

## *Bacillus licheniformis* 에 의한 단백질분해효소 생산 Kinetics

김진현·유영제  
서울대학교 화학공학과

### The Kinetics of Protease Production by *Bacillus licheniformis*

Jin Hyun Kim and Young Je Yoo  
Department of Chemical Engineering, Seoul National University

#### ABSTRACT

Carbon sources and nitrogen sources are known to be very important in protease production by microorganisms. The effects of carbon source and nitrogen source on protease biosynthesis by *Bacillus licheniformis* were investigated using batch cultures. As initial carbon and nitrogen concentrations of culture medium increased, the specific growth rate of *Bacillus licheniformis* was increased, while the specific protease production rate was decreased. From the results of batch cultures, a mathematical model which considers the effects of carbon source and nitrogen source was proposed and the methods to increase the productivity of protease were discussed.

#### 서론

최근 생물 공학 기술의 발달과 함께 식품 제조, 제약, 유전자 조작 등 여러 분야에서 새로운 효소가 개발되고 있으며 효소 제품의 사용도 계속 증가하고 있다(1). 이러한 효소들 중 제일 많이 사용되는 단백질 분해 효소인 protease는 단백질을 펩티드나 아미노산으로 분해하는 효소로서 식품 가공, 의약품 및 피혁 가공 등에 널리 사용되고 있다. 이와 같이 널리 사용되고 있는 protease는 대부분 bacteria와 fungi에 의하여 생산되는데 protease는 active site의 구조면에서 alkaline protease, neutral protease, acid protease로 나누어 진다. 이 중에서 최근 세제용 protease로 많은 각광을 받고 있는 alkaline protease는 그 분자의 active site에 serine이 포함되어 있는데(2), 이러한 alkaline protease는 특히 *Bacillus* 종에서 많이 생산되고 있다. *Bacillus* 종에 의한 alkaline protease의 생산에 미치는 여러 환경조건의 영향에 관해서는 Andresen 등(3)에 의해 보고되고 있다. 이러한 alkaline protease는 그것들을 생산하는 종에 따라 최적 pH, 최적 온도, 열안정성등이 달라진다. 지금까지의 protease 생산성 향상을 위해 연구되어온 것은 최적 배지 선정, 생합성 메카니즘의 규명, 균주의 개발, 생물반응기 기술 향상, 분리·정제 공정 기술 향상에 관한 연구 등으로 나눌 수 있다.

Protease의 생합성에 있어 생산 수율을 높이기 위한 배양 조건들에 관하여는 많은 연구 결과가 보고되고 있는데(4,5) 예를 들면, protease생산에 있어 탄소원의 영향, 질소원의 영향, 무기원의 영향, 초기 pH, 배양 온도, 배양 시간 등 protease 생산에 영향을 미치는 영양요구성과 배양 조건이 검토되었다. 또한 protease의 생합성메카니즘에 대해서도 많이 연구되어지고 있는데(6,7,8,9), 효소의 생산성을 향상시키기 위하여는 미생물이 효소를 생합성하는 메카니즘을 이해하여 이러한 메카니즘을 적절히 조절할 필요가 있다. 발효공학적인 방법에 의하여 효소의 생합성 메카니즘을 조절할 수 있는 방법의 예는 다음과 같다 : (i) 영양배지에 효소의 생성을 유도하는 유도물질(inducer)을 가하여 준다. (ii) 억제 작용을 가진 기질을 영양분으로 사용하는 것은 피하여야 하며, 만약 첨가해야 하는 경우에는 서서히 가하여 배지내에 기질이 축적되지 않게 한다. (iii) 미생물 성장의 결과로 억제작용을 하는 대사 산물이 생성되는 경우 적절한 방법을 사용하여 대사 산물을 변환시키던가, 환외여과와 같은 방법으로 대사산물을 제거시켜 준다.

