慶北大農學誌(Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ.) 3 : 85～91 (1985)

Fuji 사과의 減壓貯藏中 Acid-phosphatase의 變化

裵 天 鎬·孫 泰 華

慶北大學校 農科大學 食品加工學科

Changes of Acid-phosphatase in Fuji Apples during Sub-atmospheric Storage.

Bae, Chun Ho · Sohn, Tae Hwa

Dept. of Food Science and Technology, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

The change of acid-phosphatase in Fuji apples was investigated in terms of storage temperature and pressure.

The firmness, sugar contents, acidity and activity of acid-phosphatase with electrophoretic pattern were studied during storage.

The firmness, sugar contents and acidity were decreased during storage. Ratio of decrease was greater at normal temperature than low temperature and normal atmosphere than sub-atmosphere.

Acid phosphatase activity of apples was mainly existed cell wall fraction and increased with climacteric rise and decreased later.

The activity was higher at normal temperature than low temperature and at atmosphere than sub-atmosphere.

The optimal temperature and pH were 45 ℃ and pH 5.6, respectively.

In stability of heat and pH, enzyme solution was stabilized to 30 ℃ and pH 5-8.

Electrophoretic pattern of enzyme solution extracted from sub-atmospheric pressure with low temperature and normal atmospheric pressure with normal temperature yielded two activity bands during storage.

緖 論

사과는 生果로서의 營養的인 面 및 기호성에 있어서 그 수요가 날로 높아가고 있다. 그중 Fuji 사과는 品質의 優秀性으로 해마다 生産量이 增加되고 있으며 이것을 生果로서 貯藏하기 위한 여러가지 硏究가 활발하게 進行되고 있다. 현재 실시중인 저장방법 으로서는 低溫貯藏,[31,8,28,32] CA貯藏[18,23,9,22,7]및 이들의 諸問題

點을 補完한 減壓貯藏이 開發되어 이미 實用化 단계에 이르고 있으며 이와 더불어 減壓貯藏이 果實의 生理에 미치는 여러가지 影響을 調査 함으로서 그 效果를 높일 수 있음이 알려져 있다.[1,5,20,33,29,15] 이러한 硏究過程에서 사과의 減壓貯藏中 生理에 여러가지 영향을 미치는 酵素들의 變化에 관한 硏究는 별로 없는 실정이다.

Acid phosphatase(E.C3.1.3.1)는 動植物界에 存在하며 呼吸 energy 系에 관여하는 酵素로서 生體內의 燐酸 ester 物質로 부터 無機燐酸을 遊離시키는 加水分解 酵素이며[2,24,4] 植物體內 代謝物質의 能動的輸送, 貯藏養分의 利用,[11,14] 老化現象[16,17] 等에 관여하는 것으로 알려져 있다.

本 硏究는 사과의 減壓貯藏의 一環으로서 環境壓力의 變化가 사과의 追熟 및 老化에 미치는 影響을 酵素的인 面에서 觀察 하고자 Acid phosphatase의 活性變化 및 性質, 電氣泳動型의 變化를 果實生理 作用의 指標가 되는 呼吸量의 變化와 比較 調査 하였다. 또한 기호적인 面에서 貯藏效果에 依한 硬度, 遊離酸 및 糖의 含量變化를 調査하였다.

材料 및 方法

1. 材料

慶北達成郡 所在 果樹園에서 栽培되고 있는 10年生 果樹의 Fuji 사과를 1983年 10月 23日에 收穫하여 貯藏試料로 하였다.

2. 實驗區分 및 裝置

孫等[29]의 減壓調節裝置를 사용하여 貯藏條件을 Table1과 같이 하였다.

Table 1. Classification of experiment with different storage conditions

Pressure	Temperature	Note
760 mm Hg	15℃	NAP-N
	2℃	NAP-L
380 mm Hg	15℃	SAP-N
	2℃	SAP-L

減壓調節 및 貯藏中 發生하는 CO_2를 除去하기 위하여 Fig.1과 같이 製作한 貯藏容器를 使用하였다.

