

Optimization of Medium to Improve Protease Production Using Response Surface Methodology by *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM115785

Hee Gun Yang, Gwangsu Ha, Myeong Seon Ryu, Se Won Park, Ho Jin Jeong, Hee-Jong Yang and Do-Youn Jeong*

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Korea

Received July 26, 2021 / Revised August 18, 2021 / Accepted August 18, 2021

In this study, the optimal medium composition for enhancing protease production was established by the *Bacillus* strain isolated from *Makgeolli*, a traditional fermented food, using the response surface methodology. *B. amyloliquefaciens* SRCM115785 was selected as the protease producer by productivity analysis and identified by 16S rRNA gene sequencing. Plackett-Burman design (PBD) was introduced to analyze the effect of each component on protease production among the 11 selected medium components. As a result, glucose, yeast extract, and beef extract were finally selected as factors for enhancing protease production. Central composite design (CCD) analysis was designed as a method to determine the optimal concentration of each component for protease production and the concentration of each medium composition for maximum protease production was predicted to glucose 6.75 g/l, yeast extract 12.42 g/l and beef extract 17.48 g/l. The suitability of the experimental model was proved using ANOVA analysis and as a result of quantitative analysis to prove this, the amount of increase was 230.47% compared to the LB medium used as a control. Through this study, the optimization of medium composition for enhancing protease production was established, and based on this, it is expected that it can be efficient use of protease as an industrial enzyme.

Key words : *Bacillus amyloliquefaciens*, optimization, protease activity, response surface methodology

서 론

Protease는 단백질과 peptide 결합을 가수분해하는 효소로서 식물, 동물 및 미생물을 포함한 모든 생물이 다양한 조건에서 생산할 수 있으며 세제, 제약산업, 생물 정화 공정 및 식품산업 등 다양한 분야에 이용되고 있다[5, 14]. 세균, 곰팡이, 효모 등과 같은 다양한 미생물로부터 생성되는 protease는 산업용 효소 시장에서 약 60%라는 높은 점유율을 나타내며, 대량배양을 통한 안정적 생산 및 최적화된 공정을 통해 생산성과 경제성에 대한 높은 효율을 나타내므로 산업적 측면에서 매우 유용하다고 평가되어지고 있다[5, 14]. 현재까지 protease를 생산하는 다수의 미생물들이 보고되었고, 특히 세균은 protease를 세포 외부로 분비하여 공정상 여러 이점을 지니고 있으며[2, 5, 14], 이 중 우리나라 전통발효식품인 청국장[1], 된장[11], 간장[12] 등에서 분리되는 *Bacillus*속 균주는 안정성이 확보된 생물자원으로 인식되어 바이오산업에 높은 활용 가치를

나타내며 주목을 받고 있다[26].

유용 미생물에 대한 산업적 적용을 위해 미생물 자원의 탐색 및 발굴 외에도 대량배양이 필수적으로 이루어져야 하므로 미생물의 성장 및 대사산물의 생산에 대하여 효율적으로 활용할 수 있는 최적화된 배양조건 확립이 필수적이다[7, 9, 10]. 배양조건 중 배지 최적화는 균체량 증가 및 목적으로 하는 생산물질의 회수 등의 다양한 변수에 따른 조건들을 고려해야 한다[25]. 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)은 각 독립변수들의 복합적인 상호작용을 통해 결과의 최대값과 최소값을 예상할 수 있으며, 이를 토대로 변수들의 최적값을 정의하는데 있어서 효과적인 방법이다[6, 7]. 반응표면분석법을 응용한 배양 조건의 최적화는 배지 성분 간의 상호 관계를 확인하는데 유용하여 기존의 방법에 비해 간소화된 공정 및 실험경비 절감 등의 효과를 나타내므로, 생물공학분야에서 최적 조건을 확립하기 위한 방법으로 널리 사용되고 있다[3, 6, 25].

본 연구에서는 전통발효식품인 김치, 된장, 막걸리 등에서 protease 활성이 높은 균주를 스크리닝하여 활성이 높은 *Bacillus*속 균주들을 분리 및 동정하여 선별하였다. 최종적으로 선별된 균주 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM115785의 protease 생산량 증진을 위한 배지성분을 반응표면 분석법을 적용하여 조사하고, 각 성분의 농도를 설정하여 대량생산을 위한 최적의 산업적 배지조건을 확립하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-63-650-2000, Fax : +82-63-650-9590

E-mail : jdy2534@korea.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.

재료 및 방법

미생물 분리 및 배양

미생물 분리를 위해 전통발효식품인 김치, 된장, 막걸리를 수집하였고, 0.85% NaCl 용액에 수집한 시료 1 g을 현탁하여 단계희석을 진행하였고, 각 희석액 100 μ l을 Luria-Burtani (LB) (Difco, Sparks, MD, U.S.A.) 배지에 도말한 후 30°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 배지 위에 형성된 각각의 단일 colony를 선별하여 희석도말을 통해 순수분리한 후, LB배지에 균주를 접종하여 24시간 동안 30°C에서 150 rpm 조건으로 진탕 배양 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 회수한 배양 상등액을 이용하여 protease 효소 활성을 측정하였다.

Protease 고생산 균주 선발

Protease 효소 활성을 분석하기 위해 Skim milk (Difco, Sparks, MD, U.S.A.)를 기질로 한 skim milk agar (2% skim milk w/v) 배지를 제조하여 측정하였다. 각 균주의 배양 상등액을 0.45 μ m membrane filter (Sartorius, Frankfurt, Germany)를 이용하여 제균한 후, 2% skim milk agar 배지에 well diffusion 방법으로 측정하여 protease 분비능을 확인하였다 [16]. Protease 활성의 강도는 투명한 크기를 측정하여 우수 균주를 선발하였다. Well diffusion 방법으로 측정하여 얻은 protease 생산량을 unit 단위의 정량평가를 위해 Montville의 방법 [20]을 활용하여 well diffusion method를 통해 얻은 투명환의 지름(mm)과 log U/ml의 값의 선형상관(linear correlation) 관계를 분석하였다(Fig. 1).

