

마늘(*Allium sativum* L.)로부터 추출한 β -Fructofuranosidase의 정제 및 성질

† 이 증 수 · 권 수 진 · 이 성 훈 · 유 진 영

배재대학교 유전공학과, ¹한국 식품개발연구원 생물공학연구부
(접수 : 1997. 4. 18, 게재승인 : 1997. 11. 14)

Purification and Properties of β -Fructofuranosidase from Garlic(*Allium sativum* L.)

Jong-Soo Lee[†], Su-Jin Kwon, Sung-Hun Yi, and Jin-Young Yoo¹

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

¹Food Biotechnology Division, Korea Food Research Institute, Seongnam 462-420, Korea

(Received : 1997. 4. 18, Accepted : 1997. 11. 14)

A β -fructofuranosidase of garlic (*Allium sativum* L.; Seosan) was purified by ammonium sulfate fractionation and gel filtration chromatography with a recovery of 8.3%. The molecular mass of the purified enzyme was estimated to be 79kDa by SDS-PAGE, which revealed two subunits of 41kDa and 38kDa. Maximum enzyme activity was observed at pH 5.0 and 40°C and the enzyme was stable over the pH range of 4.0-6.0 and below 50°C. The Km value for sucrose was 15.5mM and the enzyme activity was significantly inhibited by bivalent metal ions(Hg²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺) and EDTA.

Key Words : purification, β -fructofuranosidase, garlic(*Allium sativum* L.)

서 론

서부 아시아 또는 중앙 아시아가 원산인 마늘(*Allium sativum* L.)은 우리 식생활에서는 없어서는 안 될 귀중한 신미료(辛味料)로 오래 전부터 이용되어 왔으며 고대 유럽에서는 강장제로, 중국에서는 진정제로 사용되어 왔고 살균제, 구충제와 정장제로 사용되기도 하였으며 그 밖에도 티푸스, 동맥경화증과 고혈압 등을 예방할 수 있는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(1,2).

마늘에는 약 1%의 휘발성 정유(揮發性 精油)가 함유되어 있고 그 중 60%가 diallyl sulfide이며 나머지가 allicin 등 황함유 화합물이다. 마늘의 강한 자극성 냄새의 주성분은 alliin이며 이 alliin이 세포가 파괴 되면서 allinase에 의하여 분해되어 매운맛이 강한 allicin으로 변한다(3). 이러한 매운맛에 대한 거부감과 특유의 냄새 등으로 그 수요가 증가하지 않고 있고, 매년 과일 공급에 따른 가격 폭락 등으로 생산 농가에 큰 타격을 주고 있으므로 이의 새로운 용도 개발이 절실히 요구된다.

한편, β -fructofuranosidase(β -D-fructofuranoside fructohydrolase, EC 3.2.1.26; invertase, 이하 invertase라 함)는 sucrose의 β -D-fructofuranoside 결합을 가수분해하여 fructose와 glucose

를 생성하고 raffinose를 분해하여 fructose와 melibiose를 생성할 뿐만 아니라(4) fructose 전이 반응을 촉매하여 fructose올리고당을 생성하는 것으로 알려졌으며(5) 감미료와 올리고당 생산 공업 등에 유용하게 이용되고 있다.

일반적으로 식물 조직 중의 invertase는 여러 가지 isoform으로 분포하고 있는데 먼저 보리 잎에는 3종류의 invertase가 존재하며 invertase I은 64kDa의 monomer 단백질이고 IIa와 IIb는 각각 116kDa과 155kDa의 multimer 단백질이며 이들의 sucrose에 대한 Km 값은 I보다 IIa와 IIb가 훨씬 작고 고농도 sucrose 용액에서는 sucrose-sucrose fructosyltransferase로 작용한다고 알려져 있다(6). 또한 당근의 뿌리와 줄기에는 3종류의 invertase가 세포벽과 세포내에 존재하고(7) 포도 Muscat Bailey A에도 72kDa의 분자량을 가진 invertase가 분포하고 있으며(8), 감자(9)와 한국 인삼(10)등에도 invertase가 분포하고 있고 이들의 몇 가지 성질이 보고 되어있다. 그러나 마늘중에 분포하고 있는 invertase의 정제 및 특성에 관한 연구는 아직까지 이루어지지 않았다.

