

느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 Polyphenol Oxidase 분리 정제 및 특성 조사

최주희¹ · 김현진² · 박선영¹ · 함경식^{1*}

¹목포대학교 식품공학과 및 천일염생명과학연구소
²한국식품연구원

Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*)

Ju-Hee Choi¹, Hyun-Jin Kim², Sun-Young Park¹, and Kyung-Sik Ham^{1*}

¹Dept. of Food Engineering and Solar Salt Biotechnology Research Center,
Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea

²Korea Food Research Institute, Gyeonggi 463-746, Korea

Abstract

Polyphenol oxidase (PPO) isoforms were partially purified from oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) using various chromatography techniques, and their characteristics of heat stability, substrate affinity, optimum pH, and optimum temperature were investigated. Three PPO isoforms named PO-I, PO-II-1, and PO-II-2 were partially purified from oyster mushroom. The molecular weight of PO-II-1 was 70 kDa and PO-I and PO-II-2 were less than 6 kDa each. Characterization was carried out using a PPO isoform partially purified by hydrophobic interaction chromatography. Optimum temperature was 55°C and optimum pH 5.0. However, the PPO was inactivated at neutral pH or by heating at 80°C for 30 min, while the 40% PPO still remained active after heating at 60°C for 45 min. The PPO isoform showed the highest substrate affinity to chlorogenic acid and pyrogallol, in which K_M values were 1.01 and 2.06 mM, respectively. Therefore, these results suggested that the mushrooms should be stored at a pH higher than 7.0 and at a low temperature to prevent enzymatic browning.

Key words: oyster mushroom, polyphenol oxidase, purification, characterization

서 론

식품에 대한 소비성향이 건강 지향적이면서 간편성을 추구하는 식품으로 바뀌면서 과채류와 버섯을 비롯한 다양한 기능성을 갖고 있는 신선편이식품의 소비가 꾸준히 증가하고 있다. 그러나 과채류와 버섯은 수확 후 가공 및 유통되는 과정에서 발생하는 갈변이나 물리검 현상 등 다양한 변화에 따른 품질 저하의 문제에 직면해있으며 그중에서도 갈변으로 인한 과일의 손실률이 전체 손실율의 50% 이상을 차지하는 것으로 보고되고 있다(1). 과채류나 버섯에서 발생하는 갈변 현상은 크게 polyphenol oxidase(PPO)와 peroxidase가 관여하는 효소적 갈변과 성분 상호간의 화학적 변화에 의해 발생하는 비효소적 갈변으로 나누어지는데, 과채류나 버섯의 신선편이식품 가공 시 발생하는 갈변은 주로 갈변효소에 의해 발생하는 경우가 대부분이다(2). 갈변효소 중 자연계에 널리 존재하는 PPO는 산소 존재 하에서 phenolic compounds를 산화시켜 *o*-quinon compounds를 만들고 이들 물질이 서로 중합되면서 갈색 또는 적색의 갈변물질을 생성하게 된

다. 효소적 갈변은 주로 가공이나 유통과정에서 발생하는 수세, 박피, 절단 등 물리적 스트레스에 의해 떨어져있던 PPO와 기질로 작용하는 phenolic compounds, 산소가 서로 반응하면서 주로 발생하는 것으로 알려져 있다(3). 주로 PPO에 의해 발생하는 과채류의 효소적 갈변현상을 방지하기 위해서 PPO 활성을 억제시키거나 기질 및 산소의 접촉을 최소화시키는 방법들(3-5)이 다양하게 연구되고 있으나 각각의 과채류를 비롯한 신선편이식품에 적용하기 위해서는 각각의 과채류나 버섯에 들어있는 갈변효소인 PPO 특성에 대한 연구가 뒷받침되어야 한다.

