

임상검체에서 분리된 *Serratia sp. 2000-1*에 의한 Protease의 생산 및 효소학적 성질

서울보건대학 임상병리과[†], 가톨릭대학교 강남성모병원 임상병리과*

김태전[†] · 김승곤 · 김상택*

국문초록: 본 논문은 환자들의 병소에서 채취된 가검물에 존재하는 미생물들 가운데 protease을 분비하는 균주들을 분리하고, 그 가운데 가장 효소생산력이 우수한 균주를 선정하여 가정용 Protease 세제생산에 활용 가능성을 알아보려고 그들이 생산하는 protease의 기초적 생산조건 및 부분적 효소학적 특성 등에 관한 실험에서 얻은 결과들을 보고하고자 작성되었다. *Serratia sp. 2000-1*로 동정된 본 실험 균주가 생산하는 protease의 기초적 생산조건과 부분적 효소학적 특성을 조사한 결과 효소생산을 위한 최적 배지에 탄소원과 질소원 그리고 금속염의 종류와 농도는 각각 Glucose 1.5%, C.S.P 2.0%, CaCl₂ 0.1%였다. 그리고 최적 배양온도는 30°C, 초발 pH는 8.0, 배양시간은 72시간 이었다. Protease의 정제는 ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose, Sephadex G-200 column을 통하여 분리 정제하였으며 이때 최종 효소수율은 14.4%, 효소 비활성도는 약 29배 증가한 것으로 나타났다, 그리고 효소 작용의 최적온도와 pH는 35°C와 pH 8.0으로 나타났고, 효소 작용의 열과 pH에 대한 안정성은 40°C와 pH 6~10까지는 효소의 활성이 비교적 안정한 것으로 나타났다. 금속이온들 중 Mg²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺은 효소활성을 촉진하나 Hg²⁺, Ag²⁺, Cu²⁺는 효소활성을 저해하는 것으로 나타났다. 그리고 효소활성 저해제들 중에는 SDS가 가장 강하게 효소활성을 저해하는 것으로 나타났다.

서 론

Protease는 단백질 또는 peptide bond의 가수분해를 촉매하는 효소로 촉매기작에 따라 serine protease, thiol protease, acid protease, metal protease로 나누며, 최적 작용 pH에 따라 acidic protease, neutral protease, alkaline protease로 구분하고 있다.

Serine protease는 발견된 protease들 중 그 수가 가장 많으며 활성 중심에는 serine과 histidin 등이 존재하는 것으로 알려져 있고, 일반적으로 약 알칼리성 pH에서 최고의 활성을 나타내며 chymotrypsin, trypsin, elastase, urokinase, subtilisin 등이 이에 속하고, Thiol protease에는 활성부위에 cysteine이 존재하며 그 종류로는 papain, cathepsin 등이 있다¹³⁾. 그리고 Acid protease에는 활성부위에 aspartic acid가 있으며

산성 pH에서 최고의 활성을 나타내는 pepsin, rennin 등이 있고, metalloprotease에는 metal ion의 존재 유무에 의해 활성이 지배되고 중성 pH에서 최고의 활성을 나타내는 themolysin, carboxypeptidase 등이 이에 속하는 것으로 알려져 있다²²⁾.

Protease들은 대부분 사람, 동물, 식물 또는 미생물에서 추출한 것으로 전세계 효소시장의 약 60%를 차지하며, 용도는 주로 제빵공업, 치즈 제조, 화학공업, 피혁가공 및 제지공업, 식육의 연화, 맥주나 청주의 혼탁방지, 세제산업, 소화제, 소염제, 화장품 제조, 환경정화 등에 사용되고 있다^{6,10,12)}.

Microbial protease는 *Bacillus species*를 이용하여 많은 연구가 이루어져온 결과 serin protease인 subtilisin은 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* 등에서 분비되는 것으로 알려져 있고²⁵⁾, 그밖에 *Pseudomonas maltophilia*, *Xanthomonas sp.*, *Erwinia chrysanthemi*, *Cephalosporium sp.*, *Aspergillus oryzae*, *Sacchromycopsis fibuligera*, *Sporothrix schenckii* 등에서도 protease가 분비되는 것으로 밝혀졌다^{17,31~33)}. 한편 *Serratia marcescens*는 gram negative bacteria로

* 논문 접수: 2000년 8월 8일
수정재접수: 2000년 9월 26일

[†]별책 요청 저자: (우) 461-713 성남시 수정구 양지동 212, Tel: (032) 740-7154, Fax: (032) 740-7268

Enterobacteriaceae과에 속하며 protease, chitinase, exonuclease, lipase 등을 세포외로 분비하는 것으로 알려져 있으며¹¹⁾, Miyata 등²⁶⁾은 누에 (silk worm)의 장관 (intestinal canal)에서 분리한 *Serratia marcescens*로부터 51 kDa의 단량체 (monomer)인 protease를 분리 정제하여 이 protease가 Zn^{2+} 를 cofactor로 하는 metalloprotease의 일종임을 밝혔으며, 특히 *Serratia marcescens* ATCC 21074 균주가 생산하는 metalloprotease는 현재 serratiopeptidase라는 이름으로 소염제 및 다른 치료제로 사용되고 있다^{3,21)}. 그러나 *Serratia marcescens*는 중요한 기회 감염균의 일종으로 이들에 의해 유발된 패혈증 (septicemia), 관절염 (arthritis), 육아종 (granuloma), 수막염 (meningitis), 각막염 (keratitis), 비뇨기계감염 (urinarytract infection), 폐렴 (pneumonia), 심내막염 (endocarditis) 등 다양한 질환에서^{7,9,18,24,30)} serratia protease는 직접 조직에 손상을 가하거나, 중성다핵구의 tissue-damaging enzyme의 방출을 유도하는 것으로 여겨지고 있으며³⁴⁾, 또한 실험동물에 정제한 serratia protease를 투여했을 때 폐나, 각막 등의 조직에 광범위한 손상을 입혔고²¹⁾, serratia keratitis에서는 serratia 56 kDa protease가 중요 병인자 (pathogenic factor)인 것으로 밝혀졌다^{1,30)}.

위와 같은 견지에서 볼 때 protease는 산업적인 측면과 병리학적인 측면 모두에 있어 매우 중요한 물질이라 할 수 있다.

본 논문은 환자들의 병소에서 채취된 가검물에 존재하는 미생물들 가운데 protease를 분비하는 균주들을 분리하고, 그 가운데 가장 효소생산력이 우수한 균주를 선정하여 가정용 Protease 세제생산에 활용 가능성을 알아보려고 그들이 생산하는 protease의 기초적 생산조건 및 부분적 효소학적 특성 등에 관한 실험에서 얻은 결과들을 보고하고자 작성되었다.

