

## 한국산 토마토의 Endo-Polygalacturonase 정제 및 성질

최 청·조 영 제·손 규 목\*

영남대학교 식품가공학과, \*창원전문대학 식품영양과

**초록** : 한국산 토마토로부터 endo-polygalacturonase를 gel filtration과 이온교환크로마토그라피에 의하여 약 24배 정제할 수 있었고, 최대 효소활성을 위한 pH는 5.0, 최적온도는 50 °C였으며 pH안정범위는 4.0~5.0, 열안정성은 50 °C에서 1시간 열처리 하였을 때 약 45 % 실패되었다. 정제된 이 효소는 SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 단일밴드로 확인되었으며, 그 분자량은 50,000정도였고, Km값은  $1.43 \times 10^{-1}$  mol/l이었다. 금속이온중  $Ag^+$ ,  $Zn^{++}$ 이온이 효소의 활성을 촉진시켰으며,  $Na^+$ ,  $K^+$  등의 이온에 의해서는 활성이 저해되었다(1989년 8월 11일 접수, 1990년 2월 22일 수리).

과실의 연화현상은 성숙, 저장, 유통과정에서 일어나는 생리화학적 변화로서 품질평가에 중요한 영향을 미친다. 이러한 연화현상은 물에 불용성이며 식물세포간에 유착기능을 가지는 protopectin이 가용화됨으로서 조직의 연화가 발생되고 pectin질은 pectic enzyme의 작용을 받아 세포의 분리와 식물조직의 연화를 수반하게 된다<sup>1, 2</sup>. Pectic enzyme은 펙틴질과 더불어 야채류의 성숙 또는 수확후 처리과정에 있어서 과실조직에 영향을 주는 중요한 인자일 뿐만 아니라 과실주스와 과실주 가공에 있어서는 품질의 조성과 유지에 필요불가결한 존재임이 알려져 있다<sup>3, 4</sup>. 최근 여러학자들에 의하여 과실의 세포벽 구조와 성분에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>5-10</sup>. 특히 Bartley와 Knee<sup>11</sup>는 토마토의 성숙과 연화시 middle lamella와 일차세포벽의 변화가 일어난다고 하였고, Pressey<sup>12</sup>는 토마토의 저장중 polygalacturonase의 활성이 증가하고 isoenzyme의 활성은 선택적으로 증가한다고 하였다. Polygalacturonase가 갖는 토마토의 세포벽 조직의 연화 등 생리적 변화에 대해 Archer와 Fielding<sup>1</sup>, Hobson<sup>2</sup> 그리고 Chesson<sup>3</sup>이 보고한 바 있으나 pectic enzyme이 가지는 산업적 중요성 때문에 미생물로부터 생성되는 펙틴질 분해효소에 관해서 많은 연구가 수행되었다. 그러나 야채류로부터 polygalacturonase의 정제방법, 열저항성 및 작용양상등 특성에 관하여 많은 연구의 여지가 있다고 생각되기에 본 연구에서는 식물의 생리적 변화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 endo-polygalacturonase를 토마토로부터 분리, 정제하고 그 성질을 규명하였기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 재 료

대구직할시 수성구 범물동 소재 농원에서 노지재배한 토마토(*Lycopersicon esculentum* L.) 품종 強力美穗를 1988년 7월에 수도가 완숙기에 이른 것을 수확하여 7일간 후숙한 뒤 시료로 하였다.

#### Endo-polygalacturonase(Endo-PG)의 분리 및 조효소 제조

Endo-PG의 분리는 저농도와 고농도의 염에 의한 Exo-PG와 Endo-PG의 용해성 차이에 기초한 Chan등의 방법<sup>13</sup>에 따라 실시하였다(Fig. 1). 즉, 토마토 조직에 0.06 M NaCl을 함유하는 0.05 M acetate buffer(pH 5.0)를 가하여 Exo-PG를 분리한 후 그 잔존물에 0.96 M NaCl을 함유하는 동일 완충용액을 가하여 Endo-PG를 분리한 추출액을 4000 x g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상정액에 ammonium sulfate를 70 % 포화되게 가하여 효소 단백질은 응집, 침전시킨 후 Sephadex G-25를 통과시켜 탈염하고 Diaflo PM 10 Ultrafiltration membrane을 사용하여 Amicon Diaflo system으로 질소가스하에서 가압, 농축하였다.

