

# Penicillium屬이 生産하는 alkaline protease 에 關하여

金 景 舜

효성여자대학 약학과

## Studies on the protease produced by *Penicillium* species

Kyung-Soon Kim

The Graduate School, Hyosung Women's College

### Abstract

The alkaline protease was isolated from the culture of *Penicillium* species(P-46) grown in the wheat bran media. The crude purification of this enzyme was carried out by extraction with distilled water and precipitated with 0.7-saturated ammonium sulfate, then dialysis for 3 days.

The activity of this enzyme was determined by Folin's colorimetric method. The results were as follows;

1. The optimum pH and temperature of this enzyme were pH 8.4 and 45°C.
2. This enzyme was stable at pH 7.0~9.0.
3. This enzyme was not inactivated by treatment in lower temperature than 30°C.
4. The activity of this enzyme was strongly inhibited by Hg<sup>++</sup> and Cu<sup>++</sup>, but slightly by Ag<sup>+</sup>.
5. This enzyme was not inhibited by cystein, thiourea, ε-aminocaproic acid, 2, 4-DNP, EDTA, but strongly inhibited by PCMB.

### 緒 論

動植物, 微生物 起原의 protease 에 관한 報文은 지금까지 상당한 數에 달하고 있으며, 요즘은 醫藥品이나 食品工業으로까지 응용되고 있다. 이들 研究結

果를 그 작용 pH 에 대해서 분류하면, 酸性, 中性, 알칼리性 protease 로 분류되며, 이 각 group 은 相異한 pH 範圍에서 작용을 나타냄을 특징으로 한다.

또 Hartley<sup>1)</sup>는 그 構造와 機能點에 따라 serine protease, thiol protease, metal protease, acid protease 로 분류했다. 이 중 alkaline protease 에

관한 研究는 Takeshi Ouchi<sup>2)</sup>의 *Streptomyces griseus*의 alkaline protease에 관한 研究로써 casein을 基質로 했을 때, 最適 pH가 10.0이고, 重金屬 Cu<sup>++</sup>에 의해서는 保護되나, Hg<sup>++</sup>에 의해서는 현저하게 失活되며, EDTA에는 영향을 받지 않으며, 또한 gelatin을 分解하는 힘이 강하다는 것이 알려졌다.

또, 이 酵素에 대한 分離 精製 및 여러 가지 酵素學的 性質 등의 研究結果로써 酵素 抽出濾液을 磷酸 鈣를, gel 處理로 澄清化한 후, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 鹽析, sephadex, 電氣泳動, acetone 沈澱 등의 操作을 거쳐 結晶化시켰다. Simon van Heyningen<sup>3)</sup>의 *Acremonium kiliense*의 alkaline protease는 casein을 基質로 했을 때, 最適 pH가 10.5이며, EDTA에는 阻害되지 않으나 diisopropylfluorophosphate(DFP)에는 阻害되는 serine protease였으며, A. R. Subramanian<sup>4)</sup> 등의 *Aspergillus oryzae*의 alkaline protease는 最適 pH가 7.0~9.0이며, 重金屬인 Cu<sup>++</sup>, Cd<sup>++</sup>에 의해 阻害된다고 하였으며, trypsin보다 3배 이상의 gelatin 液化力을 가지고 있음이 또 알려졌다.

그 외에도 K. Hayashi<sup>5)</sup>가 *A. sojae*에서, J. Furkova<sup>6)</sup> 등이 *A. flavus*에서 얻었으며, 또 K. Morihara<sup>7)</sup> 등이 *Pseudomonas aeruginosa*에서, S. E. Hampson<sup>8)</sup> 등이 *Pseudomonas mirabilis*에서 얻은 alkaline protease는 最適 pH가 9.0附近이며, 둘다 EDTA에는 영향을 받지 않는다고 하였다. Fukumoto<sup>9)</sup> 등의 *Bacillus subtilis*가 生成하는 subtilisin은 그 最適 pH가 9.0~10.0이며, EDTA에는 영향을 받지 않고 DFP에는 阻害를 받는 serine protease라고 發表하고 있다. 이 subtilisin은 細菌 protease 중 最初(1952)로 結晶化<sup>10)</sup>되어 1次構造<sup>11)</sup> 및 立體構造<sup>12)</sup>가 밝혀졌으며, 그 觸媒作用도 chymotrypsin과 같은 樣相이라고 推定하고 있다.

