Korean J. Appld. Microbiol. Bioeng.
Vol. 2, No. 1, March 1974

Streptomyces 屬菌이 生産하는 Protease에 關한 硏究

金 光 顯*·徐 正 填
慶北大學校 農科大學 農化學科
*慶北大學校 大學院 農化學科

Studies on the Protease procuced by Streptomyces sp.

Kwang Hyeon Kim, Jung Hwn Seu
Department of agricultural chemistry, college of agriculture,
Kyung Pook National University, Taegu. Korea
Graduate school of Kyung Pook National University
(Received November 23, 1973)

ABSTRACT

A strain of Streptomyces sp. which producing a metal containing proteolytic enzyme was isolated from soil and some properties of this enzyme were investigated. The following results were obtained.

1. Optimal pH and temperature of this enzyme were pH7.0 and 37°C
2. This enzyme was easily inactivated with heat treatment; for example, by the treatmentat 37°C for 100 minutes the activity of the enzyme was decreased to about 50 per cent of intial activety but this enzyme was stable at neutral pH.
3. The activity of this enzyme was not inhibited by Mg^{++}, Mn^{++}, Ca^{++}, Pb^{++}, or Ba^{++} ect. but strongly inhibited by Hg^{++}, Co^{++}, Ag^{+}, Cu^{++}, or Cd^{++}.
4. This enzyme was strongly inhibited by EDTA but was not inhibited by oxalic acid, citric acid, 2,4-dinitrophenol, ε-aminocaproic acid, cysteine, or thiourea.

Ⅰ. 緖 論

蛋白質 分解酵素에 關해서는 數없이 많은 硏究가 이루어졌으며 이들 硏究結果 食品工業이나 醫學的 用途가 새로 開發되므로써 從前까지는 主로 動植物이나 細菌 및 絲狀菌 등을 酵素生源으로 하던 것이 近來에는 放線菌으로부터도 많은 種類의 酵素를 얻고 있다. 特히 放線菌의 Protease에 있어서는 그 大部分이 Streptomyces 屬菌에서 얻어지고 있으며[1][2][3] 그 中에서도 Streptomyces griseus로부터 얻어진 protease[2][3][4]는 食品工業이나 消炎性 藥品으로 많이 使用되고 있다. 本人等은 金屬 protease에 關하여 實驗을 하고 있던中 土壤에서 分離한 Streptomyces 屬의 一菌株가 金屬 protease를 强하게 生産함을 알고 이 Protease에 對한 性質을 調査해 본 結果 金屬酵素인 同時에 또 SH 酵素임을 알게 되었으므로 그 結果를 發表하는 바이다.

Ⅱ. 實驗材料 및 方法

1. 供試菌株

本 實驗에 使用한 菌株는 大邱近郊의 土壤에서 分離한 放線菌을 對象으로 選別 實驗 하였다.

2. 菌分離 및 酵素生成培地 組成

培地組成 : glucose 1.0% asparagin 0.05% K_2HPO_4 0.05%, pH 7.0

위와 같은 組成의 培養液을 調製하여 1.8% agar를 加해서 菌分離用 培地로 使用했으며 그 液體培地를 酵素生成培地로 했다.

菌의 分離는 常法[5]에 依하여 行했으며 酵素生成培地로 使用할 때는 5000m*l* 容 진탕 flask에 上記 培養液을 50m*l* 씩 넣고 25Lb 에서 10分間 殺菌한 後 對象菌株를 接種하여 32°C 에서 5日間 진탕培養하였다.

3. 酵素液의 調製

위와같이 培養한 培養液을 濾過하여 $(NH_4)_2So_4$를 飽和시켜 生成된 沈澱物을 溶解시킨 後 5°C 에서 3~4日間 dialysis한 液을 酵素液으로 使用하였다(Fig 1).