재료 및 방법

1. 균주의 분리 선정과 동정 및 균체량 측정

본 실험에서는 protease를 생산하는 균주를 분리하기 위하여 각종 임상검체에서 분리된 *Serratia* 속 균주들을 분리용 배지¹⁻⁴⁾ (Glucose 5 g, Soluble starch 5 g, Casein 10 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, Agar 15 g, 증류수 1,000 ml. pH 7.4로 조절, 121°C에서 15분간 멸균)에 접종하고 30°C에서 2일간 배양하여 투명환이 큰 것들을 1차 선별하여 보존용 배지¹⁻⁴⁾

(Dextrose 0.3 g Peptic digest of animal tissue 0.6 g, Brain heart infusion 0.6 g, Disodium phosphate 0.25 g, Pancreatic digest of gelatin 0.45 g, Agar 15 g, 증류수 1,000 ml. pH 7.4로 조절, 121°C에서 15분간 멸균)에 접종하여 1개월 간격으로 계대 보존하였다. 최종 선정은 1차에서 선별한 각 균주들을 분리용 배지에서 agar를 제외하여 만든 액체배지에 30°C에서 3일간 배양한 후, 배양상등액의 효소활성을 측정하여 단백질 분해활성이 가장 높은 2000-1 균주를 최종적으로 선정하여 Bergey's 방법 등^{8,14,27,29)}에 따라 동정하고, 효소 생산조건을 조사하기 위한 전 배양은 효소생산용 배지¹⁻⁴⁾ (Glucose 10 g, Casein 10 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, 증류수 1,000 ml. pH 7.4로 조절, 121°C에서 15분간 멸균)를 100 ml 삼각 flask에 15 ml를 넣고 121°C에서 15분간 멸균한 후, 시험균주를 1백금이 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였으며, 효소생산을 위해서 효소생산용 배지를 1,000 ml 삼각 flask에 100 ml씩 분주하여 위와 같이 멸균하여 전 배양액을 5% (v/v) 되게 접종하여 30°C에서 3일간 배양하면서 균 배양액을 원심분리 (12,000×g, 20 min)하여 회수한 균체를 Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 2회 세척한 후 동량의 동일한 buffer를 가하여 현탁시킨 다음 spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 균체량을 측정하였다.

2. 효소의 생산조건

1) 탄소원, 질소원 그리고 금속염

효소생산에 미치는 탄소원과 질소원 그리고 금속염의 영향을 조사하기 위해 탄소원으로는 glucose, xylose, galactose, mannose, fructose, rhamnose, lactose, sucrose, maltose, soluble starch을, 질소원으로는 beef extract, CSP (corn steep powder), malt extract, milk casein, peptone, trypton, soybean meal, yeast extract, asparagine, urea, $(NH_4)_2SO_4$, $NH_4H_2PO_4$, NH_4Cl , NH_4NO_3 , KNO_3 , $NaNO_3$ 를, 금속염으로는 $AgNO_3$, $Li_2SO_4 \cdot H_2O$, $Ba(OH)_2$, $CaCl_2$, $Cd(NO_3)_2$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgCl_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2$, $Pb(Ac)_2$, $ZnSO_4$, Al_2O_3 를 각각 무작위로 선정하였다. 그리고 효소생산배지에 탄소원의 농도를 각각 1.0% (w/v) 되게 하여 30°C에서 3일간 정치 배양한 후 660 nm에서 흡광도 (OD)를 측정하여 효소생산성이 가장 높은 탄소원을 선정하고, 다시 선정된 탄소원을 0.2%에서 5.0%까지 되게 농도별 첨가하여 배양하고 효소생산성을 측정하여 탄소원을 최종적으로 선정하였다. 질소원은 선정된 탄소원이 첨가된 배지에 각각 1.0% (w/v) 되

게 하여 탄소원의 선정방법과 같은 방법으로 질소원의 종류와 그 농도를 결정하였다. 금속염의 선정과 그 농도는 탄소원과 질소원에 종류와 농도가 결정된 후에 각각의 금속염을 0.05% 되게 하여 탄소원과 질소원에 선정방법과 같은 방법으로 금속염을 선정하고, 그 농도는 0.01%에서 0.2%까지 되게 농도별로 첨가하여 위와 같은 방법으로 배양하고 효소생산성을 측정하여 결정하였다.

2) 최적의 pH와 배양온도 및 배양시간

효소생산에 영향을 미치는 초발 pH와 배양온도를 조사하기 위해 탄소원, 질소원 그리고 금속염의 종류와 농도가 결정된 효소생산배지의 pH를 6에서 11까지 조절한 후 30°C에서 3일간 정치 배양한 후 1)과 같은 방법으로 효소의 활성을 측정하여 최적의 pH를 결정하였다. 그 후 배양온도에 따른 영향을 조사하기 위해 20°C에서 40°C까지의 각 온도에서 3일간 배양하여 각각의 효소활성을 위와 같은 방법으로 측정하여 최적의 온도를 결정하였다. 최적의 배양시간은 24시간 전 배양한 배양액을 효소생산용 배지 (glucose 1.5%, CSP 2.0%, CaCl₂ 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, Na₂CO₃ 0.15%) 100 ml이 들어있는 2 l의 삼각 flask에 5% (v/v) 수준으로 접종하여 pH를 8.0 조절한 다음 30°C에서 배양한 후 12시간 간격으로 120시간 동안 효소활성을 측정하여 결정하였다.

3. 효소의 활성 및 단백질 측정

1) 조효소 용액의 제조

효소생산배지에 종균 배양액을 5% (v/v) 되게 접종하여 30°C에서 3일간 배양한 후 배양액을 원심분리하고 상등액을 ammonium sulfate (45~80%)로 분별 침전한 다음, 원심분리하여 침전물을 회수하고 소량의 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 현탁시킨 후 동일 buffer로 4°C에서 24시간 투석하여 조효소 용액으로 사용하였다.

2) 효소활성과 단백질의 측정

단백질 분해효소의 활성 측정은 Kamekura와 Onishi¹⁵⁾의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 조효소액 0.5 ml에 기질 (1% hammarsten casein in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0) 1.0 ml를 가하여 35°C에서 30분간 반응시킨 후 0.44 M TCA 1 ml를 가하여 실온에서 30분간 방치하여 반응을 중지시킨 다음 filter paper로 여과하였다. 여과액 0.5 ml에 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 ml와 3배 희석한 Folin 시약 0.5 ml를 순차적으로 첨가하여 35°C에서 30분간 방치하여 발색을 안정시킨 다음 spectrophotometer를 이용하여 파장 660

nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 35°C에서 1분당 기질로부터 1 µg의 tyrosine을 생성하는 효소량을 1 unit로 정하였다.

단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Bradford⁵⁾의 방법에 따라 정량하였으며, 효소 정제과정에서의 단백질 농도는 spectrophotometer를 이용하여 280 nm에서의 흡광도로 표시하였다.

