

Optimal Condition to Produce Protease by Strain Separated from the Intestine of *Reticulitermes speratus*

Min-Kyung Park, Hong-Joo Son, Yong-Gyun Kim, Sang-Mong Lee, Keun-Ki Kim and Hyeon-Cheal Park*

Department of Life Science & Environment Biochemistry, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Received November 2, 2009 / Accepted December 8, 2009

We separated the bacteria showing protease activity from *Reticulitermes speratus* which is known as the only termite species in Korea. Then, we collected the best activated strain and studied the optimal culture condition for producing the enzyme. According to the results of observing morphological and physiological characteristics, and the type of 16S rRNA of the strain, it was identified as *Serratia marcescens* and named *S. marcescens* strain TM-3215. This strain showed the best activity under conditions of 0.8% (w/v) starch, 0.4% (w/v) peptone, 0.08% (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 30°C and pH 8.0. After being cultivated under optimal conditions for 9 hr, the strain produced 19.8 U/ml of enzyme, an amount 1.8 times greater than the control.

Key words : *Reticulitermes speratus*, *Serratia marcescens*, enzyme, termite, protease

서 론

최근 생물공학 기술의 발달과 함께 식품제조, 제약, 유전자 조작 등 여러 분야에서 새로운 효소가 개발되고 있으며, 효소 제품의 사용도 계속 증가하고 있다[9]. 그 중 protease는 대부분 사람, 동물, 식물, 또는 미생물에서 추출한 것으로 전 세계 효소시장의 약 60%를 차지하며[4,5,6], 발효와 및 전분공업에서 널리 쓰이는 당화효소와 더불어 2대 주요한 효소 중 하나이다[3].

현재 protease 중에도 알칼리성 protease의 연구와 더불어 내열성 또는 저온성 등의 특성을 가지고 있는 protease 생산 미생물의 탐색이 이루어지고 있으나[14], 대부분의 경우 자연계 특히, 폐수 및 토양에서 분리된 미생물이 생산한 protease를 이용하고 있다[17,18]. 그러나 한정적인 지역에서 하는 실정이므로 새로운 미생물의 탐색에는 한계를 가지고 있어 특이한 특성을 지닌 protease를 포함한 산업용 효소를 생산하는 미생물을 탐색하기 위해 극지, 열수 및 심해 등지에서 새로운 미생물의 탐색에 많은 연구가 되고 있다. 하지만 일반적으로 극한 환경 속에서 성장하는 미생물은 생장이 느리고 취급이 어려운 점이 많기 때문에 실제 산업에 이용되지 못하는 실정이다. 이에 반해서 곤충과 관련한 미생물은 곤충의 섭식조건, 서식처 및 생태와 관련이 있기에 관련 미생물로부터 생성된 효소 또한 다양한 특이적인 성질을 가지고 있는 것이 많다[7].

곤충류 중 흰개미는 생태계 내에서 식물이 필요로 하는 유기물질을 분해하는 분해자로서 전 세계적으로 2,300여 종이 보고되고 있으며, 전 대륙에 걸쳐 서식하고 있다[15]. 흰개미의

장내미생물들이 음식물의 소화와 영양에 관여한다는 사실은 널리 알려져 있으며[2], 최근 분자 생물학적 기법을 활용한 곤충 장내 미생물의 분포와 역할에 대한 연구와 목재를 가해하는 흰개미의 장내미생물 DNA library로부터 재조합 DNA 기술을 응용한 새로운 종류의 xylanase를 탐색하는 등의 연구가 진행되고 있다[1]. 그러나 곤충 장내 미생물로부터 protease에 대한 연구는 한국산 무당거미 serralysin protease [16]와 누에장에서 분리된 serrapeptase가 대표적이거나 그 외 곤충 유래 protease 연구는 드물다[7]. 따라서 본 연구는 흰개미의 장으로부터 protease를 갖는 미생물을 분리, 동정하고 균주가 생성하는 protease의 최적조건을 알아보았다.

