

# *Pseudomonas stutzeri* IAM 12097 의 Exo-maltotetraohydrolase 에 관한 研究

## 第三報. 各種基質에 對한 Exo-maltotetraohydrolase 의 分解產物 및 分解率

李 美 子 · 鄭 萬 在\*

韓國人蔘煙草研究所, 忠北大學校 食品加工學科\*

(1984年 11月 15日 受理)

### Studies on the Exo-maltotetraohydrolase of *Pseudomonas stutzeri* IAM 12097

#### Part III. Reaction products and hydrolysis rate on various carbohydrates of Exo-maltotetraohydrolase

Mi-Ja Lee and Man-Jae Chung\*

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Daejeon, \*Department  
of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chung Buk  
National University, Cheongju, Korea.

#### Abstract

Exo-maltotetraohydrolase produced by *Pseudomonas stutzeri* IAM 12097 was characterized with respect to substrate specificity, the reaction products and hydrolysis rate on various carbohydrates.

Maltopentaose, maltoheptaose, soluble starch, amylose, amylopectin, oyster glycogen and gelatinized starch of corn, potato, glutinous rice, green banana and arrow root were hydrolyzed by this enzyme, but  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -cyclodextrin, sucrose, raffinose, lactose, pullulan, maltose, maltotriose and maltotetraose were not hydrolyzed. Among oligosaccharides, maltohexaose was favorably hydrolyzed by this enzyme and the main reaction product of oligosaccharides and polysaccharides was maltotetraose. Addition of pullulanase to this enzyme increased the hydrolysis rate on gelatinized starches, but it did not on raw starches. Among various starches, corn starch was favorably hydrolyzed by this enzyme, whereas it acted on potato starch, arrow root starch and high amylose corn starch weakly.

## 序 論

Exo-maltotetraohydrolase는 1971年 Robyt와 Ackerman<sup>1)</sup>에 의하여 *Pseudomonas stutzeri* NR RL B-3389로 부터 發見된 酵素로 本酵素의 特性에 관하여는 廣範圍하게 研究되어 있지 않은 實情이다.

筆者등<sup>2,3)</sup>은 *Pseudomonas stutzeri* IAM 12097이 生産하는 Exo-maltotetraohydrolase을 精製하고, 精製酵素의 特性을 檢討하여 그 結果를 報告하였다.

本報에서는 各種基質에 對한 特異성과 分解産物을 經時的으로 調査하고 各種糊化澱粉 및 生澱粉의 分解率을 比較檢討하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 酵 素

Exo-maltotetraohydrolase는 李등<sup>2)</sup>의 方法에 따라 *Pseudomonas stutzeri* IAM 12097로 부터 精製하였고, Pullulanase는 *Bacillus cereus*로 부터 이온교환수지를 사용하여 精製하였다.

### 2. Paper chromatography

前報에 記述한 方法<sup>2)</sup>에 의하여 실시하였다.

### 3. 糊化澱粉의 分解率測定

各種澱粉 10 mg을 2.0 ml의 5 mM phosphate buffer (pH 6.6)에 넣어 100°C에서 5分間 糊化시킨 후 효소를 0.3unit씩 添加하여 40°C에서 所定時間 反應시켰다. pullulanase와의 混用の 경우에는 各種澱粉 10mg을 1.7ml의 동일완충액에 넣어 糊化시킨 후 本酵素 0.3unit와 pullulanase 0.1 unit를 添加하여 同一한 方法으로 反應시켰다. 反應液을 經時的으로 一定量씩 取하여 沸騰水浴中에서 5分間 煮沸하여 反應을 終지시킨 후 還元糖과 全糖을 Somogyi-Nelson法과 phenolsulfuric acid法<sup>4)</sup>으로 定量하여 各種糊化澱粉의 分解率을 求하였다.

