

## 絲狀菌의 蛋白質分解酵素에 關한 研究

(第 1 報) *Rhizopus japonicus* S-62 에 依한 酸性 protease 의  
生産 및 耐熱性試驗

鄭 萬 在

忠北大學 農化學科

(1977년 9월 25일 수리)

## Studies on the Proteolytic Enzyme of Mold

(Part I) Production and Heat Resistance of Acid Protease by  
*Rhizopus japonicus* S-62

Man-Jae Chung

Department of Agricultural Chemistry, Chung Buk National University

(Received Sept. 25, 1977)

### Abstract

These experiments were conducted to investigate the condition of the production and the heat resistance of the acid protease by *Rhizopus japonicus* S-62. The results obtained were as follows :

- 1) The optimum concentrations of sucrose, yeast, ammonium chloride and sodium phosphate monobasic added to the wheat bran medium in the acid protease production were 0.5%, 2.0%, 0.4%, and 0.4%, respectively.
- 2)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  were the most effective as the heat resistant agents.
- 3) When the enzyme solutions added with  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  to the concentration of 2% were heated for 10 min, at 50°C, their residual activities were 100%, respectively.
- 4) The heat resistant effects of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  were not observed almost above 55°C.

### 緒 論

微生物 protease 는 製糖工業, 酒類의 混濁防止, gluten 의 分解, 醬油의 速釀, 食肉의 軟化, cheese 의 熟成 및 皮革加工等에 利用되며 protease 의 生産量은 培養條件 및 培地組成에 따라 크게 影響을 받는다. 따라서 protease 의 生産에는 培地組成 및 培養條件에 關한 廣範圍한 研究가 要求된다.

微生物의 酸性 protease 에 關한 研究로는 *Asp. niger*<sup>(1)</sup>, *Asp. awamori*<sup>(1,2)</sup>, *Asp. saitoi*<sup>(1,3)</sup>, *Asp.*

*usamii*<sup>(1)</sup>, *Asp. inuii*<sup>(1)</sup>, *Asp. aureus*<sup>(1)</sup>, *Asp. nakazawai*<sup>(1)</sup>, *Pen. expansum*<sup>(4,5)</sup>, *Pen. spinulosum*<sup>(4,5)</sup>, *Pen. luteum*<sup>(4,6)</sup>, *Pen. chrysogenum*<sup>(4,6)</sup>, *Pen. purpurogenum*<sup>(7)</sup>, *Pen. rubrum*<sup>(7)</sup>, *Pen. thomii*<sup>(8)</sup>, *Pen. oxalicum*<sup>(8)</sup>, *Rhiz. chinensis*<sup>(9)</sup>, *Rhiz. tritici*<sup>(4,5)</sup>, *Rhiz. chiuniang*<sup>(4,5)</sup>, *Rhiz. peka*<sup>(10)</sup>, *Rhiz. japonicus* S-62<sup>(11)</sup>, *Mon. sitophila*<sup>(4)</sup>, *Alt. tenuis*<sup>(4)</sup>, *Fus. lini*<sup>(4)</sup>, *Glio. roseum*<sup>(4)</sup>, *Muc. hiemalis*<sup>(4)</sup>, *Muc. racemosus*<sup>(4)</sup>, *Sacch. cerevisiae*<sup>(12)</sup>, *Strep. lactis*<sup>(13)</sup>, *Lact. casei*<sup>(13)</sup>, *Micro. freudenreichii*<sup>(14)</sup> 등의 acid protease 를 들 수 있다.

筆者<sup>(11)</sup>는 *Rhiz. japonicus* S-62에 의한 acid protease의 生産에 미치는 培養條件과 粗酵素의 特性을 檢討하여 報告한바 있다. 特히 wheat bran media에 sucrose, yeast,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 의 添加가 protease의 生産을 크게 增加시켰으므로 이들의 添加量을 달리하였을 때의 protease의 生産量을 檢討하였으며 아울러 本 酵素는 耐熱성이 極히 弱하므로 耐熱성에 미치는 無機鹽類의 影響을 調査하고 몇 가지 結果를 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

## 實驗材料 및 方法

### 1. 供試菌株

*Rhizopus japonicus* S-62

### 2. 基本培地

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

### 3. 培養方法

麥芽汁寒天培地에서 3日間 培養한 供試菌을 1白金耳씩 基本培地 및 基本培地에 各種 成分을 一定量씩 添加한 培地에 接種하여 30°C에서 48時間 培養하였다.

