

*Bacillus cereus*에 의한 C형 인지질 분해효소의 생산과 특성 고찰

^{1,3}서 국 화 · ^{1,3}임 용 식 · † ^{2,3}이 종 일
전남대학교, ¹물질·생물화공과, ²응용화학공학부, ³생물공정기술연구소
(접수 : 2003. 12. 26., 게재승인 : 2004. 8. 23.)

Production of a Phospholipase C by *Bacillus cereus* and Its Characterization

Kook-Hwa Seo^{1,3}, Yong-Sik Yim^{1,3}, and Jong Il Rhee^{2,3*}

¹Department of Materials and Biochemical Engineering, ²Faculty of Applied Chemical Engineering,

³BioProcess Technology Lab., Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2003. 12. 26., Accepted : 2004. 8. 23.)

In this work we have cultivated several *B. cereus* strains in a complex LB medium in order to study the production of phospholipase C (PLC), and among them *B. cereus* 318 showed the highest productivity of PLC. Some components, i.e., 5 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 5 g/L peptone, 0.5~1.0 g/L K₂HPO₄, 0.02~0.04 g/L ZnSO₄·7H₂O and 3 g/L NaHCO₃ were found to be optimal for the high production of PLC by *B. cereus* 318. Optimal culture temperature and pH were found to be 30°C and pH 7.5 for the PLC production, respectively. Optimum reaction temperature and pH of the PLC produced by *B. cereus* 11 and 318 were 45°C and pH 4.0, while they were 50°C and pH 7.0 for the PLC by *B. cereus* 559. The PLC produced by *B. cereus* was activated by Mn²⁺, Co²⁺ and dimethyl sulfoxide (DMSO), but its activity was inhibited by Cu²⁺ and partially by glycerol, isopropanol and sodium dodecyl sulfate (SDS).

Key Words : *B. cereus*, characterization, fermentation, phospholipase C (PLC)

서 론

꿀벌과 같은 무척추동물, 뱀의 독성물질, 포유동물 그리고 미생물에 존재하는 인지질 분해효소는 동물이나 식물로부터 얻을 수 있는 인지질 (phospholipids)의 에스테르 결합을 가수분해 시키는 효소이다(1). 인지질 분해효소는 반응특성에 따라 A1, A2, C 및 D형의 4가지로 분류될 수 있다(2, 3). 인지질 분해효소의 반응 특성을 살펴보면 A1형과 A2형은 인지질의 Sn-1과 Sn-2의 위치에서 아실기 부분을 수화시킨다. C형 인지질 분해효소 (PLC)는 인지질의 Sn-3 위치에서 에스테르 결합에 작용하여 인지질을 디아실 글리세롤 (diacylglycerol)과 포스포릴-엔-염기 (phosphoryl-N-염기)로 가수분해하지만 D형 인지질 분해효소는 인지질을 염기와 phosphatidic acid로 가수분해한다. 또한, 인지질 분해효소에 의한 생물화학반응은 어느 반응조건하에서는 아실기 부분의 조성이나 인지질의 머리부분 (head group)을

변경하기 위해 가역적으로 이루어질 수 있다(2, 4, 10).

한편, C형 인지질 분해효소는 *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Pseudomonas* 등과 같은 미생물을 이용하여 생산되는데 단분자, 체외분출형, 아연특이성 효소로써 배양균주에 따라 효소의 기질 특이성이 다르다(5-7). *Bacillus cereus*에 의해 생산된 C형 인지질 분해효소는 아연을 함유하고 있는 28.5 kDa의 분자량을 갖는 단분자형 효소로써 phosphatidylinositol이나 phosphatidylcholine 과 같은 인지질에 비특이적 (nonspecific) 반응을 하는 성질을 가지고 있다(8, 9). 또한, 미생물로부터 얻어지는 C형 인지질 분해효소는 유기인산의 제조, 광학 이성질적으로 순수한 (enantiomerically pure) 디아실 글리세롤 (diacylglycerol, DAG)의 생산 등과 같은 생축매 합성 반응에 사용될 뿐만 아니라 최근에는 유기산업의 탈검 (degumming) 공정에서의 응용 가능성도 제시되고 있다(3, 10-11).

본 연구에서는 산업적으로 그 중요성이 점점 증가하고 있는 C형 인지질 분해효소 (PLC) 를 각종 *B. cereus*를 이용하여 생산하고, 특히 생산된 PLC의 반응 특성, 즉, 최적 pH, 최적 온도 및 금속이온, 유기용매, 계면활성제의 첨가에 따른 PLC 활성 및 안정성 등을 살펴보고자 한다.

* Corresponding Author : BioProcess Technology Lab., Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1847, Fax : +82-62-530-0846

E-mail : jirhee@chonnam.ac.kr

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 PLC를 생산하기 위해 사용된 균주는 독일 그라이프스발트 대학교의 보른슈어 교수가 제공한 *Bacillus cereus* 11, 318, 559와 *B. cereus* ATCC10987 (American Type Culture Collection, USA)이다. 균주의 활성화를 위해 LB agar 배지 (Yeast extract: 5 g/L, Tryptone: 10 g/L, NaCl: 10 g/L)를 사용하였으며 종균배양, 전배양 및 본배양에는 LB 배지를 사용하였다(9). 또한, *B. cereus*를 이용하여 PLC를 생산하는데 배양성분의 영향성을 살펴보기 위해 사용된 기본배지는 5 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 5 g/L peptone, 3 g/L NaHCO₃이다. 배양액은 121°C, 14 psia에서 15분 동안 멸균하여 사용하였다.

