

Papaya중의 단백질 분해 효소와 Peroxidase의 열 불활성화

박관화 · 김재욱 · 신재두 · 노봉수
서울 대학교 농과 대학 식품 공학과
(1979년 5월 30일 수리)

Thermal Inactivation of Crude Papain and Papaya Peroxidase

Kwan Hwa Park, Ze Uook Kim, Jae Doo Shin and Bong Soo Noh

Department of Food Technology, College of Agriculture,
Seoul National University, Suwon

(Received May 30, 1979)

Abstract

Thermal properties of crude papain and crude peroxidase from domestic papaya were investigated. The crude extract of papaya was inactivated at the temperature range of 60°~90°C at pH 7.0 and the rest of the activities of papain and peroxidase were determined, respectively. The heat inactivation of papain and papaya peroxidase was biphasic at low temperature.

For the thermal inactivation of papain extract, the enthalpy of activation was 91.4 kJ/mol, the entropy of activation, -49.6 J/mol·K, and the free energy of activation, 108.5 kJ/mol. The activation energy for the inactivation of papaya peroxidase was 168.5 kJ/mol, the entropy of activation, 200.4 J/mol·K and the free energy of activation, 99.7 kJ/mol.

The thermal stability of papain showed that it has a possibility for use as a meat tenderizer. It was also discussed that papaya peroxidase could be more suitable as a biochemical criteria for heat treatment than papaya catalase.

서 론

파파야 라텍스(papaya latex)로부터 분리한 단백질 분해효소인 파파인(papain)과 카이모파파인(chymopapain)은 열 안정성이 비교적 크다고 알려져 있다⁽¹⁾.

이러한 열 안정성을 이용하여 육류의 연육소(meat tenderizer)로 이용하고 있는데 Kang등⁽²⁾은 파파야 라텍스에서 얻은 단백질 분해효소를 이용하여 육류 조리시에 효소의 역가 감소를 측정하였고 Ebata⁽³⁾등은 파파야 라텍스로부터 카이모파파인을 분리하여 열 안정성에 관한 실험을 하였다. 그러나 이들은 순수 분리한 후에 모형 용액중에서 실험하였던 바 주위 환경 인자의 영

향을 고려할 때 파파야의 조추출액(crude extract)에서의 단백질 분해효소의 열 불활성화과는 서로 다를 것이 예상된다. 따라서 본 실험에서는 최근 우리나라의 남해안 지방에서 재배가 시작된 파파야를 시료로 하여 조추출액을 취하여 실험하였다.

상업적인 파파야 퓨레(papaya puree)는 열 처리 과정이 없이 냉동하게 되어 저장 기간중에 향미 상실(off-flavor)을 유발하게 되는데 이러한 저장중의 품질 변화를 방지하기 위하여 적당한 열 처리를 하여 품질 변화에 관여하는 효소를 불활성화시키는 공정이 개발되어 오고 있다⁽⁴⁾. 이러한 열 처리중 한 예로 98.9°C(=210°F)에서 17초동안 처리하고 카탈라아제(catalase)의 잔류 역가를 측정하여 열 처리의 기준으로 삼고있다. 순수한 효소

의 열 특성을 조사한 것으로는 Chan 등¹⁵⁾이 파파야에 존재하는 카탈라제를 분리하고 열 안정성에 대하여 보고한 바 있다. 그밖에 파파야로부터 자당(sucrose)을 추출 할 때에는 과육에 존재하는 인버타제(invertase)의 작용으로 자당이 분해되기 때문에 효소의 열 불활성화가 중요한 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 한편 식품중에 함미 상실에 관여 할 것이라는 보고와 함께 퍼옥시다제 열 안정성에 대한 다수의 보고가¹⁷⁻¹⁹⁾ 있으며 이 효소의 열 안정성이 높은 사실이 밝혀진 후 퍼옥시다아제(peroxidase)의 잔류 역가를 측정하여 가열 시간을 정하는 기준으로 삼아 식품 등의 열 처리 공정을 합리화시키려 하고 있다^{10,11)}. 이는 열 안정성이 낮은 것으로 알려진 카탈라제의 잔류 역가 측정보다 효과적일 수도 있을 것으로 예상이 된다. 본 실험에서는 파파야 추출액중에 존재하는 퍼옥시다아제의 열 안정성을 조사하고 파파야 푸레등의 열 처리 등에 기준 효소로 사용 가능 한 지 여부를 알아 보았다.

