

## 밤(生栗)에 함유된 Peroxidase의 정제 및 특성에 관한 연구

오석홍·김용휘·이서나\*

전북대학교 농화학과, \*전북대학교 식품가공학과

### Purification and Properties of the Peroxidase in Castanea Semen

Suk-Heung Oh, Yong-Hwi Kim and Seo-Na Lee\*

Department of Agricultural Chemistry, Chonbuk National University, Chonju

\*Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University, Chonju

#### Abstract

Peroxidase was purified to a homogeneous state from Castanea Semen by ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose column chromatography, gel filtration on sephadex G-100 and HPLC, and the purification fold was 65.3. The molecular weight of the enzyme was estimated to be about 35,000 by HPLC. In properties of the enzyme which was purified up to sephadex G-100 column chromatography, the optimum pH and temperature were 5.0 and 50°C, respectively. By heating the enzyme at 80°C for 1.73 min., the enzyme activity was decreased to 10%. The enzyme was active toward aromatic amines such as o-phenylenediamine and p-phenylenediamine. Kinetic studies indicated a Km of 2.6mM for o-phenylenediamine at an optimal hydrogenperoxide concentration and a Km of 10mM for hydrogenperoxide at an optimal o-phenylenediamine concentration. Among the reagents tested, L-ascorbic acid and sodium L-ascorbate inhibited significantly the enzyme, while Ca<sup>++</sup> and Ba<sup>++</sup> activated the enzyme at the concentration of 1mM and 5mM.

#### 서 론

Peroxidase (donor: hydrogen-peroxide oxidoreductase, EC 1. 11. 1. 7)는 자연계에 널리 분포하며, Fe<sup>++</sup>이 함유되어 있는 효소로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 존재하에서 Pyrogallol, gallic acid 등의 phenol류나 benzidine, o-phenylenediamine(OPDA), p-phenylenediamine (PPDA)과 같은 방향족 amine류를 산화하여 quinone을 생성시키는 반응을 촉매하고 이때 생성된 quinone이 중합되어 갈변이 진행된다<sup>(1)</sup>.

밤(生栗)의 tannin 조성은 주로 gallic acid이고<sup>(2)</sup>, 그 외 3,6-digalloyl glucose, pyrogallol, resorcinol, chebulinic acid, chebulagic acid, sugar 등으로 구성되어 있는 것으로 알려져 있는데<sup>(3)</sup> 이러한 polyphenol 성 물질은 밤果肉에 분포되어 있는 peroxidase나 維管束部에 많이 분포되어 있는 cytochrome oxidase에 의한 효소적 변색의 주요인이 된다고 보고되었다<sup>(4)</sup>.

일부 식물체의 효소적 갈변을 유발하는 peroxidase에 대해서는 여러가지 재료로부터 peroxidase를 분리·정제하고 특성을 연구한 보고등<sup>(5-9)</sup>이 있으나 밤의 peroxidase에 관한 연구는 아직 미흡한 상태이다.

본 연구는 밤의 효소적 갈변을 유발하는 것으로 알

려진 peroxidase를 분리·정제하고 그 특성을 조사함으로써 밤의 효과적인 이용 및 효소화학 연구에 필요한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

본 실험에 사용된 밤(Castanea Semen)은 全北 淳昌에서 1985년도에 채취한 개량종으로 일부는 아세트 분말로 조제하여 -20°C 냉동실에 보관하고 일부는 생물을 그대로 4°C에서 보관하면서 공시재료로 사용하였다.

##### Total polyphenol의 정량

Total polyphenol의 함량은 4°C에 보관한 밤果肉을 메탄올로 3회 마쇄 추출하고 감압농축하여 Folin-Denis法<sup>(10)</sup>으로 정량하였다.

##### 조효소액의 조제<sup>(11)</sup>

果刀로 鬼皮 및 澁皮를 제거한 밤果肉 1kg을 적당히 썰어 1/의 아세트과 함께 waring blender로 1분간 마쇄한 후 면포로 압착여과하여 다시 이 추출잔사에 아세트 1/을 넣고 30분간 교반한 후 압착여과하여 수분,

지방 및 cartenoid색소를 제거하였다. 상기 추출잔사를 하룻밤 공기중에 방치하여 건조시킨 후 0.5mm mesh의 분말 15g을 취하여 이에 0.05M 인산 완충액(pH 7.0) 250ml를 넣고 1시간 교반하여 용출시킨 후, 5000×g(4°C)로 20분간 원심분리한 다음 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

### Peroxidase의 정제

염석 및 투석<sup>(12)</sup>: 조효소액에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 50% 포화용액이 되도록 하고 4°C에서 1시간 교반한 후 5000×g(4°C)로 20분간 원심분리하여 얻은 상등액에 다시 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 90% 포화용액이 되도록 하였다. 이 용액을 4°C에서 1시간 교반한 후, 5000×g(4°C)로 20분간 원심분리후 얻어진 침전물에 0.05M Tris/HCl 완충액(pH 7.0)을 가하여 용해하고 반투성 막(Fisher Co., U. S. A.)을 사용하여 동일완충액으로 24시간 투석하였다. 투석 후 膜內液을 2000×g(4°C)에서 15분간 원심분리하여 불용성물질을 제거하였다.

DEAE-cellulose column chromatography: glass column(3.5×35cm)에 DEAE-cellulose를 4°C에서 충전한 다음 0.05M Tris/HCl 완충액(pH 7.0)으로 평형화시켰다. 조효소액을 column에 주입하고 0.05M의 Tris/HCl 완충액(pH 7.0)과 0.5M의 NaCl을 함유한 동일완충액을 gradient로 혼합, 주입하면서 30ml/hr의 유속으로 1l 용출시켰다. 용출액은 10ml씩 fraction collector로 분취하여 활성부분을 모아 동결건조하였다.

