

## Halomonas sp. ES 100이 생산하는 alkaline protease의 특성

김찬조 · 오만진 · 최성현

충남대학교 식품공학과

**초록 :** *Halomonas* sp. ES 10이 생산하는 protease를 methanol 침전, Sephadex G-150, G-200 및 DEAE-Sephadex A-50으로 여과하여 비활성이 1,014 units/mg protein, 수율이 7%로 정제하였다. 이 효소의 작용 최적온도 및 pH는 35 °C 와 pH 11.0 이었고, 50 °C 에서 40분에 70%의 잔존활성을 보였으며 pH 7.5~11.0 범위에서 안정하였다. 정제효소의 우유 casein에 대한 Km 값은 7.4 mg/ml 이었다. Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, SDS, Tween 80 등은 효소 활성을 다소 증가시키고 Hg<sup>2+</sup>과 EDTA는 심히 저해하였다. DFP와 PMSF에 의해서는 각각 63%, 107%의 상대활성을 보여 이 효소는 serine protease가 아님을 시사하였다. 0.5 M과 1 M의 NaCl 농도에서 각각 95%와 65%의 상대활성을 보여 일반 미생물의 protease 보다 각각 20%, 15%씩 상대활성이 높았다 (1992년 4월 17일 접수, 1992년 6월 26일 수리).

전보<sup>1)</sup>에서 *Halomonas* sp. ES 10의 alkaline protease 생산조건을 발표하였다. Horikoshi는 *Bacillus* sp. No 221 이 생산하는 분자량 30,000인 protease가 pH 11.5에서 최적 활성을 보였으며 N-terminal 아미노산이 alanine 이라고 보고하고 alkaline protease는 활성부위에 serine 잔기가 있어 serine과 특이반응을 하는 물질에 의해 쉽게 활성을 잃는 serine protease라고 하였는데,<sup>2-7)</sup> 필자 등이 정제한 *Halomonas* sp. ES 10균의 alkaline protease는 이들의 특성과 달리 EDTA에 의해 실패되었다.

여기서는 *Halomonas* sp. ES 10균이 생산하는 alkaline protease를 정제하여 효소학적 특성 및 내염성과 계면활성제에 대한 영향을 검토한 결과를 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 효소의 정제

효소의 생산 최적조건<sup>1)</sup>에서 배양한 액을 조효소액으로 하여 Fig. 1과 같은 방법으로 정제하였다.

#### Protease 활성측정 및 단백질 정량

Protease 활성은 전보<sup>1)</sup>와 같이 하여 측정하고 단백질은 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 측정하였으며 각 분획물의 단백질은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

#### 정제효소의 특성

##### 1) 순도

Davis법<sup>8)</sup>에 따라 정제효소를 7.5% polyacrylamide gel (0.5×6 cm, pH 7.0)로 tris-glycine 완충액(pH 8.3)을 사용하여 2 mA/gel tube로 3시간 동안 전기영동시킨 후 0.1% coomassie blue R-250으로 30분간 염색하고 25% methanol을 함유한 7% 초산액으로 탈색하여 밴드를

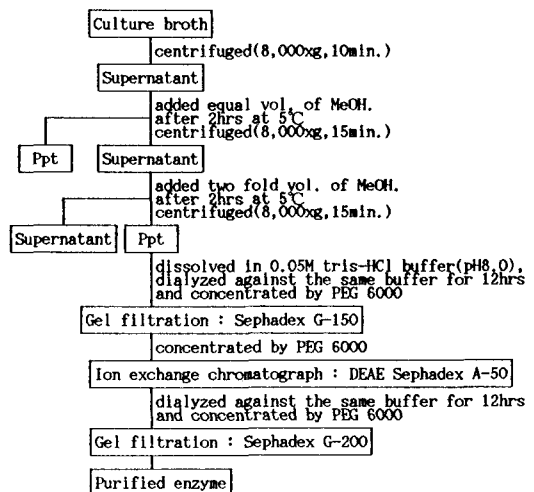


Fig. 1. Schematic diagram for the purification of the protease.

확인하였다.

2) Michaelis-Menten 정수

0.05 M NaHCO<sub>3</sub>-NaOH 완충액(pH 11.0)에 milk casein을 1~12 mg/ml로 각각 조정된 용액에 정제효소를 작용시켰을 때의 반응속도를 구하고 Lineweaver-Burk 법<sup>9)</sup>으로 도시하여 Km값을 구하였다.

