

배양조건이 *Bacillus subtilis* 융합주의 γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GTP) 활성에 미치는 영향

김관필[†] · 김성호* · 정낙현**

롯데 중앙연구소

[†]경북과학기술대학 전통식품연구소

**가톨릭 상지대학 식품영양과

Cultural Characteristics on the Activity of γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GTP) by *Bacillus subtilis* Fusant

Kwan-Pil Kim[†], Seong-Iho Kim* and Nack-Hyun Cheong**

Lotte Group R&D Center, Seoul 150-104, Korea

[†]Traditional Food Traditional Food Institute of Kyongbuk College of Science, Chilgok 718-851, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Catholic Sangji College, Andong 760-070, Korea

Abstract

A fusant FG-21 was selected on the basis of higher γ -GTP activity following fusion process between SM-2 and SM-10 of *Bacillus subtilis* mutants. γ -GTP activity of the mutant FG-21 was increased up to 612 U/mL when grown for 36 hr at 37°C in culture media containing 1% glycerol, 1% peptone, 0.1% citric acid, 5 mM K₂HPO₄, 1 mM FeCl₃, 1 mM MgCl₂, 1 mM NH₄Cl, pH 7.0. In fusant FG-21, the ratio of protein to total sugar contents for biopolymer A was 38 to 59. For biopolymer B from parental strains it was 19 to 78. Fructose contents determined by HPLC were 573.7 μ g/mg and 764.4 μ g/mg for biopolymer A and B, respectively. And glutamic acid contents were 163.7 μ g/g and 94.6 μ g/g for biopolymer A and B, respectively. In fusant FG-21, the ratio of fructose to glutamic acid contents for biopolymer A was 78 to 22. For biopolymer B from parental strains it was 89 to 11.

Key words: *Bacillus subtilis*, fusion, biopolymer, PGA (polyglutamic acid), γ -GTP (γ -glutamylpolypeptidase)

서 론

Polyglutamic acid(이하, PGA)는 homopolypeptide성 물질로서 1937년 *Bacillus anthracis*의 혐막성분으로 처음 발견되었다. *Bacillus*속 중 *B. anthracis*, *B. megaterium* 등에서는 액체배양시 세포의 생산물로서 혐막의 구성성분으로 존재하나 *B. subtilis*와 그 변이주에 의해서는 세포외로 PGA를 생산하는 것으로 알려져 있다. 대개 *B. anthracis*의 PGA 구성 성분은 D-glutamic acid로만 구성되어있는 물질이지만 *B. subtilis*와 *B. megaterium* 균주가 생산하는 PGA 성분은 D-체와 L-체의 glutamic acid가 혼합되어 존재한다고 보고되어 있다(1,2). 특히, *B. subtilis*에서 생산되는 PGA에 대한 연구가 지속적으로 진행되어서 배지의 조성을 변화시켜 대량 배양을 위한 배양상의 특징이 조사되었다(2,3). PGA생산물 배양 배지내 K⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺, PO₄³⁻ 등의 무기염 이온인자들은 PGA의 생산과 D-, L- 구성체의 비율에 큰 영향을 미치는 것이 알려져 있다(4). 미생물에 의해 생산되는 PGA

의 glutamic acid의 형태는 γ -결합의 형태로서 이들 γ -결합에 γ -glutamylpolypeptidase(이하, γ -GTP)라는 효소가 관여하는 것으로 알려져 있다(3). γ -GTP는 2가지 종류로 존재하는데 첫번째는 glutamine에서 각종 amine으로 γ -glutamyl기를 전이해주는 효소이고 두번째는 glutathione의 γ -glutamyl기를 아미노산이나 peptide로 전이해주는 효소이다(4). 그러나, PGA의 -glutamyl기의 전이는 γ -D-glutamyl-D,L-glutamic acid의 생합성에 관여하는 transpeptidase가 촉매하는 것으로 알려져 있다. 이 효소는 D-, L-glutamine의 가수분해, glutamine과 glutamic acid사이의 transamidation 또는 γ -D-glutamyl-D,L-glutamic acid의 transpeptidation에 관여하는 효소로 알려져 있다(2,5-7). PGA의 응용학적 측면에서 현재까지 알려진 바로는 식세포 방어작용, 항원성 물질, 혈장 증량제 등에 대한 응용이 보고되고 있다(2,4). 최근에는 환경친화성 물질에 대한 관심과 환경오염에 대한 규제 및 환경 친화성물질로서 plastic을 대체할 수 있는 biodegradable polymer로서 PGA에 대한 이용성 연구가 행해지고 있다(8).

[†]Corresponding author. E mail: kpkim@lotte.re.kr

Phone 82-2-670-6550, Fax: 82-2-634-6184

미생물을 이용한 유용물질의 생산에서 발효의 효율성을 높이는 데 가장 근본적인 일은 발효에 관여하는 우수 미생물의 분리와 생산성 향상과 품질개선을 위한 균주의 개량 및 육종이 이루어져야 한다. 이러한 미생물의 개량과 육종에는 돌연변이주의 획득, 유전자 조작에 의한 DNA 재조합, 형질 접합, 형질도입, 세포융합 등의 방법이 널리 이용되고 있다(9). 그중 세포융합기술은 유전 교환계가 알려지지 않은 미생물 세포 등에 널리 이용되고 있다. 특히 세포융합은 조작이 간단하고 재조합 균주의 출현빈도가 높으며, 물리화학적 조작에 의한 숙 등의 구별 없이 융합이 가능하다는 장점이 있다(10-12). Kao와 Michayluk(10)이 식물세포 원형질체에 polyethyleneglycol(PEG)과 CaCl₂를 가하면 융합체가 생긴다고 보고한 이후, 이러한 기법이 fungi, 효모(13)뿐 아니라 1976년 이후 세균분야에 *Bacillus*속(11,12), *Brevibacterium*속(14,15), *Streptomyces*속(16), 그리고 그람음성균(17)에도 널리 응용되었다. 이러한 세포융합법을 이용한 발효생산에 적용한 예를 보면 *Streptomyces*속을 이용한 항생물질 생산(16), 아미노산 생산(14,15), amylase 생산(11), cellulase 생산(18,19) 등 다양한 발효공업에 이용되고 있다.

