KOREAN J. FOOD & NUTR.
Vol. 13. No. 2, 176~180(2000)

고온성 방선균이 생산하는 단백질 분해효소의 정제와 특성

김 중 배
상지영서대학 식품영양과

Purification and Properties of Protease from Thermophilic Actinomyces

Jung-Bae Kim
Dept. of Food and Nutrition, Sangji Youngseo College, Wonju, Kangwon, 220-713, Korea

Abstract

Microbial protease has been interesting due to the biological roles in the producing microorganism. A thermophilic Actinomyces producing protease was isolated from soil. The optimal medium composition and culture conditions for maximum protease production was as follows 0.5% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $CaCl_2$, initial pH 8.0 at 50℃ for 48hours. The protease was purified by the procedure of ammonium sulfate precipitation, anion exchange chromatography(LC), DEAE high performance liquid chromatography and GPC HPLC. The purification fold of the purified enzyme was increased about 22.6. The optimal pH and temperature for reaction of the purified enzyme were 7.5 and 60℃. The purified enzyme was stable for the pH range from 6.0 to 8.5, but was unstable when treated at 80℃ for 10 minutes. The activity of the enzyme was inhibited by Ag^+ and Cu^{2+}.

Key words : protease purification, properties, thermophilic Actinomyces.

서 론

고온에서 생육하는 미생물은 배양시간의 단축, 잡균에 의한 오염방지 및 열에 안정한 내열성 효소를 생산하고 있어 산업적 관심이 높다[1,2]. 특히 내열성 효소는 생물전환기술을 통하여 아미노산과 새로운 기능을 갖는 펩티드를 생산할 목적으로 많은 연구가 진행되고 있다[3]. 근래 단백질의 3차 구조와 기능의 상관관계가 구명됨에 따라 인공 단백질의 설계와 생산이 가능하며, 이를 이용한 단백질의 열 안정화, 효소활성 증대, 기질특이성 개량, 유기용매에서 안정화와 활성발현, cofactor 요구성 및 allosteric 조절성의 개량, 융합단백질 조성에 의한 새로운 기능 부가 등 폭넓은 응용가능성을 검토하고 있다[4,5]. 미생물에서 유래되는 단백질분해효소는 곰팡이, 세균 등에서 많이 생산되고 있고, 세균 중에서도 *Bacillus* 속에서 생산되는 알칼리성 효소에 관한 연구는 많이 되었으나[6~8], 고온성 방선균에서의 보고[9]는 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구는 내열성 효소를 탐색할 목적으로 고온성 방선균을 토양에서 분리하여 여기서 생산되는 단백질 분해효소를 정제하여 효소학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 효소 생산조건

효소생산의 액체 배지조성은 1 *l* 삼각 플라스크에 0.5% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $CaCl_2$, initial pH 8.0으로 조절한 200ml 액체배지를 가압 멸균한 후 시험균주를 접종하여 50℃에서 2일간 배양하였다. 배양액은 원심 분리하여 균체를 제거한 후 상등액을 정제시료로 사용하였다.

2. 효소의 정제

균체를 제거한 상등액은 ammonium sulfate 농도

* Corresponding author : Jung-Bae Kim

가 85%가 되도록 가하여 4℃에서 4시간 방치한 후 8000×g에서 10분간 원심 분리하였다. 효소단백 침전물은 소량의 완충액(20mM Tris-HCl, pH 7.5)으로 용해한 후 cellophane tube에 넣고 4℃에서 5mM Tris 완충액(pH 7.5)으로 48시간 투석시켰다. 투석한 효소액은 20mM Tris 완충액(pH 7.5)으로 미리 평형시킨 음이온 교환수지인 DEAE 컬럼(2.5×35cm, TSK gel, DEAE-Toyopearl 650S)을 사용하여 흡착시킨 후 동일한 완충액(pH 7.5)으로 세척한 후 0.5M NaCl을 함유한 완충액으로 구배법으로 용출시켰다. 분획된 활성부분은 증발농축기(speed vac, Hanil, Korea)를 사용하여 농축한 후 HPLC(505B Gilson, France)를 사용하여 DEAE 컬럼(0.8×7.5cm, 5 μm, 120Å, YMC-pack IES-AX, Japan)으로 분당 1ml 속도로 상기의 조건으로 구배법(gradient)으로 활성부분을 용출시켰다. 활성부분은 GPC 컬럼(Diol-120 silica column, 0.8×50cm, 5 μm, YMC, Japan)을 사용하여 HPLC(505 B Gilson, France)로 최종 분리하였다.

