

## 단백질 분해효소 생산을 위한 *Aspergillus oryzae* PF 균주의 배지조성

김두상<sup>1</sup> · 김형락<sup>1</sup> · 남택정 · 변재형\*

부경대학교 식품생명공학부, <sup>1</sup>여수대학교 식품영양학과

**Medium Composition of *Aspergillus oryzae* PF for the Production of Proteolytic Enzyme. Kim, Doo-Sang<sup>1</sup>, Hyeung-Rak Kim<sup>1</sup>, Taek-Jeong Nam, and Jae-Hyeung Pyeon\*.** Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea, <sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Yosun National University, Yosun, Chunnam 550-749, Korea – The most favorable nitrogen source for the production of protease by *Aspergillus oryzae* PF was 2% soybean flour among sodium nitrate, ammonium sulfate, defatted soybean, skim milk, casein, peptone, and yeast extract. The production of protease from *A. oryzae* PF was higher at the concentration of 2% lactose than at variable concentration of glucose, sucrose, soluble starch, corn starch, potato starch, wheat starch, rice starch, cellulose, and gum arabic. Protease production was affected by the concentration of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Triton X-100, CaCO<sub>3</sub>, and MgSO<sub>4</sub>, and it was the highest at the concentration of 3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% Triton X-100, 0.3% CaCO<sub>3</sub>, and 0.06% MgSO<sub>4</sub>.

**Key word:** *Aspergillus oryzae*, protease, medium composition.

산업적으로 이용되고 있는 효소는 대체로 단백질 분해효소(약 59%)와 당질 분해효소(약 28%)가 절대적인 비율을 점하고 있다[8]. 단백질 분해효소를 생산하기 위하여 주로 이용된 미생물은 세균류인 *Bacillus* spp.[2], *Thermus* spp.[6] 등이 그 대부분을 차지하여 왔다[2]. 그 이유는 균의 생육, 효소의 생산능, 설비비, 원료비 등에 비추어 세균의 배양에 액체배양법이 적용 가능하였기 때문이다. 액체배양법은 생산면적이 적고, 시스템화에 의한 대량 생산이 가능하며, 고체 배양에서 다량으로 나오는 고형 폐기물이 거의 없는 등의 장점을 들 수 있으나[8], 곰팡이류의 배양에 있어서는 호기성이 강한 생리적 원인 때문에 액체배양에 의한 방법은 거의 개발되어 있지 않은 실정이다. 그러나 단백질 분해효소에 있어서 곰팡이의 이용은 *Mucor pusillans*(chymosin 대용 산성 단백질 분해효소의 생산에 이용), *Aspergillus* spp. 및 *Rhizopus* spp.(대두발효제품과 조미액 제조용 단백질 분해효소의 생산에 이용)와 같은 국균을 이용한 액체배양법에 관한 연구가 관련산업에 획기적으로 기여하기도 하였다[4].

본 연구는 전보[9]의 변이과정을 거쳐 얻어진 고효율 단백질 분해효소 생산능을 보유한 *A. oryzae* PF의 변이균주에 대하여 액체배지에서의 단백질 분해효소 생산을 최대화하기 위한 경제적 배지조성을 확립하였기에 보고한다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배지

\*Corresponding author  
Tel. 82-51-620-6331, Fax. 82-51-620-6731  
E-mail: nadskim@netian.com

전보[9]에서 분리, 변이된 *Aspergillus oryzae* PF를 사용하였다. Ushijima 등[13]의 방법에 따라 완전배지로서 8% malt-extract medium(pH 6.0), 최소배지는 Czapek Dox 배지(NaNO<sub>3</sub> 0.3%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%, KCl 0.05%, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001%, sucrose 3%)를 사용하였다. 그리고, 고체배지는 위의 액체배지에 1.5%의 한천을 첨가하여 조제하였다.

#### 균주의 보존

선별된 균주의 보존은 완전 사면배지에 균주를 접종한 후, 30°C에서 3일간 배양하여 4°C에 보존하면서 2개월마다 계대배양하면서 본 실험에 사용하였다. 그리고, 포자현탁액의 조제는 O'Donnell과 Peterson의 방법[10]에 따라 균주를 30°C에서 7일간 배양한 완전 사면배지에 0.1% Tween #80 5 ml과 1 g의 CaCO<sub>3</sub>를 가하여 5분간 격렬하게 교반하였다. 이를 무균적으로 흡인여과(glass filter 17G2) 후, 여액을 원심분리(3,000×g, 10분) 하고 잔사에 멸균 증류수를 가하여 포자수가 약 1×10<sup>6</sup> CFU/ml가 되도록 희석하여 포자현탁액을 조제하였다.

