

## 콩나물 Peroxidase의 열안정성과 재활성화

이민경 · 길지은 · 박인식<sup>†</sup>  
동아대학교 식품영양학과

### Thermostability and Reactivation of Peroxidase from Soybean Sprouts

Min-Kyung Lee, Ji-Oeun Kil and Inshik Park<sup>†</sup>

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

#### Abstract

The factors affecting thermostability and reactivation of peroxidase from soybean sprouts (*Glycine max* L.) were investigated. The enzyme was the most stable at pH 7.0 and below 60°C. Thermostability of the enzyme was reduced by addition of sodium chloride and saccharides. The partially inactivated enzyme by heat treatment at 75°C for 10 min was reactivated up to 211.5% at the optimal reactivation condition. The optimal pH and temperature for reactivation of the enzyme were pH 9.0 and 40°C, respectively. The reactivation was completely inhibited by addition of sulfhydryl reagent such as L-cysteine.

**Key words:** thermostability, reactivation, peroxidase, soybean sprouts

#### 서 론

Peroxidase(E.C. 1.11.1.7)는 시금치(1), 키위(2), 배(3), 복숭아(4), 토마토(5), 바나나(6), 포도(7) 등의 식물체에 널리 분포되어 있고 heme을 함유하는 당단백으로, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 존재하에서 기질을 산화시키는 효소이다. 특히 과일과 채소중의 peroxidase는 열이나 냉동시에 안정하여 통조림이나 냉동식품으로 가공하는 공정에서 효소적 갈변을 유발하여 향미손상을 일으킨다는 보고가 있다(8). Joslyn(9)은 식품에서의 peroxidase의 활성화는 식품의 향미감소와 비례한다고 하였으며 Burnette(8)도 peroxidase는 가공식품의 향미, 색깔, 질감, 그리고 영양학적인 질을 악화시킨다고 하였다. 또한 Nesbky 등(10)은 peroxidase가 야채 blanching의 지표로서 유용한데, peroxidase의 열에 대한 안정성 때문에 효율적인 blanching이 어렵고 야채의 크기, 모양, 밀도 등도 영향을 미친다고 하였다. 그러므로 식품에 존재하는 peroxidase를 완전히 불활성화 시키지 못하였을 때는 잔존한 peroxidase효소의 재활성화로 인하여 peroxidase활성이 증가되며 식품의 변질을 일으킨다고 하며 peroxidase의 불활성과 재활성화의 속도는 온도나 blanching

시간, pH, 염의농도 등 많은 요소에 의해 영향을 받는다고 보고되었다(11,12). 이런 peroxidase의 열안정성에 대하여는 많은 논문이 보고된 바 있는데 순무(13), 양배추(14), 사과(15), 망고(3), 감자(16), 포도(17) 등이 있다. 본 연구에서는 아직 밝혀진 바 없고, 우리가 흔히 먹는 콩나물에 존재하는 peroxidase의 열에 대한 안정성과 재활성화에 관하여 조사하고, 열이나 당의 첨가, 환원제의 첨가 등이 효소의 안정성 및 재활성화에 미치는 영향을 살펴보고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

본 실험에 사용한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 Junsei사 제품을, guaiacol, L-cysteine 등은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였고 콩나물(*Glycine max* L.)은 부산광역시 사하구 하단동 근처 시장에서 구입하였다.

##### 조효소액의 조제 및 정제

콩나물(774g)은 줄기부분만을 다듬어 동량의 50mM Tris-HCl(pH 7.0)완충액을 첨가하여 믹서로 3분간 마

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

쇄한 후 cheese-cloth로 여과한 다음 4°C, 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 그리고 조효소액은 Lee(18)의 방법에 의하여 정제하여 본 실험에 사용하였다.

### 효소활성 측정

콩나물 peroxidase 분석에 있어서 반응액의 최종 농도는 과산화수소 5mM, guaiacol 15mM이었다. 사용한 완충액은 0.1M Tris-HCl(pH 7.0)이었으며 50μl의 효소액을 첨가하여 50°C에서 1분간 반응시켰다. 효소 반응액의 총 부피는 3ml이었으며 효소 반응 후에 470nm에서 흡광도를 이용하여 효소활성을 측정하였다(1).

