

사과(Ralls Janet) Polyphenol Oxidase의 酵素學的 性質

鄭基澤·徐承教·宋亨翼

慶北大學校 農科大學 食品加工學科

(1983년 9월 9일 수리)

Enzymatic Characteristics of Polyphenol Oxidase from Apple (Ralls Janet)

Ki Taek Chung, Seung Kyo Seu and Hyung Ik Song

Department of Food Technology, College of Agriculture, Kyungpook National University

(Received September 9, 1983)

Abstract

In order to obtain elementary data of enzymatic browning of apples and apple products and to examine effectively inhibitory method of browning, we extracted polyphenol oxidase (EC 1.10.3.1) from apple (Ralls Janet) and investigated its general properties.

The optimum conditions for the enzyme reaction were pH 6.0 and temperature of 30°C. The enzyme was very stable at pH 4.0, and at the range of pH 5.0-9.0 its activity was above 80% compared with pH 4.0. The enzyme was very stable by heating at 40°C for 1 hour, and almost 50% of enzyme activity was lost by heating at 60°C for 30 minutes.

The polyphenol oxidase activity was enhanced by the addition of Cu^{2+} and Mn^{2+} , respectively, meanwhile Na^+ , Hg^{2+} and Co^{2+} inhibited the enzyme activity. The enzyme activity was greatly decreased in the presence of inhibitors such as cysteine, sodium metabisulfite and ascorbic acid. The polyphenol oxidase greatly catalyzed the oxidation of o-diphenols such as chlorogenic acid and catechol, which suggests that main substrate of polyphenol oxidase is o-diphenol compounds.

序 論

果實 및 그 加工品の 酵素의 褐變은 食品의 嗜好性 및 新鮮度 等の 質의 低下의 原因이 되며 褐變을 일으키는 酵素로서 polyphenol oxidase (EC 1.10.3.1, 以下 PPO로 略함)는 果實 및 果菜類에 널리 分布되어 있다.¹⁾ 이 酵素의 反應은 植物體內的 phenol化合物에 作用하여 褐變前驅物質인 quinone을 生成시키며, quinone이 酸化 重合되어 褐變物質을 生成하는 것으로 알려져 있다.²⁾

果實 및 그 加工品の 酵素의 褐變을 抑制하는데는 酵素의 一般의 性質을 調査함으로써 많은 도움이 될 것이나, PPO에 對한 一般의 性質이 品種에 따라 差異가 있으므로 各各의 原料에 含有된 PPO의 特性을 調査함으로써 그 方案을 찾을 수 있으며, 이러한 目的을 爲해 포도,^{3,4)} 아보카도,^{5,6)} 배,^{7,8)} 버섯,⁹⁾ 복숭아,¹⁰⁻¹²⁾ 바나나,¹³⁻¹⁶⁾ 감자,^{17,18)} 등에 對해서 많은 研究가 되어 있다.

사과 PPO에 對해서는 polyvinylpyrrolidone¹⁹⁾과 borate²⁰⁾에 對한 PPO의 阻害效果가 調査되어 有

며, David等²¹⁾은 紅玉에서 PPO를 抽出하여 酵素의 性質을 校討하였다. 그러나 우리나라의 主品種인 國光에 對한 研究는 거의 찾아 볼 수 없는 形편이다. 이에 著者들은 國光에서 PPO를 抽出하여 一般의 性質을 調查함으로써 이들 加工品의 酵素의 褐變을 效果의 으로 막을 수 있는 基礎的 資料를 얻기 위하여 實驗하였다.

材料 및 方法

1. 材 料

本 實驗에 使用한 材料는 慶北 慶山의 태양사과 (株) 과수원에서 栽培되고 있는 國光(Ralls Janet) 으로서 1982年 10月에 收穫하여 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 酵素液의 調製

