

Bacillus subtilis LY-353이 생산하는 Protease의 정제 및 특성

이병우 · 유영선 · 임근형 · 최춘언

오뚜기중앙연구소

Purification and Properties of Protease from *Bacillus Subtilis* LY-353

Byung-Woo Lee, Young-Sun You, Geun-Hyung Im, Chun-Un Choi

Ottogi Research Center, Anyang 430-070 Korea

Abstract

The *Bacillus subtilis* LY-353, which secretes the protease isolated from seafoods. The optimum culture condition for production of protease from *B. subtilis* LY-353 was as follows : temperature 35°C, pH 7.5, salt concentration 1.0%. The purification steps involved ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography, and Sephadex G-100 gel filtration. A 7.33 fold purification and 6.55 yield of protease was obtained from culture broth. The optimum pH and temperature for the enzyme action were pH 7.5 and 55°C respectively.

서 론

유기족매인 효소가 인류 역사와 함께 오래전부터 양조, 치즈제조, 피혁공업 등 발효 및 각종 기호식품 제조에만 용도가 제한되어 있었으나 근래에 와서 식품, 의약품, 사료, 섬유, 세제, 화장품공업은 물론 효소를 이용한 공정개선, 품질향상등 그 사용범위가 넓어지고 있다^{1~3)}.

효소의 공급원으로 동·식물을 사용할 경우 효소자체의 품질이 일정하지 못하게 될 뿐만 아니라, 대량 수요에 있어서도 신속히 대응할 수 없다는 단점 등 여러가지 제약을 받게 되므로 미생물에 의한 효소의 생산은 공급의 안정성과 유리한 경제성 때문에 산업적으로 매우 중요한 위치를 차지하게 되었다. 지금까지 알려진 효소의 종류로는 2,500여종이 넘으나 산업용으로는 약 50종이 이용되고 있다. 1963년 Schnieder Corp.에서 protease를 가정용 세제 생산에 이용한 이래로 protease는 효소제제중 사용빈도 및 식품산업에

서의 기여도에서 중요한 역할을 담당하고 있으며 효소시장에서의 시장 점유율도 60%를 차지하고 있다. 한편 미생물이 분비하는 protease 대부분은 cofactors가 필요없는 extracellular hydrolase로 단백소재를 분해시켜 기포성, 유화성, 용해성 등의 물리화학적 성질을 변화시켜 소화흡수를 향상하고 항원성 소실 등의 영양학적, 생리학적인 성질을 개선하여 다른식품 소재를 자아낼 가능성을 가진 효소이다^{4~6)}.

Protease에는 열에 대한 저항성이 큰 부류의 효소들이 존재한다. 이를 열안정한 protease들은 효소적 성질로 인하여 식품공정에 여러가지 유리한 점이 있으며 최근 이를 이용하려는 연구가 활발히 전개되고 있다⁷⁾.

따라서 본 연구는 열에 안정한 protease의 산업적 응용에 대한 연구의 일환으로, 것갈에서 protease생성이 우수한 균주를 분리하여 산업용 배지로 대량생산 후 효소를 분리 정제하고, 효소적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

수산시장에서 구입한 4종의 젖갈(멸치젓, 새우젓, 황새기젓, 꿀뚜기젓)을 분리원으로 하여 순수분리 하였으며, 분리된 균주를 5회반복 실험으로 효소활성이 가장 높은 균주(LY-353)를 선발하였다. 선발된 균주를 Bergey's manual⁸⁾에 따라 동정하였다.

사용배지 및 배양방법

TPY agar slants(Table 1)에서 보존한 균주를 TPY broth를 사용하여 30°C에서 24시간 배양한 후 starter로 사용하였다. 대량생산을 위한 산업용 배지의 조성은 Table 2와 같으며 50ℓ 발효조(Bioengineer, 스위스)를 사용하여 24시간 배양하였다.

Protease활성 측정

효소활성도 측정은 Iwata 등의⁹⁾ 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 효소액 0.1mℓ에 0.1M phosphate buffer(pH 7.5) 3mℓ와 5% casein 용액 1mℓ를 가하여 37°C에서 10분간 반응 시킨 후 5% trichloroacetic acid 5mℓ를 넣고 반응을 중지시킨 다음 반응액을 여과(whatman No. 542)한 후 280nm에

Table 1. The composition of TPY-agar

Tryptone	0.5%
Peptone	0.5%
Yeast extract	0.3%
Agar	2.0%
pH	7.5%

Table 2. The composition of industrial medium

Corn steep liquor	2.5%
Soy protein	1.2%
Skim milk	0.6%
NaCl	1.0%
pH	7.5%

서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소활성 단위는 1분간에 1μg에 상당하는 tyrosine을 생성하는 것을 1unit로 하였다.