### 효소의 열안정성 측정

#### pH의 효과

효소액에 pH 3.0에서 pH 10.0까지 변화시킨 완충액을 동량 첨가하여 75°C에서 10분간 열처리후에 잔존하는 효소활성을 열처리전과 비교하였다. 분석은 효소의 표준 효소활성 측정법으로 하였으며 반응에 쓰인 완충액(0.1M)은 pH 3.0은 Na-glycine, pH 4.0~5.0은 Na-acetate, pH 6.0은 Na-phosphate, pH 7.0~8.0은 Tris-HCl, 그리고 pH 9.0~10.0은 Na-borate를 사용하였다.

#### 온도의 효과

효소액에 0.1M Tris-HCl(pH 7.0) 완충액을 1:1로 혼합한 후 20°C에서 80°C까지의 각 온도에서 30분 방치후에 잔존하는 효소활성을 표준 효소활성 측정법으로 측정하였다.

#### 염의 효과

효소액에 0.1M Tris-HCl(pH 7.0) 완충액을 1:1로 혼합하고 여기에 NaCl을 농도별로 첨가하였다. 이것은 75°C에서 10분간 열처리하여 효소의 표준 효소활성 측정법으로 측정하여 열처리전과 비교하였다.

#### 당의 효과

효소액에 0.1M Tris-HCl(pH 7.0) 완충액을 1:1로 혼합한 후 glucose, sucrose, maltose, lactose, fructose 등을 반응액의 1%가 되도록 첨가하였다. 이것은 또한 75°C에서 10분간 열처리하여 효소의 표준 효소활성 측정법으로 측정하였다.

### 효소의 재활성화 측정

#### pH의 효과

효소액을 75°C에서 10분간 열처리하여 부분적으로 불활성화 시켰다. 여기에 완충액을 pH 3.0에서 pH 10.0

으로 변화시켜 효소액과 동량 첨가하였다. 이것을 37°C에서 24시간 보관후에 표준 효소활성 측정법에 의해 측정하였으며 0 time을 100%로 하여 relative activity로서 나타내었다.

#### 온도의 효과

효소액을 75°C에서 10분간 열처리하여 불활성화 시키고 여기에 0.1M Na-borate(pH 9.0) 완충액을 효소액과 동량 첨가하였다. 이것을 20°C에서 80°C까지 온도를 변화시켜 각 온도에서 1시간 방치한 후에 표준 효소활성 측정법으로 측정 하였다.

#### 효소의 불활성 정도에 따른 재활성화

효소액을 60°C 20분(63.6%), 75°C 10분(43.3%), 75°C 30분(26.0%), 75°C 1시간(17.1%)으로 열처리하여 각 불활성의 정도를 달리하였다. 이것은 0.1M Naborate(pH 9.0) 완충액과 1:1로 섞은 후에 40°C에서 30분후, 1시간후, 2시간후, 4시간후, 6시간후에 표준 효소활성 측정법으로 효소의 활성을 측정하여 reactivation rate로 나타내었다. Reactivation rate는 각 시간마다 측정된 효소의 활성도에서 각각의 열처리한 직후(0 time)의 활성도를 뺀 것을, 원래의 열처리전 효소활성도에서 0 time의 활성도를 뺀 것으로 나눈 뒤 백분율로 환산한 값이다.

#### 원원제의 효과

효소액을 75°C에서 10분간 부분적으로 불활성화 시킨 후 0.1M Na-borate(pH 9.0) 완충액을 동량 첨가하고 여기에 L-cysteine을 반응액의 1mM, 2.5mM이 되게 첨가하였다. 이것은 30°C에서 60분 방치하는 동안 10분마다 효소활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 열안정성에 대한 pH의 효과

Fig. 1은 열안정성에 미치는 pH의 효과를 나타낸 것으로 효소액은 pH 7.0에서 가장 안정함을 보였는데 Lu와 Whitaker(12)의 연구에서도 horseradish peroxidase의 경우 pH 7.0에 도달하였을 때 가장 안정하였다고 보고한 바가 있다. 즉 peroxidase의 열에 대한 불활성화 속도가 pH에 의존한다고 하였는데 horse radish peroxidase의 경우 효소의 불활성화 속도는 pH가 4.0에서 7.0까지 증가하였을 때는 8배 감소하였고 pH가 10.0까지 증가하였을 때는 2배 감소하였다고 보고하였다.

