

Streptomyces 屬菌이 生成하는 Metal Protease

제 1 보 : 菌의 分離 및 酵素學的 性質

이 등 희 · 유 춘 발*

경북 대학교, 농과 대학, 농화학과

*한국 사회 사업 대학, 병설 실업 전문 대학, 식품 공업과

(1979년 10월 5일 접수)

Metal Protease from *Streptomyces spp.*

I. Isolation of the Strain and the Enzymatic Properties

Dong Heui Yi and Choon Bal Yu*

Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University

*Department of Food Technology, Junior College, Korea Social Work College

(Received October 5, 1979)

Abstract

A *Streptomyces spp.* strain SY 79-1 which was capable of producing metal protease was isolated from soil. The optimal pH and temperature of the protease were around pH 8.0 and 45°C, respectively. The stable pH range of the enzyme was between pH 6.0 to 8.0. The enzyme was stable at 45°C, but it lost the activity about 75% for 5 min and completely for 30 min when it was treated at 60°C. The activity of the enzyme was inhibited by Hg²⁺, Cu²⁺, Ag⁺ and activated by Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, but Fe²⁺, Ca²⁺, Pb²⁺ and Al³⁺ did not affect enzyme activity.

This enzyme was strongly inhibited by EDTA, but was not inhibited by 2,4-DNP, *p*-CMB, ϵ -aminocaproic acid, cysteine, thiourea, citric acid, oxalic acid and sodium arsenate. When cobalt was added to the EDTA-denatured enzyme, the activity of the enzyme was restored.

서 론

푸로테아제(protease)는 오래 전부터 인간과 밀접한 관계를 가진 매우 중요한加水分解酵素인데 동식물, 미생물 기원의 푸로테아제에 관해서 많이 연구되어 왔고 현재 의약, 식품 제조, 피혁, 세제, 섬유, 사료, 양조, 사진 공업 등⁽¹⁻³⁾ 많은 분야에 걸쳐 이용되고 있는 실정이다.

푸로테아제는 그 活性과 기능의 면에서 분류한 Hartley 분류법⁽⁴⁾에 의하면 serine-푸로테아제, thioprotease, 금속 푸로테아제(metal protease), 산성 푸로테아

제등으로 나누며, 또한 그 작용 pH에 따라 산성, 중성, 알칼리성 푸로테아제로 나누어진다.

방사선균의 푸로테아제에 있어서는 그 대다수가 *Streptomyces* 속에서 얻어지고 있으며 그 중 *Streptomyces griseus*로부터 얻어진 푸로테아제^(5,6,7)는 식품 공업이나 消炎性 약품으로 많이 쓰여지고 있다. 저자등은 금속 푸로테아제에 관하여 실험하고 있던 중 토양에서 분리한 *Streptomyces* 속의 한 균주가 푸로테아제를 강하게 생산함을 알고 이 푸로테아제의 성질을 조사해 본 결과 금속 푸로테아제인 동시에 또 SH 효소임을 알게 되었으므로 보고 하고 저 하는 바이다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 경북 남부 지방의 토양으로부터 글루코오즈 1%, 펙톤 0.2% 조성의 배지(pH 7.0)를 사용하여 常法에 따라 분리 하였으며, 효소 생산은 글루코오즈 2%, 펙톤 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, NaCl 0.05%의 培地(pH 7.0)를 사용하여 500 ml 삼각 플라스크에 100 ml씩 넣어 30°C에서 7일간 정지 배양 하였다.

효소액의 조제

上記와 같이 배양한 배양 여액을 그대로 사용하거나 $(NH_4)_2SO_4$ 를 포화 시켜 생성된 침전을 용해시킨 후 4°C에서 2일간 투석한 液을 효소액으로 사용 하였다 (Fig. 1).

