

콩나물 Peroxidase의 효소적 특성

이민경 · 박인식[†]

동아대학교 식품영양학과

Enzymatic Characterization of Peroxidase from Soybean Sprouts

Min-Kyung Lee and Inshik Park[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

Abstract

Enzymatic characterization of peroxidase(E.C. 1.11.1.7) from soybean sprouts was investigated. The optimum pH of the purified peroxidase was 7.0 and relatively stable at pH 6.0~7.0. And the optimum temperature was 50°C. The enzyme was most active with guaiacol as a substrate, followed by (+)catechin, pyrogallol and *p*-phenylenediamine. The K_m values for guaiacol and H_2O_2 were 4.2mM and 2.5mM, respectively. L-Ascorbic acid and 2-mercaptoethanol greatly inhibited the enzyme activity, while Cu^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} activated the enzyme.

Key words: peroxidase, soybean sprouts, substrate specificity, kinetic property, inhibitor

서 론

식품의 변색이나 향미손상을 일으키는 효소로는 peroxidase, lipase, lipoxygenase, protease 등이 있는데(1) 특히 peroxidase(E.C. 1.11.1.7)는 식물체에 널리 분포하여 과일이나 야채의 가공시에 효소적 갈변을 일으키는 효소이며, 이런 갈변에 관여하는 효소로는 주로 polyphenol oxidase나 tyrosinase 등이 있다(2). 또한 peroxidase는 내열성이 강한 효소로서 열안정성이나 재활성화에 관한 많은 보고가 있으며(3,4) 한국산 무(*Raphanus sativus*)에서 활성이 매우 높아 그 효소적 특성이 밝혀져 있다(5). 이외에도 Japanese radish(6), Jerusalem artichoke(7), soybean(8), potato tube(9), green asparagus(10), tobacco(11), peanut(12) 등에서의 peroxidase를 추출, 정제하여 그 생화학적인 특성이나 산업적 이용에 대한 가치 등이 보고된 바가 있다. 또한 peroxidase는 superoxide dismutase, catalase, glucose oxidase, polygalacturonase, cellulase 등의 활성과도 밀접한 관계가 있고(13) indoleacetic acid 산화나(14) lignification(15), phenol성 화합물의 산화(16), 염록체의 분해(17), 과일의 숙성(18) 등에도 관여하며 최근에는 분자적인 구조를 밝혀 isoperoxidase나 active site에 관한 많은 연구가 활발히 진행되고 있다(19-21). 따

라서 본 연구에서는 아직 밝혀진 바 없고 시중에서 구입이 쉬우며 우리가 흔히 먹는 콩나물에 peroxidase의 활성이 높음을 알고 시료로 채택하였다. 즉 콩나물로부터 peroxidase를 추출, 정제하여 생화학적인 특성을 조사하고 콩나물 peroxidase의 이용시 효소화학적 연구 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 과산화수소는 Junsei사 제품을, guaiacol은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였고 콩나물(*Glycine max* L.)은 부산광역시 사하구 하단동 근처 시장에서 구입하였다.

조효소액의 조제 및 정제

콩나물은 줄기부분만을 다듬어 동량의 50mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충액을 첨가하여 믹서로 3분간 마쇄한 후 cheese-cloth로 여과한 다음 4°C, 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 그리고 조효소액은 30~70%의 황산 암모늄으로 교환, 포화시킨 후 원심분리(10000×g, 20분, 4°C)하여 침

[†]To whom all correspondence should be addressed

전물을 취하여 소량의 10mM Tris-HCl(pH 7.0)에 녹였다. 이것을 투석막에 투석후 10mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충액으로 평형화된 DEAE-Sephacel ion exchange column(2.5×15cm)에서 0~1.0M의 NaCl을 linear gradient가 되도록 하여 유속 28ml/hr로 용출시켜 2.8ml씩 분획하였다. Peroxidase의 활성이 있는 부분만을 모아서 본 실험에 사용하였으며 조효소액에 비해 specific activity가 10.8배 증가되었으며 수율은 11.3%였다.

