

Bacillus magaterium 에 의한 Alkaline protease 의 생산 조건

신석우[†] · 권미애 · 장미순 · 정규진¹ · 서호준²
여수대학교 식품공학과, ¹남도대학, ²여수대학교 화학공학과

Production conditions of Alkaline protease by *Bacillus magaterium*

Suk-U Shin[†], Mi-Ae Kwon, Mi-Soon Jang, Kyoo-jin Jung¹ and Ho-Joon Seo²

Dept. of Food Science and Technology, Yosu National University, Yosu 550-759, Korea

¹Dept. of Marine Food and Technology, Provincial College of Namdo, Changhung 529-850, Korea

²Dept. of Chemical Engineering, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

Abstract

Microorganism producing alkaline protease was isolated from Norway's mackerel and identified as *Bacillus magaterium* by the morphological and physiological characteristics. The optimum culture conditions of this strain for the maximum protease activity were 1.2% galactose, 1.5% NH₄NO₃, 0.3% MgSO₄, pH 8.0 and 48 hrs. at 35°C. Thermostable of this protease was stability at 10 to 50°C and instability at 60 to 80°C.

Key words : alkaline protease, identified, protease activity, stability

서 론

알카리성 protease는 식품산업에 중요한 효소로서 다종 다양한 시료로부터 활성 미생물에 대한 검색 및 연구가 진행되어 오고 있다.

현재 시장규모가 효소전체 시장의 60%(1)을 차지하고 있는 단백질 분해효소는 조미료 제조(2-4), 농축어류 단백질의 정미증진 및 쓴맛제거제(5,6) 세균세포의 용해에 이용되는 Lytic proteinase(7), 세제(8-10), 환상 및 상처치료제(11) 사료 공장폐수처리(12) 외에 식육 연화제, 맥주, 청주혼탁방지제, 치즈숙성, 피혁가공(13,14)등 광범위하게 이용되고 있다. 이와 같이 여러 가지 용도로 이용되고 있는 알카리성 protease를 생산하기 위해 세균에서는 *Bacillus* sp.(1-3,8), *Pseudomonas* sp.(9,13), *Xanthomonas* sp.(10), 등이 검색되었고 곰팡이에서는 *Aspergillus* sp.(15,16), *Cephalosporium* sp.(17)등, 효모에서는 *Candida* sp.(18), *Yarrowia* sp.(19,20), *Saccharomycopsis* sp.(21), 방선균에서는 *Streptomyces* sp.(14,21), *Thermoactinomyces* sp.(22)등의 미생물을 통해 연구가 행해져 왔다. 최근 미생물 중에는 저온 및 고온에 활성이 높은 알카리성 protease를 생산하는 것이 있어 이것을 이용하여 세제산업이나 특수한 식품 산업에 이용되고 있다.(1-3,9)

본 연구에서는 -20°C에서 장기간 동결한 고등어 fillet 으로부터 알카리성 protease 활성이 높은 균주를 분리하여 동정한 후 이 균이 생산하는 protease 생산 조건을 알아보았다.

재료 및 방법

Protease 활성균주의 분리 및 선정

Protease 활성균의 분리는 -20°C에 저장한 노르웨이산 고등어로부터 분리 하였다. 고등어 현탁액 0.1 mL을 표준 한천 평판 배지에 도말하여 25°C에서 1주일간 배양하여 생성된 집락으로부터 120균주를 조균하여 이들 균들에 대한 protease 활성균을 분리하기 위해 Table 1 과 같이 casein 을 첨가한 기본 배지에 희석 도말하여 25°C에서 72시간 배양해서 생성된 clear zone 을 형성한 것 중 환의 크기가 직경 3 cm 이상인 1 균주를 선별하였다.

선별균의 동정

분리 선정된 균주의 동정은 Gram 염색에 의한 형태학적 특징, 포장형성유무, catalase, oxidase 시험, 탄수화물 분해능, 질산환원, 인돌형성, 식염농도, 생육온도, voges proskauer 등의 실험을 거쳐 Bergy's manual of systematic bacteriology(23)에 의거하여 분류동정 하였다.

