

마늘(*Allium sativum* L.)로부터 추출한 Inulinase의 부분정제 및 성질

이종수 · 권수진 · 이성훈 · 김나미 · 유진영**

배재대학교 유전공학과, *한국 인삼연초연구원 제품개발부,

**한국식품개발연구원 생물공학연구부

Partial Purification and Properties of Inulinase from Garlic (*Allium sativum* L.)

Jong-Soo Lee⁺, Su-Jin Kwon, Sung-Hun Yi, Na-Mi Kim* and Jin-Young Yoo**

Department of Genetic Engineering, Paichai University, Taejeon 302-735, Korea

*Division of Ginseng Products Development, Korea Ginseng &

Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea

**Food Biotechnology Division, Korea Food Reserch Institute, Seongnam 462-420, Korea

Abstract

An inulinase of garlic(Seosan) was partially purified by ammonium sulfate fractionation and Sephadex G-150 gel filtration chromatography with a recovery of 9.1%. Optimum temperature and pH of the enzyme were 40°C and pH 6.0, respectively, and the enzyme was stable below 70°C and in the pH range of 5.0~8.0. The enzyme was strongly inhibited by metal ions(Al³⁺, Mn²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺) and EDTA, and the K_m value for inulin was 0.22%.

Key words : garlic, *Allium sativum*, inulinase, purification.

서 론

Inulinase(2,1β-D-fructanfructanohydrolase, EC 3. 2. 1. 7)는 inulin의 비환원성 말단에 있는 fructose의 β-2,1 결합을 가수분해하여 fructose를 생성하는 효소로서¹⁾ 여러 가지 미생물²⁻¹⁵⁾과 식물^{17, 18)} 등에 널리 분포하고 있으며 inulin을 이용한 fructose 시럽이나 에탄올 및 의약품 등을 생산하는데 이용되는 효소이다.

Inulinase에 관한 연구는 주로 식량개발 차원에서 유용한 식량자원인 inulin의 생물공학적인 분해에 의한 fructose의 효율적 생산을 목적으로 미생물을 중심으로 다각적인 연구가 진행되어 이들의 효소학적 성질과 생산조건의 최적화 등이 제시되었다. Inulinase는 대부분이 exo형이고¹⁸⁾ *B. subtilis*와 몇 균주 외에는 대부분이 inulin에 의하여 유도되는 당단백질이며¹⁸⁾ 일부 endo형

의 inulinase는 fructooligosaccharide를 생성⁶⁾하는 것으로 알려져 있다.

한편, 마늘(*Allium sativum* L. var. *pekinense*)은 오래전부터 우리 식생활에서 귀중한 신미료로 이용되어 왔으며 근래에 생리 기능성 보조제로의 이용성이 검토되어 왔다¹⁹⁾. 그러나 마늘의 강한 자극성 냄새와 매운 맛에 대한 거부감 등으로 그 수요가 정지되고 있고 과일 생산에 의한 가격 폭락으로 생산 농가에 막대한 지장을 주고 있다.

따라서 필자 등은 마늘의 새로운 용도를 개발하기 위하여 전보²⁰⁾에서 서산 6쪽 마늘로부터 invertase를 추출하고 정제하여 성질을 조사한 결과 분자량은 약 79kDa이었고 40°C, pH 5.0에서 sucrose를 가장 잘 분해시켰으며 sucrose에 대한 K_m값은 15.5mM, pH 4.0~6.0에서 비교적 안정하였음을 보고하였다.

본 연구에서는 서산 6쪽 마늘로부터 inulinase를 추출하여 황산암모늄 침전과 젤 여과 등으로 부분 정제 한 후 몇 가지 성질을 조사하여 시판용 *Aspergillus niger*의 inulinase 성질과 비교하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

마늘은 1996년 6월 수확한 서산 6쪽 마늘을 산지에서 구입하여 4℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Inulinase의 대조효소로서는 *Aspergillus niger*로부터 생산된 시판용 Fructozyme(NOVO사, 미국)을 사용하였고, inulin, albumin, 전기영동 시약 및 Sephadex G-150 등은 Sigma사(St. Louis, 미국) 제품을, 단백질 정량용 시약은 Bio-Rad사(California, 미국) 제품을 사용하였으며 기타 일반시약은 분석용 특급을 사용하였다.

