

호알칼리성 Coryneform bacteria TU-19가 생산하는 세종류의 균체외 단백질분해효소의 정제

강선철^{1*} · 최명철² · 양재섭³

¹대구대학교 생물공학과, ²생물학과, ³분자생물학과

초록 : 토양에서 분리된 호알칼리성 coryneform bacteria TU-19는 적어도 세종류의 단백질분해효소(Protease I, II, III)를 생성분비하였다. 이 균주의 효소생성과 관련된 배양조건을 조사해본 결과 최적온도 및 pH는 각각 30°C와 10.0인 것으로 나타났다. 이들 배양된 배양액으로부터 이 효소들을 정제하기 위해서 ammonium sulfate fractionation, gel filtration 및 QAE-Sephadex column chromatography 등을 순차적으로 행하였다. 그 결과 이들 세종류의 효소는 SDS-PAGE pattern으로 평가했을 때 single band로 순수 정제되었으며, 각각의 분자량은 120, 80, 45 kDa이었다. 정제된 효소의 특성을 살펴보면 Protease I과 II의 최적 pH와 온도는 각각 10.5, 45°C이었으며, Protease III는 11.0과 50°C로 나타났다. 또한 이들 세효소는 10 mM PMSF 농도에서 효소활성을 완전히 상실하였으며, pCMB, 1,10-phenanthroline, IAA, EDTA에는 별 영향이 없는 것으로 보아 serine protease의 일종으로 생각된다(1995년 11월 6일 접수, 1995년 12월 4일 수리).

서 론

1940년대부터 중성 pH에서 잘 자라는 *Bacillus* sp.로부터 Subtilisin Carlsberg와 Subtilisin Novo 등을 분리 정제하여 세제첨가용으로 사용하고 있다. 1971년에 Horikoshi에 의하여 호알칼리성 *Bacillus* sp.로부터 alkaline protease¹⁾가 발견되었으며 이때부터 세제, 연육가공, 탈모공정 등에 있어 탁월한 유용성이 있는 활성이 높고 새로운 성질을 갖는 alkaline protease생산균주의 선별에 많은 노력을 기울여 왔으며,²⁾ 또한 단백질분해효소의 분비기작, 삼차원적 구조, 불활성 기작, 구조적 안정화, 아미노산 배열순서 및 비교분석, 저해물질, 유전자 조작 및 발현 등에 관하여 폭넓은 연구가 이루어지고 있다.³⁻⁹⁾

한편 국내에서도 alkaline protease가 효소세제의 첨가물로서 관심이 점차 고조되어 새로운 균주 선별에 각별한 노력을 기울여왔다. 그러나 연구대상의 균주는 대부분 *Bacillus* sp.에 국한^{10,11)}되어 있고, 그 외 *Alteromonas*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* 등이 한정적으로 연구되고 있다.¹⁰⁻¹⁵⁾

본연구진은 토양으로부터 새로운 호알칼리성 균주인 coryneform bacteria TU-19를 분리, 동정한 바 있다.¹⁶⁾ Coryneform bacteria는 동, 식물의 병원균이 되기도 하지만, 여러가지 아미노산이나 핵산 등의 발효생산에 이용되는 산업적으로 매우 중요한 균주¹⁷⁾이다. 그러나 호알칼리성 coryneform bacteria의 생리적 특성에 관한 기초연구 및 이들이 생성하는 alkaline protease에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않은 실정이다.

따라서 본논문에서는 호알칼리성 coryneform bacteria TU-19가 생성분비하는 alkaline protease에 대한 연구의

일환으로 이 균주의 효소생성과 관련된 배양특성 및 이 균주가 생산하는 세종류의 단백질분해효소의 분리정제 및 특성에 관하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

미생물의 배양

단백질분해효소를 생산하기 위해서 사용한 공시균주는 본 연구진에 의해 분리, 동정된 coryneform bacteria TU-19이었으며,¹⁶⁾ 균배양은 Isolation medium(1 liter당 glucose 10 g, yeast extract 5 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g)을 이용하였다. 이때 배지의 최종pH는 Na₂CO₃를 이용하여 10.0으로 맞추었다.

효소생산을 위한 배양조건

미생물의 효소생성과 관련하여 배양최적조건을 알아 보기 위하여 다양한 온도(25, 30, 37°C 등), pH(7.0~12.0; 배지의 초기 pH는 NaOH로 조정함), 배지종류(LB; Luria-Bertani, NB; Nutrient Broth, Isolation medium) 등에서 균을 배양하면서 시간별로 상등액에 대한 효소의 활성도를 측정하였다.

