

## *Chryseobacterium* 속 신종세균 JK1의 세포외 단백질분해효소 생산특성

이유경 · 오용식 · 노동현\*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

### Production Properties on Extracellular Protease from *Chryseobacterium* Novel Strain JK1

Yu-Kyong Lee, Yong-Sik Oh, and Dong-Hyun Roh\*

Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

(Received March 2, 2012 / Accepted March 19, 2012)

A novel *Chryseobacterium* sp. JK1 strain producing extracellular protease had been isolated from soil. The largest clear zones were observed on nutrient agar plates supplemented with 1% skim milk at 30–35°C along with the growth of *Chryseobacterium* sp. JK1. The cell growth of JK1 strain was maximal at 24 h and maximum protease activity was reached up to 560 unit/ml at the stationary phase in liquid culture. In the presence of maltose, glucose or mannitol in Nutrient broth, cells grew well, but protease were produced poorly with lower production yields of 64–77% than in NB broth only. Similarly, the addition of skim milk, beef extract, yeast extract, malt extract or tryptone showed good growth and poor enzyme production. On the contrary, the addition of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> or (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gave poor growth and good enzyme production of 121–146%.

**Keywords:** *Chryseobacterium* sp. JK1, production condition, protease

단백질 분해 효소(protease)는 생물체내에서 다양한 생리적 역할을 하는 중요한 효소로 단백질의 구성성분인 아미노산 간의 펩타이드 결합을 가수분해하는 효소이다. 이러한 단백질 분해 효소는 활성부위에 존재하는 기능기의 작용기작에 따라 serine protease, metalloprotease, aspartic protease, cysteine protease 등으로 구분되며(Rao *et al.*, 1998), 작용 pH에 따라 acid protease 또는 neutral protease, alkaline protease로 분류되기도 한다.

산업적인 관점에서 단백질 분해효소는 가장 중요한 범주에 속하며, 조미료 제조, 저식염 젓갈의 숙성 발효, 식육의 연화, 맥주 청주의 혼탁방지, 치즈 숙성, 대두요구르트 제조 등의 식품공업과, 소화제, 소염진통제 등 제약공업, 세제공업, 피혁가공업 및 환경공업 등에 다양도로 응용되고 있으며, 그 시장 규모가 효소 전체 시장의 60%를 차지하고 있다(Cowan, 1983; Rao *et al.*, 1998). 이중 상업적으로는 중성, 알칼리성 효소가 대부분을 차지하고 있다. 그리고 최근 단백질 분해효소가 특정 올리고 펩타이드의 합성을 위한 화학적인 방법을 대체하여 사용될 수 있다는 가능성

으로 대단한 주목을 받고 있다(Lee *et al.*, 1993). 생물학적 효소를 화학적인 합성에 사용하기 위해서는 유기용매의 존재 하에서도 효소 특이성과 안정성에 문제가 없는 다양한 효소의 발견이 절실하다. 단백질 분해효소는 동물 및 식물, 세균, 곰팡이, 효모, 바이러스 등 다양한 미생물에서 생산되며, 동물과 식물로부터 유래한 효소는 산업적 수요를 충족하기에는 공급이 제한되어 있어 미생물 유래의 효소가 많이 사용되고 있다(Rao *et al.*, 1998).

1960년대 말에 *Bacillus* 속이 생산하는 알칼리성 단백질 분해 효소가 발견된 후 부터 대부분의 연구진들은 세제, 연육 가공, 탈모 공정 등에 있어 단백질 분해효소의 탁월한 유용성 때문에 활성이 높고, 안정된 성질을 갖는 새로운 미생물 균주 선별에 많은 노력을 기울여 왔다(Cowan, 1983; Godfrey and West, 1996; Rao *et al.*, 1998). *Bacillus* 속 이외에도 *Brevibacterium* (Rattray *et al.*, 1995), *Chryseobacterium* (Wang *et al.*, 2008; Bach *et al.*, 2011), *Kocuria* (Hinrichsen *et al.*, 1994), *Micrococcus* (Hinrichsen *et al.*, 1994; Fernsandez *et al.*, 1996; Cha *et al.*, 2007b), *Pseudoalteromonas* (Cha *et al.*, 2007a), *Pseudomonas* (Fukushima *et al.*, 1989), *Pseudoxanthomonas* (Cho *et al.*, 2010), *Serratia* (Kwon *et al.*, 1993; Bach *et al.*, 2011), *Streptomyces* (Henderson

