

가열 및 화합물에 의한 후지 사과 Peroxidase의 활성억제

최 언 호 · 정 동 선

서울여자대학 식품과학과
(1987년 9월 5일 수리)

Inactivation of Peroxidase from Fuji Apples by Heat and Chemical Treatments

Eon-Ho Choi and Dong-Sun Jung

Department of Food Science, Seoul Woman's University, Seoul, Korea

Abstract

As a basic research for inhibition of enzymatic browning of apples during dehydration or processing, peroxidase was extracted from Fuji apples to investigate heat inactivation, and chemical inhibition. Peroxidase showed the highest activity at 35°C and pH 5.5 using substrates of p-phenylenediamine and H₂O₂. The thermal inactivation followed biphasic kinetics to have activation energy (Ea) of 48.2kcal/mol and z value of 11.2°C for the heat labile fraction and Ea of 36.3kcal/mol and z value of 14.9°C for the heat resistant fraction. Browning by peroxidase was completely inhibited at the concentrations of 10mM for sodium diethyldithiocarbamate and potassium metabisulfite and 1mM for L-cysteine and ascorbic acid.

서 론

산화효소인 peroxidase (donor: hydrogen peroxide oxidoreductase; EC 1.11.1.7)는 polyphenol oxidase와 함께 과실과 채소의 갈변 및 이취생성 등에 관련하여 매우 중요시되고 있는 것으로서, Freestone peaches의 가공 중 갈변 반응¹⁾, 고추에서 carotene의 탈색²⁾, 오렌지 주우스의 품질 변화³⁾ 등에 peroxidase가 크게 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.

peroxidase는 효소 중에서 열에 가장 강하고, 거의 모든 과실과 채소에 상당한 양으로 존재하여 데치기 또는 가공 전후에 이의 활성을 측정하는데⁴⁾ 이것은 다른 효소의 불활성화 및 저장 식품에서의 off-flavor의 생성 여부를 예측하는데 도움이

된다. Vetter⁵⁾ 등은 peroxidase의 열불활성화를 여러 온도에 걸쳐 조사하고 이의 불활성화를 위한 가열 시간은 저장 중에 있을 peroxidase의 재생 정도에 따라 조정하여야 한다고 하였으며, Yamamoto⁶⁾ 등은 옥수수 peroxidase의 열불활성화 곡선은 biphasic으로 열저항성과 감수성의 두 fraction이 공존함을 시준하였다. 이외에도 peroxidase의 열불활성화에 대한 연구로는 sweet corn,⁵⁻⁸⁾ horseradish,⁹⁻¹⁴⁾ papaya¹⁵⁾ 등에서 이루어졌지만 사과의 peroxidase에 대해서는 단편적인 것에 불과하였다.^{16,17)} 따라서 저자 등은 점차 생산량이 증가하고 있는 후지 사과의 가공 및 저장에 관련된 기초 자료를 얻고자 전보¹⁸⁾의 polyphenol oxidase에 이어 가열온도와 시간, 저해제의 종류와 농도에 따른 peroxidase의 불활성화를 조사하였기에 그 결과를 보고한다.

이 논문은 1986년도 태평양장학문화재단의 지원(제목: 사과 peroxidase의 활성억제)에 의하여 연구되었음.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

경기도 김포군 대곶면 사과단지에서 1985~1986년도 수확기에 구입한 후기 사과를 4°C에 저장하여 실험재료로 사용하였다.

2. 조효소액의 조제

Flurkey와 Jen¹⁹⁾의 방법을 약간 변형하여 조제하였다. 즉 과육 30g을 3mm 두께로 썰어서 4°C의 0.05M potassium phosphate 완충용액(pH 5.5) 60ml를 가하여 homogenizer로 2분간 균질화시키고 4°C에서 원심분리 (15,000×g, 30분)한 상정액을 여과지(Toyo No. 2)로 여과하여 여액을 조효소액으로 사용하였다.

