

## 재조합 *Bacillus licheniformis* 알카리성 프로테아제의 분리정제 및 몇가지 효소학적 특성

리호남, 리일민

위대한 령도자 김정일 동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《생물공학부문에서는 세포공학과 유전자공학, 미생물공학을 비롯한 현대생물학의 발전에 큰 힘을 넣으며 현대생물학의 성과를 농업과 축산업, 의학과 식료공업에 널리 받아들여 생산성이 높은 농작물과 집짐승의 새 품종을 만들어내며 질 좋은 여러가지 의약품과 식료품을 많이 생산할수 있도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 487~488페이지)

*Bacillus* 속의 미생물들이 분비하는 알카리성 프로테아제들은 그것의 최적 pH와 최적 온도가 세척제 작용 환경에 적합한 것으로 하여 이 효소를 다량으로 생산하기 위한 연구[2, 4, 6]가 널리 진행되고 있다.

우리는 *Bacillus licheniformis* 830의 알카리성 프로테아제 유전자를 대장균 분비형 발현 운반체인 pET-22b(+)에 재조합하여 재조합 알카리성 프로테아제를 분비 발현하는 재조합 대장균을 육종[1]한데 기초하여 재조합 효소를 분리 정제하고 그것의 몇가지 효소학적 특성을 밝히기 위한 연구를 하였다.

### 재료 및 방법

재료 재조합 알카리성 프로테아제 발현 균 그루로 *E. coli* BL21(apr830-pET22b)[1]를 리용하였다.

방법 재조합 알카리성 프로테아제를 분비 발현하는 균 그루인 *E. coli* BL21(apr830-pET22b)의 유도 배양 상청액을 출발 용액으로 하여 분리 정제를 진행하였다. 0.4~0.8 포화도에서의 류안염석과 DEAE-점 유소이온 교환 크로마토그래프, 세파덱스 G-75 겔 여파 크로마토그래프의 세공정을 거쳐 분리 정제를 진행하였다.

SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)[5]으로 정제한 재조합 효소의 순도와 분자량을 결정하였다.

재조합 효소를 리용하여 각이한 온도(30, 35, 40, 45, 50, 60, 70℃)에서 효소 반응을 진행하고 가장 높은 활성이 얻어지는 온도를 재조합 효소의 최적 반응 온도로 정하였다. 각이한 온도(30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70℃)에서 효소 용액을 1시간 방치한 다음 최적 온도에서 효소 반응을 진행하고 효소 활성을 측정하는 방법으로 재조합 효소의 열안정성을 평가하였다.

각이한 pH의 완충액 속에서 효소 반응을 진행하고 가장 높은 활성이 얻어지는 pH를 재조합 효소의 최적 반응 pH로 정하였다. 각이한 pH의 완충액 속에서 효소 용액을 1시간 방치한 다음 최적 반응 pH의 완충액에 대하여 투석하고 효소 반응을 통하여 그 활성을 측정하는 방법으로 재조합 효소의 pH 안정성을 평가하였다.

1mmol/L의 각이한 금속 이온, 1% 또는 1mmol/L의 각이한 계면활성제 및 저해제가 있는 조건에서 효소 반응을 각각 진행하고 효소 활성을 측정하는 방법으로 재조합 효소의 활성에 미치는 금속 이온과 계면활성제 및 저해제의 영향을 검토하였다.

배양상청액의 프로테아제활성측정과 SDS-PAGE분석은 각각 선행방법[3, 5]에 기초하여 진행하였으며 효소활성 1U는 37°C에서 1min동안에 1 $\mu$ g의 티로신을 유리시키는데 필요한 효소의 양으로 정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1) 재조합알카리성프로테아제의 분리정제

우리가 클론화한 *Bacillus licheniformis*알카리성프로테아제는 등전점이 6.57로서 pH 8.5의 트리스-염산완충액속에서 음전하를 띠므로 음이온교환체인 DEAE-섬유소를 리용한 이온교환크로마토그래프법으로 분리할수 있다.

