

## ***Streptomyces* sp. YSA-130 이 생산하는 Alkaline Protease 의 정제 및 특성**

윤성우·이강표·유주현·신철수·오두환\*

연세대학교 공과대학 식품공학과

### **Purification and Properties of Alkaline Protease from *Streptomyces* sp. YSA-130**

Yun, Sung-Woo, Kang-Pyo Lee, Ju-Hyun Yu, Chul-Soo Shin and Doo-Hwan Oh\*

Department of Food Engineering, Yonsei University, Shinchon-dong 134,  
Sodaemun-ku, Seoul, Korea

A crystalline alkaline protease- producing *Streptomyces* sp. YSA-130 was isolated from soil in alkaline medium(pH 10.5). The optimum culture condition of *Streptomyces* sp. YSA-130 for the production of alkaline protease was as follows; 2.0% soluble starch, 1.0% soytone, 0.3%  $K_2HPO_4$ , 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.8%  $Na_2CO_3$ , pH 10.5, 30°C, and 72 hr. The alkaline protease from the culture broth of *Streptomyces* sp. YSA-130 was purified about 24 folds by ammonium sulfate precipitation, dialysis, DEAE-cellulose ion exchange chromatography, gel filtration on Sephadex G-75 and crystallization.

Optimum temperature and pH of purified enzyme were 60°C, and 11.5. Temperature and pH stability of purified enzyme were 50°C, and 5.5-12.0. Calcium ion was effective to stabilize the enzyme at higher temperature. The molecular weight of the purified enzyme was approximately 30,000. The purified enzyme was inactivated by diisopropyl fluorophosphate(DFP) but not affected by metal ion, EDTA, sulfhydryl reagent and stable detergent.

식품, 약품, 세제공업 등에 다양하게 이용되고 있는 단백질 분해효소는 주로 *Bacillus* 속이 생산하는 alkaline serine protease 가 대부분이었으나, 최근에는 곰팡이, 방선균, 효모에 의한 생산이 보고되고 있다(1-6).

Horikoshi 등(7)이 alkaline protease 의 생산에 대하여 보고한 이래 알칼리내성 및 호알칼리성 미생물로부터의 alkaline protease 의 생산, 균주개발, 활성의 증대, protease 의 이용에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다(8-12).

Protease 를 세제나 피혁 가공에 이용하기 위해서는 alkaline 내성, 내열성, detergent 내성을 가지며

allergy 반응이 없어야 하기 때문에 실제 산업적으로 생산 이용되는 종류는 극히 적으며(13), 산업적으로 유용한 효소들에 대한 protease 의 생화학적 연구가 미미한 실정이다.

따라서 본 연구는 토양으로부터 alkaline protease 를 생산하는 미생물을 분리하고 그 균주가 생산하는 alkaline protease 를 순수분리하여 물리화학적 특성을 검토하고자 한다.

#### 재료 및 방법

#### 미생물의 분리 및 선정

토양 현탁액의 상등액을 분리용 배지(2.0% soluble starch, 0.5% yeast extract, 1.0% soybean meal, 0.3%  $K_2HPO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.0%  $Na_2CO_3$ , 1.5% agar, pH 10.5)에 도달한 후, 30°C에서 72 시간 배양하여 생성된 alkalophilic strain의 colony를 분리하였다.

이중에서 protease 생산균주를 분리하기 위해서 skim milk 배지(5% skim milk, 1%  $Na_2CO_3$ , 1.5% agar, pH 10.5)에 접종하여 30°C에서 72 시간 배양하여 clear zone을 형성하는 것들을 선정하고, 다시 기본배지(2.0% soluble starch, 1.0% polypeptone, 0.3%  $K_2HPO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.0%  $Na_2CO_3$ , pH 10.5)에서 액체배양하여 protease 활성을 측정하여 분리, 선정하였다.

#### 균주의 특성 및 동정

Bergey's manual of determinative bacteriology (14) 및 Berd의 방법(15)에 따라 형태적 특성(16), 배양학적 특성(17), 생리적 특성(18), 세포벽 구성 성분 분석(19, 20)을 통하여 동정하였다.

#### 효소활성도 측정

Protease 역가는 Anson-Hagihaar 변법(21)을 이용하여 측정하였다. 일정비율로 희석된 효소액 0.5 ml에 기질(0.6% hammarsten casein 용액, pH 11.5) 3ml을 넣고 30°C에서 10분간 반응시킨 후, TCA 용액 3.2 ml를 가해 30°C에서 20분간 방치한 다음 여과하여 275 nm에서 흡광도를 측정하여 blank 값을 보정하여 효소활성도를 측정하였다.

