

## *Rhizopus oryzae*로 부터 精製한 두가지형의 Glucoamylase의 各種基質의 加水分解

許元寧·鄭萬在\*

蓮庵畜産專門大學·\*忠北大學校 農科大學 食品加工學科

### Hydrolysis of Various Substrates by Two Forms of the Purified Glucoamylase from *Rhizopus oryzae*

Won Nyong Hou and Man Jae Chung\*

Yonam Junior College of Livestock and Horticulture, Sunghwan

\*Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungju

#### Abstract

These experiments were conducted to investigate the substrate specificity, the hydrolysis products on the various carbohydrates and the hydrolysis rate on the various raw starches of the two purified glucoamylase produced by *Rhizopus oryzae*. Both of the glucoamylases hydrolyzed amylose, amylopectin, glycogen, soluble starch, pullulan, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose and maltooctaose, but did not act on  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin, raffinose, sucrose and lactose. When the reaction mixture of glucoamylase and polysaccharides were incubated 37°C for 32 hours, glucoamylase I hydrolyzed amylopectin, soluble starch and amyloses completely, but hydrolyzing glycogen up to only about 88%. Glucoamylase II hydrolyzed the previous four polysaccharides up to about 100%. Both of the glucoamylases produced only glucose for various substrates and did not have any  $\alpha$ -glucosyl transferase activity. Both of the glucoamylases hydrolyzed raw glutinous rice starch almost completely, whereas they acted on raw potato starch, raw green banana starch, raw arrow root starch, raw corn starch, raw yam starch and raw high amylose corn starch weakly. Glucoamylase II hydrolyzed raw starches at the higher rate than glucoamylase I.

#### 序 論

Caldwell 등은 *Rhizopus delemar*의 amylase<sup>(1,2)</sup>는 澱粉을 거의 100% 포도당으로 分鮮시킬 뿐만아니라 맥아당을 分鮮하므로 이 酵素를 Gluc-amylase라 命名하였다.

各種 生澱粉의 分解性 및 分解方式에 關하여 不波 등<sup>(3,4)</sup>이 보고하였고, 감자 전분립의 소립자와 대립자와 glucoamylase를 작용시킬 때 소립자는 대립자보다 잘 분해된다고 具沼 등<sup>(5)</sup>은 밝혔다. 鄭 등<sup>(6)</sup>은 *Bacillus*

*circulans* F-2가 생산하는  $\alpha$ -amylase의 생전분에 대한 분해율을 검토하여 報告하였다.

筆者는 glucoamylase의 生産能이 強한 菌株로서 *Rhizopus oryzae*를 얻어 이 菌株의 glucoamylase 生産에 미치는 培地組成의 影響을 檢討하고, glucoamylase를 分離精製하여 glucoamylase I과 II를 얻었고 이에 대한 酵素的 特性을 檢討하여 그 結果를 報告하였다<sup>(7,8)</sup>.

本報에서는 精製한 glucoamylase의 基質特異성과 各種基質에 대한 反應生成物 및 生澱粉의 分解率을 검토하였다.

材料 및 方法

精製酵素

Glucoamylase I (GI), glucoamylase II (GII)

生澱粉

감자 전분, 참쌀 전분, 미숙 바나나 전분, high amylose corn starch는 純正化學 製品이었고, 옥수수 전분, 칩 전분, 참마 전분은 和光純藥工業株式會社 製品이었다.

Glucoamylase의 activity 測定

基質 酵素 反應液을 Somogyi-Nelson 法<sup>19, 20</sup>에 依하여 還元糖을 定量하고 酵素單位는 1分間에 1  $\mu$  mole의 포도당을 遊離하는 酵素量을 1 unit (1u)로 하였다.

Paper chromatography

反應液의 一定量을 Whatman No. 1 여지에 spotting 하고 65% n-propylalcohol을 展開劑로 하여 70°C에서 上昇法에 依하여 2回 展開시켜 glucoamylase를 처리하고 37°C에서 30분간 反應시킨 後 alkaline silvernitrate dip method<sup>11</sup>에 依하여 發色시켰다. 이 때 標準物質으로는 malto oligosaccharide (日本盛進製藥會社 製品)을 사용하였다.

