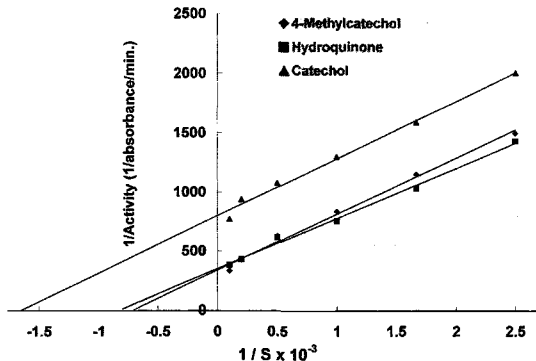


Fig. 3. Double reciprocal plots for *Ginkgo biloba* leaves enzyme.

최종 농도를 1 mM로 하였을 때 은행잎 PPO는 주로 polyphenol성 화합물에 활성을 나타냈으며 특히, 그 중에서도 *o*-diphenol성 화합물인 4-methylcatechol에 대해 가장 높은 활성을 보였는데 wheat의 *o*-diphenolase도 4-methylcatechol에 대한 활성이 가장 크게 나타났다고 보고되어 있다.<sup>22)</sup> Hydrocaffaic acid도 은행잎PPO의 좋은 기질이며, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, hydroquinone, gallic acid, *p*-phenylene-diamine 그리고 catechol에는 중등도의 활성을 나타내었고, (+)-catechin, caffeic acid에 대해서는 낮은 활성을 보였다. Monophenol성 화합물과 *m*-diphenol성 화합물에 대하여는 전혀 활성이 없었다.

식물체에서 분리한 PPO중에는 monophenol에 대한 활성은 거의 없으면서 *o*-diphenol성 화합물의 산화만을 촉매하는 것도 있고, 두 가지 활성을 모두 가진 것도 있는 것으로 알려져 있는데, 은행잎 PPO는 본 실험 결과로 미루어 보아 높은 catecholase activity는 있으나 cresolase activity는 거의 없는 것으로 사료된다.

**저해제의 영향** - 정제된 은행잎 PPO에 대해 4-

Table III. Substrate specificity of *Ginkgo biloba* leaves enzyme

Substrates(1 mM)	Relative activity(%)
Monophenols	
Tyrosine	0
1-Naphthol	0
<i>p</i> -Coumaric acid	0
<i>m</i> -Cresol	0
Cinnamic acid	0
<i>o</i> -Diphenols	
4-methylcatechol	100.0
Hydrocaffaic acid	96.9
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	30.5
Catechol	19.0
(+)-Catechin	11.5
Caffeic acid	11.1
Protocatechuic acid	3.5
Protocatechualdehyde	0
Chlorogenic acid	0
L-Dopa	0
<i>m</i> -Diphenol	
Resorcinol	0
<i>p</i> -Diphenols	
Hydroquinone	31.9
<i>p</i> -Phenylenediamine	21.7
Polyphenols	
Gallic acid	25.7
Quinic acid	0

methylcatechol과 hydrocaffaic acid를 기질로 사용하고 여기에 각종 저해제를 가했을 때, Table IV, V에서 보는 바와 같이 저해양상이 비슷하게 나타났다. 환원제가 가장 큰 저해 작용을 나타내었으며 0.5 mM에서 효소 활성을 완전히 저해하였다. Metal chelator인 sodium diethyldithiocarbamate도 은행잎PPO에 대해 저해 작용을 크게 나타냈으나, sodium azide는 비교적 저해력이 약하였다. Sodium chloride는 저해력이 매우 약하여 4-methylcatechol을 기질로 사용하였을 경우, 0.5M에서도 15%이하의 저해를 나타냈으며, chloride ion은 pH 의존성이 보고된 바 있다.<sup>1)</sup> *o*-Nitrophenol과 4-nitrocatechol은 모두 phenolic compound인데, 전자는 저해작용이 강하게 나타난 반면에 후자는 은행잎PPO에 대해 저해제로서 별로 크게 작용하지 못했다.

