

Protease (Subtilisin Carlsberg)가 血液 蛋白質 汚垢의  
除去에 미치는 影響 (II)  
— 헤모글로빈 汚垢布의 洗滌性 —

李 貞 淑 · 金 聲 連\*

慶尙大學校 衣類學科 · \*서울大學校 衣類學科

**Effect of Protease (Subtilisin Carlsberg) on the Removal  
of Blood Protein Soil (II)**

— The Detergency of Hemoglobin from Cotton Fabrics —

**Jeong Sook Lee · Sung Reon Kim\***

Dept. of Clothing and Textiles, Gyeongsang National University

\*Dept. of Clothing and Textiles, Seoul National University

(1996. 4. 15 접수)

**Abstract**

The effect of protease (subtilisin Carlsberg) on the removal of hemoglobin as protein soil was studied. The relation between the removal and the hydrolysis of hemoglobin by subtilisin Carlsberg was discussed. The soiled fabric was prepared by spotting of hemoglobin solution evenly on the cotton fabric and was denatured by steaming. The soiled fabric was washed by using Terg-0-Tometer at various conditions. The removal efficiency was evaluated by analysis of protein on the fabrics before and after washing by means of copper-Folin method.

1. The removal of hemoglobin was increased in proportion to increasing of the enzyme concentration up to a certain point, but it began to decrease above the point.
2. The hemoglobin was removed effectively by adding of subtilisin Carlsberg, and more effectively removed by adding of AOS in the enzyme solution.
3. The removal of hemoglobin deviated from the first order reaction in detergency.
4. The removal of hemoglobin was highest at 50°C in detergency. Even at low temperature the removal efficiency of enzyme was relatively higher compared with the hydrolysis of hemoglobin by the enzyme. However the removal of hemoglobin was apparently decreased with the increase of temperature over 60°C.
5. The removal of hemoglobin was relatively high at pH 7.0~8.0 and increased continuously with the increase of pH in detergency.
6. In detergency, the removal mechanism of hemoglobin by subtilisin Carlsberg could be explained as follows:

First of all, the enzyme hydrolyzed hemoglobin substrates partially by forming E-S

complex at the surface of hemoglobin on the cotton fiber, and decomposed cooperative binding of hemoglobin. Subsequently, the fragments of hemoglobin were easily removed by washing. According as the enzyme penetrated to inner part of hemoglobin gradually, the hemoglobin on the cotton fiber was effectively removed by the repetition of these process.

The removal of hemoglobin was more effectively increased by adding both the enzyme and AOS in the washing solution. Therefore, it was regarded that AOS molecules were adsorbed at the hydrophobic surface of denatured hemoglobin, subsequently, decomposed more effectively cooperative binding of hemoglobin, and the fragments of hemoglobin were removed more efficiently by means of the interfacial reaction of AOS.

## I. 序 論

蛋白質 汚垢는 衣服에 附着된 直後에는 一般 洗劑에 의해 쉽게 除去할 수 있지만, 時日이 經過함에 따라 物理的 혹은 化學的인 作用에 의해서 纖維 사이에 깊숙히 固着되고 變性 蛋白質로 構造가 바뀌므로 除去하기 어려워진다. 그러므로 加水分解 酵素를 洗劑에 添加하여 洗滌 效率를 높히려는 研究가 近來에 많이 이루어지고 있다.

이 때 添加되는 酵素의 特性은 洗滌에 많은 影響을 미친다. 먼저, 酵素의 基質 特異性에 따라 汚垢 蛋白質을 分解시키는 作用에 差異가 있다. 卵白 알부민 汚垢布를 對象으로 하여 15種의 protease를 作用시켜 洗滌한 結果에서는 endopeptidase와 exopeptidase의 兩作用을 갖고 있는 放線菌 protease, endopeptidase이면서 알칼리성인 protease의 洗滌 效果가 優秀하게 나타났다<sup>1)</sup>. 또한 未變性 馬血液 汚垢布를 使用하여 18種의 protease를 作用시켜 洗滌한 結果에서는 일반적으로 알칼리성 protease의 洗滌 效果가 優秀하게 나타났다<sup>2)</sup>. 所等<sup>3)</sup>은 食肉牛의 血液 汚染布를 使用하여 11種의 protease의 基質 特異性 및 活性이 洗滌에 미치는 影響을 檢討하였다. 그 結果, 血液 汚垢布의 洗滌에 있어서 protease 基質 特異性에 따른 洗滌性의 差異가 比較的 크며, 특히 넓은 基質 特異성과 endopeptidase 作用力 및 젤라틴의 點度 低下力이 큰 bacillus subtilisin Carlsberg 및 aspergillus oryzae 등의 一部의 微生物 protease는 短時間의 洗滌으로 顯著하게 높은 洗滌性을 나타내었다.

17種의 protease를 使用하여 牛乳 汚垢布를 洗滌한 結果에서는 endopeptidase이면서 基質 特異성이 넓은 微生物 protease의 洗滌 作用이 比較的 높게 나타났

다<sup>4)</sup>. 젤라틴 汚垢布를 對象으로 15種의 protease를 使用하여 洗滌한 結果에서는 알칼리성 微生物 protease 및 中性 放線菌 protease 등의 基質 特異성이 넓은 protease의 洗滌 效果가 優秀하게 나타났다<sup>5)</sup>. 皮膚에 附着시켜 만든 天然 汚垢布의 洗滌 結果에서는 表皮 角質層을 崩壞시키는 作用이 큰 酵素에서 洗滌 效果가 優秀하게 나타났다<sup>6)</sup>.

基質의 種類에 따른 알칼리성 細菌 protease의 分解力은 牛乳 카제인>레오글로빈>卵白 알부민>表皮 角質層 등의 順으로 同一한 酵素라도 基質에 따라 分解力의 差異가 나타났다<sup>7)</sup>. 또한 같은 基質이더라도 變性되면 顯著하게 酵素의 洗滌 效果가 低下되었다<sup>4,8)</sup>.

Kame等<sup>9)</sup>은 카제인 基質을 使用하여 두 種類의 酵素를 각각 作用시켰을 때의 加水分解 生成物을 比較한 結果에서 exopeptidase가 endopeptidase의 境遇보다 低分子 쪽의 生成物이 많았지만, 洗滌 效率面에서는 endopeptidase의 境遇에서 더 優秀하였으므로, 織物에 附着된 蛋白質이 酵素에 의하여 崩壞되면 蛋白質은 바인더(binder)로서의 機能을 喪失하고 界面活性劑에 의하여 쉽게 除去된다고 報告하였다.

以上과 같은 結果로부터 蛋白質 汚垢의 洗滌에서 汚垢의 種類에 따라 酵素의 基質 特異성이 크게 影響을 미치는 것을 알 수 있다. 또한 exopeptidase보다 endopeptidase의 洗滌 作用이 優秀하고, endopeptidase 중에서는 대체로 알칼리성 protease가 여러 가지 蛋白質 汚垢의 洗滌에서 比較的 높은 效果를 가져온다는 것을 알 수 있다.

