

## *Janthinobacterium* sp. 유래 저온 활성 프로테아제 정제

김현도, 최종일\*

전남대학교 생물공학과, 바이오에너지 및 바이오소재협동과정

Received: March 6, 2018 / Revised: March 8, 2018 / Accepted: March 9, 2018

### **Purification of Cold-adapted Protease from *Janthinobacterium* sp.**

Hyun-do Kim and Jong-il Choi\*

Department of Biotechnology and Bioengineering, Interdisciplinary Program for Bioenergy & Biomaterials, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea

**In this study, purification of cold-adapted protease from *Janthinobacterium* sp. was investigated. First, using gradient precipitation, protease was confirmed to be deposited in the 30–80% range of ammonium sulfate. Next, DEAE-Sephacel column was used for the binding of the protease under various conditions. The optimal binding condition was found to be pH 8.5 and flow rate of 30 ml/h. Under the optimal condition, the protease was purified with 29% recovery yield. This result can be useful for the purification of other cold-adapted protein.**

**Keywords:** Purification, protease, *Janthinobacterium*

일반적으로 극지와 같은 특수한 환경에서 성장하는 생물 종들은 생물산업에 많은 기회를 제공해 준다. 최근에는 이러한 저온에서 적응하며 생존하는 종들을 생물산업의 응용을 위한 연구 모델로 활용하고 있다[1, 2]. 극지와 같은 저온 환경에서 성장하는 미생물에서 분리된 효소는 저온 및 중온에서 높은 촉매 활성을 나타내기 때문에, 반응 조건이 무기 촉매나 다른 효소에 비하여 용이하며, 또한 적은 온도 상승에 의해 쉽게 불활성화 될 수 있기 때문에 산업적으로 응용 가치가 높고 그에 대한 연구가 증가하고 있다[3–5].

세계 효소 시장의 약 60%를 차지하는 프로테아제는 세계 산업, 가죽 가공, 식품 산업, 의약품 및 생물학적 환경정화 등 수많은 분야에서 잠재적인 이점을 갖는 효소이다[6]. 특히, 저온성 프로테아제는 세계 및 식품 가공과 같이 저온에서 반응이 수행되어야 하는 산업 분야에서 시간과 에너지 소비를 줄일 수 있으므로 효율적으로 공정을 수행할 수 있게 한다[7–9].

지금까지 여러 종류의 저온 미생물로부터 다양한 프로테아제가 보고되었다[7–9]. Yang 등은 *Halobacillus*에서 크로마토그래피를 이용하여 저온활성 프로테아제를 정제하였으며[9], *Yersinia ruckeri*에서 암모늄 설페이트 침전과 이온

크로마토그래피를 이용하여 프로테아제가 정제되었다[10]. Davail 등은 phenyl-Sepharose CL-4B column을 이용하여 저온성 *Bacillus*에서 alkaline 프로테아제를 정제하였다[11]. 하지만, 이러한 저온 활성 효소의 분리와 정제는 효소의 특성에 따라 조건이 다양하고, 온도에 따른 활성 변화가 쉽게 야기될 수 있는 경우가 많기 때문에 다양한 효소에 대한 정제 방법 연구가 필요한 실정이다. 따라서, 본 논문에서는 이전 연구에서 선별된 극지 미생물들 중 프로테아제의 활성이 높은 *Janthinobacterium* sp. PAMC 25641로부터 분비된 프로테아제의 정제 연구를 수행하였다[12].

본 실험에서 사용된 *Janthinobacterium* sp. PAMC 25641은 극지연구소(Korea Polar Research Institute, Korea)로부터 분양받았다. 이전 연구에 따르면 *Janthinobacterium* sp. 다른 극지 유래 균주에 비하여 성장이 우수하고, 세포외로 분비된 프로테아제는 저온에서 높은 활성을 나타내는 것으로 확인하였다[12].

*Janthinobacterium* sp.는 250 ml erlenmeyer flasks에 50 ml NB 배지(Nutrient broth, Becton, Dickinson and Company, USA)를 이용하여 15°C에서 24시간 전배양 하였고 본배양은 같은 조건에서 전배양액의 2%(v/v)를 접종하여 72시간 동안 배양하였다. 미생물의 성장은 ELISA Reader (Molecular Devices, VersaMax™ and SpetraMax® 340PC<sup>384</sup>, USA)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### **\*Corresponding author**

Tel: +82-62-530-1846, Fax: +82-62-530-1949

E-mail: choiji01@chonnam.ac.kr

© 2018, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

단백질의 농도는 Bradford assay 방법을 이용하여 측정하였다[13].

