

Monascus 屬 菌株가 生成하는 Alkaline Protease에 關한 研究

金 相 達* 徐 正 埴

慶北大學校 農科大學 農化學科 *慶北大學校 大學院

Studies on the alkaline protease produced from *Monascus* sp.

Sang-Dal Kim* Jung-Hwn Seu

Dept. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyung Pook National University

* Graduate school of Kyung Pook National University

(Received Mar. 8, 1972)

Summary

The alkaline protease was isolated from the culture material of *monascus* sp. on wheat bran culture. The crude purification of this enzyme was extracted with distilled water and precipitated with ammonium sulfate of 0.5 saturation. And, the activity of this enzyme was determined very strongly by folin's colorimetric method.

The optimal pH of this enzyme was ranging from pH 10 to 12 and the optimal temperature was 50°C. The pH stability was ranging from pH 5 to 12 and the enzyme activity was not inactivated by heat treatment in lower temperature than 40°C. The enzyme was protected from heat denature by the treatment of Pb²⁺, Ba²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, and Cu²⁺, but was inactivated with Hg²⁺, Fe²⁺ strongly. Moreover, one of these metal ions, the copper ion, has a strong protective activity on enzyme heat denature. And, it was not effected by treatment of EDTA.

I. 緒 論

微生物性 protease 에 關한 報文은 방대한 數에 達하며 이들 研究結果를 그 作用 pH에 對해서 分類하면 酸性, 中性 및 Alkali 性의 3種으로 分類할 수 있으며 이 各 Group은 그 作用에 있어서 極히 相異한 pH의 範圍를 가지고 있다는 것이 그 特徵의 하나라고 할 수 있다. 그 中 Alkaline protease 에 關한 研究中 特히 本 研究에서 많이 參考된 것이 Fukumoto⁽¹⁻²⁾ 등의 細菌性 Alkaline protease 에 關한 研究, Y. Nunokawa⁽³⁻⁴⁾의 Rice koji 中의 Alkaline protease의 研究 및 R. Bergkvist⁽⁵⁻⁶⁾ A.R. Subramanian⁽⁷⁾ 등의 *Aspergillus oryzae* 의 Alkaline protease 에 關한 研究등이었다. 이들의 結果를 보

면 Fukumoto⁽¹⁻²⁾의 *Bacillus subtilis*가 生成한 Alkaline protease는 그 最適作用 pH가 9~10이며 Sequestering agent인 E.D.T.A. 에 對해서 全然 影響을 받지 않으며 Ca²⁺에 依해서 보호된다고 하였으며 Nunokawa⁽³⁻⁴⁾는 Rice koji 中의 Alkaline protease의 最適 pH는 9~10, 60°C 10分에서 完全히 失活된다고 하며 또 Bran 培地 培養物에서 抽出한 *Asp. oryzae*의 Alkaline protease에 對한 Bergkvist⁽⁵⁻⁶⁾ 및 Subramanian⁽⁷⁾의 結果는 그 最適 pH가 7~9이며 中性에서는 比較的 安定하나 pH 11 以上에서는 급격히 失活하며 重金屬인 Cu²⁺, Cd²⁺에 依해서 阻害된다고 發表하고 있다. 本人은 *Monascus* 屬 菌株로부터 分離한 Alkaline protease가 높은 Alkali 性에서 잘 作用하며 또 Cu²⁺에 依해서 強하

게 보호된다는 흥미있는 결과를 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 實驗方法 및 結果

1. 供試菌株의 選別

1) 供試菌株 및 供試菌株의 培養

本實驗에 使用한 菌株는 慶北大學校 農科大學 微生物學 實驗室에서 分離, 保管하고 있는 絲狀菌 株 125 種 이었으며 市販用 Wheat bran 에 5%의 Sucrose 를 加한 水道水를 同量의 比率로 混合하여 20 lbs 에서 30 分間 高壓殺菌하여 酵素生成用培地로 使用했으며 供試菌株를 接種하여 30°~32°C 에 서 5 日間 培養시켰다.

