

Production and Characterization of Alkaline Protease of *Micrococcus* sp. PS-1 Isolated from Seawater

Young-Rang Jin¹, Sun-Nyoung Yu¹, Kwang-Youn Kim¹, Sang-Hun Kim¹, Seul-Ki Park¹, Hyeun-Kyeong Kim², Yong-Seok Lee³, Yong-Lark Choi³, Jae Hoon Ji⁴ and Soon-Cheol Ahn^{1,2*}

¹Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 626-870, Korea

²Medical Research Institute, Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

³Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

⁴Genome Instability Research Center, Ajou University School of Medicine Suwon 443-721, Korea

Received January 18, 2013 / Revised February 19, 2013 / Accepted February 20, 2013

The purpose of this research was to investigate the production and characterization of alkaline protease from *Micrococcus* sp. PS-1 newly isolated from seawater. *Micrococcus* sp. PS-1 was grown in Luria-Bertani (LB) medium. Its optimal temperature and pH for growth were 30°C and 7.0, respectively. The effect of nitrogen sources was investigated on optimal enzyme production. A high level of alkaline protease production occurred in LB broth containing 2% skimmed milk. The protease was purified in a 3-step procedure involving ultrafiltration, acetone precipitation, and dialysis. The procedure yielded a 16.43-purification fold, with a yield of 54.25%. SDS-PAGE showed that the enzyme had molecular weights of 35.0 and 37.5 kDa. Its maximum protease activity was exhibited at pH 9.0 and 37°C, and its activity was stable at pH 8.0 - 11.0 and 25 - 37°C. The protease activity was strongly inhibited by PMSF, EDTA, and EGTA. Taken together, the results demonstrate that the protease enzyme from *Micrococcus* sp. PS-1 probably belongs to a subclass of alkaline metallo-serine proteases.

Key words : Alkaline protease, *Micrococcus* sp., seawater, characterization, skim milk

서 론

효소의 기능은 단백질의 구조적 특성상 온도나 pH 등의 효소의 반응환경에 크게 영향을 받는다. 생체에서 작용하는 촉매물질인 효소는 개체에 따라 그 종류와 특성이 다르며 대사의 조절 기능을 지니고 있다[20]. 최근 미용과 건강에 대한 관심이 고조됨에 따라 활성이 뛰어난 새로운 효소에 대한 수요가 증가되고, 친환경 산업으로 많은 연구가 진행됨에 따라 안정성과 생산성, 비용절감 등 경제적인 면이나 공업적인 규모의 활용 측면에서 많은 장점이 있는 미생물 유래의 protease를 생산하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다[13, 17]. Protease는 protein이나 oligopeptide의 peptide bond를 분해하는 효소로서, 대부분의 살아있는 생물체에서 발견되며, 세포의 성장과 분화에 있어서 필수적이다. Protease의 분류는 효소 활성 부위의 잔기에 따라 serine protease, metal protease, aspartic protease, cysteine protease 등으로 구분되고,

효소가 최적으로 작용하는 pH에 따라 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 분류된다[11, 18].

해양생태계는 지구의 69%를 차지하고 북극 같은 극한 환경부터 염분의 농도가 진한 적도 같은 따뜻한 환경에 이르기까지 다양한 환경에서 해양생물체가 살고 있다. 해양생태계의 가장 기본적인 생명단위인 해양미생물은 곰팡이와 함께 해수에 부유하여 사는 부생생물로서 유기물질을 분해하고 생태계 내의 영양 염류의 순환에 중요한 역할을 수행한다[3, 15]. 해양미생물은 극한 환경에서 영양분을 흡수하기 위해 강력한 가수분해효소를 생산하며, 이 중 단백질 분해효소와 지질 분해효소를 대표적으로 꼽을 수 있다. 저온 환경에 적응하며 사는 해양미생물이 분비하는 효소는 저온과 높은 농도의 염에서도 뛰어난 활성을 나타내고, 유전자 재조합 및 단백질 공학 같은 새로운 생물공학기술을 적용하기가 비교적 용이한 것으로 알려졌다. 육상생물과 다른 특이한 대사 조직을 가지고 있기 때문에 육류 연화제와 와인, 치즈 같은 식품부터 세제, 화장품 및 동물사료에 이르기까지 유용한 친환경 산업자원으로서의 개발가능성이 보고되고 있으나 육상에서 분리된 균주에 비해 해양유래의 미생물에 대한 연구는 미비한 실정이다[8, 9, 12].

따라서 육상과 환경적인 차이를 보이는 특이한 생체 및 생리학적 조건에서 적응하는 해양미생물의 탐색 및 유용자원에 대한 연구를 실시하였다. 본 연구에 사용된 미생물은 부산 앞 바다의 해수에서 분리되었다. 16S rDNA sequencing 방법을

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8092, Fax : +82-55-382-8090

E-mail : ahnsc@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

통해 *Micrococcus* sp.로 동정되어, PS-1으로 명명하였다. 미생물의 배양학적 특성을 조사하기 위해 LB를 기본으로 한 배지에 여러 질소원을 첨가하여 미생물의 성장과 효소생산을 조사하였다. 또한 protease의 효소학적 특성을 조사하기 위해 온도, pH 그리고 여러 이온들을 첨가하여 효소의 최적 조건과 효소활성의 연관관계를 조사하였다.

재료 및 방법

시약 및 배지

본 실험에 사용된 기본 배지는 LB (Difco, Franklin Lakes, New Jersey, USA)이었고, ammonium chloride (Samchun, Pyeongtaek, Korea), ammonium sulfate (Katayama Chemical, Osaka, Japan), casamino acid, peptone, skim milk, soytone, tryptone, yeast extract (Difco), gelatin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), malt extract (Oxoid, Madrid, Spain), soybean meal (Busan, Korea)과 같은 질소원과 NaCl (Samchun)를 첨가하여 사용하였다. 효소의 활성측정에 사용된 시약은 Hammarsten casein (USB, Cleveland, Ohio, USA), trichloroacetic acid (Sigma), Folin-Ciocalteu reagent (Sigma), sodium carbonate (Samchun) 등을 사용하였다. 단백질의 측정에는 HPLC급 acetone (SK chemical, Ulsan, Korea)을 사용하였다.

