

Bacillus licheniformis NS70로부터 내열성 Alkaline Protease 생산을 위한 배지최적화

구자협 · 최인재 · 남희섭* · 이형재 · 신재익 · 오태광¹

(주)농심 기술개발연구소, ¹생명공학연구소

Medium Optimization for Production of Thermostable Alkaline Proteases from *Bacillus licheniformis* NS70. Ja-Hyup Koo, In-Jae Choi, Hee-Sop Nam*, Hyung-Jae Lee, Zae-Ik Shin and Tae-Kwang Oh¹. Research and Development Center, Nong Shim, Kunpo 435-030, Korea, ¹Korea Research Institute of Bioscience and Bioengineering, Taejeon 305-600, Korea - Media optimization for the production of thermostable protease specifically hydrolyzing defatted soybean meal (DSM) from *Bacillus licheniformis* NS70 was performed by two methods, one-at-a-time method and response surface methodology (RSM). The best carbon source and nitrogen source for the protease production were lactose and DSM, respectively. The maximum protease production estimated by RSM was 606 U/L at 1.11% lactose and 0.43% DSM, the value of which was nearly consistent to the experimental value of 599 U/L. Yeast extract suppressed the protease production. The medium pH was slightly increased at the beginning stage of fermentation, and it tended to decrease after 8 hours. The optimal pH for the protease production was 7.2 in the batch fermentation.

염산분해에 의한 아미노산 간장(hydrolyzed vegetable protein; HVP)제조에 주원료로 사용되고 있는 탈지대두박(defatted soybean meal; DSM)은 값싸고 단백질 함량이 높은 식물성 단백질 자원으로 알려져 있다. 근래에 DSM을 원료로 한 품질과 풍미가 향상된 효소분해간장(enzymatically hydrolyzed vegetable protein; eHVP)이 소개됨에 따라(1-4), 강력한 분해능력을 가진 protease 탐색에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서 DSM에 기질 특이성이 있고 분해력이 강하며, 산업적으로 이용할 때 미생물의 오염 가능성을 줄이고 수율을 높일 수 있는 내열성 protease를 생산하기 위해 토양으로부터 내열성 균주를 분리하였고, 이 균주를 *Bacillus licheniformis* NS70으로 명명하였다(5). 본 논문은 *B. licheniformis* NS70으로부터 protease의 발효생산을 위한 것으로 배지최적화를 위하여 다음의 2가지 방법을 단계적으로 사용하였다. 첫 단계는 one-at-a-time method(6)로 기본배지를 먼저 선정하고 한 가지 배지성분만 여러 농도로 첨가하여 그 성분이 protease의 생산에 미치는 영향을 살펴보는 것인데, 탄소원과 질소원의 탐색과정에서 이 방법을 사용하였다. 발효공정 중에서 탄소원 및 질소원의 종류와 농도는 미생물 protease 생산에 영향을 준다(7-12). 일반적으로 탄소원 중에 쉽게 대사될 수 있는 glucose나 sucrose에서는 protease의 생산이 감소한다. Starch를 탄소원으로

한 *Bacillus subtilis*의 protease의 생산에서 starch의 농도를 2%에서 5%로 높인 경우 protease의 생산은 현저히 증가되었다(11). 한편, 아미노산이나 ammonium 같은 대사가 되기 쉬운 질소원은 protease 생산을 저해하는(12) 반면, polypeptide들은 protease 생산의 inducer로 작용할 때가 많다. 예를 들면, *Bacillus* sp.를 soybean meal과 bonito extract가 포함된 배지에서 배양했을 때 protease의 생산이 증가되었는데(11), 이 질소원들은 세포 외로 분비되는 효소에 의해 천천히 가수분해되기 때문에 배지중에 높은 농도로 존재하여도 세포가 catabolite repression을 받지 않으면서 에너지와 building block을 얻을 수 있어서 protease가 많이 생산될 수 있다. 두 번째 방법은 반응표면분석법(response surface methodology; RSM)인데, RSM은 변수가 많은 복잡한 공정을 최적화하기에 효과적인 통계적 기법으로(13-15), 충분한 정보를 제공하는 데 필요한 실험구의 수를 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 전통적으로 사용되는 one-at-a-time method나 full-factorial method보다 결과의 수집, 처리가 훨씬 빠르고 경제적이다.

본 연구에서는 *B. licheniformis* NS70으로부터 DSM 분해력이 강력하고 내열성인 protease를 발효생산하는데 있어, one-at-a-time method와 RSM을 이용한 배지최적화를 실시하였으며 더불어 배양시 yeast extract농도와 pH가 protease 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

*Corresponding author

Tel. 82-343-50-5671, Fax. 82-343-57-7004

E-mail: sfbio@chollian.dacom.co.kr

Key words: Protease production, Medium optimization, Response surface methodology

재료 및 방법

균주

토양으로부터 DSM에 기질특이성이 있는 내열성 protease를 생산하는 *Bacillus licheniformis* NS70(5)을 2주마다 계대배양하면서 사용하였다.

배지 및 배양방법

기본배지는 1.0% soluble starch, 0.5% phytone peptone (BBL), 0.2% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 , 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 이루어졌으며, pH는 7.2로 맞추었다. 시험관과 flask 배양은 진탕배양기를 사용하였으며, 교반속도는 180 rpm, 온도는 50°C였다. 발효기는 2.5 L jar fermentor(NBS, Bioflo II, USA)를 사용하였고, 교반속도는 300 rpm, 온도는 50°C, 통기량은 1.0 vvm으로 하였다.

