

고려인삼 (*Panax Ginseng* C. A. Meyer) 중의 조(粗) β -amylase의 분리와 그 성질

김 병 목

중앙대학교 식품가공학과

Properties of Crude β -amylase from Korean ginseng, *Panax ginseng* C. A. Meyer.

Byung-Mook Kim

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Seoul

Abstract

Crude β -amylase was prepared by fractionation of the water extracts from Korean ginseng, *Panax Ginseng* C.A. Meyer, with 0.2-0.6 saturation of ammonium sulfate. The enzyme showed the typical properties of β -amylase, producing only maltose from starch. The enzyme preparation also showed no maltase activity. The enzyme was stable at the pH 5-9 and at the temperature below 40°C. The enzyme showed the optimum pH at 5.0 and the optimum temperature at 35°C. Its activities had proportional relations with substrate concentration below 12 mg%, showing Km Values of 4.76 mg%. The enzyme was inhibited by Ag^+ , Hg^{++} , Cd^{++} , Cu^{++} , Al^{3+} , and Fe^{3+} .

서 론

인삼은 수천년전부터 영약으로 알려질만큼 한방에서 널리 애용되어 왔을뿐만이 아니라 허약체질이나 병후 관리 등에 보전식품으로서 널리 사용되어 왔다. 최근에 이르러서는 건강식품에 대한 관심이 높아감에 따라 인스탄트 삼계탕, 인삼차, 인삼드링크, 인삼엑스, 인삼당과 등의 여러 가공식품마저 나오고 있어 식품으로서 중요한 위치를 차지하게 되었고, 특히 우리나라 토산품 개발이라는 차원에 있어서는 그의 의미가 더해가고 있다.

따라서 인삼에 대한 연구는 종래¹⁻⁴⁾의 약리학적인 면에서 뿐 아니라 식품과학적인 면에서 실시해야 할 시기에 이르렀다고 본다. 특히 이제까지 인삼의 주된 약효성분으로 알려진 saponin⁽⁵⁻⁹⁾을 비롯한 배당체들이 식품 및 영양학적으로 어떠한 의미를 가지고 있는가를 밝히는 것은 중요하며 또 이들 배당체의 인삼체내에서의 생화학적 기구를 규명하는 것도 대단히 중요하다고 본다.

이런 점에서 필자는 이들 배당체가 인삼체내에서 생성 및 소실되는 생체반응이 이미 필자가 보고한 바 있는⁽¹⁰⁻¹²⁾ α -amylase, β -amylase, invertase 등 인삼중

에 특이적으로 측정되는 glucosidase활성과 어떤 관련성이 있을 것으로 보고, 이들 상관관계를 파악하기 위하여 우선 인삼에서 glucosidase를 분리한 후 그의 성질과 기능을 연구하기로 하였다.

필자는 이미 조 α -amylase와 조invertase를 분리하여 그의 성질을 규명·보고한 바 있거니와^(10,11) 여기서는 조 β -amylase를 인삼에서 분리한 후 그의 성질을 규명한바 그 성적을 보고하고자 하는 바이다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서는 서울시내 인삼판매소에서 구입한 1983년도 강화도산 4년생 수삼(水蔘)을 시료로 사용하였다.

조(粗) 인삼 β -amylase의 조제

β -amylase를 분리하기 위하여 시료 인삼을 깨끗이 씻고 겹질을 벗긴 후 같은 량의 증류수를 넣어 마쇄하고 이것을 30°C에서 30분간 향온시킨 다음 cheese cloths를 사용하여 착즙하였다. 착즙액은 3000rpm으로

10분간 원심분리한 후 상등액을 분리하여 조인삼 추출액(crude ginseng extract)로 사용하였다.

조추출액은 $(NH_4)_2SO_4$ 로 분획하였을때 Table 1에서 보는 바와 같이 0.2~0.6포화 침전물에서 효소활성이 나타났으므로 본 실험에서는 우선 조추출액을 $(NH_4)_2SO_4$ 로 0.2포화시켜 생성되는 침전물을 8000rpm, 5℃로 20분간 원심분리하여 제거하고 다시 $(NH_4)_2SO_4$ 로 0.6포화시켜 생성되는 침전물을 같은 요령으로 원심분리한 후 분리된 침전물을 visking tube(# 30/32)를 사용하여 탈이온수로 충분히 투석시켰다. 여기서 잔존하는 불용성 물질은 다시 원심분리하여 제거한 후 투석된 용액을 조인삼 β -amylase액으로 사용하였다.

