

컬럼크로마토그래피에 의한 아스퍼질러스 계통의 α -아미라제 및
프로테아제의 결정화(제 1 보)

—*Aspergillus oryzae* S.H.W. 131의 Neutral Protease 에
대한 결정화 및 理化學的 性質—

徐 恒 源
(太平洋化學工業株式會社 酵素生産課)

Crystallization of α -Amylase and Protease of *Aspergillus*
oryzae from Column Chromatography (I)

—Crystallization and Chemical Properties of Neutral
Protease of *Aspergillus oryzae* S.H.W. 131. —

SUH, Hang Won

(Section of Enzyme Product, Pacific Chemical Co., Ltd.)

ABSTRACT

Neutral protease which was obtained from a genus of *Aspergilli* as the crystal form were investigated for their purification and properties. The results of biochemical and enzymatic studies for their purification and properties in this enzyme were as follows.

1) On the wheat media containing 70%-water and CaCO_3 , *Aspergillus oryzae* S.H.W. 131 is satisfactorily grown under the basic optimum conditions temperature $27^\circ\text{C}\sim 30^\circ\text{C}$ at relative humidity 100% for three days.

2) The enzyme solution extracted with water is successively purified through the passing on column of Asmti-177N for decolorization of it. And ion exchanger such as DEAE-Sephadex A-50 or Shepadex G-100 and fraction collector is necessary for the separate treatments of this enzyme. After washing it with organic solvents as acetone-EtOH, etc., it should be dried on the vacuum dryer at 40°C .

3) The protease activity is determined by the amounts of amino acids, tyrosine.

4) The optimum pH of neutral protease is 6.0~8.0.

5) In effectively decomposing with this neutral protease, the optimum temperature is 35°C .

6) It is interesting that the amounts of metal ion affects the activity of neutral protease.

For example, if it were treated with manganic ion, its activity would be more effective than any other that.

緒 論

絲狀菌이 生産하는 protease 系가 豫想以外
로 複雑한 酵素組成을 가지고 있는바, 最近

많은 研究者의 報告가 있는 것으로 알고 있
으나 酵素化學의 性質이 明確하게 糾明된 것
은 아직 없다. 사상균의 protease 精製는 1950
년에 Crewther에 의한 protease 精製와 赤堀四

郎 등이 rivanol 結合에 의한 정제, 天野 등에 의한 acid Taka-protease 及 alkaline protease 의 結晶化 등이 알려져 있다.

吉田은 黑麴菌으로 耐酸性 protease 를 精製 結晶化하였고, 吉村은 樹脂로서 protease 를 精製 結晶化하였으며, 近年에 와서 精製 結晶 및 理化學의 性質에 關한 研究가 많은 學者들에 의해 活發히 進行되고 있다.

本 研究는 當研究室에 保管되어있는 *Aspergillus oryzae* S.H.W. 131로부터 酸性, 中性 및 알칼리성 protease 를 分離 精製하였는바, 그 중에서 中性 protease 의 結晶化 및 酸素化學의 性質에 對하여 報告하고자 한다.

材料 및 方法

1) 使用菌株: *Aspergillus oryzae* S.H.W. 131

2) 抽出液의 調製

밀기울 3kg 와 CaCO_3 30g 을 잘 配合하여 다시 증류수 2.1 l 를 加한 後 均一하게 混合, 120°C 에서 30分間 滅菌 處理한다.

미리 100ml 용 flask 의 밀기울에 培養된 種菌을 接種한 原料밀기울을 大型 알미늄製 甕에 높이 3.5cm 되게 넣은 다음, $27^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ 에서 3일간 배양하여 그 麴을 細粉하고, 約 15 l 의 蒸溜수를 加하여 30°C 에서 약 2시간동안 保存한 後 可溶性 性分만을 抽出하여 遠心脫水機로 濾過한 後 그 濾液을 粗酵素液으로 使用하였다.

3) 硫酸鹽析

上記 粗酵素液 10 l 에 0.3 飽化되게 硫酸을 서서히 넣으면서 攪拌 溶解시킨 後 30°C 에서 24시간 放置後 吸引濾過機에서 沈澱物을 除去하고 濾過된 액에 硫酸을 0.75 飽和되게 같은 方法으로 處理하여 얻은 酵素를 40°C 에서 眞空乾燥시켜 使用하였다.

