

Bacillus sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 세포벽과 세포막에 미치는 pH의 영향

심창환¹ · 정용준² · 신원철*

¹경민전문대학 식품영양과, ²전주대학교 미생물학과,
*강원대학교 발효공학과 및 생물산업소재연구센터

Effect of pH on the Cell Wall and Cell Membrane of *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M

Chang-Whan Shim¹, Yong-Joon Chung² and Won-Cheol Shin*

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

²Department of Microbiology, Jeonju University, Chonju 560-759, Korea

*Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University
and Bioproducts Research Center, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — Using the alkalophilic *Bacillus* sp. SH-8 and its mutant *Bacillus* sp. SH-8M capable of growing at the neutral pH, the amino acid compositions of the cell wall and cell membrane were studied at varying cultivation pH's. The pattern of protein electrophoresis was also tested. It was elucidated that the amino acids consisting of the cell wall were alanine, glutamic acid, lysine, aspartic acid, and meso-diaminopimelic acid. There was not any significant difference in the amino acid composition between two strains regardless of the culture pH. As the results of HPLC assay, glutamic acid and aspartic acid accounted for more than 50% in the amino acid composition of the cell wall. By the isolation of the crude cell membrane and the SDS-PAGE analysis, it was found that there was a considerable difference in the protein pattern when the strains were cultured at the neutral pH. In addition, by the two dimensional gel electrophoresis, it was confirmed that there was a difference in the protein pattern between two strains cultivated at the neutral pH medium, but no difference at the alkaline medium.

Ikura와 Horikoshi(1)는 호알칼리성 *Bacillus* No. C-125와 *Bacillus* No. A-59의 세포벽 구성 성분의 아미노산 함량을 검토한 결과, *Bacillus* No. C-125는 pH 7.5와 10.3에서 생육시켰을 때 배지의 pH에 관계 없이 세포벽 성분 중 ninhydrin 양성물질의 약 70%가 glutamic acid이었고 *Bacillus* No. A-59는 약 70~80%가 glutamic acid와 aspartic acid이었다고 보고하였다. Aono 등(2, 3)은 호알칼리성 *Bacillus* spp.에서 pH의 변화에 따라 peptidoglycan의 조성은 변하지 않았으나 그 구성 아미노산은 대부분이 산성 아미노산이라고 보고하였다. 이와 같이 세포벽 성분 중 산성 아미노산의 함량이 높은 것은 호알칼리성 *Bacillus*의 특징으로 알려져 있다.

또한 Koyama 등(4)은 호알칼리성 *Bacillus* YN-2를

pH 10.2와 7.5에서 생육시켰을 때, SDS polyacrylamide gel 전기영동 상에서 membrane protein에 차이가 있음을 확인하였고 호알칼리성 *Bacillus* YN-2의 안정성에 membrane protein이 관련되어 있다는 가능성을 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 전보에서(5) 분리된 호알칼리성 *Bacillus* sp. SH-8과 중성에서 생육 가능한 변이주 *Bacillus* sp. SH-8M을 이용하여 생육 pH 변화에 따른 세포벽 중의 아미노산 분석과 crude cell membrane의 전기영동 분석을 행하여 생육 pH 변화에 따른 차이점을 검토하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용한 균주는 심 등(5)이 토양으로부터 분리, 동정한 호알칼리성 *Bacillus* sp. SH-8과 중성

Key words: Alkalophilic, *Bacillus* sp., pH change, cell wall, cell membrane

*Corresponding author

생육이 가능한 변이주인 *Bacillus* sp. SH-8M을 사용하였다.

배지

Horikoshi와 Akiba(6)의 배지(glucose 10 g, peptone 5 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 1 liter)를 사용하였으며 실험 목적에 따라 Na_2CO_3 의 농도를 달리하여 배지의 초기 pH를 조절하였다. 균주의 배양은 알칼리성 액체 배지(pH 10.2)에 균을 접종하여 30°C에서 하룻밤 진탕배양시킨 종균 배양액을 실험 목적에 따라 초기 pH를 조절한 새로운 배지에 0.5% (v/v) 접종하여 30°C에서 진탕배양하였다.