버섯의 경우, 수확 후 대사작용이 일반 과채류보다 활발하여 이산화탄소가 20°C에서 200~500 mg CO₂/kg/hr 발생함으로써 증량감소 및 외관변형이 발생할 뿐만 아니라, 호흡열로 인한 품온 상승으로 변색이 일어나는 것으로 보고되고 있지만 일반 과채류에 비해 갈변효소에 대한 연구가 덜 진행되어 있는 실정이다(6). 특히, 우리나라를 비롯한 아시아 지역에서 널리 식용되고 있는 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)은 cholesterol level을 낮추는데 관여하는 lovastatin을 건조

*Corresponding author. E-mail: ksham@mokpo.ac.kr
Phone: 82-61-450-2425, Fax: 82-61-454-1521

무게 대비 0.4%에서 2.7% 함유하고 있을 뿐만 아니라 항암, 항산화, 항균 등 다양한 기능성을 갖고 있는 것으로 알려졌으나 갈변에 관한 연구, 특히 PPO에 대한 연구는 거의 진행되지 않았다(7-11). 따라서 본 실험에서는 우리나라에서 버섯 총 생산량의 약 80%를 차지하고 있는(12) 느타리버섯의 효소적 갈변을 효과적으로 제어하기 위하여 느타리버섯으로부터 PPO를 부분 분리 정제하고, 이들 PPO isoforms을 함유하고 있는 부분 정제된 분획을 이용하여 최적 반응온도, pH, 열안정성, 기질특이성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 느타리버섯은 전남 목포에서 구입하여 수세, 절단 후 실온에서 24시간 동안 저장하여 갈변효소인 PPO의 함량을 증가시켜 사용하였다. 실험에서 사용된 Tris(base), ammonium sulfate, pyrogallol, gallic acid, chlorogenic acid, catechol, L-dihydroxy phenyl alanine (L-DOPA), vanillic acid, D-tyrosine, polyvinyl polypyrrolidone(PVPP)은 Sigma(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며 모든 분석용 용매는 HPLC grade 용매를 사용하였다.

조효소액의 제조

절단으로 PPO 함량이 증가된 느타리버섯(4.5 kg)을 1% polyvinyl polypyrrolidone(PVPP)을 함유한 0.5 M Na-phosphate(pH 7.0) 9 L에 넣고 분쇄한 후 1시간 동안 균질화시켰다. 이후 4°C에서 20분간 10,000×g에서 원심분리 하여 침전물을 제거한 후, 상등액과 동량의 acetone으로 단백질을 침전시킨 후 다시 원심분리 하여 단백질 pellet을 얻었다. 이렇게 얻은 단백질 침전물을 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)으로 녹여 동 용액으로 투석시킨 후 조효소액으로 사용하였다. 모든 단백질 추출과정은 4°C에서 이루어졌다.

단백질 정량

단백질은 Bradford 방법을 이용하여 정량하였다(13). 증류수로 희석된 조효소액 800 µL에 dye reagent 200 µL를 넣어 상온에서 15분간 정치시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며 bovine r-globulin을 표준물질로 사용하였다.

PPO 활성 측정

PPO활성은 0.1 M Na-succinate(pH 5.5) 450 µL와 조효소액 50 µL를 넣은 반응액에 기질로 10 mM pyrogallol 500 µL를 넣어 50°C에서 10분간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소의 정제

느타리버섯의 PPO의 정제는 Fig. 1에 제시한 바와 같이 2종류의 open column chromatography(Q-sepharose anion-

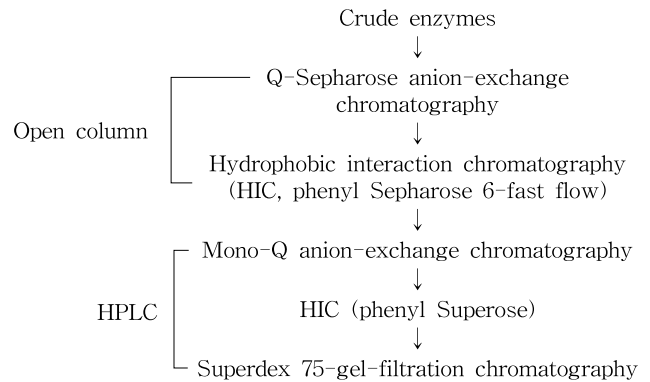


Fig. 1. Procedure for purification of oyster mushroom PPO. Enzyme fractions separated by each chromatography were dialyzed against the buffer used in the next chromatography, and the PPO activities of separated fractions were spectrophotometrically measured at 420 nm using pyrogallol as a substrate.

exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography: HIC)와 3종류의 HPLC용 column chromatography(Mono-Q anion exchange chromatography, HIC, gel-filtration chromatography)를 순차적으로 사용하여 분리하였다. Q-Sepharose anion-exchange chromatography의 경우 resin(Sigma Co.)을 충전시킨 column(2.5×20 cm)을 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)로 equilibrium 시킨 후 조효소액을 loading한 다음, 증류수와 0.5 M NaCl용액을 이용한 gradient system(Pharmacia Biotech., Stockholm, Sweden)으로 용출하였다. 이때 유속은 4 mL/min로 하여 120분간 실시하였으며 5 mL씩 분획하였다. Q-Sepharose anion-exchange column chromatography에서 효소활성을 보이는 분획(PO)을 1.2 M ammonium sulfate를 함유한 20 mM Na-phosphate(pH 6.8)로 equilibrium 시킨 후, phenyl Sepharose 6-fast flow resin(Sigma Co.)으로 충전된 HIC에 loading한 다음, 1.2 M ammonium sulfate에서 3차 증류수로 농도변화를 주면서 4 mL/min 유속으로 단백질을 분리하였다. 효소활성을 나타낸 분획(PO)을 Mono-Q anion exchange column(Pharmacia Biotech.; HR 5/5)과 HIC가 연결된 HPLC(Jasco, Tokyo, Japan)를 이용하여 순차적으로 분리하였으며, 이때 유속은 0.5 mL/min로 실시하였다. 이어 Superdex 75 gel-filtration column(Pharmacia Biotech.; HR 10/30)을 이용하여 유속 0.5 mL/min의 조건에서 최종적으로 정제하였다. 효소활성 분획(PO-II-1, PO-II-2)의 분자량은 표준물질로 bovine serum albumin(66 kDa), carbonic anhydrase(29 kDa), cytochrome(12.4 kDa), aprotinine(6.5 kDa)을 이용하여 작성된 검정곡선에 의해 추정하였다. 또한 gel-filtration column의 void volume은 alcohol dehydrogenase(150 kDa)을 이용하여 결정하였다.

Partially denatured-PAGE

정제과정 중 PPO 활성을 나타낸 모든 분획들(PO-I, PO-II-1, PO-II-2)은 partially denatured-PAGE를 행하였다.

즉, 분리한 조효소액은 열처리로 불활성화 시키지 않은 상태로 5% stacking gel과 0.1% SDS를 포함한 8% running gel을 이용하여 전기영동을 행한 다음, 전개된 gel에 기질물질인 pyrogallol을 가하여 activity staining을 행한 후 이어 silver staining 하였다.

효소특성 조사

느타리버섯에서 분리한 PPO의 특성을 조사하기 위하여 PPO isoforms을 함유하고 있는 부분 정제된 분획을 이용하여 pH 및 반응 온도에 따른 효소활성의 변화, 효소의 열 안정성 및 기질특이성에 대해 조사하였다. pH에 따른 효소의 활성 변화는 0.1 M Na-succinate(pH 3.0~5.5)와 0.1 M Na-phosphate(pH 5.0~7.0)를 사용하여 조사하였으며 효소활성의 최적온도를 알아보기 위하여 10~80°C 범위 안에서 10분간 반응시킨 후, 효소활성을 측정하였다. 효소추출액을 30, 40, 60, 80°C에서 각각 15, 30, 45, 60분 동안 열처리한 후 남아있는 효소의 활성을 측정하여 효소의 열안정성을 조사하였으며 효소의 기질특이성을 조사하기 위하여 mono-, di-, tri-hydroxy phenol(D-tyrosine, vanillic acid, L-3,4-dihydroxyphenylalaine(DOPA), chlorogenic acid, catechol, gallic acid, pyrogallol)을 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mM 농도를 기질로 사용하여 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

