

메주 유래의 *Syncephalastrum racemosum* PDA 132-2가 생산하는 Protease의 정제 및 특성

임성일 · 유진영[†]

한국식품개발연구원, 생물공학연구본부

Purification and Characteristics of Protease Produced by *Syncephalastrum racemosum* PDA 132-2 from Korean Traditional *Meju*

Seong-II Lim and Jin-Young Yoo[†]

Div. of Chemistry and Biotechnology, Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea

Abstract

Protease related mold was isolated and selected as a starter culture for commercial production of *meju*. Isolated microorganism was identified as *Syncephalastrum racemosum* PDA 132-2. To obtain basic data about protease for production of soybean peptides and application of the strain in *meju* fermentation, we extrated and purified protease and charateristics of the enzyme were investigated. The optimum condition for the production of enzyme was pH 4.0, 30°C, 5 days. The protease was purified 19.7 folds by gel filtration and ion exchange chromatography and specific activity was 12.4unit/mg. The purified enzyme was 34kDa in size, thiol protease(100% inhibited by PCMB), and was acidic protease(stable between pH 2.0~5.0). V_{max} of the enzyme was 2.14 μ g/min which was lower(1/50) than that of by *Asp. wentti* and *B. subtilis*.

Key words: *Syncephalastrum racemosum*, protease, *meju*

서 론

장류는 원료에서 유래되는 단백질, 탄수화물, 지방 등의 영양소가 골고루 갖추어진 우수한 조미식품으로 육류의 섭취량이 많지 않은 우리 민족의 중요한 단백질 공급 원으로서 식생활에 없어서는 안될 중요한 식품으로 자리 잡고 있다.

이러한 장류는 주원료인 단백질이 미생물의 작용으로 분해되어 생성된 분해산물과 발효과정 중에 미생물의 작용에 의해 새로이 생성되는 물질들로 구성되어 있으므로 다양한 생리활성을 나타낸다. 즉 콩 단백질은 유아식, 스포츠드링크, 우유나 육류대용품, 곡류강화식품 등 이화학적 기능특성을 주는 식품에 사용되고 있으나, 최근 콩 단백질 식이가 심장병, 비만, 압, 당뇨 등에 관련이 있다고 보고된 바 있어 생리활성 물질에 대한 관심도 높다.

펩타이드는 다양한 조합의 아미노산이 펩타이드 결합에 의해 중합물을 형성하고 있는 것으로 일반적으로 분자량 10,000 이하의 것을 말한다. 식품 중에 존재하는 펩타이드는 아미노산을 공급하는 영양기능, 맛이나 유화성 등에 관여하는 감각기능, 여러 생리활성을 나타내는 생체조

절기능 등에 모두 관여한다. 특히 생리활성을 나타내는 생체조절기능으로는 항암, 혈압강하, 혈청콜레스테롤 강하, 면역증강, 칼슘흡수 촉진 등의 광범위한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(1).

콩단백질은 효소의 작용에 의하여 부분적으로 가수분해되어 생리활성을 갖는 펩타이드가 될 수 있는데 생리활성기능 이외에 생체내에서 아미노산 흡수가 잘되고 콩 단백질의 C나 N-말단으로부터 소수성 아미노산을 분해하여 쓴맛을 감소시켜 준다. 또한 젤 형성능력이 강하고 유화나 거품형성능력도 좋게 된다. 생리기능면으로는 소화기내에서 담즙산의 재흡수를 저해함으로써 혈중 콜레스테롤의 저하(2) 및 LDL과 지방의 감소효과가 있어 동맥경화의 예방 및 치료가 기대된다. 또한 ACE 저해활성에 의한 혈압강화펩타이드, 혈소판 응집저해활성을 갖는 항혈전펩타이드, 항종양펩타이드 등이 보고 있다(3). 이러한 생리기능활성을 이용하여 건강보조식품, 기능성식품, 제약, 화장품에 응용된 예도 많다(4).

단백질을 가수분해하는 효소는 미생물의 종에 따라 다양하게 존재하는데 이들 효소에 작용으로 대두단백질의 특성이 변화하여 pH, 염농도, 온도 등과 같은 조건에 의해

[†]To whom all correspondence should be addressed

단백질의 변화와 이용의 제한성을 가지므로 가공조건과, 목적에 따라 대두단백질의 기능성을 조절하려는 연구도 시도된 바 있다(5). 그 예를 보면 대두단백질의 가수분해 펩타이드가 산성음료의 용해도 증가, 일부 환자의 내 알레르기성, 기능성 향상 등에 이미 산업적으로 응용되고 있다.