4. 효소의 정제

효소의 정제과정은 Fig. 1과 같은 방법으로 정제하였다. 즉, 대량 배양하여 얻은 배양액을 원심분리 (12,000 rpm, 20 min)한 후 상등액을 활성탄으로 처리하여 색소를 제거시키고, ammonium sulfate로 45~80% 되게 분별 침전하여 원심분리하고 침전물을 회수한 후 소량의 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)

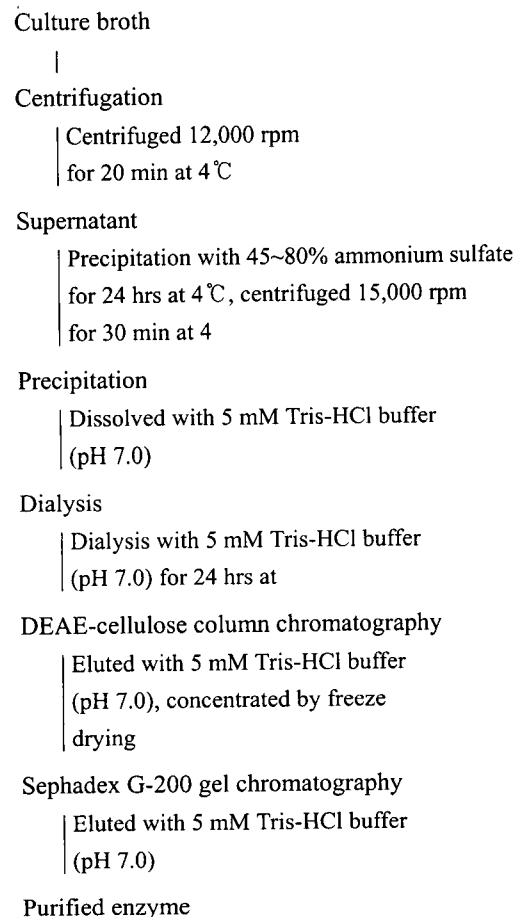


Fig. 1. Purification procedure of the protease from *Serratia sp. 2000-1*.

에 현탁시킨 다음 동일 buffer로 4°C에서 24시간 투석 농축하였다. 투석한 용액을 미리 평형화시킨 DEAE-cellulose column (2.5×30 cm) 및 Sephadex G-200 column (2×75 cm)을 통과시켜 정제하였다.

1) DEAE-cellulose column chromatography

5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 미리 평형화시킨 DEAE-cellulose column (2.5×30 cm)에 미리 농축한 효소액을 주입하고 동일 buffer로 세척한 후, 0.1~0.5 M NaCl (in Tris-HCl buffer pH 7.0)로 gradient elution을 행하여 흡착된 효소를 용출시켰다. 시간당 유속은 50 ml/hr로 하고 6 ml/tube씩 분획하여 효소활성이 있는 분획 (fraction No. 50~63)을 모아 동결건조로 농축하였다.

2) Sephadex G-200 gel chromatography

DEAE-cellulose column을 통과한 효소액의 활성분획 (fraction No. 50~63)을 모아 동결건조로 농축시킨 다음 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 미리 평형화시킨 Sephadex G-200 column (2.0×75 cm)에 주입하여 fraction당 3 ml씩 30 ml/hr의 유속으로 용출시켰다. 정제된 시료는 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

5. 정제된 Protease의 효소학적 특성

실험 균주에 의해 생산된 protease의 일반적인 특성을 알아보기로 하여 protease의 최적 활성온도와 열에 따른 안정성 검색과 최적 pH와 pH에 따른 안정성 검색, 그리고 금속이온과 저해제가 실험 균주에 의해 생산된 protease의 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

1) 최적 활성온도와 열에 따른 안정성 검색

실험 균주에 의해 생산된 protease의 최적 활성온도를 조사하기 위하여 pH 7.0에서 반응온도를 10°C에서 60°C까지 변화시켜 각 온도에서 30분간 반응시킨 후 Kamekura와 Onishi¹⁵⁾의 변법으로 효소의 활성도를 조사하였고, 열에 따른 안정성 검색은 pH를 7.0으로 하고 40°C, 50°C, 60°C의 각 온도로 열처리한 후 20분까지는 5분 간격으로, 20분에서 30분까지는 10분 간격으로, 그 이후는 15분 간격으로 60분까지 위와 같은 방법으로 잔존효소활성도를 측정하였다.

2) 최적 pH와 pH에 따른 안정성 검색

실험 균주에 의해 생산된 protease 최적 작용 pH는 pH 4에서 pH 12까지 50 mM 농도의 buffer 용액으로 35°C에서 30분간 반응시켜 Kamekura와 Onishi¹⁵⁾의 변법으로 각각의 활성도를 측정하였고, pH에 따른 안정성은 pH 4에서 pH 13까지 0.1 N HCl과 NaOH로

pH를 4~13까지 조절한 후 35°C에서 1시간 처리시킨 후 위의 방법으로 잔존효소활성도를 측정하였다.

3) 금속이온과 저해제의 영향

실험 균주에 의해 생산된 Protease의 활성에 영향을 미치는 금속이온을 조사하기 위하여 AgNO₃, Li₂SO₄·H₂O, NaCl, KCl, BaCl₂, CaCl₂, Cd(NO₃)₂, CoCl₂·6H₂O, CuSO₄·5H₂O, HgCl₂, FeSO₄·7H₂O, ZnSO₄, MnCl₂, MgSO₄·7H₂O, Al₂O₃와 같은 금속이온들을 최종농도가 1 mM과 5 mM이 되게 첨가하여 35°C에서 30분간 반응시킨 후 Kamekura와 Onishi¹⁵⁾의 변법으로 효소의 잔존활성을 측정하였고, EDTA, sodium citrate, oxalic acid, O-phenanthroline, SDS, KCN, L-cysteine, PMSF, NaN₃와 같은 각종 저해제가 본 균주가 생산하는 효소활성도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각의 저해제를 최종농도가 1 mM, 5 mM이 되도록 첨가하여 35°C에서 30분간 반응시킨 후 위와 같은 방법으로 잔존효소활성도를 측정하였다.

결 과

1. 분리균주의 특성 및 동정

분리 선별한 균주 2000-1을 nutrient agar에서 1일간 배양하여 집락의 특성을 광학현미경으로 관찰한 결과 색소를 생산치 않는 불투명한 둥근 형태에 운동성을 가진 무 아포 그람 음성 간균으로 나타났다. 그리고 nutrient agar에서 2일간 배양한 후 집락을 JSM-35C 주사 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 2와 같았다. 각종 생리 생화학적인 동정방법에 속하는 TSI (Triple sugar iron agar) 시험과 urease 시험, Voges-Proskauer 시험, Nitrate 환원 시험, Citrate utilization 시험, Lysine decarboxylase 시험, Ornithine decarboxylase 시험, Gelatin hydrolysis 시험, Malonate utilization 시험, 그리고 Acid production (glucose) 시험은 모두 양성인 반면 hydrogen sulfide (H₂S 시험)과 oxidase 시험, indole과 Methyl-red 시험, Arginine dihydrolase 시험 그리고 Dnase (25°C) 시험은 모두 음성이었다. 다음으로 탄소원 이용성을 조사하기 위해 기초배지에 각종 당을 유일한 탄소원으로 첨가하고 균을 배양하여 당을 넣지 않은 대조구와 비교한 결과 glucose, mannose, sucrose, maltose, adonitol citrate, inositol, mannitol, sorbitol 등은 잘 이용하였으나 arabinose, xylose, melibiose, raffinose, rhamnose, lactose, cellobiose, dulcitol, malonate 등은 이용하지 못하는 것으로 나타났다. 이런 모든 결과들은 표준 균주로 이용한 *Serratia marcescens*

Table 1. Effect of carbon source on the production of protease

Carbon sources	Growth (OD at 660 nm)	Relative activity (%)
None	0.124	0
Xylose	0.204	0
Glucose	1.195	100
Galactose	0.171	3
Mannose	1.367	82
Fructose	1.476	82
Rhamnose	0.169	0
Lactose	0.124	0
Sucrose	1.357	90
Maltose	0.415	28
Soluble starch	0.641	62