Protease 생산균주의 동정 및 계통학적 분석

Protease 생산 균주의 동정하기 위해 27F forward primer (5'-AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3')와 1492R reverse pri-

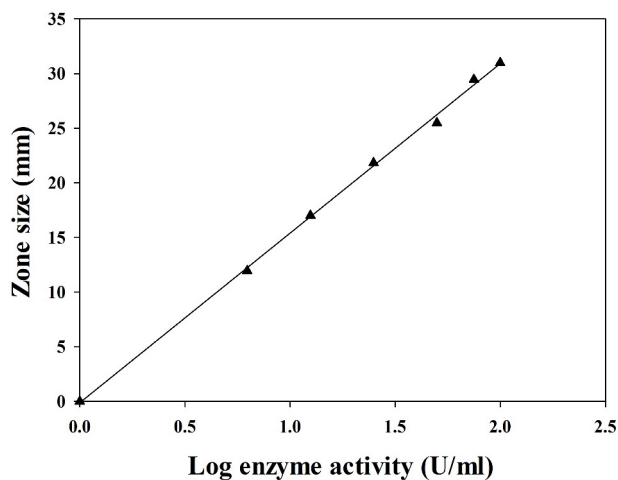


Fig. 1. Linear correlation relationship between the halo zone diameter (mm) and log of the enzyme activity (U/ml) on protease production. R-squared = 0.9986.

mer (5'-GGTACCTTGTTACGA CTT-3')를 이용하여 16S rRNA 유전자 서열을 증폭하였으며, EzTaxon-e server (<http://www.ezbiocloud.net/>) [29]와 NCBI의 nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)로부터 높은 유사도를 나타내는 표준균주들의 16S rRNA 유전자 서열을 확보하였다. Clustal W 2.0 (EMBL-EBI, Hinxton, Cambridgeshire, UK)을 사용하여 서열 간 상호 비교분석을 진행하였다. 이를 토대로 Mega 7.0.26 program을 사용하여 근연결합법(Neighbor joining method) [24]으로 계통수를 작성하였다.

SRCM115785의 배양시간에 따른 protease 생산 및 균주 성장 조사

Protease 고생산균주로 최종 선발한 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM115785 균주의 성장 및 protease 생산량을 조사하기 위해 100 ml의 LB 액체배지에 전배양액 1%를 접종 후, 30°C, 150 rpm으로 24시간 동안 진탕 배양하였으며, 4시간마다 배양액을 회수하여 protease 생산량 및 건조 균체량(DCW, dried cell weight)과 흡광도(OD600)를 조사하였다. 건조 균체량의 측정을 위해 배양액 10 ml을 30분간 13,000 rpm에서 원심분리하여 항량에 도달할 때까지 80°C에서 건조 후 균체량을 측정하였고, 흡광도는 배양액을 회수하여 UV/VIS spectrophotometer (Analytic Jena, Germany)를 이용하여 600 nm에서 측정하였다. 배양 시간별 배양액 내의 protease 생산량은 앞서 수행한 2% skim milk 배지를 이용한 well diffusion 방법을 사용하여 측정하였다.

Plackett-Burman design (PBD) 설계를 통한 protease 생산 배지 성분의 선별

SRCM115785의 protease 생산을 위한 배지 성분 및 각 성분의 최적 농도를 확립하기 위해 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)을 사용하였다. *Bacillus* 속 미생물의 성장 및 protease 생산에 영향을 주는 성분으로 조사된 탄소원 3종(glucose, sucrose, starch), 질소원 4종(yeast extract, peptone, malt extract, beef extract), 무기원소원 4종(CaCl₂, K₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄) [8, 13, 19, 21, 22, 27]을 11개를 독립변수로 설정하고 3개의 수준 (+1, 0, -1)으로 주효과를 나타내는 성분을 선별할 수 있는 시험법으로 PBD를 설계하였다. 15개의 실험구를 구성하여 각 성분을 고농도 수준 (+1)과 중심점 (0), 저농도 수준 (-1)으로 설정하였고, 각 실험구의 종속변수는 protease 생산량(mm)을 설정하였다(Table 2). 3회 반복측정을 통해 모든 실험구의 평균값을 산출하였고, Design expert 12 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) program을 사용하여 실험계획과 최적화를 위한 통계분석을 수행하였다. 본 연구에서는 Design expert program에 의해 설계된 독립변수의 수준에 따른 각 실험구 고유의 배지 OD값에 의한 protease 생산량에 대한 오차를 배제하기 위해 각 실험구로부

터 얻어진 종속변수 값을 diffusion method를 통하여 얻었으며, mm 단위로 측정된 protease 생산량 수치에 대하여 투명한 지름(mm)과 unit (U/ml)간의 선형관계 식에 대입하여 정량값을 산출하였다.

