

Serratia 배양에 의한 Serrapeptase 생성의 유도과 억제에 관한 연구

노 용 택

영동공과대학교 생명공학부 유전공학전공

Studies on the Induction and Repression of Serrapeptase in *Serratia* Culture. Yong-Taik Rho. Genetic Engineering/Faculty of Life Engineering, Institute of Yondong Technology, Chungbuk, 370-800, Korea - It was studied in order to improve the yield of serrapeptase production in fermentation that organic nitrogen sources play important roles not only as inducer, repressor and activator, but also nitrogen sources. From the investigation of the effect of Na-caseinate on the induction of serrapeptase production, it was elucidated that real inducer was leucine and strong repressor was cysteine, which were produced through hydrolysis of proteins. Serrapeptase production was strongly induced by Na-caseinate in culture time 12 hrs, but was weakly induced before and after that time. Therefore fed batch culture where partial amount of Na-caseinate is added in 12 hrs, is better than batch culture where total amount of Na-caseinate is added at the beginning. Cysteine, methionine, MgSO₄ and so on, sulfur-containing materials, repressed the serrapeptase production. In the addition of mineral salts, chlorinated salts is better than sulfated salts because of sulfur repression. The synergic effect of soybean meal with Na-caseinate on the serrapeptase production resulted from Mn²⁺ contained in soybean meal, of which the optimal concentration is 4 mM in enzyme production.

미생물 유래 단백분해효소는 산업적으로 세제, 유제품 가공, 피혁가공, 연육제, 의약품 등에 널리 이용되고 있다(1-5). *Serratia marcescens* ATCC 21074는 *Serratia piscatorium* 또는 *Serratia* sp. E-15로도 잘 알려져 있는 그람음성, 장내세균인데 분자량 50 kd의 단백분해효소를 생합성하여 세포외로 분비할 수 있다. *Serratia marcescens* ATCC 21074는 비단실을 만드는 누에의 장내에서 분리되었으며(6), 그 미생물이 만드는 단백분해효소를 처음에는 serratiopeptidase라 했고 근래에는 serrapeptase로 명명하고 있다(7). serrapeptase는 metalloprotease로 효소활성을 위해서는 Zn²⁺을 요구하며, fibrin 분해능 및 inflammatory peptide인 bradykinin, histamin에 대한 가수분해능 때문에 소염효소제로 널리 이용되고 있다(8). 이 효소에 대한 생화학적 특성은 최근까지 잘 연구되었으며, 최적온도는 30℃, 최적 pH는 9.0로 semi-alkaline protease로 알려져있다. 그 배양조건 및 대사조절에 대해서도 많은 연구가 진행되어 생산성이 많이 높아지기도 했다. yeast extract이 유기질소원으로 좋았고, glycerol이 catabolite repression을 나타냈으며, 효소분비 과정에서 단백질 processing이 일어난다고 보고되고 있다(9-13). 본 연구에서는 Serrapeptase의 발효시 생합성에 영향을 미치는 인자가운데 유도원(inducer), 억제

원(repressor), 활성원(activator) 등에 대한 효과를 조사하여 그 응용에 대해 검토하였다. 배지 성분내 생합성 조절인자에 대한 연구에 대한 보고가 있기는 하지만 배양학적, 발효학적 관찰이 대부분이고 생화학적 분자 수준의 규명은 미흡한 실정이었다(14).

본 연구에서는 Serrapeptase 발효생산시 유도원(inducer) 또는 억제원(repressor)으로 작용하는 유기질소원의 종류 및 상승효과(synergic effect), 아미노산들의 역할, 효소생합성의 조절 시기를 조사하고, 유가식 유도원 첨가에 의한 효소 발효의 생산성 향상을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주와 배양조건

Serratia marcescens ATCC 21074에 돌연변이 유도제인 nitrosoguanidine(NTG)을 처리 하여 고역가 돌연변이주인 *Serratia marcescens* YIT-1를 얻어서, 본 연구의 균주로 사용하였다(15).

배양은 500 ml 진탕플라스크에 배지 50 ml를 넣고 30℃, 150 rpm으로 진탕기에서 배양하였다. 5 l 발효조(한국발효기(주))에 배양할 경우 3 배지를 넣고, 30℃, 500 rpm, 1.0 vvm으로 배양하였다.

배지 조성

종균배지는 glucose 20 g, 10 g peptone, 10 g yeast extract, 5 g NaCl을 증류수 1 l에 녹여서 만든 복합배지

*Corresponding author

Tel. 82-414-40-1113, Fax. 82-414-40-1109

E-mail: rhosong@hitel.kol.co.kr

Key words: *Serratia marcescens*, Serrapeptase, Induction, Repression

를 사용하였다(pH 7.0). 본 발효 배지는 Miyata(6)배지를 변형하여 glucose 20 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5 g, KCl 0.5 g, NaCl 1 g, CaCl_2 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, KH_2PO_4 2 g, K_2HPO_4 4 g를 증류수 1 l에 녹여 만든 합성배지를 사용하거나(pH 7.0), 여기에 Na-caseinate 30 g과 soybean meal 15 g을 첨가한 복합배지를 사용하였다(14, 16). 5 l 발효조에서 배양할 경우에는 소포제로 실리콘오일(SAG-471) 0.5 g/l를 첨가한다.

