한국농화학회지 제 41 권 제 1 호(1998)
Agricultural Chemistry and Biotechnology
Vol. 41, No. 1, pp. 6~12(1998)

폐단백자원에 이용하기 위한 미생물 Protease의 특성

천성숙 · 조영제[1] · 성태수[2] · 손준호 · 최 청*

영남대학교 식품가공학과, [1]상주산업대학교 식품공학과, [2]창원전문대학 식품영양과

초 록 : 폐단백질을 활용하는 방도의 하나로 폐단백질 자원으로 부터 불용성 단백질의 분리 효율성을 높이고 기능성을 개선하기 위하여 protease를 생산하는 *Aspergillus* sp. MS-18 균주를 토양으로 부터 분리하고 이 균주가 생산하는 효소를 정제하여 특성을 살펴보았다. 효소 생산을 위한 최적 배양조건은 3% arabinose, 0.5% polypepton, 0.1% ammonium sulfate, 0.1% magnesium chloride 첨가로 3 일 배양이었다. 효소는 ion exchange chromatography, gel filtration 등으로 16.9 배 정제할 수 있었으며 비활성역가는 340.4 unit/mg이었다. 정제효소는 polyacryl amide gel 전기영동상 단일 밴드로 나타났으며, 분자량은 30,000 정도로 추정되었고 결정구조는 모서리가 둥그스럼한 막대 모양이었다. 정제 효소의 최적작용 pH와 온도는 9.0, 60°C였으며, pH 7.0-12.0까지 50°C에서 안정하였다. 금속이온중 Na^+, Mg^{2+}, Mn^{2+}등에 의해 활성이 증대 되었으나, Hg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}에 의해 효소 활성이 저해되었고 저해제중 ethylenediaminetetra acetic acid와 phenyl methanesulfonyl fluoride에 의한 활성 저해가 관찰되어 금속 이온이 효소 활성에 관여하는 serine protease로 추정되었으며 정제효소의 Km, Vmax는 29.33 μmole/L, 5.13 μg/min이었다.(1997년 10월 6일 접수, 1997년 11월 17일 수리)

서 론

세계 인구 증가에 따른 단백질의 부족 현상은 심각하게 될 것이다. 따라서 식품 학자들은 이에 대처하기 위해 미개발 자원으로부터 식용 단백질을 얻기 위해 단세포 단백질, 어류, 식물의 잎, 콩, 면화씨, 평지씨 등에 대한 많은 연구를 수행하여 왔다. 현재 단백질 자원으로는 대두를 비롯한 땅콩, 면실, 유채, 해바라기 종자 및 참깨 등에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며[1-12] 분리단백질 및 농축단백질 등은 식품 산업에서 단백질의 증량제, 대체제로 널리 이용되고 있다. 그러나 이들 종자 식물의 단백질은 protein-phytate 복합체를 형성하기 때문에 용해도가 감소되고 단백질 체내 흡수가 감소된다고 보고된 바 있다.[13] 따라서, 단백질을 변형시켜 용출율을 상승시키고 기능 특성을 개선하여 식품에의 이용성을 증가시키려는 연구가 많이 시도되고 있다.[14-17] 이러한 개선 방법 중 현실적으로 적용 가능성이 큰 방법으로 단백질에 단백질 가수분해 효소를 처리하여 용출율을 상승시킬 뿐만 아니라 변형 단백질을 제조하여 그 기능성을 이용하는 연구가 시도되고 있다.[18-26] Protease는 serine protease, cysteine protease, metallo protease, pepstatin, aspartic protease 등으로 분류하며, 작용하는 pH의 영역에 따라서 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 분류하기도 한다.[28] 이러한 protease중 미생물이 생성하는 효소는 동물체나 식물체에서 분리한 효소에 비하여 공업적으로 대량 생산과 생산 원가 면에서 훨씬 유리하므로[27] 미생물이 생산하는 효소에 대한 연구가 활발히 진행되었다.[28-32]

따라서 본 연구에서는 폐단백질을 재활용하는 방도의 하나로 폐단백질 자원 중 참깨박으로 부터 불용성 단백질의 분리 효율성을 높이고 기능성을 개선하기 위해 protease를 생산하는 균주를 토양으로 부터 분리, 정제하고 특성을 검토하여 폐단백질에 적용시키기 위한 최적작용 조건을 제시하기 위한 기초자료로 활용코자 하였다.

재료 및 방법

Protease 생성균의 분리

대구 및 경북 지방의 토양과 부식토를 균원 시료로하여 상법[33]에 따라 순수 분리하고, 분리된 균주 중 protease 생성능이 뛰어난 3 균주를 1 차 선발하고 3 차례 반복 실험을 행하여 효소생성 능력이 가장 우수한 균주를 선발하였다. 균의 순수분리를 위한 배지는 potato dextrose agar(PDA)를, 효소 생산을 위하여 밀기울 50 g에 2% glucose 50 m*l*를 첨가한 밀기울배지를, 균주 보관용 배지로는 Czapekdox agar를 사용하였다.

효소 생산을 위한 배양 방법

상기 밀기울 배지에 공시 균주의 균사체 및 포자를 5 백금이 접종하고, 35°C에서 3 일간 배양하였다.