전술한 내용 이외에도 protease 생산성 향상을 위하여 연구·개발되어야 할 분야는 발효공정의 최적화를 포함하는 새로운 생물반응기 기술 및 분리·정제 공정 기술 분야로서, 발효속도식의 모델링과 이를 이용한 최적화 및 제어 등에 관한 많은 연구가 이루어져야 한다. 반응

속도식에 관한 연구는 1978년 Asia 등(10)에 의해서 보고 된 것 이외에 미생물을 이용한 protease 합성에 대한 kinetics 연구는 상당히 부족하다. 또한 기존에 연구되어 진 것은 탄소원이 영향만을 고려한 모델식으로서 탄소원과 질소원의 영향이 동시에 고려된 모델식은 아직 보고 되어 있지 않다.

본 연구에서는 protease를 생산하는 *Bacillus licheniformis* 균주를 선정하여 효소 생산에 미치는 탄소원과 질소원의 영향을 관찰하여 탄소원과 질소원의 영향을 고려한 수학적 모델식을 제안하고 이를 통한 효소 생산의 최적화 조건을 검토하였다. 이러한 연구 결과는 미생물을 이용하여 단백질 분해 효소인 protease를 경제적으로 생산하는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

**재료 및 방법**

**균 주**

본 실험에서는 *Bacillus licheniformis* (ATCC 21424)을 사용하였으며 이 균주는 nutrient agar를 사용한 agar slant 상에서 4℃의 냉장고에 보관하여 이용하였다.

**배 지**

표준배지의 조성은 Table 1에 나타내었다. 탄소원과 질소원의 영향을 규명하기 위하여 제한 배지를 사용하였다. 탄소원으로는 포도당을 사용하였고 질소원으로는 ammonium chloride (NH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>)를 사용하였다. 인산염의 공급원으로는 sodium phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)와 potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)를 사용하였다.

사용된 시약으로 포도당은 Sigma제, agar는 Difco제를 그 밖의 시약은 Junsei, Wako사 등의 GR 또는 EP 등급의 것을 사용하였다.

**균주의 배양**

Nutrient agar slant에서 보관한 균주 1 loop를 250ml 삼각 플라스크에 넣은 100ml의 멸균된 배지에 접종하여 shaking incubator에서 150rpm, 37℃를 유지하여 배양하였다. 회분식 배양의 경우 shaking incubator에서 약24시간 배양시킨 배양액 100ml를 2L의 멸균된 배지에 접종하였고 통기속도는 1 vvm으로 하였다. 발효조(B.E. Marubishi Co., Model MD300-51)는 용량 5L로서 working volume은 2L로 하였으며 pH는 7.0으로 유지하였다. 그리고 배양 온도와 교반속도는 각각 37℃, 400 rpm으로 유지하였다.

**분석**

세포 농도는 분광 광도계(Bausch & Lomb, Spectronic 20)를 사용하여 670nm에서 optical density를 측정하여 보정곡선으로부터 세포 농도를 결정하였다.

Protease 활성은 수정된 Casein-Folin법(11)인 단백질 분해력을 측정하는 방법으로 하였다. 효소활성은 37℃에서 10분간 반응시켰을 때 660nm에서 optical density를 0.01 상승시킨 효소상당량을 1 unit로 하였다.

포도당 농도는 DNS method(12)를 사용하여 측정하였으며 ammonium chloride 농도는 Berthelot reaction method(13)를 사용하여 측정하였다.

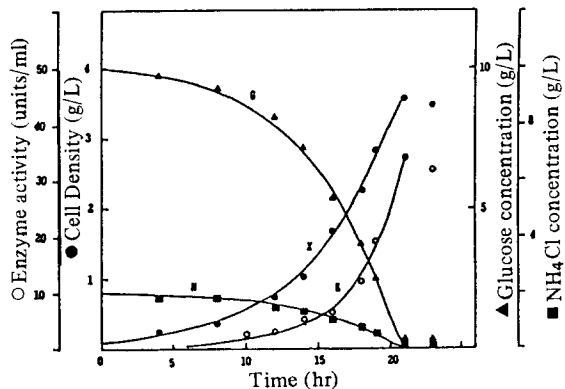
**결과 및 고찰**

**회분식 배양**

회분식 배양에서 탄소원으로는 포도당, 질소원으로는 NH<sub>4</sub>Cl를 선택하여 탄소원과 질소원의 초기농도를 달리 하여 이들의 영향을 관찰하였다. 초기 탄소원과 질소원의 농도를 각각 10 g / ℓ, 2 g / ℓ으로 하였을 때는 Fig. 1에서와 같이 최대 protease 활성과 최대 세포 농도는 각각 34 units / ml, 3.54 g / ℓ으로 나타났으며, 약