2) 酵素液의 調製

培養物에 對해 倍量의 蒸溜水를 加하여 5°C에서 24時間 浸漬 抽出한 후 여과, 遠心分離하여 그 上澄液을 酵素液으로 使用하였다.

3) 酵素活性度 測定方法

Harmmasten milk casein 을 基質로, Buffer solution은 M/10 Na_2HPO_4 -NaOH Buffer 를 使用하여 酵素를 作用시킨 후 Folin's 方法⁽⁶⁾으로 그活

性度를 測定하였으며 이 때 使用한 比色計는 Erma Photo Electric Meter (Type N-6)이었다.

4) 菌株의 選別

上記 (II-1-3)와 같은 酵素活性度 測定方法으로 써 各 供試菌株中에서 Alkali 性 protease를 分泌하 는 菌株 12株를 一次 選別한 후 이를 다시 酵素作 用溫度 60°C 의 高溫에서도 活性이 있는 protease 를 生成하는 菌株 *Monascus* 屬(c-1) 一株를 最終 選別 하였다.

2. 酵素의 分別沈澱

最終 選別된 菌株의 酵素液을 上記(II-1-2)의 方法으로 調製하여 Ammonium sulfate 를 0.3 飽和되게 加한 후 5°C에서 7時間 放置, 沈澱시킨 후 遠心分離에 依하여 沈澱物을 얻고 그 上澄液에 同 一方法으로 Ammonium sulfate 를 各各 0.5, 0.7 完全 飽和시켜 生成된 沈澱物을 各各 區分하여 回 收하였다. 이와같이 分別沈澱에 依하여 얻은 沈澱 物을 蒸溜水로써 完全히 溶解시켜 5°C에서 4 日間 dialysis 한 液을 蒸溜水로써 一定濃度로 稀釋하여 酵素液으로 使用했으며 이와같은 粗精製의 過程을 圖示하면 다음 Fig. 1 과 같다.

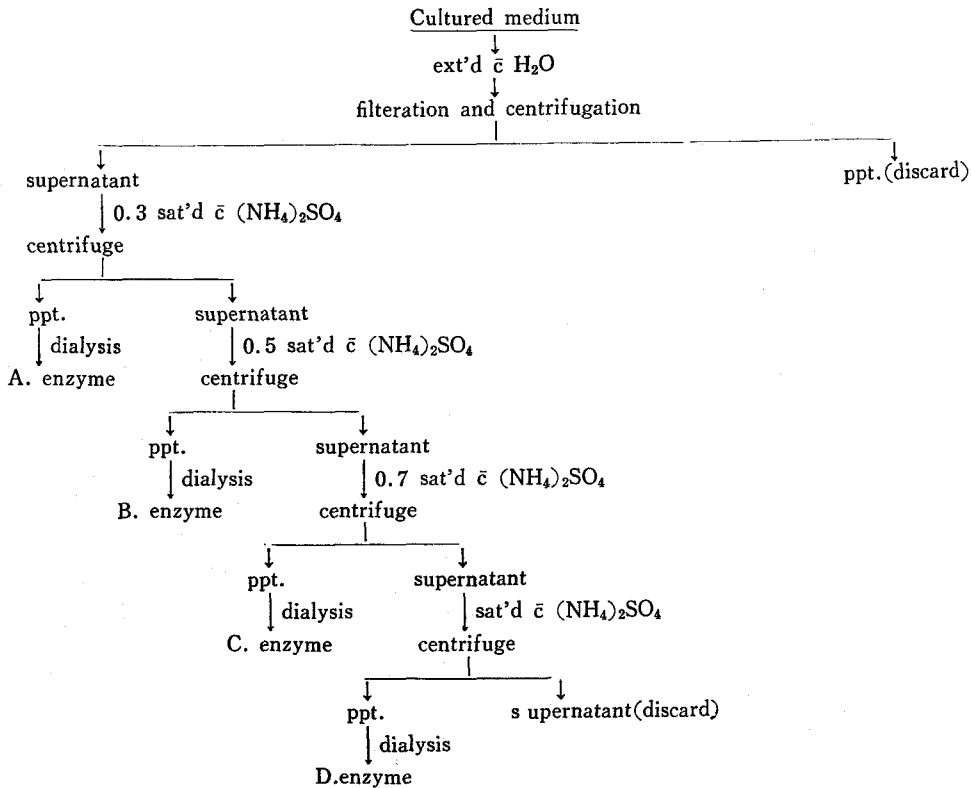


Fig. 1. Fraction of enzyme by ammonium sulfate precipitation.