### 열안정성에 대한 온도의 효과

Fig. 2는 콩나물 peroxidase의 열안정성에 대한 온도의 효과를 나타낸 것이다. 60°C까지는 80% 이상의 높은

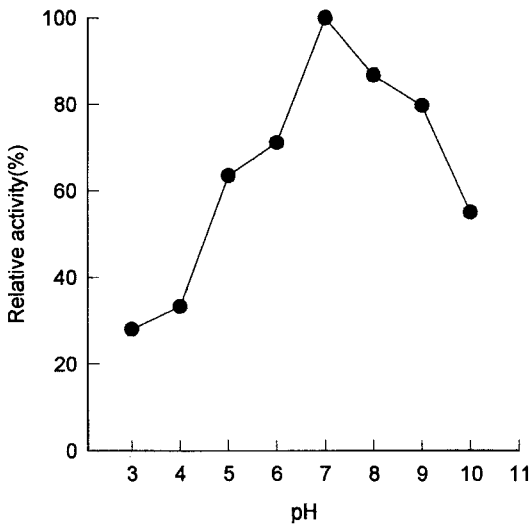


Fig. 1. Effect of pH on thermostability of peroxidase from soybean sprouts. The enzyme of various pH values were incubated for 10 min at 75°C. The residual activity of the enzyme was measured.

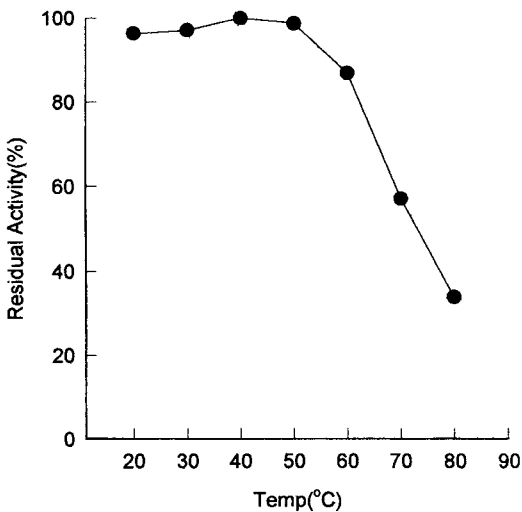


Fig. 2. Thermal stability of peroxidase from soybean sprouts. Enzyme solution was incubated at various temperatures for 30 minutes.

안정성을 나타내어 peroxidase가 내열성 효소임을 알 수 있었다. 한편 Moulding 등(19)의 연구에서는 정제된 사과 peroxidase의 경우에 열처리한 효소를 30°C에서 보관하였을 경우 원래 효소활성의 80%까지 나타내었다고 보고한 바가 있다.

열안정성에 대한 염의효과

NaCl을 농도별로 첨가하여 열안정성에 대한 염의 효과를 조사한 결과 Table 1에서와 같이 열안정성을 감소시키는 것으로 나타났으며 NaCl을 10% 첨가시에는 62.7%로 크게 감소됨을 보였다. Lopez와 Burgos(20)는 KCl 첨가시 열안정성을 보호한다고 하였으나 Lu와 Whitaker(12)의 연구에서는 0.6M NaCl 첨가시 열에 대한 안정성을 크게 감소한다고 하여 본 연구는 Lu 등의 결과와 일치하였다.

열안정성에 대한 당의 효과

콩나물 peroxidase의 열안정성에 대한 당의 효과는, 각각의 당을 첨가했을 때 열안정성을 감소시키는 것으로 나타났다(Table 2). 이는 Chang 등(21)의 연구에서 fructose같은 당의 첨가가 열안정성을 크게 감소시켰고, 이는 환원당과 단백질의 아미노산과의 상호작용 때문에 열안정성을 감소시키는데 효과적이라고 한 것과 일치하였다. 한편 Back 등(22)은 당과 polyhydric alcohols은 열에 의한 변성에 의해 단백질의 구조를 보호한다고 보고한 바가 있다.