전배양은 plate에서 한 백금이를 취하여 5 ml의 기본배지가 들어있는 시험관에 접종하여 8시간동안 배양하였고, 시험관 전배양액 5 ml를 100 ml의 기본배지가 들어있는 500 ml flask에 접종하여 20 시간 동안 배양한 것을 본배양 접종용으로 사용하였다. Protease 생산에 pH가 미치는 영향을 조사하기 위한 본배양 배지는 기본배지에 탄소원으로 1.11% lactose와 질소원으로 0.43% 탈지대두박(DSM)으로 구성되었다. Flask 배양의 경우 100 ml의 배지가 들어있는 500 ml flask를 사용하였고, 발효조에서는 2.0 L를 working volume으로 하여, 접종량 5%로 24 시간동안 배양하였다. 시료의 채취는 적당한 시간 간격으로 실시하였고, 배양액을 4°C, 10,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 상정액을 효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정

효소활성 측정용 기질은 soybean flour type I (Sigma)을 121°C에서 15 분간 열수추출하고 6,000 rpm에서 원심분리하여 상정액을 취한 다음 동결건조하여 사용하였다. 효소활성의 측정방법은 Kunitz의 방법(16)을 변형하여 사용하였다. 기질을 pH 7.0, 50 mM sodium phosphate buffer에 2% 농도로 현탁시킨 1.0 ml에 0.2 ml의 효소액 (배양상정액)을 넣어 55°C에서 30 분간 반응시켰다. 반응의 정지를 위해 0.44 M trichloroacetic acid (TCA)를 2.5 ml을 가하였다. 효소반응이 종료된 위의 용액을 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 침전시키고 상정액을 1.0 ml 취하여 따로 준비한 시험관에 넣고 2.5 ml 0.55 M Na_2CO_3 , 0.5 ml Folin and Ciocalteu's reagent (Sigma)를 혼합한 후, 잘 섞은 뒤 37°C에서 30 분간 발색반응을 시켜 578 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 1 unit를 pH 7.0, 55°C에서 1 분동안 1 mole의 tyrosine을 생산할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 결정

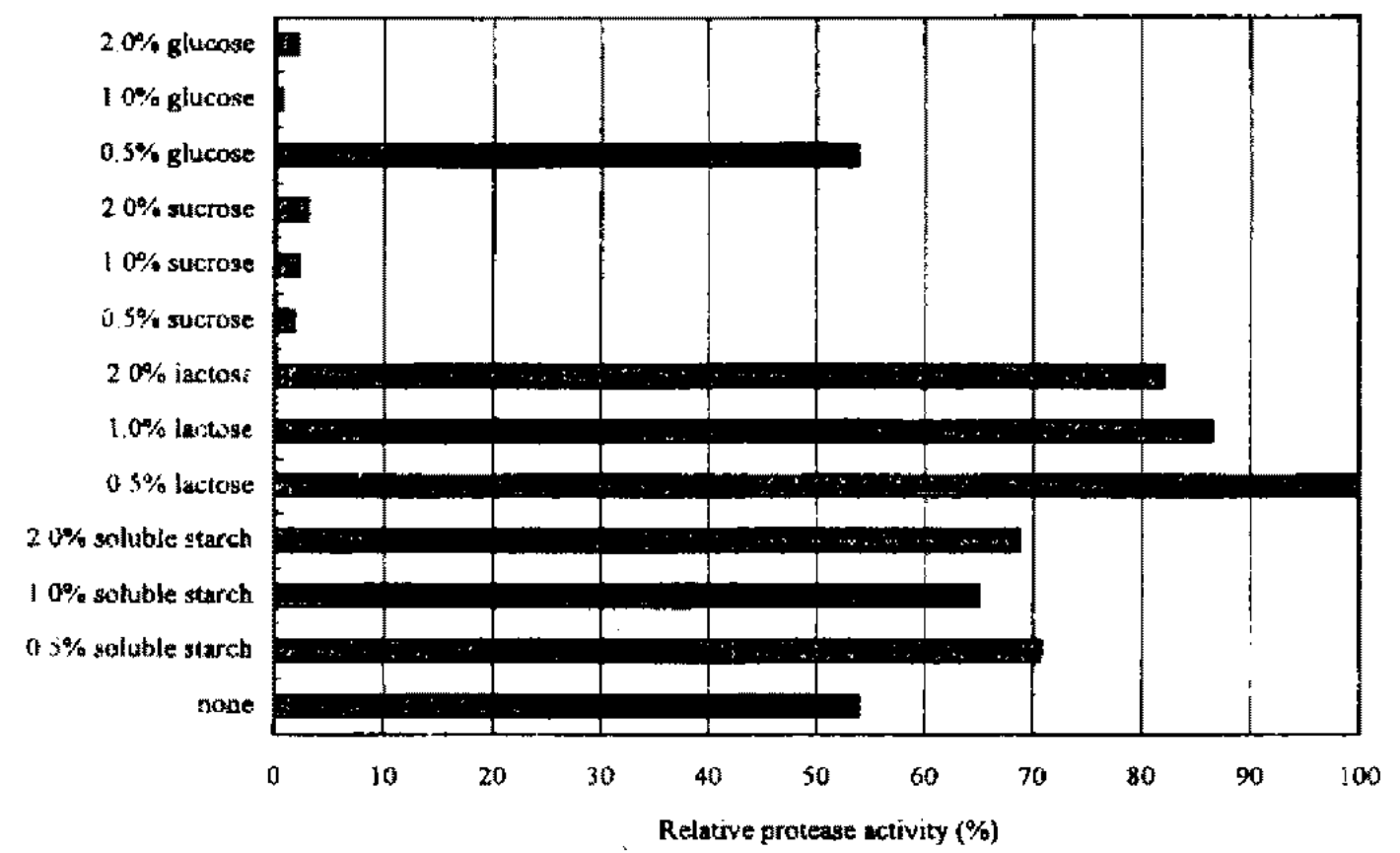


Fig. 1. The effect of carbon source on the protease production of *B. licheniformis* NS70.