3. 實驗方法

呼吸量

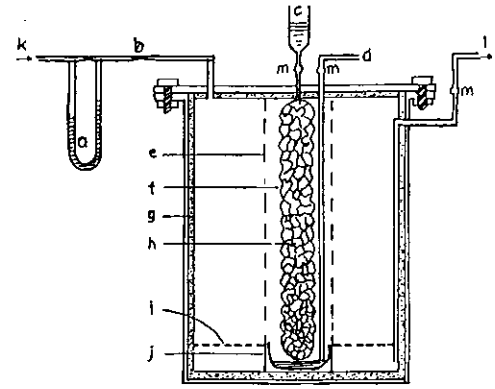

Fig. 1. Diagram of storage chamber.

a: Flow meter, b: Porous plug, c: CO_2 adsorber, d: CO_2 adsorber recovery app., e: PVC Pipe, f: CO_2 adsorption app., g: Insulator, h: Splinters of glass, i: Storage chamber plate, j: CO_2 adsorber receiver, k: Air in let l: To Vacuum tank, m: Cock.

Biale[3,21] 等의 通氣式 測定法에 준하여 CO_2 mg/kg/hr/로 나타내었다.

硬度

Magness-Taylor tester로 測定하여 kg/㎠으로 나타내었다.

糖

환원당은 果肉部 5g을 磨碎, 抽出, 濾過한 것을 假檢液으로 하고 全糖은 위의 假檢液을 酸分解한 것을 Nelson-Somogyi 法[19]으로 定量하여 glucose 로 換算하였다.

遊離酸

果肉部 5g을 磨碎, 抽出, 濾過한 後 0.1N NaOH로 適定하여 malic acid로 換算하였다.

酵素液 調製

Joseph A.Sacher[17] 等의 方法에 準하여 다음과 같이 하였다. 卽, 사과 果肉部 20g을 0.05M citrate buffer (pH 5.5) 60㎖로 磨碎한 後 2℃에서 1,000×g 15分間 遠心分離하여 얻은 上澄液을 soluble fraction으로 하고 沈澱部를 cell wall fraction으로 하여 Triton X-100 1%를 含有한 0.05M citrate buffer (pH 5.5) 30㎖로 30分間 추출한 후 10,000g 15분간 원심분리하여 상등액을 0.05M citrate buffer (pH 5.5)에서 一夜 투석시켜서 효소액으로 사용하였다.

酵素活性의 測定

Bergmeyer[2]氏의 方法에 準하여 다음과 같이 하였다. 즉 基質(p-nitrophenyl phosphate)를 0.05M citrate buffer (pH 5.5)에 2mM되게 溶解시켰다. 이 基質溶液 1 ml에 酵素液 0.2 ml를 加하여 30℃에서 30分間 反應시킨 후 0.02N NaOH 溶液 10 ml를 加하여 反應을 中止시켜 生成된 p-nitrophenol의 量을 spectrophotometer (Shimadzu spectronic 20)를 使用하여 波長 405 nm에서 比色定量하였다. 酵素活性은 30℃에서 1分間에 1 μM의 p-nitrophenol을 遊離시키는 酵素의 量을 1 unit로 나타내었다.

電氣泳動

Davis[5]法을 變形하여 sample gel 대신에 20% sucrose를 7.3% polyacrylamide disc gel electrophoresis를 하였다. upper buffer, low buffer 공히 4mM Tris-38mM glycine buffer (pH8.3)를 사용하여 tube당 3mA로 電氣泳動 하였다. Band를 관찰하기 위하여 Yamagata[13]氏의 方法에 따라서 α-naphthyl phosphate와 Fast Garnet G.B.C salt (o-amino azotoluen diazonium salt)를 0.5M sodium acetate buffer (pH 5.5)에 각각 0.02% 되게 溶解시킨 溶液에서 30℃ 4時間 發色시켰다.