Central composite design (CCD)을 통한 protease 생산 배지성분의 농도 최적화

PBD 설계로부터 얻은 실험결과를 통해 protease 생산에 주로 영향을 미치는 3개의 독립변수인 glucose, yeast extract, beef extract의 농도 최적화를 위해 통계학적 방법인 central composite design (CCD)을 설계하였다. 3개의 중심점을 포함한 17개의 실험구를 구성하여 선별된 3개의 독립변수 glucose (X₁), yeast extract (X₂), beef extract (X₃)를 5개의 수준(-2, -1, 0, +1, +2)으로 설정하였다. SRCM115785 균주의 protease 생산을 위한 3개의 변수에 대하여 회귀분석을 위한 방정식은 다음과 같다.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Y는 protease 생산량(mm)을 나타내는 종속변수로, X_i는 각각의 독립변수, β₀는 상수계수, β_i, β_{ii}, β_{ij}는 각 독립변수들의 상호작용 계수를 나타낸다[6]. 회귀분석에 의해 산출된 결과는 Design expert 12 program을 이용하여 예측하였고, analysis of variance (ANOVA) 분석을 수행하여 실험모델의 통계적 유의성을 검정하였다. 위의 결과들을 바탕으로 protease 최대 생산을 위한 3가지 배지 성분의 최적 농도를 예측하였다. 이후 예측된 최적 조건에서의 protease 생산량 분석을 통해 실험결과와의 재현성을 확인하였다. 일반배지와 비교를 통한 효율성 검증을 위해 추가적으로 Cupp-Enyad의 방법[4]을 이용하여 정량분석을 수행하였다. 0.65% casein solution (w/v, in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5) 5 ml과 배양 상등액 1 ml을 혼합하여 37°C 항온수조에서 10분간 반응하였다. 반응액에 110 mM TCA (trichloroacetic acid) 5 ml을 첨가하여 반응을 중지시키고, 37°C 항온수조에서 30분간 안정화하였다. 0.45 μm filter를 이용하여 불용물질을 제거하고 500 mM sodium carbonate solution 5 ml과 2 N Folin’s reagent 1 ml을 혼합하였다. 혼합액은 37°C 항온수조에서 30분간 반응 후, 0.45 μm filter를 이용하여 불용물질을 제거하고 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease 효소활성을 정량화하기 위해 tyrosine을 표준물질로 사용하여 표준곡선을 작성하였으며, 1 unit은 1분 동안 tyrosine 1 mg을 가수분해 할 수 있는 protease의 양으로 정의하여 U/ml로 나타내었다.

결과 및 고찰

Protease 고생산 균주 선발 및 선발 균주의 동정

Table 1. Results of protease production by 6 isolates of *Bacillus* sp. strains in LB medium

Microorganisms	Isolation source	Protease activity (diameter, mm)
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM115670	Kimchi	17.0
<i>Bacillus subtilis</i> SRCM115700	Makgeolli	16.5
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM115723	Doenjang	16.5
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM115727	Doenjang	16.3
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM115779	Makgeolli	16.2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRCM115785	Makgeolli	19.5

우리나라의 전통발효식품인 김치, 된장, 막걸리로부터 134종의 미생물을 분리하였으며, protease 고생산 균주의 선별을 위해 0.45 μm membrane filter (Sartorius, Frankfurt, Germany)를 이용하여 제균한 후 균주의 배양 상등액을 2% skim milk agar 배지에 well diffusion 방법[16]으로 측정된 결과 72종의 미생물이 protease 활성이 나타났으며, 이 중 6종이 16 mm 이상의 우수한 protease 효소 활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 19.5 mm의 가장 높은 protease 생성능을 보인 SRCM115785 균주를 최적화를 위한 균주로 최종 선정하였다 (Table 1). 최종 선별한 SRCM115785 균주의 16S ribosomal RNA 유전자 염기서열을 분석하여 1,492 bp의 서열을 해독하였고, Ezbiocloud [29]와 GenBank에 등록된 표준균주들 간의 염기서열과 비교한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7^T 균주와 99.86%의 가장 높은 유사도를 확인하였다. 또한, SRCM 115785 균주의 계통학적 분석을 위해 근린결합법을 기반으로 하여 evolutionary distance를 추론하였으며, 계통수의 신뢰도를 높이기 위해 bootstrap을 1,000회 수행한 결과, 최종 선발한 균주를 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM115785로 명명하였다 (Fig. 2). *B. amyloliquefaciens*는 이전의 연구결과들을 통해 protease를 고생산하는 것으로 알려져 있으며[1, 16, 17], 안정성이 확보된 생물자원으로 인식되어 본 연구에서 protease 대량 생산을 위한 최적조건 확립 및 바이오산업 분야에 적용하는데 있어서 적합한 미생물자원으로 사료되어진다.

SRCM115785의 배양시간에 따른 protease 생산 및 균주 성장 조사

SRCM115785 균주의 배양시간에 따른 protease생산과 균주 성장을 측정하기 위해 LB 액체배지 100 ml에 균주를 접종하여 30°C, 150 rpm 조건으로 48시간 동안 진탕배양하였으며, 4시간 간격으로 배양액을 회수하여 측정하였다. SRCM115785는 배양 후 20시간까지 급격하게 성장하는 대수기를 나타내었고, 24시간 이후 점차 성장이 느려지며 정지기에 도달하는 것으로 나타났다. Protease 생산량에 있어서 배양 20시간까지 균주가 성장함에 따라 protease 생산량도 증가하는 양상을 보이지만 20시간 이후로 protease 생산량이 점차 감소하는 것으

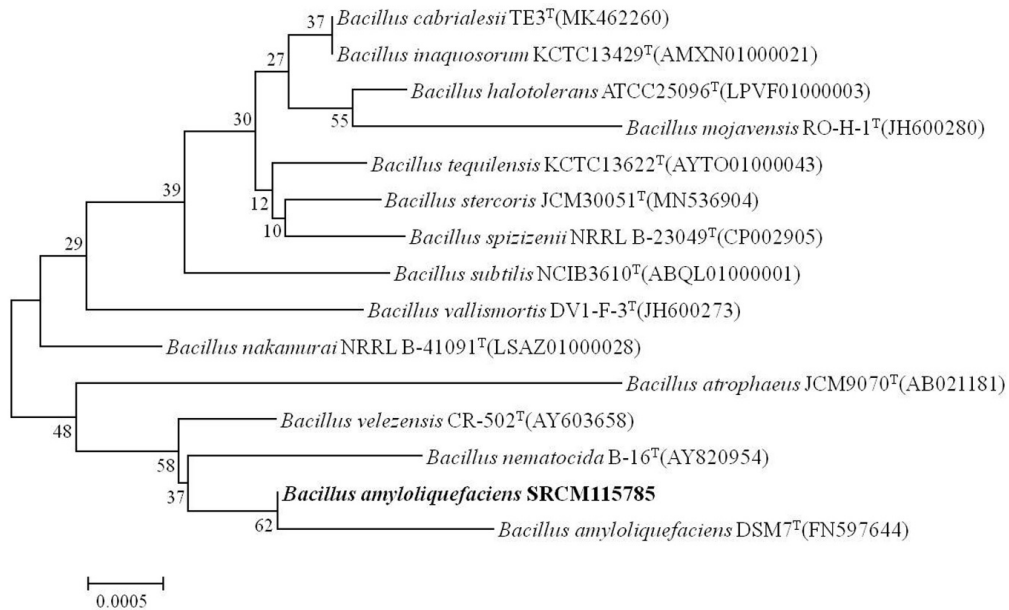


Fig. 2. Phylogenetic tree based on neighbor-joining method showing relationships between strain SRCM115785 and members of the genus *Bacillus*. The percentage numbers at the nodes are the levels of bootstrap support based on maximum-likelihood analyses of 1,000 resampled data sets. Bar, 0.0005 nucleotide substitution per position.

