

## 청국장으로부터 고 비활성 세포외 Protease 생산 세균의 분리 및 동정

박희진<sup>1</sup>, 박희동<sup>1,2†</sup>

경북대학교 식품공학과<sup>1</sup>, 경북대학교 발효생물공학연구소<sup>2</sup>

### Isolation from *Chungkookjang* and Characterization of a Bacterium Producing an Extracellular Protease of High Specific Activity

Hee-Jin Park<sup>1</sup> and Heui-Dong Park<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, and

<sup>2</sup>Institute of Fermentation Biotechnology, Kyungpook National University, Deagu 702-701, Korea

#### Abstract

Several extracellular protease-producing bacteria were isolated from *Chungkookjang*, a traditional Korean food of fermented soybeans, on skim milk agar plates. Among these bacteria, strain D14 exhibited the highest production (15.2 U/mL) and specific activity (40.0 U/mg protein) of extracellular protease activity as assessed on growth in a protease induction medium composed of 1% (w/v) soluble starch, 1.5% (w/v) skim milk, 0.5% (w/v) yeast extract, and 2% (w/v) NaCl. The bacterium was identified as *Bacillus subtilis* based on morphological and physiological characteristics and 16S rDNA sequence. A BLAST search of 16S rDNA sequences revealed that the isolate was most closely related to *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain NCIB 3610. The 16S rDNA sequence homology was 99.9%. Our isolate produced the highest level of protease when grown in a protease induction medium containing 1% (w/v) sorbitol and 0.5% (w/v) yeast extract. Fructose and glucose reduced enzyme production to 12.7% and 35.9%, respectively, of the level seen when the strain was grown in medium containing soluble starch. Soytone also reduced enzyme production to 61.4% of the level noted when the strain was grown in medium containing yeast extract.

**Key words** : *Bacillus subtilis*, *Chungkookjang*, extracellular protease, fermented soybean

#### 서 론

청국장은 대두를 원료로 한 발효 식품으로 간장, 된장, 고추장 등과 함께 오늘날까지 상용되어온 전통 장류의 하나로서 대두 발효 식품 중에서 가장 짧은 기간에 발효가 완성되며 특이한 풍미와 우수한 영양 성분을 포함하는 고유한 전통 발효 식품의 하나이다(1). 대두 중에는 아미노산(2), 불포화 지방산(3) 등이 풍부하여 영양적 측면에서도 우수한 특성을 가지고 있다(4). 또한 *Bacillus natto*와 *Bacillus subtilis*가 생산하는 효소의 작용으로 대두의 여러 단백질이 분해되어 가용성 질소 화합물인 peptone, polypeptide 및 amino acid 등이 생성되어 소화되기 쉽고 청국장 특유의

구수한 맛을 형성한다(2). 동시에 청국장에는 끈끈한 점질 물이 생성되면서 특유의 향을 내게 되는데 이 끈적끈적한 점질물의 성분은 *Bacillus* sp.가 대두의 당질과 단백질들을 기질로 하여 합성한 levan 형 fructan과 polyglutamate의 혼합 물질로 알려져 있다(5-8).

최근 단백질과 지방 공급원 같은 청국장의 영양적 측면 이외에도 발효 중에 형성되는 각종 생리활성물질의 기능성에 관한 관심이 높아지고 있다(9). 그리고 phenolic acids, saponin, trypsin inhibitor, phytic acid 및 oligosaccharide 등이 청국장에 다량 함유되어 있음이 규명되면서 청국장의 다양한 기능성에 대한 연구보고가 있다. 특히, 청국장의 혈전 용해능(10-11), 항산화효과(12), 항돌연변이성 및 항암성(13), 항염증작용(14), 혈중 glucose 저하효과에 따른 항당뇨 작용(15-17), 혈압강하 및 지질대사 개선 기능(18) 등에 관

†Corresponding author. E-mail : hpark@knu.ac.kr,  
Phone : 82-53-950-5774, Fax: 82-53-950-6772

심이 집중되고 있다. 또한 대두중의 항산화 물질인 isoflavone류는 삶은 대두, 된장 및 간장보다 함량이 높다는 보고가 있어 이에 따른 청국장의 기능성 식품으로서 그 우수성과 중요성이 재조명되고 있다(19-21). 이러한 이유로 청국장의 대량 생산, 기능성 및 관능성 증대개선에 따른 소비 증대에 많은 연구가 이루어지고 있다(22-23).

Protease는 조미료 제조, 식육의 연화, 맥주청주의 혼탁 방지 및 치즈의 숙성 등의 식품 공업과 소염진통제, 소화제, 피혁 가공 및 세제 공업 등 여러 분야에 걸쳐 널리 이용되고 있다(24). Protease는 여러 종류의 미생물이 생산하는 유용한 효소로서 구조와 작용 기전의 유사성 등으로 나눈다. Peckman(25)가 최초로 *Aspergillus* sp.에서 분리한 이후 그 기능과 활성면에서 Massaki 등(26)에 의해 serine protease, thiol protease 및 metal protease 등으로 분류되었으며 Kageyma(27)와 Nunokzwra 등(28)은 그 작용 pH의 영향에 따라 acid protease, neutral protease 및 alkaline protease로 분류하였다. Protease 생산능이 가장 강한 세균으로 알려진 *B. subtilis*가 분비하는 세포의 총 protease는 7종류로서 이들 효소 생산 유전자는 chromosome상의 위치가 조금씩 다른 것으로 알려져 있다(29). 이들 효소는 다양한 기질에 반응하는 성질을 이용하여 다양한 단백질들의 분해에 사용되는데 어떤 *B. subtilis* protease들은 여러 개의 active form을 가지고 있기도 하며(30) 어떤 protease는 세균의 단백질 품질을 결정하는데 관여하고 있다고 보고되고 있다(31).