結果 및 考察

1. 呼吸量의 變化

貯藏中 Fuji 사과의 生理的 指標가 되는 呼吸量의 變化는 Fig. 2와 같이 저장초기에 26.5 mg/kg/hr 였으나, 저장기간이 경과함에 따라 常溫常壓區는 급격히 증가한 후 감소하는 현상을 보였으나, 低溫減壓區는 초기에 감소하다가 중기에 증가하는 것으로 나타났다.

이러한 변화는 climacteric rise가 低溫 및 減壓處理로 인해 약화되는 것으로 보인다. 그리고 低溫減壓區가 常溫常壓區보다 약 20일 정도 climacteric maximum의 遲延효과가 나타남을 알 수 있는데 이는 減壓과 低溫의 복합적인 要因에서 基因되는 것으로 思料되며 減壓이 呼吸의 억제에 효과적이라는 孫[30] 等의 보고와 一致하는 結果였다.

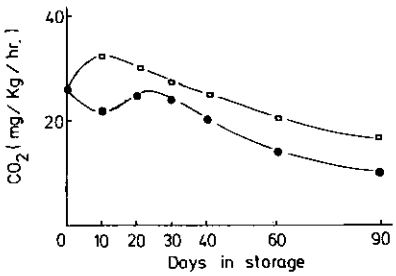

Fig. 2. Changes of carbon dioxide evolutions during the ripening of Fuji apples.
□——□ NAP—N ●——● SAP—L

2. 硬度의 變化

Fig. 3에서 보는 바와 같이 저장초기에 7.53 kg/cm² 이던 것이 저장시일이 경과함에 따라 전반적으로 減少하는 경향이었는데 低溫區보다 常溫區의 變化가 현저하였으며 減壓區가 常壓區보다 감소억제 효과가 좋았다. 이렇게 果肉의 軟化가 크게 지연된 것은 減壓에 의한 호흡억제와 ethylene 및 CO_2의 제거에 의한 追熟抑制效果로 思料된다.[29,27]

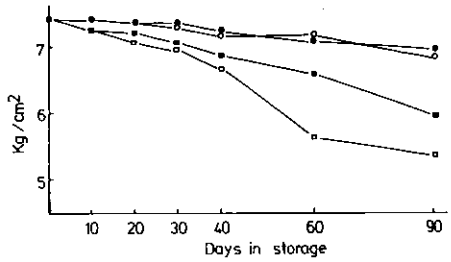

Fig. 3. Changes of firmness during the storage of Fuji apples.
●——● SAP-L ■——■ SAP-N
○——○ NAP-L □——□ NAP-N

3. 糖含量의 變化

저장기간중 糖含量을 調査한 結果는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 環元糖은 약간 증가하다가 감소하였으며, 全糖은 저장기간을 통하여 감소하였으며 常溫區가 低溫區보다 常壓區가 減壓區보다 더 감소하였다.

4. 遊離酸 含量의 變化

저장중 遊離酸 含量의 변화를 조사한 결과는 Fig. 5와 같이 저장기간중 감소하였으며 常溫區의 감소가 현저하였다.

이러한 결과는 대부분의 果實에서 追熟 및 老化가 진행됨에 따라 遊機酸이 감소한다는 여러 보고와 일치하며 본 실험에서도 低溫 및 減壓의 효과가 인정되었다.

5. Acid-phosphatase의 細胞內 分布

사과 果肉에서 acid-phosphatase의 存在部位를 알기 위하여 cell wall 구분, mitochondria 구분, soluble 구분으로 나누어 그 活性을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 즉, cell wall 구분이 전체의 83%, mitochondria

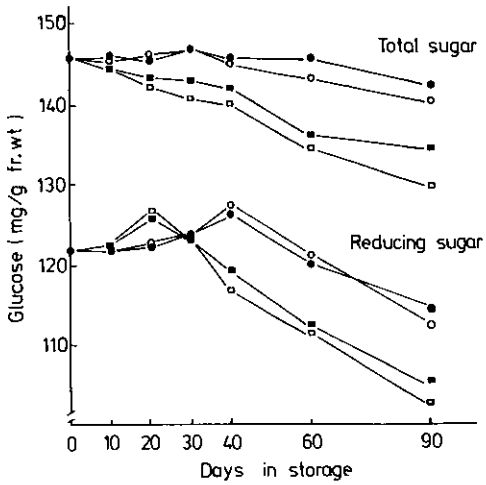

Fig. 4. Changes of total sugar and reducing sugar during the storage of Fuji apples.

