

## Bacillus sp. CW-11210| 생성하는 Alkaline Protease의 생산 및 정제

이우제 · 손규목 \* · 최정†

영남대학교 식품가공학과

\* 창원전문대학 식품영양학과

### Production and Purification of Alkaline Protease from *Bacillus sp.* CW-1121

Woo-Je Lee, Gyu-Mok Son \* and Cheong Choi†

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Dept. of Food and Nutrition, Changwon Junior College, Changwon 641-771, Korea

#### Abstract

Alkaline protease producing bacteria were isolated from soil and identified as *Bacillus sp.* CW-1121. It was found that the production of alkaline protease reached to maximum in 5 day of fermentation at 40°C. The enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation, gel filtration on Sephadex G-150 and DEAE-cellulose ion-exchange chromatography. The homogeneity of the purified enzyme was verified by polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme was purified 5.72 fold and yield of the enzyme purification was 16.71%. When the purified enzyme was applied to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, the molecular weight was estimated to be 55,000.

Key words : alkaline protease, *Bacillus sp.*

#### 서 론

Protease는 단백질 또는 펩티드에 작용하여 펩티드 결합의 가수분해를 촉진시키는 효소로써 조미료 제조, 식육의 연화, 맥주 청주의 혼탁 방지, 치이즈 숙성 등의 식품공업, 피혁공업, 세제산업 등에 널리 이용되고 있는 효소이다<sup>1,2</sup>. Alkaline protease는 알카리 범위의 pH에서 최적활성을 가지며 효소활성 부위에 serine잔기를 가지고 있어서 serine과 류이반응을 하는 물질에 대해서 쉽게 활성을 잃는 특징을 가진 효소이다<sup>3</sup>. Röhm<sup>4</sup>은 의류의 단백질 오염물을 제거하

기 위하여 protease가 함유된 훼장의 추출물을 이용하였고 Mizusawa 등<sup>5</sup>은 *Streptomyces sp.*가 알카리 범위에서 작용하는 protease를 분비한다고 보고한 이래 Horikoshi 등<sup>6-8</sup>, Tsuru<sup>9</sup>, Kobayashi 등<sup>10</sup>, Nakanishi 등<sup>11</sup>, Kinoto 등<sup>12</sup>, Kazuo 등<sup>13</sup>은 미생물에서 효율적인 protease를 분리 보고 한 바 있다.

본 연구에서는 공업적으로 활용되며 이용되고 있는 protease 중 알카리영역에서 최적의 활성을 갖는 alkaline protease 생성성이 강한 균주를 개발하고 적도양으로부터 *Bacillus sp.* CW-1121 균주가 생성하는 alkaline protease의 생산 및 정제에 관하여 그 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

\*To whom all correspondence should be addressed

## 재료 및 방법

### 균의 분리 및 선별

대구와 경북지역의 토양과 부식토를 균원시료로 하여 상법에 따라 순수분리하고 분리된 균주중 alkaline protease의 생산능력이 뛰어난 8균주를 1차 선발하고 2차 효소생성능 실험에서 가장 우수한 1균주(CW-1121)를 선발하였다. 선발된 균주는 1개월에 1회씩 계대 배양하였으며 Bergey's manual<sup>14)</sup>에 따라 등정하였다.

### 배지

균의 순수 분리를 위한 배지는 minimum salt agar<sup>15)</sup>를, 효소생성을 위하여 trypton yeast extract(TYEP) medium<sup>16)</sup>을, 균주보관용 배지로는 저장용 배지(Difco.)를 사용하였으며 이들 배지조성은 Table 1, 2와 같다.

Table 1. The composition of medium for stock culture

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4000 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1000 mg
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	66.7 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> H <sub>2</sub> O	0.13 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.98 mg
MgSO <sub>4</sub>	100 mg
Glucose	5000 mg
Agar	15000 mg
Distilled water	1000 ml

Table 2. The composition of tryptone yeast extract medium (%)

Tryptone	0.1
Yeast extract	0.25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1

### 배양방법

효소생산을 위하여 TYEP medium에 공식균 5백곰이를 접종하고 40℃에서 약 4일간 배양하였다.