\*For correspondence. E-mail: dhroh@chungbuk.ac.kr; Tel.: +82-43-261-3368; Fax: +82-43-264-9600

et al., 1987), *Vibrio* (Hinrichsen et al., 1994; Denkin and Nelson, 1999) 속의 세균들로부터 단백질 분해효소의 생산이 보고되었다.

현재 발견되고 배양 가능한 미생물은 지구상의 미생물의 1% 미만인 것으로 아직 대다수의 미생물은 생물자원으로 이용되지 못하고 있어 우수한 경제적 잠재력을 보유하고 있다. 따라서 본 연구는 상업적으로 이용되는 단백질 분해효소의 새로운 공급원의 가능성을 타진하기 위해 신종세균으로 분리된 *Chryseobacterium* sp. JK1의 생육과 효소생산에 대한 최적 배지 조건을 구하고, 이 효소가 어떤 조건에서 최적의 생산을 하는지에 대해 조사하였다.

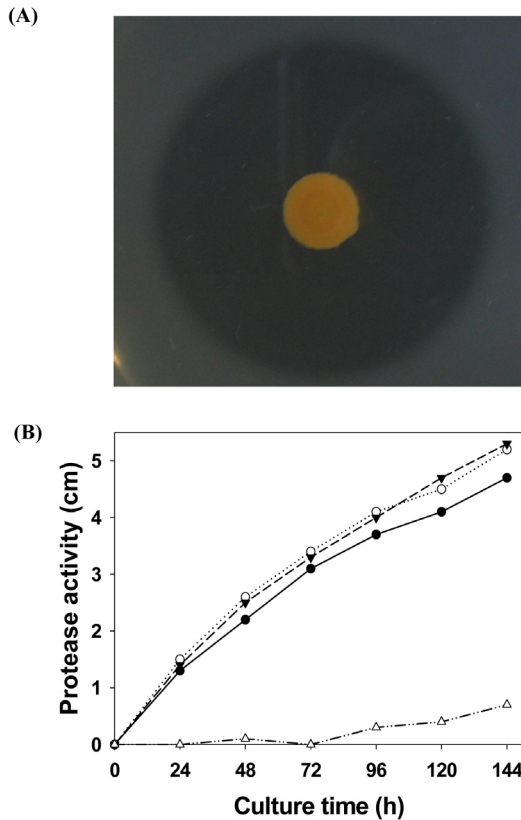
본 실험에 사용된 *Chryseobacterium* sp. JK1 균주는 토양으로부터 생체고분자 화합물 분해효소를 분비하는 유용한 미생물을 분리하는 과정에서 토양으로부터 R2A (Difco) 배지를 사용하여 순수분리 되었다. 순수 분리된 후 JK1 균주 배양을 위한 기본 배지는 Nutrient Broth (NB) 배지(Difco)를 사용하였으며, 필요에 따라 1.5% agar를 첨가하여 고체배지로 사용하였다. 균주의 배양온도에 따른 활성은 Nutrient 한천배지에 1% skim milk를 첨가하여 콜로니 주변에 생성되는 투명환(clear zone) 직경을 측정하여 콜로니 직경을 감한 값으로 표시하였다.

