

Serratia marcescens Protease의 효소학적 특성

최 병 범

신흥대학 식품영양과

Enzymatic Properties of *Serratia marcescens* Protease

Byung-Bum Choi

Department of Food and Nutrition, Shinheung College

Abstract

Serratia marcescens ATCC 25419 protease was purified to homogeneity by ammonium sulfate treatment, and DEAE-cellulose anion exchange chromatography. The specific activity of the enzyme was increased 448-fold during purification with an overall yield of 43.0%. Metal reactivation on the purified protease from *S. marcescens* was studied. *S. marcescens* protease was a metalloenzyme to be completely inhibited its activity by EDTA and the enzyme outstandingly inhibited by Hg, Fe, Cu, but the activity was increased approximately 20% by Co. The reactivation of the apoenzyme was effective with Mn, Co, Zn in pH range from 6 to 8. Among metalloenzymes prepared to the addition of Mn, Co, Zn to restore the degree of activity of native enzyme, Zn-enzyme was similar to the native enzyme in respects with enzyme activity, alkali-inactivation, thermo-stability.

Key words : protease, reactivation, purification, *Serratia marcescens*.

서 론

*Serratia marcescens*는 *Escherichia coli*나 *Salmonella typhimurium* 같은 enterobacteria와는 다르게 protease를 주위 배지에 분비하며¹⁾ *S. marcescens*의 대부분의 균주들은 Zn을 함유하고 최적 pH가 9.5인 알칼리성 metalloprotease를 생산한다고 보고되었다²⁻⁶⁾. *S. marcescens* metalloprotease의 기질 특이성은 *Bacillus thermoproteolyticus*가 생산하는 thermolysin과 유사하며 *S. marcescens* sp. E-15 protease는 분자량이 60,000 달톤, Zn-효소이고 cystine이나 methionine 같은 황-아미노산이 없으며 insulin의 β -사슬을 12개의 peptide 조각으로,

benzoylglycylleucinamide를 천천히 가수분해하지만 di-, tri-peptide 등을 가수분해하지 못한다고 보고하였다^{2,3)}. Aiyappa와 Harris는 skim milk 배지에서 *S. marcescens* protease를 분리하여 최적 pH는 6~9, 최적 온도는 45°C이고 EDTA와 o-phenanthroline에 의해 활성이 억제되고 Fe²⁺로 재활성화된다고 보고하였다⁴⁾. Lyerly 등은 *S. marcescens* BG protease는 최적 pH가 5.5~7.5 사이, 효소 1몰당 1 원자의 Zn와 7 원자의 Ca이 들어 있고 많은 산성아미노산 잔기가 있으나 황-아미노산이 없다고 보고하였다⁵⁾. *S. marcescens* ATCC 21074 protease는 30°C에서 24 시간 동안 자가분해되지 않으나 변성시 쉽게 자가 분해되며 thermolysin에 의해

† Corresponding author : Byung-Bum Choi, Department of Food and Nutrition, Shinheung College, 117 Howon-dong, Uijeongbu-city, Kyeonggi-do, 480-701 Korea.

Tel : 031-870-3397, Fax : 031-870-3397, E-mail : bbchoi@mail.shc.ac.kr

서도 쉽게 분해된다고 보고되었다⁷⁾. *S. marcescens* sp. E-15와 ATCC 21074 protease는 유전자의 염기서열을 결정하였으며^{8,9)} 3개의 Zn 리간드와 활성 부위가 추정되고 있다⁹⁾. *S. marcescens* protease는 fibrinectin, collagen 그리고 혈청단백질 등도 분해하며 *S. liquefaciens* protease도 혈청단백질을 분해하는 혈청학적 유사성을 보여주었다^{10, 11)}. *S. marcescens* 주요와 소수 protease는 서로 낮은 유전자 유사성을 나타내며 소수 효소는 *Erwinia caratovora* metalloprotease와 높은 유전자 유사성을 보여주었다¹²⁾. 한편, *S. marcescens* metalloprotease는 현재 소염제로 널리 사용되고 있어 주목의 대상이 되고 있다¹³⁾. 쥐의 인플루엔자 바이러스 감염의 병원성 혈관 침투성이 *S. marcescens* metalloprotease에 의해 증가된다고 보고되었다^{14,15)}. 본 실험에서는 대부분 Zn-효소인 기존의 metalloprotease와 비교하기 위하여 *Serratia marcescens* ATCC 25419로부터, 소염제로 널리 사용되는 *S. marcescens* protease를 one-step column으로 정제한 후 아포효소 (apoenzyme)를 제조하여 이 아포효소로부터 *S. marcescens* protease의 급속에 의한 재활성화 등 *S. marcescens* protease의 효소학적 특성을 연구하였다.

