

## *Aspergillus fumigatus*이 생산하는 Alkaline protease의 특성과 작용양상

차원섭 · 최청

영남대학교 식품가공학과

### Characteristics and Action Pattern of Alkaline Protease produced from *Aspergillus fumigatus*

Woen-Suep Cha, Cheong Choi

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

#### Abstract

This experiment was conducted to investigate the characteristics of alkaline protease from *Aspergillus fumigatus* which was isolated from soil as a superior strain for the production of the alkaline protease. The optimum temperature for enzyme activity was 50°C and optimum pH was 9.0. The enzyme was stable at pH 8.0 to 10.0 and thermal inactivation was shown 50°C. The activity of the enzyme was increased by the addition of Mn<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, whereas it was inhibited by K<sup>+</sup>, Fe<sup>+++</sup>, Ag<sup>+</sup>, Pb<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Hg<sup>+</sup>, Zn<sup>++</sup>.

EDTA, 2,4-DNP, ε-amino caproic acid did not show inhibitory effect on the proteolytic activity of alkaline protease but P-chloromercuribenzoic acid inhibited the enzyme activity, indicating that reactive sulfhydryl group is required for the enzymatic activity.

The reaction of this enzyme followed typical Michael-Menten Kinetics with the Km value of  $8.33 \times 10^{-4}$  mole/l with the Vmax of 47.62 μg/min. This enzyme had stronger proteolytic activity than trypsin on substrate such as casin and hemoglobin.

#### 서 론

현재 전산업분야에 걸쳐 많이 이용되고 있는 단백질분해효소는 활성부위의 구조로부터 활성중심에 부착된 잔기에 따라 serine protease, cystein protease, metalloprotease, aspartic protease의 4가지로 구별되기도 하고<sup>1-2)</sup>, 작용 pH의 영역에 따라 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 대별되기도 한다. 아울러 효소생산을 위한 자원으로는 흔히 동물기원, 식물기원, 미생물기원 효소로 나눌 수 있는데, 이중 공업적으로 대량생산을 위해서는 미생물기원 효소가 가장 유리하므로 *Bacillus subtilis*<sup>3)</sup>, *Myriococcum* sp.<sup>4)</sup>, *Monascus*, sp., *Aspergillus*

*oryzae* S. H. W. 131<sup>9)</sup>, *Euphansia superba*, *A. niger*, *Bacillus subtilis* var *amylosacchariticus*, *Cephalosporium* sp. km 388<sup>10)</sup>, *Pseudomonas maltophilia*<sup>15)</sup> 등의 미생물을 이용한 alkaline protease의 생산 및 정제와 결정화를 실시하고 효소학적 특성을 연구한 보고가 있으나, 효소의 열저항성 또는 작용양상등의 특성에 관하여는 연구할 소지가 많이 남아 있다고 생각된다.

본 연구에서도 alkaline protease를 강하게 생성하여 공업적으로 이용될 수 있는 새로운 균주를 얻기 위하여 토양으로부터 분리한 *Aspergillus fumigatus*이 생산하는 alkaline protease의 몇가지 특성과 작용양상에 대하여 실험한 결과를 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주

Alkaline protease 생성능이 강한 *Aspergillus fumigatus*을 대구, 경북지방의 토양에서 분리, 동정하여 사용하였다.

배지 및 배양방법

균의 분리를 위한 배지는 potato-dextrose agar와 Czapek-dox agar를 사용하였으며, 효소생산을 위해서는 밀기울배지에 2% glucose를 첨가한 배지를 사용하여 30°C에서 3일간 배양하였다.

효소활성 측정

효소활성측정은 0.6% harmmarstern milk casein을 기질로 Anson-萩原변법에<sup>11,12)</sup> 따라 행하였고, 활성단위는 tyrosine 1μg을 1분동안 분해하는데

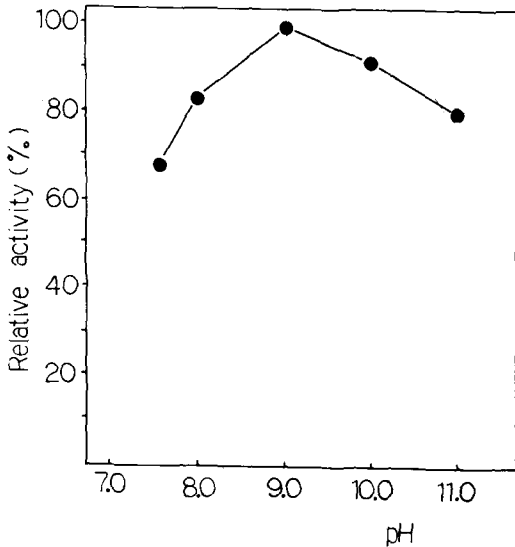


Fig. 1 Effect of pH on the activity of alkaline protease.

