

## *Bacillus subtilis* B0021가 생산하는 Gelatin 분해성 Proteolytic Enzyme 생산의 최적화 연구

†백 대 현 · \*이 항 우 · \*복 성 해  
영남대학교 이과대학 생물학과  
\*한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

### A Study on the Optimum Conditions of Gelatin-Degrading Proteolytic Enzyme Production from *Bacillus subtilis* B0021

Dae-Heoun Baek<sup>†</sup>, Hang-Woo Lee\* and Song-Hae Bok\*

Department of Biology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

\*Genetic Engineering Research Institute, KIST, Yusung P. O. Box 115, Taejon 305-600, Korea

#### ABSTRACT

Nutritional requirements and cultural conditions for the production of extracellular gelatin-degrading proteolytic enzyme by *Bacillus subtilis* B0021 were investigated. Optimum carbon source for proteolytic enzyme production was salicin, but it was substituted by glucose for economical reason. The fermentation medium giving a maximum proteolytic enzyme activity was consisted of 1.5% (w/v) glucose, 2.5% (w/v) yeast extract, and 0.001% (w/v) manganese sulfate and 0.002% (w/v) ferrous sulfate. Proteolytic enzyme activity of *B. subtilis* B0021 was completely inhibited by 0.5% (w/v) tannic acid. Initial pH was optimal at 7.0 and the enzyme activity in the flask culture usually reached a maximal level after 36 hours of fermentation at 30°C. In the 5 l fermentor fermentation at 30°C, enzyme activity was maximum at 36 hour of cultivation but after this enzyme activity was decreased rapidly. Initial viscosity of 45% (w/v) gelatin (2,800mPas) was decreased rapidly to 96% (mPas) after hydrolysis for 4hr at 40°C by crude enzyme of *B. subtilis* B0021.

#### 서 론

미생물이 분비하는 단백질 분해효소는 *Bacillus*속(1-3)과 *Streptomyces*속(4-5)으로부터 생산되는 세포외 효소로서 많이 연구되어 왔다. *Bacillus*속이 생산하는 alkaline serine protease는 식품, 약품, 세제 공업 등에 다양하게 이용되고 있으며, 최근 곰팡이(6), 방선균(7), 효모(8)에 의한 생산이 보고되고

있다. Gelatinase는 metallo-protease group으로 gelatin을 oligopeptide로 가수분해시키며, 효소활성에  $Ca^{2+}$ 를 요구하는 것으로 알려져 있으나 작용기작과 특성은 명확히 연구되어 있지 않다(9-11). Murphy 등(10)은 rabbit bone으로부터 분리한 M. W 61,000의 metalloproteinase가 collagen type IV, V에 낮은 활성을 나타내며 gelatin을 분해하는 기능이 있다고 보고하였고, 그는 이 효소를 metalloendopeptidase인 gelatinase라고 보고하였다. Collagen 및 gelatin 분해효소 생산에 대한 연구로는

† Corresponding Author

*Clostridium histolyticum* 유래의 proteinase에 대한 연구(12-14)가 있으며, Röhм(15)이 가축의 탈모 공정에 pancreatic enzyme의 이용가능성을 주장한 이후 Güntelberg 등(16)과 많은 연구자에 의해 *Bacillus subtilis*가 분비하는 alkaline bacterial protease인 Subtilisin A외의 많은 미생물 유래 세포외 단백질 분해효소들이 가축의 탈모공정에 이용될 수 있음을 발표한 바 있으나, gelatin-degrading proteolytic enzyme에 의한 cold-water soluble gelatin hydrolysate에 대한 연구는 되어 있지 않은 실정이다.

이에 본 연구에서는 냉수 가용성 gelatin 가수분해물 제조에 필요한 gelatin-degrading proteolytic enzyme 생성균인 *B. subtilis* B0021을 토양으로부터 분리하고, 이 균주에 대한 효소생산 최적화에 영향을 미치는 영양요구성과 배양조건을 연구하여 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

실험에 사용된 균주는 토양으로부터 3%(w/v) gelatin(Youngduck Gelatin Co., type B, 185 Bloom)+2% agar과 3%(w/v) casein(Hammarsten, Merck)+2%(w/v) agar을 기질로 하여 기질분해능이 있는 *Bacillus subtilis* B0021를 분리 사용하였다.

### 기본배지

기본배지는 gelatin 분해효소 생산성의 유무를 확인하기 위해 1.0%(w/v) glucose, 0.3%(w/v) yeast extract, pH 7.0을 사용하였다.

### 탄소원의 영향

3차 선별결과 단백질 분해력이 우수한 균주를 선별하였고, proteolytic enzyme 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 glucose 대신 각종 탄소원을 1%(w/v)씩 첨가하여 30℃ shaking incubator 내에서 48시간 test tube 발효한 후 원심분리에 의해 얻은 상청액의 효소활성도를 측정하였다. 최적 탄소원의 농도 선정은 1.5~3.0%(w/v)의 glucose 범위에서 효소활성을 측정하여 최대의 효소활성을 나타내는 농도로 하였다.

### 질소원의 영향

균의 증식 및 효소생산에 미치는 질소원의 영향을

조사하기 위하여 기본배지에 yeast extract 대신 각종 질소원을 1%(w/v)씩 가하여 30℃ shaking incubator 내에서 48시간 test tube 발효한 후 원심분리에 의해 얻은 상청액의 효소활성도를 측정하였다. 최적 질소원의 농도 선정은 yeast extract의 농도를 1.0~3.0%(w/v) 범위에서 효소활성을 조사하여 최대의 효소활성을 나타내는 농도로 하였다.

### Metal Ion의 영향

효소생산에 미치는 금속 ion의 영향을 조사하기 위해 각종 염의 최종 농도가 1mM이 되게 첨가한 후 발효 상청액의 효소활성도를 조사하였다.

### Amino Acid 첨가 영향

단백질 분해균의 효소생산성에 미치는 아미노산의 첨가 영향을 조사하기 위해 Table 6과 같은 여러 가지의 아미노산을 0.1%(w/v)가 되도록 가한 후 발효 상청액의 효소활성을 조사하였다. 각종 아미노산은 멸균된 0.2 $\mu$ m pore size의 membrane(Millipore)을 이용하여 여과한 후 멸균 냉각된 발효배지에 가하여 열변성을 최소화하였다.

### 온도의 영향

효소 활성도 증가에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 각각 다른 온도(25~35℃)에서 pH 7.0으로 조절된 5 l jar fermentor(NBS, top drive 방식, U. S. A.)에 working volume이 3 l가 되게 하여 180rpm으로 48시간 배양하면서 균의 효소활성을 측정하였다.

