



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](#) 

2009年 2月

碩士學位論文

국내 토양균 Actinomycetes CS624가  
분비하는 protease의 특성연구

朝鮮大學校 大學院

藥學科

張 昭 映

국내 토양균 Actinomycetes  
CS624가 분비하는 protease의  
특성연구

Characterization of protease from soil  
Actinomycetes CS624

2006年 2月

朝鮮大學校 大學院

藥學科

張 昭 映

국내 토양균 Actinomycestes  
CS624가 분비하는 protease의  
특성연구

指導教授 柳 鎮 鐵

이 論文을 藥學碩士 學位申請論文으로 提出함

2008年 10月

朝鮮大學校 大學院

藥 學 科

張 昭 映

張昭映의 碩士學位論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 金成俊 印

委員 朝鮮大學校 教授 高玉鉉 印

委員 朝鮮大學校 教授 柳鎮鐵 印

2008年 11月

朝鮮大學校 大學院

# Contents

List of tables

List of figures

Abstract

I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
II-1. 시약 .....	3
II-2. 분석기기 .....	3
II-3. Protease를 생산하는 토양방선균의 분리 및 동정 .....	3
II-3-1. Protease 활성을 가지는 토양 방선균의 분리 .....	3
II-3-2. 16S rRNA gene의 염기서열 .....	4
II-4. Actinomycetes CS624 균주의 최적 배양 조건 .....	4
II-5. Protease 활성 측정 .....	5
II-6. 단백질 정량 .....	5
II-7. Protease의 정제 .....	6
II-7-1. 조효소액 조제 .....	6
II-7-2. Ammonium sulfate 분획 .....	6
II-7-3. Sepharose CL-6B column chromatography .....	6
II-7-4. DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography .....	7
II-7-5. 겔 전기영동 .....	7
II-7-6. 최적 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향 .....	7

II-7-7. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향 .....	8
II-7-8. 효소활성도에 대한 금속이온과 계면활성제와 저해제의 영향 .....	8
III. 결과 및 고찰 .....	9
III-1. Actinomycetes CS624 균주의 동정 .....	9
III-1-1. 형태학적 특성 분석 .....	9
III-1-2. 분자생물학적 특성 분석 .....	9
III-2. 배지 성분의 최적화 .....	10
III-3. Protease 생산 .....	10
III-4. Actinomycetes CS624가 생산하는 protease의 분리정제 .....	10
III-5. 겔 전기영동 .....	11
III-6. 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향 .....	11
III-7. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향 .....	12
III-8. 효소활성도에 대한 금속이온과 계면활성제와 저해제의 영향 .....	12
IV. 결론 .....	13
V. 참고문헌 .....	31

## List of tables

Table 1	Similarity of nucleotide sequence of 16S rRNA gene of Actinomycetes CS624 with related species.....	16
Table 2	Purification of protease from Actinomycetes CS624 .....	24
Table 3	Effects of metal ions, detergents and inhibitor on the activity of protease S-2, D-1 and D-2 from Actinomycetes CS624.....	30



## List of figures

Fig. 1 Photograph showing the colony morphology of Actinomycetes CS624 .....	14
Fig. 2 Sequence of 16S rRNA gene .....	15
Fig. 3 Neighbour-joining tree of Actinomycetes CS624 .....	17
Fig. 4 Protease activity from various media by Actinomycetes CS624 .....	18
Fig. 5 Protease activity from different PO <sub>4</sub> concentration by Actinomycetes CS624.....	19
Fig. 6 Protease activity from different oat meal concentration by Actinomycetes CS624.....	20
Fig. 7 Fermentation profiles for the production of protease from Actinomycetes CS624.....	21
Fig. 8 Elution profiles of protease from Sepharose CL-6B column chromatography.....	22
Fig. 9 Elution profiles of protease S-1 from DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography.....	23
Fig. 10 Electrophoretic analysis of protease by from Actinomycetes CS624 .....	25
Fig. 11 Effect of temperature on the protease from Actinomycetes CS624 .....	26
Fig. 12 Thermal stability of protease from Actinomycetes CS624 .....	27
Fig. 13 Effect of pH on the protease from Actinomycetes CS624 .....	28
Fig. 14 Stability of pH on the protease from Actinomycetes CS624 .....	29

# ABSTRACT

## Characterization of protease from soil Actinomycetes CS624

Jang So Young

Adviser: Prof. Yoo Jin-Cheol Ph.D.

Department of Pharmacy,

Graduate School of Chosun University

Actinomycetes CS624, isolated from Korean soil, showed 100% 16S rRNA gene sequence homology with *Streptomyces murinus* NBRC 12799(T), *Streptomyces costaricanus* NBRC 100773(T), *Streptomyces griseofuscus* NBRC 12870(T), and *Streptomyces graminearus* NBRC 15420(T). It produced neutral extra cellular proteases, when cultured in a medium containing 1.5% glucose, 1.5% oat meal, 0.45% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 0.45% NaHPO<sub>4</sub> at 28°C and 180rpm.

Three forms of protease, designated as S-2, D-1 and D-2, were purified through Sepherose CL-6B column chromatography followed by DEAE-Sepherose CL-6B ion exchange column chromatography. The purified enzymes were then analyzed by using 10% SDS-PAGE, which revealed that the molecular masses of the purified enzyme, S-2, D-1 and D-2, were about 20, 30 and 50 kDa, respectively. The temperature optima for S-2, D-1 and D-2 were 70, 50 and 50°C, respectively. The pH optima for S-2, D-1 and D-2 were pH6, pH7 and pH6, respectively. Intact enzyme activity remained in

existence when S-2, D-1 and D-2 were treated for up to 2h at 70°C, 50°C and 40°C, respectively. Moreover, all the proteases were stable in the pH range of 5 to 8. The activity of D-1 and D-2 were completely inhibited by  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  whereas S-2 activity was suppressed only by  $\text{Fe}^{2+}$ . Furthermore, EDTA inhibited the activity of D-1 and D-2, but not that of S-2. In contrast, PMSF did not affect the activity of all form of proteases.

# 1. 서 론

동식물의 조직이나 세포, 미생물에 널리 존재하는 Protease는 단백질 혹은 펩티드에 작용하여 펩티드 결합의 가수분해를 촉매 할 뿐만 아니라 ester나 amide와 결합반응을 하며 효소에 따라 전이반응을 하거나 효소 교환반응을 하는 등 다양한 화학반응을 하는 효소이다.

Peckman<sup>1)</sup>과 Crewth<sup>2)</sup>가 최초로 *Aspergillus*속에서 분리한 protease는 활성위치의 기능기의 구조에 따라 serine proteases<sup>3)</sup>, aspartate proteases, cysteine proteases, metallo proteases로 나누어지며, 최적 pH에 따라서 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 나누어진다.<sup>4,5)</sup> 생산원에 따라 동물성 protease, 식물성 protease, 미생물성 protease로 나누어지고<sup>6)</sup> 효소의 작용부위에 따라서 exopeptidase와 endopeptidase로 나누어진다. exopeptidase는 펩티드 사슬의 말단부위에서 작용하여 펩티드 사슬을 분해시키며, endopeptidase는 N-말단과 C-말단으로부터 떨어진 polypeptide내의 펩티드 결합에 작용하여 펩티드 결합을 분해한다.<sup>7,8)</sup>

Protease는 조미료 제조, 식육의 연화, 맥주, 청주의 혼탁방지, 치즈 숙성 등의 식품공업과 소화제, 소염진통제 등 제약공업, 피혁가공, 세제산업<sup>9-13)</sup> 등 여러 분야에 걸쳐 광범위하게 이용되고 있다. 이러한 protease는 안정성, 생산성, 비용 면에서 고려해 볼 때 동식물에서 얻는 것보다 미생물에서 얻는 것이 더 많은 이점이 있으므로 미생물을 통한 효소 생산이 전 세계 총 생산의 40%를 차지하고 있다.<sup>14)</sup>

미생물에서 유래되는 protease는 주로 곰팡이, 세균 등에서 많이 생산되고 있으며 세균 중에서도 *Bacillus* sp. *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Neurospora* sp. *Pseudomonas* sp. *Streptomyces* sp. 등이 있다.<sup>15-25)</sup>

방선균(actinomycetes)은 호기성 세균으로서 포자를 형성하고 사상체 형태로 자라는 Gram양성 세균으로 분류학적으로 세균과 곰팡이의 중간적 위치를 차지하고 있다. 방선균은 actinomycin, streptomycin 등 많은 항생물질과 효소저해제 등 다양한 생리활성 물질들을 생산하고 고분자 물질을 분해하여 생태계의 물질순환에

크게 기여하여 산업에서 매우 중요한 세균으로 연구의 초점이 되어 이 미생물로부터 새로운 물질을 얻으려는 탐색작업이 활발히 진행되고 있다.<sup>26,27)</sup>