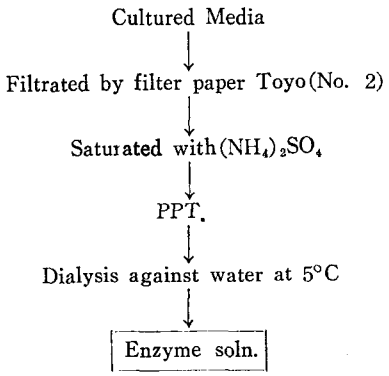

Fig 1. The Preparation of Enzyme Solution

4. 酵素活性度 測定方法

Folin's Method[6]에 依하였으며 酵素活性度는對照區와의 差로서 算出하여 그 力價를 나타내었다. 즉 0.6%의 基質(PH7.0) 2m*l* 와 buffer solution 1.5m*l*, 酵素液 0.5m*l* 씩을 順次로 加하여 37°C 에서 30分間 反應시킨 後 反應停止 및 除蛋白劑로 0.44M-T.C.A 3m*l* 를 加하였으며 Erma Electric Photometer(type N-6)로 比色定量했다.

5. 菌株選別

위와 같은 酵素活性度 測定方法으로써 土壤으로부터 分離한 Streptomyces 屬 菌株中에서 protease를 强力히 分泌하는 At-256菌株를 選別하여 그 酵素學的 實驗을 行하였다.

Ⅲ. 實驗結果

1. 最適 pH

本 酵素의 作用最適 pH를 檢討하기 爲하여 pH 2.4~6.0에서는 Mcllvain 氏 Buffer를, pH 7.0~11.0에서는 Kolthoff 씨 Buffer를 使用했으며, 基質로서는 Hammarstein milk casein, hemoglobin (Difco 製) 및 egg albumin을 使用한 結果 Fig 2.와 같이 casein에 對해서는 pH 7.0 부근에서, hemoglobin 및 eggalumin에 對해서는 pH 5.0 부근에서 가장 높은 活性을 나타내었다.

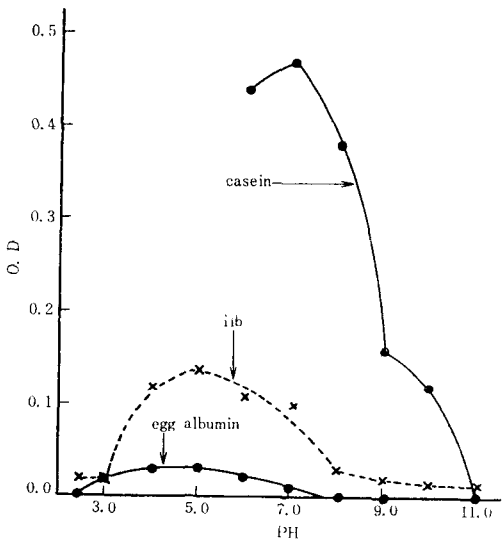

Fig 2. The Effect of pH on Enzyme Actirity

2. 最適溫度

本 酵素作用의 最適溫度를 20°~70°C 사이에서 調査해 본 結果 Fig 3.와 같이 37°C 附近에서 가장 높은 活性을 나타냈으며 以下에서 使用한 基質은 모두 casein을 使用하였다.

3. pH 安定性

本 酵素의 pH에 對한 安定性을 檢討하고져 위에서와 같은 buffer를 使用해서 酵素液을 各 pH 別로 調節하여 30°C 에서 120分間 前處理시킨 後 -NaOH와 N-HCl로서 處理된 酵素液의 pH를 中性附近으로 再調節하고 여기에 buffer(pH7.0)와 基質을 順次로 加하여 反應시켜서 그 殘存力價를 測定한 結果 Fig 4에서 보는 바와같이 本 酵素는 pH 6.0~7.0에서 比較的 安定하였다.