Enzyme activity were measured in the presence of milk casein as substrate in 0.2M phosphate buffer (pH 7.0-8.0), 0.2M boric-borax buffer(pH 9.0-11.0).

The maximum activity were expressed as 100%.

필요한 효소량을 1 unit로 하였다.

단백질 정량

Lowry등<sup>13)</sup>의 방법에 의해서 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 실시하였다.

저해제 영향<sup>14)</sup>

효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제 중 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), p-chloromercuribenzoic acid(PCMB), 2,4-dinitrophenol(DNP), ε-amino caproic acid를 선정하여 alkaline protease에 미치는 영향을 검토하였다.

결과 및 고찰

반응 최적 pH

pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.2M phosphate buffer(pH 7~8), 0.2M boric acid-borax buffer(pH 9~11)을 사용하여 pH를 7.0~11.0으로 조절한 다음 효소액 0.5ml에 같은 완

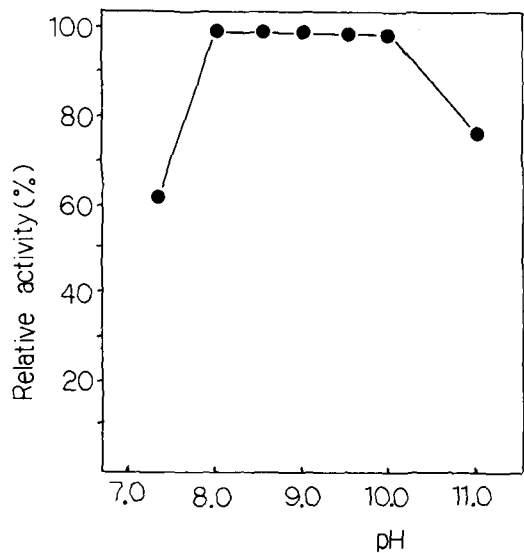


Fig. 2 pH stabilities of purified alkaline protease.

Enzyme activity were measured in the presence of milk casein as substrate in Clarc and Lub buffer(7.0-11.0). The maximum activity was expressed 100%.

충용액 1ml을 혼합한 후, 30°C에서 1시간 전처리 한 뒤 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같이 이 효소의 최적 pH는 9.0이었다. 이는 Katsumi등<sup>10)</sup>이 보고한 alkaline protease 최적pH 10~11, Daisuke등<sup>8)</sup>의 10.3~10.7, Tohru등<sup>15)</sup>의 10.5, 김등<sup>6)</sup>의 10~12, 장등<sup>3)</sup>의 12.0보다는 낮으나 Kazuo등<sup>7)</sup>의 7.0, Koichi등<sup>5)</sup>의 8.0보다는 높았고, 정등<sup>4)</sup>의 연구와는 같은 9.0인 것을 미루어 볼 때 균주에 따라 큰 차이가 있는 것으로 간주된다.

#### pH 안정성

효소의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 buffer(pH 7.0~11.0) 1ml에 효소액 0.5ml를 가하여 4°C에서 24시간 작용시킨뒤, 최적 pH 9.0으로 조절하고 잔존 활성을 조사한 결과 pH 8.0~11.0 범위 안에서 안정한 편이었다(Fig. 2).

이는 Katsumi등<sup>12)</sup>이 보고한 안정 pH 7.0이상, Daisuke등<sup>10)</sup>의 6~11범위, 김등<sup>6)</sup>의 5~11범위, 정등<sup>4)</sup>의 6~11범위 보다는 비교적 좁은 pH 안정성 범위를 가졌다고 간주되었다.

#### 온도의 영향

본 효소의 최적작용온도를 알기 위하여 30~70°C로 효소반응온도를 변화시키면서 활성을 측정할 결과 50°C에서 최대의 활성을 나타내었다(Fig. 3). 이는 장등<sup>3)</sup>의 최적온도 70°C, Daisuke 등<sup>8)</sup>의 55°C라는 보고보다는 낮으나, Katsumi등<sup>10)</sup>의 45°C, Koichi등<sup>5)</sup>의 45°C라는 보고보다는 높다. 일반적인 protease 최적반응온도가 45°C라는 사실<sup>4)</sup>과도 비슷한 결과를 보인 것으로 간주된다.

