

호알칼리성 *Bacillus* sp. DK1122 균주가 생산하는 알칼리성 단백질 분해효소의 정제 및 특성

이형재, 유지승, 배동훈*
단국대학교 식품공학과

Received: June 14, 2016 / Revised: July 7, 2016 / Accepted: July 14, 2016

Purification and Characterization of an Alkaline Protease Produced by Alkalophilic *Bacillus* sp. DK1122

Hyungjae Lee, Ji-Seung Yoo, and Dong-Hoon Bai*

Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea

An alkaline protease was purified and characterized from an alkalophilic microorganism, *Bacillus* sp. DK1122, isolated from soil in central Korea. The optimum temperature and pH for the growth of the producer strain were 40°C and pH 9.0, respectively. The protease was produced aerobically at 40°C after 24 h incubation in modified Horikoshi I medium (pH 9.0) containing 0.5% (w/v) glucose, 0.8% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) polypeptone, 0.1% (w/v) K₂HPO₄, 0.02% (w/v) MgSO₄·7H₂O, 1% (w/v) Na₂CO₃, and 3% (w/v) NaCl. The alkaline protease was purified by 70% ammonium sulfate precipitation of the culture supernatant of *Bacillus* sp. DK1122, followed by CM-Sepharose chromatography. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 27 kDa on the basis of SDS-PAGE. The optimum temperature and pH for the protease activity were 60°C and pH 9.0, respectively. Addition of CaCl₂ increased the thermal stability of the purified protease, where 90% of protease activity was retained at 60°C for up to 3 h. Consequently, it is expected that the alkaline protease from this study, exhibiting stability at pH 7–9 and 60°C, may be promising for application in the food and detergent industries.

Keywords: Alkaline protease, alkalophilic, *Bacillus*, purification, characterization

서 론

미생물 유래의 각종 효소는 일반 화학반응 대비 특이성이 높고, 가격 경쟁력이 우수하며, 지구 환경을 보전하는 친환경적 생물 소재이다. 이 중 protease의 경우, 원시 생물체도 자신이 생산한 단백질을 분해, 대사에 재사용하기 위해 protease가 필요했을 것이므로, protease는 생물학적 진화과정 중 가장 초기에 존재했을 것으로 추정된다. 미생물에 있어서 protease의 역할은 사람이나 동물이 소화기관인 장내로 이 효소를 분비하는 경우와 유사하다. 즉, 세포 외부의 단백질을 세포내로 흡수가능한 아미노산으로 분해하기 위해 protease를 분비한다. 특히 고분자 단백질의 흡수 기작이 없

는 미생물은 protease 분비를 통해 열량원 및 질소원까지 얻을 수 있다[19]. Protease가 작용하는 위치에 따라서 exopeptidase와 endopeptidase로 분류[28]하며, 미생물이 세포 외로 분비하거나 동물이 장내로 분비하는 대부분의 protease는 endopeptidase에 해당한다[19]. 최근 생물공학 기술의 발달과 함께 식품제조, 제약, 유전자 조작 등 여러 방면에서 새로운 효소가 개발되고 있으며, 효소제품의 사용도 계속 증가하고 있다. 그 중 단백질 분해효소(protease)는 세계 효소 생산의 약 25%를 차지한 산업적으로 중요한 효소이다[6, 22].

호알칼리성 protease로는 1958년에 알칼리성 단백질 분해 효소 subtilisin이 *Bacillus subtilis*로부터 분리되었다[12]. 1971년에는 호알칼리성 세균인 *Bacillus* sp.로부터 알칼리성 단백질 분해효소[13]가 발견되었고, 이후 연육가공, 세제, 탈모공정 등에 알칼리성 protease의 탁월한 유용성에 주목하여, 많은 연구자들이 활성이 높고, 안정된 성질을 갖는

*Corresponding author

Tel: +82-41-550-3562, Fax: +82-41-559-7868

E-mail: baidh@dankook.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

알칼리성 protease를 생산하는 균주 선별을 하기위해 많은 노력을 해왔다[10, 20, 26]. 또한 Protease의 생산[8], 구조분석[27] 및 구조 안정화[30], 열안정성[29], 생리학적 역할[14], 분자생물학적 연구[15]과 관련된 다양한 연구가 진행되었다. 식품, 세제 등 산업적으로 주목을 받는 호알칼리성 protease는 알칼리 범위의 pH에서 최적활성을 나타내며 대부분 활성 부위에 serine 가 존재하여, serine과 특이반응을 하는 물질[31]에 의해 쉽게 불활성화 된다고 보고되어 있다 [1]. 이후 최근까지 *B. licheniformis* MP1 [16], *B. horikoshii* [17], *B. firmus* CAS 7 [2], *Pseudomonas aeruginosa* MN1 [4], *Streptomyces clavuligerus strain* Mit-1 [33], *Aspergillus clavatus* [34] 등 다양한 미생물에서 호알칼리성 protease를 분리, 정제 및 특성연구를 통한 관련산업으로의 응용성을 알아보고자 하는 연구가 많이 보고되었다. 현재 고온성, 호염성, 호알칼리성 등 특수 환경 미생물 자원은 기초학문으로서의 생태학적 측면은 물론 산업적으로도 새로운 효소, 항생제, 향암제 등 각종 고부가가치 생물 신소재로 응용될 수 있다. 이 중 호알칼리성 protease는 식품 및 세제산업에 실제 응용이 되고 있기에 새로운 호알칼리성 protease를 찾는 것은 산업적으로 매우 중요하다고 할 수 있다.