로 나타나므로(Fig. 3), SRCM115785를 이용한 protease 생산을 위한 배양시간을 20시간으로 설정하였다. 일반적으로 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주는 24시간에서 최대 성장을 나타내는 것으로 보고되었고[18, 23], 동시에 protease 생산은 24시간에서 최대 생산량을 나타내는 것으로 보고된 바 있다[18, 27]. SRCM115785 균주 또한 균체 성장에 있어서는 이전의 보고들과 동일한 결과를 나타냈지만, protease 생산에 있어서는 20시간에서 최대 생산량을 나타내어 기존의 균주들과 차이를 나타내었다. 동일한 종에 속하는 미생물들 사이에도 각 균주마다 나타내는 특성 및 분석 방법이나 배양 방법 등 외부 요인의 차이가 존재하므로 기존 논문들과 차이를 나타내는 것으로 사료되어진다.

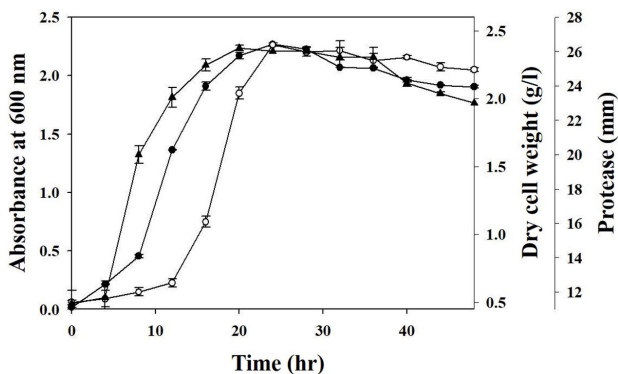


Fig. 3. Time course profile of protease production by *B. amyloliquefaciens* SRCM115785 in LB broth as unoptimized medium. ●: Log CFU/ml, ○: dry cell weight (g/l), ▲: protease (g/l).

Plackett-Burman design (PBD)을 통한 protease 생산을 위한 배지성분 선정

SRCM115785 균주의 성장 및 protease 생산을 위한 배지 조성 성분을 선별하기 위해 PBD를 이용하여 실험을 설계하였다. *Bacillus* 속 미생물의 성장 및 protease 생산에 주효과를 나타내는것으로 조사된 11개의 배지성분 중 각각의 중심값으로부터 고농도와 저농도 수준을 탄소원(glucose, sucrose, starch)은 3±2 g/l, 질소원(yeast extract, peptone, malt extract, beef extract)은 4±3 g/l, 무기원소원(CaCl₂, K₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄)은 0.55±0.45 g/l로 설정하였으며(Table 2), 독립변수별로 protease 생산에 미치는 영향을 분석하였다. PBD 설계에 따른 15개 실험구의 종속변수로 작용하는 protease 생산량은 3회 반복측정을 통해 산출된 평균값으로, Table 2에 나타내었으며, 각 독립변수별로 protease 생산에 영향을 미치는 양상을 보여주는 plot을 Fig. 4에 나타내었다. 각 성분 중 설정한 범위 내에서 glucose, yeast extract, beef extract는 농도가 증가할수록 protease 생산량 또한 현저하게 증가하는 양상을 나타냈으며, CaCl₂는 농도가 증가할수록 protease 생산량이 현저하게 감소하는 양상을 나타내었고, 나머지 성분들은 큰 영향을 미치지 않았다. Table 3은 각 실험구에 대한 독립변수들의 영향 및 모델 계수 등과 같은 통계분석 결과를 나타낸 것으로, 이 결과를 바탕으로 하여 glucose, (X₁, 96.85%), yeast extract (X₄, 99.13%), beef extract (X₇, 99.33%)을 protease 생산에 주효과를 나타내는 배지 성분으로 선별하였다. *Bacillus amyloliquefaciens* 균주의 경우 glucose 및 yeast extract 존재 하에 protease를 고생산하며, beef extract 존재 하에서 높은

Table 2. Matrix of the Plackett-Burman design experiments on 11 variables with response values

Factors	Symbol (unit)	Level of coded variables		
		-1	0	+1
Glucose	X ₁ (g/l)			
Starch	X ₂ (g/l)	1	3	5
Sucrose	X ₃ (g/l)			
Yeast extract	X ₄ (g/l)			
Peptone	X ₅ (g/l)	1	4	7
Malt extract	X ₆ (g/l)			
Beef extract	X ₇ (g/l)			
KH ₂ PO ₄	X ₈ (g/l)			
K ₂ HPO ₄	X ₉ (g/l)	0.1	0.55	1
CaCl ₂	X ₁₀ (g/l)			
(NH ₄) ₂ SO ₄	X ₁₁ (g/l)			

Run	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	Protease (diameter, mm)		Protease (U/ml)	
												Predicted	Observed	Log	Unit
												1	1	1	-1
2	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	24.23	24.23	1.58	37.90
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	21.33	21.33	1.39	24.60
4	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	24.17	24.17	1.57	37.56
5	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	24.50	24.50	1.60	39.45
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	22.00	22.00	1.43	27.18
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22.29	21.17	1.38	24.02
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	16.83	16.83	1.10	12.59
9	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	21.67	21.67	1.41	25.88
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	21.83	21.83	1.42	26.50
11	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	21.57	21.57	1.41	25.50
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22.29	21.73	1.42	26.11
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22.29	21.43	1.40	24.97
14	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	26.00	26.00	1.69	49.33
15	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	22.50	22.50	1.47	29.29

