

## 고도 호염성 *Halobacterium* sp.에 의한 protease의 생산

안영석 · 김찬조 · 최성현

충남대학교 식품공학과

**초록:** 오징어 젓갈로 부터 분리한 protease를 생산하는 H5-2 균주는 *Halobacterium* 속 균으로 동정되었으며 NaCl 2.0M 이하의 배지에서는 생육하지 못하는 고도 호염성균이었고, 이 균의 protease 생산은 NaCl 4.5M, yeast extract 0.4%, gelatin 1.5%를 첨가한 pH7.0의 Norberg & Hofsten 배지에서 38°C로 4~5일간 배양했을 때 가장 양호하였다(1990년 7월 5일 접수, 1990년 9월 20일 수리).

호염성 미생물은 식염이 적은 환경하에서 생육이 어려운 특성이 있으므로 많은 연구자들의 주목을 받고있다<sup>1)</sup>. 호염성 세균은 생육에 요구하는 식염의 양에 따라 Flannery<sup>2)</sup>와 Larsen<sup>3)</sup> 등이 제안한 저도·중도·고도 호염균으로 분류되고 있다.

호염성 세균은 배지의 염농도가 증가함에 따라 더 많은 Na와 K 이온을 세포내에 함유하게 되어 세포형태를 유지할 수 있으며, 생육에 적합한 식염 농도 이하에서는 세포가 삼투압의 차이로 급격한 변형내지 파괴가 되는 것으로 보고되어 있고<sup>4-8)</sup>, 삼투압 평형유지를 위한 물질로서 betaine이 세포내에 축적된다는 보고도 있다<sup>9,10)</sup>. 또한 호염성 세균의 단백질은 산성 amino산을 다량 함유하고 있어<sup>11-15)</sup> 식염이 없거나 낮은 상태에서는 이들 산성 amino산은 음이온간의 분자내 반발력으로 단백질 분자 구조가 변형되어 세포 조직이 제 기능을 발휘할 수 없게 된다는 “전하 차폐설”(shielding of negative charge)에 대한 보고<sup>1,16)</sup>도 있다.

한편 국내의 호염성 세균에 대한 연구는 송과 배의 보고<sup>17)</sup> 등을 볼 수 있다. 필자 등은 호염성 세균에 대한 연구와 그 protease에 대한 기초자료를 얻고자 protease를 생산하는 호염성 세균을 각종 염장식품 및 자연물로부터 분리·선정하여 그의 균학적 성질을 조사하고, 이 균의 protease생산 조건을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 균의 분리 및 동정

해조류 및 각종 염장식품 등을 20%의 NaCl용액에 현탁한 후, 4.5M의 NaCl을 가한 casein 분해세균 선택배지<sup>18)</sup> 평판상에 도말하여 30°C에서 7~10일간 배양하면서 집락 주변에 투명환을 형성하는 균주를 1차 분리하고 다시 Norberg & Hofsten배지<sup>19)</sup>에 1차 분리한 균을 접종한 후, 30°C에서 4일간 진탕배양하고 그 배양액을 12,000×g로 15분간 원심분리한 다음 상정액을 조효소액으로 하여 protease활성을 측정한 후 활성이 강한 균주를 선정하였다. 선정균주는 Microbiology a laboratory manual<sup>20)</sup>과 Bergey's manual<sup>21)</sup>에 따라 균학적 특성을 조사하고 동정하였다.

#### Protease활성 측정 및 효소단위

Protease활성은 Anson변법<sup>22)</sup>으로 측정하고 효소단위는 기본조건하에서 1분간에 tyrosine 1μg 상당량의 folin발색성물질 생성을 1단위로 하였다.

#### 염 농도에 따른 생육도

Sehgal & Gibbons complex medium(SGC배지)<sup>23)</sup>에 NaCl을 0~5.0M로 각각 첨가하고 여기에 80시간 같은 배지에서 전배양한 H5-2균 배양액을 2% 접종하여 40°C에서 진탕배양하면서 경시적으로 660nm에서 O.D.를 측정하여 생육도를 검토하였으며 또한 NaCl 대신 KCl과 MgCl<sub>2</sub>를 2.0M과 4.5M 첨가하여 생육 여부도 조사하였다.