효소생산을 위한 최적조건 결정

수분이 60% 함유된 밀기울 배지에 공시균을 접종하여 35°C에서 배양 시간별로 활성을 측정하였으며, 밀기울 배지에 유기질 소원, 무기질 소원, 탄소원을 각 1%씩, 무기염을

찾는말 : 폐단백, 미생물 protease
*연락저자

0.2%씩 첨가하고 35°C에서 최적 배양시간 동안 배양하여 효소의 활성을 측정하였다.

효소의 정제

배양된 밀기울 배지 200 g에 8 배의 0.2 M boric acid-borax buffer(pH 9.0)를 가하여 균질화 시킨 후, 4°C에서 24 시간 동안 교반하여 효소를 추출하고, 4000 xg로 30 분간 원심분리한 후 상징액을 모아, 여과하여 정제를 위한 조효소액으로 사용하였다. 효소의 정제는 조효소액을 70% 포화 황산암모늄으로 염석한 후 0.2 M boric acid-borax buffer (pH 9.0)로 투석하고, 저온실에서 Sephadex G-150컬럼을 이용한 gel filtration과, DEAE-cellulose를 이용한 이온교환 크로마토그라피로 정제하였다.

단백질 정량

Lowry 등의 방법[34]에 의하여 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하여 단백질량을 측정하였다.

효소활성 측정

Protease의 활성측정은 hammarstein milk casein을 기질로 하여 Anson[35]과 萩源의 방법[36]에 의하여 실시하였으며, 효소활성은 효소액 1 m*l*가 1 분간에 1 μg의 tyrosine을 생성하는 것을 1 unit로 정하였다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

정제한 효소 단백질은 Davis 법[37]에 의하여 polyacrylamide gel disc 전기영동으로 하였다. 영동이 끝난 gel은 1% amido black 10-B 용액으로 2 시간 염색한 후 7% acetic acid 용액으로 탈색하였다.

분자량 측정

순수하게 정제된 효소의 분자량은 Weber와 Osborn의 방법[38]에 의하여 sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacryamide 전기영동에 의하여 측정하였다. 영동시킨 후 bovine serum albumin(MW : 66,000), egg albumin(MW : 45,000), pepsine (MW : 34,700), trypsinogen(MW : 24,000), β-lactoglobulin (MW : 18,400), lysozyme(MW : 14,300)을 사용한 표준곡선을 이용하여 Rm값에 따라 분자량을 측정하였다.

결정구조의 관찰

정제된 효소는 소량의 0.2M acetate buffer(pH 5.0)에 용해하여 냉동 용기속에서 효소액을 냉각시키면서, -20°C에서 저장한 아세톤을 유백색 혼탁이 생길 때까지 서서히 가한 후 파라핀 필름으로 밀봉하고 4°C에 방치하여 결정화시키고, 결정화된 효소는 알미늄제의 mounting block위에 silver paster로 부착시킨 후 ion coater에 넣어 0.05 mmHg이하의 진공으로 감압시킨 다음 200 Å의 백금을 시료 표면에 균일하게 증착시켰다. 백금 증착된 시료는 specimen holder 위에 고정시켜서 주사전자 현미경(ISI, SS-130)에 넣고 감압시킨 후 accelerating voltage 15 kv로 결정을 관찰하였다.[28]

효소학적 특성

최적 pH, pH 안정성, 최적 반응온도, 온도 안정성, 금속이온의 영향, 저해제의 영향, Km, Vmax, 활성화 에너지 등을 측정하였다.

결과 및 고찰

Protease 생성균주 분리 및 동정

대구, 경북지역에서 채취한 토양으로 부터 분리한 67 균주를 대상으로 protease 활성을 가지는 3 균주를 1 차 선정하여 단백질 분해력이 가장 강한 1 균주를 분리, 선정하였으며, Koneman 등[39]의 방법에 따라 Czapeck-Dox-agar에 slide culture 하면서 현미경으로 관찰한 결과 Fig. 1과 같이 colony는 황색을 띠고 있었고 가근은 없으며 균사에는 격벽이 있고 foot cell에서 분지된 condiophore 의 선단은 비대하여 vesicle이 되고 그 끝에 타원형의 *conidia*가 달려 있는 것으로 보아 이 균주는 *Aspergillus* sp.으로 추정되어

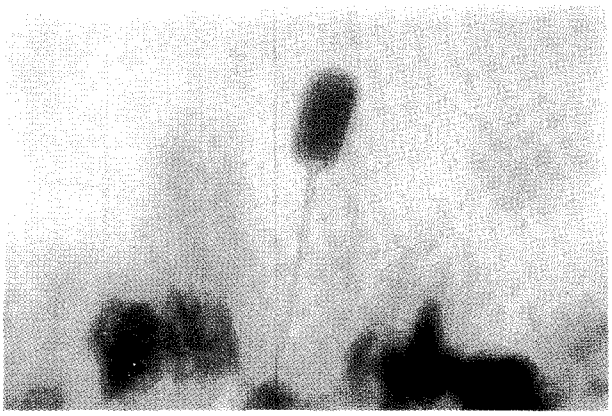

Fig. 1. Microscopic morphology of *Aspergillus* sp. SM-18.