#### 효소의 정제

효소의 정제는 조효소액을 0.05 M acetate buffer(pH 5.0)로 평형시킨 Sephadex G-150 column(2×90 cm)을 이용하여 효소활성부분을 분리하였다. 활성부위는 농축하여 DEAE-Cellulose column(3×50 cm)으로 0~0.7 M NaCl linear salt gradient를 행하였으며 분리된 활성부분은

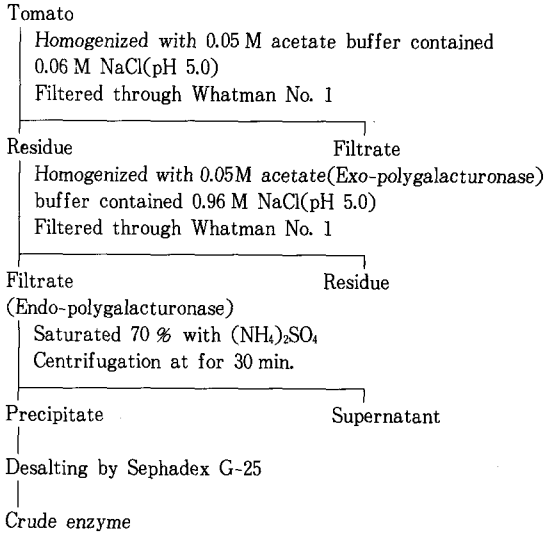


Fig. 1. Diagrammatic of separation of endo-polygalacturonase from tomato

농축한 뒤 다시 Sephadex G-150 column(2×90 cm)에 주입하여 0.05 M acetate buffer(pH 5.0)로 용출시켜 분획하였다. 이때 모든 조작은 4℃ 이하에서 실시하였다.

효소활성측정

Endo-PG의 활성측정은 Liu와 Luh의 방법<sup>14)</sup>에 따라 1% polygalacturonic acid를 기질로 하여 40℃에서 30분간 반응시켜 측정하였으며, α-D-galacturonic acid를 사용한 표준곡선에 의해 생성된 환원기의 양을 계산하였다. 이때 효소단위는 효소액 1 ml가 1분간에 1 μmole의 환원기를 생성하는 것을 1 unit로 정하였다.

단백질의 정량

조효소액 및 정제효소의 단백질 함량은 Lowry법<sup>15)</sup>에 따라 측정하였으며 이때 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였고 효소정제과정중 단백질량은 280nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였다.

Sodium dodesyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis 및 분자량 측정

전기영동에 의한 분자량 측정은 Weber와 Osborn의 방법<sup>16)</sup>에 의하여 10% SDS-polyacrylamide gel로서 실시하였으며 튜브당 3 mA로 약 7시간동안 수행되었다. 이때 표준품으로는 bovine serum albumin(66,000), egg albumin(45,000), pepsin(34,700), trypsinogen(24,000), β-lactoglobulin(18,400), lysozyme(14,300)을 사용하였다.

Endo-PG의 성질

1) pH의 영향

효소의 반응 최적 pH는 pH3~6까지는 각 pH의 0.05 M acetate buffer로, pH6~8까지는 각 pH의 0.05 M phosphate buffer로 효소활성을 측정, 비교하였고 pH에 대한 안정성은 상기의 동일 조건의 반응액을 4℃에서 17시간 동안 방치한 뒤 최적 pH로 조절하고 잔존활성을 측정하였다.

2) 온도의 영향

효소의 반응 최적온도는 반응온도를 37℃에서 80℃까지 변화시키면서 30분간 반응시켜 활성을 측정하였으며 온도에 대한 안정성은 30℃에서 60℃까지의 범위에서 60분간 열처리 시킨 뒤 최적반응온도에서 잔존활성을 측정하였다.