3. 효소의 활성 측정

Gorin과 Heidema의 방법¹⁹⁾을 약간 변형하여 측정하였다. 즉 0.05M potassium phosphate 완충액(pH 5.5) 1.8ml, 조효소액 0.2ml, 3mM H₂O₂ 0.3 ml, 1% p-phenylenediamine 0.1ml를 혼합하고 대조용에는 H₂O₂ 대신에 증류수를 넣어 475nm에서 흡광도를 측정하고 전보¹⁹⁾의 polyphenol oxidase와 같은 방법으로 활성을 구하였다.

4. pH에 따른 효소의 활성 측정

pH 2.5~8.0(0.5pH 간격) 범위에서 peroxidase의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하였다. pH 2.5~5.0에서는 0.1M citrate - 0.2M phosphate 완충액, pH 5.0~8.0에서는 0.5M potassium phosphate 완충액을 사용하여 효소활성을 측정하고 상대활성으로 나타내었다.

5. 온도에 따른 효소의 활성 측정

0.05M potassium phosphate 완충액(pH 5.5)에 조효소액을 0.2ml을 넣어 0°C부터 70°C까지의 수조에서 20분간 항온시킨 후 효소활성을 측정하여 상대활성으로 나타내었다.

6. 가열온도와 시간에 따른 효소의 활성 측정

70~90°C(5°C 간격)로 조정된 수조에서 충분히 예열시킨 각 시험관(1.0×15cm)에 조효소액을 2 ml씩 넣고 120분 동안 가열하면서 조효소액을 일

정시간별로 취하여 즉시 냉각시킨 뒤 잔존 활성을 측정하였다.

7. 저해제의 처리

Peroxidase의 저해제로 알려져 있는 것 중에서 potassium metabisulfite, ascorbic acid, L-cysteine, sodium diethyldithiocarbamate, thiourea 등을 0.1, 1.0, 10mM의 농도로 조정하여 0.2ml씩 반응혼합액에 첨가한 후 효소 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. Peroxidase의 활성에 미치는 pH와 온도의 영향

Peroxidase의 산화적 활성은 pH와 온도의 영향을 받는 것으로서 후기 사과의 peroxidase의 pH와 온도에 대한 반응을 조사한 결과는 그림 1과 같다

0.5M potassium phosphate 완충액에서 p-phenylenediamine을 기질로 사용하였을 때 후기사과의 peroxidase의 최적 pH는 5.5로 나타났으며, 전보¹⁹⁾에서의 polyphenol oxidase보다 덜 민감하여 pH 6.5와 pH 4.5에서 약 65~70%의 활성이 나타났고, pH 7.0에서 50%로 감소되었다.

Bruemmer 등²⁰⁾은 저온 살균한 오렌지 주우스에서 peroxidase의 활성이 감소하는 것은 pH의 변화에 기인한 것이라 하였고, 산도를 낮춤으로써 활성을

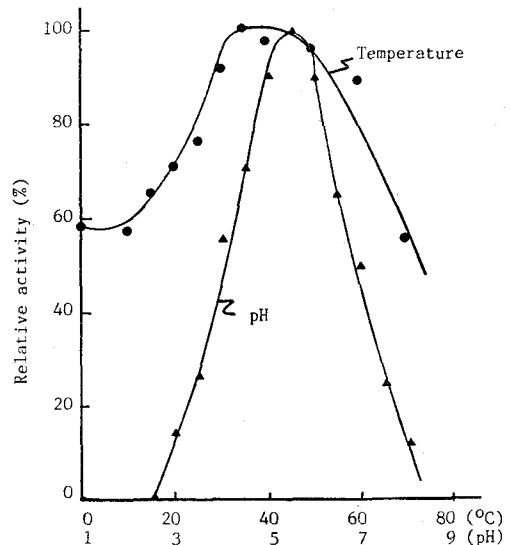


Fig. 1. Effect of pH and temperature on the activity of peroxidase from Fuji apples

