

서해 특산 다모류로부터 유용신물질의
특성 및 응용성 연구
Screening and Characterization of
a Novel Bioactive Molecules
from Polychaeta in Yellow Sea

연구 기관
인하대학교

해양수산부



제 출 문

해양수산부장관 귀하

본 보고서를 “서해 특산 다모류로부터 유용신물질의 특성 및 응용성 연구” 과제의
연차보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 인하대학교
주관연구책임자 : 장 정 순
연 구 원 : 백 승 렬
연 구 원 : 김 종 욱
연 구 원 : 주 한 승
연 구 조 원 : 박 건 춘
연 구 조 원 : 이 선 영
연 구 조 원 : 조 우 리
연 구 조 원 : 류 경 희

요 약 문

I. 제 목 : 서해 특산 다모류로부터 유용신물질의 특성 및 응용성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리 나라는 삼면이 바다로 둘러싸인 잠재력이 크고 다양한 해안선과 세계 5대 갯벌 조간대의 하나를 가지고 있다. 이러한 지형적 특성은 이에 포용되고 있는 우리 고유의 다양한 해양생물상과 아울러 생물다양성 유지의 근원이 되는 미래의 자원이며 또한 21C 고부가가치 해양공학산물의 산실일 뿐만 아니라 해안선의 특징을 보아도 단조로운 동해안, 리아스식 해안선의 남해바다 그리고 엄청난 갯벌 조간대를 이루고 있는 서해안 등 실로 우리만이 갖고 있는 특이 해양생물자원의 보고라고 생각된다.

본 연구의 목적은 우리 나라 고유의 해양생물자원으로부터 유용 신물질을 조기에 실용화하기 위한 해양생물 유래의 해양신물질 탐색 및 기법개발에 연구의 주목표로 두고 있다. 특히 본 연구는 서해연안 갯벌 조간대란 열악한 환경 하에서 훌륭한 적응특이성을 보이며 서식하고 있는 갯지렁이를 위시한 몇 종류의 갯벌 특이생물을 이용하여 천연소재의 신물질을 탐색, 실용화를 위한 각종기법 연구를 시도하고 결과로 얻는 새로이 발견된 신물질의 특성과 응용성을 집중적으로 분석함으로써 해양생물공학분야의 새로운 이정표 설정을 주목적으로 한다. 그러나 위에 기술한 생물공학 제품은 선진제국과의 분초를 다투는 치열한 경쟁 속에서 우위를 찾아야만 되는 큰 부담을 안고 있으나 상대적으로 해양생물을 이용한 신물질 실용화분야는 그 역사가 짧기 때문에 체계적인 운영과 집중적이고도 초지적인 연구가 이루어질 경우 가까운 장래에 가장 경쟁력과 잠재력이 큰 분야로 부상될 수 있다고 사료되며 특히 세계 3-4위를 찾아 하고 있는 갯벌조간대란 매우 특이한 우리 고유의 환경 하에서 서식하고 있는 해양생물을 이용할 경우 신물질의 발견과 실용화를 앞당길 수 있는 큰 경쟁력을 포용하고 있는 분야로 판단된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 실험에 사용한 재료로는 참갯지렁이를 사용하였고 이종은 현재까지 전세계적으로

1屬 1種으로(한국 특산 종)기재되어 있으며 특히 갯지렁이가 서식하고 있는 서해연안의 갯벌 조간 대는 세계3-4위를 차지하고 있는 갯벌 해양생물의 보고라고 생각된다. 일반적으로 우리 나라 갯벌의 서식 환경은 심한 조수의 간만차, 오염된 민물의 유입 및 극심한 계절별(여름 및 겨울) 온도차이등 매우 열악한(극한상태)상황의 연속이나 갯벌 특이생물은 훌륭히 생존하고 있음을 알 수 있다. 이러한 열악한 환경을 극복하기 위해서는 갯지렁이 체내에 타 생명체에 비하여 특이 신물질이 존재할 가능성이 높음을 시사한다고 판단된다. 아울러 서식환경과 해양생태학적측면으로 볼 때 바다의 정화현상, 유기물 분해 등 환경오염 제거등의 현상과 직관된다고 추정할 수 있으며 갯지렁이 체내 기능성 신물질 중 제일 후보물질로는 생체 내 화학반응을 주도하고 있는 “단백질 분해 효소”를 목표로 삼았다. 갯지렁이로부터 추출 정제된 슈퍼효소는 기존 효소의 성질을 훨씬 능가하는 초효소의 기능을 갖고 있다 (특허출원 1999. 7. 22). 이미 전세계적으로 상업적 용도로 쓰이는 효소의 경우 (미국 Novo社의 Alcalase) 대부분이 미생물인 *Bacillus licheniformis*를 돌연변이 시켜 얻고있는 효소로 본 연구 결과의 슈퍼효소와 비교하였을 때 갯지렁이 효소는 천연효소란 특성을 지니고 있음에도 불구하고 온도 내열성만을 제외하고는 전반적으로 모든 특성 등이 우위를 나타내고 있다 (pH안정성, 반응최적 pH, 단위 ug당 효소능, chaotropic agent존재하의 효소능, 중금속 존재하의 효소능, 저온(0,10도C)에서의 효소능). 이러한 특성을 지니고 있는 갯지렁이 슈퍼효소의 상업적 이용성은 매우 광범위하여 우선 세제의 효소첨가제, 가죽제품 공정중 dehairing process, silk degumming process, contact lens washing solution 첨가제, 환경오염처리첨가제, 가축사료 첨가제등 실로 방대한 분야에 대한 응용가능성을 제시하고 있다. 뿐만 아니라 갯지렁이에 공생하는 protease를 분비하는 세균을 screening 하여 강력한 protease를 분비하는 미생물을 selection 하고 이 미생물로부터 산업적으로 사용할 수 있는 protease를 screening 하고자 하였다.

IV. 연구개발결과

제 1단계로

- ① 갯지렁이 채집 및 시료를 확보함으로써 계절적 시료 난 현상을 최소화하였음.
- ② 채집한 갯지렁이로부터 전 조직을 이용하여 분쇄 후 crude enzyme(조 효소)분획 분

리

- ③ 분리된 조 효소 분획 (crude enzyme fraction)을 사용하여 각종 정제과정(ammonium sulfate 처리, 각종 chromatography 단계, 친화chromatography 및 FPLC 등)을 거친 다음 고도로 정제된 효소 분획을 얻음
- ④ 정제된 효소 분획에 대한 다양한 효소학적 실험(반응 최적온도, pH, 금속 ion, 중금속류의 억제 실험, 기질특이성 실험, 각종 detergent 영향 등)등을 실험한 결과
- ⑤ Serine계열의 단백질 분해효소(serine protease)로
 - 최적효소 활성도 pH10
 - 분자량 28kd의 단량체
 - 전 pH 영역에서 안정화
 - 효소능은 Temp 50°C에서 급격히 저하
 - 특히 낮은 온도 하에서의 효소 능은 매우 탁월함(0°C에서 25%, 10°C에서 30~40%유지)
- ⑥ Detergent, Oxidizing agent, heavy metal ions, reducing agent등의 고농도 노출하에서도 효소의 안정성 유지
- ⑦ N-terminal 아미노산 서열 및 random internal sequence 약 25 잔기에 대한 아미노산 서열 分析후 peptide searching결과 현재까지는 novel peptide로 확인되고 있음
이러한 결과로 미루어보아 서해연안 갯벌서식 갯지렁이로부터 추출, 정제된 serine 계열의 단백질 분해효소는 효소학적 측면으로 보아 일반효소의 특성을 훨씬 능가하는 슈퍼효소의 범주에 들며 이와 유사한 현재 상용화된 효소와의 특성분석을 비교하였을 때 여러 특성이 우위를 보임으로서 매우 넓은 산업적 응용성을 제시하였다고 판단된다.

제 2차 년도로는

제 1차년도에서 얻은 여러 결과를 분석한 후 다음과 같은 가장 중요한 연계실험을 일부 실시중에 있다. 제 2차 년도 실험은 1차년도에 계획치 않았던 실험내용으로

- 정제된 물질(extremozyme or 신기능성물질) 에 대한 아미노산 서열 분석
- 전체 아미노산 조성비율 분석
- 정제된 물질의 cDNA library를 제조
- 공생미생물로부터 강력한 분해효소의 탐색

- 공생미생물로부터 강력한 단백질 분해효소의 최적 생산 조건 검토
- 공생미생물로부터 강력한 단백질 분해효소와 갯지렁이 슈퍼효소와의 identity 실험
- 미생물의 fermentation 연구

그 밖에, 단백질 수준에서 해석된 단백질 분해 효소에 대한 分子生物學的 方法론을 적용 후 분자 level (혹은 DNA 수준)에서의 실험 및 해양생물공학적 접근법 시도로서 슈퍼효소에 대한 cDNA제조, genomic library제조 및 over expression을 한 유전공학 적 대량생산 기틀에 대한 실험을 진행중이다.

V. 연구개발결과의 활용계획

이미 위에 기술한바와 같이 갯지렁이 유래의 슈퍼효소에 대한 물질특허를 출원한바 있고 선진제국에서의 결과에서와 같이 본 연구결과와 같은 부류에 속하는 슈퍼효소로 이의 응용성은 매우 광범위하며 예로 의약학적인 면, 일상생활에의 응용면, 및 산업적 인 면 등으로 사용가능성이 높은 것으로 판단된다. 즉 고기능성 슈퍼효소류로서 각종 산업 응용분야 (세제효소 첨가제, 사료 전처리제, 섬유 및 피혁 공정상의 처리제, personal care제제등)와 환경오염 정화제 등 응용범위가 넓다고 판단된다.

연구개발 2차 연도부터는 (2000년 3월 ~) 명실공히 **신 학 관 협동연구**로 전환시 킬 예정으로 **산업체의 partner**로는 **서린생명과학(주)**이 적극 참여할 예정이며 궁극 적으로는 최종산물인 슈퍼효소의 대량생산 기틀 확립과 폭 넓은 응용성등을 공동으로 개발, 병행시킬 예정이다.

S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

We have developed a method of purification of a serine protease from the Korean polychaeta, *Periserrula leucophryna* by a combination of Diaion HP 20, Phenyl-Sepharose chromatography and finally Benzamidine-Sepharose chromatography. Adsorption with Diaion HP 20, Crude extracts were absorbed after stirring for 4 h with a HP 20 resin and the reactants were eluted with 20% acetone in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) as an elution buffer. The enzyme showed a remarkable recovery rate of 75% with a specific activity of 849.8 U mg⁻¹ protein and 48.6-fold of purification. Using the eluent fraction from the HP 20 resin as a starting material, the enzyme was finally purified 10 547-fold with a specific activity of 184 583 U mg⁻¹ protein. The protease by the improved method was also stable up to temperature of 45°C, however, it became unstable over 50°C. The enzyme has an optimum pH of 10 and maintained its stability over a broad range of pH values between 4 to 12. And its activity was not influenced by the heavy metals such as such as Cd²⁺ and Hg²⁺ and treatment of sodium dodecyl sulfate (SDS) did not inactivate enzyme activity. We confirmed that the adsorption procedure, involving the Diaion HP 20 resin as a first step, proved to be a highly efficient way of purifying the protease from crude extracts of *Periserrula leucophryna*.

We have also screened some protease-secreting bacteria from polychaeta hemolymph and strain 103 and 104 were selected for protease production. Among the nutrients we tested, casein and soybean meal were the most efficient for the protease production. The growth medium was composed of 1.5% soybean meal, 1% casein, 0.5% K₂HPO₄, and 0.5 mM MgSO₄ for bacteria strain 104. However, we needed to further investigate for the fermentation conditions to increase in the amounts of secreted protease.

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

CHAPTER 1 Introduction

1. Research Goal and General Subject Matter
2. Point of Aims for R/D

CHAPTER 2 Statement of Art for R/D In and Outside of Nation

1. Status of In and Outside of Nation
2. Industrial Use of Super-enzyme from *Polychaeta*
3. Prospect and Changes of R/D Circumstance

CHAPTER 3 Results of R/D

1. Detailed Subject Matter For R/D
2. Result of R/D

CHAPTER 4 Degree of achievement of Present R/D for Contribution to Outside

CHAPTER 5 Plan for Application of R/D Effect

CHAPTER 6 Reference

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 목적 및 내용

1. 연구 목적

- 1) 국내외 현황
- 2) 갯지렁이 슈퍼효소와 미세조류의 상업적 이용성
- 3) 여건변화와 전망

제 2 절 연구의 착안점

1. 기능성 해양 신물질이란?
2. 기능성 해양신물질의 활용도
3. 기능성 해양신물질의 원류는 ?

