

서양고추냉이에 있는 페르옥시다아제 이소짐의 分離와 熱不活性化

尹 晶老 · 朴 官和
서울대학교 食品工學科
(1982년 1월 19일 수리)

Isolation and Thermal Inactivation of Horseradish Peroxidase Isozymes

Jung-Ro Yoon and Kwan-Hwa Park

Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 170

(Received January 19, 1982)

Abstract

Four peroxidase isozymes from horseradish roots (isozymes A, B, C and D) were isolated by chromatography and were thermally inactivated at 70~97°C and pH 7.0.

The four isozymes had different inactivation rates and the inactivation of each isozymes did not follow first order kinetics. D values of isozymes A, B, C, D and crude enzyme were 594 s, 1850 s, 2050 s, 78 s, 130 s and z values were 24.0°C, 12.5°C, 18.0°C, 23.7°C and 24.0°C, respectively. Sephadex gel chromatogram of the thermally treated isozyme C indicated that the shape and molecular weight of the native isozyme changed during inactivation.

序 論

食品의 熱處理가공에서 高溫 短時間 殺菌(HTST)方法은 香, 色, 味, 質, 營, 養, 素와 같은 品質維持에 있어서 기존방법에 비하여 우수한 것으로 알려져 있으나 저장중에 비교적 빠른 품질 변화를 일으킨다는 것이 인정되어왔다. 이는 高溫短時間 殺菌에서 酵素 不活性化가 부적절하게 되었던 원인으로서 Yamamoto 등⁽¹⁾은 熱抵抗性이 다른 두개의 페르옥시다아제 이소짐(peroxidase isozyme)의 존재를 제안함으로써 이를說明코자 하였고, 이 제안은 페르옥시다아제 이소짐을 分離함으로써 뒷받침되었다. 즉 熱處理 가공된 食品에 殘存하는 酵素活性은 抵抗性이 큰 이소짐에 起因한다고 할 수 있다. 따라서 食品에서 酵素의 不活性化에 對한 여러가지 特性을 보다 잘 理解하기 위해서는 個個의 이소짐에 對한 研究가 先行되어야 할 것이다. 이

밖에도 효소의 열 불활성화 기작에 대하여 最近 많은 研究^(2,3)가 진행되고 있다. Shannon 등⁽⁴⁾은 서양고추냉이(horseradish) 뿌리에서 7개의 페르옥시다아제 이소짐을 분리하였고, Wang과 Dimarce⁽⁵⁾는 서양고추냉이로부터 6개의 페르옥시다아제 이소짐을 분리하여 熱處理 實驗을 行하였으나 이소짐 個個의 熱 不活性化 特性에 對한 研究는 아직 미흡한 실정이다.

本 實驗에서는 서양고추냉이 뿌리로부터 비교적 활성이 큰 4개의 페르옥시다아제 이소짐을 分離하여 각각을 열처리하고 열 불활성 정도를 비교하여 보고 열 불활성화 기작을 구명해보고자 하였다.

材料 및 方法

試料 오뚜기 食品株式會社의 포장에서 栽培한 서양고추냉이를 實驗의 試料로 사용하였다.

페르옥시다아제의 活性度 測定 水素 公여체로

guaiacol을 사용한 Wilder⁽⁶⁾의 方法을 약간 變形하여 페르옥시다제의 活性도를 測定하였다. 0.1 M 인산 완충용액 (pH 7.0) 5 ml에 20 mM guaiacol 溶液 0.1 ml와 酵素液 0.1 ml를 cuvette에서 차례로 混合한 후 40 mM H₂O₂ 溶液 0.02 ml를 加하여 反應시키고 470 nm에서 吸光度의 變化(ΔE/Δt)를 測定하였다. 酵素單位는 20°C에서 1분간에 酵素液 1 ml當 生成된 反應物이 吸光度를 1變化시키는 것을 1單位로 하였다.

