



Characterization of extracellular protease from *Pseudoxanthomonas* sp. WD12 and WD32

Woon-Dong Cho¹ · Ji-Sung Oh¹ · Dong-Hyun Roh¹

Pseudoxanthomonas sp. WD12와 WD32의 세포외 단백질분해효소 특성

조운동¹ · 오지성¹ · 노동현¹

Received: 23 May 2016 / Accepted: 5 July 2016 / Published Online: 31 December 2016
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2016

Abstract Proteolytic enzymes perform hydrolysis of the peptide bonds in the protein and most commonly use in the industry. *Pseudoxanthomonas* sp. WD12 and WD32 were previously isolated as protease producers from a rotten wood sample. Here, we report the secreted proteolytic enzymes. The optimum enzyme reaction temperature for the secreted crude enzyme from the strain WD12 and WD32 were 50 °C at pH 9.0 and 45 °C at pH 8.0, respectively. The enzyme activities of both strains were increased by addition of KCl, NaCl, CaCl₂ or MnSO₄, and decreased by addition of AgNO₃, CuSO₄, FeCl₃ or AlCl₃. Secreted enzymes of both strains were most strongly inhibited by addition of FeCl₃ or CuSO₄. Taken together these results, WD12 could be a candidate strain of industrial alkaline protease production.

Keywords Extracellular protease · Metal ion · Optimal condition · *Pseudoxanthomonas* sp. WD12 & WD32

서론

생체고분자인 단백질로 구성된 효소는 화학반응을 가속화시키거나 촉매역할을 함으로서 산업적인 측면에서 사용이 증가되고 있다. 그 중 단백질 분해효소(protease)는 산업체에서 가장 많이 사용되고 있는 효소의 하나로 식품 및 제약, 피혁 가공업, 세제, 진단 등에 이용되며, 전세계 시장에서 판매되는 효소의 60%를 차지한다(Adrio와 Demain 2014). 생체 단백질의 아미노산 사이에 존재하는 펩티드 결합을 가수분해하여 아미노산이나 펩티드를 생산하는 단백질 분해효소는 모든 생명체가 효소의 생산원이 될 수 있다(Khan 2013). 하지만 동물 및 식물로부터의 산업적인 공급은 윤리적인 문제와 기후적인 요인 등으로 필요한 수요를 맞추기 힘들며, 수요를 맞추기 위한 대부분의 효소들은 미생물로부터 생산된다(Rao 등, 1998; Adrio와 Demain 2014).

미생물은 대사과정에서 중요한 세포 내 단백질 분해효소뿐만 아니라 환경에 존재하는 단백질을 분해하여 분해된 가수분해 산물을 흡수하고 이용하기 위하여 세포외부로 단백질 분해효소를 분비한다(Kalisz 1988). 이러한 세포 외 단백질 분해효소들은 생산과 정제의 용이성 때문에 좋은 단백질 분해효소의 산업적 공급원 역할을 한다(Kumar와 Takagi 1999). 단백질 분해효소는 효소의 작용 pH에 따라 산성, 중성, 알칼리성 효소로 분류되며, 이중 알칼리성 효소가 세탁제의 첨가물로서 산업적으로 가장 많이 이용되며, 이들을 생산하는 주요 세균 속은 *Bacillus* 속이다(Rao 등, 1998). 이외에도 다양한 환경에 존재하는 *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Halomonas*, *Micrococcus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Shewanella*, *Vibrio*로부터 단백질 분해효소의 생산 및 특성 등이 보고되었다(Gupta 등, 2002; Shafee 등, 2005; Oh 등, 2015).

이전의 연구에서 새로운 미생물 효소원을 찾고자 썩은 나무로부터 단백질 분해효소를 생산하는 균주를 분리 동정하여

Dong-Hyun Roh (✉)
E-mail: dhroh@chungbuk.ac.kr

¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

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.