以上の方法으로 粗精製한 酵素液을 各各 上法 [II-1-3]에 依해서 그 活性度를 測定하였으며 이 때 反應液의 組成은 다음과 같다.

Reaction Mixture

0.6% Casein solution (pH 8.5) 2.0ml

Buffer solution

pH 11.5—M/10 Na_2HPO_4 —NaOH Buffer

1.5ml

Enzyme solution

0.5ml

Reaction condition for 30min. at 40°C

위와 같이 作用시켜 그 活性度를 測定한 結果는 다음과 같다.

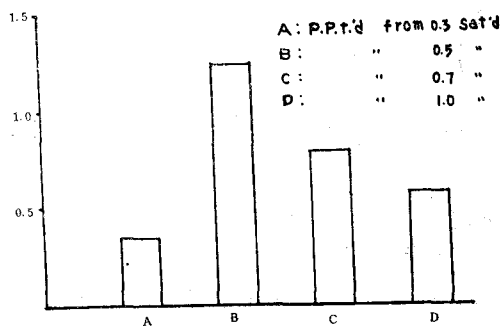


Fig. 2. Relative activity of ammonium sulfate fractionated enzymes

위에서 보는 바와 같이 本 酵素는 Ammonium sulfate 0.5飽和에서 얻은 沈澱이 가장 강한 力價를 나타내었으므로 以下 實驗에서는 이 部位만을 얻어 酵素液으로 調製 使用하였다.

3. 本 酵素의 酵學的 基本性質

1) 最適 pH

本 酵素의 最適 pH를 調査하기 위하여 pH 6.0~8.0은 M/15 Phosphate buffer를 pH 8.0~13.0은 M/10Glycin NaCl-NaOH Buffer를 使用하여 pH 1.0의 間격으로 調査하였으며 그 反應液의 組成은 다음과 같다.

Reaction Mixture

0.6% Casein solution 2.0ml

Buffer solution 1.5ml

Enzyme solution 0.5ml

Reaction condition for 30 min. at 40°C

위와 같이 作用시킨 후 上法[II-1-3]에 따라 測定하여 그 活性度를 Blank와의 差로써 나타냈으며 그 結果는 다음 Fig.3과 같다.

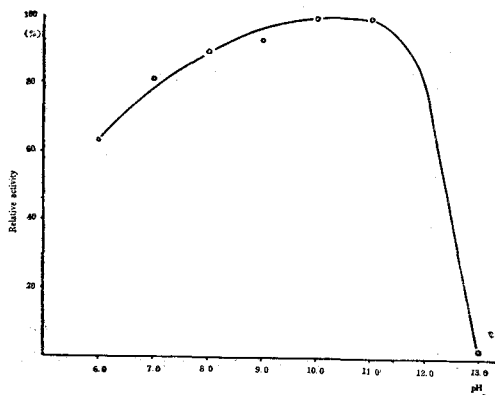


Fig. 3. Effect of pH on enzyme reaction

위에서 보는 바와 같이 本 酵素의 最適 pH는 pH 10.0~12.0이라는 것을 알았다.

2) 最適 溫度

本 酵素의 最適溫度를 調査하기 위하여 溫度 5°C의 間격으로 30°C에서 70°C까지 調査하였으며 그 反應液의 組成은 다음과 같다.

Reaction Mixture

0.6% Casein soln. (pH 10.5) 2.0ml

M/10 Glycin NaCl-NaOH Buffer (pH 10.5)

1.5ml

Enzyme soln.

0.5ml

Reaction time for 20 min.

