

## 식충식물로부터 Protease를 생산하는 *Bacillus* sp. SH-8의 분리와 효소 생산성

윤기홍<sup>1,2\*</sup> · 이미성<sup>1,2</sup> · 박병완<sup>1</sup> · 박용하<sup>3</sup> · 김홍익<sup>4</sup> · 김정현<sup>5</sup> · 김문숙<sup>5</sup>  
우송대학교 <sup>1</sup>식품영양 · 식품과학부, <sup>2</sup>생물소재 응용연구센터, <sup>3</sup>영남대학교 응용미생물학과  
<sup>4</sup>(주)프로바이오틱, <sup>5</sup>대구과학고등학교

**Enzyme Production of A Protease-producing Strain, *Bacillus* sp SH-8 Isolated from Insect-eating Plant. Yoon, Ki-Hong<sup>1,2</sup>, Mi-Sung Lee, Bueng Wan Park<sup>1</sup>, Yong-Ha Park<sup>3</sup>, Hongik Kim<sup>4</sup>, Jeong Hyeon Kim<sup>5</sup>, and Moon Sook Kim<sup>5</sup>.** <sup>1</sup>School of Food Science & Biotechnology, <sup>2</sup>BARC, Woosong University, Daejeon 300-718, <sup>3</sup>Department of Applied Microbiology Yeungnam University, Gyeongsangbuk-do 712-749, <sup>4</sup>proBionic Co. Daejeon 305-806, <sup>5</sup>Deagu Science High School, Daegu 706-852, Korea – A bacterium producing the extracellular protease was isolated from insect-eating plant and has been identified as a member of the genus *Bacillus* based on partial 16S rRNA sequences. In order to develop the medium composition, effects of ingredients including nitrogen sources, carbon source, metal ions and phosphate were examined for protease production of the isolate, SH-8. Soluble starch increased the protease productivity, while glucose repressed it. Yeast extract was effective nitrogen source for enzyme production, but the protease production of *Bacillus* sp. SH-8 was reduced by large amount of yeast extract. The calcium was found to induce protease activity as well as protease productivity. However, cell growth and enzyme production was completely inhibited by divalent ions such as Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>. The maximum protease productivity was reached 435 unit/ml in the optimized medium consisting of soluble starch (2%), yeast extract (0.3%), CaCl<sub>2</sub> (0.3%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.01%) and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.01%). The protease activity of culture filtrate was dramatically decreased after incubation for 26 h.

**Key words:** *Bacillus* sp., optimization, medium, protease production

Protease는 단백질을 저분자 peptide와 아미노산으로 분해하는 효소로 동·식물과 세균, 곰팡이, 효모등의 다양한 미생물에서 생산된다. 세균 protease는 주로 균체외로 대량 생산되며, 열안정성을 지니고 있을 뿐만 아니라 광범위한 pH에서 작용하므로 범용적 산업 효소로 인식되어 있다. 이러한 protease는 세제, 식품, 농약, 제약, 피혁, 섬유산업과 같은 여러분야의 산업에 이용되고 있다[12]. 세균 중에서 상업용 protease를 생산하는 균은 *Bacillus*속 균주이며[21], protease 중에서도 알칼리에서 활성이 높은 알칼리성 protease의 산업적 이용성이 높다. *Bacillus*속 균주를 대상으로 알칼리성 효소의 탐색하고자 하는 다수의 연구가 시도되었으며 *B. brevis*[1], *B. stearothermophilus*[3], *B. cereus*[2] 등을 포함한 여러 *Bacillus*속 균주가 알려졌다. 또한 아연과 같은 금속이온을 포함하고 있는 중성에서 최대활성을 갖는 metalloprotease도 다수의 균종에서 그 효소의 구조나, 유전자 등이 보고되었다. *B. subtilis* 중성 protease A[28]와 중성 protease B[23], *B. amyloliquefaciens*[24], *B. stearothermophilus*[20], *B. cereus*[27], *B. thuringiensis*[4]의 중성 protease

들은 모두 *B. thermoproteolyticus*[6]로부터 분리된 아연 metallo-endopeptidase로 알려진 thermolysin과 높은 상동성을 보이므로 thermolysin 유사 중성 protease(TLP)로 알려져 있다. Thermolysin과 *B. cereus* TLP의 X-선구조가 규명되었고[14, 22], 이들은 한 개의 촉매성 아연원소와 안정성에 관여하는 2-4개의 칼슘이온을 포함하고 있는 것으로 확인되었다.

