

토양에서 분리된 *Aeromonas hydrophila* AM-280이 생산하는 단백질 가수분해효소의 특성

김인숙 · 김형권 · 이정기 · 배경숙 · 오태광*

한국과학기술연구원 유전공학연구소

토양으로부터 탈지대두박을 잘 분해하는 단백질 가수분해효소를 생산하는 미생물을 분리하여 형태적, 생화학적 특성과 세포벽 지방산조성을 조사한 결과, 분리된 세균은 *Aeromonas hydrophila*로 동정되었다. 분리된 세균은 glycerol을 탄소원으로, tryptone 및 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 을 질소원으로, CaCl_2 를 무기원으로 사용한 배지에서 효소를 가장 많이 생산하였으며, 생산된 효소의 반응최적 pH는 8.0이고, 반응최적온도는 65°C 였다. 이 효소는 55°C 이하의 온도에서, pH 7.0에서 13.0의 범위에서 비교적 안정한 것으로 나타났다. 또한 이 효소는 금속이온 Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} 및 Zn^{2+} 에 의해서 효소활성이 저해를 받고, 효소저해제 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)와 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)에 의해서 효소활성이 강력히 저해되는 성질로부터 효소활성부위에 serine기와 금속이온을 갖고 있는 것으로 밝혀졌다.

KEY WORDS □ protease, *Aeromonas hydrophila*

단백질 가수분해효소는 세계 효소시장의 60%를 차지할 정도로 산업적으로 중요한 효소이다. 예를 들면, 조미료의 제조, 식품의 연화, 주류의 혼탁방지, 치즈 숙성을 위해서 식품산업에 널리 이용되고 있으며, 효소세제, 환경처리제등으로 환경산업에 이용되고 있다. 또한 소화제, 소염진통제, 혈전용해제등으로 제약공업에 사용될 뿐 아니라 피혁 가공공업에도 널리 사용되고 있다. 또한 산업기술이 발전하고 청정산업의 요구도가 점차 커짐에 따라서 효소의 용도가 더욱 다양하게 개발되고 있다.

단백질 가수분해효소는 동물, 식물 및 미생물에 의해 다양하게 생산되고 있는데, 이 중에서 미생물 기원의 단백질 가수분해효소에 관한 연구는 *Bacillus* 속(1, 2, 9, 12, 13), *Pyrococcus* 속(11), *Streptomyces* 속(3, 4, 5, 8, 17), *Staphylococcus* 속(16) 및 *Rhizopus* 속(6)을 중심으로 진행되어 왔다. 특히 단백질 가수분해효소를 세제용으로 사용하기 위해서 호알카리성 효소가 중점적으로 탐색되어 이용되어 왔다. 한편, 현재까지 보고되고 있는 단백질 가수분해효소의 탐색에서는 비교적 물에 잘 녹는 기질인 skim milk 또는 casein salt를 사용 하기 때문에, 기존의 효소를 이용하여 물에 친화력이 낮은 천연 상태의 단백질을 분해하는 데에는 상당히 어려움이 있다.

본 연구에서는 물에 친화력이 낮으며 유기용매에 의해 변성된 탈지대두박을 기질로 사용하여, 고온에서 작용하는 단백질 가수분해효소를 생산하는 세균을 탐색하여 동정하였고, 탐색된 균주가 생산하는 단백질 가수분해효소의 최적 생산조건과 효소적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선정

전국에서 수집된 50여점의 토양과 폐수를 멸균수로 희석한 후, KH_2PO_4 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, NaCl 0.3%에 탄소원으로 glycerol 0.2%, 질소원으로 탈지대두박(defatted soybean powder) 0.5%, polypeptone 1%, yeast extract 0.5%가 포함된 균주분리용 배지에 도말한 후 37°C 에서 24시간 배양하여 세균을 1차로 선별하였다. 질소원으로 탈지대두박만 2% 포함된 균주분리용 배지의 변형배지를 이용하여 선별된 세균을 액체배양한 후 탈지대두박을 기질로 단백질 가수분해효소의 역가를 측정하여 활성이 높은 균주를 2차 선정하였다. 2차로 선정된 균주중 효소의 열에 대한 특성을 조사하여 최적반응온도가 가장 높은 효소를 생산하는 균주를 최종 선발하였다.

