

## 한국산 겨자종 Myrosinase의 정제 및 효소학적 특성

신창식 · 서권일\* · 강갑석\*\* · 안철우\*\* · 김용관\*\* · 심기환†

경상대학교 식품공학과

\*동국전문대학 전통발효식품과

\*\*부산전문대학 식품가공과

### Purification and Enzymatic Properties of Myrosinase in Korean Mustard Seed (*Brassica juncea*)

Chang-Sik Shin, Kwon-Il Seo\*, Kap-Suk Kang\*\*, Cheol-Woo Ahn\*\*, Yong-Gwan Kim\*\* and Ki-Hwan Shim†

Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-092, Korea

\*Dept. of Traditional Fermented Food, Tong Kuk Junior College, Kyongbuk 718-850, Korea

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

#### Abstract

Myrosinase was purified from Korean mustard seed (*Brassica juncea*) by a sequential process of DEAE-cellulose, concanavalin A-sepharose, and Superose 6 chromatography. The molecular weight of purified myrosinase (II-2) determined by SDS-polyacrylamide electrophoresis was 67KD. About a 248-fold purification for myrosinase II-2 was obtained after Superose 6 chromatography. Optimum pH of the myrosinase was 7.0 and optimum temperature of the enzyme was 37°C. The enzyme was stable at pH 7.0, and below 30°C. Cu, Hg and Fe ion significantly inhibited the enzyme activity, but ascorbic acid enhanced, resulting in a maximum activity by 1mM ascorbic acid. Among the ascorbic acid analogues, dehydroascorbic acid inhibited the enzyme activity, whereas others showed a little effect. Reducing agents such as 2-mercaptoethanol and dithiothreitol inhibited the enzyme activity, but the reducing agents with ascorbic acid was enhanced enzyme activity.

**Key words:** mustard seed, myrosinase, purification, enzymatic property

#### 서 론

겨자는 기원전부터 유럽 및 중국에서 식품의 향신료로 이용되어 왔으며, 그 종류로는 백색, 황색, 갈색 및 흑색의 4종이 있으나 갈색과 흑색이 매우 유사하여 백겨자(*Brassica alba* L.), 황겨자(*Brassica juncea* C.) 및 흑겨자(*Brassica nigra* K.)로 구분하기도 한다(1). 백겨자와 황겨자는 서부 유럽이 원산지이나 지금은 세계 각국에서 널리 재배되고 있으며, 흑겨자는 북남미 및 유럽에서 재배되고 있다.

한편, 백겨자와 황겨자는 myrosinase(thioglucoside glucohydrolase, EC 3.2.3.1)에 의하여 배당체 sinalbin이 가수분해되어 *p*-hydroxy benzyl isothiocyanate, glucose 및 sinapine bisulfate를 생성하며, 이들 중 *p*-hydroxy benzyl isothiocyanate의 처음 맛은 약간 쓰

나 자극성의 방향을 생성하지는 않는다. 흑겨자는 배당체인 sinigrin이 myrosinase에 의하여 가수분해되어 매우 자극적인 방향과 강하게 쓰는 맛을 가지고 있는 allyl isothiocyanate와 glucose 및 potassium hydrogen sulfate를 생성하는데, 특히 이들 중 isothiocyanate는 수종의 세균과 곰팡이들에 대하여 항균활성을 갖는 것으로 보고되고 있다(2,3).

Myrosinase에 대한 연구로는 Reese 등(4)이 *Aspergillus niger*와 *Asp. sydowi*에서 myrosinase를 분리 및 정제하였으며, 그 분자량이 각각 90 및 120KD이었고, Tani 등(5)은 *Enterobacter cloacae*에서 분리한 myrosinase의 분자량이 61KD라고 보고하였다. Lönnerdal과 Janson(6)은 평지씨에서, Ohtsuru와 Kawatani(7)는 와사비(*Wasabi japonica*)에서 myrosinase를 분리 및 정제하여 그 분자량이 각각 135 및 580KD라고 보고

† To whom all correspondence should be addressed

하였다. 또한, 김과 이(8), 이(9)와 강 등(10,11)은 우리나라의 무와 배추에서, 박 등(12)은 갯에서 myrosinase를 분리 및 정제하여 그 분자량이 각각 124KD, 55KD 및 129KD라고 보고하였으며, 겨자의 myrosinase에 대한 연구로는 Palmieri 등(13)이 백겨자에서 myrosinase를 단일 칼럼으로 정제하였는데, 그 분자량은 약 140KD이었고, 그 후 정제의 새로운 방법과 물리화학적 특성을 보고하였다. 또한, Björkman과 Janson(14)은 DEAE-cellulose column chromatography를 이용하여 백겨자씨에서 3개, Tsuruo 등(15)은 SE-cellulose column chromatography를 이용하여 황겨자씨에서 2개, Ohtsuru와 Hata(16)는 DEAE 및 CM-Sephadex column chromatography를 이용하여 mustard powder에서 4개의 isoenzyme이 있음을 각각 확인하였다.

