

Characteristics of Hydrolytic Enzymes that Produced by *Bacillus subtilis* CK-2 Isolated from Doenjang

Sang-Hyup Lee and Chul-Ho Kim*

Dept. of Pharmaceutical Engineering, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

Received March 8, 2017 / Revised April 24, 2017 / Accepted July 19, 2017

In the previous paper, we isolated a bacterium that can hydrolyze various organic materials from soybean paste, including cellulose, lipids, starch, and protein. The activity and chemical properties of the crude enzymes produced by the isolate *Bacillus subtilis* CK-2 were further investigated. Cellulase showed the highest activity at pH 5.0 and 55°C. The stability of cellulase was maintained within the ranges of pH 5.0~10.0 and 20~50°C. Cellulolytic enzymes were activated by a Co^{2+} ion, demonstrating the highest activity at a 0.45% (w/v) concentration of Co^{2+} . The optimal conditions for amylase were pH 5.0 and 50°C. The activity of amylase was stable within the ranges of pH 4.0~5.0 and 20~50°C. The Co^{2+} ion was also necessary for amylase activity, which was the highest at a 0.2% (w/v) concentration of Co^{2+} . The optimal pH and temperature conditions of protease were pH 8.0 and 50°C. The activity of protease was stable within the ranges of pH 7.0~8.5 and 20~50°C. Protease activity was catalyzed by Mn^{2+} , which was the highest at a 0.125% (w/v) concentration of Mn^{2+} . The isolate *B. subtilis* CK-2 demonstrated a high activity of autolysin. Based on these results, we identified and suggested the optimal pH, temperature, and metal ion concentration in the use of the hydrolytic enzymes of *B. subtilis* CK-2 for industrial purposes.

Key words : Amylase, *Bacillus subtilis*, cellulase, optimal condition, protease

서 론

농수임산 폐기물과 음식물 폐기물은 대표적인 유기성 폐기물로 자원순환이 가능한 물질임에도 불구하고 육상매립 및 해양배출 등의 방법으로 무분별하게 투기되어 환경오염의 대표적인 물질로 인식되어 왔다. 버섯 재배 과정에서 배지에 함유되어 있는 각종 영양분의 약 20%만이 이용되고, 나머지는 폐배지 내에 남는다고 보고되고 있으며[36], 재배되는 버섯 종류에 따라 버섯균이 분비한 각종 생리활성물질과 단백당류를 함유한 균사체를 포함하고 있어 다양한 방법으로 높은 이용가치를 지니고 있다[11].

유기성 폐기물을 구성하는 섬유소, 녹말, 단백질 등을 효과적으로 분해하는 미생물로는 곰팡이, 효모 등의 진균류와 세균 등이 있으며, 이들은 모두 자연계의 유기물을 분해하여 물질의 순환에 기여할 뿐만 아니라, 특히 세균이 분비하는 여러 가지 유기물 분해효소들은 산업적으로 다양하게 활용되고 있다[15, 16, 18].

최근 농수산물 폐기물과 음식물 폐기물 등의 유기성 폐기물을 미생물을 이용한 퇴비화 또는 사료화 하는 연구가 활발하게 진행되고 있지만[3, 28], 섬유소, 녹말, 단백질, 지질 등 각각의 유기물을 분해하는 세균에 대한 연구는 많이 이루어졌으나, 이들 모두에 대한 분해능을 갖는 세균에 대한 연구는 미흡하다.

본 연구에서는 섬유소, 녹말, 단백질, 지질 등 다양한 유기물을 분해하는 것으로 확인된 *Bacillus subtilis* CK-2 [19]가 분비하는 각종 가수분해효소들의 특성을 확인함으로써 이 균주의 산업적 활용을 위한 기초 자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서 사용한 균주는 기존의 연구에서 섬유소, 녹말, 단백질 및 지질에 대한 분해능을 가지는 것으로 확인된 *B. subtilis* CK-2를 사용하였다[19].

사용배지 및 배양방법

분리균주를 NB (nutrient broth, Difco) 배지에 접종하여 200 rpm, 35°C 배양기에서 배양하였다.

조효소액 제조

각종 가수분해 효소의 활성을 측정하기 위하여 다음과 같이 조효소액(crude enzyme extract) 시료를 준비하였다. 대수생

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3395, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : chkim@gntech.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

장기에 있는 *B. subtilis* CK-2 배지를 6,000× g에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 membrane filter (Φ 0.22 μm)로 2회 여과하여 각종 효소 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다[14].

효소의 활성 측정

각 분해효소의 활성은 다음과 같이 흡광도법으로 측정하였다.

