

## 제주 연안 퇴적층에서 분리된 미생물의 동정 및 단백질분해효소 특성

김만철 · 장태원 · 김주상 · 한용재 · Ramasamy Harikrishnan · 한송헌 · 오덕철<sup>1</sup> · 허문수\*

제주대학교 수산생명의학과, <sup>1</sup>제주대학교 생명과학과

Received February 27, 2009 / Accepted May 28, 2009

**Identification of Microorganisms Isolated from Jeju Coastal Sedimentary Layer and Characterization of Their Proteases.** Man-Chul Kim, Tae-Won Jang, Ju-Sang Kim, Yong-Jae Han, Ramasamy Harikrishnan, Song-Hun Han, Duck-Chul Oh and Moon-Soo Heo\*. *Department of Aquatic Life Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea, <sup>1</sup>Department of Life Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea.* - In this study, protease-producing bacteria were isolated from the marine sedimentary layer in coastal Jeju. We isolated 2 protease producing strains (SK-2 and SK-125) and tested their protease producing activities. Gram staining and BIOLOG of isolated strains revealed that strains SK-2 and SK-125 belong to *Bacillus* and *Pseudoalteromonas* families, respectively. The 16S rDNA nucleotide sequences analyses of the isolated strains showed 99% sequence homology with those of *Bacillus* sp. and *Pseudoalteromonas* sp.; therefore, the isolated strains SK-2 and SK-125 were named *Bacillus* sp. SK-2 and *Pseudoalteromonas* sp. SK-125, respectively. The optimum conditions for the cell growth of protease activities were obtained when the both isolates were cultured at 30°C, 96 hrs and pH 7~8.

**Key words :** Protease, marine sedimentary layer, *Bacillus* sp., *Pseudoalteromonas* sp.

### 서 론

육상시설을 이용하는 양식은 날씨나 해황 변동의 영향을 직접 받지 않는다는 이점이 있어 1970년대 후반부터 보급되기 시작하였다. 이러한 육상수조식 양식산업이 지역경제의 성장과 수산업 발전에 기여하는 바가 큰 것이 사실이지만 양식장 배출수에 의한 연안 환경오염문제 또한 중요한 문제로 대두되고 있다.

또한 육상 어류 양식장의 배출수는 인접한 연안으로 유입되어 수질 악화를 초래한다[1]. 특히 생사료를 주로 이용하는 우리나라의 넙치 육상 수조식 양식장의 배출구에서 회수되는 배출물의 양은 양식어의 크기 및 양식장의 규모에 따라 다소의 차이가 있으나, 대부분의 배출물은 양식어류가 섭이하고 남은 잔류 생사료이며, 탄수화물이나 지방에 비해 단백질 함량이 높은 것이 특징이다[11]. 이러한 문제점을 개선하기 위하여 최근 제시되고 있는 퇴적물 정화 방법으로는 경운, 준설, 석회살포, 모래복토, 만구개광 등의 물리화학적 방법, 저서 미생물을 이용하는 생물공학적 방법 등이 알려져 있으나, 현실적으로 크게 실용화되지는 못하고 있는 실정이다[12,18].

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 pro-

tease, cysteine protease 등으로 구분되어지며, 작용 pH에 따라 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 분류된다[2].

Protease는 식품산업, 피혁산업, 제제산업, 환경정화산업 및 제약산업 등 여러 산업분야에 널리 사용되고 있다[5,10].

단백질분해 세균의 경우, 우유단백질의 대부분을 차지하는 카제인을 세포벽에 부착된 cell-envelope proteinase에 의해 분해하여 여러 가지 크기의 peptide로 만들고 이들 세균들의 transport system에 의해서 세포내로 이동된 다음, 세포내 peptidase들로 분해하여 이용된다고 보고되었다[3,7,16,17,19].

