

Bacillus sp. T₂-3가 생산한 균체의 단백질의 성질

이재숙 · 김찬조 · 이종수
충남대학교 식품가공학과

Properties of the Extracellular Protein Produced by *Bacillus* sp. T₂-3

Jae-Sook Lee, Chan-Jo Kim and Jong-Soo Lee
Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Chungnam National University, Daejeon 302-764, Korea

Abstract

Extracellular protein produced by *Bacillus* sp. T₂-3 was characterized for its patterns of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and sephadex G-100 filtration, spectrum of maximum absorption, composition of amino acid and solubility to solvents. The extracellular protein was composed of two kinds of protein which was little difference in molecular weight about 49,000. Maximum absorbance of the extracellular protein was showed at 230nm and main amino acids of the extracellular protein were aspartic acid, glutamic acid and alanine. Solubility of the extracellular protein was 55.8% in H₂O and 28.4% in 0.4% NaOH.

서 론

식사료문제 해결책의 일환으로 미생물이 생산하는 균체의단백질에 관한 연구는 주목할 대상이다. 그러나 이들의 이용에는 그 물리화학적 및 생물학적 성질의 검토가 필요한 것이다.

미생물의 균체의단백질에 관한 연구는 주로 이들의 대량생산¹⁻⁹⁾과 분비기작¹⁰⁻¹³⁾에 관한 것이었고 이용성을 고려한 연구는 별로 볼 수 없다.

따라서 필자들은 전보¹⁴⁾에서 *Bacillus* sp. T₂-3을 chemically defined medium에 배양하여 2.0 mg/ml의 균체의단백질을 생산한 결과를 보고 하였다. 여기에서는 생산된 균체의 단백질의 아미노산조성과 적외선 spectrum 등 몇가지 물리화학적 성질을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 균체의단백질의 생산

전보¹⁴⁾의 균체의단백질(이하 단백질이라 함) 생산 최적조건에서 단백질을 생산하고 10% trichloroacetic acid (TCA)로 침전시켜 회수한 다음 5% TCA로 3회 세척하였다. 이를 수도수로 1주야 투석한 다음 동결건조기(Chemhab Instruments, SB-4)로 건조시켜 얻은 단백질을 시료로 하였다.

2. 단백질의 특성

1) 전기영동의 형태

Laemmli¹⁵⁾의 방법에 따라 1% SDS와 β -mercaptoethanol 및 10% glycerol 등이 함유되어 있는 Tris-HCl 완충용액(pH 6.8)과 1mg/ml의 시료 단백질용액을 등량 혼합하여 5분간 가열한 다음 10% polyacrylamide slab gel로 전기영동 하였다. 이를 0.1% coomassie brilliant blue R-250으

로 실온에서 1주야 염색한 후 10% methanol이 함유된 7% 초산으로 탈색시켰다.

2) Gel 여과 현상

pH 7.2의 50mM 인산완충액에 sephadex G-100을 현탁시킨 후 이를 분취수집기(LKB 2111-Multirac, U.K.)의 유리컬럼(3.5×60cm)에 충전시킨 다음 1mg/ml의 시료단백질 용액을 주입하여 0.5 ml/min.으로 3ml씩 분취하고 이들의 흡광도를 280nm에서 측정하였다.

3) 분자량

Cytochrome c 등의 표준단백질과 시료단백질을 상기와 같이 전기영동한 후 각각의 상대이동도를 계산한 다음 이들을 반대수그래프에 도화하여 분자량을 측정 하였다.

4) 최대흡수파장 및 적외선 spectrum

최대흡수파장은 단백질 1g을 0.1N NaOH 5ml에 용해시킨 후 분광분석기로 400nm에서 200nm까지 0.5cm/min.로 scanning 하여 측정하였고 또한 단백질과 KBr로 disc를 만든후 적외선분광분석기로 spectrum를 측정 하였다.

