

# 細菌 amylase 의 耐熱性에 關한 研究(2報)

Alcohol 類와 炭水化物의 影響에 對하여

朴 允 仲 李 錫 健

(忠南大學校 農科大學)

(1969. 7. 31 受理)

## Studies on the Heat Resistance of Bacterial Amylase (part 2)

Effect of Alcohols and Carbohydrate

Yoon Choong Park, Suk Kun Lee

College of Agriculture Chungnam University

### SUMMARY

This experiment was carried out to investigate the effects of alcohols and carbohydrates upon heat resistance of the amylase produced by *Bacillus subtilis* var. M-181.

The results obtained are as follows:

1) Alcohols showed the effects of increasing heat resistance in the order of glycerin, propylene glycol, ethylene glycol, ethanol and methanol, while higher monohydroxy alcohol and dipropylene glycol affected reversely.

2) Inositol affected on heat resistance of the amylase better than sugar alcohols which effects were in the order of mannitol, dulcitol and sorbitol.

3) Monosaccharides affected on heat resistance of the amylase in the order of mannose, galactose, xylose, glucose, arabinose, rhamnose and fructose.

4) Among oligosaccharides, the effects of increasing heat resistance were recognized in the order of melibiose, lactose, maltose and sucrose.

5) Polysaccharides showed the effects of increasing heat resistance in the order of glycogen, soluble starch and dextrin, while the effects of inulin were not recognized.

### 緒 言

細菌 amylase 를 澱粉液化痰劑로 使用하는 경우 그

力價와 耐熱性的 強弱은 가장 重要한 問題가 된다. 細菌 amylase 의 耐熱性에 關하여는 多數의 報文이 있으나 그들 研究의 代價는 이 問題를 斷片的으로 取扱한 것이다. 따라서 著者들은 細菌 amylase 의 耐熱性 強化에 關한 一連의 研究를 計劃하고 前報<sup>(1)</sup>에 calium 鹽 및 sodium 鹽의 影響을 報告하였다. 本報에서는 細菌 amylase 의 基質인 澱粉 및 그 外의 炭水化物和 alcohol 類의 耐熱效果를 檢討하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

### 實 驗

#### 1. 供試菌株 :

*Bacillus subtilis* var. M-181<sup>(2)</sup>

#### 2. 培養과 酵素液의 調製 :

前報<sup>(2)</sup>의 方法에 依하여 前培養과 本培養을 하였으나 本培養의 培地用水로는 蒸溜水를 使用하였고 本培養한 乾 koji 를 20 倍量의 蒸溜水로 室溫에서 3 時間 浸出한 濾液을 酵素液으로 하였다.

#### 3. 酵素液의 熱處理 :

前報<sup>(1)</sup>의 方法에 依하여 處理하였다. 即 同一한 試驗管 數個에 酵素液 1 ml(D<sub>40</sub><sup>20</sup> 1250/ml)를 取하고 一定量의 耐熱劑와 蒸溜水를 加하여 全量이 2 ml가 되도록 한다음 管口를 密閉하고 70°C 의 水浴中에서 10 分間 加熱處理하였다. 熱處理에 있어서 Buffer Solution 은 그 自體의 鹽類가 酵素의 耐熱性에 影響을 주므로 使用하지 않았으며 acetic acid 또는

mmonia 液으로 pH를 6.0으로 되게한 다음 加熱處理하였다.

#### 4. amylase의 力價測定 :

amylase의 活性度는 Wohlgemuth法으로 測定하였다. 即 McIlvaine Buffer pH 6.0, 作用溫度 40°C, 作用時間 30分間에 있어서 培養乾燥物 1g가 1% 可溶性澱粉液을 糊精化하는 液量(ml數)으로 表示하였다.

#### 5. 酵素力 殘存率 :

熱處理하지 않고 測定한 酵素活性을 100으로 하고 熱處理後의 殘存 酵素力을 %로 나타내었다.

