

*Aspergillus tubingensis*의 acid protease에 관한 研究

— I. *Aspergillus tubingensis*의 分離·同定 및 一般의 特性

鄭 允 秀·趙 暎*·韓 錫 絃

(建國大學校 畜産加工學科·忠南大學校 化學科*)

Studies on acid protease produced from *Aspergillus tubingensis*

— I. Isolation, identification and general characteristics of *Aspergillus tubingensis*—

CHUNG, Yun Su, Young CHO*, and Suk Hyun HAN.

(Dept. of Animal science, Kon Kuk University,
Dept. of Chemistry, Chung Nam National University*)

ABSTRACT

The strain of *Aspergillus*, 6868A, producing acid protease showing high activity was isolated from soil, as a result of wide research about mold group. This strain was identified as a species of *Aspergillus tubingensis* by the investigation of morphological characteristics.

The change of the enzyme production under the various media and culture condition was also studied.

The optimum pH and stability of crude acid protease are 2.5, 2.0~4.5 and the optimum temperature and thermal inactivation was shown 50°C, 55°C, respectively.

From the result of the study on the effects of metal ions, it was found that MnCl₂, CoCl₂, CuCl₂, SrCl₂, and NiCl₂ slightly increased the enzyme activity, on the other hand ZnCl₂, CaCl₂, MgCl₂, SLS, and KMnO₄ decreased it.

緒 論

蛋白質 結合인 peptide bond를 加水分解하는 protease는 作用 最適 pH에 따라 acid protease (Dalling, 1976), neutral protease, alkaline protease로 나뉘어진다.

이들 各種 protease는 食品工業(Hukumoto, 1958)을 위시하여 化學工業, 皮革加工(Nakanish 1959), 寫眞工業, 製紙工業, 洗製, 醫藥品工業(Show, 1959), 消化劑, 分析試藥, 環境淨化 等

廣範圍하게 應用되고 있으며, 앞으로 그 使用 範圍는 더욱 넓어질 前途이다.

이와 같은 protease의 應用性으로 보아 그의 研究는 상당히 時急한 問題이다. protease의 抽出源은 動植物에서 보다 微生物(Iwasaki, 1968)에서 얻는 것이 多樣한 protease를 얻는 이의에 여러 利點이 많다. 그러면 지금까지 發見된 酸性 protease의 生産 微生物을 抄錄하여 보면, *Penicillum janthinellum*(Fukumoto, 1967; Yoshida, 1956), *Aspergillus Oryzae*(Sardinas, 1968), *Candida albicans*(Somkuti, 1968), *Paecilomyces*

variotti(Marshall, 1968), *Rhizopus chinensis*(Gripion, 1976), *Aspergillussaitoi*(Emi, 1976), *Endothia parasitica*(Tomoda, 1964; Chang, 1976), *Mucor pusillus*(Yamasaki, 1976; Marshall, 1968), *Penicillium notatum*(Yoshio, 1976), *Penicillium roqueforti*(Kohei, 1976), *Penicillium duponti*(Yoshio, 1977), *Trametes sanguinea*(Shuzo, 1975), *Aspergillus nigar*(Sawao, 1971) 등이다.

著者 등은 醫藥用 消化酵素劑(Kenji, 1976), 새로운 抗腫瘍劑(Chang, 1976), 火傷治療劑(Joanna, 1975)로서 酸性 protease가 時急하다는 觀點에서, 自然界에서 幅넓게 곰팡이를 分離한 結果, 酸性 protease 生産이 강한 菌株을 얻었다. 이 選擇菌株에 對해 培養特性을 바탕으로한 形態學의 特徵 등을 觀察하였고, 여기서 生成되는 酵素 活性度의 변화량을 培地 및 培養條件 別로 測定하였으며, 얻어진 酵素의 제반 特性에 對해 調査하여 보았다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

酵素生産을 위한 天然培地로서는 wheat bran, rice bran, soybean meal 등을 使用하였다. 이들은 다른 材料가 混入되지 않은 純粹하고 變敗가 없는 것을 農協에서 구입하였다. 菌分離用 培地는 Difco製 malt agar와 Czapek-Dox agar를 使用하였으며, 각종 試藥과 酵素基質은 Merck 製品을 使用하였다.

2. 菌의 分離와 活性菌 選別

菌分離源 試料은 皮革, 장류, 쌀, 누룩, 토양 등으로 하여, 이들로부터 곰팡이를 分離하였다.

