

## 연화 딸기의 Phenylalanine Ammonia-lyase에 관한 연구

이 광 회 · 윤 경 영\*

대구전문대학 식품영양과, \*영남대학교 생활과학대학 식품영양학과

### Purification of Phenylalanine Ammonia-lyase from Strawberry Fruits during Ripening

Kwang-Hee Lee and \*Kyung-Young Yoon

Dept. of Food and Nutrition, Tae-Gu Junior College, Tae-gu, Korea

\*Dept. of Food and Nutrition, Yeung-Nam University, kyung-san 712-749, Korea

#### Abstract

The activity of PAL, an initial and key regulatory enzyme in biosynthesis of phenolics, peaked during ripening stage. The enzyme activities were 5.60 and 4.25 units /100g fr. wt, in ripening and overripening stages. The increase in PAL activity in ripening strawberry fruits is due to de novo synthesis of the enzyme. PAL extracts from ripe strawberry fruits have a native molecular weight of about 260,000 Da.

Key words : PAL, enzyme activity, native molecular weight

#### 서 론

딸기는 풀딸기와 나무딸기가 있다. 우리가 상용하는 양딸기는 풀딸기에 속하는 장미과의 다년초이다. 양딸기의 원산지는 남미이며, 품종이 다양하고 그에 따라 맛과 모양, 색깔 등이 다양하다.<sup>1)</sup> 딸기는 생식뿐 아니라 잼, 젤리, 제과, 냉동딸기, 요구르트의 원료 등으로 가공되어 해마다 수요가 증가하고 있지만, 과실의 조직이 매우 연하고 상하기 쉬워 저장중에 품질저하를 초래하고 가공에 많은 문제를 일으킨다. 이러한 문제들을 해결하기 위해 많은 연구자들이 딸기의 연화 메카니즘과, 저온저장<sup>2)</sup>, CA저장<sup>3,4)</sup>, 약품처리<sup>5)</sup>나, 포장<sup>4)</sup> 등을 연구하여 저장성과 상품성을 높이기 위해 노력하고 있다.

과실의 연화는 효소적 연화와 비효소적 연화로 나눌 수 있다. 효소적 연화는 성숙과 저장중에 polygalacturonidase, pectinmethylesterase, cellulase,  $\beta$ -galactosidase 등의 효소가 세포벽을 분해하여 일어나고, 비효소적 연화는 세포벽으로부터  $Ca^{2+}$ 이 유리되고 세포가 비대성장하여 세포벽이 붕괴되어 일어난다.<sup>6,7)</sup> 딸기는 대표적인 비효소적 연화 과실로서 연화 정도는 색이나 향기 등의 물리적인 척도로 나타내고 있다.

Phenylalanine ammonia-lyase(EC 4.3, 1.5)는 딸기의 2차적 대사에 관여하는 효소로, 풍미나 색소, 향기 같은 페놀화합물의 합성을 조절하고 페닐프로파노이드 합성의 첫단계인 L-페닐알라닌의 탈아미노반응에 의한 *trans*-아미노산과  $NH_4^+$ 의 발생을 조절하여 딸기의 맛과 향에 영향을 준다.<sup>8~12)</sup>

본 연구는 딸기 연화중에 일어나는 물리적인 변화의 주원인인 phenylalanine ammonia-lyase를 추출·분리하고 연화중의 활성변화를 측정할 결과이다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 재료

딸기는 경남 고령군 일대에서 재배한 '보교'종을 채취하여 속도별로 4단계로 나누어 사용하였다.

##### 2. 효소의 추출

수용성 단백질과 세포벽분해효소의 추출은 Hobson 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 200g의 과육에 10mM 초산나트륨 완충용액 (pH 5.0) 400ml를 가하여 균질화시켜 3시간 동안 추출한 다음, 8,000×g로 20분간 원심분리하여 상

징액을 시료로 하였다. 수용성 단백질을 추출하고 남은 잔사에 증류수를 2배를 가해 균질화시킨 후 NaCl을 1M 가해 3시간 동안 저어준 다음, 8000×g로 20분간 원심분리하였다. 상징액을 염가용성 단백질과 효소액으로 하였다. 세포벽 단백질의 추출은 수용성 단백질과 염가용성 단백질을 추출하고 남은 잔사를 Jarvis<sup>14)</sup>의 방법으로 요오드 정색반응이 나타나지 않을 때까지 메탄올로 세척하여 당성분을 제거하고, 다시 클로로포름으로 3회 세척 여과한 다음 얻은 잔사를 동결건조하여 세포벽 성분으로 하였다. 동결건조된 세포벽성분은 0.025% NaN<sub>3</sub> 용액과 정제한 phenylalanine ammonia-lyase를 함유한 10mM 초산나트륨 완충용액 (pH 4.5)에 현탁시켜 30℃ 항온기에서 48시간 방치한 후 가용화된 단백질을 추출하여 세포벽 단백질과 효소액으로 하였다.

