

Bacillus sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 Protease 생산 및 특성에 미치는 pH의 영향

심창환¹ · 정광선 · 신원철* · 유주현²

강원대학교 발효공학과, ¹경민전문대학 식품영양과, ²연세대학교 식품공학과

Effect of pH on the Production and Characteristics of Protease by *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M

Shim, Chang-Whan¹, Kwang-Seon Jeong,
Won-Cheol Shin* and Ju-Hyun Yu²

Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University,
Chunchon 200-701, Korea

¹Department of Food Nutrition, Kyungmin Junior College, Euijungbu 480-103, Korea

²Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract — The production and the characteristics of protease produced by *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M were investigated under the different pH conditions. *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M showed the maximum activity of protease at 60 hours(70 units/ml) and 96 hours(50 units/ml) cultivation, respectively, under the alkaline condition(pH 10.2). However, *Bacillus* sp. SH-8M exhibited the maximum activities in 8 days cultivation at pH 6.9 and in 6 days cultivation at pH 7.7. *Bacillus* sp. SH-8M showed the protease activity at the pH change from alkaline to neutral condition, whereas *Bacillus* sp. SH-8 did not. In addition, all the enzymatic characteristics of protease produced by *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M were similar with the regardless of different pH conditions.

Horikoshi(1)에 의하여 alkaline protease에 관한 연구가 보고된 후 피혁 및 세계 공업에 사용하기 위한 alkaline protease에 관한 연구가 활발히 진행되었다. 처음 alkaline protease의 생산은 *Bacillus*속에서 보고되었으나(1, 2) 그 후 *Streptomyces*속에서도 생산이 확인되었다(3, 4). 국내에서도 *Bacillus*속이 생산하는 alkaline protease에 대하여 장 등(5)과 김 등(6)이 효소생산 및 특성에 관하여 보고하였다. 또한 Chu 등(7)도 *Bacillus subtilis*를 이용하여 alkaline protease 생산조건을 검토한 바가 있다.

이와 같이 현재까지의 국내외 연구는 alkaline protease에 대한 생산조건과 효소의 분리정제 및 특성에 관한 연구가 주로 진행되었다. 그러나 균주의 생육 pH 변화에 따른 alkaline protease의 생산성 변화나 생산된 protease의 특성을 중성에서 생육 가능한 변이주를 이용하여 비교검토된 바는 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 전보에서(8) 분리된 호알칼리성 *Bacillus* sp. SH-8과 중성 생육 가능한 변이주 *Bacillus* sp. SH-8M을 이용하여 생육 pH 변화에 따른 alkaline protease의 생산과 생산된 효소의 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용한 균주는 심 등(8)이 토양으로부터 분리, 동정한 호알칼리성 *Bacillus* sp. SH-8과 그 변이주인 *Bacillus* sp. SH-8M을 사용하였다.

배지

Horikoshi와 Akiba(9)의 배지(glucose 10 g, peptone 5 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, 1 liter)를 사용하였으며 실험 목적에 따라 Na₂CO₃의 농도를 달리하여 배지의 초기 pH를 조절하였다.

균주의 배양

Key words: Alkalophilic, *Bacillus* sp., pH change, protease

*Corresponding author

균주의 배양은 알칼리성 액체배지(pH 10.2)에 균을 접종하여 30°C 에서 하룻밤 진탕배양시킨 종균 배양액을 실험 목적에 따라 초기 pH를 조절한 새로운 배지에 0.5%(v/v) 접종하여 30°C 에서 진탕배양하였다.

효소활성 측정

조효소액으로는 균주의 배양액을 원심분리하여 상등액을 사용하였고, protease 활성은 Casein-Folin 법(10)으로 측정하였다.

Hammarsten casein 0.6% 용액(0.2 M Tris-maleate 완충용액, pH 8.5) 2.5 ml에 배양액 0.5 ml를 가하고 30°C 에서 10분간 반응시킨 후 2.5 ml의 0.44 M trichloroacetic acid를 가하여 반응을 정지시켰다. 미분해 casein을 30°C 에서 30분간 방치하여 침전시킨 후 Whatman No.2 여과지로 여과하고 여액 1 ml를 취하여 0.55 M Na₂CO₃액 5 ml과 3배 희석한 Folin 시약 1 ml를 가하여 30°C 에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 상법에 준하여 배양액과 침전시약의 첨가 순서를 역으로 하였다. 효소의 역가는 O.D.₆₆₀의 값을 0.01 증가시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

결과 및 고찰

효소생산에 미치는 초기 pH의 영향

Bacillus sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M을 배양시키면서 배양액의 protease 활성을 측정한 결과, Fig.

1과 같이 *Bacillus* sp. SH-8은 pH 10.2 에서 protease를 생산하였고 60시간 배양 후에 약 70 units/ml로 최고의 활성을 나타내었으나 pH 6.9와 7.7에서는 protease가 생산되지 않았다. 이는 *Bacillus* sp. SH-8이 중성배지에서는 생육이 불가능하여 protease 생산이 안되는 것으로 생각되었다. 한편, *Bacillus* sp. SH-8M은 pH 6.9, 7.7 및 10.2에서 모두 protease를 생산하였고, pH 10.2에서는 96시간에 약 50 units/ml로 최고의 활성을 나타내어 *Bacillus* sp. SH-8과는 최고 생산시간 및 활성에 차이를 보였다(Fig. 2). 또한 pH 6.9와 7.7에서 각각 8일과 6일에서 최고 활성을 나타내었다. 이와 같은 현상은 심 등(11)이 보고한 pH에 따른 포자형성능과 연관성이 있을 것으로 생각되었다.

