

Halomonas sp. ES-10균주가 생산하는 효소세제용 알칼리성 Protease

김찬조 · 이재숙 · 최성현 · 오만진*

충남대학교 식품공학과

Enzyme Detergent Using Alkaline Protease Produced by *Halomonas* sp. ES-10. Chan Jo Kim, Jae Sook Lee, Seong Hyun Choi and Man Jin Oh*. Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea - To utilize the alkaline protease produced by *Halomonas* sp. ES-10 as an enzyme detergent, the crude enzyme was obtained by methanol precipitation and lyophilization. And it was processed to coated enzyme. The best mixing ratio of components such as coated enzyme, builders, actives, fillers and adjuvants on detergency was examined, and temperature and pH influencing detergency were also tested. Detergency test of 0.15% detergent solution was carried out on EMPA test cloth #116 with shaking(90 rpm) for 10 min after 30 min of pretreatment. The detergent which contained coated-enzyme 1%, Zeolite 4A 20%, Tween 80 1.5%, sodium borate 30%, sodium meta silicate 7.5% and water 40% showed about 90% of washing efficiency at 40°C and pH 10.0.

최근 특수 환경 하의 미생물에 대한 관심이 높아져 온 및 저온성, 호염성, 호산성과 호알칼리성의 미생물에 관한 연구에 관심이 모아지고 있다(1). 호알칼리성 미생물의 검색과 이용에 대한 연구가 진행됨에 따라 종래의 일반 효소와는 다른 성질을 지닌 많은 효소를 발견하게 되어 각종 호알칼리성 효소에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(2). 알칼리성 protease에 관한 연구는 1960년대 말부터 시작되어(3) 각종 곰팡이(4, 5), 세균(6, 7) 방선균(8), 누에 유충(9)으로 부터 생산되는 것이 밝혀졌고, 이러한 미생물의 동정, 효소 분리, 효소생산 조건, 효소의 정제 및 특성, 그리고 분자육종(10)에 관한 연구가 다각도로 이루어지고 있다. 알칼리성 protease의 산업적 이용으로는 세제용, 피혁가공, 의약품 등으로 널리 사용되어지고 있으며, 현재 세제용 알칼리성 protease가 유럽, 미국, 일본 등 각국에서 생산되어 이용되므로써 이 효소의 용도 중 가장 많은 비율을 차지한다.

세제에 첨가하기 위한 protease의 조건은 pH 9~11의 강알칼리 조건에서 작용하며, 계면활성제, 형광염료, 표백제 및 향료 등 세제 보조성분에 의한 실활이 적으며, 비교적 저온의 세탁온도에서 활성이 유지되어야 한다. 또한, 단백질 내부의 peptide 결합을 절단하는 작용이 우수하여야 하며 여러 종류의 단백질에 잘 작용하여 기질 특이성이 낮아야 한다.

필자 등은 알칼리성 protease를 생산하는 호알칼리성 세균을 오징어젓갈에서 분리하여 그의 균학적 성질을 조사하고 이 균이 생산하는 알칼리성 protease의 생산 조건

및 그 정제효소의 성질에 대하여 발표한 바 있다(11, 12). 본 연구에서는 이 알칼리성 protease를 세제용으로 사용하기 위하여 조효소의 coating에 따르는 효소력 측정, 각종 세제성분과 세척조건에 따른 세척력을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

조효소의 생산

Alkaline protease를 생산하기 위하여 10l의 jar fermenter에 Norberg와 Hopsten의 액체배지(yeast extract 0.1%, gelatin 1.0%, KCl 0.5%, MgSO₄·7H₂O 1.0% 및 NaCl 1.0M, pH7.0)(13) 8l를 넣고 충남대학교 식품공학과에서 분리하여 동정한 *Halomonas* sp. ES-10 균주(11)를 접종하여 20°C에서 86시간 배양한 후 원심분리(8,000×g, 10 min)로 균체를 제거하고 상정액에 methanol을 1~3배 가하여 다시 원심분리(8,000×g, 30 min)로 조효소를 침전시켜 회수하고 -40°C로 급속동결시킨 후 건조하여 보관하였다.

조효소의 coating

영국특허(14)에 따라 조효소 분말 25%, dextrin 10%, cellulose 5%, polyethylene glycol 6000 6% 및 무수황산나트륨 54%의 무게비율로 혼합하고 8%의 물을 추가로 가하여 잘 녹인 다음 cellophane film에 얇게 편 후, 자연 건조하여 조효소를 coating시켰다.

세척력 측정

Coating된 조효소 1%와 세제성분, 증량제, 세척보조제

*Corresponding author

Tel. 82-42-821-6728, Fax. 82-42-821-6728

Key words: Enzyme detergent, Alkaline protease, *Halomonas* sp.

등의 조합비율을 달리하여 만든 효소세제를 0.15%로 사용하였으며 같은 조건에서 3회 반복실험하였다. 즉 한국공업규격 M 2074를 참고하여 인공오염포 EMPA test cloth #116 (milk 46.5%, blood 46.5% 및 indian ink 7.0%로 오염처리됨, Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research사)를 사용해서 25°C에서 30분 예침시키고 Launder-o-meter(한원상사)에 의하여 90 rpm으로 10분간 세척한 후 EMPA #116오염포를 100 ml의 증류수에서 1분간씩 흔들어 3회 씻은 후 풍건하였다. CCM(Computer Color Matching, Milton Roy, USA)를 이용하여 오염포의 표면반사율을 측정하고 다음의 식에 따라 세척력을 계산하였다.

$$\text{세척력(\%)} = \frac{R_w - R_s}{R_o - R_s} \times 100$$

(R_w , 세척 후 EMPA의 표면반사율; R_s , 인공오염 EMPA의 표면반사율; R_o , EMPA 원포의 표면반사율)

Savinase 6. OT와의 세척력 비교

Halomonas sp. ES10이 생산한 조효소와 Savinase 6. OT(Novo사)를 이용하여 효소세제를 조제하고 protease활성(11) 및 세척력을 측정 비교하였다.