따라서 前報<sup>10)</sup>에서는 蛋白質 汚垢의 除去時 洗滌 效率面에서 優秀한 알칼리성 protease인 subtilisin Carlsberg를 選擇하여 人體에서 由來되는 主要 蛋白質 源인 헤모글로빈을 모델 蛋白質로 하여 加水分解되는

舉動을 重點的으로 살펴보았다. 本 研究에서는 이의 後續 研究로서 線織物에 헤모글로빈 蛋白質을 附着시킨 汚垢布를 濕式 熱處理하여 蛋白質을 變性시킴으로써 溶解度를 낮추었다. 이것은 洗滌하기 어려운 條件으로 만들어서 相對的으로 加水分解 酵素의 作用 效果를 集中的으로 살피고자 함이었다. 또한 같은 目的으로 機械的인 힘의 影響을 排除하기 위하여 洗滌 試驗機 Terg-O-Tometer의 反轉回收를 40 cpm으로 낮게 固定시켜서 實驗하였다. 또한 洗滌時 subtilisin Carlsberg의 作用 效果를 檢討하기 위하여 酵素 濃度, 헤모글로빈 濃度, 洗滌 時間, 洗滌 溫度 및 洗液의 pH 등의 洗滌 條件을 變化시켜서 實驗하였다.

蛋白質 汚垢布의 洗滌率 評價 方法에는 汚垢布의 洗滌 直後의 表面反射率을 測定하는 方法<sup>11-13)</sup>이 있으며, 定量法으로는 킬달 法<sup>14)</sup>, 比色分析法<sup>15-17)</sup> 등을 利用할 수 있다. 皆川 等<sup>18)</sup>은 表面反射率 測定法은 比較的 評價 方法이 容易한 長點이 있으나 汚垢布의 表面反射率과 汚垢布의 蛋白質의 量과의 相關 關係를 檢討한 結果, 比例 關係가 成立하지 않음을 報告했다. 또한 試料 數가 많은 洗滌 實驗의 特性을 考慮하여 킬달法과 같은 높은 精度를 갖고 있으면서 比色分析으로 實驗할 수 있는 銅-Folin法을 사용하여 좋은 結果를 얻었으므로 本 實驗에서도 이 方法을 選擇하여 洗滌率을 評價하였다.

앞에서 살펴본 先行 研究 結果를 통하여 protease는 蛋白質 汚垢의 洗滌 效果를 增進시킴을 알 수 있지만, 蛋白質 汚垢가 酵素에 의하여 除去되는 洗滌 機構에 대한 究明은 아직 充分하지 못하다. 또한 變性 蛋白質 汚垢에 대한 洗滌 研究는 매우 드물다.

따라서 本 研究에서는 지금까지 敍述한 바와 같이 헤모글로빈 汚垢布를 熱變性시켜서 使用하였으며, subtilisin Carlsberg에 의해서 헤모글로빈이 低分子物로 加水分解되는 狀態를 電氣泳動法을 사용하여 定量 分析한 先行研究<sup>10)</sup> 資料와 本 實驗의 洗滌 結果를 比較 檢討하여 酵素가 洗滌에 미친 影響을 重點的으로 考察하여 酵素에 의한 洗滌 機構를 밝혀보고자 하였다.

## II. 實 驗

### II-1. 試藥 및 試驗布

#### II-1-1. 試藥

Protease: Bacillus licheniformis로부터 生産된

subtilisin Carlsberg (NOVO 産業, 상품명: Alcalase 2.0T)를 사용하였다. 효소의 活性度는 TNBS法<sup>19)</sup>에 의하여 측정하였으며 2.30AU/g으로 나타났다.

血液蛋白質: Hemoglobin(人體), 生化學用(Sigma 化學株式會社, No. H-7379)

Sodium dodecyl benzene sulfonate (LAS): 試藥一級(東京化成株式會社)

$\alpha$ -Olefin sulfonate(R: C<sub>14-18</sub>, AOS): 愛敬産業株式會社

Polyoxyethylene nonylphenol ether (附加 mole 數 10, NPE): 試藥一級(東京化成工業 株式會社)

Folin-Ciocalteu's phenol reagent; 生化學用(Merck 化學株式會社)

Potassium sodium tartrate: 試藥特級(林純藥株式會社)

Cupric sulfate: 試藥一級(關東化學株式會社)

Sodium tripolyphosphate(STPP): 試藥特級(Shi-nyo Pure 化學株式會社)

Sodium metasilicate: 試藥一級 (Chameleon 化學株式會社)

其他 試藥은 試藥一級을 使用하였다.

實驗에 使用한 물은 2次 및 3次 蒸溜水를 使用하였다.

#### II-1-2. 試驗布

試驗布는 韓國 衣類 試驗 檢査所에서 製作한 纖維類 製品의 染色 堅牢度 試驗用 添附白布(KS K 0905)를 使用하였으며 그 特性은 Table 1과 같다.

#### II-2. 蛋白質 汚垢布의 製造

標準 線織物 試驗布를 0.1N 탄산나트륨 溶液으로 液比 30 : 1, 100°C에서 60分間 精練하고 충분히 水洗한 다음 自然 乾燥하였다. 위와 같이 處理한 試驗布는 5

Table 1. Characteristics of fabric

Material	Cotton 100%
Weave	Plain
Fabric count	
(ends×picks/5 cm)	141×140
Yarn number (Ne)	36×36
Thickness (mm)	0.268
Reflectance of surface(%)	78.3
(at 520 nm)	

Table 2. Composition of detergent solutions

(% , W/V)

Surfactants			Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	STPP	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	pH
LAS	AOS	NPE				
0	0	0	0	0	0	5.8
0.1	0	0	0	0	0	6.5
0	0.1	0	0	0	0	6.8
0	0	0.1	0	0	0	6.2
0	0.02	0	0.08	0	0	7.0
0	0.02	0	0.0784	0.0016	0	8.0
0	0.02	0	0.04	0.04	0	9.5
0	0.02	0	0.028	0.04	0.012	11.0

cm×10 cm로 잘라서 가장 자리의 올을 풀어 2.0% (W/V) 헤모글로빈 水溶液을 400 μl 씩 均一하게 點滴하여 自然 乾燥시켰다(未變成 蛋白質 污垢布). 熱變成 蛋白質 污垢布는 未變成 污垢布를 高壓 水蒸氣(120℃) 下에서 30分間 處理하여 製造하였다. 이와 같이 만든 濕式 熱變成 헤모글로빈 污垢布를 0~5℃에 保管하여 洗滌 實驗에 使用하였다.

### II-3. 洗滌

#### II-3-1. 洗滌

洗滌에 使用한 洗液의 組成은 Table 2와 같으며 用水로는 蒸溜水를 使用하였다.

#### II-3-2. 洗滌

Terg-0-tometer를 使用하여 所定의 溫度로 맞춘 500 ml 洗液에 5 cm×10 cm 污垢布를 3枚 넣고 40±2 cpm으로 30分間 洗滌한 後 같은 條件으로 蒸溜水 500 ml에서 3分間 2회 攪拌하였다<sup>20)</sup>.

