

토양으로부터 새로이 분리된 단백질 분해효소 생산 미생물 *Bacillus subtilis* FBL-1의 동정

김민아, 시진범, 위영중*
영남대학교 식품공학과

Received: November 30, 2015 / Revised: February 15, 2016 / Accepted: March 2, 2016

Identification of a Newly Isolated Protease-producing Bacterium, *Bacillus subtilis* FBL-1, from Soil

Mina Kim, Jin-Beom Si, and Young-Jung Wee*

Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyeongsan 38541, Republic of Korea

A novel proteolytic bacterium was isolated from soil at Yeungnam University, South Korea. The strain, named FBL-1, was rod-shaped with a smooth surface. Biolog and API 50CHB test results revealed that strain FBL-1 was a *Bacillus* species. Based on 16S rDNA sequencing and chemotaxonomic characterization, the strain was identified as *Bacillus subtilis* because it had the highest homology with *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 (99.5%). In liquid culture at 37°C with shaking at 200 rpm, fructose and yeast extract were found to be the best carbon and nitrogen sources, respectively, for cell growth and protease production. The highest protease activity (451.640 U/ml) was obtained when the strain was cultured in medium containing 20 g/l of fructose and 5 g/l of yeast extract. Although further studies are needed to characterize the protease and enhance its activity, the newly isolated protein-degrading *B. subtilis* FBL-1 can be applicable for the production of peptides and for the degradation of proteins in various industries.

Keywords: *Bacillus subtilis*, identification, isolation, protease, soil bacterium

서론

단백질 분해효소(protease, EC 3.4.21-24)는 펩타이드 결합으로 이루어진 단백질을 가수분해하는 효소로 잘 알려져 있으며, 1984년 Masaaki 등에 의하여 단백질 분해효소의 활성과 기능에 따라 serine protease, thiol protease, metalloprotease 등으로 분류되었다[11]. 또한 Kageyama [9]와 Nunokawa 등[12]은 단백질분해효소의 작용 pH 영향에 따라 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 분류하였다. 최근에는 단백질 분해효소의 활성부위에 존재하는 아미노산의 작용기작에 따라 serine protease, metalloprotease, aspartic protease, cysteine protease 등으로 구분되고 있다[16].

단백질 분해효소는 산업화를 위하여 꾸준히 연구되어 온 효소중 하나이며, 전체 효소 시장의 약 60% 이상을 차지하고 있는 중요한 효소이다. 효소 시장에서 단백질 분해효소는 동물, 식물, 미생물로부터 생산이 가능하며, 이 중에서 미생물유래 단백질 분해효소의 경우 단백질 분해효소 시장의 약 40% 이상을 점유하고 있다. 미생물로부터 생산된 단백질 분해효소는 생화학적인 다양성을 가지고 있을 뿐만 아니라 유전자 조작이 간편하며, 생명공학적인 활용가능성 등 다양한 장점을 지니고 있다[4]. 또한, 효소 분리정제 후의 가공 측면에서도 동물유래나 식물유래 단백질 분해효소에 비하여 미생물유래 단백질 분해효소가 훨씬 용이하기 때문에 훌륭한 단백질분해효소의 공급원으로 각광받고 있다[6].

단백질 분해효소는 세계산업, 제약산업, 피혁산업, 식품산업, 환경, 토양 활성 개량, 화장품산업, 사료산업, X-ray 필름제조 등 매우 다양한 산업에서 응용되고 있다[2, 8, 13, 18]. 현대 산업이 발달함에 따라 환경오염은 항상 사회적인 문제로 대두되어 왔으며, 그 중 생활하수의 비율이 날로 증가하고 있어 세제에 의한 환경오염이 심각한 문제로 대두되고 있

*Corresponding author

Tel: +82-53-810-2951, Fax: +82-53-810-4662

E-mail: yjwee@ynu.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

으므로 단백질 분해효소를 함유한 생분해성 세제에 대한 연구가 꾸준히 이뤄지고 있다[15]. Alkaline protease는 높은 pH 조건의 세제 내에서도 그 활성을 나타내므로 세제의 첨가제로 매우 용이하게 사용된다. 미생물유래 단백질 분해효소는 산성이나 중성 조건에서 비교적 높은 활성을 나타내는 경우가 많으나 넓은 pH 영역에서 활성을 유지할 수 있는 단백질 분해효소가 효소의 활용성 측면에서 더 유리할 것이다 [1, 7, 15].

본 연구에서는 토양으로부터 단백질 분해효소를 생산하는 미생물을 새로이 분리하여 동정함으로써, 새로운 단백질 분해효소 공급원을 확보하고자 하였다. 그 결과, 단백질을 효과적으로 분해할 수 있는 활성을 가진 균주 FBL-1을 토양으로부터 분리하였으며, 본 논문에서는 FBL-1 균주의 동정 및 특성에 대하여 서술하였다.

