



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

백겨자(*Sinapis alba*)의 종자로부터  
효소 myrosinase의 분리 및 특성

濟州大學校 大學院

食品工學科

李 蘭

2020年 2月

# 백겨자(*Sinapis alba*)의 종자로부터 효소 myrosinase의 분리 및 특성

指導教授 高 榮 煥

李 蘭

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2020年 02月

李 蘭의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 朴 恩 珍

委 員 千 智 連

委 員 高 榮 煥



濟州大學校 大學院

2020年 02月

# Isolation and Characterization of Myrosinase from White Mustard (*Sinapis alba*) Seeds

Ran Lee

(Supervised by Professor Young Hwan Ko)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree  
of Master of Engineering

2020. 02.

This thesis has been examined and approved.

Eun-Jin Park, Thesis director, Prof. of Food Science and Engineering, Dept.

Ji-Yeon Chun, Prof. of Food Science and Engineering, Dept.

Young Hwan Ko, Prof. of Food Science and Engineering, Dept.

Feb. 2020

Department of Food Science and Engineering

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

# CONTENTS

<b>ABSTRACT</b>	.....	<b>1</b>
<b>LIST OF FIGURES</b>	.....	<b>2</b>
<b>LIST OF TABLES</b>	.....	<b>4</b>
<b>1. 서론</b>	.....	<b>5</b>
<b>2. 재료 및 방법</b>	.....	<b>10</b>
2.1. 실험재료	.....	10
2.2. Myrosinase의 추출 및 분리	.....	10
2.2.1. Myrosinase의 추출	.....	10
2.2.2. 황산암모늄 침전 분획	.....	10
2.3. Myrosinase의 정제	.....	11
2.3.1. Concanavalin A-Sepharose column chromatography	.....	11
2.3.2. Gel permeation chromatography	.....	12
2.4. Polyacrylamide gel electrophoresis	.....	12
2.5. Myrosinase 효소 활성의 측정	.....	14
2.6. 단백질 정량	.....	17
2.7. Myrosinase의 촉매 활성 특성	.....	19
2.7.1. 열역학적 특성	.....	19
2.7.2. 기질 특이성	.....	19
2.7.3. L-Ascorbic acid의 영향	.....	20
2.7.4. Thio 화합물의 영향	.....	20
<b>3. 결과 및 고찰</b>	.....	<b>21</b>
3.1. Myrosinase의 촉매 활성 측정 조건	.....	21
3.2. 백겨자 종자로부터 myrosinase의 분리 정제	.....	24
3.2.1. Concanavalin A-Sepharose column chromatography	.....	24
3.2.2. Gel permeation chromatography	.....	26
3.3. Polyacrylamide gel electrophoresis	.....	28

3.4. Myrosinase의 촉매 활성 특성 .....	31
3.4.1. 열역학적 특성 .....	31
3.4.2. 기질 특이성 .....	36
3.4.3. L-Ascorbic acid의 영향 .....	42
3.4.4. Thio 화합물의 영향 .....	45
<b>4. 결 론</b> .....	<b>48</b>
<b>국문요약</b> .....	<b>50</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>51</b>

## ABSTRACT

Myrosinase(thioglucosidase, EC 3.2.1.147) is the only known S-glycosidase, which belongs to glycoside hydrolase family 1. Myrosinases are mostly found in the *Brassicaceae* family, and catalyze the hydrolysis of secondary plant metabolites recognized as glucosinolates. In this study, myrosinases were isolated from the white mustard (*Sinapis alba*) seeds which are one of the richest in the enzyme. Its thermokinetics, substrate specificity and effector compounds were investigated. The enzyme was purified from white mustard seeds by a sequential processes of ammonium sulfate fractionation, Concanavalin A-Sepharose column chromatography, and gel permeation chromatography. The purity of the myrosinase preparation was confirmed by native polyacrylamide gel electrophoresis and on-gel activity staining with methyl red. The molecular weights of the two intact isozymes were estimated to be 171 kDa and 476 kDa, respectively. The optimum catalytic reaction temperature of the major myrosinase was 43°C and the activation energy for its inactivation was 18.3 kcal/mol. Its  $K_m$  and  $V_{max}$  were 1.03 mM and 270.27  $\mu\text{mol}/\text{min}$  for allylglucosinolate (sinigrin), 3.77 mM and 29.67  $\mu\text{mol}/\text{min}$  for 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (4-NPG), and 0.12 mM and 82.64  $\mu\text{mol}/\text{min}$  for 3-indoxyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (indican), respectively. Being compared with sinigrin, neither 2-(hydroxymethyl)phenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (salicin) nor indican was a good substrate of the myrosinase. L-Ascorbic acid, a known cofactor of myrosinase, showed 4.0-fold and 1.6-fold activation for substrate sinigrin and 4-NPG, respectively, around 0.3 mM but inhibited myrosinase activity at higher concentration than 0.6 mM. Sulfur-containing compounds including cysteine, glutathione, 2-mercaptoethanol and methionine showed different effects on the enzyme activity depending on the substrate used, sinigrin or 4-NPG.

## LIST OF FIGURES

Fig. 1. Calibration curve for molecular weight determination by native polyacrylamide gel electrophoresis .....	13
Fig. 2. Standard curve for glucose determination by DNS method .....	15
Fig. 3. Standard curve for 4-nitrophenol determination by optical density .....	16
Fig. 4. Standard curve of bovine serum albumin by Lowry method .....	18
Fig. 5. Dependence of myrosinase activities on the amount of crude enzyme .....	22
Fig. 6. Dependence of the myrosinase activity on the incubation time .....	23
Fig. 7. Affinity chromatography of ammonium sulfate precipitates from white mustard seeds on Concanavalin A-Sepharose column .....	25
Fig. 8. Gel permeation chromatography of myrosinase I fraction on Sephadex G-100 column .....	27
Fig. 9. Native-polyacrylamide gel electrophoresis of the myrosinases from white mustard seeds and protein staining with Coomassie Brilliant Blue R-250 (A) or myrosinase activity staining with methyl red (B) .....	30
Fig. 10. Effect of incubation temperature on the activity of myrosinase from white mustard seeds .....	33
Fig. 11. Arrhenius plot for temperature dependence of inactivation rate of myrosinase from white mustard seeds .....	35
Fig. 12. Lineweaver-Burk plots of the myrosinase from white mustard seed for substrates .....	39
Fig. 13. Dependence of myrosinase activity on reaction time .....	41
Fig. 14. Effect of L-ascorbic acid on the hydrolysis of sinigrin (A) and	

4-NPG (B) by myrosinase from white mustard seeds .....	44
Fig. 15. Effect of thio compounds on the hydrolysis of sinigrin (A) and 4-NPG (B) by myrosinase from white mustard seeds .....	47

## LIST OF TABLES

Table 1.	Dependence of inactivation rate constant of myrosinase from white mustard seeds on incubation temperature .....	34
Table 2.	Kinetic parameters of the myrosinase from white mustard seed for substrates .....	40

# 1. 서론

효소 myrosinase(EC 3.2.1.147, thioglucosidase, thioglucoside glucohydrolase, sinigrinase)는 1839년 Bussy에 의해서 겨자씨에서 처음 발견되었다(Bussy, 1840). Myrosinase가 발견되었을 때 albumin과 성질이 유사하고 sinigrin (allylglucosinolate, 2-propenylglucosinolate)의 가수분해에 관여한다고 하여 myrosin이라 명명하였었다(Bjokaman, 1976). Myrosinase는 glycoside hydrolase family 1(EC 3.2.1.,  $\beta$ -glucosidase, GH1)에 속하는 효소이지만, 유일하게 glucosinolate의 S-glycosidic 결합을 가수분해하는 S-glycosidase이며 myrosinase를 제외한 GH1에 속하는 효소들은 glucoside의 O-glycosidic 결합을 분해하는 O-glycosidase이다(Naumoff, 2011). Myrosinase는 주로 겨자, 무, 배추 등 십자화과(*Brassicaceae*) 식물의 잎, 줄기, 뿌리, 씨앗에 함유되어 있으며 *Lactobacillus agilis*(Palop 등, 1995), *Aspergillus* sp.(Rakariyatham 등, 2006), *Enterobacter cloacae*(Jane 등, 2013), *Bacillus thuringiensis*(Hamed 등, 2016) 그리고 장내 세균총(human gut bacteria)(Luang-In 등, 2014)등에도 존재하는 것으로 밝혀졌다. 식물의 myrosinase는 분자량이 120,000~150,000 dalton인 반면에 미생물의 myrosinase는 분자량이 61,000~120,000 dalton으로 비교적 작으며, 미생물의 myrosinase는 식물 myrosinase 활성을 촉진시키는 일정 농도의 L-ascorbic acid에 의하여 효소 활성이 억제된다고 보고되었다(Naoki 등, 1974; Pontoppidan 등, 2001).

Glucosinolate는 황(sulfur) 함유  $\beta$ -D-glucoside로써 myrosinase와 함께 주로 십자화과에서 발견되며, 이들 화합물은 서로 다른 아미노산으로부터 유래된 특이한 작용기에 따라 구분된다. Glucosinolate의 S-glycosidic 결합이 myrosinase에 의하여 가수분해 되면 D-glucose와 aglycone이 생성되는데, aglycone은 불안정하여 Lossen rearrangement 반응을 거친다. Aglycone은 중성 pH에서는 황산염과 생리활성이 높은 isothiocyanate( $R-N=C=S$ )으로 그리고 산성 pH에서는 황산염과 nitrile( $R-C\equiv N$ )로 각각 전환된다. 그 이외에도 thiocyanate, 5-oxazolidine-2-thiones, hydroxynitrile 및 epithionitrile 등이 생성된다. 이 생성

물들의 생성여부는 glucosinolate의 구조, 효소와 작용하는 물질 및 기타 인자에 따라 결정된다. 한편, L-ascorbic acid는 myrosinase의 보조인자(cofactor)로 알려져 있으며, glucosinolate의 가수분해 부산물인 황산염은 myrosinase의 경쟁적 억제체로서 효소 활성을 저해한다(Halkier 등, 2001; Albena 등, 2012; Bhat 등, 2019). 120여 종의 서로 다른 구조의 glucosinolate 중, 그 기능의 일부가 밝혀진 종류들은 sinigrin (2-propenyl glucosinolate), glucotropaeolin (benzyl glucosinolate), gluconasturtiin (2-phenethyl glucosinolate), glucoraphanin (4-methylsulfinylbutyl glucosinolate), glucobrassicin (3-indolylmethyl glucosinolate), glucoraphasatin (4-methylthio-3-butenyl glucosinolate), glucoraphenin (4-methylsulfinyl-3-butenyl glucosinolate) 등이다. 이 중 sinigrin, glucotropaeolin 및 glucobrassicin은 주로 양배추에 함유되어 있으며 glucoraphanin은 브로콜리에, 그리고 gluconasturtiin은 *Lepidium sativum*(큰다닥냉이)에 풍부하게 들어있다. 무에는 glucoraphasatin과 glucoraphenin이 비교적 많이 함유되어 있다(Clarke, 2010). Glucoraphanin과 glucobrassicin이 myrosinase에 의해 가수분해 되어 생성된 sulforaphane과 indole-3-carbinol은 항암성을 나타내는 것으로 알려져 있으며(Traka 등, 2009), gluconasturtiin이 가수분해 되어 생성된 2-phenylethyl isothiocyanate은 phase I 효소의 활성을 억제하고 phase II 효소의 활성을 유도함으로써 암의 발생을 억제한다고 하였다(Engelen-Eiglesemd 등, 2006). Phase I 효소란 발암성 물질을 활성화시키는 효소(cytochrome P-450)이며, phase II 효소는 생체이물질을 무독화 시키는 효소(glutathione transferase, quinone reductase)이다. Sinigrin이 가수분해 되어 생긴 allyl isothiocyanate는 항균, 항암, 살충, 혈전응고 방지 등의 효과가 있는 것으로 보고되었다(Albena 등, 2012). 그리고 glucotropaeolin의 가수분해산물인 benzyl isothiocyanate는 식품부패균 중 그람양성균보다 그람음성균에 대하여 보다 강한 항균활성을 나타내었고, 세균보다는 곰팡이에 대하여 더 높은 활성을 나타내는 것으로 보고되었다(Ahn 등, 1999).

겨자(芥子, mustard)는 십자화과 식물로서 잎인 갓과 종자를 통칭하는데 즉, 어떤 특정한 가지 식물을 일컫는 말이 아닌 식용, 약용 그리고 향신료로서 상업적으로 이용될 때 겨자류의 종자식물을 통틀어 칭한다(Son 등, 2006). 겨자는 한해

살이 또는 두해살이 식물로 줄기는 여러 갈래로 갈라지고 높이는 1~2m까지 자란다. 잎은 근출엽으로 크고 깃꼴로 갈라지며 가장자리에 뾰족한 작은 톱니가 있다. 겨자가 십자화과 식물이란 명칭에서 알 수 있듯이 봄에 십자모양으로 노란 꽃이 핀다(Fig. 1). 우리나라에서는 9월에 씨앗을 파종하여 다음해 5월 하순에서 6월 초순에 농작물의 종자를 채취한다(Danaka 등, 2004). 겨자 종자의 종류는 종자의 색상에 따라 3종이 있다. 백색과 황색은 유사하여 백겨자(white/yellow mustard, *Brassica alba*, *Sinapsis alba*)라 하고, 흑겨자(black mustard, *Brassica nigra*), 그리고 갈색 겨자(brown/Indian mustard, *Brassica juncea*)로 구분한다. 백겨자는 서부 유럽이 원산지이며, 흑겨자는 중앙아시아가 원산지이다(Shin 등, 1996). 겨자의 종류에 따라 함유된 glucosinolate가 다른데, 백겨자에는 주로 glucosinalbin(4-hydroxybenzyl glucosinolate)이 함유되어 있고, glucosinalbin의 가수분해물은 4-hydroxybenzyl isothiocyanate이다. 자극적인 풍미를 지닌 4-hydroxybenzyl isothiocyanate는 매우 불안정하여 빠른 속도로 4-hydroxybenzyl alcohol과 thiocyanate ion으로 분해됨으로, 처음에는 톡 쏘는 쓴맛이 나지만 단시간에 사라진다. 흑겨자에 함유된 sinigrin은 allyl isothiocyanate로 가수분해 되어 코를 강하게 자극하고 겨자 특유의 톡 쏘는 풍미를 나타내며, 갈색겨자에는 gluconapin이 주로 함유되어 3-butenyl isothiocyanate으로 가수분해 된다(Szmigielska 등, 2000; Kim, 2012).

겨자에 들어있는 myrosinase에 관해서 여러 연구가 이루어졌다. Ohtsuru 등(1972)은 겨자분말을 효소원으로 사용하여 암모늄염 침전, DEAE-cellulose column chromatography, CM-sephadex column chromatography 등의 방법으로 효소를 정제하였고, 4개의 isozyme을 확인하였다. 그리고 Shin 등(1996)은 우리나라 돌산지방에서 생산되는 갈색 겨자(*Brassica juncea*)를 효소원으로 사용하여 DEAE-cellulose, Concanavalin A-Sepharose, Superose 6 chromatography 방법으로 효소를 정제하였고, 3개의 isozyme이 있음을 보고하였다. 그 중 정제된 myrosinase의 최적 작용 pH는 7.0 그리고 온도는 37°C이었다. Stoin 등(2009)은 흑겨자에서 분리된 myrosinase의 최적 작용 pH는 7.0, 최적 작용 온도는 55°C라고 보고하였다. Van Eylen 등(2006)은 백겨자에서 분리된 myrosinase를 사용하여 고압과 가열처리가 효소활성에 미치는 영향을 조사하였으며 300 MPa, 70°C에

서 처리 후에도 효소활성이 유지되었고, 낮은 압력은 가열로 인한 효소의 불활성화를 감소시킨다고 주장하였다. Okunade 등(2015)도 백겨자, 갈색겨자 그리고 흑겨자의 myrosinase를 고압과 고온에서 병행 처리하여 효소 안정성에 미치는 영향을 조사한 결과, 압력 200~400 MPa과 온도 60~80 °C 범위에서 병행처리하면, 가열처리만 하는 대조구에 비해서 효소의 활성을 보다 잘 유지할 수 있다고 보고하였다. Ghawi 등(2012)은 십자화과 myrosinase 활성에 미치는 열처리의 영향을 조사하여, 겨자 종자의 myrosinase가 양배추 및 브로콜리의 myrosinase에 비해 열 안정성이 훨씬 높다고 밝혔다. 이후 Ghawi 등(2013)은 겨자 종자의 가루를 가열 조리된 브로콜리 가루에 첨가하였더니, sulforaphane의 함량이 3~5배로 크게 증가함을 확인하였다. 또한 Piekarska 등(2013)은 십자화과 품종 중 사보이 양배추(savoy cabbage), 흰 양배추, 유채(*Brassica napus*), 브로콜리, 콜라비(turnip cabbage), 백겨자의 myrosinase 활성을 비교한 결과 백겨자의 myrosinase 활성이 가장 높다고 하였다.

