

세제 배합용 Amylase 및 Protease 에 관한 연구

연세대학교 이공대학 식품공학과

김 유 삼* · 홍 윤 명* · 유 주 현

(1970년 9월 5일 受理)

Studies on Amylase and Protease as an Additive Material to the Synthetic Detergent

by

Yu-sam Kim*, Yun Myung Hong*, and Juhyun Yu

Dept. of Food Eng., College of Science and Engineering, Yonsei University

(Received Sept. 5, 1970)

Abstract

The crude enzyme, tamlase, was produced by cultivating the *Bacillus subtilis* on wheat bran. It is composed of amylase and protease, and can be used as an additive material to the synthetic detergent, Suny which is manufactured by Ae-kyung Oil and Fat Co.

Amylase activity of the enzyme as an additive material to the synthetic detergent;

1. is decreased by increasing the amount of detergent. But inhibitory rate under the practical used concentration of detergent is less than ten percents.
2. have optimal temperature at 40°C.
3. have optimal pH of substrate on pH 5~6.5.
4. is inhibited by Fe⁺⁺⁺.

When enzyme and detergent are mixed both as powder, the enzyme is good for storage.

Proteolytic activity is good at the practical used concentration of the detergent, but it is inhibited by strong concentration.

서 언

중래의 세제로 세탁을 할 때, 특히 식기류를 씻는데 있어서 가장 큰 결함은 단백질 및 전분의 오물을 처리하는 것이다. 이러한 점을 개선하기 위하여 세제에 amylase 및 protease를 배합함으로써 세탁효과를 높이겠다는 착상은 1930년경 스위스의 세제공장에서 시도되었고 1963년에는 스위스의 Schnieder사에서 최초로 가

정용 합성세제에 효소를 배합하여 판매하게 되었다⁽¹⁾. 이러한 제품의 효과가 인식되어 구미 각국에서는 효소 배합합성세제가 급속히 보급되었고 또 이와 같은 세제 배합용 효소의 개발이 활발히 진행 되어왔다.

*Bacillus subtilis*는 오래 전부터 강력한 protease 및 amylase를 생산하는 균주로서 알려져왔으며 또 그 용도가 광범하게 이용되어 왔다⁽²⁻⁷⁾. 이러한 효소를 세제와 배합하여 사용할 때 세제에 의한 효소활성의 저해가 적으며 우수한 결과를 가져올 수 있다는 것이 알려져 있다⁽¹⁾.

국내에서는 여기에 대한 연구가 없고 삼중효소공업

* 연세대학교 이공대학 화공과(Dept. of Chem. Eng., Yonsei Univ.)

주식회사에서 제조, 판매되고 있는 세탁용 예침제 “비오푸라제”라는 상명의 효소가 있을 뿐이다.

저자들은 합성세제와 배합하여 사용할 수 있는 효소의 국내개발을 목적으로 삼중효소공업주식회사제 amylase 와 protease 가 혼합되어있는 세균기원의 효소, tamlase 를 선정하여 여러가지 조건에서의 효소활성을 측정하여 합성세제의 배합하여 사용할 수 있을 것인지의 여부를 검토하였다.

그러나 세제배합용 효소로서의 요구조건인 몇 가지 점, 즉 세제사용조건에서 충분한 효소활성을 유지해야 된다는 것, 효소에 의한 세탁물의 변질이 없어야 한다는 것, 취급상에서 효소로 인한 발진성이나 피부자극이 없어야 한다는 것 등 여러가지 문제점 중 본보에서는 주로 세제 사용조건에서의 효소활성 및 저장성 등에 관하여 연구 검토하였고 그 결과에 대하여 보고하는 바이다.

실 험

재료 : 효소는 삼중효소공업주식회사제 “Tamlase”로 amylase 와 protease 가 혼합되어 있는 세균기원 효소이다(8,9).

합성세제는 여러종류의 시판제품 중 예비실험을 하여 “씨니” 및 “트리오”를 사용하였다.