### 조효소액의 조제

배양된 액체배지를 4℃에서 8000×g로 30분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 상정액을 모아 여과하여 조효소액으로 사용하였다.

### 단백질의 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry 등<sup>17)</sup>의 방법에 의하여 측정하였으며, 단백질 값은 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

### 효소활성 측정

기질 용액의 제조는 Hammarsten-milk casein을 0.6% 농도로 증류수에 용해하여 pH 10.0으로 조절한 다음 효소반응 기질용액으로 사용하였다. Kinetic parameter 측정 시험에서는 기질인 casein의 농도를  $1.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-4}$  M까지 변화시켰다. Alkaline protease의 활성 측정은 Anson-蒜源 변법<sup>18, 19)</sup>에 의하여 실시하였다. 즉 효소액 0.5ml에 0.2M boric acid-borax buffer(pH 10.0) 1ml를 가하고 0.6% casein-용액 2.5ml를 가한 다음 30℃에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.44M의 trichloroacetic acid(TCA) 2.5ml를 가하여 반응을 중지시키고, 여과하여 얻은 여액 1ml에 10ml의 0.55M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 가하고 1ml의 Folin-ciocalteu 시약을 가하여 30℃에서 30분간 발색시킨 다음 660nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소 활성은 효소액 1ml가 1분간에 1μg의 tyrosine을 생성하는 것을 1unit로 정하였다. 이때 표준품으로는 tyrosine을 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

### 효소의 정제

조효소액에 활산암모늄을 70% 포화되게 가하여 효소단백질을 응집, 첨전시킨 뒤 회수하여 0.2M boric acid-borax buffer로 투석한 다음 동일 buffer로 DEAE-cellulose에 의한 ion exchange chromatography를 행한 후 활성분획을 모아 저온실에서 Sephadex G-150 column 등을 사용하여 gel filtration 하여 정제하였다.

### 전기영동

정제한 alkaline protease의 순도는 Davis 법<sup>20)</sup>에 의하여 polyacrylamide gel 전기영동으로 검정하였다. 7.5% polyacrylamide gel 칠판에 시료를 주입하고 실온에서 3mA/tube의 전류를 통하여 약 4시간동안 영동하였다. 영동이 끝난 gel은 1% amido black 10-B 용액으로 2시간 염색한 다음 7% acetic acid 용액으로 탈색하였다.

### 분자량 측정

정제 alkaline protease의 분자량은 Weber와 Osborn의 방법<sup>22</sup>에 의하여 sodium dodesyl sulfate (SDS) - polyacrylamide 전기영동에 의하여 실시하였다. 정제된 효소를 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol을 함유한 0.01M phosphate buffer (pH 7.0)로 용해하여 37°C에서 4시간 동안 영동시켰다.

영동시킨 후 Rm값에 따라 표준곡선을 이용하여 분자량을 측정하였고 이때 표준품으로는 bovine serum albumin (MW : 66,000), trypsinogen (MW : 24,000),  $\beta$ -lactoglobulin (MW : 18,400), lysozyme (MW : 14,000)을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### Alkaline protease 생산균주 분리 및 동정

대구와 경북지역의 약 250개소에서 채취한 토양으로부터 분리한 120균주를 대상으로 2차에 걸친 효소 생산능력 실험을 통하여 alkaline protease 생산능력이 강한 *Bacillus sp.* CW-1121 균주를 분리 동정하였다. (Table 3)

Table 3. Microbiological properties of the isolated strain CW-1121

Form	Rod
Size	0.8um $\times$ 2.5um
Motility	+
Spore	+
Spore shape	Ellipsoidal
Spore position	Central
Gram staining	+
Reduction of nitrate to nitrite	Reduction
Methyl red test	-
Voges-Proskauer test	+
Anaerobic production of gas from nitrate	-
Formation of	
Indole	None
Hydrogen sulfide	None
Urease test	-
Oxidase test	+
Catalase test	-
Starch hydrolyzed	+
Hydrolysis of casein	+
Acid from glucose	+
pH for growth	9~11
Temperature for growth	40°C