보고된 연구들을 비교하였을 때 겨자에는 효소 myrosinase의 함량이 타 식물체에 비해서 비교적 높다고 할 수 있다. 이 효소를 효율적으로 활용하기 위해서는 상당한 정도의 정제품을 만드는 조작이 필요하다. 한편, 십자화과 가공 조리 중에 가열에 의한 myrosinase의 파괴는 각종 영양소의 파괴와 더불어 피할 수 없다. 부족한 myrosinase를 보충하고, glucosinolates를 활용하기 위해서는 가열처리가 효소의 안정성에 미치는 영향에 관한 열역학 정보가 필요하다. 그와 더불어 효소 촉매반응속도에 영향을 미치는 식용가능 화합물에 대한 정보도 필요하다. 또한 myrosinase는 유일한 S-glycosidase로 보고되어 있으며, 이 효소는 O-glycosidase의 활성부위에서 염기(base) 역할을 하는 glutamate 하나가 glutamine으로 치환되어 O-glycosidase와 매우 유사한 특성을 지닌다 (Bourderioux 등, 2005). 따라서 myrosinase는  $\beta$ -glucosidase의 일종으로서 S-linked  $\beta$ -glycosidic 결합 이외에 구조가 비슷한 O-linked  $\beta$ -glycosidic 결합도 가수분해 할 가능성이 있다. 식물체에는  $\beta$ -glucosidase로 가수분해 되는  $\beta$ -D-glucosides와 oligosaccharides 화합물이 비교적 풍부하기 때문에  $\beta$ -glucosidase의 기질들이 myrosinase에 의해 가수분해 되는지 조사할 필요가 있었다.

따라서 본 연구에서는 백겨자의 종자로부터 myrosinase를 효율적으로 분리, 정제하고 열역학적 특성을 조사하였다. 또한 효소 반응속도에 영향을 미치는 화합물에 대해서 검정하였으며,  $\beta$ -glucosidase의 일종으로서 myrosinase의 기질특이성을 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료

건조된 백겨자(white mustard, *Brassica alba* 또는 *Sinapis alba*)의 종자 (Dropship, India)를 구입하여 효소 myrosinase 분리원으로 사용하였다.

### 2.2. Myrosinase의 추출 및 분리

#### 2.2.1. Myrosinase의 추출

백겨자의 종자를 분쇄기(Homeart electrical, CG-150, China)로 미세하게 분쇄하여 분말을 얻었다. 겨자분말 0.5 g 당 10 mL의 효소 추출용 완충액(50 mM phosphate buffer, pH 6.5, 0.5 mM EDTA, 1.5 mM dithiotreitol 함유)을 가하여 총량 1,000 mL로 만든 후, 저온에서 15분 동안 섞어주었다. 이후 4°C에서 원심분리(12,000 × g, 30 min)(Hanil, HA-50, Korea)하여 얻은 맑은 상정액을 조효소액(crude enzyme)으로 사용하였다.

#### 2.2.2. 황산암모늄 침전 분획

조효소액에 50% 포화가 되도록 황산암모늄(ammonium sulfate, Sigma-Aldrich)을 가하고 용해시킨 다음에 4°C에서 1시간 동안 정치하여 단백질을 침전시켰다. 이어서 원심분리(4°C, 12,000 × g, 30 min) 후 상정액을 취했다. 상정액에 85% 포화가 되도록 황산암모늄을 추가하고 용해시킨 후 4°C에서 12시간 동안 정치하여 단백질을 침전시켰다. 그리고 다시 원심분리(4°C, 12,000 × g, 30 min) 하여 침전물을 채취하였다. 침전물을 소량의 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)에 용해시킨 뒤, 투석막(cellulose tubing, MWCO 12,000 dalton, Sigma-Aldrich)에 넣고, sodium azide 가 0.01% 함유된 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)을 사용하여 2

일간 실온에서 투석하였다. 투석액을 원심분리(4°C, 12,000 × g, 30 min)하여 맑은 상정액만을 취하여 동결건조(Ilshin, TFD 5505, Korea)하였다.

## 2.3. Myrosinase의 정제

### 2.3.1. Concanavalin A-Sepharose column chromatography

당과 특이하게 선택적으로 결합하는 lectin을 affinity chromatography에 응용하여 당 함유 효소인 myrosinase를 정제하고자 하였다(Bellostas 등, 2008). Concanavalin A-Sepharose 4B (Sigma-Aldrich) 레진(resin)을 bed volume이 29.2 mL이 되도록 유리 column에 채웠다. Column 부피의 5배에 상당하는 wash solution (1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub> 함유)을 흘려보내서 레진을 세척하였다. 이어서 equilibration buffer(20 mM Tris buffer, pH 7.4, 0.5 M NaCl 함유)를 사용하여 pH 7.4에 이를 때까지 흘려보냈다. 동결건조된 효소 시료 750 mg을 equilibration buffer 10 mL에 녹여 equilibration buffer로 평형화된 Concanavalin A-Sepharose column에 투입하였다. 이어서 column volume의 약 2배에 상당하는 equilibration buffer를 흘려보내서 column 내의 레진에 결합되지 않은 물질들을 배출시켰다. 단백질이 더 이상 유출되지 않을 때쯤에 500 mM methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside 용액을 흘려보내기 시작했다. Column을 통과한 분획물은 각각 5 mL씩 모았으며, 각 분획물의 단백질 농도와 효소활성을 측정하였다. 그 중 myrosinase 효소 활성이 있는 분획들은 모아서 투석막(cellulose tubing, MWCO 12,000 dalton, Sigma-Aldrich)에 넣고, sodium azide가 0.01% 함유된 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)을 사용하여 2일간 실온에서 투석하여 methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside를 제거하였다. 투석액을 원심분리(4°C, 12,000 × g, 30 min)하여 맑은 상정액만을 취하여 동결건조 하였다.

Affinity column을 반복해서 사용할 경우에는 column volume의 5배 이상에 상당하는 염기성 완충액 (0.1 M Tris, pH 8.5, 0.5 M NaCl 함유)으로 먼저 세척하고, 이어서 산성 완충액 (0.1 M sodium acetate, pH 4.5, 1.0 M NaCl 함유)으로 세척하는 작업을 2~3회 반복하였다. column을 사용하지 않을 때는 레진을

ethanol 20%가 함유된 0.1 M acetate buffer (pH 6.0, 1 M NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> 함유)에 담그고 냉장 보관하였다.

### 2.3.2. Gel permeation chromatography

단백질 분자량 40,000~100,000 MW을 분리할 수 있는 Sephadex G-100 column을 사용하여 gel permeation chromatography을 실행하였다. Concanavalin A-Sepharose column으로 정제된 효소 시료를 소량의 50 mM phosphate buffer (pH 6.5)에 용해시킨 후 50 mM phosphate buffer (pH 6.5, 0.01% sodium azide 함유)로 평형화된 Sephadex G-100 column (bed volume 110 mL)에 투입하였다. 유출액은 각 분획 당 3 mL씩 총 120 mL를 받았고, 각 분획에 함유된 단백질 농도와 myrosinase 효소 활성을 측정하였다. 효소활성이 나타난 분획만 모아서 동결 건조하여 효소 시료로 사용하였다.

## 2.4. Polyacrylamide gel electrophoresis

Native-polyacrylamide gel electrophoresis(native-PAGE)에는 5~20% gradient polyacrylamide gel (precast gel, ATTO, Japan)을 사용하였다. 단백질 표준물질은 bovine serum albumin (BSA, 66.5 kilo dalton(kDa))이며, Sigma 회사 제품을 사용하였다. Gel 상의 단백질은 Coomassie Brilliant Blue R-250로 염색하여 위치를 확인하였고, 표준단백질의 상대적인 이동거리( $R_f$ )와 분자량의 관계로부터 myrosinase의 분자량을 계산하였다(Fig. 1). 또한, gel 상의 단백질 myrosinase를 확인하기 위하여 다음과 같이 효소활성을 염색하였다. 전기영동이 끝난 gel을 증류수로 여러 차례 세척하였다. 세척된 gel을 10 mL의 myrosinase 활성 염색용액 (6 mM sinigrin, 1 mM ascorbic acid, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.5), 100 µg/mL methyl red 함유)을 사용하여 37°C에서 10분간 정치하였다. Myrosinase의 작용으로 sinigrin이 가수분해 되어 생긴 sulfate에서 해리된 수소 양이온(H<sup>+</sup>)이 반응액의 pH를 떨어뜨리고, 그 결과로 methyl red가 노란색에서 적색으로 변하는 것을 관찰하였다(Gonda 등, 2018).

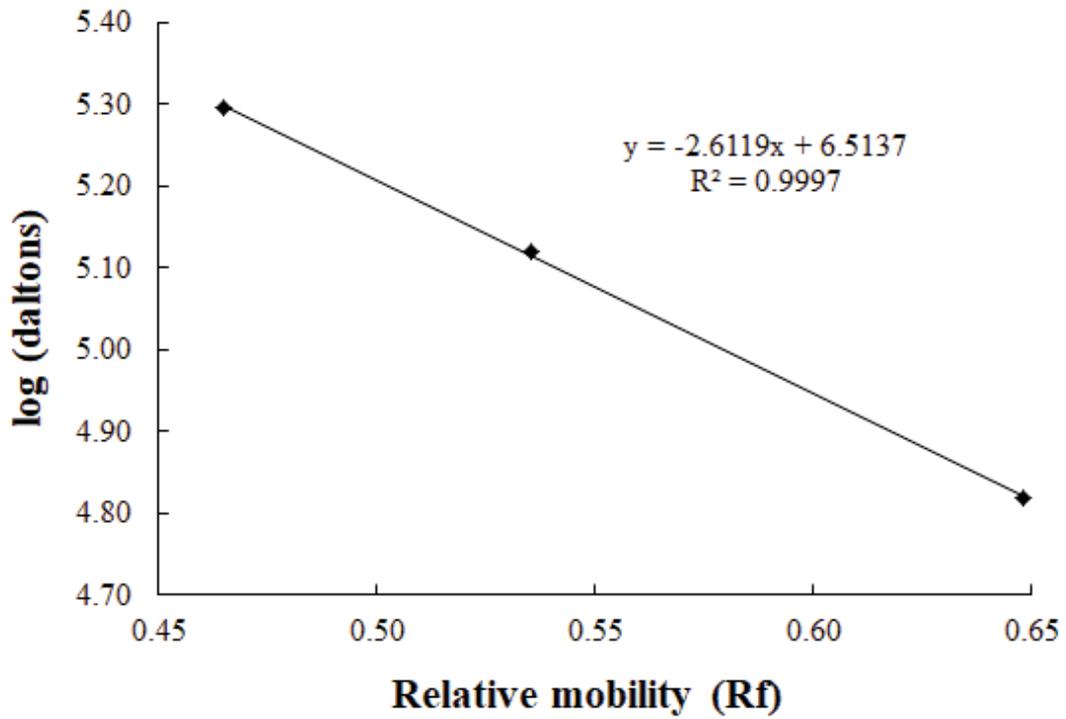


Fig. 1. Calibration curve for molecular weight determination by native polyacrylamide gel electrophoresis.

## 2.5. Myrosinase 효소 활성의 측정

효소 활성의 측정에 기본적으로 사용된 기질은 sinigrin (allylglucosinolate, 2-propenylglucosinolate)과 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside(4-NPG)이며, 별도의 언급이 없는 한 다음과 같이 촉매활성을 측정하였다.

Sinigrin을 기질로 사용했을 때는 myrosinase의 촉매작용으로 유리된 포도당을 dinitrosalicylic acid(DNS) 시약으로 정량 분석하였다(Summer, 1925). 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)에 용해시킨 기질 10 mM sinigrin 800  $\mu$ L에 10 mM L-ascorbic acid 20  $\mu$ L와 효소시료 100  $\mu$ L를 섞고, 50 mM phosphate buffer로 최종부피가 1 mL가 되도록 조절한 후에 37°C에서 30분간 정치하였다. 반응이 끝난 후, 전체 반응액을 DNS 시약 1 mL와 혼합하고 끓는 물에서 5분간 가열하여 발색시켰다. 적색의 발색 강도를 microplate reader(DTX 800 Multimode Detector, Beckman Coulter, U.S.A)로 550 nm에서 흡광도로 측정하였다. 효소활성 1 단위(unit)은 sinigrin을 가수분해하여 반응시간 1분에 1  $\mu$ mole의 포도당을 생성시키는 효소의 양으로 정의하였다(Fig. 2).

한편, 4-NPG를 기질로 사용한 효소활성 측정법은 다음과 같다(Shikita 등, 1999; Strahsburger 등, 2017). 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)에 용해시킨 기질 10 mM 4-NPG 800  $\mu$ L에 10 mM L-ascorbic acid 20  $\mu$ L와 효소 시료 100  $\mu$ L를 섞고, 50 mM phosphate buffer로 최종부피가 1 mL가 되도록 조절한 후에 37°C에서 30분간 정치하였다. 이 후 반응액에 1 M sodium carbonate( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 100  $\mu$ L를 가하여 반응을 정지시켰다. Myrosinase의 촉매작용으로 생성된 4-nitrophenol을 정량하기 위하여 microplate reader로 405 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1 단위(unit)은 기질 4-NPG를 가수분해 시켜서 반응시간 1분에 1  $\mu$ mole의 4-nitrophenol를 생성시키는 효소의 양으로 정의하였다(Fig. 3).

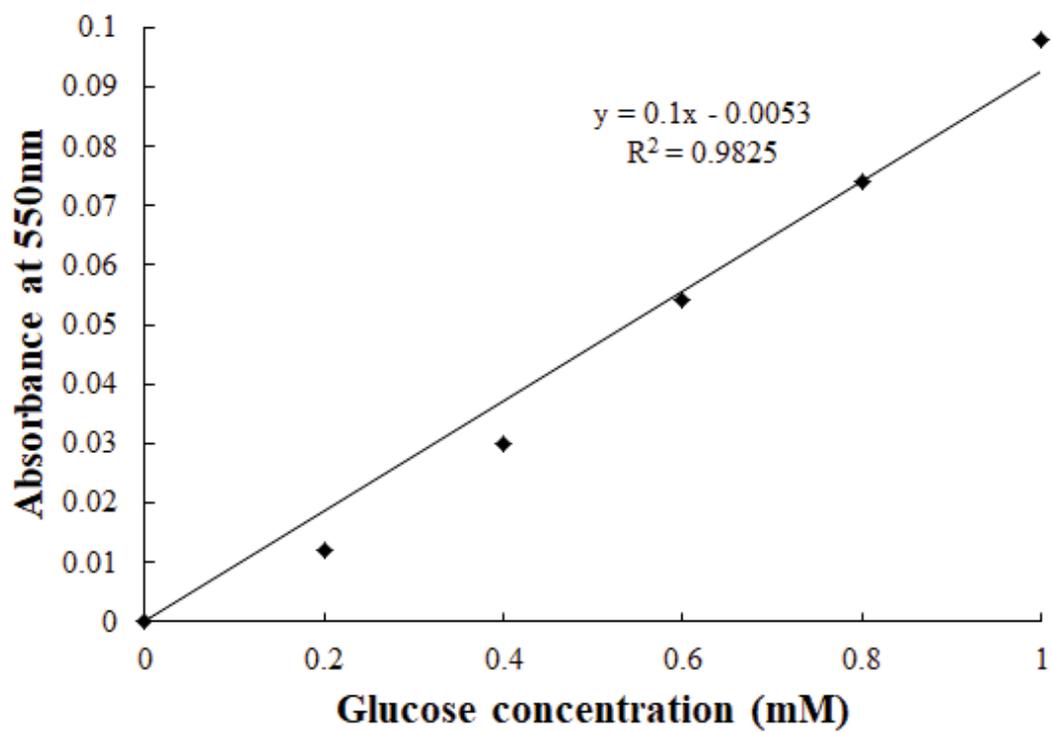


Fig. 2. Standard curve for glucose determination by DNS method.

