

사과 Peroxidase의 분리 및 특성

지원정 · 조남숙 · 김인철* · 박관화* · 최언호
서울여자대학교 식품과학과, *서울대학교 식품공학과

Isolation and Characterization of Fuji Apple Peroxidase

Wan-Jung Jee, Nam-Sook Cho, In-Cheol Kim*, Kwan-Hwa Park* and Eon-Ho Choi

Department of Food Science, Seoul Woman's University

*Department of Food Science and Technology, Seoul National University

Abstract

Three peroxidase fractions (peak I, II, III) were isolated from Fuji apples using CM-cellulose chromatography. The homogeneity of the isolated peroxidase isozymes was established by isoelectric focusing and electrophoresis. Isoelectric points of the isozymes were 3.80, 3.82, and 3.85, respectively. The optimum pH of peroxidase isozymes were pH 5.0(peak I) or 5.5(peak II, III), and optimum temperature was 40°C when assayed by using guaiacol and H₂O₂ as substrates. Inactivation rate of three peroxidase isozymes were different at temperature of 70°C and at pH of 5.5. The isozyme of peak II was found to be more heat stable than those of peak I and III. D values at 70°C of peroxidase isozymes (peak I, II, III) were estimated to be 660 sec, 1,320 sec, and 600 sec, respectively. The thermal stability of Fuji apple peroxidase was not influenced in the presence of 0.032 M sucrose or lactose. However, the thermal stability of the enzyme was decreased by fructose and glucose.

Key words: apple peroxidase, isolation of enzymes, thermal stability, isozymes

서 론

산화효소인 peroxidase(donor:hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7)는 채소와 과일류에 상당히 널리 분포되어 있으며, 과일과 채소를 통조림이나 냉동 식품으로 가공하는 공정에서 peroxidase는 품질을 저하시키는 원인이 된다고 보고⁽¹⁻⁷⁾되고 있다. Tressler⁽⁸⁾는 사과, 배, 포도, 복숭아, 살구쥬스 등이 peroxidase에 의해 갈변된다고 보고하였다. 또한 peroxidase가 딸기와 앵두의 anthocyanine을 분해하여 품질을 저하시키는 원인이 됨이 알려졌다⁽⁹⁾. 이 효소는 열에 안정하여 데치거나 가공 후에 이 효소의 활성을 측정함으로써 다른 효소의 불활성화 및 저장식품에서의 이취의 생성여부를 예측하는 지표로 이용되기도 한다. 그러나 peroxidase의 열안정성은 isozyme에 따라 현저히 다르며 초고온 단시간 살균(UHT) 제품이 저장 중에 품질변화를 일으키는 것은 열저항성이 큰 isozyme에 기인한다고 한다⁽¹⁰⁾. Peroxidase isozyme의 분리 및 열저항성은 서양고추냉이^(11,12), sweet corn⁽¹³⁾, Golden delicious⁽¹⁴⁾, Cox's apple⁽¹⁵⁾ 등 여러 식물체에서 연구되었고 Chang 등⁽¹⁶⁾은 당이 peroxidase의 열안정성에 미치는 효과에 관하여 보고하였다.

이와 같이 peroxidase의 열안정성은 peroxidase isozyme, 품종, 첨가물에 따라 달라지므로 열안정성에 대한 특성을 이해하기 위하여는 이들 인자에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 생산량이 크게 증가하고 있는 Fuji 사과의 건조제품을 개발하는데 필요한 기초자료를 얻고자 peroxidase isozyme을 순수분리하고 isozyme의 활성 최적조건과 열불활성화 등의 특성을 조사하고, 첨가물질이 peroxidase 활성에 미치는 영향에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

효소의 정제

경기도 김포군에서 1987년도 수확기에 구입한 Fuji 사과를 4°C에서 저장하여 실험재료로 사용하였으며 사과의 속(深)을 제거한 과피와 과육 4kg을 3mm 두께로 썰어서 4°C의 0.05 M 인산완충용액(pH 5.5) 7l를 가하고 Waring blender로 1분간 마쇄한 후 면포로 압착여과하여 얻은 여액에 pectinase(10mg/100 ml)를 넣고 30°C 수조에서 3시간 동안 반응시켜 추출액에 존재하는 pectin을 제거하였다.

