

綠熟고추의 低溫貯藏에 따른 種子褐變에 關한 生理化學的 研究

第 2 報 種子褐變에 따른 酵素活性的 變化

嶺南大學校 食品營養學科

李 盛 雨

(1971년 3월 7일 수리)

Physio-chemical studies on the seed-browning in mature green peppers stored at low-temperature (Part 2)

Changes in enzymatic activity with the seed-browning effect.

by

Sung Woo Lee

Dept. of Food & Nutrition, Yeung Nam University, Taegu, Korea.

(Received Mar. 7, 1971)

Abstract

(1) Relatively active polyphenol oxidase influence was seen at 0°C, and the optimal pH level for the enzyme from the seeds of a small type sweet pepper Zairaisisi is 6.5.

(2) The starting stage of the brown coloration with low-temperature injuries showed a strong activity of polyphenol oxidase, and the activity drops to 0 as the entire seed became brownish.

(3) The browning effect with enzyme solution of polyphenol extracts suggested that the brown coloration continues in vitro even if polyphenol oxidase activity is nil.

(4) Although cytochrome oxidase activity dropped when an abnormality occurs in electron pathways of respiration at the starting stage of the browning with low temperature injuries, there was no marked influence of it on the total respiration, indicating the fact that polyphenol oxidase can take place of terminal oxidase in the compensatory respiration process.

緒 言

前報⁽¹⁾에서 筆者는 甘味種 小型고추인 Zairaisisi의 低溫障害에 의한 가장 特徵的인 病症은 種子의 褐變現象이라는 것을 알고 褐變에 關與하는 基質과 中間代謝成分의 變化에 對하여 實驗 考察한 結果를 報告하였는 바, 今般은 polyphenol 成分을 酸化하여 褐變의 原因을 이루는 polyphenol oxidase에 關하여 그 基礎的인 性質을 考察하고, 低溫貯藏에 따른 polyphenol oxidase, peroxidase 活性度의 變化를 測定하여 褐變의 mechanism을 考察하는 한편 polyphenol oxidase와 呼吸과의 關

係를 考察하여 低溫障害에 의한 cytochrome 系의 異常에 따라 polyphenol oxidase가 代償呼吸系의 terminal oxidase가 될 수 있는 것으로 推定하였기에 그 結果를 報告하는 바이다. 本 研究의 一部는 1969年 日本 園藝學會 秋季大會에서 發表하였다. 그리고 本 研究을 도와 주신 大阪府立大學의 緒方邦安教授와 小机信行氏에 謝意를 表하는 바이다.

實 驗

1. 實驗材料

日本 和歌山産의 Zairaisisi를 主로 供試하였고, 一部

는 大邱市에서 栽培한 Zairaisisi 를 供試하였다.

2. 實驗方法

(1) Polyphenol oxidase 의 活性度

1°C의 低溫室에서 種子 5g을 물 10ml로 homogenize 하여 二重가제로 濾過하고 이것을 遠心하여 그 上澄液을 粗酵素液으로 삼아 根岸等(2)의 方法에 準해서 回轉白金電極을 利用하여 polarography 의 으로 溶存酸素量의 變化를 測定하는 自記呼吸酸素測定裝置를 써서 cell 속의 反應에 따라 recorder 에 記錄되는 μA 曲線에 의하여 45 秒後의 μA 值로 polyphenol oxidase 의 活性度로 삼았다. 이를테면 Fig. 1 에서 5×10⁻³M chlorogenic acid 0.2ml를 反應시켰을 때 活性도는 0.113μA:45sec. 로 表示하였다.

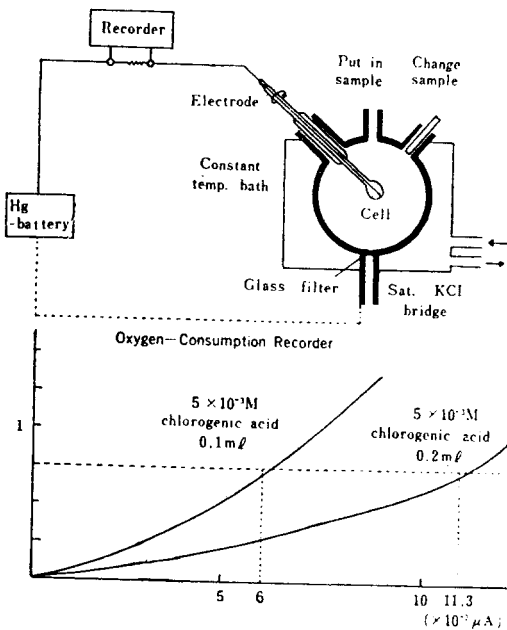


Fig. 1 Method determining polyphenol oxidase activity by oxygen-consumption recorder. phosphate buffer (pH6.0) 1.8ml enzyme soln 0.2ml

