

호알카리성 미생물의 산업적 이용



한국과학기술원 유전공학센터 **고영희**

대부분의 생물은 온화한 환경조건 즉 중성부근의 pH, 30~37°C, 1기압하에서 적당한 농도의 영양과 염류를 함유한 환경속에서 생활을 영위하고 있으나 하등생물인 미생물 중에는 특수환경 즉 강알칼리성 또는 강 산성 pH, 고온, 고압하에서 생육하며 고농도의 염을 요구하는 것이 있다. 이러한 특수환경 미생물은 자신의 환경조건에 적응할 수 있도록 생체 system을 구성하기 위하여 독특한 효소나 물질을 생성하므로 이를 산업적으로 유용하게 이용할 수 있다. 여러가지 특수환경 미생물 중 여기서는 호알칼리성 미생물의 산업적 이용면을 간단히 기술하고자 한다.

호알칼리성(alkaliphilic) 미생물과 알카리내성(alkaline tolerant) 미생물은 구별되어야 하는데 전자는 pH 9~11에서 왕성히 생육하나 중성 이하에서는 생육하지 않는 것이고 후자는 중성부근에서 최적생육을 보이나 알카리성에서도 생육하는 것이다. 호알칼리성 세균은 1934년 Vedder가 Na_2CO_3 를 첨가한 배지에서 생육하는 *Bacillus alkalophilus*를 최초로 보고하였으며 1959년 Kushner와 Lisson은 *B. cereus*을 알카리성 배지에 반복 배양하여 pH 10.3으로 생육 pH는 변화하였음을 보고하였고 1962년 Takahara등은 인디고나무잎에서 호알칼리성 *B. alkaliphilus*를 분리하였는데 최적pH가 10~11.5이었다. 호알칼리성 세균에 대하여 가장 깊이있게 많은 연구를 수행한 사람은 Horikoshi이며 그의 group에 의하여 산업화된 효소가 상당히 많이 알려지고 있다. 그는 1968년부터 본격적인 연구를 시작하여 많은 특허를 취득하였으며 최근에는 호알칼리성 특유한 성상을 분자생물학적 측면에서 많은 연구를 집중하고 있다.

호알칼리성 미생물 중에서 주로 *Bacillus*속 세균이 대부분을 차지할 정도로 많이 분리되어 있으나

이외에도 *Streptomyces*속, *Micrococcus*속, *Corynebacterium*속, *Pseudomonas*속, *Flavobacterium*속, *Achromobacter*속 등의 세균이 분리, 보고되었으며 최근에는 알카리내성 곰팡이나 효모등도 보고되고 있다. 호알칼리성의 특유한 성질을 갖는 미생물을 자연환경에서 계속 탐색한다면 온화한(moderate) 조건에서는 얻을 수 없는 새로운 효소나 유익한 새로운 생리활성물질을 분리할 수 있을 것으로 보인다.

호알칼리성 세균의 분리

분리하고자 하는 목적에 따라 배지조성을 달리 할 수 있으나 배지의 pH는 반드시 알카리성이어야 하며 Na_2CO_3 , NaHCO_3 , K_2CO_3 , Na_3PO_4 , Na_2BO_3 등으로 pH 9.5~10.5로 조정한다. 통상의 미생물 분리용 배지를 멸균한 후 별도로 멸균한 Na_2CO_3 또는 NaHCO_3 을 최종농도 1%가 되도록 첨가하면 된다. 분리방법도 통상의 미생물 분리법과 동일하다. 즉 소량의 토양이나 분뇨를 멸균수 1ml에 현탁 희석시키고 미리 준비하여둔 알카리성 세균분리용 평판배지에 현탁액 1~2방울을 덜어서 37°C에서 수일간 배양한 뒤 나타나는 colony를 사면배지에 옮겨 심고 실온에 보존하면서 목적에 따라 screening 작업을 진행할 수 있다. 알카리성 protease 생산균주를 분리하기 위해서는 탄소원으로 glucose 1% 첨가한 알카리성 평판배지에 casein을 1% 수준으로 첨가하고 분리를 행하면 수일 후 single colony가 나타나게 되고 10% trichloroacetic acid 용액을 평판에 부어주면 colony 주변에 투명대를 형성한 것을 선발하면 된다. Amylase의 경우는 탄소원으로 가용성 전분을 1% 첨가한 배지에서 성장한 colony 주위를 I_2 용액으로 활성유무를 판단할 수 있고 pectinase는

탄소원으로 pectin 1% 첨가한 액체배지에서 균을 성장시키고 탁도 감소를 보고 분리할 수 있게 된다.

