

재래식 메주에서 분리한 미생물의 단백질 분해효소

최신양 · 임성일 · 유진영

한국식품개발연구원 생물공학연구본부

서론

장류 제조에 있어 이용되는 메주는 대두를 증자하여 발효시킨 것으로 메주가 숙성되는 동안 세균, 곰팡이 및 효모가 증식되며, 이들에 의하여 protease, amylase 및 lipase 등의 효소가 생성된다. 메주의 자연 숙성중의 microflora에 대한 연구보고로서 박 등(1)은 재래식 메주에서 *Mucor mucedo*, *Rhizopus japonicas*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium sp.*, *Saccharomyces coreanus* 등을 분리하였고, 조 등(2)은 재래식 메주에서 *Mucor abundans*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium lanosum*의 곰팡이들을 분리하였으며, 세균은 *Staphylococcus aureus*가 일부 분리되었으나, 대부분 *Bacillus sp.*가 존재한다고 보고하였다. 또한 허 등(3)은 재래식 메주에서 산 생성균을 분리하였는데, 호기성 산 생성균은 *Micrococcus sp.*이고, 혐기성 산 생성균은 *Streptococcus sp.*, *Pediococcus sp.* 및 *Lactobacillus sp.*이며, 호기성 일반세균은 *Bacillus sp.*가 주종을 이루었다고 보고하였다. 메주에서 생성된 효소 중 protease는 대두의 단백질에 작용하여 여러 형태의 peptide가 생성되어 장류의 품질에 커다란 영향을 미칠 뿐 아니라(4, 5), 아미노산을 공급하는 영양 기능, 맛이나 용해성, 유화성 등에 관여하는 감각기능, 여러 생리활성을 나타내는 생체조절기능 등에 관여한다. 특히 생리활성을 나타내는 생체 조절기능으로는 항암, 혈압강하, 혈청콜레스테롤 강하, 면역증강, 칼슘흡수 촉진 등 광범위한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(6). 또한 최근 생리활성기능을 갖고 있는 콩 펩타이드를 식품에 첨가한 새로운 기능성 식품이 상품화되어 시장에 출시되었으며, 콩 펩타이드가 가진 생리활성 기능을 포함한 여러 가지 기능을 이용하여 건강지향 식품, 기능성식품, 제약, 화장품에 응용한 예도 있다(7). 한국 재래식 간장의 맛은 아미노산을 비롯한 유기산, 유기당 등 다양한 성분들의 종합적인 조화의 맛에 기인한다. 특히 아미노산들은 그 종류에 따라 지미(旨美), 고미(苦味), 감미(甘味) 등의 한국재래식 간장의 중요한 맛을 낼 뿐 아니라, peptides도 그 종류에 따라서 다양한 맛을 낸다(8-14). *B. licheniformis* SSA3-2M10이 분비하는 protease

및 peptidase(15)는 대두단백질로부터 아미노산 및 peptide를 생산하며, 한국 재래식 간장의 맛에 관여하는 아미노산 및 peptide들의 조성에 크게 관여한다고 보고된 바 있다. 그러나 장류에는 다양한 세균이 존재하며 이들의 특성이 모두 밝혀지지 않은 이상, 어떠한 균주가 가장 우수하다고는 단정지을 수가 없다. 단백질을 가수분해하는 효소는 미생물의 종에 따라 다양하게 존재하는데 이들 효소의 작용으로 대두단백질의 특성이 변화하여 pH, 염 농도, 온도 등의 조건에 따라 단백질의 변화와 이용의 제한성을 가질 수 있다.

본 고에서는 한국 재래식 메주로부터 protease 활성이 매우 높은 것으로 평가된 *Bacillus subtilis* PCA 20-3, *Aspergillus wentii*, *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103, *Syncephalastrum* PDA 132-2을 선발하여 재래식 된장과 간장의 맛 성분의 생산에 효소가 어떻게 관여하는지와 그 효소들 중 한국 재래식 메주의 독특한 맛 성분 생산에 크게 관여하는 효소를 밝혀 앞으로의 균 육종에 이용할 뿐만 아니라, 기능성 peptide의 생산을 위한 미생물 유래 protease의 생산기반을 구축하기 위한 예비단계로서 *Bacillus subtilis* PCA 20-3, *Aspergillus wentii*, *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103, *Syncephalastrum* PDA 132-2 유래의 protease의 생산과 특성에 관해 연구하여 균주 육종 및 단백질 분해효소에 대한 기초자료로 활용하고자 하였다.