Protease의 산업적 생산을 위하여 세포 외 효소 생산능이 높으며 다른 단백질의 분비가 적은 효소 즉 고 비활성의 효소를 생산하는 균주를 사용하는 것이 유리하다. 이는 높은 비활성을 가지는 세포의 효소가 대량 정제가 용이하고 정제 비용을 줄일 수 있기 때문이다. Protease 생산성 *B. subtilis* 균주는 청국장(32-33), 간장(34), 멸치젓(35), 토양(36) 등으로부터 이미 분리되었으며 최근에도 protease 고생산성 균주가 된장(37)과 고추장(38)으로부터 분리된 바 있다. 이들의 protease 활성은 대부분이 2-13 U/mL로서 낮은 수준이나 최근 된장에서 분리된 DH3 균주의 활성이 15.3 U/mL로서 높게 나타났다는 보고(37)가 있을 뿐 고 비활성의 protease 생산성 균주에 관한 연구는 많지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 우리나라 대표적 전통 식품의 하나인 청국장으로부터 비활성이 강할 뿐 아니라 protease의 생성능이 우수한 균주를 분리하고 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 배지 및 균의 배양

본 실험에서 protease 생산 세균의 분리를 위한 배지로는 분리배지(0.1% glucose, 0.1% soybean powder, 1.5% skim milk, 0.1% yeast extract, 2.0% NaCl)와 protease의 생산을

위한 배지로는 protease 생산 배지(1% soluble starch, 1.5% skim milk and 0.5% yeast extract, 2% NaCl)를 사용하였다. 균의 배양은 분리배지에 균을 한 백금이 접종한 후 37°C에서 24시간 동안 150 rpm의 속도로 진탕하면서 배양하였다. 균의 단기 보관은 균의 증식 정도를 확인한 배양액을 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였으며 균주의 변이를 방지하기 위한 장기보존은 분리 균주의 배양액에 glycerol을 최종농도가 15%되게 첨가한 후 -70°C에 냉동 보관하였다.

고 비활성 세포의 protease 생산 세균의 분리

청국장 시료를 생리식염수(0.85% NaCl)로 희석한 후 Table 1의 분리배지에 2.0%의 한천을 첨가하여 만든 분리용 고체배지에 100 µL를 도말하고 37°C에서 24시간 배양하여 생성되는 독립 colony를 분리하였다. 분리한 균주들은 같은 평판배지에서 재차 희석도말 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하여 단백질의 분해로 인하여 투명환을 강하게 생성하는 균주들을 protease 생산균주로 1차 선별하였다. 1차 선별한 균주를 분리용 액체배지를 사용하여 37°C에서 150 rpm으로 24시간 진탕 배양한 다음 배양액을 원심분리하여 얻은 상정액의 단백질 함량과 protease 활성을 측정하여 활성이 우수한 균주를 최종 선별하였다.

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the isolate D14

Morphological characteristics	
Gram staining	+
Spore formation	+
Cell shape	Rods
Cell size	0.5 ~ 0.7 × 2.1 ~ 2.5 µm
Motility	+
Physiological characteristics	
Hydrolysis of casein	+
Hydrolysis of starch	+
Liquifaction of gelatin	+
Nitrate reduction	-
Indole production	-
Hydrogen sulfide production	+
Methyl red reaction	-
Citrate Utilization	+
Urease test	-
Catalase test	+
Oxidase test	+
O/F test	F
Voges-Proskauer test	-
Optimum growth temperature	40°C
pH	pH 6.0 ~ 8.0

+ : positive, - : negative

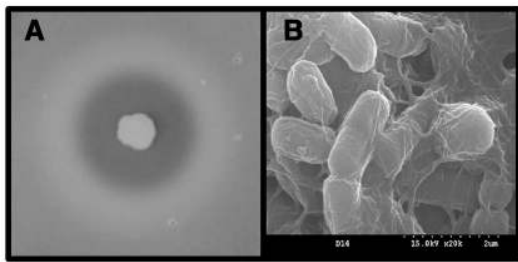


Fig. 1. Proteolytic activity of the isolate D14 on the skim milk agar plate (A) and its cell morphology observed on a scanning electron microscope (B).

