

고려인삼(*Panax ginseng*) Invertase 의 화학조성과 안정성

김용환 · 김병목*

경기대학교 식품가공학과

*중앙대학교 식품가공학과

(1990년 3월 6일 접수)

Chemical composition and Stabilities of Invertase from Korean Ginseng, *Panax ginseng*

Yong-Hwan Kim and Byung-Mook Kim*

Department of Food Science and Technology, Kyonggi University, Suwon 440-760, and

*Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, An-Sung 456-830, Korea

(Received March 6, 1990)

Abstract □ The chemical composition and stabilities of the purified ginseng invertase were investigated. The purified enzyme was found to be a glycoprotein composed of 80.2% protein and 19.7% total sugar. The protein component of the enzyme was composed of acidic amino acid (9.3%), basic amino acid (48.9%), nonpolar amino acid (21.4%), polar amino acid (20.4%) and 6.1% S-containing amino acid. It showed especially high contents of histidine and serine. The enzyme was inactivated almost completely by the treatment with some proteases (papain, pepsin, trypsin, pancreatin and microbial alkaline protease) and protein denaturants (8M urea and 6M guanidine-HCl), but not with glycosidase (α -amylase, β -amylase, glucoamylase and cellulase). Monosaccharides such as glucose, fructose, galactose and mannose did not exert any influence on the enzyme activity. The activity of the enzyme was inhibited by Ag^+ , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} and Al^{3+} , whereas Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} and Fe^{3+} gave rather activating effects on the enzyme activity. The enzyme was relatively stable in the pH range of pH 6 and 8, and at the temperatures below 35°C.

Keywords □ *Panax ginseng*, invertase, chemical composition, stability.

서 론

Invertase (EC 3.2.1.26)는 생물계에 널리 존재하며 동물 invertase 가 대부분 α -glucosidase 인데 비하여¹⁾ 식물 invertase 와 미생물 invertase 는 β -fructofuranosidase 인 것으로 알려져 왔다.²⁻⁶⁾ 일반적으로 식물 invertase 는 soluble form (free-, intracellular or protoplasm form)과 insoluble form (cell wall bound, cell debris associated or outer space form)으로 구분되는데 모두 glycoprotein 형태로 존재하는 것이 많은 것으로 알려져

왔다.⁶⁻¹⁰⁾ 또한 이들 glycoprotein 성 invertase 는 대체로 안전성이 크며 생체내에서 sucrose 대사의 조절 등 중요한 생리적 기능을 가진 것으로 알려져 왔다. 최근 Kim and Chae¹¹⁾는 인삼 invertase 가 glycoprotein 임을 시준한 바 있거니와 이 효소는 필자 등이 정제하여 얻은 인삼 invertase 와는 성질이 다른 isozyme 으로 검토되었으며¹²⁾ 또 그의 화학성분 중 당분이 효소활성과 직접적인 관련이 있는지의 여부도 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 필자 등이 얻은 정제 인삼 invertase 의 화학조성을 중심으로 효소활성과의 관련성 및 효소의 안정

성을 주로 검토한 바 상당히 흥미있는 결과를 얻었기에 여기 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재 료

시료: 본 실험에 사용된 시료는 강화도산 5년근 수삼(水蔘)을 사용하였다.

화학약품: Papain, trypsin, raffinose 는 E. Merck Co. 제품, guanidine-HCl 는 Fluka Co. 제품, pepsin 은 Worthington Co. 제품, α -amylase, β -amylase, glucoamylase, cellulase 는 Nagase Co. 제품, pancreatin, microbial alkaline protease 는 Wako Co. 제품을 사용하였다. 기타 시약도 모두 특급 및 일급을 사용하였다.

2. 실험방법

Invertase 의 정제: 전보¹²⁾에서 기술한 바와 같이 수삼을 동량(w/v)의 증류수로 추출한 후 ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulofine chromatography 및 2차에 걸친 Sephadex G-75 를 이용한 gel-filtration 등의 과정을 거쳐 정제하였다.