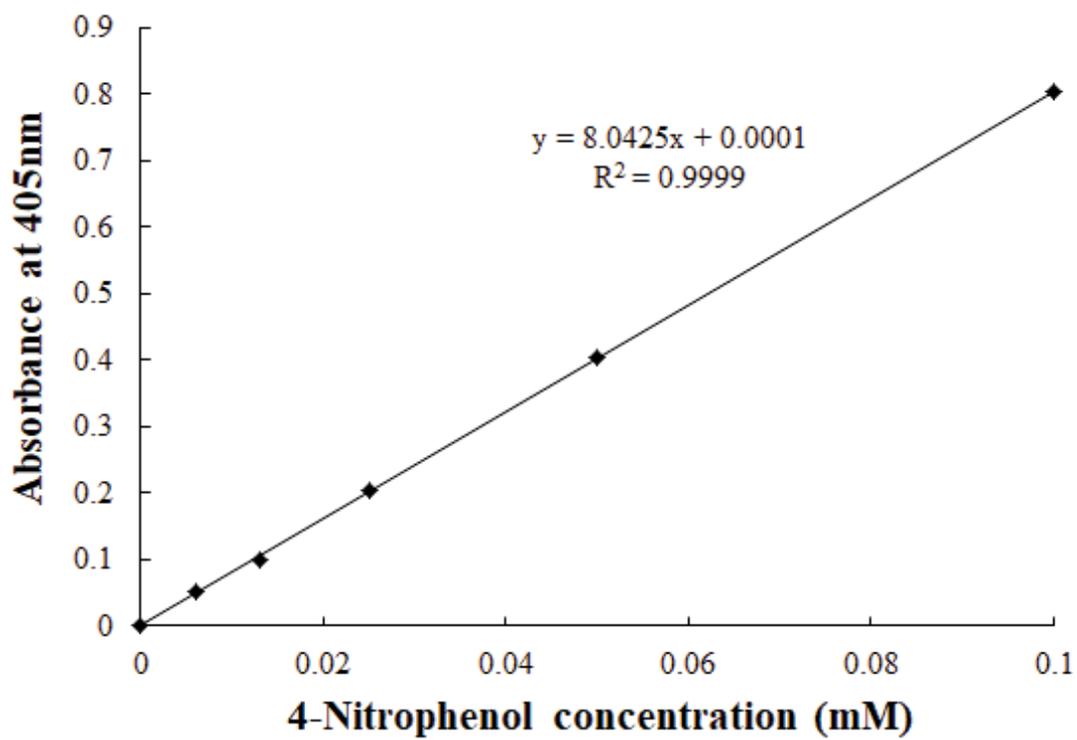


Fig. 3. Standard curve for 4-nitrophenol determination by optical density.

## 2.6. 단백질 정량

미지의 화합물이 다수 혼재된 시료 중에 함유된 단백질은 Lowry법 (Lowry 등, 1951)으로 정량하였고, 비교적 정제된 맑은 용액 상태의 시료 중에 함유된 단백질은 자외선(UV-ray) 흡광법으로 정량하였다. 단백질 표준물질로는 bovine serum albumin(BSA)(을 사용하였다(Fig. 4).

Lowry's solution은 solution A(4 mg/mL NaOH와 20 mg/mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 함유)와 solution B(10 mg/mL potassium sodium tartrate와 5 mg/mL CuSO<sub>4</sub> 함유)를 50:1로 혼합하여 제조하였다.

Lowry법을 응용하여 단백질 시료액 200  $\mu$ L에 Lowry's solution 1 mL를 섞고 실온에서 15분간 정치하였다. 이어서 1 N Folin's phenol reagent 100  $\mu$ L을 가하여 잘 혼합한 후에 실온에 정치하여 30분간 반응시켰다. 반응액의 620 nm에서 흡광도를 microplate reader로 측정하였다.

자외선 흡광법은 단백질의 자외선 흡광계수를 이용한 방법이다. 단백질을 함유한 시료의 자외선 흡광도를 260 nm와 280 nm에서 분광광도계(DR 5000 UV-Vis, Hach, U.S.A)로 각각 측정한 후, 다음 식으로 시료 중의 단백질 농도를 계산하였다(Layne, 1957).

$$\text{단백질 농도 (mg/mL)} = 1.55A_{280} - 0.76A_{260}$$

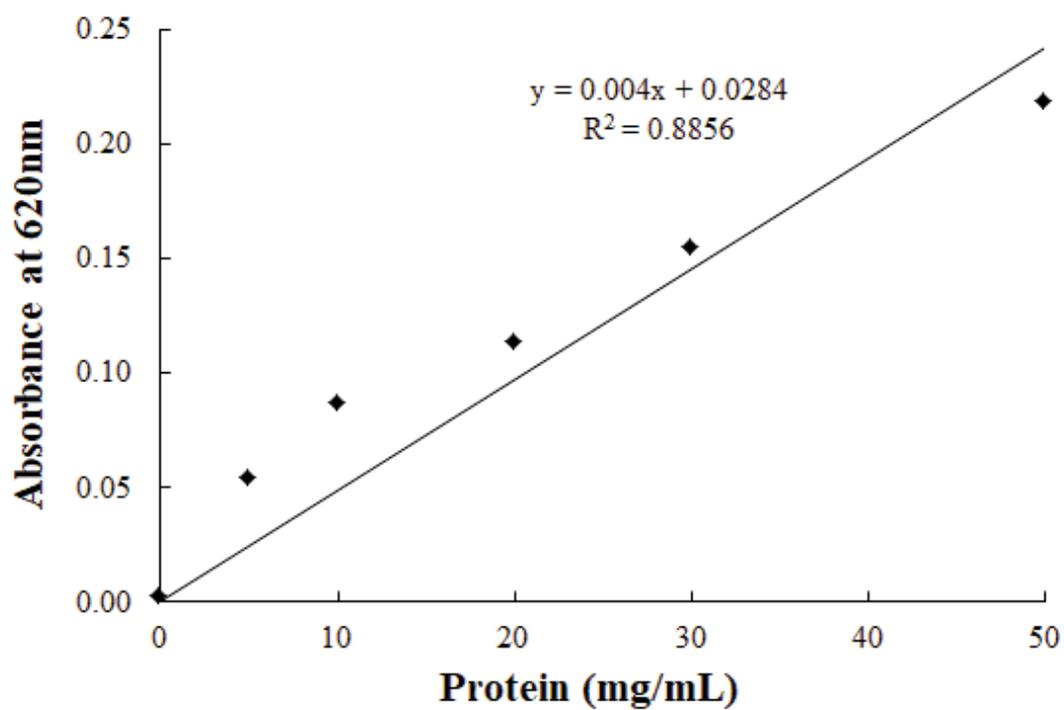


Fig. 4. Standard curve of bovine serum albumin by Lowry method.

## 2.7. Myrosinase의 촉매활성 특성

### 2.7.1. 열역학적 특성

분리된 효소의 최적 반응온도를 결정하기 위해서 10 mM의 sinigrin을 기질로 사용하였고, 반응온도 30~55°C 범위 내에서 5°C 간격으로, 각 온도에서 30분씩 반응시켜 효소활성을 측정하였다.

또한 온도에 따른 효소의 변성(불활성화) 반응 특성을 조사하기 위하여 40~70°C 범위 내에서 10°C 간격으로, 각 온도에서 효소액을 5분~30분 동안 가열한 다음에 즉시 냉각하고, 시료 중에 남아있는 myrosinase의 활성을 측정하였다.

### 2.7.2. 기질 특이성

분리된 효소의 기질특이성을 조사하기 위하여, myrosinase의 기질인 sinigrin (allylglucosinolate, 2-propenylglucosinolate) 이외에,  $\beta$ -glucosidase의 기질인 4-NPG (4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside), salicin (2-(hydroxymethyl)phenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside), indican (3-indoxyl  $\beta$ -D-glucopyranoside)을 사용하였다. 효소활성 측정에 사용된 각 기질의 농도는 다음과 같다. Sinigrin은 0.24 mM, 0.8 mM, 2.4 mM, 8 mM 농도로, 4-NPG는 0.8 mM, 8 mM, 16 mM, 40 mM 그리고 salicin과 indican은 0.3 mM, 1 mM, 3 mM, 10 mM 농도로 각각 사용하였다. Salicin과 indican을 기질로 사용한 효소활성 측정법은 sinigrin을 기질로 사용한 효소활성 측정법과 같다.

### 2.7.3. L-Ascorbic acid의 영향

Myrosinase의 cofactor로 보고된 L-ascorbic acid가 효소의 촉매활성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 효소 반응용 기질로는 전술한 바와 같은 방법으로 10 mM의 sinigrin과 4-NPG를 사용하여 비교하였다. 효소 반응액 1 mL 중 L-ascorbic acid의 최종농도가 0.0 mM, 0.2 mM, 0.6 mM, 1.0 mM이 되도록 10 mM L-ascorbic acid를 각각 0  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 60  $\mu$ L, 100  $\mu$ L씩 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다.

### 2.7.4. Thio 화합물의 영향

황 함유 아미노산 methionine, thiol 화합물인 glutathione, cysteine 그리고 2-mercaptoethanol이 myrosinase의 촉매 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 효소 활성 측정용 기질로 10 mM의 sinigrin과 4-NPG를 사용하였으며, 효소활성 측정법은 전술한 바와 같다. methionine, glutathione, cysteine 그리고 2-mercaptoethanol의 효소 반응액 중 최종농도가 각각 0.0 mM, 1.0 mM, 5.0 mM, 10.0 mM이 되도록 이들 화합물을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. Myrosinase의 촉매 활성 측정 조건

기질 sinigrin과 황산암모늄을 가하여 침전시켜 얻은 조효소액을 사용하여 효소량에 따른 촉매활성을 측정한 결과, 총 반응액 1 mL에 조효소액을 50  $\mu$ L 넣었을 때 776.41 units, 100  $\mu$ L 넣었을 때 817.11 units으로 효소를 넣지 않은 대조구에 비해서 촉매활성이 매우 높았다(Fig. 5). 반응시간에 따른 효소 활성의 변화는 37°C에서 20분 간격으로 최대 60분까지, 조효소액에 의해 가수분해된 sinigrin의 포도당 생성량을 측정하였으며, 반응시간 20분 경과하였을 때 21,849.1  $\mu$ mole으로 효소활성이 크게 증가하였다. 이후 40분에서 24,346.8  $\mu$ mole로 최대치에 도달한 것으로 보였다(Fig. 6).

위와 같이 조효소량과 반응시간의 증가에 따라 sinigrin의 가수분해로 생성된 포도당의 농도는 크게 증가하였다. 따라서 본 연구에 사용된 백겨자 종자 추출물에는 sinigrin을 가수분해하는 효소 myrosinase가 존재함을 확인하였고, 효소활성은 10 mM sinigrin을 기질로 사용하여 pH 6.5, 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 생성된 포도당의 농도를 DNS법으로 측정하는 것을 기본으로 정하였다.

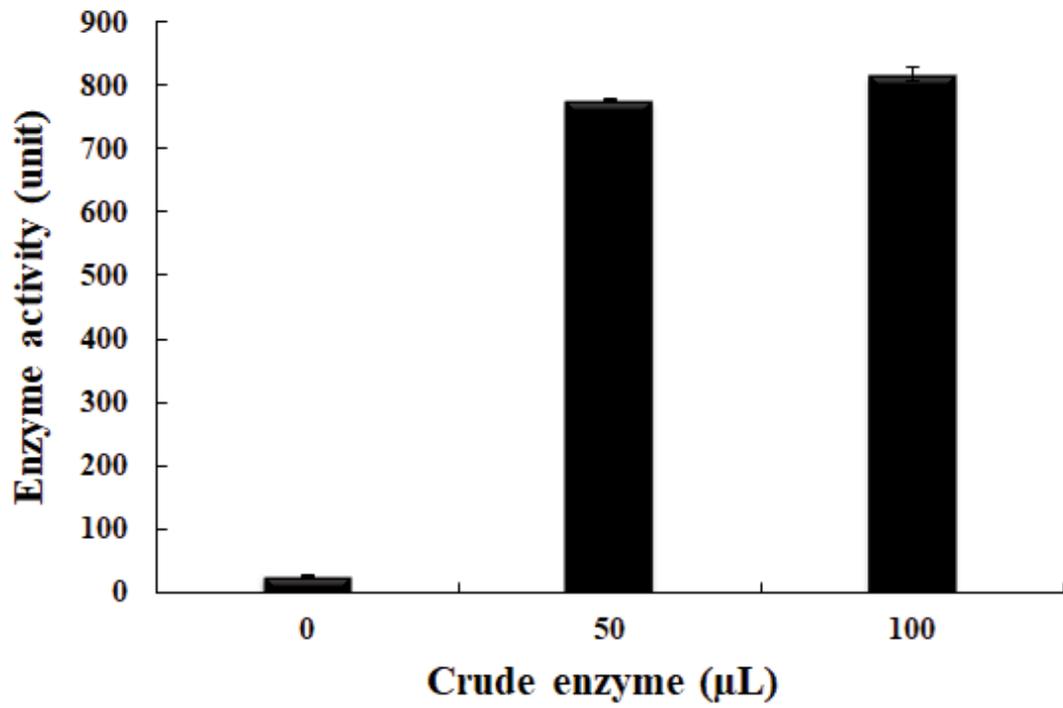


Fig. 5. Dependence of myrosinase activities on the amount of crude enzyme.

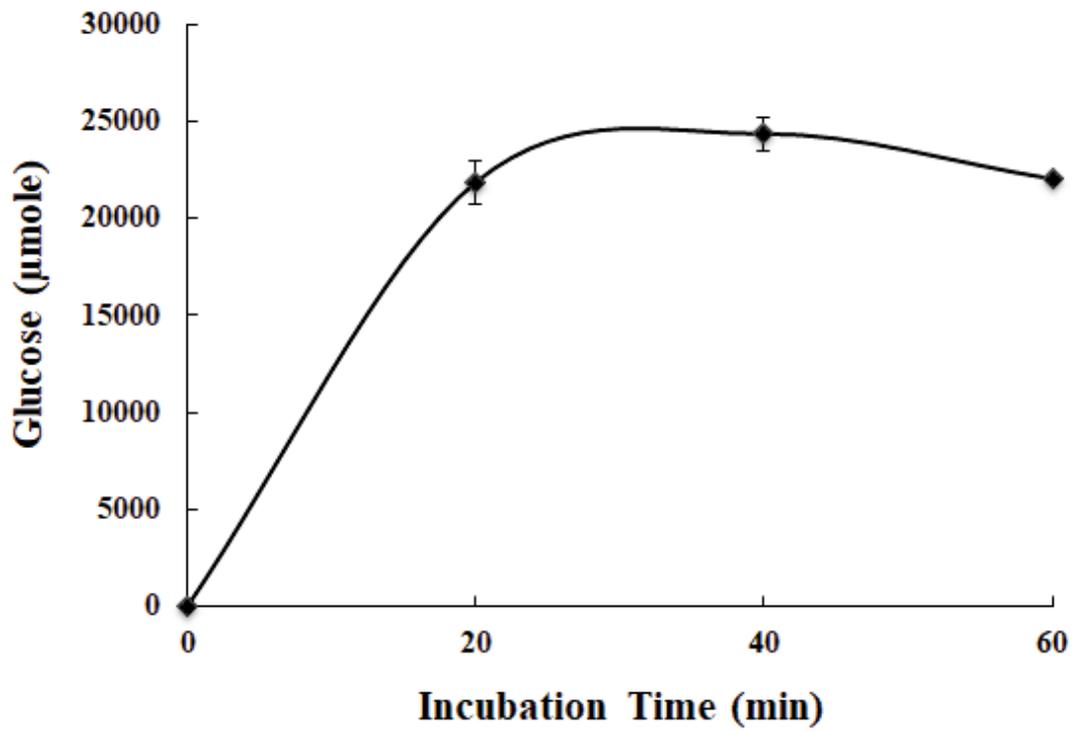


Fig. 6. Dependence of the myrosinase activity on the incubation time.