Cellulase 활성 측정

섬유소분해효소의 활성은 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) 법에 의거하여 CMC로부터 유리되는 환원당의 농도로 측정하였다[4, 5]. DNS solution은 Na K tartarate 182 g, NaOH 10 g, DNS 10 g, phenol 2 g, NaSO₄ 0.5 g을 증류수 600 ml에 녹인 후 1,000 ml로 정용하여 갈색병에 넣어 4℃에 보관하면서 사용하였다. 기질용액은 완충용액(0.2 M phosphate buffer, pH 7.0)에 1%(w/v) CMC를 녹인 기질용액 0.9 ml를 55℃에서 5분간 예열 시킨 후 조효소액 0.1 ml를 가하여 55℃에서 10분간 반응 시킨 후 DNS solution 3 ml를 넣어 반응을 정지시켰다. 이를 끓는 물에 5분간 증탕하여 발색시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정한다. 다음 얻어진 흡광도 값은 glucose 표준곡선을 이용하여 생산된 환원당의 양을 계산하였다. Cellulase의 효소활성은 1분간 1 μg의 glucose를 생산하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

Amylase 활성 측정

녹말분해효소의 활성은 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) 법에 의거하여 녹말이 분해될 때 유리되는 환원당의 농도로 측정하였다[28, 29]. 기질용액은 완충용액(0.2 M phosphate buffer, pH 7.0)에 1%(w/v) soluble starch를 사용하였으며, amylase 효소활성은 1분간 1 μg의 glucose를 생산하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

Protease 활성 측정

단백질분해효소의 활성 측정은 Anson 방법에 따라서 실시하였다[2]. 기질용액은 0.5%(w/v) casein을 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0)에 가열하여 녹인 후 식힌다. 기질용액 1 ml에 조효소액 1 ml를 넣어 40℃에서 20분간 반응시킨 후, 0.4 M Trichloroacetic acid (TCA)를 2 ml 가하여 반응을 정지시킨 후 25분간 실온에서 방치시킨 다음 여과(Whatman No.2)한 여액 1 ml를 취하여 0.4 M Na₂CO₃용액 5 ml를 첨가한 후 folin 시약 1 ml를 첨가하여 40℃에서 20분간 발색시켜서 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease 효소활성은 1분간 1 μg의 tyrosine를 생산하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

효소 반응의 최적 조건

최적 온도

Cellulase, amylase 및 protease의 반응 온도를 확인하기 위해서 기질과 효소 혼합액을 35~75℃ 범위에서 20분간 반응시켜 각 효소의 활성을 측정하였다.

최적 pH

각 효소반응의 최적 pH를 확인하기 위하여 0.2 M sodium citrate buffer (pH 3.0, 5.0), 0.2 M phosphate buffer (pH 6.0, 7.0), 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0~12.0)를 사용하여 pH 3~12 범위로 조정된 기질에 효소를 첨가하여 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다.

효소의 열안정성

효소의 열에 대한 안정성을 확인하기 위해서 조효소액 0.1 ml를 25~100℃ 온도 범위에서 60분간 처리한 후 각 효소의 활성을 측정하였다.

효소 활성에 미치는 금속이온의 영향

효소의 종류에 따라 특정 금속은 효소 활성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데[10], 본 연구에서는 *B. subtilis* CK-2가 생성하는 각 분해효소에 대한 각종 금속 이온의 영향을 확인하고, 적정 농도를 측정하였다.

금속이온의 종류별 효소활성

효소 활성에 미치는 금속이온의 종류별 영향을 확인하기 위하여 MgSO₄, ZnSO₄, CaCl₂, KCl, CuSO₄, Co(NO₃)₂, MnCl₂의 금속염을 0.1%(w/v) 농도가 되게 제조한 기질용액 0.9 ml에 조효소액 0.1 ml를 넣어 교반하고 55℃에서 10분간 반응시킨 후 각 효소의 활성을 측정하였다.

금속이온의 농도에 따른 효소활성

Cellulase와 amylase의 활성을 촉진시키는 것으로 나타난 Co²⁺ 이온과 protease의 활성을 촉진시키는 Mn²⁺ 이온의 농도에 따른 효소활성에 대한 영향을 조사하기 위해 Co(NO₃)₂를 0.05~0.5%(w/v)까지의 농도로 0.05%(w/v) 간격으로, MnCl₂를 0.025~0.15%(w/v) 범위 농도로 0.05%(w/v) 간격으로 기질용액 0.9 ml에 조효소액 0.1ml를 넣어 교반하고 반응 온도 55℃, 50℃, 40℃에서 10분간 반응 시킨 후 효소 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 최적 활성 온도

Cellulase, amylase 및 protease의 최적 활성 온도는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. Cellulase는 55℃에서 5.34 units/mg protein으로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 35~65℃ 범위에서 비교적 높은 활성을 보였다. 이러한 결과는 이러한 결과는 대부분의 다른 *Bacillus* sp.가 생성하는 cellulase가 50℃ 이하에서 최적 온도를 나타내는 것 보다는 높았으며[21, 31, 34], *Bacillus licheniformis* [32] 의해 생성된 cellulase의 최적 활성 온도가 55℃라고 한 결과와 일치하였다.