(2) Polyphenol 抽出液에 對한 酵素液의 褐變能

種子 10g을 2 倍量의 氷冷한 acetone 과 함께 氷冷하면서 homogenize 하여 遠沈하고 그 殘渣를 다시 2 回冷 acetone 으로 處理後 이것을 眞空乾燥하여 acetone powder 를 얻고 이 acetone powder 의 물 抽出液을 酵素液으로 삼아 中林等(3)의 實驗方法에 따라 褐變能을 測定하였다. 곧 polyphenol 物質의 alcohol 抽出液과 同條件에서 얻은 種子의 酵素液을 서로 섞어 振蕩하면서

30°C 로 지나면 차츰 褐變하는 바, 1 時間後에 2 倍量의 ethanol 을 넣고 反應을 停止시켜 420mμ 의 O.D. 를 測定하여 褐變能으로 삼았다.

3) Peroxidase 活性度

guaiacol 을 使用하는 比色法(4)에 의하여 1/15 M acetate buffer (pH 5.0) 10ml, 0.1% guaiacol 水溶液 1ml, 0.01% H₂O₂ 1ml, 酵素液 2ml, 물 14ml 를 混合하여 30°C 에서 15 分間 反應시킨 後 1N-H₂SO₄ 2ml 를 넣어 反應을 停止시키고 바로 470mμ 에서 O.D. 를 測定하여 peroxidase 의 活性度로 삼았다. 그리고 acetate buffer 5ml, 물 7.5ml, 酵素液 1ml 를 混合하여 blank 로 삼았다.

4) 種子切片의 呼吸量

種子切片 0.5g 을 pH 5.0의 1/15M phosphate buffer 속에서 Warburg 檢壓計를 使用하여 30°C 에서 O₂ 吸收量과 CO₂ 排出量을 測定하였다.

5) O₂ 吸收量에 미치는 DNP 의 添加效果

種子切片呼吸의 測定開始後 30 分에 DNP (最終濃度 10⁻⁴M)를 添加하고 그 後 60 分間의 O₂ 吸收量을 測定하여 添加效果를 算出하였다.

6) Cytochrome oxidase 活性度

種子 10g 에 0.05M sodium barbiturate 20ml 를 넣어 低溫下에서 homogenize·濾過하여 그 上澄液을 粗酵素液으로 삼고 Goddard 等(5)의 方法을 一部 修正한 Mondy 等의 方法(6)에 따라 Warburg 檢壓計를 써서 Warburg flask 의 主室에 0.5M phosphate buffer (pH 7.0) 1ml 와 2.25×10⁻⁴ cytochrome-C 0.3ml 를 넣고 副室에 2N-NaOH 0.2ml, 側室 I 에 酵素液 0.3ml, 側室 II 에 M/10 hydroquinone 0.3ml 를 넣고 全容積이 3.2ml 가 되도록 물을 다시 主室에 加했다. 그리하여 30°C 에서 5 分間 平衡한 後 側室의 內容物을 添加하여 還元 cytochrome 의 酸化速度를 酵素吸收量으로서 測定하여 cytochrome oxidase 의 活性度로 삼았다.

結果 및 考察

1. Polyphenol oxidase 의 基礎的 性質

(1) pH 別 活性度

고추 種子 polyphenol oxidase 의 catechol 에 對한 pH 別 活性度를 測定하였던바 Fig. 2 에서 보는 바와같이 pH 5~7 에서 높은 活性度를 보여주고 最適 pH 는 6.5 이며 pH 4 에서는 현저하게 低下하고 있다.