실험 재료 및 방법

1. 실험균주

Serratia marcescens ATCC 25419는 Louisiana State University의 Braymer 교수로부터 분양 받아 사용하였다.

2. 시 약

Vitamin-free casein, DEAE-cellulose, TCA (trichloroacetic acid), sodium phosphate, potassium phosphate, sodium citrate, magnesium sulfate, ammonium sulfate, BSA (bovine serum albumin), trizma base, EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), DTT (dithiothreitol), peptone, glycerol 등은 Sigma사 제품을 사용하였다. 그리고 BHI (brain heart infusion), MRS는 Difco사 제품을, acrylamide, N,N-methylene-bis-acrylamide, ammonium persulfate 등은 Bio-Red사 제품을 사용하였고 Temed(tetramethylenediamine)는 Merck사 제품을 사용하였다. 그밖에 실험에 사용한 모든 시약은 시중에서 구입한 특급 내지 일급품을 사용하였다.

3. *Serratia marcescens* protease의 활성도 측정

50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 7.5)으로 희석한 효소용액 1 ml과 역시 같은 완충용액에 녹인 1%

(w/v) vitamin-free casein 용액 1 ml을 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응을 50% (w/v) TCA용액 3 ml을 가하여 멈춘 후, 반응 혼합물을 12,000×g에서 15분 동안 원심분리하여 상층액의 흡광도를 280 nm에서 측정하였다. 대조군은 효소용액을 가하기 전에 TCA용액을 casein용액에 가하여 만들었다. 1 U는 assay조건 하에서 대조군에 대해 280 nm에서 상층액의 흡광도를 0.1 O.D.만큼 증가시키는 데 필요한 효소량으로 정하였다.

4. 단백질 정량

단백질 정량은 BSA를 표준단백질로 사용하여 Lowry의 방법¹⁶⁾을 사용하였다.

5. *S. marcescens* protease의 정제

1) *S. marcescens*의 배양

*S. marcescens*의 배양에 의한 *S. marcescens* protease의 생산 사면배지로부터 소량의 종균을 BHI 배지 30 ml이 들어 있는 100 ml 플라스크에 접종하여 15시간 동안 30°C에서 배양한 후, BHI 배지 2 l가 들어 있는 5 l 플라스크에 옮긴 다음 16시간 동안 30°C에서 진탕 배양하였다. 배양물을 5,000×g에서 15분 동안 원심분리하여 세포수확을 하였다.

2) 황산암모늄에 의한 분별침전

수확한 상층액에 황산암모늄을 80% 포화되게 만든 후 14,000 × g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물을 소량의 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 8.0)에 녹여 같은 완충용액에 대하여 4°C에서 하룻밤동안 투석하였다. 투석물 100 ml에 대해 11.7g의 황산암모늄을 가하여 30% 포화되게 한 후, 1 시간동안 방치한 다음 14,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액만 모았다. 여기에 다시 황산암모늄을 가하여 50% 포화용액을 만들었다. 이것을 다시 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물은 소량의 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 8.0)에 잘 녹인 후 같은 완충용액에 대하여 4°C에서 하룻밤 동안 투석하였다.