효소활성 측정

콩나물 peroxidase 분석에 있어서 반응액의 최종 농도는 과산화수소 5mM, guaiacol 15mM이었다. 즉 0.1 M Tris-HCl(pH 7.0) 완충액 2.75ml에 0.45M guaiacol 0.1ml와 0.15M H₂O₂ 0.1ml를 첨가한 후 여기에 50μl의 효소액을 첨가하여 50°C에서 1분간 반응시켰다. 효소 반응액의 총 부피는 3ml이었으며 효소 반응 후에 470 nm에서 흡광도의 변화를 이용하여 효소 활성을 측정하였다. 이때 1분 동안 효소액 1ml당 생성된 반응물이 흡광도를 1변화시키는 것을 1 unit로 정하였다.

결과 및 고찰

반응의 최적 pH

정제된 효소액의 반응에 대한 최적 pH를 알아보기 위하여 효소 반응액의 pH를 3.0에서 10.0까지 변화시키면서 효소의 활성을 측정하여 상대활성도를 Fig. 1에 나타내었다. 반응에 쓰인 완충액(0.1M)은 pH 3.0은 Na-glycine, pH 4.0~5.0는 Na-acetate, pH 6.0은 Na-phosphate, pH 7.0~8.0은 Tris-HCl, 그리고 pH 9.0~10.0은 Na-borate를 사용하였다. Fig. 1에서와 같이 pH 7.0에서 가장 활성이 높았음을 알 수 있었는데 본 연구와는 대조적으로 밤 peroxidase(22)의 최적 pH는 5.0, 대두 peroxidase(8)의 최적 pH는 5.5로 이미 밝혀진 바 있다.

pH에 대한 안정성

Fig. 2는 정제된 효소의 pH에 대한 안정성을 나타낸 것이다. 정제한 효소는 pH 3.0에서 pH 10.0으로 변화시키고 4°C에서 24시간 보관 후에 잔존하는 활성을 표준 효소활성 측정법으로 측정하였다. 효소는 pH 7.0에서 가장 안정하였으며 pH 6.0에서도 높은 안정성을 나타냈다. 이는 돼지감자 peroxidase(7)가 pH 5.5, 아그배 peroxidase(23)가 pH 5.0에서 가장 높은 안정성을 나타내어 약산성에서 안정함을 나타낸 것과는 대조적이었다.

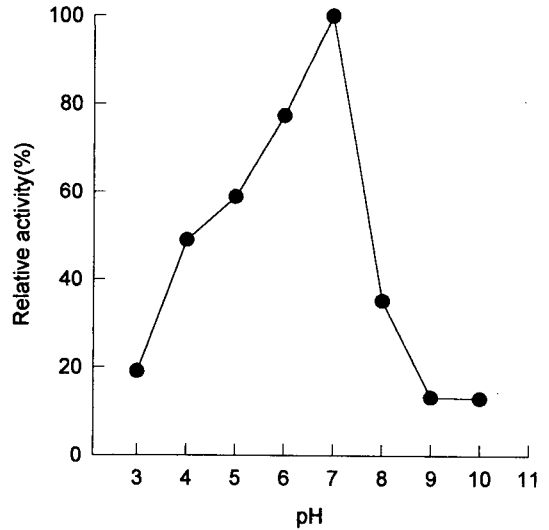


Fig. 1. Effect of pH on activity of peroxidase from soybean sprouts.

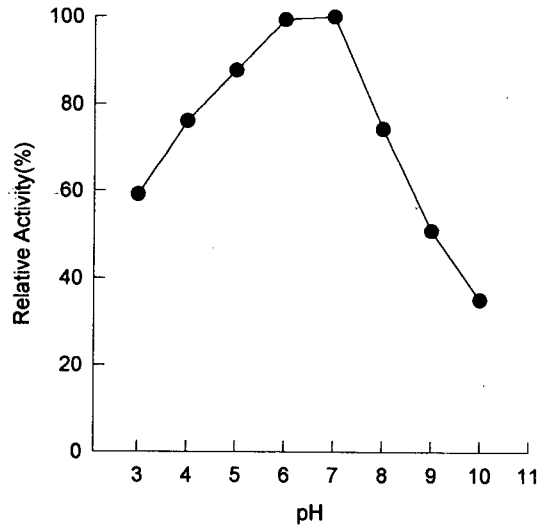


Fig. 2. Effect of pH on stability of peroxidase from soybean sprouts.