#### 배지조성에 따른 효소의 생산성

질소원 질산 나트륨을 제외한 Czapek Dox 배지에 무기질소원으로서 질산나트륨과 황산암모늄, 유기질소원으로서 대두분말, 탈지대두분말, skim milk, casein, peptone, yeast extract를 각각 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 및 4% 첨가된 배지를 250 ml 삼각플라스크에 각각 50 ml씩 조제 후 121°C에서 15분간 멸균하였다. 실온으로 냉각된 배지에 포자현탁액(1×10<sup>6</sup> CFU/ml) 1 ml을 접종한 후 30°C에서 4일

간 진탕 배양하였다. 배양액을 원심분리(3,000×g, 20 min) 하여 침전되는 균체는 glass filter 상에서 증류수로써 2회 씻은 후 가열 건조하여 균체의 건조중량을 측정하고, 균체가 제거된 배양액의 단백질 분해효소 활성을 측정하여 가장 높은 활성을 나타내는 질소원의 종류와 양을 결정하였다.

**탄소원** 질산나트륨과 sucrose가 제외된 최소배지에 질소원으로 2%의 대두분을 첨가한 다음, 단당류로서 glucose와 fructose, 이당류로서 sucrose와 lactose, 그리고 다당류로서 corn starch, gum arabic, soluble starch, potato starch, wheat starch, rice starch 및 cellulose를 각각 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 및 5% 첨가한 배지를 조제하여 질소원의 경우와 동일하게 배양 후 단백질 분해효소 활성 및 건조중량을 측정하여 최고의 활성을 나타내는 탄소원의 종류와 양을 결정하였다.

**인산염** 질산 나트륨과 sucrose가 각각 2%의 대두분과 2%의 유당으로 대체된 최소배지에 인산염으로서  $KH_2PO_4$ 의 농도가 각각 0, 1, 3, 5, 7 및 9%로 조정된 배지를 조제하였다. 각각의 배지를 위의 경우와 마찬가지로 배양하여 단백질 분해효소 생산성이 가장 높은  $KH_2PO_4$ 의 농도를 결정하였다.

$CaCO_3$  질소원으로서 2%의 대두분, 탄소원으로 2%의 유당 및 3%의 인산염이 함유된 최소배지에  $CaCO_3$ 를 각각 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5% 첨가된 배지를 조제하여 질소원의 경우와 동일하게 멸균, 접종 및 배양 후 단백질 분해효소 활성 및 건조 중량을 측정하여 최고의 활성을 나타내는 탄산칼슘의 양을 구하였다.

**Triton X-100** 대두분, 유당, 인산염 및 탄산칼슘이 각각 2, 2, 3 및 0.3%로 대체된 배지에 계면활성제로서 Triton X-100을 0, 0.01, 0.05 및 0.1%가 첨가된 배지를 사용하였다. 이후의 멸균, 접종 및 배양은 질소원의 경우와 동일하게 단백질 분해효소 활성 및 건조 중량을 측정하여 최고의 활성을 나타내는 Triton X-100의 양을 결정하였다.

$MgSO_4$  효소의 생산성에 미치는  $MgSO_4$ 의 영향을 알기 위하여 최적의 대두분, 유당, 인산염 및 탄산칼슘이 포함된 배지에  $MgSO_4$ 를 각각 최종 농도가 0, 0.005, 0.01,

0.02, 0.03, 0.05, 0.06 및 0.075%의 농도가 되도록 첨가하여 각각의 배지를 조제하였다. 이를 질소원의 경우와 동일하게 멸균, 접종 및 배양한 후 단백질 분해효소 활성 및 건조 중량을 측정하여 최고의 활성을 나타내는 황산마그네슘의 양을 구하였다.

**단백질 농도측정**

배양액 중의 단백질 농도는 Bradford [5]의 방법에 따라 측정하였으며, 표준단백질(bovine serum albumin)로서 측정된 검량곡선에 의하여 단백질농도를 결정하였다.

**단백질 분해효소 활성의 측정**

효소활성의 측정은 전보 [9]에 따랐다. 즉 예열(50°C)된 0.25% azocasein 기질용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.0) 1.0 ml에 활성측정에 알맞은 농도수준으로 희석된 효소액 250 μl을 가하여 50°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 1.25 ml의 10% trichloroacetic acid를 가하여 반응을 정지시킨 후, 원심분리하고 상층액을 취하여 파장 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성(U)은 50°C에서 1분 동안 파장 420 nm에서 흡광도 0.1을 상승시키는데 필요한 효소의 양으로 나타내었다.

