

밤의 Polyphenol물질과 Polyphenol Oxidase의 생화학적 특성

尹基潤 · 文廣德 · 孫泰華

慶北大學校 農科大學 食品工學科

Polyphenol Compounds and Biochemical Characteristics of Polyphenol Oxidase in Chinese Chestnut

Yun, Ki Yun · Moon, Kwang Deog · Sohn, Tae Hwa

Dept. of Food Engineering, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

This study was conducted to understand browning characteristics of Chinese Chestnut during processing and storage. For this, the isolation and identification of polyphenolic compounds and the biochemical characteristics of polyphenol oxidase(PPO) were investigated.

The content of total phenol was $6.5\mu\text{g/g}$ and it was consisted of ferulic acid, caffeic acid, synapic acid, p-coumaric acid, gallic acid and salicylic acid in order. PPO was purified 11.7 fold through ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose column chromatography and Sephadex G-200 column chromatography. Purified enzyme showed single protein and activity band by polyacrylamide gel electrophoresis.

The optimum pH and temperature of PPO were 5.9 and 45°C , respectively. The activity of PPO was lost 93% by exposing at 80°C for 15minutes. Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} increased the activity of PPO, but Fe^{++} , K^+ , Hg^{++} inhibited PPO at 10mM concentration. L-ascorbic acid, thiourea, sodium chloride and L-cystein were effective inhibitors of PPO.

The activity of PPO was higher for o-diphenols than other polyphenols. The Km value of PPO for catechol was 5mM.

緒 論

밤(*Castanea, mollissima Blume*)은 맛과 풍미가 독특하여 오래전부터 이용되고 있는 중요한 견과류로서 제레시에 생과로 소량이 사용되며 대부분이 단순가공하여 이용되어 왔다. 최근들어 밤의 생산량이 급증하여 이에 대한 대량이용에 관한 연구들로 밤의 탈피에 관한

연구¹⁵⁾를 비롯하여 통조림³¹⁾ 또는 밤분말의 제빵에 이용¹¹⁾ 및 밤의 저장에 관한 연구²¹⁾ 등이 이루어져 왔으며 성분에 관하여는 전분²^{7,32)} 및 지질^{22,23)} 등에 관한 연구가 이루어져 왔다.

Polyphenol 화합물은 당, carbonyl, carboxyl, amine등의 유도체로 자연계에 널리 분포되어 있으며¹²⁾ 식물의 대사, 호흡 등 생리작

용과 과채류의 리그닌화, 맛, 향기 및 색소생성에 중요한 역할¹³⁾을 한다. 또한 이는 식품의 가공 및 저장중에 polyphenol oxidase (o-diphenol: O₂ oxidase: EC 1.10.3.1, 이하 PPO라 칭함)에 의해 갈변하여 식품의 품질에 큰 영향을 미친다.²⁴⁾

Polyphenol 화합물에 관하여는 여러 종자 단백질¹⁴⁾, 통조림된 살구¹⁾, 버섯⁵⁾ 등에서 분리 동정된 바 있으며 PPO에 관하여는 버섯⁵⁾, 복숭아³⁴⁾, 사과²⁹⁾, 바나나⁹⁾ 등의 과채류에서 생화학적 특성등이 연구되고 있다.

한편, 밤에 있어서 polyphenol 물질에 대한 연구³⁰⁾는 있으나 PPO에 대한 효소학적 특성 및 정제에 관한 연구와 이의 갈변에 미치는 역할에 대한 보고는 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 밤의 가공중에 일어나는 갈변기구를 규명하는 연구의 일환으로 밤에 함유된 polyphenol 화합물을 분리, 동정하고 PPO의 생화학적 특성에 대하여 연구, 검토하였다.

재료 및 방법

공시재료

Table 1. The operating conditions of GC for polyphenol compounds analysis in chinese chestnut

| Items | Conditions |
|-----------------|---|
| Column | Chromosorb W 5% SE 30, 1.5mm × 4mm, glass |
| Temp. program | 130°C(2min.) - (5°C/min.) - 250°C(14min.) |
| Detector | F.I.D |
| Carrier gas | Nitrogen, 30ml/min. |
| Injection temp. | 270°C |
| Detector temp. | 280°C |
| Chart speed | 10mm/min. |

조효소액의 조제
Wong 등³⁴⁾, Flurkey 등⁷⁾의 방법에 따라 밤 시료에 20% polyethylene glycol(PEG20,000)과 냉아세톤을 가하고 마쇄하여 Acetone powder를 얻었다.