최근에 다당류 등의 biopolymer의 화학적 구조 및 물리화학적 특성에 관한 기존연구와 더불어 alginate, xanthan gum 등의 다당류를 생산하는 미생물의 유전자 조작에 의한 수율을 높이는 연구와 독특한 기능을 가진 biopolymer를 생산하는 미생물의 균주 개발 연구가 이루어지고 있다(20,21). 그러나, 산업적으로 이용성이 높으며 유전 교환계가 알려지지 않은 세균에 대한 유전적 조작은 복잡하고 levan과 PGA와 같은 복합 화합물을 구성하고 있는 biopolymer를 생산하는 *Bacillus*속 균주에 대한 유전적 조작은 현재까지는 초보단계에 있다.

이에 본 실험에서는 전보(22)에서 조작이 간단하면서 재조합 빈도가 높은 세포융합기술을 이용하여 biopolymer생산 *Bacillus*속 미생물을 융합하여 획득된 융합주들로부터 PGA 생산에 관여하는 γ -GTP 활성이 높은 융합균주를 선별 분리 그 배양적 특성을 조사하였다

재료 및 방법

균주의 선별

실험에 사용된 균주는 전보(22)에서 분리한 융합주 중에서 γ -GTP 활성을 측정하여 가장 높은 활성을 가진 균주를 선별하여 실험에 사용하였다.

배지

모균주 및 융합주의 배양을 위한 complete medium(CM)은 3% trypticase soy broth(TSB), pH 7.0이며, minimal medium(MM)은 1% glucose, 0.1%(NH₄)₂SO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0.4% Na₂HPO₄·12H₂O, 0.05% NaCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.1 μ g/mL biotin, pH 6.5를 사용하였고 γ -GTP 활성 측정용

G배지는 1.2% peptone, 0.2% citric acid, 2% glycerol, 0.7% NH₄Cl, 0.05% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, 0.004% FeCl₃·6H₂O, 0.1 μ g/mL biotin, pH 6.8 그리고 biopolymer생산을 위해서는 biopolymer 생산배지인 biopolymer production medium (BPM)은 5% sucrose, 1.5% MSG, 0.3% KH₂PO₄, 0.4% Na₂HPO₄·12H₂O, 0.05% NaCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.1 mL biotin, pH 7.0를 각각 사용하였다.

시약 및 기기

효소활성의 측정을 위한 L- γ -glutamyl-p-nitro-aniline, glycylglycine, p-nitroaniline 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA) 제품을 이용하였으며, 실험에 이용된 배지중 casamino acid, trypticase soy broth(TSB) 및 각종 배지는 Difco Lab.(USA) 또는 Merck & Co., Inc(USA) 제품을 이용하였다.

균체량 측정

모균주인 *B. subtilis* K-1과 융합주 중 PGA생산에 관여하는 γ -GTP 활성은 G배지에서 배양된 배양액을 원심분리(6,000 rpm, 10분) 후, 침전물을 분리하여 멸균생리식염수로 수회 세척, 재원심분리(4,000 rpm, 10분)하여 획득한 균체를 멸균생리 식염수를 대조액으로 하여 660 nm에서 흡광도 값으로 측정하였다.

γ -GTP 활성 측정

모균주인 *B. subtilis* K-1과 융합주 중 PGA생산에 관여하는 γ -GTP 활성은 G배지에서 배양된 배양액을 원심분리 후, 균체를 제거하여 얻은 상정액을 조효소액으로 하여 Oriowski와 Meister의 방법(23)을 이용하여 측정하였다. 즉, 37°C에서 30분 이상 preincubation시킨 기질용액(2.5 mM L- γ -glutamyl-p-nitroanilide, 60 mM glycylglycine, 50 mM tris-HCl, pH 8.0) 1 mL에 조효소액 1 mL를 첨가하여 37°C, 30분간 반응시킨 후 즉시 냉각시켜 3.5 N acetic acid를 2 mL를 첨가하여 반응을 중지시키고, 생성된 biopolymer를 제거하기 위해 6,000 rpm, 10분간 원심분리후, 상정액을 410 nm에서 흡광도 값을 측정하여 유리된 p-nitroaniline 양을 산출하였다. 이때 효소활성은 1분간 p-nitroaniline 1 μ mole을 유리할 수 있는 양을 1 unit로 하였다.

γ -GTP생산 조건검토

융합주 중 γ -GTP활성이 높은 균주의 γ -GTP활성에 영향을 미치는 배양상의 특징을 검토하기 위하여 250 mL 삼각 플라스크에 glycerol 2%, yeast extract 1%, biotin 0.1 μ g/mL의 기본배지를 25 mL 담고 TSB액체배지에서 12시간 배양한 전배양액을 2%양으로 접종한 후 37°C, 48시간동안 200 rpm으로 진탕배양 후 효소활성과 상대활성을 측정하였다. 융합주의 γ -GTP활성에 영향을 미치는 배지조성의 검토에서 탄소원을 각각 2% 접종 후 최적 탄소원을 선정하고 이를 1~4% 첨가하여 최적농도를 결정하였다. 질소원은 1%를 기준으로 첨가하여 최적 질소원을 결정하고 이를 0.1~3%의

범위에서 배양 후 최적농도를 결정하였다. 또한, 최적 유기산을 조사 후, 0~0.5%로 농도를 변화시킨 후 최적농도를 조사하였고, 각종 인산염과 무기염의 영향을 조사하기 위해 각종 인산염과 무기염을 1 mM과 5 mM을 첨가하여 배양 후 효소 활성을 조사하였다. 위와 같이 조사된 배지조건을 기준으로 하여 배양시간에 따른 효소의 활성정도를 조사하기 위해 72 시간 배양하면서 12시간마다 γ -GTP 활성을 측정하였다.