**Table 1. Nutrient composition of the standard medium.**

Composition	Quantity(g/L)
Glucose	10.0-20.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	10.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0
NH <sub>4</sub> Cl	2.0-6.0
MgSO <sub>4</sub>	0.2
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.01
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.01



**Fig. 1. Experimental results of protease production and calculated values using the proposed model (Go=10g/l, No=2g/l).**

21시간 배양후 탄소원과 질소원 모두 고갈되었다. 초기 탄소원과 질소원의 농도를 각각 10 g/l, 4 g/l로 하였을 때는 Fig. 2에서와 같이 최대 protease 활성 27 units/ml와 최대 세포 농도 3.85 g/l를 얻었으며, 약 21시간 배양후 탄소원은 고갈되고 질소원은 2 g/l 정도 남아있었다. 또한 초기 탄소원과 질소원의 농도를 각각 10 g/l, 6 g/l로 하여 최대 protease 활성 19 units/ml와 최대 세포농도 4.13 g/l를 얻었으며, 약 21시간 배양후 탄소원은 고갈되고 질소원은 4 g/l 정도 남아 있었다. 이들 결과는 질소원의 농도는 탄소원의 농도에 비례하여 감소함을 보여주고 있다. 즉 초기 탄소원의 양에 대해 일정량의 질소원만이 소모되고 나머지는 배지중에 남아 있음을 알 수 있었다. 또한 이들 실험 결과를 정리한 Table 2에서와 같이 탄소원의 농도가 높을수록 그리고 질소원 농도가 높을수록 *Bacillus licheniformis*의 성장은 촉진되나 protease의 생합성 비율은 감소됨을 알 수 있다. 이러한 결과는 1982년 Hanlon 등(14)에 의하여 보고된 것과 일치하는 경향을 보였다. 이들에 의하면 탄소원과 질소원의 농도가 높을수록 효소 생합성이 더 많이 억제 받는 것으로 보고되고 있다. Fig. 3과 Fig. 4는 기질의 농도에 따른 비정상 속도(specific growth

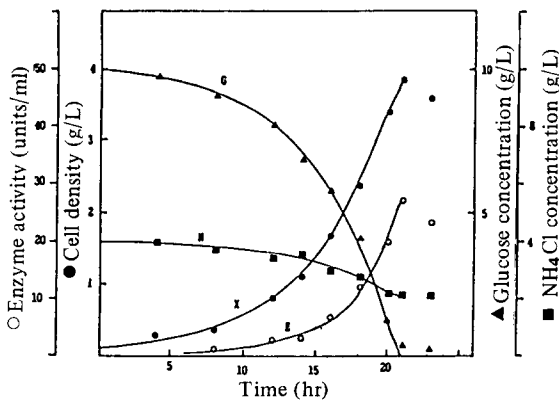


Fig. 2. Experimental results of protease production and calculated values using the proposed model ( $G_0=10\text{g/l}$ ,  $N_0=4\text{g/l}$ ).

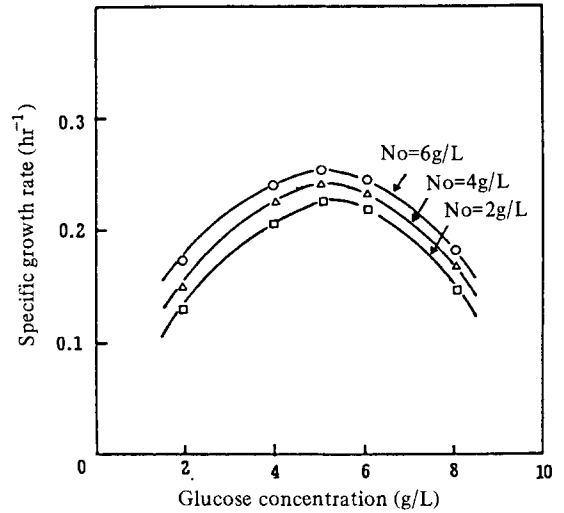


Fig. 3. Effects of the carbon source and nitrogen source concentrations on specific growth rate.