방선균은 자연계에 다양하게 분포하지만 토양에 가장 많이 존재하고 있다. 토양 중에 존재하는 방선균의 약 95%정도를 *Streptomyces*속이, 그 외에 *Nocardia*, *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Actinoplanes*, *Microbispora*속 등이 분포하고 있다<sup>28)</sup>. 방선균으로부터 유래한 alkaline protease는 기질 특이성이 높은 편이며 비교적 고온에서 작용하는 특성 때문에 주로 세제 첨가제로 쓰이고 있는데<sup>9)</sup> protease를 세제나 피혁가공에 이용하기 위해서는 계면활성제, 표백제와 같은 산화제 혹은 다른 첨가제들과 함께 광범위한 pH와 온도에서 높은 활성을 가져야만 하기 때문에 실제 산업에서 생산되고 이용되는 종류는 극히 적은 편이다.<sup>29)</sup> Neutral protease는 비교적 좁은 pH 범위(pH5~8)에서 활동적이고 상대적으로 낮은 온도내성을 갖지만 식물 단백분해효소 저해제로부터 영향을 받지 않기 때문에 양조산업에서 유용하게 사용되고 있다. 또한 단백질 식품의 가수분해에서 동물성 protease 보다 쓴맛을 덜하게 하여 식품산업에서도 그 유용성이 증가하고 있는 추세다.<sup>30)</sup>

본 연구에서는 neutral protease를 탐색할 목적으로 한 종류의 방선균을 국내 토양에서 분리하였으며 16S rRNA 유전자 분석을 통하여 *Streptomyces* 속에 속하는 세균으로 동정하였다. 또한 본 균주에서 생산되는 protease들을 정제하여 효소의 특성을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### II-1. 시약

방선균의 배양을 위한 배지는 주로 Junsei사의 제품을 사용하였다. 활성을 조사하는데 쓰이는 Azocasein, EDTA, PMSF, Triton-X 100, Tween 20, Tween 80, Folin-Ciocalteu's phenol reagent은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

### II-2. 분석기기

효소정제를 위한 Sepharose CL-6B, DEAE-Sepharose CL-6B는 Pharmacia (Uppsala, Sweden)의 제품을 사용하였다.

### II-3. Protease활성을 가지는 토양 방선균의 분리 및 동정

#### II-3-1. Protease 활성을 가지는 토양 방선균의 분리

전남 해안 지역에서 채취한 토양 샘플을 3일정도 건조시킨 후 단계적으로 희석하여 Bennet's agar medium (1% Glucose, 0.1% Yeast extract, 0.2% Peptone, 0.1% Beef extract, pH:7.0) 에 nalidixic acid (20ul/ml) 을 첨가한 배지에 도말하여 28℃에서 1~3주일간 배양하였다. 선별된 방선균은 ISP2 (0.2% Yeast extract, 1% Malt extract, 0.4% Glucose, pH:7.2) 배지에 접종하여 28℃, 200rpm에서 배양하며 protease 활성을 관찰하였다. 분리 및 선별된 균주들은 OSYM (2% Oatmeal, 1% Soybean meal, 1% Dried yeast, 1% Mannitol, pH 8.3) 고체배지에서 배양한 후 4℃의 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 균주의 장기 보관은 포자를 20% glycerol로 보관용 vial에 취해 -80℃에 보관하고 6개월마다 계대 배

양하여 보존하였다.

## II-3-2. 16S rRNA의 염기서열

16S rRNA는 PCR기기(Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler)를 이용하여 증폭하였으며 primer로는 27f(5'-AGAGTTTGATCMTGGCT-3') 1492r(5'-AAGGAGGT GWTCCARCC-3')<sup>31)</sup>을 사용하였다. 증폭조건의 변성은 94℃에서 1분, annealing은 55℃에서 1분, 신장은 72℃에서 1분간 총 30회 반복하였다. 증폭된 DNA는 Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)와 oilgo-nucleotide primers<sup>32)</sup>를 이용하여 염기서열을 확인하였다.

## II-4. Actinomycetes CS624 균주의 최적 배양 조건

OSYM 고체 배지에서 배양한 균주의 균사체 및 포자를 취하여 50ml의 OSYM 액체 배지가 들어있는 250ml flask에 접종하여 28℃, 180rpm에서 3일간 전 배양하였다. 그리고 protease의 최적 생산을 위해 자체 개발한 4가지 배지(GYT, GYTS, OSYM, GOKN)를 준비하여 protease 활성을 조사하였다.

각각의 배지조성은 다음과 같다. GYT 배지(2% glucose, 1.5% yeast extract, 0.5% trypton, 0.1% CaCO<sub>3</sub>), GYTS 배지(2% glucose, 1.5% yeast extract, 0.5% trypton, 0.1% CaCO<sub>3</sub>, 1.5% soy bean), OSYM 배지(2% Oatmeal, 1% soy bean, 1% Dried yeast, 1% Mannitol), GOKN 배지(1.5% glucose, 1.5% oat meal, 0.3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)에 2% 종배양액을 접종하여 28℃, 180rpm에서 8일간 배양하여 최고 활성을 보이는 배지를 CS624 배양배지로 선정하였다. 그리고 배양배지의 최적의 조건을 알아보기 위하여 금속염의 농도를 0%, 0.15%, 0.3%, 0.45%로 탄소원의 농도를 0%, 0.75%, 0.15%로 나누어 protease 활성의 최적 조건을 조사하였다.

## II-5. Protease 활성 측정

효소 활성 측정은 Azocasein 용액<sup>7)</sup> [(2.0%(w/v), in 0.2M Phosphate Buffer(pH7.0)] 50 $\mu$ l 와 효소시료 100 $\mu$ l를 섞어준 후, 40 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. 여기에 10%(w/v) Trichloroacetic acid 60 $\mu$ l를 가하고 즉시 vortexing한 후 ice 위에서 10분간 방치(산성화, 단백질 침전)하였다. Centrifuge(15,000rpm/ 20min)한 후, 상등액 150 $\mu$ l을 취하여 6배 희석된 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 300 $\mu$ l와 7.5%(w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 450 $\mu$ l를 넣고 즉시 vortexing 한 후에 40 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켜 660nm에서 흡광도를 측정했다. 효소활성의 단위(unit)는 1분 동안 1 $\mu$ g tyrosine을 생성시키는 효소의 양으로 정하였다.

## II-6. 단백질 정량

단백질의 농도는 Bradford의 방법(1976)<sup>33)</sup>을 이용하여 bovine serum albumin(BSA) (Life Technologies, Gaithersburg, MD, U.S.A.)을 표준시료로 하여 측정하였으며 효소정제 과정 중 분획내의 상대적 단백질 농도는 595nm 흡광도로 측정하였다.



## II-7. Protease의 정제

### II-7-1. 조효소액 조제

OSYM 고체 배지에서 배양한 균주의 균사체 및 포자를 취하여 50ml의 OSYM 액체 배지가 들어있는 250ml baffled flask에 접종하여 28℃ 180rpm에서 3일간 전 배양하였다. 이 배양액을 protease의 생산을 위해 자체 개발한 protease용 배양배지 GOKN 배지 1L에 2%수준으로 접종하여 28℃ 180rpm에서 8일간 배양하였다. 배양액은 6000rpm에서 30분간 원심분리 후 상등액을 조효소로 이용하였다.

### II-7-2. Ammonium sulfate 분획

조효소 용액에 30~90%가 포화되도록 ammonium sulfate를 가하고 원심분리 (8,000rpm, 60분)하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물에 10mM Tris-HCl (pH 8.0)를 가하여 용해시킨 후 YM10 (M.W 10,000) membrane을 사용하여 농축 및 탈염하고 동일완충액으로 평형화시켰다.

### II-7-3. Sepharose CL-6B column chromatography

Ammonium sulfate로 농축 및 탈염시킨 효소시료는 Sepharose CL-6B (2.2\*114cm) column에 적하하고 10mM Tris-HC buffer1 (pH8.0)로 4.0cm/h 전개시켜 활성을 보이는 분획들을 회수하였다. 회수한 용액을 농축 후 동일완충액으로 평형화시켰다.

#### II-7-4. DEAE-Sephrose CL-6B column chromatography

Sephrose CL-6B를 통해 회수한 농축액을 DEAE-Sephrose CL-6B column chromatography (1.2\*71cm)에 적하하였다. 0~0.5M KCl 이 포함된 10mM Tris-HCl(pH 8.0) buffer 로 7.0cm/h 전개시켜 활성을 보이는 분획들을 회수하였다. 분리된 효소는 생화학적 특성을 관찰하는데 사용하였다. 정제된 효소의 확인은 Laemmli<sup>34)</sup>의 방법에 따라 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis)로 수행하였다.

#### II-7-5. 단백질의 겔 전기영동

SDS-PAGE는 5% stacking gel과 10% polyacrylamide gel(Laemmli,1970)을 사용하였다. Molecular weight maker (17~170 kDa)는 Fermentas (Glen Burnie, MD, U.S.A) 회사의 제품을 사용하여 단백질의 분자량을 결정하였다. 겔은 0.1%(w/v) coomassie brilliant blue R-250로 1시간동안 염색한 뒤 Methanol: glacial acetic acid : H<sub>2</sub>O(1:1:8) 비율로 섞은 용액에 12시간 동안 탈색 시켰다.