이처럼 結晶화된 精製酵素를 分子狀態로써, 1次構造, 立體構造, 基質特異性 등을 활발히 糾明해 나가고 있는 요즘, 本人도 *Penicillium*屬 菌株에서 alkaline protease를 分離하여 基本性質을 調査 實驗해 본 결과 弱알칼리性에서 最適 pH를 갖는 -SH 酵素란 결과를 얻었기에 報告하는 바이다.

## 實驗材料 및 方法

### 1. 供試菌株

本 實驗에 사용한 菌株는 土壤 및 食品에서 分離한 150種의 菌株 중 *Penicillium*屬菌 一種을 選別, 實驗하였다.

### 2. 菌株의 選別

#### 1) 菌의 培養

市販用 wheat bran 100 g 당 5%의 sucrose soln. 80 ml를 가하여 15 lbs에서 30분간 高壓 殺菌後 酵素生成用 培地로 사용했으며, 上記 供試菌株를 接種하여 30°C에서 5日間 培養하였다.

#### 2) 酵素液의 調製

上記 方法으로 培養된 각 菌의 培養物에 약 2倍量의 蒸溜水를 가하여 5°C에서 12시간 抽出한 후 濾過, 遠心分離하여 그 上澄液을 酵素液으로 사용하였다.

#### 3) 菌株의 選別

alkaline protease 強力 分泌菌株를 選別하기 위하여, 上記 方法으로 抽出한 酵素液을 Fuld Gross 變法으로 測定하여, 그 活性度를 표시하였다.

즉 0.6% casein(Hammarsten milk casein) 2.0 ml에 酵素液 0.5 ml를 가하여 37°C에서 20분간 作用시킨 후, 反應停止 및 除蛋白質인 0.44 M-trichloroacetic acid(TCA) 2.0 ml를 가하였을 때, 肉眼的으로 反應液 중에 沈澱이 生成되지 않거나, 극히 微量 生成된 菌株를 選別하였다. 단, 이때 casein을 pH 8.0의 Kolthoff buffer soln.으로 溶解함으로써 反應液의 pH를 調整하였다.

이상과 같은 方法으로 각 菌株의 活性度를 測定한 결과, alkaline protease 強力 分泌菌株인 P-46을 最終 選別하였다.

### 3. 酵素의 活性度 測定方法

Folin's colorimetric method<sup>13)</sup>에 의하였으며, 酵素 活性度를 對照區와의 差로써 算出하여 그 力價를 나타내었다. 즉, 0.6% casein 2.0 ml에 酵素液 0.5 ml씩을 가하여 37°C에서 20분간 反應시킨 후, 0.44 M-TCA 溶液 2.0 ml를 가한다. 다시 37°C에서 30분간 放置하여 殘存 蛋白質을 沈澱시킨 후, 濾過한다. 이 濾液 1 ml에 0.55 M-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 ml 및 3배로 稀釋한 Folin 試藥 1 ml를 가하여 37°C에서 30분간 呈色시킨 후, 660nm(Erma electric photometer, type No. 6)에서 그 吸光度를 測定하여 對照區와의 差로써 酵素 活性度를 나타내었다.

### 4. 酵素의 粗精製

選別한 菌株 P-46 의 酵素液을 上記(2-2)法으로 調製하여  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  를 0.3 飽和되게 加한 다음,  $5^\circ\text{C}$  에서 24 시간 放置, 沈澱시킨 후 遠心分離하여 沈澱物을 얻고, 그 上澄液에 同一方法으로  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  를 각각 0.7 飽和, 完全飽和시켜, 生成된 沈澱物

을 각각 區分하여 回收하였다. 이처럼 分別沈澱에 의하여 얻은 각 沈澱物을 蒸溜水로써 完全히 溶解시켜  $5^\circ\text{C}$  에서 3 일간 透析한 것을 一定濃度로 稀釋하여, 酵素液으로 사용했다. 이와 같은 粗精製의 過程을 圖示하면 다음 Fig. 1 과 같다.

