

## 단백질 분해효소를 생산하는 호염성 미생물 *Vibrio*의 분리 및 특성

엄기범 · 윤선진\* · 이재경\*\* · 이재학\*\*\* · †이순열\*

한경대학교 생물환경정보통신전문대학원, \*한경대학교 생명공학부  
\*\*건양대학교 식품생명공학과, \*\*\*서일대학 식품영양과

### Isolation and Characterization of a Protease-Producing Halophilic *Vibrio* sp.

Ki-Bum Um, Sun-Jin Yoon\*, Jae-Kyoung Lee\*\*, Jae-Hag Lee\*\*\* and †Soon-Youl Lee\*

Graduate School of Bio-Information Technology, Hankyong National University, Ansongsi 456-749, Korea

\*School of Biotechnology, Hankyong National University, Ansongsi 456-749, Korea

\*\*Dept. of Food Science and Technology, Konyang University, Nonsansi 320-711, Korea

\*\*\*Dept. of Food and Nutrition, Seoil College, Seoul 131-702, Korea

#### Abstract

In this study, a halophilic protease-producing bacterium was isolated from the west seaside mud flats of Korea. The 16S rDNA nucleotide sequences of the isolate showed 99.5% sequence homology with those of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio fluvialis*; therefore, the isolate was named *Vibrio* sp. YH-127. Gram staining and the carbohydrate metabolism test results supported the isolate as one from the *Vibrio* family. Optimum condition for the cell growth and for the protease activity were obtained when the isolate was cultured at 25°C and pH 7.0, with the salt concentration of the medium similar to that of sea water. Finally, the addition of Mg<sup>++</sup> ions into the medium increases protease activity suggesting that the protease produced by the isolate was a metalloprotease.

Key words: protease, *Vibrio*, identification, mud flat, halophile.

#### 서 론

Protease는 동물, 식물, 미생물 등 대부분 생명체의 세포 안과 밖에서 발견되며, 다양한 생리적 역할을 하는 중요한 효소이다. Protease는 활성 부위에서 작용하는 기능기에 의해 serine protease, metal protease(metalloprotease), aspartic protease, cysteine protease 등으로 구분되어지며, 작용 pH에 따라 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 분류된다<sup>1)</sup>.

Protease는 식품산업, 피혁산업, 세제산업, 환경정화산업 및 제약산업 등 여러 산업분야에 널리 사용되고 있다<sup>2,3)</sup>. 예를 들면, 세균으로부터 분리된 neutral protease는 동물에서 분리된 protease 보다 단백질을 분해할 때 쓴맛이 적고, 열 안정성이 낮아, 효소 반응의 조절이 용이함으로 식품산업 등에 이용

된다<sup>4)</sup>. Protease를 이용한 세제의 개발은 종래의 유기 화학 약품보다 환경 오염에 대한 피해가 적고 이차 오염이 일어나지 않음으로 생태계의 피해를 예방할 수 있다<sup>5,6)</sup>. 또한 최근에는 단백질 분해효소를 이용한 혈전 치료제를 개발하기 위한 연구가 진행이 되고 있는 실정이다<sup>7)</sup>.

산업적으로 유용한 protease는 방선균, *Bacillus*, 곰팡이 등 다양한 미생물로부터 발견되었고, 최근에는 새로운 화학적 물리적 조건에 맞는 protease를 산업적으로 이용하기 위해 다양한 서식지로부터 다양한 미생물들이 검색되고 있다<sup>8)</sup>.

미생물이 생산하는 효소는 일반적으로 높은 염분 조건에서 활성을 잃어버리게 됨으로 산업적 이용에 문제가 된다. 고 단백질 음식의 제조에서 부패 방지 등의 이유로 높은 염분 상태에서 가공을 할 때, 예를 들면 생선 소스 등을 단시간에 제조

† Corresponding author: Soon-Youl Lee, School of Biotechnology, Research Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Ansong-si 456-749, Korea.

Tel: +82-31-670-5333, Fax: +82-31-670-5333, E-mail: sylee@hknu.ac.kr

하는데 단백질 분해 효소를 사용하는데 이 때 고염에서도 작용하는 단백질 분해효소가 필요하다<sup>9)</sup>. 이러한 문제는 호염성 미생물로부터 필요로 하는 효소를 분리함으로써 해결할 수 있다. 호염성 세균 중에서 protease를 생산하는 균들로는 *Halo-bacterium* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Vibrio* sp. 등이 알려져 있다<sup>10,11)</sup>.

