

Serratia marcescens ATCC 21074로 부터 순수분리한 Metalloprotease의 자가분해성과 안정성

김기석 · 이창원 · 이병룡¹ · 신용철*

경상대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹코오롱주식회사 기술연구소

Serratia marcescens ATCC 21074의 세포 배양액으로부터 순수분리한 metalloprotease의 자가분해성 및 안정성과 관련된 몇가지 효소적 특성을 조사하였다. 최적 반응온도와 pH는 각각 37°C, pH 8.0였으며 안정성은 pH 5.0-11.0 범위에서, 온도의 경우 10-37°C에서 비교적 안정한 것으로 나타났다. Differential scanning calorimeter로 이 효소의 열적 성질을 분석한 결과 변성 시작온도는 37.6°C, endothermic peak온도는 43.2°C, enthalpy 변화량은 -8.4 mJ/mg이었다. 이 효소는 30°C 에서 24 시간 동안 거의 자가분해가 일어나지 않았으나 변성된 단백질의 경우 쉽게 자가분해되는 것으로 나타났다. 또한 이 효소는 trypsin, α -chymotrypsin, elastase에 의해서 분해되지 않았으나 thermolysin에 의해서는 쉽게 분해되었다.

KEY WORDS ☐ *Serratia marcescens*, metalloprotease, autodigestion, proteolytic digestion, thermal properties

대장균과 같은 Enterobacteriaceae에 속하는 *Serratia marcescens*는 대장균과 달리 세포밖 배지중으로 protease, chitinase, nuclease, lipase 등의 효소들을 분비하는 것으로 알려져 왔다(3, 4, 7, 8, 16). *S. marcescens*가 분비하는 세포외 효소중에서 protease에 관한 연구가 비교적 많이 수행되어 protease의 분리정제, 효소의 특성, protease 생성에 미치는 생리적 요인 등이 보고되었다(1, 3-6, 11, 13, 14, 17, 19). *S. marcescens*에 속하는 몇가지 균주에서 보고된 주된 분비 protease는 분자량이 약 50 KD-52 KD 정도이고 Zn^{++} 을 함유한 metalloprotease로서 효소의 최적 pH가 9.5인 비교적 알칼리성 protease로 알려졌다. 또한 이 metalloprotease의 기질 특이성은 *Bacillus thermoproteolyticus*가 생산하는 thermolysin과 매우 유사한 것으로 나타났다. 지금까지 연구된 *S. marcescens* 균주 중에서 *S. marcescens* ATCC 21074 균주가 생산하는 metalloprotease는 오늘날 소염제로 널리 사용되고 있어 큰 관심의 대상이 되고 있다(9, 20). 이 균주가 생산하는 metalloprotease의 분리정제 및 효소적 특성에 관한 연구를 수행한 결과 그 특성이 다른 *S. marcescens*의 효소들과 매우 유사한 것으로 나타났으나 같은 종에 속하는 다른 균주들보다 protease 생산성이 3배 이상 높은 것으로 보고되었다(13-15). 최근에 Nakahama 등(18)은 *S. marcescens* ATCC 21074 균주로 부터 metalloprotease 유전자 클로닝에 성공하여 유전자의

염기서열을 결정하여 보고한 바 있다. 그러나 *S. marcescens* ATCC 21074 균주의 metalloprotease에 관하여 많은 연구가 이루어져 왔지만 용액속에서의 자가분해성과 안정성에 관한 연구는 거의 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 *S. marcescens* ATCC 21074가 분비하는 metalloprotease를 순수분리하여 이 효소의 열적 성질, 자가분해성 및 여러가지 단백질 분해효소들에 의한 분해성 등 효소의 안정성과 관련된 특성을 연구하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 실험재료

본 실험에서 사용한 균주는 *S. marcescens* ATCC 21074(*Serratia* sp. E-15)였다. DEAE-cellulose, Sephadex G-100, trypsin, α -chymotrypsin, thermolysin, elastase, azocasein, bovine serum albumin(BSA) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였고 전기영동 시약 및 단백질 표준 marker 등은 Bio-Rad(California, U.S.A.)에서 구입하였으며 기타 무기, 유기 시약은 일급시약을 사용하였다.