X₁-X₁₁ represent respective assigned variables and response values.
 -1 : low level of the variables, 0 : medium level of the variables, +1 : high level

Table 3. ANOVA(analysis of variance) for coefficients of Plackett-Burman design affecting protease production

Variables (X _i)	Effect (Ex _i)	Coefficient (β _i)	Sum of squares	F-value	P-value	Confidence level (%)
Model	44.58	22.29	60.05	69.52	0.0143*	98.57
Glucose	0.89	0.445	2.38	30.26	0.0315*	96.85
Starch	0.4434	0.2217	0.5896	7.51	0.1114	88.86
Sucrose	0.2566	0.1283	0.1976	2.52	0.2536	74.64
Yeast extract	1.7234	0.8617	8.91	113.45	0.0087**	99.13
Peptone	-0.5334	-0.2667	0.8533	10.87	0.0810	91.9
Malt extract	-0.3566	-0.1783	0.3816	4.86	0.1583	84.17
Beef extract	1.9666	0.9833	11.60	147.75	0.0067**	99.33
KH ₂ PO ₄	-0.31	-0.155	0.2883	3.67	0.1954	80.46
K ₂ HPO ₄	-0.89	-0.445	2.38	30.26	0.0315*	96.85
CaCl ₂	-3.16	-1.58	30.08	383.06	0.0026**	99.74
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.8934	0.4467	2.39	30.49	0.0313*	96.87

* : significance at p<0.05
 ** : significance at p<0.01

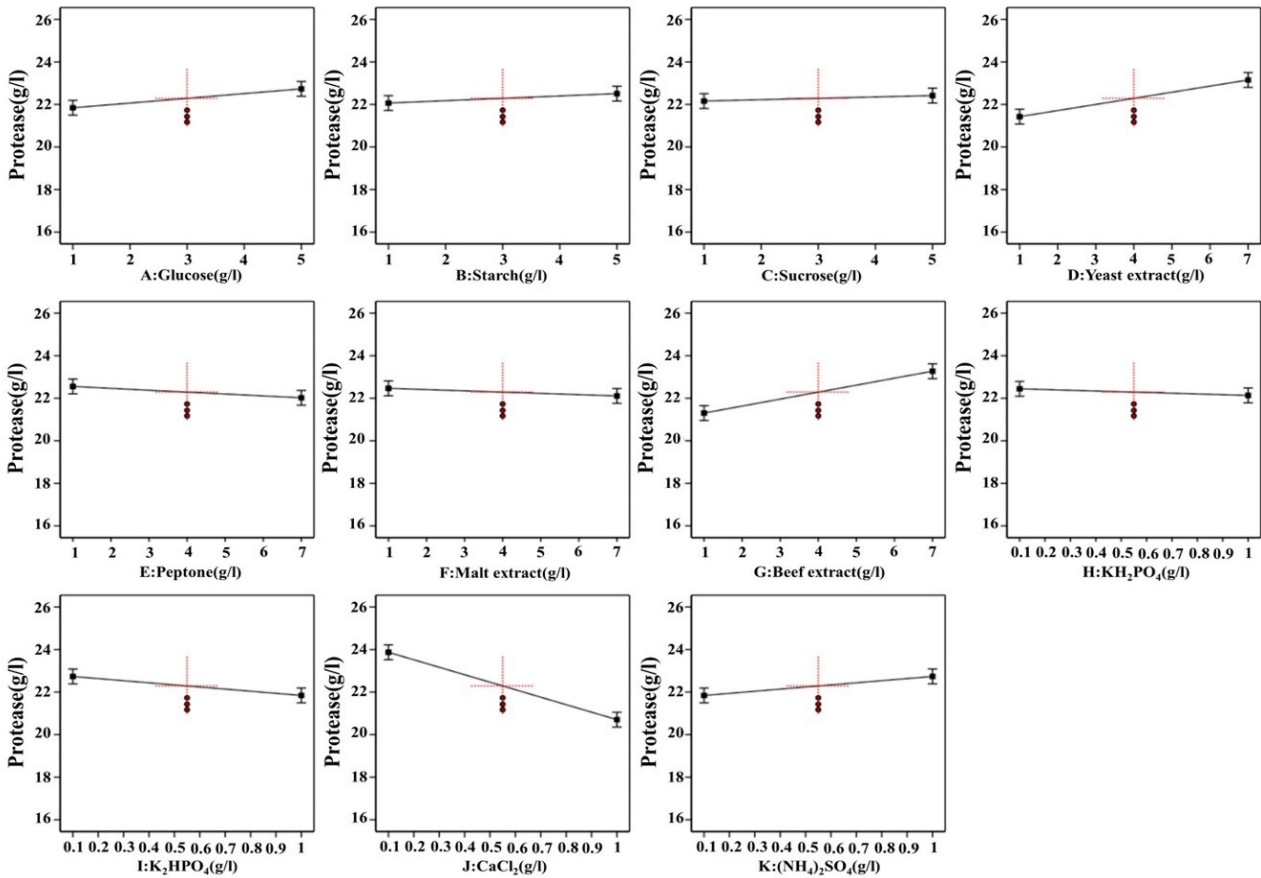


Fig. 4. Main effect plot showing effect of each variable on protease production by *B. amyloliquefaciens* SRCM115785. Steeper slope in the line illustrates the greater magnitude of the main effect.

균체의 성장을 나타내는 것으로 보고된 바가 있다[27]. 이외에, 다른 *Bacillus* 속 균주 또한 위와 동일한 보고가 있는 반면[15], 이와 다른 결과의 보고가 존재하였다[28].