Myrosinase를 산업적으로 이용하기 위해서는 구조 및 물리화학적 특성을 구명하는 것은 매우 중요한 일로서, 현재 고품종이와 다양한 십자화과 식물에서 연구가 진행되고 있다. 그러나 우리나라에서 생산되어지는 겨자에 대한 연구 보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 전남 여천군 돌산지방에서 대량 생산되고 있는 겨자의 myrosinase를 분리 및 정제하고 그 효소학적 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용된 겨자(mustard, *Brassica juncea*)는 전남 여천군 돌산지방에서 구입하여 사용하였으며, 실험에 사용된 주요 시약으로 DEAE-cellulose는 Whatman사, L-ascorbic acid-6-palmitate, dithiothreitol, sulfatase, thioglucosidase, sinigrin, methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside는 Sigma사, Concanavalin A-Sepharose (Con. A)는 Pharmacia사 제품을 사용하였고, 나머지 시약들은 특급시약을 사용하였다.

### 조효소의 조제

겨자 100g를 취하여 수세한 후 Palmieri 등(13)의 방법에 따라 증류수 600ml(4°C)을 넣고 waring blender로 마쇄한 다음 원심분리(8,000rpm, 5min, 4°C)하여 불용성 물질을 제거한 후 가아제로 여과하였다. 여액을 원심분리(15,000rpm, 30min, 4°C)한 상정액을 증류수에 하룻밤 투석시킨 후 다시 원심분리(15,000rpm, 30min, 4°C)하여 상정액을 10mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충액에 하룻밤 투석시킨 후 효소 정제에 사용하였다.

### 효소활성 측정

효소활성 측정은 Summer 등(17)의 방법에 따라 효소액 100 $\mu$ l, 10mM L-ascorbic acid 100 $\mu$ l, 3.4mM sinigrin 100 $\mu$ l 및 60mM 인산완충액 100 $\mu$ l을 각각 넣고 증류수로 최종 부피를 1ml로 조절하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 끓는 물에서 5분간 방치시킨 다음 500nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소 활성도 1unit는 반응 시간 1분당 1 $\mu$ mole의 기질을 가수분해시키는 효소의 양으로 정의하였다.

### 단백질 농도 측정

단백질의 정량은 Bradford법(18)에 따라 Bradford 시약 0.4ml, 증류수 1.6ml에 시료를 넣어 혼합한 뒤 595nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 값은 bovine serum albumin으로 작성한 정량곡선을 이용하여 시료에 존재하는 단백질의 농도를 결정하였다.

### Myrosinase 정제

겨자 조효소를 10mM Tris-HCl(pH 7.0)으로 평형화된 DEAE-cellulose 칼럼에 투입하여 280nm에서 동일 완충액으로 완전히 세척한 후 0~500mM 염화나트륨으로 linear gradient하여 용출하였다. 이중 활성이 나타난 분획을 모아 농축한 후 Con. A 완충액(20mM Tris-HCl, 1mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 500mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.0)에 하룻밤 투석한 후 평형화된 Con. A 칼럼에 시료를 투입하여 동일 완충액으로 완전히 세척하고 0.25M methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside로 용출하였다. 이중 활성을 나타낸 분획을 10mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충액에 투석시켜 안정화된 fast performance liquid chromatography(FPLC)의 Superose 6 칼럼에 투입하였으며, 이를 동일 완충액(5ml)으로 세척한 후 0~500mM 염화나트륨 linear gradient로서 용출하여 효소의 활성을 나타낸 분획을 정제된 효소로 사용하였다.

### 분자량 측정

각 정제 단계별 전기영동 패턴과 최종 정제물질의 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli(19)의 방법에 따라 12% SDS-polyacrylamide gel에 정제된 효소를 점적한 후 전기영동을 수행하였다.

### 최적 pH 및 pH 안정성

효소활성의 최적 pH를 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 조제한 후 각 pH별 효소의 활성을 측정하였으며, pH 안정성은 최적 완충액으로 pH 3.0~11.0의 범위에서 측정하였다.