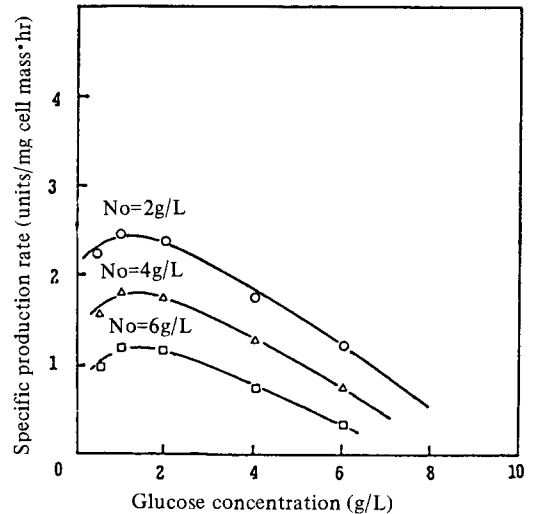


Fig. 4. Effects of the carbon source and nitrogen source concentrations on specific production rate.

Table 2. Effects of initial concentrations of carbon source and nitrogen source on the growth and the protease biosynthesis.

$G_0$ (g/l)	$N_0$ (g/l)	$E_{max}$ (units/ml)	$X_{max}$ (g/l)	$E_{max}/X_{max}$ (units/mg-cell)	$\mu_{max}$ (hr <sup>-1</sup> )	$\pi_{max}$ (units/mg-cell hr)
10	2	34	3.54	9.60	0.236	2.380
10	4	27	3.85	7.01	0.241	1.800
10	6	19	4.13	4.60	0.256	1.200

rate) 및 비생산 속도(specific production rate)를 나타내었다. Fig. 3에서 보면 기질 저해(substrate inhibition) 현상이 있음을 알 수 있으며 비성장 속도는 기질의 농도가 약 5 g/l 일 때 최대값에 도달함을 알 수 있다. 또한 초기 질소원의 농도가 높을수록 *Bacillus licheniformis*의 성장이 촉진됨을 알 수 있었다. Fig. 4에서 비생산 속도는 기질의 농도가 낮아질 수록 증가하나 기질 농도가 약 1 g/l 이하에는 감소하는 경향을 보였으며 초기 질소원의 농도가 높을수록 효소 생산은 더 많이 억제받음을 알 수 있었다. 결국 포도당에 의하여 성장은 촉진되는 반면 protease 생합성은 억제됨을 알 수 있었으며 동시에 NH<sub>4</sub>Cl에 의하여도 같은 현상이 있음을 알 수 있었다.

**수학적 모델식**

기질 저해 현상을 고려한 수정된 Monod 형태의 식을 *Bacillus licheniformis*의 성장을 모사하기 위해 사용하였는데, 전분을 기질로 사용하는 *Bacillus subtilis*의 성장에 대해서도 같은 형태의 식이 사용되었다(15).

Imanaka와 Aiba(16)는 효소 생합성에 있어 양성 조절 기구(positive control mechanism)를 따르는 이화대사산물 억제(catabolite repression)에 대한 속도론적 표현을 유도해 내었는데, 이것을 protease 생합성 속도식에 적용하였다. 실험결과로부터 질소원의 농도는 탄소원의 농도에 비례하여 감소하므로 비례상수를 도입하여 표현하였다. 본 연구에서 제안한 모델식은 다음과 같은데 이 모델식은 미생물의 성장기( $dX/dt > 0$ )에 유효하게 사용할 수 있다.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} G}{K_c + G + G^2/K_i} X \tag{1}$$

$$\mu_{max} = A_0 + A_1 \cdot N_0 \tag{2}$$

$$\frac{dG}{dt} = -\frac{1}{Y_c} \frac{\mu_{max} G}{K_c + G + G^2/K_i} X \tag{3}$$

