금속 이온을 이용한 *Bacillus Stearothermophilus* 호열성 단백질 분해효소의 역가 향상 및 호열·호기성 소화공정에의 응용

김영기, 배진혜, 이원홍, 최정우
서강대학교 화학공학과
전화 (02) 705-8280, FAX (02) 711-04394

Abstract

Proteolytic hydrolysis is one of the main enzymatic reaction of waste activated sludge (WAS) digestion. Protease excreted from *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 31197) showed optimum temperature of 75℃ for maxium heat stable proteolytic activity against azo casein. The dependency of Ca^{2+}, Zn^{2+}on heat stability of proteolytic enzymes were measured with various concentrations. It was shown that Ca^{2+} ion enhanced heat stability of these enzymes. Then thermophilic aerobic digestion (TAD) was performed using *B. sterothermophilus* with the addition of divalent ions. Performance of TAD process with ATCC 31197 activated by Ca^{2+}, Zn^{2+}ions in terms of dissolved organic carbon (DOC) concentration, extracellular protein concentration, and scanning electrion microscopy (SEM) analysis. The best result of protein reduction concentration in digestion test was obtained with the addition of 2 mM Ca^{2+} ion.

서론

매년 발생량이 급격히 증가하고 있는 폐슬러지는 주로 해양투기, 소각, 매립 등의 방법으로 처리되고 있다. 그러나 매립지 확보곤란, 해양 또는 토양오염과 같은 심각한 환경적 문제점이 있어 슬러지 처리를 위한 공정개발이 시급한 실정이다. 이에 대한 대안으로 제시된 공정중의 하나가 호열·호기성 소화공정이며 고온에서 운용되기 때문에 중온균에 대한 살균효과와 짧은 체류시간의 장점을 가진다. 소화공정에서 처리효율을 제한하는 속도제한 단계는 가수분해 반응이며, 소화공정의 주요 가수분해과정은 탄수화물과 단백질 가분분해 효소에 의해 이루어진다. 대부분의 단백질 분해효소는 고온에 대한 열안정성이 낮으며 보관안정성이 떨어진다는 단점을 가지고 있기 때문에 고온에서 운전되는 호기.호열성 미생물을 이용한 소화공정을 개발하기 위해서는 단백질 분해효소의 내열성을 높이는 것이 필수적이라 할 수 있다. 열 안정성을 가지는 단백질 분해효소를 생산하는 미생물에 대한 연구는 그 동안 활발히 진행되어 왔는데 *Bacillus* 종의 metallo-peptidase의 경우 Ca^{2+}를 반응액에 넣으면 pH와 온도에 대한 안정성이 증가되며 thermolysin-like 계열의 단백질 분해 효소의 경우 Zn^{2+} 이온의 첨가는 효소의 안정성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.[1] 또한 Nalamura

등은 *Bacillus stearothermophilus* 중성 단백질 분해 효소 헬릭스의 활성부위에 proline을 유도시켜 활성 반감온도를 68.3℃에서 78.5℃로 높인 연구도 이루어 졌다.[2] 하지만 단백질 분해효소의 내열성에 대한 연구는 활발한 반면 슬러지 소화 공정에 적용하여 단백질 분해능을 향상시키고자 하는 연구는 이루어지지 않고 있다.

본 연구에서는 *B. stearothermophilus* (ATCC 31197)에 의해 생성되는 단백질 분해효소의 내열성에 2가 금속 이온이 미치는 영향을 조사하였고 이중 선택된 Ca^{2+} 이온을 첨가하여 내열성을 높인 단백질 분해효소 활성을 갖는 호기.호열성 미생물을 이용한 소화공정에서 DOC 농도 감소와 세포외 단백질 제거량 향상을 도모하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에서 사용되는 *Bacillus stearothermophilus* (ATCC31197)는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였으며 세포는 배양배지(soluble starch 1 g, tryptone 0.5 g, yeast extract 0.5 g, $MnCl_2$ 0.05 g, KH_2PO_4 0.1 g, $CaCl_2$ 0.05 g, pH 5) 100 mL가 들어있는 멸균 플라스크에 접종하여 배양조건 55℃, 200rpm에서 배양하였다. 세포는 20시간 배양후 7500g에서 20분간 원심분리 하여 단백질 분해효소 역가실험 향상 실험에 사용하였다.