**세균의 동정**

분리 세균의 동정은 균의 형태학적 특성, API 20E kit, 16S rDNA의 염기서열 결정 및 상동성 검색을 통하여 행하였다. API kit (bioMerieux, France)를 이용한 동정은 배양된 분리균을 API kit에 100 µL를 접종하고 30°C에서 24시간 반응시킨 후 biochemical test, assimilation test 그리고 fermentation test를 하였다. Biochemical test는 생리식염수에 시험균을 현탁하여 건조된 기질이 들어있는 kit의 cupule에 접종하여 배양 후 발색시약을 첨가하여 물질의 대사유무를 색의 변화로써 판정하였다. Assimilation test는 최소배지에 현탁한 시험균을 탄수화물이 유일한 탄소원으로 들어있는 kit의 cupule에 접종 배양한 후 시험균이 이들 당을 이용할 수 있는지 여부를 탁도 변화로 알아보았다. Fermentation test는 당으로부터 산의 생산에 따른 pH의 변화로 판정하였다. 세균의 동정은 이상의 결과들을 토대로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 기준에 따라 동정하였다(39).

**전자현미경 관찰**

분리균의 배양액을 분리용 액체배지에 1%가 되게 접종하여 3일간 30°C에서 배양한 균체를 사용하였다. 세포의 고정에는 Sheehan과 Hrapchak의 방법(40)에 따라 배양액에 Karnovsky 시약을 균체와 1:1(v/v)로 혼합해 약한 vacuum 상태에서 2시간 동안 균을 고정시키고 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.2)로 세척한 후 hood에서 20분간 방치하였다. 여기에 0.5% uranyl acetate 용액을 혼합하여 4°C에서 16시간 동안 prestaining하고 30, 50, 70, 80 및 90% ethanol로 각각 20분씩 탈수한 후 다시 100% ethanol로 20분씩 3회 탈수하였다. 다음으로 hood에서 propylene oxide 용액으로 20분간 2회 탈수한 후, propylene oxide와 isoamylacetate를 1:1(v/v)로 섞은 용액을 넣어 2시간 방치한 다음, 100% isoamylacetate 용액을 넣어 진공 desicator에서 16시간 동안 방치하였다. 임계점 건조기로 건조시킨 다음 건조된 시료를 Knutton의 방법(41)에 따라 gold coating한 후 주사전자현미경(Hitachi Co. S-4300, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

**PCR을 이용한 16S rDNA의 증폭 및 염기서열의 분석**

PCR을 위한 세균의 염색체 DNA는 Dneasy Tissue Kit(Quigen, U.S.A.)를 사용하여 분리하였다. 분리 균주의 16S rDNA 단편을 증폭한 PCR primer로는 정방향(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') 및 역방향(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')의 올리고뉴클레오타이드를 20 mer 내외로 합성하여 사용하였다(42). PCR 반응은 10 µL의 Taq DNA polymerase 완충용액(× 10), 8 µL의 2.5 mM dNTP 혼합용액, 2 µL의 주형 DNA (<1 µg), 2 µL의 100 pmol 정방향 primer 및 역방향 primer, 0.5 µL의 Taq DNA polymerase (5 units/µL; Takara Co., Japan) 및 75.5 µL의 멸균증류수를 혼합하여 사용하였다. 반응은 94°C에서 5분간 denaturation하고 다시 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분의 cycle을 30회 반복하였다(43). DNA 염기서열 결정을 위하여 PCR 산물은 Dynabeads PCR Clean Up Kit (DynaL Biotech ASA, Norway)를 사용하여 정제하였다. 염기서열의 결정은(주)마크로젠(www.macrogen.co.kr)에 의뢰하여 양방향 염기서열을 분석하였으며 염기서열의 상동성 검색은 NCIB의(www.ncib.nlm.nih.gov/)의 BLAST search를 통하여 행하였다.