한편, 미생물에서는 주로 효모 invertase가 많이 연구되어 이들의 특성이 밝혀졌다(11~16). 즉 *Saccharomyces* 속군에서는 2가지 형태의 invertase, 즉 270kDa의 mannoprotein 형태의 세포외 효소와 135kDa의 glycan 형태의 세포내 효소가 존재하며(16) 작용최적 온도는 50°C이고 산성 invertase인 것으로 알려져 있다. 한편 필자 등은 호일칼리성이며 고온성인 *Bacillus* sp. TA-11을 이용하여 invertase 생산 최적조건을 검토하여 보고

† Corresponding Author : Department of Genetic Engineering, Paichai University, Taejeon 302-735, Korea.
Tel : 042-520-5388, Fax : 042-520-5388,
E-mail : biotech8@woonam.paichai.ac.kr

(17)하였고, 이 효소를 정제한 결과 분자량은 23kDa이고 pH 6.5와 40°C에서 잘 작용하였으며 sucrose에 대한 Km 값이 216.5mM이었음을 보고(18)한 바 있다.

본 연구에서는 매년 과잉생산으로 문제가 되고있는 마늘로부터 유용 효소자원을 개발하여 식품산업에 응용하고자 마늘 중의 각종 효소활성을 측정하여 invertase와 inulinase의 활성이 비교적 높았으므로 우선 fructose 시럽과 fructo 올리고당을 생성하는 효소로 응용성이 큰 invertase를 황산암모늄 침전과 겔여과 등으로 정제한 후 몇가지 성질을 조사하였다.

재료 및 실험방법

재료

마늘은 1996년 6월에 수확한 한지형 서산 6쪽 품종을 산지에서 구입하여 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Sephadex G-150과 분자량 측정을 위한 표준단백질 marker 및 전기영동 시약 등은 Sigma 사(St. Louis, 미국) 제품을 사용하였고 dinitrosalicylic acid와 sucrose 등은 일본의 Wako사 제품을, ammonium persulfate와 coomassie brilliant blue R-250 및 단백질 정량시약 등은 Bio-Rad사(California, 미국) 제품을 사용하였으며 그밖의 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

효소의 추출 및 정제

Unger 등(7)의 방법을 변형하여 다음과 같이 효소를 추출, 정제하였다. 즉, 마늘 200g을 추출 완충용액(10mM lysine, 1mM EDTA, 0.5% 2-mercaptoethanol, 1mM phenylmethylsulfonate를 함유한 20mM 초산 완충용액, pH 5.0) 60mL에 넣고 blender로 파쇄시킨 후 거르기로 여과한 다음 12,000rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 상등액에 황산 암모늄을 20%에서 50%까지 포화시켜 4°C에서 6시간 방치한 후 침전된 효소 단백질을 15,000rpm으로 10분간 원심분리하여 회수한 후 1주야 투석시킨 다음 한외 여과기로 농축시켰다. 농축 시료를 Sephadex G-150으로 시간당 6mL씩 여과하여 분획한 다음 각각의 단백질 함량과 invertase 활성을 측정하고 활성부위를 모아서 농축시켜 정제 효소로 하였다.

효소활성 및 단백질 함량 측정

Invertase 활성은 먼저 50mM 초산 완충용액(pH 5.5)에 녹인 0.1M sucrose 용액 1mL에 효소액 200 μ l를 가하여 40°C에서 2시간 반응시킨 후 생성된 환원당 함량을 Dinitrosalicylic acid법(19)으로 정량하여 측정하였다. 효소단위는 분당 1mM의 sucrose를 분해시키는데 필요한 효소의 양으로 표시하였다.

또한 정제중 각 분획의 단백질 함량은 280nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였고 기타 단백질 함량은 Bradford 방법(20)에 따라 Bio-Rad Protein Assay 시약을 사용하여 측정하였다.

순도 및 분자량 측정

정제효소의 순도는 10% non-denaturing gel로 전기영동을 하여 검정하였고 분자량과 subunit은 Lamml의 방법(21, 22)에 따라 25mM Tris-glycine 완충용액(pH 8.3)을 사용하여 10% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동하여 측정하였다. 이때 표준단백질 marker로는 myosin(205kDa), β -galactosidase(117kDa),

albumin(82kDa), ovalbumin (49kDa), carbonic anhydrase(29kDa), trypsin inhibitor(22kDa), lactoalbumin (19kDa)을 사용하였다.