효소의 활성측정

단백질분해효소의 활성은 Yanagida 등¹⁸⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 기질용액(0.6% Hammersten casein 용액)은 50 mM sodium bicarbonate 완충용액(pH 10.5) 100 ml에 casein 0.6 g을 녹이고, 5분간 중탕가열하여 제조하였다. 효소반응은 적절히 희석한 효소용액(최대 120 μl)을 기질용액 600 μl와 혼합하여 30°C에서 30분간 반

찾는말 : Alkalophilic microorganism, alkaline protease, coryneform bacteria TU-19

*연락처자

응시켰다. 여기에 TCA혼합용액(0.11 M Trichloroacetic acid, 0.22 M Sodium acetate, 0.33 M Acetic acid, glacial) 600 μ 를 첨가하여 반응을 중지시키고 30분동안 실온에 방치한 뒤 원심분리하였으며(15,000 rpm, 15분), 이때 효소의 역가는 효소반응물의 상등액에 대한 흡광도(A_{275})를 측정함으로써 결정하였다. 단백질분해효소의 활성도 1 unit는 30°C에서 30분간 효소반응시켜 흡광도(A_{275})가 1.0 증가하는 것에 상응하는 효소의 양으로 정하였다.

단백질의 정량

단백질의 농도는 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 Lowry 등¹⁹⁾의 방법으로 결정하였다.

효소의 정제

전배양한 종균을 2%(v/v) 접종하여 30°C에서 40시간 진탕배양(200 rpm)하였다. 배양이 끝난 후 균체는 원심분리 (Sorvall: 6,000 rpm, 20분)하여 제거하고, 배양상등액을 단백질분해효소의 정제원액으로 사용하였다. 여기에 ammonium sulfate를 55%로 포화시켜 생성된 침전물을 원심분리(Sorvall: 15,000 rpm, 30분, 4°C)하여 제거한 후 이것을 다시 80% ammonium sulfate로 포화시킨 후 원심분리하였다. 여기서 얻은 단백질침전물(55~80% ammonium sulfate분획)을 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에서 24시간 동안 3번 완충용액을 바꾸며 투석하였다. 효소정제를 위한 모든 실험절차는 별도의 설명이 없으면 4°C에서 수행하였다. 투석된 효소용액은 Sephadex G-150 gel filtration으로 정제하였다. Sephadex G-150 column(ϕ 2.2 \times 150 cm)은 100 mM NaCl을 포함하는 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 평형시켰으며, 여기에 투석된 효소용액 4 ml를 loading한 후 동일한 완충용액으로 용출시켰다. 이때 용출속도는 4.0 ml/h로 하였으며 용출분획은 3.3 ml씩 받았다. 각 분획마다 효소 활성을 측정하여 활성이 있는 분획들을 따로 모았다. Gel filtration의 분획중 효소활성이 있는 부분은 모두 세 부위로 나타났다. 이들 활성부분들을 따로 모아 QAE-Sephadex column chromatography(ϕ 2.2 \times 15 cm)를 행하였다. 첫번째 활성분획은 200 mM NaCl을 포함하는 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 평형시킨 QAE-Sephadex column(ϕ 2.2 \times 15 cm)을 사용하여 0.2~0.9 M의 NaCl linear농도경사로 용출시켰다. 이때의 용출속도는 30 ml/h이었으며 3.3 ml씩 분획을 받았다. Gel filtration의 두번째 활성분획은 동일한 완충용액을 사용하여 NaCl 농도경사는 0.2~0.8 M로 걸어주었다. 세번째 활성분획은 0.25 M NaCl이 포함된 Tris-HCl완충용액(pH 8.0)을 사용하여 0.25~0.7 M NaCl linear농도경사로 용출시켰다.

SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)는 Laemmli²⁰⁾의 방법에 따라 10% acrylamide gel을 사용하여 10 mA로 전개시켰다. 정제된 효소용액을 sample buffer와 1:1(v/v)로 혼합하고 100°C

에서 5분간 증탕가열하여 gel에 loading 하였다. 분자량을 알아보기 위하여 사용한 표준단백질은 Sigma제품 Mw-SDS-6H(myosin 205 kDa, β -galactosidase 116 kDa, phosphorylase b 97.4 kDa, bovine serum albumin 66 kDa, ovalbumin 45 kDa 및 carbonic anhydrase 29 kDa)를 사용하였다.

