

무에서 추출한 myrosinase의 정제 및 효소학적 특성

심기환 · 강갑석* · 서권일

경상대학교 식품공학과, *부산전문대학 식품가공과

초록 : 무에서 DEAE Bio-Gel, Con-A 및 Superose-6 칼럼을 이용하여 myrosinase를 정제하고 그 효소학적 특성을 검토한 결과 myrosinase(II)는 2개의 subunits를 가졌으며, 이들의 분자량은 SDS-GAGE상에서 각각 53 및 39 KD였다. 정제된 무효소의 비활성도는 37,500 units/mg이었으며, 정제도는 44배였다. 최적 활성 pH는 phosphate 및 Tris-HCl 완충액에서 6.5~7.0이었으며, pH 7.0에서 그 효소활성이 가장 안정하였다. 활성 최적온도는 37~38°C였고, 열안정성은 30°C 이하였다. 무 myrosinase에 대한 무기염의 영향은 구리 및 수은 이온은 효소활성을 매우 저해하며, ascorbic acid의 농도별 영향은 1 mM일 때 최대활성을 나타내었다. Ascorbic acid analogue에 대한 활성은 dehydroascorbic acid에 대해서는 거의 없었으며, 나머지 analogue들도 ascorbic acid보다 상당히 활성이 낮았다. 무 myrosinase에 대한 환원제의 영향은 2-mercaptoethanol과 dithiothreitol에 의해서는 활성을 나타내지 않았으나, 이들을 ascorbic acid 등 2-mercaptoethanol과 함께 첨가하면 활성을 나타내었다(1992년 12월 14일 접수, 1993년 3월 19일 수리).

Myrosinase(Thioglucoside glucohydrolase, EC 3.2.3.1)는 식물체 중의 S-glycosidic 결합을 끊는 효소로써 glucosinolate를 가수분해하여, 이로 인하여 생성된 aglycone은 불안정하므로 Lossen rearrangement¹⁾를 일으켜 isothiocyanate와 nitriles, thiocyanate, oxazolidine-2-thiones, hydroxynitrile 및 epithionitrile 등을 생성하고, 이들의 생성은 근본적으로 glucosinolate 구조, 효소와 작용하는 물질 및 기타 인자에 달려있다고 보고되고 있으며,²⁾ 최근에는 myrosinase가 indole기를 함유한 glucosinolate를 분해하여 항암효과를 갖는 indoleacetonitrile과 indolemethanol 등을 생성한다고 보고되고 있다.³⁾ 이 myrosinase는 glucosinolate를 가진 식물체의 잎, 줄기 및 뿌리에 존재하며, 특히 유세포 조직의 이형세포(myrosin cell)에 많이 존재하는데, 곱팡이,⁴⁾ 세균⁵⁾ 및 포유류⁶⁾ 등에서도 존재가 확인되었다. 한편 겨자 및 고추냉이의 myrosinase에 관한 연구는 많이 진행되어 왔으나 무 myrosinase에 대한 연구는 Wilkinson 등⁷⁾과 이 등⁸⁾의 연구에 불과하다. 따라서 우리나라의 대표적 십자화과 채소인 무로부터 myrosinase를 추출 정제하고 그 효소학적 특성에 대한 연구 결과를 보고하고자 한다.

효소의 조제

본 실험에 사용한 무(*Raphanus sativus* L.)는 진주 중앙시장에서 구입하여 껍질부위만 700g을 취하여 10 mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충액 150 ml(4°C)를 넣고 waring blender로 마쇄하여 원심분리(8,000 rpm, 30 min, 4°C)한 상침액을 황산암모늄 60% 포화시켜 침전물을 효소 정제에 사용하였다.