이러한 추세에서 본 연구는 대두단백질의 가수분해물의 기능특성의 개선과 식품으로의 이용성을 증가시키기 위하여, 기존의 protease와는 다른 우리나라의 전통 매주에서 분리한 균주가 생산하는 protease에 의해 분해되는 대두단백질 가수분해물의 특성과 이용성 연구의 일환으로, 우리나라 전통매주에서 분리한 *Syncephalastrum racemosum* PDA 132-2가 생산하는 protease를 분리·정제하고 그 특성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에서 이용한 Hammarstein milk casein(H. casein)은 Merck사 제품을, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), ρ -chloromercuribenzoic acid(PCMB), ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP), bovine serum albumin(BSA)은 Sigma사 제품을, 분자량 marker는 Bio-Rad사 제품을, 그 밖의 시약은 일급시약을 사용하였다.

공시균주

Yoo(6)가 재래식 매주에서 분리·동정한 곰팡이 균주 *Syncephalastrum racemosum* PDA 132-2를 사용하였다.

Protease 생산조건

기본배지는 밀기울 배지를 사용하였다. 밀기울 10g과 1% glucose 용액 10ml를 혼합하여 15 lbs에서 1시간 가압 살균한 후 공시균을 한 백금이 접종하여 20°C에서 배양하였다. 단 배양시간별 실험 이외에는 배양시간을 5일간으로 하였다. 조효소액은 배양된 밀기울 배지에 3배(w/v)의 20mM sodium citrate buffer(pH 5.0)를 가하여 균질화시킨 후, 4°C에서 6시간 교반하여 protease를 추출하고 밀기울을 cheese cloth로 분리한 다음 16,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻었다.

Protease의 정제

조효소액을 80% 포화 황산암모늄으로 4°C에서 14시간 염색한 후, 20mM sodium citrate buffer(pH 6.0)를 가해 용해시키고, 4°C에서 72시간 투석한 다음 동결건조하여 농축하였다. Protease의 정제는 open column이 장착된

ISCO사의 ProTeam LCTM을 이용하여 정제하였다. 먼저 효소단백질을 상기 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column(2.6×55cm)을 이용하여 두 차례에 걸쳐 gel filtration한 다음, CM Sephadex C-25 column(2.6×55cm)으로 ion exchange chromatography하여 흡착 활성 단백질을 정제하였다.

Protease 활성측정

Protease 활성측정은 Hagihara의 방법(7)에 준하여 측정하였다. 즉, 효소액 0.5ml에 0.1M sodium citrate buffer (pH 5.0) 1ml 가한 다음, 기질용액(0.6% Hammarstein casein, pH 5.0)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.44M trichloroacetic acid 2.5ml를 넣어 반응을 중지시키고 실온에서 10분간 방치한 다음 원심분리시켜 상등액 1ml에 0.55M Na₂CO₃ 용액 10ml와 1ml의 1N Folin & Ciocalteu 시약을 넣어 37°C에서 30분간 발색시켜 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소단위는 효소액 1ml가 1분간 1μg에 해당하는 tyrosine을 생산하는 것을 unit로 정의하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 방법(8)에 따라 측정하여 bovine serum albumin을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하였으며, 효소 정제과정 중의 단백질의 농도는 spectrophotometer(HP 89090A)를 사용하여 280nm에서 흡광도로 측정하였다.

전기영동

정제 protease의 순도와 분자량을 구하기 위하여 Laemmli(9)의 방법에 준하여 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하였다. 단백질의 염색은 coomassie brilliant blue R-250 용액[coomassie brilliant blue R-250 2.5g/L를 함유한 methanol : acetic acid : water=5 : 1 : 5(v/v/v) 용액]을 사용하여 염색하고, 탈색은 용액 I [methanol : acetic acid : water=5 : 1 : 5(v/v/v)]로 15분간 세척 후, 용액 II [methanol : acetic acid : water=2 : 1 : 7(v/v/v)]로 30분, 10% acetic acid로 하룻 밤 동안 탈색하였다. 이때 stacking gel과 separating gel의 농도는 각각 4.5%, 12%이었다. 분자량 marker는 Sigma 사로부터 구입한 prestaining marker로서 phosphorylase B(102kDa), bovine serum albumin(81kDa), ovalbumin (46.9kDa), carbonic anhydrase(32.7kDa), soybean trypsin inhibitor(30.2kDa), egg lysozyme(24kDa)이 premix된 것을 사용하였다.

