

감자 Polyphenol Oxidase의 열안정성

김나영 · 이민경 · 박인식 · 방극승 · 김석환[†]
동아대학교 식품과학부

Thermostability of Polyphenol Oxidase from Potato (*Solanum tuberosum* L.)

Na-Young Kim, Min-Kyung Lee, Inshik Park, Keuk-Seung Bang and Seok-Hwan Kim[†]

Faculty of Food Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

Abstract

Factors affecting thermostability of polyphenol oxidase (PPO) from potato were studied for the purpose of providing useful information for food processing operations. The enzyme was most stable at pH 7.0 and it was inhibited to 70% after heat treatment at 80°C for 1 min. The z-value for the thermal inactivation of the PPO was $12.17 \pm 0.58^\circ\text{C}$. The thermostability of the enzyme was reduced by addition of sodium chloride. And the activity was inhibited by addition of reducing reagents such as 2-mercaptoethanol and dithiothreitol.

Key words: potato, polyphenol oxidase, thermostability

서 론

Polyphenol oxidase(PPO, *o*-diphenol : O₂ oxidoreductase, EC 1.10.3.1)는 채소와 과일에서 일반적으로 발견되고 Cu를 함유한 효소이다. Monohydroxyphenol를 *o*-dihydroxyphenol로 hydroxylation시키는 반응과 *o*-dihydroxy compounds를 quinone류로 산화시키는 두 가지 반응이 있으며 이렇게 하여 생성된 quinone류가 중합되어 갈색을 띠게 되는 것이다(1). 이 효소적 갈변은 채소와 과일 주스의 제조, 감자 튀김 등의 가공식품의 제조 과정에서 변색 등을 일으켜 품질저하를 일으키므로 식품가공에 중요한 문제이다(2-5). 여러 보고들에 의하면, 열처리로 인한 PPO 활성의 저해가 매우 효과적인 방법이라 제시하였고(6-8), 70~90°C에서 단시간동안 열처리가 효소 촉매작용 파괴에 가장 효과적이다(2). 또한 장시간 열처리 과정은 식물조직의 polyphenol oxidase의 불활성화보다 오히려 활성화를 일으키기 때문에 단시간 열처리가 중요하다. 그러나 높은 온도에서의 열처리는 좋지 않은 질감과 나쁜 풍미를 일으킬 수도 있다(3,9). 그리고, thiol 화합물들이 여러 가지 과일과 채소의 PPO를 효과적으로 저해시킴이 보고된 바 있다(10-14). 감자 PPO의 효소의 특성에 관한 연구는 일부 수행되었으나(15), 열안정성에 미치는 다양한 조건에 관한 연구는 미약하다. 따라서 본 연구는 감자를 이용하는 식품가공 과정에서 생성될 수 있는 PPO에 의한 효소적 갈변현상을 억제시키기 위한 조사로서 감자 PPO의 열안정성에 미치는 다양한 조건에 관하여 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 catechol, L-cysteine, glutathione과 dithiothreitol은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였고, 감자는 부산광역시 사하구 하단동 근처 시장에서 구입하였다.

조효소액 조제

감자(100 g)에 50 mM phosphate buffer(pH 6.7)를 100 mL를 가하여 mixer로 5분 동안 균질화시킨 후 cheese-cloth로 여과한 다음 4°C, 15,000×g에서 20분 동안 원심 분리하여 상등액을 조효소로 사용하였다.

효소활성 측정

Zauberman 등(16)의 방법으로 감자로부터 추출된 polyphenol oxidase activity는 spectrophotometric procedure (Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000)로 측정하였다. 50 mM phosphate buffer(pH 6.7) 2.2 mL와 0.2 M catechol 0.2 mL에 효소액 0.1 mL를 첨가하여 실온에서 반응시켜 420 nm에서 1분간 직선적으로 변하는 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소활성의 1 unit는 1분간 0.001의 흡광도를 변화시키는 효소의 양으로 표시하였다.