추출한 액에 70% 아세톤(-20°C)을 가하고 30분간 방치한 후 흡인 여과하였다. 실온에 잠시 두어 잔사 중의 아세톤을 모두 휘발시킨 후 0.05 M 인산완충용액(pH 5.5)으로 용해시키고 4°C에서 원심분리(6,000xg, 20 min) 하

Corresponding author: Eon-Ho Choi, Department of Food Science, Seoul Woman's University, #126 Gongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-744, Korea

여 얻은 상등액은 여지(Whatman No. 41)를 사용하여 여과하였다.

Glass column(2.8×30 cm)에 carboxymethyl cellulose(Whatman CM-52)를 충전한 다음 0.005 M 초산완충용액(pH 4.4)으로 평형화시켰다. 이 column에 상기효소액을 주입하고 먼저 0.005 M 초산완충용액(pH 4.4)과 0.1 M 초산완충용액(pH 4.4)을, 이어서 0.1 M 초산완충용액(pH 4.4)과 0.25 M 초산완충용액(pH 4.9)을 linear gradient가 되도록 흘려주었으며 최종적으로 0.5 M 초산완충용액(pH 4.9)을 주입하고 20 ml/hr의 유속으로 10 ml씩 분획하였다.

효소활성의 측정

Wilder의 방법⁽¹⁷⁾에 준하여 0.05 M 인산완충용액(pH 5.5) 5 ml에 20 mM guaiacol 용액 0.1 ml와 효소액 0.1 ml를 차례로 혼합한 후 40 mM H₂O₂ 용액 0.02 ml를 가하여 반응시키고 475 nm에서 흡광도의 변화($\Delta E/\Delta t$)를 측정하였다. 25°C에서 1분간 효소액 1 ml당 생성된 반응물이 흡광도를 1 변화시키는 것을 1 효소단위로 하였다.

pH가 peroxidase의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 pH 2.5~5.0에서는 0.1 M 구연산-0.2 M 인산완충용액을, pH 5.5~8.5에서는 0.5 M 인산완충용액을 사용하여 효소활성을 측정하고 상대활성도로 나타내었다.

온도에 따른 효소의 역가를 측정하기 위하여 0.05 M 인산완충용액(pH 5.5)에 효소액을 넣고 예열시켜 놓은 수조에서 20분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

단백질 농도

280 nm와 260 nm에서 흡광도(A)를 측정하고 다음과 같은 식에 의하여 단백질 농도를 산출하였다.

$$\text{단백질 농도(mg/ml)} = 1.55A_{280} - 0.76A_{260}$$

Isoelectric focusing

Isoelectric focusing(I.E.F)은 Reisfeld 등의 방법⁽¹⁸⁾을 변형하여 사용하였는데 rod gel을 사용하여 음극과 양극에 각각 20 mM NaOH와 10 mM H₃PO₄ 용액을 연결하여 4 mA/tube로 4°C에서 수행하되 ampholyte(pH 3.5~10.0)를 사용하여 200V에서 15분, 300V에서 30분 그

리고 400V에서 1시간 동안 수행하였다. Coomassie blue R-250으로 protein staining을 수행하였으며, activity staining은 phast system(Pharmacia LKB, Sweden)을 이용하여 전기영동이 끝난 gel을 기질용액(0.25% o-dianisidine + 0.001% H₂O₂)에 침지시켜 약 30초 동안 경과한 후 발색된 band 위치를 확인하고 Rf값을 측정하여 phast system standard curve에 준하여서 pI값을 결정하였다.

