

耐酸性 Protease 에 관한 研究 (第 1 報)

菌의 分離 및 酵素學的 基本性質에 對하여

金 相 烈

曉星女子大學 藥學科

Studies on the acid stable protease from *Penicillium* sp.

Part I. Isolation of *Penicillium* sp. and the properties
of the acid proease.

Sang Yul Kim

Department of Pharmacy, Hyosung Women's College
(Received November 23, 1973)

Abstract

The acid protease was isolated from the culture broth of the *Penicillium* sp. grown in the wheat bran media. "The crude purification of this enzyme was carried out by extraction with distilled water and precipitated with saturated ammonium sulfate." The activity of this enzyme was found to be very strong by Folin's colorimetric method. The results were as follows.

1. The optimum pH of the enzyme activity was at 3.0 and its optimum temperature was 50°C.
2. Although the enzyme activity to hydrolyze casein was maximal at 50°C, its activity decreased rapidly by about 50%, treated at 50°C for 30 min. When treated at 40°C for 60 min, the enzyme activity decreased to 75% of original value and did not decrease any more.
3. The enzyme was stable at pH 2.0 to 6.0.
4. This enzyme activity was not effected by metal ions; Cd⁺⁺, Zn⁺⁺, Co⁺⁺, Hg⁺⁺, Mn⁺⁺, Pb⁺⁺, Mg⁺⁺, Li⁺, Cu⁺⁺, Ba⁺⁺, Ag⁺, Al⁺⁺⁺, Ca⁺⁺, Fe⁺⁺, and Fe⁺⁺⁺.
5. Also, it was not effected by treatemnt of EDTA.

I. 序 論

蛋白質分解酵素는 그 活性과 機能의 面에서 分類한 Hartley 分類法⁽¹⁾에 依하면 serine protease, thioproteinase, metal protease, acid protease 등으로 分類되며 또한 그作用 pH의 領域에 따라 酸性, 中性, alkali 性 protease 로 分類된다. 이때 酸

性 protease 는 酸性領域에서 酵素作用을 갖는 蛋白分解酵素의 一群으로서 다른 protease 와는 달라 一般的으로 活性 serine 이라든가-SH 라든가의 特定된 共通의 amino acid 殘基가 活性中心을 構成하고 있는 것이 아니고 또 DEP 나 EDTA 및 PCMB 의 SH 試藥에도 阻害되지 않는 酵素로써 酵素蛋白質 中の aspartic acid 나 glutamic acid 따위의 side chain 의 carboxyl 基가 活性에 重要な 역할을 한다

고 알려져 있다.

이 acid protease는 특히 消化酵素로서 옛부터 극히 重要な 位置를 차지해온 gastric enzyme 즉 pepsin, rennin 등으로 널리 알려져 있으며 消化酵素로서의 開發을 爲해 自然界로부터 이를 얻기 위한 研究가 活發하게 進展되었다. 즉 微生物 또는 植物로부터 研究된 報文으로서 微生物에서 由來된 acid protease는 주로 mold類에서 生成되는 酵素로서 *Aspergillus saitoi* 혹은 近緣의 *A. usami*, *A. aureus*, *A. awamori*, *A. niger*, *A. oryzae* 따위의 培養物로부터 *Aspergillus peptidase A*의 存在가 널리 알려져 그 最適作用 pH가 2.5에서 3.0이며 安定pH領域이 2.5~6.0에位置하고 있음이 報告되고 있다.⁽³⁾ 또한 *Rhizopus*屬으로부터 *J. Fukumoto*⁽⁴⁾, *Aspergillus*屬에서부터 *S. Atsuhiko*⁽⁵⁾, *Shakhova T. V.*,⁽⁶⁾ *Oreschenko L. I.*⁽⁷⁾ *Dorokhov V. V.*⁽⁸⁾ *Stepanov V. M.*⁽⁹⁾ *Penicillium*屬으로부터 *Dorokov V. V.*⁽⁸⁾ *Mucor*屬으로부터 *K. Arima*⁽¹⁰⁾ 등의 研究가 있으며 그 외에 bacteria로부터 *S. Doi*,⁽¹¹⁾ 버섯으로부터 *K. Tomoda*⁽¹²⁾, *Yeast(S. cereviciae)*로부터 *T. Hata*⁽¹³⁾ 등의 研究가 널리 알려져 있으며 특히 現在는 Zymogen으로서 分泌되는 pepsin은 물론 cathepsin D 따위의 intracellular acid proteinase 및 微生物 由來의 proteinase를 結晶狀態의 精製酵素로서 分子 Level에서 그 構造 및 作用機構를 解明하기에 이르렀다.^(3,4) 본 實驗에서도 以上과 같이 活發히 研究되고 있는 acid protease를 強力히 分泌하는 菌株을 *Penicillium*屬으로부터 分離하였으며 아울러 이를 粗精製하여 그 基本性質을 檢討하였기에 報告하는 바이다.

