

# 자두果實의 成熟中 糖含量 및 Invertase의 活性變化

金賢珠 · 文廣德 · 孫泰華

慶北大學校 農科大學 食品工學科

## Changes in Sugar Content and Invertase Activity in Plum Fruits during the Maturation

Kim, Hyun Ju · Moon, Kwang Deok · Sohn, Tae Hwa

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

### Summary

The changes of sugar content and invertase activity during maturation of plum fruits, and properties of the enzyme were investigated in this study.

The soluble sugars in plum fruits were mainly sucrose, glucose and fructose. The sucrose content in the fruit increased slowly at the early stage of maturation and then decreased slightly. At the final stage, the sucrose content increased remarkably with maturation. The contents of glucose and fructose increased slowly at the early stage of maturation following decrement at middle stage. At the final stage, glucose content decreased continuously while fructose content increased again following decrement.

Invertase activity in the fruit increased during maturation showing maximum at the onset of color change and after that, decreased remarkably. The optimum pH and temperature of invertase activity were pH 5.0 and 65°C, respectively. The enzyme was most stable at pH 5.0 and retained 75% of its activity after incubation at 70°C for 15 min. The enzyme was activated by Cu<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, but inhibited by Hg<sup>++</sup> remarkably.

### 緒 論

자두(*Prunus salicina* L)는 각종 기상상태나 토양상태에 잘 적응하는 성질이 있어 전국적으로 재배가 가능하고 초여름의 과일로서 독특한 풍미와 탄수화물 및 비타민C의 함량이 많아 기호성이 높다. 그러나 수확후 착색, 착향 및 연화현상이 급속히 진행됨에 따라 품질 저하가 수반됨으로 장기 저장이 어려운 과실중의 하나이다.<sup>23)</sup>

현재 우리나라에서는 거의 생과용으로 이용되고 있으며 가공업이 발달함에 따라 건과나 주우스, 잼 등의 통조림 및 그 밖의 가공용으로 다양하게 이용될 전망이다.<sup>24)</sup>

자두과실에 함유되어 있는 탄수화물의 대부분

은 단당류와 이당류로서 그중 중요한 것은 glucose, fructose, sucrose<sup>20,21)</sup>등인데 이들 당은 미숙과에서 볼 수 있는 starch의 분해에 의해 생육후기에서 부터 수확 저장중의 성숙기간 동안에 증대되는 경향이 있으며 또한 저장중에는 호흡기질로 소비되기도 한다.<sup>22)</sup>

한편, 당대사에 깊은 연관이 있는 invertase는  $\beta$ -fructofuranosyl 말단을 가수분해하는  $\beta$ -fructofuranosidase이다.<sup>13,34,35)</sup> 여러 식물 및 과실에서 invertase 작용과 생질에 관해서 많은 연구가 있으며,<sup>1,5,10,28,31)</sup> invertase 활성과 당대사에 관해서도 많은 보고가 있다.<sup>19,25)</sup> Hobson등<sup>17)</sup>은 tomato 과실의 성숙기간 중 당이동에 대하여, Yamaki<sup>26)</sup>는 배의 성숙과정 중 당의 변화와 그에 관련된

효소에 대하여, Komiyama<sup>20)</sup>는 자두과실의 이화학적 조성의 변화에 대해서 보고한 바 있으나, 성숙 중 자두과실의 당과 invertase 활성변화에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 자두과실의 이용성을 높이는 저장 및 가공법의 기초 자료로서 과실의 성숙 중 당함량 및 그에 관련되는 invertase의 활성변화와 효소학적 성질을 조사하였기에 이에 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 공시재료

본 실험에 사용한 자두과실은 경북대학교 부속 농장 소재 과원에서 노지재배한 자두 품종 「Sordum」을 1986년 6월 중순부터 외관이 건전하고 중량이 70g 정도인 중과를 성숙 단계별(미숙기: 7월 10일~7월 15일, 적숙기: 7월 16일~7월 22일, 완숙기: 7월 23일~7월 29일, 과숙기: 7월 30일~8월 3일)로 수확하여 공시재료로 사용하였다.