Acetone powder에 10mM sodium phosphate 완충용액(pH6.0)을 가하여 균질화 시

밤 시료는 경남 하동군에서 수확된 “축과”를 공시재료로 사용 하였다.

실험방법

Polyphenol 화합물의 추출

Polyphenol 화합물의 추출은 Golan 등¹⁰⁾과 中林 등²⁵⁾이 사용한 방법에 따라 시료에 아세톤을 가하고 마쇄하여 가열, 추출하고 여과하여 감압농축하여 얻은액을 다시 ethyl acetate로 추출, 농축하여 시료로 하였다.

Total phenol의 함량

시료를 아세톤으로 가열, 추출하여 얻은 추출액을 Folin-Denis법¹⁶⁾과 Diazo법²⁶⁾으로 정량하였으며 표준물질로는 Catechol을 사용하였다.

Polyphenol 화합물의 분리 및 동정

Horvat 등²⁸⁾의 방법에 따라 ethyl acetate추출물을 TMS화 시킨다음 GC(Pyec Unicam)로 분리하여 분리된 각 peak는 표준물질의 Retention time과 비교하여 동정하였으며 이때의 분석조건은 표 1과 같다.

킨다음 저온에서 원심분리하여 상정액을 조효소로 하였다.

효소의 정제

PPO의 정제는 藤本 등⁸⁾, Wong 등³⁴⁾, Katwa 등¹⁹⁾의 방법을 변형시켜 유안염석하여 원심분리하여 얻은 여액을 투석시킨후 5mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 평형시킨

DEAE-Cellulose Column에 주입시켜 농도구배법으로 분획하여 이중 활성이 강한 분획을 모아 PEG20,000으로 농축한 다음 10mM sodium phosphate 완충용액(pH6.0)으로 평형시킨 Sephadex G-200 Column에 주입시켜 분획하여 정제 하였다.

PPO의 활성측정

Wong등³⁴⁾과 Zenin등³⁶⁾의 방법에 따라 10mM Catechol 용액에 효소액을 반응시켜 420nm에서 흡광도를 측정하였으며 이때 효소액 1ml가 1분간 0.001의 흡광도를 변화시키는 것을 효소활성 1unit 나타냈으며 비활성도는 단백질 mg당 효소활성 unit로 표시하였다.

단백질의 정량

Bradford의 방법³⁵⁾에 따라 Coomassie Brilliant Blue G-250(CBBG-250)을 사용하여 측정하였으며 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

전기영동

Davis 법⁶⁾에 따라 tube당 3mA에서 3시간 전개시켰으며 단백질밴드는 CBBG-250 용액

으로 염색하고 효소활성 밴드는 菊谷이 사용한 방법¹⁸⁾에 따라 100mM catechol 용액에 30분간 gel을 반응시켜 확인 하였다.

결과 및 고찰

Polyphenol 화합물의 분리 및 정량

밤에 존재하는 polyphenol화합물은 그림 1과 2에서와 같이 Cinnamic acid 유도체인 Ferlic acid, Sinapic acid, p-Coumaric acid, Chlorogenic acid의 가수분해 산물인 Caffeic acid, triphenol류의 Gallic acid, carboxylic acid의 유도체인 Salicylic acid가 분리 동정되었으며 이들의 함량은 표2에서 보는바와 같이 total phenol함량이 6.5 μ g/g 이었고 그 중 Ferlic acid의 함량이 가장 높았으며 주로 monophenol류의 화합물이 동정되었는데 이는 다른식물 즉 땅콩¹⁴⁾, pecan nut²⁸⁾ 에서도 유사한 결과를 보여주었지만 밤에서 gallic acid가 가장 많은것으로 보고한 Senter³⁰⁾등의 보고와는 상이 하였다.

