

Aspergillus sp. CC-29가 생성하는 Alkaline Protease의 정제 및 특성

최 청 · 김두기 · 조영제 · 성태수*

영남대학교 식품가공학과

*창원전문대학 식품영양과

Purification and Biological Characteristic of Alkaline Protease from *Aspergillus* sp. CC-29

Cheong Choi, Doo-Ki Kim, Young-Je Cho and Tae-Soo Sung*

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan, 713-749, Korea.

*Dept. of Food and Nutrition, Chang won Junior College, Chang won, 641-210, Korea.

Abstract

Aspergillus sp. CC-29. was selected for its strong protease activity among various strains of molds found in soil. It was found that the production of alkaline protease reached to maximum when the wheat bran medium containing glucose as carbon source had been cultured for 4 days. Alkaline protease was purified 36.10 fold from *Aspergillus* sp. CC-29.

The purification procedures included ammonium sulfate fractionation, gel filtration on Sephadex, G-75, G-150 and DEAE-cellulose ion-exchange chromatography. The yield of the purified enzyme was 22.40%. The purified enzyme was confirmed as a single band by the polyacrylamide. When the purified enzyme was applied to SDS-PAGE, the molecular weight was estimated 24000. The optimum pH for the enzyme activity was 9.0 and the optimum temperature was 40°C. The reaction of this enzyme followed typical Michaelis-Menten kinetics with the Km value of 2.10×10^{-4} M, with the Vmax of 29.41 μ g/min.

The enzyme was reactively stable in alkalic condition and unstable by heat treatment. The activity of alkaline protease was increased by the addition of Ca^{2+} whereas it was inhibited by Hg^{2+} , Zn^{2+} at concentration of 1×10^{-3} M.

서 론

Protease는 Pechman¹⁾과 Crewth²⁾이 최초로 *Aspergillus*속에서 분리한 이후 Kageyma³⁾와 Nunokawa⁴⁾는 protease의 작용하는 pH에 따라 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 구분하였다. 또한 protease는 그 활성과 기능면에서 활성부위의 구조로 부터 serine protease, cysteine protease, metallo protease, aspartic protease의 4

군으로 대별한다^{5,6)}. 단백질 분해효소에 관해서는 많은 연구가 이루어져 왔으며, 이들 연구결과 식품공업이나 의학적 용도가 새로 개발됨으로써 종전까지는 주로 동식물이나 세균 및 사상균을 효소생산으로 하던것이 근래에는 방선균등으로부터도 많은 종류의 효소를 얻고 있다. 이러한 미생물로부터 얻어지는 protease중 특히 알칼리성이고 anion계면활성제에 강한 protease가 개발되어, 효소제제로서 시판되기 시작하면서 생산

량이 급증하여 현재 단일 효소로서는 세계 최대의 생산량을 기록하고 있다⁷⁾.

대부분의 효소들은 산성이나 중성의 온화한 조건하에서 활성을 나타내는 것이 보통이며, 극히 제한되어 있는 상태에 있다⁸⁾. 그러나 Horikoshi⁸⁾ 등은 알칼리 영역에서 활성을 갖는 일련의 효소에 대한 연구를 진행한바 있으며, 현재까지 alkaline protease는 *Pseudomonas*⁹⁾속, *Myriococcum*속¹¹⁾등 여러종류의 미생물을 이용하여 연구가 진행되어져 온 바 있다.

본 연구에서는 공업적으로 광범위하게 이용되고 있으며, 알칼리영역에서 최적의 활성을 갖는 alkaline protease 생성능이 강한 균주를 개발할 목적으로 토양으로부터 효소생성능이 강한 *Aspergillus* sp. CC-29 균주를 분리하여 이 균주가 분비하는 효소의 정제 및 그 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

균의 분리

대구와 경북지역의 토양과 부식토를 균원시료로 하여 상법¹²⁾에 따라 순수분리하고 분리된 균주의 효소 활성을 측정하여 활성이 강한 4 균주를 1차 선별하고 2차 효소 생성능 실험에서 가장 우수한 1 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 Czapek-Dox-agar에 1개월에 1회씩 계대배양하여 냉장 보관하였다.

