

紅玉 Polyphenol Oxidase의 一般的 性質 및 活性 Band의 熱安定性

鄭基澤 · 徐承教 · 宋亨翼

慶北大學校 農科大學 食品加工學科
(1984년 7월 23일 접수)

Some Properties of Polyphenol Oxidase from Apple (Jonathan) and Thermal Stability of the Active Bands

Ki-Taek Chung, Seung-Kyo Seo and Hyung-Ik Song

*Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Kyungpook National University,
Taegu, 635, Korea
(Received July 23, 1984)*

Abstract

As a basic research for inhibition of enzymatic browning of apple wine, polyphenol oxidase (EC 1.10.3.1) from apple (Jonathan) was extracted, partially purified, and some properties of the enzyme and changes of active bands by heat treatment were investigated. Optimum conditions for the enzyme reaction were pH6.5 and temperature of 30°C, and *o*-diphenol was the main substrate for the enzyme.

Approximately 35% and 15% of initial polyphenol oxidase activity remained after heating at 60°C and 70°C for 1 hour, respectively. About 0.5mM of the inhibitor such as sodium metabisulfite, cysteine and ascorbic acid was required for effective inhibition of the enzyme reaction. However, EDTA was found to be a very poor inhibitor. Ethanol did not affect the enzyme activity. The number of active bands of polyphenol oxidase from apple (Jonathan) was found to be four, but two bands and one band were observed after heating at 60°C and 70°C for 1 hour, respectively, which showed a significant difference in thermal stability among active bands.

序 論

褐變은 차, 담배, 커피의 경우에서와 같이 이들 가공품이褐變으로因하여 商品의 價値가 增加되기도 하지만, 대부분의 果實 및 果菜類의 加工食品에서는 褐變으로因하여 商品의 價値를 下落시킨다.

대체로 褐變은 酵素的 褐變과 非酵素的 褐變으로 나눌수 있으며, 果菜類가 損傷을 받았을 경우와 쥬스의 신속한 褐變은 polyphenol oxidase(EC 1.10.3.1,

이하 PPO로 略함)때문인 것으로 밝혀져 있다. PPO는 대부분의 果菜類에 分布¹⁾되어 있으므로 果實 및 果菜類의 加工품의 褐變을 抑制하기 위하여서는 各品種에 대한 PPO의 性質을 아는것이 중요하다.

各品種에 대한 一般的 性質이 많이 報告되어 있고, 사과에 관한 研究로서는 Walker와 Hulme²⁾은 Cox's Orange Pippin에서 PPO를 抽出하여 polyvinylpyrrolidone에 의한 沮害效果를 報告하였고, Bedrosian 등³⁾은 Stayman Winesap을 使用하여 組織의

酵素的褐變에 borate의 效果를 報告하였으며, Constantinides와 Bedford⁴⁾는 Golden Delicious PPO의 multiple form의 수에 關하여, David等⁵⁾은 Red Delicious PPO의 基質特異성과 最適 pH에 對해서, Harel等⁶⁾은 Grand Alexander의 葉肉체로부터 PPO의 精製와 multiplicity에 對해서 報告하였다.

本 實驗에서는 홍옥이 사과酒의 主된 原料인을 감안하여 사과酒의 褐變에 PPO가 미치는 影響과 그 抑制方法을 調查하기 위한 基礎的 資料로서, 홍옥에서 PPO를 抽出 및 粗精製하여 電氣泳動에 의한 活性 band의 수 및 위치를 確認함과 同時에 그 一般의 性質을 調查하였기에 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料

本 實驗에 使用한 사과는 慶北大學校 附屬農場 果樹園에서 栽培된 홍옥으로서 1983年 9月 30日에 收穫하여, -20°C 에서 貯藏하면서 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 酵素液의 調製 및 酵素活性 測定

酵素液 調製時 2차 ammonium sulfate 添加量을 80%로 測定한 것 이외에는 前報⁷⁾에 準하였다.

