

Effect of glucose and nitrogen sources on production of gellan

임성미, 이지현, 김성구

부경대학교 생물공학과

TEL. (051) 620-6188, FAX. (051) 620-6180

Abstract

The gellan was produced by *Pseudomonas elodea* ATCC 31461 under aerobic condition. Gellan provides various functionalities such as gelling, suspending, stabilizing, emulsifying and binding properties in aqueous systems. In this study, the effect of glucose concentration and nitrogen sources concentration, bacto peptone and NH_4NO_3 , on the cell growth and the production of gellan were evaluated. The maximum specific yield (g gellan/g cell) of 2.22 was obtained at 1.0% of glucose. Bacto peptone increased cell growth. And nitrogen limitation was essential for higher production of gellan. The highest cell and gellan production were obtained at 0.5 g/ℓ of bacto peptone without NH_4NO_3 .

서론

*Pseudomonas elodea*에 의하여 생성되는 gellan은 세포외 음이온 이종다당류로 D-glucose, D-glucuronic acid, L-rhamnose의 4개의 당이 반복되는 직선상 형태를 이룬다. 천연형태는 반복단위마다 glucose의 6 위치에 O-acetylation이 되어있어 pH 10에서 heating 하여 O-acetyl group을 제거한다^{1),2)}. Gellan은 특이한 물성 때문에 점증제(thickening agent), 현탁제(suspending agent), 안정제(stabilizing agent) 및 식품, 의약 공업에 그 응용성이 증대되고 있는 수용성 고분자이며 특히, 생분해성이므로 공해문제가 없으며 인체에 대한 독성이 없어 인체에 흡수되면 소화기관에서 거의 분해가 일어나지 않아 저칼로리 식품첨가제로 주목받고 있다^{3),4)}. 또한, 효소에 대한 저항력이 강하고 멸균 조작 후에도 변성이 유발되지 않기 때문에 배양배지 특히, 식물세포 배양시 agar 대용품으로 각광받고 있다⁵⁾. 미생물 다당류의 생산을 성공적으로 수행하기 위해서는 생성물의 최종농도, 수율 그리고 생산성이 경제적으로 가치가 있어야 한다. 이러한 목적을 위해서는 배양배지 조성의 최적화가 우선시 되어야한다. 따라서 본 연구에서는 배양 배지의 탄소원의 농도와 질소원의 종류 및 농도를 조절하여 균체의 성장과 gellan의 생성 수율을 알아보았다.

재료 및 방법사용 균주

사용된 균주는 *Pseudomonas elodea* ATCC 31461로 agar 배지에서 4℃로 유지하였고, 매달마다 신선한 배지로 계대배양 하였다.

배지 및 배양조건

사용된 기초 배지조성(g/ℓ)은 Glucose 10, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.1, NH₄NO₃ 0.9, Bacto peptone 0.5, mineral salt solution 1ml 이며, mineral salt solution의 조성(mg/ℓ)은 MnCl₂·4H₂O 1.8g, FeSO₄·7H₂O 2.487g, H₃BO₃ 0.285g, CuCl₂ 27, ZnCl₂ 21, CoCl₂·6H₂O 74, MgMoO₄ 23, sodium tartrate (dihydrate) 2.1g 이다. HCl과 NaOH를 이용하여 pH를 6.5-6.8로 조절한 배지를 삼각플라스크에서 전배양액 5%(v/v)를 접종하여 30℃, 200rpm으로 배양하여 탄소원 및 질소원 농도에 의한 영향을 알아보았다.

건조 균체량과 gellan 정량

균체를 얻기 위해서 배양액 10ml에 두배의 증류수를 첨가하여 혼합한 뒤, 1N NaOH를 이용해 pH 10으로 맞춘 뒤 1N HCl로 중화시켰다. 그 뒤 95℃에서 10 min 동안 heating하여 deacetylation 시켰다. 균체를 얻기 위해서 12,000rpm, 10 min 동안 원심분리 하였다. 상등액을 따라내고 침전된 세포를 분리하여 105℃에서 overnight한 후 건조량을 측정하였다. 균체량은 배양액 1ℓ 당 건조무게로 표시하였다. Gellan 생성량은 균체가 제거된 배양액에 2배 부피의 isopropanol을 첨가하여 잘 혼합한 후, 24시간동안 방치하여 gellan을 침전시키고 105℃에서 overnight 한 후 건조량을 측정하였다. Gellan 생성량은 배양액 1ℓ 당 건조무게를 표시하였다. Gellan 분리 시 얻어진 상등액은 당분석에 사용하였다.

잔당 측정

배양액에 잔존하는 당은, 균체를 제거한 상등액에서 gellan을 제거한 용액을 50℃ 진공하에서 isopropanol을 증발시킨 후 배양액과 동량의 증류수를 넣어 조절한 후 잔당량을 측정하였다. Total residual sugars는 phenol-sulfuric acid 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

1) 탄소원에 대한 영향

*P. elodea*를 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%(w/v)의 glucose 농도에서 4일 동안 배양한 결과 glucose 농도가 증가할수록 균체의 성장이 증가하였다. 하지만, gellan 생성에 있어서의 최대 specific yield는 glucose 1.0%에서 2.22로 나타났다.

