

포도주에서 분리한 *Saccharomyces cerevisiae* JS59가 생성하는 Invertase의 정제 및 특성

유지수¹ · 백현동² · 김수영³ · 이시경^{1*}

¹건국대학교 응용생물화학과
²건국대학교 축산식품생물공학과
³건국대학교 생명과학과

Purification and Characterization of an Invertase Produced with *Saccharomyces cerevisiae* JS59 Isolated from Home-made Wine

Ji-Soo Yoo¹, Hyun-Dong Paik², Soo-Young Kim³, and Si-Kyung Lee^{1*}

¹Dept. of Applied Biology and Chemistry,

²Dept. of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, and

³Dept. of Biological Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract

The microorganism producing an invertase (E.C. 3.2.1.26) was isolated from wine and tentatively identified as *Saccharomyces cerevisiae* by cellular fatty acid analysis. The invertase was purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitant, dialysis, ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50, and gel chromatography on Sephadex G-200 from the culture supernatant of *Saccharomyces cerevisiae* JS59. The specific activity and the purification fold of the purified invertase were 7620.9 unit/mg protein and 13.9, respectively. The molecular weight of the purified invertase was estimated to be 38.5 kDa by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for the invertase activity were pH 5 and 55°C, respectively. The invertase activity was relatively stable at pH 4~6 and temperature 55°C. The activity of invertase was inhibited by Ag²⁺ and Hg²⁺, but on the contrary, activated by Co²⁺ and Mn²⁺. Michaelis constant (K_m) for invertase reaction in sucrose solution was 11.5 mM. TLC analysis of the products produced in sucrose solution during invertase reaction showed the progressive presence of glucose and fructose in accordance with sucrose hydrolysis.

Key words: invertase, *Sacchromyces cerevisiae*, purification, TLC analysis

서 론

효모는 미생물 군 중에서 인간이 상업적으로 개척하여 온 가장 중요한 미생물 중의 하나이다. 인류가 효모를 이용하여 빵과 술을 만들기 시작한 것은 4,000년 전 이집트 피라미드 내부의 벽화에 이미 상당히 발달된 발효과정의 묘사된 것으로 보아 역사이전 시대로 생각된다(1). 효모는 모든 주정발효의 주 역할을 차지하고 있고, 또한 여러 가지 중요한 효소를 생산함으로써 산업에 이용되고 있으며(2), 특히 효모는 알코올 발효능이 강한 종류가 많아, 이들은 옛날부터 주류의 양조, 알코올 제조, 제빵 등에 이용되어 왔다. 현재까지 분리된 많은 효모는 protease, amylase, lipase 등의 효소를 분비하고 있다(1). 효소는 살아있는 생물세포에서 생산되는 생물학적 반응촉매제로서 작용하는 단백질 물질로서 치즈의 응고, 맥주양조 등에 이용되며 그 산업적 이용에서 가치를 더

하고 있다(3). Invertase는 sucrose의 β -D-fructo furanose 결합을 가수분해하여 fructose와 glucose를 생성하고 raffinose를 분해하여 fructose와 melibiose를 생성할 뿐만 아니라 fructotransferase 반응을 촉매 하는 기능을 가진 효소로서 특히 sucrose로부터 invert sugar를 생성하므로 식품공업에서 감미료 제조에 유용하게 이용되고 있다(4). 특히 fructose syrup은 식품에서 설탕의 결정화를 방지하기 때문에 가당 탄산음료, 캔디, 캔 식품 등에 광범위하게 사용되고 있다. 전통적으로 fructose syrup은 옥수수 전분으로부터 α -amylase, glucoamylase, glucose isomerase에 의해 생산되었으나, 지금은 invertase를 이용하여 sucrose로부터 생산할 수 있게 되었다(5,6). Invertase는 미생물과 고등식물 등에 널리 분포되고 있으며 미생물을 이용하여 이들로부터의 효과적인 추출(7,8)과 정제 및 특성(9,10), 고정화(11) 및 분자생물학적 연구(12,13) 등의 분야의 연구가 비교적 활발히 진

*Corresponding author. E-mail: lesikyung@konkuk.ac.kr
Phone: 82-2-450-3759, Fax: 82-2-450-3726

행되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 invert sugar 생산에 이용하기 위하여 가정에서 제조한 포도주로부터 *Saccharomyces* 속을 분리하여 이를 지방산분석을 통해 동정하고 이 효모가 생성하는 invertase를 분리, 정제하고 정제한 invertase의 여러 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

Invertase 생산 균주의 분리

본 실험에서 사용한 균주는 가정에서 만든 포도주로부터 분리한 효모를 사용하였다. 효모 분리를 위해 각각의 포도주 10 g에 멸균 생리식염수 90 mL를 첨가하여 30분간 진탕시켜 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 으로 희석한 후 sucrose 3%, polypepton 0.5%, KH_2PO_4 0.5%, yeast extract 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, agar 1.5%(pH 7.0)로 조제한 평판 배지에 도말하여 30°C에서 48시간 배양한 후 콜로니를 형성시켰다. 이들 분리된 순수 콜로니들 중에서 invertase 활성이 높은 것으로 나타난 효모를 선별하여 사용하였다.

