

## 토양으로부터 Protease 생산 세균의 분리 및 특성

김관필 · 김남형\* · 이창호 · 우철주 · 배동호\*†

경북대학교 식품공학과  
\*건국대학교 응용생물화학학과

### Isolation and Characterization of Protease Producing Bacteria from Soil

Kwan-Phil Kim, Nam-Hyung Kim\*, Chang-Ho Rhee, Cheol-Joo Woo and Dong-Ho Bae\*†

Dept. of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

\*Dept. of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

#### Abstract

In order to develop a new protease applicable to industries, a bacterium which produces a remarkable amount of extracellular protease were isolated from soil. About 10 bacterial strains producing protease were isolated from samples of soil, and strain PANH765 showed the highest activity of protease production among them. The strain was identified as *Bacillus subtilis* according to the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology based on its morphological, cultural and physiological characteristics. *B. subtilis* PANH765 showed the maximal production of protease in the medium containing 2.0% glucose, 1.0% yeast extract, 0.2% ammonium nitrate, 0.02% ferrous sulfate and 0.02% dipotassium hydrogen phosphate. Under the optimal condition with temperature of 30°C, initial pH of 7.0 and shaking speed of 150 rpm, the protease production reached a maximum level with 36 hr cultivation (6.34 U).

**Key words:** extracellular protease, *Bacillus subtilis* PANH765, optimal conditions

#### 서 론

미생물에 있어서 세포외 protease의 역할은 사람이나 동물이 소화기관인 장내로 분비하는 경우와 유사하다. 따라서 세포외부에 존재하는 고분자성의 단백질을 세포내로 흡수하기 전에 미리 흡수 가능한 단위인 저분자성 아미노산 단위로 분해하기 위하여 protease를 분비한다. 특히 고분자 단백질의 흡수 기작이 없는 미생물에 있어서 protease분비능의 의미는 amylase나 lipase 등과는 또 다른 차원으로서 열량원 외에 질소원까지 얻을 수 있다는 상당한 의의를 가진다.

Protease는 단백질과 peptide에 작용하여 그들의 peptide결합의 가수분해를 촉매하는 효소이며, 어떤 종의 protease는 반응조건에 따라서는 합성반응을 위시하여 여러 반응을 촉매한다(1). 촉매 과정이 protein이나 peptide의 내부에 존재하는 peptide bond를 분해하기 때문에 peptidase라 부르기도 한다. 이때 공격하는 amide bond의 위치에 따라서 exopeptidase와 endopeptidase로 분류를 한다(2). Endopeptidase는 proteinase라 부르기도 하는데 미생물이 세포외부의 주변환경으로 분비하거나 동물이 장내로 분비하는 대부분의 protease가 여기에 속한다.

Protease의 산업에의 응용은 의류의 단백질성 오염물을 제거하기 위해 최초로 사용되었으나, 현재에는 효소 세제 뿐만

아니라 조미료 제조나 식육 연화 및 맥주, 청주의 혼탁방지 등의 식품공업, 소화제·소염 진통제 등의 제약공업, 피혁공업이나 세제공업 등 각 분야에 걸쳐 광범위하게 이용될 수 있다(3). 현재 가장 대표적인 미생물성 protease는 1973년 *B. subtilis*가 생산하는 subtilisins이다(4).

Protease는 동물이나 식물로부터 추출하기도 하나, 그 수와 양은 한정되어 있으며, 근래 발효공업의 발전에 힘입어 미생물로부터의 protease생산이 경제적인 면이나 공업적 규모로의 활용면에 있어서 월등히 유리한 위치에 있다. 공업적으로 protease 생산에 이용되는 대표적인 균주로는 곰팡이류의 *Aspergillus* sp.(5,6)와 세균류의 *Bacillus* sp.(7)가 있으며, 이 외에도 방선균(8,9)이나 효모(10)에서도 protease가 생성됨이 알려져 있다. 이 중 *Bacillus* sp.(7)를 비롯한 각종 세균류는 공업적 이용에 있어 가장 유리한 장점을 갖고 있어 미생물로부터의 protease는 대부분 세균류에서 생산되고 있으며, 고전적인 변이방법을 사용하거나 값싼 원료를 사용하여 생산을 증대시키려는 시도가 진행되어 왔다(11,12). 그러나 protease 이외의 효소나 기타 유용한 대사산물을 세균으로부터 생산하려 할 때는 protease가 대량으로 생산되어 protease 이외의 효소 등을 분해시키는 등의 문제점을 나타내고 있어, 일부에서는 이러한 protease의 생산을 억제하려는 연구도 진행되어 왔다(13,14).

