

Aspergillus 屬菌이 生産하는 蛋白質分解酵素에 關한 研究

梁 漢 喆

高麗大學校 農科大學 農化學科

(1966年 4月 11日受理)

Studies on the proteolytic enzyme produced by *Aspergilli*

Han Chul Yang

College of Agriculture, Korea University

SUMMARY

For the production of proteolytic enzyme with *Aspergillus*, the examination is made on the culture-time and koji extracting conditions, during producing koji.

1. The highest activity showed up when the culture-time took 50 hours for *Aspergillus sojae* and 60 hours for *Aspergillus flavus*.

2. When the cultured koji was extracted by a buffer solution and water, the former gave the product of higher activity until pH 7 through pH 12, and water until pH 3 through pH 7.

3. In the method of crushing and granule extractions, crushing extraction produced the one of higher activity than granule.

4. The highest activity showed up when *Aspergillus sojae* took 5 hours (*Aspergillus flavus* 4 hours) in the time of extracting enzyme solution.

5. The highest activity showed up when both *Aspergillus sojae* and *Aspergillus flavus* reacted and indicated 37.60°C in the reaction temperature and activity.

I. 序 論

麴菌은 우리나라에서는 옛날부터 술, 간장, 된장釀造에 널리 사용되었고 近年에는 消化酵素劑의 醫藥品製造에 널리 사용되고 있어 麴菌의 諸性質 卽 菌學的(1-5) 立場에서부터 酵素의 定量法(6-7) 化學的成分(8) 變化에 對하여 많은 研究가 있다. 그러나 消化酵素劑 生産에 있어 培養麴의 製麴時間과 抽出條件으로 抽出水, 麴의 磨碎 및 粒狀抽出, 反應溫

度와 酵素의 活性, 抽出時間에 따르는 蛋白分解酵素의 力價에 對하여 調査한 結果를 報告하고자 한다.

II. 實 驗

(1) 使用菌株

本實驗에서 使用한 菌株는 東京大學 應用微生物 研究所에서 分割받은 *Aspergillus sojae*, *Aspergillus flavus* 을 使用하였음.

(2) 酵素液의 調製

밀기울 5g에 물 4.5 ml을 加하고 300 ml 三角 후라스크에 取하여 常壓滅菌 後 各各 前記 麴菌을 接種하여 30°C에서 *Aspergillus sojae* 50時間 *Aspergillus flavus* 는 60時間 培養하여 水 100 cc及 緩衝液 100 cc를 加하여 室溫에서 3時間 每々로, 振盪機로 振盪하고 濾過하여 濾液을 酵素液으로 하여 냉장고에 저장하여 隨時 酵素溶液으로 使用하였다.

(3) 測定方法

蛋白質 分解酵素의 力價 測定은 Anson(7-9) 變法을 使用하여 Folin 試藥에 依한 呈色을 利用하였다. 卽 尿素變性 Hemoglobin 液 2 cc을 基質로하여 여기에 1.5 cc의 緩衝液 (pH 3.0--5.0, M. citric acid. M. sodium. citrate, pH 6.0--9.0, 飽和 Borax, M. 磷酸 第一카리, pH 10.0--12.0 飽和 Borax, N-NaOH)을 加하여 所定의 pH로 하고 37°C의 恒溫水槽에서 10 分間 豫熱하고 酵素液 0.5 cc를 加하고 20分 加熱한 後 T.C.A. 4 ml을 加하여 未消化 Hemoglobin을 沈澱시키고 東洋濾紙 No 2.로 濾去하고 濾液 1 ml에 0.4 M. Na₂CO₃ 8 ml을 加하고 Folin 試藥(1-3) 1 ml을 追加한 後 37°C에서 20分 加溫한 後 이呈色液을 Spectronic 20를 利用하여 波長 660 mμ에서 吸光度를 測定하였다.

