

## 토양에서 분리한 *Bacillus* sp. WRD-2가 생산하는 Extracellular Protease의 특성

옥민<sup>1</sup> · 서원석<sup>1</sup> · 차재영 · 조영수\*

동아대학교 생명자원과학부 생물공학전공, <sup>1</sup>(주)윌바이오틱

(2001년 9월 13일 접수, 2001년 10월 10일 수리)

토양시료로부터 높은 활성의 protease를 생산하는 세균을 수십종 분리하였다. 분리된 세균중에서 protease활성과 성장속도면에서 가장 우수한 균주를 선별하여 WRD-2로 명명하였으며, 형태학적, 생화학적 및 생리학적 특성을 조사한 후 *Bacillus* sp.로 동정되었다. WRD-2 조효소의 protease 최적 활성은 pH 6.0, 온도는 40°C로 중성 protease임을 알 수 있었고, 온도 20~40°C에서 높은 protease활성을 나타내었다. 또한, 초기 pH에 따른 protease 활성에서는 pH 6에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 배양매지의 영향은 탄소원으로 maltose 3%, 질소원으로 yeast extract 4%에서 가장 높은 protease활성을 나타내었다.

**Key words:** *Bacillus* sp., WRD-2, protease, protease activity, low temperature

### 서론

현대산업사회가 발달함에 따라 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 효소단백질로 알려져 있다.<sup>1)</sup>

단백질분해효소는 1913년 Boidin과 Effront에 의해서 *Bacillus subtilis*로부터 열안정성이 높은  $\alpha$ -amylase와 더불어 발견되었다. 그 후 1947년 Linderstrom과 Othesen이 *Bacillus licheniformis*로부터 알칼리성 단백질분해효소 Subtilisin carlsberg를 발견하였고,<sup>2)</sup> 1967년에는 Werker와 Campbell이 *Bacillus amyloliquefaciens*로부터 Subtilisin Novo(Subtilisin BPN)<sup>3,4)</sup>를 발견하였다.

*Bacillus* sp.로부터 알칼리성 단백질분해효소<sup>5)</sup>가 발견된 후부터 효소의 산업적 응용이 증가하게 되어 세제, 연육가공, 피혁가공 과정 중 탈모공정 등에 있어서 활성이 높고, 안정된 성질을 갖는 새로운 균주 선별에 많은 노력을 기울여 왔다.<sup>2,6-10)</sup> 또한 이들 효소에 대한 대사기작, 삼차원구조, 불활성 기작, 단백질공학적인 방법에 의한 구조적 안정화, 면역학적 비교연구, amino acid 배열순서 및 비교분석, 저해물질, 유전자 조작 및 발현 등에 관하여 폭넓은 연구가 이루어졌다.

최근에는 알칼리성 protease의 연구와 더불어 내열성, 저온성 등의 특성을 동시에 가지는 산업적 이용에 가장 적합한 protease 생산 균주의 탐색이 이루어지고 있다. Protease에 대한 연구는 많이 이루어지고 있으나, 일반적으로 *Bacillus* sp.가 생산하는 protease는 고온활성으로 (40°C 이상) 우리나라를 비롯한 동북

아시아의 세척조건인 15~20°C에서는 부적합하며 산업에 직접 적용시키기 위해서는 알칼리 내성 뿐만 아니라 넓은 범위의 온도에서도 높은 활성을 가질 수 있어야 한다.

따라서, 본 연구는 산업적으로 유용한 protease를 탐색 중 비교적 낮은 온도에서 높은 단백질분해효소활성을 가지는 *Bacillus* sp.를 분리하여 동정, 효소활성 및 생육조건을 특성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

**균주의 분리 및 동정.** 중성 저온성의 우수한 단백질 분해 효소를 생산하는 균종을 분리할 목적으로 부산광역시 강서구 대저동 일대의 논, 밭 토양으로부터 토양시료를 채취하였다. 채취한 토양시료는 멸균수로 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, bactoagar 15 g/L)에 도말하고 항온배양기에서 30°C로 15시간 이상 배양하였다. Skim milk가 extracellular protease에 의해 분해되어 형성된 투명환(clear zone)의 크기가 상대적으로 큰 30여균종을 1차 선별하였다. 선별된 균주를 각각 동일 배지상에 tooth pick로 찍어 투명환이 가장 크다고 판단되는 균주를 WRD-2로 명명하고 본 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 균주는 extracellular protease의 활성 유지를 위해 skim milk배지에서 계대 배양하면서 사용하였다. 분리세균인 WRD-2는 생명공학연구소 유전자원센터에 의뢰하여 API 50CHB kit를 이용하여 균종을 확인하였다.

