

Aspergillus sp. 101로부터 내염성 단백분해효소 생산을 위한 최적 조건 및 특성

황주연¹ · 최승화² · 이시경¹ · 김상무^{2*}

¹건국대학교 응용생물화학과
²강릉원주대학교 해양생명공학부

Optimal Conditions for the Production of Salt-tolerant Protease from *Aspergillus* sp. 101 and Its Characteristics

Joo Yeon Hwang¹, Seung Hwa Choi², Si Kyung Lee¹, and Sang Moo Kim^{2*}

¹Dept. of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

²Faculty of Marine Bioscience and Technology, Gangneung-Wonju National University, Gangwondo 210-702, Korea

Abstract

Aspergillus sp. 101 was isolated from the Korean traditional soybean paste for the production of a salt-tolerant protease. The optimal condition for the production of a salt-tolerant protease was determined with various energy sources such as carbon, nitrogen, and protein, and at different culture conditions such as temperature, pH, incubation time and NaCl concentration. The most favorable organic nitrogen sources were 2% defatted soybean flour (DSF) and soy protein isolate (SPI). Optimal pH and temperature were pH 6.0 and 25~27°C, respectively. Therefore, *Aspergillus* sp. 101 protease was a mild acid (or neutral) protease. Protease production was the highest at 0.1% concentration of CaCO₃, K₂HPO₄ and Arabicgum. *Aspergillus* sp. 101 could grow in culture medium at 15% NaCl concentration and produce a salt-tolerant protease even at 7% NaCl. The cell mass and protease activity of *Aspergillus* sp. 101 cultured in a modified medium was comparatively higher in Czapek dox and protease producing media. Hence, *Aspergillus* sp. 101 protease can be utilized in soy or fish sauce industry as a salt-tolerant protease starter.

Key words: *Aspergillus* sp. 101, energy sources, optimum condition, salt-tolerant protease

서 론

산업적으로 이용되고 있는 효소는 대체로 단백분해효소 (protease, 약 59%) 및 탄수화물분해효소(약 28%)가 대부분을 점하고 있다. 단백분해효소 생산에 있어서 곰팡이의 이용은 *Mucor pusillus*(chymosin 대용 산성 단백분해효소의 생산에 이용)와 *Aspergillus* sp. 및 *Rhizopus* sp.(대두발효제품과 조미액 제조용 단백질 분해효소의 생산에 이용)와 같은 국균을 이용한 연구가 많이 진행되어 왔다(1,2). 지금까지 발견된 단백분해효소의 생산에 이용되고 있는 미생물에는 *Penicillium janthinellum*, *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans*, *Paecilomyces varioti*, *Rhizopus chinensis*, *Aspergillus saitoi*, *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Penicillium notatum*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium duponti*, *Trametes sanguinea*, *Aspergillus niger* 등이 있다(3-6). *A. oryzae*는 오래 동안 산업적 효소생산에 이용되어 왔으며 mylase, protease, 그리고 cellulase 등과 같은 다양한 효소를 분비하므로 가수분해효소의 중요한 생산균주

로 이용되고 있다. 단백분해효소를 이용한 단백질 가수분해 물소재의 제조로는 어육단백질 분해를 통한 액젓의 숙성발효(7) 및 조미료의 제조(8), 식물단백질의 가수분해에 의한 조미 소재의 제조(9,10) 등이 보고되고 있다. 그러나 효소를 이용한 방법은 자연 발효(숙성)로 제조한 소재에 비하여 풍미, 감칠맛 등이 유사하면서 제조 기간을 단축시킬 수 있는 이점에도 불구하고 산업화의 사례는 미미하며, 오히려 조미 소재보다는 기능성 펩타이드 제조에 단백분해효소가 많이 이용되고 있는 실정이다(10). 단백분해효소의 생산에는 균의 생육, 효소 생산능, 원료비 등에 비추어 액체배양으로 미생물을 배양하는 것이 일반적이다. 액체배양은 생산면적이 적고, 시스템화에 의한 대량생산이 가능하며, 고체배양에서 다량으로 나오는 고형폐기물이 거의 없는 등의 장점이 있으나, 곰팡이류의 배양에 있어서는 호기성이라는 강한 생리적 원인 때문에 액체배양에 의한 효소생산방법은 거의 개발되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 전보(11)에 이어 내염성 단백분해 효소를 생산하는 *Aspergillus* sp. 101 균주로 액체배지에서

