

# 사과酒 醱酵過程中 Polyphenol性 物質 및 Polyphenol Oxidase 活性 Band의 變化

鄭基澤 · 徐承教 · 宋亨翼

慶北大學校 農科大學 食品加工學科

## Changes of Polyphenols and Polyphenol Oxidase Active Bands during Apple Wine Fermentation

Ki-Taek Chung, Seung-Kyo Seo and Hyung-Ik Song

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu

### Abstract

To examine enzymatic browning of apple wine, changes of active bands of polyphenol oxidase (EC 1.10.3.1) as well as polyphenol substances related to browning of apple wine were investigated during wine brewing. The decrease of total phenol was remarkably inhibited by the addition of sodium metabisulfite. In the meantime, auto-oxidation of catechol in a model system increased proportionally as the reaction pH and temperature increased. Catechol oxidation, however, was not detected at 4 °C below pH 5.0. Polyacrylamide-gel electrophoretic patterns showed that the apple (Jonathan) indicated 4 bands with polyphenol oxidase activity, designated a, b, c and d whose R<sub>m</sub> were 0.21, 0.30, 0.41 and 0.51, respectively. Among these, 2 bands, a and c remained until 5th day fermentation and only c band after 6th day fermentation. After pasteurization of apple wine at 60 °C for 30min, c band also remained.

### 序 論

果實酒는 褐變으로 因하여 新鮮度, 香氣, 嗜好性 等 이 損傷되어 商品의 價値가 현저히 떨어진다. 一般의 으로 褐變의 原因은 食品에 含有된 polyphenol性 物質에 polyphenol oxidase (E. C. 1. 10. 3. 1.) 의 作用으로 褐變前驅體物質인 quinone이 生成되며 이것이 酸化, 重合되어 褐色色素를 形成하는 것과 polyphenol oxidase (이하 PPO로 略함)가 關與하지 않는 非酵素的인 것으로 区分할 수 있다.<sup>(1)</sup>

果實酒의 褐變에 對해서 Berg<sup>(2)</sup>는 品種, 栽培地域, 收穫時의 成熟程度가 크게 關與한다고 하였고, Berg와 Akiyoshi<sup>(3)</sup> 및 Caputi와 Peterson<sup>(4)</sup>은 溫度, pH, 酸素의 含量이, Villiers<sup>(5)</sup>는 phenol化合物의 重合等이 原因이라고 報告하였으며, 그리고 果實酒의 褐變防止에 關한 研究<sup>(6-10)</sup>은 주로 非酵素的인 原因에 對한 處理에 集中되고 있다. 한편, PPO가 果菜類에 널리 分布되어

있고, 果菜類 및 汁의 褐變에 直接 關與한다고 보고<sup>(11)</sup> 되어 있지만 主로 PPO의 性質에 關한 研究가 多數 있을 뿐이다. 그러나 PPO가 果實酒의 褐變에 直接 關與하는지의 與否는 단지 葡萄酒 製造에서 原料포도에 *Botrytis cinerea*가 發育하였을 때, PPO의 活性을 增加시켜 酵素的 褐變이 일어난다는 報告<sup>(12)</sup>가 있을뿐, 果實 및 汁에 含有된 PPO가 果實酒의 褐變에 어떤 影響을 미치는지는 거의 알려져 있지 않다.

또한, 사과內에서도 phenol性物質과 PPO가 含有되어 있고, 사과 汁의 신속한 褐變은 PPO 때문인 것으로 밝혀져 있으나,<sup>(13-15)</sup> PPO가 사과酒의 褐變에 影響을 미치는지에 對해서는 아직까지 밝혀져 있지 않다. 本 實驗에서는 사과酒 褐變에 PPO가 미치는 影響을 調査하기 爲하여 사과酒의 原料로 用을 使用하여 사과酒 醱酵過程에서 PPO 活性band의 變化를 觀察함과 同時에 褐變과 關聯된 몇가지 成分을 調査, 檢討하였기에 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 材料

慶北大學校 附屬農場 果樹園에서 栽培한 紅玉(1983年 9月 30日 收穫함)을 使用하였다.