세포벽의 분리 및 분석

분리 균주와 변이주의 종균 배양액을 새로운 알칼리성(pH 10.2) 및 중성(pH 7.7) 액체배지 300 ml에 0.5%(v/v) 되게 접종하여 O.D.₅₅₀가 1.0이 될 때까지 30°C에서 진탕배양하였다. 배양액을 4°C, 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻어진 균체를 사용하여 일반적인 미생물의 세포벽 분리 방법(7)으로 분리 균주와 변이주의 세포벽을 분리하였다.

분리된 세포벽 중의 아미노산 성분과 조성을 알아보기 위하여 세포벽 용액에 6 N 농도로 HCl을 가하고 밀봉하여 110°C에서 24시간 동안 가수분해를 행하였다. 가수분해 후 시료를 Whatman No. 2 여과지로 여과하고 여액을 회전 진공 증발기로 농축하였다. 소량의 증류수를 가하여 용해하고 다시 농축하는 과정을 두번 반복하여 얻은 시료를 다시 소량의 증류수에 용해하여 microcentrifuge tube에 옮겨 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 분석 시료로 사용하였다.

TLC 분석에는 cellulose F TLC plate(Merck Co.)를 사용하여 methanol : water : 10 N HCl : pyridine (80 : 17.5 : 2.5 : 10, v/v)의 용매로 전개시켰다. 각각의 아미노산의 위치를 0.1% ninhydrin 용액으로 분무하여 표준 아미노산과의 R_f치를 비교 확인하였다.

HPLC(amino acid conversion kit II, Waters Co.)에 의한 아미노산 분석은 amino acid analysis column (Waters Co.)을 사용하여 행하였다. 용매로는 A 용매(sodium citrate 19.6 g, phenol 1 g per liter, pH 3.05)와 B 용매(boric acid 1.5 g, sodium nitrate 21 g per liter, pH 9.6)를 사용하였고 solvent gradient를 형성시키면서 유속을 분당 0.4 ml로 하였다. Fluorescence detector(Waters 420)를 사용하여 표준 아미노산과의 용출 시간을 비교하여 분석하였으며 각각의 구성 아미노산의 조성(%)은 면적비에 따라 구하였다(8).

Crude cell membrane의 분리 및 acetone 분획

Crude cell membrane의 분리는 분리 균주와 변이주의 종균 배양액을 새로운 알칼리성(pH 10.2) 및 중성(pH 7.7) 액체 배지 100 ml에 0.5%(v/v)되게 접종하여 O.D.₅₅₀가 1.0 될 때까지 30°C에서 진탕배양한 후 Inouye와 Guthrie(9), Gudas와 Pardee(10)의 방법에 따라 행하였다.

Acetone 분획은 crude cell membrane 용액에 cold acetone을 최종 20%에서 95%(v/v)까지 농도를 높여 가면서 얼음물 수조에서 2시간씩 정치하여 각각의 acetone 농도에서 침전되는 crude cell membrane을 4°C, 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻었다.

전기영동

SDS polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli와 Favre(11)의 방법에 따라 12.5%의 gel을 사용하였다. 전기영동 후 gel을 Coomassie brilliant blue로 염색하고 Fairbanks 등(12)의 방법에 따라 탈색 후 단백질 band를 확인하였다.

2차원 전기영동은 O'Farrell의 방법(13)에 따라 isoelectric focusing gel을 사용하여 1차원 전기영동을 행한 후 다시 SDS polyacrylamide gel을 사용하여 2차원 전기영동을 행하였다.

결과 및 고찰

세포벽 중의 아미노산 분석

TLC에 의한 세포벽의 아미노산 분석 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 세포벽 중의 아미노산 성분과 조성에 대한 TLC 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 두 균주 모두 배지의 초기 pH에 관계없이 세포벽을 구성하는 아미노산이 alanine, glutamic acid, lysine, aspartic acid 및 meso-diaminopimelic acid(meso-DAP)로 차이가 없다는 것을 알 수 있었다.

Ikura와 Horikoshi(1)도 호알칼리성 *Bacillus* No. C-125의 세포벽에 관한 실험에서 pH 10.3과 7.5로 하여 생육시켰을 때 세포벽 중의 아미노산은 aspartic acid, glutamic acid, glycine, alanine, diaminopimelic acid 및 lysine으로 배지의 pH에 관계없이 그 구성 아미노산 성분이 같다고 보고하였는데 이와 같은 결과와 잘 일치하였다.

