J. Korean Agric. Chem. Soc.
한국농화학회지, 31(2), 187—192 (1988)

Bacillus sp.에 의한 균체외 단백질의 생산

이재숙 · 김찬조 · 이종수
충남대학교 식품가공학과

Production of Extracellular Protein from *Bacillus* sp.

Jae-Sook Lee, Chan-Jo Kim and Jong-Soo Lee
Department of Food Science and Technology,
Chungnam National University, Daejeon, Korea

Abstract

Extracellular protein was produced from bacterium, which was classified as a strain belong to the genus *Bacillus*. This bacterium produced 1.4mg/ml of extracellular protein when grown on chemically defined medium containing 3.0% of glucose, 1.3% of urea and 2.5% of calcium carbonate at 30°C for 48 hours. The addition of 250μg/ml of cephalexin was effective for it and was produced 2.0mg/ml of extracellular protein for 96 hours.

서 론

여러가지 단백질 자원중 미생물 단백질은 가격이 비교적 저렴하고 대량생산이 가능하며 이용시 전처리과정이 단순한 잇점등이 있으나 생산성이 낮은 결점이 있으므로 근래에 이들이 균체외로 분비하는 단백질을 좀더 효율적으로 대량생산하여 이용하려는 연구[1~3]와 이들의 단백질분비기작에 관한 연구등이 이루어지고 있다[14~22].

Udaka[1]는 토양으로 부터 균체외 단백질 생산균주를 분리하여 *Bacillus brevis* No. 47로 동정하고 배지에 glycine과 L-isoleucine의 첨가[5]로 12.1 g/*l*의 균체외 단백질을 생산 하였다고 보고 하였으며 Miyashiro등[19]은 위 균주의 변이주를 이용한 균체외 단백질 생산실험에서 bacitracin 첨가로 단백질의 생산이 증가 되었다고 보고 하였다. 原등[6]은 *Bacillus mensentericus* IFO 3214에 NTG를 처리하여 No. 6021균주를 얻고 이를 형질전환시켜 *Bacillus mensentericus* HS-29를 육성한후 이를 이용하여 7.8mg/ml의 단백질을 생산 하였다고 보고 하였고 山根[17]는 *Bacillus subtilis*에 의한 단백질생산에 관한 연구를, Tagawa등[18]은 단백질을 분비하지 않는 *E. coli*에 유전자조작실험을 실시하여 단백질생산균주를 육성 하였다고 보고하였다. 또한 Akaki등[2]은 효모에 의한 균체외 단백질 생산에 관한 연구를, 水永[23]는 *Sacch. cerevisiae*로부터 변이주를 육성하여 단백질 생산과 그 기작에 관한 연구결과를 보고 하였고 Yamada등[16]은 미생물의 단백질 분비기작에 관한 연구에서 배지중에 인산염을 첨가함으로서 세포벽층을 구성하고 있던 단백질이 균체외로 분비되어 진다고 보고 하였다. 국내에서는 車 등[8]이 *Bacillus*속균에 의한 균체외 단백질 생산에 관한 연구에서 천연배지에 glycine과 L-isoleucine을 첨가하여 4mg/ml의 단백질을 생산 하였다고 보고하였다.

필자들은 미생물에 의한 단백질 생산과 그의 분비기작에 관한 기초자료를 얻고자 토양으로부터 균체외 단백질 생산균주를 분리하여 균학적성질을 조사하고 단백질 생산조건을 검토 하였기에 보고하는 바이다.

1988년 2월 19일 수리
Corresponding Author: C.J. Kim

재료 및 방법

배지

균 분리용 배지는 표 1의 T_1, T_2배지를 사용하

Table 1. The composition of T_1 and T_2 medium

T_1 medium		T_2 medium	
Composition	Content (%)	Composition	Content (%)
K_2HPO_4	0.3	Peptone	1.0
KH_2PO_4	0.1	Meat extract	0.5
$(NH_4)_2SO_4$	0.2	Yeast extract	0.2
$MgSO_47H_2O$	0.02	Glucose	1.0
Peptone	0.3		
Meat extract	0.2		
Glucose	2.0		
Urea	0.2		

Table 2. The composition of chemically defined medium

Composition	Content (%)
Glucose	4.0
$(NH_4)_2SO_4$	1.0
KH_2PO_4	0.1
$MgSO_47H_2O$	0.005
$FeSO_47H_2O$	0.001
$MnSO_44H_2O$	0.001
$CaCO_3$	2.0

였고 단백질 생산배지는 표 2의 chemically defined medium을 사용하였다.