B. licheniformis NS70 was grown at 50°C for 24 hours on the basal media with different carbon sources.

Soluble starch를 제외한 기본배지에 여러 종류의 탄소원을 넣어 *B. licheniformis* NS70으로부터 protease의 생산에 효과적인 탄소원을 찾아내고자 하였다. 사용된 탄소원은 soluble starch, lactose, sucrose, glucose였으며, 각각의 탄소원의 농도는 0.5%, 1.0%, 2.0%로 조정하였다. Protease 생산에 가장 우수한 효과를 보인 탄소원은 lactose이었으며, soluble starch도 활성이 높았다 (Fig. 1). Sucrose와 고농도의 glucose 배지에서는 protease가 거의 생산되지 않았는데 이것은 catabolite repression 때문인 듯하다. 한편, 탄소원이 전혀 첨가되지 않은 배지에서도 protease 활성이 나타났는데, 기본배지에 사용된 phytone peptone이 균체 생육에 필요한 탄소원 성분을 함유한 것으로 판단되었다.

질소원의 결정

Protease의 생산에 결정적인 영향을 미치는 성분은 질소원이다(8-12). 일반적으로 protease 생산균주를 배양할 때, 질소원으로 무기질소원이나 amino acid를 사용하면 protease의 생산이 저해를 받는 경우가 많다. 따라서 본 연구에서는 phytone peptone, soytone, polypeptone, DSM 등의 유기 질소원을 사용하였다. 기본배지에 soluble starch와 phytone peptone을 제외하고, 1% lactose를 첨가한 다음 각 질소원의 농도를 0.25%, 0.5%, 1.0%로 조정하였다. 실험에 사용된 질소원 중에서 DSM과 phytone peptone에서 protease 생산이 현저히 높았다 (Fig. 2). 그러나 이들 질소원 농도를 1%로 높이면 활성이 현저히 감소되는 것이 관찰되었다. 이것은 질소원의 농도가 높아질수록, 질소원에 포함된 아미노산이나 저분자 형태의 peptide들의 농도가 상대적으로 높아져서 protease의 생산이 저해를 받은 것으로 생각되었다. 질소원이 전혀 포함되어 있지 않은 대조구에서는 protease의 생산이 거의 없었다. 결국 질소원의 종류도 중요한

