

한국의 토양으로부터 내열성 단백질 분해효소를 생산하는 *Bacillus* sp. JE 375의 선별

김지은 · 배동훈*
단국대학교 식품공학과

A Thermostable Protease Produced from *Bacillus* sp. JE 375 Isolated from Korean Soil

Ji-Eun Kim and Dong-Hoon Bai*

Department of Food Engineering, Dankook University

Abstract A thermophilic microorganism, strain JE 375, which produces a thermostable protease, was isolated from soil and compost in Korea. This gram-positive, rod-shaped, catalase positive, motility positive, and hemolysis β containing organism was implicated in glucose fermentation, mannitol fermentation, xylose oxidation, aerobic activity and spore formation. The color of the colony was yellowish white. The temperature range for growth at pH 6.5 was between 55 and 70°C, with an optimum growth temperature of 65°C. This result confirmed the strain JE 375 as a thermophilic microorganism. The enzyme was produced aerobically at 65°C during 20 hr in a medium (pH 6.5) containing 1% trypton, 1% maltose, 0.5% yeast extract and 1% NaCl. The 16S rDNA of strain JE 375 had 97.6% sequence similarity with the 16S rDNA of *Bacillus caldolyolyticus*. On the basis of biochemical and physiological properties and phylogenetic analysis, we named the isolated strain as *Bacillus* sp. JE 375. The thermostable protease from *Bacillus* sp. JE 375 had been partially purified and characterized. The molecular weight of the enzyme was deduced from SDS-PAGE and gel chromatography as 55 kDa and its optimal temperature was 60°C. The enzyme showed its highest activity at pH 7.5 and was stable from pH 7.0 to 8.0.

Key words: thermophilic microorganism, protease

서 론

현대인들의 건강에 대한 관심이 증가하면서 소비자들의 상품 선택이 화학적이나 인공적인 것보다는 자연이라는 단어를 선호하는 쪽으로 바뀌어 가고 있다. 이러한 추세에 발맞추어 식품 산업을 비롯한 산업 분야에서도 원재료의 가공과 같은 공정 중에 화학적 요법보다는 자연적 요법을 찾게 되었다. 소비자의 요구에 맞으면서도 경제적으로도 만족되는 방안을 찾는 것이다. 이러한 예로 미생물로부터 생산되는 단백질 가수분해 효소는 조미료 제조, 저식염 젓갈의 숙성 발효, 식육의 연화, 맥주·청주의 혼탁 방지, 치즈 숙성, 대두요구르트 제조 등의 식품공업과, 소화제, 소염진통제 등 제약공업, 세제공업, 피혁가공업 및 환경공업 등에 다양도로 응용되고 있으며, 그 시장규모가 효소 전체 시장의 60%를 차지하고 있다(1,2). 따라서 최근까지도 효소 활성이 더 높은 단백질 분해 효소를 탐색하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

광범위하게 이용되고 있는 단백질 분해효소는 Peckman(3)과 Crewth(4)가 최초로 *Aspergillus*속에서 분리한 이후 그 기능과 활

성에 따라 Massaki 등(5)이 serine protease, thiol protease, metal protease로 분류하였으며 Kageyama(6)와 Nunokwra 등(7)은 작용 pH의 영향에 따라 acid protease, neutral protease 및 alkaline protease로 분류하였다. 1960년대 말에 *Bacillus* sp.가 생산하는 알칼리성 단백질 분해효소가 발견된 후부터 대부분의 연구진들은 세제, 연육 가공, 탈모 공정 등에 있어 단백질 분해효소의 탁월한 유용성 때문에 활성이 높고, 안정된 성질을 갖는 새로운 균주 선별에 많은 노력을 기울여왔다(8). 특히 호염성 세균의 알칼리성 단백질 분해효소는 내염성도 있으므로 효소 생산 공정에서 잡균의 오염을 줄일 수 있어 공업적 이용에 있어 이점이 있다. 알칼리성 단백질 분해효소는 특히 세제용으로 가장 널리 사용된다(9,10).

최근 들어 고온내산성 또는 호알칼리성 성질을 지닌 단백질 분해효소에 관한 연구들이 많이 진행되고 있다. 그 중 고온성 균주가 생산하는 내열성 단백질 분해효소에 관한 연구에 따르면 식용유 제조과정에서 손쉽게 얻을 수 있는 탈지 대두박으로부터 고가의 정미성분을 만들어낼 수 있었다. 토양으로부터 물에 대한 용해도가 낮은 탈지 대두박을 분해하는 단백질 가수분해 효소를 생산하는 미생물을 탐색하였고, 탐색된 고온성 *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4와 내열성 단백질 분해 효소를 분리 정제되었다. 또 다른 내열성 단백질 분해효소로는 116-130°C에서 효소활성을 갖는 deep sea methanogen에서 탐색된 *Methanococcus jannaschii*의 단백질 분해효소가 있다(11). 또한 hot spring에서 분리한 *Bacillus brevis*의 고온성 단백질 분해 효소는 호알칼리성이며, 계면활성제에 안정하고 넓은 범위의 온도와 pH에서도 효소 활성이

*Corresponding author: Dong-Hoon Bai, Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
Tel: 82-41-550-3562
Fax: 82-41-550-3566
E-mail: baidh@dku.edu
Received April 24, 2006; accepted May 4, 2006

높아 세제의 첨가제로의 이용이 검토되고 있다(12). 본 연구에서는 고온에서 생육하는 미생물을 탐색하고 탐색한 미생물이 생산하는 단백질을 분해 효소를 분리, 부분 정제하고 그 특성을 알아보고 실제 산업에서의 이용 방안에 대해 검토하였다.

재료 및 방법

사용 배지 및 시약

Azocasein은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Screening을 위한 배지로는 skim milk가 1% 포함된 LB agar(Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였으며 효소 정제를 위한 resin과 단백질 전기영동을 위한 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

균주 분리 및 선발

전국 각지의 토양과 두엄을 채취해 60°C에서 생육하는 균주를 분리하고, 각 균주들 중 생육 온도가 가장 높은 균주를 선정하였다. 탐색 방법은 토양과 두엄 시료를 1g 취하여 10 mL의 생리 식염수에 현탁 후 30분간 방치하고 그 상정액 100 µL를 취하여 LB평판 배지에 도말 하였다(Table 1). 이를 60°C의 배양기에서 1-2일간 배양하여 생육한 균주를 1차로 선정하였다. 1차 선정 균주들 중 가장 고온에서 생육하는 균주를 선별하기 위한 2차 선별을 하였다. 2차 선별은 1차로 선정된 균주들을 LB액체 배지에 각각 접종하여 50°C에서 24시간동안 진탕 배양하고 이를 종 배양액으로 하여 1%를 취해 새로운 LB액체 배지에 접종하고 50-70°C에서 각각 24시간 동안 진탕 배양해서 고온에서 생육이 활발한 균주를 선정하였다.