## 3.2. 백겨자 종자로부터 myrosinase의 분리 정제

### 3.2.1. Concanavalin A-Sepharose column chromatography

황산암모늄을 가하여 침전시켜 얻은 조효소액에 함유된 myrosinase가 탄수화물을 함유한 당단백질인 특성을 이용하여, 황산암모늄 침전물을 Concanavalin A-Sepharose 4B로 채워진 affinity column에 넣었다. 대부분의 단백질은 column 내에 결합되지 않고 흘러나왔고, myrosinase는 Concanavalin A-Sepharose 4B 레진에 결합되었다가, methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside에 의해서 교체되어 유출되었다(Fig. 7). Myrosinase 활성은 methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside가 투입된 이후인 elution volume 60~90 mL, 95~100 mL 그리고 105~115 mL에서, 총 3개 분획의 피크가 나타났다. 촉매활성이 3개 분획으로 나뉘지는 경향은 반복된 실험에서도 마찬가지였다. 이는 백겨자의 종자에는 최소한 3종의 myrosinase가 존재함을 보여주고 있다. 일찍이 Ohtsuru 등(1972)은 겨자가루에서 myrosinase 활성을 나타내는 4가지 종의 당단백질(glycoprotein)을 확인하였다. 이들 효소의 당 함량은 각각 8.6, 15.8, 17.8, 22.5%로 서로 달랐다. 그리고 그 중 3종은 분자량이 153 kDa으로 아미노산 조성이 서로 비슷하였으나, 나머지 한 종은 125 kDa으로 아미노산 조성도 매우 달랐다. 본 연구에서 분리된 백겨자의 myrosinase isozyme들은 당과 결합하는 특이성에 따라 3종으로 서로 분리된 것으로 보아, 효소를 구성하는 탄수화물의 조성에 차이가 있는 것으로 추정된다.

Shin 등(1996)은 갈색 겨자(*Brassica juncea*) 종자에서 myrosinase isozyme 3종을 확인하였으며, 이는 본 연구 결과와 유사하다. Mahn 등(2014)은 브로콜리 myrosinase를 황산암모늄 침전 분획 후 Concanavalin A-Sepharose affinity chromatography로 정제하여 50~55 kDa의 3개의 subunit으로 구성된 157 kDa의 분자량을 가진 myrosinase를 확인하였다.

Affinity chromatography(Fig. 7)에서 효소활성이 나타난 분획들을 각각 따로 모아서, 60~90 mL 부분은 myrosinase I, 95~100 mL 부분은 myrosinase II, 105~115 mL 부분은 myrosinase III라 하였고, 이중 효소 활성의 대부분을 차지하는 myrosinase I 만을 gel filtration 법으로 추가 정제하였다.

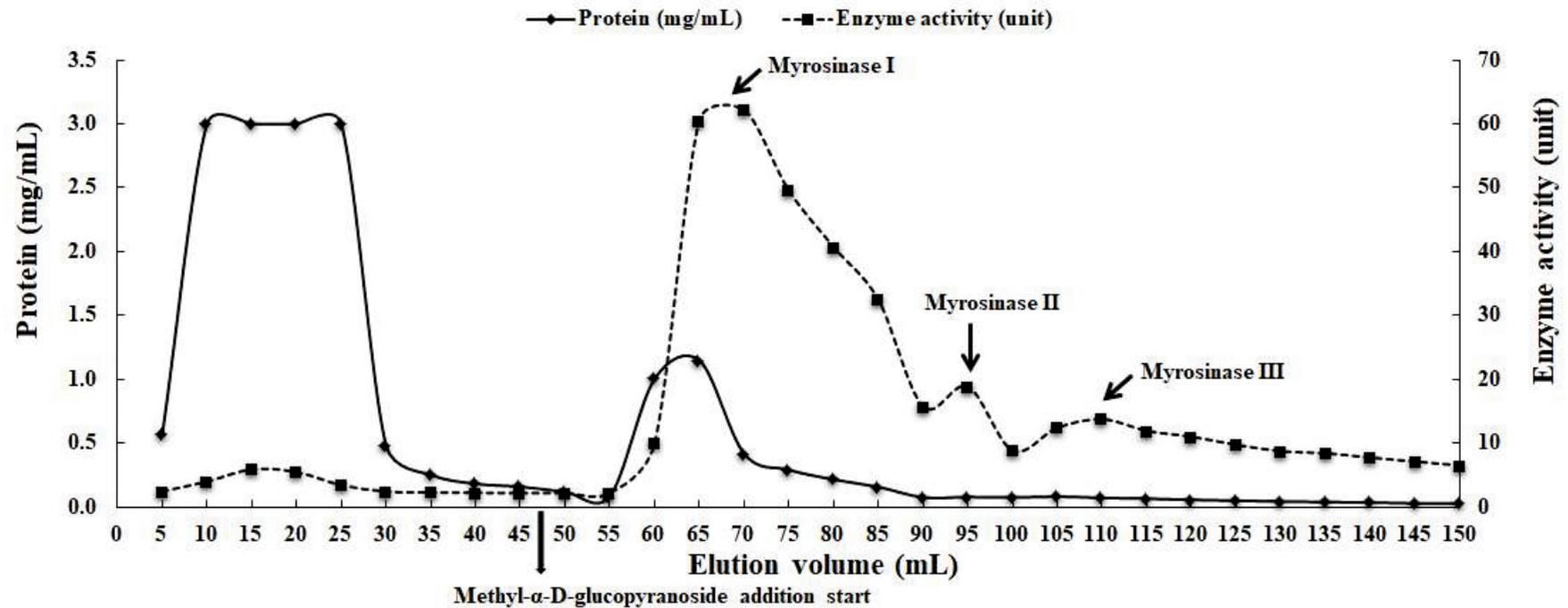


Fig. 7. Affinity chromatography of ammonium sulfate precipitates from white mustard seeds on Concanavalin A-Sepharose column. Elution was carried out with 500 mM methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside in equilibration buffer(20 mM Tris-HCl, pH 7.4). Column size, 1.5  $\times$  16.5 cm; Flow rate, 0.17 mL/min; Elution volume, 5 mL/fraction.

### 3.2.2. Gel permeation chromatography

Myrosinase 활성의 대부분을 차지하는 myrosinase I 분획을 투석하여 과량의 methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside를 제거한 후 동결건조 하였으며, 이어서 소량의 50 mM phosphate buffer (pH 6.5)에 용해시켰다. 이후 단백질의 분자량 차이를 이용하여 myrosinase를 정제하기 위해 Sephadex G-100 으로 충전된 column에 소량의 시료를 투입하여 분리하였다(Fig. 8). Elution volume 39~57 mL 사이에 myrosinase 활성을 나타내는 분획이 나타났고, 이는 단백질 농도를 나타내는 36~60 mL 사이의 분획과 일치하였다.

따라서 백겨자의 종자를 분리원으로 사용하여 조효소액 추출물을 얻고, 황산암모늄을 용해시켜 포화도 50~85%에서 침전된 단백질을 분리한 후 이어서 Concanavalin A-Sepharose affinity column과 Sephadex G-100 gel permeation column으로 분획하면 상당히 정제된 형태의 myrosinase 효소를 얻을 수 있다.

Bellostas 등(2008)은 Concanavalin A-Sepharose affinity chromatography와 이어진 Sephadex G-200 gel filtration법으로 백겨자(*Sinapis alba*)의 myrosinase를 97% 수율로 약 570배 부분 정제하였으며, 140~200 kDa에 해당하는 분자량을 갖는 myrosinase 1종을 얻었다. 하지만 *Brassica carinata*(고면), *Brassica oleracea*(꽃 양배추), *Brassica napus*(유채)의 경우 45%의 비교적 낮은 수율로 약 85배 부분 정제하여 분자량이 500~600 kDa, 270~350 kDa 그리고 140~200 kDa으로 상이한 분자량을 가진 myrosinase isozyme 복합체를 얻었다고 보고하였다.

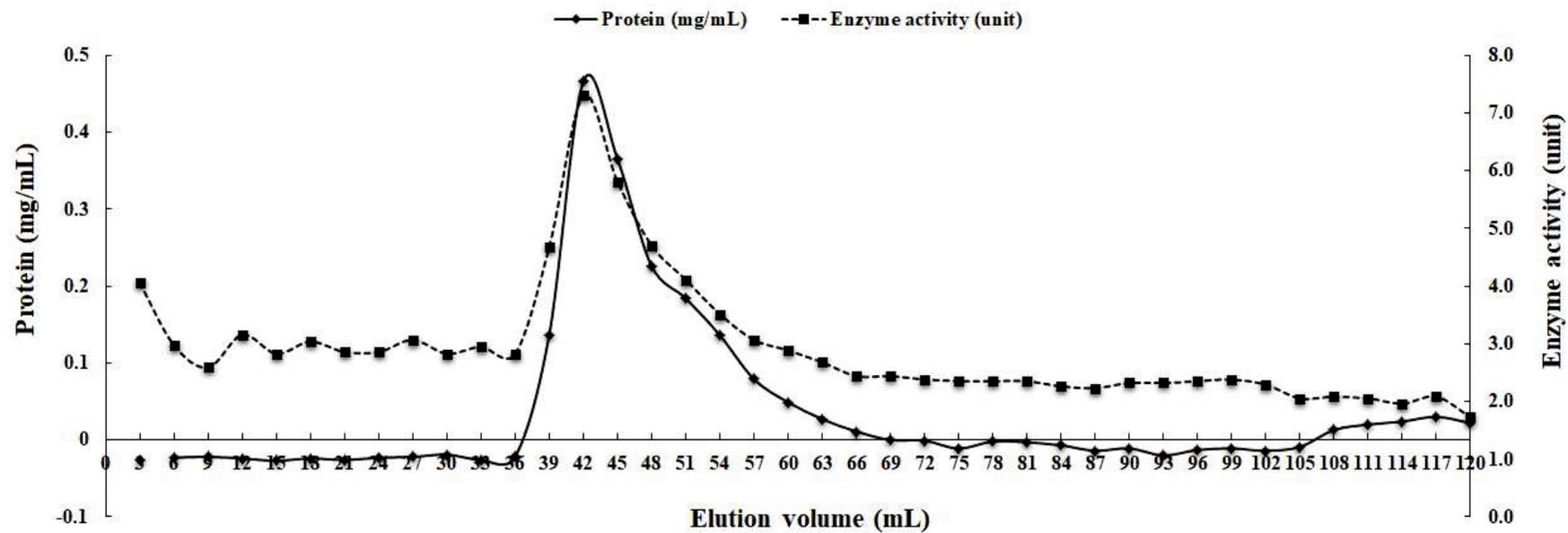


Fig. 8. Gel permeation chromatography of myrosinase I fraction on Sephadex G-100 column. Elution was carried out with 50 mM phosphate buffer(pH 6.5). Column size, 1.5 × 62 cm; Flow rate, 0.075 mL/min; Elution volume, 3 mL/fraction.

### 3.3. Polyacrylamide gel electrophoresis

백겨자 종자로부터 분리 정제된 myrosinase를 확인하기 위하여 polyacrylamide gel electrophoresis(native-PAGE)를 실행한 후 단백질 염색과 methyl red를 이용한 효소 활성 염색을 하였다(Fig. 9).

Gel 상의 단백질을 Coomassie Brilliant Blue R-250로 염색한 결과, 50~85% 포화 황산암모늄 침전물에는 myrosinase 이외에 분자량이 다른 단백질들이 다수 혼재되어 있었으나, Sephadex G-100 column으로 최종 정제된 분획물에는 주로 분자량 171 kDa과 476 kDa에 해당하는 단백질로 채워져 있었다(Fig. 9A). 효소 활성을 확인하기 위하여 동일한 gel을 sinigrin과 methyl red를 사용하여 염색하였더니, 분자량 171 kDa과 476 kDa에 해당하는 단백질이 강력한 효소 촉매활성을 나타내었다(Fig. 9B). 또한 황산암모늄 침전으로 분획된 조효소액과 Sephadex G-100으로 최종 정제된 시료 모두 gel 상의 동일한 위치에서 효소활성을 보였다. 이는 Concanavalin A-Sepharose column과 Sephadex G-100 gel permeation column을 사용하면 황산암모늄 침전 분획물로 부터 상당히 정제된 형태의 myrosinase를 얻을 수 있음을 나타낸다.

Fig. 9B 에서 분자량 171 kDa과 476 kDa에 해당하는 단백질이 강력한 효소 촉매활성을 나타내었으므로, 이들은 myrosinase isozyme이라 할 수 있다. Sephadex G-100 column으로는 171 kDa과 476 kDa에 해당하는 isozyme이 서로 분리되지 않았다가, 전기영동으로 5~20% gradient polyacrylamide gel 상에 분리되어 나타난 것이다. Bellostas 등(2008)은 십자화과 채소 종자로부터 분자량이 500~600 kDa에 해당하는 myrosinase isozyme을 확인하였고, Bhat 등(2015)은 *Lepidium latifolium* (큰키다닥냉이)로부터 효소를 정제하여 160 kDa의 분자량을 갖는 myrosinase를 확인한 바 있다. 이는 본 연구의 분자량 171 kDa과 476 kDa에 해당하는 각각의 myrosinase isozyme과 유사하며, 따라서 백겨자에는 4개 이상의 myrosinase isozyme이 존재한다고 추정할 수 있다.

한편, 분자량이 476 kDa 이상인 위치에 폭 넓게 효소활성이 나타난 배경에 대해서는 분리능이 SDS(sodium dodecyl sulfate)-PAGE에 비해 떨어지는 native-PAGE를 사용하였으며, 전기영동 중에 미량의 myrosinase 분자가 뭉쳐지

면서 다양한 형태의 복합체를 형성하고, myrosinase를 구성하는 당 성분 또한 이 복합체 형성에 영향을 미쳤기 때문으로 추정된다.