발효실험

냉동 보관중인 *B. cereus* 균주는 전배양 하루 전에 LB agar 배지에 도말하여 37°C에서 활성화시켰다. 고체배지에서 얻은 활성화된 colony를 진탕배양기 (Jeiotech Co., Korea)에서 37°C, 180 rpm으로 12시간 종균배양 (배양부피; 5 mL)한 후 1% (v/v)를 전배양 배지 (배양부피; 50 mL)에 접종하였다. 진탕배양 실험은 본배양 배지 100 mL에 전배양액의 1% (v/v)를 접종하여 진탕배양기에서 37°C, 180 rpm으로 배양하였다. 생물반응기 실험을 위해 2.5 L 생물반응기 (KoBiotech Co., Korea)를 사용하였는데 반응기 내의 본배양 배지 (배양부피; 1 L)에 전배양액의 1%를 접종하였다. 반응기의 운전 조건은 37°C, 400 rpm, 통기량 1 vvm으로 하였으며, 발효액의 pH 조절은 3 N NaOH와 3 N HCl을 사용하였다. 생물반응기 내의 각종 공정변수들, 즉, pH, 용존산소 농도, 배기가스 등을 모니터링하기 위해 pH 전극 (pH electrode. METTLER Co., Germany), 용존산소센서 (O₂ sensor. METTLER Co., Germany), O₂/CO₂ 가스 분석기 (LOKAS Co., Korea) 등을 사용하였다. 실시간 모니터링된 자료를 수집하기 위해 데이터 수집보드 (PCI 6024E DAQ board, National instrument Co., USA)를 사용하였으며, LabVIEW ver. 6.1 (National instrument Co., USA)를 이용하여 프로그래밍하였다.

분석방법

배양 중 세포농도는 채취한 시료를 3차 증류수로 1~20배 희석하여 600 nm 파장에서 흡광도 (OD₆₀₀)를 측정하여 나타냈다. 발효액의 상등액 내에 존재하는 PLC의 활성은 p-nitrophenylphosphoryl-choline (p-NPPC)을 기질로 하는 S. Kurioka의 spectrophotometric assay법을 변형하여 사용하였다(12). 즉, p-NPPC는 C형 인지질 분해효소에 의해 p-nitrophenol과 phosphorylcholine으로 분해되며 생성된 p-nitrophenol은 유색반응을 일으킨다. 이러한 반응을 이용하여 시료 (또는 표준 PLC) 90 µl와 100 mM p-NPPC 10 µl (100 mM borax buffer, pH 7.5)를 혼합한 후 microplate reader (Victor 1420, Perkin Elmer, Finland)로 405 nm에서 측정하여 시료중의 PLC의 활성을 측정하였다. 가수분해 후 생성되는 p-nitrophenol의 흡광계수는 반응 pH에 따라 다르기

때문에 본 분석법을 이용하기 위해서는 반응시약의 pH를 일정하게 유지하여야 한다. 본 연구에서 1 unit의 PLC는 반응 조건 (pH 7.5, 실온)에서 1분 동안에 1 mmol의 p-NPPC를 p-nitrophenol과 phosphorylcholine으로 분해하는 효소의 양으로 정의하였다. 또한 *B. cereus*에 의해 생산된 PLC를 정성적으로 분석하기 위해 10-12%의 아크릴아미드를 사용하는 SDS-Page법을 이용하였다.

PLC 특성 실험

생산된 PLC의 최적 온도를 결정하기 위해 30~80°C 범위에서 5°C 간격으로 활성과 안정성을 측정하였다. PLC 용액에 기질을 첨가하기 전에 PLC를 각각의 온도에서 1시간 동안 반응시켜 활성을 측정하였고 또한 12시간 동안 반응시켜 온도에 대한 안정성을 살펴보았다.

PLC의 최적 pH를 조사하기 위해 pH 4.0~8.0 범위에서 pH 1.0 간격으로 PLC의 활성과 안정성을 분석하였다. 각각 다른 pH를 갖는 완충용액 (100 mM)을 이용하여 기질을 준비하고 생산된 PLC도 이 완충용액을 이용하여 실험하고자 하는 pH값으로 조정하였다. 즉, pH 4.0~5.0에서는 citrate buffer, pH 6.0~7.0에서는 sodium phosphate buffer, pH 8.0에서는 borax buffer를 사용하였다. PLC의 pH 안정성은 기질을 첨가하기 전에 40°C에서 12시간 동안 반응한 후 측정하였다.