Amylase 활성측정법 : D. U. N. 법 (Dextrinogenic Unit of Nagase)(10)을 사용하였으며 0.01% tamlase 수용액 1ml와 세제수용액 1ml를 혼합하고 동일한 온도로 유지된 전분용액 3ml를 가하여 반응시킨 후 2NHCl 2ml를 가하여 반응을 정지시키고 0.01N I₂ 용액 1ml를 가함으로써 발색된 시료를 UV & VIS spectrophotometer (HITACH MODEL 101)로서 파장 660mμ에서 흡광도를 측정하였다.

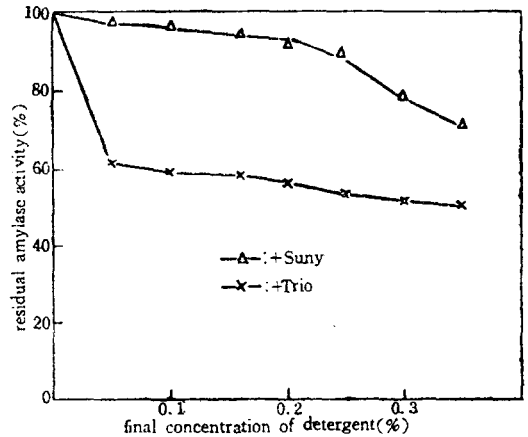
Protease 활성측정법 : Casein agar gel plate를 사용한 paper disc method와 cork borer method(11,12)를 사용했다. 즉, 1% milk casein agar gel을 만들어서 petri dish에 두께 2mm 되도록 평판을 만들었다. Paper disc method에서는 앞에서와 같이 제조된 casein agar gel plate 상에 시료가 흡착된 직경 7mm 되는 여과지의 paper disc를 놓고 30°C에서 70시간 반응시킨 후 paper, disc 주위에 형성되는 clear zone의 직경을 측정하였다.

실험결과 및 고찰

Amylase 활성

합성세제에 의한 영향 : 합성세제로 선택한 “씨니” 및

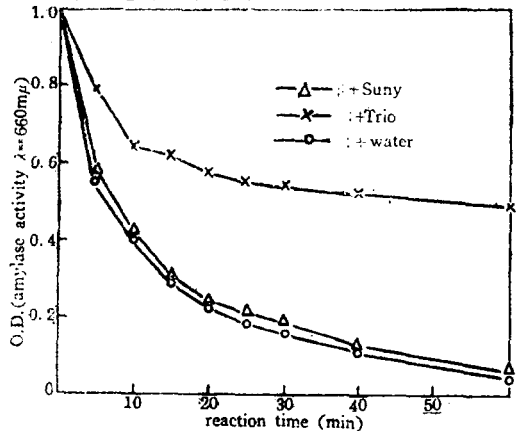
“트리오”의 농도는 그 실제 세탁에 사용 하는 농도, 즉, 0.2% 부근으로 희석되도록 조정하였으며 세제를 가하지 않았을 때 갖는 효소활성을 100으로하고 대응하는 값을 계산한 결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 세제의 농도가 짙어질수록 효소의 활성이 감소한다는 것을 알 수있었고 세제의 실제 사용농도인 0.2% 부근에서 “씨니”의 경우에는 90% 이상의 활성을 유지하고 있으나 “트리오”에서는 60% 이하로 감소되는 것을 알 수 있었다.



반응시간 ; 40°C, 반응시간 ; 15분, 기질의 pH 7.0 * concentration for practical use

Fig. 1. 합성세제에 의한 영향

반응시간에 의한 영향 : 세제의 농도를 0.2%가 되도록 효소액과 혼합하였을 때, 반응시간은 세제의 첨가에 크게 영향이 없이 공통적으로 30분 이내에 잔존활성의 90% 이상을 발휘하게 된다는 것을 알 수 있었다.