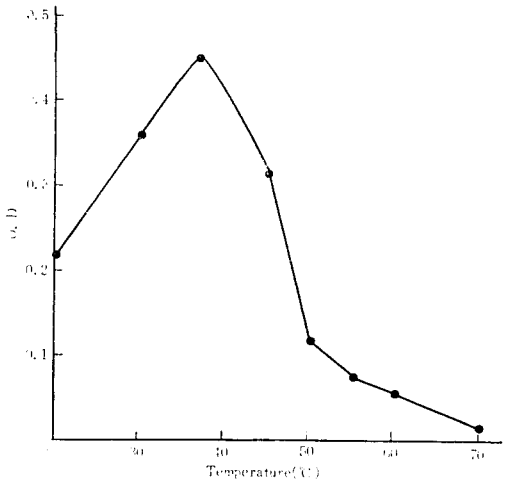

Fig 3. The Effect of Reaction Temperature on Enzyme Actirity

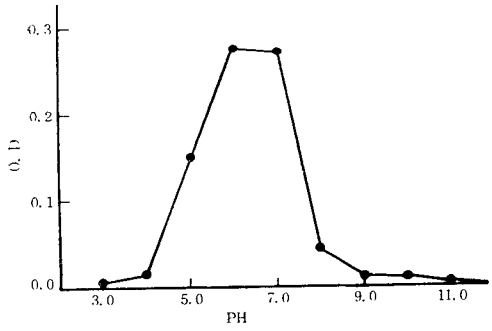

Fig 4. pH Stability of the Enzyme

4. 熱에 對한 安定性

本 酵素를 37°C, 45°C, 50°C에서 각각 100分간 熱處理시키면서 經時的으로 그 殘存力價를 測定하였으며 酵素液의 pH는 7.0으로 하였다. Fig5.에서 보는바와 같이 37°C에서 100分間 處理시켰을 때는 約 50%가 失活하였으며 또한 45°C, 50°C에서 100分間 處理시켰을 때는 90%이상 失活하였다.

5. 金屬 ion에 對한 影響

本 酵素에 여러가지 金屬들이 어떠한 影響을 미치는 가를 調査하기 爲하여 18種의 金屬鹽類를 使用하여 아래와 같은 反應液으로 그 影響을 檢討해 보았다.

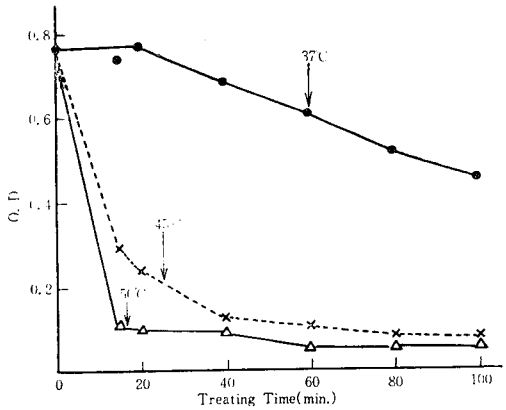

Fig 5 Heat Stability of the Enzyme

Reaction mixture

0.6% Casein (pH 7.0)	2.0m*l*
Buffer solution (pH 7.0)	2.0m*l*
Enzyme solution (pH 7.0)	0.5m*l*
Metal ion solution (10^{-2}M)	0.5m*l*

(final pH of Reaction Mixture: 7.0)

上記와같이 作用시킨 後 上法에 따라 酵素作用을 測定하여 그 活性度를 blank와의 差로써 나타냈으며 그 結果는 Table 1과 같다.

Table 1. The Effects of Metal Ions on the Enzyme Reaction

Kinds of Metal	Relative activity %
None	100
$CaCl_2$	120
$MgSO_4$	103
$BaCl_2$	98
$MnSO_4$	108
$Pb(Ac)_2$	95
Na_2WO_4	98
Na_2MoO_4	99
$K_2C_2O_4$	102
Li_2SO_4	98
H_3BO_3*	97
$Co(Ac)_2$	72
$FeCl_3$	72
$Al_2(SO_4)_3$	76
$CuSO_4$	23
$ZnSO_4$	52
$CdSO_4$	15
$AgNO_3$	27
$HgCl_2$	0

*used phosphate buffer final conc. 10^{-3}M

Table 1에서와 같이 Li^{++}, Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Ba^{++}, B^{+++}, Mo^{+6} W^{+6}, Cr^{+6}는 酵素作用에 대해서 별 영향이 없으나 Ag^{+}, Cd^{++}, Zn^{++}, Cu^{++}, Hg^{++}, Co^{++}, Fe^{+++}, Al^{+++}은 阻害作用을 나타내었다.