### 4. 生澱粉의 分解率測定

사용한 澱粉量과 buffer 및 酵素量은 糊化澱粉의 分解率測定の 경우와 같으며, 단 糊化시키지 않은 生澱粉을 所定時間 振盪反應(Oscill 120/str-

oke 5cm/min)시켰다. 反應液을 經時的으로 0.2 ml씩 取하여 H<sub>2</sub>O 0.8ml씩을 加한 후, 3,000rpm으로 10分間 遠心分離하여 上澄液과 沈澱物을 分離하고 이 沈澱物에 1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5ml를 넣어 沸騰水浴中에서 5分間 煮沸하여 加水分解시켰다. 分解率은  $\left(1 - \frac{\text{經時日의 殘存澱粉粒(mg/ml)}}{\text{처음의 澱粉粒(mg/ml)}}\right) \times 100$ 으로 계산하였으며 이때 澱粉量은 phenolsulfuric acid法에 의하여 구한 全糖量에 0.9를 곱하여 구했다.

## 5. High performance liquid chromatography (HPLC)

1%의 各種基質 1ml에 5mM phosphate buffer (pH 6.6) 0.9ml와 0.1unit의 효소를 넣고 所定時間 反應시켜 經時的으로 反應液을 일정량씩 取하고 沸騰水浴中에서 5分間 煮沸하여 反應을 終지시킨 다음 20 $\mu$ l를 注入하였으며 HPLC의 조건은 아래와 같다.

Instrument: Waters model 6,000A (Pump)

Waters model U6K (Injector)

RI 8 $\times$  (Detector)

Column: Carbohydrate analysis column  
(3.9mm $\times$ 30cm)

Solvent System: Acetonitrile/H<sub>2</sub>O, 70/30(v/v)

Flow rate: 2ml/min.

Chart speed: 0.5cm/min.

糖의 定量은 Kainuma의 方法<sup>5)</sup>에 따라 실시하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 基質特異性

1% 各種基質 100 $\mu$ l에 酵素를 0.02unit 添加하고 40°C에서 30分間 反應시켰을 때의 相對的加水 分解率을 測定한 結果는 Table 1과 같이 maltose, maltotriose, maltotetraose,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -cyclodextrin, pullulan, raffinose, lactose, sucrose는 分解하지 못하였다. corn, potato, glutinous rice, green banana, arrow root의 糊化澱粉과 amylose, amylopectin의 相對的分解率은 soluble starch다 높았으며 少糖類中에서는 maltohexaose가 約 97%로서 soluble starch와 거의 비슷한 分解率을 나타내었다.

**Table 1.** Substrate specificity of the enzyme

Substrates	Relative hydrolysis rate(%)
Soluble starch	100.0
Amylose	111.6
Amylopectin	124.1
Oyster glycogen	77.8
Corn starch*	104.4
Potato starch*	132.3
Glutinous rice starch*	115.1
Green banana starch*	133.0
Arrow root starch*	135.9
Pullulan	0
Maltose	0
Maltotriose	0
Maltotetraose	0
Maltopentaose	27.3
Maltohexaose	96.9
Maltoheptaose	5.3
Maltooctaose	6.3
$\alpha$ -cyclodextrin	0
$\beta$ -cyclodextrin	0
$\gamma$ -cyclodextrin	0
Raffinose	0
Lactose	0
Sucrose	0