蛋白質 測定 Double beam spectrophotometer U. V.-200 (Schimazu)을 使用하여 280 nm, 260 nm에서 吸光度를 측정하여 다음과 같은 式에 의하여 계산하였다⁽⁷⁾.

$$\text{蛋白質}(mg/ml) = 145 A_{280nm} - 0.74 A_{260nm}$$

여기서 A는 흡광도(absorbancy)이다.

酵素的 精製 酵素는 Fig. 1에서와 같은 순서로 精製하였다. 갈게 썬 서양고추냉이 뿌리에 0.1 M K₂HPO₄를 加하여 Waring blender로 均질화 시킨후 (NH₄)₂SO₄를 使用하여 0.35 포화용액에서 0.90 포화용액으로 하였을 때의 침전물을 취하여 0.05 M Tris(hydroxymethyl aminomethane) 완충용액 (pH 7.0)에 녹인후 0.1 M KCl을 함유한 0.05 M Tris 완충용액 (pH 8.0)으로 투석하고 0.005 M 아세트산 완충용액 (pH 4.4)으로 平衡시켜놓은 carboxymethyl cellulose(CM-cellulose) column(25×200 mm)에 加하였다.

이때 0.005 M 아세트산 완충용액 (pH 4.4) 500 ml와 0.1 M 아세트산 완충용액 (pH 4.4) 500 ml로 linear gra-

dient가 되도록 흘려주었고 이어서 0.1 M 아세트산 완충용액 (pH 4.4) 300 ml와 0.25 M 아세트산 완충용액 (pH 4.9) 300 ml도 재차 linear gradient가 되게 흘려주었으며 유속 20 ml/h로 하여 10 ml씩 分割하였다. 일차 CM-셀룰로오스 칼럼을 통과시켜 얻은 劃分(fraction) B는 다시 CM-셀룰로오스 칼럼(16×240 mm)으로 2회에 걸친 재크로마토그래피를 통하여 精製하였으며 이때 0.005 M acetate, pH 4.4-0.1 M acetate, pH 4.4를 각각 500 ml씩하고 linear gradient가 되도록 하여 溶출시켰다. 劃分C는 CM-셀룰로오스로 재 크로마토그래피한 후 다시 Sephadex G-100칼럼 (25×250 cm)에 주입한 다음 0.005 M Tris 완충용액, pH 8.4로 溶출시켜 재차 精製하였다.

酵素溶液의 熱 不活性 酵素溶液의 熱 不活性은 시험관(11×125 mm)에 0.1 M 인산완충용액 (pH 7.0) 2.7 ml를 넣고 열 처리 온도까지 가열한 다음 자석식 교반기로 교반하면서 0.3 ml의 酵素溶液을 加하여 일정시간 간격으로 일정량씩 신속히 채취하여 미리 얼음으로 냉각시켜 놓은 시험관에 옮겨 용액을 冷却시킨 후 잔존한 酵素活性을 측정하였다.

結果 및 考察

이소짐의 분리

CM-셀룰로오스 칼럼을 통하여 분리한 페르옥시다제 이소짐은 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 4개의 酵素活性을 갖는 peak가 얻어졌으며 이들을 溶출된 순서대로 A, B, C, D라 각각 稱하였다.

이상에서 분리된 이소짐을 전기영동으로 순도검정을 시도하였으나 각 이소짐이 전기영동중에 변성되어 한 개의 단백질 머플 추가하고 있는 듯하여 순도검정에 실패하였다.

이중 劃分 B는 CM-셀룰로오스로 2회에 걸친 재 크로마토그래피를 行하여 Fig. 3과 같은 결과를 얻었고 劃分 C는 CM-셀룰로오스로 재 크로마토그래피한 후 Sephadex G-100 관 크로마토그래피 하였으며 그 결과는 Fig. 4와 같다.

이상에서와 같이 서양고추냉이 뿌리로부터 페르옥시다제 이소짐을 분리한 결과를 Table 1에 종합하였다. 이때 각 이소짐의 분리정도는 조추출액을 기준으로 계산하였다.

이소짐의 열 불활성화

각 이소짐 별로 열 불활성화 실험을 行하였을 때 Fig.5와 같은 열 불활성화곡선을 보였다.