삼각 플라스크에 生理食鹽水 100ml를 넣어 殺菌하고(121°C, 15分), 여기에 分離源 試料 10g을 넣었다. 試料을 완전히 섞어 懸濁液을 만든 후, serial dilution하여 pour plating에 의해 독립된 colony를 分離하고, 이것을 다시 malt agar와 Czapek-Dox agar에 培養하였다.

活性菌의 選別은 gelatin stab medium과 casein plate를 並用하였다. gelatin medium의 경우는 分離한 strain을 stab medium에 接種하여 배양한 후(30°C, 72時間), gelatin 液化力을 確

認하고, casein plate의 경우는 固體培養한 菌體에서 酵素液을 抽出한 후 이 液을 filter paper disc(直徑: 10mm)에 沈漬하여 casein plate에 놓고 培養(30°C, 24時間)하였다. 그 후 nitric acid와 포화 MgSO₄·7H₂O의 混合液(1:4)을 부어 未分解 casein을 凝固시켜 酵素活性度를 比較하였다.

3. Colony의 伸長速度 測定 및 選別菌의 同定

選擇菌의 colony 伸長速度 測定에는 malt agar와 Czapek-Dox agar를 使用하였고, 培地의 pH는 2.0에서 9.0까지 調節한 후, 培養(33°C, 24, 48, 72時間)하여 colony의 直徑을 測定하였다.

選別菌의 同定은 The Genus of *Aspergillus* (Raper, 1973)의 方法에 의거하여 colony, conidial stage, 및 ascospore stage의 特性을 調査하였다.

4. 粗酵素液의 調製 및 活性度 測定

酵素活性도가 가장 높았던 wheat bran yeast extract 培地에서 培養후, 0.01M acetate buffer (pH 3.0)를 培地부게의 약 2배로 加한 후 실온에서 3時間 放置한 다음, warning blender로 摩碎하고 遠心分離(7,000 rpm, 30分)하였다.

酵素活性度의 測定은 milk casein을 基質로 하는 modified Anson's method(Masuyama, 1950)에 의거하였다.

測定方法은 0.1M acetate buffer(pH3.0)에 녹인 1.5% casein(Hammersten) 1ml에 酵素液 1ml를 加하여 40°C에서 60分間 反應시킨 후 0.4M trichloroacetic acid 2ml를 加하여 反應을 停止시키고 여과하였다. 濾液 1ml를 取하여 0.4M sodium carbonate 4ml와 Folin-Ciocalteus 液 1ml를 加한 후, 充分히 攪拌한 다음 20分間 放置하여 660nm에서 吸光度를 測定했다.

粗酵素液의 蛋白質 定量은 Lowry(1951) 방식에 의거하였다.

結果 및 考察

1. 優秀菌株의 選定

實驗 대상菌의 分離源 地域은 주로 영남, 경기, 영동 및 서울地域의 皮革, 장류, 누룩 등 原資材 加工工場에서와 토양을 對象으로 하였으며, 蒐集된 시료에서 곰팡이류 197菌株을 分離

하였다.

이를分離된 菌株들의 酵素活性度 選別試驗은 gelatin 液化法 및 casein 平板 消化法에 준하여, 황녹색의 *Aspergillus* 屬 5菌株, 회색 *Rhizopus* 屬 4菌株 등 포함 15菌株를 酸性側 pH에서 酵素活性도가 높았던 菌으로 選拔하였다. 이들중 특히 acid prctease 生産活性이 좋았던 菌株는 6868A와 6858A이었고, 또한 두 균주 중에서도 6868A가 培地源에 큰 影響없이 강력한 活性 菌임을 確認할 수 있었다.

2. 選定菌株의 同定

選定菌株중 acid prctease의 酵素活性도가 높았던 菌株 6868A에 대한 形態學的 特徴성은 다음

과 같다.

1) 平板培養時 colony의 特徵

Malt extract agar와 Czapek-Dox agar에서의 生長形態는 다음 Fig. 1과 같다. 培養時間이 20時間 内外에서는 colony의 色相은 黃綠色이나, 집차르 靑褐色에서 옅은 暗褐色으로 變속하였다 生育速度는 Czapek-Dox agar 平板培地에서 보다 malt extract agar 平板培地에서 더 잘 발육하였다. 특히 平板培地의 뒷면은 Czapek-Dox agar의 경우는 어느정도 規則的인 주름을 形成하였으나, malt extract agar의 경우는 colony의 中心부위에서 放射狀 紋사를 형성하였을 뿐 주름을 만들지는 않았다.

