

# 細菌 amylase 의 耐熱性에 關한 研究(第1報)

Calcium 및 Sodium 鹽의 影響에 對하여

朴 允 仲, \*李 漢 昌, 李 錫 健

忠南大學校 農科大學, \*생포醬油釀造場

(1968年 2月 18日 受理)

## Studies on the Heat Resistance of Bacterial Amylase (part 1)

Effect of Calcium and Sodium Salts.

Yoon Choong Park, \*Han Chang Lee, Suk Kun Lee.

College of Agriculture Chung Nam University

\*Saimpyo Soy Brewery

### Summary

1. The optimum temperature of amylase activity produced by *Bacillus subtilis* var. M-181 was 50°C, and its activity was lost by heating to 70°C, 10 minutes without addition of salts
2. Addition of sodium salts effects for heat resistance of the amylase affected differently by kinds of the salt. Among organic sodium salts monosodium glutamate, sodium acetate and sodium propionate affected on heat resistance of the amylase relatively better effects.
3. Addition of 10mg of sodium sulfate per ml of enzyme solution ( $D_{30}^{40} 1250/ml$ ), showed maximum affect on the heat resistance.
4. Coexistence of calcium acetate and sodium acetate, affected on the heat resistance, remarkably.

### 緒 言

葡萄糖이나 물엿製造에서 細菌 amylase 를 澱粉의 液化劑로 使用할 때에는 澱粉이 糊化 溫度에 이르기까지 酵素力이 失活되지 않고 作用할 수 있는 耐熱性을 가져야 하므로 澱粉液化酵素劑의 優劣은 그 力價 뿐만 아니라 耐熱性의 良否가 問題된다.

細菌 amylase 의 耐熱性에 關하여는 小量의 無機鹽類 또는 其他物質이 amylase 의 耐熱性을 增大시킨다는 여러 學者들의 報告<sup>(1,2,3,4)</sup>가 있으며 福本<sup>(5)</sup>는 細菌 amylase 의 粗酵素液에 Alkyldimethyl Benzylammonium chloride 를 0.1~0.2% 添加하므로서 液化型 amylase 의 耐熱性을 增大시킬 수 있다는 特許를 낸 바 있다. 笠芳<sup>(6)</sup> 등은 高温性 細菌인 *Bacillus stearothermophilus* 에 屬하는 一種의 新菌株에 依한 耐熱性이 큰 amylase 의 製法에 對한 特許를 얻은 바 있으며 朴等<sup>(7)</sup>도 高温 α-amylase 生産細菌의 分離培養에 對한 報告를 한바 있다.

著者 등은 既報<sup>(8)</sup>한 바 있는 新菌株 *Bocillus Subtilis* var. M-181 strain 이 生産하는 amylase 의 活性에 미치는 溫度의 影響과 耐熱性에 關係되는 數種의 無機鹽類에 對하여 檢討하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

### 實 驗

1. 供試菌株 : 著者 등이 市販메주에서 分離한 *Bacillus subtilis* var. M-181.
2. 培養과 酵素液 : 前培養과 本培養을 前報<sup>(8)</sup>의 方法에 準하여 小麥殼에 培養하였으나, 培地用水는 蒸溜水를 使用하였고 全히 無機鹽類를 添加하지 않았다. 本培養을 한 小麥殼 培養物의 風乾物을 20 倍量의 蒸溜水로 室溫에서 3時間 浸出하고 그 濾液

을 酵素液으로 하였다.

3. 酵素液의 熱處理: 同一한 試驗管 數個에 酵素液 1 ml ( $D_{490}^{1\%}$ , 1250/ml)를 取하고 一定量의 耐熱劑와 蒸溜水를 加하여 全量이 2 ml 가 되도록 한 다음 管口를 密閉하고 一定溫度의 水浴中에서 10 分間 加熱處理를 하였으며, 이때 Buffer 液은 使用하지 않았다. 耐熱劑로서 Sodium borate 와 같이 alkali 性側으로 變化시키거나 또는 酸性側으로 變化시키는 것은 添加時 acetic acid 와 ammomia 液으로 pH 6.0 으로 되게 한 후 加熱處理를 하였다.