배지 및 배양방법

균의 순수분리를 위한 배지는 potato dextrose agar와 Czapek-Dox agar를 사용하였으며 효소생산을 위하여 2% 포도당을 가한 밀기울 배지에 공시균의 균사체 및 포자를 5백금이 접종하여 30°C에서 4일간 배양하였다¹³⁾.

조효소액의 조제

배양된 밀기울 배지에 8배의 0.2M boric acid-borax buffer(pH 9.0)를 가하여 균질화한 후 4°C에서 24시간 동안 교반하여 효소를 추출하고 4000×g로 30분간 원심분리한 후 상등액을 모아 여과하여

조효소액으로 사용하였다.

단백질의 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry등의 방법¹⁴⁾에 의하여 측정하였으며, 단백질값은 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

효소 활성 측정

효소 활성 측정은 Anson-菑源법^{15,16)}에 의하여 실시하였으며, 효소활성은 효소액 1ml가 1분간 1μg의 tyrosine을 생성하는 것을 1unit로 정하였다.

Alkaline protease의 정제

Alkaline protease의 정제는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 조효소액을 황산암모늄으로 염석한 후 저온실에서 Sephadex G-75, G-150 column등을 사용하여 gel filtration하고 활성부위만을 농축한 후 동일 buffer로 DEAE-cellulose에 의한 이온교환크로마토그래피로 정제하였다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

전기영동은 Davis법¹⁷⁾에 의해 7.5% polyacrylamide gel로써 tube당 3 mA로 실온에서 약 4시간 동안 수행하였다. 전기영동후 gel은 1% amido black 10-B로써 염색하였고, 7% acetic acid로 탈색하였다.

분자량 측정

분자량 측정은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide 전기영동으로 Weber와 Osborn의 방법¹⁸⁾에 따라 실시하였으며, 전기후 Rm치에 따라 표준곡선을 이용하여 분자량을 측정하였다. 이때 표준품으로는 bovine serum albumin(66000), egg albumin(45000), pepsin(34700), trypsinogen(24000), β-lactoglobulin(18400), lysozyme(14300) (Sigma Co.)을 사용하였다.

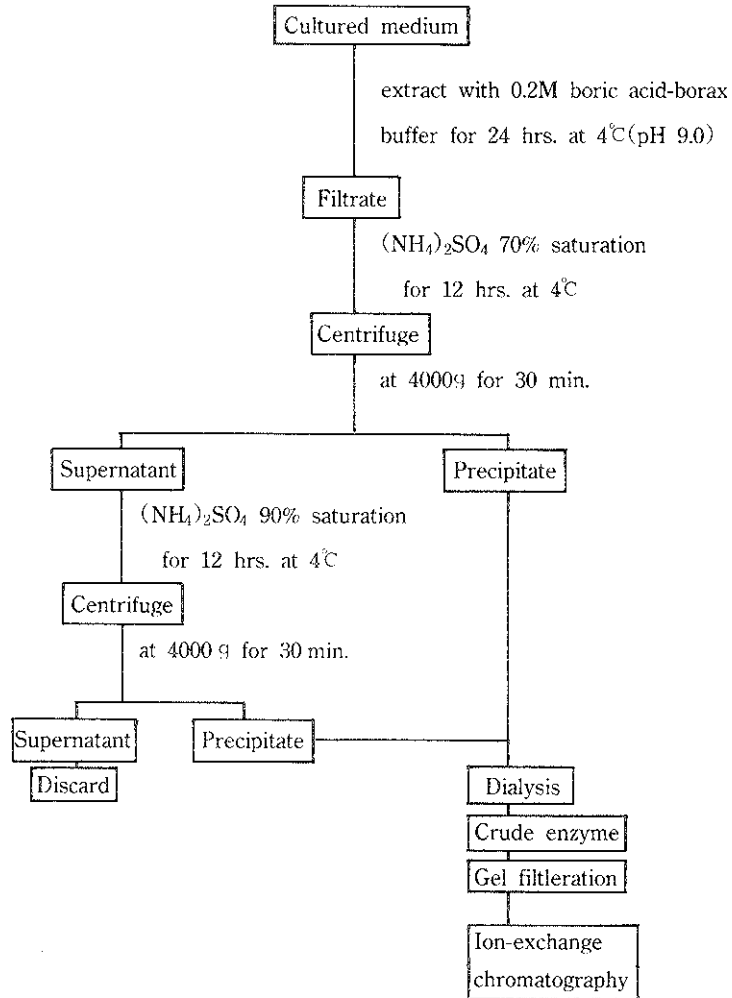


Fig. 1. Purification procedure of alkaline protease from culture medium of *Aspergillus* sp. CC-29.

