

토양으로부터 카탈라제 생산균의 분리 및 특성

한경아^{1,4,5} · 이종일^{2,3,4,5*}

¹전남대학교 물질·생물화학공학과, ²응용화학공학부, ³촉매연구소, ⁴바이오광사업단, ⁵기능성 나노 신화학 소재 사업단

Isolation and Characterization of Catalase-producing Bacteria from Soil

Kyung-Ah Han^{1,4,5} and Jong Il Rhee^{2,3,4,5*}

¹Department of Material and Biochemical Engineering ²School of Applied Chemical Engineering

³Research Institute for Catalysis ⁴Research Center for Biophotonics

⁵Center for Functional Nano Fine Chemicals, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract This study investigated the production of catalase from Bul-kyo soil bacteria through fermentation process. Isolation and selection of bacteria was performed through chemical and physiological analysis. Catalases were produced from bacteria which belong to 3 different species (*Bacillaceae bacterium* BKbChE-1, *Bacillus sp.* BKbChE-2, *Bacillus flexus* BKbChE-3) confirmed by using 16S rDNA sequence method. The catalases were found to be stable in the temperature range of 30°C-60°C for BKbChE-1, BKbChE-2 and BKbChE-3 and also in the pH range of 9.0-12.0 for BKbChE-1 and BKbChE-3. Long-term stability of the catalases was about 20 days at 4°C. However, BKbChE-2 has kept its activity over 30 days at 4°C.

Keywords: Catalase, Hydrogen peroxide, *Bacillus sp.*, Identification, 16S rDNA

서 론

과산화수소 (Hydrogen peroxide, H₂O₂)는 표백제, 산화제 등에 광범위하게 사용되는 화학물질로 최근에는 인쇄기 판 에칭용, 반도체 산업, 세척염색공업 및 제지 공업, 콘택트 렌즈 소독 등에 이르기까지 그 수요가 확대되고 있는 실정이다. 뿐만 아니라 유제품이나 발효 식품 공정 중 미생물의 제거를 위해 과산화수소가 사용되고 있다. 한편, 이들 공정에 사용된 후 잔존하는 과산화수소 분해 등의 문제가 대두 되고 있다. 더욱이 과산화수소의 사용량은 계속 증가하고 있어 이러한 과산화수소를 함유한 폐액의 양도 점차 증가하고 있다. 노화방지, 웰빙 등에 대한 현대인들의 관심이 고조되어 가고 있는 가운데, 환경 친화적인 기술의 하나로 생화학적 방법으로 과산화수소를 처리하기 위한 생물 효소에 관한 연구에 관심을 많이 갖고 있다. 그 대표적인 방법이 카탈라제를 이용하는 방법이다.

카탈라제는 1910년에 Wolff와 Stoecklin에 의해서 적혈구로부터 최초로 순수 분리되어졌고, Sumner에 의해 1937년 결정화 되었으며, 1941년 순수 분리의 방법 또한 재정리되었다. 대부분의 카탈라제는 아미노산의 조성 성분에서는 차이를 나타내고 있지만, 물리적인 특징은 거의 유사하다. 카탈라제는 과산화수소를 산소와 물로 분해하는 효소로서 세균에서 동, 식물에 이르기까지 광범위한 생물에서 발견되며 다양한 종으로부터 분리되고 연구되어 왔다 [1-4]. 카탈라제는 일반적으로 헴그룹 (heme group)을 갖는 산화/환원 효소로서 진핵세포의 퍼옥시좀에 다량 함유되어 있으며 특히 동물의 간에 다량 존재한다 [5-6].

카탈라제의 일반적인 특징은 약 220-300 KDa의 분자량을 갖고, 4개의 동일한 소단위체로 구성되어 있는데, 소단위체 각각의 분자량은 대략 55-68 KDa 정도이다. 카탈라제를 생산하는 방법은 고등 동물로부터 카탈라제를 분리하는 방법과 유기용제로 곰팡이를 사멸하여 자가 분해 방법에 의해 추출, 침전 및 회수, 비수용성 물질을 제거하고 효소액을 제조하는 방법이 대표적이다 [6-7]. 동물의 간으로부터 생산되는 카탈라제는 그 양이 산업적으로 사용하기에 부족하나 *Penicillium*이나 *Aspergillus niger*와 같은 미생

*Corresponding author

Tel: +82-62-530-0847, Fax: +82-62-530-0846

e-mail: jirhee@chonnam.ac.kr

물로부터 높은 효소 활성을 가지는 카탈라제가 생산되면서 산업적인 용도로 개발되기 시작하였다 [5-9]. *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* 등의 박테리아와 관련된 연구들도 활발히 진행되었는데, 대부분의 연구들은 *katA*, *katB*, *katE* 등의 유전자에 관한 것이다. 이들 연구는 산화적 스트레스의 기작이나 삼투 스트레스 등에 관한 것으로 카탈라제의 생산이나 산업적 응용 등과는 무관한 연구들이다 [10-12]. 따라서 산업적 용도로 개발하기 위한 카탈라제를 생산하는 토착 균주의 분리 및 확립에 관한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 국내 토양 미생물로부터 효과적으로 카탈라제를 생산할 수 있는 균주를 분리하여 카탈라제 효소의 온도와 pH 변화에 따른 활성 변화 및 장기간 저장 안정성 등에 관하여 조사하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 배지