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 현황

제 2 절 갯지렁이 슈퍼효소의 상업적 이용성

제 3 절 여건변화와 전망

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 개발 수행 내용

1. 갯지렁이 protease 의 정제

- 1) Activity assay
- 2) 조효소액 제조
- 3) 흡착
 - 3-1. 흡착 시간
 - 3-2. 용매 농도
- 4) Phenyl-Sepharose column chromatography
- 5) Benzamidine-Sepharose column chromatography

6) 정제된 protease 의 특성 규명

2. Bacterial protease

1) Bacterial protease screening

- 1-1. Activity assay
- 1-2. Protease-producing bacteria screening
- 1-3. Protease 최적 생성 조건 검토
- 1-4. Soybean meal 의 effect
- 1-5. 다른 Bacteria strain 과의 비교

2) Bacterial protease 의 정제

- 2-1. Crude extract 의 제조
- 2-2. Phenyl-Sepharose column chromatography
- 2-3. DEAE-Sepharose column chromatography
- 2-4. CM-Sepharose column chromatography
- 2-5. Hydroxylapatite column chromatography

3) Bacterial protease 의 특성 규명

제 2 절 지금까지의 연구결과

1. 당해 연도 종합

2. 갯지렁이 protease 의 정제

1) 흡착

- 1-1. 흡착 시간
- 1-2. 용출 조건

2) 갯지렁이 Protease 정제

3. Bacterial Protease

1) 단백질 분해 효소 탐색

2) 성장 곡선

3) Protease 최적 생성 조건 검토

- 3-1. 배양 배지에 따른 protease 생성 변화
- 3-2. 배양 pH 따른 protease 생성 변화
- 3-3. Carbon source 에 따른 protease 생성 변화
- 3-4. Divalent cation 첨가에 따른 protease 생성 변화
- 3-5. Inorganic salt 첨가에 따른 protease 생성 변화

4) Bacterial protease 발현에서 soybean meal 의 영향

5) 다른 Bacteria strain 과의 protease 생성 비교

- 6) Bacterial protease 의 정제
 - 6-1. Crude extract 의 제조
 - 6-2. Phenyl-Sepharose column chromatography
 - 6-3. DEAE-Sepharose column chromatography
 - 6-4. CM-Sepharose column chromatography
 - 6-5. Hydroxylapatite column chromatography
- 7) Bacterial protease 의 특성 규명
 - 7-1. optimum pH 와 pH stability
 - 7-2. Optimum temperature
 - 7-3. Heat stability
 - 7-4. Inhibition profiles
- 4. 향후 계획

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발목표 달성도

제 2 절 대외기여도

- 1. 기술적 측면
- 2. 경제·산업적 측면
- 3. 사회·문화적 측면

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참고문헌

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 목적 및 내용

1. 연구 목적

우리 나라는 삼면이 바다로 둘러싸인 잠재력이 큰 다양한 해안선과 세계 5대 갯벌 조간대의 하나를 가지고 있다. 이러한 천혜의 지형적 특성을 갖고 있음에도 불구하고 해양과학 전반에 걸친 물이해와 지정학적 특성이 해양과학의 발전을 크게 저하시켰으나 21C에 들어오면서 해양선진국대 열진입 이란 기치아래 해양수산부주체로 해양과학 전반에 걸친 총괄적 연구개발을 새로히 주도하고 있음은 매우 고무적인 사안이라고 사료된다.

위에 기술한 지형적 특성은 이에 포용되고 있는 우리 나라 고유의 다양한 해양생물과 아울러 생물다양성 유지의 근원이 되는 미래생물자원의 보고이며 또한 21C 고부가가치 해양생물공학산물의 산실일 뿐만 아니라 해안선의 특징을 보아도 단조로운 동해안, 리아스식 해안선의 남해안 그리고 엄청난 갯벌 조간 대를 이루고 있는 서해안 등 실로 우리만이 갖고 있는 특이 해양생물자원의 보고라고 생각된다.

이러한 측면으로 볼 때 우리 나라 고유의 해양생물자원으로부터 유용신물질을 조기에 실용화하기 위한 해양생물 유래의 해양신물질 탐색 및 기법개발이 매우 시급하다고 생각된다

본 연구는 우리 나라 고유의 해양생물자원으로부터 유용 해양신물질을 조기에 실용화하기 위한 탐색 및 기법개발에 연구의 주목적을 두고 있으며 우선 가장 가능성이 큰 두 가지 연구방향으로 추적할 예정이다.

즉 제 1분야에서는 서해안 갯벌 조간대란 열악한 환경 하에서 훌륭한 적응특이성을 보이며 서식하고 있는 갯지렁이를 위시한 몇 종류의 갯벌 특이생물(동족, 칠게등)을 이용하여 천연소재의 해양원류의 신물질을 탐색, 실용화를 위한 각종기법 연구를 시도하고 제 2분야에서는 해양 미세 조류가 지닌 무궁무진한 상업적 잠재력과 엄청난 가능성을 최대한 이용하여 고부가가치 유용산물의 효율적이고도 경제적인 생산을 위한 미세 조류 고농도배양 신기술의 개발을 시도할 예정이다.

1) 국내외 현황

그러나 위에 기술한 생물공학 제품은 선진제국과의 분초를 다투는 치열한 경쟁 속에서 우위를 찾아 해야만 되는 큰 부담을 안고 있으나 상대적으로 해양생물을 이용한 신물질 실용화분야는 그 역사가 짧기 때문에 체계적인 운영과 집중적인 연구비의 지원이 약속될 경우 가장 경쟁력과 잠재력이 큰 분야라고 사료되며 특히 세계 3-4위를 찾아 하고 있는 갯벌조간대란 매우 특이한 우리 고유의 환경 하에서 서식하고 있는 해양생물을 이용할 경우 신물질의 발견과 실용화를 앞당길 수 있는 큰 경쟁력을 포용하고 있는 분야로 판단된다.

2) 갯지렁이 슈퍼효소와 미세조류의 상업적 이용성

갯지렁이로부터 추출 정제된 슈퍼효소는 기존 효소의 성질을 훨씬 능가하는 초효소의 기능을 갖고 있다(특허출원 1999. 7. 22.) 이미 전세계적으로 상업적 용도로 쓰이는 효소의 경우(미국 Novo社の Alcalase) 대부분이 미생물인 *Bacillus licheniformis*를 돌연 변이 시켜 얻고있는 효소로 본 연구 결과의 슈퍼효소와 비교하였을 때 갯지렁이 효소는 천연효소란 특성을 지니고 있음에도 불구하고

온도 내열성만을 제외하고는 전반적으로 모든 특성 등이 우위를 나타내고 있다 (pH안정성, 반응 최적 pH, 단위 ug당 효소능, chaotropic agent 존재하의 효소능, 중금속 존재하의 효소능, 저온에서의 효소 능, 0도, 10도C 등).

이러한 특성을 지니고 있는 갯지렁이 슈퍼효소의 상업적 이용성은 매우 광범위하여 우선 세제의 효소첨가제, 가죽제품 공정중 dehairing process, silk degumming process, contact lens washing solution 첨가제, 환경오염처리첨가제, 가축사료 첨가제등 실로 방대한 분야에 대한 응용가능성을 제시하고 있다.

3) 여건변화와 전망

선진제국은 오는 21C의 가장 유력하고 고부가가치의 창출과 환경 친화적인 산업의 일종으로 생명공학분야의 산업을 제1로 꼽고 있다. 이 생명공학분야의 주류는 의약품, 의약학 연관 제1차 원료제품, 이외에도 각종 fine chemicals등이 대두되고 있다. 이러한 제품의 생산은 유전 공학적 방법을 이용하여 미생물 혹은 대리동물을 사용하여 목표 물질을 얻고 있고 우리 나라의 경우 그러 데로 장족의 발전을 이루어 오늘에 이르고 있다고 판단된다.

앞으로의 발전 가능성분야는 아직까지도 인류에게 많이 노출되지 않아 많은 신비에 쌓여있고 친화적인 측면으로 보아도 생명체의 발생기원과 가장 많은 부분이 태고의 모습을 간직하고 있는 각종 해양생물로부터의 새롭고 전혀 상상치 못하였던 신 가능성을 갖고 있다고 판단되는 유용물질의 추적이야말로 새로운 약속을 받을 수 있는 분야라고 판단된다.

선진제국, 특히 미국, 오스트랄리아, 노르웨이 및 일본 등 매우 특이한 해양환경을 갖고 있는 나라들이 주도를 하고 있으며 각종 해양생물로부터 항암제, 항 노화제, 항염제, 기타 산업적 부가가치가 큰 여러 종류의 fine chemicals, 효소제, extremozymes등의 개발에 박차를 가하고 있다. 즉 점차적으로 육상으로부터 해양생물로의 전환을 쉽게 알 수 있으며 이는 해양생물자체의 무궁무진한 가능성에 초점이 맞추어진 것으로 생각된다.

국내의 여러 여건은 아직 선진제국과는 많은 격차가 있으나 우리 나라 만이 갖고 있는 많은 장점을 동시에 갖고있기 때문에 앞으로의 전망은 좋다고 판단된다. 즉 고도로 훈련 된 많은 고급인력, 특히 생명공학 기법에 훈련된 인력의 보유, 매우 특이한 삼면의 해양 환경과 갯벌 등 및 여러 분야의 고급인력을 총괄적으로 포함시킬 때 앞으로의 전망은 매우 밝다고 판단된다(본 연구에서와 같이 공학분야와의 공동 참여 등).

제 2 절 연구의 착안점

- 본 실험에 사용한 재료로는 참갯지렁이 사용
- 현재까지 전세계적으로 1屬 1種으로 기재되어 있음 (한국 특산 종)
- 서해연안의 갯벌 조간 대는 세계3-4위를 차지하고 있는 갯벌 해양생물의 보고
- 갯벌의 서식환경이 매우 열악(극한상태)하나 갯벌 특이생물은 훌륭히 생존하고 있음
- 열악한 환경을 극복하기 위해서는 갯지렁이 체내에 특이 신물질이 존재할 가능성 높음
- 서식환경과 해양생태학적측면으로 볼 때 바다의 정화현상, 유기물 분해 등 환경오염 제거 등의 현상과 직관된다고 추정
- 갯지렁이 체내 기능성 신물질 중 제일 후보물질로는 생체 내 화학반응을 주도하고 있는

“단백질 분해 효소”를 목표로 삼음.

1. 기능성 해양 신물질이란?

지금까지 전혀 발견되지 않았거나 이미 유사한 물질이 존재한다하더라도 그 기능과 성질이 전혀 다른 새로운 부류에 속하는 고기능성 신물질류의 총칭

2. 기능성 해양신물질의 활용도

매우 광범위하며 의약학적인 면, 일상생활응용, 및 산업적인 면 등으로 사용가능성

- 항암제, 항노화제, 신항생물제제 등 의약품류와 연관된 신물질류
- 천연식용색소, 고기능성 슈퍼 효소류 혹은 고부가가치의 대사 중간 생성물, 첨가제, 환경오염 정화제 등
- 각종 산업 응용분야 (세제효소 첨가제, 사료 전처리제, 섬유 및 피혁 공정상의 처리제, personal care제제등)

3. 기능성 해양신물질의 원류는 ?

- 지역적 혹은 환경적 특성을 갖고 있는 지역에 서식하고 있는 각종 동·식물·미생물으로써 매우 특이한 생활환경에 적응서식하고 있는 고유종 혹은 돌연변이종의 범주에 속하는 생명체 (extremophiles의 개념)

예: 미국 Yellowstone 국립공원 98℃ 온천수 서식 미생물

원자로 노심부 냉각수서식 미생물

심해저 서식 해양 생물류

극지 서식 해양 생물류

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 현황

위에 기술한 각종 부가가치가 높은 생물공학 제품은 선진제국과의 분초를 다투는 치열한 경쟁 속에서 우위를 차지 해야만 되는 큰 부담을 안고 있으나 상대적으로 해양생물을 이용한 신물질 실용화분야는 그 역사가 짧기 때문에 체계적인 운영과 집중적인 연구비의 지원이 약속될 경우 가장 경쟁력과 잠재력이 큰 분야라고 사료되며 특히 세계 3-4위를 차지 하고 있는 갯벌조간대란 매우 특이한 우리 고유의 환경 하에서 서식하고 있는 해양생물을 이용할 경우 신물질의 발견과 실용화를 앞당길 수 있는 큰 경쟁력을 포용하고 있는 분야로 판단된다.

제 2 절 갯지렁이 슈퍼효소의 상업적 이용성

갯지렁이로부터 추출 정제된 슈퍼효소는 기존 효소의 성질을 훨씬 능가하는 초효소의 기능을 갖고 있다 (특허출원 1999. 7. 22.). 이미 전세계적으로 상업적 용도로 쓰이는 효소의 경우 (미국 Novo社の Alcalase) 대부분이 미생물인 *Bacillus licheniformis*를 돌연 변이 시켜 얻고 있는 효소로 본 연구 결과인 슈퍼효소와 비교하였을 때 갯지렁이 효소는 천연효소란 특성을 지니고 있음에도 불구하고 온도 내열성만을 제외하고는 전반적으로 모든 특성 등이 우위를 나타내고 있다 (pH안정성, 반응최적 pH, 단위 ug당 효소능, chaotropic agent 존재하의 효소능, 중금속 존재하의 효소능, 저온에서의 효소 능, 0도, 10도C 등). 이러한 특성을 지니고 있는 갯지렁이 슈퍼효소의 상업적 이용성은 매우 광범위하여 우선 세제의 효소첨가제, 가죽제품 공정중 dehairing process, silk degumming process, contact lens washing solution 첨가제, 환경오염처리첨가제, 가축사료 첨가제등 실로 방대한 분야에 대한 응용가능성을 제시하고 있다.

제 3 절 여건변화와 전망

선진제국은 오는 21C의 가장 유력하고 고부가가치의 창출과 환경 친화적인 산업의 일종으로 생명공학분야의 산업을 제1로 꼽고 있다. 이 생명공학분야의 주류는 의약품, 의약학 연관 제1차 원료제품, 이외에도 각종 fine chemicals등이 대두되고 있다. 이러한 제품의 생산은 유전 공학 적 방법을 이용하여 미생물 혹은 대리동물을 사용하여 목표 물질을 얻고 있고 우리 나라의 경우 그런 데로 장족의 발전을 이루어 오늘에 이르고 있다고 판단된다.

앞으로의 발전 가능성분야는 아직까지도 인류에게 많이 노출되지 않아 많은 신비에 쌓여있고 진화적인 측면으로 보아도 생명체의 발생기원과 가장 많은 부분이 태고의 모습을 간직하고 있는 각종 해양생물로부터의 새롭고 전혀 상상치 못하였던 신 가능성을 갖고 있다고 판단되는 유용물질의 추적이야말로 새로운 약속을 받을 수 있는 분야라고 판단된다.

선진제국, 특히 미국, 오스트렐리아, 노르웨이 및 일본 등 매우 특이한 해양환경을 갖고 있는 나라들이 주도를 하고 있으며 각종 해양생물로부터 항암제, 항 노화제, 항염제, 기타 산업적 부가가치가 큰 여러 종류의 fine chemicals, 효소제, extremozymes등의 개발에 박차를 가하고 있다. 즉 점차적으로 육상으로부터 해양생물로의 전환을 쉽게 알 수 있으며 이는 해양생물자체의 무궁무진한 가능성에 초점이 맞추어진 것으로 생각된다.