각종 세제 첨가성분의 검토

Builders Zeolite 4A, Sodium polyacrylate 및 sodium tripolyphosphate를 각각 0, 10, 20, 30 및 40%와 coating된 조효소를 1%씩 첨가하여 만든 효소세제를 0.15%의 농도로 세척실험을 하고 오염포의 표면반사율을 측정하여 세척력을 계산하였다.

Actives Zeolite 4A 20%와 coating된 조효소 1%에 sodium dodecyl benzen sulfonate(DBS) 0~0.05%와 polyethylene sorbitan(Tween 80)을 각각 0~2.0%씩 가하여 만든 효소세제의 세척력을 측정하였다.

Fillers Zeolite 4A 20%, coating된 조효소 1%, DBS 0.03% 혹은 Tween 80 1.5%를 조합한 것에 sodium borate 혹은 sodium sulfonate를 각각 0~40%로 가하여 만든 효소세제의 세척력을 측정하였다.

Adjuvant Zeolite 4A 20%, coating된 조효소 1%, DBS 0.03% 혹은 Tween 80 1.5%, sodium borate 30%를 조합한 것에 sodium meta silicate를 0~10% 농도로 가하여 만든 효소세제의 세척력을 측정하였다.

세척 조건 검토

효소세제의 성분검토에서 최적 조성(Zeolite 4A 20%, coating된 조효소 1%, DBS 0.03% 혹은 Tween 80 1.5%, sodium borate 30% 및 sodium meta silicate 7.5%)으로 만든 효소세제의 온도, pH 및 세척시간 등의

조건을 검토하였다. 이때 온도는 20~50°C까지 조정하고 pH는 1M HCl과 NaOH로 pH 8.0~11.0까지 조정하여 검토하였으며 세척시간은 오염포를 40°C 세척용액에 30분 예침시킨 후 0~20분간 진탕시키고 세척력을 측정하여 검토하였다. 또한 세제에 coating된 효소제를 0~1.5%까지 첨가하여 40°C에서 10분간 측정하여 최적 효소농도를 조사하였다.

유효 기간

Coating된 조효소와 무처리 조효소에 Zeolite 4A 20%와 세척보조제 등을 최적량으로 혼합하여 15일 간격으로 6개월간 protease의 활성을 측정하여 그 안정성을 측정 비교하였다.

α -Amylase 및 lipase의 활성

조효소액 중의 α -amylase의 활성은 김 등(15)의 방법에 준하여 측정하였으며, lipase의 활성은 olive oil을 기질로 하여 Linfield 등(16)의 방법을 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

조효소의 생산

Halomonas sp. ES-10의 배양액 15l에 methanol을 1~3배를 가하여 침전시키고 동결건조한 결과 protease의 비활성도(unit/mg)가 70.6이 되는(12) 4g의 조효소분말을 얻을 수 있었다.

Coating된 조효소에 의한 세척력

Halomonas sp. ES-10 균주는 배양 온도가 20°C로 저온이었고 생산성이 좋은 점, 호염성으로 잡균 오염 방지 효과가 좋은 점 그리고 작용 최적 온도가 낮은 점 등의 특성이 있었다(11). 영국특허(14)의 조성에 따라 *Halomonas* sp. ES-10이 생산한 조효소를 coating하여 그 활성을 측정한 결과 coating된 효소의 비활성이 무처리 효소의 비활성 보다 높게 나타났다. 이는 coating시 첨가된 각종 첨가제가 효소의 활성을 증가시킨 결과라고 생각된다. Savinase 6. OT(Novo사)와의 세척력 비교에서는 양자가 비슷하게 약 70%의 세척효과를 보였다.

세제 조성의 검토

Builders Coating된 조효소제에 각 builder를 가하여 조제한 효소세제의 세척력실험을 한 결과 Fig. 1과 같이 Zeolite 4A 20%의 첨가로 무첨가 대조구보다 약 6%, 그리고 sodium polyacrylate의 10% 첨가는 약 4%의 세척력을 높이는 효과를 보였다. Zeolite 4A는 비인산화합물로서 환경오염 문제가 적은 특징도 있다(17).

