

파의 Acid Phosphatase의 특성

김기남* · 김석지 · 김석환 · 박인식
동아대학교 식품영양학과

Characterization of Acid Phosphatase from Welsh Onion

Gi-Nahm Kim, Suk-ji Kim, Seok-Hwan Kim and Inshik Park
Department of Food Science and Nutrition, Dong-A University

Abstract

Acid phosphatase (EC 3.1.3.2) from welsh onion was partially purified by Sephacryl S-200 gel filtration and CM-Sepharose CL-6B ion exchange chromatography. The optimum pH and temperature of acid phosphatase from green onion were pH 5.5 and 60°C, respectively. The enzyme was the most stable at pH 6.0 and unstable above pH 9.0. The activation energy of the enzyme was determined to be 4.86 kcal/mole. The enzyme utilized *p*-nitrophenyl phosphate most as a best substrate among tested possible substrates, while 5'-GMP and 5'-IMP were poor substrates for the enzyme. $K_{m,app}$ of the enzyme with *p*-nitrophenyl phosphate as a substrate was identified as 0.87 mM. Among metal ions and inhibitors tested, Cr^{+++} , Zn^{++} , Cu^{++} , molybdate and metavanadate ions inhibited the enzyme reaction drastically.

Key words: welsh onion, acid phosphatase, characterization

서 론

Acid phosphatase는 산성 pH에서 다양한 orthophosphoric monoester를 가수분해하며⁽¹⁾, 식품에서 중요한 맛성분인 5'-IMP와 5'-GMP를 nucleoside나 무기인산으로 가수분해시켜 식품의 품질을 저하시키는 효소이다⁽²⁾. 따라서, 식품으로 이용되는 여러 동식물성 식품에서 분리한 acid phosphatase의 효소학적 특성을 연구하는 것은 식품의 처리, 가공, 조리과정에서의 식품의 맛성분의 변화를 파악하는 기초연구로서 중요하다. 이미 acid phosphatase는 일본 무⁽²⁾, 맥아⁽³⁾, 파파야⁽⁴⁾, 배⁽⁵⁾, 그리고 당근⁽⁶⁾에서 보고된 바 있다. 한편, 파(학명 *Allium fistulosum*)는 음식의 준비 재료로 많이 이용되고 있으나, 지금까지 파로부터 acid phosphatase를 분리, 정제 및 특성조사를 시도하지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 파로부터 acid phosphatase를 부분정제하고, 그 효소의 특성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

재료

Corresponding author: Gi-Nahm Kim, Department of Food Science and Nutrition, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

5'-AMP, 3'-AMP, 5'-IMP, 5'-GMP, 5'-ADP, 5'-ATP, *p*-nitrophenyl phosphate, sodium phytate, β -glycerophosphate, sodium metavanadate는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였으며, CM-Sepharose CL-6B와 Sephacryl S-200은 Pharmacia Fine Chemicals로부터 구입하여 사용하였다. 기타 시약들은 특급품이었다.

조효소액의 조제

파(100 g)를 잘게 썬 다음, 1.0 M KCl을 함유한 50 mM sodium acetate buffer (pH 6.0) 300 ml를 가하여 mixer로 3분간 간헐적으로 균질화하였다. 균질화된 파즙을 1,100×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

효소액 정제

조효소액 6.0 ml (17.82 units)를 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 평형화시킨 Sephacryl S-200 column (2.5×58 cm)에 loading하고 10 ml/hr의 유속으로 buffer를 흘려주어 분획당 5 ml씩 받았다. 이들 중 활성분획(40.0 ml)을 모아 다시 동일한 buffer로 평형화된 CM-Sepharose CL-6B ion exchange column (2.5×10 cm)에 loading시킨 후 동일한 완충용액으로

washing한 후, 0-1.0 M NaCl을 함유한 동일한 완충용액 300 ml로 gradient를 걸어 주어 분획당 5 ml씩을 취하였다. 이렇게 ion exchange column을 통과시킨 후 활성 있는 분획들(26.0 ml)을 모아 효소액으로 사용하였다.