### NaCl 농도에 따른 균체 안정성

생육에 최적 농도인 4.5M NaCl을 가한 SGC배지에서 3일간 진탕배양하여 균체를 회수하고 세척한 후 NaCl 0~5.0M 용액에 현탁하여 660nm에서 초기 흡광도가 약 0.3~0.4가 되도록 조정된 다음 경시적으로 흡광도를 측정하고 초기 O.D.값에 대한 백분율로 균체의 파괴도를 측정하여 그 안정도를 표시하였다.

### 효소생산 조건

Norberg & Hofsten배지를 효소생산 기본배지로 사용하여 효소생산에 대한 각종 조건을 상법에 따라 검토하였다.

### 결과 및 고찰

#### 균의 선정 및 동정

내염성의 protease를 강하게 생산하는 호염성 세균 H5-2균주를 오징어젓에서 분리하여 그 균학적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같이 간균으로서 Gram 음성이었으며 포자를 생성하지 않고, 집락은 적색을 보였다. 그리고 각종 생화학적 특성과 3.0M 이하의 NaCl을 첨가한 배지에서는 생육이 어려운 점으로 보아 H5-2균주는 고도 호염성 *Halobacterium*속 균으로 동정되었다.

#### 생육에 대한 염농도의 영향

H5-2균주의 생육에 대한 NaCl농도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 1에서와 같이 4.0M NaCl농도 이상에서 왕성하게 생육하였으며, 3.0M에서는 낮은 생육도를 나타내었고 2.0M이하에서는 생육을 못하는 점으로 보아 고도 호염균의 특징이 있었다. 일반적으로 고도 호염균의 경우 NaCl 2.0M 이하에서 생육을 못하는데 이것은 삼투압 차이에 의한 세포의 파괴 때문인 것으로 알려지고 있다<sup>4~8,24~27</sup>.

한편 NaCl 대신 KCl과 MgCl<sub>2</sub>를 배지에 첨가하여 대체효과를 검토한 결과 효과가 인정되지 않았다. 송과 배가 보고<sup>17)</sup>한 중도 호염균인 *Halobacterium*속 균의 경우 NaCl 대신 KCl을 1.5M 첨가 했을 때는 생육이 가능했으나 2.5M에서는 대체 효과가 없었다고 보고하였다.

#### NaCl 농도에 따른 균체 안정성

각 농도의 NaCl 용액에 대한 균체의 안정성을 검

Table 1. Morphological cultural and biochemical characteristics of extremely halophilic bacterium H5-2

#### 1. Morphological characteristics

Form	Rod
Size	0.7~1.0 x 3.0~4.5 μ
Gram stain	-
Spore formation	-
Observation of colony	
Color	Red
Shape	Circular
Surface	Smooth
Edge	Entire
Elevation	Convex

#### 2. Cultural characteristics(++ : good, + : weak, - : no growth)

NaCl concentration	SGC medium	Nutrient broth	Peptone water
2M	-	-	-
3M	+	-	-
4M	++	+	+
5M	++	++	++

pH range for growth 5.0~8.0 (optimal : 7.0)

Temperature range for growth 30°C~50°C (optimal : 40°C)

#### 3. Biochemical characteristics

Hydrolysis of casein	+
Hydrolysis of gelatin	+
Hydrolysis of starch	-
Indole test	+
Methyl red test	-
Voges-Proskauer test	-
Hydrolysis of H <sub>2</sub> S	+
Catalase	+
Oxidase	+
Urease	-

토한 결과는 Table 2와 같다. 4.0M 이상의 용액에서는 균체가 안정하였으나 2.0M 이하의 용액에서는 급격한 균체의 파괴로 O.D.값이 감소하였다. 한편 NaCl 3.0M 용액에서 약 3시간까지 O.D.값이