[†] Corresponding author. E-mail : ni0d005@yosu.ac.kr, Phone : 82-61-659-3214, Fax : 82-61-652-2353

Table 1. Protease isolation medium

Isolation medium	(%)
Glucose	2.0
Casein	0.5
MgSO ₄ ·	0.05
K ₂ HPO ₄	0.1
NaCl	0.75
pH	7.0

조효소의 조제

100 mL Erlenmeyer flask에 기초배지에 40 mL을 넣어 121 °C, 15분간 멸균한 후 선별된 균을 1배금이 접종해서 35°C, 200 rpm (Vision Science사, Seoul Korea)에 48시간 배양한 것을 2°C, 1000 rpm 에서 20분간 원심 분리하여 그 상등액을 조효소액으로 하였다.

효소 활성 측정법

Protease 활성은 Hammarsten Casein 을 기질로 하여 Anson-Ogihara 개량법(24)에 따라 Fig. 1에 의해 효소활성을 측정하였다. 효소활성단위는 상기 조건하에서 1분 동안에 효소기질 반응액 1 mL로부터 유리되는 tyrosin 1 mg 에 상당하는 흡광도를 나타내는 효소량을 1 unit로 하였다.

Addition	Sample	Control
Butter solution	0.4 mL	0.4 mL
2% Casein solution	0.5 mL	0.4 mL
↓ Preincubation at 35°C for 5 min.		
Enzyme solution	0.1 mL	-
↓ Incubation at 35°C for 20 min.		
0.44 M T.C.A solution	1.0 mL	1.0 mL
Enzyme solution	-	0.1 mL
↓ Stabilization at 35°C for 30 min.		
↓ Filtration		
Filtrate	1.0 mL	1.0 mL
0.55M Na ₂ CO ₃ solution	2.5 mL	2.5 mL
Folin reagent(×3)	0.5 mL	0.5 mL
↓ Coloration at 35°C for 30 min.		
↓ Measured optical density at 660 nm		

Fig. 1. Assay of enzyme activity.**효소의 생산조건**

효소생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 기초배지를 이용하여 효소의 최대 활성을 나타내는 배양지적온도를 조사한 다음 탄소원 2%, 질소원 0.5%, 무기원 0.1% 를 기초배지에 첨가하여 효소활성이 가장 높은 성분을 선정하고 이 선정된 성분에 대한 최대 활성농도를 조사하여 효소 생산을 위한 지적 배지 조성을 얻어 이 배지를 이용한 최적 pH, 온도, 배양시간 등을 조사하여 효소생산 조건을 구했다.

결과 및 고찰**Alkaline protease 생산균주의 분리 및 동정**

노르웨이에서 수입한 동결된 고등어로부터 분리한 15균주의 protease 활성균을 분리하여 이 가운데의 활성이 강한 1 균주를 선정하였다. 선정된 균주는 Table 2 와 같이 Gram 양성, 아포형성 간균으로 catalase, oxidase, voges-proskauer 반응 양성 이었고 질산환원 및 인돌 음성균으로서 식염농도 2~7%, 생육온도 5~40°C에서 잘 생육하는 균으로 Bergy's manual of systematic bacteriology(47)의 의거 *Bacillus megaterium* 으로 동정하였다.

효소의 최적생산 조건

효소생산을 위해 선정된 *Bacillus megaterium*의 지적온도와 pH범위는 Fig. 2, 3과 같다 배양온도 20~50°C의 온도 범위에서 효소활성이 가장 높게 나타난 것은 이들 온도 가운데서 35°C이었고, pH 2-13에서 pH 8 일때 효소활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 이후 효소생산을 위해 배양온도는 35°C, pH 8, 배양시간은 48시간으로 정하여 탄소, 질소, 무기원에 대한 상대활성도를 조사 하였다.

탄소원의 영향

탄소원에 대한 protease의 상대 활성은 Table 3 에서와 같이 galactose에서 217% 로 가장 높게 나타났고 이 외의 탄소원 가운데에서 mannose와 soluble starch 를 제외한 arabinose, maltose, cellulose 등에서 미약한 활성을 보였고 fructose, xylose, rhamnose 에서는 전혀 활성이 나타나지 않았다. 탄소원에 대한 활성이 가장 높은 galactose 의 농도 0.1~2.5% 범위내에서 활성을 조사한 결과는 Fig. 4 와 같다. galactose 농도가 0.1% 로부터 농도가 높아 감에 따라 효소의 상대 활성이 상승하다가 1.2% 때 최고 활성을 보였고 그 이후 부터는 급격히 감소하는 경향을 보였다. alkaline protease를 생성하는 *Bacillus licheniformis*의 탄소원으로서 glucose, lactose, starch 등에서 galactose 에서만 높은 활성을 나타내어(3) 본 조사에서 protease 활성균으로 동정한 *Bacillus magterium* 은