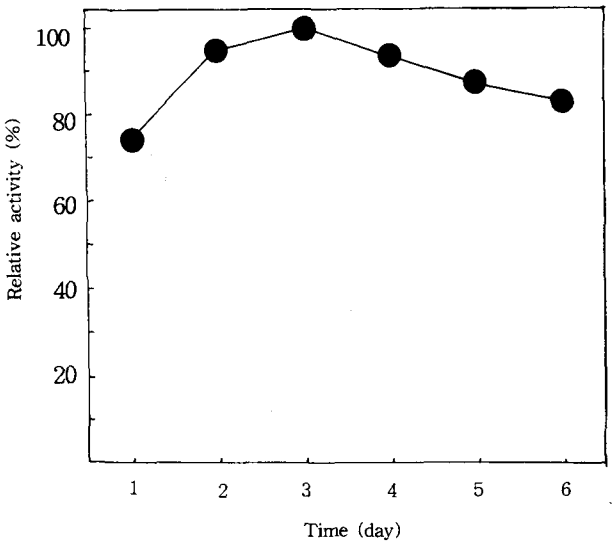

Fig. 2. Effect of cultivation time on production of the pr tease with wheat bran medium from *Aspergillus* sp. MS-18.
Enzyme activity was represented as ralative value against tl highest activity manifested on 4 hours of cultivation.

이를 *Aspergillus* sp. MS-18로 명명하고 본 실험에 사용하였다.

최적 배양조건

Aspergillus sp. MS-18의 균주에 의한 protease의 생성은 수분이 60% 함유된 밀기울 배지를 사용하여 35℃에서 배양 시간별로 측정한 결과 Fig. 2와 같이 배양시작 후 3일이 지났을 때 효소 활성이 가장 높았으며 그 이후 활성이 감소되기 시작하는데 감소 비율은 상당히 완만하였다. 탄소원 중 fructose와 arabinose에 의해서 유기질소원 중 polypepton에 의해서 무기질소원 중 ammonium sulfate, ammonium chloride 및 ammonium phosphate 순으로 활성이 촉진되었다. 또한 무기염 중 magnesium chloride에 의해서 활성이 촉진되었다. 이러한 결과는 차 등[40]이 *Aspergillus* sp.의 protease가 3일 배양 후 활성이 최대에 도달하였다는 보고와 유사하였다.(Table. 1)

Table 1. Production of protease by various sources

Source		Activity	
		Unit	%
	None	3.34	100.00
Carbon 1%	Galactose	3.21	96.06
	Arabinose	3.88	116.13
	Glycerin	0.73	21.92
	Lactose	2.88	86.08
	Glucose	1.43	42.86
	Fructose	3.52	105.42
	Sorbitol	2.62	78.33
	Mannitol	2.53	75.74
	Maltose	2.92	87.81
	Mannose	3.05	91.26
	Sucrose	1.62	48.40
	Starch	2.34	69.95
	Citrate	0.53	15.89
Organic nitrogen 1%	Casein	2.86	85.59
	Polypepton	4.22	126.23
	Glycine	3.12	93.35
	Albumin	3.67	109.85
	Urea	2.03	60.71
Inorganic nitrogen 1%	$Ca(NO_3)_2$	1.04	31.16
	$(NH_4)_2S_2O_8$	0.52	15.52
	$(NH_4)HPO_4$	3.46	103.70
	KNO_3	2.12	63.42
	NH_4Cl	3.51	105.17
	$(NH_4)_2SO_4$	3.54	116.04
	$NaNO_2$	1.70	50.86
Inorganic salt 0.2%	$MgSO_4$	2.89	86.58
	$FeSO_4$	1.10	32.88
	KH_2PO_4	0.31	9.24
	NaCl	3.06	91.50
	K_2HPO_4	2.17	64.90
	NaH_2PO_4	3.38	101.11
	$MgCl_2$	3.68	110.22
	Na_2HPO_4	3.39	101.60
	$CaCl_2$	3.10	92.74
	$CuSO_4$	1.63	48.65

Enzyme activity was represented as unit and ralative value against the highest activity manifested after 3days of cultivation.

Protease의 정제

DEAE-cellulose ion exchange chromatography : 조효소액을 70% 포화 황산암모늄으로 염석하고 탈염한 후 1.0 M 까지의 NaCl linear salt gradient를 이용하여 DEAE- cellulose ion exchange column (3 × 55 cm)으로 분당 0.79 m*l*의 유속으로 tube당 7 m*l*씩 분취하며 chromatography한 결과 Fig. 3에서와 같이 9개의 peak가 검출되었으며 약 0.26 M NaCl 정도에서 활성 단백질이 용출되었다. DEAE-cellulose ion exchange chromatography하여 분리한 활성 단백질은 Amicon membrane filter (PM-10)로 농축하였다.

