

고려인삼(*Panax ginseng*) Invertase의 정제와 그 특성

김용환·김병목*

경기대학교 식품가공학과

*중앙대학교 식품가공학과

(1990년 3월 6일 접수)

Purification and Characterization of Invertase from Korean Ginseng *Panax ginseng*

Young-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 □ An invertase (EC 3.2.1.26) was extracted from Korean giseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) with distilled water. The ginseng invertase was purified about 62.6 folds purified by procedures including ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulofine chromatography and gel-filtrations through Sephadex G-75 and the recovery of enzyme activity was 11.1%. The homogeneity of the purified enzyme was proved by polyacrylamide gel disc electrophoresis. The purified enzyme was divided into two different subunits by treating with a mixture of SDS and 2-mercaptoethanol, and the molecular weight of the large subunit was estimated to be 116,000 and that of the small one to be 14,000. The optimal pH and temperature of the enzyme were pH 6 and 45°C, respectively. The enzyme hydrolyzed specifically the hydrolyzation of the -fructofuranosides such as sucrose, raffinose and inulin. The Km values of the enzyme for sucrose and raffinose were determined to be 0.85 and 0.6 mM, respectively.

Keywords □ *panax ginseng* C.A. Meyer, invertase, purification, characterization.

서 론

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오가과(五加科, *Araliaceae*)에 속하는 다년생 초본식물로서 오래 전부터 영약(靈藥)으로 알려진 만큼 한방에서 널리 애용되어 왔을 뿐만 아니라 해약체질이나 병후관리 등에 보건식품으로서도 널리 사용되어 왔다. 최근에 이르러서는 건강식품에 대한 관심도가 높아감에 따라 인삼차, 인삼드링크, 인삼액기스, 인삼당과 등 여러 형태의 가공품 마저 나오고 있어 식품으로서 중요한 위치를 차지하게 되었고, 특히 우리나라 토산품 개발이라는 차원에 있어서는 그의 가

치가 더해지고 있다. 인삼에 대한 연구는 1854년 Garriques¹⁾가 *Panax quinquefolium*의 뿌리에서 Panaquilon($C_{12}H_{25}O_9$)이라는 황색 무정형의 분말을 추출한 이래 Shibata *et al.*,²⁾ Tanaka *et al.*³⁾에 의하여 인삼배당체(sapogenin)의 구조가 보고되었고 그 외에 Ueda,⁴⁾ Brekhman,⁵⁾ Oura⁶⁾ 등에 의하여 인삼배당체의 각종 생리적 효과가 보고되었다. 최근에 이르러서는 인삼단백질,⁷⁾ 아미노산 및 펩티드 등⁸⁻¹¹⁾에 관한 연구도 많이 보고되었다.

그러나 이들 saponin 류와 미량성분의 생체내에 서의 형성과 소장 등에 관여하는 이론과 효소계와의 관계는 별로 연구된 바 없다. 따라서 인삼의 약초

또는 식품으로서의 참된 가치와 인삼 자체내의 물질 대사 및 생리적 효과를 연구하기 위해서는 이들 효소계에 관한 종합적인 연구가 필요하다. 인삼 효소에 관한 연구는 1926년 山口¹²⁾가 diastase와 phenolase에 대하여 연구 보고한 외에 김 등¹³⁾이 인삼 근부병의 만연과정에 관여하는 효소작용에 관하여 보고한 바 있으며 특히 최근에 이르러, 수삼(水蓼) 중에 glycosidase가 특이적으로 존재함을 발견하고 그 중 α -amylase, β -amylase, invertase 등을 분리하여 그의 성질을 연구, 보고한 바 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 그러나 아직 이들 연구는 조(粗) 효소의 성질에 관한 연구이므로 앞으로 정제효소에 대한 연구가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 인삼 invertase를 분리정제하여 그의 성질을 규명하는 실험을 실시하였다. 이에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

시료인삼: 본 실험에 사용된 시료는 강화도산 5년근 수삼(水蓼)을 사용하였다.

화학약품: Acrylamide는 E. Merck Co. 제품, streptomycin sulfate는 Fluka Co. 제품, riboflavin은 BDH Co. 제품, N,N'-methylene-bis(acrylamide)는 Eastman Kodak Co. 제품, tris(hydroxymethyl) aminomethane은 Kanto Co. 제품, N,N,N',N'-tetra methyl-ethylenediamine(TEMED), coomassie brilliant blue 250 B는 Sigma Co. 제품, DEAE-cellulofine은 Chitso Co. 제품, Sephadex G-75 및 분자량 추정용 표준 단백질은 Pharmacia Fine Chemicals 제품을 사용하였다. 기타 시약도 모두 특급 및 일급을 사용하였다.