2) 電氣泳動

Davis의 方法⁸⁾에 準하여 running gel 7%(pH9.0)와 stacking gel 2%(pH6.8) acrylamide를 使用하였으며, running pH는 8.3의 Tris-glycine buffer를 使用하였다. 酵素液(150 μg protein/ml)은 sucrose로 10% 飽和시켰으며 bromophenol blue 溶液을 少量 添加한 뒤 gel 위에 注入시켜 tube(0.5 \times 10cm)當 2.5 mA로 泳動하였다.

電氣泳動이 끝난 gel은 Zenin과 Park의 方法⁹⁾에 따라 gel을 0.05% phenylene diamine을 含有하는 30 mM catechol 溶液에 30°C 에서 20分間 反應시킨 後, 7% methanol과 5% acetic acid가 含有된 溶液으로 脫色시켰다. Catechol 溶液의 製造를 위한 緩衝溶液 및 pH는 酵素活性 測定時와 同一하게 하였으며, PPO의 活性 band의 數와 位置는 densitometer(Gelman社, ACD-18)를 使用하여 420nm에서 測定하였다.

R_m 값은 band의 移動거리를 tracking dye의 移動거리로 나눈 값으로 表示하였다. 한편 試料로 사과 주스를 使用하는 경우도 粗精製한 酵素를 使用하는

경우와 比較할 때 band의 수와 位置가 同一하다는 것이 確認되었으나, band의 色度가 弱하기 때문에, 本 實驗에서는 粗精製한 酵素를 電氣泳動 試料로 使用하였다.

3) 蛋白質 定量

Lowry 등의 方法¹⁰⁾에 따라 測定하였으며 標準品으로는 bovine serum albumin(Sigma社 제품)을 使用하였다.

結果 및 考察

1. 最適 pH

홍옥 PPO의 最適 pH를 調查하기 위하여 反應液은 McIlvaine buffer로 pH 3.0~7.0으로 조절한 뒤 酵素活性를 測定하였다(Fig.1).

Fig.1에서와 같이 pH가 增加함에 따라 活性가 增加하여 pH 6.5에서는 가장 높은 活性를 보인 반면, pH 7.0에서는 급격히 活性가 減少되었으므로 홍옥 PPO의 最適 pH는 6.5이었다.

그러나, Walker와 Hulme²⁾은 사과 PPO의 最適 pH를 4.8~5.0, Bedrosian等¹¹⁾은 pH 7.0이라 報告하여 本 實驗과 相異하였다. 品種別로는 배가 pH 6.2¹²⁾, pH 7.0¹³⁾, 포도가 pH 5.5¹⁴⁾, pH 5.0¹⁵⁾, avocado가 pH 4.7~4.8¹⁶⁾, pH 5.5~6.5¹⁷⁾로 最適 pH가 다르게 報告되고 있다. 이는 品種, 使用 buffer, 反

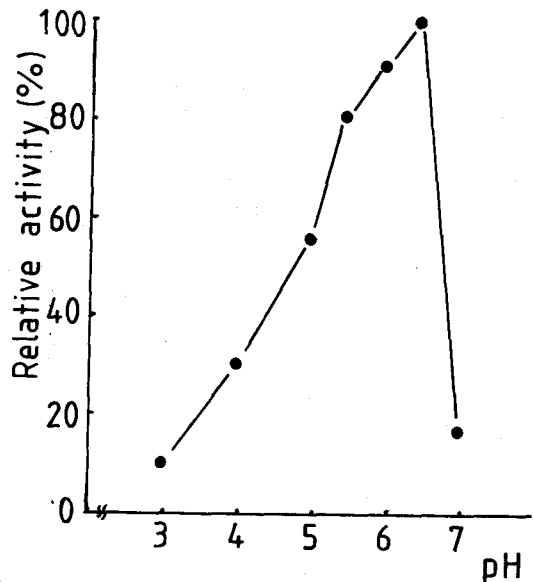


Fig.1. Effect of pH on the activity of polyphenol oxidase.