국내의 여러 여건은 아직 선진제국과는 많은 격차가 있으나 우리 나라 만이 갖고 있는 많은 장점을 동시에 갖고있기 때문에 앞으로의 전망은 좋다고 판단된다. 즉 고도로 훈련 된 많은 고급인력, 특히 생명공학 기법에 훈련된 인력의 보유, 매우 특이한 삼면의 해양 환경과 갯벌 등 및 여러 분야의 고급인력을 총괄적으로 포함시킬 때 앞으로의 전망은 매우 밝다고 판단된다.

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 개발 수행 내용

Protease 는 소화, 흡수, 방어 등의 다양한 기능을 직 간접적으로 담당하고 있으며 활성 자리의 구조에 따라 serine protease, cysteine protease, aspartic protease 그리고 metalloprotease로 구분하고 있다. 본 연구는 서해연안 특종의 한국산 갯지렁이로부터 serine protease를 탐색하고 탐색된 단백질 분해 효소를 분리, 정제하여 그 특성을 규명하고 산업적으로 응용 가능성을 연구하였다 (Ref 1~5).

1. 갯지렁이 protease 의 정제

1) Activity assay

Assay buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 9.0/5 mM CaCl₂) 와 적당하게 희석된 sample을 100 ul 되게끔 가하여 잘 mixing 한 후 5 ul의 substrate (4 mM S-2266, Val-Leu-Arg-pNA) 용액을 가하여 37°C에서 10 분간 incubation 한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다 (ref. 1).

2) 조효소액 제조

갯지렁이 몸체 (약 200 g)를 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) 에 녹인 후 Omni mixer 로 완전히 파쇄하고 50°C에서 40 분간 가열한 후 10,000 rpm으로 30 분간 원심 분리하였다. 상층액을 조심스럽게 취하여 조효소액으로 사용하였다.

3) 흡착

위의 과정에서 얻은 crude extract를 방향족 계열의 합성 흡착제를 사용하여 protein을 흡착하였다. 이 때, 흡착 시간 및 용출 buffer 에 따른 회수율을 측정하였다.

3-1. 흡착 시간

Crude extract 에 방향족 계열의 합성 흡착제를 가하여 주고 4°C에서 2, 4, 6 및 16 시간 동안 mechanical stirrer를 사용하여 250 rpm 으로 잘 저어 준 후 suction filter 로 흡착제를 회수하였다. 다음 증류수로 흡착제를 간단히 씻어준 후 25% acetone을 포함하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)로 흡착된 protein을 용출하였다.

3-2. 용매 농도

Crude extract에 방향족 계열의 합성 흡착제를 가하여 주고 4°C에서 4 시간 동안 mechanical stirrer를 사용하여 250 rpm으로 잘 저어 준 후 suction filter로 흡착제를 회수하였다. 증류수로 흡착

제를 간단히 씻어준 후 다양한 농도의 acetone (15~25%) 을 포함하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)로 흡착된 protein을 용출하였다.

4) Phenyl-Sepharose column chromatography

위의 방향족 계열의 합성 흡착제의 용출액을 1 M 이 되게 ammonium sulfate를 가하고 1 M ammonium sulfate를 포함하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)로 미리 평형되어 있는 Phenyl-Sepharose column (2.5 × 6 cm) 에 시간당 100 ml의 속도로 loading 하였으며 같은 buffer로 280 nm에서 흡광도가 0.05 이하가 될 때까지 washing 하여 준 후 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)로 결합되어 있는 단백질을 용출하였다. 이 때 각 fraction 은 150 drop 씩 (4 ml) 받았으며, protease assay 후 active fraction을 모았다. Active fraction을 Amicon YM 10 membrane으로 농축한 다음 그 이후의 단계에 사용하였다.

5) Benzamidine-Sepharose column chromatography

0.5 M NaCl 과 0.2 mM benzamidine을 포함하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)로 평형시킨 Benzamidine-Sepharose column (1.0×10 cm)에 위의 소수성 크로마토그램 단계에서 얻은 활성 분획을 시간당 15 ml의 속도로 loading 하고 같은 완충용액으로 시간당 15 ml의 속도로 전개하여 결합하지 않는 단백질을 제거한 후 0.5% acetic acid로 결합되어 있는 단백질을 용출하였다. 이 때 용출된 단백질이 산성 pH에 노출되는 것을 방지하기 위하여 1 M Tris-HCl, pH 9.0 buffer로 용출액을 중성 pH가 되게 하였다. 용출액은 Amicon Centriprep PM 10으로 농축한 후 -70°C에 보관하였다.

6) 정제한 protease 의 특성 규명

개선된 방법으로 정제한 protease 의 여러 가지 효소화적인 특성을 규명하였다.

2. Bacterial protease

1) Bacterial protease screening

1-1. Activity assay

Assay buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.2) 와 sample을 50 ul 되게끔 가하여 잘 mixing 한 후 150 ul 의 casein 용액 (4 mg/ml in assay buffer) 을 가하여 37°C 에서 30 분간 incubation 한 후 200 ul 의 10% Trichloroacetic acid (TCA) 용액을 가하고 15,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 반응하지 않은 casein을 제거하였다. 상층액을 회수하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며 효소 1 Unit 는 1 분 동안 280 nm에서 흡광도 1을 변화 ($1 \Delta A_{280}/\text{min}$)하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

1-2. Protease-producing bacteria screening

갯지렁이 체액을 skim milk/agar plate 에 plating 한 후 37°C에서 16 시간 동안 배양한 후 clear zone을 형성하는 균주를 selection 한 다음 액체 배양하여 protease를 최대 생성하는 균주를 선별하였다.

1-3. Protease 최적 생성 조건 검토

선별된 bacteria를 다양한 배양 조건에 따른 protease 최적 생성 조건을 연구하였다.

1-4. Soybean meal 의 effect

Soybean meal (SBM) 은 콩기를 생산 후 남은 부산물로써 주로 동물의 사료로 쓰이거나 폐기물로 버려지는 물질로써, 쉽고 값싸게 얻을 수 있는 성분으로 protease 생성에 아주 적합한 배지 성분으로 생각되어 이 연구에 사용하였다.

1-5. 다른 Bacteria strain 과의 비교

Bacillus subtilis 와 *B. licheniformis* 는 protease를 분비하는 대표적인 미생물로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 이 두 균주를 KCTC에서 분양 받아 protease 분비 능력을 비교하였다.

2) Bacterial protease 의 정제

Bacteria strain 104로부터 배지로 분비하는 protease를 정제하고자 하였다.

2-1. Crude extract 의 제조

3 L 의 1.5% Soybean meal/1% casein/ 0.5% potassium phosphate/0.5 mM MgSO₄ 배지를 사용하여 0.5 VVM (volume/volume/min) 의 속도로 air를 공급하면서 37°C에서 250 rpm으로 fermentor (New Brunswick Scientific사)에서 40 시간동안 배양하였다. 배양액을 10,000 rpm에서 15 분간 원심 분리하여 cell을 제거하고 상층액을 회수하여 protease 정제의 출발 물질로 사용하였다.

2-2. Phenyl-Sepharose column chromatography

위의 과정에서 회수한 배양 상층액에 최종 농도가 1 M 이 되게 ammonium sulfate를 가하여 잘 녹여준 후 1 M ammonium sulfate를 포함하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 미리 평형되어 있는 Phenyl-Sepharose column (2.5 × 8 cm) 에 loading 하였다. 같은 buffer 로 280 nm에서 흡광도가 0.05 이하가 될 때까지 washing 하여 준 후 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)로 결합되어 있는 단백질을 용출하였다. 이 때 각 fraction 은 200 drop 씩 (5 ml) 받았으며, protease assay 후 active fraction을 모았다. Active fraction 을 30~80% ammonium sulfate로 fractionation 한

후 15,000 rpm에서 40 분간 원심 분리하여 침전물을 회수하였으며, 이 침전물을 최소 부피의 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 녹인 후 같은 buffer로 투석하여 남아 있는 ammonium sulfate를 제거하고, 다음 단계에 사용하였다.

2-3. DEAE-Sepharose column chromatography

위의 과정에서 얻은 투석액을 회수하여 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5)로 미리 평형되어 있는 DEAE-Sepharose column (2.5 × 5 cm) 에 loading 하였다. 같은 buffer 로 280 nm에서 흡광도가 0.01 이하가 될 때까지 washing 하여 resin 에 결합되어 있는 단백질을 용출하였다. 이 때 각 fraction 은 100 drop 씩 (3 ml) 받았으며, protease assay 후 active fraction을 모았다.

2-4. CM-Sepharose column chromatography

위의 과정에서 얻은 protease 용액을 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 미리 평형되어 있는 CM-Sepharose column (2.5 × 5 cm) 에 loading 하였다. 같은 buffer 로 280 nm에서 흡광도가 0.01 이하가 될 때까지 washing 하여준 후 15 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 resin 에 결합되어 있는 단백질을 용출하였다. 이 때 각 fraction 은 100 drop 씩 (3 ml) 받았으며, protease assay 후 active fraction만을 모았다.

2-5. Hydroxylapatite column chromatography

위의 과정에서 얻은 protease 용액을 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 미리 평형되어 있는 Hydroxylapatite column (2.5 × 4 cm) 에 loading 하였다. 같은 buffer로 280 nm에서 흡광도가 0.01 이하가 될 때까지 washing 하여준 후 15 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5)로 resin 에 결합되어 있는 단백질을 용출하였다. 이 때 각 fraction 은 100 drop 씩 (3 ml) 받았으며, protease assay 후 active fraction을 모았다. Active fraction 은 Amicon Centriprep PM 10으로 농축한 후 -70°C에 보관하였다.

3) Bacterial protease 의 특성 규명

Bacteria strain 104에서 정제한 protease 의 optimum pH, pH stability, 반응 최적 온도, 열 안정성 등과 같은 여러 가지 효소학적 특성을 규명하였다.

제 2 절 지금까지의 연구결과

1. 당해 연도 종합

- 갯지렁이 채집 및 시료 확보
- 채집한 갯지렁이로부터 Crude enzyme(조효소) 분리
- 분리된 조효소 분획 (Crude enzyme fraction)을 사용하여 1 차년도에 확립된 각종 정제과정 (ammonium sulfate fractionation, Gel filtration chromatography, Ion-exchange chromatography 및 affinity chromatography 단계) 을 간단한 방법으로 개선 (흡착, Phenyl-Sepharose chromatography affinity chromatography 단계) 하여 정제 수율 증가하였으며 정제 기간을 약 2~3 일 로 단축
- 정제 방법의 개선으로 대량 생산 체제 구축
- 정제된 효소분획에 대한 다양한 효소학적 실험(반응 최적 온도, pH, 금속 ion, 중금속류의 억제 실험, 기질특이성 실험, 각종 detergent 영향 등)
- 갯지렁이에 공생하는 미생물 screening
- 갯지렁이에 공생하는 미생물로써 protease를 분비하는 미생물 약 15 strain을 screening
- Screening 한 공생 미생물 중 protease를 가장 많이 분비하는 strain 103 및 104를 선택
- Strain 103 및 104에서 protease 분비 시 최적 조건 검토
- 조사한 최적 조건을 fermentation 에 적용
- Strain 104 에서 분비하는 protease 의 정제
- Strain 104에서 정제한 protease 의 부분적인 characterization
- Strain 104에서 정제한 protease 는 serine계열의 단백질 분해효소(serine protease)로 판명
- 분자량 28 kDa 의 단량체
- 전 pH 영역에서 안정화
- 효소능은 Temp 50°C 이상에서 저하
- 특히 낮은 온도하에서의 효소능은 매우 탁월함

2. 갯지렁이 protease 의 정제

갯지렁이 protease를 정제 시 기존의 방법을 사용하였을 때 순도 및 회수율에서 재현성이 매우 떨어지는 단점을 가지고 있다. 따라서 정제 방법에서 전반적인 수정이 필요로 하였다. Ammonium sulfate fractionation, Sephacryl S-200 gel filtration 및 DEAE-Sepharose ion-exchange chromatography 의 단계를 생략하고 Diaion HP 20 resin을 사용하여 정제를 시도하였다. HP 20 resin 사용시 resin 으로부터 bound protein 의 elution 조건 및 최적 흡착 시간을 test 하였다.

1) 흡착

1-1. 흡착 시간

갯지렁이 body를 Omin-mixer를 사용하여 잘 파쇄하고 50°C에서 45 분간 heating 한 후 10,000 rpm에서 40 분간 원심 분리하여 상층액을 회수하였으며, 회수된 갯지렁이 body extract에 5%(w/v) 가 되게끔 Diaion HP 20 resin 을 처리한 후 4°C에서 2, 4, 6 및 16 시간 동안 stirring 한 후 suction filter로 여과하여 반응한 resin을 각각 회수하였다. 회수된 resin 은 증류수로 간단하게 washing한 후 약 4 배 volume 의 25% acetone을 포함하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 4°C에 서 약 1 시간 동안 stirring 하면서 bound protein을 elution 하였으며 용출액은 suction filter로 여과 하여 여과액을 얻었으며 그 결과를 표 1 에 나타내었다.

Table 1. Adsorption of alkaline protease with Diaion HP 20

Time	Unit (U)	Protein (mg)	SA ¹⁾ (U/mg)	PF ²⁾ (fold)	Yield (%)
Crude	31,755	1,957	16.2	1.0	100.0
2 h	7,794	22	354.3	21.9	24.5
4 h	22,968	25	918.7	56.7	72.3
6 h	29,484	56	526.5	32.5	92.8
16 h	30,326	91.6	331.0	20.4	95.5

¹⁾ SA, Specific activity; ²⁾ PF, Purification fold

위의 표 1에서 보듯이 방향족 계열의 합성 흡착제인 Diaion HP 20 resin 과 incubation 하는 시간이 증가할수록 protease 의 회수율이 높아 졌지만 6 시간 incubation 의 경우 elution 된 total protein 의 양이 4 시간 incubation 보다 약 2 배 정도 많았다. 즉 specific activity 는 4 시간 동안 incubation 하였을 때 가장 높았다. 따라서 본 연구에서는 흡착제와 4 시간 동안 흡착시키는 것을 기본 조건으로 하였다.