4. amylase 의 力價測定: 加熱處理後의 殘存酵素力 또는 無加熱酵素液의 力價로 Wohlgemuth 法으로 測定하였다. 即 McIlvain Buffer pH 6.0 作用溫度 40°C 作用時間 30 分間에 있어서 培養物乾燥 1 g 가 糊精化하는 1% 可溶性澱粉液의 液量(ml)으로 表示했다. 耐熱劑의 效果實驗에서 酵素殘存率은 加熱處理區와 同一量의 耐熱劑를 넣고 加熱處理를 하지 않고서 測定한 力價를 100 으로 하고 加熱處理後의 力價를 %로 나타 내었다.

## 結果 및 考察

### 1. 溫度와 活性

耐熱劑를 添加하지 않은 酵素液에 對하여 作用溫度만을 달리하고 Amylase 力價를 測定한 結果는 Fig 1 과 같다.

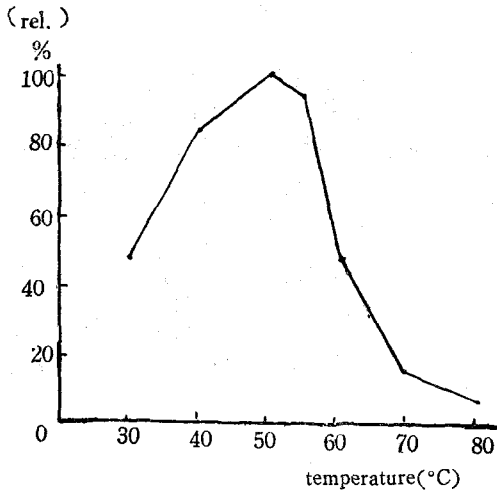


Fig. 1 The relationship between temperature and amylase activity (at PH 6.0)

이때에는 作用溫度 50°C 에서 最高의 活性度를 나타냈다. 이것은 Bacillus mesentericus 의 amylase 가 40°C 에서 活性 最適이라는 Effront<sup>(9)</sup>의 報告와 Biolase 의 活性最適溫度가 65°C 라는 Glimm<sup>(10)</sup>等

의 報告와는 多小 差異가 있다. 耐熱劑를 添加하지 않은 경우 酵素의 活性은 50°C 以上의 溫度에서 減小되어 70°C 로 10 分間 熱處理를 했을 때는 거의 活性度가 顯著히 떨어지고 75°C 에서는 完全히 失活하였다.

細菌 amylase 의 耐熱性에 關하여 福本<sup>(11)</sup>는 Bac. amyloliquefaciens 의 amylase 가 90°C 로 10 分間 加熱해도 活性의 50%가 殘存한다고 하였으며 70°C 로 加熱했을 때 보다 80°C 로 加熱했을 때 酵素活性이 오히려 적게 減小한다는 報告를 한 바 있으나 著者等의 實驗에서는 그러한 結果를 볼 수 없었으며 Bac. Coagulans 를 55°C 로 培養해서 얻은 amylase 가 90°C 로 一時間 加熱해도 90% 活性을 維持한다는 Campbell<sup>(12)</sup> 등의 報告에 比하여 M-181 의 amylase 는 그 自體의 耐熱性이 極히 弱하다고 할 수 있다. 그러나 Bac. polymyxa 의 Dextrinase 가 50°C 의 加熱에서 失活한다는 Ross<sup>(12)</sup>의 報告와 Streptomyces griseus 의 amylase 가 Ca<sup>++</sup>, Cl<sup>-</sup> 등의 存在下에서도 45°C 로 10 分間 加熱할 때 70%程度 失活 한다는 Simpson<sup>(13)</sup> 등의 報告로 미루어 M-181 의 amylase 는 中溫性 amylase 라고 生覺된다.

### 2. 各種 sodium 鹽의 影響

各種無機 또는 有機 sodium 鹽을 添加한 경우의 實驗結果는 Fig 2 와 같다.

