

Halomonas sp. ES 10에 의한 alkaline protease의 생산

김찬조 · 김교창* · 오만진 · 최성현

충남대학교 식품공학과, *충북대학교 식품공학과

초록 : 무염조건에서는 생육할 수 없고 2 M의 NaCl 존재하에서 가장 잘 생육하는 중도 호염성균이며 alkaline protease를 생산하는 ES 10균주를 멸치젓에서 분리하여 *Halomonas* 속균으로 동정하였다. 이 균은 합성배지인 TSM배지에 DL-alanine의 첨가로 생육이 촉진되고 L-proline의 첨가로 생육이 저해되었다. 이 균의 세포내 Na⁺ 함량은 *Bacillus subtilis*나 *E. coli*보다 5배 정도 많았으며 K⁺ 함량은 25배, Mg²⁺ 함량은 38배 정도 많았다. 이 균의 protease 생산은 NaCl 1 M 첨가된 Norberg와 Hofsten배지에서 20℃로 배양했을 때 가장 양호하였다 (1991년 8월 30일 접수, 1991년 10월 4일 수리).

Alkaline protease는 피혁공업, 세제공업, 섬유공업, 의약품 공업, 식품공업 분야 등에서 널리 사용된다. 호염성 세균의 protease는 일반적으로 alkaline protease가 많으며^{1,2)} 내염성도 있으므로¹⁾ 사용범위가 넓고 효소생산 공정에서 잡균의 오염을 줄일 수 있다. 합성세제가 하천의 오염원의 하나이기 때문에 합성세제의 사용량을 줄이고 우수한 세정력을 갖는 효소세제의 사용이 권장되고 있으며 이때 효소로 alkaline protease 등이 사용된다.

Alkaline protease에 대한 보고는 Horikoshi,³⁾ Kobayashi 등,⁴⁾ 배 등,⁵⁾ 김 등,⁶⁾ 안 등,⁷⁾ 오 등⁸⁾의 많은 보고가 있다.

이 연구에서는 호염성이며 alkaline protease 활성이 강한 균을 분리하여 *Halomonas* 속으로 동정하고 효소생산 조건을 검토하였으며 분리균의 염에 대한 감수성, 균체내 K⁺ 이온 등의 함량을 조사하여 호염성균의 특성을 살펴보고 아울러 영양요구성을 검토하였으므로 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균의 분리 및 동정

해수, 젓갈류, 어패류, 염전토양, 활성오니 등 시료의 현탁액을 Sehgal과 Gibbons의 복합배지(SGC 배지)⁹⁾에 3%의 탈지분유와 0~5 M의 NaCl을 첨가한 1차 선정용 배지에 접종하고 배양하여 colony 주위에 투명한 casein

분해환을 형성하는 균을 1차 분리하고 2차 선정용 배지인 Norberg와 Hopsten의 액체배지¹⁰⁾에 NaCl을 0~3.5 M로 각각 첨가하고 선정균을 접종하여 84시간 동안 진탕배양한 다음 그 배양 여액을 조효소액으로 하여 Anson변법¹¹⁾으로 protease활성을 측정하고 우수균주를 선정하였다. 선정균주는 Bergey's manual of systematic bacteriology법¹²⁾에 따라 동정하였다.

효소역가 측정

0.05 M NaHCO₃-NaOH 완충용액(pH 10.0)에 milk casein을 0.6% 녹인 용액 2.5 ml와 조효소액 0.5 ml를 시험관에 취하여 30℃에서 10분간 반응시킨 후 0.11 M TCA와 0.22 M CH₃COONa 및 0.33 M CH₃COOH의 혼합액 2.5 ml를 가하고 30분 후 여과하여 여액 1 ml에 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 ml와 3배 희석한 Folin 시약 0.5 ml를 가하여 30℃에서 30분간 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정한다.

효소단위는 1분간에 1 μg의 tyrosine에 상당하는 Folin 발색성의 단백질 분해물질 생성을 1단위로 하였다.

선정균주의 NaCl의 감수성

선정균주를 SGC 배지⁹⁾와 육즙배지에 각각 접종하고 30℃에서 5일간 배양하여 생육상태를 비교검토하였다.