2. 효소의 추출 및 정제

효소의 추출은 전보²⁰⁾에서와 같이 Unger 등²¹⁾의 방법을 변형시켜 추출하였고 이 조효소액을 먼저 황산암모늄으로 20~50%로 침전시킨 후 투석한 다음 한외여과기로 농축시켰다. 이 농축 시료를 Sephadex G-150으로 분당 0.1ml씩 분획 여과한 후 각 분획의 단백질과 효소활성을 측정하고 활성 부위를 모아 부분 정제 효소로 하였다.

3. 효소 활성 및 단백질 측정

Inulinase와 대조효소인 fructozyme의 활성은 50mM 초산 완충용액(pH 5.5)에 녹인 1% inulin 1ml에 효소액 200 μ l를 가하여 40℃에서 30분 반응시킨 후 생성된 환원당 함량을 Somogyi-Nelson법으로 정량하여 측정하였다. 효소단위는 inulin으로부터 분당 1 μ M의 fructose를 생성하는데 요하는 효소의 양으로 표시하였다.

또한 젤 여과 분획의 단백질 함량은 280nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였고 기타 단백질 함량은 Brad-

ford 방법²²⁾에 따라 Bio-Rad Protein Assay 시약을 사용하여 측정하였다.

4. Kinetics 측정

부분정제 효소의 K_m 과 V_{max} 값은 inulin의 농도를 0.1~1.0%까지 달리하여 37℃에서 일정시간 분해시킨 후 반응속도를 측정하고 이를 Lineweaver-Burk plot에 그림으로 표시하여 구하였다.

결과 및 고찰

1. Inulinase의 정제

서산 6쪽 마늘로부터 inulinase를 추출하여 20~50% 황산암모늄 침전과 Sephadex G-150 여과로 정제한 결과 Table 1과 Fig. 1에서와 같이 9.1% 수율로 부분 정제되었고, 10% Native-PAGE에서 5개의 밴드가 보였다. 따라서 순도를 높이기 위해 양이온과 음이온 교환수지 크로마토그래피를 실시한 결과 순도는 다소 높아졌으나 수율이 너무 낮았다(data not shown).

한편, 이 결과는 비슷한 방법으로 정제한 마늘 중의

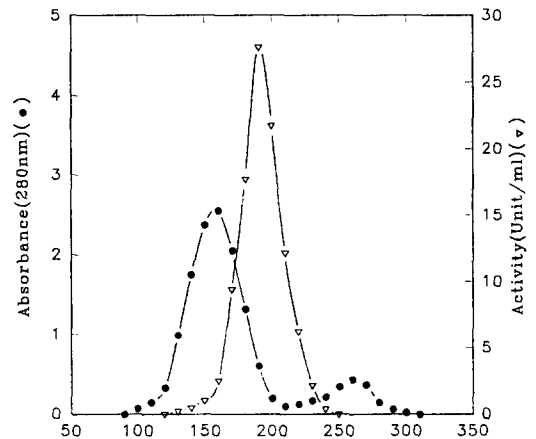


Fig. 1. Profile of gel-filtration of the inulinase on Sephadex G-150. Protein was eluted with 50mM sodium acetate buffer(pH 5.5) at flow rate, 6ml/hr.

Table 1. Summary of the purification of inulinase from garlic

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Activity recovery (%)
Cell-free extract	704	1,759	2.5	100
20~50% $(NH_4)_2SO_4$	44	205	4.7	11.7
Precipitation				
Sephadex G-150 filtration	19	160	8.4	9.1

invertase의 수율(8.3%)과는 유사하였으나²⁰⁾ *Pseudomonas* sp. NO 65의 inulinase I, II의 수율(7.3%, 15.3%)¹¹⁾보다 낮았다.