Table 2. Effect of nitrogen sources on the production of protease

Nitrogen sources	Growth (OD at 660 nm)	Relative activity (%)
None	0.117	0
Beef extract	2.282	77
CSP (Corn Steep Powder)	1.675	94
Malt extract	0.107	1
Milk casein	1.347	68
Peptone	1.911	82
Trypton	2.191	100
Soybean meal	1.502	4
Yeast extract	2.199	91
Asparagine	1.512	83
Urea	0.082	8
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.425	17
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.306	50
NH ₄ Cl	0.424	2
NH ₄ NO ₃	0.792	19
KNO ₃	0.123	2
NaNO ₃	0.126	2

Table 3. Effect of metal salts on the production of protease

Metal salt	Growth (OD at 660 nm)	Relative activity (%)
None	1.730	69
AgNO ₃	2.162	73
Li ₂ SO ₄ ·H ₂ O	1.762	79
Ba(OH) ₂	1.719	76
CaCl ₂	1.784	94
Cd(NO ₃) ₂	1.355	9
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.233	40
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.965	15
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.042	100
MgCl ₂	1.481	81
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.673	78
MnCl ₂	1.856	75
Pb(Ac) ₂	1.666	69
ZnSO ₄	1.415	28
Al ₂ O ₃	1.999	66

와 거의 일치하는 결과들로서 이 균주를 편의상 *Serratia sp. 2000-1*로 명명하였다.

2. 효소의 생산조건

1) 탄소원, 질소원 그리고 금속염

효소생산에 영향을 미치는 탄소원과 질소원 그리고 금속염의 종류와 그 농도를 조사한 결과 탄소원으로는 glucose가 1.5%에서, 질소원으로는 CSP (corn steep powder)가 2.0%에서, 그리고 금속염으로는 CaCl₂가 0.1%일 때 효소생산성이 가장 좋은 것으로 나타났다 (Table 1~3, Fig. 3~5 참조).

2) 최적의 pH와 배양온도 및 배양시간

효소생산에 영향을 미치는 초발 pH와 배양온도 및 배양시간을 조사한 결과 최적 pH는 8이었고, 배양온도는 30℃, 그리고 배양시간은 72시간이 최적이었다 (Fig. 6~8 참조).

3. 효소의 정제

효소 정제과정에 따른 수율은 Table 4와 같으며 최종 수율은 14.4%인 것으로 나타났다. 그리고 단백질 농도와 효소활성도가 비례하고, 효소의 비활성이 약 29배 증가한 것으로 나타났다 (Fig. 9~10 참조).



Fig. 2. Electron microscopic photograph of the isolated *Serratia sp. 2000-1*.

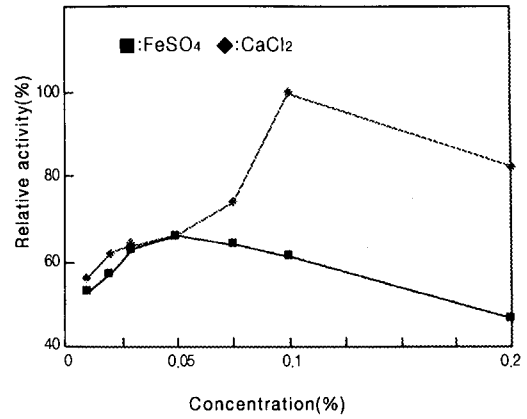


Fig. 5. Effect of FeSO₄ and CaCl₂ concentration on the production of protease.

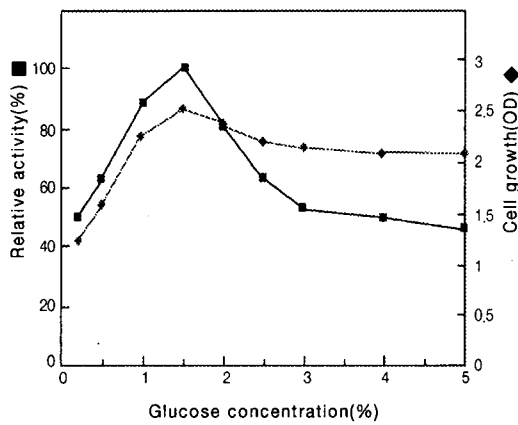


Fig. 3. Effect of glucose concentration on the production of protease.

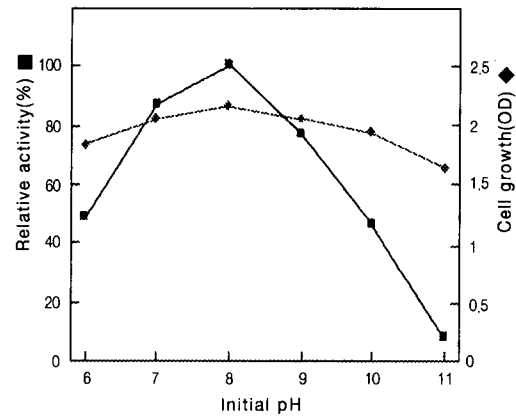


Fig. 6. Effect of initial pH on the production of protease.

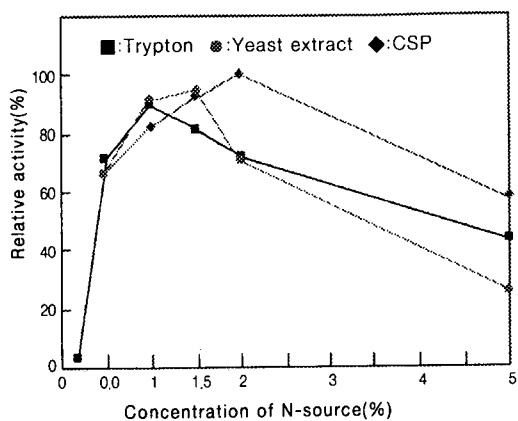


Fig. 4. Effect of trypton, CSP and yeast extract concentration on the protease production.

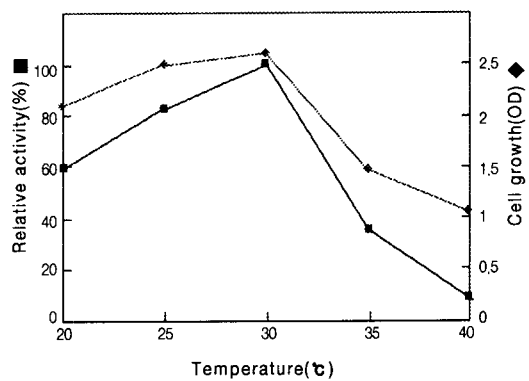


Fig. 7. Effect of temperature on the production of protease.

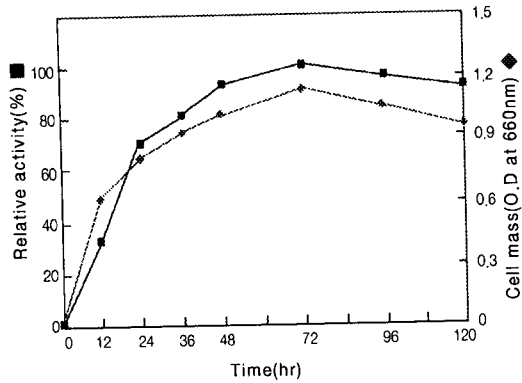


Fig. 8. Effect of culture time on the production of protease by *Serratia sp. 2000-1*.