결과 및 고찰

Alkaline protease 생성 균주의 분리 및 동정

대구와 경북지역 약 250개소에서 채취한 토양으로부터 분리한 120균주를 대상으로 단백질 분해력이 강한 1 균주를 분리, 선정한 후 Koneman 등¹⁹⁾의 방법에 따라 Czapek-Dox-agar에 slide culture하여 그 성상을 관찰한 결과 *Aspergillus* 속으로 동정되었다.

배양시간에 따른 alkaline protease의 생성

Aspergillus sp. CC-29의 균주에 의한 alkaline protease의 생성은 수분이 60% 함유된 밀기울 배지를 사용하여 40°C에서 배양시간별로 측정한 결과 Fig. 2와 같이 배양시작 후 4일 지났을 때 효소활성이 최대에 달했으며 그 이후 활성이 서서히 감소하였다.

이는 차등²⁰⁾이 *A. fumigatus*의 alkaline protease 최적배양시간이 3일 이라는 보고와는 다소 차이가 있으나 *P. maltophilia*가 약 4일 배양시 활성이

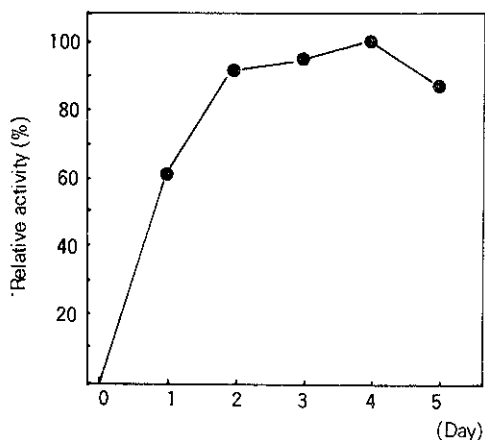


Fig. 2. Production of alkaline protease from the culture time.

최대에 이른다는 Kobayashi등⁹⁾의 보고와는 유사하였다.

Alkaline protease의 정제

배양된 밀기울 배지에 8배의 0.2M boric acid-borax buffer(pH 9.0)을 가하여 균질화 시켜준 뒤 4°C에서 24시간동안 교반하여 효소를 추출하고 여과한 후 4000×g에서 30분간 원심분리하고 그 상등액에 황산암모늄을 70% 포화되게 가하여 효소 단백질을 응집, 침전시켰으며, 이 침전물들은 원심분리시켜 회수하고 그 상등액에 다시 황산암모늄을 90% 포화되게 가하여 잔존 효소 단백질을 침전시켰다. 이 침전물들을 모아 4°C에서 0.2 M boric acid-borax buffer(pH 9.0)에 대하여 투석하였으며, 투석한 효소액은 잔존염을 제거하기 위하여 Sephadex G-25에 통과 시켜준 후 농축하였다.

DEAE-cellulose column chromatography

50ml로 농축한 효소액 25ml를 DEAE-cellulose column(3×50cm)에 충전시킨 후 약 1.5배의 0.2M boric acid-borax buffer(pH 9.0)로 비활성 단백질을 씻어낸 다음 흡착된 단백질을 0~1.0M NaCl의 linear salt gradient로 용출하였다(Fig. 3).