Biopolymer의 분석시료 제조

융합주가 생산한 biopolymer 분석실험에 사용된 시료는 모균주 *B. subtilis* K-1과 융합주를 각각 TSB배지에서 전배양시킨 것을 biopolymer 생산용 배지(BPM)에 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 3일간 진탕배양한 후 원심분리하여 얻은 상침액에 2배양의 methanol을 첨가 후 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 다시 증류수에 재용해시킨 후, methanol을 첨가하여 침전물을 회수하는 방식으로 3회 반복하여 최종적으로 얻은 침전물을 증류수에 용해시켜 증류수에 대해 24시간 투석시키고, 이를 동결 건조시켜 biopolymer 분석의 시료로 사용하였다.

Biopolymer의 단백질 함량 측정

융합주가 생산한 biopolymer를 구성하고 있는 성분의 함량비를 조사하기 위하여 PGA의 총합량을 biopolymer 단백질함량 값으로 조사하였다. Biopolymer의 단백질함량은 단백질자동분석장치(Kjeltec autosampler system 1035 analyzer, Tecator Co., Sweden)를 이용하여 분석하였다. 5 mg의 시료를 칭량한 후 시료분해용 tube에 넣고 분해촉매제 tablet (35 g K₂SO₄, 3.5 mg selen Se, kjeltabs S/3.5, Tecator Co., Sweden) 2정과 황산 12 mL을 첨가하여 420°C 분해장치에서 2시간동안 분해한 후, 방냉한 것을 분석장치에 tube를 장착하여 자동 분석하였다. 이때 분석값은 3회 반복한 평균값으로 나타내었다.

총당 함량 측정

융합주가 생산한 biopolymer를 구성하고 있는 성분의 함량비를 조사하기 위하여 levan의 함량을 총당 함량으로 조사하였다. 즉, biopolymer의 총당함량은 phenol-sulfuric acid 법(24)으로 측정하였고, glucose를 표준당으로 한 표준곡선으로부터 총당 함량을 산출하였다

Biopolymer의 구성당 함량 측정

Biopolymer를 구성하고 있는 구성당 함량을 측정하기 위하여 biopolymer 10 mg을 각각 칭량하고 3 N-HCl 10 mL를 첨가하여 100°C, 3시간 산 가수분해시킨 것을 3 N NaOH로 중화한 후, 이를 감압 농축시켜 HPLC용 증류수 10 mL에 재용해 시켰다. 이 용액을 0.45 μ m membrane filter로 여과시켜 Sep-Pak[®] C₁₈(Waters Co., USA)으로 처리한 후 HPLC로 분석하였다. 이때 사용된 HPLC의 분석조건은 HPLC, AIC/GPC 204(Waters association Inc., USA), μ column: Bon-

dapak NH₂ column(3.9×300 mm), column temperature: 60°C, mobile phase: (acetonitrile: water = 80:20 (v/v)), flow rate: 1.5 mL/min, detector: RI 401 (differential refractometer), injection volume: 10 μ L와 같으며 fructose함량은 표준물질의 비례농도에 대한 1차 회귀분석곡선(R²=0.9995)으로 산출하였다.

Biopolymer의 glutamic acid함량 측정

Biopolymer를 구성하고 있는 아미노산중 glutamic acid 함량을 조사하기 위해 biopolymer를 각각 10 mg씩을 칭량하여, 6 N HCl 10 mL를 첨가 후 110°C에서 24시간 가수분해하여 감압 농축시킨 것을 sodium citrate buffer(pH 2.2) 10 mL에 재용해시켜 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후, amino acid auto analyzer (Pharmacia biochrom 20, USA)로서 분석조건은 column은 sodium high resolution PEEK(4.6×200 mm), mobile phase sodium citrate buffer(pH 2.2), flow rate: 0.5 mL/min, injection volume: 20 μ L, UV 570 nm의 조건으로 분석하였다. 이때 glutamic acid 함량은 표준곡선의 glutamic acid 면적비로부터 산출되었다.

결과 및 고찰

***B. subtilis* 돌연변이 균주의 γ -GTP활성**

*B. subtilis*가 생산하는 biopolymer의 구성성분 중 PGA생산성 관련효소인 γ -GTP활성이 높은 균주를 선택하기 위하여 모균주와 돌연변이의 효소활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. γ -GTP활성 측정에서 *B. subtilis* 돌연변이주 중 SM-21을 제외한 모든 돌연변이주가 모균주인 *B. subtilis*보다 효소활성이 높았다. 특히 SM-2 균주가 485 U/mL로 활성이 상대적으로 가장 높았으며 SM-21을 제외하고는 SM-13이 활성이 상대적으로 낮은 것으로 나타났다. 따라서 상대적으로 γ -GTP 효소활성이 높은 SM-2와 SM-10을 PGA생산용 균주의 융합에 사용하여 γ -GTP활성이 높은 융합주의 분리에 사용하였다.

