

알칼리성 *Bacillus* sp. No.8-16 의 내열 · 알칼리성 단백질 분해효소의 정제와 특성

배 무* · 박필련

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과

Purification and Characterization of Thermotolerable Alkaline Protease by Alkalophilic *Bacillus* sp. No. 8-16

Bae, Moo* and Pil-Yon Park

Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Thermostable alkaline protease of alkalophilic *Bacillus* sp. No. 8-16 has been purified, and the properties of the enzyme investigated. The characteristic point of the organism used is especially good growth in alkaline and thermal condition. The alkaline protease of the strain No. 8-16 was purified from crude enzyme by acetone precipitation, CM-cellulose ion exchange chromatography, Sephadex G-100 and Sephadex G-75 gel filtration. Through the series of chromatographies, the enzyme was purified to homogeneity with specific activity of 37 fold higher than that of the crude broth. Characteristics of the purified enzyme were as follow; K_m value for the enzyme was 1.3 mg/ml, the alkaline protease showed a maximal activity at 70°C and from the pH 6.0 through 12.0, and stable for 1 hr. at 60°C. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 33,000 by Sephadex G-100 gel filtration. The activity of the alkaline protease was inhibited by iodoacetic acid and Ag^+ , Hg^+ , PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), and activated by Ca^{2+} and Mn^{2+} .

알칼리성 세균의 알칼리상태에서 최적 pH를 갖는 효소가 관심의 대상이 됨에 따라 알칼리성 protease의 분자특성에 대한 관심이 차츰 증대되고 있다. 알칼리성 protease에 대해서는 Horikoshi(1) 등이 발표한 이래 Kobayashi(2) 등은 *Pseudomonas* sp.에서 Tsuru(3)은 *Bacillus* sp.에서, Nakanishi(4)는 *Streptomyces*에서 알칼리성 protease를 분리하였다. 종전부터 잘 알려진 것으로는 *B. licheniformis*와 *B. amyloliquefaciens*의 subtilisin(5)으로서 활성 부위에 serine을 지니고 있는 것이 특징인데 이들은 주로 pH8에서 10 사이에서 최적 활성을 나타낸다. 한편 국내에서는 알칼리성 protease의 미생물 생성에 관해서는 박 등(6)에 의한 *Corynebacterium* sp.를 이용한 것과 이 등(7)에 의한 *Streptomyces* sp.를 이용한 연구가 있다.

본 연구에서는 알칼리성 protease 생성균인 *Bacillus* sp. 8-16 균주를 분리하여 그 분류학적 성질을 동정하여 이 균주가 *B. alkalophilus*와 유사종임을 발표한 바 있다(8). 이 알칼리성 protease는 지금까지 보고된 것(1)보다 내열성 및 최적 반응온도가 높은 것임을 발견하여, 이 효소를 정제하고 그 성질을 조사하였기에 여기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 연구에 사용한 알칼리성 protease 생산균주는 전보(8)에서 밝힌 *Bacillus alkalophilus*로 동정된 분리균이며, 균주의 배양배지는 glucose 1%, polypeptone 0.5%, yeast extract 0.5%, KH_2PO_4 0.1%.

Key words: Thermotolerable alkaline protease, alkalophilic *Bacillus*

*Corresponding author

MgSO₄·7H₂O 0.02%, Na₂CO₃ 1% 를 사용하였다. 본 배양에서는 상기의 배지에 진배양 2% 를 접종하여 50°C에서 60 시간 진탕배양하였다.

상기의 방법과 같이 배양한 본 배양액을 원심분리(3,000g×20 분)하여 상등액을 모아 조효소액으로 사용하였다.

Protease 역가 측정

Protease 의 활성은 casein 의 가수분해를 tyrosine 정량법(9)에 의해 조사하였다. 조효소액 1 ml 에 casein 0.6% 를 포함한 pH 12 의 NaOH-Borate buffer(50 mM) 5 ml 를 가하고 70°C에서 10 분간 반응시킨 후 TCA solution(0.11 M TCA, 0.22 M sodium acetate, 0.33 M acetic acid) 5 ml 를 가하여 30°C에서 30 분간 반응을 중지시킨 뒤, 생성된 침전을 여과하였다. 여과액 1 ml 에 0.4 M Na₂CO₃ 5 ml 와 1/3 로 희석된 phenol reagent 1 ml 를 넣고 38°C에서 30 분간 발색을 안정시킨 뒤 spectrophotometer(Hitachi Model 100-10)를 이용하여 660 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

Protease 의 표준곡선은 0.2 N HCl 에 tyrosine 700-4900 μg 을 녹여 같은 방법으로 결정하였다.