대두분에 의한 상승효과 실험시 대두분의 어떤 성분이 상승효과를 나타내는지를 확인하기 위하여 다음과 같이 전처리하여 사용하였다. 대조구는 대두분 15 g/l를 그대로 첨가하였고, 유효성분이 수용성인지 불용성인지 구별하기 위해 15 g/l를 60°C 물에 2시간 현탁 교반한 후 원심분리하여 그 상등액을 사용하였다. 또 유효성분이 단백질성물질인지 비단백성물질인지를 구별하기 위하여는 대두분 용출 상등액에 삼염화초산을 첨가하여 침전물과 상등액을 얻은 후 각각을 배지에 첨가했으며, 유효성분이 무기물인지 유기물인지 구별하기 위하여 대두분을 회화로에서 550°C, 4시간 회화시킨후 그 회분을 배지에 첨가하였다.

분석조건

균체량은 배양액을 생리식염수에 적당히 희석한 후 평판배지에 도말하여 1일간 배양한 후 나타난 집락수를 세어서 ml당 colony forming unit(CFU/ml)로 표시하였다.

효소의 활성도는 Abdelal *et al.* 방법을 변형하여 사용하였다(17). 발효액에 0.05 M Na-borate buffer(pH 9.0)를 혼합하여 적당히 희석된 효소 용액 3.0 ml를 시험관에 넣고 37°C 항온수조에서 10분간 정치한 후 0.05 M Na-borate buffer(pH 9.0)에 1.0%(w/v) Hammarssten casein(Merck)을 녹여 미리 37°C로 가온된 기질 2.0 ml를 넣고 37°C 항온수조에서 30분간 반응을 시킨 다음 10%(w/v) 삼염화초산(TCA)용액 5.0 ml를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 37°C 항온수조에서 30분간 더 정치시켜 남은 기질을 응고시켰다. 반응 용액중 TCA용액에 의해 응고된 기질과 효소 침전물을 종이 여과지(Toyo No. 5 C filter paper)로 여과한 후 분광광도계를 사용하여 파장 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조구로 위와 같은 조건에서 미리 TCA 용액 5.0 ml로 효소 용액을 10분간 불활성화 시킨 다음 기질 용액을 첨가하여 37°C 항온수조에서 30분간 정치시킨 것을 여과하여 사용하였다. 미리 표준 tyrosine(Sigma)용액을 이용하여 280 nm에서 tyrosine농도와 흡광도간의 표준곡선을 구하였다. 효소 활성도는 1 ml의 효소용액에 의해 Hammarssten casein으로부터 1분 동안에 1 μg 의 tyrosine이 유리될 때를 1 unit/ml로 정의 하였다.

결과 및 고찰

Serrapeptase의 회분배양 특성

Serratia marcescens YIT-1을 복합배지를 사용하여 5 l-Jar fermentor에서 회분배양할 때의 균체생장과 효소생합성과정은 Fig. 1과 같다. *Serratia marcescens* YIT-1은 접종 후 10시간이 지나서야 serrapeptase 활성이 관찰되었고, 배양 33시간에 최대에 도달하였다. 그 이상 연장 배양할 경우 효소활성이 급격히 감소함을 관찰할 수 있었다. 탄소원으로 첨가된 포도당은 배양 초기 12시간 안에 급격히 소모되었고 이 기간 동안에는 유기산의 축적으로 배양액의 pH도 6.5까지 급격히 감소하였다. 포도당 고갈 이후에는 단백질인 카제인나트륨을 기질로 분해 사용함으로써 배양액의 pH는 다시 상승하기 시작하여 정체기에 도달했을때는 8.0까지 상승하였다. 정체기 이후 사멸기에는 기질 고갈, 세포 분해 등에 의한 질소화합물의 축적으로 pH는 지속적으로 상승하는 현상을 나타내었다. 이때 효소 생성이 감소한 반면, 이미 생성된 효소는 알칼리성액에서의 비활성은 증가되어 단백질인 효소들을 자가분해하여 효소역가는 급격히 감소하게 되는 것으로 추측된다. Serrapeptase의 자가분해성에 대한 연구가 보고된적이 있다(16). 포도당이 완전히 고갈되기전인 배양초기에 효소 생합성이 억제되는 것은 포도당 자체의 catabolite repression일 수도 있고, 유기산에 의한