3. 단백질 농도 측정

단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry 등[10]의 방법에 따라 정량하였다. 즉 $CuSO_4$-alkali 용액 2.5ml를 가하여 잘 혼합하여 10분간 방치한 후, Folin시약 0.25ml를 넣고 실온에서 30분간 반응시켜 발색시킨 후 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도는 표준물질로부터 작성한 검량선을 이용하여 계산하였다. 효소정제 과정 중의 단백질 농도는 280nm에서 흡광도로 측정하였다.

4. 효소의 활성 측정

효소활성 측정은[11] 0.1M Tris 완충액(pH 7.5) 0.4ml, 시료용액 0.1ml와 1% milk casein용액 0.5ml를 가하여 50℃에서 20분간 반응시킨 후 0.44M TCA용액(trichloroacetic acid) 2ml를 가하여 반응을 정지시킨 후, 실온에서 20분간 방냉하여 원심 분리하였다. 상등액 1ml와 0.55M Na_2CO_3 용액 2.5ml, Folin-Ciocalteau 발색시약 0.5ml를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성도는 pH 7.5, 50℃에서 1분 동안 milk casein(기질)으로부터 1 μg의 tyrosine을 유리시키는 데 필요한 양을 1Unit로 정하였다.

결 과

1. 효소의 분리 정제

효소의 정제는 배양여액(1 l)에 ammonium sulfate 농도가 85% 되도록 가하여 침전을 시켜 원심 분리한 후 효소단백 침전물을 cellophane tube에 넣고 48시간 탈염시켰다. 침전물은 소량의 20mM Tris 완충액으로(pH 7.5) 용해시켜 미리 동일한 완충액으로 평형화시킨 DEAE 컬럼에 넣고 0.5M NaCl을 사용하여 구배법으로 용출시켰다. 200ml의 동일한 완충액으로 세척하고 0.5M NaCl으로 구배법으로 용출시켜 분획된 활성부분은 0.4M NaCl 농도에서 용리되었다. 활성부분은 감압농축하여 상기의 조건에서 DEAE-HPLC 컬럼을 사용하여 280nm에서 분당 1ml 유속으로 용출시킨 결과 주된 피크가 0.36M NaCl 농도에서 활성부분이 검출되었다(Fig. 1). 분획된 활성부분은

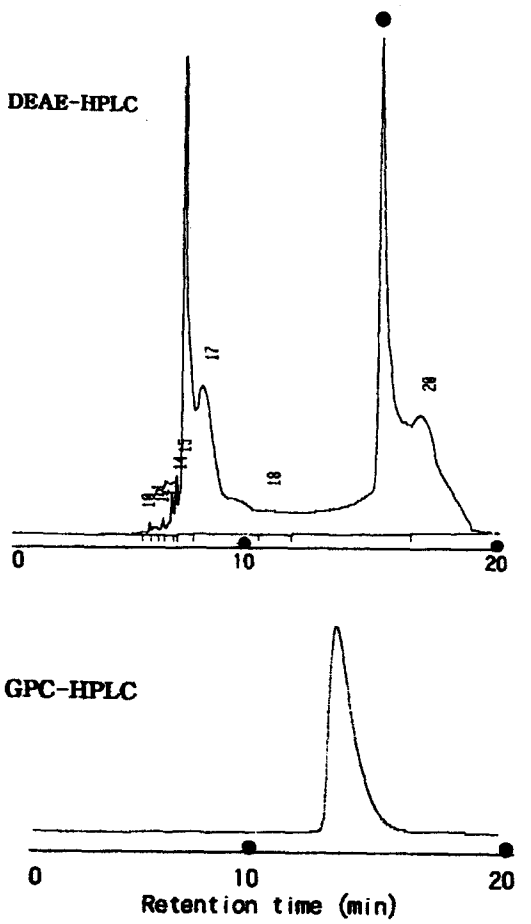

Fig. 1. HPLC chromatogram of purified protease. DEAE column: YMC-pack IES-AX(0.8×7.5cm, 5 μm, 120Å, Japan), Elution: 0~0.5M NaCl gradient in 20mM Tris buffer(pH 7.5), Flow rate: 1ml/min, GPC column : YMC Diol-120 silica column(0.8×50cm, 5 μm, Japan), Elution: 20mM Tris buffer(pH 7.5) Flow rate: 1ml/min.