2. 작용온도와 열 안정성

부분 정제한 서산 마늘 inulinase의 활성에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과 40°C에서 inulin에 가장 잘 작용하였고 60°C에서도 50% 이상의 활성을 보였다. 또한 대조효소인 *Asp. niger* 기원의 fructozyme은 60°C

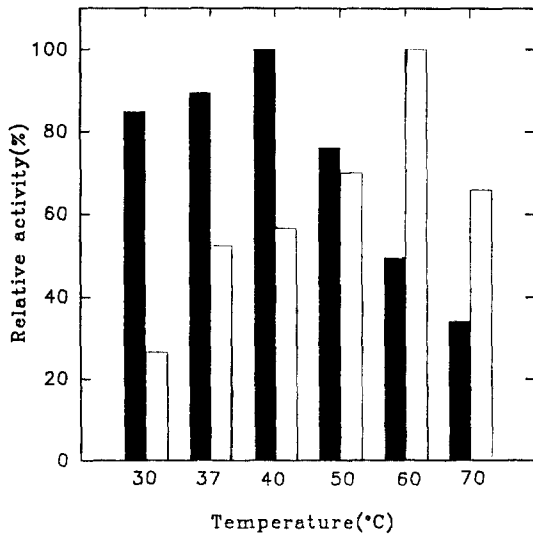


Fig. 2. Optimum temperature of the purified inulinase. ■ : Garlic inulinase □ : Fructozyme

에서 잘 작용하였으며 그 이상의 온도에서도 70% 이상의 활성을 보였다(Fig. 2).

이와 같은 마늘 inulinase의 inulin에 대한 작용 최적 온도는 지금까지 보고된 미생물의 inulinase^{5,6,13,15)}와 비슷하거나 다소 낮은 온도였으나, 60°C에서도 50% 이상의 활성을 보였으므로 오염방지나 inulin 용해도 등이 관여되는 공업적 이용시 큰 문제가 없을 것으로 생각된다.

한편, 열안정성은 *Asp. niger*의 fructozyme보다 오히려 마늘 inulinase가 더 안정하여 70°C에서 20분 처리시 약 80% 이상의 높은 잔존 활성을 보였다(Fig. 3). 이러한 열 안정성은 간단한 열처리로 생마늘의 매운 맛을 순화시키는 재래 가공법에서도 이 효소가 안정할 것으로 생각되고 기타 마늘 가공제품 개발시 매우 중요한 자료로 활용될 것으로 생각된다.

3. 작용 pH와 pH 안정성

효소활성에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과 Fig. 4와 같이 작용최적 pH는 6.0으로 *Arthrobacter* 속균¹⁶⁾과 *Bacillus* 속균¹³⁾의 inulinase와 같았으나 *Asp. niger*의 fructozyme(pH 4.0)과 곰팡이^{3, 6)} 및 효모^{5, 15)}의 inulinase의 최적 pH(5.0)보다는 높았다.

한편, 마늘 inulinase는 pH 5.0에서 8.0까지 안정하였으나 *Asp. niger*에서 생산된 fructozyme은 pH 3.0에서 5.0까지 안정하여 마늘의 inulinase보다 미생물 기원의 inulinase가 내산성이 더 강한 것으로 추정된다.

4. 금속이온의 영향

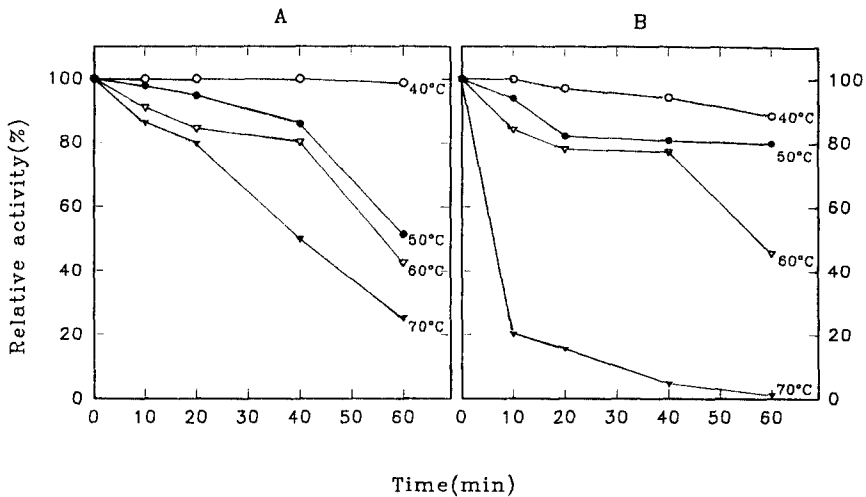


Fig. 3. Thermal stability of the partial purified inulinase. A : Garlic inulinase B : Fructozyme