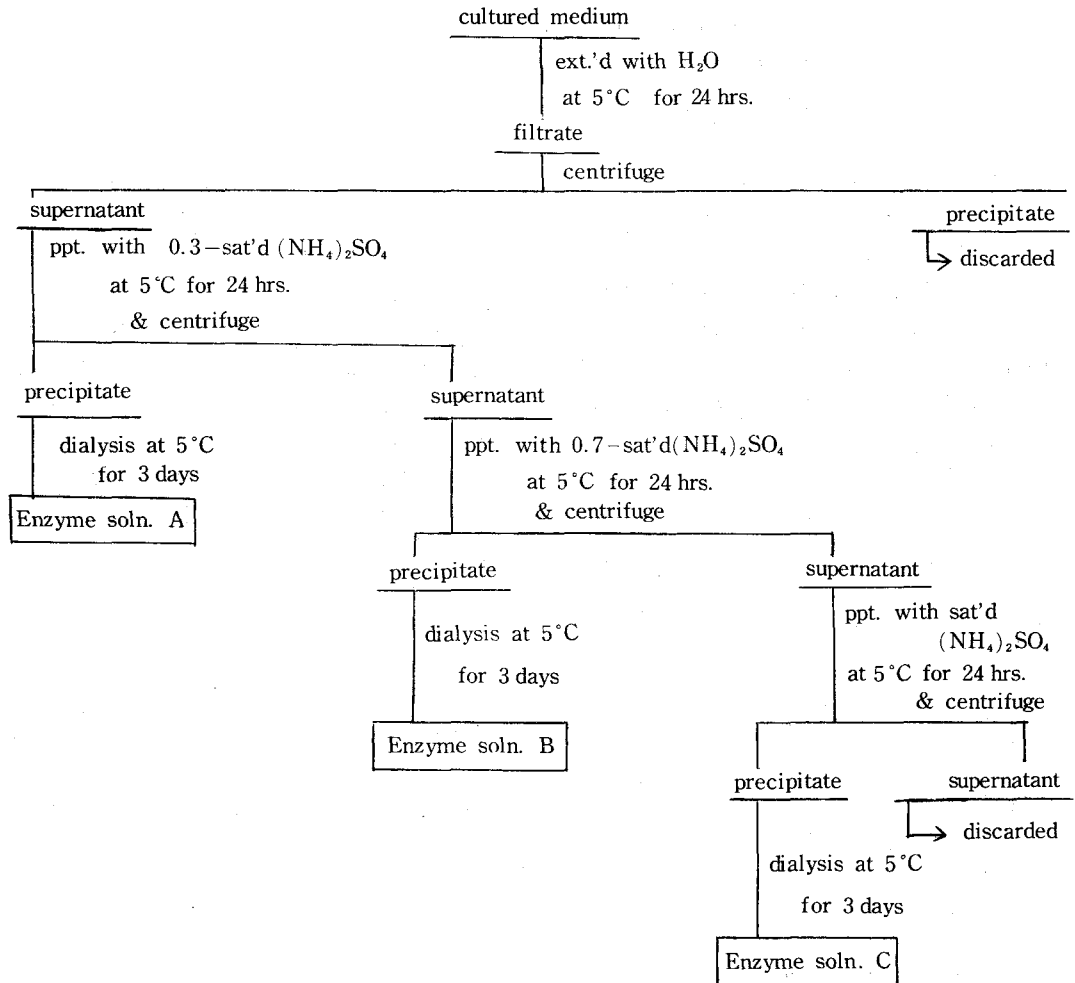


Fig. 1. The preparation of enzyme solution

이상의 방법으로 粗精製한 酵素液을 각각 上法(3)에 의해 그 活性度를 測定한 결과는 다음과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 本 酵素는  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.7 飽和에서 얻은 沈澱이 가장 강한 力價를 나타내었으므로 以下 實驗에서는 이 部分만을 酵素液으로 調製하여  $5^\circ\text{C}$  에서 방치하면서, 5배 稀釋하여 사용하였다.

