

Katsuobushi에서 분리한 *Aspergillus niger* protease의 효소학적성질

김관우* · 윤태욱 · 김준평

*송원전문대 식품영양과, 중앙대학교 식품가공학과

Properties of *Aspergillus niger* Protease Isolated from Katsuobushi

Kwan-Woo Kim*, Tai-Uk Yun and Jun-Pyong Kim

*Department of Food and Nutrition, Song-Won Junior College
Department of Food Science and Technology, Chung-ang University

Abstract

Protease was purified from *Aspergillus niger* propagated on katsuobushi. The optimal pH and temperature of the enzyme were 7.2 and 45°C, respectively. The enzyme was stable at pH 5~8 and at below 40°C. Enzyme activity was promoted by K^+ and Fe^{2+} , whereas it was inhibited by Hg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} and Cd^{2+} . The acidic, basic and neutral amino acid compositions were found to be 22.63, 13.57 and 63.80%, respectively. The content of nonpolar, polar and sulfur-containing amino acids were 39.72, 20.03 and 9.53% respectively, and aspartic and glutamic acids were abundant. The molecular weight was 42,000 and isoelectric point was estimated pH 5.6.

Key words: protease, *Aspergillus niger*, katsuobushi, enzyme properties

서 론

Protease는 단백질 또는 peptide에 작용하여 peptide 결합의 가수분해를 촉매하는 효소로 인간의 위, 소장에서 발견되고 있으며 동식물조직이나 미생물에도 넓게 분포되어 있다. 특히 미생물 protease에 관하여는 효소정제 기술의 발달에 의한 산업에의 활용성이 높아져 이에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 미생물이 생산하는 protease는 성질의 다양성과 효소생성의 용이성에 의하여 발효식품에 많이 이용되고 있으며⁽¹⁾, 작용하는 pH에 따라 acidic protease, neutral protease, alkaline protease로, protease 단백질의 활성구조에 따라 thiolprotease, serine protease, metallo protease로 분류하기도 한다.

한편 protease 가수분해시 고비물질이 생성되고 있어 이의 개선책이 요구되어지고 있으나, 이에 관한 연구는 별로되어 있지않다.

저자는 일본의 발효식품인 katsuobushi가 발효 중 고미생성이 적고 우수한 풍미를 나타내고 있어서⁽²⁾ 이로부터 분리된 *Aspergillus niger*에서 생산되는 protease를 정제하고 효소학적 성질들을 조사하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

Katsuobushi에서 분리된 균주 중 고미생성이 낮고 protease 활성이 우수한 OK-63 균주(*Aspergillus niger*)로부터 생산된 조효소에서 protease를 분리 정제하여 효소학적 성질을 조사하였다.

Protease의 활성

Protease의 활성은 Kunitz method⁽³⁾에 의하여 측정하였다. 즉, 기질 1% Hammarstein casein 용액(20 mM potassium phosphate 완충용액, pH 7.7) 0.5 ml을 가한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 후 5% trichloro acetic acid 5 ml을 넣어서 반응을 정지시키어 10분 후 여과한 여액을 280 nm에서 OD를 측정하였다.

효소단위는 37°C에서 매분당 1 mg/ml의 tyrosine을 유리시키는 효소활성을 1 unit로 하였다.

최적 pH

정제 protease의 최적pH는 2%의 Hammarstein casein (50 mM NaOH 100 ml) 용액⁽⁴⁾ 10 ml와 0.1 M sodium acetate 완충용액(pH 5.6), potassium phosphate 완충용액(pH 7.8), sodium carbonate 완충용액(pH 9)을 각각 10 ml씩 동량혼합하여 pH 5에서 pH 9.9까지 조절한 1% casein 2.5 ml에 효소액 0.5 ml 가한 후 37°C에서 10분간 반응하여 상대활성으로 표시하였다.

Corresponding author: Kwan-Woo Kim, Department of Food and Nutrition, Songwon Junior College, Kwangchundong, Kwangju 500-742, Korea

pH 안정성

정제 protease의 pH 안정성⁽¹⁴⁾은 효소용액에 20 mM 완충용액(pH 3, 4, 5, 6) 각각 동량 혼합하여 25°C에서 20 시간 보존 후 20 mM potassium phosphate(pH 7.7) 용액으로 20배 희석한 효소용액 0.5 ml를 1% casein 2.5 ml에 혼합하여 37°C에서 1시간 반응 후 5% trichloro acetic acid 5 ml를 넣어서 반응을 정지시키어 10분 후 여과한 여액을 280 nm에서 OD를 측정하여 상대활성으로 표시하였다.

