

細菌性 PROTEASE 의 精製에 關한 研究

徐正埴 禹斗理

慶北大學校 農科大學

(1969年 2月 28日 受理)

Studies on the Purification of Bacterial Protease.

J. H. Seu, D.L. Woo

Dept. of Applied Microbiology, Agr. College,

Kyung-Pook National University, Taegu.

Summary

The purification methods of bacterial protease have been published by many workers, especially by the using of ion exchange resins. But in the practical application to obtain a comparatively purified enzyme, the known methods do not give always a satisfiable results. Here we developed an industrially applicable method for purification of bacterial protease with the using of tannin. By the adaptation of the optimal conditions of this method on the purification, a 150000 unit/g.(Fuld Gross unit) of protease sample could obtained.

I. 緒 論

Protease에 關한 研究는 그 利用面이 漸次 開拓됨에 따라 活潑히 이루어지고 있으며 특히 그 起源이 微生物性 Protease 일 境遇는 그 性質의 多樣性和 酵素生成의 容易한 點 등으로 因하여 漸次 많은 注目を 끌게 되었다.

이 Protease의 用途를 大別해보면 比較的 純粹하게 精製된 狀態가 要求되는 醫學的 用途, 粗精製 狀態로 使用된 食品加工에의 利用 및 粗 酵素 即 培養狀態 그대로 利用되는 化工業的 利用 등으로 分類된다.

이와같은 用途에 따라 Protease의 精製가 아주 重要視되고 있으며 특히 Ion Exchange Resin을 利用한 高純度の 酵素를 얻는데 對한 研究는 相當히 많이 이루어져 있다¹⁻¹⁰⁾ 그러나 食品工業的 利用 등을 對象으로 하는 經濟的이며 또 作業이 簡便한 粗精製 狀態의 酵素를 얻는 精製方法에 對해서는 아직 滿足할만한 方法이 確立되지 않았으므로 本人 등은 이 點을 考慮하여 細菌性 Protease의 粗精製

에 關한 若干의 結果를 報告하는 바이다.

II. 實驗 材料及方法

本 研究의 概要는 細菌性 Protease의 浸出液에 Tannin性 物質을 添加하여 酵素 蛋白質을 凝固 沈澱시킨後 이 沈澱酵素를 母液으로 부터 分離 回收하여 有機 溶媒로서 Tannin質을 除去한 後 酵素 蛋白質을 回收하는 方法으로서

1. Protease生成 菌株는 當 研究室에 所藏되어있는 Protease生成能이 강한 *Bacillus subtilis*系統의 菌株이며 이 菌株를 常法에 依하여 Bra培地에 培養하여 浸出한 後 遠心分離하여 그 上澄液을 所要 力價가 되도록 稀釋하여 使用하였다.
2. Protease의 力價 測定方法은 Fuld Gross Method¹¹⁻¹²⁾를 使用하였으며 沈澱試藥은 T.C.A-Acetic Acid¹²⁾를 使用하였다. 여기서 使用한 Fuld Gross法은 Protease의 測定法으로서는 아주 Rough한 方法이나 本實驗의 性質上 Phenol radical가 發色되는 Folin試藥을 必要로하는 方法은 適用이 不可能하므로 不得已 上法을 使用하게 되었으며 이 方法의 實際 操作은 所要 Unit (Fuld Gross Unit)의 酵素液 10ml에 Tannin溶液(所要 濃度の) 1ml를 加하여 5°C에서 10分乃至 1時間 放置하여 沈澱을 完成시킨後 遠心分離하여 上澄液을 除去한後 여기에 Acetone을 加하여 Tannin을 分離 除去後 殘存 沈澱을 數回 Acetone으로 洗滌 乾燥後 여기에 10ml의 Buffer를 加하여 酵素를 溶解시킨後 이 液을 酵素液으로서 使用하였다.

III. 實驗 結果

1. pH와 回收率과의 關係

酵素 蛋白과 Tannin과의 結合한 Enzyme-Tannin

Complex의 形成後의 凝固性 및 酵素의 變性等에 關係되는 pH를 調査하였으며 이때 使用한 酵素 溶液은 666 unit/ml이며 Tannin의 量은 5 mg of Tannin/ml of Enzyme Solution 이었고 使用한 Buffer는 McIlvaine's Buffer 이었다. Enzyme-Tannin의 Complex 形成은 5°C에서 30分으로 하였으며 그 結果는 다음 Fig. 1.과 같다.