여기에서 각 온도별로 D-값을 구하였고 이어서 z-값을 구하였으며 Eyring의 方法⁽⁸⁾에 의해 활성화 엔탈

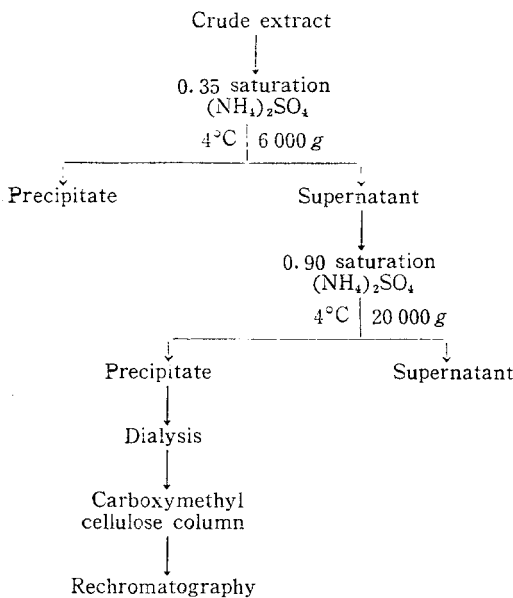


Fig. 1. Schematic diagram for purification of peroxidase isozymes

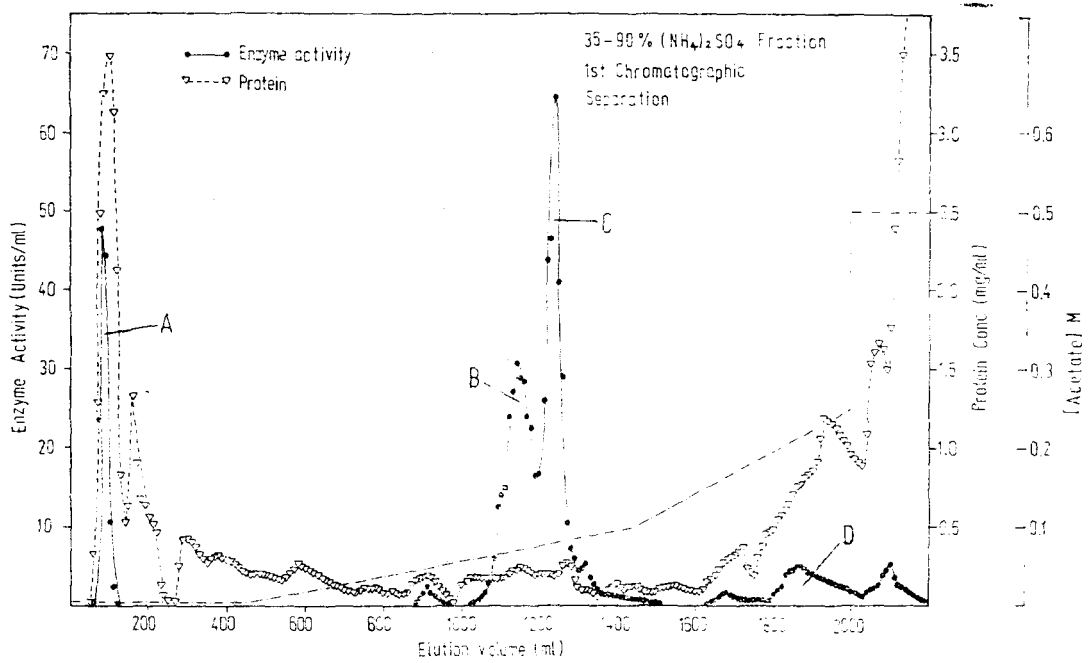


Fig. 2. Chromatograms of peroxidase isozymes from CM-cellulose column

Column size, 25×200 mm; first elution system, 0.005 M acetate, pH 4.4, 500 ml; second elution system, 0.005 M acetate, pH 4.4-0.1 M acetate, pH 4.4, 500 ml each; third elution system, 0.1 M acetate, pH 4.4-0.25 M acetate, pH 4.9, 300 ml each; fourth elution system, 0.5 M acetate, pH 4.9, 200 ml