Sephadex G-150 gel filtration : DEAE-cellulose column을 통과시킨 후 농축한 활성 단백질은 Sephadex G-150 column (2 × 70 cm)을 이용하여 0.2 M boric acid-borax buffer (pH 9.0)로 gel filtration 하였으며, 이때 유속은 분당 0.2 m*l*이었고 tube당 3 m*l*씩 분획 한 결과 Fig. 4에서와 같이 4 개의 획분이 확인되었으며 그중 1 개에서 활 성이 검출되었다. 상기와 같이 정제한 결과 효소의 비활성역가는

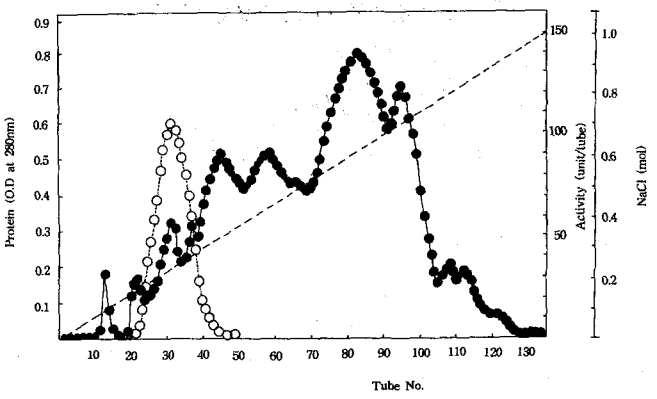

Fig. 3. DEAE-cellulose ion exchange chromatography of protease from the culture of *Aspergillus* sp. MS-18. Fraction size was 10 m*l*/tube. ●—● Protein, ○—○ Activity

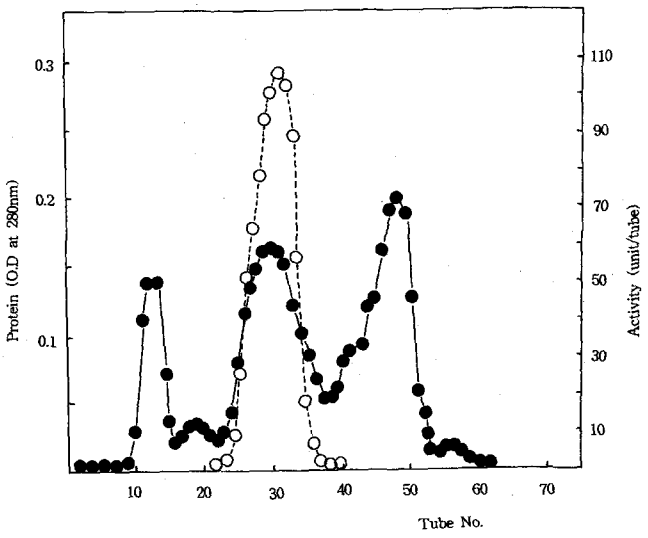

Fig. 4. Sephadex G-150 gel filtration of protease from the culture of *Aspergillus* sp. MS-18. Fraction size was 3.0 m*l*/tube. ●—● Protein, ○—○ Activity

Table 2. Purification procedure of protease from the culture of *Aspergillus* sp. MS-18

	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude enzyme solution	261.00	5250	20.11	100.00	1.00
Ammonium sulfate	30.42	1726	56.74	32.88	2.82
DEAE-cellulose	8.13	1270	156.25	24.19	7.77
Sephadex G-150	2.40	816	340.43	15.54	16.92

340.4 unit/mg이었으며, 정제배수는 16.9 배 였다. (Table 2)

Polyacrylamide gel electrophoresis

정제된 효소 단백질을 동결건조 후 Davis 법[37]에 따라 polyacryl amide gel로써 disc gel electrophoresis 행하여 본 결과 Fig. 5에서와 같이 단일 밴드로 나타났다.

분자량 측정

Weber와 Osborn의 방법[38]에 따라 SDS-polyacrylamide 전기영동에 의한 분자량 측정 결과는 Fig. 6에 나타난 바와 같이 30,000 정도의 단일 단백질으로 나타났다. Kazuo 등[41]과 Tadanobu 등[42]은 *Aspergillus* sp.의 protease가 약 30,000이라고 보고하였으며 본 균주가 생성하는 protease와 비슷하였다.

효소의 결정화

정제된 효소로 4°C에서 결정화 시켜 scanning electron microscopy에 의해 그 결정 구조를 확인한 결과 Fig. 7 과 같이 가장자리가 둥그스럼한 판상 모양을 형성하고 있었다.

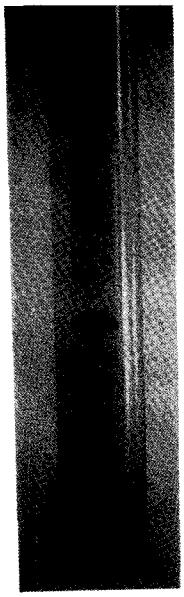

Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of protease from the culture of *Aspergillus* sp. MS-18.