**결과 및 고찰**

**단백질 분해효소 생산을 위한 최적 배지조건**

**질소원** 질산 나트륨을 제외한 최소배지에 무기질소원으로서 질산나트륨, 황산암모늄, 유기질소원으로서 대두분말, 탈지대두분말, 탈지분유, casein, peptone, yeast extract를 각각의 농도별로 첨가하여 30°C에서 4일간 배양한 후 배양액 중의 단백질 분해효소 활성을 측정하여 비교하였다 (Table 1).

질소원의 함량이 0.5% 이하인 경우 탈지 대두와 skim milk가 첨가된 배지의 단백질 분해효소 생산능이 높게 나타났으나, 1% 이상인 경우 대두분이 높게 나타났으며, 특히 2% 대두분이 첨가된 배지가 가장 높은 효소 활성을 나

**Table 1. Effect of various nitrogen sources on the production of proteolytic enzyme from *A. oryzae* PF**

(unit: U/ml)

Nitrogen source	Concentration (%)					
	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0
Sodium nitrate	0.016	0.010	0.018	0.018	0.001	0.01
Ammonium sulfate	0.012	0.019	0.009	0.005	0.030	0.02
Soybean flour	0.120	0.288	0.362	0.418	0.449	0.432
Defatted soybean	0.201	0.318	0.388	0.400	0.280	0.280
Skim milk	0.265	0.312	0.335	0.361	0.302	0.295
Casein	0.132	0.200	0.128	0.168	0.145	0.126
Peptone	0.105	0.110	0.122	0.072	0.034	0.028
Yeast extract	0.079	0.103	0.093	0.078	0.060	0.056

Production of proteolytic enzyme represents caseinolytic activity of culture supernatant.

타내었다. 그러나 sodium nitrate와 ammonium sulfate와 같은 무기질소와 가수분해된 peptone과 yeast extract를 질소원으로 사용한 경우는 단백질 분해효소 생산능이 아주 낮게 나타났다.

내염성 *A. oryzae*의 배양시 단백질 분해효소의 생산에 미치는 여러 종류의 질소원에 대한 조사[7]에서 1% casein을 질소원으로 사용하였을 때 분리대두단백(0.5%)이 1.58U, 탈지대두분(1.3%)이 1.89U의 효소활성을 나타내었으며, 가수분해된 polypeptone이나 soytone은 오히려 단백질 분해효소의 생산성을 감소한다는 보고는 본 실험의 결과와 비슷한 경향을 보였다. 배지조성으로 사용된 단백질 또는 peptide의 종류에 따라 효소의 생산성은 영향을 받으며, 이는 미생물에 있어서 균체로 흡수된 아미노산의 대사에 따른 필수아미노산조성에 기인하는 것으로 해석되며, 가수분해되지 않은 고분자 물질일수록 효소의 생산을 촉진한다[7]. 이 결과로 비추어 볼 때 미생물에 의한 단백질 분해효소의 생산에 있어서 효소생산을 유도하기 위하여 배양액 중에 단백질이 필요하며, 가수분해된 peptide들은 분해되지 않은 단백질에 비하여 단백질 분해효소 생산능을 저하시킨다는 결론을 얻을 수 있었다.

탄소원 앞의 방법과 마찬가지로 질소원으로 2%의 대두분이 첨가된 최소배지에 당당류, 이당류, 그리고 다당류들을 각각 농도별로 첨가하여 단백질 분해효소의 활성을 측

정하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다.

Table 2에 나타난 바와 같이 당 농도에 따른 뚜렷한 경향은 나타나지 않았으나, 당당류인 glucose, 이당류인 sucrose 또는 lactose가 탄소원으로 첨가된 배지에서 비교적 높은 활성을 나타내었다. 특히 1%의 glucose, 3 및 4%의 sucrose와 0.1, 0.2 및 2%의 lactose가 첨가된 배지에서 18.8~19.9 U로 단백질 분해효소 활성이 높게 나타났다. 그리고 다당류의 경우 1%의 corn starch와 0.2%의 wheat starch가 탄소원으로 첨가된 배지에서도 높은 효소 생산능을 나타내었다. 대부분의 탄소원의 경우 저 농도에서 농도가 높아질수록 단백질 분해효소 활성은 증가하였으나, 2% 이상에서는 오히려 감소하는 경향들을 보였다. 이런 특징들로 미루어볼 때 고 농도의 탄수화물에 의하여 효소생산이 감소하는 이른바 carbohydrate repression을 받고 있는 것을 알 수 있었다.

