

단백질 분해효소 생산을 위한 해양 유래 *Bacillus* sp. TS0611의 탐색과 동정

장영부·최경임·홍유미·최종덕·최영준*
경상대학교 해양식품공학과 / 해양산업연구소

Screening and Identification of *Bacillus* sp. TS0611 from Marine Sediments for Protease Production

Young-Boo Jang, Gyeong-Lim Choi, Yu-Mi Hong,
Jong-Duck Choi and Yeung Joon Choi*

Department of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry,
Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

A bacterial strain was screened and identified from sea sediments in Tongyeong coastal area in order to obtain proteases or peptidase cleaving C-terminal of glutamic acid. Strain TS0611, which showed the highest activity from 5 isolated protease producing strains, was selected and its properties investigated. Strain TS0611 was a gram-positive rod, 1.2 μ m in cell length, catalase positive, motility-positive, melanin-negative and grew at 15~50°C, and hydrolyzed gelatin and casein. This strain was identified as *Bacillus thuringiensis* or *Bacillus cereus* based on results from the API system(API 50 CHB) which examined saccharides properties, fatty acid composition of cell wall, and 16S rRNA gene sequence.

Key words: Screening, Strain identification, *Bacillus* sp., Protease, Properties

서 론

Bacillus 속이 생산하는 단백질 가수분해효소에 대한 연구는 1960년대 말에 알칼리성 단백질 분해효소가 발견된 이후로 정제와 특성에 관한 많은 연구가 진행되고 있다 (Beg and Gupta., 2003; Chauhan and Gupta., 2004; Fu et al., 2008; Haddar et al., 2009). 특히 세제(Han and Damodaran., 1998; Beg and Gupta., 2003), 가수분해물의 제조 (Creusot and Gruppen., 2008), 새로운 효소 특성을 가진 효소의 개발 (Manni et al., 2008; Hua et al., 2008) 및 폐수처리 (Brar et al., 2009)에 응용하기 위해 활성과 안정성이 높은 새로운 균주 선별에 많은 노력을 기울여 왔다. 그러나 현재 상업용 단백질 분해효소로 사용하고 있는 Protamex, Neutrase, Alcalase를 포함한 다수의 단백질 분해 효소들은 기질 특이성이 분명하지 않기 때문에 가수분해물의 제조 시에 생성되는 펩티드의 특징을 예측하기 어렵다.

단백질 가수분해물의 기능성은 가수분해물의 분자량, 구성 아미노산의 종류, 하전 등에 영향을 받으며(Choi et al., 2009), 특히 glutamic acid를 포함하는 저분자 펩티드는 단백질 가수분해로 생성된 펩티드의 맛에 큰 영향을 미친다. Glutamic acid의 glucoconjugate들은 소고기 국물 맛을 내며 (Beksan et al., 2003), glutamic acid 잔기를 포함하는 저분자 펩티드인 Glu-Leu, Glu-Val 및 Glu-Cys-Ala은 국물에 지속적인 맛을 부여하고 (Dunkel et al., 2007), 대두 단백질 가수분해물과 L-glutamic acid의 합성은 맛과 소화능을 향상시킨다

(Yamashita et al., 1975). 단백질의 glutamic acid C-말단을 절단하는 효소로 *Staphylococcus aureus* V8 protease가 있으나 (Dunn (2000)) 고가여서 단백질 서열 결정용으로 사용할 뿐 식품용으로는 사용하지 않고 있으며, 시판하고 있는 glutaminase (Daiwa Kasei K.K., Japan)는 glutamine을 glutamic acid로 전환할 뿐 glutamic acid의 말단을 절단하지 못한다. 따라서 조미성 가수분해물의 제조를 위해서 glutamic acid에 대하여 선택적인 기질 특성을 가진 상업적 단백질 가수분해 효소 선별과 특성에 관한 연구가 필요하다.