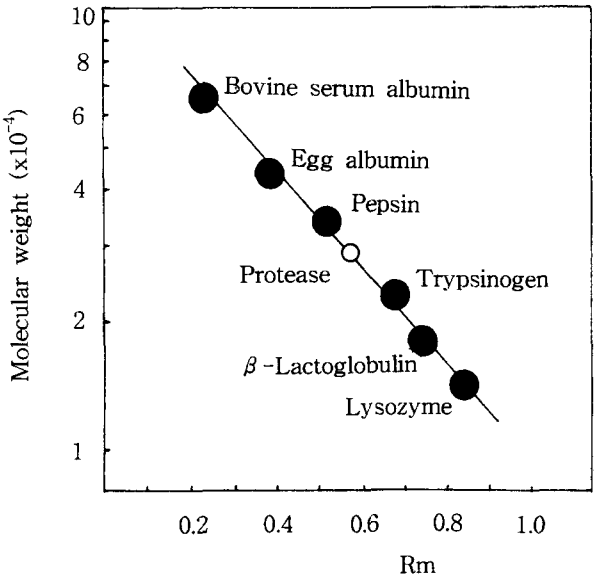

Fig. 6. The calibration curve for determination of molecular weight of protease by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.
* Standard : Bovine serum albumin (MW : 66,000)
Egg albumin (MW : 45,000)
Pepsine (MW : 34,700)
Trypsinogen (MW : 24,000)
β-Lactoglobulin (MW : 18,400)
Lysozyme (MW : 14,300)

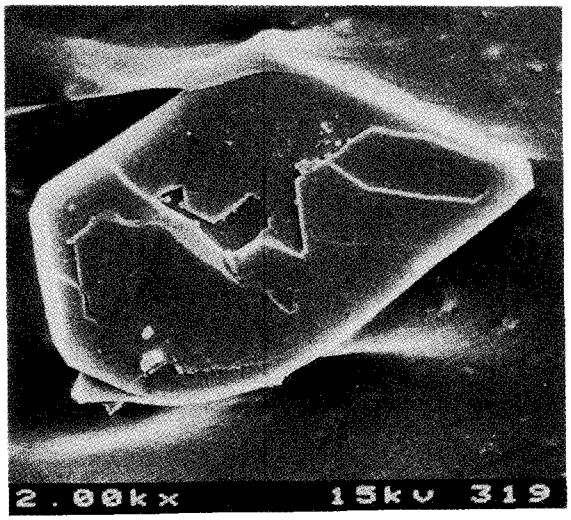

Fig. 7. Scanning electron microphotograph of crystal of protease from *Aspergillus* sp. MS-18.

Protease의 특성

pH에 의한 영향 : pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 7.0 -12.0까지의 pH 영역에서 효소 활성을 측정한 결과 Fig. 8-A에서 나타난 바와 같이 효소의 최적 pH는 9.0이었으며 pH 10.0 이상부터는 급격한 효소 활성의 감소가 관찰되었다.

pH 안정성 : 효소의 pH에 대한 안정성을 조사해 보기 위하여 효소를 pH 6 -12까지의 범 위에서 4°C, 24 시간 동안 방치한 뒤 최적 pH인 9.0으로 조절하고 잔존 활성을 조사

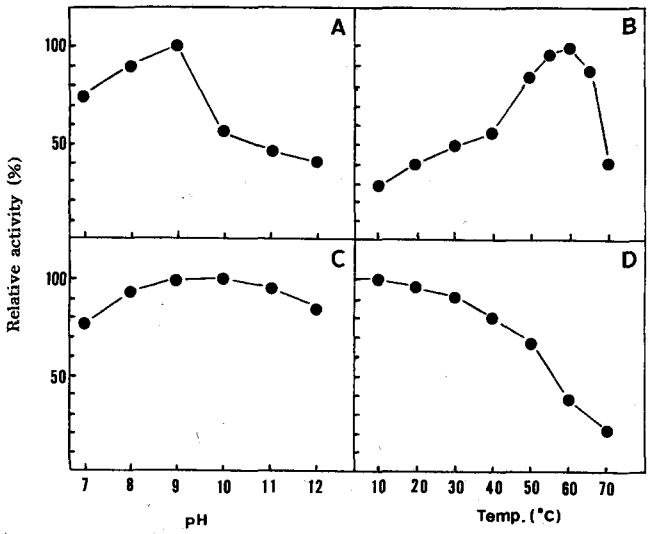

Fig. 8. Effect of pH and temperature on the activity of protease from the culture of *Aspergillus* sp. MS-18.
A : Effect of pH, B : Effect of temperature,
C : pH stability, and D : temperature stability.

한 결과는 Fig. 8-B와 같다. *Aspergillus* sp. MS-18이 생산하는 protease는 pH 7-12까지 알칼리영역 전범위에서 상당히 안정한 편이었다.

온도에 의한 영향 : 효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 반응 온도를 10-70°C 까지 변화시키면서 1 시간 동안 반응시켜 활성을 측정한 결과는 Fig. 8-C 와 같으며 60°C에서 반응시켰을 때 그 상대활성이 가장 높게 나타났다. 이는 정과 박[43]은 *Aspergillus awamori*의 protease 최적 반응온도가 40°C 라고 보고한 것과 유사 하였다.

