

팽나무버섯 polyphenol oxidase의 정제 및 특성

표한중 · 손대열¹ · 이 찬*

중앙대학교 산업과학대학 식품공학과, ¹성균관대학교 의과대학

Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from *Flammulina velutipes*

Han-Jong Pyo, Dae-Yeul Son¹ and Chan Lee*

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

¹School of Medicine, Sungkyunkwan University

Polyphenol oxidase from *Flammulina velutipes* was purified and characterized. Purification of polyphenol oxidase was achieved by ammonium sulfate precipitation, Superdex G-200 gel filtration chromatography, Phenyl superose affinity chromatography, Mono-Q anion exchange chromatography and Superdex S-200 gel filtration chromatography on FPLC. After these purification steps specific activity of purified polyphenol oxidase increased to 199.1 units/mg. Polyphenol oxidase from *F. velutipes* was composed of a single polypeptide with molecular weight of about 40 kDa. Optimum pH and temperature for the enzyme reaction were found to be 6.0 and 25°C, respectively. The activity of the enzyme gradually decreased at acidic pH between 3 and 5, and the enzyme lost its activity at alkaline pH between 8 and 10. This enzyme exhibited high substrate specificity to o-diphenols. *K_m*-values for L-DOPA and caffeic acid were found to be 3.97 mM and 1.78 mM, respectively. 2-mercaptoethanol, L-ascorbic acid, sodium bisulfite, EDTA and Mg²⁺ inhibited the activity of polyphenol oxidase and Cu²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺ and Ni²⁺ increased enzyme activity. The activity of enzyme was well maintained at -70°C for over 4 months, and at -20°C for 1 months.

Key words: *Flammulina velutipes*, polyphenol oxidase, purification

서 론

팽나무버섯(*Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Singer)은 한국을 비롯한 세계 각지의 온대에서 한대에 걸친 지역에 널리 분포하고 있는 버섯이며 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 주로 분해하여 영양에 이용하는 갈색 목재부후균이다. 팽나무버섯의 인공재배는 1899년 일본에서⁽¹⁾ 처음 시작되었으며, 씹는 맛이 좋고, 단백질 함량이 높으며, 항암효과와 혈중 cholesterol 함량을 저하시키는 효과⁽²⁾ 등이 인정되어 최근 생산과 소비가 급격히 증가하고 있다. 한국에서는 1936년에 원목재배방법이 도입된 이래 낙엽송, 소나무 등을 이용한 팽나무버섯의 재배방법⁽³⁾이 발표된 바 있다. 1980년대 후반에 이르러 환경조절 재배사에서 기계화 병재배가 본격화되면서 1997년에 200여 농가가 15,600톤을 생산하였으며, 이는 전체

버섯생산의 13.6%를 차지하고 있는 많은 양이다. 팽나무버섯은 수분함량이 매우 높아 부패하기 쉬우며, 갈변에 의한 색조변화 때문에 유통기간이 짧은 편이다. 이를 방지하기 위하여 현재 진공포장으로 유통되고 있으나 그 효과가 미흡하며 갈변에 의한 변색을 방지할 수 있는 효과적인 방법의 개발이 절실하다.

식물체 갈변현상의 주된 요인인 polyphenol oxidase(PPO; o-diphenol : O₂ oxidoreductase, E.C. 1. 10. 3. 1)는 tyrosinase, cresolase, catecholase, catechol oxidase 등으로 불려지고 있으며^(4,6), 주로 phenol을 quinone으로 산화시키는데 관여한다. PPO는 mono-hydroxyphenol을 dihydroxyphenol로 hydroxylation시키는 반응에 관여하고 그 반응으로부터 생성된 hydroxyquinone이 중합반응을 일으켜 최종반응 생성물로 적색과 적갈색의 중합체인 melanin이 생성된다. 이 같은 메커니즘으로 과실, 야채, 냉동, 건조식품 등의 조직이 공기 중에 노출되었을 때 phenol성 화합물에 PPO가 작용하여 갈변이 발생되며, 과일이나 채소류 등의 가공시에 일어나는 갈변현상의 한 원인이 되고 있다.

본 연구에서는 팽나무버섯의 갈변을 촉매하는 system을 규명하기위한 기초연구로서 팽나무버섯 내에서 polyphenol류의

*Corresponding author : Chan Lee, Chung-Ang University, Department of Food Science and Technology, Ansong, Gyeonggi 457-756, Korea
Tel: 82-31-670-3035
Fax: 82-31-676-8865
E-mail: chanlee@cau.ac.kr

산화를 촉매 하는 효소를 정제하고 그 특성을 밝혀 갈변의 주요 원인을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에서는 1998년 7월 경기도 화성에 소재한 경기농산(주)에서 재배된 성숙하고(생육 55일) 신선한 팽나무버섯을 재료로 사용하였다. Chlorogenic acid, catechin, L-3,4-dihydroxy phenyl alanine(L-DOPA), pyrogallol, caffeic acid, hydroquinone, vanillic acid, 분자량 측정용 표준단백질 시약 등은 Sigma chemical Co.(USA) 제품을 사용하였다. 기질인 catechol, resorcinol은 Junsei chemical company(Japan)에서 구입하였다. 그 밖의 시약은 일급 또는 특급 시약을 사용하였다.