2. 실험방법

조(粗) 인삼 invertase의 조제: 시료인삼(2 kg)을 충분히 세척하고 동량(w/v)의 중류수를 가하여 warling blender에서 10분간 마쇄한 후 30°C에서 30분간 항온시켜 착즙한 후 이를 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 조(粗) 인삼 추출액(crude extract)으로 하였다. 조(粗) 인삼 추출액은 Kim¹⁵⁾의 방법에 따라 황산암모늄으로 0.8 포화

시커 12시간 정치한 후 6,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻어진 상등액에 다시 황산암모늄으로 1.0 포화시켜 24시간 정치한 후 6,000 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 분리된 침전물은 중류수에서 72시간 투석시켰으며 이 때 잔존하는 불용성물질은 6,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 제거하고 상등액은 농축하여 조(粗) 인삼 invertase로 하였다.

Invertase 활성의 측정: Pressey 법¹⁷⁾에 의하여 측정하였다. 즉 시험관에 0.2 M acetate buffer(pH 4.7) 0.5 ml, 100 μ M sucrose 0.2 ml를 가하여 37°C에서 10분간 항온시키고 효소액 0.3 ml를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 0.5 M Na₂HPO₄ 1.0 ml를 첨가하여 2분간 끓여서 효소작용을 중지시켰다. 이 효소반응액 중에서 0.5 ml를 취하여 copper 시약 0.5 ml를 가하고 10분간 끓인 후 냉각, arsenomolybdate 시약 0.5 ml를 가하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 환원당을 비색 정량하였다. 효소활성단위는 37°C에서 1분당 1 μ mole의 환원당을 생성하는 것을 1 unit로 하였다.

단백질 정량: 효소액의 단백질 함량은 Lowry et al. 법¹⁸⁾에 의하여 측정하였으며 표준단백질로서는 bovine serum albumin을 사용하였다.

조(粗) 인삼 invertase의 정제: 조(粗) 효소액을 평형화된 DEAE-cellulofine column(1.2×40.0 cm)에 주입하여 흡착시킨 후 0.01, 0.1, 0.2 M 및 1.0 M NaCl을 함유하는 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0)를 사용하여 stepwise 법으로 0.35 ml/min의 유속으로 chromatography 하였다. 비(比) 활성이 가장 높은 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 용출 회분만을 따로 모아 농축시킨 후 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)에 충분히 투석시킨 후 같은 buffer로 평형화시킨 Sephadex G-75 column(1.8×90.0 cm)에서 0.1 ml/min의 유속으로 gel 여과시켰다. 여기에서 얻어진 peak 중 효소활성이 가장 큰 것을 모아 다시 같은 요령으로 gel 여과하여 Fig. 1에서 보는 바와 같이 단일 peak를 얻었다. 그러나 이 회분은 UV-absorption spectra의 경우 260 nm에서 높은 흡광도를 나타내 있으므로 해산의 가능성이 높아 이를 제거하기 위하여 streptomycin sulfate를 2.0 mg/ml 첨가하여 12시간 작용시킨 후 6,000 rpm으로 30분간

원심분리하여 침전된 핵산을 제거하였다. 얻어진 상동액은 탈이온수에서 24시간 투석하여 정제된 invertase로 사용하였다.

Polyacrylamide gel disc 전기영동: 전기영동은 Ornstein¹⁹⁾과 Davis²⁰⁾의 방법에 따라서 실시하였다. 즉 7.5% polyacrylamide gel column에 시료를 주입하고 tris-glycine buffer(pH 8.3)에서 bromophenolblue(BPB)를 tracer로 하여 3mA/tube의 전류를 통하여 120분간 영동하였다. 영동이 끝난 gel은 0.25% coomassie brilliant blue 250B로 4시간 염색 후 5% methanol-7% acetic acid로 교반, 탈색하였다. 탈색이 끝난 gel은 Gelman Science ACD-18 Densitometer를 사용하여 파장 550nm, slit: 5×3.0 mm에서 scanning 하였다.