재료 및 방법

Protease 생산 미생물의 분리

토양에 서식하는 protease 생산 미생물을 분리하기 위하여 경상북도 경산시 소재 영남대학교 내의 토양을 채취하여 멸균식염수(0.85% NaCl) 9 ml에 현탁한 후, 10^{-5} - 10^{-7} 으로 희석하여 분리용 평판고체배지(TSB 3.0 g/l, skim milk 2.0 g/l, agar 2.0 g/l)에 도말하였다. 도말한 평판고체배지는 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 미생물 집락의 크기가 크면서 skim milk를 분해하여 집락 주변으로 투명환(clear zone)을 강하게 형성한 colony를 선별하였다. 선별한 colony는 다시 분리용 평판고체배지에 옮겨 배양한 후, 본 연구에서 사용한 미생물 증식용 전배양 배지인 TSB (Bacto™ Tryptic Soy Broth Soybean-Casein Digest Medium) 배지에 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 24시간 동안 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 상층액으로부터 protease 활성을 측정하고 활성이 가장 우수한 균주를 최종 분리하였다.

형태학적 및 배양학적 특성

분리 균주의 형태학적 특성은 전계방사형 주사전자현미경(SEM, Scanning Electron Microscope, S-4100, Hitachi Co., Japan)으로 관찰하였다. 액체 배지에 배양한 균체 현탁액을 원심분리하여 균을 침전시켜 충분한 양이 될 때까지 모은 후, 2.5% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide로 고정하여 ethanol로 탈수시키고 임계점 건조기(Critical Point Dryer, HCP-2, Hitachi Co., Japan)로 건조한 후, 정밀에칭 코팅기(Precision Etching Coating System, Gatan 682, USA)로 코팅한 후 관찰하였다.

분리 균주의 배양학적 특성을 조사하기 위하여 TSB와 skim milk를 포함한 평판고체배지에서 생육한 colony의 색

깔, 크기, 모양 등의 특성을 조사하였다.

생리학적 특성

탄소원 이용성 및 발효특성 등 분리 균주의 생리학적 특성은 Biolog test와 API 50CHB kit (Biomérieux, France)를 통하여 제조사의 지침에 따라 수행하였으며, API 50CHB kit test 결과는 API 50CHB database V4.0을 이용하여 동정하였다.

16S rDNA 염기서열 및 계통 분석

분리 미생물을 TSB 배지에 24시간 동안 진탕배양 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체의 genomic DNA를 Wizard genomic DNA purification kit (Promega Co., WI, USA)를 사용하여 추출 및 분리하여 PCR 주형으로 사용하였다. 16S rDNA는 universal primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 및 1492R (5'-GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하여 증폭하였다. 증폭된 16S rDNA 단편은 Wizard SV Gel 및 PCR clean-up system (Promega Co.)을 이용하여 정제한 후, ABI PRISM 377 DNA analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 16S rDNA 염기서열 분석은 오차의 가능성을 배제하기 위하여 3회 반복 실시하였다. 분석된 16S rDNA 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BlastN program의 GeneBank database의 정보로부터 균주 염기서열의 상동성을 확인하였다. 또한 EzTaxon database (<http://www.ezbiocloud.net/>)로부터 표준균주의 16S rDNA 염기서열들을 조사하여 계통발생적 연관성을 분석하였다[10]. 수집된 염기서열들 간의 Multiple alignment는 Clustal X (2.0) software를 사용하였고 BioEdit software (7.0)를 사용하여 편집하였다. Mega (5.03) software를 이용하여 neighbor-joining method, maximum likelihood method, maximum parsimony method에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 phylogenetic tree를 얻었다. 신뢰도(bootstrap value)는 1,000회의 재구성된 자료로부터 새로운 tree를 작성하여 계산하였다.

Protease 생산을 위한 배양방법

전배양 배지로서 TSB를 이용하여 37°C, 200 rpm에서 15시간 배양한 후 본배양의 접종균으로 이용하였다. 균주 보관은 전배양 배지에서 37°C, 200 rpm으로 15시간 배양한 후 2 ml micro-cap tube에 glycerol 0.7 ml와 배양액 0.7 ml를 혼합하여 -20°C에서 보관하였다.

분리 미생물의 protease 생산에 탄소원이 미치는 영향을 알아보기 위하여 탄소원 20 g/l, 질소원 5 g/l로 배지를 조성

하여 배양하였다. 탄소원은 glucose, maltose, xylose, starch, fructose, glycerol, galactose, sucrose, lactose 총 9가지 종류를 각각 이용하였고 질소원은 beef extract로 고정하고 250 ml 삼각플라스크에서 100 ml 조업부피로 37°C, 200 rpm, 24시간 동안 진탕배양 하였다.

