한국농화학회지 제 37권 제 5호(1994)
Agricultural Chemistry and Biotechnology
Vol. 37, No. 5, pp. 356~360(1994)

한국산 대추의 Endo-Polygalacturonase의 특성

최 청*·천성숙·조영제·안봉전[1]·김영활[2]·이선호·김 성
영남대학교 식품가공학과, [1]동국전문대학 향장공업과
[2]대구보건전문대학 임상병리과

초록 : 한국산 대추의 endo-polygalacturonase는 최대 효소활성을 위한 pH는 5.0, 최적온도는 50℃ 였으며 pH안정범위는 4.0~5.0, 열안정성은 70℃에서 1시간 열처리 하였을 때 약 35% 실활되었다. 금속이온중 Cu^{++}, Mn^{++}이온이 효소의 활성을 촉진시켰으며, Na^{+}, Ba^{++}, Mg^{++}, Fe^{++} 등의 이온에 의해서는 활성이 저해되었다. 효소저해제 중 maleic anhydride, iodine, 2,4-dinitrophenol을 처리하였을 때 활성저해가 관찰되어 효소의 histidine 잔기의 imidazol기가 활성부위로 판단되었다(1994년 7월 18일 접수, 1994년 10월 13일 수리).

서 론

대추는 익으면서 세포벽 펙틴질의 분해에 관련하는 효소 즉 polygalacturonase에 의해 쉽게 연화되는 성질이 있으므로 수확 즉시 건조시키지 않으면 연화, 갈변, 부패로 연결되어 손실을 보게된다.[1-3] 그러므로 생과로서는 저장성이 극히 낮은 과실이다. 일단 과실이 연화되면 연속해서 갈변이 이루어지며 이 때 많은 영양소들이 파괴되는 것으로 알려져 있다.[4-10] 이러한 대추의 급속적인 연화현상을 규명한 연구보고는 별반없는 실정이지만 이러한 현상으로 인하여 저장성이 낮아지며, 건조중에 중요한 성분들이 파괴될 것이다. 따라서 일광건조시는 건조전에 대추의 연화와 갈변에 관여하는 효소를 불활성화시키는 처리가 필요하다고 판단 되어진다. 그러므로 본 연구에서는 이러한 대추조직의 연화에 관여하는 endo-polygalacturonase의 특성을 규명하여 건조전 효소 불활성화 처리의 기초자료로 삼고자 하였다.

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 등[10]의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 대추 조직에 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 4000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상징액에 ammonium sulfate를 70% 포화되게 가하여 효소단백질을 응집, 침전시킨 후 Sephadex G-25를 통과시켜 탈염하고 Diaflo PM 10 ultrafiltration membrane을 사용하여 Amicon Diaflo system으로 질소가스하에서 가압, 농축하였다.

효소의 정제

효소의 정제는 전보[12]에서 보고한 바와 같이 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 동결건조하였다. 이때 모든 조작은 4℃ 이하에서 실시하였다.

효소활성측정

Endo-PG의 활성측정은 기질인 polygalacturonic acid

Key words : Jujube, Endo-Polygalacturonase
*Corresponding author : Cheong Choi

를 분해하여 생긴 oligomer의 환원기의 증가량를 측정하여 polygalacturonase의 역가를 측정 하였다. 환원기의 정량은 Miller의 방법[11]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 1분간에 1 μmole의 환원기를 생성하는 역가를 1 unit로 정하였다.

Endo-PG의 특성

pH의 영향 효소의 반응 최적 pH는 pH 3~6까지는 각 pH의 0.05 M acetate buffer로, pH 6~8까지는 각 pH의 0.05 M phosphate buffer로 효소활성을 측정, 비교하였고 pH에 대한 안정성은 상기의 동일 조건의 반응액을 4℃에서 17시간동안 방치한 뒤 최적 pH로 조절하고 잔존활성을 측정하였다.

온도의 영향

효소의 반응 최적온도는 반응온도를 20℃에서 80℃까지 변화시키면서 30분간 반응시켜 활성을 측정하였으며 온도에 대한 안정성은 20℃에서 80℃까지의 범위에서 60분간 열처리 시킨 뒤 최적반응온도에서 잔존활성을 측정하였다.

금속이온의 영향

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 금속이온을 최종 농도가 10 mM 되게 첨가한 뒤 효소활성을 측정하였다.

