

γ -폴리글루타민산(γ -PGA)의 분리정제에 대한 연구

조원철, 장명철, 리진철, 리형관

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《기초과학을 발전시키는데도 힘을 넣어야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 138페이지)

γ -폴리글루타민산(γ -PGA)은 분자량이 $10^5 \sim 2 \times 10^6$ 인 수용성고분자의 아미노산중합물로서 L-Glu의 α -아미노기와 D-Glu의 γ -히드록실기사이의 폴리아실아민중합에 의하여 형성된다.[5] γ -PGA는 여러 종의 고초균(실례로 *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus licheniformis* 등)으로부터 생산할수 있다. γ -PGA는 막형성능, 섬유형성능, 산소차단성, 가소성, 점결성, 보습성과 생물분해성 등의 독특한 물리화학적 및 생물학적특성을 가지고있는것으로 하여 의약품제조, 식료품가공 그리고 납새, 과일, 수산물 등의 팽동방지 및 선도보장, 화장품공업, 담배공업, 가죽이김공업과 식물종자보호, 중금속이온흡착 등의 여러 령역에 광범히 응용되고있다.[3, 6] γ -PGA사슬에는 다량의 카르복실기가 존재하므로 일부 약물과 γ -PGA-약물복합체를 형성할수 있는 높은 생물친화성 및 생물분해성을 가진다. γ -PGA를 약물운반체로 리용하면 약물의 수용성을 개선하고 반감기를 늘이며 약물의 안전성과 치료효과성을 높일수 있다.

우리는 응용전망이 넓은 γ -PGA를 *Bacillus subtilis natto* 배양물로부터 제조하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

γ -PGA생성균주로는 전문연구소에 보관되어있는 *Bacillus subtilis natto*를 리용하였다.

시약으로는 NaCl, HCl, NaOH, Glu, 30% 중성포르말린, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 전기영동시약, 95% 에타놀, 효모엑스, 펩톤, 우무를 리용하였다.

균보존 및 계대배지로는 LB배지(펩톤 1%, 효모엑스 0.5%, NaCl 0.5%, 한천 2%, pH 7.0)를 리용하였다.

활성화 및 확대배지로는 콩즙배지에 포도당을 1%, 무기염용액을 첨가한것을 리용하였다.

발효배지로는 콩즙고체배지[4]를 리용하였다.

보존균을 활성화하고 확대배지에 접종하여 종균액을 준비한 다음 발효배지에 5~10%(v/v)로 접종하고 발효시켰다.

γ -PGA분리농축은 중공섬유정밀러과막과 중공섬유한외러과막(100kD)으로 하였다. 0.10~0.14MPa의 압력에서 러과액의 투과속도와 농축액의 투과속도비를 조절하면서 러과액과 농축액을 받은 다음 중공섬유한외러과막에 남아있는 분획들을 농축액과 혼합하여 모았다. 모든 조작은 10~15°C 조건에서 진행하였다.

투과속도와 중공섬유한외러과막의 메임결수는 선행방법[5, 7]으로 계산하였으며 SDS-PAGE도 선행방법[1]에 따라 진행하였다. 단백질정량은 선행방법[2]으로 진행하였다.

γ -PGA의 정성분석은 러지크로마토그래프법과 적외선스펙트럼법으로 진행하였다.
 γ -PGA의 순도는 포르몰법으로 결정하였다.

결과 및 논의

1) 중공섬유한외려과막에 의한 γ -PGA의 분리농축

우리는 고체배양한 *Bacillus subtilis natto* 배양물을 10배의 0.85% 식염수로 반복추출하여 중공섬유한외려과막으로 γ -PGA를 농축하였다.