Fig. 4는 은행잎에서 얻은 PPO가 저해제에 의해서 활성이 저하되는 정도를 Lineweaver-Burk식에 따라 나타낸 결과이다. 저해제들은 4-methylcatechol과 은행잎 PPO에 대해 경쟁적으로 작용했으며, 저

**Table IV.** Effect of various inhibitors on *Ginkgo biloba* leaves enzyme activity

Inhibitor	-4-methylcatechol as substrate (1 mM)- % inhibition at						
	0.5M	0.1M	0.01M	1mM	0.5mM	0.05mM	0.005mM
Reducing agents;							
Ascorbic acid	-	-	-	-	100	24	0
Cysteine	-	-	-	-	100	40	8
Glutathione	-	-	-	-	100	36	2
2-Mercaptoethanol	-	-	-	-	100	30	0
Potassium metabisulfite	-	-	-	-	100	21	0
Metal chelators;							
Sodium diethyldithiocarbamate	-	-	-	100	97	23	6
EDTA	-	-	64	16	3	0	-
Potassium cyanide	-	100	95	38	17	9	0
Thiourea	-	100	68	18	10	2	0
Sodium azide	100	79	17	14	13	11	4
Phenolic compound;							
<i>o</i> -Nitrophenol	-	-	-	100	33	8	0
Miscellaneous compounds;							
Polyvinylpyrrolidone	-	-	-	50	21	9	0
Sodium chloride	14	13	8	6	5	5	6
Inhibitor	1 mM	0.5 mM	0.05 mM	0.01 mM	0.005 mM	0.001 mM	
4-Nitrocatechol	-	-	14	6	4	1	

**Table V.** Effect of various inhibitors on *Ginkgo biloba* leaves enzyme activity

Inhibitor	-Hydrocaffeic acid as substrate(1mM)- % inhibition at						
	0.5M	0.1M	0.01M	1mM	0.5mM	0.05mM	0.005mM
Reducing agents;							
Ascorbic acid	-	-	-	-	100	39	0
Cysteine	-	-	-	-	100	74	4
Glutathione	-	-	-	-	100	57	6
2-Mercaptoethanol	-	-	-	-	100	69	8
Potassium metabisulfite	-	-	-	-	100	32	2
Metal chelators;							
Sodium diethyldithiocarbamate	-	-	-	-	100	41	0
EDTA	-	-	72	24	17	12	2
Potassium cyanide	-	95	73	49	39	8	0
Thiourea	-	100	72	30	28	4	0
Sodium azide	100	87	34	18	11	6	0
Phenolic compound;							
<i>o</i> -Nitrophenol	-	-	-	100	50	4	0
Miscellaneous compounds;							
Polyvinylpyrrolidone	-	-	-	58	48	10	0
Sodium chloride	39	28	12	8	9	5	2
Inhibitor	1 mM	0.5 mM	0.05 mM	0.01 mM	0.005 mM	0.001 mM	
4-Nitrocatechol	-	-	17	12	8	6	

Enzyme extract was pre-incubated with different concentration of inhibitors in 50 mM tris-HCl buffer, pH 8.5 for 2 min. at 45°C. Reaction was started by addition of the substrate and the enzyme activity was determined at 420 nm after the reaction for 30 min. at 45°C. The activities were expressed relative to the control(no inhibitor added)

해상수 Ki값은 각각 cysteine  $1.1 \times 10^{-5}$ M, 2-mercaptoethanol  $2.4 \times 10^{-5}$ M 그리고 pot. cyanide  $8 \times 10^{-5}$ M 이었다. 이러한 결과는 white yam tuber로부터 분리

한 *o*-diphenolase가 2-mercaptoethanol, L-cysteine, pot. cyanide에 의해 경쟁적 저해를 받는 것과 같으며, sodium azide는 uncompetitive inhibitor로서 작용한

