

Rhizopus japonicus S-62가 생성하는 蛋白質分解酵素에 관한 研究

鄭 萬 在

忠北大學 農化學科

(1976년 11월 8일 수리)

Studies on the Proteolytic Enzyme Produced by *Rhizopus japonicus* S-62

by

Man-Jae Chung

Dept. of Agricultural chemistry, Chung Buk National University, Choengju, Korea

(Received Nov. 8, 1976)

Abstract

As a study on the acid protease production by *Rhizopus japonicus* S-62, the culture conditions for the enzyme production and characteristics of the crude enzyme were investigated. The results are summarized as follows:

1. The optimum conditions for solid culture on wheat bran were 48 hrs of culture period and 100~120% addition of tap water.
2. Of the several media, wheat bran medium was the most excellent in the enzyme production.
3. The addition of sucrose, fructose, NH_4Cl and NaH_2PO_4 on wheat bran, respectively, increased largely the enzyme production.
4. The optimum pH for the enzyme action was pH 2.4~2.6, the optimum temperature was about 40°C, and the stable pH range was pH 2.5~5.0, the enzyme was stable below 40°C and was inactivated abruptly above 40°C.

結 論

微生物이 生産하는 protease는 作用하는 pH에 따라 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 大別하며 같은 菌株에 있어서도 培養條件 및 培地組成에 따라 生産量 및 그 比率이 현저하게 달라진다.

酸性 protease는 주로 絲狀菌에 의하여 生産된다. 絲狀菌의 酸性 protease에 관한 研究를 보면 蔭山⁽¹⁾은 *Aspergillus oryzae*의 酸性 protease는 Opt. pH가 2.8~

3.0이고, pH 7.0 이상에서는 反應性を 상실하며 松島⁽²⁾는 *Aspergillus niger*型菌株, *Penicillium expansum*, *Penicillium spinulosum*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus peka* 등의 protease는 pH 3.0 附近에서 높은 活性을 나타내며, 麴菌類가 生産하는 protease를 acid protease(Opt. pH 2.5~3.0), Semi-acid protease (Opt. pH 5.5~6.0), neutral protease (Opt. pH 6.0~7.0), alkaline protease (Opt. pH 10.0)로 分類하였고 *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium luteum*의 acid protease는 *Aspergillus*屬의 acid protease와 마찬가지로 Sodium lauryl sulfate에 依

하여沮害되나 EDTA의 영향은 없다고 하였다. 또한 *Mucor hiemalis*, *Mucor racemosus*는 Opt. pH가 3.0과 5.6~6.0인 protease를 생산한다고 하였다. 그 밖에 酸性 protease를 생산하는 菌株로는 *Monilia sitophila*, *Alternaria tenuis*, *Fusarium lini*, *Gliocladium roseum* 등⁽³⁾, *Saccharomyces cerevisiae*⁽⁴⁾, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus casei*⁽⁵⁾, *Micrococcus freudenreichii*⁽⁶⁾ 등이 알려졌다.

· 筆者는 強力한 Lipase 生産菌株인 *Rhizopus japonicus* S-62가 耐酸性이 강한 acid protease를 생산하는 것을 밝혀내고 protease 生産에 미치는 培養條件 및 粗酵素의 特性을 檢討하고 몇가지 結果를 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

實驗方法

1. 供試菌株: *Rhizopus japonicus* S-62(忠北大學 農化學科 保管菌株)

2. 基本培地

Wheat bran 5g와 Tap water 5ml를 100ml 三角플라스크에 넣어 잘 혼합하고 15 Lbs에서 40分間 加壓殺菌하였다.

3. 培養方法:

麥芽汁寒天培地に 3日間 培養한 供試菌을 1白金耳씩 上記 固體培地に 接種하여 30°C에서 培養하였다. 但 培養時間에 關한 實驗以外에는 48時間, 添水量에 關한 實驗以外에는 添水量을 100%로 하여 培養하였다.

4. 酵素液의 調製

培養物에 100ml의 蒸溜水를 加하여 waring blender (virtis型, 6,000rpm/min)로 2分間 攪拌하고 遠心分離 (10,000rpm/min)하여 protease activity를 測定하였다.

5. Protease activity의 測定

Anson-萩原變法⁽⁷⁾으로 測定하였다.

a. 試藥

1) Casein soln.; Hammarsten milk casein을 0.6%가 되게 McIlvaine buffer soln. (pH2.6)에 용해시킴.

2) 0.44M Trichloroacetic acid soln. (TCA soln)

3) 0.55M Na₂CO₃ soln.

