

Bacillus sp. WY-60에 의한 균체의 단백질의 분비조건

박 신·권오진*

대구대학교 농화학과, *영남대학교 식품가공학과

초록 : 미생물에 의한 균체의 단백질의 생산 및 그 분비조건에 관한 기초자료를 얻기 위해 토양으로 부터 단백질 생산균주 11주를 분리하여 그 중 단백질 생산능이 강한 WY-60 균주를 선정하여 동정한 결과, *Bacillus* sp.으로 확인되었다. WY-60 균주의 단백질생산 최적조건은 fructose 4.0%, polypeptone 1.0%, NH_4NO_3 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, CaCO_3 1.0%, pH 8.0 및 온도 30°C이었다. WY-60 균주는 penicillin G와 lincomycin을 첨가시에 단백질 생산을 촉진하였고 그 외의 항생물질의 첨가시는 단백질 생산을 증가하는 효과가 없었다. 배양시간에 따른 단백질 생산은 배양 5일째에 0.214 mg/ml로 최대가 되었다(1992년 10월 12일 접수, 1992년 12월 26일 수리).

단백질을 미생물에 의해 대량으로 값싸게 생산하려는 시도는 제 1차 세계대전 중 독일에서 *Torula* 효모를 대량배양한 것을 최초로 최근에는 C_{1-2} 화합물을 원료로 한 미생물 균체의 생산에 관한 연구가 진행되고 있다.¹⁻⁷⁾

여러가지 단백질 자원 중 미생물 단백질은 가격이 비교적 저렴하고 대량생산이 가능하며 이용시 전처리 과정이 단순한 잇점이 있어 근래에 미생물이 균체외로 분비하는 단백질을 좀 더 효율적으로 대량생산하여 이용하려는 연구⁸⁻¹⁰⁾와 단백질 분비기작에 관한 연구¹¹⁻¹⁹⁾ 등이 이루어지고 있다.

인구의 급증으로 인한 식·사료문제 해결책의 일환으로 미생물이 생산하는 균체의 단백질에 관한 연구는 매우 중요하다. 그러나 이들의 이용에는 그 물리·화학적 및 생물학적 성질의 검토가 필요한 것이다.

따라서 본 연구에서는 미생물에 의해 균체의 단백질(이하 단백질)을 생산하여 그의 분비조건에 관한 기초 자료를 얻기 위하여 토양으로 부터 단백질 생산균주를 선별하여 동정하고 단백질의 최적 생산조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

강력한 단백질 생산 균주를 분리하기 위하여 하양근 교에서 채취한 토양 132점의 시료 각 1g을 생리 식염

수에 현탁하여 10분간 정치한 다음 그 상등액 0.1 ml를 분리용 배지에 도말하여 30°C에서 48시간 배양 후 5% perchloric acid 5 ml를 평판상에 가하여 10분간 방치한 다음, 집락주위에 형성된 백탁의 농도와 크기로 단백질 생산균주를 1차 분리하였다. 분리된 균주들을 단백질 생산배지에 접종하여 생산량이 많은 균주를 최종 선별 하였다. 균 분리용 배지(T_1 , T_2)와 단백질 생산배지(TP)는 Table 1과 같다.

선별균주의 동정

선별된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology²⁰⁾에 준해 배양학적, 형태적 및 생리적 특성을 살펴 동정하였다.

단백질의 정량

균체의 단백질은 30°C에서 48시간 진탕배양한 배양을 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 Lowry법²¹⁾에 의해 정량하였고 균체내 단백질은 균체를 0.1 N phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척 후 0.2 N NaOH 용액 2 ml에 현탁하여 비등수욕에서 10분간 가열하여 세초내 단백질을 용출시켜 상기와 같은 방법으로 정량하였다.