3) DEAE-cellulose ion exchange chromatography

위 과정에서 같은 효소용액을 0.05 M sodium phosphate 완충용액 (pH 8.0)으로 이미 평형화되어 있는 DEAE-cellulose anion exchange column (2.8×18 cm)에 loading하였다. 같은 완충용액으로 보이드 (void) 부피의 3배 이상 충분히 씻어준 후, 0.1~0.4M NaCl linear gradient elution을 하여 흡착된 단백질을 용출시키며 20 ml/hr의 속도로 받았다. 활성을 가진 부분만 모아,

membrane filter CX-30을 사용하여 농축하였다.

6. 아포효소와 금속효소의 제조

아포효소는 protease (9.6 μM)에 10 mM EDTA가 들어 있는 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) 10 ml를 가해서 30°C에서 1시간 동안 incubation시킨 후, 1 mM EDTA가 들어 있는 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 대하여 4°C에서 48시간 동안 투석하여 제조하였다. 금속효소는 아포효소 (4.8 μM)에 여러 가지 금속 (2 mM)을 4°C에서 1시간 동안 가한 후, 증류수에 대하여 24시간 동안 투석한 다음 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 대하여 48시간 동안 투석하여 만들었다. 증류수는 증류과정과 탈이온과정을 거친 2차 증류수로 사용하였다. 위 과정은 4°C에서 수행하였다.

7. 아포효소의 재활성화에 대한 여러 금속의 영향

아포효소 (0.48 μM)와 염화물 형태인 1 mM의 MgCl_2 , CaCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 , ZnCl_2 , CuSO_4 , FeCl_2 , 그리고 HgCl_2 등과 pH 7.5에서 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 효소 활성도를 측정하였다.

8. 아포효소의 재활성화에 미치는 pH의 영향

아포효소 (0.48 μM)를 0.5 mM EDTA가 들어 있는 각 pH의 용액과 37°C에서 10분동안 반응시키고, 그 반응혼합물에 염화물 형태인 1 mM의 Mn, Co 그리고 Zn를 4°C에서 1시간 동안 각각 가한 후 효소 활성도를 측정하였다.

9. Protease와 금속효소의 효소 활성도 비교

위 방법에서 만든 Mn-효소 (0.24 μM), Co-효소 (0.24 μM), Zn-효소 (0.24 μM), protease (0.96 μM), 그리고 아포효소 (0.48 μM)를 casein을 기질로 사용하여 효소 활성도를 측정하였다.

10. 알칼리-불활성화

Protease (0.96 μM), Mn-효소 (0.24 μM), Co-효소 (0.24 μM), 그리고 Zn-효소 (0.24 μM)를 0.1 M Tris-

HCl (pH 8.0) 완충용액과 37°C에서 10, 20, 30, 40, 60분 간격으로 반응시키고 효소활성도를 측정하였다.

11. 열-안정성

Protease (0.96 μM), Mn-효소 (0.24 μM), Co-효소 (0.24 μM), 그리고 Zn-효소 (0.24 μM)를 pH 8.0에서 50°C에서 15, 30, 45, 60분 간격으로 반응시키고 효소 활성도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. *Serratia marcescens* protease의 정제

정제 과정에서의 온도는 4°C를 유지하였다. 2 l의 BHI 배지에 배양하여 수확한 세포 상층액 (26,085 mg)에 황산 암모늄을 80% 포화가 될 때까지 천천히 가한 후 14,000×g에서 원심 분리하여 침전 부분을 모았다. 이 침전 부분의 단백질 (660 mg)을 100배 부피의 완충용액 (50 mM potassium phosphate, pH 8.0)에 하루밤 동안 투석하였다. 침전 부분에 다시 황산암모늄에 30% 포화되게 한 다음 14,000×g에서 원심 분리하여 침전을 제거한 후 50% 포화되었을 때 14,000×g에서 원심 분리하여 침전되는 부분을 모았다. 황산암모늄의 30~50% 분별처리 단계에서 비활성도가 42.8 unit/mg이었으며 회수율은 73%였고 29배 정제되었다. 황산암모늄의 30~50% 분별처리 단계에서 비활성도가 42.8 unit/mg이었으며 회수율은 73%였고 29배 정제되었다. 회수된 단백질을 미리 표준 완충용액으로 평형화시킨 DEAE-cellulose anion exchange column (2.8×18 cm)에 효소용액을 loading하여 동일 완충용액으로 시간당 20 ml의 속도와 4 ml의 분획으로 용출시켰다(Fig. 1). 위의 효소액을 DEAE-cellulose anion exchange column에 loading 하여 0.1~0.4 M NaCl를 포함한 표준 완충용액 (pH 8.0)으로 linear gradient elution한 결과 하나의 단백질 peak가 나타났으며 NaCl의 구배농도 0.15~0.25 M에서 효소가 용출되었다(Fig. 1). 최종 DEAE-cellulose anion exchange column 단계에서 비활성도가 667.5