### Initial pH의 영향

효소생산성에 미치는 initial pH의 영향을 조사하기 위하여 효소생산 배지의 초기 pH를 2~11까지 조절하였고, 30℃ shaking incubator 내에서 48시간 배양한 후 배양 상청액의 효소활성도를 측정하였다.

### 배양시간의 영향

분리균의 배양시간에 따른 효소생산성을 조사하기 위하여 250ml triole-baffled shake flask(Bellco Co.) 및 5 l jar fermentor(NBS, top drive 방식, U. S. A.)를 이용하여 각각 다른 온도에서 배양시간별 효소활성도를 조사하였다.

### Tannic Acid의 영향

단백질 분해효소 생산에 대한 저해효과를 조사하

Table 1. Composition of proteolytic enzyme production media.

Composition	Conc.(%, w/v)
Soluble starch	2.0
Pharmamedia	0.4
Bacto soytone	0.3
Polypeptone	0.2
Yeast extract	0.1
CaCO <sub>3</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.05
NaCl	0.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	20mg/ℓ
MnCl <sub>2</sub>	10mg/ℓ
ZnSO <sub>4</sub>	10mg/ℓ
CoCl <sub>2</sub>	5mg/ℓ
pH	7.0

Table 2. Composition of LBG medium.

Composition	Conc.(%, w/v)
Yeast extract	0.5
Glucose	1.0
Trypone	1.0
NaCl	0.5
PH	6.5

기 위하여 효소생산배지에 0.5% (w/v) tannic acid를 가해 48시간 배양 후 배양 상청액을 paper disk ( $\phi$ 0.8mm)에 가해 skim milk:gelatin:agar(3:3:2%, w/v) plate에서 diffusion assay하였다. 대조구로는 tannic acid를 가하지 않은 배양 상청액을 이용하였다.

#### 분리균의 배양

효소활성도 측정 및 효소생산 조건을 조사하기 위해 500ml triole-baffled shake flask(Belco Co.)에 Table 2의 LBG 100ml를 가해 121°C에서 15분간 멸균 후 nutrient agar(NA) plate에서 전배양해 놓은 균의집락을 소량 취해 접종한 후 30°C에서 10시간 전배양하고, 균의 배양액을 효소생산 배지에 2% (v/v)되게 접종한 후 30°C rotary incubator(동양이화학기기, 한국)에서 48시간 배양하였다.

#### 균체량 측정

균의 성장에 따라 배양액 5ml를 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)에 2회 세척한 후 105°C dry oven에서 건조한 후 건조중량을 측정하였다.

#### 조효소 용액

효소 활성도 측정에 필요한 조효소용액은 효소 생산배지(Table 1)에 하루전 LBG medium에서 전배양한 배양액을 2% (v/v) 접종하여 30°C rotary incubator에서 48시간 배양 후 연속 원심분리기(CEPA, 30,000rpm)에 의해 원심분리한 상청액을 조효소액으로 사용하였다.

#### 발효액 처리에 의한 Gelatin의 점도변화

토양유래의 *B. subtilis* B0021이 생산하는 gelatin-degrading proteolytic enzyme의 gelatin 분해능을 확인하고자 45% (w/v) gelatin 용액을 제조하여 항온수조에서 1시간 swelling하여 40°C로 냉각한 후 발효액을 농도별(% (v/v))로 처리하여 4시간 동안 효소가수분해 하였고, gelatin의 점도변화를 volumetric viscometer(영일, 한국)를 이용하여 60°C에서 측정하였다.

#### Proteolytic Enzyme Activity 측정

미생물 유래의 단백질 분해효소의 활성도 측정은 Hagihara변법(17)을 이용하여 분석하였으며 Hammarsten casein(Merck)이 단백질 분해효소에 의해 생성되는 tyrosine(Sigma)양으로 측정하였다(Fig. 1). 효소용액 0.5ml를 0.6% (w/v) Hammarsten casein(in 0.05M potassium phosphate, pH 7.0) 2.5ml과 혼합하여 30°C incubator 내에서 10분간 반응시킨 후 2.5ml의 TCA용액(0.11M trichloroacetic acid, 0.22M sodium acetate, 0.33M acetic acid)을 가해반응을 정지시켰다. 이 혼합액은 30°C incubator에서 30분 정지한 후 3,000rpm, 30분 원심분리하여 미분해 casein을 제거하였고, 275nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 분해효소에 의해 생성된 tyrosine의 양을 tyrosine 표준곡선에 준해 정량하였다. 이때 효소 1unit는 30°C에서 1분 동안에 tyrosine 1 $\mu$ g을 생성시키는 효소량으로 하였다.

#### Invertase Assay

Invertase 역가는 Keilin 등(18)의 방법에 따라 측정하였다. 배양액 1.5ml를 3,000rpm에서 30분간

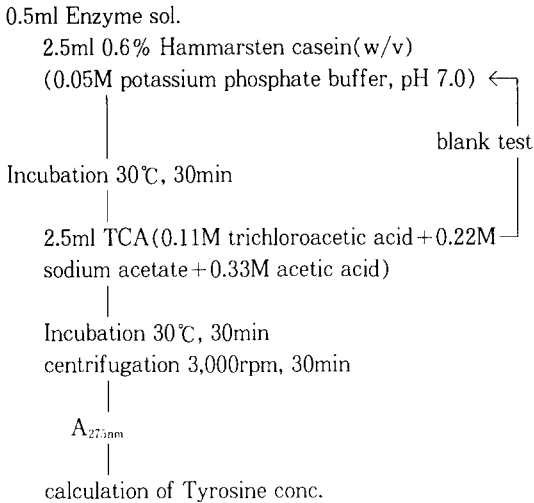


Fig. 1. Procedure of proteolytic enzyme assay.

원심분리하여 얻은 조효소액 1ml를 2% (w/v) sucrose 용액(in 0.1M acetate buffer, pH 4.0)에 혼합하여 30°C 항온수조에서 10분간 반응시킨 후 DNS법(21)에 의해 glucose 표준곡선에 준해 환원당을 정량하였다. 이때 효소 1unit는 O. D 550nm에서 10분 동안에 O. D 1증가 시킨 효소량으로 하였다.

#### $\alpha$ -Amylase Assay

효소 활성도 측정은 Bernfeld 등(19)의 DNS 방법을 이용하였다. 조효소액 1ml를 1% (w/v) 전분(in 0.02M acetate buffer, pH 5.0) 1ml에 혼합하여 40°C 항온수조에서 3분간 반응시킨 후 2ml DNS 용액(3,5-dinitro salicylic acid, 1g; NaOH, 1.8g; Rochelle salt, 30g; 100ml 증류수)를 가해 끓는 물에 5분간 처리, 냉각한 후 16ml 증류수를 가해 575nm에서 흡광도를 측정하였으며, glucose를 표준환원당으로 하여 효소활성도 측정하였다. 효소 1unit는 1ml 효소액이 40°C, pH 5.5에서 전분 1ml을 3분 동안 1mg의 glucose를 생성하는 효소량으로 하였다.