5) 아미노산 조성

Mason 등¹⁶⁾의 산화가수분해법으로 단백질 500 mg을 가수분해시킨 후 아미노산자동분석기 (LKB Alpha-450, U.K)로 분석 하였다.

(+)



(-)

Fig. 1. SDS-PAGE electrophoretogram of the protein produced by *Bacillus* sp. T₂-3

6) 용매에 따른 용해도

이 등¹⁷⁾의 보고를 참고하여 H₂O, 10% NaCl, 70% EtOH 및 0.4% NaOH 등에 시료단백질을 순차적으로 용해시킨 후 상징액중의 단백질함량을 Lowry 법¹⁸⁾으로 측정하여 용매에 따른 용해도를 검토 하였다.

결과 및 고찰

1. 단백질의 전기영동과 gel 여과 및 분자량

Bacillus sp. T₂-3로 부터 생산된 단백질을 전기영동한 결과 그림 1과 같이 1개의 밴드를 보였고 gel 여과한 결과 그림 2와 같이 두 곳에서 peak를 나타내어 이 단백질은 분자량이 비슷한 2

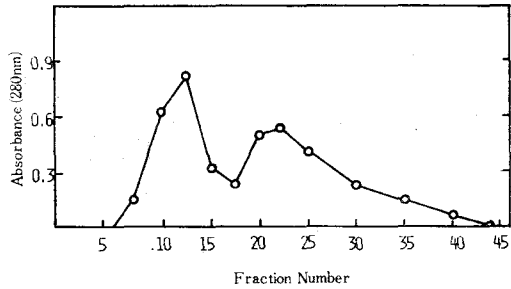


Fig. 2. Sephadex G-100 filtration chromatogram of the protein produced by *Bacillus* sp. T₂-3

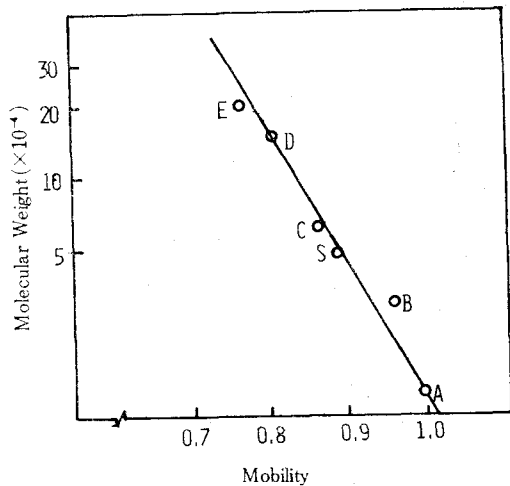


Fig. 3. Determination of molecular weight of the protein produced by *Bacillus* sp. T₂-3

- A : Cytochrom C 12,400
- B : Carbonic anhydrase 29,000
- C : Albumine, bovin serum 66,000
- D : Alcohol dehydrogenase 150,000
- E : B-Amylase 200,000
- S : Sample

종의 단백질들로 구성이 비교적 단순한 것으로 생각된다.

한편, SDS-PAGE로 균체의 단백질의 분자량을 측정한 결과 그림 3과 같이 약 49,000이었다.

2. 최대흡수파장 및 적외선 spectrum

단백질의 최대흡수파장은 그림 4와 같이 230 nm 부근이었으며 이는 일반적인 단백질의 최대흡수파장보다 다소 낮은 값으로 *Bacillus* sp. T₂-3가 생산하는 단백질의 특성으로 생각되었다.

또한 시료단백질을 구성하는 아미노산의 관능기를 보기 위하여 적외선 spectrum을 조사한 결과 그림 5와 같이 —OH, —NH₂, —COOH 등의 관능기들이 검출 되었다.

