

## Bacillus sp. WY-60 이 생산한 균체외 단백질의 특성

권오진 · 박 신\*†

영남대학교 식품가공학과

\*대구대학교 농화학과

### Properties of the Extracellular Proteins Produced by *Bacillus* sp. WY-60

Oh-Jin Kwon and Shin Park\*†

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

\*Dept. of Agricultural Chemistry, Taegu University, Kyongsan 713-714, Korea

#### Abstract

Extracellular proteins of *Bacillus* sp. WY-60 were obtained, and then the properties of the isolated proteins were characterized. The proteins were composed of two kinds of protein in size. The molecular weight of the major protein was around 21,000 according to the gel filtration chromatography and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The amino acid composition showed that glutamic acid was a major amino acid with the concentration of 26.16mg/g. The isoelectric point of the proteins was about pH 7.5.

**Key words** : extracellular protein, *Bacillus* sp. WY-60

#### 서 론

급증하고 있는 인구로 말미암아 세계적으로 단백질 자원의 결핍이 심화되고 있으며 이에 대비하기 위해 폐섬유소 자원을 이용한 미생물의 균체단백질은 매우 유망한 단백질 자원으로 간주되고 있다. 그러나 폐섬유소 기질로 균체단백질을 생산할시 균체생산량이 적으며 생산단가가 높아 식량으로서의 이용은 아직 기초 단계이나 균체단백질만의 특수한 기능성과 혼합배양 등으로 생산성을 향상시킬 수 있는 방법을 개발한다면 해결되리라 생각된다. 한편 지금까지 균체의 단백질에 관한 연구는 주로 이들의 대량생산<sup>1-4</sup>과 분비기작<sup>5-9</sup>에 대한 연구가 진행되고 있고 생산성을 높이기 위한 연구는 아직 미진한 편이다. 균체외 단백질의 생산을 위해서는 우수한 균주, 즉, 간단한 조건하에서도 배양이 용이하고 증식 속도가 빠르며 단백질 함량이 높고 아미노산 조성이 양호하며 동시에 독성이 없는 균주를 찾아내어야 하고 이를 효율적으로 이용할 수 있는 방법도 모색되어야만 한다.

이에 본연구는 균체단백질의 생산성을 높이기 위한 일련의 연구중 그 일부로서 저자 등이 전보<sup>10</sup>에서 *Bacillus* sp. WY-60 균주를 분리하여 균체의 단백질의 분비조건을 보고한 바 있어 이 연구에서는 생산된 균체외 단백질의 특성에 관해 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 균체외 단백질의 생산

전보<sup>10</sup>의 균체외 단백질 최적생산조건(fructose 4.0%, polypeptone 1.0%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.005%, CaCO<sub>3</sub> 1.0%, pH 8.0, 온도 30 °C)에서 단백질을 생산하고 10% trichloroacetic acid (TCA)로 침전시켜 회수한 다음 이를 증류수로 24시간 투석하고 동결건조기로 건조시켜 얻은 단백질을 시료로 하였다.

##### Gel 여과

50mM 인산완충액(pH 7.2)에 Sephadex G-100을 현

†To whom all correspondence should be addressed

탁시킨 후 이를 유리컬럼(3.5×60cm)에 충전시킨 다음 1mg/ml의 시료 단백질용액을 주입하여 0.55ml/min으로 3ml씩 분취하고 이들의 흡광도를 280nm에서 측정하였다.

### 단백질의 전기영동

Weber와 Osborn<sup>11)</sup>의 방법에 따라 1% SDS와  $\beta$ -mercaptoethanol 및 10% glycerol 등이 함유되어 있는 tris-HCl 완충용액(pH 6.8)과 1mg/ml의 시료 단백질 용액을 등량혼합하여 10% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동하였다. 이를 0.1% coomassie brilliant blue R-250으로 실온에서 24시간 염색한 후 10% methanol이 함유된 7% 초산으로 탈색시켰다.

