

고온성 방선균이 생산하는 단백질 분해효소의 생산

김 중 배

상지영서대학 식품영양과

Production of Protease from Thermophilic Actinomyces

Jung-Bae Kim

Dept. of Food and Nutrition, Sangji Youngseo College, Wonju, Kangwon, 220-713, Korea

Abstract

Microbial proteases have certain unique characteristics, and are now widely used in food, leather, detergent, and pharmaceutical industries. Thermophilic Actinomyces producing the protease was isolated from soil in Wonju city. This strain was able to grow and produce protease at the culture temperature of 50°C. The maximum protease production was obtained when 0.5% soluble starch and 0.4% yeast extract were used as carbon and nitrogen source, respectively. The other culture condition for the maximal productivity of the protease was 0.1% K₂HPO₄, and 0.05% CaCl₂ at initial pH 8.0 for 48 hours.

Key words : protease production, thermophilic Actinomyces.

서 론

현재까지 알려진 효소의 종류는 약 3,000종이 있으며, 산업적으로 사용되고 있는 공업용 효소는 전분, 단백질, 펙틴, 섬유소를 가수분해시키는 효소가 주종을 이룬다¹⁾. 그 중 단백질 분해효소가 40%를 점하고 있어 효소산업 분야에서 가장 큰 비중을 차지하여 왔다²⁾. 현재까지 산업적으로 사용되고 있는 생산 균주로는 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* 등이 세계의 첨가제^{1,3)}로, 곰팡이인 *Mucor pusillus* 와 *M. mechei* 등에서 생산되는 효소가 치즈제조에 rennet 대용으로^{1,2)}, 간장제조시 대두의 가수분해에 사용되는 *Aspergillus* 속²⁾, 근래 세계의 공업적 생산에 많이 사용되는 호열성 세균인 *Thermosus* 속과 *Bacillus stearothermophilus* 등이 있다^{4,5)}.

근래 배양시간의 단축, 잡균에 의한 오염방지, 냉각과 증류 비용 감소 등의 장점을 갖고 있는 고온성 미생물의 중요성이 점차 확대됨에 따라 단백질공학 분야에서는⁶⁾ 고온균에서 생성하는 효소를 이용하여 온도, pH, 산소, 용매, 압력 등에 대한 안정성을 높이고⁷⁾, 효소의 활성부위가 밝혀진 입체구조를 이용하여 유전

자 cloning 방법으로 기능 향상에 관한 연구가⁸⁾ 활발히 진행되고 있어, 새롭고 다양한 효소가 요구되고 있으며 탐색이 계속되고 있다.

따라서 본 연구는 가능한 열에 안정한 효소를 탐색하고자 고온성 방선균을 분리하여 액체 배양한 후 단백질 분해력이 강한 균주를 1차 선별하였으며, 100°C에서 5분간 열처리하여 활성이 강한 균주를 최종 선별하여 효소의 생산 조건을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 균주 분리 및 선별

고온성 방선균의 분리는 강원도 원주지방을 중심으로 부식토와 산림에서 채취한 토양을 멸균 생리식염수를 사용하여 3단 희석법으로 50°C 배양기에서 2일에서 7일 동안 배양하여, 육안과 광학 현미경으로 관찰하여 형태학적으로 방선균이라 추정되는 집락을 선정, 분리하였다. 분리된 균주는 액체배지를 사용하여 50°C에서 48시간 동안 정치배양하였으며, 균체를 제거한 배양 여액은 100°C에서 10분간 열처리한 후 단백

* Corresponding author : Jung-Bae Kim

질 분해력이 우수한 균주를 선별하였다. 분리용 배지 조성은 1% soluble starch, 0.4% peptone, 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.0% agar의 고체배지를 사용하였으며, 액체배지 조성은 0.5% soluble starch, 0.4% peptone, 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $CaCl_2$, initial pH 8.0로 조절하여 균주배양에 사용하였다. 분리된 균주의 보관은 oatmeal 고체배지를 사용하여 3개월마다 계대 배양하면서 냉장고에 보관하였다.

2. 효소의 활성측정

효소활성 측정은 Anson 방법⁹⁾을 변화시켜 사용하였다. 즉 0.1M Tris buffer(pH 7.5) 0.4ml, 시료용액(배양액) 0.1ml와 1% milk casein 용액 0.5ml를 가하여 50°C에서 20분간 반응시킨 후 0.44M TCA (trichloroacetic acid)용액 2ml를 가하여 반응을 정지시킨 후, 실온에서 20분간 방냉하여 원심분리하였다. 상등액 1ml를 취하여 0.55M Na_2CO_3 용액 2.5ml와 Folin-Ciocalteu 발색시약 0.5ml를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성도는 pH 7.5, 50°C에서 1분 동안 milk casein (기질)으로부터 1 μg 의 tyrosine을 유리시키는 데 필요한 양을 1Unit로 정하였다.

