

*Serratia*속의 신규주가 생산하는 단백질분해효소

최완수* · 정계종 · 이주경 · 박주용 · 이상훈 · 이진복 · 이송락 · 최신원

영진약품공업(주) 중앙연구소

(Received February 15, 1993)

Studies on proteolytic enzyme from A New Strain in *Serratia* sp.

Wahn-Soo Choi*, Kae-Jong Chung, Joo-Kyung Lee, Joo-Woong Park, Sang-Hoon Lee,
Jin-Bok Lee, Song-Rag Lee and Shin-Won Choi

Central Institute, Yung-Jin Pharmaceutical Co., Ltd. 239-3, Kyunggi-Do, 451-860, Korea

Abstract—*Serratia* sp. Y-4 was isolated from soil. Many characteristics of the strain and optimum cultivation condition for protease production were investigated. The protease from *Serratia* sp. Y-4 was purified and studied for the properties of the enzyme. The isolated strain was identified to the genus *Serratia*. The strain was cultivated in 1%-casein, 0.5%-Na₃PO₄·7H₂O, 0.1%-NaCl, 0.05%-KCl, 0.02%-MgSO₄·7H₂O, 0.02%-CaCl₂·2H₂O, 0.02%-ZnSO₄·7H₂O, 0.02%-MnCl₂·4H₂O and 0.5%-soy bean oil at pH 7.0 for 35 hrs. The enzyme was purified about 5.89 fold from the culture broth with 31.1% recovery and 19,613 u/mg through ultrafiltration, ammonium sulfate, DEAE-sephacel and Superose-12 chromatography. The purified enzyme was identified as one band by isoelectric focusing, SDS- and native-PAGE. It has maximum activity at 37°C and pH 9.0. Molecular weight of it is approx. 50 kD and pI is about 6.70. Its Km value for casein was 20 mg/ml. 5 mM-EDTA, 5 mM-SDS, Ag⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ and Pb²⁺ inhibited the enzyme.

Keywords □ *Serratia* sp. Y-4, Proteolytic enzyme, cultivation, purification.

단백질 분해효소는 공업적인 효소분야에서 전체 효소산업의 60%의 비중을 차지하는 중요한 품목으로 발효 및 전분공업에서 널리 쓰이는 당화 효소와 더불어 2대 주요한 효소중의 하나이다.¹⁾ 이 효소는 주로 식물 동물 및 미생물에서 생산되는데 이중 미생물에 의해 생산되는 것이 약 70%를 차지한다. 특히 *Bacillus*속,²⁻⁴⁾ *Aspergillus*속,^{5,6)} *Streptomyces*속,^{7,8)} *Pseudomonas*속^{9,10)} 그리고 *Serratia*속¹¹⁾에 속하는 미생물에 의한 생산이 보고되어지고 있으며 이들 효소들은 특성에 따라 의약품, 식품 및 세제공업 등에 다양하게 이용되어지고 있다. 그중 Serine alkaline protease로 Subtilisin Carlsberg, Subtilisin B.P.N.(혹은 Subtilisin Novo), Pronase (Kaken Pharm. Co., Ltd.) 그리고 Serratiopeptidase (Takeda Pharm. Co., Ltd) 등이 산업화되어 있다.

본 연구에서는 미생물 유래의 유용한 protease를 개발하고자 *Serratia* sp. Y-4를 토양에서 분리하여 그 균주의 특성과 단백질 분해효소의 생성 조건을 조사하였으며 그 효소를 정제하고 그 성질을 조사하였기에 여기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 실험방법

균주의 분리 및 선정—전국 각지에서 채취한 토양을 멸균수에 현탁시키고 그 상등액을 취하여 균주 선정용 배지(1%-casein, 0.05%-K₂HPO₄, 0.02%-MgSO₄, 0.001%-FeSO₄ 7H₂O, 1.5%-agar, pH 7.0)에 도말하여 30°C에서 48시간 배양한 후 colony 주변에 casein의 분해로 생기는 투명한 부위의 크기에 따라 큰 것을 1차로 선발하였다. 1차로 분리된 균주를 다시 분리용 배지에서 1.5%-agar를 뺀 액체배지에서 배양하여 배

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

양액중의 protease 활성을 측정하여 가장 활성이 좋은 균주를 선정하여 본 실험에 사용하였다.