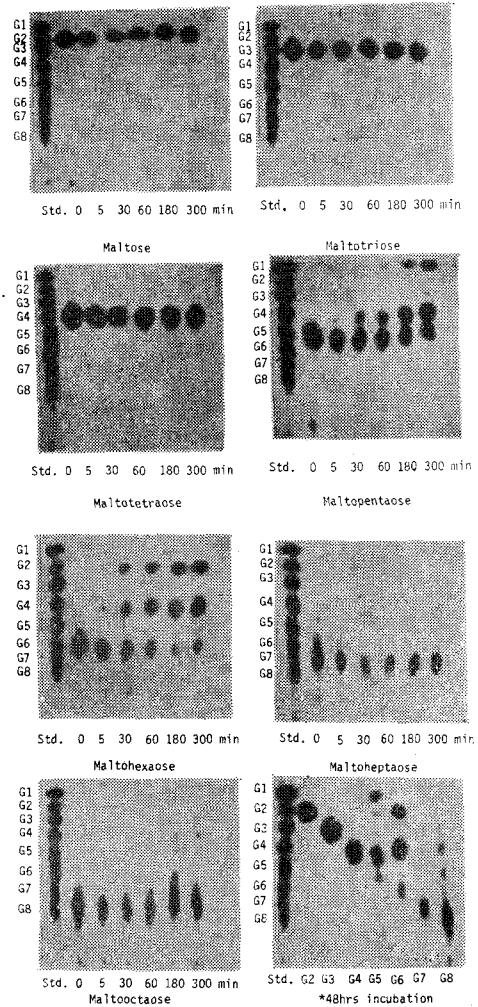
\*Gelatinized starch

**2. 各種基質에 對한 分解産物**

1%의 各種基質 1ml에 酵素液 0.1ml(0.1unit)와 5mM phosphate buffer (pH 6.6) 0.9ml를 넣고 40°C에서 所定時間 反應시켜 그 分解産物을 paper chromatography로 檢出하였다. 各種少糖類에 對한 分解産物은 Fig. 1과 같이 maltose, maltotriose, maltotetraose는 전혀 分解하지 못하였으며, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose, maltooctaose로 부터는 다같이 maltotetraose가 生成되었다.

各種多糖類에 對한 分解産物은 Fig. 2에서 보는 바와같이 pullulan을 除外한 모든 供試多糖類에서 3~5時間 反應時에 主分解産物은 maltotetraose이었고 48時間 反應時에는 maltose, maltotriose, maltohexaose 以外에 微量의 glucose가 生成되었다.

本酵素의 各種基質에 對한 分解産物은 Robyt 등<sup>1)</sup>, Sakano등<sup>6~8)</sup>의 報告와 거의 비슷한 結果를



**Fig. 1.** Paper chromatograms of the hydrolysis products on the various oligosaccharides by the enzyme

- G1 : Glucose
- G2 : Maltose
- G3 : Maltotriose
- G4 : Maltotetraose
- G5 : Maltopentaose
- G6 : Maltohexaose
- G7 : Maltoheptaose
- G8 : Maltooctaose
- Std. : Standard oligosaccharide

보였다. 48時間 反應時 soluble starch, amylopectin, corn starch, glutinous rice starch로 부터 生成되는 少糖類의 組成을 HPLC에 의하여 分離, 定量한 結果는 Table 2와 같이 maltetraose가 約 90%를 차지하고 있다. 以上の 實驗結果로 부터 本酵素는 少糖類나 多糖類를 주로 G<sub>4</sub>單位로 切斷하는 酵素임을 알 수 있다.

**3. 各種少糖類의 分解率**

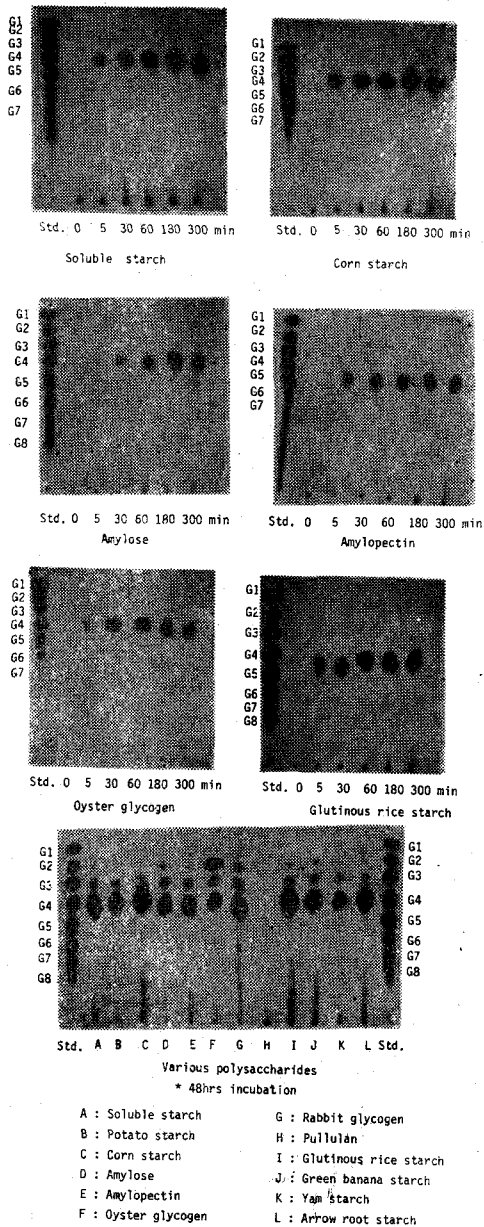


Fig. 2. Paper chromatograms of the hydrolysis products on the various polysaccharides by the enzyme.