분리 미생물의 protease 생산에 질소원이 미치는 영향을 알아보기 위하여 탄소원 20 g/l, 질소원 5 g/l로 배지를 조성하여 배양하였다. 탄소원은 fructose로 고정하고 질소원은 beef extract, yeast extract, malt extract, tryptone, peptone, urea, ammonium sulfate, ammonium chloride, corn steep liquor 총 9가지 종류를 각각 이용하여 250 ml 삼각플라스크에서 100 ml 조업부피로 37°C, 200 rpm, 24시간 동안 진탕배양 하였다.

미생물 성장 분석

배양액의 광학밀도가 0.7 이하로 되도록 희석하여 분광광도계(UV-1201, Shimadzu Co., Japan)를 사용하여 660 nm에서 광학밀도(optical density)를 측정 후, 표준곡선에 의한 광학밀도와 건조균체량(g/l)의 관계식으로부터 건조균체량(g/l)을 산출하였다. 광학밀도와 건조 균체량(g/l)의 관계식을 얻기 위하여 전배양 배지에 분리된 균주를 37°C에서 24시간 배양한 후, 그 배양액과 증류수의 비율을 0.0에서 1.0까지의 용액으로 제조하여 각각 광학밀도를 측정하였다. Bench-top centrifuge (VS-15000N, Vision Scientific Co., Korea)를 사용하여 13,000 × g에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 버리고 가라앉은 균체를 향량이 될 때 까지 80°C에서 24시간 동안 건조기(VS-1202D3, Vision Scientific Co., Korea)에서 건조하고 그 무게를 측정하였다.

Protease 활성 분석

50 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.0)에 casein (Sigma

Aldrich Co., USA)을 녹인 1% (w/v) casein 용액 500 µl에 배양액을 13,000 × g에서 10분 원심분리하여 얻은 조효소액 20 µl를 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후, 반응 정지를 위해 10% trichloroacetic acid를 500 µl 첨가하였다. 분해되지 않은 단백질을 제거하기 위하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 동일 조건에서 원심분리하였으며, 이후 얻은 상층액을 반응물로 사용하였다.

반응물은 Folin & Ciocalteu 방법을 이용하여 protease 활성을 분석하였다. 반응물 500 µl를 500 mM Na₂CO₃ 25 ml와 충분히 혼합한 후, Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma Aldrich Co.)를 20%로 희석한 용액 500 µl를 넣고 40°C에서 10분간 반응시켜 660 nm에서 측정된 흡광도를 U/ml로 산출하였다[3, 5]. Protease 활성 1 unit은 반응시간 1분 동안 1 µg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다[13, 17].

통계 처리

모든 실험은 3회 반복으로 수행하여 평균값과 표준편차로 나타내었고, 유의성은 SPSS 23.0 software (SPSS Inc., IL, USA)를 이용하여 유의수준 $p < 0.05$ 에서 분산분석을 통하여 검증하였으며, Duncan's multiple range test를 통하여 차이를 확인하였다.

결과 및 고찰

형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성

경상북도 경산시에 위치한 영남대학교 내 토양에 서식하는 protease 생산 미생물 한 종을 선별하여 FBL-1으로 명명하여 실험을 진행하였다. 균주 FBL-1은 skim milk를 포함한 TSB 고체배지에서 하얀색을 띄며 약간 울퉁불퉁한 표면을 갖는 colony를 형성하였고(Fig. 1A), 평판고체배지 상에

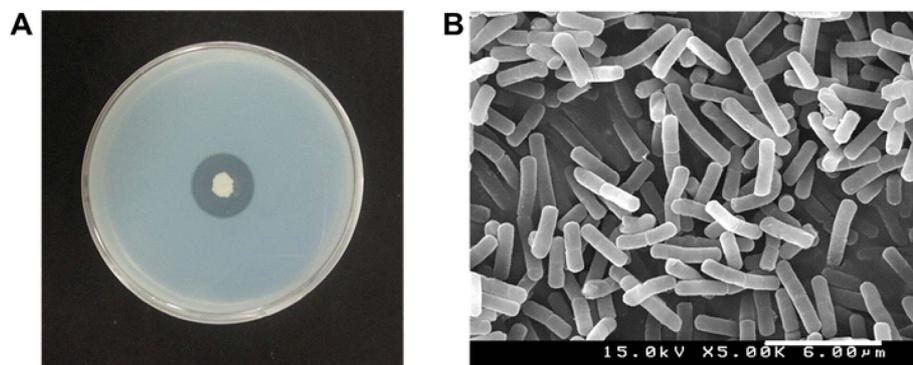


Fig. 1. Isolation of proteolytic bacterial strain FBL-1. (A) Proteolytic activity of the strain on agar plate. The strain was cultured on TSB agar plate containing skim milk at 37°C for 24 h. (B) Scanning electron microscopy (SEM) analysis. Cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde and 1% osmium tetroxide, dehydrated with a series of ethanol concentrations in distilled water (50–100%), dried with critical point dryer, and coated with gold.