최적온도

정제 protease의 최적온도를 알아보기 위하여 기질용액 2.5 ml에 효소액 0.5 ml를 가한 후 효소반응온도를 5°C 간격으로 28~80°C⁽¹⁵⁾까지 10분간 반응시켜 상대활성으로 표시하였다.

열안정성

정제 protease의 열안정성을 조사하기 위하여 기질을 제외한 기타 반응액의 조성을 모두 첨가하여 5°C 간격으로 20~80°C⁽¹⁶⁾까지의 각 온도에서 30분간 처리한 효소액 0.5 ml에 기질 2.5 ml를 가하여 잔존하는 효소를 상대활성으로 표시하였다.

금속이온의 영향

Protease 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 1×10^{-2} M의 각종 금속이온 용액을 효소액과 동량을 가하여 실온에서 4시간 방치한 후 효소활성을 측정하였다⁽¹⁰⁾.

분자량 측정

정제 protease의 분자량을 측정하기 위하여 Ornstein⁽⁴⁾, Davis⁽⁵⁾의 방법에 따라 vertical slab SDS-disc-polyacrylamide gel electrophoresis를 실시하였다. 즉 10% separating gel과 3% stacking gel에 정제 단백질을 loading한 다음 current 50~100 V로 5시간 running시킨 다음 10% TCA 용액에 10분간 처리하여 protein을 고정시키고 coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하였다. 이때 분자량 결정을 위한 molecular marker로는 Sigma 회사의 SDS-70 μ를 사용하였으며, 표준 단백질로는 ova-transferrin(MW 76,000), albumin(MW 66,250), ovalbumin(MW 45,000), carbonic anhydrase(MW 30,000), myoglobin(MW 17,200), cytochrome C(MW 12,300)를 사용하였다.

등전점 측정

Isoelectric focusing(IEF)는 pharmacia phast system(phast gel IEF3-9, code No.17-0543-01 pharmacia, sweden)에 의한 William⁽⁶⁾법으로 확인하였다.

즉 1차 단계에서는 pH gradient 형성을 위해 prefocusing을 실시하며 2차 단계에서는 sample을 3 mg/ml을 넣고, 3차 단계에서는 focusing을 실시한 후 coomassie로

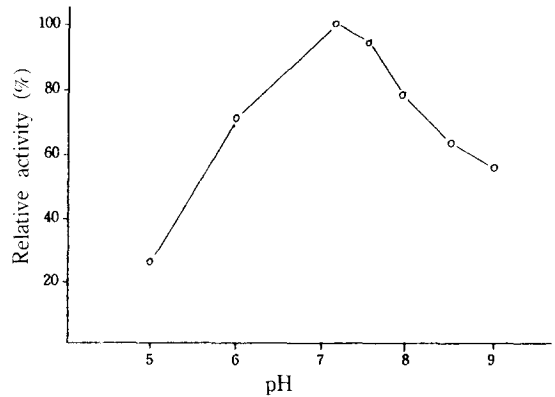


Fig. 1. Effect of pH on protease activity

Enzyme activity was measured in the presence of 1% casein as substrate in 20 mM potassium phosphate buffer solution (pH 7.7). Buffer solution used; 0.1 M sodium acetate buffer solution (pH 5, 6) and 0.1 M potassium phosphate buffer solution (pH 7, 8) and 0.1 M sodium carbonate buffer solution (pH 9, 9.9)

염색하여 확인하였다.

아미노산 분석

아미노산 정량은 Mason 등⁽⁷⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉 일정량의 효소에 6N HCl을 혼합하여 질소가스틀 충전하여 110°C에서 23시간 가수분해시킨 후 여과하여 evaporator에서 저온건조시킨 후 sodium citrate 완충용액(pH 2.2)으로 100 ml되게 희석시킨 다음 amino acid analyser(Biotronic L.C 5000)에 1.0 ml를 주입하여 아미노산 분석을 하였다.

결과 및 고찰

최적pH

일반적으로 protease는 그 작용 pH에 따라 산성, 중성, 알칼리성 protease로 분류되나 본 protease는 Fig. 1에서와 같이 pH 6.0 이하와 pH 9.0 이상에서 효소활성이 현저히 저하되었고 pH 7.2에서 최대활성을 갖는 중성 protease로 사료된다.

