

고온성 사상균의 효소에 관한 연구

(제 2 보) 고온성 사상균의 알카리성 protease

鄭 東 孝

(전국대학교 공과대학 발효공학과)

李 啓 瑚

(서울대학교 농과대학)

Studies on Enzyme of the Thermophilic Mold

(Part 2.) Thermophilic mold alkaline protease

Dong Hyo Chung

(Dept. of Fermentation Technology,
Kon-Kuk University)

Ke Ho Lee

(College of Agriculture,
Seoul National University)

(Received July 7, 1970)

SUMMARY

1. The preparation and some enzymatic properties of crude alkaline protease from a thermophilic mold, *Myriococcum sp.* was investigated.
2. Optimum pH for the hydrolysis of casein was 9.0 at 50°C for 10 minutes. Optimum temperature was 55°C at pH 9.0 for 10 minutes. The enzyme was highly stable at the range of pH 6.0 to 11.0 at 30°C
3. The alkaline protease in the culture filtrate was isolated two fractions by elution column chromatography on DEAE-Cellulose.

서 론

Protease 생성균주는 옛날부터 *B. subtilis* 를 위시하여 많이 연구되어 왔다⁽¹⁻²⁾. 현재 이들은 최적 pH에 따라 산성 중성 및 알카리성 protease 로 대별하게 되었으나⁽³⁾ 같은 *B. subtilis* 의 protease 라도 효소 단백질의 본능이 달라지는 것을 보고하였다⁽⁴⁻⁵⁾. 한편 상기의 세균 외 *Aspergillus* 속, *Penicillium* 속등의 곰팡이류에서도 2-3 종류의 protease 를 분리한데 반하여⁽⁶⁻⁷⁾ *Rhizopus* 속은 주로 산성 protease 를 생산하는데 경우가 많고⁽⁸⁾ *Mucor* 속은 우유의 응유활성이 강한 효소를 분리하는 것도 있음을 알게 되었다⁽⁹⁻¹⁰⁾. 사상균이 생산하는 protease 는 일반적으로 넓은 특이성을 가지고 있으며 그중 중성, 미알카리성 protease 는 결정화되어 상세히 검토되었다⁽¹¹⁻¹³⁾. 더욱이 pro-

tease 의 이용면도 근래 급격히 개발되어 세제첨가제로서 알카리성이고 anion 계면활성제에 강한 protease 의 개발이 진행되고 있는 차에 저자는 고온사상균이고 내알카리성의 protease 를 생산하는 균주를 분리함과 동시에 이에 생산 배지의 검토와 그들의 조효소의 성질을 조사한 결과 그 일부를 보고한다.

방 법

1. 균의 분리 및 사용균주

고온성사상균을 분리하기 위하여 발열부패 중의 퇴비에서 상법에 따라 다음의 검색배지로 45°C에서 발육된 수 백의 균주 중 protease 생산능이 강한 한균주는 *Myriococcum* 속으로 동정되어 이를 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition of screening medium

Hammarsten casein	3.0%
Glucose	0.5
Yeast extract	0.2
Ammonium citrate(dibasic)	0.1
KH ₂ PO ₄	0.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
NaCl	0.05
Chloramphenicol	0.05
Agar	1.5
Tap water	100ml.
Initial pH	6.2

2. 효소생성배지

1) 밀기울고체배양기 : 1차 균분리용 밀기울배지의 조성은 다음의 Table 2와 같다.

Table 2. Composition of wheat bran medium

Wheat bran	25.0g
Rice husk	5.0
Potato starch	3.0
Ammonium sulfate	0.12
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03
KH ₂ PO ₄	0.09
Tap water	35.0ml.

즉 Table 2의 배지를 잘 혼합하여 500ml 3차 후라스크에 넣고 1.3kg/cm²에서 30분간의 살균후 분리용 배지로 사면배양한 각 균주를 한 백금이 접종하고 45°C에서 8일간 배양을 행하였다.

2) 쌀겨고체배양기 : 쌀겨배양기의 조성은 다음의 Table 3과 같다.

