

역미셀을 이용한 *Bacillus licheniformis* 발효액으로 부터  
알카리성 단백질 분해효소의 추출에 관한 연구

권 성 필 · 구 윤 모 · \*홍 성 안  
인하대학교 공과대학 생물공학과  
\*한국과학기술원 에너지공정연구소

A Study on the Extraction of Alkaline Protease from  
*Bacillus licheniformis* Fermentation Broth using Reverse Micelle

Seong-Pil Kwon, Yoon-Mo Koo, Seong-Ahn Hong\*  
Dept. of Biological Eng., Inha University  
\*KIST, Energy Engineering Lab.

ABSTRACT

In separating alkaline protease from the bacteria (*Bacillus licheniformis*) fermentation broth using reverse micelle, effects of various factors: ionic strength, pH and surfactant concentration, on separation efficiency were studied. KCl controls the ionic strength. The lower KCl concentration was in the feed solution, the more protein and activity were recovered. The higher KCl concentration was in the stripping solution, the more protein and activity were recovered. Using sodium-di-2-ethylhexyl sulfosuccinate (Aerosol-OT or AOT) as a surfactant, the higher AOT concentration in the solvent, the more activity and protein were recovered. 0.1N NaOH and 1N HCl were used to adjust pH. Maximum recovery of protein mass and activity were obtained at feed solution of pH 5.3. Maximum activity was recovered at stripping solution of pH 7.5

시 론

역미셀(Reverse micelle)은 상간의 계면활성제에 의해서 안정화된 비극성 환경에 녹아 있는  $10^{-9}$ m 크기의 수용액 방울이다(1-7). 대부분의 단백질은 비극성 용매에 거의 녹지 않으며, 단백질을 이러한 용매로 전달할 경우 종종 비가역 변성을 가져와서 효소기능의 손실을 초래하지만, 역미셀은 단백질을 비극성 용매에 녹일 수 있으며 그들의 변성을 막아줄 수 있는데, 그것은 미셀의 극성핵 안에 단백질을 보호함으로써 가능하다(2-8). 상업용 습윤제 Aerosol OT(Sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate)는 탄화수소 내에서 미셀을 형성한다(7). 생물학적 기대

분자의 액-액추출에서 유기용매로서 역미셀의 사용 잠재력은 잘 알려져 있으며, 단순한 합성 단백질 혼합물의 분리는 상당히 쉽게 이루어지고, 연속추출/역추출(extraction/stripping) 과정을 이용하여  $\alpha$ -amylase와 같은 단일 단백질의 농축 역시 가능하다(3, 9, 10). 그러나 지금까지의 대부분의 단백질 회수에 관한 연구는 순수한 모델 시스템(pure model system)에 관한 것으로서, 역미셀 용매를 이용하여 발효배지(fermentation media)에서 단백질의 선택적 추출에 대해서 연구된 것은 많지 않다. 배지 구성물들과 계면활성제의 상호작용은 원하는 제품의 선택적 분리에 영향을 미칠 수도 있다. 세포산해나 진분과 계면활성제의 결합은 효과적인 계면활성제

농도를 낮춤으로서 시스템의 용해능력을 감소시킬 수도 있다(2). 이런 점들을 고려하여 본 연구에서는 실험에 의하여 발효제품에 대한 역미셀 분리의 타당성을 보여 이 분리공정에 대한 최적화의 지침을 제공하고자 한다.

**재료 및 방법**

미생물을 발효시킨 결과 높은 현탁도(turbidity)로 그 성장을 확인할 수 있었으며, 알칼리성 단백질 분해효소(alkaline protease)의 존재 유무는 정량적 실험을 통해서 확인하였다. 추출과 역추출 과정을 통해 회수된 알칼리성 단백질 분해효소(alkaline protease)의 정량적 분석은 % 회수량, %회수활성, 상대비활성의 3가지 관점에서 수행할 수 있다. %회수량이란 원액의 단백질 농도에 대한 회수액의 단백질 농도의 백분율이며, %회수활성이란 원액 일정부피당 활성에 대한 회수액 일정부피당 활성의 백분율이다. 그리고 상대비활성이란 원액 비활성(단백질 단위 질량당 활성)에 대한 회수액 비활성의 비를 말한다. 본 실험에서는 %회수량과 %회수활성 두가지로 분석하였다.