균주의 동정

분리선정된 균주는 그람염색과 API Kit (API 20E, 20NE, 32CN)를 이용하여 균주를 동정한 결과와 세균의 세포벽 지방산 조성을 분석한 결과를 MIDI (Microbial Identification) system (14)으로 분석한 결과를 토대로 동정되었다.

효소의 생산조건 검토

효소의 생산조건을 최적화하기 위해서, 기본배지 (K_2HPO_4 2.4 g/l, KH_2PO_4 2.4 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/l)에 탄소원 10 g/l, 질소원 1 g/l, 무기염 0.1 g/l를 각각 첨가하여 37°C 에서 24시간 배양한 후 효소활성 및 균체중식량(600 nm)을 측정하여, 효소의 생산량이

가장 많은 탄소원, 질소원 및 무기염을 결정하였다.

효소의 활성 측정

효소의 활성 측정은 초기단계 효소탐색시에는 탈지대두박을 기질로 하여 측정하였고, 균주가 선정된 후에는 탈지대두박의 불균일성과 물에 녹지 않는 성질때문에 기질용액의 제조가 문제시되고, 반복성있는 실험결과를 얻기가 어려워 비교적 균일한 기질인 Hammarsten casein을 사용하여 효소의 특성을 조사하였다. 효소의 활성 측정은 Sutar 등 (15)의 방법에 따라 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시킨 0.6% Hammarsten casein용액 3 ml에 효소용액 0.5 ml을 첨가하여 55°C에서 30분간 반응시킨후 0.44 M trichloroacetic acid (TCA)용액 3.2 ml을 첨가하여 실온에서 20분간 방치함으로써 반응하지 않은 단백질을 침전시킨 후 Whatman NO. 5 여과지로 여과한 후에 275 nm에서 여과액의 흡광도를 측정하였다. 탈지대두박을 사용할 시는 Hammarsten casein대신 탈지대두박을 사용하였고 TCA용액으로 침전시킨 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리한 상등액 1 ml에 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 ml, Folin reagent 0.5 ml을 넣고서 37°C에서 30분간 발색시킨후 575 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 Unit는 Hammarsten casein을 사용했을시 275 nm에서 분당 흡광도를 0.1만큼 변화시키는 효소의 양으로 하였다.

조효소액의 제조

효소의 특성을 조사하기 위해서 배양액으로부터 효소를 부분 정제하여 사용하였다. Ammonium sulfate 30~80% 분획에서 침전된 단백질을 각각 원심분리하여 회수한 후 소량의 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 녹이고 4°C에서 동일한 완충액 3/씩 3회 반복하여 투석한 후에 DEAE-agarose column을 통해 효소단백질을 부분 정제하였다.

DEAE-agarose column (2.5 φ×14 cm)은 10 mM potassium phosphate (pH 7.0) buffer로 평형후 분리효소액을 투여하여 비흡착단백질을 용출시킨 후 0.0~0.5 M의 KCl이 포함된 동일한 buffer로 흡착단백질을 40 ml/hr 속도로 용출시키고 이중 효소활성이 있는 단백질 분획을 모아서 Amicon 농축기로 농축한 후에 조효소액으로 사용하였고 이 조효소액을 이용하여 효소의 특성을 조사하였다.

효소의 특성조사

탐색된 단백질 가수분해효소의 기질 특이성을 살펴보기 위해서 탈지대두박의 분해력과 일반적 기질인 Hammarsten casein의 분해력의 상대비를 시판효소인 Protease P (Ammono사), Bromelain (Kyowa사), Corolase PP (Otto Rohm사), Papain (Sigma), Trypsin (Sigma)과 비교하였다. 최적반응조건, 안정성, 효소역가에 대한 금속이온의 효과 및 효소저해제에 관한 실험은 상법에 의해서 행하였다.

