

Pectinase를 생산하는 *Bacillus* sp. BS-214의 분리 및 특성

전병삼¹ · 차재영¹ · 송재영² · 이강덕³ · 김범규³ · 이영춘^{1*}

일본 동경대학 분자세포생물학연구소

¹동아대학교 생명자원과학부

²경상대학교 의과대학 미생물학교실

³경상대학교 유전공학연구소

Isolation and Characterization of Pectinase-Producing *Bacillus* sp. BS-214

Beong-Sam Jeon, Jae-Young Cha¹, Jae-Young Song², Gang-Deog Lee³,
Beom-Kyu Kim³ and Young-Choon Lee^{1,*}

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

¹*Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea*

²*Department of Microbiology, College of Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-750, Korea*

³*Department of Genetic Engineering Research Institute, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea*

Abstract

A bacterial strain BS-214 producing extracellular pectinase was isolated from soil. The isolated bacterium was identified as a strain of *Bacillus* sp. based on the morphological, biochemical, and physiological characteristics. Cell growth and pectinase activity of *Bacillus* sp. BS-214 were reached to a maximum in the culture condition of pH 8.5 at 40°C. Production of pectinase by the strain was the highest when polygalacturonic acid was added to culture medium as a carbon source, and its optimal concentration was 1%. Also, yeast extract was used as the best nitrogen source for the production of pectinase by the concentration of 0.25%. Decomposition of a constituent of *Edzworthia papyrifera* by the strain was observed by scanning electron microscope.

Key words – Pectinase, *Bacillus* sp. *Edzworthia papyrifera*

서 론

펙틴질은 고등식물의 세포벽에 많이 존재하는 식물체의 콜로이드성 탄수화물군으로서, 식물체 성장과 함께 세포벽에 축적되어 겔 상태로 존재하면서 세포사이를 접착시키는

역할을 한다[5,8]. 이러한 펙틴질은 polygalacturonic acid의 카르복실기가 유리된 상태로 존재하는 펙틴산과 메틸화된 상태로 존재하는 펙티닌산으로 크게 구분된다. 일반적으로 펙틴은 당과 산에 의해서 독특한 겔을 형성하는 것으로 펙티닌산에 속하며, 천연물중 D-polygalacturonic acid의 75% 이상은 메탄올과 에스테르화 되어있다[5,8]. 한편, pectinase는 펙틴질을 분해시키는 효소군의 총칭으로서, 자연계에 존재하는 펙틴 분해 효소는 pectin esterase와 depolymerase

*To whom all correspondence should be addressed

Tel: 051-200-7591, Fax: 051-200-6993

E-mail: yclee@mail.donga.ac.kr

로 구분 할 수 있다[1,2,6,8]. Pectin esterase(EC 3. 1. 1. 11)는 펙틴에 작용해서 pectic acid와 methanol로 분해시키며 [2,6], depolymerase는 펙틴의 glycoside 결합을 가수분해시키는 hydrolase(EC 3. 1. 1. 15)와 β -elimination으로 glycoside 결합을 분해시킴으로서 polygalacturonic acid의 C-4와 C-5 사이에 이중결합을 생성하는 lyase로 분류된다[1,6]. 그 중 endo-polygalacturonase는 pectic acid에 잘 작용하는 기질로서 무작위로 펙틴의 주쇄를 분해시켜 oligo-galacturonic acid가 분해산물로서 축적되며, 최종 분해산물로서는 mono-galacturonic acid, di-galacturonic acid가 축적되고, 경우에 따라서는 tri-polygalacturonic acid가 분해산물로서 축적되기도 한다[6,8]. 또한, exo-polygalacturonase도 기질로서 pectic acid에 잘 작용하며, 비환원성 말단으로부터 mono-galacturonic acid를 생산한다[6,8]. 지금까지 pectinase는 일부 미생물로부터의 생산이 보고되었으나[3,7,9,11], *Bacillus* sp.로부터의 생산은 최근에 보고되었다[4]. 이러한 pectinase는 삼나무의 발효정제, 과즙 및 과실주 제조에 있어서 착즙 수율 향상과 혼탁방지, 식물체 조직 배양 등에 널리 이용되고 있다[5,8]. 본 실험에서는 삼지닥나무(*Edzworthia papyrifera*)의 섬유를 이용할 방법의 일환으로 삼지닥나무를 분해시킬 수 있는 pectinase 활성을 가진 세균을 토양으로부터 분리 동정하여 분류학상의 위치를 확인하고, 효소의 생산조건에 관련된 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