#### 배양시간 및 탄소원의 영향에 따른 alkaline protease의 생성

*Bacillus sp.* CW-1121의 alkaline protease의 생성을 TYEP medium을 사용하여 40°C에서 배양시간별로 측정한 결과 Fig. 1과 같이 배양 시작후 5일째에 효소 활성이 최대에 달했으며 그 이후 활성이 점차 감소하였다. 이는 박 등<sup>23</sup>이 *Bacillus sp.* 균주가 배양 3일째 최대활성을 나타냈다는 보고와 *B. subtilis*가 18~24시간 배양시 활성이 가장 높았다는 장 등<sup>23</sup>의 보고에 비해 다소 늦은 편이었다. 탄소원이 alkaline protease 활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 fructose 등 11가지의 탄소원을 2% 수용액 상태로 첨가시킨 뒤 배양시켜 효소활성을 측정한 결과는 Table 4와 같다.

Fructose를 첨가시켰을 경우 활성이 가장 높았으며 glucose와 lactose는 fructose 첨가시 보다 81.98%, 79.88%로 활성이 각각 감소하였으며 citrate는 15.09%로 현저한 활성저하를 나타냈다. 이는 오 등<sup>24</sup>이

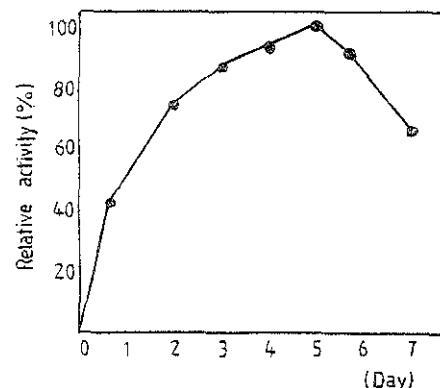


Fig. 1. Production of alkaline protease from the culture time.

Table 4. Effect of carbon source on the activity of alkaline protease

Carbon source	Relative activity(%)
Fructose	100.00
Glucose	81.98
Lactose	79.88
Glycerol	70.69
Arabinose	69.91
Sorbitol	69.28
Mannitol	64.40
Mannose	69.40
Starch	58.02
Galactose	48.79
Citrate	15.09

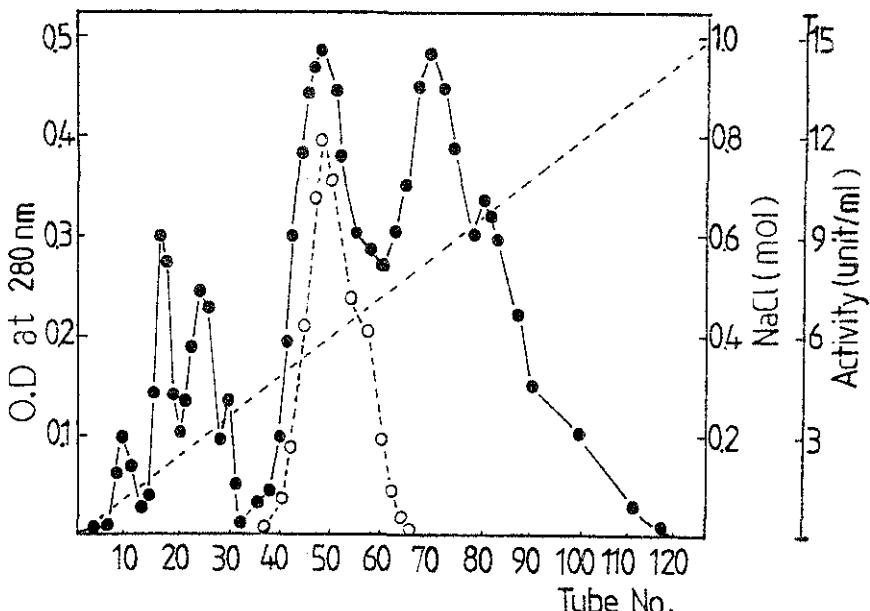


Fig. 2. DEAE-cellulose column chromatography of alkaline protease.  
(●—● : protein, ○---○ : activity)

*Streptomyces* sp. YSA-130이 생산하는 alkaline protease가 lactose 첨가시 가장 강한 활성을 나타낸다는 보고와는 다소의 차이를 보여주었다.

