Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 10, No. 4, 259-265(1982)

Bacillus circulans F-2가 生産하는 α-amylase에 關한 硏究 (第3報) 精製 α-amylase에 依한 各種 基質의 分解

鄭萬在, 谷口肇*, 丸山芳治*, 李美子, 鄭宰顯**
忠北大學校農科大學農化學科, *東京大學農學部農藝化學科
**忠州工業專門大學食品工學科
(1982年 8月 31日 수리)

Studies on α-amylase of *Bacillus circulans* F-2 (Part 3) Hydrolysis of Various Substrates by Purified α-amylase

Man Jae Chung, Hajime Taniguchi*, Yoshiharu Maruyama*, Mi Ja Lee and Jae Hyun Jeong**
Dept. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chung-Buk University
Dept. of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo University*
Dept. of Food Technology, Chung Ju Technical Junior College**
(Received August 31, 1982)

Abstract

These experiments were conducted to investigate the hydrolysis products on the various oligosaccharides of *Bacillus circulans* F-2 α-amylase, and the hydrolysis rate on the various raw starches of *Bacillus circulans* F-2 α-amylase, *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase and *Rhizopus niveus* glucoamylase.

The results obtained were as follows:

1. Maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose and maltooctaose were hydrolyzed, but maltose and maltotriose were not hydrolyzed by *Bacillus circulans* F-2 α-amylase. Among maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose and maltooctaose, especially maltotetraose was hydrolyzed weakly by *Bacillus circulans* F-2 α-amylase.
2. The hydrolysis rate of oyster glycogen was slightly lower than soluble starch, amylose and amylopectin.
3. The hydrolysis rate of corn starch was higher in shaking incubation than in stationary incubation, but the hydrolysis rate of potato starch was not definite according to kinds of enzyme.
4. On corn, rice, arrowroot, high amylose corn, banana, sago, yam and potato starch, *Bacillus circulans* F-2 α-amylase exhibited a remarkably higher hydrolysis rate than *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase and *Rhizopus niveus* glucoamylase.

緖 論

전분은 그 起源에 따라 물리화학적 성질이 다르며, 일반적으로 穀類澱粉粒은 根茎澱粉粒에 비하여 분해되기 쉽다.

不波등[1-7]은 각종 생전분의 분해성 및 분해방

식에 관하여 상세하게 보고하였고, 貝沼 등[8]은 감자전분립의 소립자와 대립자에 glucoamylase를 작용시킬 때 소립자는 대립자보다 잘 분해된다고 하였다.

檜作[9]은 전분립의 효소분해와 인산의 관계를 구명하고, 前田등[10]은 전분의 분해에 있어서 R-enzyme의 역할에 관하여 보고하였다.

지금까지의 연구에 의하면 일반적으로 potato, yam, banana, high amylose corn의 전분립은 amylase에 의한 분해율이 낮은 것으로 보고되었다.[11]

필자는 *Bacillus circulans* F-2가 생산하는 α-amylase(F-2A)를 정제하여 정제효소의 특성을 검토하고 그 결과를 보고하였다.[12,13]

本報에서는 각종 oligosaccharide에 대한 분해산물을 経時的으로 조사하고, *Bacillus circulans* F-2 α-amylase(F-2A)와 *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase(BAA), *Rhizopus niveus* glucoamylase(RNG)의 각종 생전분에 대한 분해율을 비교 검토하였다.

實驗材料 및 方法

精製酵素

Bacillus circulans F-2 α-amylase(F-2A) : 筆者가 精製한 酵素임[12]

Bacillus amyloliquefaciens α-amylase(BBA) : 長瀬産業株式會社 製品

Rhizopus niveus glucoamylase(RNG) : 生化學工業株式會社 製品

Porcine pancreatic α-amylase(PPA) : Sigma社 製品

Streptococcus bovis α-amylase(SBA) : 東京農業大學 農藝化學科 溝上博士로부터 분양받음

生澱粉 및 oligosaccharide

生澱粉은 純正化學 및 和光純藥工業株式會社의 製品이고, oligosaccharide는 盛進製藥會社의 製品임

oligosaccharide의 檢出

paper chromatography에 의하여 검출하였다. 發色은 alkaline silver nitrate-dip법[14]에 의하여 실시하였다.

