

피부에서 분리한 *Staphylococcus aureus* JJ-110이 생산하는 collagenase의 정제 및 특성

이진경 · 김해남¹ · 강호영 · 전흥기*

부산대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹마산대학 뷰티케어과

Received January 2, 2006 / Accepted February 21, 2006

Purification and Characterization of Collagenase Produced by *Staphylococcus aureus* JJ-11 Isolated from the Human Skin. Jin-Kyoung Lee, Hae-Nam Kim¹, Ho Young Kang and Hong-Ki Jun*. *Division of Biological Sciences, Pusan National University, Busan, 609-735, Korea, ¹Department of Beauty Care, Masan College, Masan, 630-729, Korea* – A bacterial strain, identified as *Staphylococcus aureus* JJ-11, producing collagenase was isolated out of 40 persons having skin troubles. *S. aureus* JJ-11 produced collagenase optimally in the media containing 1.5%(w/v) gelatin, 1%(w/v) yeast extract, 0.4%(w/v) K₂HPO₄, 0.005%(w/v) NiSO₄ · 6H₂O at 37°C for 18 hrs. The collagenase produced by *Staphylococcus aureus* JJ-11 was purified at 6.66-folds purity through application of chromatography with Amberlite IRA-900 and Sephacryl S-300 HR columns. The molecular weight of the partially purified enzyme was estimated to be 62 kDa by SDS-PAGE. The protein exhibited optimum enzymatic activity at pH 7.0, and showed a stable activity at pH 4-8. The optimum temperature for collagenase was at 37°C, and activity was maintained upto 40°C. The enzyme activity was slightly elevated in the presence of divalents such as, Fe²⁺, Co²⁺ and Ba²⁺. However, the activity was inhibited in the presence of Sr²⁺ or Hg²⁺. The inhibition of activity by O-phenanthroline and EDTA suggested that the enzyme may contain metal which is required for activity. The enzyme showed the highest activity when insoluble collagen (type I) was used as a substrate.

Key words – Collagen, collagenase, purification, *Staphylococcus aureus*

서 론

콜라겐은 피부 뿐만 아니라 힘줄, 연골, 각막, 혈관, 치아 등의 주요 구성인자로 인체를 구성하는 단백질 중 약 25~30%를 차지하는 비용해성 섬유 단백질이다[13]. 특히 강력한 신장성을 지니고 있어 우리 피부의 탄력성을 관장하며, 피부 노화에 직접적으로 관여하고 있다. 콜라겐 섬유를 구성하는 콜라겐 분자는 길이 300 nm, 두께 1.5 nm의 tropocollagen으로 분자 간에는 교차 결합이 없어 쉽게 용해된다. Tropocollagen은 수소 결합으로 서로 단단하게 꼬여있는 동일한 크기의 3개 polypeptide로 이루어진 나선형 사슬이다. 사람에게 나타나는 콜라겐인 tropocollagen은 각 polypeptide chain 구성의 차이에서 I~VII 형태의 다양한 종류가 있다. 부위에 따른 콜라겐의 여러 가지 type 중 피부의 콜라겐은 type I에 속한다[14]. 콜라겐은 보통 1,000개 이상의 아미노산으로 구성되어 있는데 분자의 아미노산 배열이 매우 규칙적이다. 각 사슬의 구성 아미노산은 1/3이 Glycine이며 거의 매 3번째 위치에 glycine이 있는 glycine-proline-hydroxyproline 배열로 종종 되풀이된다. 세 개 가닥 나선형 사슬의 안쪽은 glycine으로 꼭 차 있으며 나선형의 회전마다 세 개의 아미노산 잔기가 있다[7].

콜라겐을 분해하는 것이 collagenase이다. Collagenase는 생리적인 pH와 온도에서 변성되지 않은 콜라겐의 사슬내에 있는 펩타이드 결합을 가수 분해할 수 있는 효소로 정의된다 [1,23]. Collagenase는 척추동물과 원핵생물에서 분비되는데 척추동물의 collagenase는 상처의 치료, 성장 조절, 조직의 흡수와 재형성 등에서 중요한 역할을 하기도 하나, 정상 조직의 경우 주로 재해 인자와 결합해 불활성형 효소로서 존재한다. 특히 만성 관절 류머티스, 각막 궤양, 그 외 염증 조직에서 높은 값의 collagenase 활성이 검출되어 collagenase가 조직 파괴에 직접 관여하고 있다는 점에서 임상적으로 주목 받고 있다. 원핵생물 유래 collagenase의 여러 가지 기능들 중 하나는 콜라겐 기질을 빠르게 분해함으로써 세균이 숙주의 조직에 감염하는 것을 돕고 분해된 기질의 산물을 성장을 위한 영양원으로 사용하는 것이다[12,30]. 그러므로 세균은 virulence factor로서 collagenase를 hyaluronidase, phospholipase, elastase 등과 같이 생산하여 콜라겐을 비롯한 숙주 조직을 분해하는 작용을 촉진시킨다. Collagenase는 저질 육류의 품질 향상, 뼈나 피부의 치료 등 식품 및 의료 산업 등에 유용하게 이용되고 있기도 하고[19,25], 대부분 병원성 세균들에 의한 virulence factor로서 collagenase의 영향에 대한 연구가 진행 중이다.