알카리성 효소

지금까지 알려진 알카리성 효소는 protease, amylase, cyclodextrin glycosyltransferase, pectinase, β -1,3-glucanase, xylanase, cellulase, lipase, catalase, pullulanase, DNase, RNase, alginate lyase, uricase 등이 있으며 상업적으로 생산되고 있는 경우가 많다.

(1) Protease

알카리성 protease로서 가장 많이 연구되어 있는 것은 *Bacillus subtilis*가 생산하는 subtilisin이라는 효소인데 이것은 1965년 Matsubara 등에 의하여 보고된 최초의 알카리성 protease이다. 이 효소는 최적 pH범위가 9~11이고 등전점이 pH 9와 11 사이에 있으며 EDTA와 같은 금속 chelating agent나 *p*-chloromercuribenzoate와 같은 thiol agent에 의한 저해를 받지 않으나 serine 말단과 작용하는 diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)에 강한 저해작용을 받기 때문에 serine residue를 갖고 있음을 알 수 있다. 그러나 이 효소의 생산균주는 중성세균이다.

호알카리성 세균에 의한 알카리성 protease는 1971년 Horikoshi 등이 최초로 보고하였고 이어 1972년 Aunstrup 등이 보고하였다. Horikoshi 등은 pH 10의 알카리성 배지에서 자란 400여 균주중 *Bacillus* sp. No. 221을 선발하고 효소를 정제하였다. 이 효소는 비활성이 18,000 unit/mg이고 최적 pH는 11.5~12이며 내열성이 높아 60°C, 10분간 안정하였고 5 mM Ca⁺⁺ 첨가로 내열성이 증가하였다.

알카리성 protease는 주로 세제 및 피혁공업에 널리 이용된다. 현재 미국, 일본, 유럽 등지의 여러 나라에서 상업생산되고 있다. 세제공업에 사용되는 알카리성 protease가 갖추어야 할 조건은 1) 넓은 pH작용 범위, 2) 강한 알카리성에서 안정성, 3) dodecylbenzene sulfonate (DBS)나 sodium lauryl sulfate (SDS) 등과 같은 세제에서 높은 효소활성 및 안정성, 4) 첨가제에 대한 안정

성, 5) 넓은 작용 온도범위, 6) 용해성, 7) 보존성 등이 좋아야 한다.

십수년 전부터 세제에 첨가할 목적으로 호알카리성 세균으로부터 알카리성 protease를 상업적으로 생산하기 위한 연구가 일본을 비롯한 유럽 국가들에서 시도되었으나 그 당시는 세제에 첨가하는 단백 분해효소에 대하여 있을지도 모르는 allergie반응 때문에 효소세제의 사용이 기피되었다. 그러나 수년 전부터 상황은 달라졌다. 많은 국가들에서 석유화학물로 이루어진 세제의 사용을 억제하였고, 또한 알카리성 protease가 allergie 반응을 일으키지 않음을 알고는 점차 사용량이 증가하고 있다. 모든 알카리성 protease는 PMSF (phenylmethyl sulphonyl fluoride)에 의하여 활성을 소실하므로 이 단백질의 활성부위의 중앙에 serine으로 되어 있음을 알 수 있다.

알카리성 protease의 세탁효과를 알아보기 위하여 Table 1과 같은 조성으로 실험하며 Table 2 및 Table 3과 같은 기본적인 세제조성을 이용하며 작은 형검조각을 혈청, 우유, carbon black 등으로 더럽게 한 후 효소를 첨가한 세제와 첨가하지 않은 세제에 세탁한 다음 행구고, 말리고, 다림질

Table 1. Composition of Basic Detergent(Citrate Based)

Component	%by wt.
Linear sodium alkylbenzene sulfonate(100%)	10.00
Nonyl phenol ethoxylate(10 EO)	3.00
Sodium soap	3.00
CM cellulose, sodium salt	1.00
Na ₄ EDTA	0.18
Sodium citrate, dihydrate	19.10
Sodium perborate, tetrahydrate	25.00
Sodium metasilicate	1.00
Sodium sulfate plus water, rest to 100.00%	
pH of solution (5 g/l): 9.8.	