#### 열에 대한 안정성

Alkaline protease의 열안정성을 조사하기 위하여 30, 40, 50, 60°C에서 10~60분간 반응시킨 결과 Fig. 4와 같이 30°C와 40°C에서는 활성감소가 없었으나 50°C에서는 20분후부터 60°C에서는 10분후부터 급격하게 활성이 저하되었다. 따라서 본 효소는 50°C 이상의 열에 대해 불안정한 효소임을 알 수 있었다. 장등<sup>3)</sup>이 보고한 alkaline protease는 50°C이하에서 안정하다고 한 것과 정등<sup>4)</sup>의 50°C~40°C와는 비슷한 결과이고, 김등<sup>6)</sup>의 40°C이하, Koichi등<sup>5)</sup>의 45°C이하, Kazuo등<sup>7)</sup>의 40°C이하라는 보고보다는 높

았다.

#### 금속이온의 영향

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 pH 9.0으로 조절한 증류수에 각종 금속염을  $2 \times 10^{-3}M$  되게 용해시키고, 금속이온용액과 효소액을 같은량 혼합하여 30°C에서 5시간 방치한 다음 효소활성을 조사한 결과  $Mn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ,  $Mg^{++}$  등에 의해서는 효소 활성이 다소 증대 되었으나,  $K^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $Ag^{+}$ ,  $Pb^{++}$ ,  $Na^{+}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Hg^{++}$ ,  $Zn^{++}$

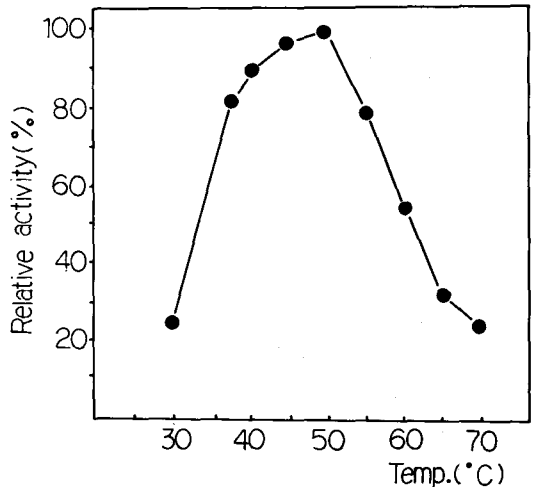


Fig. 3 Effects of temperature on the activity of alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*. The maximum activity was expressed as 100%.

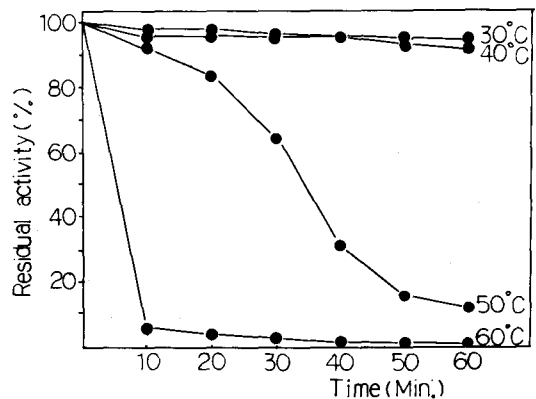


Fig. 4 Effects of temperature on the enzyme stability.

<sup>+</sup> 등에 의해서는 활성이 저해를 받았고, 특히 Zn<sup>++</sup>에 의해 1/3수준으로 저해되었다(Table 1).

김등<sup>6)</sup>과 Daisuke등<sup>8)</sup>, Katsumi등<sup>10)</sup>, 장등<sup>3)</sup>이 보고한 alkaline protease가 Hg<sup>++</sup>에 의해 강한 저해 작용을 받는다고 한 것과는 약간의 차이를 보이고, Tohrn등<sup>15)</sup>과 Kazuo등<sup>7)</sup>이 Ca<sup>++</sup>에 의해서 활성이 증대 또는 보호된다는 보고와는 반대의 결과를 나타냈다.