Table 1. Relative activity of ammonium sulfate fractionated enzymes

enzyme	saturation	activity(O.D)
A	0.0~0.3	0.3623
B	0.3~0.7	1.0543
C	0.7~1.0	0.4721

實驗結果

1. 最適 活性 pH

本 酵素의 最適 活性 pH를 調査하기 위해 pH 3.0 ~6.0 은 McIlvaine buffer soln. (0.1 M-citric acid +0.2 M-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)을, pH 6.6~11.0 은 Kolthoff buffer soln. (0.55 M-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+0.55 M-Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O)을 사용하여 각 pH 에서 酵素의 活性를 調査 하였으며, 그 反應液의 組成은 다음과 같다.

즉 0.6% casein soln. 2.0ml와 buffer soln. 0.5 ml의 混合液에 enzyme soln. 0.5ml를 가하여 37°C에서 20분간 作用시킨 후, 0.44 M-TCA 溶液 5.0 ml을 가하여 37°C에서 30분간 放置한 다음 濾過한다. 그 濾液 1ml를 취하여 Folin's colorimetric method로써 그 活性度를 測定하였다. 이 때 對照區로써는 酵素液 대신 蒸溜水 0.5ml을 添加하여 동일한 條件下에서 作用, 測定하였으며, 그 結果는 다음 Fig. 2와 같다.

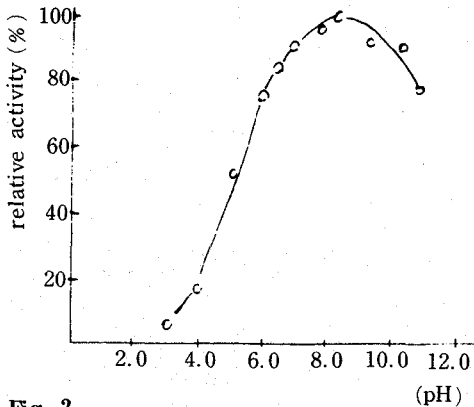


Fig. 2. The optimal pH of the enzyme reaction

위의 Fig. 2에서 보는 바와 같이 本 酵素의 最適 pH는 8.4 附近임을 알았다.

2. 最適 活性 溫度

本 酵素의 最適 活性 溫度를 조사하기 위해 溫度 26~70°C 사이에서 調査해 본 결과, Fig. 3과 같이 最適溫度가 45°C 附近에서 가장 높은 活性를 나타내었다.

3. pH 安定性

本 酵素의 pH에 대한 安定性을 調査하기 위하여, pH 3.0~6.0은 McIlvaine buffer soln.을, pH 7.0

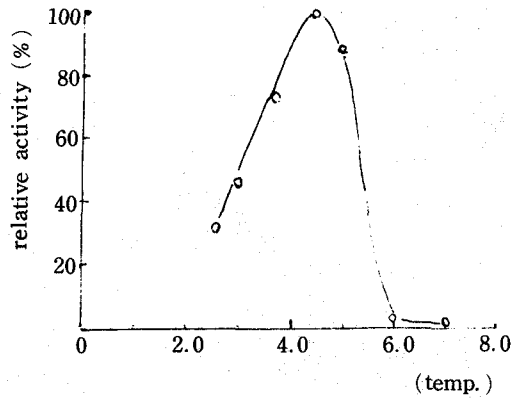


Fig. 3. The optimal temperature of the enzyme reaction

~11.0은 Kolthoff buffer soln.을 사용하여, 本 酵素의 pH를 調節하여 37°C에서 1시간, 3시간 前處理시킨 후, N-NaOH, N-HCl로써 本 酵素作用의 最適 pH(8.4)로 調節한 후, 그 殘存力價를 測定한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 本 酵素는 pH 7.0~9.0 사이에서 그 活性가 상당히 安定하였으며 pH가 5以下로 下降하거나, 9.0以上으로 上昇함에 따라 酵素 活性가 급격히 減少하였다.