최적 온도 및 열 안정성

효소 활성의 최적 온도를 측정하기 위하여 기질용액을 효소의 최적 pH 7.0으로 조절한 후 30~80°C까지의 온도에서 10분간 반응시켜 각 온도별 효소활성을 측정하였으며, 열 안정성은 30, 40 및 50°C까지 각 구간에서 90분간 방치한 다음 효소활성을 측정하였다.

금속이온의 영향

효소 활성에 대한 금속이온의 영향을 측정하기 위하여 기질용액을 효소의 최적 pH 7.0으로 조절하고 각종 금속을 첨가한 후 37°C에서 10분간 반응시켜 효소의 활성을 측정하였다. 최종 농도를 1mM로 조정하고 대조구를 기준으로 상대활성을 측정하였다.

Ascorbic acid 농도의 영향

L-ascorbic acid의 농도에 따른 효소 활성을 측정하기 위하여 L-ascorbic acid의 최종 농도를 0.0~5.0mM로 조정하여 myrosinase에 대한 상대활성을 측정하였다.

Ascorbic acid의 analogue에 대한 영향

효소의 활성에 대한 ascorbic acid analogue의 영향을 조사하기 위해 각각의 최종 농도를 1mM로 조정하고 상대활성을 측정하였다.

환원제의 영향

환원제 농도에 따른 효소 활성에 대한 영향을 조사하기 위해 최종 농도 1mM로 조정하고 L-ascorbic acid, 2-mercaptoethanol 및 dithiothreitol과의 상대활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Myrosinase의 정제

겨자의 조효소를 원심분리하여 얻은 상침액을 DEAE-cellulose 칼럼에 투입시켜 0~500mM 염화나트륨으로 linear gradient하여 용출한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 3~27 및 66~87번 tube에서 각각 myrosinase

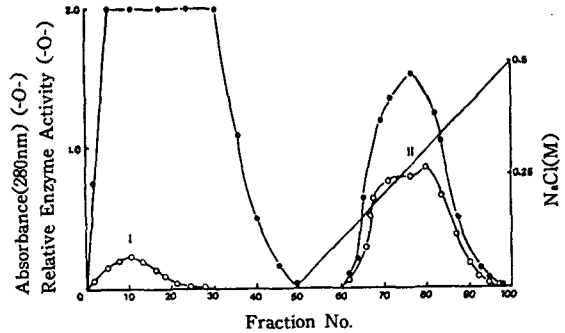


Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography of crude enzyme from mustard seed. Elution was carried out with a linear gradient(0 to 0.5M) of NaCl in 10mM Tris-HCl buffer(pH 7.0). Column size: 2.5×40cm, Flow rate: 1ml/min, Fraction volume: 10ml/tube.

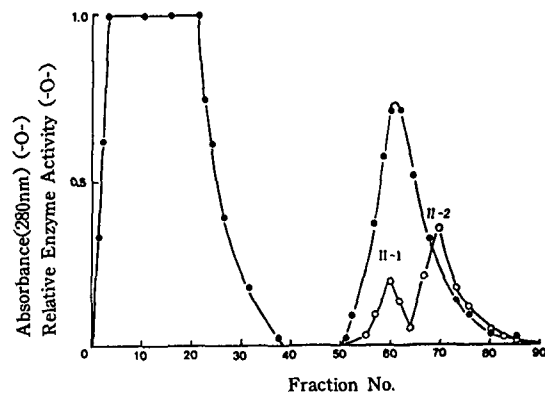


Fig. 2. Affinity chromatography of DEAE-cellulose fraction(II) on Concanavalin A-Sepharose column. Elution was carried out with 0.25M methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside in Concanavalin A-Sepharose buffer(pH 7.0). Column size: 1.5×20cm, Flow rate: 0.5ml/min, Fraction volume: 1ml/tube.

의 활성이 나타났다. 이들 분획을 따로 모아 3~27번 tube를 myrosinase I, 66~87번 tube를 myrosinase II로 각각 명명하여 이중 가장 활성이 높은 myrosinase II의 분획을 모아 농축하였다. 이를 다시 Con. A 칼럼에 투입하여 0.25M methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside로 용출한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 54~63 및 67~76번 tube에서 myrosinase의 활성이 나타났다. 이 활성 분획을 모아 농축한 후 20mM Tris-HCl(0.5M NaCl, pH 7.4)에서 하룻밤 투석하였다.

FPLC Superose 6 칼럼에 투입시켜 gel filtration한 결과(Fig. 3), 17~21번 tube에서 단일 단백질 peak와 일치하는 활성을 나타낸 부분(II-2)을 얻었다.

