

*Bacillus subtilis*가 생산하는 Alkaline Protease에 관한 연구

장신재 · 김윤숙 · 성하진* · 최용진* · 양한철
고려대학교 식품공학과, *고려대학교 유전공학과

A Study on the Alkaline Protease Produced from *Bacillus subtilis*

Shin-Jae Chang, Yoon-Sook Kim, Ha-Chin Sung,* Yong-Jin Choi,* Han-Chul Yang

Department of Food Technology, *Department of Genetic Engineering
Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract

The alkaline protease producing bacteria isolated from soil and identified as *Bacillus subtilis*. The optimum medium for alkaline protease production from the microorganism was as follows; soluble starch, 1.5% ; proteose peptone, 0.5% ; $K_2 HPO_4$, 0.1% ; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.02% and sodium carbonate, 1.0%. The optimum temperature for alkaline protease production was 35°C, and the initial pH of medium was pH 10.5. The alkaline protease activity was about 2,300 U per ml of culture broth by Casein-Folin Method. A 9.2 fold purification of alkaline protease was obtained from culture broth. The recovery was 14% and purified enzyme was identified as single band, and its molecular weight was about 19,000. The optimum temperature for enzyme reaction was 70°C, and optimum pH was 12. The activity of purified enzyme was inhibited by metal ion (Fe^{2+}), and Phenylmethylsulfonyl Fluoride, a serine protease inhibitor.

서 론

Prease는 조미료 제조, 식육연화 및 맥주, 청주의 혼탁 방지 등의 식품공업, 소화제, 소염진통제 등 제약공업, 피혁공업, 세제공업 등 각 분야에 걸쳐 광범위하게 이용되고 있으며,^{1,2)} 이 중 alkaline protease는 O. Röhm³⁾이 의류의 단백질 오염물을 제거하기 위해 protease가 함유된 책장의 추출물을 이용한 이후 많은 연구가 계속되어 왔다. 1960년대 이후 alkaline protease가 세계에 첨가되어 효소제제로서 시판되기 시작하면서 생산량이 급증하여 현재 단일효소로서는 세계최대의 생산량을 기록하고 있다.⁴⁾

대부분의 효소들은 산성이나 중성의 온화한 조건하에서 활성을 나타내는 것이 보통이며, 알칼리 영역에서 활용되는 효소들은 극히 제한되어 있는 상태에 있다.⁵⁾ 그러나 Horikoshi^{6,7)} 등은 알칼리 영역에서 활성을 갖는 일련의 효소에 대한 연구를 진행한 바 있다. 이러한 알칼리 영역에서 활성을 갖는 효소들은 새로운 영역에서의 효소 이용 가능성을 높여준다는 점에서 앞으로 계속적인 연구가 진행되어야 한다.

이에 본 연구에서는 공업적으로 광범위하게 이용되고 있는 protease 중 알칼리 영역에서 최적의 활성을 갖는 alkaline protease에 대한 연구의 일환으로, 토양으로부터 alkaline protease 생산능이 우수한 균주를 분리, 동정한 후 효소생산 최적 조건을 설정하였으며 이를 토대로 정제를 실시하여 효소특성을 검토하였다.

1988년 9월 2일 수리

Corresponding Author: H.C. Sung

재료 및 방법

결과 및 고찰

기본배지

분리용 배지로서 Horikoshi⁷⁾ 등이 보고한 alkaline protease 생산 배지를 수정하여 사용하였다. Soluble starch 0.2%, Casein 0.5%, Yeast extract 0.05%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, Na₂CO₃ 1.0%의 조성으로, Na₂CO₃는 별도 살균하여 배지에 첨가하였다.

Alkaline Protease 생산균의 분리

위의 배지에 전구 각지의 토양시료액을 평판도 말하여, 열안정성이 우수한 효소를 얻기위해 50°C에서 배양한 후, 배지중의 casein을 분해하여 투명환을 형성하는 colony를 선별하였다. 선별 colony를 액체배양하여 효소활성을 측정, 생산량이 우수한 균주를 최종 선별하였다.

균주 동정

분리균의 동정은 미생물의 분류와 동정⁸⁾, Bergy's manual of Determinative Bacteriology⁹⁾, Bergy's manual of Systematic Bacteriology¹⁰⁾ 등의 일반세균 동정법에 따라 실시하였다.