*Corresponding author. E-mail: smkim@gwnu.ac.kr
Phone: 82-33-640-2343, Fax: 82-33-640-2882

의 효소생산을 최대화하기 위한 최적 배지조성을 결정하고 단백분해효소의 특성 및 작용기작을 규명하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

Tsujita 및 Endo(12) 방법에 따라 된장으로부터 *Aspergillus* 균을 분리하여 *Aspergillus* sp. 101로 명명하였다. 세포가 증식할 수 있는 필요 최소한의 영양조성을 가진 최소배지로써 Czapek Dox(NaNO_3 0.3%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, sucrose 3%) 배지(Difco, MD, USA)를 사용하였다. 그리고 고체배지인 PDA(potato extract 0.4%, dextrose 2%, agar 2%, pH 5.6) 배지(Difco)에서 배양된 균주의 보존은 완전 사멸배지에 균주를 접종한 후 27°C에서 4일간 배양하여 4°C에 보존하면서 2개월마다 계대배양 하였다.

Halo formation

단백질 분해능이 우수한 미생물의 선발은 27°C에서 7일간 배양한 사멸배지에 0.1% Tween 80 5 mL를 가한 후, 1 g의 CaCO_3 를 가하여 교반하였다. 이를 무균적으로 흡입여과(glass filter 17G2, Advantec, Tokyo, Japan)한 다음, 여액을 3,000×g에서 10분간 원심분리하고 잔사에 멸균 증류수를 가하여 포자수가 약 1.0×10^6 CFU/mL인 현탁액을 얻었다. 이 현탁액 0.1 mL씩을 각각 취하여 Halo 형성배지에 포자를 접종하고 27°C에서 3일간 배양 후 배지상의 colony 주위에 투명한 환이 나타나는 것을 단백질분해 양성균으로 하였으며, 이중 HC ratio(투명한 환의 크기/colony의 크기)가 높은 것을 선발하였다. Halo 생성은 선택배지(Triton X-100 0.1%, yeast extract 0.2%, skim milk 5%, agar 2%, 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.5)에서 관찰하였으며(13), 이를 현미경(Olympus CH30, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 형태적 관찰을 통해 잠정 동정하였다(14).

배지조성에 따른 효소의 생산성

탄소원으로서 2% defatted soybean flour(DSF) 기본배지에 단당류로서 glucose, fructose, xylose, 이당류로서 cellobiose, lactose, maltose, sucrose 그리고 다당류로서 dextrin 및 soluble starch를 각각 1% 첨가하여 250 mL 삼각플라스크에 100 mL씩 조제하여 접종한 후 27°C에서 5일간 진탕 배양한 후 효소활성을 측정하였다. 유기질소원으로서 albumin, beef extract, casein, DSF, SPI(soybean protein isolate), skim milk와 무기질소원으로는 KNO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ 를 각각 2 및 0.1%씩 첨가하였으며, 무기염은 MgSO_4 , CaCO_3 , K_2HPO_4 , FeSO_4 , CuSO_4 를 0.1%씩 첨가하여 단백분해효소 생산능이 가장 높게 나타나는 배지를 결정하였다. 그런 다음 0.1, 0.5, 1 및 2%의 Arabic gum 농도에 따른 효소활성을 측정하였다.

효소 생산을 위한 배지 및 배양방법

PDA배지에 전배양 시킨 후 효소생산용 최적배지에 접종하여 27°C에서 5일간 진탕 배양한(160 rpm) 후 2,170×g에서 15분간 원심분리 하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

단백분해효소 활성

효소활성은 Anson 방법(15)으로 측정하였다. 즉 0.6% casein 기질용액(pH 5.5) 5 mL에 효소액 1 mL를 넣어 37°C에서 10분간 반응시킨 후 0.44 M trichloroacetic acid(TCA) 0.5 mL를 넣어 반응을 중지시키고 실온에서 30분간 방치시킨 후 Whatman No. 2로 여과하였다. 여액 2 mL에 0.55 M NaCO_3 용액 5 mL와 Folin 시약(1:3) 1 mL를 넣어 37°C에서 30분간 발색시킨 다음 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 정의는 37°C에서 효소액 1 mL가 10분 동안에 tyrosine 1 μmol 을 유리시키는 것을 1 unit로 하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등의 방법(16)에 따라 egg albumin을 기질로 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하였다. 효소정제 과정 중의 단백질 농도는 UV spectrophotometer(HP8452A, Hewlett-Packard, Palo Alto, USA)를 사용하여 280 nm에서 측정한 흡광도로 정의하였다.