아미노산 조성분석

일정량의 시료에 2회 증류한 6N HCl(2% phenol 함유)

용액을 가하고 질소가스를 충전, 밀봉하여 110°C에서 24 시간 가수분해시킨 다음 감압농축하여 HCl을 제거하고 0.2M Na-acetate buffer(pH 2.2) 100μl에 용해시킨 다음 자동 아미노산분석기(L8500S, Hitachi Co., Japan)로 분석하였다.

효소의 특성조사

pH의 영향은 universal buffer pH 2.0~12.0까지의 범위에서 효소와 기질을 혼합하여 37°C, 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였으며, pH 안정성은 효소액을 pH 2.0~12.0까지의 범위에서 각 pH별로 30°C에서 1시간 정치한 후 pH 5.0으로 환원시킨 다음, 37°C에서 30분간 효소액과 기질을 반응시켜 잔존 효소활성을 측정하였다. 온도의 영향은 pH 5.0의 0.1M sodium citrate buffer와 효소, 기질을 혼합한 후, 20, 30, 40, 50, 60, 70°C의 각 온도에서 반응시켜 효소활성을 측정하였으며, 온도의 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 5.0의 증류수에 녹이고 금속이온 용액 0.5ml와 효소액 0.5ml를 섞어 30°C에서 60분간 정치한 다음 잔존 효소활성을 측정하였으며 저해제의 영향은 0.5ml의 각 종 저해제(2mM)와 0.5ml의 효소액을 30°C에서 30분간 반응시킨 다음 잔존활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소생성을 위한 최적조건

*Syncephalastrum racemosum*의 protease의 생산을 위한 최적 배양온도와 최적 pH, 최적 배양시간을 조사한 결과, Fig. 1과 같다. 최적배양온도는 20°C였으며 40°C에서는 효소활성이 90% 이상 실패되었다. 초기배양 최적 pH는 4였으며 pH 6 이상에서 효소활성은 현저히 감소하여 산성영역에서 비교적 효소생산능이 강한 것으로 나타났다. 배양시간별 효소생산능은 5일간 배양시 가장 강하였으며 그 후 급격히 감소하였다. 재래식 간장으로부터 분리한 세균류인 *Bacillus subtilis* CCKS-111의 경우는 24 시간 배양시 최대 효소생산을 나타내었으며(10) 곰팡이인 *Asp. fumigatus*와 *Asp. oryzae* KC-15의 경우는 3일

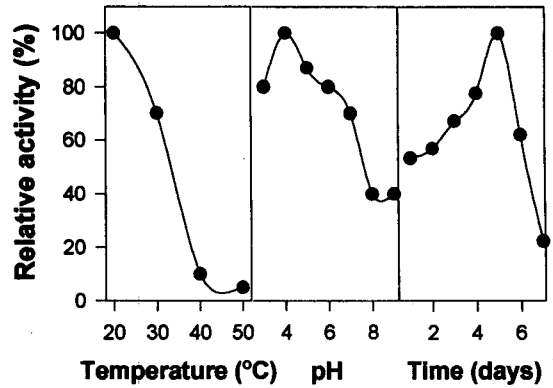


Fig. 1. Effect of temperature, initial pH and incubation time on the production of protease from *Syncephalastrum racemosum*.

인 것으로 나타나(11,12) 효소생산에 차이가 있는 것으로 나타났다.

효소의 정제

*Syncephalastrum racemosum*이 생산하는 protease를 정제한 결과는 Table 1과 같다. 즉 *Syncephalastrum racemosum*을 배양한 밀기울 배지로부터 추출한 조효소액을 황산암모늄으로 염석하여 투석한 다음, 동결건조한 것을 20mM sodium citrate (pH 5.0) buffer로 평준화시킨 Sephadex G-100 칼럼에 24.8mg/2ml을 충전시킨 다음 60ml/hrs의 유속으로 3ml씩 분획한 결과, Fig. 2에서와 같이 44~60번 fraction에서 효소활성이 검출되었다. 동일한 방법으로 수회에 걸쳐 gel filtration한 결과, 수율은 각 18.3%였고 정제도는 4.1배였다.

활성분획한 효소액을 동결건조한 다음, Sephadex G-100 칼럼에 39mg/2ml을 재충진시켜 23ml/hrs의 유속으로 3.31ml씩 분획한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 42~72번 fraction에서 효소활성이 검출되었다. 이때의 수율은 16.0%였고 정제도는 11.4배였다. 그러나 활성분획물에는 다량의 비활성 단백질이 혼재하고 있어 이를 다시 동결건조하여 이온교환수지에 흡착시켜 정제하였다.