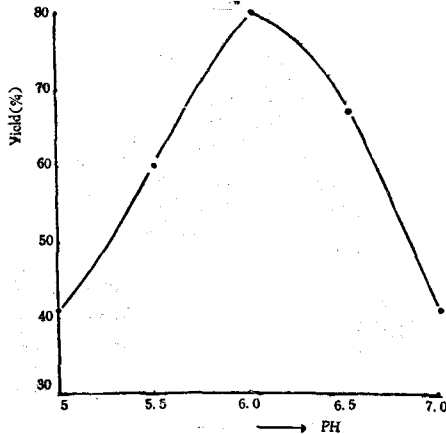


Fig. 1. The Effect of pH on the Enzyme Regained by the Tannin.

即 Bacterial Protease 와 Tannin 의 Complex 形成에 있어서 pH 6.0 附近이 가장 效果的이라는 結果를 얻었다.

2. 溫度의 影響에 對해서

酵素와 Tannin 과의 Complex 形成에 溫度가 미치는 影響을 調査한 結果는 다음과 같으며 實驗 條件은 666 unit/ml, pH 6.0의 酵素 溶液을 所定の 溫度로 調節한 後 前과 同一한 量의 Tannin 을 添加한 後 30分間 Complex 를 完成시켰다. 이 結果는 5°C, 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 의 溫度 差를 두어 調査하였으나 이 溫度의 範圍內에서는 全然 差가 나타나지 않았으며 各各 溫度에서 다 같이 75%의 回收率을 나타내었다.

即 이 結果는 Enzyme-Tannin Complex 의 形成率, 溶解度及 酵素 蛋白의 變性 等에 40°C까지의 溫度가 큰 影響을 주지 않음을 나타내고 있는 것으로 믿어진다.

3. 酵素 回收에 미치는 Tannin의 量에 對해서

一定한 力價를 지니는 酵素 溶液에 添加되는 Tannin 量의 差가 미치는 影響에 對해서 調査하였으며 그 條件은 666 unit/ml의 酵素 溶液에 各各

相異なる 濃度의 Tannin 이 混存되도록 하였고 이때의 pH는 6.0, 溫度는 20°C Complex 形成時間은 30分間이었으며 그 結果는 다음 Fig. 2.와 같다.

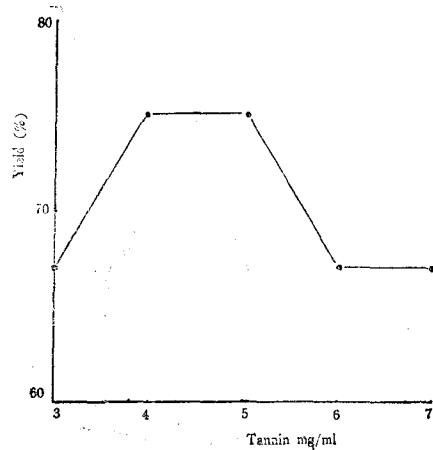


Fig. 2. The Effect of the Concentration of Tannin on Enzyme-Tannin complex Formation.

即 666 unit/ml의 Bacterial Protease 에 Tannin 4~5 mg 을 加함이 가장 回收率이 增加 하였음을 나타내었다.

4. 酵素 濃度가 回收率에 미치는 影響에 對해서

本 實驗에서는 酵素의 濃度差가 Tannin 과 Complex 形成에 影響을 미치는 가의 與否를 調査한 것이며 그 條件은 Enzyme Unit 1333 unit/ml에서 부터 333 unit/ml까지의 各各의 濃度에 對해서 666 unit/ml의 酵素에 加한 5 mg 相當의 Tannin 을 加하여 Complex 를 形成한 狀態이며 여기서 얻어진 結果는 酵素濃도에 關係없이 回收率 75% 를 얻게 되었다.

이것은 酵素 蛋白과 Tannin 과의 Complex 의 Solubility 가 아주 적다는 結果를 나타내는 것으로 생각되며 實地로 아주 稀薄한 酵素 溶液에서 酵素를 回收할때 대단히 效果的일 것으로 생각된다.