Actives Zeolite 4A 20%와 coating된 조효소 1%에

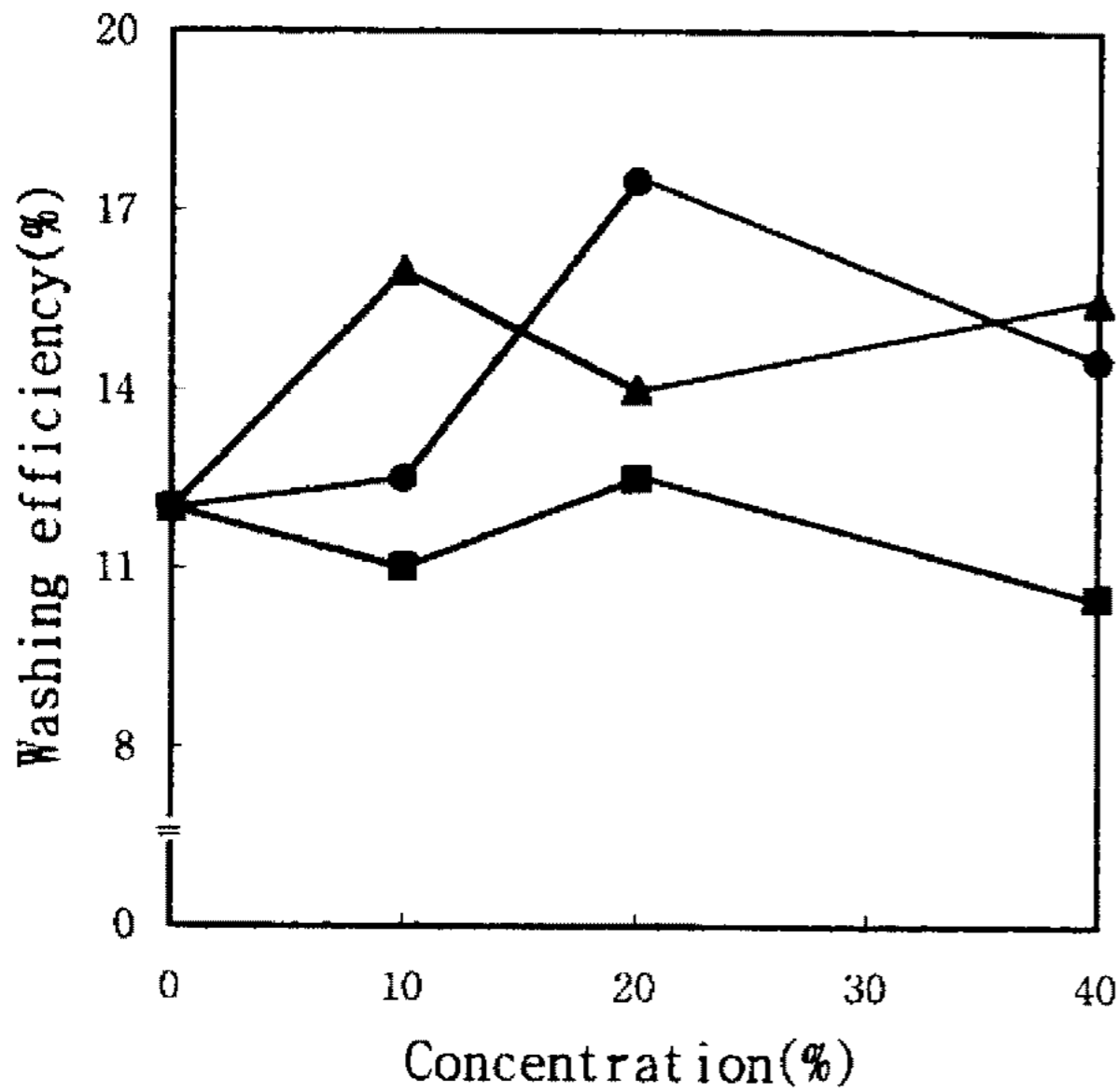


Fig. 1. Effects of the builders on the detergency of detergent solution(0.15%) for artificially soiled cloth, EMPA test cloth #116. (Detergent composition; each builder and 1% coated enzyme dissolved in water)
 -●-, Zeolite 4A; -▲-, sodium polyacrylate; -■-, sodium triphosphate

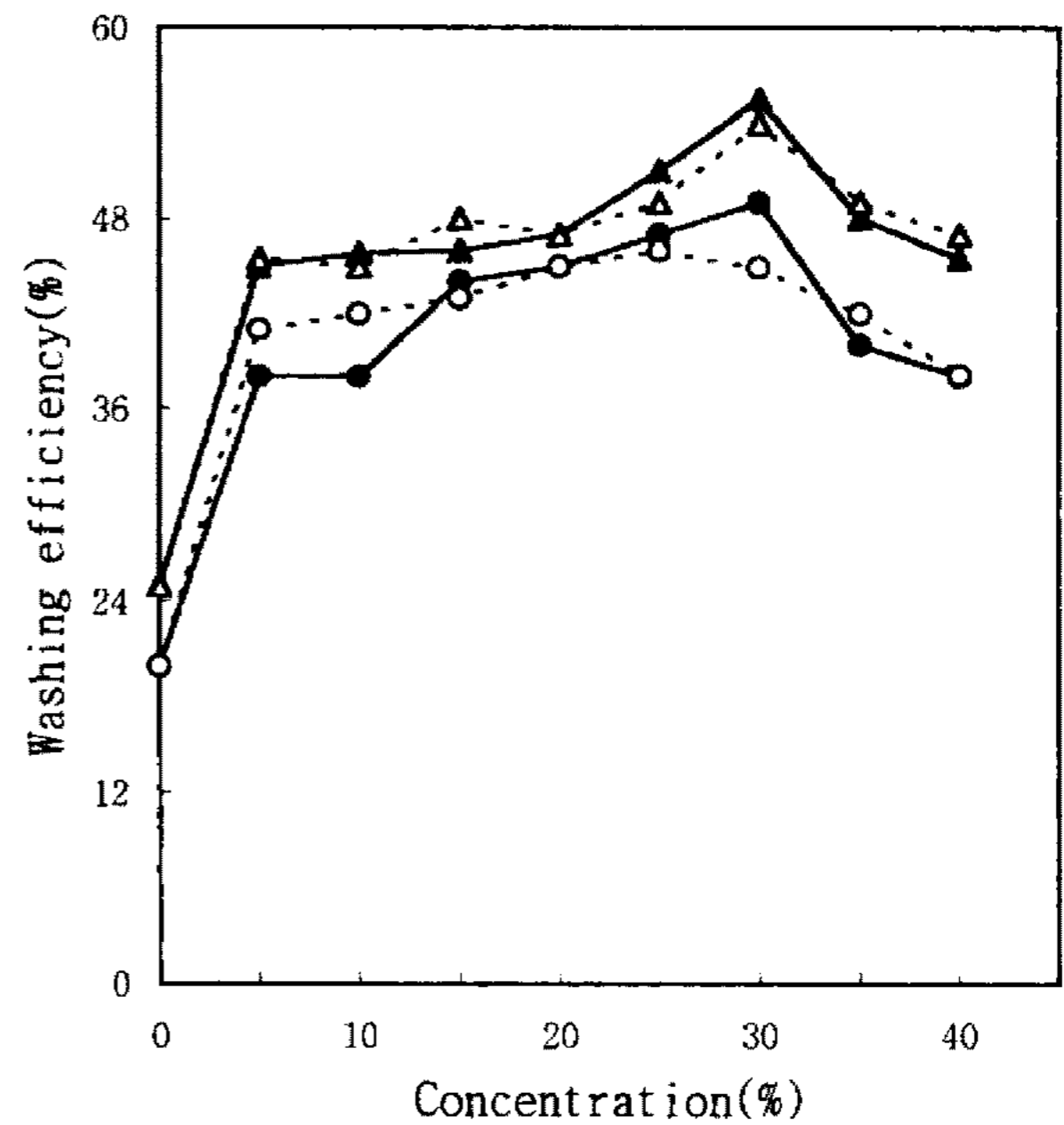


Fig. 3. Effects of fillers on the detergency of detergent solution(0.15%) for artificially soiled cloth, EMPA test cloth #116. (Detergent composition; each filler, 0.03% DBS or 1.5% Tween 80, 20% Zeolite 4A and 1% coated enzyme dissolved in water)
 -●-, sodium borate(DBS); -○-, sodium sulfate(DBS); -▲-, sodium borate(Tween 80); -△-, sodium sulfate(Tween 80)