자연계에서 단백질 분해성 세균은 질소 무기질화에 가장 중요한 역할을 한다. *B. cereus*와 *B. mycoides*가 생산하는 protease는 중성 metalloprotease에 속하고 토양에서 단백질 분해과정에 중요한 역할을 한다[13, 26]. 이들 균의 protease 생산은 균의 성장속도나 배지조성과 같은 요인에 의해 영향을 받는다. 특히 탄소원과 질소원은 효소 생산에 중요 결정 인자로 알려져 있으며, 단백질과 peptide가 protease 생산성 향상에 필요한 것으로 보고된 경우가 많다[11]. 그러나 포도당을 탄소원으로 사용하였을 때는 효소 생산이 억제되거나 향상되기도 한다[7, 18]. 이외에도 금속이온이 효소 생산에 영향을 미칠 수 있으며, 특히 칼슘이온은 protease의 활성과 안정성에 영향을 미치는 경우가 많으므로 배지성분으로 효소 생산성에 관여하는 역할이 크다[10]. 또한 해양수산물 공장의 염류폐수 처리조에서 protease 생산균으로 분리된 *B. cereus*는 2배 희석된 양어장 폐수에서 배양하였을 때 효소

\*Corresponding author  
Tel: 82-42-630-9742, Fax: 82-42-636-2676  
E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

생산성이 크게 증가하는 것으로 보고되었다[15]. 이러한 현상은 폐수에 존재하는 유기물이나 염이 균의 성장과 효소 생산을 촉진시키기 때문인 것으로 추측하고 있다. 본 연구에서는 식중식물로부터 분리된 단백질 분해활성이 높은 *Bacillus*속 균주의 protease 생산성에 미치는 배지성분의 영향을 조사함으로써 protease 생산을 위한 배지조건을 확립하였다.

## 재료 및 방법

### 배지와 시약

Protease 생산균을 탐색하기 위한 배지로는 skim milk를 1% 첨가한 nutrient 평판배지를 사용하였다. Protease 활성측정을 위한 기질로 사용된 Hammarsten casein은 Merck 회사로부터 구입하였으며, L-tyrosine, trichloroacetic acid(TCA), sodium carbonate, anhydrous sodium acetate, acetic acid와 Folin-Ciocalteus phenol은 Sigma 회사 제품을 사용하였다.

### 분리균주의 분석

분리균의 형태적 관찰을 위해서는 그람염색과 포자염색을 실시하였다. 분리균의 16S rRNA의 염기서열을 분석하기 위해서 분리균의 16S rRNA 유전자 단편을 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭한 후[17], 증폭된 16S rRNA 유전자 단편을 정제하여 dye terminator cycle sequencing kit와 373A automate DNA sequencer(Perkin Elmer Co., U.S.A.)를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

### Protease 활성측정

Protease 활성을 측정하기 위한 효소반응은 Hammarsten casein(0.6%) 2.5 ml, 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.3 ml을 혼합하여 반응온도인 50°C에서 5분간 방치한 후 분리균의 배양상등액을 조효소액으로 0.2 ml 첨가하여 30 분간 실시하였다. 반응액에 2.5 ml의 trichloroacetic acid 용액(18 g TCA, 18.1 g anhydrous sodium acetate, 18.8 g acetic acid per liter)을 첨가하여 교반함으로써 반응을 중지시키고 40°C에서 30분간 방치한 후 실온에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리된 상등액을 1 ml 취하여 실험관에 옮기고 여기에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5 ml, 사용하기 직전에 증류수로 2배 희석한 Folin-Ciocalteus phenol 시약 0.5 ml을 첨가하여 교반한 후 40°C에서 30 분간 방치하였다. 이를 실온에서 일정시간 방치하여 식힌 후 660 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. Protease 활성 1 unit는 반응시간 1분간 1 µg tyrosine에 해당하는 peptide를 생성하는 효소량으로 정의하였다.