효소활성 측정

효소활성은 casein-Folin 법¹¹⁾에 따라 측정하였다. 활성단위는 조효소 혹은 정제효소 1ml이 1분간 1μg에 상당하는 tyrosine을 생성하는 능력을 1 unit로 하였다.

단백질의 정량

Lowry¹²⁾ 등의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 단백질량을 측정하였다.

전기 영동

Reisfeld¹³⁾ 등의 방법에 따라 cathodic disc-polyacrylamide gel electrophoresis를 실시하였다.

분자량 측정

Sephadex G-75(1.1×58cm)를 이용한 Gel filtration을 실시하였으며, 표준단백질로 Ribonuclease A(M.W. 13,700), Ovalbumin(M.W. 43,000)과 Albumin(M.W. 67,000)을 사용하였다.

토양분리균의 특성

Alkaline Protease 생산균주의 형태적 특징은 간균이며, 포자를 형성하고, 호기성, Gram 양성, 2×0.5μm의 크기를 가지며 Table 1과 같은 생화학적 특성을 가지고 있었다. 이 같은 결과는 *Bacillus* sp. 중 *Bacillus subtilis*의 미생물학적 특성과 거의 일치하므로 본 균은 *Bacillus subtilis*로 동정

Table 1. Morphological, cultural and biochemical characteristics of Strain No. 19.

1. Morphological properties		
1. Type and size	Rod, 2~2.5×0.5~0.6μm	
2. Gram staining	Positive	
3. Spore staining	elliptical, central	
4. Motility	Active	
5. Colonies on agar media	Irregular, surface dull	
2. Cultural properties		
	pH 7	pH 10.5
1. Nutrient broth	±	++
2. Glucose-nutrient broth	±	++
3. Potato	±	++
4. Basal media	+	++
3. Biochemical properties		
1. Catalase test	Positive	
2. Growth on anaerobic agar	No growth	
3. Voges-Proskauer test	Positive	
4. Acid formation from		
Glucose	Positive	
Arabinose		
Xylose		
Mannitol		
5. Hydrolysis of		
Casein	Positive	
Gelatin		
Starch		
6. Citrate utilization	Utilized	
7. Propionate utilization	Negative	
8. Nitrate reduction	Positive	
9. Indol Production	Negative	
10. Growth in NaCl	10% NaCl grow well	
11. pH for growth	6.8 to 12.5	

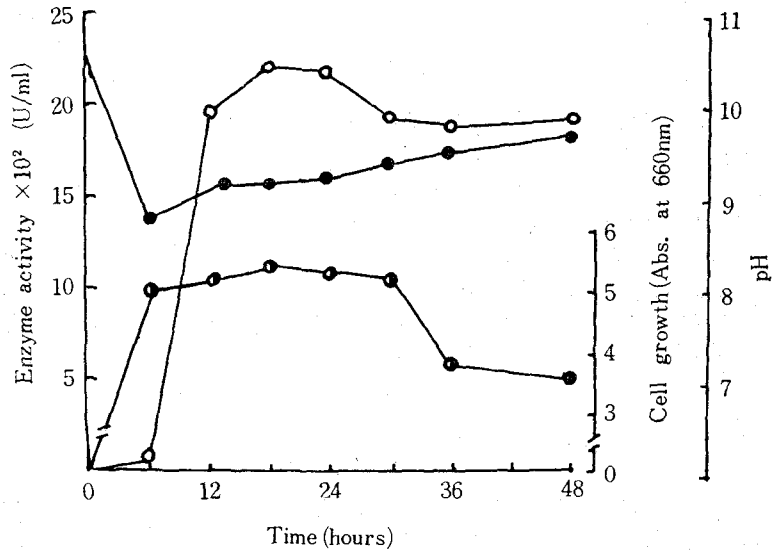


Fig. 1. Changes of enzyme activity, pH of medium, and cell growth during fermentation

- Protease activity (U/ml)
- Cell growth (Abs. at 660nm)
- pH

되었다.

배양시간에 따른 효소활성 배지 pH 균체량의 변화

최적의 배양조건과 배지조건하에서, 균체량은 배양 12시간 후 최대를 나타내었으며 이후 서서히 감소하였다. 배지 pH는 균체증식이 가장 왕성한 시기인 배양시작 6시간 후에 pH 8.8까지 급격히 감소하였으며 이후 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. 효소활성은 균체량이 서서히 감소하는 18~24시간에서 최대로 나타남으로서 같은 *Bacillus* sp.인 Horikoshi의 경우에 비해 배양시간이 짧은 잇점을 가진다(Fig. 1).