### 4. 酵素液의 調製

培養物에 100ml의 蒸溜水를 加하여 Waring blender로 2分間 攪拌하고 1時間 放置한 後 遠心 分離하여 (10,000 rpm/min) protease activity를 測定하였다.

### 5. Protease activity의 測定

Anson-萩原變法<sup>(15)</sup>으로 測定하였다.

#### 1) 試藥

- ① Casein 용액: Hammarsten milk casein을 0.6%가 되게 McIlvaine buffer soln (pH2.6)에 용해
- ② 0.44 M TCA 용액
- ③ 0.55 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액
- ④ Folin 시약

2) 測定方法: 0.6% casein 용액 5ml에 enzyme 용액 1ml를 加하고 37°C에서 正確하게 10分間 反應시킨 後 0.44 M TCA 용액 5ml를 加하여 反應을 中止시키고 37°C에서 20分間 放置한 後 濾過하고 濾液 1ml를 試驗管에 取하고 0.55 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 5ml와 Folin 試藥(3倍 희석액) 1ml를 넣어 37°C에서 20分間 發色시킨 後 660 m $\mu$ 의 波長

으로 吸光度를 測定하였다. blank는 효소액 1ml에 0.44 M TCA 용액 5ml를 加하여 酵素蛋白을 沈殿시킨 後 0.6% casein 용액 5ml를 加한 것에 대하여 같은 方法으로 吸光度를 測定하고 酵素力價는 relative activity로 表示하였다.

## 6. 耐熱性 試驗

1) 酵素液의 熱處理: 試驗管에 粗精製酵素液 1ml와 一定量의 耐熱劑 및 蒸溜水를 加하여 全量이 2ml가 되도록 한 다음 一定 溫度의 水浴中에서 一定시간 加熱處理를 하였으며 이때 완충용액은 사용하지 않았다.

2) 酵素力殘存率: 加熱處理하지 않고 測定한 酵素活性을 100으로 하고 加熱處理 後의 殘存 酵素力을 %로 表示하였다.

## 實驗結果 및 考察

### 1. 酵素生産에 미치는 各種 成分의 添加 影響

基本培地에 各種 炭素源을 1%씩, 各種 窒素源을 0.2%씩, 各種 有機窒素源을 2%씩, 各種 磷酸鹽 및 마그네슘鹽을 0.2%씩 添加하고 protease 生産에 미치는 影響을 검토한 結果 炭素源中에서는 sucrose가, 無機窒素源中에서는  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 이, 有機窒素源中에서는 yeast가, 磷酸鹽 및 마그네슘鹽中에서는  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 가 各各 效果의이 있었으므로<sup>(11)</sup> 이들 成分의 添加量을 달리하여 培養하고 protease activity를 測定하였다.

#### 1) Sucrose 添加試驗

基本培地에 sucrose를 0.5~2.5% 添加하고 48時間 培養한 結果는 Fig. 1과 같이 0.5% 添加時에 가장 效果의이었다.

Ichishima 등<sup>(16)</sup>은 *Asp. saitoi* R 3813 Mut. UV-13의 protease 生産에 있어 wheat bran에 sucrose, glucose, soluble starch의 添加는 別效果가 없었으나 lactose를 1% 添加할 때 약간의 效果를 보았으며 Hou<sup>(17)</sup>는 *Rhiz. oryzae*의 protease 生産에 glucose와 soluble starch의 添加는 效果의이었다고 하였다. 이와같이 菌株에 따라 糖의 種類가 差를 알 수 있다.

