

澱粉利用에 관한 研究 (第 1 報)

Starch Agar-gel-plate를 이용한 Amylase 活性 測定法

延世大學校 理工大學 食品工學科

柳洲鉉 · 秋慶姬* · 洪允命* · 有馬啓**

(1969年 6月 25日 受理)

Studies on Application of Starch

Part I. Action of Amylase on Starch Agar-gel-plate

by

Juhyun Yu, Kyung Hee Chu, Yun Myung Hong, and K. Arima

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

(Received June 25, 1969)

Abstract

The amylase was incubated in a 9mm hole on the starch agar gel plate bored with a cork borer. When 0.1N-iodine solution sprayed on the plate, the formed uncolored zone were observed. An activity of amylase has been determined by measurement of diameter of the uncolored zone. We named this method "cork borer method".

When amylase was incubated on the starch agar gel plate, the following points were obtained.

- 1) The optimum pH for the formation of the zone in case of amylases(Biotex, Spitase) which produced by *Bacillus* is neutrality and alkali, while that for Glucoamylase, Biodiase, and Mucor-rennin which produced by *Rhizopus* and *Mucor* is from 5 to 7.
- 2) The diameter of the zone was increased by the incubation time and amylase activity.
- 3) The zone was easily formed at low level of starch concentration and was formed much bigger than at 50°C than at 10°C.

From the above results, after making the starch agar gel plate, keeping constant concentration of the starch, the measurement of amylase activity is in efficiency upon the constant reaction time and temperature.

序 言

農産物加工·製藥原料·紡織工場の糊拔劑 등, amylase의 用度는 날로 늘어나고 있다. 따라서, 수많은 微生

* 延世大學校 理工大學 化學工學科(Dept. Chem. Engin., Yonsei Univ., Seoul)

** 東京大學校 農學部 農藝化學科

物菌 중에서, 이 酵素의 生産量이 많은 菌을 選別하는 데는 보다 간편한 方法이 요구되고 있다. Amylase 活性의 測定法으로서, 化學藥品·機器分析 등에 의해서 측정하는 方法이 있다. 抗生物質의 檢定法으로 알려져 있는 "cup method"⁽¹⁻³⁾ 또는, "paper disk test"⁽⁵⁾ 등의 方法은 amylase, protease, cellulase, lipase, pectinase⁽⁶⁾ 등의 活性測定에 刑用되고 있다. 뿐만 아니라, casein-agar gel을 이용하여 cheese製造用 酵素

와 다른 protease를 구별하는 方法, 또 凝乳活性的의 測定法 등에 대해서도 많은 연구가 되어 있다⁽⁷⁾.

이에 대하여 本 實驗에서 利用한 方法은 "cork-borer method"이다.

著者는, 위의 方法을 利用하여, starch-agar-gel-plate 上에서, 보다 간편하고 능률있게 amylase의 活性을 測定할 수 있는 方法에 關係서 檢討하고, 그 結果에 대해서 論하고자 한다.

實驗方法

1. Starch-agar-gel-plate 의 調製法 및 amylase 活性測定法

寒天 3.6g, 澱粉 3.0g을 97ml의 물에 넣어 끓여서 완전히 녹힌 다음 이 寒天板과 준비한 Michaelis' buffer (pH 3.2~6.2)⁽⁸⁾ 또는 Clark & Lubs' buffer (pH 6.0~10.0)⁽⁹⁾를 1:1의 비로 혼합하여 각 pH의 澱粉寒天液을 만든다.

이 液 30ml를 50ml 試驗管에 넣어 살균한 다음, 乾熱滅菌한 直徑 9cm의 petrodish에 부어 starch-agar-gel-plate 를 만든다. 이 gel板에 直徑 9mm의 cork borer로써 Fig.1과 같이 구멍을 뚫고 그 안에 酵素液을 0.08ml씩 注入하여 incubator에서 反應시킨다. 一定한 時間동안 反應시킨 後, 0.01N-Iodine 液으로 착색시켰을 때, 酵素가 反應한 부분에 착색되지 않는 圓形의 zone이 생긴다. 이 圓의 直徑 및 넓이를 測定해서, amylase活性和의 關係를 검토하였다(Fig.1).



Fig. 1. Starch-agar-gel-plate petrodish

2. 酵 素

使用한 酵素는, 三中物産Co. 製品인 Spitase(15 uni./g), 日本 天野製藥會社製品인 biotex (15.5 unit/g), gluco-amylase (16 unit/g), biodiase (20.3 unit/g) 및 日本 名糖産業會社의 mucor-rennin (16.3 unit/g)을 각각 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%의 酵素液으로 만들어서 使用하였다.

