

한국산 무우 Peroxidase의 열변성 및 재활성화에 미치는 요인

이경아 · 홍정민 · 김기남 · 박인식

동아대학교 식품영양학과

Factors Affecting Thermal Inactivation and Reactivation of Korean-Radish Peroxidase

Kyung-Ah Lee, Jung-Min Hong, Gi-Nahm Kim and Inshik Park

Dept. of Food Science and Nutrition Dong-A University, Pusan 604-714, Korea.

Abstract

Factors affecting thermal inactivation and reactivation of korean radish peroxidase were investigated. The enzyme was stable below 60°C, but it was completely inactivated by heat treatment at 80°C for 10 min. The enzyme was stable at pH 6.0, but it was unstable below pH 4.0 and above pH 8.0. The thermostability of the enzyme was increased by addition of glucose, sodium chloride and albumin. The inactivated enzyme by heat treatment was reactivated at room temperature. The optimal pH for reactivation of the enzyme was pH of 9.0. The reactivation rate of the enzyme was not affected by addition of glucose, sodium chloride and albumin. The reactivation was completely inhibited by addition of sulfhydryl reagent such as dithiothreitol.

서론

식물성 식품을 냉동 또는 냉장 보존하기 전에 미리 열처리를 하여 식물성 식품의 변색 또는 향미상실을 일으키는 lipase, lipoxygenase, catalase, 및 peroxidase를 불활성화시켜야 하며, 특히 이들 중 가장 내열성이 강한 peroxidase를 불활성화시키는 것이 꼭 필요하다. 열처리에 의하여 peroxidase의 활성이 완전히 불활성화하지 않을 경우, 냉동, 냉장온도에서도 잔존한 효소의 작용으로 식품의 변색 또는 향미상실의 원인이 되고있다^{1,2)}. 따라서 peroxidase의 불활성화가 식품보존을 위한 열처리의 적합여부의 주요한 지침으로 사용되고 있다³⁾. 또한 peroxidase는 열처리에 의하여 불활성화된 후 재활성화된다고 보고되었다⁴⁻⁸⁾. Peroxidase의 활성은 한국산 무우(*Raphanus sativus*)에서 매우 높으며, 또한 그

효소적 특성이 최근 밝혀진 바 있다^{9,10)}.

본 실험에서는 한국산 무우 peroxidase의 열안정성에 미치는 온도, 염, 당 및 단백질의 첨가 영향을 검토하고, 또한 열처리 후 재활성화되는 과정을 조사하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 무우는 부산지방에서 재배한 대평무우였고, 과산화수소와 phenol은 Junsei사 제품을, 4-aminoantipyrine은 Sigma사 제품을 사용하였다.

조효소액의 조제

한국산 무우 100g에 100ml의 증류수를 첨가한 후에 mixer로써 1분간 분쇄한 다음 cheese-cloth로

2번 여과하였다. 여과액을 다시 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후, 그 상등액을 조효소액으로 하였다.

Peroxidase활성도의 측정

Peroxidase 활성도 측정을 위한 반응액의 최종 농도(μmole)는 potassium-phosphate 완충액(pH 6.5), 280; 4-aminoantipyrine, 3.5; phenol, 238였다.

효소 반응액은 60°C에서 2분간 방치후, 2.55 μmole 의 과산화수소와 효소액(50 μl)을 첨가한 후 60°C에서 1분간 반응시켰다. 효소 반응액의 총 부피는 3ml였으며, 효소반응후에 spectrophotometer를 이용하여 510nm에서 흡광도의 증가를 peroxidase의 효소활성으로 측정하였다¹¹⁾.

결과 및 고찰

효소의 열안정성에 미치는 온도효과

한국산 무우로 부터의 peroxidase의 열에 의한 불활성화 정도를 조사키위해 온도를 55°C에서 80°C까지 변화시켜 각 온도에서 효소의 불활성화 정도를 조사하였다(Fig. 1). 30분의 열처리에 의해 효소는 60°C이하에서는 안정했으며, 70°C에서는 약 60%의 활성이 남아 있었으나, 80°C에서는 10분 이내에 완전히 효소가 불활성화 되었다.

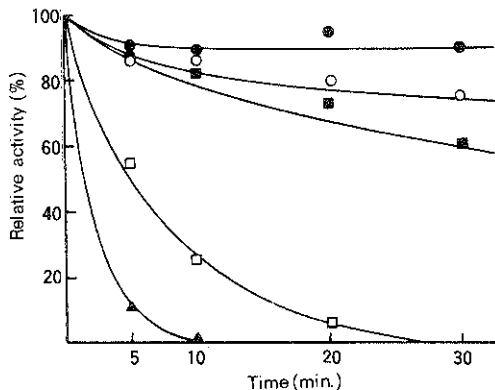


Fig. 1. Effect of temperature on thermostability of Korean radish peroxidase.(pH6.7). (●): 55°C, (○): 65°C, (■): 70°C, (□): 75°C, (▲): 80°C.