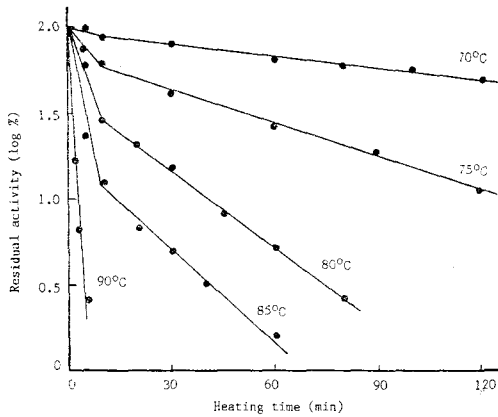


Fig. 2. Thermal inactivation of Fuji apple peroxidase at various temperature in 1/15 M potassium phosphate buffer (pH 5.5)

저해하는 방법은 이미 널리 알려져 있다. Peroxidase의 최적 pH는 과일과 채소의 종류 및 사용한 기질에 따라서 달라 감자의 peroxidase의 최적 pH는 5.0~6.0, *Ficus glabrata* Latex²⁰⁾의 최적 pH는 6.3~6.4이고, 토마토²¹⁾의 경우 기질을 guaiacol로 하였을 때 pH 5.5, pyrogallol로 사용하였을 때는 pH 7.5라고 보고되었다.

Peroxidase의 온도에 따른 활성은 35~40°C에서 최대활성을 보였고, 30°C부터 60°C 사이에서 85% 이상의 활성을 보였으며 30°C 이하와 60°C 이상의 온도에서는 점차 감소하였으나 0°C와 70°C에서도 55% 정도의 활성을 나타내는 점으로 보아 온도에 매우 안정하다는 것을 알 수 있었다.

2. 효소의 열불활성화

Peroxidase의 열에 대한 저항성을 알아보기 위하여 70~90°C에서 5°C 간격으로 조사하여 얻은 peroxidase의 활성은 그림 2와 같이 가열시간에 따라 지수함수적으로 감소하되 가열초기에는 빠르고, 10분 이후에는 보다 느리게 감소하는 biphasic으로 나타났으며 그 경향은 가열온도가 높을수록 현저하였다. 이와 같이 효소 불활성화속도가 biphasic, 다시 말해서 열감수성 부분(heat labile fraction)과 열저항성 부분(heat resistant fraction)으로 나누어진 것은 사과 증의 peroxidase가 열저항성이 서로 다른 두 가지 isoenzyme으로 구성되어 있어 열저항성이 큰 isoenzyme이 열처리 후반기에 남아 있기 때문이라고 생각된다.