세균의 배양

최소배지(ammonium phosphate 1%, KCl 0.05%, NaCl 0.1%, $CaCl_2$ 0.02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, glycerol 1%, pH 7.0) 50 ml에 *S. marcescens*를 한 백금이 접종한 후 30°C, 150 rpm 조건하에서 16 시간 전배양한 배양액을 효소 생산을 위한 본배양 배지에

*Corresponding author

1%(v/v)를 첨가하고 앞에서와 같은 조건에서 48 시간 배양하여 효소분리에 사용하였다. 본배양 배지조성은 최소배지에서 glycerol과 ammonium phosphate를 제외하고 Bacto tryptone 0.5%와 yeast extract 0.5%를 첨가한 것을 사용하였다.

Metalloprotease의 순수분리

Ammonium sulfate 침전: 4 L 배양액을 원심분리하여 균체를 제거하고 상등액에 ammonium sulfate를 최종 80% 포화농도로 처리하였다. 침전된 단백질을 15,000 rpm에서 30 분간 원심분리한 후 침전물을 모아 10 mM sodium-phosphate 완충액(pH 7.0)에 녹이고 4°C에서 이틀간 이 완충용액속에서 투석하였다.

DEAE-cellulose ion exchange chromatography: 투석한 효소액 160 ml를 10 mM sodium-phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 이미 평형화되어 있는 DEAE-cellulose column(2.5×15 cm)에 loading하였다. Column을 10 mM sodium-phosphate 완충용액(pH 7.0) 200 ml로 세척한 후 0.1 M NaCl이 포함된 이 완충용액을 이용하여 단백질을 용출하였으며 용출액은 2 ml씩 분획하였다. 각 분획의 효소활성을 측정하여 protease 활성이 있는 분획들을 모아 증류수로 투석시킨 후 동결건조하였다.

Sephadex G-100 gel filtration: 동결건조한 시료를 5 ml의 10 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 녹인 후 10 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 평형화되어 있는 Sephadex G-100 column (1.5×100 cm)에 loading하고 30 ml/hr의 속도로 용출하면서 2 ml씩 분획하였다.

Protease 활성측정

Protease 활성은 Braun과 Schmitz(3)의 방법에 준하여 측정하였다. Azocasein 1.2 g을 50 mM potassium-phosphate 완충용액(pH 7.5) 50 ml에 녹인 다음 이 기질용액 600 μ l를 37°C에서 5 분간 preincubation한 후 적당히 희석된 효소액 100 μ l를 첨가하여 37°C에서 30 분간 반응시켰다. 반응종료 후 10% trichloroacetic acid를 600 μ l 첨가하고 상온에서 1시간 방치시킨 다음 7,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 모았다. 상등액 600 μ l에 10 N NaOH 300 μ l를 첨가한 다음 spectrophotometer(Beckman, DU-65)를 이용하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 효소 활성도는 위와 같은 조건하에서 1 분에 흡광도가 1.0 증가되는 것을 1 unit(U)로 정의 하였다.

단백질의 정량

단백질은 Bradford(2)의 방법에 따라 정량하였다. 이때 BSA를 표준단백질로 하여 표준곡선을 구하고 이것으로 부터 시료의 단백질량을 산출하였다.

전기영동

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli(10) 방법에 준하여 행하였다. 사용한 polyacrylamide gel의 농

도는 12%(w/v)였으며 Hoeffer 전기영동장치(Model SE-600)를 사용하여 전기영동하였고 Coomassie blue G로 염색하여 단백질 band를 확인하였다. 세 포배양액의 전기영동은 Mackman과 Holland(12) 방법으로 단백질을 농축하여 전기영동하였다.