### 사과酒 製造

사과酒 製造는 原料사과를 常法에 따라 破碎, 착즙한 後 0.02% pectinase(태평양化學製品)를 添加하여 45°C에서 2時間 處理後 23° Brix되게 市販 설탕(第一製糖製品)을 加하였다. 이때 瓊斯pH는 3.8이었다. 이를 4ℓ들이 유리병에 3ℓ씩 넣은 다음 SO<sub>2</sub>添加劑로 sodium metabisulfite 140ppm添加區와 無添加區로 하여 各各에 種酵母(2×10<sup>8</sup> cell/ml)를 100ml씩 添加하여 30°C에서 醱酵시켰으며 3回 反復實驗하였다. 種酵母培養은 사과즙 培地를 플라스크에 넣어 1kg/cm<sup>2</sup>에서 15分間 殺菌後 *Saccharomyces cerevisiae* R-11<sup>(17)</sup>을 接種하여 30°C에서 48時間 培養하였다.

### 사과酒 醱酵中의 一般成分

糖은 Brix meter, 알콜은 比重法<sup>(18)</sup>으로 測定하였고, 總酸은 供試液 5ml를 取하여 蒸溜水 200ml를 加한뒤 0.1% phenolphthalein을 指示藥으로 하여 0.1N-NaOH로 滴定하여 malic acid로 表示하였다.

### Total phenol

Singleton과 Rossi의 方法<sup>(19)</sup>에 따라 Shimadzu UV-200을 使用하여 765nm에서 比色定量하였으며 標準品으로는 gallic acid를 使用하였다.

### Catechol의 酸化

pH 3~7로 調整한 McIlvaine buffer에 catechol 4,000 mg/l을 各各의 pH에 添加한 후 4, 15 및 30°C의 恒溫器에 넣어 時間別로 一定量씩 取하여 420nm에서 吸光度를 測定하였다.

### 蛋白質 定量

蛋白質 定量은 前報<sup>(20)</sup>와 同一하게 實驗하였다.

### 電氣泳動

Davis의 方法<sup>(21)</sup>에 準하여 running gel 7% (pH 9.0)와 stacking gel 2% (pH 6.8) acrylamide을 使用하였으며, running pH는 8.3의 Tris-glycine buffer를 使用하였다. 粗酵素液(150μg/ml, protein)은 前報<sup>(20)</sup>에 準하여 製造한 뒤 sucrose로 10% 飽和시켰으며 bro-

mophenol blue溶液을 少量 添加한 뒤 gel 위에 注入시켜 tube (0.5×10cm) 당 2.5mA로 泳動하였다.

電氣泳動이 끝난 gel은 Zenin과 Park의 方法<sup>(22)</sup>에 따라 gel을 0.05% phenylene diamine을 含有하는 30mM catechol溶液에 30°C에서 20分間 反應시킨 後, 7% methanol과 5% acetic acid가 含有된 溶液으로 脫色시켰다. Catechol溶液의 製造를 爲한 緩衝溶液 및 pH는 酵素活性 測定時와 同一하게 하였으며, PPO의 活性 band의 數와 位置를 確認하기 爲하여 Gelman社의 densitometer (ACD-18)를 使用하여 420nm에서 測定하였다. 그리고 R<sub>m</sub>값은 band의 移動거리를 tracking dye의 移動거리로 나눈 값으로 表示하였다. 한편 試料로 사과瓊스를 使用하는 경우도 粗精製한 酵素를 使用하는 경우와 比較할 때 band의 數와 位置가 同一하다는 것이 確認되었으나, band의 色도가 弱하기 때문에 本 實驗에서는 粗精製한 酵素를 電氣泳動 試料로 使用하였다.

## 結 果

### 糖 및 알콜 含量變化

全醱酵過程을 통하여 Fig. 1에서 보는 바와같이, 正常的으로 糖의 減少와 알콜 生成이 觀察되었고 SO<sub>2</sub>添加와 無添加 모두 醱酵은 8日만에 거의 完了되어 알콜

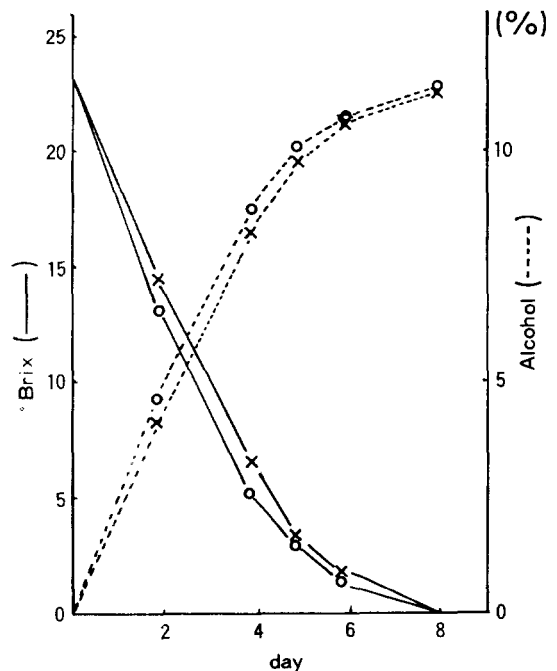


Fig. 1. Change of sugar and ethanol contents during fermentation  
O—O control, X—X SO<sub>2</sub>