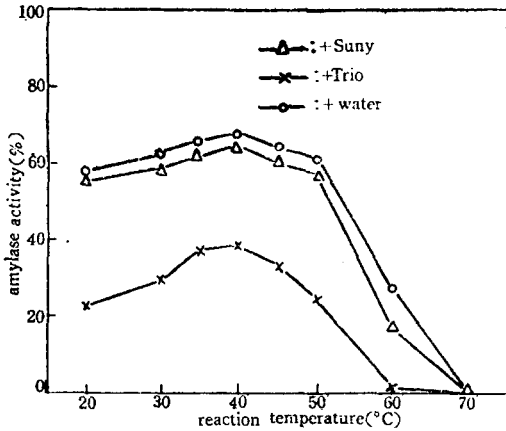


반응온도 ; 40°C, 세제의 농도 ; 0.2%, 기질의 pH ; 7.0

Fig. 2. 반응시간에 의한 영향

반응온도에 의한 영향 : 세제를 가하지 않았을 때와 가

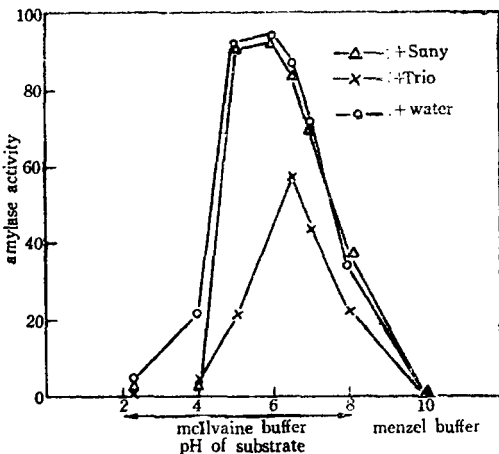
했을 때, 반응온도를 여러가지로 변화시켜 본 결과, 공통적으로 40°C 전후에서 활성이 컸었고 20°C에서도 상당한 활성을 유지하고 있으나 70°C에서는 효소의 활성이 완전히 소멸되었다. 이것은 상온세탁에도 상당한 효과를 얻을 수 있다는 것을 증명해 주는 결과가 될 것이다.



반응시간 ; 15분, 세제의농도 ; 0.2%
기질의 pH ; 7.0

Fig. 3. 반응 온도에 의한 영향

기질의 pH 에 의한 영향 : 기질로 사용한 전분액에 Mc Ilvain buffer 와 Menzel buffer 를 써서 여러가지의 pH 로 조정 한 다음 반응을 시켰을 때, 효소활성은 세제를 가하지 않았을 때와 “씨니”용액을 가했을 때는 pH 5 ~ 6.5 사이에서 활성이 높았으나 “트리오”용액을 가했을 때는 pH 6 에서 높고 산성이나 염기성이 높아질수록 그 활성이 현저히 감소함을 보여주었다.



반응온도 ; 40°C, 반응시간 ; 15분
세제의 농도 ; 0.2%

Fig. 4. 기질의 pH 에 의한 영향

금속 ion 의 효과 : 효소가 세제와 혼합되었을 때, 금

속 ion 들이 미치는 영향을 검토하기 위하여 반응시의 농도가 10⁻³mole 되도록 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Fe⁺⁺⁺ ion 들을 첨가 시켰을 때의 흡광도를 측정하여 비교, 검토하였다. 그 결과 효소에 세제를 가하지 않았을 때나 가했을 때나 똑같이 Fe⁺⁺⁺ ion 에 의해서 활성의 저해를 받게 된다는 것을 알 수 있었다.

Table 1. 금속 ion 의 효과

반응온도 ; 40°C, 반응시간 ; 15분, 세제의 농도 ; 0.2%, 기질의 pH 7.0

| Metalic ions | Concentration (mole) | O.D. (λ=660mμ) | | |
|--|----------------------|----------------|--------|-------|
| | | +Water | +Sunny | +Trio |
| Ca ⁺⁺ (CaCl ₂) | 10 ⁻³ | 0.042 | 0.063 | 0.261 |
| Mg ⁺⁺ (MgCl ₂) | 10 ⁻³ | 0.043 | 0.093 | 0.282 |
| Fe ⁺⁺⁺ (FeCl ₃) | 10 ⁻³ | 0.058 | 0.097 | 0.332 |
| Control | — | 0.043 | 0.060 | 0.240 |