재료 및 방법

실험균주 분리

실험에 사용된 균주는 국내에서 분포하고 있는 흰개미의 장으로부터 유래된 것으로 흰개미(*Reticulitermes speratus*)는 경상남도 밀양시 삼랑진읍 야산에서 채집하여 일개미(worker)의 장을 적출하였다. Protease를 분비하는 균을 분리하기 위해 skim milk agar (skim milk 12 g/l, bacto-tryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l, bactoagar 18 g/l, pH 7)를 이용하여 clear zone이 크고 생육이 우수한 균주를 분리하였다. 활성이 가장 큰 균주는 액체배양한 후 glycerol을 첨가하여 -70°C deep freezer에 보관하였다.

균주 배양 및 protease 생산조건 검토

최적의 균체생육과 효소생성을 규명하기 위해 배양시간은 3시간 간격으로 측정하였고, 온도는 15°C~40°C로 5°C간격으로, pH는 4.0~10.0까지 pH 1.0간격으로 조절하여 측정하였

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5547, Fax : +82-55-350-5549

E-mail : hcpark@pusan.ac.kr

다. 효소생성 최적화에 사용한 배지는 NB였으며, 균체생육과 효소생성에 관한 탄소원 영향은 glucose, fructose, sucrose, lactose, starch를 이용하여 조사하였으며, 선정된 최적 탄소원은 0~1%로 0.2%간격으로 최적농도를 측정하였다. 질소원 영향은 yeast extract, peptone, malt extract, casamaino acid, tryptone, beef extract, NaNO₂, NaNO₃, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄를 이용하여 조사하였으며, 선정된 최적 질소원은 0~1%로 0.2% 간격으로 최적농도를 측정하였다. 그리고 무기염 영향은 K₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, CaCl₂ · 2H₂O, MgSO₄ · 7H₂O를 이용하여 조사하였으며, 선정된 최적 무기염은 0~0.1%로 0.02% 간격으로 최적농도를 측정하였다.

액체배양은 250 ml 삼각플라스크에 배양액 50 ml과 실험 균주 2% (w/v)를 접종하여 200 rpm으로 진탕배양하였다.

실험 균주의 동정

분리된 균주를 동정하기 위하여 Bergey's manual of systematic bacteriology [8]에 기술된 방법에 따라 형태학적, 생리학적 특징을 조사하였고, 16S rRNA 염기서열을 분석하여 균을 동정하였다.

균체의 생육 및 효소활성의 측정

균체의 생육은 배양액을 분광광도계를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였고, 효소생성 측정은 배양액을 원심분리 한 후 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소생성 측정을 위하여 2% hammersten casein 기질용액 1 ml과 조효소액 1 ml을 첨가하여 30°C에 10분 동안 반응시켰다. 반응액에 5% trichloroacetic acid 용액 0.5 ml을 가하여 반응을 중지시키고, 30분 동안 정치한 후 원심분리하여 상등액을 회수하였으며, 상등액은 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 1 unit은 1분당 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소량으로 하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정

흰개미의 장으로부터 분리된 균은 그람음성의 운동성을 가진 통성혐기성 간균으로 내생포자를 형성하지 않았다. Colony의 표면은 둥글며, 매끄러웠고, catalase는 양성, oxydase는 음성, glucose를 이용하여 산을 생성하였다. 특히 붉은 색소를 분비하는 것이 특징적이다. 더욱 정확한 균 동정을 위해 16S rRNA를 이용하여 동정한 결과 *Serratia marcescens*와 99% 유사성을 보였다. 따라서 본 균주 *S. marcescens* strain TM-3215 (Fig. 1)로 명명하였다.