본 연구는 해양생태계로부터 glutamic acid 잔기의 선택적인 절단 능력을 가진 단백질 분해효소를 생산하는 토착 균주를 얻기 위하여 실시하였으며, 우선적으로 균주를 선별하여 종을 확인하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

단백질 분해효소를 생산하는 균주의 탐색을 위해, 통영 및 거제 남해안 지역의 해수, 저질, 및 해조류를 이용하였다. 미생물 배양에 사용한 펩톤과 효모 추출물은 BD (Becton, Dickinson and Co., MD, U.S.A.)를 사용하였으며, 효소 반응을 위한 기질은 Hammersten casein (US12840, USB, U.S.A.)을 사용하였다. 단백질 정량과 효소 활성 측정을 위한 발색은 Folin-Ciocalteu's phenol (F9252, Sigma Chemical Co., MI, U.S.A.)로 하였고, 그 외 실험에 사용한 무기염류와 금속염들은 특급 시약을 사용하였다. *Bacillus*속 균주의 당 이용에 따른

*Corresponding author: yjchoi@gnu.ac.kr

특성을 동정하기 위해 API 50 CH 및 API 50 CHB/E Medium kit (BioMerieux Co., U.S.A.)를 사용하였다.

균주 분리 및 배양

해양으로부터 단백질 분해효소를 생산하는 균주를 탐색하기 위해 채취한 시료는 멸균한 Falcon tube에 옮겨 담아 즉시 밀봉하여 실험실로 운반하여 실험을 수행하였다. 시료 1 g 당 멸균 증류수 10 mL를 첨가하여 혼합한 후 5분간 방치하여 잔사를 침전시키고, 10^3 까지 희석하여 상등액 100 μ L를 전배양용 modified marine medium (MMM) 평판 배지에 도말하였다. 도말한 평판을 27°C의 항온기 (WIR-250, Daihan, Korea)에서 1-2주간 정치 배양하였으며, 생육한 균주를 1% casein (bovine milk grade, C-5890, Sigma Chemical Co., MI, U.S.A.)을 포함한 평판 배지에 접종하여 동일한 온도에서 3일간 배양하여 clear zone을 생성하는 균주를 1차 선별하였다. 2차 선별은 1차로 선별된 균주들을 전배양용 액체배지에 각각 접종하여 27°C, 180 rpm으로 24시간 진탕배양 (VS-8480SR, Vision, U.S.A.)하고, 원심분리 (7,000xg, 20 min, Supra 22K plus, Hanil Scientific Co., Daejeon, Korea)하여 균체를 제거한 다음 상등액을 조효소액으로 casein 분해활성이 가장 높은 균주를 최종 선별하여 TS0611로 명명하였다. 최종적으로 선별된 균주는 전배양용 액체배지에 접종한 다음, 항온 시간에 따른 균의 생육도와 효소 활성의 변화를 측정하였다. 본 배양은 본 배양용 액체배지에 전배양액 1%를 접종하여 위와 동일한 조건에서 18시간 동안 배양하였으며, 배양 시간은 48시간 동안 배양하면서 균주 성장과 효소활성을 측정한 예비실험의 결과에 따라 결정하였다. 본 배양액은 원심분리 (7,000xg, 20 min)한 후 상등액을 감압여과 (Glass microfibre filter, 0.45 μ m)하여 균체를 완전히 제거하고, 여과액을 조효소 용액으로 사용하였다.

균주의 분리와 전 배양을 위한 배지로서는 1 L의 인공해수 (NaCl 23.0 g, KCl 0.7 g, MgCl₂·6H₂O 10.6 g, CaCl₂ 1.1 g, Na₂SO₄ 3.9 g, NaHCO₃ 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.01g, Tris-HCl 6.05 g/L 증류수, pH 7.8)에 glucose 10 g, 펩톤 5 g, 효모 추출물 1 g, ammonium nitrate 0.0016 g, disodium phosphate 0.008 g을 첨가한 MMM 배지를 사용하였다 (Lee et al., 1997). 효소생산을 위한 본 배양에서는 1.0% glucose 대신에 1.5%의 starch soluble을 사용하였으며 (Puri et al., 2002), 고체 평판배지는 본 배양 조성에 2.0%의 agar를 첨가하였다.

분리균주의 형태적 동정

그람염색은 Benson의 방법 (1990)에 따랐다. 즉 MMM 고체 배지에 형성된 집락을 백금이로 슬라이드 글라스에서 멸균 생리식염수에 현탁한 후 그람 염색하여 광학현미경 (BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하여 촬영 (Digital Camera KY-F1030, JVC, Japan)하였다. 표준균주로는 그람 음성의 E. coli를 이용하였다. 분리균주의 외형 및 세포의 크기는 주사전자현미경으로 측정하였다. 즉 시료 고정액 (냉장 보관된 2.5% glutaraldehyde, 0.5 M sucrose in 0.1 M sodium cacodylate 완충