현재까지 치주염, 각막염, 패혈증, 유방암, 위궤양 등을 유발하는 병원성 세균들에게서 virulence factor로서 collagenase가 생산되어지는 것으로 밝혀져 있다[8,24,27]. 그러나

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2270, Fax : +82-51-513-4532

E-mail : hkjun@pusan.ac.kr

병원성 세균이 생산하는 collagenase에 의해 콜라겐을 비롯한 조직이 파괴되는 과정에서 감염된 세포 또한 염증 반응 동안에 스스로 collagenase를 생성하기 때문에 병원성 세균이 생산한 collagenase의 정확한 영향을 밝히는데 어려움이 있다[26]. 하지만 이것은 병원성 세균의 collagenase가 mammalian collagenase의 분비를 촉진시킬 수 있다는 것을 암시하며, 결국 세균의 collagenase가 간접적으로 콜라겐을 분해하는데 기여하고 있는 것을 알 수 있다[8,15]. 그러므로 병원성 세균의 collagenase의 연구는 병인학에서 중요한 자료가 될 것이다.

본 연구에서는 콜라겐으로 주로 구성된 피부에서 서식하는 균들은 collagenase 활성을 가질 것이며, 특히 피부 트러블을 유발하는 균주가 높은 collagenase 활성을 보일 것이라 생각하였다. 따라서 collagenase 활성이 높은 균주를 피부에서 분리한 뒤 그 collagenase를 분리 및 정제하여 그 특성에 관한 연구를 수행함으로써 피부 트러블을 야기하는 균의 collagenase 특성에 관해 알아보았다.

재료 및 방법

균주 분리용 시료 및 사용배지

Collagenase를 생산하는 균주를 분리할 목적으로 피부 트러블을 가진 20~40대의 남녀 40명을 대상으로 피부를 멸균한 면봉으로 긁어 멸균 생리 식염수 (0.85% NaCl)에 현탁하여 사용하였다. Collagenase 생산 균주의 분리용 평판 배지는 0.3% collagen (Insoluble Type I, Sigma Co., USA), 0.1%(w/v) yeast extract, 0.7%(w/v) K_2HPO_4 , 0.2%(w/v) KH_2PO_4 , 0.01%(w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05%(w/v) citrate \cdot $2H_2O$, 그리고 1.5%(w/v) agar로 구성된 것[16]과 2.0% gelatin을 포함하는 LB 평판 배지 (5.0% $HgCl_2$ 를 뿌려 gelatin이 분해된 것을 halo로써 확인)를 사용하였다[10]. 효소 생산용 액체 배지는 0.3%(w/v) gelatin, 0.1%(w/v) yeast extract, 0.7%(w/v) K_2HPO_4 , 0.2%(w/v) KH_2PO_4 , 0.01%(w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 0.05%(w/v) citrate \cdot $2H_2O$ 를 사용하였다 [6,18,22].

Collagenase 생산 균주의 분리 및 효소 활성 측정법

일차적으로 수집된 여러 시료를 멸균 생리 식염수로 10^2 ~ 10^7 으로 희석한 후 분리용 평판 배지에 $100 \mu\text{l}$ 씩 도말하여 37°C 에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 halo를 형성하는 colony를 분리하고 1차 선별된 colony를 효소 생산용 액체 배지를 사용하여 37°C , 200 rpm에서 24시간 동안 배양시킨 후 collagenase 활성을 측정하여 활성이 가장 높은 균주를 이차 분리하였다.

Collagenase 활성 측정을 위한 조효소액은 37°C , 200 rpm으로 24시간 동안 진탕 배양한 후에 4°C , 12,000 rpm에서 10

분간 원심 분리한 것을 사용하였다. 효소 반응 기질인 collagen (0.03 g/ml)을 4 mM $CaCl_2$ 를 포함한 Tris-HCl buffer (pH 7.4) 0.4 ml를 넣어 반응 기질액을 만들어 조효소액 0.1 ml를 가하여 37°C , 110 rpm으로 30분 동안 효소 반응을 시켰다. 반응의 정지는 0.1 M cold acetic acid 0.5 ml를 가하여 행하였다. 10,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상등액 0.1 ml에 0.05% $SnCl_2 \cdot H_2O$ 을 포함한 methylcellosolve 용액에 ninhydrin을 2% 첨가하여 만든 ninhydrin solution 1 ml과 4 mM $CaCl_2$ 를 포함한 Tris-HCl buffer (pH 7.4) 1.4 ml을 가하여 100°C , 15분 가열한 후 냉각시키고, 570 nm에서 O.D를 측정하여 유리된 free α -amino group을 Ninhydrin법 [5,9,20,29]으로 정량하였다. 효소 1 unit는 1분 동안 1 μM 의 leucine을 생산하는 효소의 양으로 정의하고[28], 단백질량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Bradford assay[2] 및 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

분리 균주의 분류 및 동정

이차로 분리된 collagenase 생산 균주 중에서 가장 collagenase 활성이 높은 균의 분류학적인 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양학적, 생화학적인 제반 특성을 조사하고, 이를 바탕으로 GPI (Gram Positive Identification) Card (Biomerieux, France)를 사용하여 균주를 검토한 후, 16S rDNA의 염기 서열을 결정하고 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Gene bank database와 비교 분석하였다.