Table 1. Purification of *Serratia marcescens* protease

Step	Total volume (ml)	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
Crude extract	1850	38850	26085	1.5	1	100
80% Ammonium sulfate	30	28260	660	42.8	29	73
30~50% Ammonium sulfate	7.8	24398	178	137.2	92	63
DEAE-cellulose	125	16688	25	667.5	448	43

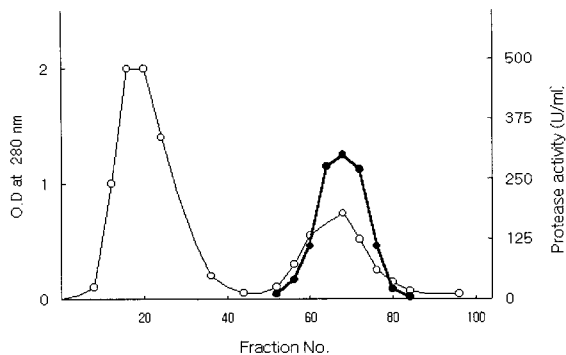


Fig. 1. Purification of *Serratia marcescens* protease on DEAE-cellulose anion exchange chromatography.

(○—○); protein profile, (●—●); protease activity.

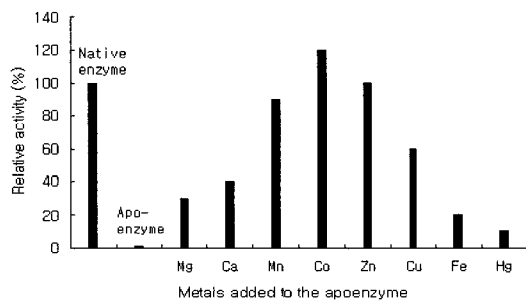


Fig. 2. Reactivation of apoenzyme with various metals.

Apoenzyme(480 nM) was supplemented with 1 mM each metal ion as chloride at pH 7.5 and at 4°C for 1 hr.

unit/mg 이었으며 회수율은 43%이었고 448배 정제되었다. *S. marcescens* protease의 정제 결과는 Table 1에 표시하였다. 비록 정제 과정이 단순할지라도 정제한 단백질의 순도는 4°C에서 전기영동하여 나타난 단일 단백질 띠로 확인할 수 있었으며 활성 염색에서도 skim milk agar 평면상에서 하나의 투명한 띠를 보여 주었다 (data not shown).

2. *S. marcescens* protease 아포효소의 재활성화

4°C에서 아포효소에 여러 금속을 가하여 재활성화 정도를 조사한 결과 Mn는 효소 활성을 원래보다 약 10% 정도 감소시켰으나, Zn은 protease의 원래 활성 수준으로 회복시켜 주었다. 한편, Co는 효소 활성을 원래보다 약 20% 정도 증가시켜 주었다 (Fig. 2). Mg, Ca 그리고 Cu는 효소 활성을 원래보다 약 40~70% 정도

Table 2. Reactivation of the *Serratia marcescens* protease by metal ions

Native enzyme	Relative activity (%)
	100
Metal ions added to the apoenzyme (1 mM)	
Mn	82
Co	110
Zn	95
Mn + Co	139
Mn + Zn	94
Co + Zn	155
Mn + Co + Zn	150

Apoenzyme(480 nM) was supplemented with 1 mM each metal ion as chloride at pH 7.5 and at 4°C for 1 hr.