***Bacillus subtilis* PCA 20-3이 생산하는 protease**

한국 전통 메주로부터 분리·동정한 *Bacillus subtilis* PCA 20-3이 생산하는 protease의 생산조건과 특성을 조사하였다. Protease의 생산 최적조건은 0.2% soytone, 2% starch, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.2% CaCl₂, 0.01% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, pH 7.0, 30에서 20시간이었다. 효소의 최적작용 pH와 온도는 6.0-11.0, 55℃였고 pH 6.0-11.0의 범위와 50℃이하에서 안정하였다. 금속이온 중 Fe²⁺와 Cu²⁺에 의해 효소활성이 저해되었다. 2mM의 phenylmethanesulfonyl fluoride에 의해 89.2%의 활성이 저하되어, 활성 serine을 가진 serine protease임이 시사되었다. 조효소액의 K_m값은 5.0 × 10⁻⁴M, V_{max} 값은 100 μg/min이었으며 bovine serum albumin, isolated soybean protein 보다 casein에 대해 초기 가수분해력이 높은 것으로 나타났다. *Bacillus subtilis* PCA20-3이 생산하는 protease를 효소 생산용 배지(0.2% soytone, 2% soluble starch, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.2% CaCl₂, 0.01% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO)를 이용하여 30℃에서 20시간 배양한 다음, 원심분리하여 상징액을 분획한 후, 80% 포화 황산암모늄에 의한 염석과 CM Sephadex C-50 및 Sephadex G-100을 이용하여 비활성도

76.0unit/mg, 수율 2.7%, 정제배수 7.6 배로 정제하였다. 정제 단백질의 YMC-pack protein-RP column chromatography에 의한 순도검증에서 순도가 95% 이상인 것으로 나타났다. SDS-PAGE 분석에서 주 밴드의 분자량은 약 31.5kDa이었고 아미노산 조성은 alanine, glycine, serine, valine의 함량이 많았으며 분자량 31,500 Da를 기준으로 하였을 경우 본 protease의 잔기수는 321잔기였다. RP-HPLC로 분획한 main peak의 N-terminal amino acid sequence를 확인한 결과 Val¹-Pro²-Tyr³-Gly⁴-Val⁵-Ser⁶-Gln⁷-Gly⁸-Lys⁹-Ala¹⁰인 것으로 밝혀졌다.

***Aspergillus wentii*가 생산하는 protease**

한국의 재래식 메주로부터 분리·동정한 *Aspergillus wentii*가 생산하는 protease를 정제하고 그 특성을 조사하였다. 기본배지[밀기울 : 1% glucose 함유H₂O=1 : 1(w/v)]에서의 효소생산 최적조건은 pH 9.0, 30℃, 4일이었다. 효소의 정제는 먼저 배양 밀기울로부터 20mM phosphate (pH8.0)로 효소를 추출하고 QAE-Sephadex와 SP-Sephadex의 ion exchange chromatography로 비흡착성 활성단백질을 분리한 후 두차례의 Sephadex G-100 gel filtration로서 분자량 약 32,000(SDS-PAGE 분석 : 단일밴드)의 비활성도 213unit/mg, 정제배수 27.3배로 효소를 정제하였다. 본 효소의 K_m값은 3.049×10⁻⁴M, V_{max}값은 151.1μg/min이었으며 ISP, hemoglobin, bovine albumin 보다 casein에 대해 가수분해력이 높은 것으로 나타났다. 정제효소의 최적작용 pH와 온도는 pH 9.0, 50℃였으며 pH 4.0~11.0의 범위와 40℃이하에서 안정하였으며 효소활성은 금속이온에 의해 영향을 받지 않았고 2mM의 phenylmethanesulfonyl fluoride에 의해 86% 실패되었다. 이 결과로부터 본 효소는 효소 활성부위가 serine의 OH기인 serine protease인 것으로 밝혀졌다.

***M. racemosus f. racemosus* PDA 1030이 생산하는 protease**

한국 재래식메주로부터 분리·동정한 *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 1030이 생산하는 protease의 생산조건과 특성을 조사하였다. 기본배지 [콩(백태) : H₂O = 1 : 1(w/v)]에서의 최적생산조건은 pH 6, 30℃, 72시간 배양이었으며 효소작용을 위한 최적 pH와 온도는 각각 5.0, 50℃였고 pH 2.0-5.0의 범위와 40℃이하에서 안정하였다. 금속이온중 Fe²⁺에 의하여 활성이 증대되었으나 Ag⁺에 의하여 효소활성이 저해되었다. 한편 본 효소는 phenylmethanesulfonyl fluoride에 의해 효소활성이 98.5% 실패되어 활성 serine을 가진 serine protease임이 시사되었다. K_m값은 0.9×10⁻⁴M, V_{max}값은 5.93μg/min이었으며

bovine serum albumin보다 casein을 더 잘 가수분해하는 것으로 나타났다.

M. racemosus f. racemosus PDA 103이 생산하는 protease는 먼저 기본배지 [밀기울 : 1% glucose 함유 H₂O = 1 : 1(w/v)] 를 이용하여 배양한 후, 20mM phosphate buffer, pH6.2로 protease를 추출하고 80% 포화 황산암모늄에 의한 염석, CM Sephadex C50 ion-exchange chromatography와 두차례에 걸친 Sephadex G-100 gel filtration chromatography하여 비활성도 60.1 unit/mg, 정제배수 83.5배로 효소를 정제하였다. 정제 효소의 순도는 YMC-pack protein-RP column chromatography에 의해 95% 이상인 것으로 나타났다. RP-HPLC 분석으로 분리된 주 peak를 분획하고 LC-MS를 이용하여 분자량을 확인한 결과 33,746Da임이 밝혀졌으며 SDS-PAGE에 의한 분자량과 일치하는 점으로부터 단백질 분자구조가 monomer인 것으로 나타났다. 아미노산 조성분석 결과와 분자량으로부터 잔기수를 추정된 결과, *M. racemosus f. racemosus*가 생산하는 protease는 330잔기로 구성된 것으로 잠정 확인되었다.

