

알칼리성 Protease 를 생성하는 알칼리성 세균 및 그 효소활성에 관한 연구

박수진 · 이강만 · 배 무*
이화여자대학교 약학대학, *자연과학대학
(Received December 12, 1989)

Studies on the Alkalophilic Bacteria Producing Alkaline Protease and its Enzyme Activities

Soo-Jin Park, Kang Man Lee and Moo Bae*
College of Pharmacy and *College of Natural Sciences, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Abstract—Alkalophilic bacteria isolated from compost were selected, identified and tested for production of alkaline protease. The bacterium was tentatively assigned to *Bacillus* sp. based on the morphological, cultural and biochemical characteristics. The optimum pH of growth was 10 Galactose and Sodium glutamate enhanced the production of alkaline protease. The protease was most active at pH 11.0 and 60 °C and stable in the range of pH 5-11 and temp. 30 °-55 °C. The protease was stabilized by the presence of calcium salts.

Keywords □ alkalophilic bacteria, protease, *Bacillus* sp.

산업적으로 유용한 물질을 생성하는 미생물들은 일반적으로 상온에서 약산성 내지 중성범위에서 성장이 좋으며, 유용한 물질을 생성하는 것으로 알려져 있다. 한편 어떤 미생물들은 온도, pH, 염도, 압력 등의 환경인자가 극한인 상황에서 생존하며 증식하는 것으로 알려지고 있어 미생물 자원의 개발이라는 관점에서 이러한 미생물들은 새로운 자원의 대상으로 중요시 되고 있다. 알칼리성 조건하에서 잘 자라는 미생물은 *Nitrosomonas* 와 *Nitrobacter* 속의 세균에서 최초로 보고된 이래,¹⁾ *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* 속들에서 발견되었으며 유용한 물질을 생성하는 균주개발의 대상으로 1970년대 이래로 관심의 대상이 되어 왔다.²⁾ 알칼리성 세균들은 여러 가지 효소를 분비하는 것으로 알려지고 있어 protease, amylase, cyclodextrin glycosyltrans-

ferase, pectinase, β -1,3-glucanase, xylanase, β -lactamase, cellulase, lipase, catalase, pululanase, DNase, RNase, alginate-lyase, uricase 등을 들 수 있다.³⁾

Protease는 serine alkaline protease, thiol protease, metallo protease, acid protease 등으로 분류되기도 하며,⁴⁾ 그 중 serine alkaline protease로는 Subtilisin Carlsberg와 Subtilisin B.P.N.(또는 Subtilisin Novo) 등이 산업적으로 이용되고 있으며 pH 9~10에서 최대 활성을 나타내는 것으로 알려지고 있다.

본 실험에서는 토양에서 분리된 알칼리성 세균들 중에서 알칼리성 protease 생성균주를 선별하여, 그 균주의 특성과 protease의 생성조건 및 그 효소활성의 특성을 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

균주—이화여자대학교 생물학과 미생물학교실에서 분리보관 중인 알칼리성 세균들을 대상으로 protease 활성을 조사하여, 활성이 좋은 균주를 실험균주로 선택, 사용하였다.

배지 및 배양—균의 보존 및 배양을 위한 기본배지는 glucose 0.2%, polypeptone 0.5%, yeast extract 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, Na_2CO_3 1%를 포함하였다. Protease 생성을 위한 액체배지는 위 기본배지 중 Na_2CO_3 1% 대신 pH 9.0 인 0.3% $NaHCO_3$ - Na_2CO_3 를 사용하였다. 균의 배양은 37°C에서 20시간 진탕배양한 것을 seedculture로 사용하여 1% 농도되게 접종, 37°C에서 배양하였다. 배양시간에 따른 영향을 조사한 실험이온의 다른 실험에서 배양시간은 72시간이었다.

알칼리성 protease 생성균의 선별—알칼리성 세균들의 배양액을 원심분리하여 (6000×g, 10분) 상등액의 효소활성을 Anson-Ogihara 변법^{5,6)}으로 측정하여, protease 활성이 가장 높은 균주를 선별하였다.