결과 및 고찰

Table 1. Physical and biochemical characteristics of isolated strain AM-28.

Factor	Result
β-Galactosidase (ONPG, PNPG)	+
β-Glucosidase (Esculin hydrolysis)	+
Arginine dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	-
Tryptophane deaminase	-
Urease	-
Gelatin liquefaction	+
Catalase	+
Citrate utilization	-
H ₂ S production	-
Indole production	+
Acetoin production (VP reaction)	+
Nitrate reduction to nitrite	+
Nitrite reduction to N ₂	-
Motility	+

Table 2. Carbon and nitrogen utilization of isolated strain AM-28.

Factor	Result	Factors	Result
Fermentation/Oxidation of glucose	+(F)	Assimilation of D-sorbitol	-
mannitol	+(F)	L-arabinose	+
inositol	-	propionate	-
sorbitol	-	valerate	+
rhamnose	-	citrate	-
sucrose	+(F)	histidine	+
melibiose	-	2-ketogluconate	-
amygdalin	+(F)	3-OH-butyrate	-
arabinose	+(F)	4-OH-benzoate	-
Assimilation of arabinose	+	L-proline	+
mannose	+	rhamnose	-
mannitol	+	D-ribose	+
N-acetyl-glucosamine	+	inositol	-
maltose	+	D-saccharose	+
gluconate	+	maltose	+
caprate	+	itaconate	-
adipate	+	suberate	-
malate	+	malonate	+
citrate	-	acetate	+
phenyl-acetate	-	DL-lactate	+
D-glucose	+	L-alanine	+
salicin	+	5-ketogluconate	-
D-melibiose	+	glycogen	+
L-fucose	-	3-OH-benzoate	-
		L-serine	+

탐색된 균주의 동정

탐색된 세균중 탈지대두박에 분해력이 상대적으로 강한 AM-28 균주를 동정하기 위해서 Gram 염색을 행한 결과 Gram 음성의 간균임을 알수 있었고,

Table 3. Cellular fatty acid profile of isolated strain AM-28.

Fatty acid	Result (%)
10:0	—
10:0 3OH	—
12:0	4.85
12:0 2OH	—
12:1 3OH	—
Unknown	0.75
14:0	3.67
15:0	0.69
14:0 3OH/16:1 iso I	4.40
16:1 w7c	40.74
16:0	24.25
iso 17:1 w9c	0.48
17:1 iso I/anteiso B	—
17:1 w8c	0.75
17:0 cyclo	—
17:0	0.69
18:1 w7c/w9t/w12t w9c/w12t/w7c w12t/w9t/w7c	18.03
18:0	0.70
19:0 cyclo w8c	—

Table 1의 생리, 생화학적 성질에서 보는 바와 같이 이동성이 있고 VP-test 및 oxidase 양성임을 알 수 있었다. 또한, Table 2에 나타난 당 및 질소원의 이용성에서 *Aeromonas hydrophila*와 98% 이상의 동질성을 가지며, 분리된 세균의 세포벽의 지방산을 조사한 결과 Table 3과 같은 조성의 지방산 profile을 가졌고 이 지방산조성을 기초로 하여 MIDI system (14)의 데이터베이스를 활용하여 조사하여 본 결과 *A. hydrophila*의 세포벽 지방산과 99%의 동질성을 갖는다고 판명되었다. 이상의 결과로부터 분리된 세균은 *A. hydrophila*로 동정되었고 *A. hydrophila* AM-28로 명명하였다.

효소의 생산조건

효소의 생산조건은 주로 탈지대두박 분해력을 기준으로 조사하였다. 효소의 생산 조건중 탄소원의 영향을 살펴보기 위해서 질소원으로 polypeptone을 사용하고 각 탄소원별 효소생산량과 세균의 생육 정도를 조사하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다.