Yamamoto등⁶⁾은 sweet corn의 peroxidase가 열

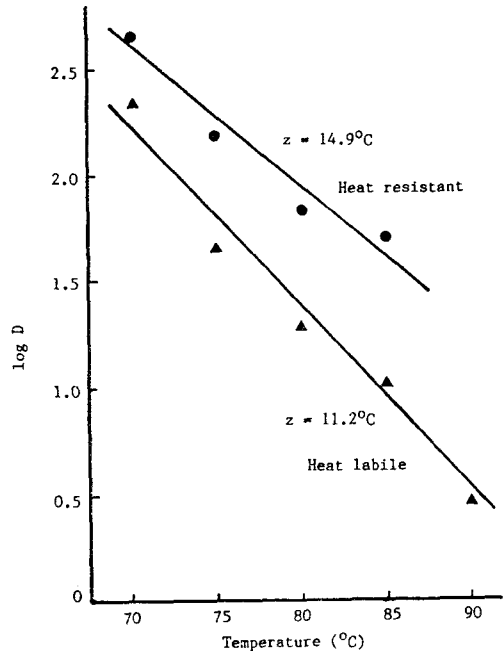


Fig. 3. Thermal destruction curves for inactivation of Fuji apple peroxidase

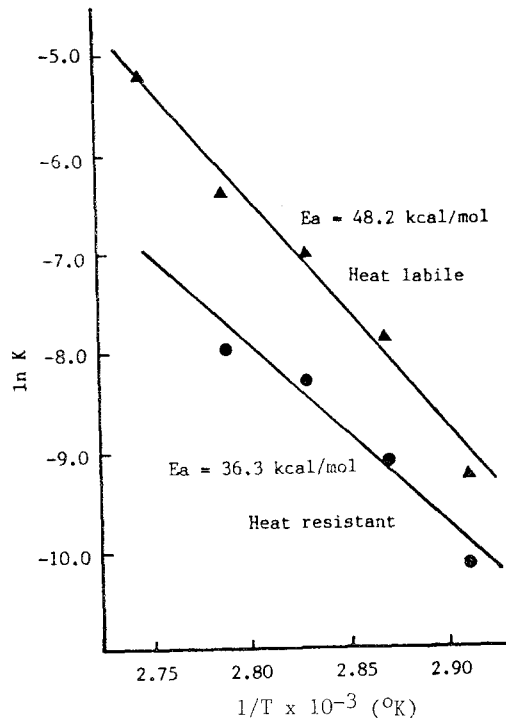


Fig. 4. Arrhenius plots of peroxidase inactivation in Fuji apples

Table 1. Thermal inactivation data of crude peroxidase from Fuji apples

Isoenzyme fraction	Inactivation temp. (0°C)	D (min)	Z (0°C)	K (sec ⁻¹ , 10 ⁴)	E _a (kcal/mol)
Heat labile	70	220	11.2	0.9	48.2
	75	46		3.6	
	80	20		8.5	
	85	10		16.5	
	90	3		54.0	
Heat resistant	70	460	14.9	0.4	36.3
	75	158		1.1	
	80	70		2.4	
	85	53		3.1	

저항성 부분과 열감수성 부분으로 되어 있다고 하였고, 朴等¹⁵⁾은 papaya에 있는 peroxidase의 열불활성화 곡선이 biphasic으로 나타남을 보고한 바 있다. 또한 Kahn 등²²⁾은 감자에서, Lu 등¹⁰⁾은 서양고추냉이에서 peroxidase가 가열 후 처음 몇분간만 1차반응속도에 따랐으며 그 후에는 일정한 값으로 유지되어 몇 개의 isoenzyme이 있음을 보여주었고, 윤 등⁹⁾은 서양고추냉이에 있는 peroxidase의 4개의 isoenzyme의 열불활성화를 조사한 바 있다.

후지사과의 peroxidase의 isoenzyme 수와 특성에 대해서는 앞으로 더 검토가 필요하나 본 연구에서 밝혀진 두 fraction의 peroxidase는 각각 1차반응속도를 따랐다. 이들 두 fraction, 즉 열감수성 곡선과 열저항성 곡선으로부터 각 온도별로 D값과 반응속도상수 K값을 구하고, 이들 D값의 온도에 대한 영향을 그림 3에 표시하여 Z값을 구하였더니 각각 11.2°C, 14.9°C이었다. 또한 가열온도에 대한 속도상수를 Arrhenious plot으로 나타내어(그림 4) 이로부터 활성화에너지(E_a)는 각각 48.2kcal/mol, 36.26kcal/mol임을 알았다(표 1).