Amylase의 최적 활성 온도는 50℃에서 9.98 units/mg protein으로 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 *Bacillus* sp. SUH4-2 (38)이 생산하는 α-amylase와 *Bacillus circulans* F-2 (8)

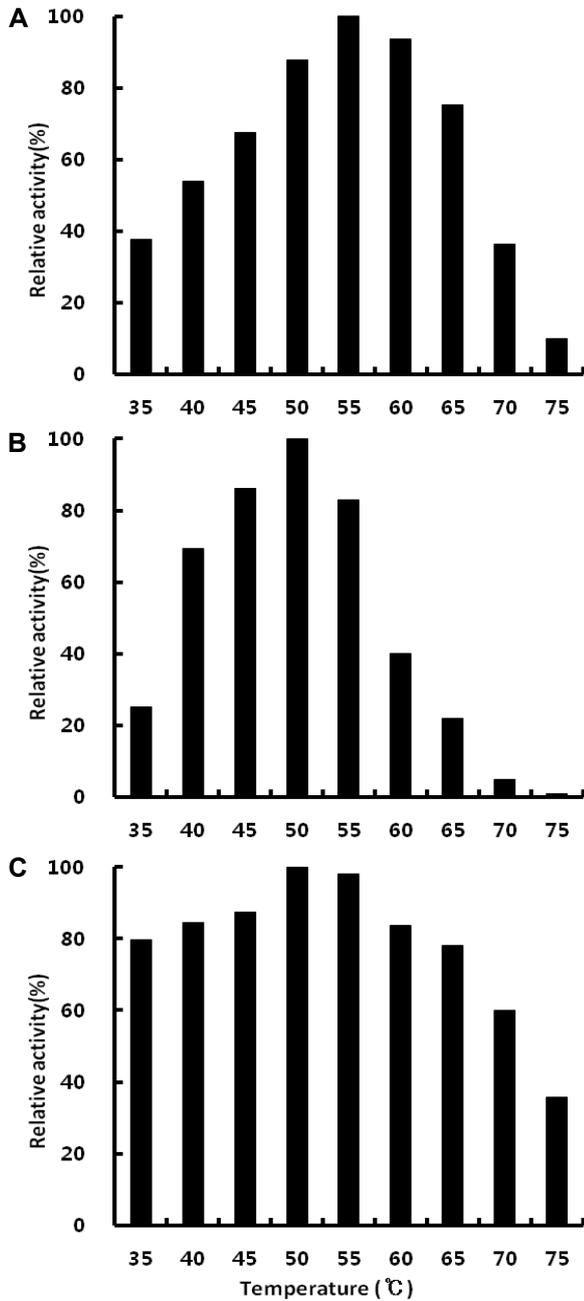


Fig. 1. Effects of temperature on activity of hydrolytic enzymes produced by *Bacillus subtilis* CK-2. A; cellulase, B; amylase, C; protease.

생산하는 α -amylase, *Bacillus* sp. TR-25 (33)가 생산하는 α -amylase의 최적 활성 온도가 60~65°C라는 보고 보다는 낮고, Lee 등[26]의 *Bacillus circulans*에 의해 생성된 호산성 α -amylase, Park 등[30]의 *Bacillus subtilis*에 의해 생성된 α -amylase의 최적 활성 온도가 45°C라는 보고 보다 높았으며, *Bacillus licheniformis* [6]에 의해 생성된 α -amylase의 최적 활성 온도는 48°C 라는 보고와 유사하였다.

Protease의 최적 활성 온도도 50~55°C에서 0.55~0.56 units/

mg protein으로 높게 나타났으며, 60°C 이상에서는 온도 상승에 따라 활성이 급격하게 감소한다는 사실을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 *Bacillus subtilis* PANH765 [22]에 의해 생성된 protease의 최적 활성 온도가 30°C, Shin 등[35]의 *Bacillus megaterium*에 의해 생성된 protease의 최적 활성 온도가 35°C, *Bacillus* sp. KUN-17 [14]에 의해 생성된 protease의 최적 활성 온도가 40°C라는 보고 보다 높았다. 반면 Kim 등[23]의 *Bacillus* sp.에 의해 생성된 protease의 최적 활성 온도 60°C, Chung [9]의 *Bacillus subtilis*에 의해 생성된 protease의 최적 활성 온도가 70°C라는 보고 보다 낮았다. Ahn 등[1]의 *Bacillus* sp.에 의해 생성된 protease, *Bacillus subtilis* LY-353 [24]에 의해 생성된 protease의 최적 활성 온도가 55°C, *Bacillus subtilis* CCKS-111 [7]이 생성하는 protease 최적 활성 온도가 50°C라는 보고와 유사하였다.

열에 대한 안정성

Cellulase, amylase 및 protease 효소반응의 열에 대한 안정성을 확인하기 위해서 조효소액 0.1 ml를 25~70°C 온도 범위에서 20분간 열처리하여 배양용액 중에 잔존하는 각 효소 활성을 측정된 결과는 Fig. 2과 같았다.

Cellulase, amylase, protease 모두 40°C까지는 각각 7.06 units/mg protein, 5.62 units/mg protein, 0.51 units/mg protein로서 안정하였으며, 50°C 까지 80% 이상의 활성을 유지하는 것을 확인하였다. Cellulase는 40°C 이후 활성이 줄어들고, 65°C에서 활성이 거의 소멸하였다. Amylase는 40°C까지 5.62 units/mg protein의 높은 활성을 보이다가 이후부터 활성이 점차 감소하였다. Protease의 활성은 45°C까지 0.51 units/mg protein 정도로 높게 유지되다가 50°C 이후 활성이 급격하게 떨어지는 것을 확인하였다.