갈변효소의 분리 정제

수세, 절단 등 외부적 환경변화에 따라 발생하는 느타리버섯의 갈변에 주로 관여하는 효소인 polyphenol oxidase (PPO)를 분리 정제하기 위하여 Fig. 1에서 보는바와 같이 조효소액을 추출한 후 다양한 column chromatography를 사용하였다. Q-Sepharose anion-exchange, hydrophobic interaction chromatography를 이용한 open column chromatography에서는 효소활성을 보이는 한 개의 peak를 분리하였으며 이를 PO라고 명명하였다. 분리된 PO를 HPLC에 의해 분석한 결과, Mono-Q-anion exchange chromatography에서 두 개의 활성 peak를 얻었으며 이를 PO-I과 PO-II로 각각 명명하였다. 그리고 활성이 강한 PO-II를 hydrophobic interaction chromatography를 이용하여 분리한 결과, 두 개의 활성 peak를 얻었으며 이를 PO-II-1과 PO-II-2로 명명하였다. 따라서 5종류의 chromatography를 이용하여 느타리버섯의 갈변효소 세 종류(PO-I, PO-II-1, PO-II-2)를 분리하였다. 분리된 이들 PPO의 분자량을 Superdex 75 gel-filtration chromatography를 이용하여 측정한 결과 PO-I와 PO-II-2는 6 kDa 이하, PO-II-1은 70 kDa 이상의 분자량을 갖는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 또한 이들 PPO를 불활성화 시키지 않고 SDS-PAGE로 분리한 후, 기질인 pyrogallol