융합주의 γ -GTP 활성

융합시켜서 획득한 30여 균주 중 일부 균주의 효소활성을

Table 1. γ -GTP activity of *B. subtilis* K-1 and various mutant strains

Strains	Phenotype	γ -GTP activity (U/mL)	Cell growth OD ₆₀₀
SM-2	Arg ⁻ , Gm ^R	485	1.125
SM-10	His ⁻ , Gm ^R	350	1.385
SM-13	His ⁻ , Asp ⁻ , Gm ^R	320	1.018
SM-21	Ile ⁻ , Gm ^R	15	0.757
<i>B. subtilis</i> K-1	wild type	150	0.912

Cultivation was carried out in G medium with shaking incubation for 48 hr at 37°C.

측정한 결과는 Table 2와 같다. 융합주인 FG 융합체들 중 20번과 21번, 26번 균주가 상대적으로 활성이 높은 편이었고 그중 융합주 FG-21가 430 U/mL로 가장 높았고, 그 외 균주들은 대부분 *B. subtilis* 변이주 SM-2보다 활성이 낮았는데 이는 융합 과정 중 활성능이 일부 저하되었거나 부분적인 전이가 원인이 될 수도 있으며 융합체의 배양적인 특성도 상당한 영향이 있으리라고 사료된다. 따라서 융합주들 중 γ -GTP 활성이 상대적으로 높은 융합주 FG-21을 선택하여 배양조건이 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다.

융합주 FG-21의 배양조건이 γ -GTP활성에 미치는 영향

탄소원의 영향: γ -GTP 활성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 glycerol 2%, yeast extract 1%, biotin 0.1 μ g/mL을 첨가한 기본배지를 기준으로 하여 기본배지의 glycerol 대신에 각종 탄소원을 2%씩 첨가하여 γ -GTP의 생산성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 탄소원들 중 glycerol이 효소활성의 유도효과가 가장 우수하였으며 sucrose와 lactose도 비교적 우수한 결과를 보였다. 특히 glycerol은 발효생산물이나 효소의 생산에 이용성이 적은 편이나 PGA의 생합성

경로에 상당히 중요한 물질로 알려져 있다(4).

Glycerol의 농도를 1~4%씩 변화시켜 효소의 활성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. Glycerol 1% 첨가시, γ -GTP활성이 598 U/mL로 가장 높았고 그 이상의 농도에서는 γ -GTP활성은 감소하였다. 대개 *Bacillus*속은 glycerol 2%에서 γ -GTP활성이 높다고 한 보고(3,4,25)보다 본 실험의 융합주의 배양상의 glycerol이 낮은 농도였다. 이는 균주의 상이성도 있지만 융합에 의한 세포의 특성이 변화되었을 가능성도 있을 것으로 사료된다.

질소원의 영향: 각종 질소원을 1% 첨가하여 γ -GTP활성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 질소원들 중 peptone과 casamino acid의 효소활성 유도효과가 높은 것으로 나타났다. Peptone과 casamino acid의 경우 단백질의 분해생산물로서 아미노산이 구성성분으로 되어있기 때문에 γ -GTP 효소에는 아미노산과 관련화합물이 큰 영향을 주는 것과 본 융합주가 아미노산 영양요구성으로 이들이 peptone이나 casamino acid중의 아미노산과 관련물질이 융합주의 영양요구성 인자

Table 2. γ -GTP activity of fusant FG strains

Fusant FG strain & <i>B. subtilis</i> strains	γ -GTP activity (U/mL)	Cell growth OD ₆₆₀
FG-01	86	0.853
FG-12	15	0.688
FG-16	153	0.651
FG-17	98	0.785
FG-19	0	0.557
FG-20	277	1.007
FG-21	430	1.257
FG-22	137	1.365
FG-23	6	0.321
FG-25	174	1.265
FG-26	305	1.113
FG-28	80	0.657
<i>B. subtilis</i> K-1	158	1.011
<i>B. subtilis</i> mutant SM-2	457	1.089

Cultivation was carried out in G medium with shaking incubation for 48 hr at 37°C.

Table 3. Effect of carbon source on the production of the γ -GTP from fusant FG-21

Carbon source	γ -GTP activity (U/mL)	Relative productivity (%)	Cell growth OD ₆₆₀
None	25	6	0.568
Glycerol	421	100	1.289
Sucrose	362	88	1.115
Lactose	357	87	0.865
Soluble starch	87	21	0.953
Fructose	53	13	0.885
Glucose	85	21	0.687

Basal medium was composed of 2% carbon source, 1% yeast extract, 0.1 μ g/mL biotin, pH 7.0. Cells were cultured with shaking (200 rpm) for 36 hr at 37°C.

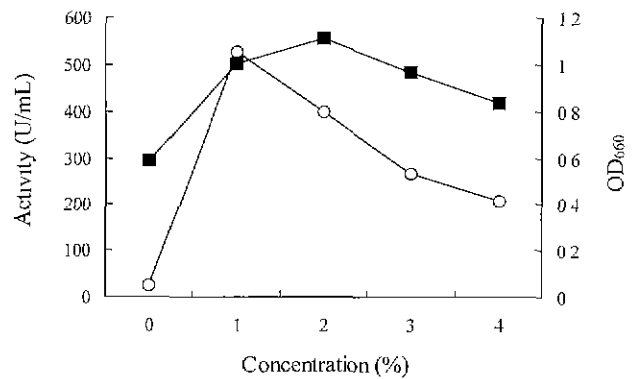


Fig. 1. Effect of glycerol on the production of the γ -GTP from fusant FG-21.

Basal medium was composed of various concentration of glycerol, 1% yeast extract, 0.1 μ g/mL biotin, pH 7.0. Cells were cultured with shaking (200 rpm) for 36 hr at 37°C.

