

細菌性 Sericin 分解酵素의 利用에 關한 研究

(第 II 報) Sericinase 에 依한 家蠶繭의 解舒에 對하여

徐正埏 · 宋邦鎬 · 韓榮求* · 高永喜

慶北大學校 農科大學 農化學科

慶北 道 工業 研究所*

(1970. 1. 31, 수리)

Studies on the application of bacterial sericinase.

(Part II) Applying on the unwinding for mulberry cocoon.

By

Jung-Hwn Seu, Bang-Ho Song, Yung-Gu Han*, Yung-Hee Kho

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,

Kyung-Pook National University.

* Kyung-Pook Industrial Research Institute.

(Received Jan. 31, 1970)

Summary

Sericin hydrolyzing enzyme, produced by the selected bacteria, S4-1-1, was studied and following properties were obtained.

1. The activity of this bacterial sericinase was not decreased for 30 days of storage at 5°C. But at 20°C, for 30 hrs. was the maximum period to keep the initial activity of this enzyme.
2. This bacterial enzyme gave only sericinase activity but never indicated fibroin hydrolyzing activity.
3. The chelating reagent of EDTA and Ag or Hg ions were classified as strong inhibitors but Cu and Cd ions were indicated as moderate inhibitors to this enzyme action.
4. This enzyme was not inhibited by the surface active agent, Peretex-N, but strongly activated by this agent at low concentration.

In the other hand, by the application of this enzyme to the unwinding works on the mulberry cocoon, the following results were also obtained.

1. On the weight and length, nonbreaking length, size, colour and unwinding ratio of have, the enzyme applying method was superior to generally used cooking method.
2. The tested results of strength and elongation, bouchon, hairiness loops, neatness and evenness of have were also indicated superior properties.

I. 緒 論

前報⁽¹⁾에 發表한 바와 같이 本 Bacterial Sericinase 는 生絲精練에 對해서 좋은 成績을 나타내었으며, 그 酵素學的 性質도 生系精練에 適合함을 알게 되었으므로 本 研究에서는 이 Sericinase 를 家蠶繭의

解舒에 利用코져 하였다. 오늘날까지 아직 Sericinase 에 依한 家蠶繭의 解舒에 對한 研究는 거의 이루어진 것이 없으며 더구나 實用化에 對해서는 外國에서도 全然 試圖된 바가 없어 여기에서는 先人들의 結果를 參酌할 수 없었고 더구나 實用化를 目的으로 하였으므로 實驗의 方法은 可及的 實地

工場作業에 標準을 두고 하였으며 操絲 等은 全部 實地 工場에서 工具에 依해 操絲되었으며 그 모든 結果를 同一한 品種의 家蠶繭을 實地工場에서 作業한 從末의 結果와 比較 檢討하였다.

그리고 本 研究에 많은 便宜를 圖謀해 주신 京 北道 蠶業 檢査所 尹赫燮 所長任과 徐永夏 技士任 에게 感謝를 드리는 바입니다.

II. 實驗方法 及 結果

A. 供試菌 Sericinase 의 酵素學的 性質

1. 供試菌 及 酵素液의 調製

本 實驗에 使用된 菌株는 既報⁽¹⁾에서 發表한 Sericin 分解酵素 強力 分泌菌株 S-1-1 이었으며 本 菌의 酵素生成培地의 組成은 다음과 같다.

Peptbn	1g
Glucose	2g
K ₂ HPO ₄	0.02g
NaCl	0.05g
MgSO ₄	0.001g
H ₂ O	100 ml

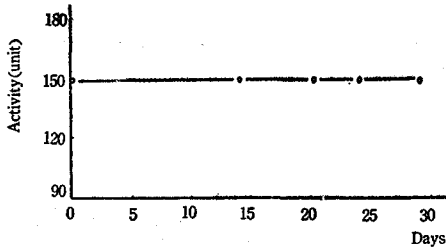


Fig. 1. The Heat Stability of Sample Sericinase (at 5°C)

즉 圖 1, 2에서 보는 바와 같이 本 酵素는 5°C 에서는 거의 1個月間 酵素力價가 持續되었으며 20°C의 室溫에서도 거의 30時間 程度까지 元來의 力價를 維持하는 熱에 對한 安定性이 대단히 強한 酵素임을 알았다.