효소의 열안정성 측정

온도의 효과: 효소액을 45°C에서 80°C까지의 온도에서 30분간 가열한 후 50 mM phosphate buffer(pH 6.7) 2.2 mL와 0.2 M catechol 0.2 mL에 가열한 효소액을 첨가하여 잔존

[†]Corresponding author. E-mail: shkim@daunet.donga.ac.kr
Phone: 82-51-200-7321. Fax: 82-51-200-7525

하는 효소활성을 효소활성 측정법으로 열처리 전과 비교하였다.

pH의 효과 : 효소액의 pH를 pH 4.0에서 pH 9.0까지 다양하게 변화시킨 후 55°C에서 30분간 열처리하여 50 mM phosphate buffer(pH 6.7) 2.2 mL와 0.2 M catechol 0.2 mL에 가열한 효소액을 첨가하여 잔존하는 효소활성을 효소활성 측정법으로 열처리 전과 비교하였다.

염, 당 및 gelatin의 첨가의 효과 : 효소액에 2%의 sodium chloride, glucose, sucrose 및 gelatin을 첨가하여 55°C에서 15분간 방치 후 50 mM phosphate buffer(pH 6.7) 2.2 mL와 0.2 M catechol 0.2 mL에 가열한 효소액을 첨가하여 효소활성을 열처리 전과 비교하였다.

염의 농도별 첨가 효과

Sodium chloride의 농도를 0%에서 3%까지 다양하게 변화시켜 효소액을 첨가한 후 55°C에서 15분간 열처리하여 50 mM phosphate buffer(pH 6.7) 2.2 mL와 0.2 M catechol 0.2 mL에 가열한 효소액을 첨가하여 잔존하는 효소활성을 측정하여 열처리 전과 비교하였다.

환원제의 첨가 효과

L-Cysteine, glutathione, dithrothreitol, 2-mercaptoethanol과 같은 다양한 환원제를 효소액에 0.1 mM이 되게 첨가한 후 50 mM phosphate buffer(pH 6.7) 2.2 mL와 0.2 M catechol 0.2 mL에 효소액을 첨가하여 효소활성을 첨가 전과 비교하였다. 또한 2-mercaptoethanol의 농도를 0에서 0.1 mM까지 다양하게 변화시켜 효소액에 첨가한 후 효소활성을 비교 측정하였다.

결과 및 고찰

열안정성에 대한 온도의 효과

Fig. 1은 감자 PPO의 열안정성을 나타낸 것이다. 45°C와 50°C에서는 30분 열처리 후에도 각각 약 86%와 72%의 높은 잔존 효소활성을 보였으나, 70°C에서는 5분간의 열처리에 효소 활성이 급격히 저하되었고 80°C에서는 5분 이내에 효소 활성이 완전히 저해되었다. Duangmal과 Apenten(15)은 70°C에서는 10분간 가열로 토란의 PPO가 완전히 저해되었다고 보고하였다. Fig. 2는 감자 PPO의 D value(Decimal reduction time)를 나타낸 것이다. 감자 PPO는 50°C 이하에서는 비교적 안정하였으나 60°C 이상에서는 불안정하였다. 따라서 감자 PPO는 내열성 효소가 아닌 것으로 사료된다. 감자 PPO의 열안정성에 대한 z-value는 $12.17 \pm 0.58^\circ\text{C}$ 이며 이것은 사과($20.08 \pm 0.75^\circ\text{C}$), 포도($13.02 \pm 2.24^\circ\text{C}$)와 자두($17.60 \pm 1.24^\circ\text{C}$)보다 낮았지만 avocado의 ($6.08 \pm 0.32^\circ\text{C}$)보다는 높았다(17).

열안정성에 대한 pH의 효과

Fig. 3은 열안정성에 미치는 pH의 효과를 나타낸 것으로

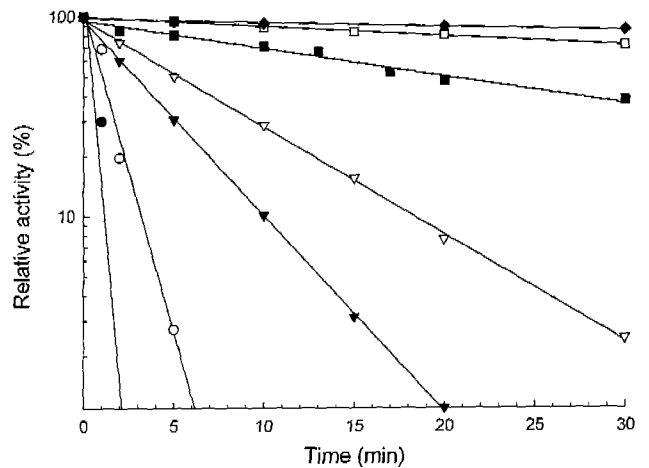


Fig. 1. Thermostability of polyphenol oxidase from potato (50 mM phosphate buffer; pH 6.7) at 45°C (◆), 50°C (□), 55°C (■), 60°C (▽), 65°C (▼), 70°C (○) and 80°C (●).