본 연구는 산업적으로 사용이 가능한 높은 염분에서도 활성을 갖는 단백질 분해효소를 생산하는 미생물을 분리하기 위해 갯벌로부터 protease를 생산하는 호염성 미생물을 분리하여, 동정하고, 분리 균주의 생육 조건에 따른 protease의 활성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 선별

서해안 제부도 인근 갯벌에서 갯벌 흙을 채취하였다. 채취한 시료는 식염수를 넣고 혼합하여 정지한 후 1 ml 상등액을 취하여 2% 탈지분유(10% 탈지분유를 105°C에서 15분간 고압 증기 멸균하여 사용함)가 함유된 Zobell 평판 배지(50% 해수, 1% peptone, 0.5% yeast extract)에 도말하여 25°C에서 배양하였다. 이 평판 배지를 다시 4°C에서 24시간 방냉한 후 투명대 형성의 정도를 통해 protease 분비 균주를 선별하였다. 선별된 균주 배양액에 멸균된 glycerol을 15% 되도록 첨가한 후 동결 보존하였다. 배지와 탈지분유는 Difco사 제품, 일반 시약은 Sigma사 제품을 이용하였다.

### 2. 미생물 동정

분리 균주의 그람 염색성을 확인하기 위해 영동제약에서 생산하는 그람 염색 시약을 사용하였으며, 제조사의 실험방법에 준하였다. 대조균으로 그람양성균인 *Bacillus licheniformis*와 그람음성균인 *E. coli*를 사용하였다.

분리 균주의 동정을 위해 49개의 탄수화물의 발효성을 확인할 수 있는 API 50 CHB/E medium(bioMerieux, Durham, USA)를 사용하였고, bioMerieux의 database system을 이용하여 분석하였다<sup>12)</sup>.

분리 균주의 동정을 위해 16S ribosomal DNA(rDNA) 서열을 이용하였으며, 16S rDNA 유전자 단편을 PCR 반응으로 증폭하여 염기 서열을 결정하였다. 사용한 primer는 다음과 같다 (9F, 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 926R, 5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGR TT-3'). PCR 반응을 위해 분리 균주로부터 genomic DNA extraction kit(Intron, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. Takara PCR Thermal Cycler와 Takara Ex Taq DNA polymerase를 이용하여 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 이루어진 과정을 35

회 반복하여 16S rDNA의 유전자 단편을 증폭하였다. 증폭된 DNA 단편의 염기 서열을 DNA sequencer(Megabase1000, GE Healthcare Bioscience, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 결정하였다. 결정된 염기 서열을 NCBI BLAST를 이용하여 GenBank에 보고된 균주와의 상동성을 조사하였다.

### 3. Protease 활성 및 측정

분리 균주의 증식과 protease 생산의 최적 조건을 알기 위하여 증식 온도와 초기 배지의 pH 및 염분의 농도에 변화를 주면서 분리 균주의 증식 및 효소 활성을 조사하였다. 기본 배지로 Zobell 액체 배지를 사용하였으며, 배양 온도를 10°C에서 40°C까지 5°C 간격으로 각각 액체 배양하였다. 초기 배지의 pH는 4~10까지 조성하여 실험을 수행하였다. 배양액의 염분 농도 변화는 바다의 염분 중 농도가 가장 높은 NaCl, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>를 선택하여 각각 LB 및 Zobell 배지에 1%, 2%(w/v)를 추가하고 실험을 하였다. 하룻밤 배양한 균을 1% 되게 집중하여 25°C에서 250 rpm으로 12시간동안 진탕 배양하였다. 균주의 증식도 측정은 600 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 효소 활성을 측정하기 위해 Leighton 등의 방법을 일부 수정하여 사용하였다<sup>12)</sup>. 배양액 600 μl를 10,000 g로 원심 분리하여 그 상등액 500 μl를 조효소액으로 사용하였다. 효소 활성은 azocasein 기질 용액(5 mg/ml) 250 μl에 조효소액 500 μl를 넣고, 37°C에서 45분간 반응시켰다. 반응 후 20% (w/v) Trichloroacetic acid 500 μl를 가하고 5분간 상온에 방치하여 반응을 종료시켰다. 반응 종료 후 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여, 그 상등액 1 ml를 취하여 2 M NaOH 250 μl와 혼합한 후 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 역가 1 unit는 상기 조건에서 1분당 440 nm에서 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소의 양으로 하였다.