HPLC에 의한 세포벽의 아미노산 분석 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 세포벽 구성 아미노산의 함량을 HPLC로 검토한 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 중성(pH 7.7)과 알칼리성(pH 10.2) 배지에서 생육시켰을 때 두 균주 모두 세포벽을 구성

하는 아미노산의 약 50%가 산성 아미노산인 glutamic acid와 aspartic acid이었다. 따라서 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M도 Ikura와 Horikoshi(1), Aono 등(3)이 언급한 호알칼리성 *Bacillus*의 세포벽에 산성 아미노산의 함량이 높다는 것과 잘 일치하였다.

또한 본 실험에 사용한 두 균주를 중성에서 배양할 경우 세포벽을 구성하는 각각의 아미노산에 대한 함량에 있어서 서로 큰 차이가 없는 것으로 보아 심등(14)이 보고한 중성 배지에서의 *Bacillus* sp. SH-8과

Bacillus sp. SH-8M의 생육의 차이는 세포벽 아미노산 함량과는 관계가 없는 것으로 판단되었다.

Crude cell membrane의 분석

Crude cell membrane의 전기영동 Crude cell membrane의 SDS polyacrylamide gel 전기영동을 행한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 알칼리성 배지(pH 10.2)에서 생육시켰을 때 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 전기영동 pattern에는 뚜렷한 차이가 없었으나, 중성 배지(pH 7.7)에서 생육시킨 경우에는 중간 부분(← 표시)에서 membrane protein의 band pattern에 차이가 있음을 확인하였다.