Cellular fatty acid 조성 측정 및 균의 동정

포도주로부터 분리된 효모의 cellular fatty acid 조성을 측정하기 위하여 Saboraud dextrose agar(Difco Co. Ltd., Detroit, MI, USA)에서 배양한 세포들을 집균 하고, 이들 세포의 지질로부터 fatty acid를 유리시키기 위해 배양균체 약 50 mg(wet weight)에 50% methanol과 15% NaOH를 첨가하여(NaOH 45 g, MeOH 150 mL, ddw 150 mL) 100°C에서 30분간 가열하여 용해시켰다. 이와 같이 지방산에 methyl ester를 형성시키고 수용상에서 유기상으로 fatty acid를 추출한 후(hexane/methyl tert-butyl ether, 1:1), 유기추출물을 수용상(NaOH 10.8 g, ddw 900 mL)으로 세척하였다(14). 추출된 시료의 fatty acid methyl esters는 capillary column(25 m×0.2 mm, phenyl methyl silicone fused silica)과 FID detector를 갖춘 gas chromatography(Agilent 6890 series, Agilent Co. Ltd., Palo Alto, CA, USA)에 의해 분석되었으며, 이의 profile은 Microbial Identification System Software(Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA)로 동정하였다.

효모의 배양 및 조효소액의 제조

Sucrose 3%, polypepton 0.5%, KH_2PO_4 0.5%, yeast extract 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%(pH 7.0)의 배지조성을 갖는 액체배지를 이용하여 분리된 효모를 1백금이 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 seed culture 1%를 같은 조성의 액체배지에 접종한 후 30°C의 shaking incubator(200 rpm)에서 48시간 배양하였으며, 배양액 1 L를 10,000×g으로 4°C에서 20분간 원심분리 하여 상등액을 취하여 조효소액으로 사용하였다.

Invertase의 활성 측정

Invertase 활성 측정은 효소액 0.5 mL와 0.1 M acetate buffer(pH 5.0) 1 mL 그리고 0.2 M sucrose 용액 0.5 mL를 혼합한 반응액을 55°C water bath에서 10분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS법(15)으로 정량하였다. 즉 반응액 0.2 mL에 DNS 시약 0.3 mL를 가하고 끓는 물에 5분간 중탕한 뒤 실온에서 식히고 증류수 10 mL로 희석하여 spectrophotometer 540 nm에서 흡광도를 조사하여 invertase 활성을 측정하였으며 이를 상대값(relative activity)로 나타내었다. Glucose 표준곡선으로부터 측정값에 대한 glucose 양으로 계산하여 효소액 1 mL당 glucose μmol 수로 나타내었고, 1분 간에 glucose 1 μmol 을 생성하는 능력을 1 unit으로 하였다.

단백질 정량

Invertase 정제과정 중의 단백질 농도는 Lowry와 Rosebrough 법(16)에 준하여 정량하였으며, bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 사용하였다.

Invertase 정제

Saccharomyces cerevisiae JS59가 생성하는 invertase의 정제를 위하여 이 효모를 30°C에서 48시간 배양시킨 배양액을 10,000×g에서 20분간 원심분리 하여 상등액을 취하여 crude enzyme를 얻었다. 이를 ammonium sulfate 80~100%의 농도로 침전물을 형성하고, 이 침전물을 회수하여 소량의 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)에 녹이고, cellulose membrane을 이용하여 24시간 동안 투석하였다. 염이 제거된 효소액을 동결건조 시킨 후, 이를 20 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 다시 녹이고, 동일 buffer로 미리 평형화시킨 DEAE-sephadex A-50 ion exchange column(3.0 cm×50 cm)에 주입하고, 전개 시 유속은 0.4 mL/min로 NaCl용액(0.1~0.5 M)을 사용하여 gradient법으로 3 mL씩 분획하여 활성부위를 용출시켰다. 이후 활성부위의 효소액을 다시 동결건조를 통하여 농축한 후, 동일 buffer로 미리 평형화시킨 Sephadex G-200 column(1.6 cm×70 cm)을 통해 invertase를 정제하였다.

단일성의 확인

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE, Mini-PROTEAN®, Bio-rad Ltd., Hercules, CA, USA)는 Laemmli의 방법(17)에 따라 10% acrylamide gel을 만들어 사용하였고, size marker(Bio-rad Co. Ltd., Hercules, CA, USA)의 표준 단백질은 myosin(M.W. 211,806), β -galactosidase(M.W. 121,020), bovine serum albumin(M.W. 100,216), ovalbumin(M.W. 54,395), carbonic anhydrase(M.W. 38,708), soybean trypsin inhibitor(M.W. 29,806), lysozyme(M.W. 20,040)을 사용하여 이동도(Rf)에 대한 분자량과의 관계로부터 분자량을 산출하였다.

Invertase의 반응 최적 pH 및 pH 안정성

Invertase에 대한 pH의 영향을 조사하기 위해 pH 3.0은 10 mM citrate buffer, pH 4.0와 5.0은 10 mM acetate buffer, pH 6.0와 7.0은 10 mM phosphate buffer 용액에 효소액을 처리하여 invertase 활성을 측정하였으며, 또한 실온에서 각각의 pH에서 30분 동안 방치한 효소액의 invertase 활성을 측정하여 pH 안정성을 비교하였다.