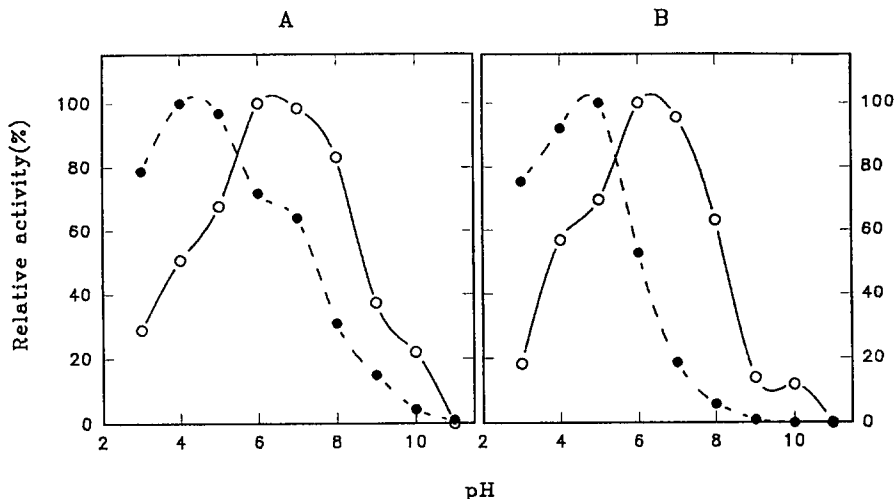


Fig. 4. Optimum pH(A) and pH stability(B) of the partial purified inulinase. ○ : Garlic inulinase ● Fructozyme

Table 2. Effect of metal ions on the activity of partial purified inulinase from garlic

Reagent	Concentration (mM)	Inulinase	Fructozyme*
Control	—	100	100
NaCl	25	65	84
KCl	25	66	99
LiCl	1	25	120
MnCl ₂	1	0	125
FeSO ₄	1	34	137
MgSO ₄	1	70	115
CuSO ₄	1	54	71
CdCl ₂	1	3	108
HgCl ₂	1	0	5
CaCl ₂	1	72	134
Al ₂ (SO ₄) ₃	1	0	145
EDTA	1	75	106
	10	0	79
Sodium thiosulfate	1	161	138

*Enzyme was obtained from *Aspergillus niger*.

효소활성에 미치는 금속이온과 EDTA의 영향을 조사한 결과 Table 2와 같이 부분 정제된 마늘 inulinase는 sodium thiosulfate에 의하여 활성이 촉진되었으나 대부분의 금속이온에 의해서 실활되었고, 특히 1mM의 Al³⁺, Mn²⁺와 Cd²⁺, Hg²⁺ 그리고 10mM EDTA에 의해서 심하게 저해되었다.

5. K_m 값

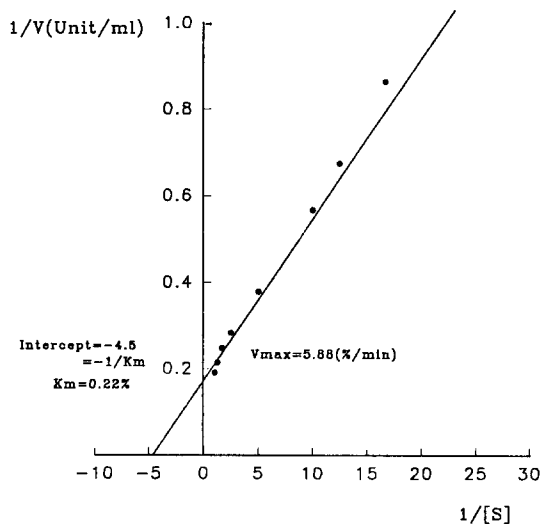


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for inulin of the partial purified inulinase from garlic.

부분 정제된 마늘 inulinase의 inulin에 대한 K_m값은 0.22%이었다(Fig. 5). 이는 inulin의 분자량을 5,400으로 추정된 *Pseudomonas* 속균의 2~5mM(1.1~2.7%)¹¹⁾보다 낮은 농도로서 inulin에 대한 친화력이 비교적 강하였다.