#### II-3-3. 洗滌率 評價

헤모글로빈 蛋白質 污垢의 洗滌率은 洗滌 前後의 污垢布上의 蛋白質을 다음과 같이 銅-Folin 法<sup>18)</sup>에 의해 定量하였다. 즉 250 ml 삼각 플라스크 안에 0.1 N NaOH 水溶液 100 ml를 넣은 다음 各各의 試料布를 1 枚씩 넣고 恒溫 震盪機를 使用하여 90±2℃, cpm 80±1에서 120分間 熱抽出하였다. 抽出液을 銅-Folin 試藥에 의해 發色시킨 後 UV spectrophotometer(Shimadzu, Model UV-240)를 使用하여 750nm에서 吸光度를 측정하고 다음 式에 의하여 洗滌率을 計算하였다.

$$\text{洗滌率}(\%) = \frac{A_s - A_w}{A_s - A_o} \times 100$$

여기서 A<sub>o</sub>: 原布에서 抽出한 液의 吸光度

A<sub>s</sub>: 洗滌 前 污垢布에서 抽出한 液의 吸光度

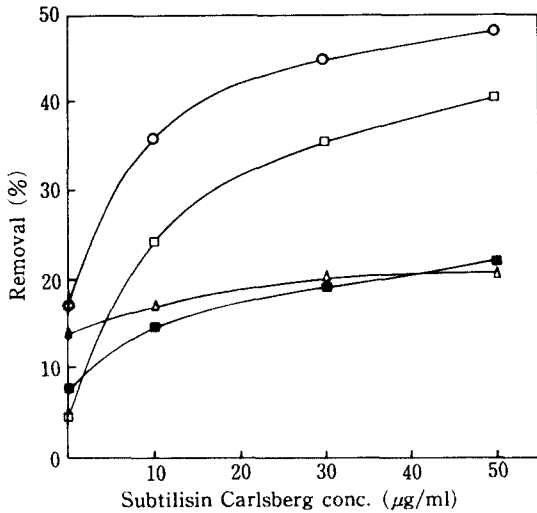
A<sub>w</sub>: 洗滌 後 污垢布에서 抽出한 液의 吸光度

### III. 結果 및 考察

#### III-1. Subtilisin Carlsberg 濃도와 界面活性劑의 影響

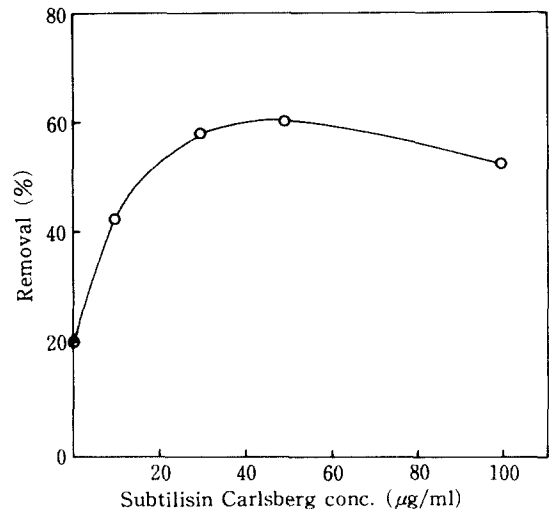
洗液에 添加한 酵素의 濃도가 헤모글로빈 污垢布의 洗滌性에 어떤 影響을 미치는지 알아보기 위하여 subtilisin Carlsberg 濃도를 0~50 μg/ml로 變化시켜서 洗滌 實驗한 結果는 Fig. 1과 같다. 또한 界面活性劑와 酵素와의 相互作用도 洗滌에 影響을 미칠 것이라고 생각하여, 陰이온系 界面活性劑 2種(LAS, AOS)과 非이온系 界面活性劑 1種(NPE)을 選定하여 洗滌 實驗하여 界面活性劑 影響도 함께 檢討하였다.

Fig. 1을 보면 洗液에 酵素를 添加하지 않은 境遇에는 AOS>LAS>蒸溜水>NPE의 順으로 洗滌率이 나타났다. AOS 및 LAS 溶液에서의 洗滌性이 NPE 경우보다 다소 높은 것은 試驗布가 綿織物이고, 污垢가 固體 狀態이기 때문에 ζ-電位를 높여주는 陰이온系 界面活性劑가 相對적으로 有利하기 때문이라고 생각된다. 그러나 洗液에 酵素를 첨가한 경우에서는 AOS>NPE>LAS>蒸溜水의 順으로 洗滌率이 높게 나타났다.



**Fig. 1.** Effect of subtilisin Carlsberg concentration on the removal of hemoglobin in the various surfactant solutions.

Water (■), LAS (△), AOS (○) NPE (□)  
 Conditions: Surfactant conc. 0.1 %  
 Temperature 40±2°C  
 Time 30 min



**Fig. 2.** Effect of subtilisin Carlsberg concentration on the removal of hemoglobin in the AOS solution.

Conditions: Detergent conc. 0.1 %  
 pH 9.5  
 Temperature 40±2°C  
 Time 30 min

같은 음이온계인 AOS 용액과 LAS 용액의境遇를比較하면, AOS 용액에서 酵素의 濃度가 增加함에 따라 顯著하게 洗滌性이 增加한데 비하여 LAS 용액의境遇에서는 酵素의 添加 效果가 매우 적게 나타났다. 이것은 酵素의 活性도가 음이온계 界面活性劑의 存在로 因하여 低下되지만 LAS 용액에서 보다 AOS 용액에서 덜 低下되기 때문이다<sup>21</sup>. 또한 酵素의 分解 作用과 AOS의 界面活性 作用이 並行하여 相乘效果를 나타냈다고 볼 수 있다.

全般的으로 洗滌性이 낮게 나타난 것은 헤모글로빈이 高壓 水蒸氣에 의한 熱變成에 의하여 分子들끼리 會合 (aggregation)되어 물에 대한 溶解度가 크게 減少했기 때문이다<sup>4,6,22</sup>. 그러나 LAS 용액을 除外하면 洗滌 作用은 酵素의 濃度가 10 µg/ml에서도 뚜렷하게 나타났으며, 酵素와의 相互適應性이 좋고 纖維 基質과 汚垢의 特性에 맞는 AOS 용액의 洗滌 效果가 큰 것을 알 수 있다.

지금까지는 界面活性劑 單獨 溶液을 使用하였으므로 다른 助劑가 添加되면 結果는 다소 다르게 나타날 수 있다고 본다. 本 實驗에서는 pH를 제외한 기타 助劑의

效果를 排除하였으며, 주된 洗滌 實驗은 AOS 용액에서 實驗하였다.

Fig. 2는 洗滌의 立場에서 가장 廣範圍하게 使用되는 pH를 考慮하여서 Table 2에 따라, pH를 9.5로 調節한 AOS 洗液의 洗滌 結果를 나타낸 것이다.

Fig. 1과 比較할 때 洗滌率은 全般的으로 다소 높게 나타났는데 이것은 subtilisin Carlsberg의 活性도가 洗液이 알칼리로 移動됨에 따라 높아졌기 때문이다. 酵素의 洗滌 作用은 매우 낮은 酵素의 濃度에서 顯著하게 높아졌으나, 30 µg/ml 이상이 되면 洗滌率의 增加가 鈍化되고, 100 µg/ml의 濃度에서는 오히려 洗滌率이 低下되었다. 이것은 subtilisin Carlsberg는 自家 加水 分解 (autolysis)가 잘 일어나는 酵素이기 때문에<sup>23</sup> 高濃度의 酵素 溶液에서는 오히려 洗滌率이 低下되었다고 생각된다.