단백질 분해효소의 내열성 향상 실험

단백질 분해효소의 내열성 향상 실험은 배양 상등액 0.5 mL를 각 농도의 2가 이온금속 용액 (Ca^{2+}, Zn^{2+}) 에 넣어 10분 동안 활성화시킨 후 이를 45℃~85℃의 온도 하에서 6.7×10^{-2} M phosphate buffer 에 녹인 1% azocasein 용액을 첨가하여 1시간동안 반응시켰다. 반응 시간 후 10% 의 trichloroacetic acid을 가하여 반응을 중지시켰으며 5000g에서 10분간 원심분리를 하여 376 nm에서의 흡광도 측정으로 단백질 분해 활성을 측정하였다. 표준 단백질 분해효소로는 Protease K type XI을 사용하였다.

호열·호기성 소화 실험

슬러지의 소화 실험은 pH와 온도가 각각 7~8, 55℃로 유지되도록 하였으며 300 rpm의 진탕배양기에서 운전부피 150 mL로 80시간동안 수행하였다. 실험에 사용한 슬러지는 정유공장의 폐수처리장에서 채취, 사용하였으며 *B. stearothermophilus* 은 대수 성장기 말기인 약 20시간 후에 2가 금속 이온을 첨가하여 슬러지가 담긴 플라스크에 접종, 소화실험을 실시하였다. 슬러지 소화효율 측정을 위한 분석방법으로 용존유기탄소(DOC)농도를 TOC analyzer (TOC-5050A, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)에 의해 측정되었으며 세포외 단백질양은 Bradford 방법에 의하여 측정하였다. 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였으며 Bradford 용액을 넣은후 발색시켜 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 슬러지 소화는 주사전자 현미경(SEM, stereoscan 360, cambridge Ins., UK)를 이용하여

시료를 수회 세정, 원심분리 하여 남은 시료를 alchol로 탈수한 후 진공 건조, gold 코팅을 하여 10,000배의 이미지 촬영으로 확인하였다.

결과 및 고찰

단백질 분해효소의 내열성 향상 실험

세포 외로 배출되는 단백질 분해효소의 내열성을 향상시키기 위하여 45~85℃ 사이의 다양한 온도에서 azo casein의 가수분해 반응을 시킨 결과 75℃에서 최대의 역가를 보였다. 이는 *B. stearothermophilus*의 단백질 분해 효소가 고온에서 높은 활성을 보이며 호열·호기성 소화공정에서 활성을 가지는 것을 나타낸다. 또한, 단백질 분해 효소의 내열성을 향상 시키기 위하여 Ca^{2+}, Zn^{2+}를 다양한 농도로 첨가하여 내열성 향상을 도모하였다. Ca^{2+}의 경우 2 mM과 4 mM을 첨가하였을 때 효소 역가의 향상을 보였으며 75℃에서 활성 차이는 더욱 두드러졌다(Fig. 1(a)). Zn^{2+}의 경우 농도에 따른 내열성 향상은 보이지 않았으며 1mM이상의 $ZnSO_4$ 첨가는 오히려 활성의 현저한 저하를 보여주고 있다(Fig. 1(b)). 시간에 따른 단백질 분해 효소의 활성 유지는 2 mM Ca^{2+}을 첨가했을 경우가 가장 우수하였다(Fig. 2). 이는 2 mM Ca^{2+}의 첨가는 소화공정의 운전 후기에도 단백질 분해 효소의 활성을 유지시킨다는 것을 나타낸다.

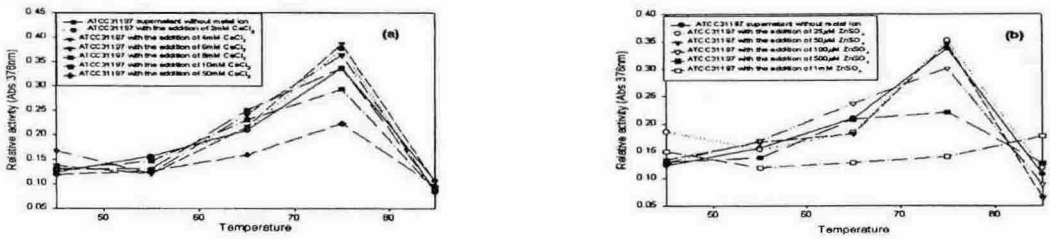

Fig. 1 Effects of temperature and divalent ion concentrations on protease thermostable activity (a) Ca^{2+}, (b) Zn^{2+}.