Table 2. Phenotypic diversity of strain FBL-1 and related strains of *Bacillus subtilis*^a.

Characteristics	A	B	C
Utilization of (with API 50CHB kit)			
Control	-	-	-
Glycerol	+	+	+
Erythritol	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+
Ribose	+	+	+
D-Xylose	-	+	+
L-Xylose	-	-	-
Adonitol	-	-	-
β-Methyl-D-xyloside	-	-	-
D-Galactose	-	-	-
D-Glucose	+	+	+
D-Fructose	+	+	+
D-Mannose	-	+	+
L-Sorbose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
α-Methyl-D-mannoside	-	-	-
α-Methyl-D-glucoside	+	+	+
N-Acetyl-glucosamine	-	-	-
Amygdalin	-	+	-
Arbutin	-	+	+
Esculin	+	+	+
Salicin	-	+	+
Cellobiose	-	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	-	-	-
Melibiose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Inulin	+	+	+
Melezitose	-	-	-
Raffinose	+	+	+
Starch	+	+	-
Glycogen	-	+	+
Xylitol	-	+	-
Gentiobiose	-	-	-
D-Turanose	+	+	+
D-Lyxose	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-
D-Fucose	-	-	-
L-Fucose	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-
Gluconate	-	-	-
2-Keto-gluconate	-	-	-
5-Keto-gluconate	-	-	-
Protease production	+	+	+

^aStrains: A, strain FBL-1; B, *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610; C, *B. subtilis* DSM 347. Data were obtained from Oguntoyinbo et al. [14].

+, Positive; -, negative.

서 투명환을 크게 생성하여 강한 단백질 분해활성을 나타냈다. 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과, FBL-1 균주는 긴 막대 모양의 단일 세포이며 약 3 μm 길이의 간균 형태를 나타냈다(Fig. 1B).

균주 FBL-1의 표현형질에 대한 1차적인 동정을 위하여 Biolog test와 API 50CHB test를 수행하였으며 그 결과를 각각 Table 1과 Table 2에 나타냈다. Biolog test를 사용한 생리학적 특성 분석 결과, dextrin, inulin, N-acetyl-D-glucosamine, D-fructose, α-D-glucose, maltotriose, D-mannose, β-methyl-D-glucoside, palatinose, D-psicose, D-ribose, sucrose, D-trehalose, L-malic acid, pyruvic acid, L-alanyl-glycine, L-glutamic acid, L-pyroglutamic acid, inosine, thymidine, uridine, thymidine-5'-mono phosphate에 대한 assimilation 반응에서 양성으로 관찰되었다. API 50CHB kit를 사용한 생리학적 특성 분석 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 FBL-1 균주는 glycerol, L-arabinose, ribose, galactose, glucose, fructose, inositol, mannitol, sorbitol, α-methyl-D-glucoside, N-acetyl-glucosamine, maltose, melibiose, sucrose, trehalose, inulin, raffinose, starch, D-turanose에 대한 assimilation 반응에서 양성으로 관찰되었으며, esculin hydrolysis (β-glucosidase) 효소반응에서 양성을 보였다. 비교 균주인 *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610의 경우 glycerol, L-arabinose, ribose, D-xylose, glucose, fructose, mannose, inositol, mannitol, sorbitol, α-methyl-D-glucoside, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, maltose, melibiose, sucrose, trehalose, inulin, raffinose, starch, glycogen, xylitol, D-turanose에 대하여 양성으로 반응하였으며, *B. subtilis* DSM 347의 경우 glycerol, L-arabinose, ribose, D-xylose, glucose, fructose, mannose, inositol, mannitol, sorbitol, α-methyl-D-glucoside, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, maltose, melibiose, sucrose, trehalose, inulin, raffinose, glycogen, xylitol, D-turanose에 대하여 양성반응을 나타냈다[14]. Table 2에서 보는 바와 같이 protease 생산에 대해서는 FBL-1, *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610, *B. subtilis* DSM 347 모두 양성임을 알 수 있었다. Biolog test 결과와 API 50CHB test 결과를 바탕으로 API 50CHB database V4.0을 이용하여 동정한 결과, 균주 FBL-1은 *Bacillus megaterium*과 73%, *B. subtilis*와 22.9% 특성이 유사한 것으로 판정되었으나 보다 더 정확한 동정을 위해서는 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 비교가 필요할 것으로 판단되었다.