Metalloprotease의 pH와 온도 의존성

순수분리한 metalloprotease를 Centricon 30 (Amicon, U.S.A.)으로 농축하고 증류수로 충분히 세척한 다음 이 효소액을 실험에 사용하였다. 반응 pH가 효소활성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 1 mM citric acid-sodium phosphate 완충용액(pH 3.0-5.0), 1 mM sodium-phosphate 완충용액(pH 5.0-7.0), 1 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0-9.0) 및 1 mM glycine-NaOH 완충용액(pH 9.0-11.0)을 사용하였다. 여러가지 pH에 따른 효소의 안정성은 앞에서와 같은 1 mM 완충용액에 효소를 첨가하고 30°C에서 1 시간 방치한 후 100 mM sodium-phosphate 완충용액(pH 7.5)에 녹인 azocasein 기질용액을 사용하여 잔류 효소활성을 측정하였다. 반응 온도가 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 여러가지 온도에서 효소활성을 측정하였고 온도에 따른 효소의 안정성은 효소액을 여러가지 온도에 방치하면서 일정시간마다 효소를 채취하여 37°C에서 효소활성을 측정하였다.

Differential scanning calorimetry(DSC)

DSC 실험은 Setaram사의 Bio-DSC batch micro-calorimeter(Caluire, France)를 사용하였으며 정제된 metalloprotease 7 mg을 0.8 ml/ 10 mM sodium-phosphate 완충용액(pH 7.0)에 녹여 시료 vessel에 넣고 평형화시킨 후 가열하였다. 가열온도는 20°C에서 65°C까지 0.3°C/min의 속도로 증가시켰으며 thermogram의 분석은 microcalorimeter에 내장된 표준 software를 이용하였다.

Metalloprotease의 자가분해성

순수분리한 metalloprotease 100 μ g을 10 mM sodium-phosphate 완충용액 buffer(pH 7.0) 150 μ l에 녹인 다음 30°C에서 자가분해시켰다. 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 효소활성과 SDS-PAGE 방법으로 metalloprotease의 자가분해 양상을 조사하였다. 변성된 metalloprotease의 분해양상을 알아보기 위해서 70 μ g의 단백질을 100°C에서 4분간 열 처리한 다음 여기에 native metalloprotease 35 μ g을 첨가하고 자가분해시킨 후 SDS-PAGE방법으로 분석하였다.

여러가지 단백질분해효소에 의한 metalloprotease의 분해성

Trypsin, α -chymotrypsin, elastase 및 thermolysin을 각각 1 mM HCl 용액에 녹이고 이것을 단백질분해 효소제로 사용하였다. 순수분리한 metalloprotease 20 μ g에 1 μ g의 단백질분해효소제를 첨가하고 10 mM potassium-phosphate 완충용액(pH 7.5)속에서 37°C에서 반응시켰다. 일정한 시간 간격으로 시료를 채취하여 SDS-PAGE 방법으로

Table 1. Summary of purification steps.

Purification step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Culture supernatant	4,000	200	2,493	12.5	100
Ammonium sulfate (0-80%)	160	152	2,180	14.3	87.4
DEAE-cellulose	5	40	787	19.7	31.6
Sephadex G-100	47	18	393	21.8	15.8

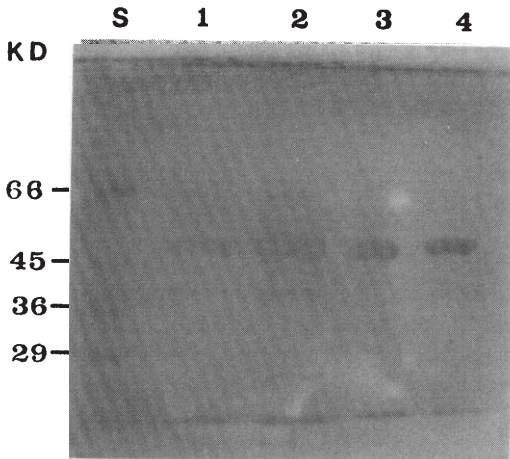


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins from each purification step. Lanes 1, culture supernatant; 2, ammonium sulfate precipitation; 3, DEAE-cellulose ion exchange chromatography; 4, Sephadex G-100 gel filtration; S, standard marker proteins.

metalloprotease의 분해양상을 조사하였다.

