

*Streptomyces alboniger*가 生産하는 Protease의 特性에 關한 研究

金 康 信 · 韓 康 完 · 金 炯 魯

全北大學校 農科大學 農化學科

(1984년 7월 15일 수리)

Studies on the Characterization of Protease Produced by *Streptomyces alboniger*

Kang-Shin Kim, Kang-Wan Han and Hyung-Rho Kim*

Dept. of Agricultural Chemistry, Dept. of Biochemistry, Chonbuk National
University, Chonju, Korea

Abstract

Some physico-chemical properties of proteolytic enzyme produced from *Streptomyces alboniger* Hesseltine were characterized.

The optimal pH and temperature of the enzyme were around pH 9.0 and 40°C, respectively. The enzyme was stable between pH 6.0~10.8 and the enzyme activity was not inactivated by heat treatment in lower temperature than 40°C. However the enzyme activity decreased by 70% of the initial activity for 10minutes at 70°C. The Km value was 7.1μM with Hammarsten casein and 333.3μM with cytochrom C. The activity of enzyme was inhibited by metal ions in the order of Fe⁺⁺⁺>Hg⁺⁺>Cu⁺⁺>Pb⁺⁺>Zn⁺⁺, whereas Ca⁺⁺ increased the enzyme activity. There was no effect of Mg⁺⁺ and Co⁺⁺ on the enzyme activity. The enzyme was inhibited by EDTA strongly. When Ca⁺⁺ was added to the EDTA-denaturated enzyme, the activity of enzyme was restored.

緒 論

放射線菌인 *Streptomyces*屬은 土壤 微生物로서 特히 여러종류의 抗生物質을 生産한다는 것이 잘 알려져 있으며¹⁾ 이런 抗生物質의 대부분은 細胞壁, 蛋白質 合成, 細胞膜 그리고 遺傳情報 傳達 등에 關여하는 酵素나 因子에 作用하는 것으로 알려져 있다.²⁾ 또한 微生物 細胞壁의 경우, 이 細胞壁 構造를 分解하는 酵素로서 *endoacetylmuramid-*

ases, endoacetylglucosamidases, acetylmuramyl-L-alanine amidases, intrapeptide hydrolases, 그리고 exopeptidases 등이 알려져 있다.^{3,4,5)}

*Streptomyces*屬中 *Streptomyces alboniger* Hesseltine은 protozoa나 gram-positive bacteria에 대한 抗生物質을 生産한다고 알려져 있으며,^{6,7)} 鄭等^{8,9)}은 *S. alboniger* 人蔘 根腐病原菌인 *Fusarium solani*의 生長에 높은 拮抗作用을 하는 것으로 보고한 바 있다.

따라서 本 研究에서는, *S. alboniger*가 *F. solani*

에 대해拮抗하는 要因으로서 *S. alboniger*가 生産하는 蛋白質 加水分解 酵素가 *F. solani*의 細胞壁 分解에 関여하는 것으로 推측하고, *S. alboniger*의 蛋白質 加水分解 酵素를 調製하여 먼저 그 理化學的 性質을 究明하였다.

계산하는 相對 酵素 活性度로서 나타내었다.

結果 및 考察

材料 및 方法

供試菌株

本 實驗에 使用한 菌株는 *S. alboniger*로서 韓 國 人蔘煙草研究所에서 純粹分離 同定한 것을 分讓받은 것이다.

供試菌株의 培養

培地로서는 2l의 증류수에 glucose 2%, peptone 0.5%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·5H₂O 0.05%가 되도록 調製한 合成培地(pH 7.0)를 5l 용량의 醱酵槽에 넣고 120°C에서 15분간 殺菌시킨 다음, 48시간 前培養시킨 40ml 培養液을 자외선 멸균상자에서 接種하고, 30°C 2기압에서 48시간 진탕배양하였다.

酵素液의 調製

上記의 培養液을 Whatman No. 1여지로 여과하고, (NH₄)₂SO₄로 沈澱시켰을 때 酵素 活性이 나타난 40%~75%의 fraction을 얻기위해 10,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 여기서 얻은 침전물은 10mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 녹이고 48시간 투석하여 酵素液으로 使用하였다.