從來 細菌 amylase 의 耐熱劑로서 알려져 있는

- sodium chloride 는 酵素液 1 ml ( $D_{490}^{1\%}$ , 1250/ml)에 對하여 20~50 ml 添加하고 70°C 로 10 分間 加熱했을 때 活性의 50%가 殘存하므로서 耐熱效果가 가장 좋았고 그 以上의 添加에 있어서는 漸次低下되었다.
- sodium bromide 는 sodium chloride 보다 耐熱效果가 적었으며 50~60 mg 添加했을 때 28% 殘存했으며 그 以上의 添加에 있어서는 漸次低下되었으나 100 mg 를 添加했을 때는 sodium chloride 와 같은 效果를 認定할 수 있었고 200 mg 를 添加 했을 때 4.7%, 400 mg 를 添加했을 때는 無添加와 비슷했고 500 mg 를 添加했을 때 逆效果를 나타내었다.
- sodium borate 는 10 mg 添加했을 때 56%의 殘存率을 보였고 그 以上의 添加에 있어서는 敏感하게 低下되어 100 mg 添加했을 때는 12%의 殘存率을 보였다. Yamamoto 等<sup>(14,15)</sup>은 熱에 依하여 不活性化된 Bac. subtilis 의  $\alpha$ -amylase 가 어떤 條件下에서 活性을 다시 回復하며 특히 M/60 borate buffer solution 으로 PH 를 固定한 狀態에서 加熱失活된  $\alpha$ -amylase 의 再活性化가 가장 좋았다고 指摘한 바 있다. 이러한 sodium borate 의 性質은 本實驗 結果에서 볼 수 있는 바와 같이 耐熱效果에도 關係가 있

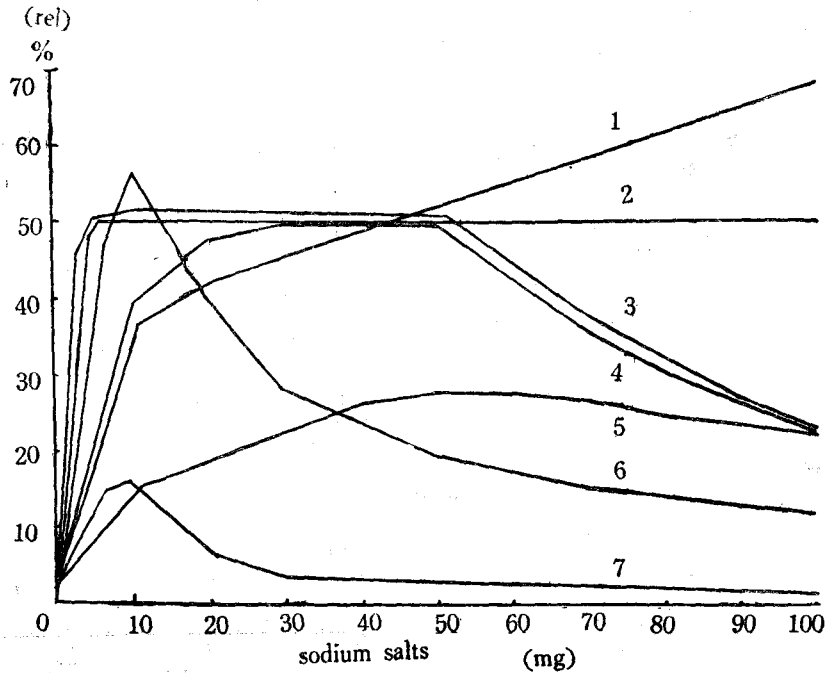


Fig. 2 Effect of sodium salts on heat resistance of the amylase

- |                          |                    |
|--------------------------|--------------------|
| 1. mono sodium glutamate | 2. sodium acetate  |
| 3. sodium propionate.    | 4. sodium chloride |
| 5. sodium bromide.       | 6. sodium borate.  |
| 7. sodium sulfate        |                    |

었다. sodium sulfate 도 sodium borate 와 비슷한 곡선을 나타내었으나 耐熱効果는 훨씬 적었다. 즉 10 mg 를 添加했을 때는 16% 殘存했으며 160 mg 添加時에는 1.6% 殘存하여 無添加區의 加熱失活과 같은 結果였고 200~300 mg 添加 했을 때는 오히려 逆作用을 보였다. 福本<sup>(1)</sup>는 sodium sulfate 를 少量 (0.1 %) 添加와 低溫 (65°C) 加熱에 있어서는 약간의 效果가 있으나 多量添加 또는 高溫加熱에 있어서는 오히려 逆效果를 보인다고 했다. 그러나 本實驗에서는 酵素液 1 ml 에 sodium sulfate 를 200~300 mg 添加했을 때는 逆效果를 나타냈으나 400 mg 를 添加했을 때 酵素蛋白質이 鹽析되었고 다시 熱保護作用이 나타나 28%의 殘存率을 보였으며 500 mg 添加時는 殘存率 56%로 耐熱效果는 더욱 上昇되었다. 그리고 耐熱劑를 添加하지 않은 酵素液의 境遇酵素의 濃度가 增加함에 따라 耐熱性이 增加됨을 볼 수 있었다. 以上の 結果로 미루어 볼때 酵素蛋白質이 鹽析되거나 高濃度로 될 때에는 熱變性を 적게 받는다고 볼 수 있다. sodium acetate 는 6~100 mg 添加에 있어서 50%의 殘存率을 보여 比較的 微量의 添加로 부터 多量에 이르기까지 넓은 範圍內에서 一定한 殘存率을 보였고 100 mg 를 超過할 때 漸次 低下되어 200 mg 添加에 있어서는 25%, 500 mg 添加에 있어서는 12%의 殘存率을 보였다. sodium

