

Xanthomonas sp. YL-37 균주가 생산하는 Alkali성 단백질분해효소의 정제 및 성질

장형수¹ · 권태종*

¹상지대학교 식품영양학과, 건국대학교 미생물공학과

Purification and Properties of Alkaline Protease from *Xanthomonas* sp. YL-37. Chang, Hyung-Soo¹ and Tae-Jong Kwon*. ¹Department of Food and Nutrition, Sang-Ji University, Wonju 220-702, Korea and Department of Microbiological Engineering, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea - An alkaline protease was 4-fold purified, yielding 2.3% of recovery by ammonium sulfate precipitation, CM-cellulose column chromatography and Sephadex G-100 column chromatography. The purified enzyme was estimated to be monomeric with molecular weight of about 62,000 from polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The optimal pH and temperature of the alkaline protease activity were 11.0 and 50°C, respectively, exhibiting high stability at pH value from 6.0 to 11.0 at 50°C for 30 minute. The alkaline protease was activated by MnSO₄, CaCl₂, and was inhibited by CuSO₄, ZnSO₄, HgCl₂, EDTA and EGTA. Also, the enzyme was found to be a metalloenzyme requiring Mn²⁺ as cofactor. The NH₂-terminal amino acid of alkaline protease was alanine. The Km and Vmax values of this enzyme for casein was 4.0 mg/ml and 5,500 unit/ml, respectively.

Key words: *Xanthomonas* sp. YL-37, alkaline protease, properties

산업의 발달에 따라 alkaline protease의 산업적 이용 면[16]이 날로 증가되고 있다. 특히 alkaline protease는 세제나 피혁공업에 많이 이용되므로 이 효소의 대량생산에 관한 연구가 많이 보고되어 있다[5, 6, 12, 20, 32, 35].

Horikoshi[12]는 alkaliphilic bacteria로 부터 생산한 alkalin성 단백질분해효소의 효소학적 성질에 대하여 보고하였으며, Kobayashi 등[20]은 *Pseudomonas maltophilia*가 생산하는 alkaline protease의 효소학적 성질을 연구하였다. 특히, Willadsen 등[39]은 *Bacillus pumilans*로 부터 세제용으로 적합한 단백질분해효소를 생산하여 그 효소학적 성질을 조사하였다. 국내에는 배 등[6]이 *Bacillus*속 균주로 부터 alkaline protease의 생산 최적조건과 효소의 정제 및 성질에 대하여 보고하였으며, Cho 등[9]은 효소생산에 있어서 탄소원으로 glucose가 가장 효과적이라고 하였다. 그 밖에도 *Bacillus*속 균주가 생산하는 alkaline protease의 정제 및 효소학적 성질에 관한 연구가[13] 있다.

본 연구에서는 우리 나라의 기온에 적합한 세제첨가용 alkaline protease를 생산하기 위하여 저온성(20°C)균주인 *Xanthomonas* sp. YL-37이 생산하는 alkaline protease를 정제하여 그 효소학적 성질을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 alkaline protease의 생산력이 높은 전보[23]의 *Xanthomonas* sp. YL-37 균주를 사용하였다.

배지 및 배양법

전보[23]와 같이 효소생산배지는 증류수 1 l에 sucrose 60 g, tryptone 10 g, soybean meal 20 g, NaCl 1 g, NH₄NO₃ 1 g, K₂HPO₄ 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g 그리고 Na₂CO₃ 3 g의 조성으로 하였다.

균주의 배양은 500 ml elenmyer flask에 효소생산배지 50 ml를 넣고 121°C에서 15분간 멸균한 후 20°C에서 24시간 전배양한 후 전배양액을 4%(v/v) 수준으로 접종하여 20°C에서 72시간 배양하였다.

효소의 활성측정

전보[23]와 같이 protease 활성은 Leighton 등[25]의 방법으로 측정하였다. 즉, 효소액 0.1 ml에 1 mM CaCl₂가 포함된 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액에 용해시킨 5.0% azocasein(Sigma) 0.2 ml, 1 M Tris-HCl(pH 8.0) 0.2 ml, 10 mM CaCl₂ 0.1 ml에 증류수로 1.0 ml 되도록 조성된 반응혼합물을 40°C에서 30분간 반응시킨 후

*Corresponding author
Tel. 82-2-450-3519, Fax. 82-2-455-0158
E-mail: tjkwon@kkucc.konkuk.ac.kr

10%(w/v) trichloroacetic acid 1.0 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 0°C에서 15분간 정지한 후 원심분리하여 상등액을 Millipore filter(0.45 μ m)로 여과하였다. 여액 1.2 ml에 1.8 N NaOH 0.3 ml를 첨가하여 발색시킨 후 분광광도계(Beckman DU-60)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성은 40°C에서 30분 동안에 1.0 μ g의 azocasein을 가수분해시킬 수 있는 효소량을 1 unit로 하였다. 또한 Hammastén-casein(Merk)을 기질로 하는 Delft unit assay[3]로 측정하였다.

단백질 측정

단백질의 농도는 Bradford 등[8]의 방법을 이용하여 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 표준시료로 하여 측정하였으며, 효소정제과정 중의 단백질의 농도는 분광광도계(Beckman DU-60)를 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소의 정제

효소의 정제는 대량배양하여 얻은 조효소액을 ammonium sulfate(30~80%)로 분별 침전시키고 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물은 탈염 후, 10 mM phosphate buffer(pH 8.0)로 용해시키고 미리 평형화한 CM-cellulose ion exchange resin column(3.5 \times 30 cm)에 주입하여 NaCl용액(0.05~0.5 M)을 이용한 농도구배법으로 용출한 후, 활성획분을 회수하였다.