농축시킨 효소액을 CM Sephadex C-50 칼럼에 전량 충전시킨 후 71ml/hrs의 유속으로 3.31ml씩 분획한 결과, Fig. 4에서와 같이 140~144번의 fraction에서 활성이 검출되어 분획하였다. 이때의 수율은 0.4%, 정제도는 19.7배였다.

Table 1. Summary of purification of protease produced by *Syncephalastrum racemosum*

Step	Total protein(mg)	Total activity(Unit)	Specific activity(Unit/mg)	Yield(%)	Purity(fold)
Crude enzyme	24,631	15,605	0.63	100.0	1.0
80% ammonium sulfate precipitation	5,367	4,152	0.77	26.6	1.2
1st Sephadex G-100	1,083	2,856	2.64	18.3	4.1
2nd Sephadex G-100	347	2,500	7.20	16.0	11.4
CM Sephadex C-50	5	62	12.4	0.4	19.7

정제연구에서 비활성단백질을 제거하기 위해 chromatography의 초기단계에 이온교환수지를 이용하는 것

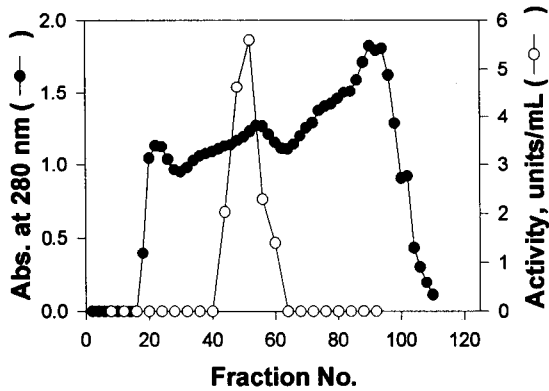


Fig. 2. 1st Sephadex G-100 chromatography. Column size, 2.6×55cm; flow rate, 1ml/min; tube volume, 3ml/tube; elution buffer, 20mM sodium citrate buffer(pH 5.0); active fraction, 44-66.

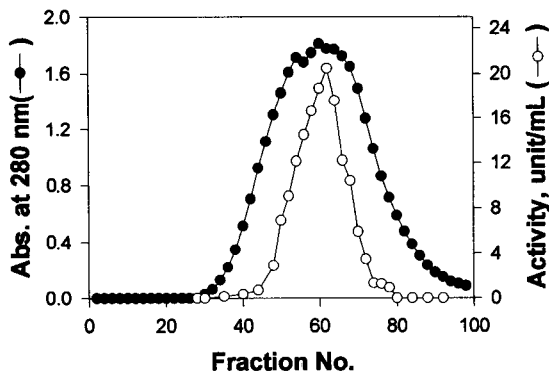


Fig. 3. 2nd Sephadex G-100 chromatography. Column size, 2.6×55cm; flow rate, 0.6ml/min; tube volume, 3.31ml/tube; elution buffer, 20mM sodium citrate buffer(pH 5.0); active fraction, 42-72.

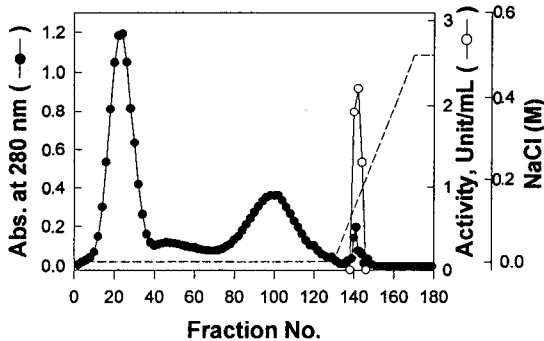


Fig. 4. CM Sephadex C-50 column chromatography. ●-●: absorbance at 280nm, ○-○: protease activity, ---: concentration of sodium chloride. Column size, 2.6×55cm; flow rate, 71.7ml/hr; tube volume, 5.2ml/tube; elution buffer, 20mM phosphate buffer pH 6.2; active fraction, 67-71.

이 일반적인 방법이다. 그러나 본 효소는 양이온(pH 5.0) 및 음이온교환수지(pH 7.0)에 활성단백질이 흡착되지 않아 젤 여과를 행하였다. 다량의 단백질을 수 차례에 걸쳐 젤 여과함으로써 활성의 손실이 있었다. 최종적으로 CM Sephadex C-50 이온교환 컬럼(pH 5.0)으로 용출한 결과, 활성단백질이 수지에 흡착됨으로서 비활성 단백질을 정제할 수 있었다. 그러나 정제 초기단계에서 동일 이온교환수지에 활성단백질이 흡착되지 않은 이유에 대해서는 아직 불명이다.