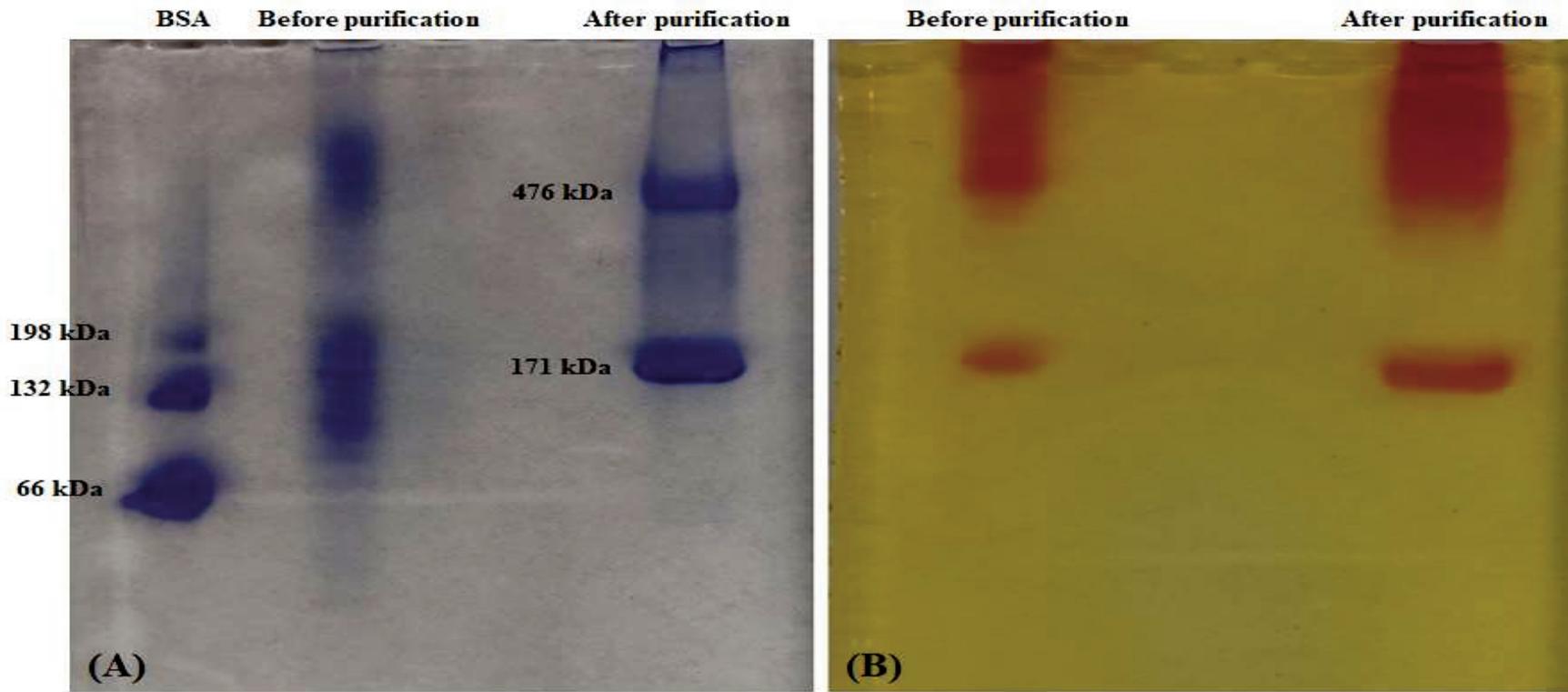


Fig. 9. Native-polyacrylamide gel electrophoresis of the myrosinases from white mustard seeds and protein staining with Coomassie Brilliant Blue R-250(A) or myrosinase activity staining with methyl red(B). BSA, bovine serum albumin monomer, dimer and trimer; Before purification, 50~85% ammonium sulfate precipitate; After purification, myrosinase I fraction after Sephadex G-100 chromatography.

### 3.4. Myrosinase의 촉매활성 특성

#### 3.4.1. 열역학적 특성

분리된 myrosinase의 최적반응온도를 찾기 위하여 일정온도에서 30분간 반응시킨 결과는 Fig. 10에 나타낸 바와 같다. 반응시간 30분 기준으로 최적반응온도는 약 43°C로 추정된다. 반응온도가 증가함에 따라 효소활성도 증가하나, 그와 더불어 효소의 불활성화가 진행될 수 있다. 50°C 이상에서는 효소활성이 급격히 감소하였다. 이러한 결과와 유사하게, Mahn 등(2014)의 연구에서 브로콜리로 부터 얻은 myrosinase의 최적반응온도는 40°C였고, Li 등(2005)의 연구에서 고추냉이(horseradish)로 부터 얻은 myrosinase의 최적반응온도는 37~45°C로 50°C 이상에서는 촉매활성이 급격히 감소하였다. 그리고 Prakash 등(2013)은 꽃양배추 myrosinase의 최적반응온도는 50°C, Bhat 등(2015)은 *Lepidium latifolium* (큰키다닥냉이) myrosinase의 최적반응온도는 50°C였다고 각각 보고하였다. 하지만, Van Eylen 등(2008)은 백겨자의 myrosinase 최적반응온도가 대기압 하에서는 60°C, 고압(200 MPa) 하에서는 40°C로 효소가 처한 환경에 따라서 다르다고 하였다. 한편, 미생물 기원의 myrosinase에 대한 연구로 Albaser 등(2016)은 *Citrobacter* 균주의 myrosinase는 25°C에서, Hamed 등(2016)은 *Bacillus thuringiensis*의 myrosinase는 50°C에서 각각 최대반응속도를 보였다고 하였다.

온도는 효소의 반응속도뿐만 아니라 안정성에도 영향을 미치며, 효소 단백질은 고온에서 변성되어 촉매 활성을 잃는다. 가열에 의한 myrosinase의 변성 속도는 단분자 반응(1st order reaction)으로 표현된다(Ghawi 등, 2012).

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (1)$$

N은 효소단백질 분자 수, t는 가열시간, 그리고 k는 반응속도 상수이며, 위 식은 아래와 같이 표현할 수 있다.

$$\ln \frac{N}{N_0} = -kt \quad (2)$$

$N_0$ 는 초기 효소단백질 분자 수이며, 반응속도 상수(k)는 아레니우스 식 (Arrhenius equation)으로 표현된다.

$$k = A \cdot e^{\frac{-E}{RT}} \quad (3)$$

즉, 위 식은 아래와 같이 표현할 수 있다.

$$\ln k = -\frac{E}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A \quad (4)$$

E는 activation energy(활성화 에너지), R은 gas constant(가스상수,  $1.9872 \times 10^{-3}$  kcal · K<sup>-1</sup> · mol<sup>-1</sup>) 그리고 T는 절대온도(K), A는 아레니우스 상수 (frequency factor)이다.

위와 같은 온도와 반응속도의 관계를 이용하여, 가열온도 40~70°C 범위에서 온도에 따른 반응속도 상수(k)를 구하였다(Table 1). 50°C부터 효소의 변성으로 촉매 활성을 잃기 시작하였고, 온도가 높아질수록 변성속도도 증가하였다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 Arrhenius plot을 제도하였고, 그로부터 활성화 에너지를 계산하였다(Fig. 11). Myrosinase의 변성(파괴)에 필요한 활성화 에너지는 18.3 kcal/mol(76.6 kJ/mol)이었다. 이는 비타민과 같은 영양분이 파괴되는데 소요되는 에너지(2~20 kcal/mol(8.4~83.7 kJ/mol))와 비슷한 수준이다. Ghawi 등(2012)은 양배추(green cabbage)의 myrosinase를 파괴하는데 필요한 활성화 에너지는 58.3~99.5 kJ/mol, Verkerk 등(2004)는 적양배추(red cabbage)의 myrosinase 변성에 필요한 활성화 에너지는 155 kJ/mol라고 보고하였으며 Van Eylen 등(2007)은 겨자에서 추출한 myrosinase를 파괴하는데 필요한 활성화 에너지는 446.4~496.0 kJ/mol 그리고 Ludikhuyze 등(1999)은 브로콜리의 myrosinase를 파괴하는데 필요한 활성화 에너지는 113.5~134.1 kJ/mol이라고 보고하였다. 또한 Van Eylen 등(2008)은 겨자 종자가 첨가된 브로콜리 즙에서 추출한 myrosinase를 파괴하는데 필요한 활성화 에너지는 327.5 kJ/mol라고 보고하였다. 본 연구에서 계산한 효소 변성에 필요한 활성화 에너지와 비교하였을 때 모두 높은 값을 나타내었다. 이 차이는 십자화과의 품종과 분리 정제 방법에 따라 myrosinase의 열안정성이 다르다고 추정된다.

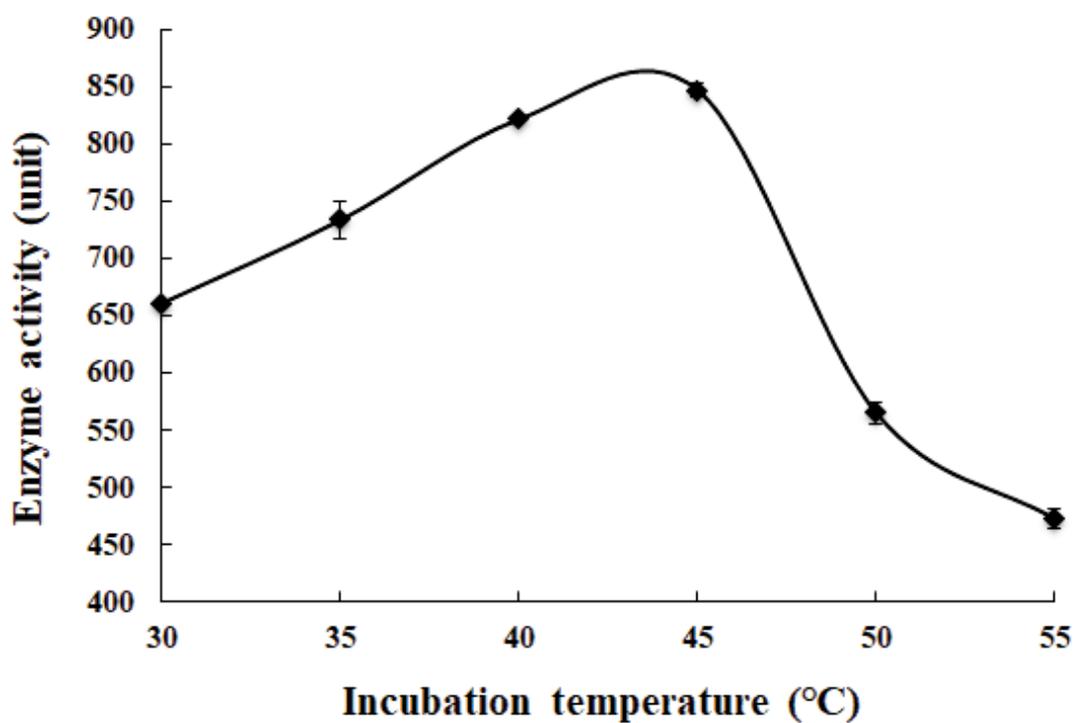


Fig. 10. Effect of incubation temperature on the activity of myrosinase from white mustard seeds.

**Table 1. Dependence of inactivation rate constant of myrosinase from white mustard seeds on incubation temperature**

Parameters	Incubation temperature (°C)			
	40	50	60	70
Inactivation rate constant (k, min <sup>-1</sup> )	0.030	0.181	0.270	0.446

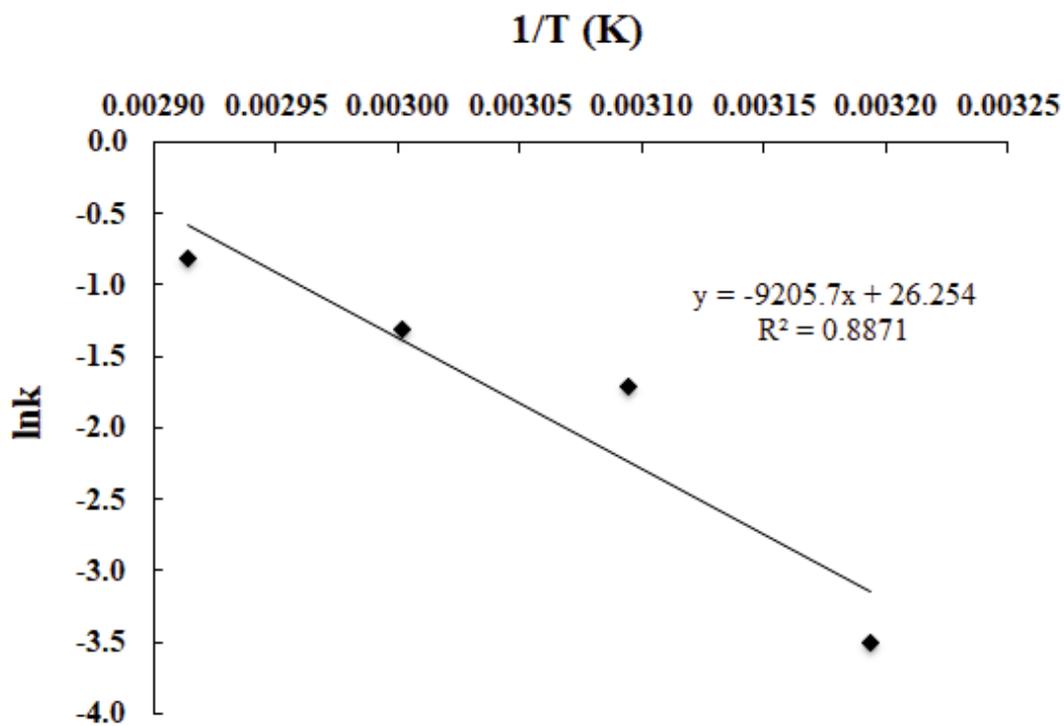


Fig. 11. Arrhenius plot for temperature dependence of inactivation rate of myrosinase from white mustard seeds.

### 3.4.2. 기질 특이성

Myrosinase(EC 3.2.1.147)는  $\beta$ -glucosidase(EC 3.2.1.21)와 더불어 glycoside hydrolase family 1(GH1)에 속하는 glycosidases의 일종으로,  $\beta$ -glucosidase와 매우 유사한 특성을 보인다. myrosinase는 S-glycosides의 가수분해를 촉진하는 유일한 효소이지만, O-glycosides의 가수분해를 촉진할 가능성이 있다. 그래서 S-glycosides인 sinigrin이외에 O-glycoside인 4-NPG, salicin 그리고 indican을 기질로 사용하여 분해되는 정도를 측정하였다. 기질의 농도와 촉매반응속도 간에 관계를 나타내는 Michaelis-Menten equation의 양변에 역수를 취하면 다음과 같은 방정식이 얻어진다.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5)$$

V는 반응속도  $V_{max}$ 는 최대반응속도이며, [S]는 기질의 농도 그리고  $K_m$ 은 Michaelis - Menten 상수이다. 각각의 기질 농도가 효소의 촉매반응속도에 미치는 영향을 조사하여 Lineweaver-Burk plot으로 표현하였다(Fig. 12). Fig. 12으로부터 효소의 기질에 대한 친화도를 나타내는 상수  $K_m$ 과 최대반응속도  $V_{max}$ 를 계산하여 Table 2에 나타내었다.

$K_m$ 값은 indican이 0.12 mM로 가장 낮았으며, 그 뒤로 sinigrin 1.03 mM, 4-NPG 3.77 mM 이었다. 따라서 indican이 효소 myrosinase와 기질 친화성이 가장 크며, 4-NPG는 효소와의 기질 친화성이 가장 낮았다. Salicin의  $K_m$ 은 음수로 myrosinase에 의해 가수분해 되지 않았으며, 따라서 salicin에 대한  $V_{max}$ 는 의미가 없다. 기질 sinigrin에 대한  $V_{max}$ 는 270.27  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 으로 가장 높았으며, indican과 4-NPG에 대해서는 각각 82.64  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 과 59.52  $\mu\text{mol}/\text{min}$ 이었다. 따라서 본 연구에서 백겨자 종자로부터 분리된 효소는 S-glycoside뿐만 아니라 O-glycoside 또한 가수분해하는 myrosinase임을 알 수 있다.

한편, Li 등(2005)은 고추냉이(horseradish) myrosinase의 sinigrin에 대한  $K_m$ 과  $V_{max}$ 는 각각 0.128 mM과 0.624  $\mu\text{mole}/\text{min}$ 이었다고 보고하였으며, Bhat 등(2015)은 *Lepidium latifolium* (큰키다닥냉이) myrosinase의 sinigrin에 대한  $K_m$ 과  $V_{max}$ 는 각각 0.171 mM과 0.302  $\mu\text{mole}/\text{min}$ 이었다고 보고하였다. 이는 본 연

구의 대상인 백겨자 종자의 myrosinase와 비교하였을 때, 고추냉이와 *Lepidium latifolium*의 myrosinase가 기질 sinigrin에 대한 친화성이 더 높으나,  $V_{max}$ 는 백겨자 종자의 myrosinase가 더 높은 것으로 해석된다. 또한 Zhang 등(2019)은 무의 종자에서 myrosinase를 분리하여 sinigrin에 대한  $K_m$ 값을 조사한 결과 1.8 mM이었고, 본 연구에서 추출한 효소보다 기질 sinigrin에 대한 친화성이 더 낮은 것으로 추정된다. Malabed 등(2014)은 갈색겨자에서 myrosinase를 분리하여 sinigrin에 대한  $K_m$ 값 0.0436 mM을 확인한 바 있으며 이는 백겨자보다 갈색겨자의 myrosinase가 기질 친화성이 더 높은 것으로 사료된다.

