

알칼리성 Protease를 생산하는 *Xanthomonas* sp. YL-37의 분리 및 조효소의 성질

이창호 · 권태종¹ · 강상모¹ · 서현호 · 권기석 · 오희목 · 윤병대*
한국과학기술연구원 유전공학연구소, ¹건국대학교 미생물공학과

Production and Characterization of an Alkaline Protease from an Isolate, *Xanthomonas* sp. YL-37

Lee, Chang-Ho, Tae-Jong Kwon¹, Sang-Mo Kang¹, Hyun-Hyo Suh,
Gi-Seok Kwon, Hee-Mock Oh and Byung-Dae Yoon*

Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea
¹Department of Microbial Engineering, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

Abstract— A bacterial strain, which showed the high protease activity at low temperature and the high tolerance for the surfactant, was isolated from soil and identified as *Xanthomonas* sp. YL-37. The optimal temperature, initial pH, and cultivation time for the production of the alkaline protease by *Xanthomonas* sp. YL-37 were 20°C, 11.0, and 84 hours, respectively. In the jar fermenter culture of *Xanthomonas* sp. YL-37, the alkaline protease activity was about 15,000 DU/ml-broth after cultivating for 108 hours. The optimal pH and temperature for the protease activity were 7.0 and 11.0, respectively. The protease was relatively stable at the pH range of 7.0~12.0 and at the temperatures below 50°C. The protease activity at 20°C was about the level of 40% of its activity at 70°C. The enzyme was suggested as a serine protease because the enzyme activity was inhibited by phenylmethane sulfonyl fluoride, a serine modifier.

Protease(EC 3.4.21.14)는 단백질 혹은 peptide에 작용하여 peptide bond의 가수분해를 촉매하는 효소로서 작용 최적 pH에 따라서 산성, 중성, 그리고 알칼리성 protease로 분류된다. 호알칼리성 protease는 알칼리 범위의 pH에서 최적 활성을 가지며 효소 활성 부위에 serine 잔기를 포함하고 있어서, serine과 특이반응을 하는 물질에 의해서 쉽게 활성을 잃는 특징을 갖는 효소로 알려져 있다(1-3). 알칼리성 protease에 관한 연구는 Horikoshi(4)가 호알칼리성 *Bacillus* sp.를 분리하여 효소학적 특성을 발표한데 이어서, Aunstrup 등(5)이 보고하였고 Margesin과 Schinner(6)는 *Pseudomonas fluorescens*, Nakanishi 등(7)은 *Streptomyces* sp., Abbas 등(8)은 *Penicillium charlesii*, Malathi 등(9)은 *Aspergillus flavus*에서 호알칼리성 protease가 분비된다고 보고하였으며, Willadsen 등(10)은 세제용으로 적합한 단백분해효소를 *Bacillus pumillans*로부터 생산한 바 있다. 국

내에서 알칼리성 protease에 관한 연구는 배 등(11)과 김 등(12)이 *Bacillus* sp., 노 등(13)이 *Pseudomonas* sp. protease 생산균주의 분리 및 효소학적 성질 등을 보고한 바 있다. 한편, 합성세제중의 LAS, AOS 등이 하천의 주요 오염원으로 알려지면서 이들의 사용이 규제되고, 대체물질로서 효소이용이 검토되었다. 세제 첨가용 효소로는 protease, lipase 및 cellulase 등이 이용가능성이 가장 높으며 현재 국내시판 대부분의 세제에 protease가 첨가 되어 있는 것으로 알려져 있다. Protease가 세제용으로 사용되기 위해서는 알칼리성 조건(pH 9.0~11.0)에서 효소활성이 높을 것, 세제 성분에 내성이 있을 것 그리고 세탁온도에서 충분한 활성을 유지할 것 등의 조건을 만족시켜야 한다(14). 최근, 세제용 효소에 대한 연구는 주로 저온에서 고효성을 갖는 효소 개발에 주력을 두고 있는데, 이는 합성 섬유류의 사용이 점차 증가하고 에너지 절감을 위하여 세탁온도가 종전의 고온(60~90°C)에서 미온(20~40°C)으로 바뀌고 있는데 기인하고 있다. 현재 세제에 첨가하는 효소는 전량 수입에 의존하고 있으며, 구미의 고온, 고농도형 세탁조건에 적합하도

Key words: *Xanthomonas* sp. YL-37, alkaline protease

*Corresponding author

록 개발된 것으로 우리나라를 비롯한 동북 아시아의 세탁조건에는 적합하지 않다.

따라서, 본 연구에서는 동북 아시아의 세탁조건(세탁온도 15~25°C)에 적합한 세제용 효소를 개발하기 위하여 각종 토양 및 하천수로부터 저온에서 활성이 우수하고 알칼리 및 계면활성제에 내성이 있는 protease 생산균주를 분리하여, 그 효소의 최적 생산조건 및 조효소의 성질을 조사하였다.

재료 및 방법

배지 및 시약

저온에서 활성이 우수하고 계면활성제에 내성이 있는 알칼리성 protease를 생산하는 미생물의 분리를 위하여 다음과 같은 분리용 고체배지를 사용하였다. 즉, yeast extract 1 g, NaCl 5 g, 시판세제 2 g, skim milk(Difco) 20 g, Na₂CO₃ 2 g, Bacto agar 15 g, 증류수 1 l의 조성이었으며 skim milk, Na₂CO₃ 및 세제는 분리해서 별도로 멸균한 후에 첨가하여 사용하였다. pH는 Na₂CO₃ 용액으로 10.0으로 조정하였다. 전배양 배지는 증류수 1 l에 sucrose 60 g, soybean meal 20 g, NaCl 1 g, NH₄NO₃ 1 g, K₂HPO₄ 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, 그리고 Na₂CO₃ 3 g 첨가한 것으로서 Na₂CO₃는 분리해서 멸균 후 첨가하여 사용하였고, protease 생산배지는 전배양배지에 tryptone 10 g/l을 첨가하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 시약은 Hammarsten-casein은 Merk사 그리고 azocasein은 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였으며, 그 이외의 시약은 특급 또는 일급시약을 사용하였다.