Protease 생산 균주의 분리 및 동정

본 연구에 사용된 해수는 부산 해수욕장 일대에서 얻어 이를 멸균된 증류수로 10^5 으로 희석하고 고체배지에 도말하여 균주를 분리하였다. Protease를 생산하는 균주를 분리하기 위한 배지로는 LB 고체배지를 기본으로 하여 0.5% (w/v) skim milk를 첨가하여 사용하였다. 균주의 동정을 위해 그람 염색법으로 형태적 특성을 확인하였다[25]. 16S rDNA 분석을 위해 universal forward primer bact_F (5'-AGAGTTTGATCTG GCTCAG-3')와 universal reverse primer bact_R (5'-ACGG CTACCTGTACGACTT-3')를 사용하여 PCR 하였다. 증폭된 PCR 산물은 GeneAll PCR SV (Seoul, Korea)를 이용하여 정제하여 코스모진텍(Seoul, Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 염기서열간의 유사도를 확인하기 위하여 The National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 제공하는 Advanced Blast Search 프로그램을 통하여 GenBank에 보고된 유사 균주의 염기서열과 비교하여 계통분류학적 유연관계를 분석하였다.

Protease의 활성 측정

Protease 활성은 Kunitz의 casein hydrolysis 법을 변형하여 측정 하였다[14]. 기질용액은 6% (w/v) Hammersten casein을 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0)에 녹여 기질로 사용하였다.

조효소액은 2% (w/v) skim milk와 1% (w/v) NaCl이 포함된 LB broth에서 48 시간 동안 배양한 뒤, 13,000 rpm으로 5 분간 원심분리하여 얻었다. 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0) 400 μ l에 조효소액 50 μ l와 6% (w/v) casein (pH 9.0) 50 μ l를 가하여 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 750 μ l의 TCA solution (0.11 M trichloroacetic acid, 0.22 M sodium acetate, 0.33 M acetic acid)을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응액을 13,000 rpm에서 15 분 동안 원심분리 한 후, 상층액 80 μ l에 200 μ l의 0.55 M Na₂CO₃와 20 μ l의 1 N Folin-Ciocalteu reagent를 가하여 37°C에서 30 분 동안 반응하였다. VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA)를 이용하여 OD 660 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. 1 unit의 효소 활성도는 위의 조건에서 1 분 동안 1 μ M tyrosine에 해당하는 아미노산을 생성하는 효소의 양으로 하였다. 단백질의 농도는 Bradford의 방법으로 측정하였다.

배양 시간과 NaCl 농도의 영향

최적 배양시간을 확인하기 위해 protease 생산배지에 균주 1% (v/v)를 접종하여 30°C shaking incubator에서 배양하면서 12 시간에서 72 시간까지 12 시간 간격으로 시료를 얻었다. 또한 NaCl 농도에 대한 영향을 확인하기 위해 protease 생산 배지에 1, 3, 7% (w/v)의 NaCl을 첨가하고 균주 1% (v/v)를 접종하여 30°C에서 48 시간까지 배양하면서 12 시간 간격으로 시료를 얻었다. OD 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 균주의 성장을 조사하였으며 protease 활성 측정을 통해 효소의 생산을 조사하였다.

효소생산을 위한 질소원의 영향

분리된 균주의 성장과 protease 생산을 촉진하는 질소원을 선정하기 위하여 다양한 유기/무기 질소원을 대상으로 조사하였다. Ammonium chloride, ammonium sulfate, casamino acid, gelatin, malt extract, peptone, skim milk, soytone, soybean meal, tryptone, yeast extract를 LB broth에 각각 1% (w/v) 씩 첨가하고 30°C에서 48 시간 동안 배양하여 균주의 성장과 protease 생산에 미치는 효과를 조사하였다[19].

효소생산을 위한 초기 pH의 영향

분리된 균주의 초기 pH에 따른 배양 특성과 효소생산을 조사하기 위해, 2% (w/v) skim milk가 포함된 LB broth를 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 초기 pH를 4.0~11.0로 적정하였다. 각각의 배지에 분리 균주를 1% (v/v) 씩 접종하여 30°C에서 48 시간 동안 배양하고 12 시간 간격으로 시료를 얻어 균주의 성장과 protease 생산을 조사하였다[1].

Protease의 부분 정제

배양상등액을 molecular weight cut-off (MWCO)가 300

kDa, 50 kDa, 10 kDa의 membrane을 사용하여 ultrafiltration (UF, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)으로 분획하였다 [16, 24]. 효소활성을 나타내는 10 kDa 이하의 단백질 fraction을 차가운 acetone으로 40% (v/v)로 포화시켜 -20°C에 4시간 동안 보관한 뒤, 10,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 40% (v/v) 포화상등에 acetone을 추가적으로 넣어 60, 80% (v/v)로 포화시켜 같은 방법으로 침전물을 얻었다. 각각의 침전물을 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) 완충액에 녹여 protease 활성 분획을 조사하고, 각 시료를 MWCO가 15 kDa인 Spectra/por® Dialysis tube (Spectrum Laboratories, Inc., Chisholm, Minnesota, USA)에 채워 밀봉한 후, 4°C에서 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) 완충액으로 dialysis시켜 정제하였다 [2, 21].

효소의 zymography 분석

부분 정제된 효소용액을 2-mercaptoethanol 이 제외된 5X zymography sample buffer (60 mM Tris-HCl, 25% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) bromophenol blue, pH 6.8)에 섞어 12% (w/v) polyacrylamide gel에 loading 하여 80 V로 전기영동 하고, Coomassie brilliant blue로 염색하여 단백질 band들을 확인하였다. Zymography는 mixed substrate (MS) gel을 만들어 TRANS-BLOT 법으로 측정하였다 [5, 7]. Gel에 포함된 SDS는 효소반응을 저해할 수 있기 때문에, 이를 제거하기 위해 3차 증류수로 10 분 간격으로 3번 washing 하고, 2.5% (v/v) Triton X-100으로 30 분간 washing 하였다. Washing 된 gel은 MS gel 에 overlay하여 20 V에서 25 분간 transfer하고, 37°C에서 예열된 zymogram reaction buffer (30 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 0.02% (w/v) sodium azide, pH 9.0) 에 30분간 반응 시킨 후, Coomassie brilliant blue로 염색하고, destaining solution (40% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid, 50% (v/v) D.W)로 탈색하여 단백질 분해활성을 나타내는 clear band를 확인하였다.