### 실험방법

#### 조효소의 조제

효소액의 추출은 Komiyama 등<sup>21)</sup>의 방법에 준하여 Fig. 1과 같이 실시 하였다. 자두과실을 0.03M ascorbic acid와 냉 acetone(-20°C)으로 마쇄하여 여과한 후 고형물에 다시 냉 acetone을 처리, 건조시켜 얻어진 acetone powder를 일정량 취하고 여기에 0.1M-citrate phosphate 완충액(pH 7.0)으로 잘 진탕하여 효소액을 추출한 후 이를 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액에 ammonium sulfate를 가하여 80%까지 포화시켰다. 이것을 다시 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 침전물을 모아서 소량의 상기 완충액으로 용해 시킨 후 증류수에 24시간 투석시켰다. 투석이 끝난 용액의 불용성 물질을 원심분리하여 제거하고 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

#### 효소활성의 측정

Invertase의 활성 측정은 Komiyama 등<sup>22)</sup>의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 기질 1% sucrose 용액 0.5ml, 0.1M-citrate phosphate 완충액(pH 5.0) 2ml 및 조효소액 0.5ml를 가하여

30°C에서 10분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 Nelson-So-mogyi법<sup>23)</sup>에 준하여 500nm에서 비색정량 하였다. 이때 효소활성 1 unit는 1시간에 1μmole의 glucose를 유리시키는 효소량으로 정하였다. (reducing sugar μmol/mg protein as glucose)

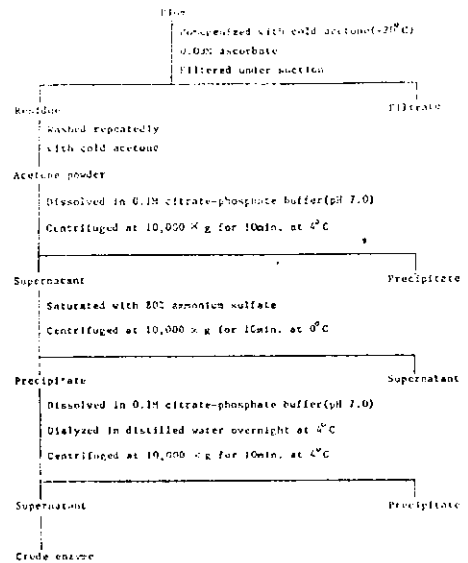


Fig. 1. Preparation of crude enzyme.

#### 단백질의 정량

조효소액의 단백질 함량은 Bradford 방법<sup>24)</sup>에 준하여 Coomassie Brilliant Blue G-250을 사용하여 측정하였으며, 표준물질로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였다.

#### 당정량

당정량은 High-Performance Liquid chromatography(HPLC)에 의하여 정량하였다. 즉, 시료 과육부 일정량을 취하여 최종농도 80%되게 순수 ethanol을 가하여 균질화한 후 환류냉각장치가 부착된 열탕에서 60분 정도 끓여서 감압여과하고 여액을 rotary evaporator로 농축한 것을 증류수로 씻어 일정량에 정용하고 pre-filtration(Toyo No. 2)한 후 0.45μ membrane filter로 여과한 것을 HPLC 시료로 하였다.

HPLC로 분리된 각 chromatogram을 같은 조건에서 표준당(Merck)의 retention time과 비교하여 동정 하였으며, 동정된 각 chromatogram의 면적은 반치폭법으로 구한 다음 standard curve에서 그 함량을 구하였다. 이때의 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Instrument and operating conditions of highperformance liquid chromatography.