(2) 溫度別 活性度

低溫에서 種子褐變이 일어나는 事實은 低溫에서도 polyphenol oxidase 가 相當한 活性를 지니고 基質을 酸

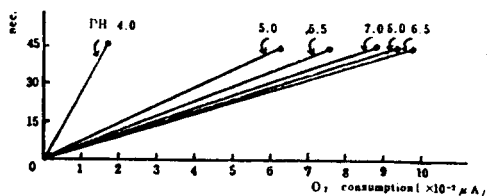


Fig. 2 Polyphenol oxidase activity of pepper seeds at various pH levels. (30°C)
phosphate buffer: 1.8ml, enzyme soln.: 0.2ml, substrate(5×10⁻²M catechol): 0.1ml

化하기 때문이라고 생각되기에 溫度別 polyphenol oxidase의 活性도를 檢討하였던 바 그 結果는 Fig. 3에서 보는바와 같이 溫度의 低下와 더불어 活性도는 低下하지만 0°C에서도 相當한 活性를 지니고 있다는 것을 알 수 있었다.

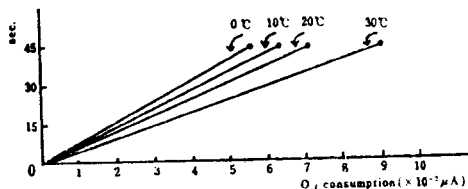


Fig. 3 Polyphenol oxidase activity of pepper seeds at various temperatures.
phosphate buffer (pH 6.5): 1.8ml
enzyme soln.: 0.2ml
substrate (5×10⁻²M catechol): 0.1ml

(3) 酵素量別, 基質量別의 活性度

低溫障害을 입은 組織에서는 polyphenol 物質이 增加하고 polyphenol oxidase가 활발히 生合成되어 이들이 서로 接觸하여 褐變이 일어나는 것으로 알려져 있는바⁽⁷⁾ 一定量의 酵素가 나타내는 活性도는 溫度의 低下와 더불어 低下하기 때문에 低溫障害에 의한 褐變은 溫度條件에 따른 基質量, 酵素量의 增加에 의하는 것이라 보고 이것을 檢討하기 위하여 0°C, 20°C區에서 各各 基質量, 酵素量을 달리하여 酵素消費量을 測定한 結果는 Fig. 4와 같다. 같은 基質量, 酵素量으로는 20°C區가 0°C區보다 酵素 消費量이 크지만 各 區別로 볼 때는 역시 基質量, 酵素量의 增加에 따라 酵素 消費量이 많아지는 것을 알 수 있었다.

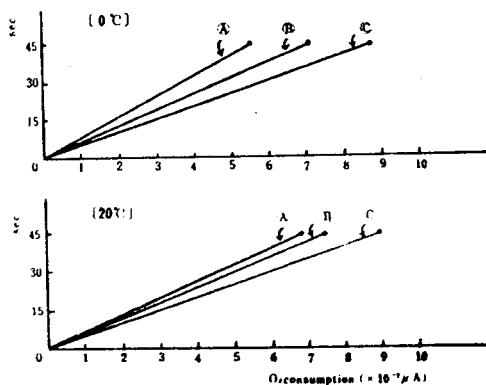


Fig. 4 O₂ Consumptions when either substrate or enzyme levels were varied.

- A. phosphate buffer : 1.8ml, enzyme soln. : 0.2ml
substrate (5×10⁻²M catechol) : 0.1ml
- B. phosphate buffer : 1.7ml, enzyme soln. : 0.2ml
substrate (5×10⁻²M catechol) : 0.2ml
- C. phosphate buffer : 1.6ml, enzyme soln. : 0.4ml
substrate (5×10⁻²M catechol) : 0.1ml

(4) 基質特異性

Polyphenol oxidase의 基質特異性에 關한 研究는 매우 많아서 中林⁽⁸⁾는 사과 polyphenol oxidase에 對하여 chlorogenic acid, catechin, catechol 등의 *o*-diphenols는 強한 特異性을 나타내고 gallic acid, pyrogallol 같은 1,2,3-trioxy phenols는 特異性이 弱하며 monophenols 가운데서 *p*-cresol는 初期의 lag period를 거쳐 酸化되고 tyrosine은 酸化되지 않았다고 報告하고 있으며, Keilin等⁽⁹⁾의 버섯 polyphenol oxidase에 對한 實驗에서는 diphenols, monophenols 다같이 特異性이 있으며 Tate等⁽¹⁰⁾의 Bartlett pear에 對한 實驗에서는 diphenols에 對하여 特異性이 있으나 hydroquinone, resorcin, phenol에는 特異性이 나타나지 않는다고 報告하고 있으니 polyphenol oxidase는 植物의 種類에 따라 다르게 作用하는 基質도 제각기 달라진다는 것을 알 수 있겠다. 이에 고추 種子의 基質特異性을 調査하였던 바 Table. 1에서 보는 바와 같이 *o*-diphenol에 強한 特異性이 나타나는 가운데서도 chlorogenic acid에 가장 強한 特異性이 나타나고 있으며 *m*-diphenol, *p*-diphenol에는 特異性이 없으며 pyrogallol에는 特異性이 若干 나타나고 resorcin, hydroquinone, gallic acid, quinic acid 등에는 特異性이 없었다.