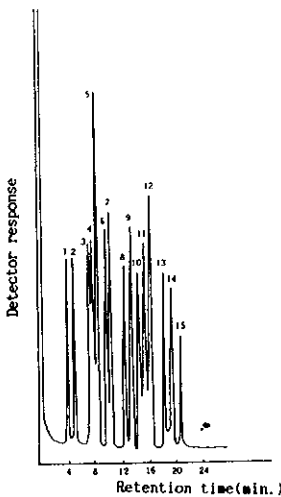


Fig. 1. Gas chromatogram of authentic polyphenols.
1: catechol, 2: methyl catechol, 3: salicylic acid
4: t-cinnamic acid, 5: pyrogallol, 6: p-hydroxybenzoic acid, 7: phloroglycinol, 8: umbelliferone, 9: protocatechuic acid, 10: syringic acid, 11: p-coumaric acid, 12: gallic acid, 13: ferulic acid, 14: caffeic acid, 15: sinapic acid

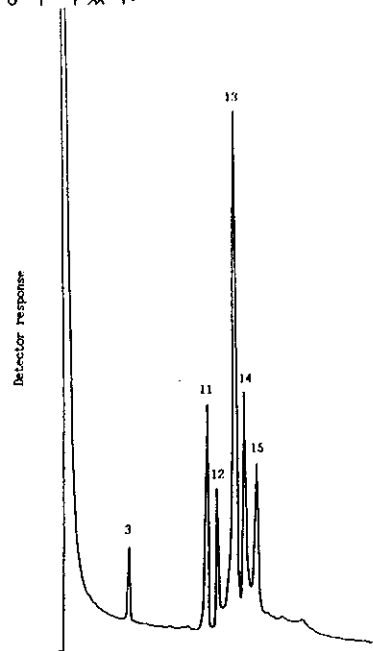


Fig. 2. Gas chromatogram of ethylacetate extracts from chinese chestnut.
3: salicylic acid, 11: p-coumaric acid, 12: gallic acid, 13: ferulic acid, 14: caffeic acid, 15: sinapic acid

Table 2. Contents of polyphenol component of chinese chestnut

| Components | Feruric acid | Cafeic acid | Synafic acid | p-Coumaric acid | Gallic acid | Salicylic acid | Total |
|-----------------------------|--------------|-------------|--------------|-----------------|-------------|----------------|-------|
| Content ($\mu\text{g/g}$) | 3.50 | 0.98 | 0.76 | 0.72 | 0.39 | 0.16 | 6.5 |

PPO의 분리 및 정제
 조효소액을 유안염석하고 DEAE-cellulose column chromatography하여 활성이 높은 분

획(11~21)을 모아 Sephadex G-200 Column chromatography한 결과 그림 3과 4에서 같이 단일의 효소활성 peak를 얻었다.

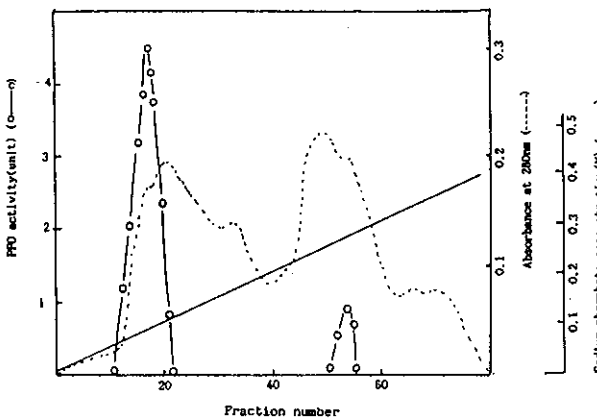


Fig. 3. Chromatogram of PPO on a DEAE-cellulose column.

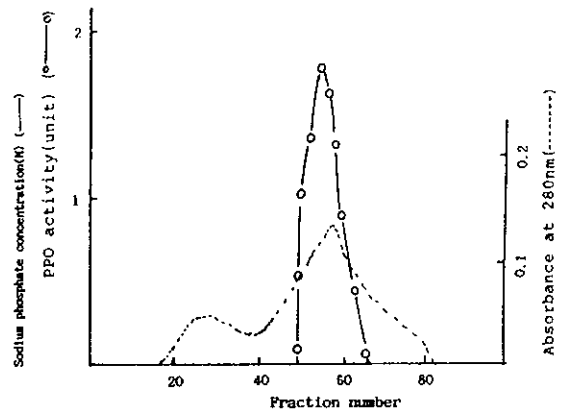


Fig. 4. Chromatogram of PPO on a Sephadex G-200 column.