### 분자량 측정

여러 종류의 표준단백질과 시료단백질을 상기와 같이 전기영동한 후 각각의 상대 이동도를 계산한 다음, 이들을 반대수 그래프에 도록하여 분자량을 측정하였다.

### Infrared(IR) spectrum

IR spectrum(Perkin-Elmer IR-1330, USA)은 할로젠화 알칼리 정제법을 이용하여 시료단백 1mg을 KBr 100mg 분말과 잘 섞어 배합 후, 가압정제를 하여 측정하였다.

### 아미노산 조성

Mason 등<sup>12)</sup>의 방법을 참조하여 아미노산 분석은 5ml의 유리관에 20mg의 단백질을 넣어 6N 염산으로 24시간 동안 가수분해 시킨 후 분해액을 여과하여 40°C 이하에서 rotary evaporator를 사용하여 염산을 완전히 증발시킨 다음 10ml sodium citrate buffer에 용해하여

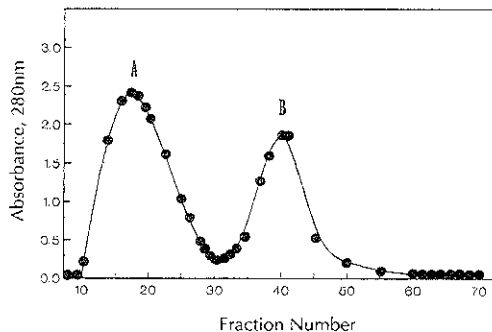


Fig. 1. Sephadex G-100 filtration chromatogram of the protein produced by *Bacillus* sp. WY-60.

이의 40 $\mu$ l를 아미노산 자동분석기(LKB 4150 Alpha plus amino acid analyzer, England)에 주입하여 분석하였다.

### pH에 따른 용해도

각 pH별 증류수에 시료단백질을 순차적으로 용해시킨 후, 상등액 중의 단백질 함량을 Lowry법<sup>13)</sup>으로 측정하여 pH에 따른 용해도를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 단백질의 gel여과

*Bacillus* sp.가 생산한 균체의 단백질의 분자량은 주로 10만 이하로 보고<sup>14)</sup>된 바 있어 본 실험에서는 Sephadex G-100을 사용하여 *Bacillus* sp. WY-60으로부터 생산된 단백질을 gel 여과하였다. 그 결과는 Fig. 1에서 보는바와 같이 2개의 peak로 나타나 이 단백질은 A, B 두종의 단백질로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

### 전기영동 및 분자량

A, B 두종의 단백질 중 그양이 많은 주된 A fraction의 단백질 분자량을 측정하기 위해 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시한 결과(Fig. 2), 단일 밴드가 관찰되어 이것을 반대수 그래프를 이용하여 분자량을 산출한 결과, Fig. 3과 같이 약 21,000으로 나타나 이 등<sup>14)</sup>이 *Bacillus* sp.가 생산한 단백질의 분자량이 49,000 이라고 보고한 것과 비교해 볼때 매우 낮았다.

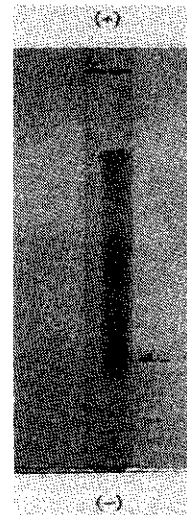


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the protein produced by *Bacillus* sp. WY-6.

IR spectrum

시료 단백질이 구성하는 아미노산의 관능기를 보기 위하여 적외선 spectrum을 조사한 결과, Fig. 4와 같이 -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH 등의 관능기들이 검출되었다.