#### II-7-6. 최적 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향

최적 활성 온도는 4~80℃의 범위에서 10℃ 간격으로 효소 반응을 수행하여 효소활성을 측정하였다. 효소의 온도 안정성을 알아보기 위해 각각의 온도(4℃, 20℃, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃, 90℃)에서 효소를 2시간 동안 incubating 시킨 후, 30분마다 sampling 하였다. Sampling 용액에 10mM Tris-HCl buffer(최적 pH) 를 넣고 15분 동안 실온에 방치한 후, 동일 완충용액으로 총량을 채운 뒤 효소 활성을 측정하여 효소의 온도에 대한 안정성을 측정하였다.

## II-7-7. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향

정제된 효소활성에 대한 최적 pH를 결정하기 위해 pH 3~12 범위 안에서 pH 1.0 간격으로 1M pH buffer (최종농도 100mM)를 넣고 최적온도에서 20분간 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 그리고 효소의 pH 안정성을 측정하기 위해 pH 3~11 범위 안에서 pH 1.0 간격으로 각각의 1M pH buffer(최종농도 100mM)를 효소용액과 넣어 4℃에서 48시간동안 방치한 뒤, 최적 pH buffer를 넣고 최적온도에서 20분간 반응시켜 효소 활성을 측정함으로써 pH 안정성을 측정하였다. 1M pH buffer는 다음과 같이 pH 3~7.5은 Citrate-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer, pH 7.5~9는 Tris-HCl buffer, pH 9~12는 Sodium-Bicarbonate buffer를 사용하였다.

## II-7-8. 효소활성도에 대한 금속이온과 계면활성제와 저해제의 영향

효소 활성에 미치는 금속이온들의 영향을 조사하기 위해 효소 반응용액에 금속이온 (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>)과 EDTA, EGTA를 1mM이 되도록 첨가하여 최적온도에서 20분 동안 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

효소활성에 영향을 미치는 계면활성제의 영향을 조사하기 위해 Triton-X 100, Tween20, Tween80, SDS를 각각 0.1%(v/v)가 되도록 효소 반응용액에 첨가하였다. 저해제로 PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride)를 1mM이 되게 첨가한 후 최적온도에서 20분간 반응시켜 효소의 활성 변화를 측정하였다. PMSF는 소량의 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 후 증류수로 희석하여 사용하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### III-1. Actinomycetes CS624 균주의 동정

##### III-1-1. 형태학적 특성 분석

전남 해안 지역에서 채취한 토양에서 protease의 활성이 높은 균주인 Actinomycetes CS624 균주를 선별하였다. Actinomycetes CS624 균주를 OSYM 고체 배지에 접종한 후 28℃에서 배양하였을 때 4~5일이 경과하면서부터 하얀색 colony가 관찰되었다. (Fig.1)

##### III-1-2. 분자생물학적 특성 분석

Actinomycetes CS624 균주에서 추출한 total RNA를 template를 이용하여 16S rRNA 부분을 PCR 반응으로 증폭시켜 16S rRNA 부분의 1,497개의 염기서열 (Fig.2)을 Blast & programd를 이용하여 가장 유사도가 높은 균주들을 검색한 결과, 분석 균주는 *Streptomyces* 속에 속하는 세균으로 나타났다. *Streptomyces*속은 약 550종(2007년 기준)이 존재하며, 16S rRNA gene 염기서열 분석 결과, Actinomycetes CS624는 *Streptomyces murinus* NBRC 12799(T), *Streptomyces costaricanus* NBRC 100773(T), *Streptomyces griseofuscus* NBRC 12870(T), *Streptomyces graminearus* NBRC 15420(T)와 100% 일치하였다. (Table 1.) CS624의 16S rRNA gene 염기서열의 의한 계통발생학적 위치는 Neighbour-joining tree (Saitou & Nei, 1987)로 나타내었다. (Fig. 3)

### III-2. 배지 성분의 최적화

Protease 생산의 최적화를 위한 4가지 배지를 통한 실험결과는 Fig.4. 나타내었다. 다른 배지에 비해 GOKN 배지에서 월등한 효과를 나타내었다. 이 GOKN 배지의 성분 중 금속염의 농도를 0%, 0.15%, 0.3%, 0.45% 로 나누어서 실험한 결과 0.45%에서 최적의 상태를 나타내었으며(Fig.5), 탄소원인 oat meal의 농도를 0%, 0.75%, 1.5%로 실험하여 1.5%에서 가장 좋은 결과를 나타내었다(Fig.6). 그래서 CS624 배양배지를 1.5% Glucose, 1.5% oat meal, 0.45%  $K_2HPO_4$ , 0.45%  $NaH_2PO_4$  로 최적화 배지를 정하였다.

### III-3. Protease 생산

Actinomycetes CS624 균주를 GOKN (1.5% Glucose, 1.5% oat meal, 0.45%  $K_2HPO_4$ , 0.45%  $NaH_2PO_4$ , pH 6.91)배지 200ml이 들어있는 1L flask에 2%의 종 배양액을 접종하고 28℃, 180rpm에서 배양하면서 배양시간에 따른 protease의 활성, pH, 건조중량의 변화를 조사하였다. 균의 증식은 배양 1일째부터 증가하기 시작하여 4일째까지 증가하였다가 그 이후부터 균의 생육이 차츰 감소하였다. Protease의 생성은 배양 1일부터 10일까지 증가하였다가 이후에는 서서히 감소하였다. 배양액 내의 pH는 6~7 범위 내에서 비교적 일정하게 유지되었다. (Fig. 7)

### III-4. Actinomycetes CS624가 생산하는 protease의 분리 및 정제

Actinomycetes CS624에 의해 생산된 protease의 전반적인 정제과정들은 Table 2.에 요약하여 나타내었다. 조효소액을 ammonium sulfate, Sepharose CL-6B column chromatography (Fig.8), DEAE-Sepharose CL-6B (Fig.9)에 의해 protease를 정제하였다. Actinomycetes CS624의 배양 여액을 ammonium sulfate (30%-90%) 로 분획하고 농축하여 탈염시킨 효소용액을 얻었다. 원심분리 후 얻은

상층액은 10mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)으로 평형화시키고 최소로 농축하여 동일 완충액으로 평형화 시킨 다음 Sepharose CL-6B column (2.2\*114cm)에 적하하여 동일 완충액으로 4ml/20min의 속도로 용출시켰다. Fig.8에서와 같이 protease는 2개의 큰 피크(S-1, S-2)로 나누어졌다. S-1과 S-2의 피크는 둘 다 1.4의 정제도를 보였으며 수율은 각각 8%, 2%를 나타내었다. Sepharose CL-6B column에서 얻은 활성 분획을 두개로 나누어 각각 농축한 후 S-1을 DEAE-Sepharose CL-6B(1.2\*71cm)에 적하하여 0.0~0.5M KCl의 농도구배로 용출시켰을 때 protease의 활성분획은 0.2~0.3M KCl 농도에서 나타났다.(Fig.9). D-1의 정제도와 수율은 1.25, 1.6%, D-2의 정제도와 수율은 1.15, 0.5%였다.

### III-5. 겔 전기영동

Sepharose CL-6B column chromatography를 통해 얻은 S-2와 DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography를 통해 얻은 D-1과 D-2를 SDS-PAGE를 통하여 확인한 결과 분자량이 각각 약 20kDa, 30kDa, 50kDa 인 것으로 확인되었다.(Fig.10)

### III-6. 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향

온도에 대한 효소활성과 안정성에 미치는 영향을 조사한 결과, S-2, D-1, D-2 효소반응의 최적 온도는 각각 70℃, 50℃, 50℃로 나타났으며 그 이상의 온도에서는 활성이 저하되었다. (Fig.11) 효소의 안정성은 4~90℃ 온도구간에서 10℃ 간격으로 효소를 2시간 동안 incubating 시킨 결과 S-2, D-1, D-2는 각각 70℃, 50℃, 40℃까지 100% 활성을 유지하였다. 그 이후부터는 점차적인 감소를 보였다. (Fig.12)

### III-7. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향

pH에 대한 protease의 활성과 안정성에 미치는 영향을 조사한 결과, pH 3~12 범위 내에서 S-2, D-1, D-2의 최적 pH는 각각 pH6, pH7, pH6으로 나타났다.(Fig.13) 효소의 pH 안정성을 보기 위해 pH 3~11 범위에서 4°C, 48시간동안 pH buffer를 처리한 후 효소활성을 조사한 결과 S-2, D-1, D-2는 각각 약산성과 중성부근에서 안정한 것으로 보아 neutral protease 임이 사료된다. (Fig.14)