효소활성의 측정—Hammarsten casein 0.6% 용액을 기질로 사용하여 효소활성을 Anson-Ogihara 변법에 따라 측정하였다. pH 3 기질용액은 casein을 0.05 M glycine-HCl buffer (pH 3.0)에 녹였으며, pH 7 기질용액은 0.05 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 buffer (pH 7.0)에 녹여 사용하였다. pH 10의 기질용액을 만들기 위하여는 0.05 M NaOH-Boric acid buffer (pH 10.0)을 사용하였다. 반응을 위한 완충용액으로는 0.1 M glycine-HCl (pH 3.0), 0.1 M sod. phosphate (pH 7.0), 0.1 M glycine-NaOH buffer (pH 10.0)을 각각 사용하였다. 반응액은 완충액 2ml, 조효소액 1ml을 가하고 40°C 항온조에서 5분간 방치 후 40°C의 기질용액 5ml을 가하여 10분 동안 반응시켰다. 0.44 M trichloroacetic acid (TCA) 5ml을 가하여 반응을 중지시키고, 30분간 방치한 후 여과하여 여액을 취하였다. 대조실험은 40°C 항온조에서 효소액 1ml과 완충액 2ml에 0.44 M TCA 5ml을 가한 후 기질용액 5ml을 가하여 30분간 방치, 여과하여 여액을 얻었다. 시료와 대조시험의 여액 각각을 2ml 취하고

0.55 M Na_2CO_3 5ml과 Folinphenol 시약(3배 희석액) 1ml을 넣고 30°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품 tyrosine을 이용하여 위와 같은 방법으로 표준곡선을 얻어 효소 활성을 결정하였다. Protease 1 unit는 40°C 반응 온도에서 1분간에 tyrosine 1μg 상당량의 흡광도에 해당하는 비단백성 물질을 생성하는 활성으로 하였다.

균성장 및 배양액 중의 단백질 정량—균의 성장 정도는 배양액을 3000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전물에 신선한 배양액을 2배량 가하여 다시 원심분리한 후 얻어지는 침전물을 신선한 배지액을 가해 혼화하고 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액 중의 단백질 양은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry 법⁷⁾에 따라 정량하였다.

균주의 동정—실험균주의 형태학적, 생리학적, 생화학적 배양상의 특징은 Manual of Methods for General Bacteriology⁸⁾와 미생물학적 실험서⁹⁾에 제시된 방법에 준하여 실험하였다. 실험결과들은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 기술되어 있는 사항들¹⁰⁾과 비교하였다.

결과 및 고찰

알칼리성 protease 생성균의 선별—Anson-Ogihara 변법에 따라 세균배양액 중의 protease 활성을 측정하여 활성이 좋은 균주를 실험균으로 선별하였다. 선별된 균주는 strain No.59⁹⁾(이화여대 생물학과 미생물학교실 보존균주 No.)였다. 선별된 균주의 활성은 90 unit 정도였다.

선별된 균주의 동정실험—균주의 동정 실험결과는 Table I에 요약된 바와 같았다. 본 균주가 포자를 형성하고, 형태가 간균형이며, 호기성이고, catalase 양성인 점 등을 고려할 때 *Bacillus* 속으로 추정되었다. 한편 사슬형태(Fig.1)를 보이며 Voges-Proskauer test 양성, Urease 양성인 점 등은 *Bacillus cereus*와 유사하였으나, anaerobic growth 음성인 점 등이 상이하였다.¹⁰⁾ 사슬형태를 취하는 점에서 *B. alcalophilus* subsp. *halodurans*와 유사하나 urease, Voges-Proskauer, anaerobic growth 등의 성질에서 차이를 보였다.¹¹⁾ 따라서 본

Table I—The morphological, cultural and biochemical characteristics of strain No. 59^s

Morphological characteristics	
Form	Rod
Gram-staining	+
Spore	Spherical
Cultural characteristics	
Nutrient broth	+
Nutrient agar	+
Glucose-nutrient broth	+
Glucose-nutrient agar	+
Alkaline medium	+
Anaerobic growth in alkaline medium	-
Temperature for growth (°C)	10°-50°C
pH range for growth	pH 7-12
Optimum pH for growth	pH 10
Biochemical characteristics	
Catalase activity	+
Hydrolysis of casein	+
Reduction of nitrate	+
Voges-Proskauer test	+
Methyl red test	-
Utilization of citrate	+
Gelatin liquefaction	+
Urease test	+