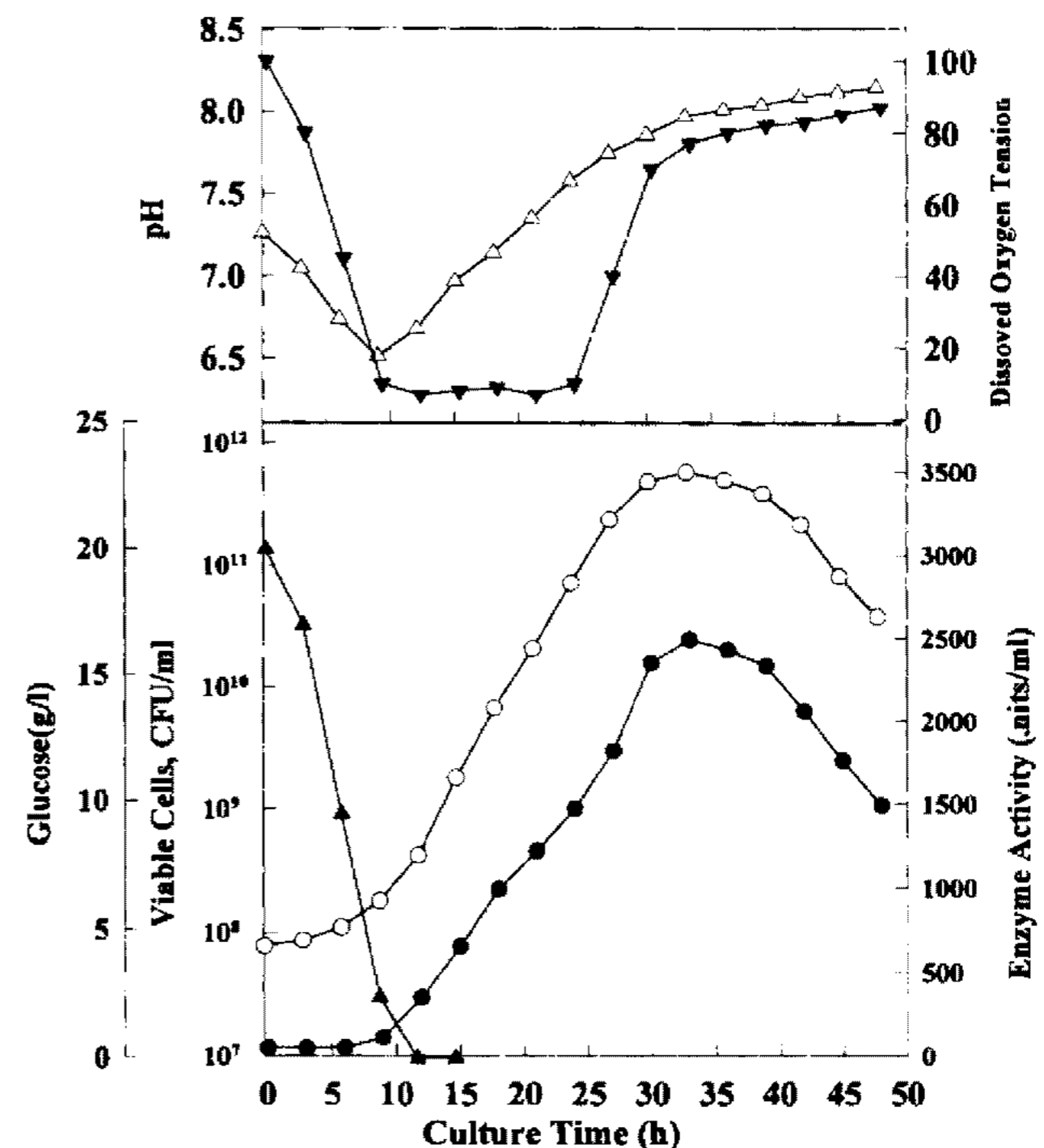


Fig. 1. Time course for the cell growth and and serrapeptase production in batch culture of 5 l-jar fermentor using *Serratia marcescens* YIT-1.

—○—, viable cell; —●—, serrapeptase; —▲—, glucose; —△—, pH; —▼—, dissolved oxygen

낮은 pH가 효소의 세포외 분비를 억제할 수도 있다고 생각된다. Bromke and Hammel는 glycerol에 의해 serrapeptase 생합성이 억제되다가 5 mM butyryl cAMP를 첨가하면 catabolite repression이 회복되는 것을 보고하였다(10). *Pseudomonas*에서는 acetate, citrate같은 유기산 및 구연산회로의 중간체들이, 세포외 효소들이 생합성된 후 세포외로 분비되는 것을 억제한다는 것이 보고되었다(18). *Serratia marcescens*에서는 대수기에 10%의 효소는 분비되지 않고 세포막에 결합되어 있으며, 분비 기작 결핍 변이주를 이용한 실험에서 serrapeptase가 분비 과정에 processing이 일어나는 것으로 관찰되었다(11).

용존산소농도(DO)는 6시간이후 성장시작과 함께 급격히 감소하여 포화농도의 10%이하로 유지되다가 30시간에 급격히 증가하여 효소생합성 종료 및 성장정체와 함께 포화농도의 80%이상으로 회복되었다. 단백분해효소 발효시 배양 종료점 이후 자가분해에 의하여 1시간당 약 2%씩 역가가 감소하는 반면, 분석시간이 장시간 소요되므로 발효의 종료점 결정은 시료채취 없이 발효조의 DO전극에 의해 확인하는 것이 효율적이라고 판단되었다.

