

배추 Myrosinase의 정제 및 효소학적 특성

강갑석 · 서권일* · 심기환*†

부산전문대학 식품가공과

*경상대학교 식품공학과

Purification and Enzymatic Characteristics of Myrosinase from Korean Cabbage

Kap-Suk Kang, Kwon-Il Seo* and Ki-Hwan Shim*†

Dept. of Food Processing, Pusan Junior College, Pusan 616-092, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract

Myrosinase from Korean cabbage (Bogdoli) was purified and its enzymatic properties were investigated. Myrosinase from the Korean cabbage was purified by DEAE Bio-Gel Sepharose, Concanavalin-A, and Mono-Q column chromatography and exhibited a 55KD molecular weight with a single band on the gel of SDS-PAGE. The enzyme was purified about 21-fold compared to its crude enzyme and a specific activity of purified enzyme was 15,120units/mg. Optimum pH of the myrosinase was 7.0 in both phosphate and Tris-HCl buffer solutions, the enzyme was stable at pH 6.5~7.0. Optimum temperature of enzyme was 37~38°C. The enzyme activity was significantly inhibited by Cu^{2+} and Hg^{2+} , but enhanced by ascorbic acid, resulting in a maximum activity at 1mM ascorbic acid. Among the ascorbic acid analogues, dehydro-ascorbic acid did not affect, whereas others showed a little effect on the enzyme activity, but less than ascorbic acid itself. Reducing agents such as 2-mercaptoethanol and dithiothreitol had no effect on the enzyme activity, but the enzyme activity was enhanced when 2-mercaptoethanol was mixed with ascorbic acid.

Key words : Korean cabbage, myrosinase, purification, enzymatic property

서론

십자화과 채소에는 여러 종류의 glucosinolate가 존재하며 이들의 분해산물은 자극취 및 쓴맛 등을 낸다고 알려져 있으며 (1), 이런 glucosinolate를 함유한 식물체를 사람과 가축이 섭취하면 그 분해산물이 생성되어 여러가지 약리적 또는 생리적 활성을 나타내는 것으로 보고 (2-6)되고 있다. 그런데 이들 glucosinolate의 분해에 관여하는 효소가 myrosinase로써 최근에는 myrosinase가 indole기를 함유한 glucosinolate를 분쇄하여 항암성을 갖는 indoleacetonitrile과 indolemethanol 등을 생성한다고 보고 (7-9)되고 있다.

Myrosinase에 관한 연구로는 주로 겨자 및 유채씨 등의 종자에 집중되어 있고 (10-12), 잎, 뿌리, 줄기 등

의 부위에 대한 연구는 미비한 상태이며, 특히 우리나라에서 채소 중 가장 많이 재배되고 있는 배추에 대한 연구 보고는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 우리나라에서 재배되고 있는 배추에서 myrosinase를 추출 및 정제하고 그 효소학적 특성에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

조효소의 조제

본 실험에 사용된 배추는 내한성과 결구력이 강한 북돌이 배추를 홍농종묘 불암농장 (김해소재)에서 구입하여 숙부위만 취하여 10mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충액 150ml (4°C)을 넣고 Waring blender로 마쇄하여, 원심분리 (8,000rpm, 5min, 4°C)하였다. 상정액을 가제

† To whom all correspondence should be addressed

로 여과하고 원심분리 (15,000rpm, 30min, 4°C)하여 상정액을 황산암모늄으로 40% 포화시켜 침전물과 상정액을 분리하고, 이 상정액을 황산암모늄으로 60% 포화시켜 원심분리 (15,000rpm, 30min, 4°C)하여 침전물을 모았으며, 상정액을 다시 황산암모늄으로 80% 포화시켜 원심분리 (15,000rpm, 30min, 4°C)하여 침전물을 얻었다. 이 중 황산암모늄으로 60% 포화시킨 침전물이 myrosinase에 대한 활성이 가장 높아 이를 조효소로 사용하였다.