효소의 열안정성에 미치는 pH의 효과

Peroxidase의 열에 의한 불활성화 정도가 효소의 pH변화에 따라서 영향을 받는지를 조사키 위해서 효소액의 pH를 3에서 10까지 변화시키면서 75°C에서 5분간의 열처리 후 남아있는 효소활성을 조사하였다(Fig. 2). 완충용액(0.1M)은 pH3 은 Na-glycine, pH 4~5는 Na-acetate, pH6 ~8은 Na-phosphate, pH 9~10은 Na-borate를 사용하였다.

Fig. 2에서 보는 바와같이 효소는 pH 6.0에서 가장 안정했으며, 산성 및 알칼리성 pH에서는 비교적 빠르게 효소가 불활성화 되었다.

효소의 열안정성에 미치는 당, 염 및 단백질의 첨가효과

Peroxidase가 함유되어 있는 식물성 식품을 열처리하는 경우에, 당, 염 및 단백질이 식품자체에 함유되어 있던지 또는 외부에서 첨가하는 경우가 많다. 따라서 당, 염 및 단백질이 한국산 무우 peroxidase의 열안정성에 미치는 효과를 조사하였다. 효소액에 glucose, NaCl 및 albumin을 각각 0.5M, 0.5M 및 1.0%가 되도록 첨가한 후에 80°C에서 5분간 열처리하였다. 열처리 후 잔존한 peroxidase의 활성을 조사한 결과 당, 염 및 단백질의 첨가는 무우 peroxidase의 열안정성을 증가시켰다(Table 1). 당, 염 및 단백질의 보호효과는 이들이 효소액에 존재하는 H₂O를 수화함으로써,

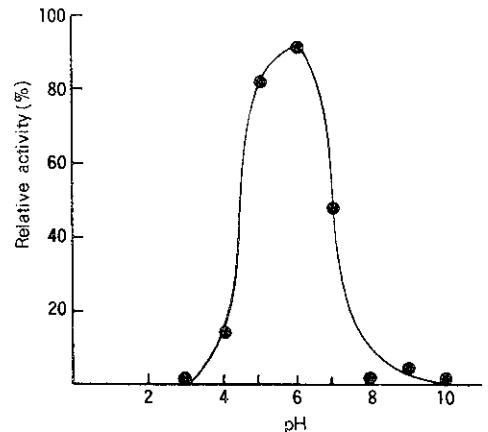


Fig. 2. Effect of pH on thermostability of Korean radish peroxidase.

Table 1. Effect of glucose, NaCl and albumin on thermostability of Korean radish peroxidase

Addition	Absorbance (510nm)	Relative activity (%)
Before heat treatment	0.71	100.0
After heat treatment		
None	0.18	25.3
NaCl(0.5M)	0.33	46.5
Glucose(0.5M)	0.23	32.4
Albumin(1.0%)	0.20	28.2

The enzyme solution(pH 6.0) was incubated at 80°C for 5 min, and the residual activities were measured as described in Methods.

효소액의 수분활성도를 저하시킴으로써 기인하는 것으로 보인다¹²⁾.

효소의 재활성화에 미치는 pH의 효과

한국산 무우 peroxidase를 75°C에서 10분간 열처리시켜서 부분적으로 불활성화시켰다. 효소의 활성도를 측정했을 때 열처리 전의 흡광도는 0.66이었으나 열처리 후에는 0.16으로 감소하였다. 부분적으로 불활성화된 효소를 0.2M의 완충용액을 동량 첨가하여 pH를 3~10까지 조절시킨 후

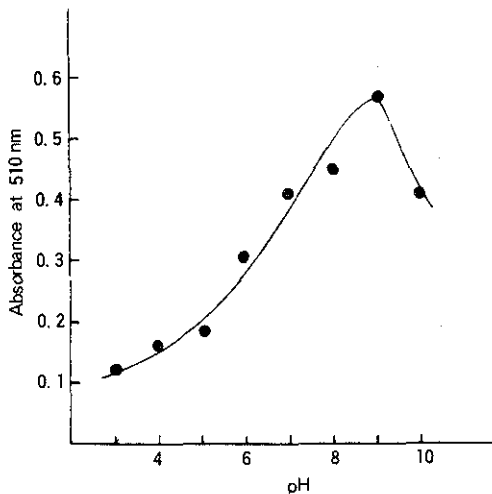


Fig. 3. Effect of pH on reactivation of Korean radish peroxidase. Experimental conditions were described in text.

35°C에서 저장시켰다. 35°C에서 48시간 후에 재활성화된 효소의 활성도를 측정하였으며, Fig. 3에서와 같이 pH 9에서 최고의 재활성화를 보였다.

효소의 재활성화에 미치는 당, 염 및 단백질의 첨가효과

75°C에서 10분간 열처리에 의해서 부분적으로 불활성화된 효소를 pH9.0으로 조절시켰다. 그리고 0.5M 포도당, 0.5M NaCl 및 1.0% albumin을 첨가하여 당, 염 및 단백질이 효소의 재활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 35°C에서 48시간 보관 후, 재활성화된 효소의 활성도를 조사하였다(Table 2).