효소의 정제

배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 후 ammonium sulfate fractionation (25~55%)하여 이를 DEAE-cellulose column chromatography, CM-Sephadex C-25 column chromatography, Sephadex G-100 및 Sephadex G-75 Gel filtration에 의

해 정제하였으며, 정제중의 모든 과정은 4°C에서 실시하였다. Table 2에서와 같이 최종수율은 14%였으며, 정제배수는 9.2로 증가하였고, 비활성은 7,073μ/mg이었다.

반응 최적 pH

기질 pH 변화에 따른 정제효소의 활성도는 기질과 효소액 pH를 각각 7~12.5로 조절하여 측정하였다. 이 결과 본 효소는 pH 12에서 최적활성을 가지는 것으로 나타남으로서 기존효소보다 알칼리 영역에서의 활용성이 우수함을 보였다.

pH에 대한 안정성

pH 4~12.5의 완충용액에 효소를 희석한 후 30°C, 24시간 보관한 결과 pH 6~12 사이에서 거의 100%의 활성을 유지하여 넓은 pH 안정성을 나타내었다.

온도에 대한 안정성

40°C~80°C에서 15분간 열처리한 후 잔존 효소

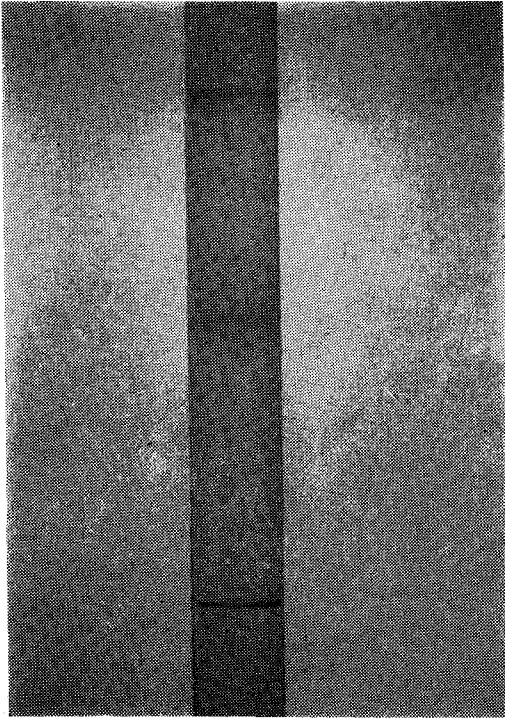


Fig. 2. Disc electrophoretic pattern of purified alkaline protease of *Bacillus Subtilis* in polyacrylamide gels of pH 4.3. The protein was stained with coomassie brilliant blue R 250

활성을 측정 한 결과 50°C까지는 거의 100% 활성을 유지하였으나, 70°C에서는 약 50%의 활성이 유지되었다.

반응 최적 온도

30°C~80°C의 온도에서 정제효소를 10분간 반응시켜 효소활성을 측정 한 결과 70°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

금속이온의 효과

정제효소의 활성에 미치는 금속이온들의 영향을 검토한 결과, Fe⁺에 의해 활성이 저해되었으며, 그 외의 금속이온에 대해서는 저해 받지 않았다 (Table 3).

이는 K. Mizusawa¹⁶⁾가 정제한 protease가 Fe⁺에 의해 활성이 증진되는 것과 상반된 결과이나 Hg⁺에 의한 활성저해는 동일한 결과를 보이고 있다. 이와 같은 결과는 J. Yagi¹⁵⁾가 *Cephalosporium* sp.에서 정제한 효소와는 거의 같은 결과이다.

