

Streptomyces rimosus 가 생산하는 Protease 의 정제와 특성

김경미¹ · 이태경² · 양한철^{1*}

고려대학교 ¹식품공학과 ²생물공학연구소

Purification and Properties of Extracellular Protease from *Streptomyces rimosus*

Kim, Kyung-Mi¹, Tae-Kyung Lee² and Han-Chul Yang^{1*}

¹Department of Food Technology, ²Institute of Biotechnology, College of Agriculture,
Korea University, Seoul 136-701, Korea

Extracellular neutral protease of *Streptomyces rimosus* producing oxytetracycline was purified by ammonium sulfate fractionation, DEAE Sephadex A-50 chromatography and Sephadex G-100 gel filtration, and was showed single band on the cathodic gel electrophoresis.

The optimum pH and temperature of the enzyme were pH 8.0 and 60°C, respectively. The enzyme was activated about 80% in the presence of Co²⁺ ion, and strongly inhibited by Hg²⁺, Fe²⁺ and chelating agent, EDTA. Molecular weight of the enzyme was estimated to be 12,000. The Km value of the enzyme of casein as a substrate was 2.7×10^{-4} M.

Protease는 조미료 제조, 식육연화와 맥주, 청주의 혼탁 방지 등의 식품공업, 소화제, 소염제 등의 제약공업, 세제 등의 각 분야에 걸쳐 광범위하게 이용되고 있다.

특히 미생물 protease는 *Bacillus*속(1,2)과 *Streptomyces*속(3-5)으로부터 생산하는 extracellular 효소로써 많이 연구되어 왔다. 특히 많은 항생물질을 생산하는 *Streptomyces*속(3,6)에서 세포의 proteolytic 효소를 생산하는 것이 알려졌다. 방선균 protease가 식품공업(7,8)이나 소화성 약품(4)으로 많이 사용되고 있다.

본 연구에서 공업적으로 oxytetracycline을 생산하는 *Streptomyces rimosus* IFO 3441로부터 효소생산 최적조건에서 배양하여 얻은 세포의 proteolytic protease를 정제하고, 효소의 특성을 연구 검토하여 그 결과를 보고한다.

Oxytetracycline 생산균주인 *Streptomyces rimosus* IFO 3441을 사용하였다.

효소활성

효소활성은 casein-275 nm법(9)에 따라 측정하였다. 기질인 casein이 가수분해되어 생성되는 tyrosine 양을 275 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해된 0.6% casein 용액 3.0 ml에 0.5 ml의 효소액을 첨가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후, 0.11 M trichloroacetic acid, 0.22 M sodium acetate, 0.33 M acetic acid로 조제된 반응정지액을 3.2 ml 가해 50°C에서 20분간 정치시킨다. 이를 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 그 상등액을 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성단위는 효소액 1 ml이 1분간 1 μg에 상당하는 tyrosine을 생성하는 것을 1 unit로 하였다.

재료 및 방법

사용균주

단백질 측정

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry법(10)에 따라 측정하였다.

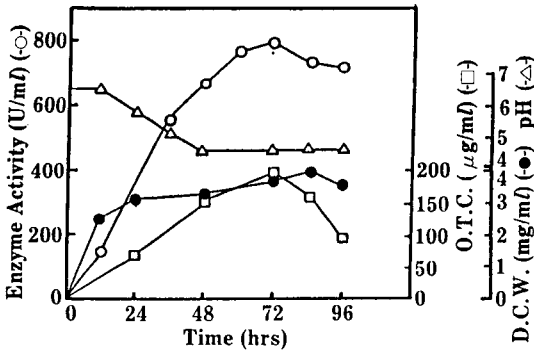


Fig. 1. Relationship between protease production and culture age of *Streptomyces rimosus*.

The medium was consisted of 2.0% maltose, 0.5% NH₄Cl, 0.4% yeast extract and 0.2% MgSO₄·7H₂O with initial pH 6.5.

O.T.C.: oxytetracycline

D.C.W.: dry cell weight

전기영동

Reisfield 등의 방법(11)에 따라 cathodic disc polyacrylamid gel 전기영동을 실시하였다.

