

## 콜라겐분해활성균 *Bacillus megaterium* UV-NTG-35의 선발육종에 대한 연구

리혜성, 김영조

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《과학연구부문에서는 나라의 경제발전과 인민생활향상에서 전망적으로 풀어야 할 문제들과 현실에서 제기되는 과학기술적문제들을 풀고 첨단을 돌파하여 지식경제건설의 지름길을 열어놓아야 합니다.》

콜라겐분해효소는 식료가공공업과 클론기술, 줄기세포기술과 같은 첨단생물공학기술에 리용되는 중요한 단백질분해효소로서 주로 미생물을 대상으로 하여 많이 연구[1, 3]되고 있으나 그 활성이 높지 못하여 광범히 리용되지 못하고있다.

우리는 콜라겐이 들어있는 여러가지 시료들에서 콜라겐분해균을 선발하고 자외선과 니트로조구아니딘(NTG) 동시복합처리방법으로 출발균에 비해 콜라게나제활성이 높은 균을 육종하기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

균분리시료 부패된 돼지가죽, 부패된 명태껍질, 돼지뼈 및 힘줄퇴적토양, 고기가공공장 폐수를 리용하였다.

콜라겐분해균분리배지조성 콜라겐 2.0%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03%, 우무 2.0%, pH 7.0

콜라겐분해균활성화배지조성 포도당 1.0%, 펩톤 0.5%, 효모엑스 0.5%, 콜라겐 0.2%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03%

콜라겐분해균의 선발방법 선발배지에 각이한 시료의 계렬희석액을 50 $\mu\text{L}$ 씩 도말하고 37°C에서 48h동안 배양한 후 콜라겐분해띠직경과 균무지직경의 비가 2.0이상인 균주들을 우무 2.0% 포함된 활성화배지에 옮겨 배양하였다.

자외선과 니트로조구아니딘(NTG) 복합처리방법 균체수가  $2.5 \times 10^7$  CFU/mL인 균현탁액을 멸균한 샤페 15개에 20mL씩 넣고 3개 조로 나누어 매 조의 NTG농도가 각각 200, 300, 400 $\mu\text{g/mL}$  되게 하였다. 다음 자외선쪼임세기 15W, 쪼임거리 20cm에서 각이한 시간(0~40min) 쪼임을 진행하고 압조건에 1h 방치한 후 분리배지에 도말하였다.

출현한 균무지수에 기초하여 생존률을 구하고 활성화배지에서 48h 배양하여 콜라겐분해효소활성을 측정하고 양성변이균주를 선발하였다.

콜라겐분해효소활성은 폴린시약법[1]으로 측정하였으며 효소활성 1U는 2.0% 콜라겐을 기질로 하여 40°C에서 1min동안에 1 $\mu\text{g}$ 의 티로진을 생성하는 효소의 량으로 하였다.

콜라겐분해활성균의 동정은 버취검색편람[2]에 준하여 진행하였다.

## 결과 및 논의

### 1) 콜라겐분해균의 선발

각이한 분리시료들을 분리배지에 도말하여 37°C에서 48h 배양한 후 콜라겐분해피가 생긴 총균무지수와 그가운데서 콜라겐분해피직경과 균무지직경의 비가 2.0이상인 균무지수, 분리비율은 표 1과 같다.

표 1. 각이한 시료들에서 콜라게나제생성균의 분리

분리원	총분리균수/개	분해피직경/균무지직경의 비가 2.0이상인 균무지수/개	분리비율/%
부패된 돼지가죽	85	16	18.8
부패된 명태껍질	68	7	10.3
돼지뼈 및 힘줄퇴적토양	105	24	22.8
고기가공공장폐수	72	5	6.9
계	330	52	15.7

표 1에서 보는바와 같이 분리시료에서 콜라겐분해피를 형성하는 330개의 균주가 분리되었으며 그가운데서 분해피직경과 균무지직경의 비가 2.0이상인 균무지수는 52개로서 15.7%를 차지하였다. 돼지뼈, 힘줄퇴적토양과 부패된 돼지가죽에서 활성균의 분리비율이 높았다.

