Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 22, No. 6, 621-626 (1994)

Pseudomonas sp. RP-222와 변이주 MR-3966의 생육 및 Protease 생산에 Cysteine이 미치는 저해효과

이광수 · 강신권 · 손봉수 · 노종수[1] · 김경숙[2] · 전성식 · 성낙계*
경상대학교 식품공학과, [1]부산 동의공업전문대학 환경공업과
[2]일본 국립건강영양연구소

Inhibitory Effects of Cysteine on Growth and Protease Production of *Pseudomonas* sp. RP-222 and its Mutant MR-3966

Lee, Kwang-Soo, Shin-Kwon Kang, Bong-Soo Son, Jong-Soo Roh, Gyeong-Sook Kim[1], Sung-Sik Chun and Nack-Kie Sung*
Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea
[1]Department of Environmental Technology, Dongeui college, Busan 614-715, Korea
[2]Division of Clinical Nutrition, The National Institute of Health and Nutrition, Tokyo, 162, Japan

Abstract — Cysteine showed strong inhibitory effect on growth and protease production of *Pseudomonas* sp. RP-222 and its mutant, MR-3966. Mid- to late-log phase cells were most sensitive to the presence of 10 mM cysteine. The inhibition caused by cysteine was almost completely overcome by addition of isoleucine, leucine and valine mixture to the medium, and inclusion of isoleucine alone could greatly reduce the inhibitory effects of cysteine. Homocysteine and cysteine, sulfur compounds having similar structure as cysteine, inhibited to varying degrees the growth of both strains. Cysteine and homocysteine were strong inhibitors of threonine deaminase but not transaminase B. These results suggest a relationship between the growth-inhibitory effects of cysteine and other sulfur compounds and the inhibition of isoleucine synthesis at the level of threonine deaminase.

Pseudomonas sp. 세균 중 일부는 단백성 식품의 중요한 부패세균이며, 특히 저온과 호기적 상태에 저장되는 식품의 부패에 큰 역할을 한다. 이 균이 부패균으로 중요시되는 것은 증식 최적온도가 20~30℃에 있는 것이 많으며, 또한 0℃의 저온에서 증식하는 균주도 많이 있으므로 저온, 냉장한 식품에서도 증식을 하기 때문이다.

이러한 단백성 식품의 부패현상은 *Pseudomonas* sp. 세균의 증식과 더불어 세포외로 분비되는 protease에 기인하며 protease의 합성은 단백질 가수분해 작용에 의한 최종산물인 아미노산에 의해 조절을 받는 것으로 알려져 있다(1).

특정 아미노산에 의한 미생물의 증식 저해(2)를 보면 valine에 의한 *Escherichia coli* K-12의 생육저해(3)를 들 수 있는데 이는 과잉의 valine이 isoleucine 생합성에 관여하는 효소인 acetohydroxy acid synthetase를 저해하여 isoleucine의 결핍을 초래하기 때문인 것으로 보고되어 있다(4, 5). 한편 cysteine은 *Escherichia coli*(6, 7), *Bacillus subtilis*(8), yeast(9, 10), fungi(11, 12)를 포함하는 많은 미생물에 독성작용과 균생육을 저해한다. 특히 Hassan 등(13)의 보고에 의하면 각종 아미노산 가운데 cysteine이 *Pseudomonas fluorescens*의 생육 및 protease 생성을 가장 크게 억제하는 것으로 나타났다.

따라서 본 연구에서는 5℃에서도 생육 및 protease 생성이 가능하고, 20℃에서 최적생육 및 효소활성을 나타내는 저온 알칼리성 세균인 *Pseudomonas* sp. RP-222와 NTG 변이원에 의하여 protease 활성이 모균주인 *Pseudomonas* sp. RP-222보다 2배 증가된 변이

Key words: Protease, *Pseudomonas* sp. RP-222, *Pseudomonas* sp. MR-3966, cysteine
*Corresponding author

주인 *Pseudomonas* sp. MR-3966을 공시균주로 이용하여 균 생육과 protease 생산에 미치는 영향을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

균주는 저온 알칼리성 protease를 분비하는 균으로서 본 연구실에서 분리한 *Pseudomonas* sp. RP-222와 *Pseudomonas* sp. MR-3966을 사용하였고 PSY와 PC 배지(Table 1)를 각각 사용하여 20℃ 항온진탕기에서 200 rpm의 속도로 진탕 배양하였다.

효소활성 측정

Protease 활성은 Hull 등(15)의 방법을 사용하였다. 즉 조효소액 1 m*l*에 casein 0.6%를 포함하는 50 mM NaOH-borate buffer(pH 10.0) 5 m*l*를 첨가하여 40℃에서 10분간 반응시킨 후 TCA 용액 5 m*l*를 첨가하여 37℃에서 20분간 처리시킨 다음 생성된 침전물을 여과(Whatman No.2)하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease의 표준곡선은 0.2 N-HCl에 tyrosine 100~2,100 μg을 녹여 같은 방법으로 결정하였다. Protease의 1 unit는 1분 동안 tyrosine 1 μg을 생성하는 효소량으로 정하였다.

Cell extract 조제

20℃에서 4일간 배양한 것을 4℃, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 다음 멸균수로 세척하였다. 이것을 50 mM $MgCl_2$, 25 mM KCl, 1 mM 2-mercaptoethanol 그리고 5% glycerol이 함유된 0.05 M Tris HCl buffer(pH 7.6)로 균체 g당 1~2 m*l*되게 첨가하여 현탁시킨 후 초음파 파쇄기(Bandelin사, Sonoplus HD60)로 파쇄하여 4℃, 15,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상등액을 threonine deaminase와 transaminase B assay에 사용하였다.