균주의 분리 및 선발

국내 각종 토양 및 하천수 등의 균원시료를 멸균된 생리식염수에 균일하게 현탁한 후 분리용 고체배지 상에 도말하여 20°C에서 3일간 배양한 후 우유단백의 분해로 형성되는 투명대의 크기에 따라 1차 선별하고, 선별된 균주는 다시 분리용 고체배지를 pH 7.0, 9.0, 10.0으로 조정하여 20°C에서 3일간 배양한 후 균생육과 분해능이 우수한 균주를 2차 선별하였다. 2차 선별된 균주는 액체배양을 통하여 얻은 배양 상등액을 이용하여 20°C에서 효소활성을 측정, 높은 알칼리성 protease 생산균주를 최종 선별하여 실험에 사용하였다. 균주의 보존은 분리용 고체배지에 계대배양 및 ampoule에 동결건조하여 4°C에서 보존하였다.

균주의 동정

분리균주의 동정은 형태적, 생리적 및 생화학적

특성을 조사한 후 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(15)와 Manual for the Identification of Medical Bacteria(16)을 참고하면서 균주동정을 실시하였고, coenzyme Q는 Yamada 등(17)의 방법에 따라 추출하여 HPTLC(Merk, 10×10 cm)를 이용하여 분석하였다. DNA의 G+C 함량은 Tamaoka와 Komagata(18)의 방법에 따라 reversed-phase HPLC로 분석하였다. 또한 균체 지방산 분석은 tryptic soy broth agar(TSBA; Difco)에 접종한 후 30°C에서 24시간 배양하여 후기 대수증식기의 균체 40~50 mg에서 지방산을 추출하여 microbial identification system(MIS, Hewlett-Packard 5890 A)에 의해 gas liquid chromatograph(GLC)를 사용하여 분석하였다(19, 20).

효소활성 측정

분리균주가 생산하는 protease 활성은 주로 Leighton 등(21, 22)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 즉, 효소액 0.1 ml에 1 mM CaCl₂가 포함된 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액에 용해시킨 5.0% azocasein(Sigma) 0.2 ml, 1 M Tris-HCl(pH 8.0) 0.2 ml, 10 mM CaCl₂ 0.1 ml, 증류수로 1.0 ml로 구성된 반응 혼합물을 40°C에서 30분간 반응시킨 후 10%(w/v) trichloroacetic acid 1.0 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 0°C에서 15분간 정치한 후 침전된 단백질을 제거하기 위하여 원심분리하고, 상등액을 Millipore filter(0.45 μm)로 여과하였다. 여액 1.2 ml에 1.8 N NaOH 0.3 ml를 첨가하여 발색시킨 후 분광광도계(Beckman DU-60)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성은 40°C에서 30분 동안에 1.0 μg의 azocasein을 가수분해시킬 수 있는 효소량을 1 unit로 정하였다. 또한 배양조건 검토시의 효소활성은 Hammarsten-casein(Merk)을 기질로 하여 Delft Unit assay(23)로 측정하였다.

균주의 배양

분리균주의 효소생산 조건을 검토하기 위하여 전배양배지를 500 ml elenmeyer flask에 50 ml를 넣고 121°C에서 15분간 가압숙윤 멸균 후 분리균주를 일백금이 접종하여 20°C에서 24시간 전배양한 후 본배양 배지에 4%(v/v) 수준으로 접종하여 효소생산을 위한 최적 배양조건, 즉 최적배양온도, 최적초발 pH, 그리고 최적배양시간 등을 조사하였다.

Jar fermenter 배양

분리균주 YL-37을 전배양 배지에서 20°C, 24시간 진탕배양한 것을 종균으로 사용하였다. Jar fermenter

배양은 5l 발효조(KFC 5l, KOREA)에 working volume 3l로 하여 통기량은 1.0 vvm, 교반은 450 rpm, 소포제는 silicon SAG-471을 최종 0.1%(v/v) 첨가하였으며, 20°C 에서 배양하면서 균체증식, pH 변화, 그리고 protease activity를 경시적으로 측정하였다. 균체증식은 분광광도계(Beckman DU-60)를 이용하여 660 nm에서 흡광도로 측정하였다.

조효소의 성질

분리균주를 protease 생산배지에서 4일간 진탕배양하여 원심분리(12,000 rpm, 15 min at 4°C)한 후 얻은 배양 상등액을 조효소액으로 하여 최적온도 및 열안정성, 최적 pH 및 pH 안정성 등을 조사하였으며, 각종저해제에 대한 영향도 조사하였다. 실험에 사용한 완충용액은 citrate buffer(pH 5.0), phosphate buffer (pH 6.0), Tris-HCl buffer(pH 7.0~9.0), sodium borate buffer(pH 10.0~11.0) 및 NaOH-KCl buffer(pH 12.0~13.0)등 이었다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 선발

국내 각종 토양 및 하천수에서 채취한 균원시료를 멸균된 생리 식염수에 균일하게 현탁한 후 분리용 고체배지상에 도말하여 20°C 에서 3일간 배양 후 투명대의 크기가 큰 colony를 선별하였다. 20°C 에서 비교적 큰 투명대를 형성하는 150여개 균주를 다시 분리용 고체배지상에서 각각 pH 7.0, 9.0, 10.0으로 조정하여 20°C 에서 3일간 배양하여 생육이 양호하고 분해능이 우수한 45개 균주를 선별하였다. 2차 선별된

균주는 protease 생산배지에서 배양하여 조효소액의 효소활성을 측정한 결과 9개 균주가 protease 활성이 우수하였다(Table 1). 특히, 분리균주중 YL-37은 가장 높은 효소활성을 보여 최종적으로 이균주를 선발하여 이하 실험에 이용하였다.