生澱粉의 分解率 測定

各種生澱粉 5mg에 50mM acetate buffer (pH5.0)를

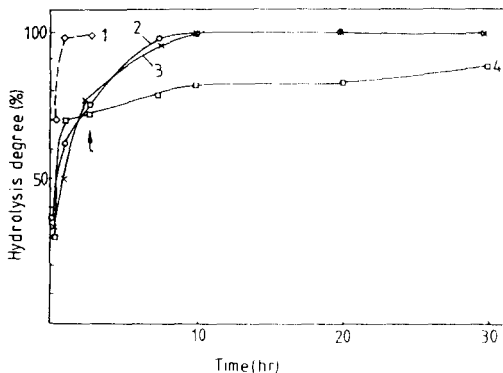


Fig. 1 A. Hydrolysis degree of the polysaccharides by glucoamylase I

The reaction mixture (1.0ml) containing 200  $\mu$ l of 1% boiled substrate aqueous solution, 200  $\mu$ l of glucoamylase I (14.6u) and 600  $\mu$ l of acetate buffer (pH 5.0) was incubated at 37°C for time as indicated. The arrow indicates the further addition of 200  $\mu$ l of the enzyme solution into the reaction mixture.  
1; Amylopectin                    2; Soluble starch  
3; Amylose                        4; Glycogen

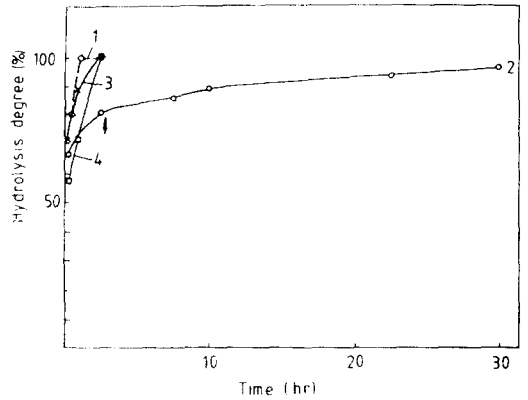


Fig. 1 B. Hydrolysis degree of the polysaccharides by glucoamylase II

The method was the same as described in Fig. 1 A.  
1; Amylopectin                    2; Soluble starch  
3; Amylose                        4; Glycogen

2.5ml 加하고 酵素를 各各 21.5u 씩添加하여 37°C에서 所定時間 振盪反應시켰다. 反應液을 經時的으로 0.2ml 씩 取하여 上澄液과 沈澱地로 分離하고, 이 沈澱物에 1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5ml를 넣고 沸騰水浴中에서 5分間 煮沸하여 加水分解하였다. 上澄液과 酸加水分解物에 對하여 各各 phenol sulfuric acid 法<sup>12</sup>에 依하여 糖을 定量하고 各種 生澱粉의 分解率을 求하였다.

結果 및 考察

基質特異性

各種基質에 對한 相對的 加水分解率은 Table 1과 같이 多糖類中 amylopectin을 가장 잘 分解시켰으며  $\alpha$ ,  $\beta$ -cyclodextrin, raffinose, sucrose, 饴糖은 分解시키지 못하였다. Fig. 1A와 Fig. 1B에서 보는 바와같이 30時間 反應에서는 GI은 amylopectin, 可溶性 전분, amylose를 거의 100% 분해하였고 glycogen 만을 88% 程度 分解하였으나, GII는 公시기질 4種을 거의 100% 분해하였다.

Glucoamylase는 그 起源에 따라 澱粉을 100% 가까이 分解시키는 *Rhizopus*型和 80% 程度 分解시키는 *Niger*型으로 區別된다<sup>13</sup>. 따라서 本菌株가 生産하는 glucoamylase는 *Rhizopus*型에 屬한다.

*Rhiz. delemar* glucoamylase<sup>11, 14, 15</sup>는 amylopectin, amylose, glycogen, 可溶性 전분에 作用하여  $\alpha$ -1,4-glucosidic linkage 및  $\alpha$ -1,6-glucosidic linkage을 分解시키나 isomaltose는 分解하지 못하고 panose는 分解할 수 있다는 報告와 *Asp. oryzae*<sup>16</sup>의 glucoam-