●——● SAP-L ■——■ SAP-N
○——○ NAP-L □——□ NAP-N

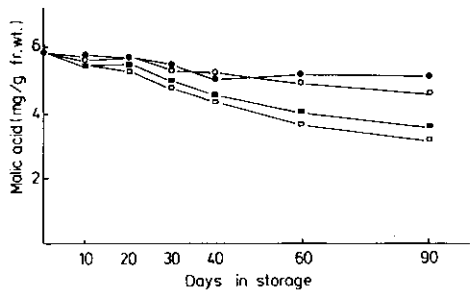

Fig. 5. Changes of freeacid during the storage of Fuji apples

●——● SAP-L ■——■ SAP-N
○——○ NAP-L □——□ NAP-N

구분이 4%, soluble 구분이 13%였다.

이러한 사실은 Nagao Ogura[24] (Tomato), Hiroshi Hyodo[12] (Banana), Lai 와 Thompson[25] (maize root) 에서 각각 조사, 보고한 결과와 一致함을 알수 있었다.

본 실험에서 사과의 Acid-phosphatase 活性은 mitochondria 부분에서는 아주 소량 존재할 뿐만 아니라 변화도 미미하였으므로 mitochondria fraction은 soluble fraction에 포함시켜 soluble fraction 및 cell wall fraction의 2個區로 나누었다.

Table 2. Distribution of Acid phosphatase in subcellular fractions of Fuji apples

Fraction	Cell wall	Mitochondria	Soluble	Total
% of activity	83	4	13	100

Cell wall fraction : 1,000 × g precipitate
Mitochondria fraction : 12,000 × g precipitate
Soluble fraction : 12,000 × g Supernatant

6. Acid-phosphatase 活性의 變化

사과의 cell wall 부분의 活性은 Fig 6과 같이 呼吸量의 변화와 그 경향이 같았다. 저장시에는 低溫區보다 常溫區의 活性이 더 높았으며 전반적으로 減壓區의 活性이 常壓區보다 낮았다.

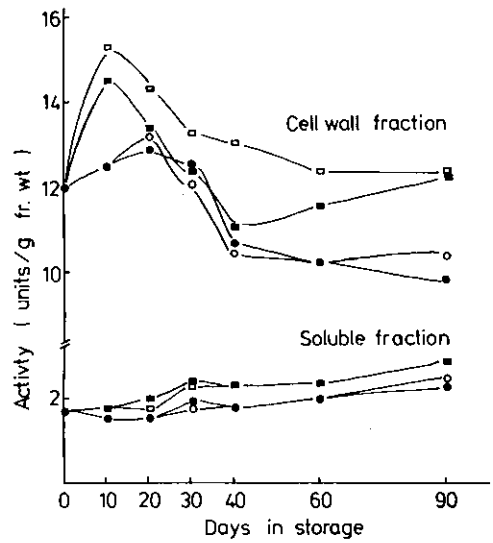

Fig. 6. Changes of Acid phosphatase activties during the storage of Fuji apples.

●——● SAP-L ■——■ SAP-N
○——○ NAP-L □——□ NAP-N

Soluble fraction의 活性은 cell wall fraction에 비해서 아주 낮았으며 약간 증가하는 경향이었다. 이 이유로서는 追熟 및 老化가 진행되면서 細胞膜의 透過性 증대 및 膜과 酵素와의 결합력이 약해져서 유리되는 酵素活性이 증가한다고 한 Deleo 등의 보고와 그 경향을 같이 하였다.

본 실험에서는 cell wall fraction 이나 soluble fraction은 저장기간을 통하여 低溫區보다 常溫區의 活性이 높았다는 사실에서 사과의 老化에 관련된 糖質 등의 저장양분의 이동이 常壓區가 減壓區보다 常溫區가 低溫區보다 심하다고 할 수 있다.