5. Enzyme-Tannin Complex 의 形成에 미치는 時間의 影響

酵素 蛋白質과 Tannin 이 作用해서 Complex 를 形成할때 所要되는 時間의 影響을 調査한 것이며 條件은 666 unit/ml의 酵素 溶液에 5 mg 의 Tannin 을 加하여 最高 2時間까지 放置하여 얻어진 回收率은 다음 Fig. 4.와 같으며 이때의 溫度는 20°C 였다.

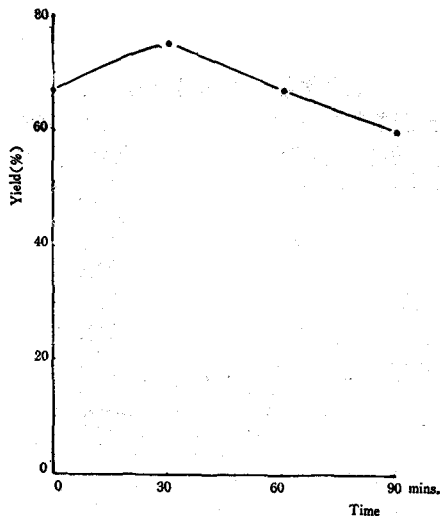
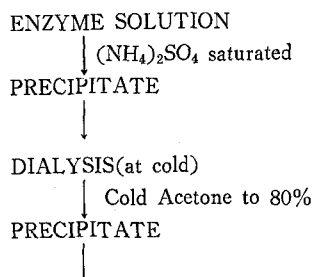


Fig. 3. The Effect of Time on Enzyme-Tannin Complex Formation.

即 Fig 3에서 보는 바와 같이 Bacterial Protease와 Tannin은 약 30분에 완전히 Complex를 형성하게 되며 이 정도의 시간範圍에서는 酵素가 비교의 完全狀態로 存在하나 그 後 時間이 經過함에 따라 急激히 酵素 蛋白質의 變性を 招來하게 되며 이것은 酵素 蛋白質의 二次乃至三次 構造를 結定하는 Hydrogen Bond의 攪亂에 起因된 結果라고 믿어진다.

6. Enzyme-Tannin Complex의 形成에 미치는 無機鹽의 影響

一般的으로 細菌性 Protease의 精製를 論하는데는 副生하는 他 Enzyme 특히 Glucosidase類의 回收를 考慮해야하며 이 Glucosidase類의 實用的 回收方法中 가장 代表的인 方法이 無機鹽의 存在下에서의 吸着法을 들수 있으며 이 境遇 Glucosidase類를 回收한 母液中에는 多量의 無機鹽類가 Protease와 共存하므로 여기서 Protease를 回收하는데 있어서는 無機鹽類의 影響을 크게 받게된다. 故로 이 點을 考慮하여 Bacterial Protease를 다음과 같이 粗精製하여 Salt Free Enzyme를 얻어 이것을 使用하여 無機鹽의 影響을 調査하였다.



DRYING(in vacuum)
↓
SAMPLE ENZYME

Fig. 4. Preparation of Salt Free Enzyme of Bacterial Protease

위에서 얻은 粗 酵素는 114200 unit/g (Fuld Gross Method)의 Activity를 나타내었으며 이 酵素 Sample을 適當히 稀釋하여 使用하였다. 即, 이 Sample을 蒸溜水에 1000 unit/ml가 되도록 溶解하여 여기에 NaCl, CaCl₂, MgSO₄·7H₂O, MgCl₂·xH₂O 등의 各種 無機 鹽類는 最高 10%까지 또 Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄의 兩種의 鹽은 最高 25%가 되도록 混存시켜 여기에 所要量의 Tannin을 加하여 Complex를 形成시킨 後 그 Complex로부터 回收 酵素를 遊離시켜 그 回收되는 酵素의 力價를 測定하였다.

이 結果 NaCl과 CaCl₂를 除外한 他 鹽類는 各各의 使用한 最高 濃度에서도 酵素의 回收率에 別影響을 주지 않았으며 CaCl₂는 10% 濃度에서 約 70% NaCl은 10% 濃度에서 約 60%의 回收率의 減少를 나타내었다.

