

곤충 병원성 곰팡이 *Beauveria bassiana*로부터 Protease의 정제와 특성

고휘진 · 김현규 · 김범기 · 강선철¹ · 권석태*

성균관대학교 유전공학과, ¹대구대학교 생물공학과

초 록 : 곤충 병원성 곰팡이 *Beauveria bassiana* ATCC7159의 배양여액으로부터 균체의 protease (bassiasin I)를 Ammonium sulfate 침전, DEAE-Sephadex A-50, CM-cellulose 및 Hydroxyapatite column chromatography를 수행하여 완전히 정제하였다. 이 과정으로 41배 정제되었으며 정제수율은 13.6%였다. 정제된 bassiasin I의 분자량은 SDS-PAGE 상에서 약 32,000 Da이며 pI값은 9.5로 확인되었다. NH₂ 말단 아미노산 서열은 다른 곤충 병원성 곰팡이가 생산하는 protease들과 높은 상동성을 보였다. Protease 활성의 최적 pH는 10.5 부근이며, pH 5.0-11.0 범위에서 안정하였다. 최대 활성온도는 60-65°C이며, 60°C에서 120분후에 약 20%의 잔존활성을 보였다. 이 protease는 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 및 diisopropyl fluorophosphate (DFP)에 의해 저해된다. (1997년 8월 21일 접수, 1997년 9월 31일 수리)

서 론

화학 농약의 사용은 약제 내성 곤충의 출현 및 익충의 소멸 등 생태계 파괴와 환경 오염의 문제를 야기하고 있다. 따라서 최근에는 환경 친화성 농법으로 자연생태계를 보존할 뿐 아니라 부작용 없이 지속적 이용이 가능한 생물적 방제에 큰 관심을 두고 있다. 생물적 방제에 가장 많이 이용되고 있는 것은 *Bacillus thuringiensis*로부터 생산되는 Bt toxin이다.¹⁾ Bt toxin은 숙주 곤충에 매우 특이적이며 곤충이 larva 상태에서만 작용한다. 또한 자외선과 건조 등에 약하여 자연환경에서 지속성이 짧다.²⁻⁴⁾ 반면에 곤충 병원성 곰팡이(Entomopathogenic Fungi)는 숙주 곤충 범위가 비교적 넓으며 자연환경에 강하다는 장점이 있다. 곤충 병원성 곰팡이로는 *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* 등이 가장 잘 알려져 있다. 이들 곰팡이의 감염은 보통 분생포자가 숙주곤충의 외표피에 부착하여 발아한 후 외피를 관통하여 체강내에서 증식 및 독소물질을 생산하여 최종적으로 숙주곤충을 사멸케 한다.⁵⁻⁷⁾ 이러한 감염에 있어 가장 중요한 단계는 숙주 곤충의 외피를 관통하는 단계로 이는 곰팡이로부터 생산되는 분비 효소에 의해 일어난다.⁸⁻¹⁰⁾ 곤충의 외피는 cuticle 층으로 구성되며 cuticle의 주성분은 chitin fibrils, protein matrix 및 lipids 등으로 되어 있다. 곰팡이가 생산하는 cuticle 분해효소는 chitinase, protease, lipase 등으로 특히 protease가 일차적으로 cuticle 분해에 관여하여 곤충 병원성에 가장 중요 요인인 것으로 보고되어 있다.¹¹⁻¹³⁾ 현재까지 곤충 병원성 곰팡이의 protease에 관한 연구는 *Metarhizium anisopliae*에서 많이 수행되었다. *Metarhizium anisopliae*에서는 현재까

지 4가지 종류의 protease가 밝혀졌으며, 최근에는 Pr1 및 Pr2의 cDNA 및 genomic DNA 염기서열이 각각 밝혀졌다.^{14,15)} 반면 *B. bassiana* GK2016에서는 한 종류의 protease가 정제되어 효소 특성의 일부가 밝혀졌으며,¹⁶⁾ *B. bassiana* 331275에서 곤충외피의 cuticle층을 분해하는 protease 유전자를 포함한 cDNA의 염기서열이 밝혀졌다.¹⁷⁾ 최근에는, *B. bassiana* ATCC7159의 배양액을 비변성 isoelectricfocusing gel 전기영동 후 각 gel 절편의 활성을 측정 한 결과 세부분에서 protease 활성이 나타났다.¹⁸⁾ 따라서 *B. bassiana* ATCC7159에서는 한가지가 아닌 다수의 protease가 존재하고 있음을 암시하였다.¹⁸⁾ 본 연구에서는 곤충 병원성 곰팡이 *B. bassiana* ATCC7159의 배양액으로부터 protease들을 부분 정제하고 그중에서도 가장 활성이 높은 protease (bassiasin I)를 완전히 정제하여 여러가지 효소특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