### Protease 생산성 분석

분리균의 protease 생산성에 미치는 배지성분의 영향을 조사하기 위해서는 탄소원, 질소원, 인, 무기금속이온의 종류

와 첨가량을 달리하고 pH 7.2로 조절한 배지에 LB 배지에서 하룻밤 전 배양된 균액을 1%(v/v)가 되도록 접종한 후 37°C에서 24시간 동안 진탕배양 하였다. 배양액을 원심분리한 후 배양상등액을 조효소액으로 사용하여 protease 활성을 측정함으로써 protease 생산성을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### Protease 생산균주의 분리와 특성

Protease 생산성이 우수한 미생물을 선별하기 위해 자연계 시료를 수집하여 적정량의 생리식염수로 희석하고 skim milk(1.0%)를 첨가한 nutrient 평판배지에 도말한 후 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 생성된 콜로니 주변에 skim milk의 분해환이 형성된 것을 관찰함으로써 protease 생산균을 선별하였다. 다수의 균주가 skim milk 분해환을 보였으며, 특히 식중식물에서 분리된 SH-8 균주가 skim milk의 분해환이 큰 것으로 나타났다. 분리균 SH-8은 포자를 형성하는 그람양성 간균으로 확인되었다. PCR로 증폭된 16S rDNA 단편으로 사용하여 직접 염기서열을 결정하여 분리균의 16S rRNA의 부분 염기서열을 확인하였다(GenBank accession number EF137715). 이를 미국 NCBI의 BLAST 검색방법을 사용하여 기존에 등록된 다양한 세균들의 상응하는 염기서열과 비교한 결과 *B. cereus*, *B. thuringiensis* 등과 유사도가 높은 것으로 나타났으며 분리균을 *Bacillus* sp. SH-8로 명명하였다.

### 탄소원이 *Bacillus* sp. SH-8의 protease 생산에 미치는 영향

Protease는 배지내 탄소원과 질소원의 성분에 따라 그 생산량에 차이가 많으며 미생물의 종류에 따라 그 영향이 다르다. 또한 *B. cereus*가 생산하는 protease 중에서 균체외로 분비되는 TLP은 CaCl<sub>2</sub>를 배지에 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때 생산성에 차이가 있으며 또한 효소활성과 안정성에도 영향을 미치는 것으로 알려졌다[25]. 따라서 protease 생산성이 높은 균으로 분리된 SH-8의 배지 조성을 확립하기 위해 우선적으로 탄소원에 따른 protease 생산성을 조사하였다. Yeast extract(5 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.1 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.1 g/L), CaCl<sub>2</sub>(1 g/L)를 공통적으로 포함하고 탄소원으로 포도당, 자당, 젖당과 가용성 전분을 각각 1%(w/v)씩 포함한 배지에 분리균 SH-8을 24시간 배양한 후 배양상등액에 존재하는 protease 활성을 측정하였다. CaCl<sub>2</sub>가 protease의 활성과 안정성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으므로 배양상등액을 사용하여 효소 활성을 측정할 때 2 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가하거나 첨가하지 않은 상태에서 반응을 각각 수행하였다. 그 결과 Table 1에 보인바와 같이 균의 성장은 가용성 전분을 포함한 배지에서 가장 높았으며, 효소 생산성도 가장 높았고, 전체적으로 CaCl<sub>2</sub> 존재하에서 효소 활성이 높았다. 다른 당

**Table 1. Effects of additional carbon sources on the growth and protease production.**

Additional carbon sources	Growth (OD <sub>600</sub> )	Protease activity (U/ml) of culture filtrate by adding	
		no CaCl <sub>2</sub>	2 mM CaCl <sub>2</sub>
None	3.1	84.0	129.0
Starch	9.0	183.2	514.8
Lactose	2.2	46.9	91.7
Glucose	2.6	0	0.2
Sucrose	1.6	65.3	133.6

을 첨가한 배지에서는 균의 성장이 당을 부가적으로 첨가하지 않은 배지보다 성장도가 낮았으며, 효소생산성도 동일하거나 저하된 것으로 나타났다. 특히 포도당을 부가탄소원으로 사용하였을 때는 배양상등액내에 효소활성이 거의 관찰되지 않았다. 이로부터 포도당은 분리균 SH-8의 protease 생산성을 억제하는 것을 알 수 있다. 포도당을 첨가한 배지에서 *Neurospora crassa*[5], *B. licheniformis*[7], *Aspergillus oryzae*[9] 등도 protease 생산이 억제된다고 보고된 바 있다.