단백질 함량

Lowry⁽¹⁰⁾의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 정량하였다.

조효소액 추출 및 정제

최적 배양조건에서 배양한 배양액을 원심분리(9,000 rpm, 20 min)하여 상정액을 조효소액으로 하였다. 이 조효소액을 ammonium sulfate 30~70%로 염석하고 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography 및 Sephadex G-100 gel filtration을 실시하였다.

전기영동

Weber와 Osborne의¹¹⁾ 방법에 따라 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 실시하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

시중에서 구입한 여러시료로부터 단백질 분해

Table 3. Morphological and physiological characteristics of the selected strain LY-353

Form	rod
Size	2.5μm×1.0μm
Motility	+
Gram	+
Spore	+
Catalase test	+
Voges proskauer test	+
Growth in anaerobic agar	-
Growth at 50°C	+
Growth in 7% NaCl	+
NO ₃ reduced to NO ₂	+
Starch hydrolyzed	+
Hydrolysis of casein	+
Acid from glucose	+
Growth at 65°C	-

선별 배지¹²⁾를 이용하여 분해능이 강한 미생물 11종을 분리 선발하였다. 분리균중 TPY배지에서 효소활성이 가장 뛰어난 LY-353균을 분리하여 동정한 결과 Table 3과 같은 생리적 특성을 갖는 *B. subtilis*로 밝혀졌다.

배양학적 특성

B. subtilis LY-353균주의 최적 배양 조건을 조사하기 위하여 TPY배지에서 온도, pH, salts농도에 따라 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 최적온도와 pH는 35°C와 7.5이며, 최적 salts농도는 1%이었다.

연속 대량생산에 따른 활성변화

B. subtilis LY-353균주의 대량생산을 하기 위하여 최적 배양조건에 따라 TPY배지와 같은 비율의 질소원을 함유하는 산업용 배지(Table 2)를 사용하였다. 즉 TPY배지로 제조한 starter를 50ℓ 발효조에 2% 접종한 다음 24시간 배양한 결과는 Fig. 2와 같다. 균체량은 배양시간 7시간 후 최대였으며 효소활성 역시 배양시간 7시간에 최고의 활성을 보여주었다. 이때 pH는 초기 7.5로 시작

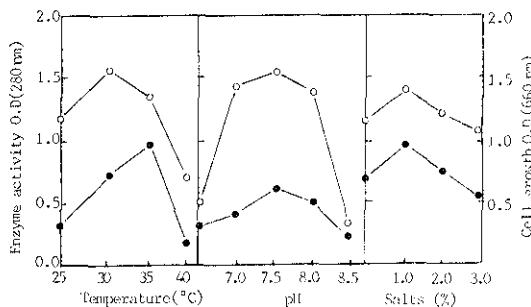


Fig. 1. Effects of temperature, pH and salts concentrations on the production of protease from *B. subtilis* LY-353.

●—● : activity ○—○ : cell growth

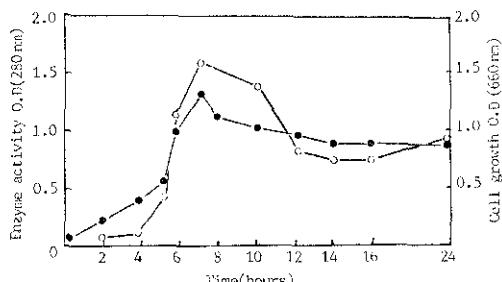


Fig. 2. Time course of *B. subtilis* on the enzyme activity and cell growth in the industrial medium.

●—● : activity ○—○ : cell growth

하여 이후 배양시간이 경과함에 따라 자동으로 보정하였다. 한편, *B. subtilis* LY-353이 생산하는 protease는 장¹³⁾, 차¹⁴⁾등의 경우에 비해 배양시간이 짧으며 산업적 용용 가능성이 기대된다.