배양 중의 pH 변화에 따른 효소생산

Bacillus sp. SH-8을 알칼리 및 중성 액체배지에서 배양시킨 후 원심분리하여 균체를 모아 각각 중성 및 알칼리성 액체배지에 다시 현탁하여 배양시키면서 배양액의 protease 활성을 측정하였다. Fig. 3에서와 같이 배지의 pH를 알칼리성에서 중성으로 바꾸었을 때, 배양 4-5시간 후부터 균주의 생육이 불가능하였고 protease도 생산하지 않았다. 한편, 중성 배지에서 알칼리성 배지로 pH를 바꾸었을 때에는 시간이 경과함에 따라 균주가 다시 생육하였고 이에 따라 protease도 생산되었으며 4일 후에 약 80 units/ml로 최대 활성을 보였다. 또한 *Bacillus* sp. SH-8M의 경우 배

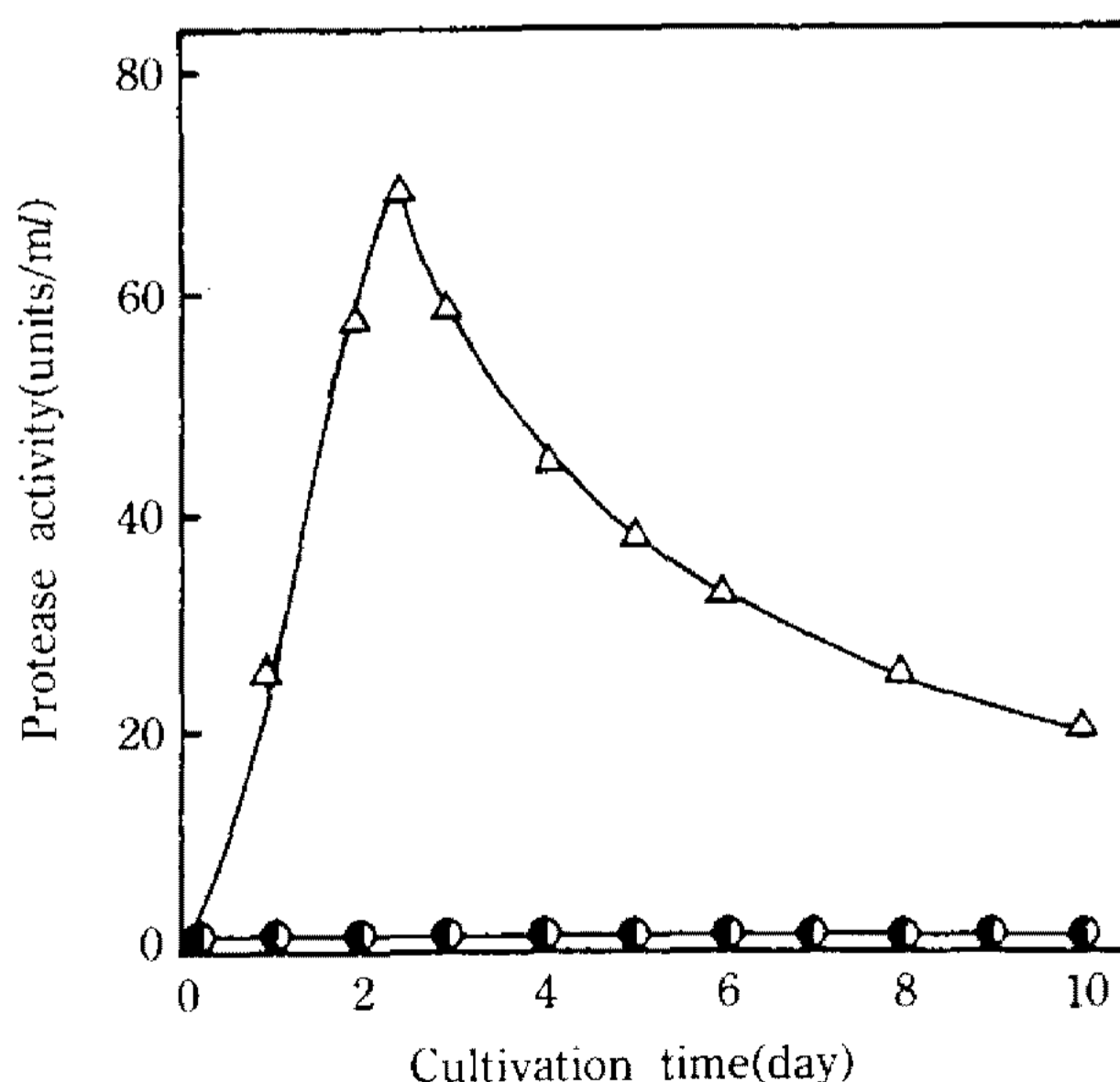


Fig. 1. Effect of the initial pH on the production of protease by *Bacillus* sp. SH-8.