단백질 생산균주의 분리 및 선정

車 등[8]의 방법에 따라 토양과 폐수를 분리원으로 하여 균체외 단백질 생산균주를 분리하였고 이들을 chemically defined medium에 접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양(진폭 3cm, 분당 150회 진탕)한 후 배양액을 1800×g로 20분간 원심분리하여 균체를 제거 하였다. 그 상징액에 10% trichloroacetic acid를 동량 가한 후 원심분리하여 침전물을 회수하고 이를 소량의 1N NaOH에 녹인다음 적당량의 증류수로 희석 하였다. 이를 다시 산과 알카리로 재침전시켜 세척한 후 단백질을 정량하여 생산량이 많은 균주를 선정하였다.

단백질의 정량

균체외 단백질은 Folin-Lowry법[24]에 따라 정량하였고 균체내 단백질은 균체를 0.1N 인산완충용액(pH 7.0)으로 세척한 후 1N NaOH용액에 현탁시켜 비등수욕에서 10분간 가열하여 세포내 단백질을 용해시킨 다음 상기와 같은 방법으로 정량하였다.

선정균주의 동정

"Manual of Methods for General Bacteriology"[25]에 의하여 선정균주의 형태학적, 배양학적 및 생리적 성질과 당 이용성 등을 검토한 후 Bergey's manual[26]에 따라 동정하였다.

균체외 단백질 생산조건

Chemically defined medium에 단백질 생산에 중요한 영향을 미칠것으로 생각되는 각종 탄소원과 질소원 및 $CaCO_3$를 일정농도로 첨가하여 30°C에서 48시간 진탕배양시킨 다음 생성된 단백질을 회수한 후 그 양을 정량하여 이들의 첨가효과를 검토 하였고 이들중 효과가 좋았던 것에 대한 최적농도를 검토 하였다.

항생물질의 첨가효과는 분리균주를 chemically defined medium에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 penicillin G 등의 항생물질을 농도별로 첨가하여 96시간 배양한 다음 단백질 생산량을 측정하여 그 효과를 검토 하였고 효과가 좋았던 Cephalexin을 250μg/ml 첨가하여 배양시간에 따른 단백질 생산량을 검토 하였다. 또한 선정균주를 72시간까지 일정시간 배양한 후 상기와 같이 단백질을 정량하여 배양시간에 따른 균체내, 외 단백질 생산을 검토 하였다.

결과 및 고찰

단백질 생산균주의 분리 및 동정

균체외 단백질 생산균주로 토양으로부터 분리하여 선정한 T-3의 형태학적 및 생리학적 특성을 조사한 결과는 표 3, 4 및 5와 같다.

T-3 균주는 그람음성의 간균 이었고 운동성이

Table 3. Morphological characteristics of the selected strain

Form	rod
Size	1.0—1.3×2.5μ
Motility	motile
Gram	negative
Spore	+

Table 4. Biological characteristics of the selected strain

Hydrolysis of gelatin	−
Hydrolysis of casein	−
Indol test	+
Voges-proskauer test	−
Methyl red test	+
Acid-fast test	−
Urease test	−
Catalase test	+
Amylase	−
Protease	−

Table 5. Carbohydrates utilization and fermentation of the selected strain

Carbohydrate	Utilization	Fermentation
Arabinose	+	+
Xylose	+	−
Ribose	+	−
Glucose	+	−(+)*
Galactose	+	−
Maltose	+	+
Mannose	+	−(+)*
Lactose	+	+
Sucrose	−	−
Trehalose	+	−
Raffinose	−	−
Melezitose	−	−
Melibiose	+	−
Cellobiose	+	−
Dulcitol	+	−
Glycerol	+	−
Inositol	+	−
Sorbitol	+	−
Cellulose	−	−

*( ) was acid from carbohydrate

있었으며 포자를 형성하였다. 또한 V-P 시험과 acid-fast시험은 음성이었고 catalase시험은 양성이었다. 이상의 특성을 종합한 결과 이 균주는 *Bacillus* sp.로 추정 되었다.