### 實驗 結果

#### 1. Alcohol類의 影響

1價 alcohol, 2價 alcohol, 3價 alcohol類等を 酵

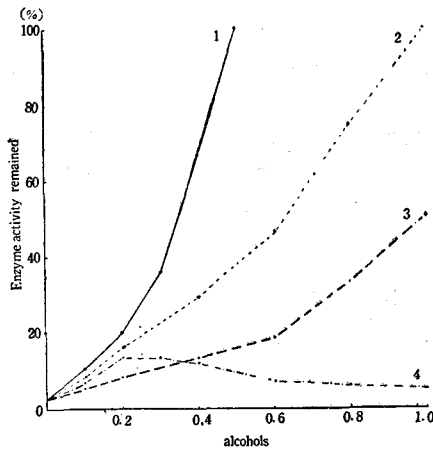


Fig. 1. Effect of alcohols on heat resistance of the amylase

- (1) glycerin (2) propyleneglycol  
(3) ethylene glycol (4) ethyl alcohol

sorbitol의 順으로 效果가 있었다. polyvinyl alcohol은 微量添加에 있어서는 거의 效果를 認定할 수 없었으나 100mg添加에 있어서 sorbitol程度의 效果가 있었고 그 以上の添加에 있어서는 高粘度 때문에 熱處理를 할 수 없었다.

#### 2. 炭水化物的 影響

各種炭水化物類를 糖 alcohol添加時와 同一하게 酵素液 1ml(D<sub>50</sub><sup>40</sup> 1250/ml)에 對하여 50—500mg添加하고 70°C로 10分間 加熱處理한 後 殘存 酵素力을 測定한 結果는 Fig. 3, 4와 같다.

素液 1ml(D<sub>50</sub><sup>40</sup> 1250/ml)에 對하여 0.1—1.0ml씩 添加하고 70°C로 10分間 加熱處理한 後 殘存 酵素力을 測定한 結果는 Fig. 1과 같다. 1價 alcohol類中에서는 ethyl alcohol과 methyl alcohol을 0.2—0.4ml添加했을때 耐熱性을 12—13%增加시켰으나 그 以上の添加에 있어서는 低下되었다.

또한 propyl 以上の 高級 alcohol은 모두 逆效果를 나타내었다. 二價 alcohol과 三價 alcohol은 어느 것이나 添加量의 增加에 따라 耐熱效果가 增加되었으며 glycerin, propylene glycol, ethylene glycol, 等の 順으로 效果가 있었다. 그러나 dipropylene glycol은 添加量의 多小에 關係없이 逆效果를 나타내었다.

다음에 inositol 및 糖 alcohol類를 酵素液 1ml에 對하여 50—500mg添加했을 때의 效果는 Fig. 2와 같다. 糖 alcohol도 添加量의 增加에 따라 耐熱效果를 增加시켰으며 inositol, mannitol, dulcitol,

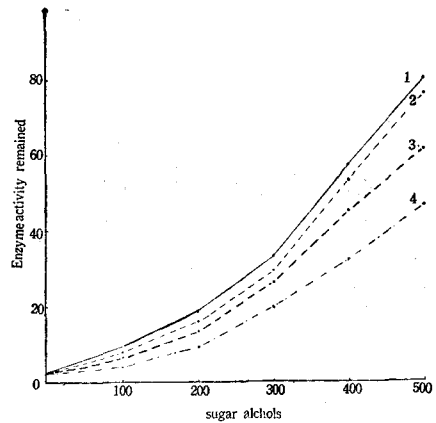


Fig. 2. Effect of sugar-alcohols on heat resistance of the amylase

- (1) inositol (2) mannitol  
(3) dulcitol (4) sorbitol

即 單糖類에 있어서는 manose, galactose, glucose, fructose 順으로 效果가 있었으며 五炭糖의 xylose와 arabinose는 glucose와 거의 같은 程度로 效果가 있었으나 xylose는 glucose보다 效果가 多小했으며 arabinose와 methyl pentose인 rhamnose는 glucose보다 效果가 多小 적었다.

多糖類에 있어서는 glycogen의 效果가 가장 顯著하여 酵素液 1ml에 對하여 50mg添加했을 때 거의 100% 殘存하였다. 다음에 starch, dextrin의 順으로 效果가 있었고 inulin은 500mg添加했을 때도 거의 效果가 없었다.