효소의 정제

근체를 제거한 조효소액에 ammonium sulfate 분말을 30%~70% 첨가하면서 분별침전시켜 얻은 침전물을 최소부피의 0.1M phosphate buffer 용액(pH 7.5)에 용해한 후 동일 완충액에 대해 하룻밤 동안 투석한 후, 효소용액을 DEAE-Sephadex A-50 column(2.0cm×60cm)에 흡착시킨 후 NaCl을 0.5M까지 적선적으로 상승시킨 gradient elution을 행하였다. 이때 2.0ml/min의 유속으로 4ml씩 분획하여 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 3와 같으며 fraction No. 16~18번의 분획을 모아서 같은 buffer로 미리 평형화 시킨 Sephadex G-100 column(2.5cm×45cm)에서 gel filtration하였으며 용출양식은 Fig. 4와 같이 protease활성을 나타내는 peak가 fraction No. 21~23에서 분리되었다. Table 4에서 볼 수 있듯이 protease정제 결과 6.55%의 수율로서

Table 4. The purification scheme of protease from *B. subtilis* LY-353

Steps	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	1415.0	1017.7	138.9	1.00	100.0
Ammonium sulfate	8265.0	20.1	411.2	2.96	58.4
DEAE-Sephadex A. 50	1416.7	1.5	944.0	6.97	10.0
Sephadex G-100	913.3	0.9	1018.1	7.33	6.5

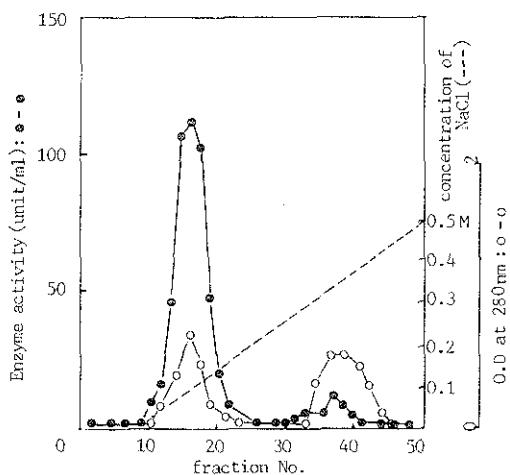


Fig. 3. Chromatography of protease on DEAE-Sephadex A-50 column.

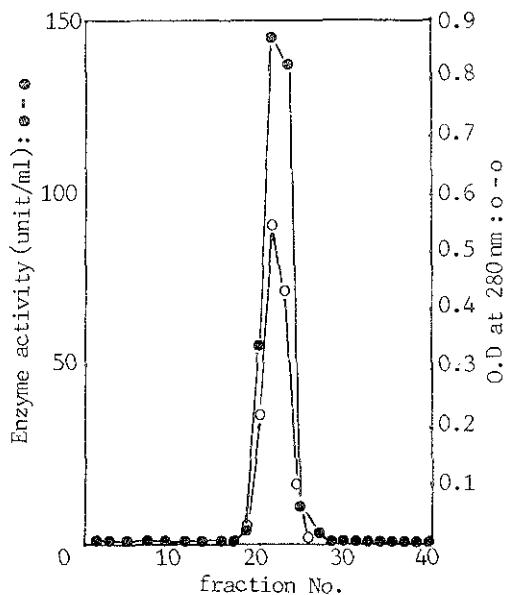


Fig. 4. Chromatography of the protease on Sephadex G-100 column.

7.33배 정제되었으며 specific activity는 1018.1 unit/mg으로 나타났다.

전기영동

정제된 효소액을 10% polyacrylamide gel에 이용한 전기영동의 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 단일 band가 나타났음을 확인하였다.

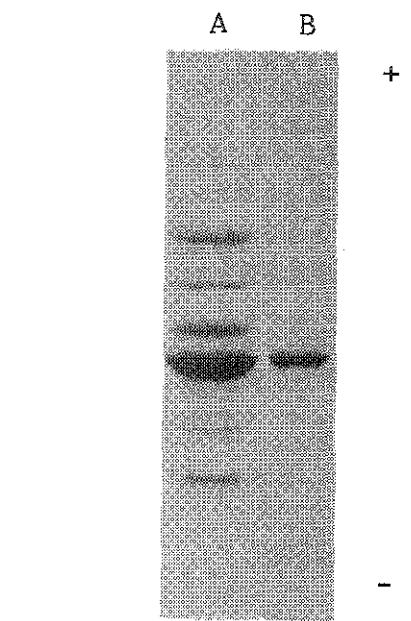


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified protease from *B. subtilis* LY-353.
A : crude enzyme B : purified enzyme