활성저해제의 영향

효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제중 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), p-chloromercuribenzoic acid(PCMB), 2,4-dinitrophenol(DNP), H_2O_2, maleic anhydride, iodine, mercuric chloride를 선정하여 10 mM 농도로 효소액에 첨가하여 30℃에서 1 시간 전처리한 후 잔존활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

pH의 영향

pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.05 M acetate buffer(pH 2~5), 0.05 M Na-phosphate buffer(pH 6~8) 용액 각 1 ml에 0.2 ml의 효소용액을 가하고 기질과 함께 40℃에서 30분간 반응시켜 효소활성을 측정한 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 효소의 최적 pH는 5.0~6.0부근이었다. Pressey와 Avants[14]는 복숭아의 polygalacturonase 최적 pH가 5.0이라고 보고하였으며, 산성의 영역에서 최적활성을 가진다는 것은 비슷하였다.

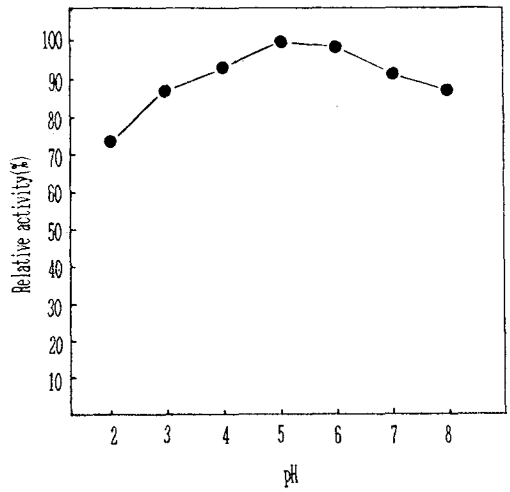

Fig. 1. Effect of pH on the enzyme activity of endopolygalacturonase from Korean jujube.

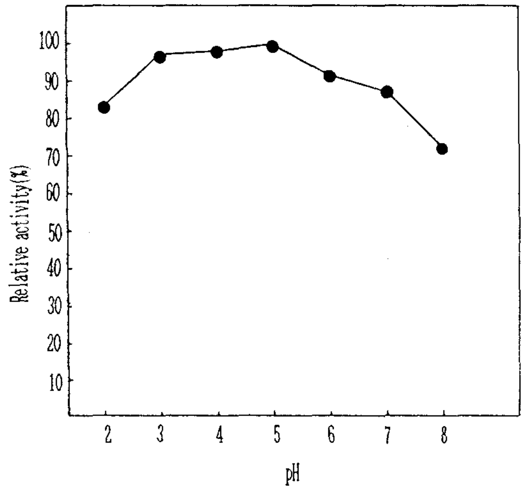

Fig. 2. Effect of pH on the stability of endopolygalacturonase from Korean jujube.

pH 안정성

효소의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 McIlvain buffer(pH 2~8) 용액 각 1 ml에 효소액 0.2 ml를 가하고

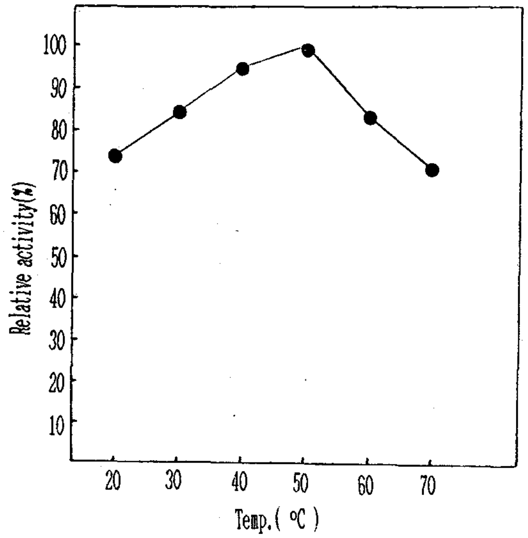

Fig. 3. Effect of temperature on the enzyme activity of endopolygalacturonase from Korean jujube.