3) 금속이온의 영향

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 금속이온을 최종농도가 10<sup>-3</sup>M되게 첨가한 뒤 효소활성을 측정하였다.

4) Km값

기질인 polygalacturonic acid의 농도를 2×10<sup>-3</sup> M~2×10<sup>-1</sup> M까지 조절하여 효소활성을 측정한 후 Lineweaver-Burk plot로 Km값을 구하였다.

결과 및 고찰

Endo-PG의 정제

농축된 조효소를 Sephadex G-150 column(2×90 cm)에 주입하고 0.05 M acetate buffer(pH 5.0)으로 분획한 결과는 Fig. 2와 같으며, 이때 분획된 활성부분의 효소를 농축하여 Fig. 3에서와 같이 DEAE-cellulose column(3×50 cm)으로 분획한 후 얻은 활성부분은 다시 Sephadex G-150 column chromatography한 결과 Fig. 4에서 나타난 것과 같이 효소를 정제할 수 있었다. 이때 활성분획의 위치가 다른것은 fraction volume의 차이에 의한 것이지 elution volume의 차이는 아니다. 이들 정제된 효소는 활성을 측정하였던 바 1274% 수율과 24배의 정제도를 나타내었으며, 정제과정중 효소의 비활성과 수율은 Table 1과 같다. 한편 Ali와 Brady등<sup>8)</sup>은 토마토의 PG를 유안염석과 gel filtration, ionexchange chromatography에 의해 31배 정제하였다고 보고하였으나 본 효소는 정제도가 약간 낮았다.

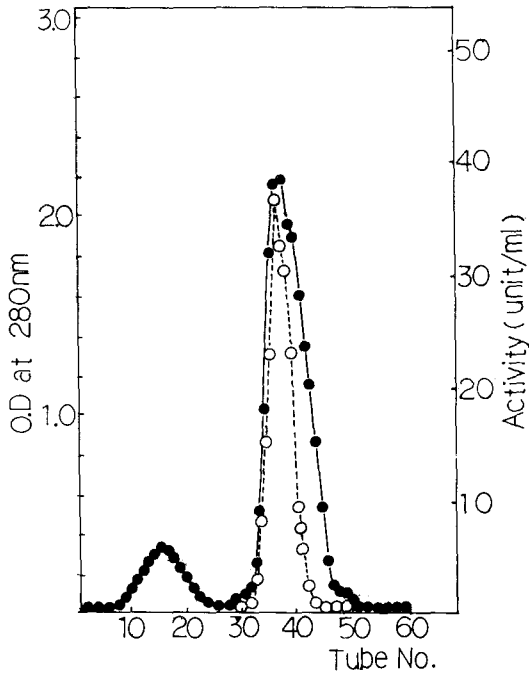


Fig. 2. Gel filtration of Endo-PG from tomato by first Sephadex G-150.

Protein concentration and Endo-PG activity are expressed as the absorbance at 280nm (●—●) and unit/ml (○—○).