한편 반응시 CaCl<sub>2</sub>을 첨가한 상태가 첨가하지 않은 상태에 비해 모두 protease의 활성이 높았다. 분리균 SH-8이 생산하는 protease의 종류는 아직 확인되지 않았지만, *B. cereus* 균주들이 수종의 protease를 생산한다는 것을 볼 때 [8, 16], SH-8도 2개 이상의 protease를 생산하는 것으로 예측된다. 이들 모두가 CaCl<sub>2</sub>에 영향을 받는다고는 할 수 없지만, CaCl<sub>2</sub>에 의해 증가된 효소활성으로 볼 때 배양상등액내에 존재하는 protease 중에 CaCl<sub>2</sub>에 의해 활성에 영향을 받는 효소가 많은 양으로 존재하는 것으로 보인다.

탄소원으로 가용성 전분의 첨가량을 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0%로 달리한 배지에서 배양된 배양액 중이 효소 생산성을 조사한 결과 효소 반응액에 CaCl<sub>2</sub>의 첨가하거나 첨가하지 않고 반응하였을 때 가용성 전분의 첨가량에 따른 배양액 중 효소 활성의 상대적 차이가 달랐다(Table 2). CaCl<sub>2</sub>를 첨가하지 않고 반응하였을 때 가용성 전분의 첨가량이 높을수록 배양액의 효소활성이 지속적으로 증가하였고, CaCl<sub>2</sub>을 첨가하고 반응하였을 때는 0.5%~2.0% 범위의 가용성 전분을 첨가한 배

**Table 2. Effects of soluble starch on the protease production.**

Sluble starch amount (%)	Growth (OD <sub>600</sub> )	Protease activity (U/ml) of culture filtrate by adding	
		no CaCl <sub>2</sub>	2 mM CaCl <sub>2</sub>
0	3.7	33.0	12.5
0.1	4.9	53.0	175.1
0.3	7.3	102.9	498.0
0.5	8.7	94.2	582.5
1.0	8.9	136.7	602.9
1.5	8.9	175.1	559.9
2.0	9.1	198.9	562.1

양액의 효소 활성이 최대활성의 90% 이상으로 유지하였다.

**질소원이 Bacillus sp. SH-8의 protease 생산에 미치는 영향**

질소원의 영향을 조사하기 위해서 가용성 전분을 2%로 고정하고 질소원을 제외한 성분(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>)은 앞과 동일한 조성으로 하여 종류가 다른 질소원(ammonium sulfate, yeast extract, casein, tryptone, urea, bacto peptone, soy peptone)을 각각 0.2% 씩 첨가한 후 배지를 pH 7.2로 조절하였다. 탄소원의 영향을 조사한 동일한 배양조건으로 배양한 후 균의 성장과 효소생산성을 조사하였다(Table 3). 그 결과 균의 성장도는 yeast extract와 soy peptone을 첨가한 배지에서 유사하였으며, urea나 ammonium sulfate를 첨가한 배지에서는 성장도가 매우 낮은 것으로 나타났다. 배양상등액의 protease 활성은 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하거나 첨가하지 않은 상태에서 측정하였는데 모두 soy peptone과 yeast extract를 첨가한 배지에서 높은 것으로 나타났다.

Yeast extract와 soy peptone이 모두 protease 생산에 적합한 질소원으로 판단되는데, soy peptone 보다는 yeast extract가 대량발효에는 국내에서 수급이 적합한 질소원으로 여겨져 이의 함량을 달리한 배지에서 효소 생산성을 조사하였다. 이때 첨가된 yeast extract의 양은 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 1.5, 2.0%이며 균의 배양결과 균의 성장은 2.0% yeast extract가 첨가되었을 때 가장 높았다(Table 4). 그러나

**Table 3. Effects of nirtrogen sources on the growth and protease production.**

Nitrogen sources	Growth (OD <sub>600</sub> )	Protease activity (U/ml) of culture filtrate by adding	
		no CaCl <sub>2</sub>	2 mM CaCl <sub>2</sub>
Urea	0.1	6.2	10.6
Ammonium sulfate	0.7	59.6	61.3
Bacto peptone	1.9	135.8	123.0
Tryptone	1.6	95.8	107.1
Soy peptone	3.0	175.4	325.0
Casein	1.5	56.8	63.4
Yeast extract	3.2	186.7	318.9