### III-8. 효소활성도에 대한 금속이온과 계면활성제와 저해제의 영향

효소 반응용액에 금속이온( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) 과 EDTA, EGTA를 1mM 되도록 첨가한 후 효소 활성의 변화를 측정한 결과 S-2, D-1, D-2는 모두 활성에  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  을 요구하였으며  $\text{Fe}^{2+}$ 에 의해 효소 활성이 완전히 저해되었다. 또한 D-1, D-2는  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  에 의해 효소활성이 100% 저해되었다. D-1, D-2가 EDTA에 의해 활성이 크게 저해되는 것으로 보아 metallo protease 임이 사료된다. 효소에 영향을 미치는 계면활성제인 (Triton X-100, Tween 20, Tween 80, SDS) 를 0.1%(v/v)와 저해제인 PMSF를 1mM로 하여 효소활성에 대한 영향을 검토한 결과 D-1, D-2가 Triton X-100 에서 안정한 반면 S-2는 Triton X-100에서 30% 활성이 감소하였다. 그리고 PMSF에서는 세 가지 효소 모두 안정함을 보여주었다.(Table 3)

## IV. 결 론

전남 지역에서 채취한 토양 시료로부터 600여종의 방선 균주를 분리하였다. 이들 균주의 배양 상등액 중 protease의 활성이 높은 Actinomycetes CS624 배양액으로 protease 효소를 분리 정제하여 그 특성을 조사하였다. 16S rRNA gene 염기서열 분석 결과, Actinomycetes CS624는 *Streptomyces murinus* NBRC 12799(T), *Streptomyces costaricanus* NBRC 100773(T), *Streptomyces griseofuscus* NBRC 12870(T), *Streptomyces graminearus* NBRC 15420(T)와 100% 일치하였다. Actinomycetes CS624 균주는 자체 개발한 GOKN (1.5% Glucose, 1.5% oat meal, 0.45% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.45% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.91) 배양배지에서 28°C, 180rpm에서 배양하였을 때 8일째 최대 활성을 나타내었으며 점차 효소 활성이 감소하였다. Actinomycetes CS624를 GOKN 배지에서 최대 활성을 가지는 배양액을 ammonium sulfate, Sepharose CL-6B column chromatography, DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography를 이용하여 순수하게 정제된 S-2, D-1, D-2 효소를 얻었다. S-2, D-1, D-2의 최적온도는 각각 70°C, 50°C, 50°C이고, 여러 구간의 온도 범위에서 2시간 동안 효소 활성의 온도 안정성을 확인한 결과 각각의 효소들은 70°C, 50°C, 40°C에서 100% 안정함을 보였다. S-2, D-1, D-2의 최적 pH는 각각 pH6, pH7, pH6 이었으며, 각 효소들은 pH 5~8에서 안정한 것으로 나타났다. 이들이 약산성과 중성조건에서 안정한 것으로 보아 neutral protease 임이 사료된다. 또한 S-2가 Yoo<sup>3)</sup>의 *Streptomyces tendae*의 최적온도 70°C, 최적 pH6로 일치함과 동시에 Lee<sup>35)</sup>의 *Streptomyces* 속이 생성하는 효소의 최적온도 50°C와 D-1이 일치함을 보여주었다. 계면활성제인 Triton X-100을 처리시 S-2는 30% 활성이 감소되었고, D-1, D-2는 안정함을 보였으며 PMSF에서는 모든 효소가 안정함을 나타내었다. 1mM 수준에서 금속 이온들의 영향을 알아본 결과, Fe<sup>2+</sup>은 3가지 효소를 모두 100% 억제하였으며 Mn<sup>2+</sup>는 D-1, D-2를 100% 억제하였다. D-1과 D-2가 EDTA, EGTA에 의해 효소활성이 저해되는 것으로 보아 metallo protease인 것으로 사료된다.



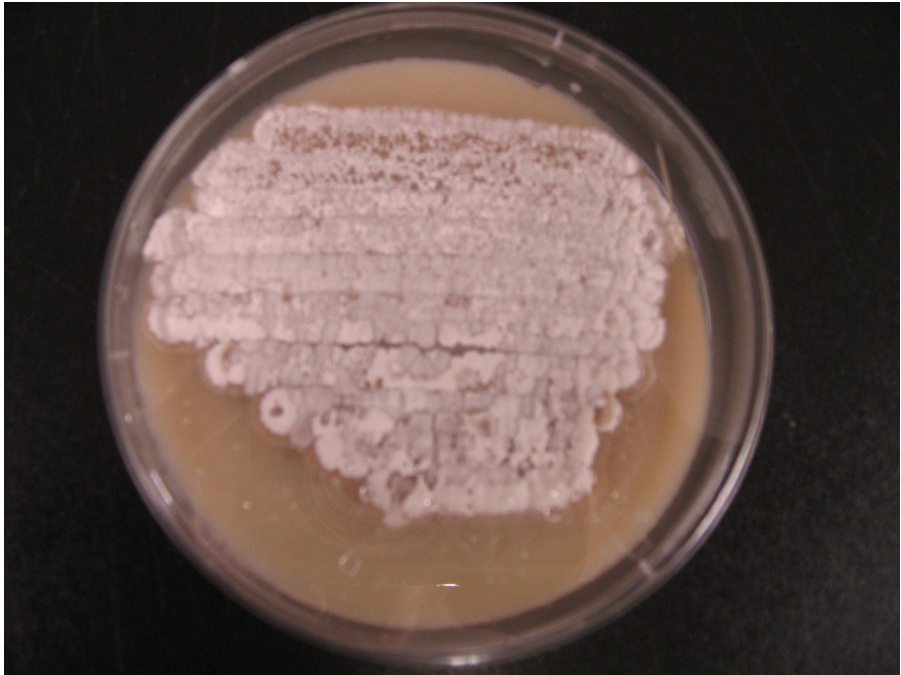


Fig. 1 Photograph showing the colony morphology of Actinomycetes CS624

5'-TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGA  
TGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGC  
AATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGG  
ATATGACCATCTTGGGCATCCTTGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGG  
ATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC  
GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA  
CACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGG  
GCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT  
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAG  
AAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAA  
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACAG  
TCGATTGTGAAAGCTCGGGGCTTAACCCGAGTCTGCAGTCGATACGGGC  
TAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT  
GCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCAT  
TACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC  
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCAC  
GTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCCGCCTGGGGAGTACGG  
CCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGG  
AGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGAC  
ATACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAG  
GTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC  
CGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGC  
TGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACG  
ACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAAT  
GGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAG  
CCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAG  
TCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC  
TTGTACACACCGCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGG  
TGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACCAGCGATTG  
GGACGAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATC-3'

**Fig. 2 Sequence of 16S rRNA gene**

**Table 1. Similarity of nucleotide sequence of 16S rRNA gene of Actinomycetes CS624 with related species**

Name/Title	Strain	Accession	Similarity	Diff/Total nt
<i>Streptomyces murinus</i>	NBRC 12799(T)	AB184155	100.0	0/1476
<i>Streptomyces costaricanus</i>	NBRC 100773(T)	AB249939	100.0	0/1480
<i>Streptomyces griseofuscus</i>	NBRC 12870(T)	AB184206	100.0	0/1476
<i>Streptomyces graminearus</i>	NBRC 15420(T)	AB184667	100.0	0/1476
<i>Streptomyces griseofuscus</i>	KACC 20083(T)	AY207605	99.8	3/1478
<i>Streptomyces griseofuscus</i>	KCTC 9879(T)	AY999809	99.6	6/1418
<i>Streptomyces misionensis</i>	NBRC 13063(T)	AB184285	98.8	17/1474
<i>Streptomyces phaeoluteichromatogenes</i>	NRRL 5799(T)	AJ391814	98.6	20/1470
<i>Streptomyces almquistii</i>	NRRL B-1685(T)	AY999782	98.2	26/1482
<i>Streptomyces lanatus</i>	NBRC 12787(T)	AB184845	98.2	26/1473
<i>Streptomyces malachitofuscus</i>	LMG 20067(T)	AJ781347	98.2	26/1463
<i>Streptomyces lanatus</i>	ISP 5090(T)	AJ399469	98.2	26/1447
<i>Streptomyces durhamensis</i>	NRRL B-3309(T)	AY999785	98.2	27/1492
<i>Streptomyces althioticus</i>	NRRL B-3981(T)	AY999791	98.2	27/1485
<i>Streptomyces thioluteus</i>	NBRC 13341(T)	AB184344	98.2	27/1476
<i>Streptomyces filipinensis</i>	NBRC 12860(T)	AB184198	98.2	27/1469
<i>Streptomyces althioticus</i>	NBRC 12740(T)	AB184112	98.1	27/1458
<i>Streptomyces malachitofuscus</i>	NBRC 13059(T)	AB184282	98.1	28/1466
<i>Streptomyces cellostaticus</i>	ISP 5189(T)	AY999742	98.1	28/1447