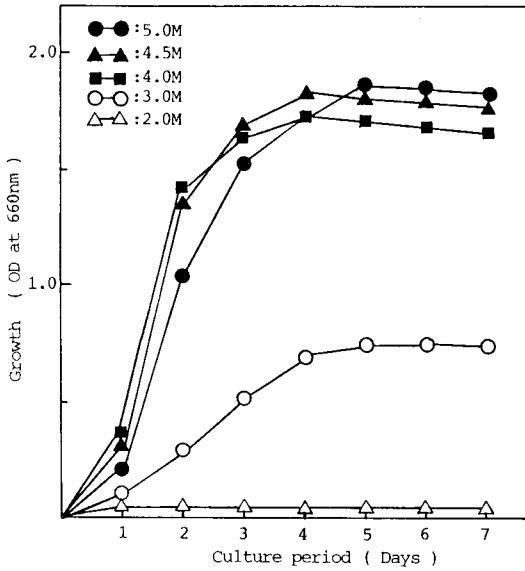


Fig. 1. Growth curves of *Halobacterium* sp. H5-2 in SGC medium containing various concentration of NaCl

Table 2. Effect of NaCl concentration of the cell lysis of *Halobacterium* sp. H5-2

NaCl(M)	Treat time					
	0 min	10 min	1 hr	3 hr	12 hr	24 hr
0	ND*	0	0	0	0	0
1	100	8	1	0	0	0
2	100	97	87	69	44	42
3	100	103	107	124	101	90
4	100	99	100	100	96	94
5	100	100	102	102	96	93

The cells grown in SGC medium contained 4.5M NaCl was harvested, resuspended and incubated in saline with various NaCl concentration. \*Not detectable.

Turbidity of the cell suspension was expressed as percentage to initial optical density (O.D.; 0.3~0.4).

증가하는 것은 Abram과 Gibbons의 보고<sup>24)</sup>에 의하면 균체가 삼투압 차이에 의해서 막대형에서 구형 또는 무정형으로 변환되기 때문이라고 하며, *Halobacterium cutirubrum*을 NaCl 3.0M 용액에 현탁하여 1시간 처리했을 경우 O.D.값이 121%로 증가했다는 보고와 유사

한 결과를 나타내었다.

효소생산 조건

1) pH 및 온도

Norberg & Hofsten배지로 4일간 진탕배양하여 효소 생산에 대한 초기pH 및 온도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 2 및 3과 같으며 초기pH는 7.0, 배양온도는 38°C 부근에서 효소생산이 양호하였다.

2) NaCl 농도의 영향

배지 중의 NaCl 농도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 4와 같고 4.5M의 NaCl을 첨가했을 때 효과적이었다.

한편 Kamekura와 Onishi<sup>28)</sup>는 중도 호염균인 *Bacillus*속 균의 protease 생산에서 NaCl 1.0M을 첨가했을 때 효과적이었다고 보고한 바 있다.

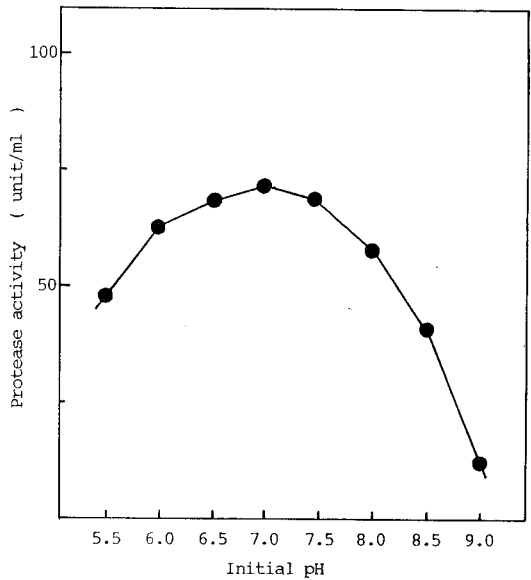


Fig. 2. Effect of initial pH of the medium on the protease production by *Halobacterium* sp. H5-2

3) 질소원

기본배지 중의 yeast extract와 gelatin의 농도를 여러가지로 조정하여 첨가했을 때의 결과는 Table 3과 같이 yeast extract 0.4%, gelatin 1.5%를 첨가할 때 효소생산이 가장 효과적이었다.

