

## 건시제조 중 Invertase의 정제 및 그 특성

이범우 · 문광덕 · 손태화  
경북대학교 식품공학과  
(1990년 1월 17일 접수)

### Purification and Characterization of Invertase in Astringent Persimmon during Sun Drying

Byung Ou Lee, Kwang Deog Moon and Tae Hwa Shon  
Department of Food Engineering, Kyungpook National University  
(Received January 17, 1990)

#### Abstract

This study was conducted to determine invertase activity in persimmon during the drying process and characterize the purified enzyme.

As drying proceeded, invertase activity increased until 10 days and decreased gradually afterwards. Invertase in persimmon fruit was extracted with 250 mM potassium phosphate sulfate buffer at pH 7.4. The enzyme was purified by means of ammonium sulfate fractionation, column chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration on Sephadex G-200 column. The optimal temperature of enzyme was 40°C and optimal pH was 5.0 and 6.0 for sucrose and raffinose, respectively. The enzyme was stable up to 50°C and pH 3-6. The Km value of the enzyme, with sucrose as a substrate, was 2.5mM. Electrophoretic pattern of purified enzyme solution showed a single band.

#### I. 서 론

감(*Diospyros Kaki* Thunberg)은 수확시 단감을 제외한 대부분은 그 조직내에 삼미를 나타내는 tannin 물질이 함유되어 있을 뿐만 아니라 일시에 다량으로 출하되기 때문에 수확 후 일수가 경과하면 중산작용으로 인한 품질의 저하가 일어남과 아울러 속도가 진전되어 장기저장이 어려운 과실의 하나이다.<sup>1)</sup> 그러므로 말삼을 하여 생과로 이용하거나 연시 혹은 건시로 제조되어 이용되고 있다. 그 중 특히 건시는 우리의 전통적인 식품으로 장기보존이 가능한 식품이다.

감과실의 주요 구성당은 glucose, fructose 및 sucrose로 되어 있으며 건시제조 중 당대사에 invertase(E. C. 3.2.1.26) 효소가 크게 관여하고 있다.<sup>2,4)</sup> 여러 식물에서 invertase의 작용과 성질에 대한 많은 보고가 있으며<sup>5-10)</sup> 그 중 과실이 성숙하는 동안에 invertase의 활성과 당대사에 관해서 많은 보고가 있다.<sup>11-16)</sup> 일반적으로 과실이 성숙하는 동안에 세포벽에 있는 invertase의 활성이

증가한다. 이는 조직내에서 급속한 세포성장과 팽창으로 인해 나타나며 hexose 농도와도 관련이 있다.<sup>17)</sup>

한편, 감과실의 건시제조에 관한 연구는 平井,<sup>2)</sup> 石井<sup>3)</sup> 등이 천일건조 중 수용성 tannin, 당의 변화에 관해서 보고한 바 있으나 이들 당의 변화와 관련된 invertase에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 건시제조 중 당대사와 관련이 있는 invertase의 활성변화와 정제된 invertase의 효소학적 성질을 조사하였다.

#### II. 재료 및 방법

##### 1. 실험재료

본 실험에 사용한 감은 경북대학교 농과대학 부속농장 과원에서 재배된 平核無를 수확하여 외관이 건전한 중과를 실험재료로 사용하였다.

##### 2. 실험방법

###### 1) 건조방법

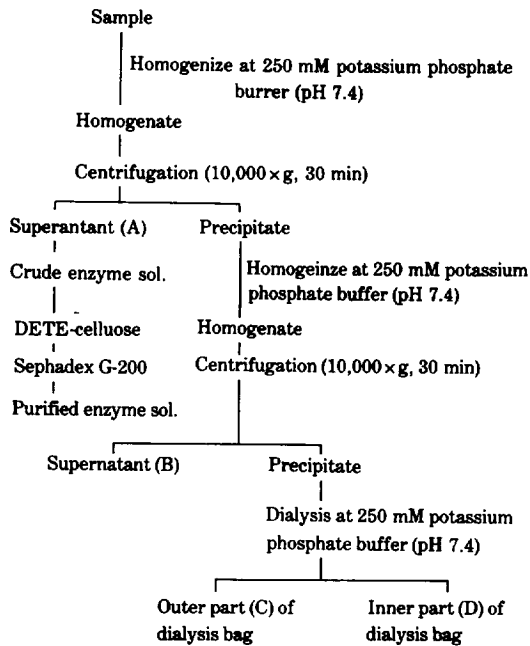


Fig. 1. Preparation of crude enzyme (A) and fraction (B), (C) and (D).