## 결과 및 고찰

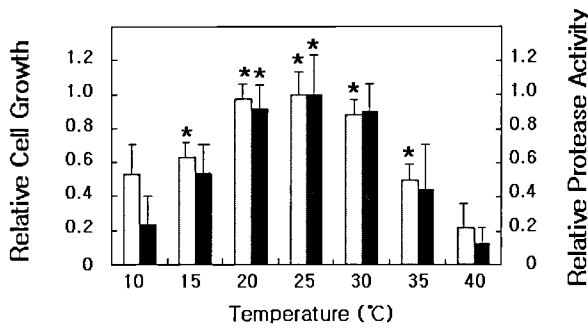
### 1. 균주의 분리 및 동정

탈지 분유가 함유된 Zobell 평판 배지에서 가장 큰 투명환 지름을 형성하는 균주를 분리하였고, 이를 YH-127로 명명하였다.

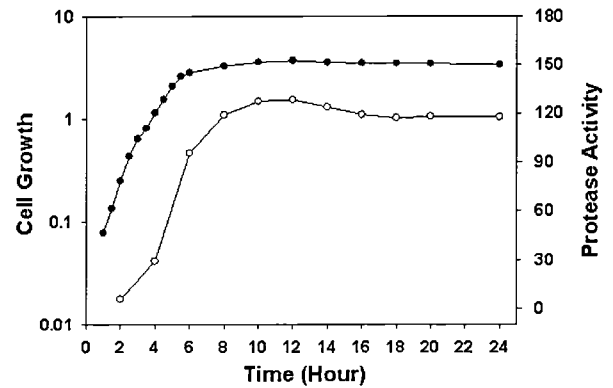
분리 균주는 그람 음성균으로 판명되었고, 16S rDNA 유전자의 염기 서열은 *Vibrio vulnificus*와 *Vibrio fluvialis*의 16S rDNA 염기 서열과 99.5%의 상동성을 보여 *Vibrio* 속에 속하는 균주로 추정되었다(Fig. 1).

분리 균주의 당분해능 확인 시험을 수행한 결과 glycerol, L-arabinose, ribose, galactose, glucose, fructose, mannose, mannitol, N-acetyl glucosamine, arbutin, esculin, salicin, maltose, sucrose, trehalose, starch, glycogen, D-arabitol, gluconate 등의 탄

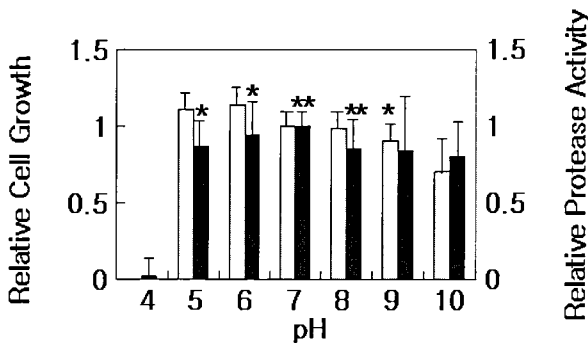




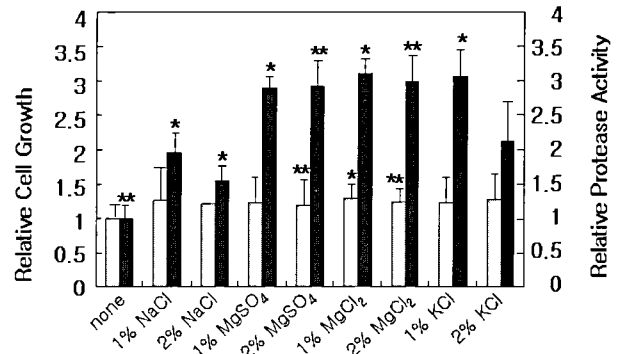
**Fig. 2. Effect of temperature on growth and protease activity of *Vibrio* sp. YH-127.** Relative growth of *Vibrio* sp. YH-127 at different temperature compared with growth of *Vibrio* sp. YH-127 at 25°C (□): Relative protease activity of *Vibrio* sp. YH-127 at different temperature compared with protease activity of *Vibrio* sp. YH-127 at 25°C (■)(\* $p < 0.01$ ).



**Fig. 4. Growth curve and protease activity of *Vibrio* sp. YH-127 at 25°C using Zobell medium at pH 7.0** Relative protease activity(open circle); Relative growth of the cell(closed circle).