3) 금속이온의 영향

K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 등을 0.05 M tris-HCl 완충액에 10 mM이 되게 가한 액과 효소액을 1 : 1로 혼합하고 30 °C 에서 30분간 둔 다음 35 °C 에서 10분간 반응시키고 잔존 효소역가를 측정하여 이들 금속이온의 영향을 검토하였다.

4) 계면 활성제 및 활성저해제

SDS, Tween 20 및 80, Triton X-100의 계면활성제를 일정농도로 녹인 용액과 0.05 M NaHCO<sub>3</sub>-NaOH 완충액(pH 11.0)에 넣은 protease 용액을 동량 섞어 30 °C 에서 30분간 반응시키고 잔존 효소역가를 측정하였다. 활성저해제의 영향은 EDTA, sodium thiosulfate, diisopropyl fluorophosphate(DFP), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 등의 활성저해제를 1 mM 농도로 녹인 용액과 protease 용액을 동량 섞어 35 °C 에서 10분간 반응시키고 잔존 효소역가를 측정하여 그들의 영향을 검토하였다.

5) NaCl 농도에 따른 효소활성

NaCl 농도를 0.5~4 M 까지 조정된 0.6% milk casein액에 정제효소액 또는 *Aspergillus oryzae*의 protease (Sigma사 제 P4755)를 일정량 가하고 반응 최적조건에서 효소역가를 측정하여 비교 검토하였다. 단, 정제효소는 pH 11.0인 0.05 M NaHCO<sub>3</sub>-NaOH buffer, Sigma사 protease는 pH 7.5인 0.05 M tris-HCl buffer를 사용하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

*Halomonas* sp. ES 10의 protease를 정제한 결과 Table 1과 같이 비활성이 1,014 units/mg, 수율은 7%로 15.7

배가 정제되었으며 정제효소를 전기영동한 결과 Fig. 2와 같이 단일 밴드를 나타내었다.

정제효소의 특성

1) 온도 및 pH

정제효소의 작용 최적온도 및 온도 안정성을 검토한 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같다. 최적온도는 35 °C ~45 °C 의 넓은 범위이었다. 온도 안정성은 50 °C 에서 40분에 70% 정도의 잔존 활성을 보였으며 60 °C 에서는 20분에 거의 실패되었다.

작용 최적 pH와 pH 안정성은 Fig. 5 및 Fig. 6과 같았다. 최적 pH는 pH 11.0 부근으로 alkaline protease임을 알 수 있다. pH 안정성은 pH 7.5~11.0까지 약 90% 이상의 활성을 유지하는 것으로 나타나 alkali 영역에서는 비교적 안정하였다.

Oh 등<sup>10)</sup>은 *Bacillus*속 균인 No. M-17 균주가 생산하는

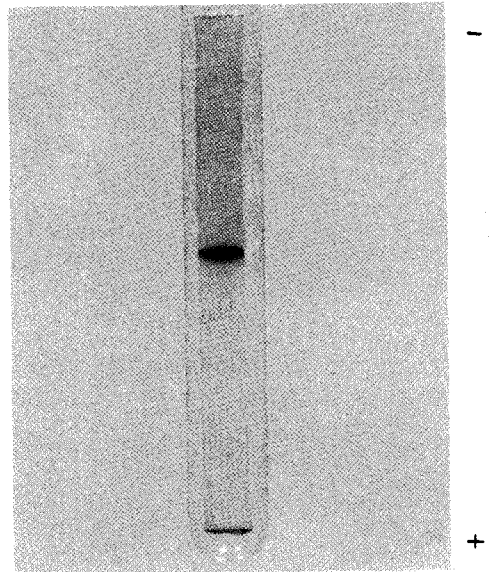


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of the purified protease.

Table 1. Summary of the purification steps of the protease

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification factor (fold)
Crude enzyme	1,320	1,756	113,000	64.4	100	1.0
Methanol precipitation	230	74.8	26,935	360	24	5.6
Sephadex G-150	77	35.2	22,746	646	20	10.0
DEAE-Sephadex A-50	60.5	11.4	10,088	885	9	13.7
Sephadex G-200	51	7.8	7,910	1,014	7	15.7

alkaline protease는 pH 11.0에서 가장 높은 활성을 보였고, pH 5.0~11.0 사이에서 안정성을 나타내었으며 최적 온도는 55 °C 이었다고 보고하였다.