+: positive, -: negative

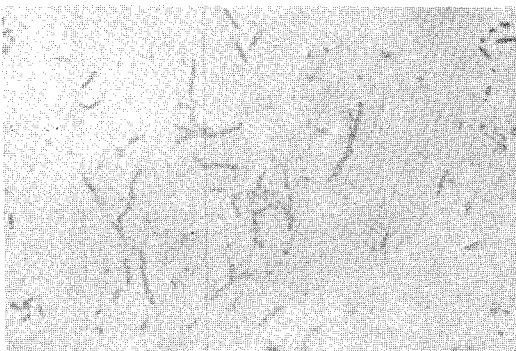


Fig. 1—The micrograph of *Bacillus* sp. No. 59^s (×600).

실험균주는 *Bacillus cereus* 와 유사 균주로 생각된다.

Protease 의 생성조건—pH 9 인 기본배지를 이용하여 배양시간에 따른 효소활성을 측정된 결과는

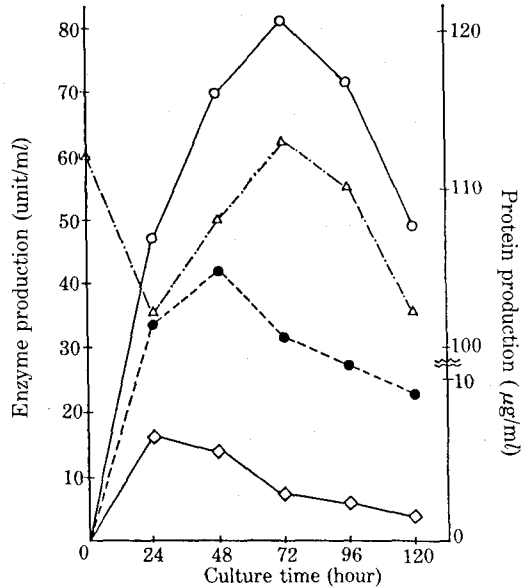


Fig. 2— Time course of protease activities and protein production. Acid protease activity (◇-◇), neutral protease activity (●-●), alkaline protease (○-○) and protein content in culture broth (△-△).

Fig.2에서 보는 바와 같았다. 본 균주는 alkaline protease 를 주로 분비하였고, 배양시작 후 72시간에 최고의 활성을 보였다. 배지의 초기 pH의 영향을 보기 위하여 pH를 3~12까지 조절한 기본배지를 이용하여 효소생성과 균성장 정도를 조사한 결과는 Fig.3에서 볼 수 있는 바와 같이 pH 9.0 이상에서 균생장과 효소생성이 현저하였다. 각종 탄소원을 0.2% 첨가하여 탄소원의 protease 생성에 미치는 영향을 조사한 실험에서는 galactose를 사용한 경우 효과가 좋았다(Table II). 질소원의 영향을 조사한 실험에서는 sodium glutamate를 1% 농도로 첨가했을 때 효소생성이 좋았다(Table III).

Protease 활성의 특성—반응액의 pH가 protease 활성에 미치는 영향을 pH 6에서 13까지 조사하였다(Fig.4). Fig.4에서 보는 바와 같이 pH 9에서 12까지의 영역에서 활성이 우수하였다. pH가 protease 활성의 안정성에 미치는 영향을 보기 위하여 pH 4에서 13까지 각기 다른 pH에서 조효소액을 30°C에서 120분간 방치한 후, 효소액의 액성을 pH 10으로 조절하고 pH 10의 기질용액을 이용하여 40°C에서 잔류활성을 측정하였다. Fig.5에서 보는 바와 같이 pH 5~11 영역에서는 효소활성