효소의 기질 특성

Casein, gelatin, bovine serum albumin (BSA)를 이용하여 protease가 선택적으로 분해하는 기질을 조사하였다. 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 9)에 6% (w/v)의 기질을 첨가하여 37°C에 1시간 동안 반응시킨 후, TCA로 반응을 정지시켜 protease 조사하였다.

효소 활성과 효소 안정성

Protease의 최적 pH를 조사하기 위해 50 mM sodium acetate (pH 3.0~6.0), 50 mM sodium phosphate (pH 6.0~8.0), 50 mM Tris-HCl (pH 8.0~9.0), 50 mM Glycine NaOH (pH 9.0~12.0) 완충액을 사용하여 37°C에서 1 시간 동안 반응한 후, 효소활성을 측정하였다. 최적 온도를 측정하기 위하여 25, 30,

37, 45, 50, 60, 70°C의 반응온도에서 조효소액을 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0)에서 1 시간 동안 반응시켜 효소활성을 비교하였다. Protease의 pH 안정성을 확인하기 위해, 각 완충액에 조효소액을 30 분 동안 실온에서 반응 시키고, 이후 pH 9.0로 적정하여 37°C에서 1 시간 동안 추가로 반응한 후, 잔존 효소활성을 측정하였다. 온도에 대한 효소의 안정성을 조사하기 위하여 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0)에 조효소액을 섞고 각 온도에서 30분 동안 반응시킨 후, 최적 온도인 37°C에서 1 시간 동안 추가로 반응하며 잔존 효소활성을 측정하였다.

Metal ion, chemical reagent, SDS의 효소활성에 대한 영향

사용된 metal ion은 Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , K^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} 으로서 최종 농도가 1, 5, 10 mM이 되도록 첨가하여 protease 활성을 조사하였다 [5]. Chemical reagent는 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), dithiothreitol (DTT), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 위의 조건과 같이 처리하여 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0)에서 1시간 동안 37°C에서 반응시켜 protease 활성을 조사하였다 [4]. 계면활성제에 따른 효소반응의 저해를 확인하기 위해 SDS를 사용하여 1, 2, 4, 5, 6% (w/v) SDS로 처리하고, 위의 조건과 같이 30분간 실온에서 반응하고, 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0)에서 1시간 동안 37°C에서 추가로 반응하여 protease 활성을 조사하였다 [13].

결과 및 고찰

Protease 생산 균주의 분리 및 동정

여과와 침전을 통해 불순물을 제거한 해수를 멸균 증류수로 10 배씩 희석하여 0.5% (w/v) skim milk가 함유된 LB agar plate에서 3 일간 배양한 후, 형성되는 미생물의 집락을 관찰하였다. 다양한 종류의 세균과 곰팡이들이 관찰되었으며, 이 중 skim milk에 대해 가장 강한 분해활성을 나타내는 균주를 분리하였다. 분리된 균주는 밝은 노란색이며, 표면이 매끈하고 불룩한 형태의 집락을 보였다. 정확한 균주의 동정을 위해 16S rDNA 염기서열(1.5 kb)을 분석하고 이를 NCBI의 BLAST database에 등록된 다른 균주들의 염기서열과 비교한 결과, *Micrococcus luteus* OS 139와 99%의 상동성을 보였다(Fig. 1). 따라서 분리된 균주를 *Micrococcus* sp. PS-1이라고 명명하였다.

Micrococcus sp. PS-1의 최적 배양 및 효소의 생산

Micrococcus sp. PS-1는 해수에서 분리하였기 때문에 NaCl의 균주 성장과 protease 효소 생산 영향을 먼저 조사하였다. NaCl이 성장에 미치는 영향은 12 시간까지는 NaCl의 첨가 유무에 상관없이 비슷한 균주의 성장을 보였고, 1 M의 NaCl 첨가 시 가장 높은 균주의 성장을 보였다(Fig. 2A). NaCl 첨가

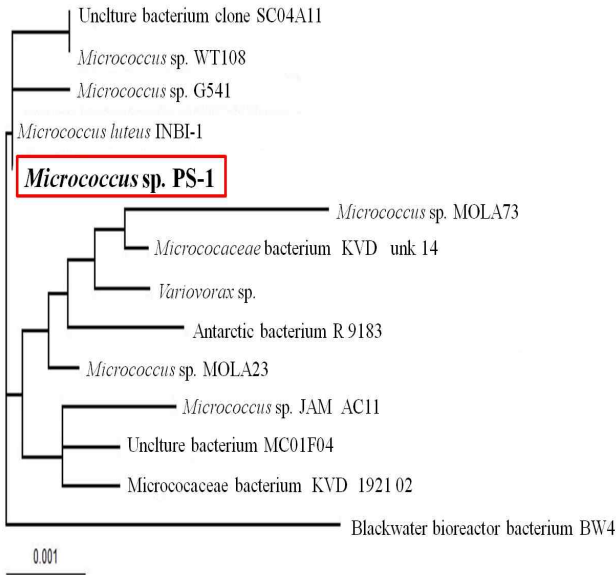


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences, showing relationships between *Micrococcus* sp. PS-1 and member of the *Micrococcus* sp.. Bar, 0.001 nucleotide substitution per position.

Table 1. Effect of nitrogen sources on the protease production of *Micrococcus* sp. PS-1

Nitrogen sources	Protease production (unit/ml)
Control	0.6±0.2
Ammonium chloride	0.8±0.1
Ammonium sulfate	0.7±0.0
Casamino acid	4.0±0.1
Gelatin	423.8±0.2
Malt extract	12.4±0.1
Peptone	1.8±0.1
Skim milk	632.5±0.2
Soytone	21.8±0.2
Soy bean meal	26.4±0.1
Tryptone	15.6±0.1
Yeast extract	4.3±0.1

에 따른 효소 생산은 성장의 결과와 유사하게 1 M NaCl에서 가장 많은 효소를 생산하였고 3과 7 M NaCl의 첨가 시 효소의 생산이 저해되는 것을 확인하였다(Fig. 2B). 따라서 protease 생산 균주인 *Micrococcus* sp. PS-1은 균주의 성장과 관련하여 염의 농도에 대해서는 tolerance를 나타내는 것으로 추정되었다.