단백질의 최적 생산조건

TP 배지를 기본배지로 하여 여기에 탄소원(4.0%), 질

소원(1.0%), 인산원(0.1%), 무기염(0.001%)과 CaCO₃(0~2.0%), pH(6~9) 및 온도(25~45°C)를 달리하여 단백질 생산에 미치는 영향을 조사하였고 이들 중 효과가 좋았던 것에 대해서는 최적농도를 검토하였다. 또한 penicillin G 등의 항생물질을 농도별로 첨가하여 그 효과도 조사하였다.

결과 및 고찰

단백질 생산균주의 분리 및 선별

T₁ 및 T₂ 배지를 사용하여 단백질 생산능이 비교적

우수한 11 균주를 1차로 분리하였으며 이중에서 WY-60 균주를 최종 선별하여 본 실험의 단백질 생산균주로 사용하였다(Table 2).

단백질 생산균주의 동정

선별한 WY-60 균주의 특성은 Table 3과 같이 gram 양성 간균으로 운동성이 있었고 아포를 형성하였으며 Voges-proskauer반응이 음성, catalase 시험이 양성인점 등의 결과로 보아 *Bacillus* sp.의 일부 균주와 비슷하였으나 당 자화성에 있어서 종별간의 특성이 일치하는 종이 없어 *Bacillus* sp. WY-60으로 명명하였다.

단백질 최적 생산조건

1) 탄소원의 영향

기본배지인 TP 배지의 glucose 대신 각 탄소원을 4.0% (w/v)씩 첨가하고 종배양액을 1.0%(v/v)되게 접종하여 30°C에서 48시간 배양하여 그 영향을 살펴 본 결과는 Table 4와 같다. Fructose를 첨가하였을 때 0.450 mg/ml 단백질을 생산하여 효과가 가장 좋았으며 sucrose를 첨가시에도 0.399 mg/ml의 단백질을 생산하였다. 또한 fructose 농도의 영향은 Table 5와 같이 4.0%에서 0.412 mg/ml의 단백질을 생산하였다. Tsuchida 등²²⁾은 *Bacillus brevis* No. 47의 단백질 생산은 4.0%의 fructose에서, 이 등²³⁾은 *Bacillus* sp.의 단백질 생산은 4.0%의 arabinose에서 각각 좋았다고 보고한 바 있다.

2) 질소원의 영향

기본배지에 polypeptone 등의 유기질소원을 각각 1.0% (w/v)되게 첨가한 결과, 단백질 생산은 polypeptone을

Table 1. The composition of T₁, T₂ and TP medium

Composition	T ₁ medium	T ₂ medium	TP medium
Glucose	20.0 g	10.0 g	40.00 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g		10.00 g
Urea	2.0 g		
Meat extract	2.0 g	5.0 g	
Yeast extract		2.0 g	
Peptone	3.0 g	10.0 g	1.00 g
K ₂ HPO ₄	3.0 g		
KH ₂ PO ₄	1.0 g		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g		0.05 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O			0.01 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O			0.01 g
CaCO ₃			20.00 g
Hepes buffer (0.1 M pH 7.2)	1/	1/	1/

Glucose and CaCO₃ were sterilized separately.

Table 2. The production of protein by each strains and their Characteristics

Strain No.	Protein ^{a)} (mg/ml)	Growth (660 nm)	Final pH	Color of T ₂ medium ^{b)}	Opaque area (cm)	Degree of density ^{c)}
WY-12	0.030	0.37	7.8	W	0.8	+
WY-46	0.090	0.43	8.7	W	1.5	++
WY-60	0.127	0.48	6.2	W	2.0	+++
WY-72	0.066	0.39	7.4	Y	0.9	++
WP-10	0.018	0.62	6.0	W	0.4	+
WP-49	0.093	0.62	9.5	Y	1.4	+++
WP-76	0.056	0.50	5.7	W	0.6	++
WP-78	0.006	0.52	6.6	W	0.2	+
WP-92	0.073	0.47	8.2	Y	1.0	++
WC-03	0.054	0.49	8.0	Y	0.7	++
WC-19	0.101	0.51	8.4	W	1.8	+++

^{a)} Concentration of extracellular protein produced at shaking incubator for 48 hrs at 30°C in medium T₂.

