Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 27, No. 6, 446–451 (1999)

재래식 메주로부터 분리한 *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103 유래 Fungal Protease의 정제

임성일 · 유진영*
한국식품개발연구원 생물공학연구본부

Purification of Fungal Protease Produced by *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103 from Korean Traditional *Meju*. Lim, Seong-Il and Jin-Young Yoo*. *Division of Chemistry and Biotechnology, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Songnam, Kyonggido 463-420, Korea* – The protease produced by *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103 from *meju* was purified by precipitating with 80% saturated ammonium sulfate. CM Sephadex C-50 ion-exchange chromatography, and secondary Sephadex G-100 gel filtration chromatography. The specific activity of the purified enzyme was 60.1 unit/mg protein and the purification fold of the enzyme was 83.5. The molecular weight of the enzyme was estimated 33,746 Da and the enzyme was elucidated as monomer by LC-MS and SDS-PAGE. The number of amino acids was evaluated about 330 residues.

Key words : *Mucor racemosus f. racemosus*, protease, purification

우리나라의 조미식품인 간장, 된장 등의 장류는 삶은 콩에 미생물이 자연접종되어 만들어진 메주를 이용한 고유의 전통 발효식품이다[12]. 장류는 전통적 방법에 의하여 일반 가정에서 제조하여 왔으나, 국민소득의 향상에 따른 주거양식의 변화 및 생활의 간소화 등으로 대량공급을 위한 품질과 제조방법 개선에 대한 연구가 이루어져 왔고[8, 19], 전통장류의 이용에 대한 새로운 인식과 관심으로 메주에 대한 연구도 활발하다[10, 21].

장류는 숙성 과정중에 효소의 작용으로 원료 단백질 유래의 peptide와 아미노산의 구수한 맛과 풍미가 결정된다. 따라서 맛을 결정하는 유리아미노산의 함량은 담금원료, 숙성온도, 숙성기간에 따라 차이가 있으나, 메주의 효소활성이 유리아미노산의 함량이나 풍미에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[2, 13].

대두단백질을 분해하는 효소는 단백질에 작용하여 peptide 결합의 가수분해를 촉매하는 효소로 미생물에 널리 분포되어 있다. 이들 protease가 담당하는 생리적 역할로는 생물의 종, 생합성되는 조직, 세포 등에 따라서 매우 다양하지만, 공통적으로 extracellular protease의 경우는 외부의 영양물을 이용하기 위해서 외부 단백질을 가수분해시켜 고분자 형태의 단백질을 세포내로 흡수가 가능한 단위인 아미노산 또는 저분자의 peptide 단위로 분해하기 위해서 분비된다[18]. 이와 같은 성질을 바탕으로 단백질 분해 효소를 처리한 분해물에 대한 다양한 기능성의 연구가 진행되고 있으며[6, 23], 대두단백질은 pH, 염농도, 온도 등과 같은 조건에 의해 단백질의 변화와 이용의 제한성을 가지므로 가공조건과, 목적에 따라 대두단백질의 기능성을 조절하려는 연구도 시도된 바 있다[20]. 대두단백질의 가수분해물은 단백질의 가수분해 정도, peptide의 구조, 크기 및 아미노산의 염기배열 등에 따라서 기호성 및 기능성 등이 다르게 나타나게 된다. 특히, 대두 단백질의 효소적 가수분해물의 peptide 등은 산성음료의 용해도 증가, 일부 환자의 내 allergy 성, 기능성의 향상 등에 대한 응용이 가능하다[22]. 따라서, 효소에 의한 부분적인 가수분해를 통해 단백질의 용해도 증가[7], 유화 형성능[3], 고미 생성의 제거[9] 등의 연구결과가 보고되고 있다.