1 unit는 1분 동안에 효소용액 1 ml에서 tyrosine 1  $\mu$ g을 생성시키는 효소의 양으로 하였다.

#### 효소의 정제 및 결정화

조효소액을 ammonium sulfate에 의한 염석, 투석, ion exchange column chromatography 및 gel filtration을 행하여 순수분리하였으며, 0.02 M Ca-acetate buffer(pH 6.0)에서 ammonium sulfate에 의한 염석, 투석 과정에서 결정화시켰다(22, 23).

#### 분자량 측정

표준 단백질과 함께 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(12.5% acrylamide gel)을 행한 후, coomassie brilliant blue로 염색하고 Fairbanks 등의 방법(24)에 따라서 탈색하여 분자량을 측정하였다.

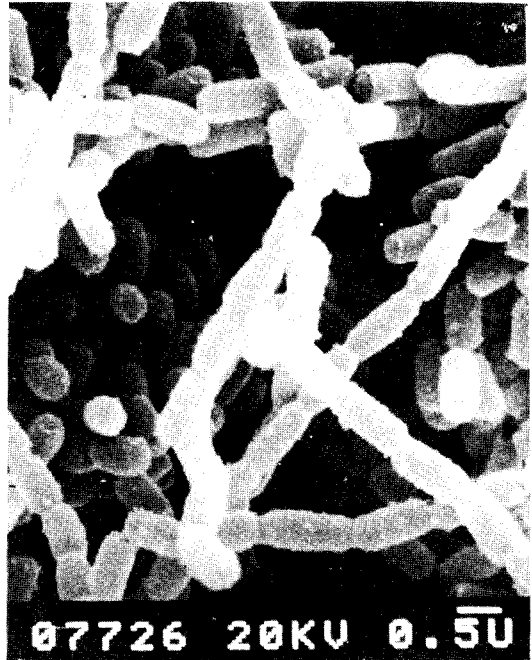


Fig. 1. Scanning electron microscope of the isolated strain YSA-130 ( $\times 10,000$ ).

#### 결과 및 고찰

##### 균주의 분리와 동정

토양으로부터 2,000여주의 alkalophilic 균주를 분리하고 이 중에서 alkaline protease 활성이 가장 높은 균주를 선정하였다.

선정한 균주의 형태학적 특성(Fig.1), 배양학적 특성, 생리학적 특성(Table 1) 및 세포벽 구성성분 분석 등을 통해 검토한(15-20) 결과, xanthine을 분해하지 못하고 tyrosine을 분해하며 urease를 생성하지 않는 점 등이 *Streptomyces somaiensis*의 특성과 유사한 것으로 나타났으며, 따라서 본 균주를 *Streptomyces* sp. YSA-130으로 명명하고 다음의 실험을 하였다.

##### 효소의 최적 생산조건

*Streptomyces* sp. YSA-130의 alkaline protease 생산을 위한 온도와 pH의 영향을 검토하기 위해서 25-35°C 및 initial pH 7.5-11.0 사이로 조절하여 살펴본 결과 30°C와 pH 10.5에서 최대의 생산을 보였는데, 이는 *Streptomyces* sp.에 대한 Nakanishi 등(22) 및 *Bacillus* sp.에 대한 Yamamoto 등(9)의 결과와 유사하였다. 배양시간의 영향을 볼 때, 42 시

**Table 1. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain YSA-130.**

Factors	Characteristics	
Oxygen requirement	+	
Gram staining	+	
Catalase production	+	
Hydrolysis of starch	+	
gelatin	+	
casein	+	
Litmus milk test	-	
Decomposition of xanthine	-	
hypoxanthine	-	
tyrosine	+	
Urease test	Slightly sensitive	
Streptomycin susceptibility	Sensitive (5 $\mu$ g/ml)	
Nitrate reduction	-	
Acid formation	-	
Melanine pigment formation	+	
	pH 7.5	pH 10.0
NaCl tolerance 5%	++	++
7%	++	++
9%	+	+
12%	-	+
15%	-	-
Utilization of carbon compound		
Glucose	+	+
Xylose	-	-
Arabinose	V*	V
Rhamnose	-	-
Fructose	-	-
Mannitol	+	+
Inositol	-	-
Galactose	+	+
Sucrose	-	-
Raffinose	-	-
Salicin	-	-
Sorbitol	-	-

\* V: variable

간 배양시 균의 생육이 최고에 도달하는 반면, 효소의 생성은 72 시간에서 최대의 활성을 나타내는 non-growth associated mode 현상을 나타내었다.

