

한국산 대추로부터 Endo-polygalacturonase 분리 및 정제

최 청 · 천성숙 · 조영제 · 우희섭 · 김태완 · 허영훈

영남대학교 식품가공학과

초록 : 한국산 대추로부터 조직의 연화에 작용하는 endo-polygalacturonase를 gel filtration과 이온교환크로마토그래피에 의하여 단일 단백질로 정제할 수 있었고, 수율은 약 6% 정도였다. 정제된 이 효소는 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis에 의하여 분자량이 약 19,000정도의 monomer로 확인되었고, 결정구조는 육각판상 모양을 나타내었다 (1994년 7월 4일 접수, 1994년 8월 22일 수리).

서 론

대추(*Zyzyphus jujube*)는 갈매기과(*Rhamnaceae*)에 속하는 낙엽관목으로 원산지는 유럽 남부 및 아시아 남부로서 세계각국에 널리 분포되어 있으며 우리나라에서는 옛날부터 한약재 및 식용으로 많이 이용되고 있는 과실의 하나이다.^{1,2)} 현재에도 대추는 국내에서 연간 18,000톤 이상 생산되고 있으며 국내 총생산량의 약 65%가 경북의 경산군, 봉화군 및 청도군에 집중되고 있어 이지역 사회에 미치는 건조대추의 비중은 다른지방보다 더욱 크다고 할 수 있다. 대추는 그 주요 구성성분에 있어서도 당분과 비타민 C가 풍부할 뿐만 아니라 독특한 물성적 특성을 가지고 있으므로 해마다 많은 양이 농가에서 건조대추로 제조되고 있다. 대추의 건조에 있어서 성분과 품질에 가장 큰 영향을 미치는 현상의 하나로 연화현상을 들 수 있다. 과실의 연화현상은 성숙, 저장, 유통과정에서 일어나는 생리화학적 변화로서 품질평가에서 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.^{3,4)} 수확을 지연시키거나 건조가 잘 되지 않을 경우 쉽게 연화되어 갈변과 부패를 수반하며 영양적 손실도 초래하게 된다. 특히 수확 후에 착색되지 않은 과실을 착색시키기 위해서나 자연건조시킬 경우 연화현상은 필연적으로 동반된다. 이러한 연화현상은 세포벽 다당류를 분해시키는 polygalacturonase가 있어 조직의 pectin질을 분해하여 수용화시킴으로서 조직의 가용화와 연화가 일어나며 갈변현상도 동반하게

되어 품질을 크게 떨어 뜨리게 된다.⁵⁻¹⁰⁾ 그러나 대추의 급속적인 연화현상을 규명한 연구보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 이러한 대추의 건조와 저장성에 중요한 영향인자인 endo-polygalacturonase의 성질을 규명하여 연화현상을 억제하기 위한 기초자료로 활용코자 효소를 분리하고 정제하여 분자량과 결정구조를 확인하였다.

재료 및 방법

재료

시료 대추(*Ziziphus jujube*)는 1993년 9월에 경북 경산군에서 재배된 2/3정도 붉은 것을 수확하여 사용하였다.

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

Endo-PG의 분리는 저농도와 고농도의 염에 의한 Exo-PG와 Endo-PG의 용해성 차이에 기초한 Chan 등의 방법¹¹⁾에 따라 실시하였다. 즉, 씨를 제거한 대추 조직 800 g에 0.06 M NaCl을 함유하는 0.05 M acetate buffer (pH 5.0)를 가하여 Exo-PG를 분리하였다. 분리한 잔존물에 0.96 M NaCl을 함유하는 동일 완충용액을 가하여 Endo-PG를 분리한 추출액을 4,000×g에서 30분간 원심 분리 하여 얻은 상정액에 ammonium sulfate를 70% 포화되게 가하여 효소단백질을 응집, 침전시킨 후 Sephadex G-25를 통과 시켜 탈염하고 Diaflo PM 10 ultrafiltration membrane을 사용하여 Amicon Diaflo system으로 질소가스하에서 가압, 농축하였다.

Key words : Jujube, Endo-polygalacturonase

*Corresponding author : Cheong Choi

효소의 정제

효소의 정제는 조효소액을 0.05 M acetate buffer(pH 5.0)로 평형시킨 DEAE-cellulose column(3×50 cm)으로 0~1.0 M NaCl linear salt gradient를 행하였다. 분리된 활성부분은 농축한 뒤 다시 Sephadex G-100 column(2×90 cm)에 주입하여 0.05 M acetate buffer(pH 5.0)로 용출시켜 분획하였으며 효소활성 부분은 동결건조 하였다. 이때 모든 조작은 4℃ 이하에서 실시하였다.

