

토양으로부터 분리한 *Bacillus* sp. WRD-10이 생산하는 extracellular protease의 특성

옥민 · 김민석 · 서원석 · 차재영 · 조영수*
동아대학교 생명자원과학부 생물공학전공

Characterization of Extracellular Protease of *Bacillus* sp. WRD-1 Isolated from Soil. Min, OK, Min-Seok Kim, Won-Seok Seo, Jae-Young Cha, and Young-Su Cho*. Division of Biotechnology, Faculty of Natural Resource and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea – Alkaline bacterium producing a high protease activity at low temperature was isolated by using enrichment culture from soil samples and identified as *Bacillus* sp. WRD-1. Cell growth was maximal at 10 hours and the optimal initial pH and culture time of culture condition for enzyme production was pH 7 and 10 hours, respectively. Temperature range of high enzyme activity were 10 ~ 40°C. The optimal pH and temperature for the enzyme activity were pH 9 and 30°C.

Key words: *Bacillus* sp. WRD-1, protease activity, low temperature

각종 효소의 이용도가 급격히 증가하고 있는 가운데 protease는 단백질화학, 식품, 의약, 환경 등의 각종 제조산업 분야에서 그 요구가 더해가고 있어서 지금의 총 효소산업 중 60% 정도의 시장성을 점하고 있으며, 특히 serine(-alkaline) protease는 피혁, 세제공업 등의 분야에서 매우 중요한 효소로 알려져 있다.[1]

Peckman[2]과 Crewth[3]가 *Aspergillus* sp.에서 단백질분해효소 생산균을 분리한 이후, Masaaki 등[4]은 그 활성과 기능 면에서 의해 serine protease, thio protease, metal protease 등으로 분류하였으며, Kageyama[5] 그리고 Nunokawa 등[6]은 그 작용 pH의 영향에 따라 acid protease, neutral protease 및 alkaline protease로 분류하였다.

최근에는 알칼리성 protease의 연구와 더불어 내열성, 저온성 등의 특성을 동시에 가지는 protease 생산 균주의 탐색이 이루어지고 있다. protease에 대한 연구는 많이 이루어지고 있으나, 산업적으로 적용시키기 위해서는 알칼리 내성뿐만 아니라 넓은 범위의 온도에서도 높은 활성을 가질 수 있어야 한다.

일반적으로 저온성 세균은 성장이 느리고 취급하는데 어려운 점이 많기 때문에 실제 산업에 이용되지 못하고 있는 실정이다. 최근 노 등[10]이 *Pseudomonas* sp.에서 저온, 알칼리성 protease 분리 등에 관한 몇몇 연구가 수행되어 있을 뿐 이 분야에 대한 연구는 아직도 미흡한 실정이다.

Bacillus sp.은 이미 다양한 연구가 수행중인 미생물 중의

하나로서 알칼리 조건, 중성조건 등에 따라 증식하는 species가 각각 다르며 이들이 생산하는 단백질 분해효소[7,8,9]는 산업적으로 다양하게 이용되고 있는데, 특히, *Bacillus subtilis* 유래의 Subtilisin Casberg[11], Subtilisin BPN[12], Subtilisin Novo[13] 등이 주로 사용되어 지고 있다. 그러나, *Bacillus* sp.유래 단백질분해 효소의 작용 온도 범위는 40°C~70°C로 대부분 중온성 또는 고온성으로 알려져 있다.

이처럼, *Bacillus* sp. 균주는 생육이 양호하고, 다양한 특성을 가진다는 점에서 보다 강력하고 안정성이 우수한 효소를 생산하는 균주의 탐색이 향후 계속적으로 이루어질 것으로 예상되어진다.