이때의 유속은 0.8ml/min이었고 10ml씩 분획하

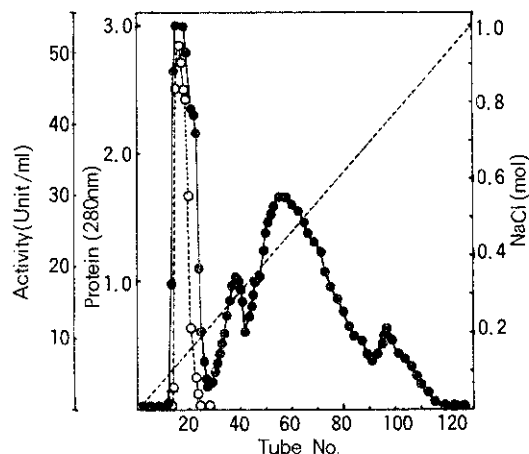


Fig. 3. DEAE-cellulose column chromatography of alkaline protease. (● : protein, ○ : activity)

였으며, 활성분획은 모아서 농축하였다. DEAE-cellulose column chromatography한 결과 약 0.13M NaCl정도에서 활성단백질이 용출되었다.

Sephadex G-75 gel filtration

40ml로 농축한 효소액 20ml를 Sephadex G-75 column(2×70cm)에 충전시킨 후 0.19ml/min의 유속으로 3ml씩 분획하였으며(Fig. 4) 활성분획은

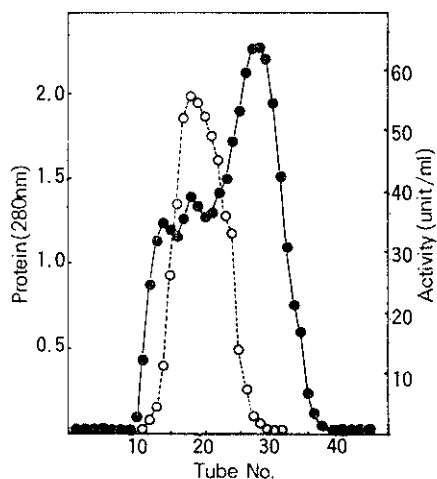


Fig. 4. Gel filtration of alkaline protease by the Sephadex G-75. (● : protein, ○ : activity)

모아서 농축하였다.

Sephadex G-75로 gel filtration한 결과 3개의 fraction으로 나타났으나 각 fraction은 완전히 분리되지 않았다.

Sephadex G-150 gel filtration

농축한 효소액을 Sephadex G-150 column(2×90 cm)에 충전시킨 후 0.12ml/min의 유속으로 3ml씩 분획한 결과 활성분획이 완전히 분리되었다(Fig. 5). 분리된 활성분획은 모아서 농축한 뒤 동결 건조하였다. 차등¹³⁾은 *A. famigatus*의 alkaline protease를 82.13배 정제하였으며, 장등²¹⁾은 *B. subtilis*의 alkaline protease를 9.2배 정제하였고,

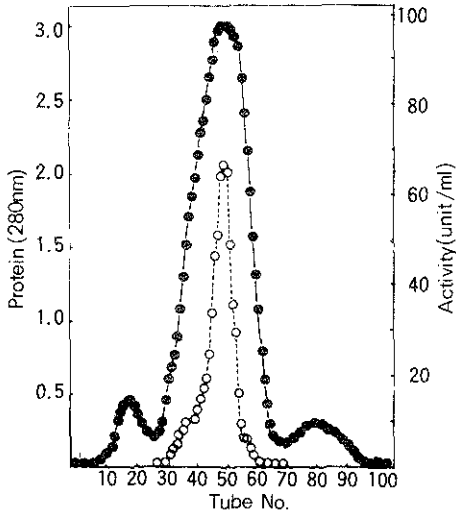


Fig. 5. Gel filtration of alkaline protease by the Sephadex G-150.

(●—● : protein, ○-----○ : activity)

Kobayashi와 Akira등⁹⁾은 *P. maltophilia*의 alkaline protease를 74배 정제하였으나 본 균주가 분비하는 alkaline protease는 36.10배 정제되었다(Table 1)

Polyacryl amide gel electrophoresis

정제된 효소단백질을 Davis법¹⁷⁾에 따라 polyacrylamide gel로써 Disc gel electrophoresis를 행하여 본 결과 Fig. 6에서와 같이 단일 band로 나타났다.