액(CdB)에 osmium tetroxide을 두 방울 첨가한 용액)과 시료 현탁액 (MA plate의 colony를 eppendorf tube에 넣고 증류수로 희석한 용액)을 1:1로 혼합하여 주사전자현미경 (S-2500, Hitachi, Japan)의 plate에 한 방울 놓은 후 실온에 1-2시간 방치하였다. 이 plate를 0.1 M CdB 가 포함된 0.25 M, 0.1 M, 0.05 M sucrose에 농도의 순서대로 세정한 후 15 분씩 방치하고 최종적으로 0.1 M CdB로 세정하였다. 세정한 주사전자현미경의 plate를 30%, 50%, 75%, 90% 및 95%의 ethanol에 각각 15분씩 탈수시켰다. t-Butylalcohol로 10분 동안 3회에 걸쳐 건조한 후 주사전자현미경의 plate를 1분 정도 액체절소에 넣어 동결건조 하였다. Plate를 시료대에 고정하고 진공증착기에 넣은 후 금박처리하여 주사전자현미경으로 촬영하였다.

분리균주의 생화학적 동정

분리균주의 catalase 활성은 일반미생물의 시험방법에 따라 측정하였으며, API system 동정은 API 50 CH와 API 50 CHB/E medium kit (BioMerieux Co., U.S.A.)를 사용하여 실시하였다. 즉 본 배양한 균체를 희석하여 CHB/E 배지에 접종하여 혼합하고, 현탁물을 API 50 CH kit의 49개 반응구에 각각 55 μ L씩 접종하여 37°C에서 배양하였다. 24시간과 48시간 배양 후의 결과는 kit manual에 따라 판정하였으며, 균주는 database (<http://apiweb.biomerieux.com>)를 이용하여 동정하였다.

세포벽 지방산 조성 분석

세포벽의 지방산은 Miller and Berger의 방법(1985)에 따라 추출하였다. 즉 뚜껑이 달린 시험관에 습균체와 알칼리 검화액(NaOH : methanol : 증류수, 15:50:50, v/v/v) 1 mL를 혼합하여 100°C의 가열 블록에서 5분간 가열시키고, 냉각한 후 혼합하여 다시 100°C에서 25분 동안 반응시켰다. 메틸화 시약(6 N HCl : methanol, 13:11, v/v) 2 mL를 첨가하여 80°C에서 10분간 반응시킨 후, 추출용 용매(hexane : tert-butylmethyl ether, 1 : 1) 1.25 mL를 첨가하여 10분간 추출하였다. 하층부의 물을 제거하고 1.2% NaOH 세정액 3 mL를 첨가하여 5분간 교반하고, 상등액의 지방산 조성은 gas chromatography (Ultra-2 capillary column, 25m × 0.20mm × 0.33 μ m, Aglient GC)로 분석하였다. MIDI (Microbial Identification System Software) system을 통해 지방산의 종류와 조성의 결과로 균주를 동정하였다.

종족 계통적 분석

16S rRNA 유전자 서열에 기초한 계통발생적 분석은 Katsuta et al.의 방법(2005)으로 수행하였으며, PCR thermal cycler (Takara, Japan)를 이용해 유전자를 증폭시켰다 (Orphan et al., 2001). 1.25 unit의 KOD Dash DNA polymerase (Toyobo, Japan), 5 μ L의 10 x PCR 완충액, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates, 각 50 pmol의 primer, 10 ng DNA 및 3차 증류수를 이용하여 최종적으로 50 μ L를 만들었다. PCR은 96°C에서 polymerase를 2 분간 활성화시켰으며, 95°C에서 15초, 50°C에서 15초, 74°C에서 15초로 35회 수행한 후, 마지막으로 74°C에서 2분간 증폭시켰다. PCR 산물의 유전자 서열은 BigDye terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, U.S.A.)를 사용하여 측정하였고, RDP-II release 9 (Cole et al.,

2005)에 적용하여 CLUSTAL_X (Thompson et al., 1997)을 통해 유전자 서열을 판독하였다.

종족 계통적 분석은 분리균주의 16S rRNA 염기서열을 토대로 *Bacillus* 속과 여러 유사 종들과의 유전적 상동성을 DDBJ blast를 통하여 배열하였다. Kimura two-para-meter model을 이용하여 유전자간의 거리를 기본으로 한 Neighbour-joining phylogenetic tree를 완성하였으며, 이 계통도는 neighbor-joining 방법을 사용하여 설계하였고, PHYML (version 2.4.4)를 이용하였다 (Kumar et al., 2004; Guindon and Gascuel, 2003).