○: pH 6.9, ●: pH 7.7, △: pH 10.2

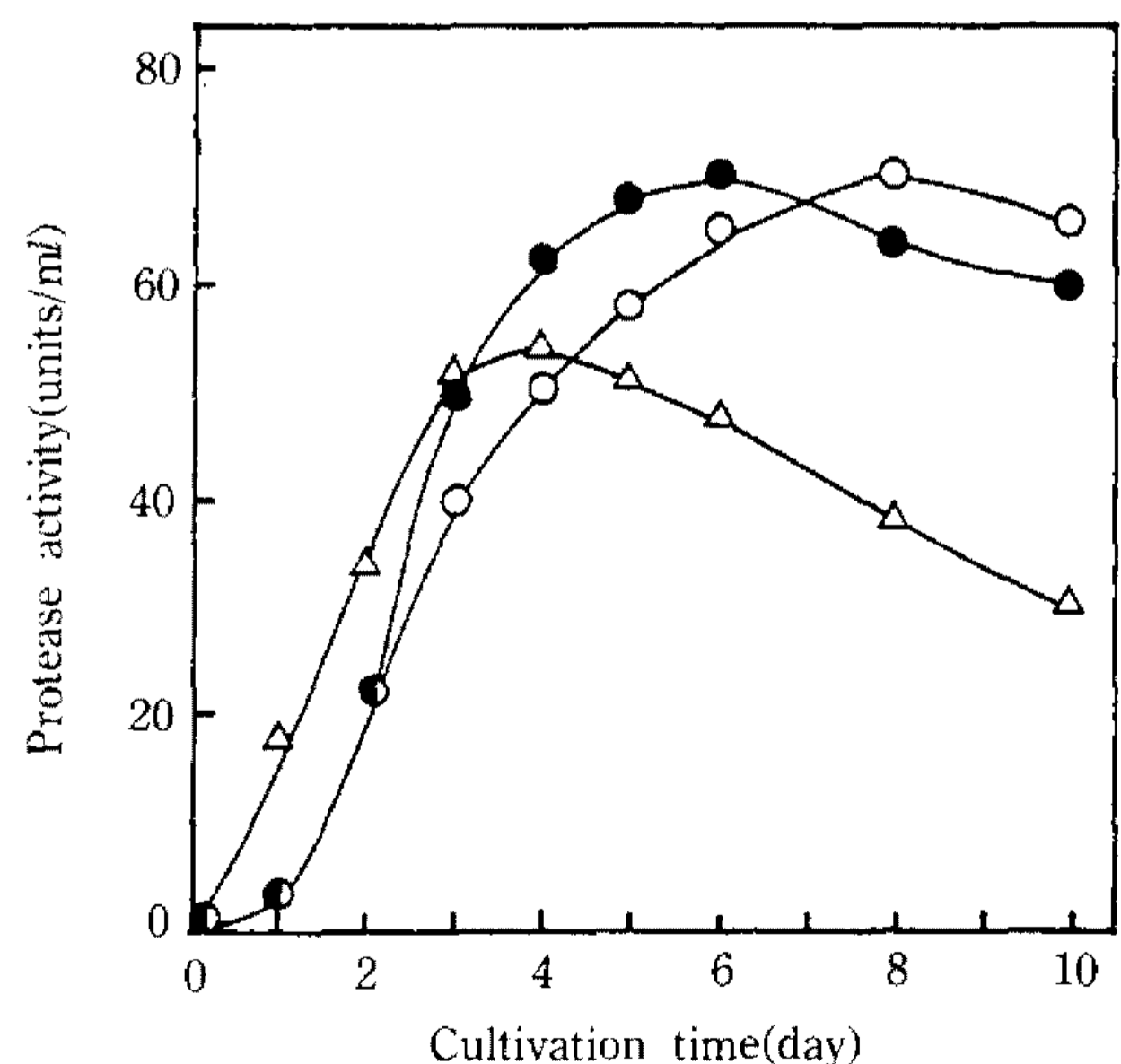


Fig. 2. Effect of the initial pH on the production of protease by *Bacillus* sp. SH-8M.

○: pH 6.9, ●: pH 7.7, △: pH 10.2

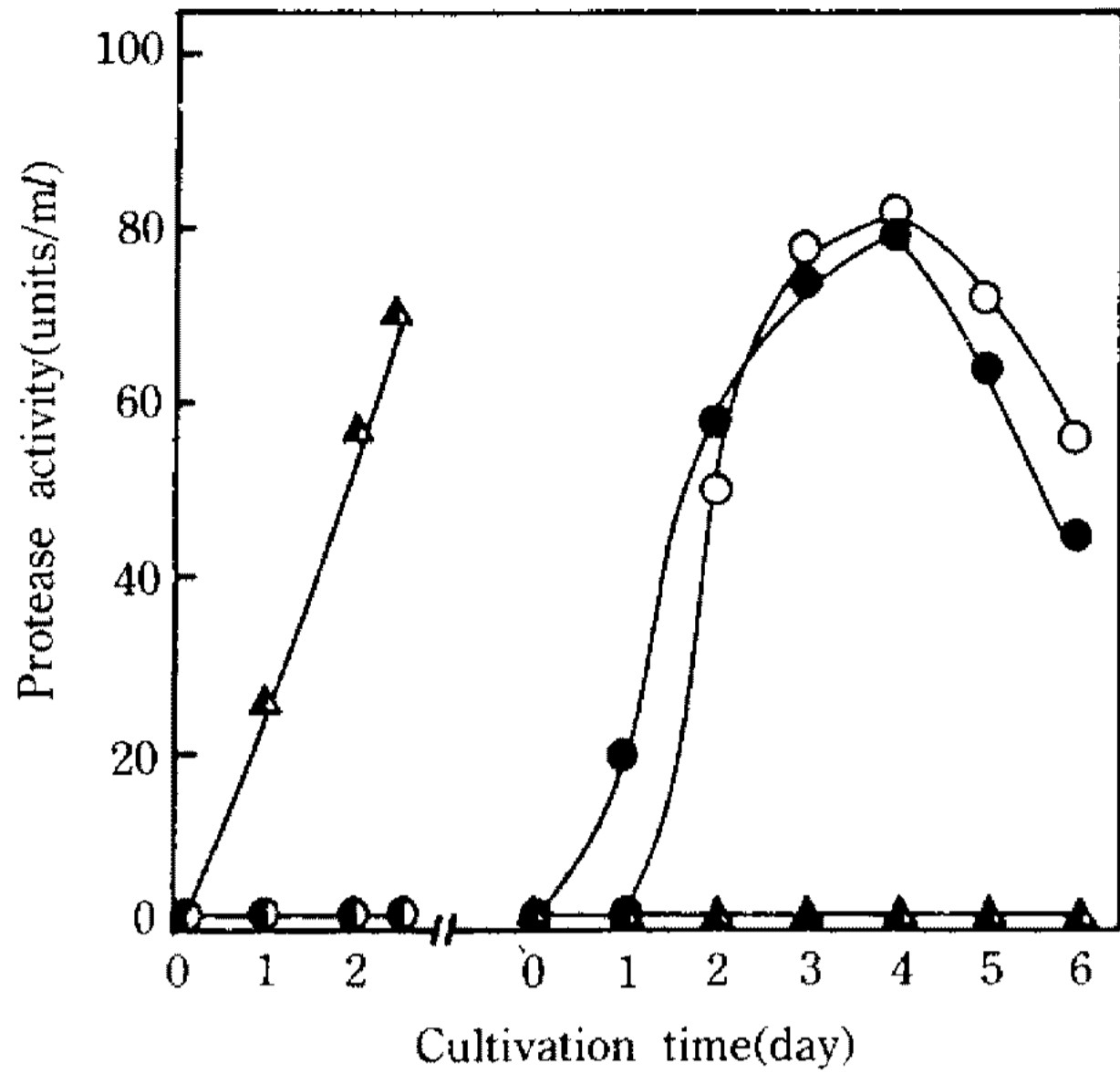


Fig. 3. Effect of pH change on the production of protease by *Bacillus* sp. SH-8.