1-2. 용출 조건

회수한 갯지렁이 body extract에 5%(w/v) 되게끔 HP 20 resin을 처리한 후 4°C에서 4 시간 동안 stirring 한 후 suction filter로 여과하여 resin을 회수하였다. 회수한 resin 은 증류수로 간단하게 washing한 후 다양한 농도의 acetone (15~25%) 을 포함하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 stirring 하면서 bound protein을 elution 하였으며 그 결과를 표 2에 나타내었다.

Table 2. Elution condition of alkaline protease from Diaion HP 20

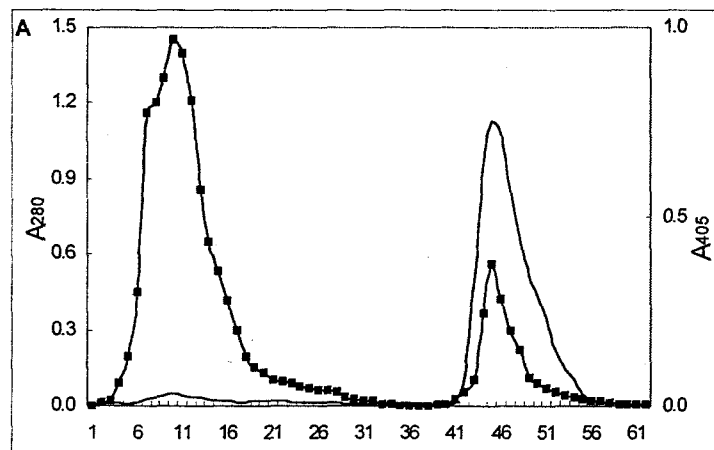
Concentration of acetone	Unit (U)	Protein (mg)	SA (U/mg)	PF (fold)	Yield (%)
Crude	45,090	2,979.0	15.1	1.0	100.0
15%	5,632	21.0	268.2	17.8	12.5
20%	33,906	39.9	849.8	56.3	75.2
25%	36,480	48.0	760.0	50.3	80.9

위의 표 2 에서 보듯이 25% acetone을 포함하는 buffer 로 elution 하였을 때 회수율이 가장 높았지만, specific activity 는 20% acetone을 포함하는 buffer로 elution 하였을 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

이상의 결과에서와 같이 방향족 계열의 합성흡착제 사용시 resin 처리 후 4 시간 동안 protease 를 binding 시킨 후 20% acetone을 포함하는 buffer를 elution buffer로 사용하여 흡착된 protease를 elution 하였다. 그러나 25% acetone를 포함하는 buffer로 용출시키는 방법 또한 좋은 방법으로 사용된다.

2) 갯지렁이 Protease 정제

Diaion HP 20으로부터 용출한 eluent를 출발물질로 하여 Phenyl-Sepharose 및 Benzamidine-Sepharose affinity chromatography를 이용한 다음 28 kDa 의 protease를 정제하였고 그림 1에 정제 profile을 나타내었다.



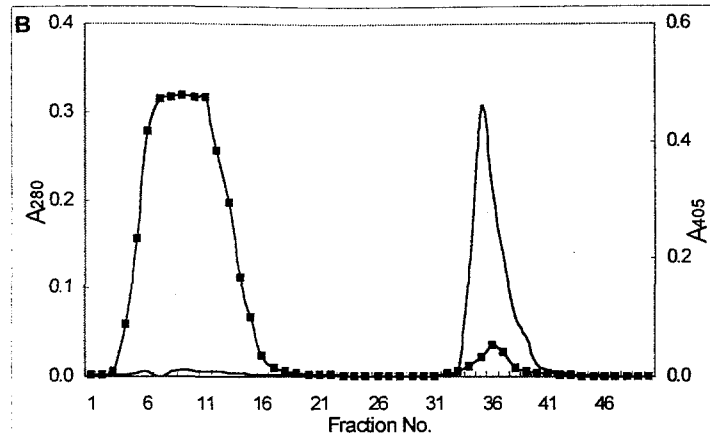


Figure 1. Purification of the protease from *P. leukophryna*. Panel A. Hydrophobic chromatography on a Phenyl-Sepharose column; Panel B, Affinity chromatography on a Benzamidine-Sepharose column. (-■-, A₂₈₀; —, protease activity)

표 3 에 개선된 방법으로 정제하였을 때의 정제 table을 나타내었으며 표 4 에 기존의 방법으로 정제하였을 때의 정제 table을 나타내었다.

Table 3. Summary of the improved purification procedures of the serine proteases from the body of *P. leukophryna*.

Step	Unit (U)	Protein (mg)	SA (U/mg)	PF (fold)	Yield (%)
crude extract	45,090	2,570.0	17.5	1.0	100.0
HP 20	33,907	39.9	849.8	48.6	75.2
Phenyl-Sepharose	27,900	14.4	1,937.5	110.7	61.9
Benzamidine-Sepharose	11,075	0.06	184,583.3	10,546.6	24.6

Table 4. Summary of the old purification procedures of the serine proteases

Step	Unit (U)	Protein (mg)	SA (U/mg)	PF (fold)	Yield (%)
Crude extract	166,220.0	855.0	194.4	1.0	100.0
Heat treatment	219,805.0	660.0	330.0	1.7	132.2
Ammonium sulfate	138,189.6	200.6	688.9	3.5	83.1
Sephacryl S-200	93,914.0	57.5	1,633.3	8.4	56.5
DEAE-Sepharose	58,675.0	6.4	9,168.1	47.2	35.3
Benzamidine-Sepharose	17,120.1	0.1	171,206.6	880.7	10.3

표 4 에서 보듯이 기존의 방법으로 정제하였을 경우 정제한 protease 의 specific activity 는 약 171,206 U/mg protein 이었으며 회수율은 약 10 % 정도이었다. 비교적 높은 specific activity를 나타내지만, 그 회수율이 낮고 무엇보다 정제 기간이 약 1 주일 정도 걸리는 문제점을 가지고 있었기 때문에 산업적으로 이용하기에 상당한 문제점을 가지고 있었다. 따라서 더 간단하면서 시간이 적게 걸리는 방법이 절실히 요구되었다. 현재 개선된 방법으로 protease를 정제하였을 경우 표 3 에서 보듯이 최종 정제한 protease 는 회수율 과 specific activity 각각 25%, 184,583 U/mg protein 이었으며 최종 정제도는 약 10,500 배 정제되었다. 비록 specific activity 에서는 큰 차이가 없었지만 회수율은 약 25% 로서 최소한 2 배 이상의 protease를 더 정제할 수 있었다. 그러나 무엇보다도 중요한 것은 정제 방법의 단순화시킴으로써 정제 시간이 약 2~3 일 정도로 단축되는 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 개선된 방법은 현재 연구 중인 갯지렁이로부터 protease를 분리하는데 효과적인 뿐만 아니라 recombinant technique으로 대량 생산된 protease 의 정제에도 매우 적합한 방법으로 사료된다.

3) 갯지렁이 Protease 의 특성 규명

정제된 protease 는 그림 2 (lane 1) 에서 같이 기존의 방법으로 정제하였을 때와 동일하게 28 kDa 위치에서 single band를 나타내어 순수하게 정제되었음을 알 수 있었다.

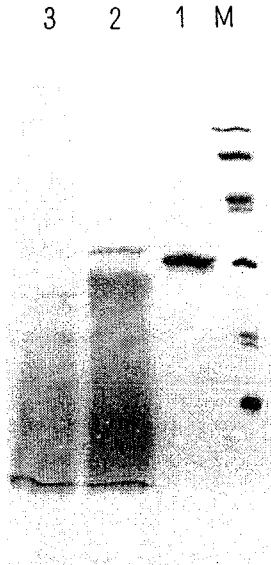


그림 2. SDS-PAGE analysis of purified protease
 lane M, marker: lane 1, Benzamidine-Sepharose, eluent
 lane 2, Phenyl-Sepharose, eluent: lane 3, HP 20, eluent

그림 3 에 기존의 방법과 개선된 방법으로 protease를 정제하였을 경우 protease band를 나타내었다.

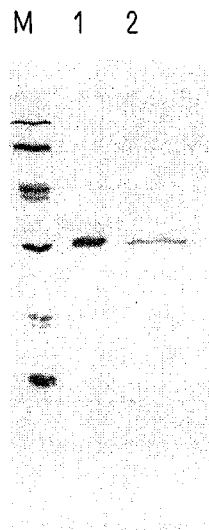


그림 3. Inactivation of the purified protease
 lane M, marker: lane 1, Purified protease by improved method
 lane 2, Purified protease by old method

위의 그림 3 에서 보듯이 약 200 g 의 갯지렁이 몸체로부터 최종 정제한 protease 의 양을 비

교하였을 때 개선된 방법으로 정제한 경우 (lane 1) 가 기존의 방법으로 정제한 경우 (lane 2) 보다 최소 2 배 이상의 protease를 더 얻을 수 있었다. 현재 사용하고 있는 개선된 정제 방법의 아래의 표에 나타내었다.

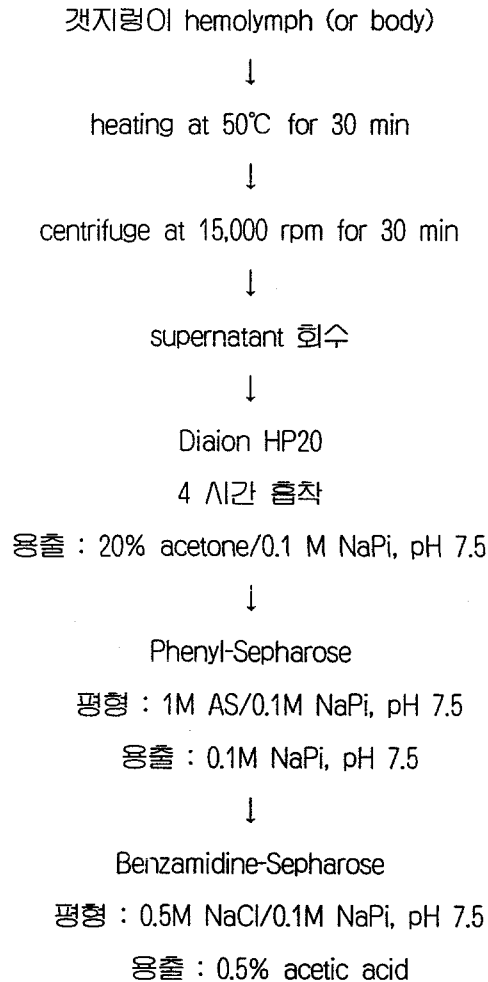


그림 4. Summary of purification procedures for the polychaeta protease

개선된 방법으로 정제한 갯지렁이 protease 는 pH-insensitive 하였으며, 계면활성제 (Sodium dodecyl sulfate, Triton X-100, Tween 20 등) 에 대한 안정성, 표백제 (Hydrogen peroxide 등) 에 대한 안정성 및 중금속 (Cd, Co, Cr, Hg, Ni 등) 이 그대로 유지되어 개선된 정제 방법은 갯지렁이 밖 같은 animal source 뿐만 아니라 recombinant technique 로 생성된 protease 의 대량생산에 적합한 방법으로 사료된다.

3. Bacterial Protease

1) 단백질 분해 효소 탐색

Skim milk/agar plate에서 분비된 protease 에 의하여 생성된 clear zone을 형성하는 13 가지의 서로 다른 colony 를 얻은 후 각 colony 를 LB (Luria-Bertani) 배지를 사용하여 shaking 배양한 다음 분비되는 protease 의 양을 측정하였다. 아래의 표 5 에서 보듯이 13 가지의 서로 다른 bacteria 중에서 strain 104 가 가장 많은 양의 protease를 분비하였으며 strain 103 도 비교적 protease를 많이 생성하였다. 따라서 본 연구에서는 strain 104 및 strain 103을 이용하여 protease 생성의 최적 조건을 연구하였다. 현재 갯지렁이로부터 casein을 분해하는 능력을 갖는 균주를 최소 7 가지가 분리되었고 각각 16S rRNA 의 sequence를 분석하여 균주를 동정하였으며 이들 중 유용한 균주는 앞으로 더 동정할 예정이다.

균주 101 : *Gordonia terrae*

균주 102 : *Gordonia alkanivorans*

균주 103 : *Bacillus megaterium*

균주 104 : *Bacillus horikoshii*

균주 107 : *Bacillus* (새로운 종으로 추측)

균주 110 : *Rhodococcus* (새로운 종으로 추측)

Table 5. Screening of bacteria producing protease

Strain	Total Unit
101	44.5
102	44.3
103	76.8
104	99.9
106	53.3
201	44.5
202	59.5
203	43.8
204	49.9
206	50.6
207	53.5
208	44.3
209	44.9

2) 성장 곡선

Bacteria strain 104를 LB 배지에 접종한 후 2 시간 간격으로 시료를 취한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 성장을 측정하였으며, 각 시간의 분비된 protease의 양을 측정하였으며 그 결과를 그림 5에 나타내었다.

