

호알칼리성 Coryneform Bacteria TU-19의 형태적, 배양적 특성에 미치는 pH효과

강선철* · 최명철 · 양재섭¹ · 황철원²

대구대학교 생물공학과, ¹분자생물학과, ²한동대학교 환경미생물학교실

초 록 : 다양한 초발 pH에서 호알칼리성 Coryneform bacteria TU-19 균주를 배양하면서 이 균주의 형태적, 배양적 특성을 조사하였다. 그 결과 pH 9.0~10.0의 초발 pH 범위에서 공시균주는 정상적인 성장을 보였으나 pH 12.0에서는 성장이 완전히 저해되었다. 흥미롭게도 본 균주는 배지의 초발 pH에 따라 균체의 형태적 변화가 관찰되었다. 즉 pH 8.0, 대수중식기에서 이 균은 길게 둘둘말린 filament 형태를 이루고 있었으나 최적 pH(10.0)에서는 한 개 혹은 두 개의 짧게 뺨은 rod 형태를 보였다. 또한 이 균은 pH 9.0~11.0 범위에서 배양할 경우 배양액의 최종 pH를 자신의 생육에 적합하도록 8.5 근처로 조절할 수 있음이 확인되었다.(1998년 8월 2일 접수, 1998년 8월 21일 수리)

서 론

1934년 Vedder는 Na_2CO_3 를 첨가한 배지에서 생육하는 *Bacillus alcalophilus*를 최초의 호알칼리성 세균으로 보고¹⁾ 하였으며, 이후에 이들 호알칼리성 균주들에 대하여 가장 많은 연구를 수행한 사람은 Horikoshi로서 주로 protease를 중심으로한 산업용 효소개발과 관련이 있었다. 즉 1971년에 이들 group에 의하여 호알칼리성 *Bacillus* sp.로부터 alkaline protease가 최초로 발견되었으며²⁾ 이때부터 세제, 연육가공, 탈모공정 등에 있어서 탁월한 유용성이 있는 활성이 높고 새로운 성질을 갖는 alkaline protease 생산균주의 선별에 많은 노력을 기울여 왔다.³⁾ 국내에서도 alkaline protease가 효소세제의 첨가물로서 관심이 고조되어 새로운 호알칼리성 균주 선별에 각별한 노력을 기울여 왔다. 그러나 연구대상의 균주는 대부분 *Bacillus* sp.에 국한^{4,5)} 되어 있고 그외 *Alteromonas*,⁶⁾ *Xanthomonas*,⁷⁾ *Pseudomonas*,⁸⁾ *Streptomyces*⁹⁾ 등이 한정적으로 연구되었다. 뿐만아니라 호알칼리성 미생물에 대한 분류학적, 생리생태학적, 배양적 특성 등에 대한 기초적 연구는 이보다 훨씬 부족한 편이며, 대체적으로 효소생산과 관련된 연구의 일부로서 *Bacillus alcalophilus*,¹⁰⁾ *B. subtilis*^{11,12)} 및 몇 종의 *Bacillus* sp.^{13,14)} 등의 균주에 대한 배양특성이 부분적으로 연구되어져 왔다. 본 연구진은 토양으로부터 alkaline protease 생성능이 우수한 새로운 호알칼리성 균주인 Coryneform bacteria TU-19를 분리·동정하여¹⁵⁾ 이 균주가 생분해하는 세종류의 alkaline proteases의 순수분리·정제 및 효소적 특성 등에 관하여 보고한 바 있다.¹⁶⁾ Coryneform bacteria는 동·식물의 병원균이 되기도 하지만 여러 가지 아미노산, 핵산, 효소 등의 발효생산에 이용되는 산업적으로 매우 중요한 균주로 알려져 있다.¹⁷⁾ 그러나 아직까지 호알칼리성 Coryneform bacteria의