Peroxidase의 열불활성화

시험관(11×125 mm)에 0.05 M 인산완충용액(pH 5.5) 4.9 ml를 넣고 70°C로 조정된 수조에서 예열시킨 다음 교반하면서 일정량의 효소용액을 가하고 일정한 시간 간격으로 0.1 ml씩을 채취하여 미리 얼음 수조에서 식혀 놓은 시험관에 넣고 냉각시킨 뒤 잔존활성을 측정하였다. 또 열불활성에 미치는 당의 영향을 보기 위해 같은 실험 조건하에서 인산완충용액과 0.032 M의 sucrose, lactose, glucose, fructose를 첨가하고 일정시간 간격으로 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Peroxidase isozyme의 분리

조효소액을 CM-cellulose column chromatography에 의해 분리 용출한 각 분획 중 0.005 M(fraction No.9-17), 0.09 M(No.43-55) 및 0.5 M(No.83-88) 농도의 초산완충용액에서 peroxidase 활성을 갖는 단백질을 용출하였다. 편의상 용출된 순서대로 각각 peak I, II, III라 표기하였다.

분리정제 과정과 효소의 역가와외의 관계는 Table 1에서 나타낸 바와 같이 peroxidase로 분리된 조효소의 specific activity는 0.254 units/mg protein이었으며 acetone 침전법에 의한 분획은 조효소에 비해 specific activity가 19.2배 증가되었고 이 때 회수율은 47.5%이었다. 또한 CM-cellulose column을 통하여 얻어진 peak I, II, III의 specific activity는 1.386, 0.868, 3.206 units/mg protein이었고 peak II의 효소활성은 peak I, III에 비하여 낮았다. Peak I, II, III의 역가를 합하여 보면 효소의 수율이 acetone 침전물에서보다 높아지는데 이는 acetone 침전물에서는

Table 1. Summary of purification procedure of Fuji apple peroxidase

Procedure	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (unit/ml)	Specific activity (unit/mg protein)	Total activity (unit)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	11,060	0.134	0.034	0.254	376.04	100.00	1.0
Acetone(70%) precipitation	620	0.059	0.288	4.880	178.56	47.48	19.21
CM-cellulose chromatography							
Peak I	90	1.162	1.590	1.368	143.10	38.05	5.39
Peak II	130	0.790	0.686	0.868	89.18	23.72	3.42
Peak III	60	0.189	0.606	3.206	36.36	9.67	12.62

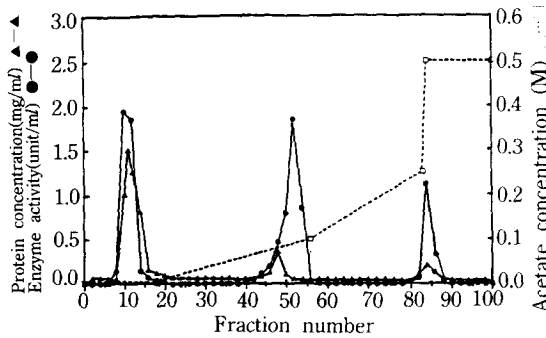


Fig. 1. Elution profile of partially purified Fuji apple peroxidase on CM-cellulose chromatography

Column size: 2.8×30 cm, flow rate: 20 ml/hr, fraction volume: 10 ml/tube
 CM-cellulose column was equilibrated with 0.05 M acetate buffer (pH 4.4).