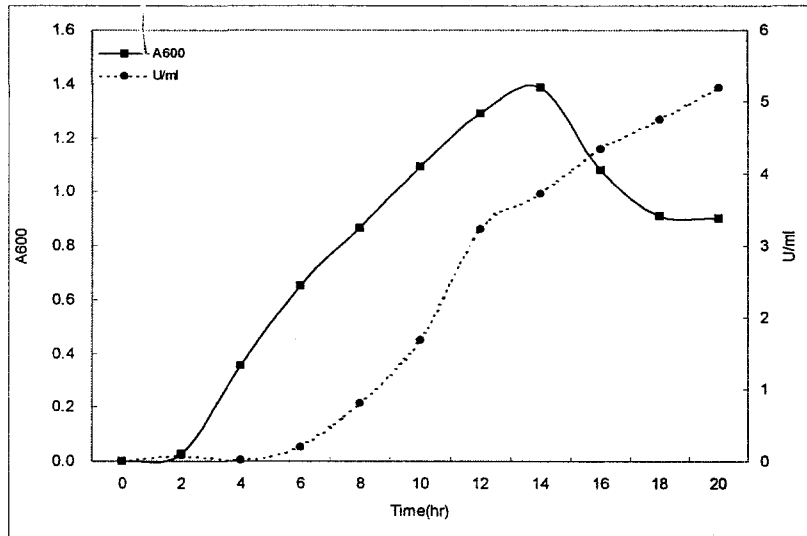


그림 5. Growth curve of bacteria strain 104

위의 그림에서 보듯이 본 실험에서 제시한 배양조건의 경우 protease 생성은 배양 시간이 길어 질수록 증가하지만 세포의 성장은 14 시간 이후에 감소가 시작되었다. 이는 14 시간 이후에 세포의 lysis에 따른 세포 내 protease의 release에 의한 protease 활성의 증가로 추측된다. 따라서 앞으로의 세균배양은 14 시간을 기준으로 배양하였다.

3) Protease 최적 생성 조건 검토

3-1. 배양 배지에 따른 protease 생성 변화

Bacteria strain 103 과 104를 각 배양 배지에 접종한 후 37°C에서 250 rpm 으로 shaking 하여 14 시간 동안 배양한 후 6,000 rpm 에서 원심 분리하여 세포 배양 상층액을 회수하여 protease 활성을 측정하였다.

Table 6. Effect of culture medium on the protease production

Medium	Relative activity(%)	
	103	104
LB	100.0	100.0
LB/1% casein	168.4	135.8
PDB	28.1	27.5
PDB/1% casein	48.0	37.5
TSB	216.8	213.8
TSB/1% casein	364.5	282.7
NB	68.6	51.0
NB/1% casein	101.8	66.2

(LB, Luria-Bertani broth; NB, Nutrient broth;

PDB, potato dextrose broth; TSB; Tryptic soy broth)

위의 표 6 에서 보듯이 strain 103 및 104 모두 TSB 배지에서 protease 생성이 가장 잘 되었으며 배지에 casein 첨가시 약 50% 정도 더 증가하는 결과를 볼 수 있었다. 따라서 이후로 protease 생성 기본 배지로는 1 % casein을 포함한 TSB 배지를 사용하였다. 그러나 이 연구에서 사용한 Luria-Bertani broth(LB) 또는 tryptic soy broth (TSB) 는 배지 가격이 상대적으로 비싼 단점을 가지고 있어 protease 대량 생산시 배지 사용으로 인한 가격 부담을 앓고 있다. 따라서 본 연구에서는 배지를 선택할 때 단가가 저렴하면서, 많은 양의 protease 발현하는 배지를 선택할 필요가 있으며 이는 protease 대량 생산할 때 가장 적절하게 사용할 수 있기 때문이다라고 생각되었다.

3-2. 배양 pH 따른 protease 생성 변화

TSB 기본 배지의 pH 에 따른 protease production 의 변화를 표 7 에 나타내었다.

Table 7. Effect of pH on the protease production

pH	Relative activity (%)	
	103	104
pH 7.2	100.0	100.0
pH 9.0	135.6	145.9

위의 표 7 에서 보듯이 alkaline pH 에서 protease 생성이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 strain 103 및 104 는 alkaline protease를 생성하는 strain 임을 알 수 있었다.

3-3. Carbon source 에 따른 protease 생성 변화

TSB 기본 배지에 carbon source로서 glucose 와 lactose를 각각 첨가하여 배양하였을 때 protease 생성을 비교하였다.

Table 8. Effect of carbon sources on the protease production

Carbon sources	Relative activity (%)	
	103	104
no addition	100.0	100.0
0.5% glucose	81.0	65.4
1% glucose	65.0	56.6
0.5% lactose	89.0	82.3
1% lactose	71.8	76.1

위의 표 8 에서 보듯이 TSB 와 같은 energy-rich medium 에 glucose 와 같은 carbon source 의 첨가는 bacterial protease expression을 감소시키는 것을 알 수 있었다.

3-4. Divalent cation 첨가에 따른 protease 생성 변화

TSB 기본 배지에 magnesium 과 같은 divalent cation을 첨가하여 배양하였을 때 protease 생성을 비교하였다.

Table 9. Effect of divalent cations on the protease production

Cation	Relative activity (%)	
	103	104
none	100.0	100.0
5 mM Mg ²⁺	120.0	107.6
10 mM Mg ²⁺	109.0	103.8
5 mM Mn ²⁺	99.0	98.4
10 mM Mn ²⁺	79.0	87.2
5 mM Ca ²⁺	69.0	80.2
10 mM Ca ²⁺	38.1	48.7

위의 표 9 에서 보듯이 Mg²⁺ 의 첨가는 strain 103, 104 모두에게 protease expression 에 약한 영향을 주었으며, 특히 culture medium 에 divalent cation의 농도가 증가할수록 protease expression 을 감소시키는 결과를 나타내었다. 따라서 bacteria 배양 시 culture medium 에 5 mM 이하의 Mg²⁺ 의 첨가는 효소 활성의 증가를 가져올 것으로 추측된다.

3-5. Inorganic salt 첨가에 따른 protease 생성 변화

0.5 mM magnesium을 포함하는 tryptic soy broth (TSB) 기본 배지에 nitrogen (N) source, sulfur (S) source 및 phosphorus (P) source를 각각 혹은 같이 첨가하여 배양하였을 때 bacterial protease 생성을 비교하였다. 이 때 N source로는 ammonium, S source 로는 sulfate, P source로는 phosphate 를 사용하였으며 그 결과를 표 10 에 나타내었다.

Table 10. Effect of inorganic salt on the protease production

Salt	Relative activity (%)	
	103	104
none	100.0	100.0
0.2% KPi	117.2	122.1
0.2% NH ₄ Cl	126.8	139.6
0.2% (NH ₄) ₂ SO ₄	156.6	189.5
0.2% KPi/(NH ₄) ₂ SO ₄	127.0	144.1

위의 표 10 에서 보듯이 inorganic salt 첨가는 전체적으로 protease expression level을 10~90%

정도 증가시키는 결과를 가져왔다. 특히 ammonium sulfate 의 첨가는 expression level 이 약 90% 정도 증가하였는데 이는 protein 생합성에 필요한 N 및 S source를 원활하게 공급하여 주는 것에 의한 것으로 추측된다. 그러나 각각의 inorganic salt 첨가에 의해서 protease expression 증가가 관찰되었지만 이러한 salt 의 조합 (예: KPi/(NH₄)₂SO₄) 에 의한 증가 현상은 오히려 ammonium sulfate 한 성분의 첨가에 의한 효과를 감소시켰다. 또한 phosphate 첨가도 약 20% 정도의 protease 발현 증가를 가져 왔다.

이상의 배양 조건을 종합하였을 때 bacteria strain 103 및 104 는 casein (1%), magnesium (1 mM 이하), ammonium sulfate (0.2%) 또는 potassium phosphate (0.2%) 를 포함하는 TSB 배지 (pH 9.0)를 사용하여 37°C 에서 250 rpm으로 14 시간 동안 shaking 배양하는 것이 protease 생성의 최적 조건임이 확인되었지만 더 값 싼 배지를 연구할 필요가 있는 것으로 사료된다.

4) Bacterial protease 발현에서 soybean meal 의 영향

Soybean meal (SBM) 은 콩기를 생산 후 남은 부산물로써 동물의 주로 사료로 쓰이거나 폐기물로 버려 지는 물질로써, 쉽고 값싸게 얻을 수 있는 성분으로 protease 생성에 아주 적합한 배지 성분으로 그 조성은 다음과 같다.

Table 11. Composition of soybean meal

Nutrient	Content (%)
Crude protein	44.0
Lysine	2.69
Methionine	0.62
Cystein	0.66
Threonine	1.72
Tryptophan	0.74
Linoleic acid	0.40
Calcium	0.29
Natrium	0.01

위의 표 11 에서 보듯이 soybean meal 은 높은 단백질 함량을 갖지만 상대적으로 낮은 아미노산 함량을 가짐으로써 protease 생산 배지에 좋은 조건을 가지고 있을 뿐만 아니라 soybean meal 은 Oil extraction 후 by-product 로서 일종의 폐기물로 아주 저렴한 가격으로 구할 수 있는 성분으로 미생물 배양용 배지로의 활용성이 매우 크다.

Table 12. Effect of soy bean meal on the protease production

Medium	% expression	
	103	104
TSB/1% casein	100.0	100.0
1% SBM/1% casein	155.8	291.3
1.5% SBM/1% casein	129.2	371.9
2% SBM/1% casein	215.0	174.2
2.5% SBM/1% casein	129.0	123.5

위의 표 12에서 보듯이 bacteria strain 103 의 경우 1% casein을 포함하는 2 % soybean meal 배지에서 배양하였을 때 TSB 에 비하여 약 2 배 정도 protease 발현이 증가하였으며, strain 104 의 경우 1% casein을 포함하는 1.5 % soybean meal 배지에서 배양하였을 때 TSB 에 배양하였을 경우 보다 약 3 배 정도 protease 발현이 증가하였다. 위의 결과는 soybean meal을 가하여 주었을 때가 TSB 보다 훨씬 효과적으로 protease 가 발현됨을 알 수 있었다.

Table 13. Effect of potassium phosphate on the protease production in soy bean meal medium

Medium	% expression	
	103	104
control	100.0	100.0
0.1% KPi	117.6	no effect
0.2% KPi	160.2	
0.5% KPi	194.6	
1% KPi	139.7	

위의 표 13 에서 보듯이 bacteria strain 103 의 경우 배지에 potassium phosphate를 첨가하였을 경우 0.5% 까지는 protease 발현이 증가하지만 그 이상에서는 오히려 감소하였다. 따라서 strain 103 은 기본 배지에 0.5% potassium phosphate를 첨가하여 주었다. Strain 104 의 경우는 potassium phosphate 첨가에 큰 영향을 받지 않았다. 이상의 결과로부터 bacteria protease 발현의 배지를 표 14 에 나타내었다.

Table 14. Media composition for the production of the protease

Nutrient	103	104
Casein	1 %	1 %
Soy bean meal	2 %	1.5 %
MgSO ₄	0.1 mM	0.1 mM
Potassium phosphate	0.5 %	-

5) 다른 Bacteria strain 과의 protease 생성 비교

KCTC에서 분양 받은 *Bacillus subtilis* 및 *B. licheniformis* 와 본 연구에서 분리한 두 가지 strain 과 protease 분비 능력을 비교하였다.

Table 15. Comparison of expressed protease according to medium

Strain	TSB	LB	배지 1
103	75.8	61.3	12.5
104	116.4	89.5	17.7
<i>B. licheniformis</i>	6.5	3.3	1.9
<i>B. subtilis</i>	10.8	7.2	3.2

B. licheniformis (USP 3,838,009); *B. Subtilis* (USP 3,622,458)

배지1 : casein 17g; peptone 3g; glucose 2.5g; NaCl 5g;

KH₂PO₄ 2.5g in 1 L of 0.1M Na₂CO₃

Bacillus subtilis 와 *B. licheniformis* 는 protease를 분비하는 대표적인 미생물로 알려져 있으며 이 두 균주는 protease 분비하는 균주로서 이미 미국에서 특허권을 가지고 있다. 위의 표 15에서 보듯이 본 연구에서 분리한 두 가지 균주 strain 103 및 104 가 *Bacillus subtilis* 와 *B. licheniformis* 에 비교하여 월등히 높은 정도의 protease를 분비함을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서 분리한 균주가 protease 대량 생산에 적합한 균주로 사료된다.

6) Bacterial protease 의 정제

Bacteria strain 104에서 분비하는 protease 의 정제를 시도하였다.

6-1. Crude extract 의 제조

3 L 의 1.5% Soybean meal/1% casein/0.5% potassium phosphate/0.5 mM MgSO₄ (pH 9.0) 배지를 사용하여 0.5 VVM 의 속도로 air를 공급하면서 37°C에서 250 rpm으로 40 시간동안 fermentation 한 후 배양액을 10,000 rpm에서 15 분간 원심 분리하여 얻었다. Fermentation 하여 얻은 배양액의 protease 활성은 약 200 Unit/ml 이었으며 총 활성은 600,000 Unit 이었고 이 배양액을 출발 물질로 하여 정제를 시도하였다.

6-2. Phenyl-Sepharose column chromatography

배양 상층액에 최종 농도가 1 M 이 되게 ammonium sulfate를 가하여 잘 녹여준 후 1 M ammonium sulfate를 포함하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 미리 평형되어 있는 Phenyl-Sepharose column에 시간당 200 ml 의 속도로 loading 하고 평형 buffer 로 280 nm에서 흡광도가 0.05 이하가 될 때까지 washing 하여 준 후 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 결합되어 있는 단백질을 용출하였으며 그 profile을 그림 6 에 나타내었다.

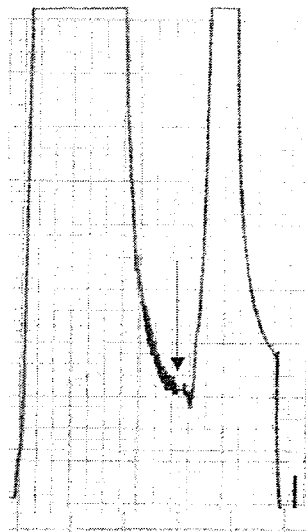


그림 6. Elution profile from Phenyl-Sepharose chromatography

Protease-active fraction을 모아 30~80% ammonium sulfate fractionation 한 후 얻은 침전물을 DEAE-Sepharose column 에 loading 하였다.

