

Radish β -amylase 에 관한 研究

禹 源 植

Won Sick Woo: Studies on β -Amylase of Radish

(Drug Research Institute, Seoul National University)

Purified preparation of β -amylase is obtained from radish root by the means of fractional precipitation with ammonium sulfate.

Purified preparation saccharifies the starch, β -maltose being formed. Dextrinization in the true sense does not take place. Hydrolysis ceases when approximately 50% of the theoretical yield of maltose is obtained and there remains a substance (to be β -limit dextrin) which gives a blue-violet with iodine, no glucose being formed.

Stability of preparation is optimal at pH 4~9 and more completely inactivated at 65° in fifteen minutes.

β -Amylase of radish exhibits optimal activity at and near pH 5.0, which varied depending upon the buffer.

Calcium and chloride ions do not effect the activities of enzyme.

The results of experiments with oxidizing, alkylating and mercaptide-forming reagents which have been reported to be specific for sulfhydryl groups confirm that free sulfhydryl groups are essential to the activity of β -amylase from radish.

(Received September 6, 1962)

緒 論

一般農作物에 含有되는 澱粉分解酵素에 對하여는 廣範圍 調査가 되어 있으나 고구마¹⁾, 콩²⁾, 보리³⁾, 밀⁴⁾, 수수⁵⁾, 고추냉이⁶⁾ 등 數種을 除外하고는 酵素의 存在만을 定性的으로 確認하였을뿐 詳細한 研究는 이루어지고 있지 않다. Radish 에 對하여도 다만 澱粉分解酵素의 存在만을 論及하고 있을뿐⁷⁾ 그 酵素의 利用值의 資料를 提供하는 報告가 없으므로 著者는 Radish 澱粉分解酵素의 應用을 企圖하는 見地에서 高濃度의 β -amylase 를 分離하여 그 酵素化學의 性質을 檢討하였다.

實 驗

I. 酵素力測定

i) 糖化力測定

2% 可溶性澱粉溶液에 40°C 에서 30分間 酵素를 作用시키고(Acetate buffer pH 4.0) 生成된 還元糖을 Willstätter-Schudel 法에 準하여 測定하여 maltose 로서 換算 表示하였다.

ii) 糊精力測定

糖化力測定과 同一한 條件에서 反應시킨 液 0.1 ml 를 10⁻³M 沃度溶液에 加한 後 沃度澱粉의 呈色을 調査하였다.

II. 酵素의 精製

i) 酵素의 鹽析

Radish 를 blender 로 磨細한 後 遠心分離한 汁液에 여러濃度의 黃酸암몬을 加한後 鹽析된 物質

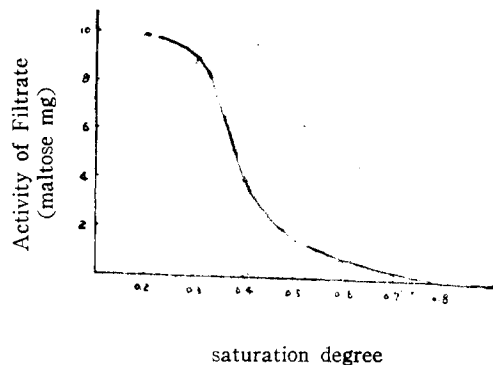


Fig. 1 Salting out of Enzyme with Ammonium Sulfate

을 濾別하고 濾液에 對하여 殘存酵素의 分解力을 測定하여 黃酸암몬의 最適鹽析濃度を 決定하였다.

即 Fig. 1에 表示되는 바와 같이 澱粉分解酵素는 0.7 飽和에서 거의 完全히 沈澱됨을 알았다(飽和도는 溶液 100ml에 黃酸암몬 76 g을 加한 때를 1 飽和로 하였음).

ii) 酵素의 濃縮

Radish의 汁液에 黃酸암몬을 加하여 飽和로 한 後 酵素를 完全히 沈澱시키고 沈澱物을 물에 溶解하여 다시 黃酸암몬을 加하여 0.7 飽和로 한 後 鹽析物에 물을 加하여 0.2 飽和가 되도록 한 後 이 溶液에 다시 黃酸암몬을 加하여 0.5 飽和로 하고 다시 물에 溶解시켜 0.2~0.5 飽和에서 鹽析을 3回 反復하고 鹽析物은 蒸溜水로 3日間 透析하였다.

이 透析液에서는 黃酸이온이 檢出되지 않았으나 若干 褐色으로 着色되어 있었으며 本液 1ml는 40°C에서 30分間에 澱粉을 分解하여 maltose 1400 mg를 生成한다. (Radish의 原汁液 1ml는 같은 條件下에서 maltose 6 mg을 生成하므로 約 250倍 濃縮液에 該當됨)

本酵素液은 Fig 2에 表示됨과 같이 約 50%의 澱粉分解率을 나타낸다.