**Table 1. Substrate specificity of the two glucoamylases**

Substrates	Relative rate of hydrolysis (%)		Limit of hydrolysis (%)*	
	G I	G II	G I	G II
Amylose	43	56	100	100
Amylopectin	112	103	100	100
Glycogen (oyster)	73	75	88	100
Soluble starch	100	100	100	98
Maltose	2	9	100	
Maltotriose	43	34		
Maltotetraose	73	57		
Maltopentaose	92	68		
Maltohexaose	57	87		
Maltoheptaose	27	32		
Maltooctaose	27	30		
$\alpha$ -cyclodextrin	0	0		
$\beta$ -cyclodextrin	0	0		
Pullulan	trace	trace		
Raffinose	0	0		
Lactose	0	0		
Sucrose	0	0		

The reaction mixture containing 10 $\mu$ l of glucoamylase solution (GI and GII 0.8 U, respectively), 50 $\mu$ l of 1% substrate, and 840 $\mu$ l of acetate buffer (pH 5.0) in a final volume of 900 $\mu$ l was incubated at 37°C for 10 min.

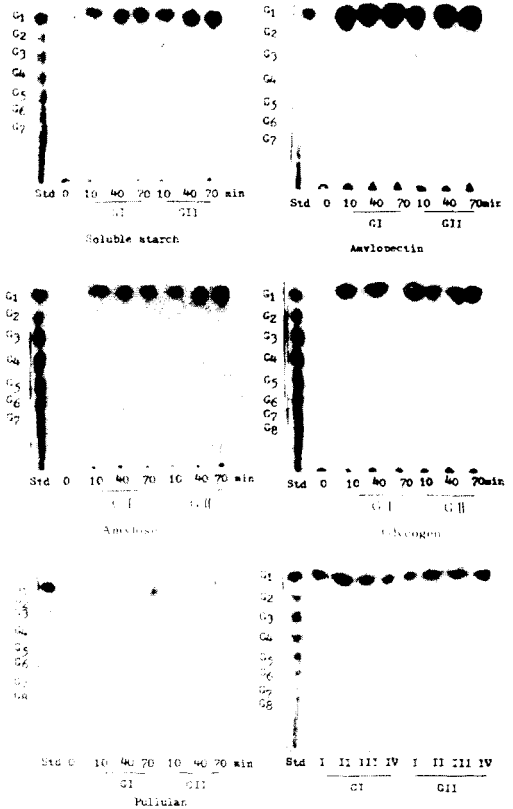
\* See Fig. 1 A and 1 B

ylase는 60%의 分解率을 나타낸다는 研究를 이루어볼 때, glucoamylase의 分解率이 이와같이 起源에 따라 다른 것은 酵素의 特性에 기인되는 것으로 史料된다.

**各種基質에 對한 反應生成地**

1% 各種基質 100 $\mu$ l에 酵素液 10 $\mu$ l(0.4 u)와 50mM acetate buffer (pH 5.0) 90 $\mu$ l를 넣고 37°C에서 所定時間 反應시켜 그 生成物을 paper chromatography로 檢出하였다. Polysaccharide의 反應生成物은 Fig. 2에서 나타냈으며, oligosaccharide의 反應生成物은 Fig. 3에서 나타내었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 GI, GII는 가용성 전분, amylopectin, amylose, glycogen 및 pullulan에 作用하여 포도당만을 生成하였다. 各種多糖類에 32時間 反應시켰을 때도 포도당만 나타나고 glucose reversion products가 생기지 않는 것은  $\alpha$ -glucosyltransferase의 活性이 없다는 것을 立證한다.

또한 oligosaccharide의 反應生成物도 Fig. 3에서 보는 바와 같이 포도당만을 生成하였고 maltase의 活性



I ; soluble starch II ; amylopectin  
III ; amylose IV ; glycogen  
\* 32 hrs incubation

**Fig. 2. Paper chromatograms of the hydrolysis products from various polysaccharides by the two purified glucoamylases**

G<sub>1</sub>; Glucose G<sub>2</sub>; Maltose G<sub>3</sub>; Maltotriose  
G<sub>4</sub>; Maltotetraose G<sub>5</sub>; Maltopentaose  
G<sub>6</sub>; Maltohexaose G<sub>7</sub>; Maltoheptaose  
G<sub>8</sub>; Maltooctaose  
Std; Standard oligosaccharides

을 나타내었다. 이와같은 결과는 Fukumoto<sup>11</sup>나 Phillip<sup>12</sup>의 *Rhiz. delemar* glucoamylase의 報告와 一致하였다.