미생물 동정

형태적, 생화학적 성질: 균주의 특성은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(13)와 Biochemical Tests for Identification

Table 1. Basic biochemical and physiological characteristics of the strain JE 375

	Strain JE 375	<i>Bacillus subtilis</i> ¹³⁾
Color of colonies	yellowish white	yellow
Form	rods	rods
Gram staining	+	+
KOH	+	+
Spore forming	+	+
Catalase	+	+
Motility	+	+
Hemolysis	β	ND
Growth		
	-(50°C)	+(10°C)
	+(55°C)	+(20°C)
	+(60°C)	+(30°C)
	+(65°C)	+(40°C)
	+(70°C)	+(50°C)
Acid from		
Glucose	+	+
Mannitol	+	+
Arabinose	-	+
Xylose	+	+

+: positive, -: negative, ND: not determined.

of Medical Bacteria(14)에 준하여 시행하였다. 균주의 형태학적인 특성은 Gram staining(15)후 광학 현미경에 의한 관찰과 scanning electron microscopy로 확인하였다. Catalase test는 건조된 균체에 30% H₂O₂ 10 µL를 첨가하여 기포 생성 유무를 확인했다. Motility는 beef extract 0.3%, polypeptone 1%, NaCl 0.5%, agar 0.4%를 함유한 배지에 strain JE 375 균체 일부를 백금선으로 접종하여 균체가 퍼져서 자라는지를 확인했다. Hemolysis test는 blood agar(Difco사, Detroit, MI, USA) 배지에 균체 일부를 백금으로 접종하여 60°C에서 24시간 동안 배양해 균락 주위의 색으로 확인하였다. Oxidation-fermentation test는 polypeptone 0.2%, NaCl 0.5%, K₂HPO₄ 0.03%, bromothymol blue 0.005%를 함유한 배지에 arabinose, glucose, mannitol, xylose를 각각 1%를 첨가하여 여기에 균체를 접종하였다. 첨가한 당의 종류 별로 각 2개씩의 배지를 만들어 접종했다. 각각의 당을 함유한 배지를 60°C로 24시간 동안 배양하는데 하나의 배지 표면에는 mineral oil(Sigma사, St. Louis, MO, USA)을 도포하여 혐기적 조건으로 하여 oxidation 여부를, 나머지는 호기적 조건으로 배양하여 fermentation 여부를 배지의 색 변화를 관찰하여 확인했다. 포자 형성은 24시간 동안 배양한 실험 균주 배양액 중 일부를 100°C에서 10분간 증탕처리하여 LB배지에 pour plate법으로 10%를 접종하여 60°C에서 24시간 동안 배양하여 그 생육 여부로 포자 생성능을 1차로 확인하였으며, 백금으로 균체를 취해 slide glass에 도말하고 malachite green과 safranin O를 이용하여 염색 후 광학 현미경으로 관찰하는 포자염색법으로 2차 확인했다. 생화학적 특성을 확인하기 위한 위의 모든 실험에는 60°C에서 24시간 동안 LB배지에서 배양한 균체를 사용하였다.

세포벽 지방산 조성 분석: 균주의 whole cell fatty acid 조성을 확인하기 위하여 MIDI사(Newark, DE, USA)의 gas chromatography (GC, HP 6890, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. 표준 지방산으로 Hewlett-Packard사의 표준 지방산(calibration standard kit)을 이용하였다. 분석용 시료는 GC를 사용하여 분석 후 MIDI사의 균주 동정 프로그램인 Sherlock 을 통하여 분석하였다.

16S rDNA의 염기서열 분석: 16S rDNA를 분석하기 위해 본 연구에 사용하는 균주 strain JE 375를 LB배지에 접종하여 60°C, 200 rpm으로 24시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 원심 분리하여 균체를 회수한 후 chromosomal DNA를 lysozyme-sodium dodecyl sulfate-proteinase K 방법(16)으로 분리하였다. 분리된 chromosomal DNA를 template로 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)법에 의하여 16S rDNA를 증폭하였다. PCR에 사용된 primer는 16S rDNA sequencing에 사용하는 universal primer(forward primer: Eubacterial 27F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3', reverse primer: Universal 1492R(5'-GGATACCTTGTACGACTT-3'))를 사용하였다. PCR 반응액의 조성은 10 µL template(50 ng/µL), 5 µL 10×reaction buffer(100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 500 µg/mL BSA, pH 8.3), 5 µL 1.5 mM MgCl₂, 5 µL Deoxynucleoside triphosphates(2.5 mM each), primer 각 1 µL(100 pmol/µL)씩, 22 µL의 멸균된 3차 증류수 총 50 µL로 만들었다. 이 혼합액을 thermocycler(Perkin-Elmer Co., Wellesley, MA, USA)를 사용하여 증폭하였다. PCR 조건은 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 polymerization시키는 조건으로 30 cycle을 행하였으며 최종적으로 72°C에서 10분간 증폭시켰다. PCR산물은 0.8% agarose gel에서 크기를 확

인하였다. 확인된 1,400 bp의 PCR product는 Bio 101 gene cleaning kit(Bio rad사, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정제한 후 topo vector(Invitrogen사, Carlsbad, CA, USA)에 ligation 시킨 후 cloning 하였다. 선별된 균주로 부터 다시 plasmid DNA를 분리하여 이를 T-vector sequencing primer(M13 forward, M13 reverse)를 이용하여 Alfred automated sequencer(Pharmacia사, Uppsala, Sweden)로써 rDNA의 염기서열을 결정하였다. 그 결과는 Blastn 프로그램을 이용하여 gene bank 와 RDP(RNA database project)의 염기서열과 비교하여 동정하였다.

효소활성의 측정

단백질 분해 효소의 활성은 Nomoto와 Lee에 의한 casein법을 변형(17)하여 사용하였다. 효소 활성을 측정하기 위한 기질로는 casein(Merck사, Darmstadt, Germany)을 사용했다. 기질 용액은 casein 0.6 g을 50 mM sodium-bicarbonate buffer(pH7.5) 100 mL 에 현탁 후 5분간 중탕하여 사용했다. 기질 용액 600 µL에 조효소액 120 µL를 첨가하여 60°C에서 10분간 반응시키고 반응되지 않은 casein 침전물을 제거하고 반응을 정지시키기 위하여 20% trichloro acetic acid 600 µL를 첨가하고 이를 9,000×g에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상정액을 취해 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 효소 활성도 1 unit은 10분 동안 275 nm에서 흡광도를 0.001 변화시키는 양으로 규정하였다.