이에 본 연구에서는 현재 산업적으로 광범위하게 이용되

†Corresponding author. E-mail: donghoya@konkuk.ac.kr  
Phone: 82-2-450-3756. Fax: 82-2-456-7011

고 있는 protease의 특성과 관련하여 중성영역에서 최적의 활성을 갖는 neutral protease에 대한 연구의 일환으로, 토양으로부터 neutral protease를 생산하는 미생물을 분리 및 동정하였으며, 또한 분리균의 neutral protease 생산 최적조건을 설정하였다.

**재료 및 방법**

**균주의 분리 및 선별**

세포외(exo type)로 분비하는 protease를 생산하는 미생물을 분리하기 위하여 하천(안양천) 유역의 토양을 채취하여 생리 식염수(0.85% NaCl)에 현탁한 후 상징액을 취하여 분리용 배지(1.0% glucose, 0.5% yeast extract, 0.1% peptone, 2.0% skim milk, 0.3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.0% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.5% agar)에 도말하여 30°C에서 3일간 배양한 후 colony 주변에 skim milk 분해로 생성된 투명환의 크기가 1 cm 이상인 것을 1차로 선별하였다. 1차 선별한 균주를 nutrient broth를 이용하여 30°C에서 24시간 재 배양한 후 배양 상징액의 protease의 활성을 측정하여 가장 우수한 균주를 최종 선별하였다.

**균주의 동정**

Protease의 활성이 우수한 균주의 동정을 위하여 균의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's Manual Systematic Bacteriology의 색인(15)에 따라 동정하였다.

**Protease 활성 측정**

Protease의 활성 측정은 Hull 방법(16)에 따라 다음과 같이 측정하였다. 효소액의 조제는 배양액을 12,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상징액을 효소액으로 사용하였다. 기질 용액은 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 기질인 casein을 사용 직전에 0.6%(w/v)로 용해하여 사용하였다. 5.0 mL의 기질 용액에 효소액 0.5 mL을 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 다음 0.4 M trichloroacetic acid를 5.0 mL첨가하여 30°C에서 20분간 방치시킨 후, 여과하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소의 활성 단위는 1분 동안에 1 µg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

**균체량 측정**

균체 증식도를 측정하기 위하여 배양액을 분광 광도계(UV-1601, Shimadzu, Japan)을 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다.

**최적 조건의 조사**

분리균의 protease 생산을 위한 배지 조성의 최적 조건을 규명하기 위하여 nutrient broth를 기본 배지로 하여 각각의 조성을 달리하여 첨가하였다. 또한 protease의 활성에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 배양 온도 30°C, 진탕 속도 150 rpm으로 하여 초기 pH를 4.0에서 10.0까지 0.5 간격으로 조절

하여 protease의 활성을 비교하였으며, 배양 온도의 영향은 초기 pH 7.0, 진탕 속도 150 rpm으로 하여 배양 온도를 20, 25, 30, 35 및 40°C에서 배양하여 protease의 활성을 비교하였다. 진탕 속도의 영향을 조사하기 위하여 회전 진탕 속도를 0, 50, 100, 150, 200, 250 및 300 rpm으로 각각 달리하여 초기 pH 7.0, 배양 온도 30°C에서 배양한 후 배양 상징액의 protease의 활성을 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**균주의 선별**