#### 2) 酵母 添加試驗

基本培地에 효모를 1.0~3.0% 添加하고 培養한 結果는 Fig. 2와 같이 2% 添加時에 最高의 protease 生産을 나타내었다.

*Asp. saitoi*<sup>(16)</sup>의 protease 生産에 polypeptone과 defatted soybean을 各各 5%, 1% 添加할 때,

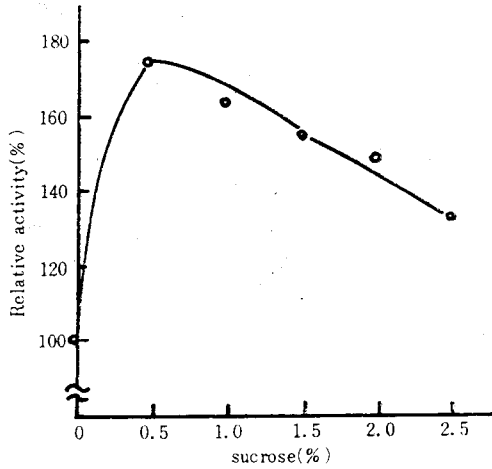


Fig. 1. Effect of Concentration of Sucrose on the Protease Production.

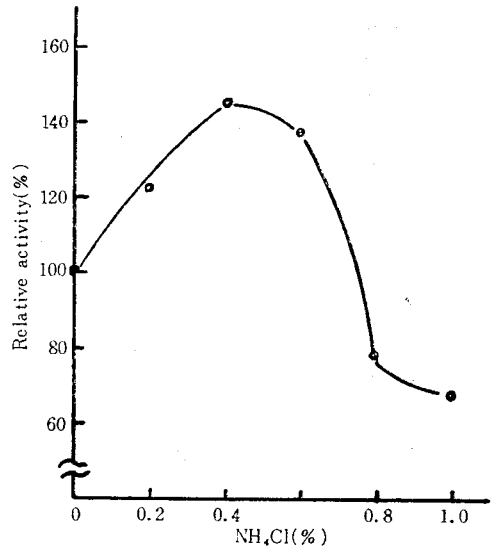


Fig. 3. Effect of Concentration of NH<sub>4</sub>Cl on the Protease Production.

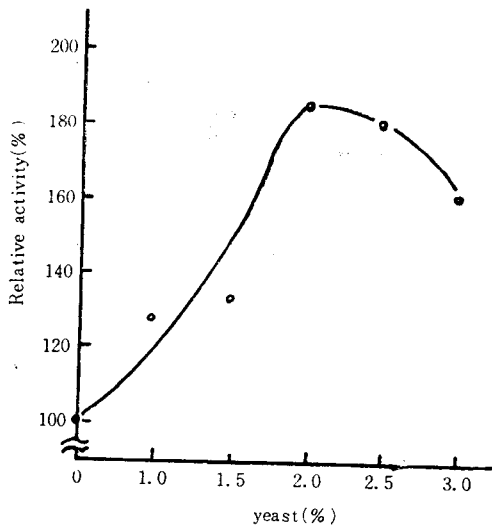


Fig. 2. Effect of Concentration of Yeast on the Protease Production.

*Rhiz. oryzae*<sup>(17)</sup>에 있어서는 casein 1% 添加時에 効果의이 었다고하는 報告가 있을 뿐, 효모 添加에 관한 研究는 거의 찾아볼 수 없다. 효모 添加時에 의 protease 生産이 현저하게 增加되는 것은 효모가 各種 成分을 含有하고 있어 微生物에 依한 protease 生産을 促進시키기 때문이 아닌가 생각된다.

### 3) Ammonium chloride의 添加試驗

Fig. 3에서 보는바와 같이 基本培地에 NH<sub>4</sub>Cl

0.4% 添加時에 最高의 protease 生産을 나타 내었다.