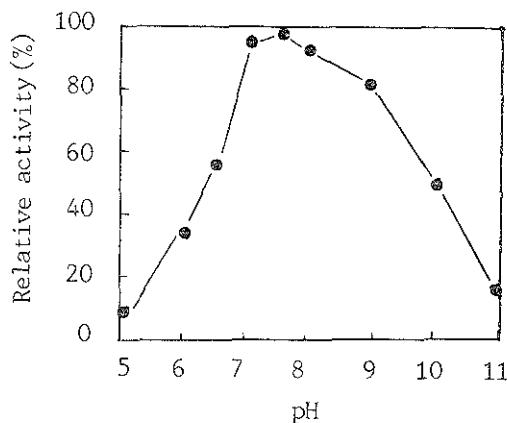


Fig. 6. Effect of pH on the activity of protease from *B. subtilis* LY-353.

효소의 특성

(1) pH의 영향

정제효소의 pH에 대한 영향을 조사하기 위하여 사용된 각 pH별 buffer를 다음과 같이 제조하였다.

pH 5.0~5.5 : 0.1M citrate buffer

pH 6.0~8.0 : 0.1M phosphate buffer

pH 8.5~9.0 : 0.2M tris-HCl buffer

pH 10.0~12.0 : 0.05M glycine-NaOH buffer

효소액 0.1mℓ에 각종 buffer 3mℓ와 기질로써 5% casein용액 1mℓ를 혼합하여 pH 5.0~12.0에서 37°C, 10분간 반응 시킨 후 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같이 pH 7.5에서 최적 pH를 나타내었다.

(2) 온도의 영향

온도에 대한 영향을 조사하기 위하여 정제효소 0.1mℓ와 0.1M phosphate buffer(pH 7.5)를 사용하여 각 온도에서 10분간 반응시킨 결과는 Fig. 7과 같으며 최적온도는 55°C로 나타났다.

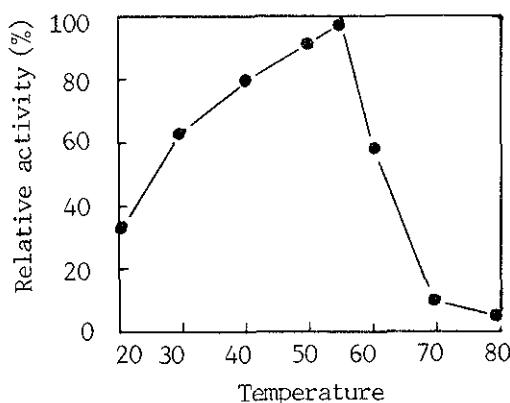


Fig. 7. Effect of temperature on the activity of protease from *B. subtilis* LY-353.

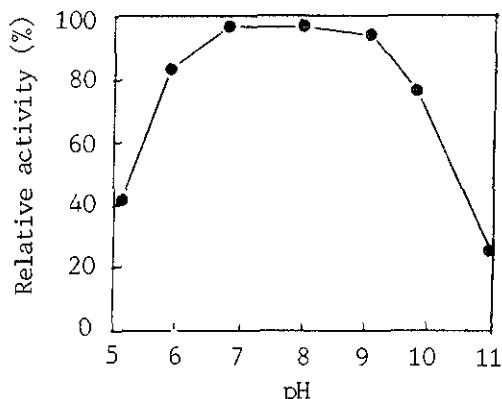


Fig. 8. Effect of pH on the stability of protease from *B. subtilis* LY-353.

(3) pH의 안정성

효소액을 각 pH로 조절하여 37°C, 2시간 방치한 후 잔존활성을 측정한 결과 Fig. 8에서 나타난 것처럼 본 효소는 pH 6.0~10.0의 범위에서 안정하였다.

(4) 온도의 안정성

효소액을 각 온도에서 30분간 열처리한 후 그 잔존활성을 측정한 결과는 Fig. 9와 같이 70°C까지는 안정하였으나 그 이상의 온도에서 실활하기 시작하여 85°C에서 완전히 실활 하였으며, 온도에 대한 안정성은 타 효소에 비해 비교적 높았다.