**효소용액 제조**

추출모액으로 사용하기 위한 효소용액은 한국 종균협회로부터 구입한 *Bacillus licheniformis* KFCC 11851을 Table. 1과 같은 복합발효배지를 사용하여 pH 10, 37°C에서 약 3일간 150 rpm으로 진탕배양하면서 발효시킨 후

**Table 1. Composition of the complex fermentation media**

component	wt.%	component	wt.%
yeast extract	0.5	peptone	0.5
potassium phosphate	0.1	magnesium sulphate	0.02
soluble starch	2.0	sodium carbonate	1.0

**Table 2. Experimental conditions**

No.	enzyme solution		stripping solution		[AOT] (mM)	temp.(°C)	
	pH	[KCl] (M)	pH	[KCl] (M)		extraction	stripping
1	V*	0	7.5	1	150	23	23
2	5.4	0	V	1	150	23	23
3	5.4	0	7.5	1	V	23	23
4	5.3	V	7.5	1	150	23	23
5	5.3	0	6.87	V	150	25	25

\*variable

3500 rpm으로 20분간 원심분리하여 세포를 제거하고 상정액을 취하여 얻었다.

이때 완충제로 사용되는 sodium carbonate는 다른 성분들과 별도로 멸균하여 사용하였다. yeast extract와 peptone은 미생물 배양용 Acumedia제품을 사용하였으며, potassium phosphate와 magnesium sulphate는 1급(extra pure)의 동양화학 제품을 사용하였고, 용해성 진분과 sodium carbonate는 1급의 Yakuri제품을 사용하였다.

**추출용매와 역추출용액 제조**

효소용액으로부터 단백질 분해효소를 추출하기 위한 추출용매는 iso-octane에 AOT(sodium-di-2-ethylhexyl sulfosuccinate)를 첨가하여 만든다. 역추출용액은 2차 증류수에 0.1N NaOH와 1N HCl을 이용하여 pH를 조절한 후 KCl을 첨가하여 이온강도를 맞춘다. 이때 iso-octane은 1급의 Yakuri 제품을 사용하였으며 AOT는 SIGMA제품(extra pure)을 사용하였다.

**실험과정 및 조건**

효소용액으로부터 단백질 분해효소를 회수하기 위하여 Fig. 1과 Table. 2와 같은 실험조건과 절차에 따라 다음과 같이 실험하였다. 효소용액과 추출용매를 1:2의 부피비로 혼합하여 50ml 비이커 내에서 1000 rpm으로 10분간 교반시킨 후 시험관 내에서 일정한 온도를 약 24시간 동안 안정화시켰다. 분리된 유기상에 역추출용액을 1:1의 부피비로 첨가하여 50ml 비이커 내에서 1000 rpm으로 10분간 교반시킨후 시험관 내에서 일정한 온도로 약 24시간동안 안정화시켜서 분리된 수용액을 분석한다.

**단백질 질량 분석**

회수된 총 단백질의 양을 알아보기 위하여 단백질 질량 분석을 실시하였으며 이는 280nm-310nm범을 사용하여 측정하였다(2, 3). Milton Roy Spectronic 601을

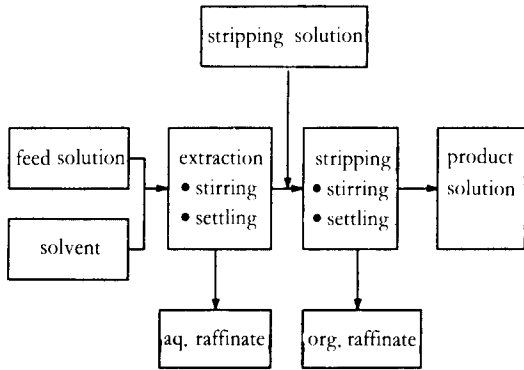


Fig. 1. Flowsheet of the experimental procedures.