Ichishima<sup>(1)</sup>는 Balck *Aspergilli* 菌에 依한 acid protease 의 生産條件을 系統的으로 檢討하고 *Asp. saitoi* 와 *Asp. usamii* 의 acid protease 生産에 있어서 NH<sub>4</sub>Cl 의 添加는 特히 効果的이라고 報告하였는데 本 菌株에 있어서도 大體로 이들 結果와 一致하고 있다.

### 4) Sodium phosphate monobasic의 添加試驗

基本培地에 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 0.1~0.5% 添加하였을 때 Fig. 4에서 보는 바와 같이 0.4% 添加時에 protease

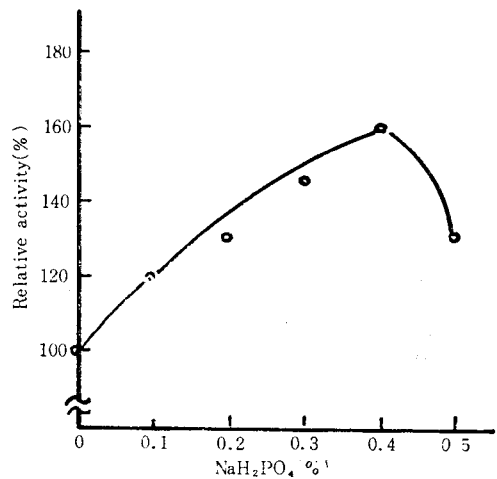


Fig. 4. Effect of Concentration of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> on the Protease Production.

生産이 가장 좋았다. *Asp. saitoi*<sup>(16)</sup>의 protease 生産에 0.5%의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  添加는 약간의 protease 生産을 增加시켰는데 比하여 本 菌株에 있어서는 0.4% 添加時에 protease 生産을 현저하게 增加시켰다.

## 2. 耐熱性 試驗

粗酵素液에  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  를 0.5 飽和度가 되게하여 5°C에서 12時間 沈殿시킨 후 遠心分離하여 沈殿을 回收하고 이에 少量의 蒸溜水를 加하여 完全히 용해시켜 cellophane tube 에 넣고 5°C에서 透析시켜  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  를 除去하고 증류수로 一定 濃度로 희석시켜 酵素液으로 使用하였다.

### 1) 各種 鹽類의 影響

효소액 1 ml 에 各種 無機鹽類를 10 g 씩 添加하여 50°C에서 10分間 加熱處理하고 殘存活性을 測定한 結果는 Table 1 과 같다.

Table 1. Effect of Various Salts on the Heat Resistance of Protease.

Various salts	Residual activity (%)
Monosodium glutamate	2.52
Sodium chloride	1.81
Sodium sulfate	2.31
Sodium nitrate	3.73
Sodium phosphate monobasic	86.10
Sodium phosphate dibasic	2.62
Sodium bicarbonate	0.81
Calcium chloride	3.93
Calcium acetate	1.31
Calcium sulfate	2.52
Calcium carbonate	2.52
Potassium chloride	2.62
Potassium sulfate	1.71
Potassium nitrate	3.32
Potassium acetate	2.31
Potassium phosphate monobasic	75.92
Potassium phosphate dibasic	2.42
Non addition	1.51

Sodium salt 中  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  는 86.10%가 殘存하므로서 耐熱效果가 가장 좋았으며 그 밖의 sodium salt 는 거의 耐熱效果를 認定할 수 없었다. 供試 4 種의 calcium salt 는 耐熱效果가 거의 없었고 potassium salt 中  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  는 活性의 75.92%가 殘存하므로서 耐熱效果가 좋았으며 나머지 potassium salt 는 거의 耐熱效果를 認定할 수 없었다. 本 實驗結果에서  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  와  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  는 殘存活性이 各各

2.62%, 2.42%인데 比하여  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  와  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  는 殘存活性이 各各 86.10%, 75.92%로서 일등하게 耐熱效果가 큰 것은 興味있는 事實로서 그 原因에 對하여는 앞으로 더 檢討를 要하는 問題라고 생각된다.