배양시간

본 균주의 균체생육과 효소생성에 미치는 배양시간의 영향

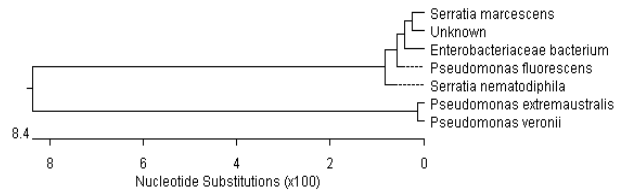


Fig. 1. Dendrogram of strain TM-3215 through 16rDNA sequence homology, scale bar, and 0.01 estimate substitution per nucleotide position. - Unknown: strain TM-3215

을 조사한 결과, Fig. 2와 같이 균체생육은 9시간이 최대였고 이후에는 감소하였다. 그리고 효소생성은 9시간 이후 효소생성의 변화가 적어 최적 배양시간은 9시간으로 하였다.

다른 연구자들에 의한 *S. marcescens*의 효소생성 결과 Matsumoto [13] 등이 24시간, 최 등[3]이 30시간, Kim과 Oh [10]가 45시간, 김 등[11]에서는 72시간이라고 보고하였다. 이에 비해 본 균주는 9시간으로 배양시간이 훨씬 적게 소요되는 것으로 나타났다.

배양온도의 영향

본 균주의 배양온도에 따른 균체생육과 효소생성을 조사하기 위해 20~40°C의 온도 범위에서 9시간 동안 배양하여 측정 한 결과 Fig. 3A와 같이 균체생육과 효소생성 모두 30°C에서 가장 높게 나타났고, 20°C와 40°C에서는 효소생성을 나타내지 않았다. 이 결과는 Kim과 Oh [10], 김 등[11], Lyerly와 Kreger [12]에서와 같이 30°C에서 효소생성이 높았다는 결과와 일치 하였다.

초기 pH의 영향

배양액의 초기 pH에 따른 균체생육과 효소생성의 변화를 조사하기 위해 pH 4.0~10.0까지 조절한 후 30°C에 9시간 동안 배양한 결과, Fig. 3B와 같이 균체생육은 pH 6.0 이후로 감소하였고, 효소생성은 pH 8.0까지 꾸준히 증가하였다. 이후 효소생

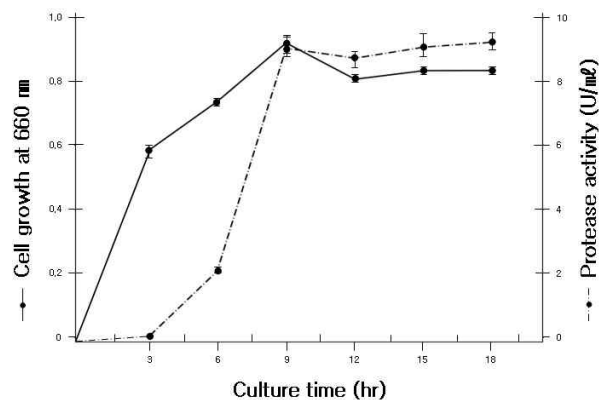


Fig. 2. Effect of culture time on cell growth and protease activity of strain TM-3215.