Myrosinase에 의한 각종 기질의 가수분해 여부를 반응시간에 따라 조사한 결과를 Fig. 13에 나타내었다. Sinigrin, salicin 그리고 indican은 효소에 의해 가수분해 되어 생성된 포도당 생성량으로 나타내었으며(Fig. 13A), 4-NPG는 효소에 의해 가수분해 되어 생성된 4-nitrophenol 생성량으로 나타내었다(Fig. 13B). Sinigrin에 대한 촉매활성은 40분에서 24,346.8  $\mu\text{mole}$ 로 가장 높았으며, 4-NPG와 indican에 대해서는 60분에서 각각 741.5  $\mu\text{mole}$ 와 2,708.7  $\mu\text{mole}$ 으로 최대치를 보였으며, salicin을 기질로 사용했을 때는 40분에서 488.5  $\mu\text{mole}$ 로 가장 높았다. 하지만 salicin의 경우 sinigrin, 4-NPG 그리고 indican과 달리 반응시간에 따른 생성량 차이는 크지 않았다.

기질에 대한  $K_m$  및  $V_{max}$ (Table 2)와 반응시간에 따른 효소활성 변화(Fig. 13)를 근거로 myrosinase에 의한 salicin의 가수분해는 매우 미약하다고 판단할 수 있다. 그리고 4 종의 기질 중에서 S-glycoside인 sinigrin이 O-glycoside인 다른 기질에 비해서 더 빠른 속도로 분해되었다. 기질 indican는 myrosinase와 친화성이 높아서 결합은 잘 되지만 가수분해 되는 속도는 느린 것으로 판단된다.

한편, myrosinase는 일부 O-glycoside 기질을 가수분해하는 것으로 보고되어있다(Durham 등, 1990; Shikita 등, 1999; Andersson 등, 2009; Nong 등, 2010). Durham 등(1990)은 *Lepidium latifolium* (큰키다닥냉이)에서 분리된 myrosinase의 기질특이성에 대해서 조사하였으며, 효소의 기질로 amygdalin, salicin 등 S-glycoside와 O-glycoside 29개 중에서 sinigrin, glucotropaeolin, 4-NPG 등 4종의 화합물만 myrosinase로 분해되었다고 보고하였다. Andersson 등(2009)은 *Arabidopsis thaliana*(애기장대)에서 분리한 myrosinase가 기질로 사용한 4-NPG

를 가수분해하는 것을 확인하였다. Nong 등(2010)은 myrosinase 유전자를 재조합하여 4 종의 O-glycoside 기질을 조사하였으며, 그 중 2-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside(2-NPG)와 4-NPG만 가수분해 되었다고 보고하였다.

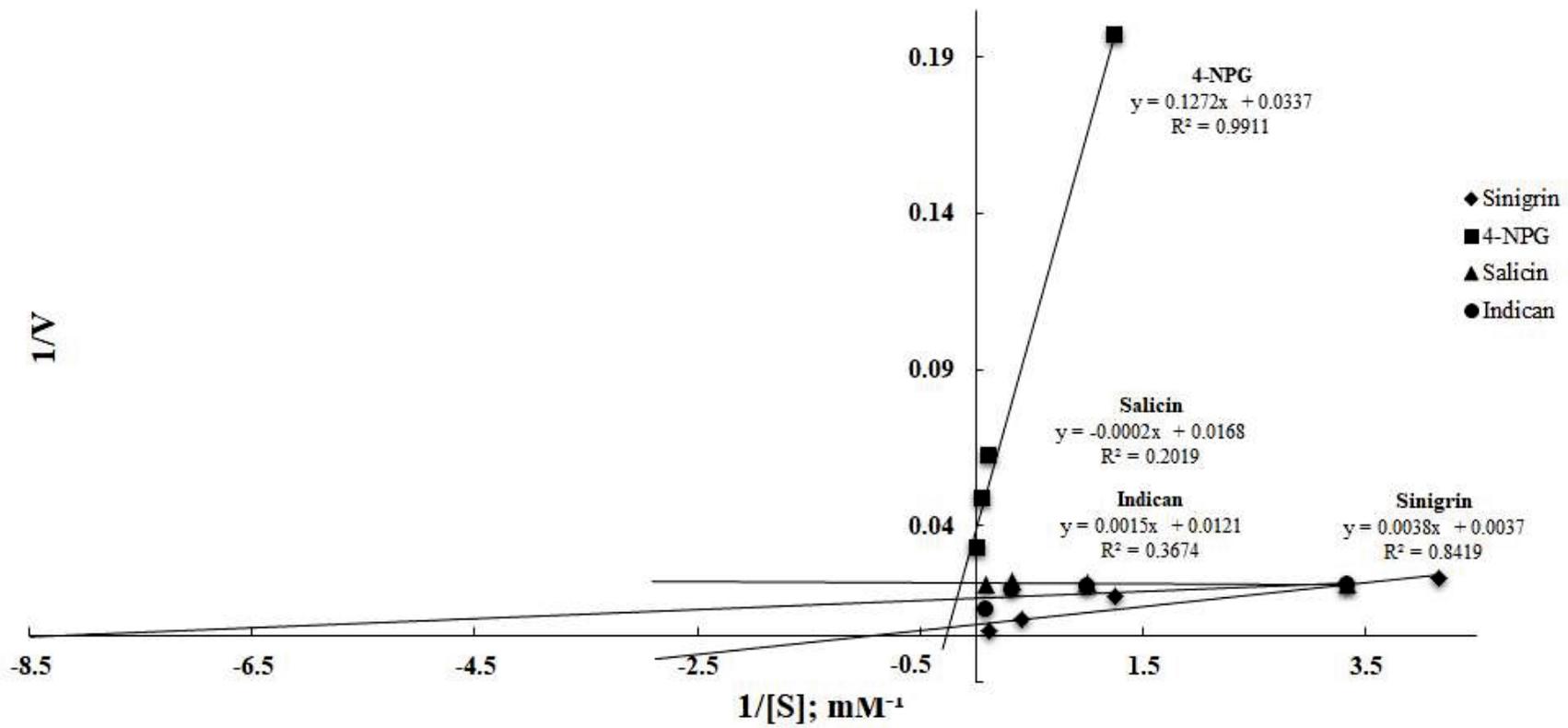


Fig. 12. Lineweaver-Burk plots of the myrosinase from white mustard seed for substrates. Sinigrin, 2-propenylglucosinolate; 4-NPG, 4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside; Salicin, 2-(hydroxymethyl)phenyl-β-D-glucopyranoside; Indican, 3-indoxyl β-D-glucopyranoside.

**Table 2. Kinetic parameters of the myrosinase from white mustard seed for substrates**

Parameter	Substrate			
	Sinigrin (2-propenylglucosinolate)	4-NPG (4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside)	Salicin (2-(hydroxymethyl)phenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside)	Indican (3-indoxyl- $\beta$ -D-glucopyranoside)
K <sub>m</sub> (mM)	1.03	3.77	-0.01	0.12
V <sub>max</sub> ( $\mu$ mole/min)	270.27	29.67	not applicable	82.64

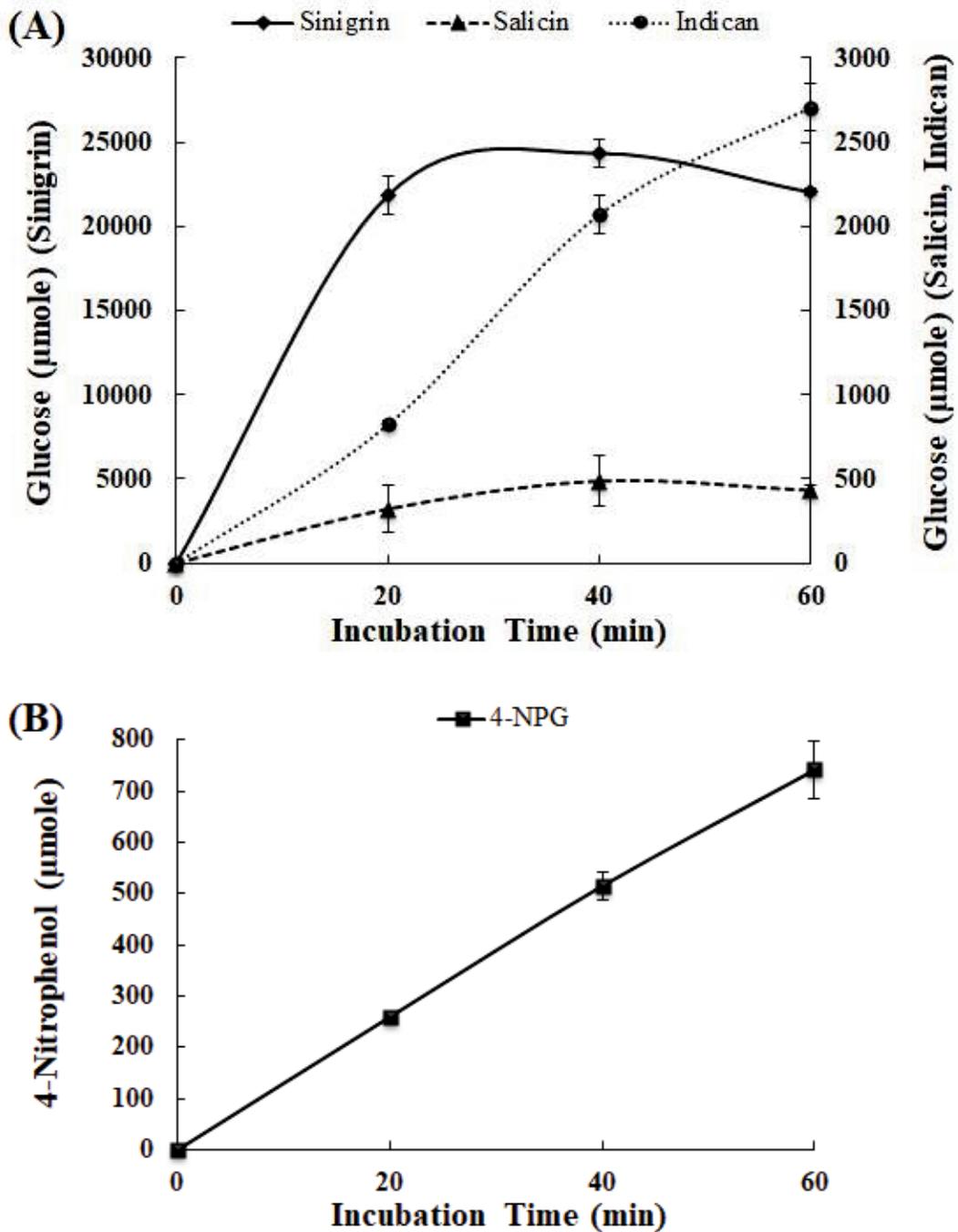


Fig. 13. Dependence of myrosinase activity on reaction time. Sinigrin, 2-propenylglucosinolate; 4-NPG, 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside; Salicin, 2-(hydroxymethyl)phenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside; Indican, 3-indoxyl  $\beta$ -D-glucopyranoside.

### 3.4.3. L-Ascorbic acid의 영향

Myrosinase의 cofactor로 알려진 L-ascorbic acid를 농도에 따라 촉매반응속도에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 14).

Myrosinase의 기질로 sinigrin을 사용하였을 때는 L-ascorbic acid의 활성 촉진 효과가 매우 컸다. L-Ascorbic acid의 농도가 0.2 mM일 때, 효소촉매활성이 240 units로 L-ascorbic acid를 첨가하지 않았을 때의 60 units에 비해서 4배 정도 증가하였다(Fig. 14A). 이러한 활성 촉진효과는 L-ascorbic acid의 농도가 1.0 mM일 때도 비슷하였다. Sinigrin이 L-ascorbic acid의 첨가 유무에 따라 큰 효소 활성 차이를 보이는 것은 myrosinase는 다른  $\beta$ -glucosidase와 달리 활성부위에 양성자 공여체로서 glutamate 대신에 glutamine 잔기를 갖고 있기 때문이다. Myrosinase의 glutamine 잔기는 L-ascorbic acid의 결합부위로 작용을 하며, 따라서 L-ascorbic acid는 myrosinase의 보조 인자이다(Nong 등, 2010).

Myrosinase의 기질로 4-NPG를 사용하였을 때는 sinigrin의 경우처럼 효소활성에 극적인 차이는 없었지만, L-ascorbic acid가 촉매 활성을 증가시켰다. L-Ascorbic acid가 없어도 효소활성은 13.5 units에 상당하였고, L-ascorbic acid의 농도가 0.6 mM일 때는 효소활성이 1.6배 정도 증가하였다(Fig. 14B).

기질 sinigrin과 4-NPG는 기본적으로 전자는 S-glycoside, 후자는 O-glycoside로 구조가 서로 다르다. 그래서 L-ascorbic acid가 myrosinase의 가수분해 활성에 미치는 효과도 다르게 나타날 수 있다. 이러한 결과는 L-ascorbic acid가 반경쟁적 활성화제(uncompetitive activator)로서 무에서 얻은 myrosinase의 sinigrin과 4-NPG의 가수분해 활성을 증가하였다는 보고와 유사하다(Shikita 등, 1999). Li 등(2005)도 고추냉이(horseradish)의 myrosinase 활성이 0.5 mM L-ascorbic acid에 의해서 촉진되어 Km과 Vmax 모두 증가하였다고 보고하였으며, Bhat 등(2015) 또한 *Lepidium latifolium* (큰키다닥냉이)의 myrosinase 활성이 0.5 mM L-ascorbic acid에 의하여 약 6.5배 증가하였다고 보고하였다. L-Ascorbic acid에 의한 효소활성 촉진은 L-ascorbic acid의 산화환원반응과 무관하다(Tsuruo 등, 1967). Burmeister 등(2000)은 x-ray crystallography를 이용하여 ascorbic acid가 어떻게 myrosinase의 활성을 촉진하는지 연구한 결과,

L-ascorbic acid가 myrosinase의 포도당 결합부위가 아닌 aglycon이 결합하는 부위와 겹치는 곳에 결합하여, 포도당 잔기를 떼어내는 가수분해반응(deglycosylation)에서 촉매작용을 하는 염기(base)의 역할을 담당하기 때문이라고 보고하였다.

한편, sinigrin과 4-NPG 공통적으로 L-ascorbic acid의 농도가 일정 수준을 넘어서면 myrosinase의 촉매활성이 다소 저해되는 결과를 보였다(Fig. 14). L-Ascorbic acid에 의한 myrosinase의 촉매활성 저해와 관련하여, Kleinwächter 등(2004)은 *Tropaeolum majus*(한련화)에서 분리된 myrosinase를 사용하여 본 연구와 비슷한 결과를 얻었으며, 그들의 연구에서 L-ascorbic acid가 없는 상태에서는 myrosinase의 촉매활성은 없었으며, 2 mM 농도에서 최대 활성을 나타냈고, L-ascorbic acid 농도가 그 이상으로 증가하면 촉매활성이 다소 떨어졌다고 보고하였다. 고추냉이(horseradish)와 *Lepidium latifolium* (큰키다닥냉이)의 myrosinase 활성 또한 L-ascorbic acid의 농도가 0.7 mM 이상부터 저해되었다고 보고되었으며(Li 등, 2005; Bhat 등, 2015), Andersson 등(2009)은 *Arabidopsis thaliana*(애기장대)의 myrosinase 활성이 1 mM 이상부터 저해된다고 하였다. 일정 농도 이상의 L-ascorbic acid는 기질이 효소에 결합하는 부위에 결합하기 때문에 myrosinase의 경쟁적 저해제(competitive inhibitor)로 작용하여 효소활성을 억제한다는 보고가 있다(Tsuruo 등, 1968; Burmeister 등, 2000; Pontoppidan 등, 2001).