Cellulase의 경우 Kim 등[20]이 보고한 *Bacillus* sp., Park 등[31]이 보고한 *Bacillus licheniformis*, Hwang 등[13]이 보고한 *Bacillus licheniformis* B1에 의해 생성된 cellulase의 열 안정성과 유사하였다.

Amylase의 경우에는 *Bacillus* sp. SUH4-2 [38]가 생산하는 α -amylase가 60°C에서 가장 높은 온도 안정성을 보였다는 것과는 차이가 있지만, Yi [37]의 *Bacillus lentus*에 의해 생성된 α -amylase가 48°C 이하의 온도에서 안정하다는 보고와 유사하였다.

Protease의 경우에는 *Bacillus subtilis* JK-1 [20]과 *Bacillus subtilis* LY-353 [25]에 의해 생성되는 protease에 비해 비교적 낮은 열 안정성을 나타내었고, Ahn 등[1]의 *Bacillus* sp.에 의해 생성된 protease와 유사한 열 안정성을 보였다.

금속이온의 종류에 따른 효소활성

금속이온이 각 효소 활성에 미치는 영향은 Table 1에 나타낸 바와 같다. 실험에 사용한 모든 금속이온은 cellulase 활성

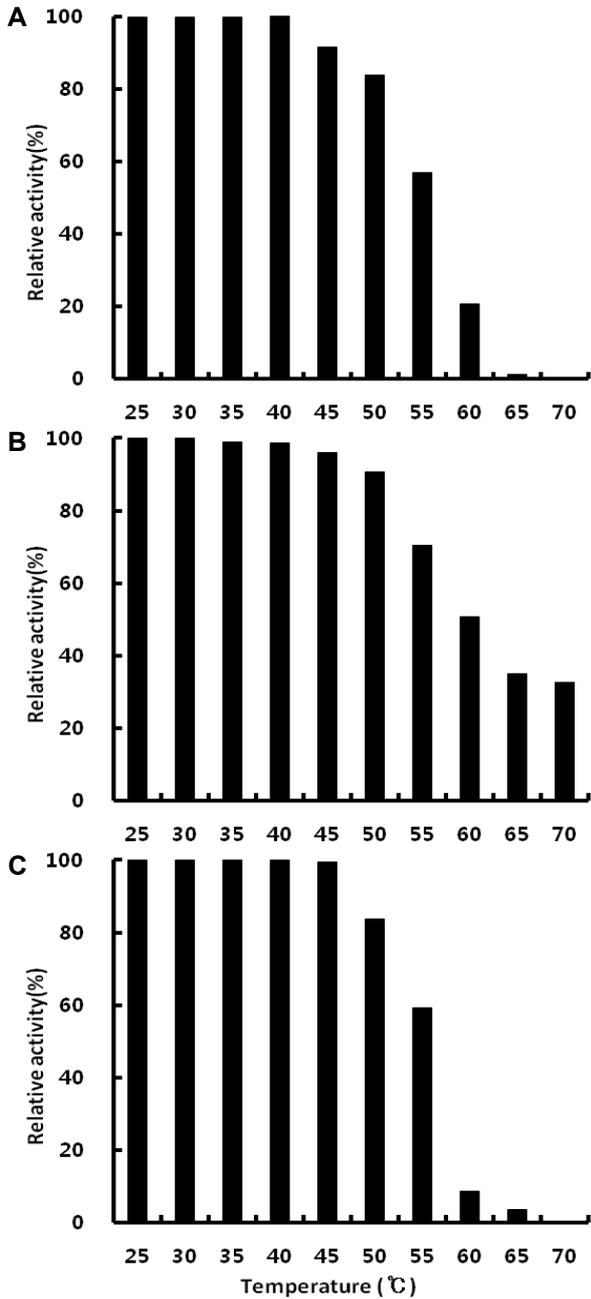


Fig. 2. Temperature stability of hydrolytic enzymes produced by *Bacillus subtilis* CK-2. A; cellulase, B; amylase, C; protease.

을 촉진하는 것을 확인하였으며, 특히 Co^{2+} 이온을 첨가하였을 때 12.23 units/mg protein로서 무처리구의 6.56 units/mg protein에 비하여 2배 정도 높은 효소 활성을 나타내었다. Mg^{2+} 와 Cu^{2+} 이온은 각각 10.45 units/mg protein, 7.44 units/mg protein로서 효소 활성을 촉진하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 다른 논문에서 *Bacillus* sp.가 생성하는 cellulase가 Co^{2+} 이온[21]과 Cu^{2+} 이온[32]에 의해 활성이 촉진된다는 보고와 유사함을 알 수 있다. 반면 Zn^{2+} 이온을 처리하였을 때는

Table. 1. Effect of metal ions on activity of hydrolytic enzymes produced by *Bacillus subtilis* CK-2

Ion	Metal	Relative activity (%)		
		Cellulase	Amylase	Protease
Mg^{++}	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	66.0	99.0	121.3
Zn^{++}	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	55.6	78.4	85.1
Ca^{++}	CaCO_3	69.1	120.1	97.9
K^+	KCl	71.0	91.2	100
Cu^{++}	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	113.4	92.8	117.0
Co^{++}	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	186.4	167.1	91.5
Mn^{++}	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	159.3	91.8	376.6
-	NONE	100.0	100.0	100.0

효소활성이 가장 현저한 저해 효과를 나타내었고, Mg^{2+} 과 Ca^{2+} , 그리고 K^+ 도 효소 활성을 저해한다는 사실을 확인하였다.