활성획분의 효소액은 ultrafiltration법으로 농축시킨 후 동일 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column(1.5 \times 100 cm)에 2회 통과시켜 정제하였다.

단일성 및 분자량

정제한 효소의 단일성 및 분자량을 측정하기 위하여 Native PAGE법을 이용하였다. 즉 10%-polyacrylamide gel을 사용하여 20 mA에서 3시간 전기영동시킨 후 분자량은 표준 단백질과의 상대 이동거리를 측정하여 logarithm을 취한 값과 비교하여 결정하였다.

또한 Laemmli[22]의 방법으로 acrylamide 함량은 7.5%로 하여 SDS-PAGE 하였다.

Cofactor의 분석

정제된 효소액 0.9 ml(0.625 mg/ml)에 50 mM이 되게 ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 0.1 ml을 첨가하여 30°C에서 2시간 정지시킨 후 4°C에서 48시간 증류수로 투석하여 투석한 효소액에 각각의 금속염을 5 mM이 되도록 넣고 30°C에서 2시간 방치시킨 후 각각의 효소액으로 효소활성의 회복정도를 비교하였다.

NH₂-말단 아미노산 서열 결정

정제된 alkaline protease의 아미노산 서열결정은 10% SDS-PAGE를 한 다음 PVDF membrane에 transfer buffer(48 mM Tris-HCl, 39 ml glycine, 20% MeOH, 1.3 mM SDS)로 15 volt에서 30분간 blotting하여 membrane staining solution(0.2% Coomassie Blue, 50% MeOH, 10%-acetic acid)으로 10분간 염색하여 destaining solution(50% MeOH, 10%-acetic acid)으로 탈색하여 얻어진 alkaline protease band를 Edman degradation method[10]로 PTH아미노산화하여 HPLC PTH(phenylthiohydantoin) analysis system(Protein sequencer 467A, ABI)으로 분석하여 NH₂-말단 아미노산 서열을 결정하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

Ammonium sulfate에 의한 효소의 회수 배양액을 0°C에서 4,500 \times g로 20분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액을 ammonium sulfate로 30%에서 80%(v/v)까지 분별 염색시켜 단백질을 침전시킨 후 9,000 \times g에서 15분간 원심분리하여 얻은 침전물을 10 mM phosphate buffer(pH 6.0)에 녹여 24시간 동안 투석하였다.

CM-cellulose column chromatography 투석한 효소액을 미리 10 mM phosphate buffer(pH 6.0)로 평형화시킨 CM-cellulose column(3.5 \times 30 cm)에 주입하여 0.05~0.5 M NaCl 용액을 이용, 농도구배를 주어 시간당 15 ml의 유속으로 tube당 4 ml씩 분획하여 용출시킨 결과는 Fig. 1과 같았다. 본 효소는 NaCl 약 0.1 M에서

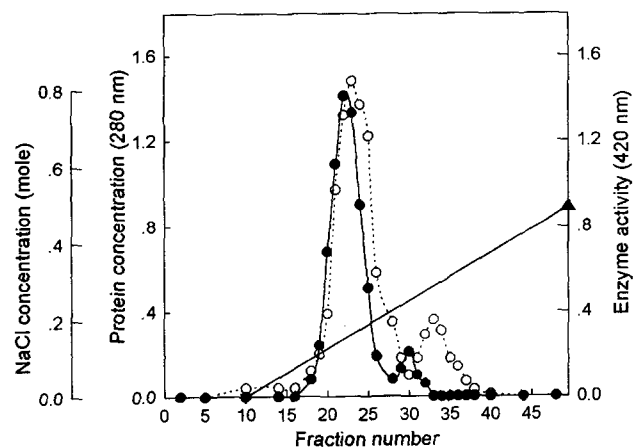


Fig. 1. Column chromatography of alkaline protease from *Xanthomonas* sp. YL-37 on CM-cellulose.

The sample solution was applied to the column (3.5 \times 30 cm) equilibrated with 10.0 mM phosphate buffer (pH 6.0) and then eluted with 0.05-0.5 M NaCl-10.0 mM phosphate buffer. The flow rate was 15 ml/hr. Symbols: (○); protein concentration, (●); alkaline protease activity, (▲); NaCl gradient.

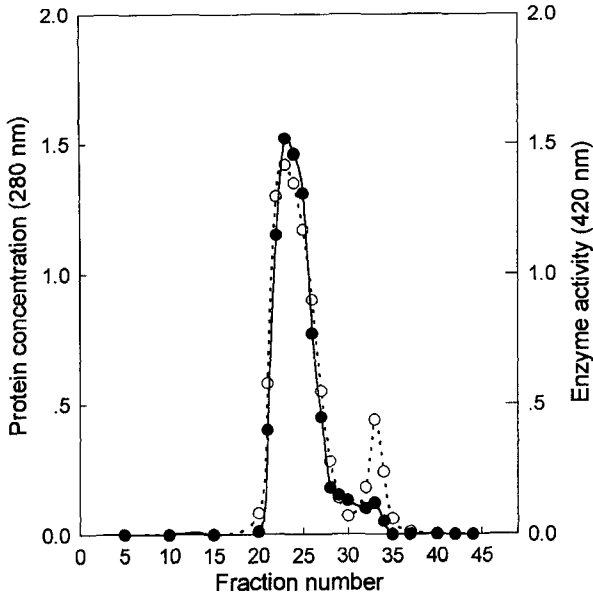


Fig. 2. Column chromatography of alkaline protease from *Xanthomonas* sp. YL-37 on Sephadex G-100 (1st).
The sample solution was applied to the column (1.5×100 cm) equilibrated with 20.0 mM phosphate buffer (pH 8.0). The flow rate was 7.0 ml/hr.
Symbols: (○); protein concentration
(●); enzyme activity

용출되기 시작하여 0.3 M에서 완전히 용출되었다. Fraction number 22주위에서 main alkaline protease가 용출되었으며 fraction number 30부위에서 또 다른 alkaline protease의 peak가 나타났으나 본 실험에서는 효소의 활성도가 높은 fraction number 15~28의 것을 모아서 정제실험에 이용하였다.

