

Katsuobushi에서 분리한 곰팡이 protease 분리정제

김관우* · 윤태옥 · 김준평

*송원전문대 식품영양과, 중앙대학교 식품가공학과

Purification of Mold Protease Isolated from Katsuobushi

Kwan-Woo Kim*, Tai-Uk Yun and Jun-Pyong Kim

*Department of Food and Nutrition, Songwon Junior College
Department of Food Science and Technology, Chung-ang University

Abstract

The strain OK-63 isolated from katsuobushi was cultured on wheat bran medium, and the isolate was morphologically identified as an *Aspergillus niger* group and showed maximum protease activity and multiplication after 6 days of cultivation. Protease was purified by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100 gel filtration and DEAE-cellulose column chromatography. The purified enzyme showed single band by polyacrylamide gel electrophoresis and the purity was 150 times higher than crude enzyme. The recovery of enzyme activity was found to be 45%.

Key words: protease, Katsuobushi, *Aspergillus niger* enzyme purification

서 론

Protease는 식품공업에서 뿐만 아니라 섬유 피혁 및 의약용품으로 다양 소보되고 있으며 최근에는 세계의 원료로까지 응용되는 매우 실용성이 큰 효소이다. Protease는 주로 protein이나 peptide에 작용하여 peptide 결합의 가수분해를 촉매하는 효소이지만 어떤 종류의 protease는 ester amide 결합을 가수분해 하기도 하고, peptide를 합성하기도 하며 전이반응이나 효소 교환반응을 하기도 한다⁽¹⁾.

식품공업에서 protease는 주로 연육소, 맥주의 혼탁방지제 등의 목적으로 이용되고 있으나 실질적인 응용은 한정된감이 있는데 이는 protease들에 의하여 생성된 가수분해물 중에는 고미를 띠는 peptide 등이 존재하여 식품에 좋지않은 풍미를 주기 때문인 것으로 알려져 있다. 그러므로 식품공업에서 응용될 protease는 고미물질을 형성하지 않는 것을 선호하게 되었고 그러한 protease를 개발하려는 노력이 꾸준히 이루어지고 있다.

예전부터 일본에서 발효식품인 katsuobushi⁽²⁾는 발효종에도 고미의 생성이 적고 우수한 풍미를 나타내고 있어서 많은 일본사람들에게 조미식품으로 환영받고 있으며 최근에는 한국에서도 이용되고 있다. 이는 katsuobushi가 발효과정 중 고미물질이 형성되지 않는 좋은 예로서 결국 고미물질을 생산하지 않는 protease가 관

여한 것으로 생각하였다.

이와 같은 가정하에서 katsuobushi에서 생육하는 *Aspergillus niger* group⁽³⁾을 분리하여 밀기울에서 배양하고 고미생성도를 검토하고 이 균주의 protease를 분리정제하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용된 시료 가다랭이는 일본 균해에서 어획된 신선한 것을 배지로 사용하였고, katsuobushi는 시판되는 것을 구입하여 균분리에 사용하였다.

균의 분리

균의 분리⁽³⁾는 신선한 가다랭이를 지방과 혈액을 제거한 후 약 5배의 물을 가하여 mixer로 homogenize하였다. 이것을 80°C에서 30분간 가열한 후 냉각시켜 samborose를 2000 unit가 되게 가하여 40°C에서 수시간 protease로 소화한 다음 끓여서 효소를 실활시켰다. 여기에 소금이 0.5%되게 가하여 여과하고 이를 농축하여 가다랭이 추출물을 얻었다⁽²⁾.

이 추출물의 조성은 농축건조중량 20.6 mg/ml, 질소 함량 2.75 mg/ml이고, pH는 5.8이었으며 상기 가다랭이 추출물에 한천을 1.5%가 되도록 가하고 120°C에서 20분간 가압살균하여 petri dish에 분주하여 균분리용 배지로 하여 균을 분리하였다.