4) Folin reagent

b. 測定方法

0.6% Casein Soln. 5ml에 酵素液 1ml를 加하고 37°C에서 正確하게 10分間 反應시킨 後 0.44M TCA soln. 5ml를 加하여 反應을 中止시키고 37°C에서 20分

間 維持한 後 濾過하고 濾液 1ml를 試驗管에 取하여 이에 0.55M Na₂CO₃ soln. 5ml와 Folin試藥 (3倍희석액) 1ml를 넣어 37°C에서 20分間 發色시킨 後 660m μ 의 波長으로 吸光度를 測定하고 (ATAGO 36型 Spectrophotometer) 標準曲線으로 부터 測定值에 對한 Tyrosine의 量을 計算하였다. Blank는 酵素液 1ml에 0.44M TCA soln. 5ml를 加하여 酵素蛋白質을 沈澱시킨 後 0.6% Casein soln. 5ml를 加한 것에 對하여 같은 方法으로 Tyrosine의 量을 計算하였다. 그리고 酵素單位는 1分間에 生成되는 Tyrosine의 μ g로서 表示하였다.

實驗結果 및 考察

酵素의 生産條件檢討

1. 培養時間

基本培地를 使用하여 一定時間 培養한 結果는 Fig.1과 같다. 48時間 培養時에 最高의 protease 活性을 나타내며 그 後 부터는 急激하게 減少되었다. 培養時間에 따른 protease의 活性은 微生物의 種類 및 培地組成에 따라 다른데 *Myriococcum* genus⁽⁸⁾는 144時間, *Rhodotorula glutinis* No.K24⁽⁹⁾는 72時間에 最高의 活性을 나타내는데 本菌株는 이들 菌株 보다 짧은 時間에 最高의 活性을 나타내었다.

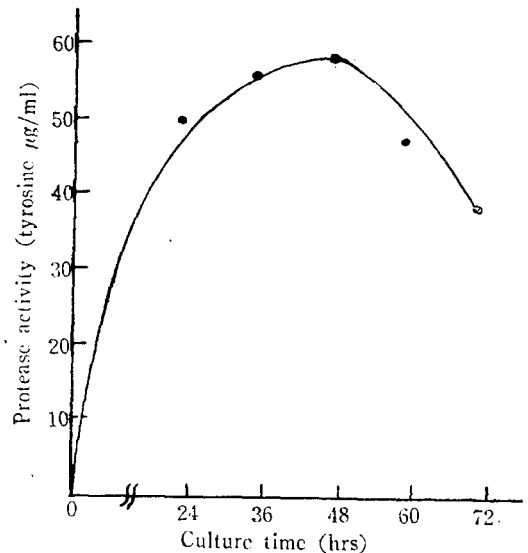


Fig. 1. Effect of culture time on the protease production

2. 添水量

Wheat bran에 Tap water를 여러가지 比率로 添加하여 培養한 結果는 Fig. 2에서 보는바와 같이 最適 添水量은 100~120%이었다.

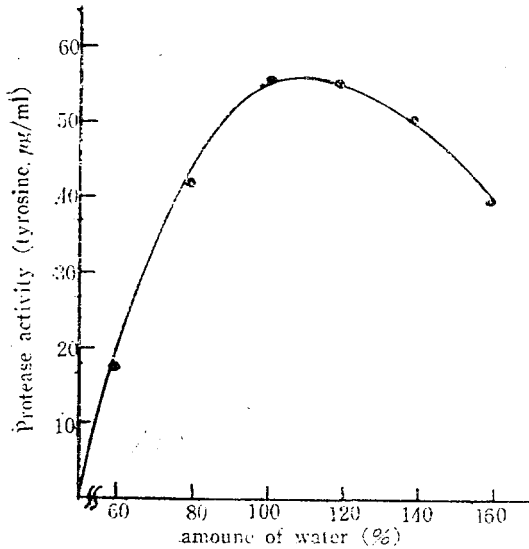


Fig. 2. Effect of the amount of added water to wheat bran on the protease production

3. 培地組成

各種 培地에 供試菌株을 培養하여 protease 活性을 測定한 結果는 Fig. 3과 같이 wheat bran 單用培地가 가장 優秀하였으며 wheat bran의 一部를 defatted soybean meal, soybean meal로 대체한 培地는 극히 不良하였다.

