

## 무우 Myrosinase의 정제 및 특성

김미리·이혜수\*

충남대학교 식품영양학과, \*서울대학교 식품영양학과

### Purification and Characterization of Radish Myrosinase

Mee-Ree Kim and Hei-Soo Rhee

Department of Food & Nutrition, Chungnam National University, Daejeon

\*Department of Food & Nutrition, Seoul National University, Seoul

#### Abstract

The purification of myrosinase from radish roots was performed using Concannavalin A-Sepharose affinity chromatography and gel permeation HPLC, which gave a 22-fold-purification(S.P.A.=39,000 units/mg) with 50% recovery, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed a single major band, suggestive of a relatively pure myrosinase, and the M.W. of the enzyme determined on gel permeation HPLC was ca. 124K. The enzyme showed on optimum pH of 6.5 and was stable at pH 6 to 7 at room temperature, but unstable below pH 4. The enzyme possessed an optimum temperature of 37°C, and gave a Vmax value of 40  $\mu$ moles/mg·min and a Km value of 0.12mM for sinigrin. The purified myrosinase was activated maximally by 0.6mM of ascorbic acid, but somewhat inhibited by more than 2 mM ascorbic acid. The activities of myrosinase present in the peelings and the peeled radish amounted to approximately 1,333 units/g and 140 units/g weight, respectively and the peelings contained much more myrosinase activity than the peeled radish.

Key words: Radish myrosinase, purification, characterization.

#### 서 론

Myrosinase(E.C. 3.2.3.1.)는 천연에 존재하는 thio-glucosides(glucosinolates)를 가수분해시켜 isothiocyanates를 생성하는데 관여하는 효소이다<sup>(1,2)</sup>. 특히 무우의 매운맛은 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate에 기인된 것으로, 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate에 myrosinase가 작용하여 생성된다<sup>(2,3)</sup>.

Myrosinase는 십자화과 식물(*Cruciferae*)에 존재하며<sup>(1)</sup>, 그의 몇가지 고등식물<sup>(4,5)</sup>, 곰팡이류<sup>(6,7)</sup>, 세균류<sup>(8)</sup> 등에도 존재한다. Myrosinase에 관한 연구는 십자화과 식물을 중심으로 특히, 겨자종의 myrosinase에 관하여 많은 연구가 진행되어 왔다<sup>(9-18)</sup>.

그러나 무우종의 myrosinase에 관하여는 Wilkinson 등<sup>(19)</sup>이 효소를 부분 정제하여 비활성도(specific activity), ascorbic acid에 의한 활성화 정도를 보고한

Corresponding author: Mee-Ree Kim, Department of Food & Nutrition Chungnam National University, Kung-Dong, Yuseong-Gu, Daejeon 302-764

외에는 거의 찾아볼 수 없다.

따라서, 무우로부터 이 효소를 분리, 정제하여 특성 규명 및 ascorbic acid에 의한 활성화 정도를 밝히는 것이 필요하다고 사료되어 실험을 수행하였으며, 이에 그 결과를 보고하는 바이다.

#### 실험 방법

##### Myrosinase의 분리 및 정제

###### 1. 무우종 myrosinase의 분리

실험에 사용된 무우는 태백무우로 대전시내 공판장에 서 구입하였다. 무우의 껍질부위 50g에 찬 증류수(4°C) 100ml를 넣고 와림 블랜더로 곱게 마쇄한 후, 가아제 2 겹을 사용하여 여과시켰다. 여액을 냉동시킨 후에 녹인 액을 반투막에 넣고 증류수를 사용하여 4°C에서 하루동안 투석시킨 후 10,000 x g에서 20분간 원침시켜 고형물을 제거한 상정액에 NaCl을 첨가하여 0.5M이 되도록 하였다.

나. 친화성 크로마토그래피법에 의한 효소의 정제

Palmieri 등<sup>(41)</sup>의 방법에 따라 행하였다. 20mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.4)으로 포화, 평형시켜 만든 Con-cannavalin A(Con A)-Sephacrose 컬럼(1×5cm)에 투석 원침시켜 얻은 조효소액 130ml를 0.6ml/min의 유속으로 투입한 후 20mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.4, 0.5M NaCl 함유)을 통과시켜 280nm에서의 흡광도가 0이 될 때까지 충분히 세척하였다. 다음 단계로 0.25M  $\alpha$ -methyl-D-mannoside 30ml를 컬럼에 통과시켜 2.2ml씩 분획 용출시키고, 효소 분획군을 증류수에서 하루동안(4°C) 투석시켜 냉동건조시켰다.

다. Gel Permeation HPLC에 의한 효소의 정제

Myrosinase 정제를 위해 사용된 gel permeation HPLC 조건은 표 1과 같다. 0.02M 인산 완충액 (pH 6.8)과 0.05M 황산나트륨-혼합 용액으로 포화 평형시켜 만든 Bio-Sil TSK 250 컬럼(300×7.5mm)에 친화성 크로마토그래피법에 의해 정제한 효소용액 100 $\mu$ l를 가하여 1ml/min의 속도로 분획 용출시키고, myrosinase 활성도를 나타내는 분획을 정제된 효소로 사용하였다.