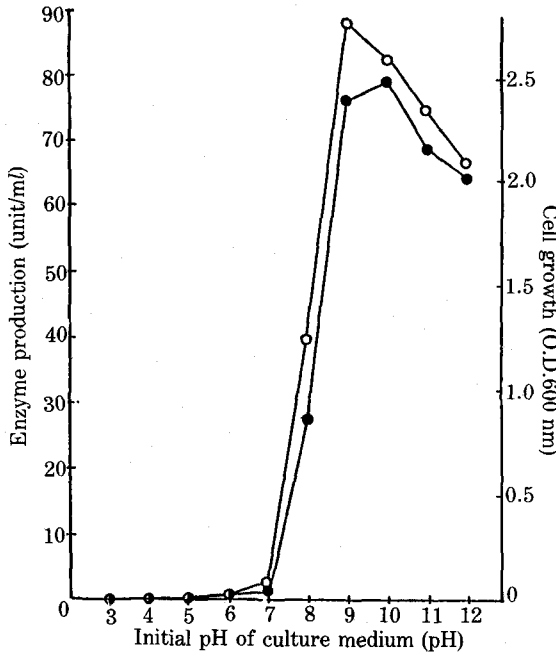


Fig. 3—The effect of initial pH on the protease production and cell growth. Enzyme production (O-O) and cell growth (●-●).

Table II—The effect of carbon sources on the protease production and cell growth

C. source (0.2%)	Enzyme production (unit/ml)	Cell growth (O.D. 600 nm)
Sucrose	73.46	1.217 ± 0.016*
Soluble starch	51.92	1.322 ± 0.025
Glucose (0.2%)	74.23	1.269 ± 0.004
Glucose (2%)	53.08	2.795 ± 0.039
Fructose	56.54	1.217 ± 0.070
Maltose	84.23	1.569 ± 0.051
Galactose	96.15	1.637 ± 0.030
Lactose	75.38	1.427 ± 0.040
Dextrin	64.62	1.273 ± 0.029
None	73.46	1.278 ± 0.050

*Values are mean ± S.D.

이 안정하게 유지되었으나 pH 4 또는 pH 12 이상에서는 안정하지 못하였다.

조효소액의 활성에 미치는 온도의 영향을 보기 위하여 반응온도를 30°C에서 70°C까지 변화시키면서 효소활성을 측정할 결과를 Fig.6에서 볼 수 있다. 효소활성은 60°C 반응온도에서 활성이 현저했으며,

Table III—The effect of nitrogen sources on the protease production and cell growth

N. source (1%)	Enzyme production (unit/ml)	Cell growth (O.D. 600 nm)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.38	0.261 ± 0.013*
NH ₄ NO ₃	0.34	0.156 ± 0.034
NH ₄ Cl	0.31	0.052 ± 0.002
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.85	0.464 ± 0.013
Polypeptone	16.92	2.095 ± 0.052
Yeast extract	6.54	0.641 ± 0.020
Casein	16.93	0.814 ± 0.089
Albumin	14.23	1.008 ± 0.029
Sodium glutamate	67.31	1.208 ± 0.068
None	0.77	0.142 ± 0.007

*Values are mean ± S.D.

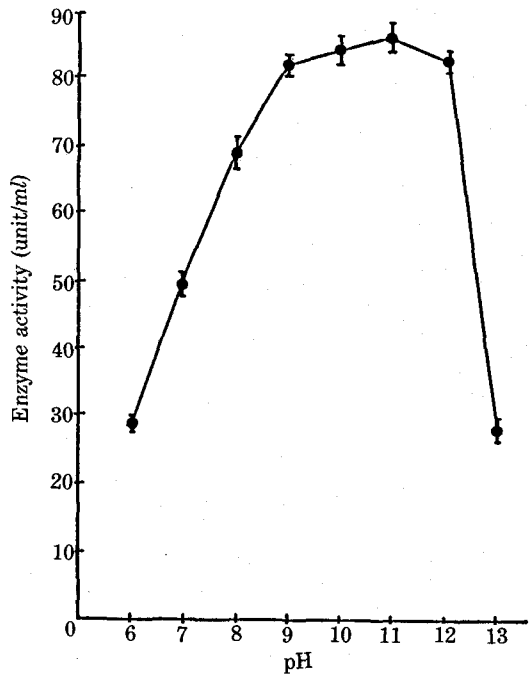


Fig. 4—The effect of pH on the protease activity. The following buffers were employed: 0.1 M acetate buffer (pH 6); 0.1 M phosphate buffer (pH 7-8); 0.1 M glycine-NaOH buffer (pH 9-13).