澱粉의 分解率 測定

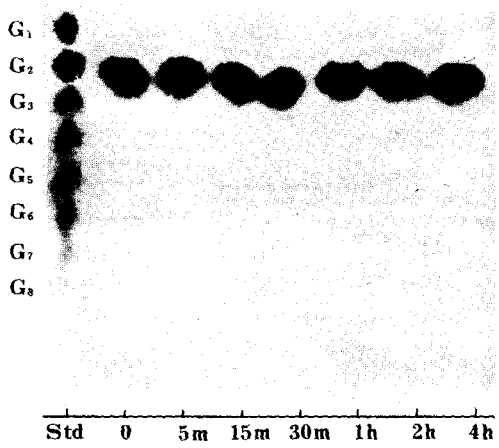
각종 生澱粉 25mg에 buffer 2.5ml, penicillin G 1mg, toluene 25μl를 넣고 효소를 各各 10u씩 첨가하여 37℃에서 진탕반응시켰다.(oscillation 125/min stroke 5cm) 단 이 때 *Bacillus circulans* F-2 α-amylase에 對하여는 50mM phosphate buffer(pH 6.5), *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase에 對하여는 10mM phosphate buffer containing 10mM $CaCl_2$(pH 6.2), *Rhizopus niveus* glucoamylase에 對하여는 0.1M acetate buffer(pH 5.0), porcine pancreatic α-amylase에 対하여는 5mM phosphate buffer containing 2mM $CaCl_2$(pH 7.0), *Streptococcus* bovis α-amylase에 對하여는 20mM acetate buffer containing 10mM $CaCl_2$(pH 5.6)를 사용하였다. 反應液을 経時的으로 0.2ml씩 取하여 원심분리하고 침전부분에 1N-H_2SO_4 5ml를 넣어 沸騰水浴中에서 5分間 煮沸하여 加水分解시켰다. 加水分解液中의 可溶性糖을 phenolsulfuric acid법[15]으로 정량하고 分解率을 求하였다.

實驗結果 및 考察

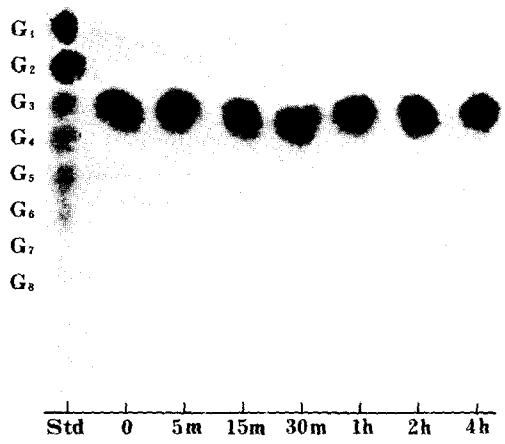
Bacillus circulans F-2 α-amylase와 各種 oligosaccharide와의 反応

1% 各種 oligosaccharide용액 1ml에 50mM phosphate buffer(pH 6.5) 0.9ml와 효소 0.1ml를 넣고 30℃에서 反應시켰다. 反應液을 経時的으로 取하여 paper chromatography를 實施한 結果는 Fig. 1과 같이 maltose와 maltotriose는 분해되지 않았으나 maltotetraose以上의 oligosaccharide는 분해되었다.

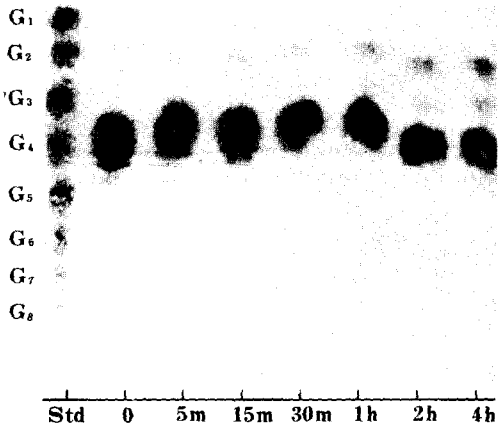
maltotetrase, maltopentaose, maltohexaose, mal-



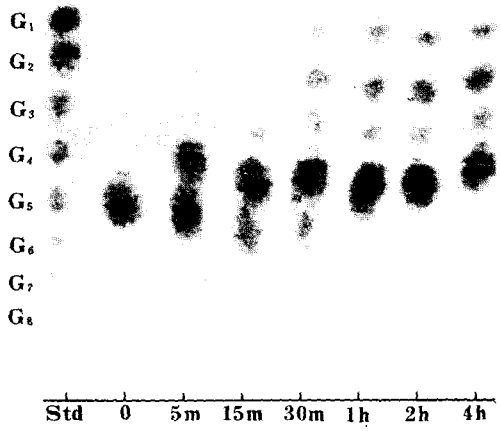
(a) Maltose (G_2)