酵素活性度 測定

酵素의 活性은 Anson과 Kunitz의 方法¹⁰⁾을 변경하여 測定하였다. 즉 반응액중에 0.5% Hamm-arsten casein, 100mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.0) 그리고 酵素液과 증류수를 넣어 전체 容량이 0.2ml 되게 하고 37°C 水槽에서 20분간 반응시킨 다음, 5% trichloroacetic acid 0.3 mL을 넣어 반응을 정지시키고, 5분간 沈澱하여 1,500×g에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액 0.2ml에 alkaline copper용액 1mL을 넣고 37°C 水槽에서 10분간 放置한 후, Folin시약 0.1ml을 넣고 상온에서 30분간 발색시킨 다음, 660nm에서의 吸光度를 測定하여 酵素 反應產物인 tyrosine과 tryptophan을 定量하였다.¹¹⁾ 酵素 活性度로는 最大 酵素 活性을 對照區로 하고 各各을 百分率로

作用最適 pH

酵素 活性에 미치는 pH의 影響을 觀察하기 위하여 완충액으로서 pH 8.0~9.0의 100mM tris-HCl buffer, pH 9.0~10.5의 100mM carbonate-bicarbonate buffer를 使用하여 pH 0.5 간격으로 酵素 活性을 測定하였다. 그 結果, 그림 2와같이 本 酵素의 作用 最適 pH는 9.0부근으로 alkali측에서 높은 活性을 보였다. 이와같은 사실은 Tobe 등¹²⁾이 보고한 *Candida lipolytica*의 作用 最適 pH와 일치하는 경향을 보였으나 金 등,¹³⁾ 李 등¹⁴⁾ 그리고 Nakanishi等¹⁵⁾이 보고한 *Streptomyces* sp.의 作用 最適 pH는 각각 7.0, 8.0, 12.3으로 本

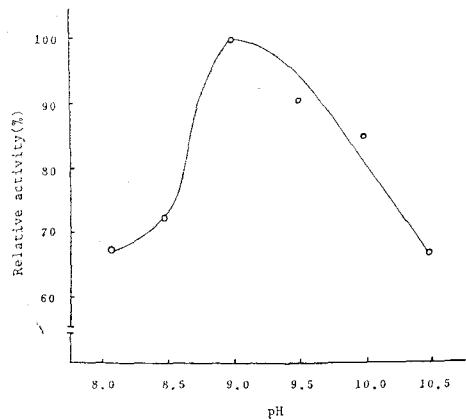


Fig. 1 Activity of enzyme at different pH values.

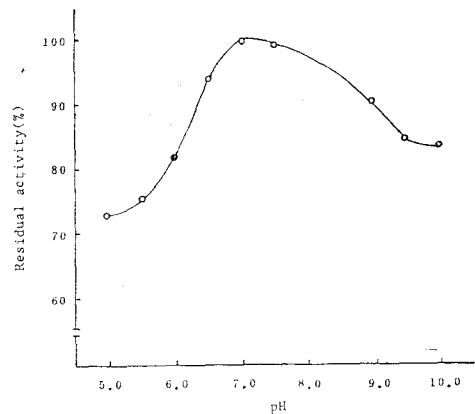


Fig. 2 Stability of enzyme at different pH values.

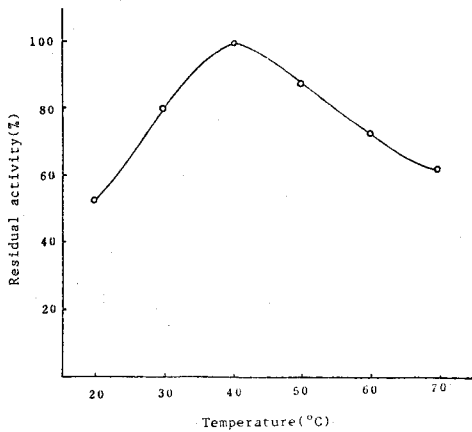


Fig. 3 Activity of enzyme at different temperatures.