○: pH 6.9→pH 10.2, ●: pH 7.7→pH 10.2, △: pH 10.2→pH 6.9, ▲: pH 10.2→pH 7.7

Cells were incubated for 60 hours, and then resuspended in fresh medium at each pH. The enzyme activity was measured at 30°C for 10 min (pH 8.5).

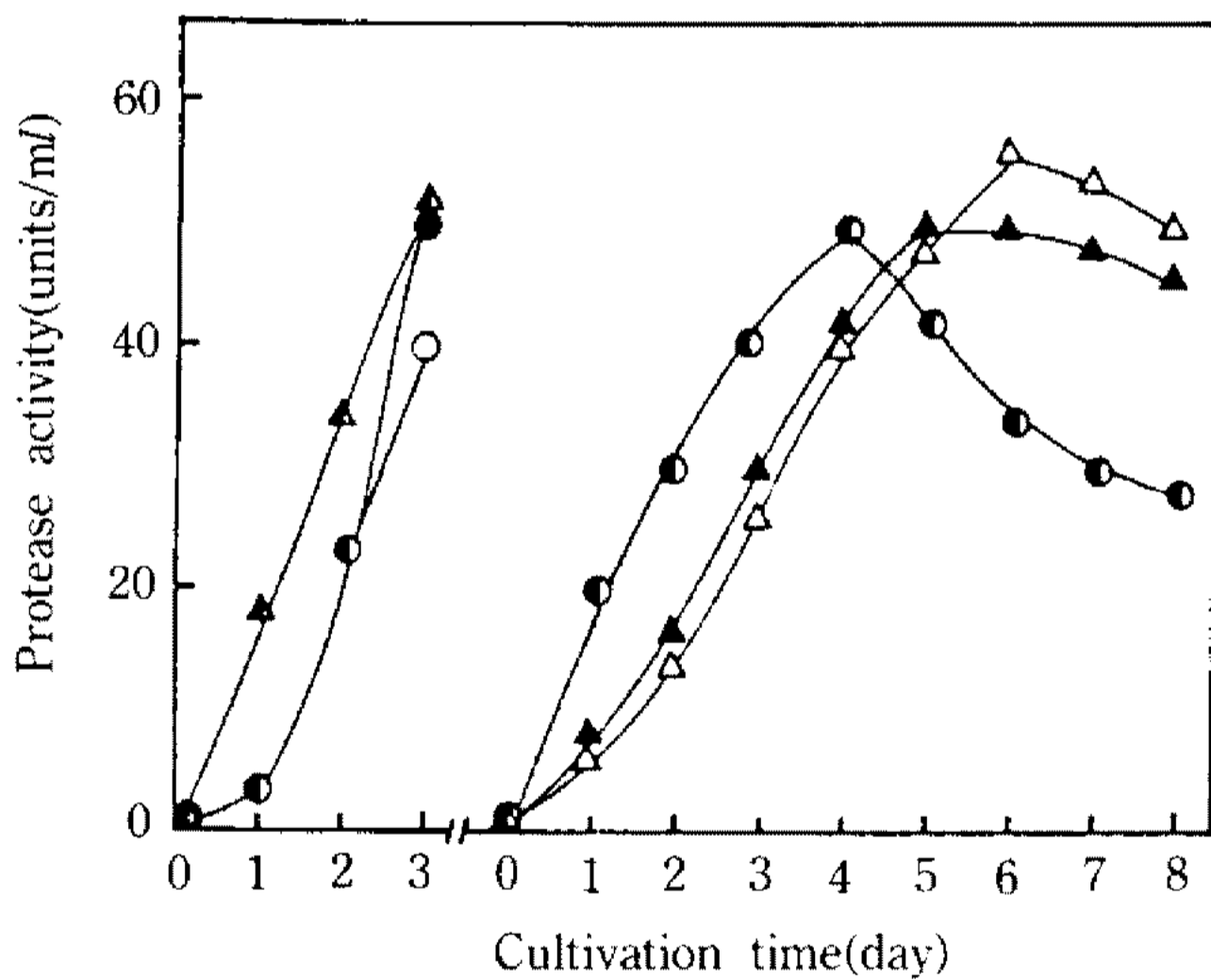


Fig. 4. Effect of pH change on the production of protease by *Bacillus* sp. SH-8M.

○: pH 6.9→pH 10.2, ●: pH 7.7→pH 10.2, △: pH 10.2→pH 6.9, ▲: pH 10.2→pH 7.7

Cells were incubated for 60 hours, and then resuspended in fresh medium at each pH. The enzyme activity was measured at 30°C for 10 min (pH 8.5).

지의 pH를 알칼리성에서 중성으로 바꾸었을 때와 중성에서 알칼리성으로 바꾸었을 때 모두 시간경과에 따라 protease 생산이 가능하였으나 생산성은 약간 낮게 나타났다(Fig. 4).