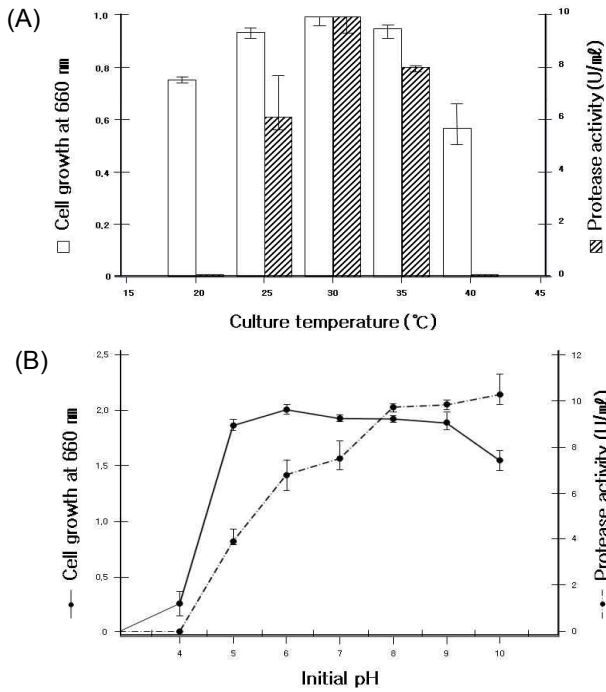


Fig. 3. Effect of culture temperature (A) and initial pH (B) on the cell growth and protease activity of strain TM-3215.

성의 큰 변화가 거의 없음을 알 수 있다. 이 결과는 효소생성에 있어 배지의 pH를 7.2로 사용한 Lyerly와 Kreger [12], pH 8.0을 사용한 김 등[11]의 결과와 유사하지만 본 균주가 더 높은 알칼리 범위에서 효소생성이 유지되는 것으로 나타났다.

탄소원의 영향

에너지원 및 탄소기본구조로 사용되는 균체생육과 효소생성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위해 탄소원을 각각 0.5% (w/v)되게 한 후 pH 8.0, 30°C에 9시간 동안 배양하여 측정된 결과 Fig. 4A와 같다. 효소생성에서 starch를 첨가하였을 때 최대 효소생성을 보였고, 다음으로 lactose, fructose의 순으로 효소생성이 나타났지만 탄소원을 첨가하지 않은 배지보다 효소생성이 낮았다. 그리고 sucrose, glucose는 균체생육은 높았지만 효소생성은 나타나지 않았다. 탄소원 중 효소생성이 높은 starch의 농도는 비교적 모든 농도에서 효소생성을 보였으며, 그 중 Fig. 4B와 같이 0.8%였을 때 가장 높았다. 본 균주의 실험결과와 달리 Kim과 Oh [10], 김 등[11], Lyerly와 Kreger [12]에서는 glucose에서 효소생성이 높게 나타나 본 균주와 상이하였다.

질소원의 영향

균체생육과 효소생성에 가장 결정적인 영향을 미치는 질소원의 종류와 농도에 따른 균체생육과 효소생성을 조사하였다. 질소원을 각각 0.5% (w/v)되게 한 후, 30°C, pH 8.0, 9시간 동안 배양하여 균체생육과 효소생성을 측정된 결과 peptone

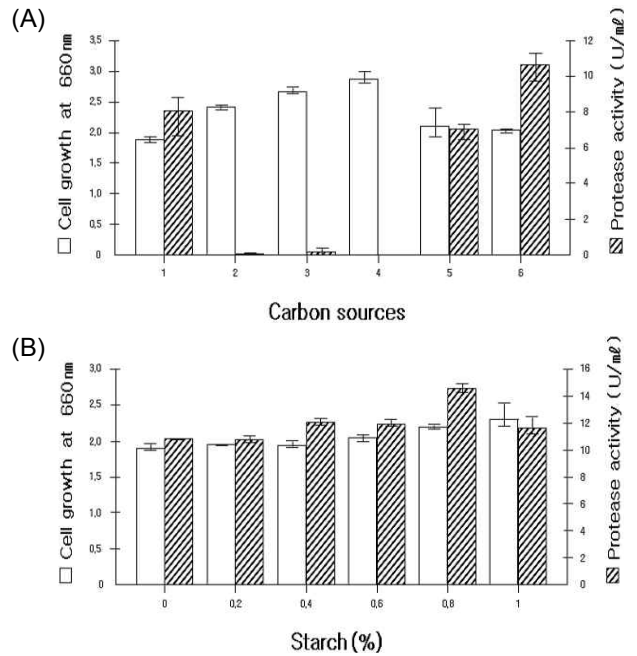


Fig. 4. Effect of various carbon sources (A) and starch concentration (B) on cell growth and protease activity from strain TM-3215. (A) 1: None; 2: Glucose; 3: Fructose; 4: Sucrose; 5: Lactose; 6: Starch