이 CaCl₂와 NaCl의 回收率 減少性의 理由는 確認하지 못하였으나 Enzyme-Tannin Complex의 形成의 阻害 또는 Complex狀의 酵素 Protein의 變性 促進 등에 起因된 것이리라 믿어진다.

IV. 考 察

以上에서 얻어진 結果를 보면 여러가지 條件의 實驗에서 最高 回收率이 約 75%를 超過하지 못하고 있다. 本 實驗에서 나타난 75%라는 數字는 75%以上 相當한 幅의 增加를 實際로 가지고 있었으리라 믿어지며 그 理由는 實驗에 適用한 力價 測定方法에 起因한 것이기 때문이다. 그러나 이 點을 考慮하지 않은 立場에서 나타난 75%의 回收率도 그 操作의 簡便함을 생각할때 結局 낮은 것이 아니고 아주 좋은 成績이라고 보여진다.

그러나 이 方法의 缺點으로는 沈澱劑인 Tannin이 酵素外의 蛋白質과도 非 選擇的으로 結合하므로 酵素 母液中の 粘質性인 微生物性 蛋白質의 分離가 不可能한 點이며 이것은 鹽析法에서도 當面되는 問題이나 이는 다시 二次的인 分離 操作으로 酵素 蛋白質만을 얻을 수 있는 것이다. 또 다른 한 가지의 問題點은 酵素 蛋白質과 Tannin의 Complex에서 Tannin을 除去할때 Tannin質이 完全히 除去되지 않고 Tannin의 分解物인 Gallic Acid等 phenol性 物質이 酵素와 強하게 結合되어있어 이의

除去가 크게 困難한 點이며 아직 本 實驗에서 確
認하지는 못하였으나 이 phenol 性 物質과 結合한
酵素는 溶解性이 적고 또 酵素의 官能基의 어느 部
분이 封鎖된 關係로 活性이 多少 低下된 것으로 생
각되므로 이는 더 究明해볼 問題라고 생각되며 또
이 方法으로 酵素母液의 條件만 잘 擇하면 最高
150000 unit/g의 酵素 Sample을 얻을 수 있었으며
이것은 酵素 母液이 約 50 倍로 濃縮된 狀態이었
다.

要 約

本 實驗은 *Bacillus subtilis* 系의 菌株가 生成하는
Protease를 Tannin을 使用하여 Complex를 形成시
켜 이 非溶性 Complex를 回收하여 Tannin을 分
離함으로써 酵素를 有機 溶媒中에서 回收하는 方
法을 確認한 것이며 Protease-Tannin Complex 形成
에 미치는 pH, 溫度, 時間 等의 影響을 調查 하였
다.

그 結果는 Complex 形成에 있어서

1. 最適 pH는 6.0 이었으며
2. 溫度의 範圍는 40°C 까지 別 影響이 없었으며
3. Complex 形成 時間은 30 分間이 가장 適當하였

으며

4. 酵素 濃度는 影響을 미치지 않았으며
5. 無機 鹽類中 CaCl₂ 와 NaCl의 存在는 Complex
形成에 影響을 미쳐 結果적으로 酵素의 回收率
을 低下시킨다는 結果를 얻었다.

參考 文獻

- 1) 森原和之; 日農化 41, 1, (1967)
- 2) 松島欽一外; 日農化 39, 4, 164(1965)
- 3) 今原廣次外; 日農化 36, 4, 327(1962)
- 4) 松島欽一外; 日農化 36, 3, 193(1962)
- 5) Fukumoto. J., et al; Prock. Japan. Acad., 27,
441(1951)
- 6) 赤堀四郎; 酵素研究法 二卷, 300 (1960)
- 7) 福本壽一郎外; 日農化, 33, 1, 6. (1959)
- 8) 土井新次外; 日農化, 32, 1, (1958)
- 9) 萩原文二; Ann. Rep. Scient., Works. Fac. Soc.,
Osaka. Univ., 2, 35. (1954)
- 10) A.V. Guntelberg et al; Nature, 170, 802, (1952)
- 11) 宮路憲二; 應用菌學下卷, 398 (1958)
- 12) 赤堀四郎; 酵素研究法 2卷, 241 (1960)