大 韓 衛 生 學 會 誌
KOREAN. J. SANITATION
Vol.5, No.2, 103~110(1990)

Bacillus屬 AP-5 菌株의 고온성 알카리 培養에 따른 Alkaline Protease의 生成 및 성질

李 光 培

大邱保健專門大學

Production and Properties of Alkaline Protease from Bacillus sp. Strain in Thermophilic and Alkaline Condition

Lee, Kwang Bae

Department of sanitary science, Taegu Health Junior college, Taegu, Korea.

Abstract

For production of thermophilic and alkaline protease, Bacillus sp. strain AP-5 was isolated from a compost.

The production of the protease was reached at maximum for 4 days at 55℃ in standing culture. Chitin and Cellulose as carbon source, and Skim Milk as nitrogen source were favorable for the production of the enzyme.

Optimal temperature and optimal pH of the enzyme was 55℃ and 11, respectively.

Metal ion didn't effect on the enzyme activity, the protease was very stable at heat treatment of 30 min at 55℃

Ⅰ. 序 論

Protease는 蛋白質이나 peptide에 作用하여 peptide 結合을 가수분해시키는 酵素로써 生産原으로 나누어보면 動物性 protease, 植物性 protease, 微生物性 protease로 大別할 수 있다. 또한 活性과 機能면에서 分類하면, serine protease, thiol protease, metal

protease 등으로 나뉘어지고 作用最適 pH에 따라서 酸性, 中性, 알카리性 protease로 나뉘어 진다. 이 중에서 alkaline protease를 分泌하는 菌株로는 Streptomyces 屬[1], Bacillus 屬[2~4], 진정자낭균류인 Aspergillus 屬[5~6], Penicillium 屬[7~8], Neurodomonas 屬[11]과 Yeast[12] 등에서도 새로운 형태의 alkaline protease를 分泌하는 것을 發見하였다.

微生物 protease는 여러 産業分野에서 利用되는데[13] 특히 alkaline protease는 洗劑[14], 可溶性 蛋白質제조, leather tanning[15], 農業廢棄物處理[16] 등에 利用된다

본 實驗에서는 洗劑에 사용할 수 있는 蛋白質分解酵素를 生産할 目的으로 alkaine protease를 強하게 分泌하는 好알카리性 bacteria를 볏짚으로부터 分離하고 動靜한 결과 Bacillus 屬 菌株임을 발견하고 이 菌株의 酵素生産條件 및 性質을 調査하였으므로 그 結果를 報告하고자 한다.

II. 材料 및 方法

1. 使用菌株

본 實驗에 使用한 菌株는 볏짚에서 分離한 Bacillus sp. 菌株 중에서 alkaline protease를 強하게 分泌하는 고온성 알카리菌株를 選別하여 使用하였다.

2. 菌株選別 및 培地조성

採取한 菌株를 Saccharose 5%, Skim milk 5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 0.1%, KH_2PO_4 0.05%, agar 2.0%를 pH 11.0의 平面培地에 培養시킨 후(55℃ Incubator culture) 3일 뒤 平面培地에 ring이 생긴 Colony를 다시 上記의 조건으로 된 保存用 斜面培地에 培養시킨 結果 3일만에 자랐으며 그 중에서 酵素의 活性이 큰 것을 供試菌으로 使用하였다.

3. 培養條件

酵素生成을 위해 上記의 培地(agar를 제외)를 100 ml Erlenmeyer flask에 20 ml 넣고 pH를 11.0으로 맞춘 후 고압살균시키고 斜面培地에 stock된 菌株를 0.9% 생리식염수에 懸濁시켜 550 nm에서 0.0 값을 0.3이 되도록 調整후 고압살균된 培地에 1 ml씩 接種해서 5일동안 55℃ Incubator에서 培養시킨다.

4. 酵素活性度 測定

酵素生成用 培地에 菌株를 1 ml 취하여 7,000 rpm에서 5분동안 centrifugation 시킨 다음 그 상등액을 粗酵素로 하고 Casein을 基質로 하여 다음과 같이 活性度를 測定하였다.

crude enzyme 0.2 ml, 1/10 H phosphate Buffer(pH 11.0) 0.8 ml, 0.6% Casein 1.0 ml을 55℃ Water bath에서 60분동안 反應시킨 후 0.44 M Trichro acetic acid 1.0 ml에 添加하여 反應을 정지시킨 후 탈지면으로 여과시켰다. 그 후 Filtrated Solution 1.0 ml, 5% Na_2CO_3 2.5 ml, phenol reagent 0.5 ml를 添加하여 30℃ Water bath에 30분동안 反應시켜 spectrophot meter 660 nm에서 O.D 값을 測定하였다.