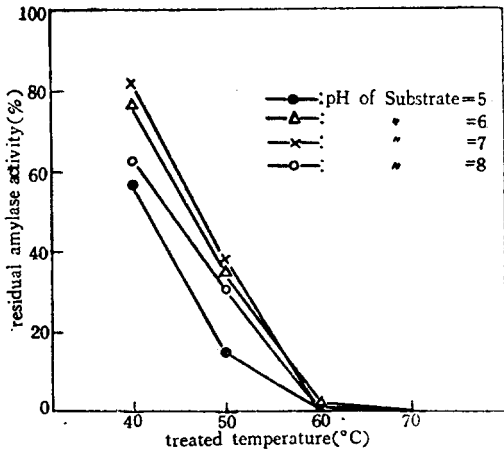
저장성 : Tamyase 와 세제를 배합했을 때의 저장성을 검토할 목적으로 수용액 상으로의 저장방법과 분말 상으로의 저장방법을 채택하였다. 즉, 1% “트리오” 수용액 1 ml 와 0.01% tamyase 수용액 1 ml 씩을 혼합하여 저장한 것과 또 1% “씨니”수용액을 혼합한 것, 또 “씨니”분말과 tamyase 분말을 혼합한 것을 30°C 의 incubator 에 넣어두고 3일간 같은 시각에 시료를 취하여 반응시킨 후, 흡광도를 측정해 본 결과, 분상저장시에는 amylase 활성의 감퇴를 측정할 수 없었으나 액상 저장시에는 현저한 활성의 감소를 보여 주었다.

Table 2. 저장성

반응시간 ; 15분, 반응온도 ; 40°C, 세제의 농도 ; 0.2%, 기질의 pH ; 7.0

| Detergent | Storing time | O.D.(λ=660mμ) | | | |
|---------------------------------|--------------|---------------|-------|-------|-------|
| | | Start | 24hr | 48hr | 72hr |
| Tamyase(soln.)+ Trio (soln.) | | 0.421 | 0.485 | 0.505 | 0.575 |
| Tamyase(soln.)+ Sunny (soln.) | | 0.053 | 0.064 | 0.072 | 0.077 |
| Tamyase(powder)+ Sunny (powder) | | 0.078 | 0.077 | 0.078 | 0.078 |

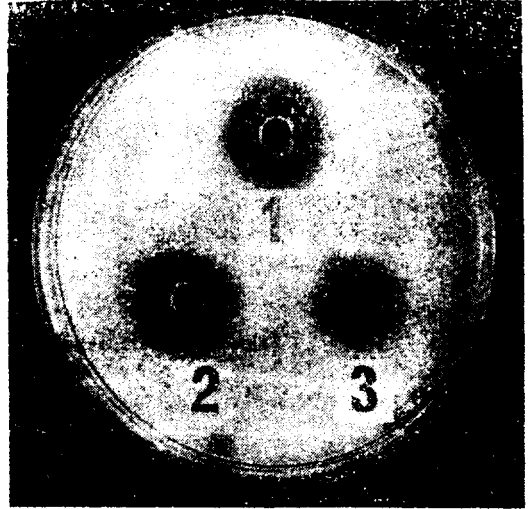
Tamyase 의 열 안정성 : 세제를 가하지않은 tamyase 수용액을 각 온도에서 30 분간 처리한 다음, 다시 실온으로 냉각시켰다가 활성을 측정해 본 결과, 50°C, 60°C 로 온도가 높아짐에 따라서 급격히 amylase 의 활성이 감퇴되어 60°C 에서는 거의 완전히 활성을 소실했고, 70°C 에서는 전혀 활성을 측정할 수가 없었다. 이것은 열에 의한 효소 단백질의 변성에 기인한 것으로 간주된다.



처리시간; 30분, 반응온도; 40°C, 반응시간; 15분

Fig. 5. Tamylase 의 열안정성

Protease 활성에 관한 합성세제의 영향 : Paper disc method 및 cork borer method 에 의하여 protease 활성을 측정해 본 결과는 Table 3 및 Fig. 5에 나타난 바와 같으며 세제 사용농도에서는 효소활성의 저해현상을 측



반응온도; 30°C, 반응시간; 70hr
1 = +water, 2 = +Sunny, 3 = +Trio

Fig. 6. Cork borer method 에 의한 protease 활성

정할 수 없었으나 세제의 농도가 짙어질수록 활성이 감소함을 알 수 있었다.