β -amylase의 활성측정

상법⁽¹²⁾에 의하여 측정하였다.

시험관에 6% starch액 2ml, 0.1M acetate buffer액(pH5) 7.5ml, 효소액 0.5ml를 넣고 50℃에서 30분간 항온시킨 다음 끊어서 효소작용을 중지시켰다. 이 반응액을 100배 희석한 후 그 중 0.5ml를 취하여 Nelson과 Somogyi 법^(14, 15, 16)에 의하여 생성된 환원당을 정량하였다.

β -amylase의 활성은 50℃에서 1분간에 환원당 1 μ mole을 유리시키는 효소의 양을 1unit로 환산하였다.

단백질의 정량

효소액의 단백질 함량은 Lowry *et. al.*⁽⁸⁾ 방법으로 측정하였다.

효소반응 산물의 분석

효소반응 산물은 HPLC로 분석하였다.

사용된 HPLC장치는 Waters Model 6000였으며 stationary phase ; μ -Bondapak C₁₈, mobile phase; H₂O, flow rate; 1.6ml/min, detector; RI-64X, chart speed ; 20mm/min, amounts of injection; 15 μ l 등의 조건하

Table 1. β -amylase activities in fractions of ginseng extract

Fractions	T.protein (mg)	T.activity (units)	Spec. activity (units/mg protein)
0.2	395.0	16200	41.0
0.4	205.0	11870	57.9
0.6	885.0	55200	62.4
0.8	944.0	-	-
1.0	148.0	-	-
Super	861.0	-	-

에서 실시하였다.

표준당류로서는 glucose(Ishizu Pharm. Co. LTD, Osaka, Japan)와 maltose (DIFCO Lab. Detroit, Michigan, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

조(粗)인삼 β -amylase의 반응산물

인삼에서 분리된 효소가 β -amylase임을 확인하기 위하여 6% starch와 6% maltose를 각각 기질로 하여 일정한 시간 반응시킨후 그 반응산물을 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 6% starch를 기질로 하여 2시간 반응시켰을 경우 maltose(Rt 2.1)와 미지의 당(Rt 1.6)이 검출되었다. 미지의 당은 반응시간 0인 경우에도 나타났으며 조효소액 만의 분석에서도 동일하게 검출되었다. 이것은 조효소액 중에 들어 있는 어떤 미지의 저분자 당에서 유래된 것으로 판단되며 전보⁽¹²⁾에서 보고한 인삼 invertase의 경우 상당량의 당이 함유되어 있었다는 점과도 유관한 것으로 해석되었다. 이 결과는 30분간 반응시켰을 경우에도 동일하였다. 6% maltose를 기질로 하여 2시간 반응시켰을 경우에도 maltose와 미지의 당 이외에 glucose는 검출되지 않았다. 따라서 본 효소는 β -amylase이며 maltase는 혼재되지 않은 것으로 고찰되었다.

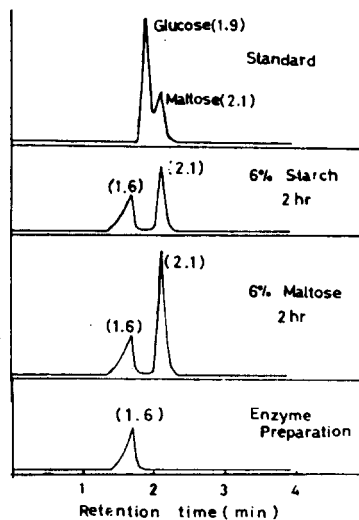


Fig. 1. High performance liquid chromatogram of sugars in the reaction-products of crude β -amylase The numbers in parentheses represent the retention times (Rt), respectively.