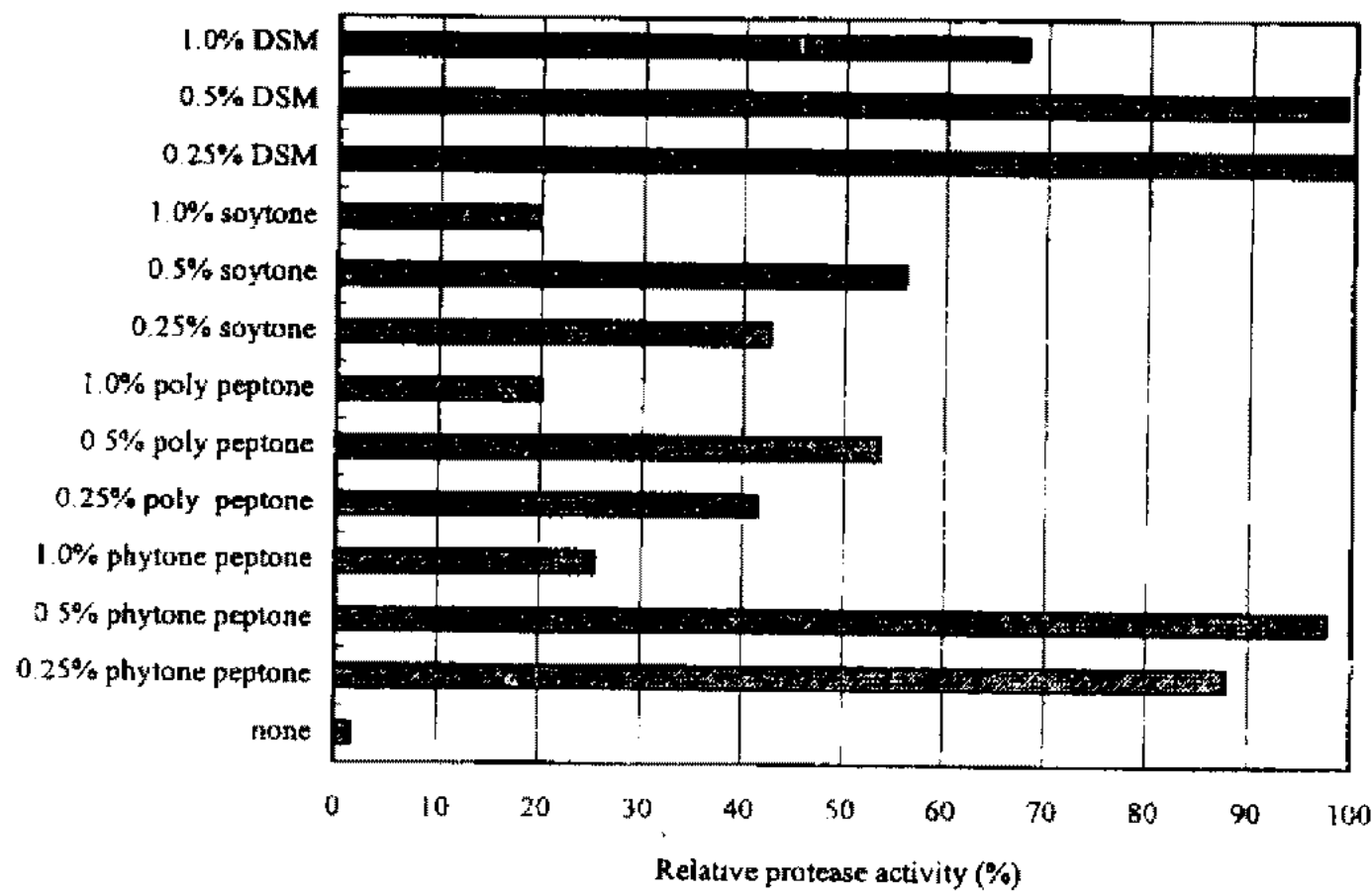


Fig. 2. The effect of nitrogen source on the protease production of *B. licheniformis* NS70. *B. licheniformis* NS70 was grown at 50°C for 24 hours on the basal media with different nitrogen sources.

Table 1. Central composite design for RSM and protease activity as dependent variable.

Experiment No.	Lactose (%)	Defatted soybean meal (%)	Protease production (U/L)
1	0.5	0.25	390.8
2	0.5	0.75	296.4
3	1.5	0.25	516.0
4	1.5	0.75	277.9
5	0.29	0.5	513.7
6	1.71	0.5	511.0
7	1.0	0.15	403.5
8	1.0	0.85	197.2
9	1.0	0.5	619.0
10	1.0	0.5	624.9
11	1.0	0.5	576.7
12	1.0	0.5	597.8
13	1.0	0.5	554.5

변수로 작용하지만 질소원의 농도가 protease의 생산에 큰 영향을 끼치는 것을 알 수 있었다. 본 실험에서는 최적의 질소원으로 DSM을 선택하였다.

반응표면분석법 (RSM)을 이용한 배지 농도의 최적화

RSM의 중심합성계획법에 따라 lactose와 DSM의 농도를 조합한 13개의 실험구를 만들었으며, 중심점의 반복은 5회로 하였다(Table 1). 이때, lactose와 DSM에 대한 농도의 범위는 각각 0.28-1.72%, 0.18-0.82%였다. 각 실험구에 대한 protease의 생산은 Table 1과 같았으며, 이 결과를 바탕으로 lactose(X_1)와 DSM(X_2)을 독립변수로 하여 통계처리전문 program인 SAS를 이용하여 다음과 같은 2차 회귀방정식을 얻었다.