細菌 amylase 및 麹菌 amylase 의 耐熱性 및 熱失活에 관한 各種 物質의 保護作用에 對해서는 많은 報告가 있으며, 特히 칼슘의 保護效果에 關해서는 福本<sup>(18)</sup>, 中村<sup>(19)</sup>, Gorini<sup>(20)</sup>, 朴 등<sup>(21)</sup>의 많은 研究가 있으나 protease 의 耐熱性에 關한 研究는 別로 찾아볼 수 없다. 다만 松島<sup>(22)</sup>는 麹菌 protease 에  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ , glycerine, agar-agar, Na-alginate 를 0.1%, 0.5%, 1.0% 씩 添加하여 50°C, 55°C, 60°C에서 15分씩 加熱處理하고 殘存活性을 測定한 結果  $\text{NaCl}$ , glycerine, Na-alginate 는 全然 效果가 없었으나 agar-agar 와  $\text{CaCl}_2$  는 保護作用을 나타내었다고 報告하였다. 그러나 本 菌株의 protease 는  $\text{CaCl}_2$  의 保護作用을 認定할 수 없었다.

### 2) $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 와 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 의 添加 濃度의 影響

酵素液 1 ml 에  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  와  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  를 5 mg ~ 25 mg 씩 添加하고 50°C에서 10分間 加熱處理한 후 殘存活性을 測定한 結果는 Fig. 5 와 같다.

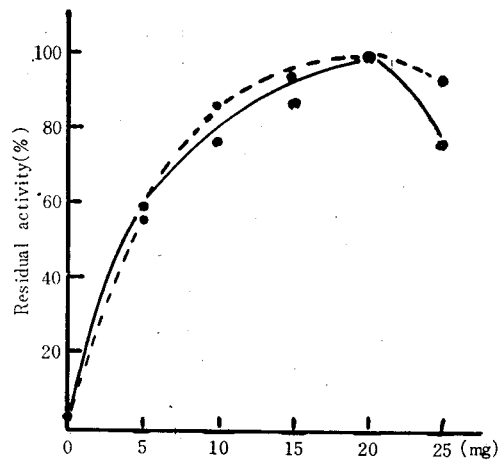


Fig. 5. Effect of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  on the Heat Resistance of Protease

—●— :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$     - - -●- - :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

酵素液 1 ml 에  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  와  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  를 20 mg 씩 添加하였을 때 殘存活性은 各各 100%로서 耐熱效果가 가장 좋았고, 25 mg 添加時에는 各各 76.90%, 94.50%로서  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  는 約 23%,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  는 約 5% 殘存活性이 減少되었다.

### 3) 加熱時間의 影響

酵素液 1 ml 에  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  와  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  를 20 mg 씩 첨가하여 50°C 에서 10~35 分間 加熱處理하고 殘存活性을 測定한 結果는 Fig. 6 과 같이 加熱時間이 길어짐에 따라 약간씩 減少되는 경향을 보였으나 50°C 에서 加熱時間이 35분까지는 安定性を 나타내고 있다.

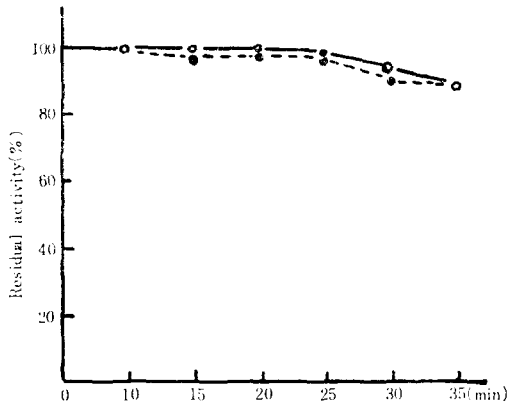


Fig. 6. Effect of Heating Time on the Heat Resistance of Protease.

—○— :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$     ---●--- :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

### 4) 加溫溫度的 影響

Fig. 7 에서 보는 바와 같이 酵素液 1 ml 에  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  와  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  를 各各 20mg 씩 添加하고 50~75°C 에서 10分間 加熱處理하였을 때 다 같이 55°C 以上에서는 耐熱效果를 認定한 수 없었다.