산업적으로 유용한 protease는 방선균, *Bacillus*, 곰팡이 등 다양한 미생물로부터 발견되었고, 최근에는 새로운 화학적 물리적 조건에 맞는 protease를 산업적으로 이용하기 위해 다양한 서식지로부터 미생물들이 분리되고 있다[4,8]. 일반적으로 육상에서 분리된 미생물이 생산하는 효소는 높은 염분 조건에서 활성을 잃어버리게 됨으로 산업적 이용에 문제가 된다[13]. 따라서 양식장 배출수의 퇴적층은 고농도의 염을 포함하고 있기 때문에 고염에서도 작용하는 단백질 분해효소가 필요하다. 이러한 문제는 호염성 미생물로부터 필요로 하는 효소를 분리함으로써 해결될 수 있다.

따라서 본 연구에서는 제주도 육상수조양식장의 밀집지역을 중심으로 배출수가 배출되고 있는 곳의 퇴적층으로부터 단백질 분해에 관련된 미생물을 탐색하여 차후 미생물의 생태적 지위를 파악한 후, 친환경적 및 산업적인 이용가능성을 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-756-3493

E-mail : msheo@cheju.ac.kr

## 재료 및 방법

### 균주의 분리

본 연구에 사용된 균주는 제주도 양식장 배출수 연안에 형성된 퇴적층으로부터 분리되었으며, 멸균된 모종삽을 이용하여 멸균 위생팩에 시료를 넣어 채집 후, 4°C를 유지하면서 실험실로 운반하여 실험에 이용하였다. 채집된 퇴적층 1 g을 멸균해수 9 ml에 넣고 충분히 섞어준 후, 이 시료를 원액으로 하여 10배씩 10차례 희석하여 6-9회차 희석액을 각각의 멸균된 배지에 100 µl 씩 접종하고 25°C에서 7일간 배양하였다.

중속영양세균의 분리 및 배양은 Marine agar (MA; Difco, USA)배지, 성장속도가 느린 세균의 배양은 R2A agar (Difco) 배지, 영양이 풍부한 일반적인 배지로 일반세균의 배양을 Nutrient agar (NA; Difco)배지, 효모, 곰팡이 또는 내산균의 배양은 YM agar (Difco) 배지를 사용하여 균주를 분리하였다.

### 단백질 분해 효소 생산 미생물 분리

높은 단백질 분해효소를 생산하는 균종을 분리할 목적으로 연안 퇴적층에서 분리된 200균주를 이용하여 단백질 분해능 측정 실험에 이용하였다.

본 실험의 경우 skim milk agar 배지(skim milk 5 g/l, bacto tryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, bacto agar 15 g/l)를 멸균해수를 이용하여 제조한 후, 각각의 분리된 균종을 백금이틀 이용하여 도말하고, 25°C 배양기에서 48시간 동안 배양하여, extracellular protease에 의해 분해되어 형성된 투명한 (Clear zone or halo)을 보이는 균주를 분리하여 본 연구에 이용하였다. 또한 본 균주의 보관을 위하여 멸균된 glycerol stock solution을 사용하여 냉동 보관하였으며, 실험은 extracellular protease의 활성유지를 위해 skim milk 배지에서 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

### 분리균주의 BIOLOG system 분석

분리균주의 생화학적 특성 분석은 3% KOH를 이용하여 간 이그람동정을 한 후, BIOLOG사(Biolog Inc., USA)의 GN2, GP2 Plate를 이용하여 95가지의 기질이용 특이성을 시험하였으며, 분석은 MicroLog™ system (release 4.05) program을 이용하였다.

순수 분리된 균주를 BUGM (Biolog Inc., USA) 사면배지에 접종하여 30°C에서 48시간 배양 한 후, 현탁하여 탁도계 (Biolog 21907, USA)를 이용하여 균주 현탁액을 각각 GP2의 경우 20%, GN2의 경우 52~59%가 되도록 조절한 후, GP2와 GN2 Micro plate의 각 well에 150 µl 씩 접종하여 30°C에서 24시간 배양 후, 보라색을 발색되는 well을 양성으로 판정하였다.

이때 현탁액은 NaCl 150 g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 51 g, KCl 3.7 g을 증류수 912 ml에 녹인 MCS stock solution [14]을 증류수

로 10배 희석한 후, 멸균하여 사용하였다.