Sephadex G-100 column chromatography

1st gel filtration CM-cellulose column을 통과시켜 얻은 효소액의 활성부위(fraction number 15~28)를 모아 ultrafiltration법으로 농축시킨 후 20 mM phosphate buffer(pH 8.0)로 용해시켜 동일한 완충용액으로 투석하고, 미리 20 mM phosphate buffer(pH 8.0)로 평형화시킨 Sephadex G-100 column(1.5×100 cm)에 주입하여 동일 완충용액으로 fraction 당 3.5 ml씩 7 ml/hr의 속도로 용출시킨 결과는 Fig. 2와 같았다.

Fig. 2에서와 같이 완전 정제되지 않고 불순물의 peak가 존재하였으므로 효소활성이 많은 앞 부위(fraction number 20~29)만을 모아 ultrafiltration으로 농축하여 다시 gel filtration을 하였다.

2nd gel filtration 전기 1st gel filtration한 시료에서 활성부위만 모아 ultra filtration법으로 농축시킨 시료를 동일 column에 loading하여 동일 buffer로 tube당 3.0 ml씩 5 ml/hr의 속도로 2차 용출시킨 결과는 Fig. 3과

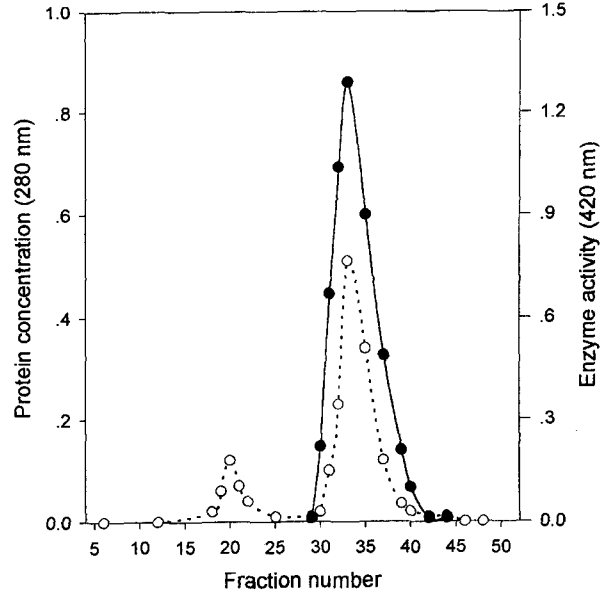


Fig. 3. Column chromatography of alkaline protease from *Xanthomonas* sp. YL-37 on Sephadex G-100 (2nd).
The sample solution was applied to the column (1.5×100 cm) equilibrated with 20.0 mM phosphate buffer (pH 8.0). The flow rate was 5.0 ml/hr.
Symbols: (○); protein concentration
(●); enzyme activity

Table 1. Purification summary of alkaline protease from *Xanthomonas* sp. YL-37

Procedure	Total activity (DU*)	Total protein (mg)	Specific activity (DU/mg)	Recovery
Culture broth	10,279,000	1,700	6,064.4	100
Ammonium sulfate (30~30%)	3,211,704	395.5	8,120.6	31.2
CM-cellulose	1,102,572	108	10,209	10.7
Sephadex G-100 (1st)	377,839	20.1	18,798	3.5
Sephadex G-100 (2nd)	235,952	9.2	25,647	2.3

*DU: delft unit.

같았다. Fig. 3에서와 같이 단백질 peak와 효소활성 peak가 일치하므로 정제된 것으로 판단하였다.

이상의 정제과정을 요약하면 Table 1과 같으며 최종수율은 2.3%였고 효소의 비활성은 약 4배 정도 증가하였다.

효소의 단일성 및 분자량

Native PAGE에 의한 확인 Sephadex G-100으로 정제한 alkaline protease의 단일성 확인 및 분자량을 측정하기 위하여 10%-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 결과는 Fig. 4와 같이 단일 band만을 보였으므로

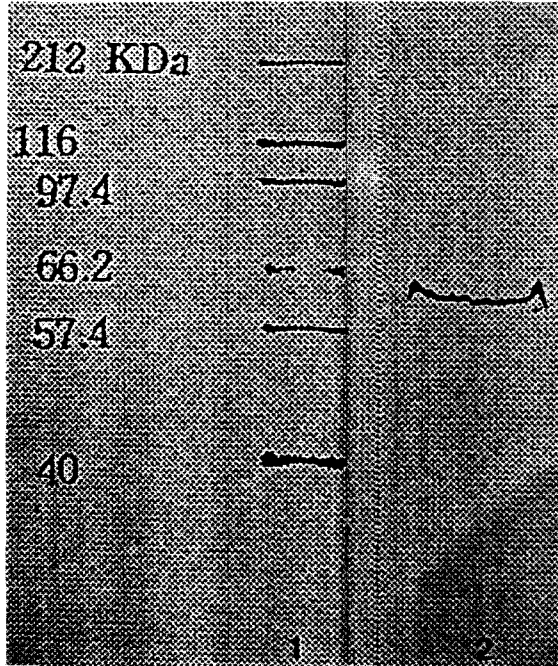


Fig. 4. Native-polyacrylamide gel electrophoresis of purified alkaline protease from *Xanthomonas* sp. YL-37. Lane 1; molecular weight standard Lane 2; purified alkaline protease