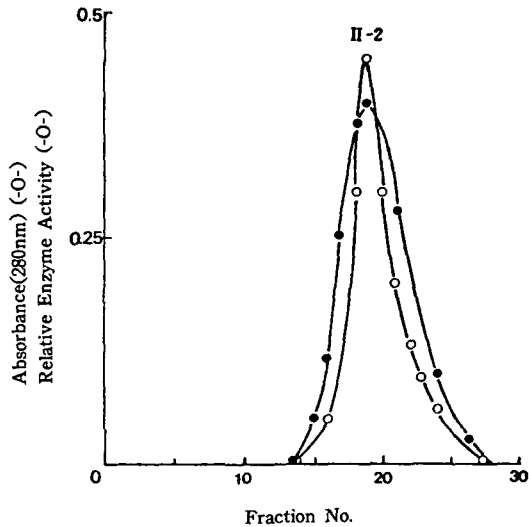


Fig. 3. Fast performance liquid chromatography of Concanavalin A-Sepharose fraction (II-2) on Superose 6 column. Elution was carried out with 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). Flow rate: 0.2ml/min, Fraction volume: 1ml/tube.

이때, 겨자 myrosinase 조효소 추출물의 단백질 함량이 5,200mg이던 것이 DEAE-Cellulose 칼럼을 통과하면서 myrosinase I은 150mg, myrosinase II는 90mg으로 감소하였으며, 이중 myrosinase II를 Con. A-Sepharose 및 FPLC Superose 6 칼럼에서 용출시켰을 때는 각각 4.5 및 2.8mg으로 감소하였다. 반면 조효소 상태에서 비활성도가 0.23units/mg이었던 것이 DEAE-Cellulose 칼럼 통과시는 myrosinase I은 0.05, myrosinase II는 11units/mg으로 나타났으며, 정제도는 각각 0.03과 47.8이었다. 이중 myrosinase II를 Con. A-Sepharose 및 FPLC Superose 6 칼럼에 통과시켰을 때, 비활성도가 55.6 및 57.1units/mg, 정제도는 241.7 및 248.3으로

나타났다(Table 1).

#### 분자량

위의 단계를 거쳐 정제한 myrosinase를 SDS-polyacrylamide gel(12%) 전기영동을 수행하여 순도를 확인한 결과, 단일밴드를 나타내었으며, 표준단백질 분자량과 비교하여 그 분자량은 약 67KD으로 추정되었다(Fig. 4).

Pessina 등(20)은 백겨자(*Sinapis alba* L.)에서 2개의 subunit(77.1KD)로 구성된 myrosinase를 분리하여 그 분자량이 135.1KD이라고 보고하였으며, Björkman과 Janson(14)은 *Sinapis alba* L.에서 3종류의 isoenzyme을 분리하여 gel filtration한 결과 그 분자량은 151KD로서 2개의 subunit(62KD)라고 보고하였다. Lönnerdal과 Janson(6)은 평지씨(*Brassica napus* L.)에서 3개의 isoenzyme을 분리하여 분자량 135KD로써 2개의 subunit(65KD)를 가졌다고 보고하였다.

Ohtsuru와 Hata(16)는 mustard powder에서 myrosinase 활성을 가지는 4종류를 분리하여(F-I A, F-I B, F-II A 및 F-II B) 각각 40, 및 30KD의 분자량을 가진 4개

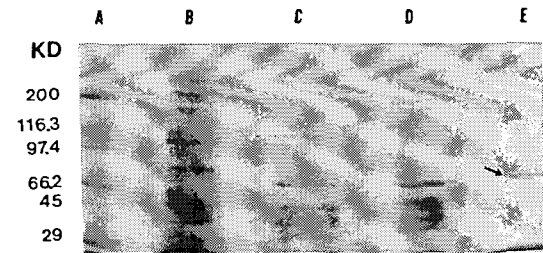


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of proteins obtained from mustard seed.

A lane: Mark protein, B lane: Crude enzyme, C lane: DEAE-cellulose column fraction, D lane: Concanavalin A-Sepharose column fraction, E lane: FPLC Superose 6 column fraction.

Table 1. Purification of myrosinase from mustard seed

Steps	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)
Crude extract	410	5,200	1,200	0.23	1
Centrifuged-dialyzed extract	450	410	1,130	2.76	12
DEAE-Cellulose					
Myrosinase I	250	150	8	0.05	0.03
Myrosinase II	220	90	990	11	47.8
Con. A-Sepharose					
Myrosinase II-1	10	8.3	260	31.3	136.1
Myrosinase II-2	10	4.5	250	55.6	241.7
FPLC(Superose 6)					
Myrosinase II-2	5	2.8	160	57.1	248.3

Units was defined  $\mu\text{mols}$  of sinigrin hydrolyzed/min

의 subunit임을 보고하였다. 이와 같이 같은 겨자라고 하더라도 분자량이 다르게 나타난 것은 종류와 그 배지의 환경조건이 다르기 때문인 것으로 생각된다.