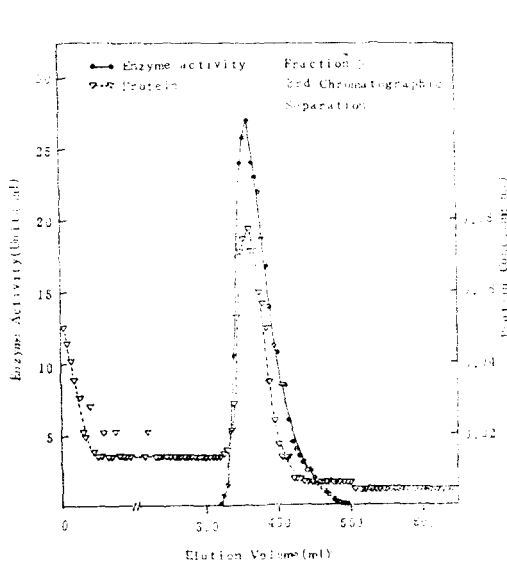


Fig. 3. Chromatogram of peroxidase fraction B from third running on CM-cellulose column

Column size, 16×240 mm; elution system, 0.005 M acetate, pH 4.4-0.1 M acetate, pH 4.4, 500 ml each; fraction volume, 5.0 ml

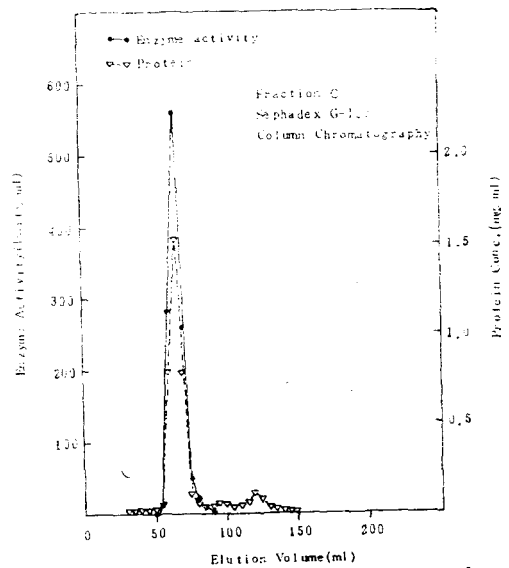


Fig. 4. Chromatogram of peroxidase fraction C from Sephadex G-100 column

Column size, 25×250 mm; elution system, 0.005 M Tris (pH 8.4); fraction volume, 5.0 ml

Table 1. Summary of purification procedure of horseradish peroxidase isozymes

Procedure	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (unit/ml)	Specific activity (unit/mg)	Total activity (unit)	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	8 500	5. 60	4. 2	0. 75	35 700	100	1. 0
Ammonium sulfate precipitation	142	93. 93	160. 0	1. 70	22 700	63. 6	2. 3
CM-cellulose chromatography							
Araciton A	70	2. 00	39. 7	19. 85	2 780	7. 8	26. 5
Fraction B	50	0. 65	100. 0	153. 85	5 000	14. 0	205. 1
Fraction C	33	1. 19	290. 0	243. 70	9 570	26. 8	324. 9
Fraction D	51	2. 39	44. 7	18. 70	2 280	6. 4	24. 9
Fraction B 3rd CM-cellulose chromatography							
Fraction C	8. 6	0. 48	109. 1	227. 29	938	2. 6	303. 1
Fraction C Sephadex G-100 gel chromatography							
Fraction C	20	0. 81	287. 5	354. 94	5 750	16. 1	473. 3