**균주의 배양조건 및 생육 특성.** WRD-2의 배양조건을 검토하기 위한 배지는 LB medium(bacto-tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L)을 사용하였고, 균주의 생육측정은 LB medium을 이용하여 3시간 간격으로 채취한 배양액을 원심 분리하여 상등액을 제거하고 멸균된 증류수 동량을 넣어 분광광도계(Spectrophotometer, HP 8452A)를 사용하여 660 nm에서

\*연락처

Phone: 82-51-200-7586; Fax: 82-51-200-7505

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

흡광도를 측정하였다.

**단백질 정량.** Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry법<sup>11)</sup>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-2 전 배양액을 3% 접종하고 180 rpm으로 30°C에서 배양하면서 3시간 간격으로 측정하였다. 이 때 효소활성 측정은 Hagihara 등<sup>12)</sup>의 방법으로 측정하였다. 즉, 50 mM sodium borate-NaOH buffer(pH 10.4)에 1 mM CaCl<sub>2</sub>와 0.6% skim milk casein을 혼합하여 기질용액으로 사용하였고, 반응은 0.5 ml의 기질용액과 0.1 ml의 효소액을 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응액은 ice bath에서 반응정지시키고 0.5 ml의 5% trichloroacetic acid를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 10,000×g로 10분간 원심 분리하여 상등액을 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 1 unit (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 조정 한 후 WRD-2 전배양액을 각각 3%씩을 접종하고 30°C에서 15시간 배양한 후 균체생육과 효소활성도를 측정하였다.

**탄소원의 종류에 따른 균체생육 및 효소활성 측정.** LB배지에 glucose, maltose, sucrose, lactose, galactose를 각각 3% 농도로 첨가하여 30°C에서 15시간 배양한 후 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

**질소원의 종류에 따른 균체의 생육 및 효소활성 측정.** LB 배지의 1% tryptone을 동일농도의 peptone, yeast extract, malt extract, NaNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, casein, soybean protein isolate로 대체하여 30°C에서 15시간 배양한 후 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

**조효소액 조제 및 효소 활성 측정.** WRD-2 유래 protease 활성의 pH 및 온도의 특성을 알아보기 위하여 LB액체배지 200 ml에 전 배양액 3%를 접종하고 180 rpm으로 30°C에서 15시간 배양하였다. 이 배양액을 10,000×g으로 20분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 조효소액으로 하였다. 조효소액의 pH 변화에 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 buffer, pH 8.0~9.0 범위는 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 9.0~11.0 범위는 0.02 M glycine-NaOH buffer로 조정하였다. 각각 pH 농도별로 조제한 기질용액에 0.6% casein(w/v) 0.5 ml를 혼합한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 온도변화에 따른 효소활성의 변화는 WRD-2 조효소액의 protease 최적활성을 갖는 pH 6.0으로 조정하고, 이 조효소 용액과 0.6% casein 기질용액과 혼합한 후 20, 30, 40, 50, 60 및 70°C에서 반응시켜 효소활성을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**균주의 분리 및 동정.** 단백질 분해능이 우수한 균주를 분리

**Table 1. Physiological characteristics of isolated microorganism WRD-2**

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

<sup>1)</sup>used with API 50 CHB kit

<sup>2)</sup>+: positive, -: negative

하기 위하여 부산광역시 강서구 대저동 일대의 논, 밭 토양으로부터 토양시료를 채취한 후 멸균수로 희석시켜 순차적으로 skim milk가 함유된 배지에 도말하여 37°C 배양기에서 15시간 이상 배양하여 생성된 투명환의 크기가 큰 균주를 1차 선별하였다. 이들 균주 중에서 protease 투명환이 직경 2 cm 이상인 30 균주를 2차 선별하고, 이 중 protease 활성이 가장 우수한 균주를 WRD-2로 명명하여 본 실험에 제공하였다. WRD-2 균주는 gram staining에서 양성을 나타내었으며, spore staining에서는 spore가 존재하였고, 원형의 colony 형태를 가지고 있었다. WRD-2의 동정을 위하여 생명공학연구원 유전자원센터에 의뢰하여 API 50CHB kit로 동정한 결과 *Bacillus* sp.로 동정되었다(Table 1).