6-3. DEAE-Sepharose column chromatography

위의 과정에서 얻은 투석액을 회수하여 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 미리 평형되어 있는 DEAE-Sepharose column 에 시간당 50 ml 의 속도로 loading 하고 평형 buffer로 280 nm에서 흡광도가 0.01 이하가 될 때까지 washing 하였다. 그 profile을 그림 7 에 나타내었다.

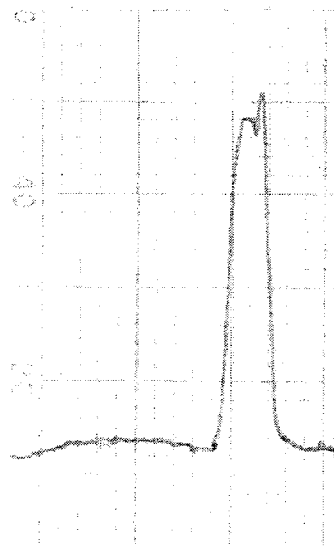


그림 7. Elution profile from DEAE-Sepharose chromatography

위의 과정에서 얻은 protease active fraction을 pooling 하여 CM-Sepharose column 에 loading 하였다.

6-4. CM-Sepharose column chromatography

Pooling 한 protease-active 용액을 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 미리 평형되어 있는 CM-Sepharose column 에 시간당 50 ml 의 속도로 loading 하였다. 같은 buffer 로 280 nm에서 흡광도가 0.01 이하가 될 때까지 washing 하여준 후 15 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 resin 에 결합되어 있는 protease 를 용출하였다. 그 profile을 그림 8 에 나타내었다.

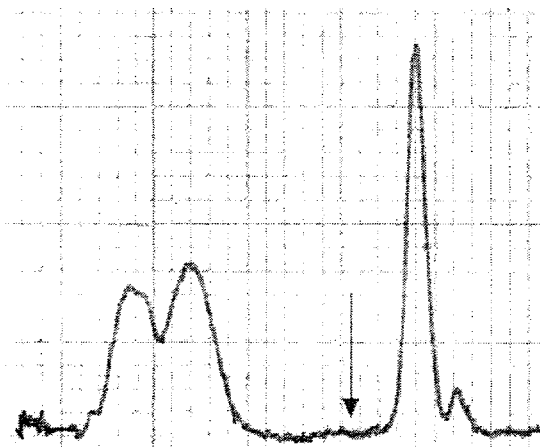


그림 8. Elution profile from CM-Sepharose chromatography

위의 과정에서 얻은 protease active fraction을 pooling 하여 Amicon Centriprep PM 10 으로 농축한 후 hydroxylapatite column 에 loading 하였다.

6-5. Hydroxylapatite column chromatography

위의 과정에서 얻은 protease 용액을 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) 로 미리 평형되어 있는 Hydroxylapatite column 에 시간당 20 ml 의 속도로 loading 하고 같은 buffer 로 280 nm에서 흡광도가 0.01 이하가 될 때까지 washing 하여준 후 15 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5)로 resin 에 결합되어 있는 단백질을 용출하였다. 그 profile을 그림 9 에 나타내었다.

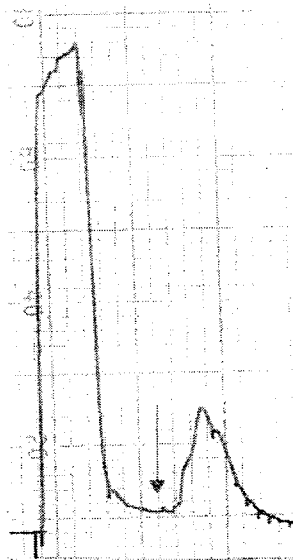


그림 9. Elution profile from Hydroxylapatite chromatography

Active fraction 은 Amicon Centriprep PM 10으로 농축한 후 -70°C에 보관하였다. 이상의 bacteria strain 104 로부터 protease를 정제하는 방법을 요약하면 다음과 같다.

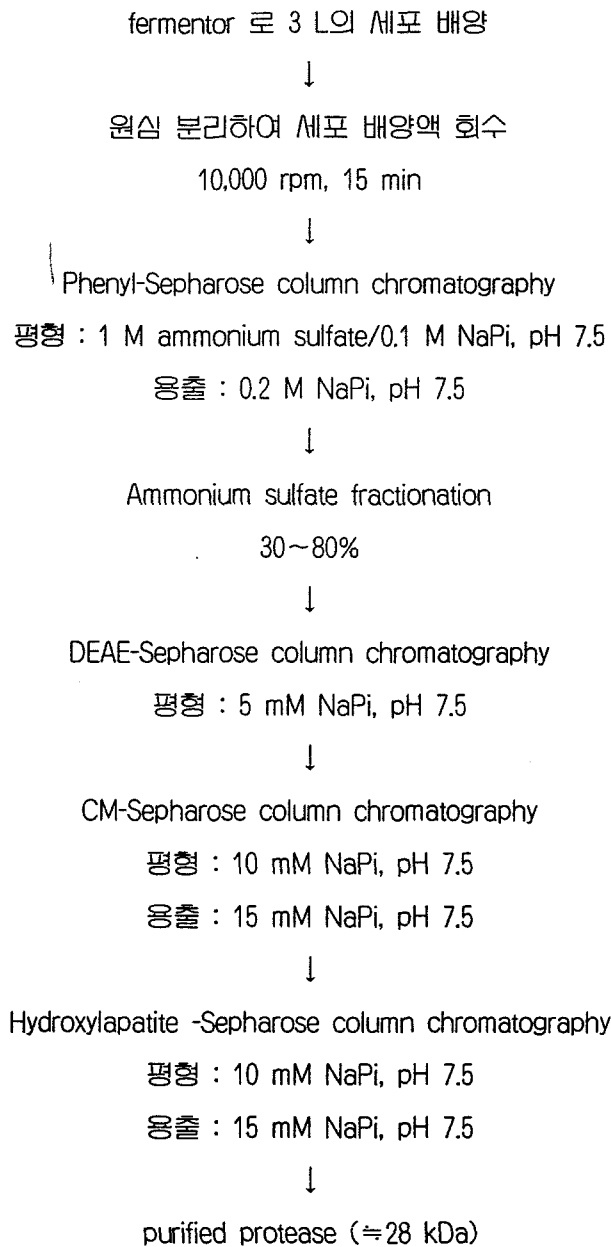


그림 10. Purification procedure of the protease from bacteria strain 104.

정제한 protease 순도를 그림 11 에 나타내었다.

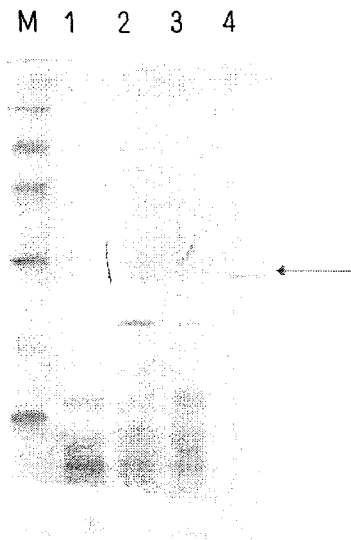


그림 11. SDS-PAGE analysis of the bacterial protease purified from strain 104
 M. MW marker; 1. Phenyl-Sepharose eluent; 2. DEAE-Sepharose effluent
 3. CM-Sepharose eluent; 4. Hydroxylapatite eluent

위의 그림 11 에서 보듯이 strain 104에서 정제한 protease 는 분자량 약 28 kDa 의 protease 임 을 알 수 있었다.

7) Bacterial protease 의 특성 규명

7-1. optimum pH 와 pH stability

Bacteria stain 103 및 104로부터 정제한 protease 의 optimum pH 와 pH 에 대한 안정성을 조사 하였다. 조사한 pH 범위는 pH 4~12 이었다. Optimum pH 는 각 pH 의 buffer에서 활성을 측정하 였으며, pH stability 는 각 pH 의 buffer로 정제한 protease를 10:1 로 희석한 후 optimum pH 조건에 서 활성을 측정하였다. 사용한 buffer는 pH 4~6 은 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6.5~7.5 는 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8~pH 9 는 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 9.5~10.5 는 0.1 M Glycine-NaOH buffer, 그리고 pH 11~12 는 0.1 M sodium carbonate buffer를 사용하였다.

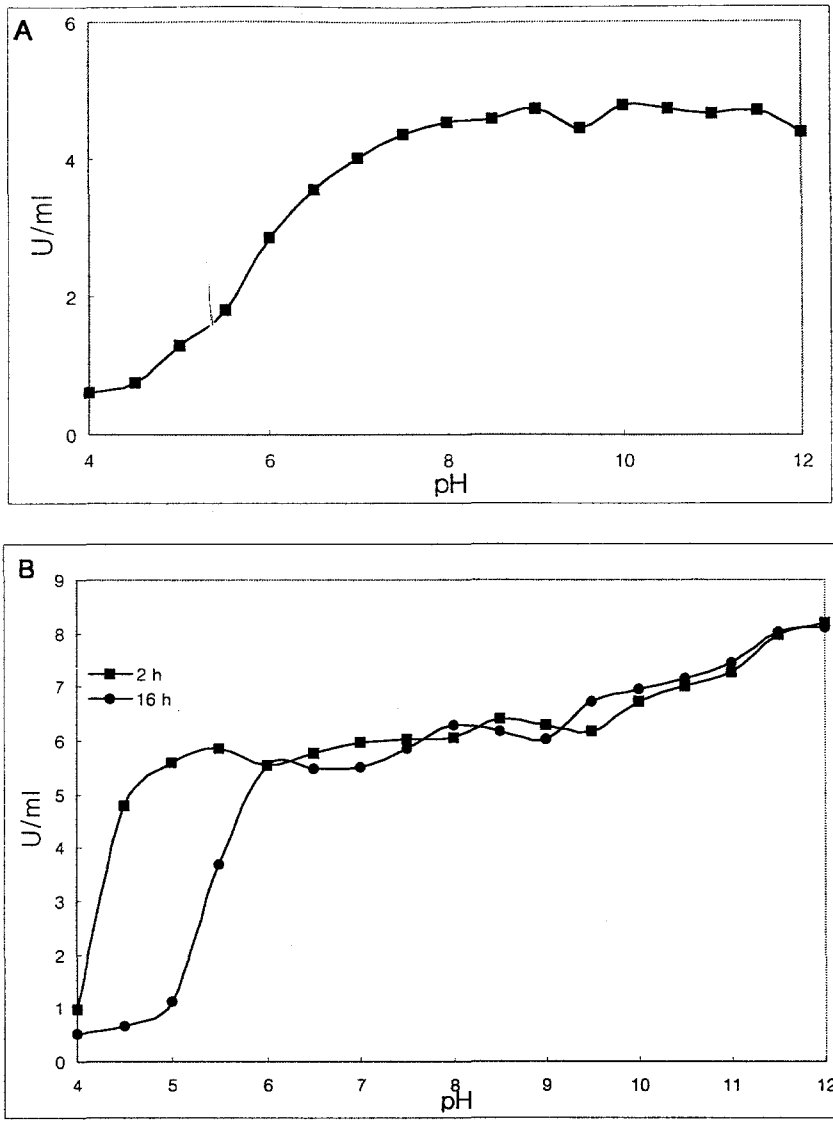


그림 12. Optimum pH and pH stability of the protease purified from bacteria strain 103.

A. Optimum pH; B. pH stability

위의 그림 12 에서 보듯이 bacteria strain 103 에서 정제한 protease 의 최적 활성 pH는 갯지렁이 protease (optimum pH 10) 와는 달리 8~12 의 pH 범위에서 broad 한 pH optima를 갖는 특이한 성질을 가지고 있었다 (그림 12A). pH 안정성을 조사한 결과 pH 6~12 에서는 20 시간 이상을 방치하여도 활성을 잃지 않는 pH에 매우 안정한 효소임을 알 수 있었다 (그림 12B).

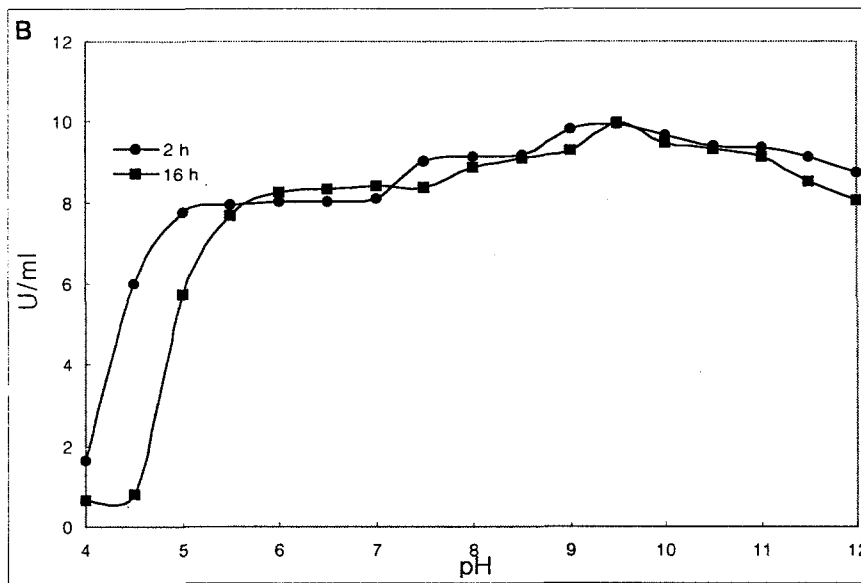
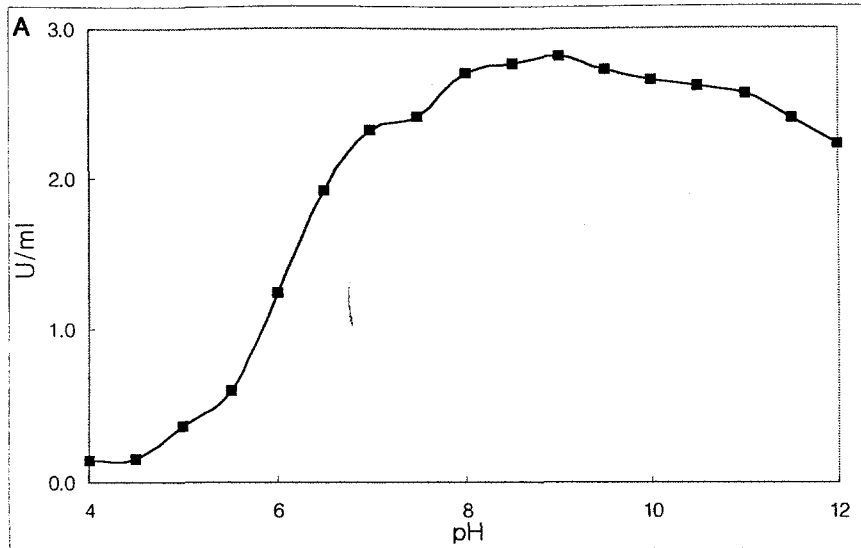


그림 13. Optimum pH and pH stability of the protease purified from bacteria strain 104.