재조합대장균 *E. coli* BL21(*apr830*-pET22b)의 배양상청액을 출발용액으로 하여 0.4~0.8 포화도에서 류안분별염석을 진행하고 투석막을 리용하여 탈염시킨 다음 이것을 0.05mol/L 트리스-염산완충액(pH 8.5)으로 평형화시킨 DEAE-섬유소탑( $\phi$  2.2cm $\times$ 16.2cm)에 흡착시키고 같은 완충액으로 충분히 세척한 후 0~0.5mol/L NaCl연속농도구배용출을 진행하였다. 용출액을 2mL씩 받고 매 분획들의 효소활성과 단백질을 측정하여 결과는 그림 1과 같다.

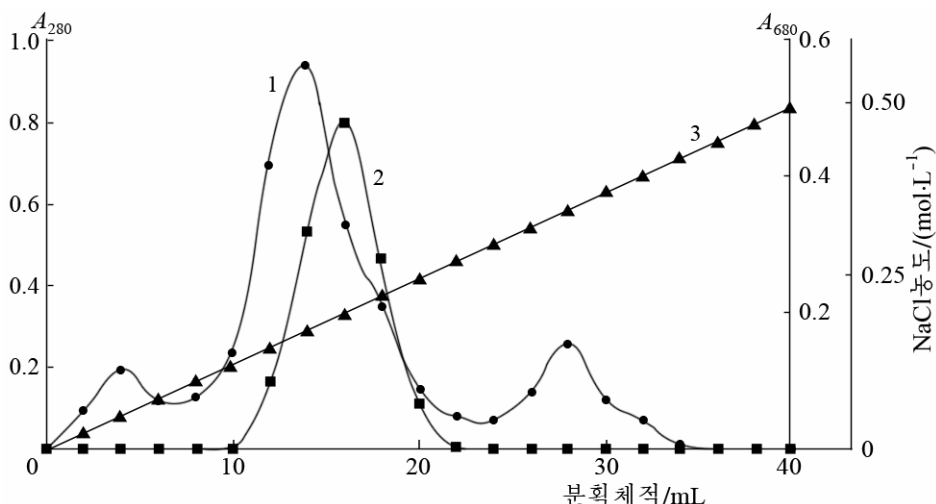


그림 1. 분별염석 및 탈염한 재조합효소의 DEAE-섬유소이온교환크로마토그램

탑크기:  $\phi$  2.2cm $\times$ 16.2cm, 분획체적 2mL, 흐름속도 20mL/h;

1-단백질량( $A_{280}$ ), 2-효소활성( $A_{680}$ ), 3-NaCl농도

그림 1에서 보는바와 같이 재조합효소는 NaCl농도 0.2mol/L에서 용출되기 시작하였는데 활성분획(10mL)들을 모아서 탈염 및 농축(1mL)하고 다음단계의 정제에 리용하였다.

DEAE-섬유소이온교환크로마토그래프법을 리용하여 부분정제한 효소활성분획(1mL)을 0.05mol/L 트리스-염산완충액(pH 8.5)으로 평형화시킨 세파덱스 G-75겔탑( $\phi$  2.2cm $\times$ 38cm, 흐름속도 5mL/h)에 적재하고 겔러파크로마토그래프법으로 정제하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 류안분별염석 및 DEAE-섬유소이온교환크로마토그래프법으로 2단계 정제한 재조합알카리성프로테아제시료속에는 다량의 프로테아제와 함께 적은량의 잡단백질이 섞여있지만 분리된 단백질봉우리와 프로테아제활성봉우리가 완전히 일치한다. 이것은 재조합알카리성프로테아제가 비교적 순수하게 정제되었다는것을 의미한다. 정제한 재조합알카리성프로테아제의 순도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 진행하였다.(그림 3)