D14	-----AGT CBAG CBGA CAGATGGGAGCTTGTCCCTGATGT
<i>B. subtilis</i>	CTGGCCGGCGTGCCTAA TACA TGCAAGT CBAG CBGA CAGATGGGAGCTTGTCCCTGATGT
D14	TAGCBGCBGACBGGTGAAGTACA CBGTGGTACCTGCC TGTAAAGAC TGGGATAACTCCGG
<i>B. subtilis</i>	TAGCBGCBGACBGGTGAAGTACA CBGTGGTACCTGCC TGTAAAGAC TGGGATAACTCCGG
D14	GAACCBGGCTAATA CBGATGGTGT TGAACCBGATGGT TCAAACATA TAAAGBGTGGC
<i>B. subtilis</i>	GAACCBGGCTAATA CBGATGGTGT TGAACCBGATGGT TCAAACATA TAAAGBGTGGC
D14	TTCGGCTACCACTTACAGATGGA CCGCBGGCCAT TACCTAG TTGG TGAAGGTAACGGCTC
<i>B. subtilis</i>	TTCGGCTACCACTTACAGATGGA CCGCBGGCCAT TACCTAG TTGG TGAAGGTAACGGCTC
D14	ACCAA GSCA ACBGTGCTAGCAGCAGCTGAGAGGGT GAT CBGGCACA CTGGBGAC TGAAGACA
<i>B. subtilis</i>	ACCAA GSCA ACBGTGCTAGCAGCAGCTGAGAGGGT GAT CBGGCACA CTGGBGAC TGAAGACA
D14	CGGCC CAGACTCTACGGGA GGCAGCA GTAGGAA TCT TCCGCAAT GSA CBAA AGTC TGA
<i>B. subtilis</i>	CGGCC CAGACTCTACGGGA GGCAGCA GTAGGAA TCT TCCGCAAT GSA CBAA AGTC TGA
D14	CBGAGCAACGCCGCGT GAGT GAT GAAGTTTT TCGGATCGTAAAGCTCTGT TGT TGGGAA
<i>B. subtilis</i>	CBGAGCAACGCCGCGT GAGT GAT GAAGTTTT TCGGATCGTAAAGCTCTGT TGT TGGGAA
D14	GAAACAGTACCGTTTCAATA GGGCBGT ACCT TGACGGT ACCT AACCAAGA AAGC CAGCGCT
<i>B. subtilis</i>	GAAACAGTACCGTTTCAATA GGGCBGT ACCT TGACGGT ACCT AACCAAGA AAGC CAGCGCT
D14	AACACTGTCAGCAGCCGCGT AATA CBTA GGTGCA AGCG TTTGT CCGGAAT TATTGGG
<i>B. subtilis</i>	AACACTGTCAGCAGCCGCGT AATA CBTA GGTGCA AGCG TTTGT CCGGAAT TATTGGG
D14	CGTAAAGGCTCAGCGCGG TTTCTTA AGTC TGA TGTG AAAGCCCGCBGCTCA ACCGGBG
<i>B. subtilis</i>	CGTAAAGGCTCAGCGCGG TTTCTTA AGTC TGA TGTG AAAGCCCGCBGCTCA ACCGGBG
D14	AGGGT CATT GGA AACT GGGGAACT TTAGGTG AGAA GAGGAGA GTGGAAAT TCCA CBGTAG
<i>B. subtilis</i>	AGGGT CATT GGA AACT GGGGAACT TTAGGTG AGAA GAGGAGA GTGGAAAT TCCA CBGTAG
D14	CGGTGAAAT GCG TAGA GATG TGGAGGA ACAC CAGT GGC GAAGGCGACTCTCTGTGCTGTA
<i>B. subtilis</i>	CGGTGAAAT GCG TAGA GATG TGGAGGA ACAC CAGT GGC GAAGGCGACTCTCTGTGCTGTA
D14	ACTGACBCT GAGGAGC GAAA GCG TGGG GAGC GAAC AGG ATTA GATA CCCC TGGT AGTC CAC
<i>B. subtilis</i>	ACTGACBCT GAGGAGC GAAA GCG TGGG GAGC GAAC AGG ATTA GATA CCCC TGGT AGTC CAC
D14	GCCGT AAAC GAT GAGT GCTA AGT GTTA GGGGTTTT CCGCCCC TTAG TGC TGA GCTA ACG
<i>B. subtilis</i>	GCCGT AAAC GAT GAGT GCTA AGT GTTA GGGGTTTT CCGCCCC TTAG TGC TGA GCTA ACG
D14	CATTA AGCA CTC CBCC TGGGAGTACGTCGCAAGACT GAAA CTCA AAGGAAT TGAC GGG
<i>B. subtilis</i>	CATTA AGCA CTC CBCC TGGGAGTACGTCGCAAGACT GAAA CTCA AAGGAAT TGAC GGG
D14	GGCCCCGCAC AAGCBGT GGAGCAT GTGGTTTA ATTC GAA GCAA GCGA AAG AACC TTAC CAG
<i>B. subtilis</i>	GGCCCCGCAC AAGCBGT GGAGCAT GTGGTTTA ATTC GAA GCAA GCGA AAG AACC TTAC CAG
D14	GTCTT GACA TCC TCTGACTCC TAGA GATA GAGACGTCCCT TCGG GGGCAGA GTGACAG
<i>B. subtilis</i>	GTCTT GACA TCC TCTGACTCC TAGA GATA GAGACGTCCCT TCGG GGGCAGA GTGACAG

Fig. 2. Analysis of 16S rDNA sequences of the isolate D14 producing an extracellular protease.

DNA fragments containing 16S rDNA were amplified by PCR from the chromosomal DNAs of the isolate D14. The 16S rDNA DNA sequences were determined and aligned with those of *B. subtilis* type strain NCIB 3610 obtained from NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

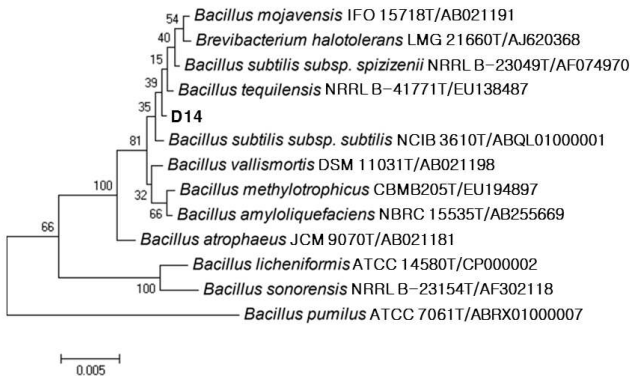


Fig. 3. Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of the isolate D14 and other related bacteria.

The tree was constructed by using the neighbor-joining method and the Kimura two-parameter calculation model.