재료 및 방법

1. 파파인 및 퍼옥시다아제 조효소액의 조제

실험에 사용한 시료는 전라남도 여천에서 재배한 파파야 열매를 절편으로 말린 것으로 유발에 넣고 마쇄하여 얻은 분말 1g 을 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0) 20 ml 에 가하고 5~6시간동안 침지시킨다음 여지로 여과한 여액을 조효소액으로 사용하였다.

2. 효소 용액의 열 불활성

Levine의 "Flask method"의 원칙을 변조한 방법¹²⁾을 사용하였다. 0.1 M 인산완충용액 20 ml를 수조에서 미리 열처리 온도까지 조절한 다음 자석식 교반기로 격렬히 교반하면서 2.0 ml의 효소용액을 가하고 일정한 시간 후 피펫으로 일정량을 신속히 채취하여 미리 열음으로 식힌 시험관에 옮겨 용액을 냉각시켰다.

3. 파파인 조효소액의 역가 측정

i) 용액의 조제

기질 ; 카제인(casein) 용액 : 1.2 g의 카제인과 5 N NaOH 0.5 ml를 증류수 100 ml에 혼합한 다음 90°C에서 15분간 가열하여 녹인 후 냉각시킨다음 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0)으로 2배 희석하여 37°C로 유지시켜 사용하였다.

단백질 침전시약 ; 0.11 M CCl₃COOH, 0.22 M CH₃COONa, 0.33 M CH₃COOH를 혼합하여 1 l되게 한 용액을 사용하였다.

ii) 측정

기질 용액 5 ml를 취하여 열처리한 효소액 1 ml와 혼합하여 10 ml들이 시험관에 넣은 후 37°C에서 교반하

면서 20분동안 반응시켰다. 이 반응액에 단백질 침전시약을 5 ml를 가하여 효소 반응을 중단시키고 37°C에서 20분간 계속하여 침전시킨 후 여과하였다.

이 여과액 1 ml에 0.55 M Na₂CO₃ 용액 5 ml와 Folin 시약(3배 희석액) 1 ml를 가하여 37°C에서 20분동안 발색시킨 후 분광광도계를 써서 660 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 단위시간당 반응생성물의 흡광도의 변화($\Delta E/\Delta t$)를 효소의 역가로 하였다.

4. 퍼옥시다아제의 역가 측정¹²⁾

기질용액으로는 *o*-phenylenediamine 550 mg을 증류수 10 ml에 녹인 다음 에틸알코올 3 ml를 가하여 제조하여 사용하였다. 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0) 5 ml가 든 cuvette에 0.04 M H₂O₂용액 0.4 ml를 가하고 열처리한 효소액 2 ml를 첨가한 후 *o*-phenylenediamine용액을 0.4 ml를 넣고 단시간내에 흔들여 잘 섞은후 분광광도계(Spectronic 20A)를 써서 420 nm에서의 흡광도 변화를 시간 별로 측정하였다. 반응 생성물의 농도 증가에 의한 흡광도의 변화를 단위 시간당($\Delta E/\Delta t$) 측정하여 효소의 반응 속도로 하였다.

결 과

1. 파파인 조효소액의 열 불활성화

열처리 온도 60~90°C사이에서의 파파인(crude pap-

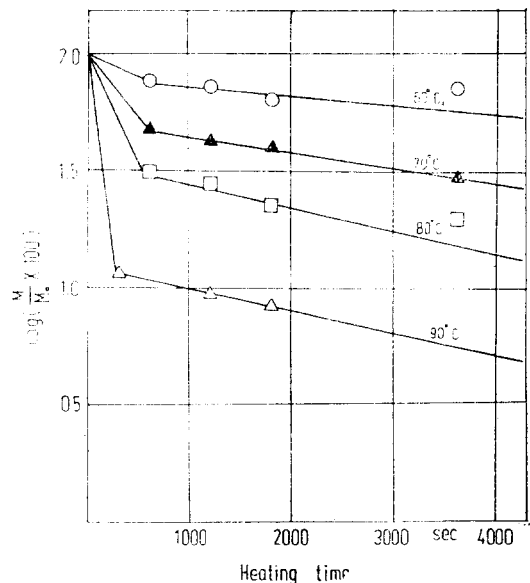


Fig. 1. Thermal inactivation of crude papain at various temperature in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0

M: enzyme activity at heating time t

M₀: enzyme activity at heating time zero

ain)의 잔류 역가를 시간에 따라 표시한 열 불활성 곡선은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 각 온도에서의 열 불활성화 곡선은 꺾여지는 점을 보여주고 있다.

Fig. 1에서 D-value를 각 온도별로 구하고(Table.

1) 이들을 온도에 따라 그린 결과는 Fig. 2와 같다.

