

고도 호염성 *Halobacterium* sp.가 생산하는 protease의 특성

안영석 · 김찬조 · 최성현

충남대학교 식품공학과

초록 : *Halobacterium* sp.가 생산하는 protease를 ethanol 침전, Sephadex G-100 및 G-75로 겔 여과하여 비활성이 364units/mg protein, 수율이 14%로 정제할 수 있었다. 정제효소의 casein에 대한 Km값은 4.2×10^{-4} M이었다. 이 효소의 반응 최적온도 및 pH는 35°C와 pH 8.0이었고, 온도 및 pH에 대한 안정성은 50°C까지와 pH 5.0~11.0범위이었다. Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 이온은 효소의 활성을 증가시켰고 Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} 이온은 저해하였다. 정제효소는 기질용액중에 NaCl 농도가 증가함에 따라 효소활성이 감소하고 2M NaCl 농도 이하에서 투석하면 활성이 저하되었으며 증류수로 2시간 투석으로 완전히 실활되었다. 그러나 0.1M $CaCl_2$ 용액으로는 6시간 투석하여도 활성은 그대로 유지되었다(1990년 11월 23일 접수, 1990년 12월 22일 수리).

Protease 생산력이 강한 고도 호염균을 분리하여 *Halobacterium* 속으로 동정하고 효소생산 조건을 검토하여 발표하였다¹⁾.

호염성 세균의 균체의 효소에 대한 보고는 amylase²⁻⁴⁾, nuclease⁵⁻⁹⁾, lipase¹⁰⁾, protease¹¹⁻¹⁴⁾ 등이 있으며 이중 Norberg와 Hofsten^{11,12)}이 보고한 고도 호염성 *Halobacterium salinarium*의 세포의 protease는 3.5M NaCl에서 가장 잘 작용하였으며 무염하에서는 실활된다고 하였다. Kamekura와 Onishi¹³⁾는 1M의 NaCl농도에서 protease를 가장 잘 생산하는 중도 호염성 *Bacillus* 속균을 분리하여 그 효소의 반응이 0.5M NaCl에서 최적이었다고 하였으며, Izotova등¹⁴⁾은 고도 호염성 *Halobacterium halobium*이 생산한 protease를 비활성이 5.2unit/mg protein이 되게 정제하여 그 효소의 아미노산 조성을 살핀 결과 산성 아미노산이 총 아미노산 잔기의 25%를 차지하였다고 보고한 바 있다.

필자들은 고도 호염성의 *Halobacterium* 속균이 생산하는 protease를 정제하여 효소학적 성질을 검토한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

효소의 정제

효소생산 최적조건¹⁾에서 얻은 배양액을 Fig. 1과 같은 방법으로 정제하였다.

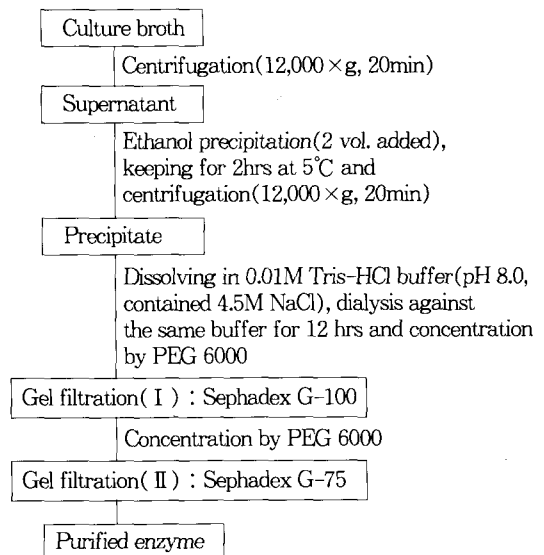


Fig. 1. Schematic diagram for purification of the protease

Protease 활성측정 및 단백질 정량

Protease 활성은 Anson 변법¹⁵⁾으로 실시하였고, 정제 과정의 단백질은 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry법¹⁶⁾으로 정량하고 이때 각 분획물의 단백질은 280nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

순도

Davis법¹⁷⁾에 따라 정제효소를 7.5% polyacrylamide gel(0.5×7.0cm)에 column당 2mA의 전류를 통하여 3시간 영동시킨 후 amido black 10B로 1시간 염색하고 7% 초산으로 탈색하여 염색띠를 확인했다.

Michaelis 정수

0.05M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 casein을 1~10mg/ml로 각각 조정된 기질용액을 사용하여 Lineweaver-Burk 방정식¹⁸⁾으로 Km 값을 구하였다.

