

컬럼 크로마토그래피에 의한 아스퍼질러스 계통의  
 $\alpha$ -아미라제 및 프로테아제의 결정화 (제 2 보)

— *Aspergillus oryzae* S.H.W. 131 이 생산하는 산성  
protease 의 理化學的性質에 관하여 —

徐 恒 源

(太平洋化學工業株式會社 酵素生產課)

Crystallization of  $\alpha$ -amylase and protease of *Asp. oryzae*  
from Column Chromatography(II)

— The physical properties of acid protease produced by  
*Asp. oryzae* S.H.W. 131. —

SUH, Hang-Won

(Sect. of enzyme product, Pacific Chemical Industrial Co.)

ABSTRACT

The studies of neutral protease which was obtained by passing through Sephadex A-50 had been reported not long ago.

Since that time the author also conducted the research to be investigated the physical properties of acid protease absorbed by Sephadex A-50.

The results are summarized as follows;

- 1) Cultivating *Aspergillus oryzae* SHW-131 on a wheat bran medium, the acid protease including neutral protease was gained in a mixed form.
- 2) Activity of acid protease is very sensitive for temperature.
- 3) This enzyme was proved, what is called, to be a sort of weak acid protease. It's optimum pH was lied in about 4.5.
- 4) A range of pH for stability is far more narrow than any other protease.
- 5) The acid protease is dropped by EDTA solution in its activity.

緒 論

絲狀菌의 酸性 protease 에 關하여는 嶋田의 *Penicillium cyclopium* 의 acid protease 精製에 關하여, 來問의 *Aspergillus* 屬의 acid protease, 吉田의 *Aspergillus niger* 系統의 酸性 protease, 福本の *Rhizopus chinensis* 의 精製酸性프로테아제 등의 理化學的 性質에 關한 報告 등이 있으나 著者는 前報에서 報告한 *Aspergillus oryzae* SHW-131 이 生産하는

protease 中에서 酸性 protease, 即 DEAE-Sephadex A-50 에 吸着시킨 protease를 0.5M -NaCl 로 溶出하여 Sephadex G-100 으로 gel filtration 하여 얻은 精製微酸性 protease 의 理化學的 性質에 對하여 報告하고자 한다.

材料 및 方法

a) 使用菌株 및 酵素  
前報에서 使用한 菌株를 同一한 方法으로 培養한후 그 麩을 물로 抽出하여 硫安鹽析,

脫鹽 및 脫色處理한 抽出酵素液을 DEAE-Sephadex A-50 에 吸着시킨 然後 0.5M-NaCl 로 溶出한것을 Sephadex G-100으로 gel filtration 하여 얻은 酵素를 使用하였다.

b) Protease 의 活性測定法

Milk casein 을 基質로 하는 Folin 呈色法에 의한 波長 660 m $\mu$ , 層長 10mm 에서 吸光度를 測定하며 酵素單位는 1分間에 生成한 1 $\mu$ g 의 tyrosine 相當의 吸光度로서 酵素力價를 表示한다.

結果 및 考察

a) 前報에서 報告한바와 同一하게 處理한 即 DEAE-Sephadex A-50에 吸着된 protease 酵素液을 0.5M-NaCl 로 溶出한 fraction No. 85-100의 酵素液을 Sephadex G-100으로 gel filtration 精製하여 酸性 protease 를 얻었다.

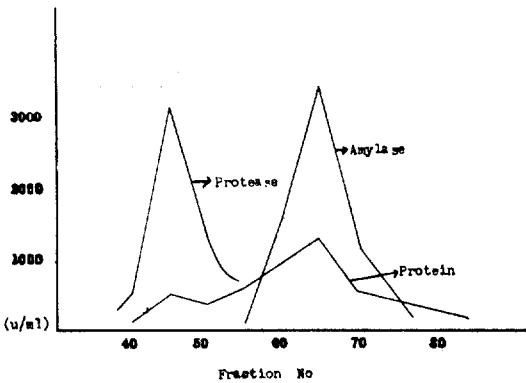


Fig. 1. Gel Filtration by Sephadex G-100.

b) pH 와 酵素活性

*Asp. oryzae* 의 酸性 protease 의 精製溶液을 milk casein 基質을 使用하여 다음과 같은 方法으로 pH 및 活性關係를 調査하였다.