본 연구에서는 선행연구를 통해 토양에서 분리, 동정한 효소 생산균주로부터 호알칼리성 protease의 최적생산조건을 수립하고, 생산하여 해당효소를 정제하고 특성을 알아보았다.

재료 및 방법

균주 및 배지

선행연구를 통해 토양에서 분리, 동정한 균주, *Bacillus* sp. DK1122를 protease 생산균주로 사용하였다[25]. 생산배지 최적화의 기본 배양배지는 균주분리에 사용한 Horikoshi I 배지(0.5% (w/v) polypeptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.1% (w/v) K_2HPO_4 , 0.02% (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1% (w/v) Na_2CO_3 , 2% (w/v) agar (pH 10.2)에 별도로 멸균된 1% (w/v) glucose를 혼합 제조)를 사용하였다[25].

Protease 활성

Protease 활성은 azocasein법을 변형하여 사용하였다[24]. 효소의 기질로 azocasein (Sigma, USA)을 최종농도 2% (w/v)로 10 mM sodium phosphate buffer (pH 9.0)에 녹인 후, 기질 250 μ l에 효소액 150 μ l를 첨가하여 60°C 또는 지정된 온도에서 10분간 반응시켰다. 이후 600 μ l의 20% (w/v) trichloroacetic acid를 가하여 효소를 불활성화 후, 9,000 \times g에서 10분간 원심분리를 통해 미반응 azocasein은 침전, 제거하였다. 700 μ l의 1 N NaOH를 원심분리 상등액 450 μ l에 혼합하고 spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu, Japan)

를 이용하여 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성도 1 unit은 10분간 효소반응에 의하여 유리되는 azo기에 의해 440 nm에서의 흡광도를 0.001 증가시키는 양으로 정하였다.

호알칼리성 Protease 생산 배양조건: 온도, 배양시간, pH, 산소공급

균체 생육에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위하여 20 ml의 Horikoshi I 배지에 종배양액을 0.5% 접종한 다음 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50°C 조건에서 250 rpm으로 24시간 진탕 배양한 후 균체의 생육도와 배양액 내의 효소활성을 측정하였다. 배양시간에 따른 균체의 생육과 효소 생산성을 검토하기 위하여 20 ml Horikoshi I 배지에 종배양액 0.5% (v/v)를 접종한 다음 40°C, 250 rpm으로 진탕 배양하였으며 4시간마다 배양액을 취하여 균체의 생육도와 배양 상등액의 효소활성을 측정하였다. 균체의 생산에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 Horikoshi I 배지에서 Na_2CO_3 를 제거하여 배지를 조제하였다. 여기에 100 mM sodium phosphate (pH 5-7), Tris-HCl (pH 7-9), sodium carbonate (pH 9-12) buffer로 pH를 조정하여 사용하였다. pH를 재조정된 배지에 종배양액 0.5% (v/v)를 접종하여 40°C, 250 rpm에서 24시간 진탕 배양하여 균체의 생육도와 효소활성을 확인하였다. 산소 공급에 따른 균체의 생육과 효소 생산성을 검토하기 위하여 250 ml Erlenmeyer flask에 pH 9로 조정된 Horikoshi I 배지를 10-100 ml까지 10 ml 단위로 제조하였다. 각각의 배지에 종배양액 0.5% (v/v)를 접종한 다음 40°C, 250 rpm으로 24시간 배양하여 균체의 생육도와 효소활성을 측정하였다.

호알칼리성 Protease 생산 배지 최적화: 탄소원, 질소원, NaCl 농도

균체의 생육과 효소 생산에 미치는 탄소원의 종류와 농도에 따른 영향을 검토하기 위해 Horikoshi I 배지(pH 9.0)에 1% (w/v) glucose 또는 glucose 대신 maltose, lactose, sucrose, dextrin, xylose, galactose, fructose, starch를 각 1% (w/v) 농도로 배지에 첨가하여 종배양액 0.5% (v/v)를 접종한 후 40°C, 250 rpm에서 24시간 진탕 배양하면서 생육과 효소활성을 측정하였다. 이 중 생육과 효소활성이 가장 좋은 탄소원을 선별하여 Horikoshi I 배지에 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10% (w/v) 농도가 되도록 첨가한 배지를 제조하여 사용하였다. 이후, 각 배지에 종배양액 0.5% (v/v)를 접종하여 40°C, 250 rpm으로 24시간 진탕 배양하여 균체의 생육도와 효소활성을 측정하였다. 질소원의 영향을 확인하기 위해, 배지 내에 질소원으로 사용하는 yeast extract와 polypeptone을 제거한 후 glucose를 0.5% (w/v) 첨가하여 pH를 9.0으로

조정된 Horikoshi I 배지 20 ml에 yeast extract, polypeptone, bactopectone, neopeptone, beef extract, tryptone, urea, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 를 각각 1% (w/v)가 되도록 첨가하였으며, polypeptone과 yeast extract 혼용 배지의 경우는 각각 0.5% (w/v) 첨가하여 총 1% (w/v)가 되도록 액체 배지를 조제하였다. 각 배지에 종배양액 0.5% (v/v)를 접종하여 40°C, 250 rpm으로 24시간 진탕 배양하여 배양액 내의 생육도와 효소활성을 측정하였다. NaCl의 영향을 검토하기 위하여 Horikoshi I 배지에 0.5% (w/v) glucose를 첨가하고 pH 9.0으로 조정하여 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20% (w/v) NaCl를 각각 첨가한 배지를 제조하였다. 여기에 종배양액 0.5% (v/v)를 접종하여 40°C, 250 rpm으로 24시간 진탕 배양하면서 균체의 생육도와 효소활성을 측정하였다.