효소활성에 대한 NaCl 및 KCl의 영향

NaCl과 KCl을 각각 0~4.5M이 되게 첨가하고 0.6% casein을 녹인 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에서 35°C로 10분간 효소반응을 시킨 후 활성도를 측정하여 NaCl 및 KCl의 영향을 검토하였다.

효소의 불활성화 및 재활성화

Sigma제 D9527 투석막을 사용하여 효소액을 증류수 혹은 각 농도의 NaCl, CaCl₂ 및 MgCl₂가 포함된

200배의 0.01M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 5°C에서 투석하면서 경시적으로 잔존활성을 측정하여 효소의 실활도를 검토하였으며 효소의 재활성화 여부는 실활된 효소를 4.5M NaCl이 포함된 200배의 0.01M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 다시 투석시켜 경시적으로 효소활성을 측정하여 검토하였다.

온도, pH 및 금속이온에 대한 영향

효소의 작용에 대한 온도, pH 및 금속이온의 영향은 상법에 따라 검토하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

Halobacterium sp.가 생산하는 protease를 정제한 결과 Table 1과 같이 비활성이 364units/mg protein, 수율은 14%, 정제도는 14배가 되었다.

Izotova등¹⁴⁾은 *Halobacterium halobium*이 생산하는 serine protease를 bacitracin Sepharose와 Sephadex G-25를 사용하여 비활성 5.2unit/mg protein, 수율이 35%, 정제도가 230인 정제효소를 얻었다고 보고하였다.

Table 1. Summary of purification steps of the protease

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification factor (fold)
Crude enzyme	1,000	3,605	93,100	26	100	1.0
Ethanol precipitation	340	672	43,792	65	47	2.5
Sephadex G-100	60	128	24,948	195	27	7.5
Sephadex G-75	35	36	13,100	364	14	14.0

정제효소의 특성

1) 순도

Fig. 2와 같이 효소를 전기영동한 결과 조효소는 4개의 band로 나타났고 정제효소는 단일 band로 나타났다.

2) Michaelis 정수

분자량 23,600으로 추정되는 casein을 사용하여 정제한 protease의 Km값을 Lineweaver-Burk법으로 측정한 결과 Fig. 3과 같이 4.2×10⁻⁴M이었다.

3) 염 농도에 따른 효소활성

정제효소의 활성에 미치는 NaCl 및 KCl 농도의

영향을 검토한 결과 Fig. 4와 같이 반응기질중에 염 농도가 증가함에 따라 효소활성이 감소되었으며, NaCl과 KCl 2M 농도에서 60~70%의 상대활성을 보이는 것으로 보아 이 효소는 내염성이 있는 것으로 생각된다.

Norberg와 Hofsten¹¹⁾은 *Halobacterium salinarium*의 균체의 protease는 약 3M의 NaCl, 세포내 peptidase는 2M의 NaCl 농도에서 가장 잘 작용하였다고 하였으며, Kamekura와 Onishi¹³⁾는 *Bacillus*속 균의 protease가 0.5M NaCl 또는 0.75M KCl 농도에서 최적이었다고 보고하였다.

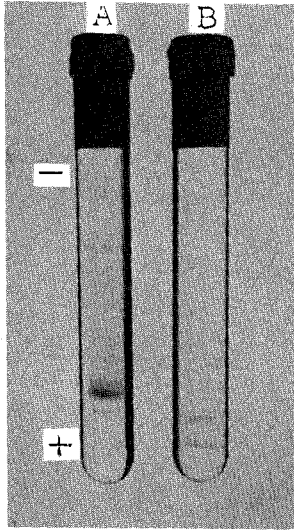


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of the culture filtrate(A) and the purified protease(B)

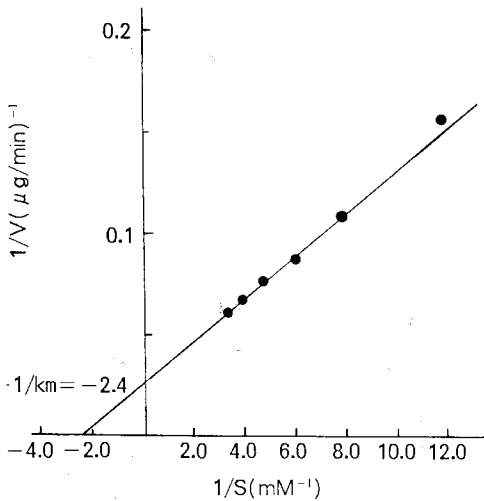


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of the protease

4) 작용 최적 pH 및 온도

효소의 작용 최적 pH와 온도는 Fig. 5 및 6과 같이 pH 8.0과 35°C이었다.