Table 3. Purification of PPO from chinese chestnut

| Purification steps | Total activity (unit) | Total protein (mg) | Specific activity (unit/mg) | Yield (%) | Purification (fold) |
|--|-----------------------|--------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|
| Curde | 192 | 8.62 | 22.27 | 100 | 1 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation | 117 | 1.35 | 86.95 | 60.9 | 3.9 |
| DEAE-cellulose | 63 | 0.50 | 126.0 | 32.8 | 5.7 |
| Sephadex G-200 | 24 | 0.092 | 260.09 | 12.5 | 11.7 |

정제과정중 효소의 비활성도 및 정제도를 본 결과 표3에서와 같이 조효소액의 비활성

도는 22.27이었으며 정제된 효소의 비활성도는 260.9로서 조효소액 보다 11.7배 정제되었

으며 회수율은 12.5% 이었다.

전기영동

조효소액으로 부터 정제된 PPO를 전기영동한 결과 그림 5에서 보는 바와 같이 단일의 단백질 밴드와 단일의 효소활성 밴드를 확인했으며 효소의 Rm치는 4.43이었다.

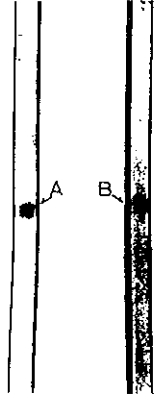


Fig. 5. Polyacrylamide disc gel electrophoresis patterns of PPO in chinese chestnut.

A: Protein band of purified PPO.
B: Activity band of purified PPO.

최적 PH

0.1M McIlvaine완충액을 사용하여 pH를 2.6에서 10까지 조절하여 PPO의 최적 pH를 조사한 결과 5.9에서 최대활성을 나타냈으며 이는 복숭아 (pH 7.0)³⁴⁾, 사과(pH 6.8)²⁰⁾보다는 낮았으나 버섯(pH 4.8)⁵⁾ 보다는 높았다.

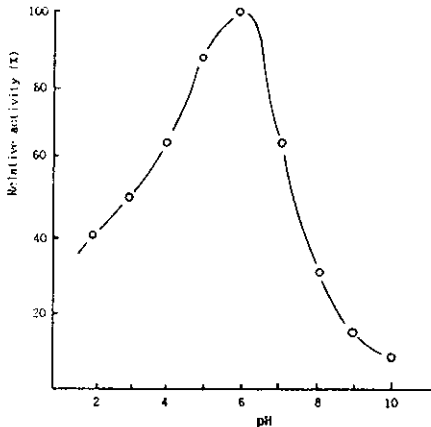


Fig. 6. Effect of pH on the activity of PPO.

최적온도

반응액의 온도를 20°C~80°C로 조절하여 효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과 그림 7에서와 같이 45°C에서 최대의 활성을 나타냈으며 이는 최적온도가 포도³³⁾(25°C)보다는 높고 표고버섯(50°C)⁵⁾ 보다는 낮았다.

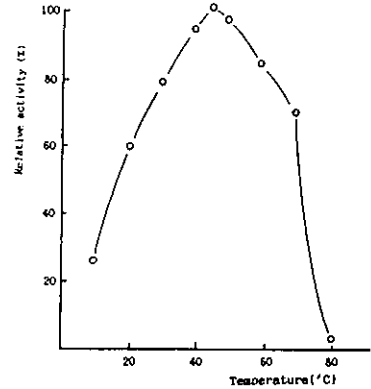


Fig. 7. Effect of temperature on the activity of PPO.

열안정성

효소반응액을 30°C~80°C의 각온도에서 15분간 열처리하여 급냉후 효소의 활성을 측정 한 결과 그림 8에서와 같이 50°C까지는 활성을 유지했으나 80°C에서는 거의 실활되었다.

이러한 결과는 60°C에서 효소활성이 급격히 실활되는 배과실¹⁷⁾ 보다는 열에 안정하였으나 80°C에서 30분 처리시도 50%만 실활되는 마늘²⁰⁾ 보다는 열에 불안정하였다.

