

돌산갓의 Myrosinase 분리 정제 및 갓김치 숙성 중 Myrosinase 활성도의 변화*

박정로 · 박석규 · 조영숙 · 전순실
순천대학교 자연과학대학 식품영양학과
(1994년 4월 8일 접수)

Purification and Characterization of Myrosinase in Dolsan Leaf Mustard(*Brassica juncea*) and Changes in Myrosinase Activity during Fermentation of Leaf Mustard Kimchi

Jeong Ro Park, Seok Kyu Park, Young Sook Cho and Soon Sil Chun
Department of Food and Nutrition, College of Natural Sciences
Suncheon National University
(Received April 8, 1994)

Abstract

Myrosinase in leaf mustard was purified and characterized to furnish a grounding information for utilizing the pungent taste and the potential antimicrobial capability of Dolsan leaf mustard to enhance the taste and storage life of kimchi. When myrosinase was purified from leaf mustard through a series of DEAE Sephadex, chromatofocusing and Con A Sepharose column chromatography, specific activity of the enzyme increased 7107-fold compared with that of crude enzyme preparation, and 18.8% yield was obtained. The purified myrosinase showed the optimum pH of 5.9, isoelectric point of 4.6, molecular weight of 129 kD, Km of 0.206 mM, and Vmax of $2.039 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$, respectively. The optimum concentration of L-ascorbic for the maximum activity of the enzyme was 0.6 mM, and the enzyme activity decreased at a higher concentration of L-ascorbic acid than 0.6 mM, showing almost no enzyme activity at a L-ascorbic acid concentration of higher than 2.0 mM. Myrosinase activity in leaf mustard kimchi immediately after the kimchi was formulated was shown to be about 70 nmol/min/mg protein which decreased rapidly after 3 days of storage at 20°C, showing that less than half and almost none of the enzyme activity was retained in 4 and 10 days of storage, respectively.

I. 서 론

갓(leaf mustard, *Brassica juncea*) 십자화과 경엽채소류 중의 하나로 영양발효시켜 김치로 식용하며, 그 씨(겨자, mustard seed)는 신미성 향신료로서 널리 사용되고 있다. 갓은 중국이 원산지이지만 현재는 한국과 일본 등에서 널리 재배되고 있으며, 국내에서는 지역적인 독특한 기후, 토양조건 등으로 전라남도 여천군 돌산지방에서 갓김치 제조용으로 오래 전부터 많이 재배되어 오고 있다. 갓김치는 갓 특유의 향미와 매운

맛을 가지고 있을 뿐만 아니라 장기간 저장중에도 비교적 쉽게 연화되지 않아 조직감을 유지하며 색소 안정성이 우수하여 다른 경엽채소류 김치에 비하여 유통상품으로서의 가치가 높은 식품으로 더욱 개발이 기대된다.

갓의 독특한 자극성 매운 맛은 겨자나 와사비의 주요 휘발성 매운 맛 성분인 allyl isothiocyanate¹⁾에 주로 기인하는 것으로 이는 갓에 함유되어 있는 glucosinolate류의 일종인 sinigrin에 효소 myrosinase(thioglucoside glucohydrolase, EC 3.2.3.1)가 작용하여 생성

*본 논문은 1992년도 한국학술진흥재단 자유공모 연구과제 결과의 일부임.

된다²⁾. 한편 겨자에서 분리 추출된 allyl isothiocyanate는 각종 박테리아, 효모, 곰팡이에 대해 항균력을 나타내는 것으로 최근 밝혀졌다³⁾. 그러므로 갓김치가 다른 경엽채소류 김치에 비해 저장성이 뛰어난 것은 갓김치 숙성 중에 갓에 함유되어 있는 glucosinolate에 myrosinase가 작용하여 생성된 allyl isothiocyanate 등의 휘발성 함유성분과 그 관련물질들이 갓김치 숙성 중에 젖산균 등 미생물균에 항균작용을 갖게 되어 김치발효를 지연시켜 김치의 조기산패를 방지하는 때문이라 추정된다.