라. 전기 영동

Laemmli<sup>(22)</sup>의 방법에 따라, 7% polyacrylamide gel에 정제된 효소 25 $\mu$ g protein/lane을 점적한 후, LKB(스웨덴사) system을 사용하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 수행하였다<sup>(23)</sup>.

표준 단백질은 phosphorylase b(94 K), 소 혈청 albumin(67 K), ovalbumin(43 K)을 사용하였고 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 단백질을 염색하였다.

효소 활성도의 측정 및 단백질 정량

Myrosinase의 활성도는 Palmieri 등<sup>(41)</sup>의 방법에 의해 측정하였으며, 효소 반응계의 조건은 60mM 인산 완충액 (pH 6.5) 3ml에 sinigrin, 아스코르브산의 농도가 각각 0.34mM, 0.6mM이 되도록 한 후, 최종적으로 효소액 30 $\mu$ l를 주입하였고, 파장 227nm( $\epsilon_{max}$ =6,950 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)에서 시간 경과에 따른 흡광도 감소를 연속 기록 방법으로 측정하여 감소되는 기질의 양을 정량하였다.

효소 활성도 1 unit은 반응시간 1분당 1 nmole의 기질을 가수분해 시키는 효소의 활성화 정도로 표시하였다.

단백질의 정량은 소 혈청 albumin을 표준 단백질로 사용하여 Bradford 측정법<sup>(20)</sup>에 기초를 둔 Bio-Rad 단백질 정량법<sup>(21)</sup>에 의한 흡광도 측정치와 280nm에서의

흡광도 비교치를 사용하여 나타내었다.

정제된 myrosinase의 특성

가. 분자량

상기에 언급된 gel permeation HPLC법에 의해 정제된 myrosinase의 분자량을 측정하였다. 표 1에 명시된 8개의 표준 단백질을 컬럼에 주입하여 각각의 용출 시간을 측정하여 분자량에 따른 상관관계 곡선을 얻은 후, 정제된 myrosinase를 주입하여 상기의 상관관계 곡선에 의거하여 분자량을 측정하였다.

Table 1. Gel permeation HPLC condition

Column : Bio-Sil TSK 250 column, 300mm×7.5mm
Injection : 20 $\mu$ l of Bio-Rad Gel filtration standard
Eluant : 0.05M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +0.02M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6.8
Standard Proteins : (1) Thyroglobulin (2) Catalase
(3) Immunoglobulin G (4) LDH <sup>a)</sup>
(5) Ovalbumin (6) Myoglobin
(7) Cyanocobalamin (8) Tryptophan
Flow rate : 1.0ml/min
Back pressure : 400 psi
Temperature : Room temperature
Detector : UV absorbance at 280nm, 1.0 AUFS
Chart speed : 1cm/min

al LDH; Lactic acid dehydrogenase

나. Michaelis 상수

효소 반응계의 조건은 기질의 농도만 제외하고 나머지는 전기와 동일한 0.6mM 아스코르브산이 함유된 30mM 인산 완충액의 효소 반응액이었다. 기질인 sinigrin의 농도는 0.01-0.1mM까지 달리하여 상온에서 초기반응 속도를 측정하고 이것과 기질 농도와의 관계를 Lineweaver-Burk plot에 의하여 Km, Vmax 값을 각각 구하였다.

다. pH의 영향

0.34mM sinigrin, 0.6mM 아스코르브산이 함유된 효소 반응액에 초산, 인산 및 붕산 완충액으로 pH를 5.0에서 9.0까지의 범위에서 pH를 0.5 간격으로 맞춘 후 각 pH에서 정제된 효소의 활성도를 측정하고 반응 최적 pH를 결정하였다.

라. 아스코르브산의 영향

30mM 인산 완충액 (pH 6.5)에 기질인 sinigrin을 0.34mM 넣고 아스코르브산의 농도를 0에서 3mM까지의 범위에 첨가한 후 효소 활성도를 측정하였다.

마. 온도의 영향

Thermostat가 부착된 수조(Harke)를 이용하여

7-63°C의 범위에서 온도를 조절하여 각각의 온도에서 효소 활성도를 전기와 동일한 효소 반응액에서 측정하여 반응 최적 온도를 검토하였다. 또 Arrhenius plot<sup>(24)</sup>에 의해 효소의 활성화 에너지를 결정하였다.

바. pH 안정성

정제한 myrosinase를 50mM 초산 및 30mM 인산 완충액(pH 3, 7 및 5, 0, 6, 5)에 넣고 20°C에서 6일간 저장하면서 시간별로 효소 활성도를 측정하였다.