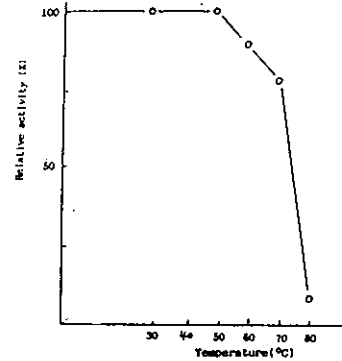


Fig. 8. Heat stability of PPO at various temperature.

금속이온의 영향

무기염의 농도를 10mM로 조절하여 효소활성에 미치는 금속이온의 영향을 조사한 결과 표 4에서 보는 것처럼 Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} 은 PPO의 활성을 약간 증가시켰으나 Fe^{++} , K^+ , Hg^{++} 는 PPO의 활성을 상대적으로 저해시켰다.

저해제의 영향

저해제의 농도를 1mM, 10mM, 20mM로 조절하여 PPO 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 표 5에서 보는 바와 같이 L-ascorbic acid, Thiourea, Sodium chloride, L-Cysteine의 저해 작용이 강했으며 EDTA, Boric acid 등은 저해 효과가 거의 없었다.

이는 Mathew 등²⁴⁾에 의하면 thiourea, EDTA 등이 효소의 prosthetic group인 Cu^{++} 와 결합하여 효소활성을 저해하는 chelator로 알

Table 5. Effect of inhibition on the activity of PPO

| Inhibitor | Concentration (mM) | Inhibition (%) |
|-------------------|--------------------|----------------|
| L-ascorbic acid | 1 | 30 |
| | 10 | 65 |
| | 20 | 90 |
| L-cystein | 1 | 15 |
| | 10 | 45 |
| | 20 | 70 |
| Sodium chloride | 1 | 65 |
| | 10 | 70 |
| | 20 | 80 |
| Thiourea | 1 | 15 |
| | 10 | 50 |
| | 20 | 75 |
| Boric acid | 1 | 0 |
| | 10 | 10 |
| | 20 | 25 |
| EDTA | 1 | 0 |
| | 10 | 25 |
| Potassium Cyanide | 1 | 0 |
| | 10 | 10 |
| | 20 | 10 |

려졌으나 EDTA는 Wiseman과 Lee³³⁾, 강등¹⁷⁾에 의해 저해효과가 거의 없는 것으로 보고한 결과와 일치하였다.

Table 4. Effect of metals on the activity of PPO.

| Salt | Relative activity(%) |
|----------|----------------------|
| None | 100 |
| $CuSO_4$ | 102 |
| $MgSO_4$ | 110 |
| $CaCl_2$ | 106 |
| $ZnSO_4$ | 102 |
| $FeSO_4$ | 93 |
| KCl | 93 |
| $HgCl_2$ | 77 |

* Concentration of salt was 10mM

기질특이성

각종 phenol화합물에 대한 기질특이성을 조사한 결과는 표 6과 같이 o-diphenol 류에 대해 비교적 높은 활성을 보였으며 그중 catechol에 대해 가장 높은 활성을 나타냈으며 monophenol류에는 활성을 나타내지 않았다.

Table 6. Substrate specificity of PPO

| Substrate | Concentration(mM) | Relative activity(%) |
|------------------|-------------------|----------------------|
| o-diphenol | | |
| Catechol | 10 | 100 |
| (+)-catechin | 10 | 89 |
| Methyl catechol | 10 | 73 |
| Chlorogenic acid | 10 | 79 |
| DL-DOPA | 10 | 16 |
| M-diphenol | | |
| Resocinol | 10 | 10 |
| Trihydroxyphenol | | |
| Pyrogarol | 10 | 63 |
| Gallic acid | 10 | 31 |
| Monophenol | | |
| p-cresol | 2.5 | 0 |
| L-tyrosine | 2.5 | 0 |
| p-coumaric acid | 2.5 | 0 |
| Ferulic acid | 2.5 | 0 |
| Salicylic acid | 2.5 | 0 |
| Sinapic acid | 2.5 | 0 |

* Relative activity of PPO on the catechol as 100.