Instrument	Waters Co. model 244
Solvent	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O(80 : 20, V/V)
Detector	R. I.
Column	Carbohydrate analysis Waters Co. (3.9mm × 30cm)
Flow rate	1.5ml/min.
Chart speed	5mm/min.

結 果

성숙 중 Sucrose 함량의 변화

성숙 중 sucrose 함량은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 성숙 초기에는 약 1% 정도였으나 성숙이 진행됨에 따라 서서히 증가하여 적숙기까지는 2%를 나타내었으며, 그 이후로는 완숙기부터 과숙기에 이르는 동안 급격히 증가하여 최종적으로 약 5.5%까지 도달하였다.

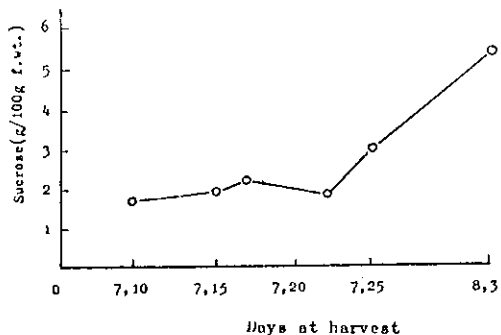


Fig. 2 Changes of sucrose content during maturation of Plum fruits.

Glucose 및 Fructose 함량의 변화

Fig. 3은 성숙중 glucose와 fructose 함량을 나

타낸 것으로서 녹숙기에서는 둘다 완만히 증가하며, glucose는 그 이후로 완만히 감소하는 반면, fructose는 감소한 후 증가하는 추세였다.

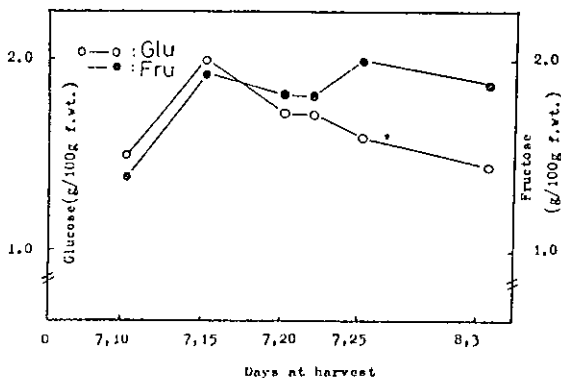


Fig. 3. Changes of glucose and fructose contents during maturation of plum fruits.

Invertase 활성의 변화

성숙중 invertase활성 변화는 Table 2에서 보는 바와 같이 과실의 성숙이 진행됨에 따라 증가하여 색깔 변화가 일어나는 시기에서 최대의 활성을 나타내었으며 그 이후로는 급격히 감소하였다.

Table 2. Activity change of invertase during maturation.

Stage	Invertase activity (Unit/mg protein)
Green	0.18
Turning color	0.26
Medium ripe	0.21
Ripe	0.13

효소의 제성질

최적 pH와 온도

최적 pH를 조사한 결과는 Fig. 4에서와 같이 pH 5.0에서 최대 활성을 나타내었다. 이때 pH 3.0~6.0까지는 0.1M citrate phosphate 완충액을, pH 6.0~8.0까지는 0.1M phosphate 완충액을 각각 사용하였다.

최적온도를 조사하기 위하여 효소액을 0.1M citrate-phosphate 완충액(pH 5.0)으로 조절한 반

응액의 온도를 20°C에서 90°C까지 각각 조절하여 10분간 반응 시켰다.

그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 65°C에서 최대활성을 나타내었다.

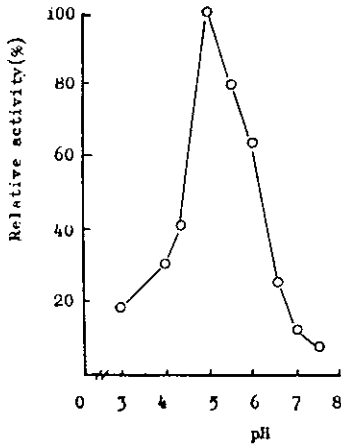


Fig. 4. Effect of pH on the activity of invertase.