이 실험에 쓰인 균주는 *Beauveria bassiana* ATCC7159이다. 균주는 sabouraud dextrose agar에서 7일간 생육시킨 plate를 4°C에서 보관하던가 또는 0.02% Tween 80으로 plate상의 균체를 현탁시킨 후 이를 멸균한 glass wool에 통과시켜 얻은 conidia를 4°C에서 보관하였다. 액체 배양은 plate상의 균체를 1×1 cm 정도로 잘라 접종 균체로 이용하였으며, 250 ml 삼각 플라스크에 담긴 70 ml의 YPD배지 (0.2% yeast extract, 1% pepton, 2% dextrose, pH 4.5)에 균체를 접종하고 28°C, 180 rpm으로 회전식 교반배양기에

찾는말 : 곤충 병원성 곰팡이, *Beauveria bassiana*, extracellular protease, bassiasin I

*연락처

서 6일간 배양하여 protease의 생산배지의 접종 균체로 이용하였다. Protease 생산배지 조성은 0.5% polypeptone, basal salt, trace elements, 50 mM potassium phosphate (pH 6.0)을 포함한다.¹⁹⁾ Protease 생산은 YPD배지에서 키운 균주를 protease 생산배지에 1%로 접종하여 28°C에서 3일간 전배양과 같은 방법으로 배양하였다.

효소 활성 측정

각 생산배지에 따른 protease의 생산효과는 casein을 기질로 이용하여 효소 활성을 측정, 조사하였다. Protease 활성 측정은 Matsuzawa 등의 방법¹⁹⁾을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 각 시간별로 배양액을 500 μ l를 취하여 면솜으로 긴 1 ml tip을 이용하여 filtration하여 mycelia 등을 제거하였다. 이 배양액 100 μ l와 50 mM glycine-NaOH 완충용액 (pH 10.5)에 용해된 0.5% casein 500 μ l를 잘 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응액에 5% trichloroacetic acid (TCA) 500 μ l를 첨가하여 반응을 종결, 실온에서 10분간 방치후 15000 rpm, 15분 원심분리하여 상층액을 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정제된 효소의 활성 측정도 유사한 방법으로 수행하였다. 활성단위 1 unit은 효소액 1 ml가 1분간 흡광도 0.002를 생성하는 양으로 결정하였다.

Protease의 정제

세포배양액을 Advantec filter paper No. 5B (Toyo Roshi)로 여과하여, 그 여액을 효소원액으로 이용하였다. 효소의 정제는 4°C에서 아래의 방법으로 수행하였다.

Ammonium sulfate 침전

배양액에 95% 포화농도의 ammonium sulfate를 첨가하여 서서히 침전시킨 후, 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 침전물을 5 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 6.0)으로 용해시킨 후 동일 완충용액에서 6시간, 6회 투석하였다.

DEAE-sephadex A-50 column chromatography

투석된 용액을 10 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 6.0)으로 평형화시킨 DEAE-sephadex A-50 column (2.5 \times 20 cm)에 통과시켰다. 동일한 완충용액으로 시료의 비흡착 단백질을 충분히 elution시킨 후, 1 M KCl로 흡착 단백질을 elution시켰다. 5 ml씩 분획하였으며, 각 분획의 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

CM-cellulose column chromatography

위의 10 mM potassium phosphate 완충용액으로 평형화시킨 CM-cellulose column에 DEAE-sephadex A-50 column (2.5 \times 20 cm)에서 elution된 비흡착 단백질을 흡착시킨 후 10 mM Borax-HCl 완충용액 (pH 6.0)과 10 mM Borax-NaOH 완충용액 (pH 10.6)을 이용하여 pH

6.0에서 pH 10.6까지 pH gradient로 elution한 후, 10 mM Borax-NaOH 완충용액 (pH 10.6)과 10 mM Borax-NaOH 완충용액 (pH 11.0)을 이용하여 순차적으로 계속 elution하였다. 각 분획의 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

Hydroxyapatite column chromatography

CM-cellulose column에서 얻은 활성분획 중 가장 활성이 높은 5번째 분획용액을 1 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 6.0)으로 평형화시킨 hydroxyapatite column (2 \times 10 cm)에 흡착시키고, 1 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 6.0)으로 충분히 씻은 후, 1 M MgCl₂ 용액으로 흡착단백질을 elution하였다. 각 분획의 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