사용하여 280nm와 310nm에서 공기기준(air reference)으로 흡광도를 측정한 후 두 값의 차를 BSA표준곡선과 비교하여 농도를 결정한다.

**활성도 분석**

변성되지 않고 회수된 단백질의 양을 알아 보기 위하여 단백질 분해효소의 활성도를 수정된 Casein-Folin법을 사용하여 측정하였다(11, 12).  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  완충용액(0.05M, pH 9.9)에 casein을 1% 녹여서 casein용액을 제조한다. 0.1 M TCA(trichloroacetic acid), 0.22 M sodium potassium acetate, 그리고 0.33 M acetic acid를 섞어서 TCA용액을 제조한다. 모든 용액(효소, Casein, TCA)을 37°C로 하고, casein용액 0.5ml과 효소용액 0.1ml을 잘 섞어 10분간 반응시킨 후 0.6ml의 TCA 용액을 사용하여 반응을 정지시키고 20분간 기다린다. 900 rpm으로 10분간 원심분리하여 상정액 0.5ml를 취해서 5ml의 0.1N NaOH에 녹아 있는 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 로 완충시켜, 0.5ml의 1N Lowry 시약을 가해서 spectrophotometer를 사용하여 700nm에서의 흡광도를 측정한다. 결과를 tyrosine 표준곡선과 비교하여 활성을 결정한다.

**결과 및 고찰**

효소용액의 pH를 변화시키면서 회수액을 분석하였을 때 Fig. 2에서 알 수 있듯이 pH가 낮을 수록 보다 높은 %회수량과 %회수활성을 보이다가 pH 5.3을 정점으로 하여 감소하였다. 단백질은 등전점(isoelectric point)이 하에서 양전하(positive charge)를 띠게 되므로 음이온성 계면활성제에 의해 생성되는 막미셀 안으로 추출된다. pH 5.3 이하에서 회수되는 양이 감소하는 것은 H<sup>+</sup>에

의하여 단백질 분해효소가 변성되는 것으로 사료된다.

역추출 용액의 pH를 변화시키면서 회수액을 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었으며, pH 7.5에서 최고의 %회수활성을 보였고 pH가 높아질수록 %회수량은 증가하였다. 역추출 용액의 pH가 높아져 등전점에 가까워질수록 단백질의 전하량은 감소하여 보다 많은 양의 단백질이 역추출됨을 알 수 있다.

추출용매의 AOT농도를 변화시키면서 회수액을 분석했을 때(Fig. 4) AOT농도가 증가할수록 %회수량은 완만하게 증가했으며, %회수활성은 급격하게 증가했다. AOT 농도의 증가는 막미셀의 크기를 증가시키므로써 단백질을 용해하는 정전기적인 기력(statical driving force)의

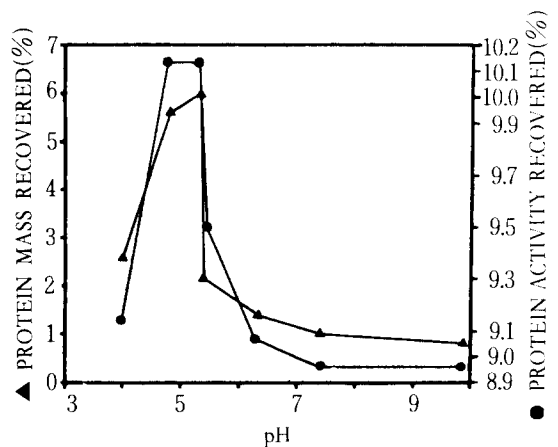


Fig. 2. Effects of pH of the enzyme solution on recoveries.

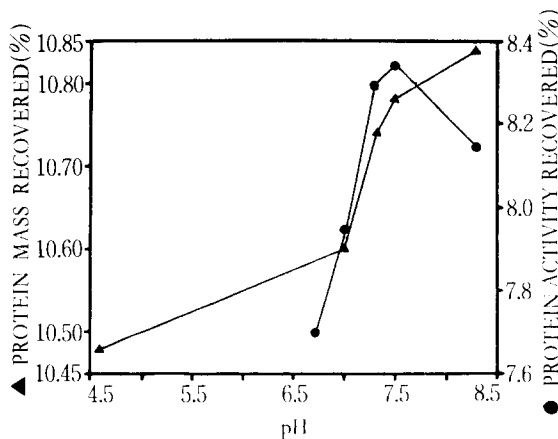


Fig. 3. Effects of pH of the stripping solution on recoveries.