분자량 측정: 정제 invertase의 분자량 측정은 Wher *et al.*²¹⁾의 방법에 따라 실시하였다. 즉 Varian 5000 liquid chromatography를 사용하여 column: MicroPak TSK 3000 SW(7.5×300.0 mm), solvent: 0.1M phosphate buffer(pH 7.0), flow rate: 1.5 ml/min, chart speed: 1.0 cm/min, detection: UV-50, 280 nm, injection volume: 10 μl의 조건하에서 측정하였으며 subunit의 확인은 효소액에 소량의 SDS와 2-mercaptoethanol을 첨가하여 16시간 정지한 후 10 μl를 취하여 동일한 조건으로 측정하였다. 표준단백질로는 bovine serum albumin(MW 67,000), ovalbumin(MW 43,000), chymotrypsinogen A(MW 25,000)를 사용하였다.

UV absorption spectra: UV absorption spectra는 Beckman M-35 spectrophotometer를 사용하여 240-400 nm 범위에서 scanning 하였다.

결과 및 고찰

1. 인삼 invertase의 정제

조(粗) 인삼 invertase를 실험방법에서 기술된 요령으로 DEAE-cellulofine chromatography, Sephadex G-75 gel 여과한 후 얻어진 효소활성이 있는 획분을 재차 Sephadex G-75 gel 여과한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 효소활성과 일치하는 단

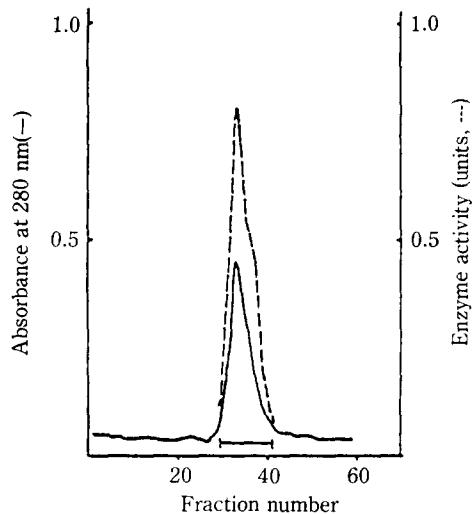


Fig. 1. Elution profile of invertase from column (1.8 × 90.0 cm) of regelfiltration by Sephadex G-75. Elution was achieved with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0). The flow rate was approximately 6 ml/hr and fractions of 3.0 ml each were collected.

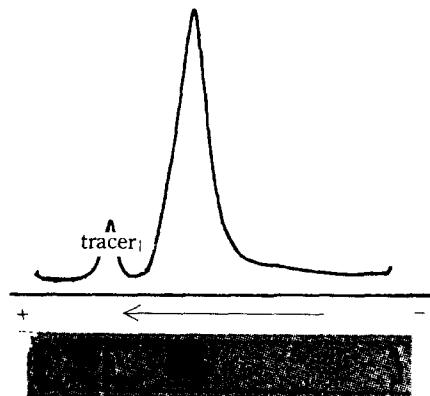


Fig. 2. Electrophoretogram on polyacrylamide gel disc and densitogram of purified invertase. Gel concentration, 7.5% polyacrylamide; buffer, tris-glycine buffer (pH 8.3); current, 3 mA/column; loading amount, 100 μl (99.5 μg protein); staining sol., coomassie brilliant blue 250B (0.25%); destaining sol, 5% MeOH-7% HAC; wavelength, 550 nm; slit, 5×3 mm.

일 peak를 얻었다. 이 획분은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 polyacrylamide gel disc 전기영동에서 단일 band를 나타내었다. 이를 다시 streptomycin sulfate로 처리한 후 원심분리하여 핵산을 침전

Table 1. Summary of purification procedures of invertase from *Panax ginseng* C.A. Meyer

Procedure	Total Volume (ml)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)	Total activity (units)	Recovery of activity (%)	Purification fold
Crude extract	2900.0	1963.3	0.11	223.3	(100.0)	(1.0)
Crude invertase	142.5	67.3	2.03	136.5	61.1	18.5
DEAE-cellulofine	233.5	10.1	4.44	44.8	20.1	40.4
Sephadex G-75						
regel filtration	41.0	5.1	6.78	34.6	15.5	61.6
Streptomycin sulfate	36.0	3.6	6.89	24.8	11.1	62.6

Ginseng roots (2 Kg) were used as the starting materials.

For experimental details, see the method.

