

Alteromonas sp.가 생산하는 alkaline protease의 특성

여인옥² · 최성현¹ · 이재숙¹ · 김찬조^{1*}

¹충남대학교 식품공학과, ²광동제약 주식회사 중앙연구소

초록 : 알칼리성 protease를 생산하는 균을 고추장에서 분리하여 *Alteromonas* sp. CN301로 동정하고 그 알칼리성 protease를 생산하여 정제효소의 성질을 조사한 결과, 최적 pH 12.0, 최적 온도 35°C 이었으며 pH 안정성은 pH 6.0~13.0 범위에서 80% 이상의 잔존효소 활성을 나타냈고 50°C 에서 1시간 처리로 64%의 활성을 보였다. SDS-PAGE에 의한 분자량은 31,000 dalton이었고 Hg²⁺를 제외한 다른 금속이온에 대해서는 저해를 받지않았다. 계면활성제인 Triton X-100, Tween 20과 80은 이 효소의 활성을 상승시키는 효과를 보였으며 EDTA와 PMSF에 의하여 효소활성이 저해되므로 효소분자 중에 금속이온을 가지는 serine protease로 생각되었다(1994년 12월 9일 접수, 1995년 2월 20일 수리).

서 론

근래 호알칼리성 미생물이 생산하는 각종 알칼리성 효소에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다^{1,6}. 알칼리성 protease에 관한 연구는 1960년대 말 부터 시작되어 *Bacillus*속 세균이 생산하는 alkaline serine protease에 관한 것이 대부분이었으나², 그 후 곰팡이, 효모, 방선균 등에 의한 생산이 계속 보고되고 있다^{3,3}. 이와 같은 알칼리성 protease는 피혁가공, 의약, 세제용 등으로 널리 사용되며 이 중 세제용이 가장 많은 비율을 차지하고 있다. 세제용 protease의 조건은 pH 9.0~11.0의 강알칼리에서 잘 작용하며, 계면활성제, 형광염료, 표백제 및 향료 등 성분에 의한 실활이 적으며, 세탁 온도에서의 활성이 유지 되어야 한다. 또한 기질 특이성이 낮아 단백질 내부의 peptide 결합을 절단하는 작용이 우수 할 것 등이다.

본 연구에서는 알칼리성 protease를 생산하는 호알칼리성 세균을 분리 동정하고 이 균의 알칼리성 protease의 생산 조건 및 정제 효소의 성질을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 효소 생산 배지

여러 지역의 토양, 장류 및 젓갈 등의 열장 식품들을 분리원으로 하여 알칼리성 protease 생산 균주를 분리 동정하고 pH 9.5, 30°C 에서 48시간 배양 (glucose 1.0%, soytone 0.3%, pepton 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄H₂O 0.02%, Na₂CO₃ 0.5%, pH 9.5) 여액을 조효소액으로 하였다.

단백질 분해 효소의 활성 측정 및 효소 단위

Protease의 활성은 Anson변법⁷으로 측정하였다. 즉 0.05 M NaHCO₃·NaOH buffer(pH 12.0)에 녹인 0.6% milk

casein용액 2.5 ml에 조효소액 0.5 ml를 가하여 30°C 에서 10분간 반응시킨 후 TCA mixture (58% TCA 36 ml, 1 M CH₃COONa 220 ml, 1 M CH₃COOH 330 ml)의 혼합액에 증류수를가하여 1l로한다)2.5 ml를가하여30°C 에서30분간 방치한 다음 여지로 여과한 후 여액 1ml에 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 ml와 Folin시약(3배 희석한 것) 0.5 ml을 가하여 30°C 에서 30분간 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소의 단위는 조효소액 1ml에 의해 1분간에 1μg의 tyrosine에 상당하는 Folin 발색성의 단백질 분해 물질 생성을 1 단위로 하였다.