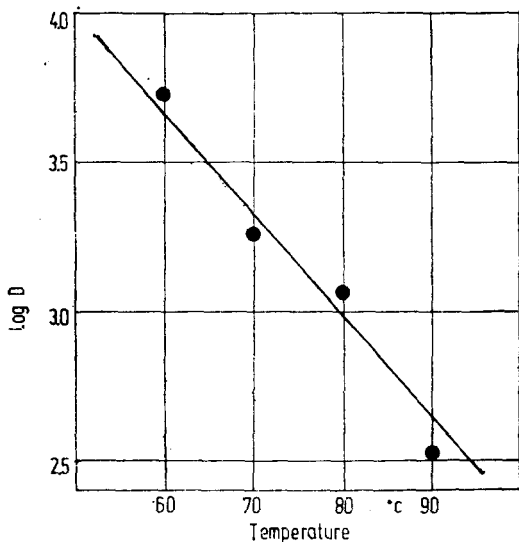


Fig. 2. Thermal destruction curve for inactivation of crude papain

다시 Fig. 2로부터 z-value를 구하여 Table 1에 적었다.

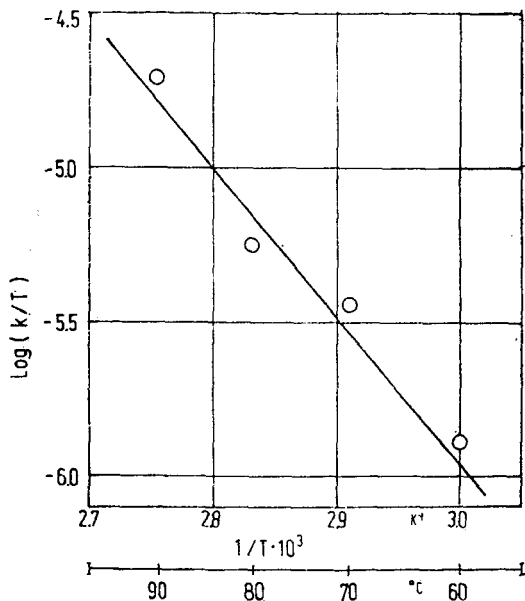


Fig. 3. Inactivation rate constant of crude papain as a function of temperature

Table 1. First order reaction rate constants and D-value for inactivation of crude papain

Heating temperature (°C)	D-value(sec)	Reaction rate constants, K (sec ⁻¹ ·10 ⁴)
60	5,420	4.25
70	1,814	12.6
80	1,157	19.9
90	328	70.2

z-value.....29.4°C

Table 2. Thermodynamic constants for inactivation of crude papain

Temp(°C)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	ΔG^\ddagger (kJ/mol)	ΔS^\ddagger (J/mol·K)
70	91.427	108.465	-49.64

절대 반응 속도 이론에 의거한 열 역학적인 값은 반응 속도상수 k를 Eyring의 방법⁽⁶⁾에 의하여 도식한 Fig. 3에 의하여 산출하여 Table 2에 수록하였다.

2. 퍼옥시다아제(crude peroxidase)의 열 불활성화 열 처리 온도 60°, 65°, 70°, 75°, 그리고 80°C에서의 파파야 퍼옥시다아제의 열 불활성화 곡선은 Fig. 4와 같다.

60°~70°C에서는 열 불활성 곡선에서 꺾여지는 점을 관찰할 수 있었고 75°C 이상에서는 퍼옥시다아제의 역

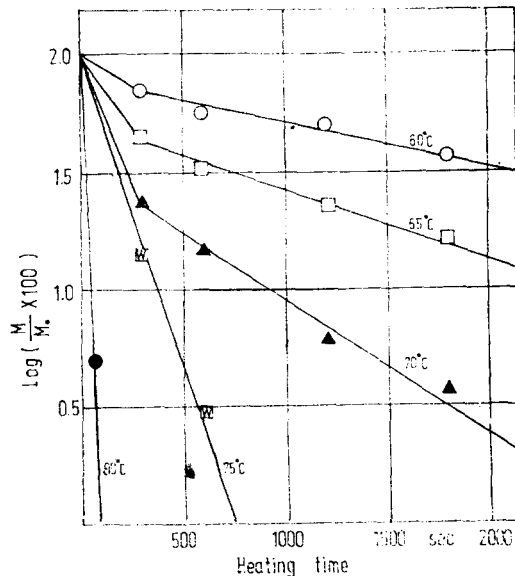


Fig. 4. Thermal inactivation of papaya peroxidase at various temperature in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0