III. 結果 및 考察

1. 培養시간에 따른 protease 生産

본 菌株를 培養하여 培養시간에 따라서 protease 生成을 調査해 본 結果 Fig. 1 에서 보는 바와 같이 55℃에서 4 일간 培養하면 가장 많은 protease 를 얻을 수 있음을 알았다.

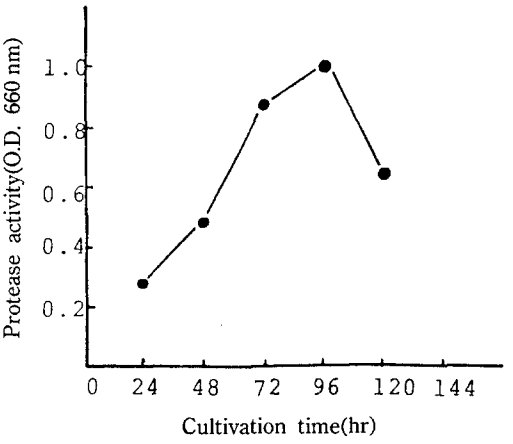

Fig. 1 Protease production according to Cultivation Time.

2. 炭素源에 따른 protease 생성

본 酵素에 미치는 炭素源의 影響을 調査하기 위하여 酵素生成用 培地에 각종 炭素源을 대치하여 5.0% 되도록 添加하여 3~4 일간 培養한 후 alkaline protease 活性을 測定한 結果는 Table 1 과 같다.

Table 1 에서와 같이 酵素生産에는 3 일째는 cellulose, chitin, sucrose 의 순으로, 4 일째는 chitin, cellulose, sucrose 의 順序로 酵素生成이 높았다.

Lee[1]가 報告한 菌株는 酵素生成에 lactose 가 가장 좋았고 cellulose, maltose, inuline 順으로 그 活性이 높았으며, Kiyoshi[17] 등은 soluble starch 가 가장 좋은 炭素源이 된다고 報告하였다.

3. 窒素源에 따른 protease 生成

본 酵素의 生成에 미치는 窒素源의 影響을 調査하기 위하여 酵素生成用 培地에 각종 窒素源을 1.0%가 되도록 대치하여 protease 생성을 調査한 結果는 Table 2 와 같다.

Table 2 에서와 같이 酵素生産에는 Skim milk 가 가장 좋았고 그외 窒素源에 대해서는 活性이 저조하였다.

Lee[1]가 報告한 菌株는 酵素生成에 peptone, yeast extract, beef extract 와 같은 有機窒素源에 대해서 活性이 높았으며, Kiyo-

Table 1 The concentration of each carbon source was 5.0% in basal medium and cultured for 3 and 4 days at 55C.

Cultivation Time(day)	Protease Activity(A. 660)	
C-source	3	4
Sucrose	0.86	1.06
Glucose	0.18	0.00
Strach(Cohn)	0.48	0.30
Chitin	1.43	1.35
Cellulose	1.53	1.19

Table 2 The concentration of each nitrogen source was 1.0% in basal medium and cultured for 3 and 4 days at 55C.

Cultivation Time(day)	Protease Activity(A. 660)	
N-Source	3	4
Skim Milk	0.92	1.07
Peptone	0.04	0.02
$(NH_4)_2SO_4$	0.01	0.02
$NaNO_3$	0.06	0.06
$NaNO_2$	0.02	0.03

Table 3 Effect alkalin protease activity by Metal Salt(10^{-4}M)

Metal Salt(10^{-4}M)	Protease activity(660 nm)
None	1.12
$CuSO_4$	1.00
$HgCl_2$	1.08
EDTA	1.15
$FeSO_4$	0.96
$CaCl_2$	1.20

shi[17]등이 報告한 菌株는 酵素生成에 Soybean meal이 가장 좋은 窒素源이었다고 報告하였다.

4. 金屬 ion에 따른 protease 活性

본 酵素의 活性에 미치는 金屬 ion의 影響을 調査하기 위하여 각종 金屬염을 10^{-4} M 濃度가 되도록 添加하여 protease 活性을 測定하였다(Table 3).

Table 3에서와 같이 金屬 ion을 加하지 않은 酵素와 比較하여 볼 때 별다른 차이가 없었다.