수확한 감을 1야 방치하였다가 박피하고 통풍이 잘 되고 빛이 잘드는 건조 상자에서 천일 건조를 행하였다.

## 2) 조효소의 조제

Nakagawa,<sup>18)</sup> Takehara<sup>19)</sup> 등의 방법에 준하여 Fig.1과 같이 하였다. 즉, 시료 일정량을 250 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)로 마쇄, 각반하였다. 이것을 10,000×g에서 30분간 원심분리한 후 여액(A)을 얻고 침전부는 다시 같은 방법으로 재추출하여 여액(B)을 얻었다. 다시 이 침전부를 완충액에 1야 투석시키고 잔사를 분리하였다. 이 때 여액(A)를 조효소액으로 하였다.

## 3) 효소활성의 측정

Melius의 방법<sup>20)</sup>에 준하여 다음과 같이 하였다. 즉, 기질 300 μM sucrose 1 ml와 0.05 M acetate buffer(pH 4.8) 1 ml 및 효소액 0.1 ml를 넣고 30°C에서 10분간 반응시킨 후 3,5-dinitrosalicylate reagent(D.N.S) 1 ml를 가하여 반응을 중지시키고 540 nm에서 비색정량하였다. 효소활성은 30°C에서 1분간 1 μmole의 환원당을 유리시킬 수 있는 효소의 양을 1 unit로 나타내었으며 비활성도(specific activity)는 단백질 mg당 효소의 단위로 표시하였다.

## 4) Ammonium sulfate precipitation

상기의 방법에서 얻어진 조효소액에 ammonium sulfate를 서서히 첨가하여 60%까지 포화시켜서 10,000×g에서 10분간 원심분리 하여 얻은 그 상등액에 다시 am-

monium sulfate를 가하여 90%까지 포화시켰다. 이것을 원심분리하여 상등액을 제외하고 침전물을 모아서 소량의 증류수로 용해시킨 후 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)에 1야 투석하였다. 투석이 끝난 용액의 불용성 물질을 원심분리하여 제거하고 상등액을 정제용 효소액으로 하였다.

## 5) DEAE-cellulose column chromatography

DEAE-cellulose를 재증류수에 현탁시킨 후 수지의 약 10~15배의 0.5 M HCl로 세척하고 glass filter로 흡인여과 후 같은 방법으로 재증류수, 0.5 M NaOH, 재증류수로 세척하고 잔사를 제거시켜 2×35 cm의 column에 충전시킨 후 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)로 평형화시켰다. 여기에 상기의 효소액 20 ml를 넣고 10 mM potassium phosphate와 500 mM NaCl이 함유된 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 사용하여 직선 농도구배법으로 chromatography 하였다. 이 때 유출속도는 시간당 15 ml로 하였으며 분획당 3 ml를 모았다.

## 6) Sephadex G-200 column chromatography

Sepadex G-200을 재증류수에서 팽윤시킨 후 기포를 제거하여 2.0×70 cm column에 충전하였다. 이것을 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 다음 같은 완충액으로 용출시켰다. 유출속도는 시간당 10 ml로 하였으며 분획당 5 ml씩 모아 280 nm에서 단백질의 흡광도를 측정하였다.

## 7) 단백질의 정량

단백질의 정량은 Bradford의 방법<sup>21)</sup>에 따라 Coomassie Brilliant Blue G-250을 사용하여 측정하였으며 표준물질로는 bovine serum albumin(BSA)를 사용하였다.

## 8) 정제효소의 성질

기질의 특이성은 환원당인 maltose, lactose와 비환원당인 sucrose, raffinose를 기질로 사용하였으며 최적 pH의 조사를 위해서는 pH 3.0에서 6.0까지는 citrate phosphate buffer를, pH 6.0에서 8.0까지는 potassium phosphate buffer를 사용하였다. 최적온도는 효소액에 250 mM citrate phosphate(pH 5.0)를 가하여 얻은 효소반응액을 각 온도에서 10분간 유지하여 효소활성을 측정하였으며 열안정성은 효소액을 pH 5.0에서 20°C부터 80°C까지 10°C 간격으로 나누어 각 온도에서 30분간 처리한 후 급냉하여 측정하였다. 또한 pH 안정성은 pH 3에서 8까지는 상기의 buffer를, pH 8 이상은 Tris-HCl buffer를 사용하여 20°C, 72시간을 각 pH에서 incubation한 후 측정하였고, 금속이온에 대한 영향은 0.01 mM로 조절한 각 금속이온의 용액을 효소액과 동량 첨가한 후 일정시간을 반응시켜 효소활성을 측정하였다.