Sephadex G-100 column chromatography: glass column(1.6×100cm)에 Sephadex G-100을 4°C에서 충전한 다음 0.05M 인산완충액(pH 7.0)으로 평형화시켰다. DEAE-cellulose column chromatography후 얻은 효소분말을 5ml의 인산완충액(pH 7.0)으로 용해시켜 Sephadex G-100 column에 주입하고 0.05M 인산완충액을 12ml/hr의 유속으로 280ml를 용출시키면서 2.8ml씩 fraction collector로 분취한 후 활성부분을 모았다.

High performance liquid chromatography: HPLC에 의한 정제방법은 Dimenna등<sup>(13)</sup>의 방법에 準하였다. Sephadex G-100 column chromatography후 얻은 효소분말을 5ml의 인산완충액(pH 7.0)으로 용해시켜 HPLC(Millipore waters, U. S. A.)를 이용하여 column: Protein Pak-125(300×7.5mm I. D.), Detector 파장: 280nm, 용매: 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0), 유속: 1.0ml/min의 조건에서 1차 주입 분석하였다. 여기서 얻은 활성부분을 더 정제할 목적으

로 1차에서와 동일한 조건에서 다시 2차 주입 분석하였다.

이 때 얻어진 효소의 순도를 Davis방법에 따른 전기영동법으로 검증하였다<sup>(14)</sup>.

### 효소활성의 측정

Peroxidase의 활성은 효소가 기질에 작용하여 quinone류를 형성하는 초기반응속도를 430nm에서의 흡광도로 측정하여 효소활성으로 정하였다. 즉, 0.1M Citrate-0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 완충액(pH 5.0)으로 o-phenylenediamine(OPDA)이 2mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 30mM이 되도록 조제하여 이 용액을 기질로 하고, 이 용액 5ml에 효소액 100ml를 가하여 50°C에서 반응시키면서 반응시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다.

효소활성 1unit는 분당 0.01의 흡광도를 변화시키는 효소의 양으로 정하였다.

### 단백질 농도의 측정

DEAE-cellulose column chromatography와 sephadex G-100 column chromatography의 각 분획별 단백질 농도는 280nm에서 흡광도를 측정하여 산출<sup>(16)</sup>하였으며, 각 정제단계에서 모든 효소액중의 총 단백질 농도는 Lowry등<sup>(17)</sup>의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 측정하였다.

### 정제효소의 특성

밤 peroxidase의 특성은 sephadex G-100 column chromatography후 얻은 효소를 사용하여 조사하였으며, 분자량은 HPLC후 얻은 효소를 사용하여 측정하였다.

작용최적 pH: pH 3.0에서 pH 5.0까지는 0.1M citrate-0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 완충액을, pH 6.0에서 pH8.0까지는 0.2M 인산 완충액을, pH 9.0에서 pH11.0까지는 Britton-Robinson완충액을 사용하여 각각 pH별로 OPDA가 2mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 30mM이 되도록 기질용액을 조제하여 효소활성을 측정하였다. 효소의 활성도는 상대활성도로 나타내었다(이하 동일).

pH 안정성: 최적 pH를 조사할 때 사용한 여러가지 pH의 완충액 1ml에 효소액 100μl씩을 가하여 혼합한 후 4°C에서 24시간 보존한후 잔존활성을 測定하였다.

작용최적 온도: 10°C에서부터 90°C까지 10°C간격으로 각 온도에서 효소활성을 측정하였다.

열안정성: 효소액 150μl를 30, 40, 60, 70, 80°C에서 15분간 보존한 후 곧 얼음물에 담그어 냉각한 다음 잔존 활성을 측정하였다.

기질특이성 : 방향족 amine류인 OPDA 및 PPDA, o-diphenol 류인 DL-DOPA, (+)-catechin, caffeic acid 와 m-diphenol 류인 resorcinol, p-diphenol 류인 hydroquinone, ferulic acid, phloroglucinol을 각각 2 mM이 되게 30mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 함유한 0.1M citrat-0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 완충액 (pH 5.0)으로 용해시켜 기질용액으로 사용하고 효소활성을 측정하였다.

Michaelis 상수의 측정<sup>(8,18)</sup>: OPDA에 대한 Michaelis 상수를 측정하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 최적의 수준 (30mM)이 되도록 용해한 0.1M citrate -0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 완충액 (pH 5.0)에 OPDA의 농도가 0.5~30mM이 되도록 기질용액을 조제하고 100 $\mu$ l의 효소액을 첨가하여 초기속도를 측정하였다. 또 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 Michaelis 상수를 측정하기 위하여 OPDA 농도가 최적의 수준 (30mM)이 되도록 용해된 0.1M citrate -0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 완충액 (pH 5.0)에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 1~40mM이 되도록 기질용액을 조제하고 100 $\mu$ l의 효소액을 첨가하여 초기속도를 측정하였다. 이때 얻어진 기질농도에 따른 초기반응 속도를 Lineweaver-Burk법으로 plot하여 Michaelis 상수를 결정하였다.

저해제에 의한 영향 : sodium diethyl-dithiocarbamate, L-ascorbic acid, thiourea, EDTA, L-cysteine, sodium bisulfate, sodium L-ascorbate, KCN을 2mM OPDA와 30mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 용해된 0.1M citrate -0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 완충액 (pH 5.0)에 농도별로 용해시키고 효소활성을 측정하여 저해정도를 백분율로 나타내었다.