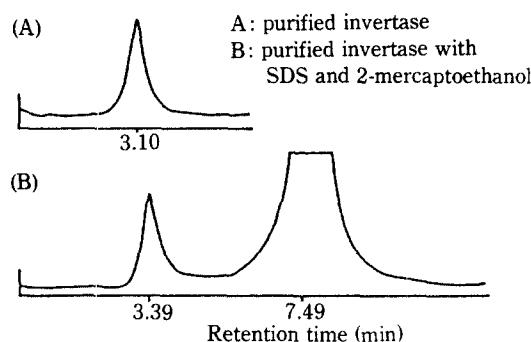


Fig. 3. High performance liquid chromatogram of purified invertase. Column, MicroPak TSK 3000 SW (7.5 × 300.0mm); solvent, 0.1M phosphate buffer (pH 7.0); flow rate, 1.5 ml/min; chart speed, 1.0 cm/min; detection, UV-50, 280 nm; injection volume, 10 µl(A: 9.95 µg protein, B: 15.92 µg protein).

으로 제거하여 정제한 결과 Table 1에서와 같이 약 62.6배 정제되었으며 11.1%의 효소활성 수율을 보였다.

2. 분자량 측정

정제 invertase를 HPLC 한 결과 Fig. 3A에서와 같이 단일 peak를 나타내었다. 또 정제 invertase를 SDS 와 2-mercaptoethanol로 처리한 후 HPLC 한 결과 Fig. 3B에서와 같이 두 개의 subunit로 분리되었다. 이들의 분자량을 측정하기 위하여 몇 종의 표준단백질과 함께 elution volume 과 분자량을 plotting 한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 정제 invertase는 분자량 135,000으로 계산되었으며 2개의 subunit은 각각 116,000과 14,000으로 계산되었다. 이는 Kim and Chae²²⁾가 보고한

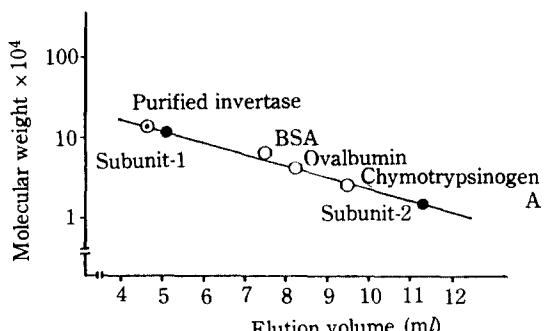


Fig. 4. Graphic determination of the molecular weights of purified invertase by HPLC. Column, MicroPak TSK 3000 SW(7.5 × 300.0mm); solvent, 0.1M phosphate buffer (pH 7.0); flow rate, 1.5 ml/min; chart speed, 1.0 cm/min; detection, UV-50, 280nm; marker protein were bovine serum albumin (MW 67,000), ovalbumin (MW 43,000) and chymotrypsinogen A (MW 25,000).

인삼 invertase의 분자량 48,000과는 현저히 다른 결과였으며 몇 종류의 인삼 invertase isozyme이 존재하는 데에 기인된 것으로 사료된다.

3. UV absorption spectra

정제 invertase는 Fig. 5에서와 같이 278 nm에서 최대 흡광도를 보이는 전형적인 단백질 형태를 보였다. 280/260 nm는 1.43으로서 Kim and Chae²²⁾가 보고한 인삼 invertase의 280/260 nm 가 1.26인 것보다 컸다. 이는 streptomycin sulfate 처리에 의한 제핵산의 효과에 의한 것으로 추측된다.

4. 최적 pH 및 최적온도

정제 invertase를 각각 pH 3-10의 범위내에서

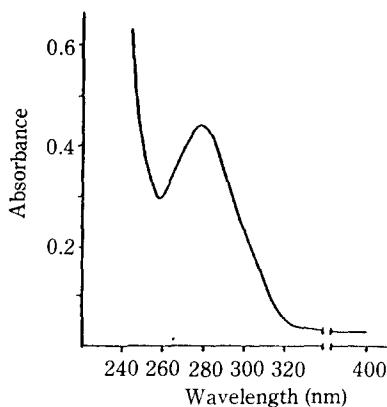


Fig. 5. UV absorption spectra of invertase was purified by treated with streptomycin sulfate.

