

Bacillus 屬균에 의한 菌體外 단백질의 생산에 대하여

車 賢 晶 · 金 燦 祚

忠南大學校 農科大學 食品加工學科

(1985년 8월 13일 수리)

Studies on the Extracellular Protein Production by *Bacillus* sp.

Hyeon-Jeong Cha and Chan-Jo Kim

Dept. of Food Sci. and Technol., College of Agriculture, Chungnam National University, Chungnam, Korea

Abstract

Seventeen extracellular protein producing bacteria were isolated from soil samples, among which T219 strain having a strong capability of producing the protein was selected and identified for investigation of biological characteristics. The factors which affect the protein production were investigated and the results are summarized as follows.

T219 strain which produces the most extracellular protein was identified as *Bacillus* sp. Optimum temperature and pH for production of the extracellular protein by T219 strain were 25°C and 7.5 respectively. Almost no activities of protease and amylase were observed in the protein produced by the protein producing bacteria. In the medium containing yeast extract, the cell growth was moderately high, but almost no accumulation of protein was observed. However, polypeptone had significant effects on both the cell growth and the protein accumulation. The addition of glycine and L-isoleucine to the medium containing polypeptone, yeast extract and meat extract had a great effect on the protein production; 4mg/ml of protein accumulation was observed.

緒 論

단백질을 미생물에 의해 대량으로 값싸게 생산 하려는 시도는 제 1 차 세계 대전 중 독일에서 *Torula* 酵母를 대량 培養한 것을 최초로 최근에는 C₁₋₂化合物을 원료로 한 미생물 균체의 생산에 대한 열 구가 진행되고 있다¹⁻⁸⁾. 이러한 연구는 미생물 세

포종의 단백질을 이용하는 것인데 반해 Udaka가 시도한 방법은 미생물이 분비하여 균체외에 생산 하는 단백질 그 자체를 이용하는 점에서 특색이 있다. Udaka⁹⁾는 토양에서 다량으로 단백질을 생산하는 *Bacillus brevis* No. 47를 分離하여 단백질 생산균이라 하였다. 최근 단백질의 菌體外 생산에 관한 연구로는 赤木等¹⁰⁾의 酵母에 의한 菌體外 단백질 생산의 연구, 高橋¹¹⁾의 butane을 탄

소원으로써 다량의 菌體外 단백질을 생산하는 연구, 上田等¹²⁾의 *Bacillus mesentericus niger* IFO3214의 變異株를 사용하여 菌體外 단백질생산을 촉진시키는 연구, 水永等¹³⁾의 酵母에 유전자 조작을하여 세포내에 있는 단백질을 分泌시키는 연구, 山根等¹⁴⁾의 枯草菌에 유전자 조작을 하여 단백질의 分泌를 촉진시키는 연구, Morio Akaki 等¹⁵⁾의 酸性條件下에서 酵母에 의한 단백질 생산에 관한 연구등을 볼수있다. Udaka等^{16,17)}은 *Bacillus brevis* No. 47에 의한 단백질생산에서 영향을 미치는 인자중 glycine과 L-isoleucine이 효과적인 질소원이 된다는것을 발표하였으며, 최적 농도로 동시에 첨가하면, 12g/l의 단백질을 생산한다고 보고하였다. 또한 上田等^{12,18)}은 *Bacillus mesentericus niger* IFO3214의 변이주인 *Bacillus mesentericus* HS-29 菌株의 菌體外 단백질생산을 시험한 결과 7.8mg/ml을 생산하였고, 1.5% glycine을 첨가시에는 10mg/ml 단백질을 생산하였다고 한다. 또, S. Miyashiro等¹⁹⁾은 *Bacillus brevis* No. 47의 變異株에 bacitracin을 60μg/ml 첨가하여 약 9mg/ml의 단백질을 생산을 보았다. 한편, 단백질을 分泌하지 않는 菌일지라도 變異에 의해서 分泌菌으로 전환이 되는데 易熱性 및 耐熱性 enterotoxin을 分泌하는 대장균은 變異에 의해서 菌體外에 단백질을 分泌할 수 있다고 한다^{20,21)}. 또한, *Escherichia coli* W4626phe⁻의 변이주 PE4LA도 세포의 분해없이 세포중의 단백질을 전체의 15%가량 분비했다고 한다^{22,23)}. 필자는 132점의 토양으로부터 Udaka의 방법에 準하여 菌體外 단백질을 생산하는 菌株 T219를 선정하여 同定하고, 生理의特性和 T219의 단백질생산조건을 검토하여 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 菌株의 分離

1) 分離源 : 강력한 菌體外 단백질 생산균주(이하 단백질 생산균이라 함)를 분리하기 위해서 大田近郊에서 채취한 토양 132점을 분리시료로 사용하였다.