이는 배지조성 중의 기질에 의해서 효소생산이 촉진되는 유도효소가 일반적으로 분해계의 반응에 관여하고, glucose에 의해 유도효소의 생산이 억제되는 glucose repression의 영향이라고 추정된다. 이러한 이유 때문에 미생물의 생육에 glucose가 필요할 경우는 일차배양으로 glucose함유 배지에서 균체를 성장시킨 후 균체를 분리하여 효소 생산용 배지에 옮겨 효소생산을 유도하는 방법이 보고되고 있다[1, 4]. *A. oryzae*의 배양에 있어서 탄소원으로서 포도당을 농도별로 첨가하여 단백질 분해효소의 생산에 미치는 영향은 포

Table 2. Effect of various carbon sources on the production of proteolytic enzyme by *A. oryzae* PF

Carbon source		Concentration(%)						
		0.1	0.2	0.5	1	2	3	4
Glucose	Activity (U/ml)	9.60	9.75	15.00	19.75	15.10	15.00	15.10
	Dry cell weight (g/l)	2.07	2.40	3.40	3.03	10.03	3.40	3.46
Sucrose	Activity (U/ml)	9.90	12.40	12.30	13.50	15.10	19.90	18.80
	Dry cell weight (g/l)	1.03	2.23	3.07	4.60	6.43	3.17	3.17
Lactose	Activity (U/ml)	18.75	19.00	13.75	16.50	19.90	13.76	12.75
	Dry cell weight (g/l)	1.77	2.37	2.70	2.40	4.00	2.60	2.60
Soluble starch	Activity (U/ml)	13.10	18.50	14.00	13.10	18.35	4.03	4.40
	Dry cell weight (g/l)	1.97	2.27	2.37	6.07	4.57	2.37	2.17
Corn starch	Activity (U/ml)	14.00	13.40	15.40	19.40	18.10	16.40	15.43
	Dry cell weight (g/l)	1.70	2.30	3.43	6.27	9.43	4.43	3.53
Potato starch	Activity (U/ml)	13.50	14.90	13.10	16.25	11.00	3.16	3.13
	Dry cell weight (g/l)	1.97	3.30	2.93	4.17	8.33	2.94	2.53
Wheat starch	Activity (U/ml)	10.90	19.00	9.60	12.50	15.60	9.64	9.50
	Dry cell weight (g/l)	2.70	5.27	3.20	8.73	4.13	3.24	3.20
Rice starch	Activity (U/ml)	3.90	4.35	2.60	4.95	1.45	2.65	2.20
	Dry cell weight (g/l)	2.00	1.93	1.67	4.37	4.57	1.64	1.97
Cellulose	Activity (U/ml)	8.65	8.10	16.75	11.50	11.15	16.76	15.75
	Dry cell weight (g/l)	1.93	2.53	5.37	8.87	6.03	5.47	4.37
Gum arabic	Activity (U/ml)	13.10	12.70	11.10	12.00	12.60	12.10	11.13
	Dry cell weight (g/l)	2.07	2.00	3.20	1.60	1.73	3.22	3.12

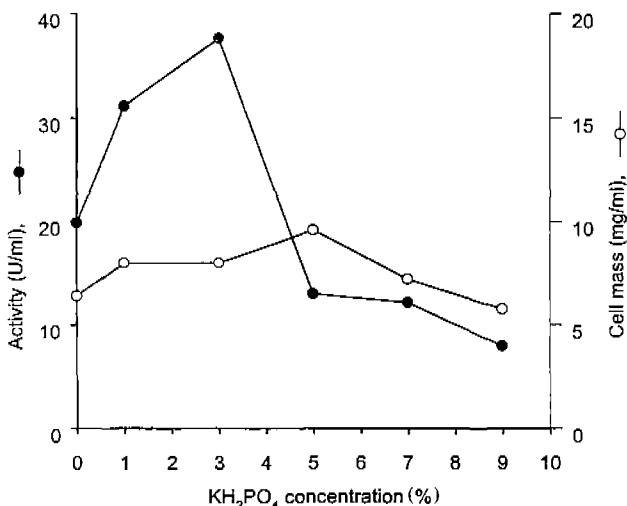
도당의 농도와는 무관하여 오히려 높은 농도의 당에 의하여 효소의 생산이 저해되는 것으로 보고되고 있다[7]. 본 실험의 결과로 비추어볼 때 단백질 분해효소의 생산에 있어서 일정농도까지의 탄소원은 균체의 성장에 비례하여 분해효소의 생산을 촉진하지만 특정 농도 이상에서는 균체의 성장에만 관여할 뿐 단백질 분해효소의 생산에 오히려 역효과를 나타낼 수 있을 것이다. 본 실험에 있어서 단백질 분해효소 생산을 위한 최적의 탄소원은 각기 다른 농도의 여러 가지 당류에서 나타났으나 실험의 편의상 2% lactose를 효소생산용 탄소원 농도로 결정하였다.