The enzyme at various pH values was preincubated for 24hrs at 4°C.

반응의 최적 온도

Peroxidase의 반응에 대한 최적온도는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 즉 효소반응액의 온도를 30°C에서 80°C까지 변화시키면서 효소활성을 표준 측정법으로 측정한 결과 50°C에서 최대 활성을 나타내었다. 이 결과는 사과 peroxidase(24)의 40°C보다는 높았으며 밤 peroxidase(22)의 50°C와는 일치하였고 아그배 peroxidase(23)의 80°C보다는 낮았다.

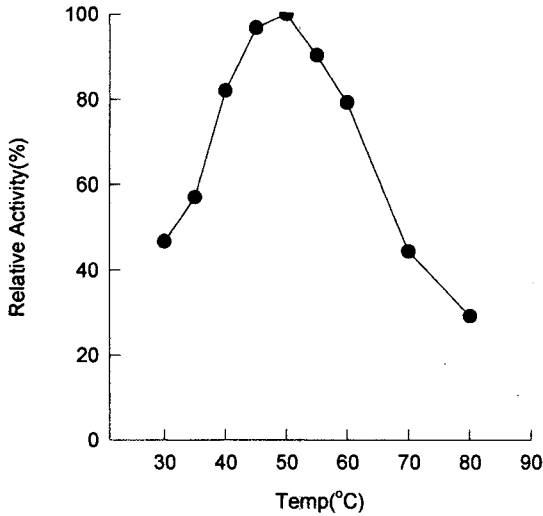


Fig. 3. Effect of temperature on activity of peroxidase from soybean sprouts. Enzyme solution was incubated at various temperatures.

기질 특이성

Table 1은 콩나물 peroxidase의 기질에 대한 특이성을 나타낸 것이다. 표준효소활성 측정법에 따라서 H₂O₂의 존재하에서 기질인 guaiacol 대신 방향족 amine류와 phenol화합물을 기질로 사용한 결과 (+)catechin이 60.1%로 가장 활성이 높았으며 trihydroxyphenol류

Table 1. Substrate specificity of peroxidase from soybean sprouts

Substrate(10mM)	Relative activity(%)
Guaiacol	100 ¹⁾
Amine	
PPDA ²⁾	26.5
OPDA ³⁾	15.9
<i>o</i> -Diphenol	
DL-DOPA ⁴⁾	1.59
(+)-Catechin	60.1
Catechol	12.4
<i>m</i> -Diphenol	
Resorcinol	0.2
<i>p</i> -Diphenol	
Hydroquinone	9.8
Ferulic acid	3.6
Trihydroxyphenol	
Pyrogallol	44.9
Gallic acid	23.2

¹⁾100% relative activity corresponds to 15.04 unit.

²⁾*p*-Phenylenediamine

³⁾*o*-Phenylenediamine

⁴⁾DL-β-3,4-dihydroxyphenylalanine

pyrogallol과 gallic acid에서 높은 활성을 나타냈다. 특히 amine류에서는 밤 peroxidase(22)의 경우 OPDA (*o*-phenylenediamine)가 PPDA(*p*-phenylenediamine)보다 4.5배 이상의 높은 친화력을 나타내었고 돼지감자 peroxidase(7)는 PPDA가 OPDA보다 훨씬 높은 친화력을 나타낸 보고가 있는데, 본 연구에서는 PPDA가 OPDA보다 1.5배 이상의 높은 활성을 나타내었다. 그 외 *m*-diphenol에서는 거의 활성이 나타나지 않았으며 *p*-diphenol류에서도 낮은 활성을 보였다.