PLC에 대한 금속 이온의 영향성을 살펴보기위해 PLC 용액과 2, 6, 10 mM의 칼슘, 마그네슘, 아연, 망간, 코발트 그리고 구리 이온 용액을 1 : 1 비율로 혼합하여 40°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 기질을 첨가하여 그 활성을 측정하였다. 그리고 계면활성제와 유기용매의 영향성을 살펴보기위해 PLC 용액에 각각 1% (w/v)의 계면활성제 Triton X-100, sodium dodecyl sulfate (SDS), cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)와 30% (v/v)의 유기용매 glycerol, methanol, isopropanol, acetone, dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 40°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 기질을 첨가하여 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

각종 *B. cereus* 균주에 따른 PLC 생산 특성

미생물의 배양을 통해서 생산되는 PLC는 대부분이 *B. cereus*에 의해서 생산된다(9, 13). 본 연구에서는 여러 종류의 *B. cereus*를 배양하면서 시간에 따른 균체성장, pH 변화 및 PLC 생산량을 측정하여 각 균주에 따른 PLC 생산 특성을 조사하였다. 균주 배양을 위해서 LB 배지를 사용하여 37°C, 180 rpm에서 진탕배양 실험을 하였다. Fig. 1(a)에 각 균주에 따른 균체성장, pH 와 PLC 생산량을 나타내었다. 균체성장은 배양 4시간 이후에 빠른 속도로 이루어졌으며 배양 8~11시간 이후에 최대 균체량을 나타내었다. *B. cereus* 559가 배양 8시간 후에 OD₆₀₀ 값이 9.0을 보이면서 최대 균체량을 보였고, 나머지 균주들도 OD₆₀₀ 값이 7~8.5 이상을 보이면서 비슷한 균체성장 특성을 나타냈다. 배양액의 pH는 배양 초기에 7.3에서 6.7까지 다소 감소하였다가 배양 2시간 이후에는 최고 pH 8.5까지 꾸준히 증가하였다. 이러한 경향은 모든 균

주에서 똑같이 나타났는데, 배양 초기에 균주가 배지를 이용하여 유기산과 이산화탄소를 생산하면서 pH가 저하되고, 배양이 진행되면서 단백질, 아미노산등이 분해되고 음이온을 사용함으로써 암모니아가 생성되어 pH값이 상승되는 것으로 생각된다. PLC의 생산량은 각 균주에 따라 배양 후 5~11시간에 최대값을 나타냈다. 특히, PLC를 생산하는 균주로 지금까지 널리 알려진 *B. cereus* ATCC10987은 배양 11시간 후에 30 units/mL의 최대 생산량을 보였고, 가장 높은 균체 성장을 나타냈던 *B. cereus* 559는 배양 5시간 후에 45 units/mL의 최대 생산량을 보였다. 그러나 *B. cereus* 11과 318은 배양 11시간 후와 10시간 후에 각각 80 units/mL와 85 units/mL의 최대 PLC 생산량을 나타냈다. 한편, Fig. 1(b)에 각 *B. cereus*에서 생산된 PLC의 상등액으로부터 얻은 단백질 밴드를 나타냈는데 *B. cereus* 11, 318과 559에서 얻은 상등액에서 28.5 kDa의 위치에서 단백질 밴드를 희미하게나마 확인할 수 있었다. 그러나 *B. cereus* ATCC10987에서 생산된 PLC에서는 28.5 kDa에서 단백질 밴드를 쉽게 확인할 수 없는데 이는 PLC의 양이 소량 생산되었기 때문인 것으로 생각된다.

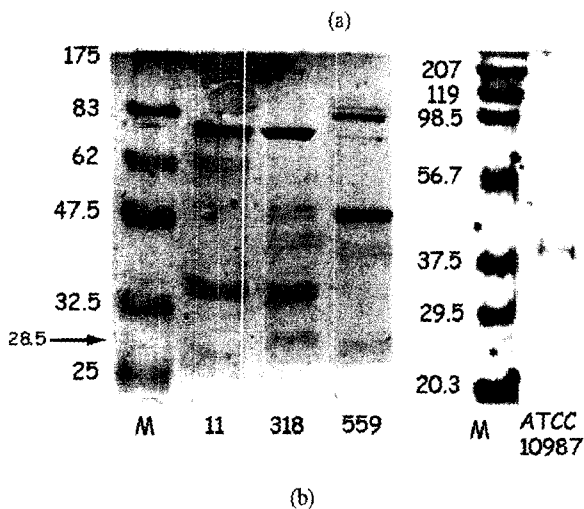
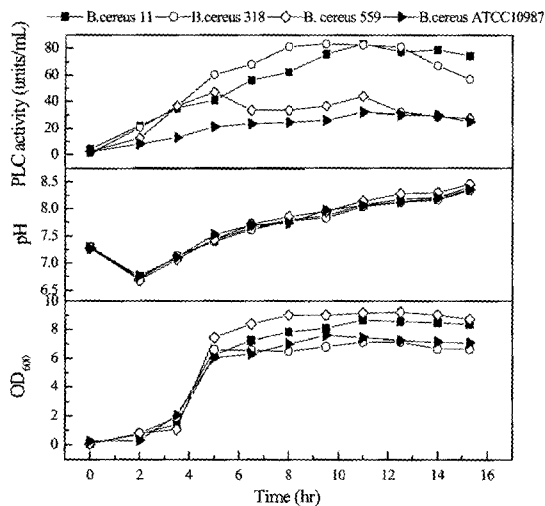


Figure 1. (a) Cell growth, pH change and PLC production by several *B. cereus* strains and (b) Protein bands of culture supernatants of *B. cereus* 11, 318, 559 and *B. cereus* ATCC 10987 by SDS-Page.

배지 성분에 따른 *B. cereus* 318에서 PLC 생산 특성

최대 PLC 생산량을 보인 *B. cereus* 318을 이용하여 미생물 배양에 필요한 주요 배지 성분과 농도에 따른 PLC의 생산 및 균체 성장 특성을 조사하였다.