감소시켰으며 Hg와 Fe는 80% 이상 감소시켰다. 아포효소의 재활성화에 대한 금속의 재조합에서, Mn과 Co, Co와 Zn는 효소 활성을 원래보다 각각 40, 55%씩 증가시켰으나, Mn과 Zn은 영향을 주지 못했다 (Table 2). Mn, Co 그리고 Zn 모두 첨가했을 때는 효소활성을 원래보다 50% 증가시켰다. 이상과 같은 결과를 미루어 보아 Co는 아포효소의 재활성화에 가장 유리한 것으로 사료된다. 아포효소를 0.5 mM EDTA가 포함된 각 pH 용액과 37°C에서 10분 동안 반응시키고 그 반응 혼합물에 1 mM의 $MnCl_2$, $CoCl_2$ 그리고 $ZnCl_2$ 등을 각각 가하여 아포효소의 재활성화에 대한 pH의 효과를 보았는데, $MnCl_2$ 에서는 pH 7, $CoCl_2$ 에서는 pH 8, $ZnCl_2$ 에서는 pH 6에서 가장 효과적이었으며, 위 경우 모두 pH 6에서 8사이, 즉 중성 pH 범위에서 효과적이었다 (Fig. 3).

3. *S. marcescens* protease와 금속효소의 성질 비교

금속효소들은 아포효소의 재활성화에서 protease의 원래 활성 수준으로 회복시켜주는 Mn, Co, 그리고 Zn

Table 3. Enzyme activity of native enzyme, apoenzyme and metalloenzymes

Enzymes	Specific activity (unit/mg)	Relative activity (%)
Native enzyme	665	100
Apoenzyme	2.1	0.3
Mn-enzyme	543	82
Co-enzyme	720	108
Zn-enzyme	635	96

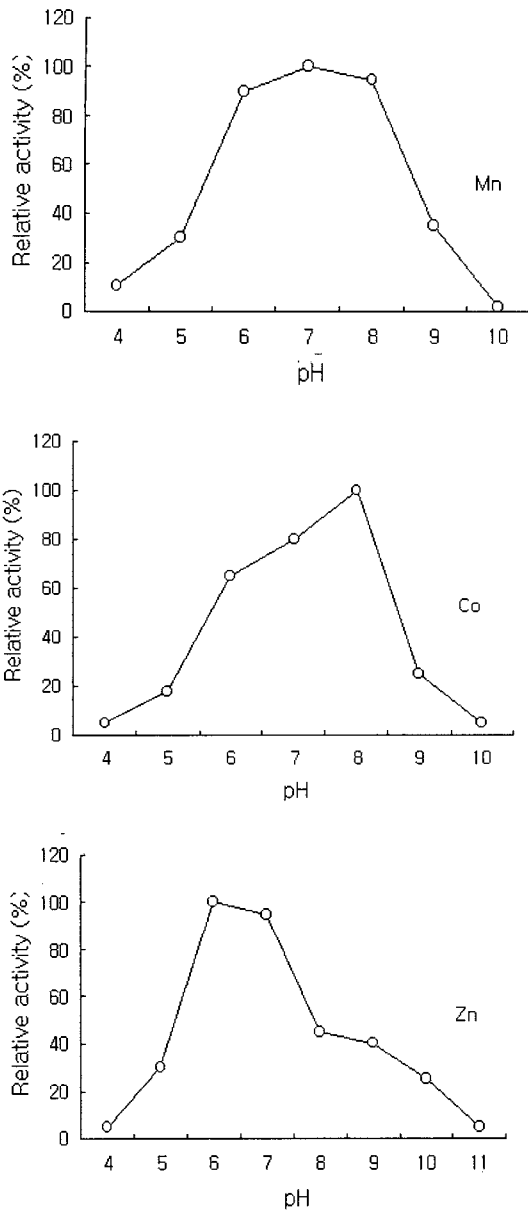


Fig. 3. Reactivation of apoenzyme as a function of pH.