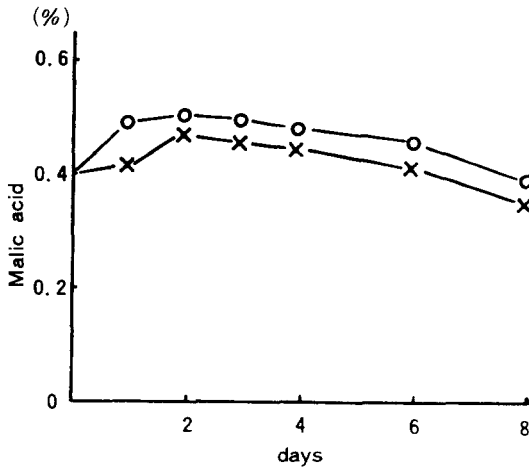


Fig. 2. Change of total acid during fermentation  
○—○ control, ×—× SO<sub>2</sub>,

含量은 12% 정도였다.

總酸의 变化

醱酵過程中 總酸은 SO<sub>2</sub>添加区, 無添加区 모두 醱酵初期에는 약간 增加하였다가 서서히 減少하는 경향이였으며, 醱酵 終了時에는 약 0.4%의 含量을 나타내었다 (Fig. 2).

Total phenol의 变化

醱酵中 褐變과 直接 關聯이 있는 polyphenol性 物質의 含量變化를 Fig. 3에 나타내었다. Total phenol含

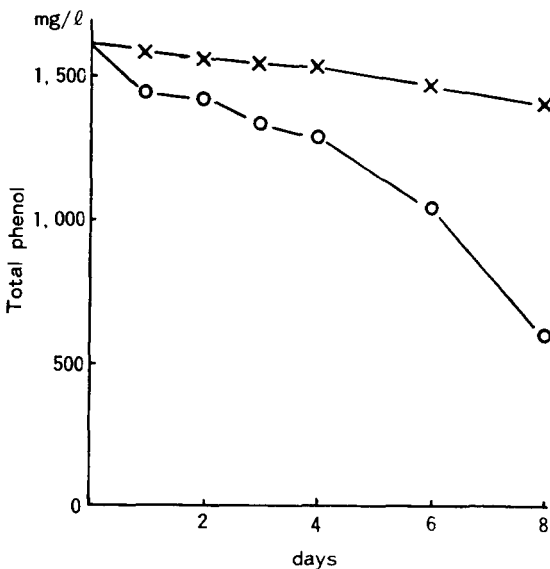


Fig. 3. Change of total phenol during fermentation  
○—○ control, ×—× SO<sub>2</sub>

Table 1. Effect of pH on the catechol oxidation at various temperatures

Time (hrs)	Temperature (°C)	pH				
		3	4	5	6	7
2	4 °C	0	0	0	0	0.08
	15 °C	0	0	0.02	0.03	0.10
	30 °C	0	0	0.02	0.05	0.11
6	4 °C	0	0	0	0	0.10
	15 °C	0	0	0.03	0.10	0.12
	30 °C	0	0	0.03	0.11	0.14
10	4 °C	0	0	0	0.01	0.10
	15 °C	0	0	0.03	0.11	0.13
	30 °C	0	0.01	0.05	0.11	0.16
20	4 °C	0	0	0	0.01	0.12
	15 °C	0	0.02	0.07	0.11	0.15
	30 °C	0	0.03	0.13	0.18	0.30
30	4 °C	0	0	0	0.05	0.12
	15 °C	0	0.04	0.13	0.14	0.17
	30 °C	0	0.05	0.15	0.20	0.37

Expressed as increased value in absorbance with respect to zero time.

量은 SO<sub>2</sub>添加 有無에 關係없이 全般的으로 醱酵가 진행됨에 따라 減少하는 경향이였다. 그러나 SO<sub>2</sub>添加에 의해 減少率이 크게 둔화되었으며, 醱酵終了時에 total phenol은 SO<sub>2</sub>를 添加한 경우가 13%, 無添加의 경우가 60% 정도의 減少率을 나타내었다.