호알칼리성 protease 정제

Bacillus sp. DK1122의 배양액을 원심분리기(Hanil Supra 22K, Hanil Science Industrial, Korea)로 7500 × g에서 20분간 원심 분리하여 균체를 분리하였다. 4°C에서 미리 냉각시켜 놓은 배양 상등액에 ammonium sulfate를 70% 포화용액이 되도록 첨가한 후, 저온에서 30분간 교반시키며 효소 단백질을 침전시켰다. 7500 × g에서 30분간 원심분리 후 상등액을 제거하여 침전된 효소 단백질에서 수분을 제거 후, 4°C에서 냉각된 10 mM sodium-phosphate buffer (pH 6.0)에 용해시켜 조효소액을 준비하였다. 수용성 조효소액을 10 mM sodium-phosphate buffer (pH 6.0)로 평형화된 CM-Sepharose column chromatography (35 × 150 mm; Sigma)를 사용하여 정제하였다. 이를 통해 얻은 활성효소분획을 PM-10 membrane을 사용하여 Amicon ultrafiltration cell (Millipore, USA)에서 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0)로 치환하였다.

단백질 정량과 전기영동

단백질의 농도는 UV-1201 spectrophotometer (Shimadzu Co.)를 이용하여 Bradford 법[7]에 준하여 측정하였다. SDS-PAGE는 Laemmli의 방법[23]에 준하여 행하였다. 전기영동 running gel은 15% (w/v)를 사용하였고 41 mA에서 3시간 전기영동한 후, 0.05% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma)으로 염색 후 탈색하여 단백질 가수분해 효소 단백질의 정제정도를 확인하였다.

호알칼리성 protease 최적반응 조건: 반응온도, 열안정성, pH, 무기염류

효소반응의 최적온도를 정하기 위해 효소를 30–70°C 범위에서 10°C 단위로 10분간 효소반응을 하여 최적반응온도를 정하였다. 효소의 열안정성을 검토하기 위하여 효소를 30–

70°C 범위에서 10°C 단위마다 0–5시간동안 1시간마다 효소 활성을 측정하였다. 효소의 활성에 미치는 반응 용액의 pH 영향을 확인하기 위하여 sodium phosphate buffer (pH 5–7), Tris-HCl buffer (pH 7–9), sodium carbonate buffer (pH 9–11)를 10 mM 농도가 되도록 첨가하여 60°C에서 10분간 반응시킨 후, 잔존 활성을 측정하였다. 무기염류가 효소의 열안정성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 열에 불안정한 60°C에서 효소에 CaCl_2 나 MgCl_2 를 첨가하여 활성을 측정하였다. 추가로 CaCl_2 를 2, 10 mM의 농도로 첨가하여 60°C에서 0–5시간 반응시키며 1시간마다 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

호알칼리성 protease 생산조건 최적화: 온도, 배양시간, pH, 산소공급

Protease 생산 시, 배양온도의 영향을 확인하기 위해, Horikoshi I 배지를 사용하여 종 배양액을 0.5%씩 접종한 후 배양온도를 20–50°C로 각기 달리하여 250 rpm, 24시간 동안 진탕 배양 후 균체 생육과 효소활성을 측정한 결과, 균체 생육은 25°C에서 서서히 증가하여 40°C에서 최대를 보였으며 45°C 이상에서는 생육이 이루어지지 않았다(Fig. 1A). 균체로부터의 단백질 분해효소 활성도 40°C에서 최대의 활성을 보였다. 본 균주는 30–40°C의 좁은 온도 범위에서만 생육하며, 배양액 중 효소활성은 40°C에서만 최적의 활성을 보이고 이외의 온도에서는 매우 낮은 활성을 보이므로 이후의 실험에는 배양 온도를 40°C로 하였다.

배양 시간에 따른 효소 생산을 검토하기 위하여 40°C, 250 rpm으로 진탕배양 후 배양액을 4시간 간격으로 채취하여 균체의 생육도와 효소 활성을 측정하였다. Fig. 1B와 같이 균체의 생육이 4시간 이후부터 서서히 증가하기 시작하여 24시간 이후에 최대의 생육을 보였고, 이후에 서서히 감소하였으나 그 차이가 현저하게 나타나지는 않았다. 또한 효소활성은 20시간과 24시간에서 가장 높았으며 그 이후 효소의 활성이 최대치의 약 80%를 유지하는 것으로 확인되었다. 따라서 이후의 실험에서는 종배양액을 접종하여 균체생육과 효소활성이 최대치를 갖는 24시간에서 배양액을 회수하였다.