분리된 JK1 균주는 skim milk를 첨가한 한천배지 상에서 큰 투명환을 생성하여 강한 세포의 분비 단백질분해효소 활성을 가

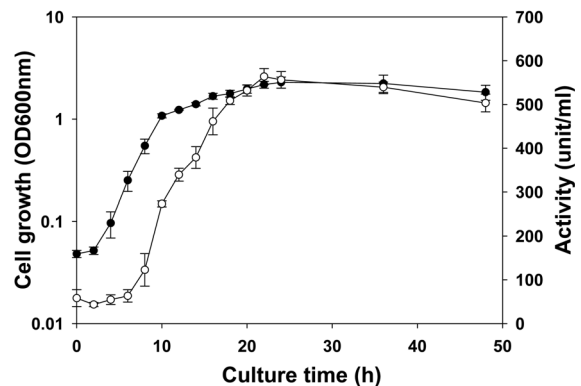
지고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이 균주의 정확한 동정 결과 *Chryseobacterium* 속에 속하는 신종세균으로 동정 되었다 (논문 준비중; GenBank accession number: HM625714). 한천배지 상에서 배양온도에 따른 효소의 생산을 조사한 결과 미생물의 생육이 왕성한 25-35°C에서 높은 효소활성을 보여주었으며, 30°C에서 4일간 배양시 가장 높은 활성을 보여주었으며, 5일 이후에는 35°C 배양시 다소 높은 효소활성을 보여주었다. 37°C 배양시에는 효소의 생산을 거의 볼 수 없었다. 이는 세균의 생육정지 온도에 도달 때문으로 생각되었다.

균주의 배양시간에 따른 단백질 분해효소 활성을 측정하기 위해 30°C에서 120 rpm으로 3일간 중배양한 배양액을 동일배지 200 ml에 1%로 집중하고, 같은 조건에서 진탕배양하면서 2시간 단위로 배양액을 채취하여 균주의 생장과 효소 활성을 측정하였다. 균주의 생장은 배양액을 분광광도계를 사용하여 600 nm에서 탁도를 측정하였고, 효소 활성은 배양액을 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 배양 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소의 활성측정은 배양 상등액을 사용하여 Windle와 Kelleher의 방법(Windle and Kelleher, 1997)에 준하여 시행하였다. 표준반응에서 효소의 기질은 0.5% (w/v) azocasein을 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 현탁시켜 사용하였다. 효소반응은 조효소액 100 µl와 동량의 기질을 잘 혼합하여 30°C에서 30분 반응시켰으며, 10% (w/v) TCA (Trichloroacetic acid) 400 µl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응액을 2분간 정지한 후 4°C에서 13,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 그 상등액 500 µl에 525 mM NaOH 700 µl를 가하여 혼합한 후 442 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성의 단위는 30°C에서 1시간 동안 432 nm에서의 흡광도 0.01 증가를 1 unit으로 정하였으며 (Secades and Guijarro, 1999) 효소의 활성은 3회 측정의 평균값과 표준편차로 표시하였다.

균의 생장에 따른 단백질 분해 효소 생산의 관계를 조사한 결과 접종 2시간 이후부터 대수기에 접어들어 24시간 후 가장 높은 미생물 생장을 보였고, 이후에는 정지기를 거쳐 사멸기에 접어들었다(Fig. 2). 효소의 생산은 대수 중기부터 급격히 증가하기



**Fig. 1.** Protease activity of strain JK1. The cell makes clear zone on Nutrient agar supplemented of 1% skim milk after incubation at 30°C for 72 h (A) and protease activities are shown by different culture temperatures as filled circles (●) at 25°C; open circle (○) at 30°C; reversed triangle (▽) at 35°C; triangle (△) at 37°C.



**Fig. 2.** Growth (●) and extracellular protease activity (○) of *Chryseobacterium* sp. JK1. Cells were grown in NB medium at 30°C. Standard deviation from the mean of three independent assays are indicated by error bars.

**Table 1.** Effect of carbon sources on the cell growth and protease activity of JK1

Carbon source	Cell growth (OD <sub>600nm</sub> ) <sup>a</sup>	Protease (U/ml)	Protease Production (U/ml)/(OD <sub>600nm</sub> )	Caseinolytic activity (%) <sup>b</sup>
NB	2.16±0.02	493.44±16.82	228.12±7.79	100.00
Maltose	3.81±0.20	556.56±9.30	146.08±2.44	64.01
Glucose	2.80±0.03	489.11±7.44	174.41±2.66	76.45
Mannitol	3.24±0.06	573.00±16.73	176.71±5.16	77.46

<sup>a</sup> For nutrient studies cells were grown in NB medium supplemented with 1% indicated chemicals at 30°C for 24 h with shaking 150 rpm. Values are means ±SD for three independent experiments.