II. 結果 및 考察

(1) 培養時間

培養時間을 달리하여 培養 後 抽出 測定한 結果

Aspergillus sojae 는 50 時間에서 *Aspergillus flavus* 는 60 時間에서 가장 높은 力價를 나타냈다. 測定結果는 服英⁽⁸⁾ 松山氏의 結果와 大體로 같은 傾向을 나타내고 있다. 本實驗 結果는 Fig. 1. Fig. 2. 와 같다.

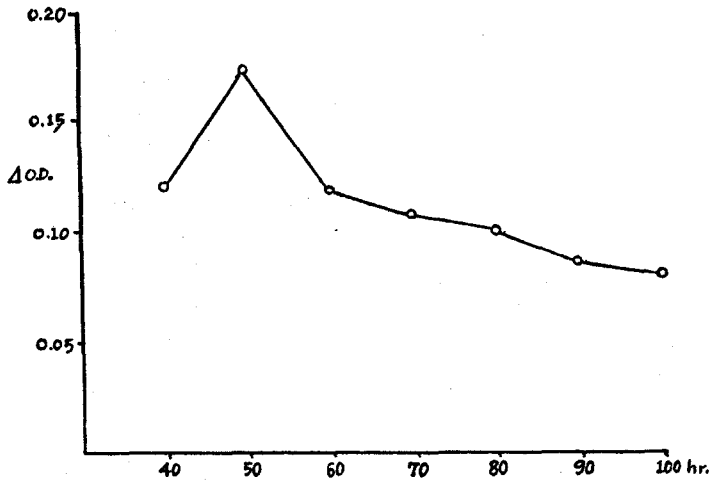


Fig. 1. Change of protease activity of *A. sojae* with the culture period.

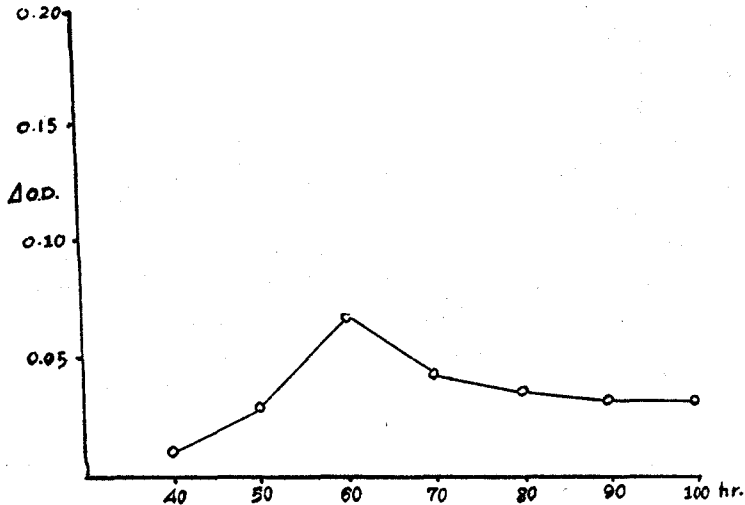


Fig. 2. Change of protease activity of *A. flavus* with the culture period.

(2) 培養物の 緩衝液及 水道水抽出

培養液을 各 緩衝液及 水道水로 粒狀 抽出한 結果 pH 3-7 까지 緩衝液 보다도 水道水로 抽出한 酵素液의 力價가 높았고 pH 7-12 까지는 水道水 보다도 緩衝液으로 抽出한 酵素力價가 높았다. 그러나 별 차이가 없었으므로 以後 protease의 抽出은

水道水로 하였다. 本 測定結果는 服英 松山⁽⁸⁾氏의 結果와 比較하면 pH 7-12 에서는 緩衝液을 使用한 部分은 같으나 pH 3-7 까지는 反對의 結果를 나타냈다. 이것은 使用한 緩衝液 Ion⁽¹⁰⁻¹¹⁾에 따라 일어나는 特性이 아닌가 生覺된다. 本 實驗結果는 Fig 3. 및 Fig 4. 와 같다.

