

## 각종 요인이 물속의 Diastase 활성에 미치는 영향

가톨릭대학 의학부 예방의학통계학교실

〈지도 조정 규 상 교수〉

윤복상 · 현호섭 · 백남원

—Abstract—

### Effect of External Factors on Diastase Activity in Water

Bock Sang Yoon, Ho Sup Hyun, Nam Won Paik

*Department of Preventive Medicine and Biostatistics, Catholic Medical College, Seoul, Korea*

〈Director:s Prof. Kyu Sang Cho  
Prof. Kyou Chull Chung〉

Many factors exert an influence on enzyme activity and thus on the rate of reactions that they catalyze. The most important of these factors are pH, temperature, substrate concentration, and the concentration of some inhibitors present. A solution of the enzyme diastase, which breaks down molecules of the polysaccharide starch to the disaccharide maltose by hydrolysis, was provided.

Activity of this enzyme was measured by the rate at which starch was removed from the reaction mixture.

These experiments were designed to study this reaction rate under varying conditions and the following results were obtained.

1. The range of optimum pH for this enzyme at room temperature was 4.0-7.0 and the optimum pH was 5.0.
2. The range of optimum temperatures for this enzyme at pH 7.0 was 30°-50°C and the optimum temperature was 40°C.
3. The relationship between the enzyme activity and substrate concentration could be expressed by the Michaelis-Menten equation. The limiting velocity of this enzyme at room temperature and pH 7.0 was 415 $\mu$ g starch removed/ml of reaction mixture/min and  $K_m$ , Michaelis constant, was 343  $\mu$ g/ml.
4. Inhibitors NaCl and HgCl<sub>2</sub> blocked this enzyme activity completely at 1% and 0.01% respectively.

### 머 리 말

위생공학적으로 볼 때 미생물(주로 세균)을 이용한 생물학적 처리방법은 가정하수나 공장폐수를 정화하는 중요한 방법의 하나이다.

하수나 폐수 중에는 주로 탄소, 질소, 인 등으로 구성

된 유기화합물이 많이 포함되어 있으며 이러한 유기물들은 대부분 물 속에 용해되어 있으므로 침전법이나 여과법으로는 제거되지 않는다.

그러므로 이러한 유기물을 제거하는데는 미생물을 이용한 생물학적 처리방법이 현재 널리 이용되고 있으며 실제로 활성오니법(activated sludge process)과 살수여상법(trickling filter 또는 percolating filter pro-

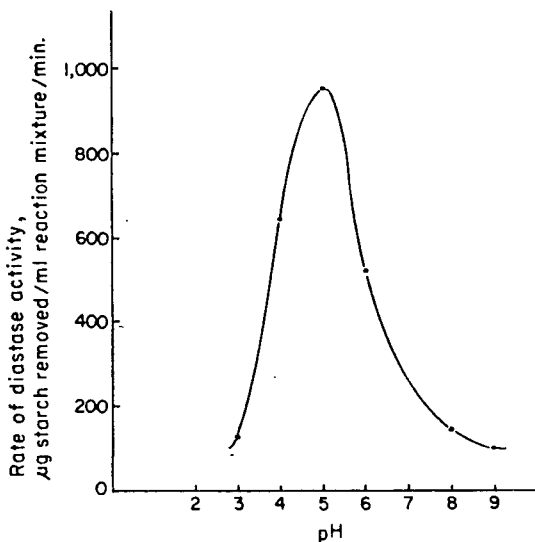


**Table 1.** The amount of starch remaining in the mixture after various reaction times according to pH values (unit:  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Time, min.	pH	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
0		above 800	515	508	above 800	above 800	above 800	above 800
0.5		above 800	195	30	565	740	above 800	753
1.0		780	57	13	245	565	780	753
1.5		740	35	0	48	420	763	753
2.0		725	30	0	23	282	725	753
2.5		650	25	0	17	160	686	753
3.0		595	20	0	17	103	580	753
4.0		565	20	0	10	60	470	650
5.0		515	15	0	7	45	355	640

**Table 2.** The amount of starch remaining in the mixture after various reaction times according to temperatures (unit:  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Time, min.	Temperature, °C	10	20	30	40	50	60
0		above 800	above 800	715	595	735	above 800
0.5		above 800	780	470	355	477	455
1.0		above 800	710	335	230	215	260
1.5		780	580	230	130	100	120
2.0		710	555	125	80	67	65
2.5		625	455	72	56	62	45
3.0		540	340	36	56	48	36
4.0		400	215	35	45	35	20
5.0		250	130	30	45	35	20



**Fig. 2.** Rate of diastase activity according to pH values.

### 3. 온도의 영향

수조(water bath)와 부란기를 이용하여 온도조건을  $10^{\circ}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 에서 매  $10^{\circ}\text{C}$  간격으로 조절하였다.