**Table 4. Effects of yeast extract on the protease production.**

Yeast extract amount (%)	Growth (OD <sub>600</sub> )	Protease activity (U/ml) of culture filtrate by adding	
		no CaCl <sub>2</sub>	2 mM CaCl <sub>2</sub>
0.1	2.2	198.9	306.0
0.2	5.5	292.3	495.6
0.4	4.8	305.4	506.1
0.6	6.7	71.1	71.4
1.0	7.8	43.4	54.5
1.5	8.5	0.9	1.4
2.0	10.0	0.9	1.7

protease의 생산성은 0.6% 이상의 yeast extract가 첨가된 배지에서는 급격히 감소하였으며, 0.2~0.4%를 첨가하였을 때 가장 높은 것으로 확인되었다. 또한 0.1% yeast extract를 첨가한 배지에서도 균의 성장은 낮지만 효소 생산성은 최대치의 약 60% 정도에 이르는 것으로 나타났다.

**인과 무기금속이온이 *B. cereus* SH-8의 protease 생산에 미치는 영향**

탄소원과 질소원의 양을 고정하고 무기 금속염의 종류를 달리하여 protease 생산성을 분석하였다. Soluble starch(20 g/L), yeast extract(3 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.1 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.1 g/L)을 포함한 배지에 무기금속염(CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>)을 개별별균 하여 0.1%의 농도로 첨가한 후 SH-8을 동일한 조건으로 배양하였다. 그 결과 MgSO<sub>4</sub>와 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 배지에서는 정상적으로 성장하였으나, 나머지 무기염이 첨가되었을 때는 성장이 거의 일어나지 않았다(Table 5). 금속이온에 의해 이러한 미생물 성장의 저해현상은 *B. cereus* BG1에서도 동일한 결과를 보이는 것으로 보도되었다[10]. 배양액내의 protease 활성을 측정할 결과 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 배지에서 효소 생산성이 가장 높았고 MgSO<sub>4</sub>를 첨가한 배지에서의 효소 생산성은 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하거나 첨가하지 않고 반응하였을 때 차이가 큰 것으로 나타났다. CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 배지에서 생산된 효소의 경우 CaCl<sub>2</sub> 존재여부에 따라 활성의 차이가 약 220 U/ml, MgSO<sub>4</sub>를 첨가한 배지에서 생산된 효소의 경우도 약 180 U/ml 정도의 활성차이가 났다. 이로 보아 *B. cereus* SH-8에 의해 생산된 protease 중 CaCl<sub>2</sub>를 활성화에 필요로 하는 효소는 생산성에 큰 차이가 없으나, CaCl<sub>2</sub>를 필요로 하지 않는 효소는 MgSO<sub>4</sub>를 첨가하였을 때와 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하였을 때 그 생산성의 차이가 큰 것으로 판단된다.

CaCl<sub>2</sub>의 양을 달리 첨가하여 효소 생산성을 검토하기 위해 상기 배지성분의 배지에 CaCl<sub>2</sub>를 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6% 첨가하여 배양하였다. 그 결과 균의 성장은 CaCl<sub>2</sub>의 첨가량에 관계없이 큰 변화가 없었으며 배양액내의 protease 활성은 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하지 않은 것보다 첨가하였을

때 향상되었다. 특히 0.2% 이하 농도의 CaCl<sub>2</sub> 첨가 배지에서 생산된 protease는 반응액내에 부가적으로 첨가된 CaCl<sub>2</sub>에 의해 효소 활성이 크게 향상되었으나, 0.3% 이상 첨가된 배지에서 생산된 효소의 경우는 반응시 CaCl<sub>2</sub>의 첨가여부에 따른 효소 활성의 차이가 미미 하였으며, 특히 0.5% 이상의 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 배지에서 생산된 효소의 경우 CaCl<sub>2</sub>를 반응액에 더 첨가하지 않았을 때 효소 활성이 더 높은 것으로 나타났다. 이는 조효소액으로 사용하는 배지상등액내에 CaCl<sub>2</sub>가 다량 존재하므로 효소반응시 CaCl<sub>2</sub>를 부가적으로 더 첨가하는 경우는 CaCl<sub>2</sub>의 농도가 높아 효소의 반응성이 낮아진 것 때문으로 판단된다.