3. Amylase의 活性測定法

各 酵素의 活性測定은, Willstätter-Schudel method⁽¹⁰⁾ 中 iodine method로서 測定하였다. Spitase, biotex,

gluco-amylase, biodiase, mucor-rennin 등, 酵素를 각각 0.1%, 0.01%液으로 만들어 4°C에서 12時間 동안 放置해 둔 다음, 各 sample을 5cc씩 취한다. 여기에 다 0.1N-I₂液 10ml와 0.1N-NaOH 25ml를 넣어 잘 섞은 다음, 1N-H₂SO₄ 5ml를 加해서 反應을 정지시킨다.

0.05N-Na₂S₂O₃ 로써 I₂의 色이 無色이 될 때까지 적정해서, 그 소비량으로 amylase 力價를 測定했다.

實驗結果

1. Clear zone 生成에 있어서 澱粉濃도가 미치는 영향

澱粉濃度 1.0~2.25%의 범위에서 각 濃度別로 pH 를 조절하여 starch-agar-gel-plate를 만든 다음, 一定한 力價의 biodiase, biotex, spitase, gluco-amylase, mucor-rennin 등 酵素를 注入시켜, 37°C에서 24시간 동안 反應시킨 다음, 生成된 無着色 zone의 直徑과 澱粉濃度와의 關係를 檢討하였다.

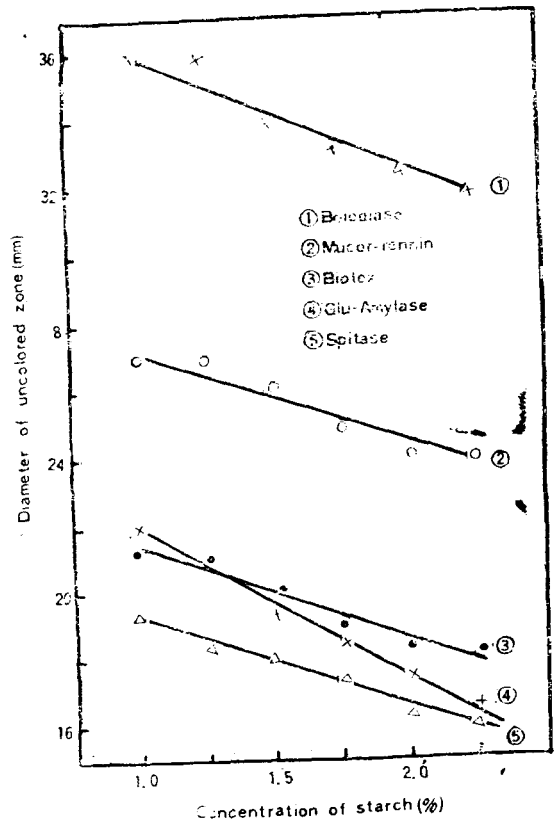


Fig. 2. The effects of starch concentration on the uncolored zone formation.

Fig. 2에 表示한 바와 같이, 澱粉의 濃度가 進해질수록, 無着色 zone의 直徑은 작아진다. 즉, 澱粉濃度와 無着色 zone과의 사이에는 서로 반비례의 관계가 있음을 알 수 있다. 澱粉濃度가 낮을수록 無着色 zone이 깨끗하게 形成되고 直徑이 커지나, 澱粉濃도가 進해지면 直徑이 작아질 뿐만 아니라, 때에 따라서는 二重의 圓을 나타낼 때도 있다. 그러므로 以後의 實驗에서는 1% starch-agar-gel-plate를 使用하기로 한다.

2. 無着色 zone 生成에 있어서 pH가 미치는 영향

各 pH로 調製한 starch-agar-gel-plate를 만들어, 一定한 酵素를 反應시켜서, pH가 미치는 영향에 대해서 조사하였다.