유도원(inducer)과 억제원(repressor)로서의 유기질소원 효과

Fig 1.에서 효소발효는 약 33시간에 끝나므로 유도원과 억제원 비교실험에서는 배양 24시간에서의 효소역가를 비교하였다. Serrapeptase의 유도원으로는 Table 1과 같이 동일한 원료 유래의 질소원이라도 단백질은 효소유도원으로, 펩톤화된 펩타이드들은 비유도원으로, 완전한 가수분해물들은 오히려 억제원으로 작용하였다. 특

Table 1. Effect of organic nitrogen sources on the production of serrapeptase in synthetic medium

Organic nitrogen sources	Serrapeptase activity (units/ml)	Viable cells (CFU/ml)
no addition	560	8.3×10^9
soybean meal	1,560	7.3×10^{10}
soyprotein	1,220	8.5×10^{10}
soytone	960	1.3×10^{11}
skim milk	2,150	8.7×10^{10}
Na-caseinate	2,470	1.5×10^{11}
milk peptone	1,260	1.3×10^{11}
casein hydrolysate	880	2.1×10^{11}
gelatin	1,540	7.5×10^{10}
corn steep solid	1,160	6.6×10^{10}
cottone seed meal	1,270	7.9×10^{10}
beef extract	1,060	1.8×10^{11}
yeast extract	1,340	1.4×10^{11}

*Basal medium; Glucose 20 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5 g, KCl 0.5 g, NaCl 1 g, CaCl_2 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, KH_2PO_4 2 g, K_2HPO_4 4 g, and organic nitrogen source 10 g/l in DW 1 l, pH 7.0. *Culture for 2 days at 30°C.

히 이러한 현상은 우유(milk)유래 유기질소원들인 skim milk, Na-caseinate, milk peptone, casein hydrolysate에서 뚜렷하였다. *Aeromonas proteolytica*의 경우도 유사한 현상이 보고 되었는데, 이 현상을 Hanson *et al.*, Cohen, Egorov *et al.*은 아미노산에 의한 catabolite repression이라고 하였다(19-22).

카제인같은 고분자 단백질이 세포내로 흡수되어, 효소생합성을 조절한다는 것은 어렵기 때문에 그 가수분해산물인 아미노산들이 serrapeptase의 생합성에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2). Leucine은 유도원 역할을 하여 효소 serrapeptase 생합성을 강력히 촉진하고, cysteine은 특이적인 억제원으로 serrapeptase의 생합성을 강력히 억제하였다. 다른 아미노산들은 약하지만 비특이적 억제원 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 따라서 casein자체가 유도원이 아니라 그것의 분해산물인 leucine에 의해 유도되고, 가수분해가 지속되면 다른 아미노산들의 농도가 높아지면서 억제가 일어나는데 특히 cysteine에 의해 생합성이 강력히 억제되는 것으로 생각된다. 그러나 분자내에 질소원자가 많이 함유된 glutamine, arginine, lysine 등과 같이 탄소원으로 이용될 경우 서서히 암모니아를 방출하는 아미노산은 단백분해효소 생합성을 촉진하는 효과가 있는 것으로 보아 최소배지에서는 질소원이 제한 요소임을 알 수 있었다. Drucker는 곰팡이인 *Neurospora crassa*에서도 세포외 단백분해효소 생합성의 실제 유도원은 leucine이었다고 보고하였다(23).

Table 2. Effect of amino acids on the production of serrapeptase in synthetic medium

Amino acids	Serrapeptase activity (units/ml)	Viable cells (CFU/ml)
no addition	420	9.2×10^{10}
glycine	580	1.3×10^{10}
alanine	610	9.5×10^9
valine	520	1.2×10^{10}
leucine	2,680	9.3×10^9
isoleucine	610	8.9×10^9
glutamic acid	680	1.6×10^{10}
glutamine	1,150	2.1×10^{10}
arginine	1,380	2.5×10^{10}
lysine	1,170	1.6×10^{10}
tryptophane	610	8.9×10^9
tyrosine	650	1.8×10^{10}
serine	510	9.4×10^9
cysteine	130	1.1×10^{10}
methionine	220	1.6×10^{10}

*Basal medium; Glucose 20 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5 g, KCl 0.5 g, NaCl 1 g, CaCl_2 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, KH_2PO_4 2 g, K_2HPO_4 4 g, and amino acid 1 g in DW 1 l, pH 7.0. *Culture for 2 days at 30°C.