**Protease 비활성 측정**

조효소액의 조제는 분리 균주를 영양배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 중 배양액을 분리용 액체배지 1,000 mL에 1%(v/v)가 되게 접종하여 배양한 후 배양액을 10,000 × g에서 30분간 원심 분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였다. 단백질의 함량은 소의 혈청 알부민 (bovine serum albumin, Sigma, USA)을 표준 단백질로 하여 Bradford 방법(44)에 따라 분광광도계 (Shimazu, UV-1601, Japan)를 사용하여 595 nm에서 비색 정량하였다. Ion exchange 및 gel filtration chromatograph에 의한 분획의 단백질 정량은 280 nm의 흡광도를 측정하여 행하였다. Protease의 활성 측정은 Hull의 방법(45)을 수정하여 다음과 같이 측정하였다. 조효소액은 상기의 방법으로 조제하고 기질 용액은 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.2)에 기질인 2% casein 용액을 사용 직전에 용해하여 사용하였다. 기질용액(2.5 mL)을 40°C에서 2분간 예열하고 조효소액 0.5 mL를 첨가하여 1시간 반응시킨 다음 0.4 M trichloroacetic acid 3 mL를 첨가하여 여과한 후 여과액 1 mL를 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 5 mL와 5 배 희석한 phenol reagent 1 mL를 첨가하여 40°C에서 30분간 발색 시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성 단위는 상기의 반응조건에서 1 µg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

**결과 및 고찰**

**고 비활성 protease 생산 세균의 분리 및 선별**

청국장 시료를 멸균 생리 식염수에 단계별 희석 후 분리용 고체배지에 도말한 다음 37°C에서 24시간 배양한 후 균체 집락 주변에 skim milk를 분해하여 투명한이 형성된 colony를 1차로 선별하였다. 이 균주들을 분리용 고체배지에 희선도말하여 동일 조건에서 배양한 후 투명한이 상대적

으로 큰 균주 17주를 2차 분리하였다. 2차 분리된 균주들을 영양 배지에 접종하여 37°C에서 150 rpm으로 24시간 배양한 배양액을 protease 생산 배지에 1%되게 접종한 다음 37°C에서 150 rpm으로 진탕하면서 24시간 재배양하여 상정액의 protease 활성을 비교한 결과 분리한 17 균주 가운데 균주 D14의 protease 활성이 15.2 U/mL로서 강하였으며 비활성 또한 40.0 U/mg protein으로서 가장 강하게 나타나 균주 D14를 최종 선별하였다(data not shown). D14 균주는 분리용 고체배지에서 skim milk의 강한 분해능에 따른 커다란 투명한의 형성능을 나타내었으며 주사전자현미경으로 관찰한 결과 대표적인 간균으로 관찰되었다(Fig. 1). 현재까지 간장 유래 *B. subtilis* 균주의 세포의 protease 정제 과정에서 나타난 효소의 비활성이 31.3 U/mL로 보고된 바 있을 뿐 고 비활성 protease를 생산하는 *B. subtilis* 균주의 분리에 관한 보고는 거의 없는 실정이다(34). 본 연구에서 분리한 균주의 비활성은 이 균주보다도 27.8% 정도 높게 나타나 다른 세포의 효소에 비하여 상대적으로 protease 분비능이 큰 것으로 추정된다.

Table 2. Acid and gas production from various carbohydrates by the isolate D14

Carbohydrate	Acid production	Gas production
Glucose	+	-
Sucrose	+	-
Lactose	-	-
Fructose	+	-
Galactose	-	-
Arabinose	-	-
Mannose	+	-
Ribose	-	-
Rhamnose	-	-
Sorbose	+	-
Maltose	+	-
Raffinose	+	-
Trehalose	-	-
Dextran	-	-
Starch	+	-
Sorbitol	+	-
Inositol	-	-
Xylitol	-	-
Mannitol	+	-
Inulin	+	-

+ : positive, - : negative

**분리 균주의 동정**

균주의 동정을 위하여 형태 및 배양학적 특성을 조사한

결과(Table 1) 분리균인 D14는 Gram 양성 간균으로서 분열에 의해 증식하였으며 크기는  $0.5-0.7 \times 2.1-2.5 \mu\text{m}$ 로서 운동성이 있으며 포자를 형성하였다. 생리학적 특성으로서는 casein 분해능, gelatin 액화능 및 황화수소 생성능이 있었으며 indole 생성능은 음성이었다. 또한 catalase 시험, citrate 이용성 및 oxidase 시험에 있어서 양성을 나타내었으나 methyl red 시험, urease 시험 및 Voges-Proskauer 시험에서는 음성을 나타내었다. 탄소원 이용성을 조사한 결과 glucose, sucrose, fructose, mannose, sorbose, maltose, sorbose, maltose, raffinose, starch, sorbitol, mannitol 및 inulin 등에서는 탄소원을 이용하여 산을 생성하였으나 lactose, galactose, arabinose, ribose, rhamnose, trehalose, dextran, inositol 및 xylitol 등에서는 산을 생성하지 않았으며 이상의 모든 탄소원으로부터 가스를 생성하지 않았다(Table 2). 이와 같은 특성들은 *Bacillus subtilis*의 특성과 유사한 것으로 나타나 분리 균주 D14를 *B. subtilis* 유연균으로 동정하였다.