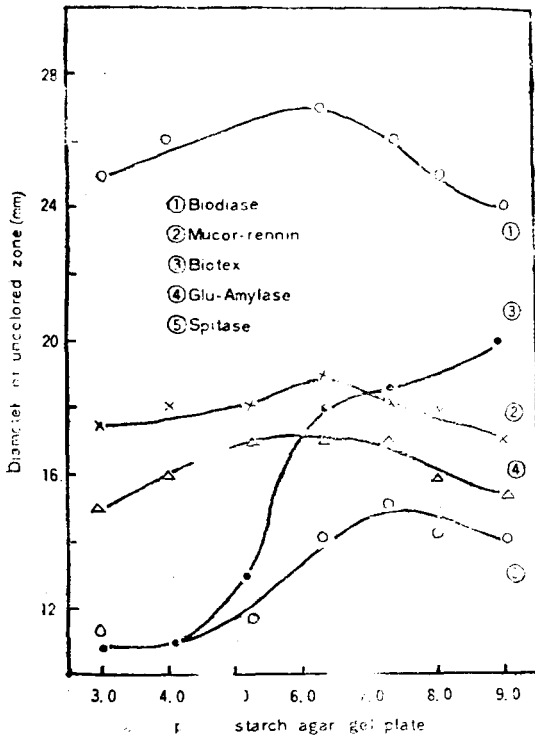


Fig. 3. The effects of pH on the uncolored zone formation

Fig. 3에 表示한 바와 같이, *Bacillus* 菌이 生産하는 alkali性 amylase로 알려져 있는 spitase, biotex 등의 作用으로 形成된 clear zone의 直徑은, 酸性 starch-agar-gel-plate 上에서는 약간 形成될 뿐이고, 弱alkali에서는 커지고 있다. 그러나 酸性 amylase로 알려져 있

는 *Mucor-pusillus*가 生産하는 mucor-rennin, *Rhizopus*가 生産하는 gluco-amylase 등에 있어서는, 無着色 zone을 形成하는 最適 pH는 5~7의 범위이다. *Rhizopus delemar*가 生産하는 amylase의 最適 pH는 5.4~7.0의 범위이고⁽¹¹⁾, *Bacillus amylase*가 生産하는 amylase의 澱粉分解時, 最適 pH는 4.8~8.6 이라고 報告되어 있다⁽¹²⁾.

이것을 보더라도, starch-agar-gel-plate 上에서, amylase의 作用에 미치는 pH의 영향에 대하여 검토한 결과는 다른 方法에 의한 結果와도 같음을 알 수 있다. 그러므로 starch-agar-gel-plate를 利用하여 amylase의 活性測定이 可能함을 알 수 있다.

3. 無着色 zone 生成에 있어서 反應時間이 미치는 영향

澱粉濃度 1.0%, pH 5.5의 starch-agar-gel-plate를 만들고, 37°C에서 各 時間동안 反應시켜 反應 時間의 變化에 따르는 無着色 zone 直徑의 크기 變化를 검토하고 그 結果를 Fig. 4에 나타내었다.

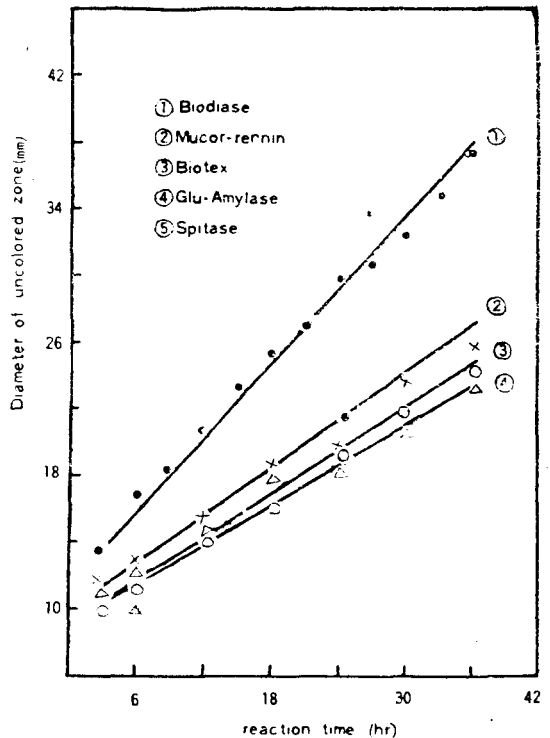


Fig. 4. The effects of reaction time on the uncolored formation

즉, 어떠한 酵素에 있어서든지 反應時間이 오래될수록 無着色 zone의 면적이 증가되고 있다. 이 결과는, 일반적인 分析法으로 分析했을 때, 細菌 *Rhizopus*⁽¹²⁾, *Aspergillus*^(11,12), *Endomycopsis*,^(11,13) *Neurospora*⁽¹¹⁾ 등의 amylase 및 麥芽의 酵素도 역시 反應時間에 따라 分解力이 증가한다는 結果와 一致한다.

4. 無着色 zone 生成에 있어서 反應溫度가 미치는 영향

1.0% starch-agar-gel-plate (pH 5.5)를 만들어서 各 濃度の 酵素를 注入하여 14時間 동안 各 溫度에서 反應시킨 다음 生成된 無着色 zone 直徑의 크기로, 溫度變化에 따른 영향을 검토하였다.