**배양시간에 따른 균체의 생육 및 효소활성의 변화.** WRD-2의 배양 시간별 균체 생육과 효소활성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 균체의 생육은 배양 6시간부터 급격히 증가하기 시작하여 배양 15시간 이후에 최대성장을 나타내었고, 그 이후로 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 *Bacillus* sp. WRD-1의 배양시간에 따른 균체 생장 및 protease 활성과 유사하였다.<sup>13)</sup> 따라서, 이 후 모든 실험은 15시간 배양을 실시하여 균주의 생육특성을 조사하였다.

**초기 pH 변화에 의한 균체 생육 및 효소 활성의 변화.** WRD-2의 초기 pH 변화에 따른 균의 생육과 효소 활성의 변화를 알아보기 위해 배양배지의 초기 pH를 4~10으로 조정 한 후 전배양액을 3%씩 접종하고 30°C에서 15시간 배양한 결과

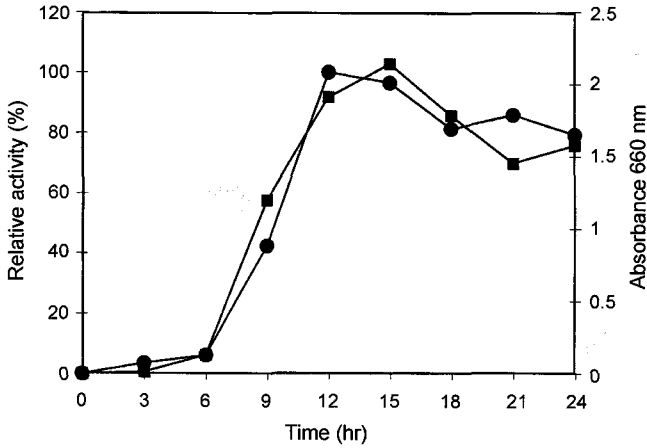


Fig. 1. Time course changes of cell growth and protease activity in *Bacillus* sp. WRD-2. Relative activity (-●-); Maximal activity was shown as 100%. Cell growth (-■-) was determined by measuring the absorbance of culture broth at 660 nm.

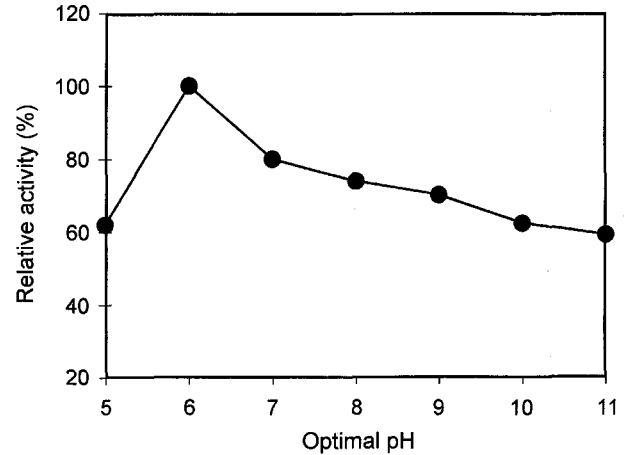


Fig. 3. The effect of optimal pH for protease activity of *Bacillus* sp. WRD-2 protease activity was determined from pH 5 to 11. Maximal activity was shown as 100%.