#### 16S rDNA 염기서열 결정 및 상동성 분석

분리 균주 D14의 16S rDNA 단편을 증폭하기 위하여 primer를 Bioneer사(Bioneer Co., Korea)에 의뢰하여 합성하고 이를 primer로 사용하여 분리 균주의 염색체 DNA를 주형으로 PCR을 행하였다. 이 증폭된 DNA 단편의 염기서열을 결정한 후 D14의 염기서열과 상동성을 가진 균주들을 알아보기 위하여 NCIB(www.ncib.nlm.nih.gov/)의 BLASTn으로 분석한 결과 D14 균주는 *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610과 가장 높은 상동성을 나타내었다. 분리 균주 D14의 경우 균주 NCIB 3610에 비하여 1 bp의 염기가 결손되어 있는 것을 제외하고는 동일하였으며 두 균주 사이의 상동성은 99.9%로 나타났다(Fig. 2). 또한 *B. subtilis* 근연균과의

상관관계를 조사하여 작성한 phylogenetic tree는 Fig. 3과 같다. 다른 *Bacillus* sp. 균주들에 비하여 *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 균주에 가장 유전적으로 근연관계에 있음을 알 수 있었다. 청국장으로부터 *B. subtilis* 등의 *Bacillus* sp. 균주의 분리는 이미 보고된 바 있다(7,11). 어떤 균주는 강력한 poly-gamma-glutamate를 생산하기도 하며 (7) 어떤 균주는 혈전용해 기능을 가지고 있다(11). 현재 본 연구에서 분리한 균주가 이러한 생리활성을 가지고 있는 지에 대하여는 현재 연구 중에 있다.

#### *B. subtilis* D14에 의한 세포외 protease의 생산

*B. subtilis* D14의 protease 활성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 protease 생산 배지에 각종 탄소원의 최종 농도가 1%가 되게 첨가하여 37°C에서 150 rpm으로 24시간 배양하여 protease 활성을 측정하였다. 그 결과 실험에 사용한 탄소원 중에서 soluble starch를 1% 첨가한 경우에 protease 활성이 가장 높았으며 그 외의 탄소원들을 첨가한 경우에는 활성이 낮게 나타났다. 특히 fructose를 첨가한 경우에 protease 활성이 대조구의 12.7%로서 가장 낮게 나타났다. glucose의 첨가구에서도 약 35.9%로서 다른 탄소원에 비하여 활성이 낮게 나타났다. 또한 fructose와 glucose 복합체인 sucrose를 첨가한 경우에도 그 활성이 낮았으며 그 다음으로 maltose를 첨가한 경우 활성이 낮게 나타나 fructose 및 glucose에 의한 protease의 생산이 억제됨을 짐작할 수 있으나 이에 대하여는 후속 연구가 필요한 것으로 판단된다(Fig. 4A). Protease 생산 배지에 각종 질소원의 최종 농도가 0.5%가 되게 첨가하여 균을 배양한 후 상징액의 protease 활성을 측정한 결과 실험에 사용한 질소원 중에서 soytone 첨가구의 경우 대조구의 약 61.4%로서 가장 낮은

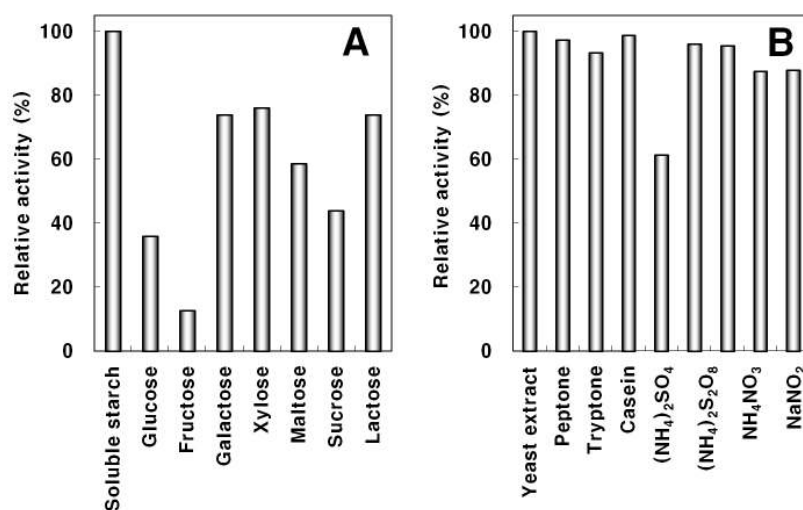


Fig. 4. Effects of various carbon (A) and nitrogen sources (B) on the production of extracellular protease by *B. subtilis* D14.

The bacteria were grown in protease producing media (1% soluble starch, 1.5% skim milk and 0.5% yeast extract, 2% NaCl) supplemented with 1.0% carbon and 0.5% nitrogen sources shown below the figure. The enzyme activity of the culture supernatant obtained from the supplemented media was calculated as a relative activity compared with that (14.2 Unit/mL) obtained by the protease producing media.

수준의 활성을 나타내었다. 그 외 peptone, casein, tryptone 등의 유기태 질소원이나 암모늄염 및 질산염 형태의 무기태 질소원을 사용한 경우에는 유사한 수준의 효소 활성을 나타내었다(Fig. 4B).