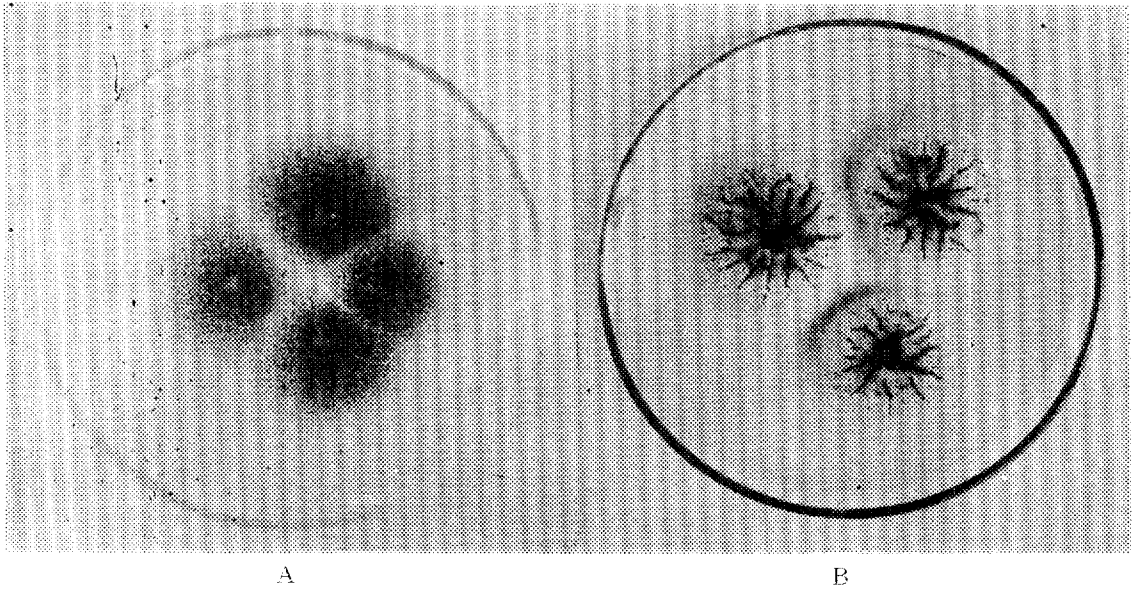


Fig. 1. Growth of colonies cultured on malt extract agar and Czapek-Dox agar
A; Malt extract agar B; Czapek-Dox agar

2) 形態學的 特徵

Czapek-Dox agar와 malt extract agar에서 培養한 形態學的 諸特徵은 Table 1과 같다.

3) 顯微鏡的 透視像

Czapek-Dox agar의 斜面培地에서 48時間 培養한 다음 顯微鏡 透視形態는 Fig. 2와 같이 건

형적인 *Aspergillus*屬임을 알 수 있었다. 6868A의 平板培養의 colony生長형태, 形態的 特徴 및 현미경적 透視像 등의 여러 特徵 등으로 *Aspergillus tubingensis*와 거의 비슷한 여러가지 特性을 가진 새로운 菌株로 생각하여 *Aspergillus tubingensis* var. 6868A로 表示하였다.

Table 1. Morphological characteristics of isolated strain 6868A

| Section of items | Morphological characteristics |
|--|--|
| 1) Colony color on Czapek-Dox agar, cultured at 30°C | Young cells; dark redish brown, old cells; brownish black. |
| 2) Colony size in plate cultures | 40~50mm in diameter at 24°C, 50~60mm in diameter at 34°C. |

- 3) Dish plate reverse of colony
- 4) Conidia head
- 5) Conidia phores
- 6) Vesicles
- 7) Sterigmata
- 8) Conidia
- 9) Colony on malt extract agar

Wrinkle at 34°C, strongly furrowed colony type in reverse side of dish plate, somewhat yellow brown
 Globose to valiate mostly 150~300 μ in diameter
 Smooth long and coarse, commonly 2 to 3mm
 Globose, most commonly 26 μ to 40 μ in diameter
 I in two series, primaries mostly 20 μ to 30 μ long, secondaries numerous 5.5 μ to 10 μ
 Globose with byaline echinulations when formed darker and rougher, when matured somewhat elongated flatterly 2.0 μ to 4.0 μ in diameter
 Rapidly grown to be 6cm in diameter, no grows after 10 days, thin, plane, welvety, dark brown sperulation; development of dark, white mycelium after seen; reverse side uncolored