효소의 특성

정제된 효소의 최적 pH를 결정하기 위하여 0.6% casein 기질용액을 다음과 같은 완충용액으로 제조하였으며 효소활성은 30°C에서 30분간 반응시킨 후 측정하였다: 50 mM sodium phosphate완충용액(pH 6.0~6.5), Tris-HCl완충용액(pH 7.0~9.0), glycine-NaOH완충용액(pH 9.5~10.0), NaHCO₃-NaOH완충용액(pH 10.5), Na₂HPO₄-NaOH완충용액(pH 11.0~12.0), KCl-NaOH완충용액(pH 12.5~13.0).

효소반응의 최적온도는 각 효소에 대한 최적 pH의 기질용액을 10~80°C 범위에서 주어진 반응온도로 평형시킨 후 효소용액을 첨가하고 30분 반응시켜 측정하였다. 효소의 저해제에 대한 영향은 Phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), Etylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1,10-phenanthroline, Iodoacetic acid(IAA), p-chloromercuribenzoic acid(pCMB) 등을 최종농도가 10 mM되게 첨가하여 30°C에서 30분간 전처리한 다음, 기질용액을 첨가하고 반응시켜 효소의 잔여활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

배양조건이 효소의 생성에 미치는 영향

배양온도에 따른 coryneform bacteria TU-19의 성장곡선 및 이 균이 생성분비하는 효소의 활성도를 Fig. 1A와 Fig. 1B에 나타내었다. Fig. 1A에서 보여주는 바와 같이 배양온도가 30°C일때 균의 성장이 가장 왕성한 것으로 나타났다. 또한 배양시간의 경과에 따른 효소활성도의 변화(Fig. 1B)는 균의 성장곡선과 거의 유사한

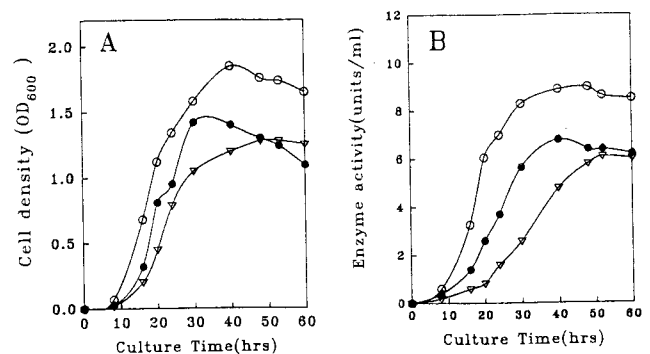


Fig. 1. Growth curve(A) and protease production(B) of coryneform bacteria TU-19 at various temperatures. Symbols: ▽-▽, 25°C; ○-○, 30°C; ●-●, 37°C.

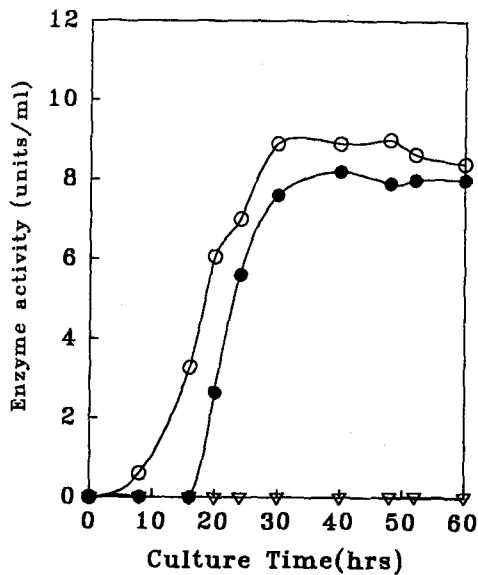


Fig. 2. Protein production of coryneform TU-19 culturing in various media. Symbols: ○—○, Isolation medium; ●—●, LB; ▽—▽, Nutrient broth.