SEM에 의한 형태관찰

SGC 배지에 NaCl 농도를 2 M 혹은 4 M로 하고 한

친을 2% 첨가한 평판배지 위에 멸균한 여지편을 놓고 동일 조성의 배지를 한 방울 여지편 위에 떨어뜨리고 그 위에 선정균의 현탁액을 접종하여 30°C에서 48시간 배양하고 여지편을 떼어내어 2.5% glutaraldehyde에 고정, acetone으로 탈수, desiccator내에서 건조시키고 100 Å 두께로 금을 증착시켜 SEM(AKASHI DS-130)으로 관찰하고 촬영하였다.

영양요구성

Onishi 등¹³⁾의 방법에 따라 아미노산 요구성을 검토하였다

항생물질 내성

NaCl 2 M과 chloramphenicol 등의 항생물질을 250~1,500 µg/ml 첨가한 temporary semisynthetic medium (TSSM)¹⁴⁾에 선정균주를 접종하여 생육도를 660 nm의 흡광도로 측정하여 표시하였다.

Table 1. Morphological, cultural and biochemical characteristics of *Halomonas* sp. ES 10

1. Morphological characteristics	
1) Cell	
Shape	Sigmoidal
Size	0.8~1.3×3.8~7.5 µm
Motility	Motile
Spore formation	-
Gram stain	-
2) Colony	
Color	Milk glass
Form	Circular
Surface	Smooth
Edge	Entire
Elevation	Convex
Structure	Butyrous
2. Cultural and biochemical characteristics	
Catalase	+
Oxidase	+
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Casein hydrolysis	+
Indol formation	-
H ₂ S formation	-
Urease	-
Reduction of nitrate to nitrite	+
Methyl red	+
Voges-Proskauer test	+
Acid formation	-
Pigment formation	-
Optimum temperature	20°C
Optimum pH	pH 6.5~8.0

균체내 Na⁺, K⁺, Mg²⁺의 정량

SGC 배지에 NaCl을 1 M 첨가하여 선정균주를 배양한 후 Shindler 등¹⁵⁾의 방법에 따라 균체내 Na⁺, K⁺, Mg²⁺를 정량하였다. 비호염성 대조군으로 *E. coli*와 *Bacillus subtilis*를 NaCl 0.5 M 함유된 육즙배지에 배양하여 비교 실험하였다.

결과 및 고찰

균의 선정 및 동정

Alkaline protease를 생산하는 호염성균을 멸치젓에서 분리하여 균학적 특성을 조사한 결과는 Table 1 및 Table 2와 같이 S자 형으로 운동성이 있고 gram음성이며 생육최적 pH는 6.5~8.0으로 넓은 범위였으며 최적온도는 20°C이었다. 또한 2 M NaCl 농도에서 가장 잘 생육하는 중도호염균인 점 등으로 보아 *Halomonas* sp.로 동정하였다. NaCl 무첨가의 SGC 배지에서는 기타 염류가 존재하므로 NaCl 무첨가시에도 생육이 가능한 것으로 생각된다.

형태학적 특성

Fig. 1과 같이 생육최적 NaCl 농도인 2 M에서 배양한 균체의 크기는 0.32~0.39×1.24~2.31 µm이었고 4 M에서는 균체가 커지고 나선형으로 되는 것을 볼 수 있었다.

아미노산 요구성

TSM 배지¹³⁾에서 아미노산의 요구성을 omission법으로 실험한 결과는 Table 3과 같다. DL-alanine, DL-histidine, glycine 등은 생육촉진 역할을, DL-valine, DL-methionine, DL-aspartic acid, L-glutamic acid, L-proline은

Table 2. The salt response pattern for growth of the *Halomonas* sp. ES 10

NaCl conc.	Medium	SGC ^{a)}	Nutrient broth
0 M		+	-
1 M		++	++
2 M		+++	+++
3 M		+	+
4 M		+	+
5 M		+	-

- : No growth, + : Moderate, ++ : Good, +++ : Excellent, ^{a)} : Sehgal and Gibbons Complex medium; casamino acids 0.75g, yeast extract 1.0g, KCl 0.2g, sodium citrate 0.3g, MgSO₄·7H₂O 2.0g, FeCl₂·nH₂O 0.0023 g, NaCl 0~5 M, D.W 100 ml(pH 7.0).

생육을 저해하는 것을 알 수 있었다.

항생물질 내성

TSSM 배지¹⁴⁾에 각 항생물질을 농도별로 첨가한 후 선정균주를 접종하여 생육도를 660 nm에서 측정 한 결과 Table 4와 같다.