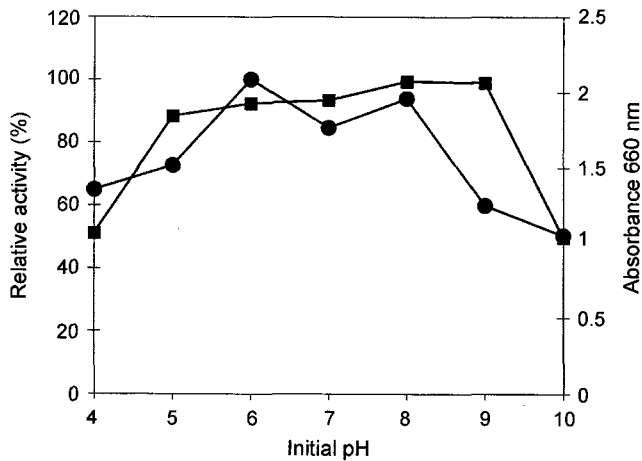


Fig. 2. The effect of initial pH for cell growth and protease activity of *Bacillus* sp. WRD-2. Relative activity(-●-); Maximal activity was shown as 100%, and cell growth (-■-) was determined by measuring the absorbance of culture broth at 660 nm.

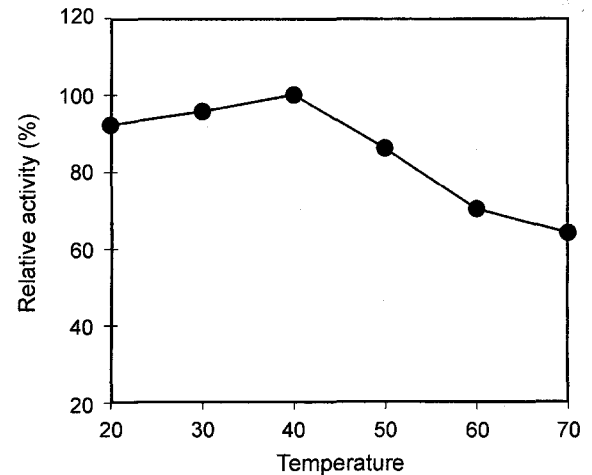


Fig. 4. Optimal temperature for protease activity of *Bacillus* sp. WRD-2 protease activity was determined from 20 to 70°C. Maximal activity was shown as 100%.

는 Fig. 2와 같다. 배양매지의 초기 pH 5~9까지 균체 생육은 전체적으로 양호하였지만, 효소 활성은 초기 pH 6~8 범위에서 높게 나타나 중성 protease로 확인되었다.

**조효소액의 효소활성에 미치는 pH 및 온도 영향.** *Bacillus* sp. WRD-2 유래 조효소액의 효소활성에 미치는 pH 영향을 검토하기 위하여 기질용액의 pH를 5에서 11까지 변화시켜 활성을 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. pH 6에서부터 9까지 비교적 넓은 pH 범위에서 protease 활성이 70% 이상의 활성도를 나타내었으며, 이 효소의 반응 최적 pH는 6으로 나타나 중성 protease임을 알 수 있었다.

또한, WRD-2 조효소액의 단백질 분해효소의 최적온도를 검토하기 위해 온도를 20~70°C에서 효소활성을 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다. 효소반응액은 20~60°C에서 70% 이상의 높은 효소활성을 나타내었으며, 이 효소의 최적 반응온도는 40°C였다. 따라서, 본 실험에 사용된 *Bacillus* sp. WRD-2는 비교적 저온인 20~40°C에서 90%이상의 높은 활성을 가지는 저온성

단백질 분해효소를 생산함으로써 산업적으로 이용성이 우수하다고 판단되어진다.

**탄소원의 종류와 농도에 따른 균체 생육 및 효소 활성 비교.** WRD-2의 탄소원 종류에 따른 균체의 생육과 효소 활성을 비

Table 2. Effects of carbon sources on the cell growth and protease activity of *Bacillus* sp. WRD-2

Carbon source <sup>a)</sup>	Cell growth <sup>b)</sup> (Absorbance 660 nm)	Protease activity <sup>c)</sup> (U/ml)
glucose	1.50	37.92
sucrose	1.44	33.55
maltose	1.98	64.02
galactose	2.48	45.32
lactose	2.27	28.41

<sup>a)</sup>The concentration of each carbon source in the medium was 3.0%.

<sup>b)</sup>Cells of *Bacillus* sp. WRD-2 were grown at 30°C for 15 hours in the media with shaking at 180 rpm.

<sup>c)</sup>The 15 hr old culture broth of the isolated *Bacillus* sp. WRD-2 at 30°C was used to measure the protease activity.