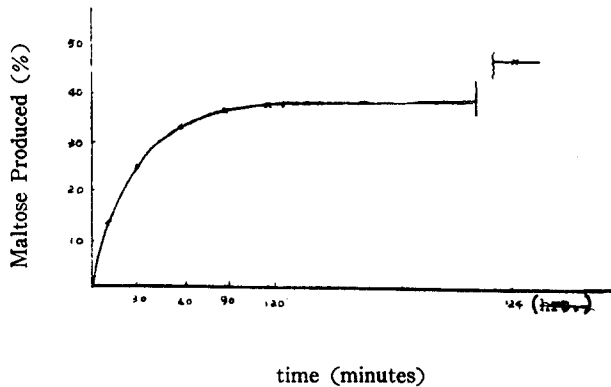


Fig. 2 Amylolysis

iii) 精製酵素液의 純度

Radish 汁液과 本精製酵素液에 對하여 糖化力 및 糊精力을 比較한 結果는 Table 1과 같다.

Table I. Comparison between Actions of Radish Root Juice and Purified Enzyme Solution

	radish root juice	diluted enzyme sol.
dextrinifing power	yellow (90 mins)	violet-blue (24 hrs)
saccharifying power	6.17 mg	22.09 mg

即 精製하므로써 糊精力은 消失되었으나 糖化力은 增加되었음을 알 수 있다. 本精製酵素와 0.8 飽和로 鹽析된 鹽析物에 對하여 Wijsman의 分別擴散法⁸⁾으로 α 및 β -amylase의 存在를 檢討한 結果 0.8 飽和鹽析物에는 α , β 酵素의 共存이 認定되었으나 精製酵素에는 α -amylase가 檢出되지 않으므로 이 結果는 Radish의 α -amylase가 黃酸암몬分別精製過程에서 除去된 것으로 생각한다.

또한 本酵素液의 反應液에 對한 paper chromatography (上昇法 四次 展開 pyridine : butanol : H₂O = 6 : 4 : 3 濾紙 Whatman No. 1)는 maltose 만을 檢出하였고, glucose는 檢出되지 않았다. 따라서 本酵素液에는 maltase도 含有되지 않음을 認定하였고, 또 反應液에 對하여 變旋光을 測定하여 Table 2와 같은 結果를 얻었다.

이 結果는 生成된 maltose 가 β -maltose 임을 意味하며 따라서 本酵素가 β -amylase 임을 確認하였다.

Table II. Mutarotation of Hydrolysate

Incubation time(min)	Immediately	After adding Na_2CO_3	Mutarotation
0	+6.50	+6.50	0
15	+6.32	+6.38	+0.06
30	+6.02	+6.13	+0.11

Ⅲ. 精製酵素의 安全性

1) 溫度에 對한 安全性

稀釋酵素液을 여러 溫度에서 15分間 放置한 다음 殘存酵素力을 測定한 結果는 Table Ⅲ-(1)과 같으며 60°C 에서 加溫時間을 延長한 實驗結果는 Table Ⅲ-(2)와 같다.

이 結果로 本酵素는 60°C 15分에서도 安全함을 알 수 있으며 1時間에서는 거의 $\frac{1}{2}$ 程度가 破壞됨을 알 수 있다.

Table III. Stability to Heat

(1) Varying Temperature for 30 minutes

Temperature (degree)	Maltose produced (mg)	% of activity
25	22.09	100.0
50	22.26	100.8
60	20.97	94.9
65	2.23	10.1
70	1.11	5.1

(2) Varying period at 60 degrees

Time (minute)	Maltose produced (mg)	% of activity
0	36.81	100.0
15	34.69	94.2
30	30.73	83.5
60	24.65	67.0

原液(濃縮酵素液)은 50°C 以下에서는 約 2個月間 酵素活性에 別影響이 없었으나 稀釋한 溶液은 漸次的으로 酵素活性이 低下됨을 觀察하였다.

ii) 液性에 對한 安全性

稀釋酵素液... 5cc를 N/50 H_2SO_4 , N/50 NaOH 加하여 여러 pH 로 調節한 後 30分間 室溫(28°C)에서 放置하였다 中和한 後 물을 加하여 10cc로 한 液에 對하여 酵素力을 測定한 結果는 Fig. 3 와 같다.

即 本酵素는 pH 4~9 에서 安

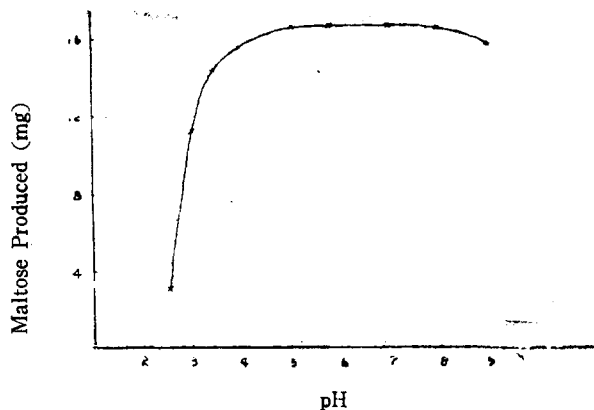


Fig. 3 Stability to pH

全함을 알 수 있다.