Protease 의 1 unit 는 1 분 동안 tyrosine 1 μg 을 생성하는 효소량으로 하였다.

단백질 정량

효소 정제과정 중의 단백질 농도는 spectrophotometer(Gilford 2,600) 280 nm 에서 그 흡광도를 측정하였고 나머지의 단백질 농도는 Lowry *et al.* (1951)의 방법(10)으로 측정하였다. Bovine serum albumin 을 표준품으로 하여 나타내었다.

효소의 분리 및 정제(11, 12)

1) **효소액의 조제** : 종균을 배양하여 단백질 분해 효소 생성배지에 2% 접종하여 50°C에서 60 시간 동안 진탕배양하였다. 배양액을 4°C에서 3,000×g 로 20 분간 원심분리한 뒤 상등액을 효소용액으로 사용하였다.

2) **아세트산에 의한 침전** : 효소용액에 4 배의 아세트산을 가해 단백질을 침전시킨 뒤 방치하였다. 그 후 7,000×g 로 원심분리하여 생긴 침전물을 10 ml 의 증류수에 녹였다.

3) **CM-cellulose column chromatography** : 2)항에서 얻은 용액을 10 mM phosphate buffer(pH 8.0)로 평형시킨 CM-cellulose column(2.5×70 cm)에 가한 다음, 0.4 M NaCl 로 용출시켰다. 용출속도는 9 ml/hr

로 하였고 각 분획마다 3 ml 씩 받아 효소활성과 단백질량을 측정하였다.

4) **Sephadex G-100 column chromatography** : 3)항의 분획 중, 효소활성을 나타낸 분획을 모아 다시 Sephadex G-100 column(1×100 cm)에 가한 다음, 10 mM phosphate buffer(pH 8.0)로 용출시켰다. 용출조건은 3)과 같이 하였다.

5) **Sephadex G-75 column chromatography** : 4)항의 분획 중, 효소활성을 나타낸 분획을 모아 다시 Sephadex G-15 column(1×100 cm)에 가한 다음, 10 mM phosphate buffer(pH 8.0)로 용출시켰다. 용출조건은 4)항과 같이 하였다.

분자량 측정

분자량 결정은 Sephadex G-100 column(1×100 cm)으로 gel filtration 에 의해 결정하였다(13, 14). Marker protein 은 bovine serum albumin(66,000), ovalbumin(45,000), carbonic anhydrase(29,000), lysozyme(14,300)을 사용하였다.

전기영동

Polyacrylamide gel electrophoresis 는 7.5% acrylamide(Tris-glycine buffer, pH 8.3)를 사용하였다(12).

100 V 에서 3 시간 동안 전기영동을 행한 후 0.05% coomassie brilliant blue R-250 으로 염색하였고 5% methanol 과 7.5% acetic acid 로 탈색하였다.

효소반응의 특성

1) **효소의 작용 최적 pH** : 효소반응의 최적 pH 를 검토하기 위하여 0.6% casein 을 아래의 완충용액에 녹여 70°C에서 10 분간 반응시킨 후 효소역가를 비교하였다. pH 7.0-8.0 50 mM phosphate buffer, pH 9.0-10.0 glycine-NaOH buffer, pH 11.0-12.0 Na-borate buffer 를 사용하였다.

2) **효소의 작용 최적 온도** : 최적 pH 완충용액에 0.6% casein 을 녹인 것을 기질로 사용하여 40°C에서부터 80°C까지 10°C간격으로 변화시키면서 각각 10 분간 반응시킨 후 효소 역가를 비교하였다.

3) **효소의 pH 에 대한 안정성** : 효소를 pH 3.0 에서부터 12.0 까지 위에 사용한 완충용액에 용해시킨 다음 60 분간 최적 온도에서 항온 처리한 후 최적 pH 에 녹인 기질을 사용하여 효소 잔존 역가를 측정하였다.