균체외 단백질의 생산조건

1) 탄소원의 영향

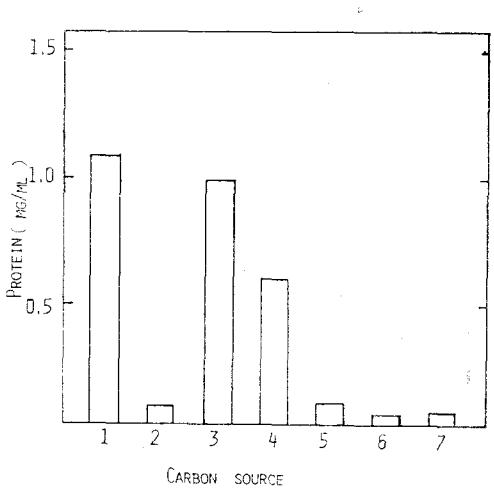

Fig. 1. Effect of carbon source on the production of protein

1; arabinose. 2; xylose. 3; glucose.
4; galactose. 5; lactose. 6; maltose.
7; raffinose.

T-3균주의 단백질 생산에 미치는 각종 탄소원의 영향을 검토한 결과는 그림 1과 같이 chemically defined medium에 arabinose를 4.0% 첨가하였을 때 1.1mg/ml의 단백질을 생산하여 효과가 가장 컸으며 glucose 첨가시 1.0mg/ml의 단백질을 생산 하였다.

또한 glucose 농도의 영향은 그림 2와 같이 3.0%에서 1.1mg/ml의 단백질을 생산 하였다. Tsuchida등[4]은 *Bacillus brevis* No. 47에 의한 균체외 단백질 생산에 관한 연구에서 4%의 fructose 첨

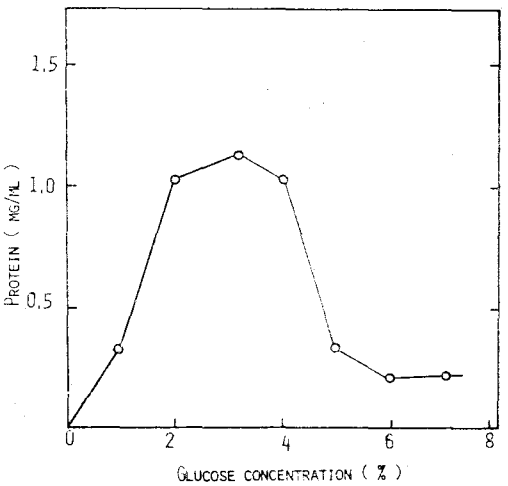

Fig. 2. Effect of glucose concentration on the production of protein

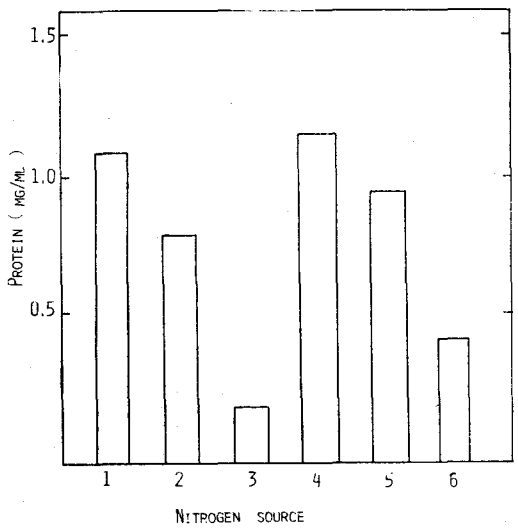

Fig. 3. Effect of nitrogen sourse on the production of protein

1: ammonium sulfate
2: ammonium nitrate
3: ammonium carbonate
4: urea
5: urea(1.3%)+glycine(0.5%)
6: urea(1.3%)+isoleucine(0.5%)

가 시 1.55mg/ml를, glucose 첨가시 1.52mg/ml의 단백질을 생산하였다고 보고한 바 있다.