단백질 분해 효소의 정제

배양액을 8,000×g로 15분간 원심분리하여 균체를 제거하고 그 상정액에 Ammonium sulfate를 60% 포화시켜 4°C 에서 overnight시키고 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 10 mM phosphate buffer(pH 8.0)로 회수하고 동일 buffer에 12시간 투석하여 PEG 6,000으로 농축한 다음 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 chromatography와 Sephadex G-150 column chromatography를 하여 정제 하였다.

단백질 정량

단백질 함량은 Lowry변법⁸으로 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 정량하였고, 정제 과정에서 단백질은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

결과 및 고찰

선정 균주의 동정

선정 균주를 Cappuccino와 Sherman⁹의 방법에 따라 배양학적 및 생리학적 특성을 검토하여 본 결과 Gram

찾는말 : *Alteromonas* sp., alkaline protease, serine protease

*연락처

Table 1. Summary of the purification steps of the alkaline protease.

Purification step	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)	Purification factor (fold)
Crude enzyme	2,030	2,314	419,195	181	100	1
Ammonium sulfate precipitation	100	32	65,870	2,058	16	11
DEAE-Sephadex A-50	64	7.7	39,715	5,171	9.5	29
Sephadex G-150	33	1.3	10,135	7,796	2.4	43

Protein contents were determined by Lowry's method.

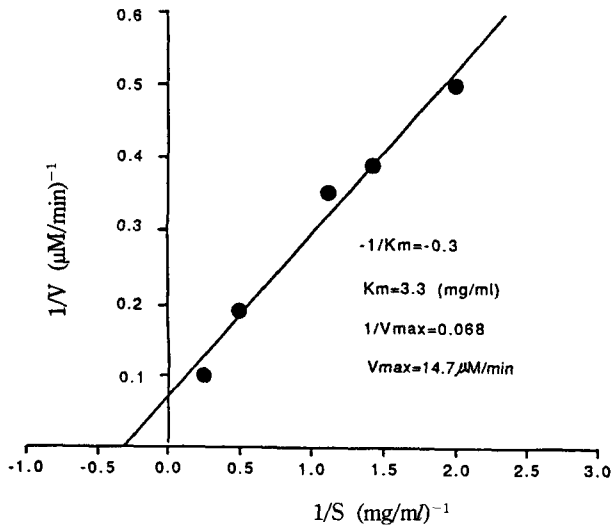


Fig. 1. Lineweaver-Burk plot for the determination of Michaelis-Menten constant of the protease.

음성의 간균으로 운동성이 있었고 생육 최적 온도와 pH는 27°C 와 pH 10이었다. 전분과 젤라틴을 액화할 수 있었고 glucose와 galactose 등의 당류를 자화할 수 있었으며 균체색이 노란색을 띄는 특징이 있었다. Krieg¹⁰⁾의 방법에 따라 동정한 결과 *Alteromonas* sp.로 추정되었으며, 이후 본 균주를 *Alteromonas* sp. CN301로 기재한다.

효소의 정제

Alteromonas sp. CN301의 알칼리성 protease의 정제 결과는 Table 1과 같았다. 정제 효소를 Laemmli 등¹¹⁾의 방법에 따라 polyacrylamide gel 전기영동하여 단일 밴드를 확인하였다.

Michaelis 정수

Michaelis 정수(Km 값)를 Lineweaver-Burk의 방식에 따라 구한 결과 Fig. 1에 보인 바와 같이 3.3 mg/ml이었다.

최적 온도 및 pH

정제효소의 최적온도와 pH는 Fig. 2, 3에서 보인 바와 같이 각각 35°C, pH 12.0이었다.