2) 分離 培地 : 분리용 배지는 Table 1 및 2와 같은 Udaka의 T₁, T₂배지를 사용하였다⁹⁾. 이들 배지성분중 glucose와 urea는 별도로 殺菌하여 첨가하였다.

3) 培養 : T₁ 및 T₂ 배지(pH7)를 petri 접시에 10ml씩 分注하여 고화시킨후 시료 1g을 각각 생리적 식염수 10ml에 현탁하여 30분간 정치한 다음 그 상액 1.0ml씩을 생리적 식염수 10ml에 넣은후 10⁶배 희석하고 그 0.1ml를 평판배지에 도말하여 30°C에서 48시간 培養하였다.

4) 菌株 選定 : 상기와 같이 培養한 후 5% perchloric acid 5ml를 평판상에 가하여 10분이상 방치한 다음, 평판배지상의 세포집락을 긁어내고, 수도물로 씻은 후, 그 집락 밑에 형성된 白濁의 농도와 크기를 측정하여 단백질 생산이 우수한 菌株를 1차 선정하였다. 선정된 菌株를 T₁ 및 T₂ 액체배지에 각각 접종하여 29°C에서 48시간 진탕배양시킨후(분당 120진동, 7cm진폭), 배양액을 10,000rpm에서 20분간 원심분리시켜 균체를 제거한 다음 그 상등액을 동량의 10% trichloroacetic acid (TCA)액에 혼합하여 실온에서 30분이상 방치한 후 다시 원심시켜 침전물을 소량의 1N-NaOH에 녹이고, 물로 희석하여 단백질생산을 측정하였다. 상기 조작을 1회 되풀이하여 더 정확한 측정을 하였으며, 그 중 생산력이 높은 1菌株를 선정하였다⁹⁾.

Table 1. The compositions of the medium for isolation(T₁ medium).

Composition	Content(%)
K ₂ HPO ₄	0.3
KH ₂ PO ₄	0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02
Peptone	0.3
Meat extract	0.2
Glucose	2.0
Urea	0.2

Table 2. The compositions of the medium for isolation(T₂ medium).

Composition	Content(%)
Peptone	1.0
Meat extract	0.5
Yeast extract	0.2
Glucose	1.0

2. 蛋白質의 定量法

Folin-Lowry法에 의해서 bovine serum albumin을 標準蛋白質로 하여 Spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정하여 定量하였다²⁴⁾.

3. 菌體增殖의 測定

T₁ 및 T₂ 液體培地에서 각각 290°C에서 48시간 振盪培養시킨 배양액을 10,000rpm에서 20분간 원심분리시켜 菌體를 포집한 다음 homogenizer로 1분간 처리하여 菌體를 파괴시킨 후 660nm에서 흡광도를 측정하여 細胞增殖度로 표시하였다¹⁶⁾.

4. 選定 菌株의 同定

“Manual of Microbiological Method”²⁵⁾ 및 “Manual of Methods for General Bacteriology”²⁶⁾에 의하여 선정균주의 형태학적 성상을 비롯한 菌學的 諸特性을 검토하고 “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”²⁷⁾에 의하여 同定하였다.

5. Protease와 Amylase 活性 測定

protease活性측정은 0.5% milk casein이 함유되어 있는 nutrient agar배지⁹⁾를 사용하여 30°C에서 2일간 배양한 후 평판에 5% TCA를 흘려서 colony주위에 나타나는 환상을 보고 활성이 있음을 측정하였고, amylase活性측정은 0.5% starch가 함유되어 있는 nutrient agar배지를 사용하여 30°C에서 2일간 배양한 후 평판에 요오드용액을 흘려서 colony주위가 청색이 되지 않는 透明帶를 보아 녹말의 분해능이 있음을 측정하였다.

