

팽이 및 만가닥버섯에서 추출한 peroxidase의 열 불활성화 특성

이 균 · 김공환* · 김현구¹

아주대학교 화학 · 생물공학부, ¹한국식품개발연구원

Thermal Inactivation Parameters of Peroxidase in *Flammulina velutipes* and *Lyophyllum ulmarium*

Kyun Lee, Kong-Hwan Kim* and Hyun-Ku Kim¹

Division of Chemical Engineering & Biotechnology, Ajou University

¹Korea Food Research Institute

Peroxidase was used as a standard enzyme to determine optimum blanching conditions of *Flammulina velutipes* and *Lyophyllum ulmarium*. Crude peroxidase extracted from raw mushrooms had maximum activity at 10~15°C and pH 5.5 (50 mM, potassium phosphate buffer) using substrates of H₂O₂ and p-Phenyldiamine. Thermal inactivation of the crude peroxidase followed the first-order kinetics. The activation energy and z value of the crude peroxidase for *F. velutipes* were 59.58 kcal/mol and 9.0°C, whereas were 43.05 kcal/mol and 12.4°C for *L. ulmarium*, respectively. On the basis of thermal kinetics parameters obtained, the optimum blanching conditions for *F. velutipes* and *L. ulmarium* were 1 min at 70°C and 5 min at 80°C, respectively. Activation energies and z values of peroxidases extracted from heat-treated mushrooms were 7.97 and 6.55 kcal/mol, and 59.8°C and 74.1°C for *F. velutipes* and *L. ulmarium*, respectively.

Key words: blanching, peroxidase, *Flammulina velutipes*, *Lyophyllum ulmarium*

서 론

팽이버섯(*Flammulina velutipes*)은 전 세계의 온대 지방에 분포하며 재배종인 팽이버섯은 5종이 기록되어 있고, 만가닥버섯(*Lyophyllum ulmarium*)은 가을철에 다발로 발생하며, 조식이 연하고 사각사각한 맛이 있어 동양인의 기호에 알맞다. 이 버섯은 버섯 발생 온도가 느타리와 비슷하므로 팽이버섯을 재배하기 곤란한시기에 재배가 가능하며, 따라서 우리나라에서는 따뜻한 봄철과 가을철에 재배하기에 알맞다. 식용버섯인 이들 버섯은 현재 점차 생산과 소비가 확대되어 대중 소비 버섯으로 성장하였다. 이는 병 재배 기술의 발전에 기인한다⁽¹⁾. 따라서 과잉공급으로 인한 가격의 변동이 심해졌으며 농가 수입이 감소함에 따라 저장 및 제품개발을 위한 기술이 필요하게 되었다. 저장이 필요한 모든 종류의 야채, 과일, 버섯류등은 가공, 저장 중 갈변으로 인한 상품성의 손실되기 마련이다. 이는 peroxidase(donor: hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7)라는 생물계에 보편적으로 존재