Kinetics 측정

정제효소의 Km과 Vmax 값은 sucrose의 농도를 0.05M에서 2.0M까지 일정 농도로 조정하여 정제효소로 분해시킨 후 반응속도를 측정하고 이를 Lineweaver-Burk plot에 도시하여 구하였다.

결과 및 고찰

Invertase의 정제

“서산” 마늘의 invertase를 추출하여 황산암모늄으로 침전시킨 후 Sephadex G-150으로 여과하여 정제한 결과 Figure 1과 Table 1에서와 같이 정제 효소의 비활성은 36.8U/mg으로 조효소액 보다 약 5배 높았고 수율은 8.3%이었다.

이 결과를 보리 잎중의 invertase I, IIA와 IIB의 정제도(360배, 780배, 137배)와 수율(0.1%, 0.6%, 1.2%)(6)과 비교하여 볼 때 정제도는 매우 낮았으나 수율은 높았고 포도 invertase의 정제도(20배)와 수율(19.5%)(8)보다는 낮았다. 또한 미생물 기원의 invertase 보다 비활성은 낮았으나 수율은 비슷하거나 높았다(11, 15, 18).

Table 1. Summary of the purification of invertase from garlic.

| Purification step | Total protein (mg) | Total activity (Unit) | Specific activity (Unit/mg) | Activity recovery (%) |
|---|--------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Cell-free extract | 704 | 5787 | 8.2 | 100 |
| 20% 50% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation | 87 | 1767 | 20.3 | 30.5 |
| Sephadex G-150 gel-filtration | 13 | 479 | 36.8 | 8.3 |

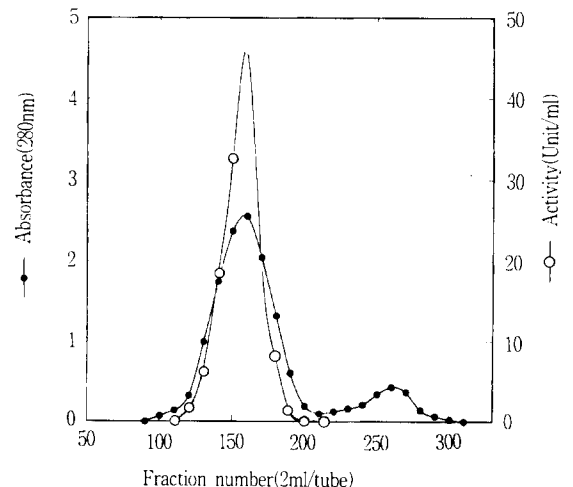


Figure 1. Profile of gel-filtration of the invertase on Sephadex G-150. Protein was eluted with 50mM sodium acetate buffer(pH 5.5) at flow rate, 6ml/hr.

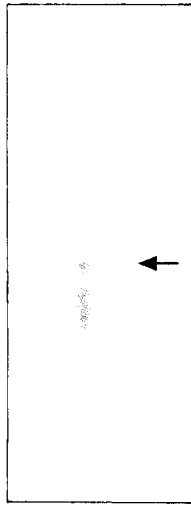


Figure 2. Native polyacrylamide gel electrophoresis of purified invertase. Electrophoresis was performed on 12% polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

한편, 정제효소의 순도를 검정하기 위하여 전기영동한 결과 Figure 2와 같이 단일 밴드를 보여 이온교환 수지 크로마토그래피 등의 후속 정제과정 없이도 비교적 고순도로 정제되었음을 확인할 수 있었다.