배양 조건에 따른 collagenase 생산능 검토

분리 균주가 어떤 배양 조건에서 가장 높은 collagenase 생산능을 보이는지 알아보기 위해 먼저 균의 성장 시간에 따른 collagenase의 활성을 조사하였다. 그리고 collagenase의 생산에 필요한 최적 배지 조건을 검토하기 위해 탄소원, 질소원, 염, 금속 이온의 종류와 농도에 따른 최적 배지 조성을 결정하였다. 그 후 초기 pH, 온도 및 통기량을 조사하여 배지 조성 외 collagenase의 최적 생산 조건을 검토하였다.

Collagenase의 정제

조효소액의 조제

효소 생산 최적 조건에서 24시간 동안 배양한 배양액을 원심 분리(10,000 rpm, 30 min)하여 상층액을 취해 Ultrafiltration (Millipore YM10 membrane, Amicon Co., USA)으로 농축한 후 조효소액으로 사용하였다.

Column chromatography

5 mM $CaCl_2$ 를 포함하는 50 mM Tris-HCl 완충액 (buffer A, pH 7.0)으로 평형화시킨 Amberlite IRA-900 column (1.8 cm \times 15 cm, Sigma Co., USA)을 사용하여 조효소액을 500 μl

/min의 유속으로 0~1.5 M NaCl gradient (with buffer A, pH 7.0)를 실시하였다. 이후 전 단계의 활성 부분을 Ultrafiltration (Millipore YM10 membrane, Amicon Co., USA)으로 농축한 후 buffer A로 평형화시킨 Sephacryl S-300 HR column (1.8 cm×53 cm, Pharmacia Co., USA)을 사용하여 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유속으로 용출하였다. Collagenase 활성을 가지고 있는 부분을 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유속으로 다시 전 단계에 사용했던 Sephacryl S-300 gel filtration으로 용출하였다.

Collagenase의 특성 검토

분자량 측정

Laemmli[11]의 방법에 따라 SDS-PAGE로 정제된 효소의 분자량을 측정하였으며, 이때 SDS-PAGE에는 12% polyacrylamide gel과 Tris-glycine buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)를 사용하였다. 단백질 시료는 100% trichloroacetic acid (TCA)로 농축시킨 후 sample buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.02% bromophenol blue)를 섞어 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2~5분간 가열 변성시킨 후 전기영동을 실시하였다. 단백질 염색은 Coomassie blue R-250으로 행한 후, 탈색액 (methanol:acetic acid:water=1:1:8, v/v/v)으로 탈색하였다.

효소 반응 특성

효소의 특성 검토에 조효소액을 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)으로 평형화시킨 Amberlite IRA-900 column (1.8 cm × 15 cm)으로 용출시켜 사용하였다. 열안정성 및 최적 활성 온도를 검토하기 위해 각각의 온도별로 조효소액을 30분 동안 방치한 후에 잔존 활성을 측정하여 상대 활성으로 열안정성을 검토하고, 각각의 온도별로 효소 활성을 측정하여 효소 활성 최적 온도를 검토하였다.

pH 안정성 및 최적 활성 pH의 영향은 각각의 50 mM pH 완충액에 조효소액을 37 $^{\circ}\text{C}$, 30분간 방치한 후에 잔존 활성을 측정하여 pH 안정성을 검토하였다. 또한 각각의 pH 완충액에 기질과 효소액 간의 효소 활성을 측정하여 효소 활성 최적 pH를 검토하였다. pH 3~6은 citrate buffer, pH 6~8은 phosphate buffer, pH 8~10은 borate buffer, pH 10~12는 $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{NaOH}$ buffer를 사용하였다.

효소 활성에 미치는 금속 이온의 영향을 검토하기 위하여 조효소액을 20 mM EDTA가 포함된 phosphate buffer (pH 7.0)에 24시간 투석한 후 다시 EDTA가 없는 동일 buffer에 24시간 투석하였다. 처리된 효소액에 2 mM과 5 mM 농도의 금속 이온을 각각 가한 후 효소 활성을 측정하였다.

저해제에 따른 효소 활성 검토는 각각의 저해제를 최종 농도가 10 mM이 되게 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 가

하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 방치한 후 효소 활성을 검토하였다 [3,4]. Type I collagen, gelatin, albumin 및 casein을 기질로 하여 효소 반응을 한 뒤 기질별로 collagenase 활성을 측정하여 [1,9,10,18,19,28] 효소의 기질 특이성 실험을 수행하였다.

결과 및 고찰

Collagenase 생산 균주의 분리 및 동정

이차 선별된 분리 균주의 형태학적인 특성을 검토한 결과 전형적인 그람양성의 구균이고 포도송이와 같은 배열을 형성하였으나 포자는 형성하지 않았다. 또한, 배양학적 특성을 관찰한 결과 황색이나 레몬색의 불투명한 colony를 형성하였다. 분리균주의 생화학적 특성은 Table 1에서 보는 바와 같이 대부분 *Staphylococcus aureus*와 흡사한 결과를 보였다. 그람염색법을 통하여 그람양성으로 확인된 분리 균주를 GPI Card로 분석해 본 결과(Table 2), *S. aureus*와 99% 상동성을 가졌으며, *S. aureus*의 대표적인 특징인 coagulase test 결과 혈장 응고 능력이 있는 것으로 밝혀져 *S. aureus*와 유사하다는 결론을 내릴 수 있었다. 분리 균주의 세포로부터 genomic DNA를 분리하여 AccuPower PCR PreMix kit (Bioneer Co., Korea)를 이용해 16S rDNA 부위를 PCR로 증폭시킨 후 자동 염기 서열 결정을 Gene bank database와 비교한 결과 *S. aureus* ATCC 25923와 100%의 상동성을 보였다. 이러한 분리 균주의 형태학적, 배양학적, 생화학적 특징 및 GPI Card 분석과 partial 16S rDNA sequencing 결과 등의 제반 분류학적 특징으로 비교해 볼 때 *Staphylococcus aureus*로 동정되었으며 최종적으로 분리 균주를 *S. aureus* JJ-11 균주로 명명하고 이후의 실험에 사용하였다.