최적 pH 및 pH 안정성

정제된 겨자 myrosinase의 최적 pH를 측정하기 위하여 10mM acetate 완충액은 pH 4.0~5.5, 10mM phosphate 완충액은 pH 6.0~7.0 및 10mM Tris-HCl 완충액은 pH 7.0~11.0으로 기질용액의 pH를 변화시켜 조제한 후 각 pH별 효소활성을 측정한 결과 phosphate 및 Tris-HCl 완충액의 pH 7.0에서 최적을 나타내었다. 이와 같은 결과를 토대로 기질용액을 Tris-HCl 완충액으로 pH 3.0~11.0까지 변화시켜 겨자 효소의 pH 안정성을 측정한 결과 pH 7.0에서 가장 안정하였다(Fig. 5).

Ohtsuru와 Kawatani(7)는 *Wasabi japonica*의 myrosinase 최적 pH는 6.5~7.0, pH 안정성은 7.0이라고 보고하였으며, 김과 이(8)는 무 myrosinase에 대한 최적 pH는 6.5이었다고 보고하였고, Björkman과 Lönnerdal(21)은 겨자씨의 myrosinase 최적 pH는 4.0~7.0로 완만하다고 하였다. 본 실험의 결과 이들과 약간의 차이를 보였는데, 이러한 차이는 효소자체의 분리원 뿐만 아니라 반응물의 조건 즉 농도, 이온강도, 반응액의 종류, 온도 및 기질 등이 다르기 때문이라고 추측된다.

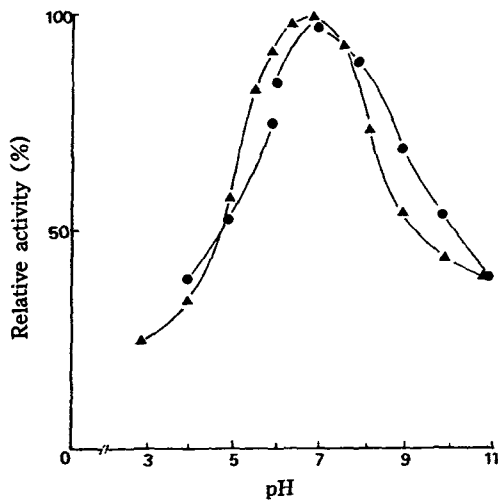


Fig. 5. Effect of pH on the activity(●) and stability (▲) of the purified myrosinase from mustard seed. pH 4.0~6.0(10mM acetate buffer), pH 6.0~7.0 (10mM phosphate buffer), pH 7.0~11.0(10mM Tris-HCl buffer).

최적 온도 및 열 안정성

각 온도에서 활성을 측정한 결과 겨자 효소는 37°C에서 활성이 가장 강했고(Fig. 6), 열 안정성에 대한 영향은 40°C에서는 25분이 지난 후 서서히 감소를 보였으나, 30°C는 30분까지 안정하였다(Fig. 7).

Ohtsuru와 Kawatani(7)는 *Wasabi japonica*의 myrosinase 최적 온도는 37°C, 열 안정성은 30°C 이하라고 보고하였으며, Tani 등(5)은 *Entrobacter cloacae*의 myrosinase는 40°C 이하에서 열에 안정하였다고 보고

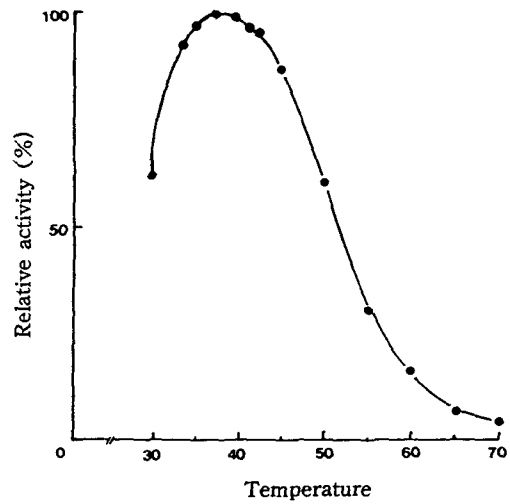


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of the purified myrosinase from mustard seed.