Katsuobushi의 표면부위를 무균적으로 긁어내어 10배의 살균수에 혼탁시키고 이 혼탁액에 일정량을 균분

Corresponding author: Kwan-Woo Kim, Department of Food and Nutrition, Songwon Junior College, Kwangchundong, Kwangju 500-742, Korea

리용 배지에 접종하였다.

한편 katsuobushi 표면을 70% alcohol로 살균한 후 칼로 katsuobushi 내부를 절단하여 그 절편의 소량을 배지에 직접 접종하여 4-20일간 배양하여 발생된 곰팡이, 호모, 세균 및 방사선균을 한천 사면배지에 이식하였다.

분리균주의 배양

상기 가다랭이 추출물에 dextrin을 1%가 되도록 가한 것을 50 ml 취하여 삼각플라스스크에 분주한 것(A 배지로 칭함)과 A 배지 15 ml에 밀기울 15g을 가한 것(B 배지로 칭함)의 2종의 배지를 120°C에서 20분간 살균한 후 균주를 1백그이 접종하여 27°C에서 배양하였다.

또한 효소생산력은 B 배지로 27°C에서, 6일간 배양^[18]하고 배양물에 5배량의 20 mM sodium acetate 완충용액을 가하여 4°C에서 침지한 후 가세로 여액을 얻은 다음 10,000 rpm에서 원심분리한 후 상징액을 조효소액으로 하여 protease의 활성을 측정하였다.

고미생성도

고미생성도^[2]는 10% Hammarstein casein 용액 4 ml에 조효소액을 2 ml 가하여 30°C에서 3~16시간 반응시킨 후 그 분해물에서 나타나는 고미생성도를 관능검사로 측정하였다.

고미생성도는 Trypsin 분해물을 4로 하여 상대치로 나타냈으며 이중 최대치, 최소치를 제외한 평균치를 조효소의 고미생성도로 하였다.

Aminopeptidase(Apase)의 활성

Apase의 활성은 Nessler's method^[4]에 의하여 측정하였다. 즉 가질 10 mM tyrosin amide(Tyr-NH₂) 용액(50 mM sodium acetate 완충용액, pH 6.0) 0.4 ml에 효소용액(50 mM sodium acetate 완충용액, pH 6.0) 0.1 ml를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 5% Nessler 시약으로 발색시켜 430 nm에서 optical density(O.D)로 측정하였다.

효소단위는 위의 실험조건에서 1분 동안에 1 μM의 Tyr-NH₂을 분해하는 효소활성을 1 unit로 하였다.

Carboxypeptidase(Cpase)의 활성

Cpase의 활성은 Yemm cocking method^[5]에 따라 측정하였다. 즉 가질 10 mM Z-Glutamyl tyrosine(Z-Glu-Tyr) 용액(50 mM sodium acetate 완충용액, pH 4.0) 0.2 ml에 효소용액(50 mM sodium acetate 완충용액, pH 4.0) 0.1 ml를 가한 후 37°C에서 10분간 반응시키고 0.1 N HCl 0.2 ml로 효소를 실활시켰다. 여기에 0.2 N citrate 완충용액(pH 5.0) 0.25 ml와 KCN-ninhydrin 용액 0.6 ml를 첨가하여 100°C에서 15분간 가열, 냉각 후 60% ethanol 5 ml을 혼합하여 570 nm에서 O.D를 측정하였다.

효소단위는 위의 실험조건에서 1분 동안에 1 μM의 Z-Glu-Tyr을 분해하는 효소활성을 1 unit로 하였다.

Protease의 활성

Protease의 활성을 Kunitz method^[6]에 의하여 측정하였다. 즉 기질 1% Hammarstein casein 용액(20 mM potassium phosphate 완충용액, pH 7.7) 2.5 ml에 효소용액(20 mM potassium phosphate 완충용액, pH 7.7) 0.5 ml를 가한 후 37°C에서 10분간 반응시켰다. 여기에 5% trichloro acetic acid 5 ml을 넣어서 반응을 정지시켜 10분 후 여과한 여액을 280 nm에서 O.D를 측정하였다.

효소단위는 37°C에서 1분당 1 mg/m의 tyrosine을 유리시키는 효소활성을 1 unit로 하였다.