pattern을 보였는데 배양 8시간때 부터 효소가 생성되어 배양 40시간때 최고의 활성을 나타내었다. 그러나 48시간 이후 균체가 감소하는 시점에서 효소의 활성은 거의 그대로 유지되었다. 이것은 효소가 배양액에서 비교적 안정하거나 혹은 효소의 분해속도와 생합성속도가 균형을 이루기 때문에 생기는 현상으로 추정된다. 25°C, 37°C의 경우에는 균의 성장곡선과 효소활성도가 30°C에 비해 상대적으로 조금 낮다는 것을 제외하고는 대체적으로 30°C와 유사한 결과를 얻었다. 이상에서 본 균주는 세포의 성장이 이루어짐과 동시에 비례적으로 효소의 생성이 이루어 진다고 판단된다. 그러나 *Bacillus* sp. 등에서는 균체의 성장이 완결된 대수증식기 말기경에 효소를 생성분비하며, 또한 이때부터 포자형성이 시작되므로 이 경우에는 효소의 분비시기가 포자의 형성과 관련되어 있을 것으로 추정하고 있다.¹⁵⁾ 그러나 coryneform bacteria TU-19는 포자를 형성하지 않으며¹⁶⁾ 또한 효소분비 양상이 균체의 성장과 더불어 증가된다는 결과 (Fig. 1)에 비추어 볼 때 이 효소의 기능이 세포의 성장에 필요한 영양성분 즉 배지중의 단백질을 분해하여 질소원으로 체내에 공급하기 위한 주요 수단으로써 이용되고 있음을 설명해주고 있다.²¹⁾

배지종류에 따른 균의 성장과 효소의 생성관계를 알아보기 위하여 LB, NB, Isolation medium 등을 사용하여 효소활성을 측정 한 결과 (Fig. 2) Isolation medium에서 효소활성도가 가장 높았으며, NB에서는 균체의 성장이 거의 일어나지 않았기 때문에 효소활성도 거의 없었다. 배지내의 초기 pH에 따른 효소의 생성관계를 알아보기 위하여 다양한 pH조건 (pH 7.0~12.0)에서 균을 배양하면서 배양상등액에 대한 효소활성을 측정하였다 (Fig. 3). 이 균주는 배지의 pH가 10.0일때 최대의 효소활성을

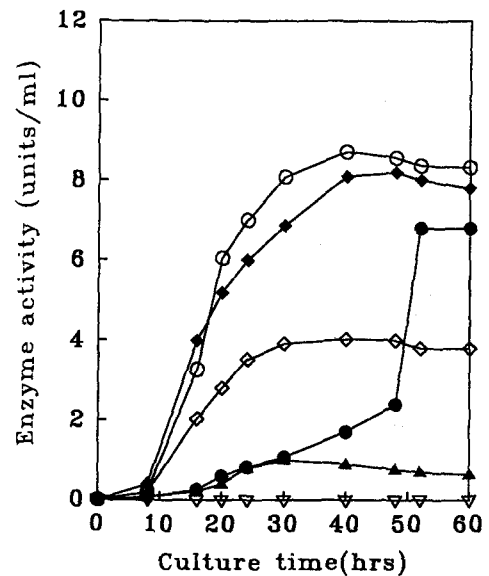


Fig. 3. Protein production of coryneform bacteria TU-19 according to initial pH. Symbols: ▲—▲, pH 7.0; □—□, pH 8.0; ■—■, pH 9.0; ○—○, pH 10.0; ●—●, pH 11.0; ▽—▽, pH 12.0.

보였다. pH 7.0 과 12.0에서는 균체의 성장이 거의 없었으며 따라서 효소활성도 거의 나타나지 않았다. 한편 pH 11.0의 경우는 배양 40시간이후에야 효소의 생산이 급증하는 양상을 나타내었는데 이것은 Souza²²⁾와 강²³⁾의 보고와 같이 초발 pH가 균체의 최적생육보다 너무 높을때 미생물이 스스로 배지의 pH를 자신의 생육에 적절한 pH로 조절하기 위하여 lag phase가 길어졌기 때문에 생긴 현상으로 추정된다.

효소의 정제

효소생성을 위한 최적 배양조건(30°C, pH 10.0, Isolation medium)에서 2%의 종균을 접종하여 40시간 진탕 배양한 후 배양액을 원심분리하였다. 이 중에서 원심상등액을 효소정제의 원액으로 이용하였다. 이때 이 상등액에 대한 효소의 비활성은 14.9 unit/mg이었다. 다음 단계로 원심상등액에 ammonium sulfate를 55~80%로 포화침전시킨 후 원심분리하여 얻은 분획침전물을 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)에서 24시간 투석하여 조효소용액을 얻었으며 (4 ml), 이때의 효소비활성은 480 unit/mg이었다.