Lee[1]가 報告한 菌株는 酵素生成에 Ca^{2+}, Mn^{2+} Mg^{2+}, Cr^{2+}은 酵素活性을 증가시켰고 Ag^{1+}, Cu^{2+}는 그 활성을 沮害하였다.

따라서 본 protease의 活性에는 金屬 ion이 影響을 미치지 못함을 볼 때 적어도 活性機能面에서 metal protease는 아니라고 思料된다. 한편 Daisuke[18] 등은 Ag^{+1}와 Cu^{2+}는 酵素活性을 沮害하지 않고 Hg^{2+}만이 沮害한다고 報告하였으며 Ljubisa[19] 등은 Zn^{2+}에 의해서 活性이 沮害된다고 하였다.

5. Protease의 熱 安定性

본 酵素의 熱에 대한 安定性을 調査하기 위하여 55℃, 80℃, 100℃에서 10分, 20分, 30分간 熱처리를 하여 시간에 따른 殘存酵素活性度를 測定한 結果는 Fig. 2와 같았다.

Fig. 2에서와 같이 55℃에서는 熱처리 하지 않은 酵素에 비해 그 活性이 별 다른 차이가 없었으나 80℃와 100℃에서는 시간이 經過됨에 따라서 酵素의 活性이 크게 失活되었으나 100℃에서 30분간 熱처리에 의해서도 미약하지만 그 活性이 維持됨을 볼 때 본 酵素는 熱에 대하여 대단히 安定함을 알았다.

Lee[1]는 40℃와 50℃에서는 比較的 安定하였으며 60℃에서 1시간 처리후 그 活性이 약 60%가 失活되었고 70℃에서 1시간 처리 후에는 약 90°F 정도가 失活하였다고 報告하였다.

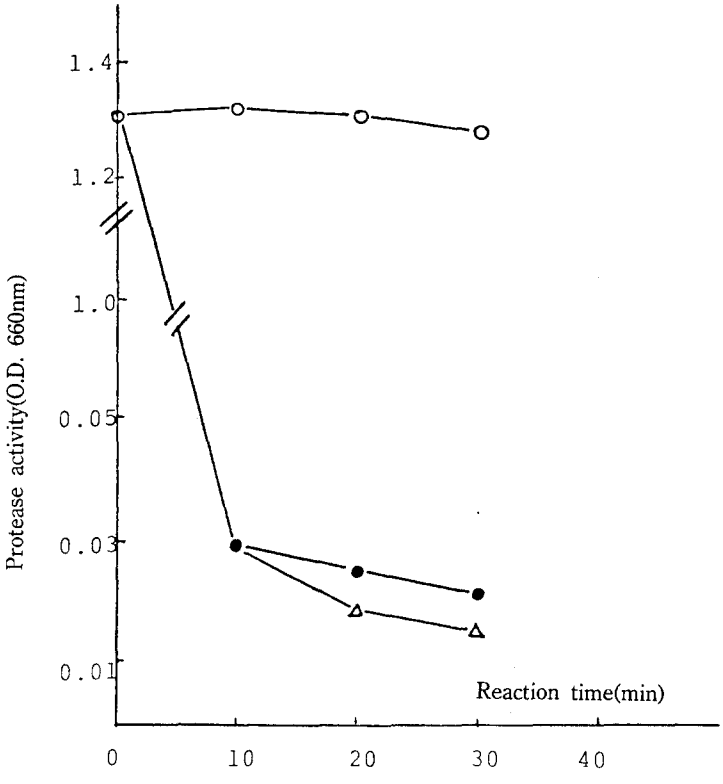

Fig. 2 Heat stability of protease.
(○－○ 55℃, ●－● 80℃, △－△ 100℃)

Tobe[20]등은 Bacillus 屬의 菌株가 生産하는 alkaline protease는 50℃에서는 안정하였지만 60℃에서 40분간 反應시켰을 때 대분분 失活한다는 報告와 대부분의 protease는 60℃정도에서 10～15분 이내에 약 50%정도 失活된다는 報告에 비해서는 熱安定性이 높았지만 S. fadie의 protease는 80℃에서 10분간 열처리에 의하여 약 28%가 失活하였다는 報告에 비해서는 熱安定性이 낮았다.