Table 3. Composition of rice bran medium

Rice bran	25.0g
Rice husk	5.0
KH ₂ PO ₄	0.09
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03
Tap water	25.0ml.

위의 같이 처리하여 접종 배양을 하였다.

3) 탈지대두박진탕배양기 : 대두박배지의 조성은 다음의 Table 4와 같다.

상기의 배지를 500ml들이 진탕 후라스크에 넣고 1.4kg/cm²에서 30분간 살균접종 후 45°C에서 5일간 진탕 배양하였다.

Table 4. Composition of defatted soy bean meal

Defatted soy bean meal	3.0%
Glucose	0.2
Tap water	100.0ml.
Initial pH	6.2

defatted soy bean meal; moisture 10%
crude protein 48%

4) 탱크배양에 의한 효소의 생성 : 미리 살균한 대두박배지를 11l jar fermentor(실용 50l)에 넣고 다시 살균 후 달리 3일간 배양한 2l의 seed를 접종하고 다음의 조건에서 3일간 배양하기 위하여 배지에 chloramphenicol 0.045%를 첨가하였다.

1. initial : pH:6
2. 살균 : 1.0kg/cm², 60분간
3. 온도 : 45°C
4. 교반 : 220rpm
5. 통기량 : 20l/min.
6. 내압 : 0.5kg/cm²
7. 소포제 : 10% silicon oil 자동적하

3. 효소액의 조제

1) 고체배양의 경우 : 각 배양후라스크에 150ml의 수도수를 가하여 실온에서 때때로 교반하면서, 5시간 동안 추출을 행하였다. 이 추출물을 먼저 거—즈로 여과하고 9,000rpm, 10분간 냉동원침을 행하여 그 상등액을 40배로 희석시켜 효소용액으로 하였다.

2) 액체배양의 경우 : 배양액을 위 고체배양과 같이 원침하고 그 상등액을 5배로, 또 jar fermentor의 경우는 10배로 희석시켜 효소용액으로 하였다.

4. 효소활성의 측정 :

Milk casein을 기질로 하는 Anson—萩原변법에 따라서 활성을 측정하였다⁽¹⁴⁾.

1) 기질 : 시판 Hammarsten을 0.6%가 되게 0.05M Na₂HPO₄(pH 5.8~7.8)에 용해하였다.

2) Protease의 활성 : 상기의 기질 5ml에 효소액 1ml을 가하고 50°C에서 10분간 반응시킨 후 0.44M TCA 용액 5ml을 가하여 반응을 정지시켰다. 이를 30°C에 30분간 방치 후 여과하고 그 여액 2ml에 0.55M 탄산소—다용액 5ml와 Folin 시약(3배 희석) 1ml을 가하여 잘 교반하여 30°C에서 30분간 방치 후 액층 1cm, 660m μ 의 파장으로 흡광도를 측정하였다. blank는 기질 대신에 TCA용액을 가하여 효소단백질을 침전 후 상기와 같이 하였다.

효소역가는 blank 와의 차에서 흡광도의 증가량으로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. 균주의 배양조건

1) 산수량 : 고체배양에 의한 효소의 생산은 배지의 수분량에 따라 영향을 받게되므로 밀기울과 쌀겨배양기의 고형물 30g에 대하여 여러 비율로 살수 하여 45°C에서 8일간 배양을 행하여 효소의 활성을 측정하였다. 그 결과는 다음의 Table 5와 같다.

Table 5. Relationship between rate of watering and enzyme production (45°C)

medium	added water (mL.)	rate of watering (%)	enzyme activity O.D. at 660m μ
wheat bran medium	20	66.7	0.020
	25	83.3	0.060
	30	100.0	0.080
	35	117.0	0.190
	40	133.0	0.180
rice bran medium	45	150.0	0.120
	15	50.0	0.020
	20	66.7	0.090
	25	83.3	0.115
	30	100.0	0.030
35	117.0	0.016	

(protease activity was expressed in optical density of Casein-Folin method)

2) 고체배양기의 종류 및 배양시간과 효소의 활성 : 고체배양기의 고형물에 대하여 앞과 같이 살수, 살균하여 8일간 배양을 한 결과는 Fig. 1과 같다.