#### Salicinase Assay

효소 활성도는 0.5ml 조효소용액을 동일량의 1% (w/v) salicin(Sigma, pH 7.0)과 혼합하여 40°C 항온수조에서 30분간 반응시킨 후 냉각하여 DNS법에 준해 glucose를 표준환원당으로 하여 효소활성도를 측정하였다. 효소 1unit는 효소용액 0.5ml가 salicin

용액(pH 7.0)에서 30분 동안 1mg의 glucose를 생성하는 효소량으로 하였다.

#### 단백질 정량

발효 조효소액의 조효소 용액 내의 단백질량의 측정은 Lowry 단백질 정량법(20)을 이용하였다. Protein standard로는 bovin serum albumin(Sigma)을 이용하였으며 Folin-phenol reagent(Merck)에 의해 나타나는 발색반응을 540nm 흡광도를 측정하여 단백질 표준곡선에 비교하여 정량하였다.

#### 환원당의 정량

발효액의 환원당 측정은 Miller 등(21)의 DNS법을 이용하여 정량하였다. 표준 환원당으로는 glucose(Sigma)을 사용하였으며 DNS(3,5-dinitro salicylic acid, Junsei, Japan)에 의해 나타나는 발색반응을 U. V-spectrophotometer(Shimazu, UV-265, Japan)를 이용하여 550nm에서 측정하여 표준 환원당에 준해 정량하였다.

#### Flask 배양

분리균의 성장과 효소생산성을 관찰하기 위해 250ml triole-baffled shake flask(Belco)에 효소생산배지 100ml를 가해 121°C에서 15분간 멸균 후 하루전에 배양한 종배양액을 2% (v/v)되게 가해 30°C에서 shaking incubation 하였고, 6시간마다 시료를 채취하여 균의 성장과 효소생산성을 관찰하였다. 배양시간의 경과에 따른 균체량 측정은 발효액 5ml를 원심분리하여 회수된 precipitant(ppt)를 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척한 후 ppt를 건조하여 건조중량을 측정하였고 균의 탁도측정은 U. V-spectrophotometer(Shimazu, U. V-265, Japan)를 이용하여 550nm에서 측정하였다.

#### Jar Fermentor 배양

탄소원인 1.5% (w/v) glucose와 질소원인 2.5% (w/v) yeast extract를 이용하여 5ℓ fermentor(NBS, top drive 방식, U. S. A.)에서 working vol.은 3ℓ로 하여 180rpm, 배양온도는 30°C, D. O. 1, 소포체는 silicon 계열(silicon 30%, 고려인삼화학)을 사용하여 pH 7.0에서 72시간 발효하면서 균의 성장성과 효소 생산성을 확인하였다. 종균 배지로는 냉장 보관된 균을 500ml triole-baffled shake flask(Belco)에 Table 2의 LBG broth 200ml를 가해 121°C에서 15분간 멸균한 후 무균상태에서 분리균

Table 3. Effect of Carbon Sources on the Gelatin-degrading Proteolytic Enzyme Production in *Bacillus subtilis* B0021.

C-sources	Cell growth	Final pH	R. A(%)	C-sources	Cell growth	Final pH	R. A(%)
D-Xylose	1.10	4.3	152	D-mannitol	1.50	4.0	118
Glucose	1.20	4.4	162	Galactose	1.30	5.7	117
D-Fructose	1.15	4.5	106	D+Trehalose	0.90	4.3	111
Sucrose	1.10	4.5	110	Dulcitol	1.50	4.9	157
D-Lactose	1.40	5.8	137	Salicine	0.90	4.5	243
Maltose	1.35	5.4	139	Raffinose	1.30	4.3	125
Glycerol	0.90	4.2	117	Corn starch	0.60	5.8	123
L-Sorbose	1.30	4.3	122	Adonitol	1.50	5.8	150
Solstarch	1.50	5.8	121	Cellulose	0.30	8.4	103
Dextrin	1.50	6.4	102	Inuline	0.70	8.6	121
Melibiose	1.20	4.4	102	Mannitol	1.40	4.0	183
L-Arabinose	1.35	5.6	136	Inositol	1.50	6.2	137
Rhamnose	1.25	4.2	112	D+Ribose	1.30	4.1	172
Control			100				

R. A : Relative activity

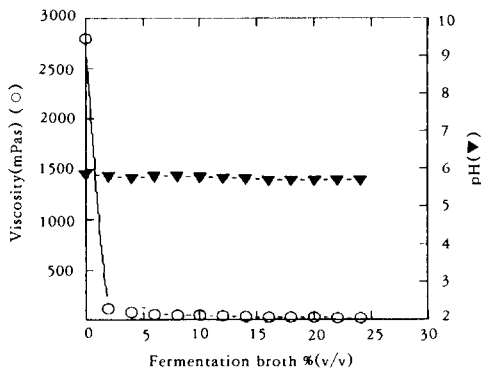


Fig. 2. Hydrolysis of gelatin by fermentation broth.

1 loop을 접종하여 30°C에서 10시간 배양한 전배양액을 2% (v/v) 접종하였다.

결과 및 고찰

Culture Broth 처리에 의한 Gelatin의 점도변화

Gelatin은 20~25°C에서 장시간 정치할 경우 gel화되며 10°C 이하에서는 완전한 gel을 형성하여 gelatin 고유의 점도, 강도를 유지하게 된다. 또한 gelatin은 산, 알칼리, 효소처리에 의해 pH가 감소하는 경향을 나타내며 점도, 강도의 저하가 나타나

게 된다(31). Gelatin 분해균의 발효 조효소액 처리에 의한 gelatin(45%, w/v)의 점도변화 측정결과 초기의 gelatin 용액의 점도는 2,800(mPas)이었고 2~25% (v/v) 발효 조효소액 처리에 의해 가수분해시킨 결과 96% (mPas) 이상의 급격한 점도 저하현상을 나타내었다. pH 변화에서는 초기(pH 5.8)와 반응종료(pH 5.6)에서 0.2의 감소를 나타내었으나 큰 변화는 관찰되지 않았다. 이는 Ward 등(31)의 주장과 일치하며 *B. subtilis* B0021이 생산하는 효소가 gelatin의 peptide bond를 절단하여 subunit화함에 의해 점도 저하현상이 나타나는 것으로 예상된다(Fig. 2). Gelatin의 가수분해에 필요한 발효 조효소액의 효율적인 이용에서는 2% (v/v)에서도 최대의 가수분해 효과(96%의 점도저하)를 유지하는 것으로 보아 2% (v/v)의 발효 조효소액 처리에 의해서도 충분한 가수분해 효과를 얻을 것으로 사료된다.