Horikoshi 등²⁾은 *Bacillus* sp.의 alkaline protease가 60°C, pH 11.5에서 최적이었다고 보고하였으며, Nakanishi

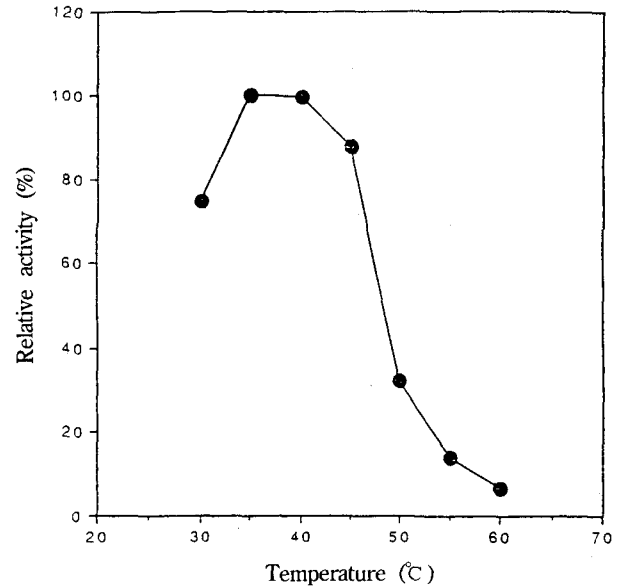


Fig. 2. Effect of reaction temperature on the protease activity. Protease activity was determined at pH 12.0 by a modification of the method which was originally described by Anson, using 0.6 % casein as substrate.

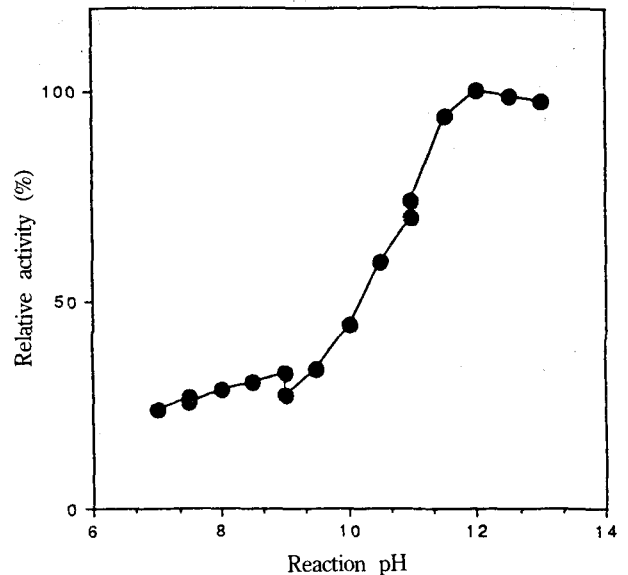


Fig. 3. Effect of pH on the protease activity. Enzyme assay method refers to Fig. 2 except for pH: Variation of pH for the reaction mixture was attained by employing the buffers, 0.05 M McIlvaine buffer for pH 7.0~7.5, 0.05 M Tris-HCl buffer for pH 7.5~9.0, 0.05 Boric acid-NaOH buffer for pH 9.0~11.0, and 0.05 M NaHCO₃-NaOH buffer for pH 11.0~13.0.

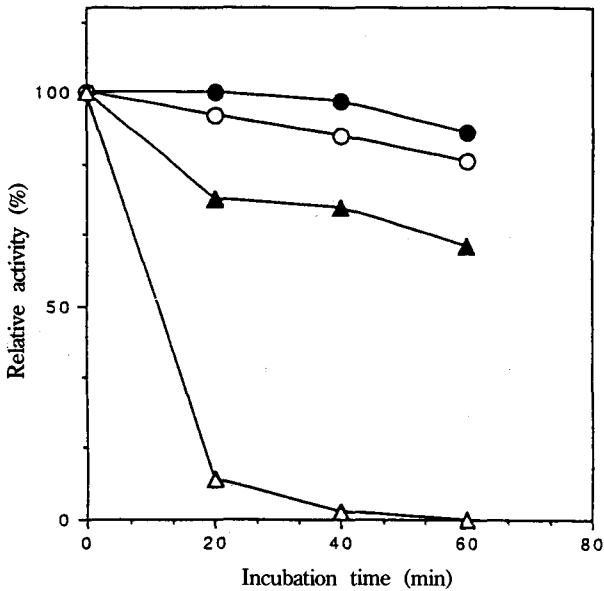


Fig. 4. Thermostability of the alkaline protease. The enzyme solution was preincubated at various temperature and the enzyme activity was measured with time intervals. 30°C, ●-●; 40°C, ○-○; 50°C, ▲-▲; 60°C, △-△