**Fig. 3. Effect of pH of medium at the beginning of the culture on growth and protease activity of *Vibrio* sp. YH-127.** Relative growth of *Vibrio* sp. YH-127 at different pH compared with growth of *Vibrio* sp. YH-127 at pH 7 (□): Relative protease activity of *Vibrio* sp. YH-127 at different pH compared with protease activity of *Vibrio* sp. YH-127 at pH 7(■)(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



**Fig. 5. Effect of salts in LB medium on the growth and protease activity of *Vibrio* sp. YH-127.** Relative growth of *Vibrio* sp. YH-127 at different concentration of the salts compared with growth of *Vibrio* sp. YH-127 without addition of salt(□): Relative protease activity of *Vibrio* sp. YH-127 at different concentration of the salts compared with protease activity of *Vibrio* sp. YH-127 without addition of salt(■)(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

균체의 protease는 대수기에서 균체 증식과 비례적으로 증가하였고 정지기로 도달하여 2시간 후에 최대 활성을 나타내었다.

**5. 염분 농도에 따른 균체 증식 및 효소 활성의 변화**

분리 균주가 일반적인 영양 배지에 비하여 염분이 높은 해수에서 자라는 미생물이므로 염분 농도에 따른 균체 증식 및 protease의 활성에 대하여 조사하고자 LB 배지와 Zobell 배지에 해수의 주요 염분 성분인 NaCl, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KCl을 각각 1%와 2%(w/v)되게 첨가하였다.

Fig. 5에서 보듯이 LB 배지에 염분을 첨가했을 때 염분의

종류와는 상관없이 균체의 증식이 약 1.2배 정도 촉진되었다. LB배지는 NaCl 1%를 이미 함유하고 있으며, 염분의 부과는 염분의 농도를 2%와 3%로 각각 증가시키는 효과가 있고 이는 해수의 염분 농도가 약 3~4%임을 생각할 때, 균체의 증식에 해수의 염분량이 도움이 된다는 것을 시사하고 있다.

염분 첨가 시 protease의 활성이 현저히 증가하였으며, 첨가한 염분의 종류에 따라 차이를 보였다. NaCl 및 KCl 각각 1%의 첨가는 약 2배의 효소 활성의 증가를 보인 반면 2%의 첨가는 1% 첨가 시보다 효소 활성의 증가 효과가 떨어지는 결과를 나타내었다(Fig. 5). 즉 너무 많은 1가 이온의 첨가는

효소 활성에 저해가 된다는 결과를 보여 주었다. 반면  $Mg^{++}$  이온 1%와 2% 첨가 시 모두 높은 효소 활성을 나타내었으며, 염분을 첨가하지 않았을 때보다 약 3배 이상까지 증가하였다. 이는 최근 *Vibrio*가 생산한 protease 가  $Mg^{++}$ 에 의하여 활성이 소폭 증가되었다는 Chang 등<sup>10)</sup>의 보고와 맥락을 같이 하지만 활성 증진 정도가 훨씬 높은 것을 알 수 있었다.

반면 해수와 유사한 염분을 가지는 Zobell 배지에서는 염분의 첨가는 균체 증식에는 약간의 도움이 되었지만, protease 활성은 서로 다른 효과를 보였다(Fig. 6). NaCl과 KCl의 첨가는 오히려 효소 활성의 감소를 초래하는 결과를 보였고,  $Mg^{++}$  이온의 경우에는 대조군에 비하여 약간의 효소 활성의 증대를 보였다.

이러한 결과로부터 분리한 균주는 균체의 증식과 효소 활성을 위해 25°C, pH 7.0, 해수의 농도와 비슷한 염분 농도를 가지는 배양 조건을 요구하는 단백질 분해효소를 생산한다는 것을 알 수 있었다.

## 요약 및 결론

대한민국 서해안 갯벌로부터 단백질 분해 효소를 생산하는 호염성 세균을 분리하였다. 분리 균주의 16S rDNA의 염기 서열 분석 결과, *Vibrio vulnificus*와 *Vibrio fluvialis*의 16S rDNA의 염기 서열과 99.5%의 상동성을 보여 분리 균주를 *Vibrio* sp. YH-127으로 명명하였다. Gram 염색과 당 대사 시험 결과도 분리 균주가 *Vibrio* 속임을 뒷받침하였다. 분리 균주의 균체 증식과 효소 활성을 위한 최적 조건은 25°C, pH 7.0에서