요 약

서산 6쪽 마늘 중의 inulinase를 추출하여 황산암모늄 침전과 Sephadex G-150여과 등을 통하여 9.1%의 수율로 부분정제하였다. 부분 정제된 inulinase는 40℃와 pH 6.0에서 inulin을 가장 잘 분해시켰고 70℃ 이하와 pH 5.0~8.0에서 안정하였다. 또한 이 효소는 Al^{3+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} 및 EDTA에 의하여 심하게 실패되었고 inulin에 대한 K_m 값은 0.22%이었다.

참고문헌

- Edelman, J. and Jefford, T. G. : The metabolism of fructose polymer in plant. 4. β -Fructosidase of tubers of *Helianthus tuberosus*, *Biochem. J.*, **93**, 148-161 (1964).
- Snyder, H. E. and Phaff, H. J. : Studies on a beta-fructosidase produced by *Sacch. fragilis* : Antonie Van Laeuwenhook, *J. Microbial. Serol.*, **26**, 433-452(1960).
- Nakamura, T., Maruki, S., Nakatsu, S. and Ueda, S. : Culture conditions for inulinase production by *Aspergillus*, *J. Agr. Chem Soc.*, **52**, 581-587(1978).
- Diana, L. V. Celia, E. C. and Fanstino, S. : Characteristics of an inulase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the Rhizosphere of vernonia herbacea. *Appl. Envir. Microbiol.*, **57**, 2392-2394 (1991).
- Guiraud, J. P. Gaudin, C. V. and Galzy, P. : Etude de l'inulinase de *Candida salmencensis* Van Uden et Buckley, *Agr. Biol. Chem.*, **44**, 1245-1252(1980)
- Nakamura, T. and Nakatsu, S. : General properties of extracellular inulase from *Penicillium*, *Nippon Nog-eikagaku Kaishi.*, **51**, 681.(1977).
- Rouwenhorst, R. J., Ritmeester, W. S., Schefers, W. A. and Dijken, J. P. : Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces maxianus* CBS 6556, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(11), 3337-3345(1990).
- Shuichi, O. and Shiomi, N. : Purification and substrate specificity of endo-type inulinase from *Penicillium purpurogenum*, *Agric. Biol. Chem.*, **52**(10) : 2569-2576(1988).
- Vandamme, E. J. and Derycke, D. G. : Microbial inulinase : fermentation process, properties and application, *Adv. Appl. Microbiol.*, **29**, 139-176(1983).
- 이태경, 성하진, 최용진, 양한철 : Inulinase 생산에 관한 연구, *한국산업미생물학회지*, **15**, 176-183(1987).
- 이태경, 최용진, 양한철 : *Pseudomonas* sp.가 생산하는 Inulinase에 관한 연구, *한국산업미생물학회지*, **16**, 259-264(1988).
- Moussa, E. and Baratti, J. C. : Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficcum* inulinase, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 61-68(1990).
- Uhm, T. B., Hong, J. S., Shon, H. S. Park, M. K. and Byun, S. M. : A constitute inulinase from a *Bacillus*, *J. Korean Agr. Chem. Soc.*, **28**, 131-136(1985).
- Ha, Y. J., Choi, O. H. and Kim, S. I. : Production of endo-inulinase from *Streptomyces* sp. S56, *Korean J. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 593(1989).
- Nahm, B. H. and Byun, S. M. : Purification and characterization of inulase from *Kluyveromyces fragilis*, *Korean Biochem. J.*, **10**, 95(1977).
- Uchiyama, T. : Action of *Arthrobacter ureafaciens* inulase II on several oligofructans and bacterial levans, *Biochim. Biophys. Acta.*, **397**, 153(1975).
- Edelman, J. and Dikenson, A., : The metabolism of fructose polymers in plants, *Biochem. J.*, **98**, 787-794 (1966).
- Guy, C., Laere, A. and Proft, M., : Purification and proterties of inulinase from chicory root, *J. Plant Physiol.*, **136**, 35-39(1990).
- 이춘영, 김우정 : 천연 향신료와 식용색소, 향문사, 서울 p. 25(1987).
- 이종수, 권수진, 이성훈, 유진영 : 마늘로부터 추출한 β -Fructofuranosidase의 정제 및 성질, *한국생물공학회지* (인쇄 중)(1997).
- Unger, C. Hofsteenge, J. and Sturm, A., : Purification and characterization of a soluble β -fructofuranosidase from *Daucus carota*. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 915-921(1992).
- Bradford, M. M., : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein dye-binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254(1976).

(1997년 7월 21일 접수)