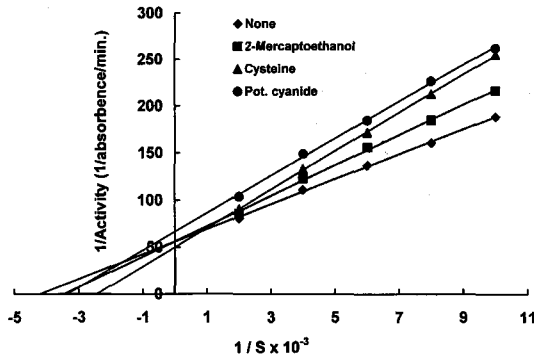


Fig. 4. Double reciprocal plots showing inhibition of *Ginkgo biloba* leaves polyphenol oxidase catalysis of 4-methylcatechol by various inhibitors.

것으로 알려져 있다.<sup>23)</sup>

**2가 양이온의 영향** - 효소활성에 보조인자로서 많이 작용하는 2가 양이온이 은행잎 PPO 활성에 미치는 영향을 검토하기 위해 반응액에 2가 양이온을 여러 농도로 첨가하여 반응시킨 후 활성변화를 측정하여 Table VI에 나타내었다.  $\text{Cu}^{2+}$ ion은 효소활성을 매우 강하게 증가시켰으며  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ion은 저농도에서는 PPO활성을 증가시키다가 고농도에서는 오히려 억제시키는 경향이 나타났다. 그러므로  $\text{Cu}^{2+}$ ion이 은행잎 PPO의 활성부위에서 촉매작용을 도와주는 것으로 생각된다.

### 결 론

은행잎에서 추출한 polyphenol oxidase를 ammonium sulfate로 60-90% fractionation한 후, sephadex G-150 column chromatography로 gelfiltration 시켰을 때 purification fold는 18이었다. 본 효소는 pH 8.5에서 활성이 가장 큰 것으로 보아 약alkali성 효소이며, 최적 온도는 45°C였다. 열에 대한 안정성을 실험한 결과, 60°C에서 45분 후에는 50%의 잔존활성을 나타내었으며 90°C에서 60분 경과 후에 활성이 완전히 소실되었다. 은행잎 PPO는 monophenol에는 작용하지 않았으며 *o*-diphenol인 4-methylcatechol에 대해 강한 친화력을 보였다. Catechol, hydroquinone 및 4-methylcatechol에 대한 Km value는 각각  $6.06 \times 10^{-4}\text{M}$ ,  $1.20 \times 10^{-3}\text{M}$ ,  $1.41 \times 10^{-3}\text{M}$ 이었다. Reducing reagent는 낮은 농도(0.5 mM)에서도 PPO활성을 완전히 저해하였고, sodium chloride는 저해제로서의 작용을 별로 나타내지 못하였다. Cysteine, 2-mercaptoethanol, potassium cyanide는 효소활성을

Table VI. Effect of divalent cations on *Ginkgo biloba* leaves PPO activity

Metals	Relative Ratio(%) at				
	0.005 mM	0.1 mM	0.25 mM	1 mM	2 mM
None	100	100	100	100	100
$\text{Cu}^{+2}$	184	200	205	259	-
$\text{Co}^{+2}$	141	140	127	98	79
$\text{Zn}^{+2}$	131	105	100	86	65
$\text{Mg}^{+2}$	108	101	99	92	77
$\text{Mn}^{+2}$	90	100	101	-	-
$\text{Ni}^{+2}$	88	77	66	37	34

Activity was determined at 420 nm after reaction for 30 min. at 45°C and pH 8.5 with 4-methylcatechol(1 mM) as a substrate.

경쟁적으로 저해하였으며 각각의  $K_i$  value는  $1.1 \times 10^{-5}\text{M}$ ,  $2.4 \times 10^{-5}\text{M}$ ,  $8 \times 10^{-5}\text{M}$ 이었다. 2가 양이온 중  $\text{Cu}^{2+}$ ion은 은행잎 PPO에 대해 강한 activator로 작용하였고,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ion은 저농도에서는 효소활성을 증가시키다가 고농도에서는 억제시켰으며,  $\text{Ni}^{2+}$ ion은 강한 저해작용을 나타내었다.