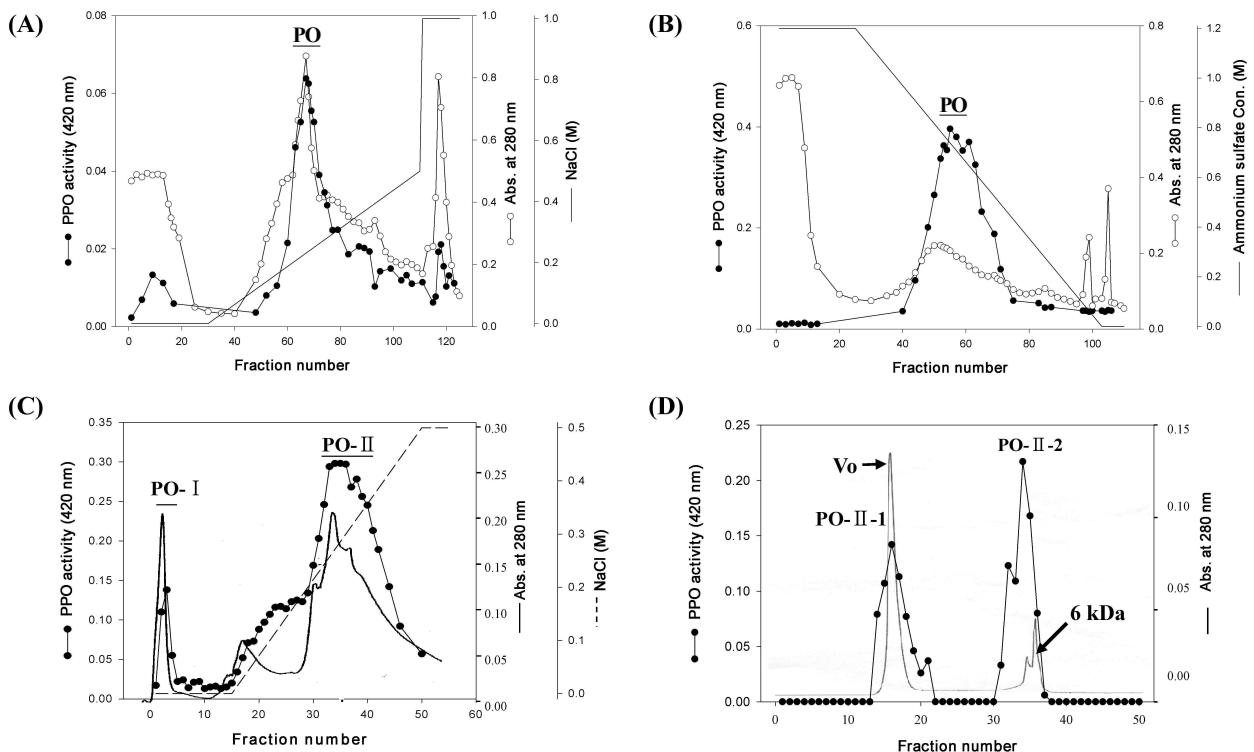


Fig. 2. Separation of oyster mushroom PPO using various chromatographies including Q-sepharose anion-exchange chromatography (A), HIC (B), mono-Q anion-exchange chromatography (C), and gel-filtration chromatography (D). The separated fractions were detected at 280 nm and the PPO activities of the fractions were spectrophotometrically measured at 420 nm using pyrogallol as a substrate.

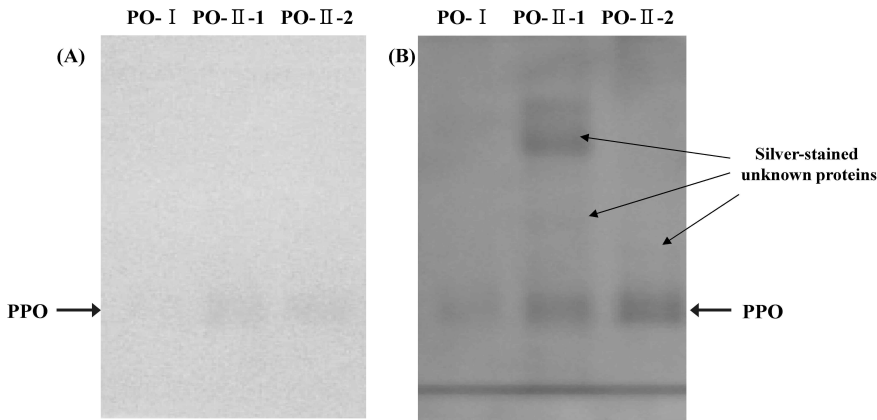


Fig. 3. Partially denatured-PAGE of purified PPO isoforms. Partially denatured-PAGE was performed on 8% running gel containing 0.1% SDS and 5% stacking gel. After electrophoresis, the gel was activity-stained at 40 for 30 min in 0.1 M Na-succinate (pH 5.5) containing pyrogallol as a substrate (A), and then the gel was stained with silver (B).

용액으로 activity staining한 partially denatured SDS-PAGE 분석 결과, 분리된 3개의 PPO isoform 모두에서 기질과 반응을 보여 단일 갈색 band를 형성함으로써 분리된 3개의 PPO는 단일 PPO isoform으로 이루어진 것으로 추정되어진다. 그러나 pyrogallol staining 후 다시 silver staining 하여 PPO 이외의 다른 단백질이 존재하는지를 확인한 결과, PO-I는 분리 정제가 잘되어 단일 band가 나타난 반면 PO-II-1과 PO-II-2에는 이들 효소들보다 분자량이 큰 다수의 단백질들 band들이 나타나는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

