

## 전통 메주로부터 분리한 *Bacillus subtilis* PCA 20-3 유래의 Protease 생산과 특성

임성일 · 김현규 · 유진영  
한국식품개발연구원 생물공학연구부

### Characteristics of Protease produced by *Bacillus subtilis* PCA 20-3 isolated from Korean Traditional *Meju*

Seong-Il Lim, Hyun-Kyu Kim and Jin-Young Yoo  
Division of Chemistry and Biotechnology, Korea Food Research Institute

#### Abstract

Protease production and its characteristics were investigated with *Bacillus subtilis* PCA20-3 which was isolated from Korean traditional *meju*. The optimum culture conditions of *Bacillus subtilis* PCA20-3 for the production of the protease were as follow: 0.2% soytone, 2% starch, 0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2%  $\text{CaCl}_2$ , 0.01% yeast extract, 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0, 30°C and 20 hrs. The optimum pH and temperature for enzyme activity of protease producing *Bacillus subtilis* PCA20-3 were pH 8.0-10.0 and 55°C, respectively. The enzyme was relatively stable at pH 6.0~11.0 and at temperature below 50°C. The activity of the enzyme was inhibited by  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ . 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride inhibited 89.2% of enzyme activity. This indicates that the enzyme is serine protease. The  $K_m$  value was  $5 \times 10^{-4}$  M,  $V_{max}$  value was 100  $\mu\text{g}/\text{min}$ . This enzyme hydrolyzed casein more rapidly than bovine serum albumin.

Key words : *Bacillus subtilis* PCA20-3, protease, *meju*

#### 서 론

장류 제조에 있어 이용되는 메주는 대두를 증자하여 발효시킨 것으로 메주가 숙성되는 동안 세균, 곰팡이 및 효모가 증식되며, 이들에 의하여 protease, amylase 및 lipase 등의 효소가 생성된다. 메주의 자연 숙성중의 microflora에 대한 연구보고로서 박 등<sup>(1)</sup>은 재래식 메주에서 *Mucor mucedo*, *Rhizopus japonicas*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium* sp., *Saccharomyces coreanus* 등을 분리하였고, 조 등<sup>(2)</sup>은 재래식 메주에서 *Mucor abundans*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium lanosum*의 곰팡이들을 분리하였으며, 세균은 *Staphylococcus aureus*가 일부 분리되었으나, 대부분 *Bacillus* sp.가 존재한다고 보고하였다. 또한 허 등<sup>(3)</sup>은 재래식 메주에서 산 생성균을 분리하였는데, 호기성 산 생성

균은 *Micrococcus* sp.이고, 혐기성 산 생성균은 *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp. 및 *Lactobacillus* sp.이며, 호기성 일반세균은 *Bacillus* sp.가 주종을 이루었다고 보고하였다. 메주에서 생성된 효소 중 protease는 대두의 단백질에 작용하여 여러 형태의 peptide가 생성되어 장류의 품질에 커다란 영향을 미칠 뿐 아니라<sup>(4,5)</sup>, 아미노산을 공급하는 영양기능, 맛이나 용해성, 유화성 등에 관여하는 감각기능, 여러 생리활성을 나타내는 생체조절기능 등에 관여한다. 특히 생리활성을 나타내는 생체 조절기능으로는 항암, 혈압강하, 혈청콜레스테롤 강하, 면역증강, 칼슘흡수 촉진 등 광범위한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>(6)</sup>. 또한 최근 생리활성기능을 갖고 있는 콩 펩타이드를 식품에 첨가한 새로운 기능성 식품이 상품화되어 시장에 출시되었으며, 콩 펩타이드가 가진 생리활성 기능을 포함한 여러 가지 기능을 이용하여 건강지향식품, 기능성식품, 제약, 화장품에 응용한 예도 있다<sup>(7)</sup>.

한국 재래식 간장의 맛은 아미노산을 비롯한 유기산, 유리당 등 다양한 성분들의 종합적인 조화의 맛에 기인한다. 특히 아미노산들은 그 종류에 따라 지미(旨

\*Corresponding author : Jin-Young Yoo, Division of Chemistry and Biotechnology, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyundong, Songnam, Kyonggido 463-420, Korea; Phone: +82-342-780-9106; FAX: +82-342-780-9265; E-mail: microbug@kfri.re.kr

味), 고미(苦味), 감미(甘味) 등의 한국 재래식 간장의 중요한 맛을 낼 뿐 만 아니라, peptides도 그 종류에 따라서 다양한 맛을 낸다<sup>(8-14)</sup>. *B. licheniformis* SSA3-2M1이 분비하는 protease 및 peptidase<sup>(15)</sup>는 대두단백질로부터 아미노산 및 peptide를 생산하며, 한국 재래식 간장의 맛에 관여하는 아미노산 및 peptide들의 조성에 크게 관여한다고 보고된 바 있다. 그러나 장류에는 다양한 세균이 존재하며 이들의 특성이 모두 밝혀지지 않은 이상, 어떠한 균주가 가장 우수하다고는 단정 지을 수가 없다.