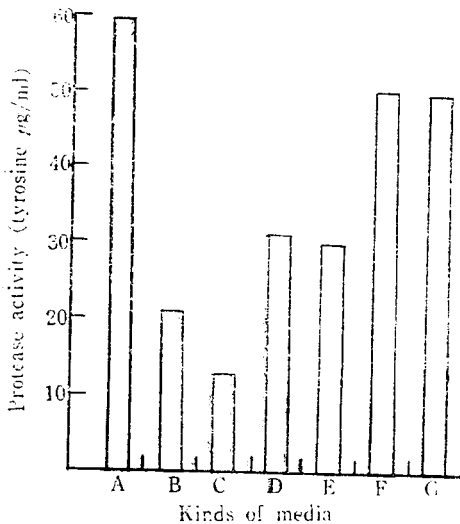


Fig. 3. Effect of each media on the Protease production

- A: wheat bran 5g
- B: wheat bran 4g, defatted soybean meal 1g
- C: wheat bran 3g, defatted soybean meal 2g
- D: wheat bran 4g, soybean meal 1g
- E: wheat bran 3g, soybean meal 2g
- F: wheat bran 4g, corn meal 1g
- G: wheat bran 3g, corn meal 2g

4. 炭素源 添加試驗

基本培地에 各種 炭素源을 1%씩 添加하고 protease 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 1에서 보는 바와 같이 一般的으로 wheat bran에 炭素源의 添加는 效果의이었으며 특히 sucrose, fructose는 protease 生産을 크게 增加시켰다.

Table 1 Effect of carbon sources on the protease production

Carbon sources	protease activity (tyrosine µg/ml)
glucose	74.25
fructose	89.71
galactose	74.48
lactose	71.28
maltose	61.44
sucrose	93.28
starch	66.25
mannitol	65.75
inositol	63.25
control	59.95

5. 窒素源 添加試驗

基本培地에 各種 無機窒素源을 各各 0.2%씩, 各種 有機窒素源을 各各 2%씩 添加하고 protease 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 2와 같이 無機窒素源中에서는 NH₄Cl와 KNO₃가 특히 效果的이었다. Ichishima⁽¹⁰⁾는 黑麴菌의 protease 生産에 對한 各種 窒素化合物의 添加影響에 關하여 調査하고 NH₄Cl의 添加는 *Asp. usamii*, *Asp.saitoi*, NaNO₃의 添加는 *Asp. usamii*, *Asp. saitoi*, *Asp. aureus*, *Asp. awamori*의 acid protease의 生産을 增加시켰다고 報告하였는데 本菌株에 있어서도 이들 結果와 거의 一致하고 있다. 方便 有機窒素源中에

Table 2. Effect of nitrogen sources on the protease production

nitrogen sources	protease activity (tyrosine µg/ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄	48.64
NH ₄ NO ₃	53.75
(NH ₄) ₂ M ₀ O ₄	59.95
KNO ₃	80.85
NH ₄ Cl	81.95
(NH ₄) ₂ HPO ₄	48.84
casein	58.20
albumin	58.33
peptone	36.04
yeast	66.65
defatted soybean meal	59.68
control	59.95

서는 yeast 添加時 若干 增加되었을 뿐 다른 窒素源은 別 效果를 認定할 수 없었다.

6. 磷酸鹽 및 마그네슘鹽 添加試驗

基本培地에 各種 鹽類를 0.2%씩 添加하고 protease 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 3과 같이 Na_2HPO_4 와 NaH_2PO_4 의 添加는 效果의이며 마그네슘 添加效果는 認定할 수 없었다.

Table 3. Effect of phosphate salt and magnesium salt on the protease production

kinds of salt	protease activity (tyrosine μ g/ml)
K_2HPO_4	58.58
KH_2PO_4	59.93
$NH_4H_2PO_4$	58.33
Na_2HPO_4	73.95
NaH_2PO_4	79.75
$MgSO_4$	59.84
$MgCO_3$	57.88
Control	59.95

粗酵素의 特性檢討

1. 酵素 作用에 미치는 pH의 影響

Mcllvaine buffer soln.을 使用하여 基質 溶液을 所定 pH로 調節한 後 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 4와 같 으며 Opt. pH는 2.4~2.6이었다.