II. 實驗方法 및 結果

1. 供試菌

自然界에서 分離한 *Penicillium*屬 61株를 對象으로 하였다.

2. 菌의 選制

1) 菌의 培養

市販 wheat bran 100g 當 2% Sucrose Solution 70ml를 加하여 15Lbs에서 15분간 殺菌後 上記 供試菌을 接種하여 30°C에서 5日間培養하였다.

2) 酵素의 抽出

上記 方法으로 培養된 各菌의 培養物에 約2배

의 蒸溜水를 加하여 5°C에서 5時間 抽出한 後 濾過하여 그 濾液을 酵素液으로 使用하였다.

3) 菌의 選別

Acid protease 強力分泌 菌株을 選別하기 위하여 上記 方法으로 抽出한 酵素液을 Fuld Gross 變法으로 測定하여 그 活性度를 表示하였다. 즉 0.1% Casein(Hammarsten milk casein) 2.5ml에 酵素液 0.5ml를 加하여 40°C에서 30分間 作用시킨후 蛋白沈澱試藥 (0.11M TCA+0.22MCH₃COONa+0.33M CH₃COOH)를 加하였을 때 肉眼的으로 反應液에 沈澱이 生成되지 않거나 극히 微量生成된 菌株을 選別하였다. 단 이때 Casein을 pH2.2의 2倍 稀釋된 McIlvaine Buffer solution으로 溶解하므로서 反應液의 pH를 調整하였다. 以上과 같은 方法으로 各 菌株의 acid prontease의 活性度를 測定한 結果 耐酸性 protease 強力分泌菌株 A-43을 最終選別하였다.

2. 選別된 菌株酵素의 粗精製

選別된 菌株 A-43을 역시 wheat bran 100g에 2% Sucrose solution 70ml를 加한 培地를 15Lbs에서 30分間 殺菌하여 接種後 30°C에서 4日間 培養하였다.

이 培養物에 約2배의 물을 加하여 5°C에서 24時間 抽出한 후 그 遠心上澄液에 (NH₄)₂SO₄를 飽和시켜 다시 5°C에서 約12時間 放置하였을때 生成되는 沈澱을 얻었다. 이 沈澱을 다시 蒸溜水에 溶解시켜 cellophane paper로서 4日間 5°C에서 dialysis를 하여 粗精製 酵素原液을 얻었으며 以下 實驗은 이液을 5°C에 放置하면서 倍稀釋하여 使用하였다.

4. 酵素의 活性度 測定方法

粗精製 酵素의 活性度를 測定하기 위하여 Folin 比色法을 使用하였다. 즉 0.5ml의 酵素液을 2.5ml의 基質(0.6% Casein solution)에 加하여 38°C에서 20分間 作用시킨후 0.44M TCA溶液 2.5ml를 加한후 다시 38°C에서 30分間 放置하여 殘存 蛋白을 沈澱시킨후 濾過하여 이 濾液 1ml에 蒸溜水 1ml, 0.55M-Na₂CO₃5ml 및 3倍 稀釋한 Folin 試藥 1ml를 加하여 38°C에서 30分間 呈色시킨후 660m μ 에서 그 吸光度를 測定하여 對照와의 O. D의 差로서 酵素活性度를 나타내었다.