효소활성은 3일째부터 나타나서 6일째에 최대의 활성을 나타내나 이후는 감소되었다.

3) 액체배양기의 배양시간과 효소활성 : 탈지대두반 3%, glucose 0.2%의 배지를 진탕배양을 5일간 행할때 pH의 변화와 효소활성은 Fig. 2와 같다.

pH는 2일째까지 약간 변화하나 3일째부터 상승되고, protease는 4일째 최대의 활성을 나타내고 그 후는 서서히 감소 되었다.

고체배양의 경우는 밀기울배양이 쌀겨 배양보다 약간 강하였다.

최고의 효소생성시간은 액체배양에서는 4일째였으나, 고체배양의 경우는 6일째였다. 이상의 결

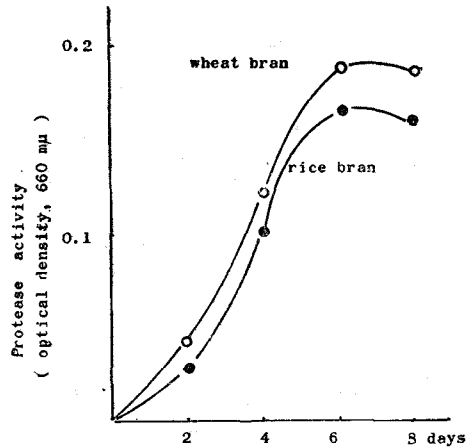


Fig. 1. Relationship between kinds of solid medium and protease activity.

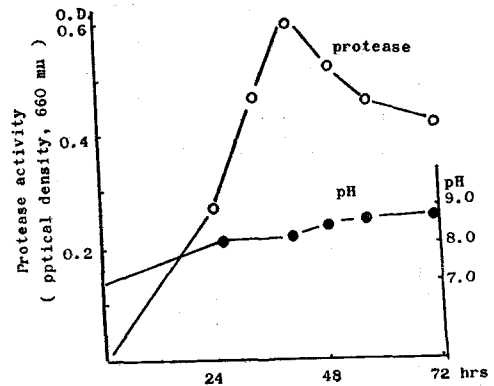


Fig. 2. Change of protease activity.

과로서 탈지대두반진탕 배양이 고체배양보다 효소 생성배지로 적당하다고 생각되었다.

4. Tank 배양에서 protease 생산

전기 탈지대두박배양기의 조성을 실용적 견지에서 tank 배양을 한 결과는 Fig. 3과 같다.

pH의 변화는 효소생성기간 중 약간 상승되고 있다.

효소생성은 40시간에 최고의 peak를 나타내나 그 후는 저하 되었다.

이상의 결과 효소생성은 진탕배양 보다 2일 빨리 촉진되는 것을 알고 이 조건으로 얻는 배양액을 효소액으로 하여 조효소의 여러 성질을 검토하였다.

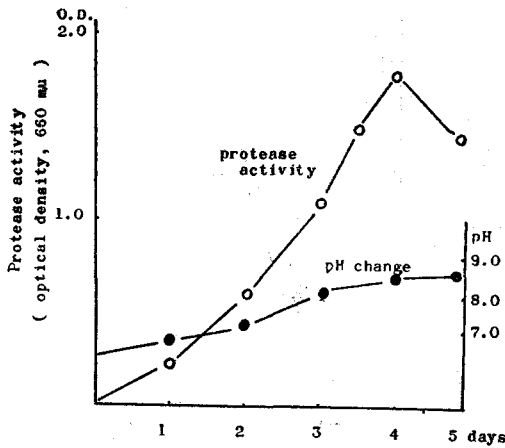


Fig. 3. Production of protease and change of pH in tank culture.