SDS-PAGE 및 활성염색

CM-cellulose column에서 얻은 분획을 이용하여 Laemmli 방법에 따라 SDS-PAGE²⁰⁾를 제조하였다. Polyacrylamide gel은 12% separating gel, 5% stacking gel을 사용하였으며, 또 protease 활성염색을 위해 0.1% gelatin이 첨가된 polyacrylamide gel을 제조하였다.²¹⁾

시료는 SDS를 포함하되 boiling은 하지 않으며 전기영동은 4°C에서 10 mA로 낮게 유지하였다. 전기영동이 끝난 0.1% gelatin이 첨가된 gel은 2.5% Triton X-100에서 30분간 incubation한 후 증류수로 1시간 이상 충분히 씻어 주고 0.1 M Tris-HCl 완충용액 (pH 8.5)에서 37°C, 5시간 이상 incubation하였다. Gel을 0.1% Amido Black으로 염색한 후 분해된 gelatin이 투명한 band로 나타날때 까지 50% methanol로 탈색시켰다.

단백질의 정량

단백질 양의 측정은 Sigma사의 단백질 정량 kit (No. p 5656)를 사용하여 Lowry 등의 방법으로 수행하였다.²²⁾

분자량 측정

Laemmli의 방법²⁰⁾에 따라 12% gel을 사용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 표준단백질로서는 protein molecular weight standards, low range (Pharmacia Co.)를 사용하였다.

NH₂말단 아미노산 서열 결정

정제된 protease를 SDS-PAGE를 수행한 후 Towbin 등의 방법²³⁾을 이용하여 PVDF membrane에 electrotransfer한 후 기초과학지원센터에 의뢰하여 NH₂말단 아미노산 서열을 결정하였다.

Isoelectricfocusing (IEF)에 의한 pI 측정

Protease의 pI값을 확인하기 위하여 Robertson 등의 방법으로 수행하였다.²⁴⁾ Ampholyte (Pharmacia)을 이용한 polyacrylamide gel에서 pH 3.5-pH 9.5 범위에서 수행하였다.

최적 pH 및 pH에 대한 안정성

정제된 protease의 pH에 따른 활성 측정은 pH 5.0-12.0 까지 0.5 간격으로 반응액의 pH를 달리하여 조사하였다. 사용한 완충용액은 50 mM potassium phosphate (pH 5.0-pH 7.5), 50 mM Tris-HCl (pH 7.5-9.0), 50 mM glycine-NaOH (pH 9.0-11.0) 및 50 mM phosphate-NaOH (pH 11.0-12.0)이다.

pH에 대한 효소의 안정성 실험은 각각의 pH에서 28°C에서 2 시간 또는 4°C에서 48시간 동안 각각 방치한 후 50 mM Glycine-NaOH 완충용액 (pH 10.5)에서 잔존 효소활성을 조사하였다.

최대 활성온도 및 열안정성

최대 활성온도의 조사는 20-70°C 범위에서 50 mM Glycine-NaOH 완충용액 (pH 10.5)으로 효소반응을 수행하여 조사하였고, 열에 대한 안정성의 조사는 30-60°C에서 20분 간격으로 열처리한 후 잔존효소 활성을 측정하였다.

저해제의 영향

대표적인 protease의 저해제를 이용하여 protease의 활성 저해 효과를 조사하였다. 사용한 protease의 저해제로는 TLCK (N-tosyl-L-lysyl-chloromethyl ketone, trypsin inhibitor), TPCK (N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone, chymotrypsin inhibitor), DTT (dithiothreitol, thiolprotease inhibitor), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, metalloprotease inhibitor), PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride, serine protease inhibitor) 및 DFP (diisopropyl fluorophosphate, serine protease inhibitor)이며 반응액에 1 mM과 5 mM 및 10 mM을 각각 첨가하여 얼음에서 10분, 실온에서 30분 방치한 후 앞서 언급한 활성 측정 방법과 동일한 효소 반응을 통해 저해효과를 측정하였다.

2가 양이온의 영향

효소활성에 영향을 줄 수 있는 금속이온들을 최종농도 1 mM과 10 mM로 효소액에 첨가하여 37°C에서 1시간 처리한 후 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Protease의 정제

Beauveria bassiana ATCC7159의 배양 여액에 95% ammonium sulfate를 처리하여 원심분리한 후 그 침전물을 5 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 6.0)에 용해시킨 후 투석하였다. 투석된 용액을 원심분리한 후 그 상등액을 DEAE-sephadex A-50 column에 통과시켰다 (data 생략). 대부분의 protease 효소 활성이 column에 결합하지 않고 비흡착 분획으로 elution되었다. 효소활성이 있는 비흡착 분획을 모아서 CM-cellulose column에 흡착시킨 후 pH gradient로 elution한 결과가 Fig. 1이다. 이 단계에서 6개의 단