본 연구에 사용된 시료 및 완충 용액 제조용 시약 등은 시그마 회사 (Sigma Co., USA)에서 구입하였다. 미생물 배양에 사용한 TSB (Tryptic soy broth) 복합배지는 비디 회사 (BD Co., USA)의 제품을 사용하였다. 미생물 희석 및 세척 등에는 생리식염수 (0.85% (wt/v) NaCl)를 사용하였다. 분석에 사용된 완충용액은 McIlvaine 완충용액 (0.1 M, pH 6.0)과 트리스 인산 완충용액 (Tris-phosphate buffer, 0.2 M, pH 6.8)을 사용하였다. 사용되어진 용액 I (o-dianisidine 0.2 mg, glycerol 0.8 mL, Tris-phosphate buffer 0.2 M, pH 6.8, HRP (Horseradish peroxide), 125 (Unit/mL)는 발색 반응을 위해 사용하였고, 염산 (HCl, 17.5%)은 효소 반응을 종결하기 위하여 사용하였다. 단백질 분석을 위해 BSA (Bovine serum albumin)와 Brilliant blue 시약을 사용하였다.

카탈라제 생산 균주의 분리

전라남도 보성군 벌교읍 마동리 농토에서 채취한 토양 1 g을 멸균한 생리 식염수 9 mL에 현탁하여 10배씩 연속적으로 희석한 후 TSB 고체 배지에 100 μ L 도말하여 30°C에서 3일간 배양하였다. TSB 고체 배지에 도말한 미생물 중 42가지의 각기 다른 콜로니를 분리하여 각각의 콜로니를 TSB 복합 배지 3 mL 접종하고 30°C, 200 rpm에서 배양하여 250 mL 삼각플라스크에 최종 배양 부피가 100 mL이 되게 1% (v/v) 접종하여 상동의 조건에서 진탕 배양하였다. 24시간 배양한 액체 시료 100 μ L를 취하여 마이크로 튜브에 넣고, 3% 과산화수소 100 μ L를 떨어뜨려 기포의 생성 유무로 카탈라제 양성반응을 나타내는 약 30여 가지의 균주 중 카탈라제 활성이 높은 세 가지 미생물을 분리하였다 [13].

배양 균주의 동정

토양에서 분리된 카탈라제 생산 미생물 BKBChE-1, BKBChE-2, BKBChE-3은 Gerhardt 등 [14]의 방법을 참고로 형태학적, 생화학적 특성 등을 검토하였고 그람염색은 Cappuccino 등 [15]의 방법을 참고하였으며, Lim 등 [16]과 같이 16S rDNA를 증폭시키기 위하여 forward primer (27mf) : (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 reverse primer (1492r) : (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하여 중합효소연쇄반응 (PCR : polymerase chain reaction)을 수행, 16S rDNA 유전자 분석을 행하여 동정하였다. 분석 결과는 Joung 등의 방법 [17]으로 RDP (ribosomal database project : <http://rdp.cme.msu.edu/>)의 데이터베이스를 이용하여 조사하였고, 계통수는 neighbor-joining method를 이용하여 MEGA 4.0 패키지를 이용하여 작성하였다.

효소 활성 측정

카탈라제 효소의 활성 측정방법은 Fiedurek 등 [1]의 방법을 참고하여 분석하였다. 스크리닝하여 얻은 균을 24시간 배양하여 얻은 시료를 원심분리 (10000 g, 4°C, 10분)하여 얻은 상등액 10 μ L에 McIlvaine 완충용액 500 μ L, 과산화수소 10 μ L를 기질로 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 시료에 용액 I (오르토-디아니시딘, 글리세롤, 인산 완충용액, 피옥시다제 혼합용액)를 150 μ L 첨가하여 온도 30°C에서 30분간 발색 반응 시킨 후 300 μ L의 염산으로 반응을 정지시켰다. 반응이 종료된 시료는 분광광도계를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 카탈라제 활성 측정에 사용하였다. 카탈라제는 시그마 회사 (Sigma Co., USA)의 효소를 표준 시료로 검량선을 작성하여 활성을 비교하는데 사용하였다. 상등액내 존재하는 단백질의 농도는 BSA로 검량선을 작성하여 Bradford [18]법에 준하여 측정하였다.