Pseudoxanthomonas 속의 두 균주 WD12와 WD32를 분리보고 하였다(Cho 등, 2010). *Pseudoxanthomonas* 속은 그람 음성균의 γ -Proteobacteria 과에 속하는 세균으로 계통학적으로 *Xanthomonas*, *Xylella*, *Stenotrophomonas* 속과 밀접한 연관관계를 가지며, biofilter로부터 처음 분리되어 독립적인 속으로 보고 되었다(Finkmann 등, 2000). 그 후 다수의 토양시료와 온천 등에서 여러 종이 분리보고 되었고 종에 따라 casein과 젤라틴을 분해할 수 있거나 없는 것으로 보고 되었다(Li 등, 2014). 하지만 이 속의 균주 중에 체의 단백질 분해 효소의 특성에 관한 보고는 많지 않고 새로운 효소를 특정 산업분야에 사용하기 위해서는 먼저 효소의 최적온도와 pH 특성을 알아야 한다. 따라서 본 연구에서는 신종의 가능성이 높은 WD12와 *Pseudoxanthomonas mexicana*로 추정되는 WD32 균주의 세포의 단백질 분해효소의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주, 배지 및 배양

본 실험에 사용된 *Pseudoxanthomonas* sp. WD12와 WD32 균주는 부패한 나무에서 분리한 균주를 사용하였고(Cho 등, 2010), 배양은 LB 배지(sodium chloride 0.5%, tryptone 1.0%, yeast extract 0.5%; Duchefa biochemie, Netherlands)에 0.1% Difco skim milk (BD, Sparks, MD, USA)를 첨가하여 만든 배지를 사용하였다. 균주는 37 °C에서 최고활성을 보인 배양시간(WD12는 100시간, WD32는 80시간) 동안 배양하고 균의 성장은 흡광도 600 nm에서 측정하였다.

효소활성 측정

단백질 분해효소의 활성 측정은 배양액을 4 °C에서 8,000 rpm (Micro 17R, Hanil, Kimpo, Korea)에서 5분간 원심분리 하여 균체를 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소의 활성 측정은 기질로 0.5 % (w/v) azocasein을 사용한 조 등의 방법(Cho 등, 2010)에 의거하여 측정하였다. 단백질 분해효소의 활성 결과 값은 모두 3 회 반복 측정하여 평균값과 표준편차로 표시하였다.

최적 pH, 온도조건 및 금속이온

최적 pH 측정을 위해 pH 6.0에서 pH 7.0까지는 0.5 M phosphate 완충용액, pH 8.0에서 pH 9.0까지는 0.5 M Tris-HCl 완충용액, pH 10.0에서 pH 11.0까지는 2.0 M glycine-NaOH 완충용액을 사용하였다. 효소 반응온도는 10 °C에서부터 60°C까지 이용하며 5°C 간격으로 조정하여 효소활성을 측정하였다. 금속이온은 AgNO₃, KCl, NaCl, CaCl₂, CuSO₄, MgCl₂, MnSO₄, AlCl₃, FeCl₃을 최종농도가 1 mM 또는 5 mM의 되도록 효소 반응액에 첨가하였다.

결과 및 고찰

세포의 단백질 분해효소의 최적 pH

반응 pH에 따른 단백질 분해효소의 활성을 조사한 결과 WD12

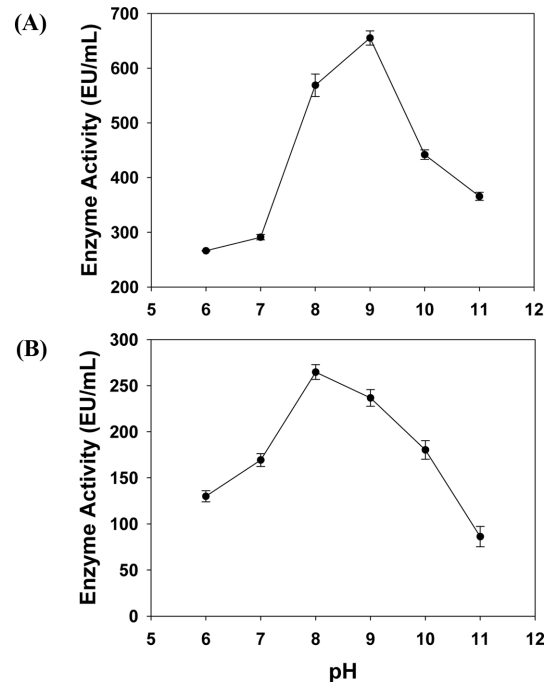


Fig. 1 Effect of pH on extracellular protease activity of *Pseudoxanthomonas* sp. WD12 and WD32. The strains WD12 (A) and WD32 (B) were cultured at 37 °C in LB supplemented with 0.1% skim milk and enzyme activity was determined with 0.5% azocasein as substrate at 45 °C for 1 h. The buffer were used 0.5 M phosphate (pH 6.0–7.0), 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0–9.0), 2.0 M glycine-NaOH (pH 10.0–11.0). Standard deviations from the mean of three independent assays are indicated by error bars