即 1.5% milk casein 溶液을 McIlvaine buffer 를 使用하여 pH 2.0~8.0 의 基質을 調製한 후 1 ml 를 test tube 에 取하여 精製 酵素液을 適當히 稀釋한 酵素液 1ml 를 加하여 37°C 에서 60分間 作用시킨 후 protease 力價를 測定하였다. 結果 本酸性 protease 는 最適 pH 가 4.0~5.0附近임이 判明되었다.

c) pH 에 對한 安定性

精製酵素液 1ml 에 各種 pH 의 buffer (0.01

M-McIlvaine 試液) 1ml 를 加하여 各各別途로 30°C 에서 24時間 保管한 後 그 處理液을 pH 4.5 의 milk casein 을 基質로 殘存活性을 測定하였다.

그結果 pH 3.5 에서 pH 6.5 사이에서 安定性을 나타내었다.

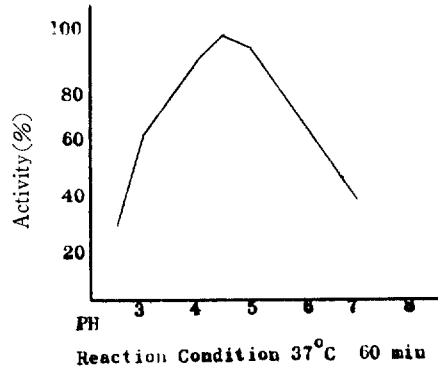


Fig. 2. pH and Activity

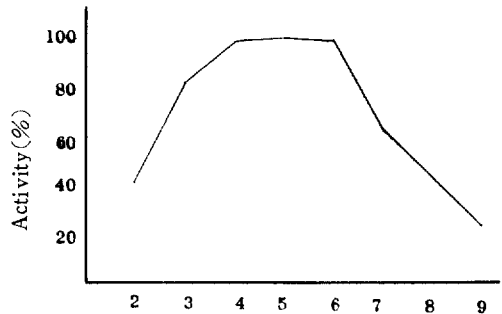


Fig. 3. pH-Stability

d) 作用温度와 酵素活性

精製酵素液 1 ml 를 1.5% milk casein 1ml (pH 4.5-M/10 McIlvaine buffer) 에 加하여 各温度에서 60分間 反應後 活性變化를 測定하였다.

本酸性 protease 는 40°C 에서 最大活性을 나타내었다.

e) 耐熱性

精製酵素液을 40°C~70°C 까지 各種温度에서 15分間 處理하였다가 急冷하여 殘存活性을 上記方法에 依해 測定하였다.

그結果 50°C~55°C 附近에서 急激한 失活이 있는 것으로 判明되었다.

f) EDTA 試液에 依한 影響

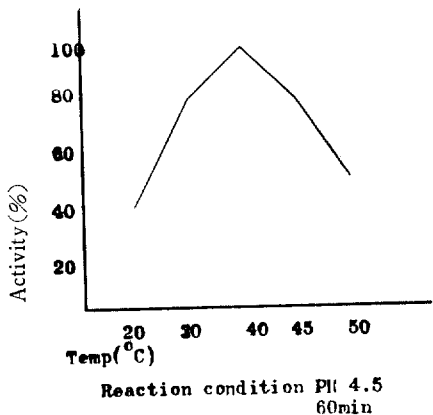


Fig. 4. The Action Temperature and Activity.

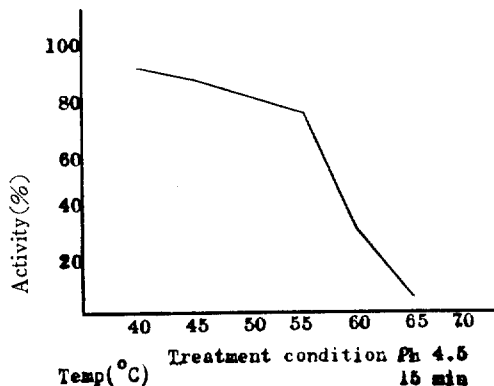


Fig. 5. The Activity Curve by temperature

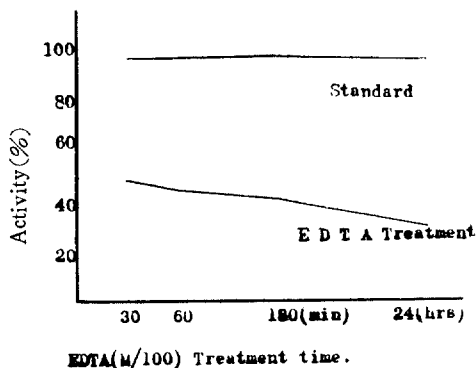


Fig. 6. The Activity Curve in EDTA Soln.