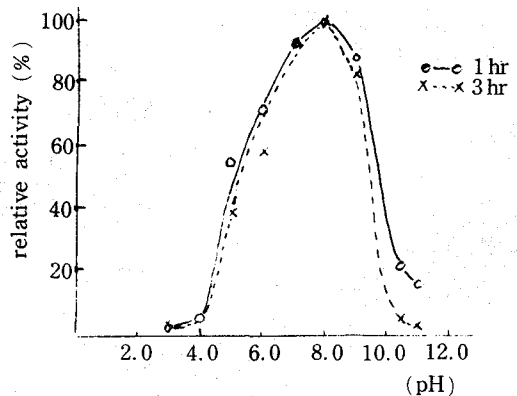


Fig. 4. The pH stability of the enzyme

4. 熱安定性

本 酵素의 熱에 대한 安定性을 調査하기 위하여, 本 酵素를 pH 8.4로 調節하여, 30°C, 40°C, 50°C에서 각 100분간 經時的으로 前處理시킨 후, 그 殘存力價를 測定하였으며, 다음 Fig. 5에서 보는 바와 같이 30°C에서는 별 영향을 미치지 않으나 40°C에서

는 100분간 處理함으로써 약 60%의 失活이 일어났고, 50°C에서는 단지 20분간 處理함으로써 약 98% 이상이 失活한다는 것을 알았다.

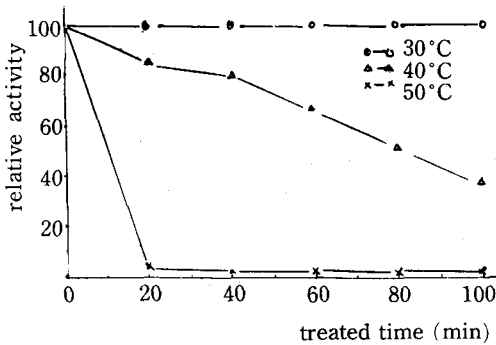


Fig. 5. The heat stability of the enzyme

5. 金屬 ion의 影響

本 酵素作用에 金屬 ion이 어떠한 영향을 미치는지의 그 與否를 調査하기 위하여 HgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, PbAc<sub>2</sub>, CoAc<sub>2</sub>, CdSO<sub>4</sub>, Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 등 14種의 金屬鹽類를 대상으로 最終濃도가 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-4</sup>M, 10<sup>-3</sup>M 되게 각각 調製하여, 同量의 酵素液에 가하여, 37°C에서 30분간 前處理시킨 후 殘存力價를 測定하였다.

이 때의 反應液의 組成은 다음과 같다.

- reaction mixture,
- 0.6% casein soln. (pH 8.4)      2.0ml
- enzyme soln.                              0.5ml
- metal ion soln.                            0.5ml
- final pH of reaction mixture,      8.4
- reaction condition, for 20 min. at 37°C

위와 같이 作用시킨 후, 上法에 따라 測定하여 그 活性度를 對照區와의 差로써 나타내었으며, 10<sup>-3</sup>M 濃度에서의 結果만을 Table 2에 例示하면 다음과 같다.

다음 Table 2에서 보는 바와 같이 Mg<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup>, Al<sup>+++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Pb<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>, Cd<sup>++</sup>, Li<sup>+</sup>은 별 영향을 미치지 않으나, Hg<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>는 强하게, Ag<sup>+</sup>는 弱하게 阻害作用을 나타내었다.

6. Hg<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>의 濃度에 따른 影響

本 酵素에 대하여 비교적 强하게 阻害作用을 나타내는 Hg<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>에 대하여 濃度別로 그 影響을 알

Table 2. Effect of metal ion on the enzyme reaction

metal salts (final conc. 10 <sup>-3</sup> M)	relative activity (%)
None	100
HgCl <sub>2</sub>	7
MgSO <sub>4</sub>	93
CuSO <sub>4</sub>	44
FeSO <sub>4</sub>	100
CaCl <sub>2</sub>	105
BaCl <sub>2</sub>	107
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	110
MnCl <sub>2</sub>	106
AgNO <sub>3</sub>	74
ZnSO <sub>4</sub>	107
PbAc <sub>2</sub>	107
CoAc <sub>2</sub>	95
CdSO <sub>4</sub>	96
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100

아 본 結果는 다음과 같다.