4) 배양 시간

H5-2균주를 효소생산 최적 조건에서 4~5일 배양하였을 때 Fig. 5와 같이 효소생산이 가장 좋았으며

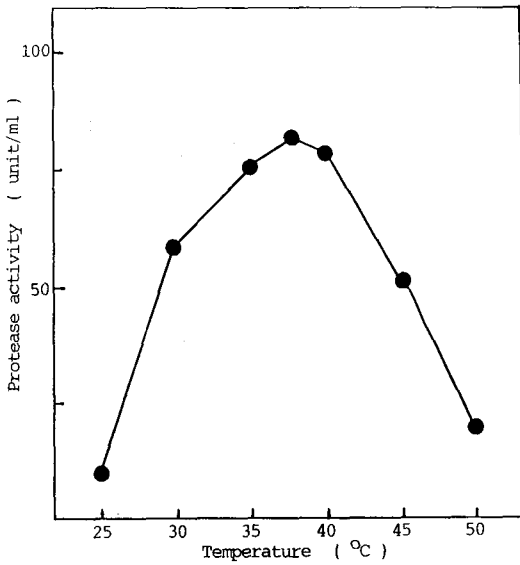


Fig. 3. Effect of temperature on the protease production by *Halobacterium* sp. H5-2

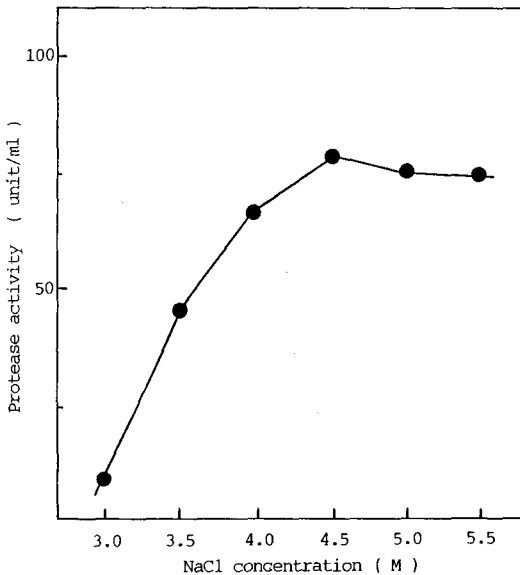


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on the protease production by *Halobacterium* sp. H5-2

Table 3. Effect of yeast extract and gelatin concentration on the protease production by *Halobacterium* sp. H5-2 (unit/ml)

Gelatin(%)	Yeast extract(%)					
	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
0.5	58	77	96	104	99	99
1.0	76	78	103	91	99	94
1.5	78	89	105	85	83	81
2.0	81	91	102	86	84	83

배양 종료후 배양액의 pH는 7.0에서 7.6으로 상승되었다.