내염성 측정

Aspergillus sp. 101균 성장 및 단백분해효소 생산에 미치는 내염성은 다음과 같이 측정하였다. 즉 배양액에 NaCl 첨가 농도를 달리하여 5일간 배양한 후, 0.6% casein 기질의 NaCl 농도를 5%로 맞춘 다음 단백분해효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

배양온도 및 pH의 영향

된장으로부터 단백분해능이 우수한 균으로 확인한 곰팡이를 현미경으로 관찰한 결과 분생자병에 선단이 팽대해진 정낭(vesicle)이 구형으로 관찰되었고, 정낭주위에 경자가 착생되었으며 그 위에 외생포자가 연쇄상으로 착생되어 있어(그림생략) *Aspergillus* sp.의 특성으로 나타나, 분리된 곰팡이를 *Aspergillus* sp. 101로 잠정 동정 명명하였다. 본 균의 단백분해효소 생산을 위한 최적배양 온도와 pH를 측정할 결과는 Fig. 1과 같다. 최적배양온도는 25~27°C이었으며 So(17)의 결과와 일치하였다. 최적 pH는 pH 5.5~7.0이었으며, pH 6에서 최적 활성을 나타내었다. 그러므로 *Aspergillus* sp. 101 균이 생산하는 효소는 약산성 또는 중성 단백분해효소이었다.

배양 시간의 영향

Aspergillus sp. 101 균의 생육곡선과 단백분해효소활성의 변화를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 5% NaCl이 첨가된

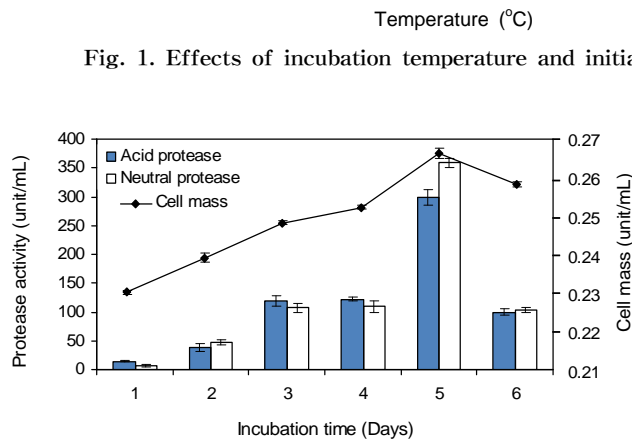


Fig. 1. Effects of incubation temperature and initial pH on the production of *Aspergillus* sp. 101 protease.

Fig. 2. Effect of incubation time on the activity of *Aspergillus* sp. 101 protease.

modified media에서의 발효기간에 따른 효소활성을 조사한 결과 산성 및 중성 단백분해효소활성은 발효 5일째 가장 높았으며, 발효 6일에는 대폭 감소하였다.

배지 조성에 따른 효소의 생산성

각종 영양원에 따른 효소활성의 변화를 측정한 결과는 Table 1과 같다. 효소의 생성에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 각 탄소원을 1% 첨가하고 27°C에서 5일간 진탕배양 한 결과, sucrose 및 xylose를 제외한 대부분의 탄소원의 경우 효소활성이 크게 감소하였다. 이는 Kim 등(1)의 *A. oryzae* 균 배양 결과와 일치한 것으로 탄수화물에 의하여 효소생산이 저해되는 이른바 carbohydrate repression이 원인인 것으로 보이며, 배지 조성 중의 기질에 의해서 효소생산이 촉진되는 유도효소가 일반적으로 분해계의 반응에 관여하고, glucose에 의해 유도효소의 생산이 억제되는 glucose repression의 영향 때문이라고 추정된다. 유기질소원의 첨가에 따라 효소생산이 증가하였으며 대두단백원인 탈지대두분(DSF)과 분리대두단백(SPI)을 각각 2% 첨가 시에 효소활성이 가장 높았다. 따라서 이들 질소원은 단백분해효소생산에 가장 좋다고 생각된다. 내염성 *A. oryzae* 균 배양 시 단백분해효소의 생산에 미치는 여러 종류의 질소원에 대한 Yaichi 등(18)의 연구에서 1% casein을 질소원으로 사용하였을 때 분리대두단백(0.5%)이 1.58 U, 탈지대두분(1.3%)