2) Michaelis-Menten 정수

Milk casein을 기질로 사용하여 protease의 Km값을

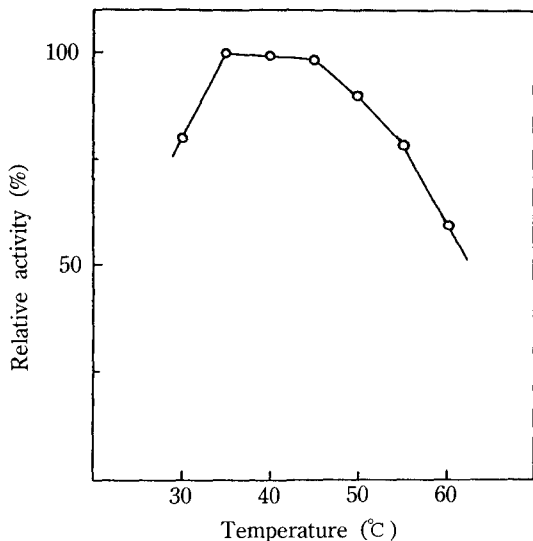


Fig. 3. Effect of reaction temperature on the protease activity. The enzyme reaction was performed at pH 11 for 10 min.

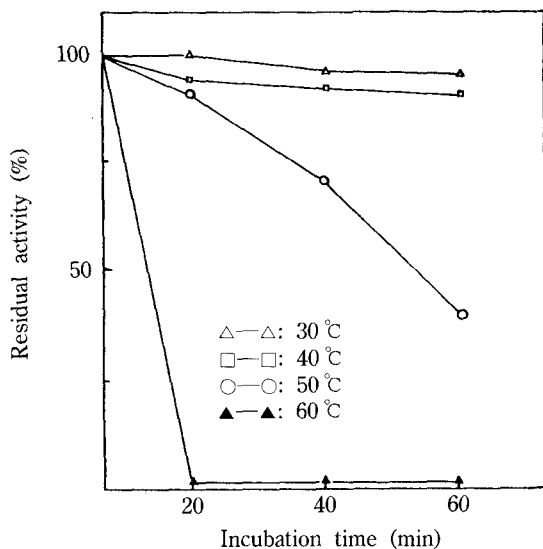


Fig. 4. Heat stability of the protease. The enzyme solution was preincubated at various temperature and the enzyme activity was measured by 20 min.

측정한 결과는 Fig. 7과 같이 7.4 mg/ml 이었다. 배 등<sup>7)</sup>이 정제한 *Bacillus*속 균의 protease는 Km값이 1.3 mg/ml 이었다고 하였다.

3) 금속이온

금속이온의 영향을 검토한 결과 Table 2와 같이 Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 등은 효소활성을 다소 증가시켰으며 Hg<sup>2+</sup>는 10 mM 첨가로 효소활성이 거의 실패되었으며 Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>,

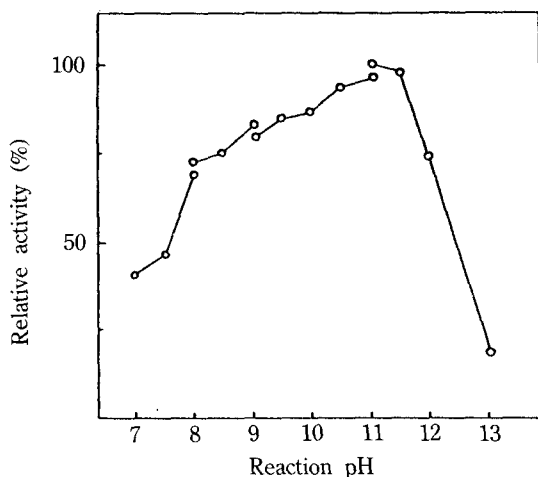


Fig. 5. Effect of pH on the protease activity. The enzyme reaction was performed at 35 °C for 10 min. The buffers used were 0.05 M McIlvaine buffer (pH 7.0~8.0), 0.05 M tris-HCl buffer (pH 8.0~9.0), 0.05 M Boric acid-NaOH buffer (pH 9.0~11.0), and 0.05 M NaHCO<sub>3</sub>-NaOH buffer (pH 11.0~13.0).