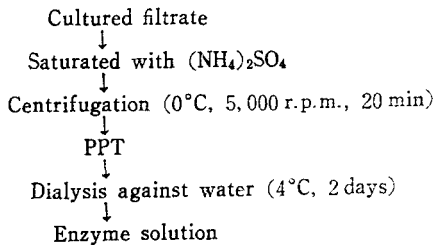


Fig. 1. The preparation of the enzyme solution

효소 활성도 측정

효소의 活性度는 Folin's 방법을 사용하여 측정 하였다. 즉 1% Hammarsten casein 0.3 ml, M/15 borate buffer (pH 8.0) 0.5 ml, 효소액 0.2 ml의 반응액을 45°C에서 30분간 반응 시킨 다음 0.44 M TCA 1 ml를 가해서 반응을 정지한 후 여과하여, 이 液 1 ml와 0.55 M Na_2CO_3 2.5 ml, Folin 시약(3배 희석) 0.5 ml로 잘 혼합한 후 45°C에서 30분간 발색시킨 뒤 660 nm에서 흡광도를 측정하여 對照區와의 差로서 산출해서 효소 활성도를 상대 효소 역가로 나타내었다.

균주 선별

위와 같은 효소 활성도 측정 방법으로 토양으로부터 분리한 *Streptomyces*屬 균주 중 푸로테아제를 강하게 분비하는 것을 1차 선별한 후, 이들 중에서 chelating agent인 EDTA에 의해서 강력하게 저해받는 균주인 SY 79-1을 최종 선별 하였다.

결과 및 고찰

최적 pH

本 酵素의 작용 최적 pH를 알아 보기 위해서 pH 5.0

~8.0에서는 McIlvaine 완충액(0.1 M citrate, 0.2 M $Na_2 HPO_4$)를 pH 8.0~10.0에서는 Clark and Lube 완충액(0.1 N NaOH, 0.1 N borate KCl)을 사용하여 조사해 본 結果 Fig. 2에서와 같이 pH 8.0 부근에서 가장 높은 活性을 나타내었다.

최적 온도

本 酵素 作用의 최적 온도를 검사하기 위하여 30°C에서 60°C까지 조사해 본 結果는 Fig. 3과 같다. 즉 45°C부근에서 가장 높은 活性을 나타내었다.

pH 안정성

本 酵素의 pH에 對한 安定性을 검사하기 위하여 1 N HCl과 NaOH로 pH를 조절한 후 45°C에서 30분간 처리한 酵素液을 중성 부근으로 재 조절하여 그 殘存 活性度를 測定한 結果 Fig. 4에서 보는 바와 같이 pH 6.0~8.0에서 비교적 안정했다.

熱에 對한 安定性

pH 7.0의 酵素液을 45, 50, 60°C에서 각각 60분간 열 처리 하면서 經時的으로 그 殘存 活性度를 測定해 본 結果 Fig. 5에서와 같이 45°C에서는 거의 안정했으며 50°C에서는 60분 처리로 약 20%가 失活 하였으며 60°C에서는 5분 처리로 약 75%, 30분 처리로 完全 失活하였다. 따라서 이 효소는 熱에 對해서 상당히 不安定함을 알 수 있었다.

금속 이온의 영향

본 효소의 作用에 對해서 여러가지 금속 이온들이 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 여러가지

Table 1. Effect of metal salts on the enzyme activity

Metal salts	Relative activity
None	100
FeSO ₄	92
MgSO ₄ ·7H ₂ O	114
CaCl ₂	102
HgCl ₂	13
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O	98
AgNO ₃	38
ZnCl ₂	76
PbAc ₂	109
MnCl ₂	114
NiSO ₄	76
CoCl ₂	120
CuSO ₄	26

The concentration of metal salts in the reaction mixture was 1 mM, and the activity not added was set at 100.

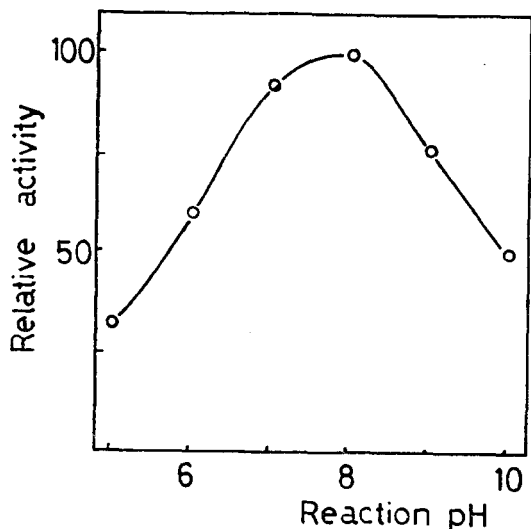


Fig. 2. The effect of pH on the enzyme activities
The enzyme activity was assayed under the standard assay conditions described in the text, except using McIlvaine buffers between pH 5.0 to 8.0 and Clark & Lube buffers between pH 8.0 to 10.0. The activity at pH 8.0 was assumed as 100