위와 같이 作用시킨 후 上法에 따라 測定하여 그 活性度를 Blank와의 差로 나타 내었으며 그 結果는 다음과 같다.

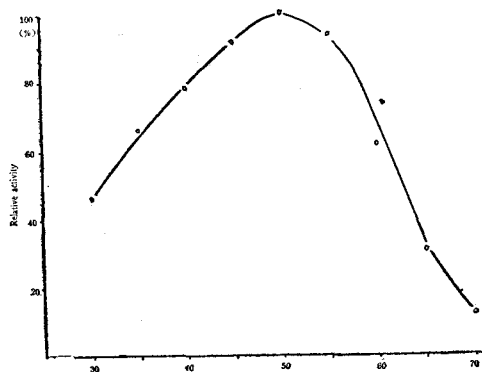


Fig. 4. Effect of temperature on enzyme reaction

위에서 보는 바와 같이 본 酵素作用의 最適溫度는 50°C이었다는 것을 알았다.

3) pH 安定性

本 酵素의 pH에 對한 安定性을 調査하기 위하여 M/10 Maclvain Buffer, M/10 Glycin NaCl-NaOH Buffer를 使用하여 pH 1.0의 간격으로 pH 3.0~12.0로 되게 本 酵素의 pH를 調節하여 30°C에서 120分間 前處理시킨 후 M/10 NaOH로써 本 酵素作用의 最適 pH로 調節한 후 그 殘存力價를 調査하였으며 이 때 反應液은 다음과 같다.

Reaction Mixture

0.6% Casein soln. (pH 10.5) 2.0ml
M/10 Glycine NaCl-NaOH Buffer (pH 10.5) 1.5ml

Treated Enzyme soln. 0.5ml

Reaction condition for 20 min. at 40°C

위와 같이 作用시킨 후 上法에 따라 測定하여 그 活性度를 Blank와의 差로써 나타냈으며 그 結果는 다음과 같다.

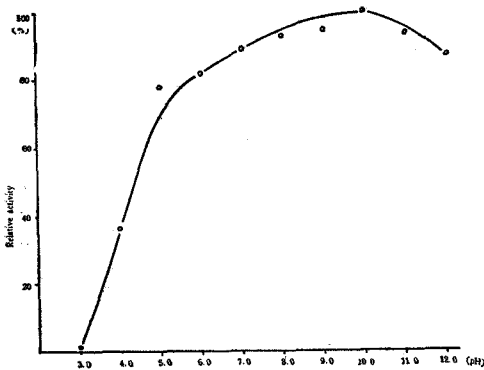


Fig. 5. pH stability of enzyme

위에서 보는 바와 같이 本 酵素는 pH 5.0에서 強 Alkali 性인 pH 12.0까지 넓은 범위에서 安定하였다.

4) 熱에 對한 安定性

本 酵素의 熱에 對한 安定性을 調査하기 위하여 本 酵素를 pH 10.0으로 調節하여 40°C, 50°C, 60°C에서 80分間 經時的으로 前處理시킨 후 그 殘存力價를 測定하였으며 이 때 反應液의 組成은 다음과 같다.

Reaction Mixture

0.6% Casein soln. (pH 10.5) 2.0ml
M/10 Glycin NaCl-NaOH Buffer (pH 10.5) 1.5ml

1.5ml

Treated Enzyme soln.

0.5ml

Reaction condition for 20 min. at 40°C

위와 같이 作用시킨 후 上法으로 測定하여 그 殘存 活性度를 Blank와의 差로써 나타냈으며 그 結果는 다음과 같다.

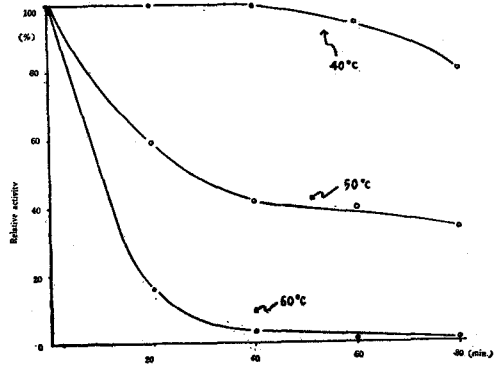


Fig. 6. Heat stability of enzyme treated at different temperature.