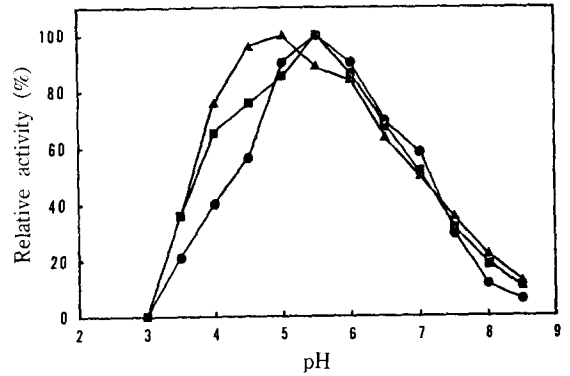


Fig. 2. pH-activity profile of purified peroxidases (peak I, II and III) from Fuji apple

The following-buffers were used: Na-acetate (peak I, II and III) from Fuji apple in 0.05 M phosphate (pH 5.5).
 ▲, peak I; ●, peak II; ■, peak III

peroxidase가 powder 형태로 되어 있으며 사과내에 존재하는 물질에 의하여 또는 효소의 3차 구조가 변형되어 activity가 약간 저해되나 CM-cellulose chromatography에 의하여 저해작용을 하는 물질 등이 제거되거나 효소의 구조가 변형되어 활성화된 것으로 추측된다.

조효소액과 CM-cellulose column chromatography 후 얻은 peroxidase peak I, II, III를 전기영동과 isoelectric focusing을 수행한 결과, 조효소액으로부터 3개의 활성 band를 얻었으며 phast system 을 이용하여 각 분획별로 얻은 peak I, II, III의 activity staining도 각각 단일 band로 나타났다. 이 때 peak I, II, III의 pI값은 각각 3.8, 8.82, 8.35이었으나 사진으로 제시하기에는 그 활성이 너무 낮았다. 최근에 Moulding 등⁽¹⁵⁾이 Cox's apple로부터 3개의 isozyme을 분리하여 2개의 anionic 및 cationic peroxidase isozyme을 얻은 결과 보고와 유사하였다. 땅콩 세포⁽¹⁹⁾에서도 anionic과 cationic peroxidase가 분리되었으며, McLellan 등⁽²⁰⁾에 의하여 cabbage는 cationic isozyme group으로, Brussels sprout는 pI값이 4.8 이하인 anionic isoperoxidase로 분리한 결과보고가 있다.

효소의 특성

효소활성에 미치는 pH의 영향: CM-cellulose column을 통과시켜 얻은 peak I, II, III의 활성 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 범위 2.5~8.5(0.5 pH 간격)에서 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. Peak I은 pH 5.0에서, peak II와 peak III은 pH 5.5에서 각각 최대 효소활성을 나타냈다. Soybean peroxidase⁽²¹⁾의 최대활성 pH는 5.5, green bean, turnip⁽²²⁾, 밤⁽²³⁾의 peroxidase의 최대활성 pH는 5.0으로 본 실험결과와 유사하였다.

Peak I은 pH 4.0에서 7.0까지는 50% 이상의 활성을 보이다가 pH 3.5와 7.5에서 약 35%로 활성이 감소되었다. Peak II는 pH 5.0과 6.0에서 90%의 높은 활성을 나타내었고 pH 4.5와 7.0에서는 50% 이상의 활성을 보였으나

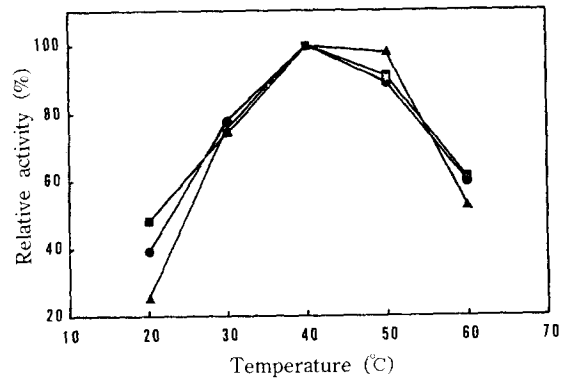


Fig. 3. Temperature-activity profile of purified peroxidases (peak I, II and III) from Fuji apple in 0.05 M phosphate buffer (pH 5.5)

▲, peak I; ●, peak II; ■, peak III

pH 3.5 이하와 7.5 이상에서는 30% 이하로 활성이 감소되었다. Peak III에서는 pH 4.0과 6.5에서 약 65%의 활성을 보이다가 pH 3.5 이하와 7.5 이상에서는 활성이 40% 이하로 감소되었다.