분자량

정제된 invertase의 분자량은 SDS-PAGE로부터 79kDa 이었고 고 분자량이 41kDa과 38kDa인 두 개의 subunit으로 구성되어

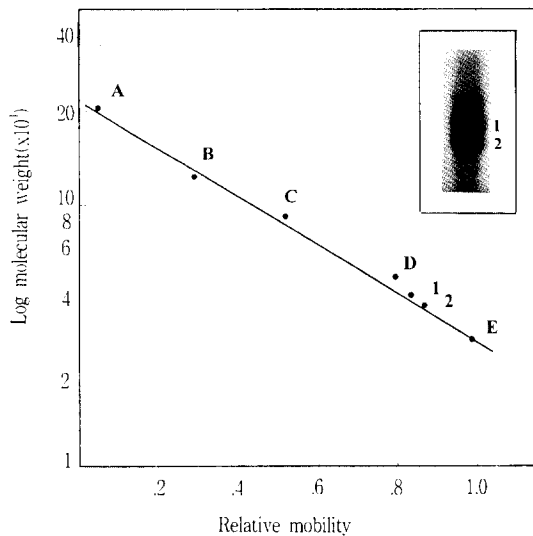


Figure 3. Determination of molecular mass of invertase by SDS-PAGE.

- A : Myosin(205kDa), B : β -Galactosidase(117kDa),
- C : Albumin(82kDa), D : Ovalbumin(49kDa),
- E : Carbonic anhydrase(29kDa),
- 1 : Subunit, 41kDa, 2 : Subunit, 38kDa
- : SDS-PAGE pattern

있었다(Fig. 3).

이는 당근 invertase(68kDa)(7), 보리 invertase(64kDa, 116kDa, 155kDa)(6), Saccharomyces spp. 의 invertase(180kDa, 270(kDa) (15)와 Asp. niger의 invertase(340kDa)(23) 보다 분자량이 작았으나 포도 invertase의 분자량 (72kDa)(8)과는 비슷하였고 Zy-momonas mobilis의 invertase(58kDa)(24), Streptococcus mutans의 invertase(48kDa)(25)와 Arthrobacter sp. K-1의 invertase (52kDa)(26)보다는 다소 컸다.

작용온도와 열 안정성

정제효소를 30℃에서 70℃까지 일정온도에서 30분씩 sucrose와 반응을 시켜 상대 활성을 측정된 결과 작용 최적 온도는 40℃이었고 30℃에서는 약 70%이상의 활성을 보였으나 60℃이상에서는 거의 작용하지 못하였다(Figure 4). 이 결과는 포도 invertase

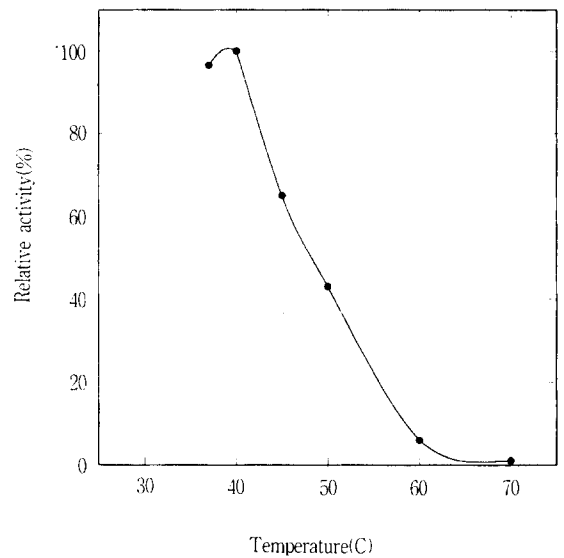


Figure 4. Effect of temperature on the activity of invertase.

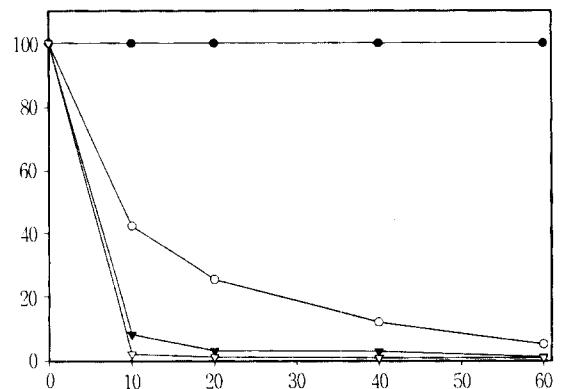


Figure 5. Thermal stability of purified invertase from garlic. Enzyme stability was investigated with assay of invertase activity after staining for 10-60min at each temperature without substrate.