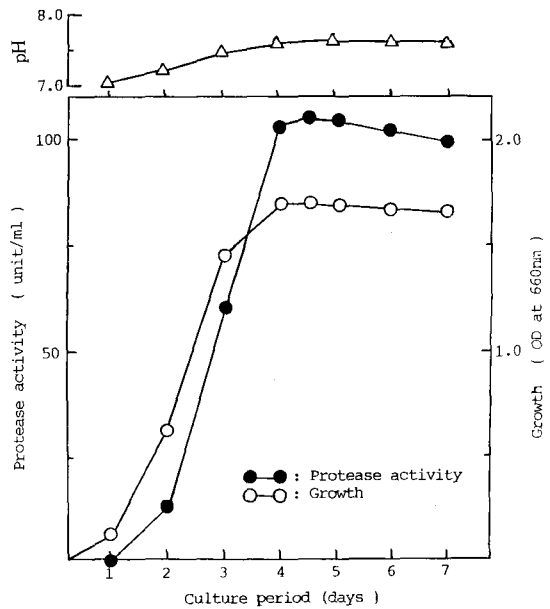


Fig. 5. Growth and protease production of *Halobacterium* sp. H5-2

참 고 문 헌

1. 大鳥太郎: 異常 環境と 微生物, p.1,121 講談社, 東京(1977)
2. Flannery, W. : Bacteriol. Rev., 20 : 49(1956)
3. Larsen, H. : Halophilism, In "The bacteria"(Eds I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier), Vol. 4 : 297(1962)
4. Christian, J. H. B. and J. A. Waltho : Biochim. Biophys. Acta., 65 : 506(1962)
5. Unemoto, T., T. Tsutomu and M. Hayashi : Can. J. Microbiol., 19 : 563(1973)
6. Lanyi, J. K. and M. P. Silverman : Can. J. Microbiol., 18 : 993(1972)

7. Masui, M. and S. Wada : Can. J. Microbiol., 19 : 1181(1983)
8. Sadler, M., M. McAninch, R. Alico and L. I. Hochstein : Can. J. Microbiol., 26 : 496(1980)
9. Galinski, E. A. and H. G. Truper : FEMS. Lett., 13 : 357(1982)
10. Imhoff, J. F. and F. Rodriguez-Valera : J. Bacteriol., 160 : 478(1984)
11. Reistad, R.: Arch. Microbiol., 71 : 353(1970)
12. Visentin, L. P., C. Chow, A. T. Matheson, M. Yaguchi and F. Rollin: Biochem. J., 130 : 103(1972)
13. Steensland, H. and H. Larsen: J. Gen. Microbiol., 55 : 325(1969)
14. Stoeckenius, W. and W. H. Kunau: J. Cell Biol., 33 : 337(1968)
15. Kushner, D. J., S. T. Bayley, J. Boring, M. Kates and N. E. Gibbons: Can. J. Microbiol., 10 : 483(1964)
16. Lanyi, J. K.: Bacteriol. Rev., 38 : 272(1974)
17. 송경숙, 배무 : 한국산업미생물학회지, 15 : 301 (1987)
18. 柳田友道 : 微生物學實驗法, p. 427, 講談社(1983)
19. Norberg, P. and B. V. Hofsten : J. Gen. Microbiol., 55 : 251(1969)
20. Cappuccino, J. G. and N. Sherman : Microbiology a laboratory manual, The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC. (1983)
21. Bergey's manual of determinative bacteriology, The William and Wilkins Co., Baltimore, 8th edition (1974)
22. 萩原文二 : 酵素 研究法, 赤堀四郎編, 第2卷, p.237 (1956)
23. Kamekura, M. and H. Onishi : Can. J. Microbiol., 22 : 1567(1976)
24. Abram, D. and N. E. Gibbons : Can. J. Microbiol., 6 : 535(1960)
25. Stoeckenius, W. and R. Brown : J. Cell Biol., 34 : 365(1967)
26. More, V. and H. Larsen : J. Gen. Microbiol., 31 : 267(1963)
27. Matheson, A. T., G. D. Sprott, I. J. McDonald and H. Tessier : Can. J. Microbiol., 22 : 780(1976)
28. Kamekura, M. and H. Onishi : Appl. Microbiol., 27 : 809(1974)

**Production of protease by the extreme halophile, *Halobacterium* sp.**

Young-Seok Ahn, Chan-Jo Kim and Seong-Hyon Choi(Department of Food Technology, Chungnam National University, Taejeon)

**Abstract :** A bacterial strain which produce a high level of protease was isolated from a commercial salted fish, squid jetkal. This strain was identified as a strain belong to the genus *Halobacterium* and was found to be extremely halophilic : more than 2.0M of sodium chloride was required for the growth. The protease production by the strain was maximized when grown on Norberg & Hofsten medium containing 4.5M sodium chloride, 1.5% gelatin and 0.4% yeast extract (initial pH 7.0) for 108hrs at 38°C.