pH 및 반응 온도에 따른 효소활성의 변화

느타리버섯에서 분리한 PPO의 특성 조사를 위해 open column인 Q-Sepharose anion-exchange column, hydrophobic interaction column에서 부분 분리 정제된 PO 분획을 사용하였다. pH 변화에 따른 효소활성은 다른 일반적인 과채류(14-16)의 갈변효소가 중성부근에서 가장 높은 활성을 보이는 것과는 달리 pH 5.0에서 가장 높은 활성을 보였으며 pH 3.0 부근에서도 효소활성이 60% 정도를 나타낸 반면 pH 7.0에서는 약 20% 효소활성만을 나타냈다(Fig. 4A). 따라서 초산이나 젖산을 이용하여 pH를 낮게 유지하여 갈변을 억제하는 일반적인 과채류나 양송이버섯과는 달리 느타리버섯의 경우 갈변을 억제하기 위해서는 pH를 7.0 이상으로 유지시켜주는 것이 좋을 것으로 사료된다. 또한 반응온도에 따른 효소활성의 변화를 관찰한 결과 Fig. 4B에서 보는바와 같이 느타리버섯의 PPO의 반응최적온도는 일반적인 과채류 PPO의 최적 온도인 30°C 부근과는 달리 60°C 부근인 것으로 관찰되었으며 10°C와 80°C에서도 약 60% 정도의 PPO 활성을 보이는 것으로 나타났다.

효소의 열 안정성 및 기질 특이성

느타리버섯으로부터 부분 정제한 PO 분획을 대상으로 30, 40, 60, 80°C에서 15, 30, 45, 60분간 가열한 후 각각의 효소 활성을 측정된 결과(Fig. 4C), 30°C와 40°C에서 60분간 열처리하여도 80% 이상의 효소 활성이 남아있는 것으로 관찰된 반면, 60°C에서 15분간 열처리한 경우 약 50% 정도의 효소가 불활성화 되었으며 80°C에서 15분간 열처리로 거의

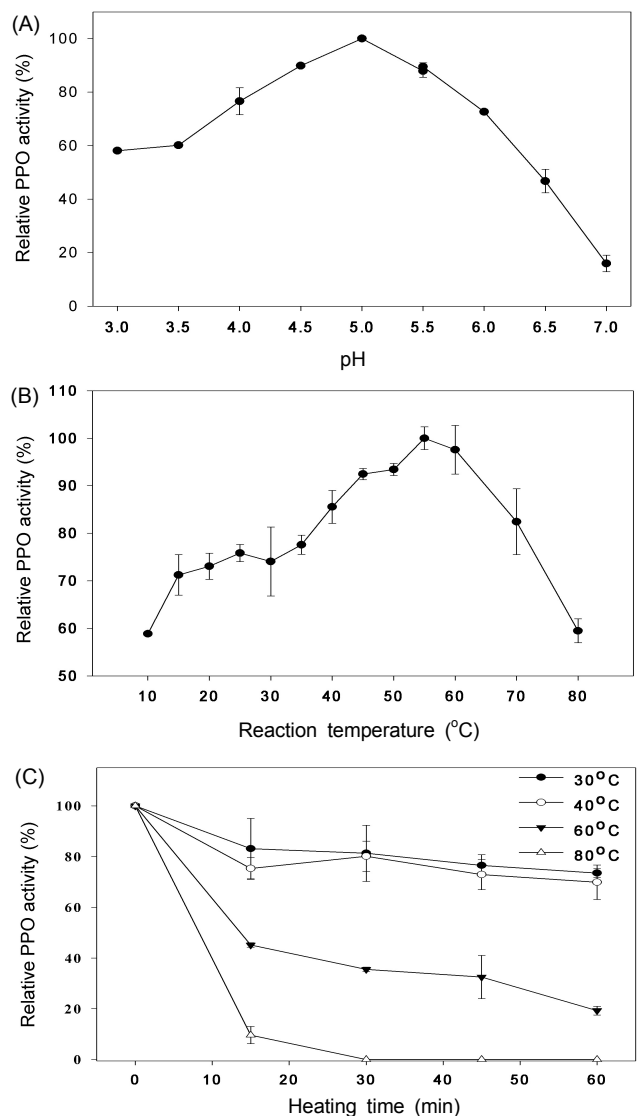


Fig. 4. Characterization of PPO isoform purified partially using hydrophobic interaction chromatography. 0.1 M Na-succinate (pH 3.0~5.5) and 0.1 M Na-phosphate (pH 5.0~7.0) were used to find optimum pH (A), the effect of reaction temperature on the PPO activity was studied at the range of 10~80 (B), and heat stability of the PPO was evaluated by determining the remaining PPO activity after incubation at 30~80°C for 10~60 min (C).