균체 생육과 효소 생산에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 배양액에서 균체 생육과 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 1C와 같다. 균체는 pH 7 이상에서 생육하여 pH 9에서 최대 생육을 보였으며 pH 11 이상에서 균체 생육이 급격히 저하됨을 확인하였다. 효소활성은 pH 8 이하와 pH 10 이상에서 현저히 낮았으며, pH 9에서 최대 활성을 나타내었다. 또한 pH 9에는 Tris-HCl buffer를 첨가하여 배양한 균주와 sodium carbonate buffer를 첨가하여 배양한 균주의 생육도는 비슷하였다. 반면, 효소활성에 있어서는 sodium carbonate

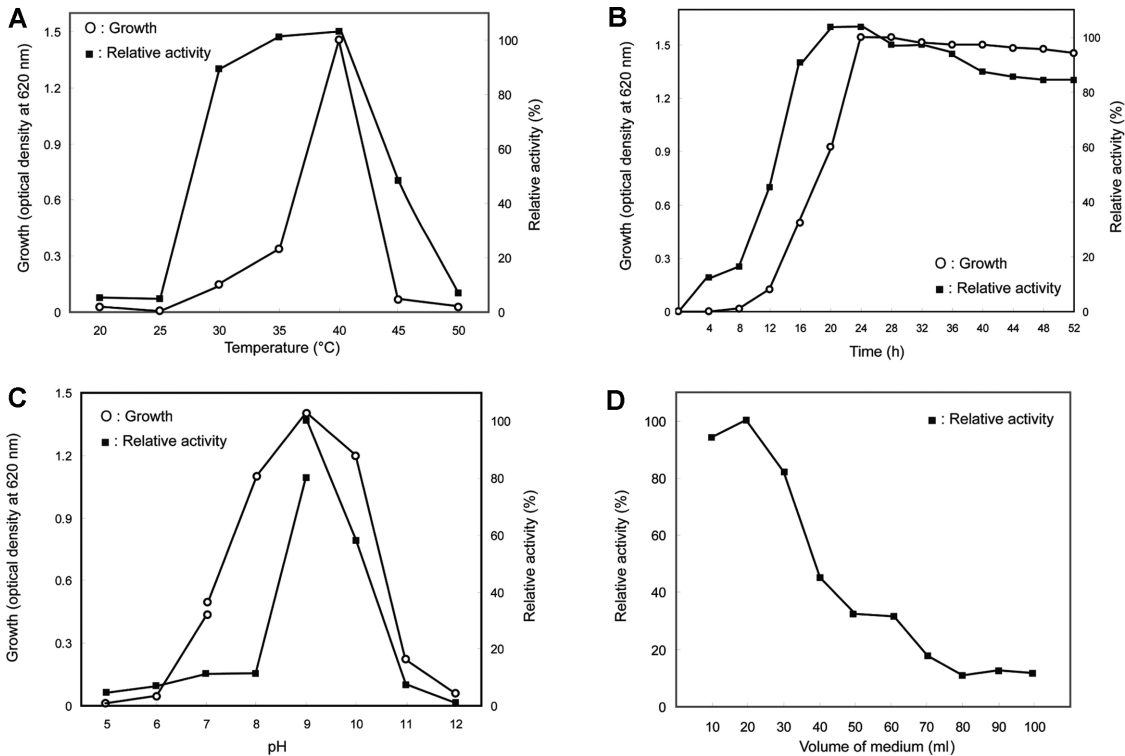


Fig. 1. Effect of culture temperature (A), culture time (B), and initial pH (C) on the growth and enzyme production from *Bacillus* sp. DK1122. (D) Effect of medium volume on the enzyme production from *Bacillus* sp. DK1122.

buffer를 사용한 배지에서의 균체 효소활성이 Tris-HCl buffer를 첨가하여 배양한 균체의 효소활성 보다 20% 정도 높은 효소활성을 나타내었다. 따라서 이후의 실험에서는 sodium carbonate를 첨가한 Horikoshi I 배지를 pH 9로 재조정하여 사용하였다.

효소 생산에 미치는 산소 공급 영향을 검토한 결과 균체의 생육도는 산소의 공급량에 크게 영향을 받지 않고 생육을 보였으나, 효소의 활성에는 산소 공급 조건에 따라 급격한 차이를 나타내었다(Fig. 1D). 배지의 양이 20 ml일 때 균체의 효소 활성이 최대를 보였으며 배지의 양이 20 ml보다 많아질수록 균체의 효소 활성은 급격히 감소되었다. 따라서 *Bacillus* sp. DK1122가 생산하는 protease는 산소공급에 따라 효소 활성에 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

호알칼리성 protease 생산 배지 최적화: 탄소원, 질소원, NaCl 농도

효소 생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토하기 위하여 배양 후 균체의 생육도와 효소활성을 측정된 결과 glucose를 첨가하였을 때 최대의 생육도와 효소활성을 보였으나, 다른 탄소원에서는 효소활성이 거의 없었다(data not shown). 한편 최대의 활성을 보인 glucose의 농도 변화에 따른 효소의

생산성을 검토하기 위하여 Horikoshi I 배지에 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10%의 농도의 glucose를 첨가하여 배양한 결과 0.5% glucose농도에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 따라서 이후의 실험에서는 0.5% 농도의 glucose를 첨가한 배지를 사용하였다.

균체 생육과 효소 생산에 미치는 질소원의 영향을 검토한 결과 polypeptone과 yeast extract를 혼합하여 첨가한 배지에서 다른 질소원을 첨가했을 때보다 높은 생육과 효소활성을 보였다(data not shown). 각각 yeast extract와 polypeptone의 농도를 변화시키면서 효소 생산을 검토한 결과 yeast extract는 0.8%의 농도에서 가장 높은 활성을 나타냈으며, polypeptone은 0.5% 농도에서 최대의 효소활성을 보였다(data not shown).