효소 생산을 촉진하기 위해 LB broth에 2% (w/v) 유기/무기 질소원을 첨가하여 *Micrococcus* sp.의 성장과 효소생산을 확인한 결과, gelatin과 skim milk를 첨가한 배지에서 protease 생산이 유도되는 것이 확인되었다(Table 1). 또한 효소 생산에 가장 적합한 배양시간을 확인한 결과, 배양 후 12시간까지는 효소의 생산이 없다가 18 시간 이후 급격히 증가하였으며, 효

소의 최대 생산은 배양 후 72 시간까지 유지되었다(Fig. 3). 배양 중 배지의 색은 맑고 연한 노란색에서 점점 연한 분홍색으로 변화였고 특유의 냄새도 관찰되었다.

초기 배양 pH에 따른 균주의 성장과 protease 생산을 알아보기 위해 배양액의 pH를 4.0~11.0까지 맞춘 후 12시간 간격

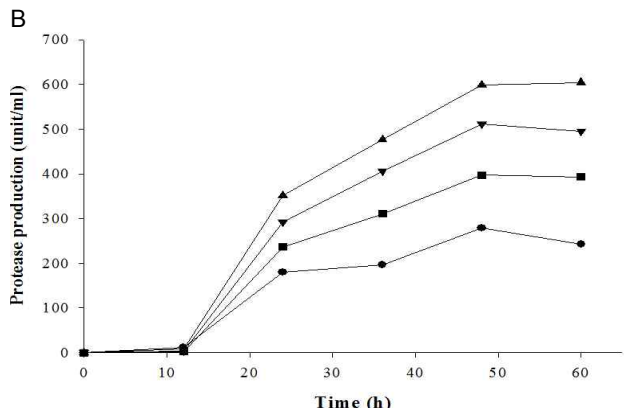
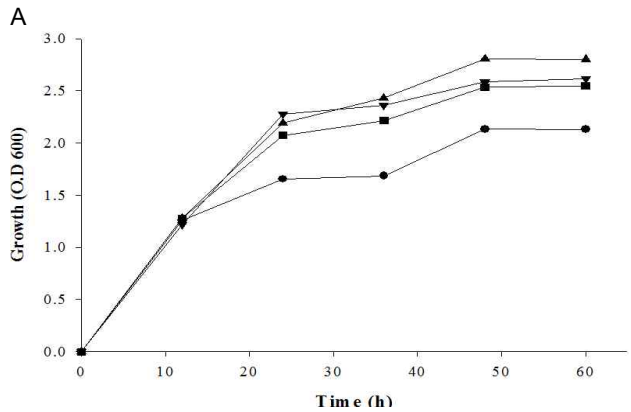


Fig. 2. Effect of NaCl concentrations on the growth (A) and protease production (B) of *Micrococcus* sp. PS-1. LB broth with 2% skim milk was used as a basal medium. ▼: control, ▲: 1 M NaCl, ■: 3 M NaCl, ●: 7 M NaCl

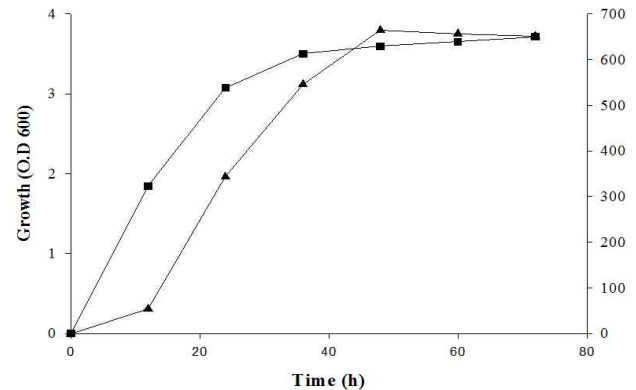


Fig. 3. Time course of growth and protease production of *Micrococcus* sp. PS-1. LB broth with 2% skim milk was used as a basal medium. ▲—▲: growth, ■—■: activity

으로 조사한 결과, 산성(pH 4.0~5.0)의 조건에서는 균주의 성장이 관찰되지 않았으나, 균주의 최대성장은 pH 7.0에서 나타났으며, pH 10.0 이상에서는 균주의 성장이 급격히 감소하였다(Fig. 4). 한편 초기 배양액의 pH에 따른 효소의 생산은 배양액의 pH가 균주의 성장에 미치는 영향과 비슷한 경향을 보였다. 즉, pH 6.0에서 pH 9.0 사이에서 최대의 효소 활성을 보였으나 pH 4.0~5.0와 pH 10.0~11.0에서는 효소의 생산이 감소하였다(Fig. 4). Protease 생산균주인 *Micrococcus* sp. PS-1은 혐기성 조건에서 효소의 생산이나 균주의 성장이 우수하였다.

따라서 분리균주 *Micrococcus* sp. PS-1은 LB배지에 2% (w/v) skim milk와 1% (w/v) NaCl을 첨가하고 pH 7의 조건에서 균주의 성장이나 protease의 생산이 가장 높은 것으로

나타나 이후의 실험에서는 이를 protease를 생산하기 위한 최적배지로 사용하였다.

