

Streptomyces sp. 4M-2 가 생산하는 生澱粉 분해효소의 특성

최성현 · 김찬조* · 오만진 · 이종수

충남대학교 식품가공학과

Characteristics of Raw Starch-Digesting Enzyme from *Streptomyces* sp. 4M-2

Choi, Seong-Hyun, Chan-Jo Kim, Man-Jin Oh and Jong-Soo Lee

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University,
Taejeon 302-764, Korea

A raw starch-digesting enzyme from *Streptomyces* sp. 4M-2 was purified by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography and Sephadex G-100 gel filtration. The specific activity of the purified enzyme was 51.22RSU/mg protein and the yield was 4.5% of the total activity of the culture broth. The purified enzyme was found to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis and its molecular weight was estimated to be about 102,000 daltons by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimal temperature and pH for the enzyme activity were 42°C and pH 5.5, respectively. The enzyme had K_m value of 44.44mg/ml for raw corn starch. The enzyme was activated by addition of calcium and barium ions. Corn amylose was degraded by the enzyme very easily and raw potato starch was also degraded easily. Main products of the enzymatic hydrolysis of raw corn starch were analyzed to be maltose and maltotriose. The enzyme was considered as α -amylase.

生澱粉 분해력이 강한 放線菌을 분리하여 *Streptomyces* sp. 로 동정하고 효소 생산조건을 검토하여 그 결과를 전보(1)에 발표하였다.

곰팡이와 세균 등이 생산하는 生澱粉 분해효소의 정제와 특성(2-6) 및 작용기작(7-10) 등의 연구는 비교적 많이 볼 수 있으나 放線菌이 생산하는 전분 분해효소의 정제와 특성에 관한 연구는 Shimizu 등(11)이 *Thermoactinomyces vulgaris* 로부터 비활성이 385u/mg 인 α -amylase 를 얻어 70°C, pH 5.0 에서 잘 작용하고 등전점이 pH 5.2 였다고 보고하였으며 Sakano 등(12)은 *Thermoactinomyces vulgaris* 로부터 생산된 α -amylase 의 amylose 와 pullulan 에 대한 K_m 값과 V_{max} 값을 검토하여 보고한 것 등을 볼 수 있다.

필자는 *Streptomyces* sp. 4M-2 가 생산하는 生澱粉 분해효소를 정제하여 효소학적 성질을 검토하고 生澱粉의 분해산물을 TLC 로 조사하여 그 결과를 보

고하는 바이다.

재료 및 방법

효소의 정제

효소생산 최적 배양조건(1)에서 얻은 배양액을 조효소액으로 하여 Fig.1 과 같은 방법으로 정제하였다.

효소활성 측정 및 단백질 정량

生澱粉 분해활성은 久留島 등(5)의 방법으로 실시하여 생성된 환원당량을 dinitrosalicylic acid (DNS) 법(13)으로 정량하여 측정하였고 정제과정의 단백질은 Lowry 법(14)으로 bovine serum albumin 을 표준단백질로 하여 정량하였으며 이때 각 분획물의 단백질은 280 nm 에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

Key words: *Streptomyces* sp., raw starch-digesting enzyme

* Corresponding author

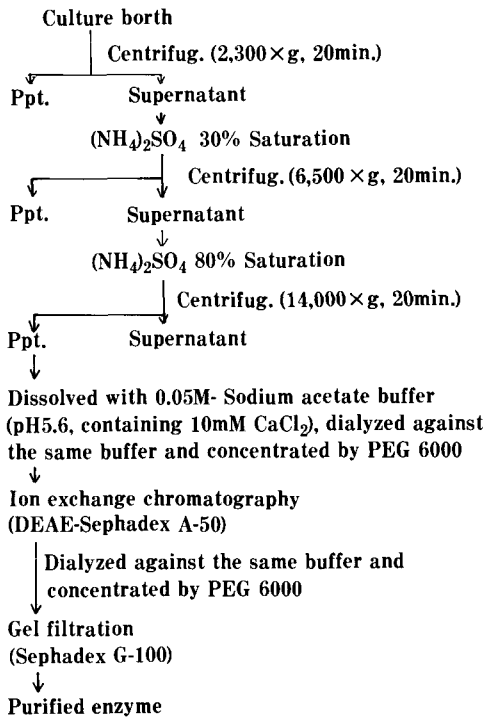


Fig. 1. Flow chart of purification steps of raw starch saccharifying enzyme.