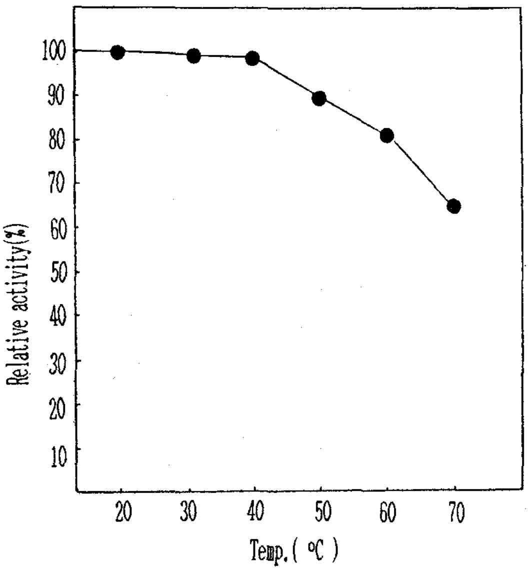

Fig. 4. Effect of temperature on the stability of endopolygalacturonase from Korean jujube.

4℃에서 17시간동안 작용시킨뒤 최적 pH인 5.0으로 조절하고 잔존활성을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 대추에서 분리한 endo-PG는 그 안정범위가 pH 3.0~6.0까지로 비교적 안정한 편이었다. 이는 Tucker 등[15]이 연화가 진행된 토마토의 PG가 pH 4~5의 산성에서 안정성을 나타내었다는 보고와 유사하였다.

온도의 영향

효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 효소반응온도를 20~70℃까지 변화시키면서 30분간 반응시켜 효소활성을 측정한 결과 Fig. 3과 같으며 50℃에서 반응시켰을 때 그 상대활성이 가장 높게 나타났다.

열 안정성

효소의 열 안정성을 조사하기 위하여 효소반응온도를 20~70℃까지 변화시키면서 60분간 예비 가열시킨 뒤 잔존효소활성을 측정한 결과 Fig. 4와 같이 40℃까지는 활성감소가 거의 없었으며 70℃에서 60분간 전처리시켰을 때에도 35% 정도의 활성 감소가 발생하여 열에는 상당히 안정한 것으로 판단되었다. Pressey와 Avants[14]는 복숭아 PG의 온도 안정성이 50℃ 이하라고 보고한 것과 비교할 때 본 효소의 열 안정성이 상당히 높아 열에 의한 효소불활성화는 적절치 않다고 판단되었다.

금속이온의 영향

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 pH 5.0으로 조절한 증류수에 각종 금속이온들을 20 mM 되게 제조하여 금속이온용액 0.2 ml에 효소액 0.2 ml를 넣어 교반하고 30℃에서 1시간동안 방치한 뒤 효소활성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 본 효소는 Cu^{++}, Mn^{++}에 의해서 활성이 촉진되며, Na^{+}, Mg^{++}, Ba^{++}, Fe^{++} 등에 의해서는 30~60% 가량 저해를 받았다. Takenishi 등[16]은 Ca^{++}이온이 PG의 활성을 촉진한다고 보고하였으나 본 효소는 약간의 저해가 관찰되는 상이한 결과를 보였다.

활성저해제의 영향

효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제중 금속과 결합하여 chelate를 형성하는 EDTA, 효소분자중 SH기의 저해제로 쓰이는 PCMB, 말단 아미노기와 친화력이 강하여 이 말단 아미노기가 효소활성단인 경우 활성을 저해하게 되는 2,4-DNP, methionine과 cystein의 modifier인 H_2O_2, N-terminal amino group과 histidine의 imidazole group을 저해하는 maleic anhydride, tyrosine의 phenolic hydroxyl group, histidine의 imidazole group을 저해하는 iodine 및 화학적 저해제로 tris와 mercuric chloride를 선정하여 10 mM의 농도로 효소액에 첨가하여 30℃에서 1시간 처리한 후 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 Table 2와 같이 maleic anhydride와 iodine에 의해서 활성저해가 관찰되었으며, 2,4-DNP에 의해서도 활성저해가 발생하였다. 이 같은 저해양상으로 보아 본

Table 1. Effect of metal ions on the activity of endo-polygalacturonase from Korean jujube

Ion	Metal	Relative activity(%)
Zn^{++}	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	101.3
Mg^{++}	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	43.8
Ba^{++}	$BaCl_2 \cdot 2H_2O$	67.5
Hg^{++}	$HgCl_2$	96.8
Pb^{++}	$Pb(CH_3COO)_2$	92.9
Ca^{++}	$CaCO_3$	88.8
Mn^{++}	$MnSO_4 \cdot H_2O$	121.3
Cu^{++}	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	158.7
Fe^{+++}	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	67.5
Na^{+}	$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$	41.3
	None	100.0

Table 2. Effect of inhibitor on the activity of endo-polygalacturonase from Korean jujube