본 균주에 있어서 NaCl 농도가 균체 생육과 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과 생육도는 10% NaCl 농도까지 높은 생육을 보였으나 15% 이상에서 급격히 감소하기 시작하여 그 이상의 고농도 염을 첨가하면 균체가 자라지 못하는 것으로 확인되었다(data not shown). 또한 효소활성은 3%의 NaCl 농도에서 최대의 활성을 보였으며, 그 이상의 농도에서는 균체의 생육이 높더라도 활성이 급격히 감소하여 7% 이상의 농도에서는 활성을 거의 찾아볼 수 없었다. 따라

서 본 균주는 3% 농도에서 최대의 활성을 갖으며 10%의 염 농도에서도 생육하는 내염균(halotolerant)으로 판단되었다. 이전 연구에서 5% NaCl에서 최적성장을 나타내는 *Bacillus* sp. 균주가 생산하는 호알칼리성 protease에 대한 연구가 있었다[18].

위의 실험 결과를 토대로 한 *Bacillus* sp. DK1122의 최적화된 배양조건은 균주 스크리닝에 사용한 Horikoshi I 배지와 차이가 있었다. 최적배지를 modified Horikoshi I medium로 명명하였고, 조성은 0.5% (w/v) glucose, 0.8% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) polypeptone, 0.1% (w/v) K₂HPO₄, 0.02% (w/v) MgSO₄·7H₂O, 1% (w/v) Na₂CO₃, 3% (w/v) NaCl이고 pH 9.0으로 조정하였다. 이후의 실험에서는 modified Horikoshi I medium으로 *Bacillus* sp. DK1122를 배양하였다.

호알칼리성 protease 정제 및 특성

Bacillus sp. DK1122가 생산하는 알칼리성 단백질 분해 효소를 분리, 정제하기 위하여 효소 최적 생산조건에서 균체를 배양하였다. 배양 후 균체를 원심분리시켜 회수한 배양 상등

액으로부터 효소 단백질을 침전하기 위하여 ammonium sulfate 농도를 달리하여 효소 침전 조건을 검토하였다. 균체를 제거한 상등액에 ammonium sulfate의 포화농도를 각각 50, 70, 80%로 하여 가하고, 4℃에서 4시간 방치하였다. 침전된 효소 단백질을 10 mM sodium-phosphate buffer (pH 6.0)에 용해시켜 효소활성을 측정하였으며, 효소량을 구하여 배양 상등액의 효소량과 비교하여 회수율을 계산 하였다. 그 결과 70%의 포화농도에서 가장 높은 효소침전 회수율(41.8%)을 보였다(data not shown). Ammonium sulfate에 의하여 침전시킨 효소 단백질을 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)에 현탁시킨 후 CM-Sepharose와 DEAE-sepharose에 흡착시켜 본 결과 효소활성이 DEAE-Sepharose의 경우 비흡착 부분에서 효소활성을 보였고, CM-Sepharose의 경우에는 흡착 된 부분에서 효소활성을 보였다. 따라서 효소액을 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) 조건에서 CM-Sepharose에 흡착시키고 0-0.5 M NaCl 범위에서 농도별로 증가시키며 효소를 용출한 결과 효소활성은 No. 41-52 분획관에서 용출되었다(Fig. 2A). CM-Sepharose column에 의해서는 배양 상등액보다 2.8배의 정제도를 보였으며 회수

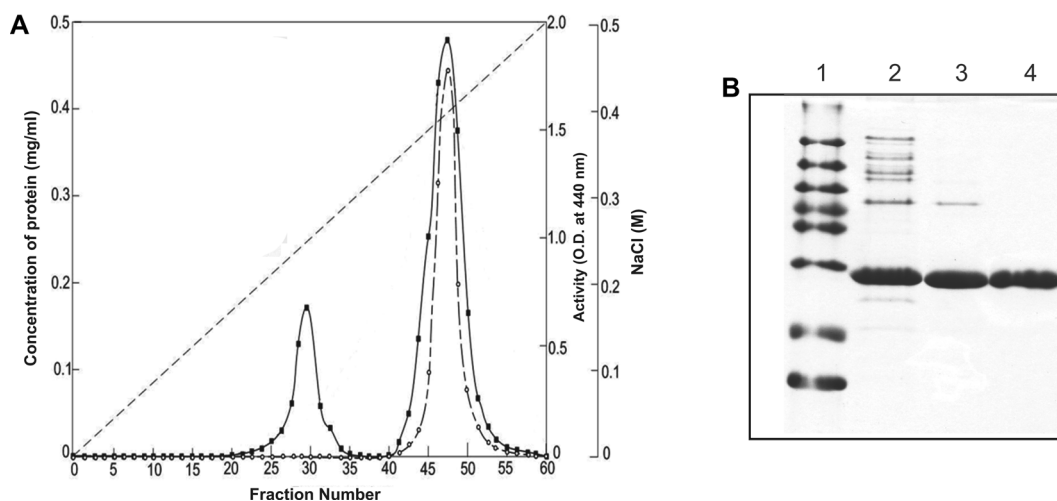


Fig. 2. Purification of alkaline protease from *Bacillus* sp. DK1122. (A) Chromatogram of an alkaline protease from *Bacillus* sp. DK1122 on CM-Sepharose chromatography. ---: concentration of NaCl (M); ■: concentration of protein (mg/ml); ○: enzyme activity (optical density at 440 nm). (B) SDS-PAGE of an alkaline protease from *Bacillus* sp. DK1122. Lane 1, molecular weight markers of 97.4, 66.2, 55.0, 42.7, 40.0, 31.0, 21.5, and 14.4 kDa; lane 2, culture broth; lane 3, precipitant of 70% ammonium sulfate; lane 4, active fractions of CM-Sepharose chromatography.

Table 1. Purification table of protease from *Bacillus* sp. DK1122.