Invertase 활성의 측정: 전보¹²⁾에서 기술한 바와 같이, Pressey 법¹³⁾에 의하여 측정하였으며 효소활성 단위는 37°C에서 1분당 1 μ mole 의 환원당을 생성하는 것을 1 unit 로 하였다.

당정량: 총 당은 phenol-H₂SO₄법¹⁴⁾에 의하여 측정하였다. 즉 효소액 1.0 ml 에 5% phenol 1.0 ml 를 첨가하고 곧이어 농황산 5.0 ml 를 첨가하여 잘 혼합하고 실온에서 20분간 정치한 후 490 nm 에서 비색정량하였으며 표준당으로는 dextrose 를 사용하였다.

지방정량: 지방은 Folch *et al.*법¹⁵⁾에 의하여 neutral lipid, amino lipid 및 phospho lipid 를 각각 비색정량하였다.

핵산정량: 핵산은 Ogur *et al.*법¹⁶⁾에 의하여 비색정량하였다.

아미노산 분석: 아미노산 조성은 Nishizawa *et al.*⁶⁾의 방법에 따라서 측정하였다. 즉 일정량의 시료에 6N HCl 용액을 가하고 감압밀봉하여 105°C 에서 24, 48, 72 시간 가수분해시킨 후 감압농축하여 HCl 을 제거하고 Na-acetate buffer (pH 2.2) 2.0

ml 에 용해시켜 LKB 4150 amino acid autoanalyzer 를 사용하여 buffer flow rate ; 45.0 ml/hr, ninhydrin flow rate ; 35.0 ml/hr, column size ; 6.0×200.0 mm, pH range : pH 3.2-10.0, wavelength ; 570 nm, 440 nm, injection volume ; 40 μ l 의 조건에서 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 화학조성

정제 invertase 의 화학조성은 Table 1 에서 보는 바와 같이 단백질 80.2%, 총 당 19.7%로 나타났으며 지방과 핵산은 검출되지 않았다. 이는 Kim and Chae¹¹⁾가 보고한 인삼 invertase 의 당 함량 6.2%에 비하여 상당히 많은 당 함량을 나타내고 있으며, 바나나 invertase 의 당 함량 24.5%라는 보고¹⁷⁾와 사탕수수의 산성 invertase 23.5%와 중성 invertase 의 22%라는 보고¹⁹⁾ 등과 비슷한 결과를 나타내고 있다. 또한 정제 invertase 의 아미노산 조성은 Table 2 에서 보는 바와 같이 산성 아미노산 9.3%, 염기성 아미노산 48.9%, 비극성 아미노산

Table 1. Chemical Composition of the purified invertase

Components	Contents (%)
Protein	80.2
Total sugar	19.7

*Each value is the average of 3 times analysis.

Table 2. Amino acid analysis of the purified invertase

Amino acids	Assumed composition (n mole)	Amino acids	Assumed composition (n mole)
Asp	5.41	Pro	3.28
Glu	2.15	Phe	1.27
Lys	2.41	Met	3.03
Arg	1.72	Gly	1.44
His	35.58	Ser	9.87
Ala	1.80	Thr	1.13
Val	2.87	$\frac{1}{2}$ Cys	1.90
Leu	2.66	Tyr	2.22
Ile	1.33		

Hydrolyzed temperature, 105 °C; Buffer flow rate, 45.0 ml/hr; Ninhydrin flow rate, 35.0 ml/hr; Column size, 6.0×200.0 mm; pH range, pH 3.2 to 10.0; Wavelength, 570 nm, 440 nm; Injection volume, 40 μ l.

Table 3. Effects of glycosidase on purified invertase activity.