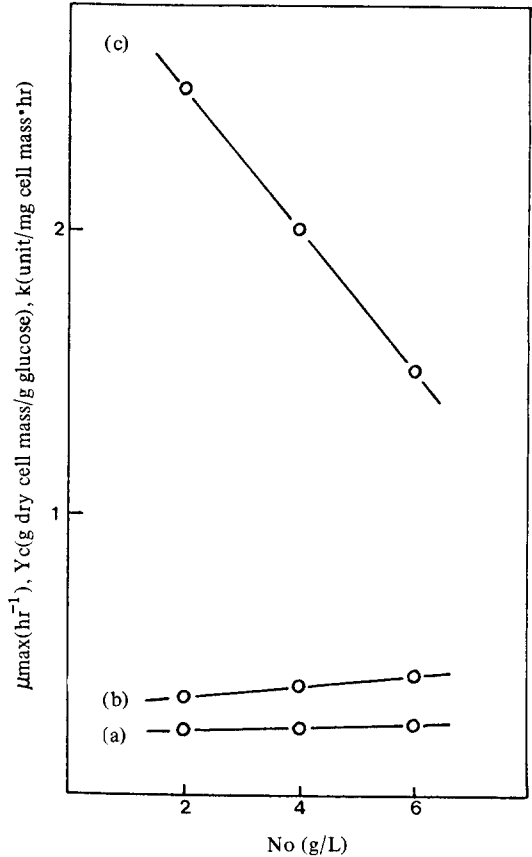
$$Y_c = B_0 + B_1 N_0 \tag{4}$$

$$\frac{dN}{dt} = \alpha \frac{dG}{dt} \tag{5}$$

$$\frac{dE}{dt} = k \frac{1 + K_e G^n}{1 + K_e(1 + K_b)G^n} X \tag{6}$$

$$k = G_0 + C_1 N_0 \tag{7}$$

모델식에 사용된 매개변수 중 일부는 배양 결과로부터 그리고 일부는 변수추정 방법을 사용하여 구하였다. 전자의 방법으로 추정된 매개 변수는  $\alpha$ ,  $K_i$ ,  $X_0$ ,  $Y_c$ ,  $\mu_{max}$ ,  $k$ 이고  $K_c$ ,  $n$ ,  $K_b$ ,  $K_e$ 는 후자의 방법으로 추정하였다. 또한  $\mu_{max}$ ,  $Y_c$ ,  $k$ 는 Fig. 5에서와 같이 회분식 배양 결과로부터 각각 초기 질소원 농도의 함수로 나타낼 수



**Fig. 5. Relation of initial nitrogen source concentrations to (a) maximum specific growth rate,  $\mu_{max}$ , (b) cell yield,  $Y_c$  and (c) proportionality constant in protease synthesis,  $k$ .**

있음을 알았으며 (2), (4), (7)식과 같이 표현하였다. 이들 추정된 매개 변수를 Table 3에 나타내었다. 제안된 수학적 모델식과 매개 변수를 이용한 simulation 결과와 실험 결과는 Fig. 1, Fig. 2에서와 같이 잘 일치함을 알 수 있다. 제안된 모델식에서  $\mu_{max}$ ,  $Y_c$ ,  $k$ 를 질소원의 초기 농도( $N_0$ )에 대한 함수가 아닌 시간 변화에 따른 질소원 농도( $N$ )의 함수로 표현하는 것이 응용면에서 바람직하며 앞으로 더욱 연구되어야 할 것이다.