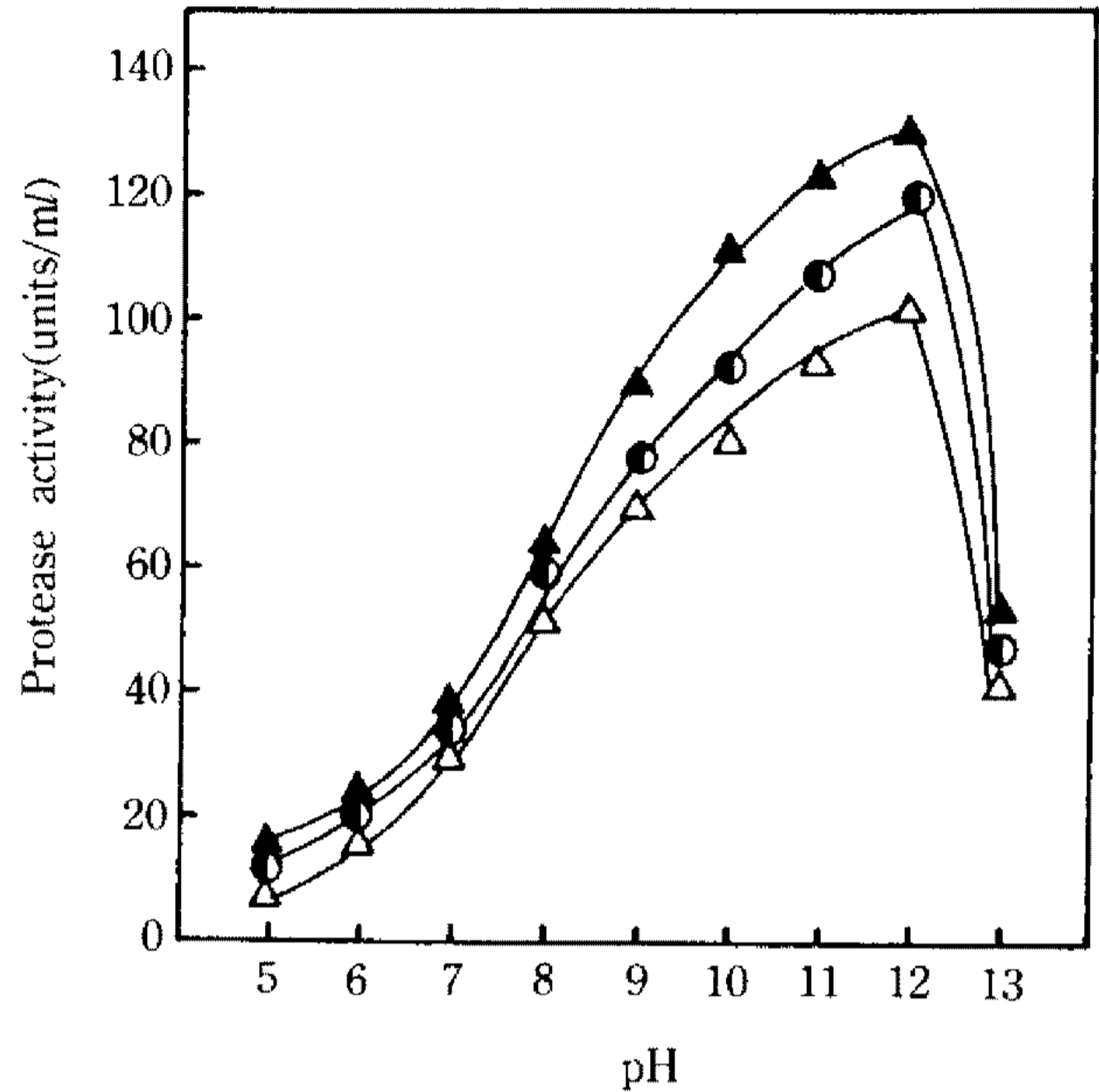


Fig. 5. Effect of pH on the activity of protease produced by *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M at different initial pHs.

○: pH 6.9, *Bacillus* sp. SH-8M, ●: pH 7.7 *Bacillus* sp. SH-8M, △: pH 10.2 *Bacillus* sp. SH-8M, ▲: pH 10.2 *Bacillus* sp. SH-8

The following buffer systems were used; Tris-maleate buffer (pH 5.0-8.5), Na₂B₄O₇-NaOH buffer (pH 9.0-12.0), 0.1 M NaOH solution (pH 13.0). The enzyme activity was measured at 30°C for 10 min.

효소활성에 미치는 pH의 영향

효소반응의 최적 pH를 검토한 결과는 Fig. 5와 같다. 알칼리성 배지(pH 10.2)에서 배양한 경우 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M이 생산하는 protease는 모두 pH 12.0에서 최대 활성을 나타내었다. 또한 *Bacillus* sp. SH-8M의 경우 pH 6.9와 7.7 배지에서 생산한 protease 역시 모두 pH 12.0에서 활성이 최고였다. 이와 같은 결과로부터 배지의 초기 pH가 달라도 생산되는 효소활성의 최적 pH에는 변화가 없다는 사실을 알 수 있었다.

Horikoshi(12)는 호알칼리성 *Bacillus* sp. No.221과 No.8-1 그리고 No.D-6이 생산하는 protease의 활성 최적 pH가 각각 11.5-12.0, 10.5-11.0, 10.5-11.0이라고 보고한 바가 있다. 따라서 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M이 생산하는 protease의 활성 최적 pH는 *Bacillus* sp. No.221과 유사함을 보여주었다.