결 과

Myrosinase의 분리 및 정제

무우의 부위별 효소 활성도는 껍질 부위가 1333±425 units/g로, 속 부위의 효소 활성도인 140±17 units/g에 비해 약 10배 높았다. 따라서 무우의 껍질 부분을 사용하여 효소를 분리 정제하였으며, 그 결과를 표 2에 나타내었다. 마쇄한 무우 껍질의 여과액을 증류수로 투석하고 원침시켜 얻은 효소액의 정제도는 1.1 이었다.

가. 친화성 크로마토그래피에 의한 효소의 정제

투석, 원침시켜 얻은 조효소액을 Con A-Sepharose로 충전되어 있는 컬럼에 투입시킨 후 Tris 완충액으로 세척하여 280nm에서 흡광도를 거의 나타내지 않는 분획번호 71까지 용출시켰을 때, 그림 1에서와 같이 Con A-Sepharose와 결합하지 않은 불순 단백질은 효소로부터 용이하게 분리시킬 수가 있었다<sup>(25)</sup>.

Con A-Sepharose에 흡착되어 있는 myrosinase를 용출하기 위하여 사용한 ligand는 0.25M α-methyl-D-mannoside 이었는데, 분획번호 72에서 84까지 myrosinase가 용출된 것을 알 수 있었다. 이때의 비활성도(specific activity)는 27,900 units/mg으로 약 16배의 정제도를 나타내었고 회수율은 약 53% 이었다.

나. Gel permeation HPLC에 의한 효소의 정제

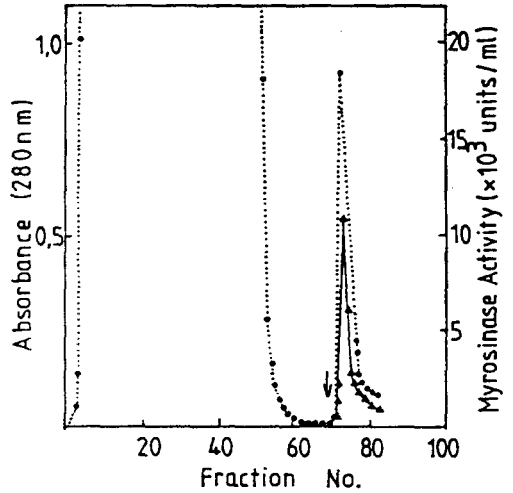


Fig. 1 Affinity chromatography of enzyme extract on concanavalin A-sepharose column: ●·····●; protein, ▲—▲; myrosinase activity, ↓; elution with α-methyl-D-mannoside.

친화성 수지를 통해 정제된 효소액을 사용하여 gel permeation HPLC를 수행한 결과는 그림 2에서와 같다. 단일 peak가 아닌 몇개의 peak가 존재하였는데, 그중 myrosinase에 해당하는 분획만을 재 크로마토그래피한 결과는 그림 2(Inset)에서와 같이 단일 peak로 나타났다.

이와 같이 최종적으로 정제하여 얻은 myrosinase의 비활성도는 표 2에서와 같이 39,000 units/mg protein 이었고 정제도는 약 22배 이었다.

다. 정제된 myrosinase의 순도

Gel permeation HPLC에 의해서 정제된 myrosinase를 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 수행하여 순도를 검토한 결과, 그림 3에서와 같이 단일 밴드로 나타났다.

Table 2. Purification of myrosinase

Step	Vol. (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	95	56.1	96,900	1,730	1.0	100
Dialyzed-centrifuged extract	100	38.0	72,000	1,895	1.1	74
Con A-Sepharose (α-methyl-D-mannoside)	10	1.83	51,120	27,900	16.2	53
Gel permeation HPLC	6.2	1.24	48,730	39,000	22.5	49

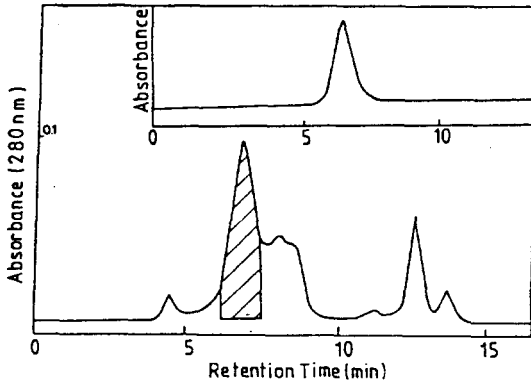


Fig. 2. Gel permeation HPLC chromatogram of affinity column-purified myrosinase; (shaded area: myrosinase fraction). Inset; Rechromatogram of HPLC-purified myrosinase on gel permeation HPLC column.

43K

67K

94K

1 2

Fig. 3. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of purified myrosinase from radish. Molecular weight standards(lane 1; 94k: phosphorylase b, 67k: bovine serum albumin, 43k: ovalbumin); purified myrosinase(lane 2).