○—: γ -Glutamyltranspeptidase activity (U/mL)
 ■—: Cell growth OD₆₆₀

Table 4. Effect of nitrogen source on the production of the γ -GTP from fusant FG-21

Nitrogen source	γ -GTP activity (U/mL)	Relative productivity (%)	Cell growth OD ₆₆₀
None	12	3	0.382
Yeast extract	403	100	1.026
Peptone	520	129	1.263
Casamino acid	484	120	1.538
L-Glutamic acid	185	46	0.956
L-Glutamic acid (1%) - Peptone (1%)	95	24	0.889
L-Glutamic acid (15%) - Peptone (0.5%)	91	23	1.002

Basal medium was composed of 1% glycerol, different of nitrogen source 1%, 0.1 μ g/mL biotin, pH 7.0. Cells were cultured with shaking (200 rpm) for 36 hr at 37°C.

로 효소생산을 촉진하는 것으로 작용될 수 있을 것이라 생각된다. 그러나 PGA생산에 필수물질로 보고(20,26,27) 되어진 L-glutamic acid는 본 융합주의 γ -GTP의 생산성에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 또한 peptone과 같이 L-glutamic acid를 혼합첨가 한 경우도 오히려 peptone의 단독첨가와 L-glutamic acid 단독첨가보다 효소활성이 낮게 나타났다. 이와 같은 결과는 L-glutamic acid의 첨가로 인한 γ -GTP의 생산에 feedback inhibition한 결과라고 생각되나 이에 대한 연구는 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다. Ward 등(28)은 *B. subtilis*에 의해 PGA생산에 wheat gluten이 효과적이었다고 보고하였다.

γ -GTP활성이 높은 peptone을 0.1~3%씩 첨가 후, 배양하여 γ -GTP활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 질소원으로서는 γ -GTP활성에 미치는 peptone의 농도는 1~1.5%에서 우수한 결과를 보였고 1.5% 이상에서는 오히려 활성이 급격히 감소하였다

유기산의 영향: PGA를 생산하는데 citric acid와 같은 유기산이 관여하여 생산성을 높여준다고 보고되어 있다(4). 따라서 본 융합체가 생산하는 γ -GTP생산에 미치는 유기산의 영향을 조사하기 위해 TCA cycle에 관련된 몇몇 유기산을 각각 0.3%씩 첨가한 결과는 Table 5와 같다. 얻어진 결과로

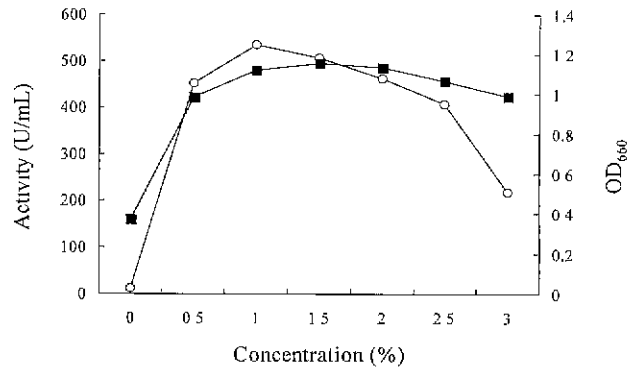


Fig. 2. Effect of peptone on the production of the γ -GTP from fusant FG-21.

Basal medium was composed of 1% glycerol, various concentration of peptone, 0.1 μ g/mL biotin, pH 7.0. Cells were cultured with shaking (200 rpm) for 36 hr at 37°C.

○: γ -Glutamyltranspeptidase activity (U/mL)
 ■: Cell growth OD₆₆₀

Table 5. Effect of organic acid on the production of the γ -GTP from fusant FG-21

Organic acid	γ -GTP activity (U/mL)	Relative productivity (%)	Cell growth OD ₆₆₀
None	502	100	0.985
Citric acid	548	109	1.186
Maleic acid	146	29	0.356
Ascorbic acid	487	97	1.003
Succinic acid	173	34	0.658
Lactic acid	478	95	0.423

Basal medium was composed of 1% glycerol, 1% peptone, 0.3% different organic acid source, 0.1 μ g/mL biotin, pH 7.0. Cells were cultured with shaking (200 rpm) for 36 hr at 37°C.

보면 유기산들 중 citric acid가 가장 우수한 생산성을 보였으며 이를 0.1~0.5%로 변화시켜 γ -GTP활성을 검토한 결과는 Fig 3과 같다. 즉, citric acid를 0.1% 첨가한 경우가 효소의 활성에 가장 우수한 결과를 보였고 0.3% 이상의 농도에서는 급격한 감소를 보였다.

인산염의 영향: γ -GTP효소활성에 영향을 미치는 인산염의 영향을 조사하기 위해 각종 인산염을 각각 5 mM과 10 mM을 첨가한 결과는 Table 6과 같다. 전체적으로 5 mM을 첨가했을 때 활성이 높았으며, K₂HPO₄ 5 mM을 제외한 대부

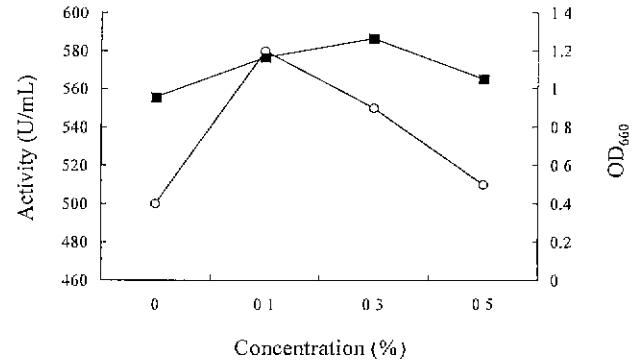


Fig. 3. Effect of citric acid on the production of the γ -GTP from fusant FG-21.