기질농도의 영향

Fig. 4와 Fig. 5는 기질로 사용한 guaiacol과 H₂O₂의 농도가 반응속도에 미치는 영향을 조사하였다. 5mM H₂O₂를 사용한 반응액 중에서 guaiacol의 최종농도를 0.93mM에서 45mM까지 다양하게 변화시켰고, 15mM guaiacol을 포함한 반응액 중에서 H₂O₂의 최종농도를 0.31mM에서 15mM까지 변화시켜 표준효소활성 측정법으로 효소의 활성을 측정하였다. 그리고 Lineweaver-Burk법에 의하여 구한 Michaelis 상수(K_m)는 guaiacol은 4.2mM, H₂O₂는 2.5mM로 나타났다. 한편 아그배 peroxidase(23)에서 기질로 사용한 OPDA와 H₂O₂의 K_m치가 1.65mM, 7.97mM이었으며 밤 peroxidase(22)에서 기질로 사용한 OPDA와 H₂O₂의 K_m치는 각각 2.6mM과 10mM이었다.

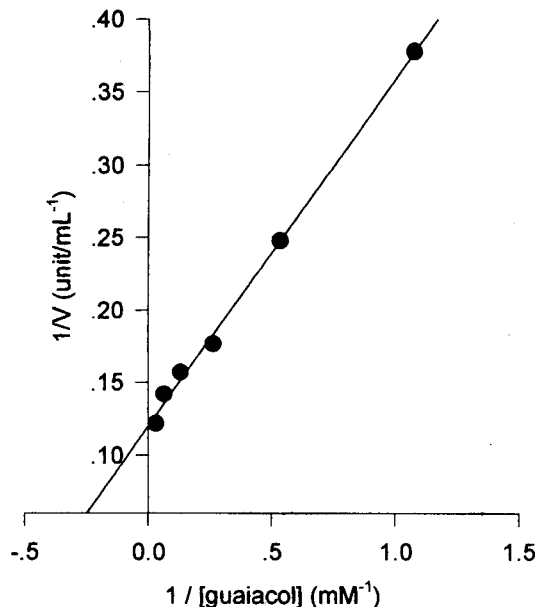


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of guaiacol oxidation of peroxidase from soybean sprouts.

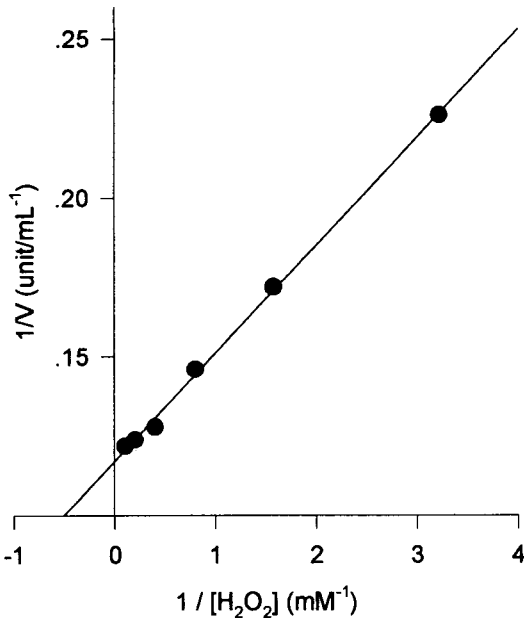


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of H_2O_2 reduction of peroxidase from soybean sprouts.

저해제의 영향

여러가지 저해제를 농도를 달리하여 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하여 그 저해정도를 백분율로 나타내었다. Table 2에서 나타난 바와 같이 L-ascorbic

Table 2. Effect of various inhibitors on the activity of peroxidase purified from soybean sprouts

Inhibitor	Concentration (mM)	Inhibition (%)
L-Ascorbic acid	10.0	100
	1.0	100
	0.1	62.4
2-Mercaptoethanol	10.0	100
	1.0	100
	0.1	77.9
L-Cysteine	10.0	100
	1.0	93.2
	0.1	42.5
Dithiothreitol	10.0	100
	1.0	100
	0.1	73.9
Sodium azide	100.0	100
	10.0	76.6
	1.0	29.9
EDTA ¹⁾	100.0	49.5
	10.0	31.0
	1.0	5.3
Urea	100.0	22.0
	10.0	15.2
	1.0	0.3