시약

본 실험에 사용한 pectin, polygalacturonic acid(sodium salt), mono-galacturonic acid 및 그 밖의 탄소원으로 사용된 시약은 Sigma사 제품을 사용하였고, polypeptone, yeast extract 등 질소원으로 사용된 시약은 Difco사 제품을 사용하였으며, 기타시약은 특급시약을 사용하였다.

균주의 분리 및 동정

경남 일대의 토양 100여종을 균원 시료로 하여 균을 분리하였다. 균 분리용 기본배지로서는 LB 고체 배지(NaCl 5g, tryptone 10g, yeast extract 5g, agar 15g/L)를 pH 8.0으로 조정하여 사용하였다. 균원 시료를 3단 희석하여 도달한 배지를 37°C에서 12시간 배양하여 나타난 colony를

LBP 고체 배지(NaCl 5g, tryptone 10g, yeast extract 5g, polygalacturonic acid 5g, agar 15g/L)에 tooth picker 한 후, 37°C에서 12시간 배양하여 Wood의 방법[16]으로 colony를 분리 하였다. 즉, colony가 나타난 배지상에 0.7% cupric acetate로 염색시켜 생성된 halo zone의 크기에 따라 균주를 1차 선별하였다. 선별된 균주를 polygalacturonic acid를 함유한 액체배지에 접종하여 37°C에서 36시간 진탕 배양한 후 배양액을 원심분리하여 균체를 완전히 제거한 상등액을 효소원으로하여 pectinase 활성을 측정하여 가장 활성이 높은 균주를 BS-214로 명명하였다. 균주의 보존은 agar plate(4°C)와 glycerol에 stock (-20°C) 하였다.

선별된 균주의 세포형태 및 포자는 위상차 현미경(Nikon Co., Japan)으로 조사하였으며, 생화학적 특성은 Bergey's manual of systematic bacteriology [10]에 따라를 검토하여 동정하였다.

균주의 생육도 및 효소 활성 측정

선별된 균주의 생육에 따른 pectinase의 생산량을 조사하기 위하여, 효소생산용 액체배지 (polygalacturonic acid 1%, yeast extract 0.25%, K_2HPO_4 0.02%, KCl 0.05%, $CaCl_2$ 0.02%, pH 8.5 조정)에 분리균 BS-214를 접종하여 40°C에서 200 rpm으로 60시간 진탕 배양하였다. 균의 생육도는 Spectronic 20(Bauch and Lomb Co., USA)과 Ultrospec 4050(Pharmacia Biotech., Sweden)으로 660 nm에서 흡광도로 나타내었다. 효소활성 측정을 위하여 배양액을 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 균체를 완전히 제거한 상등액을 조효소원으로 사용하였고, 기질로서는 polygalacturonic acid를 증류수에 녹인 후 0.1M NaOH로 pH를 8.5로 조정하여 15,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 사용하였으며, 효소활성은 Bertheau 등의 방법 [1]을 다음과 같이 약간 변형시켜 측정하였다. 즉, 반응액으로는 적당히 희석한 효소액 100 μ l과 10mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) 200 μ l에 기질 200 μ l을 첨가하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후 10mM thiobarbituric acid 5ml과 0.5M HCl 2.5ml을 첨가하여 water bath에서 45분간 끓인 후 급냉하고, 3,000 \times g에서 5분간 원심분리하여 Spectronic 20 (Bauch and Lomb Co., USA)으로 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 pectinase 활성은 위 조건에서 흡광도(O. D.)=0.1을 1 unit로 나타내었다[1].