酵素液의 抽出은 Fig. 1에서와 같이 行하였다. ^{7, 22, 23)}

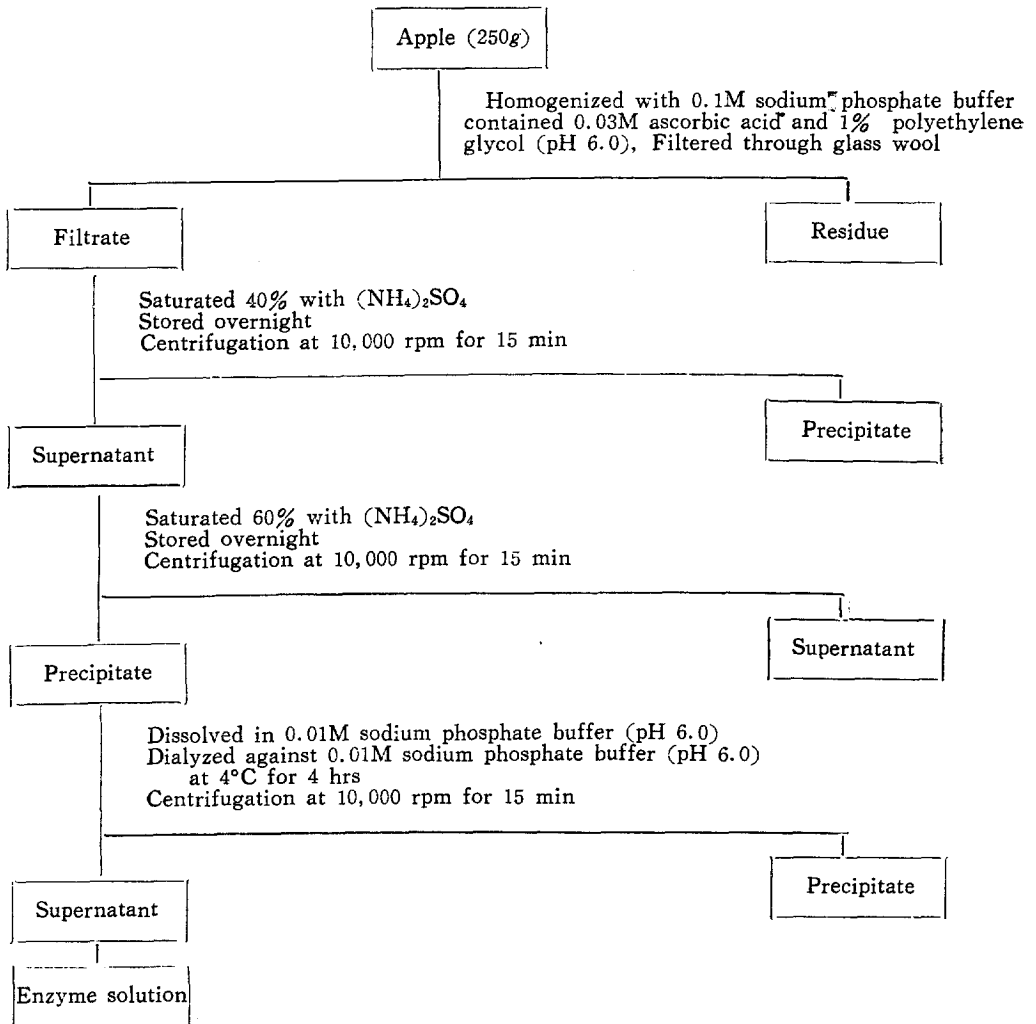


Fig. 1. Diagrammatic representation of the extraction of polyphenol oxidase from apple.

사과 250g을 0.03 M ascorbic acid와 1% polyethylene glycol을 含有하는 pH 6.0의 0.1M sodium-phosphate buffer 500 ml에 넣어 均質化시킨 후 濾過하고 이 濾液을 10,000rpm에서 15分間 원심분리

(Hitachi 20PR-52D)하였다. 上澄液에 ammonium sulfate를 加하여 40%로 飽和시킨 後 하룻밤 放置하여 다시 10,000rpm에서 15分間 원심분리하여 沈澱物은 除去하고, 上澄液에 ammonium sulfate를 60%

로 飽和시켜 上記에서와 같이 하룻밤 放置 후 원심 분리하였다. 沈澱物은 pH 6.0의 0.01M sodium phosphate buffer를 少量 加하여 녹인 후 同一 緩衝液으로서 4時間 투석 후 酵素液으로 하였다.