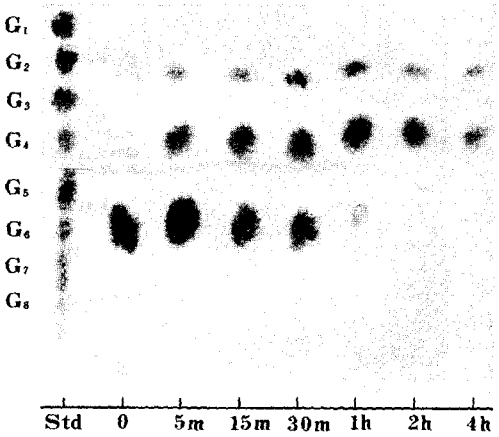
(b) Maltoriose (G_3)



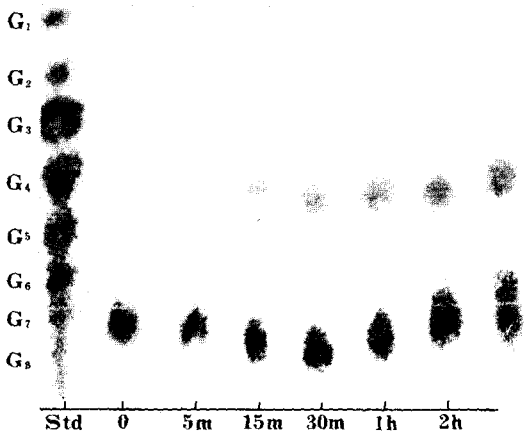
(c) Maltotetraose (G_4)



(d) Maltopentaose (G_5)



(e) Maltohexaose (G_6)



(f) Maltoheptaose (G_7)

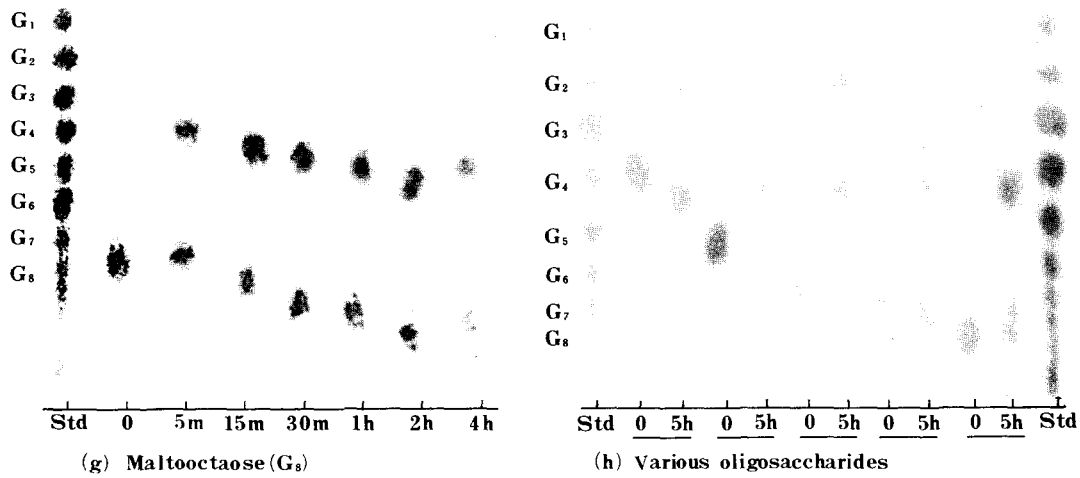


Fig 1. Paper chromatogram of reaction products on the various oligosaccharides

*Std : standard oligosaccharide

toheptaose, maltooctaose中에서 maltotetraose의 분해가 가장 微弱하게 일어났다.

maltoheptaose를 基質로 하였을 때 分解産物로써 maltotetraose만 나타나고 maltotriose 가 나타나지 않았는데 이에 対하여는 더 追求해야 할 문제로 생각되며, maltoheptaose, maltooctaose를 基質로 하여 4 시간 反応 시켰을 때 glucose, maltose, maltotriose의 spot가 나타나지 않았으나 5 시간 反応 시켰을때는 Fig. 1h에서 보는바와 같이 glucose, maltose, maltotriose가 나타나기 始作하였다.