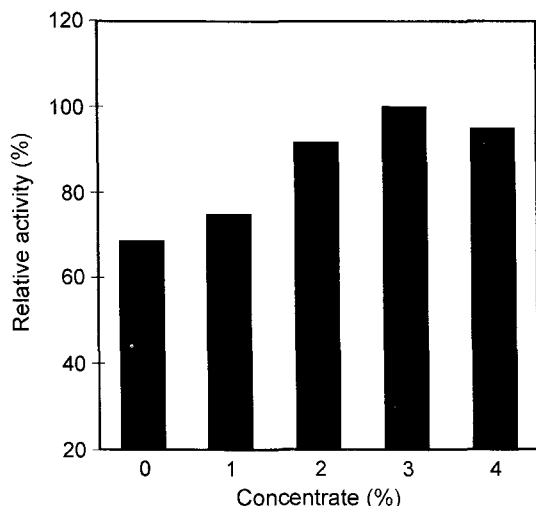


Fig. 5. The effect of maltose concentration on production of protease. Maximal activity was shown as 100%.

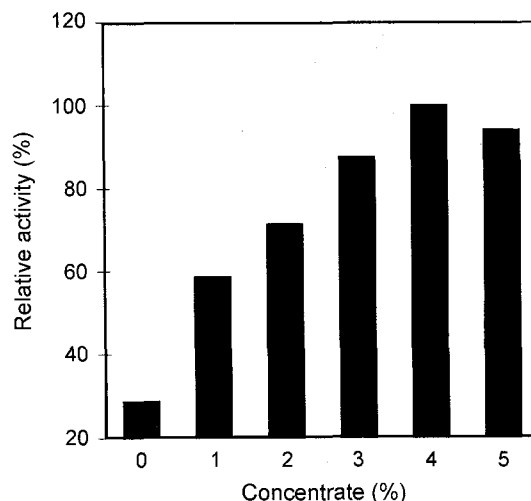


Fig. 6. The effect of yeast extract concentration on production of protease. Maximal activity was shown as 100%.

Table 3. Effects of nitrogen sources on the cell growth and protease activity of *Bacillus* sp. WRD-2

Nitrogen source <sup>a)</sup>	Cell growth <sup>b)</sup> (Absorbance 660 nm)	Protease activity <sup>c)</sup> (U/ml)
soybean	2.53	82.16
malt extract	2.05	45.43
peptone	1.98	45.25
yeast extract	2.62	91.88
casein	2.37	80.20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.73	20.88
NH <sub>4</sub> Cl	1.08	11.02

<sup>a)</sup>The concentration of each nitrogen source in the medium was 1.0%.

<sup>b)</sup>Cells of *Bacillus* sp. WRD-2 were grown at 30°C for 15 hours in the media with shaking at 180 rpm.

<sup>c)</sup>The 15 hr old culture broth of the isolated *Bacillus* sp. WRD-2 at 30°C was used to measure the protease activity.

교하기 위해 LB배지에 glucose, maltose, sucrose, lactose, galactose를 각각 3% 농도로 첨가하여 30°C에서 15시간 배양한 결과는 Table 2와 같다. 본 실험에 사용되어진 탄소원에 대한 균체 생육은 galactose 사용시 가장 좋았으나, 효소 활성은 maltose 사용시 64.02 U/ml로 가장 높았다.

WRD-2의 탄소원 종류에 의한 protease 활성 측정된 결과에서 maltose를 사용하였을 때 가장 높은 protease 활성을 나타내어 농도별 영향을 알아보기 위하여 0%, 1%, 2%, 3%, 4%로 첨가하여 30°C에서 15시간 배양 후 활성을 측정된 결과 3% 첨가시 가장 우수하였다(Fig. 5).