이에 본 연구에서는 대두단백질의 가수분해물은 단백질의 가수분해 정도, peptide의 구조, 크기 및 아미노산 잔기의 배열 등에 따라서 기호성 및 기능성이 다양하게 나타나게 되므로, 단백질 분해물 기능적 특성의 개선과 식품으로의 이용성을 증가시키기 위하여, 기존의 단백질 분해효소와는 다른 우리 나라의 전통 메주에서 분리한 균주가 생산하는 protease에 의해 분해되는 대두단백질 가수분해물의 특성과 이용성 연구의 일환으로, 우리 나라 전통메주에서 분리 · 동정된 *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103이 생산하는 protease[14]를 분리 · 정제하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

효소생산

기본배지는 밀기울 배지를 사용하였다. 밀기울 200 g과

*Corresponding author
Tel. 82-342-780-9106, Fax. 82-342-780-9265
E-mail: microbug@kfri.re.kr

1%의 glucose 200 mL를 혼합하여 1 시간 가압살균한 후 공시균을 3백금이씩 접종하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 배양된 밀기울 배지에 3배(w/v)의 20 mM phosphate buffer(pH 6.2)를 가하여 균질화 시킨 후, 4°C에서 6시간 교반하여 효소를 추출하고 밀기울을 cheese cloth로 분리한 다음 16,000 × g에서 30분간 원심분리한 상등액을 조효소액으로 하였다.

단백질 가수분해 효소의 활성

효소활성측정은 Hagihara의 방법[4]에 준하여 측정하였다. 즉, 효소액 0.5 mL에 0.1 M phosphate buffer(pH 6.2) 1 mL를 가한 다음, 기질용액(0.6% Hammarstein casein, pH 6.2)을 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.44 M trichloroacetic acid(TCA) 2.5 mL를 넣어 반응을 중지시키고 실온에서 10분간 방치한 다음 원심분리시켜 상등액 1 mL에 0.55 M Na_2CO_3 용액 1 mL와 1 mL의 1 N Folin-ciocalteu 용액을 넣어 37°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 단위는 37°C에서 1분 동안에 1 μg의 tyrosine을 유리시키는 것을 1 unit로 하였다.

효소의 정제

조효소액을 80% 포화 황산암모늄으로 4°C에서 14시간 염석한 후, 20 mM phosphate buffer(pH 6.2)를 가해 용해시키고, 4°C에서 72시간 투석한 후, open column이 장착된 ISCO사(미국)의 ProTeam LC™을 이용하여 정제하였다. 먼저 CM Sephadex C-50 column(2.6 × 55 cm) 이온교환 크로마토그래피를 수행하여 활성단백질을 흡착시킨 후, 0.5 M의 NaCl로 용출하고, 동결건조 한 다음, 상기 buffer로 평준화시킨 Sephadex G-100 column(2.6 × 55 cm)을 이용하여 2차례에 걸쳐 분리하여 *M. racemosus f. racemosus* PDA 103이 생산하는 protease를 정제하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 방법[17]에 따라 bovine serum albumin을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하였으며, 효소 정제과정중의 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

전기영동

단백질 가수분해 효소의 분리 정도와 분자량을 구하기 위하여 Laemmli[11]의 방법에 따라 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하였다. Coomassie brilliant blue R-250[Coomassie brilliant blue R-250 2.5 g/L의 methanol:acetic acid:water=5:1:5(v/v/v) 용액]을 사용하여 염색하고, 탈색은 용액I [methanol:acetic acid:water=5:1:5(v/v/v)]로 15분간 세척후, 용액II[methanol:acetic acid:water=2:1:7(v/v/v)]로 30 분, 10% acetic acid로 하루 밤 동안 탈색하였다. 이때 gel은 Sigma사로부터 구입하였으며 stacking gel과 sepa-rating gel (Sigma사)의 농도는 각각 4.5%, 12%였다. 분자량 marker는 Sigma사로부터 구입한 prestainning marker로서 phosphorylase B(102 kDa), bovine serum albumin(81 kDa), ovalbumin(46.9 kDa), carbonic anhydrase(32.7 kDa), soybean trypsin inhibitor(30.2 kDa), egg lysozyme(24 kDa)이 혼합된 것을 사용하였다.