계통발생학적 특성

균주 FBL-1의 16S rDNA 염기서열을 분석하여 NCBI의 BlastN program으로 다른 미생물들과의 상동성을 조사한

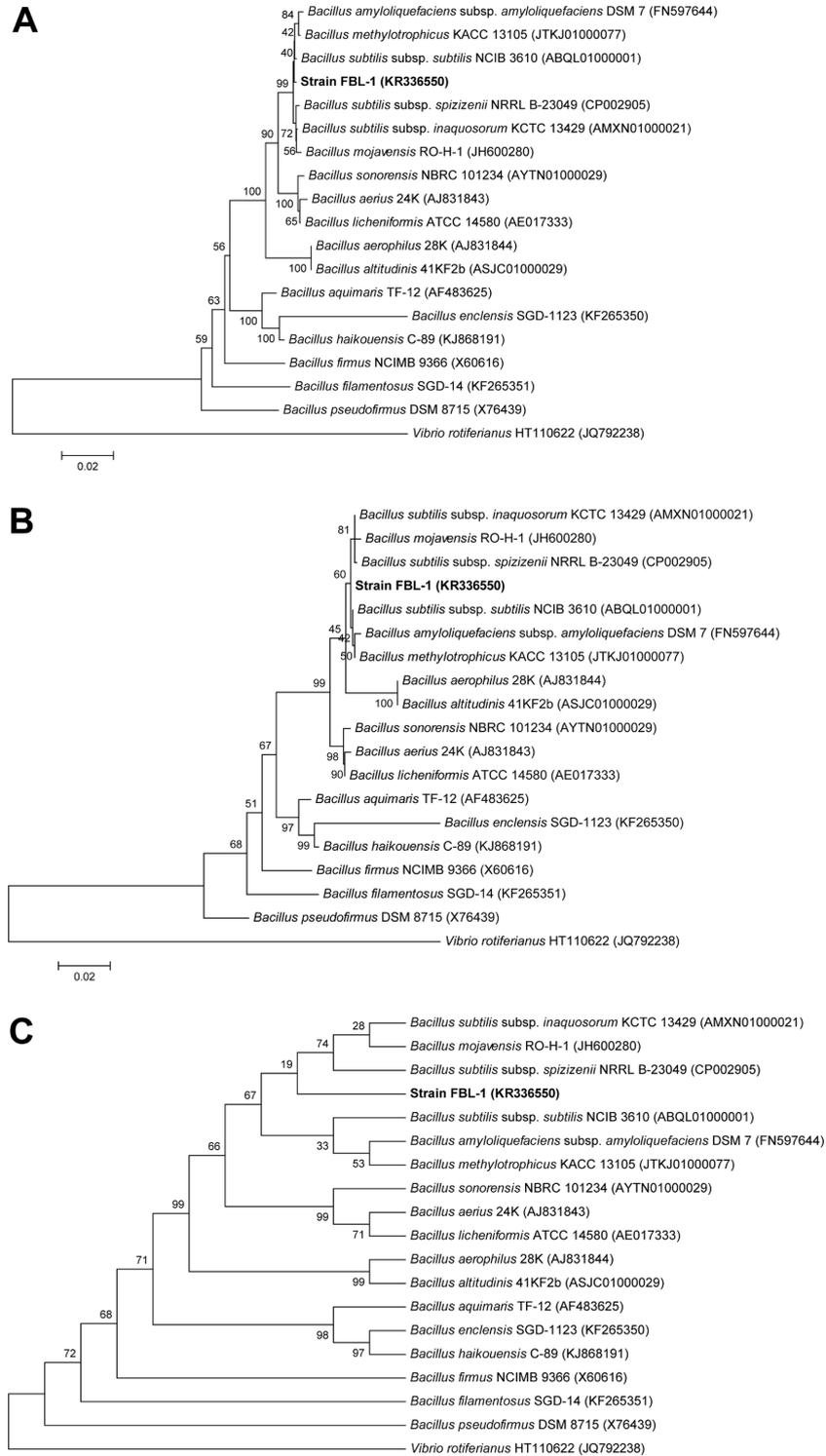


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the evolutionary relationship between strain FBL-1 and other related taxa. Trees were constructed by the (A) neighbor-joining method, (B) maximum likelihood method, and (C) maximum parsimony method, respectively. *Vibrio rotiferianus* (JQ792238) was used as an outgroup in the trees. Numbers at nodes are bootstrap values expressed as percentages of 1,000 replications. GeneBank accession numbers of the sequences are indicated in parentheses. Bar indicates 2 substitutions per 100 nucleotides.

Table 3. Similarity index of strain FBL-1 compared with related taxa.