투과속도와 메임결수 γ -PGA추출액을 중공섬유정밀려과막과 중공섬유한외려과막으로 러과하면서 경과시간에 따르는 러과액량을 측정하여 시간에 따르는 막투과속도(J), 시간과 메임결수(t/Q)사이관계를 보았다.(그림 1-4)

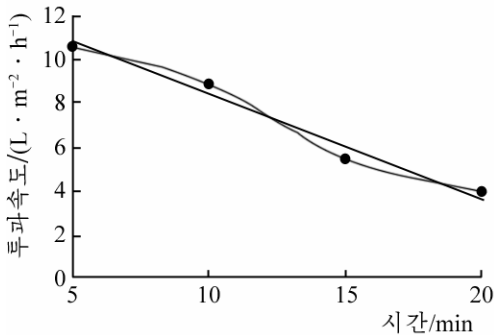


그림 1. 중공섬유정밀려과막을 리용할 때 시간에 따르는 막투과속도

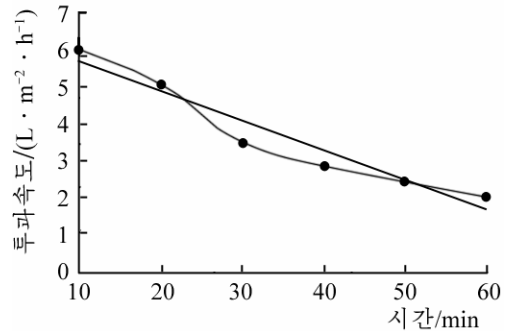


그림 2. 중공섬유한외려과막을 리용할 때 시간에 따르는 막투과속도

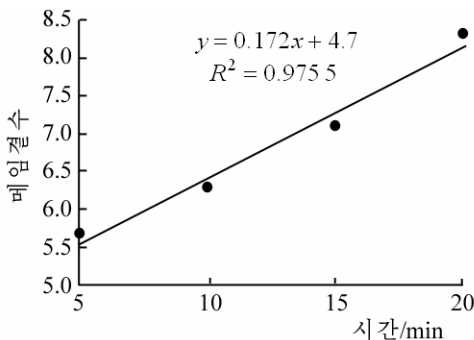


그림 3. 중공섬유정밀려과막을 리용할 때 시간에 따르는 메임결수변화

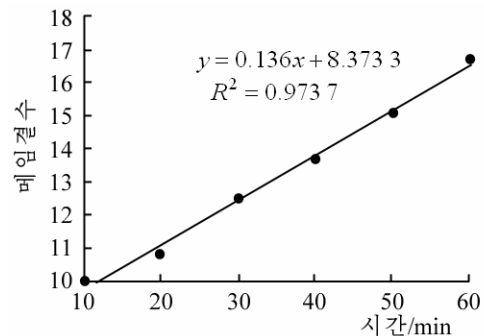


그림 4. 중공섬유한외려과막을 리용할 때 시간에 따르는 메임결수변화

그림 1과 2에서 보는바와 같이 러과시간이 경과하는데 따라 막투과속도는 점차 감소하였으며 러과시간(t)에 따르는 메임결수(t/Q)사이에는 선형관계가 잘 성립하였다.

그림 1과 2의 그래프로부터 막투과속도를 계산하면 각각 11.2, 6.0L/(m²·h)이며 그림 3, 4의 그래프로부터 얻은 회귀방정식은 각각 $y = 0.172x + 4.7$ 과 $y = 0.136x + 8.3733$ 이므로 메임결수는 각각 17.2와 13.6이다.

상대점도측정법에 의한 γ -PGA검량선작성 상대점도측정법으로 γ -PGA검량선을 작성하여 분리

농축단계에 따르는 γ -PGA량을 결정하였다.(그림 5)

다음으로 우리는 γ -PGA검량선을 리용하여 분리농축단계별로 려과액과 농축액의 γ -PGA량과 거둬를 결정하였다.(표 1)

표 1에서 보는바와 같이 중공섬유정밀려과막으로 려과하여 농축액을 수집한 다음 중공섬유한외려과막으로 려과하여 농축하였을 때 농축액에서의 γ -PGA량은 각각 291, 130mg으로서 함량은 58.2, 19.5%였다. 이로부터 막분리에 의한 γ -PGA의 거둬률이 77.7%라는것을 알수 있다.