Fig. 6에서 보는 바와 같이 Hg<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>는 10<sup>-6</sup>M 이하의 濃度에서는 별 影響을 미치지 않으나, 10<sup>-5</sup>M 濃度부터 失活을 나타내기 시작하여 10<sup>-3</sup>M에서 Hg<sup>++</sup>는 약 90% 阻害作用을 나타내었고, Cu<sup>++</sup>는 약 60%의 阻害作用을 나타내었다.

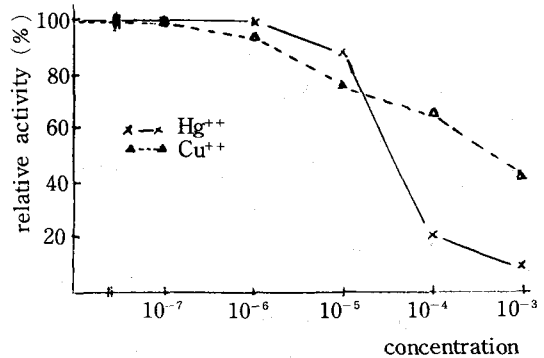


Fig. 6. Effect of mercury and copper ions on the enzyme reaction

7. 阻害劑의 影響

本 酵素가 아래와 같은 阻害劑에 의해 影響을 받는지의 與否를 알아보기 위하여 각 阻害劑를 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-4</sup>M, 10<sup>-3</sup>M 되도록 調製해서 金屬 ion의 影響을

불 때와 같은 條件으로써 調査하여  $10^{-3}$  M에서의 結果만을 Table 3에 表示하면 다음과 같다.

**Table 3. Effect of inhibitors on the enzyme reaction**

inhibitors (final conc. $10^{-3}$ M)	relative activity (%)
none	100
cystein	114
2, 4-DNP <sup>1)</sup>	93
$\epsilon$ -amino caproic acid	111
thiourea	102
EDTA <sup>2)</sup>	100
PCMB <sup>3)</sup>	18

- 1) 2, 4-dinitrophenol
- 2) ethylenediaminetetra acetic acid
- 3) *p*-chloromercuric benzoate

Table 3에서 보는 바와 같이 本 酵素는 cystein, 2, 4-DNP,  $\epsilon$ -amino caproic acid, thiourea, EDTA에는 별 영향을 받지 않았으나, PCMB에 대해서는 强하게 沮害作用을 받았으므로 本 酵素는 -SH 酵素임을 알았다.

### 考 察

本 實驗에서 사용한 *Penicillium*屬 菌株가 生産하는 alkaline protease의 最適 pH는 8.4附近으로써 弱알칼리性이며, 前述(2-9)한 他 酵素에 비해서 最適 pH가 낮으며, 그 作用範圍도 좁다. 또 이 酵素의 最適溫度는 45°C附近이며, 本 酵素의 pH安定範圍는 7.0~9.0으로써, *Aspergillus oryzae*의 pH 3.0~7.0, *Bacillus subtilis*의 pH 5.0~10.0에 비해서 좁은 範圍이다. 熱安定性에 있어서는 40°C에서 100분간 處理로 60% 失活이 있었으나, 50°C에서는 단지 20분간 處理로써 약 98%의 失活이 일어났으므로 本 酵素는 열에 不安定함을 알 수 있다.

이와 같이 열安定性이 낮은 것은 mold類에서 由來하는 protease에서는 보기 힘들고, *Streptomyces*屬에서 일반적으로 볼 수 있는 現象<sup>14)</sup>이다. 또 本 酵素에 미치는 金屬 ion의 영향을 보면,  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ,  $Pb^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Al^{+++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Li^+$ ,  $Fe^{++}$  등 2價 ion은 아무런 영향을 미치지 않

았으나, 重金屬인  $Hg^{++}$ ,  $Cu^{++}$ 는 크게,  $Ag^+$ 는 弱한 沮害作用을 나타내었으며, chelating activity가 큰 EDTA에는 영향을 받지 않는 점으로 보아 本 酵素는 matallic enzyme이 아니라는 것을 알 수 있으며, 이것은 前術한 他 alkaline protease에서도 共通的으로 볼 수 있는 現象이다.