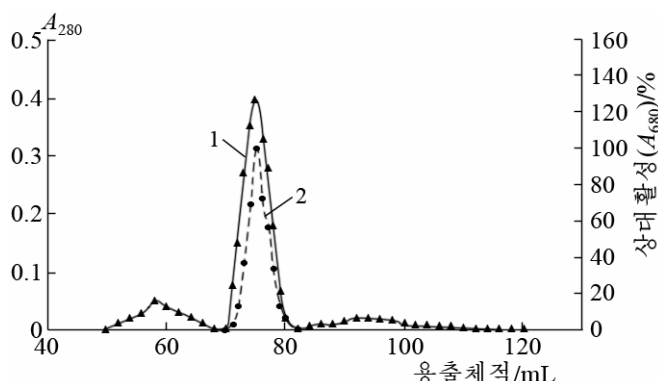


그림 2. DEAE-섬유소이온교환크로마토그래프법으로  
부분정제한 재조합효소의 세파덱스G-75겔려파  
크로마토그램  
탐크기  $\phi 2.2\text{cm} \times 38\text{cm}$  분획체적 1mL, 흐름속도 5mL/h;  
1- $A_{280}$ , 2-상대활성( $A_{680}$ )

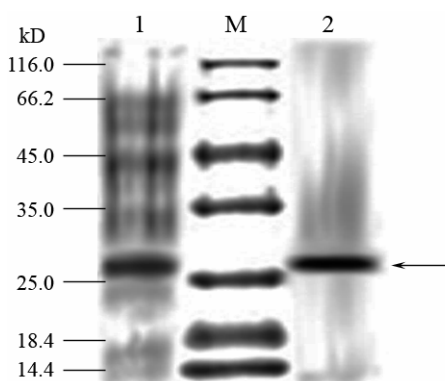


그림 3. 분리정제한 재조합알카리성  
프로테아제의 SDS-PAGE상  
1-16h 유도배양한 배양상청액,  
2-정제된 재조합알카리성 프로  
테아제, M은 단백질분자량표식자

그림 3에서 보는바와 같이 초기의 유도배양상청액속에는 여러 종류의 단백질들이 들어있는데 여기서 목적단백질이 다량으로 존재한다. 0.4~0.8포화도에서의 류안분별침전, DEAE-섬유소이온교환크로마토그래프, 세파덱스 G-75겔려파크로마토그래프의 3단계로 정제한 재조합알카리성프로테아제는 SDS-PAGE적으로 균일하였다.

표 1에 재조합알카리성프로테아제의 정제결과를 종합하였다.

표 1. 재조합알카리성프로테아제의 정제결과

정제단계	단백질량 /mg	총활성 /U	비활성 /(U·mg <sup>-1</sup> )	거둠률 /%	정제도 /배
유도배양상청액	120	75 000	630	100	1.00
류안염석(0.4~0.8포화도)	32	62 000	1 900	82.6	3.00
DEAE-섬유소이온교환크로마토그래프정제	3.5	48 000	14 000	64.0	22.2
세파덱스 G-75겔려파크로마토그래프정제	1.2	26 000	22 000	34.6	34.9

표 1에서 보는바와 같이 3단계의 정제공정을 거쳐 재조합알카리성프로테아제는 34.6%의 거둠률로 36.9배 정제되며 정제된 효소의 비활성은 2% 카제인을 기질로 할 때 약 22 000U/mg이다.

## 2) 재조합알카리성프로테아제의 몇 가지 효소학적특성

재조합알카리성프로테아제의 분자량 분리정제한 재조합알카리성프로테아제의 분자량을 SDS-PAGE를 통하여 결정하였다.(그림 3) 전기영동결과로부터 각이한 분자량을 가진 단백질들의 상대이동도와 분자량의 로그값사이관계그래프를 그렸다.(그림 4)

그림 3의 SDS-PAGE상에서 정제한 재조합효소의 상대이동도는 약 0.78이므로 검량선으로부터 계산되는 재조합단백질의 분자량은 약 27.2kD이다.