위에서 보는 바와 같이 40°C에서는 80分이 經過함으로써 약 10%정도의 失活을 하였고 60°C에서는 20分이 經過하므로 80% 以上の 失活을 하였다는 것을 알았다.

4. 金屬 ion의 影響

本 酵素에 對하여 여러가지의 金屬 ion들이 어떠한 影響을 미치는가를 調査하기 위하여 CaCl₂, MgSO₄, ZnSO₄, COAC, ZnSO₄, FeSO₄, NiSO₄, BaCl₂, MnCl₂, CuSO₄, LiSO₄, HgCl₂ 등 12種의 金屬鹽類를 最終濃度 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻²M 되게 各 各 調製하여 同量의 酵素液에 加하여 40°C에서 90分間 前處理시킨 후 그 殘存力價를 測定하였다. 이 때 對照區에 使用한 蒸溜水는 各 濃度別 金屬鹽溶液의 pH와 同一한 pH로 調節한 후 使用하였으며 이 때의 反應液은 다음과 같다.

Reaction Mixture

0.6% Casein soln. (pH 10.5) 2.0ml
M/10 Glycin NaCl-NaOH Buffer (pH 10.5) 1.5ml

Treated Enzyme soln. 0.5ml

Reaction condition for 30 min. at 40°C

위와 같이 作用시킨 후 上法에 따라 測定하여 그 殘存活性度를 Blank와의 差로써 나타냈으며 그 結果는 다음과 같다.

Table 1. Effect of Metal ions

Inhibiting reaction	Hg ⁺ Fe ⁺
Protecting reaction	Pb ⁺ Ba ⁺ CO ⁺ Zn ⁺ Cu ⁺
None effect	Mg ⁺ Ni ⁺ Ca ⁺ Li ⁺ Mn ⁺

위에서 보는 바와 같이 본 酵素에 對해서 阻害的作用을 하는 金屬 ion은 Hg⁺, Fe⁺ ion 등이었으며 保護作用을 하는 金屬 ion은 Pb⁺, Ba⁺, Co⁺, Zn⁺, Cu⁺ 등의 金屬 ion이었으며 본 酵素에 對해서 아무런 영향을 주지 못하는 金屬 ion은 Mg⁺, Ni⁺, Ca⁺, Li⁺, Mn⁺ 등의 金屬 ion 이었다는 것을 알았으며 특히 Cu⁺ ion은 아주 강한 保護作用을 한다는 것을 알았다.

5. Cu⁺ ion의 影響

本 酵素에 對한 Cu⁺ ion의 保護作用을 調査하기

위하여 Cu⁺ ion의 濃度 2×10^{-3} , 2×10^{-2} , 2×10^{-1} M 溶液을 同量의 酵素液과 混合하여 50°C와 60°C에서 各各 120分間 經時的으로 前處理시켜 熱變性된 酵素의 殘存活性을 測定하였으며 이 때 對照區에 使用한 蒸溜水는 Cu⁺ ion의 各 濃度別溶液 pH와 同一한 pH로 調節하여 使用했으며 이 때 反應液은 다음과 같다.

Reaction Mixture

0.6% Casein soln. (pH 10.5)	2.0ml
M/10 Glycine NaCl-NaOH Buffer (pH 10.5)	1.5ml
Treated Enzyme soln.	0.5ml

Reaction condition for 20 min. at 40°C

위와같이 作用시킨 후 上法에 따라 그 殘存活性度을 測定하였으며 그結果는 다음과 같다.