**各種 生澱粉의 分解**

各種 生澱粉 5mg에 GI과 GII를 各各 21.5u씩 넣고 50mM acetate buffer (pH 5.0)를 넣어 最終液量을 2.5ml로 하고 37°C에서 60分間 反應시킨 다음 Somogyi-Nelson method에 依하여 포도당을 定量하고 各種 生澱粉에 對한 相對的 活性을 求한 結果는 Table 2와 같으며 供試 生澱粉에 對하여 GII는 GI보다 一般的으로 높은 相對的 活性을 나타내었다. 또한 各種 生澱粉에 對한 加水分解率을 求한 結果는 Fig. 4와 같다.

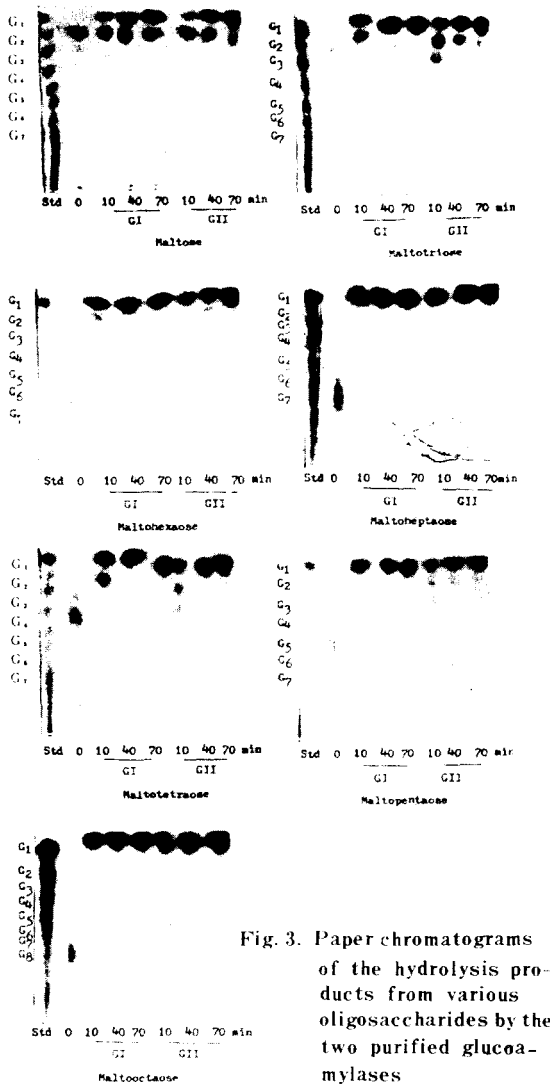


Fig. 3. Paper chromatograms of the hydrolysis products from various oligosaccharides by the two purified glucoamylases

Table 2. Relative activity of the two glucoamylases on various raw starches and boiled soluble starch

Substrates	Relative glucoamylase activity (%)	
	GI	GII
Boiled soluble starch	100.00	100.00
Potato starch	0.17	0.70
Glutinous rice starch	4.19	10.01
Green banana starch	0.50	4.39
Arrowroot starch	trace	0.53
Corn starch	trace	2.46
Yam starch	0.34	4.39
High amylose corn starch	trace	2.99