미생물 성장에서 에너지원 및 세포의 구성요소로 많이 사용되는 탄소원의 종류에 따른 균체 성장과 PLC 생산 특성을 조사하기 위해 5 g/L yeast extract, 5 g/L peptone, 3 g/L NaHCO₃이 포함된 기본 배지에 탄소원인 D-glucose, D-fructose, mannitol, mannose, sucrose, starch를 각각 5 g/L씩 첨가하여 진탕배양 실험을 수행하였다. Table 1에 탄소원의 종류에 따른 최대 균체 성장과 최대 PLC 생산량을 나타냈다. 균체 성장은 탄소원으로 sucrose를 이용한 경우 OD₆₀₀ 값이 6.09로 가장 낮았으며, glucose와 mannose를 이용한 경우 OD₆₀₀ 값이 7.06~7.19로 높게 나타났다. 최대 PLC의 생산량은 균체 성장에 거의 비례하는 것으로 보이며, glucose를 이용한 경우에 116.30 units/mL의 최대값을 보였고, mannose를 이용한 경우에도 106.92 units/mL의 비교적 높은 PLC 생산량을 보였다. 그러나 탄소원으로 mannitol을 이용한 경우에는 34.40 units/mL의 PLC 생산량을 보였고, 균체 성장량이 가장 낮았던 sucrose를 이용한 경우에도 37.65 units/mL의 낮은 PLC 생산량을 보였다. 본 실험을 통해 희분 배양에서 glucose나 mannose 모두 배양액에 첨가하는 탄소원으로 적합하지만, 미생물 배양시 비용의 절감을 위해 본 연구에서는 mannose보다는 glucose를 탄소원으로 이용하였다.

Table 1. Maximal cell mass and PLC production by different C-sources

	D-glucose (5 g/L)	D-fructose (5 g/L)	Mannitol (5 g/L)	Mannose (5 g/L)	Sucrose (5 g/L)	Starch (5 g/L)
Max. cell mass (OD ₆₀₀)	7.06	6.62	6.33	7.19	6.09	6.31
Max. PLC activity (U/mL)	116.39	49.83	34.40	106.92	37.65	65.25

미생물을 구성하는 단백질의 생합성을 위해 필수적으로 배지에 공급되어야 하는 질소원의 종류에 따른 균체 성장과 PLC의 생산 특성을 조사하기 위해 5 g/L glucose, 3 g/L NaHCO₃이 포함된 배지에 질소원으로 5 g/L yeast extract, 5 g/L peptone, 5 g/L tryptone, 5 g/L casein sodium salt, 5 g/L soybean flour, 5 g/L corn steep liquor를 2~3 종류씩 첨가하여 진탕배양 실험을 수행하였다. Table 2에 질소원의 종류에 따른 최대 균체량과 PLC의 최대 생산량을 나타냈다. 탄소원의 종류에 따른 특성을 비교했을 때와는 달리 최대 균체량이 OD₆₀₀ 값 4.0~7.0을 보였는데, 탄소원을 glucose로 고정하여 실험을 수행했음에도 불구하고 이러한 결과가 나온 것으로 보아 질소원이 균체 성장에 크게 영향을 미치는 것으로 생각된다. 질소원으로 yeast extract, peptone, tryptone을 첨가한 경우가 casein sodium salt, soybean flour, corn steep liquor를 첨가한 경우보다 더 높은 균체 성장량을 보였다. PLC의 생산량은 yeast extract와 peptone을 첨가하였을 때 168.83 units/mL의 최대값을 보이며 다른 경우보다 월등히 높은 활성을 보였다. 그러나 yeast extract, peptone, tryptone을 모두

첨가한 경우에는 균체성장은 가장 뛰어났지만 PLC의 생산성은 두 종류의 질소원을 첨가한 것보다 더 감소함을 알 수 있었다. 산업적으로 많이 이용되는 질소원인 casein sodium salt, soybean flour, corn steep liquor을 첨가한 경우에는 비슷한 균체 성장과 생산성을 보이는 것으로 나타났다. 본 실험을 통해 회분 배양에서는 질소원으로 yeast extract와 peptone을 이용하는 것이 균체성장이나 C형 인지질 분해효소의 생산에 효과적이라고 할 수 있다.

Table 2. Maximal cell mass and PLC production by different N-sources

	YE+PT	YE+TR	YE+PT+TR	CS+SO	CS+CL	CS+SO+CL
Max. cell mass (OD ₆₀₀)	6.87	6.76	6.93	4.46	4.14	4.32
Max. PLC activity (U/mL)	168.83	112.38	102.20	105.26	100.17	114.41

YE: Yeast Extract, PT: Peptone, TR: Tryptone, CS: casein sodium salt, SO: soybean flour, CL: corn steep liquor