Table 1. K_m values of oyster mushroom PPO for the various substrates

Substrate	K_m value (mM) ¹⁾	
Trihydroxyphenol	Pyrogallol	2.06
	Gallic acid	23.95
Dihydroxyphenol	Catechol	47.12
	Chlorogenic acid	1.01
	L-DOPA	23.24
Monohydroxyphenol	Vanillic acid	ND
	D-Tyrosine	ND

¹⁾ K_m values were obtained using Lineweaver-Burk Plot. ND indicates that K_m value is too big to be determined.

대부분의 PPO는 활성을 잃은 것으로 확인되었다. 느타리버섯 PPO는 60°C에서 30분간 열처리 후에 약 40% 정도 활성을 보였는데, 이는 같은 온도에서 30분 열처리 후에도 약 80%의 활성을 보이는 고구마의 PPO에 비해 열안정성이 다소 떨어지나(17), 사과와 PPO와는 거의 비슷한 열안정성을 나타냈다(18). 또한 mono-, di-, trihydroxy phenolic compounds를 사용하여 느타리버섯 PPO isoform의 기질특이성을 조사하기 위하여 최적의 반응조건(pH 5.0, 55°C)에서 각각의 Michaelis-Menten 상수(K_m) 값을 측정할 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 dihydroxy phenol 물질인 chlorogenic acid와 trihydroxy phenol 물질인 pyrogallol이 K_m value가 각각 1.01 mM과 2.06 mM로 높은 기질 친화력을 보인 반면 monohydroxy phenol 물질인 vanillic acid와 tyrosine을 사용한 경우에는 거의 갈변현상이 나타나지 않은 것으로 확인되었다.

느타리버섯 PPO의 특성 조사에 대한 결과들을 통해 볼 때 일반적인 과채류나 다른 버섯류의 PPO들이 보이는 특성과는 다른 최적 반응 조건을 보이기 때문에, 일반적인 과채류에 비해 이산화탄소 배출량이 많아 호흡열로 인한 품온 상승이 쉬운 느타리버섯(6)의 특성상 온도 조절만으로는 갈변억제가 쉽지 않을 것이다. 그러나 느타리버섯을 산소를 차단할 수 있는 포장재로 포장한 후 10°C 이하, pH 7.0 이상의 조건에서 보관한다면 갈변억제 효과를 기대해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

우리나라 버섯 생산량의 약 80%를 차지하는 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 유통 중에 발생하는 갈변을 방지하기 위한 기초 조사로 갈변원인 효소인 polyphenol oxidase (PPO)를 분리 정제하여 그 특성을 조사하였다. 느타리버섯으로부터 3개의 PPO isoforms(PO-I, PO-II-1, PO-II-2)을 분리하였으며, gel-filtration을 이용한 분자량 확인 결과 PO-II-1은 void volume(70 kDa), PO-I과 PO-II-2는 include volume(6 kDa)에서 분리되는 것으로 보아 PO-II-1은 70 kDa 이상, PO-I과 PO-II-2는 6 kDa 이하인 것으로 확인되었다. 분리된 3개의 PPO isoform들을 partially dena-