Carbon Source의 영향

Proteolytic enzyme 생산에 미치는 탄소원의 영향은 Table 3과 같다. 실험결과 토양유래성 단백질 분해균의 효소활성도는 salicin(Merck), mannitol(Junsei), D(-)ribose(Junsei), glucose(Junsei) 등의 순이었으며, dextrin, melibiose, cellulose, D(-)fructose(Sigma사) 등에서는 낮은 효소활성도를 나타내었으나 경제성을 고려하여 glucose를 탄소원

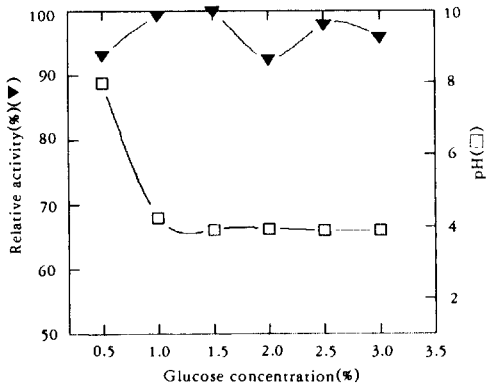


Fig. 3. Effect of glucose concentration on the gelatin-degrading proteolytic enzyme production.

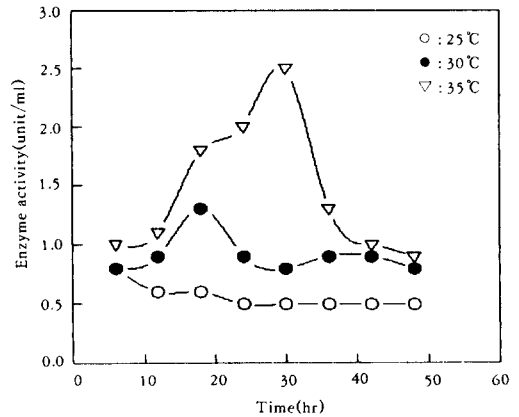


Fig. 5. Time course of invertase activity at different temperature.

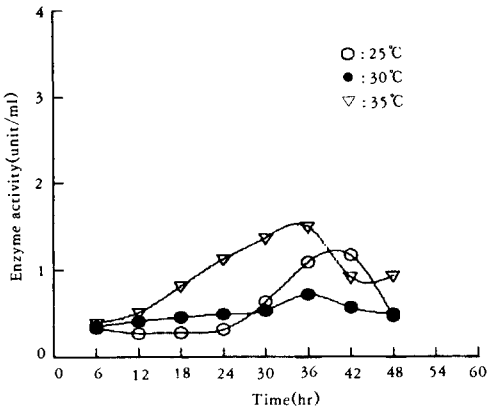


Fig. 4. Time course of amylase activity of different culture temperature.

으로 이용하였다. 최적 glucose 농도선정은 glucose를 0.5~3% (w/v)로 하여 효소생산의 최적농도를 조사한 결과 Fig. 3과 같이 1.5% (w/v)에서 최대활성도를 나타내었으며 2% (w/v) 이상에서는 5~10% (상대활성도)의 감소현상을 나타내어 glucose 농도가 증가함에 따라 효소활성도가 점차 감소하는 현상을 나타내는 것으로 확인되었다. Salicin과 복합탄소원의 이용가능성은 sucrose 분해효소인 invertase와 다당류의 α-1→4 가수분해효소인 amylase 및 salicin 분해효소인 salicinase의 효소 활성도 측정에 준하였다. Salicin을 탄소원으로 한 단백질 분해효소의 효소활성도 측정에서는 1% (w/v)의 salicin과 yeast extract가 가해진 멸균배지에 균을 접종하

여 48시간 배양한 후 여러 가지 분해효소의 활성도를 조사한 결과 배양액 내의 salicinase 활성도 측정에서는 배양 종료 후 효소활성의 변화가 나타나지 않았다. Amylase 활성도 측정에서는 35°C에서 36시간 배양시 최대의 효소활성(1.5unit/ml)을 보이다가 시간이 경과함에 따라 효소활성(specific activity)이 감소하였고, 25°C에서는 42시간 배양시 최대의 효소활성도(1.2unit/ml)를 나타내었으나 30°C에서는 36시간 배양시 최대의 효소활성도(0.6unit/ml)를 나타내어 30°C, 36시간 배양 때보다 2.5배의 효소활성이 증가하였고 25°C, 42시간 배양 때보다는 약 1.3배의 효소활성이 증가하였다(Fig. 4). 2% (w/v) sucrose(in 0.1M acetate buffer, pH 4.0)를 기질로 한 invertase assay에서는 35°C, 30시간 배양시 2.5unit/ml의 최대치를 나타내어 30°C에서는 18시간 배양시의 활성도(1.3unit/ml)보다 약 2배의 높은 효소활성을 나타내었고, 25°C에서는 시간에 영향 없이 효소활성도는 증가하지 않았다(Fig. 5).

질소원의 영향

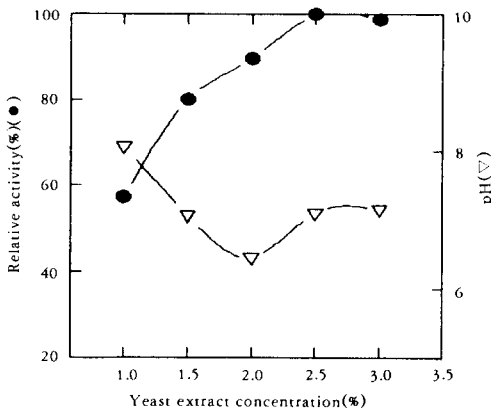
각종 질소원의 영향에 대한 결과는 Table 4와 같다. 실험결과 질소원의 영향에 대한 단백질 분해효소의 상대활성도는 yeast extract에서 가장 높게 측정되었고, casein과 gelatin은 yeast extract보다 25~48% 낮은 효소활성도를 나타내었다. Urea, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 등에서는 상당히 낮은 효소활성도를 나타내었다. 질소원으로서의 yeast extract의 농도가 효소생산성에 미치

**Table 4. Effect of Nitrogen Sources on the Gelatin Degrading Proteolytic Enzyme Production in *Bacillus subtilis* B0021.**