정제된 myrosinase의 특성

가. 분자량

상기의 gel permeation HPLC 조건하에서 표준 단백질 8가지와 정제된 myrosinase를 컬럼에 주입하여 그림 4와 같은 chromatogram을 얻었다. 이를 토대로 표준 단백질의 분자량과 plot하여 얻은 상관관계 직선(그림 5)에 의거하여, 계산된 myrosinase의 분자량은 124,000으로 추정되었다.

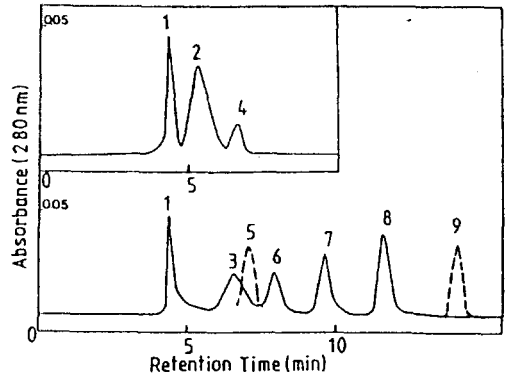


Fig. 4. Gel permeation HPLC chromatogram of standard protein; 1. Thyroglobulin, 2. Catalase, 3. Immunoglobulin G, 4. Lactic acid dehydrogenase, 5. Myrosinase, 6. Ovalbumin, 7. Myoglobin, 8. Cyanocobalamin, 9. Tryptophan.

나. Michaelis 상수

Sinigrin을 기질 물질로 사용하여 myrosinase에 이한 기질의 분해 정도를 측정하여 그림 6(Inset)에 나타내었다. 기질 농도가 증가함에 따라 myrosinase 활성도는 상승하였고 과잉의 기질 농도 0.4mM에서는 유사 zero order의 반응 kinetics를 나타내 주고 있다. 이때 1/S vs. 1/V를 표현한 Lineweaver-Burk plot(그림 6)에 의하여 구한 Km, Vmax 값은 각각 0.12mM, 40 μmole/mg · min 이었다.

다. pH의 영향

pH를 5.0에서 9.0까지 변화시키면서 정제된 myrosinase의 활성도를 측정한 결과는 그림 7에서와 같다. pH 6.5에서 최대이었고, pH가 낮아짐에 따라 효소 활성도 감소하여 pH 5.0이하에서는 거의 나타내지 않았으며, pH 8.5에서는 활성도의 약 50% 이상 감소되었다.

라. 아스코르브산의 영향

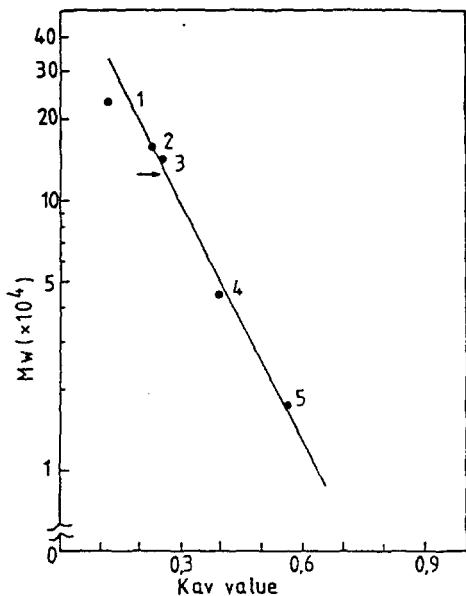


Fig. 5. Calibration curve for molecular weight determination by gel permeation HPLC:  $K_{av}$ (partition coefficient) =  $V_e - V_0 / V_i - V_0$  ( $V_e$ ; elution volume,  $V_0$ ; void volume,  $V_i$ ; internal volume); 1, Catalase(2,302,000), 2. Gammaglobulin(158,000), 3. Lactic acid dehydrogenase(140,000), 4. Ovalbumin(44,000), 5. Myoglobin(17,000).

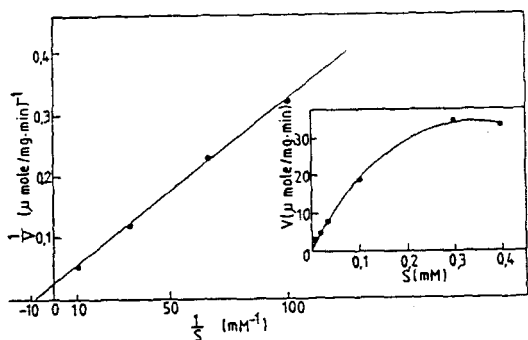


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot for the purified myrosinase. Inset; plot of myrosinase activity against sinigrin concentration.

