

## 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 잎 Invertase의 생화학적 특성

김 용 환 · 심 우 만\*

경기대학교 식품가공과, 장안전문대학 식품영양과\*

### Characteristics of Invertase from Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) Leaf

Yong-Hwan Kim and Woo-Man Shim \*

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

Department of Food and Nutrition, Jangan Junior College\*

#### Abstract

Invertase was extracted from Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) leaf with deionized water, and then prepared by ammonium sulfate(0.4~0.6 Sat.) fractionation, the enzymological properties of the invertase were investigated, and the results obtained were as follows. The optimum pH and temperature of the enzyme were pH 6.0 and 40°C respectively. The enzyme was stable in the pH range of pH 6.0 to 8.0, and at the temperature below 40°C. The enzyme was inactivated completely by the treatment with some proteases(pepsin, trypsin, papain and ficin) and protein denaturants(8M urea and 6M guanidine-HCl), but not with glycosidases( $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase and glucoamylase). The enzyme catalyzed specifically the hydrolyzation of the  $\beta$ -fructofuranosides such as sucrose and inulin.

Key words : *Panax ginseng*, invertase, characterization.

#### 서 론

Invertase는 제과공업 등의 분야에서 대단히 유용하게 이용되고 있는 효소로서 급원(source)에 따라 미생물 invertase, 동물 invertase 및 식물 invertase 등으로 분류되어지며, 식물 invertase는 *Paseolus vulgaris*에 관한 연구<sup>1)</sup>를 비롯하여 다수<sup>2~19)</sup>의 연구가 진행되어 왔다. 이 중 인삼 invertase에 관한 연구로는 김 등<sup>9)</sup>이 인삼 근부병의 효소작용에 관하여 보고한 바 있으며 Kim<sup>10)</sup>이 조(粗) invertase의 성질에 대하여, Kim과 Chae<sup>11)</sup>, 김과 김<sup>12, 13)</sup>의 정제 invertase의 특성에 대하여 검토한 것 외에는 별로 연구되어 있지 않으며, 식물의 잎 invertase에 관한 연구로는 *Alocasia leaves*<sup>15)</sup>, sugar cane leaves<sup>18)</sup>와 oat leaves<sup>19)</sup> 등이 있다. 하지만 폐자원이나 다름없는 인삼잎에 대해서는 거의

의 연구되어 있지 않은 실정이다. 이에 지금까지 이용되지 않았던 인삼잎으로부터의 이용성 증대를 위하여 soluble fraction invertase를 추출한 후 특성을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 재료

본 실험에 사용된 인삼잎은 1991년 8월 경기도 강화에서 채취하여 0.001N HCl 용액에 30분 침지한 후 유수(流水) 중에서 충분히 세척하여 -18°C의 냉동실에 보존하며 시료로 사용하였다.

##### 2. Invertase의 조제

시료 인삼잎을 동량의 탈이온수를 가하고 5분간 마쇄한 후 35°C에서 1시간 항온시켜 효소를 추출하였다. 이를 착즙한 후 streptomycin sulfate를 0.02%가 되도록 첨가하고 교반하여 30분간 정치한 후 원심분리하여

상등액을 인삼잎 추출물(ginseng leaf extract)로 하였다. 여기에  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 0.2~0.1 포화시켜 분획하였을 때 0.6포화 혼분에서 비활성이 가장 높았으므로 이 혼분을 4°C에서 48시간 탈이온수로 투석시켰다. 이를 다시 원심분리하여 불용성물질을 제거하고 상등액을 인삼잎 invertase로 하였으며, 모든 원심분리는 7,000 rpm, 4°C, 15분의 조건으로 실시하였다.

### 3. Invertase 활성의 측정

Pressy법<sup>20)</sup>에 의하여 측정했다.