탄소원을 배지에 2.0% 되게 첨가하여 protease의 생산을 검토한 결과 glucose, fructose, xylose, sorbitol, sucrose, maltose 등의 단당류나 이당류는

**Table 2. Effect of various carbon sources on the alkaline protease production.**

Carbon source (2.0%, w/v)	Final pH	Enzyme activity (unit/ml)
Xylose	9.3	134
Glucose	9.5	201
Fructose	9.4	1,474
Sucrose	9.6	1,450
Lactose	9.6	1,608
Maltose	9.5	1,072
Glycerol	9.3	101
Na-citrate	9.5	2,814
Soluble starch	9.4	3,760
Dextrin	9.4	3,400
Sorbitol	9.6	1,206
None	10.0	670

**Table 3. Effect of various nitrogen sources on the alkaline protease production.**

Nitrogen source (1.0%, w/v)	Final pH	Enzyme activity (unit/ml)
Yeast extract	9.4	2,730
Polypeptone	9.4	3,900
Soybean meal	9.5	2,810
Soytone	9.4	4,300
Casein	9.6	1,820
Skim milk	9.2	1,760
Asparagine	9.6	1,660
Urea	9.8	1,100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9.4	1,100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.5	1,130
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9.5	980
NaNO <sub>3</sub>	9.9	1,310
NH <sub>4</sub> Cl	9.5	1,230
None	10.0	1,400

protease의 활성이 130-1,600 unit/ml로 control에 비해 큰 차이가 없었으나, soluble starch나 dextrin은 각각 3,760 unit/ml, 3,400 unit/ml로 단당류나 이당류에 비해 효소생산성이 높았으며, soluble starch의 최적농도는 2.0%로 나타났다(Table 2).

Protease 생산에 대한 질소원의 영향을 검토하기 위해 질소원을 1% 되게 첨가하여 검토한 결과 urea,

ammonium sulfate,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  등은 control 과 큰 차이가 없었으나, polypeptone, soytone 등을 사용한 경우에 효소활성이 증대되었으며, 이 중 효소생산성이 가장 높은 soytone 의 최적 농도를 검토한 결과 1.0% 로 나타났다(Table 3).

무기물에 의한 영향은  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3%, 그리고  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02% 일 때 가장 alkaline protease 의 생산성이 높았다(Table 4).

이러한 최적조건하에서 72 시간 배양한 경우 protease 의 활성은 6,000 unit/ml 로 나타내었다.

**효소의 분리 정제**

효소의 분리 정제는 최적 배양조건하에서 배양하여 얻은 배양액을 원심분리하여 상등액을 얻은 뒤 이 상등액을 50-75% 유안 포화농도하에서 처리(4°C, overnight)한 후, 10,000×g 에서 10 분간 원심분리하여 효소를 회수하고 소량의 0.02 M Ca-acetate buffer (pH 6.0)에 녹인 뒤 동일 buffer 로서 투석하였다.

**Table 4. Optimum condition for the production of the alkaline protease from *Streptomyces* sp. YSA-130.**

Components	Concentration (% , W/V)
Soluble starch	2.0
Soytone	1.0
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{Na}_2\text{CO}_3^*$	0.8
pH	10.5