A. Optimum pH; B. pH stability

위의 그림 13 에서 보듯이 bacteria strain 104 에서 정제한 protease 의 최적 활성 pH는 갯지렁이 protease (optimum pH 10) 와는 달리 8~10 의 pH 범위, 특히 pH 9에서 최적의 활성을 갖는 alkaline protease 임을 알 수 있었다 (그림 13A). pH 안정성을 조사한 결과 pH 6~12 에서는 20 시간 이상을 방치하여도 활성을 잃지 않는 pH에 매우 안정한 효소임을 알 수 있었으며 strain 103 으로부터 정제한 protease 와 비교하여 acidic pH에서도 비교적 안정한 효소임을 알 수 있었다 (그림 13B).

7-2. Optimum temperature

최적의 활성을 나타내는 pH buffer를 사용하여 10~70°C에서 protease 의 활성을 측정함으로써 최적의 반응온도를 조사하였다.

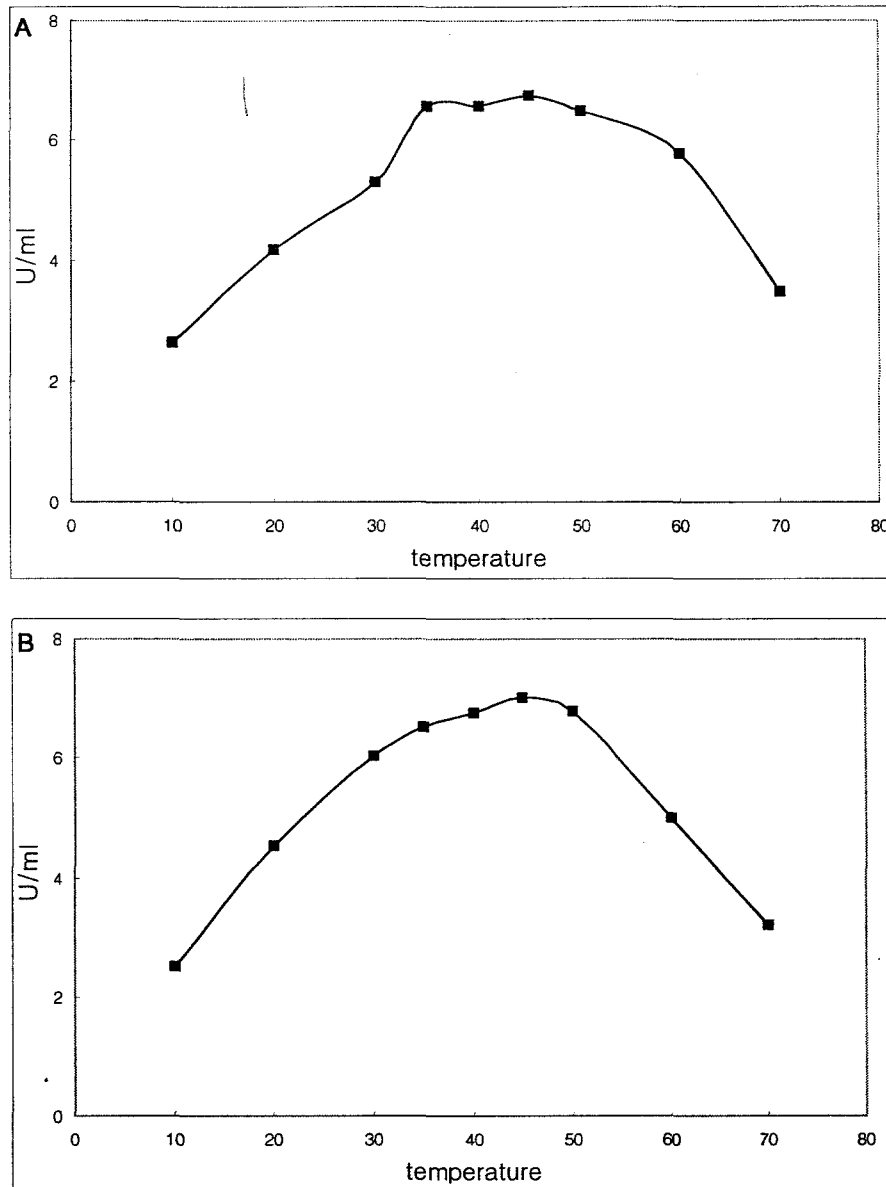


그림 14. Optimum temperature of the protease

A. Strain 103; B. Strain 104

위의 그림 14에서 보듯이 strain 103에서 정제한 protease는 35~50 °C에서 최적의 활성을 나타내었으며 (Panel A), strain 104에서 정제한 protease 는 약 45°C에서 최적의 활성을 나타내었다 (Panel B).

7-3. Heat stability

최적의 활성을 나타내는 pH buffer로 5:1 로 희석한 후 30~70°C에서 incubation 한 후 각 시간 별로 sample을 회수한 후 protease 의 활성을 측정함으로써 열 안정성을 조사하였다.

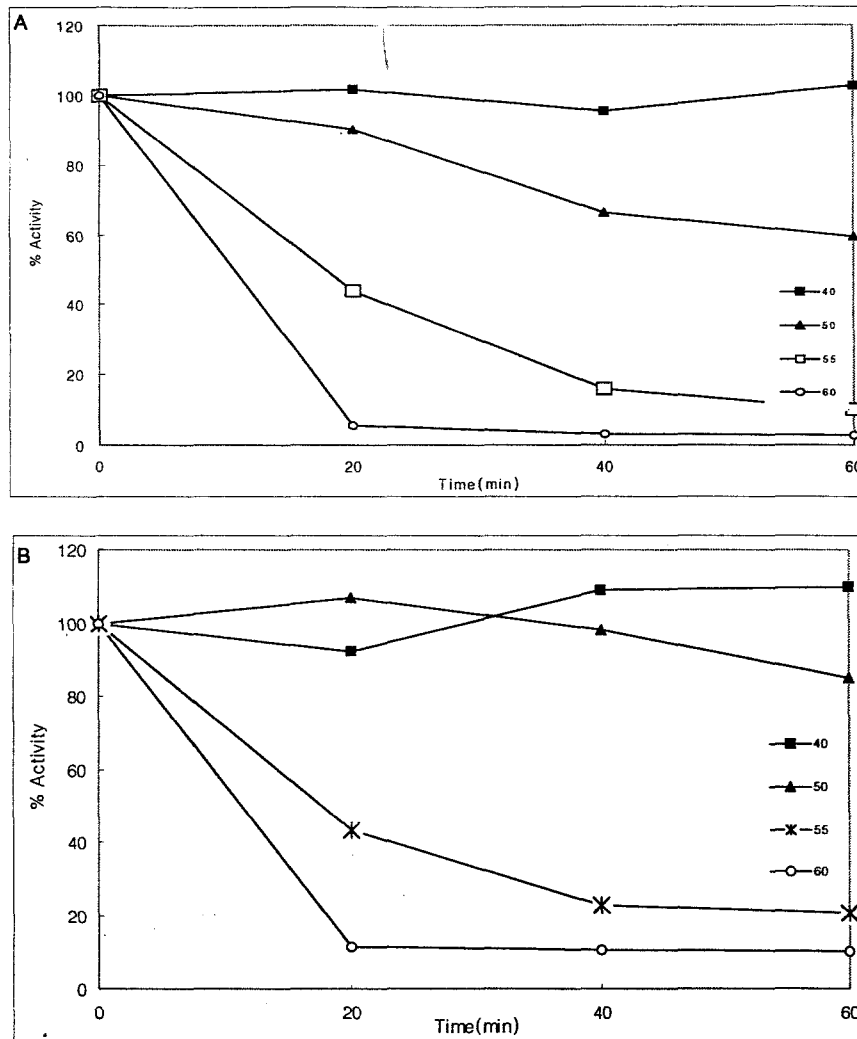


그림 15. Heat stability of the protease purified from bacteria strain 103.

A. Purified; B. Crude

위의 그림 15 에서 보듯이 strain 103에서 정제한 protease (그림 15A) 및 crude protease (그림 15B) 모두 50°C에서 1 시간 동안 incubation 하여도 그 활성에는 큰 변화가 없었지만, 55°C 이상에서는 20 분간 incubation 하여도 활성이 급격하게 감소하였다. 즉 bacteria strain 103에서 정제한 protease 는 50°C 까지 그 활성을 잃지 않는 비교적 열 안정이 높은 protease 임을 알 수 있었다.

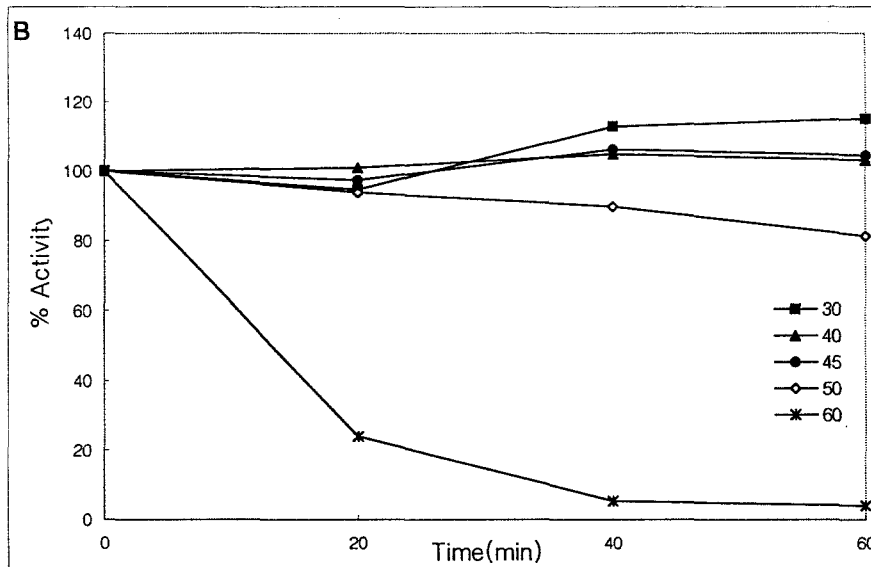
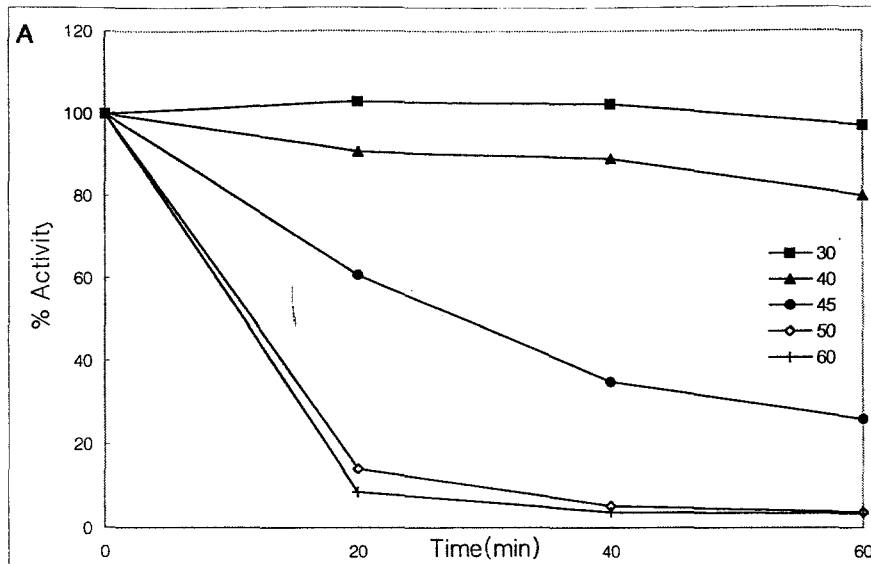


그림 16. Heat stability of the protease purified from bacteria strain 104.

A. Purified; B. Crude

위의 그림 16 에서 보듯이 bacteria strain 104에서 정제한 protease 는 40°C에서 1 시간 동안 incubation 하여도 그 활성에는 큰 변화가 없었지만 (그림 16A) , 45°C 이상에서는 20 분간 incubation 하여도 활성이 급격하게 감소하였다. 그러나 strain 103 의 protease 와는 달리 crude sample 즉 다른 protein 이 존재할 경우 50°C 에서 1 시간 동안 incubation 하여도 그 활성에는 큰 변화가 없었다 (그림 16B) . 즉 다른 protein 이 존재할 경우 열 안정성이 정제하였을 경우 보다 10°C 정도 상승하는 효과를 보였다.

이상에서 언급한 결과를 표 16 에 나타내었다.

Table 16. Characteristics of the bacterial protease

Characteristics	103	104
Optimum pH	8~12	약 9
pH stability	stable between 6~12	stable between 6~12
Optimum temperature	35~50°C	35~50°C
Heat stability		
purified protease	up to 50°C	up to 40°C
crude protease	up to 50°C	up to 50°C

7-4. Inhibition profiles

여러 가지 synthetic 및 natural protease inhibitor를 사용하여 bacteria strain 103 및 104에서 정제한 protease 에 대한 영향을 조사하였다.