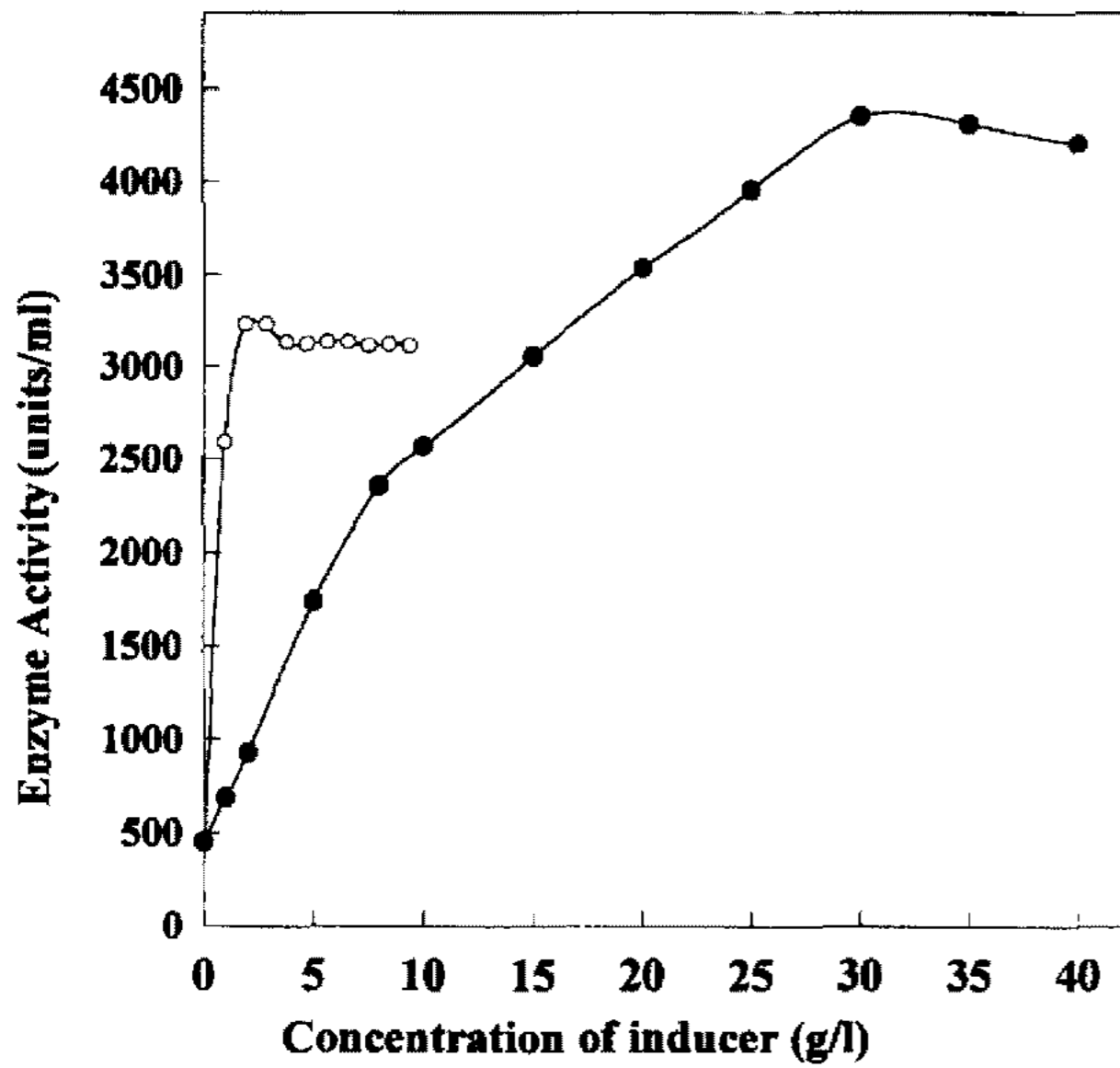


Fig. 2. Effect of Na-caseinate and leucine as inducer on the serrapeptase production. -○-, leucine; -●-, Na-caseinate.