SDS-PAGE에 의한 분자량 측정

Weber와 Osborn의 방법¹⁸⁾에 따라서 SDS-polyacrylamide전기영동에 의한 분자량 측정 결과는 Fig. 7에서 나타난 바와 같이 24,000정도로 측정되었다.

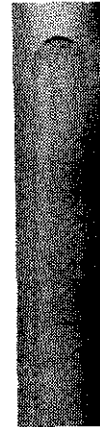


Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified alkaline protease from *Aspergillus sp.* CC-29.

Table 1. Purification of alkaline protease from *Aspergillus sp.* CC-29

	Total volume (ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude						
Enzyme solution	2310	8349	8250	1.01	1	100
Ammonium sulfate	270	7101	1512	4.70	4.65	85.05
Sephadex G-25	870	6003	1070.1	5.61	5.56	71.90
DEAE-cellulose	765	5737.5	397.8	14.42	14.28	68.72
Sephadex G-75	268	2921	126	23.18	22.95	34.99
Sephadex G-150	87	1870.5	51.3	36.46	36.10	22.40

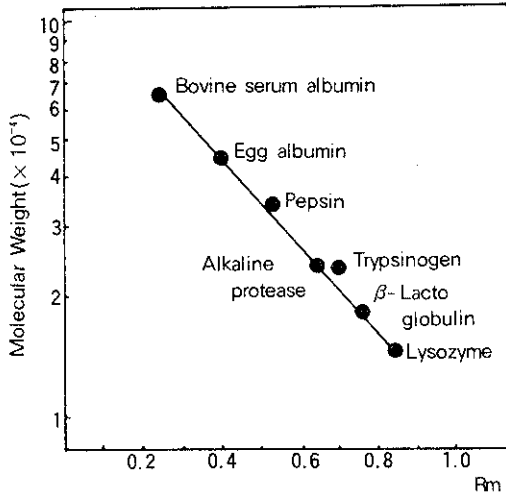


Fig. 7. The calibration curve for the determination of molecular weight of alkaline protease by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

이와같은 결과는 Tsuchiya등¹¹⁾이 *Cephalosporium* sp.의 alkaline protease의 분자량이 24000이라고 보고한 것과 Kobayashi와 Akira등⁹⁾이 *P. maltophilia*의 alkaline protease가 19000과 27000의 subunit를 가진다는 보고와 유사하였다.

Alkaline protease의 성질

* pH에 의한 영향

pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.2M phosphate buffer(pH 7~8) boric acid-borax buffer(pH 9~11)용액 1ml에 0.5ml의

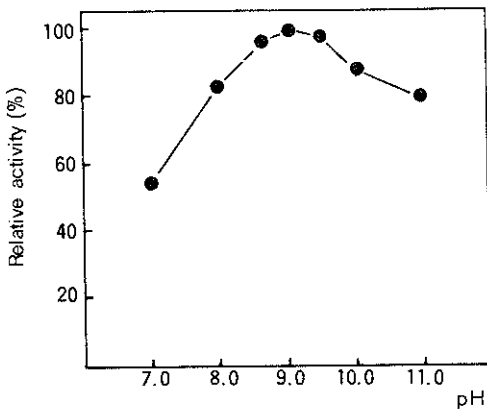


Fig. 8. Effect of pH on the enzyme activity.

효소용액을 가하고 30°C에서 1시간 전처리한 후 효소활성을 측정한 결과 Fig. 8에서 나타난 바와 같이 효소의 최적 pH는 9.0이었다.

이 결과는 장등²¹⁾과 Tsuchiya등¹¹⁾이 *B. subtilis*와 *Cephalosporium* 속의 alkaline protease는 최적범위가 pH 11~12까지의 비교적 강 알칼리라고 보고한 것과는 다소 다르지만 차등²⁰⁾이 *A. fumigatus*의 alkaline protease의 최적 pH가 9.0이라고 보고한 결과와는 유사하였다.