N-sources	Cell growth (O.D. 660nm)	Final pH	R. A.(%)
Casein	0.2	7.4	315
Polypeptone	1.0	6.0	257
Pharmamedia	7.5	6.5	198
Soybean flour	8.5	7.1	398
Gelatin	0.3	7.4	217
Urea	0.01	8.3	100
NaNO <sub>3</sub>	0.02	6.8	91
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.03	5.5	79
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	5.5	76
KNO <sub>3</sub>	0.03	5.5	84
Tryptone	0.8	8.0	293
NH <sub>4</sub> Cl	0.01	5.5	78
Beef ext.	1.5	8.0	385
Yeast ext.	3.0	7.7	415
Bacto peptone	0.4	7.4	275
Bacto soytone	3.0	7.7	220

— : Cell growth was not detected

R. A : Relative activity



**Fig. 6. Effect of yeast extract concentration on the proteolytic enzyme production.**

는 영향을 조사하기 위하여 1% (w/v) glucose가 가해진 기본배지에 1.0~3.0% (w/v) yeast extract를 가해 효소생산성을 조사하였다. 실험결과 2.5% (w/v) yeast extract에서 최대의 상대효소활성도(100%)를 나타내었으며, 1% (w/v) yeast extract보다 42%의 상대활성도가 증가하였다. 3% (w/v) yeast

**Table 5. Effect of Metal Ion on the Gelatin-degrading Proteolytic Enzyme Production in *Bacillus subtilis* B0021.**

Metal ions	Cell growth (O.D. 660nm)	Final pH	R. A.(%)
AgNO <sub>3</sub>	3.2	8.3	74
FeCl <sub>3</sub>	4.9	7.7	98
MnCl <sub>2</sub>	3.4	6.7	94
MnSO <sub>4</sub>	3.4	6.9	100
MgSO <sub>4</sub>	1.9	8.5	70
KCl	2.3	8.3	73
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.9	8.3	79
CuSO <sub>4</sub>	1.2	7.2	70
CaCl <sub>2</sub>	1.9	8.4	75
ZnCl <sub>2</sub>	1.4	6.9	57
CoCl <sub>2</sub>	0.1	6.7	53
CaCO <sub>3</sub>	2.1	8.3	75
FeSO <sub>4</sub>	7.8	7.6	101
AgNO <sub>3</sub>	3.2	8.3	74

R. A : Relative activity

extract에서는 2.5% (w/v) yeast extract보다 0.2%의 상대효소활성도가 감소하여 최적 질소원의 농도는 2.5% (w/v)으로 선정하였다. Yeast extract 농도 증가에 따른 최종 pH 변화에서는 상대효소활성도 증가와 상반해서 감소하는 현상을 나타내었으며, 2.0% (w/v) yeast extract에서 가장 낮은 pH (6.4)를 나타내었다(Fig. 6). 질소원으로서의 배지 첨가제에 대한 gelatin 이용 가능성의 조사에서는 0.1% (w/v)의 gelatin(unhydrolysed)을 첨가하여 효소생산성을 조사한 결과, 예측과는 달리 균체성장과 효소활성도의 증가 현상이 나타나지 않았다. 반면 효소처리 gelatin 분말제로서의 미생물 배지 첨가제로서는 균체성장과 아미노산 조성(31)을 검토할 때 복합아미노산 첨가제로서의 이용이 가능할 것으로 사료된다.

**Metal Ion의 영향**

분해균의 증식 및 효소생성에 미치는 금속 ion의 영향은 상대활성도를 측정하였으며 Table 5와 같다. 실험결과 토양유래의 단백질 분해균주는 Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ag<sup>2+</sup>, K<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 등에 의해 효소생산성과 균체성장이 낮게 나타났으나, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ion은 효소생산성과 균체성장의 촉진제로 작용하는 경향을 나타내었다. 이는 Murray(22)가 Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>이 2

**Table 6. Effect of Amino Acids on the Gelatin-degrading Proteolytic Enzyme Production in *Bacillus subtilis* B0021.**

Amino acids	Cell growth (O. D. 660nm)	Final pH	R. A(%)
L-Phe.	3.7	7.1	104
L-Val.	9.0	8.0	102
L-Glu.	7.5	7.5	103
L-Leu.	8.5	7.7	102
L-Pro.	7.9	7.6	102
L-Tryp.	6.8	7.3	102
L-Ser.	7.3	7.6	103
L-Gly.	7.0	7.5	100
L-Asp.	7.8	7.5	102
L-Lys.	5.6	7.3	101
L-Meth.	8.0	7.7	98
L-Thr.	8.0	8.1	101
L-Iso.	6.5	7.3	101
L-Ala.	7.3	7.4	103

R. A : Relative activity

차 대사조절의 가장 중요한 인자로 작용하며 1차 대사산물의 분비에 주로 관여한다는 주장과 일치하는 것으로 확인되었다.  $Zn^{2+}$ 는 일반적으로 bacteria spore에 존재하며  $\alpha$ -amylase와 대다수의 protease의 stability 및 cofactor로서 이용된다는(22) 보고는 있으나, 본 연구에서는 효소활성에 큰 영향을 미치지 못하였다. 이는 Zamost 등(23)이 보고한 내열성 단백질 분해효소인 thermolysin이 효소활성에  $Zn^{2+}$ 를 요구한다는 것과는 상이함을 보였고, Murphy 등(24)은 gelatin과 collagen 분해능이 있는 gelatinase가  $Ca^{2+}$  존재하에서  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  첨가시  $Cu^{2+}$ 와  $Mg^{2+}$ 에서는 95% 이상의 gelatinase 저해효과를 가져왔으나  $Zn^{2+}$ 는 23%의 저해를 나타내어 gelatinase에 대한 reactivation능을 가진다고 보고한 것과는 차이가 있었다. 또한 Kim 등(25)은 alkaline protease 생성균인 *Bacillus* sp.가  $Fe^{2+}$ 에 의해 약 20% 효소저해를 일으켰고  $Cu^{2+}$ 에 의해 20% 정도 효소활성이 상승된 것과는 상이함을 보였다.

#### Amino Acid 첨가시의 영향

아미노산 첨가영향에 대한 결과는 Table 6과 같다. 실험결과 L-phenylalanine을 비롯한 대부분의 아미노산이 효소활성도와 균체성장을 상승시키는 것

으로 확인되었다. Chaloupka 등(26)은 *Bacillus* 배양시 free amino acid가 protease 합성을 저해하였으나  $\alpha$ -amylase 합성은 증가시킨다고 보고하였고, Keay(27)는 crude form의 protein substrate가 균의 성장과 proteolytic enzyme 합성의 저해없이  $\alpha$ -amylase 합성을 증가할 수 있다고 보고하여, *Bacillus*를 이용한 단백질 분해균의 효소생성을 위해서는 복합아미노산원인 냉수가용성 gelatin 분말이 단백질 분해효소의 생산을 위한 배지첨가제로서 이용 가능한 것으로 사료된다.