이러한 결과는 김⁽¹⁴⁾의 Kiwifruit protease의 7.0, 홍과 남⁽⁸⁾의 중성 protease의 7.0, 이와 정⁽¹⁵⁾의 *Asp. oryzae*의 7.2와 일치하였다. 그 외는 최 등⁽⁹⁾의 *Aspergillus*속의 protease의 9.0, 정과 박⁽¹⁶⁾의 *Asp. awamori* protease는 2.4이었다.

pH 안정성

정제된 protease의 pH 안정성을 검토한 결과는 Fig. 2에서와 같이 pH 5~7에서 안정성을 나타내었으나 pH 5 이하에서는 극히 불안정하여 활성이 저하되었으며 pH 8

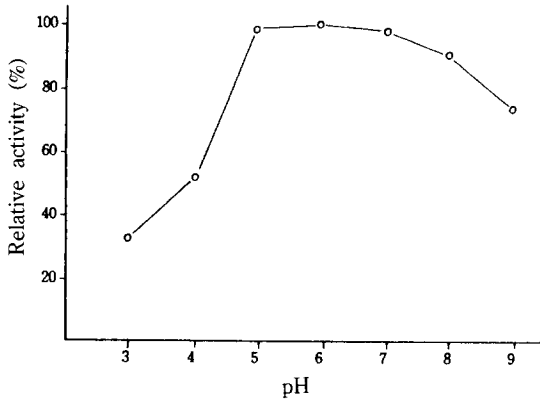


Fig. 2. pH stabilities of protease

Enzyme activity was measured in the presence of 1% casein as substrate in 20 mM potassium phosphate buffer solution (pH 7.7). Buffer solution used; 20 mM sodium acetate buffer solution (pH 3, 4, 5, 6) and 20 mM potassium phosphate buffer solution (pH 7, 8) and 20 mM sodium carbonate buffer solution (pH 9)

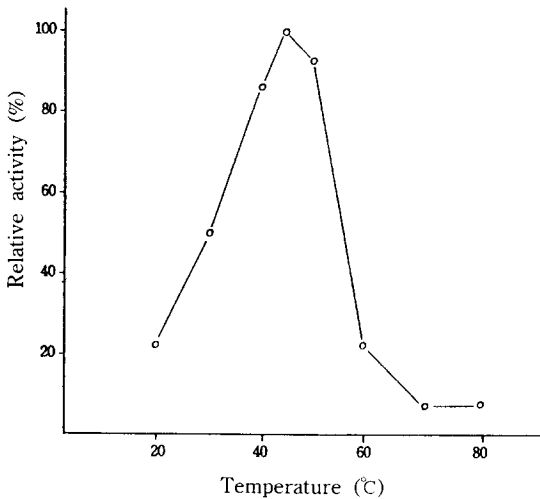


Fig. 3. Effect of temperature on protease activity

Enzyme activity was measured in the presence of 1% casein as substrate in 20 mM potassium phosphate buffer solution (pH 7.7)

이상에서도 서서히 활성의 저하를 보였다.

이러한 결과는 김⁽¹⁴⁾의 중성 protease의 3.0~9.0, 이와 정⁽¹⁵⁾ *Asp. oryzae*의 중성 protease 6.0~8.0과 일치하였다. 그 외는 차와 최⁽¹⁰⁾의 *Asp. fumigatus* 알카리성 protease 8.0~10.0, 一島⁽¹³⁾의 *Asp. saitoi*의 2.0~6.0, Fukumoto⁽¹²⁾의 *Asp. sojae*의 경우는 5.0~10.0이었다.

최적온도

정제된 protease의 최적온도를 측정된 결과는 Fig. 3

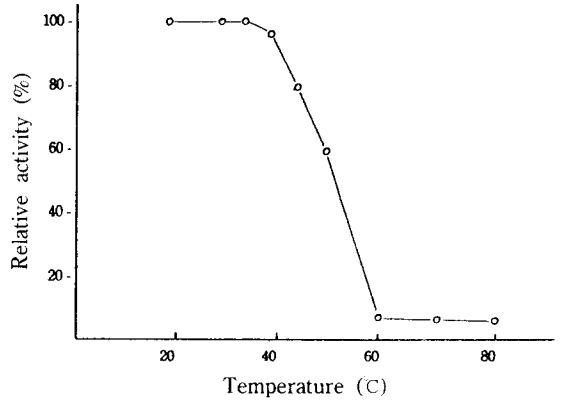


Fig. 4. Thermal stabilities of protease

Enzyme activity was measured in the presence of 1% casein as substrate in 20 mM potassium phosphate buffer solution (pH 7.7)