Table 1. Composition of media used

Medium Composition (g/*l*)	PSY	PC
Glucose	–	1
Starch	10	–
Tryptone	5	5
Casein	5	5
Peptone	20	–
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	–	0.005
$CoCl_2$	0.05	–

*Adjust pH to 10.0 with 20% Na_2CO_3 sterilized separately.

Theonine deaminase 활성측정

Threonine deaminase 활성은 Ratzkin 등(16)의 방법으로 측정하였다. 즉 cell extract 0.1 m*l*에 1 M Tris HCl(pH 8.0), 1 M NH_4Cl, 1 mM pyridoxal phosphate, 0.4 M threonine을 각각 0.1 m*l* 씩 가하고 멸균수로 1 m*l* 되게 하였다. 37℃ 항온수조에서 20분간 반응시킨 다음 50% TCA 용액 0.1 m*l*을 첨가하여 효소반응을 중지시켰다. 그리고 이 반응액을 0.5 m*l* 취하여 멸균수로 1 m*l* 되게 희석시켜 0.025% 2,4-dinitropheny-lhydrazine 2 m*l*을 가하고 25℃에서 15분 반응시켜 발색시킨 다음 40% NaOH 1 m*l*을 가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 상대활성도로 나타내었다.

Transaminase B 활성측정

Transaminase B 활성은 Duggan과 Wechsler(17)의 방법에 준하였다. 즉 cell extract 0.1 m*l*에 1 M Tris HCl(pH 8.0), 0.8 mM pyridoxal phosphate, 0.15 M α-Ketoglutarate, 0.25 M L-valine을 각각 0.1 m*l* 씩 첨가한 다음 threonine deaminase assay와 같은 방법으로 효소반응을 중지시키고 발색시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하여 상대활성도로 나타내었다.

단백질 전기영동

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 10% polyacrylamide을 이용하여 Laemmli(18) 방법에 따라 행하였다.

결과 및 고찰

균 생육 및 protease 생산에 미치는 각종 아미노산의 첨가 효과

자연계에 존재하는 20가지의 아미노산을 각각 배지에 6 mM씩 첨가하여 protease의 활성이 최대로 나타나는 4일까지 배양하면서 24시간마다 균 증식 및 protease 활성을 비교, 검토하여 저해효과가 비교적 높은 4가지 아미노산, 즉 cysteine, serine, lysine, tyrosine에 대하여 다시 저해효과를 조사하였다. 그 결과 *Pseudomonas* sp. RP-222에서는 cysteine이 가장 큰 저해를 하였으며 serine, lysine, tyrosine의 순으로 저해효과를 나타내었다(Fig. 1).