3. 균체량 측정

액체 배양액은 거름종이에(Toyo No 1, filter paper) 균체를 여과하여 충분한 양의 증류수로 세척한 후 105°C 건조기에서 항량이 될 때까지 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 균체는 실온에서 방냉한 후 건조 전후의 무게 차이를 측정하여 건조 중량(Dry Cell Weight, DCW)으로 표시하였다.

결 과

1. 탄소원의 영향

미생물의 에너지원 및 물질의 탄소 골격의 구조로 사용될 수 있는 적합한 탄소원을 조사하기 위하여 각종 탄소원의 농도가 1%가 되도록 첨가하여 배양한 후 효소 생산성을 조사한 결과 soluble starch가 가장 적합한 탄소원이었으며, α -cellulose, CMC-Na 순으로 감소되었다(Table 1). 가장 좋은 soluble starch를 농도별로 첨가하여 효소 생산성을 조사한 결과 0.5%에서 최대의 생산성을 보였으나 균체 성장은 2%에서 가장 많았다.

2. 질소원의 영향

Table 1. Effect of carbon source on the protease production

Carbon sources	Dry weight (DCW mg/10ml)	Relative activity (%)
Glycerin	3	5
D-Xylose	4	9
L-Arabinose	3	9
D-Galacturonic acid	13	27
D-Glucose	18	64
D-Galactose	12	81
D-Mannose	8	9
Lactose	19	75
Maltose	12	8
Saccharose	15	5
Salicin	5	5
Xylan	5	5
Inulin	7	8
Dextrin	5	5
Corn starch	18	74
Soluble starch (0.5%)	19	100
(1.0%)	21	89
(2.0%)	22	80
Chitin	6	7
CMC-Na	19	81
α -Cellulose	21	92

The concentration of carbon sources added was 1%. Cell growth was expressed by DCW(mg/10ml). Activity added 0.5% soluble starch was set at 100.

세포 대사와 성장에 필요한 질소원의 영향을 조사하기 위하여 각종 질소원을 기본배지에 0.5%씩 첨가하여 효소생산성을 조사하였다. 가장 적합한 질소원은 yeast extract였으며, peptone, 무기 질소원인 ammonium phosphate도 비교적 좋은 결과를 보였다(Table 2). 가장 우수한 생산성을 보인 yeast extract를 농도별로 첨가하여 생산성을 조사한 결과 0.5%농도에서 효소와 균체의 생산이 가장 좋았으며, 농도가 높아질수록 생산성은 감소하였다.

3. 금속염의 영향

세포의 효소와 대사활성에 중요한 역할을 하는 금속이온은 배지내의 최종농도가 0.05%가 되도록 첨가하여 생산성을 조사하였다. 여러 금속염 중에서 $CaCl_2$ 이 가장 우수한 생산성을 보였으며 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 순으로 낮게 나타내었다(Table 3). $CaCl_2$ 을 농도별로 첨가한 결과 0.05%에서 최대의 생

Table 2. Effect of nitrogen sources on the protease production

Nitrogen sources	Cell growth (DCW mg/10ml)	Relative activity(%)
NaNO ₂	5	5
NaNO ₃	13	38
NH ₄ Cl	11	22
(NH ₄) ₂ SO ₄	8	3
(NH ₄) ₂ HPO ₄	12	75
Urea	13	12
Yeast extract (0.3%)	18	81
(0.4%)	23	100
(0.5%)	22	91
Beef	22	89
Peptone	21	98

Each nitrogen source(0.5%) was added to basal medium containing 0.5% soluble starch. Cell growth was expressed by DCW(mg/10ml) and maximum activity was set as a value of 100.

Table 3. Effect of metal salts on the protease production

Metal salt	Cell growth (DCWmg/10ml)	Relative activity(%)
AgNO ₃	3	5
CaCl ₂ (0.05 %)	22	100
(0.1 %)	17	91
CoCl ₂ · 6H ₂ O	12	54
CuSO ₄ · 5H ₂ O	8	27
FeSO ₄ · 7H ₂ O	18	69
Hg(NO ₃) ₂ · 2H ₂ O	13	31
MnCl ₂ · 4H ₂ O	12	23
ZnCl ₂	10	21
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8	23
AlCl ₃ · 6H ₂ O	11	12
FeCl ₃ · 6H ₂ O	23	62
MgSO ₄ · 7H ₂ O	19	85

Each metal salts(0.05%) was added to basal medium containing 0.5% soluble starch, 0.4% yeast extract. Cell growth was expressed by DCW(mg/10ml) and maximum activity was set as a value of 100.