<sup>b</sup> Percent caseinolytic activity in each medium expressed in relation to the activity in Nutrient broth medium as 100%.

**Table 2.** Effect of nitrogen sources on the cell growth and caseinolytic activity of JK1

Nitrogen source	Cell growth (OD <sub>600nm</sub> ) <sup>a</sup>	Protease (U/ml)	Protease Production (U/ml)/(OD <sub>600nm</sub> )	Caseinolytic activity (%) <sup>b</sup>
None	2.24±0.06	531.66±22.12	237.78±9.88	100.00
Skim milk	4.30±0.12	691.56±14.43	160.64±3.36	67.56
Beef extract	3.12±0.08	677.00±27.80	216.86±8.91	91.20
Yeast extract	3.64±0.11	454.78±5.95	124.88±1.63	52.52
Malt extract	4.59±0.06	676.55±22.16	147.36±4.83	61.97
Tryptone	2.69±0.06	460.11±15.93	171.14±5.92	71.97
KNO <sub>3</sub>	1.92±0.07	454.56±18.75	236.42±9.77	99.43
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.40±0.02	404.44±10.09	288.89±7.21	121.49
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.36±0.02	472.22±10.84	346.43±7.97	145.69

<sup>a</sup> Cells were grown in Nutrient broth supplemented with 0.5% indicated chemicals at 30°C for 24 h with shaking 150 rpm. Values are means±SD for three independent experiments.

<sup>b</sup> Percent caseinolytic activity in each medium expressed in relation to the activity in Nutrient broth as 100%.

시작하여 정지기인 22시간대에서 활성이 564 unit/ml로 최고의 효소활성을 나타내었고, 24시간 이후부터는 활성이 완만히 감소하였다. 기존에 중온균으로 보고된 *Pseudoxanthomonas* 속 WD12 (Cho et al., 2010)와 *Micrococcus* 속 HJ19 (Cha et al., 2007b) 속의 최대활성은 각각 656 unit/ml, 480 unit/ml이었다. 그리고 저온균으로 보고된 *Pseudoalteromonas* 속 HJ47은 300 unit/ml의 활성을 보여주었다(Cho et al., 2010). 이들의 효소반응 시간이 한 시간임을 고려하면 JK1이 생산하는 효소는 이들 균주들 보다 최소 1.7배에서 3.8배의 높은 활성을 보여주었다. 같은 속에 속한 *C. indologenes* A22 균주로부터 keratin 분해성 단백질 분해 효소와 비교한 경우, 22시간대에 정지기에 도달하여 JK1 균주와 생육은 유사한 양상을 보인 반면, 최고활성은 배양 45시간대에 나타나 다소 늦게 생산되었다(Bach et al., 2011). *C. aquaticum* strain PUPC1의 경우에도 생육은 유사하였으나, 최고활성은 배양 42시간대에 최고를 보였고(Pragash et al., 2009), *C. taeanense* TKU001는 배양 3일차에 최고의 활성 값을 보여 주었다(Wang et al., 2008). 이들간의 최고활성 값은 효소활성 측정법의 차이, 배지조건 등에 따라 절대적으로 비교하기 힘들지만 대부분이 대수 후기에서 정지기에 최대활성을 나타내어 균체가 성장함에 따라 단백질 분해효소는 함께 증가하는 경향을 보였다.