6. 選定菌株의 蛋白質 생산조건

1) 배양온도와 pH : T₂₁₉菌株를 T₂액체배지에 접종한 후 20~40°C까지 5°C간격으로 조절한 恒溫水槽內에서 48시간 진탕배양한 다음, 생산된 단백질을 Folin-Lowry법을 이용하여 540nm에서 측정하였다. 최대단백질 생산량을 보인 온도를 최적온도로 하였고 최적온도에서 초발 pH를 7.0~9.0까지 0.5간격으로 조절하여 최적 pH를 검토하였다.

2) 배양시간에 따른 단백질 생산 : T₂₁₉菌株를 T₂액체배지에 접종한 후 1일~5일까지 29°C, 48시간 배양한 다음 Folin-Lowry법을 이용하여 540nm에서 단백질을 측정하였다.

3) Yeast extract의 添加效果 : medium A²⁸⁾에

서 polypeptone을 제외하고 yeast extract를 0.1~0.5%까지 각각 첨가하여 29°C, 48시간 진탕 배양한 후 단백질을 측정하여 yeast extract의 첨가효과를 검토하였다.

medium A; 0.3% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05%(NH₄)₂SO₄, 0.5% polypeptone, 0.15% ammonium acetate, 0.025% MgSO₄·7H₂O, 1% glucose, 0.001% FeCl₃·6H₂O, 0.1% yeast extract

4) Polypeptone의 添加效果 : medium A 中에서 yeast extract를 제외하고 polypeptone을 1~3%까지 각각 첨가한 후 yeast extract의 첨가때와 같은 방법으로 培養과 단백질 측정을하여 polypeptone의 첨가효과를 검토하였다.

5) 각종 有機窒素源의 混合添加效果 : 1% glucose, 0.2%(NH₄)₂SO₄, 0.1%KH₂PO₄, 0.02%MgSO₄·7H₂O가 함유되어 있는 배지에 각종 有機窒素를 첨가하여 29°C에서 48시간 진탕배양한 다음 Folin-Lowry法을 이용하여 540nm에서 생산된 단백질을 측정하여 有機窒素源의 효과를 검토하였다.

6) MgSO₄·7H₂O의 添加效果 : medium A에 MgSO₄·7H₂O를 0.02~0.1%까지 첨가한 후 29°C에서 48시간 진탕배양한 다음 단백질을 측정하여 Mg⁺⁺의 효과를 검토하였다.

7. Streptomycin과 EDTA에 의한 영향

T₂배지에 streptomycin을 10~100μg/ml농도로 milipore filter로 濾過除菌하여 첨가하고, EDTA는 1~5mM농도로 첨가한 후 최적온도에서 48시간 배양하여 생육유무와 단백질생산에 미치는 영향을 검토하였다.

結果 및 考察

1. 菌의 分離 및 選定

T₁ 및 T₂ 培地를 사용하여 단백질생산능이 우수한 菌株 17株를 1차로 분리 선발하였으며, 이들의 特性은 Table 3과 같다. 이 중에서 T₂₁₉菌株를 한천평판배지위에서의 白濁의 크기와 농도로 보아 우수균주로 선정하여 본 실험에 사용하였다. 特히, T₁배지보다 T₂배지에서 단백질 생산능이 높은 菌株가 많이 발견이 되었으며, 이것은 배지의 조성으로 보아 유기질소원이 단백질생산에 효과적임을 보여주는 것이라 하겠다.

Table 3. Characteristics of protein-production bacteria.