propionate 는 4~50 mg 에서 50% 殘存했고 100 mg 添加했을 때 23% 殘存하여 sodium chloride 의 경우와 비슷한 傾向을 나타 내었다. 이 以外에 有機 sodium 鹽으로서 sodium citrate 를 1 mg 添加하였을 때는 5% 殘存했고 10 mg 添加했을 때 6% 殘存했으나 50 mg 添加했을 때는 完全히 失活하였고, sodium oxalate 도 1 mg 添加했을 때는 4.7% 殘存하여 多小의 耐熱效果를 볼 수 있었으나 10 mg 添加했을 때는 逆效果를 나타내었다.

奧貫<sup>(16)</sup>는 cysteine 이나 citrate 의 存在下에서 glutamin 酸脫水素酵素의 加熱失活은 抑制된다고 하였으나 細菌 amylase 의 耐熱性에 sodium citrate 의 效果는 極히 微弱하였다 그런데 mono sodium glutamate 의 耐熱效果는 顯著하였으며 添加量의 增加에 따라 殘存率은 上昇되어 500 mg 添加했을 때는 85%의 殘存率을 보였다. 이것은 sodium ion 만의 效果라고는 生覺할 수 없으며 앞으로 더욱 究研될 問題라고 생각된다.

이들 鹽類의 添加量과 amylase 의 活性度와의 關係는 서로 當量的으로 要求되었다. 즉 amylase 의 活性이 1 ml 당  $D_{540}^{1.0}$  1250 인 酵素液에는 sodium borate 를 10 mg,  $D_{540}^{1.0}$  625 인 酵素液에는 5 mg 添加했을 때 同一한 效果를 나타내었다.

以上の實驗結果로 볼 때 細菌 amylase 의 耐熱性에 미치는 種 sodium 鹽의 影響이 各各 다른 것은 sodium ion 과 共存하는 陰 ion 이 어떤 形式으로나 크게 影響하는 것임을 알 수 있다.

3. Calcium acetate 와 sodium acetate 의 影響 calcium acetate 를 酵素液 1 ml 에 對하여 1~10 mg 添加하고 70°C 및 75°C 로 熱處理를 한 後의 殘存 酵素力을 測定한 結果는 Fig. 3 과 같다. 이 경우에 는 2~4 mg 添加에 있어서 가장 좋은 耐熱效果를 볼 수 있었으며 그 以上의 添加에 있어서는 耐熱效果가 오히려 低下되었다. 그리고 calcium acetate 와