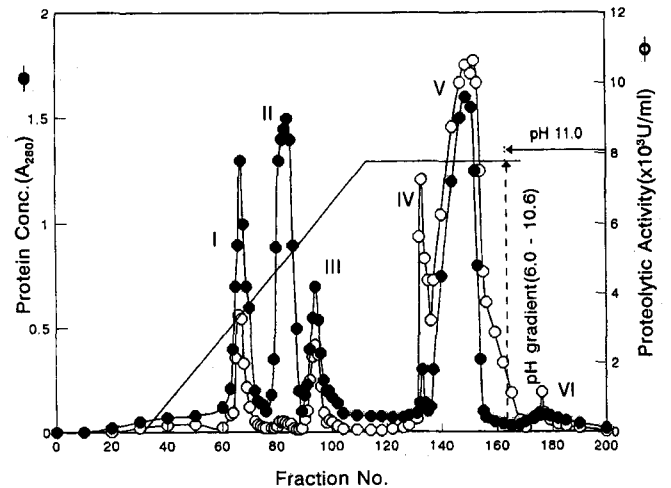


Fig. 1. Elution pattern of proteases on CM-cellulose column chromatography. The non-adsorbed fractions of DEAE-sephadex A-50 were applied to the CM-cellulose column and eluted with the linear pH 6.0-10.6 gradient.

백질 peak (peak I-VI)들이 보였으며 이중에서 peak I, III 및 V가 효소활성이 높게 나타났다. 또 이 6개의 peak 분획을 각각 전기영동하여 protease 활성염색을 한 결과가 Fig. 2이다. Fig. 2 (A)는 SDS-PAGE로 Coomassie brilliant blue R250으로 염색한 것이고, Fig. 2 (B)는 0.1% gelatin이 첨가된 gel을 0.1% Amido Black으로 염색한 후 50% methanol로 탈색시킨 것이다. Peak I, Peak II 및 peak V의 분획에서 크기가 각각 다른 protease 활성 band가 뚜렷하게 보였다. 따라서 *Beauveria bassiana* ATCC 7159의 균주는 적어도 3가지 이상의 protease를 생산하는 것으로 추측된다. 이 결과는 최근 Ko 등¹⁸⁾이 *B. bassiana* ATCC7159의 배양액을 비변성 isoelectricfocusing gel 전기영동 후 각 gel 절편의 활성을 측정한 결과 세부분획에서 protease 활성을 보인 연구결과와 일치하였다. 이중에서 특히 효소활성이 높고 단백질 양이 많은 peak V 분획을 완전히 정제하여 특성을 조사하기로 하였다.

CM-cellulose column의 pH gradient로부터 elution된 peak V분획을 모아 hydroxyapatite column에 흡착시킨 후

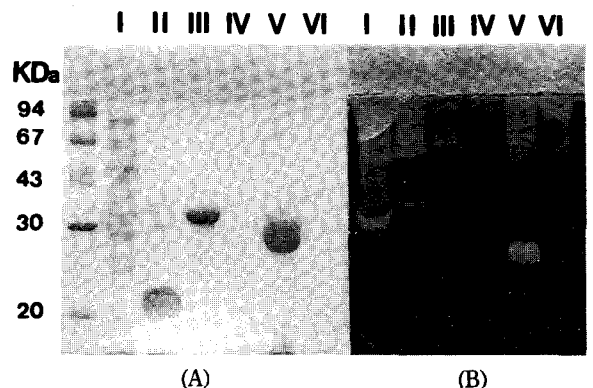


Fig. 2. SDS-PAGE (A) and gelatin SDS-PAGE (B) analysis of the CM-cellulose fractionated protein peaks (I-VI).

1 M MgCl₂ 용액으로 elution하여 정제를 완료하였다 (data 생략). peak V로부터 정제된 protease를 bassiasin I 으로 명명하였다. Table 1은 peak V분획의 protease의 정제과정을 요약한 결과이며, 최종수율은 13.6%로 비활성은 배양여액 (187.6 U/mg)에 비해 41배 (7747.3 U/mg)이다. 정제한 protease의 SDS-PAGE의 결과가 Fig. 3이며, 분자량은 약 32,000 Da으로 *B. bassiana* GK2016 protease의 분자량 (35,000 Da)과 유사하였다.¹⁶⁾ 참고로 bassiasin I의 정제시에 SDS-PAGE를 수행한 결과 분자량 32,000 Da의 한 개의 band만을 보였으나, 정제 후 보관 시간이 오래 경과함에 따라 32,000 Da의 바로 밑에 약 30,000 Da의 또하나의 band가 간혹 나타난다 (data 생략). 이 30,000 Da의 band는 bassiasin I의 자가분해된 것으로 추정된다. 정제 효소의 pI 값은 9.5이었다.

