

## 우엉(*Arctium lappa* L.) 뿌리 Polyphenol Oxidase의 부분정제 및 특성

임정호<sup>1</sup> · 정문철<sup>1</sup> · 문광덕<sup>†</sup>

<sup>1</sup>한국식품연구원, <sup>†</sup>경북대학교 식품공학과

### Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Burdock (*Arctium lappa* L.)

Jeong-Ho Lim<sup>1</sup>, Moon-Cheol Jeong<sup>1</sup> and Kwang-Deog Moon<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

#### Abstract

Polyphenol oxidase (PPO) from Burdock (*Arctium lappa* L.) was purified and characterized. Purification of polyphenol oxidase was achieved by ammonium sulfate precipitation, Phenyl-sepharose CL-4B hydrophobic chromatography and Sephadex G-100 gel filtration chromatography. The molecular mass of the purified PPO was estimated to be 30 kDa by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. In a substrate specificity, maximum activity was achieved with chlorogenic acid, followed by catechol and catechin. Whereas, there was low activity with hydroquinic acid, resorcinol or tyrosine. The optimum pH and temperature for enzyme activity were 7.0 and 35°C with catechol, respectively. The enzyme was most stable at pH 7.0 while unstable at acidic and alkaline pH. The enzyme was stable when heated to 40°C. But heating at 50°C for more than 30 min caused 50% loss of activity. Ascorbic acid, L-cystein and Cu<sup>2+</sup> inhibited the activity of polyphenol oxidase.

**Key words** : polyphenoloxidase, *Arctium lappa*, purification, chromatography

#### 서 론

우엉(*Arctium lappa* L.)은 유럽·시베리아·만주 등지에 널리 분포하고 있으며 배수가 좋은 사질토양에서 잘 자라고 어린순을 삶아 나물로 먹거나 뿌리를 먹는 근채류로서 이용 범위가 다양화 되어지고 있으나 저장 또는 가공 처리 중 갈변현상이 일어나므로 양질의 품질을 얻는데 있어 문제점으로 인식되고 있다(1). 또한 우엉은 박피 후 갈변에 의한 변색현상 때문에 유통기간이 짧은 편이며, 이를 방지하기 위하여 현재 진공포장으로 유통되고 있으나 그 효과가 미흡하고 갈변에 의한 변색을 방지할 수 있는 효과적인 처리기술 등이 필요하다.

식물체 갈변현상의 주된 요인인 효소적 갈변은 polyphenol oxidase(PPO, EC 1.14.18.1)가 관여하는 산화 반응으로 알려

져 있다. Polyphenol oxidase는 tyrosinase, cresolase, catecholase, catechol oxidase 등으로 불려지고 있으며, 주로 phenol을 quinone으로 산화시킨 후 이를 중합하여 갈색의 melanine을 생성 착색시키는데 관여한다. 이 같은 메커니즘은 과일 및 야채 조직이 공기 중에 노출되었을 때 phenol성 화합물에 PPO가 작용하여 갈변이 발생되며, 과일이나 채소류 등의 신선편이 가공 시 일어나는 갈변현상의 한 원인이 되고 있다(2,3).

식물조직 중의 polyphenol oxidase는 단일 또는 여러 종류의 isoenzyme이 존재하는 것으로 보고되고 있으며, Harel 등(4)은 사과와 PPO 중 엽록체 또는 미토콘드리아에서 유래된 4개의 isoenzyme을 분리함과 아울러 각 isoenzyme의 기질 친화성 및 저해제의 영향을 보고하였다. Janovitz-Klapp 등(5)은 'Delicious' 사과에서 황산암모늄과 phenyl-Sepharose CL-4B 크로마토그래피를 이용하여 120배의 정제도를 나타내었고, Zhou 등(6)은 음이온교환수지, 투석, 염석 및 크로마토그래피를 이용하여 'Monroe' 사과 껍질로

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail : kdmoon@knu.ac.kr,  
Phone : 82-53-950-5773, Fax : 82-53-950-6772