CM Sephadex C-50으로 분리한 효소의 분자량 및 순도를 결정하기 위해 SDS-PAGE를 행하였다(Fig. 5). 그 결과, 34kDa에서 단일밴드가 검출되어 순수분리되었음을 확인하였다. 이 결과는 도양에서 분리한 *Syncephalastrum racemosum*(13), *Asp. fumigatus*(14) 유래의 fungal protease의 분자량이 38kDa, 63kDa인 것과는 차이가 있었다.

아미노산 조성분석

정제단백질의 아미노산 조성 분석 결과(Table 2), 총 16종의 아미노산이 검출되었고, SDS-PAGE 분석에 의해 밝혀진 분자량 34kDa를 기준으로 효소단백질의 아미노산 잔기수를 계산한 결과, 본 protease는 336 잔기로 이루어진 것으로 추정되었으며 아미노산 잔기 중 alanine과 threonine, isoleucine의 잠정적인 잔기수가 각각 60, 43, 32개로 많이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌다.

효소의 특성

효소의 pH에 대한 영향을 조사한 결과 Fig. 6에서와 같이 효소의 최적 pH는 5.0이었으며 pH 6.0 이상에서 급

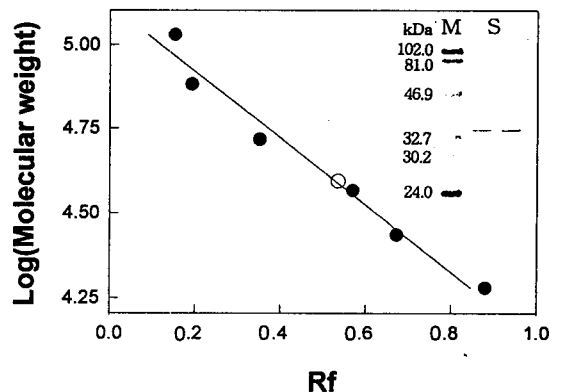


Fig. 5. Molecular weight estimation of the enzyme by 12% SDS polyacrylamide gel electrophoresis(Log₁₀ molecular weight vs. relative mobility). Purified enzyme ○; Size marker ●: 1. Phosphorylase B(102 kDa), 2. Bovine serum albumin(81 kDa), 3. Ovalbumin(46.9 kDa), 4. Carbonic anhydrase(32.7 kDa), 5. Soybean trypsin inhibitor(30.2 kDa), 6. Lysozyme(24 kDa), S: purified enzyme, M: size marker

Table 2. Composition of amino acids of protease produced by *Syncephalastrum racemosum*

Amino acids	mg%	%	Molecular weight ¹⁾	Residues ³⁾
Asp + Asn	5.086	14.837	115.00	44(43.9)
Ser	1.243	3.626	87.07	14(14.2)
Glu + Gln	3.371	9.834	127.50	26(26.2)
Gly	0.892	2.602	57.05	16(15.5)
His	0.365	1.065	137.14	3(2.6)
Thr	4.396	12.824	101.10	43(43.1)
Arg	0.322	0.937	158.18	2(2.0)
Ala	4.306	12.561	71.07	60(60.1)
Pro	1.012	2.952	97.11	10(10.3)
Tyr	0.996	2.905	163.17	6(6.1)
Val	2.328	6.791	99.14	23(23.3)
Met	0.081	0.236	131.19	1(0.6)
Ile	1.822	5.315	113.15	16(16.0)
Leu	3.669	10.703	113.15	32(32.2)
Lys	3.318	9.679	128.17	26(25.7)
Phe	1.072	6.148	147.17	14(14.2)
Total	34,280	100	34,000 ²⁾	336

¹⁾Molecular weight of amino acid

²⁾Molecular weight of enzyme by SDS-PAGE

³⁾Number of expected residues

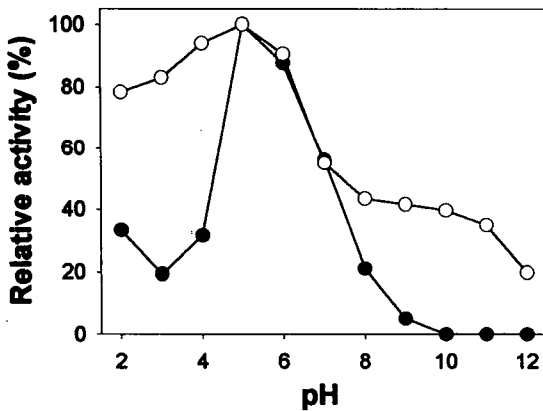


Fig. 6. Effect of pH on activity and stability of the protease produced by *Syncephalastrum racemosum*.
●-●: activity, ○-○: stability