Glycosidase	Relative activity (%)
None	100.0
α -Amylase	107.1
β -Amylase	92.7
Glucoamylase	78.6
Cellulase	100.0

The reaction mixture consisted of 0.3 ml enzyme and 0.15 ml glycosidase (1.0%). The mixture were incubated at 37°C for 4 hr and then remaining activities were measured in the presence of 0.2 ml sucrose as substrate in 0.5 ml acetate buffer (0.2M, pH 4.7) at 37°C for 30 min.

21.4%, 극성 아미노산 20.4%였으며 합황 아미노산은 6.1%였다. 특히 histidine 43.83%, serine 이 12.16%로서 특이적으로 높은 함량을 나타낸 것이 특징적이었다. 이는 밀 invertase¹⁹⁾와 대추야자 invertase²⁰⁾의 경우 산성 아미노산의 함량이 높은 것과는 상당히 대조적인 것으로 흥미롭다.

2. Glycosidase 및 Protease 의 영향

정제 invertase 의 화학성분 중 당 및 단백질이 효소활성과 어떤 관련성을 가지고 있는가를 검토하기 위하여 당 및 단백질 분해효소를 작용시켜 정제 invertase 의 당 및 단백질성분을 분해시킨 후 효소활성을 측정할 결과는 Table 3 및 4 와 같다. Table 3에서 보는 바와 같이 정제효소의 활성은 본 실험에서 사용한 4종류의 glycosidase 들에 의하여 큰 영향을 받지 않아 Anderson and Ewing²²⁾의 감자 invertase 의 경우 α -mannosidase 와 β -glucosidase 를 작용시켰을 때 촉매활성에 아무런 영향을 미치지 않았다는 보고와 일치한다. 결국 이는 본 정제 invertase 의 당성분이 효소활성부위와는 큰 관련이 없다는 것을 의미하는 것으로 해석된다. 한편 Table 4에서 보는 바와 같이 정제 invertase 의 활성은 protease 의 처리에 의하여 모두 현저히 감소되었다. 이는 효소의 활성본체가 주로 단백질 성분임을 의미한다. 다만 papain 의 경우 34.6%의 잔존 활성을 갖게된 것은 다소 특이한 현상이기는 하지만 조직배양한 옥수수 세포 invertase 가 papain 에 의하여 큰 영향을 받지 않았다는 보고²²⁾와 일치하며 이는 invertase 활성부위의 구조와 papain 의 작용 특이성과 어떤 관련성이 있는 것으로 보이나 확실하지는 않다.

Table 4. Effect of protease on purified invertase activity.

Protease	Relative activity (%)
None	100.0
Papain	34.6
Pepsin	7.7
Trypsin	—
Pancreatin	—
M.A. Protease*	15.3

The reaction mixture consisted of 0.3 ml enzyme and 0.15 ml protease (1.0%). The mixture were incubated at 37°C for 4 hr and then remaining activities were measured in the presence of 0.2 ml sucrose as substrate in 0.5 ml acetate buffer (0.2M, pH 4.7) at 37°C for 30 min.

Table 5. Effect of protein denaturants on purified invertase activity.

Protein denaturants	Relative activity (%)	
	Treated with denaturants	After dialysis
None	100.0	100.0
Urea (8M)	34.6	83.3
Guanidine-HCl(6M)	15.3	59.6

The reaction mixture consisted of 0.3 ml enzyme and 0.15 ml protein denaturants. The mixture were standing at room temperature for 4 hr or standing at room temperature for 4 hr after dialysis against deionized water at 5°C for 24 hr and then remaining activities were measured in the presence of 0.2 ml sucrose as substrate in 0.5 ml acetate buffer (0.2M, pH 4.7) at 37°C for 30 min.