이상에서와 같이 각 isozyme의 효소활성은 거의 유사한 결과를 나타내었는데 pH 4.0 이상과 7.5 이하에서 대부분 50% 이상의 효소활성이 있음을 보여주었다. 그러나 peroxidase의 반응 최적 pH는 과일이나 채소의 종류 또는 사용한 기질에 따라서 다른 결과를 보이기도 한다. Guaiacol과 pyrogallol을 기질로 사용했을 때 토마토 peroxidase⁽²⁴⁾의 반응 최적 pH는 각각 5.5, 7.5라고 보고되었다.

효소활성에 미치는 온도의 영향: 온도가 peroxidase peak I, II, III의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. Peak I, II 및 III 모두 40°C에서 최대의 활성을 보였다. 이들은 밤 peroxidase⁽²³⁾의 최적온도 50

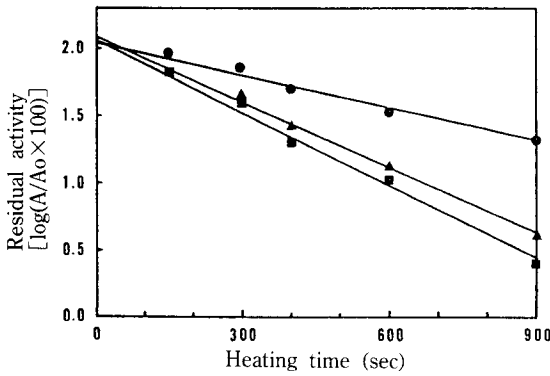


Fig. 4. Thermal inactivation of Fuji apple peroxidases (peak I, II and III) at 70°C in 0.05 M phosphate buffer (pH 5.5)

▲, peak I; ●, peak II; ■, peak III

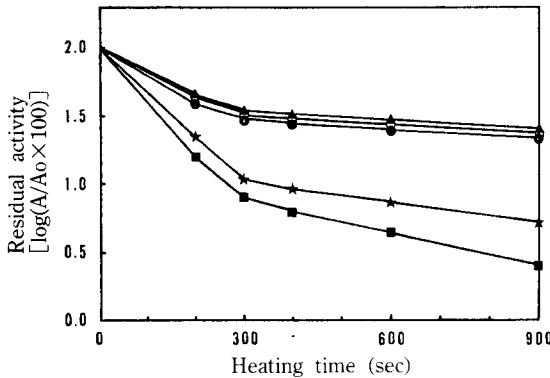


Fig. 5. Influence of various sugars on the thermal inactivation of peroxidase at 70°C

○, 0.05 M phosphate buffer (pH 5.5); ▲, 0.032 M sucrose; □, 0.032 M lactose; ●, 0.032 M glucose; ■, 0.032 M fructose.

°와 녹두 peroxidase⁽²⁵⁾의 최적온도 65°C 보다 낮았다.

Peroxidase의 열불활성화 : Isozyme의 열에 대한 저항성을 알아보기 위하여 70°C에서 실험한 결과는 Fig. 4와 같다. 열불활성화 곡선으로부터 peak I, II, III의 D값은 각각 660초, 1,320초, 600초이었다. Peak II가 가장 열에 강하였으며 peak I과 III은 열안정성이 유사하였다.

윤 등⁽²⁶⁾은 서양고추냉이로부터 4개의 peroxidase isozyme을 분리하여 각각 D-value 와 Z-value를 조사하였는데 70°C에서 D-value는 264-10,700초, 80°C에서 78-2,050초로 isozyme에 따라 열안정성이 현저하게 달랐으며, Z-value는 18~24°C이었다. Papaya⁽²⁷⁾에 있는 peroxidase의 D-value는 70°C에서 485초, 75°C에서 345초, 80°C에서 50초이었다. Sweet corn⁽¹⁰⁾에 있는 peroxidase의 열불활성에 대한 실험보고에서는 열저항성 부분의 D-value는 93°C에서 660초, 143°C에서 45초로 1차 반응곡선을 따랐다.