조효소액을 Sephadex G-150 column에서 분리하여 각 분획의 효소활성과 단백질농도를 Fig. 4에 나타내었다. 여기서 보여준 바와 같이 분획 20~32, 33~52번의 영역에서 두개의 활성 peak이 보였으며, 또한 분획 54~71번에서 다른 하나의 활성 peak이 용출되어 모두 세개의 활성 peak을 얻었으며 이것을 용출순서에 따라 단백질 분해효소 I, II, III으로 명명하였다. 이때 용출분획의 효소비활성은 각각 583, 822, 220 unit/mg이었다.

그러나 위에서 얻어진 세개의 활성부위를 SDS-PAGE로 분석했을 때 아직 순수한 단백질로 정제되지

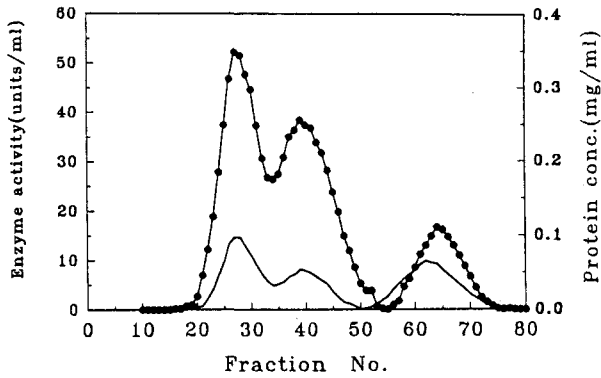


Fig. 4. Chromatogram of the crude proteases from coryneform bacteria TU-19 on Sepadex G-150 column. Dimension($\phi 2.2 \times 150$ cm); flow rate, 4.0 ml/h. Symbols: ●—●, enzyme activity; —, protein concentration.

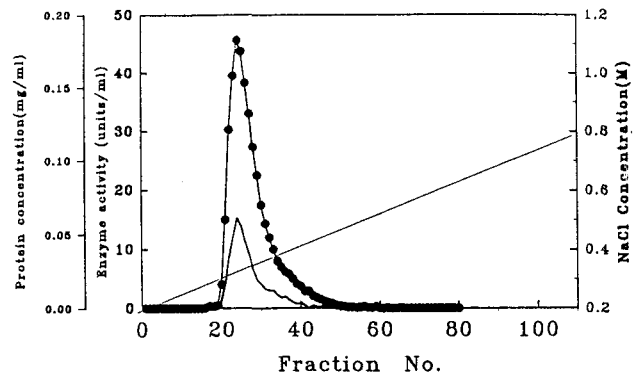


Fig. 6. Chromatogram of the Protease II on QAE-Sephadex column. Dimension, $\phi 2.2 \times 15$ cm; flow rate, 30 ml/h. Symbols: ●—●, enzyme activity; —, protein concentration.

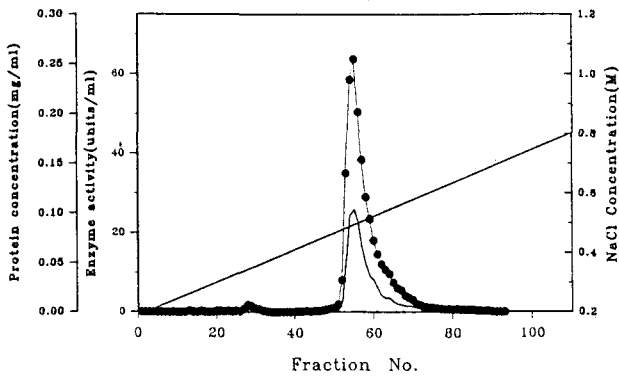


Fig. 5. Chromatogram of the Protease I on QAE-Sephadex column. Dimension, $\phi 2.2 \times 15$ cm; flow rate, 30 ml/h. Symbols: ●—●, enzyme activity; —, protein concentration.

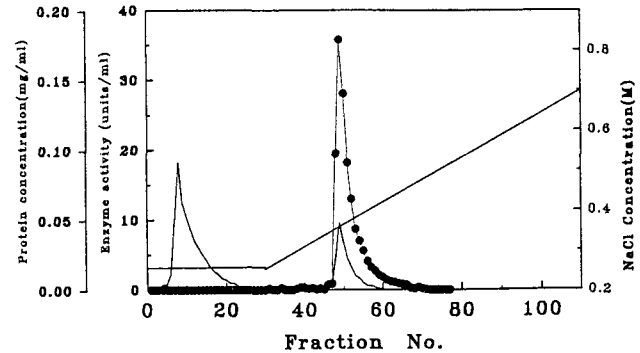


Fig. 7. Chromatogram of the Protease III on QAE-Sephadex column. Dimension, $\phi 2.2 \times 15$ cm; flow rate, 30 ml/h. Symbols: ●—●, enzyme activity; —, protein concentration.

