

재래식 메주로부터 분리한 *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103 이 생산하는 Fungal Protease 특성

임성일 · 유진영*

한국식품개발연구원 생물공학연구부

Characteristics of Fungal Protease Produced by *Mucor racemosus f. racemosus* from Korean Traditional Meju. Lim, Seong-Il and Jin-Young Yoo*. Division of Chemistry and Biotechnology, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Songnam, Kyonggido 463-420, Korea - Protease production and its characteristics were investigated with *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103 which was isolated from Korean traditional meju. Optimum culture conditions of the strain for the production of the protease in basic medium [bean(Baektae):H₂O=1:1(w/v)] were as follows: pH 6, 30°C and 72 hrs. Optimum pH and temperature for the enzyme activity of the protease produced by *Mucor racemosus f. racemosus* were pH 5 and 50°C, respectively. The enzyme was relatively stable at pH 2.0~5.0 and at temperature below 40°C. Phenylmethane-sulfonyl fluoride and Ag⁺ inhibited the enzyme activity. This indicates that the enzyme is serine protease. K_m value was 0.9 × 10⁻⁴ M and V_{max} value was 5.93 µg/min. This enzyme hydrolyzed casein more rapidly than bovine albumin.

Key words : *Mucor racemosus f. racemosus*, protease, meju

사회구조의 급진적 변화로 현재 가정에서 제조되던 장류가 산업화되어 장류업체에서 제조되어 시판되고 있기는 하지만 전통장류와의 거리감은 점차 넓게 벌어지고 있다. 장류가 가진 영양적인 가치뿐만 아니라 최근 장류가 지닌 기능적인 면[1]이 밝혀짐으로서 전통 장류에 대한 인식도가 점차 높아지고 있고 또한 제조방법의 재현에 대한 관심 역시 높아지고 있다. 이에 장류 업체들은 전통 장류의 생산공정을 재현하여 산업화하고자 하는 노력을 하고 있다. 그러나 대부분의 산업체들은 아직도 전통적인 방법을 사용하지 않고 있으며 가정에서도 제조방법이 전수되지 않아 전통적인 장류 제조방법이 소멸되고 있는 실정이다. 특히 전통 메주의 제조과정 중에는 자연 유래의 수 십종의 곰팡이와 세균들이 복합적으로 작용하므로 제품의 표준화가 어렵고, 제조기간도 약 2개월이 소요되는 등, 현대 사회에서 메주를 직접 만들어 장류를 제조하는 것이 매우 어려운 현실이다. 전통 장류의 산업화를 위해서는 전통 메주를 얼마나 현대화된 시설로 제조하느냐에 따라서 성패를 좌우 될 것이다.

현재, 대량생산 체제를 구축한 생산업체에서는 콩알메주를 이용한 일본식 장류의 제조공정을 적용하고 있다. 콩알메주의 제조에는 *Aspergillus oryzae*나 *Aspergillus sojae*를 사용하는 것이 일반적이며, 경우에 따라 *Bacillus sp.*를 이용하기도 한다. 따라서 콩알메주에 관한 연구도 *Asp. sp.*

[6, 10, 11, 13]와 *Bacillus sp.*[2, 5, 8, 15]를 이용한 발효과정 중 생화학적 변화와 이를 이용한 제품의 평가 등에 집중되었다. 그러나 이렇게 산업화된 생산 시스템에서 제조된 장류의 맛이나 영양학적인 성분 등은 전통 장류와는 상당한 차이가 있는 것으로 평가되고 있다. 여기에는 원료, 발효기간 등의 요소가 전통 장류 제조공정과 다른 이유도 있으나 메주의 발효과정에 관여하는 균주의 차이가 가장 큰 원인인 것으로 보여진다.

전통 메주는 원래 자연환경에 의존하여 만들어지므로 그 품질이 균일하지 않아 장류의 대량 생산을 위하여 적합하지 않다. 따라서 체계적인 제조공정이 확립되어 이를 이용한 메주의 생산이 이루어져야 할 것이다. 이 공정의 설정을 위해서는 우선 적합한 종균이 개발되어야 하며 원료의 선정 후 공급이 원활하게 되고 발효공정이 개발되어야 하는 것이 중요한 과제이다. 이러한 취지에서 본 연구팀은 이미 재래식 메주로부터 단백질 분해 활성이 있는 균주들을 선별한 바 있다[17]. 본 연구에서는 재래식 메주로부터 단백질 분해 활성이 강한 *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103의 단백질분해 효소의 생산과 그 효소적 특성을 조사하여 장류산업에 있어 기초자료로서 이용하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

