creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2023년 8월
석사학위 논문

바실러스 테길렌시스(*Bacillius tequilensis*) 변이체를 이용한 Protease의 생산 강화 균주 개발

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

후렐어치흐 온다라흐

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

바실러스 테길렌시스(*Bacillius tequilensis*) 변이체를 이용한 Protease의 생산 강화 균주 개발

Enhanced production of protease by mutagenesis of *Bacillus teguilensis*

2023년 08월 25일

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

후랠어치흐 온다라흐

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

바실러스 테길렌시스(*Bacillius tequilensis*) 변이체를 이용한 Protease의 생산 강화 균주 개발

지 도 교 수 이 중 헌

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2023년 4월

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

후랠어치흐 온다라흐

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

후랠어치흐 온다라흐의
석사학위논문을 인준함

위 원 장 조선대학교 교 수 이 재 욱 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이 중 헌 (인)

위 원 조선대학교 교 수 신 현 재 (인)

2023년 5월

조 선 대 학 교 대 학 원

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

List of Tables ····· **IV**

List of Figures ····· **V**

ABSTRACT ····· **VII**

제1장 서론 ····· 1

제1절 연구 배경 ····· 1

제2절 이론적 배경 ····· 4

1. 프로테아제 (Protease) ····· 4

2. 바실러스 (*Bacillius spp.*) ····· 9

3. 돌연변이 유형 (Mutagens type) ····· 11

4. Mutagen의 효과 ····· 15

5. 돌연변이의 분리 및 식별(Isolation and identification of mutants) ····· 16

제3절 효소 정제 및 탈염 공정 ····· 19

제2장 실험 재료 및 방법 ····· 20

제1절 실험 재료 및 기기 ····· 20

제2절 *Bacillius.spp* 균의 mutation 및 돌연변이의 분리 ·· 21

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1. 균준비 ·····21
2. 돌연변이 방법 ·····22
가. 자외선 처리 ·····22
나. NTG 치료 ·····22
다. 온도의 영향 ·····22
3. 돌연변이의 분리 및 식별 ·····28
4. Protease의 효소 분석 및 기질로서의 카제인 ·····29

제3절 프로테아제 효소의 과생산을 위한 다양한 요인의 최적화 ·····32
1. 균 준비 ·····32
2. Bacteria 배양 최적화 ·····32
가. 최적 배지 선정 ·····32
나. 초기 pH의 영향 ·····32
다. 온도의 영향 ·····32
3. 프로테아제의 생산을 위한 균의 배양 최적화 ·····33

제4절 효소 정제 및 가죽의 탈모 ·····34
1. Ammonium sulfate solution and sephadex G-25 ·····34
2. Dehairing of leather ·····34

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제3장 실험 결과 및 고찰 ·····36

제1절 돌연변이의 선별 ·····36

제2절 UV 및 NTG 치료 후 *B.tequilensis*의 돌연변이 유발 효과 ·····40

1. Mutant strain의 배양 최적화 ·····42

2. 액체 배양 최적화 ·····44

가. TGY 배지 최적화 ·····44

나. 초기 pH의 최적화 ·····47

다. 온도 최적화 ·····44

라. 배양 시간 최적화 ·····47

바. 배양 volume ·····47

제3절 Purification enzyme ·····54

1. Protease 정제 및 탈염 공정 ·····54

2. Dehairing of hide by partially purified protease ·····56

제4장 결론 ·····58

References ·····59

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Tables

Table. 1. KCTC TGY medium N:13622 ····· 25

Table. 2. KCTC Nutrient Agar N:1659 ····· 26

Table. 3. Medium composition for media bacteria submerged culture 27

Table. 4. Activity assay ····· 30

Table. 5. Standars curve ····· 31

Table. 6. The results of lethality rade UV mutation ····· 39

Table. 7. Results of compound mutation ····· 41

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Figures

Figure. 1. Process flow chart for clean enzyme production and purification 3

Figure. 2. The structure of a TEV protease ····· 5

Figure. 3. Diagram summarizing classification of protease ····· 8

Figure. 4. UV mutagenesis mechanism ····· 13

Figure. 5. Random Mutagenesis process ····· 21

Figure. 6. Streak template ····· 24

Figure. 7. Mutant screening using pencillin ····· 28

Figure. 8. Concentration of L-Tyrosine (ppm) ····· 35

Figure. 9. Increase in enzyme activity ····· 38

Figure. 10. Different media ····· 43

Figure. 11. Mutant strain incubation ····· 45

Figure. 12. TGY media ····· 46

Figure. 13. Effect of temperature on protease production by *Bacillus tequilensis*, mutant 40-1, mutant 40-3 ····· 49

Figure. 14. Effect of casein on protease production by *Bacillus tequilensis*, mutant 40-1, mutant 40-3 and 90-2 ····· 50

Figure. 15. Effect of pH on protease production by *Bacillus tequilensis*,

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

mutant 40-1 and 40-3 ····· 51

Figure. 16. Effect of incubation period on protease production by *Bacillus tequilensis*, mutant 40-1 and 40-3 ····· 52

Figure. 17. Medium volume ····· 53

Figure. 18. Purification enzyme ····· 55

Figure. 19. Dehairing of hide by partially purified protease using horse, cow, sheep ····· 57

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Enhanced production of protease by mutagenesis of *Bacillus teguilensis*

Khurel Ochir Undrakh
Advisor : Prof. Lee, Jung Heon, Ph.D.
Department of Chemical Engineering
Graduate School of Chosun University

Mongolia has more than 71.1 million livestock animals. The leather industry using livestock animals is an important industry in Mongolia, and it is important to supply excellent quality leather to the market through perfect processing using modern technology. Since the leather processing process uses many toxic chemicals and generates a lot of polluted wastewater, it is necessary to switch to a process that uses protease as an eco-friendly process. The protease produced in this study hydrolyzes proteins into amino acids. Protease is also used in many industries, medicine and as basic biological research tools. Many laundry detergents are composed of digestive proteases and have also been used extensively in the bread industry.

The purpose of this study is to develop a mutant strain that maximizes protease production using *Bacillus teguilensis* as a host. A mutagen (UV light, NTG chemical solution) is used to increase the enzyme activity. The enzyme activity of the protease-producing *Bacillius tequilensis* parent strain is 2.4 U/mL and could be increased 4.7-fold after mutagenesis. After optimization of culture conditions, protease production is increased significantly 12-fold and its activity is 24.6 U/mL.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제1장 서론

제1절 연구 배경

현재 몽골에는 7,110만 마리 이상의 가축이 있으며 가죽은 전체 축산물의 45%를 차지한다. 그런 점에서 축산물을 현대적 기술로 완벽하게 가공해 시장에 공급하는 것이 국가 경제에 중요하다. 몽골 내 가죽 공장은 경제성이 떨어지는 친환경적인 가공 방법이 아닌 유해한 화학 물질을 계속 사용하여 환경 오염이 발생하고 있다.

가죽의 지방, 털 등을 제거하여 가공하는 무두질 공정은 화학적 방법과 생물학적 방법이 있다. 화학적 방법을 사용할 경우 오염된 폐수의 수질을 나타내는 화학적 산소요구량 (COD : Chemical oxygen demand)이 5896.7 mg/l, 폐수 내 황화물의 농도는 16.7 mg/l, 건조 잔류물은 9275.76mg/l, 슬러지 100kg, pH가 11.6으로 폐기물이 많은 알칼리 폐수가 발생 된다.

하지만, 생물학적 방법 (효소 규산염 법)을 사용한 경우 COD는 1824.0mg/l, 폐수 내 황화물은 미검출되었고, 건조 잔류물의 양은 900mg/l, 폐수의 pH는 5.2로 상대적으로 폐기물이 적게 발생 된다. 현대 사회가 친환경 제품과 생산에 초점을 맞추면서 더 많은 화학 공정이 효소 공정으로 대체되고 있다.

가죽 제작은 soaking, dehairing, bating (두드려서 부드럽게 함), degresing으로 4가지 방법이 있으며 가죽의 단백질을 녹여 제거하는데 주로 프로테아제 효소를 사용한다. 최근 박테리아를 이용한 프로테아제 연구에 대한 관심이 높아지고 있다.

생물체 내에서 효소를 추출하는데 많은 제약이 있는 반면에 미생물을 사용해서 효소를 추출하는 경우 기후에 영향을 받지 않고, 쉽고 빠르게 생산할 수 있기 때문에 경제적 측면에서 많은 장점을 가지고 있다.

프로테아제를 생성하는 박테리아 중에서 *Bacillus spp.*는 상업용 알칼리성 프로테아제로 가장 인기 있는 아종이다[1.2.3.4]. *Bacillus* 속은 프로테아제 생산에 가장 중요한 박테리아이며 극한의 온도, pH, 유기 용매, 세제 및 산화 화합물에 대한 높은 안정성으로 중성 및 알칼리성 단백질 분해 효소를 고수율로 생산할 수 있다.

펩티다아제로도 알려진 프로테아제는 펩티드 결합을 가수분해하여 단백질과 펩티드를 분해하여 더 짧은 부산물을 생성한다. 프로테아제는 다른 유형의 효소에 대한

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

연구 및 상업화 범위가 넓으며 이러한 효소에 대한 미래 수요를 충족시키기 위해서는 새로운 프로테아제 효소의 개발이 필요하다.

천연 균주에서 대사산물의 과도한 합성은 유기체의 유전적 조절 메커니즘에 의해 제한된다. 세포를 돌연변이 시킴으로써 이 제어 메커니즘이 파괴되고 조절되지 않아 물질이 과도하게 합성된다. 물리적, 화학적, 생물학적 3가지 과정을 통해 돌연변이 균주를 생산할 수 있다. 이 중 물리적 방법인 UV를 사용하여 돌연변이를 유발할 경우 효소의 합성 활성을 10~50배 증가시킬 수 있다[1.2.3].

따라서 본 연구에서는 가죽 가공에 사용되는 프로테아제 효소 합성 균주의 고활성 변이 균주를 확보하는 것을 주된 목적으로 한다. 우리는 연구에 물리적 및 화학적 돌연변이 유발을 사용했으며 더 저렴하고 안전하며 더 나은 품질의 균주를 얻는 것이 가능해 질 것으로 전망한다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

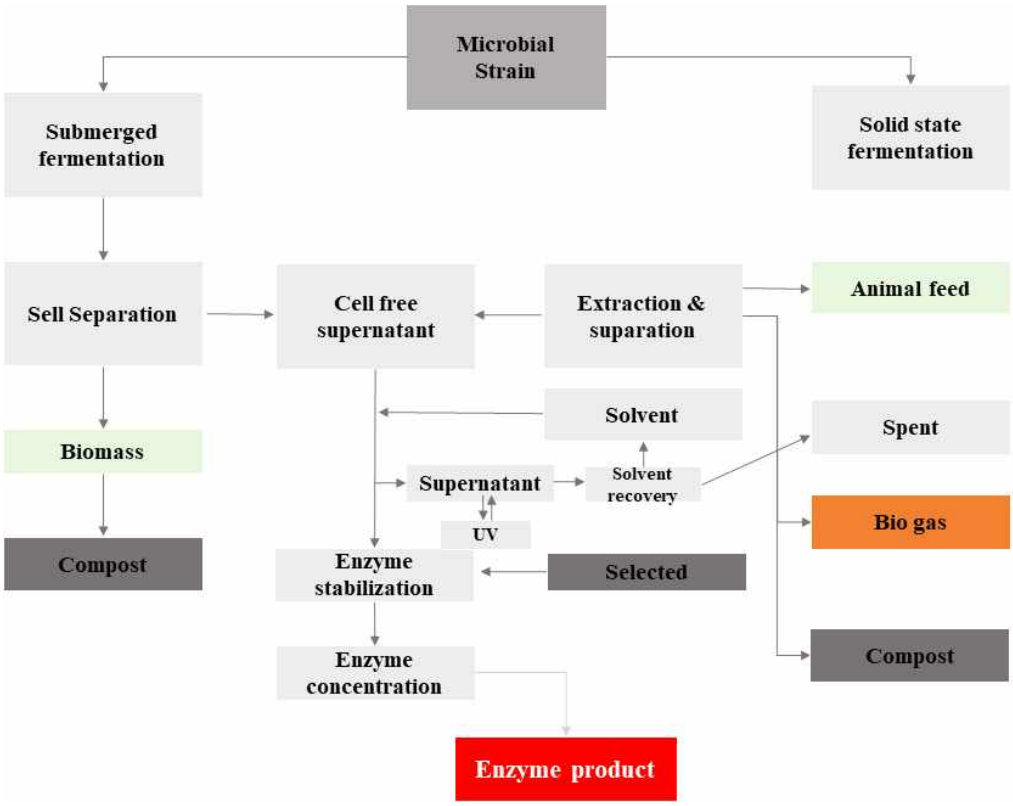

Figure 1. Process flowchart for clean enzyme production and purification.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제2절 이론적 배경

1. 프로테아제 (Protease)

모든 살아있는 유기체의 세포는 생화학적 반응을 촉매하거나 가속화하는 능력을 가지고 있고 효소로 알려진 생촉매 역할을 하는 화학 물질로 구성된다. 효소는 화학 및 합성 유래 촉매에 비해 높은 촉매 효율, 활성 및 특이성을 가지고 있다. 이러한 장점으로 화학, 식품, 의약 등 다양한 분야에서 효소의 활용이 확대되었다[Fig.1]. 이것은 고품질 효소의 저렴하고 상업적인 생산에 대한 수요를 창출했다. 그것의 중요성 때문에 지구상의 거의 모든 형태의 생명체는 생리적 기능에 중요한 요소인 알칼리성 프로테아제 효소를 함유하고 있다. 프로테아제 효소는 다양한 유기체에 의해 생산되지만 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물 공급원에서 생산되는 효소는 유전자 변형에 대한 유연성 때문에 인간 또는 식물 프로테아제 효소보다 선호된다. 프로테아제는 복잡한 단백질 화합물을 아미노산과 펩티드로 분해하기 때문에 가장 유용하고 강력한 효소로 간주된다[Fig.1]. 프로테아제 효소는 전 세계 효소 소비량의 약 60%를 차지하다[1.2.3.4.5.6].