^{b)} W, white; Y, yellow.

^{c)} + + +, strong; + +, medium; +, weak.

Table 3. Differential characteristics of the isolated WY-60 strain

Characteristics	WY-60	Characteristics	WY-60
Shape	Rod	H ₂ S	-
Size	1.0×3.0 μm	IMViC test	
Motility	+	Indol	-
Gram stain	+	Methyl red	-
Colony shape	Moderate Irregular Undulate, Rough	Voges-Proskauer	+
Colony color	White	Citrate	+
Growth on broth	Pellicle	Acid production from Glucose	+
Spore formation	+	Xylose	+
Optimum temperature	30°C	Arabinose	+
pH	7.5~8.0	Rhamnose	-
Nitrate reduced to nitrite	+(-)	Mannose	+
Catalase	+	Fructose	+
Hydrolysis of Starch	+	Sucrose	+
Gelatin	+	Galactose	+
		Lactose	-
		Maltose	+
		Raffinose	-
		Mannitol	+

+, 90% or more of strains are positive; -, 90% or more of strains are negative; +(-), 50~89% of strains are positive.

Table 4. Effect of various nutritional sources on the production of protein

Source	Component	Protein (mg/ml)	Source	Component	Protein (mg/ml)	
Carbon (4.0%, w/v)	-	0.090	Inorganic nitrogen (1.0%, w/v)	-	0.016	
	Glucose	0.094		(NH ₄) ₂ SO ₄	0.106	
	Xylose	0.137		NH ₄ Cl	0.066	
	Arabinose	0.131		NH ₄ NO ₃	0.268	
	Rhamnose	0.028		NaNO ₃	0.069	
	Fructose	0.450		KNO ₃	0.046	
	Galactose	0.149		Phosphate (0.1%, w/v)	-	0.028
	Mannose	0.074		(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.038	
	Sucrose	0.399		NaH ₂ PO ₄	0.056	
	Lactose	0.018		K ₂ HPO ₄	0.182	
Organic nitrogen (1.0%, w/v)	-	0.097	Inorganic salt (0.001%, w/v)	-	0.153	
	Polypeptone	0.284		FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.113	
	Beef extract	0.220		KCl	0.149	
	Casamino acid	0.071		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.028	
	Bacto soytone	0.282		Na ₂ SO ₄	0.125	
	Yeast extract	0.077		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.036	
	Urea	0.077		CaCl ₂	0.117	
	Glycine	0.254		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.159	
				MnSO ₄ ·6H ₂ O	0.098	
				MgSO ₄ + FeSO ₄ + MnCl ₂	0.143	
		Mineral solution	0.079			

Same weight of MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O and MnCl₂·6H₂O was used in the experiment. Mineral solution contains: CaCl₂, 0.05%; FeCl₃·6H₂O, 1.67%; ZnSO₄·7H₂O, 0.018%; CuSO₄·5H₂O, 0.016%; CoCl₂·6H₂O, 0.018%; EDTA, 2.01%. The bacteria were cultivated in test tubes on a reciprocating shaker at 30°C for 48 hrs.

첨가하였을 때 0.284 mg/ml로 가장 좋았으며 첨가하지 않았을 때 보다 193%의 증가효과가 있었다(Table 4). 한편 polypeptone의 농도를 0~2.0%(w/v)까지 변화시켜 단백질 생산량을 비교한 결과, 최적농도는 1.0%이었다. 단백질 생산에 미치는 무기질소원의 영향을 조사하기 위해 각각의 무기질소원을 1.0%(w/v)되게 첨가하여 조사한 결과는 NH₄NO₃가 가장 많은 단백질을 생산하였으며(Table 4), 그 최적농도는 0.1%이었다(Table 5). 이