아미노산 조성

단백질의 아미노산을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Glutamic acid가 26.16mg/g으로 가장 많았고 aspartic acid, leucine 등도 많이 함유하고 있었고 cystine, methionine 등의 함량 아미노산의 함량은 적었다. 또

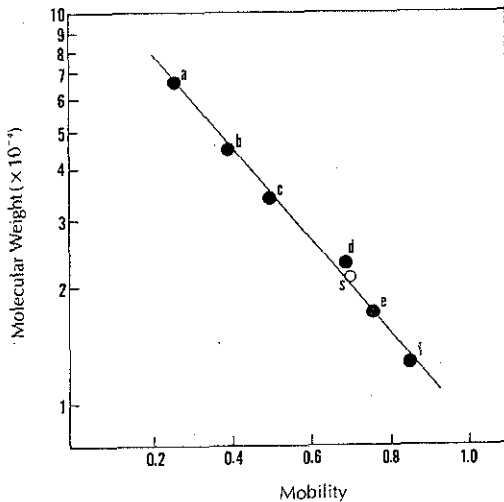


Fig. 3. Determination of molecular weight by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the protein produced from *Bacillus sp. WY-60*.

a ; Bovine serum albumin(66,000), b ; Egg albumin (45,000), c ; Pepsin (34,700), d ; Trypsinogen (24,000), e ;  $\beta$ -Lactoglobulin (18,400), f ; Lysozyme (14,300), s ; Sample

한 균체의 단백질의 제한 아미노산으로는 methionine으로 나타났으며 분석상 tryptophan은 측정할 수 없어 비교할 수 없었지만 비교적 필수아미노산의 함량이 다른 아미노산의 함량보다 높아 단백질원으로서의 영양학적 가치가 있다고 할 수 있겠다. 이와 같은 결과는 Miyashiro 등<sup>7)</sup>의 보고와 유사하였고 FAO 표준단백질<sup>15)</sup>의 필수아미노산의 함량과도 거의 비슷한 수준이었다.

pH에 따른 용해도

*Bacillus sp. WY-60*이 생성하는 균체의 단백질의 등전점은 용해도가 가장 낮은 pH 7.5부근으로 추정되며 산성에서 보다 알칼리성에서 용해도가 더욱 높은 경향을 보였다(Fig. 5).

Table 1. Amino acid composition of the protein produced by *Bacillus sp. WY-60*

Amino acid	Content(mg/g)
Aspartic acid	18.19
Threonine*	10.56
Serine	9.34
Glutamic acid	26.16
Proline	9.12
Glycine	9.58
Alanine	12.05
Cystine	trace
Valine*	14.51
Methionine*	0.98
Isoleucine*	10.55
Leucine*	17.61
Tyrosine	10.09
Phenylalanine*	12.68
Histidine	6.50
Lysine*	10.67
Arginine	6.54

\*Essential amino acid

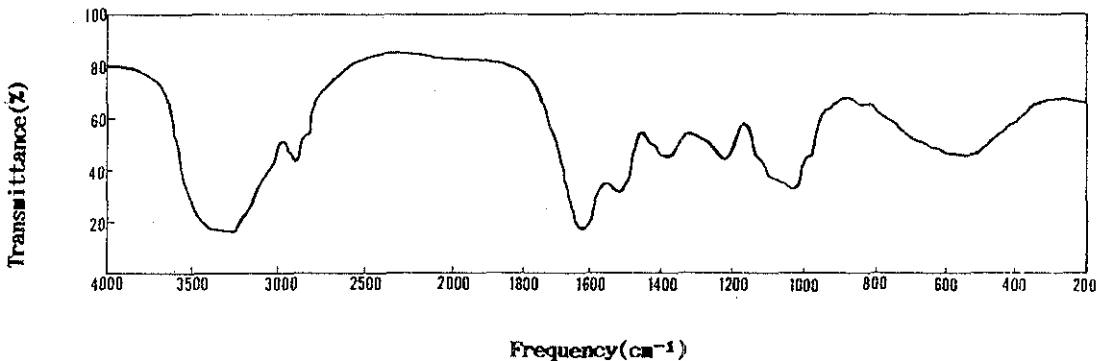


Fig. 4. Infrared spectrum of the protein produced by *Bacillus sp. WY-60*.  
(3400 : -OH, 3260 : -NH<sub>2</sub>, 2900 : -CH, 1620 : -COOH, 1030 : C-C)