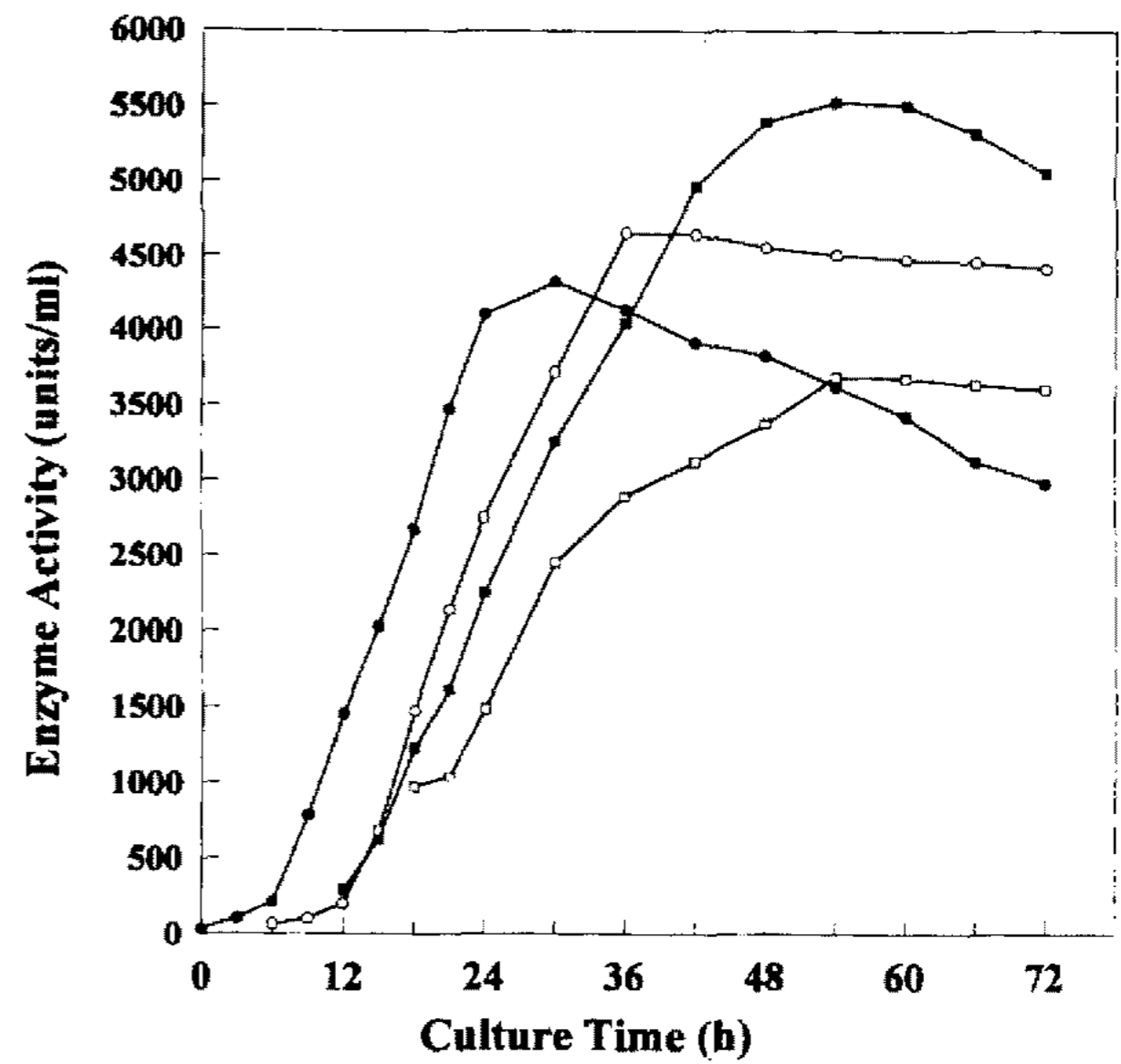


Fig. 3. Effect of the addition of Na-caseinate as inducer in the various time on the serrapeptase production. Na-caseinate (5 g/l) was added at 0 h and 10 g/l of Na-caseinate was added at 6 h, 12 h, or 18 h. -●-, 0 h; -○-, 6 h; -■-, 12 h; -□-, 18 h.

유도원의 최적농도와 작용시기

Fig. 2는 유도원으로서 가장 우수한 카제이나트륨과 leucine의 농도별 효소생합성 유도 효과를 조사한 것이다. 실제 유도원인 leucine은 2 g/l일 때 최대효과를 나타냈고, 카제이나트륨은 25 g/l일 때 최대 효과를 나타냈다. 고분자 단백질인 카제이나트륨은 일단 분해되어야 사용되므로 고농도를 요구하면서도 서서히 지속적인 유도원의 효과로 높은 역가를 나타내어 실제 유도원은 leucine이지만 그것의 전구체인 카제이나트륨이 더 효과적인 유도원이었다. 카제이나트륨은 균체생장에 필요한 질소원, 효소 serrapeptase의 구성 아미노산원으로도 이용되어야 하기 때문에 적절한 시기에 작용기작에 맞게, 필요량에 맞게 첨가되어야 할 것이다. 유도원이면서 동시에 효소의 기질이기도 하므로 효소에 의해 지나치게 분해되면 억제원인 아미노산들의 농도가 높아질 수도 있기 때문이다.

Fig. 3은 카제이나트륨의 첨가시기에 따른 효소 생성 변화를 측정해본 것이다. 적정농도 25 g/L에 해당량을 처음부터 사용한 경우와 처음에 15 g/L, 배양중 10 g/L를 나누어 다양한 시기에 첨가한 경우들을 비교한 것이다. 카제이나트륨 첨가시기는 효소 생합성이 시작된 후 2시간, 즉 배양 12시간이 가장 효과적이었다. 처음부터 첨가한 경우나 효소 생합성이 시작되기전인 배양 6시간째에는 카제이나트륨이 효소에 의해 분해되지 못하여 실제 유도원인 leucine을 생성하는 정도가 낮기 때문이며, 배양 초기부터 존재하면 유도원으로서 보다는 질소원으로 사용될 기간이 길기 때문이다. 효소생합성이 시작된 후인 배양 18시간에는 카제이나트륨을 첨가해도 효소 생합성 증가가 없었고 배양시간이 연장되지도 않았다. 즉 유도원으로도 효과가 없었고, 균체 생장에 필요한 질소

원으로도 효과가 적었다. 따라서 serrapeptase 발효와 관련된 유도조절기작은 배양중 12시간대에 효과가 크며 그 후에는 조절기작이 미약한 것으로 생각된다. 즉 효소생합성과 관련된 mRNA 등의 생합성이 이미 끝난 것으로 생각된다. 그러나 배양후기에 카제이나트륨이 첨가될 경우에는 배양말기에 나타나는 효소의 자가분해 현상이 급격히 둔화되어 안정성이 증가하는 것을 볼 수 있는데 이것은 기질이 고농도로 잔존할 경우 효소단백질과 기질 단백질간의 경쟁적 반응으로 효소 단백질의 가수분해가 둔화되기 때문이다. 이러한 결과는 효소의 정제 공정에서 기질을 적절히 안정제로 사용할 경우 안정성을 증가시키는 방법으로 응용이 가능할 것이다.

