

Glycine과 Glucose의 Maillard Reaction Products에 의한 토란의 효소적 갈변 저해

이민영 · 이민경 · 김춘영 · 박인식[†]

동아대학교 식품과학부

Inhibition of Enzymatic Browning of Taro (*Colocasia antiquorum* var. *esculenta*) by Maillard Reaction Products from Glycine and Glucose

Min-Young Lee, Min-Kyung Lee, Choon Young Kim and Inshik Park[†]

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

Abstract

The inhibitory effect of MRPs (Maillard reaction products) on enzymatic browning of taro was investigated. The MRPs prepared by heating glycine and glucose at 90°C for 7 hr exhibited a strong inhibitory effect on taro polyphenol oxidase (PPO). The maximum inhibitory activity of MRPs against taro PPO was detected toward (+)-catechin, catechol, 4-methylcatechol followed by L-β-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and pyrogallol as a substrate. The MRPs synthesized from fructose and glucose with glycine as a amino acid significantly reduced the taro PPO activity. MRPs prepared by higher glycine or glucose concentration showed stronger inhibition against taro PPO. Increasing reaction time of the glycine and glucose promoted the inhibitory effect of MRPs against the PPO activity of taro, whereas the color formation was gradually increased.

Key words: enzymatic browning, polyphenol oxidase (PPO), taro, MRPs (Maillard reaction products), inhibitory effect

서 론

식품을 가공·저장하는 동안에 고유의 빛깔이 퇴색되거나 변색을 일으켜 갈색 색소를 형성하는 갈색화 반응(browning reaction)은 식품의 색깔 뿐만 아니라 향미 및 영양가 등에 직접적 또는 간접적으로 영향을 미친다(1,2). 식품에 있어서의 갈변 현상은 효소의 관여 없이 일어나는 Maillard reaction, caramelization, ascorbic acid oxidation 등의 비효소적 갈변(non-enzymatic browning reaction)과 polyphenol oxidase(PPO, *o*-diphenol:O₂ oxidoreductase, EC 1.10.3.1)나 tyrosinase(EC 1.14.18.1) 등에 의한 효소적 갈변(enzymatic browning reaction)으로 구분된다(3,4). 이 중 효소적 갈변 반응은 갈변 효소가 직접 관여하는 반응이며, 대부분의 야채나 과실 중에 일어나는 갈색화 반응은 PPO에 의한 것으로 알려져 있다(5). 이 반응에서는 polyphenol계 화합물이 공기 중의 산소에 의하여 quinone류나 그 유도체로 산화하는 반응을 촉매하며, 여기서 생성된 quinone 또는 그 유도체들은 활성이 대단히 크기 때문에 비효소적으로 계속 산화되고 중합 또는 축합되어 melanine 색소와 갈색, 흑색의 색소를 형성한다(6). 이러한 PPO에 의한 갈변 방지법으로는 예비가열, 진공포장, pH의 변동, 온도의 -10°C 이하 유지, 전한 소금물과 설탕물

등 여러 가지 방법이 있으며, 이 외에도 가장 널리 사용되어온 첨가제인 sulfiting agent를 들 수 있다(7,8). 그러나 이 물질들은 독특한 냄새와 영양소의 파괴, 인체에 대한 유해성 등이 문제시되어 과실과 채소에 대하여 사용이 금지되었으며, 이에 따라 갈변을 효과적으로 억제할 수 있는 천연의 갈변 억제제의 개발이 요구되고 있다. 천연물질인 꿀(9), natural aliphatic alcohol(10), cysteine(11), Maillard reaction products(12-17)에서 PPO를 억제하는 활성이 확인되었다. 토란의 효소적 갈변의 원인이 되는 PPO에 관한 연구로 토란과 감자 PPO의 비교 연구(18)가 수행되었으나, 토란의 갈변을 저해하는 천연 식품에 관한 연구는 매우 적은 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 여러 가지 조건을 달리하여 제조한 MRPs가 토란의 PPO에 미치는 저해 효과를 밝히고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 토란(*Colocasia antiquorum* var. *esculenta*)은 부산광역시 사하구에서 구입하였고, glycine은 Yakuri Pure Chemical Co. 제품을 사용하였으며, catechol, 4-methylcatechol, pyrogallol, L-β-3,4-dihydroxyphenyl-

[†]Corresponding author. E-mail: ispark@donga.ac.kr
Phone: 82-51-200-7322, Fax: 82-51-200-7535

alanine(L-DOPA) 등의 기질과 사용한 당은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였다.