는 pH 6.0에서 pH가 증가함에 따라 효소의 활성도 증가하였다. pH 9.0에서 최대 활성인 655 unit/mL을 나타낸 이후 감소하다 유지되었고 pH 7.5에서 pH 11의 범위에서 최고 값의 56% 정도의 활성 값을 보여주었다(Fig. 1A). WD32는 pH 6.0에서 pH가 증가에 따라 단백질 분해효소의 활성이 증가하다가 pH 8.0에서 최대 활성 264 unit/mL을 나타낸 이후 효소활성이 감소하였으며, pH 11에서는 최고 값에 비하여 33% 활성 값을 보여주었다(Fig. 1B).

WD12의 경우에는 pH 12에서 효소활성이 유지되어(데이터 미제시) 알칼리성 조건에서 사용가능 할 것으로 생각되었다. WD12와 유사한 최적 pH를 가지는 균주는 산업적으로 많이 사용되는 *Bacillus* 속의 균주가 많았으며(Kim 등, 1997; Hutadilok-Towatana 등, 1999; Ok 등, 2000), WD32와 같은 중성 단백질 분해효소의 특성은 *Yersinia ruckeri* (Secades와 Guijarro 1999)와 *Pseudoaltermonas* sp. 47 (Cha 등, 2007), *B. cereus* SH-7 (Kim 등, 1997)가 있었다.

세포의 단백질 분해효소의 최적온도

효소의 활성온도는 산업적인 이용에서 중요하므로 효소의 최적 온도를 측정하였다. 그 결과 WD12의 경우 10°C에서 온도가 증가하면서 활성이 약하게 증가하다가 30°C에서 효소활성이 최적 온도의 29% 정도의 활성을 나타내었다. 이후 최대 활성을 보인 50°C까지 다소 강하게 증가하였고, 50°C 이상에서는 단백질

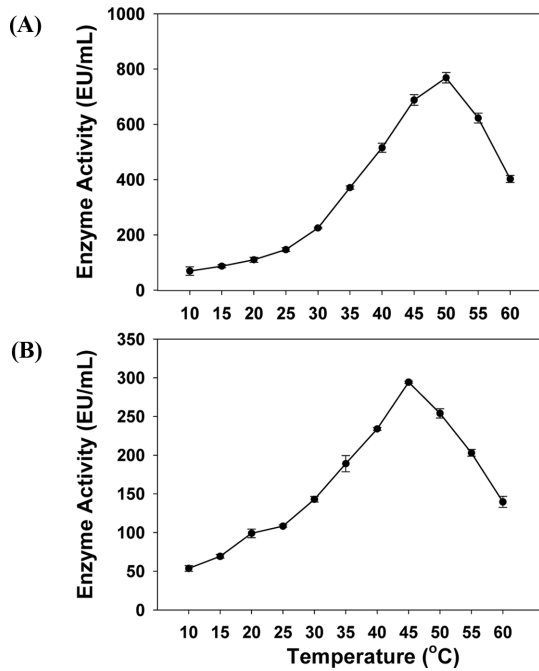


Fig. 2 Effect of reaction temperature on extracellular protease activity of *Pseudoxanthomonas* sp. WD12 and WD32. All conditions are the same as Fig. 1 except the reaction temperatures from 10 to 60 °C, and pH 9.0 for WD12 (A) and pH 8.0 for WD32 (B), respectively

의 불활성화에 의해 활성이 급격히 떨어졌다(Fig. 2A). WD32의 경우에는 최대 활성을 보인 45°C까지 완만하게 효소활성이 증가한 이후 급격한 활성 감소를 나타내었다(Fig. 2B).