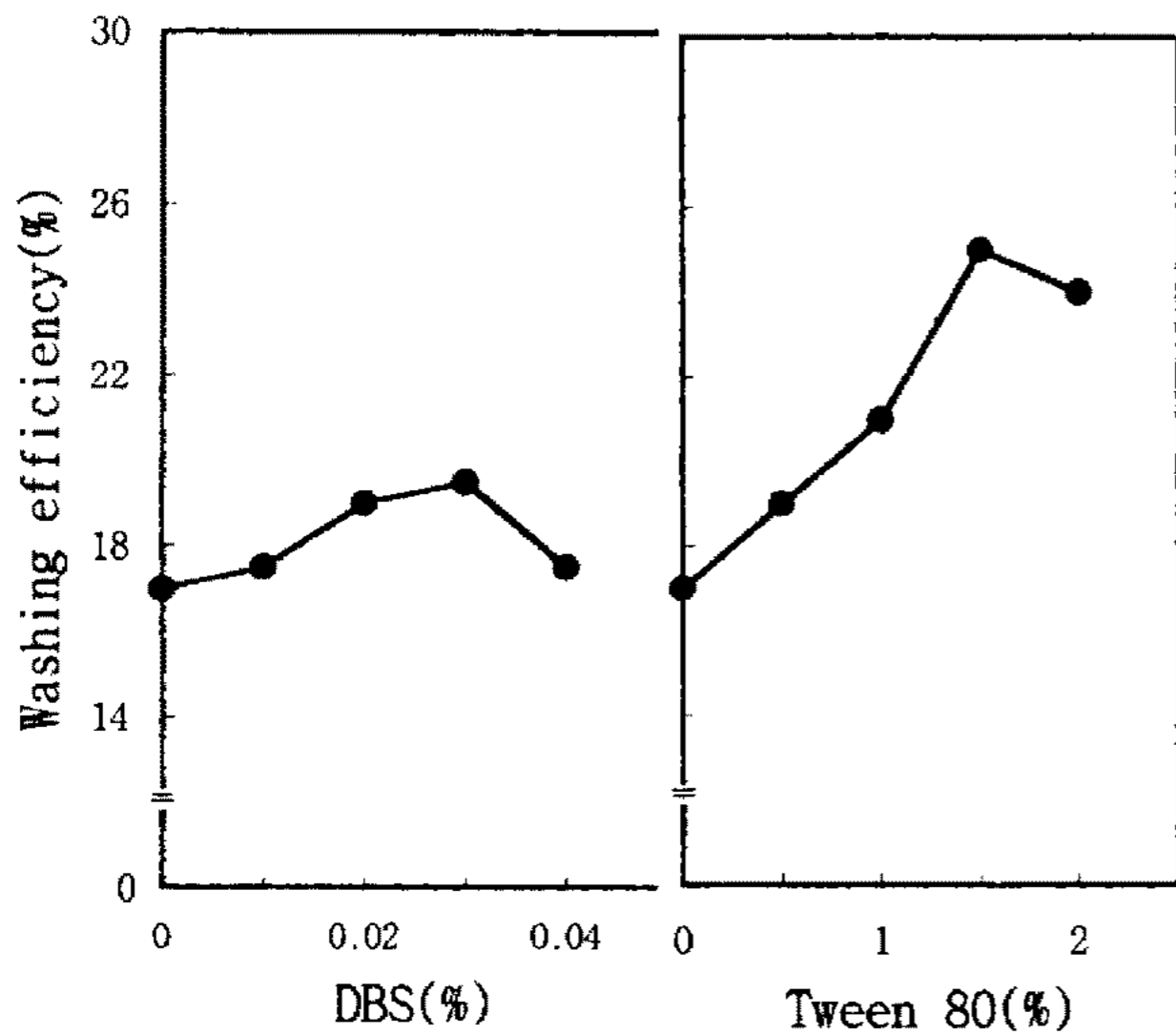


Fig. 2. Effects of actives on the detergency of detergent solution(0.15%) for artificially soiled cloth, EMPA test cloth #116. (Detergent composition; each active, 20% Zeolite 4A and 1% coated enzyme dissolved in water)

계면활성제인 DBS 혹은 Tween 80을 각각의 농도별로 첨가한 효소세제의 세척력 실험에서 Fig. 2와 같이 DBS는 0.03%의 첨가시 무첨가 대조구에 비해서 약 3%, Tween 80은 1.5%의 첨가로 약 8%의 세척력이 증가됨을 보여, Tween 80의 첨가가 DBS보다 우수하였다. 그리고 최근 DBS는 환경오염 문제로 사용이 금지되고 있다.

Fillers Zeolite 4A 20%, coating된 조효소 1%, DBS 0.03% 혹은 Tween 80 1.5%에 sodium borate와 sodium sulfonate를 각 농도별로 첨가하여 세척력에 미치

는 영향을 측정한 결과는 Fig. 3과 같이 sodium borate와 sodium sulfonate에 관계없이 Tween 80 시험구가 DBS 시험구보다 높았으며, 이들을 각각 15% 첨가에서는 약 45~50% 그리고 30%첨가에서는 약 50~55%의 세척력을 보였다.

