

Bacillus sp.가 생산하는 전분 분해효소의 활성에 미치는 Alum첨가의 영향

이신영 · 이상귀 · 강태수 · 이명열*

강원대학교 발효공학과, *충북대학교 식품공학과

Effect of Alum on the Activity of Raw Starch-Digesting Enzyme Produced by *Bacillus* sp.

Lee Shin-Young, Lee Sang-Gui, Kang Tae-Su and Lee Myong-Yul*

Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University

*Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

Abstract

The effect of alum($Al \cdot K(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) on the activity of raw starch-digesting enzyme produced by alkali-tolerant *Bacillus* sp. was investigated. In adding alum of 0.5%(w/w), activities of raw starch-digesting enzyme on the gelatinized and raw rice starches have not been inhibited. In case of adding alum of 5%(w/w), competitive and uncompetitive inhibition were observed for the gelatinized and raw rice starches, respectively. The inhibitory effect on the raw starch was much higher than that on the gelatinized starch.

Key words: alkali-tolerant *Bacillus* sp., raw starch-digesting enzyme activity, alum addition

서 론

일반적으로 각종의 미생물 발효공정에서는 전분을 탄 소원 기질로 사용하는 경우가 매우 많으며, 이때 전분의 사용농도 범위는 10~15%(w/v)인 경우가 많다⁽¹⁾. 이와 같은 경우 고농도 전분기질의 사용에 의한 점도증가는 기질과 대사산물의 물질전달, 대사열의 열전달 및 산소 전달 등을 어렵게 하여 생산성을 감소시키거나 발효진 행을 어렵게 한다⁽²⁾. 따라서 산업적 측면에서는 이러한 문제의 해결방법으로서 산이나 amylase와 같은 효소 및 발효액의 물성에 영향을 주는 요인을 인위적으로 조절 하는 방법을 강구하고 있는데, 아직 효과적인 방법은 거의 없는 실정이다^(1,3).

이 등⁽⁴⁻⁵⁾은 그동안 alum에 의한 쌀전분의 수식(modification)연구를 수행하여 alum이 쌀전분의 이화학적 성 질을 크게 변화시키며, 쌀전분의 현탁액 및 호화액의 리올로지적 성질에도 큰 영향을 미침을 확인한 바 있다. 또, 이 등은⁽⁶⁾ 토양으로부터 분리한 바 있는 *Bacillus* sp. 에 의한 생물고분자의 생산시, alum이 고농도 전분기질 하에서 점도의 감소효과로 배양액의 물성에 영향을 미 치고 생물 고분자 생성의 현저한 증가를 가져오는 등,

전분에 대한 점도 조절제로서의 역할이 기대되는 결과를 얻었다⁽⁶⁾.

그러나 alum은 미생물, 특히 곰팡이에 대한 방부작용 도 가지며, 효소반응에도 영향을 줄 것으로 예측되는 바, 본보에서는 전분을 기질로 하는 효소반응에 미치는 alum의 효과를 탐색하기 위하여 이 등⁽⁷⁾이 분리한 생전분 분해효소⁽⁷⁾의 활성에 미치는 alum의 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 alum은 99.5%의 순도를 갖는 $Al \cdot K(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 로서 시중 약국에서 구입하였다. 한편, 효 소기질로서 사용한 전분은 가용성 전분(Hayashi Pure Chemical Industries Ltd.)과 1991년도 인천시 용유동산 의 추청쌀로부터 분리한 전분이며, 이때 전분은 알칼리 침지법⁽⁸⁾으로 분리하였다.

생전분 분해효소의 조제

생전분 분해효소의 조제는 다음과 같이 행하였다. 즉, glucose 2%, yeast extract 1%, KH_2PO_4 0.1% 및 Na_2CO_3 0.12%(pH 7.5)의 조성을 갖는 배지에⁽⁷⁾ 이 등⁽⁹⁾이 토양 으로부터 분리한 바 있는 알칼리내성 *Bacillus* sp.를 접 종하고, 30°C로 24시간 진탕배양하여 전배양액으로 하

Corresponding author: Lee Shin-Young, Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University, 192 Hyoja-dong, Chunchon, Kangwon-do 200-701, Korea

였다. 이 배양액 1.5%(v/v)를 역시 위와 동일한 조성의 배지 50 ml를 함유한 250 ml 삼각플라스크에 접종한 후, 30°C, 120 rpm에서 44시간 진탕배양하였으며, 이 배양액을 12,000×g에서 5분간 원심분리한 후, 상등액을 조효소액으로 하였다. 조효소액은 60% 에탄올 침전을 행한 후, 그 상등액을 다시 70 및 80% 에탄올로 침전시켜 분획하였으며, 분획침전물을 다시 DEAE-cellulose ion exchange chromatography 및 Sephadex G-75 gel chromatography하여 정제효소로 하였다.