열 안정성 : protease의 열 안정성을 조사하기 위하여 20-70°C의 범위에서 10-60분간 열 처리한 후 최적 반응 온도인 60°C에서 활성을 측정한 결과 Fig. 8-D에서 와 같이 50°C까지는 활성감소가 별로 없었고, 60°C와 70°C에서 10 분 경과시 약 50%와 65%의 효소활성 감소가 관찰되었으나, 이후 시간이 경과 할수록 활성감소는 완만하였다. 정과 박[43]은 *Aspergillus awamori*의 protease가 50°C이하의 온도에서 안정하였고 최 등[44]은 *Aspergillus* sp.의 protease가 40°C이상의 온도에서는 불안정 하였다고 보고한 것에 비하면 본 효소는 열에 상당히 안정한 편이었다.

금속 이온의 영향 : 금속 이온이 효소 활성에 미치는 영향을 검사하기 위하여 각종 금속 이온들과 효소액을 혼합하고 30°C에서 1 시간동안 방치한 뒤 효소 활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 본 효소는 Na^+, Mg^{2+}와 Mn^{2+}에 의해서 활성이 촉진되었으며, Hg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}와 Pb^{2+}등에 의해서 상당한 저해를 받았다. 이 는 *Streptomyces*의 protease가 Hg^{2+}, Pb^{2+} 등에 의해 저해되었다는 차 등[45] 의 보고와 비슷하였다.

활성 저해제의 영향 : 효소액에 각종의 활성 저해제를 첨가하여 30°C에서 1 시간동안 전 처리한 후 잔존 활성을 측정한 결과 Table 4와 같이 EDTA와 PMSF에 의해서 활성저해가 관찰되었다. EDTA는 금속이온과 결합하여 chelate를

Table 3. Effect of metal ion on the activity of protease produced by *Aspergillus* sp. MS-18

Ion(10 mM)	Metal	Activity	
		Unit	%
None	--	4.02	100.00
Cu^{2+}	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2.35	58.39
Zn^{2+}	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.85	45.96
Ca^{2+}	$CaCl_2$	3.87	96.27
Pb^{2+}	$Pb(CH_2COO)_2$	2.27	56.39
Mn^{2+}	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	5.77	143.48
Hg^{2+}	$HgCl_2$	2.30	57.28
Mg^{2+}	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4.35	108.08
Fe^{2+}	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	3.45	85.71
Ba^{2+}	$BaCl_2 \cdot H_2O$	3.80	94.41
Na^+	NaCl	4.25	105.59
K^+	K_2SO_4	3.72	92.55

The reaction mixture, consisting of 0.5 m*l* enzyme solution and 0.5 m*l* metal ion solution(20 mM), was incubated at 35°C for 5 hrs and the residual activity was assayed.

Table 4. Effect of various inhibitors on the activity of protease produced by *Aspergillus* sp. MS-18

Activity	Inhibitor (10 mM)	
	Unit	%
None	3.72	100.00
2,4-Dinitr ophenol	3.68	98.97
Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)	0.98	26.29
Phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)	1.34	36.08
ε-Aminocaproic acid	3.66	98.45
ρ-Chloromercuribenzoic acid	3.25	87.37

The reaction mixture, consisting of 0.5 m*l* enzyme solution and 0.5 m*l* inhibitor solution (20 mM), was incubated at 30°C for 1 hr and the residual activity was assayed.

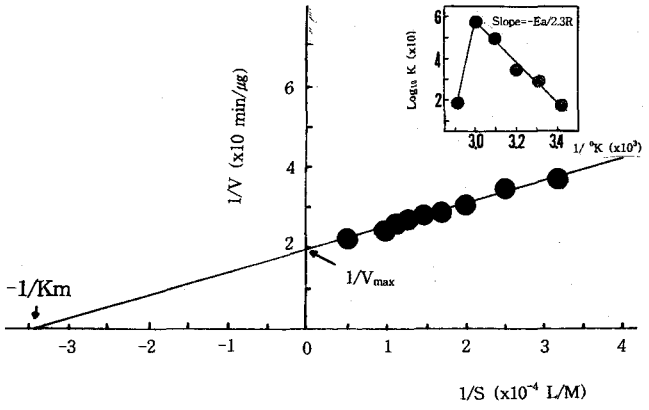

Fig. 9. Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of substrate by the purified protease from the culture of *Aspergillus* sp. MS-18.

형성하고 PMSF의 경우 효소활성 중심에 serine 잔기가 있을 경우 이를 저해하는 바, 본 효소는 serine protease로 추정되었다. EDTA 첨가에 의해 효소 활성이 급격히 저해되는 것으로 보아 금속 이온이 active site에 필수적인 것으로 추측하였으며, 저해 물질의 첨가농도가 증가할수록 활성 저

해 현상은 뚜렷이 나타남을 관찰할 수 있었다.

Km, Vmax : Protease의 기질에 대한 친화력을 조사하기 위하여 Line- weaver- Burk plot로 Km치와 Vmax를 측정한 결과는 Fig. 9와 같이 Km치는 29.33 μmole/L였으며 Vmax는 5.13 μg/min이었다.

활성화 에너지 : Protease의 활성화 에너지를 측정하기 위하여 20℃에서 70℃의 범위에서 온도 변화에 따른 효소활성을 Arrhenius방정식에 의해 plot한 결과는 Fig. 9의 상단에 나타나있는 바와 같이 활성화 에너지는 4.417 Kcal/mol이었다.