FPLC(Gilson, USA), Superdex G-200, Superdex S-200, Phenyl Superose와 Mono-Q(Pharmacia biotech, Sweden) 컬럼 크로마토그래피가 정제를 위하여 사용되었으며, 효소활성은 micro plate reader(Bio-Rad, USA)를 사용하여 측정하였다.

효소활성 측정

효소활성은 Bolwell 등⁷⁾의 방법을 응용하여 측정하였다. 10 mM potassium phosphate 완충용액(pH 6.0)에 L-DOPA를 10 mM 되도록 용해시킨 기질 용액 20 μ L에 효소용액 100 μ L를 가하였다. 효소의 1 unit은 25°C, 490 nm에서 1분당 0.001의 흡광도 변화를 나타내는 양으로 정하였다.

단백질의 정량

단백질량은 Bradford 등⁸⁾의 방법을 응용하여 측정하였다. 표준물질로 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였고, 590 nm에서 흡광도를 측정한 후 검량선에 의해서 단백질의 양을 구하였다.

효소의 정제

성숙한 팽나무버섯의 뿌리 부위를 제거한 후 1 cm의 크기로 절단하고(100 g), 10 mM 인산완충용액(pH 6.0) 200 mL를 첨가 후 homogenizer로 5분간 균질화 시켰다. 4°C에서 원심분리(10,000 rpm, 20 min)하여 얻은 상등액에 polyethyleneimine(0.2%)을 첨가, 교반 시키면서 4°C에서 10분간 방치한 후 원심분리(10,000 rpm, 15 min)하여 핵산을 제거하였다. 핵산이 제거된 상등액에 황산암모늄을 가한 후(50%, w/v), 4°C에서 원심분리(10,000 rpm, 20 min)하여 부유물과 침전물을 제거하였다. 상등액에 다시 황산암모늄을 가하여 70% 포화용액을 만든 다음, 원심분리시켜 상등액을 제거하고 침전물을 얻었다. 이 침전물에 소량의 10 mM 인산완충용액(pH 6.0)을 첨가, 용해 후 다음 정제를 위한 효소시료로 사용하였다.

10 mM 인산완충용액(pH 6.0)으로 채워진 Superdex G-200 column(16 \times 60 cm)에 효소시료 2 mL를 주입하고, 같은 완충용액(pH 6.0)으로 전개시켰다. 유출속도는 1 mL/min이며, 2 mL씩 분획하였다. PPO 효소활성을 분석 후 활성이 큰 분획들을 모아 다음 과정에 사용하였다.

Superdex G-200 크로마토그래피 과정에서 얻어진 효소 시

료에 황산암모늄(1 M)을 첨가하고, 이 용액을 1 M 황산암모늄이 포함된 10 mM 인산완충용액(pH 6.0)으로 채워진 Phenyl superose HR 5/5 column에 주입시키고 1 mL/min의 유출속도로 용출시켰다. 흡착되지 않고 통과한 효소를 모아 10 mM 인산완충용액으로 황산암모늄을 3배 희석시킨 후, 같은 완충액으로 채워진 Mono-Q column에 통과시켰다. 결합되지 않고 통과한 샘플을 모아 ultrafiltration으로 농축시킨 후 Superdex S-200 column(1 \times 30 cm)에 주입하고 1 mL/min씩 전개시켜 최종 정제하였다.

분자량 측정

정제된 효소의 순도 및 분자량을 측정하기 위하여, SDS-PAGE 전기영동법⁹⁾과 겔여과크로마토그래피(gel permeation chromatography)를 사용하였다. 겔여과크로마토그래피를 위한 분자량 표준물질로 β -amylase(200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin(66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome C(12.4 kDa), aprotinin (6.5 kDa)을 사용하였다.

pH 및 온도에 따른 효소활성

pH의 변화가 효소활성에 미치는 영향을 측정하기 위하여, pH 3에서 10까지 100 mM의 완충액을 조제하였다. pH 3에서 6까지는 아세트산완충용액, pH 6에서 8은 인산완충용액, 그리고 pH 8에서 10은 Tris/HCl 완충용액을 사용하였다. 각 완충용액으로 pH가 조정된 효소 용액과 L-DOPA 기질용액을 사용하여 효소활성을 측정하고 효소반응의 최적 pH를 결정하였다. 4°C에서 각 pH별 효소안정성을 측정하기 위하여 완충액과 정제된 효소액을 1:1의 비율로 혼합한 다음, 4°C에서 24시간 저장한 후 효소액의 상대 활성을 측정하였다.

반응의 최적 온도를 측정하기 위하여 정제된 효소액과 기질용액을 각각 4°C에서 40°C 범위에서 일정시간 항온처리 후 혼합하여 반응속도를 측정하였다. 그리고 효소의 온도별 안정성을 측정하기 위하여 정제된 효소용액을 각 온도에서 항온 방치시키면서 5분 간격으로 효소용액을 취하여 25°C에서 잔존 활성을 측정하였다.

효소의 기질 특이성

Monophenol류인 vanillic acid와 *o*-diphenol류인 L-DOPA, catechol, chlorogenic acid, caffeic acid 및 *m*-diphenol류인 resorcinol, *p*-diphenol류인 hydroquinone, 그리고 triphenol류인 pyrogallol등을 10 mM의 농도로 용해시킨 후 각 기질용액에 대한 효소시료의 상대적 활성도를 측정하였다.