조효소생산 및 황산암모늄 분획

분리된 우수균주는 밀기울배지^[14,19] (pH 5.8로 조절)에서 37°C, 6일간 배양한 후 5배의 1/100 M sodium acetate 완충용액(pH 5.8)을 첨가하여 4°C에서 잘 흔든다음 압착한 액을 여과한 후 (NH₄)₂SO₄로 0.4 포화도^[7]로 4°C에서 24시간 정지한 후 흡입여과한 액을 다시 (NH₄)₂SO₄로 0.8 포화도로 4°C에서 24시간 방치한 후 여과하여 얻어진 침전물을 투석, 농축하여 동결건조한 것을 조효소로 하여 정제에 사용하였다.

Protease의 분리정제

동결건조한 조효소를 1/20 M sodium acetate 완충용액(pH 5.8)에 용해시켜 Sephadex G-100으로 gel filtration과 rechromatography^[8]로 분획하고 protease fraction을 농축, 투석한 다음 DEAE-Cellulose chromatography^[9] 하였다.

Gel filtration에 사용한 column은 2.0×50 cm이었으며 1/20 M sodium acetate(pH 5.8)의 완충용액으로 평형시킨 후 조효소를 주입하고 5 ml/15 min의 유속으로 용출시키어 rechromatography 하였다.

또한 gel filtration을 반복하여 얻어진 protease 분획을 투석, 농축하여 1/20 M sodium acetate(pH 5.8)의 완충용액으로 평형시켜 DEAE-cellulose column(2.0×50 cm)에 주입하여 5 ml/15 min의 속도에서 0.5~1.0 N의 소금농도로 용출시켰다.

단백질 정량

단백질 정량은 Lowry et al^[10]법에 의하여 측정하였다. 표준단백질로서는 bovine serum albumin을 사용하였다.

순도검정

Protease의 순도를 측정하기 위하여 Ornstein^[11], Davis^[12]의 방법에 따라 vertical slab SDS-Slab polyacrylamide gel로 electrophoresis를 하였다.

결과 및 고찰

균의 분리와 형태학적 특징

Katsuobushi에서 분리한 미생물균은 세균, 호모로 보

Table 1. Isolation of microorganisms from katsuobushi

Microorganisms	Katsuobushi	
	Inside	Outside
Mold	35	25
Bacteria + yeast	4	8
Actinomycetes	0	1

**Fig. 1. Morphology of isolated mold**

이는 것이 12균주, 방사선균으로 보이는 것이 1균주, 곰팡이로 보이는 것이 60여균주로 총 70여균주를 분리하였다(Table 1).

특히 분리된 균주 중 가다랭이 배지에서 생육이 양호한 곰팡이균주는 17균주였다.

이 균주 중에서 protease의 활성이 비교적 강하고 고미활성이 가장 작은 균주는 OK-63 균주였다. 현미경으로 관찰한 바 이 균주는 Fig. 1과 같이 비로드 모양의 콜로니, 녹황색의 폐자낭각의 혼재, 흑갈색의 분자낭병, 원주상의 분생자두, 암자색의 자낭각, 반구형의 정낭, 구형내지 단구형의 분생자, 자색의 자낭포자, 발달된 경자, 내생포자 형성 등으로 보아 *Asp. niger* group으로 간주하였다.

분리균주의 배양

균분리용 가다랭이 추출물배지(A 배지)에서 생육이 양호한 17균주들의 최적배양조건을 알아보기 위하여 배양기의 조건을 바꾸어 생육상태를 검토한 결과는 Table 2와 같다. A 배양기에서는 대부분 균주의 생육이 불량하였으나 B 배양기에서는 생육이 양호하여 B 배지로 배양한 균주에서 효소를 생산하였다. 이는 이 등⁽¹³⁾, 서⁽¹⁴⁾의 *Aspergillus*속의 중성 protease와 박과 박⁽¹⁵⁾, 이 등⁽¹⁶⁾, 손과 박⁽¹⁷⁾의 산성 protease 및 김과 서⁽¹⁸⁾, 정과 이⁽¹⁹⁾의 알카리성 proterase 생산에도 밀기울배지를 사용한 것은 본 실험과 같았다.