효소활성에 미치는 온도의 영향

효소의 반응 최적 온도를 검토하기 위하여 반응 온도를 달리하여 각 온도별로 효소 활성을 측정

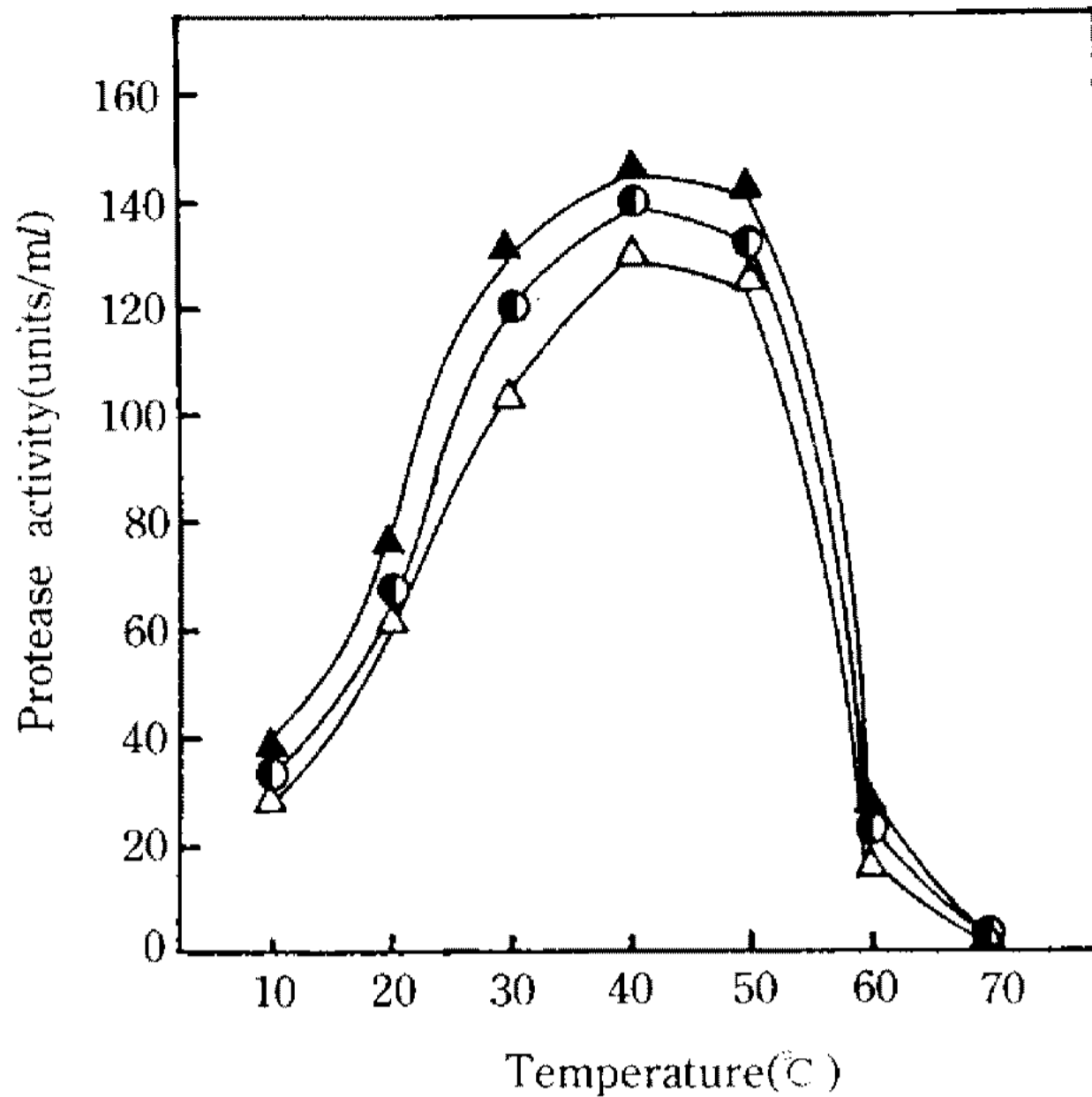


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of protease produced by *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M at different initial pHs.

○: pH 6.9, *Bacillus* sp. SH-8M, ●: pH 7.7 *Bacillus* sp. SH-8M, △: pH 10.2 *Bacillus* sp. SH-8M, ▲: pH 10.2 *Bacillus* sp. SH-8.

The reaction was carried out at the temperature indicated at pH 12.0 for 10 min.

결과(Fig. 6), pH 10.2 배지에서 배양한 경우 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M이 생산하는 protease 모두 40°C 에서 효소의 반응 최적 온도를 보였다. 또한 *Bacillus* sp. SH-8M의 경우 pH 6.9와 7.7 배지에서 생산한 protease 역시 모두 40°C 에서 최고 활성을 보였다. 따라서 효소활성 최적 pH에서의 결과와 마찬가지로 배지의 초기 pH가 달라도 생산되는 효소활성의 최적 온도에는 차이가 없다는 사실을 알 수 있었다. 이는 Horikoshi(12)와, 장 등(5)의 결과와 비교하여 볼 때 20-30°C 낮은 값이었다.

효소활성에 미치는 각종 금속이온의 영향

효소활성에 미치는 금속이온의 영향을 검토하기 위하여 각종 금속이온을 효소에 첨가하여 protease 활성을 측정된 결과(Table 1), pH 10.2 배지에서 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M이 생산하는 protease와 pH 6.9와 7.7 배지에서 *Bacillus* sp. SH-8M이 생산하는 protease 모두 Na⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ 등의 이온에 의해서 약간 활성화되었으며, Ag⁺, Hg²⁺ 이온을 제외한 이온에 대해서는 90% 이상의 활성을 유지하였다. 따라서 중성과 알칼리성 배지에서 생산된 protease의 활성은 생육 pH에 관계없이 각각의 금속이

Table 1. Effect of metal ions on the activity of protease produced by *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M at different initial pHs

Metal ion (1 mM)	Relative activity (%)		
	<i>Bacillus</i> sp. SH-8 pH 10.2	<i>Bacillus</i> sp. SH-8M pH 10.2 pH 6.9 & 7.7	
None	100	100	100
K ⁺	98	98	96
Na ⁺	103	102	101
Ag ⁺	63	64	67
Mg ²⁺	98	95	96
Co ²⁺	95	91	92
Fe ²⁺	98	99	97
Cu ²⁺	110	109	101
Mn ²⁺	125	122	121
Ca ²⁺	93	91	94
Zn ²⁺	90	90	94
Li ²⁺	98	98	96
Hg ²⁺	33	30	36

The enzyme activity was measured at 40°C for 10 min (pH 12.0).

온에 대하여 같은 성질을 나타냄을 알 수 있었다.

효소안정성에 미치는 pH의 영향

효소의 pH 안정성을 검토한 결과 Fig. 7에서와 같이 pH 10.2 배지에서 배양한 경우 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M이 생산하는 protease 모두 pH 4.0-12.0 범위에서 안정하였으며 pH 13.0에서는 잔존 활성이 전혀 없었다. 또한 *Bacillus* sp. SH-8M의 경우 pH 6.9와 7.7 배지에서 생산하는 protease 역시 같은 결과를 나타내었다.

Horikoshi(12)는 호알칼리성 *Bacillus* sp. No.221과 No.8-1 그리고 No.D-6이 생산하는 protease의 pH 안정성을 검토한 결과, 각각 pH 4.0-11.0, pH 6.0-9.0, pH 4.0-12.0에서 안정하였다고 보고하였다. 따라서 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M이 생산하는 protease의 pH 안정성은 *Bacillus* sp. No.221과 No.D-6의 protease와 유사함을 보였다.