하는 효소에 의해 야기되며 polyphenoloxidase와 함께 야채 및 과일의 산화환원 반응을 일으키는 갈변에 관련된 효소로써 과산화수소를 물로 환원시킴과 동시에 유기 화합물을 산화시키는 반응을 촉매하고, 불포화지방산에 작용하여 휘발성의 카르보닐화합물을 형성한다⁽²⁻³⁾. Peroxidase에 대한 연구는 바나나⁽⁴⁾, 사과⁽⁵⁾, 배추⁽⁶⁾, 콩나물⁽⁷⁾, 오이⁽⁸⁾ 등에서 수행되었고, 이들 식품에 있는 peroxidase의 특성은 식품의 종류 및 품종에 따라 차이가 있다고 보고되었다. 또한 peroxidase는 열 감수성 부분과 열 저항성 부분으로 구성된 isoenzyme으로 구성되어있으며 이는 열에 대한 다른 저항성을 나타낸다. 즉 열 저항성이 다른 isoenzyme으로 구성되어 있기 때문에 열처리 후반에는 열 저항성이 큰 isoenzyme이 남아 효소 불활성화의 변화 폭이 작게 나타난다. 이런 현상은 최 등⁽⁵⁾이 보고한 사과 peroxidase 활성화에 관한 연구에서도 나타났으며, 윤 등⁽⁹⁾과 Kahn 등⁽¹⁰⁾은 서양고추냉이 연구에서 네개의 isoenzyme으로 구성된 peroxidase 불활성화와 감자에서의 몇 개의 isoenzyme으로 구성된 peroxidase에 대해 연구에서도 같은 결과를 보고하였다. 따라서 저장이 필요한 야채, 과일, 버섯류는 갈변으로 인한 상품성의 손실을 막기 위해 열처리는 하는 것이 보통이며 이러한 열처리를 blanching이라 한다⁽¹¹⁾. 본 연구의 목적은 생 버섯에서 추출된 peroxidase의 열에 의한 불활성화와 생 버섯을 blanching한 후 버섯에 들어있는 peroxidase의 열 불활성화에 관련된 특성을 연구하는 데 있다.

*Corresponding author : Kong-Hwan Kim, Division of Chemical Engineering & Biotechnology, Ajou University, San 5, Wonchundong, Paldal-gu, Suwon 442-749, Korea
 Tel: 82-31-219-2450
 Fax: 82-31-214-8918
 E-mail: konghkim@ajou.ac.kr

재료 및 방법

재료

신선한 팽이 및 만가닥버섯을 산지(수향 농산, 충남 천안)에서 직접 구입하여 본 연구에 사용하였다. 팽이버섯은 뿌리를 제거한 식용 가능한 12 cm 이하인 것만을 골라 조효소액 추출에 사용하였고, 만가닥버섯은 4~9 cm 미만인 것으로 뿌리를 제거하고 식용 가능한 부분만을 사용하였다.

시료의 전처리

peroxidase의 활성 측정을 위한 시료의 전처리는 두 가지로 하였다. 첫째로, 팽이 및 만가닥버섯 peroxidase 자체의 열적 특성을 규명하기 위해 생 버섯으로부터 peroxidase를 추출한 후 열처리하였으며, 둘째로는 가열온도 및 시간의 변화에 따라 blanching한 후 peroxidase를 추출하여 thermal kinetics parameters 규명에 사용하였다.

Crude peroxidase의 제조

팽이 및 만가닥버섯의 조효소액 제조는 Flurkey와 Jen⁽¹²⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. Potassium phosphate buffer(50 mM, pH 5.5)에 파쇄된 버섯을 2:1(v/w)로 첨가하여 homogenizer(13,500 RPM, X 620 CAT, M. Zipper GmbH)로 20분간 균질화하였다. 4°C에서 원심분리(12000×g, 30 min, Sorvall RC-5B, Dupont Instruments)하여 상등액을 여과(Whatman paper No.1)한 후 -40°C에서 냉동 보관하였다.

Crude peroxidase 활성

Gorin과 Heidema⁽¹³⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 이 방법은 조효소액 0.2 mL, potassium phosphate buffer(50 mM, pH 5.5) 1.8 mL, 3 mM H₂O₂, 0.3 mL, 1% p-Phenylendiamine 0.1 mL를 혼합하여 U.V. spectrophotometer(Spectronic GENESYS 5, MILTON ROY)를 이용, 475 nm에서 흡광도를 측정하고 상대적인 활성을 구하였다.

온도 변화에 따른 효소의 활성 측정

생 버섯으로부터 추출된 peroxidase 0.2 mL에 potassium phosphate buffer(50 mM, pH 5.5) 1.8 mL를 넣고 4~95°C에서 20분간 열처리 후 36°C에서 항온 하여 효소활성을 측정, 효소 촉매반응의 속도가 직선적으로 나타나는 구간에서 기울기를 계산, 이를 이용하여 효소 활성을 상대적으로 나타내었다.