Fig. 1, 2와 前報<sup>10</sup>의 研究 結果를 比較하여 檢討하면 subtilisin Carlsberg는 헤모글로빈을 加水分解시켜 低分子로 分解함으로써 洗滌 效果를 顯著하게 높이는 作用을 하지만, 水溶液 狀態의 헤모글로빈 分子에 作用할 때와 綿織物 汚垢布에 附着되어 헤모글로빈 分子에

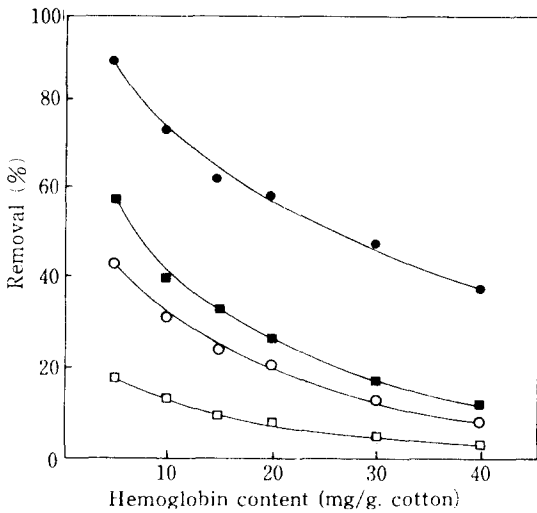


Fig. 3-a. Effect of hemoglobin content in soiled fabric on the removal of hemoglobin.

Water (□), Water+enz. (■), AOS (○), AOS+enz. (●)

Conditions: Detergent conc. 0.1 %  
 Enzyme conc. 30 μg/ml  
 pH 9.5  
 Temperature 40±2°C  
 Time 30 min

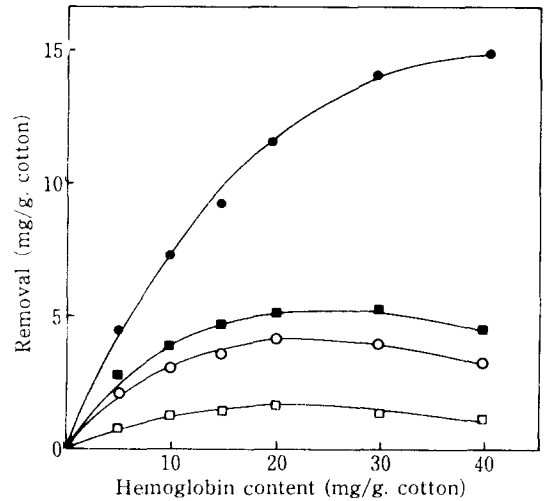


Fig. 3-b. Effect of hemoglobin content in soiled fabric on the removal of hemoglobin.

Water (□), Water+enz. (■), AOS (○), AOS+enz. (●)

Conditions: Detergent conc. 0.1 %  
 Enzyme conc. 30 μg/ml  
 pH 9.5  
 Temperature 40±2°C  
 Time 30 min

작용할 때와는 효소의舉動은 다르게 나타난 것을 알 수 있다. 즉, 純粹한 헤모글로빈 溶液에 효소가 작용할 때는 효소의 濃도가 增加할 수록 헤모글로빈의 加水分解率이 增加하여 헤모글로빈에 대한 효소의 濃도가 充分할 때는 완전히 低分子로 加水分解되었지만, 洗滌系에서 污垢布에 작용할 때는 효소의 存在는 낮은 濃度에서 相對的으로 뚜렷한 洗滌作用을 나타내었으며, 효소의 濃도가 增加함에 따른 洗滌率의 增加는 比較的 적게 나타났다. 이것은 효소가 纖維와 結合된 蛋白質 污垢에 接觸할 때, 纖維 表面에 露出된 蛋白質 污垢는 比較的 쉽게 加水分解시킬 수 있으나, 纖維 内部에 浸透된 蛋白質 污垢에 대해서는 加水分解作用이 鈍化되기 때문 이 아닌가 推定된다. 즉, 綿織物 試驗布에 附着된 헤모글로빈은 固定된 狀態이므로 水溶液 狀態의 헤모글로빈에 작용할 때와는 달리 효소는 立體 障碍(steric hindrance)를 받게 되므로 효소의 작용이 鈍化된다. 또한 綿纖維의 内部에 浸透된 헤모글로빈은 효소에 의하여 分解된 境遇에도 쉽사리 纖維 밖으로 나오기가 어려운

점도 생각할 수 있다. AOS 界面活性劑를 添加하였을 때 越等하게 洗滌率이 向上된 것은 효소의 作用과 界面 活性劑 作用과의 相乘效果가 나타났기 때문이라고 생각 된다<sup>24)</sup>.

### III-2. 헤모글로빈 含量의 影響

Subtilisin Carlsberg의 量은 一定하게 하고, 綿織物 試驗布 1g 當 헤모글로빈의 含量을 5~40 mg(0.5~4.0%, o.w.f.)으로 變化시키면서 洗滌한 結果는 Fig. 3-a, 3-b 및 4와 같다.

Fig. 3-a를 보면 洗滌效果는 AOS 洗液과 효素 > 蒸溜水와 효素 > AOS 洗液 > 蒸溜水 順으로 나타났다. 효素의 添加效果는 全般的으로 크게 나타났으나, 헤모글로빈의 含量이 增加할수록 다소 낮아졌다. 어느 洗液의 境遇에서나 헤모글로빈의 含量이 많아질수록 相對的으로 헤모글로빈의 除去率은 크게 低下되었다. 이러한 現象은 헤모글로빈의 含量이 높아질수록 헤모글로빈이 纖維 사이나 纖維 内部로 깊이 浸透하여 外部로 脫落되기

어려워지고, 헤모글로빈 단백질이 이온 결합, 수소 결합, 수성 결합 등에 의한 협동 결합(cooperative binding)을 많이 형성하게 되므로 그만큼 제거가 어려워진다고 판단된다. 또한 협동 결합은 헤모글로빈 분자와 섬유 분자 사이에서 뿐만 아니라 헤모글로빈 분자間에도 형성하게 되므로 섬유에附着된 헤모글로빈 분자의多數가 응집하게 된다고 생각할 수있다. 특히熱變成에 의하여 헤모글로빈 분자의凝固가促進되어洗滌성이 더욱 낮아진 것으로推定된다.

Fig. 3-b는洗滌時除去된 헤모글로빈의量을 무게로換算하여 나타낸 것이다. 蒸溜水에酵素를添加한境遇에는蒸溜水만으로洗滌한境遇에 비하여 헤모글로빈의除去率이約3배以上增加하였으며, AOS洗滌만으로洗滌한境遇보다도洗滌效果가더 높게 나타났다. 이것은 섬유에附着한 헤모글로빈表面에서酵素와 헤모글로빈基質의複合體(enzyme-substrate complex)가形成되어部分的으로 헤모글로빈이加水分解되면 헤모글로빈의協同結合이弱化되어 헤모글로빈 조각들이容易하게除去되기 때문이라고 볼 수 있다. 이러한過程이反復되어 점점污垢의内部로酵素가浸透하여順次的으로污垢의分解가增幅되어除去된다고 판단된다.

헤모글로빈의含量이 많아질수록除去量은緩慢하게增加하다가 20~30 mg이 되면 거의一定한限界値를 나타내고 40 mg에서는 다소減少하였다. 이러한現象은前報<sup>10)</sup>에 나타내었듯이一定한酵素의量으로加水分解되는 헤모글로빈의量은限界가 있어서,初期의 낮은 헤모글로빈의濃度에서는加水分解量이 계속增加하였으나 어느濃度以上이 되면加水分解量이 더 이상增加하지 않은 것과 같은傾向이다. 다만,洗滌系의境遇에서는 헤모글로빈이試驗布에固定된狀態로 있으므로酵素의作用이鈍化되어서除去量이 크게增加하지 못한 것으로 생각된다.