M: enzyme activity at heating time t
M₀: enzyme activity at heating time zero

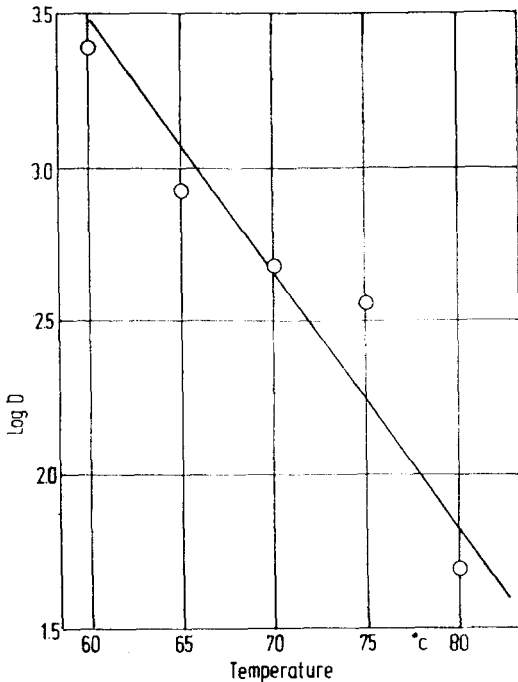


Fig. 5. Thermal destruction curve for inactivation of papaya peroxidase

Table 3. First order reaction rate constants and D-value for inactivation of papaya peroxidase

Heating temperature (°C)	D-value(sec)	Reaction rate constants, K (sec ⁻¹ ·10 ⁴)
60	2505	9.194
65	840	27.42
70	485	47.48
75	345	66.75
80	50	465.6

z-value.....12°C

Table 4. Thermodynamic constants for inactivation of papaya peroxidase

Temp. (°C)	ΔH‡ (kJ/mol)	ΔG‡ (kJ/mol)	ΔS‡ (J/mol·K)
70	168.49	99.723	200.4

가는 가열처리 시간에 따라 지수 함수적으로 감소하였다.

Fig. 4에서 D-value를 구하고(Table 3) 이들의 온도에 대한 영향을 Fig. 5에 표시하였다.

고 찰

파파인과 퍼옥시다아제의 열 불활성 곡선(Fig. 1과 Fig. 4)은 다같이 꺾여지는 점을 보여주고 있다. 이는 두 효소의 열 불활성화가 1차반응을 따르고 있지 않음을 시사하는 것으로 고추냉이 퍼옥시다아제(horse radish peroxidase), 리폭시제 나제(lipoxygenase)등에서 보여 주고있는 바와 같은 경향을 나타내고 있다⁽¹²⁾.

Kang⁽²⁾에 의하면 파파인의 열 안정성은 70 °C, pH 7.0에서 30분간 처리하여 40 %정도의 역가 감소를 보였고 파파인 조효소액의 대부분을 이루고 있는 카이모파파인은 75 °C, pH 7.2에서 75분 처리하였을 때 50 %의 감소를 보였다⁽⁶⁾. 본 실험에서는 70 °C에서 30분간 처리하였을 때 역가가 약 40 % 감소하였다. 지금까지 보고된 것보다는 파파인의 열 안정성이 약간 저하된 것으로 보이나 이는 실험 조건이 서로 동일하지 않은 까닭으로 보여진다.

파파인 조효소액은 본 실험에서 보는 바와 같이 다른 식물체로부터 분리된 단백질효소보다 열에 대한 안정성이 현저히 크다. 이는 연육소로써의 조건을 충분히 갖추고 있는 것으로 보인다.

파파야 퍼옥시다아제는 고추냉이 퍼옥시다아제에 비하여 열 안정성이 현저히 떨어졌다. 고추냉이 퍼옥시다

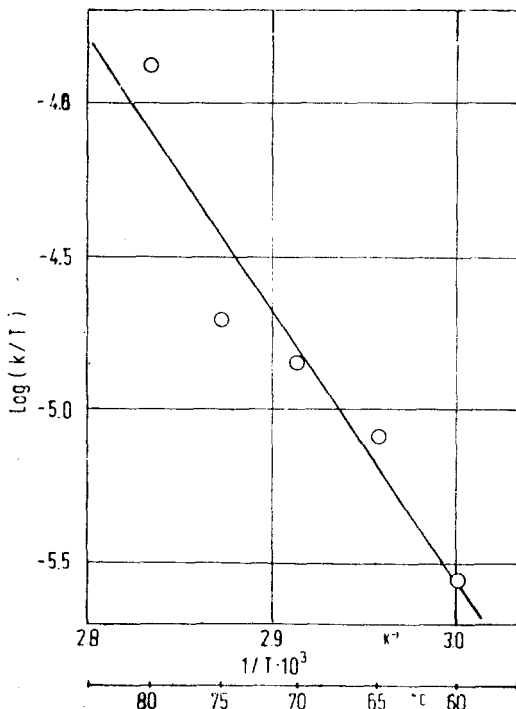


Fig. 6. Inactivation rate constant of papaya peroxidase as a function of temperature