Table 1. Biochemical characteristics of the isolated strain JJ-11

Contents	Isolated strain JJ-11	<i>Staphylococcus aureus</i>
Aerobic condition	Facultative aerobes	Facultative aerobes
Hemolysis	+	+
Novobiocin resistance (MIC* $\geq 1.6\mu\text{g}/\text{ml}$)	-	-
Catalase	+	+
Casein hydrolysis	+	+
Starch hydrolysis	-	-
Gelatin hydrolysis	+	+
Fat hydrolysis	+	+
DNase test	+	+
Mannitol test	+	+
Growth in NaCl		
0%	+	+
5%	+	+
10%	+	+
15%	+	+

*MIC (Minimal Inhibitory Concentration) : 최소 생육 저지 농도
 ** + : positive, - : negative

Table 2. Analysis of GPI (Gram Positive Identification) Card of the isolated strain JJ-11

No. of Well	Medium	Abbreviation	Positive	Negative	Active ingredient	Result
1	Peptone base	PB	Blue	Clear	Peptone, Glucose	+
2	Bacitracin	BAC	Blue	Clear	Bacitracin	+
3	Optochin	OPT	Blue	Clear	Ethylhydrocupreine hydrochloride	+
4	Hemicellulase	HCS	Blue	Clear light blue	Hemicellulase	-*
5	6% Sodium Chloride	6NC	Blue	Clear	Sodium chloride	+
6	10% Bile	10B	Blue	Yellow	Bile	+
7	40% Bile	40B	Blue	Yellow	Bile	+
8	Esculin	ESC	Brown-black	Light-yellow	Esculin Ferric	-
9	Arginine	ARG	Blue	Yellow-green	Arginine monohydrochloride	+
10	Urea	URE	Blue	Yellow-green	Urea	-
11	Tetrazolium Red	TZR	Pink-red	Clear	2,3,5-triphenyl Tetrazolium chloride	+
12	Novobiocin	NOV	Blue	Clear-light blue	Novobiocin Sodium Salt	-
13	Dextrose	DEX			Dextrose	+
14	Lactrose	LAC			Lactrose	-
15	Mannitol	MAN			Mannitol	+
16	Raffinose	RAF			Raffinose	-
17	Salicin	SAL			Salicin	-
18	Sorbitol	SOR			Sorbitol	-
19	Sucrose	SUC			Sucrose	+
20	Trehalose	TRE			Trehalose	-
21	Arabinose	ARA	Blue	Clear-light blue	Arabinose	-
22	Pyruvic acid	PYR			Pyruvic acid	+
23	Pullulan	PUL			Pullulan	-
24	Inulin	INU			Inulin	-
25	Meibiose	MEL			Meibiose	-
26	Melezitose	MLZ			Melezitose	-
27	Cellobiose	CEL			Cellobiose	-
28	Ribose	RIB			Ribose	-
29	Xylose	XYL			Xylose	-

* + : positive, - : negative

배양 조건에 따른 Collagenase 생산능 검토

효소 생산의 최적 배양 시간을 결정하기 위해 효소 생산용 배지에서 배양 시간에 따른 효소의 활성을 검토하고 생육 특성을 살펴본 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 collagenase 효소 생산에 있어서는 약 18시간을 전후하여 최고의 생산량을 나타내고 있었다. 따라서 18시간을 collagenase 활성의 최적 배양 시간으로 결정하고 탄소원, 질소원, 염, 금속 이온에 따른 최적 생산 배지 조성을 검토한 결과 pH 7.0, 37°C로 나타났다(Table 3). 균의 생육도는 효소 생산용 배지 조건과 유사한 대수 증식기와 사멸기를 보였으나 효소의 활성은 두 배 이상 증가하였으며 pH는 7.0에서 약 6.5까지 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1). 또한, 배양 상등액과 세포 추출액을 가지고 collagenase 활성을 조사해 본 결과 배양 상등액에서 더 높은 collagenase 활성을 보임에 따라 이후의 효소 정제 실험에서는 배양 상등액을 대상으로 정제를 실시하였다.