3. 아미노산 조성

단백질의 아미노산 조성을 조사한 결과 표 1과 같이 aspartic acid가 8.3%로 가장 많았고 glutamic acid, alanine 등도 많이 함유되어 있었으며 표시가 되지않은 tryptophan 등의 아미노산은 정량하지 못하였다. 이것으로 미루어보아 이 단백질의 아미노산 조성은 황황아미노산은 다소 적었으나 필수아미노산은 고루 갖추고 있었는데 이는 수소세균인 *Hydrogenomonas eutropha*¹⁹⁾와 methanol을 기질로 하여 *Pseudomonas*속으로 부터 생산된 SCP²⁰⁾의 아미노산조성과 대체로 비슷하였으나 *Torula*²¹⁾와 ethanol을 기질로 하여 *Candida*

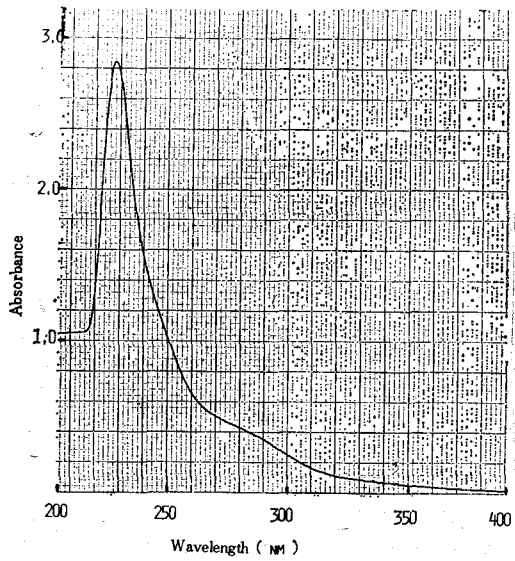


Fig. 4. Absorption spectrum of the protein produced by *Bacillus* sp. T₂-3

*utilis*로부터 생산된 SCP²²⁾ 보다는 lysine 등의 함량이 적었다.

4. 용매에 따른 용해도

각종 용매에 따른 단백질의 용해도는 표 2와 같이 물에 대하여 55.8%, 0.4% NaOH에는 28.4%이었다. 또한 알칼리성이 높을수록 용해도가 증가하였다.

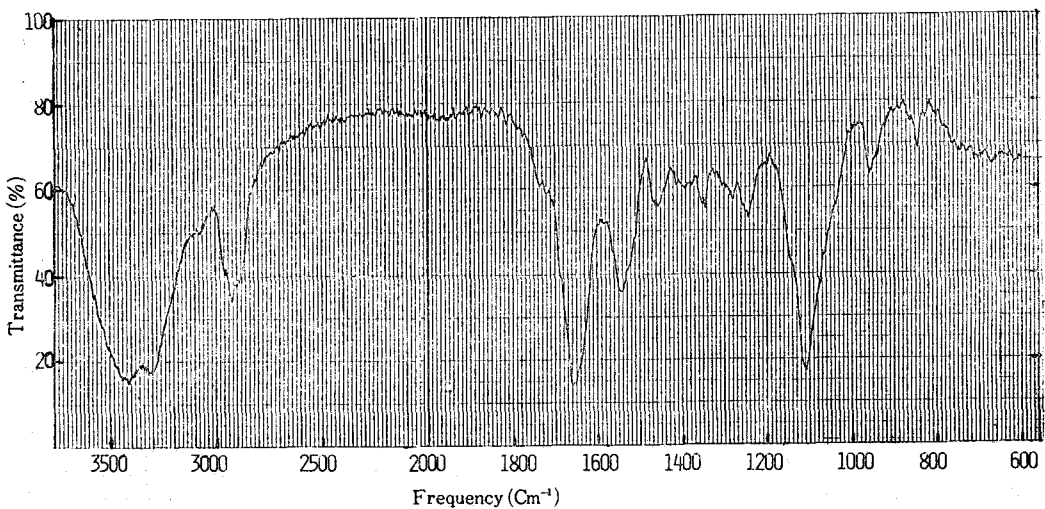


Fig. 5. Infrared spectrum of the protein produced by *Bacillus* sp. T₂-3 (3420 : —CH, 3300 : —OH, 2920 : —NH₂, 1650 : —COOH, 1100 : C—C)