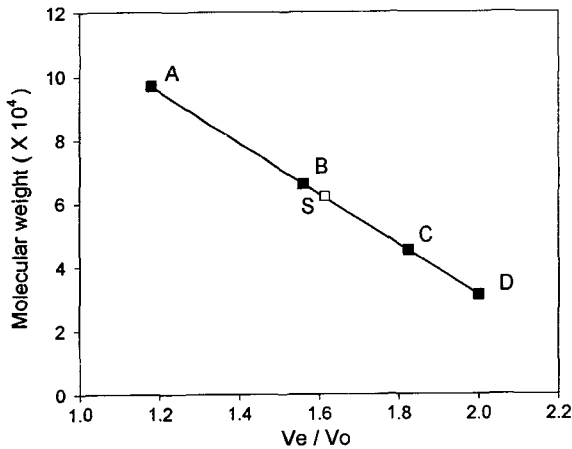


Fig. 5. Determination of V_e/V_o and M.W. of proteins. A: phosphorylase B (97,000) B: bovine serum albumin (66,000) C: oval albumin (45,000) D: carbonic anhydrase (31,000)

순수 분리되었다고 판단되었다.

본 효소의 분자량은 10%-polyacrylamide gel상에서 표준단백질과 상대이동거리를 측정하여 표준 단백질의 logarithm을 취한 값과 비교하여 결정한 결과는 Fig. 5와 같이 약 62,000 dalton 정도였다.

SDS-PAGE에 의한 확인 정제한 alkaline protease의 단일성 및 subunit를 측정하기 위하여 SDS-PAGE한 결과는 Fig. 6과 같이 단일 band를 나타내므로 정제되었

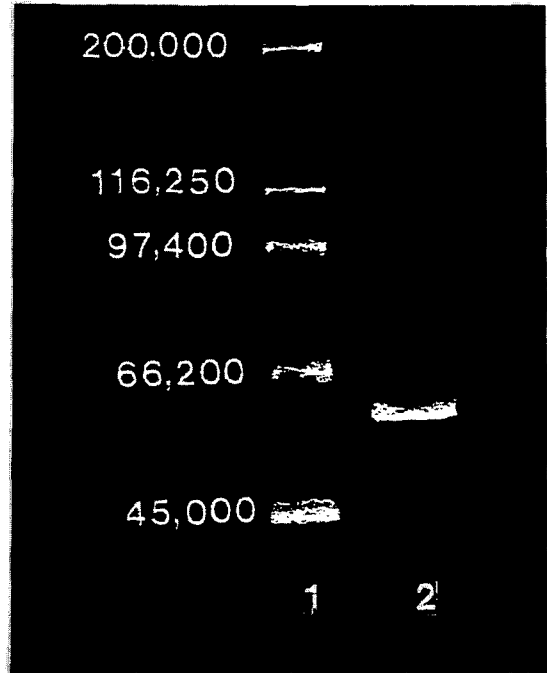


Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified alkaline protease. Lane 1; molecular weight standard Lane 2; purified alkaline protease

음을 확인하였다. 또한 본 효소의 subunit는 monomer로 구성되어있으며, 그 분자량은 표준 단백질과 상대이동거리를 비교한 결과 약 62,000 dalton으로 Native PAGE 결과와 일치하였다.

이런 결과는 Horikoshi[13]가 보고한 *Bacillus* sp. 유래의 alkaline protease의 분자량이 약 25,000에서 30,000 dalton 사이에 존재한다는 것과는 상이하였으며, Strydom 등[36]이 보고한 33,000 dalton과도 상이하였다. 또한 이 등[24]이 보고한 *Pseudomonas* sp.의 70,000과 56,000 dalton과도 차이가 있었다.

효소의 성질

효소의 최적 pH 및 안정성 *Xanthomonas* sp. YL-37균주가 생산하는 alkaline protease의 최적작용 pH를 조사하기 위하여 pH 5.0에서 pH 13.0까지 각각의 pH별로 하여 50℃에서 30분간 반응시켜 그 활성도를 측정 한 결과는 Fig. 7과 같이 최적 작용 pH는 11.0이었다. 또한 정제효소의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 pH 6.0에서 pH 13.0까지 각각의 pH로 조절하여 50℃에서 30분 처리하여 최적 pH인 11.0으로 조정 한 다음 잔존 활성을 측정 한 결과는 pH 6.0~11.0까지 비교적 안정하였고 pH 13.0과 pH 6.0에서는 효소활성이 감소하였다. 이와 같은 결과는 Margesin 등[28]이 보고한 *Bacillus* sp.의 효소와 동일하였으며 Tsujibo 등[38]이 보고한 *Ac-*

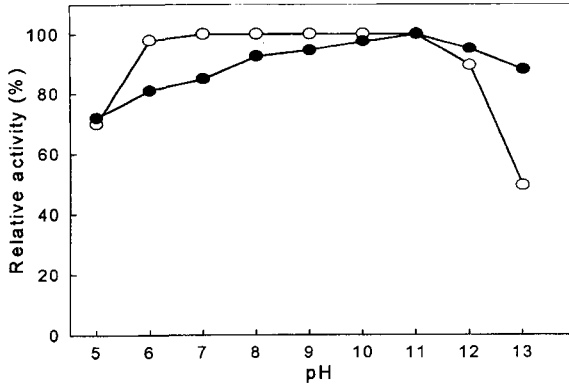


Fig. 7. Effect of pH on the purified alkaline protease from *Xanthomonas* sp. YL-37.

pH 5; citrate buffer, pH; 6 phosphate buffer, pH 7~9; Tris-HCl buffer, pH 10~11; Sodium borate buffer, pH 12~13; NaOH-KCl buffer. ●: optimal pH, ○: pH stability.