효소 활성의 측정

효소 활성의 측정은 기질인 Hammersten casein의 가수분해 정도를 tyrosine 정량법으로 측정하였다 (Wrolstad, 2000). 즉 효소액 100 μ L를 40°C의 water bath에서 5분간 사전 항온하고, 1% 기질 용액 900 μ L를 첨가하여 같은 온도에서 60 분 동안 반응시킨 다음, 10% TCA 용액 1 mL를 첨가하여 효소반응을 중지시켰다. 원심분리 (10,000 rpm, 10 min, Eppendorf C5415-C, CE, German)하여 얻은 상등액 200 μ L와 0.55 M Na₂CO₃ 800 μ L를 혼합하고 15분 동안 방치한 후, 1.0 N Folin Ciocalteu's phenol 용액 200 μ L를 첨가하여 발색 30분 후에 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 단위는 효소액 1.0 mL가 1분당 생성하는 tyrosine 1 μ M을 1 unit으로 정의하였다. 단백질 정량은 Lowry et al.의 방법 (1951)에 따라 분광광도계 (UV-1700, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였으며, bovine serum albumin (A4503, Sigma Chemical Co., MI, U.S.A.)을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

단백질 분해효소 생산균주의 분리

단백질 분해효소를 생산하는 균주의 분리시료는 경남 통영시 산양면 인근의 수심 20 m의 해저토양을 사용하였다. 채집한 시료 1 g에 멸균된 증류수 10 mL를 첨가하고 혼합하여

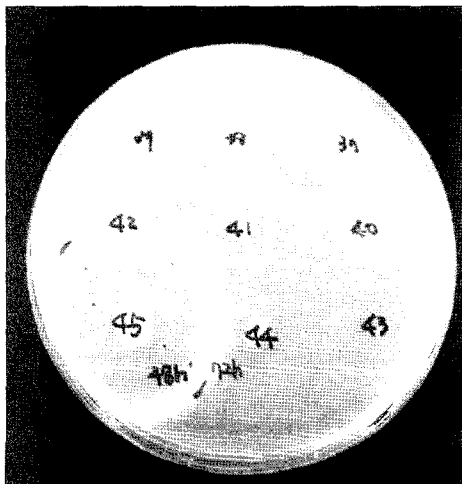


Fig. 1 Plate assay for protease produced by strain TS0611.

10분간 상온에 방치하고 상등액 100 μ L를 MMM 평판배지에 도말한 후 27°C의 incubator에서 1~2주간 정치배양하였다. 생육한 균주들은 1% casein을 포함한 MMM 평판 배지에 1 colony 접종하여 동일한 온도에서 3일간 정치배양하면서 clear zone을 생성하는 5균주 B1, C2, 37, 45 및 89를 1차 선별하였다 (Fig. 1). 1차 선별된 균주들을 전배양용 MMM 액체배지에 1 colony 접종하여 27 °C에서 180 x rpm으로 24시간 동안 진탕배양한 후 원심분리하여 상등액을 회수하였으며, 상등액을 조효소액으로 하여 casein 분해 활성을 확인하여 활성이 가장 높은 균주 45번을 단백질 분해효소 생산균주로서 최종 선별하였으며, TS0611로 명명하였다. 균주의 비성장 속도와 효소활성은 배양 15시간에 최대의 활성을 보였다 (Fig. 2). 최종 분리한 균주는 20%(v/v) glycerol을 첨가하여 -70°C의 냉동고에 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

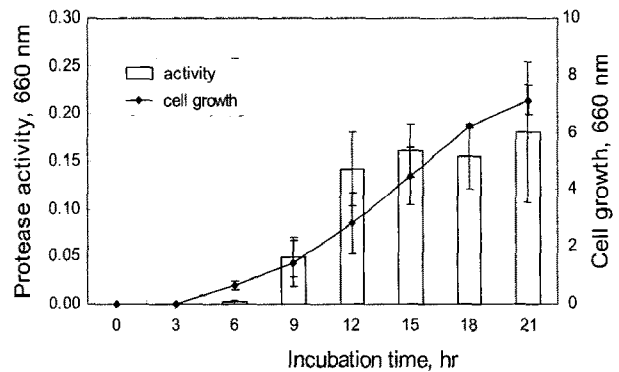


Fig. 2 Cell growth and protease activity with incubation time at 27°C.