효소활성측정

Endo-PG의 활성측정은 기질인 polygalacturonic acid (Sigma Co.)를 분해하여 생긴 oligomer의 환원기의 증가량을 측정하여 polygalacturonase의 역가를 측정 하였다. 환원기의 정량은 Miller의 방법¹²⁾에 따라 1% polygalacturonic acid를 기질로 하여 40℃에서 30분간 반응시켜 측정하였다. 생성된 환원기의 양은 α-D-galacturonic acid를 사용한 표준곡선에 의해 계산하였다. 이때 효소 단위는 효소액 1 ml가 1분간에 1 μmole의 환원기를 생성하는 것을 1 unit로 정하였다.

단백질의 정량

조효소액 및 정제효소의 단백질 함량은 Lowry 법¹³⁾에 따라 측정하였으며 이때 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

전기영동은 Davis 법¹⁴⁾에 의해 7.5% polyacrylamide gel로써 tube당 3mA로 실온에서 약 4시간 수행되었다. 전기영동 후 gel은 1% amido black 10-B로서 염색 하였고 7% acetic acid로 탈색하였다.

분자량 측정

분자량 측정은 Weber와 Osborn의 방법¹⁵⁾에 의하여 실시하였으며, 정제된 효소는 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol을 함유한 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)에 용해한 후 전기영동 하였다. 전개 후 R_m치에 따라 표준곡선을 이용하여 분자량을 측정하였다. 이때 표준품으로는 bovine serum albumin(M. W.; 66000), egg albumin(M. W.; 45000), pepsin(M. W.; 34700), trypsinogen(M. W.; 24000), β-lactoglobulin(M. W.; 18400), lysozyme(M. W.; 14300)을 사용하였다.

효소의 결정화

정제된 효소를 소량의 증류수에 용해하여 냉동용기속

에서 효소액을 냉각하는 동안 -20℃에서 저장한 차가운 아세톤을 유백색의 혼탁이 생성될때 까지 서서히 가한 후 파라핀으로 밀봉하여 4℃에서 방치하고, 결정화시켜 scanning electron microscopy에 의해 구조를 확인 하였다.

결과 및 고찰

Endo-PG의 정제

1) DEAE-cellulose column chromatography

농축된 조효소를 DEAE-cellulose 칼럼(3×50 cm)에 주입시킨 후 약 1.5배의 0.05 M acetate buffer(pH 5.0)로 비활성단백질을 씻어낸 다음 흡착된 단백질을 0~1.0 M NaCl linear salt gradient로 용출 하였다. 이때의 유속은 0.75 ml/min 이었고, 10 ml씩 분획 하였으며 활성분획은 모아서 농축 하였다. DEAE-cellulose column chromatography한 결과 Fig. 1과 같이 6개의 fraction이 검출되었으며 약 0.3 M NaCl 정도에서 활성분획이 검출되었다.

2) Sephadex G-100 gel filtration

DEAE-cellulose를 통과시킨 활성단백을 Amicon membrane ultrafiltration system으로 농축하여 Sephadex G-100 칼럼(2×90 cm)에 주입시킨 후 0.41 ml/min의 유속으로 5 ml씩 분획한 결과 Fig. 2에서와 같이 활성부위를 분리해낼수 있었다. 정제과정 중 효소의 비활성과 수율은 Table 1과 같다. 이들 정제된 효소는 1476.9 unit/mg의 비활성역가를 나타내어 최 등¹⁶⁾이 토마토에서 정제한 PG의 144 unit/mg보다 약 10배 가량 높게 나타나 단위 효소단백질이 가지는 연화효과는 더 큰것으로 추측되었으며, 정제수율은 6%로 높지 않았다. 활성 분획이 하나로 나타나는것으로 보아 isozyme은 존재하지 않는것으로 판단되었다.

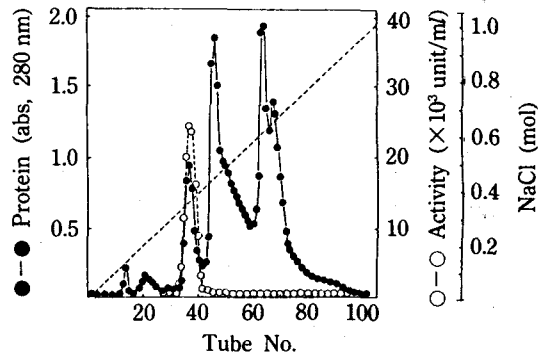


Fig. 1. DEAE-cellulose chromatography of Endo-polygalacturonase from Korean Jujube.