- : 40℃, ○ : 50℃, ▼ : 60℃, ▽ : 70℃,

의 작용최적 온도인 80℃(8)와 효모 invertase 의 작용 최적온도 50℃(11) 보다 낮은 온도이었지만, *Bacillus* sp. TA-11(18)의 invertase 작용 최적 온도(40℃)와는 같은 결과이었다. 또한 정제효소를 각 온도에서 10~60분간 처리한 후 기질과 반응시켜 잔존 활성을 측정된 결과 Figure 5와 같이 50℃에서 10분 처리 시 약 60% 이상이 실패되어 효모(4)와 포도(8) 및 보리(6) invertase 보다 비교적 열에 불안정하였다.

작용 pH와 pH 안정성

효소활성에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과 작용최적 pH는 5.0 이었고 pH 4.0과 5.5에서 90% 이상의 활성을 보였으나 pH 7.0 이상에서는 거의 활성을 보이지 않았다(Fig. 6).

이는 보리 잎(6)이나 당근(7) 등에 분포 되어있는 invertase의 작용최적 pH 5.0과 같았지만 포도 invertase(6)의 작용최적 pH 인 3.5보다는 높은 pH 이었고 *Bacillus* sp. TA-11의 invertase 의 작용최적 pH 6.5보다는 낮았다.

그러나 정제 효소를 각각의 완충용액에 첨가하여 37℃에서 30 분간 반응시켜 pH 안정성을 조사한 결과 포도 invertase(8)와 유사하게 pH 4.0에서 6.0까지 안정하였고 pH 3.0 에서도 40% 이상의 활성을 보여 산성영역에 비교적 안정하였다. Invertase에 는 산성 영역에서 작용 최적 pH를 갖는 산성 invertase 와 알칼리 영역에서 작용 최적 pH를 갖는 알칼리성 invertase가 있는데 (16) 거의 대부분의 invertase가 산성 invertase(6, 8, 9, 10, 18, 24, 25)이지만 발아대두로부터 추출된 invertase의 작용 최적 pH는 8.0-9.0로 알칼리성 invertase(27)로 알려져 있다.

금속이온의 영향

효소활성에 미치는 각종 금속이온과 EDTA의 영향을 조사한 결과 Table 2와 같이 Mn^{2+} , Fe^{2+} 와 Mg^{2+} 등에 의하여 효소활성이 일부 촉진되었으나 보리 잎 중의 invertase I, IIA와 IIB(6)와 같이 Hg^{2+} 와 Cu^{2+} 및 Cd^{2+} 등에 의해서 심하게 저해되었고 metal-complexing 시약인 EDTA 의 경우, 1mM 에서는 비교

적 안정하였으나 10mM 에서는 심하게 저해되었다.

한편, *Bacillus* sp. TA-11(18)와 *Arthrobacter* sp. K-1(26)의 invertase도 1mM의 Hg^{2+} 와 Cu^{2+} 에 의하여 심하게 저해 받는 것으로 보고되어있다.

Kinetics

마늘 invertase의 sucrose 에 대한 K_m 과 V_{max} 값을 측정된 결과 Figure 7 과 같이 각각 15.5mM과 $0.813 \mu M/min$ 으로 나타났다. 마늘로부터 정제한 invertase의 K_m 값이 보리 잎중의

Table 2. Effect of metal ions and chemicals on the activity of purified invertase from garlic.

| Reagent* | Concentration(mM) | Relative activity(%) |
|--------------------|-------------------|----------------------|
| Na ⁺ | 25 | 91 |
| K ⁺ | 25 | 98 |
| Li ⁺ | 1 | 96 |
| Mn ²⁺ | 1 | 138 |
| Ca ²⁺ | 1 | 105 |
| Fe ²⁺ | 1 | 116 |
| Mg ²⁺ | 1 | 114 |
| Cu ²⁺ | 1 | 13 |
| Cd ²⁺ | 1 | 40 |
| Hg ²⁺ | 1 | 9 |
| Al ³⁺ | 1 | 93 |
| EDTA | 1 | 97 |
| | 10 | 26 |
| Sodium thiosulfate | 1 | 89 |
| Control | - | 100 |

* All of the cations were added except that Al^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} and Cu^{2+} were added as sulfate. The enzyme solution 1 to 25 mM cations were preincubated at 40℃ for 30min and then the residual enzyme activity was measured.