본 논문에서는 한국 재래식 메주로부터 protease 활성이 매우 높은 것으로 평가된 *Bacillus subtilis* PCA 20-3을 선발하여 재래식 된장과 간장의 맛 성분의 생산에 효소가 어떻게 관여하는지와 그 효소들 중 한국 재래식 메주의 독특한 맛 성분 생산에 크게 관여하는 효소를 밝혀 앞으로의 균 육종에 이용할 뿐만 아니라, 기능성 peptide의 생산을 위한 미생물유래 protease의 생산기반을 구축하기 위한 전단계 연구로서 *Bacillus subtilis* PCA 20-3 유래의 protease의 생산과 특성에 관해 연구하여 균주 육종 및 단백질 분해효소에 대한 기초자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 시약

균주는 유 등<sup>(16)</sup>이 재래식 메주에서 protease 활성이 높은 균주로 선발한 *Bacillus subtilis* PCA 20-3를 사용하였으며, hammarstein casein(H. casein)은 Merck 제품을, penmethanesulfonyl fluoride(PMSF),  $\rho$ -Chloro-mercuribenzoic acid(PCMB), ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 2,4-dinitrophenol(2,4-DNP), bovine serum albumin(BSA)은 Sigma 제품을, 그 밖의 시약은 일급 시약을 사용하였다.

### 효소 생산 조건

효소 생산에 미치는 배지의 조성을 조사하기 위하여 탄소원, 유기질소원, 무기질소원, 무기염류, 초기 pH, 온도를 조사하였다. 탄소원은 기본배지(0.2%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01% yeast extract)에 각 탄소원을 2%되게 조정하여 30°C에서 20시간 배양한 후 protease 활성을 측정하였으며, 유기질소원은 0.2%, 무기질소원은 0.1%, 무기염류는 0.2%되도록 조정하여 측정하였다. 효소생산에 미치는 초기 pH의 설정은 효소생산 최적배지[0.2% soytone, 2% soluble starch, 0.1%

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2%  $\text{CaCl}_2$ , 0.01% yeast extract, 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ]를 이용하여 초기 pH를 5.0-9.0으로 조정한 후, 30°C에서 20시간 균주를 배양하여 효소활성을 측정함으로써 최대활성이 검출된 pH를 효소생산 최적 pH로 설정하였다. 최적온도는 효소생산 최적 pH인 7.0에서 온도의 범위를 25-45°C로 달리하여 20시간 균주를 배양하여 상기와 동일한 방법으로 설정하였고, 배양시간은 최적 pH와 온도인 pH 7.0과 30°C에서 0-30시간 배양하여 최대활성이 검출된 것을 최적배양시간으로 설정하였다.

### 조효소의 조제

*Bacillus subtilis* PCA 20-3을 nutrient broth로 30°C에서 12시간 전 배양한 후, 효소생산용 배지 1L에 1%가 되게 접종하여 30°C에서 20시간 배양한 다음, 16,000×g에서 30분간 원심분리한 상등액을 조효소액으로 하였다.

### 단백질 가수분해 활성

효소 활성은 Hagihara의 방법<sup>(17)</sup>에 준하여 측정하였다. 즉, 조효소액 0.5 mL에 0.1 M sodium citrate buffer(pH 5.0) 1 mL 가한 다음, 기질용액(0.6% hammarstein casein, pH 5.0)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.44 M trichloroacetic acid 2.5 mL를 넣어 반응을 중지시키고 실온에서 10분간 방치한 다음 원심분리시켜 상등액 1 mL에 0.55 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 10 mL와 1 mL의 1 N Folin-ciocalteu 용액을 넣어 37°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소단위는 조효소액 1 mL가 1분간 1  $\mu\text{g}$ 의 tyrosine을 유리시키는 것을 1 unit로 하였다.

### 효소의 특성조사

pH의 영향은 0.2 M Britton-Robinson buffer pH 2.0-12.0까지의 범위에서 효소와 기질을 혼합하여 37°C, 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였으며, pH 안정성은 효소액을 pH 2.0-12.0 범위에서 각 pH 별로 30°C에서 1시간 정치한 후 pH 8.0으로 환원시킨 다음, 37°C에서 30분간 효소액과 기질을 반응시켜 잔존 효소활성을 측정하였다. 온도의 영향은 pH 8.0의 0.1 M Tris-HCl buffer와 효소, 기질을 혼합한 후, 20, 30, 40, 50, 60, 70°C의 각 온도에서 반응시켜 효소활성을 측정하였으며, 온도에 대한 안정성은 각 온도에서 효소를 1시간 정치시킨 다음, 기질과 혼합 후, 37°C에서 30분간 반응시켜 잔존 효소활성을 측정하였다.