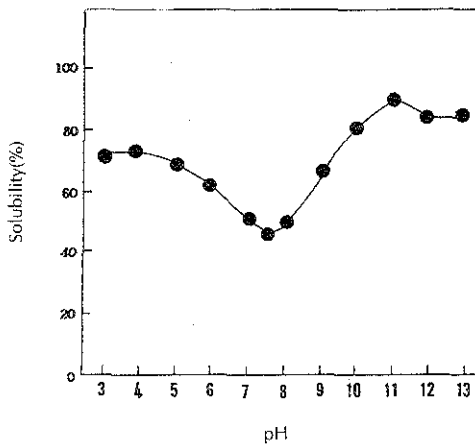


Fig. 5. Effect of pH on solubility of the protein produced by *Bacillus* sp. WY-60.

## 요 약

*Bacillus* sp. WY-60이 생산한 균체의 단백질의 특성 및 아미노산 조성을 조사하였다. 균체의 단백질을 gel 여과한 결과, 분자량이 비슷한 2종의 단백질로 구성되어 있었고 주 단백질의 분자량을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 확인한 결과, 약 21,000으로 나타났다. 아미노산 중 glutamic acid가 26.16mg/g으로 가장 많이 함유되어 있었다. 또한 균체의 단백질의 등전점은 pH 7.5 부근이었고 알칼리쪽에서 용해도가 더 높았다.

## 문 헌

1. Udaka, S. : Extracellular production of proteins by microorganisms. I. Screening for protein producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, **40**(3), 523 (1976)
2. Shaku, M., Koike, S. and Udaka, S. : Cultural conditions for protein production by *Bacillus brevis* No. 47. *Agric. Biol. Chem.*, **44**(1), 99 (1980)
3. Tsuchida, T., Miyashiro S., Enei, H. and Udaka, S. : Protein production in chemically defined medium by *Bacillus brevis* No. 47. *Agric. Biol. Chem.*, **44**(10), 2291 (1980)
4. Miyashiro, S., Enei, H., Hirose, Y. and Udaka, S. : Effect of glycine and L-isoleucine on protein production by *Bacillus brevis* No. 47. *Agric. Biol. Chem.*, **44**(1), 105 (1980)
5. Tsukagoshi, N., Yamada, H., Tsuboi, A. and Udaka, S. : Effects of phosphate in medium on protein secretion in a protein-producing bacterium, *Bacillus brevis* 47. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**(2), 370 (1981)
6. Yamada, H., Tsukagoshi, N. and Udaka, S. : Morphological alterations of cell wall concomitant with protein release in a protein-producing bacterium, *Bacillus brevis* 47. *J. Bacteriol.*, **256**, 322 (1981)
7. Miyashiro, S., Enei, H., Takinami, K., Hirose, Y., Tsuchida, T. and Udaka, S. : Stimulatory effect of inhibitors of cell wall synthesis on protein production by *Bacillus brevis*. *Agric. Biol. Chem.*, **44**(10), 2297 (1980)
8. 山根國男 : 化學と生物. **21**(10), 659 (1983)
9. Ohmlzu, H., Sasaki, T., Tsukagoshi, N., Udaka, S., Kaneda, N. and Yagi, K. : Major proteins released by a protein-producing bacterium, *Bacillus brevis* 47, are derived from cell wall protein. *J. Biochem.*, **94**, 1077 (1983)
10. 박신, 권오진 : *Bacillus* sp. WY-60에 의한 균체의 단백질의 분비조건. *한국농화학회지*, **36**(1), 11 (1993)
11. Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determination sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**(16), 4406 (1969)
12. Mason, V. C., Anderson, S. B. and Rodemo, M. : Proc. 3rd FAAP Symp. on protein metabolism and nutrition, Vol. 1 (1980)
13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
14. 이재숙, 김찬조, 이종수 : *Bacillus* sp. T2-3가 생산한 균체의 단백질의 성질. *한국농화학회지*, **31**(2), 187 (1988)
15. FAO/UN : Report of joint FAO/WHO Expert Group on Protein Requirements FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 37 (1973)

(1993년 9월 10일 접수)