효소의 정제

배추의 myrosinase 조효소는 황산암모늄으로 60% 포화 처리하여 얻은 침전물을 10mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충액으로 녹여 동일 완충액으로 하루밤 투석하고, 원심분리 (15,000rpm, 30min, 4°C)한 상정액을 평형화된 DEAE Bio-Gel 칼럼에 투입하여 동일 완충액으로 세척한 후 0~500mM 염화나트륨으로 linear gradient하여 용출하였다. 이 중 활성이 나타난 분획을 모아 농축한 후 Palmieri 등(13)의 방법으로 Concanavalin-A(Con-A) 완충액(20mM Tris-HCl, 1mM MnCl₂ · 4H₂O, 500mM NaCl, 1mM CaCl₂, pH 7.0)에 하루밤 투석한 후 Con-A 완충액으로 평형화된 Con-A Sepharose 칼럼에 시료를 투입하여 동일 완충액으로 세척하고 0.25M methyl- α -D-glucopyranoside로 용출하였다. 이 중 활성을 나타낸 분획을 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충액으로 투석하여 Fast performance liquid chromatography (FPLC) Mono-Q 칼럼에 투입하였다 (Table 1). 이를 동일 완충액 (5ml)으로 세척한 후 0~100mM 염화나트륨 linear gradient로 용출하여 효소의 활성을 나타낸 분획을 정제된 효소로 사용하였다.

효소의 활성 측정

Sinigrin을 myrosinase의 기질로 사용하였으며, 효소의 활성은 유리당을 측정하는 Summer's dinitrosalicylic

acid법 (14)을 변형하여 사용하였다. 즉 효소액 100 μ l, 10mM L-ascorbic acid 100 μ l, 3.4mM sinigrin 100 μ l 및 60mM 인산완충액 100 μ l을 각각 넣고 증류수로 최종 부피를 1ml로 조절하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 끓는 물에서 5분간 방치시켜 500nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구와 흡광도와의 차이를 효소의 활성으로 환산하였고, 효소활성도 1unit는 반응시간 1분당 1nmol의 기질을 가수분해시키는 양으로 정의하였다.

단백질 농도 측정

단백질의 정량은 Bradford법 (15)에 기초를 둔 Bio-Rad 단백질 정량법 (16)에 준하여 측정하였다. 즉 Bradford 시약 0.4ml, 증류수 1.6ml에 시료를 넣어 혼합한 뒤 595nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 값은 bovine serum albumin으로 작성한 표준단백질 정량곡선을 이용하여 시료에 존재하는 단백질의 농도를 결정하였다.

분자량 측정

Laemmli의 방법 (17)에 따라 12% SDS-polyacrylamide gel에 정제된 효소를 점적한 후 전기영동을 수행하였다. 표준단백질은 rabbit muscle phosphorylase B (97.4KD), bovine serum albumin (66.2KD), hen egg albumin (42.7KD), bovine carbonic anhydrase (31.0KD) 및 soybean trypsin inhibitor (21.0KD)을 사용하였고, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 단백질을 염색하였다.

최적 pH 및 pH 안정성

효소 활성의 최적 pH 및 최적 완충액을 알아보기 위해 10mM acetate 완충액 (pH 4.0~6.0), 10mM phosphate 완충액 (pH 6.0~7.0) 및 10mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0~11.0)으로 기질용액의 pH를 변화시켜 조제하고, pH 안정성은 최적 완충액으로 pH 3.0~11.0 까지 변화시켜 37°C에서 10분간 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다.

최적 온도

효소 활성의 최적 온도를 측정하기 위하여 기질용액을 효소의 최적 pH 7.0으로 조절한 후 30~80°C까지의 온도에서 10분간 반응시켜 각 온도별 효소 활성을 측정하였다.

금속이온, ascorbic acid의 농도와 그 analogue 및 환원제의 영향

효소 활성에 대한 금속이온의 영향은 기질용액을 효

Table 1. The operating conditions of Fast performance liquid chromatography (FPLC) for Korean cabbage purification

Items	Conditions
Instrument	FPLC 500 PLUS
Column	Mono-Q HR 5/5
Eluant	1M KCl in 10mM Tris-HCl, pH 8.0
Flow rate	0.8ml/min
Fraction	0.8ml/tube
Pressure	1M Pa
Detector	UV absorbance at 280nm
Chart speed	0.5cm/min