활성저해제의 영향

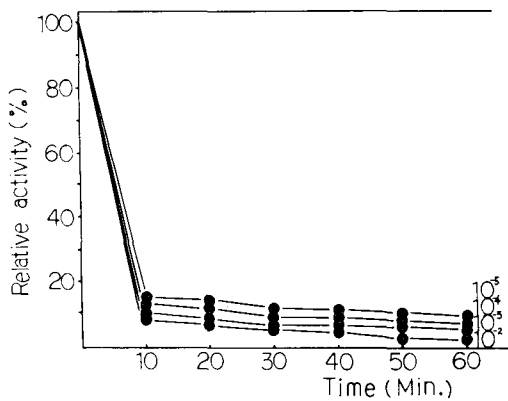


Fig. 5 Effects of ethylenediaminetetraacetic acid on the activity of purified alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

EDTA의 영향

금속과 결합하여 chelate를 형성하는 EDTA의 영향을 알아보기 위해서 pH 5.0 증류수에 EDTA를  $2 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-5} M$ 의 농도로 용해시키고 효소액과 동량 혼합하여 30°C에서 10~60분간 전처리 시킨 후 효소활성을 측정 한 결과는 Fig. 5와 같이 시간이 경과 할수록, 농도가 진할수록 활성의 저해가 보이긴 하였지만 결정적인 저해현상은 나타내지 않는 사실로 보아 본 효소가 metalloenzyme<sup>2,14)</sup>은 아닌 것으로 간주된다.

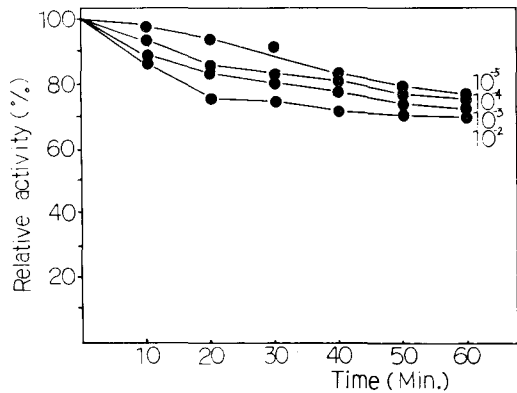


Fig. 6 Effects of p-chloromercuribenzoic acid on the alkaline protease activity from *Aspergillus fumigatus*

Table 1. Effects of metal ions on the alkaline protease activity from *Aspergillus fumigatus*

Ion	Metal	Relative activity(%)
Mn <sup>++</sup>	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	133.14
Cu <sup>++</sup>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	122.55
Ba <sup>++</sup>	BaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	115.12
Mg <sup>++</sup>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	112.82
K <sup>+</sup>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	96.67
Fe <sup>+++</sup>	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	96.08
Ag <sup>+</sup>	AgNO <sub>3</sub>	88.63
Pb <sup>++</sup>	Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	83.14
Na <sup>+</sup>	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	80.39
Ca <sup>++</sup>	CaCO <sub>3</sub>	72.16
Hg <sup>++</sup>	HgCl <sub>2</sub>	63.73
Zn <sup>++</sup>	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	35.88
	None	100.0

**PCMB의 영향**

일반적으로 효소분자의 SH기 저해제인 PCMB을 에탄올 98ml에 10%NaOH 2ml를 가한 EtOH-NaOH용액에  $2 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-5}$ M되게 용해시키고, 동량의 효소액을 혼합한 다음 10~60분간 전처리 하여 효소활성을 측정한 결과 Fig. 6에서와 같이 모든 농도에서 처음부터 큰 활성저해를 나타내는 사실로 보아 본효소의 활성부위가 SH기로 되어 있다고 사료된다.

**DNP의 영향**

효소분자의 말단 아미노기와 친화력이 강하여 말단 아미노산부위가 활성부위인 경우 효소활성을 저해하는 2,4-DNP를 0.2M boric acid-borax buffer (pH 9.0)에  $2 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-5}$ M로 용해 시키고, 동량의 효소액과 혼합하여 30°C에서 10~60분 전처리후 활성을 측정한 결과, 농도가 진한 경우에는 다소 저해는 있었으나 현저한 저해가 나타나지 않았다. (Fig. 7)

**(ε-amino caproic acid)의 영향**

일반적으로 protease의 경쟁적 저해제로써 특히 plasmin 및 carboxy peptidase B에 강하게 작용하는 ε-amino caproic acid를 pH 5.0증류수에  $2 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-3}$ M 되게 용해시키고 같은량의 효소액과 혼합하여 30°C에서 10~60분간 전처리 한후 활성을 조사한 결과 현저한 저해현상을 보이지 않았다(Fig. 8).