#### Alkaline protease의 정제

##### 염색과 투석

균을 배양한 TYEP medium으로 부터 추출한 효소액을 황산암모늄으로 70% 포화시켜 12시간 정착하여 효소단백질을 응집 침전시킨 다음  $8000 \times g$ 로 30분간 원심분리하였다. 분리된 침전물을 모아 5°C에서 소량의 0.2M boric acid-borax buffer(pH 10.0)로 용해시킨 다음 3일간 같은 완충액으로 투석시켰다. 이 때 잔존하는 불용성 물질은  $8000 \times g$ 로 15분간 원심분리하여 제거하였으며 정제도 4.24배, 수율 30.94%, 비활성도 10.81 unit/mg으로 효소를 정제할 수 있었다.

#### DEAE-cellulose column chromatography

농축된 효소액을 DEAE-cellulose column ( $3 \times 50\text{cm}$ )에 주입한 다음 약 1.5배의 0.2M boric acid-borax buffer(pH 10.0)로 비활성 단백질을 제거하고 단백질을 0~1.0M NaCl의 linear gradient로 용출시켰다 (Fig. 2). 이 때 유속은 2.0ml/min였고 7ml씩 분획하였다.

였으며 활성분획만 모아서 농축하였다. DEAE-cellulose column chromatography한 결과 약 0.6M NaCl 정도에서 활성단백질이 용출되었으며 수율 20.17%, 정제도는 5.41배, 비활성도는 13.19unit/mg으로 효소를 정제할 수 있었다.

#### Sephadex G-150 gel filtration

농축한 효소액을 Sephadex G-150 column ( $2 \times 60\text{cm}$ )에 0.5ml/min의 유속으로 5ml씩 분획한 결과 Fig. 3과 같이 4개의 단백질 peak가 나타났으며 이 중 31~63번 분획에서 효소활성이 나타났고 분리된 활성분획은 모아서 농축한 뒤 동결건조하였다. 이때 수율은 16.17%였고 정제도는 5.27배 비활성도는 14.59unit/mg으로 효소가 정제되었다 (Table 5).

장 등<sup>23</sup>은 *B. subtilis*의 alkaline protease를 10.6배 정제하였다는 보고에 비해 정제도가 낮은 편이었으나 Tsuru 등<sup>24</sup>이 *B. subtilis*로부터 정제한 alkaline protease가 3.1배의 정제배수를 나타낸 것보다는 높은 정제 배수를 나타냈다.

#### 전기 영동

위에서 정제된 protease를 Davis 법<sup>25</sup>에 따라 polyacrylamide gel 전기영동을 실시한 결과 Fig. 4에서 보