가열온도와 시간 변화에 따른 효소 활성 측정

온도 변화에 따른 효소의 활성 측정을 기초로 하여 생 버섯으로부터 추출된 peroxidase가 불활성에 가까이 이르게 되는 온도 및 시간을 정밀히 측정코자 다음과 같은 조건으로 실험을 하였다. 팽이버섯은 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85°C 영역에서 1~15분으로, 만가닥버섯은 60~90°C 영역에서 위와 같은 시간에서 가열, 냉각하여 온도 및 시간의 변화에 따른 효소의 활성을 측정하였다. 이때 효소 활성은 앞선 방법에서 측정된 효소 활성이 100%일때를 기준으로 상대적으로 나타내었다.

Blanching

생 버섯으로부터 추출된 peroxidase 활성을 기초로 하여 열수에 의한 blanching 조건을 선정하였다. 효소에 의한 재료의 변화를 최소화하기 위해 구입 즉시, 팽이버섯은 40, 50, 60, 70°C, 만가닥버섯은 50, 60, 70, 80°C로 1, 2, 3, 4, 5분 동안 열수에서 blanching하여 곧 바로 조효소액을 추출, 잔존 효소활성을 측정하였으며 시간 0일 때의 효소활성을 기준으로 삼아 상대적인 값으로 나타내었다.

Thermal kinetics parameters

생 버섯 peroxidase의 활성과 blanching에 의해 측정된 효소활성을 통해 decimal reduction time(D), thermal resistance constant(z), rate constant(k), activation energy(E_a) 등을 알아 보았다.

결과 및 고찰

생 버섯 peroxidase의 활성에 미치는 온도의 영향

H₂O₂와 p-Phenylendiamine을 기질로 사용하여 팽이 및 만가닥버섯에서 추출된 peroxidase를 열처리한 후 측정된 효소 활성은 10~15°C 내외에서 최대를 보였고 두 버섯의 경우 모두 4~30°C에서 75%이상의 높은 활성을 나타냈다(Fig. 1).

팽이버섯 peroxidase의 상대적 활성은 4°C에서도 88% 이상으로 나타났으며 15°C에서는 최대치 도달하였다. 30°C 이상에서의 효소활성은 온도가 증가함에 따라 급격히 감소함을 알 수 있으며 60°C 이상에서는 효소활성이 거의 나타나지 않음을 알 수 있었다.

만가닥버섯 peroxidase의 경우, 4°C에선 팽이버섯의 효소 활성보다 다소 높은 92%를 나타냈으나 최대 활성을 나타내는 온도는 10°C이며 70°C 이상에서는 무시할 정도로 낮은 효소활성을 나타내었다.

최⁽⁵⁾ 등이 보고한 후지 사과 peroxidase의 열적 안정성과 이⁽⁷⁾ 등 보고한 60°C까지 80% 이상의 높은 열적 안정성 나타내는 콩나물 peroxidase에 비해 팽이 및 만가닥버섯 perox-

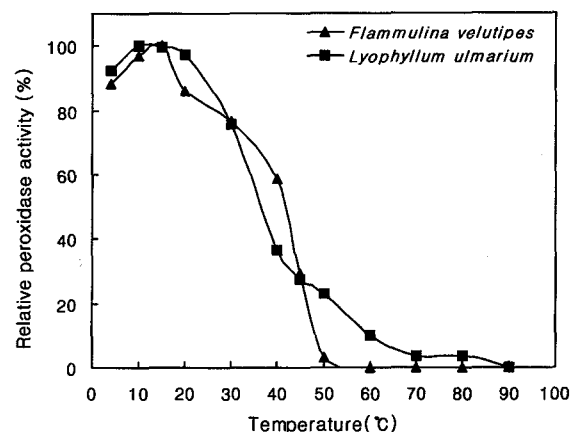


Fig. 1. Effect of temperature on the relative activity of crude peroxidase from raw *Flammulina velutipes* and *Lyophyllum ulmarium*.