Table 2. Biochemical characteristic of proteolytic enzyme production strain

Characteristic	strain C-08
Gramstain	+ ¹⁾
Spore forming	+
Catalase	+
Oxidase	+
Voges-prokauer test	-
Anaerobic growth	-
Acid from	
D-Glucose	+
L-Arabinose	d
D-Xylose	d
Hydrolysis of	
Casein	d
Gelatin	+
Starch	-
Utilization of citrate	+
Nitrate reduced to nitrate	+
Formation of indole	-
Growth in NaCl	
2%	+
3%	+
5%	+
7%	+
Growth at	
5°C	d
10°C	+
30°C	+
40°C	+
50°C	-

¹⁾ : positive, - : negative, d : 11 ~ 89% of strains positive.

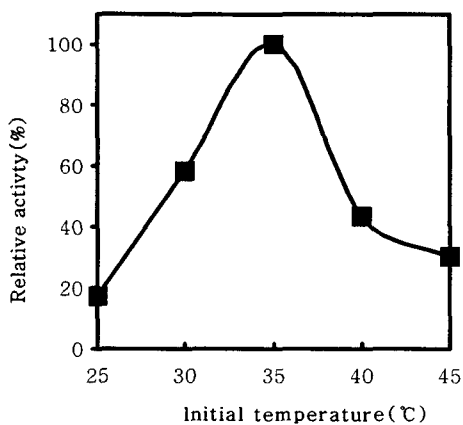


Fig. 2. Effect of initial temperature on the enzyme production.

galactose에서만 높은 활성을 나타내어 탄수화물에 대한 선택성이 상당히 제한되고 있음을 알 수 있었다.

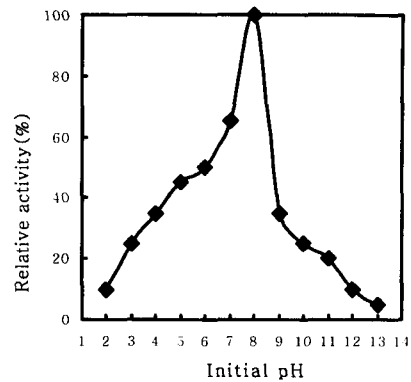


Fig. 3. Effect of initial pH on the enzyme production.

Table 3. Effect of carbon sources on the enzyme production

Carbon sources	Relative activity(%)	pH(final)
D-glucose	3	5.86
D-galactose	217	5.94
D-fructose	0	6.17
D-mannose	95	6.19
D-xylose	0	5.88
D-arabinose	28	7.02
D-rhamnose	0	8.76
D-mannitol	0	6.21
Maltose	28	6.05
Lactose	8	6.47
D-raffinose	2	6.20
Soluble starch	40	6.28
Inulin	4	6.16
α-cellulose	11	6.24
None	100	5.86

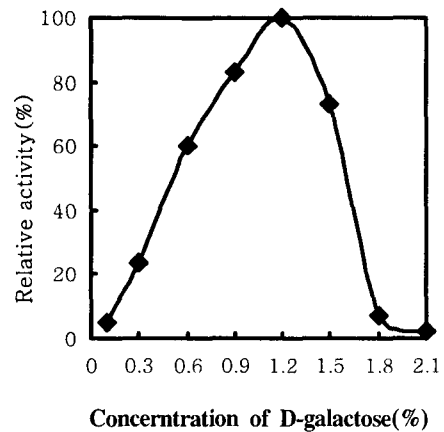


Fig. 4. Effect of carbon sources concentration on the enzyme production.