금속이온의 영향 : NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, BaCl<sub>2</sub>, Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HgSO<sub>4</sub> 및 MnSO<sub>4</sub>를 2mM OPDA와 30mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 용해된 0.1M citrate -0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 완충액 (pH 5.0)에 각각 1mM과 5mM이 되게 가하여 이에 효소액을 가한 다음 활성을 측정하였다.

한편, CaCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>와 FeSO<sub>4</sub>는 그 농도를 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10mM이 되게 조제하여 각 농도별로 효소활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Total polyphenol 함량

Tannic acid를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성한 다음 Folin-Dennis 법<sup>(10)</sup>으로 측정한 생육중의 total polyphenol 함량은 20.9mg%이었다. 이 결과는 매실중의 함량에 비해서는 13.5배<sup>(19)</sup>, 모과果肉중의 함량에 비해서는 44배<sup>(20)</sup>, 홍삼중의 함량에 비해서는 21배<sup>(21)</sup>정도로 적은 양이었다.

### Peroxidase의 정제

효소액을 DEAE-cellulose chromatography에 의해 분리 용출한 각 분획 중 peroxidase의 활성은 Fig.1에 나타난 바와같이 fraction No. 20~28과 No. 55~75의 두 부분에서 나타났고, 단백질의 농도는 fraction No. 65~70, 80~86에서 높았다. 보다 더 순도를 높이기 위해 총 활성의 95% 이상을 나타낸 fraction No. 55~75까지를 모아서 이를 증류수로 12시간 투석시킨 후, 동결건조하여 Sephadex G-100 column chromatography를 실시한 결과 Fig. 2에서와 같이 각 분획 중

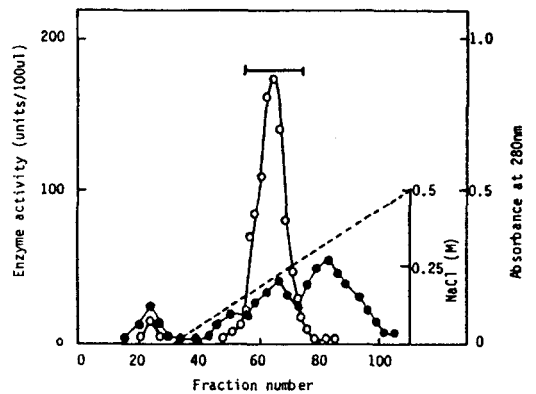


Fig. 1. Ion-exchange chromatography of the enzyme prepared from ammonium sulfate fractionation on DEAE-cellulose

●—●, OD<sub>280</sub>; ○—○, enzyme activity; ----, NaCl concentration; [—], fraction pooled

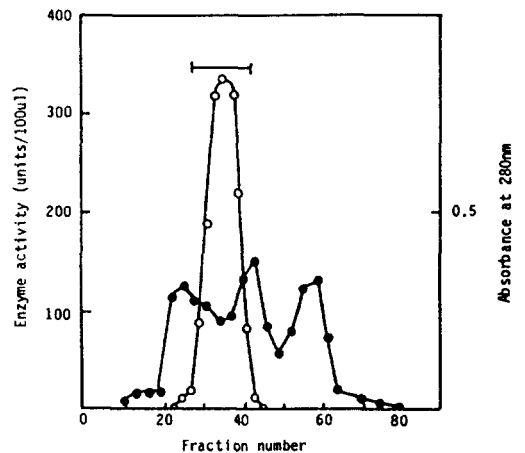


Fig. 2. Gel filtration of the enzyme prepared from DEAE-cellulose column chromatography on sephadex G-100

●—●, OD<sub>280</sub>; ○—○, enzyme activity; [—], fraction pooled

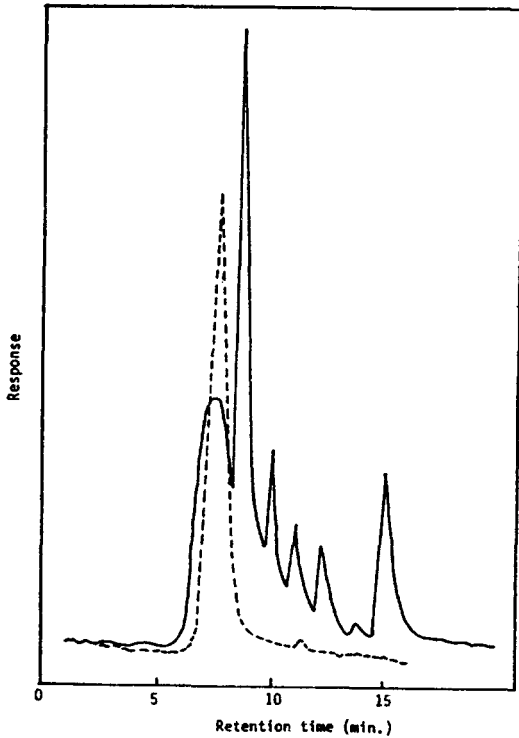


Fig. 3. The HPLC of the enzyme prepared from sephadex G-100 column chromatography ———, the 1st HPLC; - - - - - the 2nd HPLC

효소의 최대활성은 No. 33~38에서 나타났으며 단백질 농도는 fraction No. 22~28, 40~44, 55~59 사이에서 높았다. 비교적 좋은 효소활성을 나타낸 fraction No. 26~42까지를 모아서 이를 다시 증류수로 12시간 투석시킨 후, 동결건조하여 1차 HPLC에 의해서 분리하여 각 peak에 해당하는 분획을 분취하여 효소활성을 조사한 바, 머무름 시간 7.50min의 peak가 효소활성을 나