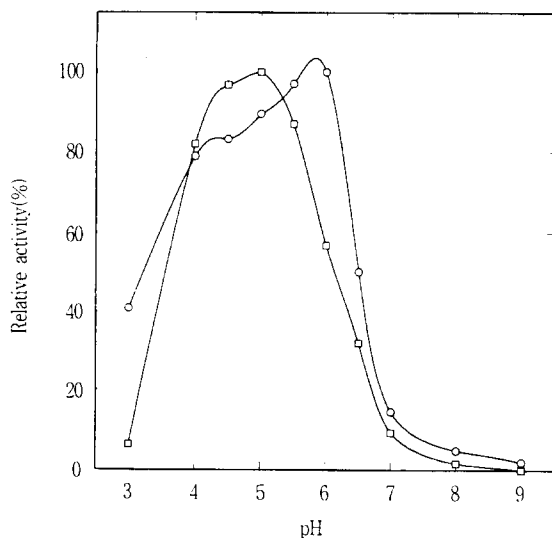


Figure 6. Effect of pH on the activity of invertase. Sodium acetate buffer : pH3-5, Sodium phosphate buffer : pH 5-9
○ : Optimum pH, ◻ : pH stability.

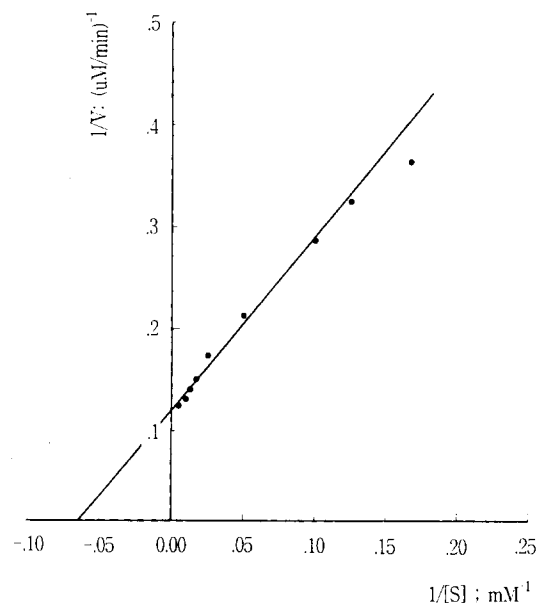


Figure 7. Lineweaver-Burk plot for invertase with sucrose as a substrate

invertase I, IIA와 IIB의 sucrose에 대한 Km 값이 각각 8.1mM, 1.0mM, 1.7mM(6)과 당근 invertase의 sucrose에 대한 Km 값 7.5mM(7), 포도 invertase의 sucrose에 대한 Km 값인 4.4mM(8) 보다는 큰 것으로 보아, 이들에 비해서 sucrose에 대한 친화성은 다소 떨어지는 것으로 추정되지만 미생물 기원의 invertase(18, 26)보다는 Km 값이 작았다.

요 약

주로 향신료로 이용되고 있는 마늘로부터 유용효소 자원을 개발하여 식품산업에 응용하고자 한지형 서산 6쪽 마늘의 invertase를 추출하여 황산암모늄 침전과 Sephadex G-150 여과로 정제한 후 몇 가지 성질을 조사하였다. 정제효소의 분자량은 SDS-PAGE로 79kDa이었고 41kDa과 38kDa의 subunit으로 구성되어 있는 dimer 단백질이었다. 효소 작용 최적 온도와 pH는 각각 40°C와 pH 5.0이었고 50°C이하와 pH 4.0-6.0에서 안정하였다. Sucrose에 대한 Km 값은 15.5mM 이었고 Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 와 EDTA에 의하여 심하게 실행되었다.