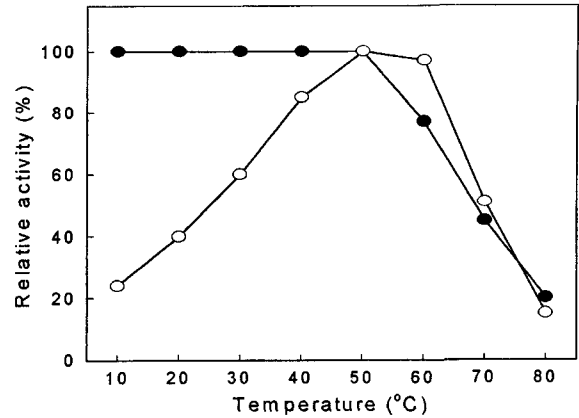


Fig. 8. Effect of temperature on the purified alkaline protease from *Xanthomonas* sp. YL-37.

○: optimal temperature, ●: temperature stability.

tinomycetes sp.와 Horikoshi[13]가 발표한 *Bacillus* sp. No. 221의 효소와도 동일하였다. 그러나 Takami 등[37]이 보고한 pH 12.0~13.0 보다는 낮았다. Kobayashi 등[20]과 배 등[6]이 보고한 중온균의 alkaline protease가 pH 5.0~12.0까지 안정하다는 것 보다는 안정영역이 좁았으며 Fujiwara 등[11], Okada 등[31]의 *Bacillus* sp.와는 동일하였다. 또한 Rho 등[34]의 *Pseudomonas* sp.에서는 pH 6.0~10.0이었다는 보고와 Allison 등[2]의 *Clostridium sporogens* 보다는 안정성이 약간 높았다. 따라서 *Xanthomonas* sp. YL-37균주가 생산하는 alkaline protease는 알칼리 범위(pH 9.0이상)에서 효소활성이 안정하므로 세제용 효소로 이용가능성이 높다고 판단된다.

효소의 최적 온도 및 열안정성 정제한 alkaline protease의 최적 반응온도를 조사하기 위하여 반응액의 pH를 11.0으로 하여 10°C에서 80°C까지 각 온도별로 30분간 반응시킨 후 효소활성을 조사한 결과는 Fig. 8과 같이 50°C에서 최적 활성을 나타냈다.

또한 효소의 열에 대한 안정성은 10°C에서 80°C까지 온도를 변화하여 각각의 온도에서 30분간 열처리한 후 50°C에서 기질과 반응시켜 그 잔존활성을 측정 한 결과는 20~50°C에서는 안정하였으나 60°C이상에서는 불안정하였다. 또한 70°C이상에서는 효소활성이 급격히 감소되는 경향을 보였으나 20°C인 저온에서는 최적온도의 약 40%정도의 활성을 나타내는 것으로 보아 우리 나라 및 동·북아시아의 세탁조건에 맞는 세제용 효소로서의 이용가능성이 높다고 판단된다. 이는 덴마크의 Novo사에서 생산·시판하고 있는 Sabinase와 20°C에서의 활성을 비교했을 때 본 효소가 80%정도 더 높은 활성을 나타냈다. 본 효소의 최적 반응온도는 Rahman 등[33]의 *Bacillus stearothermophilus*와 Matsuzawa 등[29]의 *Thermus* sp.에서 최적 활성온도가 75°C였다는 보고 보다

는 낮았으며 Kalebina 등[18]의 *Bacillus* sp.에서 최적 활성온도가 50°C였다는 보고와 같았다. 또한 노 등[34]의 *Pseudomonas* sp.에서는 40°C였다는 보고 보다는 약간 높았다. Atalo 등[4]이 보고한 70°C와 Kunitate 등[21]이 보고한 65°C보다는 열안정성이 낮았다.

금속염의 영향 분리 정제한 alkaline protease의 활성에 미치는 금속염의 영향을 조사하기 위하여 최종 농도가 1 mM과 5 mM이 되도록 각각의 금속염을 첨가하여 50°C에서 30분간 효소를 처리시킨 후 효소의 활성을 조사한 결과는 Table 2와 같았다. 그 결과 본 효소는 MnSO₄, MgSO₄, CaCl₂ 등에 의해서 효소활성이 증가되었으며, 특히 CaCl₂의 경우 촉진 작용을 하는 것과 같은 결과를 얻었으나 이는 열에 대한 효소의 변성에 보호 작용을 하는 것으로 추측된다. 반면에 HgCl₂, ZnSO₄, CuSO₄ 등에 의해서 효소활성이 저해되었다. 이와 같은 결과는 윤 등[40]과 Mizusawa 등[30]이 보고한 *Streptomyces* sp.의 alkaline protease가 Mn²⁺, Ca²⁺ 등에 의해