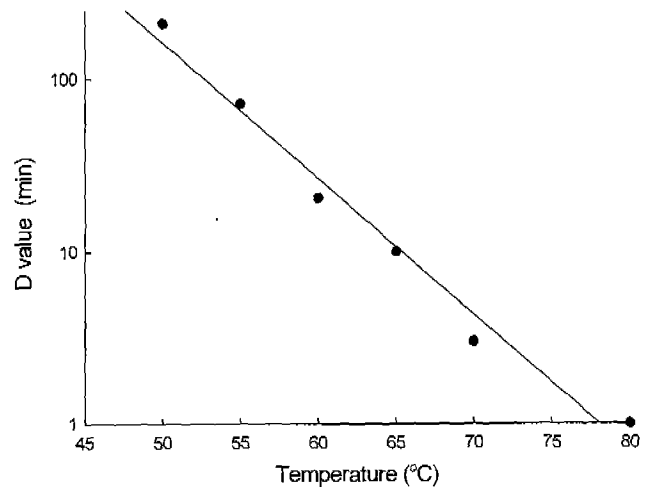


Fig. 2. Variation of decimal reduction time with temperature for polyphenol oxidase from potato.

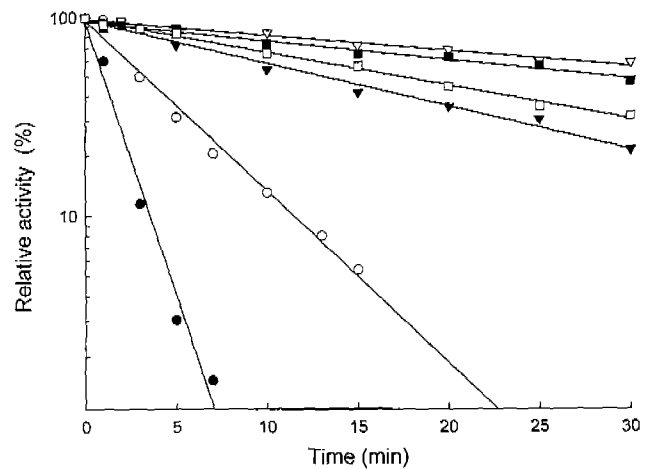


Fig. 3. Effect of pH on thermostability of polyphenol oxidase from potato (50 mM phosphate buffer; pH 6.7) at pH 4.0 (●), pH 5.0 (○), pH 6.0 (▼), pH 7.0 (▽), pH 8.0 (■) and pH 9.0 (□).

감자 PPO는 pH 7.0에서 가장 높은 안정성을 보였고, pH 8.0 과 pH 9.0에서도 비교적 높은 안정성을 나타내어 산성 용액 보다 알칼리 용액에서 더 안정함을 알 수 있었다.

열안정성에 대한 염, 당 및 gelatin의 첨가 효과

식품가공 중에 첨가될 수 있는 염, 당 및 단백질이 PPO의 열안정성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 감자 PPO에 2% sodium chloride, glucose, sucrose 및 gelatin을 첨가한 후 효소의 안정성을 조사하였다(Table 1). 2% sodium chloride 첨가했을 경우에는 효소의 열안정성이 크게 감소되었다.

열안정성에 대한 염의 농도별 첨가 효과

Fig. 4는 sodium chloride를 농도별로 첨가하여 55°C에서 15분간 보관 후 잔존하는 효소활성을 측정하였다. 첨가한 sodium chloride의 농도가 높을수록 감자 PPO의 열안정성이 강하게 저해되었다. 3% sodium chloride 첨가 시에는 약 70%까지 저해되었다. Luh와 Phithakpol(18)은 3% sodium chloride 용액(0.51 M)이 복숭아의 효소적 갈변을 억제하는 저해제로 효과가 있음을 밝혔다. 이러한 sodium chloride 작용은 PPO의 활성 중앙에 있는 Cu와 상호작용하기 때문이라 보고된 바 있다(14,19,20).