조효소액 조제

토란(140 g)을 수돗물에 깨끗이 씻은 후 잘게 썰고, 70 mL의 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)를 첨가하여 막서로 5분간 마쇄하고, cheese-cloth로 여과한 후 4°C, 16,000×g에서 20분간 원심 분리하여, 그 상등액을 ammonium sulfate fractionation(30~80%)하고, 그 침전물에 소량의 동일한 완충용액을 가하여 용해시킨 후 Cellulose dialysis membrane(molecular weight cutoff: 12,000)으로 12시간 투석 후, 조효소로 사용하였다.

Maillard reaction products(MRPs)의 조제

MRPs는 동량의 1.5 M glucose와 1.5 M glycine을 90°C에서 7시간 반응시켜 생성하였다. 이를 표준으로 하여 1.5 M glucose에 glycine의 농도를 달리하여, 또는 1.5 M glycine에 glucose의 농도를 달리하여 90°C에서 반응시간을 달리하여 MRPs를 생성하였다.

PPO 활성 측정

토란 PPO의 활성 측정은 먼저 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8) 1.9 mL에 토란 조효소액 0.1 mL를 첨가하여 25°C에서 5분간 보관하였다. 그리고 0.2 M catechol 1.0 mL를 첨가하여 반응을 시작하였으며, 420 nm에서 흡광도 (Pharmacia Biotech사의 Ultrospec 3000)의 변화를 이용하여 효소 활성을 측정하였다(12). Catechol 이외의 기질은 기질의 종류에 따라서, 410 nm(4-methylcatechol), 334 nm (pyrogallol), 475 nm((+)-catechin, L-DOPA)에서 효소활성을 측정하였다. MRPs에 의한 효소활성의 저해실험은 50 mM potassium phosphate buffer(0.9 mL), 효소액 1.0 mL 및 MRPs(1.0 mL)을 가하여 5분간 incubation 후, 0.2 M 기질 1.0 mL를 가하여 효소반응을 개시하였다.

당 종류별 MRPs의 저해 효과 측정

당 종류별 MRPs는 동량의 1.5 M glycine과 1.5 M의 다양한 종류의 당을 90°C에서 7시간 반응시켜 각각의 MRPs를 생성하였다(12). 당은 glucose, lactose, sucrose, fructose, maltose를 사용하였으며, 생성된 각 MRPs에 대한 토란 PPO의 저해 효과를 비교하였다. 그리고 glycine과 glucose의 농도를 0.05 M, 0.1 M, 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M로 변화시켜 생성된 각각의 MRPs에 대한 토란 PPO의 저해 효과를 검토하였다.

반응 시간에 따른 MRPs의 저해 효과 및 색깔 변화 측정

1.5 M glycine과 1.5 M glucose를 90°C에서 시간별로 반응시켜 생성된 MRPs의 토란 PPO에 대한 저해 효과를 검토하였으며, 반응 시간에 따른 MRPs의 색깔 변화는 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

MRPs의 첨가 효과에 대한 기질의 영향

Table 1은 여러 가지 기질에 따른 MRPs의 토란 PPO에 대한 활성 저해 효과를 조사한 결과이다. 토란 PPO에 대한 MRPs의 저해활성은 사용한 기질에 따라 상이하였으며, 사용한 기질이 (+)-catechin(12.7%), catechol(20.0%), 4-methylcatechol(44.2%), L-DOPA(53.7%), pyrogallol(73.8%) 순으로 저해활성이 높았다. 한편, Tan과 Harris(12)는 4-methylcatechol, catechol 및 L-DOPA가 기질로 사용되었을 때 사과 PPO에 대한 MRPs의 저해효과가 높았다고 보고하였다. 또한 Billaud 등(14)은 chlorogenic acid, (+)-catechin을 기질로 사용한 경우에 비하여 4-methylcatechol이 기질인 경우, MRPs의 사과 PPO에 대한 저해 효과가 더 높았다고 보고하였다. 이와 같이 본 실험의 결과와 다소 차이를 나타내고 있으나 이는 재료, 실험 조건 등의 차이에 기인한 것으로 추정된다.

MRPs의 첨가 효과에 대한 당의 영향

Fig. 1은 1.5 M glycine 용액에 여러 가지 당 용액을 첨가하여 제조한 MRPs가 효소 활성에 미치는 영향을 검토한 결과이다. Fructose와 glycine을 사용하여 생성한 MRPs가 토란 PPO에 대하여 가장 높은 저해 효과를 보였으며(상대활성도: 9.8%), 다음으로 glucose(상대활성도: 21.0%)였다. 그러나, 비황원당인 sucrose를 사용한 경우에는 MRPs에 의한 효소의 저해정도가 낮았다(상대활성도: 52.3%). Billaud 등(15)의 연구에서는 glucose/cysteine, fructose/cysteine 용액을 사용하여 생성한 MRPs의 사과 PPO 저해 효과를 조사한 결과 fructose에 비하여 glucose를 사용한 MRPs의 저해 효과가 더 높게 나타났다.