AOS洗液과酵素를並用한境遇에서는 헤모글로빈의含量이增加할수록 헤모글로빈의除去量은 크게增加하였다. 이것은酵素와 AOS의相乘作用으로 인한 것이라고 생각된다.

Fig. 4는蒸溜水와酵素, AOS洗液과酵素의境遇를比較하기 위하여試驗布 1g當에附着된 헤모글로빈의含量을基準으로 하여前報<sup>10)</sup>에引用한 5式에 의하여洗滌舉動을 나타낸 것이다. Fig. 4에 의하여算

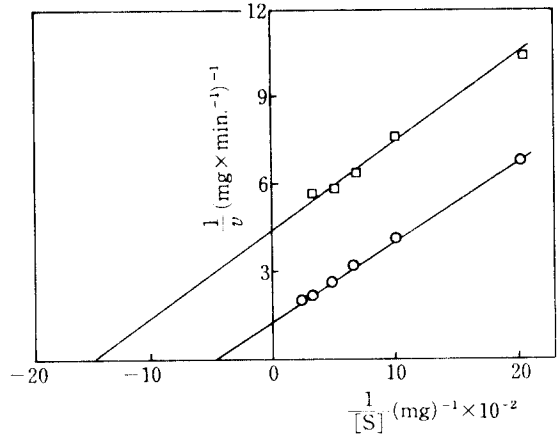


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of the removal of hemoglobin. Water+enz. (□), AOS+enz. (○)

Table 3. Kinetic parameters for the removal of hemoglobin

Parameter	K <sub>m</sub> (mg)	V <sub>max</sub> (mg.min. <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> (min. <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (min. <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )
Washing solution				
Water+enz.	6.76	2.3 × 10 <sup>-1</sup>	6.67 × 10 <sup>-2</sup>	9.87 × 10 <sup>-3</sup>
AOS+enz.	21.69	7.8 × 10 <sup>-1</sup>	2.26 × 10 <sup>-1</sup>	1.04 × 10 <sup>-2</sup>

출한 K<sub>m</sub> 및 V<sub>max</sub> 등의 값은 Table 3에 나타내었다.

Table 3에 의하면 AOS洗液과酵素를並用한境遇에서는蒸溜水에酵素만 있는境遇에 비하여 K<sub>m</sub>은約3.2배, V<sub>max</sub>는約3.4배가 큰 값으로算出되었다.

따라서酵素와 AOS의相乘作用은 다음과 같이說明할 수 있다. 즉,洗滌系의 헤모글로빈은熱變成에 의하여疏水性 아미노산들이表面으로露出되어凝集된 것으로看做되는 데, AOS의界面活性作用으로變成 헤모글로빈의表面이親水化될 수 있다.

K<sub>m</sub> 값이 크게算出되었으므로酵素는 AOS에 의하여妨害를 받아서酵素와 헤모글로빈의複合體形成은蒸溜水와酵素의境遇보다約3.2배程度 힘들어지나, 일단酵素의加水分解作用으로部分的으로 헤모글로빈의化學結合이 끊어지면 AOS의界面附着,浸透,膨潤,分散 등의作用으로 헤모글로빈의 조각들이纖維로부터 더욱 쉽게除去되어겉보기反應速度가 크게 나타났다

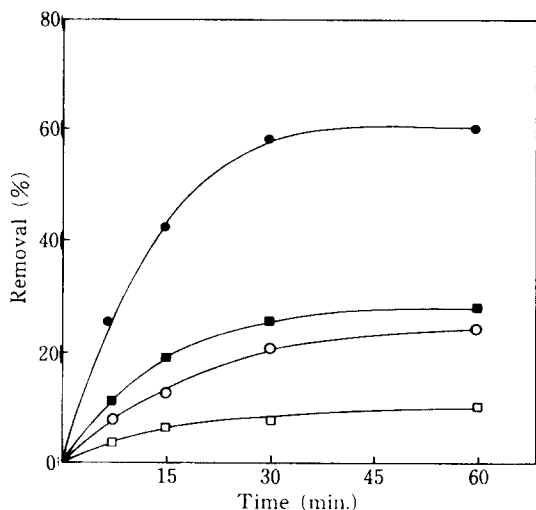


Fig. 5. Effect of washing time on the removal of hemoglobin.

Water+enz. (■), AOS+enz. (○),

AOS+enz. (●)

Conditions: Detergent conc. 0.1 %  
Enzyme conc. 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
pH 9.5  
Temperature  $40 \pm 2^\circ\text{C}$

고 볼 수 있다. 따라서 효소와 AOS가 함께 있을境遇에는相乘效果가觀察된다고 생각된다. 그러므로汚垢布에서 헤모글로빈을除去하는 데 있어서 헤모글로빈蛋白質과 효소의複合體形成이 잘 일어나加水分解가圓滑하게 이루어지도록 하고,界面活性劑를並用하여分解된蛋白質의 조각들을界面活性作用으로除去하면效率的으로洗滌效果를 높힐 수 있다고 思料된다. 이때,除去된汚垢가 다시纖維로再浸着되는再汚染現象을阻止할 수 있는要因도 함께考慮하면 바람직하리라고判斷된다.

Fig. 3-b에서 헤모글로빈의含量이 더욱增加하면 AOS와 효소를並用한洗液의境遇에서도 헤모글로빈의除去量은平衡値에到達할 것으로推定된다. 以上の結果를參照하여試驗布 무게에 대하여約 2%의 헤모글로빈을附着시켜 만든汚垢布를洗滌實驗에使用하였다.

### III-3. 洗滌時間의影響

洗滌時間이 헤모글로빈汚垢布의洗滌성에 어떤影

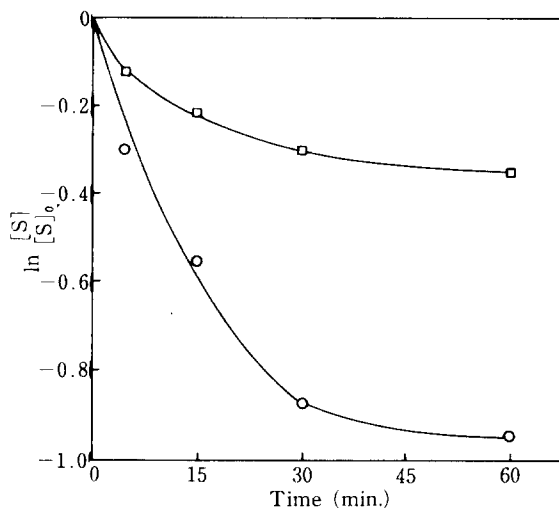


Fig. 6. Reaction kinetics of the removal of hemoglobin.