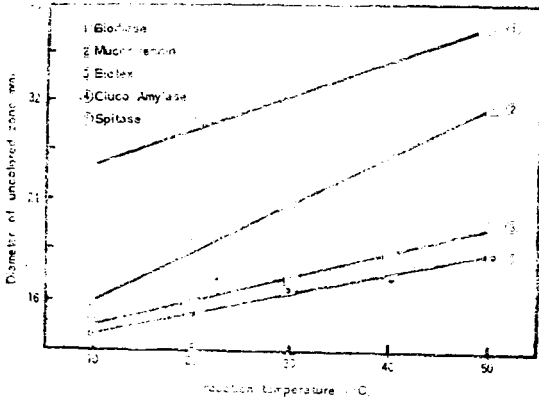


Fig. 5. The effects of reaction temperature on the uncolored zone formation

Fig. 5에 表示한 바와 같이, 無着色 zone의 形成은 各 溫度에 따라 다르고 10°C에서보다 50°C에서 反應시킨 것이 無着色 zone의 直徑이 크게 됨을 알 수 있다.

5. 無着色 zone 生成에 있어서 amylase力價가 미치는 영향

Starch-agar-gel-plate上에서, 澱粉濃도와 反應時間 및 反應溫度에 따라 生成되는 無着色 zone의 크기가 달라짐은 이미 앞에서 言及한 바 있다.

그러므로 starch-agar-gel-plate로서 amylase의 活性을 測定하려면, 먼저 이들의 各 조건을 一定하게 할 必要가 있다. 전분농도 1.0%, pH 5.5의 starch-agar-gel-plate를 만든 다음, 各 濃度の 酵素를 注入하고, 이것을 37°C에서 24時間 동안 反應시킨 다음, clear zone 形成과 amylase 力價와의 關係를 검토하였다.

어떠한 酵素나 amylase의 活性에 따라 形成된 無着色 zone의 크기도 달라진다. 즉, 이때에 形成되는 無着色 zone의 直徑은 amylase 活性의 對數에 比例한다.

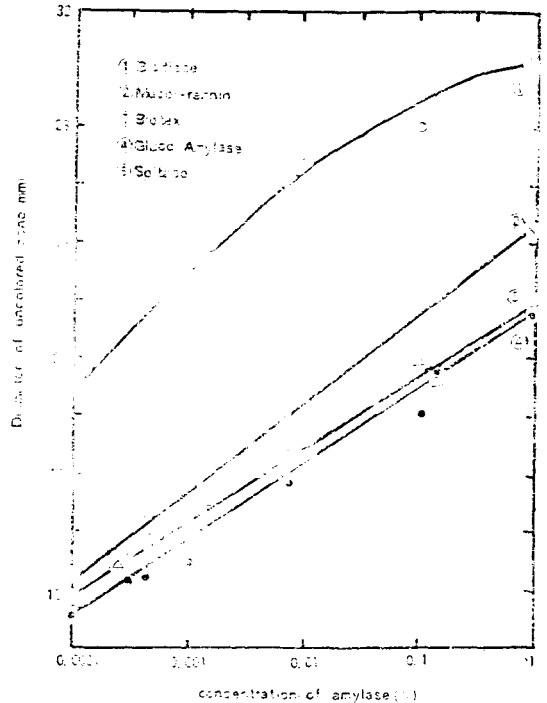


Fig. 6-1. The effects of amylase activity on the uncolored zone formation

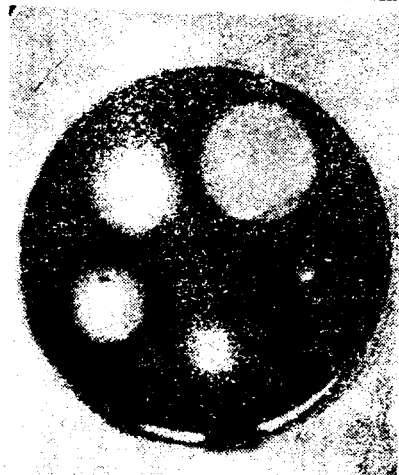


Fig. 6-2

考 察

Starch-agar-gel-plate 上에서 amylase를 使用한 後 iodine 液으로 착색反應을 시켰을 때 착색되지 않는 無着色 zone의 形成은 gel의 pH, 澱粉濃도에 따라 다르고, 또 反應時間 · 反應溫度 · amylase力價 등의 외부조건에 따라 變化함을 알 수 있다.