아스코르브산의 농도가 0에서 점차 증가됨에 따라 myrosinase 활성도는 급격히 상승하여 그림 8에서와 같이 0.6mM에서 최대 활성도를 나타내었으며 이 농도에서의 상대 활성도는 아스코르브산의 농도가 0인 경우에 비해 약 100배 정도 증가되었다. 그러나 아스코르브산의 농도를 0.6mM 이상으로 증가시켰을 때는 효소 활성도

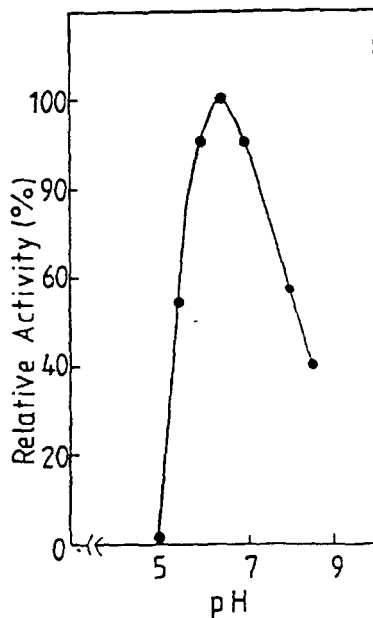


Fig. 7. Effect of pH on the activity of purified myrosinase.

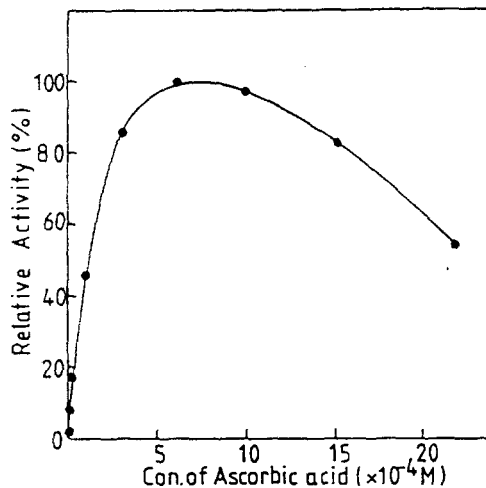


Fig. 8. Effect of ascorbic acid concentration on the activity of purified myrosinase.

가 오히려 감소하여 1mM 이상에서는 약간의 저해 작용을 나타내었다.

마. 온도의 영향

정제된 myrosinase의 활성도를 7°C에서 60°C까지의 범위에서 측정된 결과를 그림 9에 나타내었으며 이를 다

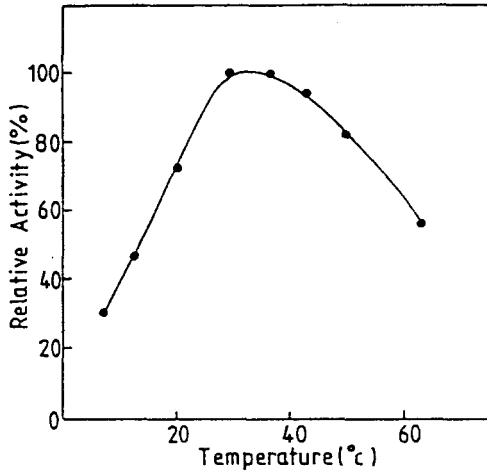


Fig. 9. Effect of temperature on the activity of purified myrosinase.

시 Arrhenius plot(그림 10)하고 효소의 활성화 에너지를 구하였다. 그림 9에서와 같이 myrosinase의 활성도는 온도가 상승함에 따라 37°C까지는 계속적으로 증가되는 것을 볼 수 있었고, log Vm vs. 1/T에 의한 plot(그림 10)에서 구한 활성화 에너지(E\*)값은 8.44kcal/mole로 나타났다.

바. pH 안정성

정제된 myrosinase의 pH 안정성은 그림 11에서와 같이 인산 완충액, pH 6.5에 2일간 실온에 저장 하였을 때 활성도가 감소되지 않았으며 잔존 활성도는 4일에

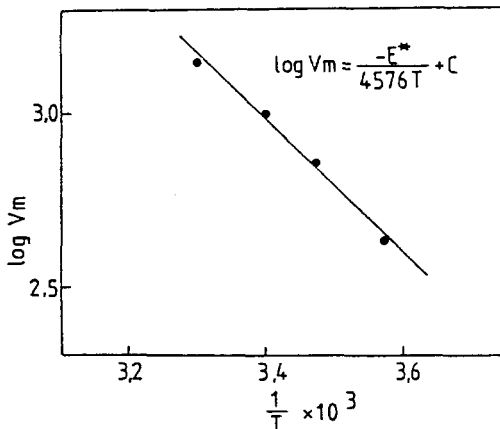


Fig. 10. The rate of hydrolysis of sinigrin by myrosinase as a function of temperature in 30mM phosphate buffer(pH 6.5).