그리고 *Pseudomonas* sp. MR-3966에서도 균 증식 및 protease 생산에 cyteine이 저해효과가 가장 높은

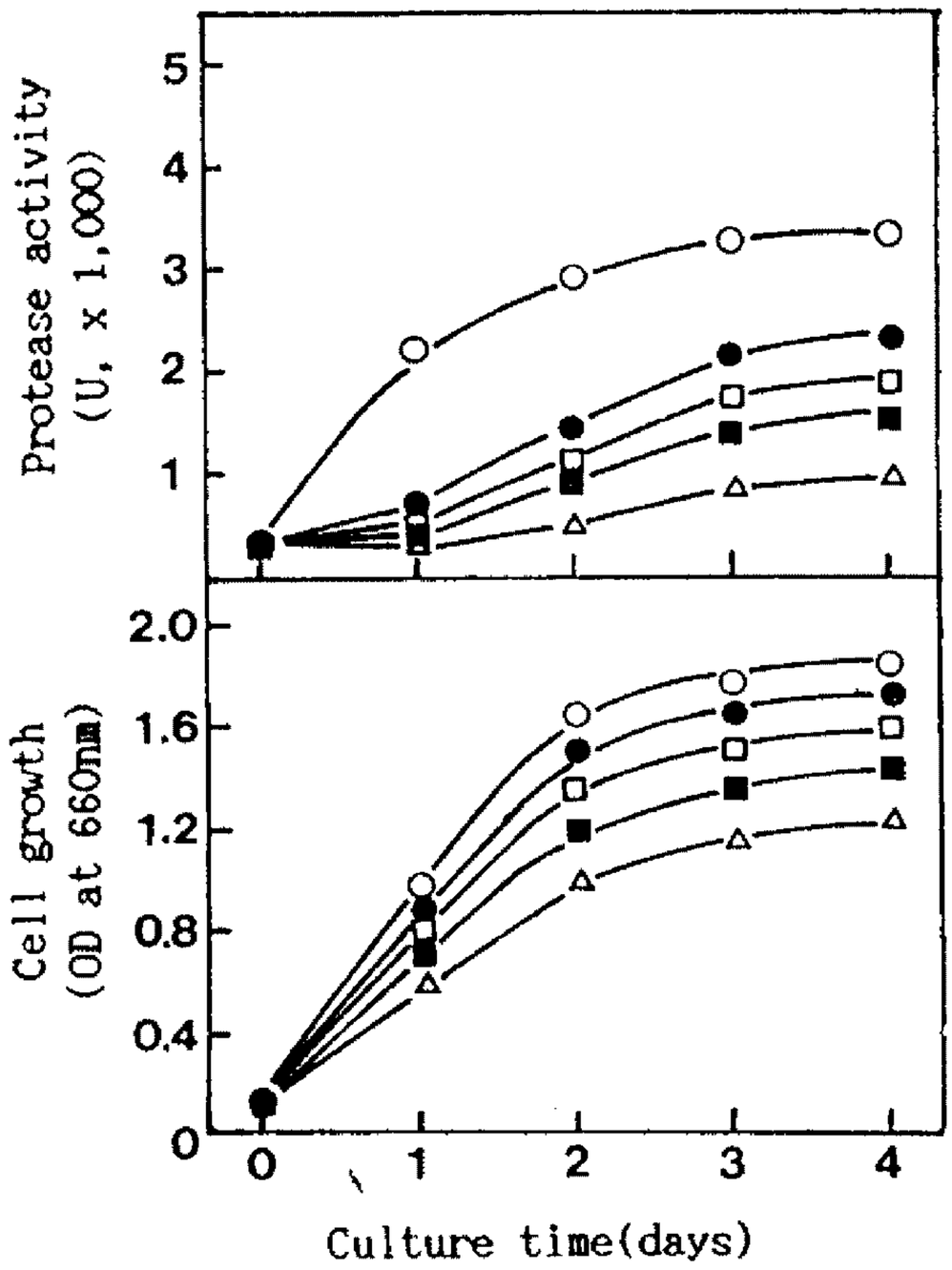

Fig. 1. Effect of aminos acid on the growth and protease activity of *Pseudomonas* sp. RP-222.
Concentration of all amino acids added was 6 mM. ○−○: Control, □−□: Lysine, △−△: Cysteine, ●−●: Tyrosine, ■−■: Serine

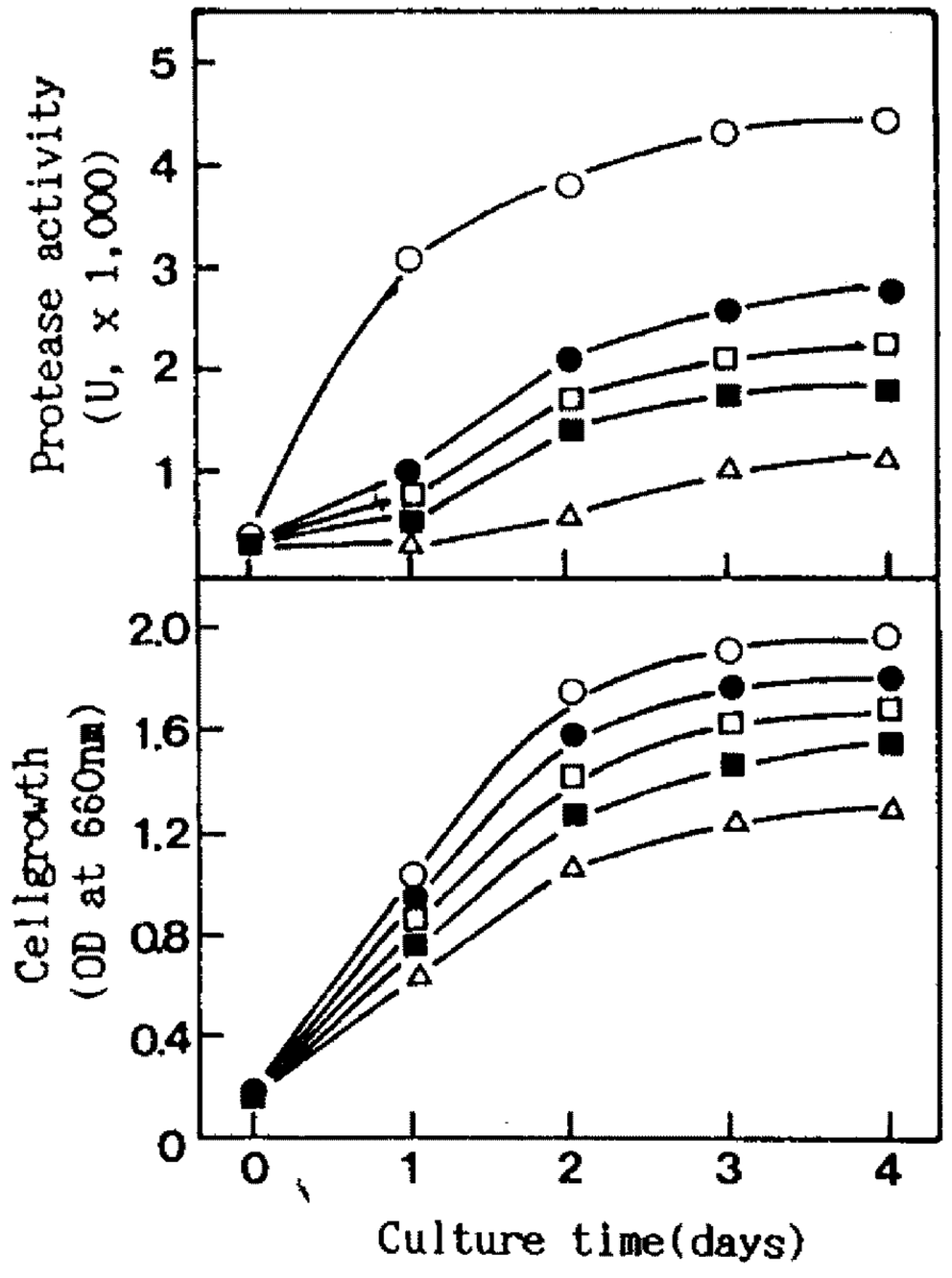

Fig. 2. Effect of amino acids on the growth and protease activity of *Pseudomonas* sp. MR-3966.
Concentration of all amino acids added was 6 mM. ○−○: Control, □−□: Lysine, △−△: Cysteine, ●−●: Glutamine, ■−■: Serine

것으로 나타났으며 *Pseudomonas* sp. RP-222와 상이한 점은 tyrosine 대신에 glutamine이 저해효과가 높게 나타난 것이었다(Fig. 2). 이것은 정확한 원인규명은 하지 않았으나 돌연변이 과정 중에 어떠한 변화가 유발되어 glutamine에 대하여 민감한 반응을 일으킨 것으로 추정된다. 위 두 균주의 실험 결과는 Hassan 등(13)이 보고한 Pseudomonas fluorescens에 대하여 cysteine이 균 생육 및 protease 생산을 가장 크게 저해시킨다는 연구결과와 유사하였다.