## 9) 전기영동

Davis 법<sup>22)</sup>을 변형한 Robert의 방법<sup>23)</sup>에 따라 7.5%

polyacrylamide gel(pH 6.8)을 사용하였으며 효소의 기질로 sucrose가 작용하므로 stacking gel은 사용하지 않았다. 50% glycerol에 0.1%의 bromophenol을 함유한 것을 tracking dye로 사용하여 tube 당 37.5 V의 일정한 전압으로 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 gel을 10% trichloroacetic acid에 담그고 실온에서 30분간 방치한 후 0.1% Coomassie Brilliant Blue G-250으로 염색하고 7% acetic acid로 탈색 후 band를 관찰하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 건시제조 중 Invertase의 활성변화

건시제조 중 invertase의 활성변화는 Fig.2에서 보는 바와 같이 건조 5일째 활성이 급증하기 시작하여 건조 10일째 최대활성을 나타내었으며, 그 이후 활성이 서서히 감소하면서 건조 25일부터 일정한 활성을 나타내었다. 한편 문,<sup>24)</sup> 平井<sup>25)</sup> 및 石井<sup>26)</sup> 등은 건시제조 중 당의

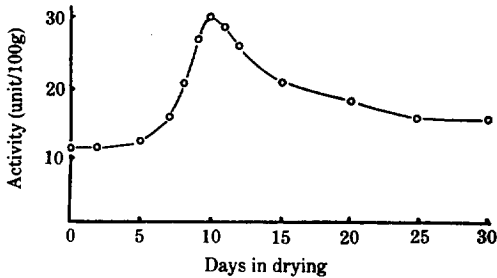


Fig. 2. Activity change of invertase during sun drying of persimmon.

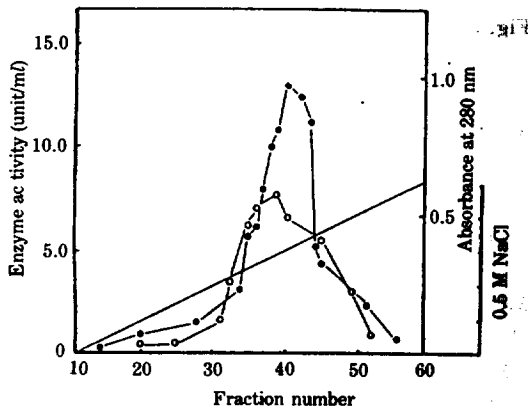


Fig. 3. DEAE-cellulose column chromatography of invertase  
column size: 2×35 cm, flow rate: 15 ml/hr, fraction volume: 3 ml, ●-●: enzyme activity, ○-○: protein OD

변화에서 과육내의 sucrose는 건조 10일경까지 거의 모두 사라진다고 보고하였으며 이러한 변화는 바로 건조 중 invertase의 활성증가에 의한 glucose와 fructose로의 분해에 기인되는 것으로 생각되었다.

#### 2. Invertase의 정제

##### 1) DEAE-cellulose column chromatography

효소활성이 가장 높은 건조 10일째의 건시에서 invertase를 추출한 효소액은 DEAE-cellulose column chromatography한 결과, Fig.3에서 보는 바와 같이 하나의 활성 peak가 나타났으며, 이 중 fraction No.35에서 44까지 모아서 다음의 정제단계를 행하였다.

##### 2) Sephadex G-200 column chromatography

Sephadex G-200으로 gel filtration한 결과는 Fig.4에서 보는 바와 같이 역시 하나의 활성 peak가 나타났으며 fraction No.51에서 55까지를 모아서 전기영동 및 효소학적 제성질을 조사하였다.

##### 3) 정제과정

Table 1에서 보는 바와 같이 60~90% 포화 ammonium sulfate로 침전된 단백질의 호소활성도는 총 활성도의 약 66%가 함유되어 있었고, crude homogenate에 비해 약 7배 정제된 효소액을 얻었다. 이것을 DEAE-cellulose, Sephadex G-200의 정제단계를 거친 후에는 crude homogenate에 비해 27배의 정제효과를 얻었다.