5. 最適活性 pH

本 菌株 A-43이 生成하는 acid protease의 作用

最適 pH를 檢討하고자 Sørensen & Palitzsch Buffer solution (0.1N-NaCl, 0.1M glycol+0.1N-HCl)을 사용하여 pH1.15에서 pH3.68까지의 각 pH에서 酵素의 活性을 調査하였다. 그 作用 候件은 0.6% casein solution (pH2.2, dissolved in Buffer solution which diluted 2 times with distilled water)을 基質로 하여 0.50ml의 酵素液을 30°C에서 20分間 作用시킨후 Folin's colorimetric method로써 그 活性度를 測定하였다. 이때 對照區로서는 酵素液 대신 蒸溜水 0.5ml를 添加하여 同一한 候件下에서 作用 測定하였으며 그 結果는 다음 Fig. 1과 같다.

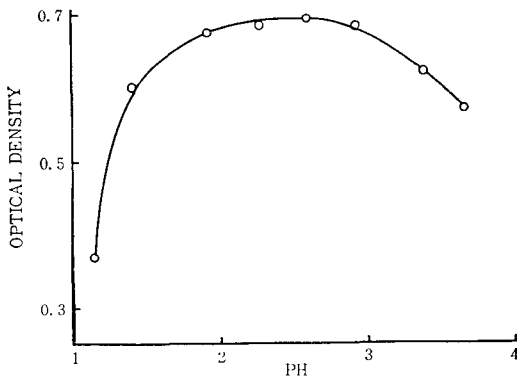


Fig. 1 Effect of pH on the Proteolytic Activity of acid Protease.

위의 Fig. 1에서 보는 바와 같이 본 A-43菌株가 生成하는 acid protease의 最適 pH는 2에서 3까지였다.

6. 最適活性 溫度

本 菌株酵素의 最適作用溫度를 調査하고자 Buffer solution, 酵素液 및 基質溶液을 最適 pH檢討時와 같이 調製하여 各 온도에서 20分間 酵素作用을 시켜 Folin 比色法으로 그 活性가를 測定한 結果 Fig. 2와 같다.

즉 本 酵素의 最適活性溫度는 50°C였다.

7. pH에 對한 安定性

pH 1.2에서 pH 8까지의 範圍內에서 本 菌株酵素의 pH에 對한 安定性을 調査하였다. 使用한 Buffer solution은 pH 1.2에서 3.6까지는 Sørensen & Palitzsch Buffer solution이었으며 pH 4에서 8까지는 McIlvaine Buffer solution (0.1M citric acid + 0.2M Na₂HPO₄)을 使用하여 各 pH의

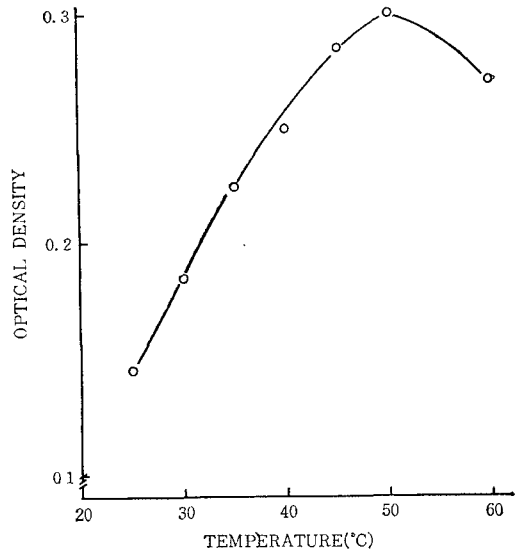


Fig. 2 Effect of Temperature on the Proteolytic Activity of Acid Protease.

buffer solution 1ml와 enzyme solution 1ml을 混合한 30°C에서 3時間 preincubation시킨후 N-HCl로서 pH를 약 2~3까지 下降시켜 0.6% casein 2.5ml를 加하여 38°C에서 20分間 酵素作用시킨후 常法에 準하여 酵素活性度를 O. D로서 나타내었다.