3. 조효소의 여러 성질

1) 최적 pH: 최적 pH는 다음과 같이 측정하였다. 즉 조효소에 동량의 각종 완충용액으로 pH 2.0~11.0(단 pH 3.5~5.8 사이는 casein이 응고됨)까지의 유액을 각각 가하고 다시 묽은 산이나 알칼리로 그의 pH를 정확히 조절하였다. 이것을 일정시간 후에 활성을 측정하고 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

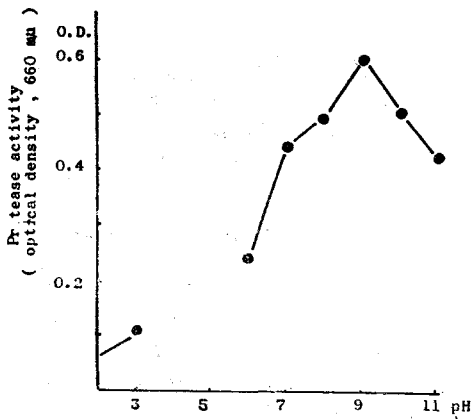


Fig. 4. pH dependence of crude protease

Fig. 4와 같이 최적 pH는 9.0으로 비교적 알칼리성인 것을 알 수 있었다.

2) pH안정성: 조효소용액에 동량의 여러 pH 완충용액을 가하여 최적 pH와 같이 30°C에서의 120분간 방치 후 pH를 최적 pH로 다시 조절시켜 잔존활성을 측정한 결과를 Fig. 5에 나타내

었다.

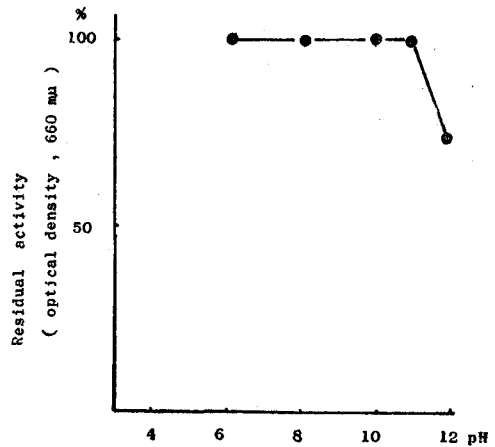


Fig. 5. pH stability of crude protease

Fig. 5와 같이 효소활성은 pH 6.0~11.0의 범위에서 안정하나 pH 12.0에서 약간 저하되어 언제나 알칼리 영역에서 안정함을 알 수 있었다.

Protease의 최적 pH에 대하여 Güntetberg는 *B. subtilis*의 protease를 분리 결정하여 그의 최적 pH는 10.0⁽¹⁵⁾, 그리고 萩原도 역시 *B. subtilis*의 한 균주에서 protease의 결정을 얻고 그의 최적 pH는 8.0~10.0이라 보고한 바 있다⁽¹⁶⁾.

한편 Tsuru 등도 *B. subtilis var. amylosacchariticus* alkaline protease의 정제 및 그의 효소화학적 성질을 추궁하여 최적 pH 10.3~10.7임을 발표하였다⁽¹⁷⁾. 그리고 이 효소의 pH안정범위는 30°C에서 20시간 범위에서 안정하였다. 또 *Scopulariopsis brevicornis*의 protease III는 pH 10.5~11.0에서 40°C에서 casein을 잘 분해하며, pH 5.5에서도 상당히 안정하였다고 하였다⁽¹⁸⁾.

이와 같이 본 균주가 생산하는 protease도 상기의 균주와 같이 alkaline protease인 동시에 alkali성에서 더욱 안정함을 알 수 있다.

3) 최적온도: 반응액을 pH 9.0 완충액으로 조절하고 25°C에서 70°C까지의 각 온도에서 그 효소의 활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다.

Fig. 6과 같이 최적 온도는 50~55°C이며 이 온도에서 대칭적 관계를 나타 내었다. 이 균주의 생육온도 45°C에 비하여 약 10°C 높은 최적 온도를 나타내고 효소반응액을 pH 9.0으로 조절하고 40~70°C까지의 각 온도에서 60분간 방치한 후 그의 잔존활성을 측정한 결과를 Fig. 7에 나타내

었다.