기질 농도의 영향을 살펴보기 위하여 주 기질인 L-DOPA를 1 mM에서 10 mM까지 각 농도별로 조제하여, 정제된 효소시료에 대한 기질농도의 영향을 조사하였다. Michaelis 상수인 K_m 값과 V_{max} 는 Lineweaver-Burk¹⁰⁾의 방법을 이용 도식하여 구하였다.

저해제, 금속이온의 영향

PPO의 저해제로 알려진 sodium dodecylsulfate, ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), L-cysteine, sodium bisulfite 및 sodium chloride 등을 각각 10 mM 인산완충용액(pH 6.0)에

0.1, 1, 10, 100, 1000 mM 농도로 용해시켰다. 정제된 효소액 100 μ L에 저해제 20 μ L를 혼합하여 4°C에서 10분간 항온처리 후, 기질용액 20 μ L를 첨가하여 25°C에서 활성을 측정하였다.

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 FeSO₄, MgSO₄, CuSO₄, CoSO₄, NiSO₄, ZnSO₄, MnCl₂, ZnCl₂ 및 CaCl₂를 각각 1 mM이 되게 10 mM 인산완충용액 (pH 6.0)에 용해시켰다. 이 용액을 효소용액에 첨가하여 10분간 처리 후 효소활성을 측정하였다.

저장 중 효소활성 변화

정제된 팽나무버섯 PPO의 저장 중 효소활성 변화를 측정하기 위하여 -70, -20, 4°C 그리고 25°C에서 일정기간 저장하면서 효소활성 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

팽나무버섯을 균질기로 분쇄 후 10 mM 인산완충용액 (pH 6.0)으로 조효소를 추출하였으며, 50~70% 황산암모늄 염석처리로 PPO를 침전시켰다. 이 효소액으로 Superdex G-200 겔 여과크로마토그래피를 수행하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 효소활성을 나타내는 분획들을 모아 방법에서처럼 Phenyl superose 친화성 흡착 크로마토그래피, Mono-Q 이온교환 크로마토그래피 과정을 수행하였다. 두 과정에서 효소는 모두 컬럼에 결합되지 않았으며, 통과된 효소 시료를 모아 농축 후 Superdex S-200 겔 여과크로마토그래피를 수행한 결과 24에서 26번까지의 분획들이 순수하게 정제된 PPO를 포함하고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 1, a, b).

팽나무버섯 PPO의 정제과정이 Table 1에 요약되어 있다. 다섯 단계의 정제과정을 통하여 팽나무버섯 PPO는 황산암모늄 염석처리 침전물로부터 17.9배 정제되었으며 효소의 회수율은 2.2%로 낮게 나타났다. Bolwell⁽⁷⁾, Flurkey⁽¹¹⁾, Benjamin⁽¹²⁾ 및 Rivas 등⁽¹³⁾이 비슷한 방법을 사용하여 감자, 녹두잎, 체리 그리고 배에서 각각 PPO를 분리 정제하였다. Park⁽¹⁴⁾은 키위에서 PPO를 12배 정제하였으며, 바나나⁽¹⁵⁾와 아보카도⁽¹⁶⁾에서 각각 24.7배와 27배 정제된 효소가 보고되었다. 시금치⁽¹⁷⁾의 경우 PPO가 32.6배로 정제되었으며, 감자에서는⁽¹⁸⁾ 47배로 정제되었다. 효소의 회수율은 바나나⁽¹⁵⁾의 경우 12%, 키위⁽¹⁴⁾에서는 31% 및 배⁽¹³⁾에서는 40.8%로 보고되었다. 여러 가지 보고된 PPO의 정제배율은 팽나무버섯에서 정제시와 비슷하거나 약간 높은 것으로 나타났다.

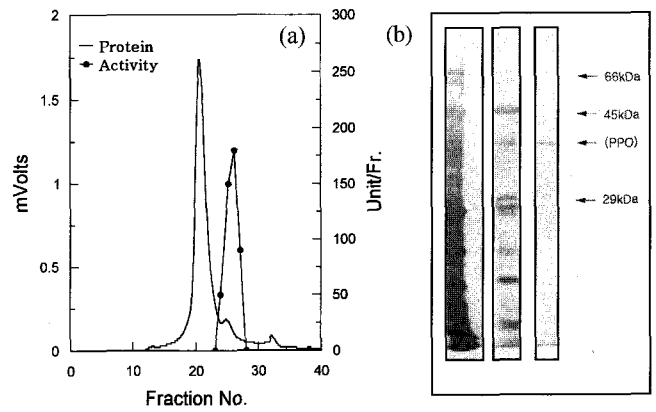


Fig. 1. Last purification step of polyphenol oxidase from *F. velutipes* with Superdex S-200 gel filtration chromatography (a) and SDS-PAGE of purified polyphenol oxidase (b).

Lane 1: Fraction after Superdex G-200 gel filtration chromatography, Lane 2: Fraction after Phenyl superose affinity chromatography, Lane 3: Fraction after Superdex S-200 gel filtration chromatography.