찾는말 : 호알칼리성 Coryneform bacteria, 초발 pH, 형태적 변화
*연락처자

생리·생태학적 특성들에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않고 있다. 따라서 본 논문에서는 토양에서 분리한 호알칼리성 Coryneform bacteria TU-19 균주를 다양한 pH조건에서 배양하면서 배지의 초발 pH가 균의 생육과 균체의 형태 변화에 미치는 영향 및 배양액의 pH 변화 등에 대하여 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주

경상북도 일대의 축사주변의 토양으로부터 순수 분리한 호알칼리성 Coryneform bacteria TU-19 균주를 본 연구를 위한 공시균주로 사용하였다.¹⁵⁾

배양배지

상기 균주의 균체배양을 위한 배지 조성은 배지 liter당 glucose 10.0 g, yeast extract 5.0 g, tryptone 10.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g 등으로 구성되며, 배지의 pH는 NaOH로 조정하였다.

미생물의 배양

배지의 초발 pH를 각각 7.0~12.0 범위로 조절하여 배양하면서 균주의 성장에 미치는 pH 효과를 조사하였다. 배양 조건은 상기조성에 따라 준비한 액체배지 5 ml (pH 10.5)에 평판배지에서 성장한 공시균주의 colony를 접종한 후 30°C에서 48시간 진탕배양시켜 종균배양액을 준비하였다. 이것을 pH만 달리하여 각각 250 ml 삼각플라스크에 50 ml씩 미리 준비한 액체배지에 1% (V/V)의 양으로 재접종하여 30°C에서 60시간 진탕배양(200 rpm)하면서 균체량을 측정하였다. 균체량은 주어진 시간에 OD_{600} 에서의 흡광도를 측

정하여 정량하였으며 배양액의 pH는 pH meter (Orion 611, USA)를 사용하여 측정하였다. 시간경과에 따른 배양액 내의 균의 형태관찰은 광학현미경(Nikon YS2-H, Japan)을 사용하였다.

Protease 활성측정

단백질분해효소의 활성은 Yanagida 등¹⁸⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 기질용액(0.6% Hammersten casein 용액)은 50 mM sodium bicarbonate 완충용액(pH 10.5) 100 ml에 casein 0.6 g을 녹이고, 5분간 중탕가열하여 제조하였다. 효소반응은 적절히 희석한 효소용액(최대 120 µl)을 기질용액 600 µl와 혼합하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 TCA 혼합용액(0.11 M Trichloroacetic acid, 0.22 M Sodium acetate, 0.33 M Acetic acid, glacial) 600 µl를 첨가하여 반응을 중지시키고 30분 동안 실온에 방치한 뒤 원심분리하였으며(15,000 rpm, 15분), 이때 효소의 역할은 효소반응물의 상등액에 대한 흡광도(A₂₇₅)를 측정함으로써 결정하였다. 단백질분해효소의 활성도 1 unit는 30°C에서 30분간 효소 반응시켜 흡광도가 1.0 증가하는 것에 상응하는 효소의 양으로 정하였다.

결과 및 고찰

초발 pH에 대한 균의 생육정도

최적 배양조건(30°C, 200 rpm)에서 초발 pH를 7.0~12.0 범위로 조절하면서 Coryneform bacteria TU-19 균주의 생육 정도를 조사한 결과(Fig. 1) pH 10.0에서 가장 왕성한 생육