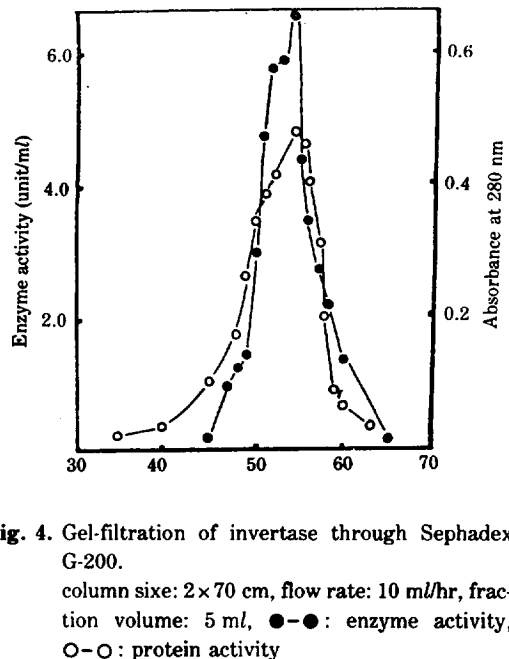


Fig. 4. Gel-filtration of invertase through Sephadex G-200.  
column size: 2×70 cm, flow rate: 10 ml/hr, fraction volume: 5 ml, ●-●: enzyme activity, ○-○: protein activity

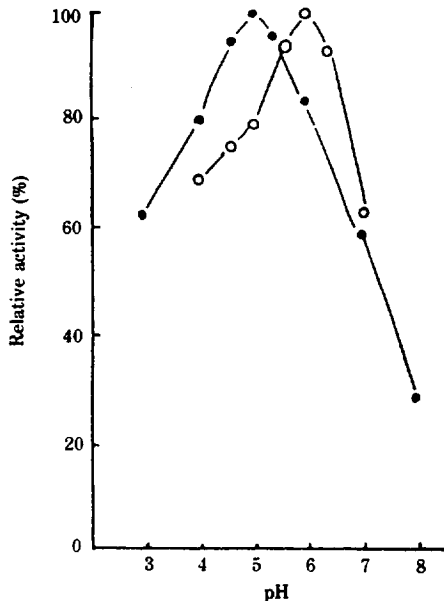
**Table 1.** Summary of purification of invertase in persimmon at 10 days of sun drying

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yeild (%)	Purification (fold)
Crude extract	916.6	1210.0	1.3	100.0	1.0
Ammonium sulfate (60-90%)	90.8	803.7	8.9	66.4	6.9
DEAE-cellulose (No. 35-44)	10.8	284.5	27.4	23.5	21.1
Sephadex G-200 (No. 51-55)	3.8	135.3	35.6	11.2	27.4

**Table 2.** Substrate specificity of invertase

Substrate	Relative activity (%)
Sucrose	100.0
Raffinose	37.8
Maltose	0.0
Lactose	0.0

The assay mixture contained 0.05 M acetate buffer (pH 4.8), 0.05 M each substrate and enzyme solution.



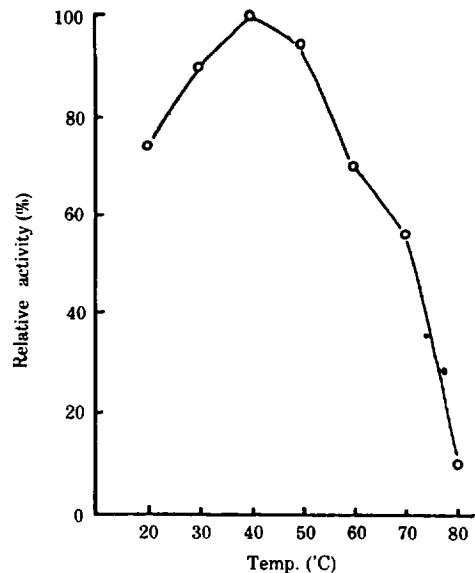
**Fig. 5.** Effect of pH on the activity of invertase.

●-● : sucrose ○-○ : raffinose

**3. 정제된 효소의 제성질**

1) 기질의 특이성

Maltose, lactose, sucrose 및 raffinose의 각 기질에 대한 효소의 기질특이성을 조사한 결과, Table 2와 같이



**Fig. 6.** Effect of temperature on the activity of invertase.

환원당인 maltose와 lactose에서는 활성이 없었으며 비 환원당인 raffinose에서는 sucrose의 약 37%의 활성을 나타내었다.

2) 최적 pH

정제된 효소의 최적 pH를 측정해 본 결과 Fig.5에서 보는 바와 같이 최적 pH는 sucrose, raffinose에 대하여 각각 5.0, 6.0에서 최적 pH를 나타내었다.