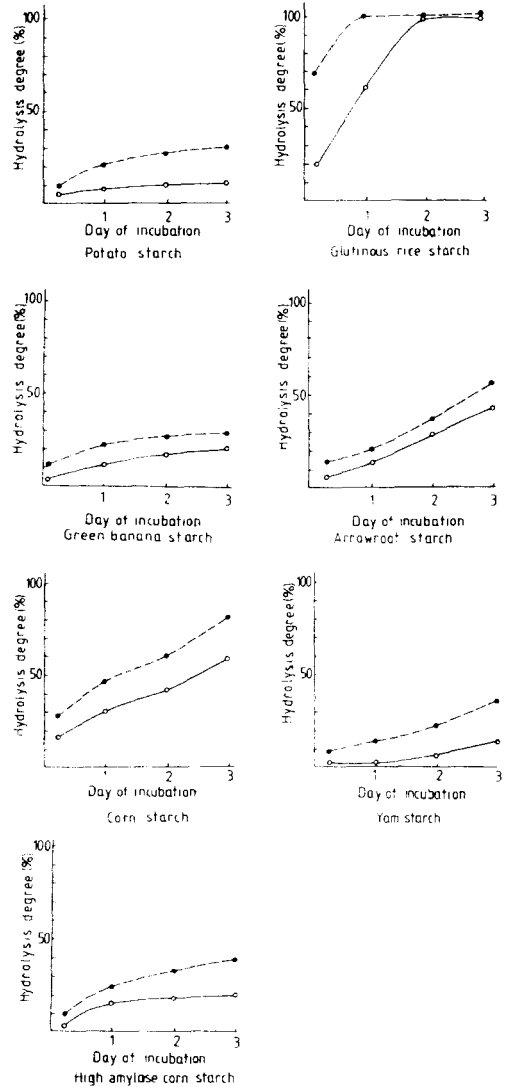


Fig. 4. Hydrolysis degree of various raw starches by the two purified glucoamylases

The reaction mixture containing 5mg of raw starch, glucoamylase solution, and 50mM acetate buffer (pH 5.0) in a final volume of 2.5ml was incubated at 37°C under shaking condition. The amount of GI and GII were 21.6 U, respectively.

○—○; GI, ●—●; GII

GI, GII를 참쌀 전분에 2日間 反應시켰을 때 100% 分解시켰으며 옥수수 전분에 대하여는 3日間の 反應으로 GI은 約 60%, GII는 80%의 分解率을 보였으나, 감자 전분, 미숙 바나나 전분, 쫄면전분, 참마 전분, high amylose corn starch는 60% 미만의 낮은 分解率을 나타내었다. 一般的으로 生澱粉에 對하여 分解率을 比較할 때 GII가 GI보다 더 높은 加水分解力을 나타내었다.

## 要 約

*Rhizopus oryzae*가生産하는 glucoamylase의各種基質에 대한分解反應을檢討하였다.

Glucoamylase I과 II는 amylose, amylopectin, glycogen, 가용성 전분, pullulan, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose, maltooctaose를加水分解하였으나,  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin, sucrose, raffinose, 젓당은加水分解하지 못하였다. 37°C, 32시간의反應에서 glucoamylase I은 amylopectin, 가용성 전분, amylose를 거의 100% 분해하였고 glycogen 만을 88%정도 분해하였으나, glucoamylase II는 供試基質 4種을 거의 100% 분해하였다. Glucoamylase I과 II의反應生成物質은 glucose 만이었고  $\alpha$ -glucosyltransferase activity는 없었다. Glucoamylase I과 II는 생참쌀 전분을 가장 잘分解시키나 생감자 전분, 생미숙 바나나 전분, 생콩 전분, 생참마 전분, raw high amylose corn starch의分解能은弱하였으며, glucoamylase II의分解能은 glucoamylase I에比하여生澱粉의分解력이強하였다.

## 文 献

- Phillips, L. L. and Caldwell, M. L. : *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 3559 (1951)
- Phillips, L. L. and Caldwell, M. L. : *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 3563 (1951)
- 不波英次 : *日本澱粉科學*, **24**, 128 (1977)
- Fuwa, H., Nakajima, M., Hamada, A. and Glover, D. V. : *Cereal Chem.*, **54**, 230 (1977)
- 具沼圭二, 山本和夫, 鈴木繁男, 高谷友久, 不波英次 : *日本澱粉科學*, **25**, 3 (1981)
- 鄭萬在, 谷國肇, 丸山芳治, 李美子 · 鄭宰顯 : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **10**, 259 (1982)
- 許元寧, 鄭萬在 : *한국식품과학회지*, **16**, 322 (1984)
- 許元寧, 鄭萬在 : *한국식품과학회지*, **16**, 392 (1984)
- Nelson, N. : *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944)
- Somogyi, M. : *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952)
- Trevelyan, W. E., Procter, D. P. and Harrison, J. S. : *Nature*, **166**, 441 (1950)
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. : *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
- 小野正之, 手塚隆久, 柳用藤治 : *酵素利用ハンドブック* (地人書館), 61 (1980)
- 辻阪好夫, 福本壽一即 : *科學と工業*, **30**, 130 (1956)
- 辻阪好夫, 福本壽一即 : *科學と工業*, **30**, 398 (1956)
- Ohga, M., Shimizu, K. and Morita, Y. : *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 967 (1966)

(1984년 7월 19일 접수)