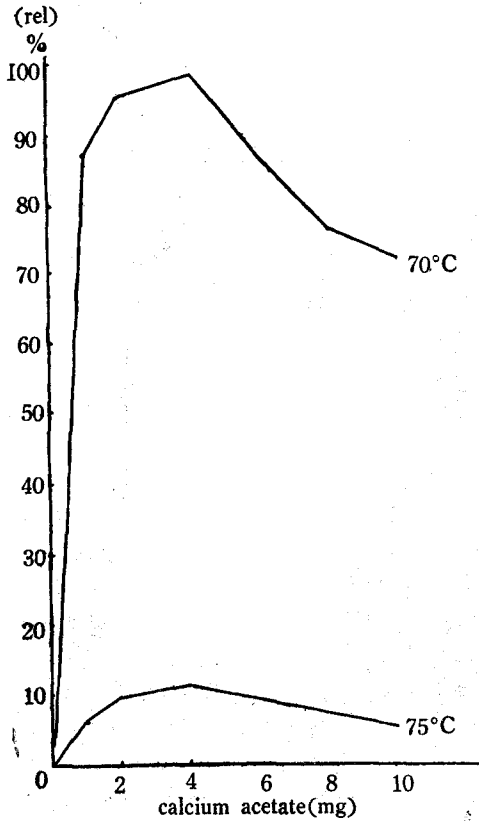


Fig. 3 Effect of calcium acetate on heat resistance of the amylase

sodium chloride 가 共存할 때 耐熱效果가 더욱 뚜렷했다. sodium chloride 의 添加量을 40 mg 로 固定하고 여기에 calcium acetate 의 量을 달리하며, 1~15 mg 添加했을 때 75°C, 10 分間 加熱에서는 모두 殘存率 100%였으며 85°C 로 10 分間 加熱했을 때의 殘存率은 Fig. 4 에서 볼 수 있는 바와 같이 calcium acetate 4~6 mg 範圍에서는 殘存率이 37~38%였으며 그 以上의 添加에 있어서는 殘存率이 低下되었다

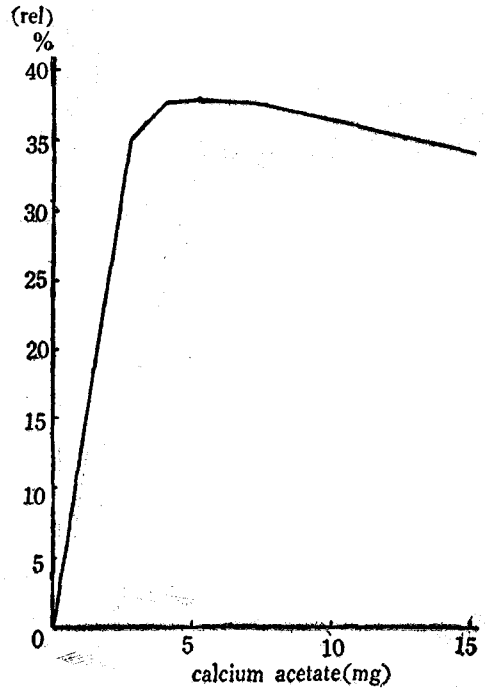


Fig. 4 Effect of calcium acetate and sodium chloride (40 mg) on heat resistance of the amylase (at 85°C, 10 min)

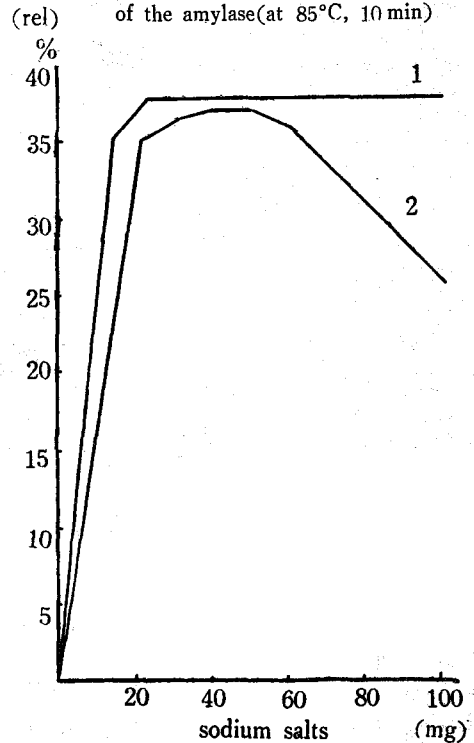


Fig. 5 Effect of sodium chloride or sodium acetate in calcium acetate on heat resistance of the amylase (at 85°C, 10 min)