Norberg와 Hofsten¹¹⁾은 고도 호염균인 *Halobacterium salinarium*이 생산하는 균체의 protease의 반응 최적 pH는 8.0이었다고 보고하였으며 Kamekura와 Onishi¹³⁾는 중도 호염균인 *Bacillus*속균이 생산하는 protease의 경우 반응 최적 pH가 8.0과 12.0이었다고 보고한 바 있다.

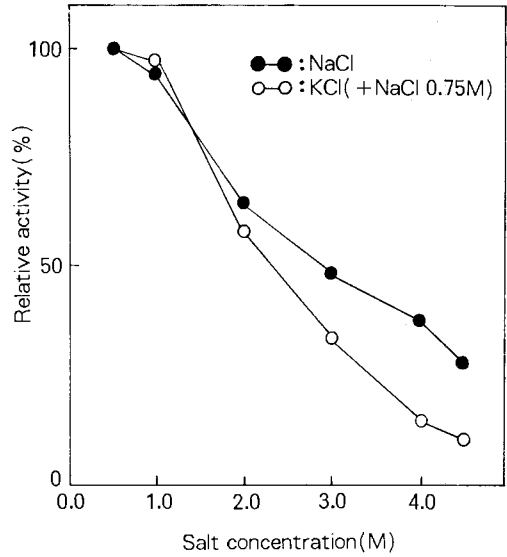


Fig. 4. Effect of NaCl and KCl concentration on the protease activity.

Protease activity was measured at 0.05M Tris-HCl, pH 8.0 containing substrate and various concentration of NaCl and KCl.

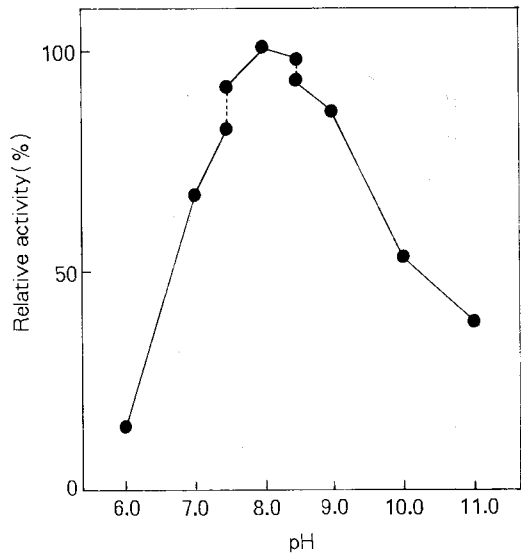


Fig. 5. Effect of pH on the protease activity.

The reaction mixture was kept at pH indicated for 10min at 35°C. The buffers used were 0.05M phosphate(pH 6.0~7.5), 0.05M Tris-HCl(pH 7.5~8.5), and 0.05M boric acid-NaOH(pH 8.5~11.0).

5) 금속이온의 영향

정제효소의 작용에 대한 금속이온의 영향을 검토한 결과 Table 2와 같이 Ca²⁺ 혹은 Mg²⁺ 이온에 의

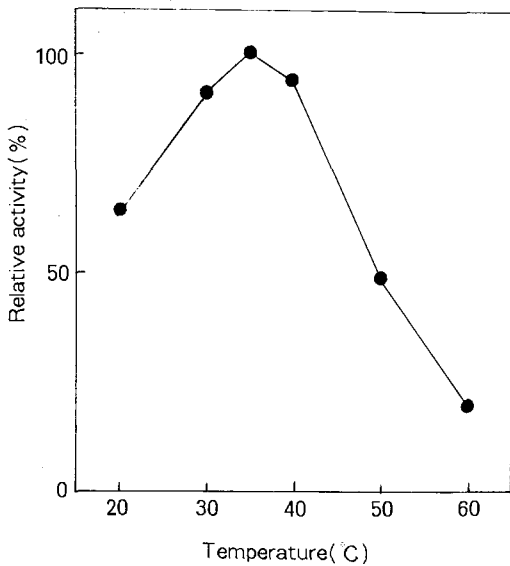


Fig. 6. Effect of temperature on the protease activity.

Reaction mixture was kept at temperature indicated for 10 min at pH 8.0.

해 상대활성이 각각 126%, 110%로 증가되었으며 Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺ 이온은 활성을 저해하였다.