Adjuvant Zeolite 4A 20%, coating된 조효소 1%, DBS 0.03% 혹은 Tween 80 1.5%, sodium borate 30%에 adjuvant를 각 농도별로 첨가한 후 세척력 실험을 한 결과는 Fig. 4와 같이 Tween 80 시험구에서 sodium meta silicate 7.5%를 첨가함으로써 세척력을 약 80%까지 올릴 수 있었다.

세척 조건

온도 위에서와 같이 검토된 최적 조성의 효소세제 (Zeolite 4A 20%, coating된 조효소 1%, DBS 0.03% 혹은 Tween 80 1.5%, sodium borate 30% 및 sodium meta silicate 7.5%)를 0.15% 농도로 만든 세척액에 오염포를 넣고 각 온도에서의 세척력을 측정한 결과는 Fig. 5와 같이 Tween 80을 1.5% 넣은 실험구는 30°C에서 약 80%, 40°C에서 약 90%의 세척력을 보였다. 조(18)는 세척 온도에 따른 섬유직물의 세척력을 측정한 결과 면의 경우 60°C까지 온도의 증가가 세척율의 증대를 가져왔고 폴리에스터와 나일론 등의 섬유는 40°C에서 세척력이 가장 좋았으며 일반적으로 모든 이화학적 변화

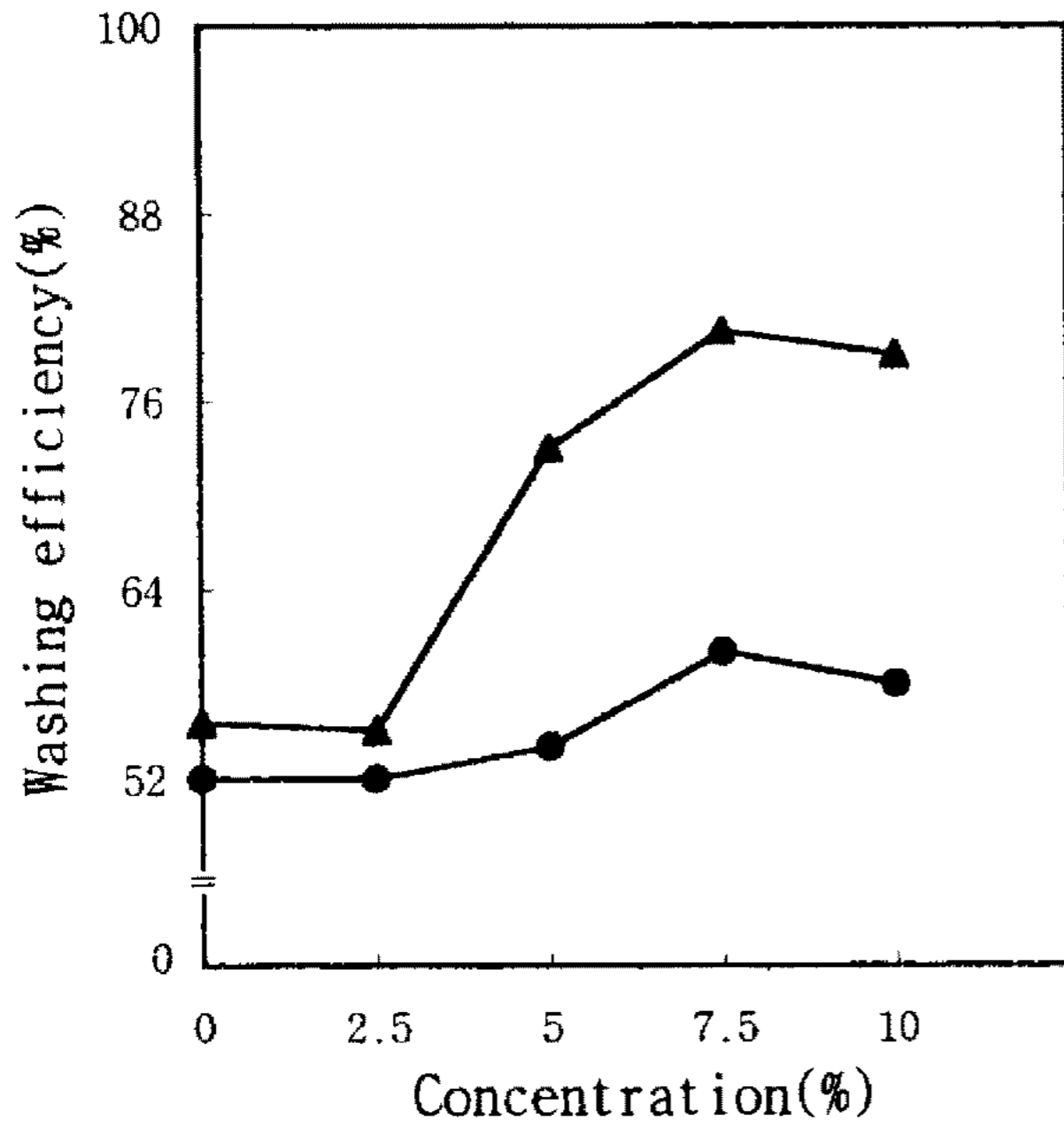


Fig. 4. Effect of adjuvant on the detergency of detergent solution(0.15%) for artificially soiled cloth, EMPA test cloth #116. (Detergent composition; each adjuvant, 30% sodium borate, 0.03% DBS or 1.5% Tween 80, 20% Zeolite 4A and 1% coated enzyme dissolved in water)
 -●-, sodium meta silicate(DBS); -▲-, sodium meta silicate (Tween 80)