Chloramphenicol, tetracyclin은 700 µg/ml, novobiocin은 1,000 µg/ml 농도에서 균의 생육을 저지하였으며 ampicillin, penicillin G, streptomycin은 1,500 µg/ml 농도까지 생육이 가능하였다.

균체내 Na⁺, K⁺, Mg²⁺의 함량

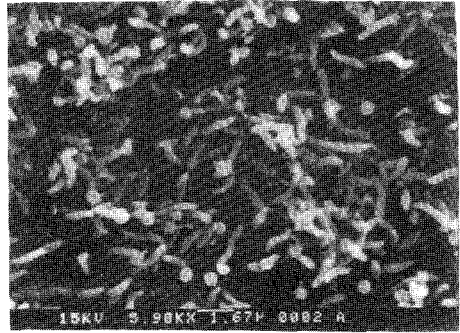
Halomonas sp. ES 10과 *E. coli* 및 *Bacillus subtilis*의

Table 3. Effect of omitting one amino acids at a time from basal mixture¹⁵⁾ on growth *Halomonas* sp. ES 10

Amino acids omitted	O.D. at 660 nm	Effect
Basal mixture(none omitted)	0.087	
DL-alanine	0.020	stimulatory
DL-histidine	0.028	stimulatory
Glycine	0.030	stimulatory
L-cystine	0.038	stimulatory
L-leucine	0.050	stimulatory
DL-serine	0.054	stimulatory
DL-tryptophan	0.069	stimulatory
DL-threonine	0.072	stimulatory
DL-isoleucine	0.079	stimulatory
L-tyrosine	0.085	none
L-arginine	0.087	none
L-lysine	0.087	none
DL-phenylalanine	0.087	none
DL-valine	0.126	inhibitory
DL-methionine	0.150	inhibitory
DL-aspartic acid	1.085	inhibitory
L-glutamic acid	1.130	inhibitory
L-proline	1.216	inhibitory

¹⁴⁾Temporary synthetic medium(TSM) : Amino acids (DL-alanine 43 mg, L-arginine 40 mg, DL-aspartic acid 45 mg, L-cystine 5 mg, L-glutamic acid 130 mg, glycine 6 mg, DL-histidine 30 mg, DL-isoleucine 44 mg, L-leucine 80 mg, L-lysine 85 mg, DL-methionine 37 mg, DL-phenylalanine 26 mg, L-proline 5 mg, DL-serine 61 mg, DL-threonine 50 mg, L-tyrosine 20 mg, DL-tryptophan 5 mg, DL-valine 100 mg) nucleotides(adenylic acid 10 mg, guanylic acid 10 mg, uridylic acid 10 mg, cytidylic acid 10 mg), salt mixture(MgSO₄·7H₂O 2g, KNO₃ 10 mg, K₂HPO₄ 5 mg, KH₂PO₄ 5 mg, Na-citrate 50 mg, FeCl₂ 0.23 mg, CaCl₂·7H₂O 0.7 mg, MnSO₄·H₂O 0.03 mg, ZnSO₄·7H₂O 0.044 mg, CuSO₄·5H₂O 5 µg), glycerol 0.1g, tween 40 50 mg, growth factors(biotin 0.1 µg, folic acid 10 µg, vitamin B₁₂ 0.02 µg), NaCl 2 M, D.W. 100 ml, pH 7.0.

(A)



(B)

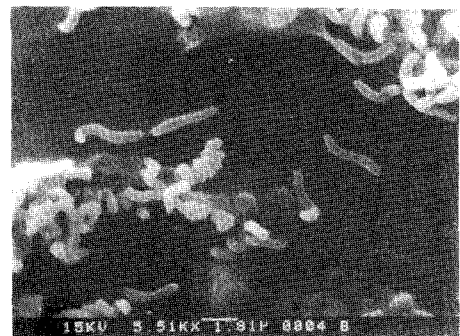


Fig. 1. Scanning electron micrograph of the *Halomonas* sp. ES 10 cultured with various concentration of NaCl.