4) **효소의 온도에 대한 안정성** : 효소를 30°C에서

부터 90°C까지의 범위에서 60분간 전처리한 최적 작용 pH의 완충용액에 casein을 녹인 것을 기질로 사용하여 효소 역가를 측정하였다.

5) 반응속도에 미치는 기질의 영향 : Casein의 농도를 1, 2, 4, 6, 10 mg/ml로 희석하여 효소액 1ml를 각 농도의 기질 5ml에 넣어 반응시킨 후 효소활성을 산출하였다.

6) 효소의 안정성에 미치는 metal ion의 영향 : 효소액을 다양한 metal ion과 함께 30°C에서 60분간

전처리한 후 남아있는 효소활성을 조사하였다.

저해제의 효과 : 저해제가 본 효소에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각의 저해제로 효소용액을 30°C에서 30분간 전처리한 후 효소 잔존 역가를 측정하였다.

결과 및 고찰

Alkaline protease의 정제

1) 아세톤의 의한 침전 : *Bacillus* sp. No.8-16을 배양한 효소용액에 4배의 아세톤을 가하여 침전된 단백질을 7,000×g에서 20분간 원심분리하여 생긴 침전물을 10ml의 증류수에 녹였다. 이 때 단백질 분해효소에 비활성은 277.3 units/mg protein이었다.

2) CM-cellulose column chromatography : 아세톤 침전에 의해 농축된 단백질 용액을 10mM phosphate buffer로 평형된 CM-cellulose column(2.5×70cm)에 흡착시킨 후 0.05M 인산완충액(pH 8.0)으로 효소활성이 없는 단백질을 용출시킨 후 이어 0.4M NaCl을 포함한 0.01M 인산완충액으로 용출시켰다. 이 때 분획 46-58 사이에서 단백질 분해효소 활성을 가진 용액이 용출되었으며 이 때의 비활성은 1164.1 units/mg protein이었다(Fig.1).

3) Sephadex G-100 column chromatography : CM-cellulose column chromatography에서 단백질 분해효소 활성이 있는 분획을 동결건조한 후 미리 10mM phosphate buffer로 평형시킨 Sephadex

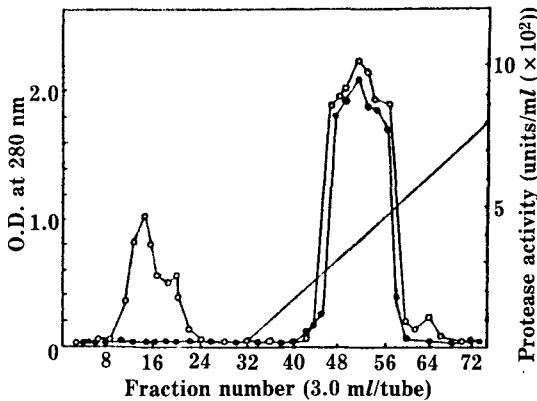


Fig. 1. Ion exchange chromatography of alkaline protease using a column of CM-cellulose.

Column size: 2.5×100 cm
Flow rate: 9 ml/hr
Phosphate buffer: pH 8.0
○-○: O.D. at 280 nm
●-●: protease activity

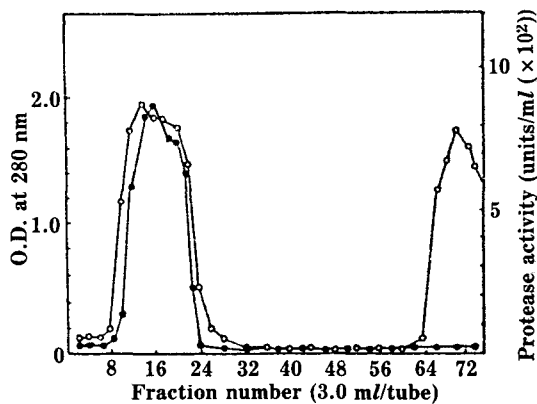


Fig. 2. Gel filtration chromatography of alkaline protease using a column of Sephadex G-100.