아제는 80°C pH 7.0에서 D-value가 약 400초인 것에 비해 파파야 퍼옥시다아제는 같은 조건에서 50초이었다. 시금치의 퍼옥시다아제 조효소액은 80°C, pH 7.0에서 D-value가 20초⁽¹²⁾이다. 또한 z-value를 비교해보면 파파야 퍼옥시다아제가 12°C, 시금치 퍼옥시다아제가 18°C, 고추냉이 퍼옥시다아제는 25°C이다. z-value에서도 파파야와 시금치의 경우는 비슷한 값을 보이나 고추냉이에 존재하는 퍼옥시다아제보다는 훨씬 떨어진다. 파파야 퍼옥시다아제는 80°C의 열처리에서 대부분 불활성화되는 것으로 볼 수 있겠다.

퍼옥시다아제는 열 불활성화된 후 일정한 저장 기간동안에 다시 재활성화된다고 알려져 있다. 이 재활성화 정도를 조사하여 이 효소의 잔류 역가와 파파야퓨레 등의 품질을 연관시켜 연구하는 것도 바람직한 일이라 하겠다.

파파야 퓨레의 열 처리 정도를 알기 위해 카탈라아제의 잔류 역가를 측정하고 있는데 파파야 카탈라아제는 열에 극히 불안정하여 65°C에서 D-value가 9초이며 85.6°C에서는 6.4×10^{-3} 초이다⁽⁶⁾. 이에 비하면 파파야 퍼옥시다아제의 잔류 역가를 열처리 indicator로 사용하는 것이 적당할 것 같다.

요 약

최근 우리나라의 남부지방에서 재배가 되어 시판되고 있는 파파야를 시료로하여 조효소액을 만들고 단백질 분해효소와 퍼옥시다아제의 열 불활성화 실험을 pH 7.0, 60°C~90°C에서 행하고 다음과 같은 열 역학적 자료를 얻었다. 비교적 저온에서는 파파인과 파파야 퍼옥시다아제는 각각 깎여지는 점을 보였고 단백질 분해효소의 경우 70°C에서 활성화 엔탈피(enthalpy of activation) 91.4 kJ/mol, 활성화 엔트로피(entropy of activation) -49.6 J/mol·K, 활성화 자유에너지(free energy of activation) 108.5 kJ/mol 이었고 퍼옥시다아제의 열 불활성화에서는 70°C에서 활성화 엔탈피 168.5 kJ/mol, 활

성화 엔트로피 200.4 J/mol·K, 활성화 자유에너지 99.7 kJ/mol 이었다.

파파인은 비교적 열에 안정하여 연속으로 사용할 수 있는 가능성을 보였고 파파야 퍼옥시다아제도 카탈라아제보다는 열에 안정하여 열처리 공정의 생화학적 지시약(indicator)으로 사용하는 편이 좋을 듯하다.

본 연구는 문교부 학술조성연구비 지원으로 수행된 것임.

문 헌

1. Jansen, F. F. and Balls, A. K.: *J. Biol. Chem.*, **137**, 459 (1941)
2. Kang, C. K. and Warner, W. D.: *J. Food Sci.*, **39**, 812 (1974)
3. Ebata, M. and Yasunobu, K. T.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1086 (1962)
4. Chan, H. T. Jr., Flath, R. A., Forrey, R. R., Cavalletto, C. G., Nakayama, T. O. M. and Brekke, J. E.: *J. Agr. Food Chem.*, **21**, 566 (1973)
5. Chan, H. T. Jr., Tam, S. Y. T. and Koide, R. T.: *J. Food Sci.*, **43**, 989 (1978)
6. Chan, H. T. Jr. and Kwok, S. C. M.: *J. Food Sci.*, **41**, 320 (1976)
7. Park, K. H. and Fricker, A.: *Z. Ernährungswiss.*, **16**, 81 (1977)
8. Joffe, F. M. and Ball, C. O.: *J. Food Sci.*, **27**, 587 (1962)
9. Winter, E.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, **145**, 3 (1971)
10. Böttcher, H.: *Die Nahrung*, **19**, 173 (1975)
11. Park, K. H. and Loncin, M.: 5th *International Congress of Food Sci. & Technol.*, 3a-32 (1978)
12. Park, K. H.: Dissertation, University of Karlsruhe, Germany(1976)