효소의 활성 측정

Sinigrin을 myrosinase의 기질로 사용하였으며, 효소의 활성은 유리당을 측정하는 Summer's dinitrosalicylic acid법⁹⁾을 변형하여 사용하였다. 즉 효소액 100 μ l, 10 mM L-ascorbic acid 100 μ l, 3.4 mM sinigrin 100 μ l 및 60 mM 인산완충액 100 μ l를 각각 넣고 증류수로 최종 부피를 1 ml로 조절하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 끓는 물에서 5분간 방치시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구와 흡광도와의 차이를 효소의 활성으로 환산하였고, 효소활성도 1 unit는 반응시간 1분당 1 nmole의 기질을 가수분해시키는 양으로 정의하였다.

단백질 농도 측정

단백질의 정량은 Bio-Rad 단백질 정량법¹⁰⁾에 준하여

재료 및 방법

Key words : Radish myrosinase, purification enzymatic properties
Corresponding author : K.-H. Shim

측정하였다. 즉 Bradford 시약 0.4 ml, 증류수 1.6 ml에 시료를 넣어 혼합한 뒤 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 값은 bovine serum albumin으로 작성한 표준 단백질 정량곡선을 이용하여 단백질의 농도를 결정하였다.

효소의 정제

상기의 무 조효소를 10 mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충액으로 녹여 동일 완충액으로 하룻밤 투석하고, 원심분리(15,000 rpm, 30 min, 4°C)한 후 DEAE Bio-Gel, Concanavalin-A(Con-A) 및 Fast performance liquid chromatography(FPLC) Superose-6 칼럼을 단계별로 이용하여 정제하였다.

즉 무 조효소를 평형화된 DEAE Bio-Gel 칼럼에 주입하여 동일 완충액으로 세척한 후 0~500 mM 염화나트륨으로 linear gradient하여 용출하였다. 이중 활성이 나타난 분획을 모아 농축한 후 Palmieri 등¹²⁾의 방법으로 Con-A 완충액(20 mM Tris-HCl, 1 mM MnCl₂·4H₂O, 500 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7.0)에 하룻밤 투석한 후 Con-A 완충액으로 평형화된 Con-A 칼럼에 시료를 주입하여 동일 완충액으로 세척하고 0.25 M methyl- α -D-glucopyranoside로 용출하였다. 이중 활성을 나타낸 분획을 10 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액으로 투석하여 Superose-6 칼럼으로 gel filtration하여(Table 1) 효소의 활성을 나타낸 분획을 정제된 효소로 사용하였다.

분자량 측정

Laemmli의 방법¹³⁾에 따라 12% SDS-polyacrylamide gel에 정제된 효소를 점적한 후 전기영동을 수행하였다. 표준단백질은 rabbit muscle phosphorylase B(97.4 KD), bovine serum albumin(66.2 KD), hen egg albumin(42.7 KD), bovine carbonic anhydrase(31.0 KD) 및 soybean trypsin inhibitor(21.9 KD)을 사용하였고, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 단백질을 염색하였다.

Table 1. The operating conditions of FPLC for radish purification

Item	Conditions
Instrument	FPLC 500 PLUS
Column	Gel filtration (Superose-6)
Elution	10 mM Tris-HCl, pH 7.0
Flow rate	0.2 ml/min
Fraction	1 ml/tube
Pressure	1 M Pa
Detector	UV absorbance at 280 nm
Chart speed	0.5 cm/min

최적 pH 및 pH 안정성

효소활성의 최적 pH 및 pH 안정성은 10 mM acetate 완충액(pH 4.0~6.0), 10 mM phosphate 완충액(pH 6.0~7.0) 및 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0~11.0)으로 기질 용액의 pH를 변화시켜 조제한 후 각 pH별 효소의 활성을 측정하였으며, pH 안정성은 최적 완충액으로 pH 3.0~11.0까지 변화시켜 측정하였다.

최적 온도 및 열 안정성

효소활성의 최적 온도는 효소의 최적 pH 7.0으로 조절한 후 30~80°C까지의 온도에서 10분간 반응시켜 각 온도별 효소활성을 측정하였으며, 열 안정성은 30~80°C까지 구간에서 20분간 방치하여 효소활성을 측정하였다.