세포외(exo type)로 분비하는 protease를 생산하는 미생물을 분리하기 위하여 하천(안양천) 유역의 토양을 채취하여 생리 식염수(0.85% NaCl)에 현탁한 후 상징액을 취하여 분리용 배지(1.0% glucose, 0.5% yeast extract, 0.1% peptone, 2.0% skim milk, 0.3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.0% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.5% agar)에 도말하여 30°C에서 3일간 배양한 후 colony 주변에 skim milk 분해로 생성된 투명환의 크기가 1 cm 이상인 것을 1차로 선별하였다. 1차 선별한 균주를 nutrient broth를 이용하여 30°C에서 24시간 재 배양한 후 배양 상징액의 protease의 활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 그 결과, 10개의 균주 중에서 PANH765의 protease 활성이 2.31 U/mL로 가장 우수하여 PANH765 균주를 효소 생산 조건을 최적화하기 위한 본 실험의 공시 균주로 최종 선별하여 사용하였다.

**균주의 동정**

Protease 활성이 가장 우수한 분리 선별된 균주 PANH765의 동정을 위하여 생리학적 특성을 조사한 결과(Table 2), 분리균은 세포의 형태가 간균이며 Gram 염색시 양성으로써 운동성은 없었으며 내생포자를 형성하였다. Catalase 시험 및 oxidase 시험 양성, VP 시험, methyl red 시험 및 indole 시험 음성, gelatin 액화능과 전분 분해성이 있으며, nitrate를 nitrite로 환원하였다. 그리고 구연산을 이용하였으며, urease 시험 음성으로 나타났고, 5% NaCl 존재 하에서 생육하였다. Glucose, arabinose, xylose, mannitol을 탄소원으로 첨가하였을 때 산을 생성하였다. 또한 탄소원 이용성을 조사한 결과(Table 3), glucose, fructose, maltose, sucrose, cellobiose, rhamnose 및 arabinose 등을 자화하였으나, trehalose, erythritol, dulcitol, 및 adonitol 등의 탄소원들은 자화하지 못하였다. 이상의 형태

**Table 1. Protease activity of isolated microorganisms from soil**

Strain	Protease activity (U/mL)	Strain	Protease activity (U/mL)
PANH135	2.02	PANH601	1.94
PANH248	1.81	PANH765	2.31
PANH331	1.52	PANH837	1.99
PANH419	1.91	PANH901	2.08
PANH597	1.95	PANH982	2.11

**Table 2. Morphological and physiological characteristics of isolated strain PANH765**

Morphological characteristics	
Form	Rods
Size	0.3~0.7×1.5~2.0 μm
Gram stain	Positive
Motility	Negative
Spore formation	Positive
Cultural characteristics	
Nutrient agar	Moderate growth, circular entire, smooth
Physiological characteristics	
Catalase	Positive
Methyl red test	Negative
V-P test	Negative
V-P test (below pH 7.0)	Negative
Indole production	Negative
Starch hydrolysis	Positive
Gelatin liquefaction	Positive
Utilization of citrate	Positive
Hydrogen sulfide production	Positive
Gas from glucose	Negative
Urease test	Negative
OF test	Fermentation
Oxidase test	Positive
Pigment production	Negative
Optimum growth temperature	25~30°C
pH	4.0~9.0
Acid production	Glucose, arabinose, mannitol
Growth in 5% NaCl	Positive

**Table 3. Carbon utilization of isolated strain PANH-765**

Carbon source	Utilization
Cellobiose	+ <sup>1)</sup>
Dextrin	w
Trehalose	-
Arabinose	+
Raffinose	+
Xylitol	-
Arbutin	+
Erythritol	-
Dulcitol	-
Ribose	-
Maltose	+
Galactose	+
Adonitol	-
Rhamnose	+
Fructose	+
Mannitol	+
Inositol	+
Glucose	+
Xylose	+
Sucrose	+
Sorbitol	+
Lactose	+
Melibiose	-
Methanol	-
Ethanol	-
Glucosamine	w
Glycine	+
Salicin	w
Succinate	-
Gluconic acid	+

<sup>1)</sup>+: positive, -: negative, w: weak.

학적 및 생리학적 특성을 토대로 하여 Bergey's Manual Systematic Bacteriology의 색인(15)에 기술된 분류 기준에 따라 동정한 결과 *Bacillus subtilis* 또는 그 유연군으로 동정되어 분리균을 *Bacillus subtilis* PANH765로 명명하였다.