삼지닥나무의 Pectin 분해력 측정

삼지닥나무(*Edzworthia papyrifera*)의 pectin 분해력을 측정하기 위하여 삼지닥나무 분말 0.5%를 첨가한 LB 액체배지에 분리균을 접종하여 정치배양 한 후 pectin 분해 정도를 광학현미경(Olympus CH30, Japan)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

Pectinase를 생산하는 균주를 탐색하기 위하여 토양 현탁액을 LB고체배지에서 3단 희석하여 0.5%의 polygalacturonic acid가 함유된 LBP배지에 도말한 후 37°C에서 배양한 결과 halo zone을 형성하는 6균주를 1차 선별하였다. 선별된 6균주를 LBP 액체배지에서 36시간 배양한 후 효소활성을 측정하였다. 이 중에서 활성이 가장 높은 균주를 선택하여 형태학적 및 생리학적 특성을 조사한 결과, 본 균주는 내열성 포자를 형성하는 그람 양성균으로 활발한 운동성을 가지며 단간균이고 호기성 균주로 확인되었으며, catalase시험과 oxidase시험에서 모두 양성반응을 나타내었다. 최종적으로 Bergey's manual [10]에 준하여 동정한 결과, *Bacillus* sp.으로 판명되어 *Bacillus* sp. BS-214로 명명하였다(Table 1).

Pectinase 생산을 위한 배양조건

Pectinase생산을 위한 최적온도를 조사하기 위하여 *Bacillus* sp. BS-214 균주를 효소생산용 배지에 접종하여 20°C, 30°C, 40°C, 45°C, 50°C에서 36시간 진탕 배양한 후 균의 생육도와 효소활성을 측정한 결과, 40°C에서 가장 높은 효소활성을 나타내어 (Table 2), 37°C에서 가장 높은 pectinase활성을 나타낸 *Bacillus* sp. PN33 [4]보다는 높은 배양온도에서 최대의 pectinase를 생산한다는 것을 알 수 있었다. 균주의 생육도와 pectinase 생산에 미치는 배지의 초기 pH의 영향을 검토하기 위하여 효소 생산용 배지에 0.1 M NaOH와 0.1 M HCl로서 pH를 5, 6, 7, 8, 8.5, 9로 조절한 후 40°C에서 36시간 배양한 결과, pH 8.5에서 가장 높은 효소활성을 나타내어 (Table 3), pH 7.0에서 가장 높은 pectinase활성을 나타낸 *Bacillus* sp. PN33 [4]보다는 알칼리 조건에서 최대의 pectinase를 생산한다는 것을 알 수 있었다.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the isolated strain BS-214

Characteristics	<i>Bacillus</i> sp. BS-214
Shape	rod
Gram strain	+
Mobility	+
Size (µm)	2
Length (µm)	5
Optimum temp. (°C)	40
Temp. of growth range (°C)	20-55
Growth in air	+
pH range for growth	5.0-11.0
Optimum pH	8.5
Endospore produced	+
Reduction of nitrates to nitrites	+
Sulfate activity reduced to sulfate	-
Catalase	+
Oxidase	+
Starch hydrolysis	+
Gelatin liquefaction	+
Urease activity	+
Citrate	+
Indol production	-
Casein hydrolysis	+
Acid form	
D-glucose	+
D-arabinose	+
D-mannose	+
Gas from glucose	-

+ : Positive reaction, - : Negative reaction

Table 2. Effect of temperature on growth and pectinase activity of *Bacillus* sp. BS-214

Temperature	Cell growth (O.D. at 660 nm)	Total Activity (unit)
20	0.75	500
30	1.0	1,300
40	1.05	2,700
45	0.95	1,600
50	0.85	1,000

균의 생육에 따른 효소생산

Bacillus sp. BS-214 균주의 생육에 따른 pectinase의 생산량을 조사하기 위하여 효소 생산배지와 효소생산 최적조건에서 배양하면서 4시간 또는 8시간 간격으로 측정된 결

Table 3. Effect of initial pH on growth and pectinase activity of *Bacillus* sp. BS-214

Initial (pH)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	Total Activity (unit)
5.0	0.53	1,600
6.0	0.72	2,000
7.0	0.75	2,500
8.0	0.94	2,800
8.5	1.24	3,100
9.0	0.96	2,500

Cultivation was carried out at 40°C for 36h in the medium containing 1% polygalacturonic acid.

과, Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 균 생육도는 30시간만에 최대에 도달하여 그 후로는 감소하는 경향을 나타내었고, 효소 생산량은 대수증식기에서 증가하기 시작하여 36시간만에 최대에 도달하였으며 그 후로는 급격히 감소하였다. 한편, 배지의 pH는 시간 경과와 함께 약간 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 균 생육의 정지기에서 최대의 효소생산량을 나타내는 *Bacillus* sp. PN33 [4]과 비슷한 경향을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

탄소원의 종류에 따른 효소생산

미생물이 생산하는 다당류 분해효소의 생산성은 배지내

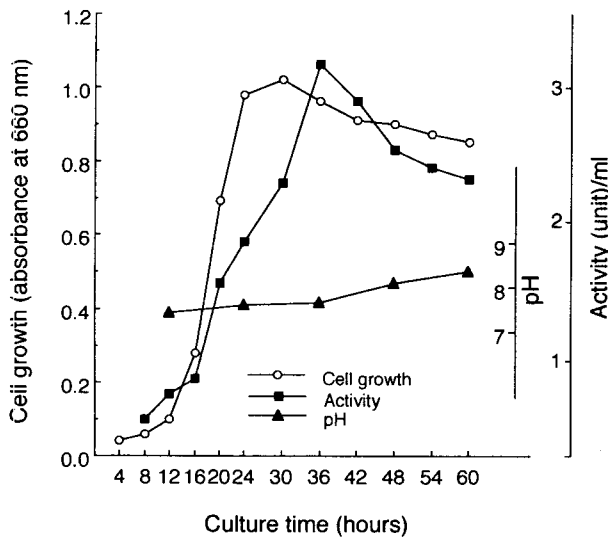


Fig. 1. The profile of pectinase production during cultivation of *Bacillus* sp. BS-214 in the shake flask culture.

존재하는 탄소원의 종류에 따라 영향을 받으므로 탄소원에 의한 균의 생육도와 pectinase의 생산성을 조사하였다. 탄소원이 결핍된 기본배지에 12종류의 탄소원을 0.5%(w/v)가 되도록 첨가하여 40°C에서 36시간 배양한 후 배양액에 존재하는 pectinase활성을 측정하였다. 그 결과, Table 4에서와 같이 polygalacturonic acid를 탄소원으로 사용하였을 때 효소생산성이 가장 좋았으며, 탄소원으로 pectin을 사용하였을 경우에도 87%의 높은 생산성을 나타내었다. 또한 polygalacturonic acid 첨가농도에 따른 효소 생산성은 Table 5에서와 같이 1%(w/v)의 농도에서 가장 좋은 결과를 나타내었다. 한편, lactose, maltose와 같은 이당류나 dex-

Table 4. Effect of carbon sources on the production of pectinase by *Bacillus* sp. BS-214

Carbon sources (0.5%)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	Relative activity (%)
None	0.70	20
Pectin	1.20	87
Polygalacturonic acid	1.35	100
Inositol	0.64	25
Lactose	0.60	20
Saccharose	0.23	27
Dextrose	0.50	20
Sorbitol	1.00	32
Arabinose	0.51	17
Mannose	0.56	14
Maltose	0.68	23
Galactose	0.54	18
Ribose	0.56	15

Cultivation was carried out at 40°C for 36h in the medium containing 0.5% carbon sources and 0.25% yeast extract.