pH 4.5-M/100 McIlvaine buffer 이 EDTA 溶液이 M/100이되게 溶解시켜 9ml의 EDTA 와 精製酵素液 1ml 를 30分, 60分, 3시간, 24 시간 保有한後 殘存活性을 測定하였다.

그結果 M/100-EDTA 處理 및 時間에는 活性이 別로 영향을 받지 않으나 standard (normal 효소액) 溶液에 비해 1/3程度의 活性低下를 알 수 있었다.

g) 金屬 ion에 對한 影響

pH 4.5의 M/100-McIlvaine buffer 溶液에 諸金屬 ion을 M/100이되게 調製한후 30°C에서 60分間 定置하였다가 活性度를 上記方法으로 測定하였다.

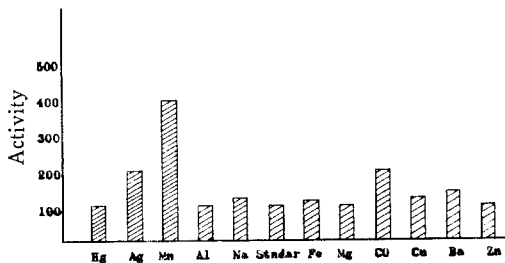


Fig. 7. The Effects of Activity by the Metal Ions.

*Asp. oryzae* SHW-131의 酸性 protease는 福本氏가 發表했던 *Rhizopus chinensis*의 酸性 protease 보다 耐熱性이 弱하며 또한 本研究室에 保管되어 있는 *Asp. niger*-18의 酸性 protease 보다도 耐熱性이 弱하여 熱에 對한 活性도 *Rhizopus chinensis*보다 10°C程度가 弱한 것으로 判明되었다. 그러므로 本 protease는 耐熱性이 極히 弱하여 不安定할 뿐더러 *Rhizopus* 屬系統이나 *Asp. niger*에 비해 耐酸性 또한 좋지 못한 것으로 생각된다.

### 摘 要

- 1) *Asp. oryzae* SHW-131 은 中性 및 酸性 protease 를 同時에 分泌하는 것으로 判明되었다.
- 2) 本酸性 protease 는 微酸性 protease 로 糾明되었다. 即, pH 4.5 附近에서 最適의 活性을 나타낸다.
- 3) pH 의 安定度는 中性 protease 보다 範圍가 狹한 것으로 判明되었다.
- 4) *Asp. oryzae* SHW-131 이 分泌하는 中性 protease 는 EDTA 에 依해 活性이 低下되지 않으나 酸性은 EDTA 에 依한 殘存活性이 현저히 低下되는 것으로 判明되었다.

### 引 用 文 獻

- 1) 서항원, 1971. 中性 protease 의 結晶化 및 理化學的性質, 한국미생물학회지, 9:4.
- 2) 松島, 嶋田, 1962. 麴菌 protease 의 chromatography, 日本農化誌, 36, 3p 193~197.
- 3) 松島, 嶋田, 1967. 곰팡이가 생산하는 protease 에 관한연구, 日本農化誌, 41. p 454~458.
- 4) 松島, 嶋田, 1965. 麴菌의 alkali-protease 에 대한 EDTA 의 영향, 日本農化, 39, 4, p. 164~167.
- 5) 來間, 奈川, 1968. 麴酵素에 의한 단백질의 분해, 日本農化, 42, 6. p 19-324.
- 6) 吉田, 1954. *Asp. niger* 의 내산성 protease, 日本農化誌, 28, 66.
- 7) Fukumoto, Tsuru and Yamamoto, 1967. Purification, Crystallization and some enzymatic Properties of acid Protease of *Rhizopus chinensis*, *Agr. Biol. chemi.* 31, No.6. p.710-717.