Invertase의 반응 최적 온도 및 온도 안정성

Invertase에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 25°C부터 60°C까지 5°C 간격으로 invertase 활성을 측정하였고, 또한 각각의 온도에서 효소를 30분간 방치 후 55°C에서 10분간 반응시켜 invertase 활성을 측정하여 온도 안정성을 비교하였다.

Invertase 반응의 금속 이온에 의한 영향

AgNO₃, BaCl₂, CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeSO₄, HgCl₂, KH₂PO₄, MgSO₄, MnSO₄, PbCl₂, ZnCl₂의 금속이온을 각각 2.0 mM 농도로 제조한 후 이 금속이온 용액 0.5 mL를 효소액 0.5 mL에 첨가하여(1.0 mM) 50°C에서 30분간 방치시킨 후, 잔존활성을 측정하여 invertase 활성에 미치는 금속이온의 영향을 조사하였다.

Invertase kinetics

정제된 효소액을 이용하여 1~10 mg/mL의 기질 농도에 따른 invertase 활성을 측정하여 각 농도에서의 invertase 활성을 Lineweaver-Burke plot(18)으로 작성하였으며, 이를 이용하여 K_m 값을 측정하였다.

반응 생성물의 TLC 분석

Hay 등(19)의 방법에 따라 효소액(9.7 unit/mL) 0.5 mL와 0.1 M acetate buffer(pH 5.0) 1 mL 그리고 0.2 M sucrose 용액 0.5 mL를 혼합한 반응액을 55°C water bath에서 일정 시간 반응시킨 다음 끓는 물에서 5분간 중탕하여 반응을 정지시켰다. 반응용액 5 µL를 pre-coated Kiesel 60 silica plate(Merck AG, Darmstadt, Germany)(20×10 cm)에 점적한 후, n-butanol : acetic acid : ethyl ether : 증류수를 9:6:3:1의 비율로 혼합한 전개용매로 실온에서 2시간 전개시켰다. Plate를 완전히 건조시킨 후 발색제(H₂SO₄/phenol/ethanol, 5:3:92, v/w/v)를 뿌리고 110°C에서 15분 이상 발색시켜 표준물질과 비교하여 그 반응산물을 확인하였다.

결과 및 고찰

Cellular fatty acid 조성 측정 및 균의 동정

포도주로부터 분리된 효모의 MIS(microbial identification system)를 이용한 지방산의 분석결과는 Table 1과 같다. 균체의 지방산 조성은 C_{10:0}가 3.63%, C_{12:0}가 2.94%, C_{14:0}가 1.67%, C_{16:0}가 12.71%, C_{16:1}가 51.10%, C_{18:0}가 1.82%,

Table 1. Fatty acid composition of yeast isolated from home-made wine

Fatty acid	Retention time (min)	Percentage (%)
10:0	2.996	3.63
12:0	4.509	2.94
14:0	6.919	1.64
16:0	9.743	12.71
16:1	10.038	51.10
18:0	13.078	1.82
18:1	13.477	6.12

C_{18:1}는 26.12%가 포함되었으며, C_{16:1}와 C_{18:1}의 함량이 가장 높았다. 이상의 실험 결과 본 실험에서 분리된 균주는 60.4%의 fatty acid homology를 보이는 *Saccharomyces cerevisiae*로 분류되어 잠정 동정하고 *Saccharomyces cerevisiae* JS59로 명명하였다.

Invertase 정제 및 분자량 측정

포도주에서 분리한 효모를 배양한 상등액을 ion exchange chromatography에 의해 용출된 각 분획과 invertase의 활성을 나타낸 결과는 Fig. 1과 같다. 그림에서와 같이 NaCl의 농도를 0.1~0.5 M linear gradient하게 하였을 때 단백질 peak가 나타난 곳 중 효소활성이 높은 fraction No. 39~44를 모아 동결건조를 통해 농축시킨 후, 동일 buffer로 미리 평형화시킨 Sephadex G-200 gel filtration column에 주입하여 fraction을 받은 결과를 Fig. 2에 나타내었으며, 최종적으로 단일 단백질 peak를 확인할 수 있었으며, 단백질 peak와 활성이 가장 높은 fraction No. 33~37을 모아 SDS-PAGE를 통해 단일성을 확인하였다. 이상의 정제과정에 따른 invertase의 정제결과를 Table 2에 나타내었다. 정제단계별 specific activity는 처음 crude enzyme에서 548.9 units/mg이었으나, 정제가 진행됨에 따라 ammonium sulfate에 의해 생성된 침전물의 투석 후에는 976.8 unit/mg protein, Sephadex A-50 ion exchange column에서는 1181.9 unit/mg protein을 보였으며, Sephadex G-200 column을 거친 후 최종적으로는 7620.9 unit/mg protein을 나타내어 정제단