을 첨가하였을 때 최대의 효소생성을 보였다(Fig. 5A). Peptone을 제외한 질소원에서는 유기질소원 tryptone, caseino acid 순서로 효소생성을 보였으나 yeast extract, beef extract, malt extract에서는 효소생성이 거의 나타나지 않았다. 그리고 무기질소원의 NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, NaNO₂, NaNO₃에서는 균체생육이 낮았으며, 효소생성은 거의 나타나지 않았다(data not shown). Peptone은 비교적 모든 농도에서 효소생성이 나타났으나, 0.4%였을 때 가장 높게 나타났다(Fig. 5B). 이 결과는 본 균주에서 두 번째로 효소생성을 보인 trypton에서 높았다는 김 등[11]과 유사하나 Lyerly와 Kreger [12]는 본 실험에서 효소생성이 없는 yeast extract에서 효소생성이 높은 것과 상이하였다.

무기염의 영향

균체생육과 효소생성에 미치는 무기염의 종류와 농도에 따른 영향을 검토하기 위해 각종 무기염을 각각 0.05% (w/v)되게 한 후, 30°C, pH 8.0, 9시간 동안 배양하여 측정된 결과 Fig. 6과 같이 MgSO₄ · 7H₂O를 첨가하였을 때 효소생성이 가장 높았다. MgSO₄ · 7H₂O를 제외한 무기염에서는 NaCl, CaCl₂ · 2H₂O 순으로 효소생성이 많았다. 이 결과는 MgSO₄ · 7H₂O와 CaCl₂에서 효소생성이 높았다고 보고한 Kim과 Oh [10], 김 등[11]과 유사하였다. MgSO₄ · 7H₂O 농도는 비교적 비슷하게 나타났으나, 0.08%였을 때가 가장 높게 나타났다(data not shown).

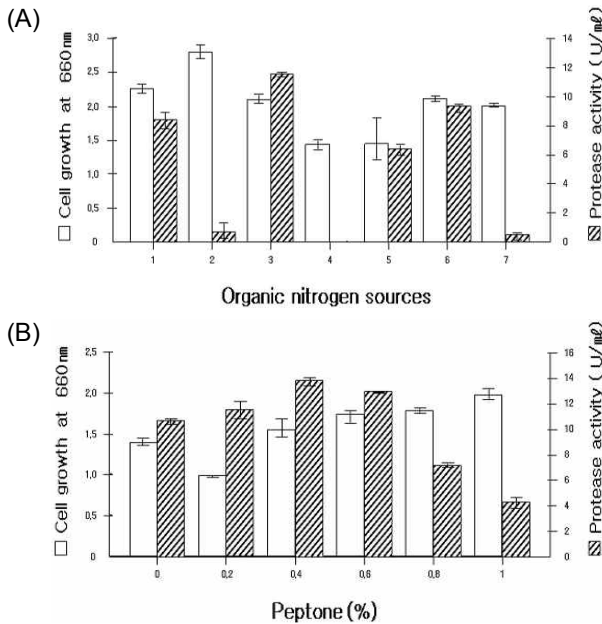


Fig. 5. Effect of various organic nitrogen sources (A) and peptone concentration (B) on the cell growth and protease activity from strain TM-3215. (A) 1: None; 2: Yeast extract; 3: Peptone; 4: Malt extract; 5: Casamaino acid; 6: Tryptone; 7: Beef extract