酵素의 特性과는 차이를 보여주었다.

pH 安定性

本 酵素의 pH에 대한 安定性を 觀察하기 위하여 완충액으로서 pH 5.0~7.5의 50mM citrate-sodium phosphate buffer, pH 7.5~9.0의 50mM tris-HCl buffer 그리고 pH 9.0~10.5의 50mM carbonate-bicarbonate buffer를 使用하였다. 즉 上記의 완충액과 효소액을 混合하여 37°C에서 1시간 放置한 다음, 그 殘存 活性을 測定하였다. 그 結果, 그림 3과같이 本 酵素는 中性부근에서 가장 安定하였고 pH 6.0~10.8까지 그 殘存 活性이 80% 이상이었다. 이와같은 사실은 金等¹³⁾과 李等¹⁴⁾이 보고한 *Streptomyces* sp.의 安定 pH 범위 가 각각 pH 6.0~7.0, 6.0~8.0인 것에 비하여

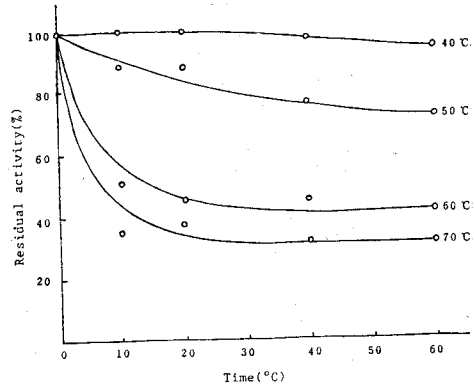
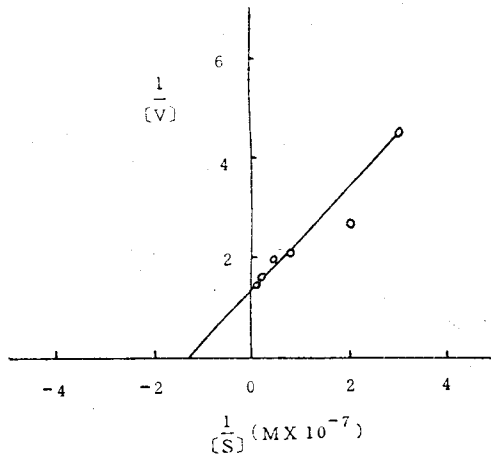


Fig. 4 Stability of enzyme at different temperatures.

넓은 安定 pH 범위를 가졌다고 할 수 있으며 Vobseck等¹⁶⁾이 보고한 *Streptomyces griseus* K-1의 性質과는 비슷한 경향을 보여주었다.

作用 最適 溫度

酵素 活性에 미치는 溫度의 影響을 觀察하기 위하여 20~70°C까지 10°C 간격으로 酵素活性을 測定하였다. 그 結果, 그림 4와같이 本 酵素의 作用 最適 溫度는 40°C 부근이었다. 이와같은 사실은 Tobe等¹⁷⁾이 보고한 *Bacillus* sp.와 金等¹⁸⁾이 보고한 *Monascus* sp. 그리고 Nakanishii¹⁵⁾이 보고한 *Streptomyces* sp.의 作用 最適 溫度가 각각 60°C, 50°C, 60°C인 것에 비하여 큰 차이를 보여 주었으며 金等¹³⁾, 李等¹⁴⁾이 보고한 *Streptomyces* sp.의 作用 最適 溫度가 각각 45°C, 37°C인 것과는 비슷한 경향을 보여주었다.

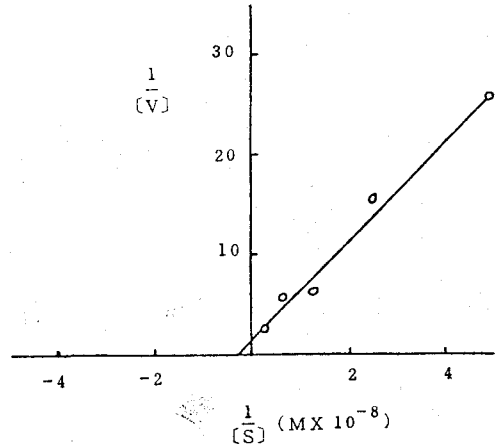


Fig. 5 Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of Hammarsten casein(left) and cytochrom C (right) by protease.