금속이온에 대한 영향은 각종 금속염을  $2 \times 10^{-3}$  M

되게 pH 8.0의 증류수에 녹이고 금속이온 용액 0.5 mL와 효소액 0.5 mL를 섞어 30°C에서 60분간 정치한 다음 잔존 효소활성을 측정하였으며 저해제의 영향은 0.5 mL의 각 종 저해제와 0.5 mL의 효소액을 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 잔존활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 효소생산을 위한 최적조건

각종 영양물 첨가에 의한 영향은 Table 1과 같다. 먼저 2%의 탄소원을 첨가하여 배양한 결과, sucrose 첨가 시의 활성을 100%로 하였을 경우, soluble starch 첨가 시 229%, fructose 첨가 시 176%로 효소활성이 증가되었으며, maltose 첨가 시는 오히려 활성이 현저히 저하되어 8%의 활성이 검출되어 탄소원은 효소생성에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 기본배지에 유기질소원을 각각 0.2%씩 첨가하여 30°C에서 20시간 배양한 결과는 soytone이 존재하는 배지에서 효소활성이 129% 검출되어 유기질소원 중 효소생성에 가장 효과적이었다. 무기질소원을 0.1% 농도로 첨가한 결과, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 첨가 시 120%의 효소생산량이 증가한 반면, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>에 의해서는 NaNO<sub>3</sub> 첨가 시에 비해

활성이 1% 검출되어 효소생산량이 가장 낮았다. 한편, 0.2%의 무기염류를 배지에 첨가한 결과, CaCl<sub>2</sub> 첨가 시 효소활성이 354%에 이르는 높은 증가를 보인 반면 FeSO<sub>4</sub> 첨가 시에는 효소생산량이 17%로 감소하였다.

이와 같은 결과는 최 등<sup>(20)</sup>의 간장에서 분리한 *Bacillus* sp.의 경우 soluble starch와 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 첨가 시 효소활성이 증가하였다는 보고와 유사하였고, 변 등<sup>(21)</sup>의 전통 메주 유래의 *B. subtilis* YG-95의 경우, soluble starch 첨가 시 활성이 증가하였으나, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 첨가 시 활성이 감소하였고, 최 등<sup>(22)</sup>의 간장 유래의 *Bacillus* sp.의 경우, soluble starch, soytone, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 첨가 시는 활성이 증가한 반면 CaCl<sub>2</sub>의 경우는 활성이 42.6%로 감소하여 장류 유래의 *Bacillus* sp.의 균이라도 배양조건에 따라 약간의 차이가 있는 것으로 나타났다.

*B. subtilis* PCA 20-3의 protease 생산을 위한 최적 배양온도 및 pH, 배양시간을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, pH의 영향은 효소활성에 큰 영향을 미치지 않았으나 pH 7.0에 최대활성이 검출되었으며, 온도의 영향은 배양온도에 따라 큰 차이가 있었는데 30°C 배양 시 최대활성이 검출되었으나 그 이상에서는 활성이 급격히 감소하였다. 배양시간별 효소활성은 20시간 배양 시 최대를 나타내었으나 그 후 급격히 감소하여 *B. subtilis* PCA 20-3의 protease 생산은 배양시간과 온도에 대해 매우 민감한 것으로 나타났다. 이 결과는 이 등<sup>(18)</sup>의 *Bacillus*속 유래의 alkaline protease가 pH 7.5와 35°C에서 최대활성을 보였으며, 황<sup>(19)</sup>의 *Bacillus* sp.의 alkaline protease가 24시간 배양 시 최대활성을 나타내었다는 보고와 약간의 차이가 있는 것으로 나타났고, 최 등<sup>(19)</sup>의 간장에서 분리한 *B. subtilis globigii* CCKS-118 유래의 protease의 경우 배양시간 20, pH 7.0에서 최대활성을 나타내었다는 보고와 유사한 결과

Table 1. Effect of various nutrient components on the production of protease from *Bacillus subtilis* PCA20-3

| Source                            | Component   | Relative activity (%) |
|-----------------------------------|---|-----------------------|
| Carbon(2%, w/v)                   | sucrose   | 100                   |
|                                   | galactose   | 106                   |
|                                   | soluble starch  | 229                   |
|                                   | fructose  | 176                   |
|                                   | maltose   | 16                    |
|                                   | glucose   | 43                    |
|                                   | lactose   | 8                     |
|                                   | xylose  | 13                    |
| Organic nitrogen<br>(0.2%, w/v)   | yeast extract   | 100                   |
|                                   | tryptophan  | 77                    |
|                                   | soytone   | 129                   |
|                                   | peptone   | 64                    |
|                                   | skim milk   | 86                    |
|                                   | casein  | 92                    |
| Inorganic nitrogen<br>(0.1%, w/v) | NaNO <sub>3</sub>   | 100                   |
|                                   | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>               | 120                   |
|                                   | NaNO <sub>2</sub>   | 59                    |
|                                   | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> | 53                    |
|                                   | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                               | 1                     |
|                                   | KNO <sub>3</sub>  | 19                    |
| Inorganic salt<br>(0.2%, w/v)     | NaHPO <sub>4</sub>  | 100                   |
|                                   | CaCl <sub>2</sub>   | 354                   |
|                                   | CuSO <sub>4</sub>   | 78                    |
|                                   | MgSO <sub>4</sub>   | 21                    |
|                                   | FeSO <sub>4</sub>   | 17                    |