따라서 4 시간 反応 시켰을 때 maltoheptaose, maltooctaose에서 glucose, maltose, maltotriose의 spot 가 나타나지 않은 것은 이들의 量이 極微量 生成되었기 때문인 것으로 생각한다.

Bacillus circulans F-2 α-amylase에 依한 polysaccharide의 分解率

1% 各種 polysaccharide용액 1 ml에 50mM phosphate buffer (pH6.5) 1 ml, toluene 20 μl, *Bacillus circulans* F-2 α-amylase 10u를 넣고 30℃에서 4시간 反應시킨 후 Somogyi-Nelson法[16,17]에 의하여 還元糖을 定量하고 分解率을 求하였다.

Polysaccharide의 분해율은 Fig. 2와 같이 soluble starch, amylopectin, amylose는 거의 비슷한 속도로 분해시켰으나 oyster glycogen은 이에 比하여 약간 분해율이 낮았다.

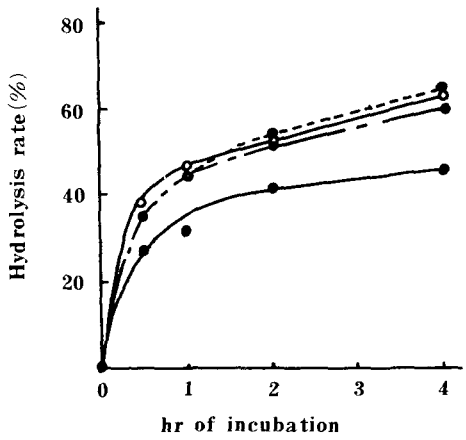


Fig 2. Hydrolysis rate (%) on the various polysaccharides

●·····● **Soluble starch**

●—·—● **Amylose**

○——○ **Amylopectin**

●——● **Oyster glycogen**

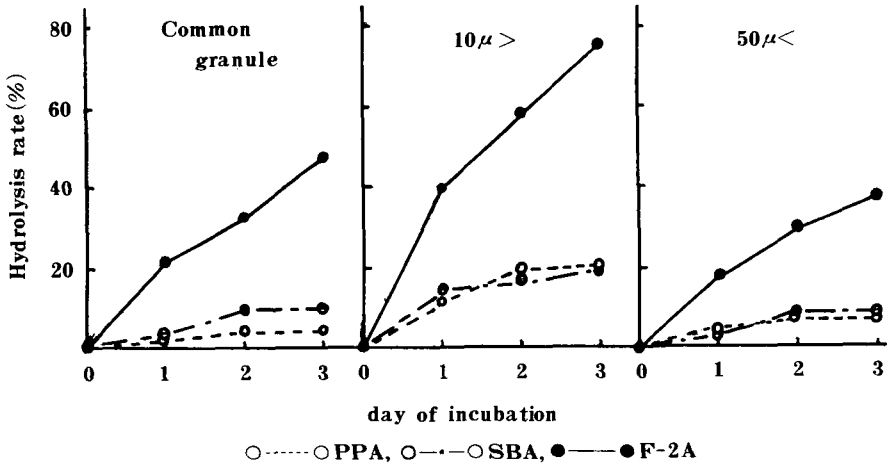


Fig 3. Hydrolysis rate(%) and diameter of potato starch granule

Potato starch granule의 直徑에 따른 분해율

감자전립의 직경이 10μ以下, 50μ以上, 보통감자전분립을 사용하여 37℃에서 진탕반응시켰다. 이 때 사용한 효소는 *Bacillus circulans* F-2 α-amylase, porcine pancreatic α-amylase, *Streptococcus bovis* α-amylase이며 各各 10u씩 첨가하여 분해율을 測定한 결과는 Fig. 3와 같다.

전분립의 직경이 작은 10μ이하의 감자전분립의 분해율이 다른 것에 비하여 높았으며 특히 *Bacillus circulans* F-2 α-amylase는 약 80%의 높은 분해율을 나타내었다. 이것은 전분립의 직경이 작으면 단위 중량당 표면적이 커서 효소와의 접촉면이 많아지기 때문인 것으로 생각된다.

澱粉粒의 분해에 미치는 振盪效果

이 때 사용한 효소는 *Bacillus circulans* F-2 α-amylase, porcine pancreatic α-amylase, *Streptococcus bovis* α-amyase이고 corn starch, potato starch의 분해율을 구한 결과는 Table 1과 같다.