2) 질소원의 영향

Chemically defined medium에 3.0%의 glucose를 가한 후 T-3균주의 단백질 생산에 미치는 질소원의 영향을 검토한 결과 그림 3과 같이 urea를 1% 가했을때 1.2mg/ml의 단백질을 생산하여

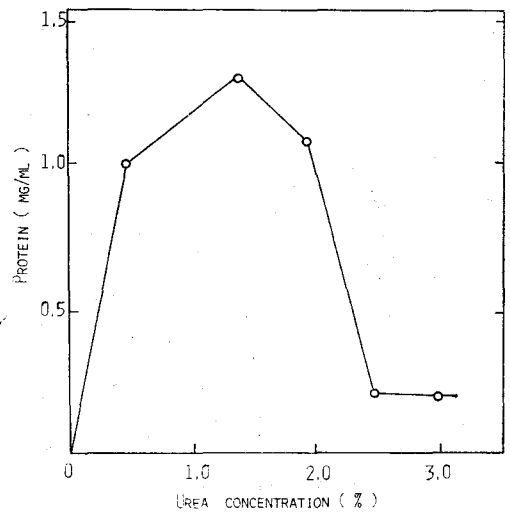

Fig. 4. Effect of urea concentration on the production of protein

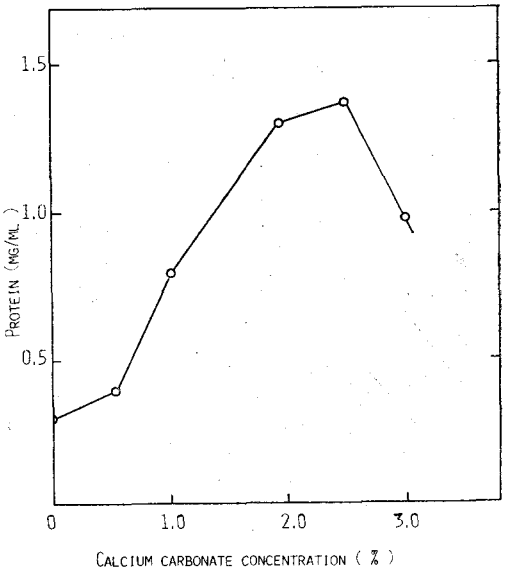

Fig. 5. Effect of calcium carbonate concentration on the production of protein

가장 효과가 컸다. 이는 Tsuchida등[4]과 Miyashiro등[5]이 *Bacillus brevis* No. 47에 의한 단백질 생산실험에서 ammonium sulfate 1% 첨가시 단백질 생산효과가 가장 컸고 glycine과 L-isoleucine의 첨가로 단백질 생산이 촉진 되었다고 보고한 결과와 車등[8]이 *Bacillus*속균에 의한 균체의 단백질 생산 실험에서 천연배지에 glycine과 L-isoleucine을 첨가하였을 때 단백질 생산이 촉진 되었다고 보고한 결과와는 효과 질소원이 달랐고 또한 아미노산의 혼용효과도 없었다.

한편 urea농도의 영향은 그림 4와 같이 1.3%에서 1.3mg/ml의 단백질을 생산하여 가장 효과가 컸다.

3) $CaCO_3$의 영향

미생물에 의한 단백질 생산 시 배지의 pH를 중성으로 유지시켜주고 glucose의 자화에 영향을 미치는 $CaCO_3$의 효과는 그림 5와 같이 2.5%를 첨가했을때 1.4mg/ml의 단백질을 생산하여 가장 효과가 컸다.

4) 항생물질의 영향

세포벽의 투과성을 증진시키는 인자로 알려진 각종 항생물질의 단백질 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 그림 6과 같다.