따라서 본 연구에서는 갓의 독특한 향미와 잠재된 항균성을 갓김치를 비롯한 다른 김치류의 맛과 저장성 향상에 이용하기 위한 기초자료로서 갓의 myrosinase를 분리 정제하여 그 특성을 밝히고, 갓김치 숙성 중 myrosinase 활성도 변화를 측정하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 갓은 전라남도 여천군 돌산면에서 재배된 돌산갓(leaf mustard, *Brassica juncea*)을 구입하여 사용하였다. Myrosinase의 분리·정제에 사용된 DEAE Sephadex A-50, PBE 94, Polybuffer 74, Con A Sepharose, Sephacryl S-200 HR 등은 Pharmacia LKB(Uppsala, Sweden) 제품을 사용하였고 그 외의 시약들은 Sigma(St. Louis, MO, USA) 및 純正化學(주) 제품으로서 특급시약을 사용하였다.

2. 조효소 추출

신선한 갓을 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.0(1 : 1, w/v)에 homogenizer로 150×1,000 rpm에 90 sec 마쇄한 후 gauze로 여과한 액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액은 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.0에 6시간 이상 투석시켜 원심분리(1,000×g, 10 min)한 후 상층액을 Whatman No.1 filter paper에 여과하여 DEAE Sephadex A-50 anion exchange column chromatography로 부분 정제하였다.

3. DEAE Sephadex A-50 anion exchange column chromatography

DEAE Sephadex A-50 resin(Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden)을 glass column(3.7×10 cm)에 packing하여 bed volume의 10배 이상의 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 포화 평형시킨 후 조효소액을 주입하였다. 조효소액 주입 후 column은 동일 buffer로 충분히 씻어낸 다음 0.2 M NaCl을 함유한 0.01 M so-

dium phosphate buffer로 시간당 75 ml/씩 용출시켰다. 용출액은 fraction collector를 사용하여 tube당 3 ml/씩 수집하여 280 nm에서의 흡광도로써 단백질의 양을 측정 후 효소활성을 측정하였다.

4. Chromatofocusing

DEAE Sephadex column chromatography에서 효소 활성이 있는 분획은 chromatofocusing 방법으로 더욱 정제함과 동시에 효소단백질의 등전점을 측정하였다. 이때 효소액은 starting buffer(0.025 M histidine-HCl, pH 6.0)에 투석한 후 chromatofocusing column에 주입시켰다. 효소액을 주입하기 전 column(0.9×10 cm)은 PBE 94 resin(Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden)으로 충전시킨 후 위의 starting buffer로 포화 평형시켰다. 효소액 주입 후 column은 Polybuffer 74(pH 4.0, 1 : 8 dilution)를 유속 25 cm/hr로 통과시켜 3 ml/씩 분획 용출하였고, 여기서 얻어진 용출액은 pH 및 단백질을 측정된 다음 효소활성을 측정하였다.

5. Concanavalin A Sepharose affinity chromatography

Chromatofocusing에서 효소활성 분획을 모아 0.5 M NaCl을 함유한 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)로 투석시킨 후 Concanavalin A Sepharose column에 주입시켰다. 효소액을 주입하기 전 column(0.9×10 cm)은 Con A Sepharose resin(Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden)으로 충전시킨 후 위의 투석 buffer로 포화 평형시켰다. 효소액 주입 후 column은 동일 buffer로 충분히 씻어낸 다음 0.25 M mannose를 함유한 투석 buffer로 유속 1 cm/min으로 3 ml/씩 분획 용출하였고, 여기서 얻어진 용출액은 280 nm에서의 흡광도로써 단백질을 측정된 다음 효소활성을 측정하였다.

6. Myrosinase의 활성도 측정

Myrosinase의 활성은 sinigrin을 기질로 사용하여 37 °C에서 기질의 감소되는 양을 227 nm에서의 흡광도의 변화로 측정하였다(sinigrin의 extinction coefficient = 6950 M⁻¹cm⁻¹)³⁾. 이때 효소반응 조건은 31 mM sodium phosphate buffer(pH 5.9) 2.0 ml, 60 mM ascorbic acid 20 μl, 34 mM sinigrin 20 μl, 효소액 10 μl이었고 대표적인 흡광도 변화곡선은 Fig. 1과 같다.