3종의 효소는 다 같이 corn starch에 대하여는 靜置보다 진탕시켰을 때 분해율이 높았으나 potato starch에 대하여는 *Bacillus circulans* F-2 α-amylase를 除外한 porcine pancreatic α-amylase와 *Streptococcus bovis* α-amylase에 있어서는 진탕효과를 인정할 수 없었다. 이와같은 현상은 효소의 特性에 기인되는 것으로 생각된다.

Table 1. Effect of Shaking on Enzymic Hydrolysis of Corn and Potato Starch

		Hydrolysis rate(%)	
		Corn, 5h	Potato, 3d
PPA	stand	51.5	8.5
	shake	72.0	7.0
SBA	stand	52.0	17.5
	shake	69.5	17.5
F-2A	stand	20.5	35.5
	shake	69.5	65.5

Added enzyme amount : 60U

Bacillus circulans F-2 α-amylase, *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase, *Rhizopus niveus* glucoamylase에 의한 각종 생전분의 분해율

생전분으로는 corn, rice, barley, arrowroot, high amylose corn, banana, sago, yam, potato starch를 사용하였고, 37℃에서 진탕반응시켜 분해율을 測定한 결과는 Fig. 4와 같다. 생전분 중 barley starch에 대하여는 *Rhizopus niveus*