Table 5. Effect of various component concentration on the production of protein

Component	Concentration (%)	Protein (mg/ml)
Fructose	0.5	0.095
	1.0	0.147
	2.0	0.269
	3.0	0.321
	4.0	0.412
Polypeptone	0.1	0.198
	0.5	0.211
	1.0	0.290
	2.0	0.258
	2.0	0.258
NH ₄ NO ₃	0.1	0.437
	0.5	0.302
	1.0	0.268
	2.0	0.085
	2.0	0.085
K ₂ HPO ₄	0.05	0.181
	0.10	0.192
	0.30	0.120
	0.50	0.112
	0.50	0.112
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	0.178
	0.005	0.190
	0.010	0.172
	0.010	0.172
	0.050	0.119

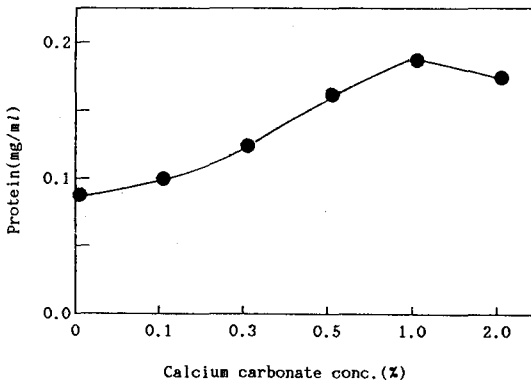


Fig. 1. Effect of calcium carbonate concentration on the production of protein.

와같은 결과는 Tsuchida 등²²⁾과 Miyashiro 등²⁴⁾이 *Bacillus brevis* No. 47의 단백질 생산실험에서 (NH₄)₂SO₄ 1.0% 첨가시 단백질 생산효과가 가장 컸고 이 등²³⁾이 *Bacillus* sp.에서의 단백질 생산실험에서 1.0%의 urea 첨가시 가장 좋았다는 보고와는 다소 상이하였다.

3) 인산원과 무기염의 영향

단백질 생산에 미치는 인산원의 영향을 살펴본 결과, K₂HPO₄ 첨가시가 0.182 mg/ml의 단백질을 생산하여 가장 효과가 좋았으며(Table 4) K₂HPO₄의 농도를 0.5%(w/v)까지 변화시키면서 단백질 생산을 본 결과, 0.1%에서 최대를 나타내었다(Table 5). 단백질 생산에 미치는 무기염의 영향을 알아보기 위해 FeSO₄·7H₂O 등의 무기염을 기본배지에 0.001%(w/v) 첨가하여 배양한 결과, MgSO₄·7H₂O를 제외한 무기염들은 단백질 생산을 저해

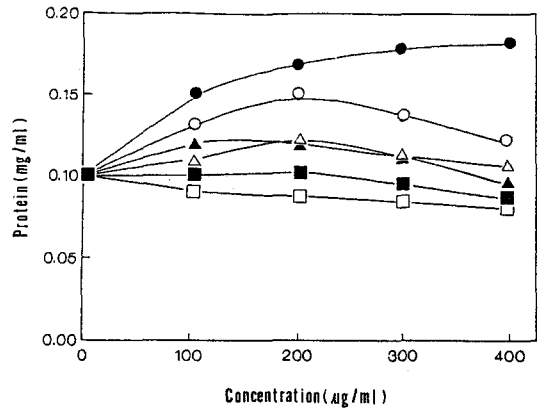


Fig. 2. Effect of various antibiotics concentration on the production of protein. ●—●, Penicillin G; ○—○, Lincomycin; ▲—▲, Streptomycin; △—△, Chloramphenicol; ■—■, Kanamycin; □—□, Gentamycin.

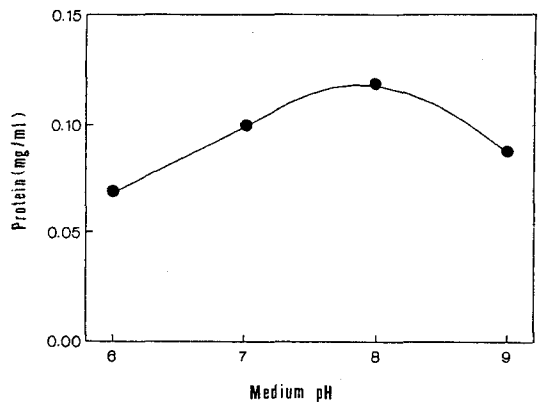


Fig. 3. Effect of pH on the production of protein.