Table 1. Effects of various energy sources on the protease production of *Aspergillus* sp. 101

Source	Component	Relative activity (%)
Control (2%, w/v)	DSF ¹⁾	100
Carbon (1%, w/v)	Cellobiose	68
	Dextrin	60
	Fructose	73
	Glucose	60
	Lactose	81
	Maltose	59
	Sucrose	96
	Soluble starch	57
	Xylose	93
Organic nitrogen (2%, w/v)	Albumin	136
	Beef extract	126
	Casein	111
	DSF	241
	SPI ²⁾	272
	Skim milk	108
	Polypeptone	113
Inorganic nitrogen (0.1%, w/v)	KNO ₃	82
	NaNO ₃	60
	NH ₄ Cl	98
	(NH ₄) ₂ SO ₄	109
	(NH ₄) ₂ NO ₃	76
Inorganic salt (0.1%, w/v)	MgSO ₄	61
	CaCO ₃	122
	K ₂ HPO ₄	124
	FeSO ₄	33
	CuSO ₄	30

¹⁾Defatted soy flour.

²⁾Soybean protein isolate.

이 1.89 U의 효소활성을 보인 것과 유사한 결과를 나타내었다. PDA 배지에 질소원으로서 soybean flour(defatted with hexane)와 skim milk를 각각 1% 첨가하여 5일간 배양한 후 효소활성 측정결과는 Fig. 3과 같다. 단백분해효소의 생산을 위한 기질로서 탈지대두분이 skim milk에 비해 효소활성이 월등히 높은 결과를 나타내었다. 이는 대두단백질에 대한 기질의 특이성이 있는 것으로 보인다. 무기질소원을 배지에 첨가하였을 때 효소생산에 미치는 영향을 살펴보기 위하여

우 SDS만이 단백질분해효소를 촉진시킨 것(20)과는 상이한 결과를 나타내었다. 따라서 같은 *Aspergillus*속이라도 계면활성제의 종류에 따라 효소 생산능이 달랐다.

단백분해효소 생산을 위한 최적배지

Czapek Dox 및 단백분해효소 생산배지를 각각 사용하여 경우와 곰팡이 단백분해효소 생산배지에 Arabic gum 0.1%, CaCO₃ 0.1%를 첨가하고, skim milk 대신 soybean flour를 1% 첨가한 배지를 사용하여 27°C에서 5일간 배양한 후 단백분해효소활성을 측정하였을 때, 단백분해효소활성이 월등히 높았다(Table 2). 저 농도로 이용되는 다당류 탄소원인 Arabic gum은 단백질이 변성될 가능성이 있는 조건에서 효소의 안정성에 관여하여 효소의 실활을 방지함으로써 효소 생산성을 증가시키는 것으로 생각되며, CaCO₃의 경우는 진균류의 배양 중에 균체의 성장에 따라 많은 유기산들이 분비되어 배양액의 pH가 급격히 떨어질 수 있으며, 이에 대한 방지책으로 CaCO₃을 배지 중에 첨가함으로써 배양 중에 생성된 산에 의해 Ca⁺⁺ 이온과 탄산 이온으로 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 배양 중의 배지의 pH 저하를 막을 수 있다(1,3). 따라서 탄산칼슘이 배양액의 급격한 pH 저하를 막고, 효소의 생산을 최적화하며, 효소의 안정화에 기여하여 단백질 분해효소의 생산을 촉진하는 것으로 생각된다. 액체배양에 있어서 배지에 질소원만을 첨가한 결과는 Table 2에 나타내었다. 질소원만을 첨가하였을 때, 효소는 거의 분비되지 않지만 여기에 인산염을 0.2 M의 농도로 첨가하였을 때 단백분해효소의 활성이 크게 증가하며, 나트륨보다는 칼륨형태의 인산염들이 단백분해효소의 생성을 촉진하였으며, Cl, SO₄ 및 NO₃와 같은 염류는 모든 효소의 분비에는 영향을 미치지 않고 오히려 감소시켰

Fig. 3. Effect of protein sources on the activity of *Aspergillus* sp. 101 protease. Skim-pH 6, 7: 1% skim milk in PDA culture medium adjusted to pH 6 and 7. Soy-pH 6, 7: 1% soybean flour in PDA culture medium adjusted to pH 6 and 7.