Column size: 1×100 cm
Flow rate: 9 ml/hr
Phosphate buffer: pH 8.0
○-○: O.D. at 280 nm
●-●: protease activity

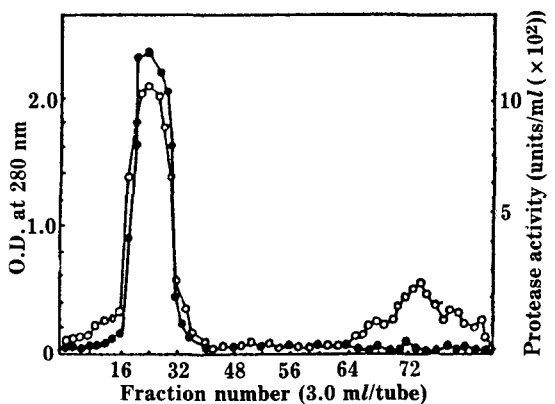


Fig. 3. Gel filtration chromatography of alkaline protease using column of Sephadex G-75.

Column size: 1×70 cm
Flow rate: 9 ml/hr
Phosphate buffer: pH 8.0
○-○: O.D. at 280 nm
●-●: protease activity

Table 1. Summary of the purification protease of the strain 8-16.

Steps	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Culture fluid	636,640	5400	80.8	100
Acetone	280,400	1011	277.3	88
CM-cellulose	259,600	223	1164.1	81.5
Sephadex G-100	196,860	129	1526.0	61.8
Sephadex G-75	152,800	56	2938.0	34.9

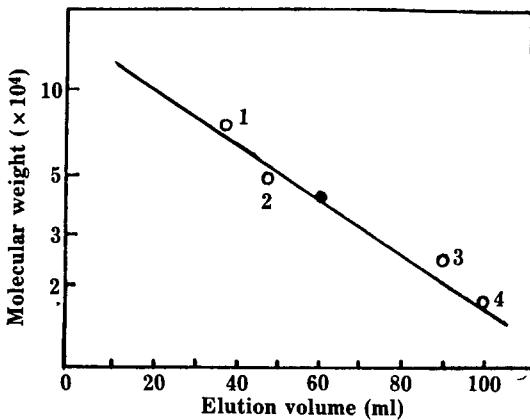


Fig. 4. Determination of the molecular weight of the protease by Sephadex G-100 gel filtration.

The standard proteins used and their molecular weights are:

- 1: Bovine'serum albumin (66,000)
- 2: Ovalbumin (45,000)
- 3: Carbonic anhydrase (29,000)
- 4: Lysozyme (14,300)
- : Standard protein, ●: Protease (sample): Strain 8-16

G-100 으로 gel filtration 하였다. 이 때 분획 10-24 에서 단백질 분해효소 활성이 나타났고 이 때의 비활성은 1526.0 units/mg protein 이었다(Fig.2).

4) Sephadex G-75 column chromatography : Sephadex G-100 column chromatography 에서 단백질 분해효소 활성이 있는 분획을 미리 10 mM phosphate buffer 로 평형시킨 Sephadex G-75 로 gel filtration 하였다. 동일 완충액으로 용출시켜 분획 16-32 에서 단백질 분해효소 활성이 나타났고, 이 때의 비활성은 2938.0 units/mg protein 이었다(Fig.3). 이렇게 하여 36.7 배 정제할 수가 있었다(Table 1).

정제 효소의 단일성을 확인하기 위해 7.5% poly-

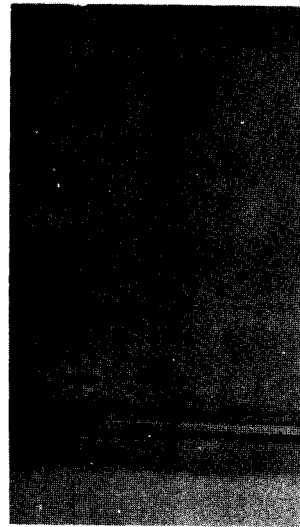


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme of *Bacillus* sp. 8-16.

acrylamide gel 로 전기영동한 결과는 Fig.5 와 같다.

5) 분자량 측정 : 정제된 효소의 분자량은 Sephadex G-100 column (1×100 cm) 을 통해 gel filtration 으로 결정하였다. 그 결과 33,000 으로 나타났다 (Fig.4).