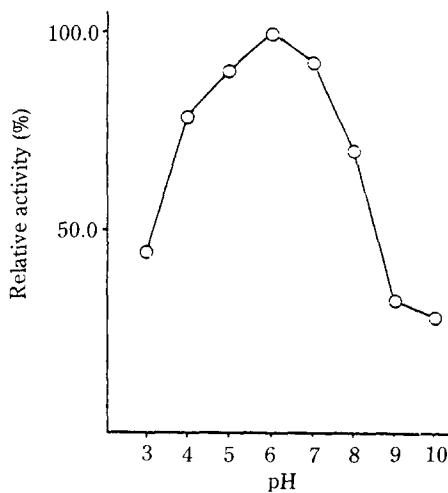


Fig. 6. Effects of pH on the activity of purified invertase. Enzyme activity were measured in the presence of sucrose as substrate in 0.2M acetate buffer (pH 3-5), 0.2M phosphate buffer (pH 6-8) and 0.2M carbonate buffer (pH 9-10). The maximum activity was expressed as 100%.

각각 효소활성을 측정한 결과 Fig. 6에서와 같이 최적 pH 6.0을 나타내었다. 이는 Kim¹⁵⁾이 보고한 조(粗) 인삼 invertase의 최적 pH 5.0 보다는 다소 중성 쪽으로 이동된 결과인 바 조효소의 경우 본 정제 invertase와 다른 산성 invertase가 혼재되어 있기 때문이 아닌가 추측된다. 한편, 정제 invertase의 반응온도를 0, 15, 25, 35, 45, 55, 60, 80°C로 각각 달리하여 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 7에서와 같이 45°C에서 최적온도를 나타내었

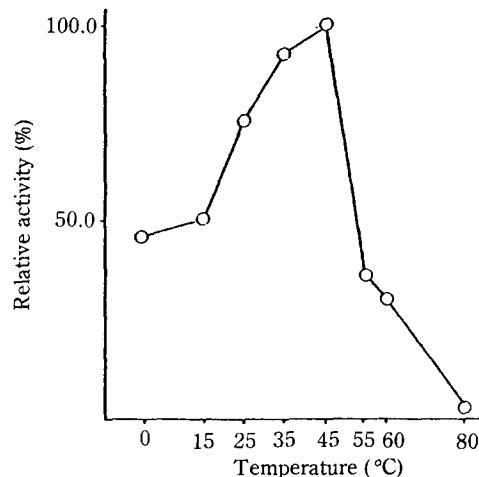


Fig. 7. Effects of temperature on the activity of purified invertase. Enzyme activity were measured in the presence of sucrose as substrate in 0.2M acetate buffer (pH 4.7). The maximum activity was expressed as 100%.

Table 2. Comparision of substrate specificity of purified invertase activity

Substrate	Relative activity(%)	Substrate	Relative activity(%)
Sucrose	100.0	Inulin(inulin type)	100.0
Trehalose	49.8	Starch(soluble)	25.1
Maltose	49.8	Glycogen	25.1
Lactose	25.1	Cellulose	—
Cellobiose	25.1	Xylan	12.4
Melibiose	25.1		
Raffinose	124.8		

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 0.2 M except polysaccharide whose concentration was 2.0%.

다. 이는 Kim¹⁵⁾이 보고한 조(粗) 인삼 invertase의 최적온도 60°C보다 다소 낮았다. 그러나 지금까지 연구, 보고된 식물 invertase에 관한 많은 보고²³⁻²⁶⁾와 대체로 일치되는 경향을 나타내었다.

5. 기질 특이성

몇몇 다른 기질을 사용하여 효소활성을 측정한 결과 본 정제 invertase는 Table 2에서와 같이 sucrose, raffinose, inulin 등에만 특이적으로 작용하였다. 아들 기질은 모두 β -fructofuranoside

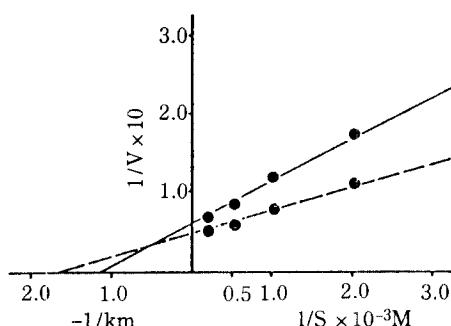


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot for determination of K_m for purified invertase. —, sucrose; ---, raffinose.

결합을 가진 물질들인 바 이는 본 효소가 전형적인 β -D-fructofuranosidase 임을 나타내는 것으로 해석된다.