MRPs의 첨가 효과에 대한 glycine과 glucose 농도의 영향

Fig. 2는 1.5 M glucose 용액에 다양한 농도의 glycine 용액을 첨가하여 생성한 MRPs가 토란에서 추출한 PPO에 미

Table 1. The inhibitory effect of MRPs synthesized from glucose and glycine with various substrates on taro PPO

Substrate (10 mM)	Relative activity (%)
Catechol	20.0
4-Methylcatechol	44.2
Pyrogallol	73.8
(+)-Catechin	12.7
L-DOPA	53.7

The MRPs were synthesized by heating 1.5 M glucose and 1.5 M glycine for 7 hr at 90°C. The PPO activity was assayed by a spectrophotometric procedure at 420 nm (catechol), 410 nm (4-methylcatechol), 334 nm (pyrogallol), and 475 nm ((+)-catechin, L-DOPA(L-β-3,4-dihydroxyphenylalanine)). The relative activity expresses % PPO activity in the absence of MRPs compared to that in the presence of MRPs.

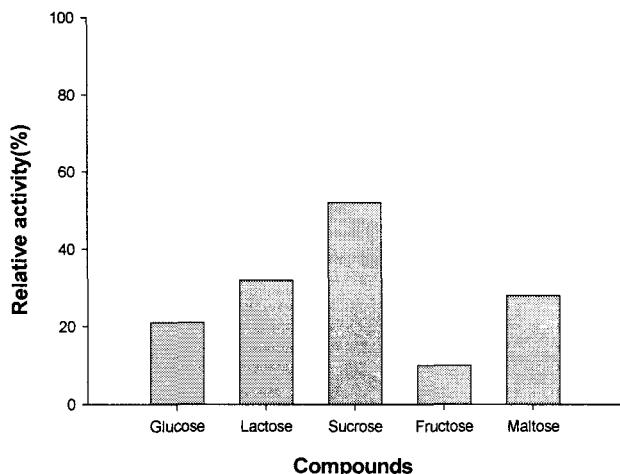


Fig. 1. The inhibitory effect of MRPs synthesized from various sugars with glycine on taro PPO.

The MRPs of various sugars were obtained by heating equal volumes of each 1.5 M sugar solution and 1.5 M glycine solution at 90°C for 7 hr. Catechol was used as a substrate.

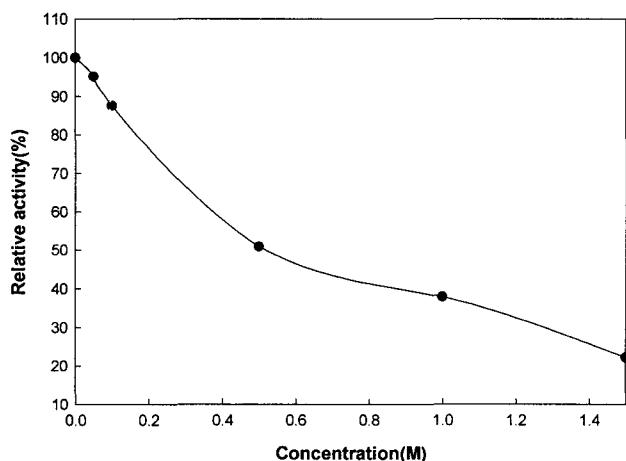


Fig. 2. The inhibitory effect of MRPs prepared by varying glycine concentration on taro PPO.

The MRPs solution was synthesized from various concentration of glycine with 1.5 M glucose at 90°C for 7 hr. Catechol was used as a substrate.