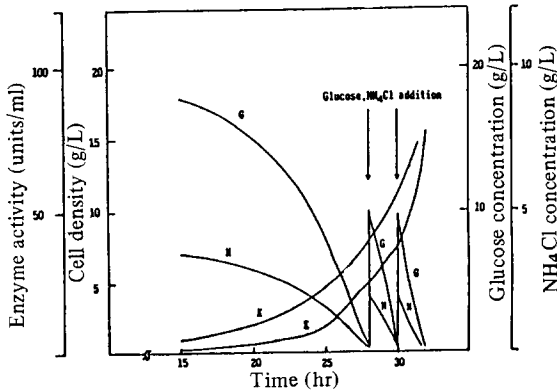
**유가식 배양**

회분식 배양 결과로부터 제안된 수학적 모델식의 적용과 protease 생산성 향상을 검토하기 위하여 유가식 배양을 실시하였다. 배양은 초기 2%의 탄소원과 0.4%의 질소원을 사용하여 회분식 배양을 하다가 이들 탄소원과 질소원이 거의 소모된 성장 말기에 새로운 배지(1% glu-

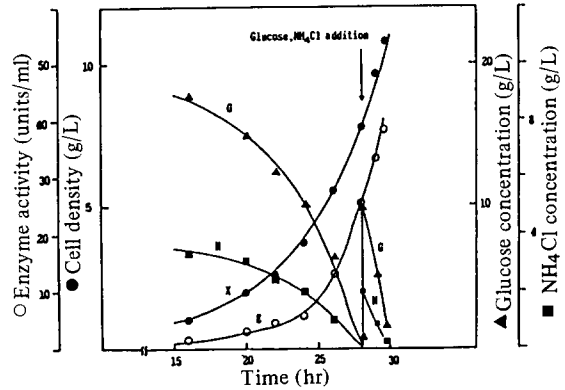
**Table 3. Parameter values in the proposed mathematical model.**

Parameter	Unit	Value	Remarks
Kb		19.90	Estimated
Kc	g/l	0.760	Estimated
Ke		0.001	Estimated
Ki	g/l	33.00	Experimental
n		2.300	Estimated
Xo	g/l	0.100	Experimental
a		0.200	Experimental
A <sub>0</sub>		0.232	Experimental
A <sub>1</sub>		0.002	Experimental
B <sub>0</sub>		0.316	Experimental
B <sub>1</sub>		0.017	Experimental
C <sub>0</sub>		3.000	Experimental
C <sub>1</sub>		-0.250	Experimental

cose, 0.2% NH<sub>4</sub>Cl)를 첨가하여 배양하는 방식을 택하였다. 배양 결과와 제안된 모델식을 이용한 simulation 결과를 Fig. 6에 나타내었는데, 제안된 수학적 모델식이 실험 결과와 잘 일치함을 알 수 있다. 또한 Fig. 7은 초기 2%의 탄소원과 0.4%의 질소원을 사용하여 회분식 배양을 하다 이들 탄소원과 질소원이 거의 소모된 성장 말기에 두번에 걸쳐 새로운 배지(1% glucose, 0.2% NH<sub>4</sub>Cl)를 첨가한 경우에 대한 simulation 결과를 나타내었다.



**Fig. 6. Experimental results of protease production and calculated values using the proposed model (go=20g/l, No=4 g/l; 10 g/l of glucose and 2g/l of NH<sub>4</sub>Cl were added during the fermentation).**



**Fig. 7. Calculated values using the proposed model (Go=20g/l, No=4g/l; 10g/l of glucose and 2 g/l of NH<sub>4</sub>Cl were injected twice during the fermentation).**

Simulation 결과로 부터 초기 4%의 탄소원과 0.8%의 질소원의 농도로 회분식 배양을 한 경우에 비하여 초기 2%의 탄소원과 0.4%의 질소원의 농도로 회분식 배양을 하다 이들 탄소원과 질소원이 거의 소모된 성장 말기에 두번에 걸쳐 새로운 배지(1% glucose, 0.2% NH<sub>4</sub>Cl)를 첨가하여 유가식 배양을 한 경우 최대 효소 활성이 79% 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Fig. 4에서 본 바와 같이 protease 생합성은 탄소원과 질소원에 의해 동시에 억제되는 것에 기인하는 것으로 판단되어 진다. 이로부터 protease 생산성 향상이 회분식 배양에서 보다 유가식 배양에서 우수하며 같은 유가식 배양인 경우에도 한번보다는 두번으로 나누어 간헐적으로 공급(intermittent addition)해 주는 방식이 우수하였다.