균체의 생산 및 효소 생산 조건의 검토

배양 시간에 따른 균체의 생육과 효소 생산성을 검토하기 위하여 50 mL의 LB배지에 종배양액 1%를 접종하여 60°C, 200 rpm (Vision Science사, Seoul)에서 진탕 배양하며 4시간마다 배양액을 취하여 균체의 생육도와 배양 상정액의 효소활성을 측정하였다. 균체 생육에 미치는 배양온도의 영향을 알아보기 위하여 100 mL의 LB 배지에 종배양액을 1% 접종하여 40, 50, 60°C에서 200 rpm으로 배양하며 4시간마다 균체의 생육도를 확인하였다. 균체의 생산에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위한 배지는 각각 sodium phosphate와 tris buffer를 사용하여 pH를 재조정된 LB 배지를 조제하여 사용했다.

단백질 분해효소의 정제

효소단백질의 침전: 효소 생산 균주의 배양액을 원심분리기 (Hanil Supra 22K, Hanil, Seoul)로 8,000×g에서 15분간 원심분리하여 균체를 분리하였다. 균체를 분리한 배양 상정액에 4°C에서 미리 냉각 시켜 놓은 acetone을 75% 용액이 되도록 첨가하고 4°C에서 24시간 동안 방치하여 효소 단백질을 침전 시켰다. Acetone 침전액의 상정액을 조심스럽게 제거하고 침전된 효소 단백질을 4°C에 냉각시켜 둔 10 mM sodium-phosphate buffer(pH 7.5)에 용해시키고 8,000×g에서 10분간 원심분리하여 불용성 단백질을 제거하였다.

DEAE-sepharose column chromatography: 수용성 조효소액을 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5)로 평형화된 DEAE-sepharose column(Sigma사, St. Louis, MO, USA)(35 mm×150 mm)에 흡착시켰다. 흡착 후 column은 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5) 로 비흡착 단백질이 용출되지 않을 때까지 세척했다. 세척 후 column에 흡착된 단백질을 동일 완충액에 용해한 NaCl을 사용하여 50 mM NaCl 부터 시작하여 50 mM 씩 단계별로 증가시켜 단백질을 용출시켰다. 용출된 단백질 중 효소 활성이 높은 부분만을 모아 ultrafiltration(Model KMC-86S, KMC Co.

Seoul)장치로 PM-10 membrane을 사용하여 농축하였다.

단백질 정량과 전기영동: 단백질의 농도는 UV-1201 UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu, Kyoto, Japan Co.)를 이용하여 Bradford(18)법에 준하여 측정하였으며, 효소의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli(19)의 방법에 준하여 행하였다. 전기영동의 running gel은 10%를 사용하였고 40 mA에서 2 시간 전개 후, 0.05% coomassie brilliant blue R-250(Sigma사, St. Louis, MO, USA)으로 염색 후 Fairbanks등의 방법으로 탈색하여 단백질 띠를 확인하였다.

결과 및 고찰

분리 균주의 선발

고온에서 생육하는 균주를 선정하기 위하여 LB평판배지를 만들고, 여기에 생리식염수 10 mL에 현탁한 토양 및 두엄 시료 100 µL를 취해 도말 하였다. 이를 60°C에서 배양하여 60°C에서 자라는 250여 균주를 일차적으로 선별하였다. 일차 선별된 균주를 다시 온도를 달리한 액체 배양법에 의하여 생육도를 측정하여 60°C 부근에서 상대적으로 활발한 생육을 보이는 균주 2주를 이차로 선정하였다. 60°C에서 상대적으로 활발히 생육능력이 우수한 균주를 선발하여 strain JE 375로 일단 명명하고 단백질 분해효소 활성이외에도 지방분해효소활성과 전분분해효소활성을 검토하였다. 그 결과 strain JE 375는 Rhodamine B와 Olive oil이 현탁된 LB평판 배지와 soluble starch가 현탁된 LB평판 배지에서는 clear zone을 생성하지 않았으며, skim milk가 현탁된 LB 평판 배지에서는 clear zone을 생성하여 단백질 분해 효소(Fig. 1)를 가지는 균주로 판명되었다.

형태학적 및 생화학적 특성 검토 와 동정

본 strain JE 375을 Gram 염색하여 광학 현미경으로 관찰 해 본 결과 간균임을 확인하였다. 그러나 수차례 반복실험을 하여도 crystal violet에 의한 염색 여부는 판정하기가 매우 어려웠으나 KOH를 사용하여 판정한 결과 그람 양성균임을 확인 할 수 있었다. crystal violet에 의해 그람 염색의 결과가 확연하게 나타나지 않은 것은 본 실험 균주가 고온성 균주로 중온성 *Bacillus* sp.와는 세포벽 조성성분에 차이가 있어 염색 결과가 확연히 나타나지 않은 것으로 보인다. 전자현미경으로 확대하여 관찰한 결과

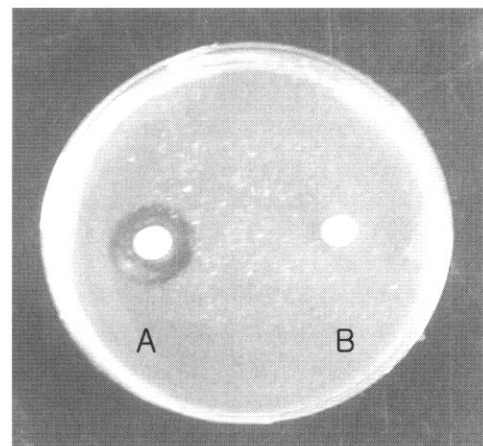


Fig. 1. Formation of digestion clear zone on the LB media containing 2% skim milk. A: *Bacillus* sp. JE 375, B: *E. coli* JM 109.