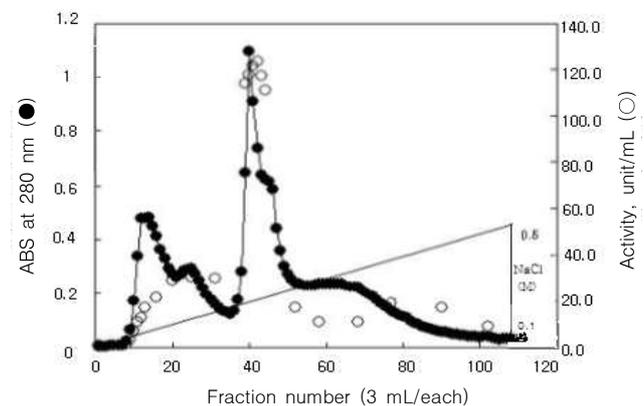
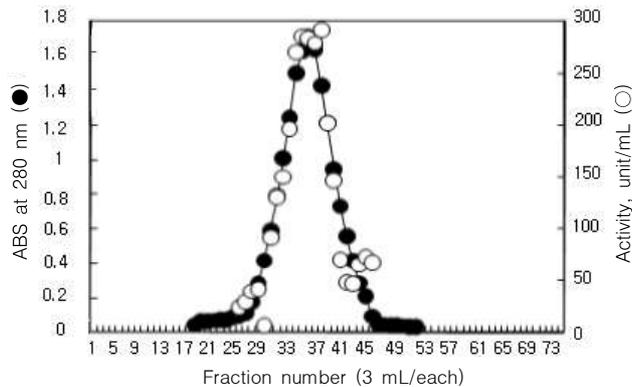


Fig. 1. Elution profile of chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of invertase produced by *Saccharomyces cerevisiae* JS59 isolated from wine.

Table 2. Results of the purification of invertase produced by *Saccharomyces cerevisiae* JS59

Purification steps	Total activity (Units)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Recovery (%)	Purification (fold)
Supernatant	70364.0	128.2	548.9	100.0	1.0
Ammonium sulfate	45464.0	46.5	976.8	64.6	1.8
Sephadex A-50	19078.0	16.1	1181.9	27.1	2.2
Sephadex G-200	9702.0	1.3	7620.9	13.8	13.9

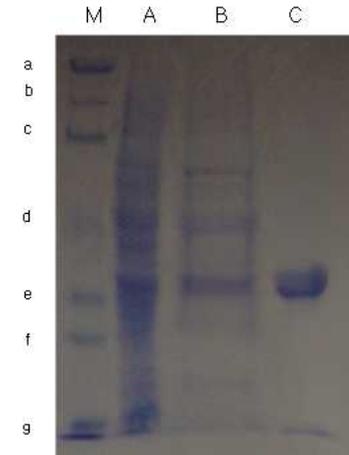
Fig. 2. Elution profile of chromatography on Sephadex G-200 of invertase produced by *Saccharomyces cerevisiae* JS59 isolated from wine.

계가 진행되면서 specific activity가 증가하였다. 또한 정제 단계에 따른 정제 배수는 최종적으로 13.9배를 보였으며, 회수율은 13.8%를 나타냈다.

Hiroshi와 Koji(20)는 Japanese pear fruit에서 분리한 invertase를 정제하고 그 특성을 조사한 결과, 정제효소의 specific activity는 65.1 nkat/mg protein, 정제도는 8.55배, 최종 회수율은 23.1%였다고 보고하였으며, Lamia와 Zhang (21)은 *Aspergillus niger* AS0023에서 분리한 invertase의 정제 실험에서, 정제 효소의 specific activity는 7047 KU/kg protein, 정제배수는 97.87배, 최종회수율은 12.68%였다고 하였다. 이 밖에도 Maria와 Rosa(22)는 *Rhodotorula glutinis*가 생산하는 invertase의 정제 및 특성에서 최종 정제된 효소의 specific activity는 0.20 μ kat/mg protein, 정제도는 5.0배, 최종 회수율은 9.4%였다고 하였다.

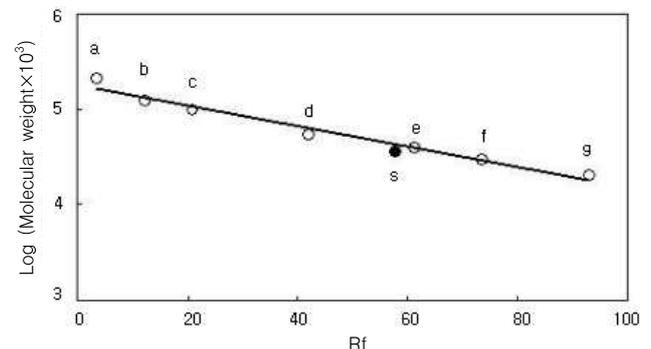
이와 같이 다양한 자원으로부터 분리된 invertase의 정제에 관한 연구에서 최종 정제된 invertase의 결과는 각 연구에 따라 크게 달라짐을 볼 수 있다. 이는 사용된 자원이나 균주의 상이함, 정제 과정 및 칼럼의 종류가 다름에서 기인하는 것으로 생각된다.

또한 정제된 invertase의 단일성 및 분자량 측정을 위하여 각 정제 단계에서 높은 invertase 활성을 나타낸 fraction들을 모아서 SDS-PAGE를 한 결과 각 정제단계에서 불순 단백질의 band가 제거되며 major band는 농축되어 Sephadex G-200의 fraction은 molecular weight 37,000~38,000 부근에서 공통된 단일 band를 확인함으로써 각 정제단계별 동일 효소가 정제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 그리고 정제된 invertase의 분자량을 결정하기 위해 SDS-PAGE 상에

Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the invertase produced by *Saccharomyces cerevisiae* JS59 isolated from wine. M: size maker, A: cell free extract, B: after DEAE Sephadex A-50, C: after Sephadex G-200 (purified enzyme). a: myosin (M.W. 211,806), b: β -galactosidase (M.W. 121,020), c: bovine serum albumin (M.W. 100,216), d: ovalbumin (M.W. 54,395), e: carbonic anhydrase (M.W. 38,708), f: soybean trypsin inhibitor (M.W. 29,806), g: lysozyme (M.W. 20,040).