정제효소의 특성

(1) NH₂말단 아미노산 서열 결정

정제된 bassiasin I의 NH₂말단 아미노산 서열을 결정한 결과 Ala-Ile-Val-Arg-Gln-Pro-Gly-Ala이었다. 이 NH₂말단 아미노산 서열을 이미 보고된 *B. bassiana* 331275,¹⁷⁾ *M. anisopliae* Pr1,¹⁴⁾ proteinase K²⁵⁾ 등의 곰팡이 유래의 pro-

Table 1. Purification of bassiasin I. The purification was started using 8.5 l culture filtrate

Purification step	Total Protein	10 ³ ×total activity	Specific activity	Recovery
	mg	U	U/mg	
Culture filtrate	28300.0	5310	187.6	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	1224.5	2691	2197.8	50.7
DEAE-sephadex A-50	573.5	2270	3959.7	42.8
CM-cellulose	364.5	1896	5202.7	35.7
Hydroxyapatite	93.0	720	7747.3	13.6

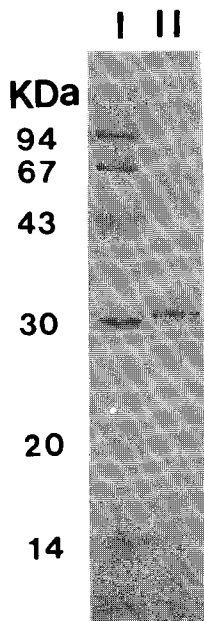


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of purified bassiasin I. Lane I, protein standard marker; lane II, purified bassiasin I.

tease들의 NH₂말단 아미노산 서열과 비교한 것이 Fig. 4이다. 이중에서 Joshi 등¹⁷⁾에 의해 보고된 *B. bassiana* 331275 protease와 bassiasin I사이에는 Ile와 Pro를 제외한 나머지 아미노산이 완전히 일치하였다. 따라서 bassiasin I (*B. bassiana* ATCC7159)과 이미 보고된 *B. bassiana* 331275 protease 사이에 상당히 유사성이 있을 것이다.

(2) 최적pH 및 pH에 대한 안정성

pH에 따른 효소활성의 측정 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 산성 pH에서는 대체로 효소활성이 낮으며 알칼리성 pH에서 높은 활성을 보였다. pH 10.5에서 최적활성을 가지며, pH 7.5의 경우 최적활성의 50%를 나타내었다. *B. bassiana* GK2016 protease¹⁶⁾의 최적 pH의 경우는 약 8.5이고 *M. anisopliae* protease¹⁰⁾의 최적 pH는 8~9인것과 비교하면 본 연구에서 정제한 protease는 알칼리성의 성질을 가지는 것으로 판단된다.

pH에 대한 효소의 안정성 실험은 각각의 pH에서 28°C에서 2 시간, 4°C에서 48시간 동안 각각 방치한 후 잔존 효소 활성을 측정한 결과가 Fig. 6이다. pH 5.0-11.0의 범위에서

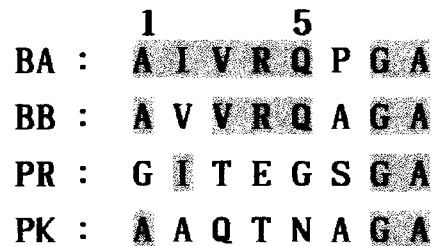


Fig. 4. NH₂-terminal amino acid sequence of bassiasin I (BA) compared with those of *B. bassiana* 331275 protease (BB),¹⁷⁾ *M. anisopliae* protease pr1 (PR)¹⁴⁾ and proteinase K (PK).²⁵⁾ Amino acids of bassiasin I, identical to those of the other proteases, are boxed. The residues of bassiasin I are numbered above the sequences.

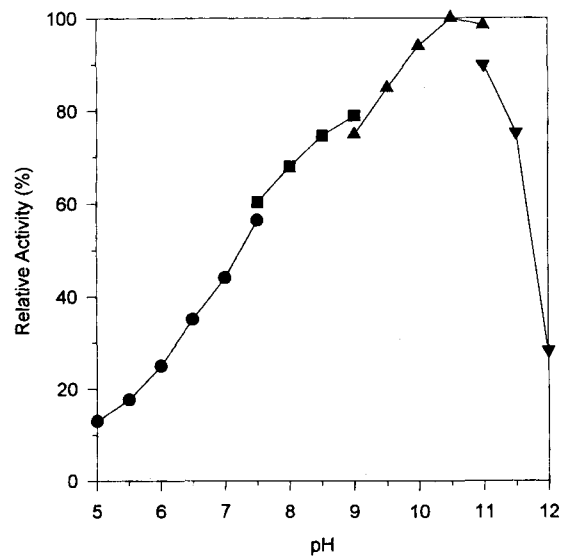


Fig. 5. Effect of pH on the proteolytic activity of bassiasin I. The reaction was carried out at 37°C in the following buffers: 50 mM potassium phosphate(●), 50 mM Tris-HCl(■), 50 mM Glycine-NaOH(▲) and 50 mM phosphate-NaOH(▼).