6. Protease activity의 最適溫度

본 酵素의 最適活性溫度를 調査하기 위하여 37℃, 55℃, 65℃, 80℃의 溫度에서 60분간 反應시킨 結果는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서와 같이 55℃에서 가장 높은 活性을 보였다. 이것은 Ahn, J. W[11] 등의 Corynebacterium 屬에서 生成되는 protease의 最適活性溫度와 같았으나, Lee[1]의 Streptomyces 屬이 生成하는 酵素의 50℃에 비해서는 最適活性溫度가 높았으며, Nakanishi[25]등의 Streptomyces 속이 生成하는 酵素의 60℃에 비해서는 最適活性溫度가 낮았다.

7. Protease activity의 最適 pH

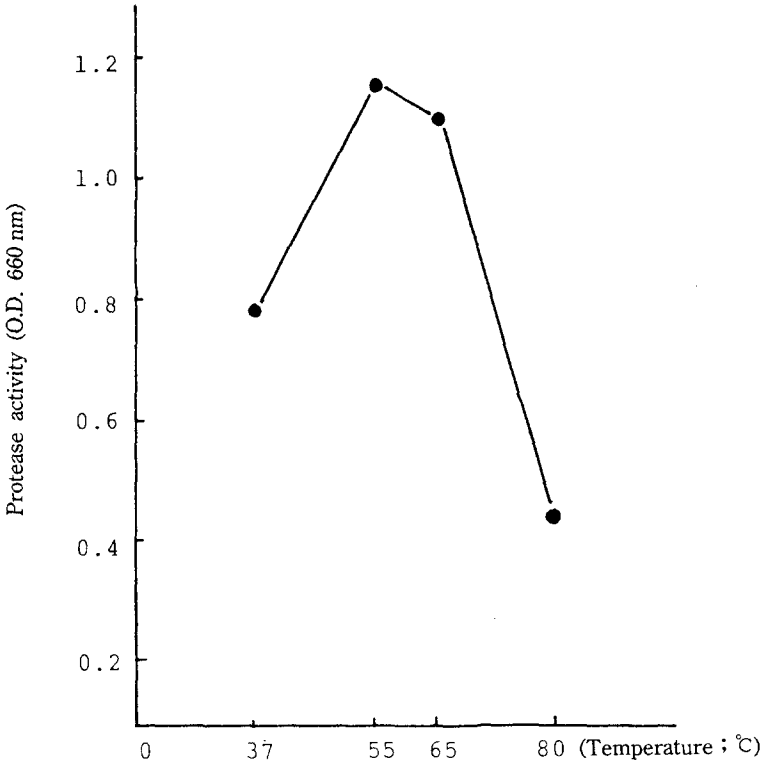

Fig. 3 Optimum Temperature of Protease activity.

본 酵素의 最適 pH 를 調査하기 위하여 pH 를 6.0~12.0 까지 각 pH 별로 酵素의 活性을 調査한 결과 Fig. 4 와 같이 pH 11.0 에서 가장 높은 活性度를 나타내었다. 이와 같은 結果는 일반적으로 alkaline protease 가 갖는 最適 pH 와 거의 비슷하였다.[7, 25, 26, 27]

Ⅳ. 要 約

볏짚 퇴비로부터 alkaline protease 를 強하게 分泌하는 Bacillus 屬의 AP 5 菌株를 分離하여 酵素生産을 위한 最適培養條件과 일반적인 性質을 調査한 結果는 다음과 같다.

Protease 生成은 55℃에서 4 일간 培養후에 가장 많았으며 이때 培地조성은 Saccharose 5.0°F, Skim milk 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%, NaCl 0.1% 및 KH_2PO_4 0.05%를 N-NaOH 로 pH 11.0 으로 調整하였다.

또한 炭素源으로서는 chitine 이나 cellulose 로 대치하고, 窒素源으로서는 Skim milk 를 사용하였을 때 본 菌株의 protease 가 가장 많이 生成되었다. 본 酵素의 活性은 最適 pH 가 11.0 이었고, 最適溫度는 55℃였다.

또한 55℃에서 30 분간 熱처리하여도 그 活性에는 變化가 없는 比較的 熱에 安定하였으며, 金屬 ion 에 대한 影響은 없었다.