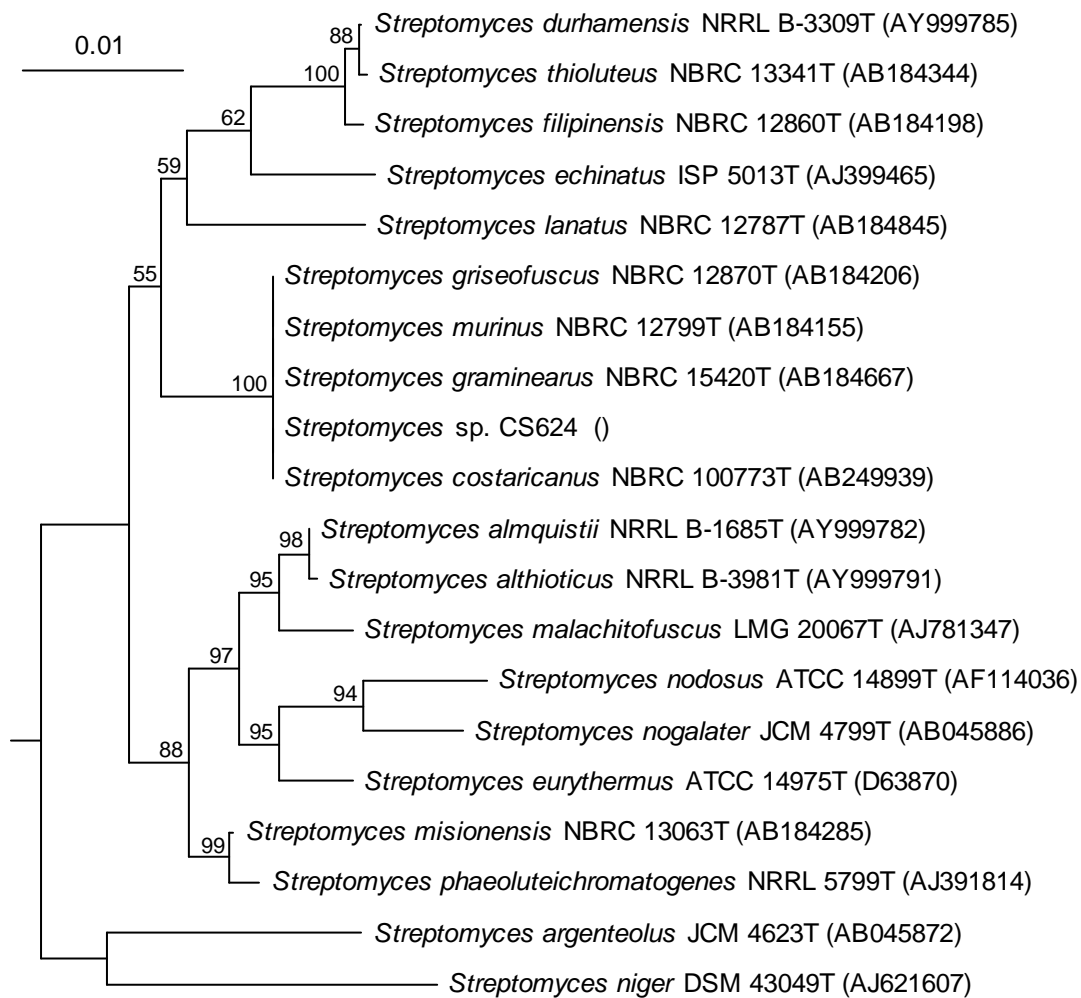


Fig. 3 Neighbor-joining tree of Actinomycetes CS624

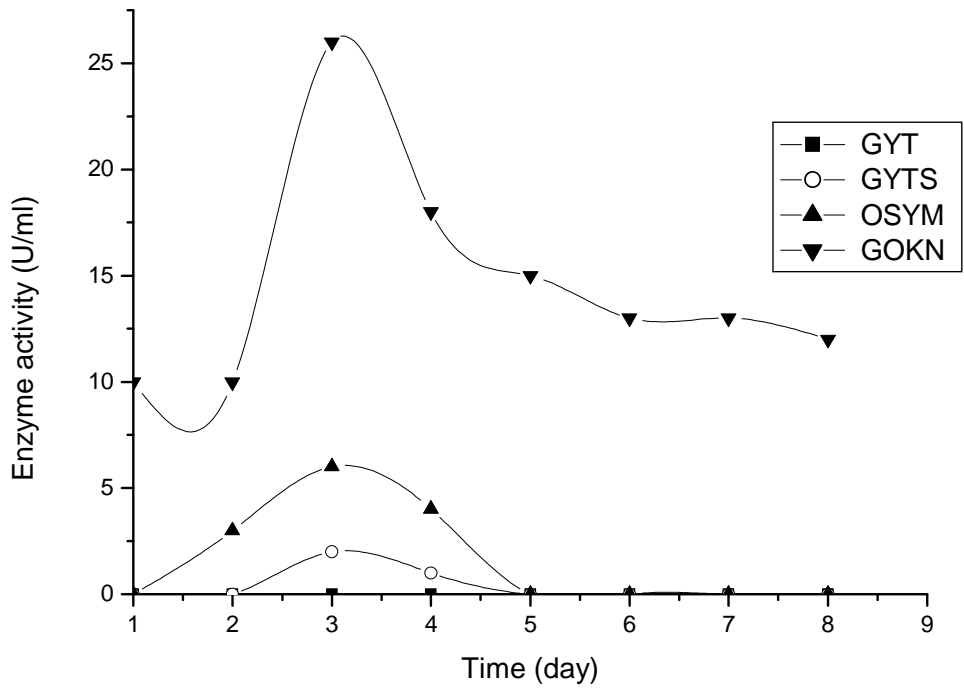


Fig. 4 Protease activity from various media by Actinomycetes CS624

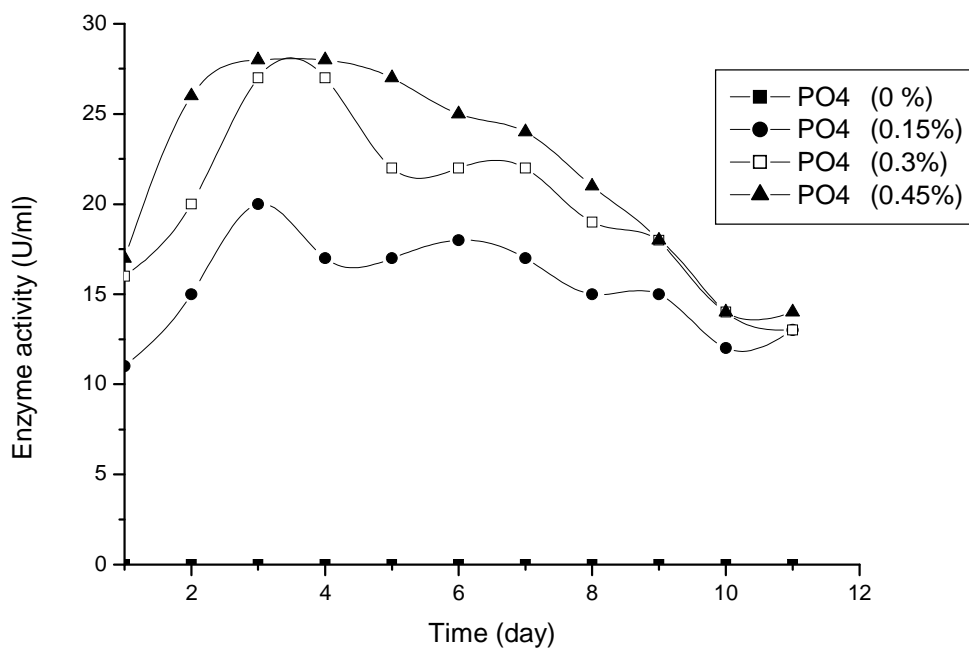


Fig. 5 Protease activity from different PO<sub>4</sub> concentration by Actinomycetes CS624

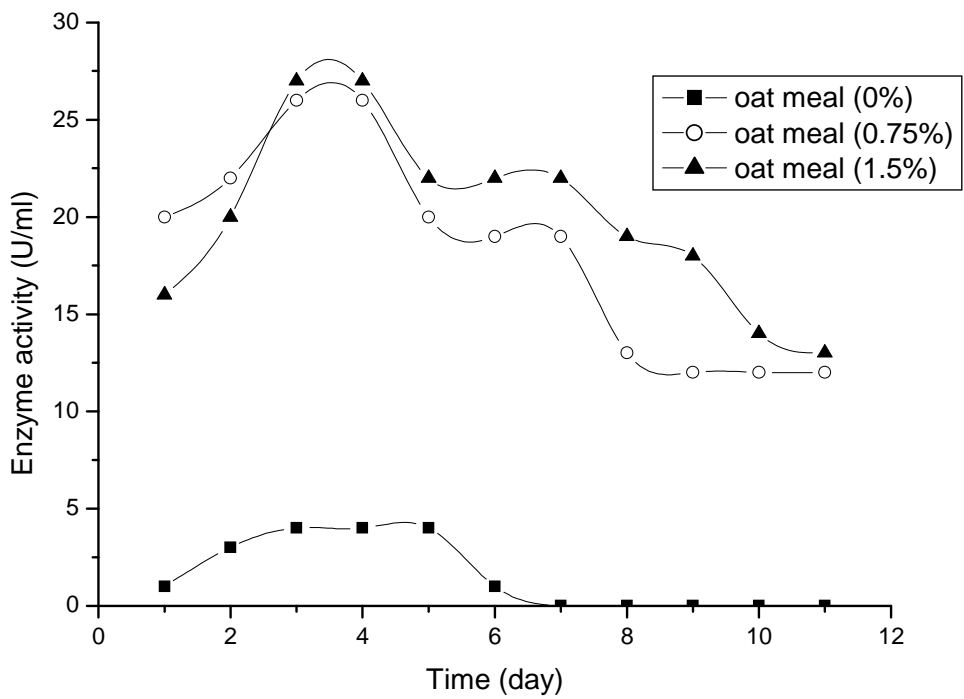


Fig. 6 Protease activity from different oat meal concentration by Actinomycetes CS624