조인삼 β -amylase의 성질

가. pH 안정성

일정량의 효소액에 0.01M acetate buffer액 (pH 3, 4, 5), 0.01M phosphate buffer액 (pH 6, 7, 8) 및 0.01M carbonate buffer액 (pH 9, 10)을 각각 2배량씩 가하여 pH를 조절한 후 저온실에서 24시간 방치하였다가 visking tube (# 18/32)를 사용하여 투석시킨후 β -amylase활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 조인삼 β -amylase는 pH 5~9에서 안정성을 나타내고 있으며 pH 7~8에서 특히 큰 안정성을 나타내었다.

이는 앞서 보고한 바와 같이^(10, 11) pH 5~6에서 가장 큰 안정성을 보이고 pH 10까지에 이르는 알칼리용액에서도 상당히 큰 안정성을 보인 조인삼 α -amylase와는 큰 차이점을 나타내고 있으나 pH 5~9에서 안정성을 보이고 pH 7부근에서 가장 큰 안정성을 나타낸 조인삼 invertase와는 상당히 비슷한 성질을 나타내고 있다.

나. 열 안정성

일정량의 효소액에 기질을 제외한 반응액의 조성을 모두 가하고 0, 20, 35, 50, 60, 80, 및 100°C의 온도에서 각각 30분간 항온시킨 뒤 기질을 가하고 반응시

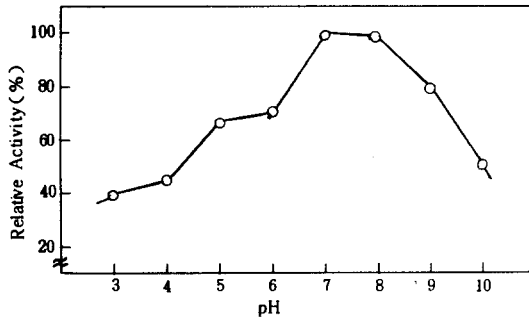


Fig. 2. pH-stabilities of crude β -amylase

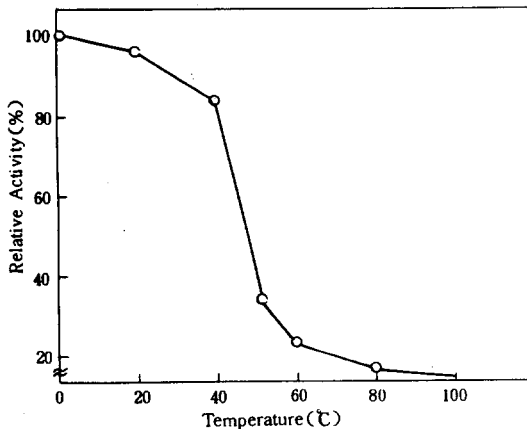


Fig. 3. Thermal stabilities of crude β -amylase

켜 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 조인삼 β -amylase는 40°C 이하에서 안정성을 나타내고 그 이상의 온도에서는 대단히 불안정하였다.

이것은 역시 50°C 이하에서 안정성을 나타내고 있는 조인삼 α -amylase⁽¹⁰⁾와는 성질상 차이점을 나타내고 있으나 35°C 이하에서 안정성을 가지고 있는 조인삼 invertase⁽¹¹⁾와는 아주 비슷한 성질을 나타내고 있다.

다. pH 의존도

몇몇 pH를 달리한 조건하에서 β -amylase의 활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 조인삼 β -amylase는 pH 5에서 최적작용 pH를 나타내었다.

이것은 또한 pH 6에서 최적작용을 나타내고 있는 조인삼 α -amylase⁽¹⁰⁾와는 차이점을 나타내고 있으나 pH 5에서 최적작용을 나타내고 있는 조인삼 invertase⁽¹¹⁾와는 비슷한 성질을 나타내고 있다.

라. 열 의존도

효소의 작용온도를 0, 20, 35, 40, 50, 60 및 80°C로 조정하여 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 조인삼 β -amylase는 35°C에서 최적작용 온도를 나타내었다.

이것은 전보^(10, 11)에서 35~40°C에서 최적작용을 나타내고 있는 조인삼 α -amylase와는 오히려 비슷한 성질을 나타내나 50°C에서 최적작용을 나타내고 있는 조인삼 invertase와는 현저히 다른 성질을 나타내고 있다.