### 4. 단백질 정량

Lowry et al. 법<sup>21)</sup>에 의하여 측정했으며 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. pH의 영향

0.2M acetate buffer(pH 3, 4, 5), 0.2M phosphate buffer(pH 6, 7, 8)와 0.2M carbonate buffer(pH 9, 10)를 사용하여 각각의 pH에서 효소활성을 측정한 결과 Fig. 1에서와 같이 pH 6~7 사이에

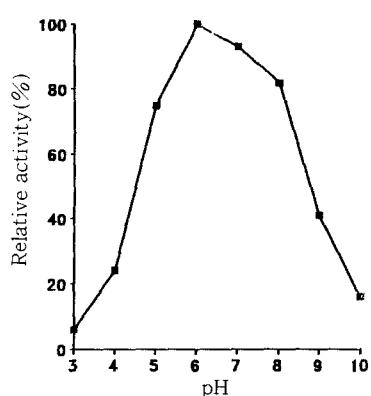


Fig. 1. Effects of pH on the activity of invertase.

Enzyme activity were measured in the presence of sucrose as substrate in 0.2 M acetate buffer(pH 3~5), 0.2 M phosphate buffer(pH 6~8) and 0.2 M carbonate buffer(pH 9~10)

서 최대의 활성을 보였으며 pH 8에서 80% 이상의 활성을 보인 반면 pH 4.0 이하 및 pH 9.0 이상에서는 현저히 저하되었다. 이제까지 연구, 보고된 각종의 식물 invertase의 최적 pH에 대해서는 산성(pH 4.5~5.5)과 중성~염기성(pH 7~8) invertase 등으로 분류되어지므로 본 효소는 최적 pH가 6.0이며 pH 7과 8에서 80% 이상의 높은 활성을 보인 점으로 미루어 중성 invertase로 사료된다.

한편 Kim<sup>10)</sup>은 인삼 조(粗) invertase가 최적 pH 5.0인 산성 invertase라고 했으나 정제된 인삼 invertase가 최적 pH 6.0인 중성 invertase라고 한 보고도 있다.

<sup>12)</sup> 또한 효소액에 0.01M acetate buffer(pH 3, 4, 5), 0.01M phosphate buffer(pH 6, 7, 8)와 0.01M carbonate buffer(pH 9, 10)를 시료에 각각 동량씩 가하여 각각의 buffer에서 24시간 투석하고 다시 탈이온수에서 24시간 투석하여 효소활성을 측정한 결과 Fig. 2에서와 같이 pH 6~8 범위에서 90% 이상의 높은 안정성을 나타내었으며 pH 4.0 이하와 pH 9.0 이상에서는 불안정하였다. 이는 pH 6~8에서 안정성을 나타내었다는 보고<sup>13)</sup>와 상당히 유사하나 양파 invertase-I, II가 pH 4.0~5.0, pH 5.0~7.0에서 안정하였다는 보고<sup>7)</sup>와 토마토 invertase가 pH 2.0~6.0 사이에서 안정하다는 보고<sup>8)</sup>와 비교할 때 본 효소는 이들보다 중성쪽에서 안전한 효소임을 알 수 있었다.

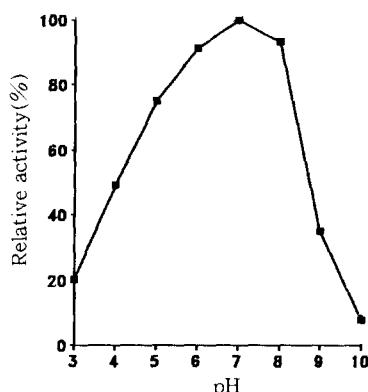


Fig. 2. pH stabilities of invertase.