프로테아제의 활성 부위에 존재하는 작용기에 따라 이들 효소는 (1) 아스파르트산 프로테아제 (Aspartic proteases), (2) 아스파라긴 펩티드 분해효소(Asparagine peptide lyases), (3) 시스테인 프로테아제(Cysteine proteases), (4) 글루탐산 프로테아제 (Glutamic proteases), (5) 메탈로프로테아제(Metalloproteases), (6) 세린 프로테아제 (Serine proteases) 및 (7) 트레오닌 프로테아제(Threonine proteases)[1,2]. 산업에서 사용되는 프로테아제는 활성 pH 범위에 따라 산성(acidic), 중성(neutral) 또는 알칼리성 (alkaline) 프로테아제로 분류된다[1,3] [Fig.3]. 그 중 알칼리성(alkaline) 단백질 분해 효소는 농업, 세제, 섬유, 가죽 등 다양한 산업 분야에서 널리 사용되기 때문에 단백질의 핵심 그룹으로 간주된다[1,3,4,5].[Fig.1] 미생물 프로테아제는 가장 중요한 가수분해 효소 중 하나이며 효소학이 시작된 이래 광범위하게 연구되어 왔다. 주로 이러한 효소가 세포 대사 과정에서 중요한 역할을 하기 때문에 산업계 및 연구에서 상당한 관심을 받고 있다. 이러한 효소는 1914년 세제 첨가제로 도입된 이후 세제 산업에서 널리 사용되었다. 미생물은 세포 내 또는 세포 외 프로테아제의 많은 배열을 정교하게 만든다. 세포 내 프로테아제는 포자형성 및 분화, 단백질 회전율, 효소 및 호르몬의 성숙과 같은 다양한 세포 및 대사 과정에 중요하다[Fig.2].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

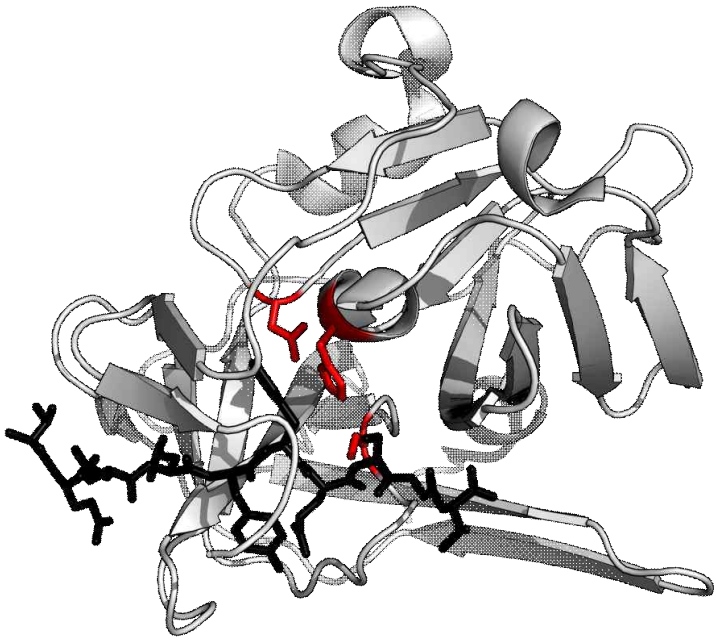

Figure 2. The structure of a TEV protease.[1)].

1) 이미지 출처 : 위키백과

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

세포 외 프로테아제는 무세포 환경에서 단백질의 가수분해에 중요하며 세포가 가수분해 생성물을 흡수하고 이용할 수 있도록 한다[1.5]. 동시에, 이러한 세포 외 프로테아제는 다양한 산업 공정에서 단백질 분해를 돕기 위해 상업적으로 활용되었다. 오늘날 프로테아제는 세제, 식품, 제약, 가죽, 진단, 폐기물 관리 및 은 회수와 같은 다양한 산업 시장 부문에서 총 효소 판매의 약 40%를 차지한다[Fig.1]. 산업 시장에서 이러한 프로테아제의 사용은 더욱 증가할 것으로 예상 된다[5.6]. 미생물 프로테아제는 프로테아제의 다양한 측면에 중점을 두고 여러 번 검토되었다. Aunstrup(1980)은 미생물 선택과 프로테아제의 발효에 초점을 맞춘 반면 Ward(1985)는 주로 미생물 프로테아제의 공급원과 자연에서 가능한 기능적 역할을 다루었다. Kalisz(1988)는 프로테아제 유형 및 상업적 응용에 대한 자세한 설명으로 사용 가능한 정보를 업데이트한 반면 Outtrup 및 Boyce(1990)는 산업적으로 중요한 프로테아제, 응용 및 프로테아제 연구에서 분자 생물학의 역할에 중점을 두었다. Rao et al(1998)은 미생물, 동물 및 식물 프로테아제의 분자 생물학, 생화학적 및 유전적 측면에 관한 훌륭한 리뷰를 발표했다. 소스에서 세포 역할, 생산, 다운스트림 처리, 특성화 및 상업적 응용에 이르는 미생물 알칼리성 프로테아제의 생물산업적 관점도 검토되었다[4.5]. 이 현재 리뷰에서는 미생물 알칼리성 단백질 분해 효소의 일부 측면을 산업적 응용 및 세제 산업에 대한 강조와 함께 새로운 기술을 사용하여 새로운 프로테아제를 발견하고 개발하기 위한 다가오는 접근법과 함께 논의한다. 이 검토의 주요 초점은 박테리아의 세린 알칼리성 프로테아제에 유지되었다.

프로테아제는 박테리아, 진균 및 바이러스를 포함한 다양한 유형의 미생물에 대해 연구되었지만 [6,7,8,9], *Bacillus.sp* 종 (박테리아)은 프로테아제의 상업적 응용을 위한 최고의 자원 중 하나이다. 세제와 호환되는 프로테아제는 얼룩을 효율적으로 제거하는 데 널리 사용되어 왔으며 가죽 산업에서 세척 및 탈모 공정의 핵심 역할을 한다[9,10,11]. 기존의 방법은 많은 양의 석회와 황화나트륨을 사용하므로 이러한 물질이 상당한 양의 환경 오염을 유발하여 환경 친화적이지 않다[1,5]. 프로테아제는 일반적으로 고온이나 계면활성제에 내성이 없으며 열안정성 프로테아제는 알칼리성 pH 조건이나 계면활성제에 내성이 없다[4,9,12].

알칼리성 프로테아제는 산업계에서 가장 널리 사용되거나 사용되는 효소다. 다양한 프로테아제 중에서 알칼리성 프로테아제는 세제, 가죽, 의약품, 단백질 가공, 식품, 진단 시약, 대두 가공, 펩타이드 합성 생산, 사용된 X-선 필름에서 은 추출, 폐기물 등 다양한 산업 분야에서 널리 사용될 수 있다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

오늘날 보다 새롭고 지속 가능하며 경제적으로 경쟁력 있는 생산 공정을 개발하기 위해서는 새롭고 개선된 다용도의 효소가 필요하다. 이 연구에서는 일부 프로테아제 생성한 *Bacteria* 및 protease 분류와 프로테아제 생산성을 향상시키는 기술에 대해 논의 한다. 저렴하고 쉽게 구할 수 있는 기질을 사용한 세균성 프로테아제의 생산이 기술되어 있다. 다양한 산업 응용에서 박테리아 프로테아제의 사용에 대해서도 논의하고 마지막으로 향후 전망을 제시한다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

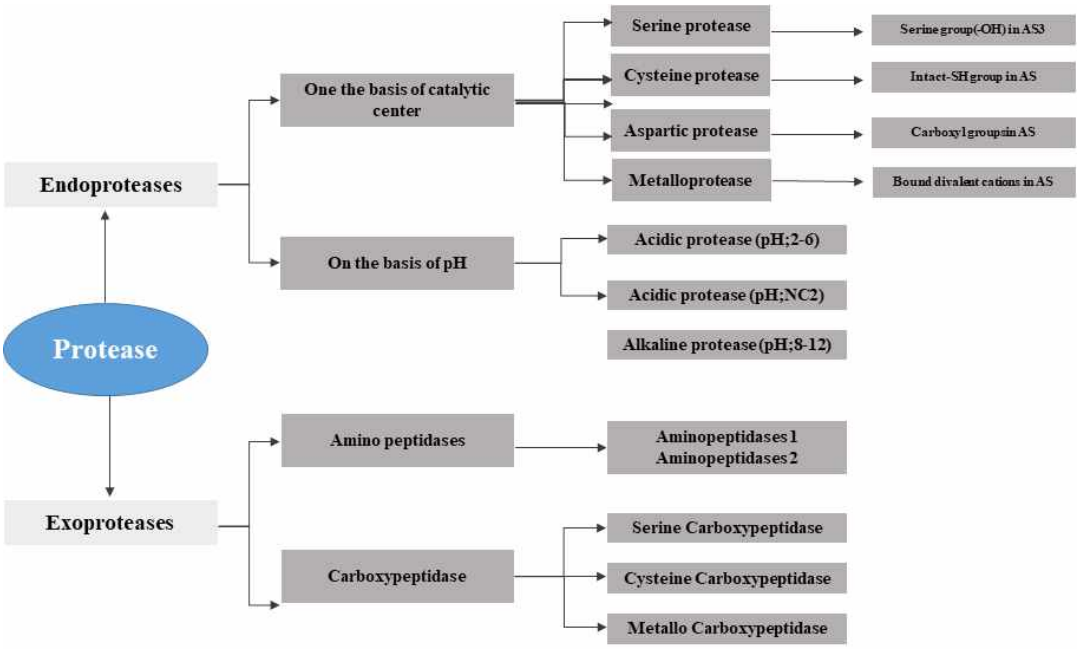

Figure 3. Diagram summarizing classification of proteases[3.4].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 바실러스 (*Bacillius spp.)*

미생물은 산업 규모에서 세포내 및 세포외 효소를 생산하는 기술에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최대 수확량을 위해 선택된 유기체는 최적의 조건에서 발효기에서 재배되며 치즈, 빵, 와인 및 맥주와 같은 제품을 만드는 데 추가로 사용될 수 있다. 살아있는 세포 내부의 대부분의 반응에는 촉매 역할을 하는 효소가 필요하며 생명에 필수적이다. 알칼리성 프로테아제는 높은 단백질 분해 활성과 알칼리성 조건에서의 안정성으로 인해 많은 관심을 받고 있다. 상업용 알칼리성 프로테아제의 대부분은 박테리아, 특히 *Bacillus sp* 와 *Streptomyces*에 의해 생산된다[4.5.6].

Bacillus 종은 세포 외 프로테아제의 주요 생산자이며, 산업 부문에서는 다양한 alkaline 효소 생산을 위해 *Bacillus subtilis, bacillius tequilensis, bacillius licheniformis, bacillius species, bacillius altitudinis, bacillius firmus, bacillius proteolyticus, aspergillius sp(fungi), thermomonospora fusca* 를 자주 사용한다. 프로테아제는 미생물 공급원에서 생산되는 주요 효소이며, 그 중 일부만이 상업적 생산자로 권장된다. *Bacillus* 종은 절대 호기성 또는 통성 혐기성이며 자유 생활 및 병원성 종을 모두 포함하다. 다양한 산업 분야에서의 광범위한 적용을 고려할 때 프로테아제 효소는 중요한 위치를 차지한다.

따라서 본 연구에서는 알칼리 프로테아제 (alkaline protease) 생산에서 가장 널리 연구된 박테리아인 *bacillius subtilis, bacillius tequilensis* 및 *bacillius licheniformis*를 선택하여 연구를 하였다[1.2.3.4.5.6].

가. *Bacillius subtilis*

*B. subtilis*는 주로 토양에서 발견되며 건초간균, 목초간균라고도 한다. 단단하고 보호적인 눈생포자를 형성할 수 있고 극한의 환경 조건을 견딜 수 있는 막대 모양의 유기체다[6].

*B. subtilis*의 유전 공학, 산업용 화학 물질 또는 효소 생산, 농업, 의약 및 생체 재료에 적용. CRISPR/cas9 균주는 *B. subtilis*의 유전 공학에 널리 사용되었다. *Bacillius subtilis*는 프로테아제를 생산할 뿐만 아니라 α-아밀라아제(α-amylase), 자일라나아제(xylanase), 리케나아제(lichenase), 리파아제(lipase), 셀룰라아제(cellulase) 또는 펙티나아제(pectinase)와 같은 다양한 산업용 효소를 생산하는 데 사용될 수 있다. 또한 리보플라빈(riboflavin), 메나퀴논-7(menaquinone-7), 이노시톨(inositol) 또는 N-아세틸글루코사

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

민(N-acetylglucosamine)과 같은 다양한 화학 물질을 생산하는 데 사용할 수 있습니다. 농업에서는 사료 첨가제로 사용할 수 있다. *B. subtilis*의 생물막은 3D 프린팅(3D printing)에서 생체 재료로 사용될 수 있다. 의학에서 *B. subtilis*는 백신 생산에 사용될 수 있다[5.6.7].

나. *Bacillius tequilensis*

*B.tequilensis*는 Epiphytic 박테리아 속에 속한다. 착생세균(Epiphytic)은 식물의 잎, 뿌리, 꽃, 새싹, 종자, 열매 등 다양한 기관의 표면에 기생하지 않고 사는 세균이다. 현재 연구에 따르면 착생 박테리아는 종종 식물에 해를 끼치지 않고 대신 얼음 결정 형성을 촉진하다. 일부는 식물 성장을 촉진하고 세균의 생활 주기에서 역할을 하는 옥신 호르몬을 생산한다. 많은 착생세균(Epiphytic)은 막대 모양이며 그람 음성 또는 그람 양성, 색소성 또는 비색소성, 발효성 및 비발효성으로 분류할 수 있다[4.5.6].

효소 제모는 환경친화적일 뿐만 아니라 효소 처리 가죽은 화학적 처리 가죽보다 품질이 우수하다[4.6]. 효소 처리는 일부 기저막 단백질, 당단백질 및 프로테오글리칸의 분해로 인해 모낭을 약화시킨다[5.6].

Bacillius tequilensis 및 *B. cereus*에서 분리한 프로테아제는 다른 알칼리성 프로테아제보다 염소 피부의 털을 제거하고 피부 품질을 개선하는 데 더 효과적이다[5.6]. *Bacillius tequilensis*의 프로테아제는 광범위한 유기 용매 (8.8에서 -1.249 범위의 log Pow 값)에 내성이 있어 산업 응용 분야에 다양성을 더한다.

다. *Bacillius licheniformis*

*Bacillus licheniformis*는 토양에서 흔히 발견되는 박테리아이다. 그것은 새의 깃털, 특히 가슴과 등의 깃털에서 발견되며, 지상에 사는 새와 수생 종에서 가장 흔하게 발견된다. 그것은 그람 양성, 중온성 박테리아다[4].

알칼리성 세린 프로테아제의 고용량 분비는 *B. licheniformis*를 산업적 효소 생산에서 가장 중요한 박테리아 중 하나로 만들었다. *B. licheniformis*가 분비하는 Subtilisin Carlsberg(P00780)는 세제 프로테아제로 사용된다. 그것은 Novozymes에 의해 Alcalase라는 이름으로 판매된다. RNA-seq 기반 연구에서 BLi_r0872라는 Subtilisin Carlsberg에 대한 작은 안티센스 RNA가 발견되었다. 그것은 프로테아제 생산에 추정되는 영향을 미칠 수 있으며 균주 개선의 대상이 될 수 있다[4.5.6].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 돌연변이 유형 (Mutagens Types)

돌연변이는 유전자의 변화를 일으키는 현대 생물학에서 매우 중요한 개념이다. 유전학에서 돌연변이는 유기체의 유전 물질(DNA 서열)의 변화다. 돌연변이는 또한 돌연변이된 유기체다[3.4].