Table 3. Effect of various metal ions on the purified alkaline protease activity

Ion	Metal	Residual activity(%)	
		1 mM	5 mM
None		100	100
Na ⁺	NaCl	98	100
K ⁺	KCl	108	90
Ca ⁺	CaCl ₂	106	98
Mg ⁺	MgCl ₂	108	104
Ba ⁺	BaCl ₂ ·2H ₂ O	104	98
Co ⁺	CoCl ₂ ·6H ₂ O	100	96
Zn ⁺	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	112	88
Fe ⁺	FeSO ₄ ·7H ₂ O	21	18
Cu ⁺	CuCl ₂ ·2H ₂ O	110	100
Hg ⁺	HgCl ₂	64	23

0.4ml of purified enzyme solution(30μg/ml) in 0.02 M Phosphate buffer(pH 7.3) was mixed with 0.1ml of metal solution(1mM and 5mM), and incubated for 10 minutes at 30°C. 3.0ml of substrate was added and incubated for 10 minutes

Table 4. Effect of various inhibitors on the purified alkaline protease activity

Reagent	Residual activity(%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100
PCMB	100	100
EDTA	98	105
Sodium citrate	105	105
Sodium Oxalate	111	106
Sodium tripolyphosphate	111	104
Sodium laurylsulfate	106	59
PMSF	96	0

0.4ml of enzyme solution(30μg/ml) in 0.02M Phosphate buffer (pH 7.3) was mixed with 0.1ml of inhibitor solution(1mM and 5mM), and incubated for 10 minutes at 30°C. 3.0ml of substrate was added and incubated for 10 minutes

각종 저해제의 영향

정제효소에 대한 저해제의 영향을 검토한 결과, sulfhydryl group의 저해제인 PCMB, metal chelating제인 EDTA, sodium citrate와 sodium oxalate에는 전혀 저해받지 않았으나, serine protease inhibitor인 PMSF(Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride)에 의해 강하게 저해받음으로서 본 효소

는 활성부위의 구성아미노산으로 serine을 갖는 serine protease로 나타났다(Table 4).

분자량의 측정

분자량 13,700~67,000의 표준단백질을 대조로 분자량을 측정 한 결과 약 19,000의 분자량을 나타 내었다.

이는 subtilisin BPN의 분자량 27,700, Hori-koshi의 *Bacillus* sp.에서 정제한 효소의 분자량 30,000 보다 적은 값이나 *Streptomyces* sp.¹⁴⁾에서 정제한 효소와는 거의 유사하다.

초 록

토양에서 분리된 Alkaline Protease 생산균주는 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. 본 균주의 최적배 양온도는 최적 배지조건에서 35°C이며, 초기 배지 pH는 10.5였다. 효소역가는 Casein-Folin 법으로 약 2,300 Unit/ml로 나타났다. 배양액에 일련의 정제과정을 실시한 결과 정제배수 9.2, 회수율 14 %의 정제효소를 얻었으며, 분자량은 19,000이었다. 정제효소의 반응최적온도는 70°C, 최적 pH는 12였다. Fe²⁺에 의해 활성이 저하되었으며, 또한 serine protease inhibitor인 PMSF에 의해 활성이 저해되었다. 이것으로 부터 본 효소는 활성부위에 serine을 갖는 serine protease의 일종임을 알 수 있었다.

사 의

본 연구는 학술진흥재단의 86년도 자유공모과제 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. 檜垣寅雄: 酵素利用技術の新展開, CMC Co.,

Tokyo(1985)

2. Godfrey, T. and Reichelt, J.: Industrial Enzymology-the application of enzymes in industry, The Nature Press(1983)

3. Röhm, O.: GP 283923(1913)

4. 鶴大典: 科學と工業, 43(1969)

5. Horikoshi, K.: Agr. Biol. Chem., 35 : 1783 (1971)

6. Horikoshi, K.: Arg. Biol. Chem., 36 : 285 (1972)

7. Horikoshi, K.: Arg. Biol. Chem., 35 : 1407 (1971)

8. 長谷川武治: 微生物の分類と同定, 學會出版, Center(1985)

9. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.: Bergey's manual of Determinative Bacteriology 8th Ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974)

10. Krieg, N.R. and Holt, J.G.: Bergey's manual of Systematic bacteriology, Williams and Wilkins Co., Baltimore(1984)

11. 萩原文二: 酵素研究法, 2 : 240(1956)

12. Lowry, O.H. and Rosebrough, N.J.: J. Biol. Chem., 193 : 265(1951)

13. Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. and Williams, D.E.: Nature 195 : 281(1962)

14. Mizusawa, K. and Yoshida, F.: J. of Biol. Chem., 248 : 4417(1973)

15. Yagi, J., Yano, T., Jomon, K., Sakai, H. and Ajilsaka, M.: J. Ferment. Technol., 50 : 810(1972)

16. Mizusawa, K., Ichishima, E. and Yoshida, F.: Agr. Biol. Chem., 28 : 884(1964)