Table 2. Conditions for Laboratory Washing Test

Apparatus	Lauder-0-meter
Volume of suds	300 ml
Washing time	33 min
Temperature	25-90 °C
Detergent concentration	5 g/l
Fabric/suds ratio	1 g/100 ml
Hardness of water	10 ° German hardness

Table 3. Composition of Basic Detergent (Phosphate Based)

Component	%by wt.
Linear sodium alkylbenzene sulfonate(100%)	11.00
Nonyl phenol ethoxylate (10 EO)	2.50
Sodium soap	3.00
CM-cellulose, sodium salt	1.00
Na ₄ EDTA	0.18
Sodium tripolyphosphate	38.00
Sodium perborate, tetrahydrate	25.00
Sodium silicate, alkaline	7.00
Sodium sulfate plus water, rest to 100.00%	

pH of solution (5 g/l): 9.8.

하고서 두 가지 세탁의 차이 (ΔR)를 구하면 된다.

알카리성 protease는 세제외에 피혁공업에서도 이용된다. 原皮를 脫毛하기 위해서 통상 포화 Ca(OH)₂와 Na₂S의 혼합액으로 처리하나 이 공정은 비경제적이며 심한 공해를 유발하기 때문에 脫毛時 효소를 이용한 공정이 유리하다. 효소처리에 의한 시도가 과거에도 수차례 시도되었으나 강한 알카리성 조건에서 반응이 이루어져야 하기 때문에 실패를 하였다. 原皮의 脫毛는 반드시 강한 알카리성 조건을 유지해야 하는 것은 다음 공정을 위하여 原皮가 swelling되어야 하고 saponification에 의하여 脂肪이 제거되어야 하기 때문인데 이때의 pH가 12 이상으로서 여기에 안정하고 강한 작용을 나타내는 효소가 필요한 것이다. Table 4는 효소처리에 의하여 탈모가 가능하고 오염을 일으키는 Na₂S와 대체될 수 있음을 보여주고 있다. 탈모효율(Unhairing efficiency)는 다음과 같이

시험한다. 소굽에 절인 암소원피(cowhide)를 20×4 cm 조각내어 24시간 물에 담갔다가 지방층과 肉質을 제거하고 0.5~5 unit/l 효소용액 400 ml에 담근다. 24시간 30°C에서 효소반응을 시킨 다음 플라스틱유리로 脫毛한다. 탈모효율은 1) 털 전체가 쉽게 탈모되는 것, 2) 대부분의 털은 제거되나 간혹 몇군데 남아있는 것, 3) 제거되지 않는 것으로 분류한다.

(2) Amylase

알카리성 amylase에 관한 연구는 1971년 Horikoshi등에 의하여 최초로 보고되었고 이어서

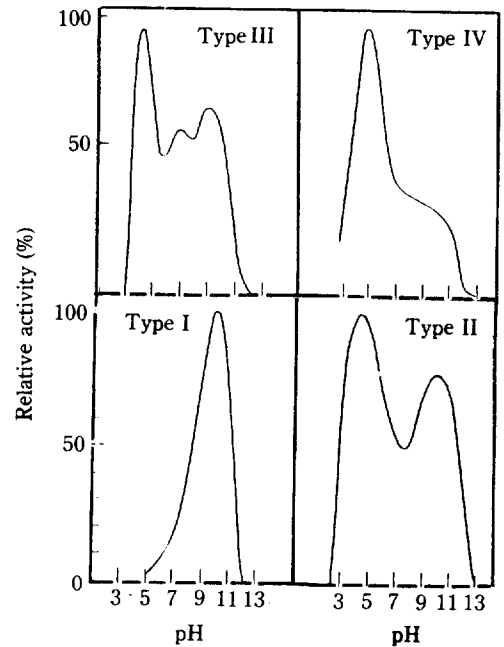


Fig 1. Four types of pH-activity curves of alkaline amylases of alkalophilic *Bacillus* strains.

Table 4. Laboratory Experimental with Proteases from Alkalophilic *Bacillus* Strains

	Enzyme ^a								
	Control	Subt. C.			NUE 1		TB 5		VB 12
Units/l	0	0.5	5	0.5	5	0.5	5	0.5	5
Initial pH	11.9	11.8	11.8	11.9	11.9	11.9	11.8	12.0	11.9
Final pH	11.9	11.8	11.7	11.8	11.8	11.8	11.8	11.9	11.8
Unhairing efficiency ^b	3	3	3	1	1	2	2	3	1

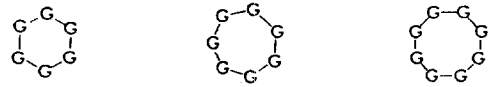
^aSubt. C., subtilisin Carlsberg; NUF 1, NOVO Enzyme No. 1; TB5, VB12, alkaline proteases.