합황 물질들에 의한 효소합성 조절

많은 아미노산 가운데 특이하게 cysteine에 의해 효소의 생합성이 억제되며, 단백질 가수분해물들에 의한 실제 repressor는 cysteine인 것이 확인되었다. Table 3은 cysteine만큼 강하지는 않지만 methionine, K₂SO₄, MgSO₄도 억제현상을 나타내었다. 따라서 배지에 첨가되는 Ca²⁺, Mg²⁺같은 무기염류는 황화물을 염화물로 교체하면 발효역가를 높일 수 있었다. 대표적인 예가 필수적인 Mg²⁺원으로 MgSO₄보다 MgCl₂를 사용할 경우 약 14% 역가가 상승되었다. Braun and Schmitz(11)에 의하면 Serratia marcescens ATCC 25419의 세포의 단백질분해효소의 아미노산 조성 분석결과 cysteine과 methionine이 없다는 보고와 본 연구 결과에 의해 이 세포의 단백질분해효소의 생물학적 역할을 추측할 수 있었다. 자연 생태계에서 이

Table 3. Effects of sulfur-containing compounds on the production of serrapeptase in complex medium

Sulfur-containing compounds	Serrapeptase activity (units/ml)
no addition	2,370
cysteine 1.0 g/l	480
methionine 1.0 g/l	1,250
K ₂ SO ₄ 0.5 g/l	1,960
KCl 0.5 g/l	2,120
MgSO ₄ 0.2 g/l	2,250
MgCl ₂ 0.2 g/l	2,580

*Basal medium; Glucose 20 g, (NH₄)₂HPO₄ 5 g, Na-caseinate 10 g, NaCl 1 g, CaCl₂ 0.2 g, KH₂PO₄ 2 g, and K₂HPO₄ 4 g in DW 1 l, pH 7.0. *Culture for 2 days at 30°C.

세균은 황이 결핍된 환경에서는 이 효소를 분비하여 유기물로 부터 합황 물질들을 분해 이용하고, 황이 풍부한 환경에서는 이 효소가 합황물질에 의해 생합성이 억제되는 조절기작을 갖고 있다고 생각된다.

대두분에 의한 상승효과

대두분만 단독으로 유기질소원으로 첨가할 경우 카제이나트륨보다는 효소 생성이 적었으나 두 유기질소원을 혼합사용할 경우 상승효과(synergic effect)가 있어서 카제이나트륨 단독으로 사용할 때 보다도 대두분 15 g/l를 첨가할 경우 약 22%의 발효역가 상승이 관찰되었다 (Table 4). 카제이나트륨은 유도원인 것으로 밝혀졌지만 대두분의 역할은 유기질소원이거나 유도원이 아닌 다른 인자로 추정되었다. Table 4는 이러한 대두분의 상승효과의 인자를 확인하기 위하여 일련의 실험을 실시한 것이다. 대두분 용출액의 원심분리 상등액에 상승효과가 있었고, 그것의 삼염화초산을 처리하여 단백성 물질들을 제거한 상등액에 상승효과가 있는 것으로 보아 비단백성, 수용성 물질이 상승인자라고 생각되었다. 또 대두분

Table 4. Effect of soybean and soybean components on the production of serrapeptase in complex medium

Soybean and soybean components	Serrapeptase activity (units/ml)
no addition	4,460
soybean meal	5,480
soytone	4,140
aqueous extract	5,220
TCA* precipitate	4,210
TCA supernatant	5,070
ashed soybean	5,170
MnCl ₂ 4 mM	5,860

*Basal medium; Glucose 20 g, (NH₄)₂HPO₄ 5 g, Na-caseinate 30 g, KCl 0.5 g, NaCl 1 g, CaCl₂ 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, KH₂PO₄ 2 g, K₂HPO₄ 4 g, and soybean meal 15 g or equivalent component in DW 1 l. *Culture for 2 days at 30°C. *TCA; Trichloroacetic acid.

을 회화시켜 그것을 염산에 녹여 배지에 첨가한 경우 상승효과 있으므로 유기물보다는 무기염류라고 생각되었다. 대두분에 함유된 무기염류중 함량이 높은 원소들을 시험한 결과 Mn²⁺가 상승효과 인자라는 것이 확인되었고, Mn²⁺의 최적 첨가량은 실험결과 4 mM임이 밝혀졌다. Table 4에서와 같이 카제이나트륨 단독으로 첨가한 경우와 비교시 Mn²⁺ 4 mM을 혼합첨가하면 상승효과에 의해 발효역가가 약 30% 상승하였다. 이러한 Mn²⁺의 효과는 serrapeptase가 metalloprotease이므로 효소생성보다는 효소활성도를 증가시키는 것으로 생각할 수 있으나, 효소반응시에는 오히려 약간의 저해효과가 발견되었고 오직 발효시 배양액에 첨가되어야 효소 역가를 증진시키는 것으로 보아 효소 생합성에 관여 하든지, 효소 막 투과성에 관여 하는 것으로 생각되었다. 이러한 현상은 peptide계 항생제인 bacitracin발효에서도 볼 수 있는데 작용기작은 효소생합성 단계에 직접 작용하기 보다는 세포막의 투과성 증가라고 보고되고 있다(24, 25).

요 약

Serrapeptase의 발효 생산시 유기질소원이면서 동시에 효소 생합성의 유도원인 카제이나트륨의 효과를 검토하는 과정에서 실제 유도원은 단백질의 가수분해산물인 leucine이며, 단백질의 가수분해 산물인 cysteine은 강력한 억제원인 것이 밝혀졌다. 이러한 유도 조절기작은 배양시간 12시간대, 즉 효소 생합성이 시작된후 2시간까지 유도원의 조절을 받으며 그 이후에는 조절을 받지 않는 것으로 나타났다. 따라서 카제이나트륨을 적당히 배분하여 초기에 질소원으로 일부를 첨가하고, 배양 12시간에 유도원으로 첨가하는 유가식 배양이 효과적이었다. 또 cysteine, MgSO₄ 등 합황물질들이 효소의 생합성을 억제하는 것으로 나타나 무기염류도 황화물보다는 염화물이 우수한 것으로 나타났다. 대두분의 상승효과는 대두분에 함유된 Mn²⁺에 의한 것이며 최적농도는 4 mM로 밝혀졌다.