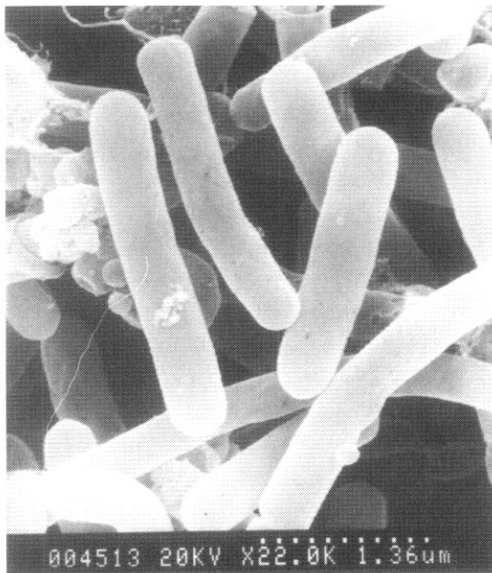


Fig. 2. Scanning electron micrograph of the strain JE 375.

(Fig. 2) 간균으로 보이는 본 균주의 크기는 일반적인 *Bacillus* sp.의 균주들과 흡사한 형태를 지니는 간균(0.7×1.5-2.5 μm)이나 일부는 그 길이가 매우 신장된 형태를 나타내는 것이 관찰 되었다. strain JE 375는 포자 염색 결과 포자가 관찰되었고 catalase 양성 균임이 확인되었다. 또한 생화학적인 실험결과 55-70°C의 범위 내에서 생육 가능하며 motility 양성, hemolysis β균의 특성을 보였으며 균주가 glucose 발효, mannitol 발효균이며, xylose 산화균임을 알 수 있었다(Table 1). 이러한 성질은 포자를 형성하며 catalase 양성, motility 양성균인 *Bacillus subtilis*와 동일하지만 생육 온도 범위에서 상당한 차이를 보이며, oxidation-fermentation test에서 glucose 산화·발효균인 *Bacillus subtilis*와는 차이를 보였다. Strain JE 375의 whole cell fatty acid를 gas chromatography로 분석한 결과 C_{15:0 iso} 26.17%, C_{17:0 iso} 30.19%, C_{16:0 iso} 13.01%, C_{16:0} 11.92%로 분석되었으며 이는 C_{15:0 iso} 25.40%인 *Bacillus* 계열과 매우 유사한 지방산 분포를 보여 *Bacillus* 계열로 동정되었다(Table 2). 그러나 *Bacillus subtilis*의 지방산 조성은 C_{15:0 iso} 25.40%, C_{15:0 anteiso} 37.41%, C_{17:0} 9.66%으로, C_{15:0 iso}외의

Table 2. Cell wall fatty acid composition of the strain JE 375

<i>Bacillus</i> sp. JE 375		<i>Bacillus subtilis</i>	
Fatty acid	(%)	Fatty acid	(%)
C _{14:0} ISO ^a	0.37	C _{14:0} ISO	1.20
C _{14:0}	0.75	C _{14:0}	0.87
C _{15:0} ISO	26.17	C _{15:0} ISO	25.40
C _{15:0} ANTEISO ^b	1.16	C _{15:0} ANTEISO	37.41
C _{15:0}	2.22	C _{15:0}	0.20
C _{16:0} ISO	13.01	C _{16:0} ISO	2.47
C _{16:0}	11.92	C _{16:0}	5.50
C _{17:0}	30.19	C _{17:0} ANTEISO	8.87
C _{17:0} ISO	5.68	C _{17:0} ISO	9.66
C _{18:0}	1.06	C _{18:0}	0.50
C _{18:0} ISO	0.99		
C _{19:0} ISO	1.07		
C _{19:0} ANTEISO	0.15		

^a: isomer, ^b: anteisomer.

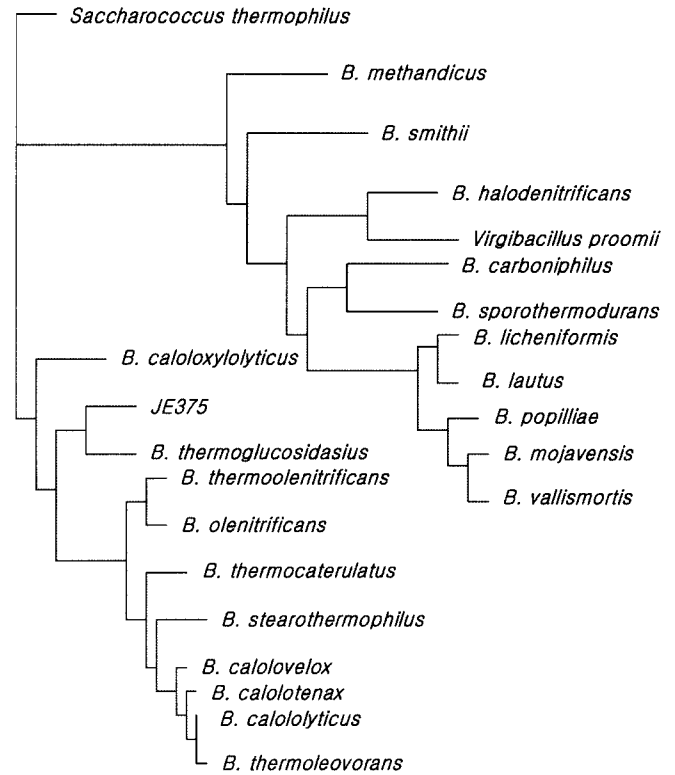


Fig. 3. Dendrogram of the *Bacillus* sp. JE 375 through 16S rDNA gene sequence homology.

C_{15:0 anteiso}, C_{16:0 iso}, C_{16:0} 등의 지방산 조성에서는 Strain JE 375와 *Bacillus subtilis* 간에 차이가 있었다. 이는 일반적인 *Bacillus* 계열과 구별되는 Strain JE 375의 고온에서 생육하는 특성에 기인하는 것으로 보인다. Strain JE 375의 16S rDNA sequence를 분석한 결과 1,846 bp의 염기 서열을 확인하였으며, gene bank에 등록된 다른 균주들과 16S rDNA sequence를 비교하여 dendrogram을 작성하였다(Fig. 3). 이를 gene bank에서 확인한 결과 등록된 균주 중 strain JE 375와 유사성이 높은 균주는 *Bacillus caldoolyolyticus*와 *Bacillus thermoglucosidasius*로 확인되었다. strain JE 375는 *Bacillus caldoolyolyticus*과 16S rDNA sequence가 97.6% 일치하는 유사성을 보였으며, *Bacillus thermoglucosidasius*와는 97.4% 유사성을 보였으나 gene bank data base 상에서 16S rDNA sequence가 전부 일치하는 균주는 검색되지 않았다. 이 같은 실험 결과에 따라 strain JE 375는 기존에 발표되지 않은 새로운 균주로 판단되어 *Bacillus* sp. JE 375로 명명하였다.