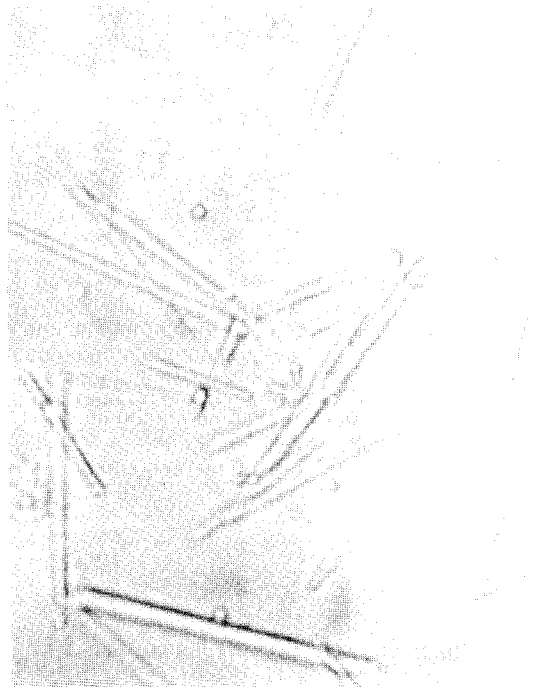
Culture condition: at 30°C, for 72 hr

\*: Sterilized separately

**Table 5. Purification of the alkaline protease from *Streptomyces* sp. YSA-130.**

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (unit/ml)×10 <sup>4</sup>	Specific activity (unit/mg)×10 <sup>2</sup>	Yield	Purification fold
1. Culture broth	10,000	600	6.0	100.0	1.0
2. Ammonium sulfate fractionation (50-75%)	1,327	375	28.3	62.5	4.7
3. DEAE-cellulose chromatography	173	225	130.1	37.5	21.7
4. Sephadex G-75 gel filtration	84	120	142.9	20.0	23.8

그 후 투석한 효소액을 DEAE-cellulose column (column size; 3.0×60.0 cm, flow rate; 30 ml/hr) 에 흡착시킨 후 NaCl 을 0.5 M 까지 이온 강도를 증가시키면서 0.02 M Ca-acetate buffer (pH 6.0)로 용출하여 활성부위를 모았으며, 이를 sephadex G-75 column (column size; 2.0×30.0 cm, flow rate; 28 ml/hr)에 가한 뒤 0.02 M Ca-acetate buffer (pH 6.0)로 용출시키고 1.4 ml 씩 분획하여 정제된 alkaline protease 얻었다. 그 결과 Table 5에서 보는 바



**Fig. 2. Microphotography of crystalline alkaline protease (×1,000).**

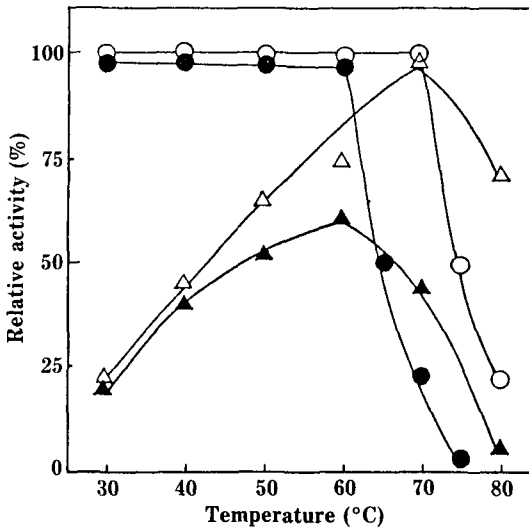


Fig. 3. Effect of temperature on the activity and stability of the alkaline protease.

- ▲- : Activity in the absence of CaCl<sub>2</sub>
- : Stability in the absence of CaCl<sub>2</sub>
- △- : Activity in the presence of CaCl<sub>2</sub>
- : Stability in the presence of CaCl<sub>2</sub>

와 같이 비활성도 14,290 unit/mg, 정제도 23.8 배, 수율 20.0%로 효소를 정제할 수 있었다.

**결정화**

정제된 alkaline protease를 0.002 M calcium 이 함유된 0.02 M acetate buffer(pH 6.0)에서 75% ammonium sulfate를 포화시켜 투석할 경우에 서서히 결정화가 일어났다.

결정화된 alkaline protease를 광학 현미경으로 관찰한 결과, Fig.2에서 보는 바와 같이 침상구조를 나타내었다.

**Alkaline protease의 특성**

**분자량 측정** : 표준 단백질과 함께 discontinuous SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 행하여 분자량을 측정한 결과, alkaline protease의 분자량은 30,000 정도로서 Yamamoto(9)가 보고한 *Bacillus* No.221의 분자량과 유사하였으며 *Aspergillus oryzae*(25)와 *Streptomyces* sp.(22)가 생산하는 alkaline protease의 분자량은 각각 23,000, 50,000이라는 보고와는 차이를 나타내었다.