소의 최적 pH 7.0으로 조절하고 각종 금속을 첨가한 후 38°C에서 20분간 반응시켜 효소의 활성을 측정하였으며, 이때 최종 농도를 1mM로 조정하고 대조구를 기준으로 상대 활성을 측정하였다. L-ascorbic acid의 농도에 따른 효소 활성은 L-ascorbic acid의 최종 농도를 0.0~5.0mM로 조정하고, 효소의 활성에 대한 ascorbic acid의 analogue에 대한 영향은 각각의 최종 농도를 1mM로 되게 조정하여 상대 활성을 측정하였다. 완원제 농도에 따른 효소 활성에 대한 영향을 조사하기 위해 최종 농도 1mM로 조정하고 L-ascorbic acid, 2-mercaptoethanol 및 dithiothreitol과의 상대 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Myrosinase의 분리 및 정제

배추의 조효소 400ml에 황산암모늄으로 60% 포화 처리한 침전물을 10mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충액으로 녹여서 동일 완충액으로 하루밤 투석하여 원심분리 (15,000rpm, 30min, 4°C)시켜 상정액을 동일 완충액으로서 100ml로 조정한 후 평형화된 DEAE Bio-Gel 칼럼에 투입시켜 동일 완충액 400ml로 세척한 후 0~500mM 염화나트륨으로 linear gradient하여 용출한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 #42~65 (F-I), #66~77 (F-II), #78~96 (F-III)에서 각각 myrosinase의 활성이 나타났다. 이들 분획 중 가장 활성이 높은 F-I의 분획을 모아 농축한 후 Con-A 완충액에 하루밤 투석하였다. Con-A 완충액으로 평형화된 시료를 Con-A Sepharose 칼럼에 투입하여 동일 완충액 120ml로 세척한 후 0.25M methyl- α -D-glycopyranoside로 용출한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이

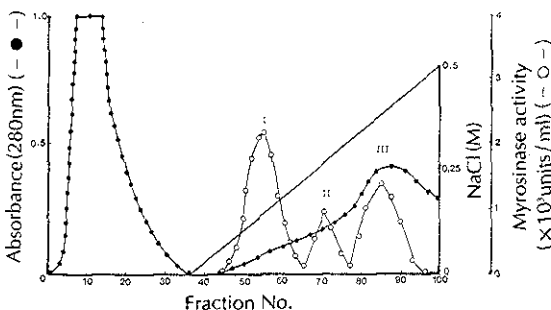


Fig. 1. DEAE Bio-column chromatography of crude enzyme from Korean cabbage. Elution was carried out with a linear gradient (0 to 0.6M) NaCl in 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). Column size : 5 x 20cm, Flow rate : 5ml/min, Fraction : 5ml/tube.

#30~40에서 myrosinase의 활성이 나타났다. 이 활성 분획을 모아 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충액으로 투석시켜 FPLC Mono-Q 칼럼에 투입시켜 동일 완충액 (5ml)으로 세척한 후 0~100mM 염화나트륨으로 linear gradient하여 용출한 결과 (Fig. 3), #15~21에서 단일 단백질 peak와 일치하는 활성을 나타낸 부분을 얻어 이를 정제 효소로 사용하였다. 배추 myrosinase의 정제 과정은 Table 2에서 보는 바와 같이 배추 조효소의 비활성도가 720units/mg이었던 것이 황산암모늄으로 60% 포화 처리시 860units/mg로 증가하였으며 정제도는 1.2이었다. DEAE Bio-Gel 칼럼 통과시 F-I은 3.336, F-II는 1.195 및 F-III는 1.014units/mg으로 비활성도가 증가하였으며, 정제도는 F-I은 4.7, F-II는 1.7 및 F-III는 1.4이었다. 이중 F-I을 Con-A 및 FPLC (Mono-Q)에 통과시켰을 때 비활성도가 10,080 및 15,120units/mg으로 증가하였으며, 정제도도 14 및 21로 증가하였다.

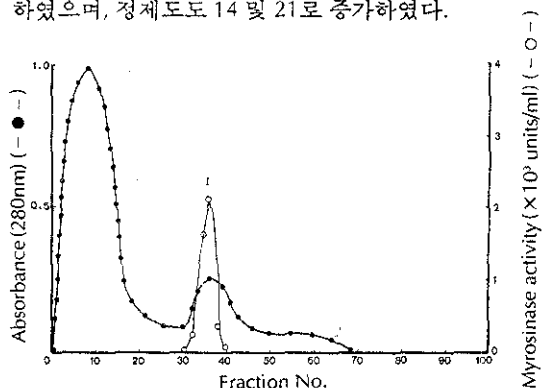


Fig. 2. Affinity chromatography of DEAE Bio-Gel fraction (I) on Concanavalin-A sepharose column. Elution was carried out with 0.25M methyl- α -D-glycopyranoside in Concanavalin A-sepharose buffer (pH 7.0) Column size : 2.5 x 10cm, Flow rate : 1ml/min, Fraction : 1ml/tube.