$$\text{Protease(U/L)} = 594.58 - 110.35 X_2 - 100.27 X_1^2 - 312.27 X_2^2$$

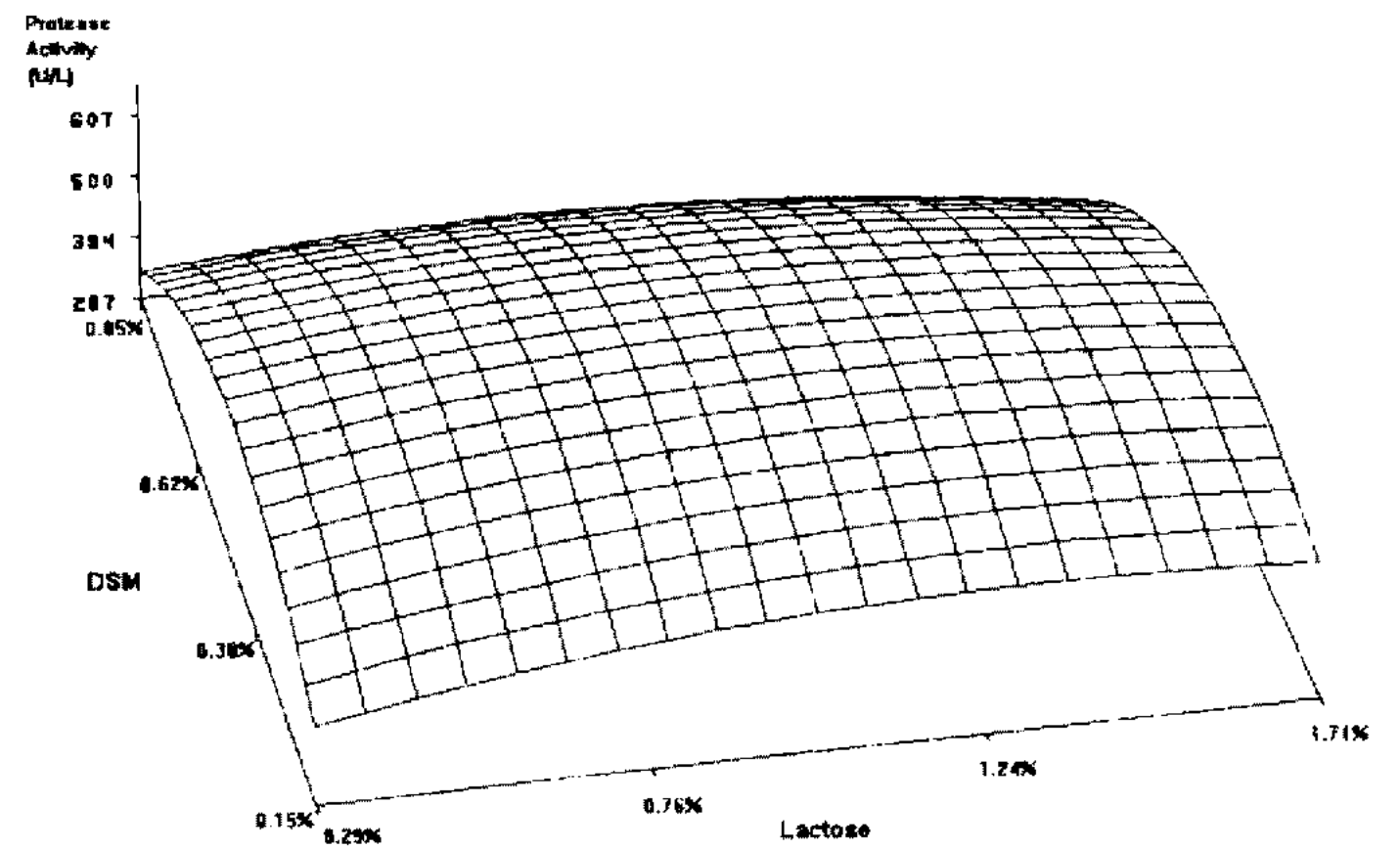


Fig. 3. Three-dimensional plot shows the response surface. The maximum protease production (606.8 U/L) was predicted at 1.11% lactose and 0.43% DSM.

이 식의 total regress에 대한 결정계수(R-square)는 0.9674였고, $p < 0.05$ 수준에서 유의성이 인정되었고, 적합성결여 검정(Lack of fit) 결과 $\text{Prob} > F$ 가 0.3083으로 0.05보다 크므로 추정모형으로 적합이 결여되었다고 판단할 근거가 없기 때문에, 추정된 반응표면식이 통계적으로 적합함을 알 수 있었다. *B. licheniformis* NS70은 lactose의 농도에 대해서는 protease 생산의 변화가 완만한 반면, DSM의 농도에 대해 protease의 생산이 크게 변화하는 것을 통해서 질소원이 protease 생산에 영향을 더 크게 미치는 것을 알 수 있다(Fig. 3). Canonical analysis 결과 stationary point는 최대값을 나타내며, 최대 protease의 생산은 1.11% lactose, 0.43% DSM에서 얻을 수 있고, 이 때 추정되는 protease의 활성은 606 U/L이었다(Fig. 3). 예측 결과의 검증 실험을 실시한 결과, 평균 599 U/L(표준편차 45 U/L)의 protease 활성을 얻을 수 있어서, 통계적인 방법에 의한 최적 결과를 신뢰할 수 있었다. 배지성분 농도의 최적화에 사용된 통계적 처리방법인 RSM의 적용은 실험구의 대폭적인 감소를 장점으로 들 수 있다. Full factorial method의 경우, 이번 실험에서와 같이 5 수준에서 2개의 요인에 대해 실험할 때, 25 개의 실험구가 필요하게 되고, 요인이 증가할수록 실험구의 수는 훨씬 더 많아진다. 이에 반해 RSM은 경제적인 실험 설계를 통하여 분석에 필요충분한 최소한의 자료를 얻음으로써 실험의 효율성 제고와 함께 정확한 예측으로, 배지최적화 뿐만 아니라 시간, 온도, pH, 용존 산소농도 등 발효공정의 환경변수 최적화에도 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Yeast extract가 protease 생산에 미치는 영향

Yeast extract에는 각종 미네랄과 비타민 등이 함유되어 있어 미생물의 성장을 향상시키는 배지성분으로 많이 사용되고 있는데, protease 생산에 있어서 균주마다 그