7. Acid-phosphatase의 諸性質

最適溫度와 pH

酵素液의 最適溫度 및 pH를 조사한 결과는 Fig. 7

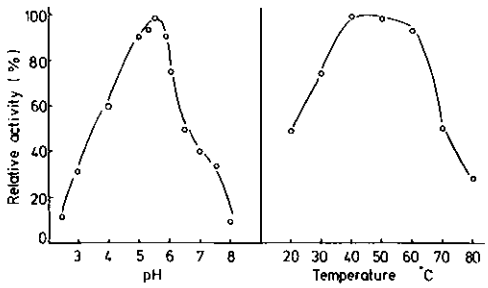

Fig. 7. Effect of pH and temperature on the acid phosphatase activity during the storage of Fuji apples.

과 같다. 이때 pH 3.0～6.0까지는 citrate buffer를, pH 6 ～ 9 까지는 Tris-HCl buffer를 사용하였으며 最適溫度를 조사하기 위하여 酵素 反應液을 20℃에서 90℃까지 10℃ 간격으로 溫度別로 30분씩 保持하였다.

最適 pH는 pH 0.2 간격으로 조제한 buffer에 酵素 및 基質을 일정량 첨가한 다음 그 反應性을 조사하였다.

그 결과 最適溫度는 45℃, 最適 pH는 5.5였다.

熱 및 pH 安定性

酵素의 熱 및 pH 安定性을 조사한 결과는 Fig. 8과 같다. 酵素의 熱安定性을 측정하기 위하여 酵素液을 最適 pH에서 20℃에서 80℃까지 10℃ 간격으로 나누

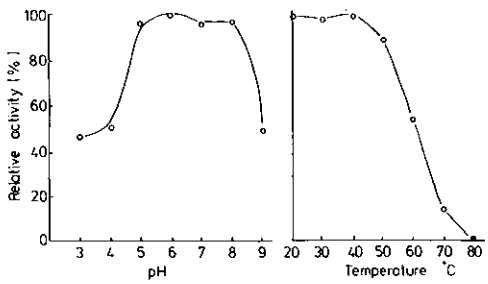

Fig. 8. Stability of pH and heat on the activity of Fuji apples.

어서 각 溫度區에서 1시간 처리한 후 급냉하여 酵素活性을 측정하였으며 pH 安定性은 酵素液을 pH 3.0에서 9.0까지 조절하여 30℃에서 24시간 방치한 후 酵素活性을 측정하였다. 그 결과 40℃까지는 안정하였으며 70℃에서는 약 18%의 活性만이 남았다. pH는 5에서 8까지 안정하였다.

無機鹽의 影響

각종 無機鹽의 濃度를 조절한 후 酵素液에 첨가한 후 일정시간 반응시켜 活性을 측정한 결과 酵素의 活性은 Fe, Hg 鹽에 의해 크게 沮害되었다.

Table 3. Effect of inorganic salt on the Acid phosphatase activity of Fuji apples

0.01 M	Relative activity (%)
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	103
NaCl	96.2
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	84.3
$FeCl_3 \cdot H_2O$	75.4
K_2SO_4	99.3
$HgCl_2$	74.2
EDTA	94.1
Control	100

電氣泳動型의 變化

追熟 및 貯藏中의 電氣泳動型의 변화는 Fig. 9와 같이 climacteric maximum에서는 band의 色이 약간 진하였으며 貯藏時日이 경과할수록 band의 色이 희미해졌다.

電氣泳動型의 변화는 Naik[26] 등은 Golden delicious 사과에서 Acid-phosphatase의 活性 band는 未熟狀態, 成熟狀態 다같이 2개였다고 보고하였다.

본 실험에서는 貯藏全期間을 통하여 band의 强, 弱에만 약간의 변화가 있었다.