Amylase 활성은 조효소액에 Co^{2+} 와 Ca^{2+} 를 첨가 하였을 때 활성이 증가하였으며, 특히 Co^{2+} 를 첨가하였을 때 10.21 units/mg protein으로, 무처리구의 6.11 units/mg protein에 비하여 훨씬 높은 효소 활성을 나타내었다. Zn^{2+} 을 첨가하였을 때는 효소활성이 20% 이상 감소하였고, Mg^{2+} 이온은 영향이 거의 없었으며, K^+ , Cu^{2+} , 그리고 Mn^{2+} 에 의해서는 효소활성이 약 10% 저해되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 Roh 등[35]이 보고한 *Bacillus* sp. TR-25에 의해 생성된 α -amylase의 경우 Ca^{2+} 에 의해 효소 활성이 촉진되고, Mn^{2+} 과 Cu^{2+} 는 효소 활성에 영향을 미치지 않았다는 보고와 차이가 있다.

Protease 활성은 Mg^{2+} , Cu^{2+} , 그리고 Mn^{2+} 을 첨가하였을 때 효소활성이 높았으며, 특히 Mn^{2+} 이온을 처리하였을 때에는 1.77 units/mg protein로서 무처리구의 0.47 units/mg protein에 비하여 3배 이상 효소 활성을 촉진시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Choi 등[7]의 *Bacillus subtilis* CCKS-111와 Kim 등[24]의 *Bacillus* sp.가 생성하는 protease가 Cu^{2+} 에 의해 활성이 가장 높았다는 보고와 차이가 있다. 반면 Zn^{2+} 을 첨가 하였을 때 약 15%, Co^{2+} 를 첨가하였을 때 약 9% 효소활성이 억제되었는데, 이는 Chung 등[9]의 *Bacillus subtilis*가 생성하는 protease의 경우 Zn^{2+} 에 의해 활성이 촉진된다는 보고와 차이가 있다. K^+ 이온은 protease 활성에 영향이 미치지 않는 것으로 확인되었다.

금속이온의 농도에 따른 효소활성

Cellulose와 amylase의 활성을 높여준 금속이온 중 활성이 가장 높았던 Co^{2+} 이온과 protease의 활성을 촉진하는 것으로 확인된 Mn^{2+} 이온을 대상으로 농도에 따른 각 효소활성에 대한 영향을 측정된 결과는 Fig. 3, Fig. 4, 그리고 Fig. 5와 같다.

Cellulase의 경우 Co^{2+} 이온에 의해 활성이 촉진되는 것을 확인할 수 있었는데, 무처리구에서 6.43 units/mg protein인 반면 0.35% 이상의 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 를 처리하였을 때 16.50 units/mg protein 정도의 활성을 나타냄으로써 250% 이상 활성이 촉진

되었다. Amylase의 경우에는 무처리구에서는 4.62 units/mg protein 정도의 활성을 나타낸 반면 0.1% 이상의 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 를

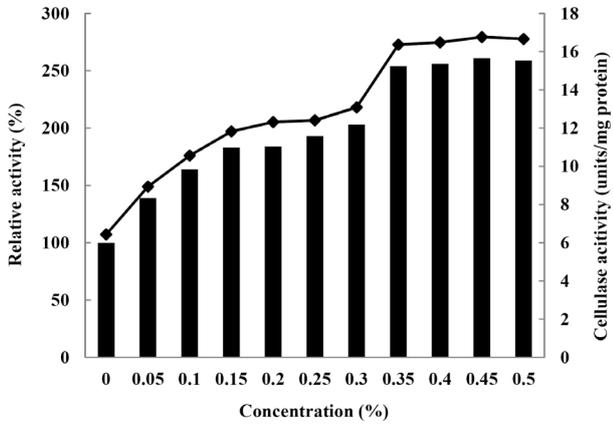


Fig. 3. Effect of cobalt ion concentrations on the activity of cellulase from *Bacillus subtilis* CK-2. ■, relative activity; ◆, cellulase activity.

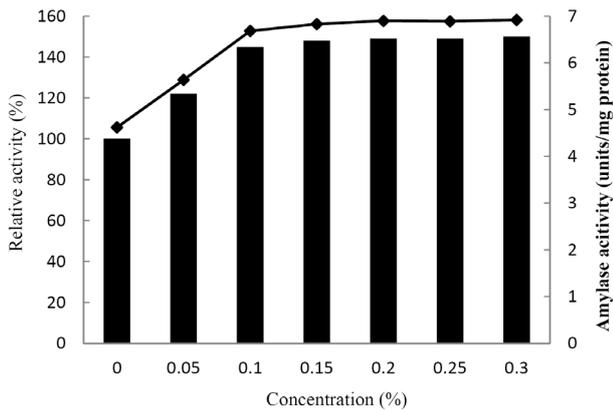


Fig. 4. Effect of cobalt ion concentrations on the activity of amylase from *Bacillus subtilis* CK-2. ■, relative activity; ◆, amylase activity.