그 結果 Fig. 3에서 보는 바와 같이 本 A-43菌株酵素는 pH 2에서 6까지의 넓은 범위에서 그

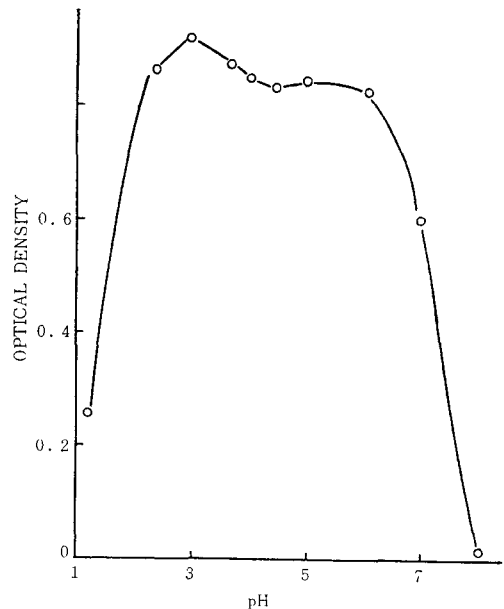


Fig. 3 pH Stability of the Acid Protease

活性이 상당히 安定하였으며 pH가 2 以下로 下降하거나 6 以上으로 上昇함에 따라 酵素活性이 急激히 下降함을 알게되었다.

8. 溫度에 對한 安定性

40°C, 50°C, 60°C의 各 溫度에서 酵素液을 5 時間까지 處理시키면서 經時的으로 酵素液을 取하여 -5°C에 放置한 후 最終溫度處理 酵素液과 同一條件下에서 즉 0.6% casein 2.5ml에 加하여 38°C에서 20分間 酵素作用을 시킨후 以下 常法에 準하여 酵素活性度를 나타내었다.

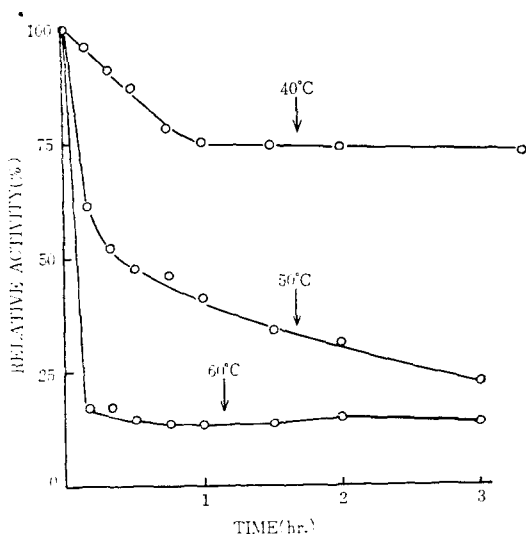


Fig. 4 Heat Stability of Acid Protease

위의 Fig. 4에서 보는 바와 같이 本酵素는 40°C에서는 時間의 經過에 따라 상당히 徐徐히 失活되어 3時間이 經過後에도 30%程度였으나, 60°C에서는 約 10分後부터 80%程度 失活되었다.

9. 金屬 ion의 影響

本 酵素作用에 金屬 ion이 影響을 주는가 與否를 調査하기 爲하여 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Co}$, HgCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Li_2SO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, BaCl_2 , AgNO_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$, $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 등 16種의 金屬鹽類를 對象으로 10^{-5}M 濃度부터 10^{-2}M 까지 調査하였다.

즉 各 金屬鹽類溶液의 調製는 上記 各 濃度의 溶液을 pH3(HCl로 調整)의 蒸溜水로서 溶解하였 으며 그 反應區는 다음과 같다.

S; 0.5ml enzyme solution } preincubation
0.5ml metal ion solution } 38°C 1hr.

0.6% casein 3ml } incubation
38°C, 30min

0.44M T. C. A 3ml → (0.5ml H₂O
0.5ml H₂O (pH₃))

C₁; 0.5ml enzyme solution } preincubation
0.5ml H₂O (pH₃) } 38°C, 1hr.

0.6% Casein 3ml } incubation
38°C, 30min.

0.44M T. C. A 3ml → (0.5ml H₂O
0.5ml metal ion solution)

C₂; 0.5ml H₂O } preincubation
0.5ml metal ion solution } 38°C, 1hr.

0.6% casein 3ml } incubation
38°C, 30min.

