한국농화학회지 Vol. 22, No. 1, March 1979
J. Korean Agricultural Chemical Socitey

Horseradish Peroxidase의 열불활성화에 Lecithin과 지방산이 미치는 영향

박 관 화
서울대 농대 식품공학과
(1978. 10. 16. 수리)

Influence of Lecithin and Fatty Acids on the Thermal Inactivation of Horseradish Peroxidase

Park K.H.
Dept. of Food Technology, Seoul National University.
(Received Oct. 16, 1978)

SUMMARY

A study was carried out about the effect of free fatty acids and lecithin on the thermal inactivation of horseradish peroxidase. In presence of lecithin peroxidase was inactivated very rapidly at 70°C and pH 7.0, and showed also a rapid inactivation curve at 0°C and pH 4.0.

Linoleic acid was more effective in an O_2-stream than in a N_2-stream, but oleic acid showed a similar tendency in the presence of O_2-and N_2 stream. From the results of the experiment we suggested that the opening of the heme crevis of peroxidase in the presence of lecithin and the produced lipidperoxide from linoleic acid may accelerate the thermal inactivation of horseradish peroxidase respectively.

서 론

식품을 저장하는 중에 그 품질을 변하게 하는 효소들을 불활성화 하기 위하여 열처리를 행하고 있다. 이때 효소의 열에 의한 불활성화는 열처리 조건, 즉 열처리 될 때의 환경인자가 중요한 역할을 한다고 알려져 왔다.[1,2] 식품중에 있는 여러가지 성분들은 이와같은 열처리 환경인자로써 다양하게 작용할 것이라는 것이 예상된다. 즉 식품중의 세포내 물질은 열처리 시에 효소를 보호하거나 또는 효소의 구조를 열역학적으로 불안정하게 하여 열안정성을 감소시키는 역할을 할 것이다. Ivanetich 등[3]은 cytochrome c가 mitochondria 내의 인지질과 복합체를 형성하는 것을 관찰하였다. 식물체내에 존재하는 peroxidase도 이와 비슷한 방법으로 생체내에서 인지질과 복합체를 형성할 수도 있으며 이러한 경우의 peroxidase-phospholipid 복합체가 효소 단독으로 존재할 때보다 열불활성화에 안정한 것인지 여부는 궁금한 일이다. 한편 Chio 등[4]은 지방의 과산화물의 분해산물인 malondialdehyde가 직접 효소를 불활성화 시키는 것이라고 추정한 바 있다. Svensson 등[2]은 linoleic acid 존재하에 lipoxygenase의 열불활성화를 관찰하고 지방의 자동산화 결과 생성된 과산화물이 작용한 것이라고 밝혔다. 따라서 본 실험에서는 식물체내에 다량으로 존재하는 인지질은 계면활성제이므로 표면장력과 효소의 불활성화 정도와는 어떤 관계가 있을 것이라 추정하

고 인지질 이외의 계면활성제 및 지방산을 효소용액에 첨가한 후 열처리하고 첨가하지 않은 효소용액의 열처리구와 비교하여 그 효과를 조사하고 식품의 열처리 공정에 이러한 결과를 이용할 수 있는지를 실험, 검토하였다.

재료 및 실험방법

1. 재료 : horseradish peroxidase. Boehringer의 순도 I (Reinheitsgrad I, 250 U/mg)을 구입 사용하였고 linoleic acid(>99%)는 Sigma 회사의 것을 사용하였다. oleic acid와 lauric acid, ovolecithin은 Merck 회사 제품을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 효소의 열처리 : 효소용액의 열처리는 flask method를 사용하였다.