Enzyme activity were measured in the presence of sucrose as substrate in 0.2 M acetate buffer(pH 4.7)

## 2. 온도의 영향

10~70°C 사이에서 반응온도를 각각 달리하여 활성을 측정한 결과 Fig. 3에서와 같이 40°C에서 최대의 활성을 보였으며 50°C 이상에서는 현저히 저하되었다. 한편 35°C로부터 45°C 사이까지 90% 이상의 높은 활성을 보여 지금까지 연구, 보고된 35~45°C에서 최대활성을

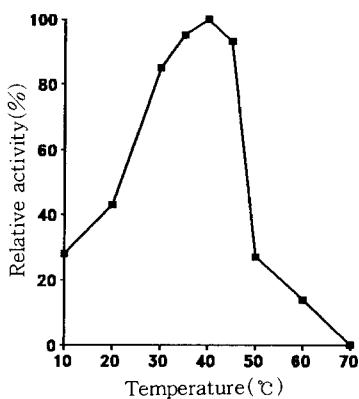


Fig. 3. Effects of temperature on the activity of invertase.

Enzyme activity were measured in the presence of sucrose as substrate in 0.2 M acetate buffer (pH 4.7)

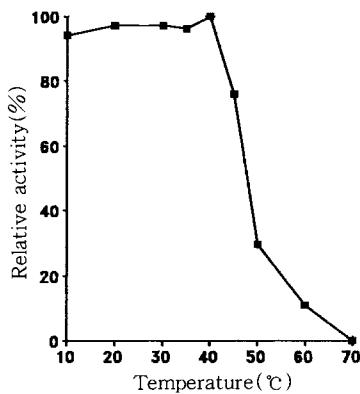


Fig. 4. Thermal stabilities of invertase.

Enzyme activity were measured in the presence of sucrose as substrate in 0.2 M acetate buffer (pH 4.7)

갖는다는 보고<sup>12)</sup>와 35~50°C인 범위에서 최적온도를 갖는다는 다수의 보고<sup>6, 14-16)</sup>와 대체로 일치하는 경향을 타나내었다.

또한 효소액에 기질을 제외한 기타 반응액의 조성을 모두 첨가하여 10~70°C까지의 각 온도에서 30분간 처리 후 기질을 가하고 활성을 측정한 결과 Fig. 4에서와 같이 40°C 이하에서는 안정하였으나 45°C 이상에서는 급격히 실활되는 현상을 나타내었다. 이는 인삼 조(粗) invertase가 35°C 이하에서 안정하다는 보고<sup>10)</sup>보다는 열 안정성이 다소 높은 것으로서 40°C 이하에서 안정하다는 보고<sup>5)</sup>와 상당히 유사한 결과를 나타내고 있다.

## 3. Protease 및 Glycosidase의 영향

효소단백질의 가수분해에 의한 촉매활성의 상실 정도를 조사하기 위하여 pepsin(0.01 M acetate buffer, pH 5.0), trypsin(0.01 M phosphate buffer, pH 6.0), papain(0.01 M phosphate buffer, pH 7.0)과 ficin(0.01 M phosphate buffer, pH 7.0)의 1.0% 수용액을 효소액의 반량씩 첨가하여 37°C에서 4시간 반응시킨 후 활성을 측정한 결과 Table 1에서와 같이 protease에 의하여 대부분 실활되었으며, 이는 인삼 정제 invertase가 protease에 의하여 실활되었다는 보고<sup>13)</sup>와 일치하며, 이로 미루어 본 효소는 활성 본체가 단백질로 구성되어 있다는 것을 의미하는 것으로 사료된다.

그리고 각종 glycosidase가 효소활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 효소액의 반량에 해당하는  $\alpha$ -amylase(0.01 M acetate buffer, pH 5.0),  $\beta$ -amylase(0.01 M phosphate buffer, pH 6.0)과 glucoamylase(0.01 M acetate buffer, pH 4.0)의 1.0% 수용액을 각각 첨가하여 37°C에서 4시간 반응시킨 후 활성을 측정한 결과 Table 2에서와 같이 별다른 저해를 받지 않았다. 이는 potato invertase가  $\alpha$ -mannosidase와  $\beta$ -glucosidase에 의하여 저해를 받지 않았다는 보고<sup>4)</sup>와  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase 및 cellulase에 의하여 저해가 없었다는 보고<sup>13)</sup>와도 일치한다.

