

통계학적 방법을 이용한 *Bacillus clausii* I-52로부터 염기성 단백질 분해효소 생산 증진

이재우 · ¹김현수 · ²장정순 · †김은기
인하대학교 공과대학 생물공학과, ¹누보연구소, 무궁화(주), ²인하대학교 의과대학 생화학교실
(접수 : 2005. 2. 10., 게재승인 : 2005. 5. 14.)

Increased Alkaline Protease Production from *Bacillus clausii* I-52 by Experimental Design Methods

Jae-woo Lee, Hyun-soo Kim¹, Chung-soon Chang², and Eun-ki Kim†
Institute of Biotechnology, Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
¹Nuvo Research Center, Moogunghwa Co., Gonglung, Nowon, Seoul 139-801, Korea
²Biochemistry Lab., Medical School, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2005. 2. 10., Accepted : 2005. 5. 14.)

Production of alkaline protease by *Bacillus clausii* I-52 was optimized by experimental design methods. Among 7 medium components, three (wheat flour, sodium citrate, sodium carbonate) were selected as components affecting the protease activity significantly by Plackett-Burman methods. Furthermore the ranges of effective concentrations were determined by Box-Behnken methods. The objective function describing the alkaline protease production was obtained and optimum concentration of 3 components was determined by using response-surface methods (RSM). Theoretical maximum production was 74000 U/mL (Wheat flour: 0 g/L, Sodium citrate: 5 g/L, Sodium carbonate: 10 g/L). With the optimized medium composition, 92000 U/mL alkaline protease was produced experimentally, resulting in 90% increase compared to before-optimization production (49000 U/mL).

Key Words : Alkaline protease, *Bacillus clausii*, experimental design method

서론

단백질 분해효소는 세계 효소 생산의 약 25%를 차지하고 있다. 산업용 효소 중 가장 중요한 효소 중의 하나이다. 단백질 분해효소는 세제첨가용, 가죽 처리용, 온도금, 의료용, 식품 공정, 사료, 화학 산업과 폐수 처리 등에 사용되는 산업적으로 상당한 잠재력을 가진 효소이다(1).

대부분의 산업용 단백질 분해효소 (중성과 염기성)는 *Bacillus*종에 의해 생산되어진다. 중성 단백질 분해효소는 반응의 중간물질 때문에 음식에 첨가하였을 때 동물성 단백질 분해효소보다 더 음식단백질을 잘 가수분해하여 쓴맛을 줄여준다. 이런 작용 때문에 식품산업에 널리 이용되고 있고, 박테리아에서 생산되는 염기성 단백질 분해효소

는 알칼리 pH (약 pH 10)에서 높은 활성을 보이고, 넓은 기질 특이성을 가지고 있고, 높은 온도에서 안정해서 세제 첨가용으로 널리 사용되고 있다(2).

세제 첨가용으로 사용되는 염기성 단백질 분해효소는 얼룩에서 단백질상의 물질을 분해하고, 환경친화적이기 때문에 널리 사용되고 있다. 하지만 넓은 pH와 온도에서 안정해야 하고, 세제의 다른 첨가물인 산화제나 금속이온 봉쇄제를 혼합했을 때 안정해야 하는 까다로운 조건을 만족해야 한다. *Bacillus* 종에서 생산되는 대표적인 세제첨가용 효소로는 Novozyme사의 Savinase와 Genecore사의 properase 등이 있다(1).

Bacillus clausii I-52는 인천지역의 오염된 해변으로 분리한 균주로서 산화제 안정성, 넓은 온도와 pH 범위를 가지고 있어서 산업용 효소첨가효소로서의 특성을 갖고 있다(3, 4).