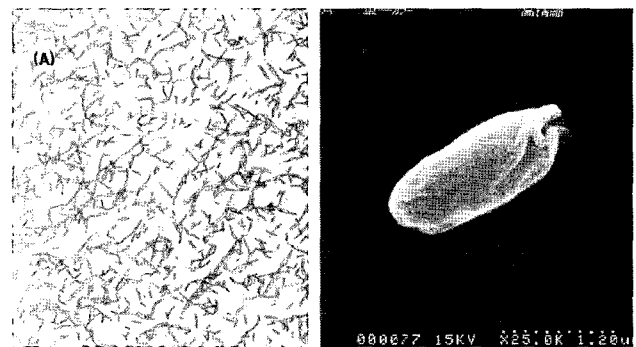


Fig. 3 Light micrograph (A, \times 400) and scanning electron microscopy (B, \times 1,500) of strain TS0611.

형태 및 생화학적 특성

분리한 45번 균주를 그람 염색 후, 전자현미경 상으로 400 배 확대하여 관찰한 결과, 전형적인 간균의 형태를 하고 있었으며(Fig. 3A), 세포의 크기는 1.2 μ m 이었다 (Fig. 3B). 분리한 TS0611 균주의 여러 생리생화학적 특성들을 조사한 결과 (Table 1), gram 양성 및 catalase 양성이었고 멜라닌 색소는 생성하지 않았다. 이 같은 결과는 전형적인 *Bacillus* 속의 특성을 보였다. 그리고 균체는 15-50°C에서 성장하였으며, casein과 gelatin을 분해하는 특성을 가지고 있었다.

Table 1. Morphological and physiological characteristics of strain TS0611

Characteristics	strain TS0611
Growth of cell(°C)	15-50
Gram staining	+
Shape of a cell	Rod
Length of cell (um)	1.2
Catalase	+
Motility	+
Melanin pigment	-
Casein hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+

Table 2. Biochemical characteristics of the strain TS0611 by API 50 CHB system

Test	Test	Test
1. Glycerol(b) +	17. Inositol(a)(b) +	33. Inulin -
2. Erythritol -	18. Mannitol -	34. Melezitose -
3. D-Arabinose -	19. Sorbitol -	35. D-Raffinose -
4. L-Arabinose -	20. α-Methyl-D-mannoside -	36. Starch(b) +
5. Ribose +	21. α-Methyl-D-glucoside -	37. Glycogen +
6. D-Xylose -	22. N-Acetylglucosamine +	38. Xylitol(b) -
7. L-Xylose -	23. Amygdaline -	39. β-Gentiobiose -
8. Adonitol -	24. Arbutin +	40. D-Turanose -
9. β-Methoxyxycloside -	25. Esculin +	41. D-Lyxose -
10. Galactose -	26. Salicin +	42. D-Tagatose -
11. D-Glucose +	27. Cellobiose +	43. D-Fucose -
12. D-Fructose +	28. Maltose +	44. L-Fucose -
13. D-Mannose(b) +	29. Latose -	45. D-Arabitol(b) +
14. L-Sorbose -	30. Melibiose -	46. L-Arabitol -
15. Rhamnose -	31. Sucrose(a),(b) -	47. Gluconate -
16. Dulcitol -	32. Trehalose +	48. 2-Ketogluconate -
		49. 5-Ketogluconate -

+, positive ; -, negative

The results suggested that the strain TS0611 was *Bacillus thuringiensis*.

분리 균주의 당에 대한 특성을 API 50 CH kit와 API 50 CHB/E kit로 측정하고 (Table 2), database (<http://apiweb.biomerieux.com>)를 통하여 동정한 결과 *Bacillus thuringiensis*와 *Bacillus cereus* 두 종이 동정되었다. *B. thuringiensis*와 *B. cereus*의 성질은 상당히 유사하며, *Bacillus* 속의 수많은 종들 중에서 가장 많이 보고된 종이 *Bacillus cereus* 종이기 때문에, *Bacillus* 속을 동정할 때, 유사성 및 우선순위가 높은 균주로 *B. cereus* 종이 동정되었다 (Miller and Berger, 1985; Kreig, 1989). 따라서 본 실험 결과에서도 두 종이 함께 동정된 것으로 추정되었다. *Bacillus thuringiensis* (ACTC 1033) 종 (Seong et al., 1992)과는 2개의 반응에서 상이 하였으나, *Bacillus cereus* (ATCC 11778) (Jin and Ryu, 1995)와는 7개의 반응구에서 TS0611 strain과 상이하였다. 이 같은 결과에 비추어 API 50 CHB kit를 이용한 strain TS0611의 생화학적 특성은 *B. cereus* 종 보다는 *B. thuringiensis* 종에 더 가까운 것으로 추정되었다.