금속이온의 영향

효소활성에 대한 금속이온의 영향을 측정하기 위하여 기질용액을 효소의 최적 pH 7.0으로 조절하고 각종 금속을 첨가한 후 38°C에서 20분간 반응시켜 효소의 활성을 측정하였다. 최종농도를 1 mM로 조정하고 대조구를 기준으로 상대활성을 측정하였다.

Ascorbic acid 농도의 영향

L-Ascorbic acid의 농도에 따른 효소 활성은 L-ascorbic acid의 최종농도를 0.0~5.0 mM로 조정하여 myrosinase에 대한 상대활성을 측정하였다.

Ascorbic acid의 analogue에 대한 영향

효소의 활성에 대한 ascorbic acid의 analogue의 영향은 각각의 최종 농도를 1 mM로 되게 조정하고 상대활성을 측정하였다.

환원제의 영향

환원제 농도에 따른 효소활성에 대한 영향은 최종농도를 1 mM로 조정하고 L-ascorbic acid, 2-mercaptoethanol 및 dithiothreitol과의 상대활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

DEAE Bio-Gel column chromatography에 의한 효소의 정제

무 조효소 200 ml에 황산암모늄으로 60% 포화시킨 침전물을 10 mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충액으로 녹인 후 동일 완충액으로 하룻밤 투석하여 원심분리(15,000 rpm, 30 min, 4°C)한 상정액 90 ml을 평형화된 DEAE Bio-Gel

칼럼에 주입하여 동일 완충액 400 ml로 세척한 후 0~500 mM 염화나트륨으로 linear gradient하여 용출한 결

과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 #59~69 및 #70~79의 분획이 각각 myrosinase의 활성이 나타났다. 이때의 비활성도는 2,400 units/mg으로 약 2.83배였다(Table 2).

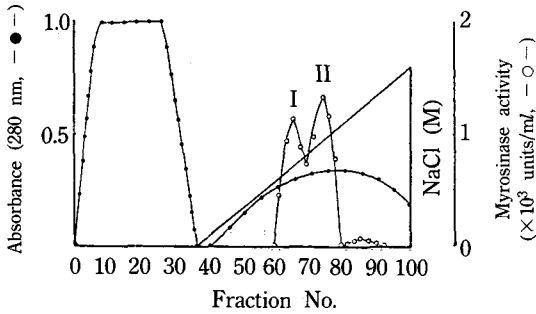


Fig. 1. DEAE Bio-Gel column chromatography of crude enzyme from radish. Elution was carried out with a linear gradient (0 to 0.5 M) NaCl in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). Column size, 5×20 cm; Flow rate, 5 ml/min; Fraction, 5 ml/tube.

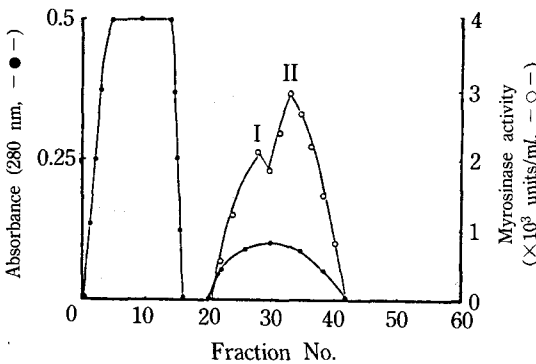


Fig. 2. Affinity chromatography of DEAE Bio-Gel fraction (I and II) on Concanavalin A column. Elution was carried out with 0.25 M methyl- α -D-glucopyranoside in Concanavalin A buffer (pH 7.0). Column size, 2.5×10 cm; Flow rate, 1 ml/min; Fraction, 1 ml/tube.

Con-A column chromatography에 의한 효소의 정제

DEAE Bio-Gel 칼럼 통과시의 활성분획을 모아 농축한 후 Con-A 완충액에 하룻밤 투석하여 Con-A 완충액으로 평형화된 Con-A 칼럼에 주입하였다. 이를 동일 완충액 120 ml로 세척하여 0.25 M methyl- α -D-glucopyranoside 로 용출한 결과(Fig. 2) #20~40의 분획이 활성을 나타내었으며, 비활성도는 20,700 units/mg으로 약 24.5배의 정제도를 나타내었다(Table 2).