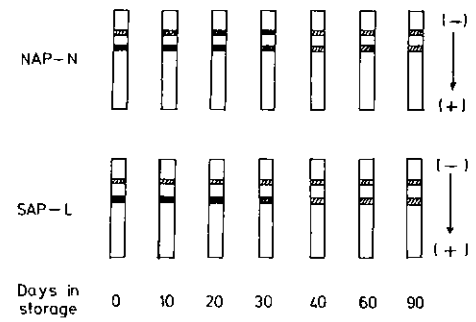

Fig. 9. Zymograms of acid phosphatase activities bands during the storage of Fuji apples.

Relative intensity : ▬ > ▬ > ▨

摘 要

Fuji의 減壓貯藏中 品質變化에 미치는 영향을 酵素的인 面에서 관찰하고자 preclimacteric 단계에서 수

확하여 常溫(15℃) 및 低溫(2℃), 減壓(380㎜Hg) 및 常壓(760㎜Hg)에서 貯藏하여 硬度, 酸, 糖 그리고 酵素活性의 변화 및 電氣泳動型의 변화를 관찰하였다.

Fuji 사과의 Acid-phosphatase는 cell wall fraction에 주로 존재하며 climacteric maximum 에서 최고의 活性을 보였으며 이후로 감소하는 경향이었으며 常溫常壓區에서 변화의 폭이 가장 크고 活性이 높았으며 그 다음 常溫減壓區, 低溫常壓區, 低溫減壓區의 順이었다. 酵素의 最適 pH는 5.5, 最適溫度는 45℃였다. 熱과 pH의 安定性을 조사한 결과 30℃까지는 안정하였으며 pH 5～8사이에 안정하였다. 無機鹽의 영향에서는 Fe, Hg에 의해서 크게 沮害되었다.

저장중 常溫常壓區와 低溫減壓區에서 저장기간별로 추출해낸 酵素液을 電氣泳動시킨 결과 全期間에 걸쳐서 약간의 변화를 나타내었다.

引 用 文 獻

1. Asami, Y. 1932. On the processing of japanese persimmons with partial vacuum. J. Hort. Sci, Jap., 3 : 80-86.
2. Bergmyer, H. 1963. Method of enzymatic analysis. Academic press, New York (Ⅱ) : 856-881.
3. Biale, J. B. 1950. Postharvest phy and biochemistry of fruits, Ann. Rev. Plant physiol., 1 : 183-206.
4. Bielesfei, R. L. 1973. Phosphate pools, phosphate availability. Ann. Rev. Plant physiol., 24 : 225-252.
5. Burg, S. P. and E. A. Burg. 1966. Fruit storage at sub-atmospheric pressure. Science, 153 : 314-315.
6. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis Ⅱ. Method and application to human serum protein, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121 : 404-427.
7 Drake, S. R., J. W. Nelson, and J. R.Powers. 1979. The influence of controlled atmosphere storage and processing conditions on the quality of applesauce from Golden delicious apples. J. Amer. Soc. Hort. Sci., : 68-70.
8. Fidler, J. C., and C. J. 1968. The effect of conditions of storage on the respiration of apples. Ⅳ. Changes in concentration of possible substrate of respiration, as related to production of carbon dioxide and uptake of oxygen by apples at low temperature. J. Hort. Sci., 43 : 429-439.
9. Fidler, J. C., and C. J. 1971. The effect of conditions of storage on the respiration of apples. Ⅶ. The carbon and oxygen balance. J. Hort. Sci., 46 : 245-250.
10. Figier, J., 1968. Localization infrastructural de la phosphomonoesterase acid dans la stipule de Viciafaba L.auniveau du nectaire, Planta., 83 : 60-79.
11. Flinn, A. M. and D. C. Smith. 1967. The localization of enzyme in cotyledons of Pisum aruense L. during germination. Planta, 75 : 10-22.
12. Hiroshi Hyodo, Kuniaki Tanaka, Toshiro Suzuki. 1981. The increase of Acid phosphatase and ribonuclease during ripening of banana fruit, J. Japan Soc. Hort. Sci., 50 : 379-385.
13. Hiroshi Yamagata, Kunisuke Tanaka and Zenzaburo Kassi, 1979. Isozymes of Acid phosphatase in aleurone particles of rice grain and their interconversion Agric. Biol. Chem., 43 : (10), 2059-2066.
14. Hiroshi Yamagata, Kunisuke Tanaka, and Zenzaburo Kasi. 1980. Purification and characterization of Acid phosphatase in aleurone particles of rice grains. Plant & Cell physiol., 21 : 1449-1460.
15. 福田博之. 1981. 減壓貯藏中 及果肉 かつ 變障害について 日本園藝學會 シンポジウム 發表要旨 143-154.