균주의 동정

본 균주는 고체배지에서 원형의 colony를 형성하며, colony 색깔은 노란색을 띄었다. 간균이며, 크기는 직경이 0.4~0.5 μm 이고 길이는 1.2~1.5 μm 였다(Fig. 1). 본 균주는 gram 음성균으로서 호기성 세균이며 운동성을 지니고 있다. Catalase는 양성, oxidase는 음성이며, glucose 이용시 발효를 하였다. Gelatin, KCN, asculin 반응은 양성이고, VP, MR, indole, urease는 음성이며, 탄소원의 이용에서는 lactose, maltose, mannitol, rhamnose, salicin, sucrose 그리고 xylose 모두 이용하지 못하였다. Coenzyme Q는 ubiquinone Q-8이고, DNA의 G+C 함량은 65.3%로서 *Xanthomonas* 속(63~71%)과 비슷한 결과로 나타났다(Table 2). 이상의 결과로부터 분리균주 YL-37은 *Xanthomonas* sp.로 추정되었지만 더 정확한 균주동정을 위하여 균체 지방산 조성을 분석한 결과 15:0 iso (37.02%), 15:0 anteiso(9.96%), 16:1 w7c(9.91%) 순으로 우점한 지방산 형태로 나타났다(Table 3). 특이적으로, gram 음성균중에서 iso와 anteiso type을 갖는 균주는 *Xanthomonas* sp.로서(20), 본 균주는 *Xanthomonas* 속과 가장 유사한 균체 지방산을 나타내는 균주로 밝혀져 최종적으로 *Xanthomonas* sp. YL-37로 명명하였다.

효소 생산조건 검토



Fig. 1. Scanning electron microscopic photograph of the isolate YL-37 cultured on the isolation medium for 3 days.

Table 1. Comparison of protease activity on the isolated strains

Strain	Clearing zone (mm) ¹⁾	Activity (U/ml) ²⁾
YL-1	14.3	4646
YL-5	13.9	2575
YL-6	13.0	3265
YL-9	15.3	4851
YL-26	12.1	2609
YL-27	13.9	4033
YL-33	13.8	3641
YL-37	16.2	5390
YL-38	15.7	5081

¹⁾ Strains were cultivated on isolation medium (pH 10.0) at 20°C for 3 days, ²⁾ The reaction was carried out for 30 minutes at 20°C.

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the selected strain YL-37

Characteristics	YL-37
Shape	rod
Motility	+
Optimum temp.	20°C
Gram stain	-
Growth in air	+
Catalase	+
Oxidase	-
Glucose(acid)	-
Carbohydrate(F/O/-)	F
Growth in KCN	+
Citrate as C source	+
Gas from glucose	-
MR test	-
VP test	-
Asculin hydrolysis	+
Coenzyme Q	Q-8 ⁺
G+C mol content	65.3%
Indole	-
Gelatin	+
Urease	-
H ₂ S from TSI	-
Lycine decarboxylase	+
Ornithine	+
Arginine	+
Phenylalanine	+
Utilization of carbon source	
Lactose	-
Maltose	-
Mannitol	-
Rhamnose	-
Salicin	-
Sucrose	-
Xylose	-

배양온도의 영향: 분리균주 *Xanthomonas* sp. YL-37를 protease 생산배지에서 15, 20, 28, 37°C 로 4일간 진탕배양하면서 효소생산 최적온도를 검토하기 위하여 배양시간별로 protease 활성을 측정하였다(Fig. 2). *Xanthomonas* sp. YL-37은 20°C 에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으며, 28°C 에서는 현저히 저하되었고 37°C 이상에서는 효소활성을 거의 나타내지 않는 특성을 나타내었다. 이러한 결과는 노 등(13)이 보고한 *Pseudomonas* sp.와 Margesin 등(24)이 보고한 *Bacillus* sp.의 결과와 비슷하였으나, Margesin과 Schinner(6)가 보고한 *Pseudomonas fluorescens*의 최적 생육온도인 10°C 보다는 높았다. 이와 같은 결과로

Table 3. Major fatty acid composition of *Xanthomonas* sp. YL-37 FAME

Feature	Mean(%)
10 : 0	0.51
11 : 0 iso	3.23
11 : 0 anteiso	0.10
10 : 0 3OH	0.16
unknown 11.798	1.41
11 : 0 iso 3OH	1.71
13 : 0 iso	0.46
13 : 0 anteiso	0.10
12 : 0 iso 3OH	0.14
12 : 0 3OH	2.58
14 : 0 iso	0.60
Sum in Feature 1	0.09
14 : 0	3.57
13 : 0 iso 3OH	3.30
13 : 0 2OH	0.37
15 : 1 iso F	1.32
15 : 0 iso	37.02
15 : 0 anteiso	9.96
15 : 0	0.37
16 : 0 iso	0.90
16 : 1 w9c	3.33
16 : 1 w7c	9.91
16 : 0	7.69
iso 17 : 1 w9c	5.22
17 : 0 iso	3.10
17 : 0 anteiso	0.26
17 : 1 w8c	0.14
18 : 1 w9c	1.35
Sum in Feature 7	0.74
18 : 0	0.17

본 균주는 20°C 부근에서 최적 생육온도를 갖는 저온성 균주로 사료된다.

초발 pH의 영향: Protease 생산배지를 각각 다른 pH로 보정하여 효소생산 최적 초발 pH를 검토하기 위하여 20°C 에서 4일간 진탕배양하면서 protease 활성을 측정하였다(Fig. 3). *Xanthomonas* sp. YL-37은 알칼리성 범위인 pH 9.0~12.0에서 효소활성이 높았으며, 효소생산을 위한 최적 초발 pH는 11.0이었다. 그러나 pH 7.0과 pH 13.0 이상에서는 효소활성이 저하되는 특성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Margesin 등(24)이 보고한 *Bacillus* sp.와 노 등(13)이 보고한 *Pseudomonas* sp.의 최적 pH가 10.0이었다는 것과는 약간 상이하였으나 김 등(12)이 보고한 *Bacillus* sp.은 pH 8.0~11.5로서 유사하였다.