FPLC Superose-6 column chromatography에 의한 효소의 정제

Con-A 칼럼 통과시의 활성분획을 모아 농축한 후 FPLC Superose-6 칼럼으로 gel filtration하여 I과 II 2개의 isoenzyme을 확인하였으며(Fig. 3), 이때 이들 각각

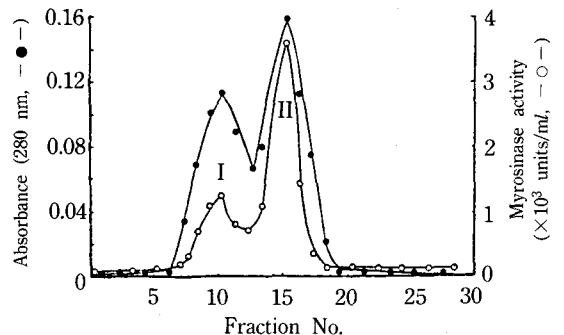


Fig. 3. Gel filtration by fast performance liquid chromatography of Concanavalin-A fraction on Superose-6 column. Elution was carried out with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0).

Table 2. Purification of myrosinase from radish

Steps	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)
Crude extract	200	130	110,000	846	1
40~60% (NH ₄) ₂ SO ₄	90	100	95,000	950	1.10
Dialysis	90	95	92,000	968	1.14
DEAE Bio-Gel	25	18.8	45,000	2,400	2.83
Concanavalin-A	0.5	1.5	31,000	20,700	24.50
FPLC(Superose 6)					
Myrosinase(I)	4.0	0.33	8,000	24,200	28.0
Myrosinase(II)	4.0	0.40	15,000	37,500	44.0

의 비활성도는 24,200과 37,500 units/mg으로 약 28 및 44배의 정제도를 나타내었으며(Table 2), 이중 정제도가 높은 효소(II)를 모아 효소학적 특성을 구명하였다.

정제 효소의 분자량

무 myrosinase(II)는 native PAGE상에서 단일밴드를

나타내었으며, SDS-PAGE pattern을 확인한 결과 두개의 subunit를 가지며 그 분자량은 표준분자량과 비교하여 각각 53과 39 KD이었다(Fig. 4).

Ohtsuru 등¹⁴⁾은 겨자(mustard powder)에서 myrosinase 활성을 가지는 4종류(F-IA, F-IB, F-IIA 및 F-IIB)를 분리하여 분자량 153 KD인 F-IA, F-IB 및 F-IIA와 분자량 30 KD인 F-IIB를 확인하여 각각 4개의 subunit임을 보고하였다. Björkman¹⁵⁾은 겨자씨(*Sinapis alba*, L.)에서 3종류의 isoenzyme을 분리하여 분자량 151 KD인 2개의 subunit(65 KD)를 보고하였다. Lonnerdal 등¹⁶⁾은 평지씨(*Brassica napus* L.)에서 3종류의 isoenzyme을 분리하여

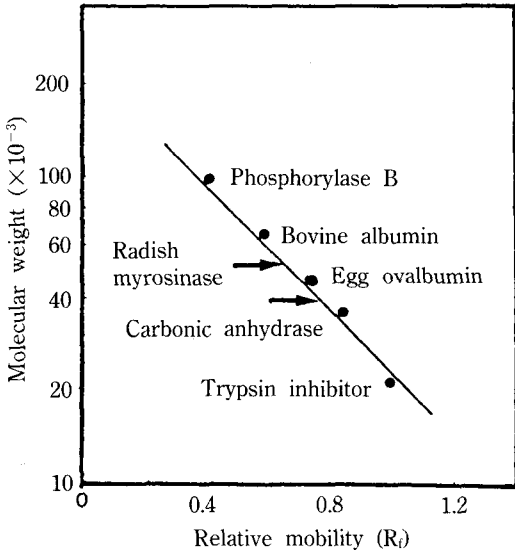


Fig. 4. Calibration curve typically obtained with proteins from the MW-SDS Kit (12% gels).