마. 기질농도와 효소활성

기질(starch)의 농도 0.01~120mg% 범위내에서 기질의 량을 각각 달리 효소반응액에 넣고 효소활성을 측정해 본 결과 조인삼 β -amylase는 기질농도 12mg% 이하에서는 기질농도에 비례하여 효소 활성이 증가하였으나 그 이상의 기질 농도에서는 효소활성의 증가가 현저하지 못하였다.

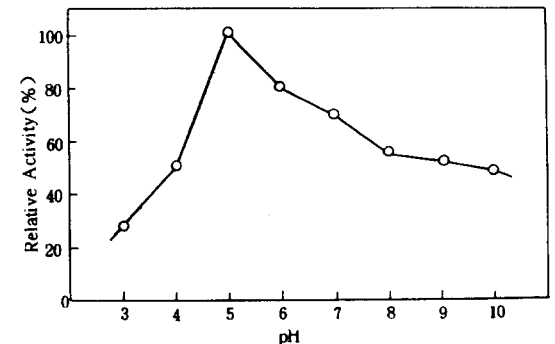


Fig. 4. Effects of pH on the activities of crude β -amylase

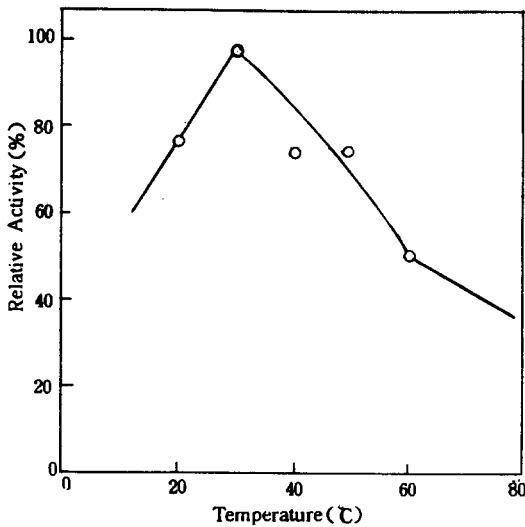


Fig. 5. Effects of temperature on the activities of crude β -amylase

Table 2. Effects of metal ions on crude β -amylase

Metals ($1 \times 10^{-3}M$)	Relative activity (%)
None	100.0
KCl	109.6
NaCl	104.5
AgNO ₃	59.8
SnCl ₂	100.0
CaCl ₂	108.6
HgCl ₂	6.4
CdCl ₂	75.6
CoCl ₂	100.0
CuCl ₂	80.0
MnCl ₂	100.0
AlCl ₃	60.1
FeCl ₃	60.0
Zn(NO ₃) ₂	99.2

Mn⁺⁺; Zn⁺⁺의 저해효과, Cu⁺⁺; Fe³⁺, Ca⁺⁺등의 활성화효과⁽¹¹⁾ 등과 다른 점이다.

요 약

고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer) 중의 β -amylase를 연구하기 위하여 조(粗)인삼 β -amylase를 분리한 후 그의 성질을 조사하였다. 조인삼 β -amylase는 ammonium sulfate 0.2~0.6포화분획에 의하여 효과적으로 조제되었다. 조제된 본 효소는 전형적인 β -amylase의 작용을 하여 starch에서 maltose만을 생산하였으며 maltase의 활성은 나타내지 않았다. 본 효소는 pH5~9(특히 pH7~8), 40°C 이하의 조건하에서 안정성을 나타내었고 최적pH 5.0, 최적온도 35°C를 나타내었다. 본 효소는 기질(starch)농도 12mg% 이하에서 기질농도에 비례하여 효소활성이 증가하였으며 Km치는 4.76mg%이었다. 또 본 효소는 K⁺; Na⁺; Sn⁺⁺, Ca⁺⁺; Co⁺⁺; Mn⁺⁺; Zn⁺⁺에는 영향을 받지 않았으나 Ag⁺; Hg⁺⁺; Cd⁺⁺; Cu⁺⁺; Al³⁺; Fe³⁺ 등에는 현저한 저해를 받았다.