미생물의 동정— 실험균주의 형태학적, 생리학적, 생화학적 배양상의 특징은 *Manual of Methods for General Bacteriology*¹²⁾와 미생물학적 실험서¹³⁾에 제시된 방법에 준하여 실험하였다. 실험결과들은 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*에 기술되어 있는 사항들¹⁴⁾과 비교하였다.

효소의 활성도 측정— Protease 활성의 측정은 Kunitz방법¹⁵⁾에 의하여 다음과 같이 측정하였다. 일정 비율로 희석된 효소액 0.2 ml에 기질로 1%-hammsten casein 용액(50 mM-sod. carbonate buffer, pH 9.0) 2 ml를 넣고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 5%-trichloroacetic acid 용액을 2 ml 가해 37°C에서 20분간 방치시킨 후 여과하여 여액을 증류수로 5배 희석한 후 275 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성도를 측정하였다. 이때 효소의 역가 1 unit는 1분 동안에 1.0 µg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 정하였다.

효소의 조제— 선정된 균주를 125 ml 삼각플라스크의 효소 생산용 배지(1%-casein, 0.5%-Na₃PO₄·12H₂O, 0.1%-NaCl, 0.05%-KCl, 0.02%-MgSO₄·7H₂O, 0.02%-CaCl₂·2H₂O, 0.02%-ZnSO₄·7H₂O, 0.02%-MnCl₂·4H₂O, 0.5%-soybean oil, pH 7.0)에 접종한 후 30°C에서 48시간 진탕 배양한 것을 종균으로하여 2l-baffled flask의 효소 생산용 배지에 1% (V/V) 수준으로 접종하고 30°C, 200 rpm으로 유지하면서 배양하였다. 2l-baffled flask에서 전 배양된 배양액을 14.7l 발효조(MA-114, NBS)에 1% (V/V) 수준으로 접종하였고 working volume은 10l로 하고 통기량은 1.0 vvm, 200 rpm, 배양온도는 30°C, 소포제로는 antifoam A emulsion을 0.005% (V/V) 첨가하여 배양하였다.

단백질의 정량— Bovine serum albumin을 표준단백질로하여 Bradford¹⁶⁾의 방법에 따라 정량하였으며, chromatography 과정에서는 280 nm에서 흡광도로 나타냈다.

효소의 정제— 본 배양을 마친 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액에 황산아모늄 분획과 투석, ion exchange column chromatography, gel filtration을 이용하여 효소를 분리정제 하였다. 배양액을 원심분리하여 상등액을 얻은 뒤 이 상등액을 한외여과하여(Sartorius UF system, MW cutoff 10,000) 황산아모늄을 30~65% 처리하고, 10,000×g에서 15분간 원심

분리 하여 침전 단백질을 소량의 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.2)에 녹여 20 mM의 같은 buffer에 24시간 동안 투석시켰다. 투석시킨 효소액을 DEAE-sephacel column(26×150 mm, 42 ml/hr, 5.6 ml/fr.)에 흡착시킨 후 NaCl을 0.5 M까지 이온 강도를 높이면서 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)로 용출시켜 효소활성 부위를 모았다. 활성 부위의 분획물을 모아 농축한 후 (47 mm UF system, Millipore Co. MW cutoff 10,000) 미리 50 mM Tris-HCl(pH 7.2, 0.15 M NaCl)로 평형된 Superose 12 column(10×300 m/m, 18 ml/hr, 1 ml/fr.)을 이용해서 분획하였다.

전기영동— 정제된 protease의 purity, subunit 구성, 분자량, PI를 알아보기 위한 Native polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, 그리고 isoelectric focusing은 Phastysystem (Pharmacia-LKB)을 사용하여 그 manual¹⁷⁾에 준하여 실험하였다.

결과 및 고찰

균주의 선정 및 동정— 토양에서 부터 1,500여 주의 균주를 분리하고 그중 protease 활성이 가장 높은 균주를 선정하였다. 선정된 균주의 동정 실험결과는 Table I에 요약된 바와 같았다. 본 균주가 포자를 형성하지 않고 형태가 간균이며, 호기성이고, catalase 양성, MR test 음성, VP test 양성인점 등을 고려 할 때 *Serratia liquefaciens*와 비슷했으나 carbon source의 이용성, casein분해 및 gelatin 액화실험에서 그 결과가 상이했으므로 본 균주를 *Serratia* sp. Y-4라 명명하였다.