고미생성도 관찰

Protein 활성이 강한 8균주와 *Asp. oryzae*의 산성 pro-

Table 2. Growing condition of microorganism by a culture medium composition

Strains	Medium A (Katsuo extract & dextrin)	Medium B (medium A & wheat bran)
OK-2	++	++
OK-6	+	++
OK-14	+	++
OK-15	+	++
OK-16	-	++
OK-17	-	++
OK-21	-	++
OK-22	+	++
OK-23	-	++
OK-25	+	++
OK-26	+	++
OK-36	++	++
OK-43	--	++
OK-45	--	++
OK-51	-	++
OK-55	+	++
OK-63	+	++

+: Good ++: Very good -: Poor

Table 3. Bitterness of milk casein by sensory evaluation digested by several protease

Strains	Bitterness formed	
	3 hr incubation	16 hr incubation
<i>Asp. oryzae</i>	1.17	2.40
Trypsin	4.00	4.00
OK-6	2.00	2.75
OK-14	0.83	3.00
OK-15	2.00	3.13
OK-22	1.17	0.87
OK-25	1.67	2.13
OK-26	0.53	1.25
OK-55	1.67	1.63
OK-63	0.43	1.13

tease 표표효소인 trypsin를 동일한 unit로 맞추어 우유 카제인을 3시간과 16시간 반응시켜 분해시 생성되는 고미도 생성은 Table 3과 같다. 즉 분리된 8균주 모두가 trypsin보다 고미도가 낮았으며 OK-6, 15, 22, 25, 55는 *Asp. oryzae*와 비슷한 고미도를 나타냈으며 특히 OK-22는 16시간 반응시 고미도가 아주 낮았고 OK-63은 3시간 반응시 고미도가 가장 낮았다.

분리균주들의 효소활성

밀기울 가다랭이 추출물배지를 pH조절한 후 고체배양한 균주들의 protease의 생산력을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. 즉 17균주 중 OK-6, 14, 15, 22, 25, 26, 36, 55, 65 등 9균주가 활성을 나타냈으며 이중 OK-36은 강산성에서, OK-6은 약알카리성에서 그리고 나머지 8

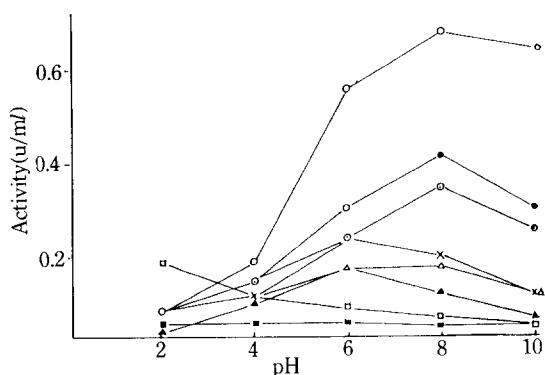


Fig. 2. pH activity curve of proteases obtained from screened molds

○—○; OK-6, ●—●; OK-22, ○—○; OK-63, ×—×; OK-55, △—△; OK-14, 15, ▲—▲; OK-25, 26, □—□; OK-36, ■—■; OK-2, 16, 17, 21, 23, 43, 45, 51

Table 4. Activities of Cphase, Apase and protease in crude enzymes

Activity	Protease Casein ^a u/ml	Apase Tyr-NH ₂ ^b u/ml	Cphase Z-Glu-Tyr ^c u/ml
OK-22	2.32	0.164	1.52
OK-63	3.55	0.228	1.94

^a; Assayed pH; ^b7.7, ^c6.0, ^d4.0

균주들은 중성에서 Protease를 생산하였다. 고미생성도가 가장 낮은 OK-22, 63균주에 대한 조효소 protease, Cphase, Apase 등의 합성 peptide Tyr-NH₂와 Z-Glu-Tyr의 분해활성을 측정한 결과는 Table 4와 같다.