돌연변이의 결과는 일반적으로 유전자에 의해 지정된 최종 산물의 변화다. 경우에 따라 돌연변이는 미생물에서 새로운 대사 활동이 발견되면 유익할 수 있고, 대사 활동이 상실되면 해로울 수 있다.

돌연변이는 자발적이거나 환경 돌연변이원에 의해 유발될 수 있다. 불일치는 염기 호변이성체 이동, 산화적 DNA 손상, 탈퓨린화 및 탈아미노화와 같은 세포 과정 또는 화학 물질, 방사선, 바이러스, 식이 및 생활 방식(돌연변이원)과 같은 "환경" 영향으로 인해 발생할 수 있다. 뉴클레오티드 치환, 결실 또는 추가는 돌연변이의 두 가지 메커니즘이다[Fig.3]. 박테리아 돌연변이는 Missense, Unsense, Silent, Frameshift, Lethal, Suppressor 및 Conditional Lethal Mutations를 비롯한 여러 가지 변화를 했다. 이러한 돌연변이를 검출하려면 검출 방법이 필요하다. 클로닝, 페니실린 강화, 발색 기질을 사용하는 Ames 테스트와 같은 고전적인 방법과 중합효소 연쇄 반응(PCR) 및 겔 전기영동, 유전자 프로브 및 서던 블롯팅, DNA 시퀀싱 및 DNA 마이크로어레이와 같은 최신 테스트가 호환된다[Fig.4].

돌연변이는 자발적으로 발생하거나 화학적 또는 물리적 작용제에 의해 유발될 수 있다. 돌연변이의 원인은 일반적으로 DNA 또는 염색체에 대한 어떤 형태의 손상이다. 그러나 비암호화 영역인 DNA의 일부에서 손상이 발생할 수 있으므로 돌연변이를 일으키지 않는다. 돌연변이는 해로울 수도 있고 해롭지 않을 수도 있다. 그들은 체세포 또는 생식 세포에서 발생할 수 있다. 생식 세포에서 발생하는 돌연변이는 다음 세대로 전달될 수 있다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

가. 물리적 돌연변이원 (Physical mutagen)

자외선(UV)은 비이온화 방사선으로 돌연변이를 일으킬 수 있다. 돌연변이 유발에 가장 효과적인 자외선의 파장은 약 2,600A°이다. 이것은 DNA에 가장 잘 흡수되고 단백질이 거의 에너지를 흡수하지 않는 파장이다. UV 방사선이 돌연변이를 유도하는 몇 가지 방법에는 염기 결실, 가닥 파손, 가교 결합 및 뉴클레오티드 이량체 형성이 포함된다.

UV radiations are of three types:

UV-A는 320nm(근가시 범위)의 파장을 가지며 피리미딘의 이합체화를 일으키는 것으로 알려져 있다. 이 특정 형태의 피리미딘 이합체화는 DNA 구조를 변경하여 복제 프로세스 동안 복제 분기점의 생성을 방지한다. 이러한 이합체화는 건강에 부정적인 영향을 미칠 수 있다.

UV-B는 파장이 290-320nm이며 DNA에 매우 치명적이다.

UV-C는 180~290nm의 파장을 가지며 오존층에 주로 흡수되며 가장 치명적이고 발암성이 있다[Fig.4].

UV 돌연변이 유발 메커니즘의 도식적 개요: UV가 생성하는 것으로 생각되는 DNA 병변은 이전 연구에서 UV 노출 후 검출된 돌연변이와 관련이 있으며, 개입 가능한 분자 메커니즘에 의해 매개된다. 복제를 통해 매개되는 돌연변이는 손상된 분자와 변형된 염기쌍 형성 능력으로 인해 손상된 염기 반대쪽의 잘못된 뉴클레오티드 또는 온전하지만 일치하지 않는 주형 염기 반대쪽의 손상된 뉴클레오티드를 통합함으로써 발생할 수 있다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

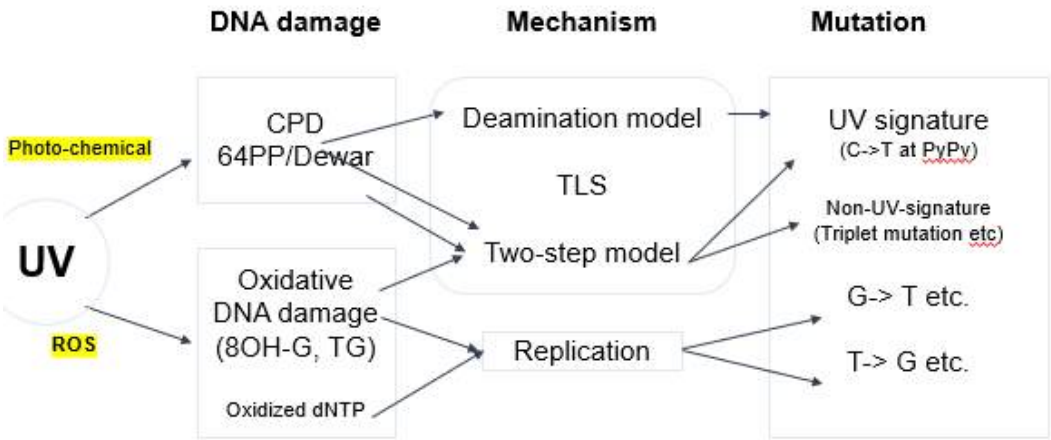

Figure 4. UV Mutagenesis Mechanism

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 화학적 돌연변이원 (Chemical Mutagen)

많은 화합물이 유전자의 변이성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

Auerbach와 Robson은 1947년 겨자 가스와 질소, 유황 겨자, 겨자 기름, 클로르아세톤과 같은 관련 물질을 사용한 수컷 Drosophila melanogaster에 대한 실험에서 화학물질이 돌연변이를 일으킬 수 있음을 처음으로 보여주었다[Fig.4].

이러한 물질은 퓨린 및 피리미딘과 같은 염기를 가진 구조적 특성을 가지고 있다. 5-브로모우라실 및 아미노퓨린은 화학적 돌연변이원으로 간주되는 가장 널리 퍼진 두 가지 염기 유사체다. 염기 유사체는 이러한 작용제와 DNA 염기 사이의 구조적 유사성 때문에 복제 중에 DNA 구조에 통합된다. 아데닌과 마찬가지로 아미노퓨린은 C 또는 T와 쌍을 이루어 염기쌍을 형성할 수 있다(C와의 염기쌍 형성은 드물지만). 우레탄 트리아진, 카페인(커피, 차 및 청량 음료에서 발견됨), 페놀 및 발암 물질, 아크리딘(프로플라빈 등) 등을 포함한 일부 추가 염기 유사체는 유사하게 돌연변이를 유발한다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. Mutagen의 효과

1. 진화 (Evolution)

시간이 지남에 따라 궁극적으로 생명의 진화에 기여한 유전자 풀의 변화는 돌연변이에 의해 발생한다. 자연 선택은 다양한 돌연변이를 가진 개체군이 지속되도록 허용하는 반면, 환경 변화에 적응할 수 없거나 그러한 변화의 결과로 진화할 수 없는 개체군은 결국 멸망한다. 그러한 유전적 진화 단계 중 하나는 위장을 위해 곤충과 동물에 의한 코트 색상의 발달을 포함한다.

2. 적응 (Adaptation)

돌연변이 단백질인 Apolipoprotein A1-Milano(또는 Apo A1M)는 작은 이탈리아 그룹에서 발견되었다. 정상적인 Apolipoprotein은 콜레스테롤 수송을 담당하는 단백질이다. 돌연변이 형태의 아포지단백질은 콜레스테롤을 제거하고 플라크를 용해시키는 것 외에도 항산화 특성을 가지고 있으며 심장 질환으로부터 이탈리아 인구를 구하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5. 돌연변이의 분리 및 식별 (Isolation and identification of mutants)

일반적으로 단백질의 아미노산 수준 변화는 단백질 활성에 결과적으로 영향을 미치며 일반적으로 유해하다. 따라서 중요한 대사 경로는 식별 가능한 표현형을 초래하는 기능적 효소의 부족으로 차단될 수 있다. 이러한 표현형은 세 가지 주요 그룹으로 분류할 수 있다:

1. 항생제, 특정 박테리오파지, 독성 화학물질 또는 일반적으로 모세포에 치명적이거나 억제하는 기타 제제에 내성이 있는 돌연변이
2. 영양요구성, 즉 아미노산과 같은 추가 성장 인자를 필요로 하는 돌연변이
3. 특정 성장 기질(보통 당)을 사용할 수 없는 돌연변이

가. Replica plating

이 과정에서 돌연변이화된 배양물이 수확되고, 돌연변이체와 부모의 성장 배지에서 단일 콜로니가 얻어진다. 배양 후 콜로니는 멸균 벨벳 패드를 사용하여 최소 한천 플레이트에 도금한 다음 적절한 보충제(이 경우 히스티딘, 특히 히스티딘 영양 요구체를 찾고 있기 때문에)가 추가된 유사한 플레이트에 도금된다. 영양요구성을 필요로 하는 히스티딘은 첫 번째 플레이트에서는 자랄 수 없지만 두 번째 플레이트에서는 자랄 것이다. 따라서 돌연변이 콜로니는 첫 번째 [1,5,14]에 비해 두 번째 플레이트에서 성장하지 못한 콜로니를 국소화하여 식별할 수 있다.

나. Penicillin enrichment

생화학적 돌연변이를 강화하기 위한 고전적인 기술은 페니실린이 세포벽의 구조적 무결성에 필수적인 펩티도글리칸 중합체의 교차 결합을 억제함으로써 성장하는 세포만 죽일 수 있다는 사실을 이용한다. 박테리아를 최소 배지에 재현탁하고 페니실린을 추가하면 성장할 수 있는 부모 세포를 죽이고 성장하지 않는 돌연변이는 생존할 수 있다[Fig.7].

다. Ames test

에임스 테스트는 히스티딘 합성에 관여하는 유전자에 돌연변이가 있는 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium) 박테리아의 여러 변종을 사용했다. 이 방법은 세포가 히스티딘이 없는 배지에서 자랄 수 있도록 비영양요구성 상태로 되돌릴 수 있

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

는 돌연변이를 생성하는 돌연변이원의 기능을 테스트했다. 박테리아는 소량의 히스티딘이 있는 한천 플레이트에 퍼진다. 성장 배지에 있는 이 소량의 히스티딘은 박테리아가 초기 시간 동안 성장하고 돌연변이를 일으킬 수 있는 기회를 갖게 한다. 히스티딘이 고갈되면 자신의 히스티딘을 생산할 수 있는 능력을 얻기 위해 돌연변이를 일으킨 박테리아만 살아남을 것이다.

플레이트를 48시간 동안 배양한다. 물질의 돌연변이 유발성은 관찰된 집락의 수에 비례한다.

라. Use of chromogenic substrate

특정 탄소원(예: 유당)을 이용할 수 없는 돌연변이는 해당 효소에 의해 작용할 때 쉽게 감지할 수 있는 색상 변화를 나타내는 발색 기질을 사용하여 분리할 수 있다. 이 경우 효소는 β 갈락토시다제인데, 이는 유당을 구성당인 포도당과 갈락토오스로 가수분해하는 것을 촉매한다. β-갈락토시다제에 일반적으로 사용되는 발색 기질은 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-βD-갈락토사이드이며, X-gal로 더 널리 알려져 있다. 이것은 갈락토스에 연결된 염료를 포함하는 천연 기질의 합성 유사체다. X-gal 자체는 무색이며, 염료의 색상은 β-갈락토시다제에 의한 결합의 가수분해에 의해 방출될 때만 나타난다. Lac+ 콜로니는 X-gal이 포함된 배지에서 파란색이고 β갈락토시다제를 생성하지 않는 콜로니는 흰색이다.

마. Polymerase chain reaction (PCR) and Gel electrophoresis

이 방법에서는 표적 유전자(이 경우 돌연변이 서열)를 기하급수적으로 증가시킬 수 있다. 돌연변이로 인해 특정 유전자의 크기에 상당한 변화(예: 삽입 또는 결실)가 발생한 경우 겔 전기영동을 사용하여 PCR 산물의 크기 변화로 감지된다.

바. Gene probes and Southern blotting

이 방법은 아가로스 겔에서 전기영동으로 DNA 조각을 분리하고 이를 필터로 옮겨 표지된 프로브와 혼성화할 수 있다. 고도로 특이적인 프로브를 사용하면 서열의 차이를 감지할 수 있다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

사. DNA sequencing

DNA 시퀀싱 템플릿은 PCR 및 관심 영역 측면에 있는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 증폭된다. 증폭된 단편은 형광 시퀀싱 프라이머, Sanger 디데옥시 시퀀싱 화학 및 돌연변이 Taq DNA 폴리머라제와 내열성 파이로포스파타제의 효소 혼합물을 사용하여 직접 사이클 시퀀싱된다. 생성된 시퀀스 래더는 실시간 자동 4색 시퀀싱 시스템에서 분석된다. 이 방법은 혼합 염기 위치를 나타내는 신호 강도 패턴을 인식하는 소프트웨어에 의해 이형 접합체가 재현 가능하게 검출되고 식별될 수 있도록 충분히 높은 품질의 정제되지 않은 PCR 단편으로부터 서열 사다리를 생성한다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제3절 효소 정제 및 탈염 공정

염석법은 용액에서 단백질을 정제하는 데 가장 일반적으로 사용되는 방법 중 하나이며 간단하고 빠른 방법을 제공하다. 용액에서 단백질은 노출된 극성 및 이온 그룹을 통해 물 분자와 수소 결합을 형성한다[4]. Ammonium sulfate과 같은 고농도의 작고 고도로 하전된 이온이 첨가되면 이러한 그룹은 물 분자에 결합하기 위해 단백질과 경쟁한다. 이렇게 하면 단백질에서 물 분자가 제거되고 용해도가 감소하여 침전이 발생한다(단백질 분자와 상호 작용할 물 분자가 충분하지 않은 경우). 과도한 소금이 존재하는 상태에서 단백질이 침전되는 이러한 현상을 염석(salting-out)이라고 한다[4.5].

일반적으로 분자량이 큰 단백질은 낮은 염 농도에서 침전된다. 이 절차에 가장 일반적으로 사용되는 염은 다음과 같은 이유로 $(NH_4)_2SO_4$ 염석법은 용액에서 단백질을 정제하는 데 가장 일반적으로 사용되는 방법 중 하나이며 간단하고 빠른 방법을 제공한다. 용액에서 단백질은 노출된 극성 및 이온 그룹을 통해 물 분자와 수소 결합을 형성한다. 황산 암모늄과 같은 고농도의 작고 고도로 하전된 이온이 첨가되면 이러한 그룹은 물 분자에 결합하기 위해 단백질과 경쟁한다. 이렇게 하면 단백질에서 물 분자가 제거되고 용해도가 감소하여 침전이 발생한다(단백질 분자와 상호 작용할 물 분자가 충분하지 않은 경우). 과도한 소금이 존재하는 상태에서 단백질이 침전되는 이러한 현상을 염석(salting-out)이라고 한다[3.4.5.6].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제2장 실험 재료 및 방법

제1절 실험 재료 및 기기

본 연구에 사용한 균주는 한국생명공학연구원 생물자원 연구원에서 제공한 *bacillius tequilensis, bacillius subtilius, bacilius licheniformis*을 분양받아 사용하였다.