참고문헌

1. World Conference on Vegatable Food Proteins, Amsterdam (1979) *J. Am. Oil. Chem. Soc.,* **56**, 99.
2. King, J., C. Aguirre and S. De Pablo (1985) Functional properties of lupin protein isolates(Lupinus albus cv Multolupa), *J. Food Sci.,* **50**. 82-86.
3. Yang, C. I. (1980) Studies on the nutritional quality of rapeseed protein isolates, *Korean J. Food Sci.Technol.,* **12**, 109-115.
4. Kim, J. P., W. M. Shin and C. I. Kim (1980) Separation and composition of scsame meal protein. *J. Kor. Agric. Chem. Soc,* **23**, 14-20.
5. Shin, H. S. (1973) Chemical and nutritional studies of *Sesamum indicum. J. Korean Soc. Food Nutr.,* **5**, 113-118.
6. Choi, C., Y. J. Cho, G. M. Son, S. I. Lim and W. J. Lee (1989) Effect of pH and salts on protein and phytatc solubility of defatted sosame meal. Yeungnam Univ. *J. of Resource Development,* **8**, 85-90.
7. Nilo R., J. E. Dench and J. C. Caygill (1981) Nitrogen extractability of sesame (*Sesamum indicum* L.) seed and the preparation of two protein isolates, *J. Sci. Food Agric.,* **32**, 565-570.
8. Boloorforooshan, M. and P. Markakis (1979) Protein supplementation of navy bean with sesame, *J. Food Sci.,* **44**, 390-397.
9. Brito, O. J. and N. Nunez (1982) Evaluation of sesame flour as a complementary protein source for combinations with soy and corn flours, *J. Food Sci.,* **47**, 457-465.
10. El, T. A. H., A. H. Khattab and M. O. Khidir (1976) Protein and oil compositions of sesame seed, *J. Am. Oil Chem. Soc.,* **53**, 648-655.
11. Robert, L. A., J. W. Walter and G. Donald (1973) Extraction of soybean meal proteins with salt solutions at pH 4.5, *J. Agric. Food Chem.,* **21**, 251-254.
12. De Pauda, M. R. (1983) Some functional and utilization characteristics of sesame flour and proteins, *J. Food Sci.,* **48**, 1145-1153.
13. Chang, C. W. (1967) Study of phytase and fluoride effects in germinating corn seeds, *Cereal Chem.,* **44**, 129-132.
14. Adler-Nissen, J. (1976) Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility, *J. Agric. Food Chem.,* **24**, 1090-1093.
15. Kim, S. Y., P. S. Park and K. C. Rhee (1990) Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate, *J. Agric. Food Chem.,* **38**, 651-664.
16. Montecavalvo, J. JR., S. M. Coonstantinides and C. S. T. Yang (1984) Enzymatic modification of fish frame protein isolates, *J. Food Sci.,* **49**, 1305-1311.
17. Lee, C. H., H. R. Kim, J. S. Lee and Y J. Kang (1982) Effects of external conditions on the emulsifying property of proteins. *Korean J. Food Sci. Tech.* **14**, 49-53.
18. Edwards, J. H. and W. F. Shipe (1978) Characterization of plastein reaction products formed by pepsin, α-chymotrypsin, and papain treatment of egg albumin hydrolysates, *J. Food Sci.,* **43**, 1215-1222.
19. Kang, Y. J., K. C. Rhee and Y. H. Park (1988) Hydrolysis of 7S and 11S Soy Proteins By commercial Proteases, *Korean J.Food Sci. Tech.,* **20**, 338-343.
20. Kang, Y. J. (1984) Enzymatic modification of soy proteins: Effects of functional properties of soy isolate upon proteolytic hydrolysis, *Korean J. Food Sci. Tech.,* **16**, 211-217.
21. Quaglia, G. B. and E. Orban (1990) Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (Sardina pilchardus) protein hydrolysates, *J. Food Sci.,* **55**, 1571-1575.
22. Kim, C. H., H. S. Kim, J. S. Lee and Y. J. Kang (1992) Funtionality changes of rapesccd protein upon proteolysis. *J. Korean Soc. Food Nutr.,* **21**, 519-523.
23. Yoo, J. S. and S. R. Lee (1988) Efficacy of enzyme trcatment for the quality improvement of soumilk. *Korean J. Food Sci. Tech.,* **20**, 426-432.
24. Lee, S. H., Y. J. Cho, S. Kim, B. J. Ahn and C. Choi (1995) Optirnal conditions for the enzymatic hydrolysis of isolated sesarne meal protein. *Korean J. Food Sci. Tech.,* **38**, 248-253.
25. Cha, M. H. and S. Yoon (1993) Modification of funtional properties of soy pretein isolate by proteolytic enzymes. *Korean J. Food Sci. Tech.,* **25**, 39-43.
26. Lee, S. M. and Z. U. Kim (1990) Extraction of proteins from soymilk residueusing the enzymes from *Bacillus subtilis. Kor. Agric. Chem. Soc.,* **33**, 282-286.
27. Jung, Y. S., Y. Cho and S. H. Han (1982) Studies about acid protease of *A. tubingensis Kor. J. of Appl. Microbiol. and Biotech.,* **20**, 105-112.
28. Cha, W. S., Y. J. Cho and C. Choi (1989) Production and purification of alkaline protease from *Aspergillus fumigatus. J. Korean Soc. Food Nutr.,* **18**, 279-286.
29. Kazuo S., K. Shimada and K. Matsushima (1985) Purification and some properties of serine proteinase from a mutant of *A. niger, J. Ferment. Technol.,* **63**, 479-483.
30. Shigeki F., K. Nakamura, M. Miyahira and M. Kurata (1988) Some properties of two proteinases from a luminous bacterium Vibrio harveyi strain FLN-108, *Agric. Biol. Chem.,* **52**, 3009-3014.
31. Don, A. C., M. D. Roy and W. M. Hugh (1987) A comparison of extracellular serine proteases from four strains of Thermus aquaticus, *Fems Microbiology Letters,* **45**, 155-159.
32. Choi, C., Y. G. Jung, S. K. Sung, K. S. Choi, J. S. Lee, Y. J. Cho and O. J. Kwon (1992) Production and puriication of alkaline protease from *Streptomyces* sp. *Kor. J. of Appl. Microbiol. and Biotech.,* **18**, 279-286.
33. Department of Food Engineering Younsei University (1970)