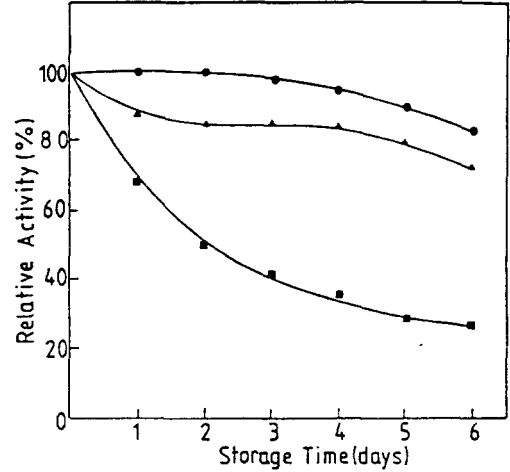


Fig. 11. Relative stability of purified myrosinase in several buffers at 20°C.

- : 30mM phosphate buffer, pH 6.5
- ▲—▲: 50mM acetate buffer, pH 5.0
- : 50mM acetate buffer, pH 3.7

95%, 6일에 83%로 매우 안정하였다. 초산 완충액, pH 3.7에서는 활성도가 급격히 감소하여 1일에 68%, 2일에 50%, 5일에 28%로 감소하여, 낮은 pH에서는 불안정하였다.

고 찰

Myrosinase의 분리 및 정제

Myrosinase의 분리 정제에 관하여는 겨자씨 myrosinase에 대한 연구가 대부분이며(10-12,14), 무우중의 myrosinase의 분리 정제에 대한 연구는 되어 있지 않으며, 효소의 정제 방법도 대부분 재래의 방법을 사용하였다. 그러나 최근 Palmieri 등(14)이 겨자씨 myrosinase 정제를 위해 사용한 친화성 컬럼을 본 실험에서도 도입하여 무우 myrosinase를 정제하였다.

무우의 부위별 myrosinase의 활성도는 껍질 부위가 속 부위에 비해 약 10배 높았으며, 이러한 결과는 껍질 부위가 속 부위에 비해 훨씬 더 매운 맛을 나타내는데 대한 부준적 설명 자료로 생각된다. 따라서 효소 정제시 껍질 부위를 사용하는 것이 더 유리하였다.

표 2에서와 같이 무우즙의 여액을 투석 후 원침시켰을 때의 비활성도(specific activity)는 크게 증가되지 않았으나 친화성 크로마토그래피에서 방해가 되는 불용성 고형물질을 사전에 침전 제거시키는 장점이 있다. 친화성

컬럼 통과 후의 회수율은 53%로 비교적 용이하게 고도(16배)의 정제된 myrosinase를 얻을 수 있었다.

한편 무우 myrosinase는 본 실험에 사용된 Con A-Sephrose에 대해 친화성을 나타내어 일종의 glycoprotein임을 확인시켜 주었다<sup>(26,27)</sup>.

Palmieri 등<sup>(14)</sup>은 이 친화성 크로마토그래피를 통해 얻은 겨자씨 myrosinase는 homogeneous하다고 하였으나, Ohtsuru 등<sup>(15)</sup>의 myrosinase isoenzymes에 대한 보고와는 일치하지 않았다.

따라서 친화성 크로마토그래피 다음 단계의 정제가 필요하게 되어 gel permeation HPLC를 수행하였다. 그림 2에서와 같이 myrosinase의 HPLC profile은 myrosinase의 주 peak 외에 다른 불순 단백질이 30% 이상 존재함을 나타내 주었는데, 이중 일부는 분자량이 ovalbumin과 유사한 hemoprotein으로 생각된다.

따라서 myrosinase의 주 peak를 재 크로마토그래피 하였을 때, 단일의 피크로 나타났으며 molecular mobility를 고려하였을 때, 비교적 순수한 것으로 생각되었고, 90% 이상의 회수율과 1.5배의 정제도를 보인 좋은 최종 정제 단계임을 알 수 있었다.

또, 전기영동시 그림 3에서와 같이 단일 밴드로 나타나 전기영동상의 순도가 입증되었다.

#### 정제된 myrosinase의 특성

정제된 myrosinase의 분자량은 gel permeation HPLC 결과 124,000으로, 겨자씨 myrosinase의 분자량(151,000 혹은 152,000)<sup>(12,28)</sup>이나 유채씨 myrosinase 분자량(135,000)<sup>(13)</sup>에 비해 약간 작았다.

효소의 기질 특이성에 대한 결과에 있어서 겨자씨와 유채씨 myrosinase의 경우, 기질인 sinigrin에 대한 Km 값이 0.2-0.4mM로 보고 되었는데, 무우 myrosinase의 Km 값은 0.12mM로 비교적 작아 기질 친화성이 더 큰 것으로 생각된다. 또 0.25mM에서는 이미 saturation kinetics의 양상을 보였으므로 본 분석에서 사용된 기질 농도(0.3mM)가 zero order kinetics를 나타내기에 충분함을 확인할 수 있었다.

무우 myrosinase의 작용 최적 pH는 pH 6.5에서 최대 활성을 나타내어 다른 십자화과 채소류 중의 myrosinase와 유사하였으며<sup>(9-11,13,19)</sup>, 또, 생 무우중의 pH가 약 6.5임을 고려할 때 의미있는 결과라고 생각된다.