분자량 측정

효소분자량은 Andrew 방법(12)에 따라 Sephadex CL-4B column(1.3×112cm)에서의 이동속도를 비교하여 산출하였다. 이 때 표준단백질로 ribonuclease A(M.W. 13,700), bovine serum albumin(M.W. 67,000), thyroglobuline(M.W. 669,000)을 사용하였고 void volume(*v*₀)은 blue dextran(2,000,000)을 이용하여 구하였다.

결과 및 고찰

Flask 배양에 의한 효소생산

Maltose 2.0%, NH₄Cl 0.5%, yeast extract 0.4%, MgSO₄·7H₂O 0.2%의 배지를 초기 배양 pH 6.5로 하여, 30°C에서 진탕배양한 결과 oxytetracycline 와

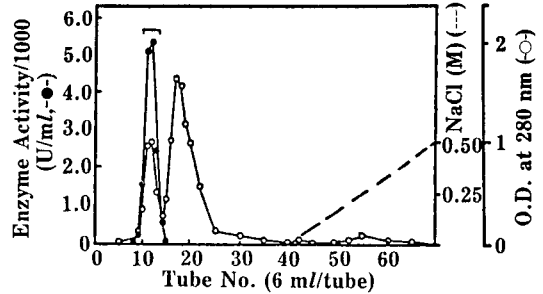


Fig. 2. Chromatography of the enzyme on DEAE Sephadex A-50.

DEAE Sephadex A-50 was equilibrated with 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0).

The column was eluted with a linear gradient of NaCl with 0.02 M phosphate buffer at a flow rate of 36 ml/hr.

protease의 생산이 배양시간에 따라 증가하여 72시간에서 효소활성이 배양액 ml 당 약 800 units, oxytetracycline 약 200 µg을 생산하였고, pH의 경우 배양초기에 급격히 감소하였다가 서서히 증가하는 경향이 *Streptomyces* 속(13) 효소의 결과와 일치하였다(Fig.1 참조).

효소의 정제

(NH₄)₂SO₄분획: *Streptomyces rimosus* 배양액 277 ml를 4°C, 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 그 상등액에 유안을 첨가, 50~70% 포화농도 사이의 분획을 취하여 0.02 M phosphate 완충용액에 48시간 투석하여 6ml를 얻었다. 이 때 비활성은 1,645 units/mg protein으로써 조효소액보다 3.3배 증가하였다.

DEAE Sephadex A-50 이온교환: 완충용액으로 평형시킨 DEAE Sephadex A-50 column(2.5×30cm)에서 NaCl을 0.5M까지 직선적으로 상승시킨 gradient elution을 행하였으며 Fig.2에서와 같이 미흡착획분에서 protease 활성부분이 용출하였다. 이 때 비활성은 3,613 units/mg protein으로써 조효소액보다 7.2배 증가하였다.

Table 1. Summary of purification of protease from *Streptomyces rimosus* IFO3441.

Step	Volume (ml)	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	277	192404	382.3	503	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 50-70%	6	135308.9	82.25	1645	70	3.27
DEAE Sephadex A-50	24	86714.6	24	3613	45	7.18
Sephadex G-100	23	44383	7.18	6181	23	12

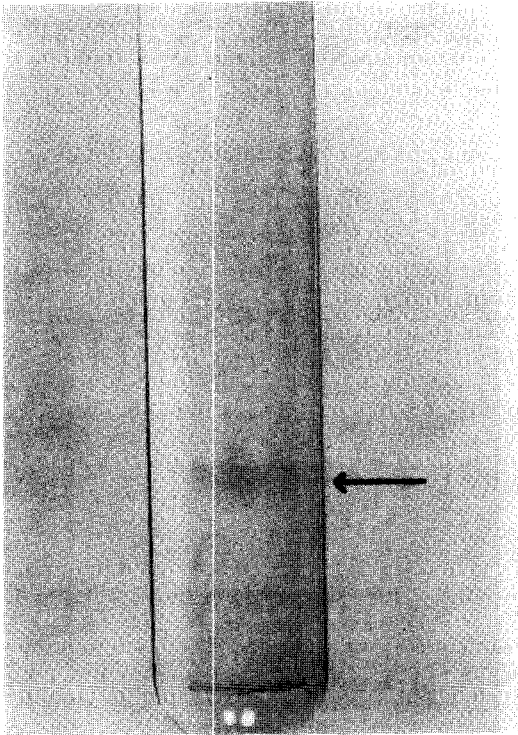


Fig. 3. Cathodic disc polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme.