부터 161배의 정제도를 나타내었다. 뿐만 아니라, 당근(7), 감자(8), 바나나(9), 복숭아(10) 그리고 딸기(11) 등에 대한 polyphenol oxidase 정제 및 효소학적 특성 등의 연구는 보고된 바 있다. 그러나, 다른 식물체에 비하여 심한 갈변현상을 일으키는 우영의 polyphenol oxidase에 대한 연구는 미미한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 우영의 갈변을 발생시키는 효소인 polyphenol oxidase의 특성을 밝혀 갈변의 주요 원인을 알아보고자 음이온 교환수지, 투석, 황산암모늄, 크로마토그래피를 이용하여 PPO를 정제하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에서는 2005년 5월 경상남도 진주에서 재배된 성숙하고 신선한 우영을 재료로 사용하였다. Chlorogenic acid, catechin, L-3,4-dihydroxy phenylalanine (L-DOPA), pyrogallol, caffeic acid, hydroquinone, resorcinol, Triton X-100, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), DEAE-cellulose, protinin, ammonium sulfate와 Phenyl-sepharose CL-4B는 Sigma Chemical Co.(USA) 제품을 사용하였다.

### 조효소액의 조제

효소의 추출은 Zhou 등(6)의 방법을 변형하여 실시하였다. 먼저 추출 용액은 2% (v/v) Triton X-100과 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)가 들어있는 0.1 M 인산완충용액 (pH 6.5) 240 mL를 제조하였고, 충분히 팽윤시킨 DEAE-Cellulose resin 50 g을 추출용액에 혼합하였다. 음이온 교환 수지는 먼저 산, 알칼리 처리로서 활성을 증가시켰으며, 추출용액에 넣어 4°C에서 12시간 동안 평형을 이루게 하였다. 우영 뿌리는 동결건조기(SFDSM24, Samwon Co., Korea)를 이용하여 탈수를 시킨 후 분쇄기로 분쇄하여 사용하였다. 분쇄된 우영 뿌리 30 g을 추출 용액에 넣고 4°C에서 60분간 resin과 함께 교반하여 효소를 추출하였다. 그 추출물은 glass wool을 이용하여 여과하였고, 여과된 용액은 15,000 g의 속도로 4°C에서 30분간 원심분리를 실시하였다. 상등액은 모아서 approtinin(0.33 mL/100 mL)을 첨가하여 4°C에서 보관하였다. 보관된 시료는 조추출물로 사용하였다.

### 효소의 정제

조추출물은 1.0 mM 인산완충액(pH 6.5)에서 12시간 투석을 실시하였다. 투석된 효소 용액은 황산암모늄(25 - 80%)를 단계별로 첨가하고 12,500 g에서 30분간 원심분리를 실시하여 침전물을 분리해내었다. 그 침전물은 1.0 M의 황산암모늄을 함유한 0.05 M 인산완충액(pH 6.5)의 6.0 mL

에 녹이고 동일한 완충액에서 12시간 투석을 실시하였다. 투석된 시료는 15,000 g에서 30분간 원심분리를 실시하였고, 상등액을 5°C에서 완충용액 A (1.0 M 황산암모늄과 1.0 M 염화칼륨이 함유된 0.05 M 인산완충액, pH 6.5)로 평형화된 Phenyl-sepharose CL-4B 칼럼(1.0 × 8.0 cm)로 분리하였다. 완충용액 A는 황산암모늄과 염화칼륨을 각각 1 M, 0.8 M, 0.5 M, 0.05 M, 0 M의 농도로 통과 시키고 다음으로 50% ethylene glycol과 증류수를 통과시키는 단계별 농도 구배를 두어 효소 분리를 실시하였다. 칼럼의 흐름 속도는 1.0 mL/min이었고 fraction collector를 통해 2.5 mL씩 분취하였다. 활성 부위는 모두 모으고, 다시 0.05 M 인산완충액 (pH 6.5)에서 투석을 실시한 후 Microcon YM-10 ultrafiltration cells(Millipore, Amicon, USA)을 이용하여 농축하였다. 농축된 시료는 10,000 g로 4°C에서 10분간 원심분리를 실시하였고, 0.05 M 인산완충액(pH 6.5)으로 평형화된 Sephadex G-100 gel 칼럼(1.6 × 65 cm)에서 분리를 실시하였다. 활성부위는 모두 모아서 Microcon YM-10으로 농축하여 우영 뿌리의 polyphenol oxidase 정제물로 사용하였다.