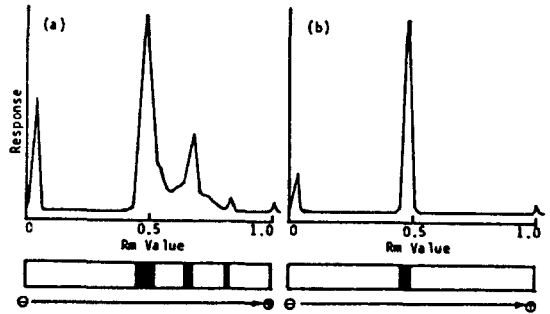


Fig. 4. Densitometric patterns of polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme (a) The purified enzyme up to 1st HPLC analysis (b) The purified enzyme up to 2nd HPLC analysis

타냈으며, 이 부분을 모아서 더 정제하기 위해 2차 HPLC를 실시한 결과 Fig. 3과 같이 peroxidase의 활성은 머무름 시간 7.39min.에서 단일 peak로 나타났다.

이와같이 얻어진 밤 peroxidase의 순도를 검증하기 위하여 전기영동을 실시한 후 덴시토미터(shandon Co, U.K.)를 이용하여 gel을 스캐닝한 결과 Fig. 4의 (b)에서와 같이 단일 peak를 보였으므로 이는 순수한 효소라 판단되었다.

밤 Peroxidase의 전체적인 정제결과는 Table 1에서 보는 바와같이 조효소의 specific activity는 56.0 units/mg protein이었으며,  $(NH_4)_2SO_4$ 에 의한 분획은 조효소에 비하여 Specific activity가 4.6배 증가되었고 이때 회수율은 96%이었다. 또한 DEAE-cellulose column chromatography에서는 specific activity가 14.8배로 증가되었고 회수율은 92%이었으며, sephadex G-100 column chromatography에서는 정제도가 17.5

Table 1. Summary of purification steps of the enzyme

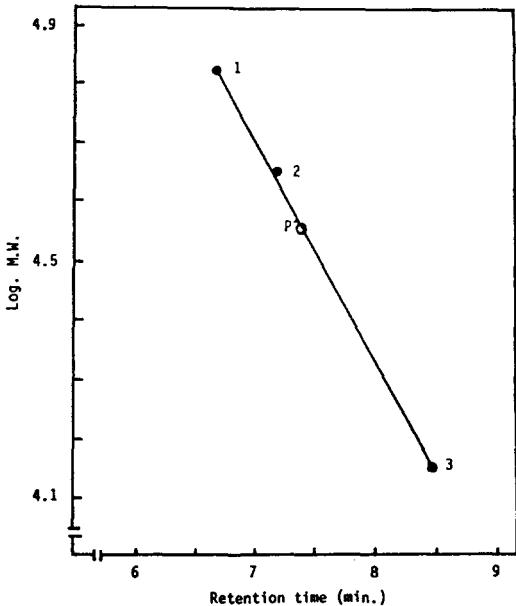
| Purification step             | Volume (ml) | Total activity (units) | Total protein (mg) | Specific activity (units/mg) | Yield (%) | Purification (fold) |
|-------------------------------|-------------|------------------------|--------------------|------------------------------|-----------|---------------------|
| Crude extract                 | 242         | 18,742.9               | 334.7              | 56.0                         | 100.0     | 1.0                 |
| $(NH_4)_2SO_4$ , 50-90%       | 22          | 18,125.8               | 70.2               | 258.3                        | 96.0      | 4.6                 |
| DEAE-cellulose chromatography | 200         | 18,710.0               | 21.0               | 889.3                        | 92.0      | 14.8                |
| Sephadex G-100 chromatography | 50          | 10,505.0               | 10.7               | 981.9                        | 56.1      | 17.5                |
| 1st HPLC                      | 31          | 1,929.7                | 0.6                | 3,122.5                      | 10.3      | 55.8                |
| 2nd HPLC                      | 270         | 1,206.0                | 0.5                | 3,654.5                      | 6.4       | 65.3                |

배, 회수율은 56.1%이었다. 1차 HPLC에서는 정제도가 55.8배로 급격히 증가하였으나 회수율은 10.3%로 떨어졌고, 2차 HPLC에서는 정제도가 65.3배, 회수율은 6.4%였다.

이러한 결과는 Lee 등<sup>(8)</sup>이 보고한 cauliflower의 peroxidase가 phenyl-sepharose CL-4B hydrophobic column chromatography의 방법으로 180배 정제된 결과에 비하면 정제도가 낮았지만 이등<sup>(22)</sup>이 보고한 녹두의 peroxidase가 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 의한 침전, sephadex G-75, DEAE-cellulose의 방법으로 16배 정제된 결과에 비하면 정제도가 월등히 높았다. 한편, 회수율에 있어서는 송등<sup>(22)</sup>이 보고한 녹두 peroxidase의 회수율 8%보다는 약간 적은 6.4%로 나타났는데 회수율을 좀 더 개선하기 위해서는 정제과정의 신속화, 정제기술의 고도화가 필요할 것으로 생각된다.