Sephadex G-100 gel 여과 : Protease 활성을 나타내는 DEAE Sephadex A-50 이온교환에서 얻은 tube No.10~13의 획분을 모아 Sephadex G-100 column(1.8×51 cm)에 의한 gel 여과를 행한 결과 효소의 비활성이 12 배 증가하였다(Table 1 참조).

정제효소는 cathodic disc polyacrylamide electrophoresis 를 실시 최종 정제도를 확인한 결과 Fig.3 과 같이 단일 band 로 나타났으므로 정제효소액이 단일단백질로 구성되어 있음을 확인하였다.

효소의 특성

최적 pH 및 pH안정도 : pH 5.5~10.0 범위에서 각각의 완충용액으로 기질과 효소의 pH를 조절 후 효소활성을 측정할 결과 pH 8.0에서 최대의 활성을 나타냈으며 이것은 *Streptomyces griseus* K-1(4)과 일치되는 결과를 보였으며, 따라서 본 효소는 neutral protease임을 알 수 있었다. 또한 pH 4.0~11.0의 완충용액으로 희석한 효소액을 4°C와 25°C에서 24시간 보관 후 효소활성을 측정할 결과 Fig.4에서와 같이 pH 9.0에서 100% 활성을 나타냈으며 pH 7.0~10.0까지 효소활성이 80% 이상 유지되었다(Fig.4).

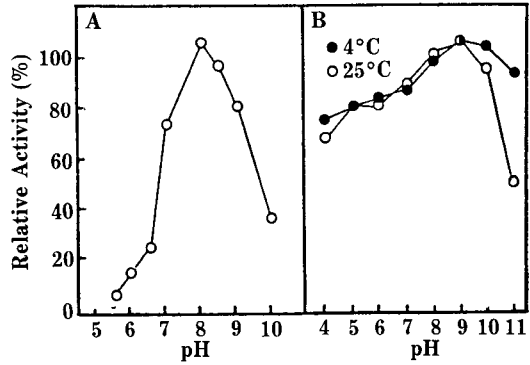


Fig. 4. Optimum pH (A) and stability (B) of protease. A: The reaction was carried out for 10 minutes at 50°C in buffers of various pH value. B: The enzyme preparations were incubated at 4°C and 25°C for 24 hours in buffers of various pH value. The enzyme assay was carried out under standard condition. pH 5.5-6.5 McIlvaine buffer. 7.0 Phosphate buffer. 8.0-10 Clark & Luck buffer.

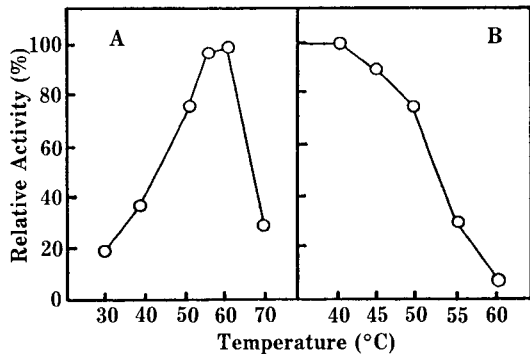


Fig. 5. Optimum temperature (A) and heat stability (B) of protease. A: The reaction was carried out at various temperatures for 10 minutes. B: The enzyme solution was incubated at various temperatures for 10 minutes, chilled and assayed under the standard condition.