Molasses, starch, sucrose, trehalose, glycerol, mannose를 탄소원으로 사용한 경우, 효소의 생산량이 높게 나타났으며, glycerol을 사용한 경우에 효소가 가장 많이 생산되었다. 특히 glycerol의 경우는 세균 생육에 대한 효소생산량이 다른 탄소원에 비해서 월등히 높게 나타나서 효소생산용 탄소원으로 적합하다고 판정되었다 (Fig. 1).

질소원의 효소생산에 미치는 영향을 살펴보기 위해서 탄소원으로 glycerol을 사용하고 질소원을 달리 하여 효소생산량을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이

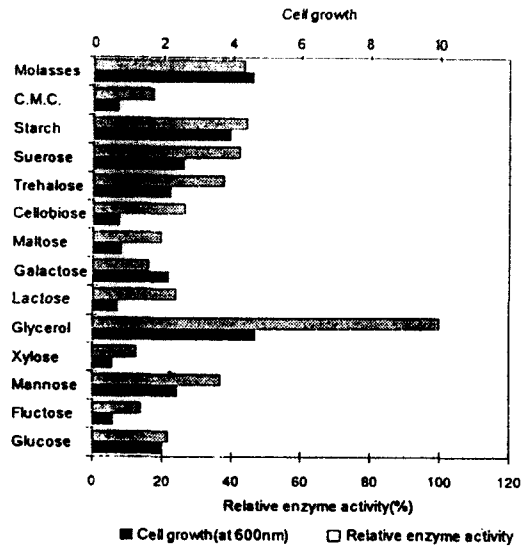


Fig. 1. Effect of carbon sources on the enzyme production.

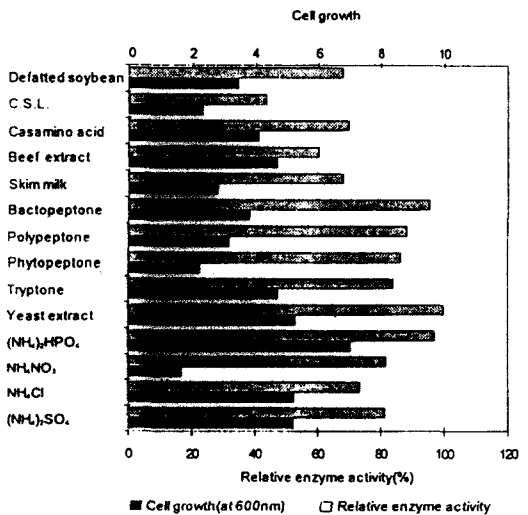


Fig. 2. Effect of nitrogen sources on the enzyme production.

질소원으로 bactopeptone, polypeptone, phytopeptone, trypton, yeast extract, (NH₄)₂HPO₄를 사용한 경우에 효소 생산량이 높게 나타났다.

그림에서 보는 바와 같이 균체생산량이 적고 효소 생산량이 많은 tryptone과 효소의 생산량이 가장 많은 yeast extract와 (NH₄)₂HPO₄를 최종적으로 선발하여, 효소의 생산시 이중 한가지를 사용하였다. 탄소원으로 glycerol, 질소원으로 tryptone을 사용하고 무기염을 달리하여 효소생산을 비교한 결과 Fig. 3에 보는 바와

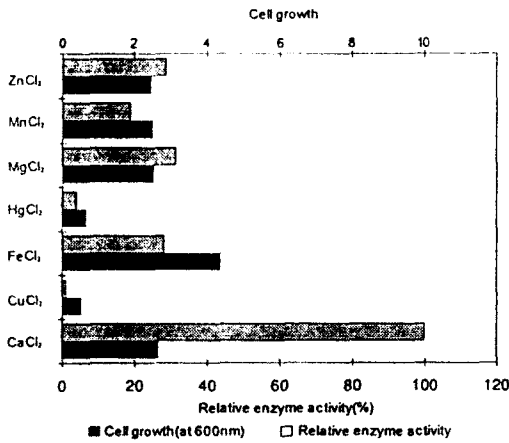


Fig. 3. Effect of metal sources on the enzyme production.