Cysteine의 첨가 농도에 다른 균 생육 및 protease 생산에 미치는 저해효과

배양초기에 cysteine을 3 mM, 5 mM, 그리고 10 mM 되게 첨가하여 4일간 배양하면서 24시간마다 균증식 및 protease 활성을 측정하였다. 그 결과 *Pseudomonas* sp. RP-222와 *Pseudomonas* sp. MR-3966. 두 균주 모두 cysteine의 첨가농도가 높아질수록 저해효과가 높게 나타났다(Fig. 3).

Fig. 4는 cystine 첨가농도에 따른 protease 생산량을 보기 위한 단백질 전기영동 결과(20)로서 cysteine의 농도가 증가함에 따라 protease 양이 줄어듦을 알 수 있다. 이것으로 보아 cysteine이 protease 활성을 저해하는 것이 아니라 생합성의 어떤 단계를

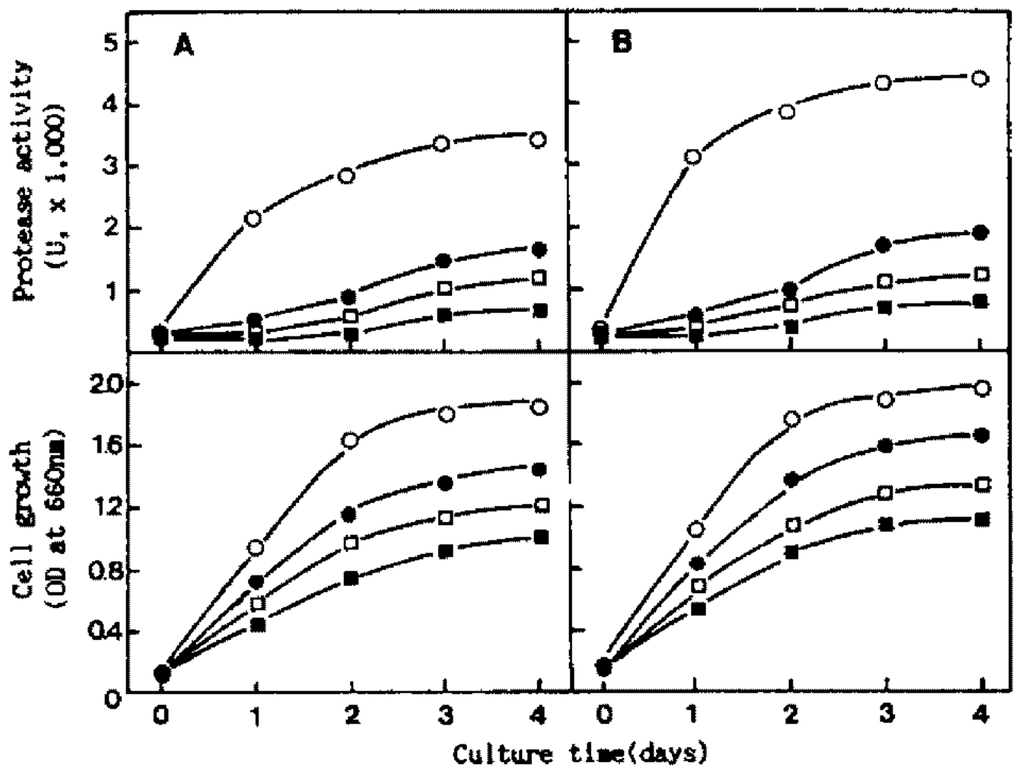

Fig. 3. Effect of cysteine concentration on growth of and protease production by *Pseudomonas* sp. RP-222(A) and MR-3966(B).
○−○: Control, ●−●: 3 mM, □−□: 6 mM, ■−■: 10 mM