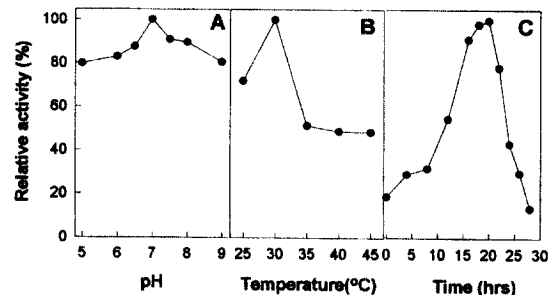


Fig. 1. Effects of initial pH (A), temperature (B) and culture time (C) on the production of protease from *B. subtilis* PCA20-3.

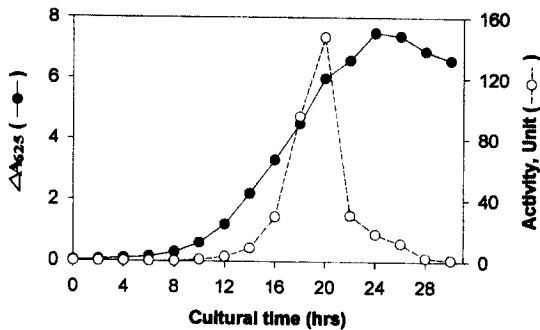


Fig. 2. Growth curve and proteolytic activity of *B. subtilis* PCA20-3 at optimal condition.  
● : Growth curve, ○ : Activity

를 얻었다.

최적배지 및 배양조건에서의 균체생육과 효소생산과의 상관관계를 조사한 결과(Fig. 2), 균의 exponential phase는 12~20시간이었으며, stationary phase는 22~26시간이었다. 효소생산량은 배양 16시간 이후부터 급격히 증가하여 배양 20시간에서 최대활성이 검출되었으나 20시간 이후 급격히 저하되었다. 따라서 최대 활성이 검출된(효소 최대 생산)시점은 exponential phase의 말기시점으로서 균체량과 효소생산량과의 상관관계는 약간의 차이가 있는 것으로 나타났다. 한편, stationary phase 이후 효소활성이 급격히 저하된 이유는 아직 밝혀지지 않았다. 단백질 분해효소는 그 자체가 단백질로 이루어져 있어 자가소화 현상이 일어나는데 효소활성이 강할수록 그 현상이 강하게 일어난다. 그리고 균주의 growth pattern과 효소활성과는 반드시 일치하는 것은 아니나 정체가 시점에서부터 활성이 감소하는 현상이 일반적인 현상이다. 그러나 본 연구에서 최대활성이 검출된 시점인 20시간 이후에는 배지중의 효소의 기질이 되는 단백질의 부족현상이 발생할 수 있어, 배지성분 중의 기질이 아닌 효소 단백질 자체를 가수분해할 가능성이 있다. 동시에 이미 생성된 효소 단백질이 30°C에 계속적으로 노출됨으로서 효소의 자가소화현상이 발생하여 배양배지 내의 효소활성이 급격히 저하된 것으로 추정된다.

pH 및 온도에 의한 영향

효소의 특성을 조사하기 위해서 최적배지와 최적배양조건에서 배양하고 원심분리 한 상등액을 조효소액으로 제조하였다. Casein을 기질로 하였을 때, 본 효소의 효소역가는 151 unit이었다. pH 2.0~12.0 범위의 완충용액 1 mL에 기질 2.5 mL를 혼합한 다음, 효소 0.5 mL를 가하여 37°C에서 30분간 반응시켜 효소활성을

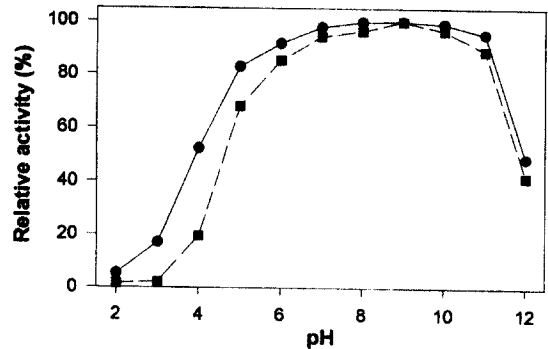


Fig. 3. Effect of pH on proteolytic activity and stability of protease produced from *B. subtilis* PCA20-3.  
● : Activity, ■ : Stability

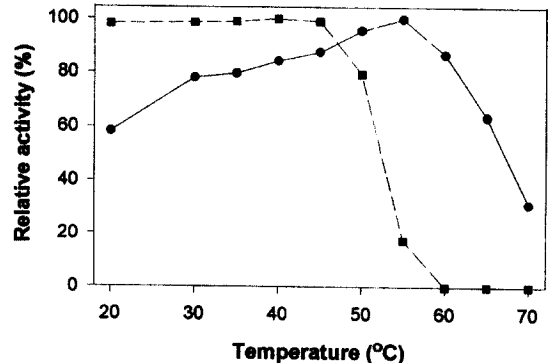


Fig. 4. Effect of temperature on proteolytic activity and stability of protease produced from *B. subtilis* PCA20-3.  
● : Activity, ■ : Stability