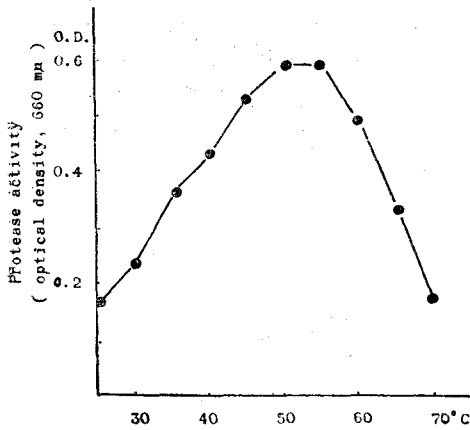


Fig. 6. Temperature dependence of crude protease

Fig. 7 과 같이 60°C까지의 온도에서는 실활되지 않으나 70°C의 경우는 급격히 실활되어 겨우 25%가 잔존되었다. 일반적으로 protease의 최적 온도는 45°C 정도이고 내열성도 *B. subtilis* 경우 60°C에서 47%, 70°C에서 90%가 불활성으로 되는데 반하여⁽¹⁾ 본 균주의 경우 이에 비하여 약

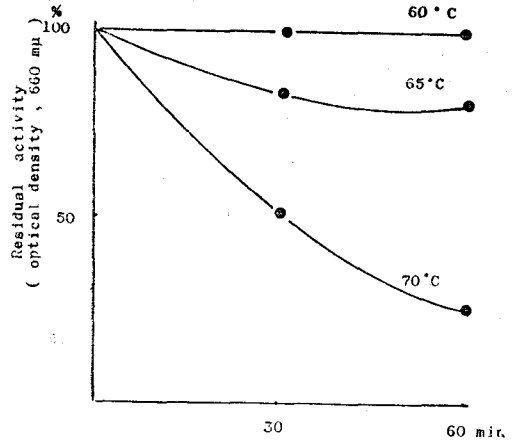


Fig. 7. Thermal stability of crude protease

10°C가 높으며 60°C에서 2시간 동안 거의 불활성화 되지 않았다. 이런 점으로 봐서 이 protease는 alkaline protease인 동시에 고온성 protease 즉 thermophilic alkaline protease인 것이 그 특색이라 할 수 있다.

5) 기질의 분해곡선 : 효소액의 반응을 최적 pH로 조절하고 50°C, 60°C, 70°C에서 기질의 분해를 측정된 결과는 Fig. 8과 같다.

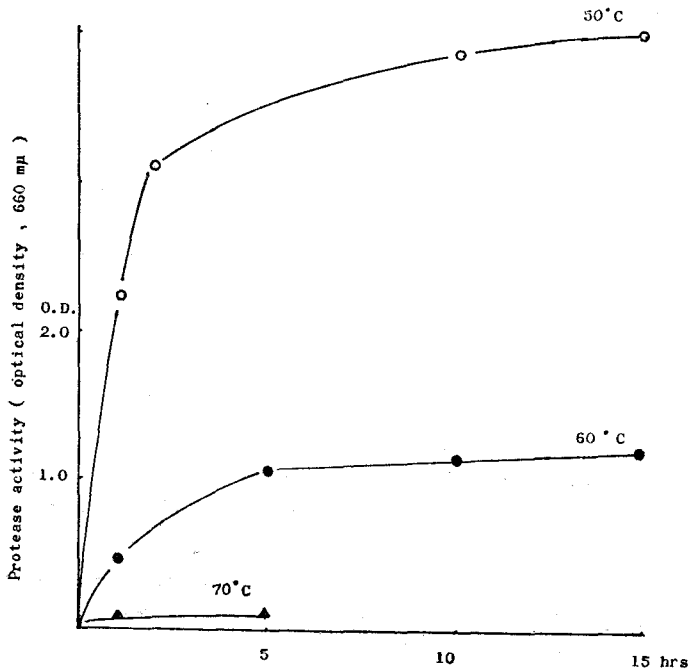


Fig. 8. Relationship between reaction time and enzyme activity

Fig. 8과 같이 50, 60°C의 경우는 반응시간 1 시간 동안에는 거의 직선적인 관계가 나타 났으며 70°C의 경우는 반응이 일어나지 않았다.