분자량 측정

정제된 효소의 순도 분석 및 분자량 측정을 위하여 SDS-PAGE와 겔 여과크로마토그래피를 수행하였다. Fig. 1, b)의 lane 1은 Superdex G-200 겔 여과 크로마토그래피, lane 2는 Phenyl superose 친화성 흡착 크로마토그래피, 그리고 lane 3은 마지막 정제 단계인 Superdex S-200 겔 여과 크로마토그래피의 결과를 나타내고 있으며, 전기영동 후 silver staining 시 단일 band를 나타내어 효소가 순수하게 정제되었음을 확인하였다. Fig. 2, a)와 b)는 전기영동 후 및 겔 여과크로마토그래피 후의 분자량 결정을 나타내고 있으며 이 두 결과로부터 팽나무버섯 PPO는 분자량 40 kDa인 단일 폴리펩티드로 구성되어 있음을 알 수 있었다. Bolwell 등⁽⁷⁾은 감자 PPO는 분자량이 60 kDa과 69 kDa인 두 개의 단위로 구성된 단백질을 보고하였다. 포도 PPO와 사탕수수 PPO는^(19,20) 그 분자량이 isozyme에 따라 각각 20에서 58.4 kDa, 32에서 130 kDa이라 밝혀졌으며 시금치⁽²¹⁾, 바나나⁽¹⁵⁾ 그리고 올리브⁽²²⁾ PPO의 분자량은 각각 40 kDa, 31~62 kDa, 및 32 kDa으로 발표되었다. 이와 같이 여러 식물에서 발표된 PPO는 매우 다양한 분자량을 나타내고 있으며 팽나무버섯 PPO의 분자량은 시금치 PPO의 분자량과 유사한 것으로 나타났다.

효소활성에 미치는 pH 및 온도의 영향

정제된 효소의 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 3에서 10

Table 1. Purification of polyphenol oxidase from *Flammulina velutipes*

Purification step	Volume (mL)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Ammonium sulfate	4.8	19200	1728	11.1	1.0	100.0
Superdex G-200	14	9212	224	41.1	3.7	48.0
Phenyl superose	14	3248	56	58.0	5.2	16.9
Mono-Q	4	1920	18	106.7	9.6	10.0
Superdex S-200	1.5	418	2.1	199.1	17.9	2.2

The starting material was 100 g of *Flammulina velutipes* stromata.

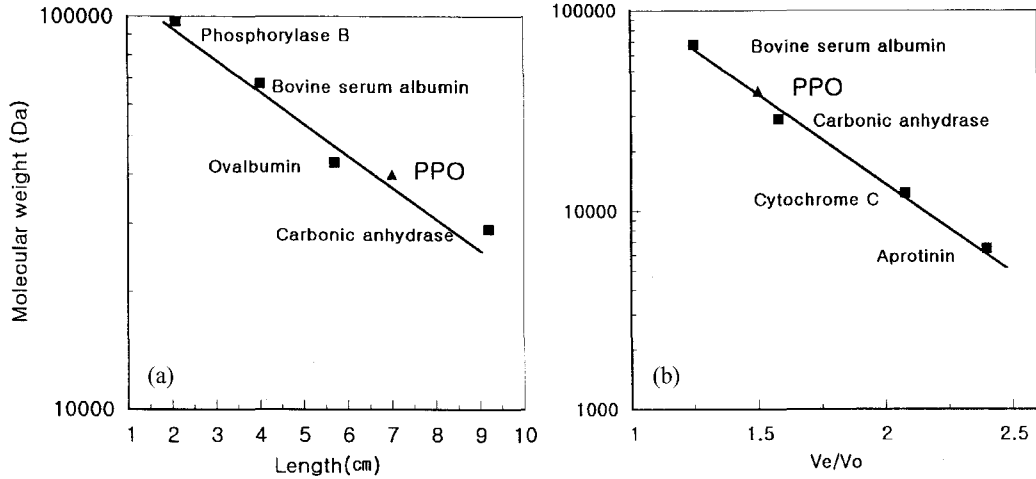


Fig. 2. Determination of molecular weight of polyphenol oxidase on SDS-PAGE (a) and on Superdex S-200 gel filtration chromatography.

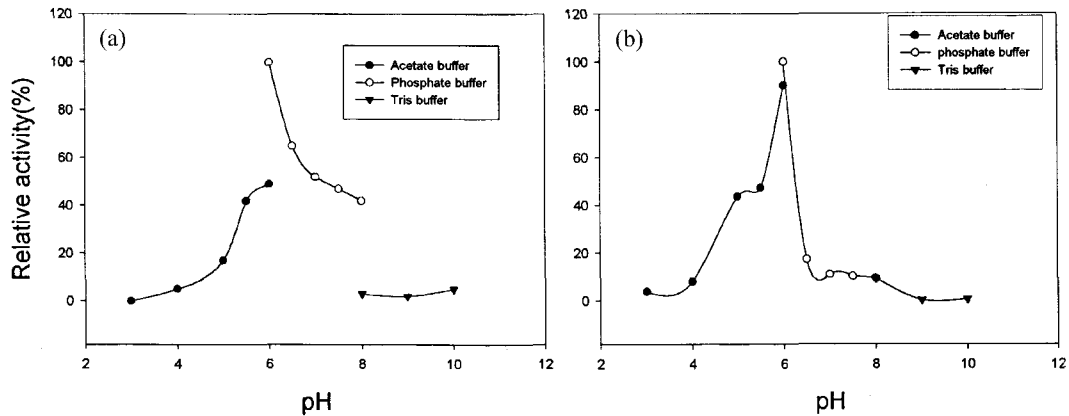


Fig. 3. Effect of pH on the activity of polyphenol oxidase from *F. velutipes* (a) and pH stability of the enzyme at 4°C.

