

*Aspergillus fumigatus*에 의한 Alkaline Protease의 생산과 정제

차원섭 · 조영제 · 최청

영남대학교 식품가공학과

The production of Alkaline Protease by *Aspergillus fumigatus* and Purification of Enzyme

Woen-Suep Cha, Young-Je Cho and Cheong Choi

Dept. of Food Science & Technology, Yeung-Nam University, Kyungsan, 713-800, Korea.

Abstract

The alkaline protease producing mold isolated from and identified as *Aspergillus fumigatus*. It was found that the production of alkaline protease reach to maximum was cultured for 3 days at 30°C.

The enzyme was purified 86.13 fold and yield of the enzyme purification was 6.4%, The purification procedure include ammonium sulfate treatment, gelfiltration on Sephadex G-25, G-75, G-150 and DEAE-cellulose ion-exchange chromatography. When the purified enzyme was applied sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, the molecular weight was estimated about 63000. This enzyme composed 17 amino acids and main amino acids of this enzyme were glycine and glutamic acid.

서 론

Protease는 제빵공업, 세제공업, 소화제 및 진통제 등 제약공업, 장류의 양조, 식육의 연화, cheese의 숙성, 피혁가공 등 여러분야에 걸쳐 광범위하게 이용되고 있으며,^{1,2)} 작용하는 pH에 따라 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 대별되고, 이 중 alkaline protease에 대해서는 Röhms³⁾가 동물의 췌장 protease를 연구한 이래 *Bacillus Sabtilis*⁴⁾, *Myriococcum* sp.⁵⁾, *Aspergillus sojae*⁶⁾, *monascus* sp.⁷⁾, *Pseudomonas maltophilia*⁸⁾, *Euphamsia superba*⁵⁾, *Cephalosporim* sp. KM 388¹⁰⁾이 생산하는 alkaline protease를 정제하고 특성을 구명한 연구, alkaline protease의 고정화¹¹⁾와 열안정성을 높이기 위한 화학물질의 첨가¹²⁾, 등 많은 연구가 계속되어 오고 있다.

근래에 와서 alkaline protease가 첨가된 효소제제가 개발되면서 소요량이 급격히 증가하여 현재 단일효소로써는 세계 최대의 생산량을 기록하고 있고¹³⁾ 앞으로도 수요가 급격히 증가될 것으로 간주된다.

본 연구에서는 alkali영역에 최적의 활성을 갖는 alkaline protease에 대한 연구를 위하여 토양 및 부식토로부터 alkaline protease 생성능이 우수한 균주를 분리하고, 이 균주로부터 생산된 효소를 정제하여, 몇가지 특성을 얻은 바 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리

대구 및 경북지방의 토양과 부식토를 균원시료로 하여 상법¹⁴⁾에 따라 순수분리하고, 분리된 균주중

Table 1. The composition of potato-dextrose agar (%) (medium for stock culture)

potato extract	20 (w/v)
agar	2.0
dextrose	2.0
pH	7.0

200 g of sliced potato in 1 l of tap water was boiled for 30 min. After cooling the extract was filtered through cotton.

Table 2. The composition of Czapek-Dox Agar

sodium nitrate	0.5g
potassium chloride	0.5g
magnesium sulfate, 7 hydrate	0.5g
dipotassium hydrogen phosphate	1.0g
ferrous sulfate, 7 hydrate	0.01g
glucose	20.0g
agar	20.0g
distilled water	to 1 liter

Table 3. The composition of wheat bran medium

wheat bran	50g
2% glucose solution	50ml

alkaline protease 생성능이 뛰어난 균주를 3차례 반복실험을 행하여 효소생성능력이 가장 우수한 균주를 선발하였다.

배지

균의 순수분리를 위한 배지는 Potato dextrose agar를, 효소생산을 위하여 밀기울 배지를, 균주 보관용 배지로는 Czapek-dox agar를 사용하였으며, 이들 배지조성은 Table 1, 2, 3과 같다.

효소생산을 위한 배양방법

상기 밀기울 배지에 공시균주의 균사체 및 포자를 5백금이 접종하고, 30°C에서 3일간 배양하였다.