효소의 생산조건— 효소의 생산을 위한 탄소원, 질소원, 미량원소, pH 등의 영향을 조사한 결과 효소의 생산의 최적 배지조건은 Table II와 같았다. 탄소원의 첨가는 효소생산에 좋지 않았으며 무기 질소원에서는 균주가 생육하지 않았으며 유기 질소원 중 casein, skim milk에서 우수한 활성을 보였다.

Serratia sp. Y-4를 최적배지 10l가 든 14.7l-발효조에서 배양시키면서 시간에 따른 균체량, pH, 용존 산소, 잔존 단백질량과 효소 생산량과의 상호관계를 본 결과 Fig. 1과 같았다. 배양시간의 영향을 볼때 35시간 배양시 균의 생육 및 효소의 생성이 최대치를 보이는 growth-associated mode 현상을 나타내었다.

Table I—Microbiological properties of the isolated strain

Morphology	
Form	rods
Size(μm)	0.5–0.7×1.2–1.8
Mobility	+
Spore	–
Gram staining	–
Biochemical properties	
Hydrolysis of	
Casein	+
Gelatin	+
Utilization of	
Citrate	+
Reduction of nitrate	+
Methyl Red(MR) test	–
Voges-Proskauer(VP) test	+
Indole Production	
on peptone water	+
on tryptone water	–
Urease test	+
Oxidase test	–
Catalase	+
pH for growth	7–9
Temperature for growth	4–37°C
Utilization of sugars:	
Fructose + Galactose + Glucose + Glycerol +	
Raffinose + Rhamnose – Xylose + Lactose –	
Maltose + Sucrose + Carboxymethyl cellulose –	
Soluble starch – Myoinositol – Sorbitol +	
+: Positive –: Negative	

Table II—Optimum composition of medium for the protease production by *Serratia* sp. Y-4

Casein	1.0%
Na ₃ PO ₄ ·12H ₂ O	0.5%
NaCl	0.1%
KCl	0.05%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02%
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02%
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.02%
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.02%
Soybean oil	0.5%
pH	7.0

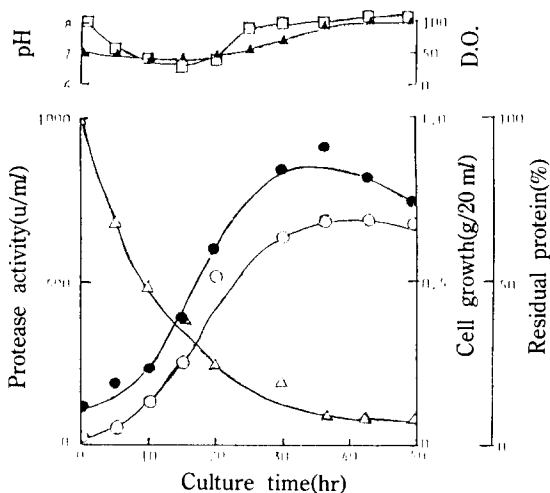


Fig. 1—Time course of the protease production by *Serratia* sp. Y-4. The fermentation was carried at 30°C, 200 rpm with jar fermenter (MA 114, NBS Co.), protease activity (●—●), cell growth (○—○), residual protein (△—△), pH (▲—▲), D.O. (□—□).

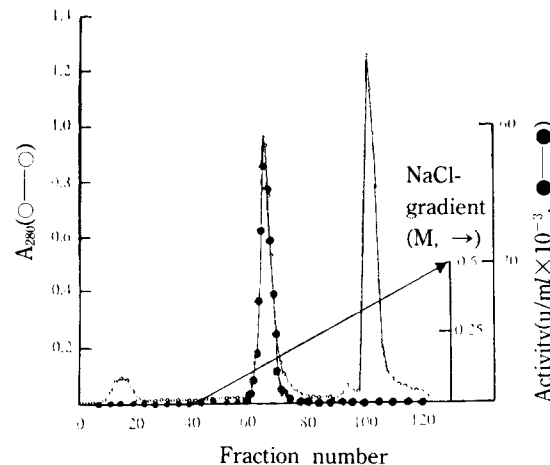


Fig. 2—DEAE-Sephacel column chromatography of the protease produced by *Serratia* sp. Y-4. The protein solution obtained between 30~65% ammonium sulfate saturation was put on the column (2.6×15 cm) equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) after dialysis. After unbound protein was washed out with the same buffer, the bound protein was eluted with a gradient of NaCl (→) at a flow rate of 42 ml per hr. 5.6 ml Aliquots were collected at each fraction. The active fractions were pooled and provided for the next step.