까지의 효소활성을 측정 한 결과 효소는 pH 6.0에서 최대의 활성을 나타내었으며 강산으로 갈수록 활성이 감소하고 알칼리에서는 거의 활성이 나타내지 않았다(Fig. 3, a). pH 6에서도 아세트산완충용액보다 인산완충용액에서 효소활성이 높게 나타났다. 송이버섯⁽²³⁾과 배⁽¹³⁾에서 정제된 PPO의 최적 pH는 모두 4.0이었으며, 복숭아⁽²⁴⁾, 담배⁽²⁵⁾, 버찌⁽²⁹⁾ 그리고 포도⁽¹⁹⁾에서 정제한 PPO의 최적 pH는 각각 4.4와 5.5, 7.3~7.8, 그리고 8로 보고되었다. pH 변화에 따라 단백질의 4차 구조가 달라지므로, pH 안정성과 최적 pH는 그 값이 일치하지 않는 경우가 많다. 정제된 효소를 각각의 pH에서(4°C) 저장하며 시간별로 효소액을 취하여 pH 6으로 조정 한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다. 이 실험에서 4°C의 경우 팽나무버섯 PPO는 인산완충용액(pH 6.0)에서 가장 안정되게 저장되었으며 최적 pH와 유사한 경향을 나타내고 있다(Fig. 3, b).

정제된 PPO는 25°C에서 최적의 활성을 나타내었으며, 30°C 이상에서는 활성이 완만히 감소(15%)하였고, 40°C 이상부터는 활성을 측정할 수 없었다(Fig. 4, a). Niagara grapes PPO의 경우 최적온도는 25°C이며, 25°C 이하의 온도에서 활성이 완만히 감소하였다고 보고되었다⁽²⁶⁾. 한편, 돼지감자⁽²⁷⁾의 PPO는 비교적 고온인 40°C에서 효소활성이 가장 강하게 나

타고 있다. 일반적으로 PPO는 특정온도에서 최적의 활성을 가지고 있다. 보고된 버섯류에서는 최적온도가 25~55°C의 넓은 범위를 가지고 있는 것으로 나타났으나, 연구결과 팽나무버섯 PPO는 25°C에서 최적의 활성을 보였다.

효소용액을 각각의 온도에서 항온처리하며 5분 간격으로 잔존 활성을 측정하였다(Fig. 4, b). 그림에서처럼 35°C에서는 20분에 25%, 40°C에서는 58%, 45°C에서는 75% 그리고 50°C에서 95%의 활성이 감소하였다. 송이버섯 효소⁽²³⁾의 활성은 70°C에서 2분간 가열로 완전히 소실되었다고 보고되었으며, 배의 PPO⁽¹⁶⁾는 55°C에서 1시간 이상 안정하였다. 이 연구에서 팽나무버섯 PPO는 55°C에서 5분간 가열로 활성을 잃고 불활성화 되었으며, 송이버섯, 마늘, 배에서 보고된 PPO에 비하여 열 안정성이 약한 것으로 나타났다.

기질 특이성

여러 종류의 phenol성 화합물을 기질로 하여 기질의 특이성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 이 표의 값들은 L-DOPA에 대한 효소활성을 100으로 하였을 때의 상대 비교치이다. Table 2에 나타낸 바와 같이 정제된 효소는 *o*-diphenol류에서 높은 활성을 나타내었다. 여러 가지 *o*-diphenol류 중

Table 2. Substrate specificity of polyphenol oxidase from *F. velutipes*

Substrate	Relative activity (%) (10 mM)	<i>K_m</i> value
Diphenols		
o-diphenols		
L-DOPA	100	3.97
catechol	0	
chlorogenic acid	14	
caffeic acid	22	1.78
m-diphenols		
resorcinol	0	
p-diphenols		
hydroquinone	0	
Triphenol		
pyrogallol	0	
Monophenol		
vanillic acid	0	

catechin에 대해서 Kiwifruit⁽¹⁴⁾와 Avocado^(16,28)의 PPO가 활성이 높은 것으로 보고되었으며 chlorogenic acid에 대해서는 감자^(18,29)와 포도⁽¹⁹⁾의 PPO가 활성이 높은 것으로 나타났다. Harel⁽¹⁹⁾은 포도 PPO는 *m*-diphenol류와 *p*-diphenol류에 활성을 나타내지 않는다고 보고하였으며, 시금치⁽³⁰⁾ PPO도 Harel의 연구에서와 같이 *m*-diphenol류와 *p*-diphenol류에서는 활성을 나타내지 않았다. 특히 이 효소는 triphenol류 중에서도 pyrogallol에서 대단히 높은 활성을 나타내었으나, monophenol류는 전혀 활성이 없었다. 버섯⁽³¹⁾과 포도⁽²⁶⁾에서 각각 pyrocatechol과 caffeic acid에 대한 PPO의 활성이 보고되었으며, Velvet bean⁽³²⁾, 배⁽³³⁾, 복숭아⁽²⁴⁾, 망고⁽³⁴⁾, 고구마⁽³⁵⁾, 바나나⁽³⁶⁾ 등의 PPO의 DL-DOPA에 대한 기질특이성이 발표되었다.