이들 결과는 서양고추냉이 peroxidase의 열불활성화에 대해서 Ling 등¹²⁾은 열저항성 부분의 Z값이 27.3±3°C, E_a는 21.5±2kcal/mol이고, 열감수성 부분의 Z값은 17.0±5°C, E_a는 33.8±11kcal/mol로 보고하였고, 윤 등⁹⁾은 4개의 isoenzyme별로 D값과 Z값을 조사한 바 Z값은 18~24°C, D값은 70°C에서 264-10700초, 80°C에서는 78-2050초로 다양한 값을 보고하였다. 또한 Lu 등¹⁰⁾은 70~83°C에서의 E_a가 32.0kcal/mol, Joffe 등¹³⁾은 85~100°C에서의 E_a가 25.1kcal/mol, 朴²³⁾은 60~120°C에서의 Z값이 25.5°C, 朴 등¹¹⁾은 110°C 이상에서의

peroxidase의 Z값이 20°C로 thermal inactivation data가 같은 재료에서도 달리 나타났다. 또한 sweet corn⁶⁾에 있는 peroxidase의 열저항성 부분의 D값은 93.3°C에서 11분, 143.3°C에서 0.75분이고, Z값은 66~93.3°C에서는 12.2°C, 99.3~143.3°C에서는 18.3°C이었고, 열감수성 부분은 93.3°C에서의 D값은 13초, Z값은 30.6°C였다. Papaya¹⁵⁾에 있는 peroxidase의 D값은 70°C에서 485초, 75°C에서 345초, 80°C에서 50초이고 Z값은 12°C이었다.

이 결과로 보아 후지사과 peroxidase는 서양고추냉이 peroxidase보다는 열에 예민한 편이고 sweet corn peroxidase보다는 안정하며 papaya peroxidase와는 비슷한 경향을 보였다.

후지사과의 peroxidase의 각 온도에서의 D값을 전보¹⁸⁾의 polyphenol oxidase와 비교해 보면 peroxidase는 70°C에서 220분, 85°C에서는 10분이고, polyphenol oxidase는 70°C에서 16.8분, 85°C에서 2.5분으로 커다란 차이가 나타나 각 온도에서의 열저항성은 peroxidase가 polyphenol oxidase보다 훨씬 강하다는 것을 알 수 있었다. 그러나 온도 변화에 따른 의존도는 polyphenol oxidase의 Z값이 19.7°C이고, peroxidase의 Z값은 11.2°C로서 polyphenol oxidase가 peroxidase보다 더 안정하다는 것을 알 수 있었다.

3. 효소의 활성억제에 미치는 저해제의 저해 효과

Peroxidase에 대한 저해제의 작용기작은 기질인 phenol을 우선적으로 산화시킴으로써 저해하는 것과 효소의 보결분자단과 복합체를 형성하거나 치

환함으로써 저해하는 것, 기질과 복합체를 형성함으로써 저해하는 것 등이 있다.

본 연구에서는 효소의 초기 반응산물인 semi-quinoid를 환원시켜 갈변을 지연시키는 것으로 알려진 potassium metabisulfite, ascorbic acid, L-cysteine과 효소의 보결분자단과 반응하는 것으로 알려진 sodium diethyldithiocarbamate, thiourea 등을 각각 0.1, 1.0, 10mM의 농도로 만들어 효소액에 처리하였다. 저해효과는 각 효소의 활성 측정 과정에서 흡광도 증가가 초기 120초간 지속된 직선의 기울기로부터 계산하되 저해제 첨가 후 흡광도 증가가 일어나지 않는 시간이 120초 이상 일 때를 저해효과 100%로 간주하였다.

각 저해제의 농도별 저해효과는 표 2와 그림 5, 6에 나타난 것과 같이 potassium metabisulfite, ascorbic acid, L-cysteine, sodium diethyldithiocarbamate 등은 10mM에서 peroxidase의 활성을 100% 저해하였고, thiourea는 10mM에서 25.5% 저해하여 가장 효과가 낮았다.