산성을 보였고, 농도가 높을수록 효소생산은 감소되었다.

4. 초기 pH의 영향

효소생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위

하여 0.1N HCl과 NaOH를 사용하여 배지의 pH를 조절하여 고압 멸균한 후 50°C 배양기에서 48시간 배양하여 효소생산성을 조사하였다. 효소생산은 산성영역보다는 약 알카리 영역인 pH 8.0에서 생산성과 균체증식량이 최대가 되었다(Fig. 1).

5. 배양온도의 영향

효소생산의 최적온도를 검토하기 위하여 배양온도를 20°C에서 70°C 범위에서 액체배양하여 생산성을

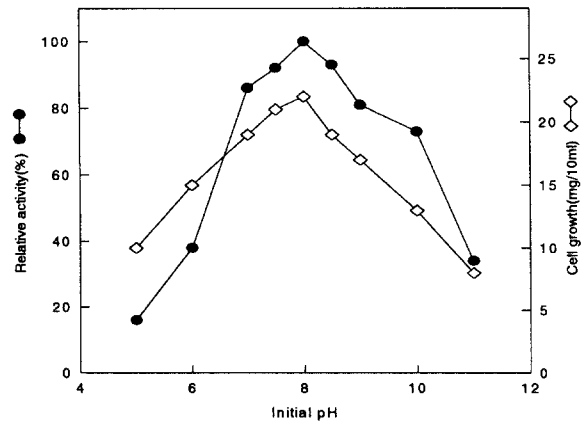


Fig. 1. Effect of initial pH on the protease production. pH of culture medium was adjusted with 0.1N HCl and NaOH. The cultivation was carried out at 50°C for 48hrs. The composition of the medium was 0.5% soluble starch, 0.4% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% CaCl₂. Cell growth was expressed by DCW(mg/10ml).

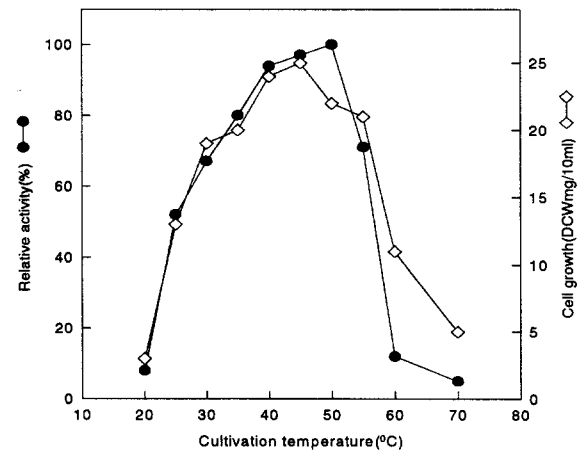


Fig. 2. Effect of temperature on the protease production. The cultivation was carried out for 2 days. The composition of the medium was 0.5% soluble starch, 0.4% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% CaCl₂, at initial pH 8.0.

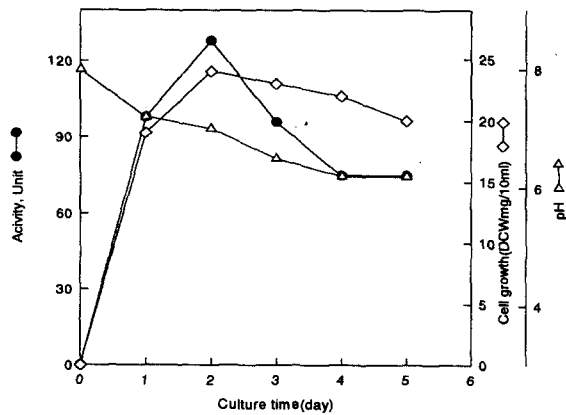


Fig. 3. Effect of culture time on the protease production. The composition of the culture medium was 0.5% soluble starch, 0.4% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $CaCl_2$, at initial pH 8.0. The cell were cultivated at 50°C and cell growth was expressed by DCW(mg/10ml).

조사한 결과 50°C에서 가장 우수한 생산성을 보였다 (Fig. 2). 배양온도가 50°C 이상에서는 생산성이 급격하게 저하되었으나, 30°C에서 50°C 사이에서는 온도가 높을수록 효소생산도 증가되었다.

6. 배양일수

효소생산의 액체 배지조성은 0.5% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $CaCl_2$, initial pH 8.0으로 조절하여 가압 멸균한 후 시험균주를 접종하여 50°C에서 배양하면서 경시적으로 효소생산량, 균의 증식 및 pH 변화를 측정하였다. 배양시간 별로 생산성을 조사한 결과 배양 48시간에서 균체증식과 효소생산량이 최대가 되었으며, 시간이 경과할수록 균체량과 효소생산량은 감소하였다. 배양액의 pH 변화는 시간이 경과할수록 점차 낮아지는 경향을 보였다(Fig. 3).