역상 HPLC(Reverse phase HPLC)

정제효소액에 2%가 되도록 trifluoroacetic acid(TFA) 를 가하여 5분간 효소활성을 실활시킨 다음 역상 HPLC를 행하였다. HPLC는 Jasco사(일본)의 PU-987 intelligent prep. pump와 UV-975 intelligent UV/VIS detector를 이용하였다. 전개방법은 0.1% TFA(A buffer)로 평준화시킨 YMC-Pack column(250 × 4.4 mm)을 이용하여 함수유기용매[acetonitrile/TFA(100/0.1, B buffer)]를 1.0 mL/min의 유속으로 B buffer 10~60%(0~50 min, linear)까지의 직선농도 구배로 전개하였다. 이때 성분검출은 UV 220 nm에서 행하였다.

아미노산 조성분석

일정량의 시료에 2회 증류한 6 N HCl(2% phenol 함유)용액을 가하고 질소가스를 충진, 밀봉하여 110°C에서 24시간 가수분해시킨 다음 감압농축하여 HCl을 제거하고 0.2 M Na-acetate buffer(pH 2.2) 100 μL에 용해시킨 다음 자동아미노산 분석기(Hitachi Co. L8500S, 일본)로 분석하였다.

LC-MS 분석

Molecular mass(mass/charge:m/z)는 Micromass, Manchester, U.K.의 Platform II Mass Spectrometry로 분석하였다. 이때의 mass range는 0~2000 a.m.u.(dalton/e)이었다.

결과 및 고찰

Protease의 분리 및 정제

M. racemosus f. racemosus PDA 103이 생산하는 protease를 정제한 결과는 Table 1과 같다. 먼저 배양액으로부터 단백질을 농축하기 위해서 황산암모늄을 이용하여 염석하고 투석한 결과, 수율은 29.4%, 정제도는 2.7배였다.

투석한 효소액 85 mL/570 mg을 20 mM phosphate buffer(pH 6.2)로 평준화시킨 CM Sephadex C-50 컬럼에 충진시킨 후 71.7 mL/hr의 유속으로 5.2 mL씩 용출하였다 (Fig. 1). 먼저 효소액을 용출한 후(fraction No. 10~50), 상기 완충액으로 컬럼을 세척한 다음(fraction No. 51~62),

Table 1. Summary of purification of protease from *M. racemosus f. rasemosus*

Step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Yield (%)	Purification
Crude Enzyme	540.0	5266.0	3775	0.7	100.0	1.0
80% Ammonium sulfate Precipitation	85.0	570.0	1112	2.0	29.4	2.7
CM Sephadex C50	28.5	131.4	1073	8.2	28.4	11.3
1st Sephadex G-100	45.9	15.6	707	45.3	18.7	62.9
2nd Sephadex G-100	57.0	10.2	613	60.1	16.2	83.5

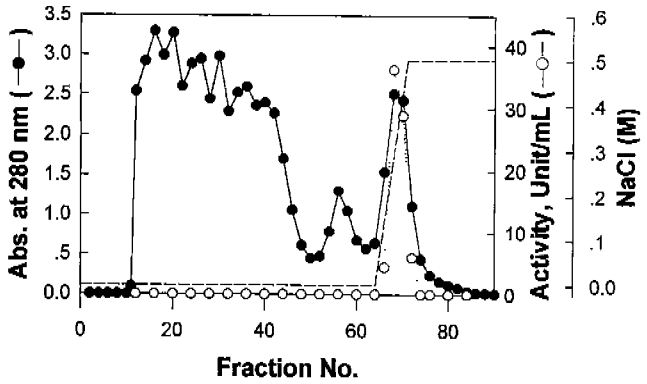

Fig. 1. CM Sephadex C50 column chromatography.
●—●: absorbance at 280 nm, ○—○: protease activity, ---: concentration of sodium chloride. About 120 mL of the enzyme was applied; column size, 2.6 × 55 cm; flow rate, 71.7 mL/hr; fraction volume, 5.2 mL/tube; elution buffer, 20 mM phosphate buffer pH 6.2; active fraction, 67-71.