이들의 結果는 amylase의 力價測定法으로 알려져 있는, Blue value method,⁽¹⁴⁾ Willstätter-Schudel method⁽¹⁰⁾, Smith method⁽¹⁵⁾, Schimmer method⁽¹⁶⁾ 등으로 檢討된 amylase의 性質의 結果와 일치하였다. 各 濃度의 酵素, 즉, amylase 力價가 다른 酵素를 starch-agar-gel-plate 上에서 反應시켰을 때 形成되는 無着色 zone의 直경은 amylase의 力價에 對數比例한다.

그러므로 無着色 zone의 直경을 D , amylase의 活性을 A , 酵素를 注入하였을 때의 구멍의 面積을 D_0 , 無着色 zone 形成係數를 k 라고 하면,

$$D = k \log A + D_0$$

의 式이 成立된다.

이 結果로 인하여 抗生物質의 檢定法과 같이 amylase 力價를, starch-agar-gel-plate를 使用하여 cork borer method로써 測定할 수 있음을 알았다.

따라서 이 方法은 수 많은 微生物菌 中에서 amylase 生産菌을 選別하는데 있어서 신속하고도 能率있게 力價를 測定할 수 있는 方法이라 하겠다.

要 約

本 實驗에서는, amylase 活性을 測定하기 위하여 starch-agar-gel-plate를 만들어 cork borer 로써 9mm의 구멍을 뚫고, 各 濃度의 酵素를 注入하여 一定한 溫度에서 一定한 時間동안 反應시킨 후, 0.1N-iodine 液으로 分解하지 않은 starch를 착색시켜, 착색안된 無着色 zone의 直경을 測定해서 비교 검토한 것으로서 이 方法을 "cork borer method" 라고 칭하였다. starch-agar-gel-plate 上에서의 無着色 zone 形成의 最適 pH는, *Bacillus* 菌이 生産하는 amylase인 biotex, spitase 등은 中性 내지 알칼리性에서, 糸狀菌이 生産하는 호소인 mucor-*rennin*, gluco-amylase, biodiase 등 에 있어서는 pH 5~7의 범위이다. 無着色 zone 形成直경은 전분濃도가 적을수록 유리하고, 反應時間이 길수록, amylase activity가 강할수록 커진다.

한편 反應溫度에 의한 영향은 10°C보다 50°C에서 無着色 zone이 크게 形成된다. 따라서 starch 溫度 및 pH가 一定한 starch-agar-gel-plate를 만들고, 反應時

間·反應溫度 등을 일정하게 하여주면 amylase activity를 能率있게 測定할 수 있다.

끝으로 本 研究를 위하여 研究費를 支給하여주신 聯合財團과 大學院長 李吉相博士, 또 酵素를 제공하여 주신 三中酵素工業株式會社의 金東振社長, 天野製藥株式會社(日本) 등의 여러분께 진심으로 감사드립니다.

References

- (1) G.L. Peltier, F.R. Schrieder: *J. Bact.*, **51**, 127(1949)
- (2) 古武孫久 等: 農化, **24**, 36 (1950)
- (3) B.S. Luila, M. Sreenivasaya: *J. Sci. Ind. Research* **4**, 449 (1946)
- (4) T. Tamagawa: *Chem. Abstract*, **45**, 1188 (1951)
- (5) 醫藥 및 生物學, **17**, 162 (1950)
- (9) E. Stark, R. Willerson, J. P.A. Tetraut, C.F. Kossack: *Appl. Microbiol.*, **1**, 236 (1953)
- (7) J. Dingle, W.W. Reid, G.L. Solomons: *J. Sci. Food Agr.*, **4**, 149 (1953)
- (8) J. Yu, G. Tamura, K. Arima: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **43**, 6 (1959)
- (9) Michaelis: *Die Wasserstoffionenkonzentration*, p. 185(1914)
- (10) Clark and Lubs: *J. Bact.*, **2** (1), 109, 191, (1917)
- (11) Willstätter R., Schudel G.: *Ber.*, 51 (1918)
- (12) 福本壽一郎: *Proceeding Symp. on Amylase*, 33 (1955)
- (13) 林田善策: *Proceeding Symp. on Amylase*, 98 (1955)
- (14) 辻阪好夫, 福本壽一郎: *Proceeding Symp. on Amylase*, 67(1965)
- (15) H. Fuwa: *J. Biochem.*, **41**, 583 (1954)
- (16) G.N., Smith. L. Stocker: *Arch. Biochem.*, **21**, 59 (1949)
- (17) S. Schimmer: *Cereal Chem.*, **18**, 237 (1941)