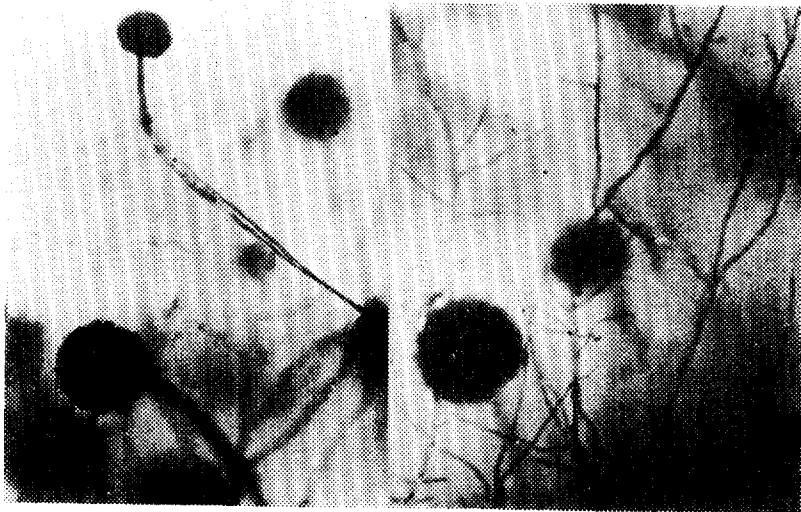


Fig. 2. Microphotographies showing detailed structure of the conidial heads (A) and mycelia(B).

3. 生理的 特徴

1) 生育最適 pH

pH를 달리한 malt extract agar와 Czapek-Dox agar의 平板培地에 각각 單胞子를 接種한 다음 培養하여 (35°C, 72時間) 生育最適 pH를 구한 結果는 Fig. 3과 같다. pH 1.0에서 2.0의 條件에서는 두 培地에서 모두 生育하지 못하였고, pH 2.0에서부터 發芽되었다. pH3.0에서 5.0 사이에서는 相當히 빠르게 生育하였으며, Czapek-Dox agar에서 보다 malt extract agar에서 더욱 生育이 잘되었다.

2) 生育最適溫度

最適 pH로 調節한 平板培地에 菌株를 接種하여 각 溫度別에 따른 colony의 生長程度로써 生

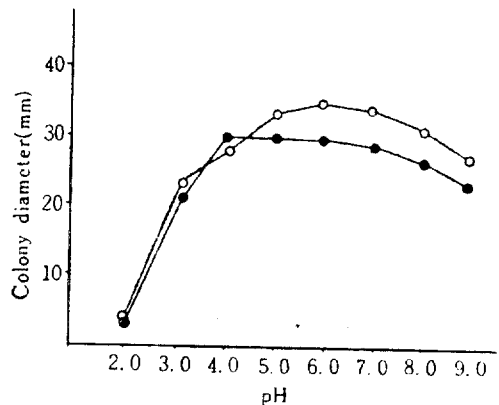


Fig. 3. Optimum pH of colony growth

—●—: Czapek-Dox agar
 —○—: Malt extract agar

育最適溫度를 구한 結果는 Fig. 4와 같다. Fig. 4와 같이 본 菌株의 colony生長程度로 보아最適溫度는 35°C임을 알 수 있었다.

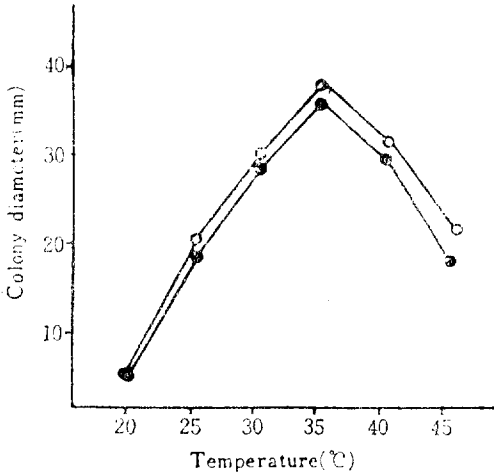


Fig. 4. Optimum temperature of colony growth on Czapek-Dox agar and malt extract agar
 —●—: Czapek-Dox agar
 —○—: Malt extract agar

5와 같이 tap water와 0.5M NaCl 溶液이 좋았고, 本 培地의 原料成分을 살펴보면 Table 2와 같다.