^bSee text.

1972년 Boyer 등이 *Bacillus* sp. NRRL B-3881 을 보고하였다. 알카리성 amylase는 그들의 pH 활성영역에 따라 Fig. 1과 같이 4 group으로 나눈다. Type I은 pH 10.5에 하나의 peak가 있고 II는 pH 4~4.5와 9.0~10.0에서 2개의 peak, III은 산성, 중성, 알카리성의 3개의 peak, IV는 pH 4의 peak와 pH의 shoulder가 있다. 이와같이 여러가지의 peak를 갖는것은 이들 효소에 여러 종류의 성분을 갖고 있음을 뜻한다. 알카리성 amylase는 전분을 분해하여 다음에 기술하는 cyclodextrin제조와 직접적인 연관을 갖고 있다.

(3) Cyclodextrin Glycosyltransferase(CGTase)

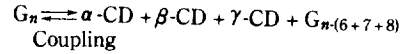
CGTase[EC 2. 4. 1. 19]는 전분을 분해하여 포도당이 6~8개 단위로 α -1,4 결합으로 환상을 하고 있는 cyclodextrin을 생성케하는 효소이다. 포도당이 6, 7, 8개의 수에 따라서 α , β , γ -cyclodextrin이라 하는데 용해도는 $\gamma > \alpha > \beta$



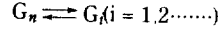
α -Cyclodextrin β -Cyclodextrin γ -Cyclodextrin

G, α -glucose; --, α -1,4-linkage.

Cyclization



Coupling



Disproportionation

Fig. 2. Reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase. G, α -glucose unit; CD, cyclodextrin; n, i , number of G unit.

순이다. 가격은 β 에 비해 α , γ 가 각각 10배, 100배에 달한다. Cyclodextrin(CD)은 Fig. 2와 같은 환상으로 되어 있으므로 그 구조상 휘발성 물질의 불휘발화, 산화·광분해 물질의 안정화, 물리·화학적 성질의 변화, 서서히 물질을 방출시키는

Table 5. Industrial Application of β -CD

Use	Guest compounds and end products
Foods	
1) Emulsification	Eggless mayonnaise, seasoning oil, whipping cream, etc.
2) Increase of foaming power	Egg white (freeze-dry), hotcake-mix, cake-mix, etc.
3) Stabilization of flavors and seasonings	Chewing gum flavor, biscuit flavor, powdered seasoning, instant noodles, seasoning paste, etc.
4) Taste masking	Meat paste
Cosmetics and toiletries	
1) Color masking and control	Fluorescein, bath agents
2) Stabilization of fragrances	Menthol
3) Stabilization	Chalcone, dihydrochalcone (toothpaste)
Pharmaceuticals	
1) Increase of solubility	Prostaglandin, phenobarbital, chloramphenicol
2) Taste masking	Prostaglandin
3) Powdering (nonvolatile)	Nitroglycerin, clofibrate
4) Stabilization (UV, thermal)	Prostaglandin, vitamins
5) Decrease of irritation	Cu-alcanolamine complex
Pesticides	
1) Stabilization (UV, thermal)	Pyrethrins, pyrethroids, isoprenoid
2) Powdering (nonvolatile)	DDVP and other phosphorous pesticides
Plastics	
Stabilization of colors and flavors	Colors, flavors
Others	Adhesives