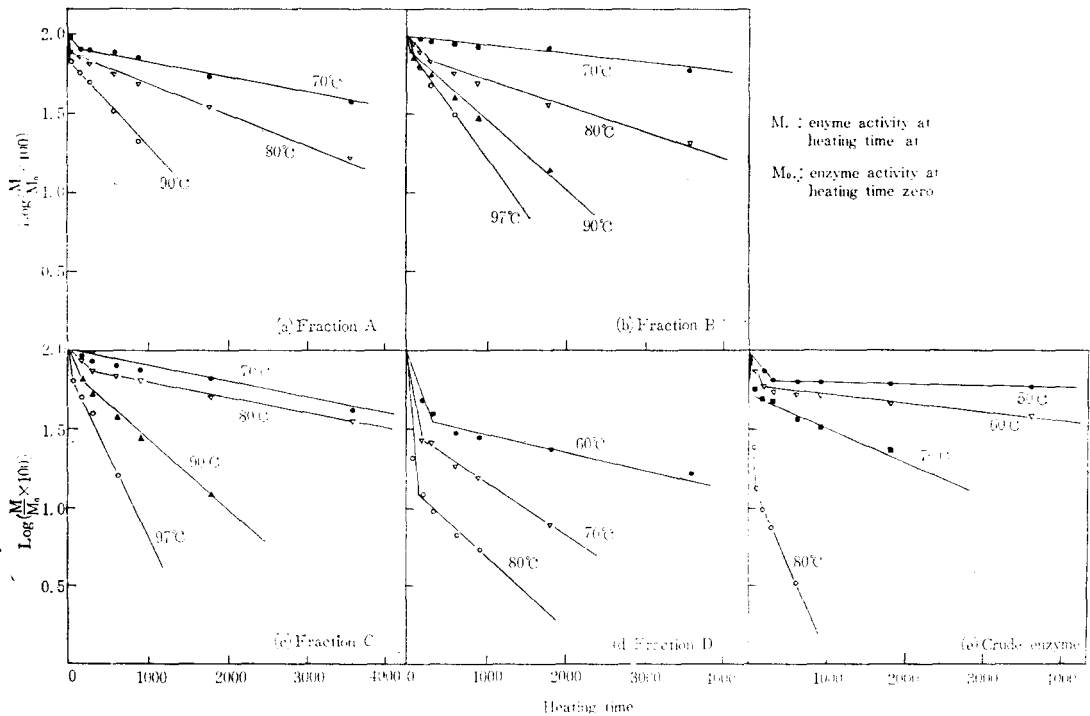


Fig. 5. Thermal inactivation of peroxidase isozymes with respect to temperature and heating time

피의 변화(ΔH^*), 활성화 자유에너지의 변화(ΔG^*), 활성화 엔트로피의 변화(ΔS^*)도 아울러 구하였으며 그 값은 Table 2에서와 같았다. 사용한 전기영동상의 위치만으로 이소짐을 동정하기 힘들기 때문에 위에서 구한 열역학적 데이터를 다른 논문에서 보고된 것과 비교하기는 어렵지만 Ling과 Lund⁽³⁾가 보고한 열에 강한 이소짐의 D값은 이소짐 B와 C와 비슷한 값을 보이

고 열에 약한 이소짐은 이소짐 D의 열저항성과 비슷한 값을 보이고 있다. Fig. 5에서 보는 바와같이 조효소액과 각 이소짐의 열 불활성 곡선이 1차 반응에서 벗어남을 볼 수 있었다.

열 불활성화과정중 효소의 변화

페르옥시다아제가 열 불활성화 되었을 때 분자적 수준에서 어떤 변화가 일어나는지를 알아보고자 우선 이

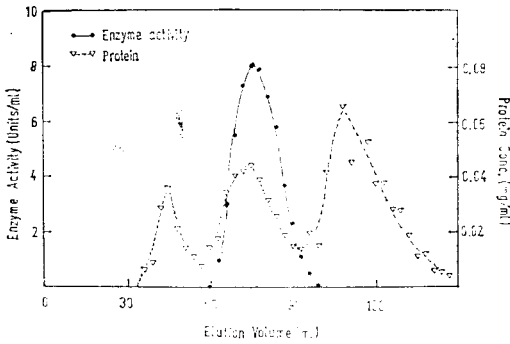


Fig. 6. Chromatogram of heat treated peroxidase fraction C from Sephadex G-150 column