염기성 단백질 분해효소의 생산성을 높이기 위해서 어떤 인자가 중요한가를 연구하는 방법이 중요하며 대표적으로 연속 배양을 이용한 중요인자를 찾는 방법과 통계학

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering,
Inha University, Namgu, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7514, Fax : +82-32-875-0827
E-mail : ekkim@inha.ac.kr

적 방법을 이용한 최적화 방법이 보고되고 있다. 하지만 산업용 효소로 사용하기 위해서는 비교적 가격이 저렴한 soybean meal과 같은 복합배지를 사용하는 경우가 대부분이다. C,N,P의 영양원이 모두 포함된 Soybean 같은 배지성분의 경우 C,N,P 각각으로 분리하여 배지를 최적화하는 방법은 적용이 힘들며, 따라서 이러한 복합배지를 사용시 연속배양에 의한 배지 성분의 각각의 효과를 측정하여 생산성을 높이는 연구는 쉽지 않다. 대부분의 산업용 단백질 분해효소 생산법은 통계학적으로 결정된 배지를 사용한다. 통계학적 방법 중 표면반응 분석법 (Response Surface Methods; RSM)은 여러개의 인자가 상호작용을 하는 경우, 예를 들면 복합배지의 경우처럼 C,N,P의 공급원이 여러 개로 복합적으로 작용할 때, 원인보다는 결과에 근거하여 최적점을 찾는 통계적 방법이다(5). 이런 통계학적 방법을 응용한 고농도 배양은 대량생산을 위한 최적 배지조성 확립과 배지 성분 간의 상호관계를 확인하는데 적합한 방법이다. 따라서 RSM은 최적배지 조건과 배지성분간의 상호관계를 통해서 생산성을 증가시킬 수 있고, 다양한 공정을 간소화할 수 있고, 비용을 절감할 수 있는 장점이 있어 생물공학에서 최적조건을 알아내는 연구에 응용되어 사용되고 있다.

본 연구에서는 기존에 세제 첨가용으로 사용되어 왔던 단백질 분해효소와 비교했을 때 그 성능이 우수하고, 산업화 가능성이 큰 인천 갯벌에서 분리한 *Bacillus clausii* I-52로부터 생산되는 알칼리 단백질 분해효소를 통계학적 방법을 이용하여 최적 생산조건을 적용 결과 25%의 생산증가를 보였다.

재료 및 방법

균 주

본 연구에서는 인천의 오염된 갯벌에서 분리한 *Bacillus clausii* I-52 균주를 인하대학교 의과대학 생화학 실험실로부터 분양받아 사용하였다(3, 4). 균주를 생산 배지에 36 hr 배양한 후 80% glycerol를 첨가하여 4℃에 보관하였다.

배 양

Bacillus clausii I-52로부터 알칼리 단백질 분해효소 생산 배지는 Soybean meal, 2%; Wheat flour, 1%; Sodium citrate, 0.5%; Potassium phosphate, 0.4%; Sodium phosphate, 0.1%; 1 M CaCl₂, 0.1%;를 첨가하여 멸균하였고, Liquid maltose, 2.5%와 Sodium carbonate, 0.6%는 따로 멸균하여 첨가하였다(Table 1). 액체 배양은 250 mL baffle flask에 생산 배지 50 mL를 넣고 멸균한 다음, 균 1%를 접종하여 37℃, 250 rpm으로 진탕 배양하였다.

균수, 효소 활성 측정

배양 중 균체의 생장을 알아보기 위해 생균수를 측정하였다. 생산 배지 내에 녹아 있지 않은 성분이 있어 Spectrophotometry를 이용한 흡광도를 측정하기 어려웠다. 따라서 생균수 측정 방법을 이용하였다. 생균수 측정 방법

은 TSB 평판 배지에 Saline (0.85% NaCl) 용액에 희석한 배양액을 점적, 도말 후 37℃ 정지 배양기에서 10~12시간 배양 후 집락 수를 계산하였다.