효소의 부분정제

최적생산배지 1 l에 *Micrococcus* sp. PS-1을 1% (v/v) 접종하여 48시간 동안 배양하여 조효소액 얻고, 이를 ultrafiltration 한 결과, 10 kDa 이하의 분획에서 protease 활성을 나타냈다. 10 kDa이하의 분획을 대상으로 acetone을 사용하여 40~60% (v/v)까지 포화시켜 침전한 결과, total protein은 85.9 mg으로 줄었고, specific activity는 3604.14 unit/mg으로 나타났다. 이후 dialysis tube (MWCO 15 kDa)를 이용하여 acetone 침전물을 dialysis한 결과, total protein양은 28.4 mg이었고 specific activity는 10620.29 unit/mg으로 높아졌다. 최종으로 부분 정제된 protease의 수율은 54.25%이고, 정제도는 16.43배로 증가하였다(Table 2). 12% (w/v) native polyacrylamide gel에 부분 정제된 효소액을 5X zymography sample buffer에 섞어 loading하여 전기영동한 후 TRANS-BLOT 법을 사용하여 zymography한 결과, 35.0 kDa과 37.5 kDa 크기의 band에서 clear zone이 관찰되었으나(Fig. 5), 효소액과 buffer를 100°C에

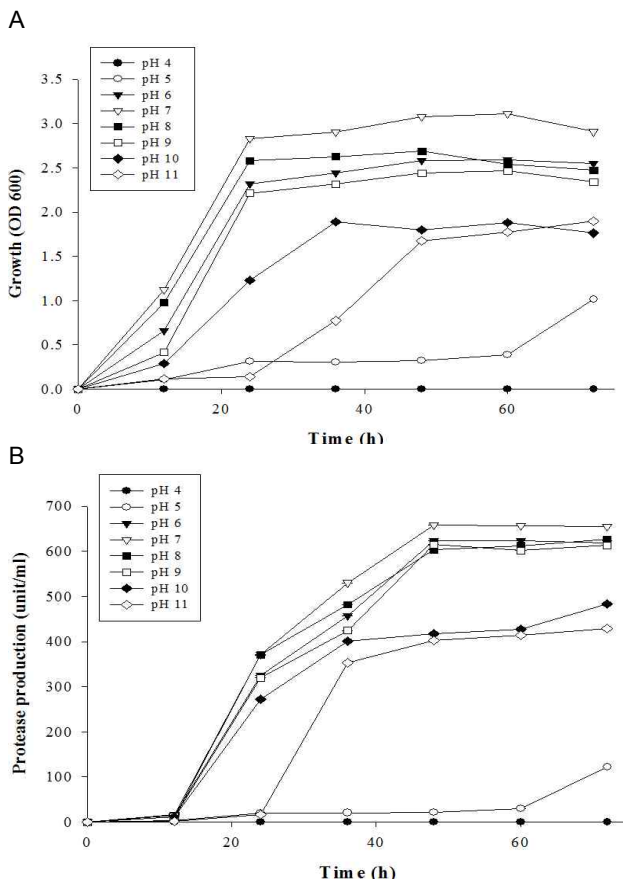


Fig. 4. Effect of initial pH on the growth and protease production of *Micrococcus* sp. PS-1. LB broth with 2% skim milk was used as a basal medium.

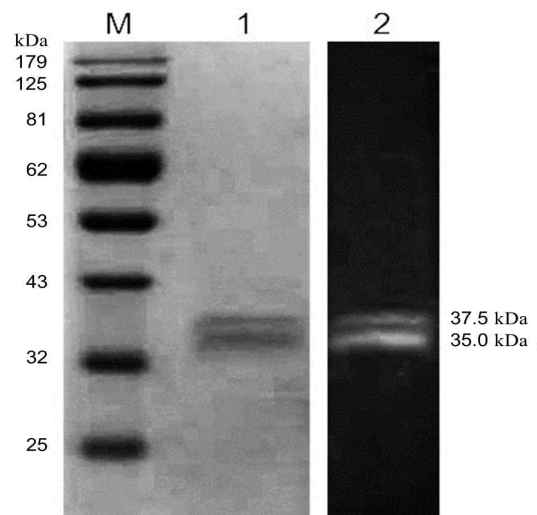


Fig. 5. Zymography analysis of the protease from *Micrococcus* sp. PS-1. The electrophoresis was done on 12% native polyacrylamide gel for caseinolytic zymography. M: Size marker, 1: Zymogram, 2: Coomassie brilliant blue staining.

Table 2. Summary of purification step for the protease of *Micrococcus* sp. PS-1

Purification step	Total enzyme activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield
Crude enzyme	555,960	860.0	646.46	1.00	100.00
Ultra filtration	520,606	440.0	1183.20	1.83	93.64
Acetone precipitation	309,596	85.9	3604.14	5.58	55.69
Dialysis	301,616	28.4	10620.29	16.43	54.25

서 10분간 끓인 후, 12% (w/v) denature gel로 전기영동했을 때 protease 활성은 소실되었다(data not shown). 이는 2-mercaptoethanol이 protease의 disulfide bond를 분해하여 효소가 불활성화되어 효소활성이 사라진 것으로 추측된다.

Protease의 기질 특이성

Protease의 최적 기질을 확인하기 위하여 6% (w/v) BSA, casein, gelatin을 이용하여 분해능을 조사하였다. 각각의 기질을 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 9.0)에 녹여 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨 후 효소 활성을 측정된 결과, 최적 기질은 casein으로서 gelatin의 2.5 배, BSA보다 128 배 더 강한 단백질 분해 활성이 확인되었다(Fig. 6). 이 결과는 앞서 확인되었던 배양배지의 질소원 특성 결과와 유사한 경향을 보였다. 즉, LB broth에 첨가한 질소원 중 skim milk와 gelatin를 첨가한 배지에서 우수한 효소생산이 관찰되었으며, gelatin 보다 skim milk에서 효소생산이 1.5 배 더 높은 것으로 확인되었다. 따라서 skim milk의 주성분이 casein인 것을 고려할 때 *Micrococcus* sp. PS-1이 생산하는 protease 효소의 기질 특이성이 casein에서 가장 높은 것으로 사료되었다.