65°C 이상에서는 활성이 급격히 감소하였다. 온도에 대한 효소의 안정성을 실험하기 위하여 pH 10으로 액성을 조절한 조효소액을 30~70°C의 온도에서 30분간 방치시킨 후 40°C에서 효소의 잔류활성을 측정

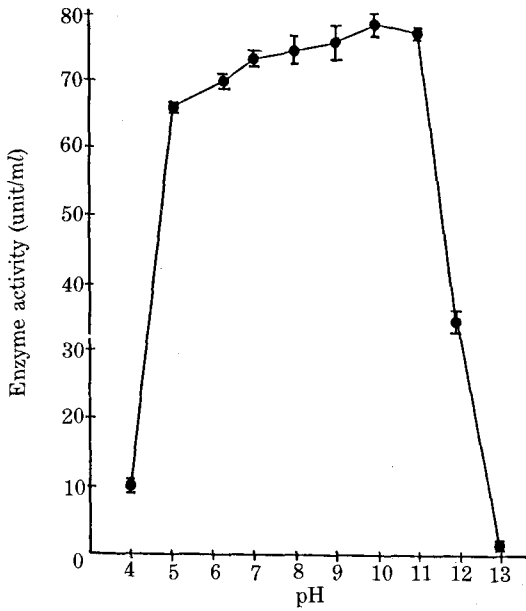


Fig. 5—The effect of pH on the stability of the protease. The following buffers were used: 0.1 M acetate buffer (pH 4-6); 0.1 M glycine-NaOH buffer (pH 9-13). The enzyme at various pH was incubated at 30°C for 120 min. and the residual activity was determined at pH 10.

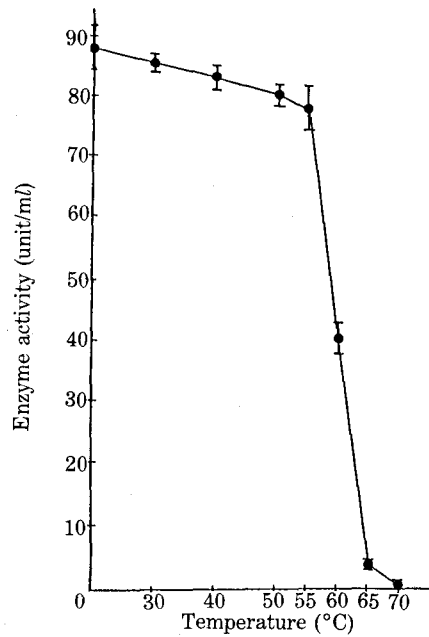


Fig. 7—The effect of temperature on the stability of the protease. The enzyme in 0.1 M glycine-NaOH buffer (pH 10.0) was incubated at the temperature indicated for 30 min. and the residual activity was determined at 40°C.

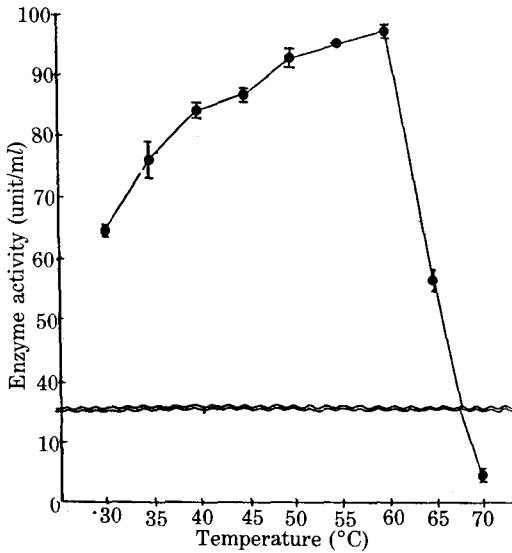


Fig. 6—Optimum temperature for the protease activity. The reaction was carried out at the temperature indicated and pH 10.0 for 10 min.