Table 1. Summary of purification procedure of protease

Step	Protein (mg)	Enzyme (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Enzyme yield (%)	Enrichment (fold)
Crude enzyme	4,289	37,235	6.7	100	1.0
Amm. sulfate	3,182	30,156	19.8	81	3.0
DEAE-HPLC	487	12,536	93.5	34	14.0
GPC-HPLC	204	8,321	185.3	22	27.7

동일 완충용액을 사용하여 GPC HPLC컬럼을 사용하여 최종적으로 분리하였다. 정제효소의 정제도는 배양여액에 비해 22.6배 증가되었다(Table 1).

2. 최적 pH와 pH 안정성

pH에 대한 영향을 조사하기 위하여 pH 3.0에서 10.0까지 0.2M Britton-Robinson 광역 완충액을 사용하여 최적 pH를 조사한 한 결과 pH 7.5에서 가장 활성이 좋았으며, pH 9.0에서는 60%, pH 4.0 이하에서는 45%의 상대활성을 나타내었다(Fig. 2). pH에 대한 안정성은 7.0~8.0사이에서는 매우 안정하였으며, pH 10에서 40%, pH 4.0 이하에서는 50%정도 실활되었다(Fig. 3).

3. 최적온도와 열 안정성

효소활성의 최적온도를 조사하기 위하여 50℃에서 80℃까지 항온 수조에서 각 온도별로 활성을 조사한 결과 60℃에서 최대의 활성을 보였으며, 70℃에서는 64%의 상대활성을 보였다(Fig. 4). 열에 대한 안정성은 60℃에서 30분 반응시켜도 안정하였으나, 120분간 반응시킨 결과 잔존하는 효소활성은 40% 이하, 70℃

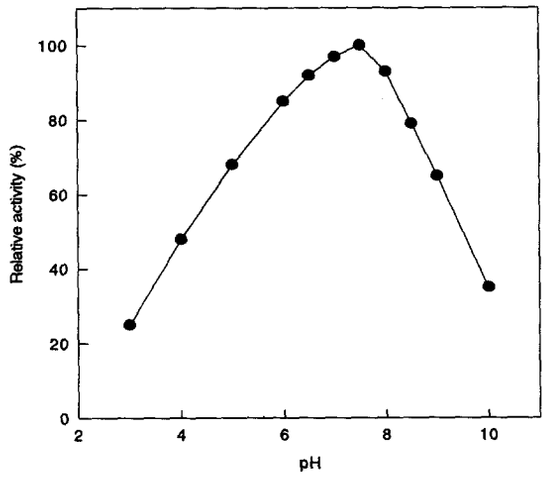

Fig. 2. Effect of pH on activity of the purified protease.

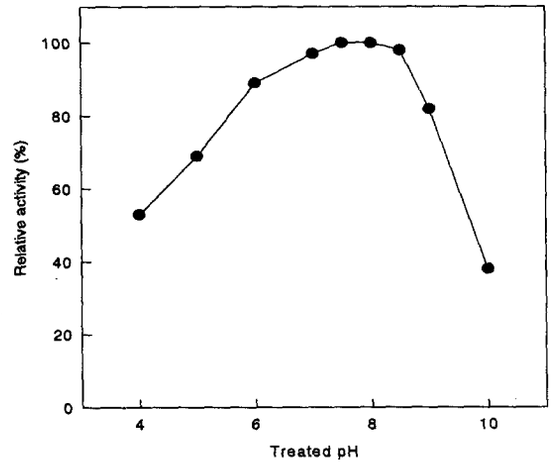

Fig. 3. pH stability of the purified protease.