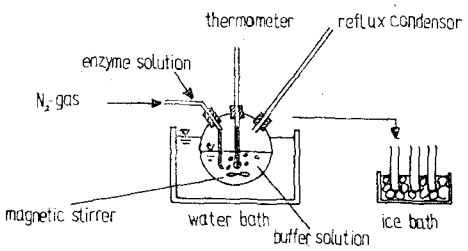

Fig. 1. Apparatus for thermal inactivation of enzyme

Fig. 1과 같이 장치한 밑이 둥근 삼구 플라스크에 28ml의 완충용액을 넣고 열처리하고자 하는 온도에까지 도달하게 한 후 자석식 교반기로 교반하면서 2ml의 효소용액을 가하고 일정시간 후에 피펫으로 1ml 가량을 취하여 얼음으로 냉각시켜 놓은 시험관에 옮겨 냉각시켰다. 질소 또는 산소 존재 하에 열처리 하는 경우에는 길이 50cm 가량의 유리관을 달아 수증기를 응축 시켰고 완충용액은 열처리 15분 전에 해당되는 기체를 미리 통과시켜 포화시켰다. lecithin의 suspension은 0.1M 인산완충용액에 lecithin을 가하고 Biosonik Ⅲ (Bron-will Scientific)을 사용하여 1분간 초음파 처리하였다. 유리지방산은 ethanol에 녹여 표준용액으로 하고 해당하는 양을 취하여 0.1 M 인산완충용액에 가하였다. 이때 ethanol의 양은 이의 영향을 무시할 수 있을 정도 미량이었다.

2) 효소의 역가 측정

peroxidase의 역가는 guaiacol 방법을 사용하였다. 0.1M 인산완충용액(pH 7.0) 2.95ml, 20 mM guaiacol 용액 0.05ml와 peroxidase 용액 0.05ml를 차례로 cuvette에 넣고 섞은 후 40mM H_2O_2 용액 0.01ml를 가하여 격렬히 흔들어 준다음 곧 Zeiss spectro photometer(PM Q Ⅱ) 470nm에서 연속적으로 흡광도를 측정하고 시간당 흡광도의 변화를 효소의 역가로 표시하였다.

실험결과

가. Oleic acid와 Linoleic acid가 산소 및 질소의 존재하에서 미치는 영향

지방산의 산화물이 peroxidase의 열불활성화에 미치는 영향을 규명하기 위하여 oleic acid와 linoleic acid의 emulsion에 산소 및 질소가스를 유입시키면서 열처리하였다. oleic acid를 첨가한 실험구에서 산소및 질소 존재하에 얻은 불활성화 커브와 질소 존재 하의 linoleic acid첨가구에서는 아주 유사한 불활성화 커브를 얻었다. (Fig. 2)

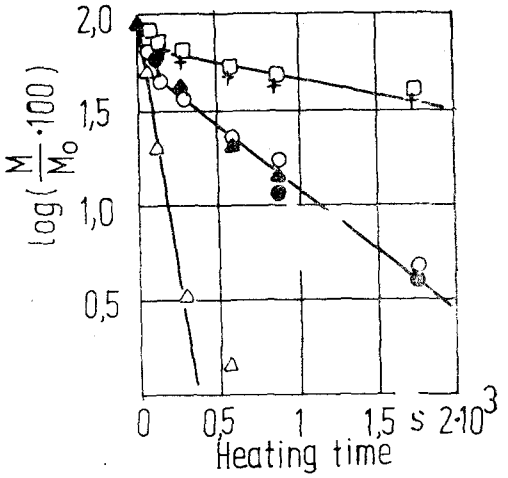

Fig. 2. Thermal inactivation of horseradish peroxidase in presence of fatty acid. Concentration of fatty acids: 100μM Heating: 70°C at pH 6.0. + palmitic acid in O_2 stream o oleicacid in O_2 stream ● oleic acid in N_2 stream ▲ linoleic acid in N_2 stream △ *linoleic acid in O_2 stream* □ without fatty acid M_0: initial activity. M: residual activity

그와 반면 linoleic acid를 첨가한 용액에 산소를 유입시킨 실험에서는 아주 급격한 커브를 보였다. palmitic acid의 경우는 별 영향을 보이지 않았다. 산소존재하에 linoleic acid를 첨가한 용액에서 70°C 10분간 처리한 peroxidase의 흡수

스펙트럼을 350nm~700nm에서 취하였다. 이때 무처리구와 linoleic acid 첨가구와의 조건을 동일하게 하기 위하여 무처리구는 열처리한 후 동일한 양의 linoleic acid를 첨가한 후 spectrum을 취하였다. Fig. 3에서와 같이 400nm 부근의 soret-band의 extinction은 linoleic acid 첨가 용액에서 무첨가 용액에서 보다 현저히 약화된 것을 볼 수 있다.