2) 酵素 活性 測定

polyphenol oxidase의 活性 測定은 Zenin과 Park²³⁾의 方法에 準하였다. 反應液은 10 mM의 catechol을 含有하는 pH 6.0의 0.01M sodium phosphate buffer 2.9ml를 1cm cuvette에 넣고 30°C로 安定化시킨 후 酵素液 0.1ml를 加하여 反應시키고, 420nm에서의 吸光度를 測定(Shimadzu, UV-200)하였으며 1分間에 酵素 1ml당 吸光度 0.01의 增加를 1 unit로 하였다.

3) 蛋白質 定量

Lowry등의 phenol시약법²⁴⁾에 準하였으며 標準品인 bovine serum albumin (Sigma제)의 검량선에 의하여 含量을 算出하였다.

4) 酵素活性에 미치는 各 因子의 影響

(1) 酵素活性에 미치는 pH의 影響

국광 PPO의 最適 pH의 調査는 反應液의 pH를 3.0~7.0까지 McIlvaine buffer로 調整하여 測定하였다.

(2) 酵素活性에 미치는 溫度의 影響

本酵素의 最適溫度는 反應液의 溫度를 10~50°C 범위로 調整하여 調査하였다.

(3) pH安定性

本酵素의 pH에 대한 安定性은 McIlvaine buffer와 glycol-HCl buffer를 使用하여 pH 3.0~10.0範圍의 各 pH로 調節한 뒤 시험관에 酵素液 1ml와 各 pH別 緩衝容液 1ml를 添加하여 40°C의 water bath에서 1時間 反應시킨후 pH 6.0으로 調整하여 上記 酵素活性 測定法에 準하여 活性도를 測定하여 相對值로 나타내었다.

(4) 熱安定性

熱에 對한 酵素의 安定性은 40~70°C로 調整한 water bath에 시험관을 넣어 충분히 豫熱시킨 후 各 시험관에 酵素液 10ml를 注入한 뒤 時間別로 1ml씩 취하여 冷却시킨 뒤 活性도를 測定하였다.

(5) 金屬鹽의 影響

使用한 金屬鹽은 CuCl₂, FeCl₃·6H₂O, HgCl₂, CaCl₂, CoCl₂·6H₂O, ZnCl₂, MnCl₂·4H₂O, MgCl₂ 및 KCl로서 各 各의 10⁻¹mM 溶液 1ml와 酵素液 1ml를 混

合하여 40°C에서 1時間동안 反應시킨 후 活性도를 測定하였다.

(6) 阻害劑의 影響

阻害劑가 酵素에 미치는 影響을 調査하기 위하여 PPO의 阻害劑^{3, 8, 11, 25-28)}로 알려져 있는 것들 중에서 cysteine, citrate, NaCl, tartarate, sodium metabisulfite, ascorbic acid 및 boric acid를 使用하여 10⁻¹mM에서 10mM의 농도로 처리한 후 酵素活性를 測定하였다.

(7) 基質特異性

基質에 對한 特異性은 o-diphenol로서 catechol 및 chlorogenic acid, m-diphenol로서 resorcinol을, trihydroxyphenol로서 gallic acid를, monophenol로서 tyrosine을 各 各 使用하였으며 tyrosine의 농도는 1mM로 하고 그 외는 10mM로 調整하여 酵素活性를 測定하였다.

結果 및 考察

1) 국광 PPO의 ammonium sulfate 分劃

本酵素의 精製에 가장 알맞는 最適 ammonium sulfate 添加量을 調査하기 위하여 ammonium sulfate를 40~100% 범위로 飽和시켜 處理하였다.

Table 1. Changes of the protein content and specific activity of polyphenol oxidase by the fractional purification with ammonium sulfate

Ammonium sulfate (%)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)
40	592	79.21	7.47
60	2463	42.05	58.57
80	80	3.45	25.39
100	10	3.15	3.17

그 結果, Table 1에서 보는 바와 같이 40% 飽和 ammonium sulfate 용액에서 全體沈澱蛋白質중 62%가 沈澱되었으나 比活性은 60% 飽和 용액에서 가장 높게 나타났다. 이런 結果를 기초로 本 實驗에서는 60% ammonium sulfate 포화용액을 使用하였다.