않았기 때문에 QAE-Sephadex column을 통하여 한번 더 정제하였다(Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7). Gel filtration의 첫번째 활성부위(Protease I)를 QAE-Sephadex column을 통하여 정제한 결과는 Fig. 5에서와 같이 0.55 M NaCl 농도에서 주요 활성부위가 용출되었으며 이 활성부위의 효소비활성은 602 unit/mg이었다. Gel filtration의 두번째 활성부위(Protease II)를 QAE-Sephadex column으로 정제한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 주요 활성부위는 0.35 M NaCl 농도에서 용출되었으며 효소비활성은 875 unit/mg이었다. Gel filtration의 마지막 활성부위(Protease III)를 QAE-Sephadex column으로 정제한 결과는 Fig. 7과 같이 나타냈다. 이 경우 0.25 M NaCl을 포함하는 완충용액으로 washing한 flow-through 분획에서 상당량의 단백질이 용출되었으나, 효소활성은 전혀 없었으며 0.33 M NaCl linear 농도경사부터 주요 활성부위가 용출되었다. 효소정제과정을 요약하여 표시하면 Table 1과 같다. 이 정제과정을 통하여 최종적으로 얻어진 단백질분해효소의 회수율은 각각 단백질분해효소 I, II, III의 순서로 27.6%, 27.2%, 11.8%이었고, 404배, 586배, 547배로 정제되었다. 이상의 방법으로 정제된 효소를 SDS-

PAGE를 실행한 결과(Fig. 8) 이 효소들(Protease I, II, III)은 single band로 순수정제되었음을 알 수 있었다. 이때 SDS-PAGE pattern에 의해 결정된 단백질분해효소의 분자량은 각각 120, 80, 및 45 kDa으로 나타났다. 호알칼리성 *Bacillus* sp.의 protease는 대부분 그 분자량이 약 25~40 kDa의 범위²⁻⁶⁾내에 있는데 비해 coryneform bacteria TU-19가 생성하는 단백질분해효소의 분자량은 위의 결과(Fig. 8)에서 보여주는 바와 같이 비교적 큰 것으로 밝혀졌다.

효소의 특성

Protease I과 II의 효소활성에 대한 최적 pH는 각각 10.5로 동일하였으며, Protease III의 최적 pH는 11.0인 것으로 나타났다(Table 2). 이 결과로부터 Protease I, II, III는 알칼리성 pH에서 최고 활성을 나타내는 전형적인 alkaline proteases임을 알 수 있었다.

또한 효소의 최적온도는 Protease I과 II는 45°C이었으며, Protease III는 50°C이었다(Table 2). 이것은 호알칼리성 *Bacillus* sp.기원의 proteases의 최적온도가 55~70°C인 것에 비해서는 낮은 것으로 나타났다.^{3,5,11)}

이들 효소들에 대한 여러가지 저해제의 효과는 Table

Table 1. Purification summary of the proteases from coryneform bacteria TU-19.

Steps	Total Activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg of protein)	Purification folds	Recovery (%)
Culture fluid	3,800	2,544	1.49	1	100
Ammonium sulfate fractionation	3,456	7.2	480	322	91
Sephadex G-150 chromatography					
Protease I	1,364	2.34	582.9	391	36
Protease II	1,250	1.52	822.4	551	33
Protease III	590	2.31	220.3	147	13
QAE-Sephadex chromatography					
Protease I	1,048	1.74	602.2	404	27.6
Protease II	1,033	1.18	875.4	588	27.2
Protease III	448	0.55	814.5	546	11.8