Table. 1 Difference in O₂ consumptions by polyphenol oxidase in pepper seeds when various substrates were used. (30°C, pH 6.5)

substrate	concentration	O ₂ consumption ($\times 10^{-2} \mu A : 45sec.$)
chlorogenic acid	$5 \times 10^{-3} M$	0.113
catechin	$5 \times 10^{-3} M$	0.038
catechol	$5 \times 10^{-2} M$	0.126
caffeic acid	$5 \times 10^{-3} M$	0.025
dopa	$5 \times 10^{-2} M$	0.019
pyrogallol	$5 \times 10^{-2} M$	0.023

[negative]

resorcin, hydroquinone, gallic acid, shikimic acid, quinic acid, *p*-cresol, phenol, tyrosine.

한편 monophenols 에 대한 polyphenol oxidase 의 특이성은 植物의 種類에 따라 positive 의 것과 negative 의 것이 있는 것으로 알려져 있는 바^(8,9,10) 고추種子 polyphenol oxidase 는 충분한 lag period 를 주어도 특이성이 나타나지 않았다.

2. Polyphenol oxidase 活性度の 變化

前報⁽¹⁾에서 Zairaisisi 의 低溫貯藏에 따른 褐變도와 褐變基質 含量의 變化를 測定한 바에 의하면 total polyphenol 含量은 5hr. 後부터 增加하여 褐變度 1.2 인 1日 後까지 增進하여 全面褐變에 들어가는 4日 後에는 크게 減少하였다. 今般은 이에 따른 polyphenol oxidase 活性度の 變化를 測定하였던 바 Fig. 5 에서 보는 바와 같이 1°C 區에서는 1日 後에 增大하고 4日 後

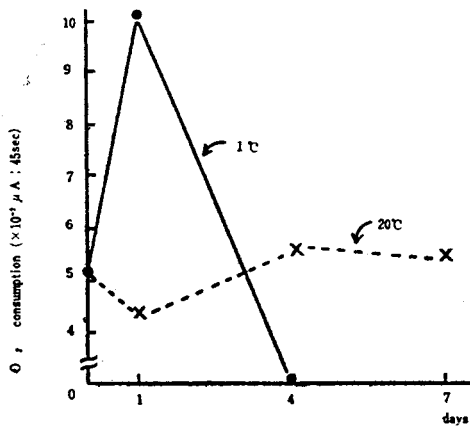


Fig. 5 Changes in polyphenol oxidase activity of pepper seeds at low-temp. storage. phosphate buffer (pH 6.5) : 1.8ml enzyme soln. : 0.2ml substrate ($5 \times 10^{-2} M$ catechol) : 0.1ml

에는 活性도가 0 이 되었고, 20°C 區에서는 貯藏에 따라 커다란 變化가 보이지 않았다.

이로써 低溫障害를 받아 polyphenol 物質이 增加하고 同時에 polyphenol oxidase 活性도는 急速히 增大하여 polyphenol 物質은 酸化되어 quinone이 되고 이것이 重合하여 褐變現象이 일어나는 同時에 polyphenol oxidase 는 急速히 活性이 低下하는 것으로 생각된다.

3. Polyphenol 抽出液에 對한 酵素液의 褐變能

低溫貯藏中의 種子에서 polyphenol 物質을 抽出하고 이에 相當하는 酵素液을 添加하여 褐變能을 比色에 의하여 測定하였던 바 그 結果는 Fig. 6 에서 보는 바와 같이 1°C 區에는 1日 後에 褐變能이 매우 強하였고 4日 後에는 急速히 低下하였으나 褐變能이 0 에 이르지는 않았다. 4日 後에 種子는 上記한바와 같이 全面的으로 褐變하고 polyphenol oxidase 活性도가 negative 가 되었는데도 褐變能이 0 에 이르지 않고 있음은, 남아있는 褐變基質이 peroxidase나 自動酸化等 다른 原因에 의하여 酸化褐變되는 것으로 생각된다.