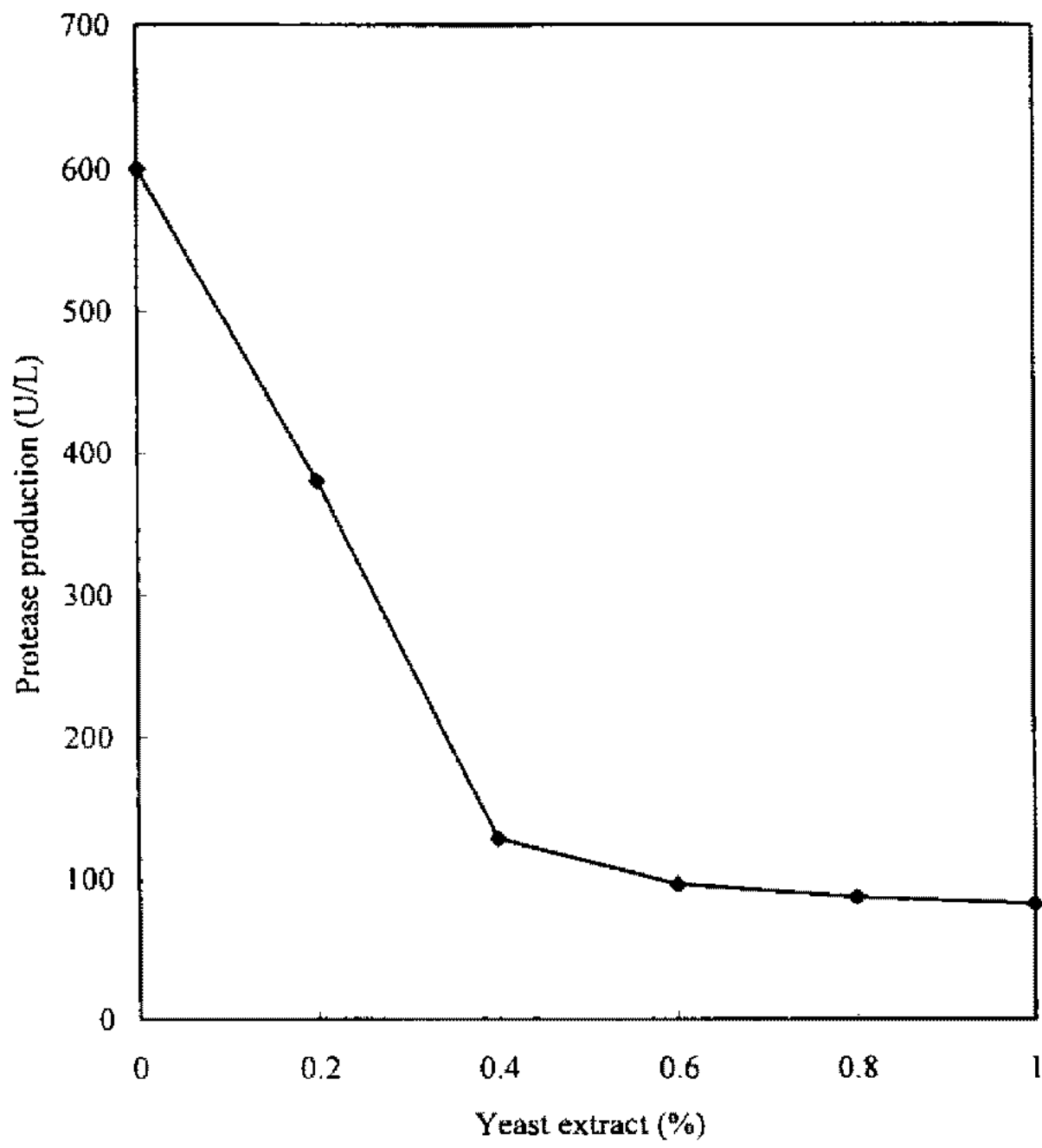


Fig. 4. The effect of yeast extract on the protease production of *B. licheniformis* NS70. *B. licheniformis* NS70 was grown at 50°C for 24 hours on the optimized media with different yeast extract concentrations.

영향이 다르다. *Thermoactinomyces* sp. 배지에 0.04%의 yeast extract를 첨가하면 protease의 생산이 2배로 높아지지만(17) *Bacillus firmus*의 protease생산에서 yeast extract를 0.03%까지 첨가할 때는 protease의 생산이 증가하나 그 이상의 농도에서는 오히려 생산이 감소하였다(18). 본실험에서는 yeast extract가 protease 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 최적화된 배지에 yeast extract를 1.0%까지 첨가하였을 때 첨가된 yeast extract의 농도가 0.4%까지 증가하면 protease의 생산은 급격히 감소하였고, 0.4-1.0%에서는 protease 생산이 매우 낮았으며 변화는 거의 없었다(Fig. 4). 이것은 yeast extract 내에 포함되어 있는 아미노산과 저분자 peptide들로 인하여 protease 생합성이 억제되기 때문으로 생각되었다.

배양액의 pH가 protease의 생산에 미치는 영향

배양액의 pH는 수많은 효소작용뿐만 아니라 세포막을 통하는 여러가지 물질들의 통과에도 영향을 미친다. 따라서 pH는 미생물의 생육과 그들의 효소생산에도 영향을 미칠 것이다.

초기 pH를 7.2로 조정된 상태에서 배양한 결과, 배양 3시간부터 8시간까지 급격히 protease가 생산되었다. 이때, pH는 배양 8시간까지 약간 증가하다가 그 이후 pH가 서서히 감소하였다(Fig. 5). 배양초기에 pH가 증가되는 것은 유기질소원을 사용하였기 때문이며(8), 배양 중기 이후의 pH 감소는 세포 생육의 부산물로 생산되는 유기산들에 의한 것으로 생각된다. Chu 등(8)은 pH의 변