Table 17. Inhibition profiles of the bacterial protease

Inhibitors	Concentration	103	104
Control	-	100.0	100.0
Aprotinin	1 TIU/ml	87.9	91.6
Chymostatin	50 ug/ml	107.9	59.4
LBTI	50 ug/ml	90.4	98.2
SBTI	50 ug/ml	91.6	97.5
APMSF	1 mM	95.1	114.4
Benzamidine	1 mM	100.1	112.1
Bestatin	50 ug/ml	89.9	96.7
Leupeptin	50 ug/ml	88.7	95.5
PMSF	1 mM	10.7	21.7
EDTA	1 mM	99.1	97.4
TLCK	0.5 mM	89.6	99.8
TPCK	0.5 mM	90.6	97.2

위의 표 17 에서 보듯이 bacteria strain 103 및 104에서 정제한 protease 는 PMSF 에 의해서만

억제되는 매우 특이한 성질을 갖는 serine protease 임을 알 수 있었다.

이상에서 언급한 것 처럼 bacteria strain 103 및 104 에서 정제한 protease 는 분자량이 약 28 kDa 의 serine protease 계열의 protease 로서 pH 에 매우 안정하며, 약 50°C 까지 온도에서 활성을 잃지 않는 비교적 안정한 효소임을 알 수 있었다.

4. 향후 계획

- 정제된 물질(extremozyme or 신기능성물질) 에 대한 아미노산 서열 분석
- 전체 아미노산 조성비율 분석
- 정제된 물질의 cDNA library를 제조
- 공생미생물로부터 강력한 분해효소의 탐색
- 공생미생물로부터 강력한 단백질 분해효소의 최적 생산 조건 검토
- 공생미생물로부터 강력한 단백질 분해효소와 깃지렁이 슈퍼효소와의 identity실험
- 미생물의 fermentation 연구

제 4 장. 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절 연구 개발 목표 달성도 (계획, —————▶ ; 진도 —————▶)

연구 내용	연구 분담	추진 일정 (월)												비고	
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2			
다모류(갯지렁이) 분류	장 정 순	▶	▶												
기 채집된 갯지렁이의 기관 분리 및 보관	장 정 순 김 종 욱		▶	▶	▶	▶									
각 기관의 조 효소류 채취 및 예비실험 계속	주 한 승 박 건 춘		▶	▶	▶	▶									
Gene expression 실험 및 분자생물학 본 실험수행	백 승 렬 주 한 승		▶	▶	▶	▶									
갯지렁이 protease 정제법 개선	주 한 승 박 건 춘														
갯지렁이공생세균 분리	주 한 승 이 선 영			▶	▶	▶	▶								
공생세균의 분비효소특성 실험	장 정 순 김 기 태 주 한 승														
공생세균에서 protease 발현 조건 연구	장 정 순 김 기 태 조 우 리														
공생세균의 protease 정제 연구	이 선 영 조 우 리														
사업진도 (%)			20		20			50			10				

제 2 절 대외 기여도

1. 기술적 측면

갯벌은 단지 육지와 해안의 연결지점이라는 의미보다는 육지로부터 유입되는 각종 다양한 유기물, 유기폐기물 및 대량의 하천 수 유입 등이 집적되는 곳으로 이런 열악하고 극한적인 변화의 해양 환경 하에 생명체가 주위의 환경을 훌륭히 정화시키면서 적응 서식한다는 것은 해양생태학적 측면으로 볼 때 갯벌생물의 무한한 환경적응력과 생체 내에서의 회복 및 복원과정이 타 생물과는 매우 판이하다는 사실을 암시하고 있다.

또한 바다에 서식하고 있는 많은 생물 종은 아직도 인류에게 노출되지 않고 태고의 신비를 간직한 채 오늘날에도 아직 밝혀지지 않은 수없이 많은 종류의 신물질들을 간직한 채 생존하고 있으며 이러한 사실을 서서히 인식하면서부터 현재 세계적으로 활발한 연구가 진행되고 있는 미개척 분야의 하나이다. 해양 미세조류 만 보더라도 현재 약 2만 6천 종 정도가 지구상에 존재하는 것으로 알려져 있으나, 실제 인류에 의해 조금이라도 연구가 진행되고 있는 종은 수백 종에 불과한 형편이다. 따라서, 풍부한 해양자원을 가진 우리 나라는 무궁무진한 가능성을 가지고 있는 해양생물의 탐색연구와 유용해양신물질의 개발이 시급한 실정이라고 사료된다.

이러한 관점으로 볼 때 갯벌환경이나 특이해양환경에 서식하고 있는 해양생물 상은 정상적인 환경보다는 분명히 특이한 환경을 극복하고 적응하기 위한 특수기능을 갖고있다고 생각되며 이는 곧 신물질보유라는 가능성을 암시하고 있고 높은 기능성의 극한효소류(extremozymes)나 극한친화생물질류(extremophiles)를 갖고 있으리라는 것은 충분히 납득할 수 있다고 생각된다. 즉 이들 생물 상을 이용하여 새로운 기능을 갖고 있을 것으로 추측되는 신물질을 탐색하고 이에 대한 기초연구와 아울러 응용성을 타진하는 일은 순수 학문적일 뿐만 아니라 기술적인 측면으로도 매우 큰 의의가 있다고 생각된다.

이 과정에서 얻을 수 있는 기술적인 효과는, 유용신물질의 탐색기술에 대한 know-how의 축적, 탐색된 유용신물질의 역가 및 효과를 확인하는 기초 의약학 기술 및 임상기술 수준의 발전, 그리고 확인된 유용신물질을 대량생산하고 분리·정제하는 전반적인 해양생물공학산업의 발전 등을 들 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

생물산업의 세계 시장규모는 예측기관에 따라 차이가 있으나, 2000년에 1,000억 달러로 전망하고 있으며, 미국 A. D. Little사와 DRI(Decision Resources Inc.)사의 자료에 따르면, 연 평균 20% 이상의 고성장을 지속할 것으로 전망된다. 전체 생물산업의 시장중 생물의약품과 생물관련 1차 산업제품이 차지하는 비율이 매우 높을 것으로 전망되고 있다. 더욱이, 같은 의약품이라도 생물 공학적으로 생산된 의약품이 광학 활성이 높고 순도가 높아 부작용이 적은 것으로 밝혀지고, 생물공학

기술의 발전으로 가격경쟁력까지 생기면서, 세계의약품 시장의 미래는 결국 생물산업에 의한 생산으로 이동될 것으로 전망되고 있다 (Table 19 참고). 따라서, 가장 빠르게 성장할 것으로 전망되는 이들 생물산업에의 투자는 국가 경제나 산업에 커다란 기여를 할 것이며, 극단적으로는 생물산업의 위축은 국가 경제 전반의 경쟁력에 치명적인 타격을 입힐 것으로 예상된다.

Table 19. 세계 의약품의 수요전망 (단위: 억 달러)

구 분	1995년	2000년	2005년	연평균 증가율(%)	
				1995~2000	2000~2005
합성의약품	2,600	3,300	4,000	4.9%	3.9%
생물의약품	200	500	1,200	20.1%	19.1%
전체의약품	2,800	3,800	5,200	6.3%	6.5%

자료 : 미국 A. D. Little / IMS Pharma Strategy Group,
 LG경제연구원, 바이오의약품산업의 전망과 과제, 1997년

거대한 잠재력과 고부가 가치성 및 환경 친화적인 생물산업 내지 해양생물공학산업은 우리 나라와 같이 부존자원은 적으나 많은 고급인력을 갖고있는 상황에서는 경제, 산업적 측면으로 볼 때 더 할 나위 없이 적합한 분야로써 해양생물자원으로부터의 유용신물질 개발사업은 국가의 경제적으로나 사회적으로 절실히 요구되고 있는 분야라고 판단되며, 현재 반도체 분야에만 집중되어 있는 국가 수출구조의 개선에도 큰 몫을 할 것으로 기대되는 신기술이라고 판단된다.

3. 사회·문화적 측면

과거 중국문화권이었던 우리 나라는 중국의 영향력을 우리고유의 형태로 소화시켜 다양한 문화를 재창출한 역사적 배경을 갖고 있다. 이미 잘 알려진 바와 같이 중국에서 발달한 한의학은 우리나라에서 사상의학 내지 동의보감을 주축으로 하는 새로운 차원의 동 의학으로 새로운 형태의 꽃을 피우고 있으며 우리 선대에는 많은 경험으로부터 얻은 민간요법 내지 동의학적 치료법이 다양하다. 여기에는 우리 토질에서 난 육상생물과 아울러 많은 해양생물을 이용하고 있는 치료법이 의외로 많음을 알 수 있다.

본 연구에서 시도할 각종 연구의 사회·문화적 배경으로는 우리 고유의 민간요법으로부터의 경험적 idea를 얻어 이를 과학화할 경우 새로운 차원의 사회·문화적으로 큰 파급효과를 나타낼 수 있다고 생각된다.

제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획

- ① 우리 나라 특산종이고 고유종의 참 갯지렁이 유래의 신 기능성 슈퍼효소에 대한 생화학적 내지 효소학적 특성이 1차 연도에 대략 마무리되었고 일부 특성의 몇 가지를 효소학적 측면으로 분석할 경우 이에 대한 연구결과는 기초 학문적 측면에서 기존의 유사 효소와의 차이점을 분석함으로써 특이효소의 기본 작동 기작을 이해하고 새로운 종류의 효소를 생산하고자 하는 단 백질 공학과 생물산업에 커다란 도움을 제공 할 수 있을것으로 판단됨.
- ② 경제·산업적 측면에서는 다양한 각도에서의 응용성을 토대로 고부가가치의 생물소재물질을 생산함으로써 21C 주도형의 새로운 생물산업기반을 조성하게되며 경쟁력 있는 venture기업의 창출 및 새로운 분야에 대한 국가 경쟁력을 극대화시켜 나갈 수 있다. 상기 슈퍼효소의 활용방안은 매우 광범위하나 우선 활용에 큰 무리가 없는 산업적인 측면으로의 활용도가 클 것으로 기대된다
- ③ 해양 미세조류의 경우 우선 광 생물반응기라는 전혀 새로운 개념의 반응기가 도입될 경우 발효생물산업에 획기적인 issue가될 것이고 특히 활용성이 무궁무진한 미세조류를 위와 같이 초고농도로 배양이 실현될 경우의 산업적 파급효과는 그 어느 것보다도 클 것으로 기대한다.

그 활용방안은 갯지렁이를 비롯한 갯벌유래 해양생물과 미세조류가 갖고 있다고 추정되는 극한친화생물질(extremophiles)중 특히 중요하게 생각되는 극한효소류 또는 슈퍼효소에 대한 활용도가 다양한 분야에 걸쳐 이루어질 것으로 기대된다.

- 정밀활성 및 무독성을 요구하는 의약학 제제로써의 응용성
- 극한효소류 경우 생체내 분해가 쉽고 독성출현 등의 확률이 낮으며 따라서 다양한 질환의 치료제나 예방제에 응용가능성이 크다.
- Supraphysiological temperature(초생리적 온도)의 저온 및 고온과 같은 극한 조건을 요구하는 각종 생물반응, 생물 반응기 및 이를 충족시킬 수 있는 시술 시에 효과적 역할담당 가능성이 크다.
- 갯벌내 유기생체의 1차 기능이 정화작용임을 미루어보아 그로부터 유래된 극한효소류는 정화 촉진제로써의 가능성이 클 것으로 예상된다.
- 오염물질 정화시의 특수환경인 산성 및 혐기성 조건에서 유지되는 효소의 활성도로 미루어 응용성의 극대화 가능
- 미생물을 이용한 생물화학공정에 이용함으로써 생산성의 증가뿐만 아니라 식품첨가제로서의

응용성이 커 산업적 응용성을 증진시킬 수 있다.

- 기타 일상생활에 필요한 각종세제류(의류, 세척) 및 생활폐수의 전처리에 사용될 가능성이 크다.
- 활성과 안정성이 큰 극한효소류는 고부가가치의 생물소재 산업분야에 무한한 응용성을 갖고 있고 이외에도 생명과학분야의 기초학문 발전에 지대한 공헌을 할 것으로 기대되며 결과적으로 경제적 파급효과 역시 클 것으로 기대됨.
- 광 생물반응기의 미세조류에 따른 최적반응 기작을 도출함으로써 생산공정의 단축, 원가절감 및 타 반응법에 비해 우위를 점할 수 있는 know-how의 축적이 기대됨.

제 6 장 참고 문헌

1. Anwar, A. and Saleemuddin, M. (1997) Alkaline pH acting digestive enzymes of the polyphagous insect pest *Spilosoma obliqua*: stability and potential as detergent additives. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 25, 43-46.
2. Anwar, A. and Saleemuddin, M. (1998) Alkaline proteases: A review. *Bioresource Technol.* 64, 175-183.
3. Herbert, R.A. (1992) A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnol.* 10, 395-402.
4. Jasvir, S., Gill, N., Devasahayam, G. and Sahoo, D.K. (1999) Studies on alkaline protease produced by *Bacillus* sp. NG312. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 57-63.
5. Manachini, P.L. and Fortina, M.G. (1998) Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 20, 565-568.
6. Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R. and Darmwal, N.S. (1999) The production of alkaline protease by *Bacillus* species isolate. *Bioresource Technol.* 67, 201-203.
7. Zaghoul, T.I. (1998) Cloned *Bacillus subtilis* alkaline protease (*aprA*) gene showing high level of keratinolytic activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 199-205.
8. Tsuchiya, K., Nakamura, Y., Sakashita, H. and Kimura, T. (1992) Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 246-250.
9. Gupta, R., Gupta, K., Saxena, R.K. and Khan, S. (1999) Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* 21, 135-138.