7. Myrosinase의 분자량 측정

정제한 myrosinase의 분자량은 gel filtration chromatography 방법으로 결정하였다. Concanavalin A Sepharose column chromatography 결과 효소활성 분획

은 0.15 M NaCl을 함유한 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 투석시킨 후 Sephacryl S-200 HR column에 주입시켰다. 효소액을 주입하기 전 column(0.9 × 100 cm)은 Sephacryl S-200 HR resin(Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden)으로 충전시킨 후 위의 투석 buffer로 포화 평형시켰다. 효소액 주입 후 column은 동일 buffer로 유속 0.1 cm/min으로 1 ml/씩 분획 용출하였고, 여기서 얻어진 용출액은 280 nm에서의 흡광도로써 단백질을 측정한다 다음 효소활성을 측정하였다. Void volume은 Blue Dextran으로 측정하였으며, 분자량은 alcohol dehydrogenase(mw 150 k), bovine serum albumin(mw 66 k), carbonic anhydrase(mw 29 k) (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA) 등 분자량이 알려진 표준 단백질을 같은 방법으로 column에 용출시킨 후 각각의 분자량에 따른 retention time을 semi-log 그래프에 그린 다음 효소의 retention time과 비교하여 결정하였다.

8. 갓김치 제조와 숙성 중 myrosinase 활성 측정

갓을 10% NaCl 용액에 3시간 절인 후 깨끗이 씻어 마늘 2%, 생강 1%, 고추가루 2%와 잘 혼합하여 plastic 용기에 담아 20°C의 물을 채운 vinyl bag을 상부에 눌러 공기와의 접촉을 방지하였다. 갓김치의 저장 중 myrosinase 활성 변화는 갓김치를 담근 후 20°C에 보관하면서 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20일에 각각 측정하였다. 갓김치는 증류수로 간단히 행구어 부재료를

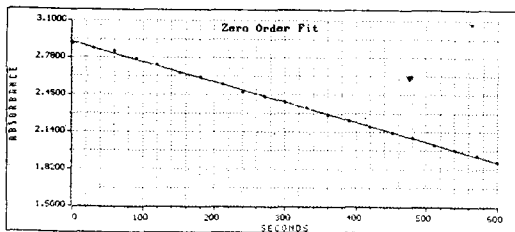


Fig. 1. A typical spectrophotogram for determination of myrosinase activity.

씻어낸 후 고형물 100 g을 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 100 ml에 homogenizer로 마쇄한(150 × 1,000 rpm, 90 sec) 후 gauze로 여과하여 여과액의 단백질 함량과⁴⁾ myrosinase 활성을 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Myrosinase의 분리 및 정제

돌산갓에 함유되어 있는 myrosinase를 anion exchange chromatography, chromatofocusing, affinity chromatography 등의 방법에 의해 정제한 결과는 Table 1과 Fig. 2-4와 같다. Crude enzyme를 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 투석시킨 후 원심분리한 결과 효소의 손실은 거의 없고 2.1배의 정제 효과가 있었다. 투석 후 효소액을 DEAE Sephadex A-50 음이온교환 수지에 흡착시킨 후 0.2 M NaCl로 용출시킨 결과 Fig. 2에서와 같이 tube 76에서 101번까지 효소활성을 보였으며 이들 분획의 비활성도(specific activity)는 4.79 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein으로 crude enzyme보다 73.7배의 정제도를 보였다. Ohtsuru와 Hata⁵⁾에 의하면 겨자에서 myrosinase를 정제하는 과정에서 DEAE Sephadex A-50 chromatography 결과 2개의 다른 peak로 myrosinase 활성을 보였지만 본 실험에서 갓의 myrosinase는