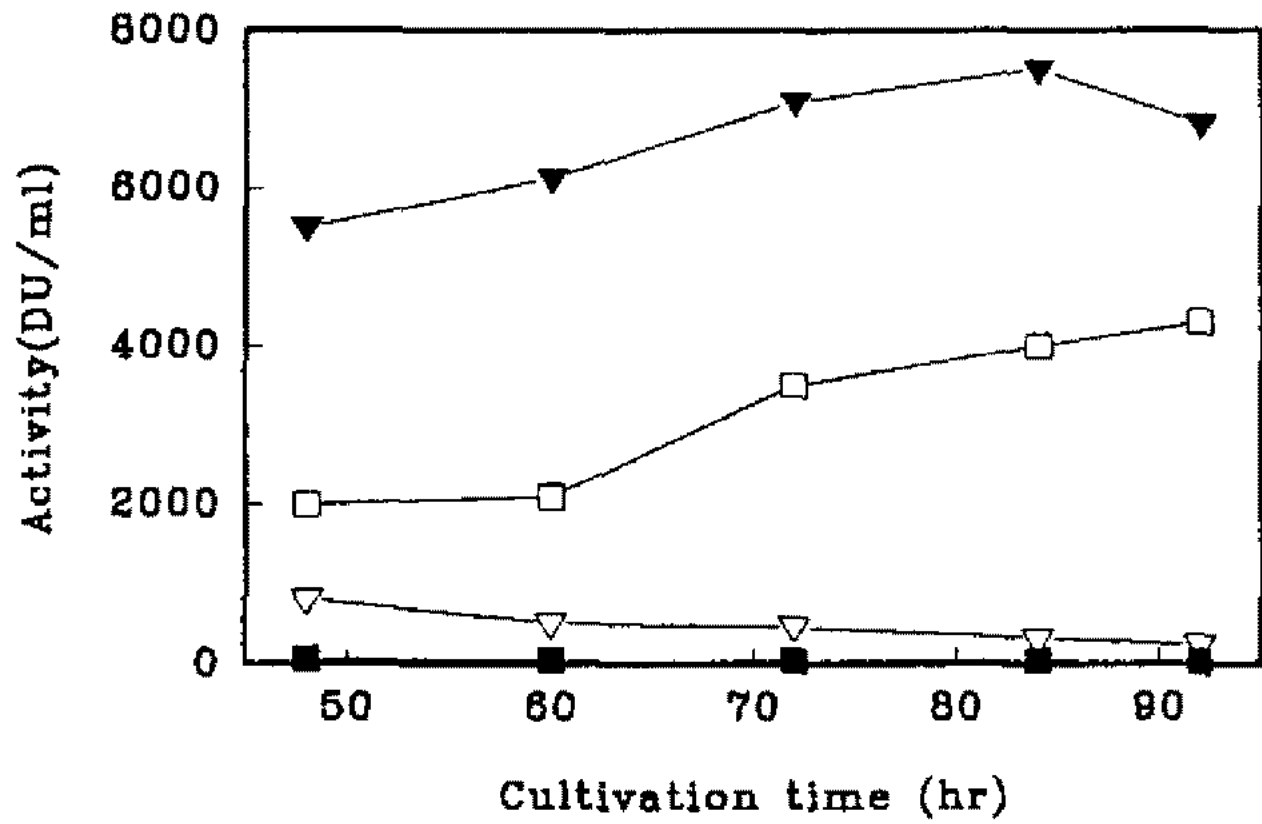


Fig. 2. Effect of temperature on protease production by *Xanthomonas* sp. YL-37. □; 15°C, ▼; 20°C, ▽; 28°C, ■; 37°C

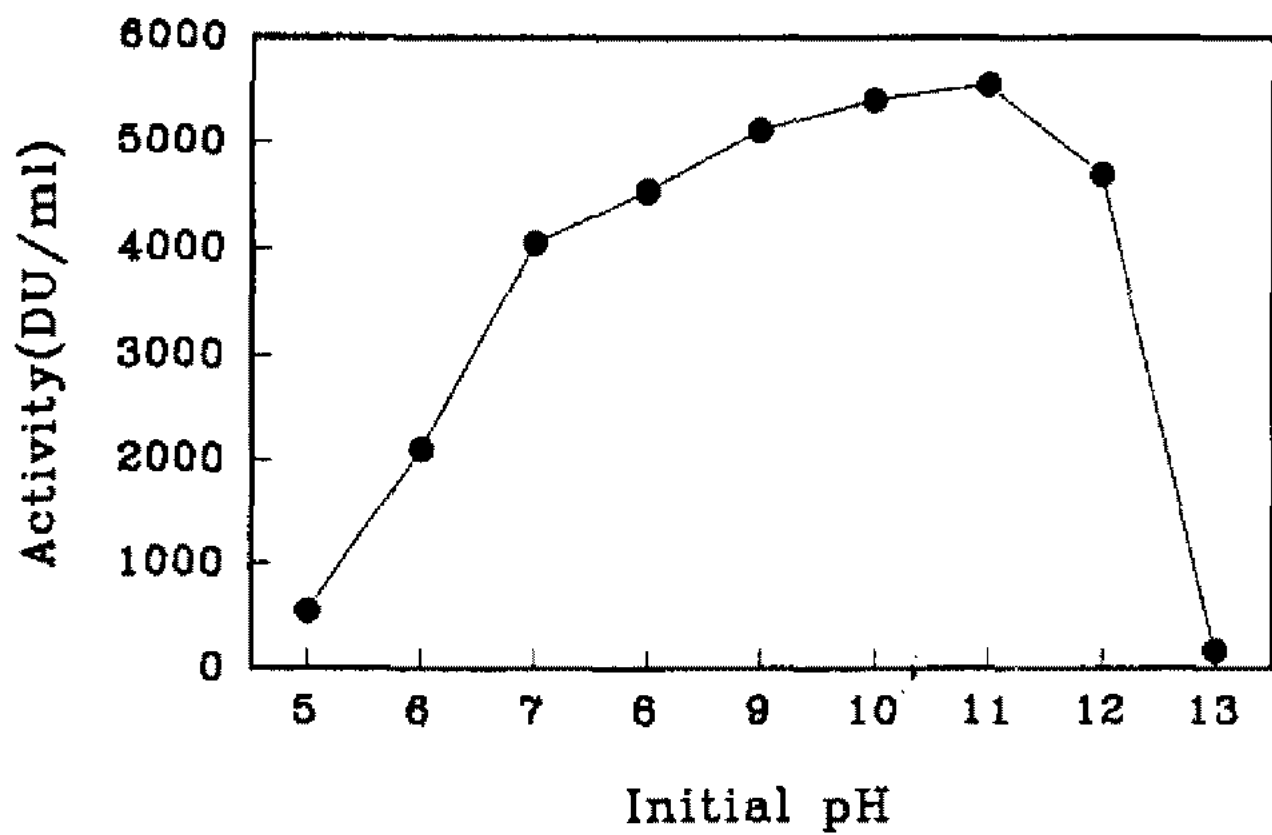


Fig. 3. Effect of initial pH on protease production by *Xanthomonas* sp. YL-37.