질소원의 영향

질소원의 종류와 농도는 미생물의 protease 생산에 영향을 준다(19) 따라서 본 조사에서는 질소원으로 유기태 질소원

과 무기태 질소원을 대상으로 protease 의 상대 활성을 조사한 것은 Table 4 와 같다. 유기태 질소원에서는 asparagine 에서 183%로 가장 높았고 그 다음이 malt extract에서 133% 였다. 그 외 다른 유기태 질소원에서는 아주 낮은 활성을 보였다. 무기태 질소에서는 NH₄NO₃ 에서 223%, NH₄Cl 에 서 120% 였고 그 외의 무기태 질소에서는 낮은 활성을 보 였다. 또한 이들 질소원 가운데서 가장 활성이 높은 NH₄NO₃ 의 농도(0.1~2.5%)에 따른 protease의 상대 활성을 조사한 것은 Fig.5와 같다. NH₄NO₃ 의 농도가 높아 감에 따라 활성은 점진적으로 상승하다가 1.5% 일 때 최대 활성 을 보였고 이 이후에는 급격히 감소하는 경향을 보였다. 상 기에서 기재한 *Bacillus licheniformis* 에서는 유기질소중 탈지 한 soybean meal 에서 질소원 중 가장 높은 활성을 보인 것 과 본 균에서 무기질소에서 높은 활성을 보인 것과는 대조 적인 것을 알 수 있다.

Table 4. Effect of nitrogen sources on the enzyme production

Nitrogen sources	Relative activity(%)	pH(final)
Peptone	16	6.10
Casein	6	5.76
Yeast extract	33	5.90
Malt extract	133	5.57
Beef extract	10	5.57
L-asparagine	183	6.03
Urea	6	5.83
(NH ₄) ₂ SO ₄	90	5.92
NH ₄ Cl	120	6.22
NH ₄ NO ₃	223	6.10
KNO ₃	16	5.53
Albumin	26	5.94
NaNO ₃	13	6.90
None	100	5.60

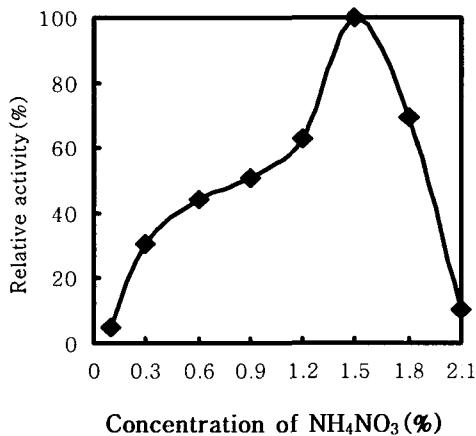


Fig. 5. Effect of nitrogen sources concentration on the enzyme production

무기염의 영향

무기염이 protease 생산에 미치는 영향을 조사한 것은 Table. 5와 같다. 여러 가지 무기염 중에서 가장 활성이 높 은 것은 MgSO₄ 로 122% 였고 COCl₂, CaCl₂, FeSO₄, MgCl₂ 등에서는 미약한 활성을 보였다. 그 외의 무기염에서는 전 혀 활성을 나타내지 않았다. 배(22)등이 알카리성 protease 를 생산하는 *Bacillus alkalophilus*에 대한 무기염의 영향에서 효소 활성이 높은 염류로서 COCl₂, CuSO₄, Fe₂(SO₄)₃, MgSO₄, MnCl₂, ZnSO₄등에서 110% 이상 이였고, 김(2) 등이 내열성 protease 를 생성하는 *Bacillus amyloliquefaciens*에서는 무기염이 효소활성에 아무런 영향을 미치지 못한 균들과 본 protease 생성균과는 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다. 본 균에서 활성이 가장 높은 MgSO₄의 농도에 따른 효소활성을 조사한 것은 Fig. 6 과 같다. MgSO₄ 농도가 0.3% 일때 가장 활성이 높았고 농도가 증가됨에 따라 점진적으로 효소활성 이 감소되어 2.5% 에서는 활성이 없는 것으로 나타났다. 이 상에서 조사 된 것과 같이 탄소원으로 galactose 1.2%, 질소 원으로 NH₄NO₃ 1.5%, 무기염으로 MgSO₄ 0.3% 를 기본배지 에 첨가하여 효소생산 배지(Table. 6)를 제작하였다.