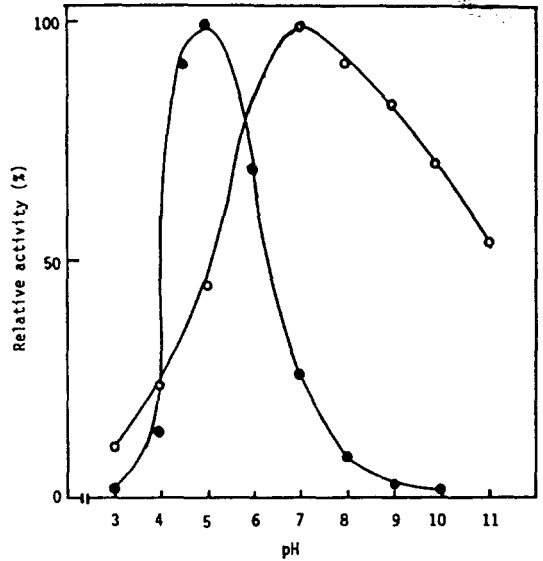
**Peroxidase의 특성**

분자량 측정: 표준 단백질로 bovine serum albumine(66,000), chicken egg albumin(45,000), bovine milk α-lactalbumin(14,200)을 사용하여 HPLC에 의해 본 효소의 분자량을 측정해 본 결과는 Fig. 5와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 분자량은 35,000으로 추



**Fig. 5. Molecular weight estimation of the purified enzyme by HPLC using GPC column**

- 1, albumin from bovine serum (66,000);
- 2, albumin from chicken egg (45,000);
- 3, α-lactalbumin from bovine milk (14,200);
- P, The purified enzyme



**Fig. 6. Effect of pH on activity and stability of the partially purified enzyme**

●——●, effect of pH on activity; ○——○, effect of pH on stability

정되었다.

pH가 초기 속도 및 효소의 안정성에 미치는 영향: 정제효소의 작용최적 pH를 알아보기 위하여 기질용액의 pH를 3.0~11.0으로 변화시켜 제조한 후 각 pH별로 효소활성을 측정된 결과는 Fig.6과 같다. 반응최적 pH는 5.0이었고 pH 변화에 따라서 효소활성은 크게 변화되었는데 pH4.0 이하와 pH7.0 이상에서는 활성이 30%이하로 감소하였다. 이러한 결과는 Turnip peroxidase<sup>(9)</sup>의 최적 pH가 5.0이었다는 보고와는 같았으나 녹두 peroxidase<sup>(22)</sup>의 최적 pH 5.6, cauliflower peroxidase<sup>(8)</sup>의 최적 pH 6.5와는 차이를 보였다.

한편, pH가 효소의 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각 pH별로 효소액을 4°C에서 24시간 보존한 후, 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 6에서와 같이 pH 7.0에서 보존된 효소의 잔존활성이 가장 높았으므로 이 효소는 pH 7.0에서 가장 안정한 것으로 생각되며, pH 6.0 이하에서 보다 pH 8.0 이상에서 활성이 서서히 감소된것은 작용최적 pH가 산성쪽(pH 5.0)이었던 결과와는 상이한 경향이였다.

온도가 초기속도 및 효소 안정성에 미치는 영향: 각 온도에서 활성을 측정된 결과 Fig. 7에서 나타난 바와 같이 50°C에서 초기반응 속도가 가장 빠른 것으로 나타났다. 40°C 이하와 60°C 이상에서는 완만한 감소를 보였고 80°C 이상에서는 10%미만의 상대활성을 보였다. 이 결과는 cauliflower peroxidase<sup>(8)</sup>의 최적온도 40°C

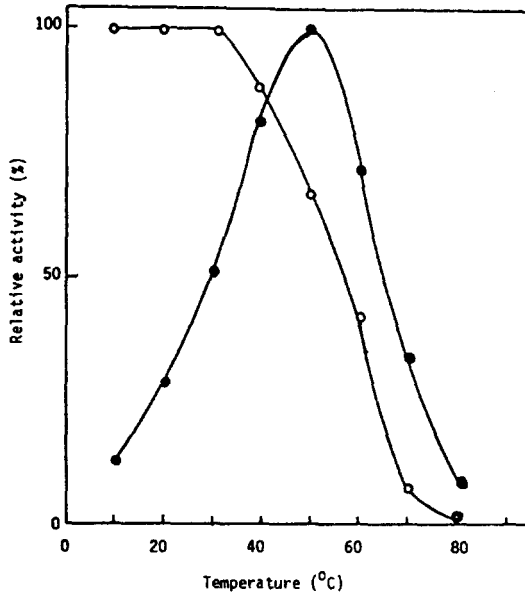


Fig. 7. Effect of temperature on activity and stability of the partially purified enzyme

●—●, effect of temperature on activity;  
○—○, effect of temperature on stability

보다는 높았으나 녹두 peroxidase<sup>(22)</sup>의 최적온도 65°C보다는 낮았다.

한편, 온도가 본 효소의 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 효소액을 여러 온도에서 15분간 보존한 다음, 잔존활성을 측정된 결과는 Fig. 7에서와 같이 최적온도보다 낮은 30°C 이하에서 보존된 효소는 최대활성을 그대로 유지하였으나 40°C 이상에서 보존된 효소는 서서히 불활성화가 진행되어 40°C에서는 약 9%, 50°C에서는 약 31%, 60°C에서는 약 58%, 70°C에서는 90% 이상이 불활성화되었다.

효소액을 여러 온도에서 보존하면서 1분에서 15분까지 경시적으로 효소액을 취하여 그 잔존활성을 측정된 다음 열을 가하지 않은 효소액의 활성을 100%로 하여 비교한 결과는 Fig. 8과 같다. 40°C에서는 15분에 9%, 50°C에서는 32%, 60°C에서는 57%, 70°C에서는 92% 불활성화되었고, 80°C에서는 1.73분만에 90%가 불활성화 되었다. 이러한 결과는 papaya peroxidase가 80°C에서 0.83분간 열처리되었을 때 90% 불활성화 된 것<sup>(23)</sup>에 비하면 열 안정성이 높지만, horse radish peroxidase가 135°C에서 1.81분간 열처리 되었을 때 비로소 90% 불활성화 된 것<sup>(24)</sup>에 비하면 열 안정성이 현저히 떨어졌다.