고 찰

단백질 가수분해효소는 식품가공, 의약품, 피혁가공 분야에 많이 사용되고 있다^{1,2)}. 근래 생화학적 분석기술의 급속한 발달과 함께 효소의 입체구조와 활성부위가 상세히 해석됨으로써^{10,11)}, 미생물이 생산하는 열에 안정한 다양한 protease 필요성이 증대되고 있다. 고온성 미생물은 통상 50°C에서 생육할 수 있는 균주로 분류하며, 일부 세균인 경우 75°C에서 내열성 효소를 생산하는 균주도 보고되고 있다^{3,12,13)}. 본 실험에 사

용한 방선균은 최적 생육 온도가 50°C인 결과는 *Bacillus* 속에서의 최적온도^{4,5,12)}와 비슷하였고, 생육 pH는 다른 알칼리성 *Bacillus* 속의 생육 pH 10.5보다는^{4,5)} 낮았으나 다른 고온성 방선균¹⁴⁾과 비슷한 생리적 특성을 보였다. 대부분의 고온균은 탄소원으로서 가용성 전분, 질소원으로 yeast extract와 peptone 순으로 사용한 것과 유사한 경향을 보였다^{4,5,15)}. Ca^{2+} 이온을 첨가하여 효소생산성이 증가된 결과는 다른 균주에서의 보고와 유사하였다^{5,11,12,16)}.

요 약

강원도 원주지방에서 분리한 고온성 방선균을 사용하여 단백질 분해력이 강한 균주를 선별하여 생산조건을 조사하였다. 온도에 대한 효소 생산성을 검토한 결과 배양온도는 50°C에서 가장 좋았으며 균체 생성량도 가장 많았다. 최적의 탄소원과 질소원은 각각 0.5% soluble starch와 0.4% yeast extract였다. 효소생산을 위한 배지의 초기 pH는 8.0, 금속염은 0.05% $CaCl_2$ 에서 48시간 정치 배양하였을 때 최대의 생산성을 보였다.

감사의 말

본 연구는 1999년도 상지영서대학의 학술연구비 지원으로 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. Reed, G. : Enzyme in food processing, Academic press, New York, 123~179 (1975).
2. Paul, P., Faust, U., Sitting, W. and Dieter, A. S. : Fundamentals of biotechnology, WCH, New York, 493~498 (1987).
3. Makio, K., Listyani, W. and Koki, H. : Biochemical properties a thermophilic alkalophile. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2429~2435 (1987).
4. 鶴大典 : *Bacillus*屬 細菌の分泌するプロテアーゼの比較生化学. *日本農藝化学會誌*, 65, 50~55 (1991).
5. Koki Horidoshi : Study on alkalophilic microorganism and alkaline enzyme. *日本農藝化学會誌*, 68, 1343~1349 (1989).
6. 今中忠行 : タンパク質工學とプロテアーゼ. *日本醸造工學協會*, 85, 160~1660 (1990).
7. 山岸明彦 : 進化分子工學を利用した蛋白質分子育種の實例. *化学と生物*, 38, 118~121 (2000).
8. 竹内道雄 : ポストトランスレイショナルモディファイケ

- イシヨンによる プロテアゼの特異性變換. *日本農藝化學會誌*, 64, 38~41 (1991).
9. Greenberg, D. M. : Plant proteolytic enzymes. *Methods in Enzymol.*, 2, Academic Press, New York, 54~64 (1955).
10. 高木博史 : サチライシン(subtilisin)の蛋白質工學. *日本農藝化學會誌*, 65, 63~67 (1991).
11. Stephen, A. K : A study of enzymes. vol 2, CRC Press, Boston, 161~169 (1991).
12. 芳本忠 : *Bacillus*屬 細菌の生産するエキソペプチダゼ. *日本農藝化學會誌*, 65, 60~62 (1991).
13. 小巻利章 : 細菌プロテアゼの利用とその問題點. *日本農藝化學會誌*, 65, 68~70 (1991).
14. Kim, Y. O., Lee, J. K., Sunitha, S., Kim, H. K. and Oh, T. K. : Minor thermostable alkaline protease produced by *Thermoactinomyces* sp. E79. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 469~474 (1999).
15. Katsumi, T., Tsutomu, A., Kazuyuki, S. and Tetsu, K. : Purification and some properties of alkaline proteinases from *Cephalosporium* sp. KM388. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2959~2965 (1987).
16. Jung, H. J., Kim, H. K. and Kim, J. I. : Purification and characterization of Co^{2+} activated extracellular metalloprotease from *Bacillus* sp. JH108. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 861~869 (1999).

(2000년 4월 15일 접수)