Central composite design (CCD)을 통한 protease 생산 배지 성분의 농도 최적화

PBD 통계분석 결과를 기반으로 SRCM115785균주의 protease 생산량 증가에 가장 큰 영향을 미치는 성분으로 glucose, yeast extract, beef extract 3종을 선별하였고, 선별된 성분의 농도 최적화를 위해 CCD를 설계하였다(Table 4). 3개의 중심점을 포함한 17개 실험구에 대한 각각의 독립변수와 반응값 (Y, protease g/l)에 대한 회귀방정식은 Design expert 12 program을 이용하여 다음과 같이 예측하였다.

$$Y = 23.60588 + 0.594185 * \text{glucose} + 0.009732 * \text{yeast extract} - 0.102074 * \text{beef extract} - 0.010833 * \text{glucose} * \text{yeast extract} + 0.011979 * \text{glucose} * \text{beef extract} + 0.017917 * \text{yeast extract} * \text{beef extract} - 0.049502 * \text{glucose} * \text{glucose} - 0.003681 * \text{yeast extract} * \text{yeast extract} - 0.001438 * \text{beef extract} * \text{beef extract}$$

반응값에 대한 분산분석을 진행한 결과 결정계수(R-square)

값이 1에 가까운 수치인 0.9193을 나타내었고, *p-value* 값이 0.05보다 낮은 0.0044으로 가정된 모델에 대한 높은 유의성 및 실험 모형의 적합도를 확인하였다(Table 5). 또한 회귀방정식의 검정을 위해 lack of fit의 *p-value* 값을 확인한 결과 0.2730으로 유의성을 판단하는 기준값인 0.05보다 높아 lack of fit의 결과가 유의하지 않음을 확인하였고, 이는 실험모델이 회귀모형을 설명하기 위해 적합한 모델임을 증명하였다[6]. Protease 생산에 있어서 각각의 변수들이 미치는 영향을 확인하기 위해 1개의 독립변수를 최적값에 고정하여 나머지 2개 변수의 농도를 변화시켜 작성된 3차원 반응표면도를 Fig. 5에 나타내었다. 분석결과 beef extract가 protease 생산에 있어서 가장 큰 영향을 미치는 변수로 작용한다는 것을 확인하였고, beef extract와 yeast extract의 농도가 높아질수록 protease 생산량이 증가하는 경향을 나타내었다. 이를 기반으로 하여 SRCM115785 균주의 protease 최대 생산량은 26.62 mm로 예측되었고, protease 최대 생산을 위한 각 배지조성별 농도는 glucose 6.75 g/l, yeast extract 12.42 g/l, beef extract 17.48 g/l로 예측되었다.

실험모델의 검증

반응표면분석법에 의해 예측된 최적화 배지에서 *B. amyloli-*

Table 4. Matrix of the Central composite design experiments on 17 variables with response values

Factors	Symbol (unit)	Level of coded variables		
		-1	0	+1
Glucose	X ₁ (g/l)	3	5	7
Yeast extract	X ₂ (g/l)	5.5	8	10.5
Beef extract	X ₃ (g/l)	6	10	14

Run	X ₁	X ₂	X ₃	Protease (diameter, mm)		Protease (U/ml)	
				Predicted	Observed	Log	Unit
1	0	-2	0	25.17	25.17	1.64	43.59
2	-1	-1	1	24.94	25.10	1.63	43.14
3	0	0	-2	24.97	25.00	1.63	42.50
4	1	1	-1	25.21	25.20	1.64	43.79
5	0	0	0	25.59	25.57	1.67	46.27
6	0	0	2	26.01	25.83	1.68	48.09
7	1	1	1	26.03	26.34	1.72	51.89
8	1	-1	-1	25.36	25.50	1.66	45.79
9	-1	1	1	25.73	25.73	1.68	47.38
10	0	0	0	25.59	25.67	1.67	46.96
11	-1	1	-1	25.04	25.17	1.64	43.59
12	2	0	0	25.26	25.10	1.63	43.14
13	1	-1	1	25.71	25.73	1.68	47.38
14	0	2	0	25.81	25.67	1.67	46.96
15	0	0	0	25.59	25.40	1.65	45.11
16	-1	-1	-1	24.73	24.57	1.60	39.86
17	-2	0	0	24.32	24.33	1.59	38.46

X₁-X₃ represent respective assigned variables and response values.

Table 5. ANOVA for central composite design (quadratic model) of SRCM115785

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value, Prob>F
Model	3.45	9	0.3837	8.86	0.0044**
X ₁	0.8726	1	0.8726	20.15	0.0028**
X ₂	0.4021	1	0.4021	9.29	0.0187*
X ₃	1.07	1	1.07	24.70	0.0016**
X ₁ X ₂	0.1082	1	0.1082	2.50	0.1580
X ₁ X ₃	0.0091	1	0.0091	0.2102	0.6605
X ₂ X ₃	0.1096	1	0.1096	2.53	0.1556
X ₁ ²	0.7802	1	0.7802	18.02	0.0038**
X ₂ ²	0.0128	1	0.0128	0.2956	0.6035
X ₃ ²	0.0128	1	0.0128	0.2956	0.6035
Residual	0.3031	7	0.0433		
Lack of fit	0.2668	5	0.0534	2.94	0.2730
Pure error	0.0363	2	0.0181		
Cor total	3.76	16			

Standard deviation	0.2081	Press	2.14
Mean	25.36	R-squared	0.9193
Coefficient of variation (%)	0.8206	Adjusted R-squared	0.8156

X₁: Glucose, X₂: Yeast extract, X₃: Beef extract.