각종의 무기질소원을 0.1% 농도로 첨가하였을 때 NH₄Cl와 (NH₄)₂SO₄를 제외하고는 대부분 효소활성이 크게 감소하였다. 배지에 각종 무기염류를 각각 0.1% 농도로 첨가하고 효소활성을 측정한 결과 CaCO₃와 K₂HPO₄가 최대 활성을 보였으며, 이는 Lee와 Chung(19)의 보고와 유사하였다. 효소활성을 높이기 위하여 Arabic gum을 농도별로 배양액에 첨가하여 5일간 배양한 후 단백분해효소 활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 배양액에 0.1% 첨가 시 가장 효소활성이 높았으며, 대조구(무첨가구)에 비해 효소의 내염성 및 산성단백분해효소의 활성이 증가하였다. Arabic gum은 물에 쉽게 녹으며, 점성이 낮고 pH에 따라 성질이 변하는 특성이 있으며, 유화제(계면활성제)로 많이 사용되고 있는데, 이런 특성들이 효소의 안정성을 높임으로서 효소 활성을 극대화한 것으로 생각된다. 또한 *Aspergillus phoenicis*와 *Aspergillus awamori*로부터 산성단백질 분해효소 생산에 미치는 계면활성제의 영향을 분석하기 위하여 Tween 80과 SDS를 농도별로 배지에 첨가하여 단백질 분해효소의 생산능을 측정한 결과, 두 계면활성제 모두 0.1% 농도까지는 *A. awamori*의 산성단백분해효소의 생산을 증가시켰으나, *A. phoenicis*의 경

Fig. 4. Effect of arabic gum concentration in culture media on the activity of *Aspergillus* sp. 101 protease.

Table 2. Comparison of acid protease activities and cell masses based on Czapek dox, protease producing, and modified media

Content	Czapek dox medium	Protease producing medium	Modified medium
Activity (U/mL)	0.1±0.02	19±2.1	64.55±4.5
Cell mass (mg/mL)	0.14±0.03	0.23±0.03	0.26±0.04
Medium composition (%)			
NaNO ₃	0.3	—	—
K ₂ HPO ₄	0.1	0.1	0.1
MgSO ₄	0.05	0.05	—
KCl	0.005	—	—
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.001	—	—
Sucrose	3	—	—
Defatted soybean flour	—	1	2
Skim milk	—	2	—
CaCO ₃	—	—	0.1
Arabic gum	—	—	0.1

다. 배지 조성으로 사용된 단백질 또는 peptide의 종류에 따라 효소의 생산성은 영향을 받으며, 이는 미생물에 있어서 균체로 흡수된 아미노산의 대사에 따른 필수아미노산 조성에 기인하는 것으로 해석되며, 가수분해 되지 않은 고분자 물질일수록 효소의 생산을 촉진한다. 따라서 단백분해효소 생산을 유도하기 위하여 배양액 중에 단백질이 반드시 필요하며, 가수분해 된 peptide들은 분해되지 않은 자연 단백질에 비하여 단백분해효소 생산능을 저하시키는 작용이 있다. *Aspergillus* sp. 101 단백분해효소는 기질이 첨가되어야만 활성이 나타나기 때문에 구성효소가 아닌 유도효소이며, 효소 활성을 높이기 위해 다른 탄소원을 없애고 단백질원을 배양액에 첨가하여 사용하였다.

내염성 특성 및 단백분해효소 활성

Aspergillus sp. 101균주가 생성하는 내염성 단백분해효소의 생산을 유도하기 위하여 배양액에 서로 다른 농도의 NaCl을 첨가하여 5일간 배양한 다음, 0.6% casein의 최종 NaCl 농도를 5%로 조정하여 단백분해효소 활성을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 대조구(염이 첨가되지 않은 배양액)에 비하여 염의 첨가농도가 증가할수록 효소 활성은 감소하였으며, 염농도 7%까지는 어느 정도 효소활성이 잔존하였으나, 염농도 8% 이상(20%까지 측정)에서는 효소활성은 거의 나타나지 않았다. 산성분해효소 활성은 대조구(NaCl을 첨가하지 않은 기질, pH 5.5)와 5% NaCl 첨가구를 각각 사용하여 측정하였는데, 대조구에서 효소 활성이 가장 높았으며, 배양