* pH 안정성

효소의 pH에 대한 안정성을 조사해 보기 위하여 Clark and Lubs buffer(pH 7.0~11.0) 1ml에 효소액 0.5ml를 가하고 30°C에서 1시간동안 작용시킨 뒤 pH 9.0으로 조절하고 잔존활성을 조사한 결과는 Fig. 9과 같다. *Aspergillus* sp. CC-29가 생산하는 alkaline protease는 그 안정범위가 pH 8.0~10.0까지로 약 알칼리에서 비교적 안정한 편이었다.

정등²²⁾, Tsuru등¹⁰⁾, Fukasawa²³⁾등 Toshihiro²⁵⁾는 *Myriococcum*속, *B. subtilis*, *V. harvovi*, *Streptomyces*속의 alkaline protease 안정범위가 pH 6~11까지라고 하였으나 본 균주가 생산하는 효소는 그 보다 안정범위가 좁았다.

* 온도의 영향

효소활성에 미치는 온도의 영향을 규명하기 위하여 효소반응 온도를 35~70°C까지 변화시키면서 활성을 측정한 결과는 Fig. 10과 같으며 40

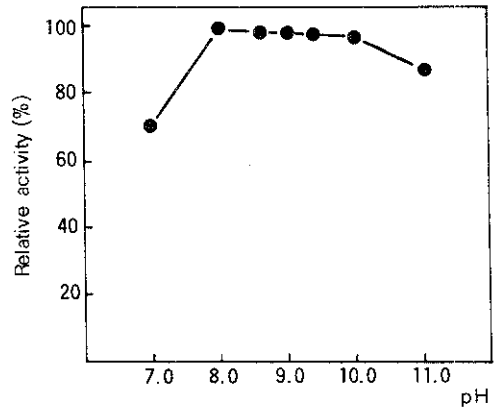


Fig. 9. Effect of pH on the enzyme stability.

℃에서 반응시켰을 때 그 상대활성이 가장 높게 나타났다. 정등²²⁾, Tsuru등¹⁰⁾, Kobayashi등⁹⁾은 *Myriococcum*속, *B. subtilis*, *P. maltophilia*의 alkaline protease는 최적반응 온도가 55℃라고 보고하였고, Koichi등²⁴⁾, Tsuchiya등¹¹⁾은 *E. superba*와 *Cephalosporium*속의 alkaline protease의 최적온도가 45℃이라고 보고하였으며, 차등²⁰⁾이 *A. fumigatus*의 alkaline protease의 최적온도가 50℃라고 보고한 것과는 달리 본 효소는 40℃에서 최대 효소활성을 나타내었다.

* 열안정성

Alkaline protease의 열안정성을 조사하기 위하여 30, 40, 50, 60℃에서 10~60분간 반응시킨 결과 Fig. 11에서와 같이 30℃에서는 활성감소가 거의

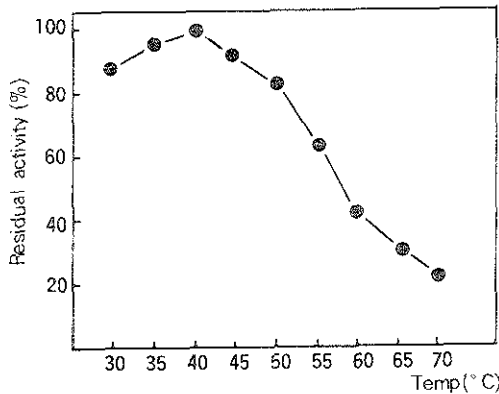


Fig. 10. Effect of temperature on the enzyme activity.

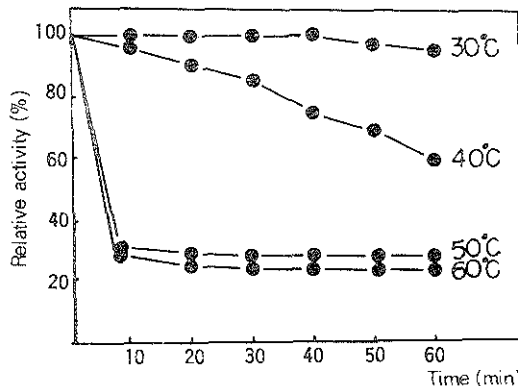


Fig. 11. Effect of temperature on the enzyme stability.