Catechol의 酸化

사과酒의 褐變에 미치는 非酵素的인 影響을 調査할 目的으로 polyphenol性 物質로서 catechol을 使用하여 catechol의 酸化에 미치는 pH 및 溫度의 影響을 調査하였다 (Table 1).

全般的으로 pH 및 溫度가 높을수록 catechol의 自動酸化는 促進되는 경향이였다. 그러나, pH 3.0에서는 溫度에 對한 影響이 전혀 없었으며 pH 4.0, pH 5.0에서는 catechol의 自動酸化가 일어나지 않았으나, pH 6.0 이상에서는 4 °C에서도 自動酸化가 일어났다.

醱酵中 PPO 活性 band의 变化

사과酒 醱酵中의 PPO 活性 band의 变化는 SO<sub>2</sub>添加 有無에 關係없이 活性 band가 同一하게 觀察되었으므로, SO<sub>2</sub>無添加 醱酵時의 活性 band만을 Fig. 4에 나타내었다. 紅玉에 含有된 PPO의 活性 band의 數는 Rm 값인 0.21, 0.30, 0.41, 0.51인 a, b, c, d의 4개였으나, 유스를 精製하기 위하여 pectinase로 45 °C에서 2

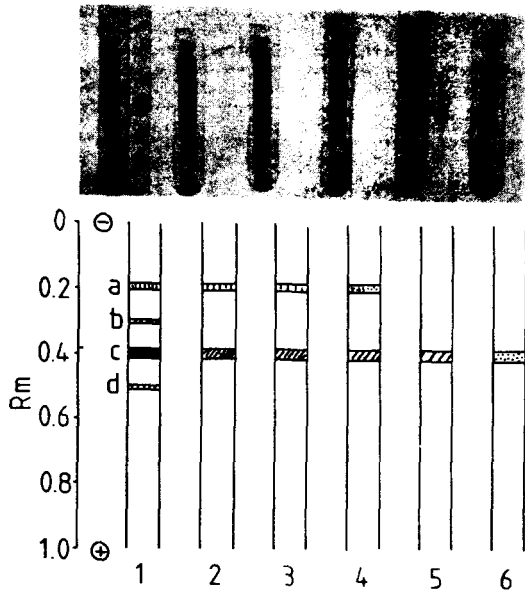


Fig. 4. Change of electrophoretic patterns of polyphenol oxidase during wine making (1) apple; (2) after pectinase treatment; (3) 1 day after fermentation; (4) 5 days after fermentation; (5) 8 days after fermentation; (6) after pasteurization. Darker bands indicate higher activity.

時間 處理 後에는 a, c band 만이 나타났다. 그리고 醱酵 5 日 째 까지는 계속 a, c band 가 觀察 되었으나 活性 band 의 色은 醱酵 가 經過 함에 따라 약간씩 弱하게 나타났으며 醱酵 6 日 째 부터 醱酵 終了 時 까지는 c band 만이 觀察 되었고, 60°C 에서 30 分 間 殺菌 處理 後에도 c band 는 계속 觀察 되었다.

活性 band 에 미치는 阻害劑의 影響

紅玉을 利用한 사과酒 醱酵中 SO<sub>2</sub> 및 다른 阻害劑가 活性 band 에 미치는 影響을 調査하기 爲하여 電氣泳動이 끝난 gel 을 0.5mM 과 5mM 濃度의 sodium metabisulfite, ascorbic acid 및 cysteine 溶液에 1 時間 동안 침지시킨후 蒸溜水로 洗滌하고 活性 band 를 발색시킨 結果, 모든 阻害劑에 對하여 5mM 濃度에서는 band 가 形成되지 않았다. 그러나 0.5mM 에서는 Fig. 5 에 나타낸 바와같이 a, c band 만이 弱하게 觀察 되었다.

考 察

醱酵 期間 동안 一般成分 및 褐變과 關聯이 있는 polyphenol 性 物質과 PPO의 變化를 調査한 바, 一般의 으로 사과酒 醱酵 期間이 7~10 日, 總酸含量이 0.3~0.5 % 임을 고려할 때, 本 實驗에서의 醱酵 期間 8 日, 總酸含量 約 0.4% 는 정상적인 醱酵 醜을 나타낸다.