Table 5. Effect of metal salt on the enzyme production

Metal salt	Relative activity(%)	pH(final)
MgSO ₄	122	5.90
CoCl ₂	40	6.10
CaCl ₂	22	6.15
CuSO ₄	5	5.70
Pb(NO ₃) ₂	0	5.90
ZnSO ₄	0	5.90
FeSO ₄	15	5.70
AgNO ₃	0	5.90
Li ₂ SO ₄	0	6.00
MnSO ₄	0	6.10
HgCl ₂	10	5.70
KCl	0	6.00
None	100	6.10

Table 6. Protease production medium

Production medium	(%)
D-galactose	1.2
Casein	0.5
NH ₄ NO ₃	1.5
MgSO ₄	0.3
K ₂ HPO ₄	0.1
NaCl	3.0
pH	8.0

분리 protease 의 열안전성

분리된 protease 을 40, 50, 60, 70와 80℃에서 60분 동안

방치하면서 그 상대 활성을 조사한 것은 Fig. 7과 같다. 40℃에서는 60분 동안 효소활성에는 아무런 영향을 미치지 못하였고 50℃에서는 미약하지만 시간이 경과하면서 점진적으로

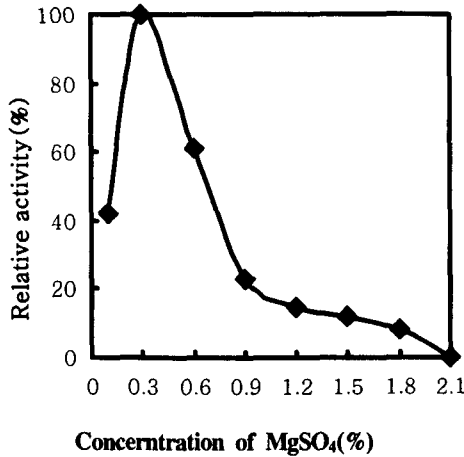


Fig. 6. Effect of metal salt concentration on the enzyme production.

하는 동안 약 40%, 30 분경과시에는 15% 정도로 급격히 감소되다가 그 이후부터는 60분까지 별다른 변동이 보이지 않았다. 80℃에서는 10분 방치시 약 15% 로 급격히 감소하였고 그 이후부터는 시간의 경과에 따라 미세하게 감소하는 경향을 보였다.

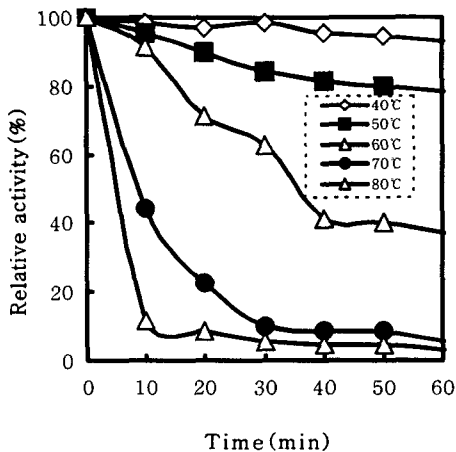


Fig. 7. Thermostability of the protease.

요 약

-20℃로 동결된 노르웨이산 고등어로부터 protease 활성이 강한 미생물을 분리하였다 분리된 미생물을 형태 및 생리학적 성상에 의거하여 동정한 결과 Bacillus magaterium으로 분류 되었다. protease 최대 활성을 얻기 위해 최적온도, pH,

배양시간, 탄소원, 질소원, 무기원 및 이들에 대한 지적농도를 조사한 결과 pH 는 8, 온도는 35℃, 배양시간은 48시간 이었고, 탄소원은 galactose 로 1.2%, 질소원은 NH₄NO₃로 1.5%, 무기원은 MgSO₄로 0.3% 에서 protease 최대 활성을 얻을 수 있었다. 또한 이 효소의 열에 대한 안전성을 검토한 결과 40~50℃에서 60분까지는 효소활성이 80~100%로 안정하였고 60~80℃에서는 시간에 경과됨에 따라 40~50%까지 감소하였다.