없었으나 40℃에서 60분 반응시 약 40%가량의 활성감소가 발생하였으며, 50, 60℃에서 반응시켰을 때는 10분 반응시부터 약 25%까지 감소하였다.

이와같은 결과는 Tsuchiya등¹¹⁾, Tsuru등¹⁰⁾, Charles등²⁶⁾이 *Cephalosporium*속, *B. subtilis*, *S. marcescens*등이 분비하는 효소가 50~60℃에서 거의 실향한다고 보고한 것과 유사하였으나, 차등²⁰⁾의 *A. fumigatus*의 alkaline protease보다는 다소 열안정성이 떨어지는 것으로 생각되었다.

* 금속이온의 영향

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검사하기 위하여 pH 9.0으로 맞춘 증류수에 각종 금속이온들을 $2 \times 10^{-3}M$ 되게 제조하여 금속이온용액 0.5ml에 효소액 0.5ml를 넣어 교반하고 30℃에서

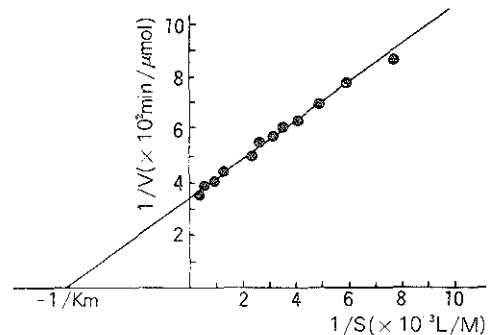


Fig. 12. Line Weaver-Burk plot for the hydrolysis of casein by the purified enzyme from *Aspergillus sp.* CC-29.

Table 2. Effect of metal ion(final conc. $10^{-3}M$)

Ion	Metal	Relative activity(%)
Cu^{++}	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	116.30
Mn^{++}	$MnSO_4 \cdot H_2O$	102.09
Mg^{++}	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	99.30
Fe^{++}	$FeSO_4$	94.57
Pb^{++}	$Pb(CH_3COO)_2$	93.04
Ca^{++}	$CaCO_3$	92.13
Ba^{++}	$BaCl_2 \cdot 2H_2O$	87.81
Hg^{++}	$HgCl_2$	72.42
Zn^{++}	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	68.11
---	NONE	100.00

1시간 방치한 뒤 효소활성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 본 효소는 Cu^{2+} 에 의해서는 활성이 다소 촉진되며 Hg^{2+} , Zn^{2+} 등에 의해서 30~40% 가량 저해되었다.

이는 Tsuchiya 등¹¹⁾과 Tsuru 등¹⁰⁾이 *Cephalosporium* 속과 *B. subtilis*가 분비하는 효소가 Ca^{2+} , Mg^{2+} 등에는 비교적 안정하며 Zn^{2+} 에 의하여 약 50% 가량 저해된다는 보고와 유사하였다.

효소반응 속도론

Alkaline protease의 기질에 대한 친화력을 조사하기 위하여 Line Weaver-Burk plot로 Km치와 Vmax를 측정 한 결과는 Fig. 12와 같이 Km치는 대략 2.10×10^{-4} M/L였고, Vmax는 29.41 μ g/min 정도였으며, 차등²⁰⁾의 *A. fumigatus*의 alkaline protease보다 기질친화력이 낮은 것으로 판단되었다.

요 약

토양에서 분리한 *Aspergillus sp.* CC-29가 생산하는 alkaline protease를 Sephadex G-75, G-150과 DEAE-cellulose를 사용하여 36.10배 정제할 수 있었고, 최대효소활성을 위한 pH는 9.0, 최적온도는 40°C였다. 정제된 alkaline protease를 SDS-PAGE로 단일 단백질임을 확인하였고, 그 분자량은 24000으로 추정되었다. 이 효소의 Km값은 2.10×10^{-4} M/L, Vmax값은 29.41 μ g/min이었고, 약 알칼리의 pH에서 안정성을 보였으며, 온도에 의한 안정성은 30°C였고, 50°C 이상에서는 급격한 효소단백질의 불활성화가 진행되었다. 금속이온 중 Cu^{2+} 이 활성을 촉진시켰으며, Hg^{2+} , Zn^{2+} 등은 효소활성을 저해하였다.