**요 약**

미생물에 의한 단백질 분해 효소인 protease 생산에 있어 탄소원과 질소원의 영향은 매우 중요한 것으로 알려져 있다. *Bacillus licheniformis*에 의한 protease 생산에 있어서 탄소원과 질소원의 영향을 규명하기 위해서 제한 배지를 사용하여 회분식 배양을 수행하였다. 탄소원의 농도가 높을수록 그리고 질소원의 농도가 높을수록 *Bacillus licheniformis*의 성장은 촉진되나 protease의 생합성 비율은 감소됨을 알았다. 또한 회분식 배양 결과로부터 탄소원과 질소원의 영향을 고려한 수학적 모델식을 제안하였으며 제안된 수학적 모델식을 사용하여 탄소원과 질소원을 적절히 공급함으로써 protease의 생산성을 증대시킬 수 있었다.

## 사용기호

- E : enzyme activity (units/ml)  
 $E_{max}$  : maximum enzyme activity (units/ml)  
 G : glucose concentration ( g/l )  
 $G_o$  : initial glucose concentration(g/l)  
 k : proportionality constant in protease synthesis  
 $K_b$  : equilibrium constant, in the original report (ref. 16),  $K_b = 1 / [K^*(CAP)t]$ , where K' is the equilibrium constant for binding between CAP(catabolite activator protein) and promoter gene, and (CAP)t is the total catabolite gene activator protein concentration  
 $K_c$  : saturation constant ( g/l )  
 $K_e$  : equilibrium constant for binding between cAMP and CAP  
 $K_i$  : inhibition constant ( g/l )  
 n : stoichiometric constant for binding of cAMP to CAP  
 N : nitrogen source concentration ( g/l )  
 $N_o$  : initial nitrogen source concentration ( g/l )  
 X : cell density ( g/l )  
 $X_{max}$  : maximum cell density ( g/l )  
 $X_o$  : initial cell density ( g/l )  
 $Y_c$  : cell yield (g cell mass/g carbon source)  
 $\alpha$  : proportional constant in substrate consumption  
 $\pi$  : specific production rate (units/mg dry cell mass·hr)  
 $\pi_{max}$  : maximum specific production rate (units/mg dry cell mass·hr)  
 $\mu$  : specific growth rate (hr<sup>-1</sup>)  
 $\mu_{max}$  : maximum specific growth rate (hr<sup>-1</sup>)

## 참고 문헌

1. A. Wieseman (1975), *Handbook of ENZYME Technology*, p. 114, John Wiley, New York.
2. M. Dixon, E.C. Webb (1979), *Enzymes*, 3rd ed., p. 227, Longman Press, London.
3. O. Andresen, K. Aunstrup and H. outtrup (1973), *US Patent* 3723250.
4. M. Patil and N.V. Shastri (1981). *J. Ferment. Technol.*, **59**, 403.
5. R.W. Bernlohr and V. Clark (1971). *J. Bacteriol.*, **105**, 276.
6. E.J. Laishley and R.W. Bernlohr (1968), *J. Bacteriol.*, **96**, 322.
7. J. Kraut (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 331.
8. H. Drucker (1975), *J. Bacteriol.*, **122**, 1117.
9. H. Uehara, Y. Yoneda and B. Maruo (1974), *J. Bacteriol.*, **119**, 82.
10. T. Asai, Y. Nakao, T. Kono and H. Fukuda (1978), *J. Ferment. Technol.*, **56**, 84.
11. N. Fujiwara and K. Yamamoto (1987), *J. Ferment. Technol.*, **65**, 345.
12. G. Miller (1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
13. F. Srienc, B. Arnold and J.E. Bailey (1984), *Biotech. Bioeng.*, **26**, 982.
14. G.W. Hanlon, N.A. Hodges and A.D. Russel (1982), *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 845.
15. M.A. Baig, J. Pazlarova and J. Votruba (1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 331.
16. T. Imanaka and S. Aiba (1977), *Biotech. Bioeng.*, **19**, 757.

(Received June 26, 1989)