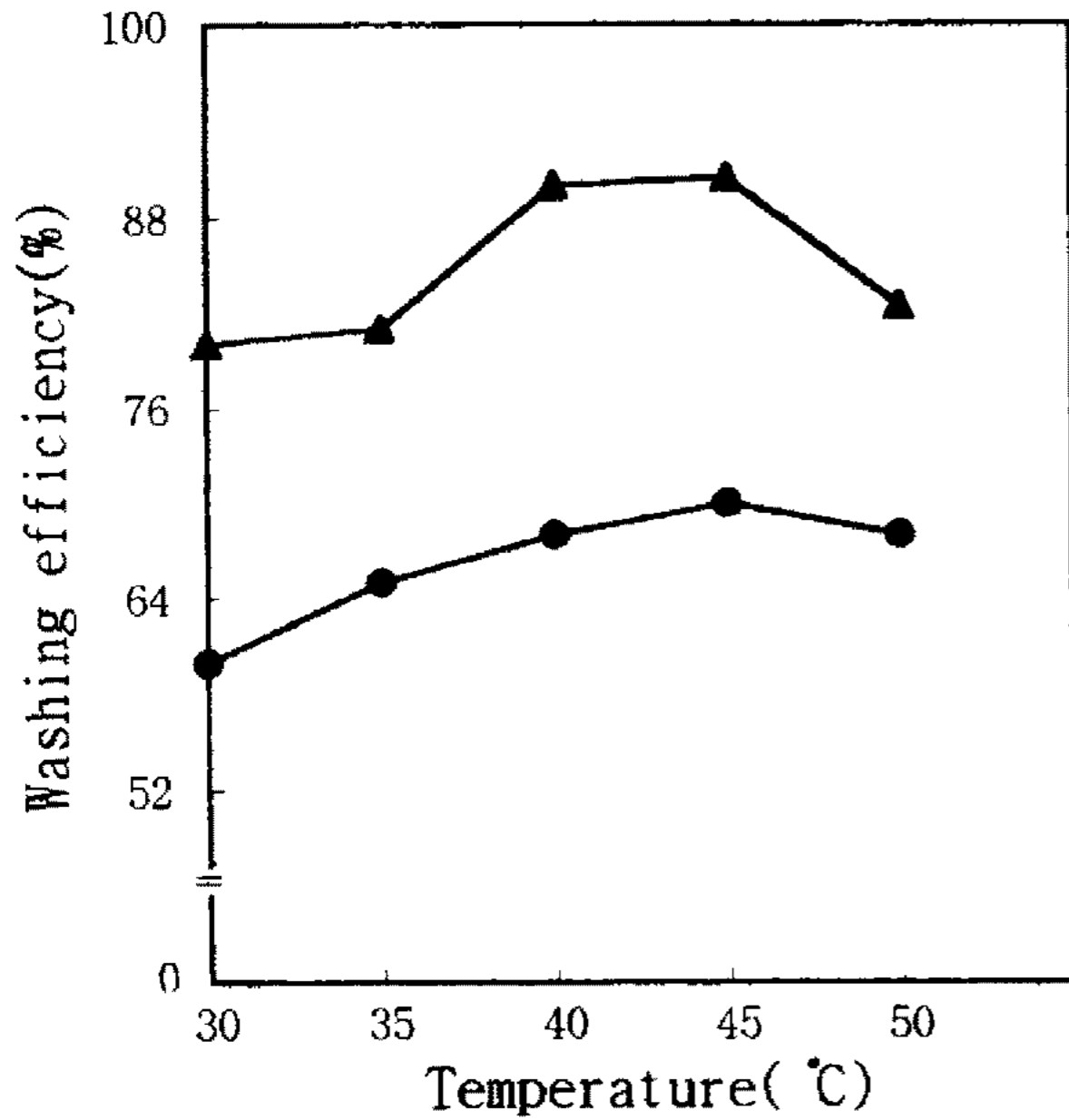


Fig. 5. Effect of the washing temperature on the detergency of detergent solution(0.15%) for artificially soiled cloth, EMPA test cloth # 116. (Detergent composition; 7.5% sodium meta silicate, 30% sodium borate, 0.03% DBS or 1.5% Tween 80, 20% Zeolite 4A and 1% coated enzyme dissolved in water)
 -●-, DBS; -▲-, Tween 80

는 온도가 상승함에 따라 촉진되는 것이 보통이나 세척 온도의 상승은 섬유 및 세제의 종류에 따라 다르며 반드시 세척효과를 상승시키지 않는다고 하였다.