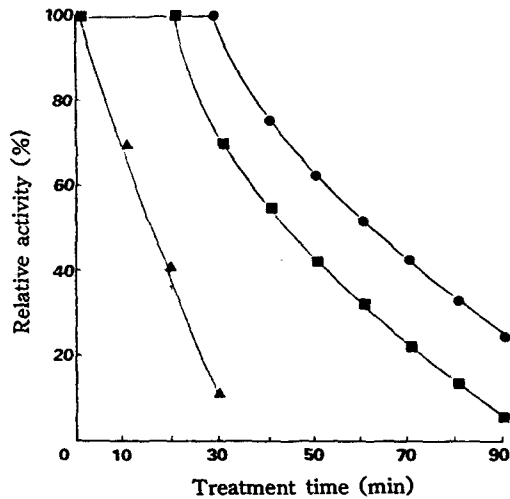


Fig. 7. Effect of temperature on the thermal stability of the purified myrosinase from mustard seed. ●: 30°C, ■: 40°C, ▲: 50°C,

하였다. Björkman과 Lönnnerdal(21)은 겨자씨의 myrosinase는 60~65°C까지는 활성이 증가하나 그 이상의 온도에서는 변성이 시작된다고 보고하였으며, 김과 이(8)는 무 myrosinase는 37°C에서 최대 활성을 나타내었다고 보고하여 본 실험의 결과도 이들과 비슷하였다.

#### 금속이온의 영향

겨자 효소에 대한 무기염의 영향을 Table 2에 나타내었다. 망간, 아연, 나트륨 및 코발트 이온은 대조구에 비하여 상대활성이 높았으나 수은, 구리 및 철이온은 효소활성을 크게 억제하였다. 그러나 효소 정제과정 중 용출액으로 사용한 염화나트륨은 효소활성에 큰 영향을 미치지 않았다.

Ohtsuru와 Kawatani(7)는 *Wasabi japonica*에서 칼슘, 코발트 및 망간 이온 첨가시 myrosinase 활성이 높았으나 구리 및 수은 이온은 myrosinase 활성을 강력히 저해한다고 보고하였으며, Tani 등(5)은 *Enterobacter cloacae*에서 칼슘, 코발트 및 망간 이온 등은 myrosinase 활성을 약간 저해하였으나 칼슘, 수은 및 철 이온은 myrosinase 활성을 크게 저해한다고 하였는데, 본 실험의 결과도 이들과 비슷한 경향을 보였다.

#### Ascorbic acid의 영향

겨자 myrosinase에 대한 ascorbic acid의 농도별 영향은 Fig. 8에서 보는 바와 같이 효소 반응시 L-ascorbic acid의 첨가 유무에 따라 상당한 효소 활성 차이를 보였으며, ascorbic acid의 최종 농도가 1mM에서 최대 활

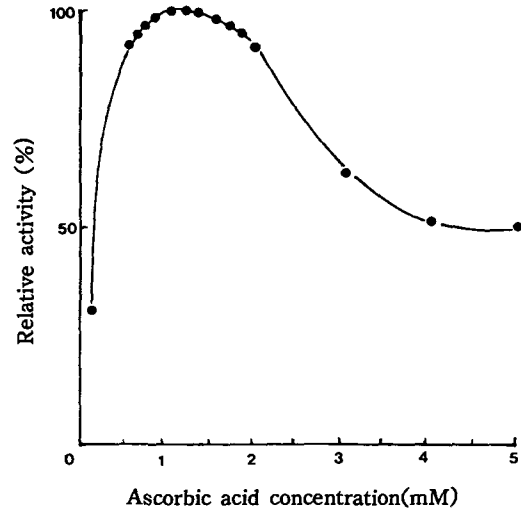


Fig. 8. Effect of ascorbic acid concentration on activity of purified myrosinase from mustard seed.

성을 나타내었고, 1mM 이상의 농도에서 농도가 높을수록 효소의 활성이 억제되는 결과를 보였다. 이는 ascorbic acid가 3mM 이상일 때는 효소와 경쟁적 저해를 한다는 Tsuruo 등(15)의 보고를 고려할 때 상기의 결과도 이러한 현상에 기인된 것으로 생각된다.

Ohtsuru와 Hata(22)는 *Wasabi japonica*는 2mM ascorbic acid에서 최대 활성을 나타내었고, Tani 등(5)은 *Enterobacter cloacae*에서는 식물 myrosinase와는 달리 L-ascorbic acid가 myrosinase 활성을 저해한다고 보고하였다. Henderson과 McEwen(23)은 여러 종류의 십자화과 채소에서의 ascorbic acid의 영향을 보고하였으며, Phelan과 Vaughan(24)은 *Sinapis alba* L.에서 isoenzyme에 따라 L-ascorbic acid의 활성이 다르다고 보고하였고, Björkman과 Lönnnerdal(21)은 *Sinapis alba* L. 및 *Brassica napus*에서 L-ascorbic acid의 농도가 0.7mM이었을 때 myrosinase 활성이 최대였으나 5~10mM에서는 활성이 나타나지 않았다고 보고하였다.