Table 1. Amino acid composition of the protein produced by *Bacillus* sp. T₂₋₃

amino acid	content (%)
threonine	4.7
valine	5.0
methionine	1.7
isoleucine	3.5
leucine	5.8
phenylalanine	3.0
lysine	4.1
serine	3.6
aspartic acid	8.3
glutamic acid	7.6
proline	0.3
glycine	3.6
alanine	6.5
cystine	0.8
tyrosine	1.7
histidine	3.0
arginine	2.4

Table 2. Effect of solvents on solubility of the protein produced by *Bacillus* sp. T₂₋₃

solvent	solubility (%)
H ₂ O	55.8
10% NaCl	3.0
70% EtOH	3.0
0.4% NaOH	28.4

초 록

Chemically defined medium을 사용하여 *Bacillus* sp. T₂₋₃으로 균체의 단백질을 생산한 후 이들의 각종 물리화학적 성질을 조사 하였다.

균체의 단백질은 전기영동과 gel 여과 결과로 분자량이 약 49,000이 되는 비슷한 2종의 단백질로 구성되어 있었다. 최대흡수파장은 230nm 부근이 있으며 aspartic acid를 가장 많이 함유하고 있었다. 또한 균체의 단백질의 물에 대한 용해도는 55.8%, 0.4% NaOH에 대한 용해도는 28.4%로 albumin과 glutelin 계통의 단백질로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 40(3) : 523 (1976)
2. Tsuchida, T., Miyashiro, S., Enei, H. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 44(10) : 2291 (1980)
3. Miyashiro, S., Enei, H., Hirose, Y. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 40(1) : 105 (1980)
4. Tagawa, M. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 44(8) : 1867(1980)
5. Akaki, M., Nakaseko, Y. and Yamada, T.: Agric. Biol. Chem., 42(12) : 2391(1978)
6. 水永, 武光 : 化學と生物, 20(11) : 742(1982)
7. 水島昭二 : Nippon Nōgeikagaku Kaishi, 61(1) : 57(1987)
8. 山根國細 : Nippon Nōgeikagaku Kaishi, 61(1) : 64(1987)
9. 차현정, 김찬조 : 한국농화학회지, 28(3) : 209 (1985)
10. Tsukagoshi, N., Yamada, H., Tsuboi, A. and Udaka, S.: Appl. and Environ. Microbiol., 42(2) : 370(1981)
11. Yamada, H., Tsukagoshi, N. and Udaka, S.: J. Bacteriol., 148(1) : 322(1981)
12. Miyashiro, S., Enei, H., Takinami, K., Hirose, Y., Tsuchida, T. and Udaka, S.: Agric. Biol. Chem., 44(10) : 2297(1980)
13. Tsuboi, A., Uchihi, R., Tabata, R., Takahashi, Y., Hashiba, H., Sasaki, T., Yamagata, H., Tsukagoshi, N. and Udaka, S.: J. Bacteriol., 153(1) : 365(1986)
14. 이재숙, 김찬조, 이종수 : 한국농화학회지, 31(2) : 136(1988)
15. Laemmli, U.K.: Nature, 227 : 680(1970)
16. Mason, V.C., Anderson, S.B. and Rodemo, M.: Proc. 3rd FAAP Symp. (on protein metabolism and nutrition) Vol. 1 (1980)
17. 이가논, 임국이, 최우영, 오만진 : 한국식량영양학회지, 14(4) : 345(1985)
18. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Faar, A.L. and Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193 : 265 (1951)

-
- | | |
|--|------------------------------------|
| 19. Calloway, D.H. and Kumar, A.D.: Appl. Microbiol., 17 : 176(1969) | 21. 総合食料工業, 恒生社厚生閣版, 東京, 502(1970) |
| 20. Gow, J.S. and Littlehailes, J.D.: 2nd Int. Conf. on SCP., U.S.A., May. 29~31(1973) | 22. 尾崎淺日亂: 日本科學飼料協會誌, 1 : 17(1919) |