Table 2. Effect of inorganic salts on alkaline protease activity

Inorganic salts	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100.0	100.0
NaCl	100.8	98.7
KCl	94.7	111.4
Al ₂ O ₃	98.7	101.1
CaCl ₂ · 2H ₂ O	102.3	110.4
FeCl ₃	98.0	103.3
AgNO ₃	104.3	107.7
BaCl ₂ · 2H ₂ O	107.6	103.3
MgSO ₄ · 7H ₂ O	95.8	112.6
CuSO ₄ · 5H ₂ O	101.7	77.9
HgCl ₂	98.5	57.6
MnSO ₄ · 4H ₂ O	109.9	123.5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	83.0	77.3

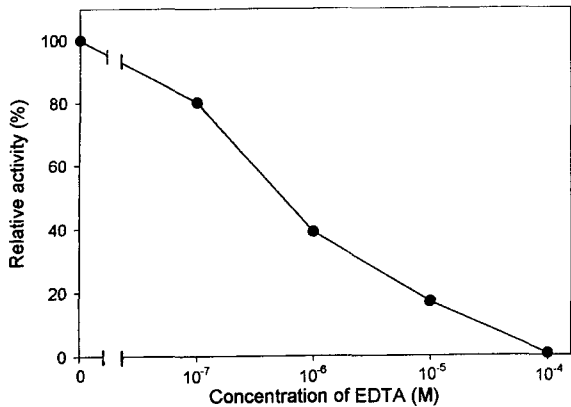


Fig. 9. Effect of EDTA on purified alkaline protease activity from *Xanthomonas* sp. YL-37.

서 활성이 촉진되며 또한 배 등[6]이 보고한 MgSO₄가 촉진한다는 결과와는 같았으며 CuSO₄, ZnSO₄, HgCl₂ 등에 의해 저해 작용을 받는다는 것과 유사하였다. 특히 HgCl₂의 경우 Horikoshi 등[12-16]이 보고한 *Bacillus* sp. 유래의 alkaline protease는 잔존활성이 28% 정도 였으나 본 효소의 잔존활성은 57.6%로서 우수성을 가지므로 효소세제로의 사용에 유리하다고 판단된다. 그러나 Mizusawa 등[30]의 효소촉진제가 CuSO₄였다는 보고와는 상이하였으나 FeSO₄가 촉진한다는 점은 유사하였다.

EDTA농도에 따른 영향

전보[23]에 따르면 EDTA와 ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetra acetic acid (EGTA)에 의해서 약 51% 저해받았다. 따라서 효소반응 용액에 EDTA용액의 최종농도가 10⁻⁴ M에서 10⁻⁷ M이 되도록 각각 넣고 50℃에서 30분간 효소 작용시킨 결과는 Fig. 9와 같았다. alkaline protease는 EDTA 첨가농도에 따라서 활성은 상대적으로 감소하였으며 10⁻⁴ M첨가시 활성이 완전히 소실되었다.

이와 같은 결과는 효소구성성분에 cofactor가 존재할 것으로 추정되며 또한 apoenzyme과는 약하게 결합되었

Table 3. Reactivation ratio of alkaline protease by metal salt

Metal salt	Reactivation (%)	
	5 mM	50 mM
None	0	0
FeCl ₃	85	50.7
MgSO ₄	0	19.8
MnSO ₄	91.4	106.3

을 것으로 추정된다.

Cofactor의 성분

Cofactor의 성분을 조사하기 위하여 정제효소에 EDTA를 넣어 금속과 착염을 형성시킨 후 투석하여 EDTA와 금속을 제거한 후 각각의 금속염을 넣고 효소활성의 부활정도를 측정한 결과는 Table 3과 같았다.

Table 3에서와 같이 MnSO₄를 5 mM되게 첨가한 경우 약 91.4%회복되었으며 50 mM에서 100% 부활되었다. 반면 FeCl₃ 및 MgSO₄의 경우 각각 85%, 19.8% 회복되었다.

이와 같은 결과로 본 효소에는 cofactor로 Mn²⁺가 결합되어 있으며 결합상태는 metal enzyme type으로 되어 있다고 판단된다. 이와 같은 결과는 Sexton 등[35]이 *Pseudomonas pseudomallei*에서 Fe가 cofactor였다는 것과 지금까지 밝혀진 metalloprotease에서는 Zn²⁺[12]이 cofactor였다는 것과는 상이하였다.

NH₂-말단 아미노산 서열 결정

정제된 alkaline protease의 NH₂-말단 아미노산 잔기를 분석한 결과는 Fig. 10과 같이 alanine이었고, 아미노산의 상동성을 비교한 결과는 *Pseudomonas aeruginosa* [34], *Pseudomonas pseudomallei*[35], Subtilisin BPN' 그리고 Subtilisin Carlsberg[17]과 상동성은 거의 없었다.