성질에 의한 식품·의약품·화장품에의 도입과 농약 및 비료에의 응용등을 들 수 있다. Table 5는 β -CD의 산업적 이용면을 나타낸 것이다. CD 生産을 위하여 많은 사람들에 의하여 시도되었는데 1969년 Corn Products International Co.은 *Bacillus macerance* CGTase를 이용하여 β -CD를 생산하였고 곧이어 일본의 Teigin社도 pilot plant로 β -CD를 생산하였으나 *B. macerans*의 CGTase가 효소생산이 어려워 공업적 이용에 적합치 못하였고, 전분으로부터 CD 생산 수율이 20-30%로 낮았고, 전환율을 올리기 위하여 유독한 trichloroethylene, bromobenzene등의 용제를 사용하여야 하는 문제점이 있었다. 이러한 유독한 용매는 공정자체가 비경제적이고 유독하여 산업화에 문제가 많았다. Horikoshi등은 호알카리성 세균으로부터 CGTase 생산 미생물을 탐색하기 시작하여 *Bacillus* No. 38-2를 선발하였는데 이것은 기존의 다른 효소보다도 효율이 좋았으며 더우기 CD를 침전시킬 때 유독한 용매를 전혀 사용하지 않는다는 점이다. Horikoshi등은 이 균주를 이용하여 日本食品化工(株)와 1976년부터 용매를 사용하지 않는 공정으로 산업화하였다.

1984년 부터는 CD 합성효소인 CGTase의 cloning에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

(4) Pectinase

지금까지 알려진 pectinase의 대부분은 최적 pH가 산성측에 있으며 알카리성은 거의 알려져 있지 않다. Horikoshi등은 토양으로부터 분리한 *Bacillus* No. P-4-N은 pectin 함유 알카리성 배지에서 생육시켜 알카리 pectinase를 분리 정제하여 특성을 조사한 바 있으나 응용면에는 연구되어 있지 않다. 麻의 精鍊등에 이용될 가능성이 있을 것이다.

(5) Cellulase

산업적으로 생산되는 대부분의 cellulase는 中溫性 곰팡이에 의한 것이고 pH 4~5, 40~50°C가 최적조건이다. 최근에는 세균성의 고온성 cellulase가 발견되고 있지만 알카리성에서 작용하는 것은 없다. 1972년 Horikoshi 등이 alkaline cellulase를 찾았지만 산업적으로 생산되지는 못하였다. 분뇨속에 섞여 있는 cellulose性 물질을 처리하기 위해서는 효소는 alkali性 측에서 작용해야

한다. 분뇨에서 다량의 ammonia가 발생되어 pH 값이 통상 8~9인데 pH 8에서 안정한 것으로 *Aeromonas* sp. ATCC 31085가 발견되어 있을 뿐이다. alkaline cellulase의 경우는 산업적 이용면 보다는 위와같은 분뇨의 효율적 처리를 위한 환경적인 면에서 추구하여야 할 것이다.

(6) Catalase

대부분의 미생물에 의해 생성되는 catalase는 細胞內 효소이나 Kurono등에 의한 *Bacillus* sp. Ku-1은 細胞外 효소를 분비하였다. 열에 안정된 것으로 다량 만들었으나 용도개발이 뒤따라야 한다.

(7) DNase

DNA의 -G-G-결합을 절단하는 효소가 균체외로 다량 분비된다. 열에 강하고 작용 pH가 9이므로 종래의 핵산 분해효소와는 상당히 다른 면으로 추구해 볼 수 있다.

(8) Polyamine oxidase

알카리성 배지에서 분리한 내알카리성 곰팡이인 *Penicillium* sp. No. PO-2이 菌體外로 polyamine oxidase를 분비하였다. 보통의 polyamine oxidase는 菌體內 효소이지만 이 菌에 의하여 菌體外로 분비되는 최초의 예로서 이 효소는 acetylpolyamine에 작용하는 성질에서 尿中の polyamine의 정량이 가능하기 때문에 최근에는 암진단용으로 사용한다.

抗生物質

호알카리성 세균에 의한 알카리성 효소에 대한 연구가 발표되자 일본의 많은 제약회사들이 호알카리성 세균으로부터 새로운 항생물질을 발견하기 위한 연구가 되었다. 최근에는 희귀 방선균으로부터 새로운 생리활성 물질을 찾기위한 시도의 일부로써 호알카리성 방선균으로부터 항생물질을 찾기위한 노력의 결과로서 일본에서 몇몇 새로운 항생물질이 발견되었으나 아직까지 상업적으로 생산되는 것은 없다. 왜냐하면 이들 항생물질들은 독성이 강하고 물리적 성질이 나쁘기 때문이다. 1980년 Sato등은 알카리성 배지(pH 10.5)에서 자라는 *Paecilomyces lilacinus* No. 1907을 분리하고 생성되는 항생물질을 정제하고 항균 spectrum

을 조사하였다. 이 항생물질은 반드시 pH 9~10, 5의 알칼리성하에서만 생성되는 것이 특징이다.