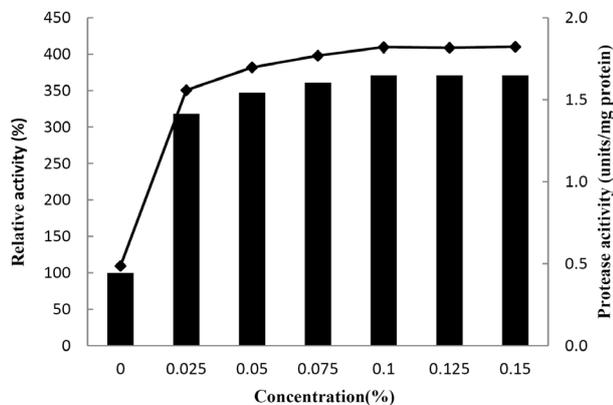


Fig. 5. Effect of manganese ion concentrations on the activity of protease from *Bacillus subtilis* CK-2. ■, relative activity; ◆, protease activity.

처리하였을 때는 6.90 units/mg protein 정도로 150% 이상 활성이 촉진되는 것을 확인하였다. Protease의 경우에는 무처리구에서 0.49 units/mg protein의 활성을 나타낸 반면 0.025% 이상의 MnCl_2 를 처리하였을 때 활성이 촉진되었으며, 0.75% 이상 처리하였을 때 최고 1.82 units/mg protein로서 370% 정도로 활성이 촉진되는 것을 확인하였다.

효소반응의 최적 pH

Cellulase, amylase 및 protease의 pH에 따른 효소활성은

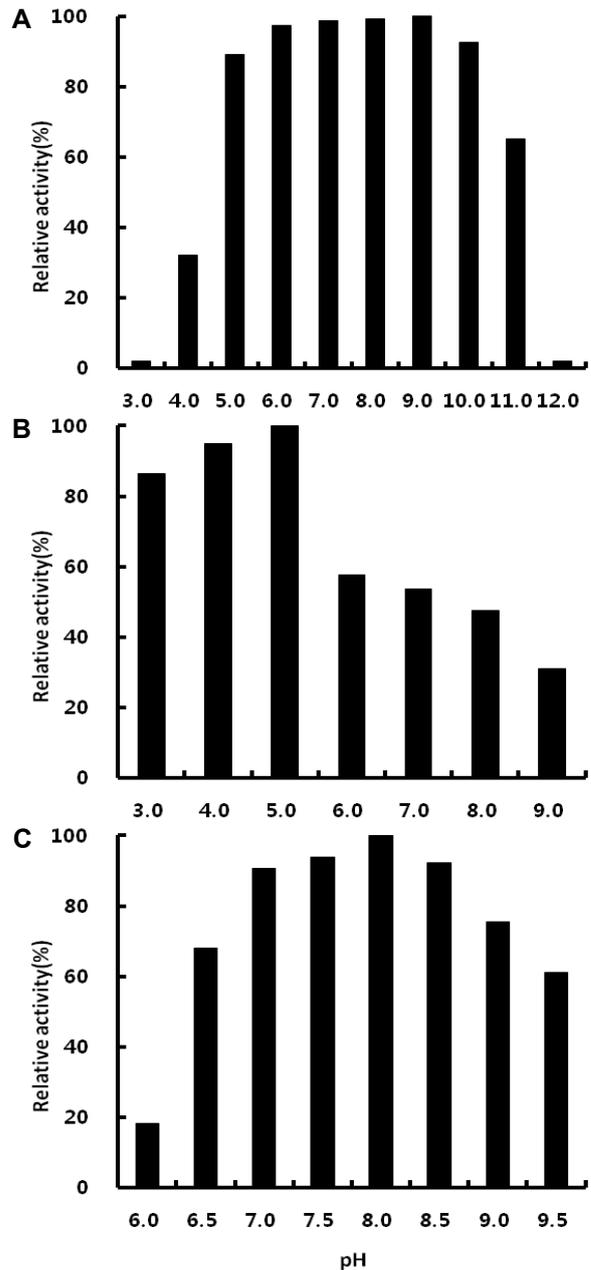


Fig. 6. Effect of pH on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Bacillus subtilis* CK-2. A; cellulase, B; amylase, C; protease.

Fig. 6와 같이 나타났다. Cellulase 효소활성은 pH 5.0~10.0의 넓은 범위에서 거의 유사하게 나타남으로써 pH에 대한 안정성이 매우 높은 것을 확인할 수 있었고, pH 4.0 이하 및 pH 11.0 이상에서는 효소활성은 급격하게 감소하는 것을 알 수 있었다. 다른 보고[12, 18, 33, 35]에서 확인된 *Bacillus* sp.의 경우와 비교할 때 *Bacillus subtilis* CK-2가 생성하는 cellulase는 매우 넓은 pH 범위에서 높은 활성을 유지한다는 사실을 알 수 있었다.