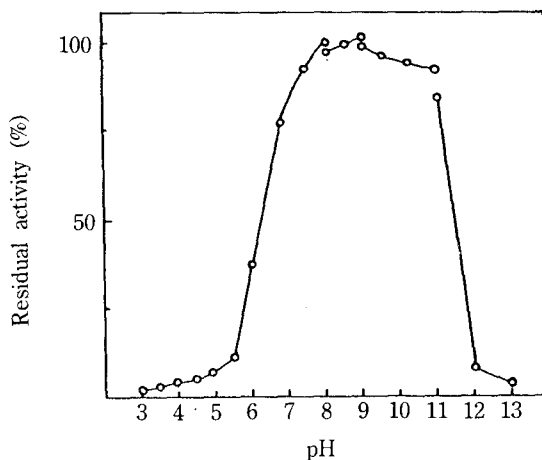


Fig. 6. pH stability of the protease. The enzyme solution was incubated at 5 °C for 16 hrs on each pH. The remaining activity was measured at pH 11.0 and 35 °C for 10 min. The buffers used were the same as those Fig. 5.

Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> 첨가에 대해서는 효소활성이 90% 이상 유지되었다.

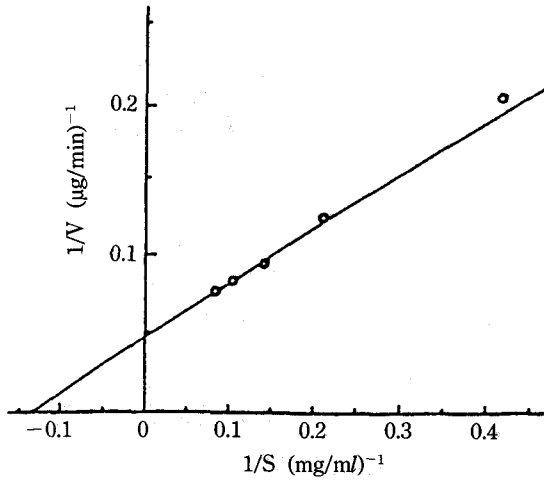


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot for the determination of Michaelis-Menten constant of the protease on milk casein.

Table 2. Effect of metal ions on the protease activity

Salts (10 mM)	Relative activity (%)	Salts (10 mM)	Relative activity (%)
KCl	95	MnSO <sub>4</sub>	101
LiCl	105	CuSO <sub>4</sub>	99
CoCl <sub>2</sub>	91	HgCl <sub>2</sub>	2
CaCl <sub>2</sub>	103	FeCl <sub>2</sub>	98
MgCl <sub>2</sub>	101	FeCl <sub>3</sub>	91
ZnCl <sub>2</sub>	94	None	100

The mixture contained 0.5 ml of protease solution dissolved 0.05 M tris-HCl buffer (pH 8.0) and 0.5 ml of metal ion solution was incubated for 30 min at 30 °C and the remaining activity was determined.

Table 3. Effect of various detergents on the activity of the protease

Detergents	Concentration	Relative activity (%)
SDS	1 × 10 <sup>-3</sup> M	111
Tween 20	1%	105
Tween 80	1%	125
Triton X-100	1%	100
Control		100

The mixture containing 0.5 ml of protease solution dissolved 0.05 M NaHCO<sub>3</sub>-NaOH buffer (pH 11.0) and 0.5 ml of detergent solution was incubated for 30 min at 30 °C and the remaining activity was determined.

4) 계면 활성제 및 활성저해제

Table 3 및 4와 같이 이 효소는 SDS 1 mM, Tween 80을 1% 첨가할 때 활성이 증가되었으며 EDTA에 의해 완전히 실활되었다. 또한 효소의 serine기에 특이적으로 부착하여 효소 활성을 저해한다고 하는 DFP,<sup>2-5)</sup> PMSF<sup>6,7)</sup>의 처리에도 효소활성이 유지되는 것으로 보아 이 alkaline protease는 serine protease가 아니라고 생각된다.

5) NaCl의 영향

Table 4. Effect of inhibitors on the activity of the protease

Reagent	Concentration (mM)	Relative activity
EDTA	1	0
Sodium thioglycolate	1	109
pCMB	1	97
L-Cysteine	1	101
Sodium thiosulfate	1	106
DFP	1	63
TPCK	1	107
PMSF	1	107
Control		100

The mixture containing 0.5 ml of protease solution dissolved 0.05 M NaHCO<sub>3</sub>-NaOH buffer (pH 11.0) and 0.5 ml of inhibitor solution was incubated for 10 min at 35 °C and the remaining activity was determined.