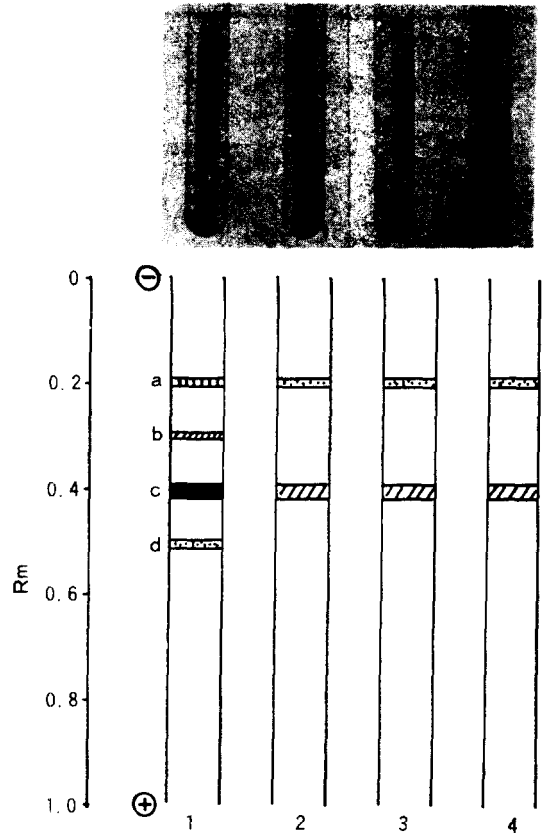


Fig. 5. Electrophoretic patterns of polyphenol oxidase treated with different inhibitors (0.5mM) (1) no inhibitor; (2) ascorbic acid; (3) sodium metabisulfite; (4) cysteine. Legend is the same as for Fig. 4.

醱酵中 total phenol 은 SO<sub>2</sub> 添加와 無添加 모두 減少 하였지만, SO<sub>2</sub> 添加는 減少率이 현저히 低下되었다. SO<sub>2</sub> 無添加에서의 total phenol 의 급격한 減少는 phenol 性 物質의 自動酸化와 PPO에 의한 酸化가 同時에 일어난 爲하므로 生覺된다. Total phenol 의 減少가 非酵素的인 酸化와도 關聯이 있다고 보는 것은 사과酒의 醱酵條件(사과쥬스 pH 3.8, 온도 30°C)이, catechol 의 自動酸化가 pH 4.0, 30°C 조건에서도 일어나는 것과 一致되는 點에서 알 수 있다. 또한 PPO가 關與한다고 보는 理由는 醱酵中에 酵素의 活性 band 가 계속적으로 觀察 되었기 爲문이다. 한편 SO<sub>2</sub> 添加가 無添加에 비해 phenol 性 物質의 減少率이 低下되는 것은 SO<sub>2</sub>에 의한 PPO의 阻害, 反應生成物과의 還元作用 등으로 생각된다. Phenol 性 物質의 自動酸化는 Palmer,<sup>(13)</sup> David等<sup>(14)</sup>에 의해서도 확인되었고, PPO에 의한 酸化는 사과內의 主 phenol 性 物質이 o-phenol 이며,<sup>(15)</sup> 이는 또한 PPO의 主基質이므로 主로 o-diphenol 이 酸化되었을 可能

성이 크다. Phenol性 物質은 褐變과 直接的인 關係가 있으며, phenol性 物質의 減少는 포도주의 褐變을 增加시킨다<sup>(1)</sup>고 한 점으로 미루어 사과酒의 褐變도 phenol性 物質의 減少와 깊은 關聯이 있을 것으로 생각된다. 그러므로 catechol의 自動酸化가 pH3~4에서는 4℃에서 安定하며 PPO는 10℃에서 약 30%의 活性을 나타내므로 褐變을 억제하기 위하여 低温醱酵 및 低温저장으로 褐變을 減少시킬 수 있을 것으로 생각된다.