**온도 및 pH** : Fig.3에서 보는 바와 같이 protease 작용의 최적온도는 60°C로서 30°C에서보다 3배 정도 효소활성이 증대되었으며, 0.012 M CaCl<sub>2</sub>를 효소용

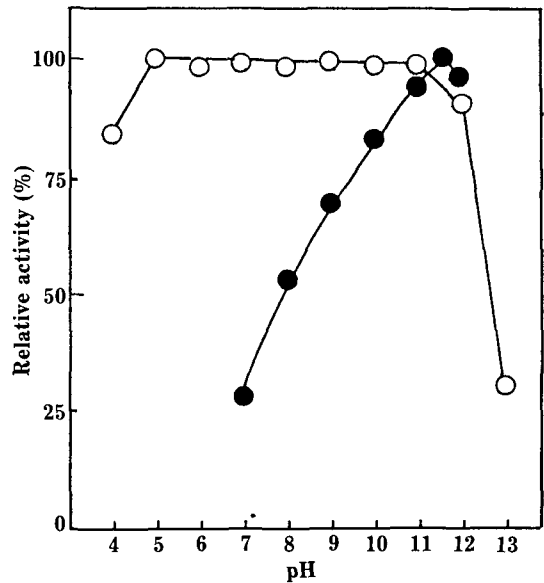


Fig. 4. Effect of pH on the activity and stability of the alkaline protease.

- : Activity
- : Stability

액에 첨가한 경우에는 70°C에서 가장 활성이 높았으며 Ca<sup>++</sup> ion 첨가시 열안정성이 증가하였다.

또한 효소에 대한 온도 안정성을 30-80°C에서 검토한 결과 Ca<sup>++</sup> ion을 첨가하지 않은 경우는 60°C까지, Ca<sup>++</sup> ion(0.012 M CaCl<sub>2</sub>)을 첨가한 경우에는 70°C까지 안정하였으나 그 이상에서는 현격한 활성 감소를 나타내었다. 이 결과는 *Streptomyces* sp.(22)와 *Bacillus* No.221(9)의 온도 안정성과 유사하였다.

pH 4-12 사이의 buffer에서 최적 효소작용 pH를 검토한 결과 pH 11.5에서 최대의 활성을 나타내었으며, 효소의 안정성은 pH 4-12에서 30°C, 48시간 처리하여 검토한 결과 pH 5.5-12.0 사이에서 안정성을 보였으며 pH 4 및 pH 13에서는 효소의 잔존활성이 80%, 40% 정도로 급격히 저하되었다.

**Detergent 및 기타 인자의 영향** : Detergent가 protease의 활성에 미치는 영향을 검토하기 위해서 SDS, Tween 20, Tween 60, Tween 80 및 Triton X-100을 각각 1% 되게 효소용액에 첨가시키고 30°C에서 30분간 처리 후 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 SDS만을 제외하고는 모두에게 강한 저항성을 보여주었다.

또한 정제효소에 대한 금속이온들의 영향(Table

**Table 6. Effect of various detergents on the alkaline protease.**

Detergents (1.0% v/v)	Relative activity (%)
SDS	90
Tween 20	120
Tween 60	130
Tween 80	125
Triton X-100	120
None	100

7)에서는 Ag<sup>++</sup>, Hg<sup>++</sup> ion에 의해 60%, 95% 저해되었으며, 저해제에 대한 영향을 살펴본 결과 metal chelating agent인 EDTA와 reducing agent인 sodium citrate, sodium thiosulfate, L-cysteine 및 potassium cyanide에 대해서는 활성이 저해받지 않는 반면, DFP(diisopropyl fluorophosphate)에 의해 대부분의 효소활성이 저해되어 이 alkaline protease는 활성부위에 serine 잔기가 있는 것으로 추정되었다(Table 8).

그밖에 20% NaCl에서 20% 이상의 잔존활성을 유지하였으며 1M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에서 30분간 정제효소를 처리하였을 때 60%의 잔존활성을 유지하였다.

**요 약**

토양으로부터 분리한 *Streptomyces* sp. YSA-130으로부터 활성이 좋은 결정화된 alkaline protease를 분리하였다.

Alkaline protease 생산의 최적 배양조건은 2.0% soluble starch, 1.0% soytone, 0.3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.8% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 30°C, pH 10.5에서 72시간 배양하였을 때였다.

Alkaline protease의 정제는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 분별침전, 투석, DEAE cellulose column chromatography, Sephadex G-75 gel filtration, crystallization으로 하였으며, 그 결과 비활성도 14,290 unit/mg, 정제도 23.8배였고, 수율은 20.0%이었다.

Alkaline protease의 반응 최적온도와 pH는 60°C와 11.5이었으며, 효소의 pH 안정성은 5.5-12.0에서 안정하였고, 온도 안정성은 50°C까지 안정하였으며, Ca<sup>++</sup> ion 첨가시 60°C까지 안정성이 증가하였다.