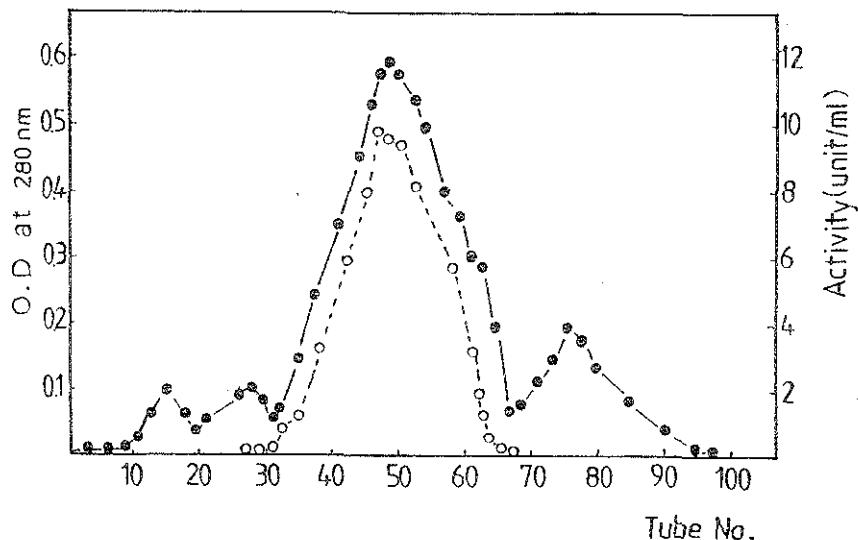


Fig. 3. Gel filtration of alkaline protease by the Sephadex G-150.  
(●—● : protein, ○---○ : activity)

Table 5. Effect of carbon source on the activity of alkaline protease

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold
Crude enzyme solution	364.95	929.36	2.55	100.00	1
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	26.60	287.52	10.81	30.94	4.24
DEAE-cellulose	13.59	187.44	13.79	20.17	5.41
Sephadex G-150	10.64	155.28	14.59	16.71	5.72

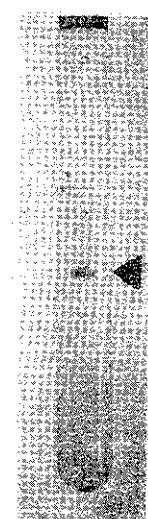


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified alkaline protease from *Bacillus* sp. CW-1121.

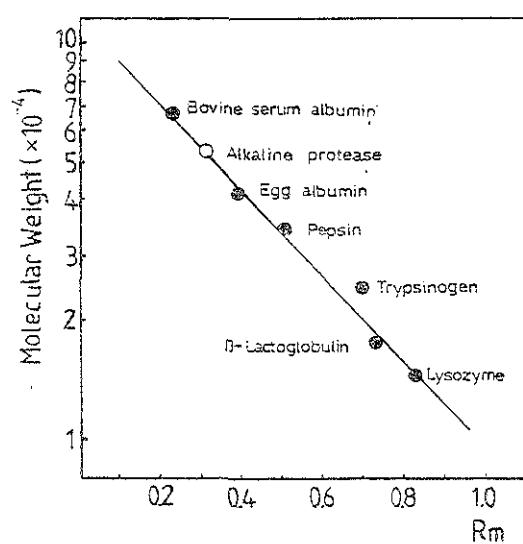


Fig. 5. The calibration curve for the determination of molecular weight of alkaline protease by SDS-polyacrylamide electrophoresis.

는 바와 같이 전기영동시 단일밴드를 나타냈다.

### 분자량 측정

Weber와 Osborn<sup>21)</sup>에 따라 SDS-polyacrylamide 전기영동에 의한 분자량 측정 결과는 Fig. 5에 나타난 바와 같이 55,000이었다. 이와 같은 결과는 장 등<sup>22)</sup>이 *B. subtilis*가 생산하는 alkaline protease의 분자량이 19,000인 것과 비교할 때 본 효소는 비교적 분자량이 큰 효소임을 알 수 있었으나 Shimizu 등<sup>23)</sup>의 *B. subtilis* IFO-302가 생산한 protease의 분자량과는 비슷하였다.

## 요 약

Alkaline protease의 생산능력이 강한 *Bacillus sp.* CW-1121을 토양으로부터 분리 동정하고, 이 균주에 의한 효소생산 조건을 규명한 결과 tryptone yeast extract medium에 5일간 배양하였을 때 최대의 활성을 나타내었다. 황산암모늄 염석, Sephadex G-150을 사용한 gel filtration과 DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피를 통하여 이 효소를 정제하여 수율 16.71%, 정제도 5.72배의 효소를 얻었으며, 정제효소의 분자량은 SDS-polyacrylamide 전기영동에 의하여 55,000 정도로 추정된다.