조효소액 조제

배양된 밀기울 배지를 8배의 boric acid-borax buffer(pH 9.0)를 가하여 균질화 시킨후, 4°C에서 24

시간동안 교반하여 효소를 추출하고, 4000 g로 30분간 원심분리한 후 상정액을 모아, 산성 및 중성 protease를 실험 시킨후 여과하여 조효소액으로 사용하였다.

protease activity 측정

효소활성도 측정은 Anson-萩原법^{15,16)}에 따라 행하였고, 활성단위는 조효소 혹은 정제효소 1ml가 1분간 1μg에 해당하는 tyrosine을 생성하는 능력을 1 unit로 하였다.

단백질 정량

Lowry¹⁷⁾ 등의 방법에 의하여 bovine serum albumine을 표준단백질로 사용하여 단백질량을 측정하였다.

효소의 정제

alkaline protease의 정제는 조효소액을 황산암모늄으로 염석한후 0.2M boric acid-borax buffer(pH 9.0)로 투석하고, 저온실에서 Sephadex G-25, G-75, G-150 컬럼을 사용하여 gel filtration하고 활성부위를 농축한 후, DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피로 정제하였다.

분자량 측정

분자량 측정은 Weber와 Osborn의 방법¹⁸⁾에 의해 SDS-polyacrylamide 전기영동에 의해 실시하였으며, 표준단백질로는 bovine serum albumine(M. W. 66000), egg albumine(M. W. 45000), pepsin(M. W. 34700), trypsinogen(M. W. 24000), β-lactoglobulin(M. W. 18400) lysozyme(M. W. 14300)을 사용하였다.

아미노산 분석

효소의 아미노산 조성은 시료에 6N-HCl을 가하고 질소가스를 충전 밀봉시켜 105°C에서 20시간 가수분해한 다음, 증발기를 이용하여 완전히 탈산한후 아미노산 자동분석기(LKB-4159)로 분석하였다.

결과 및 고찰

Alkaline protease 생성균주의 분리동정

대구 및 경북지방에서 채취한 토양 및 부식토에서 분리한 52균주를 대상으로 alkaline protease 생성 능이 가장 강한 *Aspergillus fumigatus*을 분리 동정 하였다.

배양시간에 따른 protease의 생성

Aspergillus fumigatus 균주에 의한 alkaline protease 생성은 수분이 60% 함유된 밀기울배지에서 30°C에 배양하여 시간별로 활성을 측정 한 결과 Fig. 1과 같이 3일후가 효소활성이 가장 높았으며, 4일째는 82%, 5일째는 68%로 활성이 감소하였다. 장등¹⁹⁾은 *B. Subtilis*에 의한 alkaline protease 생성이 12~14시간에서 최고라고 한 것과 정등²⁰⁾이 *A. awamori*가 72시간 배양시 활성이 가장 높았다고 한 것과 비교할 때 균주의 종류에 따라 최적배양 시간에 차이가 있음을 알 수 있었다.

Alkaline protease의 정제

염석 및 투석

균을 배양한 밀기울 배지로부터 추출한 조효소액

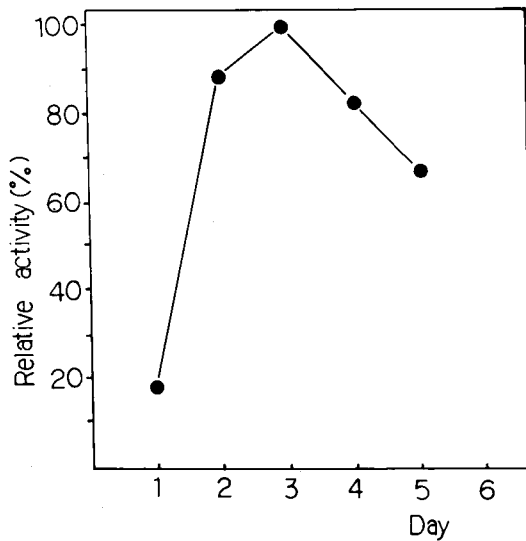


Fig. 1 Effect of culture time on production of alkaline protease by *Aspergillus fumigatus*

에 황산암모늄을 70% 포화시켜서 효소단백질을 응집 침전시킨 다음 원심분리하여 침전물을 회수하고, 그 상정액을 다시 황산암모늄 90% 포화시켜서 잔존 효소단백질을 침전시켰다. 이 침전물들을 모아 5°C에서 boric acid-borax buffer(pH 9.0)로 용해시킨후 3일간 같은 완충액으로 투석을 실시하였으며, 완충액은 2시간마다 교환하였다. 그 결과 수율은 31.9%, 정제정도는 6.4배였다.