하였다. Fig.7에서 보는 바와 같이 55°C까지에서 효소활성이 안정성을 보였으나 60°C 이상에서는 활성이 급격히 감소하여 70°C에서는 불활성화되었다.

Table IV—The effect of various salts on the heat resistance of the alkaline protease

Salts (10 mg)	Remaining protease activity (%)
None**	100 ± 0.30*
NaCl	119.9 ± 0.65
Na ₂ SO ₄	100.3 ± 0.30
NaNO ₃	112.5 ± 0.23
Na ₂ CO ₃	60.0 ± 0.35
NaH ₂ PO ₄	74.1 ± 0.35
KH ₂ PO ₄	94.9 ± 0.60
CH ₃ COOK	92.3 ± 0.001
KNO ₃	81.8 ± 0.30
KCl	84.6 ± 0.001
K ₂ SO ₄	63.2 ± 0.47
CaCl ₂	120.5 ± 0.16
CaSO ₄	133.3 ± 0.30
Control***	137.2 ± 0.20

* Values are mean ± S.D.

** The crude enzyme solution was incubated at 60°C for 10 min. without any addition of salts.

***This indicated the original crude enzyme activity.

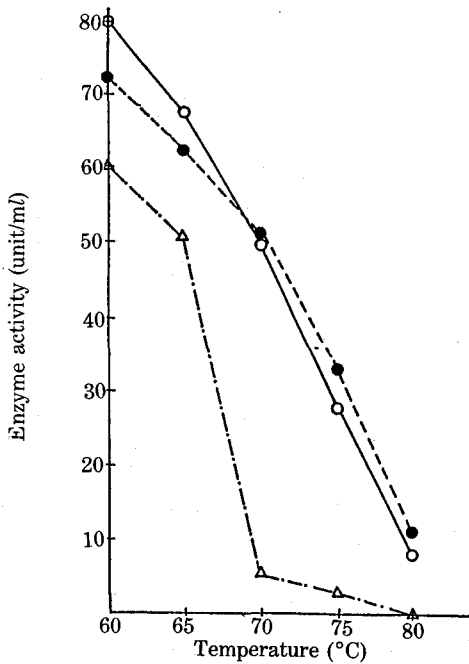


Fig. 8—The effect of heat treatment in the presence of calcium salts on the protease activity. CaSO₄ (O-O), CaCl₂ (●-●), control (Δ-Δ). The enzyme solution with or without calcium salt was incubated at various temperatures for 10 min. and the residual activity was measured.

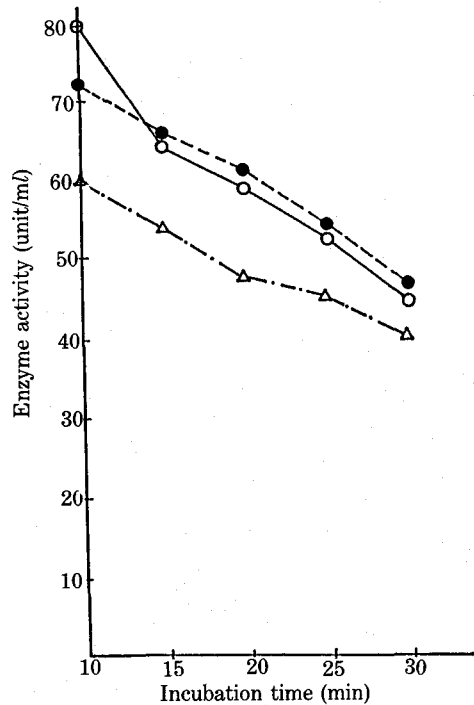


Fig. 9—The effect of heat treatment on the protease activity at 60°C for variable time. The enzyme solutions (O-O; with CaSO₄, ●-●; with CaCl₂, Δ-Δ; enzyme only) were incubated at 60°C for a variable time and the residual activity was determined.