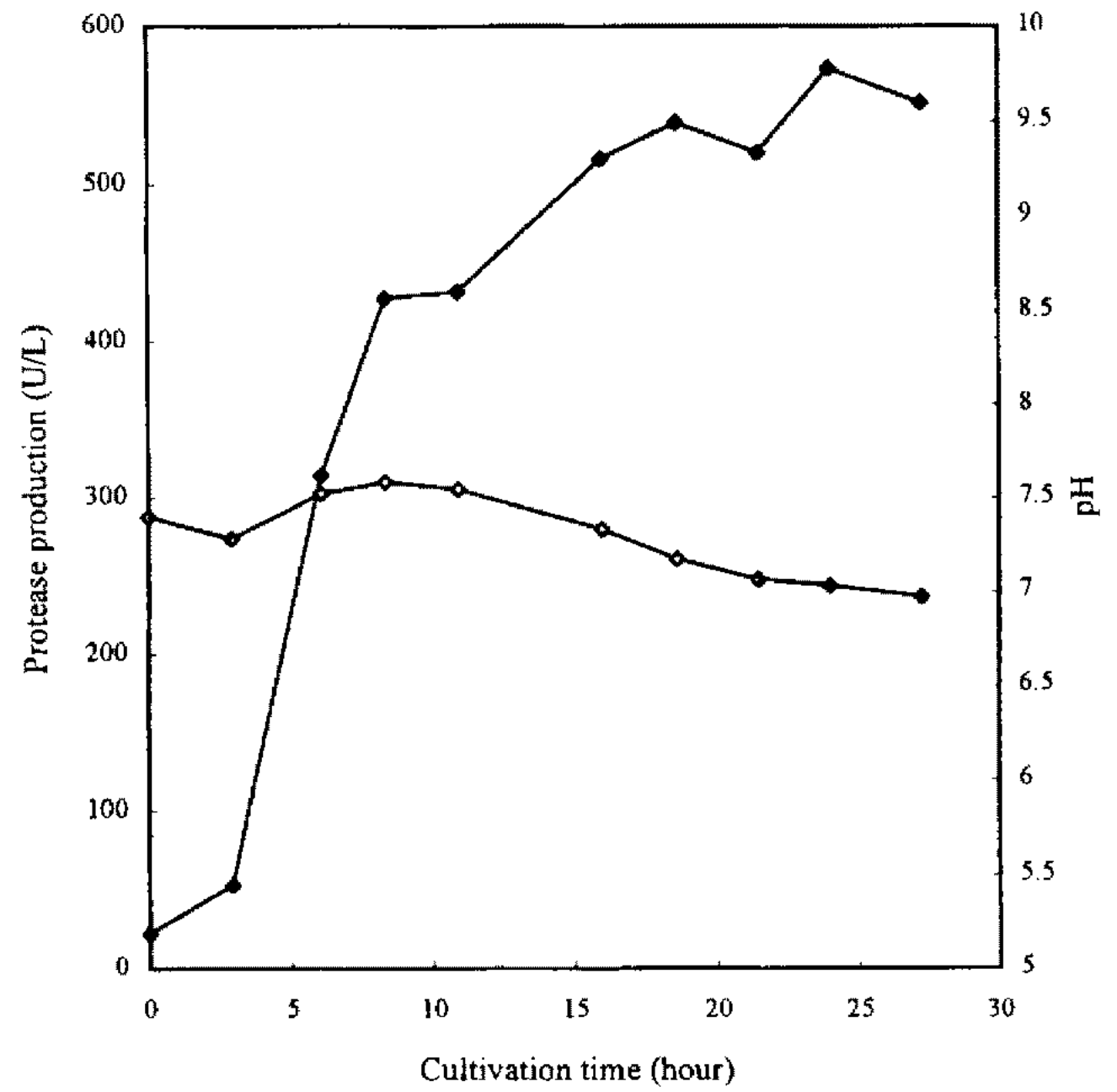


Fig. 5. Protease production of *B. licheniformis* NS70 in a 2.0 L fermentation. Temperature was 50°C, agitation 300 rpm, and aeration 1.0 vvm. (◆, protease; ◇, pH).

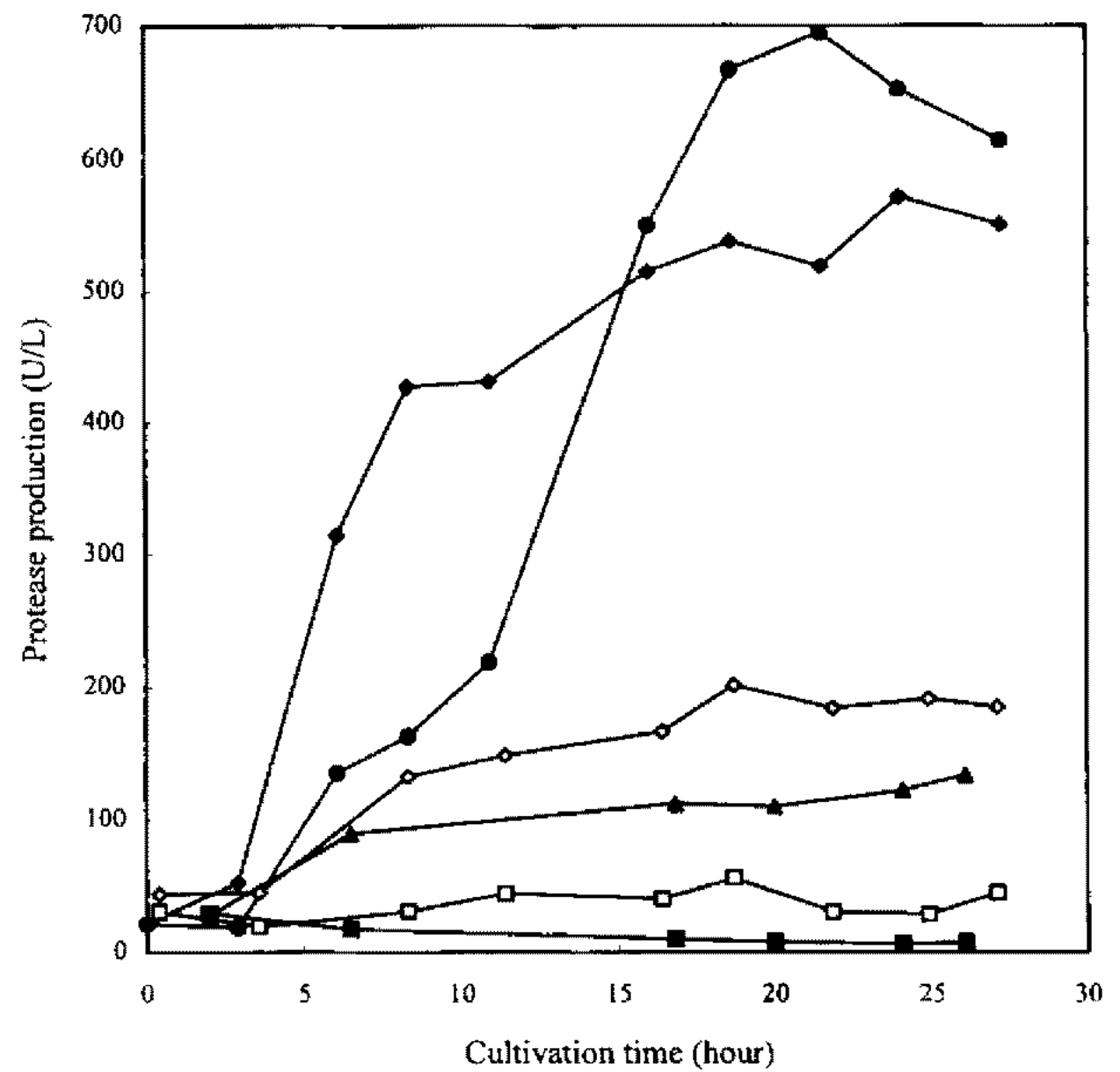


Fig 6. The effect of pH on the protease production of *B. licheniformis* NS70 in the batch fermentation. (◆, uncontrolled; ■, pH 5.2; ▲, pH 6.2; ●, pH 7.2; ◇, pH 8.2; □, pH 9.2).