균체 생육 및 효소 생산

LB배지를 사용하여 종 배양액을 1%씩 접종한 후 배양온도를 40-75°C로 각각 달리하여 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 24시간 후 균체 생육과 효소 활성을 측정된 결과 균체 생육은 55°C부터 증가하여 65°C에서 최대를 보였으며 75°C 이상의 온도에서는 생육이 이루어지지 않아 65°C를 중심으로 20°C 범위의 좁은 온도 범위에서만 생육을 보이는 특징을 나타내었다(Fig. 4). 배양 시간에 따른 효소 생산을 검토하기 위하여 LB 배지에 한천 사면 배지에 보관한 균체 한 백금이를 접종하여 65°C, 200 rpm에서 24시간 배양하여 만든 종 배양액을 LB배지에 1% 농도로 접종하여 65°C, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양액을 이용하여 4시간 간격으로 균체의 생육과 효소 활성을 측정된 결과 Fig. 5에서 보이는 바와 같이 배양액에서의 효소 활성은 4시간 이후부터 나타나

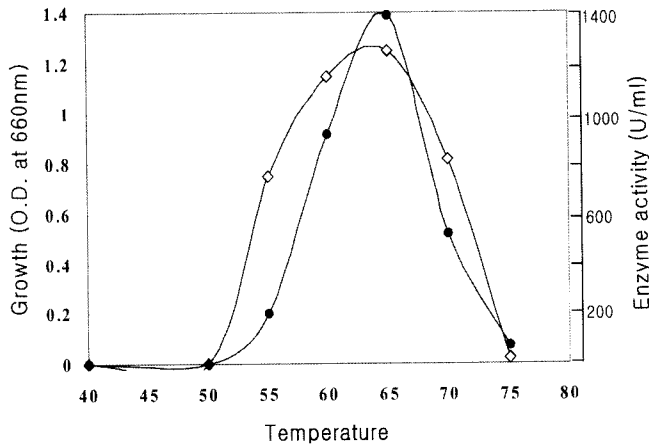


Fig. 4. Effect of culture temperature on the growth and enzyme production of *Bacillus* sp. JE 375. ◇: growth, ●: enzyme activity.

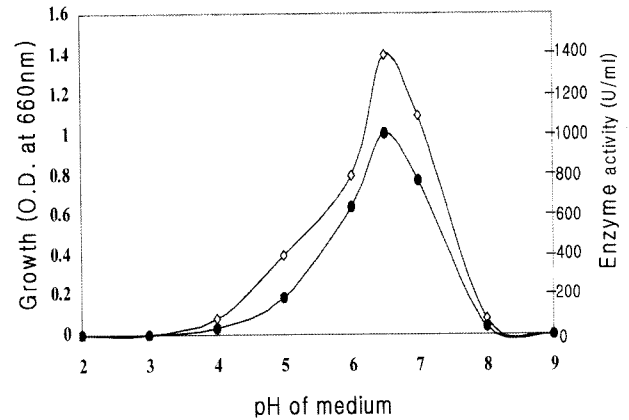


Fig. 6. Effect of initial pH of medium on the growth and enzyme production of *Bacillus* sp. JE 375. ◇: growth, ●: enzyme activity.

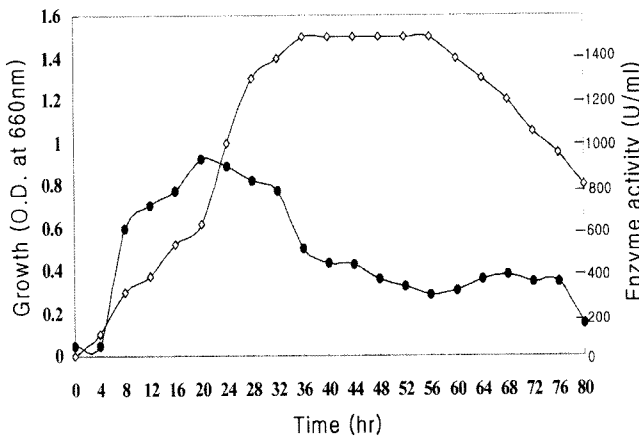


Fig. 5. Effect of culture time on the growth and enzyme production of *Bacillus* sp. JE 375. ◇: growth, ●: enzyme activity.

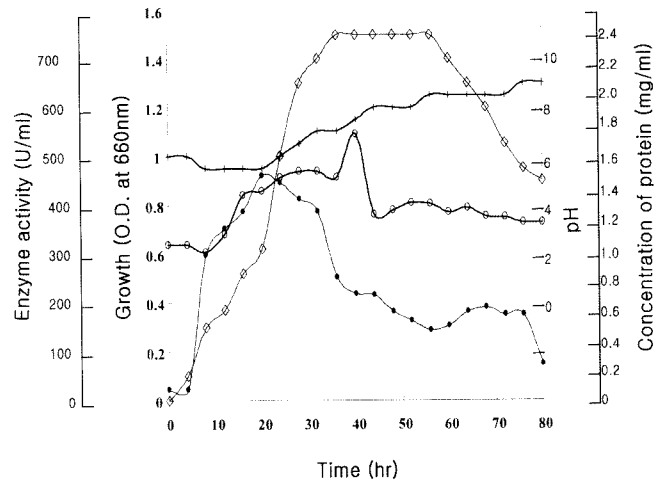


Fig. 7. Profiles of cell growth, pH, protein concentration and production of the enzyme of *Bacillus* sp. JE 375. ◇: growth, ●: enzyme activity; ■: pH; ○: protein.

기 시작하여 20시간까지 서서히 증가하였고 28시간 이후에는 급격히 감소하였다. 또한 효소 활성은 20시간에서 가장 높았다. 그러므로 이후의 실험에는 종 배양액을 접종하여 20시간 배양 후 배양 상정액을 회수하였다. *Bacillus* sp. JE 375의 단백질 분해효소생성과 관련된 배양적 특성은 대수증식기에서 생육도가 높아 질수록 효소 활성이 증가하다가 대수증식기 말부터 감소하는 추세를 보이며, 정지기에 이르면 급격히 감소한다. 이로 미루어보아 초기 세포의 성장이 이루어질 때 효소의 생성이 이루어지며 이것이 어느 정도에 이르면 효소생산은 중지되고 세포의 증식만이 이루어진다고 판단 할 수 있다. 단백질 분해 효소 활성을 가진 다른 *Bacillus* sp. 균주들의 경우 포자형성이 이루어지는 대수증식기의 말기에 단백질 분해효소의 생산이 많아지는 경향을 보이는 것으로 보고되어지고 있으나(10,20) 본 균주는 이들 단백질 분해 효소 활성을 가진 *Bacillus* sp. 균주들과는 다른 양상을 보였다. *Bacillus* sp. JE 375의 생육 및 효소 생산에 미치는 배지의 초기 pH, 탄소원과 질소원의 영향을 검토하였다. 균체는 pH 5.0 이상에서부터 생육하여 약산성인 pH 6.5에서 최대 생육을 보였고 pH 8 이상에서는 균체 생육이 급격히 저하됨을 확인하였다 (Fig. 6). 효소 활성 또한 pH 6.5에서 최대 활성을 보여 이후의 실험에서 배지의 pH는 6.5로 조절하여 사용하였다. 효소 생산에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향을 검토하기 위하여는 glucose, maltose, sucrose, starch 등의 탄소원과 polypeptone, bacropeptone,