Table 1. Effect of metal salts on enzyme activity

Metal salts	Relative activity(%)
None	100
CaCl ₂	73
KCl	107
CdCl ₂	51
FeCl ₂	102
AlCl ₂	84.5
MnCl ₂	59
HgCl ₂	34
Zn(NO ₃) ₂	41

The reaction mixture was contained in each of 0.01 M metal salts

에서와 같이 45°C에서 최대활성을 보였으며 40°C에서 85% 이상의 활성, 50°C에서 95%의 활성을 보였으나 그 이상의 온도에서 활성이 현저히 저하되었다. 특히 60°C 이상의 고온에서는 효소활성이 급격히 저하되었는 바 이는 본 효소가 열에 의하여 쉽게 변성되는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과는 정과 박⁽¹⁶⁾의 *Asp. awamori* protease의 45°C와 이와 정⁽¹⁵⁾의 *Asp. oryzae*의 protease 40~45°C와는 일치하는 중온성 protease임을 알 수 있다. 이와는 달리 서⁽¹⁸⁾의 *Asp. oryzae*의 protease 경우는 35°C, 차와 최⁽¹⁰⁾의 *Asp. fumigatus*의 protease 경우는 50°C였다.

열안정성

정제된 protease의 열안정성을 조사한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 40°C까지는 안정하였으나 그 이상에서는 온도상승과 더불어 급격히 생활하는 현상을 나타냈다.

이러한 결과는 서⁽¹⁸⁾의 *Asp. oryzae*의 protease, 정⁽¹⁹⁾의 *Rhizopus japonicus*의 protease, 김과 서⁽²⁰⁾의 *Monascus*의 protease 40°C 이하와는 일치하였다. 그 외는 차와

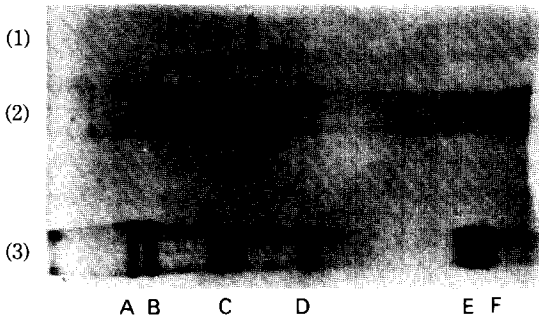


Fig. 5. Estimation of molecular weight of protease purified by SDS-Slab gel electrophoresis.

Stacking gel; 3.5%, Current; 30 mA, Running gel; 1.2%, Running time; 150 min, Stain; Silver stain
 A; Ovotransferrin (76,000), B; Albumin (66,250), C; Ovalbumin (45,000), D; Carbonic anhydrase (30,000), E; Myoglobin (17,200), F; Cytochrome c (12,300)
 Lane (1); Purified enzyme, Lane (2); Crude enzyme, Lane (3); Standard protein.

최⁽¹⁰⁾의 *Asp. fumigatus*의 protease와 정과 박⁽¹⁶⁾의 *Asp. Kawachii*의 protease 50°C, 이와 정⁽¹⁵⁾의 *Asp. oryzae*의 protease 열안정성은 60°C였다.

금속이온의 영향

정제된 protease 활성에 미치는 각종 금속이온의 영향을 검토한 결과는 Table 1과 같다.

정제 protease는 K⁺, Fe²⁺ 등에 의하여 활성이 증대되었으나, Ca²⁺, Al³⁺, Hg²⁺ 등에 의하여 그 활성이 저해를 받았고 Zn²⁺, Mn²⁺, Cd³⁺ 등에 의하여 효소활성이 현저히 저해되었다.

이러한 결과는 차와 최⁽¹⁰⁾의 *Asp. fumigatus*의 protease 활성을 촉진한 K⁺, Fe²⁺, 김과 서⁽²⁰⁾의 *Monascus*의 알칼리성 protease의 활성을 저해하는 Hg²⁺와 변과 김⁽²¹⁾의 *Penicillium* protease의 활성을 저해한 Hg²⁺는 본 실험과 일치하였다. 그 외는 정과 박⁽¹⁶⁾의 *Asp. awamori*의 protease의 활성을 증진한 Ca²⁺, 서⁽²²⁾의 *Asp. oryzae*의 protease의 활성을 증진한 Ca²⁺가 보고되었다.