Table 5 Effects of metal ions on the activity of protease from *B. subtilis* LY-353

Ion	Metal	Relative activity (%)
Mn ²⁺	MnSO ₄ · H ₂ O	97.8
Ba ²⁺	BaCl ₂ · 2H ₂ O	100.0
K ⁺	KCl	98.0
Na ⁺	NaCl	103.5
Cu ²⁺	CuSO ₄ · 5H ₂ O	90.1
Co ²⁺	CoCl ₂ · 6H ₂ O	98.6
Mg ²⁺	MgSO ₄ · 7H ₂ O	98.5
Fe ²⁺	FeSO ₄ · 7H ₂ O	80.8
Zn ²⁺	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	95.0
None	-	100.0

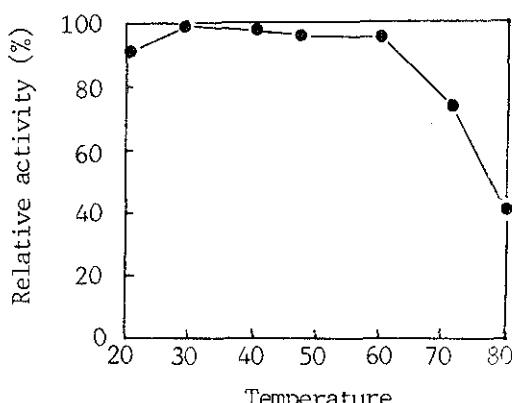


Fig. 9. Effect of temperature on the stability of protease from *B. subtilis* LY-353.

(5) 금속이온에 대한 영향

금속 이온에 대한 효소활성 변화를 관찰하기 위하여 정제된 효소액 0.1mℓ에 5mM 금속이온 용액 1.0mℓ를 넣고 37°C에서 반응시킨 결과는 Table 4와 같이 각종 금속이온이 효소활성을 억제하지 않고 활성의 안정성을 나타내는 것으로 보아 Cowan⁶⁾ 이 보고한 효소의 열변성에 대한 저항성은 일정한 금속이온의 결합이 분자차원에서 안정성을 증대한다는 보고와 같은 효과로 생각된다.

요약

첫 번째에서 protease 생성 균주 *Bacillus subtilis* LY-353 균주를 분리, 동정하였다. LY-353 균주의 효소생산에 대한 최적 배양 조건은 온도 35°C, pH 7.5, salt 농도 1.0%였으며, 산업용 배지를 사용하여 50ℓ 맘효조에서 7시간 배양하였을 때 최고의 활성을 나타내었다. 정제과정으로 7.33배 정제되었으며 수율은 6.55%이었다. 정제된 효소액은 전기영동으로 단일 band를 확인할 수 있었으며, 효소활성에 필요한 온도와 pH는 각각 55°C와 7.5이었다.

문헌

- Im, M. : Fish protein hydrolysates. *Process Biochemistry*, 1, 26(1982)
- Ishide, K. I. and Nagasaki, M. : Effect of protease on textural properties of wheat flour dough. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 36, 1003(1989)
- Ishida, K. I. and Nagasaki, M. : Effect of protease on textural properties of wheat flour

dough. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 36, 1003(1989)

- Linko, S. : Novel approaches in microbial enzyme production. *Food Biotechnology*, 1, 31(1989)
- 정태희, 박영훈 : 신효소의 탐색과 개발, *Microrg. Ferment.*, 13, 29(1989)
- Todd, W. Gusek and John E. Kinsella : Properties and potential application of a unique heat stable protease, *Food Tech.*, 1, 102(1988)
- Cowan, D., Daniel, R. and Moran, H. : Thermophilic protease, properties and potential applications, *Trends in Biotechnology*, 3, 68(1985)
- Buchanan, R. E. and Gibbone, N. E. : *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th (1974)
- Iwata, K., K. Kobayashi and Hase, J. : Studies on muscle alkaline protease I. isolation, purification and some physicochemical properties of alkaline protease from carp muscle. *Bull. Jap. soc. sci. Fish.*, 39, 1325(1973)
- Lowry, O. H. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)
- Weber, K and Osborne, M. : The reliability of molecular weight determination by SDS-PAGE. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406(1969)
- 차용준, 이옹호 : 저식염 멸치젓에서 분리한 단백질 분해액이 강한 세균 및 생성된 단백분해효소의 특성, *한국수산학회지*, 21, 71(1983)
- 장신재, 김윤숙, 성하진, 최용진, 양한칠 : *Bacillus subtilis*가 생산하는 alkaline protease에 관한 연구. *한국농화학회지*, 31, 356(1988)
- 차원섭, 조영제, 최정 : *Aspergillus fumigatus*에 의한 alkaline protease의 생산과 정제. *한국영양식량학회지*, 18, 279(1989)

(1990년 11월 3일 접수)