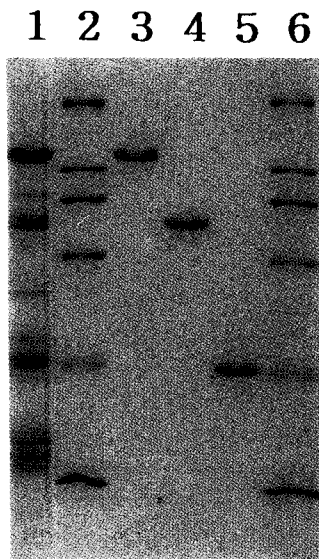


Fig. 8. SDS-PAGE pattern of the proteases purified from coryneform bacteria TU-19. Lane 1. After 55-80% ammonium sulfate fractionation 2. Size markers in kilodaltons(top to bottom): Myosine 205 kDa; β -galactosidase, 116 kDa; Phosphorylase b, 97.4 kDa; Bovine serum albumin, 66 kDa; Ovalbumin, 45 kDa; Carbonic anhydrase, 29 kDa. 3. Protease I after QAE-Sephadex 4. Protease II after QAE-Sephadex 5. Protease III after QAE-Sephadex 6. Size markers.

3과 같이 세효소가 전부 serine 잔기에 대한 저해제인 PMSF에 의해서만 효소활성을 상실하였으며, sulfhydryl 저해제인 iodoacetic acid나 sulfhydryl 환원제인 pCMB에 대해서는 영향을 받지 않았으며, 금속 chelator인 EDTA나 zinc chelator인 1,10-phenanthroline에 의해서도 영향을 받지 않았다. 따라서 이들 세효소들은 전부 serine 계의 protease라 생각된다. 호알칼리성 *Bacillus* sp. 기원의 proteases도 대부분 serine protease이지만 coryneform bacteria TU-19로부터 정제된 이들 세효소의 분자량이 상대적으로 크기 때문에 구조형태적으로는 서로 다를 가능성이 크다.

Table 2. Enzymatic characteristics of Protease I, II and III.

	Protease		
	I	II	III
Optimum pH	10.5	10.5	11.0
Optimum temperature (°C)	45	45	50

* Optimum pH: The enzyme activity was measured at 30°C for 30 min in the following 50 mM buffers: sodium phosphate (pH 6.0~6.5), Tris-HCl (pH 7.0~9.0), glycine-NaOH (pH 9.5~10.0), NaHCO₃-NaOH (pH 10.5~11.0), Na₂HPO₄-NaOH(pH 11.5~12.0), KCl-NaOH (pH 12.5~13.0). * Optimum temperature: The reaction mixture was incubated for 30 min at the predetermined temperatures(10~80°C) in 50 mM NaHCO₃-NaOH buffer.

Table 3. Effect of inhibitors on Protease I, II and III.

Inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity (%)		
		I	II	III
Control	0	100	100	100
PMSF	10	0	0	0
IAA	10	101	97	87
pCMB	10	92	99	97
1,10-phenanthroline	10	96	89	95
EDTA	10	97	101	103

* The enzymes were incubated with the reagent in 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0) at 30°C for 30 min. and residual activities were measured. * Abbreviation: PMSF, phenylmethylsulphonyl fluoride; IAA, iodoacetic acid; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; pCMB, p-chloromercuribenzoic acid.

이상의 효소의 특성에 관한 결과를 종합해보면 coryneform bacteria TU-19로부터 분리된 세 종류의 단백질 분해효소들은 분자량 이외에는 여러가지 효소적 특성이 매우 유사하기 때문에 동일 기원의 효소일 수도 있다 (Table 2, Table 3). 그러나 이들 효소가 동일기원의 효소인지 혹은 전혀 다른 효소인가를 정확히 결정하기