Sephadex G-25 gel filtration

투석한 효소액을 60ml로 농축한 뒤 30ml씩 Sephadex G-25겔(3.0×45cm)에 충전시킨후, 1.5ml/min.의 유속으로 5ml씩 분획하여 280nm에서 흡광도를 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다. 즉 9~21번에서 alkaline protease활성이 나타났고 수율은 22.9%, 정제정도는 21.8배였다.

Sephadex G-75 gel Filtration

30ml로 농축한 효소액을 Andrews의 방법²⁶⁾에 따라 15ml씩 Sephadex G-25 겔(2.2×90cm)에 충전시킨후 2.2ml/10min.의 유속으로 5ml씩 분획한 결과는 Fig. 3과 같이 27~41번에서 효소활성이 있었고, 수율은 10.3%, 정제정도는 22.8배였다.

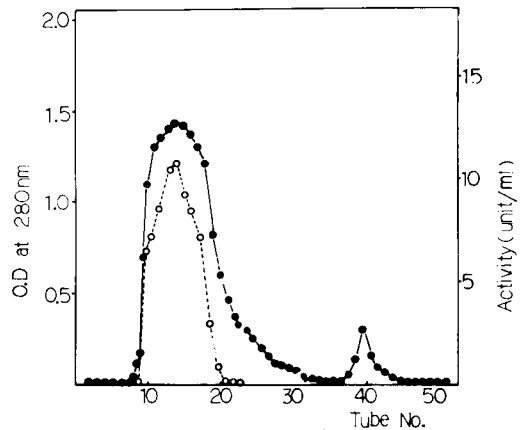


Fig. 2 Sephadex G-25 gel filtration pattern of alkaline protease by *Aspergillus fumigatus* protein ; ●—● activity ; ○-----○

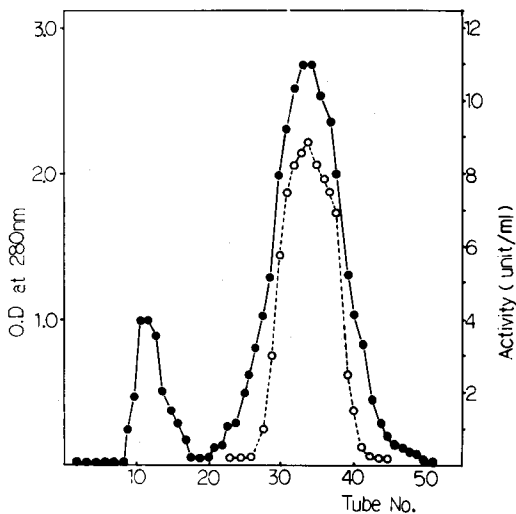


Fig. 3 Sephadex G-75 gel filtration pattern of alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

protein : ●—● activity : ○- - -○

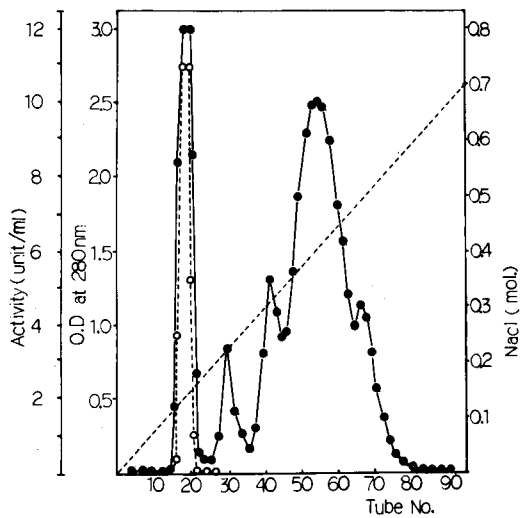


Fig. 4 DEAE-cellulose ionexchange chromatogram of alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

protein : ●—● activity : ○- - -○

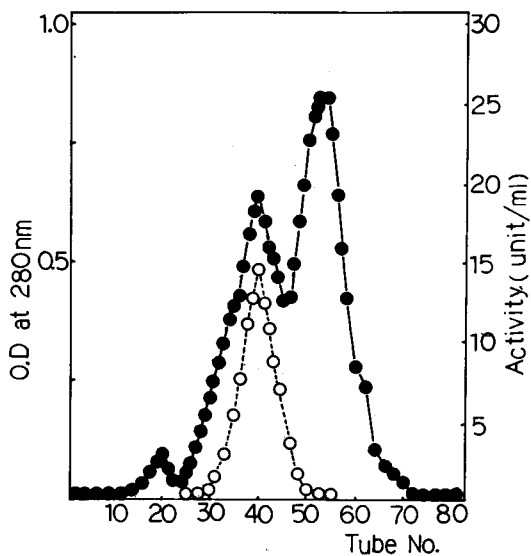


Fig. 5 First Sephadex G-150 gel filtration pattern of alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