한편, 상기의 결과를 기초로 해서 밤 가공시 80°C에서 2~3분 정도 blanching하면 밤 peroxidase를 불활

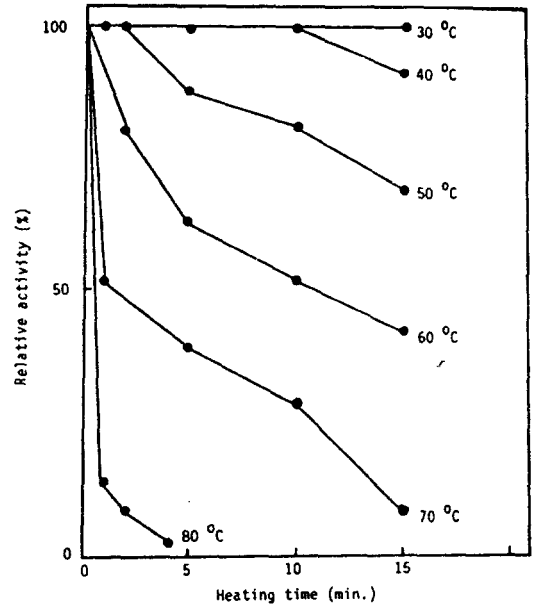


Fig. 8. Heat stability of the partially purified enzyme

성화 시켜 변색으로 인한 품질의 손상을 방지할 수 있을 것으로 생각되지만, 효소의 열 불활성화 속도가 그 구성 성분이 복잡한 식품에서는 다르게 나타날 것으로 생각된다.

기질 특이성 : 여러가지 방향족 amine류와 phenol화합물을 기질로 사용하여 기질 특이성을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

방향족 amine류에서 뚜렷한 활성을 나타냈으며 특히 OPDA는 PPDA에 비하여 약 4.5배 이상의 높은 친화력을 보였다. phenol류에서는 trihydroxyphenol류인 gallic acid와 pyrogallol에서 약간의 활성을 나타냈고 o-Diphenol류인 caffeic acid에서도 약 3% 정도의 활성을 보였으나 resorcinol 및 hydroquinone, phloroglucinol에서는 활성을 전혀 나타내지 않았다. 이 결과로 미루어 볼 때 밤 peroxidase는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 존재하에서 phenol류보다는 방향족 amine류에 대하여 친화도가 높은 효소임을 알 수 있었다.

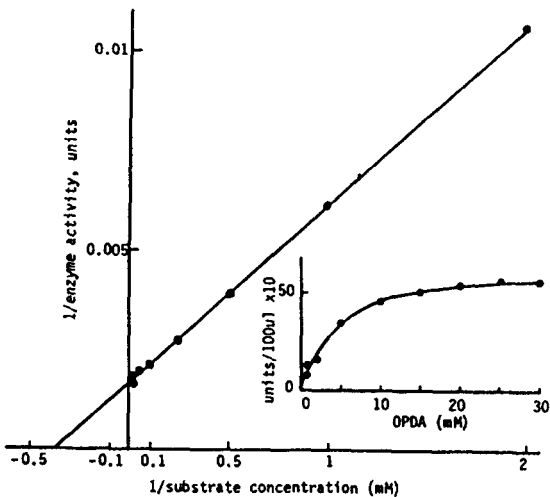
기질 농도의 영향 : Lineweaver-Burk 법으로 plots(Fig. 9, Fig. 10)하여 구한 밤peroxidase의 OPDA와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 Michaelis 상수는 각각 2.6mM과 10mM이었다.

각종 저해제 및 금속 이온의 영향 : 각종 저해제의 농도를 달리하여 효소활성을 측정하고 그 저해정도를 백분율로 나타낸 결과는 Table 3과 같다. 밤 peroxidase는 sodium diethyldithiocarbamate 5mM,

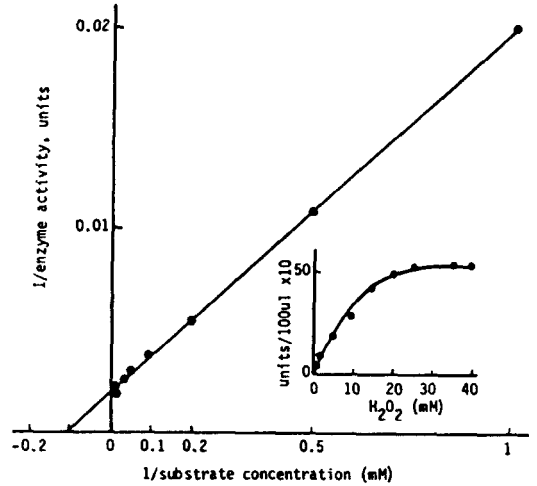
**Table 2. Substrate specificity of the partially purified enzyme**

| Substrate        | Relative activity(%) |
|------------------|----------------------|
| Amines           |                      |
| OPDA             | 100.0                |
| PPDA             | 23.7                 |
| o-Diphenols      |                      |
| DL-DOPA          | 0.8                  |
| (+)-catechin     | 0.8                  |
| catechol         | 0.8                  |
| caffeic acid     | 3.3                  |
| m-Diphenol       |                      |
| resorcinol       | 0                    |
| p-Diphenol       |                      |
| hydroquinone     | 0                    |
| ferulic acid     | 1.2                  |
| Trihydroxyphenol |                      |
| pyrogallol       | 3.3                  |
| gallic acid      | 4.2                  |
| phloroglucinol   | 0                    |