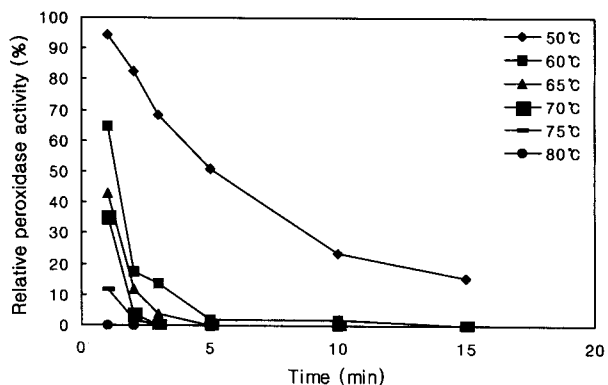


Fig. 2. Changes in relative activity of crude peroxidase from raw *Flammulina velutipes* at various temperatures.

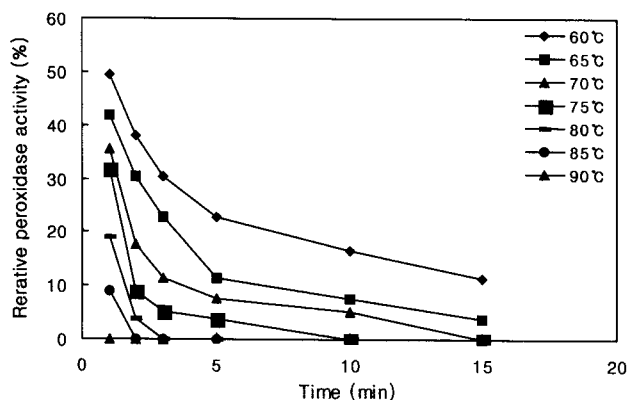


Fig. 3. Changes in relative activity of crude peroxidase from raw *Lyophyllum ulmarium* at various temperatures.

idase는 열에 민감하다는 것을 알 수 있었다. 또한 두 버섯 모두 30°C 내외에서는 80%에 가까운 활성을 나타내는데 이는 정제된 사과 peroxidase를 30°C에서 보관할 경우 원래 효소활성의 80%까지 나타낸다는 Moulding 등⁽¹⁴⁾의 연구에서와 일치한 결과를 보였다.

팽이버섯은 0.000~0.017의 범위에서, 만가닥버섯은 0.000~0.043의 O.D.(475 nm)값을 나타내었다. 이 두 버섯의 활성치로부터 만가닥버섯 peroxidase의 활성이 팽이버섯 peroxidase 활성보다 높다는 것을 알 수 있었다. 또한 팽이버섯의 경우 55°C 이후에는 활성이 거의 나타나지 않았으나 만가닥버섯의 경우 90°C 이상에서도 약간의 활성이 나타나는 것으로 보아 만가닥버섯 peroxidase의 열 저항성이 팽이버섯 peroxidase의 열 저항성보다 높다는 결론을 얻을 수 있었다.

효소의 열 불활성화

Fig. 2, 3은 peroxidase 불활성화 시점을 정확히 알아보고자 앞서 측정된 효소 활성 측정을 기초로 가열온도와 시간 변화에 따른 생 버섯으로부터 추출된 peroxidase의 열 저항성을 알아 본 것이다.

두 생 버섯 peroxidase의 활성 변화는 효소 활성이 급격히 감소한 이후에 활성 변화 폭이 작게 나타난다는 동일한 결과를 보였으며, 효소 활성 변화 경향은 다소 차이가 있으나 특정 시간 이후에 효소 활성이 급격히 감소하는 공통점을 보

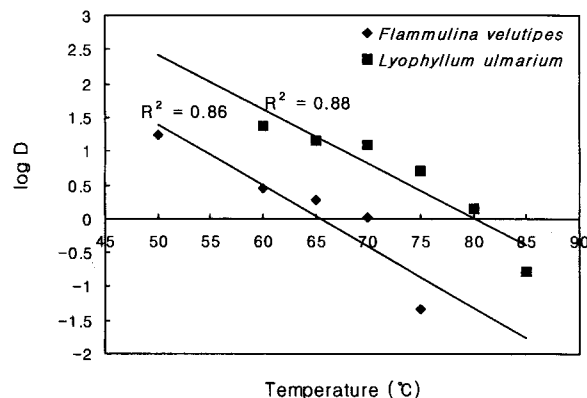


Fig. 4. Semilogarithmic plot of D value versus temperature for inactivation of peroxidase from raw *Flammulina velutipes* and *Lyophyllum ulmarium*.