측정한 결과(Fig. 3), 최적 pH는 6.0~11.0의 범위이었다. 효소의 pH 안정성은 효소와 완충용액을 혼합한 후 30°C에서 1시간 방치 후, 기질을 혼합한 다음, 37°C에서 30분간 반응시켜 효소의 pH 안정성을 조사한 결과(Fig. 3), pH 6.0~11.0의 범위에서 효소가 안정한 것으로 나타났다. 이 결과는 Tsuru 등<sup>(23)</sup>, 문<sup>(24)</sup>, 김 등<sup>(25)</sup>, 황<sup>(19)</sup>이 보고한 *Bacillus* sp.의 alkaline protease의 최적 pH가 10.0인 것과 유사하였으며, 안 등<sup>(26)</sup>, 장 등<sup>(27)</sup>, 문 등<sup>(24)</sup>이 *B. subtilis* protease가 6~12의 pH 범위에서 안정하다고 보고한 것과 비교해 본 효소의 pH 안정범위는 다소 협소하였다.

효소의 열에 대한 영향은 Fig. 4와 같다. 효소액 0.5 mL과 0.1 M Tris-HCl buffer 1 mL, 기질 2.5 mL를 혼합하여 각 온도에서 반응시킨 후 효소활성을 측정할 결과, 55°C에서 반응하였을 때 최대활성이 검출되어 본 효소의 최적 온도는 55°C이었으며, 효소액과 완충용액을 혼합한 후 각 온도에서 1시간 방치한 다음, 기

Table 2. Effect of metal ions on the protease activity

| Ion ( $2 \times 10^{-3}$ M) | Metal                                | Relative activity (%) |
|-----------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Control                     | -                                    | 100                   |
| Ca <sup>2+</sup>            | CaCl <sub>2</sub>                    | 101                   |
| Fe <sup>2+</sup>            | FeSO <sub>4</sub>                    | 28                    |
| Cu <sup>2+</sup>            | CuSO <sub>4</sub>                    | 55                    |
| K <sup>+</sup>              | K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>       | 103                   |
| Mg <sup>2+</sup>            | MgSO <sub>4</sub>                    | 97                    |
| Mn <sup>2+</sup>            | MnSO <sub>4</sub>                    | 104                   |
| Pb <sup>2+</sup>            | Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> | 96                    |

질과 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켜 효소활성을 측정할 결과, 20~45°C 범위의 온도에서 안정한 것으로 나타났으며 50°C 이상에서 급격히 효소활성이 감소하였다. 본 효소의 열에 대한 영향은 안 등<sup>(26)</sup>, 이 등<sup>(28)</sup>, Tsuru 등<sup>(23)</sup>, 오 등<sup>(29)</sup>의 *Bacillus* sp.의 최적온도가 55°C 이었다고 한 보고와 황<sup>(18)</sup>의 40°C 이상의 높은 온도에서 최대활성을 검출되었다는 보고와 일치하였다. 또한 Tsuru 등<sup>(23)</sup>, 오 등<sup>(29)</sup>, 김 등<sup>(25)</sup>, 황<sup>(19)</sup>의 *Bacillus* sp. 유래 alkaline protease의 열안정성이 45°C 이하였다는 보고와 본 효소의 열에 대한 안정성이 일치하였다. 한편 장 등<sup>(27)</sup>의 *B. licheniformis* SSA3-2M1의 경우, 최적온도가 50°C로 본 효소에 비해 비교적 낮았으며 45°C 이하에서 안정하여 본 효소와 유사한 것으로 나타났다.

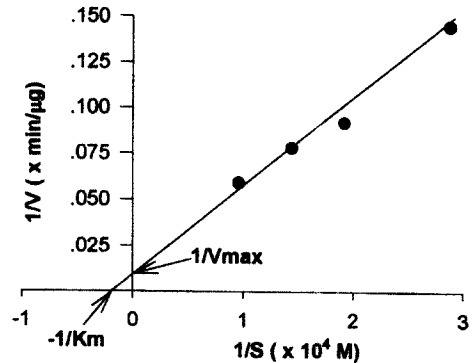
#### 금속이온과 저해제의 영향

본 효소에 미치는 금속이온의 영향을 조사한 결과, Table 2와 같이 Fe<sup>2+</sup>와 Cu<sup>2+</sup>에 의해서만 각각 28%, 55%로 효소활성이 감소되었으며 그 밖의 다른 금속이온은 효소활성에 크게 영향을 미치지 않았다. 이와 같은 결과는 최 등<sup>(20)</sup>의 *Bacillus* sp.의 alkaline protease가 Cu<sup>2+</sup>에 의해 활성이 증대되어 본 효소와 상반되는 결과였으나, 최 등<sup>(22)</sup>의 Fe<sup>2+</sup>에 대해 효소활성이 저해되었다는 보고와 유사하였다.