## 요 약

우리나라 전통발효식품의 하나인 청국장으로부터 고 비활성 세포의 protease 생산능이 우수한 균주를 분리하고 그 특성을 조사하였다. 분리된 균주 중 D14 균주 배양 상정액의 protease 활성이 15.2 U/mL로서 가장 강하였으며 비활성 또한 40.0 U/mg protein으로서 가장 강하게 나타났다. 이 균주의 특성을 조사한 후 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 준하여 *Bacillus subtilis*로 동정하였다. 균주 D14의 16S rDNA 염기서열을 분석하여 *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 균주와 99.9%의 상동성을 가짐을 확인하였다. 또한 16S rDNA의 염기서열을 토대로 계통분석을 통하여 다른 *Bacillus* sp.의 균주들보다 NCIB 3610 균주와 유전적으로 매우 가까운 관계에 있음을 확인하였다. Soluble starch는 사용한 탄소원 중 가장 높은 수준의 protease 생산능을 보였으나 단당류, 이당류 등은 모두 효소 생산능에 대하여 저해효과를 나타내었다. 특히 fructose를 첨가한 경우에는 12.7%, glucose를 첨가한 경우에는 35.9% 수준의 효소 생산능을 나타내었다. 질소원의 경우는 soytone의 첨가구에서 대조구에 비하여 약 61.4% 수준의 효소활성을 나타내어 저해효과가 가장 높았으며 다른 질소원은 효소 생산에 크게 영향을 미치지 않았다.

## 참고문헌

1. National Rural Living Science Institute, R.D.A. (1996) Food Composition Table, 5, 324-325
2. Kim, S.Y. and Kim, W.U. (1967) Studies on the changes of protein, peptide and amino acid during preparation. Korean J. Agric. Chem., 8, 11-20
3. Kim, J.G., Kim, S.K. and Lee, J.S. (1988) Fatty acid composition and electrophoretic patterns of protein of Korean soy beans. Korean J. Food Sci. Technol., 20, 263-271
4. Landers, R.E. and Rathmann, D.M. (1981) Vegetable oils: Effect of processing storage and use on nutritional values. J. Am. Oil Chem., 58, 255-259
5. Onishi, R., Keiko, A., Seiichi, H. and Ko, A. (1987) Studies on a viscous substance of the natto. Nippon Kasei Gakkaishi., 10, 871-875
6. Lee, Y.L., Kim, S.H., Choung, N.H. and Yim, M.H. (1992) A study on the production of viscous substance during *Chungkookjang* fermentation J. Korean Soc. Agric. Chem. Soc., 35, 202-209
7. Ashiuchi, M., Kamei, T., Baek, D.H., Shin, S.Y., Sung, M.H., Soda, K. Yagi, T. and Misono, H. (2001) Isolation of *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*), a poly-gamma-glutamate producer with high genetic competence. Appl. Microbiol. Biotechnol., 57, 764-769
8. Lee, B.Y., Kim, D.M. and Kim, K.H. (1991) Physico-chemical properties of viscous substance extracted from *Chungkookjang*. Korean J. Food Sci. Technol., 23, 500-506
9. Lee, J.O., Ha, S.D., Kim, A.J., Yuh, C.S., Bang, I.S. and Park, S.H. (2005) Industrial application and physiological function of *Chongkukjang*. Food Sci. Ind., 38, 69-78
10. Heo, S., Lee S.K. and Joo H.K. (1998) Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional *Chungkookjang*. Agric. Chem. Biotechnol., 41, 119-124
11. Kim, W.K., Choi, K.H., Kim, Y.T., Park, H.H., Choi, J.Y., Lee, Y.S., OH, H.I., Kwon, I.B. and Lee, S.Y. (1996) Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strains CK11-4 screened from *chungkookjang*. Appl. Environ. Microbiol., 62, 2482-2488
12. Kim, N.Y., Song, E.J., Kwon, D.Y., Kim, H.P. and Heo, M.Y. (2008) Antioxidant and antigenotoxic activities of Korean fermented soybean. Food Chem. Toxicol., 46, 1184-1189
13. Yoon, K.D., Kwon, D.J., Hong, S.S., Kim, S.I. and Chung, K.S. (1996) Inhibitory effect of soybean and fermented soybean products on the chemically induced mutagenesis. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 525-528
14. Choi, Y.H., Lim, H., Heo, M.Y., Kwon, D.Y. and Kim, H.P. (2008) Anti-inflammatory activity of the ethanol extract of *Chungkukjang*, Korean fermented bean: 5-lipoxygenase inhibition. J. Med. Food, 11, 539-543
15. Kim, D.J., Jeong, Y.J., Kwon, J.H., Moon, K.D., Kim, H.J., Jeon, S.M., Lee, M.K., Park, Y.B. and Choi, M.S. (2008) Beneficial effect of *chungkukjang* on regulating blood glucose and pancreatic beta-cell functions in C75BL/KsJ-db/db mice. J. Med. Food, 1, 215-223
16. Kwon, D.Y., Daily, J.W. 3rd, Kim, H.J. and Park, S. (2010) Antidiabetic effects of fermented soybean