#### 온도의 영향

배양온도에 따른 효소활성도는 specific activity (unit/ml)로 나타내었으며 온도별 효소활성도 측정은 25~35℃ 범위에 한정 실험하였다. 실험결과 salicin을 기질로 한 salicinase assay에서는 온도변화에 관계없이 효소활성이 나타나지 않았으며, amylase assay에서는 35℃에서 36시간 배양액에 최대의 효소활성(1.5unit/ml)을 보였다. 온도 상승에 따른 specific activity(unit/ml)에서는 25℃에서 40시간 배양시 최대의 효소활성(1.2unit/ml)을 나타낸 반면 30℃에서는 36시간 배양시 최대의 효소생산성(0.6unit/ml)을 나타내어 25℃ 배양 때보다 20%의 효소활성이 증가하였고, 30℃ 배양 때는 60%의 효소활성이 증가하여 최적 배양온도의 선정은 35℃로 하였다(Fig. 4). Invertase assay에서는 35℃, 30시간 배양 때 최대의 효소활성도(2.5unit/ml)를 나타낸 반면 30℃에서는 배양 18시간째에 최대효소활성(1.3unit/ml)을 나타내어 약 50%의 효소활성이 증가하였다(Fig. 5). 단백질 분해효소 활성도에서는 35℃, 30시간 배양시 최대의 효소활성도(330unit/ml)를 나타내어 30℃, 36시간 배양 때보다 1.5배의 효소활성도 증가를 나타내었고 25℃, 30시간 배양 때보다 5배의 효소활성이 증가하였다(Fig. 7). 따라서 본 실험에 이용된 gelatin 분해성 *Bacillus subtilis* B0021는 중온성 세균인 것으로 사료된다.

#### Initial pH의 영향

효소 생산성에 미치는 initial pH의 영향에 대한 실험결과 초기 pH가 중성 범위(pH 7.0)에서 가장 높은 상대효소활성(100unit/ml)을 보였고 산(pH 4.0), 염기(pH 10.0)하에서 발효시킨 배양액의 효소활성도는 40% 감소하여 나타났다(Fig. 8). 중성범위의 pH에서 효소 활성도가 가장 높게 유지된 것은



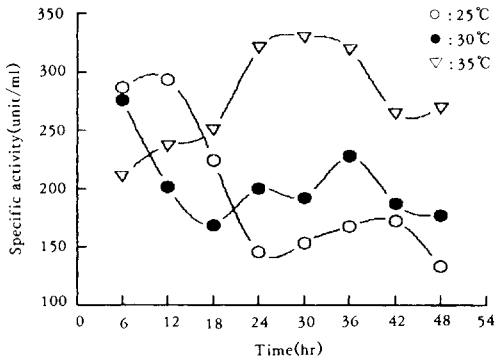


Fig. 7. Proteolytic enzyme activity at different temperature.

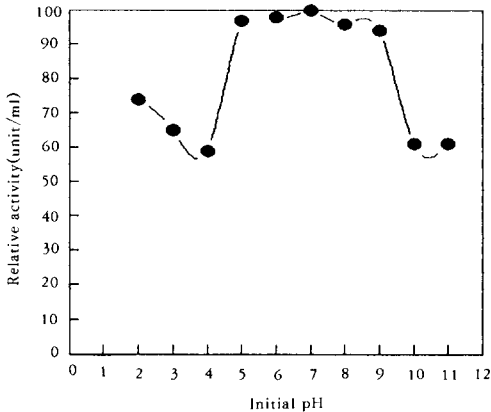


Fig. 8. Proteolytic enzyme activity at different initial pH.

분비효소의 작용 pH 범위가 중성 부근이며 이 부근에서 효소활성이 가장 안정화되기 때문인 것으로 사료된다. Initial pH에 따른 final pH, total protein (mg/ml), 흡광도(O.D 550nm)에서는 pH가 9 이상에서는 final pH가 9 이상을 유지하였고, total protein에서는 pH 9에서 최대의 증가량(4mg/ml)을 보였으나 초기 pH가 강알칼리 부위에서는 갑작스런 감소현상을 나타내었다. Initial pH에 따른 specific activity(unit/ml)는 산(pH 3.0 이하)에서는 효소활성이 낮게 측정되었고, 알칼리(pH 9.0)에서 일시적인 감소가 있는 후 효소활성이 급격히 증가하였다. 균의 성장에 따른 흡광도(O.D 550nm)의 변화에서는 산(pH 4.0 이하) 및 알칼리 범위(pH 9.0 이상)에서 성장이 저하되었으나 pH 5.0~9.0에서는 가장 높은 성장을 유지(O.D 3.5)하여(Fig. 9) 세포

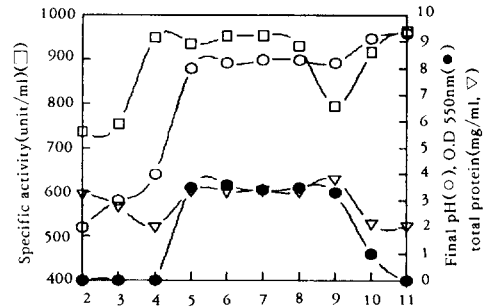


Fig. 9. Effect of initial pH on the gelatin-degrading proteolytic enzyme production.

외성 단백질 분해효소 생성균인 *Bacillus subtilis* B0021의 배양 최적 pH는 중성범위가 가장 적당한 것으로 사료된다.

배양시간의 영향

분리균의 배양 시간에 따른 효소 생산성의 실험결과 salicinase 활성은 배양 시간에 관계없이 효소활성의 변화를 보이지 않았다. Amylase 활성에서는 35°C에서 36시간 배양때 최대의 효소활성(1.5unit/ml)을 보인 반면 25°C에서는 40시간 배양 때 최고의 효소활성을 나타내었다. 한편 30°C 배양의 경우 36시간째 0.6unit/ml를 나타내어 amylase 생산성은 36시간 배양이 적당한 것으로 사료된다(Fig. 4). Invertase 활성에서는 35°C, 30시간 배양 때 최고의 효소활성(2.5unit/ml)을 보인 반면 30°C에서는 배양 18시간째 1.3unit/ml를 나타내었다(Fig. 5). Proteolytic enzyme assay에서는 35°C, 30시간 배양 때 최대의 효소활성도(330unit/ml)를 나타내어 30°C, 36시간 배양 때보다 1.5배의 효소활성도가 증가하였고 25°C, 30시간 배양 때보다 5배의 효소활성이 증가하였다. 25°C 및 30°C에서는 36시간 및 42시간째에 소량의 증가를 보였으나 시간이 지남에 따라 점점 감소하는 현상을 나타내어(Fig. 6) *Bacillus subtilis* B0021의 최적 배양시간은 30시간 전후의 배양이 최대의 효소활성을 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