2) 酵素活性에 미치는 pH의 影響

反應液의 pH變化에 따른 酵素活性를 調査한 結果는 Fig. 2와 같다.

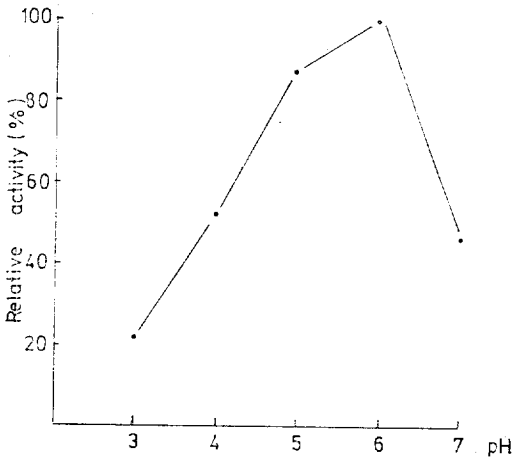


Fig. 2. Effect of pH on the activity of polyphenol oxidase.

pH 3.0에서는 相對活性이 약 20% 程度였으며 pH가 增加함에 따라 活性이 增加하여 pH 6.0에서 가장 높은 活性을 나타내었으며 그 이상의 pH에서는 活性은 減少하였다.

Harel 等²⁹⁾은 사과 PPO의 最適 pH가 5.1, Betrosian 等²⁰⁾은 pH 7.0이라 報告하여 本實驗의 結果와 相異함을 볼수 있는데 이와 같은 現象은 아보카도의 경우 Kahn⁶⁾은 pH 6.0 Knapp⁵⁾는 pH 4.8이라 하였고, 배의 경우 Halin과 Montgomery⁸⁾는 pH 7.0, Rivas와 Whitaker⁷⁾는 pH 4.0으로 相異한 結果를 報告한 점으로 미루어 品種의 差異에서 오는 傾向이라 생각된다.

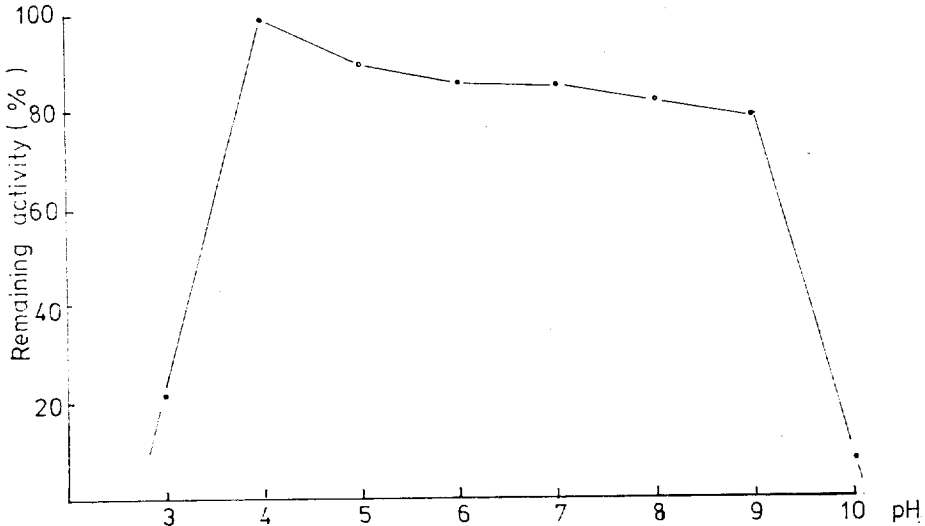


Fig. 4. Effect of pH on the stability of polyphenol oxidase.