이 결과로 보아 OK-63 균주가 생산하는 protease가 OK-22 균주가 생산하는 protease보다 casein 분해력, Tyr-NH₂ 분해력, Z-Glu-Tyr 분해력이 우수함을 알 수 있다.

조효소생산

Protease 효소력이 가장 우수한 OK-63 균주의 효소생산력을 상대활성으로 표시한 결과는 Fig. 3과 같다.

특히 배양 2~4일째에는 균사체의 발육으로 배지전체가 백색이었으나 5일째에는 거의 전면이 흑록색으로 되었고 6일째에는 전면이 완전히 흑녹색이 되었다. 그 이후에는 고화되기 시작하였다. 그리고 효소활성은 2일부터 6일까지는 증가하였으나 그 이후에는 급속히 감소하였다. 이러한 결과는 김과 서⁽¹⁸⁾의 5~6일 밀기울배양과 일치하였다. 그 외는 이 등⁽¹³⁾, 서⁽¹⁴⁾, 박과 박⁽¹⁵⁾, 손과 박⁽¹⁷⁾의 2~3일 밀기울배양과 정과 이⁽¹⁹⁾의 8일간 배양이 보고되었다.

황산암모늄 분획

상기밀기울 배양의 조효소액을 황산암모늄의 포화도에

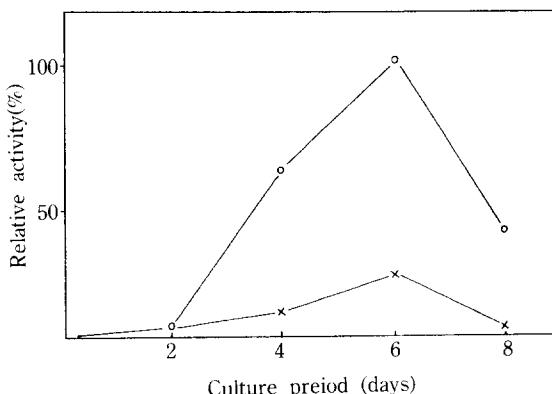


Fig. 3. Changes in enzyme activities during OK-63 culture

○—○; Protease activity, ×—×; Cphase activity

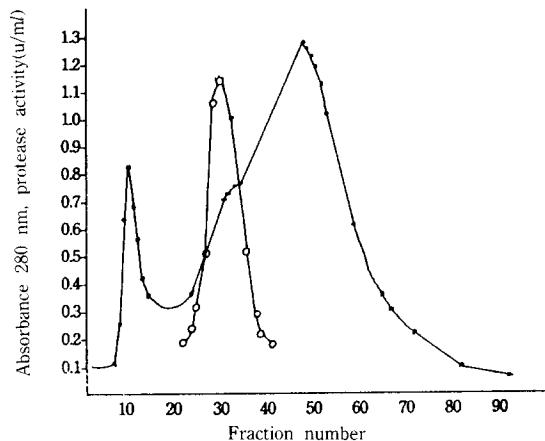


Fig. 4. Elution profile of protease by Sephadex G-100 column chromatography (2.0×50 cm)

Elution was achieved with 0.05 M sodium acetate buffer solution(pH 5.8) The flow rate was approximately 5 ml/15 min