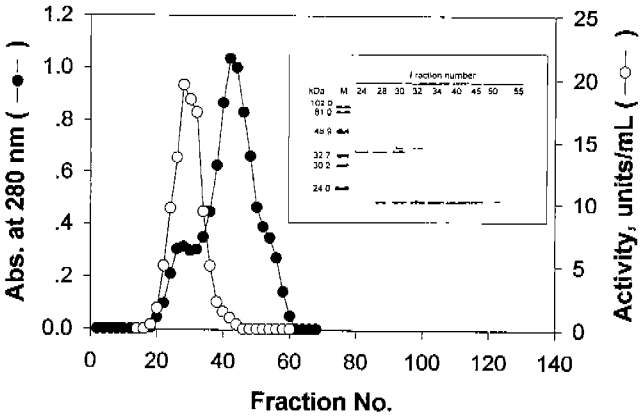

Fig. 2. 1st Sephadex G-100 gel filtration chromatography and SDS-PAGE.
●—●: absorbance at 280 nm, ○—○: protease activity. About 3 mL of the enzyme was applied; column size, 2.6 × 55 cm; flow rate, 71.7 mL/hr; fraction volume, 5.2 mL/tube; elution buffer, 20 mM phosphate buffer pH 6.2; active fraction, 24-30.

0.5 M NaCl/20 mM phosphate buffer(pH 6.2)을 가해 흡착된 활성 단백질을 회수하였다. 그 결과, 총 단백질의 약 75%에 해당하는 비흡착성 peak 부분에서는 효소활성이 검출되지 않았으나 NaCl 농도구배 개시지점부터 활성이 검출되어 67~71번 튜브의 단백질을 분획하였다. 이때의 수율은 28.4%, 정제도는 11.3배였다.

활성단백질을 동결건조한 후 Sephadex G-100 컬럼에 전량(131.4 mg/3 mL)을 사용하여 40 mL/hr의 유속으로 5.2 mL씩 분획한 결과, Fig. 2에서와 같이 두 개의 peak가 검출되었고 20~40번 분획에서 효소활성이 검출되었다. SDS-PAGE 결과 24~30번 분획의 단백질에서 주 밴드(분자량 약 34,000)가 검출되었으며, 30번과 40번 사이의 분획에서는 활성효소와 비활성 단백질이 혼합된 상태로 검출되었고, 40번 분획 이후에서는 효소활성은 물론, SDS-PAGE에서 밴드가 검출되지 않아, 본 protease의 분해산물 또는 배양원료 유래의 peptide인 것으로 사료된다. 따라서 주 밴드를 함유한 활성단백질을 정제하기 위해 24~30번의 분획을 모아 동결건조하였다. 이때의 수율은 각 18.7%였고 정제도는 62.9배였다.

동결건조한 후 활성단백질을 순수분리하기 위해서 Sephadex G-100 컬럼(2.6 × 65 cm)에 전량(131.4 mg/3 mL)을 사용하여 rechromatography 하였다. 40 mL/hr의 유속으