전분 분해효소 활성의 측정⁽¹⁰⁾

1% 생전분 및 호화전분 용액 1.6 ml에 0.1 M acetate buffer(pH 5.5) 0.2 ml를 첨가하여 pH 5.5로 조절한 다음, 50°C에서 5분간 pre-incubation 하고, 이 용액에 효소액 0.2 ml를 넣어 50°C에서 30분간 반응시켰다. 이때 반응의 정지는 끓는 물에서 5분간 가열하여 행하였으며, 분해되지 않은 생전분은 12,000×g에서 5분간 원심분리하여 제거하였다. 생성된 환원당의 양은 DNS(dinitrosalicylic acid)법⁽¹¹⁾으로 비색 정량하였고, 효소의 활성은 조효소액 1 ml가 1분당 1 µg의 환원당을 생성할 수 있는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

결과 및 고찰

Alum이 호화 및 생전분의 효소활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 여러 기질농도에서 *Bacillus* sp.가 생산하는 전분분해 효소의 반응 속도를 50°C에서 측정한다. 결과는 Fig. 1과 같다.

그림에서 보는 바와 같이 호화전분에서 효소활성은 기질농도의 증가에 따라 1.311~1.889(mg/ml/min.)이었으며, 5%(w/w)의 alum 첨가로 효소활성은 저하하였다.

생전분에서의 효소활성은 대조구의 경우, 기질농도의 증가에 따라 0.241~0.923(mg/ml/min.) 범위이었다. 또 0.5%(w/w)의 alum 첨가시는 효소활성이 대조구와 거의 비슷하였으나, 5%(w/w) 첨가시는 호화전분과 마찬가지로 효소활성이 크게 저하하였다. 그러나 기질농도 및 alum 첨가 유무에 관계없이 생전분의 효소활성은 호화전분의 약 1/2 정도이었다.

효소와 기질 친화력에 대한 alum 첨가효과에 대한 보충 정량적인 자료를 얻기 위하여 Fig. 1의 자료로부터 1/V와 1/S의 관계를 도출하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 볼 수 있는 바와 같이 alum 첨가에 관계없이 시료 모두 1/V와 1/S의 관계는 직선관계를 보여 Lineweaver-Burk 식⁽¹²⁾에 잘 일치하였다.

호화 전분의 경우는 alum첨가로 직선의 기울기가 달라져서 기질 유사성에 의해 경쟁적으로 결합하는 경쟁적 저해, 그리고 생전분의 경우는 기울기는 변하지 않았으나 절편값이 달라져서 불경쟁 저해⁽¹³⁾를 나타내었고, 따라서 호화전분과 생전분의 alum에 대한 효소저해 기작은 서로 다름을 보였다.

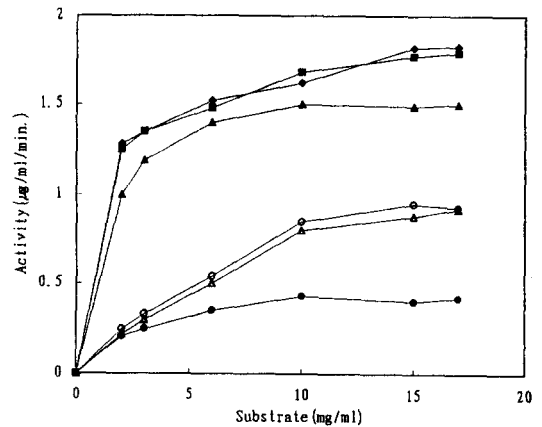


Fig. 1. Activities of raw starch-digesting enzyme on gelatinized starch and raw starch at various substrate concentrations

gelatinized starch
 ◆—◆, control
 ■—■, 0.5%(w/w) alum
 ▲—▲, 5.0%(w/w) alum
 raw starch
 ○—○, control
 △—△, 0.5%(w/w) alum
 □—□, 5.0%(w/w) alum

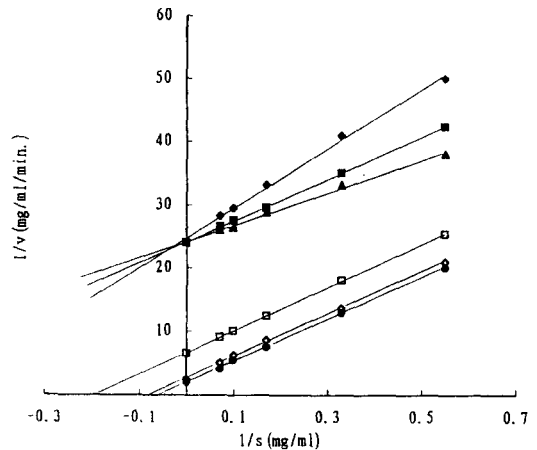


Fig. 2. Lineweaver-Burk plots of raw starch-digesting enzyme action on gelatinized starch and raw starch

gelatinized starch
 ■—■, control
 ▲—▲, 0.5%(w/w) alum
 ◆—◆, 5.0%(w/w) alum
 raw starch
 ●—●, control
 ◇—◇, 0.5%(w/w) alum
 □—□, 5.0%(w/w) alum

직선의 관계로부터 효소의 특성값을 산출하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다.