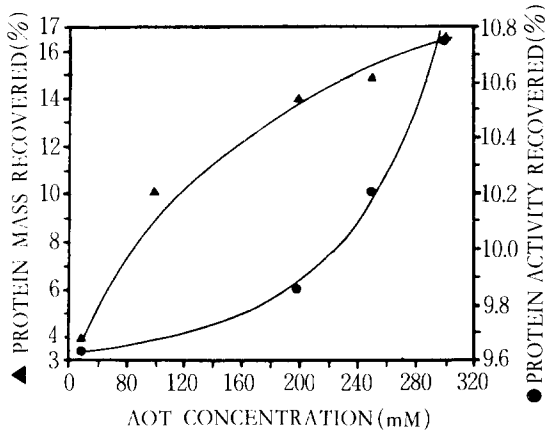


Fig. 4. Effects of AOT concentration of the extraction solvent on recoveries.

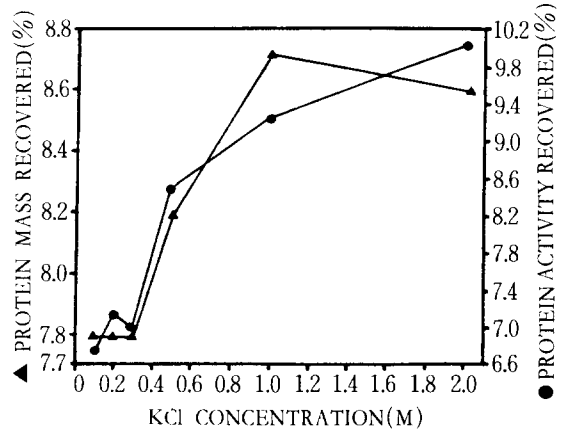


Fig. 6. Effects of KCl concentration of the stripping solution on recoveries.

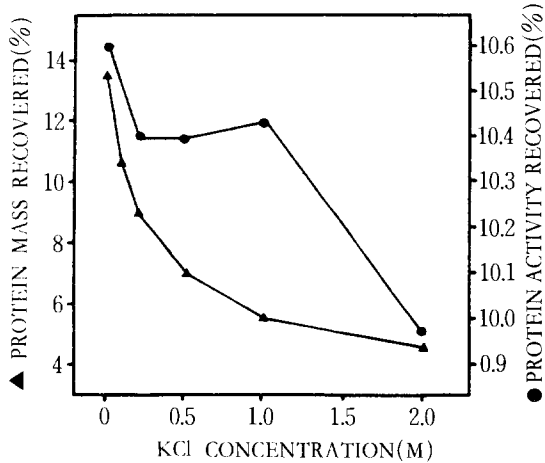


Fig. 5. Effects of KCl concentration of the enzyme solution on recoveries.

감소없이 크기배제(size exclusion)의 가능성을 감소시켜 더욱 높은 회수율을 나타내는 것으로 해석된다.

효소용액의 이온강도(KCl 농도)를 변화시키면서 회수율을 분석하였을 경우 Fig. 5에서 알 수 있듯이 KCl 농도가 증가할수록 %회수량과 %회수율은 감소했다. KCl은 불용덩이(water pool) 내에서 이온상태로 존재하면서 음이온성 계면활성제(anionic surfactant)의 극성을 떨어뜨리는 작용을 하기 때문에 계면활성제간의 정전기적 반발력을 감소시켜 역미셀의 크기를 감소시킨다. 따라서, KCl 농도가 증가할수록 유기상에 용해되어 추출되는 단백질의 양이 감소하게 된다.

역추출 용액의 KCl 농도가 효소의 회수에 미치는 영향을 Fig. 6에 나타내었다. KCl 농도가 증가할수록 %회수율과 %회수량은 증가하며 이는 정전기적 반발력의 감소로 인한 역미셀 크기의 감소는 보다많은 단백질의 역추출을 가능케 한 것으로 해석된다.