인산은 미생물의 대사를 위해 필요할 뿐만 아니라 중성 pH 영역에서 완충작용을 하므로 배지의 pH 변화를 최소화하는 역할을 한다(14). 인산의 농도에 따른 C형 인지질 분해효소의 생산 특성을 조사하기 위해 5 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 5 g/L peptone, 3 g/L NaHCO₃, 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.02 g/L MnSO₄ · H₂O, 0.05 g/L FeCl₃ · 6H₂O, 0.05 g/L MgSO₄ · H₂O, 0.02 g/L ZnSO₄ · 7H₂O이 포함된 배지에 각각 0, 0.5, 1, 1.5 g/L의 K₂HPO₄를 첨가하여 진탕배양 실험을 수행하였다. Fig. 2에 인산 농도에 따른 PLC의 생산량을 나타내었다. 배양 후 4시간까지는 40 units/mL의 비슷한 PLC 생산성을 보이다가 그 이후에는 생산속도에 약간의 차이를 보이지만 계속하여 PLC가 생산되었다. 배양 12시간 후에는 각각 0.5 g/L 와 1 g/L의 K₂HPO₄를 첨가한 경우에 최대 100 units/mL의 PLC를 생산하였고, K₂HPO₄를 첨가하지 않은 경우에는 최대 70 units/mL, 1.5 g/L의 K₂HPO₄를 첨가한 경우에는 최대 80 units/mL의 PLC를 생산하였다. 따라서, 본 배양 실험을 통해 회분배양에서는 0.5~1.0 g/L의 K₂HPO₄를 배지에 첨가하는 것이 C형 인지질 분해효소의 생산에 효과적이라고 할 수 있다.

B. cereus 유래 PLC는 아연 특이성 효소로 알려져 있기 때문에 배양배지에 존재하는 아연 이온의 농도에 따른 PLC의 생산 특성을 조사하기 위해 5 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 5 g/L peptone, 3 g/L NaHCO₃, 1 g/L K₂HPO₄, 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.02 g/L MnSO₄ · H₂O, 0.05 g/L FeCl₃ · 6H₂O, 0.05 g/L MgSO₄ · H₂O이 포함된 배지에 ZnSO₄ · 7H₂O를 각각 0, 0.02, 0.04, 0.08 g/L씩 첨가하여 진탕배양 실험을 수행하였다. Fig. 3에 아연 이온의 농도에 따른 PLC의 생산량을 나타내었다. PLC의 생산성은 인산 농도에 따른 실험을 수행했을 때와 비슷하게 배양 후 5시간까지는 45 units/mL로 거의 비슷한 값을 보이다가 그 이후에는 각기 다른 생산 속도로 증가하였다. 배양 12시간 후에 각각 0.02 g/L와 0.04 g/L의 ZnSO₄ · 7H₂O를 첨가한 경우에 최대 100 units/mL의 PLC가

생산되었고, ZnSO₄ · 7H₂O를 첨가하지 않았을 경우와 0.08 g/L의 ZnSO₄ · 7H₂O를 첨가하였을 경우에는 약 70 units/mL의 PLC 생산량을 보였다. 본 배양 실험을 통해 회분배양에서는 0.02~0.04 g/L의 ZnSO₄ · 7H₂O를 첨가하는 것이 PLC 생산에 효과적이라고 생각된다. 인산의 경우와 마찬가지로 배양액에 아연 성분을 전혀 첨가하지 않았을 경우뿐만 아니라, 다량의 아연 성분이 첨가 되었을 때에도 PLC 생산량이 감소함을 알 수 있었다.

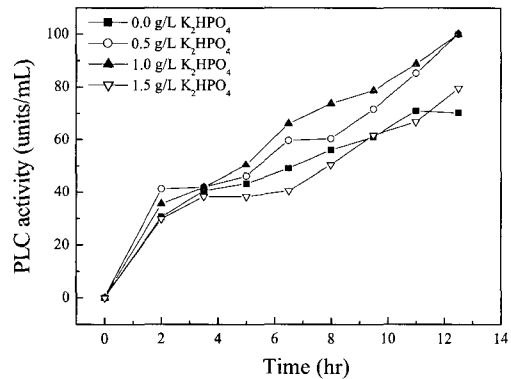


Figure 2. Effects of phosphate ions added to culture medium on PLC production.

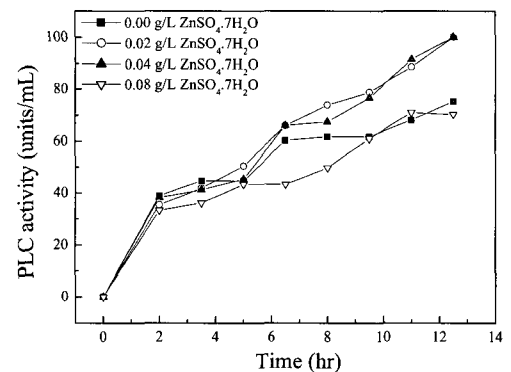


Figure 3. Effects of zinc ions added to culture medium on PLC production.

배양 온도에 따른 *B. cereus* 318에서 PLC 생산 특성

배양 온도에 따른 *B. cereus* 318의 PLC 생산특성을 살펴 보기 위해 5 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 5 g/L peptone, 3 g/L NaHCO₃를 배지로 하여 30, 35, 40℃에서 진탕배양 실험을 수행하였다. Fig. 4에 온도에 따른 PLC의 생산량을 나타내었는데 온도에 따라 최대 PLC 생산량은 80~95 units/mL 정도였으며, 시간 변화에 따른 PLC 생산특성이 온도에 따라 다른 경향을 보였다. 30℃ 배양에서는 배양 후 8 시간까지 PLC 생산량이 25 units/mL로 거의 일정하였다가 그 이후 빠른 속도로 증가하면서 배양 14시간 후에는 최대 95 units/mL에 도달하였다. 35℃ 배양에서도 배양 후 6시간 까지 PLC 생산량이 25 units/mL로 일정하였다가 그 이후에 꾸준히 증가하여 배양 14시간 후에는 최대 80 units/mL의 생산량을 나타냈으며, 40℃ 배양에서는 배양 시작 직후부터

PLC 생산량이 꾸준히 증가하여 배양 9시간 후에는 80 units/mL의 최대 생산량을 보였다.