Polyacrylamide gel electrophoresis

정제된 효소단백질을 Davis 법¹⁴⁾에 따라 7% polyacrylamide gel로써 disc gel electrophoresis를 행하여 본 결과 Fig. 3에서와 같이 단일밴드로 나타났다.

분자량 측정

분자량을 측정하기 위해 Weber와 Osborn의 방법¹⁵⁾에 따라 SDS-polyacryl-amide 전기영동에 의한 분자량 측정 결과는 Fig. 4에서와 같이 분자량이 약 19,000 정도의 단일 단백질이 확인되어 monomeric 상태의 효소임이 판명되었다. 최 등¹⁷⁾은 대추종실의 주단백질이 18,000이었다고 보고하였으며 대추과육 중에 존재하는 본 효소의 분자량과 유사 하였다. Takuo와 Aya¹⁸⁾, Obi와 Moneke¹⁹⁾는 곰팡이의 PG 분자량이 38,000~40,000정도이고, 최 등¹⁶⁾은 토마토의 PG분자량이 50,000 정도라고 보고하였으며, Pressey와 Avants²⁰⁾는 완속기의 복숭아에서는 고분자의 효소활성이 감소하며 분자량 42,000~52,000 정도의 PG가 급격히 증가한다고 보고한것과 비교하면 대추에는 연화가 일어나는 일반과실보다 저분자의 Endo-PG가 존재하는것으로 확인되었다.

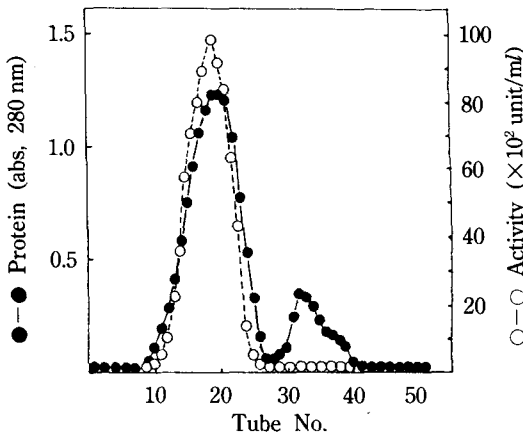


Fig. 2. Gel filtration of Endo-polygalacturonase from Korean Jujube by Sephadex G-100.

정제효소의 결정구조

정제된 효소를 4°C 에서 결정화시켜 scanning electron microscopy에 의해 그 구조를 확인한 결과 Fig. 5와 같이

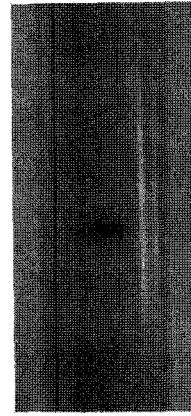


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified Endo-polygalacturonase from Korean jujube.

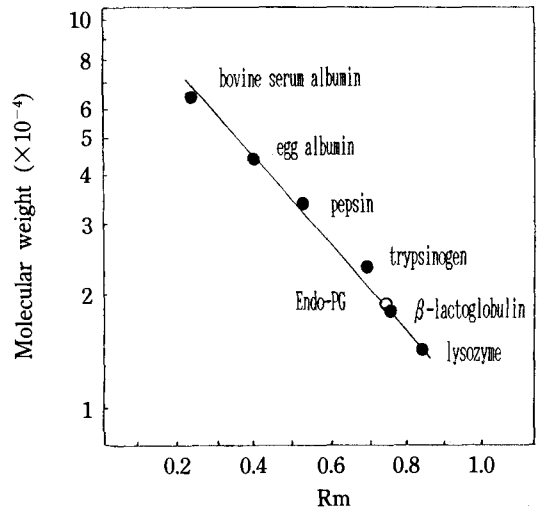


Fig. 4. Estimation of molecular weith of Endo-polygalacturonase from Koran jujube.

Table 1. Purification of endo-polygalacturonase from Korean jujube

	Total activity ($\times 10^4$ unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Fold	Yield (%)
Crude enzyme solution	138.0	3740.0	367.7	1.0	100.0
Ammonium sulfate	26.5	394.8	670.9	1.8	19.3
DEAE-cellulose	11.4	99.6	1144.6	3.1	8.3
Sephadex G-100	8.3	56.2	1476.9	4.0	6.0

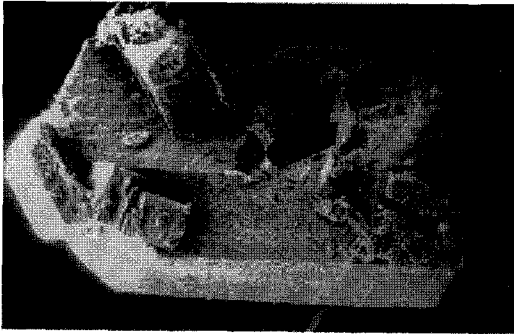


Fig. 5. Scanning electron microscopy of crystal of Endo-polygalacturonase from Korean jujube.