세포의 분비 단백질 분해효소는 환경으로부터 미생물 영양섭취에 중요한 역할을 하며(Gupta et al., 2002), 배지에 추가적인 영양분의 첨가는 미생물의 생육과 효소활성에 영향을 미친다고 알려져 있다. 따라서 배지의 조성성분에 따라 *Chryseobacterium*

sp. JK1의 생육 및 효소 생산에 미치는 영향을 검토하였다. 탄소원에 대한 단백질 분해효소 생산의 영향을 조사하기 위해 NB 배지에 추가적인 탄소원으로 glucose, maltose, mannitol을 각각 1%로 첨가하고, 질소원의 경우에는 NB 배지에 0.5%의 추가적인 질소원으로 tryptone, KNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, beef extract, yeast extract, skim milk, malt extract를 첨가하여 30°C에서 24시간 배양한 후 균의 생장과 효소 활성을 측정하였다. 분리균주 JK1는 균의 동정과정 중에서 소수의 탄소원만을 이용하여 maltose, glucose, mannitol만을 사용하였다. 이중 탄소원을 첨가했을 때 모두 생육이 증가하였으며, 효소의 활성은 glucose는 유사하였으나, maltose와 mannitol 첨가한 경우는 높은 활성을 보였다(Table 1). 그러나 균주의 생육당 단백질분해효소의 생산은 NB 단독보다 64-77%의 낮은 생산을 보여주었다. *Yersinia ruckeri*의 경우에도 당의 첨가가 높은 세포생육을 보이고 낮은 효소활성과 효소생산을 보여준 결과와 유사하였으며, 이러한 당의 첨가로 단백질 분해효소의 생산이 감소하는 이화억제(catabolite repression) 기작은 다른 여러 균주에서 보고되었다(Secades and Guijarro, 1999). 하지만 *Micrococcus* sp. HJ19에서는 당의 첨가가 생육에 큰 영향을 주지 않았으며, mannitol의 경우는 오히려 높은 효소생산결과를 보여주어 균주마다 다소 다른 결과를 보여주었다(Cha et al., 2009).

질소원의 경우에는 복합 유기질소원을 첨가했을 때 생육과 효소활성이 증가한 반면, 무기질소의 첨가시 생육과 효소의 활성이 NB 배지 보다 감소하였다. 하지만 효소의 생산은 유기질소

원의 첨가했을 경우 67-91%을 보여준 반면, 무기질소원들의 경우는 유사하거나 황화암모늄을 첨가한 경우에는 146% 정도의 생산을 보였다. 이러한 결과는 토양에서 분리한 *Bacillus* 속의 경우 암모니아 질소원을 사용하였을 때 낮은 활성을 보인 것과는 다소 상이한 결과를 보여주었다(Ok *et al.*, 2000). *Micrococcus* HJ19의 경우에는 유기질소원을 첨가했을 경우 생육에는 큰 영향을 주지 않고 단백질 분해효소 생산을 증가시킨 것과 상이한 결과를 보였지만, 무기질소원의 경우는 JK1과 유사한 결과를 보였다(Cha *et al.*, 2009).

같은 조건에서 기존에 보고된 단백질 분해효소보다 높은 활성을 가지고, 같은 속의 균주들보다 빠른 시간에 효소활성을 보인 *Chryseobacterium* sp. JK1의 효소는 아직까지 보고되지 않은 신종 미생물에서 유래한 것으로, 앞으로 산업적 이용가능성을 위해 효소의 특성과 세포외로 분비되는 단백질 가수분해효소의 수, 유전자를 클로닝 하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 적요

세포외 단백질분해효소를 생산하는 신종세균 *Chryseobacterium* sp. JK1은 토양으로부터 분리되었다. JK1 균주는 30-35°C에서 skim milk를 첨가한 고체배지상에서 가장 큰 투명환을 보여주었다. 액체배지에서 JK1 균주의 세포생육은 24시간에 최대이었고, 세포외 단백질분해효소의 최대활성은 정지기인 22시간에 560 unit/ml에 도달하였다. Nutrient 배지에 maltose 혹은 glucose, mannitol을 첨가하면 생육이 향상되었지만, 단백질 분해효소 생산은 64-77%로 저조하였다. Skim milk 혹은 beef extract, yeast extract, malt extract, tryptone의 첨가는 향상된 생육과 줄어든 효소생산을 보인 반면, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 또는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 첨가는 저조한 생육과 121-146%의 향상된 효소생산을 보여 주었다.

## 감사의 말

이 논문은 2010년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다(This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2010).

## 참고문헌

Bach, E., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F., and Brandelli, A. 2011. Production and properties of keratinolytic protease from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. *Biodegrad.* **22**, 1191-1201.