### 단백질 측정

단백질의 함량은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Bradford의 방법(12)에 의해서 측정하였다. 칼럼에서 분리되는 단백질의 함량은 분광광도계(V-560, Jasco Co., Japan)를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 분자량 측정

정제된 효소의 분자량을 측정하기 위하여, SDS-PAGE 전기영동법(13)을 수행하였다. SDS-PAGE 전기영동을 위하여 10% polyacrylamide gels을 사용하였으며, Myosin,  $\beta$ -galactosidase, phosphorylase b, serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor, lysozyme and aprotinin (각각 분자량이 200,000, 116,250, 97,400, 66,200, 45,000, 31,000, 21,500, 14,400 and 6,500 Da)이 변성 조건에서 표준 분자량로서 사용되었다. Coomassie brilliant blue R-250로 염색하여 위에 언급한 단백질의 band를 확인하였다.

### 기질 특성성

기질은 catechol, chlorogenic acid, (+)-catechin, dihydroxy phenylalanine (L-dopa), hydroquinone acid, pyrogallol, resorcinol 그리고 tyrosine으로 측정하였다. Michaelis-Menten 상수 ( $K_m$ )은 다양한 기질 농도에서 측정하였다. 각각의 기질의 최대 과장에서 흡광도의 증가를 측정하여, 0.1 mL의 효소 용액과 2.9 mL의 다양한 기질 용액은 0.05 M 인산완충액 (pH 6.5)에서 측정하였다.

### pH 특이성 및 안정성

0.1 M citric acid-0.2 M disodium phosphate(pH 3-8);

tris(hydroxymethyl)aminomethane (pH 8.5); 그리고 0.1 M bicarbonate (pH 9-10)의 세가지 완충액을 이용하여 정제된 PPO의 pH 활성과 안정성에 관한 실험을 실시하였다. PPO 활성에 대한 pH의 영향은 0.2 mL의 0.5 M catechol 용액에 2.7 mL의 다양한 완충액을 첨가하고 0.1 mL의 정제된 효소를 첨가하여 측정하였다. 효소 활성은 420 nm에서 분광광도계(V-560, Jasco Co., Japan)를 이용하여 측정하였으며, polyphenol oxidase에 대한 pH 안정성은 pH 3에서 pH 10사이의 완충액을 25°C에서 30분간 정치시킨 후 측정하였다.

### 온도에 따른 효소활성

반응의 최적 온도를 측정하기 위하여 정제된 효소액과 기질용액을 각각 10°C에서 80°C 범위에서 0.2 mL의 0.5 M catechol 용액에 일정시간 항온처리 한 2.7 mL의 0.05 M 인산완충액을 혼합한 후 0.1 mL의 정제된 효소를 첨가하여 반응속도를 측정하였다. 그리고 효소의 온도별 안정성을 측정하기 위하여 정제된 효소용액을 취하여 각각의 온도에서 30분간 정치시킨 후 반응속도를 측정하였다.

### 금속이온 및 저해제의 영향

효소 활성에 있어서 저해제의 영향은 2.7 mL의 0.05 M 인산완충액(pH 6.5)의 10 mM catechol과 0.2 mL의 저해제를 각기 다른 농도로 혼합한 후 0.1 mL의 효소용액을 첨가하여 420 nm의 흡광도에서 변화정도를 측정하였다. 효소활성의 상대적적인 값은 대조구에 대한 기울기의 변화량으로 측정하여 그 저해정도를 백분율(%)로 나타내었다.

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 FeCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub> 및 CaCl<sub>2</sub>를 각각 1 mM이 되게 0.05 M 인산완충액(pH 6.5)에 용해시켰다. 이 용액을 효소용액에 첨가하여 효소활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 효소의 추출·정제