**효소반응 속도론**

Alkaline protease의 기질에 대한 친화력을 조사하기 위하여 기질의 농도를  $1.7 \times 10^{-4} \sim 2.5 \times 10^{-3}$ M로 변화시키면서 Lineweaver-Burk plot로 Km치와 Vmax를 측정한 결과 Km치는  $8.33 \times 10^{-4}$  mol/l, Vmax는 47.62μg/min였다.

**기질에 대한 특이성**

정제된 효소의 기질 특이성을 알아보기 위하여 알칼리성 소화효소인 trypsin을 대조로 하여 비교하였다. 기질용액은 0.6% casein과 0.6% hemoglobin을 사용하여 10~60분동안 반응시킨 후 활성을 측정하여 각기질의 분해정도를 조사한 결과 Fig. 10, 11과 같이 본 효소가 trypsin보다 casein과 hemog-

bin을 더 잘 분해했고, hemoglobin보다 casein을 더 잘 분해하였다.

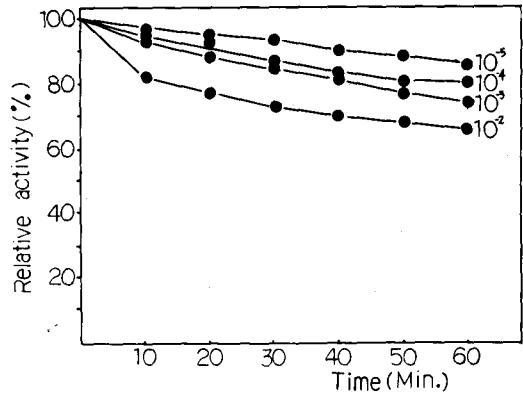


Fig. 7 Effects of 2,4-dinitrophenol on the activity of purified alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

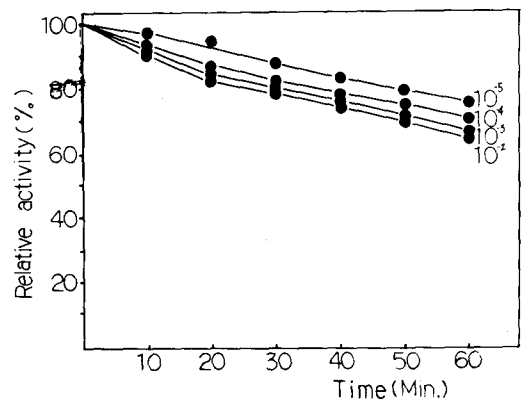


Fig. 8 Effects of ε-amino caproic acid on the activity of purified alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

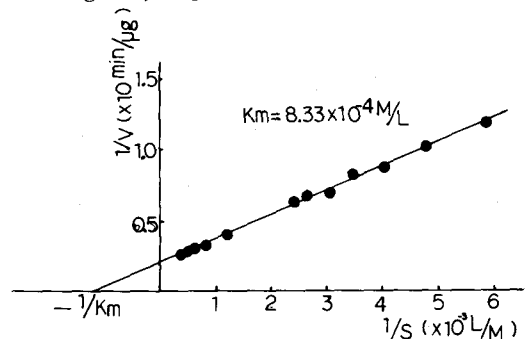


Fig. 9 Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of casein by the purified alkaline protease.

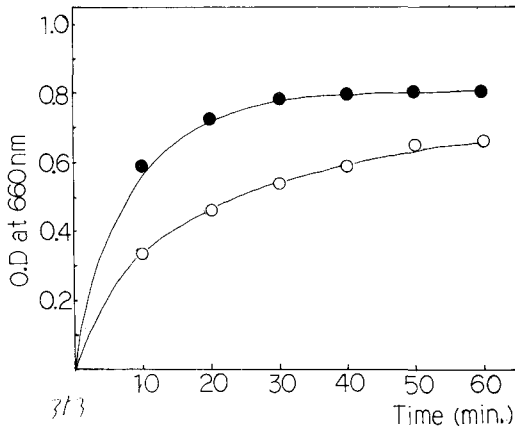


Fig. 10 Effect of decomposition on casein by alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