**질소원의 종류에 따른 균체 생육 및 효소활성 비교.** 질소원의 종류에 따른 균체의 생육 및 효소 활성을 비교하기 위하여 LB배지에서 1% tryptone 대신에 peptone, yeast extract, malt extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, casein, soybean protein isolate를 동일한 농도로 대체하여 30°C에서 15시간 배양한 결과는 Table 3과 같다. 균체 생육과 효소활성은 복합질소원을 사용했을 때 양호하였으며, 특히 yeast extract 첨가배지에서 가장 높았다. 그리고, 효소 활성은 yeast extract를 사용하였을 때 가장 높은

91.88 U/ml이었고, soybean protein isolate(82.16 U/ml), casein (80.20 U/ml) 순으로 나타났다. 암모니아형태의 질소원을 사용하였을 때 효소 활성이 상대적으로 낮았는데, 이는 Himelbloom<sup>14)</sup>에 의해 보고되어진 결과와 일치하였다.

L-broth배지를 이용하여 질소원을 달리하여 protease 활성을 비교한 결과 yeast extract를 사용하였을 때 가장 우수하여 yeast extract 농도를 무첨가, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%의 농도로 하여 배양한 결과는 Fig. 6과 같이 질소원의 농도가 4% 때 가장 높은 활성을 나타내었다.

### 참고문헌

1. Ward, O. P. (1985) Proteolytic Enzymes, In *Comprehensive Biotechnology*. 1st ed. by Murray, M. Y., Pergamon press, pp. 789-792.
2. Guntelber, A. V. and Ottesen, M. (1952) Preparation of crystals containing the plakalbumin forming enzyme from *Bacillus subtilis*. *Nature* **170**, 802.
3. Smith, E. L., Delange, R. J., Evans, W. H., Landon, M. and Markland, F. S. (1968) Subtilisin Calsberg. V. The complete sequence: comparison with subtilisin BPN: evolutionary relationship. *J. Biol. Chem.* **243**, 2184-2191.
4. Ottesen, M. and Spector, A. (1960) A comparison of two proteinases from *Bacillus subtilis*. *C. R. Trav. Lab. Calsberg.* **32**, 63-74.
5. 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.
6. Durham, D. R., Stewart, D. B. and Stellwag, E. J. (1987) Novel alkaline and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX 6638. *J. Bacteriol.* **169**, 2762-2768.
7. Kobayashi, T., Ogasawara, A., Ito, S. and Saitoh, M. (1985) Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 693-698.
8. Nakadai, T., Nasuno, S. and Iguchi, N. (1973) Purification and

- some properties of alkaline proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* **37**, 2685-2694.
9. Manachini, P. L., Fortima, M. G. and Parini, C. (1988) Thermo-stable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 409-413.
  10. Tsuru, D., Kira, H., Yamamoto, T. and Fukumoto, J. (1966) Studies on bacterial protease. Part 16. purification crystallization and some enzymic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*. *Agric. Biol. Chem.* **30**, 1261-1268.
  11. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. A. and Randal, R. J. (1951) Protein Measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
  12. Hagihara, B., Matrubaraa, H., Nakai, M. and Okunuki, K. (1958) Crystalline bacterial proteinase. 1. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.* **45**, 185-194.
  13. Ok, M., Kim, M. S., Seo, W. S., Cha, J. Y. and Cho, Y. S. (2000) Characterization of Extracellular protease of *Bacillus* sp. WRD-1 Isolated from Soil. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 329-333.
  14. Himelbloom, B. H. and Hassen, H. M. (1986) Effect of cysteine on growth, protease production, and catalase activity of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 418-421.

---

#### Isolation and Characterization of *Bacillus* sp. WRD-2 Extracellular Protease from Soil

Ok Min<sup>1</sup>, Won-Seok Seo<sup>1</sup>, Jae-Young Cha, and Young-Su Cho\* (Division of Biotechnology, Faculty of Natural Resource and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea; <sup>1</sup>WILL BIOTECH Co., Ltd, Busan 604-714, Korea)

**Abstract:** In order to produce alkaline protease, psychrotrophic Bacterium which have high enzyme activity, was isolated by using enrichment culture from soil samples and identified as genus *Bacillus* sp. The optimal pH and temperature for the enzyme activity were pH 6 and 40°C. The temperature range of high enzyme activity was 20~40°C. The optimal initial pH of culture condition for enzyme was pH 6. The most favorable carbon and nitrogen sources for the production of protease by *Bacillus* sp. WRD-2 were 3% maltose and 4% yeast extract, respectively.

---

Key words: *Bacillus* sp., WRD-2, protease, protease activity, low temperature

\*Corresponding author