분자량 측정

정제된 효소의 분자량을 측정하기 위하여 분자량 14,000~66,000의 분자량을 marker로 하여 SDS-Disc PAGE를 실시한 결과는 Fig 5와 같았다. 나타난 marker protein과 purified enzyme band의 Rf치를 계산한 결과 분자량은 42,000 dalton이었다.

이러한 결과는 Oda 등⁽²³⁾의 산성 protease의 분자량 43,000과는 일치하였다. 이와는 달리 一島⁽¹³⁾의 *Asp. saitoi*의 산성 protease 34600, Yagi 등⁽¹⁷⁾의 *Asp. kawachii*의 산성 protease의 35,000, 차 등⁽¹¹⁾의 *Asp. fumigatus*의 알칼리성 protease 분자량은 63,000이었다.

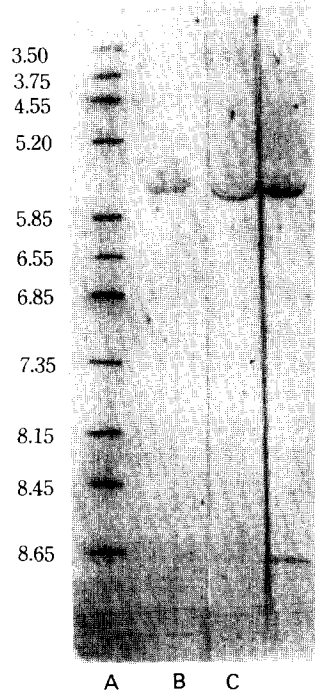


Fig. 6. Isoelectric focusing of protease
 A; pI standard marker(pH 3~9), B,C.; protease

Table 2. Amino acid analysis of protease

Amino acids	Content(mg/100 mg)
Lysine	3.52
Histidine	4.09
Arginine	2.44
Aspartic acid	8.82
Threonine	3.61
Serine	3.53
Glutamic acid	7.94
Proline	3.59
Glycine	5.08
Alanine	4.39
Valine	5.01
Methionine	0.92
Isoleucine	3.44
Leucine	4.77
Tyrosine	2.86
Phenylalanine	3.17
Cysteic acid	6.14
Total	73.89

등전점

정제된 protease의 등전점을 측정한 결과는 Fig. 6에 서와 같이 B, C 모두 pH 5.2~5.85 사이에서 단일 band가 나타남으로 고도의 순도를 확인할 수 있었으며 등전점이 약 pH 5.6임을 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 Terashita⁽²⁴⁾ 등이 보고한 산성 protease의 등전점 4.2, Yagi 등⁽¹⁷⁾의 *Asp. kawachii* protease의 pI 3.9 Arguelles 등⁽²⁵⁾의 *Asp. oryzae* protease의 pI 3.0 보다는 높았고, 장과 Goldberg⁽²⁶⁾의 중성 protease 등전점 6.4 보다는 낮았다.

Amino acid의 조성

정제 protease의 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 산성아미노산 22.63%, 염기성아미노산 13.57%, 중성아미노산 63.8%였으며 비극성아미노산, 극성아미노산 및 함황아미노산의 비율은 39.72%, 23.03% 및 9.53%로 구성되어 있었고 특이적으로 aspartic acid와 glutamic acid의 함량이 많았다.

이러한 결과는 Braun과 Schmitz⁽²⁷⁾가 보고한 protease의 아미노산 조성 과 일치하였다.

요 약

Katsuo bushi에서 분리한 *Aspergillus niger* 균주에서 생산한 조효소로부터 정제한 protease의 최적 pH와 온도는 pH 7.2와 45°C였으며, pH 5~6 범위내에서 40°C 이하에서 안정하였으며, 금속이온의 영향은 K⁺와 Fe²⁺는 효소활성을 증진시켰고 Zn²⁺, Mn²⁺ 및 Cd³⁺ 등은 효소활성을 저해하였으며, 구성아미노산은 산성아미노산이 22.6%, 염기성아미노산이 13.57%, 중성아미노산이 63.8%였으며, 비극성아미노산, 극성아미노산 및 함황아미노산의 구성비는 각각 39.72%, 23.03% 및 9.35%이었다. 분자량은 42000, 등전점은 pH 5.6이었다.