그 밖의 영양원 앞의 결과에 의하여 최소배지에 2%의 대두분과 2%의 유당을 첨가한 후,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 와  $\text{CaCO}_3$ 를 각각의 농도별로 첨가하여 배양 후 배지중의 단백질 분해효소 활성과 균체 증량을 측정하여 Fig. 1과 2에 나타내었다.

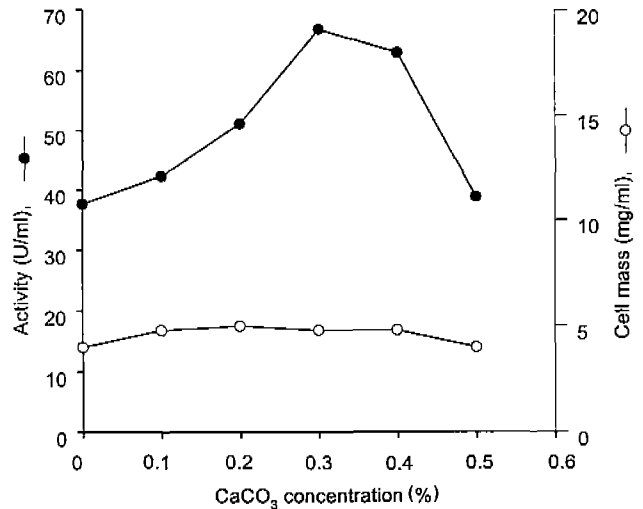
배지 중  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 의 농도가 3%일 때 단백질 분해효소 활성이 가장 높았으며, 이후 활성은 급격히 감소하였다. 이와는 달리 균체증량은  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 의 농도가 5%일 때가 다소 높게 나타났으나, 실험에 적용된 농도범위 내에서는 균체의 성장은 거의 비슷하게 나타났다.

$\text{CaCO}_3$ 의 경우에는 0.3~0.4% 부근에서 단백질 분해효소 활성이 가장 높았으나 균체 증량은  $\text{CaCO}_3$ 의 농도와는 무관한 것으로 나타났다.

단백질 분해효소 활성과 균체 증량과의 관계가 일정하게 비례하지 않는 이유로서 균체의 성장에 관한 대사과 효소 분비의 대사가 분리되어 상호보완적이기는 하지만, 배지 중에 영양분의 고갈이 균체의 성장을 저지시킴으로서 2차대



**Fig. 1. Effect of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentration on the production of proteolytic enzyme from *A. oryzae* PF.** Fermentations were carried out in Czapek Dox medium replaced with 2% soybean flour and 2% lactose as nitrogen and carbon source, respectively, at 30°C for 4 days.

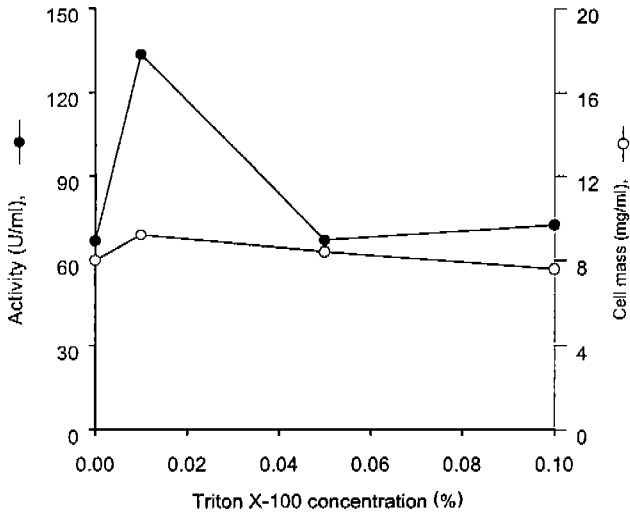


**Fig. 2. Effect of  $\text{CaCO}_3$  concentration on the production of proteolytic enzyme from *A. oryzae* PF.** Fermentations were done in Czapek Dox medium replaced with 2% soybean flour, 2% lactose, and 3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as nitrogen, carbons and phosphate source, respectively, at 30°C for 4 days.