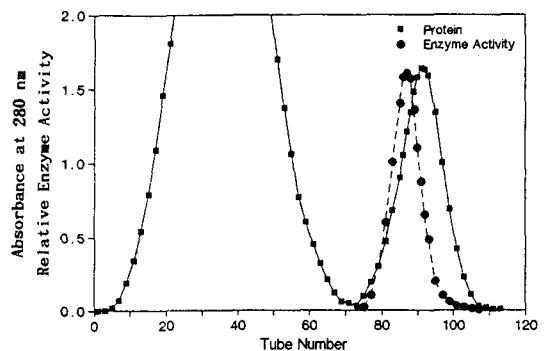


Fig. 2. Column chromatography on DEAE Sephadex A-50.

Table 1. Purification table of myrosinase from leaf mustard

Steps	Total activity ¹	Specific activity ²	Fold purification	Yield (%)
Crude enzyme	259.5	0.07	1.0	100
Dialysis	247.9	0.14	2.1	95.5
DEAE Sephadex A-50	239.6	4.79	73.7	92.3
Chromatofocusing	135.5	19.51	300.0	52.2
Con A Sepharose	48.7	462.32	7,107.3	18.8

¹ μmol s of sinigrin hydrolyzed/min, ² μmol s of sinigrin hydrolyzed/min/mg protein

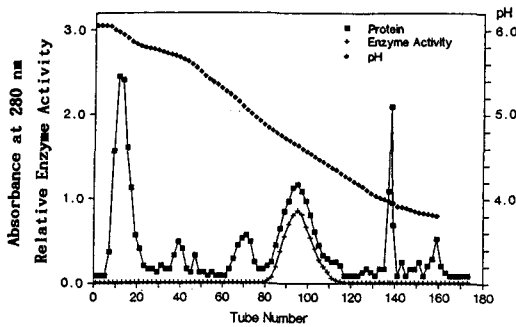


Fig. 3. Chromatofocusing on PBE 94.

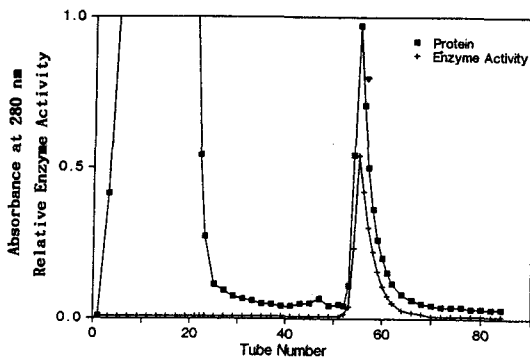


Fig. 4. Column chromatography on Concanavalin A Sepharose.

한 개의 peak로 분리되어 약간 다른 결과를 보이고 있다.

음이온교환수지 상의 효소활성 분획을 다시 chromatofocusing에 의해 더욱 정제한 결과 19.51 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein의 비활성도를 보여 crude enzyme보다 300배의 정제도를 보였으며(Table 1), 이 효소의 등전점(isoelectric point)이 pH 4.6으로 나타나(Fig. 3) Ohtsuru와 Hata⁹⁾의 겨자에서의 2종류 myrosinase 중 하나와 비슷하였다.

Chromatofocusing 결과 효소활성 분획을 다시 Concanavalin A Sepharose affinity column에 흡착시킨 후 0.25 M mannose로 용출시킨 결과(Fig. 4, Table 1) 더욱 정제되어 462.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein의 비활성도를 보여 전단계 chromatofocusing 분획보다 24배, crude enzyme보다 7,107배 높은 정제도를 보였다. 이러한 결과는 Concanavalin A Sepharose 한가지 수지를 사용하여 무우나 겨자에서 myrosinase를 정제한 보고들보다 상당히 높은 정제도를 나타낸 것이다^{6,7)}.