●—● : Alkaline protease  
○- - -○ : Trypsin

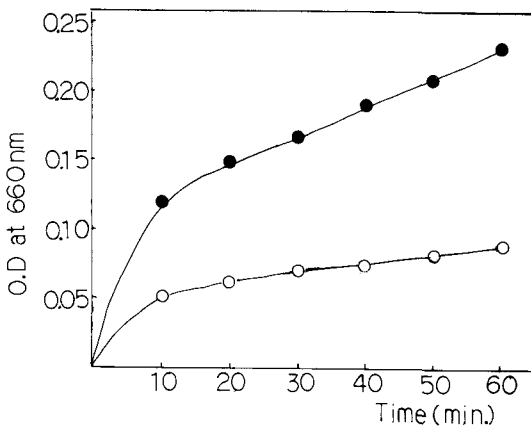


Fig. 11 Effect of decomposition on hemoglobin by alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*

●—● : Alkaline protease  
○- - -○ : Trypsin

요약

Alkaline protease 생성능이 강한 *Aspergillus fumigatus* 균주를 토양에서 분리하고, 생성효소를 정제하여 특성을 조사한 결과 최적 pH는 9.0, pH안정성은 pH 8.0~10.0, 최적온도는 50°C였으며, 50

°C이하의 온도에서는 안정하나 그 이상의 온도에서는 급격한 효소 불활성화를 보였고, 금속염  $Mn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ,  $Mg^{++}$  등에 의해서 활성이 다소 증대되나,  $K^+$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $Ag^+$ ,  $Pb^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Hg^+$ ,  $Zn^{++}$ 에 의해 저해를 받았다. 활성저해제인 EDTA, 2,4-DNP,  $\epsilon$ -amino caproic acid에는 큰 저해를 받지 않으나, PCMB에 많은 저해를 받는 것으로 미루어 활성 부위가 SH기인 cystein protease로 추정되었다. Km값은  $8.33 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ , Vmax는  $47.62 \mu\text{g/min}$ 였으며, casein과 hemoglobin을 trypsin보다 더 잘 분해하고, casein을 hemoglobin보다 잘 분해하였다.

문헌

1. 정만재 : *Rhizopus japonicas*에 의한 Acid protease의 생산과 정제에 관한 연구, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 12, 45(1984)
2. Barredt, A. J. and Salverserr, G. : *Protease inhibitors*, Elsevier co., New York(1986)
3. 장신재, 김윤숙, 성하진, 최용진, 양한철 : *Bacillus subtilis*가 생산하는 Alkaline protease에 관한 연구, *한국농화학회지*, 31, 356(1988)
4. 정동효, 이계호 : 고온성 사상균의 효소에 관한 연구, *한국농화학회지*, 13, 223(1970)
5. Koichi, K., Toshihiro, Y. and Kazuo, M : Purification and characterization of Chymotrypsin-like protease from *Euphausia superba*, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1599(1985)
6. 김상달, 서정훈 : *Monascus*속 균주가 생성하는 alkaline protease에 관한 연구, *한국농화학회지*, 15, 1, (1972)
7. Kazuo, S., Kyo, S. and Kinichi, M. : Purification and some properties of serine proteinase from a mutant of *Aspergillus niger*, *J. Ferment. Technol.*, 63, 479(1985)
8. Daisuke, T., Heizo, K., Takehiko, Y. and Junichiro, F. : Purification, crystallization and some enzymatic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*, *Agr. Biol. Chem.*, 40, 1261(1966)
9. 서항원 : 컬럼크로마토그래피에 의한 아스퍼질러스 계통의  $\alpha$ -아미라제 및 프로테아제의 결정화, *Kor. Jour. MicroBiol.*, 9, 163(1971)
10. Katsumi, T., Tsutomu, A., Kazuyuki, S. and Tetsu, K. : Purification and some properties of alkaline proteinases from *Cephalosporium* sp. KM 388, Ag-

- ric. Biol. Chem.*, 51, 2959(1987)
11. Anson, M. L. : The estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *J. physio.*, 22, 79(1938)
  12. 萩原四郎 : 酵素研究法, Vol II (朝昌書店, 東京), 1-7, 237(1956)
  13. 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)
  14. 김상열 : 내산성 protease에 관한 연구, *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 1, 2, (1973)
  15. Tohru, K., Akira, O., Susumi, I. and Masahiro, S. : Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 693(1985)

(Received August 10. 1989)