Strain number	Protein produced ^{a)} (mg/ml)	Growth (660nm)	Final pH	Color of culture broth ^{c)}	Opaque area size beneath the colony	Degree of density beneath the colony ^{d)}	Gram strain	Extracellular	
								Protease ^{b)}	Amylase ^{b)}
T160	0.83	4.16	9.6	W	2.3	+	+	-	-
T247	0.93	1.2	6.4	W	2.3	+	+	-	+
T224	0.68	4.38	9.5	Y	1.3	±	+	+	+
T246	0.72	6.72	9.5	Y	1.5	±	+	+	-
T216	0.99	5.6	9.7	Y	2.2	+	+	-	-
T219	2.475	4.7	9.5	W	2.5	+	+	-	-
T234	0.71	3.9	9.5	Y	1	±	+	+	-
T234'	0.79	9.68	9.3	Y	2	+	+	+	+
T221	0.825	7.28	9.5	W	2.5	+	+	-	+
T214	1.2	4.72	9.4	W	2.3	+	+	-	-
T121	0.68	5.44	9.5	W	1.2	±	+	+	-
T138	1.45	2.56	8.3	W	2.3	+	+	-	+
T120	0.74	2.64	7.2	W	1	±	+	+	-
T117	0.52	3.6	8.7	W	1	±	+	+	+
T229	0.93	7.28	9.5	W	2	+	+	-	+
T222	0.93	4	7.3	W	1.2	+	+	-	-
T236	0.48	4.88	7.8	W	1	±	+	+	-

a) Concentration of extracellular protein produced after shake culture at 29°C for 2 days in medium T₂.

b) Test was performed as described in materials and methods.

+, formation of a large halo

-, almost no halo

c) W, white

Y, yellow

d) #, strong density

+, middle density

±, weak density

2. 菌의 同定

선정한 T219菌株의 특성을 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology²⁷⁾에 따라 조사한 결과는 Table 4, 5, 6과 같다. T219 菌株는 長桿菌으로 gram陽性, 運動性이 있고, 孢子를 形成, Voges-Proskauer 시험이 陰性, oxidase가 陽性인 점등으로 보아 이 菌株는 *Bacillus*속에 속하는 菌으로 추정되었다.

3. 선정菌의 菌體外 단백질 생산조건

1) 최적 온도: T219菌株의 단백질 생산에 미치는 배양온도의 영향을 검토하기 위해 T2 배지에

T219 菌株를 접종하고 20~40°C까지 5°C간격으로 48시간 배양한 후의 결과는 Fig. 1과 같다. 균체 증식과 균체의 단백질생산은 온도에 따라 많은 영향을 받음을 알수있었고, 25°C에서 2.4mg/ml로

Table 4. Morphological characteristics of the isolated strain.

Form	rod
Size	0.5~0.6×1.5~4.0μ
Motility	motile
Gram stain	positive
Spore	+

Table 5. Biological characteristics of the isolated strain.

Hydrolysis of ONPG	+
Production of arginine dihydrolase	-
Production of lysine decarboxylase	-
Production of ornithine decarboxylase	-
Utilization of citrate	+
Production of H ₂ S	-
Urease test	-
Production of deaminase	-
Indole test	-
Voges-proskauer test	-
Liquefaction of gelation	+
Oxidase	+
Catalase	+
Amylase	-
Protease	-

Table 6. Utilization of carbon compound by the isolated strain.

Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	-
Galactose	+
Sorbitol	-
Rhamnose	-
Sucrose	+
Melibiose	-
Amygdaline	+
Arabinose	+

단백질생산이 가장 많았으며, 균체증식도 균체의 단백질 생산량과 비슷한 경향을 보였다. T219 菌 株 의 균체 의 단백질생산 최적온도는 약 25°C 가 됨 을 알 수 있었다.

2) 최적 pH : T₂배지의 pH를 7.0~9.0까지 0.5 간격으로 조절하여 최적온도에서 48시간 배양한 결과는 Fig. 2와 같다. 최적 pH는 7.5이었으며 균체증식은 pH8에서 가장 높았다. 한편 *Bacillus brevis* No. 47²⁸⁾의 최적 pH는 8이고, pH 7.5이하와 pH8.5이상에서는 단백질생산이 현저히 감소하였다는 보고와 비교하여 볼때 본 菌 株 는 차 이 가 있었다.