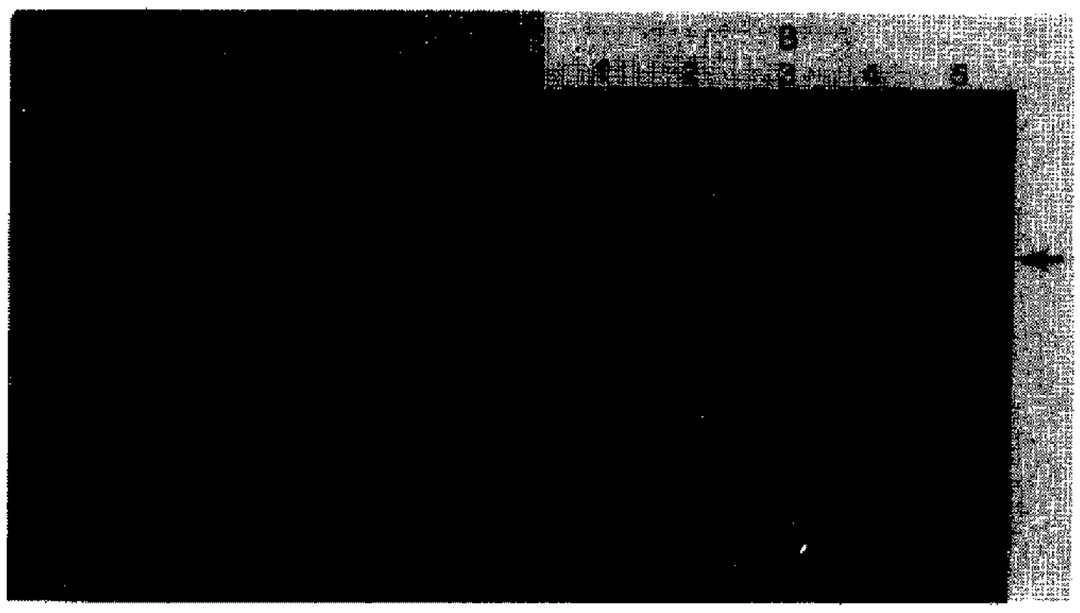

Fig. 4. SDS-polyacryoamide gel electrophresis of *Pseudomonas* sp. RP-222(A) and MR-3966(B) proteases in terms of the cysteine concentration added to the culture media.
Lane 1: Molecular weight marker, 2: control, 3: 3 mM, 4: 6 mM, 5: 10 mM

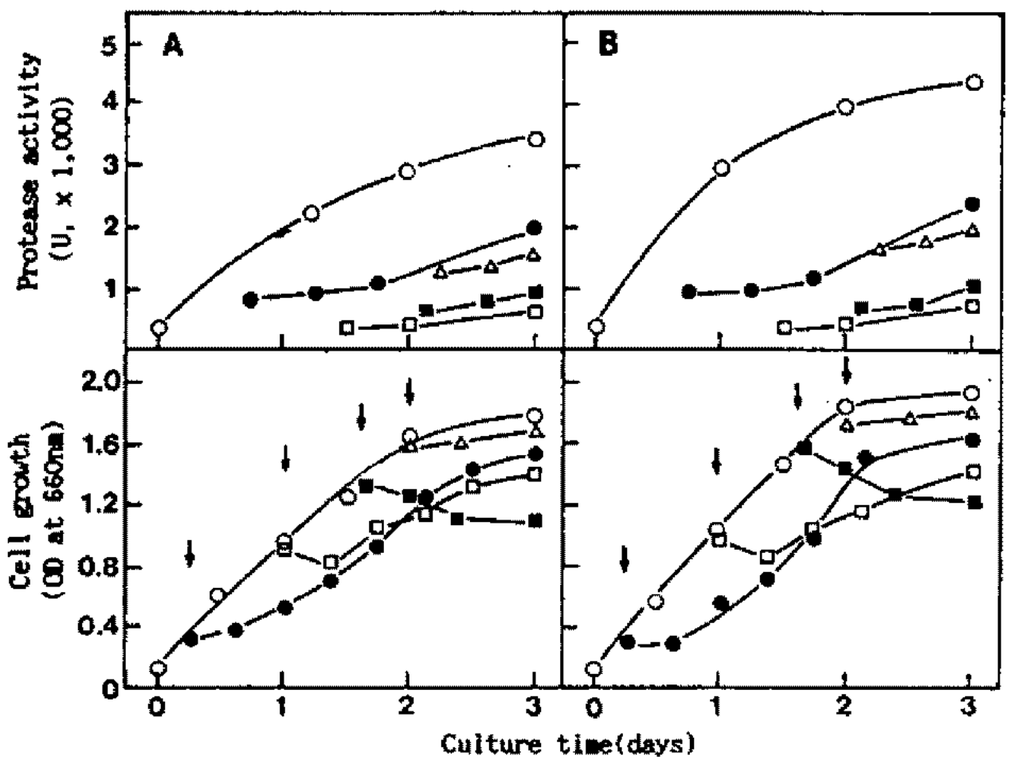

Fig. 5. Effect of adding time of cystein(10 mM) on growth and protease production of *Pseudomonas* sp. RP-222(A) and MR-3966(B).
Transfer times(hours): Control(○), 6(●), 24(□), 39(■), 48(△)

저해하므로써 protease 생산량을 감소시키는 것으로 추정되었다.

Cysteine의 첨가시기에 따른 균 생육 및 protease 생산에 미치는 저해효과

대수증식기 초기에 접어드는 6시간, 중기에 해당하는 24시간, 말기에 해당하는 39시간, 그리고 정지기에 접어드는 48시간째에 저해효과가 크게 나타난 cysteine 6 mM을 첨가하였다. 그 결과 *Pseudomonas* sp. RP-222와 *Pseudomonas* sp. MR-3966 두 균주 모두 대수증식기 중기와 말기에서 균 생육 및 protease 활성이 급격히 감소되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 5).