A : 2 M NaCl, B : 4 M NaCl

Table 4. Effects of antibiotics on growth of the *Halomonas* sp. ES 10 (O.D at 660 nm)

Antibiotics	Concentration(µg/ml)					
	250	500	700	1000	1300	1500
Chloramphenicol	0.160	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000
Ampicillin	1.159	0.954	0.179	0.141	0.120	0.135
Penicillin G	1.082	0.924	0.692	0.691	0.479	0.506
Novobiocin	0.107	0.059	0.031	0.000	0.000	0.000
Tetracyclin	0.051	0.043	0.000	0.000	0.000	0.000
Streptomycine · SO ₄	1.061	0.955	1.025	0.930	0.742	0.743

The *Halomonas* sp. ES 10 was cultured in TSSM¹⁶⁾

¹⁶⁾Temporary semisynthetic medium : Vitamine-free casamino acid 2.0g, tryptophan 0.005g, cysteine 0.01g, vitamins(biotin 1 µg, Ca-pantothenate 0.1 mg, choline 2 mg, folic acid 10 µg, inositol 1.7 mg, niacin 1.25 mg, p-aminobenzoic acid 6 µg, pyridoxine-HCl 35 µg, riboflavin 0.15 mg, thiamine-HCl 40 µg, vitamine B₁₂ 0.01 µg/100 ml), nucleic acid bases(adenine 1 mg, guanine 1 mg, cytosine 1 mg, uracil 1 mg, thymine 1 mg/100 ml), metal ion(FeSO₄·7H₂O 0.25 mg, CuSO₄·5H₂O 0.2 mg, ZnSO₄·7H₂O 0.22 mg, MnSO₄·4-6H₂O 20 µg, CoCl₂·6H₂O 30 µg/100 ml), KCl 0.2g, MgSO₄·7H₂O 2.0g, NaCl 2 M, D.W 100 ml, pH 7.0.

Table 5. Comparison of intracellular Na⁺, K⁺ and Mg²⁺ content in the cell mass of the *Halomonas* sp. ES 10 and general bacteria

Strains	Metal ions	Na ⁺ (mg/dry weight, g)	K ⁺ (mg/dry weight, g)	Mg ²⁺ (mg/dry weight, g)
<i>E. coli</i>		55.8	6.5	0.73
<i>B. subtilis</i>		62.8	4.7	0.52
<i>Halomonas</i> sp. ES 10		319.0	128.2	22.9

Halomonas sp. ES 10 was cultured in SGC medium containing 1 M NaCl and general bacteria was cultured in nutrient broth containing 0.5 M NaCl.

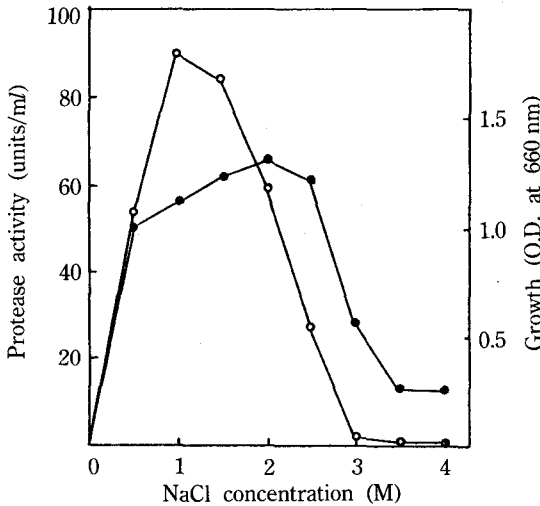


Fig. 2. Effect of NaCl concentration on the protease production by the *Halomonas* sp. ES 10 incubated at 30°C for 84 hrs. Basal medium was Norberg and Hofsten medium. ○—○ : Protease production, ●—● : Growth

건조균체 1g당 Na⁺, K⁺, Mg²⁺을 정량하여 mg으로 표시한 결과는 Table 5와 같다.

중도 호염균인 *Halomonas* sp. ES 10 균주의 세포내 Na⁺ 함량은 *E. coli*와 *Bacillus subtilis*보다 5배 정도 많았고 K⁺ 함량은 25배 정도, Mg²⁺ 함량은 38배 정도 많았다.