문 헌

1. 相澤孝亮, 小野正之, 水塚隆久柳田藤治: 酵素利用ハンドブック, p.121(1980)
2. 大本貴士: 絲狀菌プロテアーゼに関する研究. 日本大阪市立大學 修士學位論文 (1986)
3. Kunitz, M.: Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Phys.*, **36**, 291(1947)
4. Ornstein, L.: Disc electrophoresis-I. In background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 321(1964)
5. Davis, B.J.: Disc electrophoresis-II. In method and application to Human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404(1964)
6. Williams, K.W. and Soderberg, L.: *A carrier ampholyte for isoelectric focusing*. International laboratory(1979)
7. Mason, V.C., Rudemo, M., Bech Anderson, S.: *Zeitschrift für Tier Physiologie. Tiernahrung und Futtermittelkunde*, **43**(1), 35(1980)
8. 홍재식, 남공희: *Pleurotus ostreatus*가 생산하는 중성 protease에 관한 연구. 전북대학교 농대논문집 **6**, 107 (1975)
9. 최 청, 김두기, 조영제, 성태수: *Aspergillus* sp CC-29가 생성하는 alkaline protease의 정제 및 특성. 한국영양식품과학회지, **19**, 434(1990)
10. 차원섭, 최 청: *Aspergillus fumigatus*가 생산하는 alkaline protease의 특성과 작용양상. 한국영양식품과학회지, **18**, 348(1989)
11. 차원섭, 조영제, 최 청: *Aspergillus fumigatus*에 의한 alkaline protease 생산과 정제. 한국영양화학회지, **18**, 279(1989)
12. Fukumoto, S. and Yamamoto, T.: 清酒用 麹菌の研究 *Agri. Biol. Japan*, **31**, 710(1967)
13. 一鳥英治: Acid protease의 生化學. *日本醸協誌*, **22**, 393(1964)
14. 金福子: 키위열매 Protease의 추출정제 및 그 특성에 대하여, 한국식품과학회지, **21**, 569(1989)
15. 이미자, 정만재: *Aspergillus oryzae* KC-15에 의한 protease의 생산 및 그 효소의 특성에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, **8**, 77(1980)
16. 정만재, 박남규: 사상균의 단백질 분해효소에 관한 연구. 한국산업미생물학회지, **1**, 93(1973)
17. Yagi, F.J., Jadera, K. and Kobayashi, A.: Purification and characterization of carboxyl proteinase from *Aspergillus kawachii*. *Agri. Biol. Chem.*, **50**, 1029(1976)
18. 서항원: 한 컬럼 크로마토그래피에 의한 *Aspergillus* 계통의 α -amylase 및 Protease의 결정화(제 1보). 한국미생물학회지, **9**, 163(1971)
19. 정만재: *Phizopus Japonicus* S-62가 생성하는 단백질 분해효소에 관한 연구. 한국식품과학회지, **9**, 31(1977)
20. 김상달, 서정훈: *Monascus*속 균주가 생산하는 Alkaline Protease에 관한 연구. 한국농화학회지, **15**, 27(1972)
21. 변재정, 김정락: Purification of the three alkaline proteinase from the pyloric caeca of mackerel, *Scomber japonicus*. 한국수산학회지, **19**, 537(1986)
22. 서항원: 한 컬럼 크로마토그래피에 의한 *Aspergillus* 계통의 α -amylase 및 Protease의 결정화(제 3보). 한국미생물학회지, **10**, 105(1972)
23. Oda, K. and Murao, S.: Purification and some enzymatic properties of acid protease A and B of *Scytalidium lignicolum* ATCC 24568. *Agri. Biol. Chem.*, **38**, 2435(1974)
24. Terashita, T., Oda, K., Kono, M. and Murao, S.: Purification and Some properties of Carboxyl proteinase in mycelium of *Lentinus edodes*. *Agri. Biol. Chem.*, **45**, 1929(1981)
25. Argelles, A.L., Baens, A.L. and Anglo, P.G.: Preparation of crude protease powder from a philippine strain of *Aspergillus Oryzae* Cultured in coprameal. *J. Sci. philippine*, **106**, 11(1977)
26. Chung, C.H. and Goldberg, A.L.: Purification and Characterization of protease So, a Cytoplasmic Serine protease in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **154**, 231 (1983)
27. Braun, V. and Schimitz, G.: Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.*, **124**, 55(1980)

(1991년 1월 17일 접수)