### 효소생산 균주의 16S rDNA 염기서열 분석

분리 균주의 동정을 위해 16S ribosomal DNA 염기서열을 이용하였으며, 16S rDNA 유전자 단편을 PCR 반응으로 증폭하여 염기 서열을 결정하였다. PCR 반응에 사용된 primer는 27F (forward primer; AGAGTTTGATCTGGCTCAG)와 1492R (reverse primer; GGTTACCTTGTTACGACTT)를 사용하였고, ABI 3730XL capillary DNA Sequencer를 이용하여 sequencing분석을 하였으며, 염기조성, 상호비교(pairwise comparisons)를 위한 염기치환 양상 및 각 개체 · 개체군의 유전자 차이는 MEGA 3.0 프로그램으로 계산되었으며, 미생물 군집 분석에 이용된 계통수는 distance 방법으로 MEGA 3.0 [6] 프로그램의 Pair-distance를 이용하여 작성하였다. 결정된 염기서열을 NCBI BLAST를 이용하여 GenBank에 보고된 균주와의 상동성을 조사하였다. 또한 GenBank에 분리균주의 염기서열을 등록한 후, Accession Number를 각각 부여 받았다.

### 단백질분해 효소 생산 미생물의 온도별 성장 측정 및 Protease 활성 측정

단백질 분해능이 확인된 균주를 Marine broth (MB, Difco)에 액체 배양 후, 각각의 시간대별로 균주 배양액을 1 ml 씩 취한 후, 분광광도계를 이용하여 660 nm에서 성장도를 측정하였다.

온도별 성장도 및 효소활성을 측정하기 위하여 분리 시 사용되었던 Marine agar의 액체배지를 기본배지로 Marine broth (MB, Difco)를 사용하였으며, 20°C, 30°C, 40°C 배양조건 하에서 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96시간 동안 각각 660 nm에서 흡광도로 측정하였으며, protease활성을 측정하기 위하여 각 온도별로 배양 후, 시간대별로 배양액을 9,600× g에서 3분간 원심 분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

분리된 균주의 Protease 활성은 Anson 방법을 변형하여 측정하였다[15]. 즉, 조효소액에 기질로 Azocasein (Sigma. Co. USA)을 50°C에서 10분간 반응시키고, 0.44 M TCA를 첨가하여 반응을 정지시키고 8,000× g에서 원심분리 후, 시판되는 Folin reagent 시약을 3배 희석한 후, 첨가하여 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성은 조효소액 1 ml가 1분 동안 1 µg의 Tyrosine을 생성할 때를 1 Unit으로 하였다. 단백질 정량은 Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry법[9]에 따라 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 단백질 분해 효소 생산 미생물 분리 및 동정

제주 연안 퇴적층에서 MA배지, R2A Agar배지, NA배지, YM Agar배지를 사용하여 총 200여 균주를 분리하였으며, 분

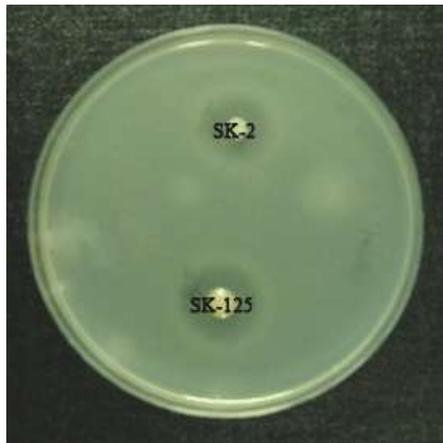


Fig. 1. Photos of protease producing bacteria by using skim milk agar plates (SK-2, SK-125).

리된 균주를 이용하여 Skim milk가 함유된 평판 배지에서 투명환을 형성하는 균주를 재 분리하였고, 가장 활성이 좋은 균주를 각각 SK-2, SK-125로 명명하였다(Fig. 1).