효소의 활성에 미치는 반응 조건 분석

카탈라제 활성에 미치는 온도 및 pH의 영향을 조사하기 위해 Kim 등 [19]과 Costa 등 [20,21]의 방법을 참고하여 BKBChE-1, BKBChE-2, BKBChE-3 세 가지 균주 배양 상등액을 반응에 사용하였다. 카탈라제 생산량이 높은 세 균주를 복합배지인 TSB 3 mL에 전배양하고, 100 mL의 액체배지에 550 nm에서 OD 0.05가 되도록 접종하여 30°C, 200 rpm에서 24시간 배양하여 시료 1 mL을 원심분리 (10000 g, 4°C, 10분)하였다. 분리된 상등액을 각각 4°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C 온도 범위에서 효소를 2시간 반응시킨 후 상기 서술한 카탈라제 활성 측정법으로 효소 활성을 비교하여 온도가 카탈라제 효소에 미치는 영향을 조사하였다. 효소에 pH가 미치는 영향을 조사하기 위하여 세

균주 BKBChE-1, BKBChE-2, BKBChE-3를 배양, 원심 분리하여 얻은 상등액 100 μ L를 pH 7.0에서 pH 13.0까지의 범위에 해당하는 0.1 M의 인산 완충용액 (potassium phosphate-NaOH) 900 μ L에 넣고 40°C에서 12시간 반응시킨 후 카탈라제 활성 측정에 사용하여 각기 다른 pH에 따른 효소 활성 변화를 측정하였다.

장기간 저장성 테스트

토양 미생물이 생산한 카탈라제 효소의 장기간 저장성을 확인하기 위해 배양한 균주를 원심분리 (10000 g, 4°C, 10분)하여 얻은 상등액을 4°C에 30일간 보관하며 0일, 5일, 10일, 15일, 20일, 30일 각각 시료를 채취하여 활성 변화를 측정하였다. 시간이 지남에 따라 변하는 활성을 바탕으로 세 가지 균주가 생산한 카탈라제 효소의 장기간 저장성을 검토하였다.

결과 및 고찰

카탈라제 생산 균주의 생화학적 특성

전라남도 벌교에서 토양을 채취하여 분리한 각각의 균주를 카탈라제 양성반응 여부를 테스트하여 채취한 토양으로부터 분리한 균주 중 카탈라제 양성반응을 보인 30여 가지 미생물을 분리하고 (Table 1), 상대적으로 높은 카탈라제 활성을 갖는 미생물 BKBChE-1, BKBChE-2, BKBChE-3은 TSB 고체배지에서 크림색의 콜로니를 형성하였고, 현미경상에서 형태학적으로 간균을 나타내었다. 전자현미경을 이용하여 균주의 형태를 관찰한 결과, 세 가지 미생물 모두 간균의 형태로 관찰되었다. *Bacillaceae* bacterium BKBChE-1이 *Bacillus* sp. BKBChE-2와 *Bacillus flexus* BKBChE-3에 비해 크기가 작은 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1(a)). 세 가지 중 그람 양성균이 1종, 그람 음성균이 2종 이었다 (Fig. 1(b)). 카탈라제와 옥시다제 시험에서 모두 양성반응을 나타내었고, 전분분해 시험에서는 모두 음성반응을 나타내었다. 운동성 시험에서는 세 가지 모두 양성반응을 나타내었다 (Table 2). BKBChE-1, BKBChE-2와 BKBChE-3 균주의 16S rDNA 염기서열을 분석하여 RDP 데이터베이스에 등록된 상동성이 높은 균주들과 유전자간의 상관성을 알아본 결과, BKBChE-1은 *Bacillaceae* bacterium과 가장 높은 상동성을 나타내었고 (Fig. 2(a)), BKBChE-2는 *Bacillus* sp.와 가장 높은 상관 관계를 보였으며 (Fig. 2(b)) BKBChE-3은 *Bacillus flexus*와 가장 높은 상동성을 나타내었으므로 (Fig. 2(c)), 스크리닝한 균주를 각각 *Bacillaceae* bacterium BKBChE-1, *Bacillus* sp. BKBChE-2와 *Bacillus flexus* BKBChE-3로 명명하였다. 세 가지 미생물이 생산한 카탈라제 활성을 측정한 결과 *Bacillaceae* bacterium BKBChE-1이 생산한 카탈라제는 약 75 Unit/mg protein의 활성을 가졌고, *Bacillus* sp.

BKBChE-2가 생산한 효소활성은 약 81.8 Unit/mg protein의 활성을 보였으며 *Bacillus flexus* BKBChE-3로부터 얻은 카탈라제는 약 86.8 Unit/mg protein의 활성을 나타내는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 본 실험 결과는 다른 연구 결과와 같이 Unit/mL 단위로 표기하면 약 320-400 Unit/mL의 활성으로 Costa 등 [21]이 바실러스로부터 얻은 카탈라제 활성이 약 300 Unit/mL인 결과와 비교하여 카탈라제 생산량이 우수함을 보여주는 결과이다.