●—●; Protein profile of OK-63, ○—○; Protease activity of OK-63

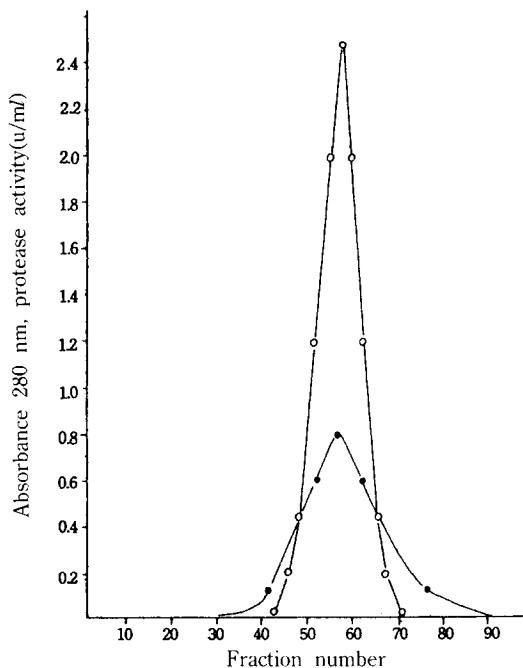
따른 protease의 활성을 관찰한 결과 상등액의 효소활성은 0.5 포화도까지는 활성이 높았으며 그 이상의 포화도에서는 급히 낮아지는 반면에 침전물은 반대로 효소활성이 높았다. 따라서 조효소는 0.4 포화도로 침전된 fraction을 버리고 다시 이 상등액을 0.8 포화도까지 포화시킨 후 침전물을 회수하였다.

이는 서⁽¹⁴⁾의 0.75 포화도, 김과 서⁽¹⁸⁾의 0.5~0.7 포화도, Bhumibhamon⁽²⁰⁾의 0.7 포화도, Roseman과 Levin⁽²¹⁾의 0.8 포화도의 황산암모늄 용액에서 침전시킨 것은 본 실험과 일치하였다. 그 외는 박과 박⁽¹⁵⁾의 0.6~0.95 포화도의 황산암모늄 분획이 있었다.

Gel filtration

Table 5. Purification procedures of protease obtained from OK-63 strain

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg protein)	Recovery of activity	Purification fold
Culture extract	180,000	4,300	0.0239	100	0
Ammonium sulfate fractionation	15,500	3,100	0.200	72.1	8.36
Sephadex G-100	2,500	2,200	0.088	51.2	36.8
DEAE-Cellulose	720	1,950	3.692	45.3	154.3

**Fig. 5. Elution profile of protease by Sephadex G-100 rechromatography column (2.0×50 cm)**

Elution was achieved with 0.05 M sodium acetate buffer solution(pH 5.8). The flow rate was approximately 6 ml/15 min

●—●; Protein profile of OK-63, ○—○; Protease activity of OK-63

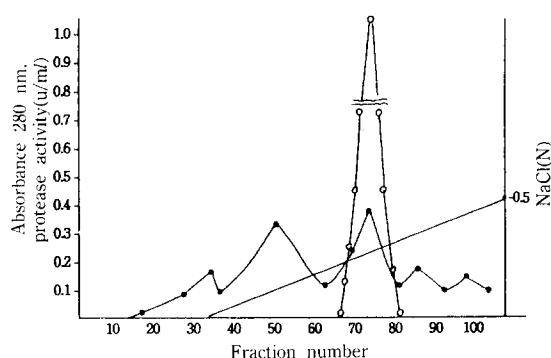
0.8 포화도 황산암모늄으로 분획하여 얻어진 조효소를 투석한 다음 Sephadex G-100의 column에 충전하여 fraction한 결과 Fig. 4와 같은 분획으로 분리되었다.

Protease의 활성을 보인 분획을 다시 gel refiltration 하여 그 결과 효소활성이 Fig. 5에서와 같이 단일 peak의 효소활성이 나타났다.

Ion-exchange chromatography

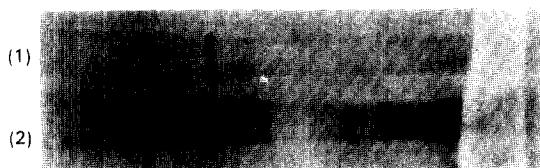
Gel refiltration한 효소의 정체도를 높이기 위하여 DEAE-cellulose column으로 chromatography한 결과는 Fig. 6과 같다. 단백질은 여러 fraction으로 분획되었지만 효소활성은 단일의 분획으로 분리되었다.

각 분획의 효소활성 정체도와 수율 등은 Table 5와

**Fig. 6. Elution profile of protease by DEAE-Cellulose column chromatography (2.0×50 cm)**

The flow rate was approximately 5 ml/15 min

●—●; Protein profile of OK-63, ○—○; enzyme activity of OK-63

**Fig. 7. Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of purified protease**

Lane (1); Purified enzyme, Lane (2); Crude enzyme

같이 정제 protase는 sephadex G-100배, 수율 51% 그리고 DEAE-cellulose chromatography에서 150배, 수율은 45%였다.