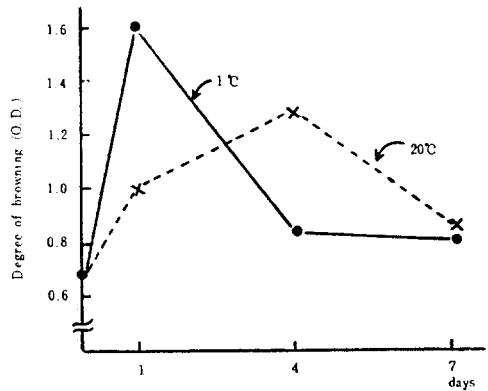


Fig. 6 Changes in degree of in vitro browning for polyphenol extracts with the seed enzyme solution at low-temp. storage. (the samples all obtained from the same fruit and same day)

4. Peroxidase 活性度の 變化

病이나 傷害를 받은 植物體中에서 peroxidase 活性이 增大한다는 Heitefuss 等⁽¹¹⁾, Felaman 等⁽¹²⁾의 報告가 있고 또 peroxidase 는 H₂O₂ 의 存在下에서 catechol, pyrogallol, catechin 等の phenol 物質을 酸化한다는 것이 알려져 있기에⁽¹³⁾ 低溫貯藏에 따른 種子의 peroxidase 活性度の 變化를 測定하여 보았던 바 Fig. 7 에서 보는 것 처럼 4日 後까지는 當初와 거의 같은 活性도를 지니고 있기에 polyphenol oxidase 活性도 0 인 4日 後의

褐變現象에 peroxidase가 關與하는 듯도 하나, peroxidase에 의한 polyphenol의 酸化에는 H₂O₂의 存在가 必要하고 植物體에는 보통 catalase가 共存하는 일이 많기 때문에 이 問題에 對해서는 더욱 檢討할 餘地가 있는 것으로 보인다.

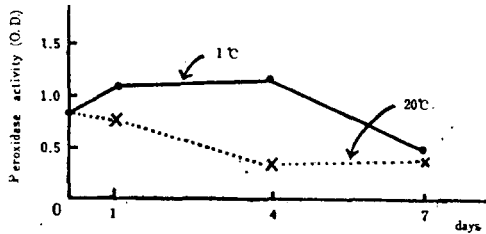


Fig. 7 Changes in the seed peroxidase activity at low-temp. storage.

5. Polyphenol oxidase와 呼吸

polyphenol oxidase와 呼吸과의 關係를 檢討코자 우선 呼吸酵素系의 電子傳達部와 酸化의 磷酸化部の 共軛을 切斷하는 uncoupler인 DNP를 種子切片에 添加하여 O₂ 吸收量에 미치는 影響을 보았든 바 그 結果는 Table. 2에서 보는 바와 같이 20°C區에서 얼마큼 나타나는 添加效果가 1°C區에서는 나타나지 않을 뿐더러 오히려 抑制效果가 나타나고 있다. 이것은 邨田等⁽¹⁴⁾의 banana, Minamikawa等⁽¹⁵⁾의 감자에 對한 實驗結果와 一致되는 것으로 低溫障害에 의하여 呼吸의 電子傳達系에 異常이 생긴 것 만은 짐작 할 수 있겠다.

Table 2 Effect of DNP in administration on O₂ uptake in pepper seed slice at low-temp. storage. (%)*

days after	0	1	4	7
1°C	105	96	85	44
20°C		106	106	105

*percent of control (without DNP administration) value.

다음은 呼吸의 電子傳達系로서 일반적으로 알려져 있는 cytochrome系의 terminal oxidase인 cytochrome oxidase의 低溫貯藏에 따른 活性度の 變化를 測定한 結果는 Table. 3에서 보는 바와 같이 褐變度 1.5에서 半程度로 低下하고 全面的으로 褐變하면 현저하게 活性도가 떨어지고 있다. Mondy等⁽⁶⁾의 고구마에 대한 實驗에서도 低溫에서는 polyphenol物質은 增加하고 cytochrome oxidase의 活性도는 低下한다고 報告하고 있다.