- products on type 2 diabetes. *Nutr. Res.*, 30, 1-13
17. Kim, J.I., Kang, M.J. and Kwon, T.W. (2003) Antidiabetic effects of soybean and *chungkookjang*. *Korean Soybean Digest.*, 20, 44-52
  18. Yang, J.L., Lee, S.H. and Song, Y.S. (2003) Improving effect of powders of cooked soybean and *chungkookjang* on blood pressure and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.*, 32, 899-905
  19. Choi, Y.B. and Sohn, H.S. (1998) Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 30, 745-750
  20. Naim, M., Gestetner, B., Bond, A. and Birk, Y. (1976) Antioxidative and antihemolytic activity of soybean isoflavones. *J. Agric. Food Chem.*, 22, 806-810
  21. Messina, M. and Messina, V. (1991) Increasing use of soyfoods and their potential role in cancer prevention. *J. Am. Diet Assoc.*, 91, 836-841
  22. Youn, K.C., Kim, D.H., Kim, J.O., Park, B.J., Yook, H.S., Cho, J.M. and Byun, M.W. (2002) Quality characteristics of the *chungkookjang* fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 31, 204-210
  23. Lee, O.K., Ha, S.D., Kim, A.J., Yuh, C.S., Bang, I.S. and Park, S.H. (2005) Industrial application and physiological functions of *Chongkukjang*. *Food Sci. Ind.*, 38, 69-78
  24. Godfrey, T. and Reichelt, J. (1983) Industrial enzymology : The application of enzyme in industry. The Nature's Press Co., Mercer, U.S.A., pp127-172
  25. Peckman, E.V. (1951) *Aspergillus* protease. *Biochemistry*, 5, 321-325
  26. Masaaki, Y., Kazuo, S. and Mitsuo, M. (1984) Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3405. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 1637-1645
  27. Kageyama, K. (1955) Studies on *Aspergillus oryzae* strain for sake brewing. *J. Ferment. Technol.*, 33, 53-57
  28. Nunokawa, Y., Namba, Y. and Watanabe, S. (1961) A study of the rice Koji protease. *J. Soc. Brew.*, 53, 930-933
  29. Kang, S.M., Cha, M.K., Kim, S.J. and Kwon, Y.J. (2006) The effect of quality improvement for wool and silk treated with protease produced by *B. subtilis* K-54. *J. Korean Soc. Cloth. Ind.*, 8, 239-244
  30. Bruckner, R., Shoseyov, O. and Doi, R.H. (1990) Multiple active forms of a novel serine protease from *B. subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, 221, 486-490
  31. Molière, N. and Turgay, K. (2009) Chaperone-protease systems in regulation and protein quality control in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.*, 160, 637-644
  32. Park, C.S., Min, D.K., Ahn, Y.S., Lee, J.H., Hong, S.K., Kim, J.H. and Kang, D.K. (2002) Isolation and characteristics of soy protein-degrading strain, *Bacillus subtilis* EB464. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 210-215
  33. Ahn, Y.S., Kim, Y.S. and Shin, D.H. (2006) Isolation, identification and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional *Cheonggukjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 38, 82-87
  34. Kim, D.Y., Lee, E.T. and Kim, S.D. (2003) Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* K7 isolated from Korean traditional soy sauce. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 46, 176-182
  35. Kim, K.P., Kim, N.H., Lee, C.H., Woo, C.J. and Bae, D.H. (2002) Isolation and characterization of protease producing bacteria from soil. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 31, 754-759
  36. Cha, Y.J., Lee, K.H. and Chang, D.S. (1988) Characterization of the strong proteolytic bacteria isolated from low salt fermented anchovy and of protease produced by that strain. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 21, 71-79
  37. Jung, H.K., Jeong, Y.S., Youn, K.S., Kim, D.I. and Hong, J.H. (2009) Quality characteristics of soybean paste (Doejang) prepared with *Bacillus subtilis* DH3 expressing high protease levels and deep-sea water. *Korean J. Food Preserv.*, 16, 348-354
  38. Jung, S.T., Kim, M.H., Shin, D.H. and Kim, Y.S. (2008) Isolation and identification of *Bacillus* sp. with high protease and amylase activity from Sunchang traditional *Kochujang*. *Food Sci. Biotechnol.*, 17, 519-526
  39. Murray, R.G.E., Brenner, D.J., Bryant, M.P., Holt, J.G., Kreig, N.R., Moulder, J.W., Pfenning, N., Sneath, P.H.A. and Staley, J.T. (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2, 1104-1139
  40. Sheehan, D. and Hrapchak, B. (1980) Theory and practice of histotechnology. Battelle Press, Columbus, U.S.A., pp.330-331
  41. Knutton, S. (1995) Electron microscopical methods in adhesion. *Method. Enzymol.*, 253, 145-158
  42. Hayashi, H., Sakamoto, M. and Benno, Y. (2004) Evaluation of three different forward primers by terminal restriction fragment length polymorphism analysis for determination of fecal *Bifidobacterium* spp. in health subjects. *Microbiol. Immunol.*, 48, 1-6
  43. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular*

- cloning, a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, U.S.A., p.8.18-8.24
44. Bradford, M.M. (1964) A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
45. Hull, M.E. (1974) Studies on milk proteins II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J. Dairy Sci.*, 30, 881-884

---

(접수 2009년 12월 16일, 수정 2010년 5월 20일, 채택 2010년 5월 28일)