결과 및 고찰

Metalloprotease의 순수분리

S. marcescens 배양액으로 부터 분리한 protease는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 하나의 단백질 band로 나타나 protease가 순수분리되었음을 알 수 있었다. 또한 전기영동 상에서 protease의 분자량이 약 50 KD 정도로 나타나 Nakahama 등(18), Braun과 Schmitz (3) 및 Decedue 등(6)이 *S. marcescens*로 부터 분리한 분자량 50 KD-52 KD 사이의 metalloprotease와 거의 일치함을 알 수 있었다. 분리된 protease의 비활성도는 21.8 U/mg 였으며, 정제도는 1.74배, 최종수율은 15.8%였다(Table. 1). *S. marcescens*의 배양 중 세포밖으로 분비된 단백질의 대부분이 분자량 50 KD 정도의 protease였기때문에 순수분리된 protease의 정제도는 그리 높지 않았다. 본 연구에서는 4 L 배양액으로 부터 최종 18 mg의 단백질을 순수분리할 수 있었다.

정제된 protease에 미치는 EDTA의 영향

정제된 protease가 metalloprotease임을 확인하기 위해서 EDTA에 의한 효소활성의 변화를 조사하였다. EDTA 농도를 다르게 하고 30°C에서 10분간 방치한 후 효소활성을 측정한 결과 0.1 mM 이하에서는 효소활성의 변화가 관찰되지 않았으나 1 mM, 10 mM, 100 mM EDTA 농도에서는 효소활성이 각각 80, 65, 25%로 감소되었다. 이러한 결과는 계산된 protease 분자수보다 EDTA 수가 월등히 많음에도 불구하고 효소활성의 억제 정도가 매우 낮은 것으로 나타났다. 또한 40 μ g protease에 1 mM EDTA를 30°C에서 처리하게 되면 2 시간 후 효소활성이 100% 감소하였으나 4°C에서 처리하는 경우 효소활성이 느리게 직선적으로 감소하여 24 시간 후에도 10% 정도의 효소활성이 남아 있었다. 이러한 결과는 EDTA가 효소에 결합된 금속이온(Zn^{++})을 chelation 하는 데 반응온도와 반응시간에 의존적임을 보여주는 것으로 생각되었다. EDTA를 처리하여 apoenzyme으로 만든 다음 1 mM $ZnCl_2$ 를 첨가하면 효소활성이 거의 100% 회복되는 결과로 부터 분리한 protease는 metalloprotease인 것으로 생각되었다.

효소의 활성과 안정성에 미치는 pH와 온도의 영향

정제된 metalloprotease의 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 3.0-11.0 범위에서 효소활성을 측정한 결과 pH 8.0 부근에서 최대 효소활성을 보였으며 산성범위에서는 효소활성이 낮아 pH 3.0에서 100% 활성을 잃었다. 그러나 이 효소는 pH 11.0에서도 최대 효소활성의 44%를 나타내 비교적 알칼리 범위에서 효소활성이 강한 것으로 나타났다. 정제된 효소의 pH에 따른 안정성을 알아보기 위해서 효소를 pH 3.0-11.0 범위의 완충용액에 넣고 30°C에서 1시간 방치한 후 효소활성을 측정한 결과 pH 5.0-11.0 범위에서 안정하였으며 산성범위에서는 효소의 안정성이 낮아 pH 4.0 에서는 급격히 효소활성이 떨어졌다. 그러나 이 효소는 pH 11.0까지 거의 100% 안정한 것으로 나타나 알칼리성 범위에서 매우 안정성이 뛰어난 것으로 생각되었다.

본 효소의 최적온도를 알아보기 위하여 10-60°C 범위에서 효소활성을 조사한 결과 37°C에서 최대 효소활성이 나타났으며 60°C에서는 최대 효소활성의 90% 정도가 소실되었다. 온도에 대한 안정성을 조사한 결과 30°C에서 24 시간까지 100% 안정하였고 37

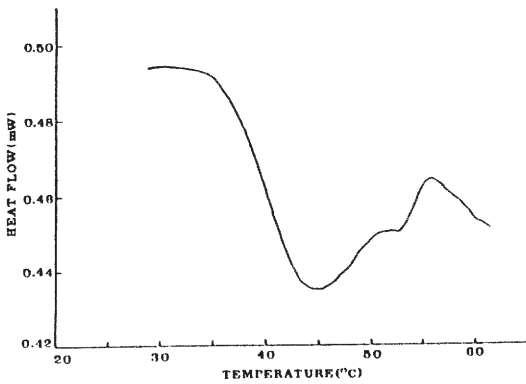


Fig. 2. Differential scanning calorimetry transition for the thermal denaturation of purified metalloprotease. Data were analyzed the purified enzyme in 10 mM sodium-phosphate buffer(pH 7.0).