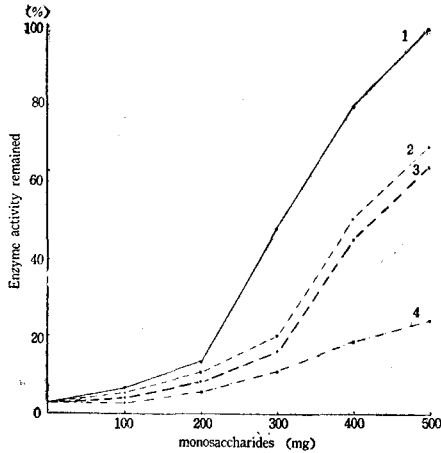


Fig. 3. Effect of monosaccharides on heat resistance of the amylase

- (1) mannose (2) galactose  
(3) glucose (4) fructose

二糖類中에서는 melibiose가 dextrin과 거의 같은 정도로 효과를 나타냈고 lactose, maltose, sucrose 등의 순으로 효과가 있었다. 三糖類인 raffinose는 sucrose보다 효과가 적었다. 또한 carboxy methyl cellulose는 酵素液 1 ml에 대하여 50 mg 추가했을 때 dextrin 정도의 효과를 認定할 수 있었으나 그 이상의 추가에 있어서는 高粘度 때문에 熱處理 및 殘存酵素力의 測定을 할 수 없었다.

### 考 察

calcium 또는 Sodium 등의 無機鹽類에 依한 細菌 amylase의 耐熱性 增加에 對하여는 많은 報告를 볼 수 있으나 carbohydrate의 耐熱效果에 對하여는 1933年 OPARIN等<sup>(3)</sup>이 malt amylase의 耐熱性에 있어서 sucrose의 濃度가 增加함에 따라 熱에 對한 保護作用이 增大한다는 報告를 한바 있고 福本<sup>(4)</sup>도 *Bacillus amyloliquefaciens*의 amylase에 對하여 sucrose와 같은 效果를 認定한바 있다. 또 西田等<sup>(5)</sup>은 糖化型 細菌 amylase의 pH 定定性에 있어서 小量의 澱粉 또는 maltose, glucose 등이 共存하면 安定性이 增加된다고 한바 있으며 LEVITZKI等<sup>(6)</sup>은 結晶糊狀  $\alpha$ -amylase에 小量의 dextrin 또는 glycogen을 加하여 不溶性의 complex를 형성시키고 이것의 性質에 對하여 報告한바 있다.

著者等은 *Bacillus subtilis* var. M-181이 生産한 amylase의 耐熱性에 미치는 各種 alcohol類와 炭

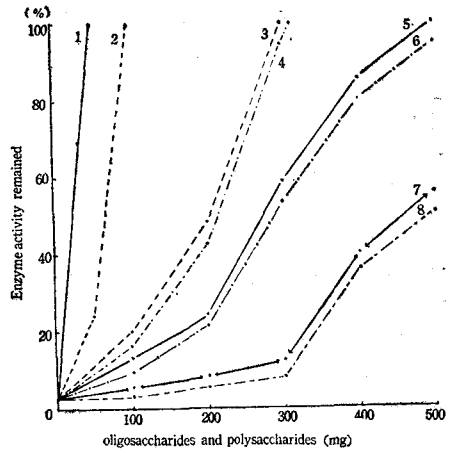


Fig. 4. Effect of oligosaccharides and polysaccharides on the heat resistance of amylase

- (1) glycogen (2) soluble starch  
(3) dextrin (4) melibiose  
(5) lactose (6) maltose  
(7) sucrose (8) raffinose

水化合物에 對하여 實驗한 結果, 一價 alcohol에 있어서는 ethyl alcohol과 methyl alcohol이 一定量의 範圍에서 耐熱性을 增加시키는 效果가 있었으나 그 以上添加하는 添加量의 增加에 따라 오히려 逆效果를 나타내었다. 一價 alcohol中 propyl 以上の 高級 alcohol은 量의 多小에 關係없이 모두 逆效果를 나타내었다. 二價 alcohol, 三價 alcohol은 添加量의 增加에 따라 耐熱效果가 增加되었으며 特히 glycerin은 效果가 顯著하였다. 그러나 dipropylene glycol은 逆效果를 나타 내었다. alcohol類에 있어서는 一般의으로 OH基數에 따라 耐熱效果가 커진다고 생각된다.