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold
Culture broth	7,725.0	1,427,100	184.7	100	1
70% Ammonium sulfate	1,401.6	596,300	425.4	41.8	2.3
CM-Sepharose chromatography	659.8	341,700	517.9	23.9	2.8

율은 23.9%였다(Table 1). 정제 효소의 순도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 행하였다. 그 결과 정제된 단일 band를 확인하였고, 분자량은 27 kDa로 추정되었다(Fig. 2B). 다른 *Bacillus* spp.에서 생산하는 호알칼리성 protease의 분자량이 30 kDa [5], 28 kDa [9, 21]인 것과 유사한 것으로 판명되었다. 그러나 halotolerant *Bacillus* sp.에서 유래 호알칼리성 protease (40 kDa)와는 분자량이 상이하였다[18]. SDS-PAGE 분석에 의하여 CM-Sepharose column chromatography에 의한 정제 분획물로부터 단일 단백질 밴드를 나타내어 순수 정제된 것으로 판단되었다. 일부 *Bacillus* spp. 경우 2개의 monomeric 단백질로 호알칼리성 protease를 생산한다고 보고된 것과는 상이한 결과를 나타냈다[11, 32].

호알칼리성 protease 최적반응 조건: 반응온도, 열안정성, pH, 무기염류

효소 반응온도를 30-70°C 범위로 온도를 조정하여 정제된 효소활성 최적반응 온도를 측정하였다. 그 결과 40°C 부터 효소활성이 점차 증가하여 60°C에서 최대 효소활성을 보였으며 그 이상의 온도에서는 급격히 감소하였다(Fig. 3A). 따라서 효소 활성 측정 시 반응온도를 60°C에서 행하였다.

다른 *Bacillus* spp.에서 분리된 효소의 경우 최적 활성온도는 60°C [9, 11]로 동일하거나, 40°C [32]로 본 연구에서 정제한 효소의 최적활성온도보다 낮았다.

효소의 활성에 미치는 반응용액의 pH 영향을 확인하기 위하여 sodium phosphate buffer (pH 5-7), Tris-HCl buffer (pH 7-9), sodium carbonate buffer (pH 9-11)를 10 mM 농도가 되도록 첨가하여 60°C에서 10분간 반응시켰다. 그 결과 효소활성이 pH 7-9의 범위에서 높게 나타났으며 pH 9.0에서 최적의 효소 활성이 나타남을 확인하여 정제된 효소는 alkaline protease로 판명되었다(Fig. 3B). 기존 보고된 호알칼리성 protease의 경우와 동일하거나 유사한 최적 pH (pH 8.0-10.0)를 나타냈다[3, 11, 34]. 따라서 효소활성 측정 시 기질로 사용하는 azocasein 용액은 pH 9.0으로 조정하여 사용하였다. 이를 통해 세제산업 등 알칼리성에서 활성을 나타내는 protease 수요를 충족시키는데 본 효소나 이를 기반으로 추후 개량된 효소를 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

정제된 효소의 열안정성을 검토하기 위하여 효소를 0-60°C 까지 0-5시간동안 반응시키며 1시간마다 효소활성을 측정하였다. Fig. 3C에서 나타난 바와 같이 0-30°C까지는 5시간