기질에 대한 영향

Catechol 농도를 1mM~50mM까지 변화시키면서 효소의 활성을 측정하여 Line Weaver와 Burk가 제시한 double reciprocal plot로 밤 PPO의 Km치를 측정된 결과 그림 9와 같이 5mM로서 표고버섯(1.49mM)⁶⁾, 마늘(0.4mM)²⁰⁾ 보다는 친화력이 약했으나, 바나나(44mM)⁹⁾, 포도(15.9mM)³³⁾ 보다는 높은 기질 친화성을 나타내었다.

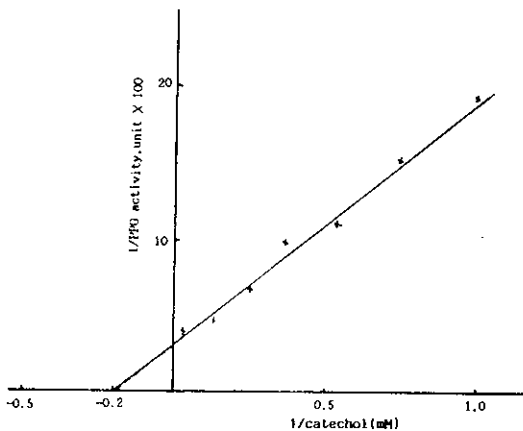


Fig. 9. Effect of substrate concentration.

요 약

밤과실의 가공 및 저장중 갈변기구를 규명하는 일환으로 밤에 함유된 polyphenol 화합물 및 PPO를 분리, 동정하고 PPO의 생화학적 특성에 대해 연구한 결과는 다음과 같다.

밤의 total phenol 함량은 6.5 μ g/g 이었고 ferulic acid, caffeic acid, synapic acid, p-coumaric acid, gallic acid, salicylic acid 순으로 함량이 높았다.

PPO를 분리, 정제하여 전기영동한 결과 단일의 단백질 및 효소활성밴드를 확인하였으며 정제된 효소의 비활성도는 260.9이고 조효소액보다 11.7배 정제되었다.

PPO의 최적 pH와 온도는 각각 5.9, 45°C였으며 효소활성은 80°C에서 15분 처리시 거의 실활되었다.

무기염의 영향을 본 결과 Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} 들은 효소활성을 증가시켰으나 Fe^{++} , K^+ , Hg^{++} 는 활성을 저해시켰다.

저해제로는 L-ascorbic acid, thiourea, sodium chloride, L-cysteine의 저해작용이 강했다.

밤의 PPO는 o-diphenol에 대한 강한 활성을 나타냈으며 특히 catechol에 대해 가장 강했으며 monophenol에는 활성을 나타내지 않았다.

PPO의 Km값은 catechol에 대해 5mM이었다.

인용문헌

1. A.S. EL-SAYED, and B.S. Luh: 1965, polyphenolic compounds in Canned apricots, J. food sci., Vol.30: 1106-1020
2. Alfred, M.M. and E.Harel: 1979, Polyphenol oxidase in plants, Phytochem., 18: 193-215
3. Bradford, M.M.: 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem., 72: 248-254.
4. Chrambach, A., Reisfeld, R.A., Wyckoff, M. and J. Zaccari: 1967, A Procedure for rapid sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis, Anal. Biochem., 20: 150-157.
5. 최상원, 손태화: 1987. 표고버섯의褐變現象과 polyphenol oxidase의 生化學的 特性, 경북대학교 박사학위논문.
6. Davis, B.J.: 1964, Disc electrophoresis, Ann. N-Y. Acad. Sci., 121: 405-427.
7. Flurkey, W.H. and J.J.Jen: 1978, Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peach, J. Food Sci., 43: 1826-