3) 배양시간에 따른 단백질 생산 : 5일간 배양

하면서 시험한 결과 배양 1일에서는 단백질생산이 저조하였으나 배양 2일에서는 단백질생산이 최대였고, 배양 3일 이후는 감소하였다. 세포의 증식은 2일정도 배양하면 거의 증식은 끝나고 정상기로 들어갔으며 이때 단백질분비는 세포의 증식과 더불어 이루어졌다. 즉, 단백질의 분비축척은 세포의 증식과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있

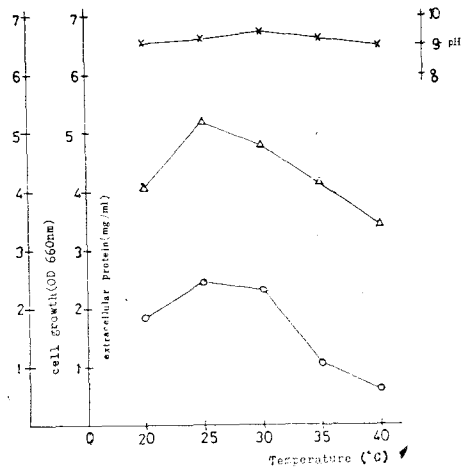


Fig. 1. Effect of temperature on the cell growth and protein production of T219.

○—○ extracellular protein
△—△ optical density at 660nm cell growth
×—× final pH

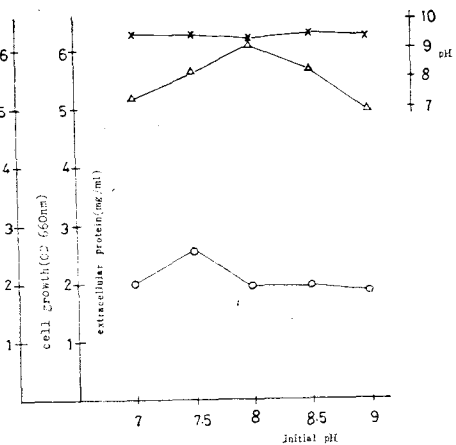


Fig. 2. Effect of pH on the cell growth protein production of T219.

○—○ extracellular protein
△—△ optical density at 660nm cell growth
×—× initial pH

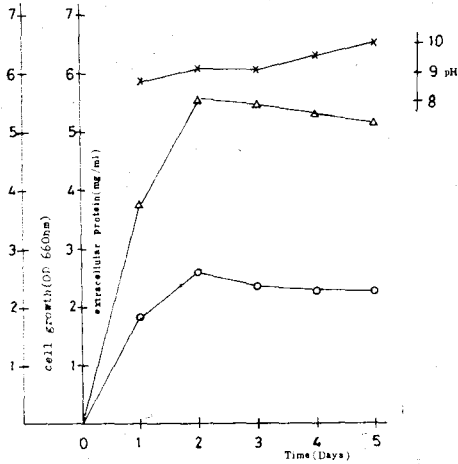


Fig. 3. Time profiles of the cell growth and protein production of T219.
 ○—○ extracellular protein
 △—△ optical density at 660nm cell growth
 ×—× final pH

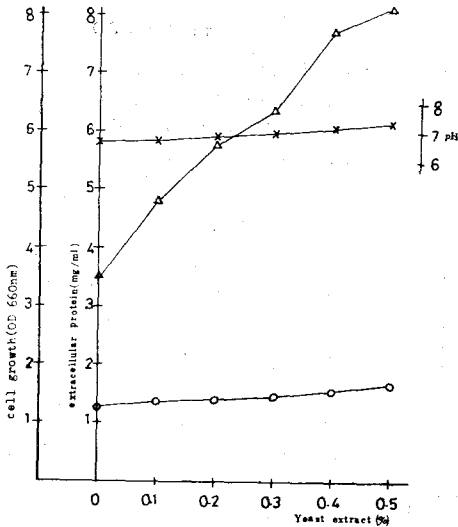


Fig. 4. Effect of yeast extract on the cell growth and protein production of T219.
 ○—○ extracellular protein
 △—△ optical density at 660nm cell growth
 ×—× final pH

었다. 한편 *Bacillus brevis* No. 47^{28,29)}은 40시간 배양에서 4.3mg/ml, 48시간 배양에서 5.1mg/ml의 단백질을 생산하였으며,菌體증식은 배양 1일 이후 감소하였다.