Basal medium was composed of 1% glycerol, 1% peptone, various concentration of citric acid, 0.1 μ g/mL biotin, pH 7.0. Cells were cultured with shaking (200 rpm) for 36 hr at 37°C.

○: γ -Glutamyltranspeptidase activity (U/mL)
 ■: Cell growth OD₆₆₀

Table 6. Effect of phosphate salt on the production of the γ -GTP from fusant FG-21

Phosphate salt	γ -GTP activity (U/mL)		Relative productivity (%)		Cell growth OD ₆₆₀	
	5 mM	10 mM	5 mM	10 mM	5 mM	10 mM
None	530	530	100	100	0.678	0.678
KH ₂ PO ₄	515	407	97	77	0.975	0.815
K ₂ HPO ₄	568	429	107	81	1.189	0.911
NaH ₂ PO ₄	503	336	95	63	1.009	0.923
Na ₂ HPO ₄	517	424	98	80	1.113	0.992
Na ₄ H ₂ PO ₄	408	285	77	54	0.995	0.965
(NH ₄) ₂ HPO ₄	425	307	80	58	0.541	0.788

Basal medium was composed of 1% glycerol, 1% peptone, 0.1% citric acid, 5 mM or 10 mM phosphate salt, 0.1 μ g/mL biotin, pH 7.0. Cells were cultured with shaking (200 rpm) for 36 hr at 37°C

Table 7. Effect of mineral salt ion on the production of the γ -GTP from fusant FG-21

Mineral salt ion	γ -GTP activity (U/mL)		Relative productivity (%)		Cell growth OD ₆₆₀	
	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM
None	558	558	100	100	0.995	0.995
MnCl ₂	417	243	74	44	0.562	0.283
CoCl ₂	342	172	61	31	0.336	0.189
MgCl ₂	518	214	93	38	0.899	0.621
CaCl ₂	345	87	62	16	0.552	0.316
ZnCl ₂	327	17	59	3	0.886	0.327
FeCl ₃	601	475	108	85	1.068	0.986
FeSO ₄	507	342	91	61	0.967	0.845
MgSO ₄	578	428	104	77	1.117	1.251
KCl	531	372	95	67	1.011	0.869
NaCl	488	298	87	53	1.032	1.265
NH ₄ Cl	562	409	101	73	0.956	0.885

Basal medium was composed of 1% glycerol, 1% peptone, 0.1% citric acid, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM or 5 mM mineral salt, 0.1 μ g/mL biotin. pH 7.0 Cells were cultured with shaking (200 rpm) for 36 hr at 37°C.

분의 첨가군은 무첨가군에 비해 낮은 활성을 나타냈다.

무기염의 영향: γ -GTP활성에 영향을 미치는 무기염의 영향을 조사하기 위해 각종 무기염의 이온을 각각 1 mM과 5 mM을 첨가한 결과는 Table 7과 같다. 무기염은 FeCl₃, MgCl₂, NH₄Cl을 각각 1 mM씩 첨가한 경우를 제외한 모든 무기염은 효소활성이 저해되었으며 5 mM은 무첨가에 비해 15~97% 까지 효소활성이 감소되었다. 또 PGA 생산에서 Mn²⁺의 첨가 시 PGA내 D-glutamic acid 함량을 증가시켜 준다라는 보고 (3,4)가 있으나 본 융합주의 γ -GTP활성에는 큰 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다.

배양시간의 영향: γ -GTP생산용 최적배지에서 72시간 배양동안 12시간별로 효소활성을 검토한 결과는 Fig. 4와 같다. γ -GTP활성은 배양 12시간에 178 U/mL이었으나 배양 24시간부터 급격히 증가하여 배양 36시간에 621 U/mL로 최대의 활성을 보였고 48시간 이후 서서히 감소하는 경향을 보였다. 따라서 본 융합균주의 효소활성은 배양 36시간에서

최대활성을 보이고 그 이후에 감소하는 것으로 나타나 효소의 최적 생산속도가 상당히 빠른 것으로 사료된다.

Biopolymer의 분석

Biopolymer의 단백질 및 총당함량: 모균주와 융합주가 생산하는 biopolymer의 구성성분 물질로서 PGA와 levan의 함량을 각각 총단백질함량과 총당의 함량으로 조사한 결과는 Table 8과 같다 융합주 FG-21균주가 생산한 biopolymer A가 단백질함량이 38.4%이고 *B. subtilis* K-1이 생산하는 biopolymer B의 단백질함량은 19.3%로 FG-21이 생산하는 biopolymer A보다 함량이 낮았다 융합주 FG-21의 biopolymer가 모균주의 biopolymer B보다 단백질함량이 높은 것은 상대적으로 높은 γ -GTP활성이 높아서 생성된 PGA가 levan보다 함량이 많기 때문인 것으로 사료된다.

총당함량은 biopolymer A가 58.5%, biopolymer B가 76.5%로 나타났다. 따라서 biopolymer의 구성비를 단백질함량과 총당함량으로 나타내었을 때 biopolymer A는 PGA와 levan이 대략 38 : 59, biopolymer B는 19 : 78의 비율로 구성되어 있는 것으로 추론할 수 있다. 그러나 이와 같은 단백질함량과 총당함량으로서 biopolymer의 구성성분에 대한 비는 구성성분의 함량에 대한 정확한 값이 구해졌을 때 가능할 것으로 사료된다.