순도 및 분자량

7.5% polyacrylamide gel column(0.5×6 cm, pH 7.0)을 사용하여 Davis 법(15)으로 column 당 2 mA의 전류를 통하여 3 시간 영동시킨 후 밴드를 확인하였다. 또한 Laemmli 법(16)으로 SDS-polyacrylamide slab gel에 전기영동을 시킨 후 표준단백질과 정제효소의 상대 이동거리를 반대수 그래프에 도회하여 분자량을 측정하였다.

Michaelis 정수

10 mM CaCl₂가 함유된 0.05 M 초산완충액(pH 5.6)에 옥수수전분을 ml 당 5.0~600 mg 까지 각각 첨가하여 초기반응속도를 측정하고 이것과 전분 농도와의 관계를 Lineweaver-Burk 방식(17)에 따라 K_m값과 V_{max}값을 구하였다.

온도, pH 및 금속이온의 영향

10 mM CaCl₂가 함유된 0.05 M 초산완충액(pH 5.6) 10 ml에 옥수수전분 250 mg을 첨가하고 20~70°C로 조정후 14 RSU/ml의 효소액 1 ml를 가하여 60 분간 반응시킨 후 상대활성을 측정하여 반

응 최적온도를 검토하였고 5-70°C에서 1 시간 방치한 후 잔존활성을 측정하여 온도안정성을 검토하였다. pH 4.5-11.0으로 조정하여 최적온도 검토시와 같은 방법으로 최적 pH를 검토하였으며 pH 안정성은 각각의 pH로 조정후 완충액과 동량의 효소액을 혼합하여 5°C에서 12 시간 방치한 후 pH를 5.5로 조정후 다음 잔존활성을 측정하여 검토하였다. 금속이온의 영향은 pH 5.6인 0.05 M 초산완충액 10 ml에 NaCl, KCl, CaCl₂ 등의 금속이온을 각각 1 mM과 10 mM 첨가하여 그 영향을 검토하였으며 효과가 있었던 Ba²⁺, Ca²⁺을 다시 10⁻⁵-10⁻¹ M 농도로 각각 첨가하여 검토하였다.

각종 전분의 분해력

10 mM CaCl₂가 함유된 0.05 M 초산완충액(pH 5.6) 10 ml에 옥수수, 고구마, 감자 등의 生澱粉과 옥수수 amylose 및 옥수수 amylopectin을 각각 250 mg씩 첨가하여 검토하였다.

분해산물의 TLC

2.5% 옥수수전분액을 각각 1 시간, 5 시간, 20 시간 효소반응시킨 후 그 상정액을 표준당과 함께 silicagel 60 aluminium TLC 판(Merk사 제품)에 점적하여 n-butanol : acetic acid : H₂O = 12 : 3 : 5의 용매로 전개, 건조시킨 후 aniline diphenylamine phosphate 시약(18)을 분무하여 105°C에서 발색시켜 분해산물을 분석하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

Streptomyces sp. 4M-2가 생산한 生澱粉 분해효소를 정제하여 Table 1과 같이 비활성이 51.22 RSU/mg, 정제도 54.5 배, 수율은 4.5%였다.

김 등(2)이 *Rhizopus oryzae*가 생산하는 生澱粉 분해효소를 정제하여 비활성이 27.6 RSU/mg, 수율이 13.8%이었다는 결과보다는 비활성이 높았다. 溝上 등(6)은 *Streptococcus bovis*의 生澱粉 당화효소를 정제하여 비활성이 245 U/mg 이고 수율이 65.5%이었다고 보고한 바 있다.

정제효소의 특성

순도 및 분자량 : 정제효소를 polyacrylamide gel에 전기영동한 Fig.2와 같이 단일 밴드를 나타내었

Table 1. Summary of purification steps of raw starch saccharifying enzyme from *Streptomyces* sp. 4M-2.

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (RSU)	Specific activity (RSU/mg)	Yield (%)	Purification factor (fold)
Crude enzyme	2,000	9,920	9,300	0.94	100	1.0
Ammonium sulfate fractionation	100	693.7	2,025	2.92	21.8	3.1
DEAE-Sephadex A-50 chromatography	70	65.3	704	10.78	7.6	11.5
Sephadex G-100 chromatography	16	8.2	420	51.22	4.5	54.5



Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme.

으며 분자량은 Fig.3 에서와 같이 약 102,000 으로 추정되었다.

Hayashida(19)는 *Asp. awamori* var. kawachi 의 生澱粉 당화효소의 분자량이 90,000, 김 등(2)은 *Rhizopus oryzae* 가 생산하는 生澱粉 분해효소의 분자량이 67,000, 손 등(3)은 *Asp. niger* 와 그 변이주가 생산한 生澱粉 분해효소의 분자량이 76,000 그리고 Pazur 등(20)은 *Asp. niger* NRRL 330 의 生澱粉 당화효소의 분자량이 112,000 이었다고 보고한 바 있다.