당이 peroxidase의 열안정에 미치는 영향 : 70°C에서 완충액과 여러 가지 당용액내에서 peroxidase의 열안정성을 조사한 결과가 Fig. 5와 같다. 0.032 M sucrose와 lactose가 존재할 때에는 0.05 M 인산완충용액(pH 5.5)의 결과와 거의 비슷한 반면 0.032 M glucose와 fructose는 아주 현저하게 열에 대한 peroxidase의 열안정성을 감소시켰다.

Chang 등⁽¹⁶⁾에 의하면 horseradish peroxidase는 sucrose의 농도가 40% 이상이였을 때 열에 대하여 안정하였으나 fructose, glucose, lactose를 동일한 농도(10%)로 첨가하였을 경우에 sucrose의 존재시보다 빠르게 활성이 저하된다고 하였으며 이는 환원당과 효소단백질간의 상호작용에 의한 것이라고 추측하였다. 본 효소도 환원당이 존재할 때 열안정성이 현저히 감소되는 것으로 보아 환원당과 효소단백질간의 상호작용이 효소단백질의 열안정성을 저하시킨다고 생각된다.

요 약

Fuji 사과로부터 acetone 처리 및 CM-cellulose column chromatography를 통하여 3개의 peroxidase isozyme(peak I, II, III)을 분리하고 isoelectric focusing에 의하여 pI값이 각각 3.80, 8.82, 8.35임을 확인하였다. Peroxidase isozyme의 최적 pH는 guaiacol과 H₂O₂를 기질로 하였을 때 peak I이 pH 5.0, peak II, III은 pH 5.5이었으며 최적온도는 peak I, II, III 모두 40°C이었다. 70°C에서 각 isozyme의 D값은 660초, 1,320초, 600초로서 peak II isozyme이 가장 열에 안정하였다. 당(0.032 M)의 존재하에서는 sucrose와 lactose는 효소의 열안정성에 영향을 미치지 않았으나 fructose와 glucose는 열안정성을 현저하게 감소시켰다. 이는 환원당과 효소단백질의 상호작용에 기인한 것으로 생각된다.

감사의 말

이 연구는 1989~1991년도 한국과학재단 연구비 지원 (과제번호 891-1508-030-2) 에 의한 결과의 일부입니다.

문 헌

1. Tauber, H.: Ch. 8. The iron-porphyrin enzymes. 26. Enzymes in the meat, egg, vegetable and fruit industries. In *The Chemistry and Technology of Enzymes*, p. 189,440. John Wiley & Sons, Inc., New York (1949)
2. Bruemmer, J.H., Roe, B. and Bowen, E.R.: Peroxidase reactions and orange juice quality. *J. Food Sci.*, 41, 186(1976)
3. Esselen, W.B. and Anderson, E.E.: Thermal destruction of peroxidase in vegetables at high temperatures. *Food Res.*, 21, 322(1956)
4. Bedford, C.L. and Joslyn, M.A.: Enzyme activity in frozen vegetables string beans. *Ind. Eng. Chem.*, 31