Table 1. Catalase productivity of catalase-producing bacteria from soil

Strain No.	Catalase productivity	Strain No.	Catalase productivity	Strain No.	Catalase productivity	Strain No.	Catalase productivity
1	+	12	+	23	+	34	+
2	+	13	-	24	+	35	+
3	+	14	++	25	+	36	+
4	-	15	++	26	+	37	+
5	+	16	-	27	+	38	+
6	+	17	-	28	-	39	++
7	+	18	-	29	+	40	+
8	+	19	+	30	+	41	+
9	-	20	+	31	+	42	-
10	+	21	-	32	+		
11	+	22	+	33	+		

- : negative reaction.

+ : positive reaction.

++ : positive reaction (strong).

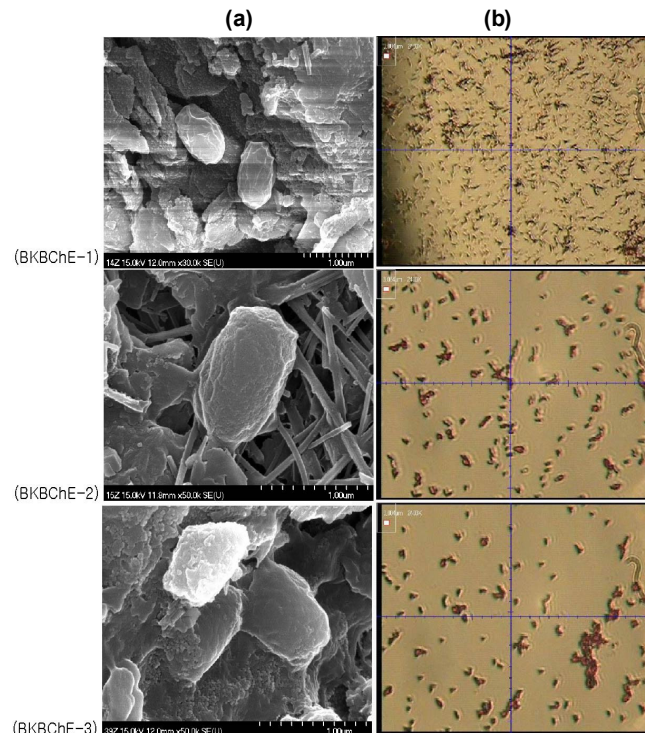


Fig. 1. Morphology of isolated strains. (a) FE-SEM, (b) optical microscope (2400 \times).

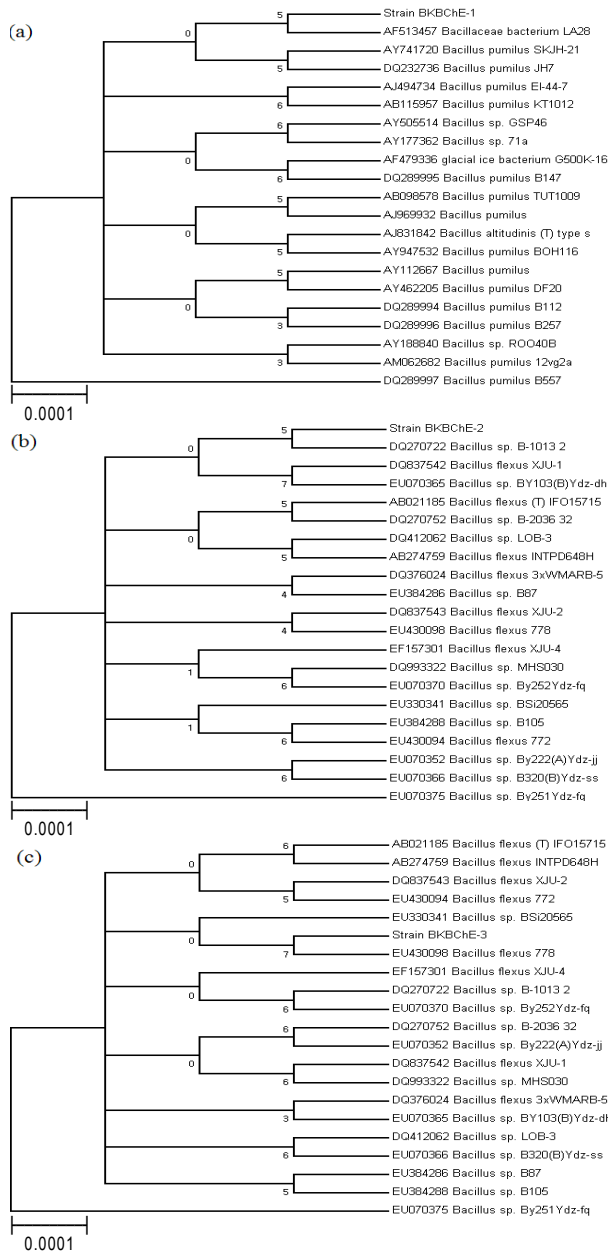


Fig. 2. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rDNA gene sequence indicating the position of isolated strains. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Jukes-Cantor method and are in the units of the number of base substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). Phylogenetic analyses were conducted in MEGA 4.0. (a) strain BKbChE-1, (b) strain BKbChE-2, (c) strain BKbChE-3.