치는 저해정도를 나타낸 것이다. 토란의 PPO는 glucose와 glycine을 각각 1.5 M씩 첨가하여 생성한 MRPs에 의하여 높은 저해(상대활성도: 23.0%)를 받았으나, 1.5 M glucose에 1.0 M glycine을 첨가하여 생성한 MRPs에 의하여 상대활성도가 38.5%로 감소하였다. Fig. 3은 1.5 M glycine 용액에 다양한 농도의 glucose 용액을 첨가하여 제조한 MRPs가 효소 활성에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 고농도의 glycine, glucose를 사용하여 제조한 MRPs는 토란 PPO에 대한 저해 효과가 높았으나, 낮은 glucose의 농도에서 제조한 MRPs는 토란 PPO에 대한 저해효과가 상대적으로 낮았다. Tan과 Harris(12)는 0.5 M glucose 용액에 1.0 M, 1.5 M cysteine 용액을 첨가하여 90°C에서 2시간 동안 반응시켜 제조한 MRPs가 사과 PPO의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, 고농도

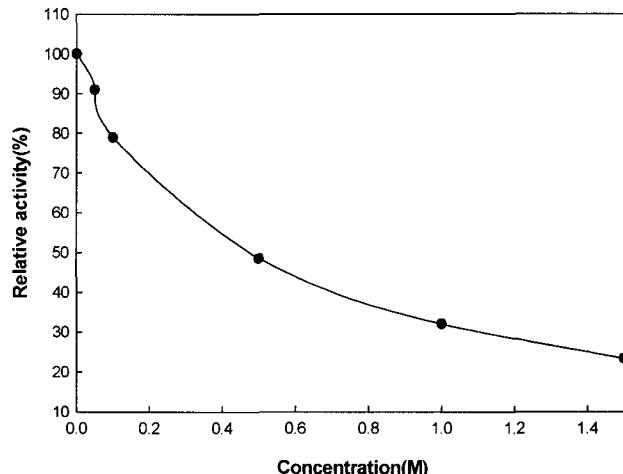


Fig. 3. The inhibitory effect of MRPs prepared by varying glucose concentration on taro PPO.

The MRPs solution was synthesized from various concentration of glucose with 1.5 M glycine at 90°C for 7 hr. Catechol was used as a substrate.

의 cysteine을 첨가하여 제조한 MRPs일수록 사과 PPO에 대한 저해 효과가 더 높았다고 보고하였다. 또한 Billaud 등(16)도 다양한 농도의 cysteine 용액을 이용하여 제조한 MRPs가 사과 PPO의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 cysteine 용액의 농도가 높아질수록 사과 PPO의 저해 효과가 높았다.

MRPs의 첨가 효과에 대한 반응 시간의 영향

Fig. 4는 1.5 M glycine 용액과 1.5 M glucose 용액을 90°C에서 시간별로 반응시켜 제조한 MRPs가 효소 활성에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 장시간 반응시켜 생성된 MRPs가 토란 PPO의 효소 활성을 크게 저해하였다. 그리고 각각의 MRPs는 반응 시간이 길어질수록 변색의 정도가 높았다. Billaud 등(14)의 연구에서는 fructose/glutathione, glucose/

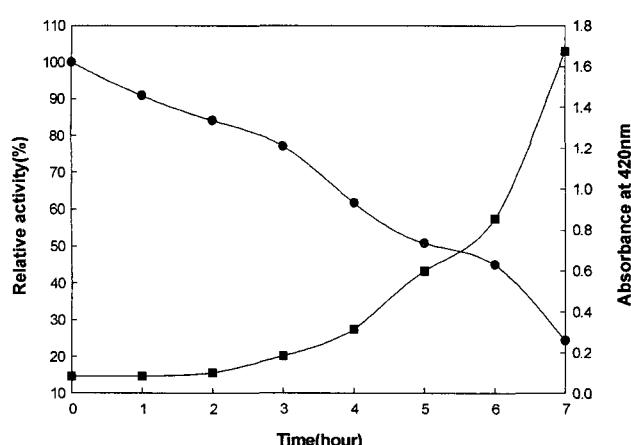


Fig. 4. Time dependent color formation and inhibitory effect of MRPs synthesized from glucose with glycine on taro PPO. The MRPs were prepared by heating equal volume of 1.5 M glucose and 1.5 M glycine at 90°C for various times. Catechol was used as a substrate. Relative activity (●—●); Absorbance at 420 nm (■—■).

glutathione 용액을 사용하여 제조한 MRPs를 90°C에서 39시간 반응시킨 결과, 반응 시간이 길어짐에 따라 MRPs의 사과 PPO 저해 효과가 증가하였다. 또한 Billaud 등(15)은 동량의 glucose 또는 fructose 용액과 cysteine 용액을 다양한 pH, 온도별로 반응시켜 제조한 MRPs가 사과 PPO의 저해에 미치는 영향을 조사하였으며, 반응 시간을 6시간으로 하였을 경우에 108°C에서 제조한 MRPs(pH 2.5)의 저해 효과가 최적으로 나타났다고 보고하였다. 그리고 Billaud 등(16)도 동량의 glucose/cysteine, fructose/cysteine 용액을 90°C에서 시간별로 반응시켜 제조한 MRPs가 사과 PPO의 저해에 미치는 영향을 조사한 결과 반응 시간이 길어질수록 MRPs의 색깔이 매우 연한 노란색에서 오렌지색을 거쳐 짙은 갈색으로 변화하였다고 보고하였다. Morales와 Jiménez-Pérez(17)의 연구에서도 당, 당과 아미노산을 첨가하여 제조한 MRPs를 시간별로 반응시켰을 경우, 반응 시간에 따라 갈색의 정도가 증가하였다.