## 4. 단백질 변성제의 영향

효소액의 반량에 해당하는 8M urea와 6M guanidine-HCl 용액을 가하여 실온에서 4시간 반응시킨 후

**Table 1. Effects of protease on invertase activity.**

Protease	Relative activity(%)
None	100.0
Pepsin	15.2
Trypsin	12.8
Papain	28.5
Ficin	24.3

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(0.2 M, pH 4.7) at 37°C for 30 min.

반응액의 반량은 투석하지 않은 상태로, 나머지 반량은 탈이온수로 4°C에서 24시간 투석하여 활성을 측정하여 재활성화 정도를 검토한 결과 Table 3에서와 같이 변성제를 첨가한 경우 43.5%와 39.7%의 저조한 활성을 나타내어 본 효소는 변성제에 의하여 활성저해를 받는 것을 알 수 있었다. 그러나 변성제 처리 후 투석하여 이를 제거한 경우 각각 82.5%와 80.8%의 높은 활성 회복력을 나타내었다. 따라서 이들 변성제에 의한 변성은 가역

**Table 2. Effects of glycosidase on invertase activity.**

Glycosidase	Relative activity(%)
None	100.0
α-Amylase	98.3
β-Amylase	101.2
Glucoamylase	100.8

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(0.2 M, pH 4.7) at 37°C for 30 min.

적 반응을 나타낸 것을 알 수 있었으며 이는 김과 김의 보고<sup>13)</sup>와도 일치한다. 그러므로 본 효소는 활성부위가 단백질쪽에 있는 것으로 사료된다.

### 5. 기질 특이성

0.2M의 이당류와 삼당류, 그리고 2.0%의 다당류를 각각의 기질로 하여 활성을 측정한 결과 Table 4에서와 같이 sucrose와 inulin에만 특이적으로 작용하였는 바

**Table 3. Effects of protein denaturants on invertase activity.**

Protein denaturants	Relative activity(%)	
	Treated with denaturants	After dialysis
None	100.0	100.0
Urea(8M)	43.5	82.5
Guanidine HCl(6M)	39.7	80.8

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(0.2 M, pH 4.7) at 37°C for 30 min.

**Table 4. Comparison of substrate specificity of invertase activity.**

Substrate	Relative activity(%)	Substrate	Relative activity(%)
Sucrose	100.0	Inulin (inulin type)	90.7
Maltose	34.3	Raffinose	62.3
Lactose	12.8		

The activities were measured in the presence of 0.3 ml enzyme and 0.2 ml given substrate in 0.5 ml acetate buffer(0.2 M, pH 4.7) at 37°C for 30 min. each substrate was used at 0.2M except polysaccharide whose concentration was 2.0%.

이는 sucrose와 inulin에 작용하였다는 보고<sup>12)</sup>와 일치하며, 이를 기질은  $\beta$ -fructofuranoside 결합을 가진 물질들인 점으로 미루어 본 효소는 전형적인  $\beta$ -fructofuranosidase인 것으로 사료된다.

## 요 약

고려인삼(*Panax ginseng* C.A Meyer) 잎 중의 가용성 invertase를 탈이온수로 추출한 후 황산암모늄 0.4~0.6 포화획분에 의하여 조제하였으며 이의 효소화학적 성질을 검토한 결과는 다음과 같다. 본 효소의 최적 pH와 온도는 pH 6.0과 40°C였으며 pH 6.0~8.0 범위와 40°C 이하에서 안정하였다. Protease 및 단백질 변성제 처리에 의하여 활성이 현저히 저하되었으며 glycosidase에 의해서는 저해를 받지 않았다. 본 효소는 sucrose와 inulin 등의  $\beta$ -fructofuranoside 결합을 가진 기질에 특이적으로 작용하여 전형적인  $\beta$ -fructofuranosidase의 성질을 나타내었다.