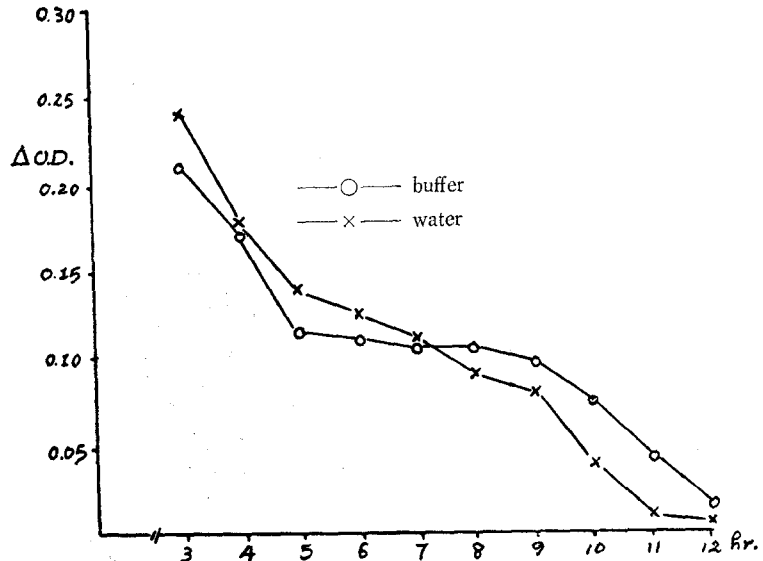


Fig. 3. Comparison of extraction medium for the protease of *A. sojae*.

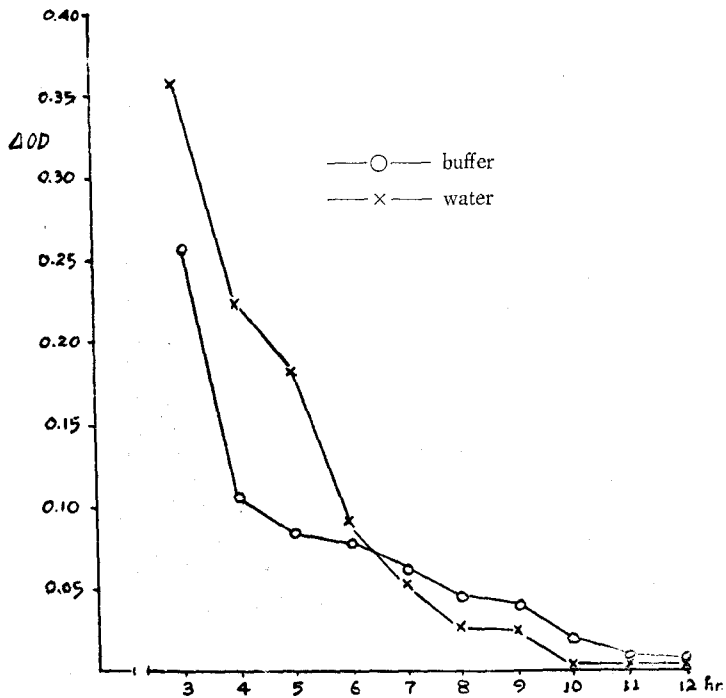


Fig. 4. Comparison of extraction medium for the protease of *A. flavus*.

(3) 培養麴의 磨碎抽出과 粒狀抽出

培養麴을 磨碎한것과 粒狀 그대로 水道水로 抽出하여 力價를 測定한 結果 粒狀보다 磨碎한 部分이 酵素力價가 높은 傾向을 나타내고 있고 松山氏의

結果와 거의 같은 傾向을 나타내고 있다. 이 結果로 培養麴의 抽出에 있어서는 攪拌磨碎效果가 있으나 磨碎程度에 對하여는 좀더 研究할 必要가 있다고 생각된다. 本 實驗結果는 Fig. 5 및 Fig. 6 과 같다.