5. Fibroin 에 미치는 影響

本 酵素가 고치의 解舒 途中 Fibroin 에 對한 分解作用으로 因해 落緒回數가 增加될 可能性이 있으므로 Fibroin 에 對한 損傷 與否를 檢討하기 爲해 本 實驗을 하였다.

生絲를 逆流 冷却裝置下에서 8時間 煮沸하여 熱水로 洗滌後 다시 0.1% NaOH 液에 30時間 煮沸하여 結締性 Sericin 을 完全히 除去한 後 dilute-HOAc 로 中和 洗滌後 乾燥한 Fibroin 試料⁽²⁾에 酵

上記 培地를 150 ml 씩 振盪 flask 에 注入하여 15 Lb 에서 20分間 殺菌(finaI pH 7.2) 後 供試菌을 接種하여 30~35°C에서 48時間 振盪培養했으며 이때의 振盪條件은 往復式, 振幅 5 cm, 振盪回數 120回/分 이었다. 이와 같이 하여 얻은 培養液을 吸引 濾過한 後 濾液을 酵素液으로 使用하였다.

2. 酵素 活性度 測定法

既報⁽¹⁾에서와 同一한 方法을 使用하였다.

3. 最適 pH 及 pH에 對한 安定性

本 酵素의 最適 活性 pH는 7.4였으며 pH 8.0 附近에서 그 活性이 가장 오래 持續되었음을 既報⁽¹⁾에서 發表하였다.

4. 最適 溫度 及 溫度에 對한 安定性

亦是 既報⁽¹⁾에서 最適溫度는 50°C였음을 發表 하였으며 또 溫度에 對한 安定性은 液體 培養 酵素液을 各各 5°C와 20°C에 放置하면서 經時的으로 殘存하는 Gelatin 液化力을 測定하여 圖 1, 2와 같은 結果를 얻었다.

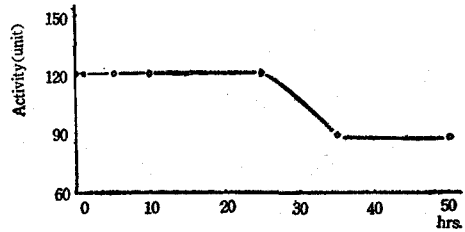


Fig. 2. The Heat Stability of Sample Sericinase (at 20°C)

素液(pH 7.4)을 加하여 各各 60 unit, 90 unit, 150 unit 에서 10時間씩 段階的으로 作用(40°C) 시키면서 그 重量變化를 調査한 結果는 表 1과 같다.

Table 1. The Effect of Sample Sericinase on the Fibroin

Treatment Enzyme Unit ([LP] mg gel/min)	0	60	90	150
Raw Silk Weight(g)	1,177	1,120	1,109	1,109

즉 위 表 1에서 보는 바와 같이 本 酵素를 繼續作用시켰을 때 처음 그 重量이 多少 減少된 化學的方法에 依해 未 除去된 殘存 Sericin 部分이 分解 除去되었다고 생각되며 이어서 2次 3次的 處理에서 各各 恒量이 維持되었으므로 本 酵素는

Fibroin 性物質에 對해서는 全然 損傷을 주지 않고 Sericin 特有的 分解力만 가지고 있음이 認定되었다.

6. EDTA가 本 酵素에 미치는 影響

Chelate 試藥으로서의 EDTA(EDTA-2Na)가 本 酵素 活性에 阻害의 影響을 미치는 가의 與否를 檢討하였다.