액의 NaCl 농도가 증가함에 따라 점진적으로 효소 활성은 감소하였다. 한편, 단백분해효소 활성은 5% NaCl 첨가구 대조구 및 1~4% NaCl 첨가구보다 약간 낮았으나, 어느 정도 높은 활성을 나타내었다. 이는 내염성 곰팡이균인 *A. oryzae* NISL 1913이 10% NaCl 존재 하에 단백분해효소를 생산한다는 보고(17)와 유사하였다. 그리고 염이 포함된 배양액에서의 미생물의 성장 및 활성이 낮아도 세포 밖으로 분비되는 효소는 내염성이 있을 수 있으므로 배양액에 NaCl을 첨가하지 않은 배지(대조구)에 농도별로 염을 첨가하여 내염성 및 산성 단백분해효소 활성을 동시에 측정하였다(Fig. 6). Fig. 6에서와 같이 염 농도가 높을수록 역시 효소 활성이 낮아지는 것을 볼 수 있으며, 염 농도 5%까지는 효소 활성이 다소 높았다. 이 균주의 내염성 실험과 비교해 볼 때 내염성효소 또한 염의 농도가 높아질수록 활성은 낮아졌지만 배양액 5% 식염 첨가구의 단백분해효소 활성(310 unit/mL, Fig. 5)과 기질 5% 식염 첨가구의 단백분해효소 활성(370 unit/mL, Fig. 6)과 비교했을 때, 식염 무첨가 배지로 균을 최적배양조건으로 배양한 뒤 생산된 효소는 정제하여 산업적으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다. *Aspergillus* sp. 101 균주는 Plate growth assay을 통해 내염성을 측정한 결과(Fig. 7)와 같이 다른 균에 비해 산성 단백분해효소 활성이 높았으며, 최고 15% NaCl이 첨가된 agar plate상에서도 생장이 가능하였다(Fig. 7). 이는 일반 곰팡이 균이 5% 에서의 salt stress에 의한 성장 저해와 비교해 볼 때 약 3배 이상의 매우

Fig. 5. Effect of NaCl concentration in culture media on the activity of *Aspergillus* sp. 101 protease.

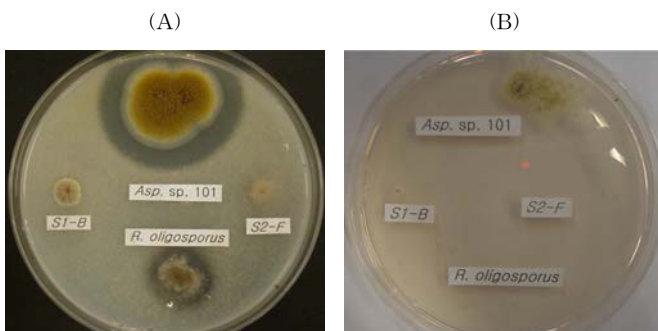


Fig. 6. Effect of NaCl concentration in substrate on the activity of *Aspergillus* sp. 101 protease.

Fig. 7. Identification of *Aspergillus* sp. 101 protease. (A), Growth of colonies cultured on PDA medium with 0% NaCl; (B), Growth of colonies cultured on PDA medium with 15% NaCl.

높은 내염성을 나타낸다고 볼 수 있다. *Zygosacchomyces rouxii*가 2 M NaCl에서 생육가능하고 *Saccharomyces cerevisiae*는 0.5 M 농도에서는 생육속도가 낮고 1.5 M 이상에서는 거의 생육이 불가능하다는 보고(21)와 비교해볼 때 본 실험에 사용한 된장에서 유래한 *Aspergillus* sp. 101 균주는 높은 내염성(4 M NaCl 농도에서도 생육가능)을 나타내었다.