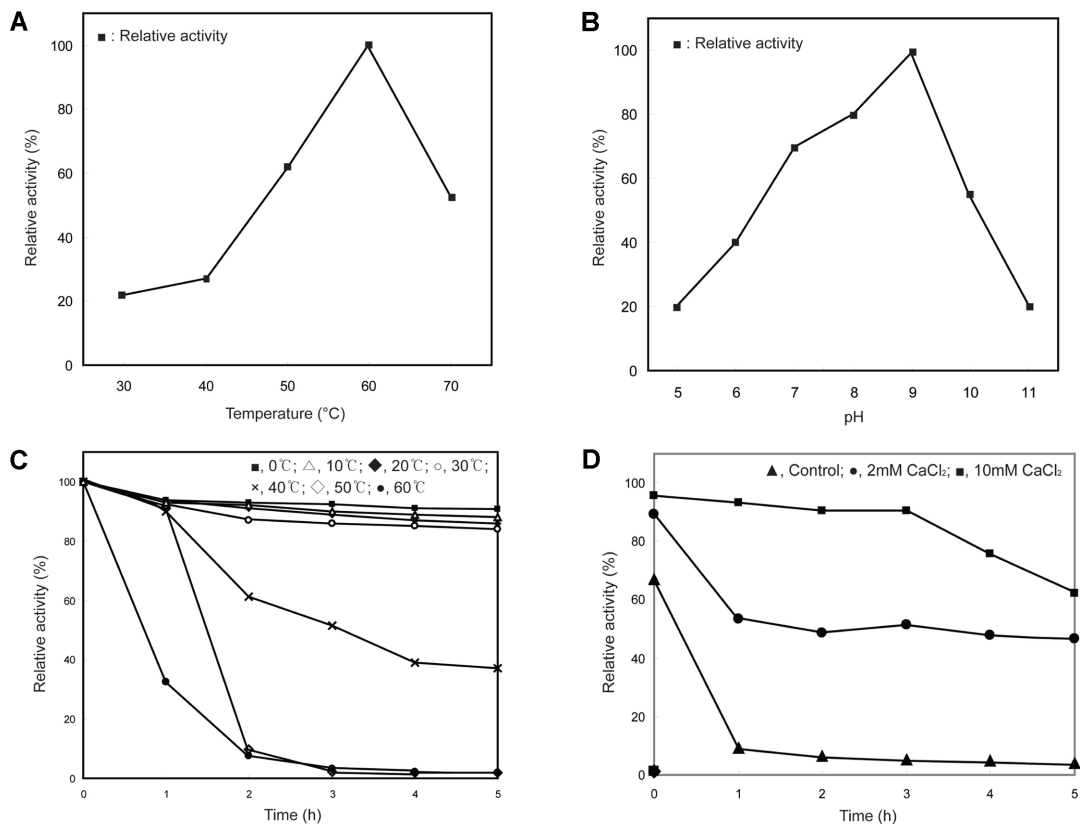


Fig. 3. Effect of temperature (A), pH (B), and inorganic salts (D) on the activity of the purified protease from *Bacillus* sp. DK1122. (C) Thermal stability of the activity of the purified protease from *Bacillus* sp. DK1122.

이 지라도 효소가 매우 안정하였으나 40°C 이상의 온도에서는 효소의 안정성이 점차 감소하는 것을 알 수 있었다. 40°C에서 1시간 반응시까지도 90%의 효소활성을 보였으나 그 이후에 서서히 감소하여 5시간 후에 40%의 잔존 활성만이 남았고, 50°C에서도 1시간까지 효소의 열안정성은 높았으나 1시간 이후 급격히 감소하여 불안정한 상태를 보였다. 또한 60°C의 온도에서는 열안정성이 거의 없는 것으로 확인되었다. 이전 보고된 호알칼리성 protease의 경우 열안정성은 본 실험의 경우와 비슷하거나[34], 높은 온도에서 최적반응온도[32]나 열안정성[3]을 나타냈다. 따라서 본 효소의 상대적으로 높은 온도에서의 최적활성 및 열안정성은 이후 이를 기반효소로 하여 최적반응온도의 상승 등 효소의 개량을 통해 효소의 이용가능성을 높이기 용이할 것으로 판단된다.

무기염류가 정제된 효소의 열안정성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 열에 불안정한 60°C 온도에서 효소에 CaCl₂나 MgCl₂를 첨가하여 활성을 측정된 결과 MgCl₂보다 CaCl₂에서 효소 활성이 더 오래 지속되는 것을 확인하였다. 이는 *Bacillus* sp. 유래 호알칼리성 protease의 경우 CaCl₂의 첨가가 효소의 최적반응온도를 상승시켜준다는 기존 보고와 일치하는 결과를 나타냈다[24, 32]. 그러나 *P. aeruginosa* 유래 호알칼리성 protease의 경우에는 Ca²⁺ ion에 의해 저해되었다[4]. 이후 효소액에 CaCl₂를 2, 10 mM의 농도로 첨가하여 60°C에서 5시간까지 반응시킨 후 시간대 별로 효소활성을 측정하였다. 그 결과 2 mM 농도에서는 반응 시작부터 급격히 감소하여 5시간까지 50%의 활성을 유지하였으나, 10 mM 농도에서는 3시간 반응시까지 90% 이상의 활성을 유지하였다. 이후 활성이 서서히 감소하여 5시간까지도 60% 이상의 효소활성을 보였다. 효소 활성이 급격히 감소되는 시점인 1시간까지의 반응을 살펴보면, 10 mM CaCl₂를 첨가한 효소에서 무첨가군 보다 90%나 증가된 활성을 보여 CaCl₂가 열안정성을 빠르게 회복하는 것으로 확인되었다 (Fig. 3D).

본 연구를 통해 정제된 호알칼리성 protease는 동일계열의 효소와 비교하여 유사하거나 고유의 특성을 갖고 있는 것으로 나타났다. 높은 온도에서의 열안정성 및 알칼리 내성은 호알칼리성과 열안정성이 요구되는 식품, 세제 및 관련산업에서의 응용성이 매우 높다고 기대된다.

요 약

호알칼리성 protease를 분비하는 토양에서 분리된 *Bacillus* sp. DK1122 균주로부터 효소의 생산조건을 검토 후, 효소를 정제하고 특성을 알아보았다. 본 균주의 효소생산 최적 배지 조성은 0.5% (w/v) glucose, 0.8% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) polypeptone, 0.1% (w/v) K₂HPO₄, 0.02% (w/v)

MgSO₄·7H₂O, 1% (w/v) Na₂CO₃, 3% (w/v) NaCl, pH 9.0 이었으며, 종배양액 0.5% 접종시 40°C에서 24시간 배양했을 때 효소 생산량이 가장 높았다. *Bacillus* sp. DK1122가 생산하는 alkaline protease를 70% 포화 ammonium sulfate로 침전시키고, CM-Sepharose column chromatography에 의해 23.9%의 수율에 2.8배의 정제도를 지니는 효소를 얻을 수 있었다. SDS-PAGE를 통해 정제된 protease는 27 kDa의 크기의 단일 subunit으로 확인되었고, 정제된 효소의 최적 pH는 9.0, 최적온도는 60°C였으며, 50°C에서 1시간까지 열에 안정하였고, 60°C에서 10 mM CaCl₂ 첨가 후 3시간까지 90%의 활성을 유지하여 Ca²⁺에 의해 열안정성이 증가하였다. 본 연구를 통해 정제된 호알칼리성 protease는 식품, 세제 및 관련산업에서의 응용성이 매우 높을 것으로 기대된다.