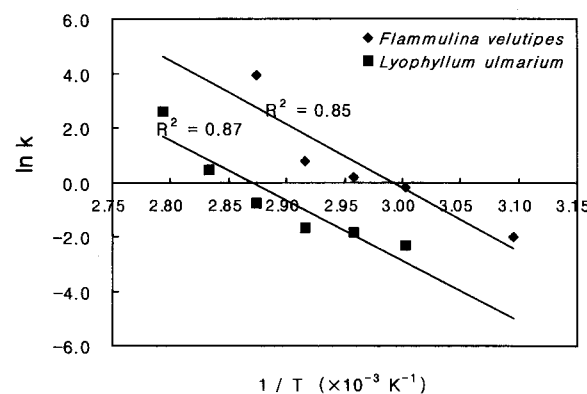


Fig. 5. Arrhenius plot of thermal inactivation of peroxidase from raw *Flammulina velutipes* and *Lyophyllum ulmarium*.

였다. 그러나 특정 온도를 기준으로 하면 두 버섯의 효소활성의 변화 특성은 다르다. 즉 peroxidase 활성의 감소를 온도 별로 보면, 팽이버섯은 60°C 이상에서 효소 활성이 급격히 감소하지만 만가닥버섯의 경우는 특정 온도에 의해 급격한 효소 활성의 감소는 찾기 힘들다.

팽이 및 만가닥버섯 peroxidase의 열 저항성 곡선(Fig. 2, 3)으로부터 얻는 값을 이용하여 D값과 온도에 대한 영향을 Fig. 4에 표시하여 이로부터 z값을 구하였다. 팽이버섯은 9.0°C, 만가닥버섯은 12.4°C로 나타났다. 여기서 D값은 각 온도별 효소의 활성을 90% 감소시키는데 필요한 가열시간이며 z값은 D값을 90% 감소시키는데 필요한 온도이다. 가열에 대한 속도상수를 Arrhenius plot으로 나타내어(Fig. 5) 이로부터 구한 팽이 및 만가닥버섯의 활성화에너지(E_a)는 각각 59.58 kcal/mol, 43.05 kcal/mol이 었다(Table 1). z값이 클수록 열에 대한 저항성은 크며 활성화에너지(E_a)는 작아진다. 따라서 측정된 z값과 활성화에너지에 의해 팽이버섯의 peroxidase는 만가닥버섯 peroxidase보다 온도 변화에 따른 열 저항성이 낮음을 알 수 있다.

Blanching 최적 조건의 확립

위 결과를 바탕으로 팽이 및 만가닥버섯의 blanching 조건을 확립하였다. 이때 blanching에 의해 육안으로 판단되지

Table 1. Thermal inactivation parameters of crude peroxidase from raw *Flammulina velutipes* and *Lyophyllum ulmarium*

Mushrooms	Inactivation temp (°C)	D (min) ¹⁾	z (°C) ²⁾	k (min ⁻¹) ³⁾	E _a (kcal/mol) ⁴⁾
<i>Flammulina velutipes</i>	50	17.41	9.0	0.13	59.58
	60	2.77		0.83	
	65	1.92		1.20	
	70	1.05		2.19	
	75	0.046		50.1	
<i>Lyophyllum ulmarium</i>	60	23.81	12.4	0.01	43.05
	65	14.19		0.16	
	70	12.14		0.19	
	75	4.96		0.46	
	80	1.43		1.61	
	85	0.17	13.55		

¹⁾Decimal reduction time.