문 헌

1. Dechman, E. V. : *Aspergillus* proteinase., *Biochem.*, 2, 321(1951)
2. Crewther, W. C. : The effect of pH and cations on the thermal denaturation of trypsin, *Aus. J. Biol. Sci.*, 6, 597(1953)
3. Kageyama, K. : Studies on *Aspergillus oryzae* strains for sake brewing. *J. Ferment. Technol.*, 33, 53(1955)
4. Nunokawa, Y., Namba, Y. and Watanabe, S. : A study of the rice *Koji* protease, *J. Soc. Brew.*, 56, 930(1961)
5. Chung, M. J. : Studies on the production of acid protease by *Rhizopus japonicus* and purification of the enzyme, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 12, 45(1984)
6. Masaaki, Y. S., Kazuo and Mitsuo, M. : Purification and properties of acid protease from *Monascus sp.*, No. 3405. *Agr. Biol. Chem.*, 48, 1637(1984)
7. 鶴大典 : 科學と工業, 43(1969)
8. Horikoshi, K. : Production of alkaline enzymes by alkaliphilic microorganism, *Agr. Biol. Chem.*, 35(9), 1407(1971)
9. Kobayashi, K., Toshihiro, Y. and Kazuo, M. : Purification and characterization of chymotrypsin-like proteinase from *Euphausia superba*, *Agr. Biol. Chem.*, 49, 1599(1985)
10. Tsuru, D., Heizo, K., Takehiko, Y. and Juichiro, F. : Studies on bacterid protease, *Agr. Biol. Chem.*, 30(12), 1261(1966)
11. Tsuchiya, K., Tsutomu, A., Kazuyuki, S. and Tetsu, K. : Purification and some properties of alkaline protease from *Cephalosporium sp.* KM 388, *Agr. Biol. Chem.*, 51, 2959(1987)
12. 京都大學農學部食品工學教室 : 食品工學實驗書, 養賢堂(1970)
13. 차원섭, 조영재, 최정 : *Aspergillus fumigatus*에 의한 Alkaline protease의 생산과 정제, 한국식량영양학회지, 18(3), 279(1989)
14. 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)
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. Davis, B. J. : Disc electrophoresis-II method and application to human serum proteins, *Ann. New York Acad. Sci.* 121, 404(1964)
18. Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determinations sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, 244, 4406(1969)
19. Kone man, E. W., G. D. Roberts and S. E. Wright : Practical laboratory mycology. pp. 20

- 21. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
20. 차원섭, 최청 : *Aspergillus fumigatus*가 생산하는 alkaline protease의 특성과 작용양상, 한국식량영양학회지, 18(3), 348(1989)
 21. 장신재, 김윤숙, 성하진, 최용진, 양한철 : *Bacillus subtilis*가 생산하는 alkaline protease에 관한연구, 한국농화학회지, 31(4), 356(1988)
 22. 정동효, 이계호 : 고온성 사상균의 효소에 관한 연구, 한국농화학회지, Vol. 13(3), 223 (1970)
 23. Fukasawa, S., Nakamura, K., Miyahira, M. and Kurata, M. : Some properties of Two proteinases from a Luminous Bacterium, *Vibrio harveyi* Strain FLN-108, *Agr. Biol. Chem.*, 52(12), 3009(1988)
 24. Koichi, K., Toshihiro, Y. and Kazuo, M. : Purification and Characterization of chymotrypsin proteinase from *Euphausia superba*, *Agr. Biol. Chem.*, 49, 1599(1985)
 25. Toshihiro, N., Yoshikazu, M., Noshi, M. and Takehiko, Y. : Purification and some properties of an alkalophilic proteinase of a *streptomyces species*, *Agr. Biol. Chem.*, 38(1), 37(1974)
 26. Charles, J. D., Evest, A. B., Alworth, D. L. and Hugh, D. B. : Purification and characterization of the extracellular proteinase of *Serratia marcescens*, *Biochimica et Biophys. Acta.*, 569, 293 (1979)

(1990년 5월 23일 접수)