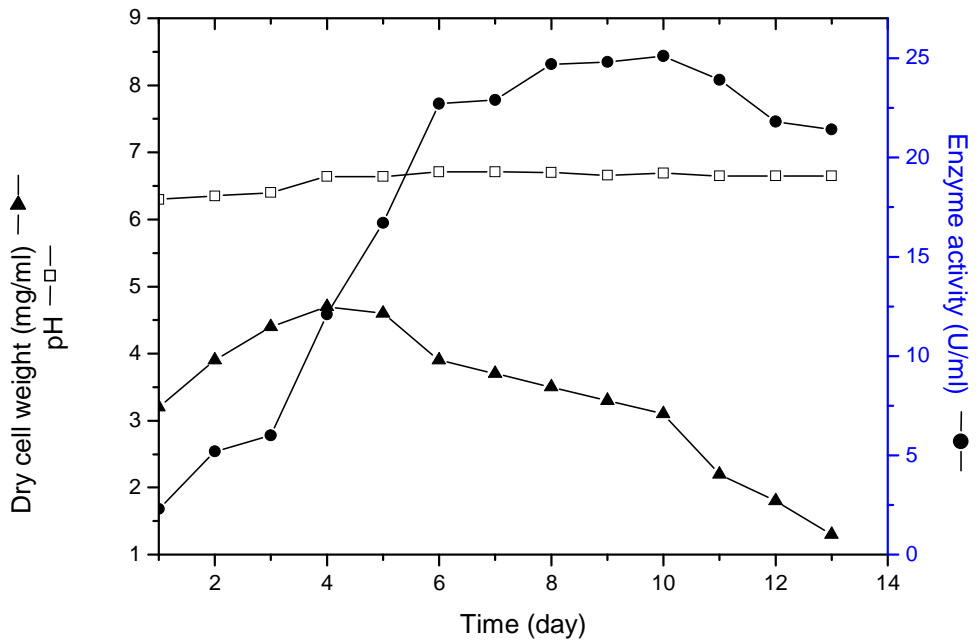


Fig. 7 Fermentation profiles for the production of protease from Actinomycetes CS624



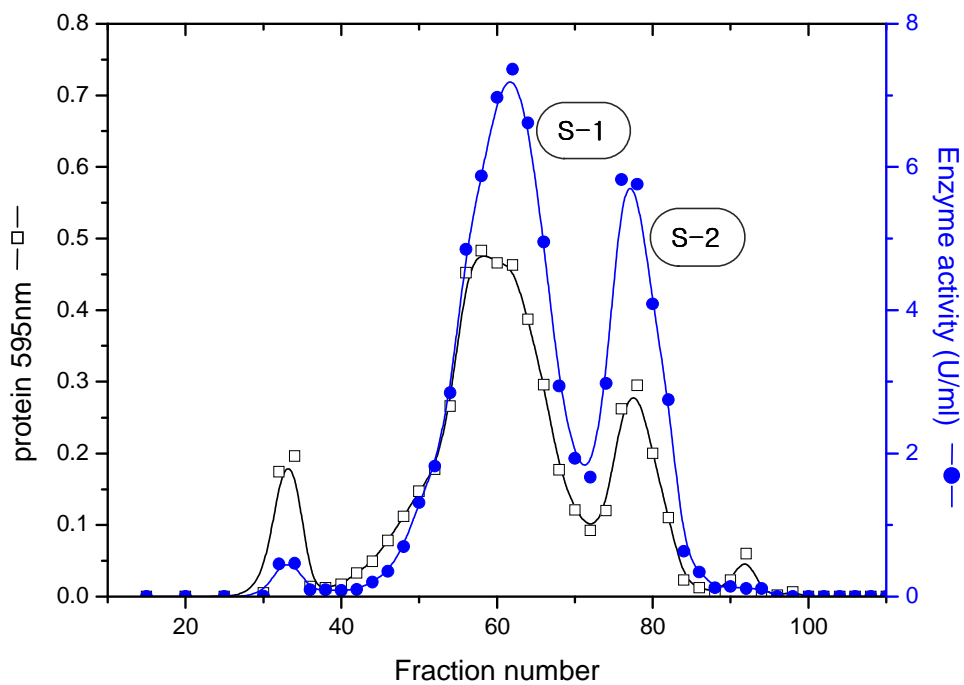


Fig. 8 Elution profile of protease from Sepharose CL-6B column chromatography

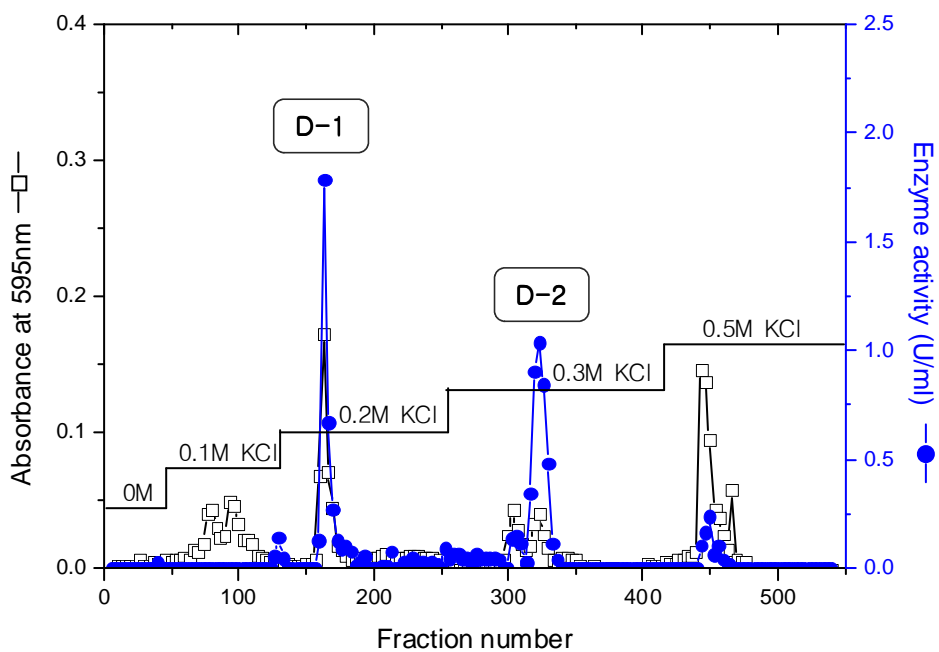


Fig. 9 Elution profile of protease S-1 from DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography

Table 2. Purification of protease from  
Actinomycetes CS624

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Fold	Yield (%)
Crude supernatant	240	12740	53	1	100%
Ammonium sulfate	80	3356	42	0.8	26%
Sephacrose CL-6B					
S-1	14	1031	74	1.4	8%
S-2	3.5	256	73	1.4	2%
DEAE - Sepharose CL-6B					
S-1(D-1)	3.2	213	66.5	1.25	1.6%
S-1(D-2)	1.1	67	60.9	1.15	0.5%