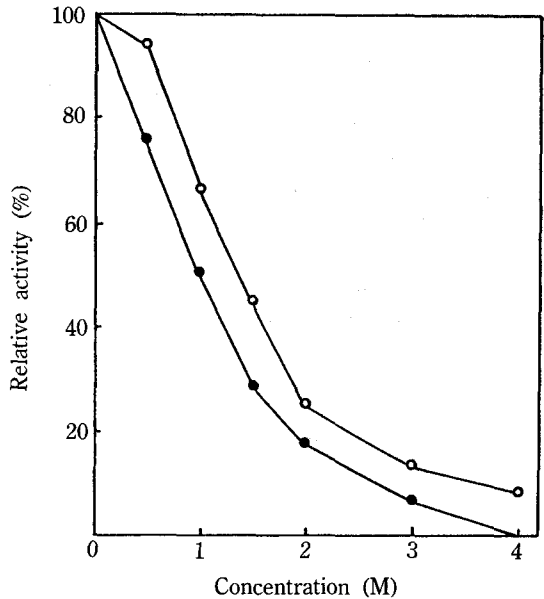


Fig. 8. Effect of NaCl concentration on the protease activity by the purified enzyme (○—○) and the protease from *Asp. oryzae* (●—●).

Fig. 8과 같이 *Halomonas* sp. ES 10의 protease는 *Aspergillus oryzae*의 protease(시그마사 제 P4755)보다 내염성이 강하여 NaCl 0.5 M에서 20%, 1 M에서 15% 활성이 높았다.

## 사 사

본 연구는 1990년도 한국과학재단의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 관계당국에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. 김찬조, 김교창, 오만진, 최성현: 한국농화학회지, 34 : 307(1991)
2. Horikoshi, K.: Agric. Biol. Chem., 35 : 1407(1971)
3. Matsubara, H., Kasper, C. B., Brown, D. M. and Smith, E. L.: J. Biol. Chem., 240 : 1125(1965)
4. Markland, Jr. F. S. and Smith, E. L.: "The enzymes" (3rd ed.) Vol. 3, Academic Press, New York and London, p. 561(1971)
5. Oh, S. H. and O, P. S.: Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 19 : 1(1991)
6. Aunstrup, K., Outtrup, H., Andresen, O. and Dambmann, C.: "Fermentation Technology Today (Proceedings of the 4th International Fermentation Symposium)", Society Ferment. Technol., Osaka, Japan, p. 299(1972)
7. 배 무, 박필련: 산업미생물학회지, 17 : 545(1989)
8. Davis, D. J.: Ann. New York Academy Sci., 121 : 404(1964)
9. Lineweaver, H. and Burk, D.: J. Am. Chem. Soc., 56 : 658(1934)

### Characteristics of the alkaline protease from the moderate halophile, *Halomonas* sp. ES 10

Chan-Jo Kim, Man-Jin Oh and Seong-Hyun Choi(Department of Food Technology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea)

**Abstract :** The protease from *Halomonas* sp. ES 10 was purified by methanol precipitation, gel filtration on Sephadex G-150 and G-200, and ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50. The purified enzyme was found to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis. The specific activity of purified enzyme was 1,014 units/mg protein, and the yield of the total activity from the culture filtrate was 7%. The optimal temperature and pH for the enzyme activity were 35 °C, and pH 11.0, respectively. And the enzyme was stable in the range of pH 7.5~11.0. The residual activity of the enzyme was 70%, when the enzyme was incubated at 50 °C for 40 min. The Km value of the enzyme was 7.4 mg/ml to milk casein. Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, SDS and Tween 80 were appeared to activators, whereas Hg<sup>2+</sup> and EDTA to inhibitors. The addition of DFP and PMSF showed the relative enzyme activities of 63% and 107%, respectively, suggesting that the enzyme may not belong to serine type protease. When the alkaline protease was treated with 0.5 M and 1 M NaCl, the relative enzyme activities were 95% and 65%, respectively. This enzyme showed 20% and 15% higher enzyme activity than that of *Aspergillus oryzae* (Sigma Chemical Company product, P4755) in the presence of 0.5 M and 1 M NaCl.