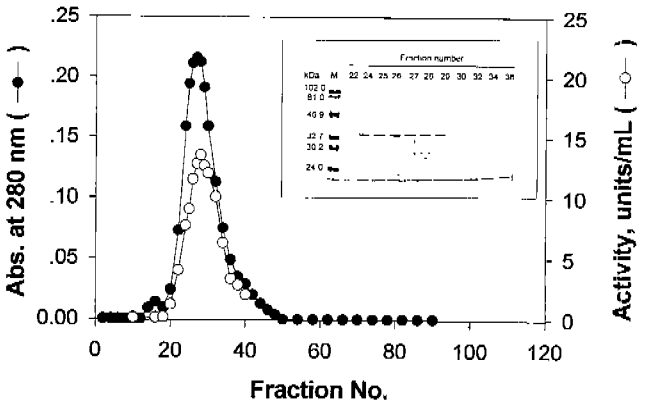

Fig. 3. 2nd Sephadex G-100 gel filtration chromatography and SDS-PAGE.
●—●: absorbance at 280 nm, ○—○: protease activity. About 3 mL of the enzyme was applied; column size, 2.6 × 55 cm; flow rate, 71.7 mL/hr; fraction volume, 5.2 mL/tube; elution buffer, 20 mM phosphate buffer pH 6.2; active fraction, 26-29.

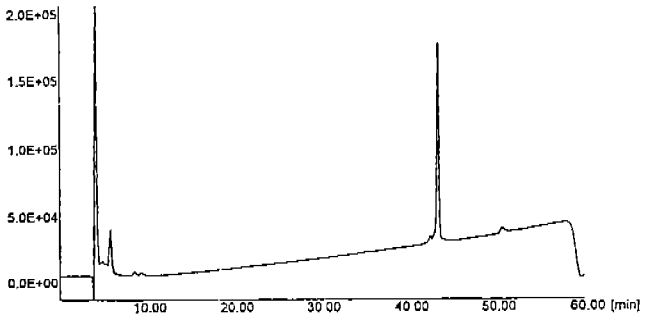

Fig. 4. Reverse phase-HPLC pattern.
A solution, 0.1% TFA; B solution, 0.1%TFA/acetonitrile; gradient, 10-60% B solution (50 min); flow rate, 1 ml/min.

로 5.2 mL씩 분획한 결과 Fig. 3에서와 같이 20~40번 분획에서 효소활성이 검출되었다. 22~36번 분획을 SDS-PAGE 분석한 결과 22~34번 분획에서 단일 밴드가 검출되었으며 26~29번 분획을 활성단백질 정제물로서 얻을 수 있었다. 이때의 수율은 각 16.2%였고 정제도는 83.5배였다.

역상 HPLC(Reverse phase HPLC)

두 차례의 gel filtration을 통해 정제된 효소의 순도를 결정하고 순수 분리한 protease의 아미노산분석 및 LC-MS에 의한 분자량을 결정하기 위한 시료를 준비하기 위하여 역상 HPLC를 수행한 결과(Fig. 4), retention time 43분에서 주 peak가 검출되었으며 주 peak가 전체 peak에 대해 95% 이상인 것으로 나타나 정제효소의 순도는 95%이상이었다.

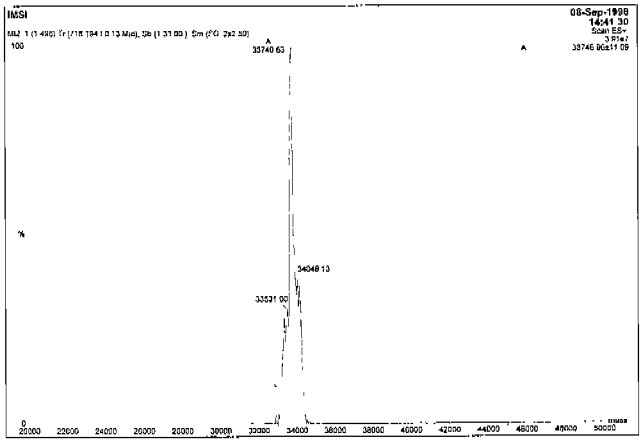

Fig. 5. Electrospray mass spectra of purified enzyme for molecular weight determination.
The upper-right number (33746.96UN11.09) represents the molecular weight of protease from *M.racemosus f. racemosus*.