우리가 클론화한 *Bacillus licheniformis* 알카리성 프로테아제 유전자(*apr830*)는 379개의 아미노산을 암호화하고있으며 발현운반체에 재조합할 때 28개의 아미노산이 N-말단앞에 더 첨부되었다. 이로부터 번역되는 단백질의 분자량은 27.2kD을 훨씬 넘게 되는데 발현산물의 SDS-PAGE결과 27.2kD의 단백질띠가 나타난것은 목적유전자가 정확히 전사 및 번역되고 번역후 수식과정을 거치는 과정에 신호펩티드(29aa) 및 프로펩티드부분(76aa)이 떨어져

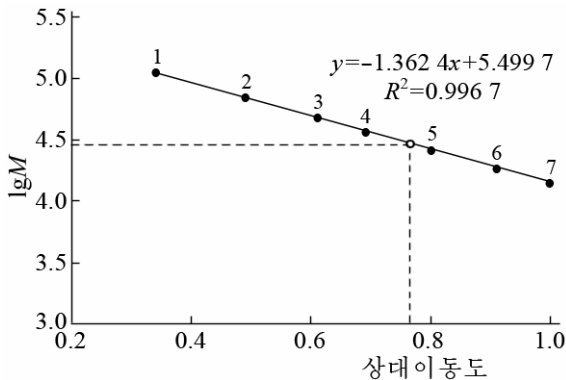


그림 4. 분자량이 각이한 단백질들의 상대이동도와 분자량의 로그값사이 관계 그래프

1-116.0kD, 2-66.2kD, 3-45.0kD, 4-35.0kD, 5-25.0kD, 6-18.4kD, 7-14.4kD, ○: 정제 한 재조합알카리성프로테아제

나가고 성숙효소단백질(274aa)만이 발현되었다는 것을 보여주며 이와 함께 발현운반체인 pET-22b(+)에 재조합할 때 목적단백질의 N-말단부분에 추가되는 28개 아미노산배열은 목적단백질의 번역 및 수식과정에 전혀 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다.

$K_m$ ,  $V_{max}$ 의 결정 각이한 카제인기질농도에서 재조합알카리성프로테아제를 리용한 효소반응을 진행하고 초기반응속도( $v_0$ )를 측정 한데 기초하여 라인위버-버크그래프를 그린 결과는 그림 5와 같다.

그림 5로부터 재조합알카리성프로테아제의 카제인기질에 대한  $K_m$ ,  $V_{max}$  값은 각각 8.16mg/mL, 84.75mmol/(min·L)이라는 것을 알 수 있다.

최적반응온도 및 열안정성 각이한 온도에서 재조합알카리성프로테아제의 활성을 측정한 결과는 그림 6과 같다.

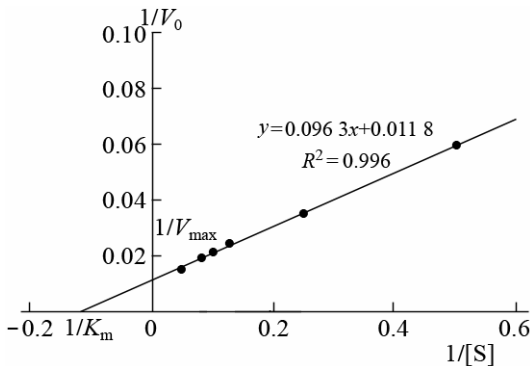


그림 5. 재조합알카리성프로테아제의 라인위버-버크그래프

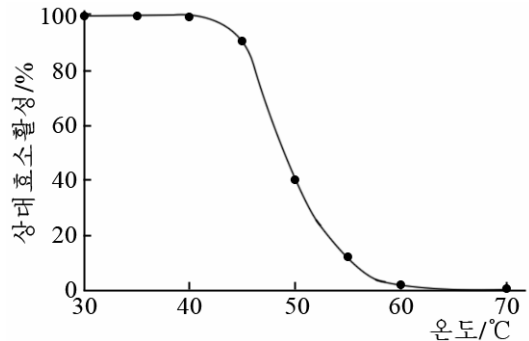


그림 6. 재조합알카리성프로테아제의 활성에 미치는 반응온도의 영향  
활성측정조건: pH 10.0, 10min

그림 6에서 보는바와 같이 재조합효소는 45°C에서 최대활성을 나타내었다.