6) 효소의 정제 : Duolite CS-101(200~400mesh)는 약산성 양이온교환수지이며 이것은 단백질의 분리 정제에 옛날부터 사용되어 왔다. 이를 상법에 따라 정제하고⁽¹⁹⁾ tank 배양으로 얻은 배양액을

1/100 까지 농축시켜 투석을 완전히 한 후에 column에 흡착시켰다. 먼저 pH 5.0M/20 acetate buffer, 다음에 pH 7.0 M/5 phosphate buffer로 step-wise로 용출시켰다. 이때 얻어진 용출 곡선 및 효소의 활성은 다음 Fig. 9에 나타 난것과 같은 용출상이 얻어 졌다.

이와 같이 처음의 pH 5.6 M/20 acetate buffer

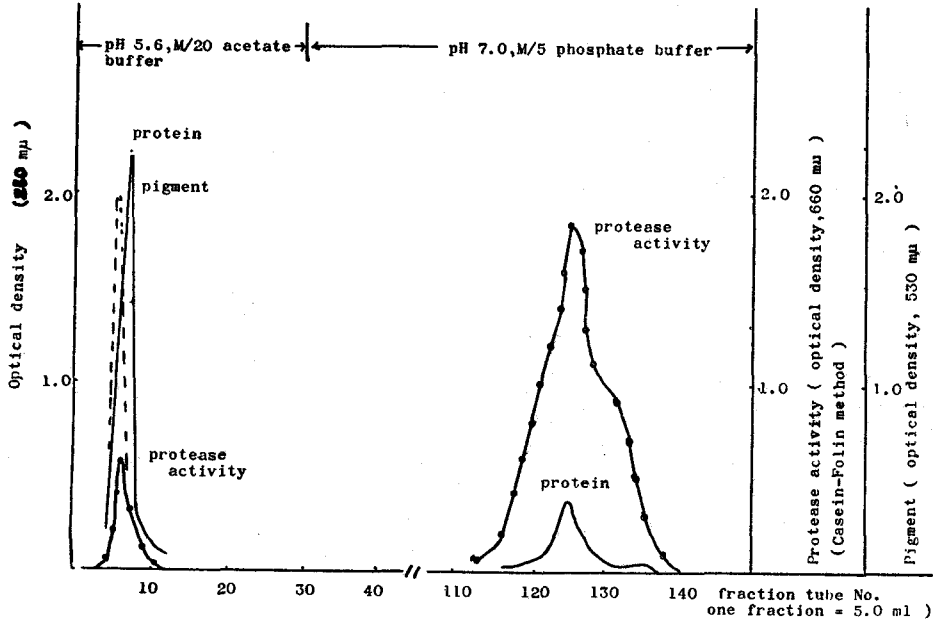


Fig. 9. Chromatogram of protease on a column of Duolite CS-101(1.6×25cm)

용액으로 용출되는 구분은 protease 활성은 거의 없으며 착색 부분이 쉽게 용출되었다. 이에 반하여 pH 7.0M/5 phosphate buffer 용액의 용출구분은 단백질의 량은 적으나 protease 활성은 강하였다. 여기서 획득된 2개의 peak는 다른 것으로 생각하고 이들의 효소 화학적인 성분은 다음에 발표하기로 한다.

Alkaline protease의 생산 균주로는 곰팡이 중 *Aspergillus oryzae*에 대한 연구도 많았고⁽²¹⁻²²⁾ 같은 곰팡이라도 균주의 차이에 따라 특이성이 달라진 것을 알 수 있다⁽²³⁻²⁵⁾. 이들 외에도 *Asp. flavus*⁽²⁶⁾, *Asp. sydowi*⁽²⁷⁾, *Asp. mellus*⁽²⁸⁾에서도 alkaline protease가 생산된다는 보고도 있다. 한편 Danno 씨는 *Asp. sulphureus*의 alkaline protease를 결정화시켜 pH 안정성은 6에서 11이라 하였다⁽²⁹⁾. 그리고 Hayashi 씨는 *Asp. sojae*의 alkaline protease를 정제한 결과 최적 pH가 11.0였으나 온도의 안정성은 낮아 60°C에서 10분간에 거의 실활되었다.