Table 1. Plackett-Burman Experimental Design

RUN	A	B	C	D	E	F	G
1	+	-	+	-	-	-	+
2	+	+	-	+	-	-	-
3	-	+	+	-	+	-	-
4	+	-	+	+	-	+	-
5	+	+	-	+	+	-	+
6	+	+	+	-	+	+	-
7	-	+	+	+	-	+	+
8	-	-	+	+	+	-	+
9	-	-	-	+	+	+	-
10	+	-	-	-	+	+	+
11	-	+	-	-	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0

(+) indicates the addition of each component as in the medium composition (see Materials and Methods). (-) indicates no addition. (0) indicates the addition of each components at 50% of medium composition (A: Soybean meal, B: Wheat flour, C: Sodium citrate, D: Potassium phosphate, E: Sodium phosphate, F: Starch syrup, G: Sodium carbonate).

Table 2. Box-Behnken experimental Design

RUN	W. flour (g)	S. citrate (g)	S. carbonate (g)
1	-	-	-
2	0	-	-
3	+	+	0
4	0	+	-
5	0	0	0
6	-	0	+
7	0	+	+
8	-	+	0
9	0	-	+
10	+	0	+
11	+	-	0
12	-	0	-
13	0	0	0
14	0	0	0
15	+	0	-

"+", "-" and "0" levels indicate the higher, lower and medium levels, respectively, of a factor in that combination. Wheat flour (g/l) (+; 1.0, 0: 0.5,-:0); Sodium citrate (g/l) (+; 1.0, 0: 0.5,-:0); Sodium carbonate (g/l)(+; 22, 0: 16,-:10)

단백질 분해효소는 Casein을 기질로 사용해서 활성을 측정했다. casein을 0.1 M glycine-NaOH (pH 11) 완충액에 0.5% 농도로 녹인 후 사용하였다. 효소는 15000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 0.1 M glycine-NaOH (pH 11) 완충액에 100배 희석해서 사용하였다. 반응 정지액은 1.888% acetic acid, 2.992% Sodium acetate, 1.8% TCA를 혼합하여 사용하였다.

실제 배양액에서의 분석과정은 0.5 mL 기질을 각 1.5 mL tube에 넣고, 60℃에서 10분간 전처리시켰다. 희석된 효소액 0.01 mL을 blank를 제외한 나머지 tube에 첨가하고, 10 min 간 60℃에서 반응 후 4℃에서 10 min간 방치하였다. 원심분

리 (15000 rpm, 10 min)를 이용하여 침전물과 상층액을 분리한 후, A₂₇₅에서 흡광도를 측정하였다. 60°C에서 분당 1 µg의 tyrosine을 방출하는 양을 1 Unit로 정의하였다.

통계학적 실험법 구성

Bacillus clausii I-52를 이용한 단백질 분해효소 생산 배지 최적화를 실험하기 위해 7개의 배지 성분 중 단백질 분해효소 활성에 주 효과가 있는 성분 3개를 선별하기 위해서 주효과를 검출하는 2수준 일부 실시 실험 계획 중의 하나인 Plackette-Burman design을 이용하였다.

각 인자들을 Table 2와 같이 고위, 중위, 저위 수준으로 분포시킨 후 실험 결과에 대한 각 인자들의 양성, 음성 효과의 크기를 계산하여 선정하였다.

Plackett-Burman experimental Design으로는 각각의 인자간의 상호관계와 최적점을 측정하기는 불충분하기 때문에 선정된 세 개의 인자를 One Factor at a Time 실험법을 이용하여 각 인자의 농도 범위를 세분화하고, 인자의 농도 범위를 “+”, “0”, “-” 값으로 분포시킨 후 Box-Behnken experimental Design을 이용하였다(Table 3).

Table 3. Increased protease activity by medium optimization

Variables	Levels before optimization	Level after optimization	Protease activity		
			Before optimization		Experimental
			Predicted	After optimization	
W.flour	1%	0%			
S.citrate	0.25%	0.5%	49000 U/ml	74000 U/ml	92000 U/ml
S.carbonate	0.6%	1.0%			

위 실험 방법을 이용해서 인자간의 상호작용 관계와 최적 배지 농도를 구하였다. 통계학적 해석과 최적 농도의 계산은 MINITAB® software (Minitab Co. version 14, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

Main effect 선정

Bacillus clausii I-52의 최적 배지를 선정하기 위해서 인자의 조성을 “+”, “0”, “-”로 조성된 PBD 방법을 실행하여 단백질 분해효소 생산에 영향을 주는 중요한 인자 3개를 선정하였다.