최종적으로 인의 영향을 조사하고자 배지의 기본조성을 soluble starch(20 g/L), yeast extract(3 g/L), CaCl<sub>2</sub>(3 g/L, 개별별균)로 하고 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 각각 0%, 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.14%, 0.2%되게 첨가하였다. 동일한 조건에서 배양한 후 균의 성장을 비교한 결과 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 첨가량이 많을수록 균의 성장이 약간 상승하였다(Table 7). 효소 생산성의 경우는 0.0~0.02% 정도에서는 변화가 거의 없었으며 그 이상을 첨가한 배지에서는 약간씩 감소하는 것으로 나타났다. 이로부터 인은 protease의 생산성에 미치는 영향이 미미한 것을 알 수 있었다.

**균의 성장과 효소생산성**

*Bacillus* sp. SH-8의 protease 생산성을 증가시키는 것은

**Table 6. Effects of CaCl<sub>2</sub> on the protease production.**

CaCl <sub>2</sub> amount (%)	Growth (OD <sub>600</sub> )	Protease activity (U/ml) of culture filtrate by adding	
		no CaCl <sub>2</sub>	2 mM CaCl <sub>2</sub>
NONE	6.2	37.0	306.0
0.1	6.9	233.4	382.8
0.2	6.9	293.0	453.8
0.3	6.4	501.0	574.5
0.4	6.2	618.0	571.6
0.5	7.4	605.0	465.4
0.6	6.6	702.5	586.8

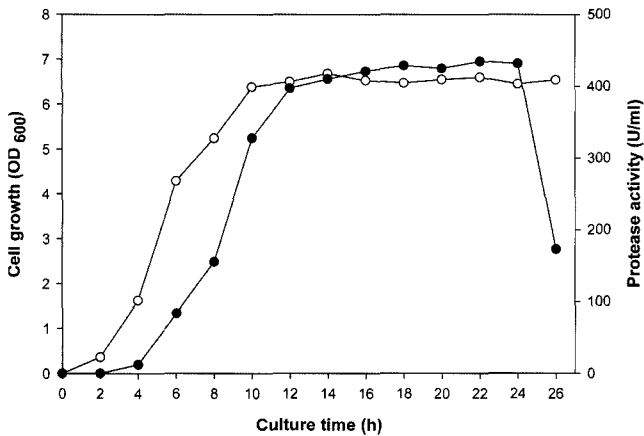
**Table 5. Effects of metal ions on the growth and protease production.**

Chemicals (0.1%)	Growth (OD <sub>600</sub> )	Protease activity (U/ml) of culture filtrate by adding	
		no CaCl <sub>2</sub>	2 mM CaCl <sub>2</sub>
CaCl <sub>2</sub>	6.8	233.4	535.8
MgSO <sub>4</sub>	6.9	44.0	221.0
ZnCl <sub>2</sub>	0.3	ND	ND
CuSO <sub>4</sub>	0.3	ND	ND
CoCl <sub>2</sub>	0.1	ND	ND
MnSO <sub>4</sub>	0.1	ND	ND

ND, not detectable

**Table 7. Effects of potassium phosphate on the protease production.**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> amount (g/L)	Growth (OD <sub>600</sub> )	Protease activity (U/ml) of culture filtrate by adding	
		no CaCl <sub>2</sub>	2 mM CaCl <sub>2</sub>
NONE	5.9	370.8	533.8
0.2	6.0	428.3	559.9
0.4	5.5	342.5	509.8
0.6	5.4	307.6	469.0
1.0	6.6	241.0	432.0
1.4	6.4	263.2	404.3
2.0	6.7	107.0	82.0



**Fig. 1. Growth and protease production of *Bacillus* sp. SH-8.** *Bacillus* sp. SH-8 was grown in the optimized medium consisting of soluble starch (2%), yeast extract (0.3%), CaCl<sub>2</sub> (0.3%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.01%) and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.01%) at 37°C with vigorous shaking. The cell growth (open symbol) was determined by measuring absorbance of cell culture. Protease activities (closed symbol) were determined with the culture filtrates.