3) 최적온도

정제된 효소의 최적온도를 측정해 본 결과 Fig.6에서 보는 바와 같이 40°C에서 최대의 활성을 나타내었다.

4) 열 및 pH 안정성

효소의 열 및 pH 안정성을 조사한 결과는 Fig.7과 같았다. 50°C까지의 온도에서는 비교적 안정하였으며 60°C에서도 76%의 활성이 남아 열에 대하여 비교적 안

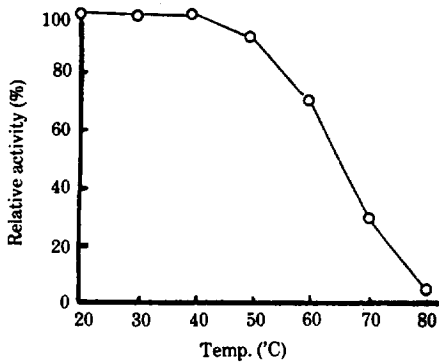
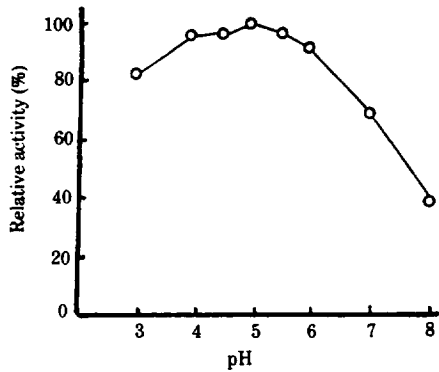


Fig. 7. Effect of pH and heat on the stability of invertase.

Table 3. Effect of metal ions on invertase activities

Matels	Relative activity (%)
None	100.0
NaCl	108.7
KCl	98.5
CuSO <sub>4</sub>	97.3
CaCl <sub>2</sub>	103.1
MgSO <sub>4</sub>	70.8
HgCl <sub>2</sub>	61.8
MnCl <sub>2</sub>	83.0
ZnSO <sub>4</sub>	72.5
FeCl <sub>3</sub>	90.2

정하였다. 그리고 pH 5 부근에서 안정하였다.

5) 금속이온의 영향

효소활성에 대한 금속이온의 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같이 2가 양이온 중 Hg, Mg, Zn 및 Mn에 의하여 효소활성의 저해작용이 나타났다.

6) Lineweaver-Burk plot

Sucrose의 농도를 변화시키면서 효소의 활성도를 측정하였을 때 Fig.8에서 보는 바와 같이 invertase에 대한

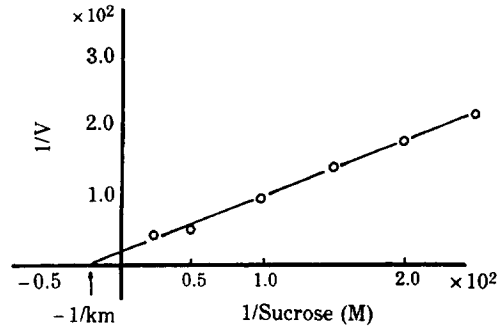


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot for sucrose by the purified invertase.

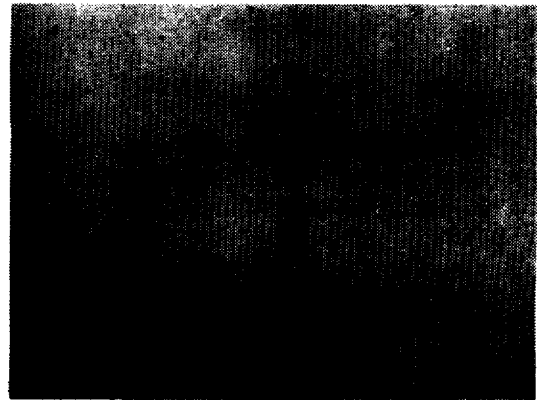


Fig. 9. Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of purified invertase.

K<sub>m</sub> 값은 2.5 mM 이었다.

많은 고등식물에는 acid invertase와 alkaline invertase가 존재하는데<sup>25,26)</sup> Matsushita<sup>27)</sup>는 최적 pH 및 K<sub>m</sub> 값에 기준을 두고서 pH 4.0~5.5, K<sub>m</sub> 값 2~13 mM이면 acid invertase로 구분하였다. 久島<sup>28)</sup>가 보고한 생사에서 invertase는 최적 pH 4.0, K<sub>m</sub> 값 1.4 mM로 acid invertase에 속하였으며 건시 또한 acid invertase에 속하는 것으로 여겨진다.