조성을 달리한 15개의 배양액을 48시간 동안 배양시킨 후, 단백질 분해효소 활성을 측정하여 주요 인자 선정 계산에 이용하였다(Table 2). 이 실험의 결과로 단백질 분해효소 생산에 가장 영향을 많이 주는 성분으로 선정된 3개의 인자는 Wheat flour, Sodium citrate, Sodium carbonate이다(Fig. 1).

Box-Benken experimental Design

선정된 3개의 중요 성분의 농도를 넓게 나누어 배양하여 선정 인자의 농도의 예상최적점 “0”과 최적점 전후의 “+”, “-” 점을 찾아 Box-Behnken Design에 적용하였다.

Bacillus clausii I-52의 단백질 분해효소 생산에 영향을 주는 선정된 세 인자의 농도별 실험 결과 Wheat flour: 0%, Sodium citrate: 0.5%, Sodium carbonate: 1.6%에서 최대 활성을 보였다.

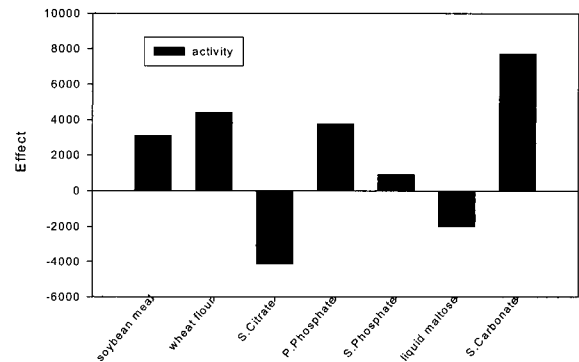


Figure 1. Effect of experimental factors on alkaline protease production.

이 세 성분간의 농도별 실험결과를 가지고 Box-Behnken experimental Design 실험을 수행하였다(Fig. 2~4). 최적 농도 범위를 적용하여 농도의 값을 “+”, “0”, “-” 값으로 나누어 15개의 실험을 하였다(Table 3). 15개의 실험은 먼저 선정된 인자의 농도값의 변화에 따른 인자간 상호관계에 대한 결과를 알 수 있다.

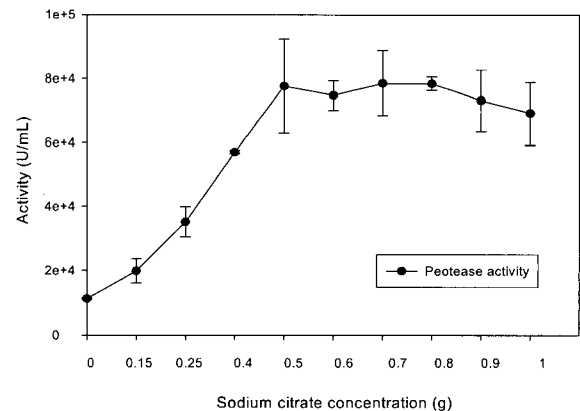


Figure 2. The effect of wheat flour on protease production.

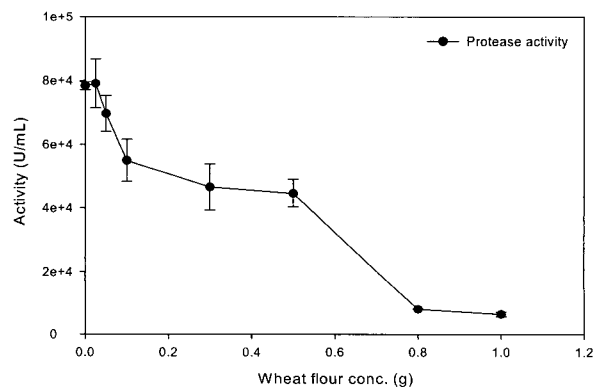


Figure 3. The effect of sodium citrate on protease production.