요 약

단백질 식품의 가공에 이용할 수 있는 내염성 단백분해효소를 생산하기 위하여, 된장에서 분리한 *Aspergillus* sp. 101 균으로부터 내염성 단백분해효소생산을 위한 최적 배지조성을 확립하였다. 질소원으로서 대두단백원인 탈지대두분(DSF)과 분리대두단백(SPD)을 각각 2% 첨가 시에 효소 활성이 가장 높았고, 무기질소원으로 CaCO₃와 K₂HPO₄이 각각 0.1%씩 첨가 시에 가장 좋은 결과를 얻었다. 또한 Arabic gum을 배양액에 0.1% 첨가하였을 때, 효소 활성이 가장 높았다. *Aspergillus* sp. 101은 최고 15% NaCl 농도의 agar plate에서 생육이 가능하였으며, 조효소 또한 NaCl 7%까지 안정하였다. 이와 같이 조정 배지(modified medium)에 *Aspergillus* sp. 101에 의해 생산된 내염성 단백분해효소는 일반적인 곰팡이류의 단백분해효소 생산용 배지에 비해 생산성이 높았으며, 최적배지에서 배양한 *Aspergillus* sp. 101 유래 단백분해효소에 의한 어육단백질 가수분해물의 기능 개선 또는 식품첨가물로서의 활용은 단백분해효소 생산의 산업화를 가능하게 하는 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신사업(RTI05-01-02) 지원으로 수행되었음. 최승화는 교육과학기술부 2단계 BK21핵심사업의 수혜학생이며 사의를 표합니다.

문 헌

- Kim DS, Kim HR, Nam TJ, Pyeun JH. 1999. Medium composition of *Aspergillus oryzae* PF for the production of proteolytic enzyme. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27: 404-409.
- Lee SS, Sung CK, Hae JC, Yu JY. 1997. *Kanjang* and *meju* made with a single inoculums of the microorganism isolated from the Korean traditional *meju*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 751-758.
- John CA, John OM, William ES. 1980. *Microbiology of Foods*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA. p 238-246.
- Jeong MJ. 1997. Studies on the proteolytic enzyme of mold. *Kor J Appl Microbiol Bioeng* 5: 153-158.
- Jeong MJ. 1977. Studies on the proteolytic enzyme produced by *Rhizopus japonicus* S-62. *Kor J Appl Microbiol Bioeng* 9: 31-35.
- Jeong MJ. 1984. Studies on the characteristics of *Rhizopus japonicus* acid protease I and II. *Kor J Appl Microbiol Bioeng* 12: 179-183.
- Park JH, Kim YM, Kim DS, Kim SM. 2005. Functionality of low molecular weight peptides of acceleratedly manufactured anchovy sauce with *Bacillus subtilis* JM3 protease. *Korean J Food Sci Technol* 37: 827-832.
- Kim SK, Park PJ, Kim KH. 2000. Preparation of sauce from enzymatic hydrolysates of cod frame protein. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 635-641.
- Jeong KH, Seo JH, Jeong YJ. 2005. Characteristics of soybean hydrolysates prepared with various protease. *Korean J Food Preserv* 12: 460-464.
- Chae HJ, In MJ, Kim MH. 1997. Production and characteristic of enzymatically hydrolyzed soy sauce by the treatment using protease. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 784-787.
- Hwang JY, Kim SM, Heo SO, Kim CJ, Lee CH, Lee SK. 2008. Purification and characterization of a novel salt-tolerant protease produced by *Saccharomyces cerevisiae* B101 isolated from baker's yeast dough. *Food Sci Biotech* 17: 766-771.
- Tsujita Y, Endo A. 1978. Presence and partial characterization of internal acid protease of *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol* 36: 237-242.
- Kim DS, Kim HR, Nam TJ, Pyeun JH. 1998. Strain improvement of *Aspergillus oryzae* for increasing productivity of a proteolytic enzyme. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 26: 490-496.
- Pollack RA, Finally L, Mondschein W, Modesto RR. 2005. *Laboratory Exercises in Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. p 96.
- Anson ML. 1939. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 22: 79-91.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- So MH. 1993. Conditions for the production of amylase and protease in making wheat flour Nuluk by *Rhizopus japonicus* T2. *Korean J Food Nutr* 6: 96-102.
- Yaichi F, Itoh H, Fukase T, Motai H. 1989. Continuous protease production in a carbon limited chemostat culture by salt tolerant *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 30: 604-608.
- Lee MJ, Chung MJ. 1980. Studies on the production of protease by *Aspergillus oryzae* KV-15 and characteristics of the enzymes. *Korean J Appl Microbiol Bioeng* 8: 77-85.
- Bhumibhamon O. 1982. Effect of some surfactants on the production of acid protease by *Aspergillus phoenicis* and *Aspergillus awamori*. *J Ferment Technol* 60: 167-169.
- Byun MO, Lee SB, Ku BS, Song JK, Leu JC, Lee DH. 1999. Identification and characterization of osmotolerant yeast isolated from soy paste. *Korean J Mycology* 27: 181-186.

(2009년 8월 6일 접수; 2009년 8월 31일 채택)