효소역가 측정

효소역가는 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.5) 0.3 ml, 10 mM p-nitrophenyl phosphate 0.1 ml에 효소액 0.1 ml를 첨가하여 60°C에서 10분간 반응시킨 후 0.1 M NaOH 0.1 ml를 첨가하여 반응을 중지시키고 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생산된 p-nitrophenol의 양을 계산하기 위해 410 nm에서 molar extinction coefficient인 19.5 mM⁻¹cm⁻¹을 사용하였다⁽⁷⁾. 효소역가 1 unit는 주어진 조건하에서 1분당 1 mole의 p-nitrophenol을 생산하는 효소의 양으로 정하였다.

단백질의 함량 측정

단백질량은 Lowry *et al.*⁽⁸⁾법으로 측정하였으며, 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

효소정제 과정은 Table 1에 요약하였다. 효소액은 Sephacryl S-200 column과 CM-Sepharose CL-6B ion exchange chromatography를 통해 수득물 61%에 22.58배의 정제율을 얻었다.

효소의 최적 pH 및 안정성

효소활성에 대한 pH의 영향은 pH 3.0에서 10.0까지의 범위내에서 조사하였다. 효소활성은 기질 p-nitrophenyl phosphate에 대하여 pH 5.5에서 최대값을 나타 내었다(Fig. 1). 최적 pH 5.5는 파파야와 일본산 무에서 분리한 phosphatase의 최적 pH 6.0^(2,4)보다 약간

낮다. 효소의 활성이 alkaline pH에서는 나타나지 않는 것으로 보아, 파의 phosphatase는 acid phosphatase로 생각된다. 효소의 pH 안정성은 4°C에서 24시간동안 주어진 pH로 방치한 후 표준측정법을 이용하여 측정 하였으며, pH 6.0에서 가장 안정하였다(Fig. 2). 맥아의 경우, acid phosphatase의 pH 안정성 범위는 pH

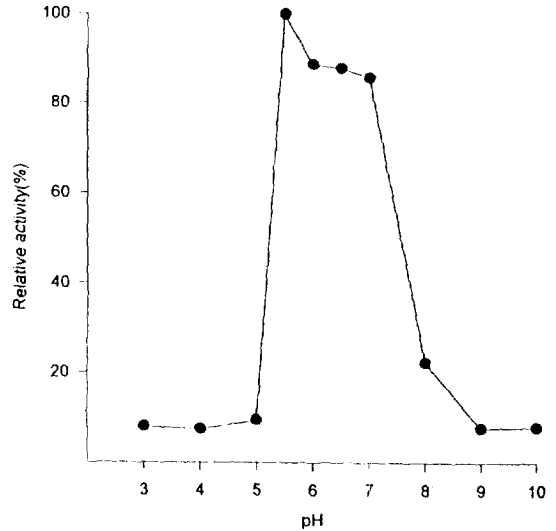


Fig. 1. Effect of pH on activity of acid phosphatase from welsh onion The buffers (0.1 M) used are as follows: pH 3.0-6.0, sodium acetate; pH 7.0-8.0, Tris-HCl; pH 9.0-10.0, sodium borate

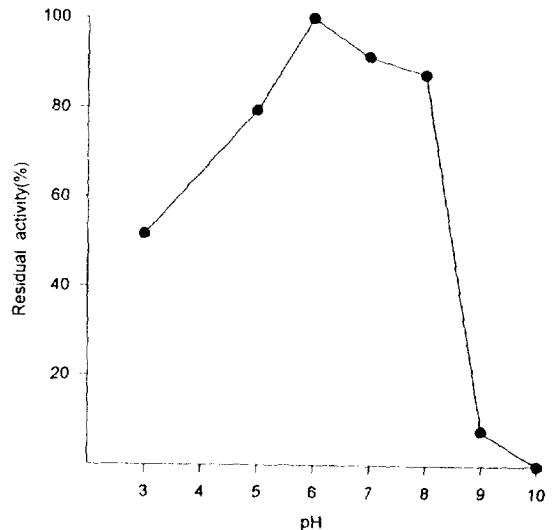


Fig. 2. Effect of pH on stability of acid phosphatase from welsh onion The enzymes were incubated at 4°C for 24 hrs at various pH values, and the residual activities were measured at standard assay condition