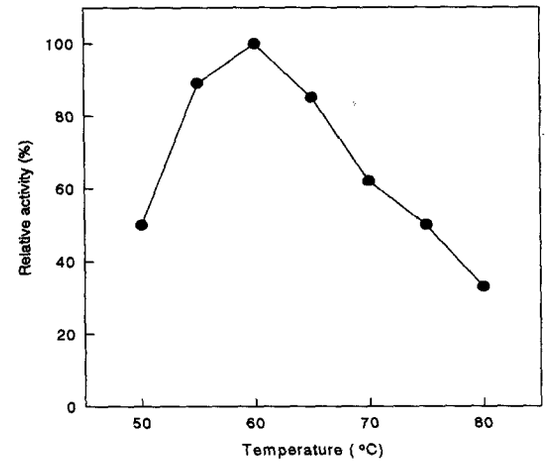

Fig. 4. Effect of temperature on the activity of the purified protease.

에서 30분 처리하였을 경우 약 55% 이상이 실활되었다(Fig. 5).

4. 금속이온의 영향

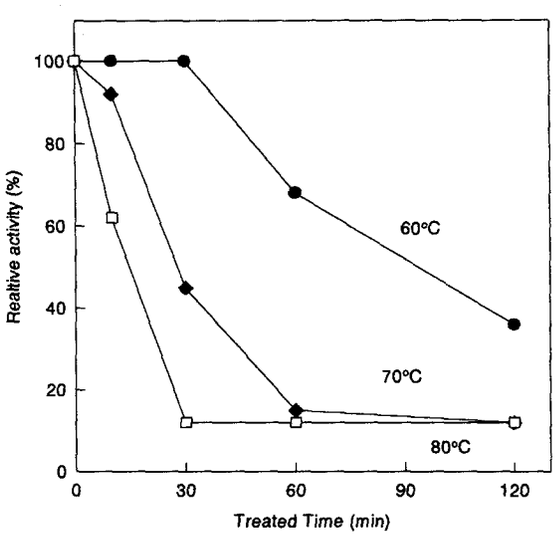

Fig. 5. Thermal stability of the purified protease.

Table 2. Effect of metal ion on the protease activity

Metal salt	Relative activity (%)
Control(none)	100
Ag^{+}	5
Cu^{2+}	27
Ca^{2+}	128
Co^{2+}	105
Fe^{2+}	79
Hg^{2+}	3
Mg^{2+}	98
Mn^{2+}	29
Zn^{2+}	15
Al^{3+}	16
Fe^{3+}	71

Each metal ions were added to the final concentration in the reaction mixture of 1mM and control activity was set as a value of 100.

다양한 금속이온을 반응액에서 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하여 활성을 조사한 결과 본 효소는 Ca^{2+} 이온에 의하여 활성이 증가되었으나, Ag^{+}와 Cu^{2+}이온은 효소반응을 저해시켰다(Table 2).

고 찰

단백질 분해효소는 단백질을 분해하여 다양한 생리활성기능을 갖는 펩티드를 생성한다. 근래 단백질 분해산물인 펩티드의 기능이 생체조절기능을 갖는 항암, 혈압조절, 면역증가, 콜레스테롤의 강하 등의 작용이 알려지면서 이를 이용한 기능성 식품 개발에 주목하고 있다[12]. 또한 온도, pH, 산소, 용매, 압력 등에 대한 안정성을 높이기 위한 다양한 방법[4~5]이 시도되고 있다. 근래 고온성 방선균은 새롭고 다양한 효소를 검색할 목적으로 연구가 진행되고 있다. 본 효소의 최적온도는 60℃에서 가장 활성이 높았으며, 열에 대한 안정성은 60℃에서 60분간 처리하였을 때 78% 정도 잔존활성을 보였다. 이러한 결과는 *Bacillus stearothermophillus*의 80℃에서 1시간 처리해도 안정하다는 보고[6]보다는 안정성이 낮지만, *Aspergillus wentii*의 최적온도와 안정성이 각각 50℃와 60℃에서 10분간 처리하였을 시 55%가 실활되었다는 결과[13]보다는 높았다. 이러한 결과는 고온균이 중온균보다[13,14] 온도에 대한 활성과 안정성이 좋다고 알려진 보고와 일치한다[1,6,9]. pH에 대한 최적의 활성은 7.5에서 가장 좋았다. *Bacillus* 속[1~3,6,7,12]의 최적 pH 9~11, *Aspergillus wentii* 균주가[13] 7~11에서 안정한 결과와 비교할 때 약간 낮은 경향을 보였다. pH 안정성은 본 효소가 6.0에서 8.5 범위에서 비교적 안정하였으나 *Bacillus* 속[1,6~8]이 5~15, *Aspergillus wentii*[13]의 4~11에서 안정한 결과보다 범위가 좁았다. 금속이온의 영향은 *Bacillus* 속에서 Ca^{2+}이온이 열 보호작용과 활성을 증가시킨다는 보고[1,7,8,15]와 같은 경향을 보였으나 *Bacillus* sp. JH108의 Co^{2+}에 의한 활성이 증가되었다는[16] 결과와는 상이하였다.