### 3. Phenylalanine ammonia-lyase의 활성 측정

Cheng과 Breen<sup>9)</sup>의 방법에 따라 0.06μM L-페닐알라닌 1ml, 30mM 붕산나트륨 완충용액(pH 8.8) 1.5ml와 0.5ml의 효소액을 혼합하여 30℃에서 1시간 반응시킨 후 0.1ml의 6N HCl 용액으로 반응을 정지시키고, 290nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성은 30℃에서 30분간 생성된 1mM의 cinnamate 양을 1unit로 하였다.

### 4. Phenylalanine ammonia-lyase의 추출

Bartley<sup>15)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. 딸기 500g에 아세트산과 0.2 M Tris-HCl 완충용액 (pH 8.9)을 9:1로 혼합한 용액 1l를 가하여 균질화한 다음 Whatman No.541 여과지로 여과하여 잔사를 5mM 인산나트륨 완충용액 (pH 7.2)에 현탁하고, 톨루엔 3방울을 가하여 3일간 둔 다음 원심분리하여 상징액을 취했다. 이를 다시 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 85% 포화, 염석하고 15,000×g로 10분간 원심분리 한 다음, 증류수에 용해하여 10mM 초산나트륨 완충용액에 48시간 투석하였다. 이 투석액을 20,000×g로 15분간 원심분리한 상징액을 Diaflo PM10 한외 여과막 (Mw. cutoff ; 10,000)의 Amicon Diaflo 장치로 질소기류하에서 가압, 농축한 후 효소액으로 사용하였다.

### 5. Phenylalanine ammonia-lyase의 분리 및 정제

효소액 10ml를 CM-cellulose 컬럼(2.0×35cm)에 흡착시킨 다음, 0~1.0M의 NaCl 농도기울기로 용출시켰다. 분리된 효소액은 Diaflo PM10 한외 여과막 (Mw. cutoff ; 10,000)을 부착한 Amicon Diaflo 장

치로 질소기류 하에서 가압, 농축하였다. 농축 효소액을 10mM 초산나트륨 완충용액 (pH 4.5)으로 평형화시킨 Sephacryl S-200 컬럼(2.0×35cm)에 10ml 주입하여 유속 0.25ml/min, 20분 간격으로 크로마토그래피하였다.

### 6. 겔 크로마토그래피에 의한 효소의 분자량 측정

분자량은 Whitaker<sup>16)</sup>의 방법에 따라 Sephacryl S-200 겔 크로마토그래피로 측정하였다. Sephacryl S-200 컬럼 (2.0×35cm)을 10mM 초산나트륨 완충용액으로 평형시켜 void volume (V<sub>0</sub>)을 구하고, 칼럼을 완전히 세척한 후 표준단백질을 칼럼에 주입하여 각각의 유출량(V<sub>e</sub>)을 구한 다음 표준단백질의 분자량에 대한 V<sub>e</sub>/V<sub>0</sub>을 도식한 검량선에 의해서 각 효소의 분자량을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

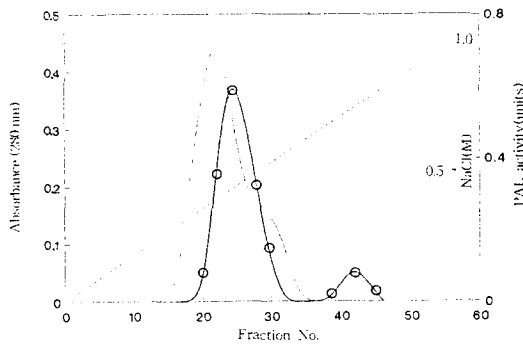
효소활성은 추출용매에 따라 수용성, 염가용성, 세포벽 분획으로 나누어 연화의 단계별로 측정하였다.

Table 1은 phenylalanine ammonia-lyase의 활성을 측정한 결과이다. 수용성 분획에서는 완숙기까지 경미한 활성 증가를 보이다가 과숙기에서는 활성이 급격히 감소하고 염가용성 분획에서는 딸기가 연화할수록 활성이 증가하였다. 세포벽 분획은 감소하였고, 총 phenylalanine ammonia-lyase의 활성은 완숙기까지는 증가하다가 과숙기에 감소하였다. phenylalanine ammonia-lyase는 딸기의 색소나 향기 성분의 연구에서 많이 보고되었고, 빛에 대응한 *de novo* 합성이나 성숙 중의 합성은 이미 알려져 있다.<sup>17)</sup> 특히 딸기에서 안토시

**Table 1. Changes in the activity of phenylalanine ammonia-lyase extracted from strawberries during ripening**

Enzyme activity (units) <sup>1)</sup>	Stage			
	Mature green	Turning	Ripening	Over ripening
Water-soluble fraction	2.48	2.74	2.91	1.29
Salt-soluble fraction	1.96	1.96	2.04	2.22
Cell wall fraction	0.83	0.86	0.65	0.74
Total	5.28	5.56	5.60	4.25

1) 1 unit is defined as the amount of enzyme required for the formation of 1 mol of product in 1 hour.