1%의 各種少糖類 100 $\mu$ l에 0.02unit의 酵素와 5mM phosphate buffer (pH 6.6) 80 $\mu$ l를 넣고 40°C에서 所定時間 反應시켜 還元糖을 定量하고 分解率을 구한 結果는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 6時間 反應시켰을 때는 maltose, maltotriose, maltotetraose는 전혀 分解되지 않았으며 maltohe-

Table 2. Composition of oligosaccharides in various gelatinized polysaccharides hydrolyzates(48hrs incubation)

Polysaccharides	Hydrolysis rate(%)	Composition of oligosaccharides(%)			
		G1	G2	G3	G4
Soluble starch	39.6	trace	2.7	8.1	89.2
Corn starch	48.0	trace	2.1	6.1	91.8
Glutinous rice starch	47.1	trace	2.5	6.6	90.9
Amylopectin	43.7	trace	2.2	6.8	91.0

xaose는 48%, maltopentaose는 39%의 分解率을 나타내었는데 maltoheptaose와 maltooctaose의 경우는 各各 17%, 15%의 낮은 分解率을 나타내었다.

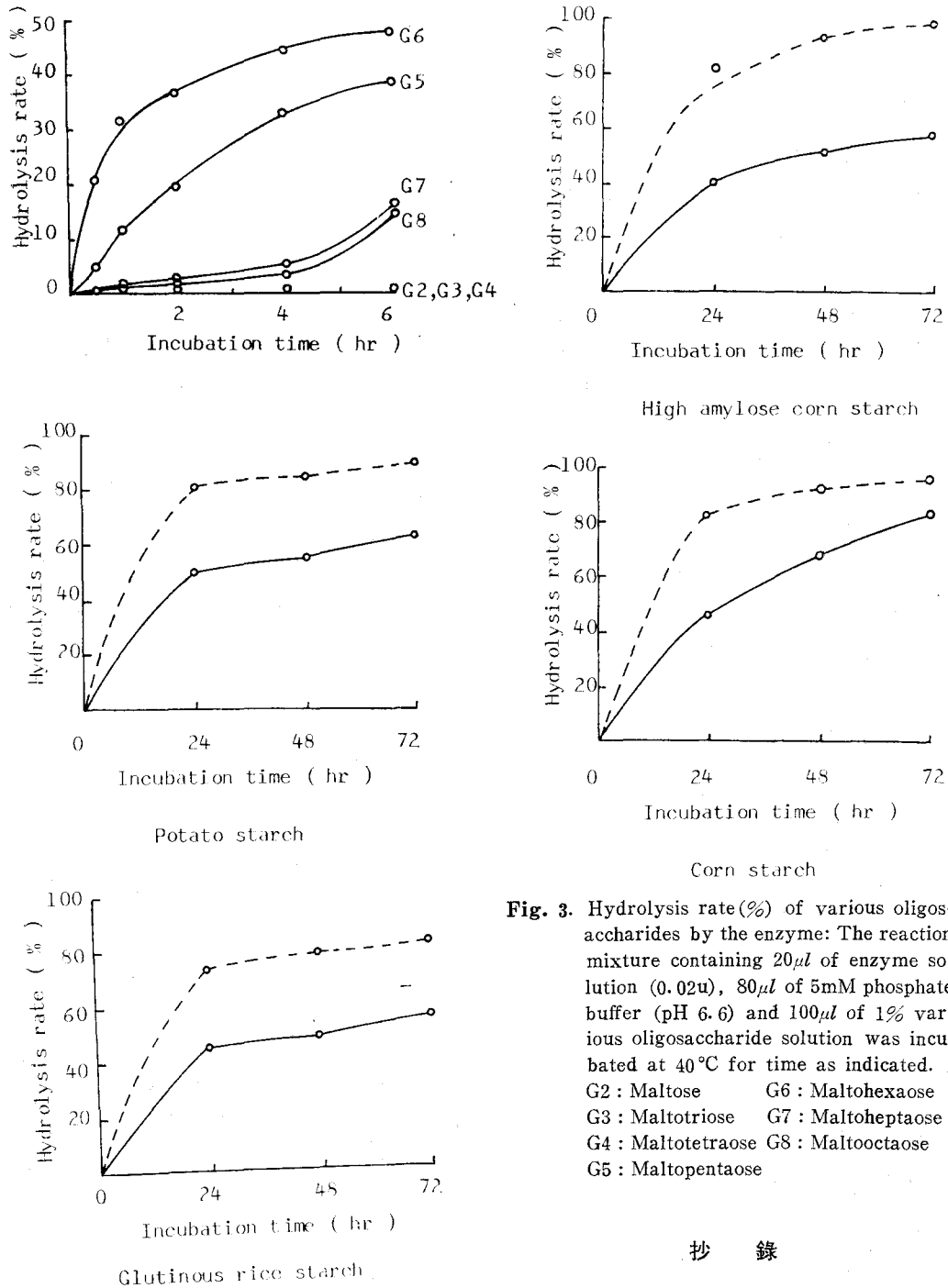
#### 4. 各種糊化澱粉 및 生澱粉의 分解率

本酵素의 各種糊化澱粉 및 生澱粉에 對한 分解率을 求하였고, 同時에 이들 澱粉의 分解率을 높이기 위하여 debranching enzyme인 pullulanase를 混用하여 分解率을 求한 結果는 Fig. 4, Fig. 5와 같다.

各種糊化澱粉의 分解率은 澱粉의 종류에 따라 약간의 差異가 있으며, 이와같은 現象은 澱粉의 特性에 基因되는 것으로 생각된다.