Strain	Accession number	Similarity (%)	Nucleotide differences /compared
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610 ^T	ABQL01000001	99.5	8/1477
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429 ^T	AMXN01000021	99.4	9/1477
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> NRRL B-23049 ^T	CP002905	99.3	11/1477
<i>Bacillus methylotrophicus</i> KACC 13105 ^T	JTKJ01000077	99.3	11/1477
<i>Bacillus mojavensis</i> RO-H-1 ^T	JH600280	99.1	14/1477
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>amyloliquefaciens</i> DSM 7 ^T	FN597644	98.9	16/1477
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	98.0	30/1476
<i>Bacillus aerius</i> 24K ^T	AJ831843	97.8	32/1465
<i>Bacillus sonorensis</i> NBRC 101234 ^T	AYTN01000016	97.8	33/1476
<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T	ASJC01000029	96.9	46/1476
<i>Bacillus aerophilus</i> 28K ^T	AJ831844	96.8	47/1475
<i>Bacillus aquimaris</i> TF-12 ^T	AF483625	95.9	60/1456
<i>Bacillus haikouensis</i> C-89 ^T	KJ868191	95.6	64/1456
<i>Bacillus firmus</i> NCIMB 9366 ^T	X60616	94.9	73/1419
<i>Bacillus pseudofirmus</i> DSM 8715 ^T	X76439	94.0	87/1456
<i>Bacillus filamentosus</i> SGD-14 ^T	KF265351	93.6	90/1399
<i>Bacillus enclensis</i> SGD-1123 ^T	KF265350	91.1	122/1375

^T, type strain

결과, *Bacillus* 속 미생물들과 높은 상동성을 보였다. Table 3에서 보는 바와 같이 FBL-1 균주의 16S rDNA 염기서열은 *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 (99.5%), *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429 (99.4%), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049 (99.3%), *B. methylotrophicus* KACC 13105 (99.3%) 등 *Bacillus* 속 균주들과 높은 상동성을 나타냈다. 이 결과를 바탕으로 Neighbor-Joining 법, Maximum likelihood 법, Maximum parsimony 법으로 각각 계통도를 작성하여 그 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 계통발생학적 관계를 바탕으로 균주 FBL-1을 *B. subtilis* FBL-1으로 최종 명명하였고, 그 16S rDNA 염기서열은 GeneBank에 KR336550으로 등록하였다.

탄소원 종류에 따른 균체 성장 및 protease 활성 비교

B. subtilis FBL-1의 발효가 진행되는 동안 protease의 생산에 가장 큰 영향을 미치고, 보다 높은 수준의 protease를 생산할 수 있는 탄소원을 알아보기 위하여 총 9가지의 탄소원 종류에 따른 protease 활성과 건조균체량을 비교하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 건조균체량은 탄소원을 첨가하지 않은 경우를 제외하고 모두 높은 결과를 보였으나, protease 활성은 특정 탄소원에서만 높게 나타났다. Fructose를 탄소원으로 첨가한 경우의 protease 활성이 201.436 U/ml로 가장 우수한 결과를 보였으며, 그 다음으로 maltose 117.681

U/ml, sucrose 90.116 U/ml, glucose 36.046 U/ml 등의 protease 활성을 나타내었다. 균체 성장의 경우 glucose를 탄소원으로 사용한 경우 건조균체량이 2.065 g/l로 가장 높게 나타났으나 protease 활성은 36.046 U/ml로서 상대적으로 낮은 결과가 관찰되었다. 반면, fructose를 탄소원으로 사용한 경우 건조균체량은 1.580 g/l로 실험에 사용한 탄소원들 중 중간 정도의 균체 성장을 보였으나 protease 활성은 가장 높은 값을 나타냈다. 탄소원을 첨가하지 않은 경우에도 건조균체량은 0.689 g/l까지 증가하였는데, 이는 복합질소원인 beef extract에 포함된 영양원에 의한 것으로 생각되나 protease 활성은 전혀 검출되지 않았다. 이 실험의 결과로부터 *B. subtilis* FBL-1을 이용한 protease 생산에 있어서 fructose가 가장 우수한 탄소원임을 알 수 있었다. 탄소원을 포함하지 않고 beef extract 5 g/l 만을 포함한 배지의 경우 protease 활성을 전혀 보이지 않았으나, 탄소원을 포함한 모든 배지에서 효소활성이 나타나는 것으로 보아 탄소원이 protease 생산에 중요한 영향을 미친다는 사실을 알 수 있었다.

질소원 종류에 따른 균체 성장 및 protease 활성 비교

B. subtilis FBL-1의 protease 생산과 균체 성장에 적합한 질소원을 알아보기 위하여 질소원 종류에 따른 protease 활성과 건조균체량을 비교하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이