Table 3 Changes in cytochrome oxidase activity of the seeds at low-temp. storage.

degree of browning	(O ₂ uptake μl/enzyme sol. ml/hr)			
	0	1.5	4	5
low temp.	56.7	29.2	6.1	6.0
room temp.			51.3	41.6

한편 低溫貯藏에 따른 呼吸量의 變化를 測定하여 보았든 바 Table. 4에서 보는 바와 같이 褐變度 1.2程度에서는 當日과 커다란 差異가 보이지 않았으나 全面的으로 褐變하면 현저하게 呼吸量이 低下하고 있다.

Table 4 Changes in the seed respiration at low-temp. storage. (μl/g/h)

days after (degree of browning)	(μl/g/h)				
	0(0)	1(1.2)	4(4.5)	7(5)	
1°C	O ₂	280.2	258.6	71.4	—
	CO ₂	273.6	229.4	49.2	—
	RQ	0.98	0.89	0.69	—
20°C	O ₂		230.6	172.6	147.0
	CO ₂		204.6	156.4	126.0
	RQ		0.88	0.90	0.86

褐變度 1.5程度에서 cytochrome oxidase의 活性도가 半程度로 低下하였는 데도 불구하고 呼吸量이 當日과 別差없음은 低溫障害에 의하여 mitochondria의 電子傳達系에 異常이 생겨서 cytochrome oxidase의 活性이 低下하였을 때 ATP獲得을 위하여 이를 代身하는 代償呼吸系가 成立한 탓이라고 推定된다. 이 代償呼吸系의 terminal oxidase의 하나로서 polyphenol oxidase가 알려져 있다.^(16,17) 實際로 Fig. 5에서 보는 바와 같이 褐變度 1.2程度에서 polyphenol oxidase의 活性도가 매우 크기 때문에 이때 cytochrome系의 弱화에 따라 polyphenol oxidase가 terminal oxidase로 쓰일 것이라 推測된다. 따라서 이것을 더욱 檢討기 위하여 中林⁽⁸⁾가 考察한 方法에 따라 貯藏中の 種子에 chlorogenic acid를 添加하였을 때의 O₂ 吸收量 및 CO₂ 排出量의 變動을 Warburg 檢壓計를 써서 測定하였다. 그 結果는 Fig. 8에서 보는 바와 같이 當日區에서는 酸素吸收量이 chlorogenic acid의 添加에 의하여 一時急激한 增加를 보이지만 이어 正常增加를 계속하고 CO₂ 排出量은 큰 變動없이 正常增加를 계속하므로 이때는 polyphenol oxidase가 代償呼吸系에 關與하지 않은 것 같고 中林⁽⁷⁾는 健全 사과에 對한 實驗에서도 같은 結果를 報告하고 있다. 한편 cytochrome oxidase의 活性도가 낮아진 褐變度 1.5程度의 stage에서 chlorogenic acid를 添加하면 O₂ 吸收량과 CO₂ 排出量이 다 같이