최적 온도 및 열안정성 : 30~70°C에서 정제효소를 10분간 반응 후 효소활성을 측정할 결과 60°C에서 높은 활성을 나타냈으며 40~60°C에서 15분간 열처리한 후 잔존 효소활성을 측정할 결과 효소활성이 50°C까지 거의 70%을 나타냈으나, 55°C 이상에서 급격히 저하되었다(Fig.5 참조).

금속이온과 기타 저해제의 효과 : 효소활성에 미치는 금속이온들의 영향을 검토한 결과, Co²⁺이온에 의해 약 80% 활성이 높아졌으나, Hg²⁺와 Fe²⁺이온에 의해 저해를 받았으며, 그 외의 금속이온에 대해서는

Table 2. Effect of various metal ions inhibitors on the protease activity.

Metal	Residual activity (%)	
	1 mM	5 mM
	100	100
NaCl	100	100
KCl	103	105
CaCl ₂	103	105
MgCl ₂	100	109
CoCl ₂ ·6H ₂ O	177	188
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	110	101
FeSO ₄ ·7H ₂ O	24	18
CuCl ₂ ·2H ₂ O	56	42
MnCl ₂ ·4H ₂ O	86	86
HgCl ₂	4.1	1.4
pCMB	93	94
EDTA	1.2	0
Sodium citrate	86	81
Sodium laurylsulfate	87	62
PMSF	99	97

The enzyme solutions were preincubated with each inhibitor solution (mM) for 10 minutes at 25°C before activities measurement and were incubated at 50°C with pH 7.0 after addition of 3.0 ml of 0.6% casein solution. pCMB: p-chloro mercuri benzoic acid
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
PMSF: phynyl methyl sulfonyl fluoride

별 영향을 받지 않았다. 그 결과는 K. Mizusawa (14)의 효소가 Fe²⁺에 의해 활성이 활성화된 것과 상반된 결과였으나, Hg²⁺에 의해 활성이 저해되는 것과는 동일하였다. pCMB(p-chloromercuribenzoic acid)와 PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)에 별 영향을 받지 않았으나 금속이온의 chelating agent인 EDTA와 Na-citrate에 의해서 저해를 받은 것으로 보아 본 효소는 metalloprotease로 생각된다. 일반적으로 neutral protease가 metalloprotease라는 연구결과(1, 8, 15)와 일치하였다(Table 2).

분자량 측정 : 표준단백질을 사용하여 gel 여과를 행한 후 분자량을 산정한 결과 Fig.6 과 같이 약 12,000 이었다. 이는 일반적 neutral protease 의 분자량이 35,000~45,000 인 것(14, 16)에 비해 매우 적은 분자량을 나타냈고 *Streptomyces griseus*(17)에 있어서의 trypsin 과 유사한 작용을 갖는 enzyme 이 19,000 의 분자량을 갖는 것과는 거의 비슷하게 나타

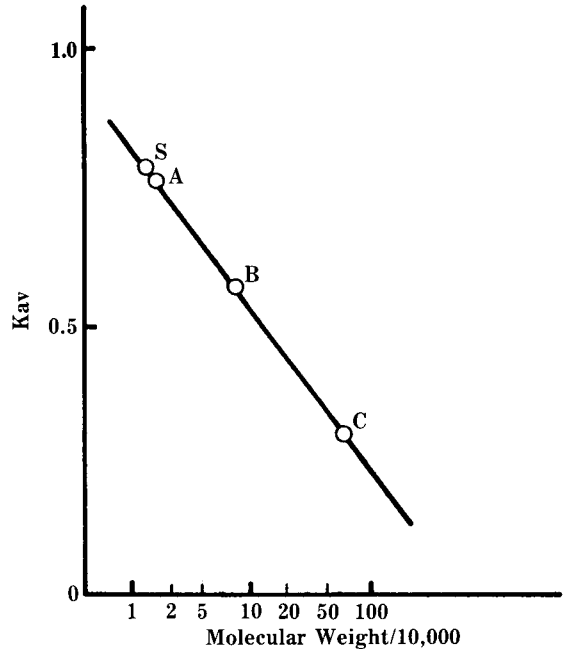


Fig. 6. Estimation of molecular weight by gel filtration on Sepharose CL-4B.