Cephalexin을 250μg/ml 첨가 하였을때 단백질 생산이 촉진되어 96시간에 2.0mg/ml의 단백질을 생산 하였다. 이는 Miyashiro등[10]이 *Bacillus brevis* No. 47의 변이주에 의한 단백질 생산 실험

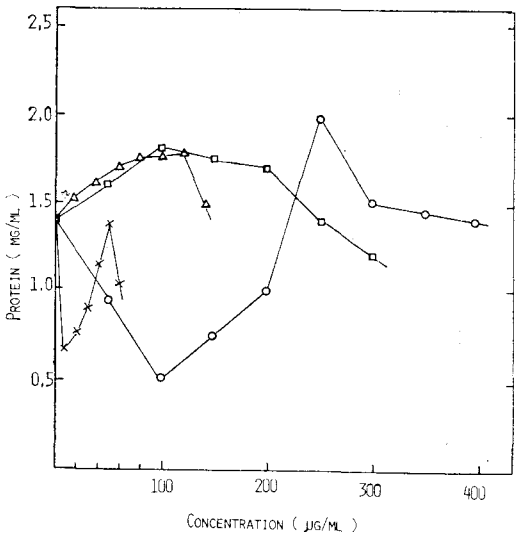

Fig. 6. Effect of various antibiotics concentration on the production of protein

—△—; penicillin, —□—; cefazolin, —○—; cephalexin, —×—; streptomycine.

에서 bacitracin을 50μg/ml 첨가 하였을때 9mg/ml의 단백질을 생산 하였고 기타 Cefazolin과 penicillin G 등도 효과가 있었다는 결과와 비교하여 볼 때 T-3균주의 항생물질에 대한 감수성이 매우 낮아 단백질 생산에 미치는 영향이 적은 것으로 생각된다.

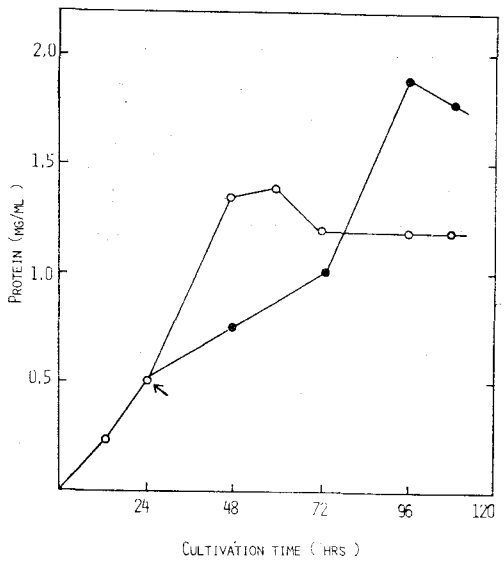

Fig. 7. Time course of the protein production

—●—●—; added cephalexin
—○—○—; without cephalexin

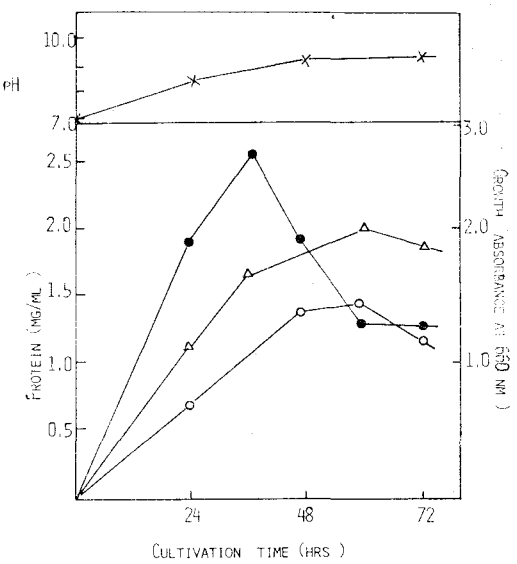

Fig. 8. Intra-, extracellular protein production and growth on cultivation time

—●—●—; intracellular protein
—○—○—; extracellular protein
—△—△—; growth

또한 cephalexin을 배양 24시간 후 가하여 배양시간에 따른 단백질 생산량을 검토한 결과 그림 7과 같이 cephalexin을 첨가하지 않았을때는 배양 60시간에 가장 높은 단백질 생산량을 보였으나 cephalexin을 첨가 하였을때는 96시간에 가장높은 단백질생산량을 나타내었다.

5) 배양시간에 따른 균체내, 외 단백질생산

Chemically defined medium에 T-3균주를 접종하여 배양시간에 따른 균체내, 외 단백질 생산량을 비교, 검토한 결과는 그림 8과 같다.