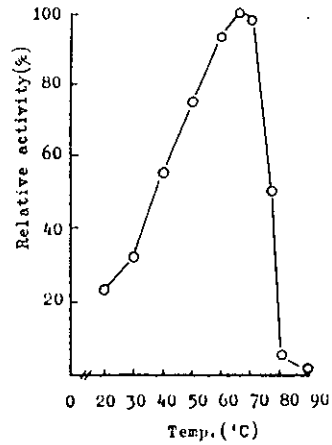


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of invertase.

열 및 pH 안정성

효소의 열 및 pH 안정성을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. 이때 열 안정성을 측정하기 위해서 효소액을 최적 pH에서 0°C에서 90°C까지 10°C 간격으로 나누어 각 온도구에서 15분간 처리한 후 급냉하여 측정하였다.

그 결과 본 효소는 60°C까지는 비교적 안정하

였으며, 70°C에서는 75%잔존 활성이 남아 열에 대해서 비교적 안정하였다.

pH안정성은 pH 3.0~6.0까지는 0.1M citrate-phosphate 완충액을, pH 6.0~8.0까지는 0.1M phosphate 완충액을 각각 사용하여 20°C에서 72시간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 그 결과 pH 5부근에서 안정하였다.

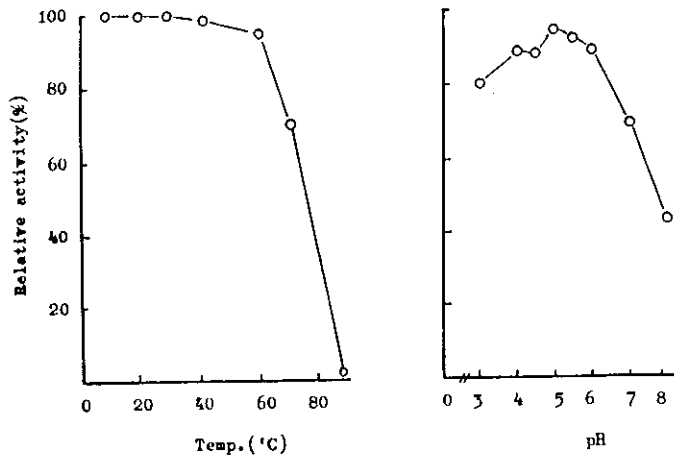


Fig. 6. Effect of pH and heat on stability of invertase.

### 금속이온의 영향

효소의 금속이온에 대한 영향을 조사하기 위하여 금속이온의 농도를 10mM로 조절하여 효소액과 동량을 첨가한 후 30°C에서 10분간 반응시켜서 활성을 측정하였다. 그 결과, Table 4에서 보는 바와 같이 효소의 활성은 2가 양이온 중  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ 에 의해 활성이 증가하였으나 그 외에는 저해 작용을 나타내었다.

Table 3. Effect of metal ions on invertase activity.

Metals	Relative activity (%)
None	100.0
NaCl	82.37
KCl	80.80
$\text{CuSO}_4$	137.5
$\text{CaCl}_2$	117.2
$\text{MgSO}_4$	75.2
$\text{FeCl}_3$	98.8
$\text{HgCl}_2$	62.5
$\text{ZnSO}_4$	72.5
$\text{MnCl}_2$	83.0