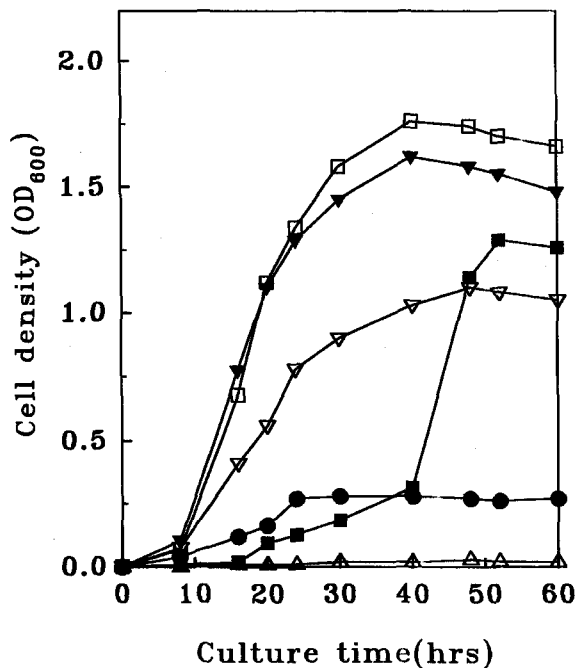


Fig. 1. Growth curve of Coryneform bacteria TU-19 at various initial pHs. Symbols denote the initial pHs: ●—●, pH 7.0; ▽—▽, pH 8.0; ▼—▼, pH 9.0; □—□, pH 10.0; ■—■, pH 11.0 and △—△, pH 12.0.

상태를 보였으며, 이때 배양 8시간째부터 대수증식기에 들어가 40시간째 정지기에 도달하였다. 그러나 이 균주는 중성 pH(pH 7.0)에서는 성장이 매우 저조하였으므로 내알칼리성 균주가 아니라 호알칼리성 균주로 생각된다. 한편 pH 11.0에서는 유도기(lag phase)가 상당히 길어져서 배양 40시간이 되어야 대수증식기가 시작되었으며, 강알칼리 조건(pH 12.0)에서는 균체의 성장이 거의 없었다. 일반적으로 호알칼리성 균주들은 pH 7.0~11.0 범위내에서 성장이 매우 양호한 것으로 알려져 있는데¹⁹⁾ 비해 본 균주는 pH 9.0~10.0 사이에서만 성장이 잘되는 pH 범위가 비교적 협소한, 호알칼리성 균주로 사료된다.

배지의 초발 pH에 따른 균주의 형태 변화

배지의 초발 pH를 10.0, 8.0으로 각각 조절하여 공시균주를 배양했을 때 배양중의 미생물의 형태변화를 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. 이 균주는 pH 10.0의 고체평판배지에서 배양하여 72시간 이상 경과하면 한 개 혹은 2개로 된 구균의 형태를 취한다. 그러나 이것을 액체배지(pH 10.0)에 재접종하여 배양하면 16시간 경과 후 4~8개 혹은 그 이상의 구균이 서로 붙어있는 형태로 성장하여 막대균과 같은 형상을 하게 된다. 그리고 배양 30시간에는 세포가 서로 분리되기 시작하여 배양 60시간 경에는 매우 짧은 단간균이 쌍으로 붙어 있는 형태 혹은 구균의 형태를 취하게 된다(Fig. 2). 그러나 pH 8.0의 경우에는 배양초기(배양 16 시간) 때부터 세포가 성장하여도 분리되지 않은채 긴 사슬모양을 이루어 배양 40시간 때까지 매우 긴 사슬이 구부러지고, 영