6. Hg^{++}, Cu^{++}, Cd^{++}의 濃度에 따른 影響

本 酵素에 對하여 比較的 强하게 阻害作用을 하는 金屬 ion 中의 Hg^{++}, Cu^{++}, Cd^{++}에 對하여 濃度別로 그 影響을 알아본 結果는 Fig 6과 같이 Cu^{++}의 경우 10^{-5}M 以下에서는 別影響이 없으나 그 以上에서는 급격히 失活하여 10^{-3}M 에서는 約 85%가량 阻害作用을 나타냈으며 Hg^{++}는 100%, Cd^{++}경우에는 90%以上 阻害作用을 하였다.

7. 阻害劑의 影響

本 酵素가 阻害劑에 依해 받는 影響을 알아보기 위하여 7種의 阻害劑를 使用하여 金屬 ion의 影響을 볼때와 같은 條件으로써 調査하여본 바 Table 2와 같은 結果를 얻었다.

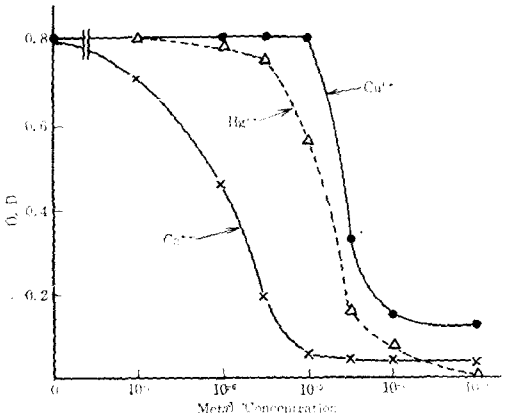

Fig 6 The Effects of Cadmium, Copper and Mercury Ions on the Enzyme Reaction

Table 2에서 보는바와 같이 thiourea 2.4-D.N.P.등 6種의 阻害劑는 別影響이 없었으나 EDTA에 의해서는 阻害되었다. 이때 최종濃度는 10^{-4}M 이었다.

8. EDTA의 濃度에 따른 影響

위에서 EDMA에 의하여 阻害를 받으므로 濃度別로 調査해 본 結果 Fig 7과 같이 10^{-6}M以下의 濃度에서는 別影響이 없으나 그 以上에서는 阻害作用을 나타내어 10^{-3}M 일때는 約 75%정도 阻害作用을 나타내었다.

Table 2. The Effects of Inhibitors on the Enzyme Reaction

inhibitor (final conc $\times 10^{-4}$M)	activity[1] (−log·T)	relative activity (%)
None	0.58	100
thiourea	0.61	104.7
oxalate	0.63	107.1
citrate	0.59	101.6
EDTA	0.23	39.6
2-4-DNP*	0.59	101.2
ε-amino capr-oic acid	0.60	102.3
cysteine	0.62	106.1