°C에서는 24 시간 동안에 약 12% 정도 활성이 떨어졌으나, 50°C에서는 30분, 60°C에서는 10분만에 완전히 효소활성을 잃었다. 정제된 metalloprotease를 DSC로 열특성을 조사해 본 결과 37.6°C에서 변성되기 시작하였으며 43.2°C에서 endothermic peak를 보였다(Fig. 2). 효소변성시 enthalpy 변화량은 -8.4 mJ/mg이었다. 이 결과로 부터 본 효소는 비교적 온도에 대한 안정성이 낮아 37°C 이상에서는 열변성이 쉽게 일어나는 것으로 생각되었다.

Metalloprotease의 자가분해성

*S. marcescens*에서 정제한 metalloprotease는 30°C에서 24 시간 까지 효소활성이 조금도 떨어지지

않은 것으로 보아 metalloprotease 사이의 자가분해성이 낮을 것으로 예측되었다. Fig. 3(a)에서 보는 바와 같이 정제된 효소를 30°C에서 24 시간 동안 자가분해시킨 후 SDS-PAGE로 분석해보았을 때 단백질 band의 크기가 거의 변하지 않았다. 또한 37°C에서 자가분해시켰을 때 6 시간까지는 안정하였으나 그 후 단백질 band가 다소 감소되는 것으로 관찰되었으며 이것은 native 효소사이의 분해가 아니라 일부 효소가 변성되어 변성된 단백질이 native 효소에 의해서 분해되는 것으로 추측되었다. 이러한 현상을 확인하기 위해서 native 효소와 열변성 효소를 섞은 후 자가분해시켰을 때 Fig. 3(a)에서 보는 바와 같이 초기 0 시간에 비해서 2 시간 후 단백질 band가 급격히 줄어들었으나 2 시간 후 부터 24 시간까지 단백질 band의 변화는 거의 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 변성된 단백질이 native 효소에 의해서 2 시간 내에 모두 분해되고 그 이후로는 native 효소사이의 분해가 일어나지 않았기 때문에 생긴 것으로 해석되었다. 이 결과로 부터 *S. marcescens*에서 분리한 metalloprotease는 자가분해성이 없으며 다만 열에 의해서 변성된 metalloprotease는 native enzyme에 의해서 쉽게 분해된다는 것을 알 수 있었다. 이러한 자가분해성은 metalloprotease의 3차원적 구조에 기인된 것으로 native enzyme의 경우 절단부위가 밖으로 노출되지 않는 반면에 변성단백질의 경우 절단부위가 밖으로 노출되어 쉽게 분해되는 것으로 사료된다. *S. marcescens* ATCC 21074의 metalloprotease는 산화된 insulin β -chain을 분해할 때 Asn-Glu, Cys-Gly, Ala-Leu, Tyr-Leu, Gly-Glu, Arg-Gly, Tyr-Thr 사이의 펩타이드 결합을 주로 자르는 것으로 보고된 바 있다(14). Nakahama 등(18)이