Table 1. Summary of Purification steps

Fraction	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	17.82	30.6	0.58	100.0	1.0
Sephacryl S-200	15.18	19.8	0.77	85.2	1.33
C M Sepharose	10.87	0.83	13.1	61.0	22.58

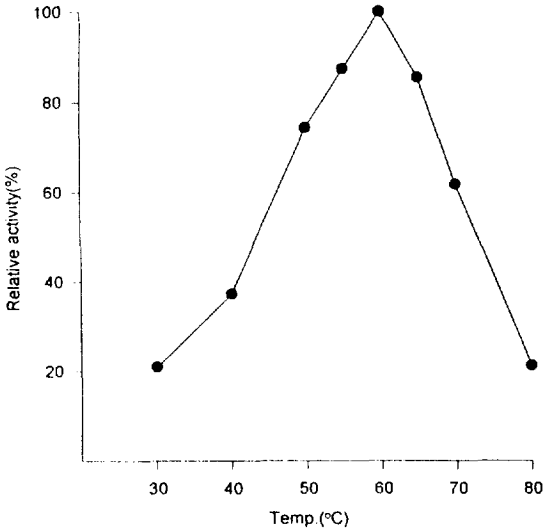


Fig. 3. Effect of temperature on activity of acid phosphatase from welsh onion The reaction was carried out at pH 5.5 for 30 min at various temperatures

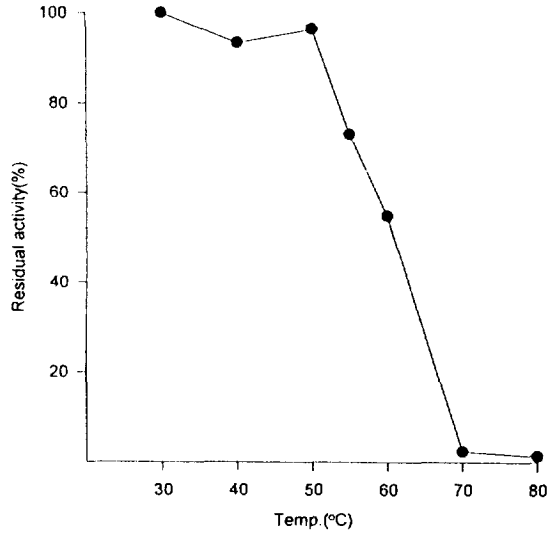


Fig. 5. Theroinactivation of acid phosphatase from welsh onion The enzyme was incubated at pH 6.0 for 10 min at various temperatures and the residual activities were measured at standard assay condition

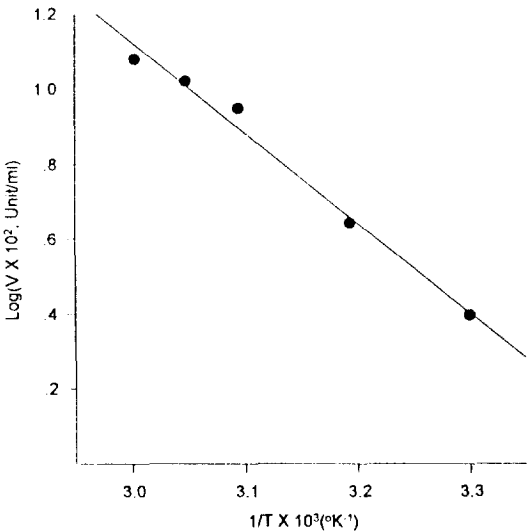


Fig. 4. Arrhenius plot of acid phosphatase from welsh onion

4.0-7.0⁽³⁾이었다.