이상의 실험결과와 같이 인자들의 일정한 값에 대하여 회수되는 단백질의 양은 최대값 혹은 일정한 경향성을 보이고 있으나, 전반적으로 그 회수율이 10%정도로 낮고, 각 인자들이 회수되는 효소활성에 미치는 영향이 민감하게 나타나고 있지 않다. 낮은 회수율은 Hatton등의 실험결과(2)와 크게 다르지 않으며, 이는 추출·역추출 과정중 교반에 의한 변성 및 발효배지내의 여러 성분들의 방해효과에 기인하는 것으로 해석된다.

각 인자들(pH, AOT 농도, 이온강도)을 동시에 최적화할 경우 보다 높은 수율을 얻을 수 있을 것으로 기대되며, 그외의 추출효율에 크게 영향을 줄 온도 등의 intensive 변수와 교반속도나 추출액과 모액의 부피비 등의 extensive 변수등을 최적화 함으로써 역미셀에 의한 추출공정의 효율을 극대화하는 연구가 진행되고 있다. 본 실험에서 얻어진 자료들이 순수한 단백질 분해효소를 사용하는 시스템에서 얻어지는 자료들과 비교·보충된다면 산업적으로 그 가치가 증대될 것으로 사료된다.

요 약

역미셀을 이용하여 박테리아 (*Bacillus licheniformis*)의 발효액으로부터 알카리성 단백질 분해효소를 분리할 때 여러가지 인자들, 즉 이온강도, pH, 계면활성제의 농도 등이 분리효율에 미치는 영향에 대하여 다음과

같은 결과를 얻었다. 이온강도를 높여 주기 위하여 KCl을 사용하여 조절하였으며, 발효액의 이온강도를 높여줄수록 추출되는 효소의 양은 감소하였으며, 역추출 용액의 이온강도를 높여줄수록 역추출되는 효소의 양은 증가하였다. 계면활성제로는 sodium-di-2-ethylhexyl sulfosuccinate (Aerosol-OT 또는 AOT)를 사용하였으며, 유기상내의 계면활성제 농도를 높여줄수록 더 많은 양의 효소가 추출됨을 알 수 있다. pH는 1N HCl과 0.1N NaOH를 사용하여 조절하였고, 발효액의 pH가 5.3이었을 때 가장 많은 양의 변성되지 않은 효소가 추출되었으며, 역추출 용액의 pH가 7.5일 때 가장 많은 양의 변성되지 않은 효소가 역추출됨을 알 수 있다.

### 참 고 문 헌

1. K. E. Göklen (1986), "Liquid-liquid extraction of biopolymers", MIT Industrial Liaison Program Report, MIT.
2. R. S. Rahaman, et al. (1988), *Biotech. Prog.*, **4**(4), p. 218-224.
3. 조상우(1989), "역미셀계를 이용한 대두 단백질로부터 트립신 저해제의 분리에 관한 연구", 석사학위논문, 한국과학기술원.
4. M. Dekker, et al. (1989), *Analytical biochemistry*, **178**, p. 217-226.
5. P. L. Luisi and B. E. Straub, *Reverse micelles* (Switzerland), p. 1-19.
6. 홍성안, 하홍용(1989), *생물화학*, **3**(4), p. 77-103.
7. K. Shinoda (1967), *Solvent properties of surfactant solution*, Marcel Dekker, p. 65-115.
8. S. Giovenco, et al. (1987), *Enz. Microb. Technol.*, **4**, p. 470-473.
9. K. E. Göklen and T. A. Hatton (1985), *Biotech. Prog.*, **1**(1), p. 69-74.
10. K. Martinek, et al. (1987), *Collection Czechoslovak Chem. Commun.*, **52**, p. 2589-2602.
11. J. H. Kim and Y. J. Yoo (1989), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **4**(2), p. 128-133.
12. 김윤숙(1988), "Alkaline Protease 생산균주의 분리 및 동정에 관한 연구", 석사학위논문, 고려대학교.

(Received; February 12, 1991, Accepted; April 30, 1991)