순도검정

정제된 protease의 순도를 검정하기 위하여 polyacrylamide gel slab 전기영동한 결과는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 단일의 band로 나타났다.

요약

Katsuobushi에서 곰팡이, 세균, 효모 등 총 70여 군주를 분리하였으며 이중 곰팡이는 가다랑이 추출물에

밀기울을 가한 배지에서 생육이 양호하였다. protease 활성이 높고 고미생성도가 적은 균주는 *Aspergillus niger*로 동정된 OK-63 strain이었으며 배양 6일만에 균체의 최대증식, protease의 최대 효소활성을 나타내었다. 효소정제는 150배 정제, 활성수율은 45%였으며 polyacrylamide gel 전기영동에 의해 단일 band로 확인되었다.

감사의 말

본 연구의 균분리를 위해 협조하여 주신 오사카시립대학의 南浦能至 教授와 飯塚勝 教授에게 깊은 사의를 표합니다.

문 헌

1. 정동효 : 효소학개론. 선진문화사, 148(1982)
2. 大本貴士 : 絲狀菌プロテア-セ-にする研究. 日本大阪市立大學 修士學位論文 (1986)
3. Raper, K.N. and Fennell, D.I.: *The genus Aspergillus*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore (1965)
4. 藤井暢三 : 生化學實驗法, 定量篇, 南山堂, 249(1961)
5. 石井信一 : 實驗化學講座 23, 生物化學1 日本化學會編, 126(1966)
6. Kunitz, M.: Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physical.*, 36, 306(1946)
7. Dixon, M.A.: A monogram for ammonium sulfate solution. *J. Biochem.*, 54, 45(1953)
8. Work, T.S. and Work, E.: Laboratory thechniques in biochemistry and molecular biology. *J. Biochem.*, Holland, 1, 1(1980)
9. Work, T.S. and Work, E.: Laboratory thechniques in biochemistry and molecular biology. *J. Biochem.*, Holland, 1, 1(1980)

- land, 2, 228(1980)
10. Lowry, C.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)
11. Ornstein, L.: Disc electrophoreses-I. In background and therory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 321(1964)
12. Davis, B.J.: Disc electrophoresis-II. In method and application to Human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404(1964)
13. 이성범, 최경환, 임동순, 김덕치 : 막걸리제조를 위한 효소제의 개발연구. 탄수화물 및 단백질분해력에 대하여. 한국미생물학회지, 7, 159(1969)
14. 서향원 : 컬럼 크로마토그래피에 의한 *Aspergillus* 계통의 α -Amylase 및 Protease의 결정화. 한국미생물학회지, 9, 163(1971)
15. 박경민, 박관화 : *Aspergillus niger*가 생산하는 Endopolysgalacturonase의 분리와 특성. 한국식품과학회지, 16, 41(1984)
16. 이용규, 전순배, 최원기, 정기철, 배석, 김과천 : *Aspergillus niger* CADI의 효소생산 조건 및 효소학적 성질. 한국식량영양학회지, 15(4), 32(1986)
17. 손천배, 박윤중 : 내산성 효소생산균의 분리와 효소생산 조건에 관한 연구. 한국식품과학회지, 13, 241(1981)
18. 김상달, 서정훈 : *Monascus*속 균주가 생산하는 Alkaline Protease에 관한 연구. 한국농화학회지, 15, 27(1972)
19. 정동효, 이계호 : 고온성 사상균의 알카리성 Protease에 관한 연구. 한국농화학회지, 13, 223(1970)
20. Bhumibhamon, O.: Concentration of the protease-xylanase-Cellulase complex of *Aspergillus awamori*. *J. Agri. Sci., Thai.*, 13, 285(1980)
21. Roseman, J.E. and Levin, R.L.: Purification of a protease. *J. Biol. Chem.*, 262, 2101(1987)

(1991년 1월 17일 접수)