²⁾Thermal resistance constant.

³⁾Rate constant.

⁴⁾Activation energy.

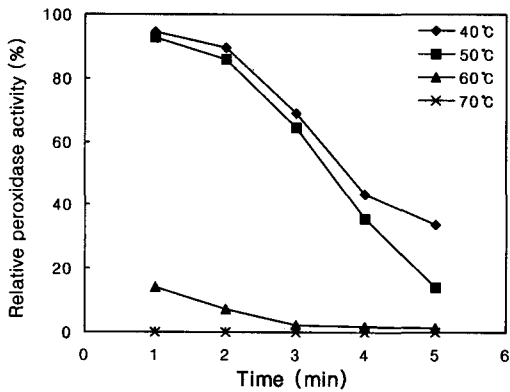


Fig. 6. Changes in relative activity of peroxidase from heat-treated *Flammulina velutipes* at various temperatures.

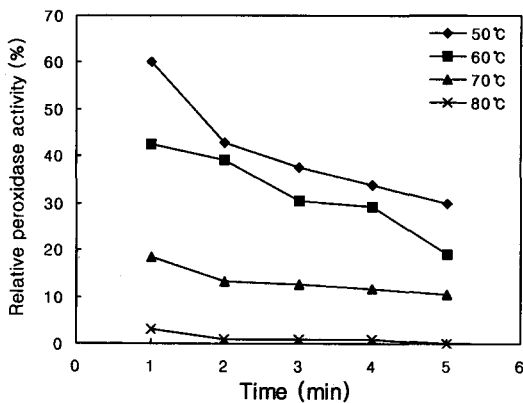


Fig. 7. Changes in relative activity of peroxidase from heat-treated *Lyophyllum ulmarium* at various temperatures.

는 버섯의 조직적 변화는 없었으며 약간의 갈변만이 진행되었다.

Fig. 6, 7은 blanching한 후 두 버섯에서 추출된 peroxidase의 효소 활성을 나타낸다.

40, 50°C에서의 팽이버섯 peroxidase 활성(Fig. 6)은 blanch-

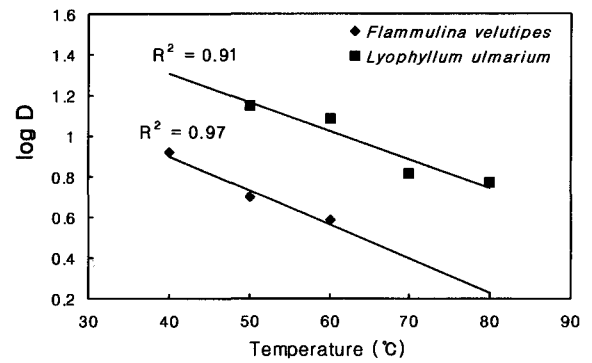


Fig. 8. Semilogarithmic plot of D value versus temperature for inactivation of peroxidase from heat-treated *Flammulina velutipes* and *Lyophyllum ulmarium*.

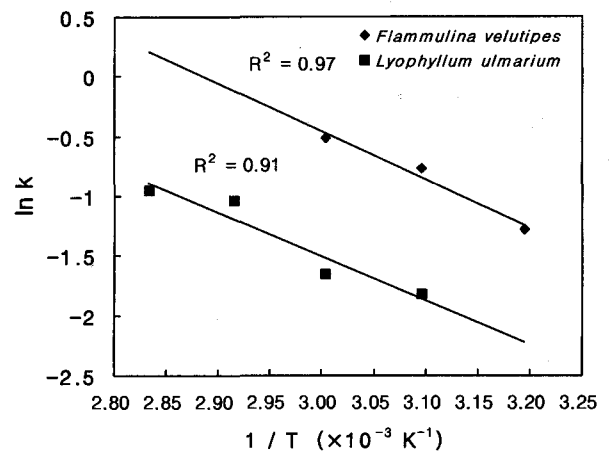


Fig. 9. Arrhenius plot of thermal inactivation of peroxidase from heat-treated *Flammulina velutipes* and *Lyophyllum ulmarium*.