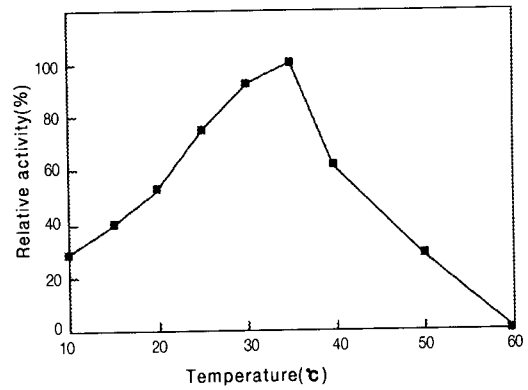


Fig. 11. Effect of temperature on the protease activity.

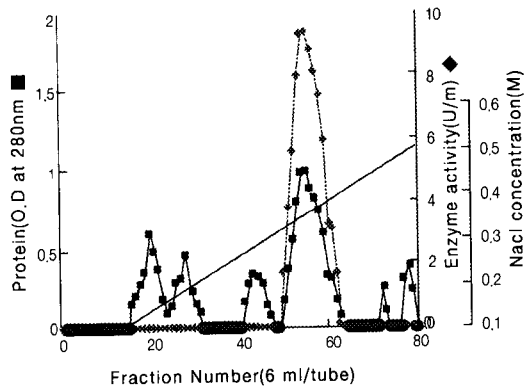


Fig. 9. Column chromatography of protease from *Serratia sp. 2000-1* on DEAE-cellulose.

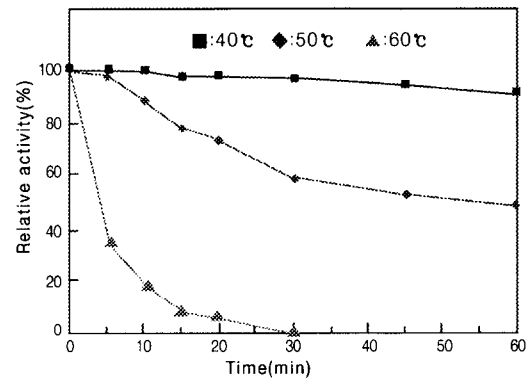


Fig. 12. Effect of temperature on the stability of protease.

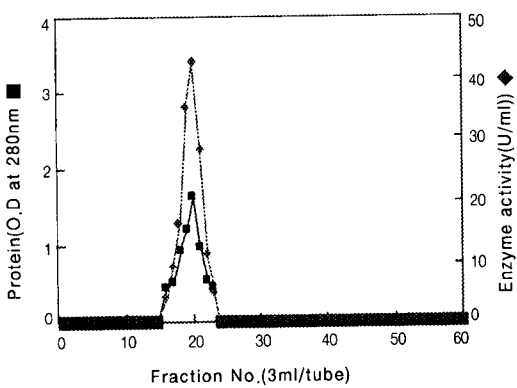


Fig. 10. Sephadex G-200 gel filtration chromatography of protease from *Serratia sp. 2000-1*.

4. 실험 균주에 의해 생산된 proteasa의 일반적 성질

1) 최적 활성온도와 열에 따른 안정성 검색에 결과

본 균주가 생산하는 protease의 최적 활성온도는 35°C였고, 열에 따른 안정성을 검색 결과 40°C까지는 안정하였으나 그 이상 온도에서는 효소의 활성이 급격히 감소하였다. 그리고 60°C에서 30분간 열처리시에는 효소의 활성이 완전히 상실되었다 (Fig. 11~12 참조).

2) 최적 pH와 pH에 따른 안정성 검색에 결과

본 균주가 생산하는 protease의 최적 작용 pH는 pH 7~8로 나타났으며, pH에 따른 안정성 검색 결과 pH 6~10까지는 안정한 것으로 나타났다 (Fig. 13~14 참조).

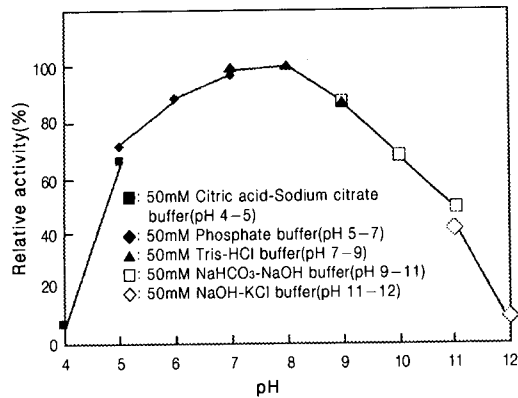


Fig. 13. Effect of pH on the protease activity.

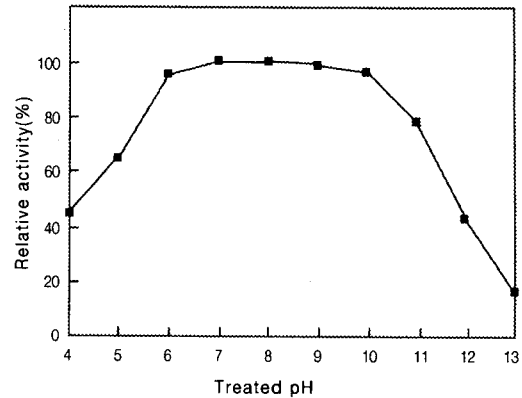


Fig. 14. Effect of pH on the protease stability.

Table 4. Summary of the purification steps

Purification step	T. protein (mg)	T. activity (units)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Cell free extract	2,800	6,608	2.36	100
A.S. precipitation	1,022	4,558	4.46	69
DEAE-cellulose	116	1,306	11.26	19.8
Sephadex G-200	14	951	67.96	14.4

T.: Total, A.S.: Ammonium sulfate

Table 5. Effect of metal ion on the protease activity

Metal ion	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100
AgNO ₃	12	0
Li ₂ SO ₄ ·H ₂ O	69	100
KCl	96	73
NaCl	99	100
BaCl ₂	117	108
CaCl ₂	110	116
Cd(NO ₃) ₂	38	20
CoCl ₂ ·6H ₂ O	103	104
CuSO ₄ ·5H ₂ O	53	13
FeSO ₄ ·7H ₂ O	96	89
HgCl ₂	11	0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	110	124
MnCl ₂	87	113
ZnSO ₄	103	51
Al ₂ O ₃	97	84

Table 6. Effect of inhibitor on the protease activity

Inhibitor	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100
EDTA	95	93
Sodium citrate	98	98
Oxalic acid	94	98
O-Phenanthroline	73	57
SDS	57	0
KCN	83	37
L-Cysteine	47	65
PMSF	104	102
NaN ₃	91	100

3) 금속이온과 저해제의 영향에 대한 조사 결과 본 균주가 생산하는 protease의 활성에 미치는 금속이온의 영향을 조사한 결과 Mg²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ 등의 이온에 의해서는 활성이 촉진되는 반면 Hg²⁺, Ag⁺, Cu²⁺ 등의 이온에 의해서는 심하게 저해를 받

는 것으로 나타났다. 한편 저해제의 영향을 조사한 결과 본 효소는 SDS (sodium dodecyl sulfate)에 의해 효소활성이 크게 저해를 받았을 뿐만 아니라 KCN, cysteine, *O*-phenanthroline에 의해서도 저해를 받는 것으로 나타났다. 그러나 PMSF에 의해서는 효소의 활성이 영향을 받지 않는 것으로 나타났다 (Table 5~6 참조).