Table III—Purification of the protease produced by *Serratia* sp. Y-4

Purification step	Total activity (unit $\times 10^{-3}$)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
Culture broth	7,814	2,350	3,325	1.00	100.0
UF	5,235	1,471	3,558	1.07	67.0
AS(30–65%)	3,204	486	7,215	2.17	41.0
DEAE-Sephacel	2,751	177	15,542	4.67	35.2
Superose-12	2,432	124	19,613	5.89	31.1

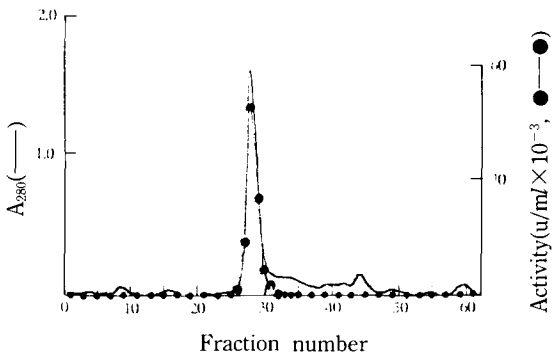


Fig. 3—Superose 12 column chromatography of the protease produced by *Serratia* sp. Y-4. The active fractions from DEAE-Sephacel column were concentrated by ultrafiltration and the concentrated protein was put on a column (1 \times 30 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl containing 0.15 M-NaCl and eluted with the same buffer at a flow rate of 18 ml/hr. 1 ml Aliquots were collected at each fraction.

효소의 정제—조 효소액을 DEAE-sephacel로 분리 하였을 때 Fig. 2와 같은 chromatogram을 얻었다. 이 효소는 흡착되었다가 NaCl 0.1 M과 0.22 M 사이에서 용출되었다. 이때 비활성은 15,542 u/mg protein으로써 조효소액보다 4.67배 정제되었으며 회수율은 35.2 %였다. 이 효소를 더 정제하기 위하여 Superose 12 column을 통과시킨 결과는 Fig. 3와 같으며 거의 단일한 band를 얻었다. 정제과정은 Table III에 나타난 바와 같으며 전 정제과정을 통하여 약 5.89배의 정제도를 가진 효소를 분리할 수 있었다.

전기 영동—정제된 효소의 순수도 및 subunit 존재 여부를 알아보기 위해 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 4와 같았다. Fig. 4에서 보여지는 것처럼 효소는 단일 band로 순수하게 정제되었음을 알 수 있었으며 Native-PAGE와 SDS-PAGE가 분자량이 같았으므로 su-

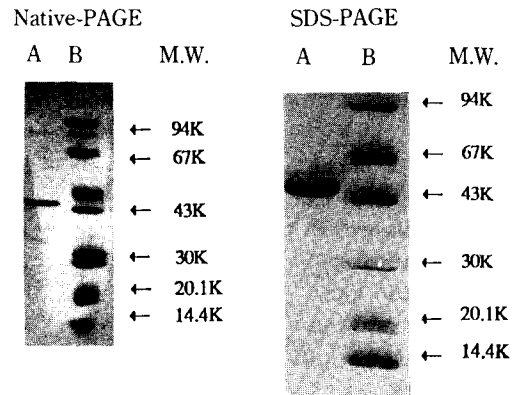


Fig. 4—Native and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified protease produced by *Serratia* sp. Y-4. (Native-PAGE) The purified enzyme preparation was electrophoresed on the phast gel gradient 8~25 by the manual from pharmacia-LKB. Proteins were stained by the silver staining procedure of it. (SDS-PAGE) The purified enzyme preparation reduced by β -mercaptoethanol was electrophoresed on the phast gel gradient 8~25 by the manual from pharmacia-LKB. Proteins were stained by the silver staining procedure of it. Lane A, the purified protease; Lane B, standard proteins including phosphorylase b (94 kD), bovine serum albumin (67 kD), ovalbumin (43 kD), carbonic anhydrase (30 kD), trypsin inhibitor (20.1 kD) and α -lactalbumin (14.4 kD).

bunit가 없는 monomer임을 알 수 있었다.

효소의 특성

1) pH의 영향—본 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과 효소반응의 최적 pH는 9.0부근이었으며 pH 6에 pH 8까지 비교적 안정 하였다(Fig. 5).