분리 균주 SK-2, 및 SK-125의 생화학 특성을 조사한 결과를 Table 1과 Table 2에 나타내었다. SK-2균주의 경우 그람 양성균으로 판명되었으며, 생화학적 특성을 확인해 본 결과 Glycerol, D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate,  $\alpha$ -Cyclodextrin,  $\beta$ -

Cyclodextrin, Arbutin, Maltose, Palatinose, Turanose, Dextrin, D-Cellobiose, Maltotriose, Glycogen, D-Fructose, D-Mannitol 등의 탄수화물에 대한 대사활성을 확인하였으며, *Bacillus* 속 균주들과 가장 유사한 결과를 보였다(Table 1).

또한 분리균주 SK-125는 그람 음성균으로 판명되었으며, 생화학적 특성을 확인해 본 결과 Table 2와 같이 Dextrin, Arbutin, D-Cellobiose, D-Fructose, Maltose, Glycerol, Salicin D-sorbitol, Sucrose, D-Trehalose, Turanose 등의 탄수화물에 대한 대사활성을 확인하였다(Table 2).

리보솜 RNA (rRNA)는 전 생물에 보편적으로 존재하는 보존성이 높은 핵산분자이며, 미생물의 진화계통의 연구에 가장 유용한 분자마커로 이용되고 있다. 특히 범용성이 높은 분자는 small subunit rRNA (SSU rRNA)로서 분류에 이용되는 16S 및 16S유사(18S) rRNA가 이에 속한다. 현재 미생물의 분류체계는 SSU rRNA의 정보를 근거로 재구축되어 있으며, 이 방법은 미생물 분류학에 필수적인 것으로 인식되기에 이르렀다. 특히, 미지의 분리균주의 계통학적 위치를 알기위한 최초의 실험단계에서 SSU rRNA 분석은 필수적이다.

분리균주 SK-2, 및 SK-125의 16S rRNA PCR 증폭을 통해 얻은 염기서열을 National Center Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 수행한 결과 분리균주 SK-2는 *Bacillus licheniformis*와

Table 1. Biochemical characteristics of isolation strain tested by BIOLOG (SK-2)

A1 Water	A2 $\alpha$ -Cyclodextrin	A3 $\beta$ -Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween40	A9 Tween80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	A12 Amygdalin
-	+	+	+	+	-	-	+	±	±	±	±
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 $\alpha$ -D-Glucose	B12 m-Inositol
±	-	+	+	+	-	±	-	+	±	+	+
C1 $\alpha$ -D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 $\alpha$ -Methyl-D-Galactoside	C10 $\beta$ -Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside
-	±	+	+	+	+	-	±	-	-	+	±
D1 $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	D2 $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D-Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Starchyose	D12 Sucrose
+	-	+	+	±	-	-	+	±	+	-	+
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turanose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 $\alpha$ -Hydroxybutyric Acid	E8 $\beta$ -Hydroxybutyric Acid	E9 $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid	E10 p-Hydroxy-Phenyl aceticAcid	E11 $\alpha$ -Ketoglutaric Acid	E12 $\alpha$ -Ketovaleric Acid
-	+	+	-	-	±	-	-	-	-	-	±
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvatic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-Methyl Eser	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succine amic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
-	-	-	-	+	+	±	-	+	-	-	-
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl-L-Glutamic Acid	G8 Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
-	-	±	±	+	+	+	±	+	-	+	+
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenocine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 $\alpha$ -D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate
-	±	+	+	±	-	-	-	-	-	-	+

Symbols: +, Positive; -, Negative; ±, Weak positive.