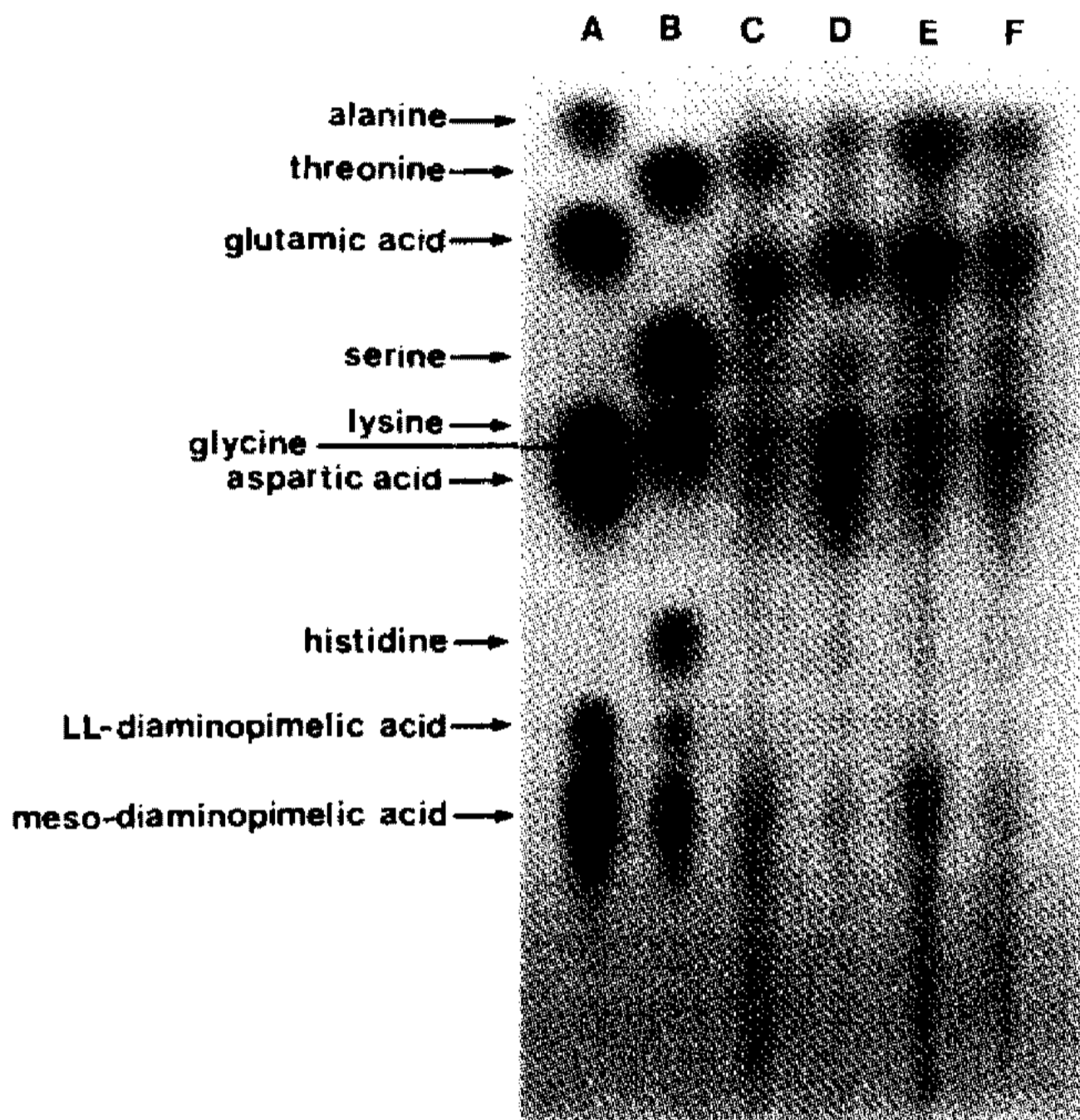


Fig. 1. Thin layer chromatogram of amino acids in the cell wall of *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M grown at the initial pH 10.2 and pH 7.7.

- A: standard amino acids; alanine, glutamic acid, lysine, aspartic acid, diaminopimelic acid
- B: standard amino acids; threonine, serine, histidine, diaminopimelic acid
- C: pH 10.2, *Bacillus* sp. SH-8
- D: pH 7.7, *Bacillus* sp. SH-8
- E: pH 10.2, *Bacillus* sp. SH-8M
- F: pH 7.7, *Bacillus* sp. SH-8M