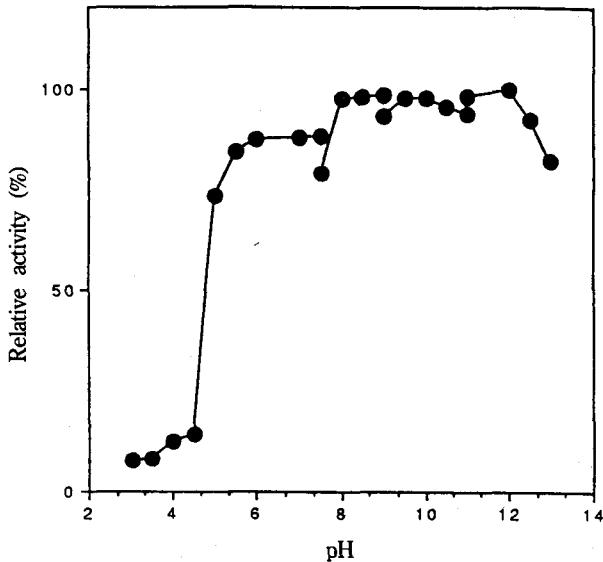


Fig. 5. pH stability of the protease. The enzyme solution was adjusted to various pH, and then incubated at 5°C for 16 hr. The residual activity was determined after adjusting pH to 12.0.

등³⁾은 *Streptomyces* sp.가 생성하는 alkaline protease의 최적온도는 60°C, 최적 pH 11.0이라고 보고하였다. 한편 안 등⁶⁾이 *Bacillus* sp.가 생성하는 alkaline protease의 최적온도와 pH를 55°C와 pH 12.5로 보고하였고 김 등⁴⁾은 최적온도 60°C, 최적 pH 10.5으로 보고하였으며, 배 등⁵⁾은 최적온도 70°C, 최적 pH 11.0으로 보고하였다. 이상과 같이 지금까지 발표된 대부분의 알칼리성 protease와 달리 *Alteromonas* sp. CN301 균주의 protease는 중온 부근인 35°C에서 최대 활성을 보이는 특성이 있

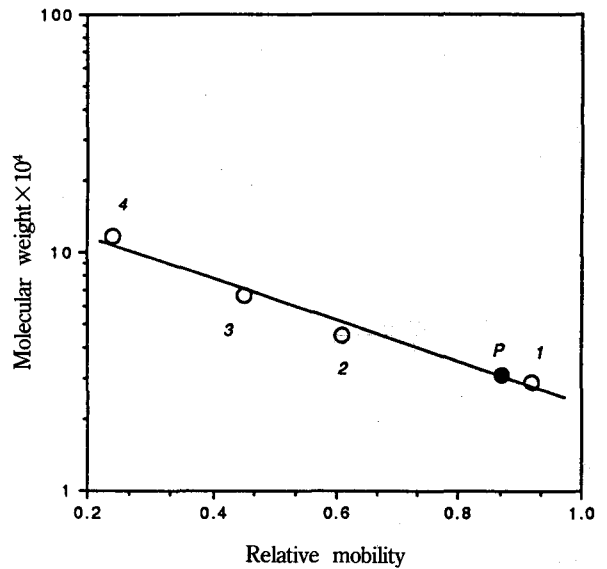


Fig. 6. Determination of molecular weight of the alkaline protease by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. 1) Bovine erythrocytes (M.W. 29,000) 2) Albumin, egg (M.W. 45,000) 3) Albumin, bovine (M.W. 66,000) 4) β -Galactosidase from *E. coli* (M.W. 116,000). P: the purified protease