Amylase의 경우에는 pH 5.0에서 7.00 units/mg protein으로 가장 높은 활성을 나타내었으며, pH 4.0에서도 비교적 높은 활성을 보인 반면 pH 6.0에서는 효소 활성이 57% 정도로 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 이전의 많은 연구 [8, 27, 31, 34]에서 *Bacillus* sp.가 생성하는 amylase의 경우 산성의 최적 pH를 나타내는 것과 유사한 결과이다.

Protease는 pH 7.0~8.5의 범위에서 높은 활성을 나타내었으며, pH 8.0에서 0.74 units/mg protein으로 가장 높은 활성을 보였다. pH 6.0 이하에서는 효소활성이 거의 나타나지 않았으며, pH 9.5에서도 60% 정도의 효소활성이 나타났다. 기존의 보고[7, 14, 25, 35]에서 *Bacillus* sp.의 protease는 다양한 pH 조건에서 최적 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

이러한 결과를 바탕으로 *B. subtilis* CK-2는 식품, 사료 등의 개발 뿐만 아니라 유기성 폐기물의 활용 및 처리에 중요한 자원으로의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 경남과학기술대학교 연구비의 지원으로 수행한 연구 결과입니다.

References

- Ahn, J. W., Oh, T. K., Park, Y. H. and Park, K. H. 1989. Partial purification and characterization of the alkaline protease from *Bacillus* sp. *Kor. J. Microbiol. Biotech.* **18**, 344-351.
- Anson, M. L. 1939. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **22**, 79-89.
- Ariffin, H., Abdullah, N., Kalsom, M. S. U., Shirai, Y. and Hassan, M. A. 2006. Production and characterisation of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *J. Engineer. Technol.* **3**, 47-53.
- Bailey, M. J., Biely, P. and Poutanen, K. 1992. Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* **23**, 257-270.
- Bernfeld, P., Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. 1955. *Methods in Enzymology*, pp. 149-154, Acad. Press: New York.
- Chandra, A. K., Medda, S. and Bhadra, A. K. 1980. Production of extracellular thermostable α -amylase by *Bacillus licheniformis*. *J. Ferment. Technol.* **58**, 1-10.
- Choi, C., Choi, K. S., Cho, Y. J., Lim, S. I. and Kim, S. 1996. Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111 in korean traditional soy sauce. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 915-921.
- Chung, M. J., Taniguchi, H., Maruyama, Y. and Lee, M. J. 1982. Studies on α -amylase of *Bacillus circulans* F-2. Part II. Enzymatic characteristics of the purified α -amylase. *Kor. J. Microbiol. Bioeng.* **10**, 123-132.
- Chung, S. J., Kim, Y. S., Sung, H. C., Choi, Y. J. and Yang, H. C. 1988. A study on the alkaline protease produced from *Bacillus subtilis*. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **31**, 356-360.
- Cowan, D., Daniel, R. and Moran, H. 1985. Thermophilic protease, properties and potential applications. *Trends Biotechnol.* **3**, 68.
- Hiyama, R., Gisusi, S. and Harada, A. 2011. Evaluation of waste mushroom medium from cultivation of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) as feedstock of enzymic saccharification. *J. Wood Sci.* **57**, 429-435.
- Horikoshi, K., Nakao, M., Kurono, Y. and Sashihara, N. 1984. Cellulases of an alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil. *Can. J. Microbiol.* **30**, 774-779.
- Hwang, J. S., Yoo, H. J., Kim, S. J. and Kim, H. B. 2008. Characterization of β -1,4-glucanase activity of *Bacillus licheniformis* B1 in Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* **44**, 69-73.
- Hwang, S. Y. 1995. Purification and Characterization of An extracellular serine protease from *Bacillus* sp. strain KUN-17. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 53-59.
- Im, M. 1982. Fish protein hydrolysates. *Process Biochemistry* **1**, 26.
- Ishede, K. I. and Nagasaki, M. 1989. Effect of protease on textural properties of wheat flour dough. *Nippon Shochuinh Kogyo Gakkaishi* **36**, 1003.
- Ito, S., Shikata, S., Ozaki, K., Kawai, S., Okamoto, K., Inoue, S., Takei, A., Ohta, Y. and Satoh, T. 1989. Alkaline cellulase for laundry detergents: production by *Bacillus* sp. KSM-635 and enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 1275-1281.
- Johansson, T. and Nyman, P. O. 1993. Isoenzymes of lignin peroxidase and manganese peroxidase from the white-rot *Basidiomycete*. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 49-56.
- Kim, C. H. and Lee, S. H. 2011. Isolation of *Bacillus subtilis* CK-2 hydrolysing various organic materials. *J. Life Sci.* **21**, 1716-1720.
- Kim, J. Y. 2007. Isolation and characterization of an alkaline peptase produced by *Bacillus subtilis* JK-1. *Kor. J. Microbiol.* **43**, 331-336.
- Kim, J. Y., Hur, S. H. and Hong, J. H. 2004. Isolation and characterization of an alkaline cellulase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. *Kor. J. Microbiol.* **40**, 139-146.
- Kim, K. P., Kim, N. H., Rhee, C. H., Woo, C. J. and Bae, D. H. 2002. Isolation and characterization of protease producing bacteria from soil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 754-759.
- Kim, T. H., Park, S. H., Lee, D. S., Kwon, E. K., Kim, J. K. and Hong, S. D. 1990. Properties of alkaline protease produced by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**, 159-164.
- Kim, T. I., Han, J. D., Jeon, B. S., Ha, S. W., Yang, C. B. and Kim, M. K. 1999. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* CH-10 secreting cellulase from cattle manure.