따라서, 본 연구에서는 이러한 목적에 부합하는 protease를 생산하기 위하여 알칼리성이면서 저온에서도 비교적 높은 활성을 가지는 토양 유래 *Bacillus* sp.를 분리하여 효소 활성 및 생육조건을 특성 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

넓은 생육 온도 범위를 가지면서 높은 단백질 분해 효소를 생산하는 균종을 분리할 목적으로 경남 김해시 일대의 논토양, 밭토양으로부터 시료를 채취하였다. 채취된 시료는 멸균수로 적당히 희석한 후 순차적으로 skim milk agar 배지 (skim milk 5 g/l, bacto tryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l, bacto agar 15 g/l)에 도말하고 30°C로 18시간 배양하였다. 분리한 수십종의 균종 skim milk가 extracellular protease에 의해 분해되어 형성된 투명환(clear zone or halo)의 크기가 직경 2cm이상인 균종을 선별하고 그 중 활성이 가장 높은 균주를 WRD-1으로 명명하고 본 실험에 사용하

*Corresponding author

Tel. 82-51-200-7586, Fax. 82-51-200-7505

E-mail: choys@mail.donga.ac.kr

였다. 균주의 보관을 위하여 멸균된 glycerol stock solution을 사용하여 동결건조 시킨 후 ample 형태로 보관하였다. 실험에 사용된 균주는 extracellular protease의 활성 유지를 위해 skim milk배지에서 계대 배양하였다. 분리세균인 WRD-1은 생명공학연구소 유전자원센터에 의뢰하여 균종을 확인하였다.

균주의 배양조건 및 생육 특성

WRD-1의 배양조건을 검토하기 위한 배지는 LB medium (Bacto tryptone 10 g/l, yeast extract 1.5 g/l, NaCl 1.5 g/l)를 사용하였고, 균주의 생육측정은 LB medium을 이용하여 2시간 간격으로 분광광도계(Spectrophotometer, HP 8452A)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry법 [14]에 따라 측정하였다.

배양시간에 따른 균체 생육 및 효소활성 측정

배양시간에 따른 균체 생육과 효소 생산을 확인하기 위하여 LB medium 100 ml에 동일배지에서 배양한 WRD-1 전배양액을 3% 접종하고 180 rpm으로 30°C에서 배양하면서 2시간 간격으로 배양액을 취해 균체 생육과 효소활성을 측정하였다. 이때 효소활성 측정은 Hagihara 등[15]의 방법으로 측정하였다. 즉, 50 mM Sodium borate-NaOH buffer (pH 10.4)에 1 mM CaCl₂와 0.6% skim milk casein을 혼합하여 기질용액으로 사용하였고, 반응은 0.5 ml의 기질용액과 0.1 ml의 효소액을 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응을 실시하였다. 반응액은 ice bath에 의해 정지시키고 0.5 ml의 5% trichloroacetic acid를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 10,000×g로 10분간 원심분리하여 상등액을 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 1unit(U)는 분당 흡광도를 0.002를 증가시키는데 필요한 효소의 양으로 하였다.

초기 pH 변화에 따른 균체생육 및 효소활성 측정

배양배지의 초기 pH를 4에서부터 10까지 단계로 조정할 후 WRD-1 전배양액을 각각 3%씩을 접종하고 30°C에서 18시간 배양한 후 균체생육과 효소활성도를 측정하였다.

탄소원의 종류에 따른 균체생육 및 효소활성 측정

LB배지에 glucose, maltose, sucrose, lactose, galactose를 각각 2%로 첨가하여 30°C에서 18시간 배양한 후 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

질소원의 종류에 따른 균체의 생육 및 효소활성 측정

LB배지의 tryptone을 동일농도의 peptone, yeast extract, malt extract, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, casein, soybean으

로 대체하고, 1%의 glucose를 첨가하여 30°C에서 18시간 배양한 후 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

조효소액 조제 및 효소 활성 측정

WRD-1유래 protease활성의 pH 및 온도의 특성을 알아보기 위하여 LB액체배지 200ml에 전배양액 3%를 접종하고 180rpm으로 30°C에서 24시간 배양하였다. 이 배양액으로부터 조효소액을 조제하기 위하여 배양액을 10,000×g으로 20분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 조효소액으로 하였다.

조효소액의 pH 변화 따른 효소활성 변화를 알아보기 위하여 pH 4.0~7.0 범위는 0.02 M citric acid-sodium phosphate dibasic buffer, pH 7.0~8.0 범위는 0.02 M sodium phosphate mono basic sodium phosphate dibasic buffer, pH 8.0~9.0 범위는 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 9.0~11.0은 0.02 M glycine-NaOH buffer로 조정하였다. 각각 pH 농도 별로 0.6% casein(w/v) 기질용액에 0.5 ml를 혼합한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 온도변화에 따른 효소활성의 변화는 WRD-1 조효소액의 protease 최적활성을 갖는 pH 9.0으로 조정하고, 이 조효소용액과 0.6% casein(w/v) 기질용액과 혼합한 후 20, 30, 40, 50, 60 및 70°C에서 반응시켜 효소 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