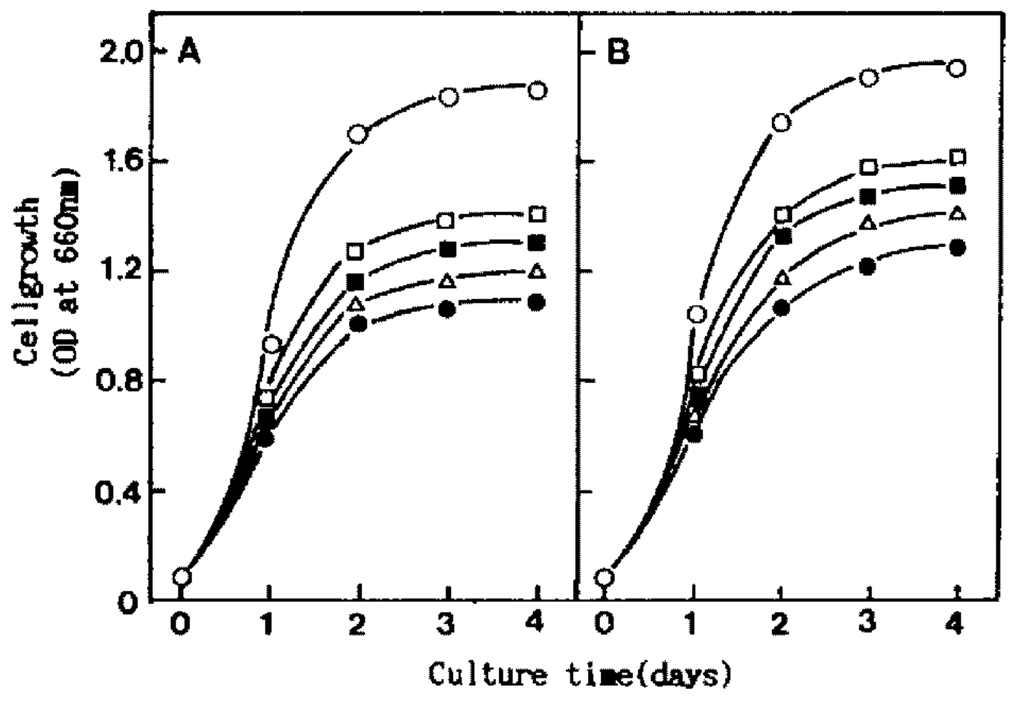

Fig. 6. Release of cysteine growth inhibition by branched amino acids.
A: *Pseudomonas* sp. RP-222, B: *Pseudomonas* sp. MR-3966
○−○: Control, ●−●: 6 mM Cysteine, □−□: 6 mM Cysteine+6 mM Isoleucine, ■−■: 6 mM Cysteine+6 mM Valine, △−△: 6 mM Cysteine+6 mM Leucine

가지사슬 아미노산 첨가에 의한 cysteine 저해효과 억제

Cysteine이 함유된 배지에 isoleucine, valine, 그리고 leucine을 각각 따로 첨가하여 균 생육에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 6).

그 결과 isoleucine의 첨가가 cysteine에 의한 저해효과를 가장 크게 상쇄시켰고 valine과 leucine 순으로 상쇄효과가 좋게 나타났는데 이는 가지사슬 아미노산인 isoleucine과 valine, leucine의 생합성 과정 중 *E. coli*에서 cysteine이 isoleucine 생합성의 첫단계 반응 촉매효소인 threonine deaminase를 저해하는 inhibitor로 작용한다는 Harris(19)의 연구결과와 유사하였다.

Fig. 7은 cysteine이 함유되어 있는 배지에 isoleucine, valine, 그리고 leucine을 동시에 첨가하여 cysteine의 저해효과에 대한 상쇄정도를 조사하였다. 그 결과 isoleucine, valine, 그리고 leucine을 배지에 각각 첨가하였을 때보다 cysteine에 의한 저해효과를 훨씬 크게 억제하였다. 이러한 결과로 보아 *Pseudomonas* sp. RP-222와 그 mutant인 *Pseudomonas* sp. MR-3966에서도 cysteine이 가지사슬 아미노산 생합성 반응에 관여함을 알 수 있었다.

Threonine deaminase transaminase B 활성에 미치는 cystein의 저해효과

Cysteine이 어떤 반응단계를 저해하는지 규명하기 위하여 Harris(19)의 연구결과를 기초로 하여 isoleucine 생합성의 첫번째 반응단계를 촉매하는 threonine