Table 5. Effect of polygalacturonic acid concentration on the production of pectinase by *Bacillus* sp. BS-214

Polygalacturonic acid (%)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	Relative activity (%)
0.5	1.35	80
1.0	1.50	100
1.5	1.45	90
2.0	1.40	85

Cultivation was carried out at 40°C for 36h in the medium containing 0.25% yeast extract.

triose, arabinose, mannose, galactose 등과 같은 단당류를 탄소원으로 이용하였을 경우에는 균의 생육이 잘 이루어지지 않았고, 효소활성도 낮게 나타났는데 이로부터 본 균주는 단당류나 이당류에 대한 탄소원으로서의 이용성이 낮다는 것을 추측할 수 있다. Kim 등 [4]은 *Bacillus* sp. PN33에 의한 pectinase의 생산은 pectin에 의해서만 유도되고 다른 단당류와 이당류에 의해서는 유도되지 않는다고 보고하였다. 따라서 본 연구에 사용된 *Bacillus* sp. BS-214는 김 등이 보고한 *Bacillus* sp. PN33가 생산하는 pectinase와 그 생합성 기구에 있어서 유사한 특성을 가지고 있는 것으로 추정된다.

질소원의 종류에 따른 효소생산

질소원에 따른 균주의 생육과 pectinase의 생산성을 조사하기 위하여 1%(w/v)의 polygalacturonic acid를 탄소원으로 첨가하고 질소원이 결핍된 기본배지에 여러 가지 종류의 무기질소원과 유기질소원을 0.5%(w/v)가 되도록 첨가한 후 배양상층액의 효소활성을 측정하였다. 그 결과, 무기 질소원 중에서는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가하였을 경우와, 유기 질소원 중에서는 yeast extract 첨가하였을 경우에 균의 생육과 효소생산이 가장 좋았으며, 무기 질소원 보다 유기 질소원에서 더 높은 활성을 보였다 (Table 6). 이러한 결과는 이미 보고된 *Bacillus* sp. PN33의 균생육과 pectinase의 생산에 최적 질소원으로서 yeast extract의 이용성은 일치하

Table 6. Effect of nitrogen sources on the production of pectinase by *Bacillus* sp. BS-214

Nitrogen sources (0.5%)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	Total Activity (unit)
None	0.13	200
NH_4NO_3	0.20	300
NH_4Cl	0.22	100
Tryptone	0.80	2,300
Yeast extract	1.20	2,900
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.70	2,000
Peptone	0.45	1,700
Skim milk	0.68	1,700
Beef extract	0.62	2,100
Casein	0.40	1,800
Malt extract	0.32	50

Cultivation was carried out at 40°C for 36h in the medium containing 1% polygalacturonic acid and 0.5% nitrogen sources.

지만, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와 같은 무기질소원을 이용하지 않은 결과와는 다른 경향을 나타내었다 [4]. 또한, 효소 생성에 가장 적합한 질소원인 yeast extract의 농도별 영향을 조사하기 위하여 각 농도별로 첨가하여 조사한 결과, Table 7에서와 같이 0.25%(w/v)의 농도에서 가장 좋은 결과를 나타내었다.

삼지닥나무의 pectin 분해정도

Bacillus sp. BS-214 균주를 이용하여 삼지닥나무의 pectin 분해력을 알아보기 위하여, 0.5%의 삼지닥나무 분말을 첨가한 LB 액체배지에 균주를 1% 접종하여 40°C에서 정치 배양한 결과, Fig. 2에서와 같이 본 균주에 의해 생산된 pectinase에 의해 삼지닥나무의 pectin질이 분해됨을 알 수 있었다.

Table 7. Effect of yeast extract on the production of pectinase by *Bacillus* sp. BS-214

Yeast extract (%)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	Relative activity (%)
None	0.22	5
0.05	0.72	18
0.10	0.94	25
0.25	1.08	100
0.50	1.25	84
1.00	1.32	79

Cultivation was carried out at 40°C for 36h in the medium containing 1% polygalacturonic acid.