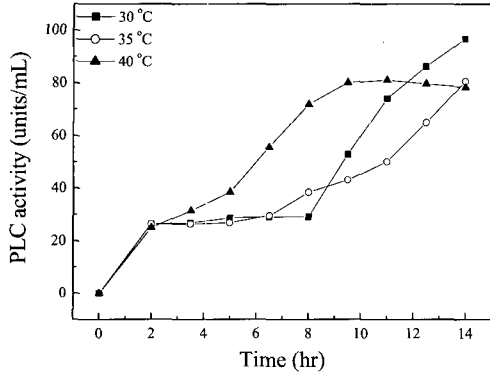


Figure 4. Effects of culture temperature on PLC production.

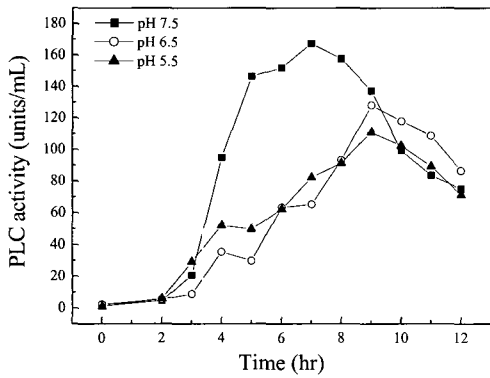


Figure 5. Effects of culture pH on PLC production.

배양액의 pH값에 따른 B. cereus 318에서 PLC 생산 특성

배양액의 pH값에 따른 B. cereus 318의 PLC 생산특성을 살펴보기 위해 5 g/L glucose, 5g/L yeast extract, 5 g/L peptone, 3 g/L NaHCO₃를 배지로 하고 배양액의 pH를 5.5, 6.5, 7.5로 조절하여 생물 반응기 실험을 수행하였다. Fig. 5에 배양액의 pH에 따른 PLC 생산량을 나타내었다. 배양액의 pH에 따른 PLC의 최대 생산량은 110~165 units/mL 정도였다. 배양액의 pH를 5.5와 6.5로 조절한 경우에는 배양 9시간 후에 최대 PLC 생산량을 보였으며 그 이후에는 활성이 감소했고, 배양액의 pH를 7.5로 조절한 경우에는 배양 7시간 후에 165 units/mL의 PLC를 생산하고 그 이후에는 다른 경우와 마찬가지로 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 그 이유는 B. cereus 배양에 의해 생산된 PLC는 중성 pH영역에서 활성과 안정성이 산성 pH영역에서보다 매우 낮으므로, 최대 PLC가 생산된 후 배양액내에서 그 활성이 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다. pH 6.5와 pH 5.5의 경우에도 유사한 경향을 나타냈는데 pH 7.5와 비교해서 활성 감소의 효과가 더 낮았다. 또한, 생물반응기를 이용하여 배양실험을 수행하였을 때 가 진탕배양 실험을 수행했을 때보다 최대 PLC 생산량에 도달하는 시간에 빨리 도달함을 볼 수 있었다.

온도에 따른 PLC의 활성 변화

각종 B. cereus 에 의해 생산된 PLC의 온도에 따른 PLC의 활성 (activity)과 안정성 (stability)을 조사하였다. Fig. 6에서 B. cereus 11에서 생산된 PLC는 45°C에서 최대 활성을, 30°C에서 최대 안정성을 보였으며, B. cereus 318에서 생산된 PLC는 최대 활성과 안정성이 모두 45°C에서 얻어졌다. B. cereus 11과 318에서 생산된 효소는 온도에 따른 PLC 활성이 큰 변화를 보이지는 않았지만, 최대 활성을 100%로 하였을 때 45°C보다 높은 온도에서는 70%까지 활성이 감소하였다. B. cereus 559에서 생산된 PLC는 50°C에서 최대 활성과 안정성을 보였으며, 최대 활성을 100%로 하였을 때 65°C 이상에서는 활성이 50% 이하로 급격히 감소하였지만, 다른 B. cereus에서 생산된 PLC와는 달리 60°C까지도 90%가 넘는 높은 PLC 활성을 유지했다.

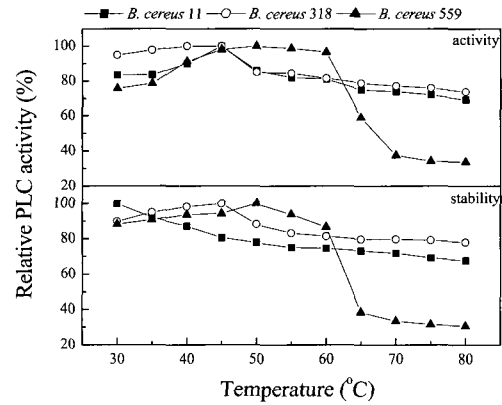


Figure 6. Effects of incubation temperature on PLC activity and stability.