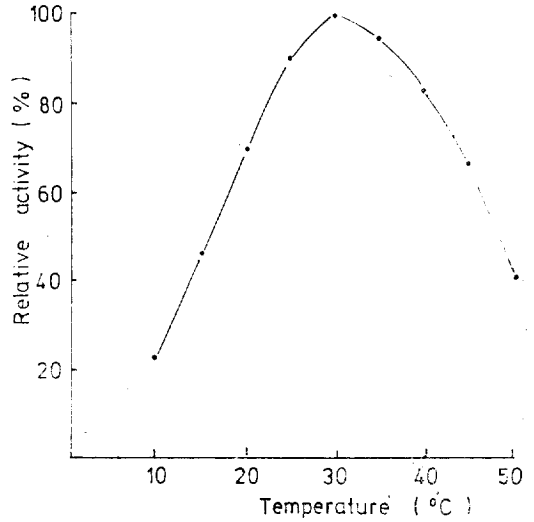


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of polyphenol oxidase.

3) 酵素活性에 미치는 溫度的 影響

국광 PPO의 活性에 미치는 溫度的 影響은 Fig. 3과 같다.

反應溫度가 10°C에서는 20% 程度의 活性을 나타내었으며 溫度가 상승함에 따라 급격히 活性이 增加되어 30°C에서 가장 높은 活性을 나타내었다. 그리고 30°C 以上에서는 크게 活性이 減少되어 50°C에서는 45% 程度의 活性을 나타내었다. 이 같은 結果는 포도³⁾, table beet³⁰⁾ 경우의 25°C보다 多少 높았다.

4) pH 安定性

pH에 대한 安定性を 調査한 바 Fig.4에서와 같이 pH 4에서 가장 높은 活性을 나타내는 것으로 보아 pH 4에서 安定性이 큰 것으로 생각되며 pH 5.0~9.0에서도 80% 以上の 活性을 나타내었다. 그러나 pH 3.0, pH 10.0에서 급격히 活性이 減少되어 10% 程度의 活性을 나타내었다. 따라서 국광 PPO의 pH 安定性은 대체적으로 pH 4.0~9.0의 비교적 넓은 pH 範圍를 가진다고 할 수 있다.

5) 熱安定性

酵素의 安定性에 미치는 溫度의 影響을 調査하였다. (Fig. 5)

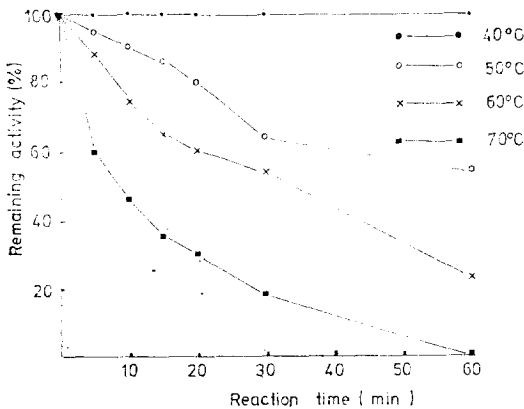


Fig. 5. Effect of temperature on the stability of polyphenol oxidase.

40°C에서 1時間동안 處理한 것은 熱에 安定하였으나, 溫度가 상승함에 따라 酵素活性은 급격히 減少하여 酵素活性을 50% 減少시키는데는 50°C에서는 60分 以上, 60°C에서 30分, 70°C에서 9分 程度를 나타내었다.

바나나¹³⁾에서는 55°C에서 30分, 아보카도¹⁴⁾는 58°C에서 16分間 熱에 安定하였으며 酵素活性을 50% 減少시키는데는 배¹⁵⁾의 PPO는 70°C에서 11.7分 table beet³⁰⁾의 PPO는 60°C에서 9.1分, 70°C에서 6.8分이라 報告되고 있다. 따라서 국광 PPO는 바나나, 아보카도, 배보다는 熱에 不安定하나 table beet보다는 安定하다고 보겠다.

6) 阻害劑의 影響

몇 種의 阻害劑가 本 酵素活性에 미치는 影響을

調査한 結果는 Table 2와 같다.

Table 2. Effect of inhibitors on the activity of polyphenol oxidase

Inhibitor	Concentration(mM)				
	0.1	0.5	1	5	10
None	100	100	100	100	100
Cysteine	75	20	0	0	0
Citric acid	100	89	43	29	18
Ascorbic acid	95	27	0	0	0
Sodium metabisulfite	85	20	0	0	0
NaCl	100	100	98	95	83
Boric acid	100	98	93	78	66
Tartaric acid	100	58	40	28	20

Values denote relative activity based on none.