#### 배지조건에 따른 효소 생산

Protease의 생산에 미치는 영양소들의 영향을 조사하기 위하여 nutrient broth를 기본 배지로 하여 탄소원, 질소원 및 무기성분의 종류와 농도를 각각 다르게 하여 실험한 후 protease 생산에 적합한 배지 조성을 조사하였다.

**탄소원의 영향**: *B. subtilis* PANH765의 protease의 활성과 균체 성장에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 먼저 glucose의 농도를 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 및 3.0%(w/v)로 조정하여 실험한 결과 2.0%일 때 protease의 활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 각 탄소원의 농도를 2.0%로 하여 기본 배지에 탄소원의 종류를 달리하여 첨가한 후 30°C에서 24시간 배양한 다음 원심 분리하여 균체량과 protease의 활성을 측정된 결과 (Table 4), glucose를 첨가한 경우 protease의 활성이 4.20 U/mL로 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로는 rhamnose(3.92 U/mL), fructose(3.73 U/mL), maltose(2.98 U/mL), sucrose(2.98 U/mL)를 첨가할 때 protease의 활성이 높게 나타났으며, 그 외의 탄소원들은 protease의 활성이 낮게 나타났다. 특히 arabinose(0.08 U/mL), soluble starch(0.27 U/mL), ribose(0.38 U/mL), inuline(0.56 U/mL), xylose(0.93 U/mL)를 첨가한 경우에는 protease의 활성이 2% glucose 첨가할 때와 비교할 때 30%이하로 매우 낮게 나타났으며, 균체 성장 또한 매우 낮은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과로 볼 때 protease의 생산성을 위한 탄소원으로는 glucose가 효과적이라 판단되어, 본 실험에서는 protease의 활성이 가장 우수한 탄소원으로 밝혀진 glucose를 사용하였다. 이러한 결과는 Kang 등(17)과 Yun 등(18)이 보고한 *Saccharomyces lipolytica*가 생산하는 pro-

**Table 4. Effects of various carbon sources on the cell growth and protease activity of *B. subtilis* PANH-765**

Carbon source (2.0%)	Cell growth (600 nm)	Protease activity (U/mL)
Fructose	2.8	3.73
Sucrose	2.4	2.98
Rhamnose	3.2	3.92
Ribose	0.8	0.38
Raffinose	4.3	3.27
Galactose	2.9	2.52
Lactose	1.4	2.05
Mannitol	1.7	2.24
Glucose	3.9	4.20
Inositol	1.8	2.05
Arabinose	0.7	0.08
Maltose	3.4	2.98
Xylose	1.2	0.93
Inuline	0.4	0.56
Soluble starch	0.3	0.37
None	1.6	2.14

tease와 *Streptomyces* sp. YSA-130이 생산하는 alkaline protease 경우와 비교시 탄소원의 농도는 비슷한 결과를 나타내었으나, 본 균주는 soluble starch 첨가시 protease의 활성이 낮게 나타난 반면에 위의 결과들은 soluble starch 첨가시 glucose 첨가시보다 protease의 활성이 높게 나타났다는 결과와는 상이하였다.

**질소원의 영향:** 효소 생산에 미치는 유기 질소원의 영향을 조사하기 위하여 먼저 yeast extract의 농도를 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.0, 3.0, 및 5.0%로 조정하여 실험을 한 결과 1.0%일 때 protease의 활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 각 유기 질소원의 농도를 1.0%로 하여 기본 배지에 질소원의 종류를 달리하여 첨가한 후 30°C에서 24시간 배양한 다음 원심 분리하여 균체량과 protease의 활성을 측정된 결과(Table 5), 실험에 사용한 질소원 중에서 yeast extract를 첨가한 경우 protease의 활성이 4.70 U/mL로 가장 높게 나타났다. 그리고 beef extract(4.26 U/mL), soytone(4.04 U/mL), peptone (3.64 U/mL)을 첨가한 경우에도 protease의 활성이 비교적 높은 활성을 나타내었으며, 그 외의 질소원을 첨가할 경우에는 protease의 활성이 낮게 나타났다. 균체 성장은 질소원으로 peptone을 첨가 시 가장 높게 나타났으며, yeast extract를 첨가한 경우에는 균체 성장은 peptone보다 낮게 나타났다.