Bacillius tequilensis 사용된 배양 TGY 배지로 Glucose(DUKSAN), phosphate(K_2HPO_4, Junsei Chemical), Yeast Extract (Bacto™, gibco), Tryptone(DAEJUNG), Casein from milk(Chemical Pure)을 사용하였다.

Bacillius subtilius, bacilius licheniformis 배양에는 Nutrient Broth(Bacto™, gibco) 배지를 사용하였으며, 고체배지 제조에는 Agar, powder(DAEJUNG)를 첨가하였다. pH 조절을 위해서 Sodium hydroxide(NaOH, Junsei Chemical)와 Hydrochloric acid(HCl, DUKSAN)를 사용하였다.

프로테아제 활성 평가를 위한 Casein as a Substrate Potassium 시약 제조에는 Phosphate, Dibasic, Trihydrate(Sigma Prod. No. P-5504), Casein(Sigma Prod. No.C-7078), Trichloroacetic Acid (6.1 N, approximately 100% (w/v),Sigma Stock No-490-10), Sodium carbonate(Sigma-Aldrich), Folin-Ciocalteu's reagent(Junsei Chemical) 시약을 사용하였으며, 표준품으로는 L-Tyrosine(Sigma Prod. No. T-3754)를 사용하였다.

사용한 배지 멸균을 위해 오토클레이브(HB-201SL, Hanbaek), 무균 상태에서 박테리아 접종을 위해 클린벤치(GHL-42CB, Hanbaek)를 사용하였다. 균사체 배양기로 부란기(Hanbaek)와 진탕 배양기(HB201L, Hanbaek)를 사용하였다. 이동상의 pH를 7.5으로 맞추기 위해 pH 미터 (SANXIN, MP511)를 사용하였다. 균 분리를 위해서 소형 원심분리기(Small High Speed Refrigerated Centrifuge Mega17R, HANIL)와 모든 시험 샘플을 0.45㎛ 시린지 필터(Whatman)를 사용하여 분석하였다. UV/Visible 분광광도계(Ultrospec 2100 pro, Amersham)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

돌연변이 하기 위해 화학적 돌연변으로는 Nitrosoguanidine(Aldrich)이 사용하였으며 물리적 돌연변이라는 UV radiation(Caution, UVITEC)를 사용하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제2절 *Bacillius.sp* 균의 mutation 및 돌연변이의 분리

1. 균준비

한국형문화자료실(KCTC) 생물자원센터(BRC)에서 분양 받은 3 종류의 *bacillius tequilensis, bacillius subtilius, bacillius licheniformis* 균는 동결건조 미생물 재생법을 따라 배양된 균주를 실험에 사용하였고 TGY 배지(Tryptone Glucose Yeast media)와 Nutrient Agar 사용하여 배양하였다. 접종 준비를 하기 위해 배지를 250mL Erlenmeyer 플라스크에 준비하였다. NaOH/HCL을 사용하여 배지의 pH를 7.5으로 조정하고 (121°C)에서 15분 동안 autoclaved 사용했다. *Bacillus.sp* 세포로 가득 찬 루프를 멸균 배지로 옮겼다. 플라스크를 24시간 동안 흔들어(150rpm) 균일한 세포 현탁액을 얻었다[Fig5].

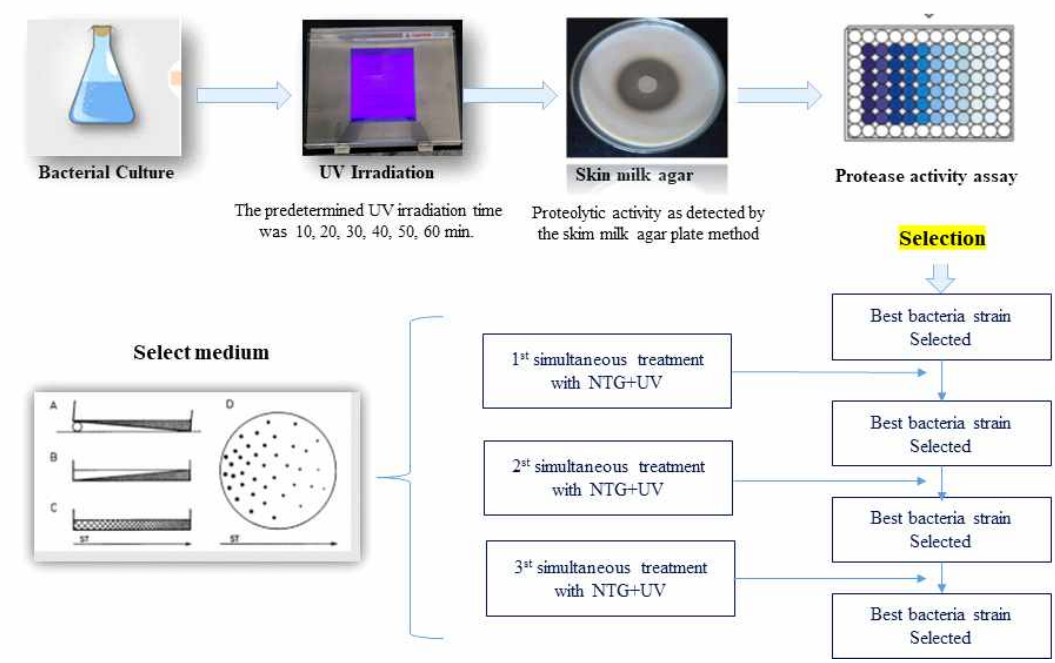

Figure 5. Random mutagenesis process

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 돌연변이 방법

가. 자외선 처리

균주의 세균 용액을 생리식염수로 희석하였다. 박테리아 용액(4ml)을 UV 광으로 5-90분 동안 조사하였다(UV 파장은 250nm, 전력은 15W, 거리는 20cm). 처리 후, 박테리아 현탁액을 한천 배양 배지 플레이트에 코팅하였다. 플레이트에 가벼운 손상을 피하기 위해 검은색 백으로 덮고 37℃에서 밤새 배양한 다음 플레이트의 세균 콜로니 수를 기록했다.

사망률은 다음 공식을 사용하여 계산되었다.

$$I\ \% = [1 - (\ Wt\ /\ W0)] * 100\%$$

여기서 I는 사멸률, Wt는 UV 조사군의 콜로니 수, W0은 블랭크 그룹의 콜로니 수를 나타낸다.

나. NTG 치료

UV 처리 후 사멸률이 85%인 세균액을 선별하여 탈지유 부용 배지에 코팅하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 균주는 H/C의 비율로 선별하여 부용 배지에 접종하였다. 배지를 37℃, 150rpm에서 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 한천 배양 배지를 0.1 ml 세균 현탁액으로 코팅하였다. 멸균 이쑤시개로 배지에 소량의 NTG 분말을 접종했다. NTG 억제 구역은 37℃에서 48시간 동안 배양한 후에 관찰되었다. 균주를 NTG 억제 구역 가장자리에서 긁어내고 부용 배양 배지(5 ml)에 접종하고 37°C, 150rpm에서 4시간 동안 배양하였다. 그런 다음 희석된 세균액을 탈지유 부용 배양 배지에 코팅하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 돌연변이 된 균주는 H/C의 값에 의해 선택된 다음, 이들 균주를 48시간 동안 37℃, 150rpm에서 진탕 상 발효로 스크리닝하였다. 프로테이나제 활성이 가장 높은 돌연변이 균주를 선택하였다. 이후 광학현미경과 주사전자현미경으로 변형을 관찰하였다[Fig.5].

Mutant 균이 반고체 배지에서 집락으로 얻은 박테리아(즉, 줄무늬, 찌르기 또는 기울기/사면)는 가능한 한 빨리 줄무늬를 제거해야 한다. 원래 재료는 균주의 적절한 스톡이 만들어질 때까지 냉장 보관할 수 있다. 템플릿에 마스터 플레이트를 놓은 다음 소량의 세균 배양/현탁액을 멸균 플라스틱 루프에 로드를 한다. 이것을 사용하여 섹

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

션 1(1A, 1B 등)의 줄무늬를 준비한다. 새로운 루프를 사용하여 섹션 2의 줄무늬를 준비한 다음 루프의 다른 쪽을 섹션 3의 줄무늬에 사용된다. 섹션 4와 5에 대해 새로운 루프로 반복한다. 또는 와이어 루프를 사용할 수 있다. 루프는 사용하기 전 그리고 각 섹션 2~5에 줄무늬를 그리기 전에 멸균해야 한다. 매번 사용하기 전에 한천 표면을 만져서 냉각된다[Fig.6].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

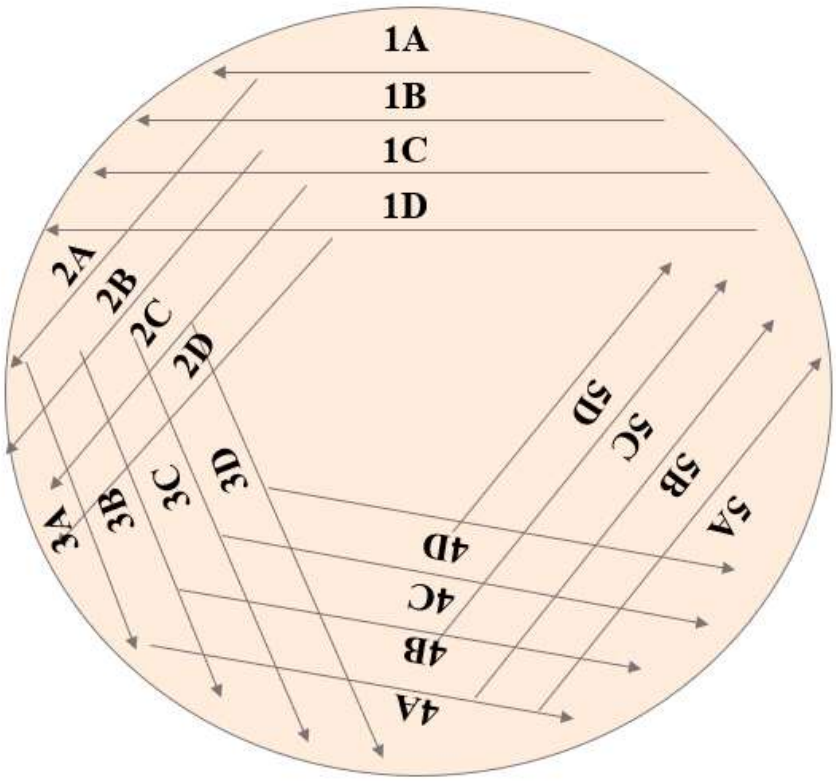

Figure 6. Streak template

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. KCTC TGY medium N:13622

배지 번호	75	
배지명	TGY Medium	
조성	Tryptone (BD 211705)	5.0g
	Yeast extract	5.0g
	Glucose	1.0g
	K2HPO4	1.0L
	Agar	20.0g
pH	7.0	
MEMO	Autoclave at 121C for 15 minutes.	

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. KCTC Nutrient Agar N:1659

배지 번호	1	
배지명	Nutrient Agar	
조성	Beef extract	3.0g
	Peptone	5.0g
	Agar	15.0g
	Distilled water	1.0L
pH	6.8	
MEMO	Autoclave at 121C for 15 minutes.	

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Medium composition for bacteria submerged culture

Compositions	Concentration (g/L)			
	PDB	Nutrient Agar	TGY	Plate count agar
PDB	27	-	-	-
Plate count	-	-	-	23.5
Glucose	-	20	1	-
Nutrient broth	-	8	-	-
Yeast	-	-	5	-
Peptone	-	1	-	-
Tryptone	-	-	5	-
K2HPO4	-	-	1	-
Casein	1	1	1	1

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 돌연변이의 분리 및 식별

한천 플레이트에서 penicillin 강화 및 생화학적 돌연변이 선택을 수행했다. 이 기술을 사용하면 특정 영양요구체의 최대 수율을 위한 최적의 페니실린 노출 시간이 있다. 배양물을 연속 희석하고 한천 ml당 2,000 U의 페니실린 G(Squibb)를 함유하는 최소 포도당 한천 플레이트에 플레이팅하고 플레이트를 다양한 시간 동안 37℃에서 배양하였다. 나타난 콜로니를 선택하여 원하는 영양요구성 요건에 대해 테스트하였다 [Fig.7].

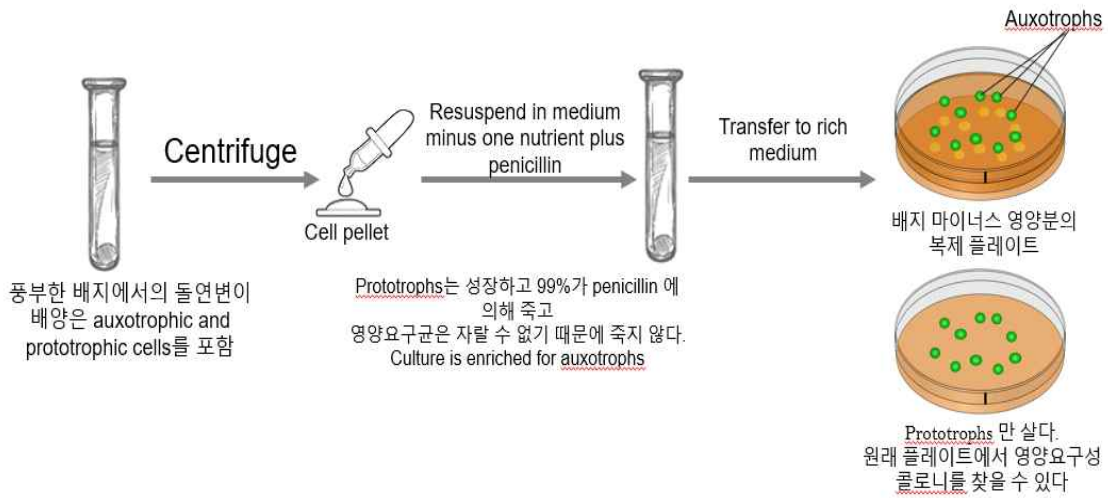

Figure 7. Mutant screening using penicillin

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. PROTEASE의 효소 분석 및 기질로서의 카제인

가. 프로테아제 분석

각각의 분리균을 1% 카제인이 함유된 100ml 영양액에 접종하고 30°C에서 회전식 진탕기 (100rpm)에서 24시간 동안 배양하였다. 5000rpm에서 20분 동안 배양액에서 성장을 원심분리하여 세포를 분리하였다. 상청액은 효소를 함유하고 조 효소 추출물로 간주되었다. 프로테아제 활성은 약간의 변형을 가한 카제인 분해 분석을 사용하여 측정되었다. 프로테아제 효소 활성은 37℃에서 인산염 완충액(pH-7)에 카제인을 첨가하여 측정하였다. 반응을 1.5ml의 트리클로로아세트산(5% w/v)으로 정지시켰다. 10분 후, 전체 혼합물을 5000rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 상등액의 흡광도는 비활성 효소에 대한 수정된 Folin Ciocalteu 방법으로 측정되었다. 1단위의 프로테아제 활성은 30°C에서 분당 1μg의 티로신[Table.5]을 방출하는 효소의 양으로 정의되었다. 카제인의 산화는 UV/Vis 분광광도계를 사용하여 660nm에서 결정되었다[Table.4].