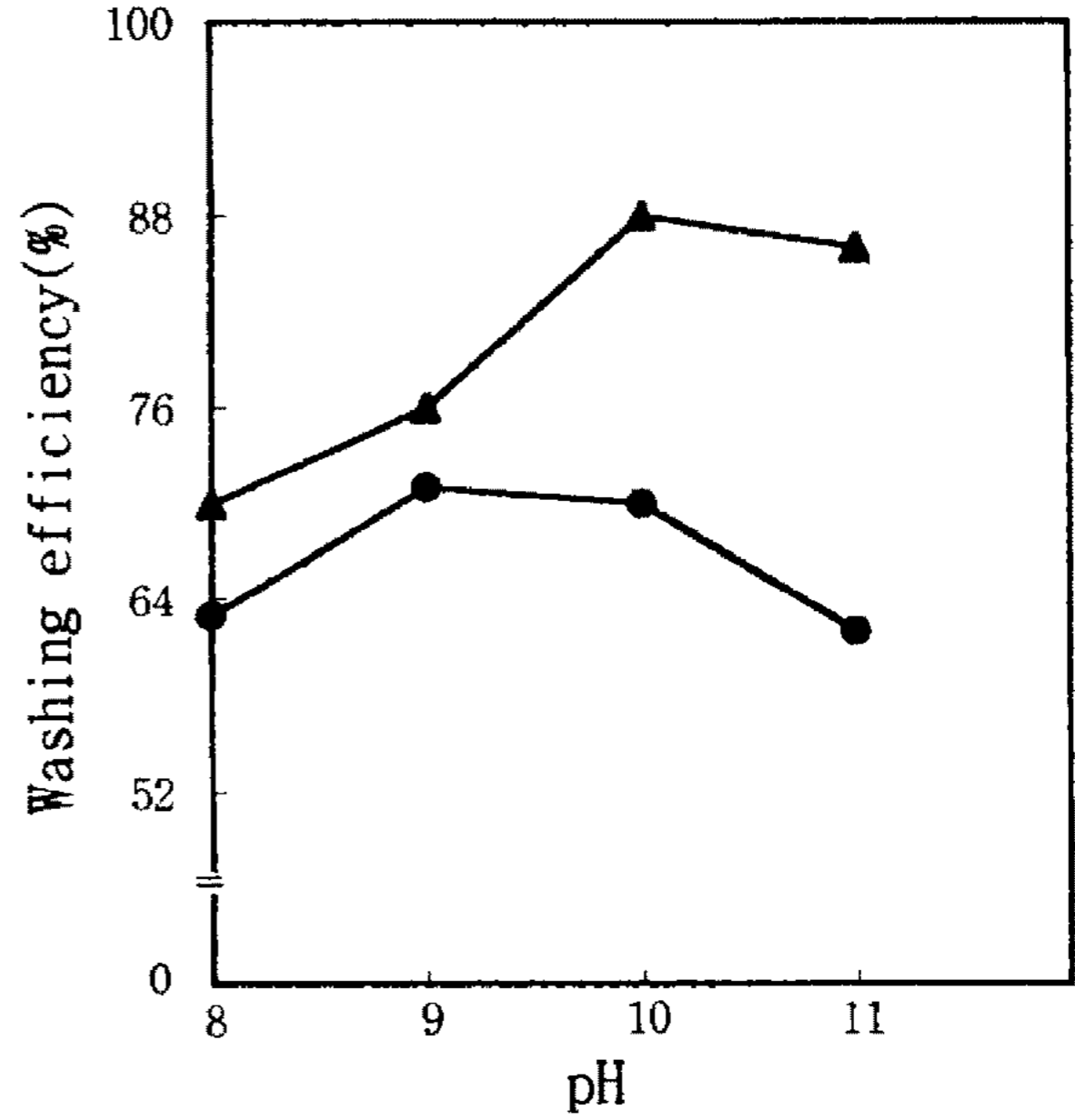


Fig. 6. Effect of the pH on the detergency of detergent solution(0.15%) for artificially soiled cloth, EMPA test cloth # 116. (Detergent composition; same as Fig. 5)
 -●-, DBS; -▲-, Tween 80

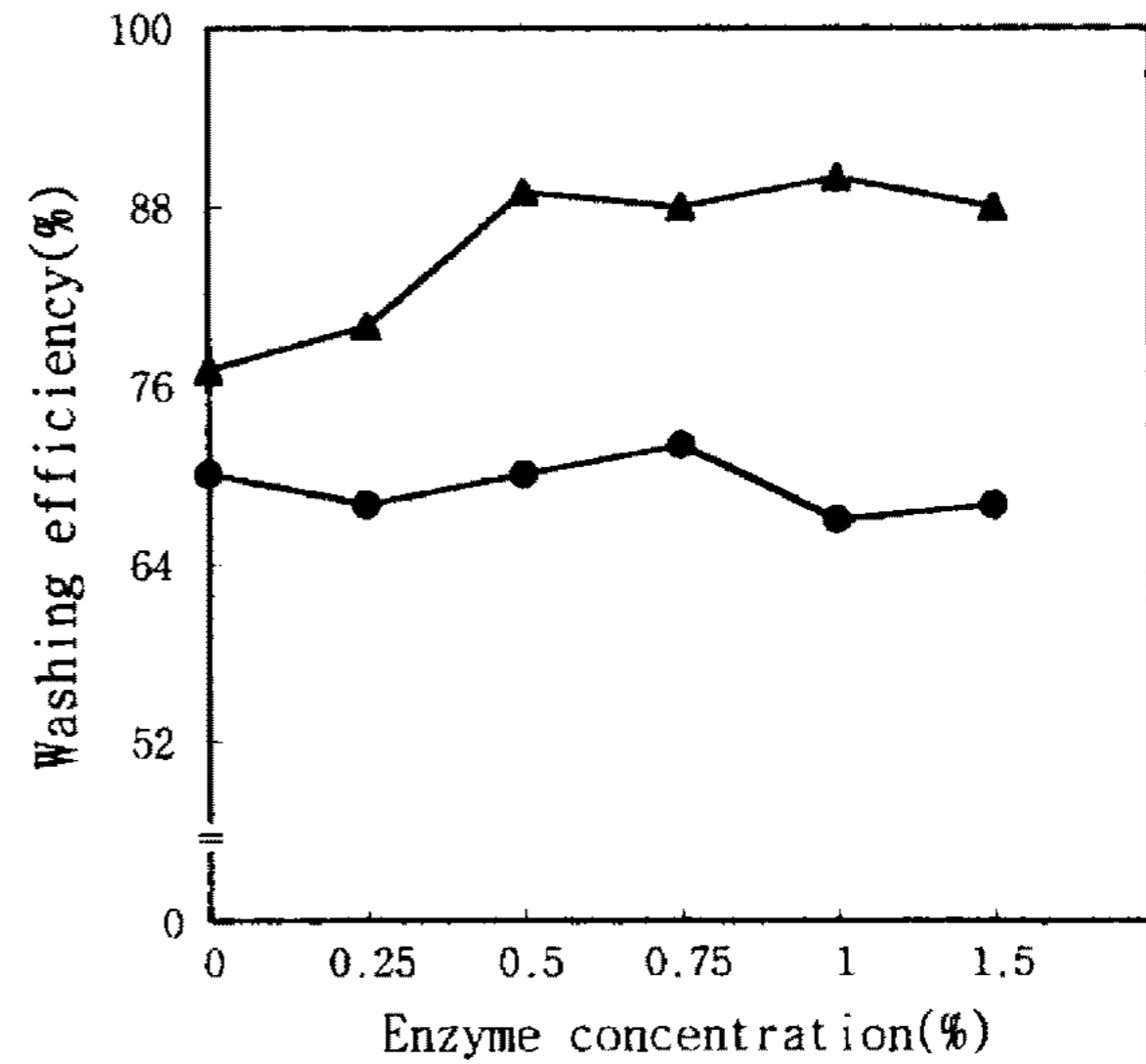


Fig. 7. Effect of the coated enzyme concentration on the detergency of detergent solution(0.15%) for artificially soiled cloth, EMPA test cloth # 116. (Detergent composition; same as Fig. 5)
 -●-, DBS; -▲-, Tween 80

pH 세척액을 pH 8.0~11.0까지 조정하여 세척력을 측정한 결과는 Fig. 6과 같이 Tween 80을 1.5% 첨가한 실험구에서 pH 9.0일 때 약 75%, pH 10.0~11.0일 때 약 87% 정도의 세척력을 보여 이 효소세제는 강한 알칼리성 하에서도 높은 세척력을 가지는 것을 알 수 있었다.