재래식 메주 유래의 균주로 유 등[17]이 분리한 *M.*

*Corresponding author

Tel. 82-342-780-9106, Fax. 82-342-780-9265

E-mail: microbug@kfri.re.kr

racemosus f. racemosus PDA 103을 실험에 사용하였으며 콩(백태)은 수한농업협동조합(충북 보은군)의 제품을, Hammarstein milk casein(HMC)은 Merck사(독일) 제품을, phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF), *p*-chloromercuribenzoic acid(PCMB), ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 2,4-dinitrophenol(2,4-DNP), bovine serum albumin(BSA)은 Sigma사(독일) 제품을, 그 밖의 시약은 1급시약을 사용하였다.

효소생산조건

기본배지는 콩 배지를 사용하였다. 콩 10 g과 증류수 10 mL를 혼합하여 15 lbs에서 1시간 가압살균한 후 공기균을 1백금이씩 접종하여 30°C에서 배양하였다. 단 배양시간별 실험 이외에는 배양시간을 3일간으로 하였다.

조효소의 조제

배양된 콩 배지에 3배(w/v)의 증류수를 가하여 균질화시킨 후, 4°C에서 6시간 교반하여 효소를 추출하고 콩을 cheese cloth로 분리한 다음 16,000 × g에서 30분간 원심분리한 상등액을 조효소액으로 하였다.

단백질 가수분해 활성

효소 활성측정은 Hagihara의 방법[14]에 준하여 측정하였다. 즉, 효소액 0.5 mL에 0.1 M sodium citrate buffer (pH 5.0) 1 mL 가한 다음, 기질용액(0.6% HMC, pH 5.0)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.44 M trichloroacetic acid 2.5 mL를 넣어 반응을 중지시키고 실온에서 10분간 방치한 다음 원심분리시켜 상등액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 용액 10 mL와 1 mL의 1 N Folin-ciocalteu 용액을 넣어 37°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 단위는 37°C에서 1분 동안에 1 µg의 tyrosine을 유리시키는 것을 1 unit로 하였다.

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 2.0-12.0 까지의 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 mM이 되게 pH 6.0의 증류수에 녹이고 금속이온 용액 0.5 mL와 효소액

0.5 mL를 섞어 30°C에서 60분간 정치한 다음 잔존 효소활성을 측정하였으며 저해제의 영향은 0.5 mL의 각종 저해제(2 mM)와 0.5 mL의 효소액을 30°C에서 30분간 반응시킨 다음 잔존활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소생산을 위한 최적조건

M. racemosus f. racemosus PDA 103의 protease 생산을 위한 최적 배양온도 및 pH, 배양시간을 조사한 결과 Fig. 1에서와 같이 30°C와 pH 6.0에서 배양시 최대의 생산을 보였고 배양시간별 효소활성은 3일간 배양시 최대를 나타내었으며 4일 이후 급격히 감소하였다. 배양시간별 활성은 *Asp. fumigatus*[1]와 *Asp. oryzae* KC-15[12]의 alkaline protease가 72시간 배양시 최대활성을 나타낸 결과와 유사하였다.

효소의 특성

본 효소의 pH에 대한 영향은 Fig. 2에서와 같이 최적 pH가 5.0~6.0으로서 산성 protease인 것으로 나타났다. 이와 정[12]은 *Asp. oryzae*로부터 3종의 protease가 검출되었으며 최적 pH는 각각 3.4, 7.2, 9.0이었다고 보고한 바 있는데 본 효소와는 상이한 결과로서 *M. racemosus*가 생산하는 protease는 *Asp. sp.*과는 다른 protease를 생산하는 것으로 사료된다. pH 안정성은 Fig. 2과 같이 pH 2.0~5.0의 범위인 산성영역에서 효소가 안정한 것으로 나타났다. 이 결과는 *Asp. saitoi*의 protease의 경우, protease II는 pH 4.5~10.5에서, protease III는 pH 3.0~6.3의 범위에서 안정한 것으로 나타나 산성 protease의 pH 안정범위와 유사하였다.