熱에 대한 安定性

本 酵素의 熱에 대한 安定性을 觀察하기 위하여 40~70°C까지 10°C간격으로 10분, 20분, 40분, 60분간 熱處理하였다가 急冷시켜 그 殘存 活性을 測定하였다. 그 結果, 그림 5와같이 本 酵素는 40°C에서 60분간 熱處理로 거의 변화가 없었으나 50°C에서는 60분간 熱處理로 약 30%정도 감소하였다. 또 60°C, 70°C에서는 10분 處理로 각각 50%, 70%정도 감소하였다. 그런데 60°C, 70°C에서 10분과 60분 處理時를 비교하여 볼 때, 10분 處理時에는 酵素 活性의 급격한 低下를 볼 수 있으나 60분 處理하여도 그 이상의 酵素 活性의 차이가 거의 없음을 볼 수 있다. 이것은 本 酵素에 熱에 대한 性質이 서로 다른 isoenzyme이 存在할 可能性을 示唆하는 것이라 할 수 있다.

基質 特異性

基質 蛋白質로서 Hammarsten casein, cytochrom C, hemoglobin, bovine serum albumin(BSA)을 使用하여 基質 特異性을 調査하여 본 結果, 표 1과 같다. 또 그중에서도 높은 活性을 보여주는

Table 1 Substrate specificity of protease.

Substrate	Relative activity(%)
Casein	100
Cytochrom C	56
Hemoglobin	50
BSA	29

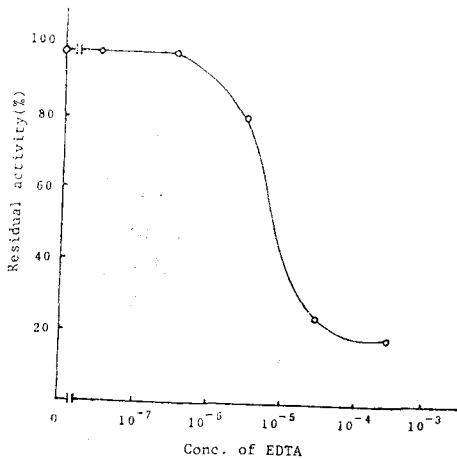


Fig. 6. Activity of enzyme at different conc. of EDTA.

Hammarsten casein(MW 8,700)과 cytochrom C (MW 12,384)에 대한 本 酵素의 Michaelis 정수 (Km)를 '하였다. 즉 Hammarsten casein의 2.9 μM, 5.8 μM, 11.5 μM, 23.0 μM, 46.0 μM 69.0 μM과 cytochrom C의 20.2 μM, 40.4 μM, 80.7 μM, 161.5 μM, 323.0 μM에서의 初期反應速度를 구하여 Lineweaver-Burx 작도로서 Km值를 계산하였다. 그 結果, 그림 6에서 나타난 바와 같이 casein과 cytochrom C에 대한 Km值는 각각 7.1 μM, 333.3 μM이었다. 따라서 casein이 cytochrom C보다는 本 酵素와의 親和性이 크다고 할 수 있다.

金屬 이온의 影響

金屬 이온이 本 酵素의 活性에 미치는 影響을 觀察하기 위하여 여러가지 金屬鹽을 使用하여 調査하였다. 즉 金屬鹽과 酵素液을 混合하여 반응액 중의 金屬 이온의 농도가 5mM이 되게 하고 37°C 水槽에서 1시간 放置하였다가 急冷시켜 그 酵素 活性을 測定하였다. 그 結果, 표 2에서 보는 바와 같이 Fe⁺⁺⁺>Hg⁺⁺>Cu⁺⁺>Pb⁺⁺>Zn⁺⁺순서로 酵素 活性이 阻害되었으며 Ca⁺⁺는 活性을 증진시켰다. 그러나 Mg⁺⁺와 Co⁺⁺는 별다른 影響을 미치지 못하였다. 이와같은 사실은 李 等¹⁴⁾이 研究한 *Streptomyces* sp.의 金屬 酵素가 Hg⁺⁺와 Cu⁺⁺에 의하여 강하게 阻害된다는 것과 일치하였으나 Co⁺⁺에 의하여 酵素活性이 증진된다는 보고와는 차이를 보여주었다. 또 Simonds等¹⁵⁾이 研究한 *Escherichia coli* K-12의 金屬 酵素가 Zn⁺⁺에 의하여 강하게 阻害된다는 보고와 다르고 Vosbeck等¹⁶⁾이 研究한 *Streptomyces griseus* K-1이 Ca⁺⁺에 의하여 酵素 活性이 증대된다는 보고와 비슷하였다.