酵素는 Acetone Dried Enzyme⁽¹⁾을 使用했으며, (mg/ml) 基質로서 0.5% Casein 液과 EDTA 液은 各各 M/15 McIlvaine Buffer Solution (pH 7.4)에 溶解하였다. 反應液으로서는 酵素液 0.5 ml EDTA 液 0.5 ml, Casein 液 2 ml의 混合液을 40°C에서 20 分間 作用시킨 後 Folin 比色法에 準하여 그 吸光度를 測定하여 比 活性度를 百分率로 換算해서 酵素의 殘存 活性을 求하였다.

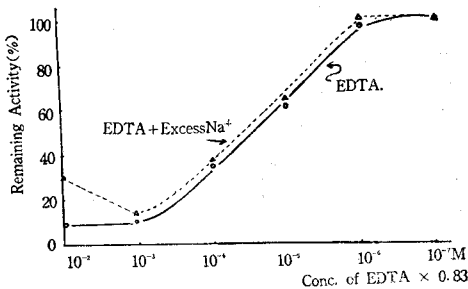


Fig. 3. The Effect of EDTA

즉 圖 3에서 보는 바와 같이 $0.83 \times 10^{-6} M$ 濃度까지의 低 濃度에서는 거의 阻害作用이 없었으나 漸次 그 濃度가 上昇됨에 따라 그 阻害能도 顯著하게 增加되어 $0.83 \times 10^{-3} M$ 濃度에서는 거의 90%에 가까운 強力한 酵素의 失活이 認定되었다. 단 이때 EDTA 溶液에 過剩의 Na^+ 存在時에는 高濃度에서 그 阻害能이 多少 下降되었다.

7. 金屬 ion에 對한 影響

고치의 處理 工程中 製絲用水에 含有되었거나 用器에 依해 遊離되는 金屬 ion에 依한 本 酵素의 失活 與否를 알고자 本 實驗을 하였으며 使用한 Buffer Solution 및 酵素濃度, 基質, 作用 pH 및 溫度는 各各 前記 EDTA의 影響을 檢討할 때와 同一하였다.

反應液 亦是 0.5 ml의 酵素液에 各 鹽類液 0.5 ml 및 Casein 溶液 2 ml를 加하여서 40°C에서 20 分間 作用시킨 後 그 力價를 測定해서 鹽類 無添加의 境遇에 對한 比 活性度를 百分率로 나타내었다.

表 2에서 보는 바와 같이 Hg^{2+} , Ag^+ 에 依해서 本 酵素能이 거의 完全히 失活되며 Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}

Table. 2. The Effect of Metal Ions on the Sample Sericinase

Metal ions ($10^{-3}M$)	Remaining Activity(%)
Hg^{2+} ($HgCl_2$)	0.3
Ag^+ ($Ag NO_3$)	0
Cd^{2+} ($Cd SO_4$)	28.0
Fe^{2+} ($Fe_2(SO_4)_3 \cdot XH_2O$)	41.1
Cu^{2+} ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	67.7
Pb^{2+} ($Pb(Ac)_2$)	54.3
Mg^{2+} ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	75.9
Ca^{2+} ($CaCl_2$)	87.0
Ba^{2+} ($BaCl_2$)	84.7

에 依해서도 比較的 強한 阻害 現象이 나타났으며 또 反對로 賦活作用을 나타내는 金屬 ion은 없었다. 特히 Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 에 對해서 各 濃度別로 阻害現象을 調査한 結果 圖 4에서 보는 바와 같이 Cd^{2+} 를 除外한 他 ion은 $10^{-6}M$ 濃度에서는 거의 酵素의 阻害現象이 나타나지 않았으나 金屬 ion의 濃度가 漸次 上昇됨에 따라 $10^{-3}M$ 濃度에서는 Ag^+ , Hg^{2+} 는 거의 100%에 가까운 失活이 일어났으며 Cd^{2+} 는 濃度에 거의 無關하게 約 70%의 阻害現象을 維持하였다.