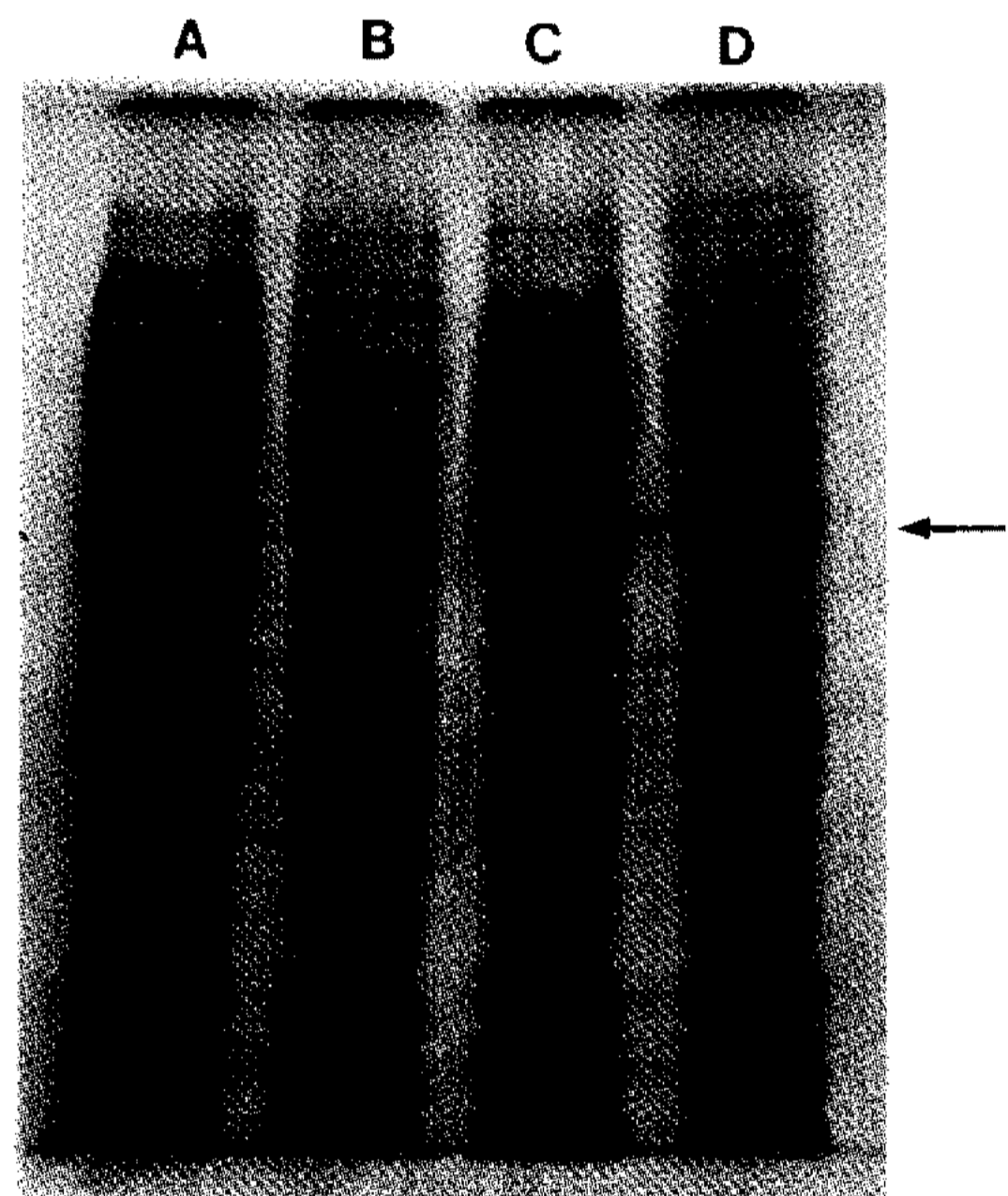


Fig. 2. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of the crude membrane protein of *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M grown at the initial pH 10.2 and pH 7.7.

- A: pH 10.2, *Bacillus* sp. SH-8
- B: pH 7.7, *Bacillus* sp. SH-8
- C: pH 10.2, *Bacillus* sp. SH-8M
- D: pH 7.7, *Bacillus* sp. SH-8M

Table 1. Amino acid compositions of the cell wall of *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M by the analysis of HPLC

Amino acid	Composition (%)			
	<i>Bacillus</i> sp. SH-8		<i>Bacillus</i> sp. SH-8M	
	pH 10.2	pH 7.7	pH 10.2	pH 7.7
Aspartic acid	5.28	19.12	7.45	12.64
Glutamic acid	47.93	35.34	45.89	39.99
Alanine	33.81	21.32	29.61	26.52
meso-Diaminopimelic acid	5.54	2.41	4.79	3.16
Lysine	7.44	21.82	12.26	17.68