Table 3. The optimum culture conditions for collagenase production by *S. aureus* JJ-11

Medium (w/v, %)	
Gelatin	1.5
Yeast extract	1.0
K ₂ HPO ₄	0.4
NiSO ₄ · 6H ₂ O	0.005
Other Conditions	
Initial pH	7.0
Temperature	37 °C
Culture time	18 hrs
Aeration	200 ml of medium per 500 ml flask

Collagenase의 정제

조효소액을 Amberlite IRA-900 column chromatography를 실시한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 활성 부위가 50~

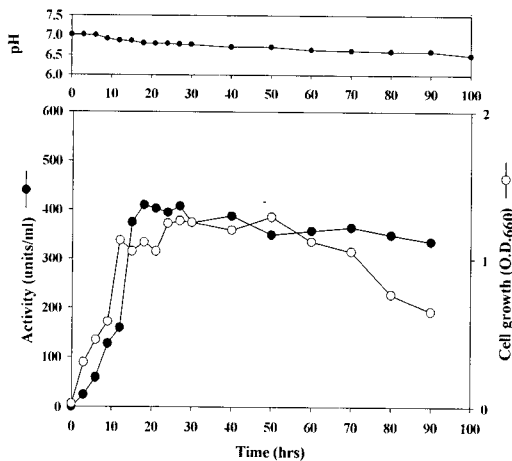


Fig. 1. Collagenase production and cell growth by *S. aureus* JJ-11 at optimum culture conditions.

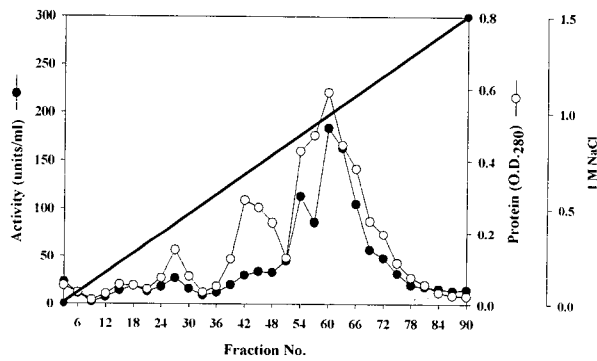


Fig. 2. First Amberlite IRA-900 column chromatography for collagenase of *Staphylococcus aureus* JJ-11. Column size 1.8 cm×15 cm, equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), fraction volumn 3 ml, flow rate 0.5 ml/min.

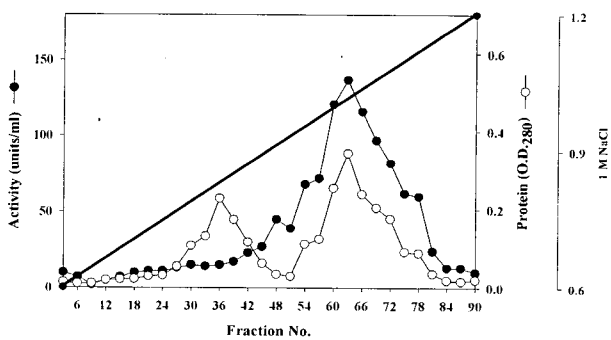


Fig. 3. Second amberlite IRA-900 column chromatography for collagenase of *Staphylococcus aureus* JJ-11. Column size 1.8 cm×15 cm, equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), fraction volumn 3 ml, flow rate 0.25 ml/min.

70까지 비교적 넓게 분리되어 용출되었으며, 활성 부위에 있는 두 개의 peak를 분리하기 위해 50~70까지의 20개 분획을 다시 ultrafiltration (YM10 membrane, Amicon Co., USA)으로 농축하여 다시 한번 더 Amberlite IRA-900 column (1.8 cm × 15 cm)을 사용하여 0.1 ml/min의 유속으로 흡착시킨 다음 완충액을 충분히 흘려 안정화시킨 후 높은 활성을 보이기 시작한 0.6~1.2 M까지 NaCl 농도구배를 실시하여 250 μ l로 용출시켰다(Fig. 3). 이 때 첫 번째 정제의 경우 효소의 비활성은 약 216 units/mg이었고 회수율은 5% 정도였으며, 두 번째 정제의 경우 효소의 비활성은 처음 정제의 약 2배인 407 units/mg정도로 증가하였고, 회수율은 2.8%이었다(Table 4).

전 단계의 활성부분인 60~75 부분의 분획을 ultrafiltration (YM10 membrane, Amicon Co., USA)으로 농축시켜 Sephacryl S-300 HR column (1.8 cm×53 cm)을 사용하여 250 μ l/min의 유속으로 용출시켰다(Fig. 4). 이 때 얻어진 효소의 비활성은 598 units/mg이었고, collagenase 회수율은 1.37%였다(Table 4).

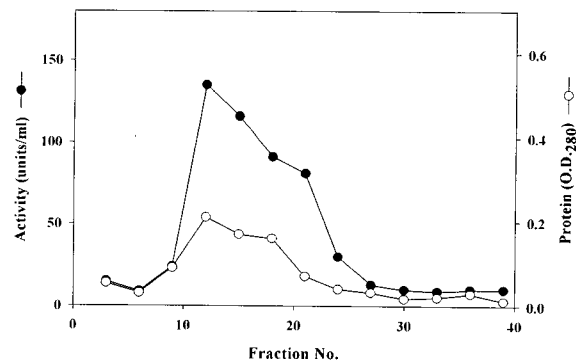


Fig. 4. Sephacryl S-300 HR column chromatography for collagenase of *S. aureus* JJ-11. Column size 1.8 cm×53 cm, equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), fraction volumn 15 ml, flow rate 0.25 ml/min.