우엉 뿌리로 부터의 polyphenol oxidase 추출과 분리 과정에 대한 요약은 Table 1에 나타내었다. 분리된 polyphenol oxidase는 조추출물의 단백질 함량에 비하여 129배의 정제도를 나타내었으며, 효소에 대한 수율은 1.3%로 나타났다. Polyphenol oxidase의 추출에 있어서 식물체 내 페놀이 퀴논 형태로 변화하는 것을 막기 위하여 insoluble 또는 soluble poly vinyl pyrrolidone(PVP), poly vinyl poly prrorolidone(PVPP) 및 음이온 수지와 같은 phenol-binding agent를 이용하는 것은 내부 페놀을 제거시켜 그들의 산화를 방지하고 효소활성을 유지시켜주는데 효과적인 방법으로 제시되고 있다(6). 또한, DEAE cellulose 수지와 같은 음이온 교환수지를 사용함으로써 조추출물에서의 친수성 단백질을 제거할 수 있으며, 페놀의 일부와 수지가 결합·흡수함으로써

내생 페놀 구성성분을 제거할 수 있다. 이와 더불어 phenyl-sepharose CL-4B에 의한 분리는 복숭아(10), 딸기(11), 바나나(9) 및 감자(8)와 같은 다양한 과실로부터의 polyphenol oxidase 정제에 사용되었다.

Table 1. Summary of the extraction and purification of polyphenol oxidase from brudock (*Arctium lappa* L.)

Purification step	Total Act., Units	Sp. act., Units/mg	Total protein (mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	4866500	570.17	8535.25	1.00	100.0
25-80% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	673750	9502.82	70.90	16.67	13.8
Phenyl-sepharose CL-4B	153720	67244.09	2.29	117.94	3.1
Sephadex G-100	67580	73536.45	0.92	128.97	1.3

이 실험에서 우엉 뿌리의 polyphenol oxidase는 phenyl-sepharose CL-4B 칼럼으로부터 0.05 M의 완충용액 A에서 용출되었으며 한 개의 피크를 나타내었다.

polyphenol oxidase의 정제를 위해서 phenyl-sepharose CL-4B에 의해서 분리된 단백질 중 활성이 강한 피크를 모아서 microcon YM-10으로 농축한 다음 다시 Sepadex G-100 칼럼에 주입시켜 분리함으로써 우엉 뿌리의 polyphenol oxidase를 정제를 하였다. 활성을 가지는 피크는 gel filtration에 의해서 관측되었고 정제된 효소는 피크의 중심 분획에서 찾을 수 있었다(Fig. 1).

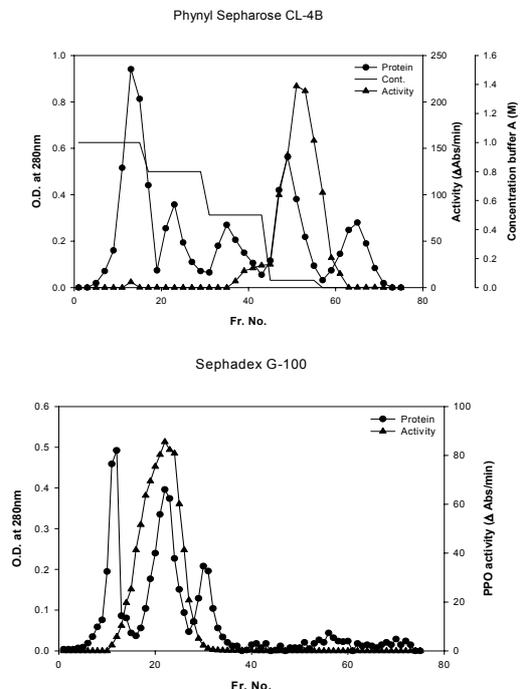


Fig. 1. Elution profiles of polyphenol oxidase and protein after Phenyl-sepharose CL-4B chromatography (upper) and Sephadex G-100 filtration (lower).

**분자량 측정**

정제된 polyphenol oxidase의 분자량은 SDS-PAGE 전기영동에 의해 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2의 lane 1은 표준 용액, lane 2는 Phenyl-sepharose CL-4B 흡착 크로마토그래피, 그리고 lane 3은 마지막 정제 단계인 Separdex G-100 겔 여과 크로마토그래피의 결과를 보였고, 전기영동 후 약 30 kDa의 분자량을 나타내었다. 이들 조건에서 다른 과실의 polyphenol oxidase의 분자량은 당근(7), 감자(8), 바나나(9) 그리고 올리브(14) PPO의 분자량이 각각 59 kDa, 69 kDa, 31~61 kDa 및 32 kDa이 보고되었다. 이 실험에서 나타난 결과는 바나나 및 올리브와 유사한 PPO 분자량을 가지고 있는 것으로 나타났으며 당근과 감자의 polyphenol oxidase와는 차이를 나타내었다.