* : significant at p<0.05, ** : significant at p<0.01.

quefaciens SRCM 115785 균주의 protease 생산량을 검증하기 위해 최적 배지와 대조구인 LB 배지에 SRCM115785 균주를 접종하여 24시간 배양한 후 protease 생산량을 측정하였다. 최적화 배지에서 3회 반복실험을 수행한 결과 protease 생산

량은 27.46±0.97 mm (61.31±3.03 U/ml)로 CCD로부터 얻어진 예측값인 26.62 mm가 오차범위 내에 존재하였으며, 대조구인 LB배지에서의 protease 생산량인 20 mm 보다 137% 향상된 결과를 나타내었다. 또한, 앞서 정의한 최적조건에서 dif-

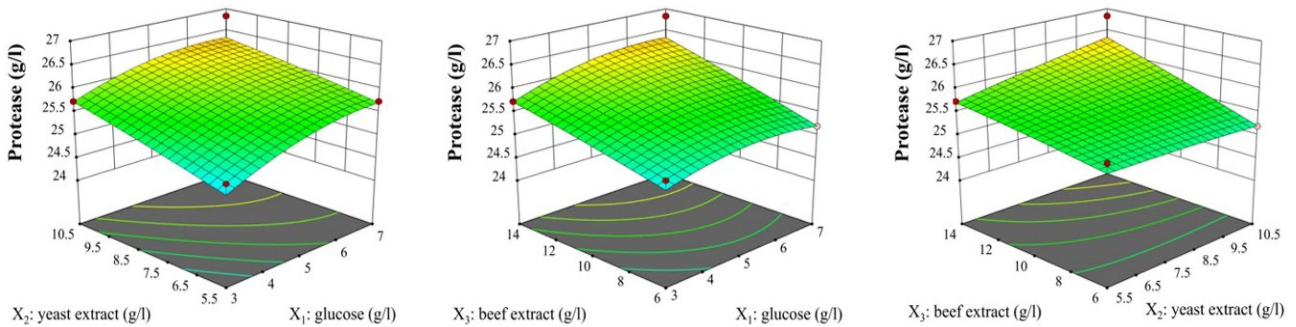


Fig. 5. The three-dimensional response surface plots of protease production as predicted by the quadratic model. The effects of two independent variables on protease production are simultaneously demonstrated.

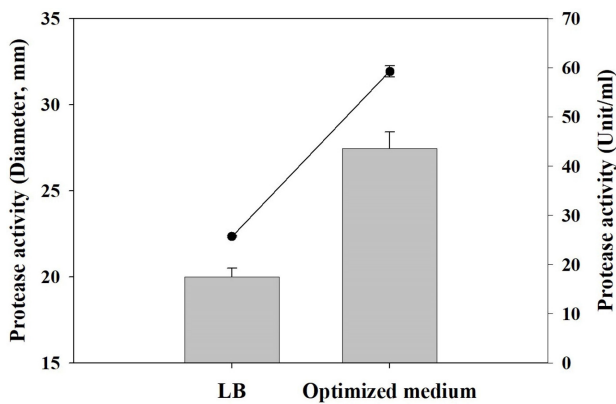


Fig. 6. Comparison of protease production in different media, LB (unoptimized medium) as well as comparing the model to experimental value. Data are presented as the mean ± SD. ■: diameter (mm), ●: U/ml.

fusion method로부터 산출된 값과 정량분석법에 의해 산출된 값의 동일성을 확인하기 위해 Cupp-Enyad [4]의 방법을 이용하여 protease 생산량을 분석한 결과 59.28 U/ml의 생산량을 나타내어 diffusion method로부터 산출된 값(61.31±3.03 U/ml)의 오차범위 내에 존재하는 것을 확인하였다. 또한, 이는 대조구로 사용된 LB 배지에서 얻어진 농도 25.72 U/ml보다 230.47%의 증가량을 나타내었다(Fig. 6). 이러한 결과는 기존의 논문에서 측정된 *B. amyloliquefaciens* 균주들의 protease 생산량보다 높은 결과값을 나타내므로[18, 27], protease의 효율적인 생산을 위한 지표로 사용될 수 있음을 증명하였다. 본 연구에서는 protease를 고생산하는 것으로 알려진 *Bacillus*속 균주들을 분리 및 동정하였으며, 그 중 protease 활성이 가장 높게 나타난 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM115785 균주를 선별하였다. 선별균주를 대상으로 protease 대량생산을 위한 산업적 배지조건을 확립하기 위해 통계학적 분석기법인 반응표면분석법을 활용하여 배지 최적화를 수행하였고, 그 결과 일반 LB배지보다 효율적으로 높은 생산량을 나타내었다. Protease는 생산성과 경제성에 높은 효율을 나타내어 다양한 산업 분야에 유용하게 사용되므로, 향후 더 효율적이고 안정적인

pilot scale의 대량생산을 위한 배양 온도, pH와 같은 물리적 조건 및 경제성을 고려한 생산 조건 확립을 위한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 2021년 농림축산식품부 농축산·식품마이크로바이옴 통합 바이오뱅크축사사업의 지원에 의해 수행된 것입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- 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*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**, 82-87.
- Bae, Y. E. and Yoon, K. H. 2012. Production and characterization of thermostable protease from *Bacillus licheniformis* isolated from Korean traditional soybean paste. *Kor. J. Microbiol.* **48**, 298-304.
- Bong, K. M., Kim, K. M., Seo, M. K., Han, J. H., Park, I. C., Lee, C. W. and Kim, P. I. 2017. Optimization of medium for the carotenoid production by *Rhodobacter sphaeroides* PS-24 using response surface methodology. *Kor. J. Org. Agric.* **25**, 135-148.
- Cupp-Enyard, C. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay-Casein as a substrate. *J. Vis. Exp.* **17**, 899.
- Gupta, R., Beg, Q., K., Khan, S. and Chauhan, B. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 381-395.
- Ha, G. S., Kim, J. W., Im, S. A., Shin, S. J., Yang, H. J. and Jeong, D. Y. 2020. Application of response surface methodology in medium optimization to improve lactic acid production by *Lactobacillus paracasei* SRCM201474. *J. Life Sci.* **30**,