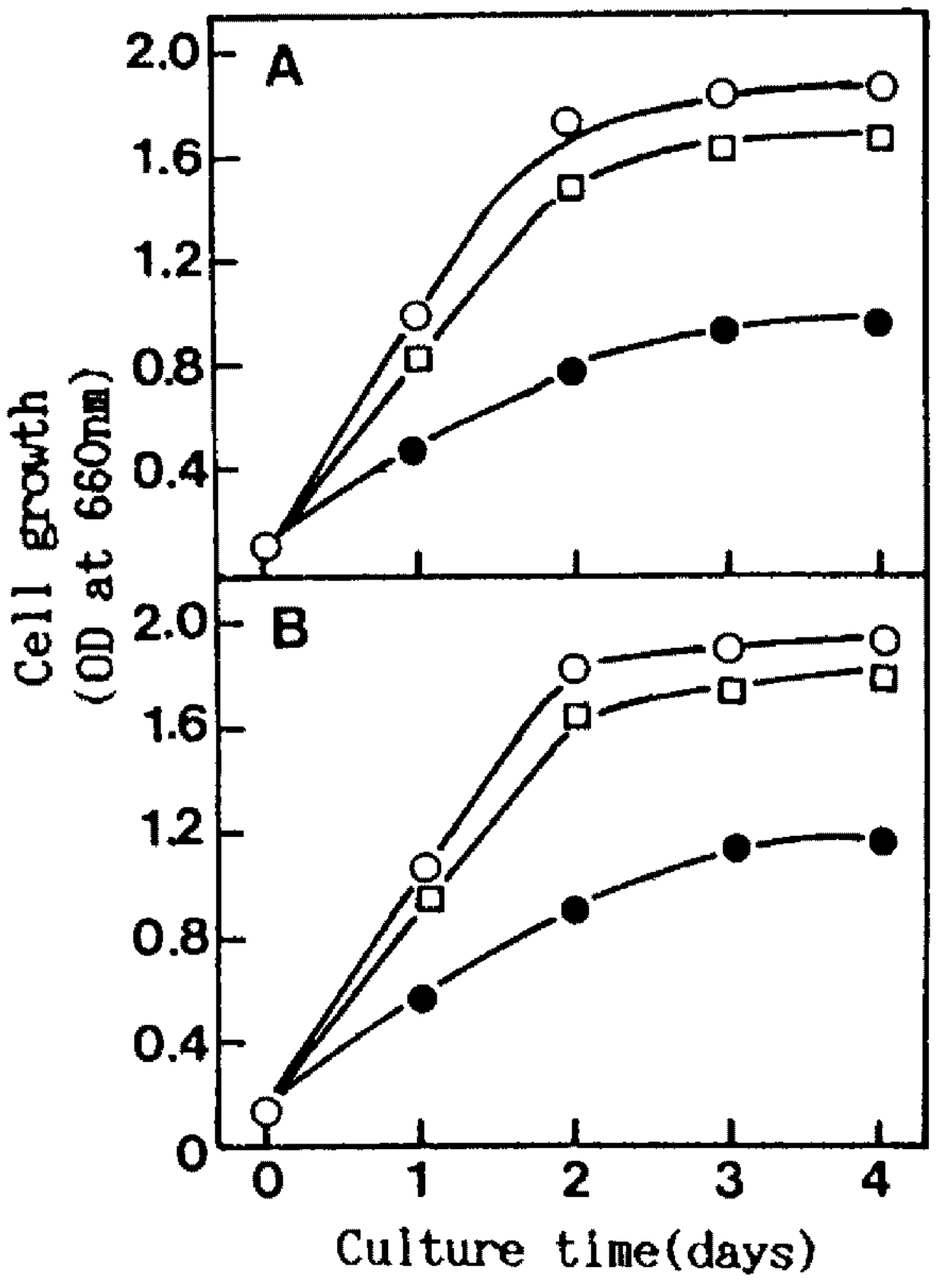

Fig. 7. Release of cysteine growth inhibition by a mixture of branched amino acids.
A: *Pseudomonas* sp. RP-222, B: *Pseudomonas* sp. MR-3966
○−○: Control, ●−●: 10 mM Cysteine, □−□: Cysteine+Isoleucine, Leucine and Valine(10 mM, repectively)

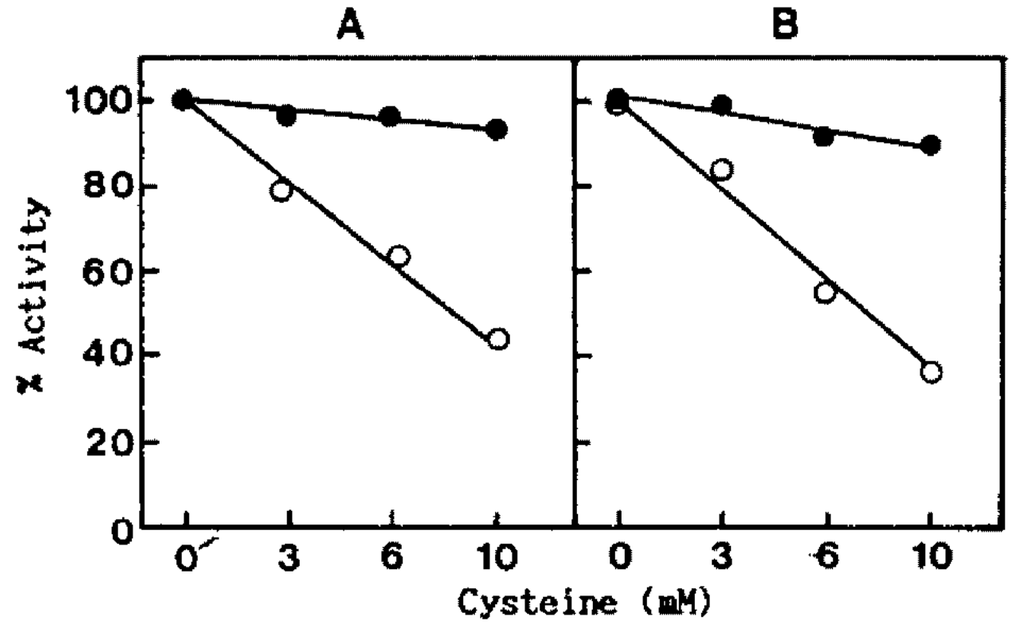

Fig. 8. Effect of cysteine on threonine deaminase(○) and transaminase B(●) activities from *Pseudomonas* sp. RP-222(A) and *Pseudomonas* sp. MR-3966(B).

Table 2. Effect of sulfur compounds on the growth and threonine deaminase of *Pseudomonas* sp. RP-222 and *Pseudomonas* sp. MR-3966

Compounds	Growth effect	Threonine deaminase activity(%)	
		RP-222	MR-3966
None	None	100.0	100.0
Cysteine	Inhibition	44.0	38.5
Homocysteine	Inhibition	47.4	45.1
Mercaptoethanol	None	100.0	100.0
Cystine	Slight inhibition	90.8	88.0

*The concentration of all compounds added was 6 m*l*.

deaminase와 마지막 반응단계의 촉매효소인 trassaminase B의 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 8). 그 결과 두 균주 모두 threonine deaminase 활성이 크게 저해를 받았는데 *Pseudomonas* sp. RP-222에서는 약 58%, *Pseudomonas* sp. MR-3966의 경우에서는 약 63%의 저해를 받았다. 그러나 transaminase B의 활성은 크게 저해를 받지 않은 것으로 보아 cysteine이 isoleucine 생합성 경로의 첫 단계 촉매효소인 threonine deaminase의 저해제로 작용함을 알 수 있었고, 따라서 cysteine이 생합성을 저해함으로써 균 생육 및 protease 생산을 저해하는 것으로 추정되었다.