효소 활성은 U/mL으로 표현된다[Fig.8].

Calculations Formula:

$$\textbf{Unit/mL enzyme} = \frac{\mu mol\ 티로신\ 등가물\ 방출\ 분석\ 총\ 부피}{A*B*C}$$

A = 사용된 효소의 양
B = 분석에 소요되는 시간(20분)
C = 비색 측정에 사용되는 부피(1 ml))

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Activity assay

	Test	Blank
Casein	5.00 ml	5.00ml
Equilibrate to 37°C. Then add:		
Enzyme Solution	1.00ml	-
37°C에서 정확히 10분 동안 흔들고 배양하다. 그런 다음 다음을 추가한다		
TCA	5.00ml	5.00ml
소용돌이치면서 혼합하고 37°C에서 약 30분 동안 배양하다. Whatman #50 여과지 또는 0.45mm 필터를 통해 여과하고 여액을 발색에 사용한다.		
Test Filtrate	2.00ml	-
Blanck Filtrate	-	2.00ml
Sodium carbonate	5.00ml	5.00ml
Folin	1.00ml	1.00ml
37°C에서 30분 UV 660nm		

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 5. 활성 분석 Standard Curve

	Std1	Std2	Std3	Std4	Blanck
1.1 mM L-Tyrosine	0.05	0.10	0.20	0.40	0.00
Deionized Water	1.95	1.90	1.80	1.60	2.00
Sodium carbonate	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Folin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제3절 프로테아제 효소의 과생산을 위한 다양한 요인의 최적화

1. 균준비

Bacillius tequilensis, Bacillius subtillius 및 *Bacillius licheniformis*를 각 각에 돌연변이 한 후 660nm[Fig.8]에서 activity가 찍고 활성이 가장 높은 균을 선택하여 SKIM MILK 배지에서 24시간 접종한 후 TGY 배지로 넘겼다.

2. Bacteria 배양 최적화

가. 최적 배지 선정

선택된 균 성장에 적합한 배지 선정을 위하여 조성이 다른 4종류의 배지를 활용하여 배양 특성을 조사하였다(A- TGY media B- nutrient agar media, C- PDA media, D- LB media agar). 배양액 1ml를 (0.1 O.D 600nm) 특정 생산 배지 100ml에 접종하고 회전식 진탕기(150rpm)에서 35℃에서 24시간 동안 배양하였다. 각 생산 배지 100ml에 사전 성장 세포 현탁액 2%(v/v)를 접종하고 회전식 진탕기 (100rpm)에서 35℃에서 24시간 동안 배양하고 세포를 5000rpm에서 20분 동안 원심분리 하였다. 다양한 매개변수 연구를 위한 조 효소로 사용되는 상청액을 얻기 위해서 한 번에 하나의 매개변수 접근 방식이 사용되었으며 모든 실험이 3회 수행되었다.

나. 초기 pH의 영향

액체 배양의 최적 균 생장을 위한 초기 pH 조사를 목적으로 300mL 삼각플라스크에 선정한 최적 배지를 100mL 제조한 뒤, 1M NaOH와 1M HCl를 사용하여 초기 pH를 조절하였다. pH 범위를 6, 7, 8, 9, 10으로 설정한 배지에 3개를 접종하여 48시간 간 35℃, 150rpm에서 배양하고 Folin 시약을 사용해서 균의 생장을 확인하였다.

다. 온도의 영향

액체배양의 최적 균 생장을 위한 온도 조사를 위하여 선정한 최적 배지에 3개를 접종하여 온도 범위를 25, 35, 45, 55℃로 설정하여 1일간 150rpm에서 진탕 배양하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 프로테아제 생산을 위한 균의 배양 최적화

가. 최적 배지 선정

TGY 배지를 기본 배지로 선정하여 Glucose, Yeast extract, tryptone, casein, K_2HPO_4의 조성을 조절하여 *Bacillius.sp* 균주의 농도를 최적화하였다. 균주의 세포 농도 측정을 위해서 UV/Visible-spectrophotometer를 이용하여 600nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 프로테아제 생산에 사용되는 알칼리성 배지 TGY(pH 9)는 다음을 포함한다: Glucose의 농도는 10−50g/L, yeast extract의 농도는 10−50g/L, Tryptone의 농도는 10−50g/L, K_2HPO_4 10−50, casein 0.5−2.0g/L의 범위로 설정하여 조성이 서로 다른 48종류의 TGY 배지를 제조하였다(Table 5). 균을 배양액에 접종하여 35℃, 150rpm에서 48시간 진탕 배양하였다.

나. 초기 pH의 영향

프로테아제 생산은 24, 48, 72 및 96시간과 같은 다양한 시간 간격으로 결정되었으며 회전식 진탕기 (150rpm)에서 35℃로 배양되었다. 프로테아제 생성에 대한 통기의 영향은 하나의 배양 플라스크를 진탕기 (150rpm)에서 배양하고 다른 배양 플라스크는 35ºC에서 24시간 동안 정적 조건에서 배양하여 연구했다.

다. 온도의 영향

프로테아제 생산을 위한 최적의 배양 온도는 30ºC, 35ºC, 45ºC, 55ºC 및 65ºC 범위에서 Shaker 조건(150rpm)에서 48시간 동안 결정되었다. 프로테아제 생성을 위한 최적의 pH는 7 내지 12의 상이한 pH 범위에서 TGY 배지에서 성장된 배양물에서 결정되었다(배지의 pH 조정을 위해 1N NaOH 및 1N HCl이 사용됨).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제4절 효소 정제 및 가죽의 탈모

1. Ammonium sulfate solution and sephadex G-25

조 효소 추출물을 황산암모늄의 다양한 포화 농도(포화도 40% 내지 포화도 90%)로 처리하여 효소를 침전시켰다. 포화 $(NH_4)_2SO_4$ 용액 제조의 Beaker나 flask에 물 1000ml에 ammonium sulfate 750g을 넣는다. 실온에서 자기 교반기로 용액을 15분 동안 또는 포화 될 때까지 간단히 저어준다. 용해되지 않은 고형물이 플라스크 바닥에 가라앉은 후 투명한 상층액을 조심스럽게 따른다. 단백질 용액 sample을 교반 막대가 들어 있는 비이커에 옮기고 얼음이 담긴 용기에 넣은 다음 자석 교반기에 올려 놓는다. Mutant sample이 교반되는 동안(약 30분 동안) ammonium sulfate을 천천히 첨가하여 최종 농도가 포화되도록 한다(table 5). 튜브로 옮기고 12000rpm에서 30분 동안 원심분리한다. 상층액을 조심스럽게 제거하여 폐기물 용기에 버리고 증류수 1ml에 펠릿을 재현탁한 다음에 단백질 용액을 투석 튜브로 옮기고 증류수에 대해 투석한다. 튜브와 원심분리기에서 단백질 용액을 제거하여 남아 있는 이물질을 제거한다. 장기 보관을 위해 농도를 결정하고 −80℃에서 보관해야 한다.

2. Dehairing of leather

소가죽, 양가죽, 말가죽을 선별하여 물로 세척하여 염분 및 기타 이물질을 제거하였다. 작은 조각(5 × 5 cm2)으로 자르고 부분적으로 정제된 효소(~1000 U)와 25% 트리스 완충액으로 12-24시간 동안 처리했다. Control 소 가죽 조각은 증류수로만 처리되었다. 처리 후 가죽의 색상, 흠집 제거 및 일반적인 외관과 같은 특징을 조사하여 탈모 과정을 평가하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

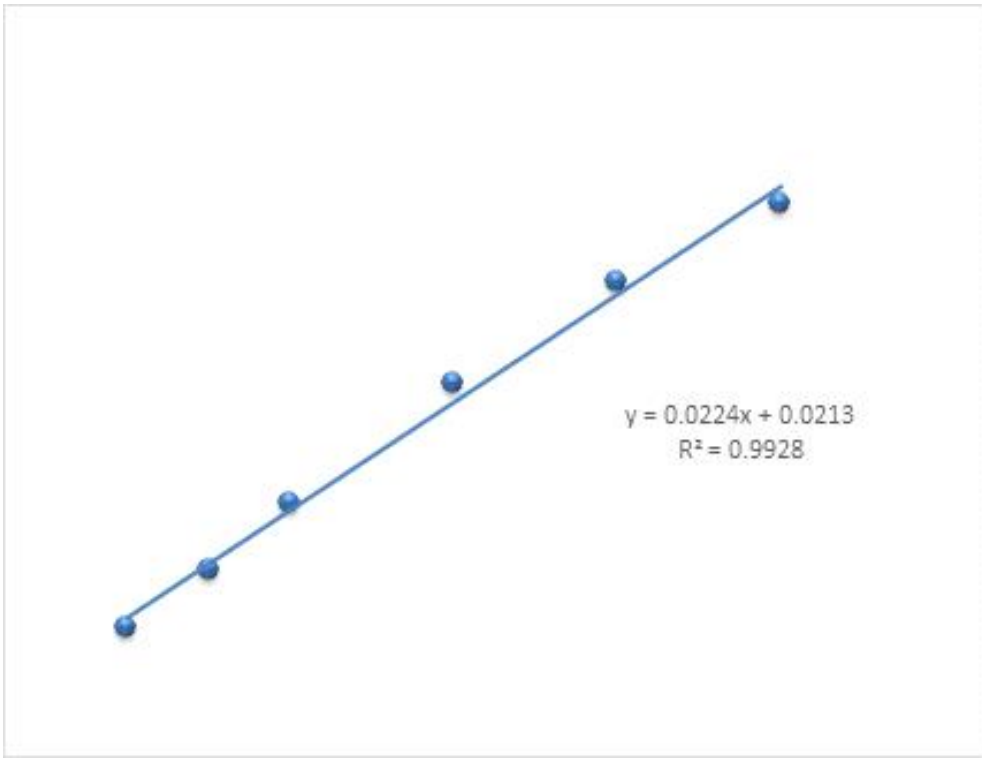

Figure 8. Concentration of L-Tyrosine (ppm)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제3장 실험 결과 및 고찰

제1절 돌연변이의 선별

가죽 가공에 사용되는 프로테아제 효소 합성 균주의 고활성 변이 균주를 확보하는 것을 주된 목적으로 하였다. 상업적으로 생존 가능한 미생물의 돌연변이 및 스크리닝은 발효 산업에서 요구되는 다양한 균주의 성공적인 개발을 위해 중요하다. 따라서, 모균주인 *B.licheniformis, B.subtilis, B.tequilensis*는 생산성을 향상시키기 위해 UV 조사 및 NTG(N methyl-N-nitro-N-nitrosoguinidine) 같은 돌연변이원으로 처리되었다. 물리적 및 화학적 돌연변이 유발은 더 저렴하고 안전하며 더 나은 품질의 균주를 얻는 것이 가능해질 것으로 보인다.

B.licheniformis, B.subtilis, B.tequilensis 3종의 균주를 차례로 돌연변이 시키면 효소 활성이 조금씩 증가하다가 4회 이후부터 활성이 감소하였다(Fig.9).

Bacillus.sp의 3개 균질한 세포 현탁액을 사용하여 30분 간격으로 5-90분 동안 UV 조사하였고 chemical solution의 NTG 시약을 사용하여 박테리아 포자를 처리했다(table.6). 변이된 포자를 10배 연속 희석해서 skim milk plate를 도말하였다. 더 선명한 영역을 보인 colon를 프로테아제의 과생산을 위한 돌연변이로 선택하였다.

돌연변이의 효소 활성은 1번째 step에서 *Bacillius subtillis*의 2.01U/ml였는데 4번째 step에서 4.4U/ml로 2배 활성화되었다. 다음 *B.licheniformis*의 효소 활성은 3.4U/ml에서 3.7U/ml까지 증가했으며 *B.tequilensis*는 처음 돌연변이 했을 때 2.04U/ml에서 7.65U/ml으로 가장 많은 3.5배 효소 활성을 증가 되었다[Fig.9].

UV 조사는 *B.tequilensis*의 프로테아제 활성을 증가시키기 위해 암실에서 수행하였다. *Bacillus tequilensis* 돌연변이에 의한 프로테아제 생산은 skim milk(1% w/v) 성장 배지에서 수행되었다. Parent strain는 mutant 존재 하에서 증식할 수 없었으며 parent strain 박테리아의 성장이 억제되었다. 연구자는 이전에 프로테아제 생성 돌연변이를 분리하고 선택하기 위해 skim milk를 사용했다고 보고했다[17].

그런 다음, 한천 배양 배지를 0.1 ml 세균 현탁액으로 코팅하였다. 한천 배지를 함유하는 젤라틴에 플레이팅된 돌연변이체의 분리를 위한 높은 농도(1.5%)의 탈지유가 사용되었고 돌연변이체는 배지에 표시된 클리어런스 영역을 기준으로 스크리닝 되었다.

UV 또는 화학적 돌연변이 유발 인자에 대한 순차적인 노출과 성장 제한에 기초한 탈지유를 사용한 돌연변이 선별도 보고되었다. Screening 후에 돌연변이 된 colon이

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

skim milk 내성인 것으로 보였다. 모든 UV 처리된 돌연변이체 및 parent strain의 casein을 기질로 사용하여 프로테아제 효소 생산을 위해 TGY 및 Nutrient agar에서 배양하였다. 모든 돌연변이 균주는 parent strain에 비해 더 높은 효소 활성을 나타내는 것으로 관찰되었다(Figure 8).