3. 단백질 변성제의 영향

효소활성에 미치는 단백질 변성제의 영향을 조사하기 위하여 효소액의 1/2 량에 해당하는 8M urea 와 6M guanidine-HCl 을 각각 가하여 실온에서 4 시간 반응시킨 후 반응액의 1/2 량은 투석하지 않은 상태로, 나머지 1/2 량은 탈이온수에서 24 시간 투석하여 각각의 효소활성을 측정할 결과는 Table 5 와 같다. Table 5에서 보는 바와 같이 8M urea 와 6M guanidine-HCl 을 처리함으로써 각각 34.6%와 15.3%로 활성이 감소되었으며, 증류수로 투석하여 Urea 와 guanidine-HCl 을 제거한 경우, 83.3%와 59.6%로 효소활성이 회복되었다. 이는 단백질 변성제에 의한 효소활성저하는 어느 정도 가역적이지만 효소활성이 완전히 복원되지 않는다는 것을 의미한

Table 6. Effects of monosaccharides on purified invertase activity.

Monosaccharides	Relative activity (%)
None	100.0
D-Glucose	107.2
D-Fructose	98.0
D-Galactose	98.0
D-Monnose	125.3

The activities were measured in the presence of 0.3 ml/enzyme, 0.15 ml monosaccharide (0.01M) and 0.2 ml sucrose in 0.5 ml acetate buffer (0.2M, pH 4.7) at 37 °C for 30 min.

다. 결국 이는 효소의 활성분체가 단백질층에 있어 변성체에 의해 크게 영향을 받은 것으로 해석된다.

4. 단당류의 영향

효소활성에 미치는 product의 영향을 조사하기 위하여 효소액에 1/2 량의 0.01 M의 단당류액을 각각 첨가하여 효소활성을 측정 한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 본 효소는 단당류에 의하여 활성에 큰 영향을 받지 않았다. 이것은 본 효소가 반응생성물인 glucose와 fructose 등에 의한 product inhibition이 없는 것을 나타낸 것이다. 이와 같은 현상은 Anderson²⁴⁾의 감자 invertase가 glucose와 fructose에 의하여 효소활성에 영향을 받지 않는다는 보고와 일치하나 Matthew and Copeland²⁴⁾의 soybean nodule invertase가 15 mM fructose에 의하여 50%의 product inhibition을 받았다는 보고, Shiomi²⁵⁾의 양파 invertase가 glucose, xylose, galactose 등에 의하여 저해를 받았다는 보고 등과는 다르다. 한편 mannose를 첨가했을 때 약 25%의 활성 증대효과를 나타내었는데 이것이 mannose의 특이적인 효과인지에 대해서는 아직 확실하지 않다.

5. 금속이온의 영향

효소활성에 미치는 각종 금속이온의 영향을 검토하기 위하여 5×10^{-4} M의 각종 금속염 용액을 효소액과 동량을 가하여 효소활성을 측정 한 결과는 Table 7과 같다. 정제 invertase는 Ag^+ , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} 등에 의하여 활성저해를 받았으나 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} 등에 의하여서는 오히려 활성증대효과를 나타내었다. 이는 Kim²⁶⁾이 보고한 조(粗)인삼 invertase에 미치는 금속이온의 영향

Table 7. Effects of metal ions on purified invertase activity.

Metals	Relative activity (%)	Metals	Relative activity (%)
None	100.0	$CaCl_2$	94.8
KCl	94.8	$HgCl_2$	68.4
NaCl	94.8	$CuCl_2$	105.4
$AgNO_3$	63.2	$BaCl_2$	137.0
$CaCl_2$	126.4	$CdCl_2$	105.4
$MgCl_2$	126.4	$FeCl_3$	152.8
$MnCl_2$	63.2	$AlCl_3$	89.6
$SnCl_2$	105.4	$Zn(NO_3)_2$	79.0

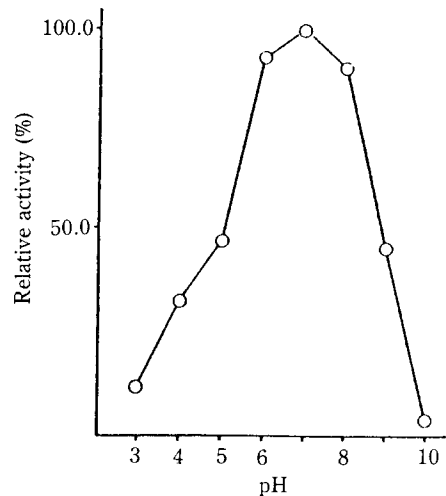


Fig. 1. pH stabilities of purified invertase. Enzyme activity were measured in the presence of sucrose as substrate in 0.2M acetate buffer (pH 4.7). The maximum activity was expressed as 100%.