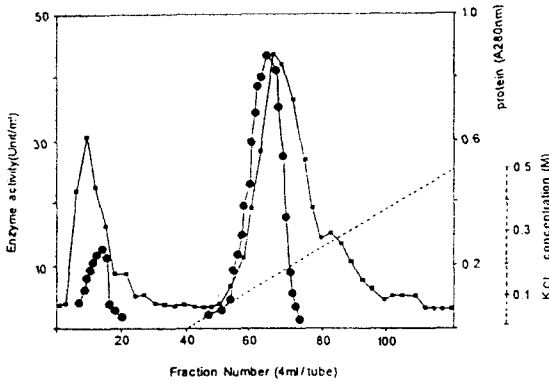


Fig. 4. Ion exchange chromatogram on DEAE-agarose column of crude *A. hydrophila* protease. -●-, enzyme activity; -■-, protein concentration (A280 nm).

같이 CaCl₂을 첨가했을 때 효소생산량이 가장 많은 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 본 선정세균으로 탈지대두박을 분해하는 단백질 가수분해효소를 생산할 때는 탄소원으로 glycerol, 질소원으로는 tryptone, yeast extract 및 (NH₄)₂HPO₄ 중 한가지, 무기염으로 CaCl₂를 사용하는 것이 가장 효과적임을 알 수 있다.

조효소액의 제조

균이 생산하는 단백질 가수분해효소의 특성을 조사하기 위해서 이 균의 배양액으로부터 효소단백질을 부분정제하였다. 배양액은 배양 중 생성물 또는 분해물이 효소특성 조사시 효소의 역가에 영향을 미칠 수 있기 때문에 부분정제된 효소를 조효소로 사용하였다. Ammonium sulfate 침전 후에 투석을 수행한 조효소액을 DEAE-agarose column을 통과시킨 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 2개의 효소활성 분획을 얻었고 이중 흡착되어 분리된 단백질 분획을 조효소로

Table 4. Comparison of proteolytic activity against defatted soybean and Hammarsten casein among various commercial proteases and screened protease.

Enzymes	Activity (unit/mg protease) on		Relative activity (%) ^a
	Defatted soybean	Hammarsten casein	
Protease p	7.5	37.6	20
Bromelain	3.1	11.1	28
Corolase p.p	8.5	36.2	24
Trypsin	5.9	7.9	74
Papain	7.9	9.8	80
Screened protease	9.0	14.4	63

$$^a = \frac{\text{Activity on Defatted soybean}}{\text{Activity on Hammarsten cassin}} \times 100$$

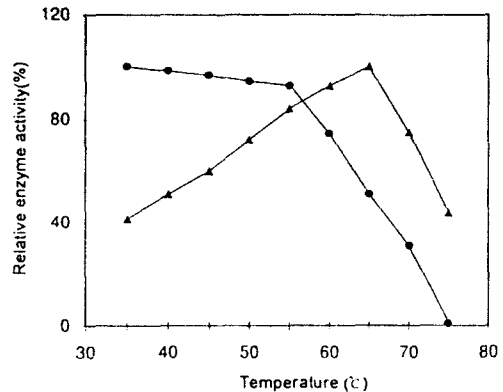


Fig. 5. Effect of temperature on the protease activity (-●-) and stability (-▲-).

사용하였다.

효소의 탈지대두박 분해력

시판용효소와 *A. hydrophila* AM-28의 배양액으로부터 얻은 조효소액을 이용해서 탈지 대두박과 Hammarsten casein에 대한 분해력을 비교하였다. Table 4의 결과와 같이 선발된 *A. hydrophila* AM-28의 단백질 가수분해효소가 동, 식물에서 유래된 trypsin이나 papain에 비해서 탈지대두박/Hammarsten casein의 비가 낮지만 다른 시판용 효소에 비해서 높았다. 특히, 같은 효소량으로 비교해 볼때 *A. hydrophila* AM-28가 분비하는 효소가 시판효소에 비해서 탈지대두박의 분해력이 우수하였다.