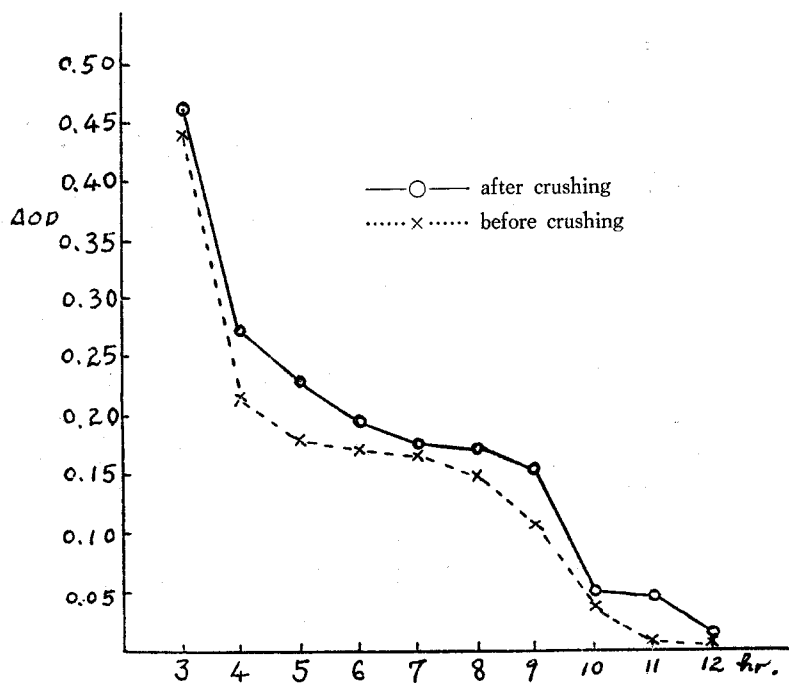


Fig. 5. Comparison of protease activity of *A. sojae* in water extraction before and after crushing.

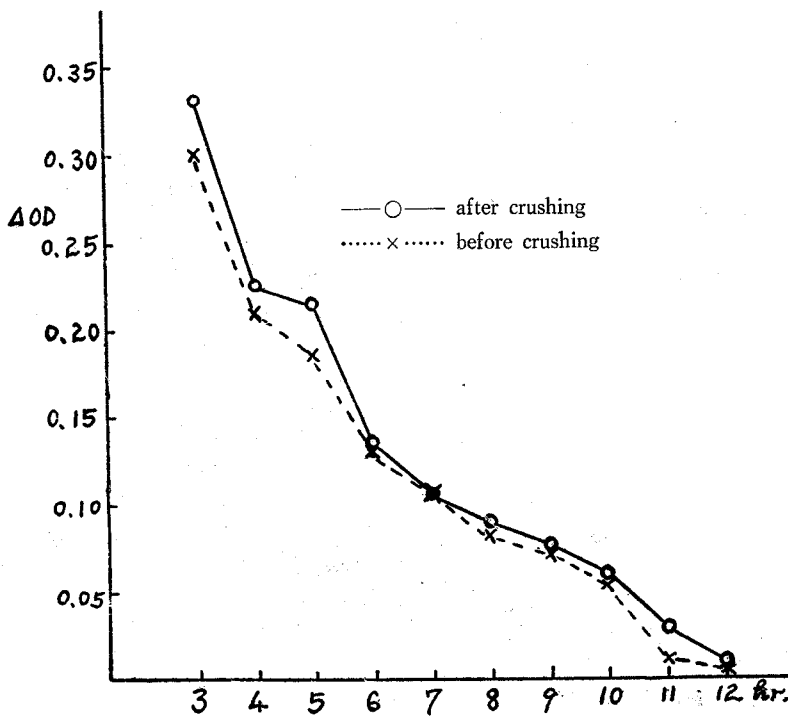


Fig. 6. Comparison of protease activity of *A. flavus* in water extraction before and after crushing.

