

컬럼 크로마토그래피에 의한 아스퍼질러스 계통의
 α -아미라제 및 프로테아제의 結晶化 (제 3 보)

— *Aspergillus oryzae* S.H.W. 131 의 α -amylase 의 結晶化 및 化學的 性質 —

徐 恒 源

(太平洋化學工業株式會社 酵素生産課)

Crystallization of α -amylase and protease of *Asp. oryzae*
from Column Chromatography(III)

—Crystallization and Chemical Properties of α -Amylase
of *Aspergillus oryzae* S.H.W. 131—

SUH, Hang Won

(Section of Enzyme Product, Pacific Chemical Industrial Co.)

ABSTRACT

The enzyme was produced by *Asp. oryzae* SHW 131. The enzymatic properties of α -amylase are following:

- 1) Crystallization of α -amylase is formed of longish square.
- 2) The range of stable pH is 5~10 and optimum pH is 5.5.
- 3) It is very unstable enzyme about EDTA and protection by Ca^{++} ion and best activated at 50°C about temperature.
- 4) *Asp. oryzae* SHW 131 produced α -amylase with acid-protease, neutral-protease and tepid-alkalin-protease.

緒 論

Taka-amylase : *Aspergillus oryzae* 가 生産하는 菌體外 분비효소로서 1898年 高峯謙吉氏가 최초로 발견하였으며 赤堀四郎研究室로부터 Taka-amylase 의 연구에 관한 최초의 보고가 日本化學會誌에 기재되었으며 1937年 이래 세계제 2 차대전중 연구가 중단되었으나 1951년부터 amylase 結晶化에 대한 연구가 활발히 진행되었다.

Aspergillus oryzae 의 amylase 結晶化에 대하여는 1952年 赤堀四郎氏에 의하여 rivanol 에 의한 分離精製가 최초이며 그후 有機無機藥品等으로 精製가 활발히 진행되었다.

A. Tsu-gita 氏는 1959年에 Ion exchange 로서 amylase 의 分離精製를 시작한 후 많은 研究者로부터 *Aspergillus oryzae* 의 結晶

및 理化學的 性質 化學的 構造에 대한 研究가 進行되고 있다.

저자는 *Aspergillus oryzae* S.H.W. 131이 生産하는 산성 중성 미알카리성 protease 와 함께 존재하는 α -amylase 를 분리 정제하였기에 이에 보고하고자 한다.

材料 및 方法

- 1) 使用菌株 : *Aspergillus oryzae* SHW 131
- 2) 추출액의 조제 : 제 1 보와 동일조건
- 3) α -amylase 의 力價測定

0.05%의 soluble starch soln. 9 ml 을 시험관에 넣고 40°C 에서 가온하고 적당히 희석한 효소액 1 ml 을 가하여 경시적으로 그의 0.5 ml 을 취하여 미리준비한 소형비색시험관에 준비한 M/500 I_2 용액 0.5 ml 을 가하여 발색을 검사한다.

그의 착색과 표준색(M/10 I₂) 용액과 일치하는 점을 반응의 종점으로 한다.

상기의 조건에서 효소첨가시부터 종점까지 10분간을 요하는 효소력을 1 unit 로 한다.

- 4) Ion exchange 에 의한 흡착 용리
제일보와 동일방법
- 5) DEAE-Sephadex G-100의 gel filtration.
제일보와 동일방법
- 6) 結晶化

Gel filtration 하여 얻은 α-amylase 의 단백질농도가 4%되게 농축시킨후 냉각하여 서서히 냉아세톤을 첨가하면서 빙실에서 약 4일 만에 결정을 얻었다.