| Elute solvent | Protease activity(O.D) 660nm | |
|-------------------------|------------------------------|-------|
| | 0.3 | 0.5 |
| Distilled water | ~0.15 | ~0.15 |
| Tap water | ~0.25 | ~0.25 |
| 0.5M NaCl solution | ~0.35 | ~0.35 |
| Lactate buffer (pH 3.0) | ~0.25 | ~0.25 |

Fig. 5. Comparison of elute solvent on protease extraction

또한 培養 온도, pH, 수분함량 등의 제 조건은 같게 하고 固體培地의 조성 및 培養時間을 달리 해서 나타난 酵素活性度の 변화는 Fig. 6와 같다. Fig. 6와 같이 wheat bran만을 酵素生産培地로 하였을 때, 培養溫度 35°C, 水分含量 40% pH6.7에서 24時間內에 酵素活性가 增加되었고, 그후는 완만한 增加를 보이다가 72時間후에는 酵素活性도가 급히 감소하는 傾向이었다.

그러나 Sawada(1963)가 報告한 바에 의하면

4. 粗酵素의 抽出 및 培養條件別 酵素活性度の 변화
 Wheat bran 培地에서 酵素의 抽出條件은 Fig.

Table. 2. Ingredients of basal media, wheat bran & rice bran

| Ingredients of media | Moisture (%) | Protein (%) | Fat (%) | Ash (%) | Fiber (%) | Vitamin B ₁ (%) | Vitamin B ₂ (%) |
|----------------------|--------------|-------------|---------|---------|-----------|----------------------------|----------------------------|
| Pure wheat bran | 12.5 | 12.03 | 5.08 | 4.54 | 2.51 | 8.25 | 0.25 |
| Pure rice bran | 11.3 | 15.75 | 1.45 | 10.84 | 6.72 | 0.39 | 0.52 |

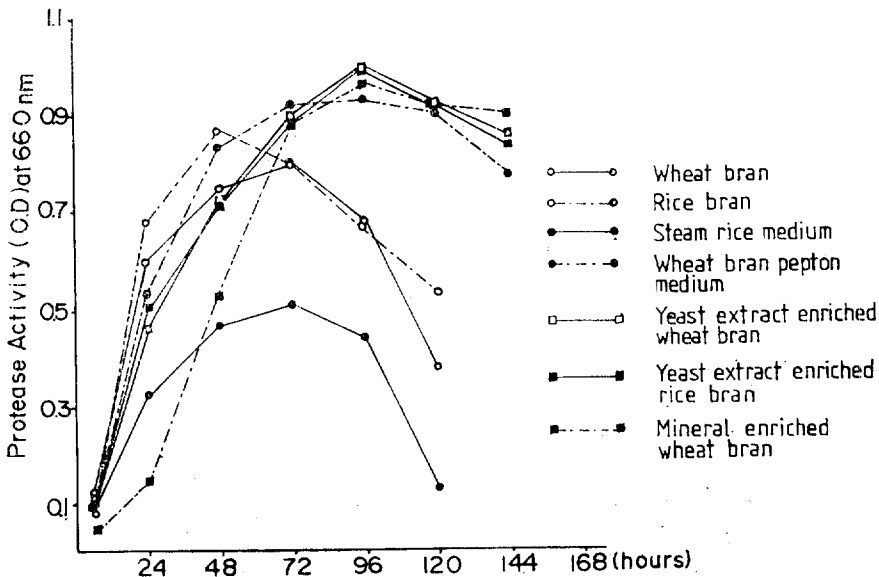


Fig. 6. Activities of produced enzymes on various media according to incubation time.

pH 2.5~6.0일 때 대체로 同 酵素의 生産은 培地源에 따라 特異性을 갖는다고 하였다. rice bran의 경우는 脫脂狀態로서, 온도, 수분 등 諸條件은 wheat bran의 경우와 같게 하였고 實驗結果 最大活性度는 wheat bran 培地에 비해 24時間 앞당겨 活性이 나타났으며, 그 후는 감소되었다. 특히 rice bran 및 米麩에서 生産되는 酸性 protease는 布川(1962)에 의하면 切斷가능한 peptide chain의 幅이 넓고 遊離 amino acid를 많이 放出할 수 있다고 하였다. 純白米만의 경우는 wheat bran과 rice bran에 비하여 같은 條件에서 酵素活性도가 저조하였으며 最大生産時間도 rice bran에 비해서 늦었다. 그러나 布川(1962) 등이 發表한 바에 의하면 米麩의 酸性 protease 生産에 따른 培養條件검토 결과는 中溫에서 보다 比較的 低溫에서 培養하였을 때가 酵素活性도가 強하고, 특히 釀造時에는 同 酵素의 安定性이 높다고 하였다. wheat bran에 peptone을 0.2%, 0.09%로 添加할 때는 Fig. 6와 같이 wheat bran에 비해 酵素의 最大活性도의 到達時間이 약 24時間 遲延되었다. 또한 wheat bran에 yeast extract를 0.2%, 0.09% 添加하였을 경우도 peptone 添加의 경우와 같았으며, rice bran에 yeast extract 0.2%, 0.09% 添加한 경우, 酵素의 最大活性도의 到達時間이 약 96時間이었으며, 非添加區에 비해 48時間의 遲延을 나타내었다.