Table 3. Paper disc method 에 의한 protease 활성

반응온도; 30°C, 반응시간; 70 hr

| Final concentration of detergent(%) | Control | 0.125 | 0.25 | 0.375 | 0.50 | 0.625 | 0.750 | 0.875 |
|-------------------------------------|---------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|
| +Trio (Dia. mm) | 18 | 16 | 15 | 14 | 14 | 13 | 12 | 12 |
| +Sunny (Dia. mm) | 18 | 18 | 18 | 17 | 18 | 16 | 15 | 16 |

이상의 결과로서 tamylase 중의 amylase 및 protease 는 음 ion 계 및 비 ion 계 중성 합성세제인 “씨니”와 혼합하였을 때, 그 효소활성을 유지하고 단백질 및 전분의 오물을 수용성 성분으로 분해할 수 있다는 것을 알 수 있었으며 amylase 활성의 측면에서 볼 때는 세탁 및 식기류 세척의 적절한 조건으로 40°C 의 수용액에서 15 ~ 20 분간 유지시킨 뒤 처리하면 효과적이라는 것을 알 수 있었다. 또한 효소분말과 세제분말을 혼합하여 포장한다면 장기간 저장해도 효소활성에 영향이 없을 것으로 간주되며 냉암소에 보관하도록 주의할 기을인다면 장기유통이 가능할 것이다. Protease 활성의 측면에서도 “씨니”수용액과 혼합되었을 때, 그 세제농도가 실제 세탁에 사용되는 농도 부근에서는 활성의 저해현상이 거의 없다는 것을 알 수 있었다.

요 약

Bacillus subtilis 가 생산하는 효소 Tamylase (상품명)

는 시판되는 여러가지의 합성세제 중 “씨니”와 배합해서 효소배합 합성세제로 사용할 때, 가장 좋았으며 amylase 활성에 관하여 측정해본 결과는 “씨니”의 세탁에 사용되는 농도(0.2%)에서 그 활성이 90% 이상 유지되고 있었으며 세제의 농도가 짙어질수록 효소활성은 감퇴되었고 최적반응조건으로는 기질의 pH 5 ~ 6.5에서 40°C 도 30분 정도 반응시키는 것이 이상적이다. 또한 철 ion 에 의해서는 효소활성에 저해를 받으며 내열성은 낮은 편이었고 효소분말과 세제분말을 혼합하였을 때, 저장성이 우수했다.

Paper disc method 와 cork borer method 에 의해서 측정된 proteolytic activity 는 세제를 가했을 때, 그 농도가 세탁에 사용되는 농도, 즉, 0.2% 부근에서는 거의 안정하였다. 그러나 농도가 짙어지면 상당한 활성의 저해를 보여 주었다.

본 연구를 위하여 효소를 제공해 주신 삼중효소공업 주식회사 및 시약과 측정기기를 사용하도록 해 주신 샘 표장유양조장 박규회 사장에게 감사를 드리는 바이다.

참 고 문 헌

1. 日本農藝化學會 講演要旨集 45, p.446 (1970)
2. B. Hagihara: The Enzymes (ed. P.P. Boger *et al.*) Vol. 4, p.194 (1960)
3. B. Hagihara, H. Matsubara, M. Nakai. K. Okunuki: *J. Biochem.*, 45, 185 (1958)
4. 日本應用酵素協會: "プロテアーゼ"利用に 關する" p. 61 (1966)
5. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th edition (1957)
6. 裴貞尙 · 朴允仲: 韓國食品科學會誌, Vol. 1, 85 (1969)
7. 小卷利章: 醱酵協會誌, 19, 1 (1961)
8. 日本應用酵素協會: "Proceedings of the Symposium on Amylase" 47 (1965)
9. 長瀬酵素レポート A-2
10. 長瀬酵素 レポート A-4
11. 柳洲鉉 · 田村學啓 · 有馬啓: 日本農藝化學會誌 Vol 43, No. 1, 60 (1969)
12. 柳洲鉉 · 秋慶姬 · 洪允命 · 有馬啓: 韓國食品科學會誌, Vol. 2, No. 1, 67 (1970)