경남 김해시 진례면의 논도양 및 밭도양으로부터 채취한 시료를 멸균수로 희석한 후 순차적으로 skim milk가 함유된 배지에 도달한 뒤 37°C에서 18시간 이상 배양하여 생성된 균주들 중 상대적으로 투명환이 큰 균주를 1차 선별하고, 이들 선별 균주 중에서 protease의 저온활성이 우수한 균주를 선별하기 위해 20°C에서도 생육조건이 좋고 투명환이 큰 균주를 최종 선별하여 WRD-1으로 명명하였다. (Fig. 1)

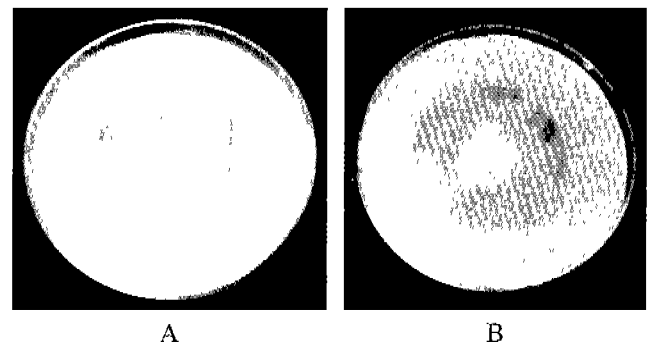


Fig. 1. The protease activity of *Bacillus* sp. WRD-1 at various cultural temperature.

A: Incubation for 18 hr at 37°C B: Incubation for 18 hr at 20°C.

Table 1. Physiological characteristics of isolated microorganism *Bacillus* sp. WRD-1

Glycerol	-
Erythritol	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	-
Ribose	+
D-Xylose	-
L-Xylose	-
Adonitol	-
β-Methyl-xyloside	-
Galactose	-
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	-
L-Sorbose	-
Rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	-
Sorbitol	-
α-Methyl-D-mannoside	-
α-Methyl-D-glucoside	-
N-Acetyl glucosamine	+
Amygdaline	-
Arbutine	+
Esculinc	+
Salicine	+
Cellobiose	-
Maltose	+
Lactose	-
Melibiose	-
Saccharose	-
Trehalose	+
Inuline	-
Melezitose	-
D-Raffinose	-
Amidon	-
Glycogen	-
Xylitol	-
β-Gentibiose	-
D-Turanose	-
D-Lyxose	-
D-Tagatose	-
D-Fucose	-
L-Fucose	-
D-Arabitol	-
L-Arabitol	-
Gluconate	-
2-Keto gluconate	-
5-Keto gluconate	-

1) API 50CHB kit was used.
2) +: positive, -: negative.

분리균주인 WRD-1은 gram양성을 나타내었으며, spore가 존재하였고 원형의 colony형태를 가지고 있었다.

WRD-1을 API 50CHB kit로 동정한 결과 82.4%의 유사율로 *Bacillus* sp로 동정되었다. (Table 1)

배양시간에 따른 균체의 생육 및 효소활성의 변화

WRD-1의 배양시간별 균체 생육과 효소활성을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 균체의 생육은 배양 6시간부터 급격히 증가하기 시작하여 배양 10시간 이후에 성장을 나타내었다. 이 때 WRD-1유래 protease활성도 배양 6시간부터 급격히 증가하기 시작하여 배양 10시간째에 최대치를 나타내어 균체 생육과 동일한 양상을 나타내었다. 이는 황[17]이 보고한 균의 대수성장기가 지난 후 효소활성도가 최대가 되었다는 결과와 동일한 결과를 나타내었다.

초기 pH 변화에 의한 균체 생육 및 효소 활성의 변화

WRD-1의 초기 pH 변화에 따른 균의 생육과 효소 활성의 변화를 알아보기 위해 배양배지의 초기 pH를 4~10으로 조절한 후 전 배양액을 3%씩 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 균체생육과 효소활성도는 Fig. 3과 같다. 배양배지의 초기 pH 5~10까지 균체생육은 전체적으로 양호하였지만, 효소 활성도는 초기 pH 4부터 증가하기 시작하여 초기 pH 7에서 가장 높게 나타났다. 그러나, 배양 후의 배양액의 pH는 전체적으로 8.6~8.8로 유사하였다.