또한 pullulanase의 混用으로 分解率이 增加되었다. 이와같이 分解率이 增加되는 것은 pullulanase에 의하여 澱粉中의  $\alpha$ -1,6-glucosidic linkage가 分解되기 때문인 것으로 생각된다. 반면 生澱粉의 경우에는 pullulanase의 混用效果를 거의 인정할 수 없었으며, 一般적으로 糊化澱粉에 比하여 낮은 分解率을 나타내었으나 生澱粉中에서 特히 corn starch의 分解率은 비교적 높아 72時間 反應時에 約 78%의 높은 分解率을 나타내었다.

糊化澱粉은 amylase에 依하여 容易하게 分解되나 生澱粉(澱粉粒)은 잘 分解되지 않고<sup>8-12)</sup> 또한 澱粉은 그 起源에 따라 物理化學的 性質을 달리하며, 一般적으로 地上澱粉이 地下澱粉에 比하여 分解되기 쉬운 것으로 알려져있다<sup>13)</sup> 本實驗結果는 고아밀로스 옥수수 생전분 및 고구마 생전분이 pancreatin에 의하여 잘 分解되지 않는다는 杉本등<sup>13)</sup>의 報告와 一致하였다. 그리고 옥수수 생전분은 pancreatin<sup>14)</sup>, Streptococcus bovis의  $\alpha$ -amylase<sup>15)</sup>, Bacillus circulans F-2의  $\alpha$ -amylase

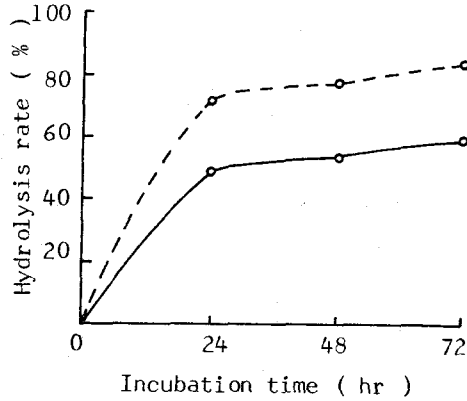


**Fig. 3.** Hydrolysis rate(%) of various oligosaccharides by the enzyme: The reaction mixture containing 20 $\mu$ l of enzyme solution (0.02u), 80 $\mu$ l of 5mM phosphate buffer (pH 6.6) and 100 $\mu$ l of 1% various oligosaccharide solution was incubated at 40°C for time as indicated.