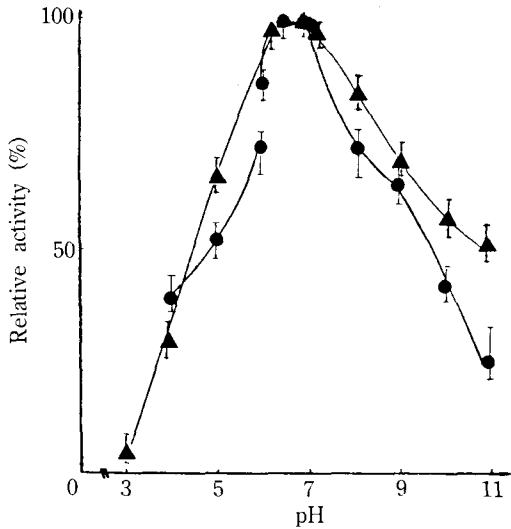


Fig. 5. Effect of pH on the activity (●) and stability (▲) of the purified myrosinase from radish. pH 4.0~6.0 (10 mM acetate buffer), pH 6.0~7.0 (10 mM phosphate buffer), pH 7.0~11.0 (10 mM Tris-HCl buffer).

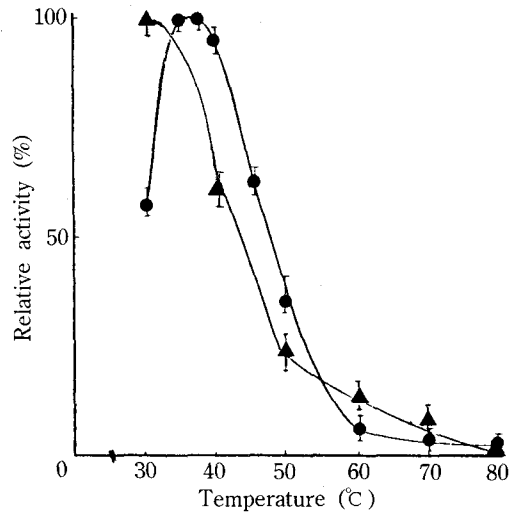


Fig. 6. Effect of temperature on the activity (●) and thermal stability (▲) of purified myrosinase from radish.

Table 3. Effect of inorganic salts on activity of myrosinase from radish

Inorganic salts	Conc.(mM)	Relative activity (%)
Control	1	100
CaCl ₂	1	115
CoCl ₂	1	121
SnCl ₂	1	110
NiCl ₂	1	100
MgCl ₂	1	108
ZnCl ₂	1	109
CuCl ₂	1	0
HgCl ₂	1	30
KCl	1	113
NaCl	1	114

분자량 135 KD로써 2개의 subunit(65 KD)로 구성됨을 확인하였으며, Tani 등¹⁷⁾은 *Enterobacter cloacae*에서 myrosinase를 분리하여 61 KD임을 보고하였다. Ohtsuru 등¹⁸⁾은 *Aspergillus niger* 및 *Asp. sydowi*에서 myrosinase를 분리하여 각각의 분자량은 90 KD 및 120 KD임을 보고하였다.