탄소원의 종류에 따른 균체 생육 및 효소 활성 비교

WRD-1의 탄소원 종류에 따른 균체의 생육과 효소 활성을 비교하기 위해 LB배지에 glucose, maltose, sucrose, lactose, galactose를 각각 2%농도로 첨가하여 30°C에서 18시간 배양한 후 균체 생육과 효소활성도는 Table 2와 같다. 사용되었던 탄소원에 대한 균체 생육은 전체적으로 흡광도 2.49~2.69로 양호하였지만, 효소 활성도는 galactose(63.15 U/ml),

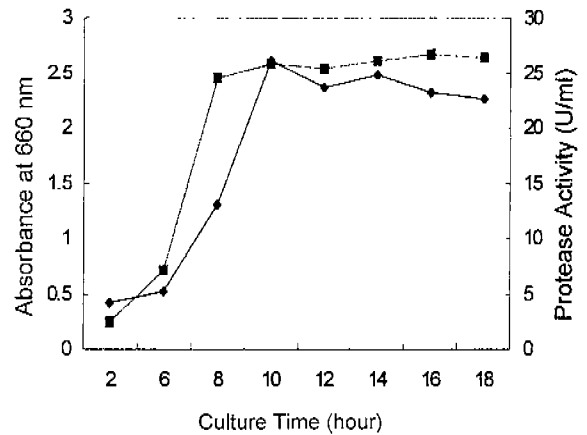


Fig. 2. Time course of protease activity in *Bacillus* sp. WRD-1.
(—■—: Cell growth, —◆—: Proteolytic activity (U/ml))

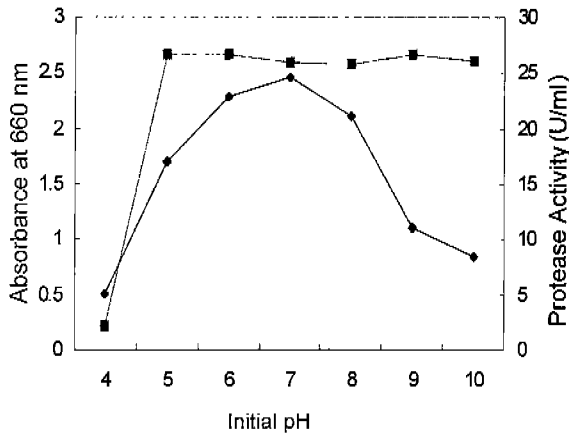


Fig. 3. Effect of initial pH on the cell growth and protease activity of *Bacillus sp.* WRD-1. (—■—: Cell growth, —◆—: Proteolytic activity (U/ml))

Table 2. Effect of carbon source on the cell growth and protease activity of *Bacillus sp.* WRD-1

Carbon source ^{a)}	Cell growth ^{b)} (Absorbance 660 nm)	Protease activity ^{c)} (U/ml)
glucose	2.67	28.40
sucrose	2.52	24.75
maltose	2.70	48.05
galactose	2.49	63.15
lactose	2.59	33.33

a) The concentration of each carbon source in the medium was 2.0%.
 b) Cells of *Bacillus sp.* WRD-1 were grown at 30°C for 18 hours in the media with shaking 180rpm.
 c) The 18hr old culture broth of the isolate *Bacillus sp.* WRD-1 at 30°C was used to measure the protease activity.

maltose(48.05 U/ml), lactose(33.33 U/ml), glucose(28.40 U/ml) 그리고 sucrose(24.75 U/ml) 순으로 나타났다. 이와 같은 결과는 glucose나 sucrose가 미생물에 의해 쉽게 대사되어 생육은 촉진시키지만 효소활성은 감소한다는 결과와 일치하였다.[18]

질소원의 종류에 따른 균체 생육 및 효소활성 비교

질소원의 종류에 따른 균체의 생육 및 효소 활성을 비교하기 위하여 LB배지에서 질소원인 1% tryptone 대신에 peptone, yeast extract, malt extract, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, casein, soybean을 동일한 농도로 대체하여 30°C에서 18시간 배양한 후 균체의 생육과 효소활성도를 비교하였다. (Table 3) 균체 생육은 복합질소원을 사용했을 때 양호하였으며 특히, yeast extract 첨가배지에서 가장 균체 생육이 높았다. 그리고, 효소 활성은 soybean을 사용하였을 때 가장 높은 104.76 U/ml이었고, casein (89.80 U/ml), yeast extract (84.92 U/ml) 순으로 나타났다. 암모니아형태의 질소원을 사