Protease 생산조건

1) NaCl 농도

Fig.2와 같이 효소생산은 1 M NaCl 농도에서 가장

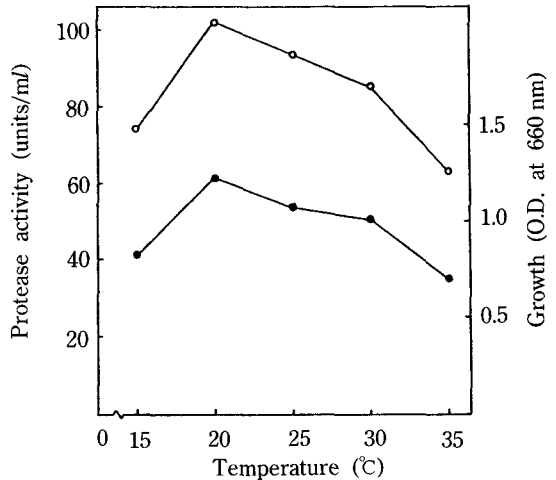


Fig. 3. Effect of temperature on the protease production by the *Halomonas* sp. ES 10. ○—○ : Protease production, ●—● : Growth

양호하였으며 균 생육은 2 M 농도에서 가장 좋았다.

2) 배양온도 및 pH

Fig.3과 같이 일반 미생물 보다 다소 저온인 20°C에서 생육 및 효소생산이 가장 양호하였다.

효소생산에 미치는 배지의 초발 pH의 영향을 검토한 결과 pH 6.5~9.5의 넓은 범위에서 효소생산이 거의 비슷하였다.

사 사

본 연구는 1989년도 한국과학재단의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 관계당국에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Kamekura, M. and Onishi, H. : Appl. Microbiol., 27 : 809(1974)
 2. Izotova, L.S., Strongin, A.Y., Chekulaeva, L.N., Sterkin, V.E., Ostoslavskaya, V.I., Lyublinskaya, L.A.,

- Timokhina, E.A. and Stepanov, V.M. : J. Bacteriol., 155 : 826(1983)
3. Horikoshi, K. : Agri. Biol. Chem., 35 : 1407(1971)
 4. Kobayashi, T., Ogasawara, A., Ito, S. and Saito, M. : Agric. Biol. Chem., 49 : 693(1985)
 5. 배무, 박필련 : 한국산업미생물학회지, 17(6) : 534 (1989)
 6. 김태호, 박성희, 이동선, 권태규, 김종국, 홍순덕 : 한국산업미생물학회지, 18(2) : 159(1990)
 7. 안장우, 오태광, 박용하, 박관화 : 한국산업미생물학회지, 18(4) : 344(1990)
 8. Oh, Sung-Hoon and Pyong-Su O : Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 19(1) : 1(1991)
 9. Sehgal, S.N. and Gibbons, N.E. : Can. J. Microbiol., 6 : 165(1960)
 10. Norberg, P. and Hofsten, B.V. : J. Gen. Microbiol., 55 : 251(1969)
 11. 萩原文二 : 酵素 研究法, 赤堀四郎編, 第2巻 : p. 237 (1956)
 12. Krieg, N.R. : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1 : Williams & Wilkins, Baltimore(1984)
 13. Onishi, H., McCance, M.E. and Gibbons, N.E. : Can. J. Microbiol., 11 : 365(1965)
 14. Kamekura, M. : Can. J. Microbiol., 22 : 1567(1976)
 15. Shindler, D.B., Wydro, R.M. and Kushner, D.J. : J. Bacteriol., 130 : 698(1977)

Production of alkaline protease by the moderate halophile, *Halomonas* sp. ES 10

Chan-Jo Kim, Kyo-Chang Kim*, Man-Jin Oh and Seong-Hyun Choi(Department of Food Technology, Chungnam National University, Taejeon 305-335, Korea, *Department of Food Technology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea)

Abstract : A moderate halophile, ES 10 which produces a high level of alkaline protease was isolated from the salted anchovies and indentified as a strain of *Halomonas* sp. The optimum growth of the *Halomonas* sp. was revealed in the presence of 2 M NaCl and its growth rate in the Temporary Synthetic Medium was increased by adding DL-alanine, but inhibited by adding L-proline. The concentration of Na⁺, K⁺ and Mg²⁺ in the cell mass of the *Halomonas* sp. ES 10 was 5-, 25- and 35-fold higher by dry weight basis, respectively than those of *B. subtilis* or *E. coli*. Norberg and Hofsten medium with 1 M NaCl was selected as the best medium for producing high level of alkaline protease. The optimum temperature for the growth and protease production was equally 20°C.