Biopolymer의 구성당 및 구성아미노산 함량 측정: 2개의 융합주와 모균주가 생산하는 biopolymer의 구성성분에 대

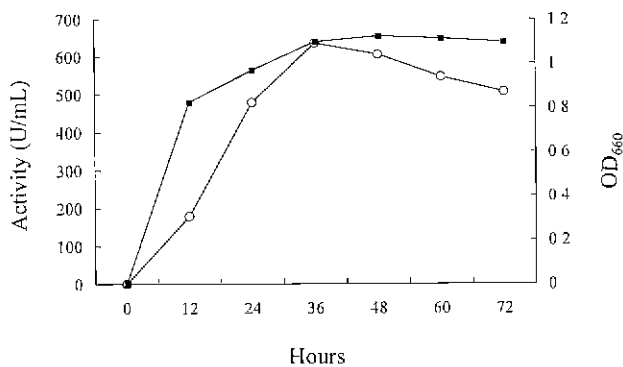


Fig. 4. Time course of γ -GTP production in fusant FG-21. Cultivation was carried out in the medium containing 1% glycerol, 1% peptone, 0.1% citric acid, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM FeCl₃, 1 mM MgSO₄, 1 mM NH₄Cl, 0.1 μ g/mL biotin, pH 7.0 Cells were cultured with shaking (200 rpm) for 72 hr at 37°C.
 -○- γ -Glutamyltranspeptidase activity (U/mL)
 -■- Cell growth OD₆₆₀

Table 8. Protein and total sugar contents of biopolymer produced by fusant FG-21 and *B. subtilis* K-1

Composition items	Biopolymer sample	
	A ¹⁾	B ²⁾
Protein (%)	38.4±2.0	19.3±0.9
Total sugar (%)	58.5±2.2	77.5±2.7
Others (%)	3.1	3.2

¹⁾A: Biopolymer sample produced by fusant FG-21.

²⁾B: Biopolymer sample produced by *B. subtilis* K-1.

Table 9. Fructose contents of biopolymer produced by fusant FG-21 and *B. subtilis* K-1

Composition items	Biopolymer sample	
	A ¹⁾	B ²⁾
Fructose (mg/g, biopolymer)	573.7	764.4
Glutamic acid (mg/g, biopolymer)	163.7	94.6

¹⁾²⁾Abbreviations are same as in Table 8

한 정확한 함량비를 구하기 위하여 구성당을 HPLC로 분석한 결과 chromatogram에서 biopolymer A, B의 분해물은 fructose의 단일 peak로 이루어진 것으로 확인되었다. 따라서 융합주의 모균주가 생산하는 biopolymer 구성성분중 다당 성분은 fructose만으로 구성된 것임을 알 수 있었다. 두 종류의 biopolymer내 fructose의 함량을 분석한 결과는 Table 9와 같다. 융합주 FG-21이 생산하는 biopolymer A의 fructose 함량은 573.7 mg/g, 모균주 *B. subtilis* K-1이 생산하는 biopolymer B는 764.4 mg/g으로 나타났다. Fructose의 함량 차이는 biopolymer의 구성물 중 levan의 함량과 일치하므로 두 종류의 biopolymer는 구성상 levan함량이 많은 biopolymer인 것으로 사료된다. 또한 두 biopolymer A, B의 구성 아미노산을 auto amino acid analyzer로 분석한 결과는 chromatogram에서 A, B가 동일한 pattern이었으며, biopolymer 구성 아미노산은 거의 대부분 glutamic acid로 구성되어 있었다. 이 chromatogram을 토대로 glutamic acid의 함량을 조사한 결과 biopolymer A의 glutamic acid 함량은 163.7 mg/g, biopolymer B는 94.3 mg/g으로 나타났다. Fructose와 glutamic acid의 두 성분간의 함량비를 계산해 보았을 때 biopolymer A는 fructose : glutamic acid가 78 : 22, biopolymer B는 89 : 11의 비로 함유되어 있었다.

따라서 fusants에 의해 생산된 biopolymer는 모균주보다 구성상태가 변화된 biopolymer를 생산한 것으로 판단되어 fusion과 같은 균주 개량을 통하여 물질의 구성적, 물질적 특성이 변화된 biopolymer를 생산할 수 있을 것이라 사료된다.

요 약

Bacillus subtilis 돌연변이주 중 γ -GTP활성이 높은 SM-2와 SM-10을 융합시켜 획득한 융합주 중 γ -GTP활성이 높은 융합주 FG-21의 배양적 특성을 조사하였다. 융합주 FG-21에 의한 γ -GTP의 생산은 1% glycerol, 1% peptone, 0.1% citric acid, 5 mM K_2HPO_4 , 1 mM $FeCl_3$, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $NiCl_2$, pH 7.0의 배지에 의해 37°C에서 36시간 배양했을 때 621 U/mL으로 최대의 활성을 보였다. 융합주 FG-21이 생산한 biopolymer A가 단백질함량이 38.4%이고 *B. subtilis* K-1이 생산하는 biopolymer B의 단백질함량은 19.3%로 융합주 FG-21이 생산하는 biopolymer A보다 함량이 낮았다. 융합주 FG-21의 biopolymer가 모균주의 biopolymer B보다

단백질함량이 높은 것은 상대적으로 높은 γ -GTP활성이 높아서 생성된 PGA가 levan보다 함량이 많기 때문인 것으로 사료된다. 총당함량은 biopolymer A가 58.5%, biopolymer B가 76.5%로 나타났다. 융합주 FG-21과 모균주가 생산하는 biopolymer의 단백질함량과 총당함량비는 융합주 FG-21이 생산한 biopolymer A는 38 : 59, 모균주가 생산한 biopolymer B는 19 : 78의 비율이었고 HPLC분석에 의한 biopolymer A와 B의 fructose함량은 각각 573.7 mg/g biopolymer, 764.4 mg/g biopolymer으로 나타났다. Biopolymer A와 B의 glutamic acid함량은 각각 163.7 mg/g, 94.3 mg/g이었다. Biopolymer A와 B의 fructose와 glutamic acid의 함량비는 각각 78 : 22, 89 : 11의 비로 함유되어 있었다. 따라서 융합주에 의해 생산된 biopolymer는 모균주보다 구성상태가 변화된 biopolymer를 생산한 것으로 판단되어 fusion과 같은 균주 개량을 통하여 물질의 구성적, 물질적 특성이 변화된 biopolymer를 생산할 수 있을 것이라 사료된다.