16. James, E. Baker and Tadakazu Takeo. 1973. Acid phosphatase in plant tissue. I : Change in acidity and multiple form tea leaves and tomato fruit during maturation and senescence, Plant & Cell physiol., 14:459-471.
17. Joseph, A. Sacher. 1975. Acid phosphatase development during ripening of Avocado, Plant physiol., 55:382-385.
18. Kidd, F., and C. West. 1927. A relation between the concentration of oxygen and carbon dioxide in the atmosphere, rate of respiration, and length of storage life in apples. Great Britain Dept., Sci. & Indus. Res., Food Invest Bd. Rept., 1925/26:41-45.
19. 久保田正光. 1967. 糖質試驗法, 共立出版(東京) pp. 13-14.
20. Langridge, I. W., and R. O. Sharples. 1972. Storage under reduced atmospheric pressure. East Mall. Sta. Ann. Rept., p. 76.
21. 松本態市, 長坡啓助, 中村怜之輔. 1957. 果實蔬菜の呼吸 に關する 研究 (1). 園藝學研究集錄, 8:74-79.
22. Meheruik, M. M., S. W. Porrit, and P. D. Lidster. 1977. Effects of carbon dioxide treatment on controlled atmosphere storage behavior of Mcintosh apples. Can. J. Plant Sci., 57:457-460.
23. Murata, T., Minamide. 1970. Studed. on organic acid metabolism and ethylene production during controlled atmosphere storage of apples. Plant & Cell physiol., 11:857-863.
24. Nagao Ogura, T. Iwashita, S. C. Chem, H. Nakagawa. 1972. Studied on Acid phosphatase of tomato fruits. Bull. Fac. Hort. Chiva Univ., 20:67-72.
25. Pietro, Deleo. and Joseph, A. Saccher. 1970. Control of ribonuclease and Acid phosphatase by auxin and abscisic acid during senescence of Rhoeo leaf sections, Plant physiol., 46:806-811.
26. Renupad Naik and Dwight. 1973. Changes in protein and isozyme content of apple fruits following infection by Monochaetia mali, Phytopathology., 63:851-854.
27. Salunke, D. K., and M. T. Mu. 1973. Effect of sub-atmospheric pressure storage on ripening and associated chemical changes of certain deiduous fruit, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 98 (1):168-171.
28. Scott, K. J., and R. B. H. Wills. Low temprature break down in apples. CSIRO. Food Res. Q., 30:35-39.
29. 孫泰華. 1975. 減壓에 의한 사과 貯藏中 生理化學的 變化에 關한 硏究. 嶺南大學校 大學院 博士學位 論文.
30. 孫泰華, 崔鍾旭, 金聲達. 1972. 靑果物 貯藏에 關한 硏究(第1報). 通氣量調節에 따른 貯藏室內氣體組成 및 生理化學的 變化에 대하여. 韓國食品科學會誌. 4:13-17.
31. Sterling, C. 1968. Effect of low temperature on structure and firmness of apple tissue. J. Food Sci., 33:577-580.
32. Wills, R. B. H., K. J. Scoot, and W. B. Mcglasson. 1970. A role acetate in the development of low temperature breakdown in apples. J. Sci. Food Agr., 21:42-44.
33. Wu, M. T., S. J. Jadhav, and D. K. Salunkhe. 1972. Effect of subatmospheric pressure storage on ripening of tomato fruits. J. Food Sci., 37:952-956.