배양시간의 영향 : *Xanthomonas* sp. YL-37를 20°C에서 진탕배양 하면서 배양시간의 경과에 따르는 균생육과 효소활성을 측정하였다(Fig. 4). 배양 후 12시간까지는 균생육과 protease의 활성이 거의 없지만 균체증식이 대수적으로 증가되는 배양 후 24시간부터는 효소활성이 급격히 증가하였다. 균체증식의 정지기 말기인 배양 후 84시간에 7,400 DU/ml로 최대의 효소활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 노 등(13)이 보고한 *Pseudomonas* sp.와 Margesin과 Shinner가 보고한 *Pseudomonas fluorescens*가 96시간이었다는 것보다는 조금 빨랐다.

Jar fermenter 배양

Xanthomonas sp. YL-37를 ptorease 생산배지를 사용하여 working volume 3l의 jar fermenter에서 배양하면서 배양시간의 경과에 따른 균체증식, pH, 그리고 protease 활성을 측정하였다(Fig. 5). *Xanthomonas* sp. YL-37은 접종 후 20시간 이내에 pH가 급격히 감소하면서 균체증식은 대수적으로 증식하고

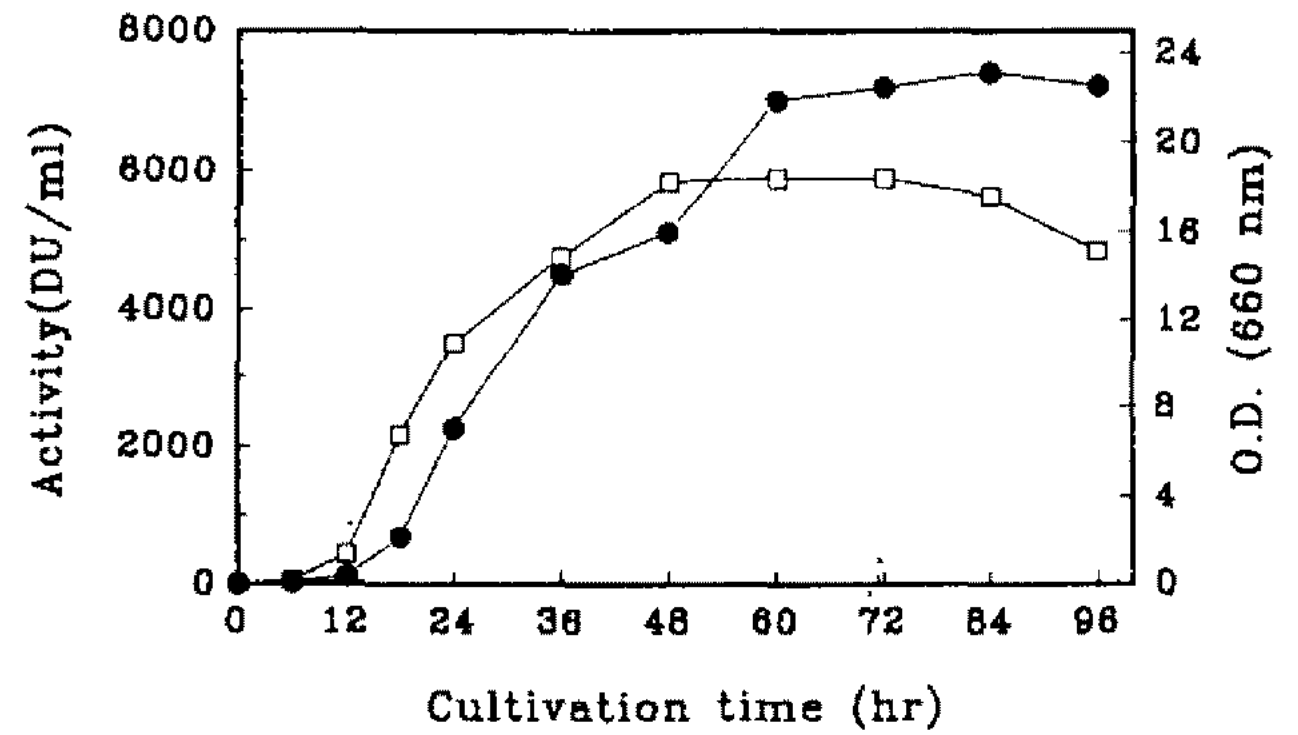


Fig. 4. Time course of cell growth and the production of protease by *Xanthomonas* sp. YL-37. □; Cell growth, ●; Activity