#### Ascorbic acid의 analogue에 대한 영향

겨자 효소액에 대한 ascorbic acid의 analogue에 대한 영향은 Table 3에서 보는 바와 같이 겨자 효소는 모든 analogue들이 ascorbic acid의 첨가시 보다 활성이 낮았으며, dehydro ascorbic acid의 첨가시는 myrosinase의 활성이 전혀 나타나지 않았다.

Ohtsuru와 Kawatani(7)는 *Wasabia japonica*에서

Table 2. Effect of inorganic salts on the activity of the purified myrosinase from mustard seed

Inorganic salts(1mM)	Relative activity(%)
Control	100
CaCl <sub>2</sub>	108
CoCl <sub>2</sub>	129
SnCl <sub>2</sub>	123
MnCl <sub>2</sub>	160
SrCl <sub>2</sub>	115
MgCl <sub>2</sub>	139
ZnCl <sub>2</sub>	116
CuCl <sub>2</sub>	60
HgCl <sub>2</sub>	81
FeCl <sub>2</sub>	85
KCl	126
NaCl	129
NiCl <sub>2</sub>	117
CdCl <sub>2</sub>	121

**Table 3. Effect of analogues of ascorbic acid on the activation of the purified myrosinase from mustard seed**

Analogues(1mM)	Relative activity(%)
None	78
L-Ascorbic acid	100
Ascorbyl-stearate	90
Ascorbyl-palmitate	75
D-Isoascorbic acid	69
Dehydro ascorbic acid	0

**Table 4. Effect of reducing reagents on the activation of the purified myrosinase from mustard seed**

Reducing reagents(1mM)	Relative activity(%)
L-Ascorbic acid(ASA)	100
2-Mercaptoethanol	19
Dithiothreitol	51
ASA + 2-Mercaptoethanol	114
ASA + Dithiothreitol	92

myrosinase가 dehydro-ascorbic acid에 의해 강력히 저해됨을 보고하였다.

#### 환원제의 영향

겨자 효소에 대한 환원제의 영향은 Table 4에서 보는 바와 같이 L-ascorbic acid의 활성을 100으로 보았을 때, ascorbic acid와 2-mercaptoethanol을 혼합한 결과는 ascorbic acid 첨가시 보다 오히려 myrosinase 활성이 높았으며, ascorbic acid와 dithiothreitol을 혼합한 측정치는 ascorbic acid만 첨가한 경우 보다 약간 낮게 나타났다.

Ohtsuru와 Kawatani(7)는 *Wasabi japonica*에서 2-mercaptoethanol 및 dithiothreitol은 L-ascorbic acid만 첨가하였을 때와 비교하여 모두 myrosinase 활성이 없거나 거의 나타나지 않았으나 L-ascorbic acid+2-mercaptoethanol 및 L-ascorbic acid+dithiothreitol을 혼합했을 때는 myrosinase의 상대활성이 오히려 높거나 약간 낮게 나타났다고 보고하였다. Tani 등(5)은 *Enterobacter cloacae*의 myrosinase는 dithiothreitol 및 2-mercaptoethanol 첨가시 myrosinase의 활성이 L-ascorbic acid 첨가시 보다 오히려 높았다고 보고하였으며, Ohtsuru 등(22,25)은 L-ascorbic acid+2-mercaptoethanol 첨가시 myrosinase 활성이 높게 나타난 이유로 이들이 효소의 functional group과의 관련 때문이라고 보고하였다. 본 실험의 결과에서 ascorbic acid와 dithiothreitol을 혼합한 처리구의 myrosinase 활성이

ascorbic acid만 처리한 경우 보다 약간 낮게 나타난 결과는 2-mercaptoethanol이 ascorbic acid의 산화를 보호하는 결과라고 여겨진다.