tured-PAGE 후, activity staining을 이용하여 분석한 결과, 비록 이들 PPO isoforms PO-II-1과 PO-II-2에 다수의 단백질들이 들어있기는 하지만 PPO 활성을 보이는 band가 하나로 나타남으로써 분리된 PPO isoform들이 실제 PPO 활성을 갖고 있는 단백질로 확인되었으며 다른 PPO isoform이 혼합되지 않은 단일 PPO isoform으로 분리되었음을 알 수 있다. Hydrophobic interaction chromatography에서 분리된 isoform PO를 이용하여 특성을 조사한 결과 최적 반응온도와 pH는 일반적인 다른 과채류와는 달리 50~55°C, pH 5.5에서 높은 활성을 나타내었으며, 열 안정성 실험에 있어서는 60°C에서 45분간 가열 처리 시 약 40%의 PPO activity가 남아있는 반면, 80°C에서 30분간 가열 처리 시 PPO가 완전히 불활성화되었다. 그리고 chlorogenic acid와 pyrogallol에 대하여 높은 기질 특이성을 보였다.

감사의 글

본 연구는 2011년 한국식품연구원의 지원을 받아 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

문 헌

- Whitaker JR, Lee CY. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning (an overview). In *Enzymatic Browning and Its Prevention*. Lee CY, Whitaker JR, eds. ACS Symposium Series 600, Washington, DC, USA. p 2-7.
- Martinez MV, Whitaker JR. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trend Food Sci Technol* 6: 195-200.
- Mayer AM. 2006. Polyphenol oxidase in plants and fungi: Going places? *Phytochemistry* 67: 2318-2331.
- Friedman M. 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. *J Agric Food Chem* 45: 1523-1540.
- González EA, Peiró JM, Oria R, Lopez-Buesa P. 2007. Browning prevention by ascorbic acid and 4-hexyl-resorcinol: Different mechanism of action on polyphenol oxidase in the presence and in the absence of substrates. *J Food Sci* 72: C464-C470.
- Han DS, Ahn BH, Shin HK. 1992. Modified atmosphere storage for extending shelf life of oyster mushroom and shiitake. *Korean J Food Sci Technol* 24: 376-381.
- Alarcón J, Aguila S, Arancibia-Avila P, Fuentes O, Zamorano-Ponce E, Hernández M. 2003. Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (*Basidiomycetes*) strains. *Z Naturforsch* 58: 62-64.
- Hossain S, Hashimoto M, Choudhury EK, Alam N, Hussain S, Hasan M, Choudhury SK, Mahmud I. 2003. Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolaemic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30: 470-475.
- Saragi I, Ghosh D, Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK. 2006. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *Int Immunopharmacol* 6: 1287-1297.
- Hearst R, Nelson D, McCollum G, Millar BC, Maeda Y, Goldsmith CE, Rooney PJ, Loughrey A, Rao JR, Moore JE.

2009. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complement Ther Clin Pract* 15: 5-7.
11. Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P. 2007. Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol* 42: 183-191.
 12. Choi MH, Kim GH. 2003. Quality changes in oyster mushrooms during modified atmosphere storage as affected by temperatures and packing materials. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1079-1085.
 13. Bradford MM. 1976. 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.
 14. Chisari M, Barbagallo RN, Spagna G. 2008. Characterization and role of polyphenol oxidase and peroxidase in browning of fresh-cut melon. *J Agric Food Chem* 56: 132-138.
 15. Doğan S, Turan P, Doğan M, Arslan O, Alkan M. 2005. Purification and characterization of *Ocimum basilicum* L. polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 53: 10224-10230.
 16. Moon SM, Kim HJ, Ham KS. 2003. Purification and characterization of polyphenol oxidase from lotus root (*Nelumbo nucifera* G.). *Korean J Food Sci Technol* 35: 791-796.
 17. Lourenco EJ, Neves VA, Da Silva MA. 1992. Polyphenol oxidase from sweet potato: purification and properties. *J Agric Food Chem* 40: 2369-2373.
 18. Lim JH, Jeong MC, Moon KD. 2006. Purification and characterization of polyphenol oxidase in the flesh of the Fuji apple. *Food Sci Biotechnol* 15: 177-182.

(2011년 8월 23일 접수; 2011년 9월 19일 채택)