분리된 균들가운데서 콜라게나제활성이 높은 균주들은 표 2와 같다.

표 2. 콜라게나제활성이 높은 균주들

분리균 번호	콜라게나제활성 (U·mL <sup>-1</sup> )	분리원
5	340±10	부패된 돼지가죽
13	400±10	"
16	320±10	"
28	360±10	돼지뼈, 힘줄퇴적토양
37	390±10	"
45	420±10	"

표 2에서 보는바와 같이 선발된 6개 균주들의 콜라게나제활성은 320~420U/mL범위에 있었으며 그가운데서 돼지뼈 및 힘줄퇴적토양에서 분리된 No. 45균주의 활성이 제일 높았다. 이 균주는 선행연구에서 콜라게나제활성이 제일 높은 균으로 알려진 *Clostridium histolyticum*[1]보다 활성이 거의 2배 더 높다.

### 2) 분리균 No. 45의 동정

분리균 No. 45의 형태학적특징 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*를 대조균으로 하여 분리균 No. 45의 형태학적특징을 조사하였다.(표 3)

표 3. No. 45균주의 형태학적특징

균주	형태	크기/μm	그람염색성	아포형성능	운동성	산소요구성
No. 45	막대균	(1.0~1.5)×(3~5)	+	+	+	호기성
<i>B. subtilis</i>	막대균	(0.5~0.6)×(1.5~2.0)	+	+	+	호기성
<i>E. coli</i>	짧은막대균	(0.4~0.8)×(0.8~1.0)	-	-	+	통성혐기성

표 3에서 보는바와 같이 No. 45균주는 그람양성막대균이며 아포를 형성하고 운동성이 있는 호기성균이므로 전형적인 *Bacillus*속 균이었다. 그런데 대조균 *Bacillus subtilis*보다 세 포크기가 2배정도 더 컸다.

분리균 No. 45의 생리생화학특징 No. 45균주의 생리생화학특징을 조사한 결과는 표 4와 같다.

표 4. No. 45균주의 생리생화학특징

특징지표	No. 45균주	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>
V-P시험	—	+	—
카탈라제	+	+	+
농마분해	+	+	+
질산염환원	+	+	+
인돌생성	—	+	—
레몬산염리용능	+	+	+
D-포도당→산생성	+	+	+
아르기나제생성	+	—	+
5°C 생장능	—	—	d
10°C 생장능	—	—	—
30°C 생장능	+	+	+
50°C 생장능	+	—	+

표 4에서 보는바와 같이 분리균 No. 45는 V-P시험, 아르기나제생성능, 50°C 생장능에서 *Bacillus subtilis*와 차이나며 모든 특징지표들에서 *Bacillus megaterium*과 일치하였다. 따라서 우리는 분리균 No. 45를 *Bac. megaterium* No. 45로 명명하였다.

현재까지 선행연구들에서는 *Bacillus*속에 속하는 콜라게나제생성균들로 *Bac. subtilis*, *Bac. licheniformis*가 알려졌을뿐 *Bacillus megaterium*은 제기된것이 없었다.

### 3) 자외선-니트로조구아니딘(NTG)복합처리에 의한 콜라게나제활성균 *Bac. megaterium* UV-NTG-35의 육종

NTG처리농도 200, 300, 400 $\mu$ g/mL에서 자외선을 0~40min 쪼임한 후 출발균 *Bac. megaterium* No. 45의 생존률을 조사한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 NTG-자외선복합처리구들에서는 자외선 또는 NTG만 처리한 구들에 비해 생존률이 훨씬 낮았으며 NTG처리농도가 증가할수록 생존률은 급격히 감소하였다.

각이한 시험구들에서 분리한 균들을 배양하여 양성변이률을 조사한 결과는 그림 2와 같다.