요 약

토란으로부터 polyphenol oxidase를 추출하여 Maillard reaction products(MRPs)가 토란 PPO에 미치는 영향을 조사하였다. 토란 PPO에 대한 MRPs의 저해 효과는 사용한 기질이 (+)-catechin, catechol인 경우에 높게 나타났다. 그리고 MRPs의 토란 PPO 저해 효과는 당의 종류를 달리하여 생성한 MRPs 중에서 fructose와 glucose로 제조한 MRPs의 첨가 시 가장 높았으며, glycine과 glucose의 농도가 높아질수록 저해 효과가 증가하였다. 반응 시간에 따른 MRPs의 저해 효과를 조사한 결과, 반응 시간이 길어질수록 MRPs의 변색 정도가 높아졌으며, 이에 따라서 토란 PPO에 대한 저해 효과도 증가하였다.

감사의 글

이 논문은 2002학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제) 지원에 의하여 연구되었음.

문 헌

- Mathew AG, Parpia AB. 1971. Food browning as a polyphenol reaction. In *Adv Food Res*. Academic Press, New York. Vol 19, p 75-132.
- Perez-Gilabert M, Carmona FG. 2000. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 48: 695-700.

- Lee CY, Walker JRL. 1994. *Enzymatic browning and its prevention*. American Chemical Society, Washington, DC. Vol 10, p 317.
- Manzocco L, Calligaris S, Mastroloca D, Nicoli MC, Lerici CR. 2001. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci Technol* 11: 340-346.
- Vamos-Vigyazo L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 15: 49-127.
- Rivas NDJ, Whitaker JR. 1973. Purification and properties of two polyphenol oxidase from bartlett pears. *Plant Physiol* 52: 501-507.
- Sapers GM. 1993. Scientific status summary. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technol* 47: 75-84.
- Bush RK, Taylor SL, Holden K, Nordlee JA, Busse WW. 1986. Prevalence of sensitivity to sulfiting agents in asthmatic patients. *Am J Med* 81: 816-820.
- Oszmianski J, Lee CY. 1990. Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *J Agric Food Chem* 38: 1892-1895.
- Valero E, Varon R, Gracia-Carmona F. 1990. Inhibition of grape polyphenol oxidase by several aliphatic alcohols. *J Agric Food Chem* 38: 1097-1100.
- Kahn V. 1985. Effect of protein, protein hydrolyzate and amino acids on dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado and banana. *J Food Sci* 50: 111-115.
- Tan BK, Harris ND. 1995. Maillard reaction products inhibit apple polyphenoloxidase. *Food Chem* 53: 267-273.
- Zauberberg G, Ronen R, Akerman M, Weksler A, Rot I, Fuch Y. 1991. Postharvest retention of the red color of litchi fruit pericarp. *Scientia Hort* 47: 89-97.
- Billaud C, Brun-Mérémée S, Louarme L, Nicolas J. 2004. Effect of glutathione and Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with glutathione on polyphenoloxidase from apple-I: Enzymatic browning and enzyme activity inhibition. *Food Chem* 84: 223-233.
- Billaud C, Maraschin C, Nicolas J. 2004. Inhibition of polyphenoloxidase from apple by Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with L-cysteine under various conditions of pH and temperature. *Lebensm-Wiss u-Technol* 47: 69-78.
- Billaud C, Roux E, Brun-Mérémée S, Maraschin C, Nicolas J. 2002. Inhibitory effect of unheated and heated D-glucose, D-fructose and L-cysteine solutions and Maillard reaction product model systems on polyphenoloxidase from apple-I. Enzymatic browning and enzyme activity inhibition using spectrophotometric and polarographic methods. *Food Chem* 81: 35-50.
- Morales FJ, Jiménez-Pérez S. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem* 72: 119-125.
- Duangmal K, Owusu Apenten RK. 1999. A comparative study of polyphenoloxidase from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuber ossum* var. *Romano*). *Food Chem* 64: 351-359.

(2004년 3월 18일 접수; 2004년 7월 2일 채택)