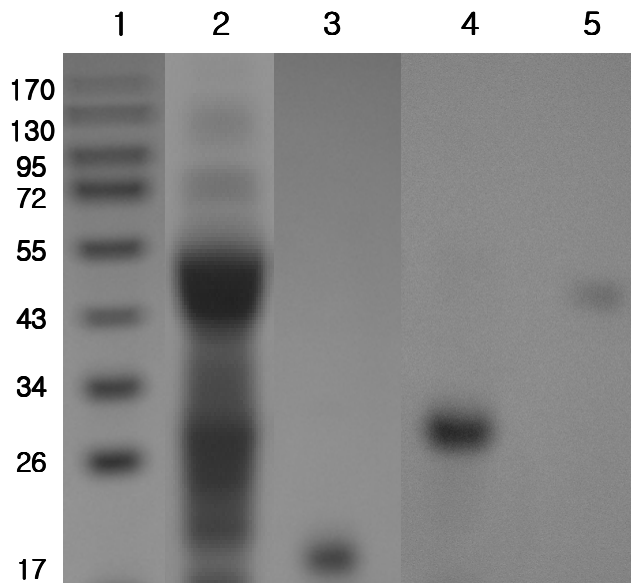


Fig. 10 Electrophoretic analysis of protease from  
*Actinomycetes* CS624

Lane 1: molecular weights of standard protein marker

Lane 2: S-1

Lane 3: S-2

Lane 4: D-1

Lane 5: D-2

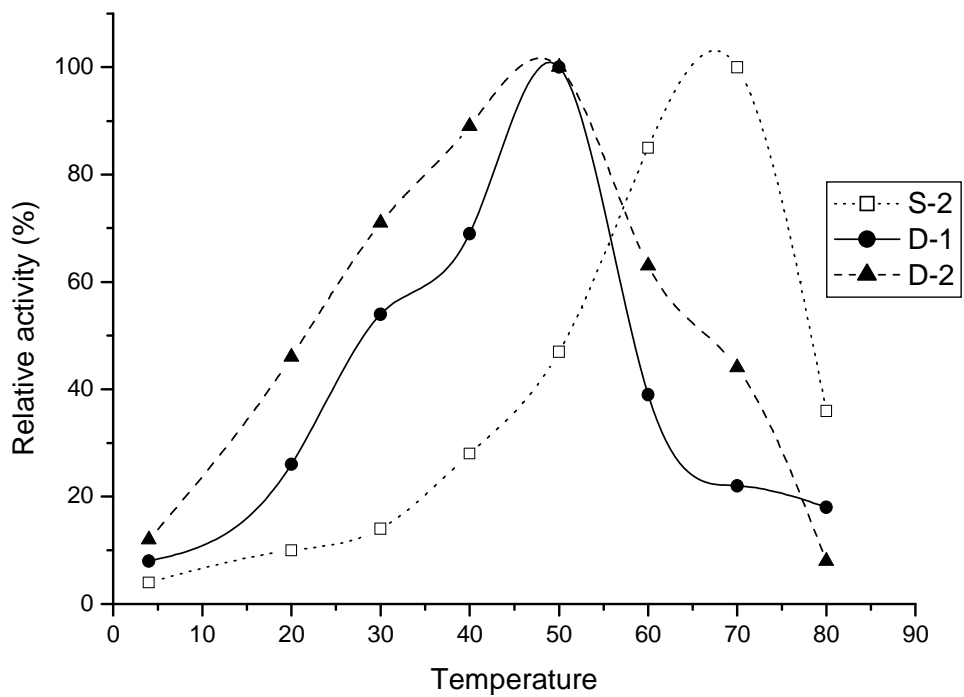


Fig. 11 Effect of temperature on the protease from Actinomycetes CS624

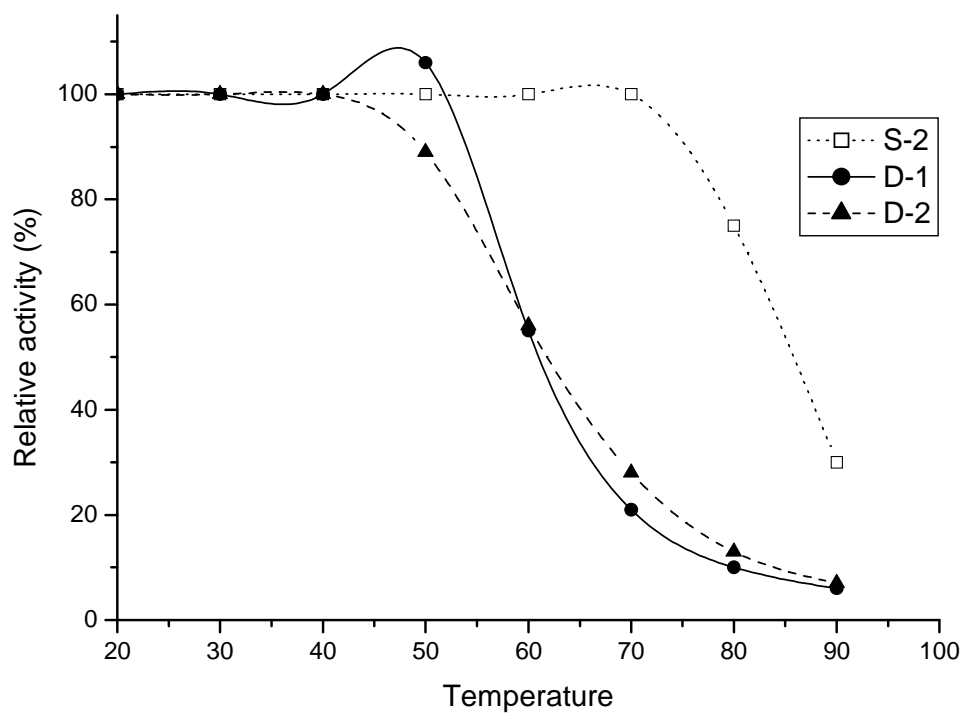


Fig. 12 Thermal stability of protease from Actinomycetes CS624

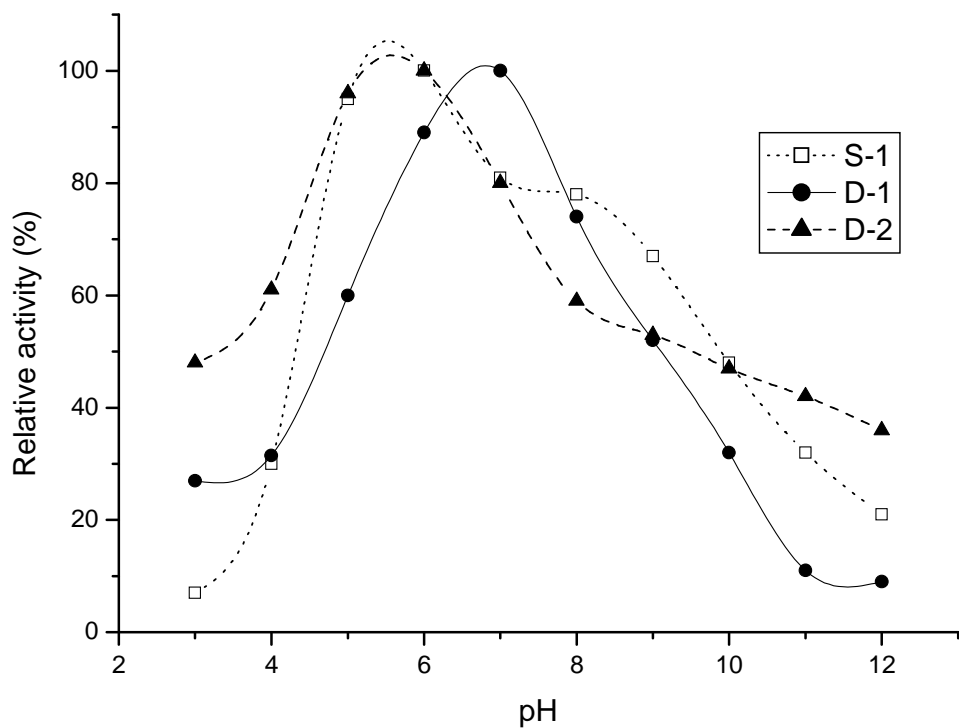


Fig. 13 Effect of pH on the protease from Actinomycetes CS624

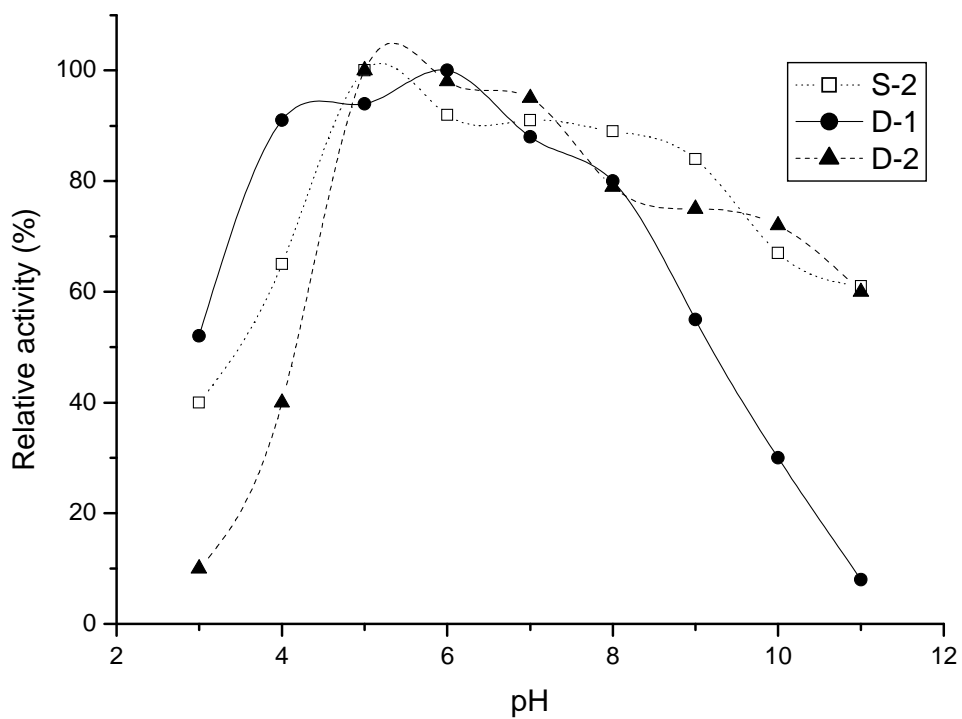


Fig. 14 Stability of pH on the protease from Actinomycetes CS624



**Table 3 . Effect of metal ions, detergents and inhibitor on the activity of protease S-2, D-1 and D-2 from Actinomycetes CS624**