효소의 최적반응조건 및 안정성

생산된 효소의 최적 반응온도를 알아보기 위하여 35~75°C에서 각각 30분씩 반응시킨 후 효소의 역가를 측정하였고 온도에 대한 안정성은 조효소액을 35~75°C에서 각각 30분씩 열처리한 후 효소의 잔존

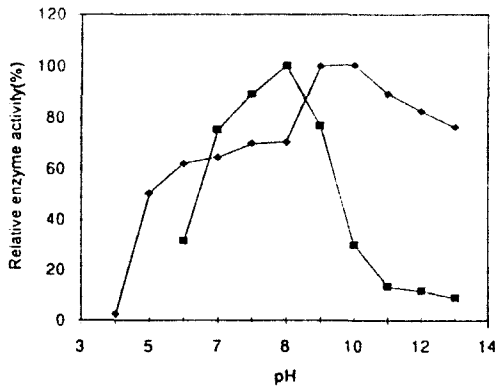


Fig. 6. Effect of pH on the protease activity (◆) and stability (■).

Table 5. Effects of metal ions on the protease activity.

Metal ions	Concentration	Relative activity (%)
None	-	100
	-	100
CaCl ₂	1 mM	100
	5 mM	30
CuCl ₂	1 mM	18
	5 mM	0.2
HgCl ₂	1 mM	1.9
	5 mM	0.6
MgCl ₂	1 mM	96
	5 mM	54
MnCl ₂	1 mM	65
	5 mM	7.9
KCl	1 mM	92
	5 mM	110
ZnCl ₂	1 mM	42
	5 mM	2.8

Table 6. Effects of inhibitors on the protease activity.

Inhibitor	Concentration	Relative activity (%)
None	-	100
	-	100
N-Ethylmaleimide	1 mM	110
	5 mM	115
PMSF	1 mM	79
	5 mM	44
EDTA	1 mM	41
	5 mM	22
Iodoacetamide	1 mM	100
	5 mM	100

PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride.
EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid.

활성을 측정하였다. 그 결과 효소의 최적 반응온도는 65°C 이었고 온도에 대한 안정성은 55°C 부터 활성이 떨어지기 시작하여 65°C 에서 50%의 잔존활성을 나

타내었다. 또한, 이 효소의 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 6.0~13.0 buffer에 0.6%의 Hammarsten casein을 용해시킨 기질을 사용하여 효소의 역가를 측정하였고 효소의 pH에 대한 안정성은 pH 4.0~13.0 buffer에 농축된 효소용액을 첨가하여 30°C에서 1시간 항온 처리 후 효소의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 이 효소의 최적 pH는 8.0이었고 pH 7.0에서 pH 13까지 비교적 안정하였다 (Fig. 6).

금속이온 및 효소 저해제의 영향

효소활성에 미치는 금속이온의 영향을 Table 5에 나타내었다. 단백질 가수분해활성이 1 mM 농도의 Cu²⁺와 Hg²⁺에 의해 강력히 저해되었으며, 5 mM 농도의 K⁺에 의해 약간 증가하였고, 5 mM 농도의 Ca²⁺에 의해 상당히 저해되었다. 효소 활성에 대한 효소 저해제의 영향은 Table 6에 나타난 바와 같이 cysteine protease의 저해제인 N-ethylmaleimide 및 iodoacetamide에 의해 효소 활성이 저해받지 않았고 오히려 5 mM 농도에서는 효소활성이 증가하는 양상을 보였다. Serine protease의 저해제인 PMSF, metal protease인 EDTA에 저해를 받는 특성으로 보아 효소의 활성장기부분에 serine기와 metal이 관여하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 김태호, 박성희, 이동선, 권태규, 김종국, 홍순덕, 1990. 호알칼리성 *Bacillus*속 균주가 생산하는 alkaline protease의 특성. 한국산업미생물학회지 18 (2), 151-164.
- 배 무, 박필현, 1989. 알칼리성 *Bacillus* sp. NO. 8-16의 내열, 알칼리성 단백질 분해효소의 정제와 특성. 한국산업미생물학회지 17 (6), 545-551.
- 윤성우, 이강표, 유주현, 신철수, 오두환, 1989. *Streptomyces* sp. YSA-130이 생산하는 alkaline protease의 정제와 특성. 한국산업미생물학회지 17 (4), 358-364.
- 최 청, 정영건, 성삼경, 최광수, 이재영, 조영재, 권 오진, 1992. *Streptomyces*속 균주가 생산하는 alkaline protease의 생산 및 정제. 한국산업미생물학회지 20(2), 169-177.
- Bascaran, V., C. Hardisson, and A.F. Brana, 1990. Regulation of extracellular protease production in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 208-213.
- Farley, P.C. and L. Ikasari, 1992. Regulation of the secretion of *Rhizopus oligosporus* extracellular carboxyl proteinase. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2539-2544.
- Peek, K., R.M. Daniel, C. Monk, L. Parkker, and T. Coolbear, 1992. Purification and characterization of a thermostable proteinase isolated from *Thermus* sp. strain Rt 41A. *Eur. J. Biochem.* 207, 1035-1044.
- Licaenstien, H.S., L.A. Busse, G.A. Smith, N.M.O. McGinley, M.F. Rohde, J.L. Katowitz, and M.M. Zukowski, 1992. Cloning and characterization of