¹⁾Ethylenediamine tetraacetic acid

Table 3. Effect of metal ions on the activity of peroxidase purified from soybean sprouts

Metal ions(10mM)	Relative activity(%)
None	100
CaCl ₂	133.7
BaCl ₂	112.7
MnCl ₂	131.1
CuCl ₂	292.4
MgCl ₂	144.1
CoCl ₂	191.5
ZnCl ₂	100.2
HgCl ₂	43.2
NiCl ₂	161.4
CrCl ₃	38.3

acid, 2-mercaptoethanol, dithiothreitol은 1.0mM 첨가 시 100% 활성이 저해되었고 L-cysteine은 10.0mM 첨가 시, sodium azide는 100.0mM 첨가 시 효소의 활성이 완전히 저해되었다. 또한 EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid)는 100.0mM 첨가 시 49.5%의 저해를 나타냈으며 urea는 22.0%로 가장 저해율이 낮았다. 위에서 나타난 바와 같이 가장 강력한 저해효과를 나타낸 L-ascorbic acid는 효소작용으로 생성된 quinone류를 환원시켜 중합과 갈변을 방지하는 작용을 한다고 알려져 있으며(25) 본 실험에 사용된 화합물들은 효소의 보결원자단과 복합체를 형성함으로써 효소반응을 저해하는 것으로 알려져 있다(26).

금속이온의 영향

Table 3은 효소활성에 대한 여러가지 금속이온의 영향을 조사한 것이다. 10mM의 각종 금속을 첨가 시 Cu²⁺에서 가장 높은 활성이 나타났으며 Co²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ 등도 활성을 증가시켰다. 반면에 Hg²⁺나 Cr³⁺ 등은 효소활성을 저해하는 것으로 나타났다. 밤 peroxidase (22)의 경우에는 5mM의 Hg²⁺ 첨가 시 효소활성을 촉진시킨다고 보고되었으며 돼지감자 peroxidase(7)의 경우에는 본 논문과 같이 Cu²⁺에서 활성이 높았음이 보고되었다.

요 약

콩나물(*Glycine max* L.)로부터 추출, 정제한 peroxidase의 효소적 특성을 분석한 결과 반응의 최적 pH는 7.0이었고, pH에 대한 안정성은 pH 6.0~pH 7.0에서 높은 안정성을 보였다. 또한 반응의 최적온도는 50°C로 나타났으며, 콩나물 peroxidase의 기질에 대한 특이성을 알아보기 위하여 H₂O₂의 존재하에서 방향족 amine류와 phenol화합물을 기질로 사용한 결과 guaiacol 의

에 (+)catechin이 60.1%로 가장 활성이 높았으며 pyrogallol과 gallic acid에서도 높은 활성을 나타내었다. 그의 *p*-diphenol류에서는 활성이 낮았으며 *m*-diphenol류에서는 거의 활성이 나타나지 않았다. 그리고 본 연구에서 기질로 사용한 guaiacol과 H₂O₂의 Lineweaver-Burk법에 의하여 구한 K_m치는 각각, 4.2mM과 2.5mM이었다. 한편 콩나물 peroxidase에 각종 저해제를 첨가한 저해효과는 L-ascorbic acid가 가장 강력하게 저해를 하였으며 2-mercaptoethanol, dithiothreitol 등도 저해율이 높았다. 또한 효소활성에 대한 금속이온의 영향은 Cu²⁺ 첨가시에 가장 활성이 높았으며 Co²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺ 등도 활성을 증가시켰고, Hg²⁺와 Cr³⁺ 등은 효소활성을 저해하는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 동아대학교 학술연구 조성비(일반과제)에 의하여 수행되었다.