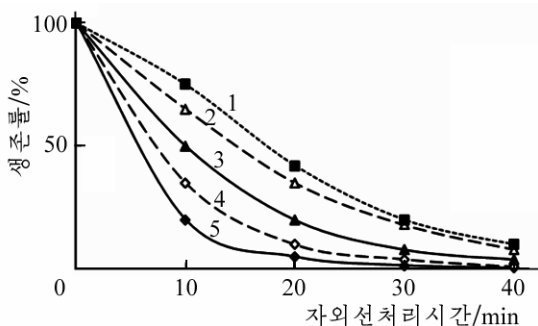


그림 1. 자외선-NTG복합처리에 의한 *Bac. megaterium* No. 45의 생존률

1-5는 NTG의 농도가 각각 0, 400(자외선처리하지 않음), 200, 300, 400 $\mu$ g/mL일 때

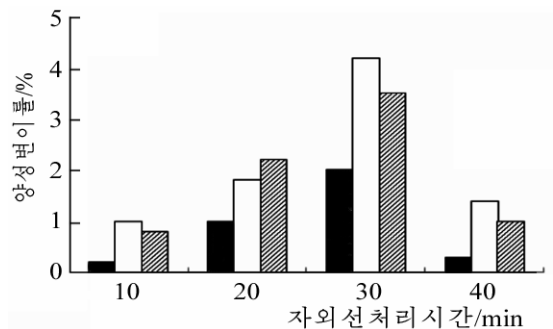


그림 2. 자외선-NTG복합처리조건에 따르는 양성변이률

■ 200 $\mu$ g/mL, □ 300 $\mu$ g/mL,  
▨ 400 $\mu$ g/mL

그림 2에서 보는바와 같이 NTG처리농도 300 $\mu$ g/mL, 자외선조임시간 30min일 때 복합 처리구에서 양성변이률이 4.2%로서 제일 높았다.

이것은 변이제들의 처리농도가 높고 처리시간이 길수록 균의 생존률이 급격히 낮아지며 양성변이률도 낮아진다고 한 선행연구결과[2]와 일치하였다.

양성변이균주들 가운데 콜라게나제 활성이 높은 균주들은 표 5와 같다.

표 5. 양성변이균주들 가운데 콜라게나제 활성이 높은 균주들

표 5에서 보는바와 같이 육종균들 가운데서 UV-NTG-35균주의 콜라게나제 활성이 860U/mL로서 제일 높았으며 이것은 출발균(420U/mL)에 비해 2배정도 더 높은것이다.

균주 No.	콜라게나제 활성 /(U·mL <sup>-1</sup> )
UV-NTG-25	800 $\pm$ 10
UV-NTG-35	860 $\pm$ 10
UV-NTG-42	780 $\pm$ 10

다음으로 육종균 *Bac. megaterium* UV-NTG-35의 계대안정성을 조사하였다.(표 6)

표 6. *Bac. megaterium* UV-NTG-35의 계대안정성

계대수	1	3	5	7	9
상대효소활성/%	100	100	100	98.5	96.5

표 6에서 보는바와 같이 육종균은 9회까지 계대하여도 콜라게나제상대활성이 95%이상으로 안정하게 유지되었으며 따라서 이 균주를 계대안정성이 높은 균주라고 볼수 있다.

## 맺 는 말

자외선-NTG복합처리방법으로 출발균주에 비해 콜라게나제 활성이 2배 정도(860U/mL) 높아진 새로운 활성균주 *Bacillus megaterium* UV-NTG-35를 육종하였다.

## 참 고 문 헌

- [1] B. Ace et al.; Afr. Journal Microbial Res., 6, 2373, 2012.
- [2] Paul De Vos et al.; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer, 30~60, 2009.
- [3] 史济平等; 天津微生物, 30, 2, 11, 2017.

주체107(2018)년 7월 5일 원고접수

## Selection and Breeding of *Bacillus megaterium* UV-NTG-35, the Active Collagenolytic Strain

Ri Hye Song, Kim Yong Jo

We isolated a collagenolytic strain from several samples containing collagen and bred a new strain, *Bacillus megaterium* UV-NTG-35 of which collagenase activity was twice as high as the initial one with simultaneous treatment of ultraviolet and nitrosoguanidine.

Key words: collagenolytic strain, *Bacillus megaterium*, ultraviolet, nitrosoguanidine