효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제 중, metal protease 저해제인 EDTA, 말단아미노산 잔기가 활성부위인 효소의 저해제인 2,4-DNP, 활성부위에 SH기를 가진 thiol protease 저해제인 PCMB, serine protease의 저해제인 PMSF를 선정하여 *Bacillus subtilis* PCA 20-3의 protease 활성에 미치는 영향을 검토하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 활성 serine 잔기에 특이적으로 결합하여 효소작용을 저해하는 PMSF에 의해 protease 활성이 89.2%까지 현저히 저해되었고, thiol protease를 저해하는 PCMB에 의해 51.8%의 활성이 저해되는 것으로 나타나, 본 효소는 효소 활성부위에 serine 잔기를 가지는 serine protease인 것으로 시사되었으며, 촉

Table 3. Effect of various inhibitors on the protease activity

| Reagents(2 mm)                   | Relative activity (%) |
|----------------------------------|-----------------------|
| Control                          | 100.0                 |
| Ethylenediamine-tetraacetic acid | 61.9                  |
| 2,4-dinitrophenol                | 93.3                  |
| p-chloromercuribenzoic acid      | 48.2                  |
| Phenylmethanesulfonyl fluoride   | 10.8                  |

Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of hamma-stein casein by protease from *B. subtilis* PCA20-3.

매부위에 cystein 잔기가 존재할 가능성도 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 간장 유래의 *B. subtilis globigii* CCKS-118<sup>(20)</sup>, *B. subtilis* CCKS-111<sup>(22)</sup>, 메주 유래의 *Scopulariopsis brevicaulis* protease<sup>(30)</sup>의 화학적 저해제의 영향과 일치하였다.

#### 효소 반응 속도상수의 결정

기질농도와 효소활성과의 관계를 검토하기 위하여 H. casein을  $0.3 \times 10^{-4}$  M~ $2 \times 10^{-4}$  M로 기질농도를 달리 하였을 때, 효소 활성의 변화를 측정하고, Lineweaver-Burk plotting한 결과, Fig. 5에서와 같이  $K_m$  값은  $5 \times 10^{-4}$  M,  $V_{max}$  값은 100  $\mu\text{g}/\text{min}$ 이었다. 이러한 결과는 최 등<sup>(20,22,31)</sup>이 분리한 *B. subtilis globigii* CCKS-118 protease의  $K_m$  값,  $1.24 \times 10^{-4}$  M과 *B. subtilis* CCKS-111의  $K_m$  값,  $2.313 \times 10^{-4}$  M, *Streptomyces griseus* HC-1141 protease의  $K_m$  값  $2.299 \times 10^{-4}$  M과 비교해 높게 나타나 기질결합력이 1/5-1/2 정도 낮은 반면, *B. subtilis* sp.의 조효소의  $V_{max}$  값은 각각 25.99  $\mu\text{g}/\text{min}$ , 39.216  $\mu\text{g}/\text{min}$ <sup>(20,22)</sup>인 것으로 나타나, 본 효소의 최대반응속도가 2.5~4배 높게 나타났다. 촉매활성( $k_{cat}/K_m$ )은 효소량의 정량적 평가가 이루어지지 않아 기질과 효소 촉매잔기와의 반응력인 kcat 값을 결정할 수 없어 구하지 못했다.

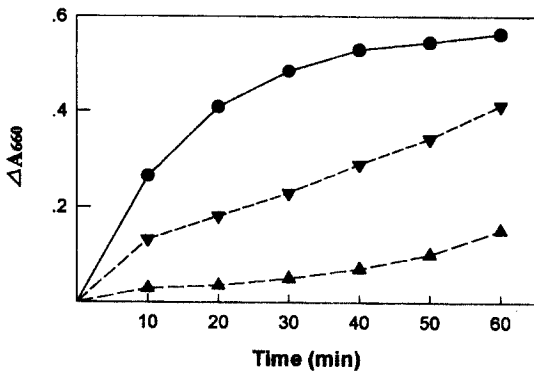


Fig. 6. Hydrolysis of various substrates by protease from *B. subtilis* PCA20-3.  
 ● : H. casein, ▼ : isolated soybean protein, ▲ : bovine serum albumin

기질에 대한 특이성

본 효소의 기질에 대한 특이성을 조사한 결과, Fig. 6에서와 같이 기질 가수분해력은 H. casein > isolated soybean protein > BSA 순으로 높게 나타나, 본 효소의 casein에 대한 가수분해력은 *B. subtilis* sp. protease<sup>(20,22)</sup> 와 *Scopulariopsis brevicaulis*<sup>(30)</sup> 유래의 protease가 casein에 대해 높은 가수분해력을 가졌다는 보고와 유사하였다. 본 균주가 메주에서 분리한 균주 유래의 protease임에도 불구하고 isolated soybean protein 보다도 casein에 대해 가수분해력이 높은 것은 단백질 가수분해효소의 단백질 분해력이 기질의 입체구조에 따라 상당히 좌우되기 때문이다. 즉, 기질 단백질의 분자구조가 복잡하게 folding 되어 compact한 경우에는 효소와 반응시켜도 intact한 상태로 검출되는 경우가 많으며, 입체구조가 linear.으로서 unfolding 되었거나 folding이 약하게 이루어져 있는 경우는 분해되기 쉽다. 따라서 이러한 단백질 분자의 구조적인 차이점에 의해 메주에서 분리한 효소일지라도 어떠한 단백질의 기질을 사용하는가에 따라서 가수분해력이 달라질 수 있다고 할 수 있다.