효소와 기질의 친화력을 나타내는 Km값은 alum첨가에 관계없이 호화전분의 경우는 1.265~1.880(mg/ml)범위로 생전분의 경우(15.934~4.373 mg/ml)보다 효소에 대한 친화도가 높았고, 일반적인 경향과도 잘 일치하였다. Alum 0.5%(w/w) 첨가시는 시료 모두 대조구와 비슷한 결과를 나타내었으나 alum 5%(w/w)의 첨가시에는

Table 1. The values of Vmax and Km for raw starch-digesting enzyme in the absence or presence of alum

Sample	Alum concentration (w/w %)	Vmax ¹⁾ (mg/ml/min.)	Km ²⁾ (mg/ml)
Gelatinized Starch	0.00	0.369	1.265
	0.50	0.349	1.307
	5.00	0.335	1.880
Raw Starch	0.00	0.368	15.934
	0.50	0.341	15.698
	5.00	0.112	4.373

¹⁾Maximum reaction rate

²⁾Michaelis-Menten constant

호화전분의 Km값은 1.880(mg/ml)으로 대조구보다 낮은 친화력을 보였으며, 생전분의 경우는 4.398(mg/ml)로 대조구보다 높은 친화력을 보였다. 또한, 호화전분의 경우 Vmax값은 alum첨가에 관계없이 0.369~0.335(mg/ml/min)의 범위로 대조구와 거의 비슷한 결과를 보였으나 생전분의 경우는 alum 5%(w/w) 첨가구에서 Vmax가 0.112(mg/ml/min)로 대조구의 Vmax값보다 현저히 낮았다. 이러한 결과로부터 alum 5%(w/w) 첨가의 경우, alum에 대한 전분 분해의 저해작용은 호화 전분의 경우는 미미하나 생전분의 경우는 비교적 현저함을 알 수 있었다. 이는 alum을 전분질을 기질로 하는 미생물 또는 효소 공정에 활용할 경우, 호화 전분계에서 더욱 효과적으로 활용할 수 있음을 보여주는 사실이라 하겠다.

결 론

Bacillus sp.가 생산하는 생전분 분해 효소의 호화 및 생 전분에 대한 활성은 alum 0.5%(w/w) 첨가시는 저해 작용을 보이지 않았다. 그러나 alum을 5%(w/w) 농도로 첨가하였을 때는 호화전분 및 생전분에 대하여 각각 경쟁적 저해 및 불경쟁적 저해를 보였으며, 생전분에서 호화전분보다 더 현저한 저해현상을 나타내었다.

문 헌

1. Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S., Sa'-Correia, I. and White,

C.A.: Starch Biomass; A chemical feedstock for enzyme and fermentation processes. In *Starch: Properties and Potential*, Galliard, T.(ed.), John Wiley & Sons, New York, p.115 (1987)

2. Deindoerfer, F.H.: Fermentation kinetics and model processes. In *Advances in Applied Microbiology*, Umbreit, W.W.(ed.), Academic Press, New York, Vol.2, 321 (1960)

3. Kuratsu, Y., Sakurai, M., Inuzuka, K. and Suzuki, T.: Effect of phosphate ion and ammonia-nitrogen on colistin production by *Bacillus polymyxa*. *J. Ferment. Technol.*, 61, 365 (1983)

4. 이신영, 이상귀, 김광중, 권익부: 쌀전분의 이화학적 성질에 미치는 명반첨가의 영향. *한국식품과학회지*, 25, 355 (1993)

5. 이신영, 이상귀, 임양순: 쌀 전분 현탁액의 리올로지 특성에 미치는 alum 첨가의 영향, 강원대학교 논문집, 과학기술연구, 제 33집, p.295 (1994)

6. 이신영, 이근억, 이상귀: 알카리 내성 *Bacillus* sp.의 생물고분자 생산에 미치는 alum첨가의 영향, 강원대학교 논문집, 과학기술연구, 제 30집, p.206 (1991)

7. 이신영, 이근억, 김갑수, 조택상: 알카리 내성 *Bacillus* sp.에 의한 생전분 분해효소의 분리 및 최적 배양조건. 강원대학교 논문집, 과학기술연구, 제 31집, p.472 (1992)

8. Yamamoto, K., Sawada, S. and Onogaki, T.: Properties of rice starch prepared by alkali method with various conditions. *Denpun Kagaku*, 20, 99 (1973)

9. 이신영, 이범수, 신원철, 권익부, 유주현: 생물고분자 생성 알카리 내성균주의 분리 및 특성. *한국식품과학회지*, 23, 161 (1991)

10. Kainuma, K., Ishigami, H. and Kobayashi, S.: Isolation of a Novel Raw Starch-Digesting Amylase from a Strain of Black Mold-*Chalaraparadoxa*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 32, 136 (1985)

11. Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing. *Anal. Chem.*, 31, 426 (1959)

12. Henderson, P.J.F.: Statistical analysis of enzyme kinetic data. In *Techniques in the Life Sciences*, Kornberg, H.L., Metcalfe, J.C., Northcote, D.H., Pogson, C.I. and Tipton, K.F.(ed.), Elsevier North-Holland, New York, Vol. B113, p.1 (1978)

14. 大西正健: 酵素反應速度論 實驗入門. 學會出版 센터, 東京, p.123 (1988)

(1995년 5월 13일 접수)