Table 2. Biochemical characteristics of isolation strain tested by BIOLOG (SK-125)

A1 Water	A2 α-Cyclodextrin	A3 β-Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween40	A9 Tween80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	A12 Amygdalin
-	-	-	+	±	-	-	-	-	+	-	+
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 α-D-Glucose	B12 m-Inositol
-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
C1 α-D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 α-Methyl-D-Galactoside	C10 β-Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 α-Methyl-D-Glucoside
-	-	+	+	+	±	-	-	-	-	±	+
D1 β-Methyl-D-Glucoside	D2 α-Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D-Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Starchyose	D12 Sucrose
-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turannose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 α-Hydroxybutyric Acid	E8 β-Hydroxybutyric Acid	E9 γ-Hydroxybutyric Acid	E10 p-Hydroxy-Phenyl acetic Acid	E11 α-Ketoglutaric Acid	E12 α-Ketovaleric Acid
-	+	+	-	-	±	-	-	-	-	-	-
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvatic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-Methyl Eser	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succine amic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
-	-	-	-	-	±	-	-	+	-	-	-
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl-L-Glutamic Acid	G8 Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
±	-	-	-	±	+	-	-	-	-	-	+
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenocine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 α-D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L-α-Glycerol Phosphate
+	-	±	+	+	-	±	+	-	+	+	+

Symbols: +, Positive; -, Negative; ±, Weak positive.

*Bacillus subtilillus*와 99%의 유전적 상동성을 보였다. 최종적으로 분리균주 SK-2의 생화학적 및 유전학적 특성에 따라서 *Bacillus* sp. SK-2라고 명명하였다(Fig. 2). 또한, GenBank로부터 Accession Number를 FJ595987로 부여받았다.

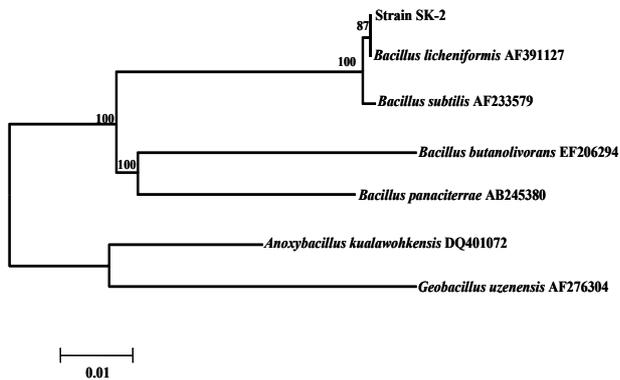


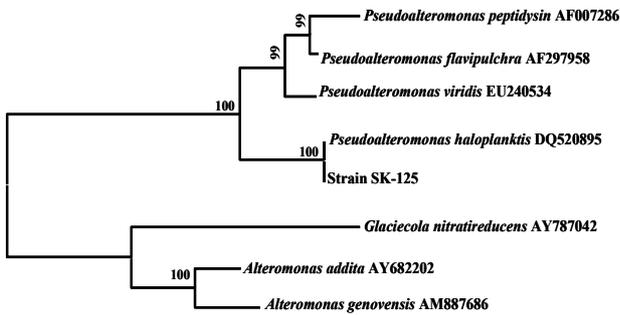
Fig. 2. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain SK-2 and member of the *Bacillus* sp.. Numbers at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled database. *Anoxybacillus kualawohkensis* DQ401072, and *Geobacillus uzenensis* AF276304 were used as an outgroup. Bar, 0.01 represents nucleotide substitution per position.

분리균주 SK-125는 *Pseudalteromonas haloplanktis*와 99%의 유전적 상동성을 보였으며(Fig. 3), 생화학적 특성 및 유전학적 특성을 기초로 하여 최종적으로 *Pseudalteromonas* sp. SK-125라고 명명하였으며, GenBank로부터 Accession Number를 FJ595988로 부여받았다. 분리된 단백질분해균주들의 염기서열 정보들은 NCBI에서 확인할 수 있다.

배양 온도에 따른 균 생육도 및 효소 활성의 영향

균주 *Bacillus* sp. SK-2와 *Pseudalteromonas* sp. SK-125의 증식을 위한 최적 배양온도를 확인하고 증식온도에 따른 단백질 분해 효소 활성의 변화를 조사하였다. 이를 위하여 20°C에서 40°C까지 10°C간격의 배양온도에서 배양하여 균체의 증식을 확인하였으며, 균주의 배양액을 이용하여 단백질분해 효소의 활성을 조사하였다.