4) 脫鹽

上記 乾燥된 粗酵素를 500ml 蒸溜수에 溶解시킨 後 直徑 75cm, 길이 630cm인 column 에 Sephadex G-25 를 充填시킨 後 同粗酵素液을 서서히 落下시켜 完全히 脫鹽된 粗酵

素液을 使用한다. (確認은 2% BaCl_2 로 한다)

5) 脫色

脫鹽하여 얻은 약 600ml 의 粗酵素液을 Asmit-173N 으로 充填시킨 直徑 3.5cm 길이 78cm 인 column 에 M/100-acetate buffer 로 洗滌하여 通過시켜 脫色 處理한다.

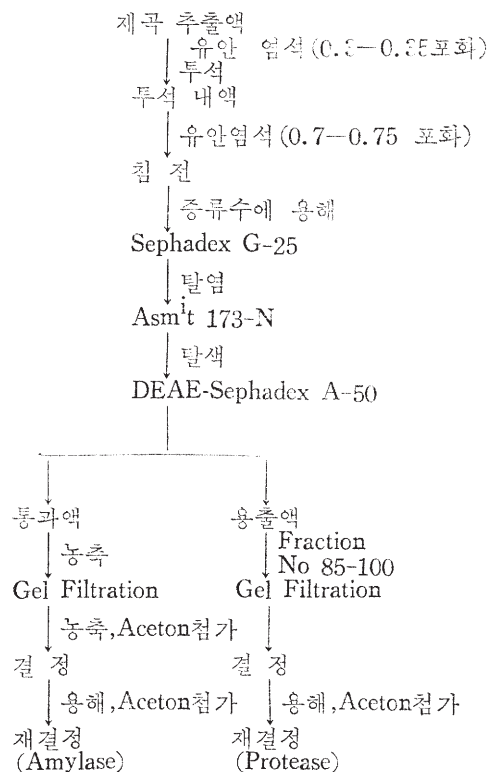


Fig. 1. Purification Scheme of α -amylase and of Protease

6) Ion exchange에 의한 吸着 및 溶離.

5)에서 脫色된 粗酵素液을 弱鹽基性 Anion-exchange 로 處理한다.

豫備로써 M/100-Acetate buffer (pH 5.0)에 完衛된 DEAE-Sephadex A-50 을 column (직경 3cm, 길이 35cm)에 充填시켜 終末濃도가 M/100-pH 5.0 이 되게 하고, 같은 完衛液으로써 完衛시킨 효소액 600ml 을 S.V ≈ 2 의 速度로 展開시킨 後 吸着된 酵素를 0.5M/NaCl로 溶出시키면서 fraction collector 에 의하여 5ml 씩 分離하여 pH가 다른 蛋白質을 取해 protease I 을 분리하였고, 또한