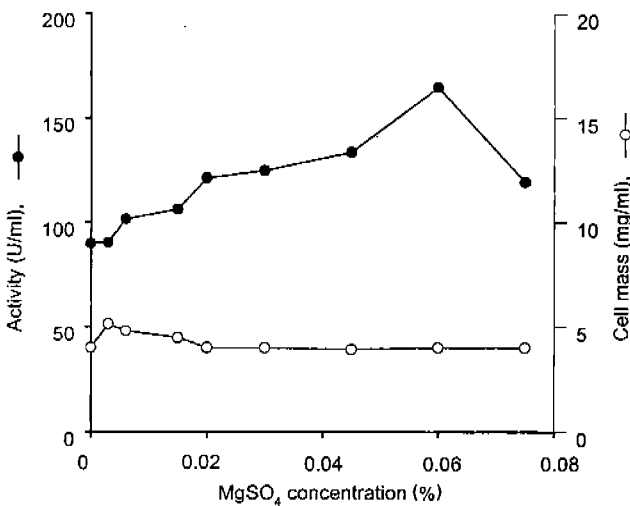
사인 분해효소들을 많이 분비하여 배지중의 고분자 물질들을 분해 후 그것을 영양원으로 이용하기 위한 것으로 보고되고 있다[6]. 또한 *A. oryzae*의 액체배양에 있어서 배지 중에 질소원만을 첨가하면 효소(protease,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -amylase)는 거의 분비되지 않지만 여기에 인산염을 0.2 M의 농도로 첨가하였을 때 특히 단백질 분해효소의 활성이 크게 증가하며, 나트륨보다는 칼륨 형태의 인산염들이 단백질 분해효소의 생성을 촉진하나,  $\text{Cl}$ ,  $\text{SO}_4$  및  $\text{NO}_3$ 와 같은 염류는 모든 효소의 분비에는 영향을 미치지 않고 오히려 감소시킨다고 보고되고 있다[12]. 그러나 본 결과에서는 더 낮은 농도에서 높은 단백질 분해효소 활성을 보였는데 이는 인산염 이외의 배지조성이 다르기 때문인 것으로 추측된다.

특히, 진균류의 배양 중에 균체의 성장에 따라 많은 유기산들이 분비되어 배양액의 pH가 급격히 떨어질 수 있으며, 이에 대한 방지책으로서  $\text{CaCO}_3$ 을 배지 중에 첨가함으로써 배양 중에 생성된 산에 의해  $\text{Ca}^{++}$  이온과 탄산이온으로 해리된다. 이때 탄산이온은 완충작용으로 배지 중의 pH를 일정하게 유지시키고, 칼슘이온은 유기산과 결합하여 불용성의 유기산칼슘염의 형태로 변화하여 배양액의 pH 저하를 방지한다. 이러한 탄산 및 칼슘의 복합 상승작용으로 균체 배양중의 배지의 pH 저하를 막을 수 있다(Aunstrup, 1979). 따라서 탄산칼슘이 배양액의 급격한 pH의 저하를 막고, 효소의 생성을 최적화하며, 효소의 안정화에 기여하여 단백질 분해효소의 생산을 촉진하는 것으로 추측할 수 있다.

최소배지에 2%의 대두분과 2%의 유당을 첨가한 후,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 와  $\text{CaCO}_3$ 를 각각의 3%와 0.3%의 농도별로 첨가한 후, Triton X-100과  $\text{MgSO}_4$ 를 각각의 농도별로 첨가하



**Fig. 3. Effect of Triton X-100 concentration on the production of proteolytic enzyme from *A. oryzae* PF.** Fermentations were performed at 30°C for 4 days in Czapek Dox medium replaced with 2% soybean flour, 2% lactose, 3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and CaCO<sub>3</sub>.



**Fig. 4. Effect of MgSO<sub>4</sub> concentration on the production of proteolytic enzyme from *A. oryzae* PF.** Fermentations were carried out at 30°C for 4 days in Czapek Dox medium replaced with 2% soybean flour, 2% lactose, 3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and CaCO<sub>3</sub>, and 0.01% Triton X-100.

여 배양 후 배지중의 단백질 분해효소 활성과 균체 중량을 측정하여 나타난 결과를 Fig. 3과 4에 나타내었다.