阻害劑의 種類 및 농도에 따라 阻害率은 크게 달랐다. 대체로 1mM 농도의 cysteine, ascorbate, sodium metabisulfite는 酵素活性을 完全히 阻害하였으며, citrate와 tartarate는 60% NaCl과 borate는 각각 2%, 7%로서 阻害效果가 매우 낮았다. 이와 같은 結果는 바나나,¹⁶⁾ 배,⁸⁾ 포도³⁾의 PPO에 대하여 實驗한 結果와 거의 일치하였다. 이들 化合物의 阻害機構에 대해 Embs와 Markakis³¹⁾는 sodium metabisulfite의 sulfite는 反應生成物인 quinone과 付加反應物을 생성하며 melanine으로 重合되는 것을 抑制한다고 하였으며, 李²⁾는 cysteine이 quinone을 還元할 뿐만 아니라, quinone과 付加反應을 일으키며, 賈³²⁾는 ascorbate가 quinone의 還元에 관여한다고 한 점과 관련이 있다고 생각된다.

7) 金屬鹽의 影響

酵素活性에 미치는 金屬鹽의 影響은 金屬鹽의 농

Table 3. Effect of metal salts on the activity of polyphenol oxidase

Matal salt (10 ⁻¹ mM)	Relative activity(%)
None	100
CuCl ₂	144
FeCl ₃ · 6H ₂ O	119
NaCl	81
HgCl ₂	69
CaCl ₂	100
CoCl ₂ · 6H ₂ O	78
ZnCl ₂	106
MnCl ₂ · 4H ₂ O	125
KCl	92
MgCl ₂	113

도를 各各 10^{-1} mM의 농도로 처리한 結果, Cu^{2+} , Mn^{2+} 에 의하여 活性이 增加하였으며 Na^+ , Hg^{2+} , Co^{2+} 에 의하여서는 阻害效果를 나타내었다(Table 3).

Galeazzi와 Sgarbieri¹⁶⁾는 바나나 PPO의 경우 10 mM의 金屬鹽을 添加한 結果, Fe^{3+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} 은 阻害效果를 나타내며 Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} 는 아무런 影響이 없다고 報告하였다. 또 金等³³⁾은 마늘의 PPO에서 Cu^{2+} 의 농도에 따른 酵素活性變化를 測定해 본 結果 低濃度(10^{-2} ~1.0 mM)의 Cu^{2+} 는 酵素活性이 增加하였으나, 高濃度(10 mM)에서는 酵素活性이 減少한다고 하였다. 本實驗에서의 Cu^{2+} 에 의한 活性增加現象은 Cu^{2+} 가 PPO의 cofactor로서 作用하기 때문이라고 생각된다.

2) 基質特異性

基質特異성을 調査한 結果, chlorogenic acid와 catechol에서는 높은 酵素活性을 보여 주었고, tyrosine을 약간 酸化하였으나 gallic acid와 resorcinol은 酸化시키지 못하였다.(Table 4)

Table 4. Substrate specificity of polyphenol oxidase

Substrate	Activity(unit)	Relative activity(%)
Catechol	300	100
Chlorogenic acid	740	247
Gallic acid	0	0
Resorcinol	0	0
Tyrosine	20	6

이 結果로 미루어 보아 국광 PPO는 o-diphenol 化合物을 가장 잘 酸化하므로 포도,³⁾ 배,⁸⁾ 복숭아,¹¹⁾ 바나나¹⁶⁾에서와 같이 o-diphenolase인 것으로 생각된다. 또한 tyrosine에 대한 약간의 酸化는 사과에서 基質特異성을 調査한 David 등²¹⁾의 結果와 一致하였다.

要 約

사과 및 그 가공품의 酵素의 褐變에 대한 基礎的 資料를 얻고 나아가서 그 防止策을 調査하는 목적으로 국광으로부터 polyphenol oxidase(EC 1.10.3.1)를 抽出하여 그 一般的 性質을 檢討하였다.