Table 2. Morphological and physiological characteristics of the isolated strains

Characteristics	Isolated Strains		
	Strain No. 14	Strain No. 15	Strain No. 39
Colony size (cm)	0.1	0.3	0.25
Colony color	Cream	Cream	Cream
Colony margin	Circular	Circular	Circular
Gram staining	+	-	-
Shape	Rod	Rod	Rod
Motility	+	+	+
Catalase test	+	+	+
Aerobic growth	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+
Growth at 10°C	+	+	+
Growth at 40°C	+	+	+
Spore formation	+	+	+

+ : positive reaction, - : negative reaction.

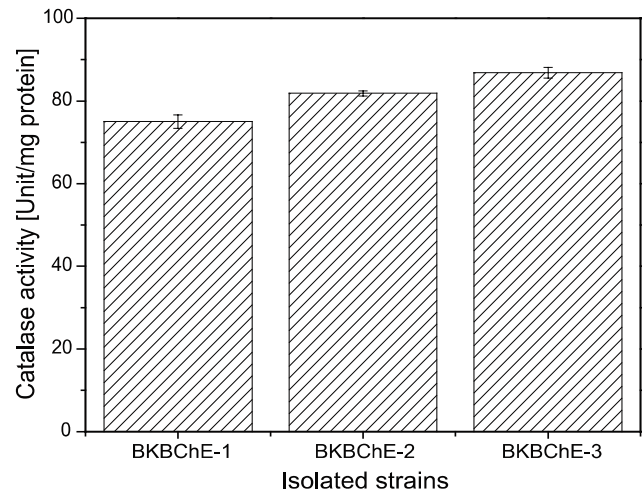


Fig. 3. Catalase activity from isolated strains.

온도가 카탈라제 효소에 미치는 영향

세 가지 균주가 생산한 효소 활성에 온도가 미치는 영향을 조사한 실험은 4°C에서 카탈라제 효소 활성을 100%로 환산하여 온도 변화에 따른 효소의 활성을 %로 환산하여 표기하였다. 각각의 결과는 3회 반복실험하여 얻은 값의 평균 활성과 표준 편차로 표기하였다. 세 가지 균주가 생산한 카탈라제 효소의 온도에 따른 활성은 온도가 증가함에 따라 점차 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 4). 이는 Costa 등 [21]의 보고에서 *Bacillus sp.*로부터 얻은 카탈라제에 온도가 미치는 영향성 실험에서 보여주는 것과 일치하는 반면, *Bacillaceae bacterium* BKbChE-1이 생산한 카탈라제 효소는 30°C에서 90% 가량의 활성을 유지하였고 40°C와 50°C에서 동일하게 80% 가량의 효소 활성을 보였으며, 60°C의 온도에서 카탈라제 활성이 약 48% 까지 유지되는 것을 확인하였다. *Bacillus sp.* BKbChE-2가 생산한 카탈라제 효소의 경우 30°C에서 활성이 90%, 40°C와

50°C에서 각각 70%, 65% 가량의 효소 활성이 유지되었고 60°C에서 약 48%로 *Bacillaceae bacterium* BKBChE-1이 생산한 효소와 비슷한 활성을 보였다. *Bacillus flexus* BKBChE-3이 생산한 효소의 경우 30°C에서 효소 활성이 90%, 40°C에서는 85%의 효소 활성이 측정되었으며, 50°C와 60°C에서는 각각 80%와 70%의 카탈라제 활성이 남아 있는 것을 확인하였다. BKBChE-1, BKBChE-2와 BKBChE-3이 생산한 카탈라제는 60°C의 온도조건에서 약 50% 가량의 효소 활성을 유지하는 것을 확인하였다. 이 결과는 Costa 등 [21]의 실험에서 60°C의 온도에서 카탈라제 효소 활성이 20% 가량 남은 결과와 비교할 때, 우수한 결과임을 확인할 수 있었고, 고온의 폐수 처리 조건에서 산업적으로 응용이 가능할 것으로 사료된다.