과 대체로 일치하고 있으나 Cu^{2+} 의 경우 조(粗)인삼 invertase에 대하여 활성 증대효과를 보인 반면 본 효소에서는 큰 영향을 끼치지 않은 점이 다르다.

6. pH 및 열안정성

효소액에 0.01 M acetate buffer (pH 3-5), 0.01 M phosphate buffer (pH 6-8), 0.01 M carbonate buffer (pH 9, 10) 등을 동량씩 가하여 pH를 각각 3-10으로 조절 한 후 저온실(4°C)에 24시간 정치한 다음 탈이온수에서 충분히 투석하고 효소활성을 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉 정제 invertase는 pH 6-8에서 안정성을 나타내었으며 pH 5 이하와

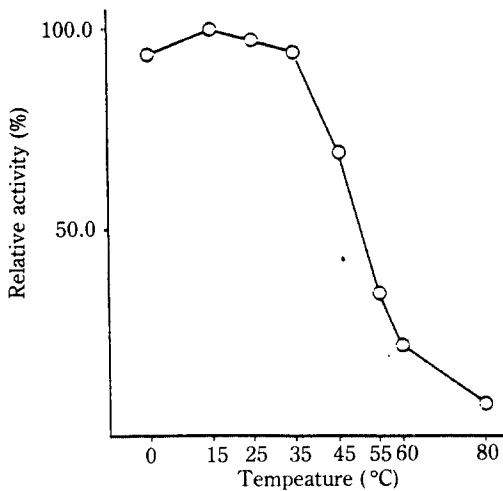


Fig. 2. Thermal stabilities of purified invertase. Enzyme activity were measured in the presence of sucrose as substrate in 0.2M acetate buffer (pH 4.7). The maximum activity was expressed as 100%.

pH 9 이상에서는 급격한 활성저하를 보였다. 이는 Shiomi²⁸⁾의 양파 invertase I 과 II가 각각 pH 4-5, pH 5-7, Takehana and Nakagawa²⁸⁾의 토마토 invertase 가 pH 2-6에서 안정성을 보인 것보다는 훨씬 더 중성부근에 치우친 것으로 흥미로운 사실이다. 한편, 효소액에 기질을 제외한 기타 반응액의 조성을 모두 첨가하고 0, 15, 25, 35, 45, 55, 60, 80°C까지의 각 온도에서 30분간 처리한 후 기질을 가하여 효소활성을 측정된 결과 Fig.2에서와 같이 35°C 이하에서는 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 온도상승과 더불어 급격히 실패하는 현상을 나타내었다. 이는 Kim²⁶⁾의 조(粗) 인삼 invertase 가 35°C 이하에서 안정하다는 보고와 잘 일치한다. 결국 본 정제 invertase 는 glycoprotein 성 효소임에도 불구하고 안정성이 그리 크지 못하다는 점이 특이하다. 또한 본 효소의 당성분이 활성과는 직접적인 관련이 없으므로 이를 완전히 제거해도 무방하지 아니한가 하는 추측이 가며 그렇게 함으로서 효소의 정제도를 더 높일 수 있을 것이라고 전망되나 이점에 대해서는 차후 더 깊은 연구가 필요하다고 사료된다.