Threonine deaminase 활성에 미치는 황화합물의 저해효과

Cysteine의 threonine deaminase에 대한 결합 특이성을 알아보기 위하여 황을 함유하는 화합물을 cell extract에 첨가하여 균 생육 및 threonine deaminase의 활성에 미치는 저해효과를 조사해 보았다(Table 2).

그 결과 cysteine과 가장 유사한 구조를 하고 있는 homocysteine이 가장 높은 저해효과를 보였으며 아미노산의 기본구조를 가지지 않는 mercaptoethanol의 경우에는 저해효과가 전혀 나타나지 않는 것으로 보아 cysteine의 threonine deaminase에 대한 결합 특이성을 알 수 있었다.

요 약

Protease 생산 미생물로서 분리되어진 *Pseudomonas* sp. RP-222와 그 변이주인 *Pseudomonas* sp. MR-3966을 이용하여 각종 아미노산의 첨가에 의한 균 생육 및 protease 생산에 미치는 저해효과를 조사하였다. 그 결과 두 균주 모두 cysteine에 의해 저해를 가장 크게 받는 것으로 나타났으며, cysteine의 첨가농도에 따른 저해효과는 첨가농도가 높을 수록 크게 나타났고 배양동안의 첨가시기는 대수증식기 중기에서 말기 사이가 가장 효과적임을 알 수 있었다. 한편,

cysteine이 함유된 배지에 isoleucine, leucine 및 valine과 같은 가지사슬 아미노산의 첨가가 cysteine에 의한 저해효과를 억제하였고, cysteine이 threonine deaminase의 활성을 크게 저해시키는 것으로 보아 threonine deaminase의 inhibitor로 작용함을 추측할 수 있었다. 그리고 cystein의 threonine deaminase에 대한 결합특이성을 조사해 본 결과 cysteine과 유사한 구조를 가지고 있는 황화합물이 균 생육 및 threonine deaminase의 활성을 크게 저해하였는데 그 가운데 cysteine과 가장 유사한 구조를 하고 있는 homocysteine이 가장 효과적이었다.

참고문헌

1. Glenn, A.R. 1976. Production of extracellular proteins by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **30**: 41-62.
2. De Felic, M., M. Levinthal, M. Iaccarino, and J. Guardiola. 1979. Growth inhibition as a consequence of antagonism between related amino acids: effect of valine in *Escherichia coli* K-12. *Microbiol. Rev.* **43**: 42-58.
3. Tatum, E.L. 1946. Induced biochemical mutations in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **11**: 278-284.
4. Leavitt, R.I. and H.E. Umbarger. 1962. Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. XI. Valine inhibition of the growth of *E. coli* strain K-12. *J. Bacteriol.* **83**: 624-630.
5. Umbarger, H.E. and B. Brown. 1958. Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. VIII. The formation of α-acetolactate. *J. Biol. Chem.* **233**: 1156-1160.
6. Brown, O.R. 1975. Failure of lipoic acid to protect against acute cellular oxygen toxicity in *Escherichia coli*. *Microbios.* **14**: 205-217.
7. Kari, C., Z. Naagy, P. Kovacs, and F. Hermadi. 1971. Mechanism of the growth inhibitory effect of cysteine on *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **68**: 349-356.
8. Villarejo, M. and J. Westley. 1966. Sulfur metabolism of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Acta.* **117**: 209-216.
9. Bhuvaneswaran, C., A. Sreenivasan, and D.V. Rege. 1964. Effect of cysteine on respiration and catalase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **92**: 504-508.
10. Maw, G.A. 1961. Effect of cysteine and other thiols on the growth of a brewer's yeast. *J. Inst. Brew. London.* **67**: 57-63.
11. Allen, E.H. and G.G. Hussey. 1971. Inhibition of the growth of *Heminthosporium carbonum* by L-cysteine. *Can. J. Microbiol.* **17**: 101-103.
12. Tomonaga, G., H. Ohama, and T. Yanagita. 1964. Effect of sulfur compounds on the protease formation by *Aspergillus niger*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **10**: 373-386.
13. Himelbloom, B.H. and H.M. Hassan. 1986. Effect of cysteine on growth, protease production, and catalase activity of *Psedomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 418-421.
14. Ha, S.W. 1992. Thesis for Master's Degree. Gyeongsang Natl. Univ.
15. Hull, M.E. 1974. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J. Dairy Sci.* **30**: 881-884.
16. Ratzkin, B., S. Arfin, and H.E. Umbarger. 1972. Isolecine and metabolism in *Escherichia coli*. XVIII. Induction of acetohydroxy acid isomeroreductase. *J. Bacteriol.* **112**: 131-141.
17. Duggan, D.E. and J.A. Wechsler. 1973. An assay for transaminase B enzyme activity in *Escherichia coli* K-12. *Anal. Biochem.* **51**: 67-79.
18. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **277**: 680-685.
19. Harris, C.L. 1981. Cysteine and growth inhibition of *Escherichia coli*: Threonine deaminase as the target enzyme. *J. Bacteriol.* **145**: 1031-1035.
20. Rho, J.S. 1992. Thesis for Ph. Doctor's Degree. Gyeongsang Natl. Univ.

(Received July 8, 1993)