재조합알카리성프로테아제의 열안정성을 평가한 결과는 그림 7과 같다.

그림 7에서 보는바와 같이 재조합효소는 45°C이상의 온도에서는 활성이 급격히 떨어졌다.

최적반응pH 및 pH안정성 재조합알카리성프로테아제의 최적반응pH 및 pH안정성을 확정한 결과는 그림 8, 9와 같다.

그림 8에서 보는바와 같이 재조합효소는 pH 10부근에서 최대활성을 나타내었다.

또한 그림 9에서 보는바와 같이 재조합효

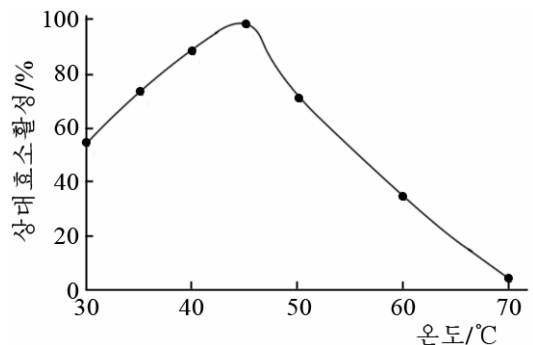


그림 7. 재조합알카리성프로테아제의 열안정성

활성측정조건: 40°C, pH 10.0, 10min

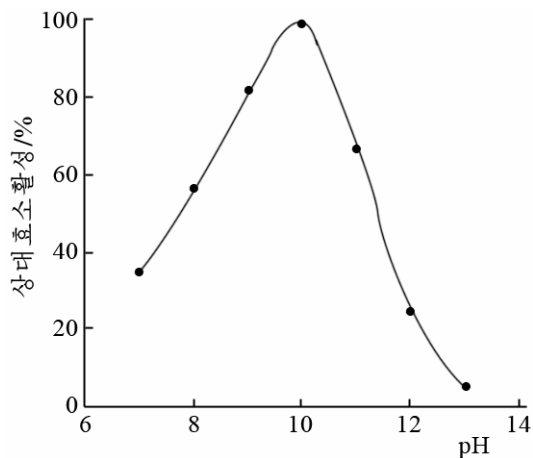


그림 8. 재조합알카리성 프로테아제의 활성에 미치는 반응 pH의 영향  
활성 측정 조건: 40°C, 10min

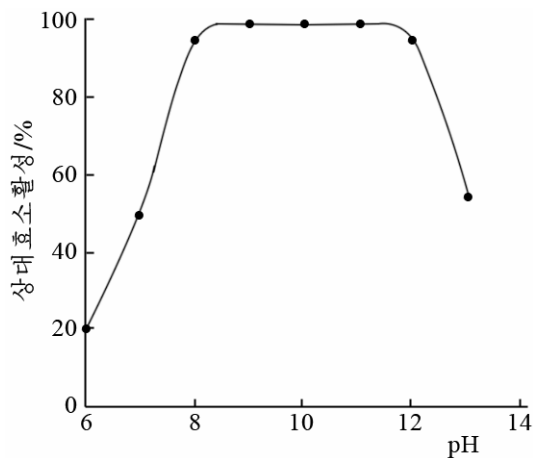


그림 9. 재조합알카리성 프로테아제의 pH안정성  
활성 측정 조건: 40°C, pH 10.0, 10min

소는 pH 8~12의 넓은 구간에서 비교적 안정하였다. pH 8.0이하와 pH 12.0이상의 구간에서는 효소활성이 급격히 떨어졌다. 최적반응 pH와 pH안정성 조사결과로부터 우리가 재조합발현시킨 프로테아제가 알카리조건에 대하여 비교적 높은 안정성을 가지는 효소라는 것을 알 수 있다.