- Kor. J. Microbiol. **35**, 277-282.
25. Lee, B. W., You, Y. S., Im, G. H. and Choi, X. U. 1991. Purification and properties of protease from *Bacillus subtilis* LY-353. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **20**, 21-26.
 26. Lee, J. S., Kim, J. Y., Kim, H. B. and Lee, D. S. 2000. Cloning and expression of an acidophilic α -amylase gene from *Bacillus circulans* in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **36**, 112-118.
 27. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
 28. Nakasaki, K. and Akiyama, T. 1988. Effect of seeding on thermophilic composting of household organic waste. *J. Ferment. Technol.* **66**, 37-42.
 29. Oh, D. H., Lee, K. P., Pyun, Y. R. and Yu, J. H. 1981. Studies on the production of thermostable amylase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **9**, 91-97.
 30. Park G. W., Kim, M. D., Ahn, J. W., Kim, Y. B. and Seo, J. H. 1998. Characterization of enzymatic properties of *Sterptomyces albus* amylase expressed in recombinant *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**, 1426-1431.
 31. Park, C. S., Kang, D. O. and Choi, N. S. 2012. Characterization of cellulase and xylanase from *Bacillus subtilis* NC11 isolated from environmental soil and determination of its genes. *J. Life Sci.* **22**, 912-919.
 32. Park, J. D., Kim, Y. A. and Yoon, K. H. 2009. Properties of a *Bacillus licheniformis* cellulase produced by Recombinant *Escherichia coli*. *Kor. Microbiol.* **45**, 257-262.
 33. Roh, S. B., Son, H. J. and Lee, J. K. 1997. Thermotable α -amylase production by thermophilic *Bacillus* sp. TR-25 Isolated from extreme environment. *J. Life Sci.* **7**, 30-38.
 34. Shikata, S. K., Saeki, H., Okoshi, T., Yoshimatsu, K., Ozaki, S. and Ito, S. 1990. Alkaline cellulases for laundry detergents: production by alkalophilic strains of *Bacillus* and some properties of the crude enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 91-96.
 35. Shin, S. U., Kwon, M. A., Jang, M. S., Jung, K. J. and Seo, H. J. 2004. Production conditions of alkaline protease by *Bacillus megaterium*. *Kor. J. Food Preser.* **11**, 227-232.
 36. Williams B. C., McMullan, J. T. and McCahey, S. 2001. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock. *Bioresour. Technol.* **79**, 227-230.
 37. Yi, Y. P. 2003. Study on the produces of *Bacillus lentu* α -amylase. MS thesis, Chongju University.
 38. Yun, S. H., Kim, M. J., Kim, J. W., Kwun, G. S., Lee, I. W. and Park, K. H. 1995. Purification and characterization of a novel maltooligosaccharide forming α -amylase from *Bacillus* sp. SUH4-2. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 573-579.

초록 : 된장으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* CK-2가 생산하는 가수분해효소의 활성 특성

이상협 · 김철호*

(경남과학기술대학교 제약공학과)

이전의 논문에서 된장으로부터 섬유소와 지질, 녹말, 그리고 단백질을 포함하는 다양한 유기물을 가수분해하는 세균을 분리한 바 있다. 본 연구에서는 분리균주인 *Bacillus subtilis* CK-2가 생산하는 각종 가수분해효소의 조효소 특성을 확인하였다. 섬유소분해효소의 경우 적정 수소이온농도는 pH 5.0, 적정온도는 55°C로 확인되었으며, pH 5.0~10.0과 20~50°C의 범위에서 높은 활성을 나타내었다. 섬유소분해효소는 Co^{2+} 이온에 의해 활성이 높아지며, 0.45%(w/v)의 Co^{2+} 이온 농도에서 가장 높은 활성을 보였다. 녹말분해효소의 경우 적정 수소이온농도는 pH 5.0, 적정온도는 50°C로 확인되었으며, pH 4.0~5.0과 20~50°C의 범위에서 높은 활성을 나타내었다. 녹말분해효소는 Co^{2+} 이온에 의해 활성이 높아지며, 0.2%(w/v)의 Co^{2+} 이온 농도에서 가장 높은 활성을 보였다. 단백질분해효소의 경우 적정 수소이온농도는 pH 8.0, 적정온도는 50°C로 확인되었으며, pH 7.0~8.5과 20~50°C의 범위에서 높은 활성을 나타내었다. 섬유소분해효소는 Mn^{2+} 이온에 의해 활성이 높아지며, 0.125%(w/v)의 Mn^{2+} 이온 농도에서 가장 높은 활성을 보였다. 이러한 결과로부터 *B. subtilis* CK-2가 생산하는 가수분해효소를 산업적으로 이용하기 위해서는 효소의 종류에 따라 수소이온농도와 온도, 그리고 금속이온을 적절하게 조절할 필요가 있다는 것을 알 수 있다.