Cha, I.-T., Lim, H.-J., and Roh, D.-H. 2007a. Isolation of *Pseudoalteromonas* sp. HJ47 from deep sea water of East Sea and characterization of its extracellular protease. *Kor. J. Life Sci.* **17**, 272-278.

Cha, I.-T., Oh, Y.-S., and Roh, D.-H. 2007b. Isolation and characterization of *Micrococcus* sp. HJ-19 secreting extracellular protease. *Kor. J. Microbiol.* **43**, 222-226.

Cha, I.-T., Oh, Y.-S., Cho, W.-D., Lim, C.-S., Lee, J.-K., Lee, O.-S., and Roh, D.-H. 2009. Production condition and characterization of extracellular protease from *Micrococcus* sp. HJ-19. *Kor. J. Microbiol.*

**45**, 69-73.

Cho, W.-D., Lee, J.-K., Lim, C.-S., Park, A.-R., Oh, Y.-S., and Roh, D.-H. 2010. Isolation of *Pseudoxanthomonas* sp. WD12 and WD32 producing extracellular protease. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 63-69.

Cowan, D. 1983. Industrial applications: Proteins. pp. 353-374. In Godfrey, T. and West, S. (ed.), *Industrial enzymology- The application of enzymes in industry*. The Nature Press, New York, N.Y., USA.

Denkin, S.M. and Nelson, D.R. 1999. Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3555-3560.

Fernandez, J., Mohedano, A.F., Polanco, M.J., Medina, M., and Nunez, M. 1996. Purification and characterization of an extracellular cysteine proteinase produced by *Micrococcus* sp. INIA 528. *J. Appl. Microbiol.* **81**, 27-34.

Fukushima, J., Yamamoto, S., Morihara, K., Atsumi, Y., Takeuchi, H., Kawamoto, S., and Okuda, K. 1989. Structural gene and complete amino acid sequence of *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455 elastase. *J. Bacteriol.* **171**, 1698-1704.

Godfrey, T. and West, S. 1996. *Industrial enzymology*. 2nd ed. Macmillan Publisher Inc., New York, N.Y., USA.

Gupta, R., Beg, Q., Khan, S., and Chauhan, B. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 381-395.

Henderson, G., Krygman, P., Liu, C.J., Davey, C.C., and Malek, L.T. 1987. Characterization and structure of genes for proteases A and B. from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **169**, 3778-3784.

Hinrichsen, L.L., Montel, M.C., and Talon, R. 1994. Proteolytic and lipolytic activities of *Micrococcus roseus* (65), *Halomonas elongata* (16) and *Vibrio* sp. (168) isolated from Danish bacon curing brines. *Int. J. Food. Microbiol.* **22**, 115-126.

Kwon, Y.-T., Lee, H.-H., and Rho, H.-M. 1993. Cloning, expression and sequencing of the minor protease encoding gene from *Serratia marcescens* ATCC 21074. *Gene* **125**, 75-80.

Lee, K.H., Lee, P.M., Siaw, Y.S., and Morihara, K. 1993. Kinetics of aspartame precursor synthesis catalyzed by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **56**, 375-381.

Ok, M., Kim, M.-S., Seo, W.-S., Cha, J.-Y., and Cho, Y.-S. 2000. Characterization of extracellular protease of *Bacillus* sp. WRD-1 isolated from soil. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 329-333.

Pragash, G., Narayanan, M.K.B., Naik, P.R., and Saktivel, N. 2009. Characterization of *Chryseobacterium aquaticum* strain PUPC1 producing a novel antifungal protease from rice rhizosphere soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 99-107.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 597-635.

Ratray, F.P., Bockelmann, W., and Fox, P.F. 1995. Purification and characterization of an extracellular protease from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3454-3456.

Secades, P. and Guijarro, J.A. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3969-3975.

Wang S.-L., Yang, C.H., Liang, T.-W., and Yen, Y.-H. 2008. Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001. *Bioresour. Technol.* **99**, 3700-3707.

Windle, H.J. and Kelleher, D. 1997. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **65**, 3132-3137.