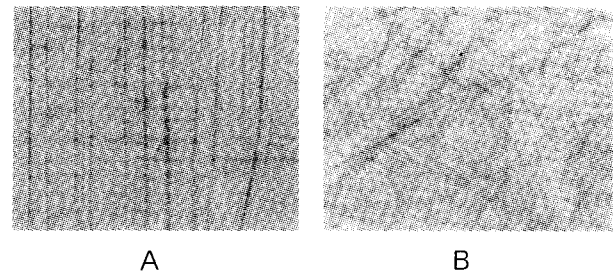


Fig. 2. The optical microscopic photogram of pectinase-treated (A) and untreated (B) *Edgeworthia papyrifera*.

요 약

과즙 및 과실주 제조에서 착즙 수율 향상, 혼탁 방지, 삼의 발효정제, 식물 조직배양 등에 pectinase가 널리 이용되

고 있다. 본 연구에서는 삼지닥나무의 이용 및 응용하는 연구의 일환으로서 토양으로부터 높은 pectinase 활성을 나타내는 균주를 분리, 동정하여 삼지닥나무를 분해시키는 pectinase의 생산조건을 검토하였다. 경남 일대에서 채취된 토양시료 100여 점으로부터 pectinase 활성이 높은 6균주를 1차 선별하고, 이들 균주 중에서 효소활성이 가장 높은 균주를 선별하여 BS-214로 명명하였다. BS-214 균주의 형태학적, 생화학적 특성을 조사하여 동정한 결과 *Bacillus* sp.로 밝혀졌다. *Bacillus* sp. BS-214의 배양특성과 pectinase 생성조건을 검토한 결과, 온도 40°C, pH 8.5, 배양시간 36 시간에서 효소생산이 가장 양호하였다. 균의 생육과 효소 생산에는 탄소원으로서 1% 농도의 polygalacturonic acid와 질소원으로서 0.25%의 yeast extract가 가장 적합하였으며, 본 균주에서 생산된 효소에 의한 삼지닥나무의 펙틴질 분해도 관찰되었다.

참 고 문 헌

- Bertheau, Y., E. Madgidi-Hervan, A. Kotoujansky and C. Njuyen. 1984. Detection of depolymerase isoenzymes after electrofocusing or in titration curves. *Anal. Biochem.* **139**, 383-389.
- Christensen, T. M., J. E. Nielsen, J. D. Kreiberg, P. Rasmussen and J. D. Mikkelsen. 1998. Pectin methyl esterase from orange fruit: characterization and localization by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Planta* **206**, 493-503.
- Kester, H. C. and J. Visser. 1990. Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**, 150-160.
- Kim, J.-C., H.-Y. Kim and Y.-J. Choi. 1998. Production and characterization of acid-stable pectin lyase from *Bacillus* sp. PN33. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 353-360.
- Pilnik, W. and A. G. J. Voragen. 1970. Pectic substances and other uronides, p. 53, In Hulme, A. C. (ed.), *The biochemistry of fruits and their products*, Vol. **1**, Academic Press Inc., New York.
- Rombouts, F. M. and W. Pilnik. 1980. Pectic enzymes. *Microbial Enz. and Bioconv.* **5**, 227-230.
- Sakai, T., M. Sawada, T. Katsuragi and K. Toumura. 1989. Possible role of cell wall mannan in the secretion of the protopectin insolubilizing enzyme of *Trichosporon penicillium*. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 9-18.
- Sakai, T., T. Sakamoto, J. Hallaert and E. J. Vandamme. 1991. Pectin, pectinase, and protopectinase: Production, properties, and application. *Adv. Appl. Microbiol.* **3**, 233-237.
- Schlemmer, A. F., C. F. Ware and N. T. Keen. 1987. Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Pseudomonas fluorescens* W51. *J. Bacteriol.* **169**, 4493-4498.
- Sneath, P. H. A. 1986. Endospore forming Gram-positive rods and cocci. pp. 1104-1138, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. **2**, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Tsuyumu, S. and A. K. Chatterjee. 1984. Pectin lyase production in *Erwinia chrysanthemi* and other soft-rot *Erwinia* species. *Physiol. Plant Pathol.* **24**, 291-302.