고 찰

최근 여러 감염부위에서 분리되는 *Serratia* species는 대부분 색소를 생성하지 않으며 cephalosporins를 포함한 여러 항생제에 내성을 나타내는 다제 내성 *Serratia* species들로¹⁹⁾ 이전에 기회 감염균으로 알려졌던 것과는 달리 병원균으로 중요하며, 더욱이 면역능력이 저하된 환자나 스테로이드 등의 치료를 받고 있는 환자의 병소로부터 분리되었을 경우에는 감염의 원인균으로도 큰 의의가 있을 뿐만 아니라 이들에 의해서 분비될 수 있는 protease의 성질과 특성을 밝혀 산업용으로 활용할 수 있는 가능성을 규명하는 것도 매우 중요한 일이라 생각된다.

따라서 본 저자들은 여러 임상검체로부터 protease를 분비하는 균주들을 분리한 후 각 균주들을 분리용 배지에서 agar를 제외한 액체배지에 1 loop씩을 접종하여 30℃에서 3일간 배양한 후, 배양상등액으로 효소활성을 측정하여 단백질 분해활성이 가장 높은 2000-1 균주를 최종적으로 선정하여 Bergey's 방법 등^{8,14,27,29)}에 따라 동정하고, 광학현미경과 전자현미경학적 검사, 그리고 각종 생리 생화학적 검사 결과 표준 균주로 이용한 *Serratia marcescens*와 거의 일치하는 결과들을 나타내 이 균주를 편의상 *Serratia* sp. 2000-1로 명명하고 이들에 의해서 분비되는 protease의 생산조건과 일반적인 성질, 그리고 특성을 밝혀 산업용으로 활용할 수 있는 가능성을 규명하는 기초자료들을 마련하고자 실험을 시행하였다.

효소생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과 (Table 1 참조) glucose를 첨가하여 주었을 때 효소생산이 가장 우수하였고, 그 다음으로 sucrose, fructose, mannose 등의 순서로 효소생산이 우수하였다. 반면에 lactose, rhamnose, galactose와 xylose 첨가시에는 균체생산과 효소생산이 모두 낮았다. 일반적으로 *Serratia marcescens*의 metalloprotease의 생산을 위해 glucose를 사용한 Lyerly와 Kreger²⁰⁾의 보고와는 일치하지만 탄소원 첨가시에 효소생산이 좋지 않았

다는 최 등⁴⁾의 보고와는 상이하였다. 또한 glucose의 농도에 따른 효소생산을 조사한 결과 (Fig. 3 참조) 1.5% 농도에서 효소활성과 균체증식이 가장 높게 나타났으며 이는 *Serratia marcescens*의 metalloprotease의 생산을 위해 glucose의 농도를 1.5%로 사용한 Kim과 O¹⁶⁾의 보고와 유사하였으나 0.1%를 사용한 Lyerly와 Kreger²⁰⁾의 보고와는 약간 상이하였다.

생육과 효소생산에 밀접한 관계가 있는 질소원의 영향을 조사한 결과 (Table 2 참조) trypton, CSP, yeast extract의 순으로 다른 질소원에 비해 효소생산이 우수하였고, malt extract, KNO₃, NaNO₃ 등에서는 효소생산이 낮았다. 이는 *Serratia marcescens*의 metalloprotease의 생산에 있어서 yeast extract를 사용한 Lyerly와 Kreger²⁰⁾의 보고와는 유사하였으나, casein과 skim milk가 우수하였다는 최 등⁴⁾과 casein이 우수하였다는 김 등²⁾의 보고와는 상이하였다. Trypton, CSP 및 yeast extract의 농도가 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과 (Fig. 4 참조) CSP의 농도가 2.0%일 때 효소생산이 가장 우수한 것으로 나타났다.

금속음이 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과 (Table 3 참조) Fe²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ 순으로 효소생산이 우수하였으나, Cd²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ 등에 의해서는 효소생산이 현저하게 저해되었다. 이와 같은 결과들은 *Serratia marcescens*의 metalloprotease 생산에 Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ 등이 우수하였다는 최 등⁴⁾과 Ca²⁺, Mg²⁺를 효소생산에 사용한 Kim과 O¹⁶⁾의 결과들과는 매우 유사하였다. FeSO₄와 CaCl₂의 농도별 영향을 조사한 결과 (Fig. 5 참조) CaCl₂를 0.1% 첨가해 주었을 때 효소생산성이 가장 우수하였다. 이러한 결과는 *Serratia marcescens*의 metalloprotease 생산에 있어서 CaCl₂의 농도를 0.01%로 사용한 Kim과 O²⁾, 그리고 0.02%를 사용한 최 등⁴⁾의 결과와는 상이하였다.

초발 pH의 영향을 조사한 결과 (Fig. 6 참고) 효소생산의 최적 pH는 8이었고 pH 7~9까지는 비교적 효소생산이 안정하였다. 이런 결과들은 *Serratia marcescens*의 metalloprotease 생산에 있어서 배지의 pH를 7.2로 사용한 Lyerly와 Kreger²⁰⁾, 그리고 7.0을 사용한 최 등⁴⁾과 Kim과 O¹⁶⁾의 결과들과 유사하였다.

배양온도의 영향을 조사한 결과 (Fig. 7 참조) 효소생산량은 균체의 증식과 비례하여 증가하여 30℃에서 균체의 최적 증식온도와 효소생산의 최적온도가 일치하였고, 35℃ 이상에서는 균체증식과 효소생산이 감소되었다. 이와 같은 결과들은 *Serratia*

*marcescens*의 metalloprotease 생산을 위해 30°C에서 배양한 Lyerly와 Kreger²⁰, 최 등⁴, Matsumoto 등²³ 그리고 Kim과 O¹⁶의 결과와는 일치하였으나 26°C에서 배양한 김 등³¹의 보고와는 약간 상이하였다.

배양시간의 영향을 조사한 결과 (Fig. 8 참조) 효소활성과 균체증식이 72시간에서 최대치를 나타냈다. 이는 *Serratia marcescens*의 metalloprotease 생산에 있어서 효소의 최대 생산시간이 45시간이었다는 Kim과 O¹⁶, 30시간의 최 등⁴과 김 등², 24시간이었다는 Matsumoto 등²³의 보고에 비해서는 배양시간이 많이 소요되었다.

이상의 결과들은 같은 균주라도 연구자들에 따라 탄소원이나 질소원 그리고 금속염의 종류와 농도, 최적온도와 pH 그리고 배양시간 등이 거의 유사하거나 좀 다른 것은 균주들의 분리원들 (sources)이 다르고, 생육 환경이 다르고, 또한 균주마다 생리학적으론 유전학적으로 각기 다소간에 차이가 있기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 분리된 균주에 따라 목적인 생산물을 최대로 생산케하는 조건들을 새로 찾는 것이 가장 바람직한 일이라 하겠다.