Table 2 Activity of enzyme at different metal salts.

Metal salts	Relative activity(%)
None	100
CaCl ₂ ·2H ₂ O	129
CoCl ₂ ·6H ₂ O	99
MgSO ₄	96
ZnCl ₂	61
Pb(AC) ₃ ·3H ₂ O	53
CuSO ₄ ·5H ₂ O	36
HgCl ₃	33
FeCl ₃ ·6H ₂ O	8

Table 3. Activity of enzyme at different inhibitors.

Inhibitor	Relative activity(%)
None	100
PHMB	87
PMSF	87
EDTA	15

The final concentration of inhibitor in the reaction mixture was about 5mM.

阻害劑의 影響

P-hydroxymercuribenzoate(PHMB), phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF), ethylenediaminetetraacetate(EDTA) 등의 阻害劑가 本 酵素의 活性에 미치는 影響을 觀察하였다. 즉 阻害劑와 酵素液을 混合하여 反應액중의 阻害劑의 濃도가 5mM 이 되게 하고 37°C 水槽에서 1시간 放置하였다가 急冷시켜 酵素 活性을 測定한 結果, 표 3과 같다. SH group을 阻害하는 PHMB에 의하여는 별 影響을 받지 않았으므로 本 酵素가 SH 酵素라고 단정할 수는 없을 것이다. 한편 alkaline protease에 있어서 active site로 作用하는 OH group을 阻害하는 PMSF에 의하여 影響을 받지 않았으며 金屬 이온과 chelate 化合物을 만드는 EDTA에 의하여는 강하게 阻害되었다. 이와같이 本 酵素가 alkali 測에서 높은 活性을 보이면서 EDTA에 의하여 강하게 阻害되는 사실은 Vosbeck等¹⁶⁾이 보고한 *S. griseus* K-1의 性質과 비슷하였다.

EDTA의 影響

本 酵素가 EDTA에 의하여 강하게 阻害를 받았으므로 EDTA를 濃도별로 使用하여 그 미치는 影響을 觀察하였다. 즉 EDTA와 酵素液을 混合하여 反應액 중의 EDTA 濃도가 각각 $5 \times 10^{-7}M$, $5 \times 10^{-6}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $5 \times 10^{-4}M$, $5 \times 10^{-3}M$ 되게 하고 37°C에서 1시간 放置한 후 酵素 活性을 測定하였다. 그 結果, 그림 7에서 보는 바와같이 EDTA $5 \times 10^{-3}M$ 에서는 酵素 活性이 약 70% 감소하였고 $5 \times 10^{-6}M$ 이하에서는 별 影響을 받지 않았다.

阻害된 酵素 活性의 復活

EDTA處理로 인하여 活性이 阻害된 酵素에 金屬 이온을 첨가함으로써, 金屬 이온이 阻害된 酵素 活性의 復活에 미치는 影響을 觀察하였다. 즉

Table 4. Reactivation of EDTA-denatured enzyme with metal ion.

Metal ion	Reactivation ratio(%)
Ca ⁺⁺	71
Co ⁺⁺	54
Mg ⁺⁺	27
Zn ⁺⁺	21

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

where A : No EDTA, No metal
 B : Add EDTA, No metal
 C : Add EDTA, Add metal

Final conc. of EDTA : 0.5mM

Final conc. of metal : 3mM

1mM EDTA 溶液 30 μ l와 酵素液 30 μ l를 混合하여 4°C에서 30분간 前處理시키고 나서 10mM 金屬 溶液 30 μ L를 첨가하여 다시 4°C에서 30분간 處理한 다음, 酵素의 復活能을 測定하였다. 이때 相對 活性도는 EDTA를 處理하지 않고 金屬 이온도 加하지 않았을 때의 活性을 100으로 하여 표 3과 같이 계산하였다. 따라서 Ca⁺⁺이 本 酵素의 復活에 크게 關여하며 Co⁺⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺⁺도 부분적으로 關여함을 볼 수 있다. 이와같은 사실은 Simonds等¹⁹⁾이 研究한 *E. coli* K-12의 酵素가 Co⁺⁺와 Mn⁺에 의하여 復活된다는 보고와는 차이를 보였으나 Vosbeck等¹⁶⁾이 研究한 *Streptomyces griseus* K-1의 酵素가 Ca⁺⁺에 의하여 復活된다는 보고와는 비슷하였다.