알칼리성 단백질 분해효소의 성질

1) 효소의 작용 최적 pH 와 온도 : 효소액을 pH 7.0-13.0 까지의 기질과 반응시켜 단백질 분해효소의 활성을 조사한 결과 균주 8-16 의 최적 pH 는 11.0 이었고 (Fig.6) pH 13 에서는 본 효소활성이 낮았다.

0.6% casein 이 포함된 pH 11.0 의 완충용액과 효소액을 각 온도 (30-90°C) 에서 반응시켜 활성을 조사한 결과 본균주 모두 70°C 에서 최적이었다 (Fig.7).

Horikoshi(1) 에 의해 분리된 균주 *Bacillus* sp. No.221 은 최적 온도가 60°C 이고 Desai *et al.* (11) 에 의해 분리된 Thermophilic Actinomycetes 는 60-70°C 이고, Matsuzawa *et al.* (15) 에 의해 분리된 *Thermus aquaticus* 는 70°C 인 것으로 보아 8-16 균주에 의해 생성된 protease 는 고온성인 것으로 보인다.

2) 효소의 안정성에 미치는 pH 와 온도 : 각 pH 의 buffer (pH 6-12) 에 효소액을 넣어 30°C 에서 30분 동안 전처리한 후 70°C 에서 10분간 기질과 반응시켜 protease 활성을 조사하였다. 그 결과 pH 8 에서 가장 안정하였고 pH 6-12 까지의 전범위에서 상당히 안정하였는데 Tsuru 등(3) 의 *Bacillus subtilis* 의 경우

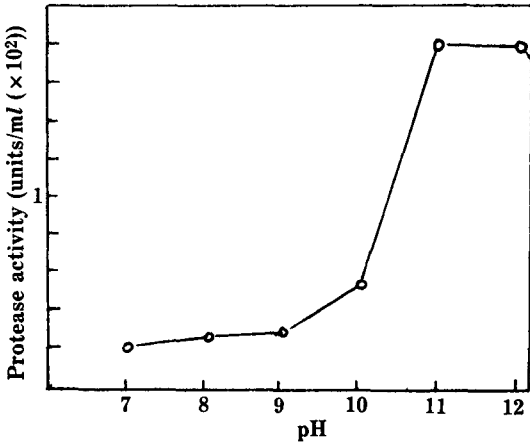


Fig. 6. Optimum pH on the protease activity. Enzymes were assayed at 70°C (10 min), various pH range.

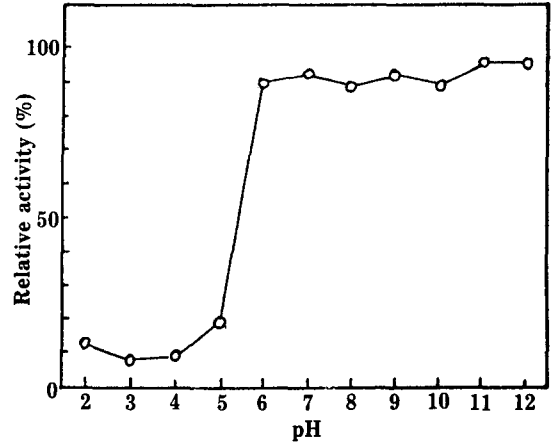


Fig. 8. Effect of pH on stability of protease (30°C, 30 min preincubation. 70°C, 10 min).

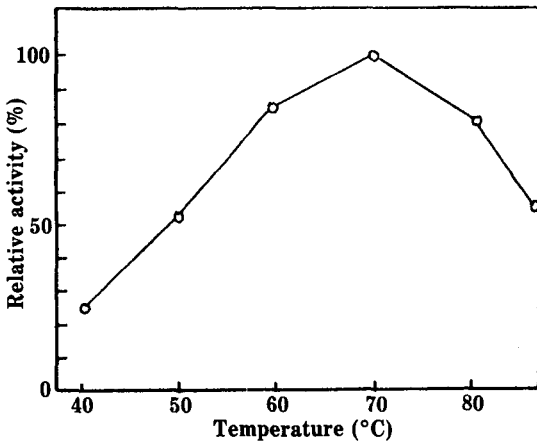


Fig. 7. Effect of temperature on the alkaline protease activity.