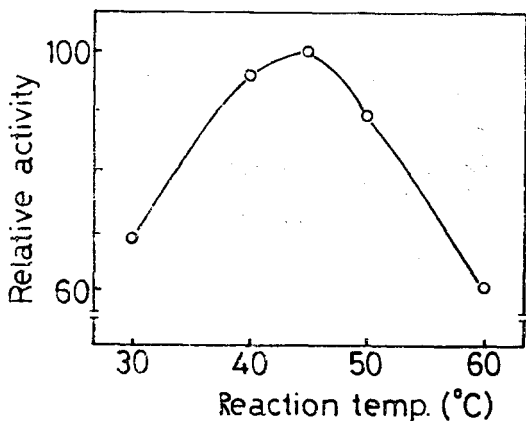


Fig. 3. The effect of temperature on the enzyme activities

Activities were assayed in 1/15 M borate buffer, pH 8.0 at temperature ranges between 30 to 60°C. The activity at 45°C was assumed at 100

금속 염을 반응액 중에 1 mM 농도가 되게 가한 후 효소 작용을 측정해 본 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 Fe[#], Pb[#], Ca[#], Al[#] 등은 별 영향을 미치지 못했으나 Hg[#], Ag⁺, Cu[#] 등은 강한, 그리고 Zn[#], Ni[#] 등은 약한 저해 작용을 나타내었고 Mg[#], Mn[#], Co[#] 등은 효소 작용을 증진시켰다. 이와 같은 사실은 Hayman 등의 금속

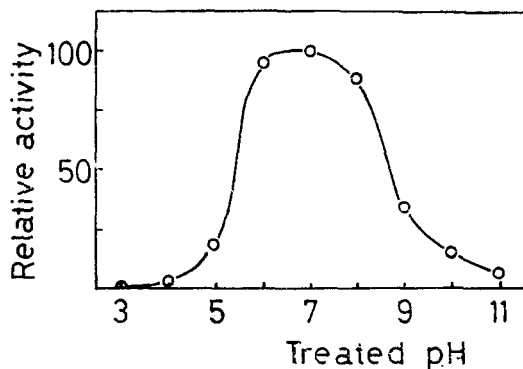


Fig. 4. pH stability of the enzyme preparation
The enzyme preparation was treated for 30 min at 45°C at various pH's. The remaining activities were measured at the standard assay conditions described in the text

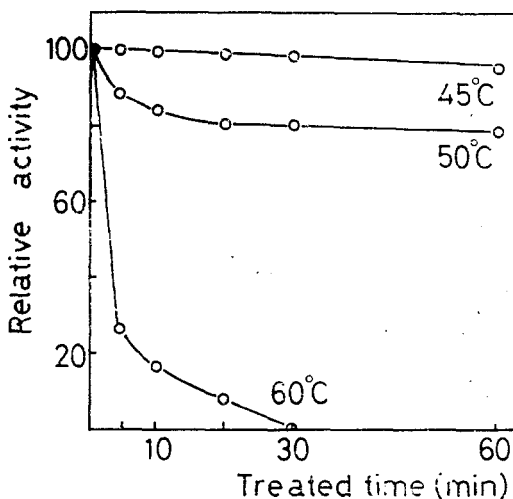


Fig. 5. Temperature stabilities of the enzyme preparation

The enzyme preparation was treated for various periods of time at 45, 50 and 60°C. The remaining activities were assayed at the standard assay conditions described in the text. The activity of the untreated enzyme was assumed as 100

酵素⁽⁹⁾가 Zn[#]에 의해서 강하게 저해되는 현상과는 다르며 Co[#]에 의해서 作用이 증진되는 현상과는 일치함을 보여준다. 그리고 금속 이온 중 SH기와 결합력을 가지는 Hg[#], Cu[#], Ag⁺ 등에 의해서 강하게 저해 작용을 받으므로 이 효소는 SH 酵素이라고 생각된다.