최적 pH 및 pH 안정성

정제된 무 myrosinase의 최적 pH를 조사하기 위하여 10 mM acetate 완충액은 pH 4.0~5.5, 10 mM phosphate 완충액은 pH 6.9~7.0 및 10 mM Tris-HCl 완충액은 pH 7.0~11.0으로 기질용액의 pH를 변화시켜 조제한 후 각 pH별 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 무효소액은 phosphate 및 Tris-HCl 완충액의 pH 7.0에서 최적을 나타내었다. 이와 같은 결과를 토대로 기질용액을 Tris-HCl 완충액으로 pH 3.0~11.0까지 변화시켜 무효소의 pH 안정성을 측정한 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 pH 6.5~7.0에서 가장 안정하였다. Ohtsuru 등¹⁹⁾은 *Wasabi japonica*의 myrosinase 최적 pH는 6.5~7.0, pH 안정성은 7.0이라고 보고하였으며, Tani 등¹⁷⁾은 *Enterobacter cloacae*의 myrosinase 최적 pH는 6.8~7.0, pH 안정성은 5.0~7.0이라고 보고하였다. 또한 김 등⁸⁾은 무 myrosinase에 대한 최적 pH는 6.5이었다고 보고하였고, Björkman 등²⁰⁾은 겨자씨의 myrosinase 최적 pH는 4.0~7.0로 완만하게 나타났는데, 이러한 차이는 반응물의 조건 즉 농도, 이온강도, 반응액의 종류, 온도 및 기질 등에 기인한다고 추측된다.

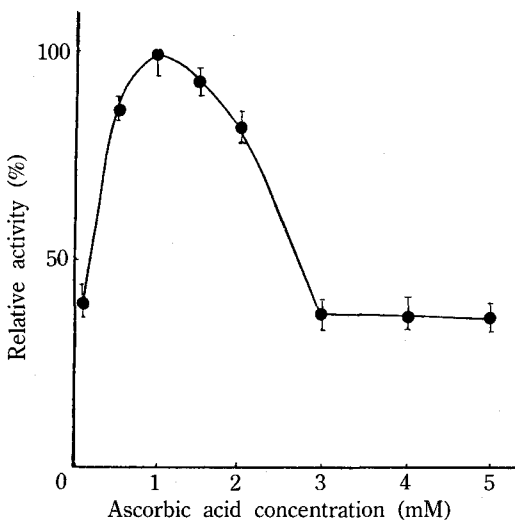


Fig. 7. Effect of ascorbic acid concentration on activity of purified myrosinase from radish.

최적 온도 및 열 안정성

각 온도에서 무 myrosinase의 최적 온도 및 열 안정성을 측정한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 무의 효소액에 대한 최적 온도는 37~38°C 였으며, 30°C 이하에서는 안정하였다.

Ohtsuru 등¹⁹⁾은 *Wasabi japonica*의 myrosinase 최적 온도는 37°C, 열 안정성은 30°C 이하라고 보고하였으며, Tani 등¹⁷⁾은 *Enterobacter cloacae*의 myrosinase는 40°C 이하에서 열에 안정하였다고 보고하였다. Björkman²¹⁾은 겨자씨의 myrosinase는 60~65°C 까지는 활성이 증가하나 그 이상의 온도에서는 변성이 시작된다고 보고하였으며, 김 등⁸⁾은 무 myrosinase는 37°C 에서 최대 활성을 나타내었다고 보고하였다.

무기염의 영향

무 myrosinase에 대한 무기염의 영향은 Table 3에서 보는 바와 같이 칼슘, 코발트, 칼륨 및 나트륨 이온은 상대활성이 대조구에 비해 높게 나타났으며, 수은 및 구리 이온은 효소활성을 크게 저해하는 것으로 나타났다. Ohtsuru 등¹⁹⁾은 *Wasabi japonica*에서 칼슘, 코발트 및 망간 이온 첨가시 myrosinase 활성이 높았으나 구리 및 수은 이온은 myrosinase 활성을 강력히 저해한다고 보고하였으며, Tani 등¹⁷⁾은 *Enterobacter cloacae*에서 칼슘, 코발트 및 망간 이온 등은 myrosinase 활성을 약간 저해하였으나 칼슘, 수은 및 철 이온은 myrosinase 활성을 크게 저해한다고 보고하였다.