격이 활성이 저하되어 pH의 변화에 대해 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 이 결과는 국균 유래의 3종의 protease의 최적 pH가 각각 3, 7, 7~10인 것(12)과, Bergkrist(15)가 보고한 *Asp. oryzae* 유래의 3종의 protease의 최적 pH가 4.5, 6.3, 9.0~9.5라고 한 보고와는 상이한 결과로서 본 효소는 이들 효소보다 약 산성에서 최적 pH인 산성 protease인 것으로 나타났다.

효소의 pH 안정성은 Fig. 6에서와 같이 pH 2.0~6.0의 범위인 산성영역에서는 안정하였으나, 알칼리 영역에서는 비교적 효소활성 낮았다. 사상균의 protease의 pH 안정성에 관한 연구를 보면 Hukawa 등(16)은 쌀누룩의 산성 protease는 pH 3.5~5.5, 알칼리성 protease는 pH 5.5

~7.0이라고 보고하였는데 본 균주가 생산하는 protease의 pH 안정범위는 산성 protease의 pH 안정범위와 유사하였다.

효소활성에 미치는 온도의 영향은 50~60°C에서 최대 활성을 보였으나 60°C 이상에서 급격히 효소활성이 감소하였다(Fig. 7). 이 결과는 *Asp. oryzae*(15)의 protease I 과 II가 50°C에서, *Rhiz. chinensis*(17)의 산성 protease가 60°C에서, 사상균 protease의 최적온도가 45~55°C에서 최대활성인 결과와 유사하였다.

한편, 열에 대한 안정성은 Fig. 7에서와 같이 본 효소는 40°C 이상에서 실활되기 시작하여 열에 대해서 상당히 불안정한 것으로 나타났다. *Asp. oryzae*의 산성 protease와 알칼리성 protease는 60°C에서 10분간 처리로 완전히 실활되었고 *Asp. awamori* U-3의 protease는 60°C에서 10분간 처리로 약 55%가 실활되었다고 하였다. 이와 같이 균주에 따라 열안정성이 다른데 본 균주가 생산하는 효소는 40°C 이상의 고온에서 상당히 불안정하여 내열성이 약한 것으로 나타났다. 효소의 최적온도는 일반적으로 열 안정범위 내인 경우가 일반적이나, 본 효소는 기질이 존재하지 않는 상태에서 1시간 방치하여 열에 대한 안정성을 조사함으로써 효소의 autocatalysis가 촉진된 결과로 인하여 50°C에서 약 40%의 활성이 실활된 것으로 사료된다.

금속이온에 대한 영향은 Table 3에서와 같이 Ag⁺ 존재시 잔존활성이 31%로 현저히 실활되었으며 그 밖의 금속이온에 대해서 다소 저해되는 것으로 나타났다. Kazuo 등(18)이 Ca²⁺에 의해서 활성이 증대 또는 보호된다는 보고와는 반대의 결과를 얻었다.

저해제에 대한 영향은 금속과 결합하여 chelate를 형성함으로써 metal protease의 활성을 저해하는 EDTA, 효소분자의 말단 아미노기와 친화력이 강하여 말단 아미

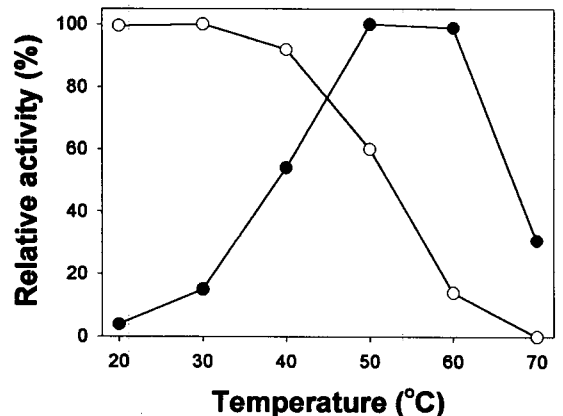


Fig. 7. Effect of temperature on activity and stability of the protease produced by *Syncephalastrum racemosum*.
●-●: activity, ○-○: stability