반응속도에 미치는 기질의 영향

본 효소의 반응속도를 조사하기 위하여 casein의 농도

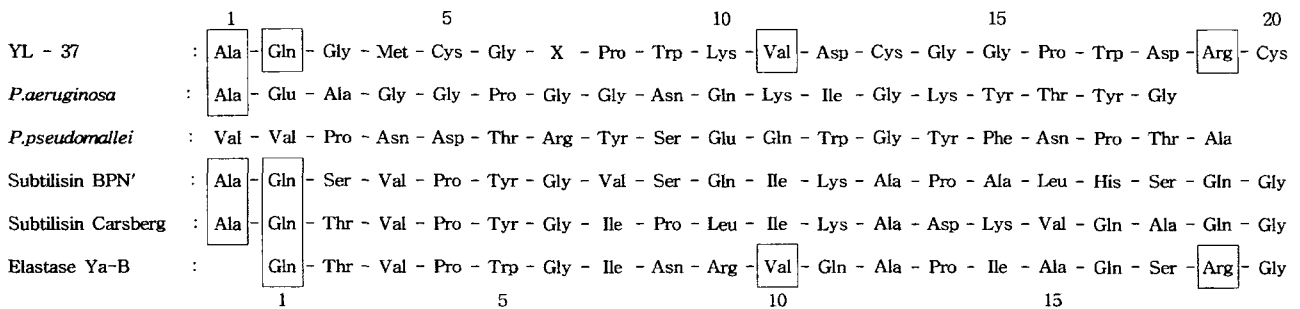


Fig. 10. Comparison of the NH₂-terminal sequence of alkaline protease from *Xanthomonas* sp. YL-37 with those of other alkaline proteases. The homologous amino acid residues are boxed.

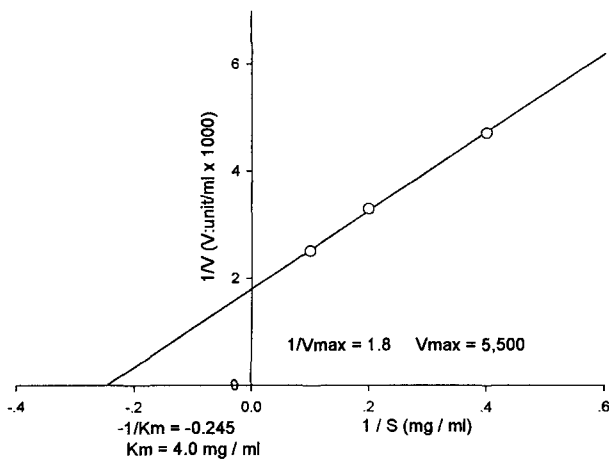


Fig. 11. Lineweaver-Burk plot of various concentration of casein on the enzyme reaction rate.

를 1.0, 2.0, 2.5, 5.0 및 10.0 mg/ml로 조절하여 효소와 반응시킨 후 단백질 분해 효소의 활성을 Lineweaver-Burk plot[26]상에서 조사한 결과는 Fig. 11과 같았다. 본 효소의 Km값은 4.0 mg/ml였으며 Vmax는 5,500 unit/ml이었다. 이는 Takami 등[37]이 보고한 8.5 mg/ml와 Kim 등[19]이 보고한 10.0 mg/ml보다는 낮았으며, Banerjee 등[7]이 *Rhizopus oryzae*에서 1.11 mg/ml였다는 보고와 배 등[6]이 보고한 1.3 mg/ml보다는 높았다.

요 약

Xanthomonas sp. YL-37 이 생산하는 alkaline protease를 정제하기 위하여 ammonium sulfate로 침전시켜 회수하여 CM-cellulose ion exchange resin column에 주입한 후 Sephadex G-100 column에 2회 통과시켜 단일효소를 얻었으며 분자량은 약 62,000 dalton으로 단일 subunit로 되어있다. 정제효소의 반응최적온도는 50℃였으며 특히 20℃에서도 최적활성의 약 40%를 유지하였다. 금속염에 대한 영향은 MnSO₄, MgSO₄, CaCl₂ 등에 의해서 효소활성이 촉진되었으나 HgCl₂, ZnSO₄, CuSO₄ 등에 의해서 효소활성이 저해되었다. 본 효소는 EDTA, EGTA에 의해서 강하게 저해를 받는 것으로 보아 metal ion을 갖고 있는 metalloenzyme으로 보이며 효소에 결합된 cofactor는 Mn²⁺이었으며 정제한 alkaline protease의 NH₂-말단 아미노산은 alanine이었다. 본 효소의 Km값은 4.0 mg/ml이었고 Vmax는 5,500 unit/ml이었다.

REFERENCES

1. Ahn, J. W, T. K. Oh, K. H. Park, and Y. H. Park. 1990. Partial purification and characterization of the alkaline protease from *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol.*