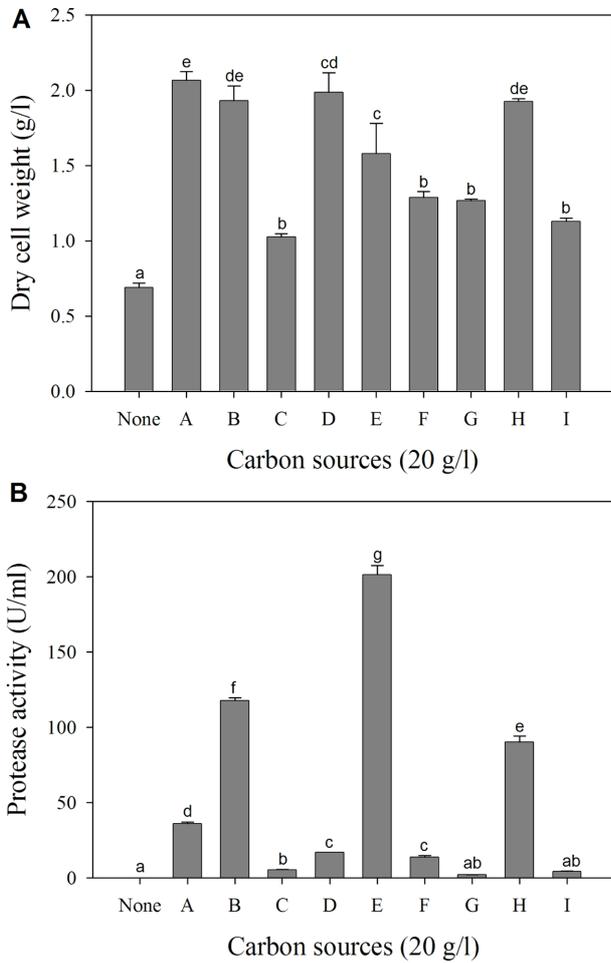


Fig. 3. Effect of carbon sources on (A) cell growth and (B) protease production in liquid culture. *B. subtilis* FBL-1 was cultured in the medium containing 20 g/l of each carbon source and 5 g/l of beef extract with shaking at 37°C for 24 h. Means with different letters (a-g) are significantly different ($p < 0.05$) according to Duncan's multiple range test, and the bars indicate the standard deviation of three replicates experimented. A, glucose; B, maltose; C, xylose; D, starch; E, fructose; F, glycerol; G, galactose; H, sucrose; I, lactose.

질소원이 포함되지 않은 배지에서는 전혀 protease 활성을 나타내지 않았기 때문에 질소원 또한 탄소원과 함께 protease 생산에 중요한 인자임을 알 수 있다. Protease 생산에 가장 우수한 영향을 미치는 질소원으로는 yeast extract (451.640 U/ml)로 확인되었으며, 그 다음으로는 beef extract (194.014 U/ml)와 tryptone (183.414 U/ml)을 사용한 경우에서 비교적 높은 활성을 보였다. 대부분의 유기 질소원의 경우에는 protease 활성이 높게 나타났으나, malt extract 및 peptone의 경우는 다른 유기 질소원에 비하여 상대적으로 낮은 protease 활성과 균체 성장을 보였다. 또한, ammonium

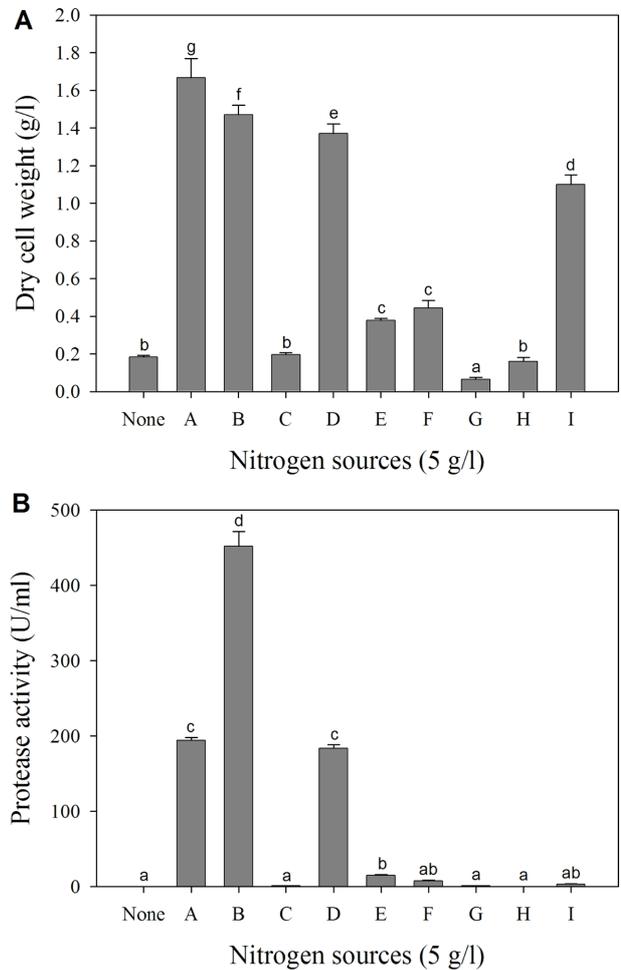


Fig. 4. Effect of nitrogen sources on (A) cell growth and (B) protease production in liquid culture. *B. subtilis* FBL-1 was cultured in the medium containing 20 g/l of fructose and 5 g/l of each nitrogen source with shaking at 37°C for 24 h. Means with different letters (a-g) are significantly different ($p < 0.05$) according to Duncan's multiple range test, and the bars indicate the standard deviation of three replicates experimented. A, beef extract; B, yeast extract; C, malt extract; D, tryptone; E, peptone; F, urea; G, ammonium sulfate; H, ammonium chloride; I, corn steep liquor.