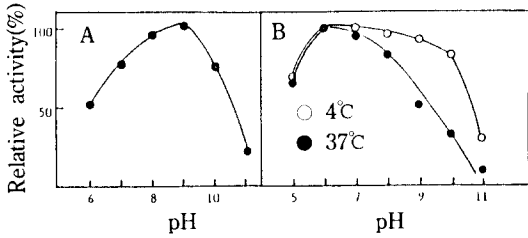


Fig. 5—Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of the protease. A: The reactions were carried out for 5 minutes at 37°C in buffers of various pH value. B: The enzyme preparations were incubated at 4°C and 37°C for 24 hrs in buffers of various pH value. The enzyme assays were carried out under the standard condition.

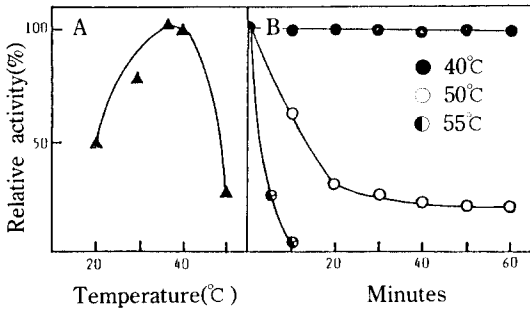


Fig. 6—Optimum temperature (A) and heat stability (B) of the protease. A: The reactions were carried out at various temperatures for 5 minutes. B: The enzyme solutions were incubated at various temperatures (40, 50, 55°C) and chilled every 10 mins and assayed under the standard condition.

2) 온도의 영향—효소의 활성화에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과 효소 반응의 최적온도는 약 40°C였으며 40°C까지는 안정하였으나 50°C 이상에서는 급격히 실활되었다(Fig. 6).

3) 금속이온과 기타 저해제 효과—효소활성에 미치는 금속이온들의 영향을 검토한 결과 Ag^+ , Cu^{+2} , Hg^{+2} , 그리고 Pb^{+2} 에 의해서 저해를 받았으며 그 이외의 금속에는 별 영향이 없었다(Table IV). 이 protease의 종류를 알아보기 위해 각종 inhibitor를 사용한 결과 metal chelator인 EDTA에서 현저히 활성의 억제가 있는 것으로 보아서 이 효소의 활성화에 me-

Table IV—Effect of various metal ions on activity of the protease

Reagent	Residual activity (%)
None	100.0
$AgNO_3$	1.2
$Ba(CH_3COO)_2$	112.2
$CaCl_2$	107.3
$Ca(NO_3)_2$	121.2
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	108.0
$CuSO_4$	2.0
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	63.7
$HgCl_2$	0.0
KCl	103.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	105.0
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	97.6
NaCl	102.0
$Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$	63.7
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	112.0

The enzyme solutions were incubated in the solution of each metal ions (10 mM) at 4°C for 1 hour before the measurement of activity and residual activities were measured under the standard assay condition.

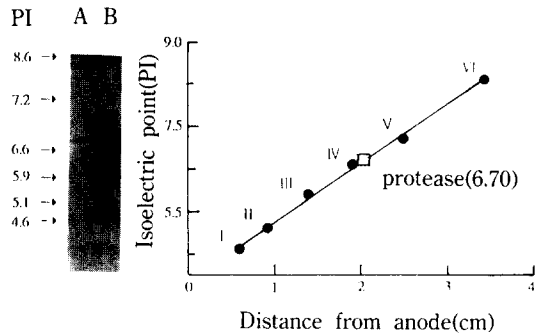


Fig. 7—Isoelectric focusing gel electrophoresis (left) and the calibration curve for measurement of isoelectric point (right). (Lane A) the purified protease (Lane B) the PI standards including trypsin inhibitor (4.6, I), β -lactoglobulin (5.1, II), carbonic anhydrase II (5.9, III), carbonic anhydrase I (6.6, IV), myoglobin (7.2, V) and L-lactate dehydrogenase (8.6, VI).

tal ion이 관여하는 것으로 생각되어진다(Table V).