Experiments in Food Science and Engineering, 122-124, Tamgudang.
34. Lowry, O. H., N. J. Rosebrogh, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-271.
35. Anson, M. L. (1938) The estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *J. Gen. Physio.*, **22**, 79-85.
36. Hagwara, S. (1956) Method of Enzymatic Analysis Vol. 2, 237-246, Tokyo, Japan.
37. Davis, B. J. (1964) Disc electophoresis II. Method and application of human serum protein, *Ann New York Acad. Sci.*, **121**, 404-409.
38. Weber, K. and M. Osborn (1969) The reliability of molecular weight determination sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4411.
39. Koneman, E. W., G. D. Roberts and S. E. Wright (1979) Partical labolatoy mycology, p.20-21, The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
40. Choi, C., Y. G. Jung, S. K. Sung, K. S. Choi, J. S. Lee, Y. J. Cho and O. J. Kwon (1992) Production and puriication of alkaline protease from *Streptomyces* sp. *Kor. J. of Appl. Microbiol. and Biotech.*, **18**, 279-286.
41. Kazuo S., K. Shimada and K. Matsushima (1985) Purification and some properties of serine proteinase from a mutant of *A. niger, J. Ferment. Technol.*, **63**, 479-483.
42. Tadanobu N., S. Nasuno and N. Iguchi (1973) Purification and properties of alkaline proteinase from *Asp. oryzae, Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2685-2694.
43. Jung, M. J. and N. K. Park (1979) Studies on the proteolytic enzyme of mold (part 1) Production of acid protease by *Aspergillus awamori* U-3 and characteristices of enzyme. *Kor. J. of Appl. Microbiol. and Biotech.*, **7**, 157-164.
44. Choi, C., D. K. Kim, Y. J. Cho and T. S. Sung (1990) Characteristics and purification of alkaline protease from *Aspergillus* sp. CC-29. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **19**, 434-442.
45. Cha, W. S., J. H. Park, Y. J. Cho and Y. W. Son (1991) Biological characteristics of alkaline protease from *Streptomyces* sp. JH-309. *Thesis collection Sangju National Polytechnic Univ.* **1**, 233-240.

Characteristics of Microbial Protease for Application to Abolished Protein Resource

Sung-Sook Chun, Young-Je Cho[1], Tae-Soo Sung[2], Jun-Ho Son and Cheong Choi* (*Dept. of Food Science & Technology, Yeungnam University, Gyungsan 712-749, Korea; [1]Dept. of Food Engineering, Sangju National Polytechnic University, Sangju 742-170, Korea; [2]Dept. of Food Nutrient, Changwon Junior College, Changwon 641-180, Korea*)

Abstract : To extract insoluble proteins and to improve funtional properties of abolished proteins, a protease producing *Aspergillus* sp. MS-18 was isolated from soil. The enzyme was purified and its enzymological characteristics were investigated. It was found that production of protease reached to the maximum when the wheat bran medium containing 3% arabinose, 0.5% polypepton, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$ and 0.2% magnesium chloride was cultured for 3 days. Protease was purified 16.9 folds after ion exchange chromatography and gel filtration and the specific activity was 340.4 unit/mg. Purified enzyme was confirmed as a single band by the polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of protease was estimated to be 30,000. Crystalization form of purified protease was a stick shape with rounding edges. The optimum pH and temperature for the protease activity were 9.0 and 60°C, respectively. The enzyme was stable in pH 7.0-12.0 at 50°C. The activity of purified enzyme was inhibited by Hg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} and Pb^{2+}, whereas it was activited by Na^{+}, Mg^{2+} and Mn^{2+}. The activity of the protease was inhibited by the treatment with ethylenediaminetetraacetic acid and phenylmethane sulfonyl fluoride. The result suggests that the purified enzyme is a serine protease with metal ion at active site. Km and Vmax of purified protease were 29.33 μmole/L and 5.13 μg/min, respectively.

Key words : abolished protein, microbial protease, purification, characteristics
*Corresponding author