세포벽의 지방산 조성

지질은 박테리아의 세포막의 주요한 구성인자로, 세포구조 및 기능에 중요한 역할을 담당한다. 세균 세포막의 주요 지질은 인지질이지만, 탄소골격이나 작용기 등에 다양한 분자종이 존재하므로, 세포막 지질은 세균 분류의 지표로 널리 사용하

Table 3. Composition of fatty acid of cell wall of the strain TS0611

Fatty acid	Composition(%)
12:0 ISO	1.44
12:0	0.65
13:0 ISO	8.96
13:0 ANTEISO	1.81
14:0 ISO	6.41
14:0	2.70
15:0 ISO	22.80
15:0 ANTEISO	5.92
15:0	0.57
16:1 w7c alcohol	1.26
Sum In Feature 2	3.78
16:0 ISO	8.53
16:1 wilc	0.46
Sum In Feature 3	9.02
16:0	5.76
15:0 2OH	0.75
ISO 17:1 w10c	2.77
ISO 17:1 w5	4.14
17:1 ANTEISO A	1.16
17:0 ISO	7.61
17:0 ANTEISO	1.78
17:0	0.44
16:0 2OH	0.47
18:0 ISO	0.39
18:0	1.08
Total	100.65

Table 4. 16S rRNA sequence of the strain TS0611

Score	1633 bits (824)
Expect	0
Identities	831/832 (99%)
Gaps	1/832 (0%)
Strand	Plus/Plus
Sequence	AGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGA CGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTA TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGAT GTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAC TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATG TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCCAGT GGCGAAGGCAGCTTTCTGGTCTGTAACGTGACTGAGGCG CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAG TCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTC CGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCT GGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGAC GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCA AGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCTTGACATCCTCTGAA AACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGAC AGGTGTCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTT GCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTGACTGCCGGTGACA AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC CTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACGGTACA AAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGG

Table 5 Similarity scores between *Bacillus* sp. TS0611 and the highly matched type strain identified by NJ analysis(Fig. 4)

Species	Accession	% Similarity	Definition	Source
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Z84593	99	<i>Bacillus thuringiensis</i> 16S rRNA gene, strain WS 2614.	Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 1373-1382, 1998
<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF178440	99	<i>Bacillus cereus</i> strain 1Re107 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	J. Appl. Microbiol. 104 (1), 91-104, 2008
<i>Bacillus thuringiensis</i>	EF432658	99	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain xjul-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	Unpublished
<i>Bacillus cereus</i>	EF095218	99	<i>Bacillus cereus</i> strain BNM0343 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	Unpublished
<i>Bacillus cereus</i>	EF178440	99	<i>Bacillus cereus</i> strain 1Re107 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	J. Appl. Microbiol. 104 (1), 91-104, 2008
<i>Bacillus</i> sp. CCBAU51490	EF377314	99	<i>Bacillus</i> sp. CCBAU 51490 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	Unpublished
<i>Bacillus</i> sp. MHS001	DQ993325	99	<i>Bacillus</i> sp. MHS001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	Soil Biol. Biochem. 39 (9), 2371-2379, 2007
<i>Bacillus cereus</i>	EF095218	99	<i>Bacillus cereus</i> strain BNM0343 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	Unpublished

고 있다 (Park et al., 2004). 분리균의 세포벽 지방산 조성을 gas chromatography로 분석하고 (Table 3), 분석 결과를 토대로 MIDI system을 이용하여 균주를 동정하였다. 지방산은 사슬의 길이 C12 - C17의 비율이 전체 지방산의 98% 이상을 차지하며, 사슬의 종류 중에서 이성질체 및 anteiso 형태가 전체의 50%를 넘어 전형적인 그람 양성 세균의 특성을 나타내고 있었다 (Seong et al., 1992). MIDI system 동정 결과는 API kit system의 동정 결과와 마찬가지로 *B. thuringiensis*와 *B. cereus*가 함께 동정되었다. *B. thuringiensis*와 *B. anthracis*의 지방산 조성을 비교할 때 약간의 차이는 있으나, *B. thuringiensis*와 *B. cereus* 및 *B. cereus* var. *mycoides*의 세포벽 지방산 조성이 유사하다고 보고하였으며 (Kaneda, 1968; Niskanen et al., 1978), *B. thuringiensis* (ATCC 35866, ATCC 35646) 두 종의 지방산 (Adams et al., 2005)과 본 실험에서 분리된 strain TS0611의 지방산 조성이 유사한 것에 미루어 생화학적 특성과 마찬가지로 본 균주는 *B. thuringiensis* 혹은 *B. cereus*일 것으로 추정하였다.