효소의 최적온도

효소활성에 대한 온도의 영향은 30°C에서 80°C까지의 범위내에서 조사하였다(Fig. 3). 효소활성은 기질로 *p*-nitrophenyl phosphate를 사용하여 측정해 본 결과 60°C에서 최대활성을 나타내었다. 파파야와 일본산 무의 acid phosphatase의 최적온도는 각각 37°C⁽⁴⁾

와 45°C⁽²⁾이다. 그러므로, 파의 acid phosphatase의 최적온도는 파파야와 일본산 무의 acid phosphatase보다 더 높은 것으로 보인다. 효소의 활성화에너지는 Fig. 3을 이용하여 절대온도의 역수에 대한 log velocity를 그래프로 작성하여 계산하였는 바(Fig. 4), 효소의 활성화에너지는 4.86 kcal/mole이었다. 효소의 열안정성은 효소를 30°C에서 80°C 사이의 각 온도에서 10분간 방치한 후 표준측정법에 따라 잔존 효소활성을 측정하여 조사하였다(Fig. 5). 효소는 50°C 이하에서 안정하였으며, 50°C 이상에서는 급속하게 활성이 떨어졌다.

기질 특이성

다양한 인산화합물에 대한 acid phosphatase의 상대적 활성을 Table 2에 요약하였다. *p*-nitrophenyl phosphate에 대해서는 가장 활성이 높게 나타났으나, 핵산과 당인산의 분해는 미약하였다. 또한 이 효소는 식품의 맛성분이 되는 5'-IMP와 5'-GMP를 거의 가수분해하지 않는 것으로 나타났다. 따라서, 열을 가하지 않는 식품가공 또는 조리시에도 파를 첨가해도 맛의 변화는 거의 없을 것으로 생각된다.

Michaelis-Menten상수의 측정

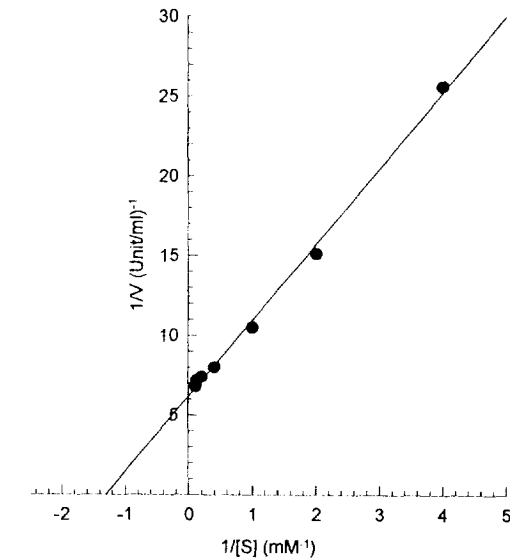
Fig. 6에서는 acid phosphatase의 Lineweaver-Burk plot를 나타내었다. *p*-nitrophenyl phosphate농도 0.25 mM에서 10.0 mM 범위내에서 $K_{m,app}$ 를 측정하였으며,

Table 2. Substrate specificity of acid phosphatase from welsh onion

Substrate (2 mM)	Relative activity (%)
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	100.00
5'-ATP	1.26
5'-ADP	0.47
5'-AMP	0.79
5'-GMP	0.47
5'-IMP	0.31
3'-AMP	0.15
Phytic acid	0.79
β -Glycerophosphate	0.94
α -D-Glucose-1-phosphate	0.47

Table 3. Effect of metal ions on activity of acid phosphatase from welsh onion

Metal ions (10 mM)	Relative activity (%)
Control	100.0
NiCl ₂	72.3
CaCl ₂	94.3
MnCl ₂	58.2
CuCl ₂	0.0
ZnCl ₂	3.8
BaCl ₂	77.8
CrCl ₃	0.0
HgCl ₂	32.8
CoCl ₂	85.3
MgCl ₂	92.3

**Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of acid phosphatase with *p*-nitrophenyl phosphate as a substrate**

그 값은 0.87 mM이었다. 일본산 무⁽²⁾, 파파야⁽⁴⁾, 배⁽⁵⁾ 및 당근⁽⁶⁾의 acid phosphatase의 K_m 은 각각 0.31 mM, 1.0 mM, 1.53 mM, 그리고 0.55 mM이었다. 그러므로, 파의 acid phosphatase의 K_m 값은 일본산 무와 당근보다 높고, 파파야와 배의 K_m 값보다는 낮은 편이다.