protein : ●—● activity : ○- - -○

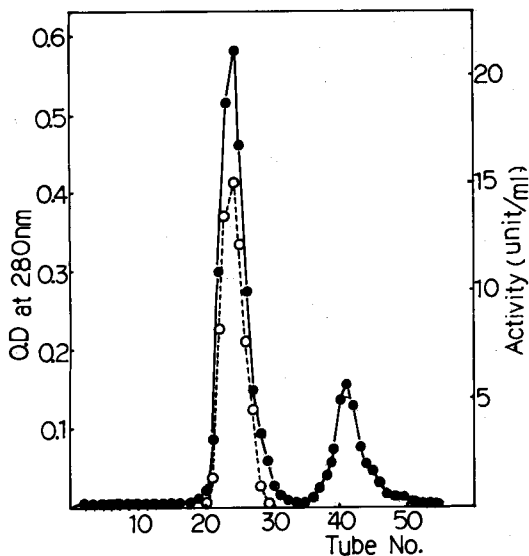


Fig. 6 Second Sephadex G-150 gel filtration pattern of alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

protein : ●—● activity : ○- - -○

Table 4. Summary of purification of alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

Step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude enzyme solution	1175	3807	3055	0.802	100	1
Ammonium sulfate	305	189	976	5.16	31.9	6.4
Sephadex G-25	100	40.09	700.8	17.49	22.9	21.8
Sephadex G-75	70	17.1	313.5	18.3	10.3	22.8
DEAE-cellulose	42	7.3	255	34.93	8.35	43.55
First Sephadex G-150	33	4.14	236.4	57.10	7.74	71.20
Second Sephadex G-150	25	2.83	195.5	69.08	6.40	86.13

DEAE-Collulose Column chromatography

농축시킨 효소액을 DEAE-Cellulose 컬럼(3×50 cm)에 충전시킨 후 약 1.5배의 boric acid-borax buffer(pH 9.0)로 비활성 단백질을 제거한 다음 흡착된 단백질을 0~0.7M NaCl을 linear salt gradient로 용출시켰다.

이때의 유속은 0.85ml/min.였고 7ml씩 분획한 결과 15~21번에서 효소활성이 보였고(Fig. 4) 수율은 8.35%, 정제정도는 43.55배였다.

First Sephadex G-150 gel Filtration

Sephadex G-150 컬럼(2×90cm)을 이용하여 1.6 ml/10min.의 유속으로 2.5ml씩 분획한 결과 30~50 번에서 효소활동이 나타났으며(Fig. 5) 수율은 7.74%, 정제정도는 71.20배였다.

Second Sephadex G-150 gel Filtration

농축한 효소액을 Sephadex G-150 컬럼(1.8×120 cm)으로 1.2ml/10min. 유속으로 3ml씩 분획한 결과(Fig. 6) 20~30번에서 활성이 보였고, 수율은 6.4%, 정제정도는 82.13배였다(Table. 4). Tohru⁸⁾은 74배로 정제한 alkaline protease로 Disc gel 전기영동을 실시하여 단일밴드를 확인하였다고 했고, Katusumi¹⁰⁾은 proteinase C, D를 각각 263배, 196배로 정제, 수율 5.1%, 25%를 얻었다고 하였으며, Koichi Kimoto⁹⁾은 proteinase A₂를 280배 정제하였고, 장¹⁹⁾은 9.2배 정제에 회수율 14%, Kazuo²¹⁾은 92배 정제에 9% 회수율, Malik²²⁾은 55배 정제에 35%의 수율을 얻었다는 보고와 비교할

때 정제정도에서 차이가 큰 것은 최초 효소용액의 농도가 진한지 묽은지에 따라 다른 것으로 간주된다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

정제된 효소 단백질을 Davis²³⁾에 따라 polyacrylamide gel로써 disc gel 전기영동을 행하여 본 결과 Fig. 7과 같이 단일밴드를 확인할 수가 있었다.