0.44M T. C. A 3ml → (0.5ml enzyme solution
0.5ml H₂O)

즉 이들 各各의 金屬鹽類 溶液과 酵素液을 preincubation 시킨 後, substrate를 加하여 酵素作用을 시킨 後 常法에 따라 그 比色度를 測定하여 酵素作用을 나타내었으며 이때 對照區로서는 enzyme 만이 substrate에 作用했을 경우 (C₁)와 metal

Table 1 Effect of metal ions(10⁻⁵M conc.)

ion	metal	S	C ₁	C ₂
Ca ⁺⁺	CaCl ₂	1.398*	1.402	.2588
Zn ⁺⁺	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.268	1.284	.2381
Co ⁺⁺	(CH ₃ COO) ₂ Co	1.209	1.260	.6261
Hg ⁺⁺	HgCl ₂	1.143	1.149	.2292
Mn ⁺⁺	MnCl ₂ ·4H ₂ O	.8697	.8665	.2020
Pb ⁺⁺	PbAc ₂	.8212	.8135	.1361
Mg ⁺⁺	MgSO ₄ ·7H ₂ O	.8827	.8539	.1279
Li ⁺	Li ₂ SO ₄	.7447	.7959	.1226
Cu ⁺⁺	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.041	1.041	.1675
Ba ⁺⁺	BaCl ₂	.8539	.8543	.1129
Ag ⁺	AgNO ₃	.8297	.8339	.1124
Al ⁺⁺⁺	Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O	.8477	.8508	.1169
Cd ⁺⁺	3CdSO ₄ ·8H ₂ O	.8861	.8386	.1129
Fe ⁺⁺	FeSO ₄	.8928	.8861	.0706
Fe ⁺⁺⁺	FeCl ₃	.8861	.8670	.0630
Fe ⁺⁺⁺	Fe ₂ (SO ₄) ₃	.8539	.8861	.0706

※ O. D.(-logT)

란이 基質에 作用했을 경우(C₂)를 設定하여 比較 檢討하였다. 10⁻³M 濃度에서의 結果만을 Table 1 에서 例示하면 다음과 같다.

위의 Table 1에서 보는 바와 같이 本 acid protease 는 金屬 ion에 依해서는 거의 그 活性에 影響을 미치지 않음을 알게 되었다.

10. EDTA 의 影響

EDTA-2Na(Dotite)를 pH3 으로 調節(HCl)한 증류수에 溶解하여 各各 反應液에서 最終濃度 10⁻⁷M에서 10⁻³M 까지 되게하여 이들 EDTA 溶液 0.5ml와 酵素液 0.5ml를 混合하여 38°C에서 40分間 preincubation 시킨 後 0.6% casein 3ml를 加하여 酵素作用을 시켰으며 (S區) 이때 對照로서는 金屬鹽類의 影響 檢討할 때와 同一 條件 즉 enzyme 만이 基質에 作用했을 경우(C₁區)와 EDTA 만을 作用시켰을 경우(C₂)를 設定하여 常法에 따라 그 酵素의 活性을 測定한 結果는 다음 Table 2 와 같다.

Table 2. Effect of EDTA

Conc. of EDTA	S	C ₁	C ₂
10 ⁻⁷ M	1,000*	.9469	.1074
10 ⁻⁶	.9947	.9469	.1045
10 ⁻⁵	1,000	.9914	.1096
10 ⁻⁴	1,017	.9568	.1118
10 ⁻³	1,036	.9788	.1107

※ O. D(-logT)

위의 Table 2에서 보는 바와 같이 本酵素의 活性에 Chelate 試藥인 EDTA 가 全然影響을 미치지 않으므로 本 酵素內에는 金屬이 含有되어 있지 않음을 알게 되었다.

III. 考 察

微生物 起源의 酸性 protease 는 主로 mold 類로 부터 많이 生成됨은 周知事實이다. 本報에서도 Penicillium 屬으로 부터 強力히 酸性 protease 를 分泌하는 菌一株을 分離하여 wheat bran culture 에 依한 培養物의 抽出液에 saturated ammonium sulfate 分割을 dialysis 하여 粗精製한 酵素의 基本的 性質을 調査한 바 그 最適 pH 가 2.6으로 나타났다 이는 J. Sawada⁽¹³⁾의 Paecilomyces proteinase 의 最適 pH 2.5~3.0 및 K. Tomota⁽¹⁴⁾의

느타리 버섯 protease 의 pH 2.5, Shakhova, J. V⁽⁶⁾의 Asp. awamori 로 부터 얻은 酵素의 pH 2.5 와 거의 一致되는 것으로서 酸性 領域에서 극히 活性이 강한 酵素임을 알게 되었다. 또 이는 pH 2 에서 6까지의 넓은 pH 範圍에서 酵素活性이 극히 安定하게 保持됨을 알았다. 이는 一般 Aspergillopeptidase A 의 安定 pH 範圍⁽³⁾ 2.5~6.0과 거의 一致하였다.