wheat bran에 sodium nitrate(0.4%), potassium phosphate(0.1%)를 添加한 경우는 wheat bran에 비해 最大活性도의 到達時間이 約 25時間 遲延되었으나, 活性도는 높게 나타났다. 가장 遲延時間이 짧았던 것은 peptone 添加區였으며, yeast extract나 무기염添加區는 48時間 내지 그 以上の 遲延度를 나타내었다.

5. 粗酵素液의 最適 pH, 最適溫度 및 金屬 ion에 對한 影響

casein分解에 對한 粗酵素의 最適 pH 및 pH stability는 Fig. 7, Fig. 8과 같다.

粗酵素의 最適 pH는 pH 2.5에서 가장 強한 活性度를 나타내었고, 微弱하나마 pH 6.0에서 약간의 活性을 나타내었다. 이같은 양상은 弱酸性 및 中性酵素의 混在로 인한 結果로 생각된다.

각 pH별로 조정된 酵素液 一定量을 50°C의

water bath에서 20時間 처리한 後 殘餘 酵素活性을 調査한 結果, pH安定性은 pH 2.0~4.5이고 그 以上以下에서는 매우 不安定하였다.

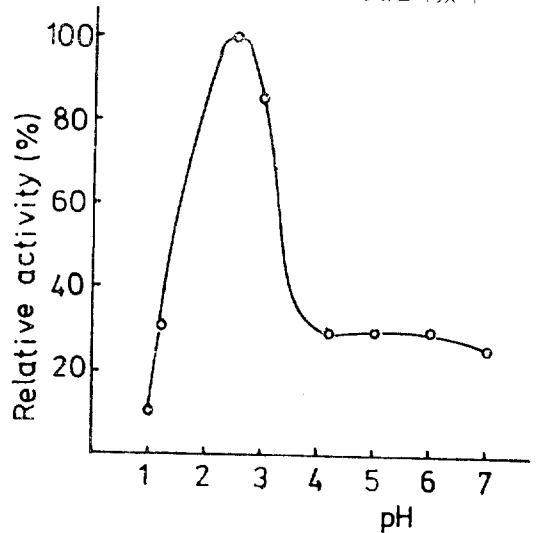


Fig. 7. pH effect on acid protease.

또한 粗酵素液 一定量을 각 溫度에서 각각 30分間 處理한 다음 殘餘 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 9과 같다. 따라서 粗酵素의 最適溫度는 50°C였으며 그 이상 이하에서는 失活되었다.

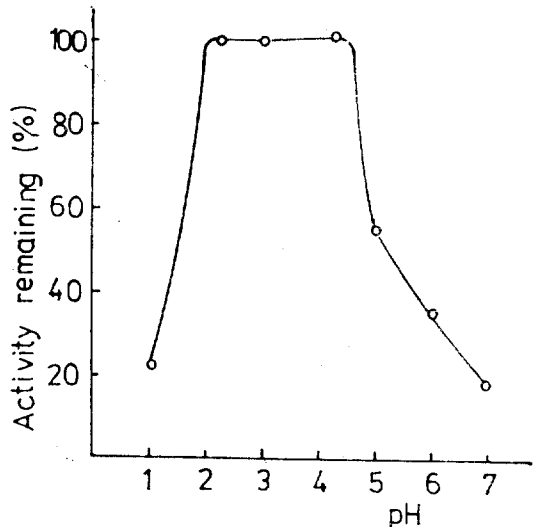


Fig. 8. pH stability of acid protease.