효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과 Fig. 3과 같이 50°C에서 최대활성을 보였으나 60°C 이상에서 급격히 효소활성이 감소하였다. *Asp. awamori* U-3[14]의 산성

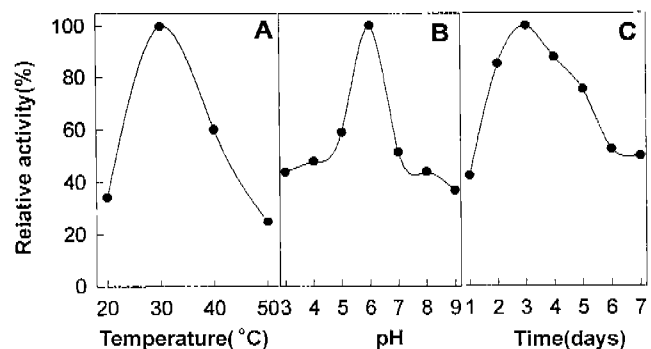


Fig. 1. Effect of incubation temperature (A), initial pH (B) and incubation time (C) on the production of protease from *Mucor racemosus f. racemosus*.

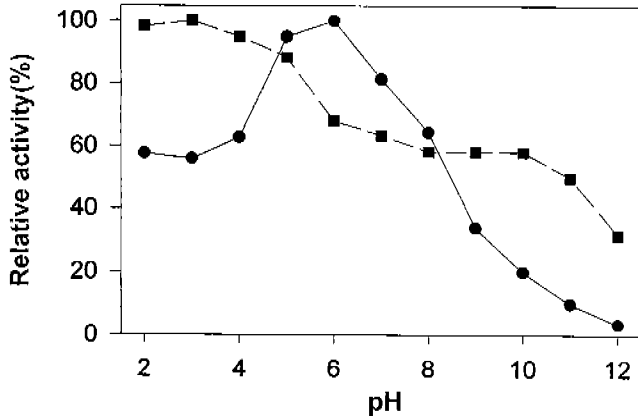


Fig. 2. Effect of pH and pH stability on activity of protease from *Mucor racemosus f. racemosus*. ●—●: effect of pH, ■—■: pH stability.

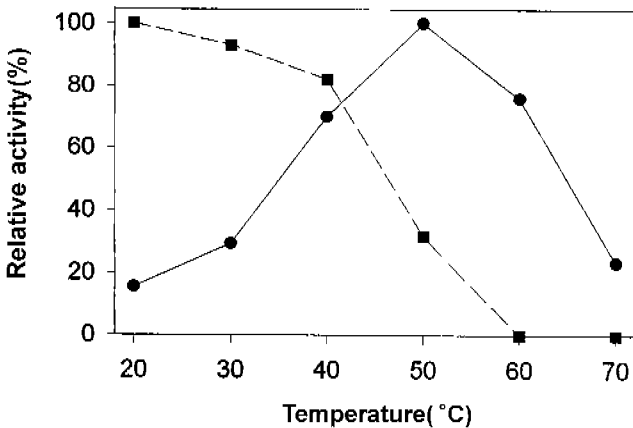


Fig. 3. Effect of temperature and temperature stability on protease from *Mucor racemosus f. racemosus*. ●—●: effect of temperature, ■—■: temperature stability

protease는 45°C, *Rhizopus chinensis*[3]의 산성 protease는 60°C로 대부분의 사상균 protease의 최적온도가 45~ 55°C 인 것과 유사한 결과를 얻었다. 한편, 열에 대한 안정성을 조사한 결과, Fig. 3과 같이 40°C 이상에서 급격히 실활되어 열에 대하여 매우 불안정한 것으로 나타났다. *Asp. oryzae*의 산성 protease와 알칼리성 protease의 경우 60°C 에서 10분간 처리로 완전히 실활[12]되며 *Asp. awa-mori* U-3의 protease는 60°C에서 10분간 처리로 약 55%가 실활[14]되는 것과 비교해 볼 때, 본 균주가 생산하는 효소는 내열성이 더욱 약한 것으로 나타났다.

금속이온에 대한 영향

본 효소에 미치는 금속이온의 영향을 조사한 결과, Table 1과 같이 Ag⁺에서 잔존 효소활성이 40%로 현저히 실활되었으며 Fe²⁺, Mn²⁺에서는 효소활성이 각각 113%, 106%로 검출되어 약간 증가하였으나 Ca²⁺을 포함한 그 밖의 금속이

Table 1. Effects of metal ions on the protease activity

Ion	Ion source	Relative activity(%)
	None	100
Ag ⁺	AgNO ₃	40
Ba ²⁺	BaCl ₂ · 2H ₂ O	92
Ca ²⁺	CaCl ₂	87
Cu ²⁺	CuSO ₄ · 5H ₂ O	76
Fe ²⁺	FeCl ₃ · 6H ₂ O	113
K ⁺	K ₂ CO ₃	95
Mg ²⁺	MgSO ₄ · 7H ₂ O	98
Mn ²⁺	MnSO ₄	106
Pb ²⁺	Pb(CH ₃ COO) ₂	82
Zn ²⁺	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	81

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

온에 대해서 다소 저해되는 것으로 나타났다. Tohm 등[16]과 Kazuo 등[7]이 보고한 알칼리성 protease가 Ca²⁺에 의해서 활성이 증대 또는 보호된다는 보고와는 반대의 결과를 얻었다.