***Syncephalastrum racemosum* PDA 132-2가 생산하는 protease**

Syncephalastrum racemosum PDA 132-2의 메주의 대량 생산을 위한 starter culture로서 사용 가능성과 콩펩타이드의 생산을 위한 효소의 기초자료를 얻기 위하여 protease를 추출하고 정제하였으며 그 특성을 조사하였다. Protease의 밀기울에서의 최적 효소생산 조건은 pH 4.0, 20℃, 5일이었고 gel filtration과 ion exchange chromatography를 이용하여 정제한 결과, 정제도는 19.7배, 비활성도는 12.4unit/mg이었다. 정제효소는 크기가 약 34kDa이며 PCMB에 의해 효소활성이 100% 저해되어 thio protease, pH 2.0~5.0에서 안정한 산성 protease인 것으로 밝혀졌다. 효소반응속도는 V_{max}값이 2.14μg/min로서 *Asp. wentti*와 *B. subtilis*와 비교해 1/50이었다.

요약

재래식 메주로부터 protease 활성이 높은 것으로 평가된 *Bacillus subtilis* PCA 20-3, *Aspergillus wentti*, *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103, *Syncephalastrum* PDA 132-2을 선발하여 protease의 생산조건과 효소정제에 따른 특성을 조사한 결과, 비활성도는 *Aspergillus wentti*, *Bacillus subtilis* PCA 20-3, *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103, *Syncephalastrum* PDA 132-2순으로 높았으며 효소반응속도 역시 V_{max}값이 같은

순서로 높았다. 따라서 *Aspergillus wentii*와 *Bacillus subtilis* PCA 20-3가 생산하는 protease를 이용하여 장류에서의 기능성 peptide 생산을 위한 기초자료로의 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구결과의 일부는 농림기술개발사업 3차 기획연구과제 연구비에 의하여 수행되었으며, 이에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. Park, J.M. and Oh, H.I. Changes in microflora and enzyme activities of traditional *Kochujang Meju* during fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 56-62 (1995)
2. Cho, D.H. and Lee, W.J. A study on the fermentive microflora of Korean traditional soy souce. J. Kor. Agric. Chem. Biotechnol. Soc. 13: 35-42 (1970)
3. Hu, S.H. and Ha, D.M. Occurence of acid producing bacteria in *Meju* loaves. J. Kor. Agric. Chem. Biotechnol. Soc. 34: 130-133 (1991)
4. Cho, J.S. Supply and demand of products, present condition and the point of issue of research of Korean soy seasonings. Food Science and Industry, 22: 28-36 (1989)
5. Lee, J.S., Kwon, S.J., Chung, S. W., Choi, Y.J., Yoo, J.Y. and Chung, D.H. Changes microorganism enzyme activities and major component during the fermentation of Korean traditional *Doenjang* and *Kochujang*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 247-253 (1996)
6. Messina, M. Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. J. Nutr. 125: 567 (1995)
7. Motoki, K. and Sequso, K. Trends in Japanese soy protein research. INFORM, 5: 308 (1994)
8. Clegg, K.M. and Lim, C.L. The structure of a bitter peptide derived from casein by

- digestion with papain. J. Dairy Sci. 41: 183 (1974)
9. Fujimaki, M., Kato, H., Arai, S. and Tamaki, E. Proteolytic enzyme treatment of soybean protein and its effect on the flavor. Food Technol. 22: 889 (1968)
 10. Hamiton, J.S. Hill, R.D. and H. van leeuwen. A bitter peptide from Cheddar cheese. Agric. Biol. Chem. 38: 375 (1974)
 11. Hill, R.D. and H. van leeuween. Bitter peptides from hydrolysed casein coprecipitate. Aust. J. Dairy Technol. 19: 32 (1974)
 12. Matoba, T., Hayashi, R. and Hata, T. Isolation of bitterness of peptides and their chemical structures. Agric. Biol. Chem. 36: 1423 (1972)
 13. Matoba, T., Hayashi, R. and Hata, T. Isolation of bitter peptides from tryptic hydrozate of casein and their chemical structure. Agric. Biol. Chem. 34: 1235 (1970)
 14. Minamimura, N., Matsumura, Y., Fukumoto, J. and Yamamoto, T. Bitter peptides in cow milk casein digests with bacterial proteinases. Agric. Biol. Chem. 36:588 (1972)
 15. Kim, J.K., and Kim, S.D. Genetic breeding of Korean soy sauce-fermenting *Bacillus* by UV mutation. J. Kor. Agric. Chem. Soc. 31: 346-350