위해서는 보다 상세한 효소적 특성과 분자구조적인 연구가 뒤따라야 한다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Horikoshi, K. (1971) Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agri. Biol. Chem.* **35**, 1407-1414.
- Ward, O. P. (1986) Proteolytic enzymes. *Comprehensive Biotechnology*. vol III. 789-818.
- Takami, H., T. Akiba, and K. Horikoshi (1990) Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH 101. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **33**, 519-523.
- Tsuru D., H. Kira, T. Yamamoto, and J. Fukumoto (1967) Studies on bacterial protease. Part XVI. Purification, crystallization and some enzymatic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*. *Agric. Biol. Chem.* **30**, 1261-1268.
- Durham, D. R., D. B. Stewart, and E. J. Stellwag (1987) Novel alkaline and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX 6638. *J. Bacteriol.* **169**, 2762-2768.
- Delepelaire, P. and C. Wandersman (1989) Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*. *J. Biol. Chem.* **264**, 9083-9089.
- Pantoliano, M. W., R. C. Ladner, P. N. Bryan, M. L. Rolence, J. F. Wood, and T. L. Poulos (1987) Protein engineering of Subtilisin BPN': enhanced stabilization through the introduction of two cysteines to form a disulfide bond. *Biochemistry* **26**, 2077-2082.
- Nedkov, P., W. Oberthur, and G. Braunitzer (1985) Determination of the complete amino acid sequence of subtilisin DY and its comparison with the primary structures of the subtilisins BPN', Carlsberg and Amylosacchariticus. *Biol. Chem. Hoppe-seyler.* **366**, 421-430.
- Tanizawa, K., S. Watanabe, and Y. Kanaoka (1990) Fluorescence-labeled Streptomyces subtilisin inhibitor: Analysis of the interaction with Subtilisin and Streptomyces griseus protease. *Bioorganic Chem.* **18**, 318-329.
- 안장우, 오태광, 박용하, 박관화 (1990) *Bacillus* sp.가 생산하는 호알칼리성 protease의 부분정제 및 특성. 한국산업미생물학회지 **18**, 344-351.
- 배 무, 박필런 (1989) 알칼리성 *Bacillus* sp. No. 8-16의 내열·알칼리성 단백질분해효소의 정제와 특성. 한국산업미생물학회지 **17**, 545-551.
- 여인옥, 최성현, 이재숙, 김찬조 (1995) *Alteromonas* sp.가 생산하는 alkaline protease의 특성. 한국농화학회지 **38**, 106-110.
- 이창호, 권태중, 강상모, 서현효, 권기석, 오희목, 윤병대 (1994) 알칼리성 protease를 생산하는 *Xanthomonas* sp. YL-37의 분리 및 조효소의 성질. 한국산업미생물학회지 **22**, 515-521.
- 노중수, 정영철, 박석규, 성낙계 (1991) 저온·알칼리성 Protease를 생산하는 *Pseudomonas* sp. RP-222의 분리 및 조효소의 특성. 한국산업미생물학회지 **19**, 383-389.
- 정병철, 신현승, 이계준 (1988) 방선균 일주에서 포자형성과 호알칼리성 단백질 분해효소의 생합성과의 관계성. 한국미생물학회지 **26**, 355-361.
- 최명철, 양재섭, 강선철 (1995) 단백질분해효소를 생성분비하는 호알칼리성 Coryneform bacteria TU-19의 분리 및 동정. 한국산업미생물학회지 Submitted.
- Follettie, M. T. and A. J. Sinskey (1986) Recombinant DNA technology for *Corynebacterium glutamicum*. *Food technology* **40**, 88-94.
- Yanagida, N., T. Uozumi, and T. Beppu (1986) Specific excretion of *Serratia marcescens* protease through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **166**, 937-944.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Bissell, M. J., R. Tosi, and L. Gorini (1971) Mechanism of excretion of a bacterial proteinase: Factors controlling accumulation of the extracellular proteinase of a Sarcina strain (coccus P). *J. Bacteriol.* **105**, 1099-1109.
- Souza, K. A. and P. H. Deal (1977) Characterization of a novel extremely alkalophilic Bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **101**, 103-109.
- 강선철, 최명철, 양재섭 (1995) 호알칼리성 coryneform bacteria TU-19의 배양특성에 미치는 pH효과. 한국산업미생물학회지 Submitted.

Purification of Three Extracellular Proteases from Alkalophilic Coryneform Bacteria TU-19

Sun-Chul Kang^{1*}, Myoung-Chul Choi², Jae-Sub Yang³ (¹*Department of Biotechnology,* ²*Department of Biology and* ³*Department of Molecular Biology, Taegu University, Taegu 712-714, Korea*)

Abstract: Alkalophilic coryneform bacteria TU-19 isolated from soil extracellularly produced at least three proteases (Protease I, II, and III). Investigating the cultural conditions related to the enzyme production of this bacterial cell, the optimum pH and temperature were 10.0 and 30°C, respectively. In order to purify these enzymes from the 2 day culture broth ammonium sulfate fractionation, gel filtration and QAE-Sephadex column chromatography were performed step by step. And then these three proteases were purified to near homogeneity by judging from SDS-PAGE pattern, and had the molecular weights of 120, 80, and 45 kilodaltons, respectively. The optimum pH and temperature for the enzyme activity of Protease I and II were 10.5 and 45°C, respectively, and Protease III were 11.0 and 50°C. And the enzymes were completely inhibited by PMSF suggesting serine protease, but not affected by pCMB, 1,10-phenanthroline, IAA, and EDTA.

*Corresponding author