Table 3. Effect of nitrogen source on the cell growth and protease activity of *Bacillus sp.* WRD-1

Nitrogen source ^{a)}	Cll growth ^{b)} (Absorbance 660 nm)	Protease activity ^{c)} (U/ml)
soybean	2.57	104.76
malt extract	2.45	83.98
peptone	2.58	60.58
yeast extract	2.62	84.92
casein	1.57	89.80
NaNO ₃	0.49	84.93
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.73	18.31
NH ₄ Cl	1.08	34.02

a) The concentration of each nitrogen source in the medium was 1.0%.
 b) Cells of *Bacillus sp.* WRD-1 were grown at 30°C for 18 hours in the media with shaking 180rpm
 c) The 18hr old culture broth of the isolate *Bacillus sp.* WRD-1 at 30°C was used to measure the protease activity

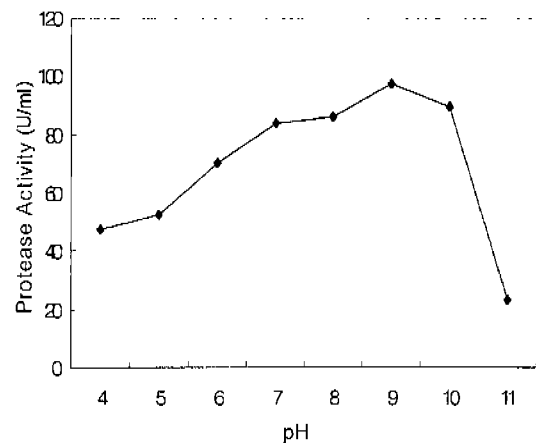


Fig. 4. Optimal pH for protease activity of *Bacillus sp.* WRD-1.

용하였을 때 효소 활성이 상대적으로 저조하였는데, 이는 Himelbloom[19]에 의해 보고되어진 결과와 일치하였다.

조효소액의 효소활성에 미치는 pH 및 온도 영향

Bacillus sp. WRD-1 유래 조효소액의 효소활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 기질용액의 pH를 4에서 11까지 변화시켜 조효소용액과 반응시킨 뒤 활성을 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다. pH 6에서부터 10까지 비교적 넓은 pH 범위에서 높은 효소활성을 나타내었으며, 이 효소의 반응 최적 pH는 9로 나타났다. 이러한 결과는 김 등[16]이 보고한 된장에서 분리한 *Bacillus cereus* 유래의 protease와 유사한 결과를 나타내었다. 따라서, *Bacillus sp.* WRD-1이 분비하는 단백질 분해효소는 알칼리성으로 사료되어진다.

또한, WRD-1 조효소액의 단백질 분해효소의 최적온도를 검토하기 위해 온도를 10°C 부터 70°C로 변화시키면서 효소활성을 측정 한 결과는 Fig. 5와 같다. 효소반응액은 10~

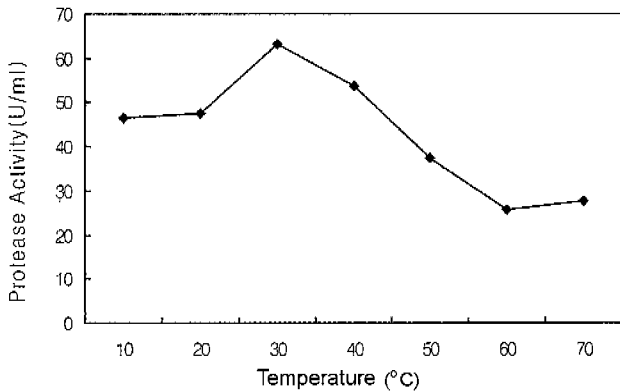


Fig. 5. Optimal temperature for protease activity of *Bacillus sp.* WRD-1.