## 문 헌

1. 檜垣寅雄：酸素利用技術の新展開，CMC Co., Tokyo (1985)
2. Godbery, T. and Reichert, J. : Industrial Enzymology -The application of enzyme industry, The Nature Press Co. (1983)
3. Barret, A. J. and Salvesec, G. : Proteinase inhibitors, Elserier Co., New York (1986)
4. Röhm, O. : GP. 283923 (1913)
5. Mizusawa, K. and Nakamura, E. : Studies on the proteolytic enzymes of thermophilic *Streptomyces*. *Agri. Biol. Chem.*, 28(12), 884 (1964)
6. Horikoshi, K. : Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. *Agri. Biol. Chem.*, 35 (9), 1407 (1971)
7. Horikoshi, K. and Kitada, M. : Alkaline proteinase production from methyl acetate by alkalophilic *Bacillus sp.* *J. Ferment. Technol.*, 54(6), 383 (1976)
8. Horikoshi, K. and Roy H. D. : The NH<sub>2</sub>-terminal residues of *Bacillus subtilis* proteins. *J. Biol. Chem.*, 243(9), 2381 (1968)
9. Tsuru, D. and Kira, H., Yamamoto T. and Fukumoto : Studies on bacterial protease. *J. Agr. Biol. Chem.*, 30(12), 1261 (1966)
10. Kobayashi, T., Ogasawara, A., Ito, S. and Saito, M. : Purification and some properties of alkaline protease produced by *Pseudomonas malophilia*. *Agri. Biol. Chem.*, 49, 393 (1985)
11. Nakanishi, T., Matsmura, Y., Minamiura, N. and Yamamoto, T. : Purification and some properties of an alkalophilic proteinase of *Streptomyces* species. *Agri. Biol. Chem.*, 38(1), 37 (1974)
12. Kimoto, K., Kusama, S. and Murakami, K. : Purification and characterization of serine proteinase from *Euphausia superba*. *Agri. Biol. Chem.*, 47(3), 529 (1983)
13. Sakka, K. and Shimada, K. : Purification and some properties of serine proteinase from *A. niger*. *J. Ferment. Technol.*, 63(5), 479 (1985)
14. Buchanan, R. E. and Gibbone, N. E. : Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th (1974)
15. London, C. J., Griffith, L. P. and Koitt, A. A. : Produced by *Pseudomonas* isolated from sheep fleece. *Appl. Environ. Micro.*, 47(1), 75 (1984)
16. Malik, R. K. and Mathur, D. K. : Purification and characterization of heat-stable protease from *Pseudomonas* sp. B-25. *J. Dairy Sci.*, 67, 522 (1984)
17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
18. Anson, M. L. : The estimation of pepsin, papain cathepsin with hemoglobin. *J. Physio.*, 22, 79 (1939)
19. 萩原四郎：酸素研究法, Vol. Ⅱ(朝昌書店, 東京), p. 237 (1956)
20. Davis, B. J. : Disc gel electrophoresis Ⅱ. Method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 404 (1964)
21. Weber, K. and Oshorn, M. : The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244(6), 4406 (1969)
22. 박관화, 안장우, 오태광, 박용하 : *Bacillus sp.*가 생산하는 호알카리성 protease의 부분정제 및 특성. 한국미생물학회지, 18(4), 344 (1990)
23. 장신재, 김윤숙, 성하진, 최용진, 양한철 : *B. subtilis*가 생산하는 alkaline protease에 관한 연구. 한국농화학회지, 31(4), 356 (1988)
24. 오두환, 윤성우, 이강표 : *Streptomyces* sp. YSA-130이 생산하는 alkaline protease의 정제 및 특성.

- 한국산업미생물학회지, 17(4), 358(1989)
25. Shimizu, Y., Nishino, T. and Murao, S. :  
Purification and characterization of a membrane bound serine protease of *B. subtilis* IFO 3027.  
*Agric. Biol. Chem.*, 47(8), 1775(1983)  
(1991년 3월 28일 접수)