효소안정성에 미치는 온도의 영향

효소의 온도에 대한 안정성을 검토하기 위하여 각각 온도를 달리하여 처리한 후 protease의 잔존 활성을 측정하였다. Fig. 8에서와 같이 pH 10.2 배지에서 배양한 경우 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M이 생산하는 protease 모두 40°C 까지 안정하였으며, 50

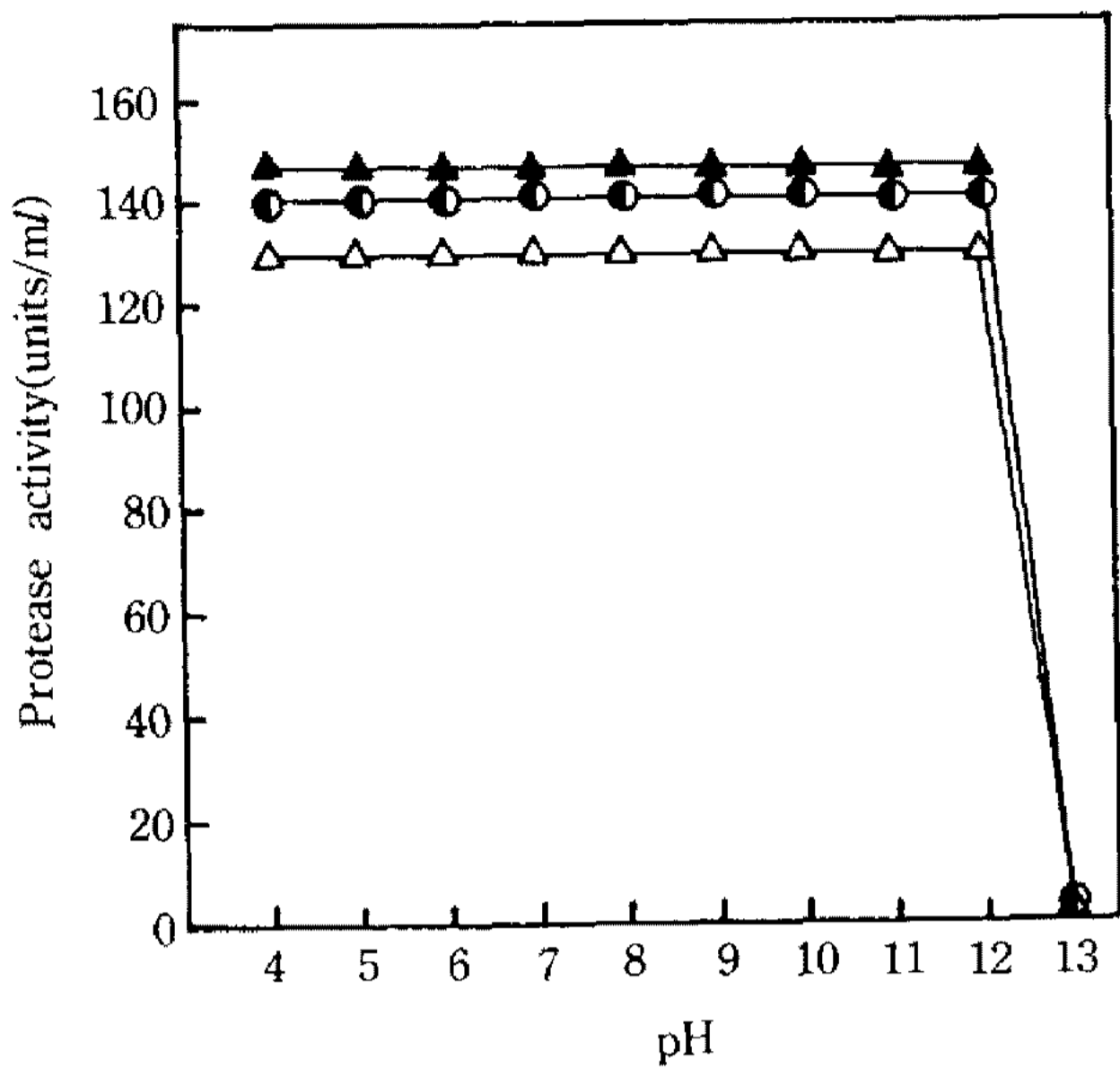


Fig. 7. Effect of pH on the stability of protease produced by *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M at different initial pHs.

○: pH 6.9, *Bacillus* sp. SH-8M, ●: pH 7.7 *Bacillus* sp. SH-8M, △: pH 10.2 *Bacillus* sp. SH-8M, ▲: pH 10.2 *Bacillus* sp. SH-8.

The enzymes were incubated at different pHs for 12 hours at 4°C, and then the residual activity was measured at 40°C for 10 min (pH 12.0).