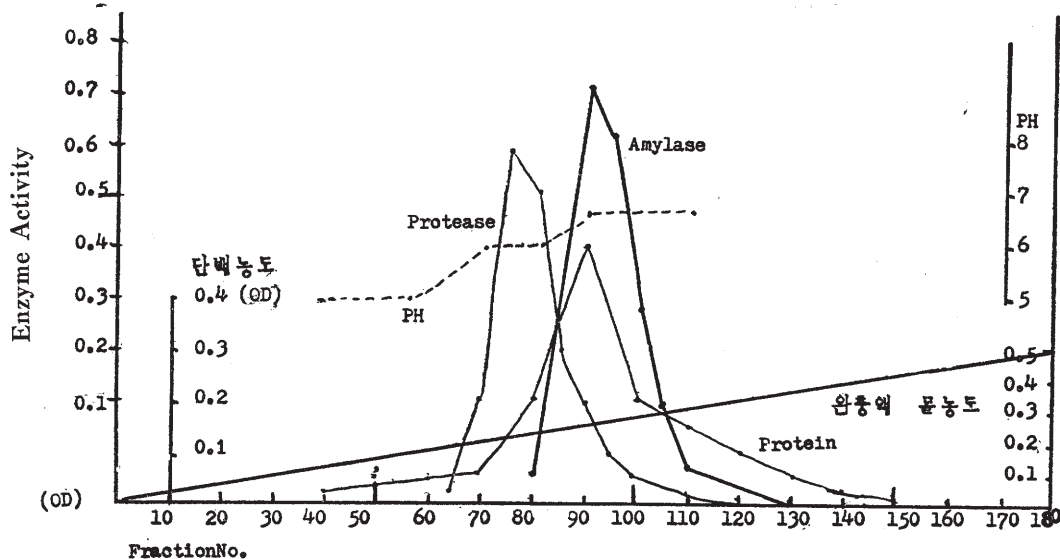


Fig. 2. Amylase and Protease absorbed by DEAE-Sephadex A-50

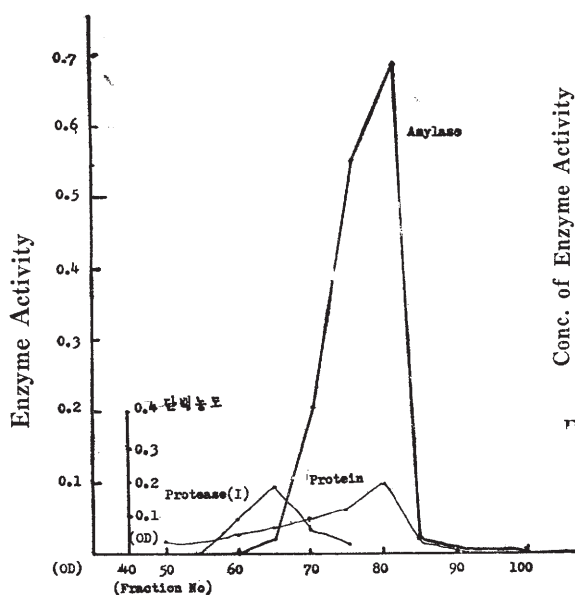


Fig. 3. DEAE-Sephadex Fraction(Fraction No. 85-110)

通過된 酵素液은 polyethylene glycol 로濃縮시켜(약 15ml 되게) Sephadex G-100 의樹脂로 gel filtration 시켰다. 方法은 直徑 3cm, 길이 2m 인 column 에 Sephadex G-100 을 充填시키고 M/100-pH 5.0 acetate buffer 로 完衡시킨 後 S.V=1 의 速度로 展開시키면서 fraction collector 로써 5ml 씩 受取 分

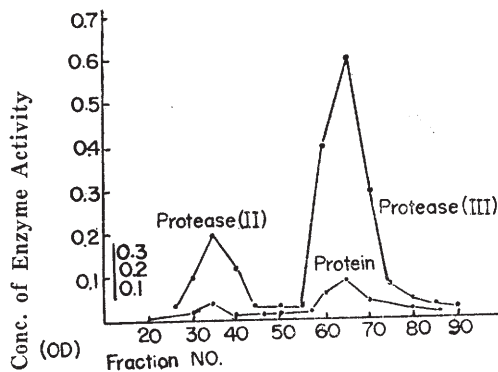


Fig. 4. Gel Filtration from DEAE-Sephadex A-50.

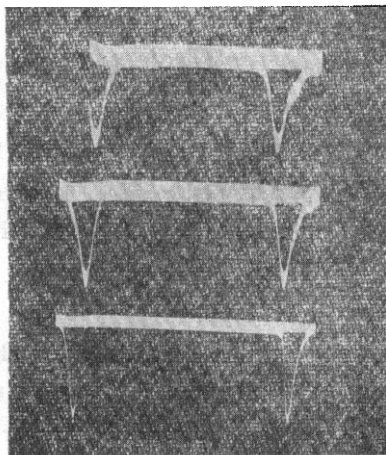


Fig. 5. Electrophoresis of neutral protease

離시켜 protease II와 III 를 각각 분리하였다.
(Fig. 4. 參照).

7) 結晶化

6)의 處理로 얻은 酵素液을 蛋白濃도가 약 4~5%되게 濃縮시킨 후 冷却하여 서서히 冷아세톤을 添加하면서 氷室에서 약 4日만에 結晶을 얻었다.

8) 電氣泳動

結晶화된 protease 를 遠心分離하여 35% 冷아세톤에 完全히 洗滌한 후 蒸溜수에 溶解해서 Tiseluis 型 電氣泳動裝置에 의해서 分析하였다.

(泳動條件)

pH 6.0 磷酸完衡液($\mu=0.12$)

蛋白濃度 1.2%

7mA, 51V, 4°C

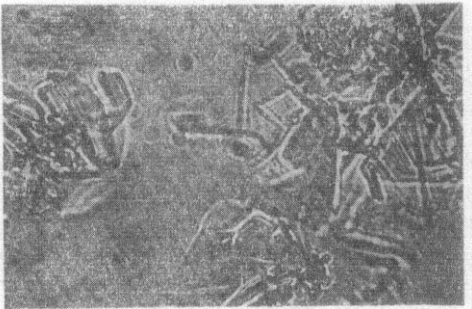


Fig. 6. Crystallization of Neutral Protease.