Table 2. Effect of metal ions on the protease activity

Metal ions (10 mM)	Relative activity (%)	Metal ions (10 mM)	Relative activity (%)
None	100	Mn ²⁺	101
K ⁺	95	Cu ²⁺	99
Li ⁺	105	Hg ²⁺	2
Co ²⁺	91	Fe ²⁺	98
Ca ²⁺	103	Fe ³⁺	91
Mg ²⁺	101	Zn ²⁺	94

Five hundred microliters of the enzyme solution dissolved in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) were mixed with 0.5 ml of 10 mM salt solution. The mixture was pre-incubated for 30min. at 30°C, and then the residual activity of the enzyme was determined.

었다.

온도 및 pH 안정성

정제효소의 온도 및 pH 안정성을 검토한 결과는 Fig. 4, 5와 같이 온도 안정성은 30°C에서 1시간 처리로 90%, 40°C에서 1시간 처리로 84%, 50°C에서 1시간 처리로 64%의 잔존 활성을 나타내었으며, 60°C에서 1시간 처리로 효소가 완전히 실패되었다. pH 안정성은 pH 5.0 이하에서 불안정하며, pH 6.0~13.0까지 넓은 범위에서 80% 이상의 잔존 활성을 나타내었다.

Horikoshi²⁾에 의하면 *Bacillus* sp.가 생산하는 alkaline protease의 온도 안정성은 60°C까지 100% 활성이 유지되었고 pH 안정성은 pH 5.0~10.0에서 안정하였으며, Nakanishi 등³⁾이 발표한 *Streptomyces* sp.의 효소는 60°C까지 안정하였으며, pH 안정성은 pH 5.0~10.0 범위에서

Table 3. Effect of various detergents on the activity of the protease.

Detergents	Concentration	Relative activity (%)
SDS	1×10 ⁻³ M	102
Tween 20	1%	124
Tween 80	1%	125
Triton X-100	1%	164
Control		100

The mixture containing 0.5 ml of protease solution dissolved in 10 mM phosphate buffer (pH 8.0) and 0.5 ml of detergent solution was incubated at 30°C for 30 min., and the enzyme activity was determined.

Table 4. Effect of inhibitors on the activity of the protease.

Reagent	Concentration (mM)	Relative activity (%)
EDTA	1	19
Sodium thioglycolate	1	99
p-CMB ^{a)}	1	88
L-Cysteine	1	89
Sodium thiosulfate	1	90
TPCK ^{b)}	1	80
PMSF ^{c)}	1	20
Control		100

The mixture containing 0.5 ml of protease solution dissolved in 10 mM phosphate buffer (pH 8.0) and 0.5 ml of inhibitor solution was incubated at 30°C for 30 min. and the enzyme activity was determined. ^{a)}p-chloromercuribenzoic acid(p-CMB), ^{b)}N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), ^{c)}phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)

안정하였다고 보고하였다.

분자량

정제효소의 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli 등¹¹⁾의 방법에 따른 SDS-PAGE를 실시하여 Fig. 6과 같이 정제효소와 표준 단백질과의 상대 이동거리를 반대수 그래프에 도획하여 산출한 정제효소의 분자량은 31,000 dalton이었다.

금속 이온의 영향

정제 효소활성에 미치는 금속이온의 영향을 검토한 결과는 Table 2와 같다. Hg²⁺를 제외한 모든 금속이온은 정제 효소의 활성에 큰 영향을 보이지 않았으나 Li⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺를 첨가할 경우 그 활성이 다소 증가되었고, Hg²⁺에 의한 저해 효과는 매우 큰 것으로 나타났다. 알칼리성 protease에 대하여 지금까지 Ca²⁺의 활성증진 효과와 Hg²⁺의 저해 작용이 다수 보고되어 있으며 증진제로는 Ca²⁺ 이외에도 Mg²⁺, Co²⁺ 등이, 저해제로는 Hg²⁺ 이외에 Ni²⁺ 등이 보고된 바 있다. 한편 Hayashi 등¹⁾은 *Aspergillus sojae*의 알칼리성 protease 연

구에서 Hg²⁺ 이온이 α-helix 구조를 파괴하여 효소 단백질의 unfolding 시킴으로 실활을 일으킨다고 보고하였다.