熱安定性 시험은 各溫度에서 6時間 熱處理한 다음 殘存 酵素活性度를 測定해 본 結果 Fig. 10과 같다. 40°C, 50°C, 55°C의 熱處理 條件에서는 거의 6時間 後에도 失活되지 않았으나, 60°C 以上에서는 急激히 失活되어 80~90°C에

서는 80% 이상 失活되었다.

metal ion에 대한 影響은 metal ion의 농도를 Table 3과 같이 하여 10ml의 증류수에 녹이고 여기에 酵素液 1ml를 넣어서 37°C에서 30分間 加溫處理한 다음, 殘存活性を 測定한 결과, Table 3에 나타난 바와 같이, 各種 金屬ion 中 Co, Cu, Sr, Ni의 處理區는 活性도가 약간 促進되었고, Mn의 경우는 活性도가 상당히 증가하였다.

Table 3. Effects of various reagents on enzyme activity.

| Chemicals | Concentration (mM) | Residual activity (%) |
|-------------------|--------------------|-----------------------|
| CoCl ₂ | 10 | 101.7 |

| | | |
|-------------------|-----|-------|
| ZnCl ₂ | 10 | 85.7 |
| CuCl ₂ | 10 | 107.0 |
| CaCl ₂ | 10 | 85.0 |
| MnCl ₂ | 10 | 133.3 |
| CdCl ₂ | 10 | 98.2 |
| MgCl ₂ | 10 | 67.5 |
| SrCl ₂ | 10 | 101.7 |
| NiCl ₂ | 10 | 112.2 |
| FeCl ₂ | 10 | 97.3 |
| SLS | 1 | 83.3 |
| KMnO ₄ | 0.1 | 53.5 |
| BaCl ₂ | 10 | 99.1 |
| I ₂ | 10 | 67.5 |
| Conrtol | — | 100 |

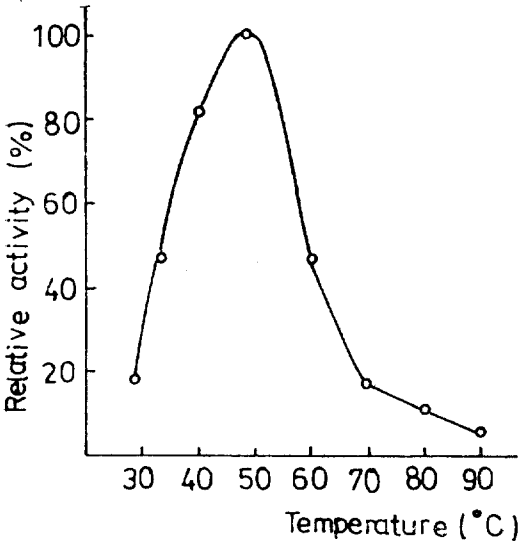


Fig. 9. Temperature effect on acid protease.

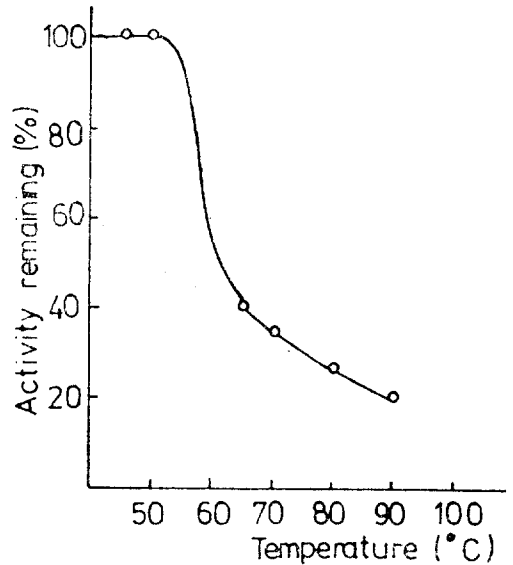


Fig. 10. Thermal stability of acid protease.

摘 要

自然界로부터 酸性 protease를 生産하는 mold group에 대해 폭넓게 調査한 結果, 土壤으로부터 分離된 여러 菌株中, 비교적 높은 酵素活性도를 나타내었던 *Aspergillus* strain, 6868A를 얻었다.

본 選擇 菌株에 대한 培養 特性을 바탕으로한 菌體의 形態學의 特徵 등을 觀察한 結果, *Aspergillus tubingensis*와 여러 特性이 類似하였다.

여기서 生成되는 酵素活性도의 變化량을 培地 및 培養條件 별로 測定한 結果, wheat bran과 yeast extract를 85:2의 무게 比率로 하고 水分含量을 약 45%로 하여 30°C에서 96時間 培養했을 때 最大의 酵素活性도를 보였다.