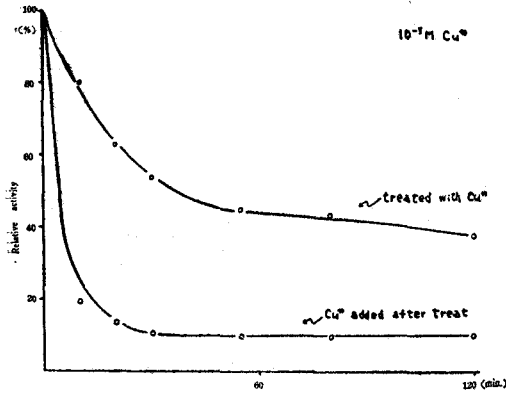


Fig. 7-1. Effect of Cu⁺ on enzyme activity (Preincubated at 50°C)

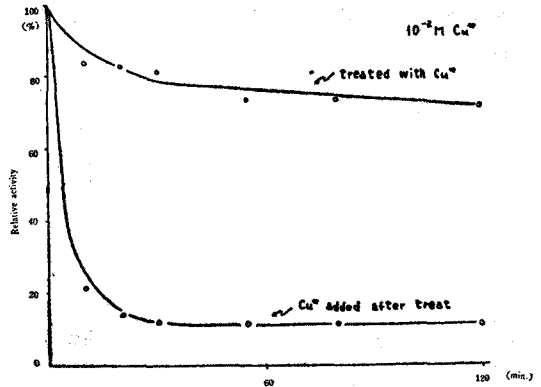


Fig. 7-2. Effect of Cu⁺⁺ on enzyme activity (Preincubated at 50°C)

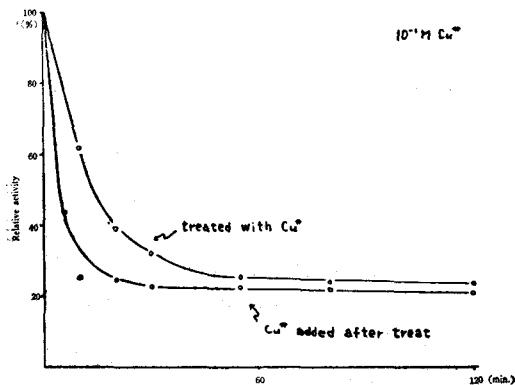


Fig. 7-3. Effect of Cu⁺ on enzyme activity (Preincubated at 50°C)

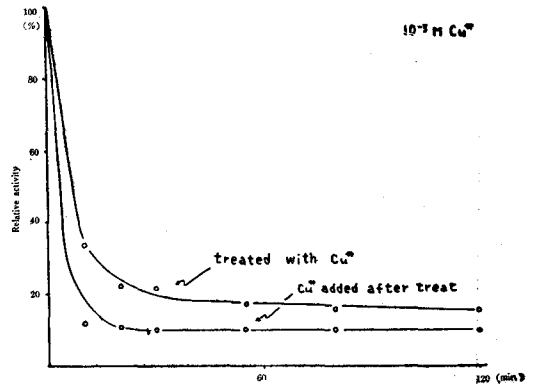


Fig. 8-1. Effect of Cu⁺ on enzyme activity (Preincubated at 60°C)

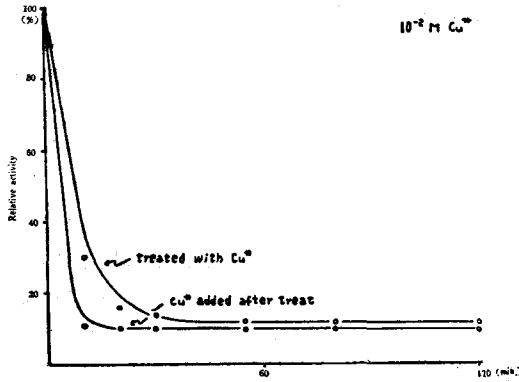


Fig. 8-2. Effect of Cu^{2+} on enzyme activity (Preincubated at 60°C)

위에서 보는 바와 같이 50°C 에서 80分間 處理시킴으로써 Cu^{2+} ion이 10^{-3}M 로 存在했을 경우에는 對照區에 比較해서 約 40%정도, 10^{-2}M 로 存在했을 경우에는 約 60%정도, 10^{-1}M 의 경우에는 거의 영향을 받지 못한 정도의 熱保護作用을 받았고 60°C 에서는 Cu^{2+} ion이 10^{-3}M , 10^{-2}M 로 存在했을 경우에 아주 弱한 保護作用을 받았으나 10^{-1}M 일 경우에는 거의 保護作用을 받지 못하였다는 것을 알았다.