sulfate, ammonium chloride, urea와 같은 무기 질소원을 사용한 경우 protease 활성이 매우 낮게 나타났다. 균체 성장의 경우 beef extract를 질소원으로 사용한 경우 건조균체량이 1.668 g/l로 가장 높게 나타났으나 protease 활성은 194.014 U/ml로서 상대적으로 낮은 결과가 관찰되었다. 반면, yeast extract를 질소원으로 사용한 경우 건조균체량은 1.471 g/l로 beef extract를 사용한 경우보다는 다소 낮은 값을 보였으나 protease 활성은 yeast extract를 사용한 경우에 비하여 2배 이상 높은 결과를 보였다. 따라서 *B. subtilis*

FBL-1을 이용한 protease 생산에는 yeast extract가 가장 적합하다는 것을 알 수 있었다.

요약

경상북도 경산시에 위치한 영남대학교 내의 토양으로부터 protease를 생산하는 신규 미생물 FBL-1을 분리하였다. 본 균주는 Biolog test 및 API 50CHB test 결과, *Bacillus* 속 미생물 중 하나인 것으로 확인되었다. 16S rDNA 염기서열 분석결과로부터 FBL-1 균주는 *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 (99.5%), *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429 (99.4%), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049 (99.3%), *B. methylotrophicus* KACC 13105 (99.3%) 등과 높은 상동성을 보였다. 이러한 생리적, 형태학적, 계통학적 특성에 따라 균주 FBL-1은 *B. subtilis*에 속하는 균으로 최종 동정하여 *B. subtilis* FBL-1으로 명명하였다. *B. subtilis* FBL-1을 이용한 protease 생산시 탄소원으로는 fructose, 질소원으로는 yeast extract가 균체 성장 및 protease 활성을 위하여 가장 적합한 것으로 나타났다. *B. subtilis* FBL-1 균주는 protease를 생산하는데 활용할 수 있으며, 향후 배지 및 발효조건 최적화와 효소의 특성 규명 등의 연구를 통하여 식품, 세제 등의 다양한 산업에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

References

- Adinarayana K, Ellaiah P, Prasad DS. 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **4**: 1–9.
- Anissa H, Nahed FZ, Noomen H, Fakher F, Monef N, Alya SK. 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.
- Anson ML. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **22**: 79–89.
- Banerjee UC, Sani RK, Azmi W, Soni R. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem.* **35**: 213–219.
- Folin O, Ciocalteu V. 1927. On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* **73**: 627–650.
- Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 381–395.
- Horikoshi K, Atsukawa Y. 1973. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. *Arg. Biol. Chem.* **35**: 1407–1414.
- Josephine FS, Ramya VS, Devi N, Ganapa SB, Siddalingeshwara KG, Venugopal N, et al. 2012. Isolation, production and characterization of protease from *Bacillus* sp. isolated from soil sample. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* **2**: 163–168.
- Kageyama K. 1955. Studies on *Aspergillus oryzae* strain for sake brewing. *J. Ferment. Technol.* **33**: 53–57.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 716–721.
- Masaaki Y, Kazuo S, Mitsuo M. 1984. Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3405. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1637–1645.
- Nunokawa Y, Namba Y, Watanabe S. 1961. A study of the Koji protease. *J. Soc. Brew.* **53**: 930–933.
- Oberoi R, Beg QK, Ouri S, Saxena RK, Gupta R. 2001. Characterization and wash performance analysis of a SDS-stable alkaline protease from *Bacillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 493–497.
- Oguntoyinbo FA, Sanni AI, Franz CMAP, Holzapfel WH. 2007. Phenotypic diversity and technological properties of *Bacillus subtilis* species isolated from *okpehe*, a traditional fermented condiment. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 401–410.
- Park HS, Yang SY, Kim MH, Lee JG. 2002. Isolation and characterization of *Aeromonas hydrophila* PBI6 and properties of synthetic wastewater degradation. *Korean J. Microbiol.* **38**: 235–240.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 597–635.
- Reddy LVA, Wee YJ, Ryu HW. 2008. Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83**: 1526–1533.
- Reddy LVA, Wee YJ, Yun JS, Ryu HW. 2008. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour. Technol.* **99**: 2242–2249.