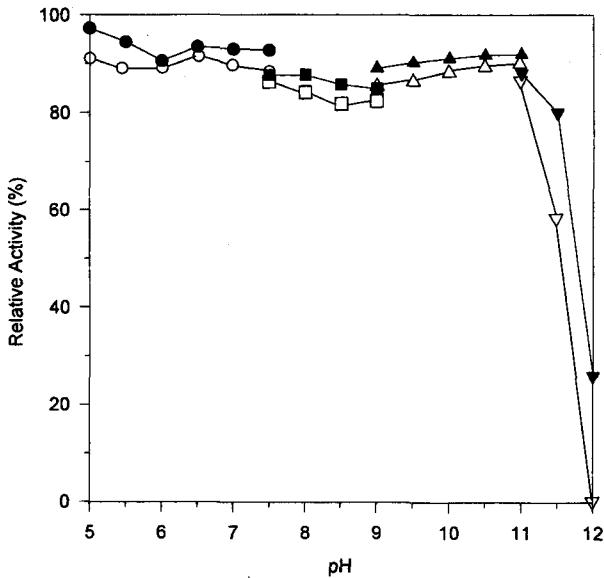


Fig. 6. Effect of pH on the stability of bassiasin I. The pH treatment was carried out in the following buffers (25 mM concentration): potassium phosphate (●, ⊖), Tris-HCl (■, ⊕), Glycine-NaOH (▲, △) and phosphate-NaOH (▼, ▽) at 4°C for 48h (●, ■, ▲, ▼) and 28°C for 2h (⊖, ⊕, △, ▽).

잔존활성의 90% 이상을 유지하므로 이 pH 범위에서는 상당히 안정하다. 대부분의 중성 및 알칼리성 protease들이 중성 및 알칼리성 pH에서 자가분해에 의한 불활성화를 일으키며, 산성 pH쪽에서 안정한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 알칼리성 pH보다 산성 pH쪽에서 상당히 안정한 것으로 나타났다.

(3) 최대 활성온도 및 열안정성

최대 효소 활성온도를 알아보기 위해 20-70°C 범위에서 10°C 간격으로 효소활성을 측정된 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 최대활성은 60-65°C이며 70°C에서는 활성이 급격히

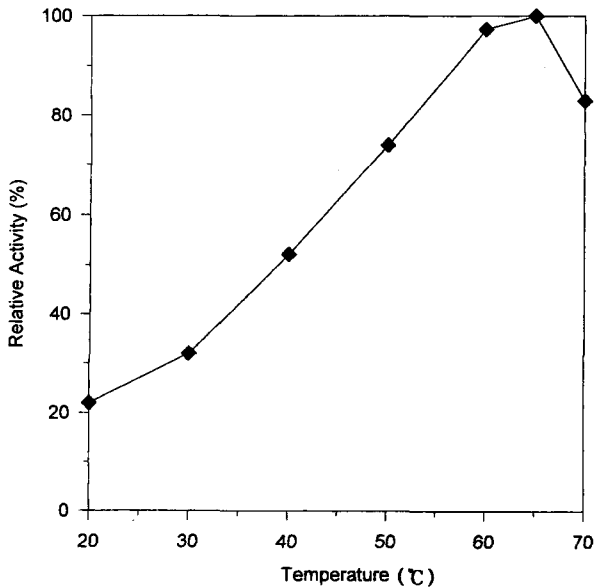


Fig. 7. Effect of temperature on the proteolytic activity of bassiasin I. The enzyme activity was assayed at indicated temperatures in 50 mM Glycine-NaOH buffer (pH 10.5) for 10 min.

감소하는 것으로 나타났다.

효소의 열안정성을 조사하기 위해 20 mM Potassium phosphate 완충용액 (pH 6.0)에서 30-60°C까지 10°C 간격으로 가열처리하면서 경과시간에 따른 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 8과 같다. 본 효소는 40°C에서 120분 가열하여도 효소활성을 그대로 유지하나, 50°C에서는 50분 가열시에 최초 활성의 50%가 감소되며 60°C에서는 120분 가열하였을 때 최초 활성의 약 80%가 감소되었다.