통계학적 최적화 결과

Box-Behnken experimental design에 의해서 얻은 값을 이용하여 MINI-TAB® software (Minitab Co., Window version 14, USA)를 통해 통계학적인 배지 최적화 농도를 구할 수 있었다.

$$K = 9853 - 115133X + 102750Y + 96678Z - 733X^2 - 110533Y^2 - 39190Z^2 + 59400XY + 47417XZ - 47333YZ \quad (1)$$

(K: Protease activity, X: W.flour, Y: S. citrate, Z: S. carbonate)

식(1)의 최대값을 구하기위해서 3개의 변수에 대해서 편미분을 실시하였고 이 결과 X: 0g, Y: 0.25 g, Z: 1.0%의 값을 얻었다. 처음의 생산배지의 농도와 다소 다른 점은 Wheat flour가 단백질 분해효소 생산에 영향을 미치지 않는다는 점과 배지내의 pH와 연관이 있는 완충제 역할을 하는 S. carbonate의 농도가 0.4% 더 증가되었다는 점이다. 따라서 위 결과를 직접 flask 실험에 적용하였다.

MINI-TAB software를 이용해서 배지의 최적 농도를 구하였고, 이를 적용하여 최적 배지를 결정했다. 세 성분의 최적 농도는 각각 Wheat flour: 0%, Sodium citrate: 0.5%, Sodium carbonate: 1.0%이다. 이를 최적 배지로 하고, 기존의 생산 배지와 단백질 분해효소 활성 비교를 하였다. 그 결과로 flask 실험에서 단백질 분해효소 활성이 생산 배지보다 최적 배지가 92% 증가됨을 보였다.

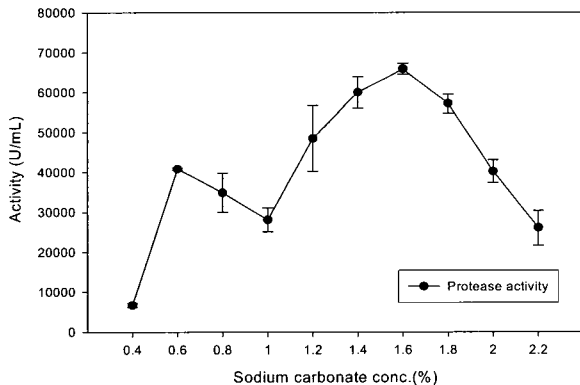


Figure 4. The effect of sodium carbonate on protease production.

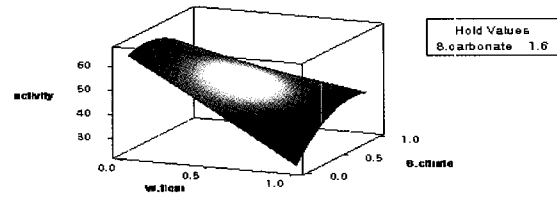
결론

Bacillus clausii I-52 균주로부터 생산되는 alkaline protease 생산성을 증가시키기 위해서 통계학적 방법(RSM)을 이용하여 배지 성분 7개 중 protease 생산에 영향을 주는 3개의 중요 성분 (Wheat flour, Sodium citrate, Sodium carbonate)을 Plakette-Burman experimental Design 실험을 통해 선정하였고, Box-Behnken 방법으로 최적점을 각각 선정하였다(Wheat flour: 0%, Sodium citrate: 0.5%, Sodium carbonate: 1.0%).

3개의 인자로 구성된 함수를 구하였고, 이 함수의 최대치인 74000 U/mL을 예측값으로 구했다. 실제 실험으로 최적화된 배지 사용 결과 이전 배지보다 1.9배의 증가를 보

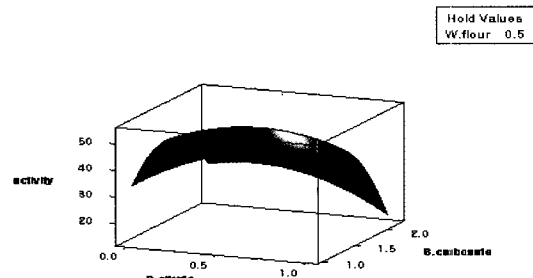
였다.