금속이온과 저해제의 영향

효소활성에 대한 금속이온과 저해제의 영향은 표준 측정액에 금속이온과 다양한 저해제를 첨가하여 조사하였다. 효소활성은 Cr⁺⁺⁺, Zn⁺⁺와 Cu⁺⁺이온과 같은 금속이온에 의해 크게 저해되었으며(Table 3), 준비된 저해제들 중 molybdate와 metavanadate 이온들에 의해서도 크게 저해되었다(Table 4). 또 NaCl의 농도가 높을

Table 4. Effect of various inhibitors on the activity of acid phosphatase from welsh onion

Inhibitor (1 mM)	Relative activity (%)
Control	100.0
Sodium citrate	94.8
Sodium tartarate	92.4
Sodium phosphate	74.3
Sodium pyrophosphate	60.4
Sodium trimetaphosphate	95.0
Sodium metavanadate	40.3
Ammonium molybdate	17.1
EDTA ¹⁾	86.4

¹⁾Ethylenediamine tetraacetic acid

Table 5. Effect of NaCl concentration on activity of acid phosphatase from welsh onion

NaCl conc. (%)	Relative activity (%)
0.0	100.0
0.5	96.9
1.0	90.7
2.5	81.2
5.0	79.2
10.0	74.3
15.0	67.3
20.0	58.8

수록 효소활성이 저해되었다(Table 5).

요 약

파로부터 acid phosphatase를 Sephacryl S-200 gel filtration과 CM-Sepharose CL-6B ion exchange chromatography를 이용하여 부분정제하였다. *p*-Nitrophenyl phosphate를 기질로 사용했을 경우에 최적 pH는 5.5, 최적온도는 60°C였다. 효소의 활성화 에너지는 4.86 kcal/mole이었다. 효소는 pH 6.0에서 가장

안정하였으며, 50°C 이하에서 대체로 안정하였다. 효소는 *p*-nitrophenyl phosphate를 기질로 가장 잘 이용하였으며, 5'-IMP와 5'-GMP는 기질로 거의 이용하지 못하였다. 효소는 *p*-nitrophenyl phosphate를 기질로 했을 경우에 $K_{m,app}$ 값이 0.87 mM이었다. Cr^{+++} , Zn^{++} , Cu^{++} 이온은 효소의 활성을 저해하였으며, 또한 molybdate와 metavanadate 이온이 효소의 활성을 저해하였다. 그리고, NaCl의 농도가 높을수록 효소의 활성을 저해하였다.

감사의 글

본 연구는 동아대학교의 연구지원사업에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

문헌

1. Hollander, V.: Acid Phosphatase. In *The Enzymes*. Vol. 4, Boyer, P.D. (Ed.), Academic Press, New York., p.896 (1971)
2. Yoshimoto, M., Kimura, T., Miyamoto, T., Sakamoto, J.

- and Hatano, S.: Purification and properties of acid phosphatase from Japanese radish. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**(1), 147 (1992)
3. Van Etten, R. and Waymack, P.: Substrate specificity and pH dependence of homogeneous wheat germ acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**(2), 634 (1991)
4. Carreno, R. and Chan. Jr., H.: Partial purification and characterization of an acid phosphatase from papaya. *J. Food Sci.*, **47**, 1498 (1982)
5. Shin M., Yoon Y., Kim G., Kil J. and Park I.: Properties of acid phosphatase from pear. *Foods and Biotechnol.*, **3**(1), 29 (1994)
6. Kim G., Shin M. and Park I.: Characterization of acid phosphatase from carrots. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**(3), 490 (1994)
7. Hayakawa, T., Okada, F., Tsutsui, M., Sata, N. and Igaue, I.: The effect of phytate on hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate with phosphatase from various sources. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 651 (1991)
8. Lowry, O., Roserbrough, H., Farr, A. and Randall, R.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)

(1996년 2월 7일 접수)