감사의 말

본 연구에 발효기를 지원해 주신 (주)한국발효기 유대환 사장님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Aaslyng, D., E. Gorsen, and H. Malmos. 1991. Mechanistic studies of protease and lipases for the detergent industry. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **50**: 321-330.
2. Aiyappa, P. S. and J. O. Harris. 1976. The extracellular metalloprotease of *Serratia marcescens*: I. Purification

- and characterization. *Mol. Cell. Biochem.* **13**: 95-100.
3. Layman, P. L. 1986. Industrial enzymes, battling to remain specialties. *Chem. Eng. News* **64**: 11-14.
 4. Aratani, H., H. Tateishi, and S. Negita. 1979. Studies on *in vivo* activity of antibiotics in experimental pneumonia in rats. I. Combination of ciclacillin and serratiopeptidase. *Jap. J. Antibiot.* **32**: 806-811.
 5. Aratani, H., H. Tateishi and S. Negita. 1980. Studies on the distribution of antibiotics in the oral tissues: Experimental staphylococcus infection in rats and effect of serratiopeptidase on the distributions of antibiotics. *Jap. J. Antibiot.* **33**: 623-635.
 6. Miyata, K., K. Maejima, K. Tomoda, and M. Isono. 1970. Serratia protease Part I. Purification and general properties of the enzyme. *Agr. Biol. Chem.* **34**: 310-318.
 7. Koyama, K., T. Ikemoto, S. Itoh, S. Hirai, and N. Kitamor. 1989. Determination of serrapeptase by high performance liquid chromatography using column. *Takeda Kenkyuso Ho.* **48**: 72-77.
 8. Tomoda, K., K. Miyata, M. Isono and E. Ohmura. 1982. Industrial production and medical application of Serratiopeptidase. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **56**: 559-565.
 9. Loria, J. K., B. Brukner, and N. S. Egorov. 1977. On the nature of a true inducer of synthesis of extracellular protease by *Serratia marcescens*. *Microbiologia* **46**: 440-446.
 10. Bromke, B. J. and J. M. Hammel. 1979. Regulation of extracellular protease by *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* **124**: 55-61.
 11. Braun, V. and G. Schmitz. 1980. Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* **124**: 55-61.
 12. Decedue, C. J., E. A. Broussard, A. D. Larson, and H. D. Braymer. 1979. Purification and characterization of the extracellular proteinase of *Serratia marcescens*. *Biochim. Biophys. Acta.* **569**: 293-301.
 13. Kim, H. L. and Pyong-Su O. 1991. Selection of protease hyperproducing mutant strain from *Serratia marcescens* ATCC 21074 and enzymatic properties of the protease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 450-455.
 14. Ro, H. S., H. J. Park, and B. R. Lee. 1992. Studies on the production of Serratiopeptidase from Serratia culture. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 207-212.
 15. Abdelberg, E. A., M. Mandel, and G.C.C Chen. 1965. Optimal condition for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**: 788-7955
 16. Kim, K. S., C. W. Lee, B. D. Lee and E. C. Shin. 1992. Serratia marcescens ATCC 21074로 부터 순수 분리한 metalloprotease의 자가분해성과 안정성. *Kor. J. Microbiol.* **30**: 71-77.
 17. Abdelal, A.T.H., E. H. Kennedy, and D. G. Ahearn. 1977. Purification and characterization of a neutral protease from *Saccharomyces lipolytica*. *J. Bacteriol.* **130**: 1125-1129.
 18. Boethling, R. S. 1975. Regulation of extracellular protease secretion in *Pseudomonas maltophilia*. *J. Bacteriol.* **123**: 954-961.
 19. Litchfield, C. D. and J. M. Presscott. 1970. Regulation of proteolytic enzyme production by *Aeromonas proteolytica*; I. Extracellular endopeptidase. *Can. J. Microbiol.* **16**: 17-32.
 20. Hanson, M. A. and G. A. Marzulf. 1973. Regulation of a sulfur-controlled protease in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **116**: 785-789.
 21. Cohen, B. L. 1973. Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **79**: 311-320.
 22. Egorov, N. S., Zh. K. Loriya, and T. G. Yudina. 1983. Effect of proteins on exoprotease synthesis in *Bacillus thuringiensis*. *Mikrobiologiya.* **52**: 569-572.
 23. Drucker, H. 1973. Regulation of exocellular protease in *Neurospora crassa*: Role of Neurospora protease in induction. *J. Bacteriol.* **116**: 593-599.
 24. Eugene D. Weinberg. 1967. Bacitracin, Gramicidin, and Tyrocidine, Pp 240-253. In D. Gottlieb and P.D. Shaw (ed.), Antibiotics, Vol. 1, Springer-Verlag, New York.
 25. Frøyskov. Ø. 1977. The production of bacitracin synthetase by *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *FEBS Letters* **81**: 315-318.

(Received 11 April 1997)