- (1), 751(1939)
5. Farkus, D.F., Goldlith, S.A. and Proctor, B.E.: Stopping storage off-flavors by curbing peroxidase. *Food Eng.*, **28**(1), 52(1956)
 6. Wagenknecht, A.C. and Lee, F.A.: Enzyme action and off-flavor in frozen peas. *Food Res.*, **23**, 25(1958)
 7. Lopez, A., Bocklet, M.F. and Wood, C.B.: Catalase and peroxidase activity in raw and blanched southern peas, *vigna sinensis*. *Food Res.*, **24**(5), 548(1959)
 8. Nebeskey, E.A., Esselen, W.B. JR., Kaplan, A.M. and Fellers, C.R.: Thermal destruction and stability of peroxidase in acid foods. *Food Res.*, **15**, 114(1950)
 9. Grommeck, R. and Markakis, P.: The effect of peroxidase on anthocyanin pigments. *J. Food Sci.*, **29**, 53(1964)
 10. Yamamoto, H.Y., Steinberg, M.P. and Nelson, A.I.: Kinetic studies on the heat inactivation of peroxidase in sweet corn. *J. Food Sci.*, **27**, 113(1961)
 11. Shannon, C.T. and Pratt, D.E.: Apple polyphenol oxidase activity in relation to various phenolic compounds. *J. Food Sci.*, **32**, 479(1967)
 12. Wang, S.S. and Dimarco, G.R.: Isolation and characterization of the native, thermally inactivated and regenerated horseradish peroxidase isozymes. *J. Food Sci.*, **37**, 547(1972)
 13. Chenchin, E.E. and Yamamoto, H.Y.: Distribution and heat inactivation of peroxidase isozyme in sweet corn. *J. Food Sci.*, **38**, 40(1973)
 14. Gorin, N. and Heidema, F.T.: Peroxidase activity in Golden Delicious apples as a possible parameters of ripening and senescence. *J. Agric. Food Chem.*, **24**(1), 200(1976)
 15. Moulding, P.H., Sinsleton, D.E., McLellan, K.M. and Robinson, D.S.: Purification and heat stability of cox's apple pulp. *Intern. J. Food Sci. Technol.*, **23**, 343 (1988)
 16. Chang, B.S., Park, K.H. and D.B. Lund : Thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase. *J. Food Sci.*, **53**, 920(1988)
 17. Wilder, C.J.: Factors affecting heat inactivation and partial reactivation of peroxidase purified by ion-exchange chromatography. *J. Food Sci.*, **27**, 567(1962)
 18. Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. and Willams, D.E.: Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* (London), **195**, 281(1962)
 19. Cesar, V.H., EvelynMae, T.M. and Dolores, A.R.: Coconut peroxidase isoenzymes: Isolation, partial purification and physicochemical properties. *Phytochemistry*, **22**(6), 1335(1983)
 20. McLellan, K.M. and Robinson, D.S.: Cabbage and brussels sprout peroxidase isoenzymes separated by isoelectric focussing. *Phytochemistry*, **22**(3), 645(1983)
 21. Sessa, D.J. and Anderson, R.L.: Soybean peroxidase purification and some properties. *J. Agric. Food Chem.*, **29**(5), 960(1981)
 22. Zoueil, M.E. and Esselen, W.B.: Thermal destruction rates and regeneration of peroxidase in green bean and turnips. *Food Res.*, **24**, 119(1959)
 23. 오석홍, 김용휘, 이서나 : 밤에 함유된 peroxidase의 정제 및 특성에 관한 연구. 한국식품과학회지, **19**(6), 506(1987)
 24. Jen, J.J., Seo, A. and Flurkey, W.H.: Tomato peroxidase : Purification via hydrophobic chromatography. *J. Food Sci.*, **45**, 60(1980)
 25. 이상갑, 박우철, 홍종욱 : 녹두에서의 peroxidase 동위 효소들의 분리와 효소적 특성. 한국농화학회지, **29**(3), 279(1986)
 26. 윤정로, 박관화 : 서양고추냉이에 있는 peroxidase isozyme의 분리와 열불활성에 관하여. 한국식품과학회지, **14**(2), 125(1982)
 27. 박관화, 김재욱, 신재두, 노봉수 : Papaya 종의 단백질 분해효소와 peroxidase의 열불활성화. 한국식품과학회지, **11**(3), 171(1979)

(1991년 4월 2일 접수)