Inhibitor(10 mM)	Relative activity(%)
None	100.0
2,4-Dinitrophenol	73.1
EDTA	86.6
Mercuric chloride	85.2
Maleic anhydride	68.1
Iodine	67.9
H_2O_2	85.5
p-Chloromercuribenzoic acid	70.4
Tris	93.4

효소의 active site에 histidine 잔기가 존재하며, 그 histidine 잔기의 imidazole group이 효소활성에 관여함을 추측할 수 있었다. Westhead[17]와 Rexova[18-20]는 polygalacturonase의 활성단에 histidine이 존재하며 그 histidine 잔기의 imidazole기가 효소활성에 필수적이라고 보고한 결과와 유사하였다. PCMB에 의한 활성저해는 cystine의 SH기가 변화하여 효소활성의 발현에 영향을 주는 것으로 추측되었다.

감사의 말씀

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

참 고 문 헌

1. 曺哉銑 (1981) 改定 食品材料學, p.268, 기전연구사, 서울
2. 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
3. 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
4. Hubber, D. J. (1983) The role of cell wall hydrolases in fruit softening. Horticultural Reviews, 5, 169-173
5. 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
6. 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
7. 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
8. Besford, R. T. and G. E. Hobson (1972) Pectic enzymes associated with the softening of tomato fruit. *Phytochem.*, 11, 2201-2205
9. 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
10. Chan, H. T. Jr., S. Y. T. Tan and S. T. Seo (1981) Papaya polygalacturo nase and its role in thermally injured ripening fruit. *J. Food Sci.* 46, 190-193
11. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31(1), 426-431
12. 최 청, 천성숙, 조영제, 우희섭, 김태완, 허영훈 (1994) 한국산 대추의 Endo-polygalacturonase분리 및 정제, 한국농화학회지, 37(5)
13. Lowry, O. H., N. J. Rosebrogh, A. L. Fan and R. J. Randall, R. J. (1951) Protein measurenent with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-271
14. Pressey, R. and J. K. Avants (1973) Separation and characterization of endo-polygalacturonase and exo-polygalacturonase from peaches. *Plant Physiol.*, 52,

252-255
15. Tucker, G. A., N. G. Robertson and D. Grierson (1981) The conversation of tomato fruit polygalacturonase isoenzyme III into isoenzyme *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 115, 87-92
16. Takenish, S., Y. Watanabe, T. Miwa and R. Kobayashi (1983) *Agric. Biol. Chem.*, 47(11), 2553-2540
17. Westhead, E. F. (1965) Photooxidation with Rose Bengal of a critical histidine residue in yeast enolase. *Biochem.*, 4, 2139-2145
18. Rexova, B. L., J. Omelkova and B. Verunovic (1983) Endopolygalacturo nase immobilized on a porous poly-2,6-dimethyl-p-phenyleneoxide. *Biotech. Letters*, 5, 737
19. Rexova, B. L. and P. M. Mrackova (1981) Effect of immobilization of Aspergillus niger extracellular endo-D-galacturonase or kinetics and action pattern. *Carbohydr. Res.*, 98, 115
20. Rexova, B. L., J. Omelkova, K. Filka and J. Koeourek (1983) Selective isolation of endo-D-galacturonase of aspergillus niger based on interaction with D-galactosiduronic acid covalently bound to polyhydroalkylmethacrylate. *Carbohydr. Res.*, 122, 269

Characteristics of Endo-Polygalacturonase from Korean jujube

Cheong Choi, Sung-Sook Chun, Young-Je Cho, Bong-Jeon Ahn*[1], Young-Hwal Kim*[2] and Seon-Ho Lee(Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyongsan, Korea,*[1]Department of Cosmetic Engineering, Tongkuk Junior College and *[2]Department of Clinical Pathology, Daegu Junior Health College)

Abstract : The optimum pH and temperature for endo-polygalacturonase activity from Jujube were 5.0 and 50℃. The range of its stability to pH was 4.0 to 5.0. The enzyme was inactivated about 35% by treatment at 70℃ for 1 hr. It was found that Ag^{+}, Zn^{++} and Mg^{++} increased the enzyme activity. In contrast, Ba^{++}, Hg^{++}, Pb^{++}, Ca^{++}, Mn^{++}, Cu^{++}, Fe^{+++}, Na^{+} and K^{+} decreased it. The enzyme was inactivated by treatment with maleic anhydride, iodine and 2,4-dinitrophenol. The results indicate that active site is a imidazole group on the enzyme.