나타난 표준단백질의 상대이동거리(Rf 값)를 측정하여 이동도와 표준단백질의 분자량과의 관계식을 이용하여 분자량을 산출한 결과 본 연구에서 정제한 invertase는 Fig. 4에서와 같이 M.W. 38,500으로 나타났다.

미생물 유래 invertase의 정제에 관하여 Quang과 Judit(23)은 *Aspergillus niger* IMI 303386에서 분리한 fructooligo-

Fig. 4. Molecular weight determination of purified invertase produced by *Saccharomyces cerevisiae* JS59 isolated from wine using 7.5% SDS-PAGE. Purified enzyme (●), size marker (○): a, myosin (M.W. 211,806); b, β -galactosidase (M.W. 121,020); c, bovine serum albumin (M.W. 100,216); d, ovalbumin (M.W. 54,395); e, carbonic anhydrase (M.W. 38,708); f, soybean trypsin inhibitor (M.W. 29,806); g, lysozyme (M.W. 20,040).

saccharides를 생산하는 invertase의 효소학적 성질을 연구하였는데, 정제된 invertase의 분자량이 125 kDa이었다고 보고하여 본 연구에서 정제한 invertase보다 3배 이상 컸으며, Kim 등(24)은 호 알칼리성, 고온성 *Bacillus* sp. TA-11이 생성하는 invertase의 정제 및 특성에서 정제된 invertase의 분자량이 25 kDa이라고 보고하여 본 연구의 결과보다 낮았다. 그러나 Elina와 Laine(25)이 *Aspergillus* sp.로부터 정제한 endo- β -1,4-galactanase의 분자량은 38 kDa으로 본 연구에서 정제한 invertase의 분자량과 거의 일치하였다. 또한 Muramatsu와 Kakuki(26)는 *Aspergillus niger* IAM 2544로부터 분리한 intracellular invertase의 분자량이 50 kDa이었다고 하였다.

Invertase 반응의 최적 pH 및 pH 안정성

포도주로부터 분리한 효모가 생성하여 정제된 invertase의 최적 pH 및 pH 안정성을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 정제된 invertase는 pH 5.0에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으며, pH 4에서는 최대효소활성의 94%의 효소활성이었고, pH 6에서는 65%의 효소활성을 나타내었다. 또한 pH 3과 7에서는 각각 2%와 4%의 상대 효소활성을 보여 pH 4.0과 5.0 약산성 부근에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 Hong과 Lee(27)가 *Aspergillus niger*가 생산하는 invertase의 정제와 특성에서 정제된 효소의 최적 pH가 5.0이었다는 것과 동일한 결과였으며, Sayago와 Vattuone(28)이 *Pteris deflexa*가 생산하는 invertase의 pH가 5.0이었다고 보고하여 본 실험의 결과와 일치하였다.

한편 각 pH의 효소 용액을 25°C에서 30분간 방치 후 잔존 효소활성을 측정하여 pH 안정성 결과는 pH 5.0에서는 100% 잔존 활성을 나타냈으나, pH 3.0, 4.0에서의 잔존 효소활성은 각각 0%, 88%이었으며, pH 6.0, 7.0에서는 각각 64%, 4%의 잔존 효소활성을 보여, pH 4와 5에서 비교적 안정한 것으로 나타났다. Ester와 Michele(29), Sanjay와 Sugunan(30)은

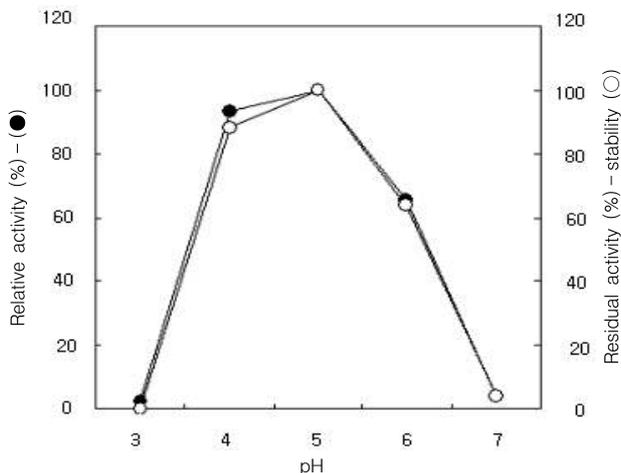


Fig. 5. Effect of pH on the activity and stability of the invertase produced by *Saccharomyces cerevisiae* JS59 isolated from wine.

invertase의 pH 안정성 범위가 pH 4.0~6.0이었다고 보고하였으며, Quang과 Judit(23) 및 Choi와 Lee(31)는 *Aspergillus niger* IMI 303386과 *Bacillus* sp. TA-11이 생산하는 invertase의 안정범위가 pH 4.0~11.0이었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 *S. cerevisiae* JS59로부터 분리 정제한 invertase는 알칼리 영역에 비해 산성 영역에서 더 안정한 것으로 나타나 acidophilic invertase임을 확인할 수 있었다.