**무기 성분의 영향:** *B. subtilis* PANH-765의 protease의 활성과 균체 성장에 미치는 무기 성분의 영향을 조사하기 위하여 nutrient broth에 각종 무기 성분의 최종 농도를 다르게 첨가하여 30°C에서 24시간 배양한 다음 균체량과 protease의 활성을 측정하였다(Table 6). 그 결과, 실험에 사용한 무기 성분 중에서 ammonium nitrate와 magnesium sulfate를 첨가한 경우 protease의 활성이 높게 나타났으며, 농도는 각각 0.2%와 0.02%일 때 효소의 활성이 2.60 U/mL로 가장 높게 나타났다. 그 다음으로는 0.02%의 dipotassium hydrogen phosphate를 첨가할 경우 활성이 2.51 U/mL로 높게 나타났다. 그리고 그 외 sodium chloride, ammonium sulfate, magnesium sulfate를 첨가한 경우 protease의 활성이 대조구와 비교할 경우 효소의 활성을 감소시키는 것으로 나타났다.

배양 온도에 따른 효소 생산

*B. subtilis* PANH765의 protease의 활성과 균체 성장에 미

Table 5. Effects of various nitrogen sources on the cell growth and protease activity of *B. subtilis* PANH-765

Nitrogen source (0.5%)	Cell growth (600 nm)	Protease activity (U/mL)
Tryptone	2.6	3.06
Soytone	3.0	4.04
Peptone	3.5	3.64
Yeast extract	3.2	4.70
Malt extract	2.9	2.73
Casamino acid	1.4	2.19
Polypeptone	1.2	1.64
Beef extract	3.2	4.26
None	1.6	2.14

Table 6. Effects of various inorganic compounds on the cell growth and protease activity of *B. subtilis* PANH-765

Inorganic compound	Concentrations (%)	Cell growth (600 nm)	Protease activity (U/mL)
Ammonium nitrate	0.10	1.7	2.23
	0.20	1.9	2.60
	0.30	1.5	2.05
Dipotassium hydrogen phosphate	0.01	1.4	1.86
	0.02	1.9	2.51
	0.03	1.8	2.05
Sodium chloride	0.10	1.2	1.58
	0.20	1.0	1.30
	0.30	0.8	0.93
Ammonium sulfate	0.10	1.5	1.49
	0.20	1.8	1.86
	0.30	1.6	1.68
Magnesium sulfate	0.01	1.7	2.23
	0.02	1.9	2.60
	0.03	1.5	2.42
Ferrous sulfate	0.01	1.0	1.21
	0.02	1.1	1.40
	0.03	1.4	1.68
None		1.6	2.14

치는 배양 온도의 영향을 조사하기 위하여 protease 생산 최적 배지(2.0% glucose, 1.0% yeast extract, 0.2% ammonium nitrate, 0.02% ferrous sulfate and 0.02% dipotassium hydrogen phosphate)에 균을 접종한 후 20, 25, 30, 35 및 40°C 등의 각 온도에서 150 rpm으로 24시간 배양한 다음 균체량과 protease의 활성을 측정하였다(Fig. 1). 그 결과, 배양 온도가 30°C일

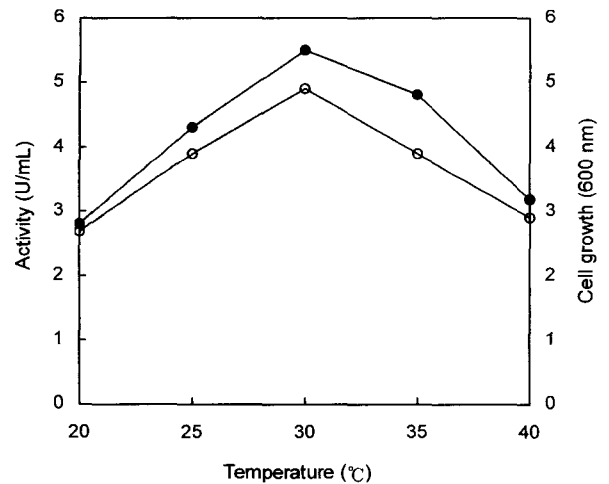


Fig. 1. Effects of temperature on the cell growth and protease activity of *B. subtilis* PANH765.