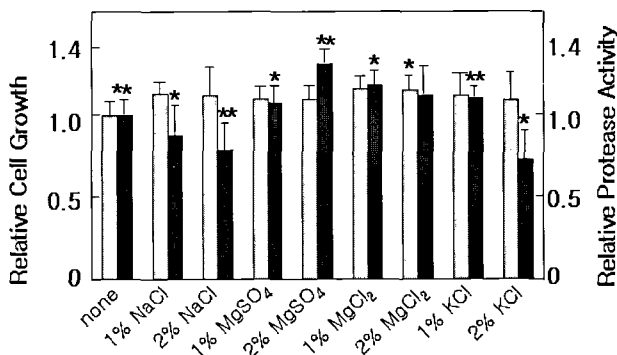


Fig. 6. Effect of salts in Zobell medium on the growth and protease activity of *Vibrio* sp. YH-127. Relative growth of *Vibrio* sp. YH-127 at different concentration of the salts compared with growth of *Vibrio* sp. YH-127 without addition of salt(□): Relative protease activity of *Vibrio* sp. YH-127 at different concentration of the salts compared with protease activity of *Vibrio* sp. YH-127 without addition of salt(■)(\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).

해수와 유사한 염분 농도를 가지는 배양 조건이었다. 배양 배지에  $Mg^{++}$ 이온을 첨가함으로써 protease 활성이 증가함은 분리 균주에 의해 생성되는 protease는 metalloprotease임을 시사한다.

## 감사의 글

본 연구는 환경대학교 2005년도 학술연구구성비의 지원에 의한 것임.

## 참고문헌

1. Chun, DS, Kang, DK and Kim, HG. Isolation and enzyme production of neutral protease-producing strain, *Bacillus* sp. DS-1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30:346-351. 2002
2. Kim, DS, Kim, HR, Nam, TJ and Pyeon, JP. Medium composition of *Aspergillus oryzae* PF for the production of proteolytic enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 404-409. 1999
3. Min, OK, Kim, MS, Seo, WS, Cha, JY and Cho, YS. Characterization of extracellular protease of *Bacillus* sp. WRD-1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:329-333. 2000
4. Sloma, AA, Ally, D and Pero, J. Gene encoding a minor extracellular protease in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170: 5557-5563. 1988
5. Mcconn, JD, Tsura, D and Yasunobu, KD. *Bacillus subtilis* neutralprotease. *J. Biol. Chem.* 239:3706-3709. 1964
6. Sloma, AA, Rufo, CF, Rudolph, BJ, Sullivan, KA and Pero, J. Bacillopeptidase F of *Bacillus subtilis*: Purification of the protein and the cloning of the gene. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 172:1470-1477. 1990
7. Peng, Y, Yang, X and Zhang, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity *in vivo*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:126-32. 2005
8. Godfrey, T and West, S. Industrial enzymology. 2nd ed. Macmillan Publishers Inc. NY. USA. 1996
9. Namwong, S, Hiraga, K, Takada, K, Tsunemi, M, Tanasupawat, S and Oda, KA. Halophilic serine proteinase from *Halobacillus* sp. SR5-3 isolated from fish sauce: purification and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:1395- 401. 2006
10. Ryu, K, Kim, J and Dordick, JS. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile.

- Enzyme Microb. Technol.* 16:266-75. 1994
11. Ali Amoozegar, M, Zahra, FA, Reza, HH and Reza, RM. Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiol. Res.* [Epub ahead of print] 2006
  12. Leighton, TJ, Doi, RH, Warren, RAJ, and Kelln, RA. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 76: 103-122.1973
  13. Claus, D and Berkeley, RW. Genus *Bacillus*, pp.1105-1139. In sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt(ed.), Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, Williams and Wilkins. Baltimore. 1986
  14. Murray, PR, Baron, EJ, Pfaller, MA, Tenover, FC and Tenover, FC. Manual of clinical microbiology, 7th Ed. American Society for Microbiology, Washington DC. 1999
  15. Kawase, T, Miyoshi, S, Sultan, Z and Shinoda, S. Regulation system for protease production in *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 240:55-9. 2004
  16. Chang, AK, Kim, HY, Park, JE, Acharya, P, Park, IS, Yoon, SM, You, HJ, Hahm, KS, Park, JK and Lee, JS. *Vibrio vulnificus* secretes a broad-specificity metalloprotease capable of interfering with blood homeostasis through prothrombin activation and fibrinolysis. *J. Bacteriol.* 187:6909-6916. 2005
- 
- (2007년 3월 21일 접수; 2007년 4월 13일 채택)