B. bassiana GK2016 protease¹⁶⁾의 최대 활성 온도는 37~42°C이고 40°C에서 30분 혹은 50°C에서 5분 가열시에 활성의 60%를 잃는다고 보고되어 있으며 Bassiasin I과 비교해 볼 때 상당한 차이를 보였다.

(4) 효소 활성에 미치는 저해제의 영향

Chymotrypsin과 Trypsin의 inhibitor로 각각 TPCK와 TLCK, metalloprotease의 inhibitor로 EDTA, serine계 protease inhibitor로 PMSF 및 DFP 그리고 thiolprotease

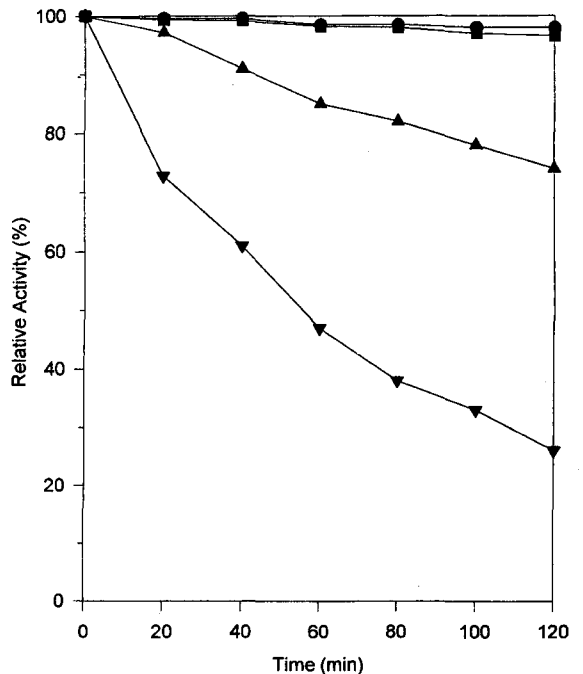


Fig. 8. Effect of heat stability of bassiasin I. The enzyme was dissolved at the concentration of 1.0 µg/ml in 20 mM Potassium phosphate buffer (pH 6.0). After incubation at 30°C(●), 40°C(■) 50°C(▲) and 60°C(▼) for the indicated times, the remaining activity was assayed as described under Materials and Methods.

Table 2. Effects of protease inhibitors on the proteolytic activity of bassiasin I.

Inhibitor	Relative Activity (%)		
	1 mM	5 mM	10 mM
None	100	100	100
PMSF	6.0	0.7	0.09
DFP	24.7	8.56	0.7
TPCK	97.7	95.4	88.0
TLCK	96.8	96.7	97.0
EDTA	106.8	105.4	106.7
DTT	106.8	109.7	108.6

inhibitor로 DTT를 사용하여 효소활성 저해효과를 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. Bassiasin I의 활성은 PMSF 및 DFP에 의해 저해되었고 DFP보다는 PMSF 첨가 시 뚜렷한 저해를 가져왔다. 이로부터 Bassiasin I은 serine protease로 확인되었다. 한편 TPCK와 TLCK, EDTA 및 DTT는 효소 활성에 미치는 영향이 없었다.

(5) 2가 양이온의 영향

효소활성에 영향을 줄 수 있는 금속이온, CaCl₂, CuCl₂, MgSO₄, MnCl₂, ZnCl₂, FeSO₄ 등을 최종농도 1 mM과 10 mM로 효소액에 첨가하여 37°C에서 1시간 처리한 후 효소 활성을 측정하고 위의 금속이온을 처리하지 않은 효소액의 활성이 거의 동일하였다. 이 결과는 효소액에 EDTA를 처리하였을 때 효소활성에 전혀 영향을 받지 않았던 위의 결과 (Table 2)와 일치하였다.

감사의 글

본 연구는 97년도 농림수산 특정 과제 (과제명 : 작물 병충해에 대한 살충성 사상균 유래의 생물 농약 개발 및 이용)에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다. 또 아미노산 서열 결정에 도움을 준 기초과학연구원 센터 남명희씨에게 사의를 표하는 바이다.