분자량 측정

RP-HPLC에 의해 분획한 단백질의 분자량을 결정하기 위하여 LC-MS를 이용하였다(Fig. 5). Electrospray mass spectrum 분석 결과, *M. racemosus f. racemosus* 유래의 protease의 분자량은 33,746 Da인 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 메주에서 분리한 *Aspergillus wentti*[15], *Syncephalastrum racemosum*[6] protease의 분자량 32, 34

Table 2. Composition of amino acids of protease from *M. racemosus f. rasemosus*

Amino acids	mg%	%	Molecular weight*	Residues***
Asp+Asn	3.201	15.000	115.00	44(44.0)
Ser	1.640	7.685	87.07	30(29.8)
Glu+Gln	1.746	8.181	127.50	22(21.7)
Gly	1.535	7.193	57.05	43(42.5)
His	0.151	0.708	137.14	2(1.7)
Thr	2.084	9.765	101.10	33(32.6)
Arg	0.366	1.715	158.18	4(3.7)
Ala	1.349	6.321	71.07	30(30.0)
Pro	0.973	4.559	97.11	16(15.8)
Tyr	1.371	6.424	163.17	13(13.3)
Val	1.290	6.045	99.14	21(20.6)
Met	0.064	0.300	131.19	1(0.8)
Ile	1.142	5.351	113.15	16(16.0)
Leu	1.633	7.652	113.15	23(22.8)
Lys	1.483	6.949	128.17	18(18.3)
Phe	1.312	6.148	147.17	14(14.1)
Total	21.341	100	33,746**	330

* molecular weight of amino acid ** molecular weight of enzyme by LC-MS
*** number of expected residues

kDa과 유사하였으며 토양에서 분리한 *Syncephalastrum racemosum*[21], *Aspergillus fumigatus*[1] 유래의 fungal protease의 분자량 38, 63 kDa과는 차이가 있었다. 한편, Fig. 3의 SDS-PAGE분석에 의한 분자량이 약 34 kDa인 점과 LC-MS 분석에 의한 분자량이 일치하는 것으로 나타나 본 fungal protease는 monomer인 것으로 잠정 확인되었다.

아미노산 조성분석

정제한 효소단백질의 아미노산 조성은 Table 2와 같다. 총 16종의 아미노산이 검출되었고, LC-MS에 의해 밝혀진 분자량 33,746 Da를 기준으로 효소단백질의 아미노산 잔기수를 계산한 결과 본 protease는 330잔기로 이루진 것으로 추정되었으며 아미노산 잔기 중 glycine, threonine, serine, alanine의 잠정적인 잔기수가 각각 43, 33, 30, 30으로 많이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌다.

요 약

한국의 재래식 메주로부터 분리한 *M. racemosus f. racemosus* PDA 103이 생산하는 protease를 분리정제하였다. 먼저 기본배지[밀기울:1% glucose 함유 H_20=1:1(w/v)]를 이용하여 배양한 후, 20 mM phosphate buffer, pH 6.2로 protease를 추출하고 80% 포화 황산암모늄에 의한 염석, CM Sephadex C50 ion-exchange chromatography와 두차례에 걸친 Sephadex G-100 gel filteration chromatography하여 비활성도 60.1 unit/mg, 정제배수 83.5배로 효소를 정제하였다. 정제 효소의 순도는 YMC-pack protein-RP column chromatography에 의해 95% 이상인 것으로 나타났다. RP-HPLC 분석으로 분리된 주 peak를 분획하고 LC-MS를 이용하여 분자량을 확인한 결과 33,746 Da임이 밝혀졌으며 SDS-PAGE에 의한 분자량과 일치하는 점으로 보아 단백질 분자구조가 monomer 인 것으로 나타났다. 아미노산 조성분석 결과와 분자량으로부터 잔기수를 추정한 결과, *M. racemosus f. racemosus*가 생산하는 protease는 330잔기로 구성된 것으로 잠정 확인되었다.