Water+enz. (□), AOS+enz. (○)

Conditions: Detergent conc. 0.1 %

Enzyme conc. 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$

pH 9.5

Temperature  $40 \pm 2^\circ\text{C}$

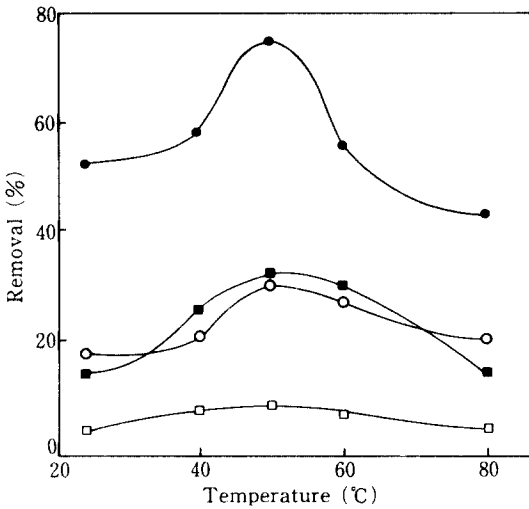
響을 미치는지 알아보기 위하여 0~60分으로洗滌時間을變化시켜實驗한結果는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5를 보면 5分, 15分의 비교적 짧은洗滌時間의境遇에서는洗滌率의向上이 컸으나 30分以上の時間에서는洗滌率이 거의一定하여졌다. 이러한傾向은全血 및血清汚垢布의境遇에서도類似하게 나타났다<sup>3)</sup>.

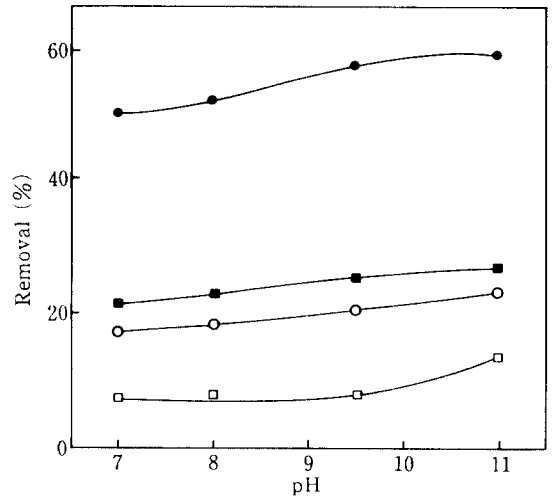
효소의作用과界面活性劑의作用을各各檢討하기 위하여 Table 2에 따라 pH를 9.5로一定하게 하고蒸溜水, 蒸溜水와 효素, AOS洗液, AOS洗液과 효素로各各洗滌實驗하였다.

洗滌時間이 30分인境遇에서蒸溜水の洗滌率과比較할 때, 蒸溜水에 효素를添加하여洗滌率이 18% 더 높아졌으며, 蒸溜水에 AOS를添加하여洗滌率이 13% 더向上되었다. 그러나 AOS와 효素를 첨가한洗液의境遇에서는蒸溜水の境遇에서보다 50% 더洗滌率이 높아짐으로써 효素의分解作用으로 인한增加分과 AOS의界面活性作用으로 인한增加分을 합친 31%보다越等하게洗滌效果가增進되었다. 또한綿織物試驗布에서 헤모글로빈의除去率은 AOS洗液과 효素 > 蒸溜水와 효素 > AOS洗液 > 蒸溜水の順序로 나타났다.





**Fig. 7.** Effect of washing temperature on the removal of hemoglobin.  
 Water (□), Water+enz. (■), AOS (○), AOS+enz. (●)  
 Conditions: Detergent conc. 0.1 %  
 Enzyme conc. 30 µg/ml  
 pH 9.5  
 Time 30 min



**Fig. 8.** Effect of pH on the removal of hemoglobin.  
 Water (□), Water+enz. (■), AOS (○), AOS+enz. (●)  
 Conditions: Detergent conc. 0.1 %  
 Enzyme conc. 30 µg/ml  
 Temperature 40±2°C  
 Time 30 min

따라서 헤모글로빈의除去에는界面活性劑보다 酵素의作用이 더 效果的이며, 界面活性劑를 添加할 境遇에는 III-2에서 論한 바와 같이 相乘 效果가 顯著하게 나타남을 알 수 있다.

Fig. 6에는 洗液에 酵素를 添加하였을 때 洗滌 時間의 變化에 따라 汚垢布에서 헤모글로빈이 除去되는 反應 機構를 살펴 본 것이다. 水溶液 狀態의 헤모글로빈이 酵素에 의하여 加水分解되는 反應은 前報<sup>10)</sup>에 나타난 것처럼 1次 反應으로 나타났지만 織物에 附着된 헤모글로빈이 洗液에서 除去되는 反應은 다르게 나타났다. 이것은 溶液 狀態의 헤모글로빈은 反應 時間의 增加에 따라 酵素의 反應이 促進되어 계속 直線的으로 加水分解된 데 비하여 綿織物에 附着된 헤모글로빈은 熱 變化에 의하여 固着 狀態로 되어 있으므로 洗滌 時間의 增加와 더불어 比例的으로 除去되지 않고, 相對的으로 織物 및 纖維 内部에 殘存하여 脫落되기 어렵기 때문인 것 같다.

一般的으로 界面活性劑의 作用에 의한 汚垢의 洗滌 機構는 1次 反應인 境遇가 많지만 本 實驗에서는 1次 反應이 아닌 것으로 나타났으며, 蒸溜水에 酵素를 添加

한 境遇와 AOS에 酵素를 添加한 境遇에서의 反應이 서로 類似하게 나타났기 때문에 (Fig. 6), 界面活性劑의 影響보다는 酵素의 影響이 더 크다고 생각된다. 그러므로 纖維의 特性, 汚垢의 特性, 洗液 成分 등 洗滌系에 關聯된 여러 가지 因子에 대한 酵素의 適應性이 洗滌에 큰 影響을 미친다고 생각할 수 있다.

#### III-4. 洗滌 溫度의 影響

洗滌 溫度가 헤모글로빈 汚垢布의 洗滌性에 어떤 影響을 미치는지 알아 보기 위하여 洗液의 溫度를 25~80°C의 範圍로 變化시켜서 實驗한 結果는 Fig. 7과 같다.

Fig. 7을 보면 蒸溜水 및 AOS 洗液에 各各 酵素를 添加한 境遇에서 溫度의 影響이 크게 나타났다. 즉, 酵素의 最適 溫度인 50°C에서 가장 높은 洗滌率을 나타내었다. 이러한 傾向은 前報<sup>10)</sup>의 研究 結果와 一致하였다.

蒸溜水만으로 洗滌한 境遇에서는 溫度의 變化에 따라 洗滌性의 差異는 거의 나타나지 않았으며 全般的으로 매우 낮게 나타났다. 蒸溜水에 酵素를 添加한 洗液에서

는 50~60°C에서 높은 洗滌率을 나타내었으며, 25°C와 80°C에서는 洗滌率이 낮게 나타나서 前報<sup>10)</sup>에 附屬된 結果라고 생각된다.

AOS 洗液만으로 洗滌한 境遇에는 比較的 低溫에서는 洗滌率이 낮았으며, 50°C 以上の 溫度에서는 다소 높아졌지만 60°C 以上에서는 洗滌率이 低下되었다. 그리고 AOS에 酵素를 添加한 洗液에서는 크게 洗滌率이 向上되었다. 특히 25°C의 低溫에서도 洗滌 效率이 顯著하게 높아져서 酵素를 添加하지 않은 境遇보다 약 3배 程度 높은 洗滌率을 나타내었다. 또한 50°C에서는 가장 높은 洗滌性을 보였으며, 60°C 및 80°C의 高溫에서는 洗滌率이 크게 낮아졌다. 이러한 結果와 헤모글로빈을 水溶液 狀態에서 加水分解한 前報<sup>10)</sup>의 研究 結果를 比較해 보면, 50°C에서 洗滌 效率이 最大值를 보인 것은 一致하였다. 반면에 25°C 低溫에서는 加水分解率이 매우 낮았지만 洗滌率은 相對的으로 높게 나타났으며, 60°C의 溫度에서 加水分解率은 50°C와 비슷하였으나 洗滌率은 크게 낮아졌다. 따라서 酵素에 의한 加水分解率과 洗滌性은 반드시 一致한다고 볼 수는 없다.