계면 활성제의 영향

정제효소의 활성에 미치는 계면활성제의 영향을 검토한 결과는 Table 3과 같이 SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 모두에 의하여 효소활성이 증가하였고 특히 Triton X-100에 의해서는 효소활성이 64% 증가하였다. 안 등⁶⁾이 보고한 *Bacillus* sp.의 alkaline protease는 SDS에서 활성이 80% 저해된다고 하였다.

Inhibitor의 영향

정제효소의 활성에 미치는 inhibitor의 영향을 검토한 결과는 Table 4와 같으며 PMSF에 의해 현저히 저해되는 것으로 보아 serine protease이며, EDTA에 의해 저해되는 것으로 보아 금속이온을 가지는 metalloenzyme로 생각된다.

참 고 문 헌

- Hayashi, K., M. Terada and K. Mogi (1970) Enzymatic properties of purified alkaline proteinase from *Aspergillus sojae*. *Agric. Biol. Chem.* **34**, 621-637.
- Horikoshi, K. (1971) Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganisms. part I Alkaline protease produced by *Bacillus* sp. No.221. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 1407-1414.
- Nakanish T., Y. Matsumura, N. Minamiura and T. Yamamoto (1974) Purification and some properties of an alkalophilic proteinase of a *Streptomyces* species. *Agric. Biol. Chem.* **38**, 37-44.
- 김태호, 박성희, 이동선, 권택규, 김종국, 홍순덕 (1990) 호알칼리성 *Bacillus*속 균주가 생산하는 alkaline protease의 특성. *산업미생물학회지* **18**, 159-164.
- 배 무, 박필런 (1989) 알칼리성 *Bacillus* sp.No.8-16의 내열. 알칼리성 단백질 분해효소의 정제와 특성. *산업미생물학회지* **17**, 545-551.
- 안장우, 오태광, 박용화, 박관화 (1990) *Bacillus* sp.가 생산하는 호알칼리성 protease의 부분정제 및 특성. *산업미생물학회지* **18**, 344-351.
- 赤堀四郎編 (1956) 酵素 研究法, 第2卷, 朝創書店 p237-246.
- Stoscheck, C. M. (1990) In 'Methods in Enzymology' vol. 182 (Deutscher, M.P. ed.) p57-60. *Academic Press Inc.* CA, U.S.A.
- Cappuccino, J. G. and N. Sherman (1987) *Microbiology, A Laboratory Manual.* The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc.
- Krieg, N. R. (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1.* Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-687.

Characteristics of a alkaline protease from *Alteromonas* sp.

In-Ok Yeo², Seong-Hyun Choi¹, Jae-Sook Lee¹ and Chan-Jo Kim^{1*}(¹*Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea.* ²*Kwang Dong Pharmaceutical Co. Ltd., Seoul 152-053, Korea*)

Abstract: An alkaline protease-producing bacterium was isolated from Korean hot pepper paste and identified as *Alteromonas* sp. CN301. A alkaline protease was purified and characterized. The optimal pH and temperature for the enzyme activity were pH 12.0 and 35°C, respectively. Molecular weight of the enzyme was determined as 31,000 dalton by the SDS-PAGE. The enzyme was stable in the range of pH 6.0~13.0 showing the residual activity above 80% of the enzyme activity. The residual activity of the enzyme was 64% when the enzyme was incubated at 50°C for 1 hr. The activity of the enzyme was not affected by most metal ions tested except Hg²⁺, and activated by Triton X-100, Tween 20 and Tween 80. The enzyme activity was severely inhibited by PMSF and EDTA, suggesting that the enzyme is serine protease having metal ion in its structure.

*Corresponding author