Tannic Acid의 영향

Tannin은 오랫동안 소화저해효과를 나타내는 것으로 확인되어 protein과 insoluble complex를 형성하여 침전되는 현상을 나타내며, 단백질 분해효소와 protein substrate에 작용하여 효소활성을 저해하는

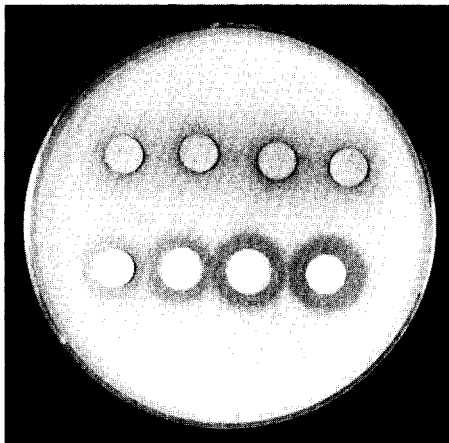


Fig. 10. Effect of tannic acid on 3%(w/v) skim milk :3%(w/v) gelatin :2%(w/v) agar A : 0.5%(w/v) tannic acid added culture broth, B:Tannic acid not added culture broth.

것으로 확인되었고, 초식동물에서는 tannin-rich diet 섭취시 분비성 nitrogen의 배출이 증가하는 것으로 확인되었다(28). 효소생산배지에 0.5%(w/v) tannic acid를 가해 단백질 분해효소의 활성을 조사한 결과 *Bacillus subtilis* B0021의 단백질 분해효소는 tannic acid에 의해 완전한 효소생산저해를 일으켰으며(Fig. 10, A), 균의 성장에 따른 흡광도의 증가도 나타나지 않아 tannin이 단백질 분해효소와 상호작용에 의해 저해작용을 한다는 지금까지의 이론적 근거를 뒷받침하는 것으로 확인되었다.

Flask 발효

Flask 발효결과 배양액의 pH는 접종 후 24시간째 가장 낮게(pH 6.5) 나타났으며, 효소활성이 증가하는 시기부터 pH의 지속적인 상승이 이어졌다. 균체량(g/l)의 변화에서는 효소활성이 최고치에 달하는 배양 30시간 이후에서 7g/l로 최고치를 기록한 이후 점점 감소하는 현상을 나타내었고, 흡광도(O.D 550nm)에서는 효소활성이 증가하는 배양 24시간 이후에서 급격한 증가를 보였으나 효소활성이 최대인 배양 36시간째(15,000unit/ml)는 급격한 흡광도 감소(O.D 5.5)를 나타내었고, 효소활성이 감소하는 배양 36시간 이후에는 흡광도가 최대를 유지하였다. 단백질 분해효소의 total activity(unit/ml)에서는 배양 24시간 이후에서 최대의 증가를 나타낸 반면

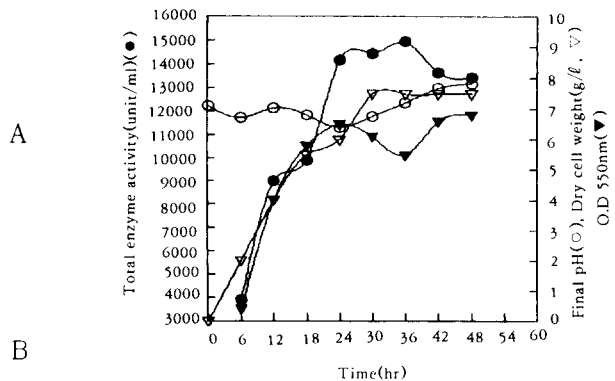


Fig. 11. Flask fermentation of *B. subtilis* B0021.

균체량의 변화가 없는 36시간 이후에는 효소활성이 감소하였다. 흡광도와 효소활성의 관계에서는 최대의 효소활성이 나타나는 배양 36시간째에 최고의 흡광도 감소를 나타내어 분비형 단백질 분해효소에 의해 bacteria cell의 세포벽분해로 흡광도가 감소한 것으로 사료되며, 효소활성이 유지되는 시기에 계속적인 pH가 증가한 것은 *Bacillus subtilis* B0021의 단백질 분해효소가 호알칼리성 단백질 분해효소 생산균이기 때문인 것으로 사료된다(Fig. 11).

Fermentor 발효

발효결과 접종 6시간 이후 균 성장에 따른 흡광도가 크게 증가하였으며 최대의 효소활성을 나타내는 배양 20시간 이후에서 최대의 흡광도(O.D 6.0)을 나타내었다. 효소활성도(specific activity, unit/ml)는 배양 20시간 이후 최대의 효소활성을 나타내어 균체량(mg/5ml) 및 흡광도(O.D 550nm)의 증가와 비례함을 알 수 있다. 환원당의 정량에서는 효소활성이 증가함에 따라 급격한 감소현상을 나타내었는데 배양 20시간 이후 효소활성은 최대(570unit/ml)치를 나타낸 반면 환원당은 최저치(약 7mg/ml)를 나타내어 균 성장에 따른 급격한 탄소원의 소비현상과 더불어 효소활성이 증가함을 알 수 있다. 발효에 따른 cfu(colony forming unit)/ml는 미생물 회석법에 준한 실험결과 배양 12시간째에 10<sup>10</sup>cfu(colony forming unit)/ml개로 최대치를 나타내었으며, 57시간째에는 10<sup>7</sup>cfu/ml개로 급격히 감소하였다. 균체량은 24시간 배양 때에 5.5g/l로 가장 큰 성장성을 나타내었고 발효에 따른 효소활성도는 균체량의 증가에 비례하여 상승하였다(Fig. 12). 이는 Oh 등(29)이 보고한 high alkaline protease 생성균인

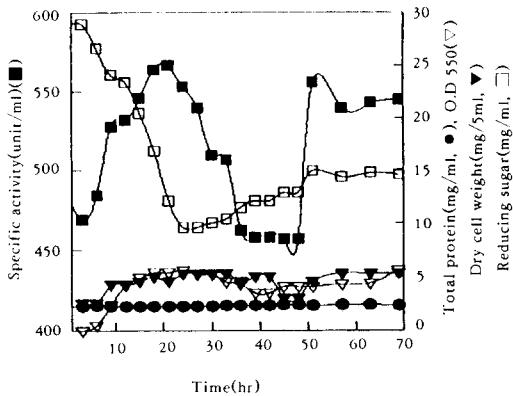


Fig. 12. Fermentation curve of *B. subtilis* B0021.