6. K_m 값의 측정

정제 invertase의 기질 친화력을 보기 위하여 sucrose 및 raffinose의 농도를 0.1-5.0 mM의 범위로 달리하여 각각 효소활성을 측정한 후 Lineweaver-Burk plotting하였다. 그 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 K_m 값은 sucrose의 경우 0.85 mM raffinose의 경우 0.6 mM로서 raffinose가 sucrose보다 기질 친화력이 강한 것으로 나타났다. 이는 다른 많은 invertase의 경우 sucrose가 raffinose보다 기질 친화력이 강한 것²⁷⁻²⁹과는 대조적인 것으로서 흥미있는 일이다.

요 약

고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer) 중의 invertase를 종류수로 추출한 후 황산암모늄분획, DEAE-cellulofine column chromatography, Sephadex G-75 gel 여과 및 쟈 gel 여과, streptomycin sulfate 처리 등의 과정을 거쳐서 정제하였다. 효소의 정제율은 약 62.6배였으며 효소활성 수율은 11.1%였다. 정제 invertase는 polyacrylamide gel disc 전기영동에 의하여 균일성이 확인되었으며 high performance liquid chromatography(HPLC)에 의하여 분자량은 약 135,000으로 계산되었다. SDS와 2-mercaptoethanol 처리에 의하여 2개의 각기 다른 subunit로 분리되었으며 이들 중 큰 subunit의 분자량은 116,

000이고 작은 subunit는 14,000이었다. 정제효소의 효소반응 최적 pH와 온도는 pH 6.0과 45°C이었다. 정제효소는 sucrose, raffinose, inulin 등의 β -D-fructoside 결합을 가진 기질에 특이적으로 작용하여 전형적인 β -D-fructofuranosidase의 특징을 나타내었다. Sucrose와 raffinose의 K_m 값을 각각 0.85 mM 및 0.6 mM이었다.

Literature Cited

- Garriques: *Annal. d. Chem. w. Phamac.* **90**, 231 (1854).
- Shibata, S., Tanaka, O., Sado, M. and Yoshikatsu, S.: *Tetrahedron Letters*, No. 12, 795 (1963).
- Tanaka, O., Nagai, M. and Shibata, S.: *Tetrahedron Letters*, No. 33, 2291 (1964).
- Ueda, K.: *Pharm. Bull. (Japan)* **2**, 335 (1953).
- Brekhman, I.I.: *Drugikh Lekarstsu. Rast. Daln. Vost.* **5**, 249 (1963).
- Oura, Y.: *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 980 (1972).
- 최 청, 윤상홍, 배만종, 안봉전: *한국식품과학회지*, **17**, (1985).
- 이성우, 黑崎 敏 晴, 우상규, 윤태현: *한국영양식량학회지*, **11**, 37(1982).
- Gstirner, F. and Vogt, H.J.: *Arch. Pharm.* **299**, 936 (1966).
- Gstirner, F. and Vogt, H.J.: *Arch. Pharm.* **300**, 371 (1967).
- Gstirner, F. and Braun, W.: *Arch. Pharm.* **296**, 384 (1963).
- 山口: *朝鮮醫學雜誌*, **85**, 125(1926).
- 김명목, 김용환, 이덕순, 조현준: *고려인삼학회지*, **6**, 75(1982).
- 김명목, 박성희, 정동선: *서울여자대학 논문집*, **8**, 337(1979).
- Kim, B.M.: *Korean J. Food Sci. Technol.* **12**, 1 (1980).
- 김명목: *한국식품과학회지*, **17**, 240(1985).
- Pressey, R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 667 (1966).
- Lowry, C.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- Ornstein, L.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 321 (1964).
- Davis, B.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404 (1964).

21. Wher, C.T., Thomas, V.A. and Lori Tallman: Varian instrument at work No. LC-134.
22. Kim, B.M. and Chae, S.K.: *Korean J. Food Sci. Technol.* **14**, 1 (1982).
23. Masuda, H. and Sugawara, S.: *Plant Physiol.* **66**, 93 (1980).
24. 仲宗根 洋子, 永友 浩二郎: 琉球大學 農學部 學術報告, **30**, 241(1983).
25. 仲宗根 洋子, 安井 勝: 琉球大學 農學部 學術報告, **29**, 73(1982).
26. 知念 功, 江川 義和, 外間 宏一, 四方 治五郎: 琉球大學 農學部 學術報告, **24**, 217(1977).
27. Shiomi, N.: *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* **58**, 321 (1977).
28. Kato, T. and Kubota, S.: *Physiol. Plant.* **42**, 67 (1978).
29. Arnold, W.N.: *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 134 (1965).