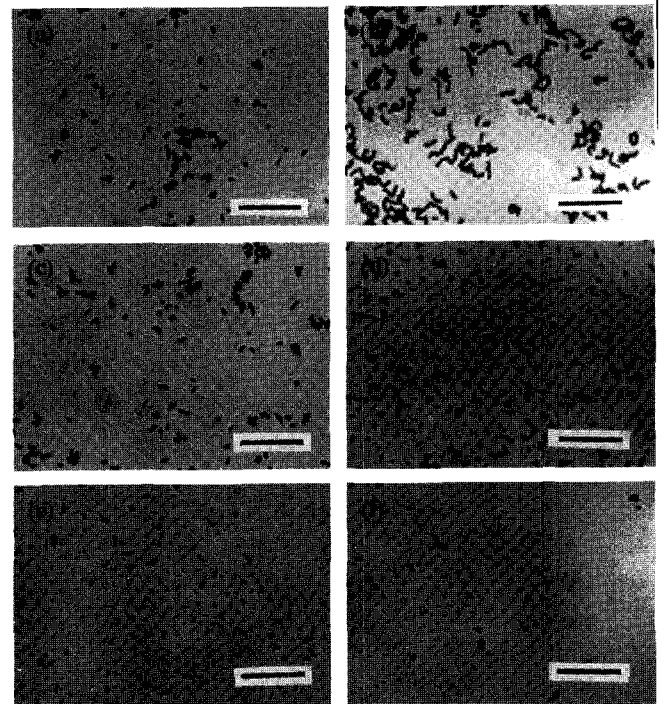


Fig. 2. Photomicrographs of Coryneform bacteria TU-19 grown at pH 10.0. The scale bar indicates 10 µm. Symbols denote the culture time of the bacteria: A, 8 hrs; B, 16 hrs; C, 24 hrs; D, 30 hrs; E, 40 hrs and F, 52 hrs.

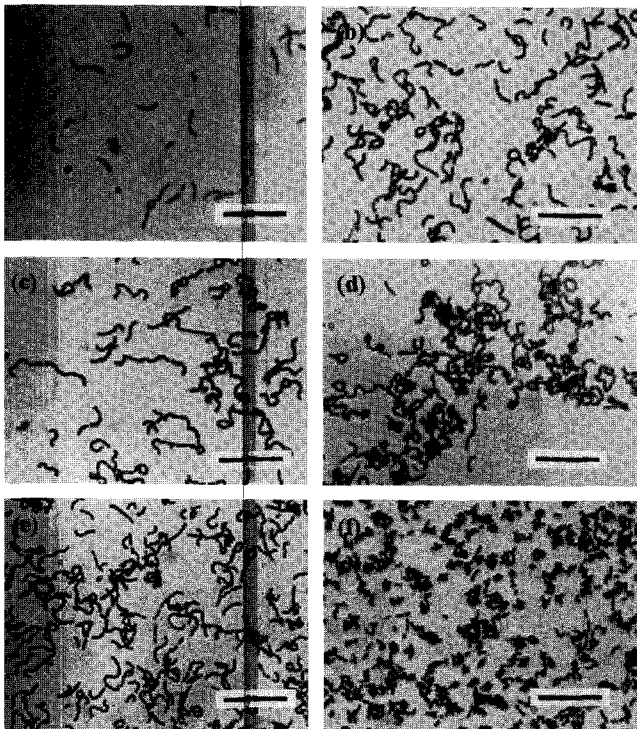


Fig. 3. Photomicrographs of Coryneform bacteria TU-19 grown at pH 8.0. The scale bar indicates 10 μ m. Symbols denote the culture time of the bacteria: A, 8 hrs; B, 16 hrs; C, 24 hrs; D, 30 hrs; E, 40 hrs and F, 52 hrs.

켜진 형태로 관찰되었다(Fig. 3). 한편 pH 9.0과 11.0에서는 세포의 성장과 관련된 약간의 시차는 있었지만 대체적으로 pH 10.0에서의 형태변화와 유사한 경향을 보였다(data 생략). 이상의 결과는 Souza *et al.* 등이 호알칼리성 *Bacillus* sp.에서 보고²⁰⁾한 것과 같이 공시균주도 배지의 초발 pH에 따라 균체의 형태변화에 영향을 받을 수 있음을 보여주는 것이다. 그러나 초발 pH에 따라 미생물의 형태변화가 어떠한 양상으로 일어나는지에 대한 정확한 생리생화학적인 기작을 규명하기 위해서는 배양단계별 세포막, 세포벽 등의 화학조성변화 및 물리적 구조변화에 대한 보다 자세한 분석이 필요할 것이다.

배양시간 경과에 따른 배양액의 pH 변화

배양액의 초발 pH를 7.0~12.0 범위로 조정하여 30°C에서 60시간 배양하면서 배양액의 pH변화를 시간별로 측정하였다(Fig. 4). 배양 초발 pH가 10.0인 경우 배양 8시간 경과 후 pH는 9.6으로 낮아졌다. 또한 이 후의 대수증식기 동안에 균체의 성장밀도는 계속 증가하였으나 pH는 계속 떨어져 균체밀도가 최고인 배양 40시간 경에 pH 8.5까지 낮아졌다. 이후로는 이 pH 상태를 그대로 유지하였다(Fig. 4). pH 9.0의 경우는 pH 10.0에 비해 비교적 완만하게 pH가 낮아졌으며 배양 40시간경에 pH 8.4로 최저를 기록한 후 동일한 값을 그대로 유지하였다.