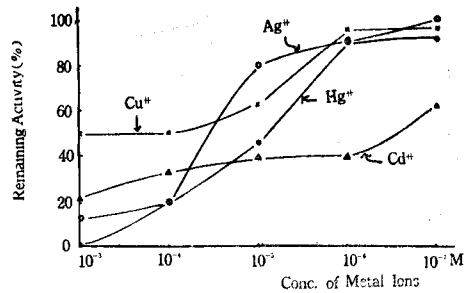


Fig. 4. The Effect of Metal Ions

8. 界面 活性劑의 影響

界面 活性劑는 絹絲 處理工程에 있어서 물의 浸透性 增加 及 絹纖維 柔軟效果, 揚返의 固着防止 등을 爲해 널리 使用된은 周知의 事實이다⁽⁸⁾.

따라서 本 實驗에서는 酵素液 浸透劑로서 加해지는 界面 活性劑가 酵素處理工程에 混存할때 酵素 活性에 어떠한 影響을 미치는 가를 檢討코저 한 것이며 이때 使用된 界面活性劑는 Peretex N 이었다. 酵素液 및 基質의 調製는 前記 金屬 ion의 影響을 調査할 때와 同一하였으며 界面活性劑는 各 濃度別로 McIlvaine Buffer (pH 7.4)로써 稀

釋하였다.

反應液으로서 酵素液 0.5 ml 에 界面 活性劑 0.5 ml 를 加하여 40°C 에서 20 分間 Preincubation 시킨 後 0.5% Casein 2 ml 를 加하여 亦是 40°C 에서 20 分間 作用시켜 Folin 比色法에 依해 그 吸光度 를 測定하여 이에 對한 對照區와의 差異를 $-\log T$ 로 나타내었으며 그 結果는 圖 5 와 같다.

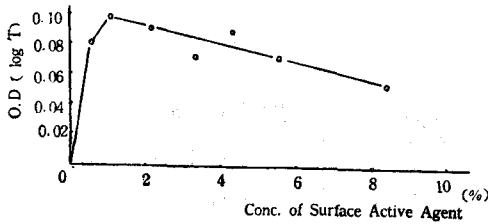


Fig. 5. The Effect of Surface Active Agent (peretex N)

即 界面 活性劑는 그 濃度에 無關하게 酵素活性 에 阻害現象을 나타내지 않고 오히려 그 活性을 促進하는 結果를 얻었다.

9. 酵素生成에 對한 培地組成의 影響

本 酵素를 工業的으로 大量 生産함에 있어서 그 生産原價는 無視될 수 없다. 本 實驗에서는 그 生産原價를 勘案하여 可及의 값싼 原料를 培地로 하여 高 力價의 酵素를 얻고져 表 3 과 같이 C 源으로서 Sucrose, N 源으로서는 NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 Pupae Extract 등을 使用하여 各各 그 組成을 달리하였으며 이에 無機鹽類를 添加하여 常法에 依해 殺菌後 供試菌을 接種하여 30~35°C 에서 48 時間 振盪 培養하여 Gelatin 液化力法으로 그 力價를 測定하여 比較 檢討하였다.

B. 本 Sericinase 에 依한 家蠶繭의 解舒

1. 供試繭

1969 年度 설악×소양, 소양×설악 春蠶 乾繭比率 40%

Table 3. Enzyme Production on the Different Media.

	C Source (%)	N Source (%)				Mineral Salts (%)			[LP]mg.Gel/min
	Sucrose	Pepton	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NaNO_3	Pupae	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	K_2HPO_4	NaCl	
A	2	1	—	—	—	0.005	0.02	0.05	90
B	"	—	—	—	5	"	"	"	120
C	"	—	0.5	—	5	"	"	"	30
D	"	—	—	0.5	5	"	"	"	150
E	"	—	0.5	0.5	—	"	"	"	30
F	1	—	0.5	0.5	5	0.05	0.05	"	90

2. 고치의 處理工程

고치를 一定한 容器內에서 減壓시킨 後 力價 5 unit (pH 7.4)의 酵素液(界面活性劑로서 Peretex-N 1.0% 含有)을 注入하여 浸透시킨 後 約 1 時間 酵素作用을시켜 고치 外液을 溫水로 置換後 繼續 1 時間 經過시켜 作用을 完了시켰으며 이때 回收된 外液은 다시 고치 置理液으로 使用하였다.