팽나무버섯의 PPO는 *o*-diphenol류 중 L-DOPA에 대해 높은 활성을 나타내었으며, *m*-diphenol, *p*-diphenol, 및 monophenol류, triphenol류에 대해서는 활성이 없었으며 이는 다른 보고된 PPO와 구별되는 특성으로 나타났다.

팽나무버섯 PPO의 L-DOPA와 caffeic acid에 대한 *K_m*값이 Lineweaver-Burk⁽¹⁰⁾의 방법에 의하여 plot되었으며(Data not shown), 이 plot에 의하여 caffeic acid와 L-DOPA의 *K_m*값은 각각 1.78 mM과 3.97 mM로 확인되었다. Avocado⁽¹⁶⁾ PPO는 DL-DOPA에 대하여 특이성을 나타내었으며(*K_m* = 3.7 mM), 감자의 PPO⁽³⁷⁾의 chlorogenic acid에 대한 *K_m* 값은 1.4 mM로 나타났다. Bartlett Pear PPO⁽¹³⁾는, (+)-catechin(*K_m* = 2.1 mM)에 대하여 가장 높은 특이성을 나타내었으며, Black poplar⁽³⁸⁾, cocoa 껍질⁽³⁹⁾ 등의 PPO는 catechol이 가장 좋은 친화도가 높은 기질이었다.

저해제 및 금속이온의 영향

각종 저해제가 팽나무버섯 PPO의 효소활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각 저해제의 농도별 효소활성을 측정하여 저해정도를 백분율로 나타낸 결과는 Table 3과 같다. 저해효과는 2-mercaptoethanol, L-ascorbic acid, sodium bisulfite 및 EDTA가 큰 것으로 나타났다. Harel⁽¹⁹⁾, Ben-Sha-

Table 3. Effect of various inhibitors on the activity of polyphenol oxidase from *F. velutipes*

Inhibitor	Concentration (mM)	Inhibition (%)
L-ascorbic acid	50	100
	10	100
	1	100
	0.1	38
Sodium bisulfite	100	100
	10	100
	1	100
Sodium chloride	0.1	39
	1000	96
	100	26
	10	10
2-mercaptoethanol	1	10
	0.1	3
	100	100
Sodium azide	10	100
	1	100
	0.1	94
	0.1	42
Urea	100	0
	10	6
	1	1
	0.1	4
Sodiumdodecyl-sulfate	100	87
	10	47
	1	10
	0.1	6
L-cysteine	10	0
	1	0
	0.1	7
	0.01	6
Ethylenediamine etraacetic acid	50	100
	10	100
	1	100
	0.1	9

lom⁽²²⁾ 및 Kahn⁽¹⁶⁾은 포도, 올리브 그리고 아보카도종의 PPO에 대한 저해제 조사에서 모두 EDTA가 저해작용이 없는 것으로 보고하였다. 그러나 팽나무버섯 PPO에서는 EDTA가 저해효과가 큰 것으로 확인되었다.

각 금속이온들의 농도를 1 mM로 하여 25°C에서 효소활성을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 이 표에서와 같이 Cu²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, 및 Ni²⁺가 효소활성을 증가시키고, Mg²⁺은 활성을 저해시키는 것으로 나타났다.

Galeazzi 등⁽¹⁵⁾은 바나나에서 Ca²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺은 저해효과가 있었다고 보고하였으며 Spinach Beet⁽¹⁷⁾에서는 정제 효소 활성이 Cu²⁺에 의해 증가되었음이 보고되었다. 마찬가지로 Cu²⁺

Table. 4. Effect of metal ions (100 μ M) on the activity of polyphenol oxidase from *F. velutipes*

Salt	Relative activity(%)
None	100
FeSO ₄	566
MgSO ₄	63
NiSO ₄	108
CuSO ₄	1670
ZnSO ₄	442
CoSO ₄	81
MnCl ₂	92
ZnCl ₂	407
CaCl ₂	99

는 팽나무버섯 PPO에 대한 효소활성을 크게 증가시키는 것으로 나타났다.

저장 중 Polyphenol oxidase 활성의 변화

팽나무버섯에서 정제된 효소를 각기 다른 온도로 저장하였을 때의 PPO 활성의 변화는 Fig. 5와 같다. 그림과 같이 -70°C에서 3개월간은 효소활성의 변화가 거의 없었으며 4개월째부터 감소하기 시작하였다. 그러나 -20°C에서는 저장 2

개월만에 PPO의 활성이 40%까지 감소됨을 보였다. 또한 4°C에서 24시간 저장으로 PPO의 활성이 75%로 감소하고, 30°C에서는 저장 24시간 만에 효소활성이 45%의 급격한 감소를 보였다. 이 같은 결과로 판단시 팽나무버섯 PPO의 활성을 유지하는 가장 좋은 저장 조건은 -70°C임을 알 수 있었다.