Table 4. Effect of the analogues of ascorbic acid on activation of myrosinase from radish

Analogues(1 mM)	Relative activity(%)
None	10
L-Ascorbic acid	100
Ascorbyl-stearate	30
Ascorbyl-palmitate	36
D-Isoascorbic acid	46
Dehydroascorbic acid	0

Table 5. Effect of reducing reagents on activation of myrosinase from radish

Reducing reagents(1 mM)	Relative activity(%)
L-Ascorbic acid(ASA)	100
2-Mercaptoethanol	0
Dithiothreitol	12
ASA + 2-Mercaptoethanol	104
ASA + Dithiothreitol	93

Ascorbic acid의 영향

무 myrosinase에 대한 ascorbic acid의 농도별 영향은 Fig. 7과 같다. 무효소는 모두 L-ascorbic acid를 효소 반응시 첨가 유무에 따라 상당한 효소활성 차이를 보였고, ascorbic acid의 최종농도가 1 mM에서 최대 활성을 나타내었는데, 이는 ascorbic acid가 3 mM 이상일 때는 효소와 경쟁적 저해를 한다는 Tsuruo²²⁾의 보고와 관련이 있다는 것으로 생각된다. Ohtsuru 등²³⁾은 *Wasabi japonica*는 2 mM ascorbic acid에서 최대 활성을 나타내었고, Tani 등¹⁷⁾은 *Enterobacter cloacae*에서는 식물 myrosinase와는 달리 L-ascorbic acid가 myrosinase 활성을 저해한다고 보고하였다. Henderson 등²⁴⁾은 여러 종류의 십자화과 채소에서의 ascorbic acid의 영향을 보고하였으며, Phelan 등²⁵⁾은 *Sinapis alba* L.에서 isoenzyme에 따라 L-ascorbic acid의 활성이 다르다고 보고하였고, Björkman²⁶⁾은 *Sinapis alba* L. 및 *Brassica napus*에서 L-ascorbic acid의 농도가 0.7 mM이었을 때 myrosinase 활성이 최대였으나 5~10 mM에서는 활성이 나타나지 않았다고 보고하였으며, Ohtsuru²⁶⁾는 myrosinase의 active site에 L-ascorbic acid가 특이적으로 작용한다고 보고하였다.

Ascorbic acid의 analogue에 대한 영향

무 myrosinase에 대한 ascorbic acid의 analogue에 대한 영향은 Table 4에서 보는 바와 같이 모든 analogue들이 ascorbic acid의 첨가시보다 활성이 낮았으며, dehydroascorbic acid의 첨가시는 myrosinase의 활성이 전혀 나타나지 않았다. Ohtsuru 등¹⁹⁾은 *Wasabia japonica* myrosinase가 dehydroascorbic acid에 의해 강력히 저해됨을 보고하였다.

환원제의 영향

무 myrosinase에 대한 환원제의 영향은 Table 5에서 보는 바와 같이 L-ascorbic acid의 활성을 100으로 보았을 때 2-mercaptoethanol 및 dithiothreitol의 첨가시 무 효소의 활성이 낮았으나, ascorbic acid와 2-mercaptoethanol을 혼합한 결과는 ascorbic acid 첨가시보다 오히려 myrosinase 활성이 높았으며, ascorbic acid와 dithiothreitol을 혼합한 측정치는 ascorbic acid 첨가시보다는 약간 낮게 나타났다. Ohtsuru 등¹⁹⁾은 *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 등¹⁷⁾은 *Enterobacter cloacae*의 myrosinase는 dithiothreitol 및 2-mercaptoethanol 첨가시 myrosinase의 활성이 L-ascorbic acid 첨가시보다 오히려 높았다고 보고하였으며, Ohtsuru 등¹⁹⁾은 L-ascorbic acid + 2-mercaptoethanol 첨가시 myrosinase 활성이 높게 나타났으며, 이는 환원시약이 ascorbic acid의 산화를 막기 때문이라고 보고하였다.