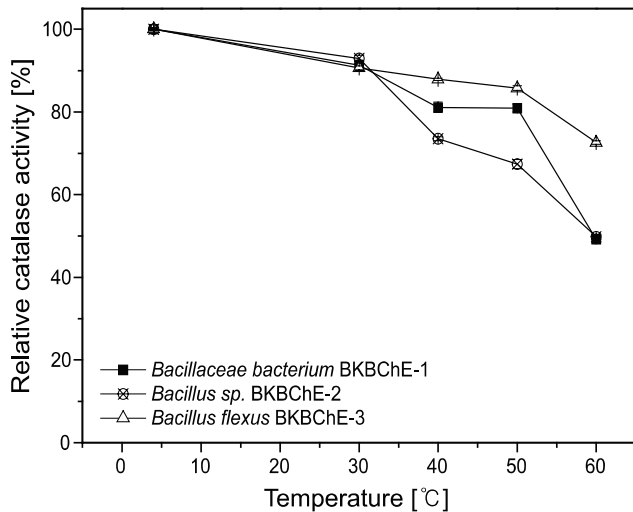


Fig. 4. Effects of temperature on the catalase activity of isolated strains. The maximum catalase activity was set to 100% as a reference.

pH가 카탈라제 효소에 미치는 영향

pH가 토양 미생물이 생산한 카탈라제 활성 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 미생물 배양하여 얻은 효소를 각각 pH 7.0에서 13.0까지의 범위에 해당하는 완충용액에 12시간 반응시킨 후 카탈라제 활성 측정에 사용하였다. 카탈라제 효소 용액은 pH가 7.0에서 13.0까지 증가함에 따라 점차 증가하다 감소하는 경향을 보였다. 세 가지 균주 모두 가장 높은 활성을 나타내는 pH에서 측정된 카탈라제 활성을 100%로 하여 상대적인 카탈라제 활성을 나타내었다. 각 실험 결과는 3회 반복실험을 통해 얻은 값의 평균 활성과 표준 편차로 표기하였다. *Bacillaceae bacterium* BKBChE-1이 생산한 카탈라제의 경우 pH가 증가함에 따라 점차 활성이 증가하여 pH 10.0에서 100%로 최대 활성을 보이는 것으로 관찰되었고, pH 11.0에서 70%의 활성을 보이다가 pH 13.0에서 효소의 카탈라제 활성은 40%로 관찰되었다. *Bacillus sp.* BKBChE-2가 생산한 효소 활성 실험에서는

pH 7.0부터 활성이 점차 증가하여 pH 9.0에서 100%의 활성을 보였고, pH가 증가함에 따라 효소 활성이 점차 감소하는 것으로 관찰되었고 pH 11.0에서 20%로 가장 낮은 효소 활성을 관찰하였다. *Bacillus flexus* BKBChE-3의 경우 pH가 증가함에 따라 효소 활성이 증가하여 pH 10.0에서 100%로 최대 활성을 보이고 pH 11.0에서 90% 활성을 보인다 점차 pH가 감소하여 pH 13.0에서 30% 가량의 카탈라제 활성을 확인하였다 (Fig. 5). 이들 실험 결과는 Kim 등 [19]이 수행한 *Bacillus licheniformis* DK42를 배양하여 얻은 셀룰라제와 자일라나제의 pH 영향성 연구에서 pH 7.0 이상의 알칼리 영역에서 점차 효소 활성이 감소하여 pH 9.0에서는 두 가지 효소의 활성 모두 20% 이하로 떨어진 결과와, Costa 등 [21]의 실험에서 *Bacillus sp.*가 생산한 카탈라제 효소는 pH가 증가함에 따라 점차 효소 활성이 감소하여 pH 12.0에서 활성이 거의 없는 것으로 관찰된 결과를 비롯하여 Yang 등 [9]의 연구에서 *Aspergillus niger*로부터 생산한 카탈라제가 pH 4-8의 영역에서 안정하다는 결과와 비교할 때, 본 연구에 사용된 미생물이 생산한 카탈라제는 pH 7.0이상의 알칼리 영역에서 효소 활성이 증가하는 것이 관찰되었고, pH 13.0에서도 20% 이상의 카탈라제 활성이 유지되는 것이 확인되는 것으로 보아 호알칼리 조건의 폐수 공정에서 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

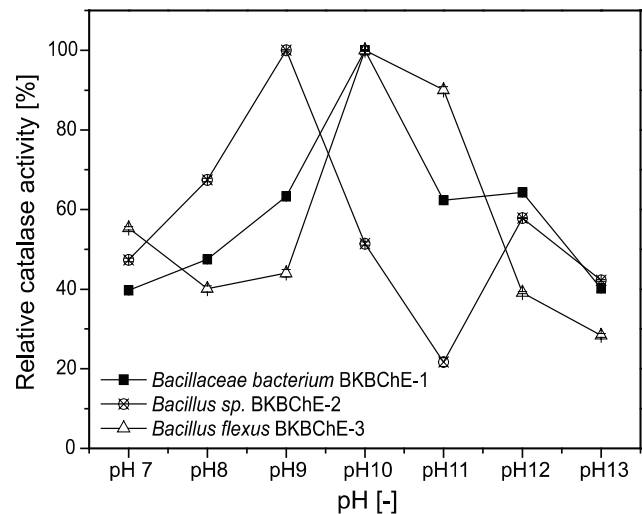


Fig. 5. Effects of pH on the catalase activity of isolated strains. The maximum catalase activity was set to 100% as a reference.