40°C에서 높은 활성을 나타내었으며, 이 효소의 최적 반응 온도는 30°C를 나타내었다. 따라서, *Bacillus sp.* WRD-1은 비교적 저온에서도 활성이 높은 단백질분해효소를 생성함으로써 현재 산업적으로 많이 이용되어지는 세제용이나 토양활성개량제 등에 적용되어질 가능성이 있는 것으로 생각되어진다.

요 약

토양시료로부터 비교적 저온에서도 높은 활성을 나타내는 알칼리성 protease를 생산하는 세균을 수집종 분리하였다. 분리된 세균중에서 protease활성과 성장속도면에서 가장 우수한 균주를 선별하여 WRD-1으로 명명하였으며, 형태학적, 생화학적 및 생리학적 특성을 조사한 후 *Bacillus sp.*로 동정하였다. WRD-1유래 protease는 20°C 배양 및 pH 9.0에서 배양된 균주로부터 높은 활성을 나타내어 저온성, 알칼리성 protease로 판명되었다. 또한, WRD-1유래 protease 생산을 위한 최적 배양조건은 배양온도 10~40°C, 초기 pH 6.0~8.0 및 배양시간은 10시간으로 나타났다. Protease최적 활성은 pH 9.0, 온도는 30°C였다.

REFERENCES

1. Ward, O. P. 1985. Proteolytic Enzymes, in Comprehensive Biotechnology 1st ed. by M. Y. Murray, Pergamon press, 789-792.
2. Peckman, E.V. 1951. *Aspergillus* proteinase. *Biochemistry*. **5**: 321-325.
3. Crewth. W. C. 1963. The effect of pH and cations on the thermal denaturation of trypsin. *Aus. J. Biol.* **6**: 597-601.
4. Masaaki, Y., S. Kazuo, and M. Mitsuo. 1984. Purification and properties of acid protease from *Monascus sp.* No. 3405. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1637-1645.
5. Kageyama, K. 1955. Studies on *Aspergillus oryzae* strain for sake brewing. *J. Ferment. Technol.* **33**: 53-57.
6. Nunokawa, Y., Y. Namba, and S. Watanabe. 1961. A study of the rice Koji protease. *J. Soc. Brew.* **53**: 930-933.
7. Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganism. part 1. alkaline protease produced by *Bacillus* No.221. *Agr. Biol. Chem.* **35**: 1407-1414.
8. Manachini, P. L., M. G. Fortima, and C. Parini. 1988. The most stable alkaline protease produced by *Bacillus thermotuber* a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 409-413.
9. Tsuru, D., H. Kira., T. Yamamoto, and J. Fukumoto. 1966. Studies on bacterial protease. Part 16. purification crystallization and some enzymic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis var. amylosacchariticus*. *Agr. Biol. Chem.* **30**: 1261-1268.
10. 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.
11. Guntelber, A. V. and M. Ottesen. 1952. Preparation of crystals containing the plakalbumin forming enzyme from *Bacillus subtilis*. *Nature* **170**: 802.
12. Smith, E. L., R. J. Delange., W. H. Evans., M. Landon, and F. S. Markland. 1968. Subtilisin Calsberg. V. The complete sequence: comparison with subtilisin BPN: evolutionary relationship. *J. Biol. Chem.* **243**: 2184-2191.
13. Ottesen, M. and A. Spector. 1960. A comparison of two proteinases from *Bacillus subtilis*. *C. R. Trav. Lab. Calsberg.* **32**: 63-74.
14. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, L. A. Farr, and R. J. Randal. 1951. Protein Measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
15. Hagihara, B., H. Matrubaraa, M. Nakai, and K. Okunuki. 1958. Crystalline bacterial proteinase. 1. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.* **45**: 185-194.
16. Kim, S. J., H. J. Yoon, M. S. Lee, and H. B. Kim. 1997. Isolation and Characterization of *Bacillus cereus* Secreting Protease from Korean Soybean Paste. *Kor. J. Microbiol.* **33**: 136-141.
17. Hwang, S. Y. 1995. Purification and Characterization of An Extracellular Serine Protease from *Bacillus sp.* strain KUN-17. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 53-59.
18. Koo, J. H., I. J. Choi, and H. S. Nam. 1997. Medium Optimization for Production of Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus licheniformis* NS70. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 207-211.
19. Himelbloom, B. H. and H. M. Hassen. 1986. Effect of cysteine on growth, protease production, and catalase activity of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 418-421.

(Received September 29, 2000)