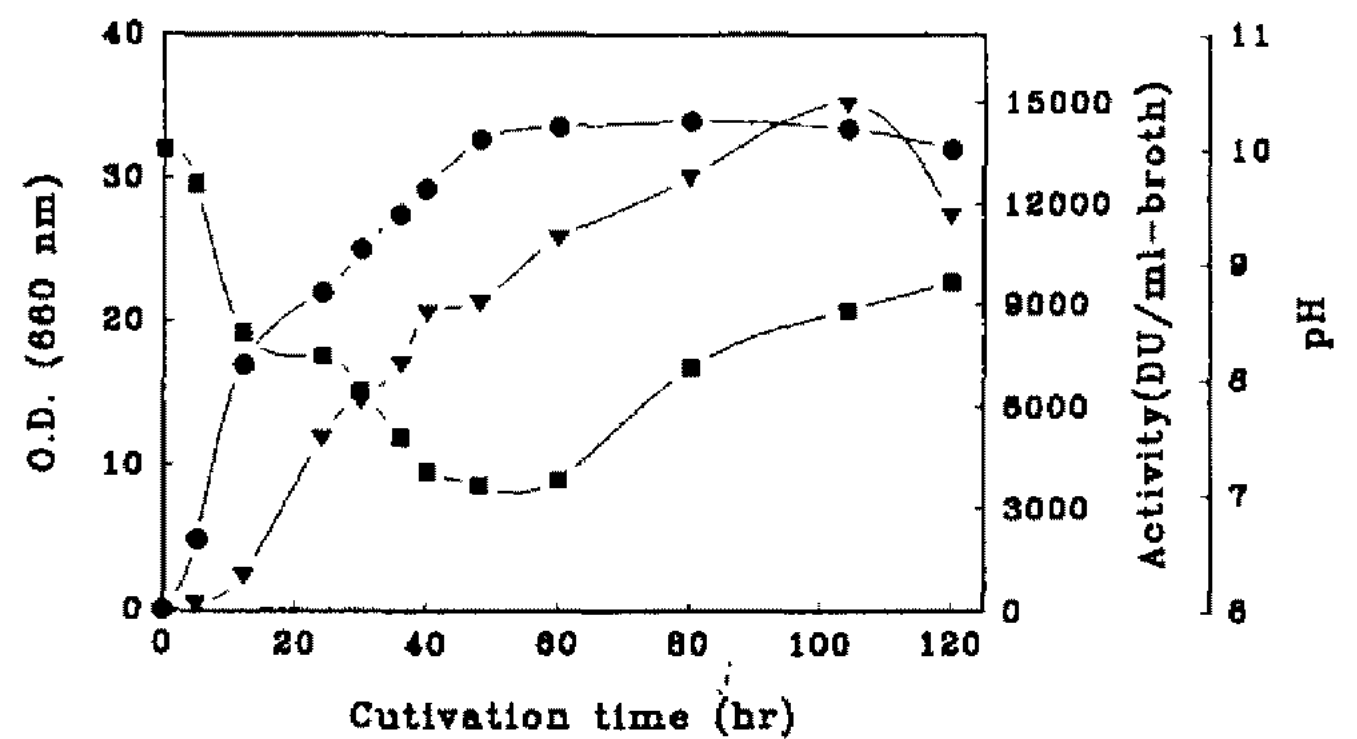


Fig. 5. Profiles of cell growth, pH, and protease production in jar fermenter. ●; Cell growth, ▼; Activity, ■; pH

그 후 pH가 점차 상승함에 따라 균생육이 정지기에 도달하면서 효소역가가 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 최대 효소역가는 배양 후 108시간에 배양액 1 ml당 약 15,000 Delft unit 정도였다. 이와 같은 결과는 Novo사에서 개발된 sabinase 효소역가의 약 50%에 해당된다.

조효소의 성질

최적온도 및 열안정성 : 조효소액과 기질을 혼합하여 각 온도에서 30분간 반응시켜 효소활성을 측정한 결과 protease 활성은 70°C에서 최적이었고, 20°C에서도 최적온도의 약 40% 정도의 활성을 나타내어 동북아시아의 세탁조건에 맞는 세제용 효소로서 이용 가능성이 있다고 사료된다. Novo사의 sabinase와 20°C에서의 활성 비교시 본균주가 80% 정도 더 높은 활성을 나타내었다(별도자료는 제공하지 않았음). Protease의 열안정성은 각 온도별(20~80°C)로 30분간 반응시킨 후 기질을 첨가하여 잔존활성을 측정한 결과 20~50°C에서 안정하였으나 60°C 이상에서는 불안정하였다(Fig. 6). 이와 같은 결과는 배 등(11)이

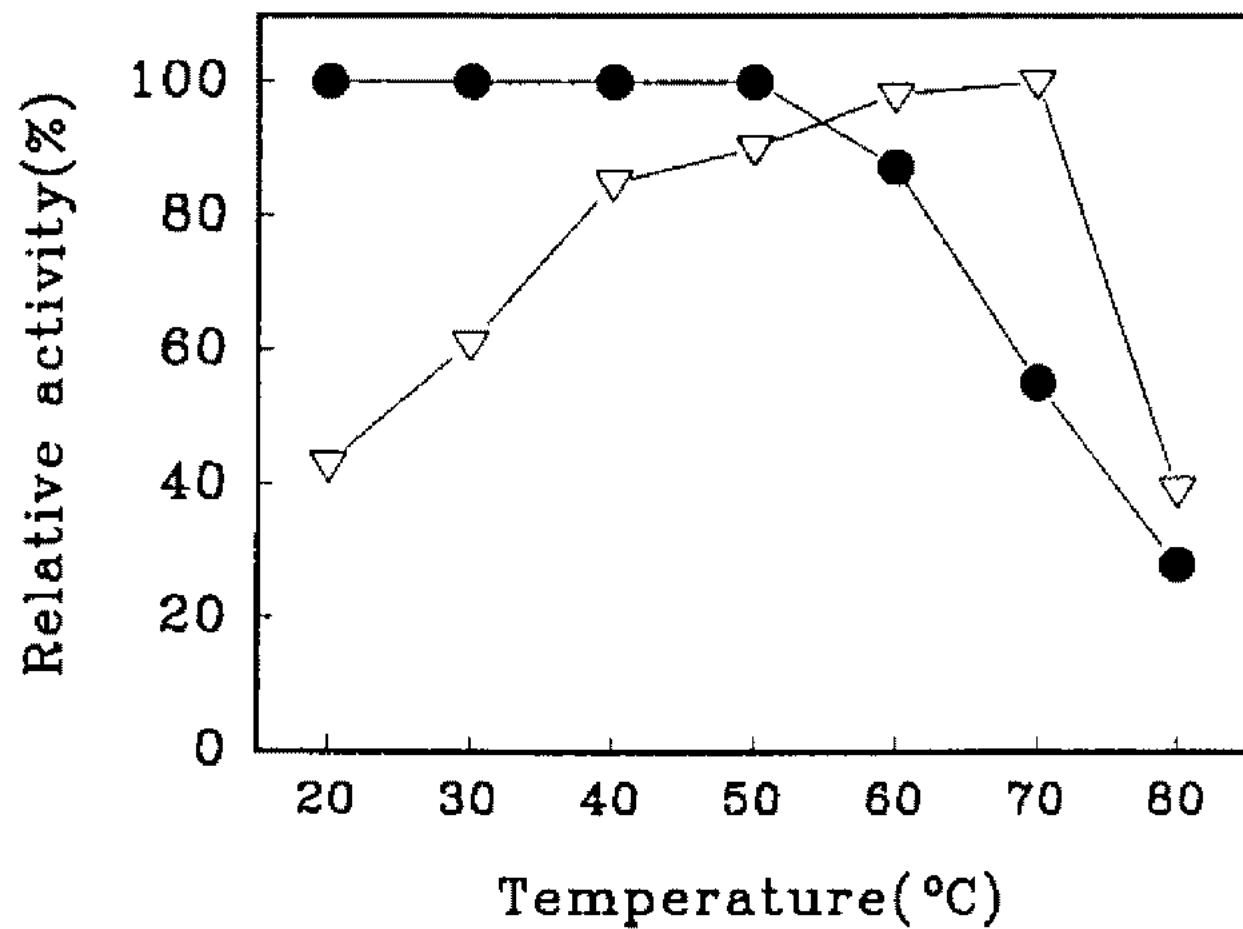


Fig. 6. Effect of temperature on the activity and stability of alkaline protease produced by *Xanthomonas* sp. YL-37.