### 考 察

Invertase는 많은 고등동식물에 널리 분포하여 세포벽에 주로 결합되어 있고 acid invertase와 alkaline invertase가 존재한다.<sup>30, 35) Matsushita<sup>27)</sup></sup>는 최적 pH 및 km값에 기초하여 km값 2~13mM 이면 acid invertase, pH 7.0~7.6 km값 9~25mM 이면 alkaline invertase로 구분하였는데, 자두 과실은 Fig. 4와 같이 산성측인 pH 5.0부근에 최적 pH로서 acid invertase로 생각되어진다. 이 최적 pH값은 yeast<sup>6)</sup> 4.5, tomato 4.5<sup>31)</sup>, sweet potato<sup>27)</sup> 4.6, 감<sup>16)</sup> 4.5와 거의 유사하나 포도<sup>2)</sup>의 2.0, Lychee<sup>10)</sup>의 2.6 보다는 좀 더 높았다. 또, 최적온도(Fig. 5)는 65°C이므로 papaya<sup>11)</sup>, tomato<sup>31)</sup>, 포도<sup>2)</sup>, 감<sup>15)</sup>, guava<sup>29)</sup>, lychee<sup>10)</sup> 등에 비해서 다소 고온이었다.

자두과실의 당은 주로 sucrose와 glucose 및 fructose였으며(Fig. 2, Fig. 3) sucrose의 함량은 성숙말기에 최대를 나타내었고 glucose, fructose는 성숙초기에 약간 증가한 후 glucose는 적열기 이후부터 서서히 감소하는 반면 fructose는 약간 증가하는 경향을 보였다. Patching 등<sup>4)</sup>은 C-glucose를 mature green stage에 있는 tomato에 주입했을 때 glucose catabolism의 73%가 EMP

경로를 통해 방출되고 27%는 glucose의 전환기 구로서 중요한 역할을 하는 HMP경로를 통과하면서 여러 생합성 중간생성물이 생성된다고 하였으며 Ransey<sup>33)</sup>는 녹속기 tomato의 glucose carbon은 1.5~3.5%가 amino acid로 되며, 5.8~7.3%가 12시간 후에 유기산으로 된다고 보고하고 있다. 한편 Fig. 2의 sucrose함량의 증가 현상은 Yamaki<sup>36)</sup>, Hirai<sup>14)</sup>, Komiyama<sup>21)</sup> 등의 배, 비파, 자두과실 보고와 거의 일치하며 특히 Yamaki<sup>36)</sup>의 경우, 배과실에서 성숙이 진행됨에 따라 sucrose가 축적될 때 invertase 활성이 급격히 떨어지며, 그래서 sucrose의 축적원인이 invertase 활성의 감소에 의존함을 제시했고 이는 과실내에 이미 존재하고 있던 어떤 당의 상호전환과 있거나 껍질 등을 통해 sucrose와 sucrose 전구체들의 전이를 고려함으로써 다소 증명될 수 있을 것으로 보고하였다.

자두과실의 invertase 활성 변화(Table 2)는 turning color시기까지 대체로 증가하다가 그 이후로는 감소하는 것으로 나타났으며, 이것은 Nakagawa<sup>18)</sup>, Hirai<sup>14)</sup> 등의 보고와 거의 일치하며  $\beta$ -FFase의 증가는 내재성 inhibitor의 소실이라기 보다는  $\beta$ -FFase의 합성 때문이다.

여러 연구자들<sup>26, 35)</sup>은 tomato의 세포벽에 주로 존재하는 invertase의 활성도가 증가함에 따라 조직 내 sucrose농도가 감소하며 hexose의 농도가 증가한다고 보고하고 있다. 또한 Yamaki 등<sup>36)</sup>은 invertase 활성 증가는 sucrose 함량 저하와 평형을 이루나 화학양론적으로는 증명되어 질 수 없고 단지 invertase의 증가에 의해 sucrose농도가 감소하는 경향을 볼 수 있다고 한다. Glasziou 등<sup>9)</sup>은 사탕수수에서 sucrose는 free space에서 acid invertase에 의해 가수분해되고 연조직세포에서 glucose와 fructose의 인산화가 일어나며 sucrose phosphate의 합성 후에 액포에서 sucrose의 저장이 일어난다고 하였으며, Hawker<sup>12)</sup>는 invertase 활성증가 후 sucrose 축적시 sucrose-synthetase, sucrose-phosphate synthetase 및 sucrose phosphatase의 활성이 증가한다고 보고하였다.