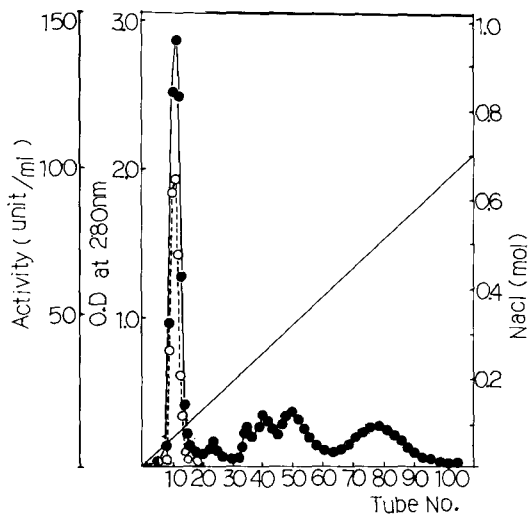


Fig. 3. DEAE-Cellulose chromatography of Endo-PG from tomato

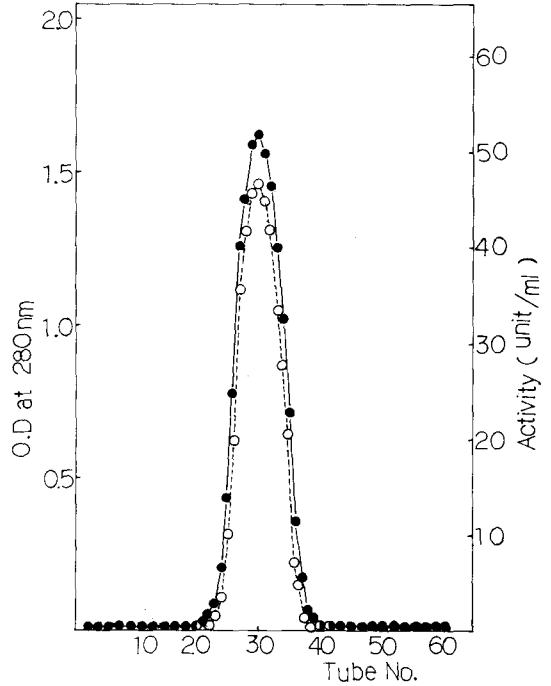


Fig. 4. Gel filtration of Endo-PG from tomato by second Sephadex G-150

Table 1. Purification of endo-polygalacturonase from tomato

	Total volume (ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Fold	Yield (%)
Crude enzyme solution	2950	13677.30	2275.00	6.012	1.00	100.00
Ammonium sulfate	105	2449.65	251.48	9.74	1.62	17.91
Sephadex G-25	65	1953.90	41.16	45.27	7.53	14.29
First Sephadex G-150	65	1953.90	41.16	45.27	7.53	14.29
DEAE-cellulose	52	1810.64	17.99	100.65	16.74	13.24
Second Sephadex G-150	72	1742.40	12.10	144.00	23.95	12.74

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 및 분자량 측정

정제된 효소는 Weber와 Osborn의 방법<sup>16)</sup>에 따라 전기영동을 실시한 결과 Fig. 5, 6에서와 같이 분자량이 약 50,000정도인 단일밴드를 나타내었다. Tucker등<sup>9)</sup>과 Pressey와 Avants등<sup>17)</sup>은 변색기의 토마토에서 분자량 80,000~115,000정도의 PG가 다량 존재하며 완숙기의 토마토에서는 고분자의 효소활성이 감소하며 분자량 42,000~52,000

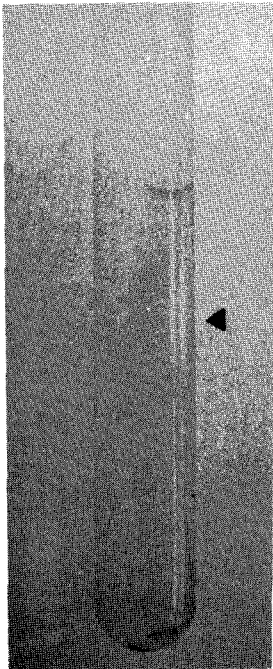


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified Endo-PG from tomato

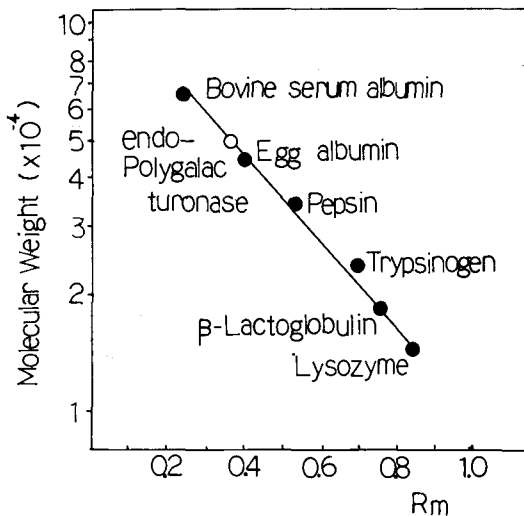


Fig. 6. Estimation of molecular weight of Endo-PG from tomato

정도의 PG가 급격히 증가한다고 보고한 바 있으며 Takehana 등<sup>18)</sup>은 연화된 토마토에서 분자량 52,000 정도의 PG를 분리하였다고 보고한 것과 비슷한 결과를 얻었다.