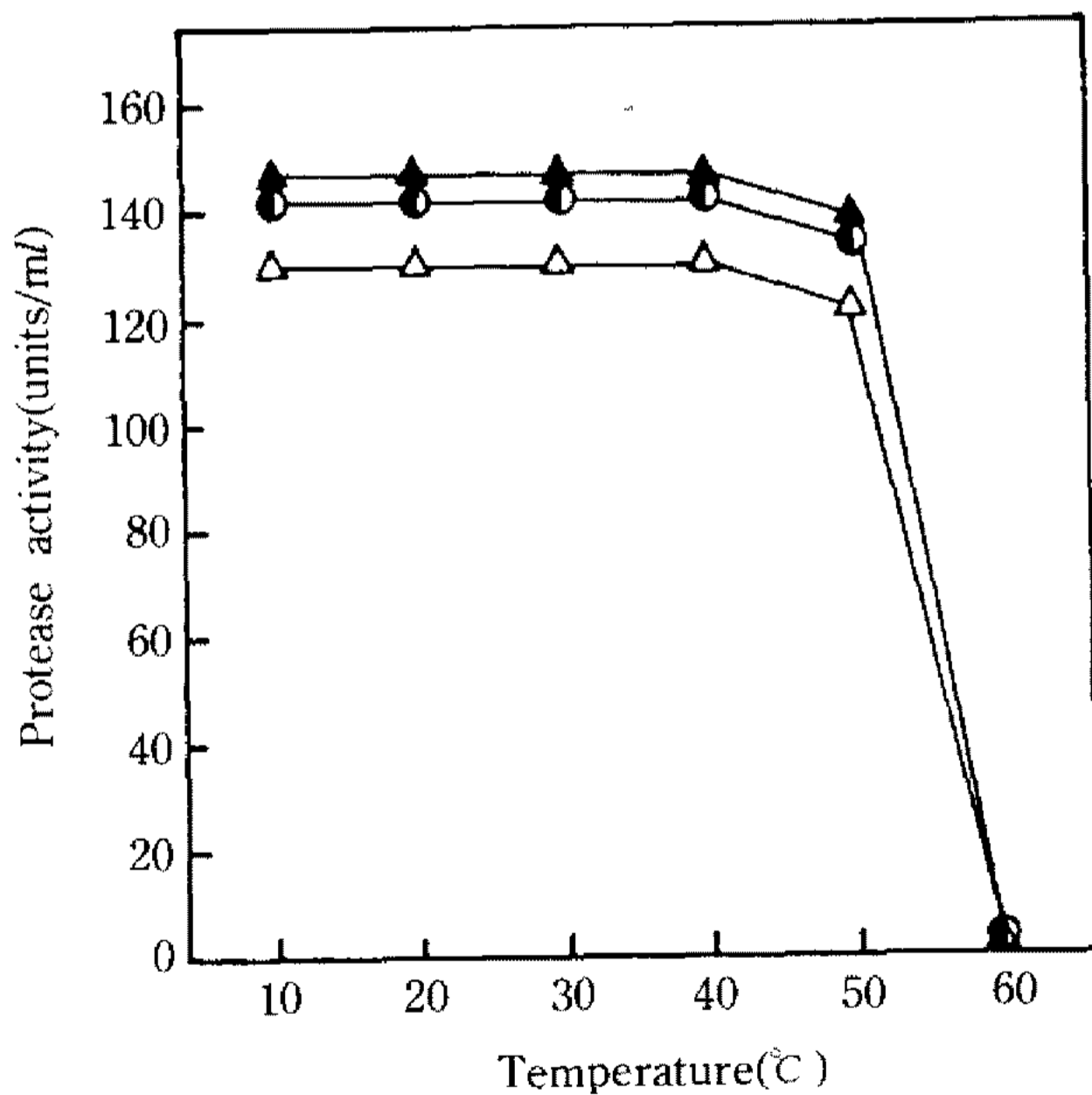


Fig. 8. Effect of temperature on the stability of protease produced by *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M at different initial pHs.

○: pH 6.9, *Bacillus* sp. SH-8M, ●: pH 7.7 *Bacillus* sp. SH-8M, △: pH 10.2 *Bacillus* sp. SH-8M, ▲: pH 10.2 *Bacillus* sp. SH-8.

The enzymes were incubated at different temperatures for 1 hour, and then the residual activity was measured at 40°C for 10 min (pH 12.0).

°C에서는 약간의 실활을 보였고 60°C 이상에서는 완전히 실활되었다. 또한 *Bacillus* sp. SH-8M의 경우 pH 6.9와 7.7 배지에서 생산된 protease 역시 같은 온도 안정성을 나타내었다.

Horikoshi(12)는 호알칼리성 *Bacillus* sp. No.221이 생산한 protease는 60°C 에서 약 80%의 실활을 보였으며 65°C 에서는 완전히 실활되었다고 보고한 바가 있다. 또한 장 등(5)과 김 등(6)도 *Bacillus*속이 생산하는 alkaline protease인 경우 50°C 까지 안정하였다고 보고하였다.

이와 같은 결과와 비교하여 볼 때 본 균주의 온도 안정성은 낮았으나 배지의 초기 pH가 달라도 생산되는 protease의 온도 안정성에는 차이가 없었다.

요 약

Bacillus sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M을 이용하여 생육 pH 변화에 따른 protease 생산과 효소학적 특성을 검토하였다. 알칼리성 배지(pH 10.2)에서는 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M 균주 모두 protease를 생산하였으며 60시간, 96시간에서 각각 70 units/ml과 50 units/ml로 최고의 활성을 보였다. 중성 배지(pH 6.9, 7.7)에서 *Bacillus* sp. SH-8은 protease 활성을 나타내지 않았으나 *Bacillus* sp. SH-8M은 pH 6.9와 7.7에서 각각 8일과 6일에 최고 활성을 나타내었다. 또한 배양도중 배지의 pH를 알칼리에서 중성으로 변화시킬 경우 *Bacillus* sp. SH-8M은 protease를 생산하였으나 *Bacillus* sp. SH-8은 생산하지 않았다. 알칼리 및 중성 배지에서 생산된 protease는 배양 pH를 변화시켜도 효소의 물리 화학적 특성이 비슷하였다.

참고문헌

1. Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganism. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1407-1414.
2. Nakamura, K., A. Matsushima, and K. Horikoshi. 1973. The state of amino acid residues in alkaline protease produced by *Bacillus* sp. No.221. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 1261-1267.
3. Nakanishi, T., Y. Matsumura, N. Minamiura, and T. Yamamoto. 1974. Purification and some properties of an alkalophilic proteinase of a *Streptomyces* species. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 37-44.
4. Nakanishi, T., and T. Yamamoto. 1974. Action and specificity of a *Streptomyces* alkalophilic proteinase. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 2391-2397.

5. 장신재, 김운숙, 성하진, 최용진, 양한철. 1988. *Bacillus subtilis*가 생산하는 alkaline protease에 관한 연구. 한국농화학회지 **31**: 356-360.
6. 김태호, 박성희, 이동선, 권택규, 김종국, 홍순덕. 1990. 호알칼리성 *Bacillus*속 균주가 생산하는 alkaline protease의 특성. 한국산업미생물학회지 **18**: 159-164.
7. Chu, I.M., C. Lee, and T.S. Li. 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 755-761.
8. 심창환, 신원철, 유주현. 1991. 호알칼리성 미생물의 분리, 동정 및 중성에서 생육 가능한 변이주의 분리. 한국산업미생물학회지 **19**: 543-547.
9. Horikoshi, K. and T. Akiba. 1982. *Alkalophilic Microorganisms*, Pp. 35-37. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
10. Hagihara, B. 1956. 酵素研究法. Vol.II, Pp. 240. 朝倉書店, 東京.
11. 심창환, 신원철, 유주현. 1992. *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 생육 및 배양 특성에 미치는 pH의 영향. 한국산업미생물학회지 **20**: 371-376.
12. Horikoshi, K. 1989. Study on the alkalophilic microorganism and alkaline enzymes. *Nippon Nogei-kagaku Kaishi* **63**: 1343-1349.

(Received December 16, 1993)