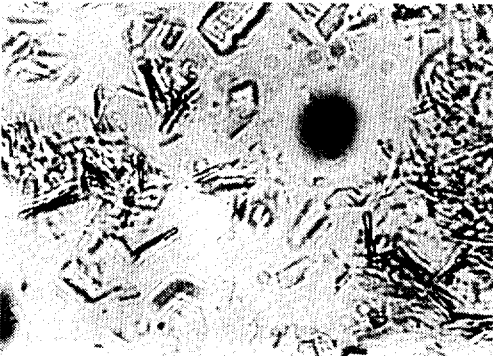


Fig. 1. Crystallization of α-amylase

- 7) 전기영동
결정화된 α-amylase 를 원심분리하여 35%

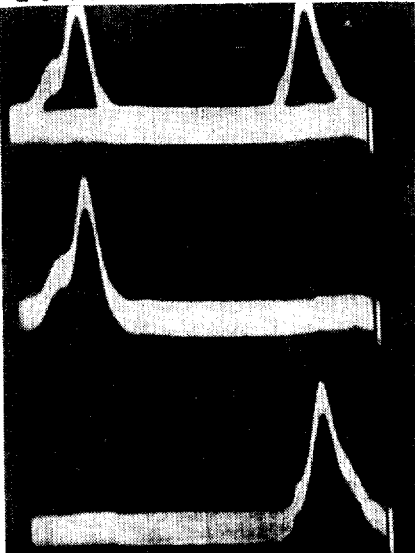


Fig. 2. Electrophoresis of α-amylase

냉 아세톤에 완전히 침전 시킨후 증류수에 용해하여 Tiseluis 型 전기영동장치에 의해서 분석하였다.

(영동조건)

- pH 6.0 인산완충액 (v=0.12)
- 단백 농도 1.3%
- 7mA, 51V, 4°C

結果 및 考察

1) pH 와 酵素活性

결용 α-amylase 액을 1% soluble starch solution 을 기질로서 pH 별 활성을 측정하였던바 pH 5.5 에서 최대의 활성도를 보여주고 있다.

- 1% soluble starch solution. 5ml
- N/10 citrate buffer. 4 ml
- 효소액 1 ml
- 40°C 에서 10분간 반응

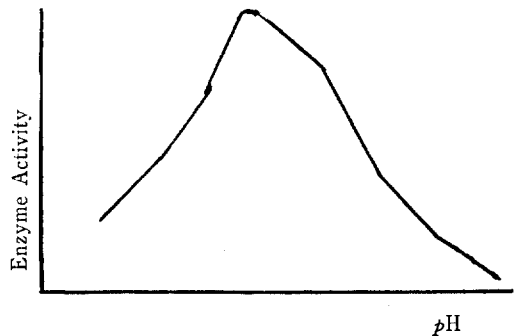


Fig. 3. Activities relating to pH changes.

2) pH 의 안정성

결정효소를 증류수에 용해하여 적당히 희석한 효소액 0.5 ml 에 각종 pH 완충액 0.5 ml 를 가하여 30°C 에서 24시간 보존후 각 처리액에 pH 5.0 의 M/5 초산액을 20배희석하여 잔존활성을 측정하였다.

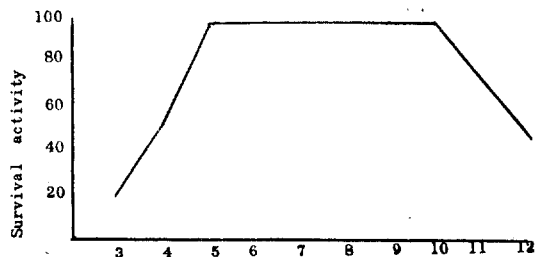


Fig. 4. Stabilities relating to pH changes

3) EDTA 및 Ca에 의한 내열성

결정효소액을 적당히 희석하여 M/100 EDTA와 M/100 Ca⁺을 첨가하여 30°C~70°C에서 10분간 처리한후 잔존활성을 측정하였다.

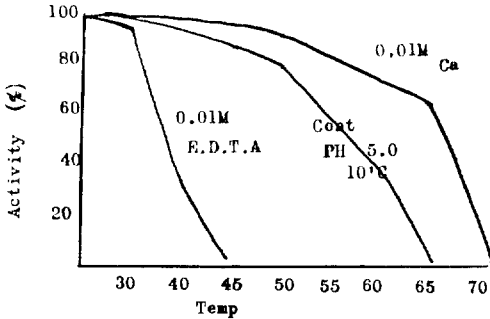


Fig. 5. Relationship between Thermal tolerance and Enzyme activities

4) EDTA에 대한 영향

pH 5.0 N/10 citrate buffer에 M/100 EDTA이 되게한 용액 9 ml에 결정 효소액 1 ml을 넣어 시간에 따른 EDTA에 영향을 관찰하였다.