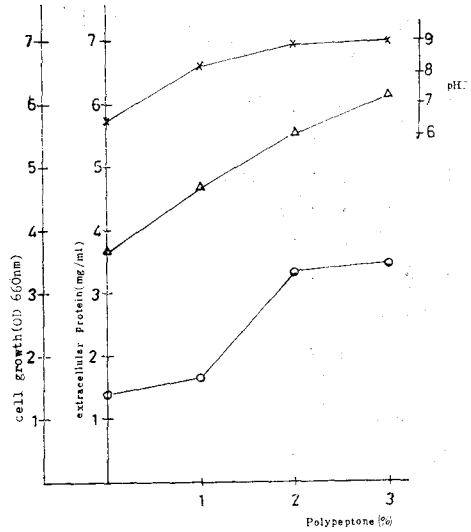


Fig. 5. Effect of polypeptone on the cell growth and protein production of T219.
 ○—○ extracellular protein
 △—△ optical density at 660nm cell growth
 ×—× final pH

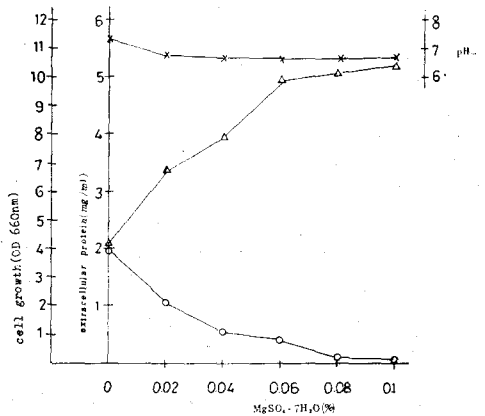


Fig. 6. Effect of MgSO₄·7H₂O on the cell growth and protein production of T219.
 ○—○ extracellular protein
 △—△ optical density at 660nm cell growth
 ×—× final pH

4) Yeast extract의 添加效果 : medium A에서 polypeptone을 제외하고 yeast extract를 0.1~0.5%까지 첨가하여 단백질생산 및 菌體증식을 시험한 결과는 Fig. 4와 같다. yeast extract의 첨가량에 따라 균체증식은 많아졌으나, 단백질 축적은 근소한 증가를 보였을 뿐이다. 이는 Udaka²⁸⁾.

Table 7. Effect of various nutrients on protein production by T219.

Nutrient added(%)	Protein production (mg/ml)	Growth (660nm)	Final pH
YE 0.2	0.09	3.72	5.7
YE 0.5	0.19	5.48	6.5
ME 0.5	0.24	2.44	5
ME 0.5+YE 0.2	0.73	3.6	6.4
PP 0.5	1.176	3.62	6.2
PP 1.0	1.56	4.8	7.5
YE 0.2+PP 1.0	2.1	4.6	6.8
ME 0.5+PP 1.0	2.1	5.6	8.9
YE 0.2+ME 0.5+PP 1.0	2.94	4.6	8.5
YE 0.2+ME 0.5+PP 1.0+Gly 0.25	3.2	3.18	9
YE 0.2+ME 0.5+PP 1.0+Ile 0.5	3.0	5.8	8.3
YE 0.2+ME 0.5+PP 1.0+Gly 0.25+Ile 0.5	4	3.32	8.3
Glu 0.2+Asp 0.1+CysH 0.01	0.1	0.1	2.6
Glu 0.2+Asp 0.1+CysH 0.01+Ile 0.1	0.1	0.1	3.0
Glu 0.2+Asp 0.1+CysH 0.01+Ile 0.1+Gly 0.05	0.1	0.1	2.75
Glu 0.2+Asp 0.1+CysH 0.01+Ile 0.1+Gly 0.05+PP 1.0	0.1	0.1	2.4
AA 0.5	0.1	0.1	2.7
AA 0.5+PP 1.0	0.09	1.9	3.8
None	0.09	0.1	4.2

Medium contained 1% glucose, 0.2% (NH₄)₂ SO₄, 0.1% KH₂PO₄ and 0.02% MgSO₄·7H₂O, pH was adjusted to 7.5.

(Abbreviation: YE, yeast extract; ME, meat extract; PP, polypepton; AA, mixture of 0.2% L-glutamic acid, 0.1% L-aspartic acid, 0.1% L-isoleucine 0.01% L-cysteine)

가 보고한 *Bacillus brevis* No. 47과 비교할때 비슷한 결과였으나 균체증식의 증가는 낮은편이었다.