요 약

팽나무버섯(*Flammulina velutipes*)에서 polyphenol oxidase가 황산암모늄 침전법, Superdex G-75 겔여과크로마토그래피, Phenyl superose 친화크로마토그래피, Mono-Q 이온교환수지 크로마토그래피, 그리고 Superdex S-200 겔크로마토그래피 등의 과정으로 정제되었으며, 특성화 되었다. 정제된 효소의 비활성도는 199.1 units/mg으로 나타났으며, 이 효소는 40 kDa의 단일폴리펩티드 사슬로 구성되어 있음이 밝혀졌다. 효소 반응의 최적 pH와 온도는 각각 6.0과 25°C이었으며, pH 3과 5 사이의 산성조건과, pH 8과 10 사이의 알칼리 조건에서는 활성이 감소되거나 상실되었다. 이 효소는 L-DOPA와 caffeic acid 등의 *o*-diphenols류에 대하여 높은 효소활성을 나타내었으며, L-DOPA와 caffeic acid에 대한 *K_m* 값은 각각 3.97 mM과 1.78 mM로 계산되었다. 2-mercaptoethanol, L-ascorbic acid, sodium bisulfite, EDTA와 Mg²⁺은 팽나무버섯

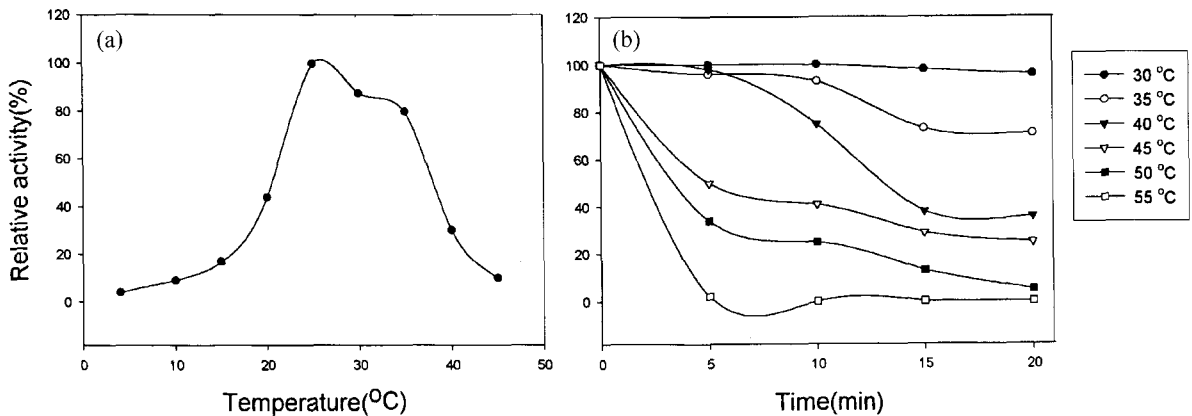


Fig. 4. Effect of temperature on the activity of polyphenol oxidase from *F. velutipes* (a) and thermal stability of the enzyme at various temperature.

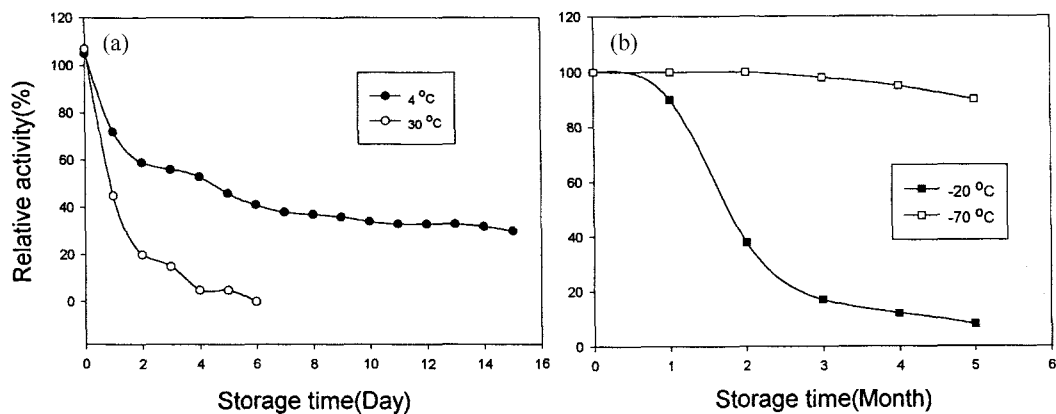


Fig. 5. Stability of polyphenol oxidase from *F. velutipes* during the storage at various temperature.