Table 3. Effects of metal ions on proteolytic activity of protease produced by *Syncephalastrum racemosum*

Ion	Metal	Relative activity(%)
	None	100
Ag ⁺	AgNO ₃	31
Ba ²⁺	BaCl ₂ · 2H ₂ O	70
Ca ²⁺	CaCl ₂	72
Cu ²⁺	CuSO ₄ · 5H ₂ O	80
Fe ²⁺	FeSO ₄	66
K ⁺	K ₂ CO ₃	62
Mg ²⁺	MgSO ₄ · 7H ₂ O	70
Mn ²⁺	MnSO ₄	76
Pb ²⁺	Pb(CH ₃ COO) ₂	65
Zn ²⁺	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	70

노산부위가 활성부위인 경우 효소활성을 저해하는 2,4-DNP, 효소분자의 SH기 저해제인 PCMB, serine protease의 활성 serine과 결합하여 효소활성을 저해하는 PMSF, 이상 4종에 대해 조사하였다. 그 결과, Table 4과 같이 효소활성이 PCMB에 의해 100% 저해되는 것으로 나타나 본 효소는 thiol protease임이 시사되었다.

기질농도와 효소활성과의 관계를 검토하였다. H. casein을 $0.0625 \times 10^{-4} \sim 0.5 \times 10^{-4} M$ 로 기질농도를 달리하였을 때 효소활성의 변화를 측정 한 후 Lineweaver-Burk plotting한 결과 Fig. 8와 같이 K_m값이 $0.6 \times 10^{-4} M$, V_{max}값은 2.14μg/min이었다. Cha와 Choi(11)의 *Asp. fumigatus*가 생산하는 protease의 경우 K_m값이 $8.33 \times 10^{-4} M$, V_{max}값은 47.62μg/min인 결과와 비교해 볼 때, 본 protease의 촉매활성은 기질결합력이 13.8배 강하나 V_{max}값이 약 22배 약하여 *Asp. fumigatus* protease의 촉매활성보다 약한 것으로 생각된다.

본 효소의 0.6%의 H. casein과 BSA에 대한 기질특이성은 Fig. 9에서와 같이 BSA보다 H. casein에 대해 가수분해력이 높은 것으로 나타났다. 이 결과는 두 기질의 단백질구조의 차이에 의한 것으로 생각된다. 일반적으로 folding 상태의 단백질구조가 S-S 결합 등에 의하여 compact한 경우는 가수분해력이 강한 효소로 반응시켰다 할지라도 intact한 상태로 검출되는 경우가 많고, 또한 효소의 아미노산 레벨의 기질특이성이 기질단백질의 분자 내

Table 4. Effects of various inhibitors on the protease from *Syncephalastrum racemosum*

Reagent	Relative activity(%)
Control	100
Phenylmethanesulfonyl fluoride	80
p-Chloromercuribenzoic acid	0
Ethylenediaminetetraacetic acid	100
2,4-Dinitrophenol	97

The reaction mixture, consisted of 0.5ml enzyme solution and 0.5ml inhibitor solution(2mM), was incubated at 30°C for 30 min and the residual activities were assayed.

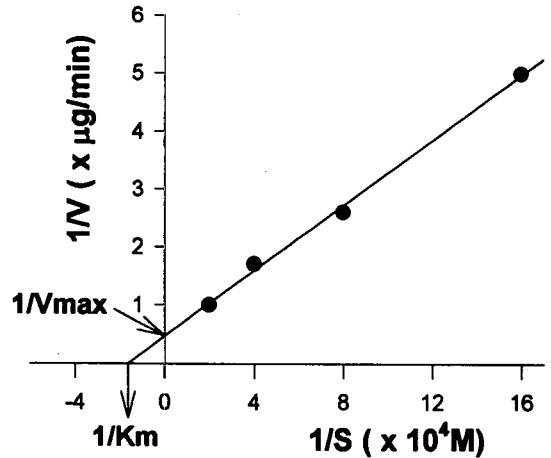


Fig. 8. Lineweaver-burk plot for hydrolysis of H. casein by protease from *Syncephalastrum racemosum*.