1% 녹말용액 1ml에 완충액(pH 7.0) 8.5ml를 가하고 위의 여러가지 온도조건하에 30분 동안 방치하였다. 다음에 10% diastase 용액 0.5ml를 가하고 (2)와 같은 방법으로 지시약을 가한 후 녹말 제거 속도를 측정하여 효소의 활성과 온도의 상관관계를 보고 최적온도를 결정 하였다.

### 4. 기질농도(substrate concentration)의 영향

1% 녹말 용액 0.05ml, 0.1ml, 0.25ml, 0.5ml, 0.75ml, 1ml, 및 2ml를 취하고 완충액(pH 7.0)으로 9.5ml가 되도록 희석하였다. 다음 각각에 10% diastase 용액 0.5ml를 가하고 위와 같은 방법으로 녹말이 제거

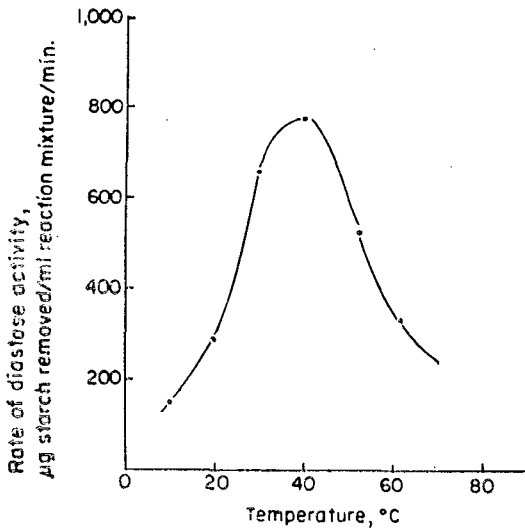


Fig. 3. Rate of diastase activity against temperature.

되는 속도를 보고 실온에서 diastase의 한정속도(limiting velocity)를 측정 하였다.

### 5. 방해물질 (enzyme inhibitors)의 영향

완충액 (pH 7.0) 7.5ml, 1% 녹말 용액 1ml 및 10% diastase 용액 0.5ml 등의 혼합액에 0.01%, 0.1%, 및 1.0% HgCl<sub>2</sub> 용액 1ml씩을 가하고 (각 HgCl<sub>2</sub> 농도는 0.001%, 0.01%, 및 0.1%에 해당함) 또 한편 위의 혼합액에 0.1%, 1.0%, 및 10% NaCl 용액 1ml 씩을 가하여 (각 NaCl 농도는 0.01%, 0.1% 및 1%에 해당함) HgCl<sub>2</sub>와 NaCl이 diastase의 활성에 미치는 영향을 측정 하였다.

## 성 적

### 1. 수소 이온 농도의 영향

pH 3.0~9.0범위 내에서 1,000 μg/ml의 녹말이 diastase와 반응할때 반응 시간별로 혼합액중에 남아 있는 녹말의 양을 측정하여 제 1표와 같은 결과를 얻었고 이를 근거로 diastase의 활성도를 계산하니 다음 그림 2에서 보는 바와 같이 diastase의 활성도는 pH 5.0에서 가장 높았다.

### 2. 온도의 영향

녹말농도 1,000μg/ml의 조건 하에서 온도 10°~60°C 범위에서 녹말이 diastase와 반응할 때 혼합액 중에 남아 있는 녹말양을 측정하여 제 2표와 같은 성적을 얻었고, 이를 근거로 diastase의 활성도를 계산하였던 바,

온도가 증가함에 따라 diastase의 활성도는 증가하는 경향을 보였으나 40°C 이상에서는 오히려 감소 하였다 (그림 3).

### 3. 기질농도의 영향

실온과 pH 7.0의 조건 하에서 여러가지 녹말 농도에 대하여 diastase의 활성을 관찰하였다. 반응 시간별로 혼합액중에 남아 있는 녹말 농도를 측정하여 (제 3표) 이를 근거로 diastase의 활성도를 산출하여 그림 4와 같은 결과를 얻었다. 즉 diastase의 활성은 처음에는 기질농도가 증가함에 따라 증가하였으나, 일정한 농도 이상에서는 활성도가 더 이상 증가하지 않고 한정속도 (limiting velocity)를 유지함을 관찰 할 수 있었다.