Column size, 2.5×25 cm; elution system, 0.005 M acetate(pH 5.8); fraction volume, 3.0 ml; heat treatment, 20 min at 90°C

소짐 C 만을 택하여 Sephadex G-150으로 크로마토그래피하였을 때 Fig. 6과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 3개의 단백질 peak 중에서 두번째 peak만이 酵素活性을 가지고 있었으며 열처리하지 않은 페르옥시다아제 이소짐 C를 동일한 Sephadex G-150으로 관 크로마토그래피 하였을 때 한개의 酵素活性을 갖는 peak가 얻어졌으며 그 elution volume은 Fig. 6의 두번째 peak와 일치하였다.

따라서 열 처리 후에는 원래의 분자보다 큰 물질과 작은 물질이 모두 생성된 것을 알 수 있었으나 酵素活性을 나타내지는 않았다. 이상에서 본 바와 같이 각 이소짐의 열 불활성화 반응이 1차반응에서 벗어난 열변성 과정이 각 효소단백질의 3차구조의 변화와 aggregate의 생성 등 복잡한 단계를 거치고 있음을 시사하고 있으며 조효소의 경우는 이들 각 이소짐을 포함하고 있으므로 더욱 복잡한 양상을 보이고 있는 듯하다.

Table 2. D-, z-value and thermodynamic data for inactivation of horseradish peroxidase isozymes and crude extract

Peroxidase	D(sec)				z(°C)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔG^* (kJ/mol)	ΔS^* (J/mol·K)	(80°C)
	60	70	80	90 (°C)					
Peroxidase isozyme									
A	—	2255	594	333	24.0	99.4	103.2	10.8	
B	—	14500	1850	400	12.5	162.5	106.6	158.5	
C	—	10700	2050	875	18.0	124.3	106.9	49.3	
D	567	264	78	—	23.7	101.4	97.3	11.6	
Crude extract	860	280	130	—	24.0	88.1	98.8	30.0	

要 約

식품의 열 처리 공정중에 일어나는 페르옥시다아제의 熱不活性化 特性을 알기 위하여 서양고추냉이 뿌리에서 4개의 페르옥시다아제 이소짐 (isozyme A, B, C 및 D)을 분리하고 pH 7.0, 온도범위 70~97°C에서 각 이소짐 별로 熱不活性化 實驗을 행하였다.

각 이소짐의 열 저항성이 서로 크게 달랐고 80°C에서는 C, B, A, D의 순서로 열에 강하였으며 각 이소짐의 열 불활성화는 1차반응에서 벗어났다. 이소짐 A, B, C 및 D의 D₈₀값은 각각 594초, 1850초, 2050초 및 78초 이었고 z값은 각각 24.0°C, 12.5°C, 18.0°C 및 23.7°C이었으며 조효소의 D₈₀값은 130초, z값은 24.0°C이었다. 이소짐 C를 열처리 했을 때에는 원래의 효소분자보다 분자량이 큰 단백질과 작은 단백질이 생성되었으며 이들은 효소활성이 없었다.

文 獻

1. Yamamoto, H. Y., Steinberg, H. P. and Nelson, A. I.: *J. Food Sci.*, **27**, 113 (1962)
2. Park, K. H. and Fricker, A.: *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, **164**, 167 (1977)
3. Ling, A. C. and Lund, D. B.: *J. Food Sci.*, **43**, 1307 (1978)
4. Shannon, L. M., Kay, L. and Lew, J. Y.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 2166 (1966)
5. Wang, S. S. and Dimarco, G. R.: *J. Food Sci.*, **37**, 514 (1972)
6. Wilder, C. J.: *J. Food Sci.*, **27**, 567 (1962)
7. Kalckar, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 461 (1947)
8. Joffe, F. M. and Ball, C. O.: *J. Food Sci.*, **27**, 587 (1962)