Aspergillus oryzae SHW 131의 α -amylase 결정은 직사각형의 모양을 하였다.

赤堀氏が 분리정제한 *Aspergillus oryzae*의

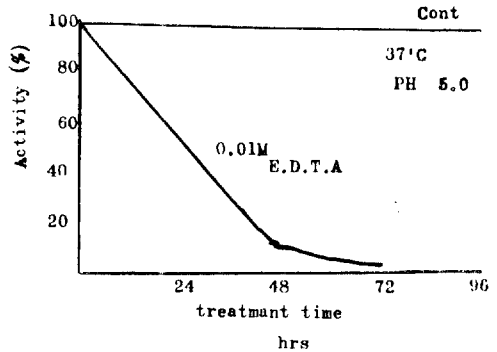
摘 要

- 1) *Aspergillus oryzae* SHW 131을 배양하여 얻은 효소액을 DEAF-Sephadex A-50에 흡착하여 Gel filtration하여 얻은 α -amylase의 결정은 직사각형의 모양을 하였다.
- 2) 안정 pH는 5~10이며 최적 pH는 5.5부근인 것을 확인하였다.
- 3) 열에 대하여는 Taka amylase보다 더 낮은 50°C에서만 100% 활성을 나타내었다. EDTA에 대하여는 극히 불안정한 효소이고 역시 Ca⁺에 대하여는 보호작용을 받은것을 확인하였다.
- 4) *Aspergillus oryzae* SHW 131이 생산하는 효소는 산성, 중성, 미알카리성 protease와 α -amylase가 존재하는 것을 확인하였다.

引 用 文 獻

- 1) 赤堀四郎, 池中徳治, 萩原文二, 1952. Taka-amylase의 정제 결정화, 酵素化學, 第7集 107
- 2) 吉村貞參, 田中昭, 1955. Taka- α -amylase (I) 결정화에 관한 因子, 兵庫農大研, 2, 11.
- 3) R.V. Feniksova and G. A. Molodova, 1961. Crystalline of α -amylase from *Aspergillus oryzae*, *Mikro Biologija*, 30, 607.
- 4) H. Toda and Akbori, 1963. Chromatogr-

Fig. 6. Effects of EDTA affecting to the Enzyme activities



α -amylase의 결정은 거의 정사각형에인대 비하여 약간의 모형을 긴것으로 확인되었다

Asp. oryzae(Taka) amylase은 내열성이 55~70°C, 최적 pH는 4.9~5.2이고 pH의 안정성은 4.7~9.5로 기록되어있으나, *Asp. oryzae* SHW 131의 내열성은 50°C까지이고 최적 pH는 5.5, pH의 안정성은 5~10까지로 赤堀의 Taka amylase와 비슷하였으나 열에 대한 안정성은 극히 적은것으로 판명되었다.

역시 Ca⁺에 대하여는 보호작용을 가지며 EDTA에 대하여는 활성도가 극히 불안정한 것으로 판명되었다.

aphy of Taka-amylase of *Aspergillus oryzae* by Diethyl aminoethyl cellulose column, *J. Biochem* 5 3, 102.

- 5) A.S. Tsyperovich and I.P. Galich, 1965. Crystallization of α -amylase of *Asp. oryzae* from Soviet Enzymatic Preparation, *Biokhimzh* 27, 14.
- 6) S. Akabobi, B. Hagihara and T. Ikenaka, 1951. Purification and Crystallization of Taka-amylase *Proc. Japan ACTA* 27,350.

- 7) Ed.H. Ficcher, R.De. Mont Mollin, 1951. Purification et Cristallization de l' α -amylase *Aspergillus oryzae* sur les enzyme 1951, Helv. Chim. ACTA 34, 1967.
- 8) Suh. H.W., 1971. Crystallization and Chemical Properties of Neutral Protease of *Aspergillus oryzae* S.H.W. 131 *Kor. Jour. Microbiol* 9, 163~168.