酵素의 最適 溫度에서 洗滌 效果가 높게 나타난 結果는 많은 報告<sup>1,2,4-6,25)</sup>와 一致하였다. 또한 酵素의 活性이 낮은 低溫에서는 前報<sup>10)</sup>의 研究 結果에서 보이듯이 헤모글로빈의 加水分解率이 낮았지만, Fig. 5에서 洗滌率이 比較的 높게 나타난 現象은 다른 研究<sup>26-28)</sup>에서도 報告되었다. 이러한 結果로부터 洗滌系에서는 약간의 加水分解에 의해서도 蛋白質의 協同 結合이 顯著하게 低下되기 때문에 洗滌 效果가 좋아지는 것으로 생각된다<sup>24)</sup>.

蒸溜水에 酵素만 添加한 境遇에 비하여, AOS를 더 添加한 境遇에서 越等하게 洗滌性이 높아져서 AOS의 補助 效果가 큰 것을 알 수 있다. 한편, AOS 洗液만으로 洗滌한 境遇에 비하여 酵素를 첨가한 AOS 洗液에서 역시 洗滌 效果가 顯著하게 增加하였으므로 酵素와 AOS의 同時 使用이 洗滌에서 매우 效率的임을 알 수 있다.

60°C에서는 前報<sup>10)</sup>의 研究 結果와 相反되게 洗滌率이 오히려 低下된 것은 織物에 附着된 蛋白質이 洗液의 溫度가 60°C 이상이 되면 變成 정도가 더욱 심해져서 溶解度가 減少하고, 酵素의 作用이 鈍化되기 때문이 아닌 推定되며 AOS 界面活性劑의 特性과도 關聯이 있지 않나 생각된다.

洗滌 溫度에 있어서는 酵素의 溫度 特性 및 熱에 대한 安定性 이외에도 헤모글로빈의 물에 대한 溶解度, 分散性 등이 洗滌에 영향을 미치므로 高溫의 洗液에서는 오히려 洗滌 效果가 낮아졌다고 생각된다.

### III-5. 洗液의 pH 影響

洗液의 pH가 헤모글로빈 汚垢布의 洗滌率에 어떤 影響을 미치는지 알아보기 위하여, Table 2에 의하여 pH를 7.0~11.0으로 變化시켜서 實驗한 結果는 Fig. 8과 같다.

Fig. 8을 보면 一般的으로 洗液의 pH가 알칼리가 될수록 洗滌率이 緩慢하게 增加하였지만 pH의 影響은 크게 나타나지 않았다. 대체로 AOS 洗液과 酵素 > 蒸溜水와 酵素 > AOS 洗液 > 蒸溜水의 順으로 洗滌 效率이 나타났다.

헤모글로빈을 水溶液 狀態에서 加水分解한 前報<sup>10)</sup>의 研究 結果와 比較해 보면, pH가 높아질수록 加水分解率이 增加한 것과 같이 洗滌性도 pH가 높아질수록 增加하였다. 그러나 前報<sup>10)</sup>의 研究 結果에서는 pH 9.5 以上에서 加水分解率이 顯著하게 높아졌지만 Fig. 8에서는 헤모글로빈의 除去率이 그다지 높지 않았다. 一般的으로 洗液의 pH가 알칼리성으로 될수록 蛋白質의 溶解度가 增加함에 따라 蛋白質 汚垢布에서 蛋白質의 除去率이 높아진다<sup>1,2,4-6,25)</sup>.

또한 前報<sup>10)</sup>의 研究 結果를 보면 中性(pH 7.0~8.0) 附近에서 加水分解率이 매우 낮게 나타났지만, 洗滌系의 境遇에서는 洗液의 pH가 中性 附近에서도 相對的으로 洗滌 效率이 높게 나타나지 서로 다른 舉動을 보이고 있다.

이와 같이 加水分解率이 높은 條件에서 洗滌性이 그다지 높게 나타나지 않은 것은 헤모글로빈 水溶液의 加水分解 條件과는 달리 試驗布에 附着시킨 헤모글로빈은 維織 基質에 熱變成된 狀態로 固定되어 있으므로 洗液內의 헤모글로빈 分子의 境遇와는 달리 立體 障壁를 받아 酵素의 作用이 鈍化되기 때문이다. 반면에, 洗滌系에서는 酵素의 加水分解 作用으로 헤모글로빈이 조금만 分解되어도 洗滌 效果는 크게 增進되었다. 따라서 헤모글로빈 汚垢布에서 헤모글로빈을 除去하는데 미치는 酵素의 反應 機構는 織物에 附着된 헤모글로빈의 協同 結合을 弱화시키는데 主된 作用이 있으며, 酵素와의 相互

適應성이 좋으면서 維纖 基質과 汚垢의 特性에 附合되는 界面活性劑를 並行하면 酵素의 分解 作用과 더불어 界面活性劑의 作用이 서로 相互作用을 하기 때문에 洗滌 效果를 높일 수 있다.

#### IV. 結 論

Protease(subtilisin Carlsberg)가 血液 蛋白質 汚垢의 除去에 미치는 影響을 究明하기 위하여, subtilisin Carlsberg에 의한 헤모글로빈의 加水分解率과 헤모글로빈 汚垢布의 洗滌性을 關聯지워 檢討하였다. 洗滌 實驗에 使用한 汚垢布는 綿織物 試驗布에 헤모글로빈 溶液을 均一하게 點適하여 乾燥한 다음 高壓 水蒸氣에 의하여 熱變成시켜서 使用하였다. 헤모글로빈 汚垢布는 Terg-O-Tometer를 使用하여 洗滌하고 洗滌 前後의 汚垢布 上의 蛋白質을 銅-Folin法에 의해 定量하여 洗滌率을 評價하였다.

實驗한 結果로부터 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. Subtilisin Carlsberg에 의한 헤모글로빈 汚垢布의 洗滌性은 酵素의 濃度가 增加할수록 높게 나타났지만 어느 濃度 以上이 되면 헤모글로빈의 除去率이 低下되었다.

2. Subtilisin Carlsberg에 의한 헤모글로빈 汚垢布의 洗滌性은 酵素를 添加하지 않은 境遇에 비해 顯著하게 높아졌으며, 界面活性劑와 並行할 境遇에는 相乘作用으로 洗滌性이 더욱 增加되었다. 이중 酵素와의 相互適應성이 좋은 AOS 洗液에서 洗滌性이 가장 높게 나타났다.

3. 洗滌系에서 酵素에 의해 헤모글로빈이 除去되는 反應은 비교적 짧은 時間에서는 洗滌性이 높아졌으나 그 후에는 緩慢한 增加를 보이다가 一定하여짐으로써 加水分解 反應과는 서로 다른 舉動을 나타냈다.