糖 alcohol 및 炭水化合物은 添加量의 增加에 따라 耐熱效果가 增加되었으나 種類에 따라 耐熱效果가 크게 달랐다. 特히 poly saccharide中 glyrogen의 效果는 顯著的한 데 反하여 inulin의 效果는 거의 認定할 수 없었다. 또 小糖類에 있어서는 sucrose와 raffinose, 單糖類에 있어서는 fructose가 다른 糖類에 比하여 效果가 작았다. glycogen이 starch나 dextrin보다 耐熱性이 큰것은 glycogen의 多數分枝의 構造와 關聯이 있는 것으로 생각된다. 그리고 Fructose 및 Fructose를 構成成分으로 하는 Sucrose, Raffinose가 다른 單糖類나 小糖類에 比하여 耐熱效果가 매우 멀어지며 Fructose로 되는 多糖類인 Inulin의 耐熱效果가 거의 없는 것은 Ketose인 Fructose의 特異構造에 基因하는 것으로 생각된다.

Alcohol 및 炭水化合物이 amylase의 耐熱性を 增加시키는 것은 酵素蛋白質의 amino 基 또는 imino 基에 이들의 OH 基가 結合되어 熱에 依한 變性으로부터 保護하는 것이라고 생각된다. 福本<sup>(7)</sup> 등은 細菌 amylase의 活性에는 phenol 基가 必須의이고 amino 基의 一部는 活性에 直接關與하지는 않으나 酵素蛋白質의 安定性 등에 關係한다고 報告한바 있다. 細菌 amylase의 基質 또는 基質類似物質은 그 構造에 따라 酵素蛋白質의 amino 基 또는 imino 基와 結合하는 程度가 다르나 一但 結合하면 安定性を 增加하는 것으로 생각된다.

### 要 約

*Bacillus subtilis* var. M-181 生産한 amylase의 耐熱성에 미치는 alcohol 類와 炭水化合物의 影響을 檢討하였다. 그 結果는 다음과 같다.

1. Alcohol 類에서는 glycerin, propylene glycol, ethylene glycol, ethyl alcohol, methyl alcohol 등의 順으로 耐熱性增加의 效果가 있었으며 高級一價 alcohol 과 dipropylene glycol 은 逆效果를 나타냈다
2. Inositol 은 糖 alcohol 보다 效果가 컸으며 糖 alcohol 中에서는 mannitol, dulcitol, sorbitol 의 順

으로 耐熱效果가 있었다.

3. 單糖類에서는 mannose, galactose, xylose, glucose, arabinose, rhamnose, fructose 등의 順으로 耐熱效果가 있었다.

4. 小糖類에서는 melibiose, lactose, maltose, sucrose, raffinose 등의 順으로 耐熱效果가 있었다.

5. 多糖類에서는 glycogen, soluble starch, dextrin 등의 順으로 耐熱效果가 있었으며 inulin 의 耐熱性 增加效果가 認定할수 없었다.

### 文 獻

1. 朴允仲, 李漢昌, 李錫健, 本誌 9, 105 (1968)
2. 李錫健, 李漢昌 : 韓國微生物學會誌 2, 19(1964)
3. A. I. Oparin and S. Manskaya. Biochem. Z., 260, 170 (1933)
4. 福本壽一郎 : 日農化誌 19, 853 (1943)
5. 西田曉正, 福本壽一郎 : 山本武彦 : 日農化 1967 年 大會 講演要旨
6. A. Levitzki and M. Schramm. Bull. Res. coune, of Israel, 11A4 258 (1963)
7. 福本壽一郎, 山本武彦 熊田順一, 辻阪好夫 : Symposia on Enzyme chemistry 11, 74 (1956)