2. Myrosinase의 특성

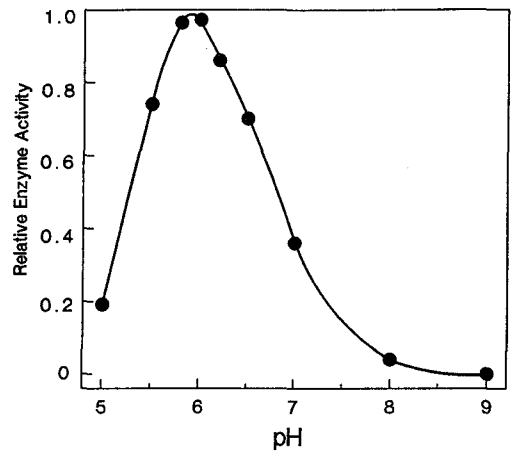


Fig. 5. Determination of optimum pH for myrosinase activity. The reaction mixture consisted of 30 mM sodium phosphate buffer(pH 5.0-9.0), 0.33 mM sinigrin, 0.6 mM ascorbic acid and enzyme solution in a total volume of 2.05 ml. The enzyme activity was measured spectrophotometrically at 37°C by the hydrolysis of substrate, sinigrin, as the decrease in absorbance at 227 nm.

돌산갓에서 분리한 myrosinase는 pH 5.9(phosphate buffer)에서 최적 효소활성을 보이고 6.8 < pH < 5.3에서는 50% 이하의 효소활성을 나타내 비교적 좁은 범위의 pH에서 활성을 보였다(Fig. 5). 이러한 결과는 겨자에서 분리한 myrosinase의 특성과 현격한 차이를 보이고 있다⁸⁾. Reese 등⁸⁾에 의하면 겨자의 myrosinase는 pH 7.5에서 최대 활성을 나타내고, 3.5 < pH < 9.0의 넓은 pH 범위에서 50% 이상의 효소활성을 유지하여 본 실험에서의 갓 myrosinase보다 상당히 높은 pH에서 최적 활성을 보이고 또한 비교적 넓은 pH 범위에서 높은 활성도를 보였다.

일반적으로 myrosinase의 activator로 알려진 L-ascorbic acid^{9,10)}는 본 실험의 갓 myrosinase의 활성에도 영향을 미쳐 0.6 mM의 농도에서 최대활성을 보이고 0.6 mM 이상에서는 농도가 높아짐에 따라 오히려 효소활성을 저하시켜 1.2 mM 이상에서는 최대 활성의 50% 이하로 효소활성을 저하시켰고 L-ascorbic acid의 농도가 2.0 mM에 달하면 myrosinase는 거의 완전히 불활성화되었다(Fig. 6). 따라서 본 실험의 결과는 Ohtsuru와 Hata⁹⁾의 보고와 비슷한 경향을 보였지만 myrosinase의 최대 활성화에 필요한 L-ascorbic acid 농도에서는 차이를 보였다.

Fig. 7은 돌산갓에 함유된 myrosinase의 Km과 Vmax를 측정하기 위한 Lineweaver-Burk plot이다. 여러 기질농도에 대한 myrosinase의 초기반응속도를

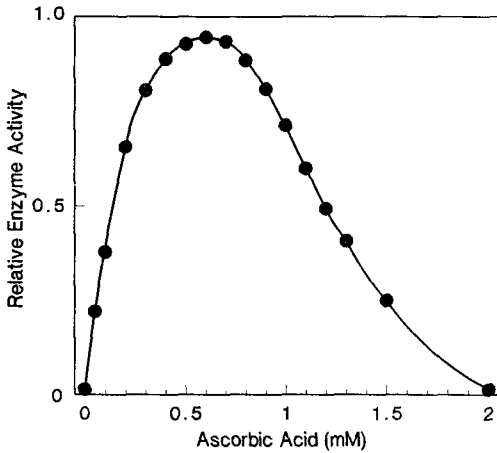


Fig. 6. Effect of ascorbic acid on the activity of myrosinase. The reaction system contained 30 mM sodium phosphate buffer(pH 5.9), 0.33 mM sinigrin, enzyme solution and 0-2.0 mM ascorbic acid in a total volume of 2.05 ml. The enzyme activity was measured as described in Fig. 5.