6. E.D.T.A.의 影響

Chelate 試藥인 E.D.T.A.를 使用하여 本酵素가 金屬 ion을 含有하는 金屬酵素인지 與否에 對해서 調査하기 위하여 E.D.T.A.-2Na (Dotite) 溶液을 pH 7로 調節하여 最終濃度 10^{-2}M 에서 10^{-1}M 까지 되게 하여 反應液에 添加했으며 이 때의 反應液은

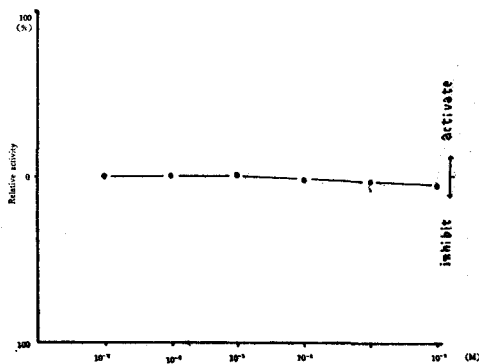


Fig. 9. Effect of E.D.T.A. on enzyme reaction

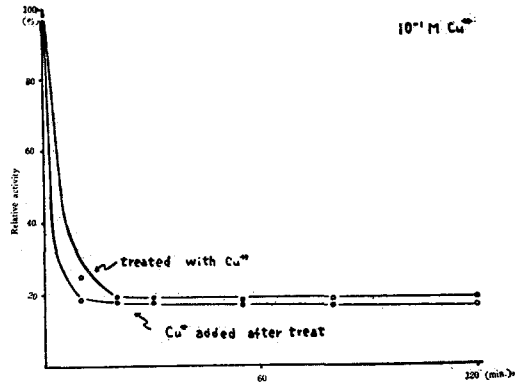


Fig. 8-3. Effect of Cu^{2+} on enzyme activity (Preincubated at 60°C)

다음과 같다.

Reaction Mixture

0.6% Casein soln. (pH 10.5)	2.0ml
M/10 Glycin NaCl-NaOH Buffer (pH 10.5)	1.5ml
E.T.A. soln. (pH 7.0)	0.5ml
Enzyme soln.	0.5ml

Reaction condition for 20 min. at 40°C

위와 같이 作用시킨 후 上法에 따라 測定하여 Blank와의 差로써 그 活性도를 나타냈으며 그 結果는 다음과 같다.

위에서 보는 바와같이 本酵素는 E.D.T.A.에 對해서 阻害的 作用을 받지 않았으므로 酵素內에 金屬 ion이 含有되어 있지 않음을 알았다.

III. 考 察

本實驗에서 얻은 *Monascus*屬이 分비하는 Alkaline protease의 最適 pH는 $10.0 \sim 12.0$ 으로써 前述⁽¹⁻⁷⁾한 他 酵素에 比較해서 더 높으며 pH 6.0에 있어서도 最適狀態에 比較 60%程度의 Activity를 가지고 있으며 그 作用 pH의 범위가 대단히 넓다. 即 Fukumoto⁽¹⁻²⁾등의 研究에서 얻은 *B. subtilis*의 Alkaline protease는 pH 6에서의 Activity는 最適 pH에 比較해서 20% 밖에 나타내지 못하고 있으며 *Asp. oryzae*⁽⁵⁻⁷⁾에서도 *B. subtilis*의 成績과 거의 비슷하다. 또 이 酵素의 最適溫度는 50°C 으로써 比較的 낮은 편이며 安定 pH의 범위는 pH $5.0 \sim 12.0$ 이었으며 이것은 *Asp. oryzae*의 pH $3 \sim 7$ 및 *B. subtilis*의 pH $5 \sim 10$ 에 比較해서 더 넓은 安定域을 가지고 있음을 알게 되었다. 熱安定에 있어서는 40°C