結果 및 考察

1. 酵素活性

1) Protease 力價의 測定方法은 milk casein 을 基質로 하는 Folin 呈色法에 의한 波長 660m μ , 層長 10mm에 의한 吹光度 (O.D.)를 測定하여 酵素單位는 1分間에 1 μ g tyrosine 相當의 吸光度를 表示한 酵素力價로서 Fig. 2. 에서 나타내어진 결과와 같다.

2) pH와 酵素活性

*Aspergillus oryzae*의 結晶溶液을 milk casein 基質로써 pH 別 活性을 測定하였던바 pH 7.0에서 酵素의 活性도가 제일 높음을 보여 주고 있다(Veronol Buffer).

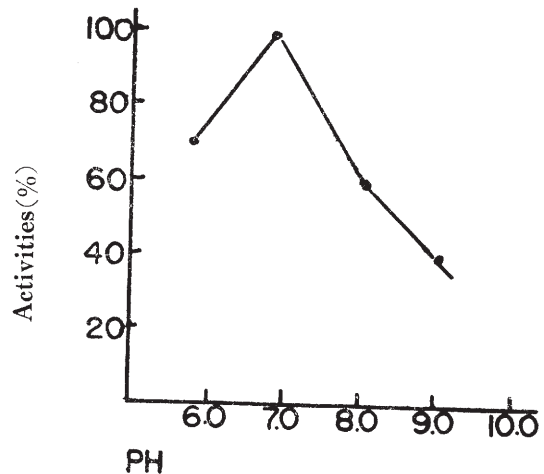


Fig. 7. Activities relating to pH changes.

2. pH의 安定性

結晶酵素의 pH 安定性은 結晶溶液 1ml 에 各種 pH의 完衡液(Veronol buffer) 1ml을 加하여 各各 別途로 30°C에서 24시간 保管後 그 處理液을 pH 7.0의 milk casein 基質로 하여 殘存活性을 測定하였더니 Fig. 8.에서 볼수 있는 바와 같이 pH 5.0~9.0사이에서 安定성을 나타내었다.

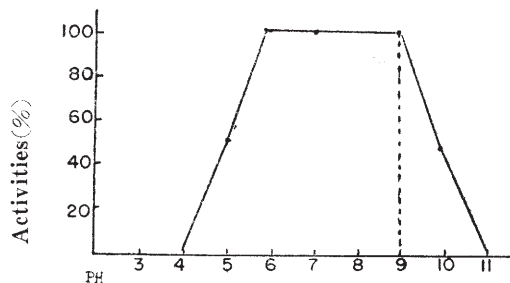


Fig. 8. Stabilities relating to pH changes

3. 作用温度와 酵素活性

各温度에 따른 活性變化는 測定結果 35°C에 最適을 나타내었다. 그 결과는 Fig. 9.에서 나타내어진 바와 같다.

4. 耐熱性

結晶溶液(단백농도 0.04%)을 40°C부터 65°C까지 各種温度에서 15分間 保管하였다가 急冷하여 處理한 殘存活性을 측정한 결

과는 40°C 근처에서 최대치를 보여주다가 얻었다.
온도가 상승함에 따라 반비례하는 결과를

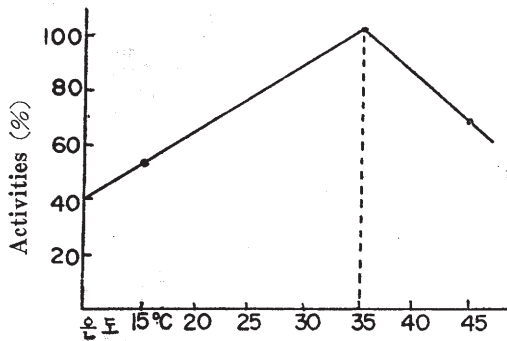


Fig. 9. Relationships between Thermal effects and Enzyme activities

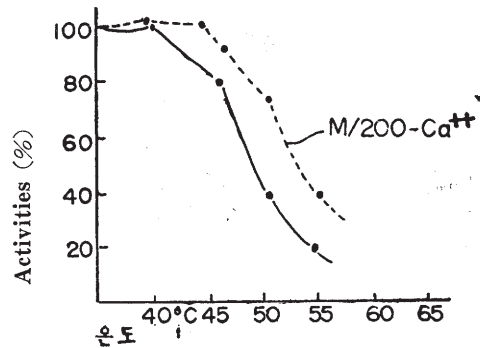


Fig. 10. Relationship between Thermal tolerancy and Enzyme activities.