분자량 측정

Weber와 Osborn의 방법¹⁸⁾에 따라 SDS-polyacryl

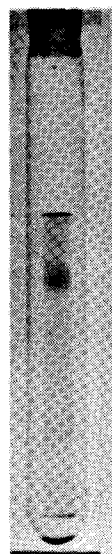


Fig. 7 Polyacrylamide gel electrophoresis of purified alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

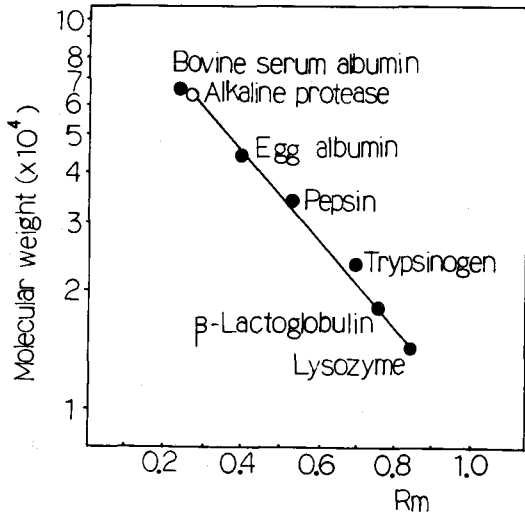


Fig. 8 The calibration curve for the determination of molecular weight of alkaline protease by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

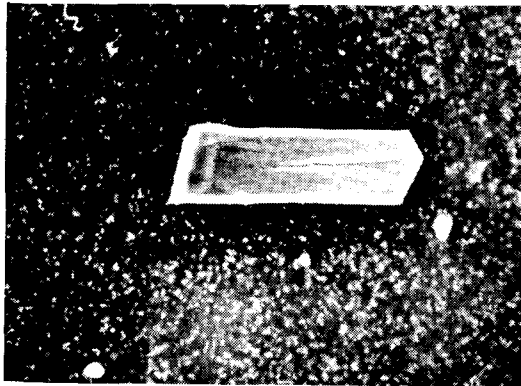


Fig 9 Scanning electron microphotograph of crystal of alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

amide전기영동에 의한 분자량 측정 결과는 약 63000 정도였다(Fig. 8).

이와 같은 결과는 *pseudomonas* sp. B-25²²⁾가 생성한 효소 분자량 41200, *A. niger*²¹⁾의 protease의 분자량 30000, *Bacillus subtilis*¹⁹⁾가 생산하는 alkaline protease의 분자량 19000, *Euphausia superba*⁹⁾

의 Chymotrypsin-like proteinase 분자량 29000, *Pseudomonas maltophilia*⁸⁾의 alkaline protease 분자량 46000, *Cephalosporium* sp. KM 388¹⁰⁾의 proteinase C와 D의 분자량이 각각 22000, 24000인 것과 비교할때 비교적 분자량이 큰 효소임을 알 수 있었다.

효소의 결정화

정제된 효소를 4°C에서 결정화시켜서 scanning electron microscopy에 의해 그 구조를 확인한 결과는 3각주형으로 (Fig. 9) Daisuke⁴⁾가 결정화시킨 protease가 바늘 모양인 것과 서²⁴⁾의 4면체 결정과는 상이한 형태를 가지고 있었다.

아미노산 분석

정제한 효소단백질의 아미노산 조성은 Table 5와 같이 17종류로 구성되어 있었고, 그 중 glycine과 glutamic acid가 각각 16.46%, 11.55%로 많이 함유되어 있고 cystine과 methionine이 가장 적은 함량을 나타내었다.

이같은 사실은 정²⁵⁾이 보고한 protease에 aspartic

Table 5. Amino acid composition of alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

Amino acid	Content(mg/g)
Aspartic acid	103.07
Threonine	47.84
Serine	108.12
Glutamic acid	115.47
Proline	13.53
Glycine	154.62
Alanine	82.63
Cystine	trace
Valine	56.76
Methionine	4.38
Isoleucine	37.29
Leucine	58.83
Tyrosine	24.39
Phenylalanine	27.81
Histidine	78.15
Lysine	55.74
Arginine	17.55

acid가 가장 많고 histidin 함량이 적은 것과 Katusumi 등¹⁰⁾이 분석한 alkaline protease에서 glycine과 alamine이 가장 많고 Cystine과 typtophane이 함유되어 있지 않다는 보고와 Malik 등²²⁾의 열안정성 protease의 아미노산 조성에서 glycine과 alanine이 가장 많고 tyrosine, cystine, proline이 없다고 한 것과 비교할 때 상당한 차이를 나타내고 있다.