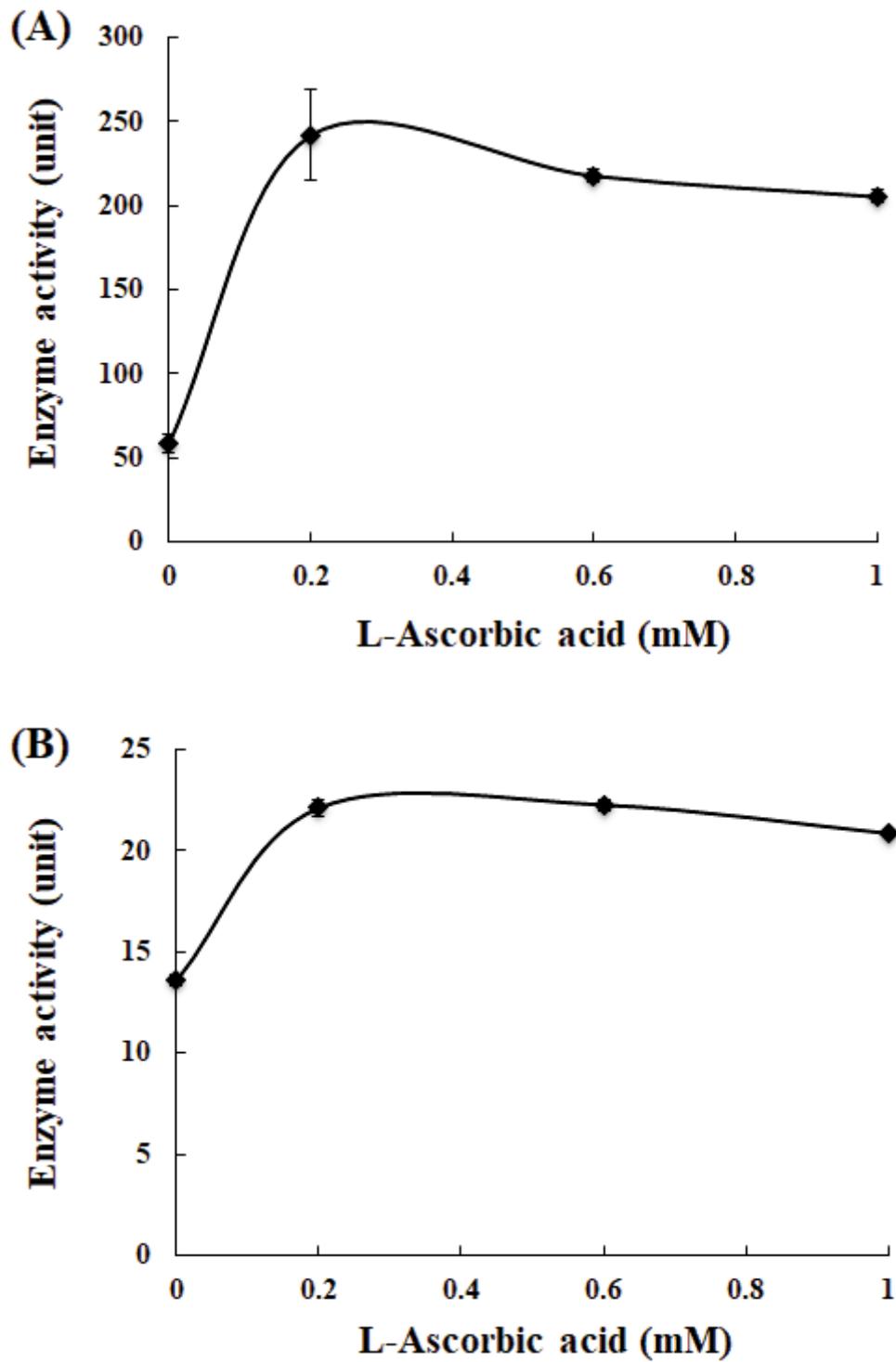


Fig. 14. Effect of L-ascorbic acid on the hydrolysis of sinigrin (A) and 4-NPG (B) by myrosinase from white mustard seeds.

#### 3.4.4. Thio 화합물의 영향

Myrosinase의 촉매활성에 미치는 thio 화합물의 영향을 조사하였으며, 기질로는 10 mM의 sinigrin과 4-NPG를 각각 사용하였다(Fig. 15).

S-glycosidic 결합을 가진 sinigrin을 기질로 사용했을 때(Fig. 15A), 황 함유 아미노산인 methionine은 농도 의존적으로 효소 활성을 촉진하였으나, 황화수소기 (sulfhydryl groups, -SH)를 갖고 있는 cysteine, 2-mercaptoethanol과 glutathione은 모두 sinigrin 분해 활성을 저해하였다.

Hamed 등(2016)은 *Bacillus thuringiensis*에서 분리한 myrosinase를 기질 sinigrin을 사용하여 5 mM의 methionine 및 cysteine의 영향을 조사하였는데, 각각의 thio 화합물은 myrosinase의 활성화제임을 확인하였지만 대조구와 큰 차이는 없었으며, 2-mercaptoethanol의 경우 60 mM 농도까지는 활성이 증가하다가 그 이상에서는 대조구에 비해 활성이 감소하였다고 보고하였다.

한편, O-glycosidic 결합이 있는 4-NPG를 기질로 사용하였을 때는(Fig. 15B), S-glycosidic 결합을 가진 sinigrin을 기질로 사용했을 때와 다른 결과가 얻어졌다. Glutathione은 농도 의존적으로 약하게 효소활성 촉진효과를 나타내었고, 그 이외에 cysteine, methionine, 2-mercaptoethanol은 최대 10 mM 농도까지 효소활성에 뚜렷한 영향이 없었다. 따라서 thio 화합물의 존재 여부는 myrosinase의 4-NPG 분해 활성에 영향이 없다고 해석될 수 있다. 이와 유사하게 Durham 등(1990)도 황화수소기를 지닌 dithiothreitol이 5 mM 농도에서 myrosinase의 4-NPG 분해 활성을 44% 증가시켰으나, 2-mercaptoethanol은 효과가 없다고 보고하였다.

Thio 화합물은 항산화제로서 효소 단백질의 산화/환원에 관여하여 촉매활성에 영향을 끼칠 수 있다(Cleland, 1964; Gilbert, 1984; Alliegro, 2000; El-Shora 등, 2009; Bhat 등, 2015; Bhat 등, 2019). Bhat 등(2015)은 myrosinase를 환원제인 dithiothreitol(DTT)과 산화제인 Copper(II) chloride( $\text{CuCl}_2$ )으로 처리하여 효소활성을 측정한 결과, 환원제인 DTT의 존재는 효소의 활성을 증가시켰고, 산화제인  $\text{CuCl}_2$ 의 존재는 효소 활성을 감소시켰다고 보고하였다. 그러나, 본 연구에서는 thio 화합물이 효소활성에 미치는 효과는 단백질의 산화/환원 반응과 관련이 없

음을 보여준다. Thio 화합물이 동일한 효소 myrosinase에 대해서 기질에 따라 서로 다른 효과를 나타내는 것은 sinigrin과 4-NPG의 분해기전이 서로 다른 것을 반영하고 있다.

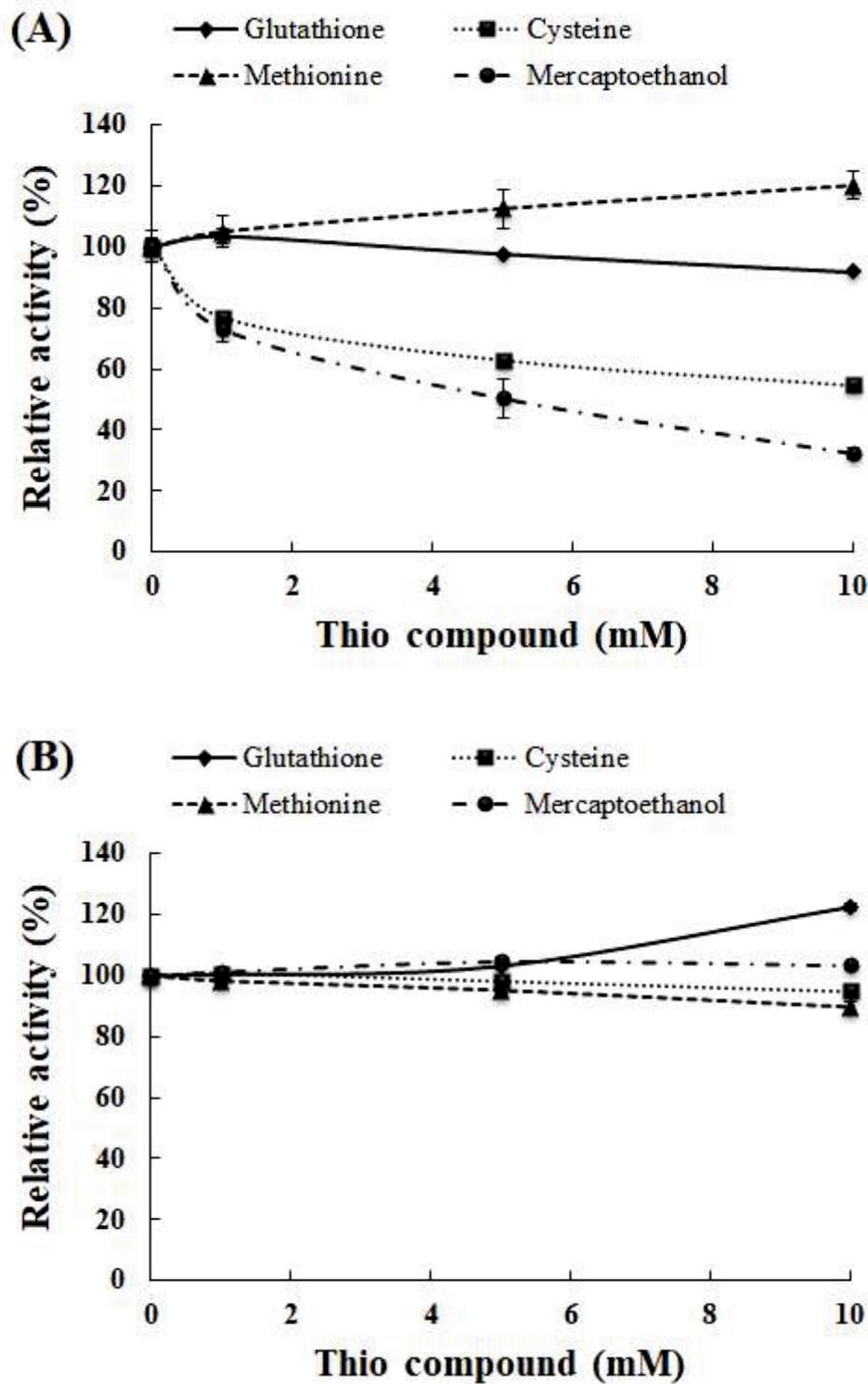


Fig. 15. Effect of thio compounds on the hydrolysis of sinigrin (A) and 4-NPG (B) by myrosinase from white mustard seeds.

## 4. 결 론

본 연구에서는 백겨자(white/yellow mustard, *Brassica alba*, *Sinapsis alba*)의 종자에 들어있는 효소 myrosinase(EC 3.2.1.147, thioglucosidase, thioglucoside glucohydrolase, sinigrinase)를 분리하였고, 효소의 열역학적 특성, 기질 특이성 그리고 효소의 활성화에 영향을 미치는 화합물에 대해서 조사하였다.

Myrosinase는 백겨자 종자를 분쇄하여 얻은 분말에 완충액(50 mM phosphate buffer)을 섞어서 추출한 후 추출물을 원심분리하여 상정액을 얻었다. 상정액에 황산암모늄을 녹인 후 단백질을 침전시켜서 포화도 50~85%사이의 침전물을 얻었고, 침전물을 투석시켜 염분을 제거 후 동결건조 하였다. 동결건조된 시료를 완충액에 용해시킨 다음 Concanavalin A-Sepharose column을 통과시켜서 당단백질을 분리 회수하였다. 이때 3개의 myrosinase isozymes를 확인 하였으며 효소활성이 가장 높은 myrosinase I 을 사용, 당단백질과 섞여있는 과량의 소분자 당류를 제거하기 위하여 시료를 투석하였다. 투석이 끝난 시료를 동결건조하고 농축하여 Sephadex G-100 gel permeation column을 시켰고, 그로부터 myrosinase 활성이 있는 분획을 모았다. 분리된 효소의 순도는 native polyacrylamide gel electrophoresis로 확인하여 gel 상에서 두개의 뚜렷한 단백질 밴드가 나타났고, 분자량은 각각 171 kDa와 476 kDa으로 추정되었다. 또한 gel 을 methyl red로 효소 활성 염색을 하였더니, 단백질 밴드가 있는 부분이 적색으로 변화하였으며 myrosinase임을 확인하였다. 따라서 백겨자 종자에는 총 4개의 myrosinase isozyme이 존재한다고 추정할 수 있다.

온도(열)에 따라 변하는 효소의 촉매활성과 안정성을 조사하였을 때, 효소의 최적 작용 온도는 43°C이었으며 50°C부터 효소의 변성으로 활성을 잃기 시작하였고, 온도가 높아질수록 변성속도도 증가하였다. 효소 단백질 파괴에 필요한 활성화 에너지는 18.3 kcal/mol이었다.

Allylglucosinolate (sinigrin), 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (4-NPG), 3-indoxyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (indican), 2-(hydroxymethyl)phenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (salicin) 등 glycoside 4종의 기질에 대한 효소의 가수분해

능을 조사한 결과, sinigrin, 4-NPG, indican은 myrosinase에 의해서 분해되었으나, salicin은 거의 가수분해 되지 않았다. 효소의 Km과 Vmax는 sinigrin에 대해서는 1.03 mM과 270.27  $\mu\text{mole}/\text{min}$ , 4-NPG에 대해서는 3.77 mM과 29.67  $\mu\text{mole}/\text{min}$ , 그리고 indican에 대해서는 0.12 mM과 82.64  $\mu\text{mole}/\text{min}$ 이었다. Sinigrin과 비교할 때 salicin과 indican은 myrosinase에 대한 우수한 기질이 아니었다.

Myrosinase의 보조인자로 알려진 L-ascorbic acid와 thio 화합물인 cysteine, glutathione, 2-mercaptoethanol 및 methionine이 myrosinase의 촉매 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 기질로 sinigrin과 4-NPG를 사용하고 L-ascorbic acid의 농도를 달리하여 L-ascorbic acid가 효소 촉매반응속도에 미치는 영향을 조사한 결과, 효소활성 촉진효과는 0.3 mM 농도에서 가장 높았으나 0.6 mM 이상의 농도에서는 오히려 효소활성을 저해하였다. L-Ascorbic acid가 myrosinase에 의한 sinigrin의 분해를 최대 4.0배 촉진하였으나, 4-NPG의 분해는 최대 1.6배 촉진하는데 그쳤다. Thio 화합물이 myrosinase 활성에 미치는 효과는 사용하는 기질에 따라서 달랐다. S-glycoside인 sinigrin을 기질로 사용했을 때 황 함유 아미노산인 methionine은 농도 의존적으로 효소활성을 촉진하였으나, 황화수소기 (sulfhydryl groups, -SH)를 갖고 있는 cysteine, 2-mercaptoethanol 및 glutathione은 모두 sinigrin 분해 활성을 저해하였다. 반면 O-glycoside인 4-NPG를 기질로 사용했을 때, glutathione은 농도 의존적으로 약하게 효소활성을 촉진하였으나, 그 이외에 cysteine, methionine, 2-mercaptoethanol은 효소활성에 뚜렷한 영향이 없었다. Thio 화합물이 작용 기질에 따라 그 분해활성에 미치는 영향이 다른 것은 sinigrin과 4-NPG의 분해기전이 서로 다름을 반영한다.