여기서 얻어진 粗酵素의 最適pH는 2.5, pH 安定성은 2.0~4.5, 最適溫度는 50°C, 그리고 熱安定성은 55°C를 기점으로 하여 급격히 떨어졌다. metal ion에 의한 影響은 Mn, Co, Cu, Sr, Ni,에 의해 活性도가 약간 增加되었으며, Zn, Ca, Mg, Na, 및 K 등에 의해 阻害되었다.

引用文献

1. Dalling, J.M., *et al.* 1976. *Aust. J. Plant Physiology*, **3**, 721.
2. Hukumoto, J., *et al.* 1958. Studies on Bacterial proteinase. *J. Agri. Chem. Soc.* **32**, 230.
3. Nakanish, K. 1959. *J. Biochem.* **46**, 1963.
4. Shaw, R. 1959. *Biochim. Biophys. Acta.* **92**, 558.
5. S. Iwasaki., *et al.* 1968. *Agri. Biol. Chem.* **32**, 1051.
6. Hukumoto, J., *et al.* 1967. Studies on Bacterial Proteinase. *Agri. Biol. Chem.* **31**, 710.
7. Yoshida, F., *et al.* 1956. Studies on the proteolytic enzymes of *Black Aspergillus* (part II). *Bull. Agri. Chem. Soc. Japan.* **20**, 257.
8. Sardinas, J.L. 1968. Rennin Enzyme of *Endothia parasitica*. *Appl. Microbiol.* **16**, 248.
9. Somkuti, G.A., *et al.* 1968. Purification and properties of *Mucor pusillus* Acid Protease. *J. Bacteriol.* **95**, 1407.
10. Marshall, W.E., *et al.* 1968. *Biochim. Biophys. Acta.* **151**, 414.
11. Gripon, J.C. 1976. Inactivation of *Penicillium roqueforti* Acid Protease. *Biochemie.* **58**, 747.
12. Emi, S., *et al.* 1976. Coupling of the *Penicillium duponti* Acid Protease to ethylene-maleic acid (1 : 1) linear copolymer. *Biochim. Biophys. Acta.* **445**, 67.
13. Tomoda, K., *et al.* 1964. Acid protease produced produced by *Trametes sanguinea*, a wood destroying Fungus. *Agri. Biol. Chem. Soc.* **28**, 770.
14. Chang, W.J., *et al.* 1976. *J. Biochem.* **80**, 975.
15. M. Yamasaki, *et al.* 1976. Specificity of Acid protease form *Aspergillus nigar var. macrosporus* toward B-chain of performic acid oxidized bovine insulin. *Biochim. Biophys. Acta.* **429**, 912.
16. Yoshio, Tsujita. 1976. Purification and characterization of the two molecular forms of *Aspergillus oryzae* Acid Protease. *Biochim. Biophys. Acta.* **445**, 194.
17. Kohei Oda, *et al.* 1976. Some physicochemical properties and substrate specificities of Acid Proteases A-1 and A-2 of *Scytalidium lignicolum* ATCC 24568. *Agri. Biol. Chem.* **40(5)**, 859.
18. Yoshio, Jusjita. 1977. *J. Bact.* **130(1)**, 48.
19. Shuzo. Satoi, *et al.* 1975. Effect of a microbial Acid protease inhibitor (S-PI). *Agri. Biol. Chem.* **39(4)**, 773.
20. Sawao Murao. 1971. *Agri. Biol. Chem.* **35(10)**, 1477.
21. Kenji Takahashi. 1976. *J. Biochem.* **80**, 497.
22. Wen-Jong Chang. 1976. The structure and function of Acid proteases. *J. Biochem.* **80**, 975.
23. Joanna, M., *et al.* 1975. *J. Biochem.* **151**, 319.
24. Raper, Kenneth B., D. Fennell. 1973. The genus of *Aspergillus*. **16**, 293.
25. Masuyama, S. 1950. *J. Ferment. Tech.* **28**, 149.
26. Lowry, O.H., *et al.* 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
27. Jiro Sawada, 1963. Studies on the Acid protease of *Paecilomyces varioti* Bainier TPR-220. *Agri. Biol. Chem.* **27(10)**, 677.
28. Nunokawa, Y. 1962. Studies on the constitution of "Rice-Koji" protease (part III). *J. Agri. Chem. Soc.* **36(11)**, 879.