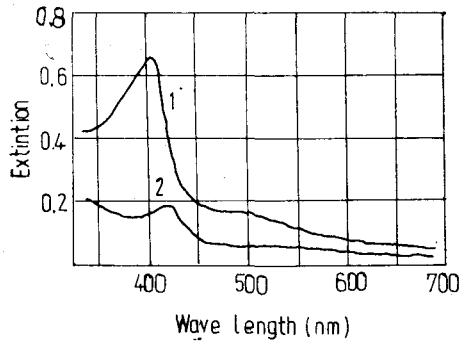

Fig. 3. Spectrum of heat inactivated peroxidase in presence of linoleic acid. Heating: 10 min. 70°C at pH 7.0. 1: heated in pure buffer solution 2: heated in presence of linoleic acid

나. Lecithin이 미치는 영향

Fig. 4에서와 같이 peroxidase의 열불활성화에 미치는 lecithin의 영향은 큰 것으로 나타났는데 산조 존재와 질소 존재하에서 보이는 영향은 서로 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. peroxidase

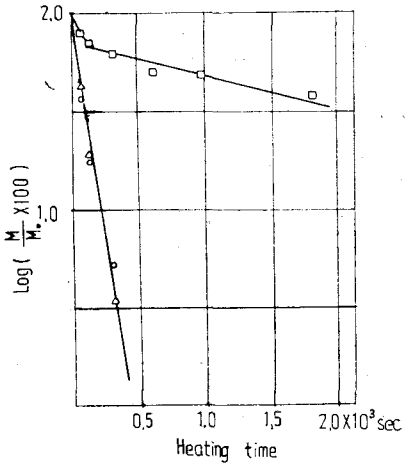

Fig. 4. Thermal inactivation of horseradish peroxidase. Effect of lecithin. lecithin concentration: 100μM

용액을 lecithin, 지방산, monoolein 존재하에 0°C의 얼음 수조에 30분및 90분간 각각 방치하고 그 역가를 측정하였다. (Fig. 5) 지방산과 monoolein의 존재하에서는 역가의 변화가 별로 없었으나 lecithin 존재하에서 peroxidase는 90분후에 약 6%의 잔류 역가를 급격히 불활성화된 것을 볼 수 있다.

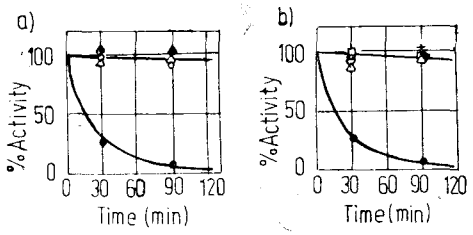

Fig. 5. inactivation of horseradish peroxidase in presence of lacithin at 0°C. concentration: 100μM

a) △ no surfactant at pH 6.0
▲ lecithin at pH 6.0
○ no surfactant at pH 4.0
● lecithin at pH 4.0

b) □ oleic acid at pH 4.0
+ palmitic acid at pH 4.0
▼ linoleic acid at pH 4.0
△ monoolein at pH 4.0
● lecithin at pH 4.0

위와같이 lecithin 존재하서에의 효소 불활성화가 가역적으로 일어났는지 불가역적으로 일어났는지를 알아보기 위해 위의 조건에서 30분 방치한 peroxidase 용액 5ml를 0.2N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 만든 후 0.1M 인산완충용액에 희석한 후 20°C에서 방치하였다. 1시간 및 18시간 후에 아무런 재활성화를 찾아볼 수 없었다.