B.licheniformis, B.subtilis, B.tequilensis 3종의 균주의 실험을 통해 *Bacillius tequilensis*의 돌연변이 활성화가 가장 좋은 결과 2.7U/mL에서 10.3U/mL까지 나왔으며 이에 따라서 *B.tequilensis*을 선택하여 실험을 하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

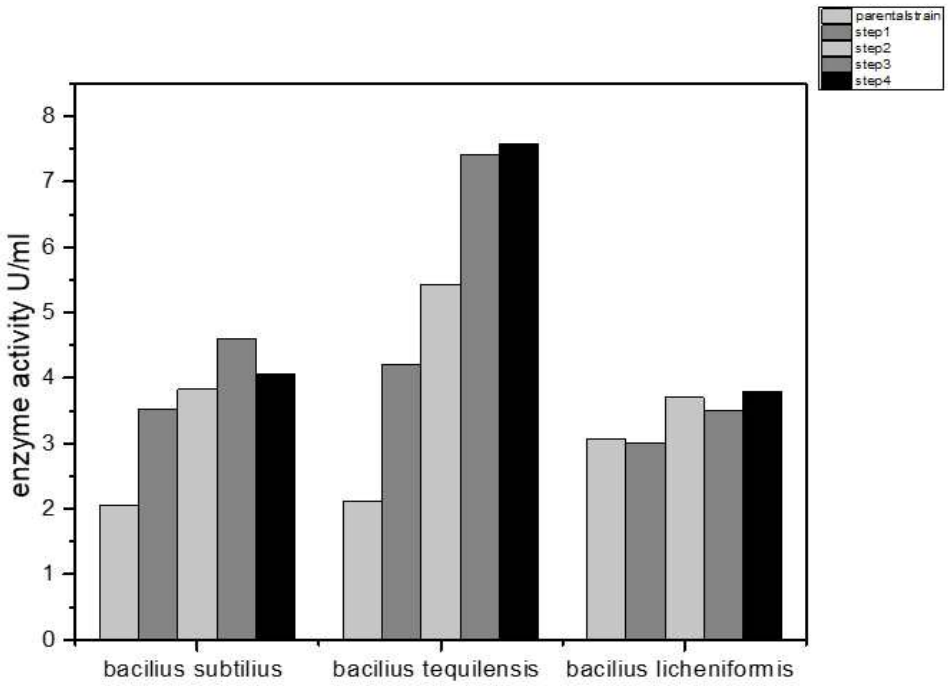

Figure 9. Increase in enzyme activity

Parental strain에서 UV 조사 시간이 5-90분으로 다양하게 시켰으며 skim milk에 clean zone이 제일 크게 보여 준 균의 colon를 선택하고 다음 단계로 넘어갔다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 6. The results of lethality rade UV mutation

UV time (min)	Number of colonies	Death rate (%)
0	62	0
15	55	25.9
20	40	45.9
40	31	60.5
60	15	88
90	7	95.4

$$\text{The lethality rade}(\%) = \left| \frac{\text{control colonies- survival colonies}}{\text{control colonies}} \right| *100\%$$

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제2절 UV 및 NTG 치료 후 *B.tequilensis*의 돌연변이 유발 효과

UV 돌연변이의 결과는 표 6에 제시되어 있다. UV 처리 시간과 치사율 사이의 관계를 보여줬다[Table.7]. UV 처리 *B.tequilensis*의 치사율은 UV 조사 시간이 증가함에 따라 급격히 증가하였다. 균주 3균의 사멸률은 30분에서 90분으로 급격히 증가하였다. 외선 조사 시간이 90분일 때 사멸률은 95.4%였으며 살아남은 균주는 거의 없었다. 높은 가변성을 얻기 위해 80-90%의 사망률을 돌연변이 유발 조건으로 선택했다[Table.6]. Mutagenesis breeding에 관한 문헌은 돌연변이 유발 용량의 사망률이 약 80%일 때 가장 높은 양성 돌연변이율과 돌연변이 유발 효과가 좋다고 제안하였다[6.7]. H/C 값이 2.5를 초과하는 6개의 균주를 NTG 처리 후 탈지유 부용 배양 배지로부터 선별하였다. 표 7에서 보는 바와 같이, 40-1 균주의 protease 활성(10.3 U/ml)이 parent 균주 대비 41.9% 증가하여 가장 높았다. 또한, 40-1, 40-3, 90-2 및 15-3 strain 각 각에서 protease 활성이 검출되었다. 따라서 균주 40-1, 40-3, 90-2 및 15-3 strain를 다음 연구를 위해 선택하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 7. Results of compound mutation

Strain number UV(min)	H/C (cm)	Protease activity(U/ml)
Parent strain	1.9	6.7
15-1	**2.2**	**5.6**
15-2	1.7	3.6
15-3	**2.5**	**10.1**
15-4	2.2	8.4
15-5	1.01	3.8
40-1	**4.3**	**10.3**
40-2	0.2	1.8
40-3	**3.2**	**7.9**
60-1	1.9	6.3
60-2	**3.6**	**6.8**
60-3	1.9	5.3
60-4	1.9	5.07
90-1	1.4	5.6
90-2	**4.2**	**10.1**

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1. Mutant strain의 배양 최적화

가. 프로테아제 생산을 위한 배양 조건 최적화

선택된 mutant strain이 성장에 적합한 배지 선정을 위하여 조성이 다른 5종류의 배지를 활용하여 배양 특성을 조사하였다. *Bacillus tequilensis* mutant 40-1은 TGY 배지 (10.03U/ml) [tryptone (5%); yeast (5%); K2HPO4, 1%; glucose, 1%; casein 0.5%; pH 9 으로 Clean zone의 8mm 으로 가장 많이 보였으며 앞으로 TGY 배지를 사용해서 실험하였다[Fig.10]. 돌연변이 15, 30, 40, 60, 90, 120분에 시켜 보였으며 40분에서 1번째 strain을 40-1 이름을 주었고 mutant 40-1으로 다음 실험을 하였다.

나. 프로테아제 생산을 위한 배양 시간

Bacillus tequilensis mutant 40-1, 40-2 strain이 TGY 배지를 이용하여 24시간부터 프로테아제 생산을 시작하였고 48시간에 최대에 도달한 다음 배양 기간이 더 증가함에 따라 감소하였다(Figure 17). PDB과 NA 배지의 0.1-0.3mm clean zone를 보였으며 PCA과 BHIA 배지는 Clean zone이 보이지 않았다[Fig.10].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

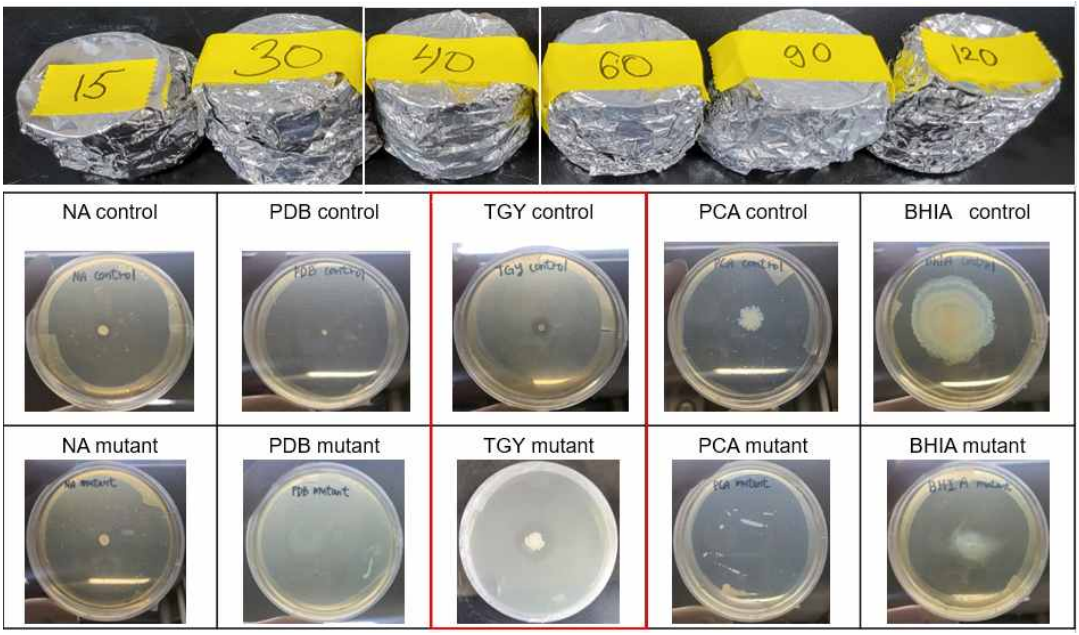

Figure 10. Different media

a) NA- Nutrient agar b) PDB agar- potato dextrose agar c) TGY agar- Tryptone Glucose Yeast agar d) PCAgar- Plate count agar e) BHIAgar- Brain heart infusion agar

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 액체 배양 최적화

가. TGY 배지 최적화

TGY 배지를 기본 배지로 선정하였고 Yeast, Glucose, K2PHO4, Tryptone의 조성을 조절하여 *Bacillius tequilenesis* mutant 40-1, 40-3 strain의 농도를 최적화하였다. 균의 세포 농도 측정을 위해서 UV/Visible-spectrophotometer를 이용하여 600nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Glucose의 농도는 10 - 50g/L, Tryptone의 농도는 10 - 50 g/L, K2PHO4의 농도는 10-50 g-L, Yeast의 농도는 10 - 50 g/L 범위로 설정하여 조성이 서로 다른 48종류의 TGY 배지를 제조하였다(Table 3). 멸균한 배양액에 Bacterium disc 3개를 접종하여 45 ℃, 150 rpm에서 48시간 진탕배양하였다(Figure 20). Mutant strain 배양에서 탄소원의 이용은 균의 성장과 생존에 필수적이다. 포도당의 농도가 균 성장에 미치는 영향을 확인하고자 포도당의 농도가 다른 배지에서 배양한 균의 성장 속도를 비교하였다. 탄소원에 따른 mutant strain 성장 속도의 영향을 측정하였다. 탄소원으로 Glucose 10-50 g/L를 이용하여 세포의 성장속도를 측정하였으며 효소 활성이 glucose 40%일때 40-1 mutant strain을 18.9U/mL으로 Parent strain보다 3배로 가장 높게 증가하였다[Fig12a]. 다음으로 Mutant strain이 특성을 고찰한 결과 Tryptone 50%, Yeast extract 30%를 사용하여 배양할 경우 균의 성장에 미치는 효과가 우수함을 보였다(Fig.12a,b). 질소원으로 yeast extract와 tryptone을 사용하여 24시간 배양할 경우 OD 값이 유사하게 나타나 균의 최종 성장 속도가 비슷하다고 판단 될 수 있으나 배양 기간을 일주일로 단축할 경우 yeast extract를 질소원으로 사용하는 것이 성장 속도가 더 우수한 것으로 나타났다. Mutant strain 40-1, 40-3 성장의 주요 단백질 원인 tryptone의 농도를 변화시키면서 균의 성장 속도를 측정하였다. 48시간 이상 배양한 결과 Tryptone의 농도가 5g/L일 경우 성장이 우수한 것으로 나타났으나 농도가 낮은 경우와 농도가 높은 경우에도 균의 농도 차이가 크게 변하지 않는 것으로 나타났다(Fig.12b). Tryptone의 농도가 높은 경우에 성장이 약간 증가하는 현상으로 보였다. Parent strain과 Mutant strain이 K2HPO4 배양한 경우 10-50%으로 농도가 변화시켰으며 parent strain이 10-20%에서 효소 활성이 가장 높게 보였다[Fig.12d]. Parent srain의 농도가 증가할수록 효소 활성이 감소하였으며 반면에 Mutant strain이 농도를 증가할수록 높게 나타났다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

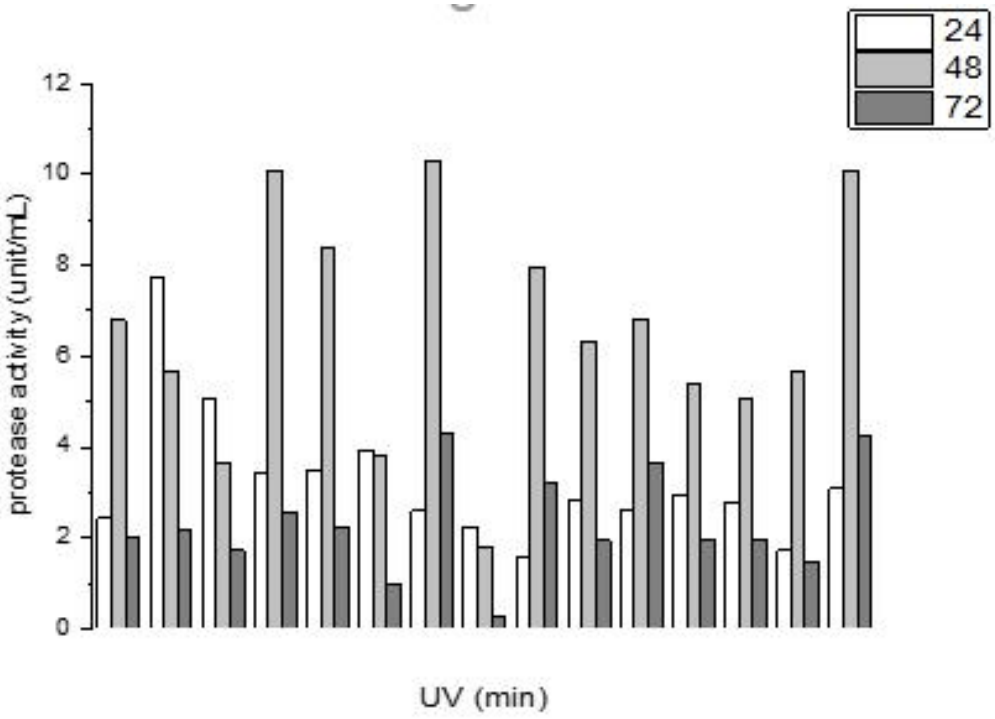

Figure 11. Mutant strain incubation

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

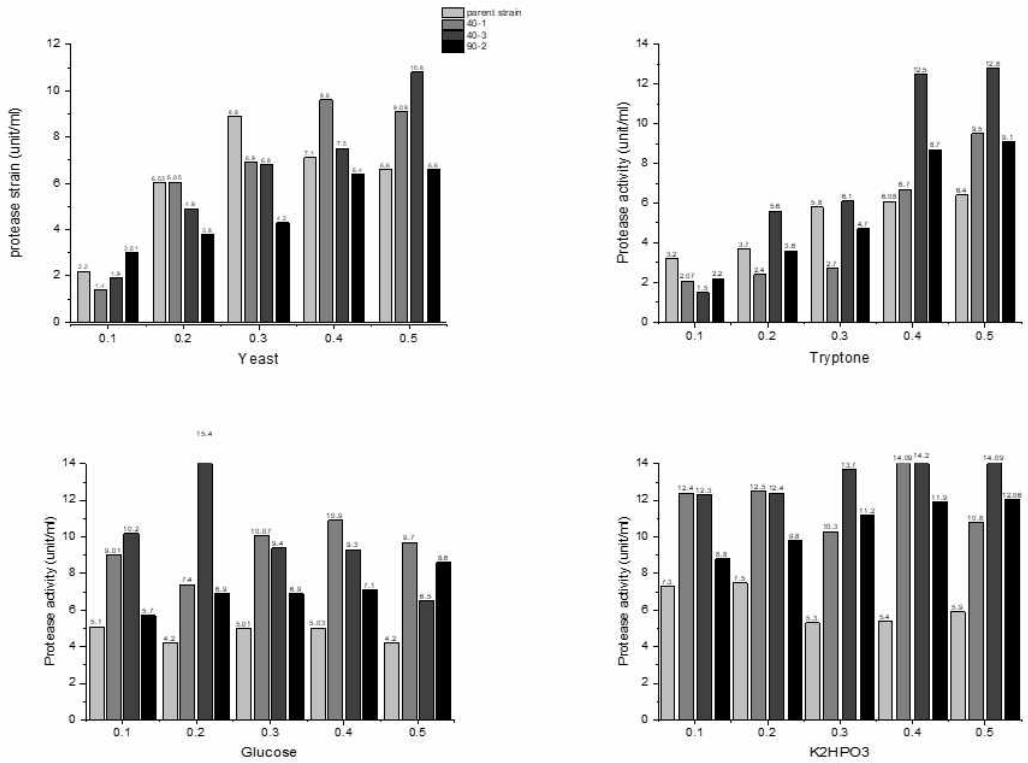

Figure 12. TGY medium

(a) Yeast10-50%, (b) Tryptone10-50%, © Glucose10-50%, (d) K2HPO4 10-50%

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 초기 pH 최적화

배지의 조성에 따른 mutant strain 균사체의 고체배양과 액체배양에서 TGY의 배지에서 우수한 성장특성을 보여 기본 배지로 선정하였다. THY를 기본 배지로 하여 pH를 4,6,8,9,10으로 조절하여 균의 성장 속도를 확인하였다.