효소활성에 대한 환원제의 첨가 효과

Table 2는 환원제인 L-cysteine, glutathione, dithiothreitol, 2-mercaptoethanol을 0.1 mM 첨가했을 때 감자 PPO의 활

Table 1. Effect of sodium chloride, glucose, sucrose and gelatin on thermostability of polyphenol oxidase from potato

Added compound (2%)	Relative activity (%)
None	100.0
Sodium chloride	51.4
Glucose	93.1
Sucrose	88.0
Gelatin	94.3

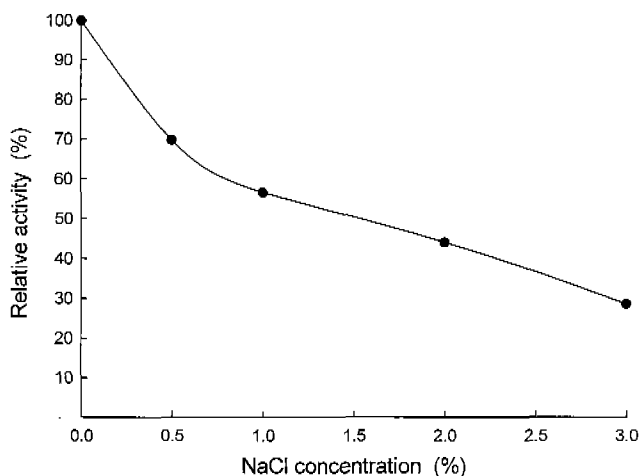


Fig. 4. Effect of NaCl on thermostability of polyphenol oxidase from potato.

Table 2. Effect of various reducing agents on activity of polyphenol oxidase from potato

Added compound (0.1 mM)	Relative activity (%)
None	100.0
L-Cysteine	96.5
Glutathione	83.5
Dithiothreitol	30.3
2-Mercaptoethanol	18.9

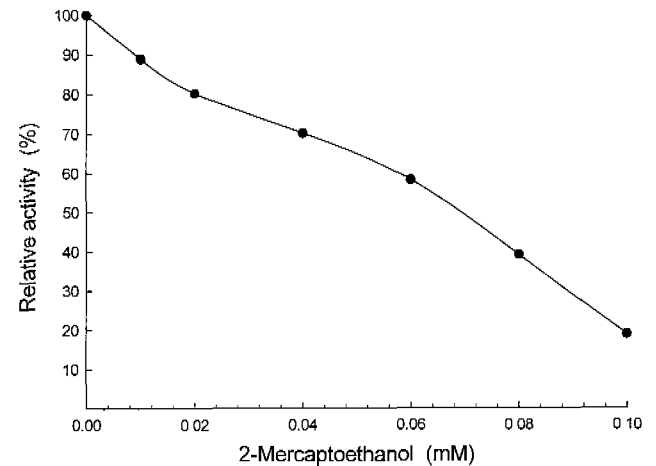


Fig. 5. Effect of 2-mercaptoethanol on activity of polyphenol oxidase from potato.

성을 나타낸 것이다. 이러한 환원제들은 감자 PPO의 활성을 저해하였으며, 특히 2-mercaptoethanol은 감자 PPO의 활성을 18.9%까지 크게 저해하였다. 2-Mercaptoethanol을 농도별로 첨가하여 감자 PPO 활성의 저해를 관찰한 결과가 Fig. 5이다. 2-Mercaptoethanol을 1 mM 첨가 시 효소활성이 완전히 저해되었고, 0.06 mM를 첨가했을 경우에는 60%로 효소 활성이 감소되었다. Thiol 화합물인 L-cysteine, glutathione, dithiothreitol, 2-mercaptoethanol과 thiourea가 사과, 배, 바나나, avocado와 머섯 PPO의 활성에 효과적인 저해제로 알려져 있다(10-13). 본 실험에서는 많은 보고들과 비슷한 경향으로 thiol 화합물이 감자 PPO의 활성 저해제로 작용하였으나, 특히 2-mercaptoethanol이 가장 효과적인 저해제로서 작용하였다.