Reagents	Concentration	Relative activity (%)		
		S-2	D-1	D-2
None		100	100	100
CaCl <sub>2</sub>	1mM	102	109	121
MgSO <sub>4</sub>	1mM	96	92	154
MnSO <sub>4</sub>	1mM	84	0	0
CoSO <sub>4</sub>	1mM	64	30	39
CuSO <sub>4</sub>	1mM	75	5	5
FeSO <sub>4</sub>	1mM	0	0	0
ZnSO <sub>4</sub>	1mM	46	15	24
EDTA	1mM	97	32	9
EGTA	1mM	99	76	12
PMSF	1mM	100	99	98
Triton X-100	0.1%	70	102	115
Tween - 20	0.1%	101	97	96
Tween - 80	0.1%	93	95	92
SDS	0.1%	74	50	75

## V. 참고 문헌

1. Peckman, E. V., *Aspergillus* Protease, *Biochemistry* 5:321-325, 1951.
2. Crewth, W. C., The effect of pH and cations on the thermal denaturation of trypsin, *Aus. J. Biol.* 6:597-601, 1963.
3. Yoo, J.C, *Biotechnology Letters* 26: 907-909, 2004
4. Kageyama, K., Studies on *Aspergillus oryzae* strain for sake brewing, *J. Ferment. Technol* 33:53-57, 1955.
5. Nunokawa, Y., Y. Namba and S. Watanabe, A study of the rice Koji protease, *J. Soc. Brew.* 53:930-933, 1961.
6. Godfrey, T. and S. West, *Industrial enzymology*, 2nd ed. New York, Macmillan Publishers Inc., p.3.1996
7. Masaaki, Y. S., Kazuo and M., Mitsuo, Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3405, *Agric. Biol. Chem.* 48:1637-1645, 1984.
8. Hartly, B. S., Proteolytic enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* 29:45-72, 1960.
9. Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge and V. V. Deshpande, Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597-635. 1998.
10. 과학기술처, 미생물을 이용한 신물질 창출 방안에 관한 연구, 한국과학기술원 과학기술정책연구평가센터:164-169. 1998.
11. Underkofler, L.A.(Miller, B. M., Litsky, W), *Industrial Microbiology*, New York, McGraw-Hill Book Co., p.128. 1976
121. Aunstrup, K., Proteinases, in *Economic Microbiology*, 5 ed., London, A. H. Rose, Academic press, 1980.
13. Muralidhara, R. N., K. J. scaria, *Leather Science* 29:457-461, 1982.
14. C.Sandhya et al., *process Biochemistry*, 40: 2689-2694, 2005.

15. Daisuke, T.H.Kiya T.Yamamoto, and J.Fukumoto: Agr, Buik. Chem, 31, 330–335,1967.
16. Chang.W.J, and S.Horiuch: J.Biochem, 80,975–979, 1976.
17. Leonard, K. and P.W.Moser: Biochem, Biophys, Fes, Communi, 34, 600–604,1969.
18. Harvey,K. :J.Bateriol, 122, 1117–1125, 1975.
19. Mandakini,p, and N.V.Shastrri :J.ferment. Techol, 59, 403–407, 1981.
20. Masahi, M., E.Majima, and E.Tchishima :Arg.biol.Chem, 46, 2485–2490, 1982.
21. Calvin, J.L. , I. L. Griffith, and A.K.Alexander : Appl.Environ, Microbiol., 47, 75–79. 1984.
22. Murao, S., R.Yamamoto, and M.Arai : Agr.Miol.Chem., 40, 23–25, 1976
23. peter, B., and L.L.Campbell : J.Bacteriol., 120, 1109–1115, 1974.
24. Renko, M., and V.Turk :Eup.J.Appl.Microbiol.Biotech., 11, 1966–171, 1981.
25. Singh, K., and S.M.Martin : Can.J.Biochem., 38, 969–972, 1960.
26. Toshihiro, N., and T.Yamamoto : Agr.Bio.che., 38, 2391–2397, 1974.
27. Tanaka, Y. and S. Omura, Metabolism and products of actinomycetes an introduction, *Actinomycetol* 4:13–14, 1990.
28. Okazaki, T., Rare actinomycetes new breed of actinomycetes, *J. Micro-organisms* 3:453–461, 1987.
29. Horikoshi, K. and T. Akiba, *Alkalophilic Microorganisms, A New Microbial World*, Japan Sci. Soc. Press, 1982.
30. Mala B.Rao, and Vasanti V. Deshpande, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(3), 597–635,1998.
31. Lee, S. D., S. O. Kang and Y. C. Hah, *Catellatospora koreensis* sp. nov., a novel actinomycetes isolated from a gold–mine cave, *Int. J. Syst.*

- Evol. Microbiol.* 50:1103-1111, 2000.
32. Chun, J. and M. Goodfellow, A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences, *Int. J. Syst. Bact.* 45:240-245, 1995.
  33. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-251, 1976.
  34. Laemmli U.K, *Nature* 227, 680-685, 1970.
  35. Lee, J.B., Production and properties of alkaline protease from *Streptomyces sp.* Kon-Kuk University (Master thesis), 1984.

## 감사의 글

내 모든 길을 인도하시고, 나의 삶속에서 나와 동행하신 하나님 아버지께 이 모든 영광을 돌려드립니다.

길고도 짧은 2년의 시간이 지나고, 졸업을 앞두고 감사한 마음과 함께 고마운 얼굴들이 떠오릅니다. 30이라는 늦은 나이에 다시 공부를 할 수 있을까 염려 반, 고민 반이었던 저를 많은 사랑과 관심으로 지도해 주신 유진철 지도교수님께 심심한 감사를 올려드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 논문 심사를 통해 많은 조언과 사랑을 보내주신 고옥현 교수님, 김성준 교수님께도 감사의 말씀 올려드립니다.

처음 제가 실험실에 들어와서 많이 힘들어하고 적응하지 못할 때, 조언과 위로를 아끼지 않으시고 섬세하게 살펴주신 광주대학교 이효정 교수님 너무나 감사드립니다. 물신양면(?)으로 도와주신 조승식 선생님, 실험실 잡무를 도맡아 하면서도 불평한마디 없는(?) 박성주, 실험실 막내 김광식, 친절하고 자상한 제이와 수리아, 처음부터 함께했던 푸념, 그리고 지금은 군대에 있는 하정완과 베트남에 있는 빅..

여러분들이 함께 있었기에 제가 여기까지 올 수 있었던 것 같습니다.

그리고 저를 위해 항상 기도해주며 사랑으로 섬겨준 frontier 요회 식구들(김순종, 윤믿음, 조미림, 안상태, 기경희 목사님)에게도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 저희 가족들에게 너무나 감사합니다.

장래진로를 앞에 두고 방황하는 저를 이곳으로 인도해 준 형부와 언니 너무 고맙고, 실험실에서 늦게 다니느라 집안일 안 해도 참아준 대근이, 혼자 늦게까지 실험하고 있으면 오뎅과 김밥을 날라다주며 섬겨준 미라와 제부 고마워요. 그리고 늦은 나이 다시 공부한다고 했을 때도 반대하지 않으시고, 저를 끝까지 믿고 기다려주신 엄마, 아빠 너무나 감사하고 사랑합니다.

2년이라는 시간이 너무나 멀게만 느껴졌었는데, 막상 지나고 보니 화살같이 빨리 지나가는 것이 시간이구나 라는 것을 새삼 느끼게 됩니다. 힘든 시간 속에서도 그 때

그 때 항상 최선을 다했다고 생각했지만, 돌아서고 나면 항상 미련이 남는 것이 인간의 마음 인 것 같습니다. 2002 한·일 월드컵 때 한국 대표 팀을 이끌며 4강 신화를 이루어낸 히딩크 감독의 말이 떠오릅니다. “나는 아직도 배가 고프다”. 무슨 일을 성취했다고 생각했을 때, 자만하기보다 또다시 무언가를 위해 준비하는 사람의 모습은 참으로 아름답다는 생각이 들었습니다. 저 역시 졸업이라는 이 두 글자가 끝이 아닌 새로운 도전을 위한 도약으로 여기고, 어느 곳에서 무엇을 하든지 최선을 다하며 도전하는 그런 아름다운 사람이 되고 싶습니다.

2008년을 보내는 겨울 문턱에서...