효소학적 성질

1) pH의 영향

한국산 토마토의 Endo-PG의 활성 및 안정성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과는 Fig. 7, 8과 같으며 최적 pH는 5.0이었고, 안정범위는 pH4~5의 범위에서 안정하였다. 이는 Pressey와 Avants 등<sup>17)</sup>이 토마토의 최적 pH가 5.0부근이라는 보고와 유사하였으며, Tucker 등<sup>9)</sup>이 성

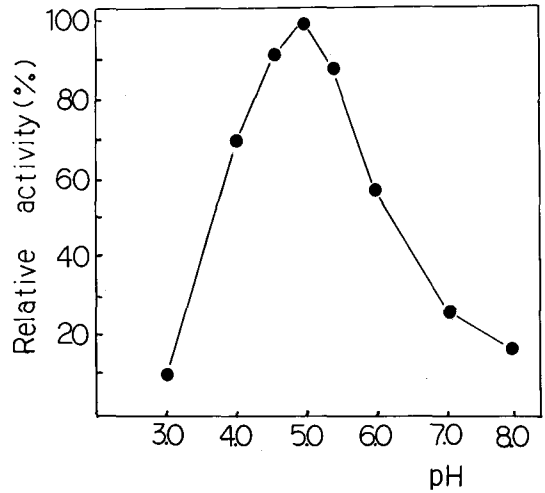


Fig. 7. Effect of pH on the activity of Endo-PG from tomato.

The enzyme solution was kept in various buffers with pH ranging from 3 to 8. Buffers used were acetate(pH3-6), and phosphate(pH7-8).

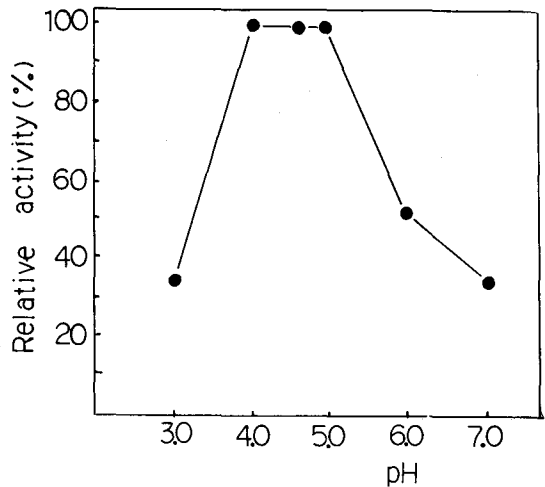


Fig. 8. Effect of pH on the stability of Endo-PG from tomato.

The enzyme solution was kept in various buffers with pH ranging from 3 to 7. Buffers used were acetate(pH3-6), and phosphate(pH 7).

숙한 토마토의 PG의 안정범위가 4.0~5.0이라고 보고한 사실과 같이 약산성에서 안정하였다.

2) 온도의 영향

본 효소의 활성 및 안정성에 미치는 온도의 영향은 Fig. 9, 10과 같으며 최적작용온도는 50°C이었고 30°C, 40°C에서는 활성감소가 거의 없었으나 50°C에서 60분간 열처리시 약 45%가량 실활되었으며, 60°C에서 열처리시 급격한 효소활성의 감소가 확인되었다. 이같은 결과는 Pressey와 Avants<sup>19)</sup>, Ali와 Brady<sup>8)</sup>등이 토마토의 PG가

50°C이하에서는 안정하나 60°C에서 거의 실활된다고 보고한 결과와 유사하였다.