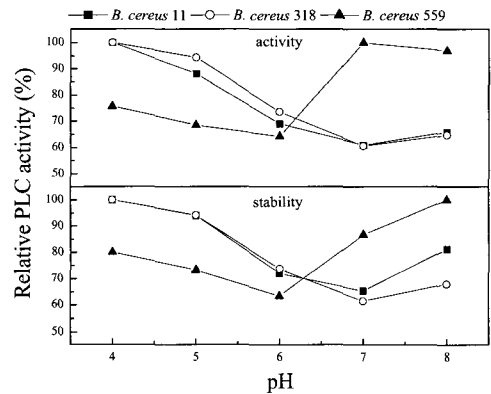


Figure 7. Effects of pH on PLC activity and stability.

pH에 따른 PLC의 활성 변화

B. cereus에 의해 생산된 PLC의 pH에 따른 활성 (activity)과 안정성 (stability)을 조사하였다. Fig. 7에 B. cereus 11, 318, 559에 의해 생산된 PLC의 pH에 따른 활성과 안정성을 나타냈는데, B. cereus 11과 318에서 생산된 C형 인지질 분해효소는 pH 4.0에서 최대 활성과 안정성을 보였다. 그러나 최대 활성을 나타낸 pH 4.0에서의 PLC 활성값을 100%로 하였을 때 최저 활성을 나타낸 pH 7.0에서는 65%까지 PLC 활성이 감소하였다. 이와는 매우 대조적으로 B. cereus 559에

의해서 생산된 PLC는 pH 6.0에서 65%의 최저 PLC 활성과 안정성을 보였으며, pH 7.0에서 최대 활성 (100%)을 보였으며 최대 PLC 안정성은 pH 8.0에서 얻었다. *B. cereus* 11과 318에서 생산된 PLC가 최대 활성과 안정성을 보인 pH 4.0에서 *B. cereus* 559에 의해 생산된 PLC는 약 80%의 PLC 활성과 안정성을 나타냈다.

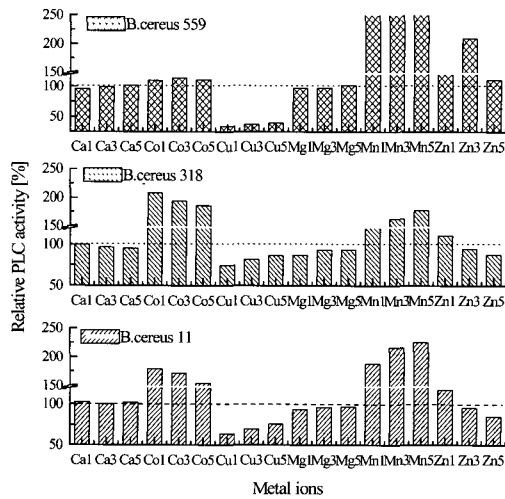


Figure 8. Effects of metal ions on the PLC activity.

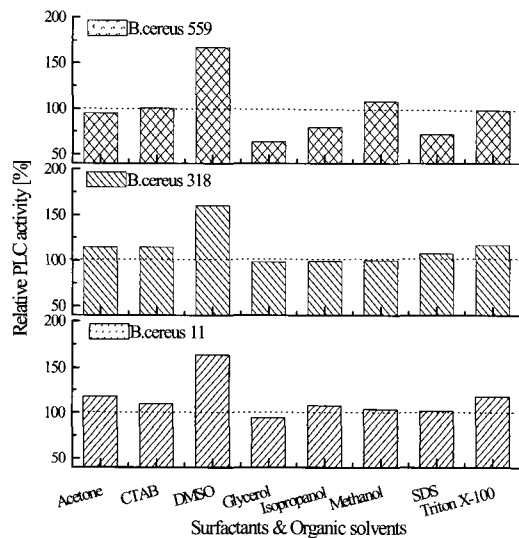


Figure 9. Effects of surfactants and organic solvents on the PLC activity.

금속이온에 의한 PLC의 활성 변화

PLC 효소 용액에 1, 3, 5 mM의 금속이온을 첨가하여 40 °C에서 3시간 동안 반응시킨 후 PLC의 활성을 측정하여 금속이온에 따른 PLC의 활성 변화를 조사하였다. Fig. 8에서 *B. cereus* 11과 318에서 생산된 PLC는 망간 이온과 코발트 이온이 첨가되었을 때 활성이 증가하는 것으로 나타났는데, 특히 5 mM의 망간 이온이 첨가 되었을 때 *B. cereus* 11에서 생산된 PLC의 활성은 2배 이상 증가했고, 1 mM의 코발트 이온이 첨가되었을 때 *B. cereus* 318에서 생산된 PLC의 활성

도 2배 이상 증가하였다. *B. cereus* 559에서 생산된 PLC는 3 mM의 아연 이온이 첨가 되었을 때 효소의 활성이 2배 이상 증가하였고, 1 mM의 망간 이온이 첨가 되었을 때는 4배 이상 활성이 증가하였다. 이와 같이 망간이온이나 코발트 이온의 첨가에 의해 PLC의 활성이 증가하였으나 구리 이온의 첨가에 의해서는 PLC의 활성이 감소하였다. 특히 *B. cereus* 559에서 생산된 PLC는 금속이온을 첨가하지 않았을 경우의 활성을 100%로 하였을 때, 구리 이온의 첨가에 의해서 활성이 35%까지 감소하였다.