Protease의 최적 효소활성과 안정성

Protease의 최적 pH를 확인하기 위하여 4가지 완충액(pH 3.0~6.0: 50 mM sodium acetate, pH 6.0~8.0: 50 mM sodium phosphate, pH 8.0~9.0: 50 mM Tris-HCl, pH 9.0~14.0: 50 mM glycine NaOH)을 사용하여 37°C에서 효소활성을 측정하였다. 그 결과, 최적 효소활성은 pH 9.0 (50 mM Tris-HCl)에서 나타났고 pH 11.0까지도 효소활성이 안정되게 유지되었다. 또한 pH 12.0에서도 약 75% 정도의 효소활성이 유지되어 전형적인 alkaline protease의 특성을 보였다(Fig. 7B). 한편 효소의 최적 온도를 측정하기 위하여 protease를 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 9.0)에서 25, 30, 37, 45, 50, 60, 70°C의 온도에서 반응시켜 효소활성을 조사하였다. 효소의 최적 반응온도는 37°C로 나타났으며 반응온도가 높아질수록 효소활성이 급격히 감소하며 50°C에서는 최적온도의 52% 수준의 효소활성을 나타냈으며,

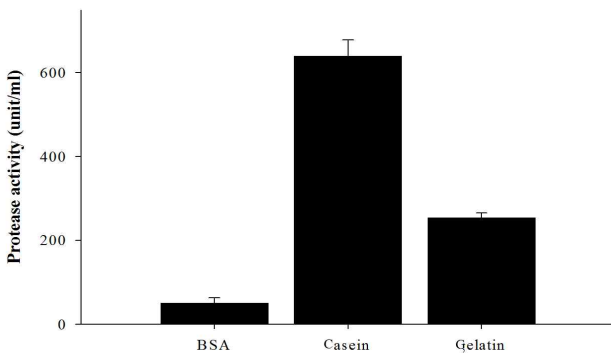


Fig. 6. Substrate specificity of the protease from *Micrococcus* sp. PS-1.

60°C부터는 활성이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 7A).

Protease의 pH와 온도에 대한 안정성을 확인하기 위해 다양한 온도와 pH 조건에서 30 분간 반응 한 후, 최적 반응조건인 pH 9.0와 37°C에서 1 시간 동안 추가로 반응시켜 잔존활성을 확인하였다. 그 결과, pH 9.0~10.0 사이에서 효소활성이 매우 안정하였으나 pH 6.0과 12.0에서는 각각 상대 효소활성이 52%와 63%로 확인되어 분리된 균주의 protease는 알칼리 조건의 pH에서 효소활성이 매우 안정하였다(Fig. 7B). 온도에 대한 안정성은 37°C 이하의 온도에서는 큰 영향을 받지 않았지만 45°C에서는 잔존활성이 53.7%로 감소하면서 열에 매우 불안정한 것으로 나타났으며, 50°C 이후에는 효소활성이 완전히 사라졌다(Fig. 7A).

효소활성에 대한 metal ion, chemical reagent와 SDS의 영향

Metal ion과 chemical reagent가 protease의 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 각각을 1, 5, 10 mM의 농도로 첨가하여 효소의 활성을 측정하였다. Metal ion은 농도가 높아질수록

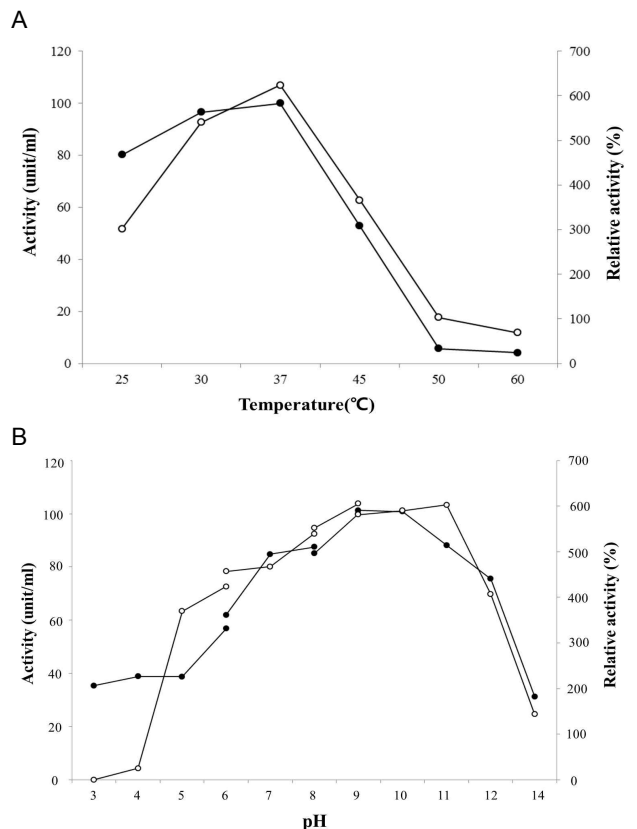


Fig. 7. Effect of temperature (A) and pH (B) on activity and stability of the protease from *Micrococcus* sp. PS-1. ○—○: activity, ●—●: stability, pH 3.0~6.0: 50 mM sodium acetate buffer, pH 6.0~8.0: 50 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0~9.0: 50 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0~14.0: glycine NaOH buffer