溫度에 있어서는 最適溫度가 50°C 로써 나타났고 安定溫度 範圍는 40°C 以上에서는 상당히 急激한 酵素의 失活을 惹起하였으나 40°C 以下에서는 安定하게 酵素의 活性이 保持됨을 알게 하였다. 또 金屬 ion으로서 約 15種중 Ca⁺⁺, Zn⁺⁺, Co⁺⁺, Mg⁺⁺, Hg⁺⁺, Mn⁺⁺, Pb⁺⁺, Li⁺, Cu⁺⁺, Ba⁺⁺, Ag⁺, Al⁺⁺⁺, Cd⁺⁺, Fe⁺⁺, Fe⁺⁺⁺ 등이 本 酵素의 活性에 하등의 影響을 미치지 않으며 이는 또 EDTA 에 依해서도 全然 酵素의 活性에 阻害現象을 나타내지 않았다.

이는 前述한 바와 같이 本 acid protease 는 DEP 나 EDTA 에 阻害되지 않는다⁽³⁾라는 現在까지의 研究結果와 一致되는 興味있는 事實로서 그 活性 構造를 究明해 나감에 앞으로의 남은 課題라고 생각된다.

IV. 要 約

Penicillium 屬 菌株로 부터 acid protease 를 強力하게 生成하는 菌株 A-43을 分離하여 이 菌의 wheat bran culture 에 依한 培養物의 抽出溶液에 saturated ammonium sulfate 로서 鹽析 및 3日間의 dialysis 를 하여 얻은 粗精製 酵素의 基本的 性質을 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

- 1) 最適活性 pH 가 2.6~3.0 이었다.
- 2) 最適活性 溫度가 50°C 이었으며
- 3) 安定 pH 範圍가 2~6에 位置하였으며
- 4) 40°C 에서 3時間 經過하였을 때 30%程度의 失活이 認知되었으며 그 以上 溫度에서는 多少 急激히 熱에 依한 失活이 일어났다.
- 5) 金屬鹽類 즉, Ca⁺⁺, Zn⁺⁺, Co⁺⁺, Mg⁺⁺, Hg⁺⁺, Mn⁺⁺, Pb⁺⁺, Li⁺, Cu⁺⁺, Ba⁺⁺, Ag⁺, Al⁺⁺⁺, Cd⁺⁺, Fe⁺⁺, Fe⁺⁺⁺ 에 依하여 酵素活性에 거의 影響을 미치지 않았다.
- 6) EDTA 에 依하여도 아무런 影響을 받지 않았다.

參 考 文 獻

- 1) Hartly, B.S; Ann. Rev. Biochem. 29 459 (1960)
- 2) 一島英治;蛋白質, 核酸, 酵素 12, (7) 539 (1967)
- 3) 一島英治;醱協誌, 25, (7) 269(1967)
- 4) Fukumoto, J. et al; Agr. Biol. Chem. 31 (6) 710(1970)
- 5) Atsuhiko, S, et al; Kakko Kogaku Zasshi, 48, (9) 519(1970)
- 6) Shakhova, T.D. et al; Prikl. Biochem. Mikrobiol. 6, (4) 383(1970)
- 7) Oreschenko, L.I. et al; Otkoytiga. Izobret. Prom. Obruztsy, Tovarnye Znaki, 6, 46, 25 (1969)
- 8) Dorokov, V.V. et al; Microbiol. Sin, sb. Inform. Mate, 15~9, No. 8(1967)
- 9) Stepanov, V.M et al; Ser. Khim. 12, 2840 (1968)
- 10) 有馬啓外;農化大會 51(1962), 12(1963)
- 11) Doi Shinji; Kagaku 14, (3) 19(1967)
- 12) Tomoda, et al; Agr. Biol. Chem., 28, 770, 774(1964)
- 13) Sawada, J.; Agr. Biol. Chem. 27. 677(1963), 28, 348(1964), 30, 393(1966)
- 14) 友田勝己外;酵素化學 Symposium 14, 1(1962), 15, 168(1963)