soybean meal, beef extract, yeast extract, tryptone 등의 질소원등을 각각 농도를 달리하여 배지를 조제하고 종배양액 1%를 접종하여 65°C에서 200 rpm으로 20시간 배양 후 균체 생육과 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 탄소원으로는 maltose 1%에서 배양하였을 때 가장 좋은 생육을 보였고 효소 활성 또한 1% 농도의 maltose에서 배양하였을 경우 최대의 효소 활성을 보였다(data not shown). Fujiwara와 Yamamoto의 연구(21)에 따르면 단백질 분해 효소 활성을 가진 *Bacillus* sp.은 탄소원으로 주로 glucose와 starch를 이용하며 sucrose는 많이 이용되지 않으며 탄소원으로 가장 적당한 glucose의 농도는 1%(w/v)라 밝혔다. 내열성 *Bacillus* sp. 균주들이 생산하는 호열성 단백질 분해효소에 관한 연구(22)에서는 단백질 분해효소 활성을 갖는 *Bacillus subtilis*들은 탄소원으로 주로 starch와 galactose를 사용했다고 하였다. 또한 Phadatar(23)는 단백질 분해효소 활성을 갖고 있는 균주 중 *Conidobolus coronatus*, *Easalp* 등은 탄소원으로 sucrose를 사용한다고 밝혔다. 동정결과 *Bacillus* sp.으로 밝혀진 본 균주 *Bacillus* sp. JE 375는 maltose를 1%(w/v)의 농도로 첨가하였을 때 균체 생육과 효소 활성이 최대인 것으로 밝혀져 위에 밝힌 Fujiwara와 Yamamoto의 연구 결과와는 차이를 보였다. 질소원의 경우에는 실험에 사용한 여러 질소원중 tryptone을 질소원으로 첨가했을 때 최대의 생육을 보였으며 효소 활성 또한 tryptone을 첨가했을 때 최대의 효

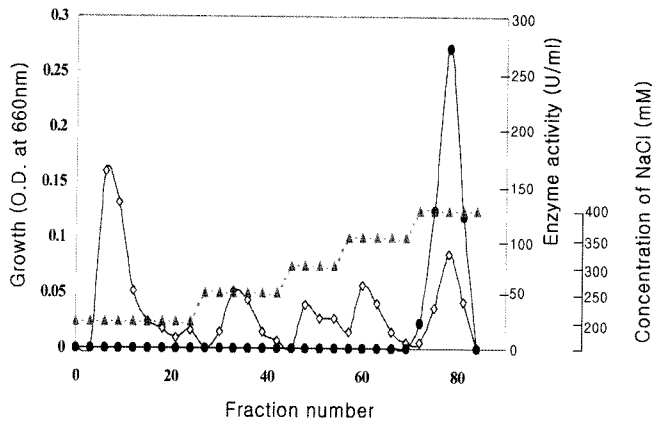


Fig. 8. Chromatogram of the protease on DEAE-sepharose column. ◇: growth, ●: enzyme activity; ▲: NaCl.

소 활성을 보였다(data not shown). 그러나 이 경우 질소원으로 tryptone과 yeast extract가 함유된 LB 배지에서와 비교하였을 때 균체 생육과 효소 활성에 커다란 차이가 보이지 않았으므로 이후의 배양에는 LB 배지에 1%의 maltose를 첨가하여 효소를 생산하였다. *Bacillus* sp. JE 375를 종배양액 1%를 접종하여 65°C에서 200 rpm으로 진탕 배양하면서 균주의 생육, 효소 활성, pH 및 배양 상정액의 단백질 농도를 4시간 간격으로 관찰하였다. Fig. 7에 나타난 바와 같이 균체의 생육은 36시간 이후부터는 stationary phase에 도달하여 배양 56시간까지 일정한 생육을 유지하였다. pH의 변화도 균체 생육에 따라 배양 초기에는 pH가 낮아지지만 균체 생육이 stationary phase에 도달하면서 pH가 다시 상승하는 것을 확인 할 수 있었다. 효소 활성은 logarithmic phase 중반인 접종 20시간 이후에 최대의 효소 생산을 확인하였다. 효소 활성은 이후 stationary phase에 이를 때까지 급격히 감소하였다. 이후의 효소 활성은 지속적으로 감소하지만 급격한 감소율을 보이지는 않았다. 또한 배양 상정액에서 단백질 농도 변화는 점차적으로 증가하다가 효소 활성이 급격히 감소한 후 감소율이 낮아지는 시점 즉 stationary phase 초기에 급격히 증가하고 이후 감소하여 일정 수준을 계속 유지하였다. 한편으로 각 시간별로 균체액을 취하여 포자염색을 행한 결과 배양시간 20시간 이후에는 대부분의 균체들이 포자를 형성한 것으로 확인되었다.

효소의 정제 및 효소의 물리화학적 성질

Bacillus sp. JE 375가 생산하는 단백질 분해 효소를 분리, 정제하기 위하여 효소 최적 생산 조건에서 균체를 배양하여 회수한 배양 상정액을 acetone 침전, DEAE-sepharose column chromatography 등에 의한 효소 정제 시료로 사용하였다.