Enzymes were assayed in sodium borate buffer (pH 11) at various temperature.

pH 6-11의 전범위에서 안정된 것으로 보아 8-16 균주에 의해 생성된 protease의 경우 pH에 대해 매우 안정한 것으로 보인다(Fig.8).

효소액을 각 온도(30-90°C)에서 1시간 동안 전처리한 후 남아있는 protease의 활성을 조사한 결과, 균주 8-16의 경우 70°C까지 매우 안정하였다(Fig.9).

이는 Horikoshi(1)에 의해 분리된 *Bacillus* No.221이 50°C까지 안정하고 Desai *et al.*(11)의 Thermophilic Actinomycetes가 90°C에서 50%까지 안정한 것으로 보아 8-16 균주에 의해 생성된 protease는 중온성 세균보다 열안정성이 높은 것을 알 수 있다.

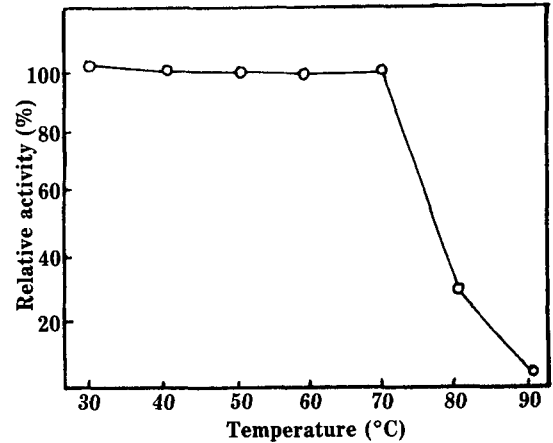


Fig. 9. Effect of temperature on stability of protease (30 min preincubation. 70°C, 10 min).

3) 반응속도에 미치는 기질의 영향 : Casein의 농도를 1, 2, 4, 6, 10 mg/ml로 하여 효소액 1 ml를 각 농도의 기질 5 ml에 넣어 반응시킨 후 단백질 분해효소의 활성을 산출하였으며 K_m 값을 구한 결과 1.3 mg/ml로 나타났다(Fig.10).

4) 효소의 안정성에 미치는 metal ion의 영향 : 효소액을 다양한 metal ion과 함께 30°C에서 60분간 전처리한 후 남아있는 단백질 분해효소의 활성을 조사하였다. 그 결과 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 는 촉진역할을 하였고, $HgCl_2$, $AgNO_3$ 는 저해작용을 하였다(Table 2).

5) 저해제의 효과 : 효소액을 다양한 저해제와 함께 30°C에서 30분간 전처리한 후 남아있는 단백질 분해효소의 활성을 조사한 결과, PMSF(Phenylme

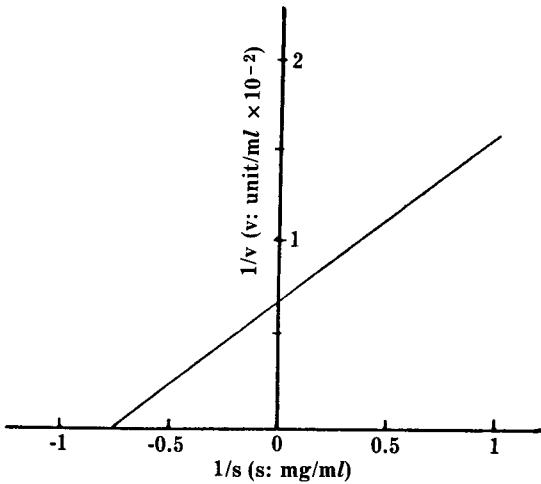


Fig. 10. K_m value on the reaction rate of the protease from strain 8-16.

Casein concentration: 1,2,4,8,10 mg/ml. temperature: 70°C
time: 10 min
pH : 11

Table 2. Effects of metal ions on the protease activity (30°C, 30 min preincubation).