阻害劑가 活性 band에 미치는 結果에서 거의 모두 비슷하게 5mM에서 活性 band가 관찰되지 않고 0.5mM에서 a, c band가 관찰되었지만, 이들 阻害劑는 PPO의 活性에 직접 阻害하는 것이 아니라, 反應生成物과 附加化合物을 生成하거나 還元作用때문<sup>(2)</sup>이며, 이는 醱酵中에 活性 band의 數의 變化에서 SO<sub>2</sub>添加와 無添加 모두 同一하게 나타난 것으로도 알 수 있다. 사과酒 製造過程에서의 活性 band의 變化를 보면, 처음 4개의 活性 band가 착즙후 pectinase處理過程에서 2개의 band가 失活되었는데, 이는 熱에 의한 失活로 생각되며, 醱酵時間동안의 1개 band의 失活은 酵素自体의 安定性 低下等이 原因일 것이다. 그리고 사과酒를 殺菌處理後에도 1개의 band가 남아있는 것은 熱에 아주 安定하기 때문이며, 이 band가 main band로서 사과酒 저장중 에 사과酒의 酵素的 褐變에 關與할 것으로 여겨진다.

## 要 約

사과酒의 酵素에 의한 褐變을 조사하기 위하여 褐變과 관련된 polyphenol性 물질 및 polyphenol oxidase 활성 band의 變化를 사과酒 제조기간동안 조사한 結果는 다음과 같다. Total phenol의 감소율은 SO<sub>2</sub> 처리에 의해서 현저히 둔화되었고, catechol의 酸化는 溫度와 pH가 높아짐에 따라 촉진되었으나, pH 5.0 이하에서는 4℃에서 酸化가 일어나지 않았다. Polyacrylamide gel 전기영동으로 사과에는 Rm값이 각각 0.21, 0.30, 0.41, 0.51인 a, b, c, d 4개의 polyphenol oxidase 활성을 가진 band가 관찰되었다. 이들중 a, c 2개의 band는 醱酵 5일째까지 계속 관찰되었으며, 醱酵 6일째부터는 c band만 관찰되었다. 이 band는 60℃, 30分間의 殺菌 처리 후에도 계속 남아있었다.

## 문 헌

1. Desrosier, N. W. : *Elements of Food Technology*, Avi Publishing Co, America, p. 73 (1977)
2. Berg, H. W. : *Food Research*, 18, 407 (1953)

3. Berg, H. W. and Akiyoshi, M. : *Am. J. Enol.*, 7, 1 (1956)
4. Caputi, A. J. and Peterson, R. G. : *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 9 (1965)
5. Villies, J. P. D. : *Am. J. Enol. Vitic.*, 12, 25 (1961)
6. Ough, C. S., Berg, H. W. and Amerine, M. A. : *Am. J. Enol. Vitic.*, 20, 101 (1969)
7. Fuller, W. L. and Berg, H. W. : *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 212 (1965)
8. Balakian, S. and Berg, H. W. : *Am. J. Enol. Vitic.*, 19, 91 (1968)
9. Prterson, R. G. and Caputi, A. J. : *Am. J. Enol. Vitic.*, 18, 105 (1967)
10. Singleton, V. L. and Kramling, T. E. : *Am. J. Enol. Vitic.*, 27, 157 (1976)
11. Reed, G. : *Enzymes in Food Processing*, Academic Press, U. S. A., p. 236 (1975)
12. Amerine, M. A., Berg, H. W. and Webb. : *Technology of Wine Making*, Avi Publishing Co, America, p. 533 (1979)
13. Buren, J. V., Vos, L. D. and Pilnik, W. : *J. Agric. Food Chem.*, 24, 448 (1976)
14. David, A. S., Akhyar, S. and Ribeiro, S. : *Phytochemistry*, 11, 535 (1972)
15. Harel, E., Mayer, A. M. and Shain, Y. : *Phytochemistry*, 4, 783 (1965)
16. Siegleman, H. W. : *Adv. Food Res.*, 5, 97 (1954)
17. 鄭基澤, 俞大植 : 慶北大 生産技術, 5, 39 (1971)
18. 韓國稅政新報社(編) : 酒稅實務要覽, 서울, p. 197 (1975)
19. Amerine, M. A. and Ough, C. S. : *Wine and Must Analysis*, John Wiley and Sons, Canada, p. 66 (1974)
20. 鄭基澤, 徐承教, 宋亨翼 : 韓國營養食糧學會誌, 12, 316 (1983)
21. Davis, B. J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404 (1964)
22. Zenin, C. T. and Park, Y. K. : *J. Food Sci.*, 43, 646 (1978)
23. Palmer, J. K. : *Plant Physiol.*, 38, 508 (1963)
24. Walter, W. M. and Purcell, A. E. : *J. Agric. Food Chem.*, 28, 941 (1980)
25. Peri, C., Pompei, C., Montedoro, G. and Cantaralli, C. : *J. Sci. Food Agric.*, 22, 24 (1971)