Invertase 반응의 최적 온도 및 온도 안정성

포도주로부터 분리된 효모에 의해 생성되어 정제된 invertase 활성의 최적 온도 및 온도 안정성을 측정하여 Fig. 6과 같다. 정제된 invertase의 최적 활성 온도는 55°C이었으며, 이때의 효소활성을 100으로 하였을 때 50°C에서는 87%의 효소활성을 나타내었고 이보다 낮은 온도인 30, 40°C에서는 효소활성이 각각 52%, 69%로 떨어졌으며, 최적 온도보다 높은 60°C에서는 30%로 떨어졌다. 이러한 결과는 Emel과 Sibel(32) 및 Bahar과 Tuncel(33)의 연구에서의 최적 온도 55°C와 일치하는 것으로 보아 고온성 invertase임을 추정할 수 있다. 그러나 Liu와 Huang(34)의 *Bambusa edulis*로부터 분리한 invertase의 최적온도가 35°C이었으며, 50°C에서는 효소활성이 70%로 감소해 중온성 invertase도 있었다.

한편 각 온도에서 30분간 방치 후 온도 안정성을 조사한 결과, 정제된 invertase를 50°C 이하에서 30분간 열처리했을 때, 효소활성은 100%의 높은 잔존 효소활성을 나타내었으며, 55°C에서도 97%를 유지해 열에 대한 안정성을 보였으나, 60°C 이상의 온도에서는 온도 상승과 함께 잔존 효소활성이 45% 이하로 크게 떨어졌다. 이는 온도가 높아짐에 따라 효소의 변성이 급격히 일어나 효소활성이 감소된 것으로 생각된다. 이러한 결과는 Lamia와 Zhang(21)의 *Aspergillus niger* AS0023으로부터 분리한 invertase의 경우 65°C에서 80%의 효소활성을 유지한다는 결과, Emel과 Sibel(32)의 70°C에서 30%의 효소활성을 유지한다는 결과와는 차이가 있었으나, *Aspergillus thecicus*가 생성하는 invertase의 최

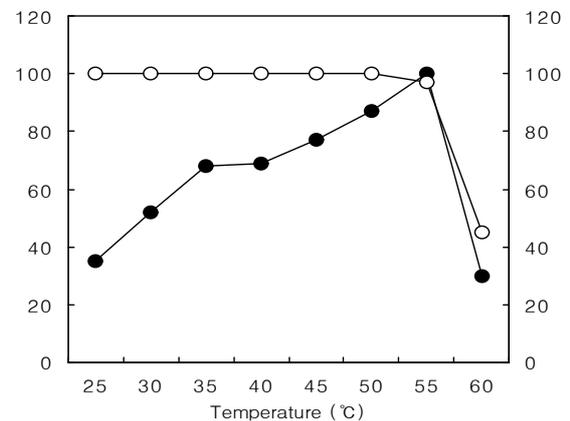


Fig. 6. Effect of temperature on the activity and thermal stability of the invertase produced by *Saccharomyces cerevisiae* JS59 isolated from wine.

Table 3. Effect of various metal ions on the activity of invertase produced by *Saccharomyces cerevisiae* JS59 isolated from wine

Ion	Metal (1 mM)	Relative activity (%)
	None	100
Ag ²⁺	AgNO ₃	0
Ba ²⁺	BaCl ₂	100
Ca ²⁺	CaCl ₂	100
Co ²⁺	CoCl ₂	143
Cu ²⁺	CuSO ₄	42
Fe ²⁺	FeSO ₄	102
Hg ²⁺	HgCl ₂	0
K ⁺	KH ₂ PO ₄	96
Mg ²⁺	MgSO ₄	101
Mn ²⁺	MnSO ₄	155
Zn ²⁺	ZnSO ₄	53
Pb ²⁺	PbCl ₂	96

대 활성온도는 50~55°C이었으며, 60°C에서 30분간 열처리 한 경우, 효소활성이 50% 정도가 감소한다는 보고(35)와는 유사한 결과였다.

Invertase 반응의 금속이온에 의한 영향

포도주로부터 분리한 효모가 생성한 invertase의 효소활성에 미치는 금속이온의 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

금속 이온 중 Ag²⁺, Hg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺의 농도가 각각 1.0 mM 이 되도록 첨가하여 효소활성을 측정하였을 때, 각각 0%, 0%, 42%, 53%로 나타나 효소활성이 감소하였으며, Co²⁺, Mn²⁺에 의해서는 효소의 활성이 50% 가량 촉진되었다. 그 밖에 다른 금속이온들에 의해서는 효소의 활성이 큰 영향을 받지 않았다. 이 결과는 Lamia와 Zhang(21)의 *Asp. niger* AS0023과 Quang과 Judit(23)의 *Asp. niger* IMI 303386이 분비하는 invertase가 Ba²⁺, Ca²⁺ 등에는 비교적 안정하며, Ag²⁺과 Hg²⁺에 의해서는 저해를 받았다는 보고와 유사하였고, Mg²⁺에 안정하며 Hg²⁺에 의해 효소활성이 저해되었다는 Liu와 Huang(34)의 결과와도 유사하였다. 또한 Maria와 Rosa(22)가 효모 *Rhodotorula glutinis*로부터 분리한 invertase의 특성에 관한 연구 결과와 비교하였을 때, Co²⁺에 의해서 효소활성이 높아졌다는 보고와는 비슷하였으나, Hg²⁺에 의해 저해를 받지 않았다는 결과와는 달랐다.