Table 4. Purification of collagenase from *S. aureus* JJ-11

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Folds
Supernatant	120,474	1,340	89.91	100	1.00
Ultrafiltration	30,684	269	114.07	25.47	1.27
1 st Amberlite IRA-900	6,020	27.86	216.16	5.00	2.40
2 nd Amberlite IRA-900	3,438	8.45	407.10	2.85	4.52
Sephacryl S-300 HR	1,656	2.77	598.05	1.37	6.66

Collagenase의 특성 검토

Gel electrophoresis를 행하여 분자량을 측정한 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 분자량은 약 62 kDa이었다. 온도에 대한 효소의 안정성은 55℃까지 80%이상의 활성이 있어 안정하였고, 60℃ 이후에는 활성이 급격히 떨어져 효소가 높은 온도에 의해 변성됨을 알 수 있었다(Fig. 6). 온도의 영향은 효소가 40℃ 이상일 때는 활성이 조금씩 떨어지다가 55℃ 이후에는 활성이 급격히 떨어지는 것을 알 수 있었다(Fig. 7).

pH의 안정성을 알아보기 위하여, 잔류 활성을 측정한 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 pH 8.0까지 안정하였고, 염기성보다 산성 쪽에서 더 안정한 것으로 확인되었다. 최적 활성 pH를 알아보기 위하여 각각의 완충용액에 30분간 37℃에서 반응시킨 후 활성을 측정하였을 때는 Fig. 9에서 보는 것과 같이 pH 7.0에서 가장 높은 활성을 보였고, 효소 활성에도 pH 안정성과 마찬가지로 산성 쪽에서 더욱 높은 활성을 보였다.

조효소액에 각각의 금속 이온을 2 mM과 5 mM 되게 가하여 Ninhydrin법으로 활성을 측정한 결과, Table 5에 나타난 것처럼 대부분의 금속에 대해 존재할 때 활성이 증가하여

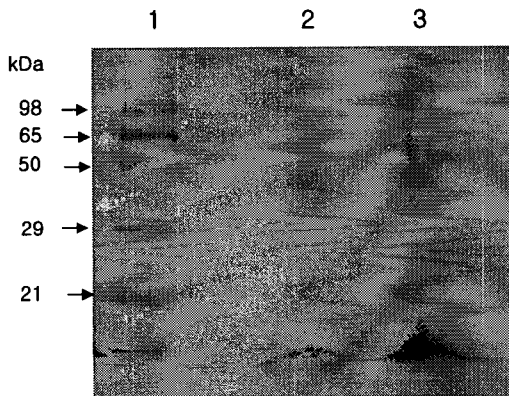


Fig. 5. SDS-PAGE of the partially purified collagenase of *S.aureus* JJ-11.

Lane 1, Standard (Phosphorylase B ; 98 kDa, Bovine serum albumin ; 65 kDa, Ovalbumin ; 50 kDa, Carbonic anhydrase ; 29 kDa, Trypsin inhibitor ; 21 kDa) ; Lane 2, Sephacryl S-300 HR ; Lane 3, Amberlite IRA-900.

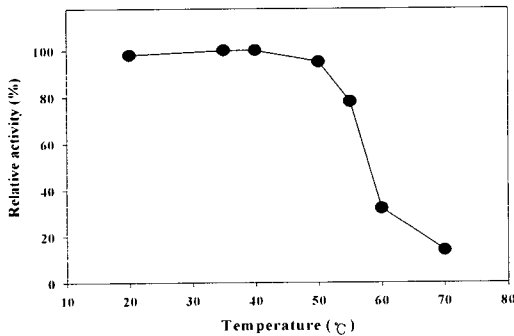


Fig. 6. Effect of temperature on collagenase stability.

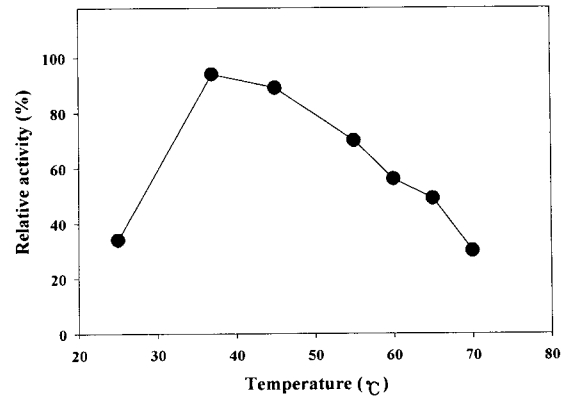


Fig. 7. Effect of temperature on collagenase activity.

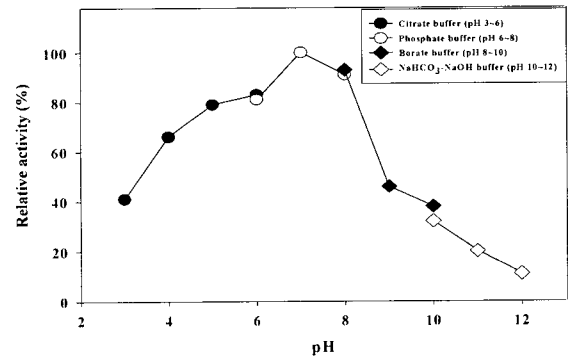


Fig. 8. Effect of pH on collagenase stability.