Alkaline protease의 분자량은 30,000이었으며 금속이온, EDTA, 환원제는 활성에 영향이 없었고 DFP에 의해 저해되었다. 계면활성제에 저항성이 크고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 잔존활성은 60%을 유지하였다.

**Table 7. Effect of various salts on the alkaline protease.**

Salts	Conc. (M)	Relative activity (%)
None	-	100
AgNO <sub>3</sub>	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	40
HgCl <sub>2</sub>	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	5
Pb (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	99
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·16H <sub>2</sub> O	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	101
CaCl <sub>2</sub>	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	102
BaCl <sub>2</sub>	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	100
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	94
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	99
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.2 × 10 <sup>-3</sup>	97
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.2 × 10 <sup>-3</sup>	98
MgCl <sub>2</sub>	1.2 × 10 <sup>-3</sup>	101
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1.2 × 10 <sup>-3</sup>	100
KCl	1.2 × 10 <sup>-3</sup>	101

**Table 8. Effect of various inhibitors on the alkaline protease.**

Addition	Conc. (M)	Relative activity (%)
None	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	100
KCN	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	98
EDTA	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	102
Sodium citrate	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	98
Sodium thiosulfate	1.2 × 10 <sup>-2</sup>	104
L-Cysteine	1.2 × 10 <sup>-3</sup>	98
Ascorbic acid	1.2 × 10 <sup>-3</sup>	95
PMSF	1.0 × 10 <sup>-3</sup>	82
DFP	1.2 × 10 <sup>-4</sup>	30

**사 사**

본 연구는 1987년도 문교부 학술연구조성비에 의해 연구되었음을 알려드리며 관계되시는 분들께 깊이 감사드립니다.

**참고문헌**

1. Horikoshi, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 285 (1972).
2. Ward, O.P.: *Microbial Enzymes and ER Biotechnology ch.*, **6**, 251 (1983).
3. Hasegihara, B.: "The Enzymes", 2nd ed., Vol. 4, 193, Academic Press, New York and London (1968).

4. Mandakini, P. and N.V. Shastri: *J. Ferment. Technol.*, **59**(5), 403 (1981).
5. Renko, M., M. Pokorny, L. Vitale and V.: *Exp. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 166 (1981).
6. David M. O. and S.J. Scharf: *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1225 (1982).
7. Horikoshi, K. and Y. Atsukawa: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1449 (1973a).
8. Horikoshi, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1783 (1971b).
9. Yamamoto, M., Y. Tanaka and K. Horikoshi: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1819 (1972).
10. Horikoshi, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1407 (1971a).
11. Kitada, M. and K. Horikoshi: *J. Ferment. Technol.*, **54**, 383 (1976).
12. Kurono, Y. and K. Horikoshi: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2565 (1973).
13. Horikoshi, K. and T. Akiba: "Alkalophilic Microorganisms, A new Microbial World", Japan Scientific Societies Press (1982).
14. Buchaman, R.E. and K.E. Gibbons: "Bergey's manual of determinative bacteriology", 8th ed., the Williams Wikins Co., Baltimore, U.S.A. (1974).
15. Berd, D.: *Appl. Microbiol.*, **25**(4), 605 (1973).
16. Harrigan, W.F. and M.E. McCance: Laboratory Methods in Microbiology, Academic Press, New York and London (1966).
17. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Intern. J. System Bacteriol.*, **18**(4), 279 (1968).
18. 長谷川武治: 微生物の分類と同定(下). 學會出版センター, 東京(1984).
19. Becker, B., M.P. Lechevalier, R.E. Gordon and H.A. Lechevalier: *Appl. Microbiol.*, **12**, 421 (1964).
20. Stanek, J.L. and G.D. Roberts: *Appl. Microbiol.*, **28**(2), 226 (1974).
21. Hagihara, B., H. Matsubara, H. Nakai and K. Okunki: *J. Biotechnol.*, **45**, 185 (1974).
22. Nakanishi, T., Y. Matsumura, N. Minamiura and T. Yomamoto: *Agr. Biol. Chem.*, **38**(1), 37 (1974).
23. Hagihara, B., H. Matsubara and M. Nakai: *J. Biochem.*, **45**(3), 185 (1958).
24. Fairbanks, G., T.L. Steck and D.F.H. Wallach: *Biochem.*, **10**, 2606 (1971).
25. Nakadai, T. and S. Nasuno: *Agr. Biol. Chem.*, **37**(12), 2685 (1973).

(Received June 13, 1989)