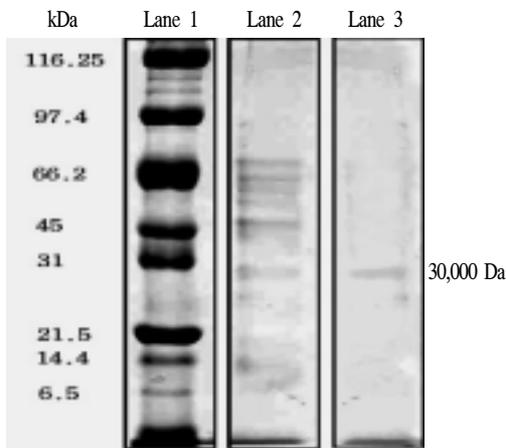


Fig. 2. SDS-PAGE of partially purified and purified polyphenol oxidase; standard solution (lane 1); active fractions eluted from phenyl-sepharose CL-4B (lane 2); purified polyphenol oxidase (lane 3).

**pH 특이성 및 안정성**

우영 뿌리로부터 추출된 PPO에 대한 pH의 영향과 안정성은 catechol을 기질로 사용하여 그 활성을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 우영 뿌리의 polyphenol oxidase는 약 7.0의 pH에서 가장 강한 활성을 나타내었으며, pH 변화에 따른 활성은 pH 5.0에서 7.0으로 변화하는 동안 급속히 증가하였고, pH 7.5에서 10.0사이에서 크게 감소하는 것으로 나타내어 강산으로 갈수록 활성이 감소하고 알칼리 범위에서는 거의 활성을 나타내지 않았다.

다양한 기질에 대한 polyphenol oxidase의 최적 pH는 5.0에서 7.0 사이에서 다양하게 보고되어지고 있다. 그러한 결과는 polyphenol oxidase 추출을 위한 원료의 차이에서 나타나는 것으로 알려진다(15). 또한 기질에 따른 최고 활성 pH가 달라지는 것으로 알려지고 있는데, 딸기(16)와 Romebeauty, 'Winesap'와 'Cortland' 사과(17)에서도 이와 유사한 결과가 보고되고 있다. 우영 뿌리에서 추출한 polyphenol oxidase에 대한 pH 안정성은 7.0에서 가장 안

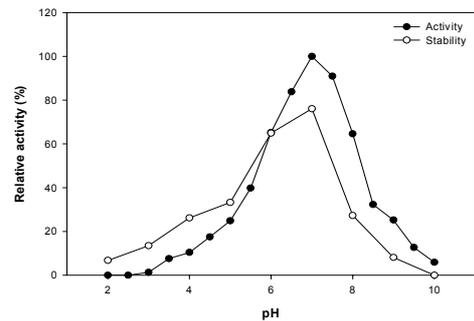


Fig. 3. Determination of the optimum pH and pH stability of polyphenol oxidase from brudock (*Arctium lappa* L.).

정한 활성을 나타내었고, 그 보다 낮은 pH 조건에서는 불안정하여 활성이 감소되는 것으로 나타났다. 또한, polyphenol oxidase의 pH에 대한 안정성은 pH 2.0에서 6.0로 변하는 동안 증가하였고, pH 7.0에서 8.0으로 변하는 동안 크게 감소하는 것으로 나타내었다.

**온도의 영향**

우영 뿌리로 부터 추출된 polyphenol oxidase의 최적 활성 온도는 35°C로 나타내었다(Fig. 4(A)). 효소 활성은 10°C에서 35°C로 변화하는 동안 그 활성은 증가하였고 그 후 35°C에서 80°C까지 온도가 증가하면서 그 활성은 감소하였다. 최적 활성온도는 PPO의 시료에 따라 다양하게 나타내어 Niagara grapes PPO의 경우 최적 온도는 25°C이며(18), 25°C