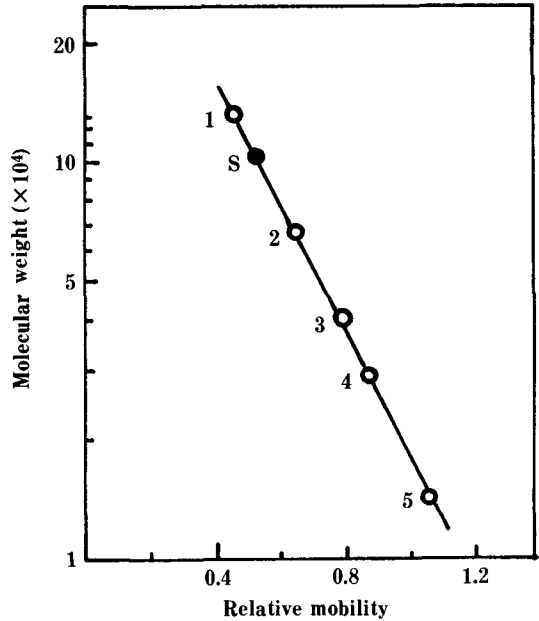


Fig. 3. Estimation of molecular weight by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

- 1: β -Galactosidase (M.W. 130,000)
- 2: Albumin, bovine serum (M.W. 66,000)
- 3: Aldolase (M.W. 40,000)
- 4: Carbonic anhydrase (M.W. 29,000)
- 5: Lysozyme (M.W. 14,3000)
- S: Sample

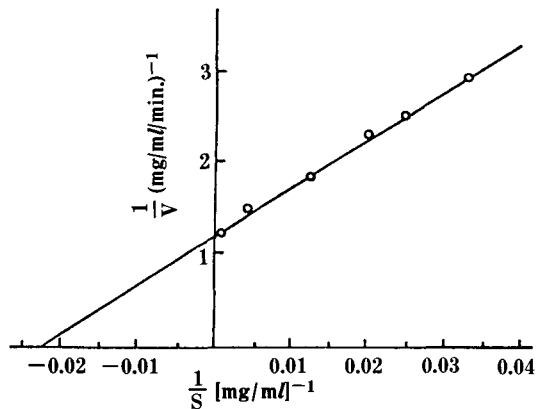


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot for the determination of Michaelis constant on raw corn starch.

Michaelis 정수 : Fig.4 에서와 같이 옥수수 生澱粉 에 대한 정제효소의 K_m 값은 44.44 mg/ml 이었고 V_{max} 값은 0.85 mg/ml/min 이었다. 김 등(2)은 *Rhizopus oryzae* 의 生澱粉 분해효소의 옥수수 生澱粉 에 대한 K_m 값이 4.082 mg/ml 이었고 손 등(3)은

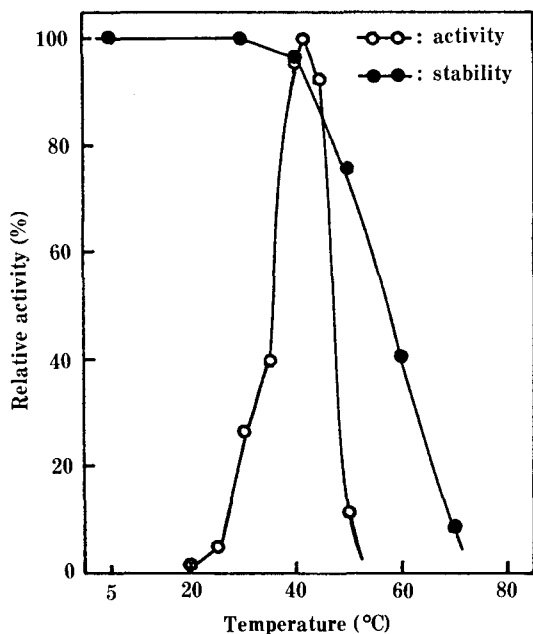


Fig. 5. Effect of temperature on the activity and stability of the purified enzyme.