### 인용문헌

1. Mayer, A. M. and Harel, E.(1979) Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18: 193-215
2. Mathew, A. G. and Parpia, H. A. B.(1971) Food browning as a polyphenol reaction. *Adv. Hood Res.* 19: 75-145
3. Paulson, A. T., Vanderstoep, J. and Porritt, S. W. (1980) Enzymatic browning of peaches: effect of gibberellic acid and ethephon on phenolic compounds and polyphenoloxidase activity. *J. Food Sci.* 45: 341-351
4. Aldridge, P. D. and Walker, J. R. L.(1980) A study of enzymic browning in the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*). *Mauri Ora* 8: 35-43
5. Mowlah, G. and Itoo, S. (1982) Quantative changes in guava polyphenols and the polyphenoloxidase (PPO) at different stages of maturation, ripening and storage, *Nippon Shokuhin Kogyo Gskkaishi* 29: 413-417
6. Meyer, H. U. and Biehl, B. (1980), Activities and multiplicity of phenolase from spinach chloroplasts during leaf ageing. *Phytochemistry* 19:

2267-2272

7. Wissemann, K. W. and Montgomery, M. W. (1985) Purification of d'Anjou pear (*Pyrus communis* L.) polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 78: 256-262
8. Vaughn, K. C. and Duke, S. O. (1984) Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant* 60: 106-112
9. Opoku-Gyamfua, A. and Simpson, B. K. (1993) Purification and characterization of three polyphenol oxidase isozymes from Lobster (*Homarus americanus*). *J. Food Biochem.* 16: 291-306
10. Thomas, P. and Janave, M. T. (1986) Isoelectric focusing evidence for banana isoenzymes with mono and diphenolase activity. *J. Food Sci.* 51: 384-387
11. Takeo, T. and Uritani, I. (1966) Tea leaf polyphenol oxidase Part II. Purification and properties of the solubilized polyphenol oxidase in tea leaves. *Agric. Biol. Chem.* 30: 155-163
12. 함승시, 김성완, 김영명 (1990) 효소적 갈변반응 생성물의 돌연변이 억제효과 및 유전자 수복에 관한 연구. *한국식품과학회지* 22(6): 632-639
13. Jerzy Zawistowski, Costas G. Biliaderis and N. A. Michael Eskin: Polyphenol oxidase. In: D. S. Robinson, D. S. and Eskin, N. A. M. (1992) Oxidative enzymes in foods. 217-273 Elsevier-Applied Science,
14. Bollag, J. M., Shuttleworth, K. L. and Anderson, D. H. (1988) Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 3086-3091
15. Negishi, O. and Ozawa, T. (1997) Effect of polyphenol oxidase on deodorization. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 2080-2084
16. Doddema, H. J. (1988) Site-specific hydroxylation of aromatic compounds by polyphenol oxidase in organic solvents and in water. *Biotechnology and Bioengineering* 32: 716-718
17. 이창복(1989) 대한 식물 도감, 57. 향문사, 서울.
18. (株)東方製藥 : 銀杏葉 新物質 研究(1991) 111. 동방 제약연구소, 서울.
19. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
20. Tolbert, N. E. (1973) Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiol.* 51: 234
21. Raymond, J., Rakariyatham, N. and Azanza, J. L. (1993) Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry* 34: 927-931
22. Interesse, F. S., Ruggiero, P., D'Avella, G. and Lamparelli, F. (1980) Partial purification and some properties of wheat (*Triticum aestivum*) *o*-diphenolase. *J. Sci. Food Agric.* 31: 459-466
23. Ikediobi, C. O. and Obasuyi, H. N. (1982) Purification and some properties of *o*-diphenolase from white yam tubers. *Phytochemistry* 21: 2815-2820

(1999년 7월 18일 접수)