A: Ribonuclease A
B: Bovine albumine
C: Thyroglobuline
S: Sample

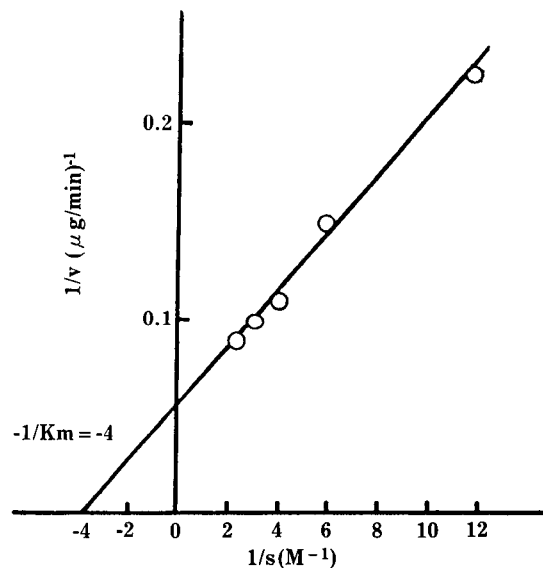


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of protease.

났다.

기질농도와 반응속도와의 관계 : Casein 분자량을 23,600 으로 하여 효소의 casein 에 대한 Michaelis

정수 (K_m)을 Lineweaver-burk 의 작도법으로 구한 결과 Fig.7에 나타난 바와 같이 본 protease 의 casein 에 대한 K_m 값은 2.7×10^{-4} M 이었다.

요 약

Oxytetracycline 생산균주인 *Streptomyces rimosus*를 maltose 2%, NH_4Cl 0.5%, yeast extract 0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2% 조성의 배지를 배양초기 pH 6.5로 하여 30°C, 72시간 진탕배양하여 얻은, 세포외 protease를 유안분획, Sephadex A-50 이온교환, Sephadex G-100 gel 여과를 행하여 정제하였다. 효소의 최적온도는 60°C이며, 최적 pH는 8.0이었으며, Co^{2+} 이온에 의해 활성화되며 Hg^{2+} , Fe^{2+} 및 EDTA에 의해 저해를 받으며 casein 분자량을 23,600으로 추정하여 구한 K_m 값은 2.7×10^{-4} M이었다.

참고문헌

1. McConn, J.D., D. Tsuru and K.T. Yasunobu: *J. Biol. Chem.*, **239**, 3706 (1964).
2. Tsuru, D., Heizokira and T. Yamamoto: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1261 (1966).
3. Laluece, C. and R. Molinari: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1863 (1977).
4. Ouchi, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 723 (1962).
5. Siegel, S., A.H. Brady and W.M. Awad: *J. Biol. Chem.*, **247**, 4155 (1972).
6. Pokorny, M.L., Vitale, V. Turk and M. Renko: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 81 (1979).
7. Loffler, A.: *Food Technol.*, **40**, 63 (1986).
8. Rose, A.H.: *Microbial Enzymes and Bioconversions in Economic Microbiology*, Academic press, **5**, 50 (1980).
9. 萩原文二: 赤堀編 酵素연구법II, p.240(1956)
10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, L.A. Farr and R.J. Randal: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
11. Reisfeld, R.A., U.J. Lewis, D.E. Williams: *Nature* **195**, 281 (1962).
12. Andrews, P.: *Biochem. J.*, **96**, 595 (1965).
13. Keay, L. and M.H. Moseley: *Biotech. Bioeng. Symp.*, No. 3, 63 (1972).
14. Mizusawa, K., Eiji. Ichishima and F. Yoshida: *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 884 (1964).
15. 김광제, 서정훈: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **2**, 13(1974)
16. Keay, L.: *Process Biochem.*, **6**, 17 (1971).
17. Jurasek, L., D. Fackre and L.B. Smillie: *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **37**, 99 (1969).

(Received June 8, 1989)