육각관상 모양을 하고 있었다.

감사의 글

이 논문은 1994학년도 영남대학교 학술연구조성비에 의한 것이며 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. 陣存仁(李尚仁 編譯) (1984) 圖說漢方 醫學大事典(中國藥學大典), 제3권, pp. 252-255, 東都文化社, 서울
2. 김용식, 김명수(1988) 대추의 성분과 약리작용 및 용도, 대추재배신기술 pp. 57-59, 五星出版社, 서울
3. Archer, S. A. and A. H. Fielding (1979). Pectolytic enzyme and degradation of pectin associated with breakdown of sulfated strawberry. *J. Sci. Food Agric.*, 30, 692 : 698
4. Hobson, G. E. (1981) Enzymes and texture changes during ripening. In "Recent Advances in the Biochemistry of fruit and vegetable." Ed. J. Friend and M. J. C. Rhode, Academic Press, London: pp. 123-127
5. Huber, D. J. (1983) The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Hortic. Reviews*, 5, 169 : 173
6. Tucker, G. A., N. G. Robertson and D. Grierson (1980) Changes in polygalacturonase isoenzymes during the ripening of normal and mutant tomato fruit. *Eur. J. Biochem.*, 112, 119 : 124
7. Babbitt, J. K., M. J. Power and M. E. Patterson (1973) Effect of growth-regulators on cellulase, polygalacturonase, respiration, color and texture of ripening tomatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 98(1), 77 : 83
8. Themmen A. P. N., A. G. Tucker and D. Grierson (1982) Degradation of isolated tomato cell walls by purified polygalacturonase *in vitro*. *Plant Physiol.*, 69, 112 : 115
9. Besford, R. T. and G. E. Hobson (1972) Pectic enzymes associated with the softening of tomato fruit. *Phytochem.*, 11, 2201 : 2205
10. Themmen A. P. N., A. G. Tucker and D. Grierson (1982) Degradation of isolated tomato cell walls by purified polygalacturonase *in vitro*. *Plant Physiol.*, 69, 112 : 115
11. Chan, H. T. Jr., S. Y. T. Tan and S. T. Seo (1981) Papaya polygalacturonase and its role in thermally injured ripening fruit. *J. Food Sci.* 46, 190 : 193
12. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31(1), 426 : 431
13. Lowry, O. H., N. J. Rosebrogh, A. L. Fan and R. J. Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 ; 271
14. Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis II. Method and application of human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 404 : 410
15. Weber, K. and M. Osborn (1969) The reliability of molecular weight determination sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, 244(16), 4406 : 1411
16. 최 청, 조영제, 손규목 (1990) 한국산 토마토의 Endo-polygalacturonase 정제 및 성질, *한국농화학회지*, 33(1), 73 : 78
17. 최 청, 성태수, 안봉전, 손양도, 함태수 (1985) 대추종실의 단백질 및 지질조성에 관한 연구, *영남대학교 자원문제연구소 논문집* 4, 129 ; 136
18. Takuo, S and A. Takaoka (1985) Purification, Crystallization and some properties of Endo-polygalacturonase from *Aureobasidium pullulans*, *Agric. Biol. Chem.* 49(2), 449-458
19. Obi, S. K. C. and N. A. Moneke (1985) Pectin lyase and polygalacturonase of *Aspergillus niger* pathogenic for yam tubers, *International journal of Food Microbiology*, 1, 277 : 289
20. Pressey, R. and J. K. Avants (1973) Separation and characterization of endo-polygalacturonase and exo-polygalacturonase from peaches. *Plant Physiol.*, 52, 252 : 255

Separation and Purification of Endo-polygalactronase from Korean Jujube

Cheong Choi, Sung-Sook Chun, Young-Je Cho, Heui-Seob Woo, Tae-Wan Kim and Young-Hoon Heo (Department of Food Science & Technology, Yeungnam University, Kyongsan 713-749, Korea)

Abstract : Endo-polygalacturonase was purified from Jujube. The purification procedures included DEAE-cellulose ion exchange chromatography and gel filtration on Sephdex G-100. Enzyme was purified as a single protein band and purification yield was about 6%. When the purified enzyme was applied to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, the molecular weight was estimated about 19,000. Purified enzyme formed hexagonal board type.