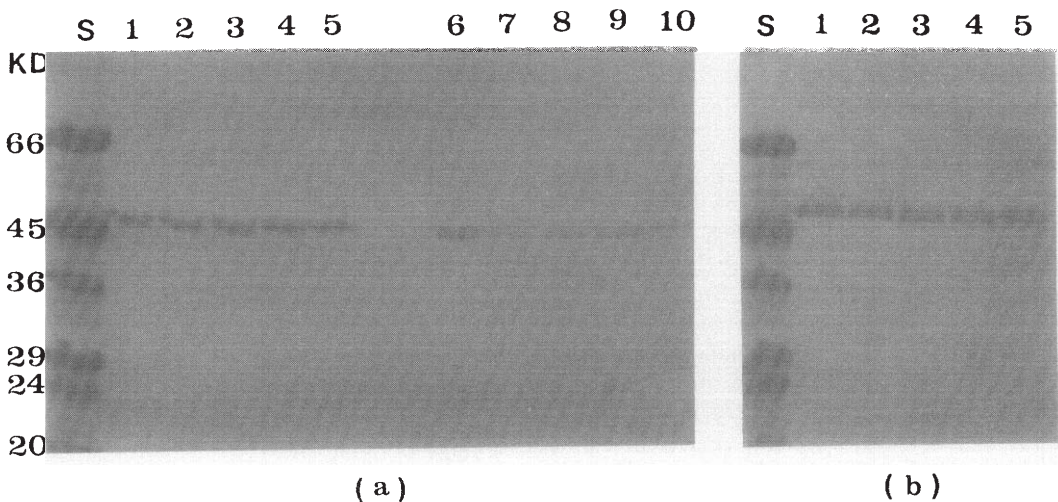


Fig. 3. Autodigestion of metalloprotease of *S. marcescens*. (a) Autodigestion of purified native enzyme(lanes 1-5) and denatured enzyme mixed with native enzyme(lanes 6-10). (b) Autodigestion of metalloprotease in culture supernatant. Incubation time: 0 hr(lanes 1 and 6), 2 hr(lanes 2 and 7), 6 hr(lanes 3 and 8), 12 hr(lanes 4 and 9), and 24 hr(lane 5 and 10). S, standard marker proteins.