5) Polypeptone의 添加效果 : mediumA에서 yeast extract를 제외하고 polypeptone을 1~3%까지 첨가한 결과 yeast extract를 첨가했을때와는 대조적으로 단백질축적이 뚜렷하였다. polypeptone 3% 첨가시 단백질 생산이 3.5mg/ml에 달했으며 polypeptone첨가량이 증가할수록 pH는 점차 높아졌다. Udaka^{28,29)} 등이 보고한바에 의하면 *Bacillus brevis* No. 47에 Difco casamino acid를 첨가했을때 균체증식과 단백질축적의 증가는 보였으나 polypeptone첨가시보다는 낮았다고 하며 菌體外 단백질생산량은 4mg/ml에 달했다고 한다. 한편 鶴高等³⁰⁾이 보고한 바에 의하면 polypeptone을 크기로 분별하여 調査한 경우 분자량 2,000~3,000의 polypeptide區分에서 단백질분비

를 촉진하는 작용이 있었다고 한다.

6) 각종 有機窒素源의 混合添加效果 : 단백질생산을 위한 각종 영양분의 첨가초과는 Table 7과 같다. 단백질생산은 glycine, L-isoleucine 역시 polypeptone, yeast extract, meat extract가 함유되어 있는 培地에서 효과가 있었으며, glycine, L-isoleucine을 같이 첨가하였을때 단백질생산이 4mg/ml에 달하는 효과를 나타내었다. 그러나 0.2% L-glutamic acid, 0.1% L-aspartic acid, 0.1% L-isoleucine, 0.01% L-cysteine은 균체성장과 단백질축적에 효과를 나타내지 못하였다. 이들의 결과로 볼 때 단백질생산과 균체성장은 polypeptone, glycine, L-isoleucine등에 의해서 영향을 받음을 알 수 있었다. Udaka等¹⁶⁾의 보고에 의하면 *Bacillus brevis* No. 47은 48시간 배양 후에 단백질 생산이 최고로 12.1g/l에 달했다고 한다.

Table 8. Effect of antibiotics and EDTA on the cell growth protein production of T219 strain.

Strain	Streptomycin($\mu\text{g/ml}$)				EDTA(mM)			
	10	30	60	100	1	2	3	5
T219	+	±	±	-	+	+	+	+

(+ : full growth, ± : poor growth, - : no growth)

4. Streptomycin과 EDTA에 의한 영향

T219菌株에 대한 Streptomycin과 EDTA에 의한 영향을 검토한 결과는 Table 8과 같다. T219菌株은 streptomycin의 30 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 생육이 저해되었고, EDTA는 생육에 저해를 주지 않았다. 이는 Udaka等²¹⁾의 단백질을 분비하는 *Escherichia coli* W4626phe⁻의 변이주 PE4LA가 EDTA 3mM이상에서 생육이 저해되었다는 보고와 비교하면 T219菌株은 이들에 대한 내성이 강하였다. 또한 이들에 의한 단백질 분비축진도 인정할 수 없었다. S. Miyashiro 等¹⁹⁾도 *Bacillus brevis* No. 47의 變異株 *Bacillus brevis* N-3 菌株를 사용한 단백질 축적시험에서 bacitracin을 첨가할 때는 단백질의 축적이 8mg/ml로 되어 이것의 단백질 분비축진 효과가 인정되었으나, streptomycin의 첨가에서는 단백질 축적이 1.7mg/ml로 되어 그 분비 축진 효과를 인정할 수 없었다고 한 바 있다. 또한 bacitracin은 단백질 합성에는 거의 영향을 줄 수 없는 것으로 세포표층 특히 peptidoglycan층에 변화를 끼쳐 直間接的으로 단백질의 분비를 축진하는 것이라고 추정하였다.