이후의 결과로 미루어 보아 성숙중 자두과실의 carbon metabolism을 이해하는 데에는 starch phospholyase, sucrose synthetase와 phosphory-

lase에 대해, 그리고 insoluble residue와 hexose의 상호전환과 invertase inhibitor의 역할에 대해서도 더 많은 연구가 요구된다 하겠다.

### 摘 要

성숙 중 자두 과실의 당함량 및 invertase활성 변화와 효소학적 성질에 대하여 조사한 결과는 다음과 같다.

자두과실에 함유되어 있는 soluble sugar의 대부분은 sucrose, glucose 및 fructose이었다. 성숙 중 sucrose의 함량은 초기에는 서서히 증가하

다가 그 이후 약간 감소하며 성숙말기에는 급격히 증가하였다. Glucose와 fructose는 성숙초기에는 완만히 증가하였으나, 그 이후 glucose는 감소, fructose는 증가하는 경향이였다.

Invertase의 활성은 성숙함에 따라 증가하여 색깔의 변화가 일어나는 시기에 최고의 활성을 나타냈으며, 그 이후 급격히 감소하였다. 효소의 최적 pH와 온도는 각각 5.0과 65°C였다.

pH와 열안정성은 pH 5.0부근에서 안정하였으며, 70°C, 15분간에서 약 75% 잔존활성을 가졌다. 효소 활성은 Ca<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>에 의해 증가되었으나 Hg<sup>++</sup>에 크게 저해되었다.

### 引 用 文 獻

- Anderson, R. S., Ewing, E. E. and A. H. Senesac, 1980, Inhibition of potato tuber invertase by an endogenous inhibitor, plant physiol., 66 : 451~456.
- Arnold, W. N., 1965,  $\beta$ -Fructofuranosidase from grape berries, Biochem. Biophys. Acta., 110 : 134~147.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem., 72 : 248~254.
- Colin R. P., Gorge A. M. and N. D. Jack, 1975, Metabolism of glucose during ripening of detached tomato fruit, J. Sci. Food Agric., 26 : 23~29.
- Dickerson, A. G., 1972, A  $\beta$ -Fructofuranosidase from clavices purpurea, Biochem. J., 129 : 263~272.
- Fawzi, A. F. A. and M. M. Elfouly, 1979, Amylase and invertase activities and carbohydrate contents in relation to physiological sink in carnation, physiol. plant. 47 : 245~249.
- 福井作藏; 1969, 還元糖の定量法(東京大學出版會), p. 11.
- Gascon, S., Neuman, N. P., and J. O. Lampen, 1968, Comparative study of the properties of the purified internal and external invertase from yeast, J. Bio. Chem., 243(7) : 1573~1577.
- Glasziou, K. T. and K. R. Gayler, 1972, Storage of Sugars in stalks of sugar cane, The Botan. Rev., 38(4) : 471~489.
- Harvey, C. J., Simmon, M. K. and O. L. Curtis, 1972, sugar composition and invertase activity in lychee, J. Food Sci., 40 : 772~774.
- Harvey, C. J. and M. K. Simmon, 1976, Isolation and characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from papaya, J. Food Sci., 41 : 320~324.
- Hawker, J. S., 1969, Change in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grapeberries, phytochem., 8 : 9~17.
- Hawker, J. S., 1969, Insoluble invertase from grapes : An artifact of extraction, phytochem., 8 : 337~344.
- Hirai M., 1980, Sugar accumulation and development of loquat fruit, Japan Soc. Hort. Sci., 49(3) : 347~353.
- Hirai, S., Rokuhama, S. and S. Shimizu, 1986, changes of invertase activity in Japanese persimmon fruits during maturation, storage and processing, Nippon shokuhin kogyo Gakkaishi, 33(6) : 369~374.
- Hisajima, S., Arai, Y. and T. Ito, 1978, Cell wall bound invertase of persimmon and soy bean callus cells, J. Jap. Soc. starch Sci., 25(3) : 198~201.