Thiourea와 sodium diethyldithiocarbamate는 copper chelating agents로서 Fe를 함유한 peroxidase에 대한 저해효과는 Cu와 Fe의 화학적 유사성 때문에 이들 화합물에 의해 저해된다고 본다. 한편 10mM sodium diethyldithiocarbamate 처리구에서 약 3분뒤 흡광도가 급증하는 것은 갈변에 의한 것이 아니라 이 용액과 H₂O₂와의 반응에서 유리된 CS₂에 의한 혼탁 때문이며²⁴⁾, 이 때 동시에 2급 amine이 생성되므로 산의 존재하에서는

Table 2. Effect of various inhibitors on peroxidase activity from Fuji apples

Inhibitor	Concentration (mM)	Percent inhibition
Potassium m-bisulfite	0.1	0
	1	26.0
	10	100
Ascorbic acid	0.1	0
	1	100
	10	100
L-Cysteine	0.1	0
	1	100
	10	100
Sodium diethyl-dithiocarbamate	0.1	15.8
	1	80.0
	10	100
Thiourea	0.1	0
	1	6.50
	10	25.5

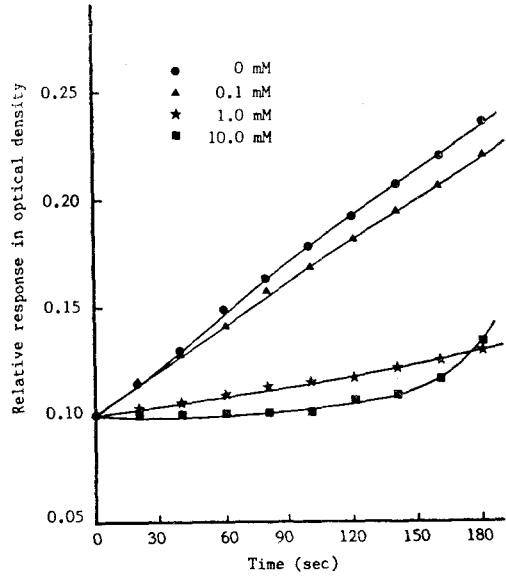


Fig. 5. Inhibition effect of sodium diethyldithiocarbamate on browning by peroxidase of Fuji apples

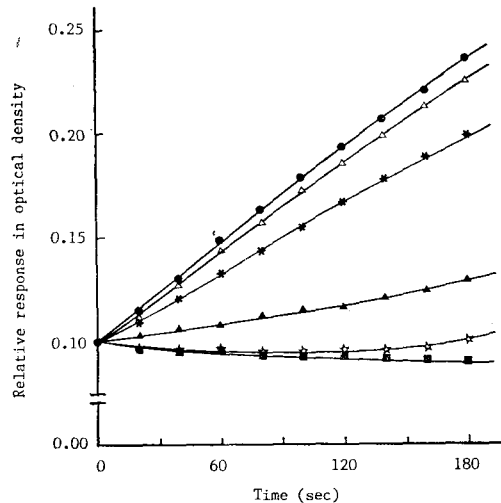


Fig. 6. Inhibition effect of chemical compounds (1mM) on browning by peroxidase of Fuji apples

- : Control
- △— : Thiourea
- *— : K-metabisulfite
- ▲— : Na-diethyldithiocarbamate
- ☆— : Ascorbic acid
- : L-Cysteine

고농도의 사용은 좋지 않을 것 같다.

Potassium metabisulfite는 다른 여러 sulfiting

agent들과 마찬가지로 갈변 저해제로서 식품에 널리 이용되고 있으나 최근의 연구결과 인체에 유해함이 밝혀져 이의 사용이 규제되고 있다²⁶⁾.

Ascorbic acid와 L-cysteine은 1mM에서도 peroxidase의 활성을 100% 저해하여 저해제 중 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다. Ascorbic acid는 semiquinoid를 환원시켜 중합과 갈변을 방지하는 작용을 하고, L-cysteine은 semiquinoid를 환원시키거나 이와 부가 반응물을 형성함으로써 갈변을 지연시키는 것이다. 따라서 이들 저해제가 산화된 후에는 semiquinoid의 산화가 진행되며, 갈변 저해 효과는 이들의 첨가량에 비례할 것이다.²⁾

요 약

사과의 건조, 가공 중의 갈변을 방지하기 위한 기초 조사로서 후지 사과로부터 추출한 crude peroxidase의 열불활성화와 갈변 저해제의 저해 효과 등을 조사하였다.