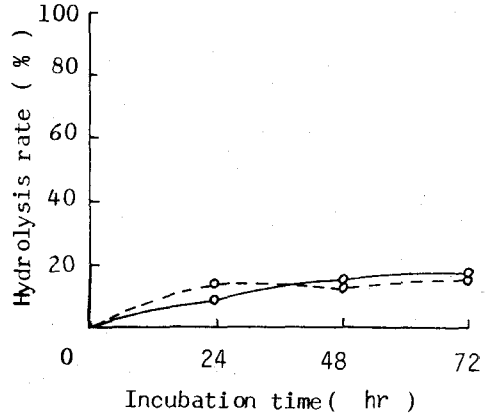
抄 錄

se<sup>16-18</sup>), *Rhizopus oryzae*의 glucoamylase G II<sup>19</sup>) 에 의하여 잘 分解된다는 報告와 大略 一致하였다.

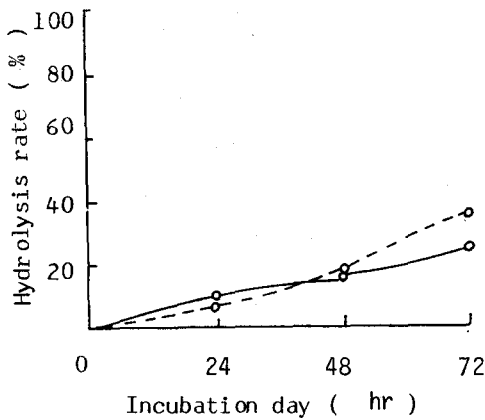
*Pseudomonas stutzeri* IAM 12097이 生産하는 Exo-maltotetraohydrolase는 soluble starch, amylose, amylopectin, oyster glycogen, corn, potato, glutinous rice, green banana, arrow root



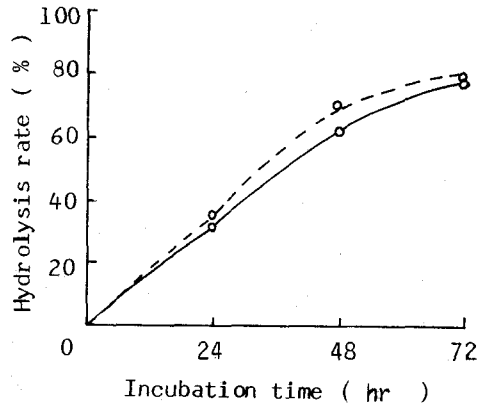
Arrow root starch



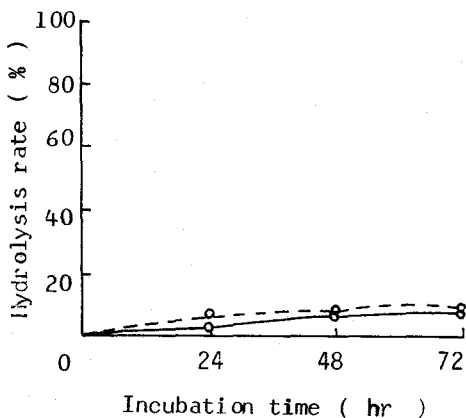
Raw high amylose corn starch



Raw arrow root starch



Raw corn starch



Raw potato starch

Fig. 4. Comparison of hydrolysis rate (1%) on various gelatinized starches by Exo-maltotetrahydrolyase and mixed enzyme.

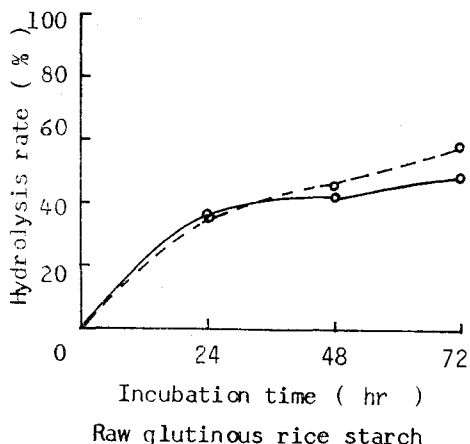
The reaction (mixture (2.3ml) containing enzyme solution, various gelatinized starches and 5mM phosphate buffer (pH 6.6) was incubated at 40°C, Amount of used enzyme