17. Hobson, C. E. and J. N. Davis, 1971, The biochemistry of fruits and their products, The tomato, 2 : 437~482.
18. Iwatsubo, T., Nakagawa, H., Ogura, N. and H. Takehana, 1975, The development of cell wall bound  $\beta$  - fructofuranosidase with ripening and senescence of tomato fruit, Agr. Biol. chem. 39(4) : 907~908.
19. Kim, B. M. and S. K. chae, 1982, studies on Invertase from Korean ginseng, Korean. J. Food Sci. Technol., 14(1) : 1~5.
20. Komiyama, Y., Harakawa, M. and S. Ozawa, 1979, changes in physical and chemical compositions of plum during maturation, Nippon shokuhin Kogyo Gakkaishi, 26(7) : 305~310.
21. Komiyama, Y., Harakawa, M. and M. Tsuji, 1985, characteristics of Sugar composition of various fruits in relation to maturity and storage, Nippon shokuhin Kogyo Gakkaishi, 32(7) : 522~529.
22. Komiyama, Y., Harakawa, M. and M. Tsuji, 1984, Relationship between invertase activity and Sugar Composition in "sordum" plum during storage at high temperature (30°C) Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 31(11) : 726~731.
23. 李光然, 高光出, 金圭來, 金成福, 1978, 新稿果樹園藝各論, 郷文社, 서울, pp. 422~427.
24. Louis, A. Gattoni, 1968, Korea fruit culture, Horticulture Advisor : p 50~53.
25. Lyne, R. L. and T. A. Ress, 1971, Invertase and sugar content during differentiation of roots *Pisum sativum*, Phytochem., 10 : 2593~2599.
26. Manning K. and C. A. Maw, 1975, Distribution of acid invertase in the tomato plant, phytochem., 14 : 1965~1969.
27. Matsushita, K. and I. Vritani, 1974, change in invertase activity of sweet potato in response to wounding and purification and properties of its invertase, plant physiol., 54 : 60~66.
28. Marouf, B. A. and L. Zeki, 1982. Isolation and characterization of invertase from iraque date fruit, J. Food Sci., 47 : 678~679.
29. Mowlam, G. and S. Ito, 1982, Guava sugar components and related emzyme at stages of fruit development and ripening, Nippon shokuhin kogyo Gakkaishi, 29(8) : 472~476.
30. Nakagawa, H., Hashimoto, T., Ogura, N. and H. Takehana, 1972, Cell wall bound emzyme(properties of  $\beta$ -fructofuranosidase bound to tomato cell wall), Agr. Biol. Chem., 36(5) : 697~702.
31. Nakagawa, H., Kawasaki, Y. and N. Ogura, 1971, Purification and some properties of two types of  $\beta$  - fructofuranosidase from tomato fruit, Agr. Biol. Chem., 36 (1) : 18~26.
32. 岡本長夫, 1970, 果實の CA貯藏, 植物の化學調節, 5 : 168~171.
33. Ransey, J. C., 1975, Ph. D. Thesis, Oregon state Univ.
34. Rose, A. E., 1980, Microbial enzymes and bioconversions, volume Academic Press, New York, pp : 213~222.
35. Takehana, H. and H. Nakagawa, 1970, Purification and some properties of  $\beta$  - fructofuranosidase from tomato fruit, Tech. Bull. Fac. Hortic. Chiba Univ., 18 : 63~72.
36. Yamaki, S., Kajjura, I. and N. Kakiuchi, 1979, Changes in sugars and their related enzymes during development and ripening of Japanese pear fruit, Bull. Fruit Tree. Res., 6 : 15~26.