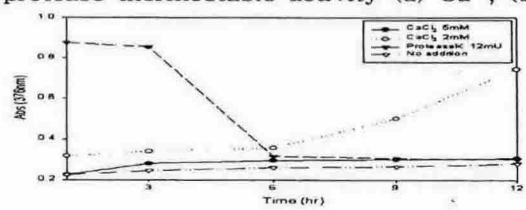

Fig. 2 Time course behavior of protease activity various of Ca^{2+} concentration.

호열·호기성 소화 실험

주사현미경에 의한 관찰은 소화실험 전 과(Fig. 3(a)) 80 시간의 소화 종료 후 고형물의 분해여부를 비교하였다. 이 경우 Ca^{2+}에 의한 영향을 알수는 없으나 화살표로 표시된 *B. stearothermophilus*에 의한 슬러지의 분해는 확인 할 수 있었다. 2가 금속 이온 첨가에 의한 *B. stearothermophilus* 단백질 분해효소의 내열성 향상이 호열·호기성 소화공정에 미치는 영향은 DOC농도와 세포외 단백질량의 변화로 측정하였다. DOC의 경우 2 mM Ca^{2+}를 첨가하였을 때 최대량 대비 51%로 높은 분해효율을 보이며 100 μM Zn^{2+} 이온을 첨가한 경우에는 37%로 금속이온을 첨가하지 않았을 때의 분해효율인 38%와 별다른 차이를 보이지

않았다(Fig. 4(a)). 소화 공정 초기단계에서 DOC가 급격한 증가를 보이다가 초기단계가 지나면 서서히 감소함을 볼 수 있는데 이와 같은 현상은 고온으로 인한 용존 고형물의 분해로 설명될 수 있으며 소화 실험 후반에 보여지는 분해는 효소에 의한 슬러지의 분해로 볼 수 있다. 세포외 단백질량 제거율도 역시 2 mM Ca^{2+}를 첨가하였을 때 27%의 분해효율을 보였으며 Zn^{2+}의 경우 17%로 금속 이온을 첨가하지 않은 경우(18%)와 유사한 결과를 보여주고 있다 (Fig. 4(b)). 따라서 Ca^{2+}첨가에 의한 단백질 분해효소의 열적 안정성 증대는 세포외단백질량 의 감소를 유도함을 확인하였으며, 이는 전체적인 슬러지 소화공정의 효율을 향상시킴을 DOC 분해 효율 증가로 알 수 있었다.

(a) (b)

Fig. 3 SEM images(Magnification ×10,000) of sludges (a) 0 hr (b) 80 hr of digestion experiments. The bar represents 5.0 μm

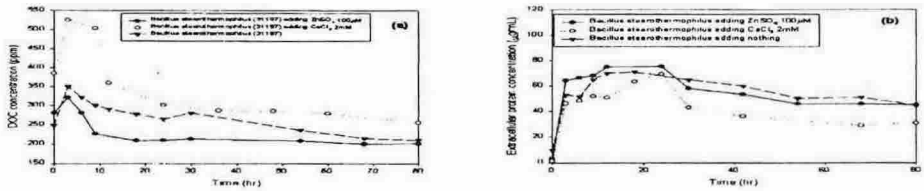

Fig. 4 Time course behavior of (a) DOC and (b) Extracellular protein concentrations in batch digestion experiments.

요약

B. Stearothermophilus 단백질 분해 효소는 2가 금속 이온인 Ca^{2+}에 의하여 내열성이 향상되며 75℃에서 최대 역가를 나타내었다. 2mM Ca^{2+}를 첨가하여 *B. Stearothermophilus*를 이용한 호열·호기성 소화공정 운전할 경우 각각 최대량 대비 51%와 27%의 DOC 및 세포외단백질의 분해가 이루어지는 것을 확인하였다.

참고문헌

1. B. Burg, A. Kreij, P. Veek, J. Mansfeld, and G. Venema, "Characteristics of a novel stable biocatalyst obtained by protein engineering" (1999), Biotechnol. Appl. Biochem., 30, 35-40

2. S. Nakamura, T. Tanaka, R. Yada, and S. Nakai, "Improving the thermostability of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease by introducing proline into the active site helix" (1997), Protein engineering, 10, 1263-1269