Apoenzyme(480 nM) was incubated at a given pH at 37°C for 10 min presence of 0.5 mM EDTA. After incubation, the apoenzyme was supplemented with 1 mM MnCl₂ or CoCl₂ or ZnCl₂ at 4°C for 1 hr.

이온 등으로 Mn-, Co-, Zn-효소 등을 만들어, 이들 금속효소와 원래 protease를 효소 활성도, 알칼리-불활성화, 열-안정성면에서 비교하였다. 원래 protease와 금속효소들의 효소 활성도를 casein을 기질로 사용하여 측정하였는데, 효소 활성도의 상대적인 비는 원래 protease에 비해 Mn-, Co-, Zn-효소는 각각 0.8, 1.08, 0.96이었다(Table 3). 원래 protease와 Zn-효소의 효소 활성

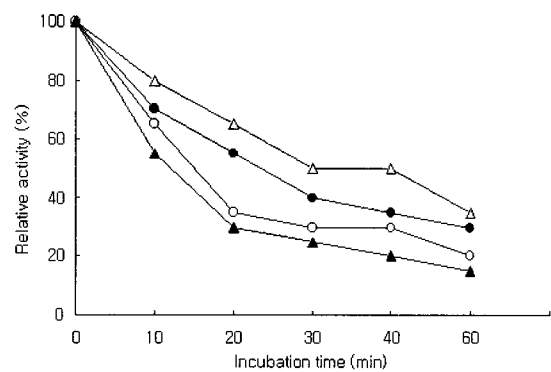


Fig. 4. Inactivation of native enzyme and metalloenzymes by alkali as a function of time.

Each enzymes were incubated in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 at 37°C. (○-○) ; Native enzyme, (●-●) ; Mn-enzyme, (△-△) ; Co-enzyme, (▲-▲) ; Zn-enzyme.

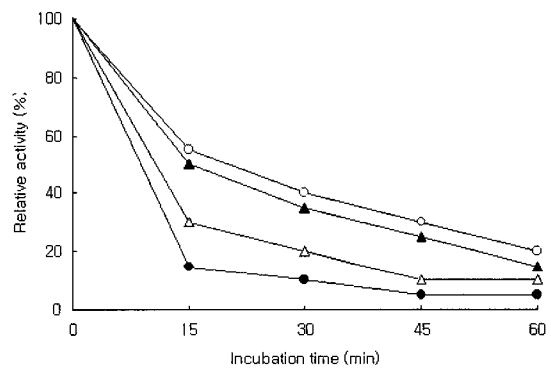


Fig. 5. Thermo-stability of native enzyme and metalloenzymes.

Each enzymes were incubated at pH 8.0 and at 50°C. (○-○) ; Native enzyme, (●-●) ; Mn-enzyme, (△-△) ; Co-enzyme, (▲-▲) ; Zn-enzyme.

도가 비슷하였으며 Co-효소는 효소 활성도가 원래 protease보다 약 8%가 더 컸으며 아포효소의 효소 활성도는 원래 protease의 0.3%이었다. Miyata 등은 알칼리-불활성화는 효소의 자가분해의 결과이며, 알칼리-용액에서의 효소의 불활성화 정도는 효소의 자가분해 속도와 상호 연관이 있다고 보고하였다²⁾. 알칼리-불활성화 양상은 원래 protease와 Zn-효소가 서로 비슷하였으며 열-안정성면에서도 원래 protease와 Zn-효소가 가장 비슷한 양상을 보여 주었다(Fig. 4, 5).

이와 같은 사실들을 종합해 보면 *S. marcescens* protease 아포효소에 Mn, Co, Zn를 첨가하여 제조한 Mn-, Co-, Zn-효소중에서 Zn-효소는 효소활성도, 알칼리-불활성도, 열-안정성면에서 원래 *S. marcescens* pro-

tease와 가장 유사한 것으로 미루어 보아 *S. marcescens* protease는 기존의 metalloprotease처럼 Zn-효소라고 사료된다.