본 실험 균주인 *Serratia sp. 2000-1*에 의해 생산된 효소 protease의 정제를 위한 DEAE-cellulose column chromatography에 의한 효소 용출 경향은 Fig. 9와 같았다. 그리고 Sephadex G-200 gel chromatography에 의한 단백질 용출 경향과 효소활성도와 관계는 Fig. 10에 나타난 바와 같이 효소 최대활성 peak와 단백질 peak가 일치하므로 단백질 농도와 효소활성도가 비례하고 있음을 알 수 있었다. 효소 정제과정에 따른 수율은 Table 4와 같았으며 최종 수율은 14.4%였다. 또한 효소의 비활성은 약 29배 증가하였다. 이런 효소수율에 결과는 Lyerly와 Kreger²⁰의 16%, 김 등¹의 15.8%와는 비교적 유사하였으나 최 등⁴의 31% 보다는 낮은 것으로 나타났다.

*Serratia sp. 2000-1*에 의해 생산된 protease의 일반적인 성질과 특성을 알아보기 위해 최적 활성온도를 조사한 결과 (Fig. 11 참조) 35°C에서 최적 활성을 보였으며, 이러한 결과는 *Serratia marcescens*가 생산하는 metalloprotease의 최적 활성온도가 30°C였다는 최 등⁴과 김 등¹의 보고와는 유사하였으나, 40°C로 보고한 Kim과 O¹⁶ 그리고 Kim과 Kim²⁸에 결과나, 최적온도가 45°C라고 보고한 Yanagida 등³⁵의 결과보다는 낮았다. 한편 이 효소의 열 안정성을 조사하기 위해 잔존효소활성도를 측정된 결과 (Fig. 12 참조) 40°C까지는 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 효소의 활성이 급격히 감소하였다. 그

리고 60°C에서 30분간 열처리시에는 효소의 활성이 완전히 상실되었다. 이러한 결과는 Lyerly와 Kreger²⁸, 최 등²⁹, Kim과 O¹⁶ 그리고 김 등¹이 보고한 *Serratia* 속의 균주가 생산하는 metalloprotease의 열 안정성과 유사하였다. 이는 임상검체에서 분리한 본 균주의 생육 환경이 인체이므로 이러한 열 안정성이 나타난 것으로 사료된다.

본 실험 균주인 *Serratia sp. 2000-1*에 의해 생산된 protease의 최적 작용 pH를 조사하기 위해 protease의 활성도를 측정된 결과 (Fig. 13 참조) 그 pH는 7~8이었다. 이러한 결과는 *Serratia marcescens*가 생산하는 metalloprotease의 최적 pH를 8.0으로 보고한 김 등¹과 Yanagida³⁵ 그리고 7.0으로 보고한 Kim과 Kim²⁸의 결과와는 유사하였으나 5.0~7.0으로 보고한 Lyerly와 Kreger²⁰, 9.0으로 보고한 최 등⁴과 Kim과 O¹⁶의 보고와는 상이하였다. 또한 이 효소의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위해 잔존효소활성도를 측정된 결과 (Fig. 14 참조) pH 6~10까지는 안정한 것으로 나타났다. 이는 김 등¹과 최 등⁴이 *Serratia marcescens*에 의해 생산되는 metalloprotease가 pH 5.0~11.0과 6.0~8.0에서 안정하였다는 결과와는 상이하였지만 Lyerly와 Kreger²⁰, Kim과 O¹⁶ 그리고 Kim과 Kim²⁸의 결과와는 대체로 유사하였다.

*Serratia sp. 2000-1*에 의해 생산된 protease의 활성에 영향을 미치는 금속이온을 조사하기 위해 효소의 잔존활성도를 측정된 결과 (Table 5 참조) Mg²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ 등의 이온에 의해서는 활성이 촉진되었으나, Hg²⁺, Ag⁺, Cu²⁺ 등의 이온에 의해서는 심하게 저해를 받았다. 이와 같은 결과들은 *Serratia marcescens*에 의해 생산된 metalloprotease가 Hg²⁺ 등에 의해 저해를 받았다는 Matsumoto 등²³과 김 등¹의 결과, 그리고 Ag⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺에 의해 저해를 받는다고 보고한 최 등⁴의 결과와 유사하였다. 각종 저해제가 본 균주가 생산하는 protease의 활성도에 미치는 영향을 조사하기 위해 효소의 잔존활성도를 측정된 결과 (Table 6 참조) SDS (Sodium dodecyl sulfate)에 의해 효소활성이 크게 저해를 받았으며 KCN, cysteine, O-phenanthroline에 의해서도 저해를 받았다. 그러나 PMSF에는 효소의 활성이 영향을 받지 않았으므로 serine protease는 아닌 것으로 생각되며, 이런 결과들은 *Serratia marcescens*에 의해 생산된 metalloprotease가 EDTA에 의해 강하게 저해를 받는 것으로 보고한 Lyerly와 Kreger²⁰, 최 등⁴, Matsumoto 등²³, Kim과 O¹⁶ 그리고 김 등¹의 결과와는 상이한 결과였다.

이상의 결과들에서 보면 본 실험 균주 *Serratia sp.* 2000-1에 의해 생산된 protease의 성질과 특성이 여러 연구자들의 결과와 매우 유사하거나 아주 상이한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 앞서 언급한 바와 같이 같은 종의 균주라도 균주들의 분리원들 (sources)이 다르고, 생육 환경이 다르고, 또한 균주마다 생리화적으로나 유전학적으로 각기 다소간에 차이가 있기 때문에 생산조건도 다를 뿐만 아니라 그들이 생산하는 물질들의 물리 화학적인 성질과 특성에도 얼마간에 차이가 있을 수 있을 것으로 본다.

따라서 본 실험 균주가 생산하는 protease에 산업용으로서의 활용 가능성을 평가하기 위해서는 Protease의 종류도 다양하고, 그들을 생산하는 균주도 다양한 관계로 여러 종류의 임상검체에서 많은 새로운 균주들을 분리하여, 위와 같은 내용들 외에도 Protease에 관한 좀 더 면밀한 조사를 실시하여야 그들에 의해 생산되는 Protease의 가정용 세제로서의 활용 가능성을 평가할 수 있을 것으로 본다.