요 약

고려인삼 (*Panax ginseng* C.A.Meyer) 중의

invertase 를 증류수로 추출하고 황산암모늄분획, DEAE-cellulofine column chromatography 그리고 Sephadex G-75에 의한 gel 여과 등의 방법으로 정제한 후 그의 화학조성과 안정성 등을 검토하였다. 정제효소는 단백질 약 80%, 총 당 약 20%로 구성되어 있었으며 단백질은 산성 아미노산 9.3%, 염기성 아미노산 48.9%, 비극성 아미노산 21.4%, 극성아미노산 20.4%, 함황 아미노산은 6.1%로 구성되어 있었고 histidine 과 serine 의 함량이 특이적으로 많았다. 정제효소는 glycosidase 처리에 의하여서는 저해를 받지 않았으나 protease 처리 및 단백질 변성제 처리에 의하여 그 활성이 크게 저하되었다. 정제효소는 여러 단당류에 의하여 활성에 큰 영향을 받지 않았다. 정제효소는 Ag^+ , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} 등의 금속이온에 의하여 활성이 저해되었고 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{++} , Fe^{3+} 등에 의하여서는 활성이 증대되었다. 정제효소는 pH 6-8 과 35°C 이하에서 안정하였다.

Literature Cited

1. Myrback, K.: The enzymes, Academic Press, New York, p. 379 (1961).
2. Frest, G.M., Greenshields, R.N. and Teale, E.W.J.: *Biochem. J.* **107**, 625 (1968).
3. Cooper, R.A. and Greenshields, R.N.: *Biochem. J.* **92**, 357 (1964).
4. Meachum, Z.D.Jr., Colvin, H.V. Jr. and Braymer, H.D.: *Biochem.* **10**, 326 (1971).
5. Nishizawa, M., Maruyama, Y. and Nakamura, M.: *Agric. Biol. Chem.* **44**, 489 (1980).
6. Iki, K., Nakagawa, H., Ogura, N. and Takehana, H.: *Agric. Biol. Chem.* **41**, 1311 (1977).
7. Kivilaan, A., Cabrera, B., T. and Bandurski, R.S.: *Plant Physiol.* **36**, 605 (1961).
8. Takehana, H. and Nakagawa, H.: *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.* **18**, 63 (1970).
9. Nishizawa, M. and Maruyama, Y.: *Agric. Biol. Chem.* **45**, 149 (1981).
10. Kim, B.M. and Chae, S.K.: *Korean J. Food Sci. Technol.* **14**, 1 (1982).
11. 김용환, 김병욱: 고려인삼학회지, **14**, 14 (1990).
12. Pressey, R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 667 (1969).
13. 福井作藏:還元糖 定量法, 東京大學出版會, 東京,

- 45(1969).
15. Folch, J., Lees G.H. and Stanley, S.: *J. Biol. Chem.* **226**, 497 (1957).
 16. Ogur, M. and Rosen G.: *Arch. Biochem.* **25**, 262 (1950).
 17. Sum, W.F., Rogers, P.J., Jenkins, I.D. and Guthrie R.D.: *Phytochem.* **19**, 399 (1980).
 18. Ernesto, J. del Rosario and Vilai Santisopasri: *Phytochem.* **16**, 443 (1977).
 19. Prentice, N. and Robbins, G.S.: *Cereal Chem.* **53**, 874 (1976).
 20. Al-Bakir, Alla Yehya: *Diss. Abstr. Int. B.* **39**, 2777 (1978).
 21. Anderson, R.S. and Ewing, E.E.: *Phytochem.* **17**, 1077 (1978).
 22. Jacob, S.: *Plant Physiol.* **37**, 342 (1962).
 23. Anderson, R.S.: *Diss. Abstr. Int. B.* **39**, 1568 (1978).
 24. Matte, M. and Copeland Les: *Plant Physiol.* **74**, 1030 (1984).
 25. Shiomi, N.: *J. Fac. Agric. Hakkaido Univ.* **58**, 467 (1977).
 26. Kim, B.M.: *Korean J. Food Sci. Technol.* **12**, 1 (1980).
 27. Shiomi, N.: *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* **58**, 321 (1977).