ing 시간의 증가에 따라 감소하였다. 특히 2분 이상 경과 시부터 더 큰 폭으로 불활성화가 진행됨을 알 수 있었고 60, 70°C에서 blanching 시간의 증가에 따른 활성의 감소폭은 40, 50°C에서보다 적었다. 그러나 온도 증가에 따른 peroxidase

Table 2. Thermal inactivation parameters of peroxidase from heat-treated *Flammulina velutipes* and *Lyophyllum ulmarium*

Mushrooms	Inactivation temp (°C)	D (min)	z (°C)	k (min-1)	E _a (kcal/mol)
<i>Flammulina velutipes</i>	40	8.30	59.8	0.28	7.97
	50	4.98		0.46	
	60	3.84		0.60	
<i>Lyophyllum ulmarium</i>	50	14.21	74.1	0.16	6.55
	60	12.10		0.19	
	70	6.50		0.35	
	80	5.94		0.38	

활성감소는 40°C, 50°C에 비해 60°C 이상에서는 약 75%이상의 큰 감소를 보였다. 이런 결과로 60°C 이하에서의 blanching에 의한 팽이버섯 peroxidase의 불활성화는 시간증가에 의해 좌우되나, 60°C 이상에서는 온도증가에 의해 크게 좌우된다는 결과를 얻었다.

그러나 만가닥버섯(Fig. 7)은 팽이버섯 peroxidase 불활성화와는 다르다. 즉, 모든 온도 범위에서 시간의 증가에 따라 효소활성은 감소되었지만 팽이버섯의 경우에서처럼 효소활성을 급격히 감소시키는 특정 온도는 나타나지 않았다. 다만 가열온도 10°C 증가에 따라 만가닥버섯 peroxidase 활성은 대략 30%내외로 감소는 경향을 보였다.

생 버섯으로부터 추출된 peroxidase를 열처리하여 얻는 불활성화 조건과는 다르게 두 버섯의 blanching 조건은 팽이버섯의 경우 70°C, 1분, 만가닥버섯은 80°C, 5분으로 나타났다.

Blanching후 추출한 peroxidase의 thermal kinetics parameters

Blanching에 의한 팽이 및 만가닥버섯 peroxidase의 열 저항성 곡선으로부터 D값과 반응속도상수 k값(Table 2)을 구하고 이들 D값의 온도에 대한 영향을 Fig. 8에 표시하였으며 두 버섯 모두 90% 이상의 신뢰도를 나타내었다. 이로부터 구한 z 값은 팽이버섯 59.8°C, 만가닥버섯은 74.1°C로 나타났다. 또한 가열에 대한 반응속도상수를 Arrhenious plot으로 나타내어(Fig. 9) 이로부터 얻은 팽이 및 만가닥버섯의 활성화에너지(E_a)는 각각 7.97 kcal/mol, 6.55 kcal/mol이었다(Table 2). Blanching후 팽이 및 만가닥버섯 peroxidase의 열 저항성은 이 두 가지 버섯으로부터 추출된 peroxidase를 열처리한 경우의 열 저항성보다 높게 나타났다. 이는 blanching시 버섯 자체의 조직적 특성과 여기에 함유된 여러 가지 성분들로 인해 열 처리시 열 전달을 방해, peroxidase 자체의 열 저항성이 증대되는 결과로 나타났다고 판단된다.

요 약

팽이 및 만가닥버섯의 가공 기술 개발의 일환으로 수행된 본 연구는 가공 전 처리 공정으로서의 blanching 조건을 확립하기 위해 두 버섯 peroxidase의 열적 특성 결과를 기초 자료로 삼았다. 효소 활성 측정은 Gorin과 Heidema의 방법을 변형하여 사용하였고, 생 버섯으로부터 추출한 조효소액을 열처리했을 경우 팽이버섯은 75°C, 3분, 만가닥버섯의 경우 80°C, 1분 이상의 온도, 시간 조건에서 peroxidase의 불활

성이 유발됨을 알았다. 이때 팽이 및 만가닥버섯 peroxidase의 활성화에너지(E_a)는 59.58 kcal/mol, 43.05 kcal/mol이며 z값은 9.0°C, 12.4°C였다.