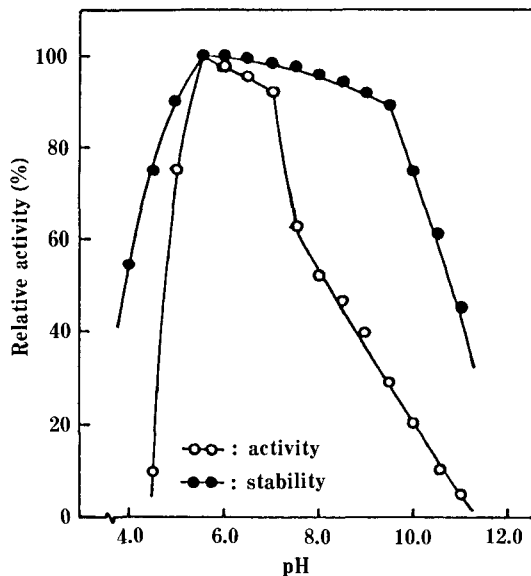


Fig. 6. Effect of pH on the activity and stability of the purified enzyme.

Asp. niger 와 그 변이주의 生澱粉 당화효소의 K_m 값이 가용성 전분에 대하여 4.545 mg/ml 이었으며 정 등(4)은 *Bacillus circulans* 의 生澱粉 당화효소의 K_m 값이 가용성 전분에 대하여 1.704 mg/ml 이었다

Table 2. Effect of metal ions on the activity of the purified enzyme.

Metal ions	Relative activity (%)	
	1 mM	10 mM
Na ⁺	126	77
K ⁺	82	60
Mg ²⁺	190	51
Ca ²⁺	271	425
Fe ³⁺	42	37
Cu ²⁺	180	38
Ba ²⁺	307	468
Hg ²⁺	42	35
Sn ²⁺	64	41
Zn ²⁺	36	41
Co ⁺	54	54
None	100	100

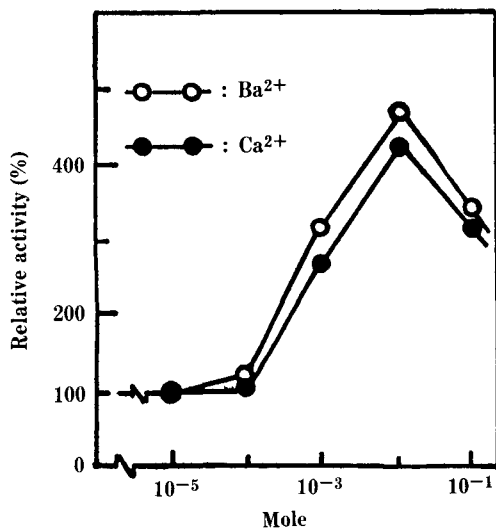


Fig. 7. Effect of concentration of Ba²⁺ and Ca²⁺ on the activity of the purified enzyme.

고 보고하였다.

온도 및 pH : 효소작용 최적온도는 Fig.5와 같이 42°C이었고 이에 대한 안정성은 30°C까지는 거의 100%의 활성을 유지하고 50°C에서는 약 76%의 활성이 유지되었다. 최적 pH는 Fig.6과 같이 pH 5.5였다. pH 안정성은 pH 5.0에서 pH 9.5까지는 약 90% 이상의 활성을 보였다.

금속이온의 영향 : Table 2와 Fig.7과 같이 Ba²⁺

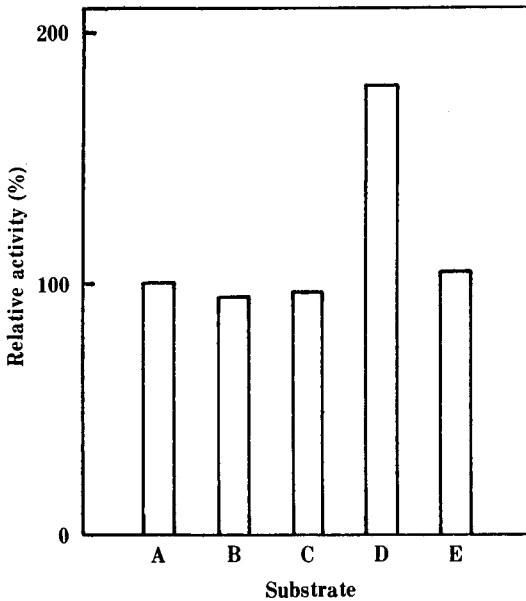


Fig. 8. Digesting activity of the purified enzyme on various kinds of 2.5% starch solution.

A: raw corn starch, B: raw sweet potato starch, C: raw potato starch, D: corn amylose, E: corn amylopectin



Fig. 9. Thin layer chromatogram of the reaction products of raw corn starch by the purified enzyme.