한편 pH 11.0에서는 이 균의 생육이 매우 느려 배양 40시간이 되어야 대수증식기를 시작하였는데 배양중의 pH는

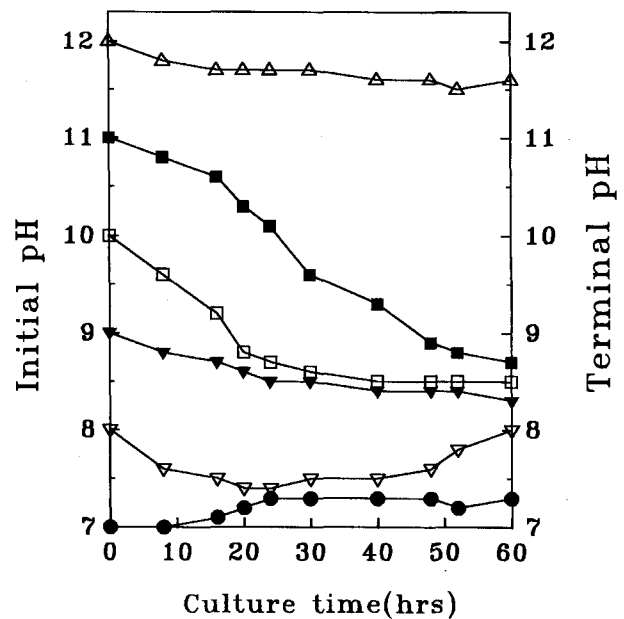


Fig. 4. External pH changes during the cultivation of Coryneform bacteria TU-19 at various initial pHs. Symbols denote the initial pHs: ●—●, pH 7.0; ▽—▽, pH 8.0; ▼—▼, pH 9.0; □—□, pH 10.0; ■—■, pH 11.0 and △—△, pH 12.0.

배양 16시간 때부터 급격히 떨어져서 균체밀도가 가장 높은 배양 48시간에는 pH 8.9까지 낮아졌다. 이것은 초발 pH가 9.0이나 10.0인 경우에 비해 pH가 훨씬 더 급격하게 떨어졌음을 알 수 있다. 이러한 원인은 첫째, 외적요인으로서 pH 11.0과 같은 높은 pH에서 배양시 이 균주는 균체의 성장과 더불어 일부 균체의 lysis가 관찰되었다. 이 과정에서 세포내용물의 방출이 일어나면서 자연적으로 pH가 낮아질 것으로 추측된다. 둘째는 내적요인으로서 이 균이 성장하면서 스스로의 능력으로 배양액의 pH를 자신의 생육에 적합하도록 조절하는 것이다. 후자의 경우는 호알칼리성 *Bacillus* sp.가 배양액의 pH를 자신의 성장에 알맞도록 변화시키는 능력이 있다는 Horikoshi,¹³⁾ Ueyama,²¹⁾ Souza²⁰⁾ 등의 보고에 근거한다. 그러나 아직까지 이들 호알칼리성 세균들이 균체 외부의 pH를 자신의 생육에 적합하도록 전환하는 것과 관련된 정확한 생화학적인 기작은 밝혀지지 않았다.