Surface Plot of activity vs S.citrate, W.flour



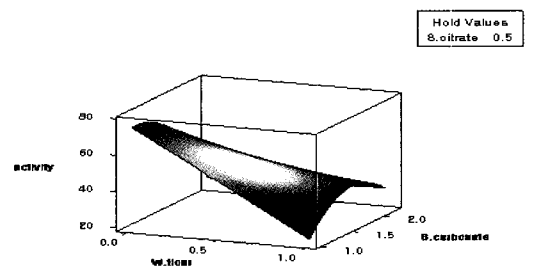
(a)

Surface Plot of activity vs S.carbonate, S.citrate



(b)

Surface Plot of activity vs S.carbonate, W.flour



(c)

Figure 5. Surface plot of protease production for two components ((a) Sodium citrate and Wheat flour, (b) Sodium carbonate and sodium citrate, (c) Sodium carbonate and wheat flour).

요약

Bacillus clausii I-52에서 생산되는 염기성 단백질 분해효소를 통계학적 방법을 이용하여 최적화하였다. 7개의 배지 성분 중 Plakett-Burmann 방법을 이용하여 단백질 분해효소 활성에 영향을 주는 3개의 성분을 선택했고, 또 영향을 주는 농도 범위를 Box-behken 방법에 의해 결정했다.

세 성분을 포함하는 염기성 단백질 분해효소의 생산 함수식을 구했고 이로부터 최적조건을 표면반응분석법을 이용해서 계산했다. 이에 근거한 이론적 최대 생산 활성 (Wheat

flour: 0 g/l, Sodium citrate: 5 g/l, Sodium carbonate: 10 g/l) 일 때 74000 U/mL의 결과를 얻었다.

실제 최적 배지를 이용한 실험에서는 92000 U/mL의 염기성 단백질 분해효소를 보였다. 최적화 이전 경우 생산량은 49000 U/mL로서 90%의 증가율을 보였다.

감 사

이 연구는 인하대학교 초정밀생물분리센터 (ERC)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. C. Canesh Kumar, Hiroshi Takagi (1999), Microbial alkaline protease: From a bio industrial viewpoint, *Biotechnology Advances* **17**, 561-594.
2. Mala B. Rao, Aparana M. Tanksale, Mohini S. Ghatage, and Vasanti V. Deshpande (1998), Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 597-635.
3. H-S. Joo, C. G. Kumar, G-C. Park, S. R. Paik, and C-S. Chang (2003), Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: Production and some properties, *Journal of Applied Microbiology* **95**, 267-272.
4. Torben Christiansen, Jens Nielsen (2002), Production of extracellular protease and glucose uptake in *Bacillus clausii* in steady-state and transient continuous culture, *Journal of biotechnology* **97**, 265-273.
5. Qasim Khalil Beg, Vikram Sahai, Rani gupta (2003), Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor, *Process Biochemistry* 1-7.
6. Han-Seung Joo, Gun-Chan Park, Kyung-Mi Kim, Seung R. Paik, and Chung-Soon Chang (2001), Novel alkaline protease from the polychaeta, *Periserrula leucophryna*: Purification and characterization, *Process Biochemistry* **36**, 893-900.
7. Han-Seung Joo, Gun-Chan Park, Kyung-Mi Kim, Ki-Tae Kim, Seung R. Paik, and Chung-Soon Chang (2002), Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*, *Process Biochemistry* **38**, 155-159.
8. Qasim Khalil Beg, R. K. Saxena, Rani Gupta (2002), De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations, *Process Biochemistry* **37**, 1103-1109.
9. Uttam Chand Banerjee, Rajesh Kunar Sani, Wamik Azmi, Raman Soni (1999), Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive, *Process Biochemistry* **35**, 213-219.