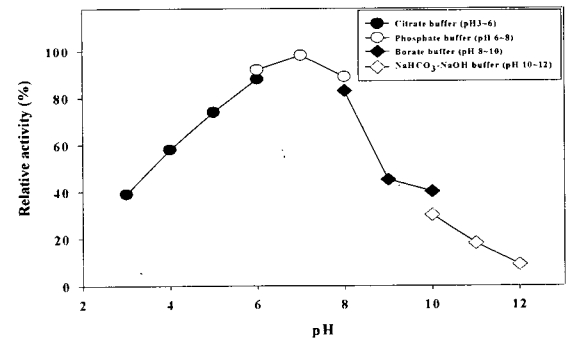


Fig. 9. Effect of pH on collagenase activity.

전형적인 metalloproteinase의 성질을 가졌다. 특히 Fe^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} 존재하에서는 5 mM 농도에서도 높은 활성을 나타내었다. 특히 Sr^{2+} , Hg^{2+} 에서는 30% 정도의 저해를 받는 것으로 확인되었다(Table 5). 일반적인 효소 저해제에 대한 효소의 활성을 검토한 결과 EDTA와 O-phenanthroline에 의해 65% 이상이 저해되는, 일반적인 collagenase의 특징인 metalloproteinase의 특징을 보였다(Table 6). 그리고, 일반적으로 collagenase가 분해할 수 있는 다양한 기질에 대해 효소의 활성을 검토한 결과 Table 7에서 보는 바와 같이 본 효소는 기질로써 insoluble collagen (type I)을 가장 잘 이용하였다.

Table 5. Effect of the metal ions on the activity of collagenase from *S. aureus* JJ-11

Metal ions	Relative activity (%)	
	Added metal ion (2 mM)	Added metal ion (5 mM)
None	100.00	100.00
MgCl ₂	96.22	91.09
MnCl ₂	101.16	102.31
ZnCl ₂	110.02	83.82
NaCl	100.53	82.15
FeSO ₄	136.12	120.52
SrCl ₂	91.86	71.07
LiCl	106.05	102.33
CaCl ₂	117.17	100.27
KCl	107.18	99.09
CoCl ₂	122.47	118.13
SnCl ₂	105.34	92.55
NiCl ₂	101.23	98.27
CuSO ₄	105.27	98.37
HgCl ₂	95.59	72.67
BaCl ₂	147.56	122.25

Table 6. Effect of some reagents on the activity of collagenase from *S. aureus* JJ-11

Reagents	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None		100.00
Ammonium persulfate	10	84.44
L-cysteine	10	85.67
N-ethylmaleimide	10	86.18
β-mercaptoethanol	10	76.15
NaN ₃	10	92.47
Na ₂ HAsO ₄	10	96.24
NaF	10	76.15
Sodium thioglycolate	10	97.29
Pentachlorophenol	10	84.59
O-phenanthroline	10	33.24
KMnO ₄	10	86.46
PMSF	1	62.68
EDTA	10	32.28

Table 7. Effect of various substrates on the activity of collagenase from *S. aureus* JJ-11.

Substrates	Relative activity (%)
Collagen(type I)	100
FALGPA	0
Gelatin	50.4
Elastin	17.5
Casein	25.7

요 약

피부 트러블을 가진 남,여 40명의 피부에서 분리한 collagenase를 생산하는 균주를 분리, 동정한 결과 *Staphylococcus aureus*로 판명되었으며 이를 *S. aureus* JJ-11이라 명명하였다.

S. aureus JJ-11 균주의 collagenase의 최적 생산 조건은 1.5%(w/v) gelatin, 1%(w/v) yeast extract, 0.4%(w/v) K₂HPO₄, 0.005%(w/v) NiSO₄ · 6H₂O를 함유한 배지 (pH 7.0)에서 37℃, 200 rpm으로 18시간 동안 배양하는 것이다.

분리 균주가 생산하는 collagenase를 정제하기 위해서 amberlite IRA-900과 sephacryl S-300 HR columns를 이용하였고, 6.66-folds로 정제되었다.

S. aureus JJ-11 균주가 생산하는 collagenase를 정제한 결과 분자량은 약 62 kDa이었으며, pH 7.0과 37℃에서 각각 최대의 활성을 가졌고, pH와 온도에 대한 안정성은 pH 4.0-8.0, 40℃까지 100%의 활성이 있었다. 금속이온에 대해서는 Fe²⁺, Co²⁺, Ba²⁺ 존재 하에서는 5 mM 농도에서도 활성을 유지하였다. Sr²⁺, Hg²⁺에서는 30% 이상이 저해를 받는 것으로 확인되었다. 또한 EDTA와 O-phenanthroline에 의해 65% 이상이 저해되는 일반적인 collagenase의 특징인 metalloproteinase의 특징을 보였으며, 그리고, 여러 가지 기질에 대해 효소활성을 비교한 결과, insoluble collagen (type I)에 대해 효소활성이 가장 높았다.

참 고 문 헌

- Asdornnithee, S., K. Akiyama, T. Sasaki and R. Takata. 1994. Isolation and characterization of a collagenolytic enzyme from *Bacillus licheniformis* N22. *J. Ferment. Bioeng.* **78(4)**, 283-287.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bryant, M.P., N. R. Krieg, S. P. Lapage, H. Lautrop, J. Liston, R. G. E. Murray, A. W. Ravin and J. T. Staley. 1977. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins. U.S.A.
- Denis, L. J. and J. Verweij. 1997. Matrix metalloproteinase inhibitors : Present achievements and future prospects. *Investigational New Drugs* **15**, 175-185.
- Doi, E., D. Shibata and T. Matoba. 1981. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* **118**, 173-184.
- Endo, A., S. Murakawa, H. Shimizu and Y. Shiraishi. 1987. Purification and properties collagenase from a *Streptomyces* species. *J. Biochem.* **102**, 163-170.
- Grenier, D., M. A. Houle, P. Plamondon and K. Nakayama. 2003. An extracellular protease of *Streptococcus gordonii* hydrolyzes type IV collagen and collagen analogues. *FEMS Microbiol. Lett.* **221**, 181-185.