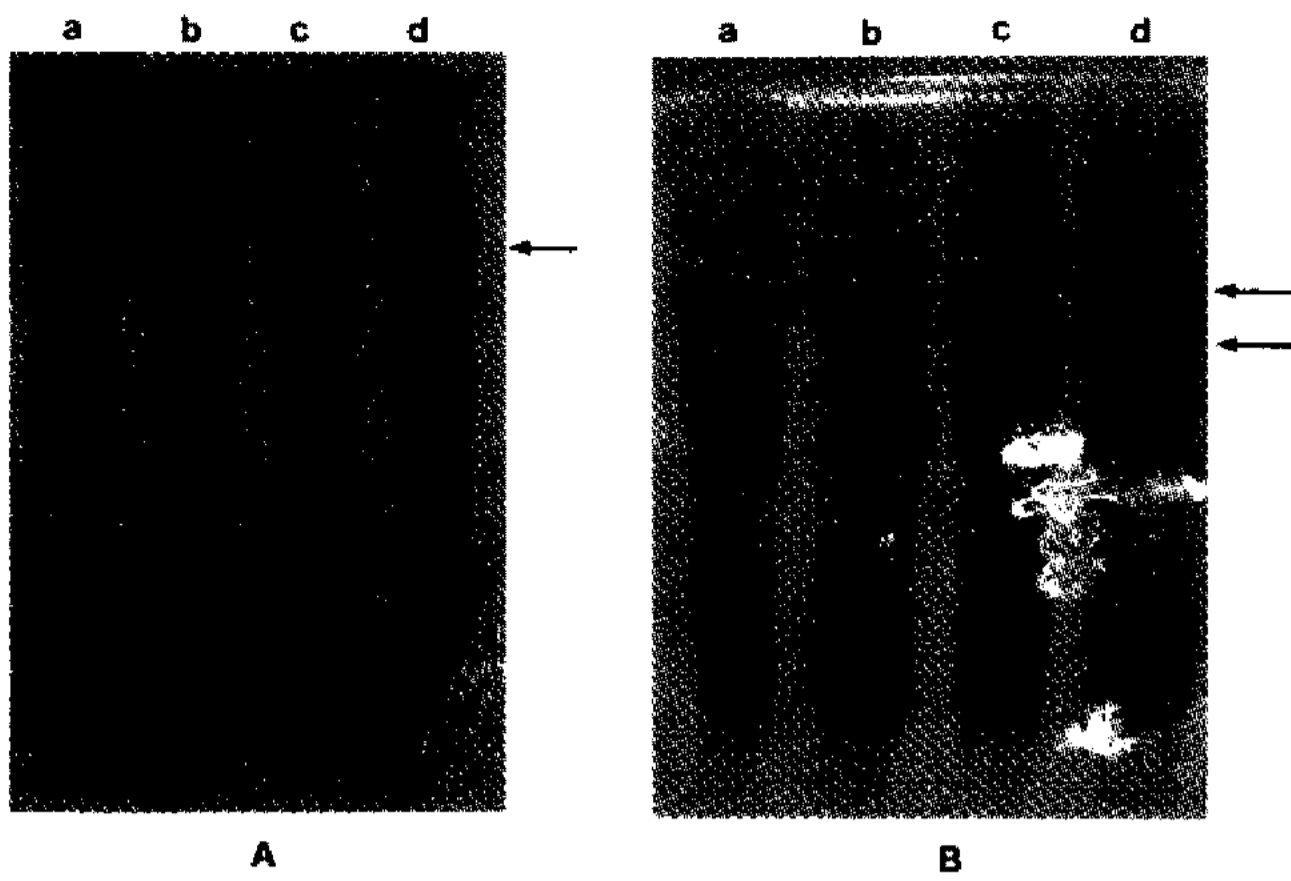


Fig. 3. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of the crude membrane protein of *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M grown at the initial pH 10.2 and pH 7.7 after acetone fractionation.

A: 40% acetone fraction, B: 60% acetone fraction
 a: pH 10.2, *Bacillus* sp. SH-8, b: pH 7.7, *Bacillus* sp. SH-8, c: pH 10.2, *Bacillus* sp. SH-8M, d: pH 7.7, *Bacillus* sp. SH-8M

Crude cell membrane의 acetone 분획 후 전기영동 Crude cell membrane을 cold acetone을 사용하여 분획한 후 SDS polyacrylamide gel 전기영동을 행한 결과는 Fig. 3과 같다. 40% acetone 분획의 경우 중성 배지(pH 7.7)에서 생육시킨 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 band pattern에 차이가 있었으며(← 표시), 또한 60% acetone 분획에서도 중성 배지에서 생육시킨 두 균주의 band pattern에 차이가 있었고 그 중의 한 곳은 40% acetone 분획에서 확인된 동일 위치에서 나타났다.

Crude cell membrane의 2차원 전기영동 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 crude cell membrane의 60% acetone 분획을 isoelectric focusing gel을 사용하여 1차원 전기영동을 행한 후, 다시 SDS polyacrylamide gel을 사용하여 2차원 전기영동을 행한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M을 알칼리성 배지(pH 10.2)와 중성