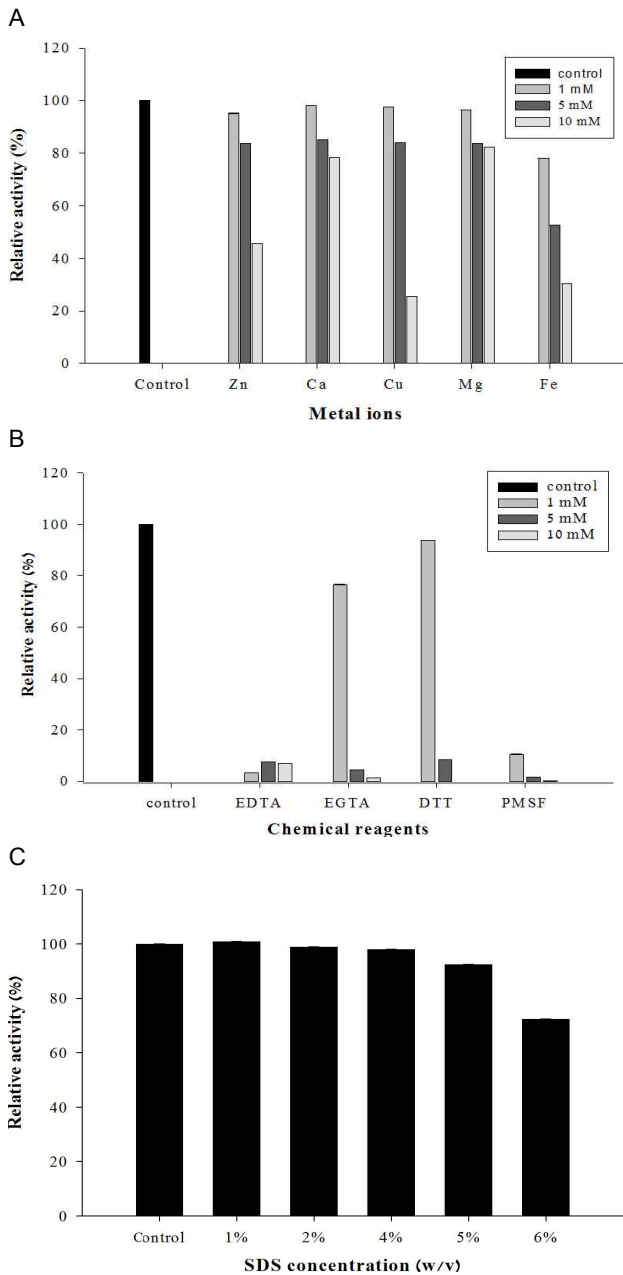


Fig. 8. Effects of metal ions (A), protease inhibitors (B) and SDS (C) on the activity of the protease from *Micrococcus* sp. PS-1. The enzyme was pre-incubated with the corresponding metal ion, inhibitor and SDS at room temperature for 30 min.

효소활성을 저해하였으며, 특히 10 mM의 Zn^{2+} , Cu^{2+} 와 Fe^{2+} 이온에서 강한 저해작용을 보여 잔여활성이 각각 43.5%, 25.6%와 30.2%로 나타났으나, 1, 5 mM의 Zn^{2+} , Cu^{2+} 에서는 영향이 없었다. 또한 Mg^{2+} 과 Ca^{2+} 이온에서는 10 mM의 농도에서도 잔여활성이 80% 이상까지 유지되어 다른 metal ion보다 효소활성에 영향이 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 8A).

EDTA와 PMSF의 경우, 1 mM부터 활성이 강하게 저해되었

고 EGTA와 DTT에서는 1 mM에서 각각 76.5%와 93.6%의 잔존활성이 유지되었으나 5 mM부터 효소활성이 급격히 감소되었다(Fig. 8B). Serine protease inhibitor로 알려져 있는 PMSF와 metal ion의 chelating agent로 알려진 EDTA와 EGTA에서의 강한 저해작용을 통해, *Micrococcus* sp. PS-1가 생산하는 protease는 serine protease와 metallo protease의 특성을 함께 갖는 것으로 사료되었다.

SDS 대한 효소의 안정성을 측정하기 위해 1, 2, 4, 5, 6% (w/v) SDS를 처리하여 활성을 확인한 결과, 5%까지 약한 저해활성을 보였으나 6% (w/v)의 농도에서도 잔존 효소활성이 72.3%로 측정되어 *Micrococcus* sp. PS-1이 생산하는 protease는 SDS에서 비교적 안정함을 확인할 수 있었다(Fig. 8C).

해양미생물이 생산하는 alkaline protease의 생리적 특성을 비교해 볼 때, 저온성 세균인 *Pseudomonas* sp. DY-A가 생산하는 alkaline protease의 경우 효소생산은 20°C에서, 효소의 최적활성은 40°C에서 관찰되었다[25]. *Bacillus* sp. Ve1은 10% (2.1 M) NaCl에서도 protease가 안정되게 생산하는 것으로 나타났다[23]. 본 연구에 사용된 *Micrococcus* sp. PS-1의 경우, 30°C와 1 M NaCl 농도에서 최적의 효소 생산을 나타내어 해양미생물이 다양한 생육조건에서 성장하기 때문에 효소의 생산조건 역시 다양하게 나타난 것으로 추정된다.

한편 *Micrococcus* sp.가 생산하는 protease의 특성을 비교해 볼 때, *Micrococcus* sp. ATCC 407의 경우 43 kDa의 extracellular calcium metalloenzyme의 최적 활성이 pH 6.5와 37°C에서 나타났고[26], *Micrococcus* sp. INIA 528은 19.4 kDa의 cysteine proteinase가 pH 7.0과 34°C에서 최적활성을 보였다[10]. 그러나 *Micrococcus* sp. MCC-315의 28.9 kDa의 caseinolytic enzyme이 45°C에서도 그 활성을 유지한다는 점을 고려할 때[22], *Micrococcus* sp.가 생산하는 protease는 넓은 범위의 환경조건에서 효소활성을 나타내는 것으로 사료된다.

따라서 *Micrococcus* PS-1이 생산하는 protease의 분자량과 효소학적 특성을 정확하게 조사하기 위해서는 단백질의 정제 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Amoozgar, M. A., Fatemi, A. Z., Karbalaee-Heidarib, H. R. and Razavi, M. R. 2007. Production of an extracellular alkaline metallo protease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiol Res* **4**, 369-377.
- Arulmani, M., Aparanjini, K., Vasanthi, K., Arumugam, P.,