Peroxidase의 최적 pH와 온도는 p-phenylenediamine과 H₂O₂를 기질로 하였을 때 각각 5.5와 35°C이었고, 열불활성화 반응은 biphasic으로 heat labile fraction의 E_a와 Z값은 각각 48.2kcal/mol과 11.2°C, heat resistant fraction의 E_a와 Z값은 각각 36.3kcal/mol과 14.9°C이었다. Peroxidase에 의한 갈변은 sodium diethyldithiocarbamate와 potassium metabisulfite는 10mM에서, L-cysteine과 ascorbic acid는 1mM에서 현저하게 저해되었다.



본 연구의 실험방법 및 자료처리에 토의, 협조하여 주신 서울대학교 식품공학과 박관화 교수에게 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

1. Reyes, P. and Luh, B.S.: Food Technol. 14 : 570 (1960)
2. Kanner, J., Mendel, H. and Budowski, P.: J. Food Sci., 42 : 1549 (1977)
3. Bruemmer, J.H., Roe, B. and Bowe, E.R.: J. Food Sci., 41 : 186 (1976)
4. Chenchin, E.E. and Yamamoto, H.Y.: J. Food Sci., 38 : 40 (1973)
5. Vetter, J.L., Nelson, A.I. and Steinberg, M.

- P.: Food Technol., July, 410 (1959)
6. Yamamoto, H.Y., Steinberg, M.P. and Nelson, A.I.: J. Food Sci., 27 : 113 (1962)
7. Lee, Y.C. and Hammes, J.K.: J. Food Sci., 44 : 784(1979)
8. Gardner, H.W., Inglett, G.E. and Anderson, R.A.: Cereal Chem., 46(6) : 626 (1969)
9. 윤경로, 박관화 : 한국식품과학회지, 14(2) : 125 (1982)
10. Lu, A.T. and Whitaker, J.R.: J. Food Sci., 39 : 1173 (1974)
11. 박관화, Stahl, R., Srimani, B.N. and Loncin, M.: 한국식품과학회지, 9 : 165 (1977)
12. Ling, A.C. and Lund, D.B.: J. Food Sci., 43 : 1307 (1978)
13. Joffe, F.M. and Ball, C.O.: J. Food Sci., 27 : 587 (1962)
14. Wilder, C.J.: J. Food Sci., 27 : 567 (1962)
15. 박관화, 김재욱, 신재두, 노병수 : 한국식품과학회지, 11(3) : 171 (1979)
16. Gorin, N. and Heiedma, F.T.: J. Agric. Food Chem., 24(1) : 200 (1976)
17. Han, Dae-Seok : 서울대학교 대학원 석사학위논문 (1983)
18. 최언호, 경동선, 조남숙, 심영현 : 한국농화학회지, 30 : 278 (1987)
19. Flurkey, W.H. and Jen, J.J.: J. Food Sci., 43 : 1826 (1978)
20. Kon, S. and Whitaker, J.R.: J. Food Sci., 30 : 977 (1966)
21. Jen, J.J., Seo, A. and Flurkey, W.H.: J. Food Sci., 45 : 60 (1980)
22. Kahn, V., Goldshmidt, S., Amir, J. and Granit, R.: J. Food Sci., 46 : 756 (1981)
23. 박관화 : 한국식품과학회지, 9(2) : 175 (1977)
24. Windholz, M., Budavari, S., Blumetti, R.F., Otterbein, E.S.: The Merck Index "An encyclopedia of chemicals, Drugs, and Biologicals" Merck & Co., Inc. U.S.A. p.1234 (1983)
25. Embs, R.J. and Markakis, P.: J. Food Sci., 30 : 753 (1965)
26. Taylor, S.L. and Bush, R.K.: Food Technol., June, 47 (1986)