세포내 단백질은 배양 36시간에 가장 높은 단백질 생산량을 보인 후 급격히 감소 하였고 세포외 단백질은 배양 60시간에 가장 높은 1.4mg/ml의 단백질을 생산 하였으며 생육도 제일 좋았다. 이와같이 단백질 생산과 균 생육이 비례하는 것은 Tsuchida등[4]의 보고와 같이 nutrient rich medium에서는 함유되어 있는 아미노산에서 직접 단백질이 생산되나 chemically defined medium에서는 단백질 합성 이전에 아미노산과 같은 구성물질의 합성이 필요하기 때문인 것으로 생각된다.

초 록

미생물에 의한 단백질 생산과 그의 분비기작에

관한 기초 자료를. 얻고자 토양으로 부터 균체외 단백질 생산균주를 분리하고 동정한 결과 *Bacillus* sp.로 추정 되었다. 선정균주를 3.0%의 glucose와 1.3%의 urea를 첨가한 chemically defined medium에 접종하여 30°C에서 48시간 배양하였을때 1.2mg/ml의 단백질을 생산 하였고 $CaCO_3$의 첨가로 단백질 생산이 촉진 되었으며 250μg/ml의 cephalexin를 첨가하여 96시간 배양 하였을때 2.0 mg/ml의 단백질을 생산 하였다.

참고문헌

1. Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 40(3) : 523 (1976)
2. Akaki, M., Nakaseko, Y. and Yamada, T.: Agric. Biol. Chem., 42(12) : 2391(1978)
3. Shaku, M., Koike, S. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 44(10) : 99(1980)
4. Tsuchida, T., Miyashiro, S., Enei, H. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 44(10) : 2291 (1980)
5. Miyashiro, S., Enei, H., Hirose, Y. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 44(10) : 105 (1980)
6. 原每夫, 藤尾雄策, 上田誠之助 : 日本農化學會講演要旨集 : 3(1982)
7. 山崎眞狩, 田村學造 : 化學と生物, 21(10) : 649(1983)
8. 車賢晶, 金燦祚 : 한국농화학회지, 28(3) : 209 (1985)
9. 水島昭二 : 日本農化學會誌, 61(1) : 57(1987)
10. 依田幸司 : 日本農化學會誌, 61(1) : 60(1987)
11. 山根國男 : 日本農化學會誌, 61(1) : 64(1987)
12. 塚越規弘 : 日本農化學會誌, 61(1) : 68(1987)
13. 鵜高重三 : 日本農化學會誌, 61(6) : 669(1987)
14. Blobel, G. and Dobberstein, B.: J. Cell Biol., 67 : 835(1975)
15. Tsukagoshi, N., Yamada, H., Tsuboi, A. and Udaka, S.: Appl. and Envi. Microbiol.: 370(1981)
16. Yamada, H., Tsukagashi, N. and Udaka, S.: J. Bacteriol., 256 : 322(1981)
17. 山根國男 : 化學と生物, 21(10) : 659(1983)
18. Tagawa, M. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem. 44(8) : 1867(1980)
19. Miyashiro, S., Enei, H., Takinami, K., Hirose, Y., Tsuchida, T. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem. 44(10) : 2297(1980)
20. Haward, L.V., Dalton, D.D. and Mccouberg, W.K., JR.: J. Bacteriol., 257 : 748(1982)
21. Hussain, M., Ichihara, S. and Mizushima, S.: J. Bacteriol., 257(9) : 5177(1982)
22. Tsuboi, A., Uchihi, R., Tabata, R., Takahashi, Y., Hashiba, H., Sasaki, T., Yamagata, H., Tsukagoshi, N. and Udaka, S.: J. Bacteriol., 261 : 365(1986)
23. 水永武光 : 化學と生物, 20(11) : 742(1982)
24. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Faar, A.L. and Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193 : 265 (1951)
25. Gerhardt, Murray, Costilow, Nester, Wood, Krieg and Philips: Manual of Methods for General Bacteriology. ASM. p. 36 (1981)
26. Buchanan, R.E. and Gibbons, N. E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(8th ed.). Williams & Wilkins Co. p. 217(1974)