저해제의 영향

효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제 중, serine protease 저해제인 PMSF, thiol protease 저해제인 PCMB, metal protease 저해제인 EDTA, 말단 아미노산 잔기가 활성부위인 효소활성 저해인 2,4-DNP를 선정하여 *M. racemosus f. racemosus*의 protease 활성에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 Table 2와 같이 *M. racemosus f. racemosus* 유래의 protease는 특이적으로 PMSF에 의해 98.5% 실활되는 것으로 나타나 본 효소는 serine protease 인 것으로 추정되었다.

효소반응속도론

기질농도와 효소활성과의 관계를 검토하기 위하여 HMC 를 0.25 × 10⁻⁴~4.0 × 10⁻⁴ M로 기질농도를 달리하였을 때

Table 2. Effects of various inhibitors on protease

Reagent	Relative activity(%)
Control	100
Phenylmethanesulfonyl fluoride	1.5
p-Chloromercuribenzoic acid	10
Ethylenediaminetetraacetic acid	56
2,4-dinitrophenol	99

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

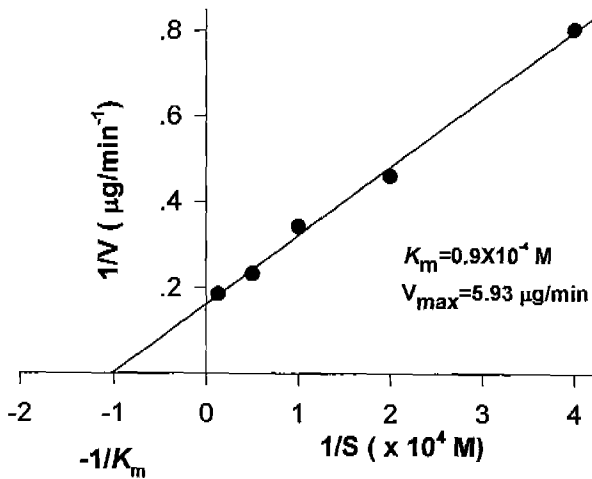


Fig. 4. Lineweaver-burk plot for hydrolysis of Hammastein milk casein by *Mucor racemosus f. racemosus* protease.

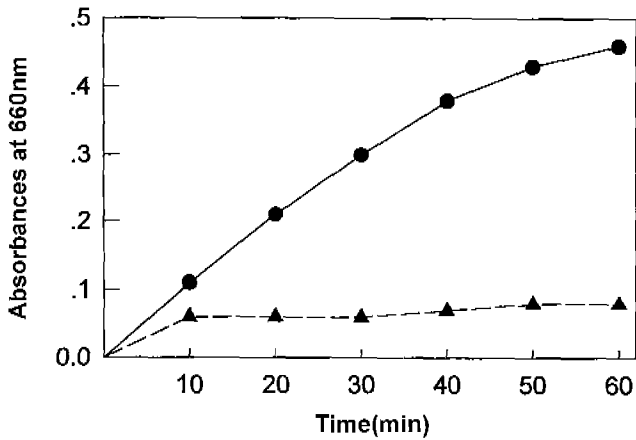


Fig. 5. Effect of decomposition on Hammastein milk casein or bovine serum albumin by *Mucor racemosus f. racemosus* protease.
●—●: 0.6% H. casein, ▲—▲: 0.6% bovine serum albumin.

효소활성의 변화를 측정후 Lineweaver-Burk plotting한 결과 Fig. 4와 같이 Km값이 0.90×10^{-4} M, V_{max} 값은 $5.93 \mu\text{g}/\text{min}$ 이었다. 차와 최[1]가 보고한 *Asp. fumigatus*가 생산하는 protease의 경우, Km값이 8.33×10^{-4} M, V_{max} 값이 $47.62 \mu\text{g}/\text{min}$ 인 결과와 비교해 볼 때 기질결합력이 9.3배 강한 반면 반응속도가 1/8인 것으로 나타나, 본 protease의 촉매활성은 *Asp. fumigatus* protease의 촉매활성과 유사한 것으로 나타났다.