### 4. 방해물질의 영향

방해물질로서 HgCl<sub>2</sub>와 NaCl을 사용하였고 이 때의 온도조건은 실온, pH는 7.0, 기질농도는 1,000μg/ml로 하였다. HgCl<sub>2</sub> 농도는 0.001%, 0.01%, 0.1%였고 NaCl 농도는 0.01%, 0.1%, 1.0% 등이었고 반응 시간 별로 혼합액 중에 남아 있는 녹말 농도를 측정하고(제 4표), 이를 근거로 diastase의 활성도를 산출하였던 바 그림 5와 같이 HgCl<sub>2</sub> 농도 0.001% 및 NaCl 농도 1.0%에서 diastase의 활성도는 0으로 저하되었다.

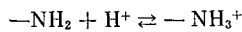
## 고 찰

효소의 활성에 영향을 주는 요인에는 여러가지가 있으며 그 중에서 중요한 것 들은 수소 이온 농도, 온도, 기질 농도, 및 방해물질 등이다.

수소 이온 농도가 효소의 활성에 영향을 미치는 것은 단백질의 이온화 특성으로 설명할 수 있다.

단백질과 같은 큰 분자는 용액 속에서 교질(colloid) 상태로 남아 있게 되며, pH에 따라 단백질의 구성물질 인 아미노산은 다음과 같이 이온화 한다.

산성인 경우;



알칼리성인 경우;



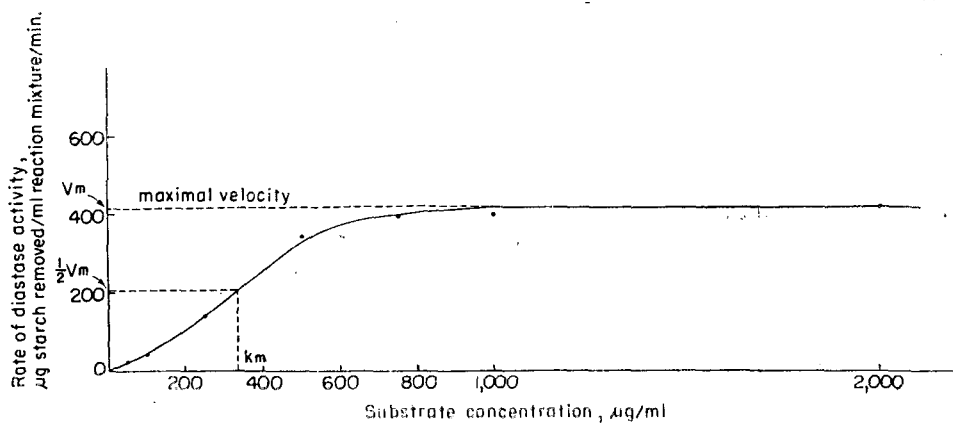
이러한 변화는 단백질 분자의 표면에 있는 전기부하 양상을 변화 시킴으로써 효소의 기질 분자에 대한 친화력이나 반발력에 영향을 미친다. 본 연구에서는 그림 2에서 보는 바와 같이 pH 4.0~7.0의 범위에서 diastase의 활성도는 적절한 수치를 보였고 pH 5.0에서 최적치를 보였으며 이 범위를 벗어나면 활성도가 매우 저하되었다.

**Table 3.** The amount of starch remaining in the mixture after various reaction times according to substrate concentrations (unit:  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Time, min.	Substrate concentration, $\mu\text{g}/\text{ml}$	50	100	250	500	750	1000	2000
	0		26	55	157	432	640	733
0.5		18	30	62	280	377	562	above 800
1.0		3	17	20	92	250	340	above 800
1.5		3	12	20	51	147	176	640
2.0		0	11	20	45	111	96	346
2.5		0	11	18	36	65	72	225
3.0		0	11	18	35	53	71	165
4.0		0	11	18	32	51	63	145
5.0		0	11	18	28	49	60	127