Invertase의 반응속도에 미치는 기질의 영향

기질의 농도에 따른 효소활성과의 관계를 조사하기 위해 정제된 invertase를 이용하여 1~10 mg/mL의 기질(sucrose) 농도에 따른 효소활성을 측정하여 각 농도에서의 효소활성을 Lineweaver-Burk plot(17)으로 나타내어, K_m값을 측정 한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 그 결과 K_m값은 11.5 mM (3.9526 mg/mL)로 나타났다. 이 같은 K_m값은 Ester와 Michele(29)의 음이온 교환체에 의해 고정된 invertase의 17.0 mM 보다는 낮았으나, Haq 등(36)이 *Fusarium solani*로부터 분리한 내산성 invertase의 3.57 mM보다는 높았다.

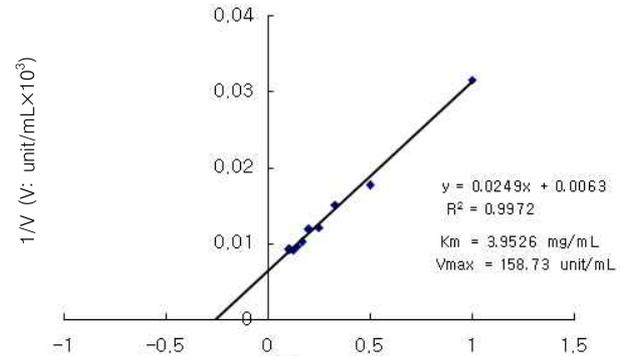


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot for sucrose by invertase produced by *Saccharomyces cerevisiae* JS59 isolated from wine.

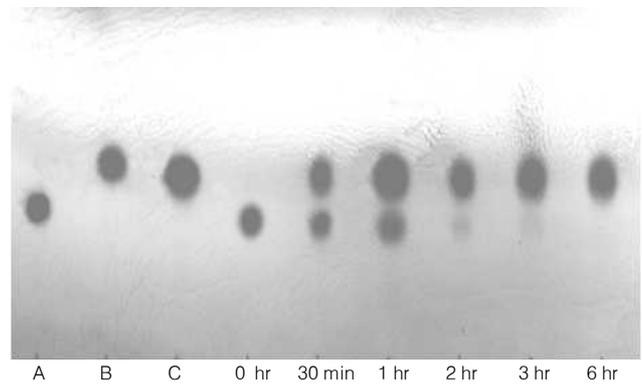


Fig. 8. Thin-layer chromatography of hydrolysis production of the sucrose by purified invertase according to time. A: sucrose, B: glucose, C: fructose.

Invertase 반응 생성물의 TLC 분석

Sucrose 용액에 정제된 효소를 넣고 반응시간에 따른 invertase 효소반응 생성물에 대해 조사하고자 효소액(9.8 unit/mL) 0.5 mL와 0.1 M acetate buffer(pH 5.0) 1 mL 그리고 0.2 M sucrose 용액 0.5 mL를 혼합한 반응액을 55°C water bath에서 일정 시간 반응시킨 다음 끓는 물에서 5분간 중탕하여 반응을 정지시켜 반응물을 TLC로 확인한 결과는 Fig. 8과 같다. 그 본 실험 결과 그림에서와 같이 시간이 경과함에 따라 sucrose 용액으로부터 glucose와 fructose가 주로 생성되었다. 특히 반응 2시간에는 기질인 sucrose용액이 전화당으로 거의 분해됨을 확인할 수 있었다.

요 약

전화당(invert sugar)을 생산하기 위하여 포도주로부터 분리한 효모가 생산하는 invertase의 특성을 조사한 결과는 다음과 같다. 포도주로부터 분리한 효모는 지방산 분석을 통하여 *Saccharomyces cerevisiae* JS59로 잠정 동정되었다. 본 균주가 생성하는 invertase를 ammonium sulfate 침전, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-200 column chromatography 법으로 정제하였을 때 단일성을 보였으며, specific

activity가 7620.9 unit/mg, 최종 회수율은 13.9로 약 14배 정제된 효소를 얻었다. 본 효소의 K_m 값은 11.5 mM이었다. SDS-PAGE로부터 분자량은 38.5 kDa로 나타났다. 정제된 invertase의 최적 pH는 5였고, pH 4에서도 94%의 높은 효소활성을 나타냈으며 4에서 6까지의 pH영역에서 안정하였고, 55°C에서 최적 활성을 나타내었으며 50°C까지는 안정하였다. Ag^{2+} 와 Hg^{2+} 에 의해서 저해를 받았고, Co^{2+} , Mn^{2+} 에 의해서는 효소활성이 증가되었으며, 기질과 효소 반응물을 thin layer chromatography로 분석한 결과, 본 효소는 기질인 sucrose를 완전히 분해하여 환원당을 생성함이 확인되었다.