배양 상정액으로부터 효소 단백질을 75%의 acetone을 가하여 침전시킨 후 침전시킨 효소 농축액을 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5)에 현탁시켰다. 현탁된 효소액은 8,000×g, 20분 동안 원심분리시킨 후 침전된 단백질을 제거하고 상정액을 10 mM

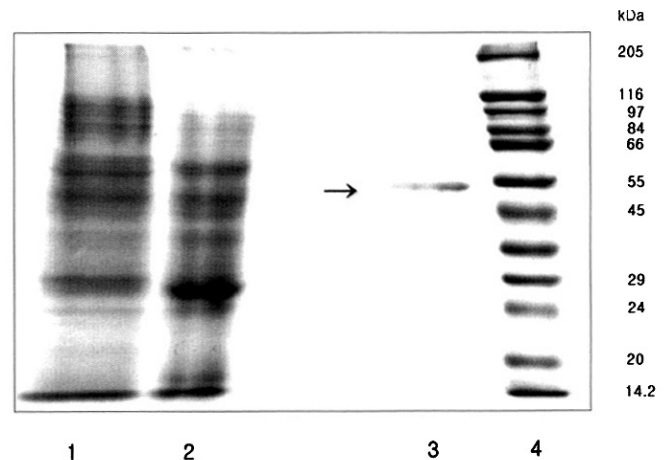


Fig. 9. SDS-PAGE of protease from *Bacillus* sp. JE 375. Lane 1: culture broth, lane 2: acetone precipitation, lane 3: DEAE-sepharose chromatography, lane 4: protein marker.

sodium phosphate buffer(pH 7.5)로 완충된 DEAE-sepharose column에 흡착시키고 NaCl을 농도별로 단계적으로 증가시키며 용출한 결과 NaCl 함량이 400 mM 일 때 활성 부분이 용출되었다(Fig. 8). DEAE-sepharose column에 의해서는 배양 상정액보다 2.19배의 정제도를 얻었으며 회수율은 35%이었다. DEAE-sepharose column로 1차 정제한 후 용출 효소액을 dialysis를 통하여 염을 제거하고 hydroxyapatite column을 사용해 2차 정제했으나 더 이상의 정제 효과는 얻을 수 없었다(Table 3). 정제 효소의 순도는 SDS-PAGE로 확인하였다. 그 결과 분자량 55 kDa의 위치에서 단백질 띠를 확인 할 수 있었다(Fig. 9).

효소의 물리화학적 성질

500 mM sodium acetate buffer(pH 5-6), 500 mM Tris-HCl buffer(pH 7-9)를 효소 반응액이 10 mM 농도가 되도록 첨가하여 60°C에서 10분간 반응 시켰다. 그 결과 pH 5 이상에서 반응하기 시작해 pH가 증가할수록 효소 활성이 증가하여 pH 7.5에서 최대 활성을 보였다. 효소활성이 pH 7-8의 좁은 범위에서 높게 나타났으며 pH 9 이상에서는 효소 활성이 급격히 저하됨을 확인하여(Fig. 10), 본 균주가 생산하는 단백질 분해효소는 알칼리성 산성 조건에서 효소 활성이 저하되며 중성 부근에서 높게 나타남을 알 수 있었다. 효소의 활성에 미치는 반응 온도의 영향을 알아보기 위하여 효소 반응액의 반응 온도를 30-70°C로 하여 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 11에서 나타난 바와 같이 반응 온도가 50°C에서부터 60°C가 될 때까지 효소 활성이 점차적으로 증가하였으며 이후 65°C 이상에서는 효소의 활성이 감소함을 확인하였다. 반응 온도가 55-65°C의 범위일 때 높은 효소 활성을 보였고 특히 60°C에서 최대 효소 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 균체의 생육 및 효소 생산에는 65°C가 최적이었다는 결과와는 5°C의 차이를 보였다. 따라서 이후의 효소 활성 측정에는 반응

Table 3. Purification of protease from *Bacillus* sp. JE 375

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold
Culture broth	580	540000	1275.86	100	1
Acetone Precipitation	115	246000	2139.13	46	1.68
DEAE-sepharose chromatography	68.49	190800	2798.81	35	2.19
Hydroxyapatite	63.44	177020	2790.35	33	2.19

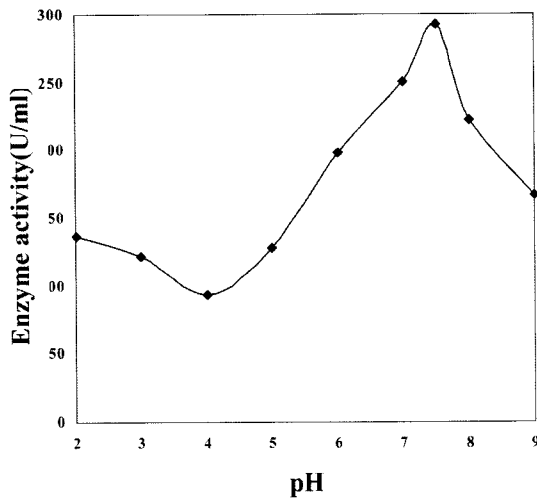


Fig. 10. Effect of initial pH on the enzyme activity from *Bacillus* sp. JE 375.

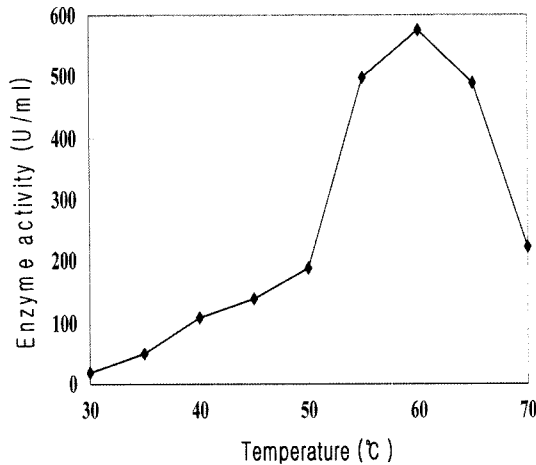


Fig. 11. Effect of temperature on the enzyme activity from *Bacillus* sp. JE 375.

온도를 60°C로 하여 측정하였다. 한편으로 무기 염류 등을 사용하여 효소 활성에 미치는 무기염류의 영향을 확인한 결과 1 mM 농도의 Ca²⁺ 이온에 의하여 효소 활성이 약 2배 증가함을 확인할 수 있었으며 Ni²⁺에 의하여는 활성이 저해되는 현상을 나타내었다(Fig. 12). 그러나 실험에 사용한 Al³⁺, Co²⁺, Li⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ 등의 이온들에 의하여는 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났다. 이러한 사실은 Banerjee 등(12)의 연구에서와 같이 *Bacillus brevis*가 생산하는 단백질 분해효소는 Ca²⁺나 Mg²⁺를 효소 반응액에 가하면 효소 활성이 높아진다는 결과와 유사성을 보였다.