REFERENCES

1. Cha, W. S., Y. J. Cho, and C. Choi. 1989. The production of alkaline protease by *Aspergillus fumigatus* and purification of enzyme. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **18:** 279–286.
2. Cho, J.S. 1989. Supply and demand of products, present condition and the point of sue of research of Korean soy seasonings. *Food Science and Industry* **22:** 28–36.
3. Choi, H. K., W. I. Cho, and T.W. Moon. 1996. Preperation of enzymatic hydrolysis of soymilk residue protein and fractionation of bile acid-binding components. *Food and Biotechnology* **5:** 64–69.
4. Hagihara, B. 1956. *Methods in Enzymology,* volII. Asashousyoten, Tokyo.
5. Ho, H. C., L. Y. Chen, and T. H. Liao. 1996. Identification of a fungal protein of *Syncephalastrum racemosum* as aspartic protease. *Arch. Biochem. Biophys.* **334:** 97–103.
6. Kang, Y. J. 1984. Enzymatic modification of soy proteins, effects of funtional properties of soy isolate upon proteolytic hydrolysis. *Korean J. Food Sci. Technol.* **16:** 211–217.
7. Kang, Y. J., K. C. Lee, and Y. H. Park. 1988. Hydrolysis of 7S and 11S soy proteins by commercial proteases. *Korean J. Food Sci.Technol.* **20:** 338–343.
8. Kim, J. K. and C. S. Kim. 1980. The taste components of ordinary Korean soy sauce. *Agric. Chem. Biotechnol.* **23:** 89–105.
9. Kim, S. H. and H. J. Lee. 1985. Characteristics of bitterness peptide from the cheese and soy paste. *Korean J. Food Sci. Technol.* **17:** 276–282.
10. Kim, S. S. 1978 Effect of *meju* shapes and strains on the quality of soy sauce. *Korean J. Food Sci. Technol.* **10:** 63–72.
11. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:** 680–685.
12. Lee, C. Y. 1989. Korean soy seasonings and culture. *Food Science and Industry* **22:** 3–7.
13. Lee, J. S., S. J. Kwon, S.W. Chung, Y. J. Choi, J. Y. Yoo, and D. H. Chung. 1996. Changes of microorganism enzyme activities and major component during the fermentation of Korean traditional *Doenjang* and *Kochujang*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24:** 247–253.
14. Lim, S. I. and J. Y. Yoo. 1998. Production and characteristics of protease in *Mucor racemosus f. racemosus* in Korean traditional *meju*. *Korean Soc. Appl. Microbiol. '98 symposium.*
15. Lim, S. I. and J. Y. Yoo. 1999. Purification and characterization of protease produced in *Aspergillus wentti* from Korean traditional *meju*. *Korean Soc. Food Sci. Tech. 62nd symposium.*
16. Lim, S. I. and J. Y. Yoo. 1998. Purification of the protease from *Syncephalastrum racemosum*. *Korean Soc. Food Sci. Nutr. 44th fall symposium.*
17. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193:** 265.
18. Neurath, H. 1989. *Proteolytic Enzyme, A Practical Approch.* IRL Press, Oxford.
19. Park, C.K. and I.K. Hwang. 1975. Consumption pattern of Korean traditional soy sauce and consumer sensory evalution. *Korean J. Soc. Food Sci. Nutri.* **11:** 521–526.
20. Pour-El, A. 1981. Protein funtionality definition and methodology. *In* J. P. Cheery(ed), *Protein Funtionality in Food.* American Chemical Society Symposium Series 47, Washington D. C.
21. Seo, J.S. and T.S. Lee. 1992. Free amino acid in traditional

soy sauce prepared from *meju* under different formations. *Korean J. Dietry Culture* **7:** 323–328.
22. Shon, D.H. 1994. Physiological activities of peptide from food protein. *Food Technology* **7:** 25.
23. Yoo, Y.S. and S.R. Lee. 1988. Efficacy of enzyme treatment for the quality improvement of soymilk. *Korean J. Food Sci. Technol.* **20**: 426–432.

(Received Ocotober 5, 1999)