**Table 4.** The amount of starch remaining in the mixture after various reaction times according to inhibitors (unit:  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Time, min.	Inhibitor Concentration	NaCl			HgCl <sub>2</sub>		
		0.01%	0.1%	1.0%	0.001%	0.01%	0.1%
0		above 800	above 800	above 800	above 800	above 800	above 800
0.5		above 800	776	// 800	// 800	// 800	// 800
1.0		776	735	// 800	// 800	// 800	// 800
1.5		605	640	// 800	// 800	// 800	// 800
2.0		555	600	// 800	// 800	// 800	// 800
2.5		465	525	// 800	// 800	// 800	// 800
3.0		370	455	// 800	// 800	// 800	// 800
4.0		280	305	// 800	760	// 800	// 800
5.0		210	200	// 800	735	// 800	// 800



**Fig. 4.** Rate of diastase activity against substrate concentration.

$V_m$ : maximal velocity

$K_m$ : michaelis constant

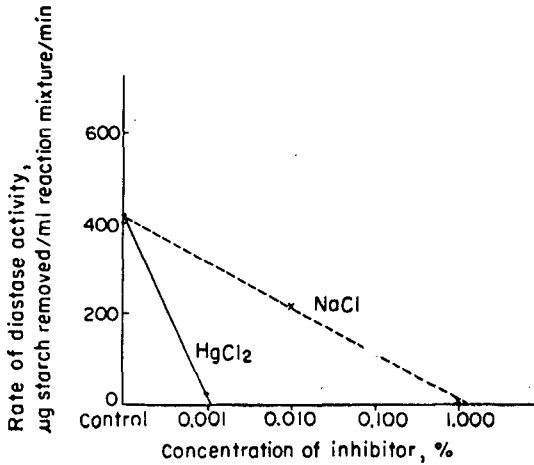


Fig. 5. Effect of inhibitors on diastase activity.

Evison (1973)은 hydrolase의 최적 pH를 6.0~8.0 이라고 하였으며, Eckenfelder (1966)는 활성오니법에 서 역시 pH 6.0~8.0이 가장 적당하다고 보고하였다.

일반적으로 생화학적 반응에서는 van't Hoff의 법칙 에 따라 일정한 온도 범위안에서는 온도가 10°C 증가함 에 따라 반응속도는 2배로 증가한다.

본 연구에서도 이와 일치한 성적을 보였으며 그림 3 에서 보는 바와 같이 10°C~20°C, 15°C~25°C, 20°C ~30°C 등에서는 10°C 증가할 때 마다 diastase의 활 성도는 약 2배로 증가하였으며 40°C를 최적온도로 하여 그 이상의 온도에서는 급격히 감소하는 경향을 보였다.

Sawyer와 McCarty (1967)에 의하면 활성오니법에 서는 온도가 10°C 증가함에 따라 반응속도는 2배 이상 증가한다고 하였으며 amylase의 활성도는 35°C~45°C 에서 가장 높다고 하였다.

West Virginia에서의 생물학적 하수처리 과정에서 BOD 제거율은 32°C에서 88%였고, 50°C에서는 75%로 저하되었음이 보고된 바 있다(Eckenfelder, 1966).

고온에서 효소의 활성이 저하되는 것은 효소가 변성 (denaturation)되고 파괴되기 때문이다(McKinney, 1962).

기질농도와 diastase의 활성도와와의 관계는 그림 4에서 보는 바와 같이 0.5% diastase의 활성도는 녹말의 농 도가 750µg/ml가 되기까지는 녹말 농도가 증가함에 따 라 급격히 증가했으며 그 이후에는 거의 증가하지 않고 있었는데 Reiner (1969)는 이러한 상태를 녹말이 포화 되었다고 표현했으며 이 때의 효소의 활성도를 한정속 도(limiting velocity)라고 하였다. 본 실험에서는 diastase의 한정속도가 415µg starch removed/ml of reaction mixture/min였다.

효소반응은 기질농도, 효소농도, 및 생성물의 농도등 에 의하여 좌우된다.

Michaelis와 Menten (1913)은 기질농도와 효소활성 과의 상관관계를 수학적으로 다음과 같이 표시 하였다.

$$V = \frac{V_m(S)}{K_m + (S)}$$

여기서 V=효소의 활성화도

$V_m$ =한정속도 또는 최고속도

S=기질농도

$K_m$ =Michaelis 상수

$K_m$ 은 주어진 효소와 기질에 따라 정해지는 상수이며 실제적인 정의는 한정속도의  $\frac{1}{2}$ 에 해당하는 활성도를 나타낼 때의 기질 농도라고 한다(Bennet and Frieden 1972).