16S rRNA 염기서열분석 및 계통분류

분리된 균주의 더욱 정확한 동정을 위해 균주의 DNA를 분리하여 PCR로 증폭시켜 16s rRNA 염기서열을 분석하였다 (Table 4). 염기서열은 GenBank를 통해 다른 균주들과 유전자의 유사성을 추정하였으며 (Table 5), 분리한 strain TS0611은 *Bacillus thuringiensis* Z84593 (99%)와 EF432658 (99%) 및 *Bacillus cereus* EF095218 (99%), *Bacillus* sp. CCBAU 51490 (99%)들과 가장 가까웠으며, 다른 여러 종들과도 높은 유사성을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 분리한 strain TS0611은 최종적으로 *Bacillus* sp. 으로 동정하였다. 그리고 본 균주의 염기서열과 유사성이 가까운 종들과의 계통도를 작성한 결과

Bacillus sp. TS0611은 *B. cereus* 및 *B. thuringiensis*종과 가까운 거리에 위치하였다 (Fig. 4).

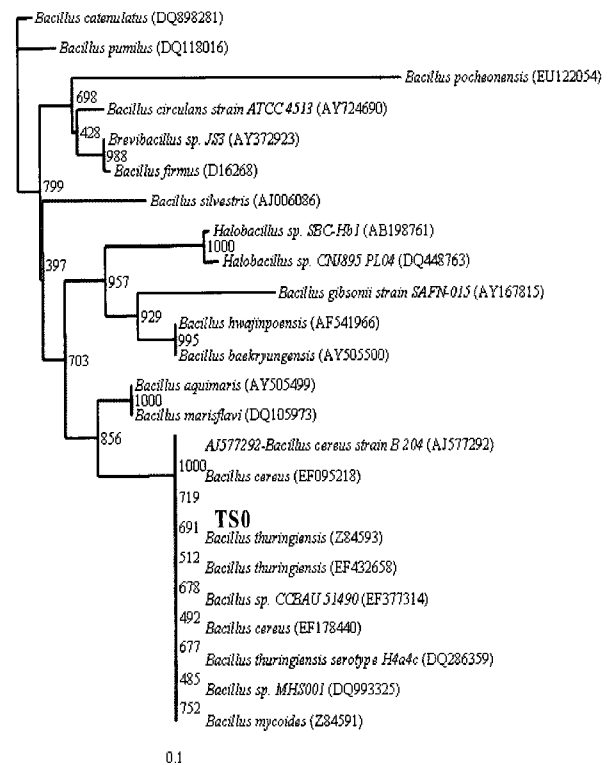


Fig. 4 A Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain TS0611. Numbers at nodes are percentage bootstrap values based on 1000 replications. GenBank/EMBL/DBJ accession numbers are given in parentheses. Bar, 0.1 substitutions per nucleotide position.