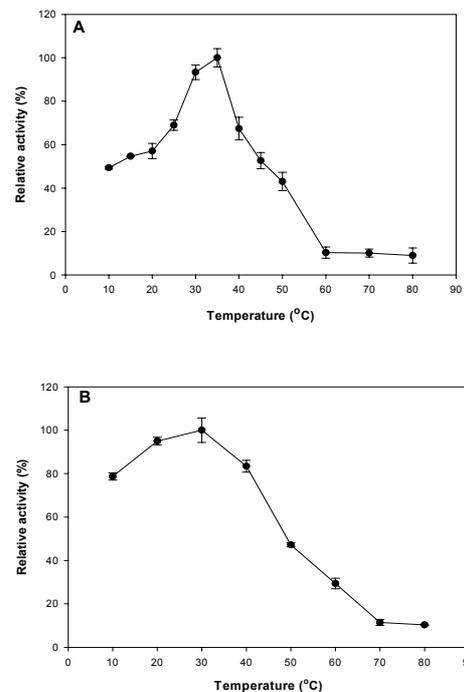


Fig. 4. The optimum temperature (A) and thermal stability (B) of polyphenol oxidase from brudock (*Arctium lappa* L.).

이하의 온도에서 활성이 완만히 감소한 반면, 돼지감자의 polyphenol oxidase는 비교적 고온인 40°C에서 효소활성이 가장 강하게 나타난다고 보고되었다(19).

온도에 따른 polyphenol oxidase 안정성에 대한 결과는 Fig. 4(B)에 나타내었다. 우엉뿌리 효소는 30°C에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 낮은 온도에서 유지되는 동안 효소의 활성은 감소하였다. 뿐만아니라, 50°C 이상에서는 그 활성이 크게 감소하여 60°C 이상에서는 그 활성이 매우 낮게 측정되었으며, 30°C에서 50°C로 변화하는 동안 그 상대적인 활성은 100%에서 47%로 감소하였다.

### 기질의 활성 특성

다양한 phenol성 기질을 이용하여 우엉 뿌리 polyphenol oxidase에 대한 기질 특이성을 조사한 결과는 Table 2에 나타내었다. 각각의 기질에 대한 최대 흡광도를 먼저 측정하였고, 그 과정에서 기질에 대한 polyphenol oxidase의 상대적인 활성은 catechol과 비교하여 계산하였다. 우엉 뿌리에서 분리된 polyphenol oxidase의 기질에 대한 특성은 tyrosine, hydroquinic acid와 resorcinol에서는 낮은 활성을 나타낸 반면, chlorogenic acid에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 다음으로는 catechol과 (+)-catechin의 순으로 나타내었다.

기질에 대한 효소의 kinetic 특성을 알아보기 위해서 chlorogenic acid, catechol, (+)-catechin과 L-DOPA에 대한 Km값은 Lineweaver-Burk plot에 의해서 계산되었으며 그 값은 각각 16.18, 23.11, 72.26 그리고 85.66 mM로 나타났다.

Table 2. Substrate specificity of polyphenol oxidase from brudock (*Arctium lappa* L.)

Substrate	Cont. (mM)	Wave length (nm)	Act. Units/mL	Relative activity	Km
Monophenol					
Tyrosine	2.5	475	3.4	1.5	-
Diphenol					
o-Phenols					
Catechol	10	420	213.4	100	23.11
Chlorogenic acid	10	420	881.8	413.2	16.18
L-DOPA	10	475	35.9	16.82	85.66
(+)-Catechin	10	420	66.4	31.11	72.26
Caffeic acid	10	420	18.9	8.85	-
m-diphenol					
Resorcinol	10	460	2.5	1.21	-
p-diphenol					
Hydroquinic acid	10	460	3.1	1.46	-
Triphenol					
Pyrogallol	10	334	15.1	7.07	-

<sup>1)</sup>compared to that of catechol (%).

이 중 chlorogenic acid의 Km값은 catechol에 비해서 70% 이상 낮은 값을 나타내었다. 이러한 결과는 chlorogenic acid가 우엉 뿌리로부터 추출된 polyphenol oxidase에 가장 친화성이 높은 기질인 것으로서 판단할 수 있으며, 이와 관련하여 Alberghina(20)와 Partill 등(21)은 감자의 polyphenol oxidase에서 chlorogenic acid가 가장 친화성이 높은 기질이라고 보고하였고, 또한 Herel 등(4)은 포도의 PPO에서도 chlorogenic acid가 가장 친화성이 높은 기질이라고 보고하였다. Avocado PPO는 L-DOPA에 대하여 Km값이 3.7 mM을 나타내었으며(22), 감자의 polyphenol oxidase에서 chlorogenic acid에 대하여 Km 값이 1.4 mM로 나타내었다(23). 추출된 PPO에 대한 Km값이 서로 다른 것은 분석방법과 원료 및 기질이 다르고 추출 pH가 다르기 때문으로 판단된다.