4. Subtilisin Carlsberg에 의한 헤모글로빈 汚垢布의 洗滌性은 50°C에서 가장 높게 나타났다. 그러나 酵素에 의한 헤모글로빈의 加水分解率과 比較할 때 洗滌性은 低溫에서도 相對的으로 높게 나타났으며 60°C 以上에서는 顯著하게 낮아졌다.

5. Subtilisin Carlsberg에 의한 헤모글로빈 汚垢布의 洗滌性은 洗滌의 pH가 7.0~8.0 附近에서도 相對的으로 높게 나타났으며 대체로 pH가 增加할수록 洗滌性이 높아졌으나 그 增加率は 比較的 낮았다.

6. 洗滌系에 subtilisin Carlsberg를 添加할 境遇에 헤모글로빈의 除去率이 크게 높아졌고 AOS를 並行할 境遇에는 相乘作用이 顯著하게 나타난 現象은 위의 研究 結果로부터 다음과 같이 說明할 수 있다. 즉, subtilisin Carlsberg에 의한 헤모글로빈의 주된 洗滌機構는 우선 維纖에 附着된 헤모글로빈의 表面에서 酵素와 헤모글로빈 基質과의 複合體(E-S complex)가 形成되어 部分적으로 헤모글로빈이 加水分解되고, 이에 따라 維纖에 附着된 헤모글로빈의 協同 結合(cooperative binding)을 弱화시킴으로써 헤모글로빈의 조각들이 容易하게 除去된다고 볼 수 있다. 이들 過程이 反復되어 점점 汚垢의 内部로 酵素가 浸透하여 順次的으로 汚垢의 分解가 增幅되어 除去된다고 判斷된다. AOS를 並行할 境遇에는 變性된 헤모글로빈 蛋白質의 流水性 表面에 AOS 分子들이 吸着하여 界面活性作用을 함으로써, 더욱 效果的으로 協同 結合이 弱化되어 헤모글로빈의 조각들이 除去되므로 顯著한 相乘作用이 觀察된다고 思料된다.

#### 參 考 文 獻

- 1) 皆川 基, 重田 美智子, 所 康子, 奥山 春彦, 藤井 富美子, たん白質汚れの洗淨に關する研究(第二報), 卵白アルブミン汚染布の洗淨について, 織消誌, 10(2), 66-74 (1969).
- 2) 皆川 基, 重田 美智子, 奥山 春彦, たん白質汚れの洗淨に關する研究(第三報), 血液汚染布の洗淨について, 織消誌, 11(5), 263-273 (1970).
- 3) 所 康子, 皆川 基, 血液たん白質汚れの洗淨に關する研究(第三報), プロテアーゼの 基質特異性なびに活性か洗淨性に及ぼす影響, 織消誌, 26(3), 123-129 (1985).
- 4) 皆川 基, 重田 美智子, 所 康子, 奥山 春彦, たん白質汚れの洗淨に關する研究(第五報), 牛乳カゼイン汚染布の洗淨について, 織消誌, 13(12), 519-529 (1972).
- 5) 皆川 基, 所 康子, 重田 美智子, 奥山 春彦, たん白質汚れの洗淨に關する研究(第六報), セラチン汚染布の洗淨について, 織消誌, 15(1), 15-21 (1974).
- 6) 皆川 基, 岡本 幾子, 重田 美智子, たん白質汚れの洗淨に關する研究(第八報), 頸部綿汚染布に附着する表皮角質層汚れの洗淨について, 織消誌, 19, 420-430, (1978).
- 7) 皆川 基, 岡本 幾子, たん白質汚れの洗淨に關する研

- 究(第七報), 衣類に付着する表皮角質層れについて, 繊維消誌, **19**(3), 106-115 (1978).
- 8) 所 康子, 皆川 基, 血液たん白質汚れの洗淨に関する研究(第五報), 變性たん白質汚れの洗淨について, 繊維消誌, **27**(10), 449-455 (1986).
- 9) Kame, M., Koda H., Kato A and Koma, T., Detergency and Mechanism of Soil Removal in Detergent-Enzyme System, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**(11), 464-469 (1973).
- 10) 李貞淑, 金聲連, Protease(Subtilisin Carlsberg)가 血液 蛋白質 汚垢의 除去에 미치는 影響( I ), Subtilisin Carlsberg 에 의한 헤모글로빈의 加水分解率, 韓國衣類學會誌, **20**(6), 550-559, (1996).
- 11) Hoogerheide, J.C.. Die Entwicklung von Enzymen zur Verwendung in Waschmitteln, *Fette Seifen Anstrichm.*, **70**(10), 743-753 (1968).
- 12) Cutler, W.G. and Davis, R.C., Detergency, Theory and Test Methods, part 1. Surfactant Science Series, Vol. 5, Marcel Dekker, 386-392, (1972).
- 13) Cayle, T., Evaluation of Enzymes for Laundry Products, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **46**, 515-519, (1969).
- 14) Kirk, P.L., Kjeldahl Method for Total Nitrogen, *Anal. Chem.*, **22**(2), 354-358, (1950).
- 15) 副島正美, 菅原潔, 蛋白質の定量法, 生物化學實驗法, A一般分析法 3, 東京大學出版會, 65-114 (1969).
- 16) Folin Otto and Ciocalteu Vintila, On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins, *J. Biol. Chem.*, **73**(2), 627-650, (1927).
- 17) Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr A. Lewis and Randall Rose J., Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, (1951).
- 18) 皆川 基, たん白質汚れの洗淨に関する研究, 銅-Folin 試薬によるたん白質の定量について, 大阪市立大學家政學部紀要, **20**, 55-65 (1972).
- 19) Novo Analytical Method: Manual Procedure for Determination of Proteolytic Activity in Enzyme Preparations and Detergents, (1984).
- 20) 日本規格協會: JIS K3371-1976, 衣料用 合成洗劑.
- 21) 小ノ澤 治子, 小見山 二郎, 洗劑用酵素の活性に及ぼす 15種の洗劑成分の影響, 日本家政學會誌, **39**(12), 1273-1280 (1988).
- 22) 水島 三一郎, 赤堀 四郎, 蛋白質化學, 2, 共立出版株式會社, 571, (1954).
- 23) Boyer P.D., the Enzymes, vol. 3., Hydrolysis: Peptide Bonds, Academic Press, 639-644, (1971).
- 24) 李貞淑, 沈潤貞, 蛋白質 分解 酵素가 洗滌에 미치는 影響, 酵素와 汚染基質의 特性을 中心으로, 韓國衣類學會誌, **17**(3), 491-505 (1993).
- 25) 皆川 基, 重田 美智子, 奥山 春彦, たん白質汚れの洗淨に関する研究(第四報), 酵素洗淨における金屬イオンの影響について, 繊維消誌, **11**(5), 274-279 (1970).
- 26) 所 康子, 皆川 基, 血液たん白質汚れの洗淨に関する研究(第四報), プロテアーゼの pH 特性ならびに温度特性が洗淨に及ぼす影響, 繊維消誌, **26**(11), 479-484 (1985).
- 27) 岡本 幾子, 皆川 基, たん白質汚れの洗淨に関する研究, 低温洗淨における酵素作用の影響について, 繊維消誌, **28**(4), 167-172 (1987).
- 28) 岡本 幾子, 皆川 基, たん白質分解酵素による豫浸を行つた場合, 洗淨時の機械作用が表皮角質層汚染綿布の洗淨ならびに損傷におよぼす影響について, 繊維消誌, **28**(12), 522-530 (1987).