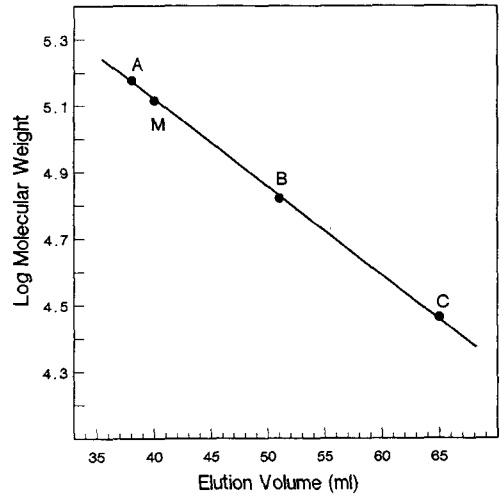


Fig. 8. Determination molecular weight of myrosinase by gel filtration on Sephacryl S-200 HR. A; Alchol dehydrogenase(mw 150 k), B; Bovine serum albumin (mw 66 k), C; Carbonic anhydrase(mw 29 k), M; Myrosinase sample

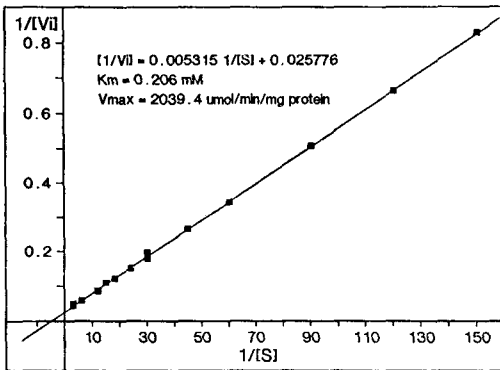


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot for determination of K_m and V_{max} of myrosinase. The reaction mixture consisted of 30 mM sodium phosphate buffer(pH 5.9), 0.0066-0.33 mM sinigrin, 0.6 mM ascorbic acid and enzyme solution in a total volume of 2.05 ml. The enzyme activity was measured as described in Fig. 5.

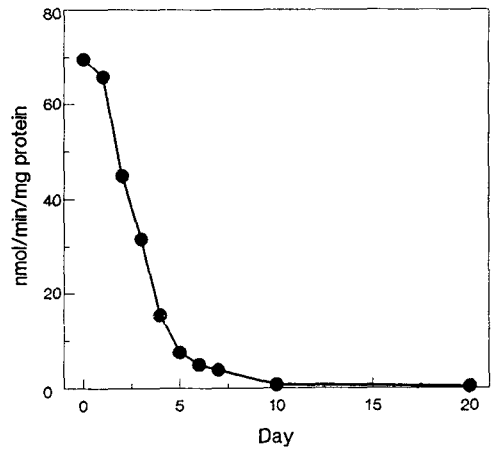


Fig. 9. Changes in myrosinase activity of Dolsan Gat kimchi during storage at 20°C.

측정한 결과 K_m 은 0.206 mM, V_{max} 는 2,039 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein으로 밝혀졌다.

Gel filtration에 의한 myrosinase의 분자량은 약 129,000으로 밝혀졌다(Fig. 8). Fig. 8 단백질 분자량의 log 값과 elution volume과의 관계에서 보는 바와 같이 분자량 150,000부터 29,000까지의 범위 내에서 일직선을 나타냈으며 elution volume 40 μl 에 해당하는 분자량의 log값이 5.11로 분자량은 약 129,000로 계산되어 Ohtsuru와 Hata⁹⁾에 의해 보고된 겨자 myrosinase의

분자량 125,000-150,000과 유사한 값을 보이고 있다.