효소의 재활성화에 대한 pH의 효과

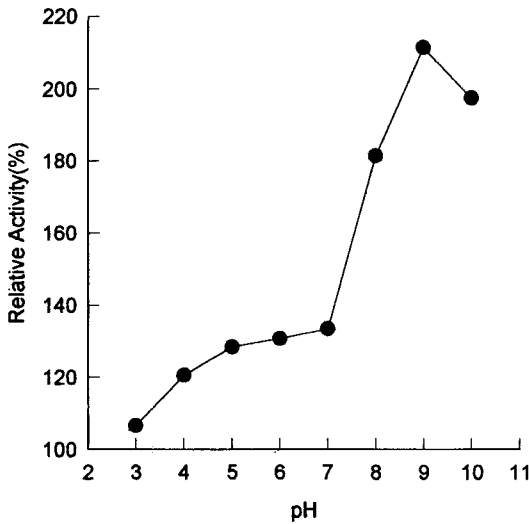
Lopez와 Burgos(20), Makino 등(23), Lee 등(24)의 연구에서와 같이 peroxidase는 부분적으로 불활성된 후에 재활성된다는 보고가 있다. 따라서 본 연구에서도 콩나물 peroxidase의 재활성에 미치는 pH의 효과를 Fig. 3에 나타내었다. pH 9.0에서 211.5%의 가장 높은 재활성을 나타내었고 pH 10.0에서는 197.6%, pH 8.0에

Table 1. Effect of NaCl on thermostability of peroxidase from soybean sprouts

NaCl conc.(%)	Relative activity(%)
0.0	100
0.5	91.9
1.0	90.2
2.5	83.4
5.0	68.0
10.0	62.7

Table 2. Effect of saccharides on thermostability of peroxidase from soybean sprouts

Added compound(1%)	Relative activity(%)
None	100
Glucose	84.7
Sucrose	67.4
Maltose	53.0
Lactose	71.0
Fructose	62.9



**Fig. 3. Effect of pH on reactivation of peroxidase from soybean sprouts.**  
The enzyme solution was preincubated at 75°C for 10 minutes. Enzyme solution was measured at various pH values after 24 hr at 37°C.

서는 181.4 %로 나타나 산성 용액에 비해 알칼리 용액에서 재활성이 잘 된다는 것을 알 수 있었다. Lu와 Whittaker(12)의 연구에서도 pH 9.0에서 효소의 재활성이 최대로 나타났다.

**재활성화에 대한 온도의 효과**

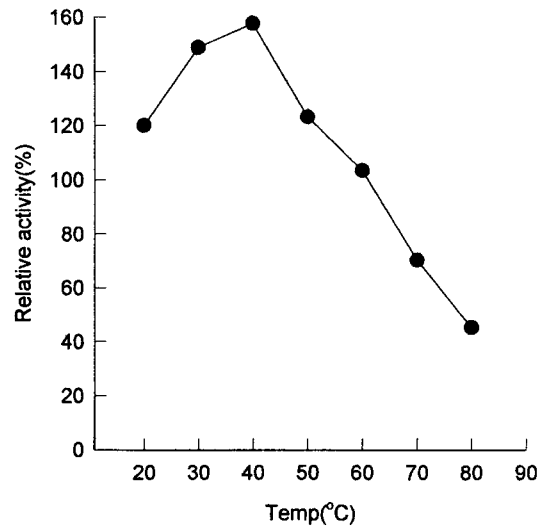
Fig. 4는 효소의 재활성화시에 미치는 온도의 효과를 알아본 것이다. 40°C에서 157.7%로 가장 활성이 높았으며 30°C에서도 148.8%로 높은 재활성을 나타내었다. Lopez와 Burgos(20)는 효소액을 4°C에서 보관했을 때 보다 실온에서 보관시에 더 빠른 재활성화를 나타내었다고 보고한 바가 있다.

**효소의 불활성 정도에 따른 재활성화**

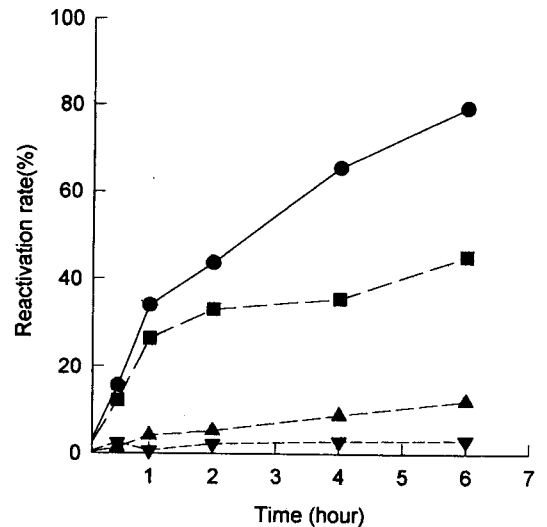
Fig. 5는 효소액을 60°C 20분(63.6%), 75°C 10분(43.3%), 75°C 30분(26.0%), 75°C 1시간(17.1%)으로 불활성의 정도를 달리하여 재활성화를 알아본 것인데 잔존하는 효소의 활성이 높을수록 재활성화가 잘 되었음을 알 수 있었다. 이는 Lopez와 Burgos(20)의 연구에서도 나타난 바가 있어 본 논문과 비슷한 결과를 나타내었다. 한편 Tamura와 Morita(25)는 열처리한 peroxidase에 prohaemin의 첨가에 의해 빠른 재활성화가 됨을 나타낸 보고가 있다.