After bacteria were cultured in an optimum medium at various temperature for 24 hr on the shaker, cell growth and protease activity were assayed as described in Materials and Methods. The optimum medium is composed of 2.0% glucose, 1.0% yeast extract, 0.2% ammonium nitrate, 0.02% ferrous sulfate and 0.02% dipotassium hydrogen phosphate (pH 7.0). ○-○, cell growth; ●-●, activity.

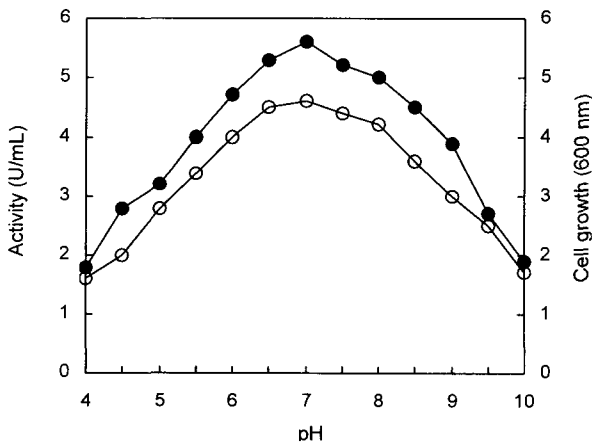
때 protease의 활성이 5.52 U로 가장 우수하였으며, 균체 성장 또한 가장 우수하였다. 이 결과는 Kang 등(17)이 protease와 생산 균주로 분리한 *Saccharomyces lipolytica*가 생산하는 효소의 활성이 15~20°C에서 가장 우수하였다는 보고와 비교하면 본 균주가 다소 높게 나타났으며, Yun 등(18)이 protease의 생산 균주로 분리한 *Streptomyces* sp. YSA-130이 30°C에서 효소 활성이 가장 우수하였다는 보고와 일치하였다.

**pH에 따른 효소 생산**

*B. subtilis* PANH765의 protease의 활성과 균체 성장에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 protease 생산 최적 배지의 초기 pH를 4.0에서 10.0까지 0.5 간격으로 조정하여 30°C에서 150 rpm으로 24시간 배양한 후 균체량과 protease의 활성을 측정하였다(Fig. 2). 그 결과, 초기 pH가 6.5~8.0일 때 protease의 활성이 우수하였으며 특히 초기 pH 7.0일 때 protease의 활성이 5.63 U로 가장 높게 나타났다. 균의 생육 또한 초기 pH가 7.0일 때 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 Kang 등(17)과 Yun 등(18)이 보고한 *Saccharomyces lipolytica*가 생산하는 protease와 *Streptomyces* sp. YSA-130이 생산하는 alkaline protease 경우와 비교시 낮은 최적 pH를 나타내었는데 그 이유는 Kang 등(17)과 Yun 등(18)이 생산하는 protease는 alkaline protease이며 본 균주가 생산하는 protease는 neutral protease이기 때문인 것으로 사료된다.

**진탕 속도에 따른 효소 생산**

본 공시균의 protease의 활성과 균체 성장에 미치는 진탕 속도의 영향을 조사하기 위하여 회전식 진탕 배양기의 회전 속도를 0, 50, 100, 150, 200, 250 및 300 rpm으로 조정하여 진탕 하였다. 배양 조건은 초기 pH 7.0 및 배양 온도 30°C에서 24시간 진탕 배양한 후, 균체량과 protease의 활성을 측정된 결과