應條件 等의 差異때문으로 생각된다^{16,18}).

2. 最適 溫度

酵素反應液의 溫度를 10~40°C로 조정하여 酵素 活性에 미치는 溫度의 影響을 調査하였다(Fig. 2).

本 酵素는 30°C에서 最大活性을 나타내었고 30°C를 전후하여 活性이 급격히 減少되었다. 이 수치는 포도¹⁴) 및 table beet¹⁸)의 最適溫度 25°C보다 다소 높은 값이었다.

3. 熱安定性

熱에 대한 安定性을 調査하기 위하여 40~70°C로 調整한 各各의 water bath에 酵素液 10ml을 各各 添加하고 時間別로 1ml씩을 취하여 氷수로 급냉시킨 後 殘存活性度를 測定하였다(Fig. 3).

Fig. 3에서와 같이 熱 處理 溫度가 增加함에 따라 殘存活性은 減少되었으며 40°C, 50°C, 60°C 및 70°C에서 1時間씩 處理 後 各各 70%, 40%, 35% 및 15% 程度의 殘存活性을 나타내었다. 이와 같은 結果를 前報⁷)의 국광 PPO의 熱安定性和 比較해 볼때 40°C정도의 낮은 溫度에서는 國광이 홍옥보다 安定하였으나 70°C의 比較의 高溫에서는 홍옥이 國광보다 安定한 것으로 나타나서 品種間에 약간의 差異가 있음이 인정되었다.

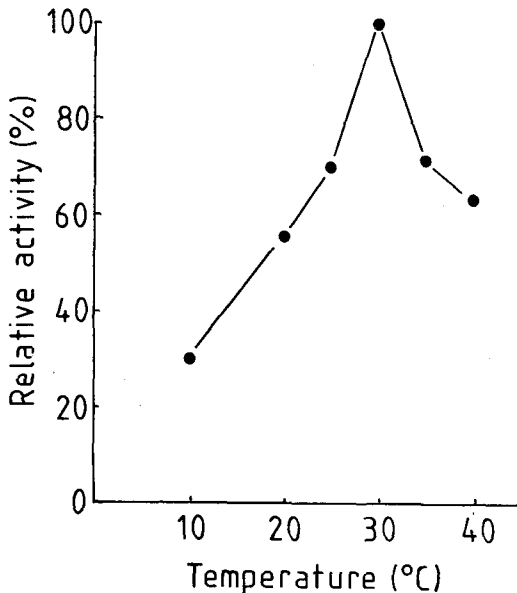


Fig. 2. Effect of temperature on the activity of polyphenol oxidase.

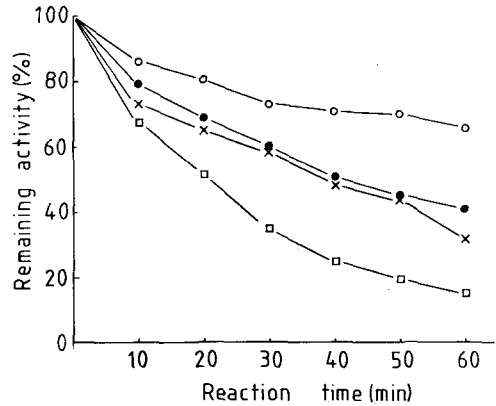


Fig. 3. Effect of temperature on the stability of polyphenol oxidase.

○—○ : 40°C, ●—● : 50°C,
×—× : 60°C, □—□ : 70°C.

4. 基質特異性

本 PPO의 基質 特異性을 調査하기 위하여 *o*-diphenol로서 catechol, chlorogenic acid, *m*-diphenol로서 resorcinol, trihydroxyphenol로서 gallic acid, monophenol로서 tyrosine을 使用하였으며 tyrosine의 濃度는 1 mM, 그 外는 10mM로 조정하여 酵素 活性을 測定하였다.