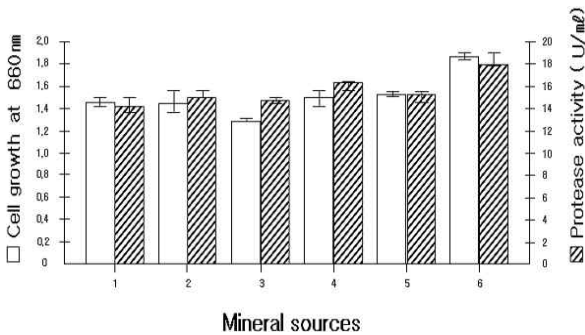


Fig. 6. Effect of various mineral sources on the cell growth and protease activity from strain TM-3215. 1: None; 2: K₂HPO₄; 3: KH₂PO₄; 4: NaCl; 5: CaCl₂ · 2H₂O; 6: MgSO₄ · 7H₂O

최적조건에서의 효소생성

본 실험에서 30°C, pH 8.0, 0.8% (w/v) starch, 0.4% (w/v) peptone, 0.08% (w/v) MgSO₄ · 7H₂O의 최적조건에서 *S. marcescens* strain TM-3215 균주를 배양하여 시간대 별로 균체생육과 효소생성을 조사하였다. 기본배지와 최적배지의 균체생육은 비슷하게 나타났지만, 효소생성에서 큰 차이를 보였다 (Fig. 7). 기본배지는 9시간에 최대 11.2 U/ml의 효소생성을 하고, 그 이후에는 효소생성이 감소하였다. 그러나 최적배지는 9시간에 19.8 U/ml의 효소생성을 하여 기본배지보다 약 1.8배가 높았다.

흰개미의 장에서 분리된 본 균주는 다른 *S. marcescens*의

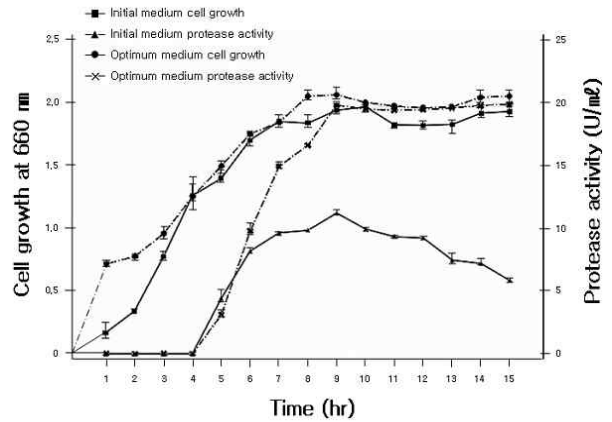


Fig. 7. Effect of optimum medium condition on the cell growth and protease activity of strain TM-3215.

protease 생장특성과 유사한 부분도 있었지만 상이한 부분도 많았다. 이것은 분리원에 따라 생육환경과 균주마다 생리학적, 유전학적 차이가 있기 때문에 특성이 조금씩 다른 것으로 판단된다. 특히 본 균주는 다른 균주들에 비해 짧은 시간에 효소생성을 나타내었으며, 높은 pH 범위에서도 효소생성을 유지하는 특성을 보였다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제학술연구비(2년)에 의해 연구되었음.

References

- Brennan, Y., W. N. Callen, L. Christoffersen, P. Dupree, F. Goubet, S. Healey, M. Hernandez, M. Keller, K. Li, N. Palackal, A. Sittenfeld, G. Tamayo, S. Wells, G. P. Hazlewood, E. J. Mathur, J. M. Short, D. E. Robertson, and G. A. Steer. 2004. Unusual microbial xylanases from insect guts. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3609-3617.
- Breznak, J. A. 1982. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**, 323-343.
- Choi, W. S., K. J. Jung, J. K. Lee, J. W. Park, S. H. Lee, J. B. Lee, and S. W. Choi. 1993. Studies on proteolytic enzyme from a new strain in *Serratia* sp. *Kor. J. Yaktak* **37**, 129-135.
- Decedue, C. J., E. A. Broussard II, A. D. Larson, and H. D. Braymer. 1979. Purification and characterization of the extracellular protease of *Serratia marcescens*. *Biochem. Biophys. Acta.* **569**, 293-301.
- Fox, P. E. 1982. Proteolysis in milk and dairy products. *Biochem. Soc. Trans.* **10**, 282.
- Gusek, T. W. and J. E. Kinsella. 1988. Properties and potential applications of a unique heat-stable protease. *Food Technol.* **42**, 102.
- Henriette, C. S., M. F. Zinbi, E. Aumaitre, H. Petitedmang,