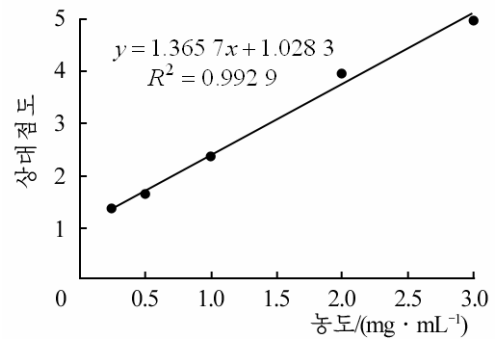


그림 5. γ -PGA검량선

표 1. 분리농축단계에서 려액과 농축액의 γ -PGA량과 거둬를

분리농축단계	체적/mL	상대점도	농도/(mg · mL ⁻¹)	γ -PGA량/mg	거둬률/%
γ -PGA추출액	2 000	2.03	0.73	1 460	100
정밀려과농축액	200	6.68	4.10	820	56.1
한외려과농축액	200	2.92	1.37	274	18.7
한외려과액	1 600	1.82	0.5	96	11.5

2) γ -PGA정성분석

우리가 얻은 γ -PGA를 확인하기 위하여 글루타민산나트륨을 표품으로 하여 γ -PGA의 물작용분해물에 대한 려지크로마토그래프분석을 진행한 결과는 그림 6과 같다.

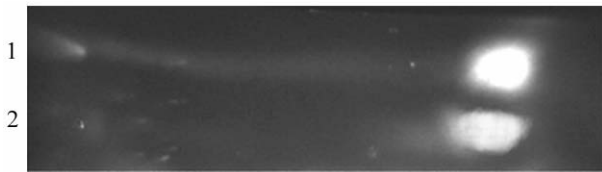


그림 6. γ -PGA의 려지크로마토그래프

1- γ -PGA의 물작용분해시료 2-글루타민산나트륨용액;
물작용분해조건-2mg/mL의 γ -PGA 1mL와 6mol/L의
HCl 2mL를 섞고 110℃에서 18h동안 분해

그림 6에서 보는바와 같이 γ -PGA물작용분해물의 이동도가 글루타민산나트륨의 이동도와 일치하였다. 이로부터 얻어진 물질이 글루타민산만으로 이루어진 물질이라는것을 알수 있다.

3) γ -PGA의 순도분석

우리는 중공섬유한외려과막으로 분리농축한 γ -PGA를 에타놀침전, 투석, 동결건조하여 γ -PGA순품을 얻고 그 순도를 결정하였다.(표 2)

표 2. 포르물법에 의한 γ -PGA순도분석

구분	아미노산함량/%	단백질함량/(μ g · mL ⁻¹)	γ -PGA순도/%
γ -PGA추출액	20.6	22.3	97
물작용분해전시료	3.2	5.4	—
물작용분해후시료	99.2	0.0	—

표 2에서 보는바와 같이 물작용분해전과 물작용분해후의 아미노산함량으로부터 결정한 γ -PGA의 순도는 97%였다.

맺 는 말

중공섬유정밀려과막과 중공섬유한외려과막(100kD)으로 γ -PGA를 농축할 때 γ -PGA 거름률은 77.7%, 농축배수는 14배였다.

종이크로마토그래프법으로 γ -PGA를 정성분석하였다.

우리가 제조한 γ -PGA의 순도는 97%였다.

참 고 문 헌

- [1] J. Sambrook; Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 205~208, 2002.
- [2] M. P. Weir et al.; Journal of Chromatography, 396, 143, 1997.
- [3] O. Chunhachart et al.; APCBEE Procedia, 10, 269, 2014.
- [4] 吗静 等; 微生物学通报, 35, 9, 1353, 2008.
- [5] 李晶搏 等; 化工进展, 27, 11, 1789, 2008.
- [6] 张绪瑛 等; 食品科学, 30, 8, 76, 2009.
- [7] 张雨忠 等; 液体分离膜枝术及应用, 化学工业出版社, 72~73, 2004.

주체106(2017)년 10월 5일 원고접수

Isolation and Purification of γ -Polygultamic Acid(γ -PGA)

Jo Won Chol, Jang Myong Chol, Ri Jin Chol and Ri Hyong Gwan

We concentrated 14 times the γ -PGA by the hollow fiber ultra-filtration membrane. The yield of γ -PGA was 77.7%. The qualitative analysis of γ -PGA was performed by the paper chromatography. The purity of γ -PGA was 97%.

Key words: γ -polygultamic acid(γ -PGA), *Bacillus subtilis natto*, isolation, concentration