Reagents	Relative activity		
	1 mM	2 mM	10 mM
None	100	101	100
AgNO ₃	108	101	56
BaCl ₂ ·2H ₂ O	100	95	82
CaCl ₂	81	102	106
CoCl ₂ ·6H ₂ O	110	98	67
CuSO ₄ ·5H ₂ O	115	104	114
Fe ₂ (SO ₄) ₃	110	100	70
HgCl ₂	106	100	41
Li ₂ SO ₄ ·H ₂ O	100	100	96
MgSO ₄ ·7H ₂ O	116	110	98
MnCl ₂ ·4H ₂ O	120	116	108
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	104	104	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	106	99	57
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	120	109	82

thylsulfonfyl fluoride), iodoacetic acid 에 의해 크게 저해받았다(Table3).

요 약

알칼리성 *Bacillus* 속 8-16 균주의 내열·알칼리성

Table 3. Effect of chemical reagents on protease activity (30°C, 30 min preincubation).

Chemical reagents		Relative activity(%)
Control		100
Serine inhibitor		
PMSF	2 mM	31
	0.5 mM	90
Cysteine inhibitor		
iodoacetic acid	2.5 mM	47
	0.5 mM	100
SDS	0.2%	49
Metal chealator		
EDTA	10 mM	83
	1 mM	100
Sodium oxalate	10 mM	83
	1 mM	72
Calcium specific chealator		
EGTA	10 mM	89
	1 mM	98
Zinc specific chealator		
O-phenanthroline	10 mM	37
	1 mM	37
Reducing agent		
potassium cyanide	10 mM	67
	1 mM	84
L-cysteine	1 mM	98
	0.1 mM	100

단백질 분해효소를 정제하여 그 특성을 조사하였다. 본 균주의 알칼리성 protease 를 아세톤침전, CM-셀룰로즈크로마토그래피, Sephadex G-100 및 G-75 젤 여과법으로 정제하였고 비활성이 37 배되게 하여 단일단백질이 될 때까지 순수정제하였다. 이 효소는 70°C pH11 에서 pH12 사이에서 최대 활성을 나타냈고 60°C에서는 한시간 동안 안정하였다.

이 효소의 K_m 치는 1.3mg/ml 이며 분자량 33,000 으로 추정된다. 또한 이 효소는 Cu²⁺ 및 Mn²⁺에 의해서 약간 활성화되고 Ag⁺, Hg²⁺ 및 PMSF 에 의해서 저해되므로 활성부위에 serine 기가 관여하는 것으로 추정된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 1987년도 차관연구비에

의하여 수행되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. Horikoshi, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**(9), 1407 (1971).
2. Kabayashi T., A. Ogasawa, S. Iao and M. Saitoh: *Agr. Biol. Chem.*, **49**(3), 693 (1985).
3. Tsuru, D., H. Kira, T. Yamamoto and J. Fukumoto: *Agr. Biol. Chem.*, **30**(12), 1261 (1966).
4. Nakanishi, T., T. Matsumura, N. Minamiura and T. Yamamoto: *Agr. Biol. Chem.*, **38**(1), 37 (1974).
5. Aunstrup, K. et al.: *Fermentation Technology Today* 299 (1972). Terui G. (ed) Osaha. Japan.
6. Ahn, J.W., T.K. Oh. and K.H. Park: *Recent Prog. in Molecular Biol and Gen. Eng. Kor.* 223 (1987).
7. Jeong B.c. and K.J, Lee.: *J. Microbiol.*, **26**(4), 355 (1988).
8. Bae M. and Y.H, Lee.: *J. Kor. Res. Inst for Better Living Ewha Wom. Univ.*, Vol.41, 19 (1988).
9. Kamekura, M. and H. Onishi: *Applied Microbiol* **27**, 809 (1974).
10. Lowry, O.H. and N.J., Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **183**, 265 (1951).
11. Desai, A.J. and S.A. Dhala: *J. Bacteriol.*, **100**, 149 (1969).
12. Laemmli, U.K.: *Nature*, **227**, 680 (1970).
13. Andrews, P.: *J. Biochem.*, **91**, 222 (1954).
14. Andrews, P.: *J. Biochem.*, **91**, 595 (1965).
15. Taguchi, H., K. Hamaoki, H. Matsuzawa and T. Ohta: *J. Biochem.*, **93B**, 7 (1983).
16. Nobuo, K., T. Nagasawa, Y. Tani and Koichiogata: *Agr. Biol. Chem.*, **36**(7), 1177 (1972).

(Received August 3, 1989)