The reaction was carried out under standard assay condition except that reaction temperature was varied. ∇ ; Optimal temperature, \bullet ; Thermal stability

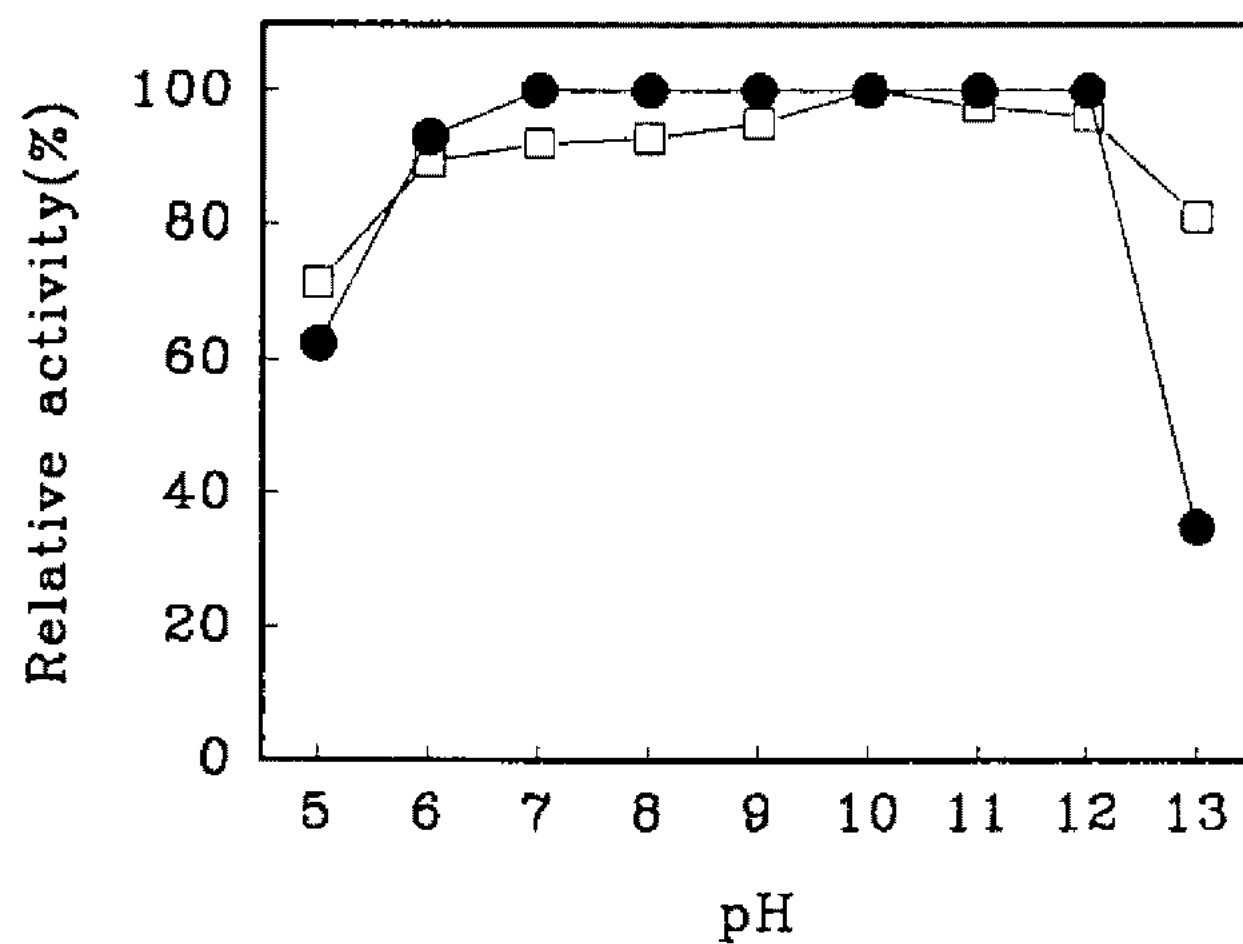


Fig. 7. Effect of pH on the activity and stability of alkaline protease produced by *Xanthomonas* sp. YL-37.

pH 5; Citrate buffer, pH 6; Phosphate buffer, pH 7~9; Tris-HCl buffer, pH 10~11; Sodium borate buffer, pH 12~13; NaOH-KCl buffer

\square ; Optimal pH, \bullet ; pH stability

보고한 *Bacillus* sp.은 최적온도가 70°C 였다는 것과 유사하였으나 김 등(12)과 Margesin 등(24)이 보고한 *Bacillus* sp.은 60°C 였고, 노 등(13)이 보고한 *Pseudomonas* sp.은 40°C 였다는 것과는 상이하였다.

최적 pH 및 안정성: 기질의 pH를 각종 완충용액으로 조절한 후 조효소를 첨가하여 70°C 에서 30분간 반응시켜 효소활성을 측정된 결과, pH 10.0에서 최적 활성을 나타내었으며 pH 7.0~12.0에서도 90% 이상의 높은 활성을 나타내었다. pH 안정성은 조효소액을 여러 완충용액과 혼합하여 50°C 에서 30분간 방치하고

Table 4. Effect of inhibitor on the protease activity produced by *Xanthomonas* sp. YL-37

Inhibitor	Final conc.	Relative activity(%)
Control		100
PMSF ¹⁾	1 mM	14.5
	5 mM	1.1
SDS ²⁾	0.5%	42.6
EDTA ³⁾	1 mM	58.9
	5 mM	49.0
EGTA ⁴⁾	1 mM	49.1
	5 mM	39.7
<i>o</i> -Phenanthroline	1 mM	87.4
	5 mM	85.0
Potassium cyanide	1 mM	97.9
	5 mM	95.5
L-Cytein	1 mM	86.4
	5 mM	66.5

¹⁾Phenylmethanesulfonyl fluoride, ²⁾Sodium dodecylsulfate, ³⁾Ethylenediamine tetraacetic acid, ⁴⁾Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid

최적 pH인 10.0으로 조정된 다음 잔존활성을 측정된 결과 pH 7.0~12.0까지는 안정하였고 pH 13.0과 pH 6.0 이하에서는 활성이 감소하였다(Fig. 7). 이와 같은 결과는 배 등(11)이 보고한 *Bacillus* sp.은 pH 6.0~12.0에서 안정하였다는 것과 유사하였으나 Margesin과 Shinner(6)가 보고한 *Pseudomonas fluorescens*는 pH 6.0~10.0에서 안정하였다는 것과는 약간 상이하였다. 따라서, *Xanthomonas* sp. YL-37이 생산하는 protease는 알칼리 범위(pH 9.0~12.0)에서 효소활성이 우수하여 세제용 효소로 이용 가망성이 높다고 사료된다.