요 약

열에 안정한 단백질 분해효소를 탐색하고자 토양에서 고온성 방선균을 분리 선별하여 여기서 생산되는 효소를 정제하여 특성을 조사하였다. 본 고온성 방선균의 효소생산 조건은 0.5% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $CaCl_2$, initial pH 8.0, 50℃에서 48시간 배양하였다. 정제 방법은 ammonium sulfate의 염석, DEAE HPLC, GPC HPLC 순으로 정제하였다. 본 효소의 최적 pH와 온도는 7.5와 60℃이였으며, 안정성은 pH 6.5~8.5사이에서 안정하였으나 80℃에서 10분간 열처리에서는 90% 실활시켰다. Ag^{+}와 Cu^{2+}이온은 효소활성을 저해시켰다.

감사의 말

본 연구는 1999년도 상지영서대학 학술연구비 지원

으로 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. 鶴大典 : *Bacillus* 屬 細菌の分泌するプロテアゼの比較生化學. *日本農藝化學會誌*, 65, 50~55 (1991).
2. Bae, M. and Park, P. R. : Purification and characterization of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Bacillus* sp.. No 8~16. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 17, 545~551 (1989).
3. Kubo, M., Murayama, K., Seto, K. and Imanaka, K. : Highly thermostable neutral protease from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Ferment. Technol.*, 66, 12~17 (1988).
4. 大西浩平, 菊池美保, 原山重明 : 進化分子工學を利用した蛋白質分子育種の實例. *化學と生物*, 38, 41~47 (2000).
5. 山岸明彦 : 進化分子工學を利用した蛋白質分子育種の實例, *化學と生物*, 38, 118~121 (2000)
6. Rahman, R. N. Z. A., Razak, C. N., Ampon, K., Basri, W., Yunuss, M. Z. W. and Salleh, A. B. : Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 822~827 (1994).
7. Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K. : Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. no AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 519~523 (1990).
8. Fujiwara, N., Mausi, A. and Imanaka, T. : Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkalophilic and thermopilic *Bacillus* sp.. *J. Biotechnol.*, 30, 245~256 (1993).
9. Kim, Y. O., Lee, J. K., Sunitha, S., Kim, H. K. and Oh, T. K. : Minor thermostable alkaline protease produced by *Thermoactinomyces* sp. E79. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 469~474 (1999).
10. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~269 (1951).
11. Greenberg, D. M. : Plant proteolytic enzymes. Methods in Enzymol., 2, Academic Press, New York, 54~64 (1955).
12. Motoki, K. and Sequso, K. : Trends in Japanese soy protein research. *INFORM*, 5, 308 (1994).
13. 임성일 : 한국 전통 메주 유래의 *Aspergillus wentti*가 생성하는 protease의 정제 및 특성. *한국식품과학회지*, 32, 161~167 (2000).
14. 김두상, 김형락, 남택정, 변재형 : 단백질 분해효소 생산을 위한 *Aspergillus oryzae* PF 균주의 배지조성. *한국산업미생물학회*, 27, 404~409 (1999).
15. Moriyama, R., Kazuhiro, S., Haishuo, Z., Toshihiko, I. and Shio, M. : A cysteine-dependent serine protease associated with the dormant spores of *Bacillus cereus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 67, 268~274 (1998).
16. Jung, H. J., Kim, H. W. and Kim, J. I. : Purification and characterization of Co^{2+} activated extracellar metalloprotease from *Bacillus* sp. JH108, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 861~869 (1999).

(2000년 4월 15일 접수)