요 약

감자로부터 polyphenol oxidase를 추출하여 열안정성에 영향을 주는 요인을 식품의 제조공정에 유용한 정보를 제공하기 위해 연구를 하였다. 감자의 PPO는 pH 7.0에서 가장 안정하였고, 이 효소는 80°C에서 1분간의 열처리로 효소 활성이 70% 저해되었다. 감자 PPO의 열안정성에 대한 z-value는 $12.17 \pm 0.58^\circ\text{C}$ 이고, 이 효소의 열안정성은 sodium chloride의 첨가로 감소되었으며, 2-mercaptoethanol과 dithiothreitol과 같은 환원제의 첨가로 역시 효소활성이 저해되었다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 동아대학교 학술연구조성비(연구기초자료비)에 의하여 연구되었음.

문헌

1. Rivas, N.D.J. and Whitaker, J.R. : Purification and some properties of two polyphenol oxidase from bartlett pears. *Plant Physiol.*, **52**, 501-507 (1973)
2. Vamos-Vigyazo, L. : Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **15**, 49-127 (1981)
3. Labuza, T.P., Lillemo, J.H. and Taoukis, P.S. : Die hemmung von polyphenoloxidasen durch proteolytische enzyme. *Flüssiges Obst.*, **59**, 15-20 (1992)
4. Martinez, M.V. and Whitaker, J.R. : The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Sci. and Technol.*, **6**, 195-200 (1995)
5. Monsalve-Gonzalez, A., Barbosa-Canovas, G.V., McEvily, A.J. and Iyengar, R. : Inhibition of enzymatic browning in apple products by 4-hexylrcinol. *Food Technol.*, **49**, 110-118 (1995)
6. McEvily, A.J., Iyengar, R. and Otwell, W.S. : Inhibition of enzymatic browning in food and beverages. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**, 253-273 (1992)
7. Sapers, G.M. : Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technol.*, **47**, 75-84 (1993)
8. Jankov, J.N. : Hitze-Inaktivierung der polyphenoloxidasen in einigen fruchtsaften. *Fruchtsaft-Industrie*, **7**, 13-32 (1962)
9. Eskin, M. : Biochemistry of food spoilage : enzymatic browning. In *Biochemistry of Foods*, Eskin, M. (ed.), Academic Press, California, p.401-427 (1990)
10. Walker, J.R.L. : Studies on the enzymatic browning of apples. II. Properties of apple polyphenoloxidase. *Aust. J. Biol. Sci.*, **17**, 360-371 (1964)
11. Molnar-Perl, I. and Friedman, M. : Inhibition of browning by sulfur amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1652-1656 (1990)
12. Montgomery, M.W. : Cysteine as an inhibitor of browning in pear juice concentrate. *J. Food Sci.*, **48**, 951-952 (1983)
13. Kahn, V. : Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on *o*-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci.*, **50**, 111-115 (1985)
14. Zawistowski, I., Blank, G. and Murray, E.D. : Inhibition of enzymatic browning in extracts of Jerusalem artichoke. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **20**, 162-165 (1987)
15. Duangmal, K. and Apenten, R. : A comparative study of polyphenoloxidases from taro and potato. *Food Chem.*, **64**, 351-359 (1999)
16. Zauberman, G., Ronen, R., Akerman, M., Weksler, A., Rot, I. and Fuch, Y. : Postharvest retention of the red color of litchi fruit pericarp. *Scientia Hort.*, **47**, 89-97 (1991)
17. Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Van den Broeck, I.L., Hendrickx, M.E. and Tobback, P.P. : Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears, and plums. *Lebensm. Technol.*, **31**, 44-49 (1998)
18. Luh, B.S. and Phithakpol, B. : Characteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peaches. *J. Food Sci.*, **37**, 264-268 (1972)
19. Sapers, G.M. : Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. *Food Technol.*, **47**, 75-81 (1993)
20. Iyengar, R. and McEvily, A.J. : Anti-browning agents; alternatives to the use of sulfites in food. *Trends Food Sci. Technol.*, **3**, 60-64 (1992)

(2001년 7월 3일 접수)