要 約

Streptomyces alboniger Hesseltin이 生産하는 蛋白質 加水分解 酵素의 몇가지 理化學的 性質을 究明하여 본 結果, 다음과 같다.

本 酵素의 作用 最適 pH와 作用 最適 溫度는 각각 pH 9.0과 40°C 부근이었다. 本 酵素의 安定 pH 범위는 pH 6.0~10.8 부근이었으며, 熱處理에 대하여 40°C 以下에서 安定하였으나 70°C에서는 10分 處理로 처음 酵素 活性의 70%가 감소하였다.

本 酵素는 Hammarsten casein과 cytochrom C에 대한 Km值가 각각 7.1 μ M과 333.3 μ M이었다. 酵素의 活性은 金屬 이온에 대하여 Fe⁺⁺⁺>Hg⁺⁺>Cu⁺⁺>Pb⁺⁺>Zn⁺⁺의 순서로 阻害되었고 Ca⁺⁺에 의하여 酵素 活性이 증가된 반면, Mg⁺⁺과 Co⁺⁺

에 의해서는 별 다른 影響을 받지 않았다. 또한 酵素는 EDTA에 의하여 강하게 阻害되었으며, EDTA에 의해 변성된 酵素에 Ca^{++} 을 첨가할 경우 酵素活性이 復活되었다.

引 用 文 獻

1. Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N. R.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed., p.744. The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1957).
2. 정희영 : 大韓生化學會雜誌, 5 : 9(1973).
3. Ghuyse, J.M., Tipper, D.J. and Strominger, J.L.: In "Methods in Enzymology", eds. by E.F. Neufeld, and V. Ginsburg, Vol. 8, p. 685. Academic Press, New York (1966).
4. Tsujisaka, Y., Tominaga, Y. and Iwai, M.: Agr. Biol. Chem., 37 : 2517(1973).
5. Tominaga, Y. and Tsujisaka, Y.: Agr. Biol. Chem., 40 : 2325(1976).
6. Abou-Zeid, A.A., Shaheen, A.B. and El-Dewany, A.I.: J. Appl. Chem. Biotechnol., 23 : 837(1973).
7. Shaheen, A.B. et al.: J. Appl. Chem. Biotechnol., 26 : 225(1976).
8. 鄭永倫·吳承煥 : 人蔘研究報告書, 56(1980).
9. 鄭永倫·鄭厚燮·吳承煥 : 韓國微生物學會誌, 20 : 73(1982).
10. Rick, W.: In "Methods of Enzymatic Analysis", 2nd ed. by H.U. Bergmeyer, Vol. 2. p.1013. Academic Press, New York(1974).
11. Layne, E.: In "Methods in Enzymology" eds. by S.P. Colowick and N.O. Kalan, Vol. 3, p. 449. Academic Press, New York(1957)
12. Tobe, S., Takami, T., Ikeda, S. and Mitsugi, K.: Agr. Biol. Chem., 40 : 1087(1976).
13. 김광현·서정훈 : 韓國産業微生物學會誌, 2 : 13(1974).
14. 이동희·유춘발 : 韓國食品科學會誌, 12 : 13(1980).
15. Nakanishi, T., Matsumura, Y., Minamiura, N. and Yamamoto, T.: Agr. Biol. Chem., 38 : 37(1974).
16. Vosbeck, K.D., Chow, K.F. and Awad, W. M.: J. Biol. Chem., 248 : 6029(1973).
17. Tobe, S., Takami, T., Hirose, Y. and Mitsugi, K.: Agr. Biol. Chem., 39 : 1749(1975)
18. 김상달·서정훈 : 韓國農化學會誌, 15 : 27(1972).
19. Simonds, S. and Toyne, N.O.: J. Biol. Chem., 242 : 2086(1967).