*Bacillus* sp. SK-2균주는 초기 배양온도가 20°C에서의 배양의 경우 24시간의 유도기를 거친 후, 대수 증식기로 접어들어 72시간대에 가장 높은 미생물 생장을 보였으며, 72시간 이후에는 정체를 거쳐 사멸기에 접어드는 것으로 나타났다. 하지만, 30°C와 40°C에서의 배양의 경우는 유도기가 6시간으로 20°C에서의 배양 보다 4배 빠르게 나타났으며, 대수증식기의 경우 30°C에서는 24시간에 최대 증식을 보였으나, 40°C에서의 배양에서는 48시간에 최대 증식을 보였다, 따라서 *Bacillus* sp.



0.01

Fig. 3. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain SK-125 and member of the *Pseudoalteromonas* sp.. Number at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled database. *Glaciecola nitratreducens* AY787042, *Alteromonas addita* AY682202, and *Alteromonas genovensis* AM887686 were used as an outgroup. Bar, 0.01 represents nucleotide substitution per position.

SK-2균주의 경우 30°C에서의 배양에서 가장 빠른 증식을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 4).

*Pseudoalteromonas* sp. SK-125균주는 배양온도가 20°C의 경우 48시간의 유도기를 거친 후, 대수 증식기로 접어들어 72시간 이후에 정체를 거쳐 사멸기에 접어드는 것으로 나타났다. 하지만, 30°C와 40°C의 경우 유도기가 6시간으로 20°C에서의 배양 보다 8배 빠르게 나타났으며, 대수 증식기의 경우 30°C배양의 경우 24시간에 최대 증식을 보였으며, 40°C에서의 배양의 경우 48시간에 가장 활발한 증식을 보였다. 따라서, SK-125의 경우 40°C에서의 배양에서 가장 빠른 증식을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 5).

분리균주 *Bacillus* sp. SK-2와 *Pseudoalteromonas* sp. SK-125의 배양시간에 따른 효소활성의 변화를 Fig. 6와 Fig. 7에 각각 나타내었다. *Bacillus* sp. SK-2 균주의 경우, 20°C의 배양실험구에서는 배양시간의 증가에 따른 효소활성의 변화가 거의 나타

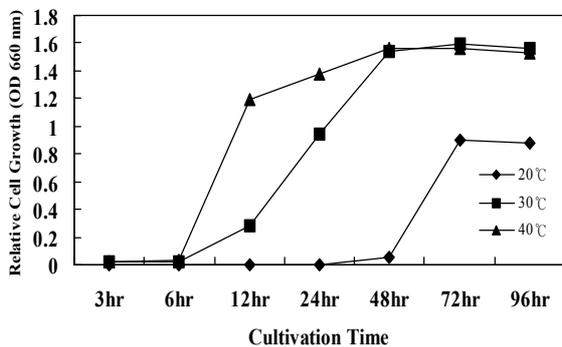


Fig. 4. Effect of temperature in Marine broth medium on the cell growth of strain *Bacillus* sp. SK-2.

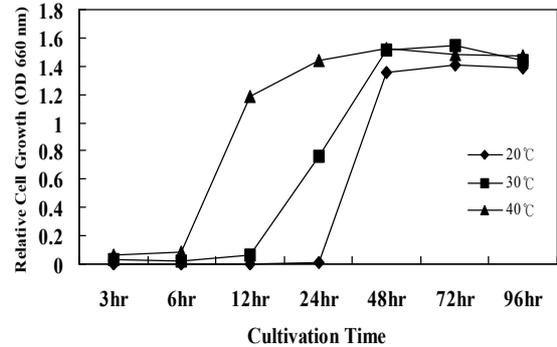


Fig. 5. Effect of temperature in Marine broth medium on the cell growth of strain *Pseudoalteromonas* sp. SK-125.