### 금속이온 및 저해제의 효과

우엉 뿌리에서 추출된 polyphenol oxidase에 대한 다양한 저해제의 영향은 Table 3에 나타내었다. 저해특성을 조사하기 위한 기질로서 catechol을 사용하였으며 저해제로서 polyphenol oxidase 저해 활성이 우수한 것으로 보고되고 있는 4-hexylresorcinol, L-cysteine, benzoic acid, ascorbic acid 그리고 kojic acid를 이용하여 측정하였다. Ascorbic acid와 L-cysteine이 1.0 mM의 농도에서 우수한 효과를 나타내었다. L-cysteine의 경우 o-quinones과 복합체를 구성함으로써 과실제품의 제조공정에서 효소적 갈변을 막는 첨가제로서 사용되어 왔으나, 1986년 FDA에서 황화합물의 신선과실과 야채에 사용하는 것을 규제한 이래로 이의 대체품에 대한 연구가 진행되고 있다(24). 또한, polyphenol oxidase 활성의 저해를 위해 첨가한 금속이온 중 CuSO<sub>4</sub>에서 우수한 저해효과를 나타내었으나, MnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>에서는 저해효과를 나타내지 못하였다. Galeazzi 등(25)은 마나나에서 Ca<sup>2+</sup>,

Table 3. Effect of various compounds on activity of polyphenol oxidase from brudock (*Arctium lappa* L.)

Compounds	Relative activity (%)	
	0.1 mM	1.0 mM
CaCl <sub>2</sub>	99.33	77.46
CuSO <sub>4</sub>	94.40	40.41
MgSO <sub>4</sub>	99.69	88.95
FeCl <sub>2</sub>	100	89.02
MnCl <sub>4</sub>	100	93.93
ZnSO <sub>4</sub>	97.60	83.46
Ascorbic acid	61.83	37.93
Benzoic acid	93.28	69.06
Kojic acid	79.81	64.03
L-Cysteine	64.51	39.03
4-Hexylresorcinol	80.36	62.19

$Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ 은 저해효과가 있었다고 보고하였으며, 오 등(26)의 연구에서도  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ 에서 저해효과를 보고하였다. 반면, Sato (27)의 시금치 polyphenol oxidase에 대한 연구와 표 등(28)의 팽나무버섯의 polyphenol oxidase에 대한 연구에서는  $Cu^{2+}$ 가 효소 활성을 증가시킨다고 보고하였다.

## 요 약

우엉 뿌리(*Arctium lappa* L.)에서 polyphenol oxidase가 DEAE-Cellulose 음이온 수지, 황산암모늄 침전법, Phenyl-sepharose CL-4B 친화크로마토그래피 그리고 Sephadex G-100 겔여과크로마토그래피 등의 과정으로 정제되었으며 정제효소의 효소학적 특성을 검토하였다. 정제된 효소의 분자량은 약 30 kDa의 단일폴리펩티드 사슬로 구성되어 있었다. 효소반응의 최적 pH와 온도는 각각 7.0과 35°C 이었으며, pH 2와 6 사이의 산성조건과, pH 8과 10 사이의 알칼리 조건에서는 활성이 감소되거나 상실되었다. 온도에 대한 영향을 살펴본 결과, 40°C까지 비교적 안정한 활성을 나타내고 있었으나, 50°C에서 30분간 정치 시 효소활성을 50%이상 감소하는 것으로 나타내었다. 이 효소는 catechol 과 L-DOPA에 대하여 높은 효소활성을 나타내었으며, chlorogenic acid과 catechol에 대한 Km 값은 각각 16.18 mM과 23.11 mM이었다. Ascorbic acid와 L-cysteine은 우엉 뿌리 polyphenol oxidase의 효소활성을 감소시켰으며, 금속 이온의 경우  $Cu^{2+}$ 가 효소의 활성을 감소시키는 인자로 나타났다.