一般的으로 protease의 Opt. pH는 菌株 및 培養條件 에 따라 다른데 *Asp. oryzae*의 acid protease⁽¹⁾는 pH 2.8~3.0이고 pH 7.0以上에서는 反應을 나타내지 않으며, *Asp. niger*, *Pen. expansum*, *Pen. spinulosum*, *R. javanicus*, *R. peka*, *R. chinensis*등⁽²⁾은 pH 3.0 附近에

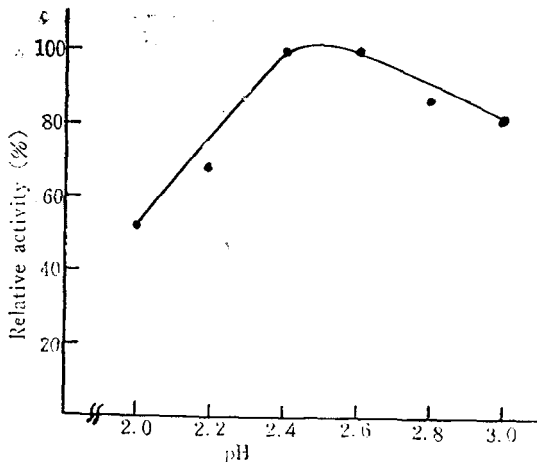


Fig. 4. Effect of pH on the protease activity

Opt. pH를 갖는 acid protease라고 報告하였는데 本菌株의 protease도 이들 protease와 마찬가지로 acid protease에 屬한다.

2. 酵素作用에 미치는 溫度의 影響

Casein soln.의 pH를 Mcllvaine buffer soln.을 使用하여 pH를 2.6으로 調節하고 20~70°C에서 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 5와 같이 作用最適溫度는 40°C 附近 이었다.

微生物 protease의 Opt. temp.에 關한 研究를 보면 *Myriococcum*屬 protease⁽⁸⁾는 55°C, *Monascus*屬 protease⁽¹¹⁾는 50°C, *Pen. purpurogenum* protease⁽¹²⁾는 55°C, *Pen. rubrum* protease⁽¹²⁾는 50°C, *L. casei* protease⁽¹⁵⁾는 50°C, *Asp. oryzae* protease⁽¹⁾ I, II는 50°C, III는 45°C, *R. chinensis* protease⁽¹³⁾는 60°C로 大部分의 微生物 protease가 50~55°C인데 比하여 本菌株의 protease는 opt. temp.가 相當히 낮음을 보여주고 있다.

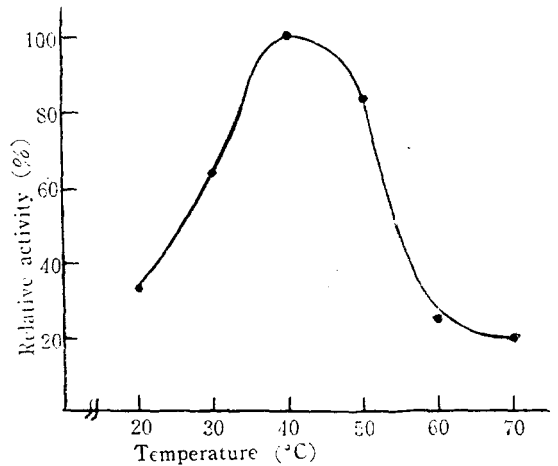


Fig. 5. Effect of temperature on the protease activity

3. 酵素의 pH 安定性

酵素液에 同量의 Mcllvaine buffer soln.을 加하여 所定 pH로 調節하고 5°C에서 24時間 維持한 後 Mcllvaine buffer soln.으로 pH 2.6으로 조절하고 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 6과 같이 安定 pH範圍는 2.5~5.0이었다. 本 酵素는 特히 酸性에서는 安定하나 中性 또는 alkali性에서는 極히 不安定함을 보여주고 있다.

微生物 protease의 安定 pH에 關한 研究를 보면 *Monascus*屬 protease⁽¹¹⁾는 5~12, *Myriococcum*屬 protease⁽⁸⁾는 6~11, *Asp. saitoi* protease^(14,15,16)는 2.5~6.0, *Pen. purpurogenum* protease⁽¹²⁾는 5.0, *M. pusillus* protease⁽¹⁷⁾는 7~8이라고 報告하였는데 本菌株의 prot-

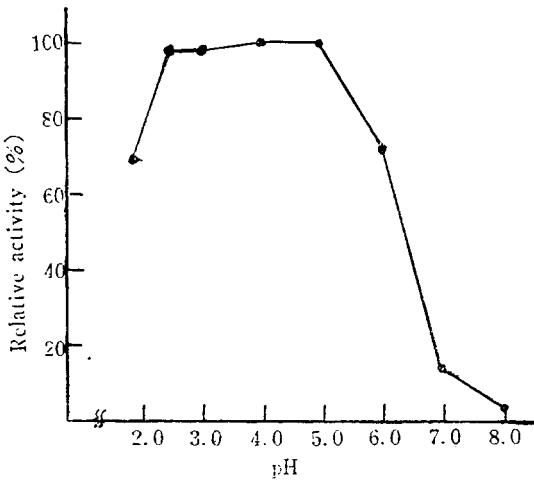


Fig. 6. Effect of pH on the protease stability

효소는 acid protease인 동시에 酸性에서 더욱 安定함을 보여주고 있다.