그 結果 Table 1에서와 같이 chlorogenic acid와 catechol에서 높은 活性을 나타내었으므로 *o*-diphenol이 主 基質인 것으로 생각되며, 이는 國광⁷) PPO의 結果와 一致하였다. 또한 사과 的 主 phenol性 物質이 *o*-diphenol인 것으로 알려져 있으며¹⁹), 大部分의 果菜類 PPO는 *o*-diphenol이 主 基質인 것으로 밝혀져 있다¹).

5. 沮害劑의 影響

沮害劑가 酵素活性에 미치는 影響을 調査하기 위

Table 1. Substrate specificity of polyphenol oxidase

| Substrate | Activity (units) | Relative activity (%) |
|------------------|------------------|-----------------------|
| Catechol | 480 | 100 |
| Chlorogenic acid | 1,500 | 312 |
| Gallic acid | 10 | 2 |
| Resorcinol | 30 | 6 |
| Tyrosine | 0 | 0 |

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

| Inhibitor | Relative activity(%) | | |
|----------------------|----------------------|-----|-----|
| | Concentration(mM) | | |
| | 0.05 | 0.1 | 0.5 |
| None | 100 | 100 | 100 |
| Cysteine | 74 | 53 | 0 |
| Sodium metabisulfite | 79 | 64 | 2 |
| Ascorbic acid | 90 | 65 | 0 |
| EDTA | 100 | 94 | 85 |

하여 PPO의 阻害劑로 알려져 있는 것들 中에서 Table 2에서와 같이 cysteine, ascorbate, sodium metabisulfite 및 EDTA를 0.05, 0.1 및 0.5mM 濃度로 反應液에 添加하여 酵素活性을 測定하였다.

Table 2에서와 같이 모든 阻害劑에 대하여 阻害 效果가 인정되었으며, EDTA를 제외하고 酵素活性을 완전히 阻害하는 濃度는 0.5mM 이었다. 홍옥 PPO가 sodium metabisulfite, cysteine 및 ascorbate 에 의해 阻害되는 현상은 배¹³⁾, 마나나^{20,21)}, 포도¹⁴⁾ 에서도 報告되어 있으며, EDTA의 경우는 Kahn¹⁷⁾, Luh와 Phithakpol²²⁾, Wissemann와 Lee¹⁴⁾ 및 Wong 等²³⁾에 의해서도 阻害效果가 거의 없는 것으로 報告 되어 本 實驗의 結果와 一致하였다. 그러나 Constantinides와 Bedford⁴⁾가 4% 添加로 阻害效果가 있다고 報告한 점으로 미루어 EDTA도 高濃度에서는 阻害效果가 있을 것으로 생각된다.

6. 알콜 濃度の 影響

홍옥 PPO의 알콜에 의한 影響을 調査하기 위하여, Table 3에서와 같이 反應液의 알콜濃度가 5, 10 및 15%로 조정한 다음 酵素活性을 測定하였다.

그 結果, Table 3에서와 같이 10% 添加時 活性이 가장 높고 그 전후로 다소 떨어지는 傾向이었다. 그러나, 이는 알콜濃度の 影響이 아니라 pH의 變化 때문인 것으로 생각된다. 따라서 알콜 濃度는 PPO

Table 3. Effect of ethanol concentration on the activity of polyphenol oxidase

| Ethanol (%) | Relative activity (%) | pH |
|-------------|-----------------------|-----|
| 0 | 100 | 6.0 |
| 5 | 109 | 6.2 |
| 10 | 112 | 6.3 |
| 15 | 102 | 6.6 |

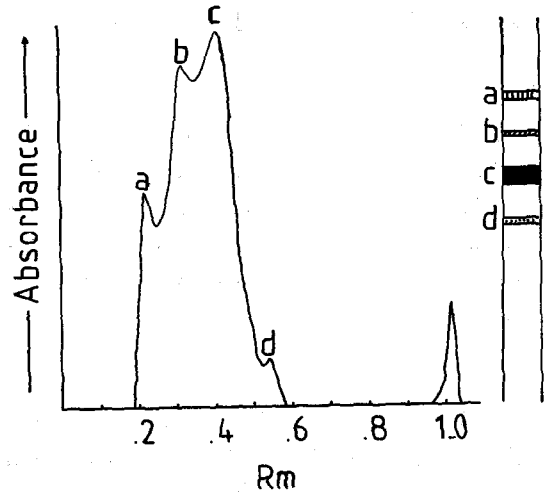


Fig. 4. Detection of polyphenol oxidase activity in polyacrylamide disc gel at 420nm in a Gelman scanning densitometer.