요 약

Alkaline protease 생성능이 강한 *Aspergillus fumigatus*을 토양에서 분리동정하고, 효소생산조건을 구명한 결과 30°C에서 3일간 배양하였을 때 최고 활성을 나타냈으며 생산된 조효소를 황산암모늄염석, Sephadex G-25, G-75, G-150 gel filtration과 DEAE-Cellulose 컬럼 chromatography로 정제하여 수율 6.4%, 정제정도 86.13배의 효소를 얻었고 polyacrylamide gel 전기영동에 의해 단일밴드인 것을 확인하였다. 정제효소의 분자량은 63000 정도였으며, 17종의 아미노산으로 구성되어 있고, 그 중 glycine과 glutamic acid가 가장 많고 methionine과 cystine이 가장 적었다.

문 헌

1. 檜桓寅雄 : 酵素利用技術의 新展開, CMC Co., Tokyo(1985)
2. Gadbrey, T. and Reichett, J. : *Industrial Enzymology - The application of enzyme in industry -*, The nature Press Co.(1983)
3. Röhm, O. : GP 283923(1913)
4. Daisuke, T., Heizo, K., Takehiko, Y. and Juichiro, F. : Purification, Czystallization and some enzymatic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* Var. *amylosacchariticus*, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1261(1966)
5. 정동효, 이계호 : 고온 사상균의 효소에 관한 연구, *한국농화학회지*, **13**, 223(1970)
6. 林 和也, 寺田 勝, 茂木孝也 : Alkaline protease from *Aspergillus sojae*, *農化*, **45**, 310(1971)
7. 김상달, 서정훈 : *Monascus*속 균주가 생산하는 alkaline protease에 관한 연구, *한국농화학회지*, **15**, 1(1972)
8. Tohru, K., Akira, O., Susumu, I. and Masahiro, S. : Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 693(1985)
9. Koichi, K., Toshihiro, Y. and Kazuo, M., Purification and Characterization of Chymotrypsin-like proteinase from *Euphausia superba*, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1599(1985)
10. Katusümü, T., Tsutomu, A., Kazuyuki, S. and Tetsu, K. : Purification and some properties of alkaline proteinases from *Cephalosporium* sp. KM 388, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2959(1987)
11. 전문진, 심상국, 정동효 : 고정화 alkaline protease에 관한 연구, *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **6**, 33(1978)
12. Yasushi, M., Mikio, M. and Kazuo, K. : Enhancement of heat stability of alkaline protease by chemical modification, *日本農化學會誌*, **48**, 105(1974)
13. 鶴大典 : 科學と工業, 43(1969)
14. 京都大學 農學部 食品工學教室 : 食品工學實驗書, 養賢堂(1970)
15. Anson, M. L. : The estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *J. physio.*, **22**, 79(1938)
16. 萩原四郎 : 酵素研究法, vol II (朝昌書店, 東京), 1-7, 237(1956).
17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
18. Klaus Weber and Mary Osbron : The reliability of molecular weight determinations by Dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406(1969)
19. 장신재, 김윤숙, 성하진, 최용진, 양한철 : *Bacillus subtilis*가 생산하는 alkaline protease에 관한 연구, *한국농화학회지*, **31** 356(1988)
20. 정만재, 박남규 : 사상균의 단백질분해효소에 관한 연구, *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **7**, 157(1979)
21. Kazuo, S., Kyo, S. and Kin-ich, M. : Purification and some properties of secine protenase from a mutant of *Aspergillus niger*, *J. Ferment. Technol.*, **63**, 479(1985)
22. Malik, R. T. and Marthru D. K : Purification and characterization of a heat-stable protease from *Pseudomonas* sp. B-25, *J. Dairy Sci.*, **67**, 522(1984)
23. Davis, B. J. : Disc electrophoresis - II method and application to human serum proteins, *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404(1964)
24. 서향원 : 컬럼크로마토그래피에 의한 아스퍼질러스 계통의 α-아미라제 및 프로테아제의 결정화,

- KOR. JOUR. Microbiol.* **9**, 163(1971)
25. 정만재 : *Rhizopus japonicas*의 acid protease I 과 II의 특성에 관한 연구, *KOR. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **12**, 179(1984)
26. Andrws, P. ; Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex Gel filleration, *Biochem. J.*, **91**, 222(1964)

(Received August 10. 1989)