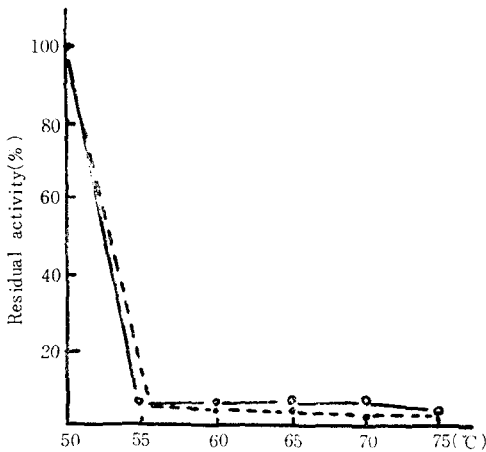


Fig. 7. Effect of Temperature on the Heat Resistance (for 10 min) of Protease

—○— :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$     ---●--- :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

## 要 約

*Rhizopus japonicus* S-62 에 의한 acid protease 의 生産條件 및 酵素의 耐熱性を 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 酸性 protease 의 生産에 있어 wheat bran medium 에 對한 sucrose, yeast, ammonium chloride, sodium phosphate monobasic 의 最適 添加 濃度는 各各 0.5%, 2.0%, 0.4% 이었다.

2) 耐熱劑로서  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  와  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  는 가장 效果의 이었다.

3) 酵素液에  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  와  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  를 各各 2% 씩 添加하고 50°C 에서 10分間 加熱處理하였을 때 殘存活性은 다 같이 100% 를 나타내었다.

4. 55°C 以上에서는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  와  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  의 耐熱效果는 거의 없었다.

## 參 考 文 獻

- 1) Ichishima, E. and Yoshida, F. : *Agr. Biol. Chem.*, Japan, **26**, 554 (1962).
- 2) 板本政義 守隨稀雪 : *日農協誌*, **35**, 98 (1957).
- 3) 吉田文彦 : *日農化*, **29**, 175 (1955).
- 4) 松島欽一 : *日農化*, **32**, 215 (1958).
- 5) 松島欽一 : *日農化*, **33**, 116 (1959).
- 6) Yamashina, I : *Acta Chem. Scand.*, **10**, 739 (1956).
- 7) 團野源一, 吉村貞彦 : *日農化大會要旨*, p. 11 (1963).
- 8) 板本政義 : *釀工誌*, **35**, 386 (1957).
- 9) Fukumoto, J., Tsuru, D. and Yamamoto, T. : *Agr. Biol. Chem.*, **31**(6), 710 (1967).
- 10) 板本政義 : *釀工誌*, **35**, 238, 278 (1957).
- 11) 鄭萬在 : *한국식품과학회지*, **9**, 31 (1976).
- 12) Lenney, J. F. : *J. Biol. Chem.*, **116**, 477 (1936).
- 13) Baribo, L. E. and Foster, E. M. : *J. Dairy Sci.*, **31**, 55 (1948).
- 14) Alford, J. A. and Frazier, W. C. : *J. Dairy Sci.*, **33**, 115 (1950).
- 15) Hakiyara, B., Matsubara, H., Nakai, H. and Okunuki, K. : *J. Biochem.*, **48**, 185 (1958).
- 16) Ichishima, E. and Yoshida, F. : *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 547 (1962).

- 17) Hou Won-Nyong : *Thesis Collection of the Graduate School* (Chung-Buk College) **3**, 71 (1977).
- 18) 福本壽一郎 : 日農化, **19**, 853 (1943).
- 19) 中村 : 日工化, **34**, 265 (1931).
- 20) Gorini, L. : *Chem. Abst.*, **44**, 2079 (1950).
- 21) 朴允仲, 李錫健 : 韓農化, **12**, 53 (1969).
- 22) 松島欽一 : 日農化, **29**, 87 (1955).