- Arivuchelvi, M. and Kalaichelvan, T. 2007. Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1. *World J Microbiol Biotechnol* **23**, 475-481.
3. Cavicchioli, R., Siddiqui, K. S., Andrews, D. and Sowers, K. R. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 253-261.
 4. Clark, D. J., Hawrylik, S. J., Kavanagh, E. and Opheim, D. J. 2000. Purification and characterization of a unique alkaline elastase from *Micrococcus luteus*. *Protein Expr Purif* **18**, 46-55.
 5. Choi, N. S., Choi, J. H., Kim, B. H., Han, Y. J., Kim, J. S., Lee, S. G. and Song, J. J. 2009. Mixed-substrate (glycerol tributyrates and fibrin) zymography for simultaneous detection of lipolytic and proteolytic enzymes on a single gel. *Electrophoresis* **12**, 2234-2237.
 6. Choi, N. S., Hahm, J. H., Maeng, P. J. and Kim, S. H. 2005. Comparative study of enzyme activity and stability of bovine and human plasmins in electrophoretic reagents, β -mercaptoethanol, DTT, SDS, Triton X-100, and Urea. *J Biochem Mol Biol* **38**, 177-181.
 7. Choi, N. S., Kim, B. Y., Lee, J. Y., Yoon, K. S., K. Han, Y. and Kim, S. H. 2002. Relationship between acrylamide concentration and enzymatic activity in an improved single fibrin zymogram gel system. *J Biochem Mol Biol* **35**, 236-238.
 8. Cristóbal, H. A., Schmidt, A., Kothe, E., Breccia, J. and Abate, C. M. 2009. Characterization of inducible cold-active β -glucosidases from the psychrotolerant bacterium *Shewanella* sp. G5 isolated from a sub-antarctic ecosystem. *Enzyme Microb Technol* **45**, 498-506.
 9. Cristóbal, H. A., Breccia, J. D. and Abate, C. M. 2008. Isolation and molecular characterization of *Shewanella* sp. G5, a producer of cold-active β -D-glucosidases. *J Basic Microbiol* **48**, 16-25.
 10. Fernández, J., Mohedano, A. F., Polanco, M. J., Medina, M. and Nuñez, M. 1996. Purification and characterization of an extracellular cysteine proteinase produced by *Micrococcus* sp. INIA 528. *J Appl Bacteriol* **81**, 27-34.
 11. Hartley, B. S. 1960. Proteolytic enzymes. *Annu Rev Biochem* **29**, 45-72.
 12. Jonathan, K., Burkhardt, F., Stephen, A. J., David, P. H. L., John, P. M., Fergal, O. G., and Alan, D. W. D. 2010. Marine metagenomics: New tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism. *Mar Drugs* **8**, 608-628.
 13. Joo, H. S., Kumar, C. G., Park, G. C., Paik, S. R. and Chang, C. S. 2003. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii*-F52: production and some properties. *J Appl Microbiol* **95**, 267-272.
 14. Kunitz, M. 1947. Crystalline soyabean trypsin inhibitor II. general properties. *J Gen Physiol* **30**, 291-310.
 15. Lee, J. H., Shin, H. H., Lee, D. S., Kwon, K. K., Kim, S. J., and Lim, H. K. 1999. Bacterial diversity of cultivable isolates from sea water and a marine coral, *Plexauridae* sp. near Mun-Sum, Cheju-Island. *J Microbiol* **37**, 193-199.
 16. Li, H. Zheng, P., H., Yuan, J. L., Fan, H. D., Chen, W., Wang, S. J., Zheng, S. S., Zheng, Z. L. and Zou, G. L. 2007. A novel extracellular protease with fibrinolytic activity from the culture supernatant of *Cordyceps sinensis*: purification and characterization. *Phytother Res* **12**, 1234-1241.
 17. Mala, B. R., Aparna, M. T., Mohini, S. G. and Vasanti, V. D. 1998. Molecular and biotechnological aspect of microbial protease. *Microbiol Mol Biol* **62**, 597-635.
 18. Massaki, Y., Kazuo, S. and Mitsuo, M. 1984. Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3403. *Agric Biol Chem* **48**, 1637-1639.
 19. Mohsen, F. N. 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electron J Biotechnol* **8**, 197-203.
 20. Nicholas, C. P. and Lewis, S. 1999. *Fundamentals of Enzymology*, pp. 35-36, 3rd eds., Oxford University press, UK.
 21. Park, P. J., Lee, S. H., Byun, H. G., Kim, S. H. and Kim, S. K. 2002. Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus*. *J Biochem Mol Biol* **35**, 576-582.
 22. Prasad, R., Malik, R. K. and Mathur, D. K. 1986. Purification and characterization of extracellular caseinolytic enzyme of *Micrococcus* Sp. MCC-315 isolated from Cheddar cheese. *J Dairy Sci* **69**, 633-642.
 23. Rajesh, P., Mital, D. and Satya, P. S. 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Process Biochem* **40**, 3569-3575.
 24. Reis, V. R. and Zydney, A. 2001. Membrane separations in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **12**, 208-211.
 25. Runying, Z., Rui, Z., Jing Z. and Nianwei, L. 2003. Cold-active serine alkaline protease from the psychrophilic bacterium *Pseudomonas* strain DY-A: enzyme purification and characterization. *Extremophiles* **7**, 335-337.
 26. Tarun, B. and Elmer, H. M. 1989. Purification and partial characterization of an aminopeptidase from *Micrococcus freudenreichii* ATCC 407 systematic and applied microbiology. *Syst Appl Microbiol* **12**, 112-118.

초록 : 해수에서 분리한 *Micrococcus* sp. PS-10이 생산하는 단백질 분해효소의 생산과 효소학적 특성

진영랑¹ · 유선녕¹ · 김광연¹ · 김상현¹ · 박슬기¹ · 김현경² · 이용석³ · 최용락³ · 지재훈⁴ · 안순철^{1,2,*}

(¹부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학 교실, ²부산대학교 의학연구원, ³동아대학교 생명과학자원 대학 생물공학과, ⁴아주대학교 의과대학 유전체불안정제어 연구센터)

본 연구는 부산 인근의 해수욕장에서 얻은 해수에서 protease를 생산하는 균주를 분리하여 동정하고 균주의 배양학적인 특성과 protease의 효소학적 특성을 확인하였다. 해수에서 분리한 protease를 생산하는 미생물은 16S rDNA sequencing을 통해 *Micrococcus* sp. PS-10으로 동정하였다. Protease 생산의 최적조건은 2% skim milk와 1% NaCl이 포함된 pH 7.0의 LB배지에 48시간 배양이었다. 효소의 부분정제를 위해 ultrafiltration 과 acetone 침전법을 사용하였고, zymography를 통해 분자량이 35.0 kDa과 37.5 kDa인 protease를 확인하였다. 또한 효소의 최적 활성은 pH 9.0과 37°C에서 나타났고, 효소는 pH 8.0에서 11.0까지, 25°C에서 37°C까지 80% 이상의 효소활성이 유지되어 안정한 것으로 확인되었으며 PMSF, EDTA 처리시 protease가 저해되는 것을 통해 alkaline metallo-serine protease로 확인되었다.