감사의 글

본 연구는 산업자원부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과임

참고문헌

- Adams D, Gurr S and Hogge J. 2005. Cellular fatty-acid analysis of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* commercial preparations. *J Agric Food Chem* 53, 512-517.
- Beg QK and Gupta R. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus. mojavensis*. *Enzyme Microbial Technol* 32, 294-304.
- Beksan E, Schieberie P, Robert F, Blank I, Fay SB, Schlichtherle-Cemy H and Hofman T. 2003. Synthesis and sensory characterization of novel umami-tasting glutamate glycoconjugates. *J Agric Food Chem* 51, 5428-5436.
- Benson HJ. 1990. A Laboratory manual in general microbiology. In: *Microbiological Application*. Wm C. Brown Publishers, Dubuque, IA, USA, 56-58.
- Brar SK, Verma M, Surampalli RD, Valero JR and Surampali RY. 2009. Entomotoxicity, protease and chitinase activity of *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater sludge with a high solids content. *Bioresource Technol* 100, 4317-4325.
- Chauhan B and Gupta R. 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochem* 39, 2115-2122.
- Choi Y, Hur JS, Choi BD, Konno K and Park JW. 2009. Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrokysates. *J Food Sci C17- C24*.
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang O, Kulam SA, McGarrell DM, Garrity GM and Tiedje JM. 2005. The Ribosomal Database Project(RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 33, D294-D296.
- Creusot N and Gruppen H. 2008. Hydrolysis of whey protein isolate with *Bacillus licheniformis* protease: Aggregating capacities of peptide fractions. *J Agric Food Chem* 56, 10332-10339.
- Dunkel A, Koster J and Hofmann T. 2007. Molecular and sensory characterization of γ -glytamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* 55, 6712-6719.
- Dunn MJ. 2000. Gel electrophoresis of peptides and proteins. In: *Peptide and protein drug analysis*, R E Reid, ed. Marcel Dekker Inc., New York, 387-451.
- Fu XT, You SG and Kim SM. 2008. Characterization of a salt-tolerant acid protease produced by *Bacillus megaterium* KLP-98 and its potential as fermentation starter for the manufacture of fish sauce *J Food Biochem* 32, 279-298.
- Guindon S and Gascuel O. 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52, 696-704.
- Haddar A, Bougatef A, Agrebi R, Sallami-Kamoun A and Nasri M. 2009. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21: Purification and characterization. *Process Biochem* 44, 29-35.
- Han X-Q and Damodaran S. 1998. Purification and characterization of protease Q: A detergent and urea-stable serine endopeptidase from *Bacillus pumilus*. *J Agric Food Chem* 46, 3596-3603.
- Hua Y, Jiang B, Mine Y and Mu W. 2008. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. nov. SK006 isolated from an Asian traditional fermented shrimp paste. *J Agric Food Chem* 56, 1451-1457.
- Jin SH and Ryu BH. 1995. Isolation and identification of a bacteriolytic enzyme producing bacterial strain from Pusan costal sea. *Kor J Appl Microbial Biotechnol* 23, 580-587.
- Kaneda T. 1968. Fatty acids in the genus *Bacillus*. *J Bacteriol* 95, 2210 - 2216.
- Katsuta A, Adachi K, Matsuda S, Shizuri Y and Kasai H. 2005. *Ferrimonas marina* sp. *Int J Syst Evolution Microbiol* 55, 1851-1855.
- Kreig NR and Holt JG. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. In: Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 2451-2492.
- Kumar S, Tamura K and Nei M. 2004. MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment, *Brief Bioinform* 5, 150-163.
- Lee HW, Kim BJ, Hwang SH and Kong JY. 1997. Isolation and identification of marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202 and optimal culture conditions for the production of agarase. *Kor J Biotechnol Bioeng* 12, 228-235.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

- Manni L, Jellouli K, Agrebi R, Bayouch A and Nasri M. 2008. Biochemical and molecular characterization of a novel calcium-dependent metalloprotease from *Bacillus cereus* SV1 Process. Biochem 43, 522-530.
- Miller L and Berger T. 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. In: Hewlett-Packard Application Note 228-248.
- Niskanen A, Kiutamo T, Raisanen S and Raevuori M. 1978. Determination of fatty acid compositions of *Bacillus cereus* and related bacteria Appl Environ Microbiol 35, 453 - 455.
- Orphan V, House J, Hinrichs CH, McKeegan KU and DeLong EF. 2001. Methane-consuming Archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis, Science 5592, 484-486.
- Park JS, Hwang KS and Chun JS. 2004. Experiments for screen and identification of microorganisms. In: World Science, Seoul, Korea, 127-143.
- Puri S, Beg QK and Gupta R. 2002. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. Current Microbiol 44, 286-290.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools Nucleic Acids Res 25, 4876-4882.
- Wrolstad RE. 2000. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. In: John Wiley & Sons, Inc. New York, U.S.A., Unit C2.2
- Yamashita M, Arai S, Kokubo S, Aso K and Fujimaki M. 1975. Synthesis and characterization of a glutamic acid enriched plastein with greater. J Agric Food Chem 23, 27-30.
- Seong HK, Lee WJ, Kim YH and Harm KJ. 1992. Studies on bacterial characteristics of *Bacillus cereus* group LS-1 isolated from Suyeong bay. Kor Jour Microbiol 30, 339-346.

2009년 8월 25일 접수

2009년 9월 22일 수정

2009년 10월 21일 수리