지금까지의 증은호기성 유포자 세균 특히 *B. subtilis*의 protease에 대하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 고온성 사상균의 그것에 대하여 연구는 거의 없었으므로 급후 이들의 효소학적인 특이성을 더욱 조사할 예정이다.

요 약

- (1) 고온성사상균인 *Myriococcus* 속의 알칼리성 protease의 생성과 조효소의 성질을 검토하였다.
- (2) 조효소의 최적 pH는 9.0 이고, 최적 온도는 55°C였다. 그리고 안정 pH 범위는 6.0에서 11.0 이었다.
- (3) 조효소용액을 DEAE-Cellulose column Chromatography로 2개의 다른 활성부분으로 나누어졌다.

인 용 문 헌

1. 福本壽一郎 : 科學と工業, 23, 91(1949)

2. 福本壽一郎, 山本武彦, 市川和宏: 日農化, **33**, 336(1958)
3. 福本壽一郎, 山本武彦, 市川和宏: 日農化, **31**, 331(1956)
4. James, D. Mc., Tsuru, D., Yasunobu, K.T.; J. Biol. Chem., **239**, 3706(1964)
5. Tsuru, D., Yamamoto, T., Fukumoto, J.; Agr. Biol. Chem., **30**, 651, 856, 1164(1966)
6. 一島英治: 醸協誌, **22**, 393(1964)
7. 松島欽一: 味増技術, **144**, 2(1966)
8. Fukumoto, J., Tsuru, D and Yamamoto, T.; Agr. Biol. Chem., **31**, 710(1967)
9. Arima, K., Iwasaki, S. and Tamura, G; Agr. Biol. Chem., **31**, 540(1967)
10. Iwasaki, S., Tamura, G, and Arima, K.; Agr. Biol. Chem., **31**, 546(1967)
11. Grewther, W.G., Lennox, F.G.; Nature, **165**, 680(1950)
12. Yoshida, F. and Ichishima. E.; Agr. Biol. Chem., **25**, 102(1962)
13. 吉村貞彦, 岸田忠照, 田野源一: 日農化, **38**, 128(1964)
14. Hakihara, B., Matsubara, H., Nakai, H. and Okunuki, K.; J. Biochem.(Tokyo) **45**, 185 (1958)
15. Guntelberg, A.V., Ottesen, M.; Nature, **170**, 802(1952)
16. Hakihara, B.; Ann. Rep. Scient. Works Fac. Sci., Osaka Univ.,; **2**, 35(1954)
17. Tsuru, D., Yamamoto, T. and Fukumoto, J.; Agr. Biol. Chem., **30**, 1251(1966)
18. 吉村貞彦, 田野源一: 日農化, **38**, 178(1964)
19. Yoshida, F., Nagasawa, M.; Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan), **22**, 32(1957)
20. 三宅棲, 濱口陽一: 生化学, **26**, 105(1954)
21. Bergkvist, R.; Acta Chem. Scand., **17**, 1541 (1963)
22. Nunokawa, Y., Namba, Y, and Kinuyama, Y.; Nippon Nogeikagaku kaishi, **36**, 884(1962)
23. Subramanian, A.R. and Kalnitsky, G.; Biochem, **3**, 1861(1964)
24. Subramanian, A.R. and Kalnitsky, G.; ibid., **3**, 1868(1964)
25. Subramanian, A.R. and Kalnitsky, G.; Fed. Proc., **24**, 593(1965)
26. Tukova, J. Miles, O. Ganceo, K and Boublick, M.; Biochem. Biophys. acta, **178**, 100(1969)
27. Ito, M. and Sugiura, M., Yakugaku Zashi., **88**, 1576(1968)
28. Danno, G.; Agr. Biol. Chem., **34**, 264(1970)