- and C. Pettdemange. 1993. Protease and lipase production by a strain of *Serratia marcescense* (532S). *J. Industrial Microbiol.* **12**, 129-135
8. Holt, J. G., N. R. krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. pp. 477-484, 9th eds., The Williams and Wilkins Co, Baltimore.
 9. John, W. and A. Wieseman. 1975. Handbook of ENZYME Technology. pp. 114, New York.
 10. Kim, H. R. and P. S. Oh. 1991. Selection of protease hyper-production mutant from *Serratia marcescens* ATCC 21074 and enzymatic propertise of the protease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 450-455.
 11. Kim, T. J., S. K. Kim, and S. T. Kim. 2000. The production and properties of protease by *Serratia* sp. 2000-1 isolated from clinical specimes. *Kor. J. Biomed Lab. Sci.* **6**, 209-221.
 12. Lyerly, D. and A. Kreger. 1979. Purification and characterization a *Serratia marcescens* metalloprotease. *Infect. Immun.* **24**, 411-421
 13. Matsumoto, H. Maeda, K. Takata, R. Kamata, and R. Okamura. 1984. Purification and characterization of four protease from a clinical isolate of *Serratia marcescens* Kums 3958. *J. Bacteriol.* **157**, 225-232.
 14. Ok, M., M. S. Kim, W. S. Seo, J. Y. Cha, and Y. S. Cho. 2000. Characterization of extracellular protease of *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 329-333.
 15. Park, H. C. 1993. The role of the Wheatbelt termite, *Drepanotermes taminensis* (Hill) in nutrient cycling within native woodland and shrubland of the Western Australian wheatbelt. Ph. D. Thesis, Curtin University, Perth, Australia.
 16. Park, H. Y., K. E. Lee, and H. C. Kim. 2004. Biochemical characterization of an extracellular protease in *Serratia pro-teamaculans* isolated from a spider. *Kor. J. Microbiol.* **40**, 269-274.
 17. Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 597-635.
 18. Wilkes, M. and W. Harder. 1978. A continous culture study of the regulation of extracellular protease production in *Vibrio* SAI. *Antonie van Leeuwenhoek J. Mccrobiol. Serol.* **44**, 141-155.

초록 : 흰개미(*Reticulitermes speratus*)의 장에서 분리된 세균에 의한 protease생성 최적조건

박민경 · 손홍주 · 김용균 · 이상몽 · 김근기 · 박현철*
(부산대학교 생명환경화학과)

국내 1종만이 분포하고 있는 흰개미(*Reticulitermes speratus*)의 장으로부터 protease 생성을 나타내는 균주를 분리한 후 그 중 생성이 가장 큰 1균주를 최종 선별하여 동정하고 효소생성을 위한 최적조건을 검토하였다. 형태학적, 생리학적 특성 및 16S rRNA를 조사한 결과 *Serratia marcescens*로 판명되었으며, *S. marcescens* strain TM-3215라 명명하였다. 본 균주의 효소생성 최적조건을 조사한 결과 0.8% (w/v) starch, 0.4% (w/v) peptone, 0.08% (w/v) MgSO₄ · 7H₂O, 30°C 및 pH 8.0에서 가장 높은 효소생성을 나타내었다. 최적조건에서 9시간 배양 후 19.8 U/ml의 효소가 생성되었으며, 이 값은 최적화 이전 배지의 효소생성(11.2 U/ml) 보다 1.8배 높은 값이었다.