**재활성화에 대한 환원제의 효과**

효소의 재활성화에 미치는 환원제의 효과를 알아보



**Fig. 4. Effect of temperature on reactivation of peroxidase from soybean sprouts.**  
The enzyme solution was preincubated at 75°C for 10 minutes. Enzyme solution was measured at various temperatures after 1 hr.



**Fig. 5. Dependence of activity recovery at 40°C from degree of inactivation.**  
Reactivation of peroxidase samples after heat inactivation up to 17.1%, 26.0%, 43.3%, 63.6%.  
—●— 63.6%, —■— 43.3%, —▲— 26.0%, —▼— 17.1%

기 위해 L-cysteine을 농도별로 첨가해본 결과 L-cysteine과 같은 환원제가 효소의 재활성화를 방해함을 알 수 있었다(Fig. 6). 이것은 peroxidase는 disulfide결합이 존재하는데, 환원제의 첨가는 효소의 재활성화에 필

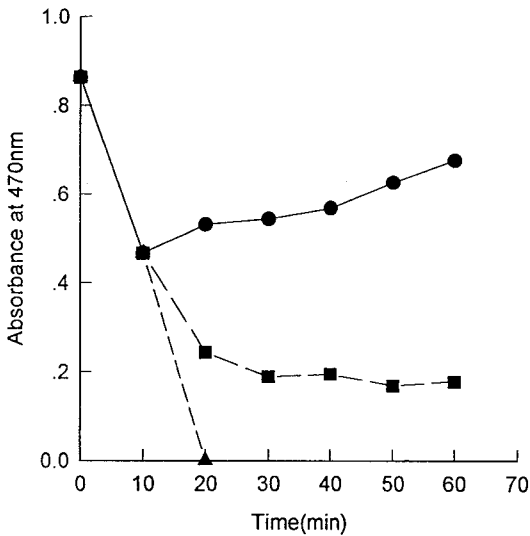


Fig. 6. Effect of L-cysteine on reactivation of peroxidase from soybean sprouts.

The enzyme solution was preincubated at 75°C for 10 min and then L-cysteine was added.

—●— control, —■— 1mM L-cysteine added, —▲— 2.5mM L-cysteine added

요한 disulfide구조를 sulfhydryl기로 변화시키기 때문인 것으로 생각된다.

## 요 약

콩나물로부터 peroxidase를 추출, 정제하여 열에 대한 안정성과 재활성화, 그리고 pH나 온도가 미치는 영향과 염, 당의 첨가효과, 환원제의 첨가효과 등을 조사하였다. 효소는 pH 7.0에서 가장 열에 대한 안정성이 높게 나타났으며 온도는 60°C 이하에서는 80% 이상의 높은 안정성을 나타내어 peroxidase가 내열성 효소임을 알 수 있었다. 또한 염이나 당의 첨가가 열안정성을 감소시키는 것으로 나타났다. 효소의 재활성화는 pH 9.0에서 211.5%의 가장 높은 재활성화를 보여 알칼리 용액에서 재활성화가 잘 되었고 온도는 40°C였다. 그리고 효소의 불활성화 정도를 달리하여 재활성화를 알아본 결과 잔존하는 효소의 활성이 높을수록 재활성화가 잘 되었음을 알 수 있었다. 또한 75°C에서 10분간 열에 대해 부분적으로 불활성화 시킨 효소에 L-cysteine과 같은 환원제를 첨가시 재활성화가 억제되었다.

## 감사의 글

이 논문은 1997년도 동아대학교 학술연구 조성비(공모과제)에 의하여 연구되었습니다.