열처리에 의한 효소의 불활성화에는 당, 염 및 단백질이 보호효과를 나타내었으나, 재활성화에는 거의 영향이 없었다.

효소의 재활성화에 미치는 환원제 효과

한국산 무우 peroxidase는 disulfide결합이 존재하며, 이것은 효소의 열안정성에 크게 기여하고 있다. 효소의 내열성은 disulfide결합에 의한 것으로 생각되며, 그리고 효소는 dithiothreitol과 같은 환원제를 첨가함으로써 불활성화하였다¹⁰⁾. Fig. 4는 부분적으로 불활성화 된 한국산 무우 peroxidase가 0.1mM dithiothreitol의 첨가에 의하여 효소의 재활성화가 억제됨을 나타낸다. 이것은 효소의 재활성화에 필요한 효소에 존재하는 disul-

Table 2. Effect of glucose, NaCl and albumin on reactivation of Korean radish peroxidase

Addition	Absorbance (510nm)	Relative activity (%)
None	0.56	100.0
NaCl(0.5M)	0.58	103.6
Glucose(0.5M)	0.54	96.4
Albumin(1.0%)	0.56	100.0

The enzyme solution used was prepared as described in Fig. 3.

For reactivation of the enzyme, it was incubated at 35°C for 24 hrs.

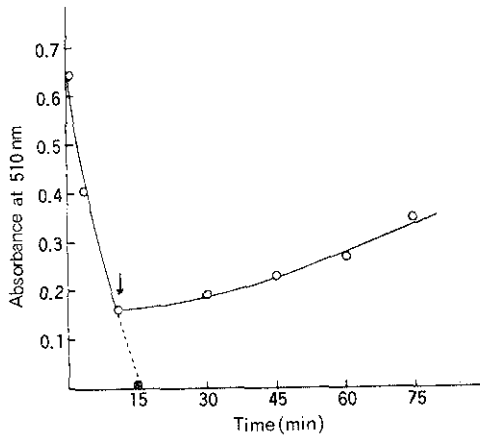


Fig. 4. Effect of dithiothreitol on reactivation of Korean radish peroxidase.

The enzyme solution was incubated at 75 °C for 10min, and then 0.1mM dithiothreitol was added.

(●) : dithiothreitol added. (○) : control.

fide구조를 sulfhydryl기로 변화시키기 때문으로 사료된다.

요 약

한국산 부우(*Rhapanus sativus*) peroxidase의 열안정성에 미치는 요인 및 열처리에 의해 불활성화된 peroxidase의 재활성화에 미치는 요인들을 검토하였다. 효소는 60°C이하의 열처리에 안정하였으나, 80°C에서는 10분 후에 완전히 불활성화하였다. 효소의 불활성화에 미치는 pH의 효과는 pH 6.0에서는 매우 안정하였으나, pH 4.0이하 및 pH 8.0이상에서는 매우 불안정하였다. 효소의 열안정성은 당, 염 및 단백질의 첨가에 의하여 증가하였다. 효소의 재활성화는 pH 9.0에서 재활성화율이 가장 높았으며, 그리고 열에 의한 불활성화와 다르게 첨가한 당, 염 및 단백질에

의해 거의 영향을 받지않았다. 열에 의해 불활성화된 효소는 환원제인 dithiothreitol의 첨가에 의하여 재활성화가 억제되었다.

문 헌

1. Reed, G. : Oxidoreductase. *Enzymes in Food Processing*, p. 216, Academic Press, New York (1975)
2. Burnett, F. : Peroxidase and its relationship to food flavor and quality : A Review. *J. Food Sci.*, **42**, 1(1977)
3. Williams, D., Lim, M., Chen, A., Pangborn, R. and Whitaker, J. : Blanching of vegetables for freezing : Which indicator enzyme to choose. *Food Technology* **40**(6), 130(1986)
4. Lu, A. and Whitaker, J. : Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. *J. Food Sci.*, **39**, 1173(1974)
5. Tamura, Y. and Morita, Y. : Thermal denaturation and regeneration of Japanese-radish peroxidase. *J. Biochem., Tokyo*, **78**, 561(1975)
6. Schwimmer, S. : Regeneration of heat-inactivated peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **154**, 487(1944)
7. Joffe, F. and Ball, C. : Kinetics and energetics of thermal inactivation and the regeneration rates of a peroxidase system. *J. Food Sci.*, **27**, 587(1962)
8. Zoueil, M. and Esselen, W. : Thermal destruction rates and regeneration in green beans and turnips. *Food Research*, **24**, 119(1959)
9. Yoo, W. and Kim, S. : Purification and characterization of anionic isoperoxidase from Korean-radish root. *Korean Biochem. J.*, **21**, 207(1988)
10. Park, I. and Suh, K. : Inactivation of Korean radish peroxidase by dithiothreitol. *Korean Biochem. J.*, **21**, 441(1988)
11. Worthington, C. : *Worthington Enzyme Manual*, p. 254, Worthington Biochemical Co., Freehold, New Jersey(1988)
12. Scopes, R. : *Protein Purification*, p. 199, Springer-Verlag, New York(1982)

(1990년 3월 30일 접수)