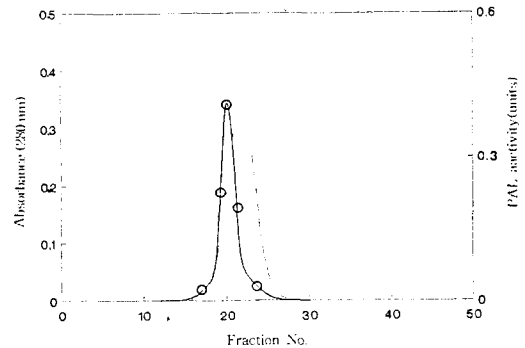
**Fig. 1. Ion exchange chromatography of phenylalanine ammonia-lyase from strawberries on a column of CM-cellulose.** Column size ; 2.0×35cm, flow rate ; 0.25ml/min.

아닌의 축적과 더불어 증가하는 결과를 Given 등<sup>18)</sup>이 보고한 바 있고, Tan<sup>19)</sup>은 사과에서 안토시아닌과 phenylalanine ammonia-lyase의 관계를 보고하며, 연화가 진행됨에 따라 활성이 증가한다고 하였다.

딸기의 속도는 보통 물리적인 방법, 즉 색깔이나 경도 등으로 판단하며, 딸기 속도 측정에 phenylalanine ammonia-lyase의 활성은 좋은 지침이 될 수 있을 것으로 생각한다.

딸기의 2차대사에 관련이 깊은 phenylalanine ammonia-lyase를 겔 크로마토그래피로 분리·정제하였다. 결과는 Fig. 1과 같이 fraction No. 19~24에서 한 개의 활성피크와 fraction No. 38~40에서 또 하나의 활성피크가 확인되었다. 이 효소액을 모아 Diaflo PM 10 환의 여과막으로 질소기류 가압하에서 Amicon Diaflo 장치로 농축한 다음 Sphacryl S-200 컬럼으로 분리한 결과는 Fig. 2와 같이 fraction 19~25에서 한 개의 피크가 나타난다.

효소액을 CM-cellulose와 Sphacryl S-200 컬럼으로 정제한 결과는 Table 2와 같다. 아세톤 처리로 효소



**Fig. 2. Gel chromatography of phenylalanine ammonia-lyase on a column of Sphacryl S-200.** Column size ; 2.0×35cm, flow rate ; 0.25ml/min.

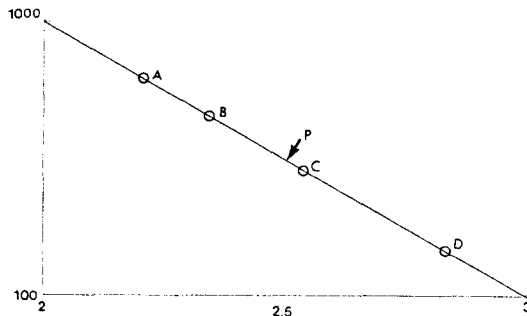
액은 약 1.14배가 정제되었고,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  처리로 2.09배로 증가하였다. CM-cellulose의 이온 교환 크로마토그래피 결과 비활성은 26.38units/mg-prot, 정제율은 5.90배였다. Sphacryl S-200의 겔크로마토그래피로 정제한 효소액은 비활성도 115.08 units/mg-prot, 정제율은 18.11%, 정제 배수는 25.74배의 결과를 나타냈다.

Phenylalanine ammonia-lyase의 분자량을 측정하기 위해 표준단백질과 효소를 Sphacryl S-200의 겔크로마토그래피한 결과는 Fig. 3과 같다. 딸기에서 분리·정제한 PAL의 phenylalanine ammonia-lyase의 분자량은 260,000 이었다. Zimmermann과 Hahlbrock<sup>20)</sup>는 식물세포에서 서브유닛 83,000의 tetramer인 phenylalanine ammonia-lyase를 정제하였고, Schopfer<sup>21)</sup>는 mustard에서 분자량 300,000의 phenylalanine ammonia-lyase를 분리하였다. Ife와 Haslam<sup>22)</sup>이 옥수수에서 분리·정제한 phenylalanine ammonia-lyase의 분자량은 306,000이다.