로 확인된 배지성분(soluble starch 20 g/L, yeast extract 3 g/L, CaCl<sub>2</sub> 3 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1/0.1 g/L(pH 7.2))을 이용하여 배양시간에 따른 효소 생산성과 균의 성장정도와의 관계를 조사하였다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 배양 시간 10 시간 정도부터 균의 성장은 정지기에 이르렀으며, 효소 생산성은 약 12시간 이후부터는 증가하는 정도가 미미하였다. CaCl<sub>2</sub> 존재하에서 활성을 측정하였을 때 효소 생산성은 최대 435 U/ml로 나타났다. 배양시간이 26시간에 이르렀을 때 배양균액의 흡광도는 감소하지 않았지만 배양액 내에 protease 활성이 급격히 감소하였다. 이는 protease의 자가분해 때문에 일어난 현상으로 여겨진다. 배양시간이 길어지면 배양액내 protease 활성이 감소하는 현상은 다른 *B. cereus* 균에서도 보고되었다[10, 19]. 한편 분리균 SH-8의 효소 생산성은 약 5,000 U/ml의 생산성을 보이는 *B. cereus* BG1[10] 보다는 훨씬 낮지만, 약 130 U/ml의 protease를 생산하는 *B. cereus* MCM B-326[19]보다는 높았다.

**요 약**

식중식물에서 채취된 시료로부터 protease의 생산균으로 분리된 SH-8은 그람 양성간균으로 16S rRNA의 부분 염기 서열에 근거하여 *Bacillus*속 균주로 확인되었다. Protease 생산을 위한 배지를 제조하기 위해 질소원, 탄소원, 인, 금속 이온의 성분을 변화시키면서 균의 성장과 효소 생산성을 비교하였다. 포도당을 탄소원으로 사용하였을 때는 균의 성장은 정상적으로 일어나지만, protease 생산이 완전히 억제되는 것으로 나타났으며, 가용성 전분을 탄소원으로 사용하였을 때 효소 생산성이 가장 높았다. 질소원으로는 yeast extract

가 효소 생산에 가장 적합하였으며, 농도가 높으면 효소 생산성이 저하되었다. 한편 2가 금속이온 중 Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>을 배지에 첨가하였을 때는 균의 성장이 심하게 저해되었으며, 효소 생산도 되지 않았다. CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 배지에서는 효소 생산성이 증가되었으며, 효소 반응에 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하였을 때도 효소 활성이 증가하였다. 이로보아 CaCl<sub>2</sub>는 *Bacillus* sp. SH-8의 protease 생산성과 활성을 모두 증가시키는 것으로 판단된다. 가용성 전분(2%), yeast extract (0.3%), CaCl<sub>2</sub>(0.3%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.01%)와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.01%)를 포함하는 것으로 구성된 최적화 배지에서 최대효소 생산성은 435 U/ml로 나타났으며 26 시간이 되었을 때 배양액 내 효소활성은 급격히 감소하였다.

**REFERENCES**

1. Banerjee, U. C., R. K. Sani, W. Azmi, and R. Sani. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem.* **35**: 213-219.
2. Banik, R. M. and M. Prakash. 2004. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiol. Res.* **19**: 135-140.
3. Dhandapani, R. and R. Vijayaragvan. 1994. Production of thermophilic, extracellular alkaline proteases by *B. stearothermophilus* AP-4. *Wor. J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 33-35.
4. Donovan, W. P., Y. Tin, and A. C. Slaney. 1997. Cloning of the *nprA* gene for neutral protease A of *Bacillus thuringiensis* and effect of *in vivo* deletion of *nprA* on insecticidal crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2311-2317.
5. Drucker, H. 1972. Regulation of exocellular protease in *Neurospora crassa*: induction and repression of enzyme synthesis. *J. Bacteriol.* **110**: 1041-1049.
6. Feder, J. and J. M. Schuck 1970. Studies on the *Bacillus subtilis* neutral-protease- and *Bacillus thermoproteolyticus* thermolysin-catalyzed hydrolysis of dipeptide substrates. *Biochem.* **9**: 2784-2791.
7. Ferrero, M. A., G. R. Castro, C. M. Abate, M. D. Baigori, and F. Sineriz. 1996. Thermostable alkaline protease *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 327-332.
8. Fricke, B., K. Drossler, I. Willhardt, A. Schierhorn, S. Menge, and P. Rucknagel. 2001. The cell envelope-bound metalloprotease(camelysin) from *Bacillus cereus* is a possible pathogenic factor. *Biochim. Biophys. Acta* **1537**: 132-146.
9. Fukushima, Y., H. Itoh, T. Fukasa, and H. Motai. 1989. Continuous protease production in a carbon-limited chemostat culture by salt tolerant *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 604-608.
10. Ghorbel-Frikha, B., A. Sellami-Kamoun, N. Fakhfakh, A.