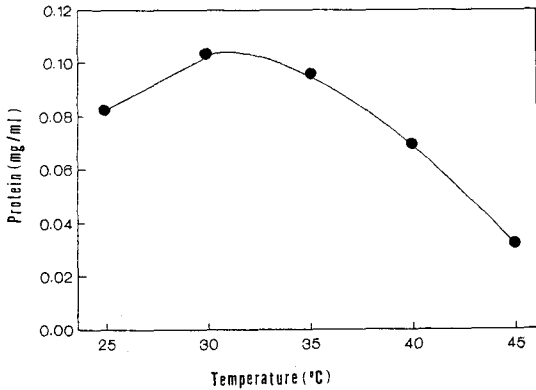


Fig. 4. Effect of temperature on the production of protein.

하였고 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 만이 단백질 생산에 효과가 있었으며 기타 무기염들은 단백질 생산을 저해하였다(Table 4). $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도를 0.001~0.050%로 변화시켜 단백질 생산을 조사한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 0.005%에서 최대를 나타내었다.

4) $CaCO_3$ 의 영향

미생물에 의한 단백질 생산시 배양액 중의 pH를 중화시켜 주고 glucose의 자화에 영향을 미치는 $CaCO_3$ 첨가효과는 Fig. 1과 같이 1.0%(w/v)를 첨가하였을 때 0.183 mg/ml의 단백질을 생산하여 가장 효과가 컸다. 이와 같은 결과는 이 등²³⁾이 *Bacillus* sp.에 의한 단백질 생산시 $CaCO_3$ 를 2.5%를 첨가하는 것이 가장 효과가 있다는 보고와 다소 상이하였다.

5) 항생물질의 영향

세포벽 투과성을 증진시키는 인자로 알려진 각종 항생물질의 첨가가 단백질 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. 항생물질 중 penicillin G를 첨가하였을 때는 다른 항생물질보다 단백질 생산이 촉진되어 400 µg/ml 첨가시에는 0.182 mg/ml의 단백질을 생산하였다. 이는 Miyashiro 등¹⁶⁾이 *Bacillus brevis* No. 47에 의한 단백질 생산시험에서 penicillin G가 효과가 있었다는 보고와 유사하였다. Penicillin G 이외의 항생물질은 단백질 생산에 미치는 영향이 적어 본 WY-60 균주는 항생물질에 대한 감수성이 매우 낮은 것으로 생각된다.

6) pH 및 온도의 영향

단백질 생산을 위한 기본배지의 초기 pH를 5.0~9.0으로 조절하여 pH에 따른 단백질 생산량을 비교한 결과는 Fig. 3과 같이 pH 8.0에서 최대 생산량을 나타내었다. 이는 *Bacillus brevis* No. 47의 최적 pH가 8.0이었다는 보고²²⁾와 유사하였다. 단백질 생산에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과, 30°C에서 단백질 생산량이 최대로

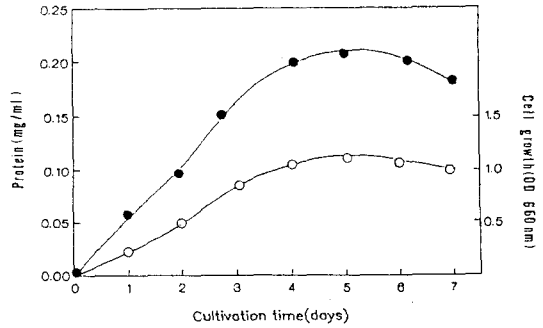


Fig. 5. Extracellular protein production and cell growth on cultivation time. ●—●, Extracellular protein; ○—○, Cell growth.

나타났고 25°C 이하와 40°C 이상에서는 단백질 생산이 현저히 감소하였다(Fig. 4).