각종 阻害劑와 EDTA의 영향

本 酵素의 活性이 각종 阻害劑에 의해서 받는 영향을 알아보기 위해서 반응액중 1 mM 농도로 가해서 酵素 活性度를 측정해 본 결과 Table 2와 Fig. 6에서 보

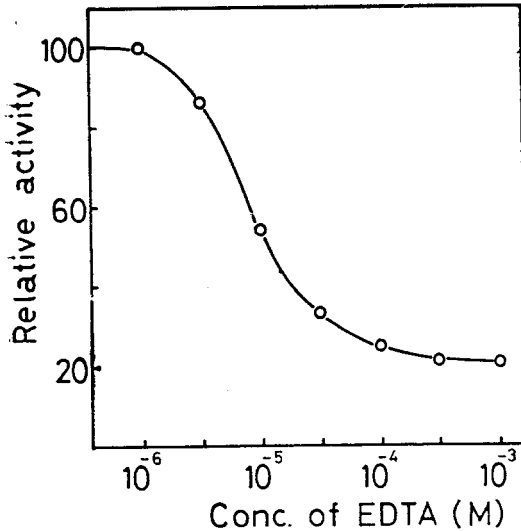


Fig. 6. The effects of various concentrations of EDTA on the enzyme activities

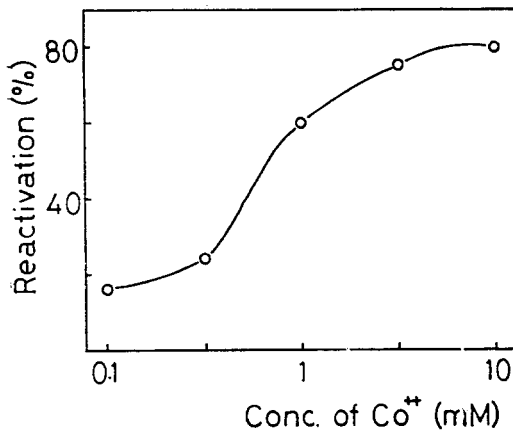


Fig. 7. The reactivation of EDTA-treated enzyme with cobalt

는 바와 같이 EDTA에 의해서 活性이 强하게 저해되었으며 EDTA 농도가 10⁻³ M일때 약 80 % 정도 沮害되었으며 10⁻⁶ M이하에서는 별로 영향이 없었다. 이와 같은 현상은 Seber등이 연구한 금속 효소⁽¹⁰⁾가 EDTA에 의해서 저해 작용을 받지 않는 사실과는 相異하며, Vosbeck등⁽¹¹⁾이나, Simmonds등⁽¹²⁾이 연구한 것과는 유사한 경향을 보여준다.

EDTA에 의해서 저해된 효소 활성의 부활

가. 금속 이온에 의한 효소 활성의 부활

EDTA 처리로 인해서 活性이 沮害된 효소에 금속 이온을 가하여 부활 되는 현상을 조사 함으로서 본 효소에 어떠한 금속이 관여 하는가를 알아 보기 위하여 2 mM EDTA 0.2 ml에 효소액 0.2 ml를 혼합하여 45°C에서 5

Table 2. The Effect of inhibitors on the enzyme

Inhibitor	Relative activity
None	100
2, 4-DNP	103
p-CMB	100
EDTA	20
ε-Amino caproic acid	102
Thiourea	104
Citrate	105
Oxalate	104
Cysteine	96
Na-arsenate	100

The concentration of inhibitor in the reaction mixture was 1 mM and the activity not added was set at 100

Table 3. Reactivation of EDTA-denatured enzyme with metal ion

Metal ion	Reactivation ratio*
Mg ⁺	2
Co ⁺	75
Mn ⁺	20

$$* \text{Reactivation ratio (\%)} = \frac{C-B}{A-B} \times 100$$

where A : no EDTA, no metal

B : add EDTA, no metal

C : add EDTA, add metal

Concentration of EDTA : 1 mM

Concentration of metal : 5 mM

분간 前處理시키고 여기에 15 mM 농도의 금속 이온 0.2 ml를 가하여 다시 45°C에서 5분간 처리한 후 완충액 (pH8.0) 0.8 ml와 1 % 카제인 0.6 ml를 가하여 30분간 반응시켜 효소 활성도를 측정하여 부활능을 對照區와의 差로 산출한 결과는 Table 3과 같다. 이때의 相對 活性度는 EDTA 처리를 하지 않고 금속 이온을 가하지 않았을 때의 활성을 100%로 한 것이다.