(4) 酵素液抽出時間

培養液을 抽出時는 室溫(10~15°C)에서 振盪機로 1, 2, 3, 4, 5, 6時間 抽出後 力價를 測定한 結果 *Aspergillus sojae* 와 *Aspergillus flavus* 는 4時間 振盪한 것이 가장 높은 力價를 나타냈으며 松山氏의 結

果에서는 3時間 정도로 抽出하면 充分하다 하였으나 이것은 抽出時 室溫의 溫度와 振盪回數에 따라서 多少 差異가 나타나지 않았나 생각된다. 本 實驗 結果는 Fig. 7. 및 Fig 8. 과 같다.

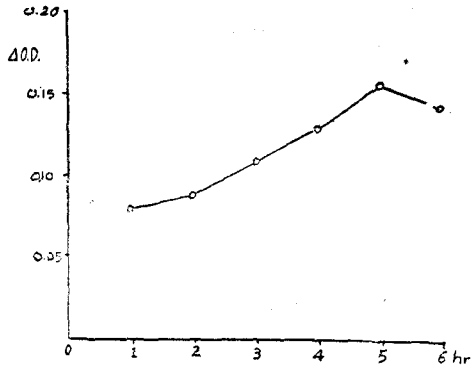


Fig. 7. Change of protease activity of *A. sojae* with the extraction period.

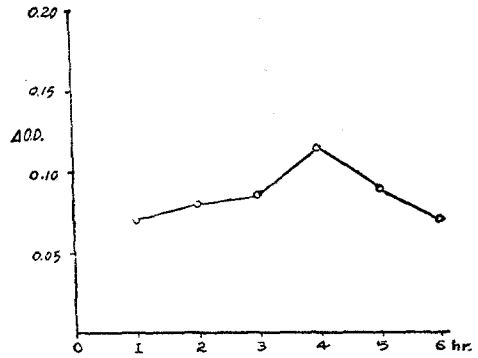


Fig. 8. Change of protease activity of *A. flavus* with the extraction period.

(5) 反應溫度와 活性

培養物로부터 抽出한 酵素液을 使用하여 各 溫度에 反應時間을 變化시키어 力價의 變化를 測定한 結果 *Aspergillus sojae* 및 *Aspergillus flavus* 全部는 37°C

恒溫水槽에서 60分間 反應시켰을 때 가장 높은 力價를 나타냈다. 이 結果는 杉浦⁽¹¹⁾氏의 實驗結果와 거의 같은 傾向을 나타냈다. 本 實驗 結果는 Fig. 9 및 Fig. 10 과 같다.

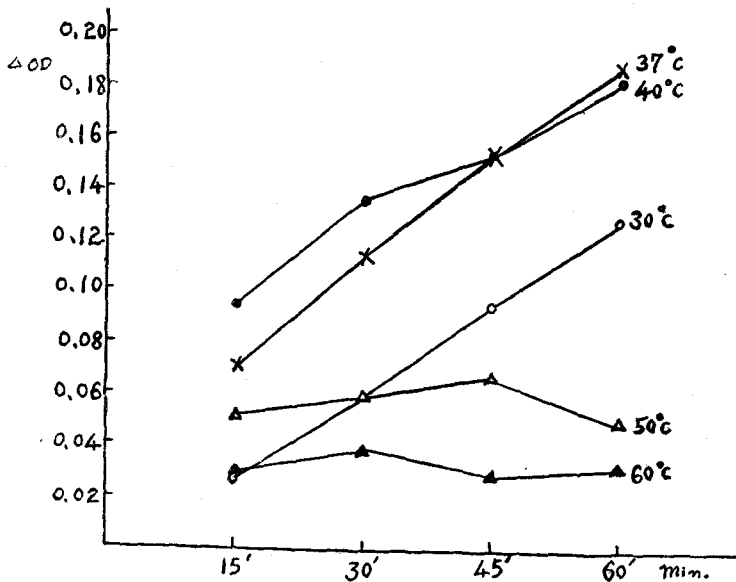


Fig. 9. Activity of protease in reaction to various temperature [use of *Asp. sojae*]