1. Sodium acetate 2. Sodium chloride

다음에 calcium acetate의 量을 4 mg로 固定하고 이것에 sodium chloride 또는 sodium acetate를 各各 量을 달리하여 添加했을 때의 耐熱效果를 보면 sodium chloride는 30~50 mg 添加에 있어서 가장 效果가 좋았으며 그 以上の 添加에 있어서는 低下되었다. sodium acetate는 20~100 mg 添加에 있어서 38% 殘存하여 sodium chloride보다 더욱 效果가 있었으며, 300 mg 添加에 있어서는 殘存率 18%로 低下되었다. 細菌 amylase의 活性에 있어서 calcium ion의 關與에 對하여 carlo等<sup>(17)</sup>은 細菌 amylase의 安定性에는 Calcium이 必要하다는 것을 밝혔고 Yamamoto<sup>(18-22)</sup>는 細菌 amylase가 calcium을 必須成分으로 하며 calcium의 除去로 不活性化된 amylase가 calcium ion의 添加로 다시 活性을 恢復한다고 하였다. Fischer<sup>(23,24)</sup> 등은 唾液 amylase의 充分한 活性을 爲해서는 1 mol當 1g 原子量의 calcium이 必要하며 細菌 amylase는 4g 原子量 또는 그 以上の calcium이 必要하다고 報告하였다. 또한 福本<sup>(4)</sup>는 細菌 amylase에 Ca<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> 및 Cl<sup>-</sup>의 三者가 共存할 때 耐熱性을 가장 强하게 나타낸다고 報告하였다. 本實驗의 結果를 보면 細菌 amylase의 耐熱性을 強化하는데는 calcium acetate 또는 sodium acetate 만으로도 效果가 있으며 특히 兩者가 共存할 때 相乘的인 效果를 나타냈다. 따라서 福本가 指摘한 바 있는 Ca<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> 및 Cl<sup>-</sup>의 三者가 共存할 때 耐熱性이 가장 좋다고 하는 報告는 檢討를 要한다. 即 本實驗에서는 Cl<sup>-</sup>보다, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>의 경우가 Na<sup>+</sup>과 共存하거나 Na<sup>+</sup> 및 Ca<sup>++</sup>과 共存하거나 간에 耐熱性 強化의 效果가 좋았다. 이 點으로 미루어 Cl<sup>-</sup>의 共存效果는 認定하기 어렵다고 생각된다.

## 要 約

1. *Bacillus subtilis* var. M-181이 生産한 amylase에 耐熱劑를 添加하지 않았을 때의 作用 最適溫度는 50°C였으며 75°C로 10分간 加熱 했을 때는 完全히 失活되었다.
2. 耐熱劑로서 sodium 鹽은 그 種類에 따라 影響이 各各 다르며 有機鹽으로서 monosodium glutamate, sodium acetate, sodium propionate 등의 效果가 顯著하였다.
3. Sodium sulfate는 酵素液 1 ml (D<sub>50</sub><sup>0</sup>, 1250/ml)에 10 mg 添加했을 때를 頂點으로 하여 若干의 效果를 나타 내었으며 그 以上の 濃度에서는 漸次 耐

熱效果가 低下 되었으나 400 mg 以上の 濃度에서는 다시 耐熱性을 增大되었다.

4. Sodium acetate와 calcium acetate가 共存할 때는 相乘的 效果가 認定되었으나 陰 ion으로서 Cl<sup>-</sup>의 共存效果는 認定하기 어려웠다.

## 引用 文 獻

1. 福本壽一郎: 日農化誌 19 853 (1943)
2. H. Lüers und P. Lorinser: Biochem. Z., 144 212 (1924)
3. A.I. Oparin und S. Manskaya: Ibid. 260 170 (1933)
4. 朝井勇宣編: 微生物工業 朝倉書 p. 212
5. 福本壽一郎, 根來秀夫: 日本特許 2234 (1966)
6. 笠坊武夫, 遠藤滋俊: 日本特許 22640 (1961)
7. 朴啓仁, 洪承喆: 國立工業研究所報告 15 50 (1965)
8. 李錫健, 李漢昌: 韓國微生物會誌 2 19 (1964)
9. G. Effront: compt. rend., 164 415 (1917)
10. E. Glimm und I.U. Gizycki: Biochem, Z., 248 449 (1932)
11. L.L. Campbell, Jr.: J. Am. Chem. Soc., 76 5256 (1954)
12. D. Ross: Arch. Biochem., 16 349 (1958)
13. F.J. Simpson and E. Mc Coy: App. Microbiol., 1 228 (1953)
14. T. Yamamoto, A. Nishida and J. Fukumoto: Agr. Biol. Chem., 28 656 (1964)
15. Ibid. 30 994 (1966)
16. 奥貫一男: 酵素化學 Symposium 14 139 (1960)
17. F.J. D. Carlo and S. Redfern: Arch. Biochem., 15 333(1947)
18. T. Yamamoto: Agr. Biol. Chem, 23 68 (1959)
19. Ibid.: 24 16 (1960)
20. 山本武彦, 福本壽一郎: 酵素化學 Symposium 14 315 (1960)
21. 山本武彦: Ibid. 10 32 (1954)
22. 山本武彦: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 20 188 (1956)
23. F.H. Fischer et al., The 4th International empress of Biochemistry Symposium 3 (1958)
24. Eric A. Stein, Julia Hsiu and Edmono H. Fischer: Biochemistry 3 61 (1964)