要 約

토양으로부터 菌體外 단백질 생산균주 17株를 분리하여 이 중 단백질생산이 강한 T219를 선정하여 同定하였으며 단백질 생산에 영향을 미치는 因子들을 검토하였다. T219 菌株는 *Bacillus*속으로 同定되었으며 菌體外 단백질생산 최적온도는 25°C, pH는 7.5이었다. 단백질생산균주들이 분비하는 단백질에서는 protease와 amylase활성은 보이지 않았으며, 배양시간에 따른 단백질생산은 배양 2일에서 최대로 되었다. yeast extract와 meat extract를 함유한 배지에서 균체증식은 컸지만, 단백질 축적은 거의 없었고, polypeptone은 菌體

증식과 단백질생산에 큰 효과를 보였다. 또한 배지에 glycine과 L-isoleucine을 혼합하여 첨가하였을 때 단백질생산의 효과가 커서 4mg/ml의 단백질축적이 있었다. T219菌株는 streptomycin의 30 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 생육이 저해되었고, EDTA의 5mM농도에서는 생육에 영향을 받지 않았다. 또한, 이들 물질은 단백질생산에 영향을 미치지 않았다.

參 考 文 獻

1. 山田浩一等 : 日本食品工業, 17(2) : 20(1974).
2. 中原忠篤等 : 日本食品工業, 17(4) : 20(1974).
3. 加藤清昭 : 日本食品工業, 17(6) : 20(1974).
4. 榭田淑郎 : “微生物タンパクの開発”, 講談社, (1978).
5. Snedecor B. and Cooney C.L.: Appl. Microbiol., 27 : (1112) (1974).
6. 유주현, 정건섭, 변유량 : 産業微生物學會誌, 7 : (2), 65(1979).
7. Bees, R.N. and Rahway, N.J.: Anal. Chem., 20 : 30(1948).
8. Stickland, L.H.: J. Gen. Microbiol., 5 : 698. (1951).
9. Shigezo Udaka: Agr. Biol. Chem., 40 : (3), 523(1976).
10. 赤木盛郎, 中世古幸信, 山田哲也 : 化學と生物, 18(9) : 607(1980).
11. J. Takahashi: Adv. Appl. Microbiol, 26 : 117(1980).
12. 原敏夫, 藤尾雄策, 上田誠之助 : 日本農化學會講演要旨集, p.3(1982).
13. 水永武光 : 化學と生物, 20(11) : 742(1983).
14. 山根國男 : 化學と生物, 21(10) : 659(1983).
15. Morio Akaki, Yukinobu Nakaseko and Tetsuya Yamada: Agric. Biol. Chem., 42 (12) : 2391(1978).
16. Shigeyoshi Miyashiro, Hitoshi Enei, Yoshio Hirose and Shigezo Udaka: Agr. Biol. Chem., 44(1) : 105~112(1980).
17. Takayasu Tsuchida, Shigeyoshi Miyashiro, Hitoshi Enei and Shigezo Udaka: Agric. Biol. Chem., 44(10) : 2291(1980).
18. T. Hara and S. Ueda: J. Ferment. Technol., 59 : 341(1981).

19. S. Miyashiro, H. Enei, K. Takinami, Y. Hirose, T. Tsuchida, and S. Udaka: *Agric. Biol. Chem.*, 44(10) : 2297(1980).
20. 山崎眞狩, 田村學造 : 化學と生物, 21(10) : 649(1983).
21. M. Tagawa: *Adv. Appl. Microbiol.*, 26 : 117(1980).
22. M. Tagawa and S. Udaka: *Agric. Biol. Chem.*, 42(6) : 1157(1978).
23. Munekazu Tagawa and Shigezo Udaka: *Agric. Biol. Chem.*, 44(8) : 1867(1980).
24. D.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farrand, and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, 193 : 265(1951).
25. *Manual of Microbiological Method*: Mcgraw-Hill book Co. (1957).
26. Gerhardt, Murray Costilow Nester, Wood Krieg and Phillips: *Methods for General Bacteriology*: ASM, 36~40(1981).
27. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th edition. The Williams and Wilkino Co. Baltimore, (1974).
28. Masao Shaku, Shoko Koike, and Shigezo Udaka: *Agric. Biol. Chem.*, 44(1) : 99(1980).
29. S. Udaka: "Development in Food Science", Vol. 2, ed. by H. Chiba et al. (proc. 5th Intern. Congr. Food Sci. & Technology), Kodansha & Elsevier, p.285(1979).
30. 鶴高重三, 塚越規弘 : 化學と生物, 20(8) : 506 (1982).
31. Munekazu Tagawa and Shigezo Udaka: *Agric. Biol. Chem.*, 42(6) : 1157(1978).