Protease 저해제의 영향

조효소의 활성에 미치는 저해제의 영향을 조사하기 위하여 각각의 저해제를 도표에 표시되어 있는 최종 농도로 첨가하여 50°C 에서 30분간 반응시킨 후 잔존 활성을 측정된 결과 serine 잔기와 작용하는 PMSF에 강한 저해작용을 받았다(Table 4). 지금까지 연구된 거의 모든 알칼리성 protease는 PMSF 및 DFP(Diisopropyl phosphorofluoridate)에 의해서 활성을 상실하므로 이 단백질의 활성부위의 중앙에 serine 잔기를 가지고 있다고 알려졌다(2). 본 균주가 분비하는 protease도 활성부위에 serine 잔기를 갖고 있는 것으로 사료된다.

요 약

저온에서 높은활성을 나타내며, 계면활성제에 내성이 있는 알칼리성 protease를 생산하는 균주를 토양으로부터 분리·선발하였으며, *Xanthomonas* sp. YL-37로 명명하였다. 효소생산을 위한 배양 최적온도, 초발 pH, 그리고 배양시간은 각각 20°C, 11.0, 그리고 84시간이었다. Jar fermenter 배양을 했을 때 배양 후 108시간에 효소의 역가는 약 15,000 DU/ml-broth였다. 본 알칼리성 protease의 최적온도 및 pH는 70°C 및 10.0이었으며, 20°C 에서도 최적활성의 약 40%를 유지하였다. pH 및 열안정성은 각각 pH 7.0~12.0, 온도 50°C 이하에서 비교적 안정하였다. 또한 *Xanthomonas* sp. YL-37이 생산하는 protease는 PMSF에 강하게 저해를 받아서 본 효소는 활성부위에 serine 잔기를 가지고 있는 일종의 serine protease로 사료된다.

참고문헌

- Matsubura, H. and J. Fedder. 1971. *The Enzymes*, Pp. 721. 3rd ed. Academic Press, Vol. 3, New York and London.
- Horikoshi, K. and T. Akiba. 1982. *Alkalophilic Microorganisms*, Pp. 93-101. Scientific Societies Press, Tokyo.
- Shaw, E. and J. Ruscica. 1968. The essentiality of histidine in the catalytic action of subtilisin. *J. Biol. Chem.* **243**: 6312.
- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. alkaline protease produced by *Bacillus* sp. No. 221. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1407-1414.
- Aunstrup, K., H. Outtrup, O. Andresen, and C. Dambmann. 1972. *Proteases from Alkalophilic Bacillus Species*, Pp. 299-305. Fermentation Technology Today(Proceedings of the 4th International Fermentation Symposium), Society Ferment. Technol., Osaka.
- Margesin, R. and F. Schinner. 1992 Production and properties of an extracellular metalloprotease from a psychrophilic *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biotech.* **24**: 207-210.
- Nakanishi, T., Y. Matsumura, N. Minamiura, and T. Yamamoto. 1974. Purification and some properties of an alkalophilic proteinase of a *Streptomyces species*. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 37-44.
- Abbas, C.A., S. Groves, and E. Gander. 1989. Isolation, purification, and properties of *Penicillium charlesii* alkaline protease. *J. Bact.* **171**: 5360-5367.
- Malathi, S. and R. Chakraborty. 1991. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Appl. Env. Microbiol.* **57**: 712-716.
- Willadsen, K.J.S. and K.P. Vestberg. 1976. U.S. Patent No. 3960665.
- 배무, 박필련. 1989. 알칼리성 *Bacillus* sp. No. 8-16의 내열, 알칼리성 단백질 분해효소의 정제와 특성. *산업미생물학회지* **17**: 545-551.
- 김태호, 박성희, 이동선, 김종국, 홍순덕. 1990. 호알칼리성 *Bacillus* 속 균주가 생산하는 alkaline protease의 특성. *산업미생물학회지* **18**: 159-164.
- 노종수, 정영철, 박석규, 성낙계. 1991. 저온 알칼리성 protease를 생산하는 *Pseudomonas* sp. RP-222의 분리 및 조효소의 특성. *산업미생물학회지* **19**: 383-389.
- Onouchi, T. 1986. 세제용효소의 개발. *Bioindustry* **3**: 181-188.
- John, G.H., N.R. Krieg, and P.H.A. Sneath. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Cowan, N.R. and K.J. Steel. 1974. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed. Cambridge University, London.
- Yamada, Y., T. Ohishi, and K. Kondo. 1983. The coenzyme Q system in strains of some yeasts and yeast-like fungi. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **29**: 51-57.
- Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase HPLC. *FEMS Microbiol. Letters* **25**: 125-128.
- Goodfellow, M. and D.E. Minikin. 1985. *Chemical Method in Bacteria Systematics*, Pp. 145-171. Academic Press, New York.
- Miller, L.T. and T. Berger. 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acid, Pp. 228-248. *In Hewlett-Packard Application Note*.
- Leighton, T.J., R.H. Doi, R.A.J. Warren, and R.A. Kelln. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **76**: 103-122.
- Fujii, M., M. Takagi, T. Imanaka, and S. Aiba. 1983. Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* in a vector plasmid and its expression in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* **154**: 831-837.
- Antoon, G.V.V. 1974. Enzyme-polymer complexes. London Patent No. 1353317.
- Margesin, R., N. Palma, F. Knauseder, and F. Schinner. 1992. Purification and characterization of an alkaline serine protease produced by a psychrotrophic *Bacillus* sp. *J. Biotech.* **24**: 203-206.

(Received August 9, 1994)