또 EDTA를 제외한 一般酵素 沮害劑인 cystein, thiourea, 2, 4-DNP,  $\epsilon$ -aminocaproic acid, PCMB를 써서 本 酵素에 미치는 影響을 알아보면, 다른 것은 별 影響을 미치지 않았으나, 酵素 分子 내 -SH와 强하게 結合하는 PCMB에 의해 强하게 沮害되었으므로, 本 酵素는 -SH 酵素임을 알았으며, 앞으로도 本 酵素를 精製한 段階에서 一次構造, 立體構造, 基質特異性 등을 糾明해 나감을 과제로 남겨두는 바이다.

### 結 論

*Penicillium*屬 菌株로부터 alkaline protease를 强력히 生産하는 菌株 I-46을 分離하여 wheat bran 培地에 의한 培養物을 抽出한 溶液에 0.7-sat'd ( $NH_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로써 鹽析 및 3일간의 dialysis를 하여 얻은 粗精製 酵素의 基本的 性질을 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 最適 pH는 8.4附近이다.
2. 最適溫度는 45°C附近이다.
3. pH安定範圍는 7.0~9.0에 位置하였다.
4. 熱安定性은 30°C에서는 별 影響을 미치지 않았고, 40°C에서는 100分間 處理로 약 60%의 失活이 일어났으며, 50°C에서는 20分間 處理로 약 98%의 失活이 있었다.
5. 金屬鹽類의 影響에 있어서  $Hg^{++}$ ,  $Cu^{++}$ 는 强한 沮害作用을 일으켰고,  $Ag^+$ 는 약한 沮害作用을 나타내었다.
6.  $Cu^{++}$ ,  $Hg^{++}$ 를 濃度別에 따른 그 沮害作用을 調査해 보면,  $10^{-6}$  M 이하의 濃度에서는 별 影響이 없었으나,  $10^{-3}$  M에서  $Hg^{++}$ 는 약 90%,  $Cu^{++}$ 는 약 60%의 失活을 나타내었다.
7. metabolic inhibitor인 cystein, thiourea,  $\epsilon$ -amino caproic acid, 2, 4-DNP, EDTA에 대해서도 영향을 받지 않았으나 PCMB에 대해서는 强하게 沮害作用을 나타내었다.

参考文献

- 1) B. S. Hartley : *Ann. Rev. Biochem.*, 29, 45 (1960)
- 2) Takesi Ouchi : *Agr. Biol. Chem.*, 26, 11, 734~739 (1962)
- 3) Simon Van Heyningen : *Eur. J Biochem.*, 38, 432 (1972)
- 4) A. R. Subramanian et al : *J. Biochem.*, 3, 1861 (1964)
- 5) K. Hayashi, D. Fukushima; K. Mogi : *Agr. Biol. Chem.*, 31, 642 (1967)
- 6) J. Furkova, O. Mikes, K. Gan cev, M. Boublík : *Biochem, Biophys. Acta.*, 178, 100 (1969)
- 7) K. Morihara, H. Tsuzuki : *Biochem. Biophys. Acta.*, 92, 351 (1964)
- 8) S. E. Hampson, G. L. Mills, T. Spencer : *Biochem. Biophys. Acta.*, 73, 476 (1963)
- 9) J. Fukumoto et al : *J. Agr. Chem. Soc.*, 33, 6~13 (1959)
- 10) A. V. Güntelberg, M. Ottesen : *Nature*, 170, 802 (1952)
- 11) E. L. Smith, F. S. Markland, C. B. Kasper, R. J. Delange, M. Landon, W. H. Evans : *J. Biol. Chem.*, 241, 5974 (1966)
- 12) C. S. Wright, R. A. Aldon, J. Kraut : *Nature*, 221, 235 (1969)
- 13) 赤堀四郎 外 : 酵素研究法, 朝倉書店, 164, 165, 477 (1955)
- 14) 吉田丈彦 : protease 利用講習 Text, 日本應用酵素協會, 97 (1964)