요 약

전국 각지에서 채집한 토양에서 분리한 25종의 내열성 균주 중 내열성 단백질 가수분해효소 활성을 갖는 균주 strain JE 375를 선별하였다. 본 균주는 gram 양성 간균의 특징을 나타냈으며 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology와 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria에 준하여 생화학적 특성을 검토한 결과 catalase 양성, 포자형성, motility 양성, glucose 발효, mannitol 발효, xylose 산화, hemolysis β균임을 보아 *Bacillus* sp.

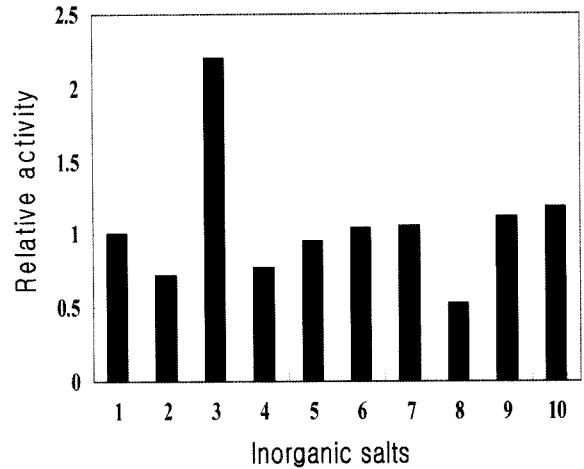


Fig. 12. Effect of inorganic salts on the enzyme activity from *Bacillus* sp. JE 375. 1: control, 2: AlCl₃; 3: CaCl₂; 4: CoCl₂; 5: LiCl₂; 6: MgCl₂; 7: MnCl₂; 8: NiSO₄; 9: ZnSO₄; 10: CuSO₄.

으로 추정되었다. Strain JE 375의 whole cell fatty acid를 gas chromatography로 분석한 결과 C_{15:0 iso} 26.17%, C_{16:0 iso} 13.01%, C_{17:0 iso} 30.19%로 분석되어 *Bacillus* 계열로 동정되었다. 16S rDNA sequence 분석 결과 strain JE 375는 *Bacillus caldoolyolyticus*와 sequence가 97.6% 일치하는 유사성을 보였으나 부분적으로 sequence의 차이가 있고 gene bank data base상에서 16S rDNA sequence가 일치하는 균주는 검색되지 않았다. 이 같은 실험 결과에 따라 strain JE 375는 기존에 발표되지 않은 새로운 균주로 판단되어 *Bacillus* sp. JE 375로 명명하였다. *Bacillus* sp. JE 375은 tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%, maltose 1%의 배지조성분과 배양 온도 65°C에서 20시간 동안 배양하였을 때 최대의 단백질 분해 효소를 생산하였다. *Bacillus* sp. JE 375로부터 단백질 분해 효소를 acetone으로 침전시키고 DEAE-sepharose column chromatography를 통하여 효소를 정제하여 SDS-PAGE를 통해 확인한 결과 55 kDa 크기의 band를 확인할 수 있었다. 이 효소의 최적 배양 온도는 65°C이었으며 배지의 최적 pH는 6.5로 나타났다. pH에 대한 안정성은 중성 부근의 pH에서 효소 활성의 안정성이 높게 나타났다. 본 효소의 반응 조건을 검토한 결과 중성 조건에서 안정하였으며, 60°C의 고온에서 활성을 가졌다. 효소 활성은 1 mM CaCl₂ 첨가에 의해 증가하였다.

감사의 글

이 연구는 2004학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

문 헌

1. Lee EH, Cha YJ. Studies on the processing of rapid fermented anchovy prepared with low salt contents by adapted microorganism. *Agric. Biol. Chem.* 33: 325-329 (1990)
2. Kim HK, Kim KH, Lee JK, Kim YO, Nam HS, Oh TK. Characterization of a thermostable protease from thermophilic *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 322-328 (1995)
3. Peckman EV. *Aspergillus proteinase*. *Biochemistry* 5: 321-325 (1951)
4. Crewth WC. The effect of pH and cations on the thermal denaturation of trypsin. *J. Biol. Chem.* 6: 597-601 (1963)
5. Massaki YS, Kazuo M. Purification and properties of acid pro-

- tease from *Monascus* sp. No.3405. Agric. Biol. Chem. 48: 1637-1645 (1984)
6. Kageyama K. Studies on *Aspergillus oryzae* strain for sake brewing. J. Ferment. Technol. 33: 53-57 (1955)
 7. Nunokawa Y, Namba Y, Watanabe S. A study of the rice koji protease. J. Soc. Brew. 53: 930-933 (1961)
 8. Horikoshi K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* sp. No. 221. Agric. Biol. Chem. 35: 1407-1414 (1971)
 9. Ward OP. Comprehensive Biotechnology. Elsevier, New York, NY, USA. pp.789-818 (1986)
 10. Horikoshi K, Terada M, Mogi K. Enzymatic properties of purified alkaline proteinase from *Aspergillus sojae*. Agr. Biol. Chem. Tokyo 34: 621-637 (1970)
 11. Michels PC, Clack D. Pressure-enhanced activity and stability of a hyperthermophilic protease from a deep sea methanogen. Appl. Environ. Microbiol. 3985-3991 (1997)
 12. Banerjee UC, Sani RK, Azimi W, Soni R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. Process Biochem. 30: 213-219 (1999)
 13. Kreig NR, Halt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, USA (1984)
 14. Macfaddin JF. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, USA (1990)
 15. Benson HJ. Microbiological Application; A Laboratory Manual in General Microbiology, 5th edition. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, IA, USA. pp. 56-58 (1990)
 16. Davis LG, Dibner MD, Battey JF. Basic Method in Molecular Biology, Elsevier, New York, NY, USA. pp. 42-43 (1986)
 17. Oh SH, O PS. Physiology and metabolism; Screening of *Bacillus* sp. No. M-71 with high alkaline protease productivity and some properties of the enzyme. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 1-7 (1991)
 18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976)
 19. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)
 20. Durham DR, Stewart DB, Stellwag EJ. Novel alkaline and heat stable serine protease from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX 6638. J. Bacteriol. 169: 2762-2768 (1987)
 21. Fujiwara N, Yamamoto K. Production of alkaline protease in low cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. J. Ferment. Technol. 65: 345-348 (1987)
 22. Fujiwara N, Masui A, Imanaka T. Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkalophilic and thermophilic *Bacillus* sp. J. Biotechnol. 30: 245-246 (1993)
 23. Phadataru SU, Deshpande VV, Srinivasan MC. High activity alkaline protease from compatibility with commercial detergents. Enz. Microb. Technol. 15: 72-76 (1993)