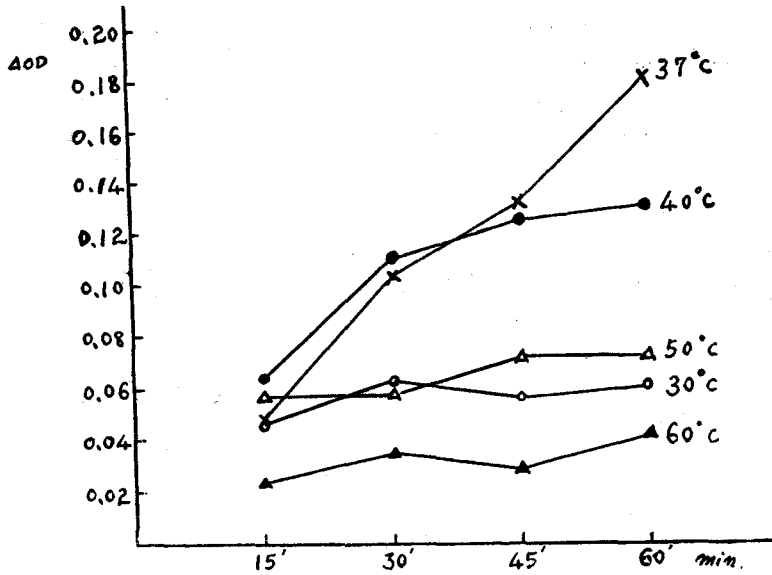


Fig 10. Activity of protease in reaction to various temperature [use of *Asp. flavus*]

IV. 要 約

Aspergillus 屬菌이 生産하는 蛋白分解酵素生産에서 製麴時間과 麴의 抽出 條件에 對하여 檢討하였다.

1. 培養時間은 *Aspergillus sojae* 는 50 時間, *Aspergillus flavus* 는 60 時間에서 가장 높은 力價를 나타냈다.

2. 培養麴의 緩衝液及 水道水로 抽出할 때는 pH 7—12 까지는 緩衝液이 높았고 pH 3—7 까지는 水道水로 抽出할 때 높았다.

3. 培養麴의 磨碎 抽出과 粒狀 抽出할 때 粒狀 抽出보다 磨碎 抽出이 높은 力價를 나타냈다.

4. 酵素液 抽出 時間은 *Aspergillus sojae* 에 있어서는 5 時間, *Aspergillus flavus* 에 있어서는 4 時間에서 가장 높은 力價를 나타냈다.

5. 反應溫度와 活性은 *Aspergillus sojae* 및 *Aspergillus flavus* 는 모두 37°C, 60 分 反應시켰을 때 가

장 높은 力價를 나타냈다.

끝으로 本 研究를 遂行함에 있어 始終 指導鞭撻을 하여주신 서울大學校 農科大學 李春寧博士님과 恩師 孟道源教授님께 衷心으로 感謝를 드립니다.

V. 參考文獻

- (1) 坂口, 石谷; 農化 26, 19, 85, 279. (1952)
- (2) K.B. Raper; J. Bact. 48, 639. (1944)
- (3) 坂口, 石谷, 高森; 日本 農化 27, 638. (1953)
- (4) 小田, 山縣; 釀工 31, 154, 251. (1953)
- (5) 井口; 日本 農化 27, 229, 541. (1953)
- (6) 成田, 漆島; 乙卯 4, 40, 84. (1953)
- (7) 標準生化學實驗; 文光堂 (1953)
- (8) 服英, 松山; 調味科學 33, 22. (1961)
- (9) 飯沼; 藥劑學 18, 112. (1958)
- (10) Methods in Enzymology I. (1955)
- (11) 杉浦; 藥劑學 32. 206. (1963)