효소내열성에 미치는 염류의 영향—조효소액 1 ml에 증류수 1 ml을 가하고 각종 염류를 10 mg씩 첨가하여 60°C에서 10분간 방치한 후 잔류활성을 측정할 결과를 Table IV에서 볼 수 있다. Calcium 염의 첨가에서 열에 대한 안정성이 향상되었다. 이러한 결과는 protease 활성이 열에 의해 저하됨에 대하여 Ca²⁺이온이 보호효과를 보인다는 다른 보고들과 일치하였다.¹²⁻¹⁵⁾

CaCl₂와 CaSO₄ 존재하에서 반응온도가 효소활성에 미치는 영향을 보기 위한 실험의 결과는 Fig. 8에서 보는 바와 같았다. 각각의 온도에서 10분간 방치한 후 잔류활성을 비교한 결과 CaSO₄ 또는 CaCl₂를 첨가함으로써 온도에 대한 protease의 안정성이 증대되었다.

CaCl₂ 또는 CaSO₄ 존재하에서 효소활성의 온도에 대한 영향을 살펴본 다른 실험으로 60°C에서 방치시간 변화에 따른 잔류효소활성을 조사하였던 바 Fig. 9에서 보는 바와 같이 염의 첨가로 잔류활성을

높은 수준으로 유지할 수 있었으나 효소활성의 감소는 시간의존성을 나타냈다.

결 론

토양에서 분리한 알칼리성 세균을 대상으로 균주의 특성과 이 균주가 생성하는 protease의 특성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

이 균주는 사슬형태를 보이는 간균형이고 *G₊*am 양성균으로 *Bacillus cereus*와 유사한 *Bacillus* 속이었다. 이 균주의 최적 생육 pH는 10이었고, 10~50°C 온도에서 성장을 보였고, protease type 중 알칼리성 protease를 주로 분비하였으며 37°C에서 72시간 배양시 알칼리성 protease 생성이 최대에 이르렀다. 배지성분에 따른 protease 생성을 보면 탄소원으로는 galactose가 질소원으로는 sodium glutamate가 효과적이었다. 이 균주가 생성하는

알칼리성 protease는 pH 11과 60°C에서 최대 활성을 보였고, pH 5~11과 30~55°C의 온도범위에서 효소활성이 안정하였으며, Ca²⁺ 이온첨가로 열에 대한 영향으로부터 보호효과를 볼 수 있었다.

문헌

- 1) Meek, C.S. and Lipman, C.B., *J. Gen. Physiol.* **5**, 195 (1922).
- 2) Horikoshi, K. and Teruhiko, A.: *Alkalophilic Microorganisms: A new Microbial World*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp.3-6 (1982).
- 3) Horikoshi, K. and Teruhiko, A.: *Alkalophilic Microorganisms: A New Microbial World*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 93-139 (1982).
- 4) Hartley, B.S., *Annu. Rev. Biochem.*, **29**, 45 (1960).
- 5) 赤堀四郎: 酵素研究法II, 朝倉書店, p.240 (1967).
- 6) 동경대학 농학부 농예화학교실편: 實驗農藝化學, 上卷, 朝倉書店, p.281 (1960).
- 7) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.J. and Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 8) American Society for Microbiology: *Manual of Methods for General Bacteriology*, pp.412-423 (1981).
- 9) 김종협, 이배함, 이지열: 미생물학실험서, 대광문화사, 서울, pp.25-27 (1983).
- 10) Sneath, P.H.A.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2*, Williams & Wilkins, Baltimore, pp.1122-1139 (1986).
- 11) Horikoshi, K. and Teruhiko, A.: *Alkalophilic Microorganism: A New Microbial World*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp.13-14 (1982).
- 12) Mizusawa, K., Ichishima, E. and Yoshida, F., *Agr. Biol. Chem.* **28**, 884 (1964).
- 13) Mizusawa, K., Ichishima, E. and Yoshida, F., *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 35 (1966).
- 14) Mizusawa, K., Ichishima, E. and Yoshida, F., *Appl. Microbiol.* **17**, 366 (1969).
- 15) Danno, G. and Yoshimura, S., *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1151 (1967).