효소활성에 미치는 금속이온의 영향 적당히 희석한 효소액 1mL에 기질 1mL, 금속이온을 1mmol/L 되게 첨가하여 효소활성에 미치는 금속이온의 영향을 조사하였다.(표 2)

표 2. 재조합알카리성 프로테아제의 활성에 미치는 금속이온의 영향

금속이온	상대 효소 활성/%	금속이온	상대 효소 활성/%
대조	100	Mn <sup>2+</sup>	96±2
Ca <sup>2+</sup>	110±2	Ni <sup>2+</sup>	75±2
Co <sup>2+</sup>	92±1	Zn <sup>2+</sup>	92±2
Hg <sup>2+</sup>	7.5±0.3	Mg <sup>2+</sup>	96±2
Cu <sup>2+</sup>	3.0±0.2	Fe <sup>2+</sup>	98±2

n=10, p<0.05

표 2에서 보는바와 같이 Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>들이 뚜렷한 억제작용을 나타내었다.

효소활성에 미치는 계면활성제 및 저해제의 영향 재조합알카리성 프로테아제의 활성에 대한 각종 계면활성제 및 저해제의 영향을 조사한 결과는 표 3과 같다.

표 3에서 보는바와 같이 재조합효소는 도데실류산나트륨(SDS), 에틸렌디아민테트라초산(EDTA), 뇨소에 의하여서는 억제되지 않거나 혹은 약하게 억제되지만 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의해서는 세게 억제되며 특히 페닐메틸술폰불화물(PMSF)이나 디이소프

로필불화린산(DFP)에 의해서는 완전히 활성을 잃는다.

표 3. 재조합알카리성 프로테아제의 활성에 미치는 계면활성제 및 저해제의 영향

종류	대조	SDS	EDTA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PMSF	DFP	뇨소
농도	—	1%(w/v)	1mmol/L	1mmol/L	1mmol/L	1mmol/L	1%(w/v)
상대 활성/%	100	94±1	105±2	8±0.2	0	0	96±1

n=10, p<0.05

## 맺 는 말

재조합대장균 *E. coli* BL21(*apr830*-pET22b)의 배양상청액으로부터 재조합알카리성 프로테아제를 분리정제하고 그것의 몇가지 효소학적특성을 분석하였다.

류산암모늄분별침전, DEAE-섬유소이온교환크로마토그래프, 세파덱스G-75겔여과크로마토그래프의 3단계정제공정을 거쳐 재조합알카리성 프로테아제는 34.6%의 거둢률로 34.9배 정제되었으며 정제한 효소는 SDS-PAGE적으로 균일하였다.

분리정제한 재조합알카리성 프로테아제의 분자량은 약 27.2kD이고 카제인기질에 대한  $K_m$  및  $V_{max}$ 는 각각 8.16mg/mL, 84.75mmol/(min·L)이며 최적반응온도는 45°C, 최적반응pH는 10.0이다. 재조합알카리성 프로테아제의 활성은  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ 들과  $H_2O_2$ 에 의하여 심히 저해되며 PMSF, DFP에 의해 완전히 활성을 잃는다.

## 참 고 문 헌

- [1] 리호남 등; 생물학, 4, 16, 주체107(2018).
- [2] Om Prakash et al.; Indian Journal of Microbiol., 57, 218, 2017.
- [3] O. H. Lowry et al.; J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
- [4] P. Ravichandra et al.; Biochemical Engineering Journal, 34, 2, 185, 2007.
- [5] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 127~354, 2001.
- [6] H. Enling et al.; J. Ocean Univ. China, 16, 319, 2017.

주체108(2019)년 10월 5일 원고접수

## Purification and Characterization of Recombinant *Bacillus licheniformis* Alkaline Protease

Ri Ho Nam, Ri Il Min

From the supernatant of recombinant *E. coli* BL21(*apr830*-pET22b) broth, recombinant alkaline protease was purified through three processes including ammonium sulfate salting-out, DEAE-cellulose ion exchange chromatography and Sephadex G-75 gel filtration chromatography, and then characterized.

Keywords: alkaline protease, *Bacillus licheniformis*, purification, characterization