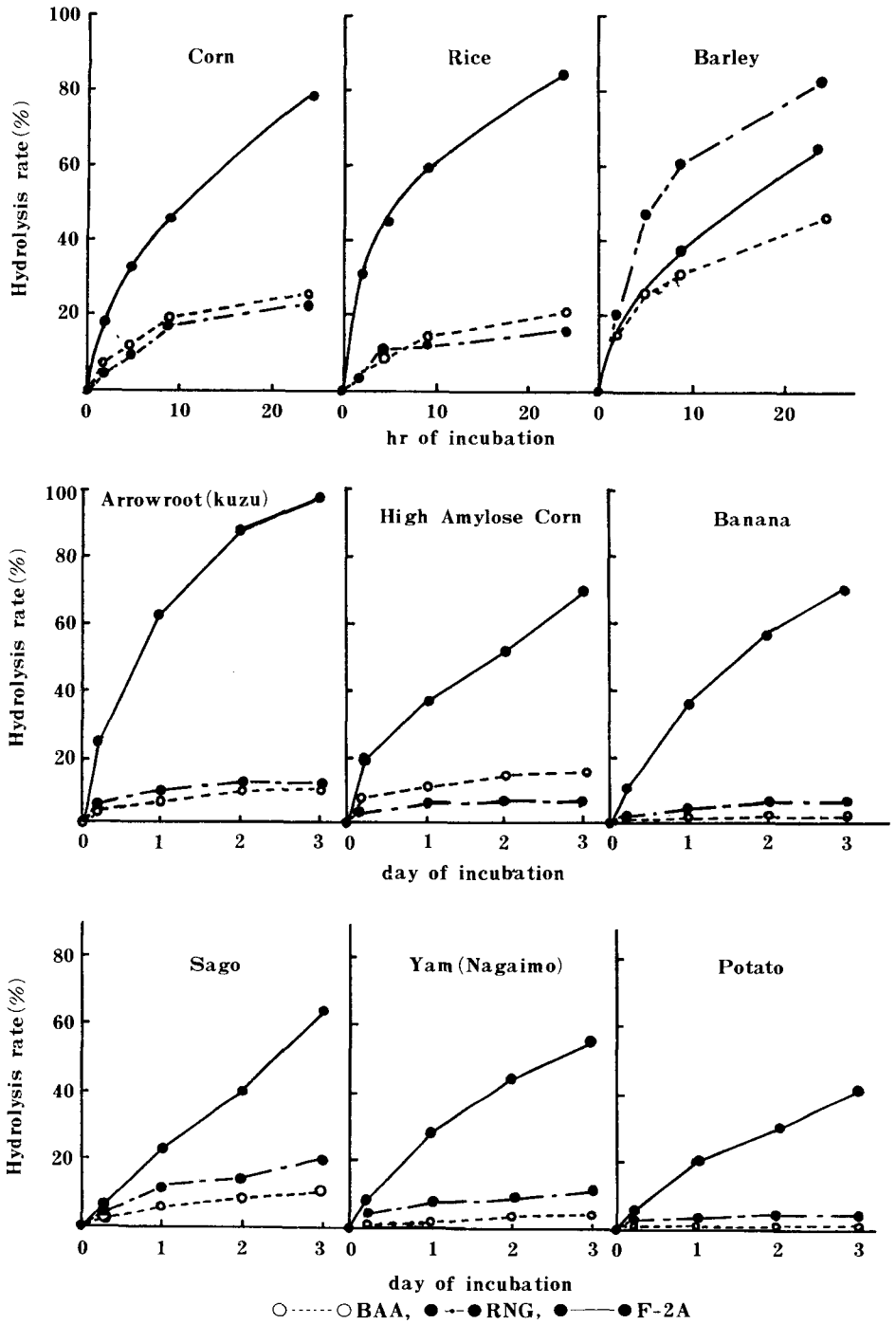


Fig 4. Hydrolysis rate(%) of various raw starches by *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase(BAA), *Rhizopus niveus* glucoamylase(RNG) and *Bacillus circulans* F-2 α-amylase(F-2A). (Added enzyme amount; 10U)

glucoamylase가 분해율이 가장 높았으나 그 밖의 생전분에 대하여는 *Bacillus circulans* F-2 α-amylase가 *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase와 *Rhizopus niveus* glucoamylase보다 월등하게 높은 분해율을 나타내었다.

要　　約

Bacillus circulans F-2 α-amylase에 의한 각종 oligosaccharide의 분해산물을 조사하고, *Bacillus circulans* F-2 α-amylase, *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase, *Rhizopus niveus* glucoamylase에 의한 각종 生澱粉의 분해율을 比較 檢討한 결과를 要約하면 다음과 같다.

1. 供試 oligosaccharide中 *Bacillus circulans* F-2 α-amylase는 maltose와 maltotriose를 분해시키지 못하였으나 meltotetraose以上의 oligosaccharide는 분해시켰다. maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose, maltooctaose中 maltotetraose의 분해가 가장 微弱하였다.

2. soluble starch, amylopectin, amylose, oyster glycogen中 oyster glycogen의 분해율이 약간 낮았다.

3. corn starch의 분해율은 진탕반응이 정치반응보다 높았으나 potato starch에 대하여는 효소의 종류에 따라 일정치 않았다.

4. corn, rice, arrowroot, high amylose corn, banana, sago, yam, potato starch에 대하여 *Bacillus circulans* F-2 α-amylase가 *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase, *Rhizopus niveus* glucoamylase보다 월등하게 높은 분해율을 나타내었다.

參 考 文 獻

1) 不波英次：日本澱粉科學, **24**, 128 (1977)
2) Fuwa, H., M. Nakajima, A. Hamada and D. V. Glover : *Cereal Chem.*, **54**, 230 (1977)
3) 杉本温美, 高谷友久, 不波英次：日本澱粉科學, **23**, 42 (1976)
4) Fuwa, H., D. V. Glover, Y. Sugimoto and M. Tanaka : *Stärke*, **30**, 186 (1978)
5) Takaya, T., Y. Sugimoto, E. Imo, Y. Tominaga, N. Nagatani and H. Fuwa : *Stärke*, **30**, 289 (1978)
6) Fuwa, H., D. V. Glover, Y. Sugimoto, R. Nishimura and M. Tanaka : *Stärke*, **30**, 367 (1978)
7) Fuwa, H., Y. Sugimoto, T. Takaya and Z. Nikuni : *Carbohyd. Res.*, **70**, 233 (1979)
8) 貝沼圭二, 山本和夫, 鈴木繁男, 高谷友久, 不波英次：日本澱粉科學, **25**, 3 (1981)
9) 檜作進, 竹田靖史, 松林卓哉： 日本澱粉科學, **26**, 112 (1979)
10) 前田巖, 自見信子, 谷口筆, 中村道徳：日本澱粉科學, **26**, 117 (1979)
11) 不波英次, 杉本温美, 高谷友久：日本澱粉科學, **26**, 105 (1979)
12) Chung, M. J., H. Taniguchi and Y. Maruyama : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **9**, 185 (1981)
13) Chung, M. J., H. Taniguchi, Y. Maruyama and M. J. Lee : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **10**, 123 (1982)
14. Terevelyan, W. E., O. D. Procter and J. S. Harrison : *Nature*, **166**, 444 (1950)
15) Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Robers and F. Smith : *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
16) Somogyi, M. : *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952)