문헌

- Kim JW, Park JS. 1997. Industrially useful microorganism (III). *Kor J Microbiol Biotechnol* 10: 26-33.
- Cha SK, Choi HS, Kim WJ, Yoon SH, Kim YB. 1996. Screening of yeast cell wall lytic enzyme producing microorganism and optimization of enzyme production. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 24: 143-148.
- Cipan A, Alkan S, Toppare L, Hepuzer Y, Yagci Y. 2003. Immobilization of invertase in conducting copolymers of 3-methylthienyl methacrylate. *Bioelectrochem* 59: 29-33.
- Myrbäck K. 1960. Invertase. In *The Enzyme*. Boyer PD, Lardy H, Myrbäck K, eds. Academic Press Inc., New York, NY, USA. Vol 4, p 379-396.
- Ester JT, Michele V. 2007. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. *J Food Eng* 80: 662-667.
- Santiao JA, Vásquez JM. 2006. Direct immobilization of a recombinant invertase to Avicel by *E. coli* overexpression of a fusion protein containing the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* and the carbohydrate-binding domain DBDcex from *Cellulomonas fimi*. *Enz Microb Technol* 40: 172-176.
- Arnold WN. 1974. Expression of cryptic β -fructofuranosidase in *Sacch. rouxii*. *J Bacteriol* 120: 887-894.
- Arnold WN. 1972. The structure of the yeast cell wall. Solubilization of a marker enzyme, β -fructofuranosidase by the autolytic enzyme system. *J Biol Chem* 247: 1161-1169.
- Gascon S, Lampen JO. 1968. Purification of internal invertase of yeast. *J Biol Chem* 243: 1567-1572.
- Babczynski P. 1980. Partial purification, characterization and localization of the membrane-associated invertase of yeast. *Biochem Biophys Acta* 614: 121-133.
- Onyezili FN, Onitiri AC. 1981. Immobilization of invertase on modified nylon tubes. *Anal Biochem* 113: 203-206.
- Metzenberg RL. 1962. A gene affecting the repression of invertase and trehalase in *Neurospora*. *Arch Biochem Biophys* 96: 468-474.
- Ottolenghi P. 1971. A comparison of five genetically distinct invertase from *Saccharomyces* sp. *Eur J Biochem Biophys* 18: 544-552.
- Welch DF. 1991. Applications of cellular fatty acid analysis. *Cli Microbiol Rev* 4: 422-438.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Lowry OH, Rosebrough NJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lineweaver H, Burke D. 1934. Determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 56: 658-666.
- Hay GW, Lewis BA, Smith F. 1963. Thin-film chromatography in the study of carbohydrates. *J Chromat* 11: 479-486.
- Hiroshi H, Koji T. 2003. Purification and characterization of two soluble acid invertase isozyme from Japanese pear fruit. *Phytochemistry* 63: 125-129.
- Lamia LH, Zhang W. 2000. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *J Biotechnol* 81: 73-84.
- Maria CR, Rosa R. 2002. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry* 61: 605-609.
- Quang DN, Judit MR. 2005. Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI 303386. *Process Biochem* 40: 2461-2466.
- Kim NM, Kim DW, Kim JH. 2002. Biosynthetic regulation of invertase from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. TA-11. *Korean J Food Nutr* 15: 126-130.
- Elina L, Laine C. 2003. Purification and characterization of *Aspergillus* β -D-galactanases acting on β -1,4- and β -1,3/6-linked arabinogalactans. *Carbohydr Polym* 53: 155-168.
- Muramatsu M, Kakuki T. 2005. Enzymatic synthesis of novel fructosyl and oligofructosyl trehaloses by *Aspergillus sydowi* β -fructofuranosidase. *Biosci Biotechnol Biochem* 59: 208-212.
- Hong JM, Lee KA. 1990. Production and properties of invertase from *Aspergillus niger*. *J Korean Soc Food Nutr* 19: 577-582.
- Sayago JE, Vattuone MA. 2002. Proteinaceous inhibitor versus fructose as modulators of *Pteris deflexa* invertase activity. *J Enz Inhib Medicinal Chem* 17: 123-130.
- Ester JT, Michele V. 2006. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. *Process Biochem* 41: 1325-1331.
- Sanjay G, Sugunan S. 2005. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. *Food Chem* 94: 573-579.
- Choi YJ, Lee JS. 1995. Production of β -fructofuranosidase from alkalophilic, thermophilic *Bacillus* sp. TA-11. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 23: 197-202.
- Emel E, Sibel S. 2006. Polyacrylamide-gelatin carrier system used for invertase immobilization. *Food Chem* 97: 591-597.
- Bazar T, Tuncel A. 2004. Concanavalin A carrying reactive beads for yeast invertase purification. *Reactiv Function Polym* 61: 203-210.
- Liu CC, Huang LC. 2006. Purification and characterization of soluble invertases from suspension-cultured bamboo (*Bambusaedulis*) cells. *Food Chem* 96: 621-631.
- Madyastha KM, Ganguli AR. 1987. Extracellular invertase from *Aspergillus thecicus*: isolation and immobilization. *Biotechnol Lett* 9: 555-560.
- Haq NB, Asgher M, Abbas A. 2006. Studies on kinetics and thermostability of a novel acid invertase from *Fusarium solani*. *J Agric Food Chem* 54: 4617-4623.