4. 효소의 熱安定性

효소액에 同量의 McIlvaine buffer soln. (pH 2.6)을 加하여 30~70°C에서 10分間 維持한 後 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 7과 같이 40°C以下에서는 安定하나 그 以上の 溫度에서는 急激하게 不安定하여 45°C의 경우 約 28%, 55°C의 경우 約 75%가 失活되었다. *Bac. subtilis* protease⁽¹⁸⁾는 60°C에서 47%, 70°C에서 90%가, *Asp. oryzae*의 acid protease 및 alkaline protease⁽¹⁹⁾는 60°C로 10分間 維持시킬때 完全히 失活되었고 *Pen purpurogenum* protease⁽¹²⁾는 pH 3.0에서 60°C, 10分處理로 60%, *Pen rubrum* protease⁽¹²⁾는 pH 3.0에서 60°C, 7分處理로 完全히 失活되었다고 한다. 이와 같이 菌株에 따라 熱安定性이 다른데 本菌株가 生産하는

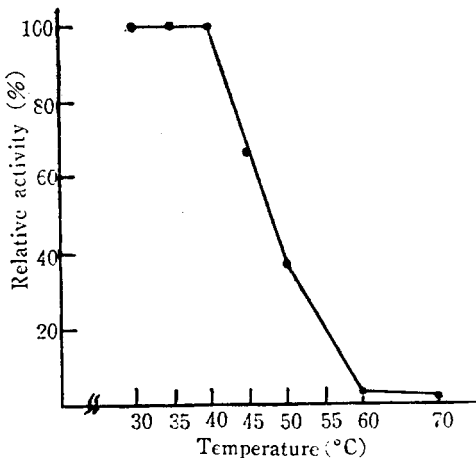


Fig. 7. Effect of temperature on the protease stability

protease는 耐熱性이 比較的 弱한 便에 屬한다.

要 約

Rhizopus japonicus S-62가 生産하는 acid protease에 關한 研究로서, 효소의 生産條件 및 粗酵素의 特性을 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 밀기울에 培養하는 경우 最適培養 時間은 48時間 添水量은 100~120%이었다.
2. 各種 培地中 밀기울 培地가 가장 優秀하였다.
3. 밀기울에 sucrose, fructose, NH₄Cl, NaH₂PO₄의 添加는 protease生産을 크게 增加시켰다.
4. 本酵素의 作用最適pH는 2.4~2.6, Opt. temp.는 約 40°C, 安定 pH 範圍는 2.5~5.0이고, 40°C以下에서는 安定하나 그 以上の 溫度에서는 急激하게 不活性化되었다.

參 考 文 獻

1. 蔭山公雄: 日醫工誌, 33, 53(1955)
2. 松島欽一: 日農化, 32, 215(1958)
3. 松島欽一: 日農化, 33, 116(1959)
4. Lenney, J.F: *J. Biol. Chem.*, 221, 919(1956)
5. Brandsaeter, E and Nelson, F.E.: *J. Bact.*, 72, 68(1956)
6. Alford, J.A. and Frazier, W.C.: *J. Dairy sci.*, 31, 55(1948)
7. Hakiyara, B., Matsubura, H., Nakai, H. and Okunuki, K.: *J. Biochem. (Tokyo)* 45, 185(1958)
8. 鄭東孝, 李啓瑚: 韓農化, 13, 223(1970)
9. 村尾, 鎌田, 中瀬, 小倉, 小田: 日農化, 46, 167 (1972)
10. Ichishima, E. and Yoshida, F.: *Agr. Biol. chem. Japan*, 26, 547(1962)
11. 金相達, 徐正墳: 韓農化, 15, 27(1972)
12. 吉村, 岩田, 團野: 日農化, 38, 128(1964)
13. Fukumoto, J., Tsuru, D. and Yamamoto, T.: *Agr. Biol. Chem.*, 31, 710(1967)
14. 吉田文彦: 日農化, 29, 175(1955)
15. Yoshida, F.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 20, 252(1956)
16. Yoshida, F. and Nagasawa, M.: *ibid.*, 20, 257 (1956)
17. 有馬啓, 岩崎慎二郎: 日農化大會要旨 p.57(1962),
18. 福本壽一郎: 科學と工業, 23, 91(1949)
19. 布川, 難波, 衣山: 日農化, 136, 879(1962)