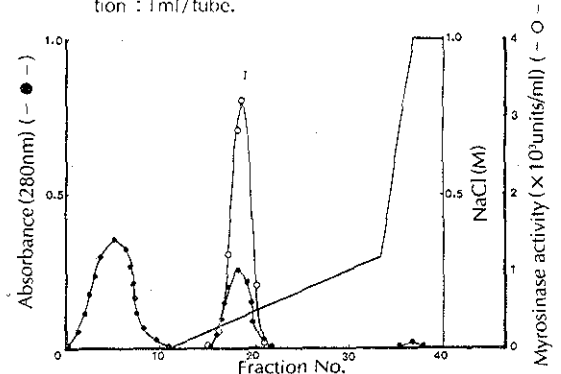


Fig. 3. Fast performance liquid chromatography of Concanavalin-A sepharose fraction on Mono-Q column. Elution was carried out with a linear gradient (0 to 1.0 M) NaCl in 10mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).

Table 2. Purification of myrosinase from Korean cabbage

Steps	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)
Crude extract	400.0	350.0	252,000	720	1
40~60% (NH ₄) ₂ SO ₄	100.0	280.0	241,000	860	1.2
Dialysis	100.0	210.0	235,000	1,120	1.3
DEAE Bio-Gel					
Myrosinase (I)	40.0	22.4	75,200	3,360	4.7
Myrosinase (II)	10.0	25.3	30,240	1,195	1.7
Myrosinase (III)	20.0	62.1	63,000	1,014	1.4
Concanavalin-A Myrosinase	1.2	2.2	20,160	10,080	14
FPLC (Mono-Q) Myrosinase	0.54	1.1	16,630	15,120	21

분자량

정제된 배추 myrosinase의 분자량은 12% SDS-PAGE gel에서 전기영동하여 표준단백질과 비교한 결과 55 KD로 나타났다 (Fig. 4).

한편 Ohtsuru와 Hata (18)는 겨자 (mustard powder)에서 myrosinase 활성을 가지는 4종류 (F-IA, F-IB, F-IIA 및 F-IIB)를 분리하여 gel filtration 결과, 분자량 153KD인 F-IA, F-IB 및 F-IIA와 분자량 125KD인 F-IIB를 확인하였으며, SDS-PAGE 결과, 분자량 40KD인 F-IA, F-IB 및 F-IIA와 분자량 30KD인 F-IIB를 확인하여 각각 4개의 subunit임을 보고하였다. Björkman과 Janson (10)은 겨자씨 (*Sinapis alba*, L.)에서 3종류의 isoenzyme을

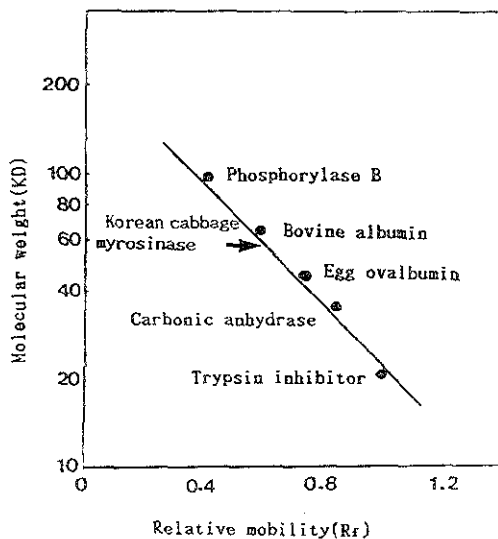


Fig. 4. Calibration curve typically obtained with proteins from the MW-SDS Kit (12% gels).