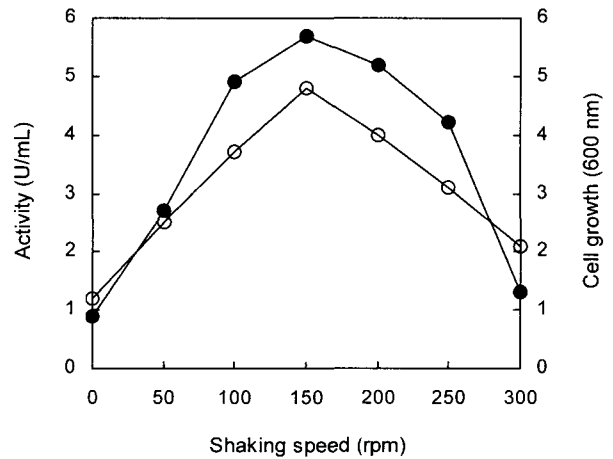


**Fig. 2. Effects of initial pH on the cell growth and protease activity of *B. subtilis* PANH765.** After bacteria were cultured in an optimum medium with various initial pH at 30°C for 24 hr on the shaker, cell growth and protease activity were assayed as described in Materials and Methods. The optimum medium is composed of the same as Fig. 1. ○-○, cell growth; ●-●, activity.

(Fig. 3), 최대 protease의 활성은 진탕 속도가 150 rpm일 때 5.72 U로 가장 높게 나타났으며, 균체 성장 또한 150 rpm일 때 가장 우수하였다.

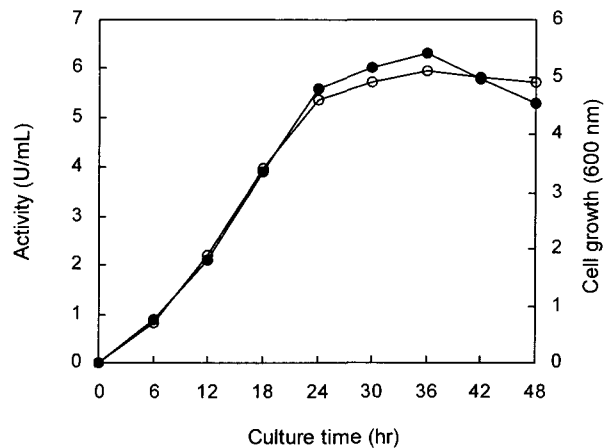
**배양 시간의 영향**

이상에서 검토한 최적 배지 조성 및 최적 배양 조건에서 균주의 생육과 효소의 활성을 경시적으로 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 그 결과, 균의 생육과 효소의 활성은 배양 36시간일 때 가장 높게 나타났으며, 이때의 효소 활성은 6.34 U/mL로 나타났으며, 그 이후의 시간에는 감소하는 경향을 나타내었다.



**Fig. 3. Effects of shaking speed on the cell growth and protease activity of *B. subtilis* PANH765.**

After bacteria were cultured in an optimum medium at 30°C for 24 hr on the shaker at various shaking speed, cell growth and protease activity were assayed as described in Materials and Methods. The optimum medium is composed of the same as Fig. 1. ○-○, cell growth; ●-●, activity.



**Fig. 4. Changes in cell growth and protease activity of *B. subtilis* PANH765 upon culturing period.**

Optimum culture conditions about temperature, initial pH and shaking speed were 30°C, 7.0 and 150 rpm. The optimum medium is composed of 2.0% glucose, 1.0% yeast extract, 0.2% ammonium nitrate, 0.02% ferrous sulfate and 0.02% dipotassium hydrogen phosphate. ○-○, cell growth; ●-●, activity.