이 酵素 處理繭에 對한 對照區로서의 自動蒸煮機에서 現行되고 있는 方法 그대로 蒸煮한 것이다.

3. 線絲方法 及 成績

慶北道 蠶業 檢査所의 K.J 式 線絲 機에서 工具로 하여금 直接 操絲계 하였으며 이때 線絲 速度는 80 m/min. 하였고 索緒湯은 80~90°C 操絲湯은 30°C 內外의 溫度에서 常法대로 行하였다.

以上과 같은 條件에서 酵素處理繭과 蒸煮處理繭을 各各 數回 反復 操絲하였을 때의 線絲成績은 表

4 과 같으며 이때 供試粒數는 150 粒이었다.

表 4 에서 酵素處理繭을 蒸繭과 同一條件에서 線絲했을 때 生絲長이나 生絲重量에 있어서 蒸繭에 비해 조금도 遜色이 없었으며 特히 有意해서 檢討되어야 할 解舒率이 70.1%인데 비해 蒸繭은 65.2% 였으며 添緒 回數는 1.46 回 對 1.54 回이었고 生絲量 比率에 있어서도 14.2% 對 13.5%로서 酵素處理繭이 蒸煮處理繭보다 오히려 優秀한 線絲成績을 얻게 되었다.

本 線絲成績表에는 나타나 있지 않으나 索緒率에 있어서 本 酵素處理繭이 蒸繭보다 多少 나쁜 結果를 얻었으나 이는 酵素處理時 酵素液의 短時間內均一 浸透度를 上昇시켰으므로 充分히 矯正될 수 있으리라 믿어진다.

4. 生絲의 檢査

表 5 는 本 實驗에서 얻은 生絲의 檢査를 慶北

Table 4. 繰 絲 成 績

區 分	酵 素 處 理 區					蒸 煮 處 理 區				
	A	B	C	D	平 均	K	I	M	平 均	
繭 重 量 g	122,409	125,291	125,633	122,011	123,836	122,433	125,503	128,826	125,587	
生 絲 長 m	19,252	18,773	19,250	18,812	19,250	18,960	19,490	19,236	19,239	
生 絲 重 量 g	43,700	43,800	44,774	43,329	43,900	41,324	42,500	43,308	42,374	
添 緒 回 數 回	219	217	197	225	214.5	217	229	245	230.3	
對 一 粒 成 績	絲 長 m	1,027	1,001	1,027	1,003	1,014	1,001	1,038	1,025	1,021
	絲 量 cg	28.1	29.2	28.9	28.0	27.0	27.5	28.3	28.9	28.2
	織 度 D	2.55	2.56	2.62	2.59	2.58	2.45	2.45	2.53	2.47
	落 緒 回 數 回	1.49	1.45	1.41	1.50	1.46	1.45	1.53	1.63	1.54
解 舒 絲 長 m	703	692	782	669	712	699	685	628	671	
解 舒 絲 量 cg	19.9	20.2	22.7	19.9	20.9	19.0	18.5	18.7	18.7	
解 絲 率 %	68.5	69.1	76.1	66.6	70.1	69.1	65.4	61.2	65.2	
生 絲 量 比 率 %	14.3	14.0	14.3	14.2	14.2	13.5	13.6	13.5	13.5	

Table 5. 絲條班 및 小節檢査成績

區 分	絲 條 班		小 節	
	酵 素 區	蒸 煮 區	酵 素 區	蒸 煮 區
1	95.5	96.5	84.0	96.0
2	96.0	95.0	86.0	95.0
3	95.5	95.5	92.5	96.0
4	96.0	—	94.5	—

蠶業檢査所에 直接 依賴하여 얻은 成績이다.