참고문헌

1. Lee, J.H. and Bai, D.H. (2004) A thermostable protease produced from *Bacillus* sp. DF 218. Korean J. Food Sci. Technol., 36, 105-110
2. Kim, H.K., Kim, K.H., Lee, J.K., Kim, Y.O., Nam, H.S. and Oh, T.K.(1995) Characterization of a thermostable protease from thermophilic *Bacillus amyloiquefaciens* NS 15-4. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 322-328
3. Koo, J.H., Choi, I.J., Nam, H.S., Lee, H.J., Shin, Z.I. and Oh, T.K. (1997) Medium optimization for production of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* NS 70. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 207-211
4. Choi, C., Choi, K.S., Kim, S., Lee, S.H., Son, J.H., Choi, H.G., Lee, S.S. and An, B.J. (1997) Characteristics and action pattern of protease from *Scopulariopsis brevicaulis* in Korean traditional Meju. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 56-61
5. Noguchi, M., Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M. (1975) On the bitter masking activity of a glutamic acid rich oligopeptide fraction. J. Food Sci., 40, 367-370
6. Umetsu, H. and Ichishima, E. (1985) Mechanism of digestion of bitter peptide from a fish protein concentration by wheat Carboxy peptidase. Nippon Shokuhin Kogyo Gokkaishi, 32, 281-287
7. Nakagawa, T., Nagayama, F. and Hories, S. (1985) Properties of the extracellular lytic proteinase of *Pseudomonas* sp. Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 51, 75-78
8. Ahn, J.W., Oh, T.K., Park, Y.H. and Park, K.H.(1990) Partial purification and characterization of the alkaline protease from *Bacillus* sp. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18, 344-351
9. Roh, J.S., Chung, Y.C., Park, S.K. and Sung, N.K. (1991) Isolation of alkalo psychrotrophic protease-production *Pseudomonas* sp. RP-222 and properties of its crude enzyme. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 19, 3 83-389

10. Lee, C.H., Kwon, T.J., Kang, S.M., Suh, H.H., Kwon, G.S., Oh, H.M. and Yoon, B.D. (1994) Production and characterization of an alkaline protease from an isolate, *xanthomonas* sp. YL-37. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 515-521
11. Christie, R.B.(1980) Topics in enzyme and fermentation biotechnology, 4th ed., A. Wiseman, Ellis Horwood, Chichester, U.K., P.25-83
12. Shin, S.W., Jung, K.J., Kim, S.W. and Park, S.H. (1989) Identification of the protease producing bacteria to use fish meal wastewater and the producing conditions for fish enzyme. Bull. Kor. Fish. Soc., 22, 138-146
13. Choi, C., Chung, J.G., Sung, S.K., Choi, K.S., Lee, J.S., Cho, Y.J. and Kwon, O.J. (1992) Production and purification of alkaline protease from *Streptomyces* sp. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 169-177
14. Choi, C., Chung, J.G., Sung, S.K., Choi, K.S., Lee, J.S., Cho, Y.J. and Chun, S.S. (1992) Characteristics and action pattern of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 10, 295-301
15. Choi, C., Kim, D.K., Cho, Y.J. and Sung, T.S. (1990) Purification and biological characteristic of alkaline protease from *Aspergillus* sp. CC-29. J. Korean Soc. Food Nutr., 19, 434-442
16. Nakadai, T., Nasuno, S. and Iguchi, N. (1973) Purification and some properties of alkaline proteinase from *Aspergillus oryzae*. Agric. Biol. Chem., 37, 2685-2694
17. Tsuchiya, K., Tsutomu, A., Kazuyuki, S. and Tetsu, K. Purification and some properties of alkaline protease from *Cephalosporium* sp. KM-388. Agr. Biol. Chem., 51, 2959-3003
18. Nelson, G. and Young, T.W. (1987) Extracellular acid and alkaline protease from *candida olea*. J. Gen. Microbiol., 133, 1462-1467
19. Kim, C.H., Lee, T.H., Yu, C.B. and Jim, I.Y. (1996) Isolation, identification and production of a yeast producing an extracellular proteinase. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24, 452-458
20. Yu, C.B., Kim, C.H., Jin, Y.H. and Jin, I.Y. (1996) Purification and characteristics of the extracellular alkaline proteinase by a yeast *Yarrowia lipolytica* TH65. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 316-320
21. Ogrydziak, D.M. and Schart, S.L. (1982) Alkaline extracellular protease produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. J. Gen. Microbiol., 128, 1225-1234
22. Tsuchiya, K., Sakashita, Y., Nakamura, Y. and Kimura, T. (1991) Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. Agric. Biol. Chem., 55, 3125-3127
23. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and John, G. H. (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology, 8th ed., Volume2, Williams and Wilkins, Baltimore, US, p.1122- 1123
24. 江下不二夫編(1977).標準 生化學實驗法, 文光堂.東京, p.643

(접수 2004년 4월 10일, 채택 2004년 5월 27일)