Table 2. Effect of metal ions on the protease activity

Reagent (10mM)	Relative activity (%)	Reagent (10mM)	Relative activity (%)
K ⁺	100	Cu ²⁺	47
Li ⁺	100	Hg ²⁺	58
Co ²⁺	101	Cd ²⁺	88
Ca ²⁺	126	Fe ³⁺	7
Mg ²⁺	110	Zn ²⁺	30
Mn ²⁺	103	None	100

The enzyme solution was preincubated at 30°C for 30 min with reagent indicated. After preincubation, the remaining activity was measured at pH 8.0 and 35°C.

6) 염 농도에 따른 효소의 안정성

NaCl 2M 이하에서는 Table 3과 같이 효소활성이 저하되며 특히 무염상태에서 2시간 투석으로 완전히 실패하였다.

이와같은 결과는 호염성 미생물이 생산하는 효소는 무염상태에서 실패한다는 보고^{3,5,11,19~21)}와 같은 결과이다.

또한 Ca²⁺ 이온은 효소의 실패 방지에 부분적으로 효과가 인정되었고 Mg²⁺ 이온은 효과가 없었다. Onishi³⁾는 *Micrococcus*속이 생산하는 amylase를 증류수에 70시간 투석하면 100% 실패되나 0.05M의 CaCl₂의 첨가로 실패가 방지되는 특성이 있다고 보고하였으며, Kamekura와 Onishi⁵⁾도 *Micrococcus varians*가 생산하는 nuclease는 증류수에 24시간 투석하면 100% 실패되나 0.01M의 MgCl₂의 첨가로 실패가 방지되는 특성이 있다고 보고하였다.

Table 3. Dialysis experiments of the protease

Dialysis solutions	Remaining activity after dialysis (%)		
	Treat time		
	6 hrs	12 hrs	24 hrs
Distilled water	0	0	0
1M NaCl	38	4	0
2M NaCl	87	42	19
3M NaCl	103	98	92
4.5M NaCl	101	100	97
0.05M CaCl ₂	91	51	32
0.1M CaCl ₂	108	82	52
0.05M MgCl ₂	0	0	0
0.1M MgCl ₂	0	0	0

The enzyme solution was dialyzed against 200 volumes of 0.01M Tris-HCl buffer(pH 8.0) containing each salt and remaining activity was measured at pH 8.0 and 35°C. Initial protease activity was 25units/ml.

한편 증류수에서 투석하여 실패된 효소의 재활성화를 검토하기 위하여 4.5M NaCl 용액에 다시 투석하여 활성을 보아도 재활성화는 볼 수 없었다. Norberg와 Hofsten¹¹⁾은 무염용액에서 실패된 *Halo-bacterium salinarium*의 세포외 protease와 세포내 peptidase는 25% NaCl 용액과 0.02M MgSO₄, ZnSO₄, MnSO₄ 용액에서 재활성화는 되지 않았으나 세포내 protease는 Zn²⁺과 Mn²⁺ 이온에 의해서 70~90% 정도 재활성화가 되고 Mg²⁺ 이온은 효과가 없었다고 하였다.

7) pH 및 온도에 대한 안정성

정제효소의 pH 및 온도 안정성은 Fig. 7 및 8과 같이 pH 5.0~11.0의 넓은 범위에서 80% 이상의 활성을 나타냈으며, 50°C, 60°C, 70°C에서 1시간의 처리로 각각 90%, 58%, 15%의 활성을 보였다.

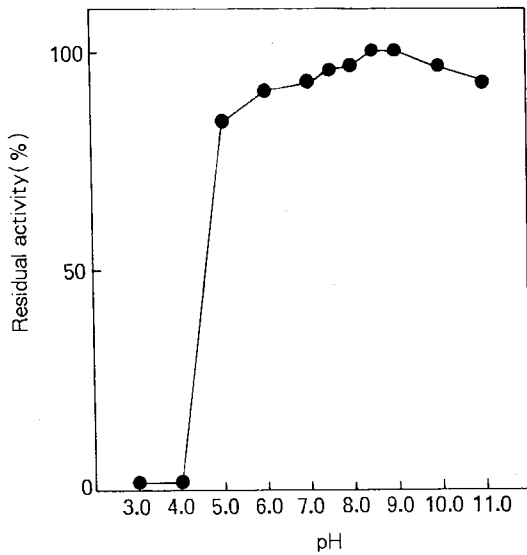


Fig. 7. pH stability of the protease.

The enzyme solution was incubated at pH indicated and 5°C for 17 hrs. The remaining activity was measured at pH 8.0 and 35°C. The buffers used were 0.05M McIlvain(pH 3.0~7.5), 0.05M Tris-HCl(pH 7.5~8.5), 0.05M boric acid-NaOH(pH 8.5~11.0).