유화제 종류(SDS, Triton X-100, Tween #20, Tween #60 및 Tween #80)가 단백질 분해효소 생산성에 미치는 영향을 예비실험을 통하여 측정한 결과 Triton X-100의 경우가 가장 효과적이었다. 따라서 Triton X-100을 농도별로 첨가하여 배양 후 배지중의 단백질 분해효소 활성과 균체 중량을 측정된 결과, 그 농도가 0.01%일 때 가장 높았다가 그 이상의 농도에서는 효소활성이 감소하는 경향을 나타내

**Table 3. Comparison of activity, cell mass, and medium composition among Czapek Dox, protease producing and modified medium**

	Czapek Dox medium	Protease producing medium*	Modified medium
Activity (U/ml)	0.01	19.0	163.0 ± 4.85
Cell mass (mg/ml)	4.0	13.5	4.1
Medium composition (%)			
NaNO <sub>3</sub>	0.3	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	0.1	3
MgSO <sub>4</sub>	0.05	0.05	0.06
KCl	0.05	-	0.05
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.001	-	0.001
Sucrose	3	-	-
Soybean flour	-	1	2
Lactose	-	2	2
CaCO <sub>3</sub>	-	-	0.3
Triton X-100	-	-	0.01

\*Medium used in previous paper [9].

었고, 균체 중량은 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 저 농도의 계면활성제는 단백질이 변성될 가능성이 있는 배양 온도에서 효소의 안정성에 관여하여 효소의 실활을 방지함으로써 효소의 생산성을 높이는 것으로 보고되고 있다[6]. 그러나 *A. phoenicis*와 *A. awamori*에 있어서 산성 단백질 분해효소 생산에 미치는 계면활성제의 영향으로 Tween #80 과 SDS를 농도별로 배지에 첨가하여 단백질 분해효소의 생산능을 조사한 결과, 같은 *Aspergillus* 속이라도 계면활성제의 종류에 따라 효소생산능이 다르게 나타났다[3]. 즉, 두 계면활성제 모두 0.1% 농도까지는 *A. awamori*의 산성 단백질 분해효소의 생산을 증가시켰으나, *A. phoenicis*의 경우 SDS만이 단백질 분해효소 생산을 촉진시켰다.

MgSO<sub>4</sub>를 각기 다른 농도로 배지에 첨가한 경우 0.06% 까지 첨가했을 때 효소 생산능이 서서히 증가하다가 그 이상에서 급격히 감소하는 경향을 보이는 반면에 균체 중량은 초기에 증가하다가 이후 무첨가군과 비슷하였다. MgSO<sub>4</sub>가 단백질 분해효소 생산에 미치는 영향은 명확하지는 않으나[2], MgSO<sub>4</sub>가 미생물, 특히 진균류의 성장에 있어서 필수 무기원소이므로 균의 성장을 촉진시켜 효소의 생산성을 향상시키는 것으로 추정된다.

*A. oryzae* PF의 배지 조성에 의한 단백질 분해효소 생산성을 비교한 결과를 Table 3에 나타내었다. 최초로 시도된 최소배지인 Czapek Dox 배지에서 배양된 경우 효소생산량은 0.01 U/ml로 매우 낮았으며 건조 균체량은 4 mg/ml이었다. 이에 비하여 배지조성을 최적화 함으로써 건조균체량은 4.1 mg/ml로서 비슷하였으나 효소 생산량은 163 U/ml로 상승하였다. 조정된 배지조성은 Czapek Dox 배지에 비하여 질소원과 탄소원이 NaNO<sub>3</sub>와 sucrose에서 2%의 대두분과 2%의 유당으로 대체되었고 무기물 중의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 MgSO<sub>4</sub>

의 함량이 각각 0.1%와 0.05%에서 3%와 0.06%로 조정되었으며, 이외에 CaCO<sub>3</sub>와 Triton X-100이 0.3%와 0.01%씩 추가되었다.

Czapek Dox 배지는 일반적으로 곰팡이류의 배양 및 보존에 사용되는 배지로 성장에 필요한 최소량의 배지조성을 지니고 있으므로 균주의 성장에만 관여할 뿐 효소의 생산에는 관여하지 않는 것으로 알려져 있다[14]. 그리고 조정된 배지로 배양한 경우 일반적으로 곰팡이류의 단백질 분해효소 생산용으로 사용되며 전보[9]에서 사용한 단백질 분해효소 생산용 배지로 배양하였을 때보다 단백질 분해효소 생산성이 약 8배 정도 높게 나타났으나, 건조 균체량은 오히려 3배 이상 감소한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 앞에서 서술된 효소 생산성과 균체 성장률의 반비례하는 경향과 일치하는 것으로 해석된다.