분리하였는데 gel filtration 결과, 분자량은 151KD로서 2개의 subunit (62KD)를 보고하였다. Lonnerdal과 Janson (12)은 평지씨 (*Brassica napus* L.)에서 3개의 isoenzyme을 분리하여 분자량 135KD로써 2개의 subunit (65 KD)를 보고하였으며, Tani 등 (19)은 *Enterobacter cloacae*에서 myrosinase를 분리하여 gel filtration한 결과, 분자량 61KD임을 보고하였다. Ohtsuru 등 (20)은 *Aspergillus niger* 및 *Asp. sydowii*에서 myrosinase를 분리하여 gel filtration 결과, 각각의 분자량은 90KD 및 120KD임을 보고하였다. 같은 myrosinase 이과 같이 분자량이 다른 것은 분리한 재료의 차이 때문인 것으로 생각된다.

최적 pH 및 pH 안정성

정제된 배추 myrosinase의 최적 pH를 측정하기 위하여 완충액으로 기질용액의 pH를 변화시켜 조제한 후 각 pH별 효소 활성을 측정된 결과 phosphate 및 Tris-HCl 완충액의 pH 7.0에서 최적을 나타내었으며, 이와 같은 결과를 토대로 기질용액을 Tris-HCl 완충액으로 pH 3.0~11.0 까지 변화시켜 배추 myrosinase의 pH 안정성을 측정된 결과 pH 6.5~7.0에서 가장 안정성을 나타내었다 (Fig. 5).

한편 Ohtsuru와 Kawatani (21)는 *Wasab japonica*의 myrosinase 최적 pH는 6.5~7.0, pH 안정성은 7.0이라고 보고하였으며, Tani 등 (19)은 *Enterobacter cloacae*의 myrosinase 최적 pH는 6.8~7.0, pH 안정성은 5.0~7.0이라

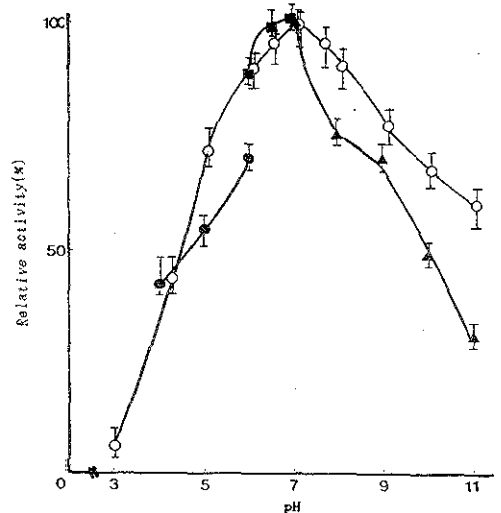


Fig. 5. Effect of pH on the activity (●) and stability (○) of purified myrosinase from Korean cabbage.

- : pH 4.0~6.0 (1.0mM acetate buffer)
- : pH 6.0~7.0 (10mM phosphate buffer)
- ▲ : pH 7.0~11.0 (10mM Tris-HCl buffer)

고 보고하였다. 또한 김과 이 (22)는 무 myrosinase에 대한 최적 pH는 6.5이었다고 보고하였고, Björkman과 Lonnerdal(11)은 겨자씨의 myrosinase 최적 pH는 4.0~7.0로 완만하게 나타났으며, 이러한 차이는 반응물의 조건 즉 농도, 이온강도, 반응액의 종류, 온도 및 기질 등에 기인한다고 보고하였다.

최적 온도

각 온도에서 배추 myrosinase의 활성을 측정한 결과 37~38°C에서 활성이 가장 강했고, 40°C 이상에서는 급격한 감소를 보였다 (Fig. 6).

한편 Ohtsuru와 Kawatani(21)는 *Wasabi japonica*의 myrosinase 최적 온도는 37°C, 열 안정성은 30°C 이하라고 보고하였으며, Tani 등(19)은 *Enterobacter cloacae*의 myrosinase는 40°C 이하에서 열에 안정하였다고 보고하였다. Björkman과 Lonnerdal(11)은 겨자씨의 myrosinase는 60~65°C까지는 활성이 증가하나 그 이상의 온도에서는 변성이 시작된다고 보고하였으며, 김과 이 (22)는 무 myrosinase는 37°C에서 최대 활성을 나타내었다고 보고하였다.

무기염의 영향

배추 myrosinase에 대한 무기염의 영향을 Table 3에 나타내었다. 칼슘, 코발트, 아연, 칼륨 및 나트륨 이온은 대조구에 비하여 상대활성이 높았으나, 수은 및 구리 이온은 효소 활성을 크게 억제하였다. 또한 본 실험

의 효소 정제과정 중 염화나트륨을 용출액으로 사용하였는데, 이는 효소 활성에 큰 영향을 미치지 않았다.