그 결과 사용한 금속 이온 중에서 Co⁺가 가장 강한 부활능을 가졌음을 알 수 있으며 금속이 효소 분자에 비교적 약하게 결합되어 있다고 생각된다.

그리고 Table 3에서 보는 바와 같이 금속 이온에 의한 효소의 부활은 Seber 등⁽¹⁰⁾이나 Vosbeck 등⁽¹¹⁾과 Simmonds 등⁽¹²⁾의 금속 효소와는 부활에 作用하는 금속 이온과의 관계에서 차이를 보여준다.

나. Co⁺에 의한 효소의 부활

앞에서 조사한 바와 같이 Co⁺가 EDTA로 변성된 효소의 活性을 가장 강하게 부활 시켰으므로 Co⁺로 0.1 mM

에서 10 mM 까지 농도 별로 사용하여 1 mM EDTA에 의해 변성된 효소의 부활능을 검토해 본 결과는 Fig. 7과 같다. 즉 Co²⁺농도가 1 mM일때 약 60%, 5 mM에서 약 75%, 10 mM 농도에서 약 80%의 부활율을 나타내었다.

要 約

토양에서 分離한 *Streptomyces* 속 中 금속을 함유하는 프로테아제를 强하게 分비하는 균주 SY 79-1을 選別하여 그 효소학적 성질 몇가지를 조사해 본 결과는 다음과 같다.

1. 본 효소의 최적 pH는 8.0 부근이며 최적 온도는 45°C였다.

2. 본 효소는 中性 附近에서는 비교적 安定하며 열 처리에 대해서는 45°C에서는 安定했으나 60°C에서는 5분간 처리로 약 75%, 30분간 처리로 完全히 失活하였다.

3. Hg²⁺, Ag⁺, Cu²⁺ 등에 依해서 强하게 阻害되고, Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ 등은 효소 활성을 증진 시켰으며, Fe²⁺, Ca²⁺, Pb²⁺, Al³⁺ 등에는 별 영향을 받지 않았다.

4. 각종 저해제 中 EDTA에 의해서는 强하게 저해되었으나, 2,4-DNP, *p*-CMB, ϵ -aminocaproic acid thiourea, Na-arsenate, cysteine, oxalate, 干연산에 의해서는 영향을 받지 않았으며, EDTA에 의해서

阻害된 酵素 活性은 Co²⁺에 의해서 부활되었다.

文 獻

1. Keay, L. : *Proc. Biochem.*, 4(8), 17 (1971)
2. 好井久雄 : 食品 工業, 8(下), 50 (1974)
3. Hashimoto, H. and Yokotsuka, T. : *J. Ferment. Technol.*, 51, 661 (1973)
4. Hartly, B. S. : *Ann. Rev. Biochem.*, 29, 459 (1960)
5. Duchi, T. : *Agr. Biol. Chem.*, 26, 723 (1962)
6. Simon, S. : *Acta. Microbiol. Acad. Sci.*, 3, 53 (1955)
7. 野本正雄 : 理研究報告, 35, 84(1959)
8. 赤堀四郎 編 : 酵素 研究法, 朝倉 書店, 第二卷, p. 240. (1965)
9. Hayman, S. and Patterson, E. K. : *J. Biol. Chem.*, 246, 660 (1971)
10. Seber, J. F., Toomey, T. P., Rowell, J. T., Brew, K. and Awad, W. M. : *J. Biol. Chem.*, 251, 204 (1976)
11. Vosbeck, K. D., Chow, K. and Awad, W. M. : *J. Biol. Chem.*, 248, 6029 (1973)
12. Simmonds, S. and Toye, N. O. : *J. Biol. Chem.*, 242, 2086 (1967)