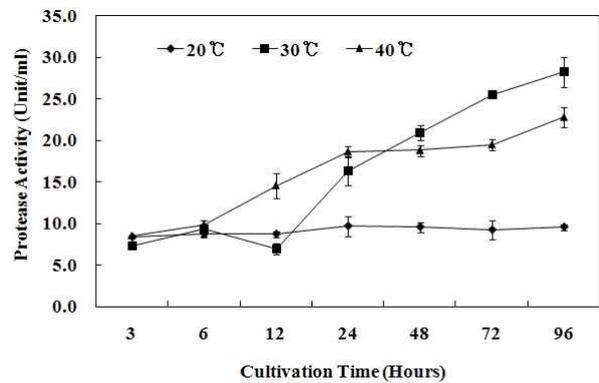


Fig. 6. Effect of temperature on bacterial growth and activity of *Bacillus* sp. SK-2 produced enzyme by the 96 hours culture in Marine Broth.

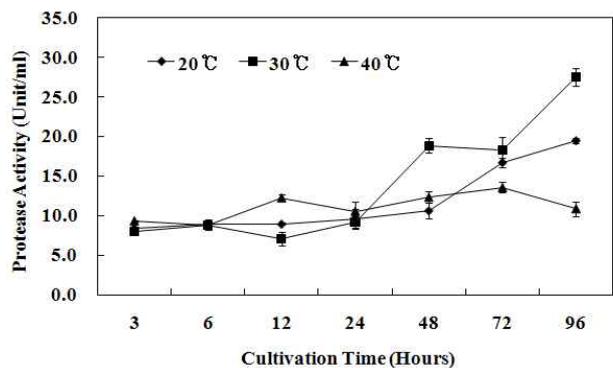


Fig. 7. Effect of temperature on bacterial growth and activity of *Pseudoalteromonas* sp. SK-125 produced enzyme by the 96 hours culture in Marine Broth.

나지 않았으나, 30°C와 40°C의 실험구인 경우는 시간의 흐름에 따라 효소활성 또한 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 40°C의 배양실험구에서는 6시간 이후에 효소활성이 서서히 증가하다가 96시간대에 최고의 활성을 보였으며, 30°C의 배양실험구에서는 12시간까지 효소활성이 거의 변화가 없었지만, 12시간 배양 이후부터 효소활성이 급격히 증가하다가 96시간대에는 최고 활성을 보였으며, 20°C 및 40°C의

배양실험구보다 높은 효소활성을 나타내었다(Fig. 6). 이는 분리균주 *Bacillus* sp. SK-2가 30°C에서 최고 생육도를 나타내는 것과 비례하여 높은 단백질분해활성을 나타내는 것으로 확인되어, 차후 30°C를 기준으로 하여 좀 더 명확한 최적배양온도를 확인할 필요성이 있다고 사료된다.

*Pseudoalteromonas* sp. SK-125의 배양시간에 따른 효소활성을 Fig. 7에 나타내었다. 40°C의 배양실험구에서는 12시간 이후에 효소활성이 증가하였으나, 이후 배양시간이 길어져도 효소활성의 변화가 거의 일어나지 않았다. 20°C의 배양실험구의 경우, 48시간 배양 이후부터 효소활성이 증가하는 양상을 나타냈으며, 30°C의 실험구에서는 72시간 이후부터 높은 효소활성을 보였으며, 96시간에 가장 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과로 비추어볼 때 본 분리균주 *Pseudoalteromonas* sp. SK-125는 최적 생육온도가 효소활성에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 결과적으로, *Bacillus* sp. SK-2와 *Pseudoalteromonas* sp. SK-125 균주는 모두 30°C의 배양에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다.