희귀방선균 중에서 호알칼리성 방선균에 의해 생산되는 생리활성물질에 관한 탐색은 많이 이루어져 있지 않으므로 미지의 새로운 물질을 찾을 가능성이 높다고 하겠다.

기타 산업적 이용

일본에서는 옛날부터 indigo 염료로 단청을 할 때 Na_2CO_3 로 알칼리성으로 하면 염료는 환원되어 변하지 않는 사실을 알고는 1960년 Takahara 등은 호알칼리성 세균 *Bacillus* sp. No. S-8을 indigo를 넣은 배지에서 배양하여 환원된 indigo를 산업적으로 생산하였다.

1982년 Yoshihara 등은 참피나무를 분쇄하고 호알칼리성 *Bacillus* sp. GIR-27을 알칼리성 조건에서 배양하여 양질의 pulp를 얻고 Japanese paper를 생산하였는데 전통적인 soda-ash cooking으로 만들어진 것보다 훨씬 우수하였다.

이외에도 호알칼리성 세균을 이용한 예로서 Rayon 폐기물 처리, Pullulanase, RNase, Alginate lyase, Uricase, Galatalate dehydrogenase 등의 연구 예가 있으나 지면관계로 생략한다.

호알칼리성 미생물의 유전공학

호알칼리성 미생물이 갖고있는 DNA는 새로운 연구재료로서 중성 미생물과는 다른 측면에서 관심의 대상이 될 수 있으나 매우 흥미있는 사실은 호알칼리성 *Bacillus* 유래의 DNA 단편을 대장균에 유전자조작하여 넣었을 때 菌體外로 분비되지 않던 효소가 분비된다는 사실이다. Horikoshi 등은 호알칼리성 *Bacillus* sp. No. 170에서 DNA 단편을 얻고 pMB9과 결합시켜 *E. coli* HB101에 도입, penicillinase 및 alkaliphosphatase를 菌體外로 분비시켰다. 이것은 대장균에서 단백질을 菌體外로 분비시킬 수 있음을 보여주는 연구로서 발효공업에 커다란 기여를 할 수 있으리라 보인다.

앞으로의 연구방향

호알칼리성 미생물의 세계는 중성에 비해 1/10~1/1000에 지나지 않을 뿐더러 연구의 역사가 매우 짧아서 아직까지는 산업적 이용 면에서 크게 발달하지 못하였다. 따라서 중성세계와는 다른 생태학, 생리학의 중요한 연구수단이 될 수 있고 지금까지 추구되지 않았던 새로운 효소, 항생물질, 생리활성물질들의 산업적 이용면을 추구하고 있을 것이다. 또한 이러한 특성을 나타내는 성상을 지배하는 유전자에 대한 연구도 새로운 DNA 자료원으로 활용할 분야가 中性세계에서는 생각지도 못한 것이 많이 있을 가능성이 있으므로 새로운 연구를 시작할 가치가 매우 큰 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Horikoshi, K. and Akiba, T.: Alkaliphilic Microorganism, A New Microbial World, Japan Scientific Societies Press, (1982).
2. Horikoshi, K.: *Agr. Biol. Chem.* **36**, 1407 (1971).
3. Yamamoto, M. and Horikoshi, K.: *Agr. Biol. Chem.* **36**, 1819 (1972).
4. Horikoshi, K. and Atsukawa, Y.: *Biochim. Biophys. Acta.* **384**, 477 (1975).
5. Akiba, T. and Horikoshi, K.: *Agr. Biol. Chem.* **44**, 274 (1980).
6. Nakamura, N. and Horikoshi, K.: *Agr. Biol. Chem.* **40**, 935 (1976).
7. Yamamoto, M. and Horikoshi, K.: *Die Staerke*, **33**, 244 (1981).
8. Davis, R.B. and Abraham, E.P.: *Biochem. J.*, **143**, 115 (1974).
9. Matsushima, K., Mori, I., Ito, N. and Shimata, K.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **54**, 875 (1965).
10. Souza, K.A., Deal, P.H., Mack, H.M. and Turnbull, E.E.: *Appl. Microbiol.*, **28**, 1066 (1974).
11. Aunstrup, K., Outtrup, H., Anderson, O. and Dambmann, C.: *Proceeding of the 4th International Fermentation Symposium*, pp. 299 (1972).