- 522-531.
7. Ha, G. S., Shin, S. J., Jeong, S. Y., Yang, H. Y., Im, S. A., Heo, J. H., Yang, H. J. and Jeong, D. Y. 2019. Optimization of medium components using response surface methodology for cost-effective mannitol production by *Leuconostoc mesenteroides* SRCM201425. *J. Life Sci.* **29**, 861-870.
 8. Haddar, A., Fakhfakh-Zouari, N., Hmidet, N., Frikha, F., Nasri, M. and Kamoun, A. S. 2010. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. *J. Biosci. Bioeng.* **110**, 288-294.
 9. Jeong, S. J., Yang, H. J., Ryu, M. S., Seo, J. W., Jeong, S. Y. and Jeong, D. Y. 2018. Statistical optimization of culture conditions of probiotic *Lactobacillus brevis* SBB07 for enhanced cell growth. *J. Life Sci.* **28**, 577-586.
 10. Joshi, S., Yadav, S., Nerurkar, A. and Desai, A. J. 2007. Statistical optimization of medium components for the production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 313-319.
 11. Jung, H. K., Jeong, Y. S., Youn, K. S., Kim, D. I. and Hong, J. H. 2009. Quality characteristics of soybean paste (*Doenjang*) prepared with *Bacillus subtilis* DH3 expressing high protease levels, and deep-sea water. *Kor. J. Food Preserv.* **16**, 348-354.
 12. 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. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 176-182.
 13. Kim, J. Y. 2007. Isolation and characterization of an alkaline protease produced by *Bacillus subtilis* JK-1. *Kor. J. Microbiol.* **43**, 331-336.
 14. Kim, K. E. 2014. Isolation of protease producing microorganisms. *J. Kor. Soc. Environ. Eng.* **36**, 265-270.
 15. 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.
 16. Klingeren, B. V. and Rutgers, A. 1979. Microbiological assays of aminoglycoside antibiotics in serum: Technique and interpretation. *Acta Clin. Belg.* **34**, 278-287.
 17. Lee, N. R., Go, T. H., Lee, S. M., Hong, C. O., Park, K. M., Park, G. T., Hwang, D. Y. and Son, H. J. 2013. Characteristics of *Chungkookjang* prepared by *Bacillus amyloliquefaciens* with different soybeans and fermentation temperatures. *Kor. J. Microbiol.* **49**, 71-77.
 18. Lee, R. H., Yang, S. J., Hwang, T. Y., Chung, S. K. and Hong, J. H. 2015. α -glucosidase inhibitory activity and protease characteristics produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Kor. J. Food Preserv.* **22**, 727-734.
 19. Lim, S. I., Kim, H. K. and Yoo, J. Y. 2000. Characteristics of protease produced by *Bacillus subtilis* PCA 20-3 isolated from Korean traditional Meju. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**, 154-160.
 20. Montville, T. J. 1983. Dual-substrate plate diffusion assay for proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 200-204.
 21. Nilegaonkar, S., S., Zambare, V., P., Kanekar, P. P., Dhakephalkar, P. K. and Sarnaik, S. S. 2007. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresour. Technol.* **52**, 3571-3578.
 22. Pathak, A., P., Rathod, M., G., Mahabole, M. P. and Khairnar, R. S. 2020. Enhanced catalytic activity of *Bacillus aryabhatai* P1 protease by modulation with nanoactivator. *Heliyon* **6**, e04053.
 23. Ryu, M. S., Yang, H. J., Jeong, S. J., Seo, J. W., Ha, G. S., Jeong, S. Y. and Jeong, D. Y. 2018. Characteristic study and optimization of culture conditions for *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 100731 as probiotic resource for companion animal. *Kor. J. Microbiol.* **54**, 384-397.
 24. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
 25. Yang, H. J., Park, C. S., Yang, H. Y., Jeong, S. J., Jeong, S. Y., Jeong, D. Y., Kang, D. O., Moon, J. Y. and Choi, N. S. 2015. Optimization of medium for the production of cellulase by *Bacillus subtilis* NC1 using response surface methodology. *J. Life Sci.* **25**, 680-685.
 26. Yang, S. J., Lee, D. H., Park, H. M., Jung, H. K., Park, C. S. and Hong, J. H. 2014. Amylase activity and characterization of *Bacillus subtilis* CBD2 isolated from *Doenjang*. *Kor. J. Food Preserv.* **21**, 286-293.
 27. Yoo, J. H., Joo, J. H., Kim, S. G. and Jang, I. H. 2006. Isolation and characterization of protease producing *B. amyloliquefaciens* JH-35 from food waste. *Kor. J. Environ. Agric.* **35**, 294-301.
 28. Yoon, K. H. and Shin, H. Y. 2010. Medium optimization for the protease production by *Bacillus licheniformis* isolated from *Cheongkookjang*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 385-390.
 29. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S. J., Lim, J. M., Kim, Y. S., Seo, H. S. and Chun, J. S. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 1613-1617.

초록 : 반응표면분석법을 이용한 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM115785의 protease 활성증가를 위한 배지 최적화

양희건 · 하광수 · 류명선 · 박세원 · 정호진 · 양희종 · 정도연*
((재)발효미생물산업진흥원)

본 연구에서는 반응표면분석법을 이용하여 전통발효식품인 막걸리로부터 분리한 *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM115785 균주에 대하여 protease 생산량을 증가시키기 위한 배지의 최적 농도를 확립하고자 하였다. 선정된 11개의 배지 성분 중 각 성분이 protease 생산에 미치는 영향에 대한 분석을 위해 Plackett-Burman design (PBD) 를 설계하여 통계분석한 결과 glucose, yeast extract, beef extract를 protease 생산 향상을 위한 요인으로 최종 선별하였다. 선별된 3개의 성분에 대해 protease 생산을 위한 각 성분별 최적 농도를 결정하기 위해 central composite design (CCD)분석을 설계하여 protease 최대 생산을 위한 각 배지조성별 농도는 glucose 6.75 g/l, yeast extract 12.42 g/l, beef extract 17.48 g/l로 예측되었다. ANOVA 분석을 통해 실험모델의 적합성을 증명하였고, 설계한 최적배지에서 반복실험을 진행하여 protease 생산량을 측정된 결과 예측값과 매우 유사한 값을 나타냄을 확인하였다. 최종적으로 일반 배지에 비해 137% 환이 증가하였으며, 추가로 정량 분석 결과 기존 25.72 U/ml 대비 59.28 U/ml로 230.47% 증가함을 확인하였다. 본 연구를 통해 protease 생산량 증가를 위한 배지 성분의 최적화를 확립하였고, 이를 바탕으로 산업용 효소로서 protease의 효율적인 활용방안에 대한 기초자료로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.