참고문헌

1. Agaisse, H. and D. Lereclus (1995) How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* **177**, 6027-6032.
2. Feitelson, J. S., T. C. Quick and F. Gaertner (1990) Alternate hosts for *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin genes. In 'New directions in Biological Control', Baker, R. R. and Dunn, P. E., ed., pp. 561-571, Alan R. Liss, New York.
3. McGaughey, W. H. (1985) Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **299**, 193-195.
4. McGaughey, W. H. (1990) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. In 'New directions in Biological Control', Baker, R. R. and Dunn, P. E., ed., pp. 583-598, Alan R. Liss, New York.
5. Samsonet, R. A., H. C. Evans and Latge, J. P. (1988) 'Atlas of entomopathogenic fungi'. pp. 187, Springer-Verlag, Berlin.
6. Eilenberg, J., J. Bresciani and J. P. Latge (1986) Ultrastructural studies of primary spore formation and discharge in the genus Entomophthora. *J. Invertbr. Pathol.* **48**, 318-324.
7. Latge, J. P., L. Sampedro., P. Brey and M. Diaquin (1987) Aggressiveness of *Conidiobolus obscurus* against the pea aphid : Influence of cuticular compounds on spore germination. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1987-1997.
8. Brey, P., J. P. Latge and M. C. Prevost (1986) Integumental penetration of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, by *Conidiobolus obscurus*(Entomophthoraceae). *J. Invertbr. Pathol.* **48**, 34-41.
9. St. Leger, R. J., A. K. Charnley and R. M. Cooper (1986) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *J. Invertbr. Pathol.* **48**, 85-95.
10. St. Leger, R. J., R. M. Cooper and A. K. Charnley (1987) Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1371-1372.
11. St. Leger, R. J., M. Goettel., D. W. Roberts and R. C. Staples (1991) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertbr. Pathol.* **58**, 168-179.
12. St. Leger, R. J., P. K. Durrands., A. K. Charnley and R. M. Cooper (1988) The role of extracellular chymo-elastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J. Invertbr. Pathol.* **52**, 285-293.
13. Bidochka, M. J. and G. G. Khachatourians (1990) Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertbr. Pathol.* **56**, 362-370.
14. St. Leger, R. J., D. C. Frank., D. W. Roberts., and R. C. Staples (1992) Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. J. Biochem.* **204**, 991-1001.
15. Smithson, S. L., I. C. Paterson., A. M. Bailey., S. E. Screen., B. A. Hunt., B. D. Cobb., R. M. Cooper., A. K. Charnley and J. M. Clarkson (1995) Cloning and characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* **166**, 161-165.
16. Bidochka, M. J. and G. G. Khachatourians (1987) Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1679-1684.
17. Joshi, L., R. J. St. Leger and M. J. Bidochka (1995) Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters* **125**, 211-218.
18. Ko, H.-J., H.-K. Kim., S.-C. Kang and S.-T. Kwon (1996) Optimal production of protease from entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Agricultural Chemistry and Biotechnology(Korea)* **39**, 449-454.
19. Matsuzawa, H., K. Tokugawa., M. Hamaoki., M. Mizoguchi., H. Taguchi., I. Terada., S.-T. Kwon and T. Ohta (1988) Purification and characterization of aqualysin I (a thermophilic alkaline serine protease) produced by *Thermus aquaticus* YT-1. *Eur. J. Biochem.* **171**, 441-447.
20. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
21. Siegel, M.S. and K. L. Polakoski (1985) Evaluation of the

- human sperm proacrosin-acrosin system using gelatin-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biol. Repro.* **32**, 713-720.
22. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein estimation with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
23. Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.
24. Robertson, E.F., H. K. Dannelly, P. J. Malloy and H. C. Reeves (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **167**, 290-294.
25. Gunkel, F. A. and H. G. Gassen (1989) Proteinase K from *Tritirachium album Limber* : Characterization of the chromosomal gene and expression of the cDNA in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **179**, 185-194.

Purification and Characterization of Protease from Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*
 Hwi-Jin Ko¹, Hyun-Kyu Kim¹, Beom-Gi Kim¹, Sun-Chul Kang² and Suk-Tae Kwon^{1*} (¹Department of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea; ²Department of Biotechnology, Taegu University, Taegu 713-714, Korea)

Abstract : Extracellular protease (bassiasin I), from the culture filtrate of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* ATCC7159, was successively purified by precipitation with ammonium sulfate followed by DEAE-Sephadex A-50, CM-cellulose and Hydroxyapatite column chromatography. A typical procedure provided 41-fold purification with 13.6% yield. The molecular weight of the purified protease (bassiasin I) was found to be approximately 32,000 by SDS-PAGE. Isoelectric-focusing analysis of the enzyme showed a pI of 9.5. NH₂-terminal sequence of the protease showed homology with those of the fungal proteases. The enzyme has an optimal pH for activity at 10.5 and is stable over pH 5.0-11.0. The maximum activity of the enzyme was at 60-65°C, and approximately 20% activity remained at 60°C after 120 min. The protease was inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and diisopropyl fluorophosphate (DIFP).

Key words : entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, extracellular protease, bassiasin I

*Corresponding author