효소의 장기간 저장성 테스트

세 가지 균주가 생산하는 카탈라제의 장기간 저장성은 배양한 균주 상등액을 4°C에 30일간 보관하며 0일, 5일, 10일, 15일, 20일, 30일 각각 채취한 시료의 효소 활성을 측정하여 안정성을 관찰하였다. 효소 활성은 저장 시작한 시점을 활성 100%로 환산하여 시간이 지남에 따라 활성이 감소하는 것을 조사하였다. 각각의 결과는 3회 반복실험하여 얻은 값의

평균 활성과 표준 편차로 표기하였다. *Bacillaceae bacterium* BKbChE-1이 생산한 카탈라제의 경우 10일 경과 60%, 20일 경과 후 50%, 30일이 지나자 효소 활성 10% 가량으로 관찰되었다. *Bacillus sp.* BKbChE-2가 생산한 효소 활성의 경우, 10일이 지나자 45%, 20일과 30일은 각각 40%, 30%의 카탈라제 활성이 남아 있는 것을 확인하였다. *Bacillus flexus* BKbChE-3이 생산한 카탈라제는 10일이 지나 활성이 50%로 감소하였고, 20일이 지나 25% 가량의 효소 활성이 남아있었고, 30일이 지나자 효소의 활성이 거의 남아 있지 않았다 (Fig. 8). 세 가지 균이 생산한 카탈라제 효소의 4°C에서 장기간 저장 안정성은 Costa 등 [21]의 실험에서 4°C에서 카탈라제 활성이 14일 후 50%로 반감되는 결과와 비교하여 특별히 *Bacillaceae bacterium* BKbChE-1이 생산한 카탈라제 활성이 냉장 온도에서 보다 안정한 것으로 관찰되었다.

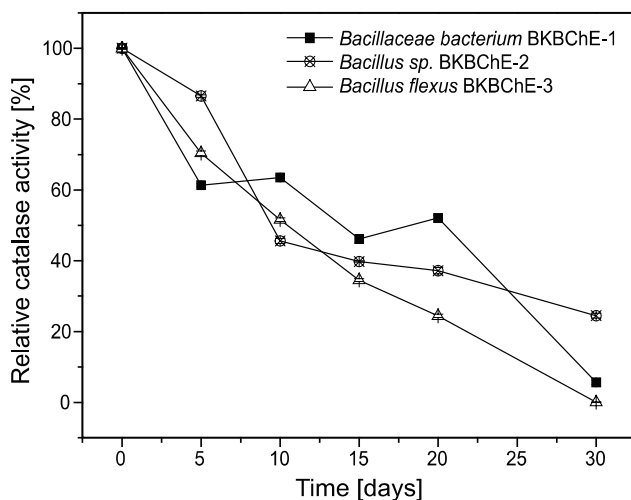


Fig. 6. Long-term storage test for catalases of isolated strains. The initial peak height was set to 100% as a reference.

요약

국내 토양 미생물로부터 효과적인 카탈라제 생산 미생물을 이용하기 위하여 전라남도 벌교 토양 시료로부터 카탈라제 생산량이 높은 균주 (BKbChE-1, BKbChE-2, BKbChE-3)를 분리, 생화학 실험과 전자현미경을 통한 균주의 형태 관찰 및 16S rDNA 유전자 서열분석 등을 통해 미생물을 동정하여 각각의 균주는 99% 이상의 상동성으로 *Bacillaceae bacterium* BKbChE-1, *Bacillus sp.* BKbChE-2, *Bacillus flexus* BKbChE-3로 명명하였다. 선별된 세 가지 균을 배양하여 얻은 카탈라제 효소의 온도와 pH 변화가 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 토양에서 분리한 세 가지 균주가 생산한 카탈라제 효소는 60°C 이상의 온도에서도 약 50% 가량의 활성을 유지, pH 7.0 이상의 알칼리 조건에서 pH가 증가함에 따라 활성이 증가하다 감소하는 경향을 보여 pH

13.0의 강한 염기 조건에서 약 20% 가량의 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 4°C에서의 장기 저장 안정성 실험에서는 *Bacillus flexus* BKbChE-3이 생산한 카탈라제를 제외하 나머지 두 가지 미생물이 생산한 카탈라제 활성 실험의 경우 20일이 지난 후에도 40% 이상의 활성이 유지되는 것을 조사하였다. 상기 결과는 세 가지 미생물이 생산한 카탈라제가 생산량의 측면에서 Costa 등 [21]이 바실러스로부터 얻은 카탈라제 활성의 결과와 비교하여 높은 카탈라제 활성을 보일 뿐만 아니라, Yang 등 [9]이 곰팡이로부터 얻은 카탈라제의 pH 실험 결과와 비교하여 보다 높은 알칼리 조건에서도 안정하여 그 활성이 우수함을 확인하였다. 이들 결과를 근거로 고온의 호알칼리 과산화수소 제거 공정에서 분리한 미생물 사용이 가능할 것으로 기대된다.