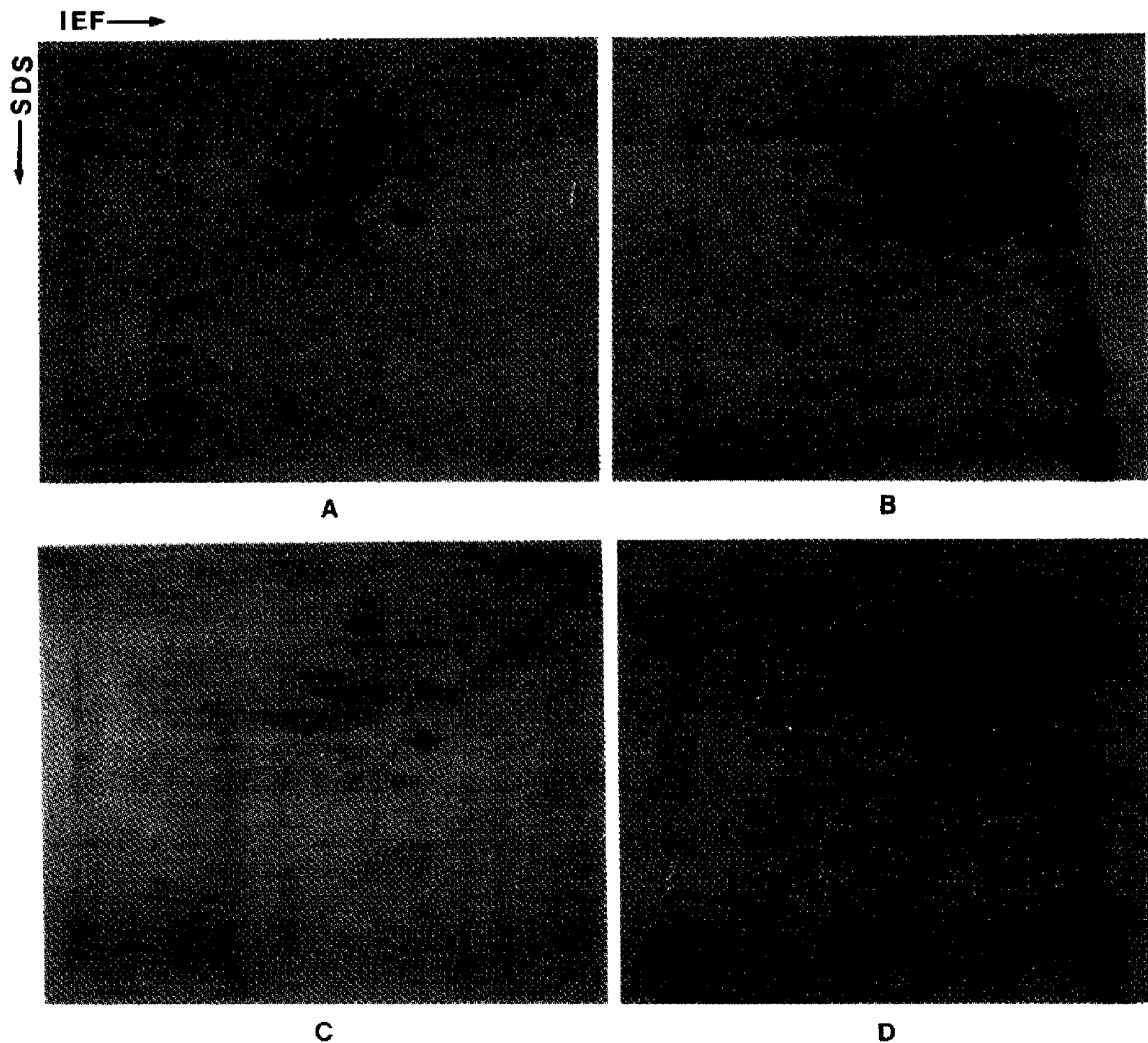


Fig. 4. Two dimensional gel electrophoresis of the crude membrane protein of *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M grown at the initial pH 10.2 and pH 7.7 after 60% acetone fractionation.

A: pH 10.2, *Bacillus* sp. SH-8, B: pH 7.7, *Bacillus* sp. SH-8, C: pH 10.2, *Bacillus* sp. SH-8M, D: pH 7.7, *Bacillus* sp. SH-8M

참고문헌

배지(pH 7.7)에서 생육시켰을 때 두 균주 모두 배지의 pH에 따라 membrane protein의 전기영동 pattern에 큰 차이를 나타내어 cell membrane을 구성하는 protein의 성분은 배지의 pH에 따라 다르다는 것을 알 수 있었다. 한편, 알칼리성 배지에서 생육시켰을 때 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 전기영동 pattern(Fig. 4의 A, C)은 서로 커다란 차이점을 발견할 수 없었다. 그러나, 중성 배지에서 생육시키면 두 균주의 전기영동 pattern(Fig. 4의 B, D)은 여러 부분에서 차이가 있음을 확인하였다. Membrane에 존재하는 단백질에는 구성 단백질 뿐만 아니라 세포가 외부로부터 영양분을 흡수하기 위해 필요한 active transport system에 관여하는 단백질이나 세포의 respiratory chain에 연관되어 있는 단백질 등과 같은 기능성 단백질이 존재한다고 알려져 있다(15).