3) 금속이온의 영향

효소활성에 미치는 각종 금속이온의 영향을 검토한 결과는 Table 2와 같이 Ag<sup>+</sup>이온에 의해 129.2%로 가장 많은 활성촉진이 발생하였다. 한편 Takenish등<sup>10)</sup>은 Ca<sup>++</sup>이온이 PG의 활성을 촉진한다고 보고하였으나, 본 효소는 약 37%가량의 활성저해가 관찰되었다.

Table 2. Effect of metal ions on the activity of Endo-PG

Ion	Metal	Relative activity(%)
Ag <sup>+</sup>	AgNO <sub>3</sub>	129.20
Zn <sup>++</sup>	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	109.43
Mg <sup>++</sup>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	102.00
Ba <sup>++</sup>	BaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	98.16
Hg <sup>++</sup>	HgCl <sub>2</sub>	92.87
Pb <sup>++</sup>	Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	85.75
Ca <sup>++</sup>	CaCO <sub>3</sub>	62.99
Mn <sup>++</sup>	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	59.54
Cu <sup>++</sup>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	40.00
Fe <sup>+++</sup>	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	36.32
Na <sup>+</sup>	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	23.23
K <sup>+</sup>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	-
	None	100.00

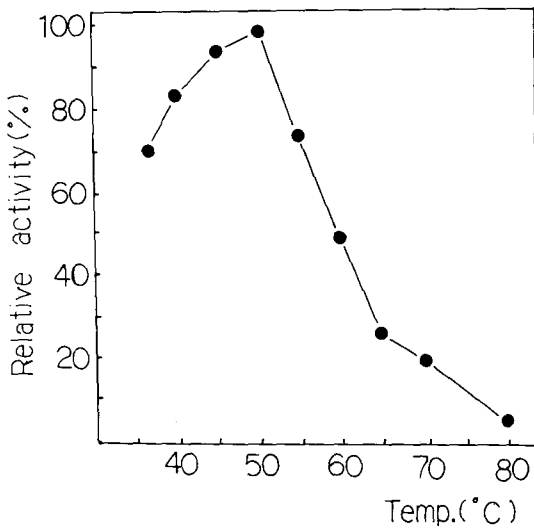


Fig. 9. Effect of temperature on the activity of Endo-PG from tomato

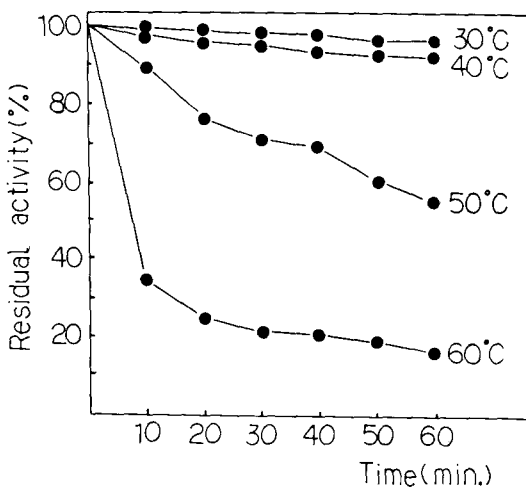


Fig. 10. Effect of temperature on the thermal stability of Endo-PG from tomato

4) K<sub>m</sub>값

본 효소의 기질에 대한 친화력을 살펴보기 위하여 Lineweaver-Burk plot로 K<sub>m</sub>값을 측정된 결과 Fig. 11에서와 같이 K<sub>m</sub>값은 1.43 × 10<sup>-1</sup> mol/l이었다.