시간 40°C 세제액에 오염포를 30분 예침시킨 후 세척 시간을 달리하여 세척력을 측정한 결과 5~20분 까지 세척력은 약 88%로 큰 차이가 없었다.

조효소제의 첨가 농도 효소세제 중 coating된 조효소

제의 첨가 비율을 0~1.5%까지 달리하여 40°C에서 10분간 세척력을 측정된 결과는 Fig. 7과 같이 0.5~1.5%의 첨가에서는 비슷하였다. Tween 80을 사용한 구에서는 약 90%의 세척력을 보였으며 DBS 첨가구에서는 효소에 의한 세척효과를 인정할 수 없었다. 이는 Sato 등(17)의 보고와 같이 DBS에 의한 효소활성의 저해에 의한 것으로 생각된다.

효소의 유효 기간 Coating한 효소와 무처리 효소에 Zeolite 4A를 20% 첨가하여 15일 간격으로 효소 활성을 측정하고 그 안정성을 검토한 결과 6개월 경과까지 효소 활성에 변화가 없어 본 효소는 안정성이 비교적 좋은 효소로 생각되었다.

Halomonas sp. ES-10의 α -amylase 및 lipase의 활성 α -Amylase 및 lipase의 활성을 측정된 결과 이 두 효소의 활성은 없었다.

요 약

Halomonas sp. ES-10균주가 생산하는 알칼리성 protease를 효소세제에 응용하고자, 조효소를 얻어 coating하고 coating된 조효소 분말과 기타 세척보조제 등의 함유비를 달리하여 세척효과와 아울러 온도 및 pH 등을 검토하여 최적 비율과 조건을 설정하였다. 효소세제 성분의 비율은 coating된 조효소 1%, Zeolite 4A 20%, Tween 80 1.5%, sodium borate 30%, sodium meta silicate 7.5% 및 물 40%였으며, 세척조건은 40°C와 pH 10.0이었다. 0.15%의 세제용액에 인공오염포(EMPA test cloth # 116)를 30분간 예침하고 90 rpm에서 10분간의 진탕세척으로 약 90% 정도의 세척효과를 보였다.

감사의 말

본 연구는 1993년도 한국과학재단의 연구비지원(921-1500-031-2)에 의해 수행되었으며 이에 감사드리고, 아울러 실험수행에 도움을 준 (주)태평양 안산공장 이성구 과장에게도 심심한 사의를 표합니다.

참고문헌

- Edwards, C. 1990. *Microbiology of Extreme Environments*, Pp. 147-177. McGraw-Hill publishing company, New York.
- Kamekura, M. and H. Onish. 1974. Halophilic nuclease from a moderately halophilic *Micrococcus varians*. *J. Bacteriol.* **119**: 339-344.
- Hayashi, K., M. Terada and K. Mogi. 1970. Enzymatic properties of purified alkaline proteinase from *Aspergillus sojae*. *Agric. Biol. Chem.* **34**: 627-637.
- Ohara, T. and S. Nasuno. 1972. Enzymatic properties of alkaline proteinase from *Aspergillus candidus*. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 1797-1802.
- Abbas, C. A., S. Groves and J. E. Gander. 1989. Isolation, purification and properties of *Penicillium charlesii* alkaline protease. *J. Bacteriol.* **171**: 5630-5637.
- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1407-1414.
- Kato, N., T. Nagasawa, S. Adachi, Y. Tani and K. Ogata. 1972. Purification and properties of proteases from a marine-psychrophilic bacterium. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 1185-1192.
- Nakanishi, T., Y. Matsumura, N. Minamiura and T. Yamamoto. 1974. Purification and some properties of an alkalophilic proteinase of a *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 37-44.
- Sasaki, T., M. Morishita and M. Ise. 1985. Cleavage site specificities of silkworm alkaline proteases. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 2707-2710.
- Gazzo, J., M. Murgier, A. Filloux and A. Lazdunski. 1990. Cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease gene and secretion of the protease into the medium by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 942-948.
- 김찬조, 김교창, 오만진, 최성현. 1991. *Halomonas* sp. ES 10에 의한 alkaline protease의 생산. *한국농화학회지* **34**: 307-311.
- 김찬조, 오만진, 최성현. 1992. *Halomonas* sp. ES 10이 생산하는 alkaline protease의 특성. *한국농화학회지* **35**: 237-241.
- Norberg, P. and B. V. Hofsten. 1969. Proteolytic enzyme from extremely halophilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **55**: 251.
- Patent specification 1362356. Courier Press, Leamington Spa, 1974. Patent Office, London.
- 김진구, 신승렬, 김광수, 손태화. 1988. 맥아의 α -amylase isozyme에 미치는 red light의 영향. *한국농화학회지* **31**: 351-355.
- Linfield, W. M., S. Serota and L. Sivieri 1985. Lipid-lipase interactions. 2. A new method for the assay of lipase activity. *JAOCs.* **62**: 1152-1154.
- Sato, M., K. Yoshikawa and M. Minagawa. 1990. The effect of builders on the activity of protease enzymes. *JAOCs.* **67**: 711-716.
- 조성교. 1979. 세제의 종류 및 세척 온도에 따른 각종 섬유질의 세척성. *한국의류학회지* **3**: 49-56.

(Received 21 July 1996)