감사의 글

본 연구는 1990년도 한국학술진흥재단의 연구비 지원에 의하여 수행된 과제의 일부이며 관계당국에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Ettlinger, M. G. and Lundeen, A. J.: J. Am. Chem. Soc., 79 : 1764(1957)
- Fenwick, G. R. and Mullin, W. J.: Food Sci. and Nutrition, 18 : 123(1982)
- Slominski, B. A. and Campbell, L. D.: J. Agric. Food Chem., 37 : 1297(1989)
- Reese, E. T., Clapp, R. C. and Mandels, M.: Arch. Biochem. Biophys., 75 : 228(1958)
- Oginsky, E. L., Stein, A. E. and Greer, M. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119 : 360(1965)
- Goodman, I., et al.: Science, 130 : 450(1959)
- Wilkinson, A. P., Rhoades, M. J. C. and Fenwick, G. R.: J. Sci. Food Agric., 35 : 543(1984)
- 김미리, 이혜수: 한국식품과학회지, 21 : 136(1989)
- Summer, J. B.: J. Biol. Chem., 65 : 393(1925)
- Bradford, M. M.: Anal. Biochem., 72 : 248(1976)
- Bio Rad Protein Assay: Bio Rad Laboratories Instruction Manual(1990)
- Palmieri, S., Lori, R. and Leoni, O. : J. Agric. food chem., 34 : 138(1986)
- Laemmli, V. K.: Nature, 227: 680(1970)
- Ohtsuru, M. and Hata, T.: Agr. Biol. Chem., 36(13) : 2495(1972)
- Björkman, R. and Janson, J. C.: Biochim. Biophys. Acta., 276 : 508(1972)
- Lonnerdal, B. and Janson, J. C.: Biochem. Biophys. Acta., 315 : 424(1973)
- Tani, N., Ohtsuru, M. and Hata, T.: Agr. Biol. Chem., 39(9) : 1623(1974)
- Ohtsuru, M., Tsuru, I. and Hata, T.: Agr. Biol. Chem., 33 : 1309(1969)
- Ohtsuru, M. and Kawatani, H.: Agric. Biol. Chem.,

- 43 : 2249(1979)
20. Björkman, R. and Lonnerdal, B.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 327 : 121(1973)
21. Björkman, R.: *Biology and chemistry of criiferae*, 191(1976)
22. Tsuruo, L., Yosida, M. and Hata, T.: *Agr. Biol. Chem.*, 31(1) : 18(1967)
23. Ohtsuru, m. and Hata, T.: *Agr. Biol. Chem.*, 37(8) : 1971(1973)
24. Henderson, H. M. and McEwen, T. J.: *Phytochemistry*, 11 : 3217(1972)
25. Phelan, J. R. and Vaughan, J. G.: *Botany*, 31 : 1425 (1980)
26. Ohtsuru, M. and Hata, T.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 567 : 384(1979)

Purification and enzymatic characteristics of myrosinase from radish

Ki-Hwan Shim, Kap-Suk Kang*, Kwon-Il Seo (Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, Korea, *Department of Food Processing, Pusan Junior College, Pusan, 616-092, Korea)

Abstract : Myrosinase from radish was purified by DEAE Bio-Gel, Con-A, and Superose-6 column. The purified myrosinase(II) possessed 2 subunits, and their molecular as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis were 53 and 39 KD, respectively. The specific activity of purified enzyme was 37,500 units/mg. The enzyme was purified approximately 44-fold compared to the crude enzyme. Optimum pH of the myrosinase was 6.5~7.0 in phosphate and Tris-HCl buffer solutions. Optimum temperature of the enzyme was 37~38°C. The enzyme was stable at pH 7.0, and less than 30°C. Cu or Hg ion significantly inhibited the enzyme activity, but ascorbic acid enhanced, resulting in a maximum activity by 1 mM ascorbic acid. Among the ascorbic acid analogues, dehydroascorbic acid did not affect, whereas others showed a little effect, but less than ascorbic acid itself. Individual 2-mercaptoethanol and dithiothreitol (reducing agents) did not enhance the enzyme activity, but 2-mercaptoethanol effect was enhanced when mixed with ascorbic acid.