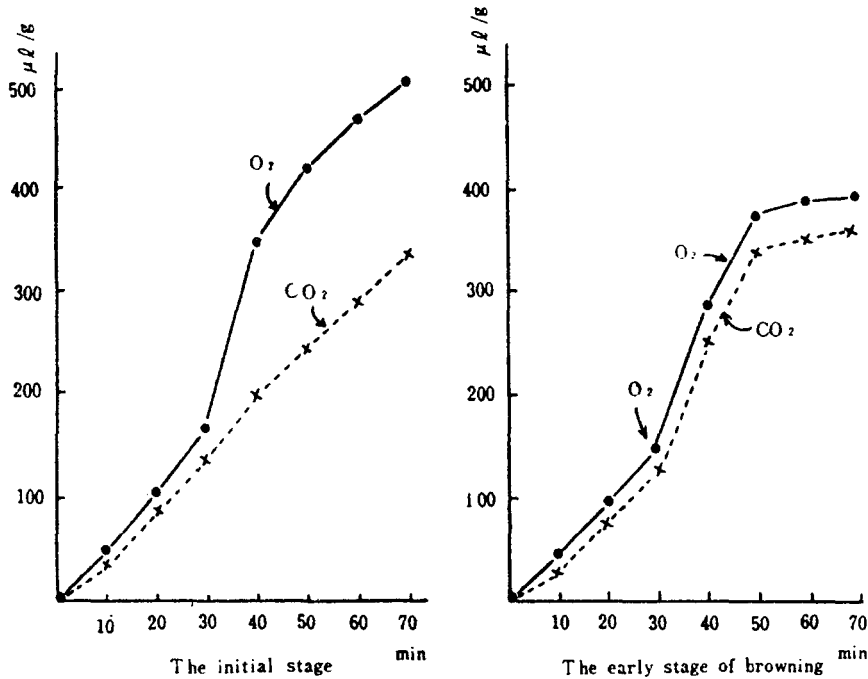


Fig. 8 The additive effect of chlorogenic acid on the seed respiration. (30°C, pH 6.5)

* concentration of chlorogenic acid : 10⁻⁴M

처음에는 급격히 증가하지만, 酸化生成物로 말미암아 酵素의 活性이 低下하는 탓인지 그 後 O₂ 吸收量과 CO₂ 排出量이 매우 微微해진다. 이로 미루어 高추種子의 低溫障害에 따라 polyphenol oxidase는 代償呼吸의 terminal oxidase로 關與하다가 polyphenol 物質의 酸化生成物이 蓄積됨에 따라 polyphenol oxidase의 活性이 阻害되어 代償呼吸系마저 무너지면 呼吸量이 심하게 減少하는 것으로 解釋된다.

要 約

- (1) 甘味種 小型고추인 Zairaisisi 種子의 polyphenol oxidase는 最適 pH가 6.5이고 0°C에서도 相當한 活性을 가지며 o-diphenol에 對하여 강한 特異性을 가지나 monophenol에 對해서는 特異性이 없었다.
- (2) 低溫障害에 의한 褐變初期에 polyphenol oxidase는 강한 活性度를 나타내지만 全面褐變에 따라 活性度는 0이 되었다.
- (3) Polyphenol 抽出液에 相當하는 酵素液의 褐變能을

測定하였든 바 polyphenol oxidase의 活性度가 0일때 도 in vitro에서는 褐變現象이 進行되었고 이때 peroxidase는 當初와 거의 같은 活性度를 지니고 있었다.

- (4) 低溫障害에 따른 褐變初期에서는 DNP 添加實驗으로 미루어 呼吸의 電子傳達系에 異常을 볼 수 있었고 cytochrome oxidase 活性度가 低下하였지만 呼吸量에는 큰 變動이 생기지 않았기에 組織呼吸에 미치는 chlorogenic acid 添加實驗을 하여 polyphenol oxidase가 代償呼吸系의 terminal oxidase로 쓰인다는 것을 推定할 수 있었다.

引用 文 獻

1. 李盛雨; 食科誌, 3, 29 (1971)
2. 根岸正好, 瓜谷郁三; 食品工誌, 11(9), 371(1964)
3. 中林敏郎, 鶴飼暢雄; 食品工誌, 10(6), 211 (1963)
4. 中林敏郎; 日農化, 27, 813 (1953)
5. Goddard, D.R., Holden, C., Arch. Biochem., 27, 41 (1950)

6. Mondy, N.I., S. Bond Gedde dahl, and E. Owens Mobley; J. Food Sci., 30, 32 (1965)
7. 瓜谷郁三; 化學の領域, 増刊 74 (天然物化學) 南江堂, p.175 (1966)
8. 中林敏郎; 日農化, 28, 212 (1954)
9. Keilin, D., Mann, T.; Polyphenol oxidase, Proc. Roy. Soc. London: B125, 187 (1938)
10. Tate, J.N., B.S. Luh, and G.K. York; J. Food Sci., 28, 829 (1964)
11. Heitefuss, R., Stahmann, M.A. and Walker, J.C.; Phytopathology, 50, 370 (1960)
12. Felaman, A.L. and Lin, I.; C.A., 62, 83186(1965)
13. 緒方邦安; 園藝食品の加工と利用(養賢堂), p.154 (1969)
14. 邨田卓夫, 古衡山; 食品工誌, 13, 465 (1966)
15. Minamikawa, T., Akazawa, T. and Uritani, I.; Pland & cell physiol., 2, 301 (1961)
16. Thimann, K.V., C.S. Yocum, and D.P. Hackett; Arch. Biochem., 53, 239 (1954)
17. J. Bonner; 植物生化學(朝倉書店), p.201 (1950)