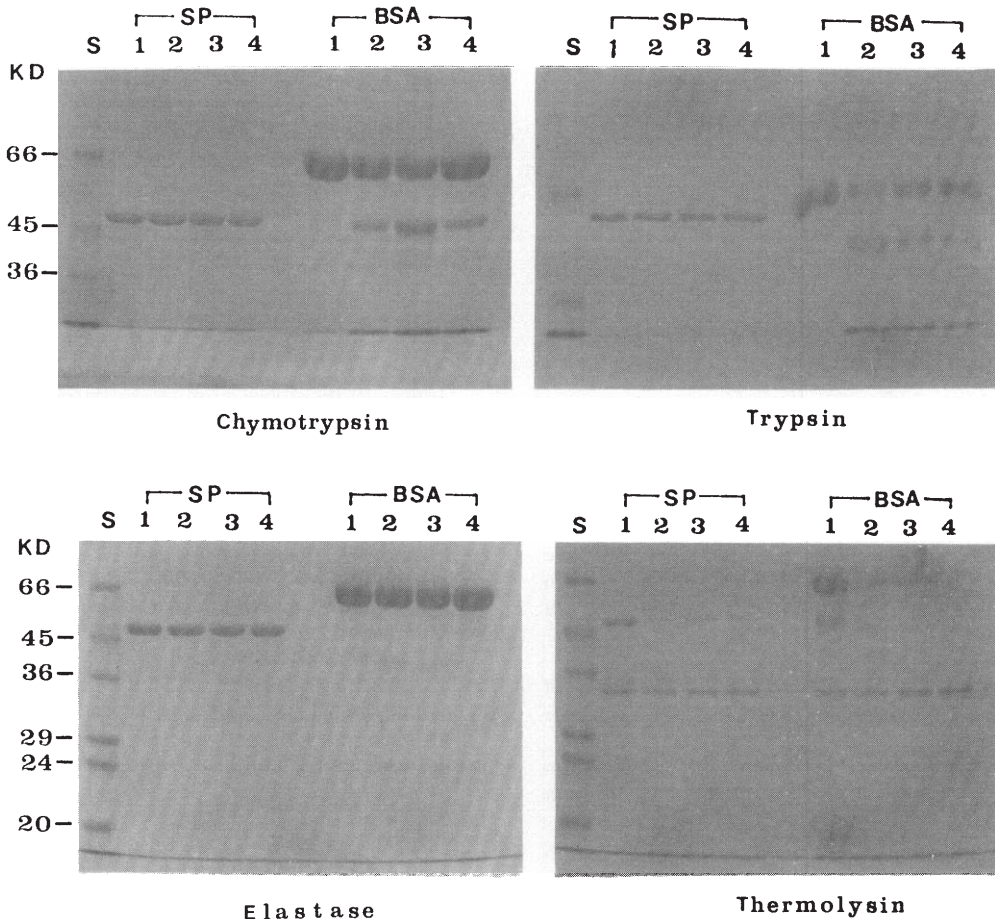


Fig. 4. Proteolytic digestion of purified metalloprotease of *S. marcescens* with various proteases. Incubation time; 0 min(lane 1), 10 min(lane 2), 30 min(lane 3), and 60 min(lane 4). S, standard marker proteins. SP and BSA represent metalloprotease and bovine serum albumin, respectively.

S. marcescens ATCC 21074의 metalloprotease 유전자를 클로닝하고 염기 서열을 결정하여 아미노산 서열을 유추하였는데 이것을 토대로 보면 이 단백질에는 Miyata 등(14)이 보고한 주된 절단부위가 7군데 이상 존재하는 것으로 생각되는데 이러한 펩타이드 결합은 단백질의 안쪽에 위치하고 있을 것으로 추정되었다.

지금까지 *S. marcescens* ATCC 21074 균주의 것과 매우 유사한 것으로 알려진 *S. marcescens* ATCC 25419 metalloprotease의 경우 정제된 상태에서나 배양액 상태에서 자가분해가 일어난다고 보고되었다(3). 그러나 본 연구에서는 정제된 metalloprotease는 30°C에서 거의 자가분해가 일어나지 않았으며 또한 Fig. 3(b)에서 보듯이 세균 배양액상에서도 30°C에서 24 시간까지 거의 자가분해가 일어나지 않았다. 이러한 차이는 Braun과 Schmitz(3)의 경우 40°C에서 자가분해 실험을 하였기때문에 생긴 것으로 판단된다. 40°C에서 방치할때 metalloprotease가 분해된 것은

자가분해때문이 아니라 열에 의해서 변성된 단백질이 native 효소에 의해서 분해되었기 때문인 것으로 사료되었다.

여러가지 단백분해효소들에 의한 분해성

정제된 metalloprotease가 다른 동물과 미생물이 만드는 단백분해 효소들에 의해서 어떻게 분해되는지를 알기 위해서 trypsin, α -chymotrypsin, elastase, thermolysin 등으로 처리한 후 SDS-PAGE 방법으로 분석하여 보았다(Fig.4). Trypsin, α -chymotrypsin, elastase를 처리했을 때 대조구인 BSA는 분해가 일어나 분해된 band를 보였으나 정제된 metalloprotease는 분해된 흔적이 전혀 발견되지 않았고 *B. thermoproteolyticus*에서 분리한 thermolysin에 의해서는 쉽게 분해되는 것으로 나타났다. 실험에 사용한 네가지 단백분해효소들 중에서 동물 유래의 세효소에 대해서는 안정하고 미생물 유래의 한 효소에 의해서 분해되는 것이 흥미롭다고 생각되었다. *S. marcescens* ATCC 21074 균주의 metalloprotease가

사람의 소화기관에서 흡수되어 혈관속에서 active한 형태로 발견된다고 보고된 바 있는데(9, 20) 이러한 사실은 metalloprotease가 동물의 여러가지 단백분해효소에 의해서 분해되지 않는다는 본 연구 결과와 부합되는 것으로 해석되었다.