## 요 약

제주도 양식장 배출수 퇴적층에서 단백질 분해 효소를 생산하는 세균을 분리하였으며, 각각 SK-2, 및 SK-125라고 명명하였다. 분리균주 SK-2의 16S rDNA의 염기서열 분석 결과 *Bacillus licheniformis*와 *Bacillus subtilis*의 염기서열과 99%의 상동성을 보였으며, BIOLOG를 이용한 생화학적 분석에서도 *Bacillus* family와 유사한 특성을 보여 최종적으로 분리균주 SK-2를 *Bacillus* sp. SK-2으로 명명하였다. 또한 분리균주 SK-125의 16S rDNA의 염기서열 분석 결과 *Pseudoalteromonas haloplanktis*의 염기서열과 99%의 상동성을 보였으며, BIOLOG를 이용한 생화학적 분석에서도 *Pseudoalteromonas* family와 유사한 특성을 보여 최종적으로 분리균주 SK-125를 *Pseudoalteromonas* sp. SK-125라고 명명하였다. *Bacillus* sp. SK-2와 *Pseudoalteromonas* sp. SK-125균주의 온도별 실험에서는 40°C에서 가장 높은 생육도를 보였으며, 효소활성은 *Bacillus* sp. SK-2와 *Pseudoalteromonas* sp. SK-125 두 균주 모두 30°C에서 가장 높은 활성을 보였다.

## References

- Ackefors, H. and M. Enell. 1990. Discharge of nutrients from Swedish fish farming to adjacent sea areas. *Ambio* **19**, 28-35.
- Chun, D. S., D. K. Kang, and H. G. Kim. 2002. Isolation and enzyme production of neutral protease-producing strain, *Bacillus* sp. DS-1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 346-351.
- Exterkate, F. A. 1984. Location of peptidase outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 177-183.
- Godfrey, T. and S. West. 1996. Industrial enzymology. 2nd ed. *Macmillan Publishers Inc. NY. USA*.
- Kim, D. S., H. R. Kim, T. J. Nam, and J. P. Pyeun. 1999. Medium composition of *Aspergillus oryzae* PF for the production of proteolytic enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 404-409.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. Mega 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* **5**, 150-163.
- Lee, Y. D., C. Y. Kim, and M. P. Kang. 2002. A study on the water quality characteristics of aquacultural effluents by Electrolysis. *Journal of Korea Technological Society of Water and Waste Water Treatment* **10**, 41-49.
- Lee, Y. J., Y. C. Jae, H. J. Lee, H. C. Chang, J. H. Kim, D. K. Chung, Y. S. Kim, S. K. Cho, and D. H. Lee. 2002. Identification of Cellenvelope Proteinase of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 116-112.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, L. A. Farr, and R. J. Randal. 1951. Protein measurement with folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Min, O. K., M. S. Kim, W. S. Seo, J. Y. Cha, and Y. S. Cho. 2000. Characterization of extracellular protease of *Bacillus* sp. WRD-1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 329-333.
- Moon, S. W., J. B. Lee, Y. D. Lee, S. J. Kim, B. J. Kang, and Y. B. Go. 2002. Recycling marine fish farm effluent by microorganisms. *J. Aquaculture* **15**, 261-266.
- Murakami, K., Y. Hosokawa, and S. Talano. 1998. Monitoring on bottom sediment quality improvement by sand capping in Mikawa bay. *Bull. Coastal Oceanogr.* **36**, 83-89.
- Namwong, S., K. Hiraga, K. Takara, M. Tsunemi, S. Tanasupawat, and K. A. Oda. 2006. Halophilic serine proteinase from *Halobacillus* sp. SR5-3 isolated from fish sauce: purification and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1395-1401.
- Noble, L. D. and J. A. Gow. 1998. The effect of suspending solution supplemented with marine cations on the oxidation of Biolog GNMicroPlate substrates by Vibrionaceae bacteria. *Can. J. Microbiol.* **44**, 251-258.
- Novo Industry A/S. 1990. Anson hemoglobin method for determination of bacterial proteinase activity. AF 4.2/5, Novo Industry A/S, Bagsvaerd, Denmark.
- Pritchard, G. G. and T. Coolbear. 1993. The Physiology and Biochemistry from Proteolytic System in Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 179-206.
- Smid, E. J., B. Poolman, and W. N. Konings. 1995. Casein Utilization by *Lactococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2477-2452.
- Takeuchi, T. 1999. Possibility of water quality improvement works for environmental conservation in water areas. *Bull. Coastal Oceanogr.* **36**, 131-135.
- Tan, P. S. T., B. Poolman, and W. N. Konings. 1993. Proteolytic Enzyme of *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Res.* **60**, 269-286.