80分 處理하여서는 別影響이 없으나 50°C 80分 處理로서는 約 70%가 또 60°C 處理에서는 40分에서 大部分의 酵素가 失活되고 있으며 이것은 *B. subtilis*와 거의 같은 傾向을 나타내고 있음을 알게 되었다. 또 이 酵素에 미치는 金屬 ion의 영향을 보면 Hg[#], Fe[#]은 阻害的으로 作用하나 그 外의 Pb[#], Ba[#], Co[#], Zn[#], Cu[#], Mg[#], Ni[#], Ca[#], Li[#], Mn[#]등 2價 ion의 金屬들은 보혹적으로 作用하거나 或은 영향을 미치지 못함을 알게 되었으며 특히 일반적으로 酵素作用에 있어서 阻害的으로 作用하며 또 Protease의 大部分을 阻害하는 Cu[#]이 本 酵素의 熱失活을 强하게 保護한다는 흥미로운 事實을 알게 되었다. 即 熱失活에 對한 保護作用에 있어서 Cu[#]의 最適濃度는 10⁻²M이었으며 이 濃도에 있어서 Cu[#] 無침가區의 酵素는 50°C, 10分間의 加熱로 約 80%의 酵素가 失活하는데 비해 Cu[#]를 添加한 區에서는 120分間 處理에서 30% 미만의 失活밖에 일어나지 않으며 또 이 酵素는 E.D. T.A에 對해서 全然 영향을 받지 않으므로 이 Enzyme protein이 Metallo나 或은 Metallic protein이 아니라는 點을 감안할 때 Cu[#]에 依한 보호作用은 더 흥미로운 事實이라고 할 수 있다. 이런모든 點을 보아서 本 實驗에서 얻어진 Alkaline protease는 지금까지 微生物性 Alkaline protease에 있어서 代表的이라고 할 수 있는 *B. subtilis* 및 *Asp. oryzae*의 Alkaline protease에 比해서 더 높은 Alkali性에 있어서도 그 作用과 安定성이 維持되며 또 金屬 ion, 특히 Cu[#]에 對한 영향등으로 보아 이 酵素는 *B. subtilis* 및 *Asp. oryzae*의 兩 酵素와는 根本的으로 다른 規範에 屬하는 酵素라고 생각되며 이 點에 對해서는 앞으로 더 調査해 보고져 하는 바이다.

要 約

本 *Monascus*屬 菌株를 Wheat bran培地に 培養하여 여기서 얻은 Alkaline protease의 酵素學的 性質은 다음과 같다.

- 1) 本 Protease의 最適 pH는 10~12에 位置하고 있으며
- 2) 最適溫度는 50°C 이었으며
- 3) 安定 pH는 5~12에 位置하며
- 4) 本 Protease는 40°C 以下에서 安定하였으며
- 5) 金屬 Ion中 Hg[#]와 Fe[#]는 阻害的으로 作用하며 Pb[#], Ba[#], Co[#], Zn[#], Cu[#]등은 保護作用을 나타내었고 이中 Cu[#]는 10⁻²M 濃度에서 本 protease의 失活을 强하게 保護함을 알았다.
- 6) E.D.T.A는 本 Protease에 對해서 아무 영향을 주지 않음을 알았다.

參考文獻

- 1) J. Fukumoto et al. J. Agr. Chem. Soc., **33**, 6~9 (1959)
- 2) J. Fukumoto et al. J. Agr. Chem. Soc., **33**, 9~13 (1959)
- 3) Y. Nukukawa J. Agr. Chem. Soc., **36**, 879~883 (1962)
- 4) Y. Nukukawa J. Agr. Chem. Soc., **36**, 884~890 (1962)
- 5) R. Bergvist Acta Chem. Second **17**, 1541 (1963)
- 6) R. Bergvist Acta Chem. Second **17**, 2239 (1963)
- 7) A.R. Subramanian et al J. Biochem. **3**, 1861 (1964)
- 8) 萩原文二, 米谷隆, 赤堀四郎 酵素研究法 第 2 卷 p.240 朝倉 (1956)