고 찰

Lumry 등(5)은 계면활성제에 의한 단백질의 변성은 계면활성제와 단백질의 친유성기와의 van der Waals 결합에 의한 것이라고 가정하였다. 또한 두 물질 사이의 정전기적인 영향에 의한 것이라는 추정으로 설명하고 있다. Meyer 등(6)의 가설에 의하면 계면활성제가 단백질내의 친유성기의 결합을 약화시키면서 3차 구조의 변화를 가져와 단백질 변성을 초래한다고 하였다. linoleic acid는 산소 존재하에서 peroxidase 불활성화에

큰 영향을 미쳤다. 이 현상은 유리지방산의 계면 활성제로서의 영향 이외의 것으로, 가열하는 동안에 자동산화작용에 의하여 생긴 lipidperoxide에 의한 것으로 풀이할 수가 있겠다. linoleic acid의 용액을 가열하면 자동산화에 의해 1~3%의 lipidperoxide가 생성되는것이 알려져있어 이를 뒷받침 해 주고있다.

Chio 등(7)은 본 실험의 결과와 비슷한 lipidperoxide의 영향을 ribonuclease에서 관찰하였는데 lipidperoxide의 분해산물이 효소 분자와 분자내 또는 분자간의 결합형식으로 복합체를 만든다고 가정하였다.

Oleic acid는 산소및 질소 존재하에서 동일한 정도의 영향을 보였는데 oleic acid는 linoleic acid에 비해 자동 산화되는 속도가 크게 떨어지므로 산소 존재하에서도 lipidperoxide는 거의 생성되지 않았고 다만 유리 지방산의 효과만 보여준 것으로 보인다. 이는 linoleic acid가 질소 존재하에서 이들과 같은 정도의 영향을 보인 것은 이를 잘 뒷받침해 주고 있다. Fig. 5에서 보여주는 바와같이 lecithin은 0°C에서도 peroxidase를 불활성화시켰다. Ivanetich 등 (8)은 phospholipid와 ferricytochrome c는 복합체를 형성하는데 이때 ferricytochrome의 heme crevis에 변화가 있었음을 관찰하였다. 이와같이 본 실험에서도 lecithin과 peroxidase가 복합체를 형성하면서 peroxidase의 heme crevis에 변화를 초래하고 hemin과 apoprotein의 결합 위치에 산(pH 4.0)의 작용이 용이하게 하는 것으로 추정할 수 있겠다.

이상과 같이 식품 첨가물인 monoolein, 지방산 lecithin 등이 살균시에 효소의 불안정화 작용을 한다면 필요에 따라서는 식품의 열처리를 가벼게 할 수도 있어 살균에 의한 식품의 변질을 방지할 수 있는 한 방법이 될 수도 있겠다.

요 약

Horseradish peroxidase의 열불활성화에 미치는 몇가지 인자의 영향에 대해 실험하였다. lecithin이 존재하는 용액 속에서 peroxidase를 pH 7.0 70°C에서 처리한 결과 급격한 열불활성화를 보였고 pH 4.0의 용액에서는 0°C에 짧은 시간 방했을 때도 급격한 불활성화를 나타내었다. linoleic acid는 산소 존재하에서 처리 했을 때가 질소 존재 하의 처리에서 보다 큰 영향을 보였고 oleic acid의 경우는 산소및 질소 존재 하에서 비슷한 영향을 보였다. lecithin과 linoleic acid의 영향에 대한 결과 각각 heme crevis의 개열 내지는 생성된 lipoperoxide에 의한 불활성화라고 추정하였다.

참 고 문 헌

1. Wilder, C.J.: J. Food Sci. **27** 567(1962).
2. Svensson, S.G., Eriksson, C.E.: Lebensm.-Wiss. u. Technol. **5** 124(1972).
3. Ivanetich, K.M., Henderson, J.J., Kaminsky, L.S.: Biochemistry **12** 1822(1973).
4. Chio, K.S., Tappel, A.L.: Biochemistry **8** 2821(1969).
5. Lumry, R., Eyring, H.: J. Phys. Chem. 58 110(1954).
6. Meyer, M.L., Kauzmann, W.: Arch. Biochem. Biophys. **99** 348(1962).
7. Chio, K.S., Tappel, A.L.: Biochemistry **8** 2827(1969).
8. Ivanetich, K.M., Henderson, J.J., Kaminsky, L.S.: Biochemistry **13** 1469(1974).