## 참고문헌

- Cooper, R.A. and Greenshields, R.N. : The partial purification and some properties of two sucrases of *Paseolus vulgaris*. *Biochem. J.*, **92**, 357-364(1964)
- Arnold, W.N. :  $\beta$ -fructofuranosidase from grape berries. *Biochim. Biophys. Acta.* **128**, 124-129(1966)
- Nakagawa, H., Iki, K., Hirata, M., Ishigami, S. and Ogura, N. : Inactive  $\beta$ -fructofuranosidase molecules in senescent tomato fruit. *Phytochemistry*, **19**, 195-197(1980)
- Anderson, R.S. and Ewing, E. E. : Partial purification of potato tuber invertase and its proteinaceous inhibitor. *Phytochmistry*, **17**, 1077-1081(1978)
- Nakagawa, H., Kawasaki, Y., Ogura, N. and Takehana, H. : Purification and some properties of two types of  $\beta$ -fructofuranosidase from tomato fruit. *Agr. Biol. Chem.*, **36**(1), 18-26 (1971)
- Masuda, H. and Sugawara, S. : Purification and some properties of cell wall bound invertases from sugar beet seedlings and aged slice of mature roots. *Plant Physiol.*, **66**, 93-96 (1980)
- Shiomi, N. : Purification and characterization of  $\beta$ -fructofuranosidases solubilized and released from cell debris of aged onion slices. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, **58**(3), 321-342(1977)
- Takehana, H. and Nakagawa, H. : Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from tomato fruit. *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.*, **18**, 63-72(1970)
- 김병목, 김용환, 이덕순, 조현준 : 인삼근부병의 기구와 방제에 대한 생화학적 연구. 고려인삼학회지, **6**(1), 75-83(1982)
- Kim, B.M. : Studies on Invertase from Korean ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer. I. separation and properties of crude invertase. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **12**(1), 1-5 (1980)
- Kim, B.M. and Chae, S.K. : Studies on Invertase from Korean ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer. II. purification and phyco-chemical properties of ginseng invertase. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **14**(1), 1-5 (1982)
- 김용환, 김병목 : 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) Invertase의 정제와 그 특성. 고려인삼학회지, **14**(1), 14-20(1990)
- 김용환, 김병목 : 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) Invertase의 화학조성과 안정성. 고려인삼학회지, **14**(1), 21-26(1990)
- Nakasone, Y. and Nagatomo, K. : Neutral invertase from sugar cane stalk. *Ryukyu Daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku*, **30**, 241-246(1983)
- Nakasone, Y. and Yasui, M. : Invertase from *Alocasia* leaves. *Ryukyu Daigaku Nogakubu*

*Gakujutsu Hokoku*, **29**, 73-78(1982)

16. Chinen, I., Egawa, Y., Hokama, K. and Yomo, H. : Studies on acid invertase of sugar cane stalk. *Ryukyu daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku*, **24**, 217-229(1977)
17. Kato, T. and Kubota, S. : Properties of invertases in sugar storage tissues of citrus fruit and changes in their activities during maturation. *Physiol. Plant.*, **42**, 67-72(1978)
18. Madan, V.K., Singh, K., Shivapuri, S., Pande, H.P. and Saxena, Y.R. : Activity of invertase(s) in sugar cane leaves. *Int. Sugar J.*, **83**, 974(1980)
19. Greenland, A.J. and Lewis, D.H. : Changes in the activities and predominant molecular

forms of acid invertase in oat leaves infected by crown rust. *Physiological plant Pathology*, **22**, 293-312(1983)

20. Pressey, R. : Invertase inhibitor from potatoes : purification, characterization and reactivity with plant invertase. *Plant Physiol.*, **42**, 1780-1786(1967)
21. Lowry, C.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951)

---

(1992년 10월 20일 수리)