8. Harrington, D. J. 1996. Bacterial collagenase and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infect. Immun.* June **64**, 1885-1891.
9. Hisano, T., S. Abe, M. Wakashiro, A. Kimura, and K. Murata. 1989. Isolation and properties of a collagenase with caseinolytic activity from a *Pseudomonas* sp. *J. Ferment. Bioeng.* **68(6)**, 399-403.
10. Juarez, Z. E. and M. W. Stinson. 1999. An extracellular protease of *Streptococcus gordonii* hydrolyzes type IV collagen and collagen analogues. *Infect. Immun.* **67(1)**, 271-278.
11. Laemmli, J. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
12. Lecroisey, A. and B. Keil. 1979. Differences in the degradation of native collagen by two microbial collagenase. *Biochem. J.* **179**, 53-58.
13. Lim, D. V., R. J. Jackson and C. M. Pull-Von Gruenigen. 1993. Purification and assay of bacterial collagenases. *J. Microbiol. Methods* **18**, 241-253.
14. Lim, K. S., S. H. Son, H. Y. Kang and H. K. Jun. 2005. Purification and characterization of *Bacillus subtilis* JS-17 collagenase. *J. Life Science* **15(4)**, 657-663
15. Makinen, K. K. and P. L. Makinen. 1987. Purification and properties of an extracellular collagenolytic protease produced by the human oral bacterium *Bacillus cereus*(strain soc 67). *J. Biol. Chem.* **262(26)**, 12488-12495.
16. Manicourt, D. H. and V. Lefebvre. 1993. An assay for matrix metalloproteinases and proteases acting on proteoglycans, casein or gelatin. *Anal. Biochem.* **215**, 171-179.
17. Miyoshi, S. I., H. Wakae, K. I. Tomochika and S. Shinoda. 1997. Functional domains of a zinc metalloproteinase from *Vibrio vulnificus*. *J. Bacteriol.* **179(23)**, 7606-7609.
18. Nagano, H. and A. T. Kim. 1999. Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63(7)**, 181-183.
19. Nakayama, T., N. Tsuruoka, M. Akai and T. Nishino. 2000. Thermostable collagenolytic activity of a novel thermophilic isolate, *Bacillus* sp. strain NTAP-1. *J. Biosci. Bioeng.* **89(6)**, 612-614.
20. Netzel-Arnett, S., S. K. Mallya, H. Nagase, H. B. Hansen and H. E. Van Wart. 1991. Continuously recording fluorescent assays optimized for five human matrix metalloproteinases. *Anal. Biochem.* **195**, 86-92.
21. Rosen, H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 10-15.
22. Sasagawa, Y., Y. Kamio, Y. Matsubara, Y. matsubara, K. Suzuki, H. Kojima and K. Izaki. 1993. Purification and properties of collagenase from *Cytophaga* sp. L43-1 strain. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57(11)**, 1894-1898.
23. Sepulveda, P., A. Murgui, J. L. Lopez-ribot, M. Casanova, J. Timoneda and J. P. Martinez. 1995. Evidence for the presence of collagenous domains in *Candida albicans* cell surface proteins. *Infect. Immun.* **63(6)**, 2173-2179.
24. Sorsa, T., T. Ingman, K. Suomalainen, M. Haapasalo, Y. T. Konttinen, O. Lindy, H. Saari and V. J. Uitto. 1992. Identification of protease from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. *Infect. Immun.* **60(11)**, 4491-4495.
25. Teresa D.C., L. Wang, J. Wille, J. Armiento, and K. Chada. 1998. Epidermal expression of collagenase delays wound-healing in transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 1029-1033
26. Uitto, V. J., H. Larjava, J. Heino and T. Sorsa. 1989. A protease of *Bacteroides gingivalis* degrades cell surface and matrix glycoproteins of cultured gingival fibroblasts and induces secretion of collagenase and plasminogen activator. *Infect. Immun.* **57(1)**, 213-218..
27. Uitto, V. J., K. Suomalainen and T. Sorsa. 1990. Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. *J. Periodont. Res.* **25**, 135-142.
28. Van, Wart H. E., and D. R. Steinbrink. 1981. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Anal. Biochem.* **113**, 356-365.
29. Verheijen, J. H., N. M. E. Nieuwenbroek, B. Beekman, R. Hanemaaijer, H. W. Verspaget, H. K. Ronday and A. H. Bakker. 1997. Modified proenzymes as artificial substrates for proteolytic enzymes: colorimetric assay of bacterial collagenase and matrix metalloproteinase activity using modified pro-urokinase. *Biochem. J.* **323**, 603-609.
30. Zaira, E. J. and M. W. Stinson. 1999. An extracellular protease of *Streptococcus gordonii* hydrolyzes type IV collagen and collagen analogues. *Infect. Immun.* **67(1)**, Jan. 271-278.