요 약

공업적으로 광범위하게 이용되고 있는 protease 중 중성 영역에서 최적의 활성을 갖는 중성 protease에 대한 연구의 일환으로, 토양으로부터 protease의 생성능이 우수한 10여 균주를 순수 분리하였으며, 이들 중에서 protease의 활성이 가장 우수한 PANH765를 최종 선별하였다. 이 균주의 형태학적, 배양학적, 생리학적 및 생화학적 특성을 조사하여 Bergey의 세균 분류서의 색인에 따라 체계적으로 분류한 결과, *Bacillus subtilis* 또는 그 유연군으로 동정되어 분리균을 *Bacillus subtilis* PANH765로 동정하였다. *B. subtilis* PANH-765 균주에 의한 protease의 최적 배지 조성은 2.0% glucose, 1.0% yeast extract, 0.2% ammonium nitrate, 0.02% ferrous sulfate 및 0.02% dipotassium hydrogen phosphate이었으며, 최적 생산 조건은 배양온도 30°C, pH 7.0, 진탕 속도 150 rpm이었다. 이 조건에서 초기 균체량을 5%(w/v)접종하여 배양하였을 때 시간에 따른 효소의 최대 활성은 배양 36시간일 때 6.34 U이었다.

문 헌

1. Appel W. 1970. *Methods of enzymatic analysis*. In *Peptidase*. Bergmeyer HU, ed. Verlag Chemie Weinheim, Academic press, New York. p 949-989.
2. Neurath H. 1989. The diversity of proteolytic enzymes. In *Proteolytic enzymes a practical approach*. Beynon RJ, Bond JS, eds. IRL press, Oxford. p 1-13.
3. Godfrey T, Reichelt J. 1983. *Industrial enzymology. The application of enzymes in industry*. The Nature Press. p 127-172.
4. Hamamoto T, Horikoshi K. 1992. Alkaliphiles. In *Encyclopedia of microbiology*. Lederberg J, ed. Academic press, London. p 81-87.
5. Impoolsup A, Bhumiratana A, Flegel TW. 1981. Isolation of alkaline and neutral proteases from *Asperillus flavus* var. *columnaris*, a soy sauce koji mold. *Appl Environ Microbiol* 42: 619-628.
6. Horikoshi K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms, Part I, alkaline proteinase produced by *Bacillus* No. 221. *Agr Biol Chem* 35: 1407-1414.
7. Mizusawa K, Ichishima E, Yoshida F. 1964. Studies on the proteolytic enzymes of thermophilic *Streptomyces*. *Agric Biol Chem* 28: 884-895.
8. Nakanishi T, Matsumura Y, Minamura N, Minamiura N, Yamamoto T. 1974. Purification and some properties of an alkalophilic aroteinase of a *Streptomyces* sp. *Agric Biol Chem* 38: 37-44.
9. Meusdoerffer F, Tortora P, Holzer H. 1980. Purification and properties of proteinase A from yeast. *J Biol Chem* 255: 12087-12093.
10. Rhden AC, Lindberg M, Philipson L. 1973. Isolation and characterization of two protease - producing mutants from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 116: 25-32.
11. Chandrasekaran S, Dhar SC. 1983. A low-cost method for the production of extracellular alkaline proteinase using Tapioca starch. *J Ferment Technol* 61: 511-514.
12. Hare P, Scott-Burden T, Woods DR. 1983. Characterization of extracellular alkaline proteases and collagenase. *J General Microbiology* 129: 1141-1147.
13. Long S, Mothibeli MA, Robb FT, Woods DR. 1981. Regulation of extracellular alkaline protease activity by histidine in a collagenolytic *Vibrio alginolyticus* strain. *J General Microbiology* 127: 193-199.
14. Aronson AI, Angelo N, Holt SC. 1971. Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus* T: Characterization of mutants producing altered amounts of protease. *J Bacteriol* 106: 1016-1025.
15. John GH, Noel RK, Peter HAS, James TS, Stanely TW. 1994. *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*. 9th ed.
16. Hull ME. 1974. Studies on milk proteins II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J Dairy Sci* 30: 881-884.
17. Kang KH, Bae IH, Lee CH. 1987. Studies on extracellular protease from *Saccharomycopsis lipolytica* - conditions of enzyme production. *Kor J Appl Microbiol Bioeng* 15: 279-285.
18. Yun SW, Lee KP, Yu JH, Shin CS, Oh DH. 1989. Purification and properties of alkaline protease from *Streptomyces* sp. YSA-130. *Kor J Appl Microbiol Bioeng* 17: 358-364.

(2002년 6월 24일 접수; 2002년 10월 4일 채택)