사 사

본 연구는 교육부 기초과학연구소 학술조성연구비(1989-1990)와 (주)코오롱 수탁연구비(1991)로 수행된 연구의 일부분이며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Aiyappa, P.S. and J.D. Harris, 1976. The extracellular metalloprotease of *Serratia marcescens*: Purification and characterization. *Mol. Cell. Biochem.*, **13**, 95-100.
2. Bradford, M.M., 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.
3. Braun, V. and G. Schmitz, 1980. Excretion of protease by *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.*, **124**, 55-61.
4. Bromke, B.J. and J.M. Hammel, 1979. Regulation of extracellular protease formation by *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 47-52.
5. Castaneda-Agulla, M., 1956. Studies on the biosynthesis of extracellular protease of bacteria. I. *Serratia marcescens*: Synthetic and gelatin media. *J. Gen. Physiol.*, **39**, 369-375.
6. Decedue, C.J., E.A. Boussard, A.D. Larson, and H.D. Breymer, 1979. Purification and characterization of the extracellular proteinase of *Serratia marcescens*. *Biochim. Biophys. Acta*, **569**, 293-301.
7. Eaves, G.N. and C.D. Jeffries, 1963. Isolation and properties of an extracellular nuclease of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, **85**, 273-278.
8. Heller, K. 1979. Lipolytic activity copurified with the outer membrane of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, **140**, 1120-1122.
9. Isono, M., K. Tomoda, K. Miyata, and K. Maejima, 1972. Method for producing protease. U.S. Patent. 3,691,014.
10. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*, **227**, 680-685.
11. Loriya, Z.K., B. Brywkner, and N.S. Egorov, 1977. Nature of the true inducer of the synthesis of extracellular protease by *Serratia marcescens*. *Mikrobiologiya*, **46**, 440-446.
12. Mackman, N. and I.B. Holland, 1984. Secretion of a 107 K dalton polypeptide into the medium from a haemolytic *E. coli* K 12 strain. *Mol. Gen. Genet.*, **193**, 312-315.
13. Miyata, K., K. Maejima, K. Tomoda, and M. Isono, 1970a. *Serratia* protease. Purification and general properties of the enzyme. *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 310-318.
14. Miyata, K., K. Tomoda, and M. Isono, 1970b. *Serratia* protease. Substrate specificity of the enzyme. *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1457-1462.
15. Miyata, K., K. Tomoda, and M. Isono, 1971. *Serratia* protease. Characteristics of the enzyme as metalloprotease. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 460-467.
16. Monreal, J., and E.T. Reese, 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.*, **15**, 689-696.
17. Murakami, M., K. Fukunaga, M. Matsuhashi, and M. Ouo, 1969. Stimulative effect of proteins on protease formation of *Serratia* sp. *Biochim. Biophys. Acta.*, **192**, 378-380.
18. Nakahama, K., K. Yoshimura, R. Marumoto, M. Kikuchi, I.S. Lee, T. Hase, and H. Matsubara, 1986. Cloning and sequencing of *Serratia* protease gene. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 5843-5855.
19. Ryden, A.C.B. and B. van Hofsten, 1968. Some properties of the extracellular proteinase and the cell-bound peptidase of *Serratia*. *Acta Chem. Scand.*, **22**, 2803-2808.
20. Tachibana, M., O. Mizukoshi, Y. Harada, K. Kawamoto, and Y. Nakai, 1984. A multi-centre, double-blind study of serrapeptase versus placebo in post-antrotomy buccal swelling. *Pharmatherapeutic.*, **3**, 526-530.

(Received January 15, 1992)

(Accepted March 9, 1992)

ABSTRACT: Autodigestion and Stability of Metalloprotease Purified from *Serratia marcescens* ATCC 21074

Kim, Ki Seok, Chang-Won Lee, Byeong Ryong Lee¹ and Yong Chul Shin*
(Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea, ¹Kolon Research and Development Center, Kolon Industries, Inc., Kumi 730-030, Korea)

A 50 KD metalloprotease of *Serratia marcescens* ATCC 21074 was purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose ion exchange chromatography, and sephadex G-100 gel filtration. Optimal pH and temperature of enzyme were pH 8.0 and 37°C, respectively. This enzyme was stable in the ranges of 10-37°C and pH 5.0-11.0. Thermal denaturation was investigated by differential scanning calorimetry. Onset temperature of denaturation and endothermic peak temperature were 37.6°C and 43.2°C, respectively. The denaturation enthalpy was -8.4 mJ/mg. The purified metalloprotease was resistant to autodigestion for 24 hr at 30°C. Metalloprotease in culture supernatant was also resistant to autodigestion in this conditions. Heat-denatured enzyme, however, was rapidly digested by the native enzyme. The metalloprotease was stable to proteolytic digestion by mammalian proteases such as trypsin, α -chymotrypsin, and elastase. But the enzyme was easily digested by bacterial protease, thermolysin.