초발 pH가 단백질분해효소 생성에 미치는 영향

배지내의 초발 pH에 따른 단백질분해효소의 생성관계를 알아보기 위하여 다양한 pH조건(pH 7.0~12.0)에서 공시균을 배양하면서 배양상등액에 대한 효소활성을 측정하였다(Fig. 5). 이 균주는 배지의 pH가 10.0일 때 최대의 효소활성을 보였다. 그러나 pH 7.0과 12.0에서는 균체의 성장이 거의 없었으며(Fig. 1) 효소의 활성도 거의 나타나지 않았다(Fig. 5). 한편 pH 11.0의 경우는 배양 40시간 이후에야 효소의 생산이 급증하는 양상을 나타내었는데 이것은 Souza의 보고²⁰⁾와 같이 초발 pH가 균체의 최적생육보다 너무 높을 때 미생물이 스스로 배지의 pH를 자신의 생육에 적절한 pH로 조절하기 위하여 lag phase가 길어졌기 때문에 생긴

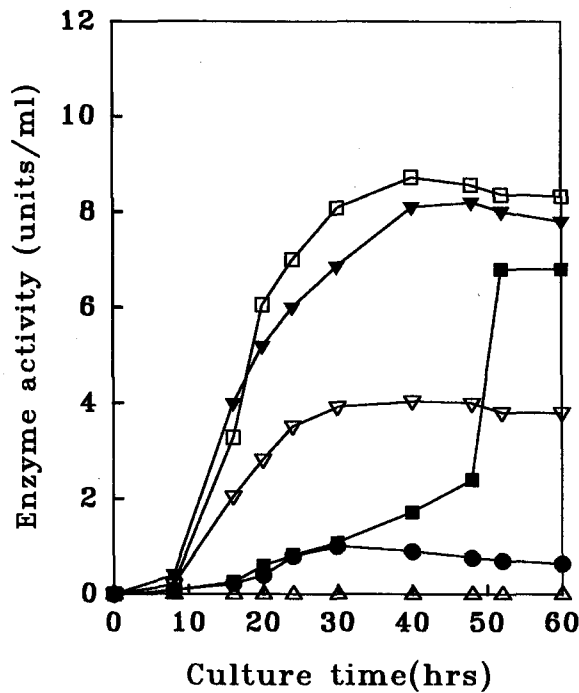


Fig. 5. Protease production of Coryneform bacteria TU-19 according to initial pHs. Symbols denote the initial pHs: ●—●, pH 7.0; ▽—▽, pH 8.0; ▼—▼, pH 9.0; □—□, pH 10.0; ■—■, pH 11.0 and △—△, pH 12.0.

현상으로 추정된다.

이상에서 본 균주는 세포의 성장이 이루어짐과 동시에 비례적으로 효소의 생성이 이루어진다고 판단된다. 그러나 *Bacillus* sp. 등에서는 균체의 성장이 완결된 대수증식기 말 기경에 효소를 생성분비하며, 또한 이때부터 포자형성이 시작되므로 이 경우에는 효소의 분비시기가 포자의 형성과 관련되어 있을 것으로 추정하고 있다. 그러나 Coryneform bacteria TU-19는 포자를 형성하지 않으며 또한 효소분비 양상이 균체의 성장과 더불어 증가된다는 결과에 비추어 볼 때 이 효소의 기능이 세포의 성장에 필요한 영양성분 즉 배지중의 단백질을 분해하여 질소원으로 체내에 공급하기 위한 주요 수단으로써 이용되고 있음을 설명해 주고 있다.