4) 분자량, PI 그리고 Km 값—정제된 효소를 표준 단백질을 사용하여 Native-PAGE 및 SDS-PAGE를 실시한 결과 Fig. 4와 같이 분자량 약 50,000 dalton인 monomer임을 알 수 있었다. 또 이 효소를 표준단백

Table V—Effect of chemical reagents on the protease activity

Chemical reagents	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	—	100
Serine inhibitor		
DIFP	1	102
	5	104
PMSF	1	103
	5	101
Cysteine inhibitor		
Iodoacetic acid	1	102
	5	100
SDS	1	96
	5	1
Metal chelator		
EDTA	1	52
	5	2
Sodium oxalate	1	101
	5	102
	20	104
	80	105
Sodium citrate	20	103
	80	105
Reducing agent		
Potassium cyanide	1	102
	5	104
L-cysteine	1	101
	5	104

After each enzyme solutions was incubated in the solution of each reagents at 37°C for 30 min and then the residual activities were checked under the standard assay condition.

질과 같이 Isoelectric focusing을 실시한 결과 Fig. 7과 같이 PI는 약 6.70임을 알 수 있었다.

5) 기질농도와 반응속도와의 관계—Casein에 대한 Michaelis 정수(Km)을 Lineweaver-burk의 작도법으로 구한 결과 Fig. 8에 나타난 바와 같이 본 protease의 casein에 대한 Km 값은 20 mg/ml이었다.

문 헌

- 1) 박영훈, 정교민: “제 4회 한·일 기술교류 세미나” p. 117 (1987).
- 2) Maconn, J. D., Tsuru, D. and Yasunobu, K. T.: *Bacillus subtilis* neutral protease. *J. Biol. Chem.*, **239**,

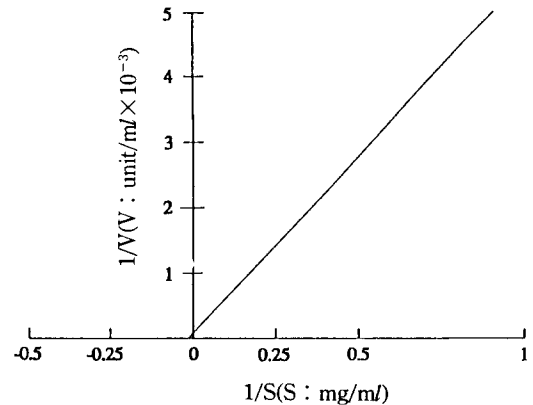


Fig. 8—Km value on the reaction rate of the protease produced by *Serratia* sp. Y-4. The concentrations of casein used as the substrate were 1, 2, 4, 8 and 10 mg/ml. Each activities were checked under the standard assay condition.

3706 (1964).

- 3) Tsuru, D., Heizokira and Yamamoto: Studies on bacterial protease. *Agri. Biol. Chem.*, **30**, 1261 (1966).
- 4) Horikoshi, K. and Akiba, T.: *Alkalophilic Microorganisms*, Japan scientific societies press, Inc., Tokyo, p. 93 (1982).
- 5) Matsushima, K-I., Hayakawa, K., Ito, M. and Shimada K.: Features of the proteolytic enzyme system of hyper-acid-productive and non-acid-productive fungi. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **27**, 423 (1981).
- 6) Tsujita, Y. and Endo, A.: Presence and partial characterization of internal acid protease of *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 237 (1978).
- 7) Narahashi, Y. and Yanagita, M.: Studies on proteolytic enzyme of *Streptomyces griseus* K-1. *J. Biochem.*, **62**, 633 (1967).
- 8) Narahashi, Y., Shibuya, K. and Yanagita, M.: Studies on proteolytic enzyme of *Streptomyces griseus* K-1. *J. Biochem.*, **64**, 427 (1968).
- 9) Kobayashi, T., Ogasawara, A., Ito, S. and Sitoh, M.: Purification and some properties of alkaline protease. *Agri. Biol. Chem.*, **49**, 693 (1985).
- 10) O'Callaghan, J. A.: Studies on protease production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Ph. D. thesis, National University of Ireland, Dublin
- 11) Miyata, K., Maejima, K., Tomoda, K. and Isono,

- M.: Purification and properties of the enzyme. *Agri. Biol. Chem.*, **34**, 310 (1970).
- 12) American Society for Microbiology: *Manual of Methods for General Bacteriology* (1981).
- 13) 김종협, 이배함, 이지열 : 미생물학적 실험서, 대광문화사, 서울(1983).
- 14) Krieg, N. R. and Holt, J. G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore/London, (1984).
- 15) Kunitz, M.: Determination of proteolytic activity by casein digestion method. *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291 (1947).
- 16) Bradford, M. B.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 17) "Phastsystem-Owner's manual", Pharmacia-LKB Biotechnology AB. S-75182, Uppsala (1989).