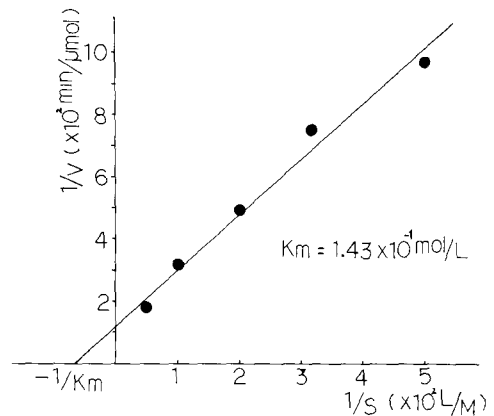


Fig. 11. Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of polygalacturonic acid by the purified enzyme

## 참고문헌

1. Archer, S. A., and Fielding, A. H. : J. Sci. Food Agric., 30 : 692(1979)
2. Hobson, G. E. In 'Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables', Ed. J. Friend and M. J. C. Rhode, Academic Press, London, p.123(1981)
3. Chessan, A. : J. Appl. Bacteriol., 48 : 1(1980)
4. Grierson, D., Tuckes, G. A. and Robertson, G. : In 'Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and Vegetables', Ed. by J. Friend and M. J. C. Rhode, Academic Press, London, p.149 (1981)
5. Brady, C. J., MacAlpine, G., McGlasson, W. B. and Veda, Y. : J. Plant Physiol., 9 : 171(1982)
6. Brown, M. R., Ough, C. S. : Amer. J. Enol. Viticult., 32 : 272(1981)
7. Buescher, R. W., Hobson, G. E. : J. Food Biochem., 6(3) : 147(1982)
8. Ali, Z. M. and Brady, C. J. : Aust. J. Plant Physiol., 9 : 155~169(1982)
9. Tucker, G. A., Robertson, N. G. and Grierson, D. : Planta., 155 : 64~67(1982)
10. Takenish, S., Watanabe, Y., Miwa, T. and Kobayashi, R. : Agric. Biol. Chem., 47(11) : 2553~2540(1983)
11. Bartely, I. M. and Knee, M. : Food Chem., 9 : 47(1982)
12. Pressey, R. : Eur. J. Biochem., 144 : 217(1984)
13. Chan, H. T. Jr., Tam, S. Y. T. and Seo, S. T. : J. Food Sci., 46 : 190(1981)
14. Liu, Y. K. and Luh, B. S. : J. Food Sci., 43 : 721 (1978)
15. Lowry, O. H. and Rosebrugh, N. J. : J. Biol. Chem., 193 : 265(1951)
16. Weber, K. and Osborn, M. : J. Biol. Chem., 244 (16) : 4406(1969)
17. Pressey, R. and Avants, J. K. : Biochemica et Biophysica Act., 309 : 363~369(1973)
18. Takehana, H., Shibuya, T. and Ogura, N. : Chiba Daigaku Engeigakuba Gakujutsu Hoku, 25 : 29~34(1977)
19. Westhead, E. F. : Biochem., 4 : 2139(1965)

**Purification and Characteristics of Endo-Polygalacturonase from Korean Tomato**  
 Cheong Choi, Young-Je Cho and Gyu-Mok Son\*(Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyongsan, Korea, \*Department of Food and Nutrition, Changwon Junior College, Changwon, Korea)

**Abstract :** Endo-polygalacturonase was purified from tomato, *Lycopersicon esculentum* L. The purification procedures included gel filtration on Sephadex G-150 and DEAE-cellulose ion exchange chromatography. Yield of the enzyme purification was 12.74%. Purified enzyme was confirmed as a active single band by the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. When the purified enzyme was applied to SDS-PAGE, the molecular weight was estimated about 50,000. The optimum pH for the enzyme activity was 5.0 and the range of its stability to the pH was 4.0 to 5.0. The optimum temperature was 50°C, while the enzyme was abruptly inactivated above 50°C. From the result of the study on the effects of metals ion, it was found that Ag<sup>+</sup>, Zn<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> increased on the enzyme activity. In contrast, Ba<sup>++</sup>, Hg<sup>++</sup>, Pb<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> decreased it. the reaction catalyzed by this enzyme followed typical Michaelis-Menten kinetics with the Km value of 1.43×10<sup>-1</sup> mol/l.