감사

이 논문은 지식경제부의 지방 기술 혁신 사업 (RTI04-03-03)과 post-BK21 사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 9월 15일, 게재승인 : 2009년 12월 25일

REFERENCES

1. Fierek, J. and A. Gromada (1997) Screening and mutagenesis of molds for improvement of the simultaneous production of catalase and glucose oxidase. *Enzyme. Microb. Technol.* 20: 344-347.
2. Jiang, Z. and B. Ooraikul (1988) Reduction of nonenzymatic browning in potato chips and french fries with glucose oxidase. *J. Food Proc Pres.* 13: 175-186.
3. Shaw, S., E. G. Blith, and A. D. Woyewoda (1986) Spoilage pattern of Atlantic cod fillets treated with glucose/gluconic acid. *Technol. J.* 19: 3-6.
4. Dondero, M., W. Egana, W. Tarkay, A. Cifuentes, and A. J. Torres (1993) Glucose oxidase/catalase improves preservation of shrimp (*Heterocarpus reedi*). *Journal of Food Science* 58: 774-779.
5. Murthy, M. R. N., T. J. Reid III, A. Sicignano, N. Tanaka, and M. G. Rossmann (1981) Structure of beef liver catalase. *J. Mol. Biol.* 152: 465-499.
6. Heo, B. O., D. C. Lee, and H. J. Shin (2003) Catalase production by membrane process for treatment of industrial wastewater containing hydrogen peroxide. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 18: 186-189.
7. Dwight, L. B. (1953) Production of catalase from mold. *US Patent* 2,605,069.
8. Hans, E. D. (1961) Method of extracting catalase from

- liver. *US Patent* 2,992,167.
9. Yang, H. S., H. C. Yang, and Y. Tani (1988) Catalase from *Aspergillus niger* KUF-04. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 16: 193-198.
 10. Bol, D. K. and R. E. Yasbin (1991) The isolation, cloning and identification of a vegetative catalase gene from *Bacillus subtilis*. *Gene* 109: 31-37.
 11. Cho, Y. H. and J. H. Roe (1997) Isolation and expression of the *catA* gene encoding the major vegetative catalase in *Streptomyces coelicolor* Muller. *J. Bacteriol.* 179: 4049-4052.
 12. Hassett, D. J., J. F. Ma, J. G. Elkins, T. R. McDermott, U. A. Ochsner, S. E. H. West, C. T. Huang, J. Fredricks, S. Burnett, P. S. Stewart, G. McFeter, L. Passador, and B. H. Iglewski (1999) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase gene and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* 34: 1082-1093.
 13. Hong, Y., J.-H. Kim, B.-H. Ahn, and S.-K. Cha (2000) The effects of low temperature storage and aging of *Jeot-kal* on the microbial counts and microflora. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 1341-1349.
 14. Gerhardt, P., R. G. Murray, E. R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips (1981) *Manual of Method for General Bacteriology*. 1st ed., PP. 135-154, Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.
 15. Cappuccino, J. G. and N. Sherman (2008) *Microbiology: a Laboratory Manual*. 8th ed., PP. 73-78. The Pearson Benjamin Cummings.
 16. Lim, Y.-S., S.-Y. Kim, and S.-K. Lee (2008) Characteristics of lactic acid bacteria isolated from kefir made of goat milk. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 28: 82-90.
 17. Joung, P.-M., K.-S. Lim, I. S. Lee, and S. J. Park (2001) Discovery of acid-tolerant epiphytic bacterial communities on plant leaves in the industrial area and the natural forest area based on 16S rDNA. *Kor. J. Microbiol.* 37: 265-272.
 18. Daniel, M. B. and J. E. Stuart (1991) *Protein Methods*. PP. 50-55. Wileyless, New York, USA.
 19. Kim, M. J., S. J. Lim, and D. -K. Kang (2008) Isolation of a *Bacillus licheniformis* DK 42 cellulase and xylanase and properties of the enzymes. *J. Anim. Sci. Technol. (Kor.)* 50: 429-436.
 20. Costa, S. A., T. Tzanov, A. F. Carneiro, A. Paar, G. M. Gübitz, and A. C. Paulo (2001) Immobilization of catalase from *Bacillus* SF on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme Microb. Technol.* 28: 815-819.
 21. Costa, S. A., T. Tzanov, A. F. Carneiro, A. Paar, G. M. Gübitz, and A. C. Paulo (2002) Studies of stabilization of native catalase using additives. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 387-391.