## 문 헌

1. Wang, Z. and Luh, B. : Characterization of soluble and bound peroxidase in green asparagus. *J. Food Sci.*, **48**, 1412(1983)
2. Soda, I., Hasegawa, T., Suzuki, T. and Ogura, N. : Purification and some properties of peroxidase from kiwi fruit. *Agri. Biol. Chem.*, **55**, 1677(1991)
3. Moulding, P. H., Goodfellow, J., McLellan, K. M. and Robinson, D. S. : The occurrence of isoperoxidases in conference pears. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **24**, 269 (1989)
4. Flurkey, W. and Jen, J. : Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *J. Food Sci.*, **43**, 1826(1978)
5. Kokkinakis, D. and Brooks, J. : Tomato peroxidase : purification, characterization and catalytic properties. *Plant physiol.*, **63**, 93(1979)
6. Harrd, N. : Upsurge of particular peroxidase in ripening banana fruit. *Phytochem.*, **12**, 555(1973)
7. Sciancalepore, V., Longone, V. and Alviti, F. : Partial purification and some properties of peroxidase from *Malasia grapes*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 105(1985)
8. Burnette, F. : Peroxidase and its relationship to food and flavor and quality. *J. Food Sci.*, **42**, 1(1977)
9. Joslyn, M. A. : Enzyme activity in frozen vegetable tissue. *Adv. Enzymol.*, **9**, 613(1949)
10. Nebesky, E. A., Esselen, W. B. and Fellers, C. P. : Studies on the peroxidase in pickles and pears. *Food Technol.*, **5**, 110(1951)
11. Bruemmer, J. H., Roe, B. and Bowen, E. R. : Peroxidase reactions and orange juice quality. *J. Food Sci.*, **41**, 186(1976)
12. Lu, A. T. and Whitaker, J. R. : Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. *J. Food Sci.*, **39**, 1173(1974)
13. Servant, I., Gilot, B. and Gbert, H. J. : Comportement thermique des peroxydases de legumes. I. Etude experimentale. *J. Food Eng.*, **5**, 287(1986)
14. McLellan, K. M. and Robinson, D. S. : Heat stability of peroxidases from orange. *Food Chem.*, **13**, 139(1984)
15. Moulding, P. H., Grant, H. F., McLellan, K. M. and Robinson, D. S. : Heat stability of soluble and ionically bound peroxidase extracted from apples. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **22**, 391(1987)
16. Kahn, V., Goldshmidt, S., Amir, J. and Granit, R. : Some biochemical properties of soluble and bound potato tuber peroxidase. *J. Food Sci.*, **46**, 756(1981)
17. Robinson, D. S., Bretherick, M. and Donnelly, J. K. : The heat stability and isoenzyme composition of peroxidases in Ohane grapes. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **24**, 613(1990)
18. Lee, M. K. : Enzymatic determination of glucose using soybean sprouts peroxidase. *Korean J. Life Science*, **8**, 416(1998)
19. Moulding, P. H., Sinfleton, D. E., McLellan, K. M. and Robinson, D. S. : Purification and heat stability of Cox's apple pulp peroxidase isoenzymes. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **23**, 343(1988)

20. Lopez, P. and Burgos, J. : Peroxidase stability and re-activation after heat treatment and manothermosonication. *J. Food Sci.*, **60**, 451(1995)
21. Chang, B. S., Park, K. H. and Lund, D. B. : Thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase. *J. Food Sci.*, **53**, 920(1988)
22. Back, J. F., Oakenfull, O. and Smith, M. B. : Increased thermal stability of proteins in the presence of sugar and polyols. *Biochemistry*, **18**, 5191(1979)
23. Makino, R., Uno, T., Nishimura, Y., Iizuka, T., Tsuboi, M. and Ishimura, Y. : Coordination structures and re-activities of compound II in iron and manganese horseradish peroxidases. *J. Biol. Chem.*, **261**, 8376(1986)
24. Lee, K. A., Hong, J. M., Kim, G. N. and Park, I. S. : Factors affecting thermal inactivation and reactivation of Korean-radish peroxidase(in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **19**, 301(1990)
25. Tamura, Y. and Morita, Y. : Thermal denaturation and regeneration of Japanese-radish peroxidase. *J. Biochem.*, **78**, 561(1975)

(1998년 9월 10일 접수)