活性的에 아무런 影響이 없는 것으로 생각된다.

7. 홍옥 PPO의 活性 band

홍옥 PPO의 活性 band의 수와 위치는 Fig.4에서와 같이 주스나 粗酵素液에서 모두 Rm 값이 각각 0.21, 0.30, 0.41, 0.51인 a, b, c, d의 4개의 band가 觀察되었으며, Kahn²⁴⁾도 주스 및 粗酵素液과의 活性 band 差異는 없다고 하였다.

Gel내의 酵素活性은 c가 가장 色이 진한 것으로 보아 가장 活性이 높은 것으로 생각되며, 그 다음이 b, a 순이었고 d는 가장 活性이 낮은 것으로 생각되었다. 그러나, 사과 PPO의 活性 band가 3개라고 報告한 것과는 相異하였다^{4,6)}. 一般的으로 活性 band의 수와 위치는 各 品種 및 부위별로 큰 差異가 있는 것으로 報告되어 있다.

8. 活性 band에 미치는 溫度的 影響

活性 band가 溫度에 의한 影響을 調査하기 위하여 酵素液을 60°C, 70°C에서 1時間 동안 處理한 後 電氣泳動한 結果 60°C에서는 a, c band, 70°C에서는 c band만이 나타났었다(Fig.5, 6).

이와 같은 結果는 同一한 熱 處理 條件下에서 本 酵素의 殘存活性이 各各 35% 및 15%로 나타난 것으로 보아 열에 강한 a band와 c band가 열처리 후 잔존한 것으로 보인다.

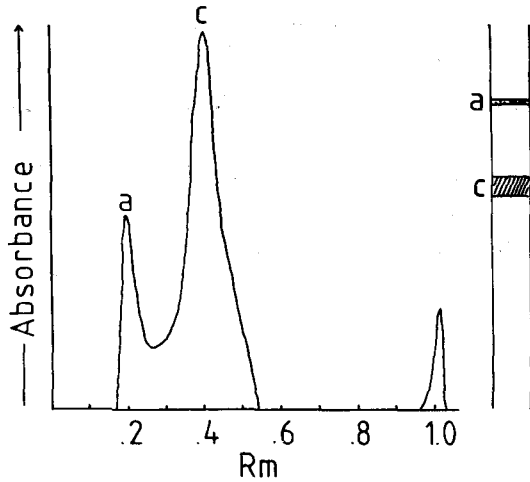


Fig. 5. Electrophoretic pattern of polyphenol oxidase after heating at 60°C for 1 hr.

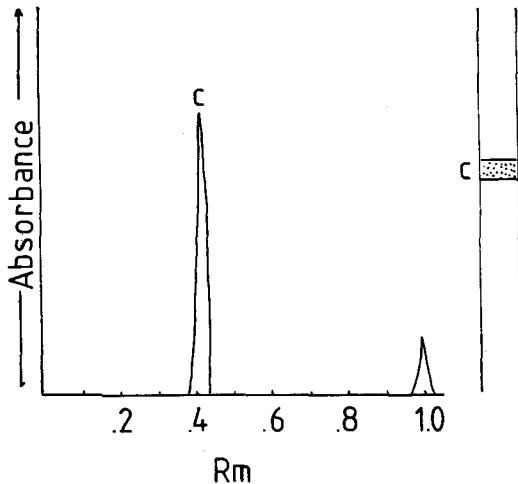


Fig. 6. Electrophoretic pattern of polyphenol oxidase after heating at 70°C for 1 hr.