#### 요 약

한국산 겨자에서 myrosinase를 분리 및 정제하고, 이들의 효소학적 특성을 조사한 결과는 다음과 같다. 겨자 myrosinase를 DEAE-cellulose, Concanavalin A-Sepharose 및 FPLC Superose 6 칼럼을 이용하여 분리 및 정제하였을 때 적어도 3개의 이성효소가 존재하는 것으로 나타났으며, Myrosinase II-2의 최종 비활성도는 57.1units/mg, 정제도는 약 248배였다. SDS-PAGE상에서 myrosinase(II-2)의 단일밴드를 확인한 결과, 그 분자량은 약 67KD로 추정되었다. 최적 pH는 phosphate 및 Tris-HCl 완충액에서 7.0이 가장 활성이 높았고, 그 효소는 pH 7.0에서 안정하였으며, 최적 활성을 나타내는 온도는 37°C 부근이었고, 40°C 이상에서는 비교적 불안정하게 나타났다. Ascorbic acid의 영향은 1mM에서 가장 안정하였으며, 그 이상의 농도에서는 변화가 없었다. 망간과 마그네슘 및 나트륨은 효소활성을 촉진시키는 것으로 나타났으며 구리, 수은 및 철 이온은 약간 저해하였다. Ascorbic acid analogue 중 dehydroascorbic acid는 효소 활성을 저해하였으며, 나머지 것들은 거의 영향을 미치지 않았다. 2-Mercaptoethanol과 dithiothreitol과 같은 환원제는 효소활성을 억제하였으나 이들과 ascorbic acid를 함께 첨가하였을 때는 활성이 다소 증가하였다.

#### 감사의 글

본 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

#### 문 헌

1. Macleod, A. J. : Volatile flavour compounds of the cruciferae. p.307(1974)
2. Farrell, K. T. : Spices, condiments and seasonings. AVI, New York, p.150(1985)
3. 서권일 : 한국산 겨자의 항균성에 관한 연구. 경상대학교 박사학위논문(1995)
4. Reese, E. T., Clapp, R. C. and Mandels, M. : A thioglycosidase in fungi. *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 228 (1958)
5. Tani, N., Ohtsuru, M. and Hata, T. : Purification and general characteristics of bacterial myrosinase produced by *Enterobacter cloacae*. *Agr. Biol. Chem.*, **39**,

- 1623(1974)
6. Lönnerdal, 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)
  7. 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)
  8. 김미리, 이혜수 : 무 myrosinase의 정제 및 특성. 한국식품과학회지, **21**, 136(1989)
  9. 이경선 : 무 myrosinase의 정제와 깎두기 숙성 중의 myrosinase 활성의 변화. 충남대학교 석사학위논문(1988)
  10. 강갑석, 서권일, 심기환 : 배추 myrosinase의 정제 및 효소학적 특성. 한국영양식량학회지, **24**, 563(1995)
  11. 심기환, 강갑석, 서권일 : 무에서 추출한 myrosinase의 정제 및 효소학적 특성. 한국농화학회지, **36**, 86(1993)
  12. 박정로, 박석규, 조영숙, 전순실 : 돌산 갖의 myrosinase 분리 정제 및 갖 김치 숙성 중 myrosinase 활성도의 변화. 한국식문화학회지, **9**, 137(1994)
  13. Palmieri, S., Iori, R. and Leoni, O. : Myrosinase from *Sinapis alba* L. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 138(1986)
  14. Björkman, R. and Janson, J. C. : Studies on myrosinase I. Purification and characterization of myrosinase from white mustard seed(*Sinapis alba* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 508(1972)
  15. 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. *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 18(1967)
  16. Ohtsuru, M. and Hata, T. : Molecular properties of multiple forms of plant myrosinase. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2495(1972)
  17. Summer, J. B. : A more specific reagent for the determination of sugar in urine. *J. Biol. Chem.*, **65**, 393(1925)
  18. 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)
  19. Laemmli, V. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680(1970)
  20. Pessina, A., Thomas, R. M., Palmieri, S. and Luisi, P. L. : An improved method for the purification of myrosinase and its physicochemical characterization. *Archives, Biophysics*, **280**, 383(1990)
  21. Björkman, R. and Lönnerdal, B. : Studies on myrosinase. III. Enzymatic properties of myrosinases from *Sinapis alba* and *Brassica napus* seeds. *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 121(1973)
  22. Ohtsuru, M. and Hata, T. : Studies on the activation mechanism of the myrosinase by L-ascorbic acid. *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1971(1973)
  23. Henderson, H. M. and McEwen, T. J. : Effect of ascorbic acid on thioglucosidase from different crucifers. *Phytochemistry*, **11**, 3217(1972)
  24. Phelan, J. R. and Vaughan, J. G. : Myrosinase in *Sinapis alba* L. *J. Exp. Botany*, **31**, 1425(1980)
  25. Ohtsuru, M., Tsuruo, I. and Hata, T. : Fungal myrosinase. I. Production, purification. *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1309(1969)

(1996년 5월 25일 접수)