- 1831.
8. 藤本健四郎, 宮代正子, 金田尙志,: 1969, シイタケの酵素的褐變とその防止法について(I)(II), 榮養と食糧, 23(5): 40-47
 9. Galeazz, M.A., M. Sgarbier, V.C. and S.M. Constantinides: 1981, Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oxidase from a dwarf variety of banana, J.Food Sci., 46: 150-155.
 10. Golan, A., Kahn, V. and A.Y. Sadvoski: 1977, Relationship between polyphenols and browning in avocado mesocarp. Comparison between the Fuerte and Lerman Cultivars, J. Agric. Food Chem., 25(6): 1253-1259
 11. 韓判柱, 申斗鎬: 농공이용연구소 시험연구보고서 농촌진흥청, p.685(1978)
 12. Harborne, J.B.: Biochemistry of phenolic compounds, Academic press. London and New York, 1964, p.618
 13. Huang, H.M. and B.L. Odell.: 1986, Phenolic acid content of food plant and possible nutritional implications, J. Agric. Fd. Chem., 34: 48-51.
 14. J.A. Maga and K. Lorenz: 1974, Gas-liquid chromatography separation the free phenolic acid fraction in various oilseed protein sources, J. Sci. Fd. Agric., 25:797-802
 15. Numerization of peeling easiness and role of phenolic compounds of the pellicee in the adhesion between the pellicee and Embryo in Comparison of Japanese and Chinese chestnut., Japan Soc. Hort. Sci., 50(3): 363-371.
 16. J. Slyn, M.A.: 1970, Methods in food analysis, Acad. press, New York, 710-711.
 17. 강윤환, 손태화, 최종욱: 1986, 배과실의 polyphenol oxidase의 분리정제 및 그 특성, 경북대 농학지, 4: 55-64.
 18. 菊谷元資: 1969, Disc 電氣泳動法(そのII), 化學と生物, 7: 620-627
 19. Kafwa, L.C., Ramakrishna, M. and M.R. Regharedra Rao: 1982, Purification and properties of polyphenol oxidase from mango peel, J.Food Biochem., 6: 217-228
 20. 金銅淵, 李鍾旭, 金良培: 1981, 마늘 (Allium Sativum L.) Polyphenol oxidase 특성. 한국농화학회지, 24(3): 167-172
 21. 이병영, 윤인화, 김영배, 한판주, 이정명: 1985. 밤의 polyethylene film 저장효과, 한국식품과학회지, 17(5) 331-335.
 22. 李鍾旭, 金載勳: 1982, 밤의 내과육 및 외과육의 지질조성, 한국농화학회지, 25(4): 239-247
 23. 이종욱, 金恩先, 金銅淵: 1983. 밤의 구성지질 및 구성지방산의 조성, 한국농화학회지, 26(1): 19-26
 24. Mathew, A.G. and A.B. Parpia: 1971, Food browning as a polyphenol reaction. Ibid, 19: 75-132.
 25. 中林敏郎: 1967, 果實および茶類のタンニン成分.(第1報)バラ科果樹果實のタンニン成分. 日食工誌, 15(2):73-78
 26. 栽培植物分析測定法, 1976, 日本作物分析法委員會, 養賢堂, 東京, p.419.
 27. 박홍현, 김성곤, 변유량, 이신영.: 밤전분 수용액의 리올로지 특성: 1989, 한국식품과학회지, 21(6): 815-819
 28. Robert J., Horvat and Samul D. Senter: 1980, A Gas-liquid chromatographic method for analysis of phenolic acid in plants, J. Agric. food Chem., 28(6): 1292-1295
 29. Satjawat Charaphong C, Rymal, K.S., Dozier, W.A. and R.C. Smith: 1983, polyphenol oxidase system in red delicious apples, J. Food Sci., 48:1879-1880
 30. S.D. Senter, R.J. Horvat, and W.R. Forbus: 1983, Comparative GLC-MS analysis of phenolic acid of selected tree nut, J. Food sci., 48:778-779, 824
 31. 徐奇泰, 韓判柱, 李聖鍾: 1974, 밤가공에 관한 研究, 한국식품과학회지, 6(2): 98-108
 32. S. Y. Xu and Charles F. Shoemaker: 1986, Gelatinization properties of Chinese Water

- Chestnut Starch and Lotus Root Starch, J. Food Sci. 51(2): 445-449
33. Wisseman, K.W. and C.Y. Lee: 1981, Characterization of polyphenol oxidase from ravat 51 and Niagara grapes, J. Food Sci., 46: 506-510
34. Wong, T.C., Luh, B.S. and J.R. Whitaker: 1971, Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of clingstone peach, Plant Physiol., 48: 19-23
35. Zenin, C.T. and Y.K. Park: 1978, Isoenzymes of polyphenoloxidase from high L-DOPA Containing Velvet beam, J. Food Sci., 43: 646-647.