화를 통하여 protease의 생산양상을 예측할 수 있다고 보고하였는데, 효소의 생산이 시작되면 pH가 증가하기 시작하여, protease가 생합성되는 동안은 pH의 증가속도가 빠르지만 protease의 생산이 중단되면서 pH의 증가속도가 둔화된다고 하였는데, 본 실험에서도 비슷한 경향이 관찰되었다(Fig. 5). 이로써 배양중 pH의 변화를

관찰함으로써 protease의 생산양상도 예측할 수 있어서, protease의 생산을 monitoring할 수 있는 중요한 환경인 자임을 알 수 있었다. Fig. 6은 회분식 배양 중 pH를 조절하였을 때, protease의 생산변화를 관찰한 것이다. pH를 조절하지 않은 배양을 대조구로 하여 비교해 보면, pH 7.2로 조절했을 때 protease 생산이 다소 증가하는 양상을 보였고 나머지 pH에서는 protease의 생산이 감소하였다. 이 결과로부터 *B. licheniformis* NS70의 protease 생산이 가능한 pH 범위가 좁았고, 배양액의 pH가 본 균주로부터 protease의 생산에 크게 영향을 미치는 요인임을 알 수 있었다. Alkaline protease는 선발된 균주가 생산하는 효소의 특성이고, 알칼리조건에서 효소의 성능이 가장 뛰어나며, 배양액의 pH는 생산균주가 생육하고, alkaline protease를 생산하는 데 필요한 환경변수로 pH 7.2가 적당하였다.

요 약

토양으로부터 분리된 탈지대두박(DSM)에 기질특이성이 있고 내열성 protease를 생산하는 *Bacillus licheniformis* NS70의 발효생산시 배지최적화를 one-at-a-time method와 반응표면분석법(RSM)에 의해 실시하였으며, 더불어 yeast extract의 농도와 pH가 protease의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. *B. licheniformis* NS70의 protease의 생산에 최적의 탄소원과 질소원은 각각 lactose와 DSM이었다. RSM에 의해 예측된 최대 protease 생산은 1.11% lactose와 0.43% DSM 농도일 때 606.8 U/L 였으며, 검정실험을 통하여 평균 599 U/L로 예측값과 실험값이 거의 일치함을 보였다. 배지에 yeast extract를 첨가하면 protease 생산은 억제되었다. 발효조 배양 중에 pH는 초기에 약간 증가하다가 배양 8시간 이후에는 감소하는 경향을 나타내었으며, 회분식 배양에서는 pH 7.2로 조절하였을 때 최대의 protease 생산을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 1995년도 과학기술처의 선도기술개발과제(G7 프로젝트) 연구비의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 食品と開發. 1996. 酵素による食品開發-最近の話題, **31**(2): 26-27.
2. Pommer, K. 1995. New proteolytic enzymes for the production of savory ingredients. *Cereal Foods World* **40**(10): 745-748.
3. 月刊フドケミカル. 1995. 調味料製造用 酵素製劑 “フ

4. 糖 麹, 로버트 두스탄 우드, 알프레드 우페이어. 1996. 향미료의 제조방법. 대한민국특허 96-5057.
5. Kim, Y. O., J. K. Lee, Y. S. Park and T. K. Oh. 1996. Purification and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis* NS70. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**(1): 1-6.
6. Silveira, R. G., T. Kakizono, S. Takemoto, N. Nishio, and S. Nagai. 1991. Medium optimization by an orthogonal array design for the growth of *Methanosarcina barkeri*. *J. Ferment. Bioeng.* **72**(1): 20-25.
7. Shalini Sen and T. Satyanarayana. 1993. Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40. *Indian J. Microbiol.* **33**(1): 43-47.
8. Chu, I. M., C. Lee, and T. S. Li. 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 755-761.
9. Frankena, J., H. W. van Verseveld, and A. H. Stouthamer. 1985. A continuous culture study of bioenergetic aspect of growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 169-176.
10. Heineken, F. G. and R. J. O'Conner. 1972. Continuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and amylase *Bacillus subtilis* NRRL-B 3411. *J. Gen. Microbiol.* **73**: 35-44.
11. Fujiwara, N. and K. Yamamoto. 1987. Production of alkaline protease in a low-cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. *J. Ferment. Technol.* **65**(3): 345-348.
12. Himelbloom, B. H. and H. M. Hassen. 1986. Effects of cysteine on growth, protease production, and catalase activity of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**(2): 418-421.
13. Arteaga, G. E., E. Li-Chan, M. C. Vazquez-Arteaga, and S. Nagai. 1994. Systematic experimental designs for product formula optimization. *Trends Food Sci. Technol.* **5**: 243-254.
14. Gontard, N., S. Guilbert, and J. Cuq. 1992. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.* **57**(1): 190-199.
15. Shieh, C. J., C. C. Akoh, and P. E. Koehler. 1995. Four-factor response surface optimization of the enzymatic modification of triolein to structured lipids. *JAOCs* **72**(6): 619-623.
16. Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* **30**: 291.
17. Tsuchiya, K., Sakashita, Y., Nakamura, Y., and Kimura, T. 1991. Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. *Agric. Biol. Chem.* **55**(12): 3125-3127.
18. Moon, S. H. and Parulekar, S. J. 1991. A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 467-483.

(Received 24 September 1996)