*2.4-Dinitrophenol

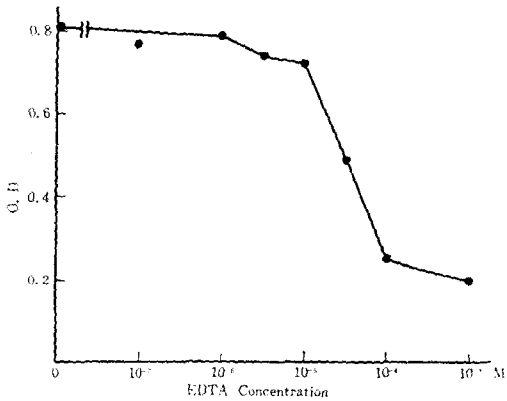

Fig 7 The Effect of EDTA on the Enzyme Reaction

Ⅳ. 考 察

本 實驗에서 使用한 Streptomyces 屬菌株의 protease는 substrate에 따라 多少 다른 最適 pH를 나타내었다. 卽 milk casein에 對해서는 pH 7.0 이었으며 egg albumin과 hemoglobin에 對해서는 pH 5.0으로 나타났다. 이와같은 現象은 Aspergillus saitoi에서 얻은 protease에서도 그 例를 볼 수 있다[7][8]. 또한 最適溫度는 37°C로 比較的 낮으며 安定溫度 역시 매우 낮아 37°C에서 100分間 處理로서 約 50%의 失活를 나타내므로 本 protease는 熱에 對해서 매우 不安定하다. 이와 같이 熱安定性이 낮은 것은 Streptomyces 屬에서 由來하는 protease에서 一般的으로 볼수 있는 現象이다.

또 本 酵素는 pH 6~7인 中性에서는 비교적 安定하였다.

金屬 ion 과의 關係를 보면 一般的인 金屬 ion 에 依해서는 別 영향을 받지 않으나 SH 基와 結合力을 가지는 Hg^{++} Ag^{++} Cu^{++} Cd^{++}에 依해서는 强하게 阻害作用을 받으므로 本 protease 는 SH-酵素라고 생각된다. 또한 一般的인 酵素 阻害劑인 2.4-dinitrophenol, ε-amino caproic acid, thiourea, 와 약한 Chelate 試藥인 oxalic acid, citric acid, SH 試藥인 cysteine 等에 依해서는 阻害되지 않으나 chelating activity 가 큰 EDTA 에 依해서는 거의 完全히 阻害되며 어떤 金屬 ion 에 依해서도 reactivation 되지 않았다. 故로 本 protease 는 metallo protease 에 屬하며 金屬이 酵素分子에 强게 結合되어 있어 weak chelating reagent 에 依해서는 非可逆的으로 失活된다고 생각된다.

또 本 protease 는 金屬 ion 에 依해서는 全然保護되지 않았다.

V. 要 約

土壤에서 分離한 Streptomyces 屬 中에 金屬을 含有하고 있는 protease 를 强하게 分泌하는 菌一株를 선별하여 그 酵素學的 性質 몇가지를 알아본 結果는 다음과 같다.

1. 本 酵素의 作用 최적 pH 는 中性附近이며 최적온도는 37°C 附近이다.

2. 本 酵素는 中性附近에서 比較的 安定하며 熱에는 比較的 不安定하며 37°C 에서 100分間 熱處理했을때 약 50% 가량 失活하였다.

3. Hg^{++}, Cu^{++}, Cd^{++}, Ag^{+} 等에 依하여 强하게 阻害되며, Mn^{++}, Mg^{++}, Ca^{++}, Pb^{++}, Ba^{++}等에는 별 영향을 받지 않는다.

4. oxalate, citrate, 2-4-dinitrophenol, ε-amino caproic acid, thiourea, cysteine 에 依해서는 强하게 阻害되었다.

參 考 文 獻

(1) A. A. Tytell etal; Fed Proc, **13**, 312(1952)

(2) T. Ouchi; Agr,. Biol,. Chem,. **26**, 723, 728, 734(1962)

(3) S. Simon; Acta, Micobial, Acad, SciHung **3**, 53(1955)

(4) 野本正雄外：理研究報告, **35**, 84, 90(1959)

(5) 吉田文彦：Protease 利用講習 Text, 日本應用酵素協會, 97(1964)

(6) 赤堀四郎外：酵素研究法 Vol 1. 164, 165, 477 (1955)

(7) F. Yoshida; Bull,. Agr,. Chem,. Soc,. , Japen **20**, 252(1956)

(8) F. Yoshida; ibid **20**, 262(1956)