**Table 2. Summary of the purification of phenylalanine ammonia-lyase extracted from strawberries**

Purification step	Total activity (units) <sup>1)</sup>	Protein content(mg)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extract	42.56	9.66	4.40	100.00	1.00
Aceton powder	30.2	4.76	6.34	70.95	1.44
Ammonium sulfate	22.71	2.42	9.38	53.35	2.13
CM-cellulose	15.13	0.42	36.02	35.54	8.18
Sphacryl S-200	8.90	0.06	148.33	20.91	3.71

1) 1 unit is defined as the amount of enzyme required for the formation of 1 mol of product in 1 hour.



**Fig. 3. Estimation of molecular weight of phenylalanine ammonia-lyase extracted from strawberries by Sephacryl S-200 gel filtration.** A : thyroglobulin(Mw. 669,000), B : ferritin(Mw. 440,000), C : catalase(Mw. 232,000), D : aldolase(Mw. 158,000) P : PAL.

**요 약**

딸기의 2차대사에 관여하는 phenylalanine ammonia-lyase는 풍미나 색소, 향기 등에 큰 영향을 미치며 속도 측정지표로 여겨진다. phenylalanine ammonia-lyase는 숙성 전단계에 걸쳐 활성을 나타내기는 하나 완숙기와 과숙기에 그 활성이 뚜렷이 증가하였다. 이는 딸기의 숙성과 더불어 *de novo* 합성이 되기 때문으로 보인다. 분자량은 겔 크로마토그래피로 260,000으로 나타났다.

**참고문헌**

1. 유태종 : 봄의 식품, 딸기 박영사, 식품카르테, 22(1985).
2. Smith, R. B. : Controlled atmosphere storage of red-cort strawberry fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117(2), 260,(1992).
3. El-Kazzaz, M. K., Sommer, N. F. and Fortlage, R. J. : Effect of different atmospheres on postharvest decay and quality of fresh strawberries. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*, Vol. 73, No. 2, (1983).
4. Brown, K. M., Geeson, J. D. and Dennis, C. : The effects of harvest date and CO<sub>2</sub>-enriched storage atmospheres on the storage and shelf-life of strawberries. *J. Hort. Sci.*, Vol 59(2), 197, (1984).
5. Ponappa, T., Scheerens, J. C and Miller, A. R. : Vacuum infiltration of polyamines increases firmness of strawberry slices under various storage con-

- ditions. *J. Food Science*, Vol. 58, No. 2, (1993).
6. Juan, F. B., Rocio, R., Guillen, R., Jimenez, A. and Heredia, A. : Activity of cell wall-associated enzymes in ripening olive fruit. *Physiol. Plant.*, 93, 651(1995).
7. Huber, D. J. : The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Horticultural Review.*, 5, 169(1983).
8. Erez, A. : Possible errors in quantitative determination of phenylalanine ammonia-lyase activity by spectrophotometric methods. *Plant Physiol.* 51, 409 (1973).
9. Cheng, G. W. and Breen, P. J. : Activity of phenylalanine ammonia-lyase and concentration of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *J. Amer. Soc. Hort. sci.*, 116(5), 865 (1991).
10. Given, N. K., Venis, M. A., and Grierson, D. : Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *J. Plant Physiol.*, Vol. 133, 25(1988).
11. Perez, A. G., Rios, J. J., Sanz, C. and Olias, M. : Aroma components and free amino acids in strawberry variety chandler during ripening. *J. Agric. Food chem.*, 40, 2332(1992).
12. Schroeder, J., Kreuzaler, F., Schaefer, E. and Hahlbrock, K. : Concomitant induction of phenylalanine ammonia-lyase and flavanone synthase mRNAs in irradiated plant cells. *J. Biol. Chem.*, 254, 57(1961).
13. Hobson, G. E., Richardson, C. and Gillham, D. J. : Release of protein from normal and mutant tomato cell walls. *Plant Physiol.*, 71, 635(1983).
14. Jarvis, M. C. : The preparation of calcium-bond pectin in plant cell walls. *Planta*, 154, 344(1982).
15. Bartley, I. M. :  $\beta$  Galactosidase activity in ripening apple. *Phytochemistry*, 13, 2107(1974).
16. Whitaker, J. R. : Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on sephadex. *Anal. Chem.*, 35, 1950(1963)
17. Creasy, L. L. : The role of enzyme inactivation in the regulation of synthetic pathway. *Physiol. Plantarum*, 71, 389(1987).
18. Given, N. K., Venis, M. A. and Grierson, D. : Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from strawberry fruit and its synthesis during ripening. *J. Plant Physiol.*, 133, 31(1988).
19. Tan, S. C. : Relationships and interactions between phenylalanine ammonia-lyase, phenylalanine ammonia-lyase inactivating system, and anthocyanin in apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 104(5), 581(1979).
20. Zimmermann, A. and Hahlbrock, K. : *Arch. Biochem. Biophys.* 166, 54(1975).
21. Schopfer, P. : *Planta*, 101, 339(1971).
22. Ife, R. and Haslam, E. : *Chem. Commun.* 2818(1971).