두 균주 모두 생육하는 최적온도는 37°C이었지만(Cho 등, 2010), 효소의 최적활성 온도는 WD12가 50°C, WD32는 45°C로 상이하였다. 최적의 온도와 pH에서 단백질 분해효소의 최고 활성을 측정한 결과 WD12의 활성은 768 unit/mL을 나타내었고, WD32의 활성은 294 unit/mL을 나타내어 WD12가 WD32보다 2.6배 높은 활성을 보여주었다. WD12와 WD32의 최적활성 온도는 내열성 *Bacillus* 속의 균주들이 가지는 70 °C보다 낮았다(Bae와 Park 1989; Hutadilok-Towatana 등, 1999). WD12는 Kim 등(1997)이 보고한 *B. cereus* SH-7의 균주와 같은 최적온도를 가졌고, WD32는 Kang 등(1998)이 보고한 호알카리성 Coryneform 세균과 같았다.

세포의 단백질 분해효소에 대한 금속이온의 효과

일반적으로 효소의 활성은 다양한 금속이온에 의해 영향을 받으므로 이를 조사하였다. WD12는 KCl, NaCl, MnSO₄, CaCl₂, MgCl₂에 의해 활성이 증가하였고, WD32는 KCl, NaCl, MnSO₄, CaCl₂에 의해 활성이 증가하였다(Table 1). 최고의 활성증가는 5mM MnSO₄의 첨가했을 때 WD12는 30 %, WD32는 55 % 활성증가를 보였다. MgCl₂에 첨가시 WD12에서는 활성이 증가한 반면 WD32는 영향을 주지 못했다. 금속이온에 의한 효소의 억제에는 두 균주 모두 AgNO₃, CuSO₄, AlCl₃, FeCl₃에 의해 활성이 저해되었고, 특히 5 mM FeCl₃, CuSO₄에 의해 활성이 27 % 이상 강하게 저해되었다(Table 1).

Table 1 Effect of metal ions on the activity of extracellular proteases of *Pseudoxanthomonas* sp. WD12 and WD32

Metal ions	WD12		WD32	
	Concentration (mM)	Relative activity (%)	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	-	100.0±6.9	-	100.0±2.0
AgNO ₃	1	85.4±2.8	1	89.1±0.8
	5	84.5±1.5	5	85.4±1.8
KCl	1	104.2±1.2	1	97.8±2.0
	5	105.7±5.5	5	103.4±1.3
NaCl	1	98.8±3.9	1	96.6±0.7
	5	105.9±0.2	5	103.4±2.4
CaCl ₂	1	103.8±6.6	1	105.9±1.0
	5	101.5±3.8	5	109.9±1.5
CuSO ₄	1	79.3±1.3	1	74.1±2.1
	5	72.1±2.9	5	61.8±1.4
MgCl ₂	1	102.1±2.4	1	99.6±1.9
	5	107.4±1.2	5	98.4±3.0
MnSO ₄	1	120.5±2.9	1	118.9±1.3
	5	130.3±3.0	5	155.5±1.3
AlCl ₃	1	90.0±5.3	1	95.2±1.6
	5	90.2±1.0	5	82.3±4.7
FeCl ₃	1	90.1±1.3	1	85.9±1.8
	5	73.2±1.3	5	61.6±8.2

이와 같이 MnSO₄에 의해 강한 활성증가를 보인 *Chryseobacterium* sp. JK1 (Lee 등, 2013)는 AgNO₃, CuSO₄, AlCl₃에서는 활성감소를 보여 다소 유사한 경향을 보였지만 FeCl₃의 경우에는 두 균주와 달리 활성증가를 보였다. *Pseudoalteromonas donghaensis* HJ51 (Oh 등, 2015)의 경우도 AgNO₃, CuSO₄, AlCl₃에서는 활성감소를 보여 유사한 결과를 보였지만 두 균주에서 강한 활성을 보인 MnSO₄의 첨가에는 강한 활성 감소를 보여 상이하였다.