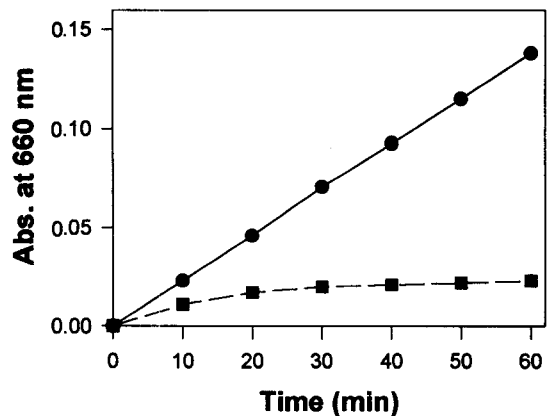


Fig. 9. Hydrolysis of various substrate by the protease from *Syncephalastrum racemosum*.

●-●: H. casein, ■-■: BSA

부를 구성하는 아미노산 잔기인 경우, 가수분해력이 현저히 저하될 수 있다. 따라서 BSA가 casein보다 compact한 folding 구조를 가진 결과로 casein의 가수분해력이 BSA보다 높게 검출된 것으로 사료된다.

요 약

메주의 대량 생산을 위한 starter culture로서 protease를 생산하는 곰팡이를 분리 동정하였다. 우리는 *Syncephalastrum racemosum* PDA 132-2의 메주 숙성시 사용가능성과 콩펄타이드의 생산을 위한 효소의 기초자료를 얻기 위하여 protease를 추출하고 정제하였으며 그 특성을 조사하였다. Protease의 밀기울에서의 최적 효소생산 조건은 pH 4.0, 20°C, 5일이었고 gel filtration과 ion exchange chromatography를 이용하여 정제한 결과, 정제도는 19.7배, 비활성도는 12.4unit/mg이었다. 정제효소는

크기가 약 34kDa이며 PCMB에 의해 효소활성이 100% 저해되어 thio protease, pH 2.0~5.0에서 안정한 산성 protease인 것으로 밝혀졌다. 효소반응속도는 V_{max} 값이 2.14 μ g/min로서 *Asp. wentti*와 *B. subtilis*와 비교해 1/50이었다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 과학기술처 선도기술과제 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

문헌

- Lee, H. J. : Health functional peptides from soybean foods. *Korean Soybean Digest.*, **15**, 16-22(1998)
- Han, E. S., Lee, H. J. and Shon, D. W. : Effect of surface hydrophobicity of soybean peptides on the concentration of serum cholesterol and fecal steroid extraction in rats. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **25**, 571-575(1993)
- Shon, D. H. : Functional food peptides and their applications. *Food Sci. Industry*, **30**, 22-29(1997)
- Motoki, K. and Sequso, K. : Trends in Japanese soy protein research. *INFORM*, **5**, 308-313(1994)
- Hiroshi, S. and Kadota, H. : Intracellular protease of *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1047-1051(1976)
- Yoo, J. Y. : Study on the commercial scale production of *meju* for Korean fermented soybean products. Research report of MOST(1998)
- Hagihara, B. : Method of enzyme vol. II. Asashoushoten, Tokyo, Japan, Vol. 2, pp.237-246(1956)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685(1970)
- Choi, C., Choi, K. G., Cho, Y. J., Lim, S. I., 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. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **25**, 915-921(1996)
- Cha, W. S. and Choi, C. : Characteristics and action pattern of protease from *Aspergillus fumigatus*. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **18**, 348-355(1989)
- Lee, M. J. and Chung, M. J. : Studies on the production of protease by *Aspergillus oryzae* KC-15 and characteristics of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **8**, 77-85(1980)
- Ho, H. C., Chen, L. Y. and Liao, T. H. : Identification of a fungal protein of *Syncephalastrum racemosum* as aspartic protease. *Arch. Biochem. Biophys.*, **334**, 97-103(1996)
- Cha, W. S., Cho, Y. J. and Choi, C. : The production of alkaline protease by *Aspergillus fumigatus* and purification of enzyme. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **18**, 279-286(1989)
- Bergkvist, R. : The proteolytic enzymes of *Aspergillus niger*. II. Properties of the proteolytic enzymes. *Acta Chemica Scandinavica*, **17**, 1541-1551(1963)
- Nunokawa, Y., Namba, Y. and Kinuyama, Y. : Studies on the constitution of "rice-koji" protease. Part II. The general properties of acid- and alkaline-protease. *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, **36**, 879-883(1962)
- Fukumoto, J., Tsuru, D. and Yamamoto, T. : Studies on mold protease. Part I. Purification, crystallization and some enzymatic properties of acid protease of *Rhizopus chinensis*. *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 710-717(1967)
- Kazuo, S., Kyo, S. and Kinichi, M. : Purification and some properties of serine protease from a mutant of *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.*, **63**, 479(1985)

(1999년 8월 6일 접수)