要 約

사과酒의 酵素의 褐變에 대한 基礎 研究의 일환으로, 홍옥에서 polyphenol oxidase(EC 1.10.3.1)을 抽出, 粗精製하여 그 一般의 性質 및 熱處理에 따른 polyphenol oxidase 活性 band의 變化를 調査한 結果는 다음과 같다.

홍옥 polyphenol oxidase의 最適 pH는 6.5, 最適 溫度는 30°C였으며, 主 基質은 o-diphenol 이었다. 熱에 대한 安定性은 60°C와 70°C에서 1時間 處理 後에도 殘存活性이 各各 35%, 15% 정도였다. Sodium metabisulfite, cysteine 및 ascorbate는 0.5mM

에서 거의 완전히 酵素活性을 阻害하였으나 EDTA는 阻害效果가 아주 약하게 나타났다. 또한 알칼운 polyphenol oxidase의 活性에 아무런 影響을 미치지 않았다.

홍옥 polyphenol oxidase의 活性 band는 4개로 觀察되었고, 60°C 및 70°C에서 1時間 동안 酵素液을 熱處理한 後에는 各各 2개 및 1개의 活性 band가 觀察되었다. 그러므로 各 band는 熱에 대한 安定性이 크게 差異가 있음을 알 수 있었으며, 또한 各 band의 熱安定성과 酵素의 熱安定性 성격과는 거의 一致되었다.

文 獻

1. Mayer, A.M. and Harel, E.: *Phytochem.*, **18**, 193(1979)
2. Walker, J.R.L. and Hulme, A.C.: *Phytochem.*, **4**, 677(1965)
3. Bedrosian, K., Nelson, A.I. and Steinberg, M.P.: *Food Technol.*, **13**, 722(1959)
4. Constantinides, S.M. and Bedford, C.L.: *J. Food Sci.*, **32**, 446(1967)
5. David, A.S., Akhtar, S. and Ribeiro, S.: *Phytochem.*, **11**, 535(1972)
6. Harel, E., Mayer, A.M. and Shain, Y.: *Phytochem.*, **4**, 783(1965)
7. 鄭基澤, 徐承教, 宋亨翼: 韓國營養食糧學會誌, **12**, 316(1983)
8. Davis, B.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
9. Zenin, C.T. and Park, Y.K.: *J. Food Sci.*, **43**, 646(1978)
10. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
11. Bedrosian, K., Steinberg, M.P. and Nelson, A.I.: *Food Technol.*, **14**, 480(1960)
12. Tate, J.N., Luh, B.S. and York, C.K.: *J. Food Sci.*, **29**, 829(1964)
13. Halim, D.H. and Montgomery, M.W.: *J. Food Sci.*, **43**, 603(1978)
14. Wissemann, K.W. and Lee, C.Y.: *J. Food Sci.*, **46**, 506(1981)
15. Harel, E. and Mayer, A.M.: *Phytochem.*, **10**,

- 17(1971)
16. Knapp, F.W.: *J. Food Sci.*, **30**, 930(1965)
17. Kahn, V.: *J. Food Sci.*, **42**, 38(1977)
18. Reyes, P. and Luh, B.S.: *Food Technol.*, **14**, 570(1960)
19. Siegelman, H.W.: *Adv. Food Res.*, **5**, 97(1954)
20. Galeazzi, M.A.M. and Sgarbieri, V.C.: *J. Food Sci.*, **46**, 1404(1981)
21. Montgomery, M.W. and Sgarbieri, V.C.: *Phytochem.*, **14**, 1245(1975)
22. Luh, B.S. and Phithakpol, B.: *J. Food Sci.*, **37**, 264(1972)
23. Wong, T.C., Luh, B.S. and Whitaker, J.R.: *Plant Physiol.*, **48**, 19(1971)
24. Kahn, V.: *Phytochem.*, **15**, 267(1976)