문헌

- Williams, D. C., Lim, M. H., Chen, A. O., Pangborn, R. M. and Whitaker, J. R.: Blanching of vegetables for freezing which indicator enzyme to choose. *Food Technology*, **40**, 130(1986)
- Stutle, G. W.: Quantification of net enzymatic activity in developing peach fruit using computer video image analysis. *Hort. Science*, **24**, 113(1989)
- Lopez, P. and Burgos J.: Peroxidase stability and re-activation after heat treatment and manothermosonication. *J. Food Sci.*, **60**, 451(1995)
- Lee, K. A., Hong, J. M., Kim, G. N. and Park, I. S.: Factors affecting thermal inactivation and reactivation of Korean-radish peroxidase. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **19**, 301(1990)
- Yoo, W. and Kim, S.: Purification and characterization of anionic isoperoxidase from Korean-radish root. *Korean Biochem. J.*, **21**, 207(1988)
- Morita, Y., Yoshida, C. and Maeda, Y.: Properties and structure of peroxidase isozymes of Japanese-radish. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1074(1971)
- Yoon, E., Kang, S., Noh, B. and Choi, E.: Isolation and characterization of peroxidase from Jerusalem artichoke tubers. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **25**, 565(1993)
- Sessa, D. J. and Anderson, R. L.: Soybean peroxidases: purification and some properties. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 960(1981)
- Kahn, V., Goldshmidt, S., Amir, J. and Granit, R.: Some biochemical properties of soluble and bound potato tuber peroxidase. *J. Food Sci.*, **46**, 756(1981)
- Wang, Z. and Luh, B.: Characterization of soluble and bound peroxidases in green asparagus. *J. Food Sci.*, **48**, 1412(1983)
- Pang, A., Catesson, A., Francesh, C., Rolando, C. and Goldberg, R.: On substrate specificity of peroxidases involved in the lignification process. *J. Plant Physiol.*, **135**, 325(1989)
- Hü, C. and van Huystee, R. B.: Immunological similarity of the cationic and the anionic peanut peroxidase isozymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 689(1989)
- Halliwell, B.: Generation of hydrogen peroxidase, superoxide and hydroxyl radicals during the oxidation of dihydroxyfumaric acid by peroxidase. *Biochem. J.*, **163**, 441(1977)
- Smith, A. M., Morrison, W. L. and Milham, P. J.: Oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase: Involvement of reduced peroxidase and compound III with superoxide as a product. *Biochemistry*, **21**, 4414(1982)
- Chibbar, R. N. and van Huystee, R. B.: Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiol.*, **75**, 956(1984)
- Halliwell, B. and Rycker, J. de: Superoxide and peroxidase-catalysed reactions. Oxidation of dihydroxyfuromate, NADH and dithiothreitol by horseradish peroxidase. *Photochem. Photobiol.*, **28**, 757(1978)
- Matile, P., Ginsburg, S., Schellenberg, M. and Thomas, H.: Catabolites of chlorophyll in senescent leaves. *J. Plant Physiol.*, **129**, 219(1987)
- Abeles, F. B., Dunn, L. J., Morgens, P., Callahan, A., Dinterman, R. E. and Schmidt, J.: Induction of 33-kD and 60-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant Physiol.*, **87**, 609(1988)
- Aibara, S., Yamashita, H., Mori, E., Kato, M. and Morita, Y.: Isolation and characterization of five neutral isoenzymes of horse-radish peroxidase. *J. Biochem.*, **92**, 531(1982)
- Khan, A. A. and Robinson, D. S.: Purification of an anionic peroxidase isoenzyme from mango. *Food Chem.*, **46**, 61(1993)
- Welinder, K. G.: Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase. *Eur. J. Biochem.*, **151**, 497(1985)
- Oh, S. H., Kim, Y. H. and Lee, S. N.: Purification and properties of the peroxidase in castanea semen. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **19**, 506(1987)
- Yang, H. C., Son, H. S., Shim, K. K., Oh, C. H. and Choi, D. S.: Purification and some properties of peroxidase from the fruit *Malus sieboldii* rehder. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 84(1992)
- Jee, W. J., Cho, N. S., Kim, I. C., Park, K. H. and Choi, E. H.: Isolation and characterization of fuji apple peroxidase. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 442(1991)
- Bruemmer, J. H., Roe, B. and Bowen, E. R.: Peroxidase reaction and orange juice quality. *J. Food Sci.*, **41**, 186(1976)
- Vamos-Vigyazo, L.: Polyphenol oxidase and peroxidase in fruit and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri. Sep.*, **15**, 49(1981)