반면 Blanching에 의한 두 버섯 peroxidase의 활성화에너지(E_a)와 z값은 각각 7.97 kcal/mol, 6.55 kcal/mol와 59.8°C, 74.1°C로 나타났다. 이는 peroxidase 자체의 열적 특성과 blanching에 의해 유발된 peroxidase의 열적 특성이 다르다는 것을 보여주는 것으로 blanching시에는 버섯자체와 버섯내의 성분들에 의해 열에 대한 저항성이 증대되어 z 값이 높아지는 결과를 유발, 활성화에너지(E_a)가 감소하는 결과로 나타났다.

문 헌

- Sung, J.M., Yoo, Y.B. and Cha, D.Y. Mushroom Science. pp. 435-456, Kyohaksa, Seoul (2000)
- Kim, H.J., Lee, J.J., Cheigh, M.J. and Choi, S.Y. Amylase, protease, peroxidase and ascorbic acid oxidase activity of *Kimchi* ingredient. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 1333-1338 (1998)
- Baek, H.H., Lee, C.H., Woo, D.H., Park, K.H., Pek, U.H., Lee, K.S and Nam, S.B. Prevention of pectinolytic softening of *Kimchi* tissue. Korean J. Food Sci. Technol. 21: 149-153 (1989)
- Cano, M.P., Begona, de A., Lobo, M.G. and Mariana, S. Improvement of frozen banana colour by blanching: relationship between browning, phenols and polyphenol oxidase and peroxidase activities. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 204: 60-65 (1997)
- Choi, E.H. and Jung, D.S. Inactivation of peroxidase from Fuji apples by heat and chemical treatments. J. Korean Agric. Chem. Soc. 30: 285-290 (1987)
- Rhee, H.I., Park, K.S., Choi, Y.S. and Lee, S.Y. Purification and characterization of peroxidase from Chinese cabbage. Korean J. Appl. Microbiol Biotechnol. 19: 470-476 (1991)
- Lee, M.K., Kil, J.O. and Park, I.S. Thermostability and reactivation of peroxidase from soybean sprouts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 81-86 (1999)
- Jang, M.J., Cho, I.Y. and Lee, S.K. Effects of dill pickling process, H₂O₂ and storage duration on lipoxygenase, peroxidase, catalase activity in cucumber and brine. Agri. Chem. Biotechnol. 39: 222-226 (1996)
- Yoon, Y.R. and Park, K.H. Isolation and thermal inactivation of horseradish peroxidase isozymes. Korean J. Food Sci. Technol. 14: 125-129 (1982)
- Varda, K., Sarah, G., Jacob, A. and Rina, G. Some biochemical properties of soluble and bound potato tuber peroxidase. J. Food Sci. 46: 756-764 (1981)
- Kwon, Y.J., Kwon, J.H., Park, G.H., Park, Y.K. and Yang, H.C. Food Chemistry. pp. 255-257, Youngchi, Seoul (2000)
- William, H., Flurkey and Joseph, J.J. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. J. Food Sci. 43: 1826-1828 (1978)
- Gorin, N. and Heidema, F.T. Peroxidase activity in golden deli-

- cious apple as a possible parameter of ripening and senescence. J. Agric. Food Chem. 24: 200-201 (1976)
14. Moulins, P.H., Sinleton, D.E., McLellan, K.M. and Robinson, D.S. Purification and heat stability of Cox's apple pulp peroxidase

isoenzymes. Int. J. Food Sci. Technol. 23: 343-348 (1988)

(2002년 10월 15일 접수; 2002년 10월 23일 채택)