한편 Ohtsuru와 Kawatani(21)는 *Wasabi japonica*에서 칼슘, 코발트 및 망간 이온 첨가시 myrosinase 활성이 높았으나 구리 및 수은 이온은 myrosinase 활성을 강력히 저해한다고 보고하였으며, Tani 등(19)은 *Enterobacter cloacae*에서 칼슘, 코발트 및 망간 이온 등은 myrosinase 활성을 약간 저해하였으나, 칼슘, 수은 및 철 이온은 myrosinase 활성을 크게 저해한다고 보고하였다.

Ascorbic acid의 농도 및 analogue에 대한 영향

배추 myrosinase에 대한 ascorbic acid의 농도별 영향은 L-ascorbic acid를 효소 반응시 첨가 유무에 따라 상당한 효소 활성 차이를 보였고, ascorbic acid의 최종 농도가 1mM에서 최대 활성을 나타내었는데 (Fig. 7), 이는 ascorbic acid가 3mM 이상일 때는 효소와 경쟁적 저해

Table 3. Effect of inorganic salts on activity of myrosinase from Korean cabbage

Inorganic salts(mM)	Relative activity(%)
Control	100
CaCl ₂	102
CoCl ₂	139
SnCl ₂	101
NiCl ₂	97
MgCl ₂	102
ZnCl ₂	123
CuCl ₂	6
HgCl ₂	10
KCl	114
NaCl	115

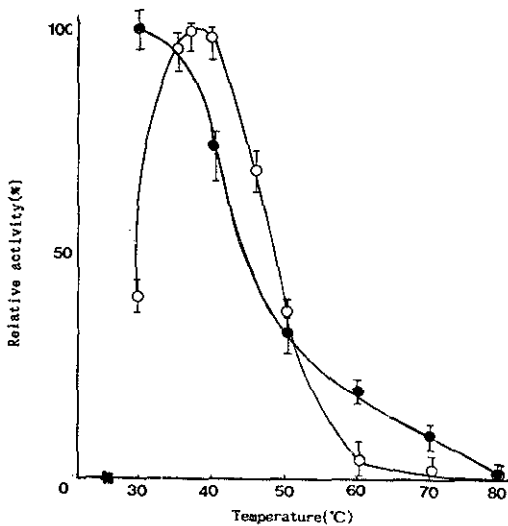


Fig. 6. Effect of temperature on the activity (○) and thermal stability (●) of the purified myrosinase from Korean cabbage.

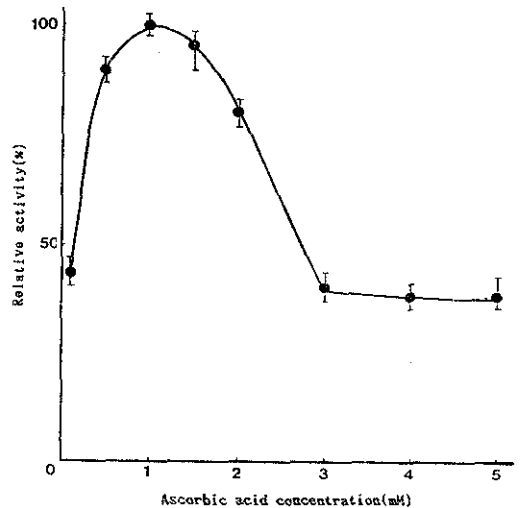


Fig. 7. Effect of ascorbic acid concentration on activity of purified myrosinase from Korean cabbage.

Table 4. Effect of analogues of ascorbic acid on activation of myrosinase from Korean cabbage

Analogues (1mM)	Relative activity (%)
None	13
L-Ascorbic acid	100
Ascorbyl-stearate	27
Ascorbyl-palmitate	28
D-Isoascorbic acid	63
Dehydro-ascorbic acid	0