IV. 最適 pH

緩衝液으로서 acetate 및 citrate buffer 를 사용하여 水素이온濃도에 의한 酵素作用에 對한 影響을 調査한 結果는 Fig 4 와 같다.

即 citrate buffer 에서는 pH 5.5, acetate buffer 에서는 pH 5.0 에서 最適 pH 를 보이고 있으나 그 最適範圍는 大端히 넓다.

V. 阻止劑 및 無機이온의 影響

澱粉分解酵素作用에 影響을 주는 몇가지 物質에 對하여 그 作用을 檢討한 結果는 Table IV 와 같다.

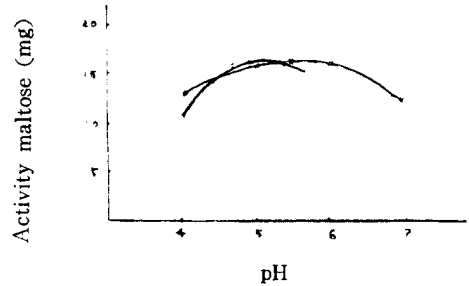


Fig. 4. Influence of pH on Enzyme Activity

Table IV. Influences of Several compounds on Enzyme Action

Reagent	Treatment Concentration (mols)	After Treatment Activity % of control
AgNO ₃	1.0×10 ⁻⁶	43
AgNO ₃	1.0×10 ⁻⁵	0
HgCl ₂	1.0×10 ⁻⁶	0
CuSO ₄	1.0×10 ⁻⁴	44
Pb(Ac) ₂	1.0×10 ⁻⁴	98
NaCl	1.0×10 ⁻⁴	100
Ca(Ac) ₂	1.0×10 ⁻⁴	100
I ₂	5.0×10 ⁻⁴	0
ICH ₂ COOH	5.0×10 ⁻²	62
Cl-HgC ₆ H ₄ COOH	2.0×10 ⁻²	0

Treated with ICH₂COOH for one hundred and twenty minutes and with other reagents for thirty minutes at room temperature.

即 Ca⁺⁺ 또는 Cl⁻에는 影響을 받지 않으나 重金屬 및 有機金屬化合物에 依하여 大端히 阻止되며 酸化劑, 알킬化劑에 依하여서도 阻止作用을 받았다.

考 察

Radish 에서 黃酸암분別沈澱法으로 容易하게 高濃度の β-amylase 酵素液을 얻을 수 있었으며 精製過程中 着色됨을 發見하였으나 이 現象은 peroxidase 作用에 基因한 것으로 生覺된다.

小麥의 β-amylase⁹⁾, 甘藷의 β-amylase¹¹⁾의 最適 pH 는 緩衝液의 種類에 따라 變化함과 같이 本酵素도 緩衝液의 種類에 따라 差가 있었고 다른 植物의 β-amylase 와 거이 같은 態度를 보여 주었다. 酸化劑인 沃度와 mercaptide 를 形成하는 重金屬類 및 有機金屬化合物인 p-chloromercuri benzoate, alkylating reagent 인 沃度醋酸으로 本酵素의 活性이 強力히 阻止됨은 本酵素가 SH 酵素임을 示唆하는 것이며, 本酵素가 澱粉을 分解하여 β-amaltose 만을 生成하고 65°, 15分間에서 그 酵素作用이 거이 大部分 喪失되며 酸에 對하여는 比較的 安全한 點은 現在까지 알려진 植物 β-amylase 의 作用 및 性質에 比하여 類似하다. (서울大學校 生藥研究所)

文 獻

1. A.K. Balls M.K. Walden and R.R. Thompson: J. Biol. Chem., **173**, 9 (1948)
2. 福本, 辻阪: 科學と工業 **28**, 282 (1954)

3. S. Schwimmer: J. Biol. Chem., **179**, 1063(1949). K.H. Meyer E.H. Fischer and A. Piguet: Helv. Chim. Acta, **34**, 316(1951)
 4. K.H. Meyer P.F. Spahr and E.H. Fischer: Helv. Chim. Acta, **36**, 1924(1953)
 5. S.K. Dube and P. Nordin: Arch. Biochem. Biophys., **94**, 121(1961)
 6. 春日井 : 農化 **33**, 1111, 1115(1959)
 7. 中村, 山崎, 丸屋 : 農化 **24**, 197(1951) 中村, 山崎, 戸田 : 農化 **25**, 119(1951) 春日井 : 家庭學雜誌 **3**, 6(1953)
 8. 二國 : 澱粉化學, 再版, p. 407(1951) G.A. van Klinkenberg : Proc. Acad. Sci. Amsterdam **34**, 893 (1931)
 9. G.A. Ballou and J.M. Luck: J. Biol. Chem., **139**, 233(1941)
-