## 참고문헌

1. Jeong, S.B. and Shin, M.S. (1990) The oriental medicinal dictionary. Younglimsa, Seoul, Korea. p. 1010-1011
2. Lee, C.Y. and Whitaker, J.R. (1995) Enzymatic browning and its prevention. p. 9-22. In: Enzymatic Browning in Fruits. Walker JR (eds.) American Chemistry Society, Washington, DC, USA
3. Macheix, J.J. Sapis, J.C. and Fleuriet, A. (1991) Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 30, 441-486
4. Harel, E., Mayer, A.M. and Shain, Y. (1965) Purification and multiplicity of catechol oxidase from chloroplasts. Phytochem., 4, 783-790
5. Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C. and Nicolas, J.J. (1989) Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some property. Phytochem., 28, 2903-2907

6. Zhou, P., Smith, N.L. and Lee, C.Y. (1993) Potential purification and some properties of monroe apple peel polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem., 41, 532-536
7. Irene, S. (1995) Properties of carrot polyphenoloxidase. Phytochem., 39, 33-38
8. Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoeppler, A. and Poggi, V. (2003) Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. Phytochem., 63, 745-752
9. Yang, C.P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M.D., Nakamura, N. and Hayashi, N. (2000) Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. J. Agri. Food Chem., 48, 2732-2735
10. Wesche-Ebeling, P. and Montgomery, M.W. (1990) Strawberry polyphenoloxidase: purification and characterization. J. Food Sci., 55, 1315-1319
11. Flurkey, W.H. and Jen, J.J. (1980) Hydrophobic adsorption chromatography of peach polyphenol oxidase. J. Food Sci., 43, 1826-1828, 1831
12. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254
13. Lineweaver, H. and Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., 56, 658-660
14. Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E. and Mayer, A.M. (1977) Catechol oxidase from green olives: Properties and partial purification. phytochem., 16, 1153-1158
15. Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J. and Aubert, S.Y. (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products. Cri., Rev.Food Sci. Nutr., 34, 109-157
16. Wesche-Ebeling, P. and Montgomery, M.W. (1990) Strawberry polyphenoloxidase: purification and characterization. J. Food Sci., 55, 1315-1319
17. Shannon, C.T. and Pratt, D.E. (1967) Apple polyphenol oxidase activity in relation to various phenolic compounds, J. Food Sci., 32, 479-483
18. Wissemann, K.W. and Lee, C.Y. (1981) Characterization of polyphenol oxidase from Ravat 51 and Niagara Grapes, J. Food Sci., 46, 506-508
19. Park, E.B., Lee, J.S. and Choi, E.H. (1991) Isolation and characteristic of polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke tuber. Korean J. Food Sci. Technol., 23, 414-419
20. Alberghina, F.A.M. (1964) Chlorogenic acid oxidase

- from potato tuber slice, partial purification and properties. *Phytochem.*, 3, 65-72
21. Partill, S.S. and Zucker, M. (1965) Potato phenolase: Purification and properties, *J. Biol. Chem.*, 240, 3938-3943
22. Kahn, V. (1976) Polyphenol oxidase isoenzymes in avocado. *Phytochem.*, 15, 267-272
23. Maerae, A.R. and Duggleby, N. (1968) Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase. *Phytochem.*, 7, 853-861
24. Son, S.M., Moon, K.D. and Lee, C.Y. (2000) Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2071-2074
25. Galeazzi, M.A.M., Sagarbieri, V.C. and Constrantinides, S.M. (1981) Isolation, purification physicochemical characterization of polyphenoloxidase from a dwarf variety of banana. *J. Food Sci.*, 46, 150-155
26. Oh, M.J., Lee, W.Y. and Lee, K.S. (1988) Purification and some properties of polyphenol oxidase from arrowroot. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 31, 331-338
27. Sato, M. and Hasegawa, M. (1976) The latency of spinach chloroplast phenolase. *Phytochem.*, 15, 61-65
28. Pyo, H.J., Son, D.Y. and Lee, C.Y. (2002) Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Flammulina velutipes*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 34, 552-558
- 
- (접수 2005년 6월 30일, 채택 2005년 9월 23일)