L-ascorbic acid 0.1mM, thiourea 100mM, L-cysteine 10mM, sodium L-ascorbate 0.1mM에서 전혀 활성을 나타내지 못했으며 sodium diethyldithiocarbamate 0.5mM, L-ascorbic acid 0.01mM, thiourea 5mM, L-cysteine 1mM, sodiumbisulfate 100mM, sodium L-ascorbate 0.01mM, K CN 0.05mM에서 50% 이상이



**Fig. 9. Lineweaver-Burk plot of OPDA oxidation by the partially purified enzyme**



**Fig. 10. Lineweaver-Burk plot of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduction by the partially purified enzyme**

저해되었으며, EDTA는 100mM에서 34.1% 밖에 저해작용을 나타내지 않았다. 본 실험에 사용된 이들 화합물들은 peroxidase의 보결 원자단인 Fe<sup>++</sup>과 결합하여 저해작용을 나타내는 일종의 chelator로 알려져 있고, 가장 높은 저해율을 보인 L-ascorbic acid는 효소 작용으로 생성된 quinone류를 환원시킬 수 있다고 알려져 있다.<sup>(25)</sup> 즉, ascorbic acid를 첨가할 경우 반응 생성물이 다시 기질로 전환됨으로써 외견상 반응 속도가 낮아진 것으로 나타날 뿐이지 이 물질이 효소에 직접 작용하여 효소를 저해하는 것은 아니므로 ascorbic

금속 이온의 농도를 1mM과 5mM로 각각 조정하고 효소활성을 측정된 결과는 Table 4와 같다. Cu<sup>++</sup>, acid는 진정한 의미의 peroxidase 저해제는 아닌 것으로 생각된다. 한편 산화방지제로써 식품에 첨가가 허용되고 있는 ascorbic acid는 과일 통조림의 갈변 방지를 위한 사용권장량이 0.03%인 바<sup>(26)</sup>, 본 실험의 결과로 미루어 볼때 권장량 보다 훨씬 낮은 농도에서도 밤 peroxidase에 의한 산화는 방지될 수 있을 것으로 기대된다.

Fe<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>은 효소활성을 저해시켰고 Hg<sup>++</sup>은 1mM에서 보다 5mM에서 촉진되었으며 Ca<sup>++</sup>과 Ba<sup>++</sup>는 두드러지게 효소활성을 촉진시켰다. 또 일반적으로 효소적 갈변은 Cu<sup>++</sup>와 Fe<sup>++</sup>에 의하여 촉진되는 것으로 알려져 있으나 본 실험에서는 Cu<sup>++</sup> 및 Fe<sup>++</sup>이온 모두 밤 peroxidase의 활성을 저해시켰다. 이상과 같은 결과는 농도 차이에 기인된 것이라 생각되어 Ca<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>의 농도를 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10mM로 조정하여 다음 효소활성을 측정된 결과는

**Table 3. Effect of inhibitor on the partially purified enzyme at various concentration**

| Inhibitor                      | Concentration (mM) | Inhibition (%) |
|--------------------------------|--------------------|----------------|
| Sodium diethyldithio-carbamate | 5.00               | 100.0          |
|                                | 1.00               | 74.6           |
|                                | 0.50               | 51.0           |
|                                | 0.10               | 38.1           |
| L-ascorbic acid                | 0.10               | 100.0          |
|                                | 0.05               | 92.6           |
|                                | 0.01               | 81.5           |
| Thiourea                       | 100.00             | 100.0          |
|                                | 10.00              | 92.8           |
|                                | 5.00               | 51.0           |
|                                | 1.00               | 36.1           |
| EDTA                           | 100.00             | 34.1           |
|                                | 10.00              | 21.2           |
| L-cysteine                     | 1.00               | 1.3            |
|                                | 10.00              | 100.0          |
|                                | 1.00               | 53.7           |
|                                | 0.10               | 14.2           |
| Sodium bisulfate               | 100.00             | 94.2           |
|                                | 10.00              | 49.4           |
|                                | 1.00               | 14.2           |
| Sodium L-ascorbate             | 0.10               | 100.0          |
|                                | 0.05               | 88.0           |
|                                | 0.01               | 74.6           |
| KCN                            | 1.00               | 100.0          |
|                                | 0.10               | 88.0           |
|                                | 0.05               | 78.8           |

Table 5와 같다.

Ca<sup>++</sup>과 Ba<sup>++</sup>은 0.001mM에서 10mM까지 모두 peroxidase의 활성을 증가시킨 반면 Cu<sup>++</sup>와 Fe<sup>++</sup>은 0.001, 0.01, 0.1mM에서는 활성을 증가시켰으나 1mM과 10mM에서는 저해시켰다. 이러한 결과를 종합하여 볼때 저농도의 Cu<sup>++</sup>와 Fe<sup>++</sup>은 peroxidase에 부족되는 보결 원자단의 금속이온을 보충해줌으로써 활성을 증가시킨 반면 고농도에서는 더 이상 보결원자단을 요구하지 않게되고 과량의 금속이온은 오히려 peroxidase의 활성을 저해하는 것으로 생각된다.

한편, 여러 효소를 저해하는 것으로 알려진 Hg<sup>++</sup>을 비롯하여, Ca<sup>++</sup>과 Ba<sup>++</sup>이 밤 peroxidase의 활성을 촉진하는 것으로 나타났는데, 현재로서는 그 이유를 알 수 없었다.