를 한다는 Tsuruo 등(23)의 보고와 관련이 있는 것으로 생각된다. 한편 Ohtsuru와 Hata(24)는 *Wasabi japonica* 는 2mM ascorbic acid에서 최대 활성을 나타내었고, Tani 등(19)은 *Enterobacter cloacae*에서는 식물 myrosinase와는 달리 L-ascorbic acid가 myrosinase 활성을 저해한다고 보고하였다. Henderson와 EcEwen(25)은 여러 종류의 십자화과 채소에서 ascorbic acid의 영향을 보고하였으며, Phelan와 Vaughan(26)은 *Sinapis alba* L.에서 isoenzyme에 따라 L-ascorbic acid의 활성이 다르다고 보고하였고, Björkman과 Lonnerdal(11)은 *Sinapis alba* L. 및 *Brassica napus*에서 L-ascorbic acid의 농도가 0.7mM이었을 때 myrosinase 활성이 최대였으나 5~10mM에서는 활성이 나타나지 않았다고 보고하였으며, Ohtsuru와 Hata(27)는 myrosinase에 대한 L-ascorbic acid의 active center로서의 역할을 보고하였다.

배추 myrosinase에 대한 ascorbic acid의 analogue에 대한 영향은 Table 4에서 보는 바와 같이 모든 analogue들이 ascorbic acid의 첨가시 보다 활성이 낮았으며, dehydro-ascorbic acid의 첨가시는 myrosinase의 활성이 전혀 나타나지 않았다. Ohtsuru와 Kawatani(21)는 *Wasabi japonica* myrosinase가 dehydro ascorbic acid에 의해 강력히 저해됨을 보고하였다.

환원제의 영향

배추 myrosinase에 대한 환원제의 영향은 Table 5와 같다. L-Ascorbic acid의 활성을 100으로 보았을 때 2-mercaptoethanol 및 dithiothreitol의 첨가시 배추 myrosinase의 활성이 전혀 없거나 낮았으나, ascorbic acid와 2-mercaptoethanol을 혼합한 결과는 ascorbic acid 첨가시 보다 오히려 myrosinase 활성이 높았으며, ascorbic acid와 dithiothreitol을 혼합한 측정치는 ascorbic acid 첨가시 보다는 약간 낮게 나타났는데, 이는 2-mercaptoethanol이 ascorbic acid의 산화를 보호하는 결과라고 여겨진다.

한편 Ohtsuru와 Kawatani(21)는 *Wasabi japonica*에서 2-mercaptoethanol 및 dithiothreitol은 L-ascorbic acid만

Table 5. Effect of reducing reagents on activation of myrosinase from Korean cabbage

Reducing reagents (1mM)	Relative activity (%)
L-Ascorbic acid (ASA)	100
2-Mercaptoethanol	0
Dithiothreitol	0
ASA + 2-Mercaptoethanol	116
ASA + Dithiothreitol	92

첨가하였을 때와 비교하여 모두 myrosinase 활성이 없거나 거의 나타나지 않았으나 L-ascorbic acid + 2-mercaptoethanol 및 L-ascorbic acid + dithiothreitol을 혼합했을 때는 myrosinase의 상대 활성이 오히려 높거나 약간 낮게 나타났다고 보고하였다. Tani 등(19)은 *Enterobacter cloacae*의 myrosinase는 dithiothreitol 및 2-mercaptoethanol 첨가시 myrosinase의 활성이 L-ascorbic acid 첨가시 보다 오히려 높았다고 보고하였으며, Ohtsuru와 Hata(24,28)는 L-ascorbic acid + 2-mercaptoethanol 첨가시 myrosinase 활성이 높게 나타난 이유로서 이들이 효소의 functional group과의 관련 때문이라고 보고하였다.

요 약

배추 myrosinase를 DEAE Bio-Gel, Concanavalin-A Sepharose 및 FPLC Mono-Q 칼럼을 이용하여 분리 및 정제하여 SDS-PAGE 상에서 단일밴드를 확인하였으며, 정제된 효소의 비활성도는 15,120units/mg, 정제도는 약 21배였으며, SDS-PAGE상에서 분자량은 55KD였다. 배추 myrosinase의 활성 최적 pH는 phosphate 및 Tris-HCl 완충액에서 7.0이었고, pH 6.5~7.0에서 가장 안정하였으며, 활성 최적 온도는 37~38°C였다. 배추 myrosinase에 대한 무기염의 영향은 구리 및 수은 이온은 효소 활성을 매우 저해하며, ascorbic acid의 농도별 영향은 1mM일 때 최대 활성을 나타내었다. Ascorbic acid analogue에 대한 활성은 dehydro-ascorbic acid에 대해서는 거의 없었으며, 나머지 analogue들도 ascorbic acid 보다 상당히 활성이 낮았다. 배추 myrosinase에 대한 환원제의 영향은 2-mercaptoethanol과 dithiothreitol에 의해서는 활성을 나타내지 않았으나, 이들을 ascorbic acid 및 2-mercaptoethanol과 함께 첨가하면 활성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 부산전문대학 학술연구조성비로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문헌