- a gene encoding extracellular metalloprotease from *Streptomyces lividans*. *Gene* **111**, 125-130.
9. Mao, W., P. Pan, and D. Freedman, 1992. High production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in a fed-batch fermentation using a synthetic medium. *J. Ind. Microbiol.* **11**, 1-6.
 10. Palleroni, N.J., 1989. Pseudomonadaceae P. In N. R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
 11. Eggen, R., A. Geerling, J. Watts, and M. Willem, 1990. Characterization of pyrolysins, a hyperthermoactive serine protease from the archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**, 17-20.
 12. Rufo, G.A., B.J. Sullivan, A. Sloma, and J. Pero, 1990. Isolation and characterization of a novel extracellular metalloprotease from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **172**, 1019-1023.
 13. Sloma, A., G.A. Rufo, Jr., C.F. Rudolph, B.J. Sullivan, K.A. Theriault, D. Ally, and J. Pero, 1990. Gene encoding a novel extracellular metalloprotease in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **192**, 1024-1029.
 14. Stager, C.E. and J.R. Davis, 1992. Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 302-327.
 15. Sutar, I.I., M.C. Srinivasan, and H.G. Vartak, 1991. A low molecular weight alkaline proteinase from *Conidiobolus coronatus*. *Biotechnol. Lett.* **13**, 119-124.
 16. Teufel P. and F. Götz. 1993. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* **175**, 4218-4224.
 17. Vinci, V.A., J.S. Aphale, G.D. Gibb, and W.R. Strohl, 1993. Purification and properties of the chymotrypsin-like serine proteinase overproduced by *Streptomyces* sp. strain C₅-A₁₂. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 69-73.

(Received May 30, 1994)

(Accepted July 27, 1994)

ABSTRACT: Properties of Protease from *Aeromonas hydrophila* AM-28 Isolated from Soil

Kim, In-Sook, Hyung-Kwoun Kim, Jung-Kee Lee, Kyung-Sook Bae, and Tae-Kwang Oh* (Genetic Engineering Research Institute, KIST, Daejeon 305-606, Korea)

A bacterial strain NO. AM-28, showing proteolytic activity against defatted soybean was isolated from domestic soil. The isolated strain was identified as *Aeromonas hydrophila* by both the biochemical tests using API kit and the analysis of cellular fatty acid profile with MIDI system. The protease production from *A. hydrophila* AM-28 was highly enhanced when it was cultivated in the medium containing glycerol as a carbon source, tryptone or (NH₄)₂HPO₄ as a nitrogen source, and CaCl₂ as a mineral source. The optimal pH and temperature for the enzyme was 8.0 and 65°C, respectively. The enzyme was stable up to 55°C and at pH values ranging from 7.0 to 13.0. The enzyme activity was inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride and EDTA, indicating that serine residue and metal ions be involved in enzyme activity.