Exo-maltotetrahydrolyase: 0.3u(0-0)

Mixed enzyme: Exo-maltotetrahydrolyase 0.3u+pullulanase 0.1u(0-0)

의 糊化澱粉, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose, maltooctaose를 加水分解하였으나,  $\alpha, \beta, \gamma$ -cyclodextrin, sucrose, raffinose, pullulan,

maltose, maltotriose, maltotetraose는 分解하지 못하였다. 少糖類中 maltohexaose를 가장 잘 分解하였으며, 各種基質의 主分解産物은 maltotetraose였다. pullulanase의 混用으로 糊化澱粉의 分解率은 增加되었으나 生澱粉에 對하여는 混用效果를 認定할 수 없었고 生澱粉中에서 corn starch가 가장 잘 分解되며 raw potato starch, raw arrow



**Fig. 5.** Comparison of hydrolysis rate(%) on various raw starches by the Exo-maltotetrahydrolase and mixed enzyme.

The reaction mixture (2.3ml) containing enzyme solution, 10mg of various raw starches and 5mM phosphate buffer (pH 6.6) was incubated at 40°C. Amounts of used enzyme.

Exo-maltotetrahydrolase: 0.3u(○-○)  
 mixed enzyme: Exo-maltotetrahydrolase 0.3u+pullulanase 0.1u (○...○)

root starch, raw high amylose corn starch의 分解는 微弱하였다.

### 參 考 文 獻

1. Robyt, J.F. and Ackerman, R.J.V.: Arch. Biochem. and Biophys., 145 : 105(1971).
2. 李美子, 鄭萬在 : 韓農化, 27(2) : 73(1984)
3. 李美子, 鄭萬在 : 韓農化, 27(4) : 271(1984)
4. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Anal. Chem. (U.S.A.), 28 : 350(1956).
5. Kainuma, K.: J. Chrom., 212 : 126(1981).
6. Sakano, Y., Kashiwagi, Y. and Kobayashi, T.: Agr. Biol. Chem. 46, 3 : 639(1982).
7. 坂野好幸, 柏木豊, 櫻山英二, 小林恒夫 : 澱粉科學, 29, 2 : 131(1982).
8. Sakano, Y., Kashiyama, E. and Kobayashi, T.: Agr. Biol. Chem., 47, 8 : 1761(1983).
9. 久留島通俊, 佐藤淳司, 北原覺雄 : 日農化, 48, 6 : 379(1974).
10. 吉澤淑, 池見元宏, 石川雄章, 寶玉俊信, 池田哲郎 : 醸工, 56, 2 : 122(1978).
11. Kainuma, K., Yamamoto, K., Suzuki, S., Takaya, T. and Fuwa, H.: J. Jap. Soc. Starch Sci., 25, 1 : 3(1978).
12. Fuwa, H., Sugimoto, Y. and Takaya, T.: J. Jap. Soc. Starch Sci., 26, 2 : 105(1979).
13. Sugimoto, Y., Ohnishi, K., Takaya, T. and Fuwa, H.: J. Jap. Soc. Starch Sci., 26, 3 : 182(1979).
14. Takao, F., Sugimoto, Y. and Fuwa, H.: J. Jap. Soc. Starch Sci., 25, 1 : 12(1978).
15. 溝上恭平, 小崎道雄, 北原覺雄 : 日農化, 51, 5 : 299(1977).
16. 谷口肇, 鄭萬在, 丸山芳治, 中村道徳 : 澱粉科學, 29, 2 : 107(1982).
17. 鄭萬在, 谷口肇, 丸山芳治, 李美子 : 産業微産物學會誌, 10, 2 : 123(1982).
18. 鄭萬在, 谷口肇, 丸山芳治, 李美子, 鄭宰顯 : 産業微産物學會誌, 10, 4 : 259(1982).
19. 許元寧, 鄭萬在 : Kor. Soc. Food Sci. & Technol., 16(4) : 398(1984).