B.tequilensis 40-1 pH 11에서 효소 활성이 매우 크게 성장하였으며, pH 4에서는 효소 활성의 크기는 작으나 높은 성장 속도를 보였다(Fig.15).

Parent strain는 초기 pH 7의 배지에서 성장 속도가 우수하였으며 pH가 높아질수록 성장률이 감소하였다[Fig.15].

다. 온도 최적화

균 배양에 적합한 최적 온도 선정을 위하여 기본배지로 선정한 TGY에 균 4종을 접종하여 25, 35, 45, 55, 65℃로 배양 온도를 조절하여 비교하였다. Parent strain activity 온도의 증가는 프로테아제의 활성을 점차 감소시키는 것으로 나타났으며 반면에 mutant strain 40-1의 높은 온도에서는 효소 활성이 높게 보였다.

Parent strain은 높은 온도에서 성장을 보이지 않으며, 35℃에서 가장 우수한 성장 속도를 보였다. 배양 온도를 40 ℃로 증가시키면 균의 성장은 관찰할 수 있으나 성장 속도가 감소하였다[Fig.13].

Mutant 40-3은 균사가 45℃에서 빠르게 성장하였다.

라. 배양 시간 최적화

성장 곡선 실험은 돌연변이 균주가 TGY에서 30시간 후 정상 정지 단계를 갖는 반면 다른 영양 배지는 24시간을 갖는 것으로 나타났다. 균을 배양 시간이 12, 24, 48, 72시간으로 다르게 하였다. Parent strain의 activity가 24시간 배양을 한 후에 6.3U/ml였고 48시간에 8.9U/mL, mutant 40-1 strain의 24시간에 9.6U/mL에서 48시간 12.8U/mL으로 증가하였다[Fig.16].

바. 배양 volume

TGY 배지 volume를 3가지 (100ml, 1L, 20L)로 각 각에 배양하였다. *Bacillius tequilensis* mutant 40-1 strain를 100ml에 TGY 배지를 배양 한 경우는 100ml에 효소 활성이 9.3U/ml였고 1L에 활성이 8.4U/mL, 20L 배양에서 14.4U/mL로 조금씩 계속 증가하였다[Fig.15].

Bacillius tequilensis mutant 40-1 strain 분리 중에 의한 알칼리 프로테아제 생성을 위한 최적 온도, 배지의 초기 pH 및 교반은 각각 45℃, pH 11.0 및 150rpm이었다. 미

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

정제 효소 용액을 실온에서 2시간 동안 pH 8.0에서 인큐베이션한 후, 원래 활성에서 약 29%의 감소가 관찰되었다. pH 11.0에서 감소율은 25%이다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

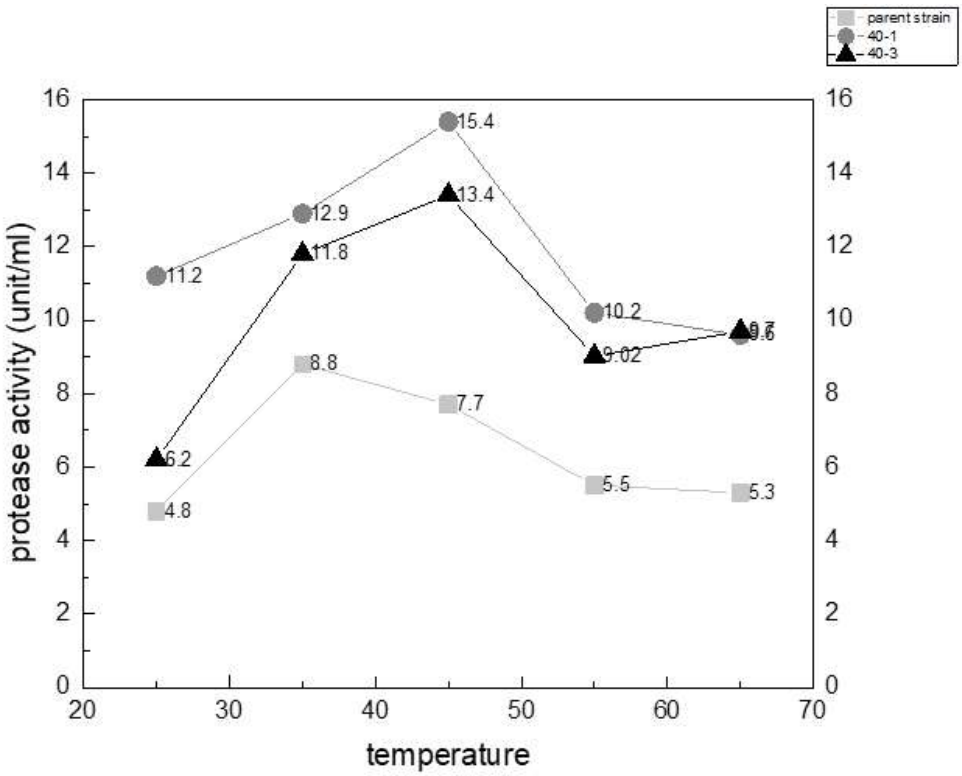

Figure 13. Effect of temperature on protease production by *Bacillus tequilensis,* mutant 40-1, mutant 40-3

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

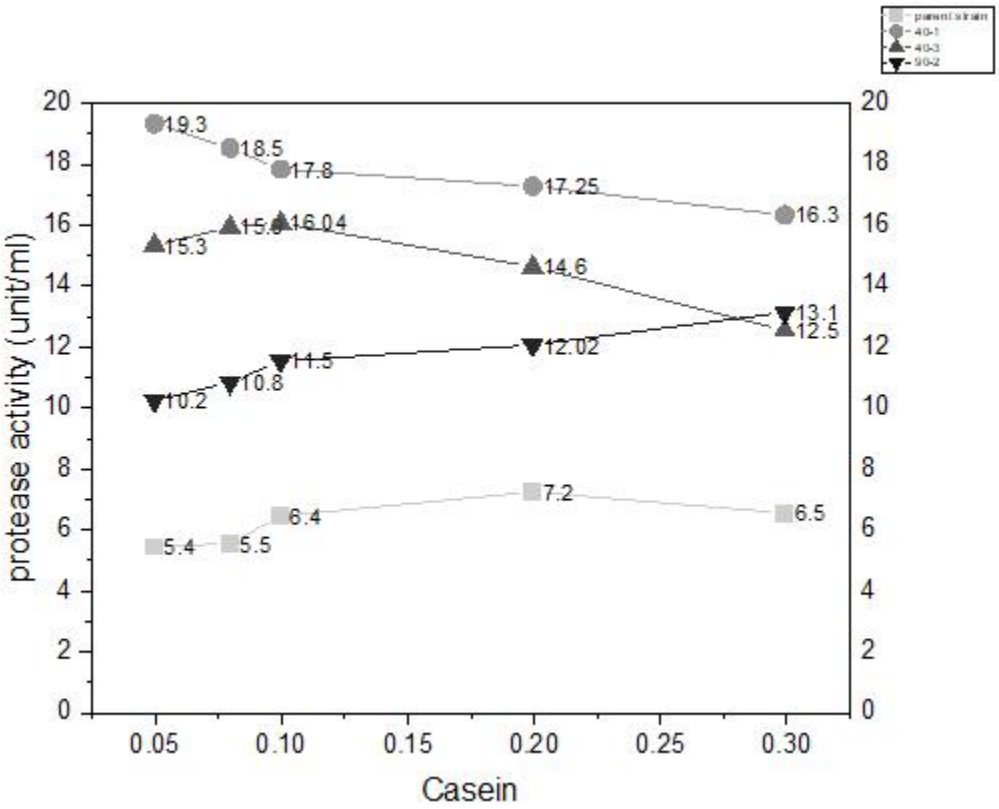

Figure 14. Effect of casein on protease production by *Bacillus tequilensis,* mutant 40-1, mutant 40-3 and 90-2

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

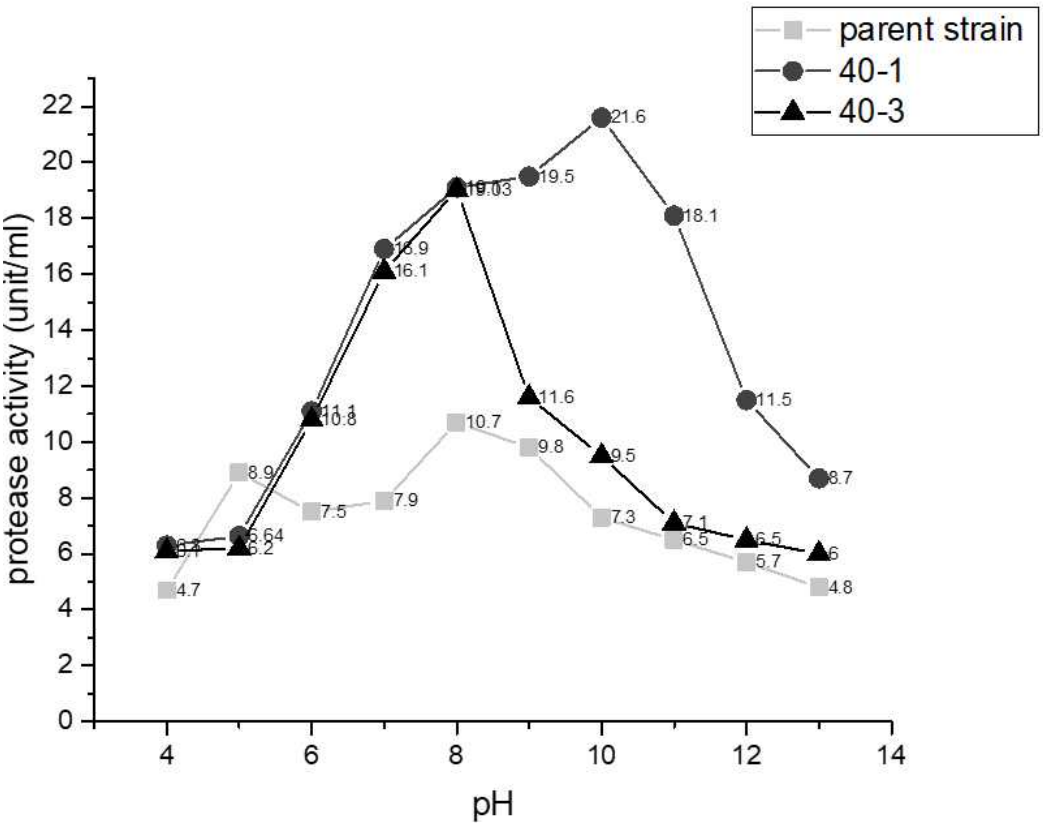

Figure 15. Effect of pH on protease production by *Bacillus tequilensis,* mutant 40-1 and 40-3

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

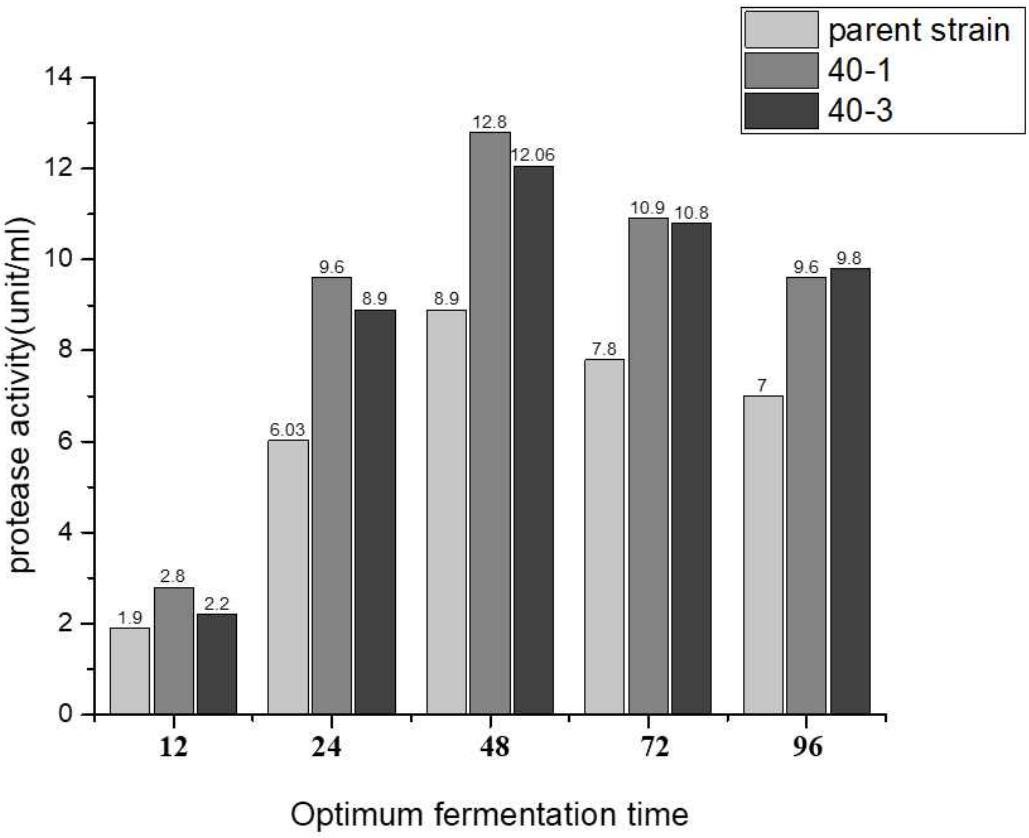

Figure 16. Effect of incubation period on protease production by *Bacillus tequilensis,* mutant 40-1 and 40-3