유기용매와 계면활성제에 의한 PLC의 활성 변화

C형 인지질 분해효소 용액에 30% (v/v)의 유기용매와 1% (w/v)의 계면활성제를 첨가하여 40 °C에서 1시간 동안 반응시킨 후 PLC의 활성을 측정하여 유기용매와 계면활성제의 첨가에 따른 효소의 활성 변화를 Fig. 9에 나타냈다. 세 종류의 *B. cereus* 11, 318, 559에서 생산된 PLC는 DMSO의 첨가에 의해서만 활성이 50% 이상 증가하였다. 그러나 *B. cereus* 559에서 생산된 PLC는 glycerol, isopropanol 과 SDS의 첨가에 의해서는 20% 이상 감소하였다.

요 약

본 연구에서는 C형 인지질 분해효소 (PLC)를 생산하는 것으로 알려진 각종 *B. cereus* (*B. cereus* 11, 318, 559 와 *B. cereus* ATCC10987)의 배양을 통해 미생물의 성장과 PLC의 생산 특성을 조사하였다. 특히, LB 배지에서 최대 PLC 생산 (85 units/mL) 특성을 보인 *B. cereus* 318를 이용하여 균체성장 및 PLC 생산에 적합한 배양 배지를 조사하였다. 탄소원으로는 glucose, 질소원으로는 yeast extract와 peptone, 인산과 아연의 농도는 각각 0.5~1 g/L과 0.02~0.04 g/L이 PLC의 생산을 최대로 할 수 있는 적합한 배양액의 조성인 것으로 나타났다. 또한, *B. cereus*를 이용하여 PLC를 생산할 때 배양 온도는 30 °C, 배양액의 pH는 7.5로 배양하는 것이 균체성장 및 PLC 생산에 효율적임을 알 수 있었다. 한편, *B. cereus*에 의해 생산된 PLC의 반응 특성을 연구하였는데, *B. cereus* 11과 318에 의해 생산된 PLC는 45 °C, pH 4에서 최대 활성을 보였고, *B. cereus* 559에서 생산된 PLC는 50 °C, pH 7에서 최대 활성을 나타냈다. *B. cereus*에서 생산된 PLC에 망간 이온, 코발트 이온 그리고 DMSO가 첨가되었을 때는 PLC의 활성이 상당히 증가했고, 구리 이온, glycerol, isopropanol 과 SDS 등을 첨가했을 때는 PLC 활성이 감소함을 볼 수 있었다.

감 사

본 연구는 2001년 한국과학재단 국제공동연구과제 (20015-307-01-2) 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Abe, T., M. Sugita, T. Fujikura, J. Hiyoshi, and M. Akasu (2000), Giant hornet (*Vespa mandarinia*) venomous phospholipases: The purification, characterization and inhibitory properties by biscochlorine alkaloids. *Toxicon*. **38**. 1803-1816.

2. Mukherjee, K. D. (1990), Lipase-catalysed reactions for modification of fats and other lipids, *Biocatalysis* **3**, 277-293.
3. Clausen, K. (2001), Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase, *Eur. Lipid Sci. Technol.* **103**, 333-340.
4. D'Arrigo, P. and S. Servi (1997), Using phospholipases for phospholipid modification, *TIBTECH.* **15**, 90-96.
5. Kostadinova, S., A. Ivanov, and E. Kamberov (1991), Purification and some properties of phospholipase C from *Achromobacter xylosoxidans*, *J. Chromatogr.* **568**, 315-324.
6. El-sayed, M. Y., C. D. DeBose, L. A. Coury, and M. F. Roberts (1985), Sensitivity of phospholipase C (*Bacillus cereus*) activity to phosphatidylcholine structural modifications, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **837** (3), 325-335.
7. Songer, J. G. (1997), Bacterial phospholipases and their role in virulence, *Trends In Microbiol.* **5**(4), 156-161.
8. Tan, C. A., M. J. Hehir, and M. F. Roberts (1997), Cloning, overexpression, refolding, and purification of the nonspecific phospholipase C from *Bacillus cereus*, *Protein Express. Purif.* **10**, 365-372.
9. Sutherland, J. P., A. Aherne, and A. L. Beaumont (1996), Preparation and validation of a growth model for *Bacillus cereus*: the effects of temperature, pH, sodium chloride and carbon dioxide, *Int. J. Food Microbiol.* **30**, 359-372.
10. Schneider, M. (2001), Phospholipids for functional food, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**, 98-101.
11. Winter, B. H., K. Titze, and V. Marschner (1998), Application of phospholipases in the edible oil industry, *Fett/Lipid* **100**, 152-156.
12. Martin, S. F. and P. J. Hergenrother (1998), Enzymatic synthesis of a modified phospholipids and its evaluation as a substrate for *B. cereus* Phospholipase C, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 593-596.
13. Xu, X. (2000), Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **102**, 287-303.
14. Guddal, P. H., T. Johansen, K. Schulstad, and C. Little (1989), Apparent phosphate retrieval system in *Bacillus cereus*, *J. Bacteriol.* **177**, 5702-5706.