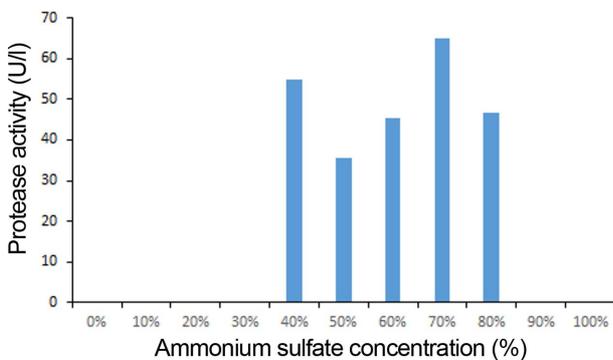
*Janthinobacterium* sp. 유래 프로테아제 활성 측정은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) 200 µl에 기질인 10 mM AAPF (N-succinyl-ALA-ALA-PRO-PHE-P-nitroanilide, Sigma-Aldrich, USA) 10 µl을 넣고 100 µl의 효소 혼합액과 690 µl의 증류수를 혼합하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 60°C에서 20분간 불활성화 하여, ELISA reader를 사용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit의 프로테아제 활성은 extinction coefficient = 8,800으로 하여 다음 식에 의하여 계산하였다[12].

$$\text{Unit (mmol/min)/l} =$$

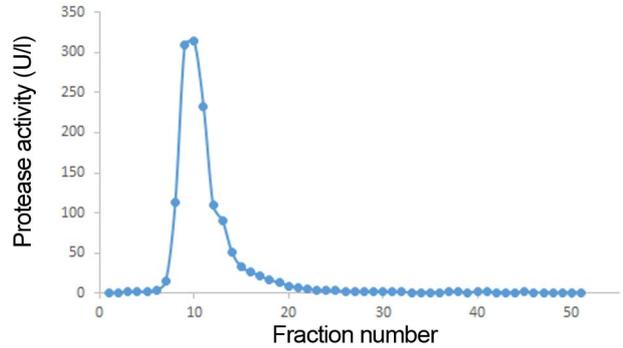
$$\frac{(\text{net OD}_{410}) \times (\text{volume of reaction mixture, L}) \times 10^6}{\epsilon \times (\text{reaction time, min}) \times (\text{volume of enzyme solution, L})}$$

*Janthinobacterium* sp.로부터 세포외로 분비된 프로테아제를 분리하기 위하여 먼저 gradient precipitation을 수행하였다. 발효 후 얻어진 여액에 암모늄 설페이트를 0-100% 농도 범위로 처리한 후 4°C, 22,000 ×g으로 30분간 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 pellet을 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)로 녹인 후 같은 용액으로 투석을 진행하였다. 투석용액은 적어도 2번 교체하였고, 침전을 위해 사용된 암모늄 설페이트 농도에 대한 상대적인 프로테아제의 활성을 투석 후 측정하였다.

이러한 방법을 통해서 최적의 암모늄 설페이트 농도를 설정하였고, 이후 정제 단계의 최적화를 진행하였다. 발효 후 얻어진 여액에 암모늄 설페이트를 70%의 농도로 처리한 후 4°C, 22,000 ×g으로 30분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 얻은 pellet을 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)로 녹인 후 같은 용액으로 투석을 진행하였다. 투석용액은 적어도 2번 교체하였다. 크로마토그래피를 이용한 단백질 정제의 최적화를 위하여 다양한 조건의 pH (6.5-8.5)와 유속(1.5-3 ml/



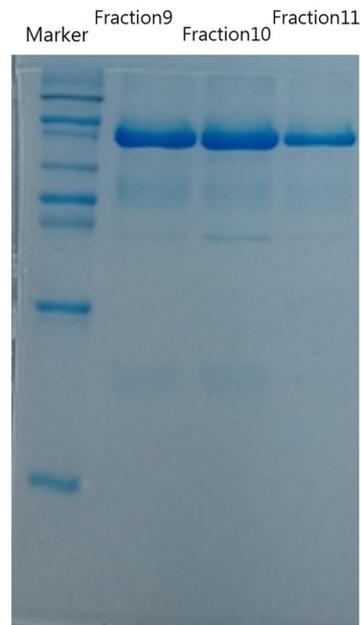
**Fig. 1. Protease activity after gradient precipitation of cell broth of *Janthinobacterium* sp..**



**Fig. 2. Protease activity of fractions after elution.** The fractions were eluted with 0-0.5 M NaCl gradient at a flow rate of 30 ml/h, with 10 mM of the fraction volume.

min)에서 정제를 수행하고 분석하였다. 투석 후 원심분리 하여 분리된 상층액을 DEAE-Sepharose column (1.5 × 5 cm, Sigma-Aldrich)에 가하였고 0-0.5 M 농도의 NaCl을 30 ml/h의 유속으로 10 ml씩 용출하였고 각각의 분획의 효소 활성을 측정하였다.