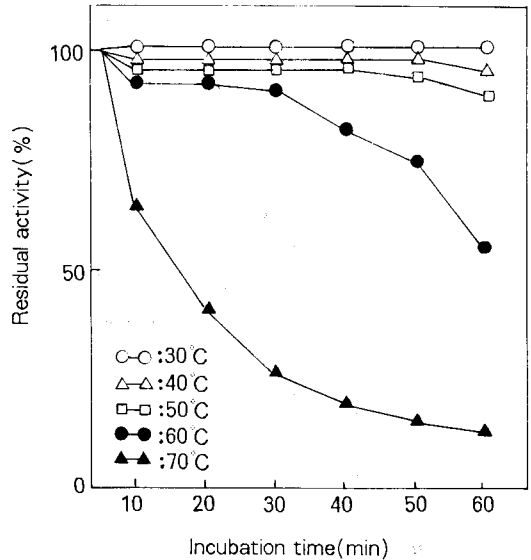


Fig. 8. Heat stability of the protease.

The enzyme solution was preincubated at various temperatures. After preincubation, the remaining activity was measured at pH 8.0 and 35°C.

References

- 안영석, 김찬조, 최성현 : 한국농화학회지, 33 (3) : 247(1990)
- Good, W. A. and P. A. Hartman : J. Bacteriol., 104 : 601(1970)
- Onishi, H. : J. Bacteriol., 109 : 570(1972)
- Onishi, H. and O. Hidaca : Can. J. Microbiol., 24 : 1017(1978)
- Kamekura, M. and H. Onishi : J. Bacteriol., 119 : 339(1974)
- Kamekura, M. and H. Onishi : Can. J. Microbiol., 22 : 1567(1976)
- Kamekura, M. and H. Onishi : J. Bacteriol., 133 : 59 (1978)
- Kamekura, M. and H. Onishi : Can. J. Microbiol., 25 : 1113(1979)
- Garber, C. B. and D. J. Kushner : J. Bacteriol., 146 : 24(1981)
- Gonzalez, C. and C. Gutierrez : Can. J. Microbiol., 16 : 1165(1970)
- Norberg, P. and B. V. Hofsten : J. Gen. Microbiol., 55 : 251(1969)
- Norberg, P. and B. V. Hofsten : Biochim. Biophys. Acta, 220 : 132(1970)
- Kamekura, M. and H. Onishi : Appl. Microbiol., 27 : 809(1974)
- Izotova, L. S., A. Y. Strongin, L. N. Chekulaeva, E. A. Timokhina, V. I. Ostoslavskaya, V. E. Sterkin and V. M. Stepanov : J. Bacteriol., 155 : 826(1983)
- 萩原文二 : 酵素研究法, 赤堀四郎編, 第 2卷, p.237 (1956)
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : J. Biol. Chem., 247 : 3011(1951)
- Davis, D. J. : Ann. New York Academy Sci., 121 : 404(1964)
- Lineweaver, H. and D. Burk : J. Am. Chem. Soc., 56 : 658(1934)
- Holmes, P. K. and H. O. Halvorson : J. Bacteriol., 90 : 312(1965)
- Hubbard, J. S. and A. B. Miller : American Society Microbiol., 99 : 161(1969)
- Hubbard, J. S. and A. B. Miller : J. Bacteriol., 102 : 677(1970)

Characteristics of the protease from the extreme halophile, *Halobacterium* sp.

Young-Seok Ahan, Chan-Jo Kim and Seong-Hyun Choi(Department of Food Technology, Chungnam National University, Taejeon, Korea)

Abstract : The protease from *Halobacterium* sp. was purified by ethanol precipitation and gel filtration on Sephadex G-75 and G-100. The purified enzyme was found to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis. Its specific activity was 364units/mg protein and yield was 14% of the total activity of the culture filtrate. The K_m value against casein was determined to be $4.2 \times 10^{-4}M$ by Lineweaver-Burk plot. The optimal temperature and pH for the enzyme activity were 35°C and pH 8.0, respectively. The enzyme was stable from 5.0 to 11.0 at relatively wide range of pH but was inactivated at the temperature above 50°C. Ca^{2+} and Mg^{2+} appeared to react as activators whereas Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} and Cd^{2+} as inhibitors. The enzyme activity reduced with increasing the concentration of NaCl : the apparent activity with 2M NaCl was 65% as compared with that without the salt. However the enzyme was unstable without salts : the activity was lost when dialyzed against distilled water for 2hr, whereas maintained against 0.1M solution of $CaCl_2$ for 6hr.