5. EDTA에 對한 影響

pH 7.0 M/50-Veronol buffer에 EDTA M/100 용액이 되게 용해시켜 9ml의 EDTA와 結晶酵素液 1ml을 30分, 60分, 3시간, 24시간 保存하였다가 殘存活法을 測定한 결과는 Fig. 11.과 같은데 比較區는 變化가없음에 比하여 處理區는 3時間後 活性도가 떨어졌다.

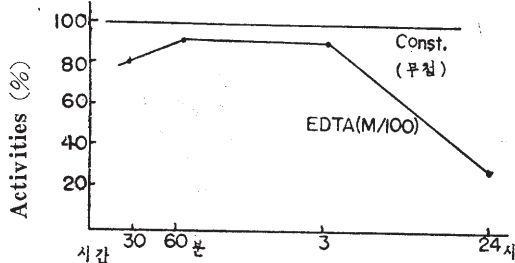


Fig. 11. Effects of EDTA affecting to the Enzyme activities

6. 金屬 ion의 影響

pH 7.0 M/100-Veronol buffer에 各金屬 ion을 M/100 되게 調製한 後 30°C에서 60分間 定置하였다가 活性度를 上記 方法으로 測定한 결과는 Fig. 12.에서 나타내어진 결과와 같았다.

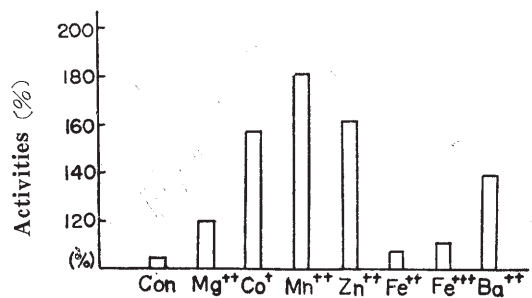


Fig. 12. Effects of Metal ions affecting to the Enzyme activities.

摘 要

Aspergillus oryzae S.H.W.131의 菌株을 水分含有量 70%되게 CaCO₃ 小量을 添加한 밀기울 培地에서 3日間, 溫度 27°C~30°C, 濕度 100%로 調節하면서 培養한 結果 酸性, 中性, 알카리성 三種의 protease를 얻었다.

그중 中性 protease를 특별히 脫色, 脫鹽 處理한후 ion 交換樹脂 및 fraction collector를 利用, 分離하여 結晶酵素를 얻었다.

이 結晶酵素에 對하여 酵素的化學的 及 理化學的 實驗結果 다음과 같은 事實을 얻었다.

1. 結晶은 觀察結果 四面體인 것이 判明되었다.
2. 中性 protease는 거의 完全한 單一 蛋白質인 것이 Tiseluis 電氣泳動機에 依해 確認되었다.

3. 中性 protease 는 重金屬 ion 에 對해 많은 保護作用을 가지며 특히 Mn^{++} 에 對해서는 그 活性度가 거의 倍나 높은 것이 確認되었다.
4. 耐熱性에 있어서도 $M/200 Ca^{++}$ 을 添加한 것이 다른것 보다 耐熱性이 높은 것이 判明되었다.
5. 最適作用 溫度는 實驗結果 $35^{\circ}C$ 이며 安定 pH 범위는 6.0~8.0이다.

引 用 文 獻

1. F. Yoshida and M. Nagasawa. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 20, 252
2. Ibid. 1956. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 20, 257
3. W.G. Crewther, F.G. Lennox. 1950. Nature, 165, 680
4. 赤堀四郎, 蔭隙二, 池中德治, 迫田直一. 1953. 酵素化學 8, 49.
5. T. Amano, S. Isojind, H. Fujio. 1953. Med. Journ. of Osaka Univ., 4, 255.
6. 吉田文産. 1954 農化, 28, 66
7. 吉村貞彦, 團野源一. 1964. 農化, 38, 4.
8. Y. Nunokawa. 1965. Agr. Biol. Chem., 29, 687.
9. 布川彌郎, 難波病之祐, 衣山陽二. 1962. 農化 36, 879.
10. 松島欽一 島田協. 1962. 農化 36, 3.
11. 福本壽一. 1958. 農化 32, 233.
12. 辻阪好夫. 1967. 科學과 工業 第642권.
13. 岩井美枝子. 1965. 大阪市立工業研究所報告 Vol. 49.
14. 辻阪好夫. 1960. 大阪市立工業研究所報告 Vol. 23.
15. 鷄大典. 1967. Agr. Biol. Chem. 30, 1261