polyphenol oxidase의 효소활성을 감소시켰으며, Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} and Ni^{2+} 등은 효소의 활성을 촉진하는 인자로 밝혀졌다. 정제된 효소는 -70°C 에서 3개월, 그리고 -20°C 에서 1개월간 활성의 손실 없이 저장이 가능하였다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- Iwate, K.N. Method of mold cultivation. Chikyu Press, Tokyo (1961)
- Komatsu, J.H. Terekawa, K.N. and Watanabe, Y. *Flammulina velutipes* with antitumor activities. *J. Antibiot.* 16: 139-143 (1963)
- Yun, J.K. On the fruit bodies formation of *Collybia velutipes* (Curt.ex fr.) in the various artificial sawdust media. Theses collection of Chung-Buk College. 4: 227-237 (1970)
- Schwimmer, S. Source book of food enzymology. pp. 265-283. The AVI publishing company. Westport (1981)
- Joslyn, M.A. Methods in food analysis. 2nd ed. pp. 734-736. Academic press. New York (1976)
- Davies, D.D. The biochemistry of plants. 2nd ed. pp. 81-123. Academic press. New York (1980)
- Bolwell, G.P. and Partington, J.C. Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein patatin from Potato Tuber. *Phytochem.* 42: 1499-1502 (1996)
- 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)
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning.* 3, 18.47-18.88. Cold Spring Harbor Laboratory press. New York (1989)
- Lineweaver, H. and Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soci.* 56: 658-666 (1934)
- Flurkey, W.H., Froderman, T. and Shin, R. Isolation and characterization of a Mung Bean Leaf polyphenol oxidase. *Phytochem.* 45: 15-21 (1997)
- Benjamine, N.D. and Montgomery, M.W. Polyphenol oxidase royal ann cherries: Purification and characterization. *J. Food Sci.* 38: 799-806 (1973)
- Rivas, N.D.J. and Whitaker, J.R.L. Purification and properties of two polyphenol oxidase from bartlett pears. *Plant physiol.* 52: 501-507 (1973)
- Park, E.Y. and Luh, B.S. Polyphenol oxidase of Kiwifruit. *J. Food Sci.* 50: 678-684. 1985.
- Galeazzi, M.A.M., Sagarbieri, V.C. and Constrantinides, S.M. Isolation, purification physicochemical characterization of polyphenol oxidase from a dwarf variety of banana. *J. Food Sci.* 46: 150-155 (1981)
- Kahn, V. Polyphenol oxidase Isoenzymes in avocado. *Phytochem.* 15: 267-272 (1976)
- Sato, M. and Hasegawa, M. The latency of spinach chloroplast phenolase. *Phytochem.* 15: 61-65 (1976).
- Alberghina, F.A.M. Chlorogenic acid oxidase from potato tuber slice, Partial purification and properties. *Phytochem.* 3: 65-72 (1964)
- Harel, E. and Mayer, A.M. Partial purification of catechol oxidase in grapes. *Phytochem.* 10: 17-22 (1971)
- Coombs, J., Boldry, C., Buck, C. and Long, S.P. *o*-Diphenol oxygen oxidoreductase from leaves of sugar cane. *Phytochem.* 13: 2703-2708 (1974)
- Vaughan, P.F.T., Eason, R. and Paton, J. Molecular weight and amino acid composition of purified spinach beet phenolase. *Phytochem.* 14: 2383-2386 (1975)
- Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E. and Mayer, A.M. Catechol oxidase from green olives: Properties and partial purification. *Phytochem.* 16: 1153-1158 (1977)
- Hong, J.S. and Yang, H.C. Studies on Polyphenol oxidase of *Tricholoma matsutake*. *J. Korean Agr. Chem. Soci.* 26: 1-10 (1983)
- Paulson, A.T., Vanderstoep, J. and Porritt, S.W. Enzymatic browning of peaches. Effect of gibberellic acid and ethephon on phenolic compounds and polyphenol oxidase activity. *J. Food Sci.* 45: 341-345 (1980)
- Ban-Loon, L.C. Tobacco polyphenol oxidase. A specific staining method indicating nonidentity with peroxidase. *Phytochem.* 10: 503-509 (1966)
- Wisseemann, K.W. and Lee, C.Y. Characterization of polyphenol oxidase from Ravat 51 and *Niagara Grapes*. *J. Food Sci.* 46: 506-508 (1981)
- Park, E.B., Lee, J.S. and Choi, E.H. Isolation and characteristic of polyphenol oxidase from *Jerusalem Artichoke* Tuber. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 414-419 (1991)
- Louis, J., Van, L., Gerrish, C. and Dixon, R.A. Enzyme activities and polyphenols related to mesocarp discoloration of avocado fruit. *Phytochem.* 23: 1531-1534 (1984)
- Partill, S.S. and Zucker, M. Potato phenolase: Purification and properties, *J. Biol. Chem.* 240: 3938-3943 (1965)
- Meyer, H.U. and Biehl, B. Activities and multiplicity of phenolase from spinach chloroplasts during leaf ageing. *Phytochem.* 19: 2267-2272 (1980)
- Smith, J.L. and Krueger, R.C. Separation and purification of the phenolases of the common mushroom. *J. Biol. chem.* 237: 1121-1128 (1962)
- Zenin, C.T. and Park, Y.K. Isoenzyme of polyphenol oxidase from high L-DOPA containing velvet bean. *J. Food Sci.* 43: 646-651 (1978)
- Halim, D.H. and Montgomery, M.W. Polyphenol oxidase of *d'Anjou* pears (*Pyrus communis* L.). *J. Food Sci.* 43: 603-610 (1978)
- Park, Y.K., Sato, H.A., Almeida, T.D. and Moretti, R.H. Polyphenol oxidase of mango (*Mangifera indica* var. Haden). *J. Food Sci.* 45: 1619-1625 (1980)
- Walter, W.M.Jr. and Purcell, A.E. Effect of substrate levels and polyphenol oxidase activity on darkening in sweet potato cultivars. *J. Agr. Food Chem.* 28: 941-946 (1980)
- Mongomery, M.W. and Sysebieri, V.C. Isoenzymes of banana polyphenol oxidase. *Phytochem.* 14: 1245-1250 (1975)
- Maerae, A. R. and Duggleby, N. Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase. *Phytochem.* 7: 853-861 (1968)
- Michele, T. and Joseph, G.B. Isolation and characterization of the polyphenol oxidase from senescent leaves of black poplar. *Phytochem.* 23: 501-505 (1984)
- Martin, F.C. Preparation and properties of an *o*-diphenol; O_2 -oxidoreductase from cocoa husk. *Phytochem.* 17: 1897-1899 (1978)

(2002년 4월 1일 접수; 2002년 7월 23일 채택)