7) 전기영동

정제된 invertase를 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis한 결과는 Fig.9와 같다. 0.02 M phosphate buffer(pH 6.8)을 사용한 경우 R<sub>m</sub> 값 0.1부근에서 명확한 단일 band가 나타났다.

IV. 요약

건시제조 중 invertase의 활성변화를 조사하고 정제된 invertase의 효소적 특성에 관하여 실험한 바 그 결과는

다음과 같다. 건조가 진행됨에 따라 invertase의 활성은 증가하여 건조 10일째 최고 활성을 나타내었으며 그 이후는 감소하였다. 건조에서 invertase를 250 mM potassium phosphate(pH 7.4)로 추출하여  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 염석, DEAE-cellulose 및 sephadex G-200 column chromatography의 과정으로 정제한 결과 정제도는 조효소액보다 약 27배 증가되었으며 회수율은 약 11%였다. 최적 pH는 sucrose, raffinose에 대하여 각각 5.0과 6.0으로 나타났다. 최적온도는 40°C였다. 열과 pH 안정성은 50°C까지 그리고 pH 5 부근에서 안정하였다. Sucrose에 대한  $K_m$  값은 2.5 mM이었으며, 정제된 invertase는 polyacrylamide gel 전기영동상에서 하나의 band를 나타내었다.

### 참고문헌

1. 北川博敏: 力키의 栽培 利用, 養賢堂發行, 東京 p.233 (1970).
2. 平井俊次, 山崎喜美江: 日食工誌, 30(3), 178(1983).
3. 石井靖子, 山西貞: 日食工誌, 29(12), 720(1982).
4. 眞部正敏, 上川尚義, 樽谷陰之: 日園學雜, 46(4), 555 (1978).
5. Anderson, R.S., Ewing, E.E. and Senesac, A.H.: *Plant Physiol.*, **66**, 451 (1980).
6. Rutheford, P.P. and Deacon, A.C.: *Biochem. J.*, **126**, 596 (1972).
7. Harvey, C.J., Simmon, M.K. and Curtis, O.L.: *J. Food Sci.*, **40**, 772 (1975).
8. Harvey, C.J. and Simmon, M.K.: *J. Food Sci.*, **40**, 770 (1975).
9. Marouf, B.A. and Zeki, L.: *J. Food Sci.*, **47**, 678 (1982).
10. Kim, B.M. and Chae, S.K.: *Korean, J. Food Sci. Technol.*, **14**(1), 1 (1982).
11. Mowlam, G. and Itoo, S.: *Nippon shokuhin kogyo Gakkaishi*, **29**(8), 472 (1982).
12. Hawker, J.S.: *Phytochem.*, **8**, 9 (1969).
13. Iwatsubo, T., Nakagawa, H. and Ogura, N., Takehana, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**(4), 907 (1975).
14. Yamaki, S., Kajiura, I. and Kakiuchi, N.: *Bull. Fruit tree Res.*, **6**, 15 (1979).
15. Fawzi, A.F.A., Elfouly, M.M.: *Physiol. Plant.*, **47**, 245 (1970).
16. Lyne, R.L. and Rees, T.A.: *Phytochem.*, **10**, 2593 (1971).
17. Manning, K. and Maw, C.A.: *Phytochem.*, **14**, 1965 (1975).
18. Nakagawa, H., Hashimoto, T., Ogura, N. and Takehana, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**(5), 697 (1972).
19. Takehana, H. and Nakagawa, H.: *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.*, **18**, 63 (1970).
20. Melius, P.: *J. Chem. Educ.*, **48**, 765 (1971).
21. Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
22. David, B.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
23. Rovert, C.A., Spencer, C.E., Bowman, G.C. and Blackman, D.: *J. Chem. Educ.*, **53**(1), 62 (1976).
24. 文廣德, 係泰華: 韓國食文化學會誌, 3(4), 385(1988).
25. Cooper, R.A., Greenshields, R.N.: *Biochem. J.*, **19**, 357 (1963).
26. Copping, L.C. and Street, H.E.: *Physiol. Plant.*, **26**, 346 (1972).
27. Masushita, K. and Uritani, I.: *Plant. Physiol.*, **54**, 60 (1974).
28. Hisajima, S., Aria, Y. and Ito, T.: *J. Jap. Soc. Starch. Sci.*, **25**(3), 198 (1978).