## 국문 요약

Myrosinase(thioglucosidase, EC 3.2.1.147)는 유일하게 알려진 S-glycosidase이며, glycoside hydrolase family 1(GH1)에 속한다. Myrosinases은 주로 십자화과(*Brassicaceae*)에서 발견되며, myrosinase와 함께 십자화과에 주로 존재하는 glucosinolates의 가수 분해를 촉진한다. 본 연구에서는 효소 myrosinase가 풍부한 십자화과 일종인 백겨자(*Sinapis alba*) 종자로부터 myrosinase를 분리 정제하고, 열역학적 특성과 기질 특이성 그리고 효소 반응속도에 영향을 미치는 화합물에 대하여 조사하였다. 효소 myrosinase는 백겨자 종자로부터 추출된 조효소액을 황산암모늄으로 침전 분획한 후 Concanavalin A-Sepharose column chromatography 및 gel permeation chromatography을 사용하여 순차적으로 정제하였다. Myrosinase의 정제 정도는 native polyacrylamide gel electrophoresis(native-PAGE)를 사용하여 단백질 염색 및 gel상에서 methyl red를 이용한 효소 활성 염색으로 조사하였다. Native-PAGE에서 확인된 2개의 myrosinase isozymes의 분자량은 각각 171 kDa 및 476 kDa인 것으로 추정된다. 백겨자 종자의 myrosinase는 최적반응온도 43°C이며, myrosinase의 불활성화에 필요한 활성화 에너지는 18.3 kcal/mol이었다. 효소의 기질에 대한 친화도를 나타내는 상수 Km과 최대반응속도 Vmax는 각각 allylglucosinolate (sinigrin)에 대해서는 1.03 mM 및 270.27  $\mu\text{mole}/\text{min}$ , 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (4-NPG)에 대해서는 3.77 mM 및 29.67  $\mu\text{mole}/\text{min}$ , 그리고 3-indoxyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (indican)에 대해서는 0.12 mM 및 82.64  $\mu\text{mole}/\text{min}$ 이었다. 2-(hydroxymethyl)phenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (salicin)은 myrosinase에 의해 가수분해 되지 않았다. Sinigrin과 비교할 때 salicin과 indican은 myrosinase에 대한 우수한 기질이 아니었다. Myrosinase의 보조인자로 알려진 L-ascorbic acid는 0.3 mM 농도에서 기질 sinigrin과 4-NPG의 분해를 각각 최대 4.0배, 1.6배 촉진하였으나, 0.6 mM 이상에서는 오히려 효소활성을 저해하였다. Thio 화합물인 cysteine, glutathione, 2-mercaptoethanol 및 methionine이 myrosinase 촉매 활성에 미치는 영향은 사용된 기질에 따라 다르게 나타났다.

## REFERENCES

- Albaser A, Kazana E, Bennett MH, Cebeci F, Luang-In V, Spanu PD, Rossiter JT. 2016. Discovery of a bacterial glycoside hydrolase family 3 (GH3)  $\beta$ -glucosidase with myrosinase activity from a *Citrobacter* strain isolated from soil. *J Agric Food Chem* 64: 1520 - 1527.
- Albena T, Dinkova K, Rumen VK. 2012. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol Med* 18: 337-347.
- Alliegro MC. 2000. Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol-disulfide exchange: for consideration in the analysis of protein function with Cleland's reagent. *Anal Biochem* 15: 102-106.
- Andersson D, Chakrabarty R, Bejai S, Zhang J, Rask L, Meijer J. 2009. Myrosinases from root and leaves of *Arabidopsis thaliana* have different catalytic properties. *Phytochemistry* 70: 1345 - 1354.
- Bellostas N, Petersen IL, Sorensen JC, Sorensen H. 2008. A fast and gentle method for the isolation of myrosinase complexes from *Brassicaceous* seeds. *J Biochem Biophys Methods* 70: 918 - 925.
- Bhat R, Kaur T, Manu KM, Vyas R, Vyas D. 2015. Purification and characterization of a novel redox-regulated isoform of myrosinase ( $\beta$ -thioglucoside glucohydrolase) from *Lepidium latifolium* L. *J Agric Food Chem* 63: 10218-10226.
- Bhat R, Vyas D. 2019. Myrosinase: insights on structural, catalytic, regulatory, and environmental interactions. *Crit Rev Biotechnol* 39: 508-523.
- Bourderioux A, Lefoix M, Gueyrard D, Tatibouet A, Cottaz S, Arzt S, Burmeisterd WP, Rollin P. 2005. The glucosinolate myrosinase system. New insights into enzyme substrate interactions by use of simplified inhibitors. *Org Biomol Chem* 3: 1872 - 1879.

- Burmeister WP, Cottaz S, Rollin P, Vasella A, Henrissat B. 2000. High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *J Biol Chem* 275: 39385-39393.
- Bussy A. 1840. Sur la ormotion de l'huile essentielle de moutarde. *J Pharm Sci* 27: 464 - 471.
- Clarke DB. 2010. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Anal Methods* 2: 310-325.
- Cleland WW. 1964. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *J Biochem* 3: 480-482.
- Danaka K, Jang KJ. 2004. Encyclopedia of the medicinal plants in home. *Donghaksa* 24.
- Durham PL, Poulton JE. 1990. Enzymic properties of purified myrosinase from *Lepidium sativum* seedlings. *Z Naturforsch* 45: 173-178.
- El-Shora HM, Metwally AM. 2009. Effect of phytohormones and group selective reagents on acid phosphatase from *Cladosporium cladosporioides*. *Asian J Biotechnol* 1: 1-11.
- Engelen EG, Holden G, Cohen JDC, Garnder G. 2006. The effect of temperature, photoperiod, and light quality on gluconasturtiin concentration in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *J Agric Food Chem* 54: 328-334.
- Ghawi SK, Methven L, Rastall RA, Niranjana K. 2012. Thermal and high hydrostatic pressure inactivation of myrosinase from green cabbage: A kinetic study. *Food Chem* 131: 1240 - 1247.
- Ghawi SK, Methven L, Niranjana K. 2013. The potential to intensify sulforaphane formation in cooked broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) using mustard seeds (*Sinapis alba*). *Food Chem* 138: 1734-1741.
- Gilbert HF. 1984. Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. *Methods Enzymol* 107: 330-351.

- Gonda S, Szucs Z, Plaszkó T, Cziaky Z, Kiss-Szikszai A, Vasas G, M-Hamvas M. 2018. A Simple method for on-gel detection of myrosinase activity. *Molecules* 23: 2204.
- Halkier BA, Gershenzon J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* 57: 303 - 333.
- Hamed M. El-Shora, Ahmed M. El-Shobaky, Maissa M. El-Atrozy. 2016. Activity of purified bacterial myrosinase and its essential residues. *Int J Curr Microbiol App Sci* 5: 567-578.
- Jane AM, William JK, Tony KM, Juliet A, Julian AH. 2013. Lactic acid bacteria convert glucosinolates to nitriles efficiently yet differently from Enterobacteriaceae. *J Agric Food Chem* 61: 3039-3046.
- Kim CS. 2012. Physicochemical properties of tofu with mustard powder. Master's Thesis. Sunchon National University. Seoul. Korea.
- Kleinwächter M, Selmar D. 2004. A novel approach for reliable activity determination of ascorbic acid depending myrosinases. *J Biochem Biophys Methods* 59: 253 - 265.
- Layne E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol* 3: 447 - 454.
- Li X, Kushad MM. 2005. Purification and characterization of myrosinase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Plant Physiol Biochem* 43: 503 - 511.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265 - 275.
- Luang-In V, Narbad A, Nueno-Palop C, Mithen R, Bennett M, Rossiter JT. 2014. The metabolism of methylsulfinylalkyl- and methylthioalkyl-glucosinolates by a selection of human gut bacteria. *Mol Nutr Food Res* 58: 875 - 883.
- Ludikhuyze L, Ooms V, Weemaes C, Hendrickx M. 1999. Kinetic study of the irreversible thermal and pressure inactivation of myrosinase from

- broccoli (*Brassica oleracea* L-Cv. Italica). *J Agr Food Chem* 47: 1794–1800.
- Mahn A, Angulo A, Cabañas C. 2014. Purification and characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) myrosinase ( $\beta$ -thioglucosidase glucohydrolase). *J Agric Food Chem* 62: 11666–11671.
- Naoki T, Masaru O, Tadao H. 1974. Purification and general characteristics of bacterial myrosinase produced by *Enterobacter cloacae*. *Agr BioI Chern* 38: 1623–1630.
- Naumoff DG. 2011. Hierarchical classification of glycoside hydrolases. *Biochem (Mosc)* 76: 622 - 635.
- Nong H, Zhang JM, Li DQ, Wang M, Sun XP, Zhu YJ, Wang QH. 2010. Characterization of a novel  $\beta$ -thioglucosidase CpTGG1 in *Carica papaya* and its substrate-dependent and ascorbic acid-independent O- $\beta$ -glucosidase activity. *J Integr Plant Biol* 52: 879 - 890.
- Ohtsuru M, Hata T. 1972. Molecular properties of multiple forms of plant myrosinase. *Agr BioI Chern* 36: 2495–2503.
- Okunade OA, Ghawi SK, Methven L, Niranjana K. 2015. Thermal and pressure stability of myrosinase enzymes from black mustard (*Brassica nigra* L. W.D.J. Koch. var. nigra), brown mustard (*Brassica juncea* L. Czern. var. juncea) and yellow mustard (*Sinapsis alba* L. subsp. maire) seeds. *Food Chem* 187: 485–490.
- Palop ML, Smiths JP, Brink BT. 1995. Degradation of sinigrin by *Lactobacillus agilis* strain R16. *Int J Food Microbiol* 26: 219–229.
- Piekarska A, Kusznierevicz B, Meller M, Dziedziul K, Namieśnik J, Bartoszek A. 2013. Myrosinase activity in different plant samples; optimisation of measurement conditions for spectrophotometric and pH-stat methods. *Ind Crops Prod* 50: 58 - 67.
- Pontoppidan B, Ekbom B, Eriksson S, Meijer J. 2001. Purification and characterization of myrosinase from the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*), a brassica herbivore. *J FEBS* 268: 1041 - 1048.

- Prakash O, Rai AK, Singh J, Singh PM. 2013. Partial purification and kinetic properties of myrosinase from cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Ind J Agri Biochem* 26: 190–194.
- Rakariyatham N, Butr-Indr B, Niamsup H, Shank L. 2006. Improvement of myrosinase activity of *Aspergillus* sp. NR4617 by chemical mutagenesis. *Electron J Biotechnol* 9: 379 - 385.
- Shikita M, Fahey JW, Golden TR, Holtzclaw WD, Talalay P. 1999. An unusual case of ‘uncompetitive activation’ by ascorbic acid: purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings. *J Biochem* 341: 725 - 732.
- Shin CK, Seo KL, Kang KS, Ahn CW, Kim YG, Shim KH. 1996. Purification and enzymatic properties of myrosinase in korean mustard seed(*Brassica juncea*). *J Kor Soc Food Sci Nutr* 25: 687–694.
- Son MH, Lee JY. 2006. Standardization of processing conditions of mustard powder and mustard oil for quality improvement. *Kor J Culinary Research* 12: 131–139.
- Stoin D, Pirsan P, Radu F, Poiana MA, Alexa, E, Dogaru D. 2009. Studies regarding the myrosinase enzymatic activity from black mustard (*Brassica nigra*) seeds. *J Food Agric Environ* 7: 44 - 47.
- Strahsburger E, de-Lacey AML, Marotti I, Di-Gioia D, Biavati B, Dinelli G. 2017. In vivo assay to identify bacteria with  $\beta$ -glucosidase activity. *Electron J Biotechnol* 30: 83–87.
- Summer JB, 1925. The estimation of sugar in diabetic urine using dinitrosalicylic acid. *J Biol Chem* 62: 287–290.
- Szmigielska AM, Schoenau JJ. 2000. Use of Anion-exchange membrane extraction for the high-performance liquid chromatographic analysis of mustard seed glucosinolates. *J Agric Food Chem* 48: 5190 - 5194.
- Traka M, Mithen R. 2009. Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem Rev* 8: 269–282.

- Tsuruo I, Yosida M, Hata T. 1967. Studies on myrosinase in mustard seed. Part II. On the activation mode of the myrosinase by L-ascorbic acid. *Agric Biol Chem* 31: 27-32.
- Tsuruo I, Hata T. 1968. Studies on myrosinase in mustard seed. Part V. On the  $\beta$ -glucosidase activity of myrosinase and the interaction of ascorbate with myrosinase. *Agric Biol Chem* 32: 1425-1431.
- Van Eylen D, Indrawati M, Hendrickx A, Van Loey A. 2007. Temperature and pressure stability of mustard seed (*Sinapis alba* L.) myrosinase. *Food Chem* 97: 263-271.
- Van Eylen D, Oey I, Hendrickx M, Van Loey A. 2008. Kinetics of the stability of broccoli (*Brassica oleracea* cv. Italica) myrosinase and isothiocyanates in broccoli juice during pressure/temperature treatments. *J Agric Food Chem* 55: 2163-2170.
- Van Eylen D, Oey I, Hendrickx M, Van Loey A. 2008. Behavior of mustard seed (*Sinapis alba* L.) myrosinase during temperature/pressure treatments: a case study on enzyme activity and stability. *Eur Food Res Technol* 226: 545-553.
- Verkerk R, Dekker M. 2004. Glucosinolates and myrosinase activity in red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. Capitata f. rubra DC.) after various microwave treatments. *J Agric Food Chem* 52: 7318-7323.

## 감사의 글

설렘과 꿈을 안고 대학원에 들어왔던 게 엇그제 같은데, 어느덧 2년의 석사과정을 마치고 학위 논문을 마무리하게 되었습니다. 지난 2년간의 시간을 돌아보면 많은 아쉬움과 반성들이 남는 시간들이었지만, 저에게는 감사함이라는 마음을 항상 품을 수밖에 없도록 만들어주었던 시간들이었습니다. 저의 부족한 부분들을 무한한 관심과 애정 그리고 아낌없는 조언으로 채워주시고자 하신 분들에게 감사의 마음을 전하고자 합니다.

처음 실험실 생활을 시작하면서 부족함이 컸던 저를 아주 세세한 부분까지도 세심한 지도와 배려로 하나라도 더 가르침을 주시려 노력하시고 격려해주시며 학문적 기초를 다질 수 있게 이끌어주셨던 고영환 지도교수님께 존경과 무한한 감사를 드립니다. 교수님의 지도를 통해 연구가 무엇인지, 제게 부족한 점이 무엇이고 어떤 방향으로 나아가야 할지에 대해 알 수 있었던 것 같습니다. 그리고 바쁘신 일정에도 불구하고 저의 학위논문 심사위원을 맡아주시고 아낌없는 조언들로 제게 큰 도움을 주셨던 박은진 교수님, 천지연 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 학부부터 석사과정까지 보다 넓은 시야로 학문을 바라볼 수 있도록 필요한 가르침을 주시고 자상한 마음으로 배려와 격려를 아끼지 않으셨던 임상빈 교수님, 김현정 교수님께 진심으로 감사드립니다.

대학원 생활을 함에 있어서 모르는 것이 있을 때마다 여쭙보면 항상 자기 일처럼 도움을 주셨던 동신오빠, 예리한 조언과 도움을 주신 효진언니께 감사드립니다. 또한 작은 사소한 일도 관심을 가지고 챙겨주셨던 유리언니께도 감사드리며, 같은 실험실은 아니었지만 여러 도움을 주었던 서경이, 하영이, 수민이, 두리, 혜인이, 진우한테도 너무 감사합니다. 학부부터 대학원까지 서로에게 의지가 되어준 대학원 동기인 윤형오빠, 효석오빠, 지은이, 하정이에게도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로, 제멋대로인 딸을 항상 이해하고 믿어주시며 묵묵히 응원해주시는 부모님께 감사와 사랑의 마음을 전합니다.