**Table 4. Effect of metal ion on the partially purified enzyme**

| Metal ion        | Relative activity(%) |       |
|------------------|----------------------|-------|
|                  | 1mM                  | 5mM   |
| None             | 100.0                | 100.0 |
| Na <sup>+</sup>  | 72.1                 | 64.5  |
| K <sup>+</sup>   | 72.1                 | 59.7  |
| Mg <sup>++</sup> | 82.7                 | 64.5  |
| Ca <sup>++</sup> | 208.3                | 328.9 |
| Fe <sup>++</sup> | 93.4                 | 72.1  |
| Cu <sup>++</sup> | 74.7                 | 52.7  |
| Ba <sup>++</sup> | 225.3                | 328.9 |
| Li <sup>+</sup>  | 64.6                 | 100.0 |
| Hg <sup>++</sup> | 91.1                 | 149.1 |
| Mn <sup>++</sup> | 91.1                 | 59.7  |

**Table 5. Effect of CaCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub> and FeSO<sub>4</sub> concentration on the partially purified enzyme**

| Concentration (mM) | Relative activity (%) |                  |                  |                  |
|--------------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|
|                    | Ca <sup>++</sup>      | Ba <sup>++</sup> | Fe <sup>++</sup> | Cu <sup>++</sup> |
| 0.001              | 108.4                 | 104.2            | 108.0            | 105.8            |
| 0.01               | 121.4                 | 125.8            | 120.7            | 110.2            |
| 0.1                | 133.6                 | 135.1            | 129.5            | 104.0            |
| 1.0                | 208.3                 | 225.3            | 93.4             | 74.7             |
| 10.0               | 429.3                 | 404.9            | 48.8             | 29.5             |

## 요 약

밤(生棠)으로 부터 peroxidase를 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 의한 염석 및 DEAE-cellulose column chromatography, sephadex G-100 column chromatography, HPLC방법으로 정제하였으며 정제도는 조효소에 비하여 65.3배였고, HPLC로 측정한 밤 peroxidase 분자량은 35,000으로 추정되었다. sephadexG-100 column chromatography 후 얻은 밤 peroxidase의 작용최적 pH는 5.0이었고, 작용최적 온도는 50°C이었으며 80°C에서 1.73분 열처리할 때 90%의 효소가 불활성화되었다. 본 효소는 OPDA 및 PPDA와 같은 방향족 amine류에 높은 활성을 나타내었다. OPDA와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 Km치는 각각 2.6mM과 10mM이었고, 저해작용은 L-ascorbic acid와 sodium L-ascorbate가 가장 컸으



며,  $Ca^{++}$ 과  $Ba^{++}$ 은  $1mM$ 과  $5mM$ 에서 현저히 효소활성을 증가시켰다.

### 문 헌

1. 이성우 : 식품화학, 수학사, P 354(1979)
2. Kurogi, M. and Bessho, Y. : *Shokuhim Sogo Kenkyusho Kenkyu Hokoku*, **36**, 33(1980)
3. Biffi, M. : *Glas Sumske Pokuse*, **17**, 5(1984)
4. Harada, N. : *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, **30**, 125(1961)
5. Sciancalepore, V., Longon, V. and Alviti, F.S. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 105(1985)
6. Fils, B., Sauvage, F. X. and Nicolas, J. : *Sci. Aliments.*, 5(2), 217(1985)
7. Espelie, K.E. and Kolattutudy, P. E. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 240(2), 539(1985)
8. Lee chang, Y., pennesi, A.P. and Dickson, M.H. : *J. Agri. Food chem.*, **32**, 18(1984)
9. 藤田修二, 東野哲三 : *日本農藝化學會誌*, **54**(6), 429(1980)
10. Harel, E., Mager, A.M. and Shain, Y. : *Phytochem.*, **4**, 783(1985)
11. Scopes, P. K. : *In the techniques in the life science*, Elsevier North-Holland, New York, **2**, 101(1978)
12. Scopes, P. K. : *In the techniques in the life science*, Elsevier North-Holland New York, **7**, 101(1978)
13. Dimenna, G. P. and Segall, H. J. : *J. chromar.*, 4(4), 639(1981)
14. Davis, B. J. : *Ann. N.Y. Acid sci.*, **121**, 404(1964)
15. Chenchin, E. E. and Yamamoto, H. Y. : *J. Food sci.*, **38**, 40(1973)
16. 한국생화학회 교재편찬위원회 편저 : 실험생화학, 탐구당, P236(1979)
17. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.L. : *J. Biol.chem.*, **193**, 265(1951)
18. Lehninger, A.L. : *Biochemistry*, Worth Publishers, INC., P. 202(1975).
19. 김용휘, 장재철, 오석홍 : 전북대학교 농대 논문집 **15**, 73(1984)
20. 김영숙, 이성우, 이갑량, 이광수, 조수열, 이종희 : 한국식품과학회지, **3**, 163(1971)
21. 김동연 : 한국농화학회지, **16**, 60(1973)
22. 이상갑, 박우철, 홍종욱 : 한국농화학회지, **29**(3), 279(1986)
23. 박관화, 김재욱, 신재두, 노봉수 : 한국식품과학회지, 11(3), 171(1979)
24. 박관화, Stahl, R., Srimani, B.N. and Loncin, M. : 한국식품과학회지, 9(2), 165(1977)
25. Benjamin, N.D. and Montgomery, M.W. : *J. Food sci.*, **38**, 799(1973)
26. 문범수 : 식품첨가물, 수학사, P 102(1982)

(1987년 6월 10일)