본 조사에서는 그림 4에서 보는 바와 같이  $K_m$ 은 340 µg/ml였다.

본 실험에서 얻은  $V_m$ 과  $K_m$ 을 Michaelis-Menten 방정식에 대입하여 본 결과 본 실험치에 의한 곡선과는 다소 차이가 있었다.

NH<sub>4</sub>Cl, NaCl 및 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>등 무기염류들은 고농도에서 단백질을 변성시키며, 또 어떤 무기물이나 무기이온들은 효소표면에 대하여 특별한 친화력을 가지고 있어서 저농도에서도 효소활성을 차단한다. 이러한 무기물로서는 황화수소(H<sub>2</sub>S)나 청화물(cyanide) 등이 있고 무기이온으로서는 주로 중금속을 들 수 있다(Evison, 1973).

본 실험에서는 그림 5에서 보는 바와 같이 NaCl과 HgCl<sub>2</sub>가 diastase의 활성을 억제함을 보았으며 NaCl 1.0%와 HgCl<sub>2</sub> 약 0.001% 농도에서 diastase의 활성은 완전히 억제 되었다. 즉 HgCl<sub>2</sub>의 diastase 활성 억제작용은 NaCl보다 약 1000배 강하다는 사실을 관찰할 수 있었다.

우리 나라에서는 특히 1년 중 기온의 차이가 심하고, 공업화에 따라 공장폐수 중에는 방해물질이 많이 포함되어 있으므로 하수나 폐수의 생물학적 처리과정을 실시 하는데 많은 애로가 있으리라 예상되며 이러한 애로점을 극복하는데는 앞으로 보다 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 본다.

## 요 약

위생공학에서 하수나 공장폐수를 처리할 때 이용하는 생물학적 처리과정은 미생물에서 생성되는 효소에 의하여 이루어 진다.

본 연구에서는 diastase의 활성에 대하여 수소이온 농도, 온도, 기질 농도 및 방해물질 등 여러가지 요인이

미치는 영향을 실험적으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) diastase의 활성도는 pH 4.0~7.0의 범위가 적당하였고 최적치는 pH 5.0이었다

(2) diastase의 활성도는 30°C~50°C에서 높았으며, 최저온도는 40°C였다.

(3) 기질농도의 영향을 보면 녹말농도 750 $\mu$ g/ml까지는 diastase의 활성도가 급격히 증가하였고, 그 이후에는 한정속도를 나타냈다. Michaelis 방정식을 적용시켜 보면 한정속도는 415 $\mu$ g starch removed/ml of reaction mixture/min였고 Michaelis 상수는 340 $\mu$ g/ml였다.

(4) 방해물질의 영향을 보면 NaCl 농도 1.0%, HgCl<sub>2</sub> 농도 0.001%에서 diastase의 활성은 완전히 억제되었다.

### 인 용 문 헌

- Bennet, T. P. and Frieden, E. (1972). *Structure and function of biological molecules, Modern Topics in Biochemistry*, p. 43-56, London, The MacMillan Company.
- Eckenfelder, W. W. Jr. (1966). *Industrial Water Pollution Control*, p. 149-152, New York, McGraw-Hill Company.
- Evison, L. M. (1972). *Properties of Enzymes*, PHE 213/L, Division of Public Health Engineering, Department of Civil Engineering, University of Newcastle upon Tyne, England.
- Evison, L. M. (1973). *Microbial Biochemistry*, Division of Public Health Engineering, Department of Civil Engineering, University of Newcastle upon Tyne.
- Fair, G. M., Geyer, J. C. and Okun, D. A. (1968) *Water and Wastewater Engineering*, Vol. 2, Chapter 28 and 31, New York, John Wiley and Sons, Inc.
- McKinney, R. E. (1962). *Microbiology for Sanitary Engineers*, p. 54-65, New York, McGraw-Hill Company.
- Michaelis, L. and Menten, M. (1913) *Kinetics of invertase action*, *Biochem. Z.*, 49, 333-340.
- Reiner, J. M. (1969). *Behavior of Enzyme systems*, 2nd Ed., p. 65-70, Van Nostrand Reinhold Company.
- Sawyer, C. N. and McCarty, P. L. (1967). *Chemistry for Sanitary Engineers*, p. 225-232, New York, McGraw-Hill Company.