요 약

Serratia marcescens ATCC 25419 protease를 ammonium sulfate treatment, DEAE-cellulose anion exchange chromatography 등의 방법으로 정제하였는데 최종 단계에서 667.5 unit/mg 이었으며 회수율은 43%이었고 448배 정제되었다. 정제한 *S. marcescens* protease로부터 아포효소를 만든 후 금속 재활성화에 대해 조사하였다. *S. marcescens* protease는 EDTA에 의해 완전히 활성을 잃는 metalloenzyme이며 Hg, Fe, Cu 등에 의해서 효소 활성을 70% 이상 잃은 반면, Co는 효소 활성을 약 20% 정도 증가시켰다. 아포효소의 재활성화는 pH 6~8에서 Mn, Co, Zn 등이 효과적이었다. Mn, Co, Zn 등을 아포효소에 가하여 만든 효소들 중에서 Zn-효소는 효소 활성도, 알칼리-불활성화, 열-안정성 면에서 원래 protease와 유사하였다.

참고문헌

- Braun, V. and Schmitz, G. : Excretion of protease by *Serratia marcescens*, *Arch. Microbiol.*, **124**, 55~61 (1980)
- Miyata, K., Tomada, K., and Isono, M. : *Serratia* protease. purification and general properties of the enzyme, *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1457~1462 (1970)
- Miyata, K., Tomada, K., and Isono, M. : *Serratia* protease. characteristics of the enzyme as metalloenzyme, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 460~467 (1971)
- Aiyappa, P. S., and Harris, J. D. : The extracellular metalloprotease of *Serratia marcescens* : purification and characterization, *Mol. Cell. Biochem.*, **13**, 95~100 (1976)
- Lyerly, D. M., and Kreger, A. S. : Importance of *Serratia* protease in the pathogenesis of experimental *Serratia marcescens* pneumonia, *Infect. Immun.*, **40**, 113~119 (1983)
- Decedue, C. J., Broussard, E. A., Larson, A. D., and Bra-
llular proteinase of *Serratia marcescens*, *Biochim. Biophys. Acta*, **569**, 293~301 (1979)
- 김기석, 이창원, 이병룡, 신용철 : *Serratia marcescens* ATCC 21074로부터 순수분리한 metalloprotease의 자가 분해성과 안정성, *한국미생물학회지*, **30**, 71~77 (1992)
- Braunagel, S. C., and Benedik, M. J. : The metalloprotease gene of *Serratia marcescens* strain SM6, *Mol. Gen. Genet.*, **222**, 446~451 (1990)
- Nakahama, K., Yoshimura, K., Marumoto, R., Kikuchi, M., Lee, I. S., Hase, T., and Matsubara, H. : Cloning and sequencing of *Serratia protease* gene, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 5843~5855 (1986)
- Molla, A., Matsumoto, K., Oyamada, I., Katsuki, T., and Maeda, H. : Degradation of protease inhibitors, immunoglobulins and other serum proteins by *Serratia* protease and its toxicity to fibroblasts in culture, *Infect. Immun.*, **53**, 522~529 (1986)
- Wolf, U., Bauer, D., and Traub, W. H. : Metalloproteases of *Serratia liquefaciens* : degradation of purified human serum proteins, *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol.*, **276**, 16~26 (1991)
- Kwon, Y. T., Lee, H. H., and Rho, H. M. : Cloning, sequencing and, expression of a minor protease-encoding gene from *Serratia marcescens* ATCC 21074, *Gene*, **125**, 75~80 (1993)
- Isono, M., Miyata, K., Tomada, K., and Maejima, K. : Method for producing protease, *U.S. patent*. 3,691,014 (1972)
- Akaike, T., Molla, A., Ando, M., Araki, S., and Maeda, H. : Molecular mechanism of complex infection by bacteria and virus analyzed by a model using serratial protease and influenza virus in mice, *J. Virol.*, **63**, 2252~2259 (1989)
- Kamata, R., Yamamoto, T., Matsumoto, K., and Maeda, H. : A serratial protease causes vascular permeability reaction by activation of the Hageman factor-dependent pathway in guinea pigs, *Infect. Immun.*, **48**, 747~753 (1985)
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275 (1951)