表 5에서 絲條班의 成績은 酵素處理繭이 煮繭에 比해 거의 遜色이 없이 出生絲規格 6A 格이었으며 小節成績은 初期 階段에서는 84點의 나쁜 狀態였으나 繭 處理時 減壓度를 上昇시키에 따라서

Table 6. 引長強度試驗成績 (g)

區 分	回	厚皮絲	中皮絲	薄皮絲
酵 素 區	1	830	533	447
	2	838	584	432
	3	846	733	465
	4	948	620	418
	5	797	580	442
	平 均	929	582	409
蒸 煮 區	1	865	605	436
	2	867	514	—
	3	1,003	575	441
	4	920	562	453
	5	857	538	425
	平 均	912	547	439

漸次 上昇되어 亦是 6A 格에 가까운 品質이 優秀한 生絲를 얻을 수 있었다.

또 引長強度를 檢査하였으며 그 測定條件은 振子 lever 型 把持距離 20.4 cm의 單絲 強度 試驗機로 測定하였으며 厚皮絲, 中皮絲, 薄皮絲를 各各 分別해서 測定한 結果 表 6과 같이 煮繭에 比해 거의 同一한 強度를 나타냄을 알았다.

Ⅲ. 考 察

本 S₄-1-1 菌株가 分泌하는 Sericin 分解 酵素는 熱에 對해서 安定하며 Fibroin 에는 全然 損傷을 加하지 않고 Sericin 에만 特異하게 作用하며 또 酵素液의 繭層 浸透를 容易하게 하기 爲한 界面活性劑의 混存이 酵素의 活性을 促進하는 結果를 얻었다.

이와 같이 優秀한 S₄-1-1 菌株의 酵素를 家蠶繭의 解舒에 利用하므로써 그 繰絲能率에 있어서나 生絲의 品質面에 있어서 本 實驗에서 얻어진 繰絲 成績 및 生絲의 品質 檢査 結果로서 充分히 現行되고 있는 蒸煮에 依한 解舒에 比해 오히려 優秀한 解舒가 可能하다고 생각된다.

아울러 生絲品質의 質의 向上이나 生産原價의 切下를 目的으로 本 酵素를 더욱 開發하여 大規模의 高 活性酵素의 量産 및 이를 利用한 家蠶繭의 工業的 解舒工程을 確立함은 앞으로의 研究 課題라고 생각된다.

Ⅳ. 要 約

本 Sericin 分解 酵素 強力 分泌菌株 S₄-1-1 이 生成하는 Sericinase 는

1. 熱에 對해 安定하여 5°C에서 1個月間 20°C에서 約 30時間까지 그 活性이 持續되며

2. Fibroin 物質에 對한 分解力은 全然 認定되지 않았고

3. EDTA 및 Ag[#], Hg[#]에 依해 거의 完全失活되며 Cu[#], Cd[#]에 依해서도 比較的 強하게 失活되었다.

4. 界面活性劑 Peretex N의 混存時 그 活性이 多少 促進되었다.

이와 같은 Sericin 分解酵素를 家蠶繭의 解舒에 利用하므로서 現行되고 있는 煮繭에 比해

1. 繰絲成績 즉 解舒率, 生絲量比率 등이 오히려 優秀했으며

2. 絲條斑, 小節, 引長強度의 成績 亦是 煮繭에 比해 何等的 遜色이 없었다.

參 考 文 獻

1. 徐正垣, 奇字京: 韓國農化誌, 12, 75 (1969)

2. 京都大農化教室, 農藝化學實驗書, 三卷 1292, 1968.

3. 比村愛夫, 日蠶絲誌, 33, 4, 309 (1964)