따라서 본 실험에서 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 cell membrane protein 중 중성 배지에서 차이가 나는 단백질(Fig. 4의 D)이 구성 단백질인지 기능성 단백질인지에 대해서는 더욱 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

토양에서 분리한 호알칼리성 *Bacillus* sp. SH-8과 중성에서 생육이 가능한 변이주 *Bacillus* sp. SH-8M을 중성(pH 7.7) 및 알칼리성(pH 10.2) 배지에서 생육시키면서 각각의 세포벽과 세포막을 분석, 비교하였다. 그 결과 두 균주 모두 배지의 초기 pH에 관계없이 세포벽을 구성하는 아미노산이 alanine, glutamic acid, lysine, aspartic acid 및 meso-diaminopimelic acid로 성분이나 함량에 큰 차이가 없었으며, 산성 아미노산인 glutamic acid와 aspartic acid가 약 50% 정도 존재하였다.

Crude cell membrane을 SDS polyacrylamide gel 1차원 전기영동을 행한 결과, 알칼리성 배지에서 생육시켰을 때 두 균주의 전기영동 pattern에 차이가 있음을 확인하였다. Crude cell membrane을 acetone으로 분획 후 2차원 전기영동을 행한 결과, 두 균주 모두 배지의 초기 pH에 따라 세포막의 전기영동 pattern에 큰 차이를 나타내어 세포막을 구성하는 단백질 성분은 배지의 pH에 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 한편, 알칼리성 배지에서 생육시켰을 때 두 균주의 전기영동 pattern에는 차이점이 없었으나, 중성 배지에서 생육시키면 여러 부분에 차이가 있음을 확인하였다.

- Ikura Y. and K. Horikoshi. 1983. Studies on cell wall of alkalophilic *Bacillus*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 681-686.
- Aono, R., K. Horikoshi, and S. Goto. 1984. Composition of the peptidoglycan of alkalophilic *Bacillus* spp. *J. Bacteriol.* **157**: 688-689.
- Aono, R., M. Ito, and K. Horikoshi. 1993. Occurrence of teichuronopeptide in cell walls of group 2 alkaliphilic *Bacillus* spp. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2739-2744.
- Koyama N., H. Takinishi, and Y. Nosoh. 1983. A possible relation of membrane proteins to the alkalostability of a facultatively alkalophilic *Bacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **16**: 213-216.
- 심창환, 신원철, 유주현. 1991. 호알칼리성 미생물의 분리, 동정 및 중성에서 생육 가능한 변이주의 분리. *한국산업미생물학회지* **19**: 543-547.
- Horikoshi, K. and T. Akiba. 1982. *Alkalophilic microorganisms*, Pp. 35-37. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips. 1981. *Manual of methods for general bacteriology*, Pp. 346-347. American Society for Microbiology, Washington.
- Boyer, R.F. 1986. *Modern Experimental Biochemistry*, Pp. 73-75. Addison-Wesley Publishing Company, Inc., U.S.A.
- Inouye, M. and J.P. Guthrie. 1969. A mutation which changes a membrane protein of *E. coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **64**: 957-961.
- Gudas, L.J. and B. Pardee. 1976. DNA synthesis inhibition and the induction of protein X in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **101**: 459-477.
- Laemmli, U.K. and M. Favre. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **80**: 575-599.
- Fairbanks, G., T.L. Steck, and D.F.H. Wallach. 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**: 2606-2617.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- 심창환, 신원철, 유주현. 1992. *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 생육 및 배양 특성에 미치는 pH의 영향. *한국산업미생물학회지* **20**: 371-376.
- Brock, T.D. 1979. *Biology of microorganisms*, Pp. 171-173. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.

(Received 14 November 1994)