참 고 문 헌

- 1) 김기석, 이창원, 이병룡, 신용철 (1992): *Serratia marcescens* ATCC 21074로부터 순수 분리한 Metalloprotease의 자가분해성과 안정성. 산업미생물학회지, **30**: 71-77.
- 2) 김남수, 남영중, 김수일 (1990): *Serratia marcescens*가 생성하는 세포의 단백 분해효소의 정제. 산업미생물학회지, **18**: 165-170.
- 3) 노현수, 박효진, 이병룡 (1992): 세라티아 균주의 배양에 의한 세라티아 펩티다제의 생산에 관한 연구. 산업미생물학회지, **20**: 207-212.
- 4) 최완수, 정계중, 이주경, 박주웅, 이상훈, 이진복, 이송락, 최신원 (1993): *Serratia* 속의 신균주가 생산하는 단백질 분해효소. 약학회지, **37**: 129-135.
- 5) Braford MM (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quntitation of μ g Proteins. *Anal Biochem*, **72**: 248-254.
- 6) Decedue CJ, EA II Broussard, Larson AD and Braymer HD (1979): Purification and Characterization of the Extracellular Proteinase of *Serratia marcescens*. *Biochem Biophys Acta*, **569**: 293-301.
- 7) Dorwart BB, Abrutyn and Schmacher HR (1975): *Serratia* arthritis: medical eradication of infection in a patient with rheumatoid arthritis. *J Am Med Assoc*, **225**: 1642-1643.
- 8) Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC and Winn WM Jr. (1992): Diagnostic Microbiology (4th ed). JB Lippincott Co.
- 9) Epstein EE and Carson TE (1973): *Serratia granuloma*. *J Am Med Assoc*, **223**: 670-671.
- 10) Fox PE (1982): Proteolysis in milk and dairy products. *Biochem Soc Trans*, **10**: 282.
- 11) Grimmont PAD and Grimmont F (1978): The genus *Serratia*. *Ann Rev Microbiol*, **32**: 221-248.
- 12) Gusek TW and Kinsella JE (1988): Properties and potential applications of a unique heat-stable protease. *Food Technol*, **42**: 102.
- 13) Hartley BS (1960): Proteolytic enzymes. *Ann Rev Biochem*, **29**: 45-72.
- 14) MacFaddin JF (1980): Biochemical test for identification of medical bacteria (2nd ed.). Williams & Wilkins Baltimore.
- 15) Kamekura M and Onishi H (1974): Determination of protease activity methods. *J Appl Microbiol*, **27**: 809-810.
- 16) HR Kim and PS O (1991): Selection of Protease Hyperproduction Mutant from *Serratia marcescens* ATCC 21074 and Enzymatic Properties of the Protease. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*, **19**: 450-455.
- 17) Kobayashi T, Ogasawara A, Ito S and Saitoh M (1985): Purification and Some Properties of Alkaline Protease Produced by *Pseudomonas maltophilia*. *Agri Biol Chem*, **49**: 693-698.
- 18) Korner RJ, Nicol A, Reeves DS, MacGowan AP and Hows J (1994): Ciprofloxacin resistant *Serratia marcescens* endocarditis as a complication of non-Hodgkin's lymphoma. *J Infection*, **29**: 73-76.
- 19) Luzzaro F, Pagani L and Romero E (1995): Extended-spectrum beta-lactamases conferring resistance to monobactams and oximonocephalosporins in clinical isolates of *Serratia marcescens*. *J Chemotheraphy*, **7**: 175-178.
- 20) Lyerly D and Kreger A (1979): Purification and Characterization a *Serratia marcescens* Metalloprotease. *Infe Immun*, **24**: 411-421.
- 21) Lyerly DM and Kreger AS (1983): Importance of *Serratia* protease in the pathogenesis of experimental

- Serratia marcescens* pneumonia. *Infect Immun*, **40**: 113-119.
- 22) Maniatis T, Fritsh EF and Sambrock J (1989): A Laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York).
- 23) Matsumoto K, Maeda H, Takata K, Kamata R and Okamura R (1984): Purification and Characterization of Four Proteases from a Clinical Isolate of *Serratia marcescens* kums 3958. *J Bacteriol*, **157**: 225-232.
- 24) Meltz DJ and Grieco MH (1973): Characteristics of *Serratia marcescens* pneumonia. *Arch Intern Med*, **132**: 359-364.
- 25) Millet J (1970): Characterization of proteinases excreted by *Bacillus marburg* strain during sporulation. *J Appl Bacteriol*, **33**: 207-219.
- 26) Miyata K, Maejima K, Tomoda K and Isono M (1970): *Serratia* protease: Purification and general properties of the enzyme. *Agri Bio Chem*, **34**: 310-318.
- 27) Krieg NR and Holt JG (1984): Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Volume 1). The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- 28) NS Kim and SI Kim (1994): Characterization and primary specificity of and extracellular metalloprotease from *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol*, **40**: 120-126.
- 29) Murray PR, Baron E, Pfaller MA, Tenover FC and Yolken RH (1995): Manual of Clinical Microbiology (6th ed.). ASM Press.
- 30) Richard JD (1995): Bilateral *Serratia marcescens* keratitis after simultaneous bilateral radial keratotomy. *A J Ophthalmology*, **119**: 233-236.
- 31) Tang JL, Gough CL, Barber CE, Dow JM and Daniels MJ (1987): Molecular cloning of protease gene from *Xanthomonas campestris*: Expression in *E. coli* and role in pathogenicity. *Mol Gen Genet*, **210**: 443-448.
- 32) Tsuboi R, Sanada T, Takamori K and Ogawa H (1987): Isolation and properties of extracellular proteinase from *Sporothrix schenckii*. *J Bacteriol*, **169**: 4104-4109.
- 33) Tsuchiya K, Arai T, Seki K and Kimura T (1987): Purification and Some Properties of Alkaline Proteinases from *Cephalosporium* sp. KM388 *Agri Biol Chem*, **51**: 2959-2965.
- 34) Ward PA, Chapitas J, Conroy MC and Lepow IH (1973): Generation by bacterial proteinases of leukotactic factors from human serum, and human C3 and C5. *J Immunol*, **110**: 1003-1009.
- 35) Yanagida N, Uozumi T and Beppu T (1986): Specific Excretion of *Serratia marcescens* Protease through the Outer Membrane of *E. coli*. *J Bacteriol*, **166**: 937-944.

=Abstract=

The Production and Properties of Protease by *Serratia sp. 2000-1* Isolated from Clinical Specimes

Tai Jeon Kim[†], Sung Kon Kim and Sang Taek Kim^{*}

Department of Medical Technology, Seoul Health College, Sunghnam, 461-713, Korea[†]

Department of Clinical Pathology, Kang-Nam St' Mary's Hospital,

The Catholic University, Seoul, 137-040, Korea^{}*

The purpose of this study was to investigate the practical availability of protease production that can be used at home after isolating *Serratia sp. 2000-1* which produced extracellular protease from clinical specimen. Basic production conditions and partial enzymatic characteristics of protease produced by *Serratia sp. 2000-1* was as follows: The kind and concentration of carbohydrate, nitrogen and metal salts for optimal enzyme production condition were each identified as the concentration of 1.5% glucose, 2.0% CSP, and 0.1% CaCl₂, and the optimal temperature, time and initial pH for culture were each 30°C, 72 hours, and pH 8.0. The final enzymatic yeild that was purified by 3 steps with ammonium sulfate precipitation (45~80%), DEAE-cellulose column chromatography, and Sephadex G-200 gel chromatography was 14.4%, and enzyme inactivity rate increased approximately 29 folds. The optimal temperature and pH for purified protease activity were 35°C and pH 7.0~8.0, and purified protease activity was relatively stable by 40°C at pH 6~10 for 30 min, however heating at 60°C for 30 min, it liminated detectable protease activity. The protease activity was activated by Mg²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, but inactiviaed by Hg²⁺, Ag⁺, Cu²⁺, and the protease activity was inhibited strongly by SDS among enzyme activity inhibitors. Further study is required to evaluate the practical availability of protease production that can be used at home by isolating *Serratia sp.* from more clinical specimen and examining protease more in details.

Key Words: Protease, Extracellular protease, Optimal, Column chromatography, Enzymatic yield

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(3): 209–221, September, 2000]

[†]Corresponding author