3. 갓김치 숙성 중의 myrosinase 활성

갓김치의 저장 중 myrosinase 활성 변화를 측정한 결과는 Fig. 9와 같다. 갓김치의 myrosinase 활성은 담근 직후에 약 70 nmol/min/mg protein이던 것이 20°C에서 3일 이상 저장으로 급격히 그 활성을 잃어 4일 후에는 50% 이상의 활성을 손실하고 10일 후에는 거의 활성이 없었다. 갓이나 무우 등 십자화과 채소의 독특한

자극성 매운맛은 allyl isothiocyanate를 비롯한 휘발성 함유성분인 isothiocyanate류에 기인되는 것¹⁾으로 기질인 glucosinolate류에 효소 myrosinase(thioglucoside glucohydrolase)가 작용하여 생성되며¹¹⁻¹⁴⁾, 들산갓에 함유된 주요 휘발성 isothiocyanate류는 allyl isothiocyanate, 3-butenyl isothiocyanate, n-phenyl isothiocyanate, sec-butyl isothiocyanate 등으로 최근 보고된 바 있다¹⁵⁾. 또한 allyl isothiocyanate는 각종 박테리아, 효모, 곰팡이에 대해 항균력을 나타내는 것으로 최근 밝혀져¹⁾, 갓에 함유된 myrosinase의 효소학적 특성을 이해하고 이를 적절히 활용하면 김치 재료 외에 다른 인공첨가물을 사용하지 않고도 갓김치를 비롯한 다른 경엽채소류 김치의 향미와 저장성을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 요약

들산갓의 독특한 향미와 잠재된 항균성을 김치의 맛과 저장성 향상에 이용하기 위한 기초자료로서 갓의 myrosinase를 분리 정제하여 그 특성을 밝히고, 갓김치 숙성 중 myrosinase 활성도 변화를 측정하였다. 갓의 myrosinase를 DEAE Sephadex, chromatofocusing 및 Con A Sepharose column chromatography에 의해 정제한 결과 비활성은 7107배 증가하였고 수율은 18.8%였다. 정제된 효소의 최적 pH는 5.9였으며, 등전점은 4.6, 분자량은 약 129 kD, Km은 0.206 mM, Vmax는 2.039 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ 로 나타났다. 또한 myrosinase의 activator인 ascorbic acid는 0.6 mM에서 최대 효소활성을 보이다가 그 이후는 점차 효소활성의 감소를 보여 2.0 mM 이상의 농도에서는 효소활성을 거의 완전히 상실시켰다. 갓김치의 저장 중 myrosinase 활성 변화를 측정한 결과 김치 제조 직후에 약 70

nmol/min/mg protein이던 것이 20°C 에서 3일 이상 저장으로 급격히 그 활성을 잃어 4일 후에는 50% 이상의 활성을 손실하고 10일 후에는 거의 활성이 없었다.

참고문헌

1. Isshiki K, Tokuoka K, Mori R. and Chiba S. *Biosci Biotech Biochem* **56**: 1476, 1992.
2. Tsuruo I, Yoshida M. and Hata T. *Agr Biol Chem* **31**: 18, 1967.
3. Palmieri S, Leoni O. and Iori R. *Anal Biochem* **123**: 320, 1982.
4. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. and Randall RJ. *J Biol Chem* **193**: 267, 1951.
5. Ohtsuru M. and Hata T. *Agr Biol Chem* **36**: 2495, 1972.
6. 이경선. 충남대학교 석사학위논문, 1988.
7. Palmieri S, Iori R. and Leoni O. *J Agric Food Chem* **34**: 138, 1986.
8. Reese ET, Clapp RC. and Mandels M. *Arch Biochem Biophys* **75**: 228, 1958.
9. Ohtsuru M. and Hata T. *Agr Biol Chem* **37**: 1971, 1973.
10. Ohtsuru M. and Hata T. *Biochim Biophys Acta* **567**: 384, 1979.
11. Gilbert J. and Nursten E. *J Sci Food Agr* **23**: 527, 1972.
12. Wilkinson AP. *J Sci Food Agr* **45**: 543, 1984.
13. Björkman R. and Janson JC. *Biochim Biophys Acta* **276**: 508, 1972.
14. Hill CB. and Williams PH. *J Am Soc Hort Sci* **122**: 309, 1987.
15. 조영숙, 박석규, 전순실, 박정로. *한국식문화학회지* **8**: 147, 1993.