1. Fenwick, G. R. and Mullin, W. J. : Glucosinolate and their breakdown products in food plants. *Food Sci. and Nutrition*, **18**, 123 (1982)
2. Cole, R. A. : Volatile components produced during ontogeny of some cultivated Cruciferae. *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 549 (1980)
3. Nieuwhof, M. : Cole crops, botany, cultivation and utilization. Leonard Hill, London (1969)
4. Sparnins, V. L. and Wattenberg, L. W. : Enhancement of glutathione S-transferase activity of the mouse forestomache by inhibitors of benzopyrene-induced neoplasia of the forestomache. *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 769 (1981)
5. Wattenberg, L. W. and Loub, W. D. : Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles. *Cancer Res.*, **38**, 1410 (1978)
6. Wattenberg, L. W. : Naturally occurring inhibitors of chemical carcinogenesis, in naturally occurring carcinogens-mutagens and modulators of carcinogenesis. University Park Press, Baltimore, p.315 (1979)
7. Slominski, B. A. and Campbell, L. D. : Formation of indole glucosinolate breakdowns in autolyzed, steamed, and cooked Brassica vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1297 (1989)
8. Slominski, B. A. and Campbell, L. D. : Gas chromatographic determination of indoleacetonitriles in rapeseed and Brassica vegetables. *J. Chromatogr.*, **454**, 285 (1988)
9. Slominski, B. A. and Campbell, L. D. : Indole acetonitriles-thermal degradation products of indole glucosinolates in commercial rapeseed meal. *J. Sci. Food Agric.*, **4**, 75 (1989)
10. Björkman, R. and Janson, J. C. : Studies on myrosinase I. Purification and characterization of myrosinase from white mustard seed (*Sinapis alba* L.). *Biochem. Biophys. Acta*, **276**, 508 (1972).
11. Björkman, R. and Lonnerdal, B. : Studies on myrosinase III. Enzymatic properties of myrosinases from *Sinapis alba* and *Brassica napus* seeds. *Biochem. Biophys. Acta*, **327**, 121 (1973)
12. Lonnerdal, 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)
13. 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)
14. Summer, J. B. : A more specific reagent for the determination of sugar in urine. *J. Biol. Chem.*, **65**, 393 (1925)
15. 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)
16. Bio Rad Protein Assay : Bio Rad Laboratories Instruction Manual (1979)
17. Laemmli, V. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 (1970)
18. Ohtsuru, M. and Hata, T. : Molecular properties of multiple forms of plant myrosinase. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2495 (1972)
19. Tani, N., Ohtsuru, M. and Hata, T. : Purification and general characteristics of bacterial myrosinase produced by *Enterobacter cloacae*. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1623 (1974)
20. Ohtsuru, M., Tsuruo, I. and Hata, T. : Fungal myrosinase. I. Production, purification. *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1309 (1969)
21. Ohtsuru, M. and Kawatani, H. : Studies on the myrosinase from *Wasabia japonica* : purification and some properties of wasabi myrosinase. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2249 (1979)
22. 김미라, 이혜수 : 무우 myrosinase의 정제 및 특성. *한국식품과학회지*, **21**, 136 (1989)
23. Tsuruo, L., 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. *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 18 (1967)
24. Ohtsuru, M. and Hata, T. : Studies on the activation mechanism of the myrosinase by L-ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1971 (1973)
25. Henderson, H. M. and McEwen, T. J. : Effect of ascorbic acid on thioglucosidase from different crucifers. *Phytochemistry*, **11**, 3217 (1972)
26. Phelan, J. R. and Vaughan, J. G. : Myrosinase in *Sinapis alba* L. *J. Exp. Botany*, **31**, 1425 (1980)
27. Ohtsuru, M. and Hata, T. : The inter action of L-ascorbic acid with the active center of myrosinase. *Biochim. Biophys. Acta*, **567**, 384 (1979)
28. Ohtsuru, M. and Hata, T. : Studies on the functional groups of plant myrosinase. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 269 (1973)

(1995년 5월 20일 접수)