참고문헌

- Vedder, A. (1934) *Bacillus alcalophilus* sp. nov.; benevens enkele ervaringen met sterk alcalische voedingsbodems. *Antonie van Leeuwenhoek* **1**, 141-147.
- Horikoshi, K. (1971) Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* sp. No. 221. *Agri. Biol. Chem.* **35**, 1407-1414.
- Ward, O. P. (1986) Proteolytic enzymes. *Comprehensive Biotechnology* **3**, 789-818.
- Ahn, J. W., T. K. Oh, Y. H. Park and K. H. Park (1990) Partial purification and characterization of the alkaline protease from *Bacillus* sp.. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 344-351.
- Bae, M. and P. Y. Park (1989) Purification and characterization of thermotolerable alkaline protease by alkalophilic *Bacillus* sp. No. 8-16. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 545-551.
- Yeo, I. O., S. H. Choi, J. S. Lee and C. J. Kim (1995) Characteristics of an alkaline protease from *Alteromonas* sp.. *Agri. Chem. Biotech.* **38**, 106-110.
- Lee, C. H., T. J. Kwon, S. M. Kang, H. H. Suh, G. S. Kwon, H. M. Oh and B. D. Yoon (1994) Production and characterization of an alkaline protease from an isolate, *Xanthomonas* sp. YL-37. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 515-521.
- Roh, J. S., Y. C. Chung, S. K. Park and N. K. Sung (1991) Isolation of alkalopsychrotrophic protease-producing *Pseudomonas* sp. RP-222 and properties of its crude enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 383-389.
- Jeong, B. C., H. S. Shin and K. J. Lee (1988) Relationship between sporulation and synthesis of alkaline protease in *Streptomyces* sp.. *Kor. J. Microbiol.* **26**, 355-361.
- Boyer, E. W., M. B. Ingle and G. D. Mercer (1973) *Bacillus alcalophilus* subsp. *halodurans* subsp. nov.: an alkaline-amylose-producing, alkalophilic organism. *Intl. J. Sys. Bacteriol.* **23**, 238-242.
- O'Hara, M. B. and J. H. Hageman (1990) Energy and calcium ion dependence of proteolysis during sporulation of *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* **172**, 4161-4170.
- Chang, S. J., Y. S. Kim, H. C. Sung, Y. J. Choi and H. C. Yang (1988) A study on the alkaline protease produced from *Bacillus subtilis*. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **31**, 356-360.
- Horikoshi, K. and T. Akiba (1982) Alkalophilic microorganism: A new microbial world, Japan Scientific Societies Press Inc., Tokyo.
- Durham, D. R., D. B. Stewart and E. J. Stellwag (1987) Novel alkaline and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX 6638. *J. Bacteriol.* **169**, 2762-2768.
- Choi, M. C., J. S. Yang and S. C. Kang (1996) Isolation and identification of an alkalophilic Coryneform bacterium TU-19 producing extracellular protease(s). *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 160-165.
- Kang, S. C., M. C. Choi and J. S. Yang (1995) Purification of three extracellular proteases from alkalophilic Coryneform bacteria TU-19. *Agri. Chem. Biotech.* **38**, 534-540.
- Follettie, M. T. and A. J. Sinskey (1986) Recombinant DNA technology for *Corynebacterium glutamicum*. *Food technology* **40**, 88-94.
- Yanagida, N., T. Uozumi and T. Beppu (1986) Specific excretion of *Serratia marcescens* protease through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **166**, 937-944.
- Priest, F. G. (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* **41**, 711-753.
- Souza, K. A. and P. H. Deal (1977) Characterization of a novel extremely alkalophilic bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **101**, 103-109.
- Ueyama, H. and K. Horikoshi (1981) Japan patent, 56-186153.

Effect of pHs on Morphological and Cultural Characteristics of Alkalophilic Coryneform Bacteria TU-19

Sun Chul Kang*, Myoung Chul Choi, Jae Sub Yang¹ and Cher Won Hwang²(*Department of Biotechnology and*
¹Department of Molecular Biology, Taegu University, Taegu 712-714, Korea and ²Department of Environmental
Microbiology, Handong University, Pohang 791-940, Korea)

Abstract : The morphological and cultural characteristics of alkalophilic Coryneform bacteria TU-19 were investigated at various pHs. This bacterium showed normal growth pattern at pH 9.0~10.0, but the cell growth was completely inhibited at extreme pH (12.0 or more). Interestingly, at pH 8.0 the morphology of the bacterial cells seems to form convoluted filaments during the exponential growth phase while at pH 10.0, the optimal pH for the growth of this organism, the bacteria grew with variable paired or single forms, and straight rods during growth stages. Growing in alkaline media (pH 9.0~11.0), it adjusted the pH of the culture media to around pH 8.5 by itself.

Key words : alkalophilic Coryneform bacteria, initial pHs, morphological change

*Corresponding author