## 요 약

단백질 식품의 가공에 이용할 수 있는 역가 높은 단백질 분해효소 생산을 위한 최적 배지조성을 확립하였다. *A. oryzae* PF를 이용하여 단백질 분해효소를 가장 많이 생산할 수 있는 배지 조성은 질소원으로서 질산나트륨, 황산암모늄, 탈지대두, 탈지분유, casein, peptone, 및 대두분 중에서 2%의 대두분인 것으로 나타났다. 탄소원으로서 0.1, 0.2 및 2%의 유당, 1%의 포도당, 0.5, 3 및 4%의 설탕, 1%의 옥수수 전분 및 0.2%의 wheat starch가 첨가된 것이 단백질 가수분해효소 생산에 좋은 결과를 나타내었다. 또한 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Triton X-100, CaCO<sub>3</sub>와 MgSO<sub>4</sub>도 효소생산에 영향을 미쳤으며, 이들의 적정 농도는 3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% Triton X-100, 0.3% CaCO<sub>3</sub> 및 0.06% MgSO<sub>4</sub>였다. 이상과 같이 조정된 배지에 *A. oryzae* PF에 의해 생산된 단백질 분해효소는 일반적인 곰팡이류의 단백질 분해효소 생산용 배지에 비해 높은 생산성을 나타내었으며, 이러한 배지조성을 이용함으로써 *A. oryzae* PF에 의한 산업적인 단백질 분해효소 생산 가능성을 시사하고 있다.

## 감사의 글

본 연구는 1996년도 해양수산부 특정연구비 지원에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Atkinson, T., M. D. Scawen, and P. M. Hammond. 1987.

- Large scale industrial techniques of enzyme recovery, pp. 279-323. In J. F. Kennedy (ed.), *Biotechnology*, vol 7a. VCH Verlagsgesellschaft mbH.
2. Aunstrup, K. 1979. Production, isolation and economics of extracellular enzymes, pp. 27-69. In L. Wingard, E. Katchalski-Katzir, and L. Goldstein (eds.), *Applied Biochemistry and Bioengineering*, vol 2. Academic Press, New York.
3. Bhumibhamon, O. 1982. Effect of some surfactants on the production of acid protease by *Aspergillus awamori*. *J. Ferment. Technol.* **60**: 167-169.
4. Bigelis, R. 1992. Food enzymes, pp. 361-415. In D. B. Finkelstein and C. Ball (eds.), *Biotechnology of Filamentous Fungi, Technology and Products*. Butterworth-Heinemann.
5. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
6. Frost, G. M. and D. A. Moss. 1987. Production of enzymes by fermentation, pp. 156-182. In H. J. Rehm and G. Reed (eds.), *Biotechnology*. VCH Publishers, Weinheim.
7. Fukushima, Y., I. Harumichi, F. Tetsuro, and M. Hiroshi. 1989. Continuous protease production in a carbon-limited chemostat culture by salt tolerant *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 604-608.
8. Godfrey, T. and J. R. Reichelt. 1983. Introduction to industrial enzymology, pp. 1-7. *Industrial Enzymology, the Application of Enzymes in Industry*. The Nature press.
9. Kim, D. S., H. R. Kim, T. J. Nam, and J. H. Pyeon. 1998. Strain improvement of *Aspergillus oryzae* for increasing productivity of a proteolytic enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**(6): 490-496.
10. O'Donnell, K. and S.W. Peterson. 1992. Biotechnology of filamentous fungi, pp. 16-25. In D. B. Finkelstein and C. Ball (eds.), *Biotechnology of Filamentous Fungi*. Butterworth-Heinemann, Stoneham, USA.
11. Solomons, G. L. 1977. The microbial production of enzymes, pp. 51-62. In Z. Bohak and N. Sharon (eds.), *Biotechnological Applications of Proteins and Enzymes*. Academic press.
12. Ueno, S., M. Miyama, Y. Ohashi, M. Izumiya, and I. Kusaka. 1987. Secretory enzyme production and conidation of *Aspergillus oryzae* in submerged liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 273-276.
13. Ushijima, S., T. Nakadai, and K. Uchida. 1991. Interspecific electrofusion of protoplast between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 129-136.
14. Wainwright, M. 1992. *An Introduction to Fungal Biotechnology*, pp. 28-35. John Wiley and Sons.

(Received June 23, 1999)