이상과 같은 결과로부터 *B. subtilis* PCA20-3이 생산하는 protease는 alkaline protease의 특성을 가지고 있으면서 pH 5.0이상에서도 80% 이상의 활성을 유지하고 있고 된장과 간장의 발효기간을 0~70일간으로 설정하였을 경우, pH의 변화범위가 각각 pH 5.3~7.7, 5.4~8.0인 것으로 보고된 바 있어<sup>(32)</sup> 된장과 간장의 숙성 기간 중에도 단백질 분해활성이 높게 유지될 것으로 판단된다. 그리고 효소반응속도상수에서 초기최대반응속도  $V_{max}$ 가 100  $\mu\text{g}/\text{min}$ 으로서 메주나 간장유래의 다른 세균에 비해 비교적 높게 나타나, 된장과 간장의

제조원료가 되는 메주의 대량생산 공정에 *B. subtilis* PCA20-3의 사용이 긍정적으로 평가될 수 있을 것으로 사료된다. 최근 한국 전통 발효식품에 대한 우수성을 찾고자 하는 연구가 왕성하게 진행되고 있으며, 그 중 콩을 원료로 한 발효식품에 있어 콩 펩타이드의 생리 기능성의 검증에 대한 연구 또한 체계적으로 이루어지고 있다. 이와 같은 펩타이드 연구를 위해서는 먼저 한국 전통 콩 발효식품으로부터 다양한 단백질 분해 효소에 대한 연구가 이루어져야 한다. 이러한 관점에서 본 연구는 콩 펩타이드의 연구에 있어 콩 단백질을 분해하는 protease의 이용을 위한 기초자료로서 응용될 수 있으리라 기대된다. 현재 본 연구팀은 *B. subtilis* PCA20-3이 분비하는 protease를 정제하고 N-terminal amino acid sequence를 조사하고 있다. 앞으로 정제효소의 primary structure와 같은 분자레벨의 연구가 이루어져야 할 것이며, 또한 효소의 각 아미노산에 대한 기질 특이성 등이 연구된다면 콩 펩타이드 제조 공정에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

한국 전통 메주로부터 분리·동정한 *Bacillus subtilis* PCA20-3이 생산하는 protease의 생산조건과 특성을 조사하였다. Protease의 생산 최적조건은 0.2% soytone, 2% starch, 0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2%  $\text{CaCl}_2$ , 0.01% yeast extract, 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0, 30에서 20시간이었다. 효소의 최적작용 pH와 온도는 6.0~11.0, 55°C였고 pH 6.0~11.0의 범위와 50°C이하에서 안정하였다. 금속이온중  $\text{Fe}^{2+}$ 와  $\text{Cu}^{2+}$ 에 의해 효소 활성이 저해되었다. 2 mM의 phenylmethanesulfonyl fluoride에 의해 89.2%의 활성이 저해되어, 활성 serine을 가진 serine protease임이 시사되었다. 조효소액의  $K_m$ 값은  $5.0 \times 10^{-4} \text{M}$ ,  $V_{max}$ 값은 100  $\mu\text{g}/\text{min}$ 이었으며 bovine serum albumin, isolated soybean protein 보다 casein에 대해 초기 가수분해력이 높은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림기술개발사업 3차 기획연구과제 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. Park, J.M. and Oh, H.I. Changes in microflora and enzyme activities of traditional *Kochujang Meju* during

- fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 56-62 (1995)
2. Cho, D.H. and Lee, W.J. A study on the fermentive microflora of Korean traditional soy souce. J. Kor. Agric. Chem. Biotechnol. Soc. 13: 35-42 (1970)
  3. Hu, S.H. and Ha, D.M. Occurence of acid producing bacteria in *Meju* loaves. J. Kor. Agric. Chem. Biotechnol. Soc. 34: 130-133 (1991)
  4. Cho, J.S. Supply and demand of products, present condition and the point of issue of research of Korean soy seasonings. Food Science and Industry, 22: 28-36 (1989)
  5. Lee, J.S., Kwon, S.J., Chung, S.W., Choi, Y.J., Yoo, J.Y. and Chung, D.H. Changes microorganism enzyme activitis and major component during the fermentation of Korean traditional *Doenjang* and *Kochujang*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 247-253 (1996)
  6. Messina, M. Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. J. Nutr. 125:567 (1995)
  7. Motoki, K. and Sequso, K. Trends in Japaness soy protein research. INFORM, 5: 308 (1994)
  8. Clegg, K.M. and Lim, C.L. The structure of a bitter peptide derived from casein by digestion with papain. J. Dairy Sci. 41: 183 (1974)
  9. Fujimaki, M., Kato, H., Arai, S. and Tamaki, E. Proteolytic enzyme treatment of soybean protein and its effect on the flavor. Food Technol. 22: 889 (1968)
  10. Hamiton, J.S. Hill, R.D. and H. van Ieeuwen. A bitter peptide from Cheddar cheese. Agric. Biol. Chem. 38: 375 (1974).
  11. Hill, R.D. and H. van Ieeuwen. Bitter peptides from hydrolysed casein coprecipitate. Aust. J. Dairy Technol. 19: 32 (1974)
  12. Matoba, T. and Hata, T. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures. Agric. Biol. Chem. 36: 1423 (1972)
  13. Matoba, T., Hayashi, R. and Hata, T. Isolation of bitter peptides from tryptic hydrozate of casein and their chemical structure. Agric. Biol. Chem. 34: 1235 (1970)
  14. Minamimura, N., Matsumura, Y., Fukumoto, J. and Yamamoto, T. Bitter peptides in cow milk casein digests with bacterial proteinases. Agric. Biol. Chem. 36: 588 (1972)
  15. Kim, J.K., and Kim, S.D. Genetic breeding of Korean soy sauce-fermenting *Bacillus* by UV mutation. J. Kor. Agric. Chem. Soc. 31: 346-350 (1988)
  16. Yoo, J.Y. Study on the commercial scale production of *meju* for Korean fermented soybean products. Research report of MOST (1998)
  17. Hakhihara, B. Method of enzyme, vol. II (Asashou Shoten:Tokyo)(1956)
  18. Lee, W.J., Choi, Y.J., Son, G.M., and Choi, C. Characteristic and action pattern of alkaline proteas produced from *Bacillus* sp. CW-1121. J. Kor. Biochem. 24: 537 (1991)
  19. Hwang, S.Y. Purification and characterization of extracellular serine protease produced from *Bacillus* sp. KUN-17. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 53(1995)
  20. Choi, C., Choi, K.S., Lim, S.I., Son, J.H., Choi, H.J. and Lee, H.D. Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118 in Korean traditional soy sauce. Korean J. Agric. Chem. Biotechnol. 39: 460-465(1996)
  21. Byun, Y.G., Kim, S.H., Joo, H.K., Lee, G.S. and Yim, M.H. Isolation and identification of protease producing bacteria, *Bacillus subtilis* YG-95 from the raditional *meju* and its production condition. Korean J. Agric. Chem. Biotechnol. 41: 342-348(1998)
  22. Choi, C., Choi, K.S., Cho, Y.J., Lim, S.I., Kim, S., Son, J.H., Lee, H.D. and Kim, Y.H. Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111 in Korean traditional soy sauce. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 25: 915-921(1996)
  23. Tsuru, D., Heizokira, K. and Yamamoto, T. Studies on bacterial proteinase part 16. purification. Crystalization and some enzymatic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*. Agric. Biol. Chem. 30: 1261 (1966)
  24. Moon, S.Y., Oh, T.K. and Rho, H.M. Purification and characterization of an extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RM 615. Korea Biochem. J. 27: 323 (1994)
  25. Kim, T.H., Park, S.H., Lee, D.S., Kwon, T.K., Kim, J.K., and Hong, S.D. Properties of alkaline protease produced by an alkalophilic *Bacillus* sp.. Korean J. Appl. Microbiol. Biotech. 18: 159 (1990)
  26. Ahn, J.W., Oh, T.K., Park, Y.H., and Park, K.H. Partial purification and characterization of the alkaline protease from *Bacillus* sp.. Korean J. Appl. Microbiol. 18: 344 (1990)
  27. Chang, S.J., Kim, Y.S., Sung, H.C., Choi, Y.J., and Yang, H.C.: A study on the alkaline protease produced from *Bacillus subtilis*. J. Korean Agric. Chem. Soc. 31: 356 (1988)
  28. Lee, B.W., You, Y.S., Im, G.H. and Choi, C.U. Purification and properties of protease from *Bacillus subtilis* LY-353. J. Korean Soc. Food Nutr. 20: 21 (1991)
  29. Oh, S.H. and Oh, P.S. Screening of *Bacillus* sp. M-71 with high alkaline protease productivity and some properties of the enzyme. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 1 (1991)
  30. Choi, C., Choi, K.S., Kim, S., Lee, S.H., Son, J.H., Choi, H.J., Lee, S.S. and An, B.J. Characteristics and action pattern of protease from *Scopulariopsis brevicaulis* in Korean traditional *meju*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 56-61 (1997)
  31. Choi, C., Chung, Y.G., Sung, S.K., Choi, K.S., Lee, J.S., Cho, Y.J. and Chun, S.S. Characteristics and action pattern of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141. Korean J. Appl Microbiol. Biotechnol. 20: 295 (1992)
  32. Yoo, J.Y. Study on the commercial scale production of *meju* for Korean fermented soybean products. Research report of MOST (1995)