7) 배양시간에 따른 단백질 생산

기본배지인 TP 배지에 WY-60 균주를 접종하여 배양 시간에 따른 단백질 생산량을 비교, 검토한 결과는 Fig. 5와 같다. 단백질은 배양 5일째 0.214 mg/ml의 단백질을 생산하였으며 균 생육도 가장 좋았다. 이와같은 결과는 Tsuchida 등²²⁾의 보고와 유사하였다.

사 사

본 연구는 1991년도 대구대학교 학술연구조성비에 의한 연구임.

참 고 문 헌

1. 山田浩一等: 日本食品工業, 17: 20(1974)
2. 中原忠篤等: 日本食品工業, 17: 20(1974)
3. 加藤清昭: 日本食品工業, 17: 20(1974)
4. Snedecor, B. and Cooney, C. L.: Appl. Microbiol., 27: 1112(1974)
5. 유주현, 정건섭, 변유량: 산업미생물학회지, 7: 65 (1979)
6. Bees, R. N. and Rahway, N. J.: Anal. Chem., 20: 30 (1948)
7. Stickland, L. H.: J. Gen. Microbiol., 5: 698(1951)
8. Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 40: 523(1976)
9. Akaki, M., Nakaseko, Y. and Yamada, T.: Agric. Biol. Chem., 42: 2391(1978)
10. Shaku, M., Koike, S. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 44: 99(1980)
11. Blobel, G. and Dobberstein, B.: J. Cell Biol., 67: 835(1975)
12. Tsukagoshi, N., Yamada, H., Tsuboi, A. and Udaka

- S.: Appl. and Environ. Microbiol., 42 : 370(1981)
13. Yamada, H., Tsukagashi, N. and Udaka, S.: J. Bacteriol., 256 : 322(1981)
 14. 山根國男: 化學と生物, 21 : 659(1983)
 15. Tagawa, M. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 44 : 1867(1980)
 16. Miyashiro, S., Enei, H., Takinami, K., Hirose, Y., Tsuchida, T. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 44 : 2297(1980)
 17. Haward, L. V., Dalton, D. D. and Mccouberg, W. K., Jr.: J. Bacteriol., 257 : 748(1982)
 18. Hussain, M., Ichihara, S. and Mizushima, S.: J. Bacteriol., 257 : 5177(1982)
 19. Tsuboi, A., Uchihi, R., Tabata, R., Takahashi, Y., Hashiba, H., Sasaki, T., Yamagata, H., Tsukagoshi, N. and Udaka, S.: J. Bacteriol., 261 : 365(1986)
 20. Noel, R. K.: Bergey's manual of systematic bacteriology, 2 : 1104(1984)
 21. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: J. Biol. Chem., 193 : 265(1951)
 22. Tsuchida, T., Miyashiro, S., Enei, H. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 44 : 2291(1980)
 23. 이재숙, 김찬조, 이종수: 한국농화학회지, 31 : 187 (1988)
 24. Miyashiro, S., Enei, H., Hirose, Y. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 44 : 105(1980)

Production of extracellular protein from *Bacillus* sp. WY-60

Shin Park and Oh-Jin Kwon* (Department of Agricultural Chemistry, Taegu University, Kyungsan 713-714, Korea, *Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea)

Abstract : A bacteria strain producing extracellular protein was isolated and identified from soil samples, and the optimum conditions of producing protein were investigated. Eleven strains of bacteria were isolated from soil samples. Among which WY-60 strain showed a very strong capability of producing protein and identified as a *Bacillus* sp. The optimum composition of nutrient medium for the production of the protein by WY-60 was fructose 4.0%, polypeptone 1.0%, NH_4NO_3 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, CaCO_3 1.0% and the optimum pH and temperature were 8.0 and 30°C, respectively. The penicillin G and lincomycin added to the above medium were effective for the protein production of the WY-60, but other antibiotics were non-effective. The maximum production of protein was obtained after 5 days culture.