Biotechnol. **18**: 344-351.
 2. Allison, C. and G. T. Macfarlane. 1992. Physiological and nutritional determinant of protease secretion by *Clostridium sporogenes* characterization of six protease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 152-156.
 3. Antoon, G. V. V. 1974. Enzyme-polymer complexes. *London patent* No. 1353317.
 4. Atalo, K. and B. A. Gashe. 1993. Protease production by a thermophilic *Bacillus* species (P-001A) which degrades various kinds of fibrous protein. *Biotech. Lett.* **15**: 1151-1156.
 5. Aunstrup, K., H. Outtrup, O. Andresen, and C. Dambmann. 1972. Proteases from alkalophilic *Bacillus* species, pp. 299-305. *Fermentation Technology Today*(Proceedings of the 4th International Fermentation Symposium), Society Ferment. Technol., Osaka.
 6. Bae, M. and P. R. Park. 1989. Purification and characterization of thermotolerable alkaline protease by alkalophilic *Bacillus* sp. No. 8-16. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 545-551.
 7. Banerjee, R. and B. C. Bhattacharya. 1993. Kinetic properties of extracellular alkaline protease of *Rhizopus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 380-382.
 8. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-251.
 9. Cho, H. H. and S. K. Shim. 1982. Properties of alkaline protease produced by thermostable *Bacillus* sp. *Collection of Kyung Nam Ind. Jr. College* **6**: 295-309.
 10. Edman, P. and A. Henschen. 1975. Protein sequence determination, pp. 232-279. *In* S.B. Needleman (ed.), *Sequence Determination*. Springer, Berlin, New York.
 11. Fujiwara, N., A. Masui, and T. Imanaka. 1993. Purification and properties of highly thermostable alkaline protease from an alkalophilic and thermophilic *Bacillus* sp. *J. Biotechnol.* **30**: 245-256.
 12. Horikoshi, K. and T. Akiba. 1982. *Alkalophilic Microorganisms*, pp. 93-101. Scientific Societies Press, Tokyo.
 13. Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganism. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* sp. No. 221. *Agri. Biol. Chem.* **35**: 1407-1414.
 14. Horikoshi, K. 1985. Alkalophilic microorganisms, pp. 140-144. *In* T. Beppu (ed.), *Screening Technology*. Koudan-sha, Tokyo.
 15. Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganism. Part II. Alkaline amylase produced by *Bacillus* sp. No. A-40-2. *Agri. Biol. Chem.* **35**: 1783-1791.
 16. Horikoshi, K. 1972. Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganism. Part III. Alkaline pectinase produced by *Bacillus* sp. P-4-N. *Agri. Biol. Chem* **36**: 285-293.
 17. Jacobs, M., M. Eliasson, M. Uhelen, and J. I. Flock.

1985. Cloning, sequencing and expression of Subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic Acids Review* **13**: 8913–8926.
18. Kalebina, T. S., G. N. Rudenskaya, I. O. Selyakh, O. M. Khodova, G. G. Chestukhina, V. M. Stepanov, and I. S. Kulaev. 1988. Serine proteinase from *Bacillus brevis*: Lytic action on intact yeast cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 531–536.
19. Kim, T. H., S. H. Park, D. S. Lee, J. K. Kim, and S. D. Hong. 1990. Properties of alkaline protease produced by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 159–164.
20. Kobayashi, T., A. Ogasawara, S. Ito, and N. Saitoh. 1985. Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*. *Agri. Biol. Chem.* **49**: 693–698.
21. Kunitate, A., M. Okamoto, and I. Ohmori. 1989. Purification and characterization of a thermostable serine protease from *Bacillus thuringiensis*. *Agri. Biol. Chem.* **53**: 3251–3256.
22. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
23. Lee, C. H., T. J. Kwon, S. M. Kang, H. H. Suh, G. S. Kwon, H. M. Oh, and B. D. Yoon. 1994. Production and characterization of an alkaline protease from an isolate, *Xanthomonas* sp. YL-37. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 515–521.
24. Lee, H. S. and Y. M. Kim. 1991. Purification and characteristics of an intracellular protease from *Pseudomonas carboxydrogena*. *Kor. J. Microbiol.* **29**: 167–171.
25. Leighton, T. J., R. H. Doi, R. A. J. Warren, and R. A. Kelln. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **76**: 103–122.
26. Lineweaver, J. and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 658–666.
27. Malathi, S. and R. Chakraborty. 1991. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolated under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 712–716.
28. Margesin, R., N. Palma, F. Knauseder, and F. Schinner. 1992. Purification of an alkaline protease produced by a psychrotrophic *Bacillus* sp. *J. Biotechnol.* **24**: 203–206.
29. Matsuzawa, H., M. Hamaoki, and T. Ohta. 1983. Production of thermophilic extracellular proteases (Aqualysin I and II) by *Thermus aquaticus* YT-1, an extreme thermophile. *Agri. Biol. Chem.* **47**: 25–28.
30. Mizusawa, K., E. Ichishima, and F. Yoshida. 1964. Studies on the proteolytic enzyme of the thermophilic *Streptomyces*. *Agri. Biol. Chem.* **28**: 884–895.
31. Okada, J., H. Shimogaki, K. Murata, and A. Kimura. 1984. Cloning of the gene responsible for the extracellular proteolytic activities of *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 406–412.
32. Onouchi, T. 1986. Development of biosurfactant. *Bioindustry* **3**: 181–188.
33. Rahman, R. N. Z. A., C. N. R. Kamaruzaman, A. M. Basri, W. M. Z. W. Yunus, and A. B. Salleh. 1994. Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 822–827.
34. Rho, J. S., Y. C. Chung, S. K. Park, and N. K. Sung. 1991. Isolation of alkalopsychrotropic protease producing *Pseudomonas* sp. RP-222 and properties of its crude enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 383–389.
35. Sexton, M. M., A. L. Jones, W. Chaowagul, and D. E. Woods. 1994. Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas pseudomallei*. *Can. J. Microbiol.* **40**: 903–910.
36. Strydom, E., R. I. Mackie, and D. R. Woods. 1986. Detection and characterization of extracellular protease in *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 214–217.
37. Takami, H., T. Akiba, and K. Horikoshi. 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 519–523.
38. Tsujibo, H., K. Miyamoto, T. Hasegawa, and Y. Inamori. 1990. Purification and characterization of two types of alkaline serine proteases produced by an alkalophilic *Actinomycetes*. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 520–529.
39. Willadsen, K. J. S. and K. P. Vestberg. 1976. *U.S. Patent* No. 3960665.
40. Yun, S. W., K. P. Lee, J. H. Yoo, C. S. Shin, and D. H. Oh. 1989. Purification and properties of alkaline protease from *Streptomyces* sp. YSA-130. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 358–364.

(Received May 4, 1998)