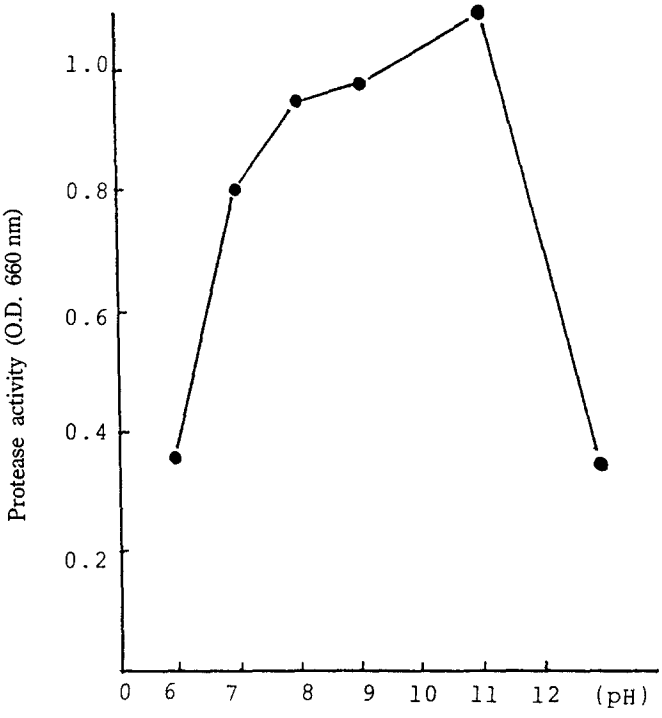

Fig. 3 Optimum pH of Protease activity.

參 考 文 獻

1. Lee, J. B. : Production and properties of alkaline protease from Streptomyces sp. Kon-Kuk University(Master thesis) (1984)
2. Pekka, M., and H. Zalkin : J. Bacteriol., 141, 493~501 (1980)
3. Daisuke, T., H. Kiya, T. Yamamot, J. Fukumoto : Agr. Biol. Chem., 31, 330~335 (1967)
4. Janes, H. H., and B. C. Carlton : ABB., 139, 69~79 (1970)
5. Subramanism, A. R., S. Spadari, and G. Kalnitsky : Federation Proc., 24, 593(1965)
6. Turkova, J. : Biochem. Biophys. Acta., 257, 257~263 (1972)
7. Motoo, A., and S. Murao : Agric. Biol. Chem., 41, 2293~2294 (1977)
8. Below, M., and J. Porath : Methods Enzymol., 19, 576, Academic press, New York (1970)
9. Richard, A., L. D. Eirich, J. S. Prices : J. Biol. Chem., 256, 811~814 (1981)
10. Harvey, D. : J. Bacteriol., 122, 1117~1125(1975)
11. Ahn, J. W., T. K. Oh and K. H. Park :

Precent progress in molecular Biology and genetic engineering in Korea. 233~240, The institute for molecular biology and Genetics (Seoul National University) (1987)

12. 掘越弘毅 : 酵素 II, 日本農芸化學 ABC シリー2 5, 110~123, 朝倉書店 (1985)
13. Underkofler, L. A. : Industrial Microbiology (Miller, B. M., Litsky, W), 128, Mcgraw-Hill Book co., New York (1976)
14. Aunstrup, K. : Proteinases, in Economic Microbiology, 5, ed. A. H. Rose, 50~114-Academic press, London (1980)
15. Muralidhara, R. N., and K. J. Scaria : Leather Science, 29, 457~461(1982)
16. Sung, N. K., K H. Shim, I. S. Kang, and H. K. Chun : Biology and genetic engineering in Korea. 291~298, The institute for Molecular biology and Genetics (Seoul National University) (1987)
17. Kiyoshi, M., E. Ichishima, and F. Yoshida : Agr. Biol. Chem., 30, 35~41 (1966)
18. Daisuke, T., H. Kira, T. Yamamoto, and J. Fukumoto : Agri. Biol. Chem. 30, 12 61~1268 (1966)
19. Sadoff, H. L., and L. Vitkovio : J. Bacteriol., 131, 891~896 (1977)
20. Sadanobu, T., T. Takami, Y. Hirose, and K. Mitsugi : Agr. Biol. Chem., 39, 17 49~1755(1975)
21. Burgum, A. A., and J. M. Prescott : ABB. 111, 391 (1965)
22. Narahashi, Y., K. Shibuya : J. Biochem., 64, 427 (1968)
23. Narahashi, Y., and M. Yanogita : J. Biochem., 62, 663 (1967)
24. Morihara, K., T. Oka : BBA., 139, 382 (1969)
25. Shigeho, I., S. Tobe, K. Liwa, A. Ishizaki, Y. Hirose : Agr. Biol. Chem., 38, 2317~2322 (1974)
26. Toshihiro, N., Y. Matsumura, N. Minamiura, and T. Yamamoto : Agr, Biol. Chem., 38, 37~44 (1974)
27. Kiyoshi, M., E. Ichishima, and F. Yoshida : Agr. Biol. Chem., 28, 884~895 (1964)