아직 보고되지 않은 신종세균과 그에 따른 단백질 분해효소에 대한 연구가 미흡한 실정에서 *Pseudoxanthomonas* sp. WD12는 기존에 보고된 *Bacillus* 속의 세균과 유사한 특성을 가져 알칼리성 조건의 산업 환경에서 이용가능 하다고 생각되며 차후 유전자 클로닝과 이를 이용한 대량생산 등에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

초 록

단백질 분해효소는 단백질 내 아미노산의 펩티드 결합을 가수 분해하며, 산업분야에서 가장 많이 사용되는 효소이다. 이전의 논문에서 부패한 나무로부터 *Pseudoxanthomonas* sp. WD12와 WD32를 분리하였다. 분비된 단백질 분해효소의 특성을 조사한 결과 WD12는 pH 9.0, 50°C, WD32의 경우 pH 8.0, 45°C에서 최적 활성을 나타내었다. 최적조건하에서 최고의 활성은 WD12는 768 unit/mL로 WD12의 활성이 WD32보다 2.6배 높았다. 금속 이온에 대한 분비효소 영향을 조사한 결과 두 균주 모두 KCl, NaCl, CaCl₂, MnSO₄를 첨가했을 때 활성이 증가하였으며, AgNO₃, CuSO₄, FeCl₃, AlCl₃를 첨가했을 때는 감소하

였고, 최고의 활성은 $MnSO_4$ 의 첨가했을 때 두 균주 모두 활성 증가를 보인 반면 $FeCl_3$, $CuSO_4$ 는 활성저해를 보였다. 신중으로 생각되는 WD12 균주의 효소는 알칼리성 조건의 산업 환경에서 이용가능 하다고 생각된다.

Keywords 금속이온 · 세포 외 단백질 분해효소 · 최적조건 · *Pseudoxanthomonas* sp. WD12 & WD32

감사의 글 이 논문은 2014년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다 (This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2014).

References

- Adrio JL, Demain AL (2014) Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules* 4: 117–139
- Bae M, Park PR (1989) Purification and characterization of thermotolerable alkaline protease by alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor J Microbiol Biotechnol* 17: 545–551
- Cha IT, Lim HJ, Roh DH (2007) Isolation of *Pseudoalteromonas* sp. HJ47 from deep sea water of East Sea and characterization of its extracellular protease. *Kor J Life Sci* 17: 272–278
- Cho WD, Lee JK, Lim CS, Park AR, Oh YS, Roh DH (2010) Isolation of *Pseudoxanthomonas* sp. WD12 and WD32 producing extracellular protease. *Kor J Microbiol* 46: 63–69
- Finkmann W, Altendorf K, Stackebrandt E, Lipski A (2000) Characterization of N_2O -producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbermensis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 273–282
- Gupta R, Beg QK, Khan S, Lorenz P (2002) Bacterial alkaline protease: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 15–32
- Hutadilok-Towatana N, Painupong A, Suntinanalert P (1999) Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719. *J Biosci Bioeng* 87: 581–587
- Kalisz HM (1988) Microbial proteinases. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 36: 1–65
- Kang SC, Park SG, Choi MC (1998) Characterization of alkaline serine protease secreted from coryneform bacterium TU-19. *J Microbiol Biotechnol* 8: 639–644
- Khan F (2013) New microbial proteases in leather and detergent industries. *Innov Res Chem* 1: 1–6
- Kim SJ, Yoon JH, Lee MS, Kim JB (1997) Isolation and characterization of *Bacillus cereus* secreting proteases form Korean soybean paste. *Kor J Microbiol* 33: 136–141
- Kumar CG, Takagi H (1999) Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv* 17: 561–594
- Lee YK, Oh JS, Roh DH (2013) Characterization of extracellular protease secreted from *Chryseobacterium* JK1. *Kor J Microbiol* 48: 48–51
- Li D, Pang H, Sun L, Fan J, Li Y, Zhang J (2014) *Pseudoxanthomonas wuyuanensis* sp. nov., isolated from saline-alkali soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 799–804
- Oh JS, Choi YS, Roh DH (2015) Characterization and optimum production condition of extracellular protease form *Pseudoalteromonas donghaensis* HJ51. *Kor J Microbiol* 51: 75–80
- Ok M, Kim MS, Seo WS, Cha JY, Cho YS (2000) Characterization of extracellular protease of *Bacillus* sp. WRD-1 isolated from soil. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 28: 329–333
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 597–635
- Secades P, Guijarro JA (1999) Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions of production. *Appl Environ Microbiol* 65: 3969–3975
- Shafee N, Aris SN, Rahman RZA, Basri M, Salleh AB (2005) Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium. *Bacillus cereus* strain 146. *J Appl Sci Res* 1: 1–8