한편 myrosinase의 최대 활성도를 나타내는 최적 아스코르브산 농도는 겨자씨, 유채씨 myrosinase의 경우 각각 1mM인 반면에<sup>(16,17,29)</sup>, 무우의 myrosinase의 경

우는, 0.6mM이었으며 이 농도에서의 활성도는 아스코르브산이 존재하지 않을 때의 활성도에 비해 약 100배까지 상승하였다. 그러나 최적 아스코르브산 농도보다 높은 2mM 이상의 농도에서는 활성도가 서서히 감소하는 경향이었는데 이 같은 결과는 겨자씨, 유채씨 myrosinase와 비슷하였다<sup>(9,11)</sup>.

한편 Wilkinson 등<sup>(19)</sup>이 무우즙 중의 부분 정제된 myrosinase를 사용하여 측정된 아스코르브산 농도에 대한 효소 활성 profile에서는 최적 아스코르브산 농도에서 약 2배 정도 증가된 활성도를 나타내고 있어 본 실험 결과와는 큰 차이를 보여 주고 있다. 이것은 Wilkinson 등이 효소를 정제하지 않고 부분 정제된 효소를 사용하였기 때문에 나타난 결과로 사료되며, 무우중의 아스코르브산 농도를 측정해 본 결과, 약 1.5mM 정도 존재하였으므로 이 농도는 효소를 활성화 시키기에 충분한 것으로 관찰되었다.

따라서 정제된 효소를 사용하여 활성도를 측정하는 것이 무엇보다도 중요하다고 본다. Myrosinase가 아스코르브산에 의해서 활성화 되는 현상은 매우 흥미로운데, 이에 대해서 여러 연구자들이 그들의 실험 결과를 토대로 추측한 것에 의하면, 최근 Ohtsuru 등<sup>(16)</sup>은 molecular mobility 연구에서 아스코르브산에 의해서 효소의 conformation의 변화가 유발되기 때문인 것으로 보고 하였다. 또, 더욱 흥미로운 것은 본 실험에서 기질 물질로 *p*-nitrophenyl-D-glucoside를 사용하여 무우 myrosinase 활성도를 측정하여 보았을 때, 아스코르브산의 효과는 관찰되지 않았는데, 이는 Ohtsuru 등<sup>(17)</sup>의 보고와 일치하였다.

온도의 영향을 관찰하기 위해 효소의 최적 조건하에서 분석한 결과, 최적 온도는 37°C로 나타나 일반 효소와 유사하였으나, 활성화 에너지 값이 효소-기질 반응의 값보다 큰 것으로 결합자리인 양이온 자리와 기질과의 ionic interaction에 의한 영향이 있을 것으로 생각되었다.

Myrosinase의 pH 안정성에 대한 결과에서 pH 6.5에서는 매우 안정하였으나 pH가 낮아짐에 따라 안정성이 감소되었고 pH 3.7 이하에서는 급격히 활성도가 감소되었는데 이 같은 결과는 겨자씨, 유채씨 myrosinase의 pH 안정성과 비슷한 양상을 나타내었다<sup>(12)</sup>.

#### 요 약

무우의 myrosinase의 특성 규명을 위해 수행한 효소 정제는, 생 무우의 조효소액을 친화성 컬럼(충진물:

Con A-Sepharose)에 흡착 시킨 후  $\alpha$ -methyl-D-mannoside 로 용출하였을 때 53%의 회수율과 16배의 정제도(S. P. A. =27,900 units/mg)를 나타내었다. 다음 단계로 gel permeation HPLC에 의해 정제한 결과, 약 50%의 최종 회수율과 22배의 정제도(S. P. A. = 39,000 units/mg)를 나타내었으며, 전기 영동상 순도가 입증되었다. Gel permeation HPLC에 의해 측정된 분자량은 약 124,000 이었으며, sinigrin 을 기질로 하여 측정된  $K_m$ ,  $V_{max}$  값은 각각 0.12mM, 40  $\mu$ moles/mg  $\cdot$  min 이었다. 작용 최적 pH는 6.5, 최적 온도는 37°C 이었고 중성용액(pH 6-7)에서는 상온에서 비교적 안정하였으나 산성용액(pH 4 이하)에서는 불안정하여 효소 활성도는 급격히 감소하였다. 효소의 활성화제인 아스코르브산에 의한 최대 활성화 농도는 0.6mM로 약 100배의 효소 활성도 증가효과를 나타내었으며 2mM 이상에서는 효소 활성도가 저하되었다. 무우중 myrosinase의 분포는 껍질 부위에 평균 1,333 units/g, 속 부위에 평균 140 units/g으로 껍질 부위가 속 부위에 비해 10배 정도 많은 효소를 함유하고 있었다.