- Haddar, L. Manni, and M. Nasri. 2005. Production and purification of a calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 186-194.
11. Giesecke, U. E. G. Bierbaum, H. Rudde, U. Spohn, and C. Wandrey. 1991. Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 720-724.
  12. Gupta, R., O. K. Beg, and P. Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 13-32.
  13. Hayano, K., M. Takeuchi, and E. Ichishima. 1987. Characterization of a metalloprotease component extracted from soil. *Biol. Fertil. Soils* **4**: 179-183.
  14. Holmes, M. A. and B. W. Matthews. 1982. Structure of thermolysin refined at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **160**: 623-639.
  15. Khannous, L., N. Souissi, B. Ghorbel, R. Jarbouï, M. Kallel, M. Nasri, and N. Gharsallah. 2003. Treatment of saline wastewaters from marine-products processing factories by activated sludge reactor. *Environ. Technol.* **24**: 1261-1268.
  16. Kim, S. S., Y. J. Kim, and I. K. Rhee. 2001. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674. *Arch. Microbiol.* **175**: 458-461.
  17. Lee, E. -H., C. -J. Kim, and K. -H. Yoon. 2005. Characterization and xylanase productivity of *Streptomyces* sp. WL-2. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 178-183.
  18. Mehrotra, S., P. K. Pandey, R. Guar, and N. S. Darmwal. 1999. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. *Bioresour. Technol.* **67**: 201-203.
  19. Nilegaonkar, S. S., V. P. Zambare, P. P. Kanekar, P. K. Dhakephalkar, and S. S. Sarnaik. 2007. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresour. Technol.* (in press)
  20. Nishiya, Y. and T. Imanaka. 1990. Cloning and nucleotide sequences of the *Bacillus stearothermophilus* neutral protease gene and its transcriptional activator gene. *J. Bacteriol.* **172**: 4861-4869.
  21. Priest, F. G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* **41**: 711-753.
  22. Stark, W., R. A. Pauptit, K. S. Wilson, and J. N. Jansonius. 1992. The structure of neutral protease from *Bacillus cereus* at 0.2-nm resolution. *Eur. J. Biochem.* **207**: 781-791.
  23. Tran, L., X. -C. Wu, and S. -L. Wong. 1991. Cloning and expression of a novel protease gene encoding an extracellular neutral protease from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 6364-6372.
  24. Vasantha, N., L. Thompson, C. Rhodes, C. Banner, J. Nagle, and D. Filpula. 1984. Genes for alkaline protease and neutral protease from *Bacillus amyloliquefaciens* contain a large open reading frame between the regions coding for signal sequence and mature protein. *J. Bacteriol.* **159**: 811-819.
  25. Veltman, O. R., G. Vriend, H. J. C. Berendsen, B. van den Burg, G. Venema, and V. G. H. Eijssink. 1998. A single calcium binding site is crucial for the calcium-dependent thermal stability of thermolysin-like proteases. *Biochemistry* **37**: 5312-5319.
  26. Watanabe, K. and K. Hayano. 1993. Source of soli protease in paddy field. *Can. J. Microbiol.* **39**: 1035-1040.
  27. Wetmore, D. R., S. L. Wong, and R. S. Roche. 1992. The role of the prosequence in the processing and secretion of the thermolysin-like protease from *Bacillus cereus*. *Mol. Microbiol.* **6**: 1593-1604.
  28. Yang, M., E. Ferrari, and D. Henner. 1984. Cloning of the neutral protease gene of *Bacillus subtilis* and the use of the cloned gene to create an *in vitro*-deletion mutation. *J. Bacteriol.* **160**: 15-21.

(Received Nov. 20, 2006/Accepted Dec. 7, 2006)