참 고 문 헌

- Block, E. (1985), The Chemistry of Garlic and Onions. pp. 94~96, Scientific America(March).
- 조재선 (1981), 식품재료학, p. 230, 기전연구소.
- 이춘영, 김우정 (1987), 천연향신료와 식용색소, pp. 25~27, 향문사.
- Myrback, K. (1960), The Enzyme (P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback eds.) Vol. 4, pp. 379~395. Academic Press. Inc., New York.
- Straathof A. and H. Bekkum (1986), Invertase Catalyzed Fructosyl Transfer In Concentrated Solutions of Sucrose, *Carbohydr. Res.*, **146**, 154~159.
- Oberland, D. M., U. Simmen, T. Boller, and A. Wiemken (1993), Purification and Characterization of Three Soluble Invertases from Barley(*Hordeum vulgare* L.) Leaves., *Plant physiol.*, **101**, 1331~1339.
- Unger, C., J. Hofsteenge, and A. Sturm (1992), Purification and Characterization of a Soluble β -Fructofuranosidase from *Daucus carota*, *Eur. J. Biochem.*, **204**, 915~921.
- Portaveewat, W., T. Takayanagi, and K. Yokotsuka (1994), Purification and Properties of Invertase from Muscat Bailey a Grapes, *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 288~292.
- Preseey R. (1966), Separation and Properties of Potato Invertase and Invertase Inhibitor, *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**, 667~674.
- Kim, B. M. (1980), Studies on Invertase from Korean Ginseng, *Korean. J. Food Sci. Technol.*, **12**, 1~5.
- Neumann, N. and J. O. Lampen (1967), Purification and Properties of Yeast Invertase, *Biochem.*, **6**, 468~475.
- Kidby, D. K. and R. Davies (1970), Inverase and Disulphide Bridge in the Yeast Wall, *J. General Microbiol.*, **61**, 327~333.
- Ottolenghi, P. (1971), A Comparison of Five Genetically Distinct Invertase from *Saccharomyces*, *Eur. J. Biochem.*, **18**, 554~552.
- Arnold, W. N. (1972), Location of Acid Phosphatase and β -Fructofuranosidase within Yeast Cell Envelopes, *J. Bacteriol.*, **112**, 1346~1352.
- Babczinski, P. (1980), Partial Purification, Characterization and Localization of the Membrane-Associated Invertase of Yeast, *Biochim. Biophys. Acta.*, **614**, 121~133.
- Abrams, B. B., R. Hekel, T. Mizunaga and J. O. Lampen (1994), Relationship of Large and Small Invertase in *Saccharomyces*; mutant selectively deficient in small invertase, *J. Bacteriol.*, **135**, 809~817.
- 최영준, 이종수 (1995), Production of β -Fructofuranosidase from Alkalophilic, Thermophilic *Bacillus* sp. TA-11, *한국산업미생물학회지*, **23**, 197~202.
- Kwon, S. J., S. H. Yi, B. H. Lee and J. S. Lee (1997), Purification and Characterization of β -Fructofuranosidase from Alkalophilic and Thermophilic *Bacillus* sp. TA-11, *Biotech Letters(in press)*.
- Miller, G. L. (1959), Uses of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.*, **31**, 426~428.
- Bradford, M. M. (1976), A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248~254.
- Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680~685.
- Choi, Y. J. (1996), Biochemical and Molecular Biological Aspects of β -Galactosidase from Alkalophilic and Thermophilic *Bacillus* sp. TA-11. MS Thesis, Dept. of Genetic Engineering, Paichai Univ., Taejeon, Korea.
- Hirayama, M., N. Sumi and H. Hidaka (1989), Purification and Properties of a Fructooligosaccharides-Producing β -Fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 667~673.
- Yanase, H., H. Fukushi, N. Ueda, Y. Maeda, A. Toyoda, and K. Tonomura (1991), Cloning, Sequencing and Characterization of the Intracellular Invertase Gene from *Zymomonas mobilis*, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1383~1390.
- Tanzer, J. M., A. T. Brown, and M. F. McInerney (1973), Identification, Preliminary Characterization, and Evidence for Regulation of Invertase in *Streptococcus mutans*, *J. Bacteriol.*, **116**, 192~202.
- Fujita, K., K. Hara, H. Hashimoto, and S. Kitahata (1990), Purification and Some Properties of β -Fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 913~919.
- Chen, J. Q. and C. C. Black (1992), Biochemical and Immunological Properties of Alkaine Invertase from Spouting Hypocotyls, *Arch. Biochem. Biophys.*, **295**, pp. 61~69.