사 의

본 연구는 문교부 학술연구조성비 지원으로 수행되었으며 이에 깊이 감사함을 드립니다.

문 헌

1. Brekhan, I. I. and Dardymov, I. V. : *Ann. Rev.*

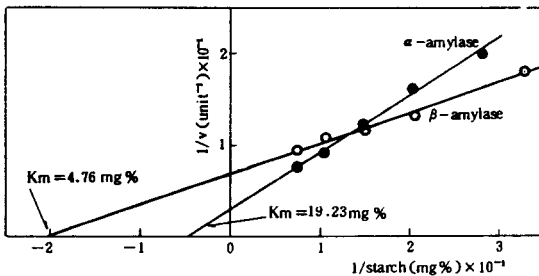


Fig. 6. Lineweaver-Burk plots for the determination of Km values of crude

이것은 조인삼 α -amylase의 경우⁽¹⁰⁾와 마찬가지로 기질농도 범위를 나타낸 것인데 이들 기질농도 범위 내에서 Lineweaver-Burk plots를 그려 조인삼 α -amylase의 경우와 Km치를 비교해 보면 Fig. 6에서 보는 바와 같이 조인삼 α -amylase의 Km치 19.23mg%에 비해 조인삼 β -amylase의 Km치는 4.76mg%로서 상당히 낮다.

바. 금속이온의 영향

금속이온이 조인삼 β -amylase의 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 $1 \times 10^{-3}M$ 의 몇몇 금속이온을 조인삼 β -amylase작용액에 각각 1ml씩 첨가한 후 효소활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서 보는 바와 같이 K⁺; Na⁺; Sn⁺⁺; Ca⁺⁺; Co⁺⁺; Mn⁺⁺; Zn⁺⁺ 등은 조인삼 β -amylase활성에 큰 영향을 미치지 않았으나 Ag⁺; Hg⁺⁺; 등 중금속과 Ca⁺⁺; Cu⁺⁺; Al³⁺, Fe³⁺ 등 다가이온은 현저한 저해효과를 나타내었다. 이는 조인삼 α -amylase의 경우⁽¹⁰⁾ Fe³⁺의 무저해 효과와 다른 현상이며 조인삼 invertase의

- Pharmacol.* 9, 419 (1969)
2. Wood, W. B., Roh, B. L. and White, P. R. : *J. Pharmacol.* 14, 289 (1964)
 3. Oura, Y. : *Chem. Pharm. Bull.* 20, 980 (1972)
 4. Yokozawa, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 987 (1976)
 5. Garriques, S. S. : *Ann. Chem. Pharm.*, 90, 231 (1854)
 6. Shibata, S., Tanaka, O., Sado, M. and Thushima, S. : *Tetrahedron Letters*, 12, 795 (1963)
 7. Tanaka, O., Nagai, M. and Shibata, S. : *Tetrahedron Letters*, 33, 2291 (1964)
 8. Sanada, S., Kondo, N., Shojo, J., Tanaka, O. and Shibata, S. : *Chem. Pharm. Bull.*, 22 (2), 421 (1974)
 9. Chen, S. E., Staba, E. J., Taniyasu, S., Kasai, R. and Tanaka, O. : *Planta Medica.*, 42, 406 (1981)
 10. 김병목, 박선희, 정동선 : 서울여자대학 논문집, 8, 337 (1979)
 11. 김병목 : 한국식품과학회지, 12, 1 (1980)
 12. 김병목, 채수규 : 한국식품과학회지, 14, 1 (1982)
 13. 東京大農化教室(編) : 實驗農藝化學(日語), 朝倉書店, 東京, 下卷, p. 622 (1960)
 14. Nelson, N. : *J. Biol. Chem.*, 153, 375 (1944)
 15. Phillip, B. H., Bernard, L. O. and William, H. S. : *Practical Physiological Chemistry*, The Blunkiton Co. Inc., New York, p. 573 (1954)
 16. Somogyi, M. : *J. Biol. Chem.*, 195, 19 (1952)
 17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Fair, A. L. and Randal, R. J. : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- (1984년 6월 30일 접수)