References

- Ahn J-W, Oh T-K, Park Y-H, Park K-H. 1990. Partial purification and characterization of the alkaline protease from *Bacillus* sp. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 344-351.
- Annamalai N, Rajeswari MV, Sahu SK, Balasubramanian T. 2014. Purification and characterization of solvent stable, alkaline protease from *Bacillus firmus* CAS 7 by microbial conversion of marine wastes and molecular mechanism underlying solvent stability. *Process Biochem.* **49**: 1012-1019.
- Bang S-H, Jeong I-S. 2011. Characterization of an alkaline protease from an alkalophilic *Bacillus pseudofirmus* HS-54. *Korean J. Microbiol.* **47**: 194-199.
- Bayoudh A, Gharsallah N, Chamkha M, Dhoubi A, Ammar S, Nasri M. 2000. Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 291-295.
- Beg QK, Gupta R. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme Microb. Technol.* **32**: 294-304.
- Bhunja B, Basak B, Dey A. 2012. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp. *J. Biochem. Technol.* **3**: 448-457.
- Bradford MM. 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.
- Delepelair P, Wandersman C. 1989. Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*. Proteases B and C are synthesized and secreted as zymogens without a signal peptide. *J. Biol. Chem.* **264**: 9083-9089.
- Deng A, Wu J, Zhang Y, Zhang G, Wen T. 2010. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresour. Technol.* **101**: 7100-7106.
- Durham DR, Stewart DB, Stellweg E. 1987. Novel alkaline-and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX6638. *J. Bacteriol.* **169**: 2762-2768.

11. Haddar A, Agrebi R, Bougatef A, Hmidet N, Sellami-Kamoun A, Nasri M. 2009. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Biore-sour. Technol.* **100**: 3366-3373.
12. Hagihara B, Matsubara H, Nakai M, Okunuki K. 1958. Crystalline bacterial proteinase: I. Preparation of crystalline proteinase of *Bac. subtilis*. *J. Biochem.* **45**: 185-194.
13. Horikoshi K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalo-philic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1407-1414.
14. Hugenholtz J, Exterkate F, Konings WN. 1984. The proteolytic systems of *Streptococcus cremoris*: an immunological analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1105-1110.
15. Jaouadi B, Ellouz-Chaabouni S, Rhimi M, Bejar S. 2008. Bio-chemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Biochimie* **90**: 1291-1305.
16. Jellouli K, Ghorbel-Bellaaj O, Ayed HB, Manni L, Agrebi R, Nasri M. 2011. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochem.* **46**: 1248-1256.
17. Joo H-S, Choi JW. 2012. Purification and characterization of a novel alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *J. Microbiol. Bio-technol.* **22**: 58-68.
18. Kim E-Y, Kim D-G, Kim Y-R, Choi S-Y, Kong I-S. 2009. Isolation and Identification of halotolerant *Bacillus* sp. SJ-10 and charac-terization of its extracellular protease. *Korean J. Microbiol.* **45**: 193-199.
19. Kim K-P, Kim N-H, Rhee C-H, Woo C-J, Bae D-H. 2002. Isolation and characterization of protease producing bacteria from soil. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**: 754-759.
20. Kobayashi T, Ogasawara A, Ito S, Saitoh M. 1985. Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseu-domonas maltophilia*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 693-698.
21. Kumar CG. 2002. Purification and characterization of a thermo-stable alkaline protease form alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **34**: 13-17.
22. Kumar CG, Takagi H. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* **17**: 561-594.
23. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
24. Lee H-S, Lee H. 2011. Purification and biochemical characteri-zation of bacteriolytic enzyme from *Bacillus subtilis* YU-1432 active against *Porphyromonas gingivalis*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **54**: 600-605.
25. Lee H, Yoo J-S, Park Y-S, Bai D-H. 2015. Identification of an alka-lophilic bacterium producing an alkaline protease from soil. *Food Eng. Prog.* **19**: 414-419.
26. Nakadai T, Nasuno S, Iguchi N. 1973. Purification and proper-ties of alkaline proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 2685-2694.
27. Nedkov P, Oberthür W, Braunitzer G. 1985. Determination of the complete amino-acid sequence of subtilisin DY and its comparison with the primary structures of the subtilisins BPN', Carlsberg and amylosacchariticus. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **366**: 421-430.
28. Neurath H. 1989. The diversity of proteolytic enzymes, p. 1-13. *In* Beynon R, Bond J (eds.), *Proteolytic enzyme: a practical approach*, IRL Press, Oxford, UK.
29. Okuda M, Ozawa T, Tohata M, Sato T, Saeki K, et al. 2013. A sin-gle mutation within a Ca²⁺ binding loop increases proteolytic activity, thermal stability, and surfactant stability. *Biochim. Bio-phys. Acta* **1834**: 634-641.
30. Pantoliano MW, Ladner RC, Bryan PN, Rollence ML, Wood JF, Poulos TL. 1987. Protein engineering of subtilisin BPN': enhanced stabilization through the introduction of two cyste-ines to form a disulfide bond. *Biochemistry* **26**: 2077-2082.
31. Shaw E, Ruscica J. 1968. The essentiality of histidine in the cata-lytic action of subtilisin. Covalent modification by a specific reagent. *J. Biol. Chem.* **243**: 6312-6313.
32. Singh J, Batra N, Sobti RC. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochem.* **36**: 781-785.
33. Thumar J, Singh SP. 2007. Two-step purification of a highly thermostable alkaline protease from salt-tolerant alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **854**: 198-203.
34. Tremacoldi CR, Monti R, Selistre-De-Araújo HS, Carmona EC. 2007. Purification and properties of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 295-299.