문 헌

1. Watson, D.W., Cromartine, W.J., Bloom, W.L., Heckly, R.J., McGhee, W.J. and Weissman, N. : Studies on infection with *Bacillus anthracis*. V. The isolation of an inflammatory factor from crude extracts of lesions of *B. anthracis* infection and its biological and chemical relationships to glutamyl polypeptide. *J. Infectious Diseases*, **80**, 121-136 (1947)
2. Thorne, C.B., Gomez, C.G., Noyes, H.E. and Housewright, R.D. : Production of glutamyl polypeptide by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **68**, 307-315 (1954)
3. Leonard, C.G., Housewright, R.D. and Thorne, C.B. : Effect of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **76**, 499-503 (1958)
4. Housewright, R.D. : The biosynthesis of homopolymeric peptides. In *The bacteria III*. Gunsalus, I.C. and Stainer, R.Y. (eds.), Academic Press, New York, p.389-412 (1962)
5. Williams, W.J., Litwin, J. and Thorne, C.B. : Further studies on the biosynthesis of γ -glutamyl peptides by transfer reactions. *J. Biol. Chem.*, **212**, 427-438 (1955)
6. Williams, W.J. and Thorne, C.B. : Biosynthesis of glutamyl peptides from glutamine by a transfer reaction. *J. Biol. Chem.*, **210**, 203-217 (1954)
7. Williams, W.J. and Thorne, C.B. : Elongation of γ -D-glutamic acid peptide chains by transfer reaction. *J. Biol. Chem.*, **211**, 631-641 (1954)
8. Giannos, S., Shah, D., Gross, R., Kaplan, D.L., Arcidiacono, S. and Mayer, J. : Biosynthesis of unusual polyamides containing glutamic acid; Proceedings American Chemical Society Division Polymer Maternal Science and Engineering, **62**, 236-240 (1990)
9. Gasson, M.J. : Genetic transfer systems in lactic acid bacteria. *Antonieus Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.*, **49**, 275-282 (1983)
10. Kao, K.N. and Michayluk, M.R. : A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, **115**, 355-367 (1974)
11. Fodor, K. and Alföldi, L. : Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 2147-2150 (1976)
12. Schaeffer, P., Cami, B. and Hotchkiss, R.D. : Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 2151-2155 (1976)

13. Sipiczki, M. and Ferenczy, L : Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type. *Mol Gen. Genet.*, **151**, 77-81 (1977)
14. Kaneko, H. and Sakagushi, K. : Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1007-1013 (1979)
15. Santamaric, R. Mesas, J.M. and Martin, J.F. : Genetic recombination by protoplast fusion in *Coryneform* bacteria. 4th. *G.I.M. Abstract*, **60**, 1172-1176 (1982)
16. Ochi, K.M., Hitchcock, J.M. and Katz, E : High-frequency fusion of *Streptomyces antibioticus* protoplasts induced by polyethylene glycol. *J. Bacteriol.*, **139**, 984-992 (1979)
17. Gotz, F., Ahrne, S. and Lindberg, M. : Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion *Staphylococci*. *J. Bacteriol.*, **145**, 74-81 (1981)
18. Gokhale, V.D., Eun, S.H., Strini Vasan, V.R. and Beobagkar, D.N. : Transfer of DNA coding for cellulases from *Cellulomonas* species to *Bacillus subtilis* by protoplast fusion. *Biotechnol. Lett.*, **6**, 627-632 (1984)
19. Kim, D.M. and Lee, K.H. : Studies on protoplast formation and regeneration of *Bacillus pumilus* and *Cellulomonas fimi*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 109-114 (1990)
20. Goldberg, J.B. and Ohem, D.E. : Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alg B mutants : Role of alg B in high-level production of alginate *J. Bacteriol.*, **169**, 1593-1595 (1987)
21. Harding, N.E. : Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris* *J. Bacteriol.*, **169**, 2854-2857 (1987)
22. Kim, S.H. and Yim, M.H. : Cell fusion and fusants characterization of *Bacillus* strains producing biopolymer. *J. Kor Soc Agri Chem. Biotechnol.*, **42**, 12-19 (1999)
23. Orłowski, M. and Meister, A. : γ -Glutamyl-p-nitroanilide : A new convenient substrate for determination and study of L- and D- γ -glutamyltranspeptidase activities. *Biochim. Biophys. Acta.*, **73**, 679-681 (1963)
24. Dubios, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Roberts, P.A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-355 (1956)
25. Hara, T., Aumayr, A., Fusio, T. and Ueda, S. : Elimination of plasmid-linked polyglutamate production by *Bacillus subtilis* (*natto*) with acridine orange. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1456-1458 (1982)
26. Hasegawa, M., Fukuda, N., Higuchi, H., Noguchi, S. and Matsubara, I. : The isolation and identification of γ -glutamylpeptides from L-glutamic acid fermentation broths and their actions to the crystallization of the amino acid. *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 49-56 (1977)
27. Hara, T. and Ueda, S. : Regulation of polyglutamate production in *Bacillus subtilis* (*natto*) : Transformation of high PGA productivity. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2275-2281 (1982)
28. Ward, R.M., Anderson, R.F. and Dean, F.K. : Polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis* NRRL B-2612 grown of wheat gluten. *Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 41-48 (1963)

(2001년 2월 21일 접수)