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

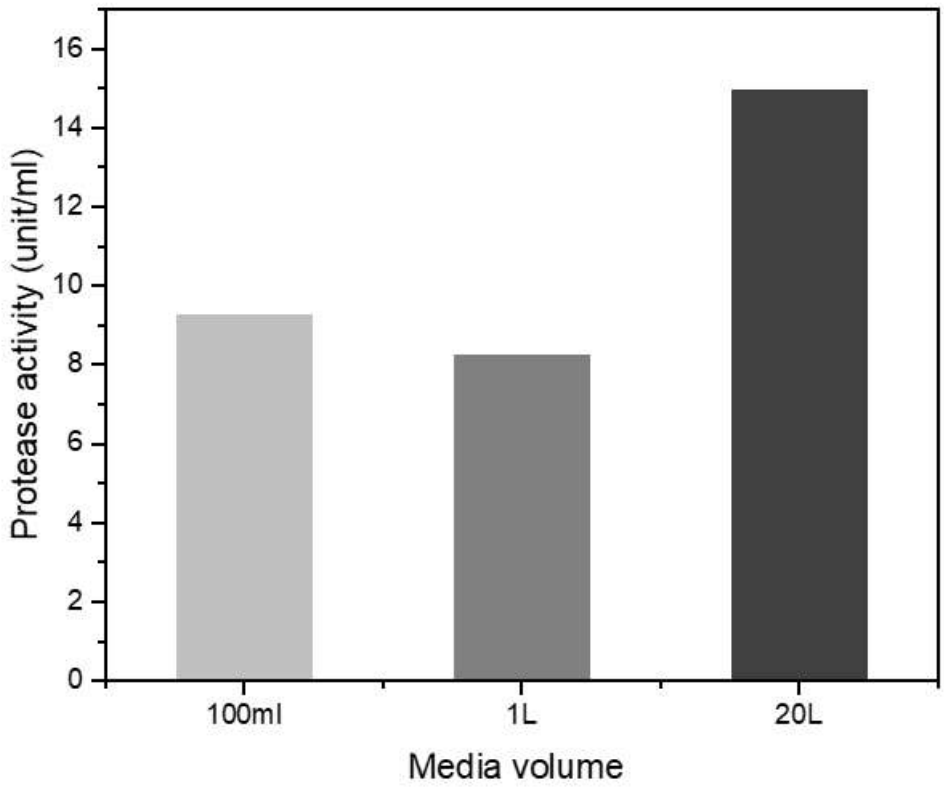

Figure 17. Media volume

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제3절 Purification enzyme

1. Protease 정제 및 탈염 공종

B. tequilensis 40-1 균주로부터의 프로테아제 생산은 45°C에서 진탕(150rpm)하면서 48시간 배양한 후 최적화된 배지에서 조사되었다. 프로테아제는 Sephadex G-25 컬럼에서 ammonium sulfate 침전 및 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 2단계 절차로 부분적으로 정제되었다. 염석법은 용액에서 단백질을 정제하는 데 가장 일반적으로 사용되는 방법 중 하나이며 간단하고 빠른 방법을 제공한다[4]. *Bacillius tequilensis* 40-1 strain의 조 효소 추출물을 황산암모늄의 다양한 포화 농도 (포화도 45, 65, 85%)으로 처리하여 효소를 침전시켰다. 효소의 정제는 투석 후 황산암모늄을 사용하여 82% 포화 상태에서 얻은 후 잠재적인 가죽 첨가제로서의 역할을 결정하는 데 사용되었다(Fig18). 85% 황산암모늄 침전을 적용함으로써 배양 여액에서 총 프로테아제의 35.71% 이상이 염석되었다. 이 절차는 배양액에 존재하는 불순물의 효과적인 제거를 용이하게 할 뿐만 아니라 효소 제제를 작업 가능한 부피로 농축하였다[Fig.18]. 효소 정제를 한 후 효소 활성을 45%으로 증가할 수 있었으며 activity가 24.6U/ml였다.

B. tequilensis 40-1 균주로부터 정제된 프로테아제의 특성은 가죽 제품 제형 보조제와 호환되는 내열성 알칼리 메탈로프로테아제로서의 효소를 나타낸다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

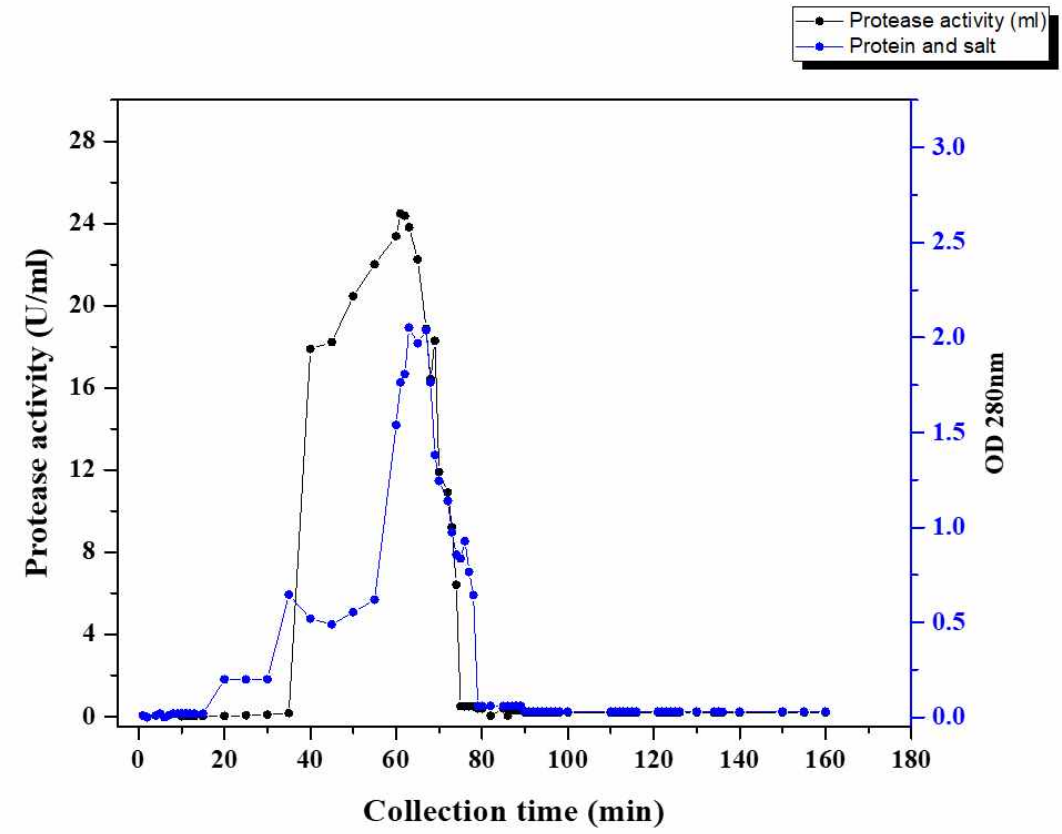

Figure 18. Purification enzyme

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. Dehairing of hide by partially purified protease

효소 처리된 가죽 조각을 손가락으로 부드럽게 긁어서 느슨한 털을 제거했다. 프로테아제로 처리한 피부는 12시간 후에 완전한 제모를 달성한 반면 증류수로만 처리한 피부는 변화가 없었다 (Fig.19f1). 12시간 이상 후 하이드 1g당 효소 2단위로 깨끗한 흰색 펠트로 완전히 털을 제거했다[Fig.19g]. 대조군에서는 겸자의 기계적 작용을 사용해도 풀림이 관찰되지 않았다[Fig.19f1]. 또한 프로테아제 제제를 5mM PMSF와 함께 사용하였을 때 탈모가 발생하지 않아 세린 프로테아제 단독으로 탈모가 진행되었음을 확인하였다[15]. 따라서 이러한 결과는 테스트 된 박테리아 제모 시스템이 탈모 과정에 바람직한 특성을 포함하고 있음을 나타난다.

Alkakin et al.(2018)은 B.subtilis AKAL의 1.0% 조 프로테아제가 28°C 및 pH 7.0에서 21시간 배양 후 소 가죽의 털을 제거했다고 보고하였다. 프로테아제는 기존의 화학적 제모 방법에 비해 더 나은 제모 능력을 보였다[Fig.19i2].

황화나트륨은 가죽이 매끄럽게 되지 않는 표피 위의 털을 제거하지만, 프로테아제는 진피 아래의 털을 공격하여 최종 가죽 준비물의 부드러운 품질을 향상시켰다[16]. 이 결과는 본 연구의 알칼리성 프로테아제가 가죽 산업에서 가죽의 탈모 가능성이 있음을 뜻한다[Fig.19]. 효소 제모 공정은 가죽 품질 향상과 더불어 독성 감소를 위한 대체 화학적 방법론으로 각광을 받고 있다[8,15,16].

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 19. Dehairing of hide by partially purified protease using horse, cow, sheep The dehairing treatment was performed at 40 °C for 12-16 hour.

a) skim milk b) salt protein c) horse leather d) cow hide e) sheep skin f1) control strain + horse leather f2) mutant 40-1 strain + horse leather g) leather after 12hour h) sheep skin dehairing i1) recovered hair i2) zoom 2400mp k1) recovered sheep skin k2) sheep skin microscope Nabual REV08 MODEL zoom 800-2400mp.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제4장 결론

본 연구에서는 *Bacillius tequilensis, Bacillius subtilis, Bacillius licheniformis* 든 protease 효소 가장 많이 생산한 3개 균을 선택하였으며 효소 활성을 증가하기 위해 돌연변이원 (UV light, NTG chemical solution)를 이용하였다. 탈지유 한천 플레이트에서 가수분해 구역을 관찰하여 프로테아제 생산에 대한 1차 스크리닝을 수행하였다. 배지의 pH, 인큐베이션 시간 및 온도, 배지와 같은 물리화학적 매개변수는 이 분리주에 의한 최대 프로테아제 생산을 위해 최적화되었다. 현재 프로테아제는 몽골에서 상업적으로 생산되지 않으며 매년 수많은 프로테아제가 수입되어 다양한 산업에 사용된다.

Bacillius tequilensis, Bacillius subtilis, Bacillius licheniformis 균들에 1 step에서 4 step까지 돌연변이를 이용하였으며 효소 활성이 가장 많이 증가하는 경우 *Bacillius tequilensis* 균이 있었다. *Bacillius tequilensis* 균에서 4개 strain이 선택하고 배지 배양 최적화를 하였으며 결론으로 TGY 배지를 사용하였다. Protease 생산한 *Bacillius tequilensis* Parent strain이 효소 활성은 2.4 U/mL였으며 돌연변이 시킨 다음 4.7배로 증가할 수 있었고 Alkaline protease의 얻기 위해 배지 배양 최적화, 온도, 농도, 배양 시간, 배양 pH, 정제를 가진 후에 24.6 U/mL으로 크게 12배로 증가하였다.

본 연구에서 생산된 protease를 사용하여 가죽 dehairing 공정에 사용한 결과 우수한 제거 능력을 보여주어 *B. tequilensis* 40-1 균주의 프로테아제가 산업적 응용을 위한 좋은 생물자원임을 시사한다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

References

[1] H.Y.Wang., et al. (2006). "Screening and mutagenesis of a novel Bacillius pumilus strain production alkaline protease for dehairing." Letters in Applied Microbiology(4).

[2] Naranchimeg, Urantelkhuur (2016). "Screening of bacteria mutants for improved production".

[3] Vandelook, S., et al. (2021). "Mutagenesis and Characterization of Bacillius Amyloliquefaciens strain for Cinnamum camphora seed kernal oil extraction by aqueous enzymatic method" AMB Express **8**.

[4] Muhammad Nadeem., et al. (2010). "Enhanced production of alkaline protease by a mutant of Bacillius licheniformis N-2 for dahairing“ Brazilian arcgives biology and technology.

[5] Aruna., et al (2016). "Production and partial characterization of alkaline protease from Bacillius tequilensis isolated from spoilt collage cheese." International journal of applied biology and pharmacetical technology.

[6] Mohsin I, N., et al. (2020). "Development of Bacillius subtilis mutant overproduction of protease" Journal of Microbiol& Biochemical Technology.

[7] Mapari, S. A., et al. (2010). "Bacillius tequilenis isoltion amylase induction" Journal of Microbiology, Biotechnology and food sciences.

[8] Al Hakim, Farhana., et al. (2018). "Production and partial characterization of dehairing alkaline protease from *Bacillius subtillius* AKAL7 using organic

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

municipal solid wases" International Journal of Bioloical Macromolecules.

[9] Gharbi Dorra, Karkouch Ines., et al. (2018). "Purification and characterization of a noverl higt molecular weigth alkaline protease produced by an endophy *Bacillius halotolerans* strain CT2" International Journal of Bioloical Macromolecules, Volume 111.2018. pp. 342-351.

[10] Akli Ouelhadj, Khelifa Bouacem., et al. "Identification and homology modeling of a new biotechnologically compatible serin alkaline protese from modelately halotolerant *Gracilibacilluius boraciitolerans* strain LO15 nd" International Journal of Bioloical Macromolecules, Volume 161.2020. pp. 1456-1469.

[11] S.S Ibrahim, Ali A., et al. "Production extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacilius.sp* NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes" Electronic Journal of Biotechnology, Volume 18, Issue, 2015. pp. 238-243.

[12] B.K.M Lakshmi, D.Muni Kumar, KPJ Hemalatha., et al. "Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillius cerues* strain S8" Journal of Genetic Enjineering and Biotechnology, Volume 16, Issue 2, 2018. pp. 295-304.

[13] Kanupriya Miglani Sharma, Rajesh Kumar., et al. "Microbial alkaline protease" Journal of Genetic Enjineering and Biotechnology, Volume 15, Issue 1, 2017. pp. 115-126.

[14] Sanjay Kumar Yadav., et al. "Partial purification and characterization of hide dehairing protease" Journal of Pharmaco chemistry, 2018. pp. 2608-2611.

[15] Ibrahim, Kalibulla Syed., et al. "Purification and Characterization of Manganese-Dependent Alkaline Serine protease from *Bacillius pumilus* TMS55"

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Journal of Microbiol. Biotechnol, 2011. 21(1), pp. 20-27.

[16] Huang, Q., et al. "Purification and characterization of an extracellar alkaline serine protease with dehairing fuction from *Bacillius pumilus*" Journal of CURR Microbiol. 46, 2018. pp. 169-173.

[17] Bilge Hilal Cadirci., et al. "A Thermostable Serine Protease By *Aspirgillius parasiticus* TEM Have promising activity in enzymatic Dehairing process" Journal of New Results in Science, Number8, 2015. pp. 72-83.

[18] Mohsen M.S. Asker, Manal., et al. "Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillius Megaterium*" Journal of Genetic Engineerina and Biotechnology, 11, 2013. pp. 103-109.

[19] Ceng Zhou., et al. "Anovel alkaline protease from alkaliphilic *Idiomarina sp.* C9-1 with potential applicition for eco-frindly enzymatic dehairing in the leather industry" Journal of Scientific reports, 2018.

[20] Saleem, M., Rehman., et al. "Biochemical analysis and investigation the propective applications of alkaline protease from a Bacillius sereus strain" Journal of Mol. Biology Recults, 39(6), 2012, pp. 6399-6408.