기질에 대한 특이성

본 효소의 기질에 대한 특이성을 알아보기 위하여 각 0.6%의 HMC와 BSA를 제조하여 시간별 효소활성을 측정 한 결과 Fig. 5에서와 같이 BSA 보다 HMC를 기질로써 더 잘 가수분해하였다. 이는 차와 최[1]가 *Asp. fumigatus*

의 alkaline protease가 hemoglobin 보다 casein에 기질특이성을 가진다고 보고한 것과 유사하였다.

요 약

한국 재래식메주로부터 분리·동정한 *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103이 생산하는 protease의 생산조건과 특성을 조사하였다. 기본배지[콩(백태):H₂O=1:(w/v)]에서의 최적생산조건은 pH 6, 30°C, 72 시간 배양이었으며 효소작용을 위한 최적 pH와 온도는 각각 5.0, 50°C였고 pH 2.0~5.0의 범위와 40°C이하에서 안정하였다. 금속이온중 Fe²⁺에 의하여 활성이 증대되었으나 Ag⁺에 의하여 효소활성이 저해되었다. 한편 본 효소는 phenylmethanesulfonyl fluoride에 의해 효소활성이 98.5% 실패되어 활성 serine을 가진 serine protease임이 시사되었다. Km값은 0.9×10^{-4} M, V_{max} 값은 $5.93 \mu\text{g}/\text{min}$ 이었으며 bovine serum albumin 보다 casein을 더 잘 가수분해하는 것으로 나타났다.

REFERENCES

1. Cha, W.S. and C. Choi. 1989. Characteristics and action pattern of protease from *Aspergillus fumigatus*. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **18**: 348-355.
2. Chang, Y.C., K.H Lee, S. Y. Kim, Y.L. Jo, and J. K. Kim. 1992. Proteainase produced by *Bacillus licheniformis* SSA3-2M1. *Kor. J. Microbiol.* **30**: 239-245.
3. Fukumoto, J., O. Tsuru, and T. Yamamoto. 1967. *Agric. Biol. Chem.* **31**: 710.
4. Hagihara, B. 1956. *Methods in Enzymology*, vol II. Asashousyoten, Tokyo.
5. Ju, H. K., S.K. Ro, and M. H. Im. 1972. Studies on the fermentation of soy sauce by bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.* **4**: 276-284.
6. Kang, H. J., E. S. Park, and S. Yoon. 1984. Interaction of phytic acid with minerals during *meju* preparation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **16**: 403-407.
7. Kazuo, S., S. Kyo, and M. Kinichi. 1985. Purification and some properties of serine protease from a mutant of *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.* **63**: 479.
8. Kim, D. H., D. W. Lim, S. Bai, and S. B. Chun. 1997. Fermentation characteristics of whole soybean *meju* model system inoculated with 4 *Bacillus* strains. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**: 1006-1015.
9. Kim, S. H., N. S. Choi, W. Y. Lee, J. W. Lee, and D. H. Kim. 1998. Isolation of *Bacillus* strains fibrinolytic enzymes from *doen-jang*. *Korean J. Microbiol.* **34**: 87-90.
10. Kim, S. S. 1978. Effect of *meju* shapes and strains on the quality of soy sauce. *Korean J. Food Sci. Technol.* **10**: 63-72.
11. Lee, C. J. and H. S. Koh. 1976. Standardization of Korean soy sauce. *Korean J. Food Sci. Technol.* **8**: 247-252.

12. Lee, M. J. and M. J. Chung. 1980. Studies on the production of protease by *Aspergillus oryzae* KC-15 and characteristics of the enzyme. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **8**: 7-85.
13. Park, C. K., J. H. Nam, H. I. Song, and H. Y. Park. 1989. Studies on the shelf-life of the grain shape improved *meju*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **21**: 876-883.
14. Park, N. K. 1978. *Thesis Collection of Graduate school Chun-Buk University* **4**: 101.
15. Suh, J. S., S. G. Lee, and M. K. Ryu. 1982. Effect of *Bacillus* strains on the *Chungkook-jang* processing. *Korean J. Food Sci. Technol.* **14**: 309-314.
16. Tohrn, K., O. Akira, I. Susumi, and S. Masahiro. 1985. Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 693.
17. Yoo, J. Y. 1998. Study on the commercial scale production of *meju* for Korean fermented soybean products. *Research report of MOST*.

(Received October 5, 1999)