*Janthinobacterium* sp.로부터 생산된 프로테아제의 최적 침전 범위를 확인하기 위하여 30-80% 범위의 암모늄 설페이트를 이용하여 gradient precipitation을 수행하였다. 그 결과, 프로테아제의 최적 침전 범위는 60-70%로 확인되었다 (Fig. 1). 30% 이하의 암모늄 암모늄 설페이트 농도에서는 프로테아제는 침전이 일어나지 않았으며, 40% 이상에서 프로테아제 침전이 확인되었다. 침전된 프로테아제의 활성은 암



**Fig. 3. SDS-PAGE analysis of fractions after elution.**

**Table 1. Protease activity and recovery yield during purification steps obtained from the culture broth of *Janthinobacterium* sp..**

Step	Total volume (ml)	Activity (U/l)	Total activity recovered (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Recovery yield (%)
Cell-free culture supernatant	1000	40	40,000	1,290	31	100
Ammonium sulfate precipitation	40	980	39,200	243	161	98
DEAE-Sepharose fraction (8-12)	60	195	11,700	20	584	29

모늄 설페이트의 농도가 증가할수록 증가하여 70%에서 가장 높은 값을 가졌다.

따라서, 배양액으로부터 프로테아제의 일차적인 정제를 위한 침전 조건을 70%의 암모늄 설페이트로 설정하고, 침전되어 얻어진 프로테아제의 고순도 정제를 위한 크로마토그래프를 수행하였다. 침전으로부터 얻어진 프로테아제 용액을 DEAE-Sepharose 컬럼의 단백질 결합을 최적화 하기 위하여 실험을 수행한 결과, pH 7.5–8.0에서는 pH 8.5 보다 낮은 단백질 결합을 나타내었다. pH 8.5에서 유속은 단백질 결합 정도에 영향을 미치지 않았다(data not shown). 따라서 DEAE-Sepharose의 로딩 조건을 pH 8.5, 유속 30 ml/h로 설정하였다.

DEAE-Sepharose에 결합된 프로테아제의 용출을 통하여 정제된 효소의 활성은 70–120 mM 농도의 NaCl을 이용하여 용출한 분획 8–13 사이에서 확인하였다(Fig. 2). 프로테아제의 활성이 가장 높은 분획은 분획 10이었으며, 분획 8에서 12까지의 용출액을 모아서 측정된 효소의 수율은 29%로 확인하였다. 분획정제된 프로테아제의 분자량은 대략 110 kDa로 확인되어졌다(Fig. 3).

*Janthinobacterium* sp.의 배양 상등액으로부터 프로테아제를 분리하기 위한 단계별 활성, 총 단백질양 및 정제 수율을 Table 1에 나타내었다.

극지와 같은 저온 환경에서 성장하는 미생물이 분비하는 프로테아제는 여러 산업 분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있다. 따라서 본 연구의 결과는 산업적 이용 가치가 높은 다양한 저온활성 효소의 정제와 그 활용에 효과적으로 이용될 수 있을 것이다.

## Acknowledgement

This research was supported by Golden Seed Project, Ministry of Oceans and Fisheries (213008-05-2-SB910).

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

1. Nichols D, Bowman J, Sanderson K, Nichols CM, Lewis T,

- McMeekin T, et al. 1999. Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 240-246.
2. Antranikian G, Egorova K. 2007. Extremophiles, a unique resource of biocatalysts for industrial biotechnology. pp. 361-406. In Gerday C, Glansdorff N (eds), Washington: ASM Press.
3. Huston AL. 2008. Biotechnological aspects of cold-adapted enzymes. pp. 347-363. In Margesin R, Schinner F (eds.), Berlin Heidelberg Springer.
4. Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP, Claverie P, Collins T, et al. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* **18**: 103-107.
5. Georlette D, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Hoyoux A, et al. 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 25-42.
6. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 597-635.
7. Kim DK, Park HJ, Lee YM, Hong SG, Lee HK, Yim JH. 2010. Screening for cold-active protease-producing bacteria from the culture collection of polar microorganisms and characterization of proteolytic activities. *Korean Soc. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 73-79.
8. Zhu HY, Tian Y, Hou YH, Wang TH. 2009. Purification and characterization of the cold-active alkaline protease from marine cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. *Mol. Biol. Rep.* **36**: 2169-2174.
9. Yang J, Li J, Mai Z, Tian X, Zhang S. 2013. Purification, characterization, and gene cloning of a cold-adapted thermolysin-like protease from *Halobacillus* sp. SCSIO 20089. *J. Biosci. Bioeng.* **115**: 628-632.
10. Secades P, Guijarro JA. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3969-3975.
11. Davail S, Feller G, Narinx E, Gerday C. 1994. Cold adaptation of proteins. Purification, characterization, and sequence of the heat-labile subtilisin from the antarctic psychrophile *Bacillus* TA41. *J. Biol. Chem.* **269**: 17448-17453.
12. Kim HD, Choi J. 2014. Effect of temperature on growth rate and protease activity of Antarctic microorganisms. *Korean Soc. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 293-296.
13. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.