S: Soluble starch 1: the reaction products after 1 hr.
 MT: Maltotriose 2: the reaction products after 5hrs.
 M : Maltose 3: the reaction products after 20 hrs.
 G: Glucose

와 Ca^{2+} 은 활성을 증가시켰으며 Hg^{2+} , Fe^{3+} , K^+ 등은 저해하였다. 김 등(2)은 *Rhizopus oryzae*의 생澱粉 분해효소가 10 mM의 Ca^{2+} 첨가로 효소활성이 증

가하였다고 보고하였고 溝上 등(6)은 *Streptococcus bovis*의 생澱粉 당화효소 활성이 20 mM의 Ca^{2+} 첨가로 촉진되었다고 보고한 바 있다.

각종 전분의 분해력: 정제효소는 Fig.8과 같이 옥수수 amylose를 가장 잘 분해시키고 감자전분도 비교적 잘 분해시켰다. 이는 곰팡이와 세균 등이 생산하는 생澱粉 당화효소가 일반적으로 지상전분보다 지하전분 특히 감자전분에 대한 당화력이 약하다는 것으로 보고되어 있는데(4, 6, 8, 10) 반하여 저자 등이 분리한 *Streptomyces* sp. 4M-2가 생산하는 생澱粉 분해효소의 특징의 하나로 생각된다.

분해산물 검증

옥수수 생澱粉의 분해산물은 Fig.9와 같이 주로 maltose와 maltotriose였으며 반응시간이 경과함에 따라 그 함량이 증가되었고 소량의 glucose와 기타 oligosaccharide 등도 검출되었다. 따라서 본 정제효소는 α -amylase 계통의 효소로 추정된다.

요 약

Streptomyces sp. 4M-2의 생澱粉 분해효소를 황산 암모니움 염석과 이온교환 크로마토그래피 및 Gel 여과 등으로 비활성이 51.22RSU/mg, 수율 4.5%로 정제할 수 있었다. 정제효소의 분자량은 102,000이었으며 생옥수수 전분에 대한 K_m 값은 44.44 mg/ml이었다. 정제효소의 작용 최적온도는 42°C, pH는 5.5였고 Ca^{2+} 와 Ba^{2+} 의 첨가에 의해 효소활성이 증가되었다. 정제효소는 옥수수 amylose를 가장 잘 분해하고 감자전분도 비교적 잘 분해하였다. 이 효소에 의한 옥수수 생澱粉의 분해산물은 주로 maltose와 maltotriose였고 소량의 glucose와 oligosaccharide도 검출되었으므로 α -amylase 계통의 효소로 추정된다.

참고문헌

- 최성현, 김찬조, 오만진, 이종수 : 한국산업미생물학회지 16(6), 457(1988).
- 김찬조, 오만진, 이종수 : 한국산업미생물학회지 18(4), 288(1986).
- 손천배, 박윤중 : 충남대 농기연보 10(1), 166(1983).
- 鄭萬在, 谷口肇, 丸山芳治, 李美子 : 한국산업미생물학회지. 10(2), 123(1982).
- 久留島通俊, 佐藤淳司, 北原覺雄 : 日農化誌. 48(6), 379(1974).

6. 溝上恭平, 小崎道雄, 北原覺雄: 澱粉科學. **25** (2), 132 (1978).
7. Taniguchi, H., F. Odashima, M. Igarashi, Y. Maruyama and M. Nakamura: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(8), 2107 (1982).
8. 不破英次, 杉本温美, 高谷友久: 澱粉科學. **26** (2), 105 (1979).
9. Hayashida, S., S. Kunisaki, M. Nakao and P.Q. Flor: *Agric. Biol. Chem.* **46**(1), 83 (1982).
10. 谷口肇, 丸山芳治: 澱粉科學. **32**(2), 142 (1985).
11. Shimizu, M., M. Kanno, M. Tamura and M. Suekane: *Agric. Biol. Chem.*, **42**(9), 1681 (1978).
12. Sakano, Y., S. Hiraiwa, J. Fukushima and T. Kobayashi: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(5), 1121 (1982).
13. Pesez, M. and J. Bartos: *Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compound and Drugs*. Marcel Dekker. New York. 407 (1974).
14. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Faar and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
15. Davis, B.J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
16. Laemmli, U.K.: *Nature* **227**, 680 (1970).
17. Lineweaver, H. and D. Burk: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).
18. Zweig, C. and J. Sherma, *Handbook of Chromatography*, CRC Press, Cleveland. p. 463 (1972).
19. Hayashida, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**(11), 2093 (1975).
20. Pazur, J.H., H.R. Knull and A. Cepure: *Carbohydr. Res.*, **20**, 83 (1971).

(Received February 23, 1989)