*Bacillus* sp. M-71 균주가 65시간째에 최대의 효소 활성을 나타낸 것과 Kim 등(30)이 보고한 neutral protease 생성균인 *Bacillus* sp. KN103N이 배양 48 시간째에 최대의 효소활성을 보인 것과 비교할 때 *Bacillus subtilis* B0021는 flask 발효에 의해 배양 24 시간째에 최대의 효소활성이 증가하는 점과 fermentor 발효에 의한 효소활성이 20시간 배양 때 최대의 효소활성을 보이기 시작하는 점에서 이들 세균과는 상당한 성장의 차이를 보이는 것으로 확인되었다.

### 요 약

Gelatin 분해성 proteolytic enzyme 생성균인 *B. subtilis* B0021가 생산하는 세포의 단백질 분해효소 생산을 위한 영양 요구성과 배양조건을 검토한 결과는 다음과 같다.

영양요구성은 1.5% (w/v) glucose와 2.5% (w/v) yeast extract에서 효소활성도가 최고치를 나타내었고 metal ion은  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  효소생성의 저해제로 작용한 반면  $\text{Fe}^{2+}$ 와  $\text{Mn}^{2+}$ 에서는 촉진제로 작용하여 최고 3.5배 효소생산성이 증가하였다. 아미노산 첨가 영향에서는 대부분의 아미노산이 효소활성을 촉진시키는 것으로 확인되었다. 배지의 최적초기 pH는 7.0 부근이며 배양온도는 35°C에서 효소에 따라 다소 차이는 있었으나 배양시간 30시간 정도에서 최고의 효소생산성을 나타내었고 30°C에서는 42시간째에 효소활성도가 최고치를 나타내었다. Tannic acid 첨가에 대한 단백질 분해효소 생산에서는 발효 배지에 tannic acid 첨가시 완전한 효소생산 저해제

로 작용하였으며 salicin을 탄소원으로 한 salicinase assay에서는 온도 및 배양시간에 관계없이 효소활성을 보이지 않았고 복합탄소원 이용에 대한 amylase assay에서는 35°C, 36시간째에 최대의 효소활성을 나타내었고 invertase assay에서는 35°C, 30시간째에 최대 효소활성도 2.5unit/ml을 나타내었다. 또한 gelatin 가수분해능에서는 45% (w/v)의 gelatin 용액의 점도가 발효조효소액에 의해 96% (mPas)의 점도저하를 가져오는 것으로 확인되었다.

### 감 사

본 연구는 1992년도 국민은행지원 중소기업지원 과제(B-00020)에 의하여 이루어졌으며 이에 대하여 국민은행과 영덕젤라틴(주) 및 유전공학연구소 생물소재그룹에 깊은 감사를 드립니다.

### 참 고 문 헌

1. P. R. Harry, W. S. Riggsby and A. H. David (1965), *J. Biological. Chem.*, **240**, 78-86.
2. J. D. McConn, D. Tsuru and K. T. Yasunobu (1964), *J. Biological. Chem.*, **239**, 3706-3715.
3. W. S. Riggsby and H. P. Rappaport(1965), *J. Biological. Chem.*, **240**, 87-92.
4. T. Ouchi(1962), *Biol. Chem.*, **26**, 723.
5. M. O. David and S. J. Scharf(1982), *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1225.
6. M. Ito, and M. Sugira(1968), *Studies on Aspergillus proteinase*, *Yakugaku Zasshi*, **88**, 1576-1582.
7. S. A. Siegel, H. Brady and W. M. Awad (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4155-4159.
8. K. H. Kang, I. H. Bae and C. H. Lee(1987), *Kor. J. Appl. Microbiol.*, **15**, 279-285.
9. W. A. Galloway, G. Murphy, J. D. Gavrilovic, T. E. Cawston and J. J. Reynolds(1983), *Biochem. J.*, **209**, 741-752.
10. G. Murphy, C. Mcalpine, C. Poll and J. J. Reynolds(1985), *Biochim. Biophys. Acta.*, **831**, 49-58.
11. P. Singleton and D. Sainsbury(1987), *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd.
12. E. Bidwell and W. E. Von Heinigen(1948),

- Biochem. J.*, **42**, 140.
13. I. Mandl, H. Zipper and L. T. Ferguson (1958), *Arch. Biochem. Biophys.*, **74**, 465.
  14. E. Yoshida and H. Noda(1965), *Biochim. Biophys. Acta.*, **105**, 562-574.
  15. O. Röhm(1913), *Collegium(Darmstadt)*, Gerber 1927, **23**, 374.
  16. A. Güntelberg and M. Ottesen(1954), *C. R. Trav. Lab. Carlsberg.*, **29**, 36-48.
  17. B. Haginbara, H. Masubara, H. Nakai and K. Okunki(1974), *J. Biotechnol.*, **45**, 185.
  18. D. Keilin and E. F. Hartree(1952), *Biochem.*, **50**, 531.
  19. P. Bernfeld(1955), "*Methods in Enzymology*", 1, 149, Academic press.
  20. O. H. Lowry, N. J. Rosebrogh, A. L. Farr and R. J. Randall(1951), Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
  21. G. L. Miller(1959), Use of Dinitrosalicilic acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chem.*, **31**, 426-428.
  22. P. Murray(1990), *Methods in Enzymology*, **182**.
  23. B. L. Zamost, Q. I. Brantley, D. D. Elm and C. M. Beck(1990), *J. Ind. Microbiol.*, **5**, 303-312.
  24. G. Murphy, C. G. McAlpine, C. T. Poll and J. J. Reynolds(1985), *Biochim. Biophys. Acta.*, **831**, 49-58.
  25. T. H. Kim, S. H. Park, D. S. Lee, T. K. Kwon, J. K. Kim and S. D. Hong(1990), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**, 159-164.
  26. J. Chaloupka and P. Kreckova(1966), *Folia. Microbiol. Praque.*, **11**, 82-88.
  27. L. Key(1972), *Int. Ferm. Sympo. Soc. Fer. Technol*, Osaka, Japan, in G. Terui(ed), 289-298.
  28. M. Simon and P. G. Waterman(1987), *Phytochemistry*, **26**(1), 99-102.
  29. S. H. Oh and P. S. Oh(1991), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(1), 1-7.
  30. H. R. Kim and P. S. Oh(1991), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(2), 116-121.
  31. A. G. Ward and A. Courts(1977), *The Science and Technology of Gelatin*, pp. 73-107, Academic Press, New York.