국광 polyphenol oxidase의 반응最適 pH는 6.0이었으며 最適 反應溫度는 30°C였다. 本酵素는 pH 4.0에서 가장 安定性이 높았으며, pH 5.0~9.0에서도 80% 이상의 活性을 나타내었다. 熱에 대한 安定性은

40°C 1時間 處理조건에서도 극히 安定하였으며 60°C에서 30分 處理로 酵素 活性이 50% 減少되었다. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} 의 添加로 酵素 活性이 촉진되었으며 Na^+ , Hg^{2+} , Co^{2+} 의 添加로 活性이 阻害되었다. 本酵素에 대한 가장 效果의인 阻害劑는 cysteine, sodium metabisulfite, ascorbate인 것으로 나타났다. 국광 polyphenol oxidase는 o-diphenol인 chlorogenic acid와 catechol을 크게 酸化시키는 것으로 보아 o-diphenol化合物이 主 基質인 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

- Mayer, A. M. and Harel, E.: *Phytochemistry*, **18**, 193 (1979)
- 李盛雨: 식품화학(修學社, 서울), 350 (1978)
- Wissemann, K. W. and Lee, C. Y.: *J. Food Sci.*, **46**, 506 (1981)
- Harel, E. and Mayer, A. M.: *Phytochemistry*, **10**, 17 (1971)
- Knapp, F. W.: *J. Food Sci.*, **30**, 939 (1965)
- Kahn, V.: *J. Food Sci.*, **42**, 38 (1977)
- Rivas, N. D. J. and Whitaker, J. R.: *Plant Physiol.*, **52**, 501 (1979)
- Halim, D. H. and Montgomery, M. W.: *J. Food Sci.*, **43**, 603 (1978)
- Smith, J. L. and Krueger, R. C.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1121 (1962)
- Luh, B. S. and Phithakpol, B.: *J. Food Sci.*, **37**, 264 (1972)
- Wong, T. C., Luh, B. S. and Whitaker, J. R.: *Plant Physiol.*, **48**, 19 (1971)
- Reyes, P. and Luh, B. S.: *Food Technol.*, **14**, 570 (1960)
- Galeazzi, M. A. M., Sgarbieri, V. C. and Constantinides, S. M.: *J. Food Sci.*, **46**, 151 (1981)
- Weaver, C. and Charley, H.: *J. Food Sci.*, **39**, 1200 (1974)
- Montgomery, M. W. and Sgarbieri, V. C.: *Phytochemistry*, **14**, 1245 (1975)
- Galeazzi, M. A. M. and Sgarbieri, V. C.: *J. Food Sci.*, **46**, 1404 (1981)
- Alberghina, F. A. M.: *Phytochemistry*, **3**,

- 65 (1964)
18. Patil, S. S. and Zucker, M. : *J. Biol. Chem.*, **240**, 3938 (1965)
 19. Walker, J. R. L. and Hulme, A. C. : *Phytochemistry*, **4**, 677 (1965)
 20. Bedrosian, K., Steinberg, M. P. and Nelson, A. I. : *Food Technol.*, **14**, 480 (1960)
 21. David, A. S., Akhtar, S. and Ribeiro, S. : *Phytochemistry*, **11**, 535 (1972)
 22. Kahn, V. : *Phytochemistry*, **15**, 267 (1976)
 23. Zenin, C. T. and Park, Y. K. : *J. Food Sci.*, **43**, 646 (1978)
 24. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
 25. Muneta, P. and Walradt, J. : *J. Food Sci.*, **33**, 606 (1968)
 26. Macrae, A. R. and Duggleby, R. G. : *Phytochemistry*, **7**, 855 (1968)
 27. Palmer, T. K. and Roberts, J. B. : *Science*, **157**, 200 (1967)
 28. Mayer, A. M., Harel, E. and Shain, Y. : *Phytochemistry*, **3**, 447 (1964)
 29. Harel, E., Mayer, A. M. and Shain, Y. : *Phytochemistry*, **4**, 783 (1965)
 30. Lee, C. Y. and Smith, N. L. : *J. Food Sci.*, **44**, 82 (1979)
 31. Embs, R. J. and Markakis, P. : *J. Food Sci.*, **30**, 753 (1965)
 32. 曹哉銑 : *식품과학*, **12**(2), 10 (1979)
 33. 金銅淵 · 李鍾旭 · 金良培 : *한국농화학회지*, **24**, 167 (1981)