## 문 헌

1. Björkman, R. : Properties and function of plant myrosinases: In *The Biology and Chemistry of the Cruciferae*. Academic Press, London, p.191-206(1976)
2. Friis, P. and Kjaer, A. : 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate, the pungent principle of radish root. *Acta Chem. Scand*, 20, 698(1966)
3. 김미리·이혜수 : RP-HPLC법에 의한 무우의 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate의 정량. *한국식품과학회지*, 18(6), 475(1986)
4. Snowden, D.R. and Gaines, R.D. : Glycosidases of *Tropaeolum majus*. *Phytochemistry*, 8, 1649(1969)
5. Tang, C.S. : Localization of benzyl glucosinolate and thioglucosidase in *Carica papaya* fruit. *Phytochemistry*, 12, 769(1973)
6. Reese, E.T., Clapp, R.C. and Mandels, M. : A thioglucosidase in fungi. *Arch. Biochem. Biophys*, 75, 228(1958)
7. Ohtsuru, M., Tsuruo, I. and Hata, T. : Fungal myrosinase. I. Production, purification. *Agr. Biol. Chem.*, 33, 1309(1969)
8. Oginsky, E.L., Stein, A.E. and Greer, M.A. : Myrosinase activity in bacteria as demonstrated by the conversion of progoitrin to goitrin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 119, 360(1965)
9. Wilkinson, A.P., Rhodes, M.J.C. and Fenwick, G.R. : Determination of myrosinase(Thioglucoside glucohydrolase) activity by a spectrophotometric coupled enzyme assay. *Anal. Biochem.*, 139, 284(1984)
10. Tsuruo, I., Yosida, M. and Hata, T. : Studies on the myrosinase in mustard seed, Part I. The chromatographic behaviors of the myrosinase and some of its characteristics. *Agr. Biol. Chem.*, 31(1), 18(1967)
11. Björkman, R. and Janson, J.C. : Studies on myrosinases I. Purification and characterization of myrosinase from white mustard seed(*Sinapis alba* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, 276, 508(1972)
12. Björkman, R. and Lönnnerdal, B. : Studies on myrosinases III. Enzymatic properties of myrosinases from *Sinapis alba* and *Brassica napus* seeds. *Biochim. Biophys. Acta*, 327, 121(1973)
13. Lönnnerdal, B. and Janson, J.C. : Studies on myrosinase, II. Purification and characterization of a myrosinase from rapeseed(*Brassica napus* L.). *Biochem. Biophys. Acta*, 315, 424(1973)
14. Palmieri, S., Iori, R. and Leoni, O. : Myrosinase from *Sinapis alba* L. : A new method of purification for glucosinolate analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 138(1986)
15. Ohtsuru, M. and Hata, T. : Studies on the functional groups of plant myrosinase. *Agr. Biol. Chem.*, 37(2), 269(1973)
16. Ohtsuru, M. and Hata, Y. : Studies on the activation mechanism of the myrosinase by L-ascorbic acid. *Agr. Biol. Chem.*, 37(8), 1971(1973)
17. Ohtsuru, M. and Hata, T. : The interaction of L-ascorbic acid with the active center of myrosinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 567, 384(1979)
18. Björkman, R. and Lönnnerdal, B. : Studies on myrosinase III. Enzymatic properties of myrosinases from *Sinapis alba* and *Brassica napus* seeds. *Biochim. Biophys. Acta*, 327, 121(1973)
19. Wilkinson, A.P., Rhoades, M.J.C. and Fenwick, G.R. : Myrosinase activity of cruciferous vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, 35, 543(1984)
20. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for



- the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248(1976)
21. Bio Rad Protein Assay, Bio Rad Laboratories Instruction Manual(1979)
  22. Laemmli, V.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterio phage T4. *Nature*, **227**, 680(1970)
  23. Cooper, T.G. : In *The tools of biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., p.194(1977)
  24. Laidler, K.J. : In *Physical chemistry with biological applications*, The Benjamin/Cummings publishing Co., Inc., p.386(1978)
  25. Ellin, R.I., Zvirblis, P. and Wilson, M.R. : Method for isolation and determination of pyridostigmine and metabolites in urine and blood. *J. Chromato.*, **228**, 235(1982)
  26. Wiseman, A. : In *Handbook of enzyme biotechnology* 2nd. ed., Ellis Horwood, p.415(1985)
  27. Venter, J.C. and Harrison, L.C. : Receptor purification procedures. In *Receptor biochemistry and methodology* Vol. 2, Alan R. Liss, Inc., New York, p.3(1983)
  28. Ohtsuru, M. and Hata, T. : Molecular properties of multiple forms of plant myrosinase. *Agric. Biol. Chem.* **36**(13), 2495(1972)
  29. Henderson, H.M. and McEwen, T.J. : Effect of ascorbic acid on thioglucosidase from different cricifers. *Phytochemistry*, **11**, 3217(1972)
- (1988년 10월 19일 접수)