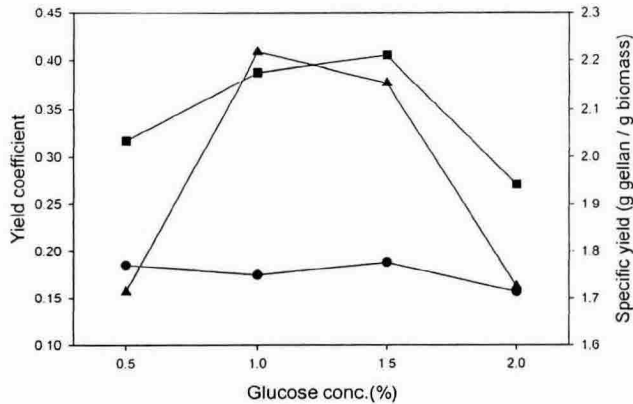
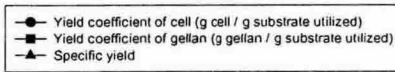


Fig. 1. Effect of glucose concentration on production of gellan



2) 질소원에 대한 영향

① NH_4NO_3 농도에 따른 영향

Fig. 2는 bacto peptone이 0.5g/l 있는 배양 배지에서 NH_4NO_3 의 농도를 달리하여 *P. elodea*의 균체 성장 및 gellan 생산에 미치는 영향을 나타내었다. 84시간 동안 배양한 결과, NH_4NO_3 가 첨가되지 않은 배지에서 균체 생산뿐만 아니라 gellan 생산도 높게 나타났고, NH_4NO_3 를 첨가함으로써 cell 성장과 gellan 생성이 크게 감소하였으며 그후 NH_4NO_3 의 농도에 상관없이 낮은 gellan 생성을 보였다. NH_4NO_3 는 cell 성장과는 크게 무관하고, gellan 생성을 저해함을 알 수 있다.

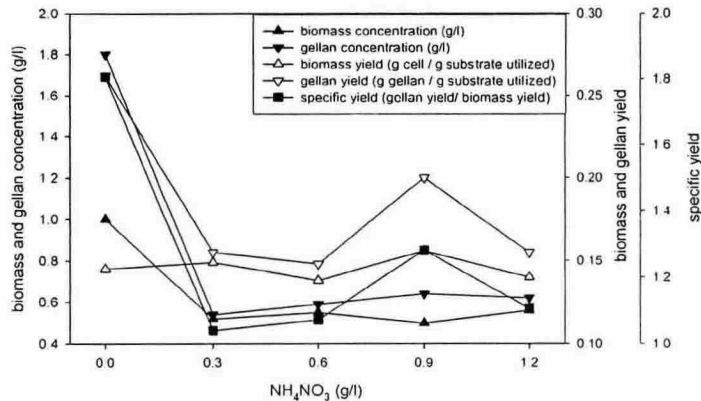


Fig.2. Effect of NH_4NO_3 with bacto peptone on production of gellan.

② Bacto peptone 농도에 따른 영향

위 실험에 근거하여 NH_4NO_3 을 첨가하지 않은 배지에 bacto peptone의 농도를 달리 하여 배양하였다. Fig. 3의 배양 결과를 보면 bacto peptone의 농도가 $0.5\text{g}/\ell$ 까지는 균체 성장과 gellan 생산이 bacto peptone 농도에 비례하여 지속적으로 증가하여 최대 gellan 생산량, $1.8\text{g}/\ell$ 를 나타냈다. 하지만 $0.5\text{g}/\ell$ 이후에는 gellan의 생산이 감소하였으나 cell 성장을 peptone의 농도에 따라 증가하였다. bacto peptone은 cell 성장에 영향을 미치며, 균체의 glucose 사용이 많을수록 cell 성장이 높게 나타남을 알 수 있었다.

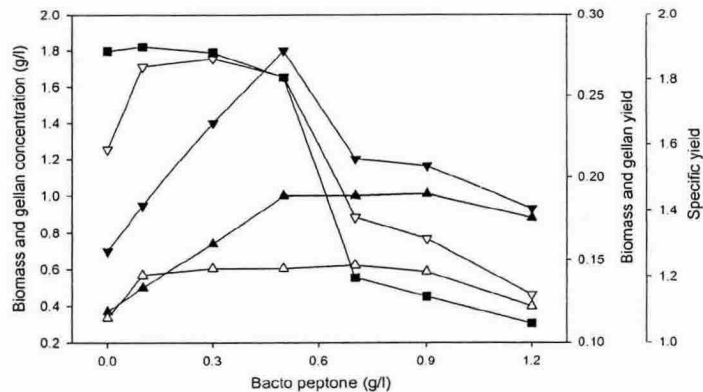


Fig.3. Effect of bacto peptone without NH_4NO_3 on production of gellan.

참고문헌

- 1) Per-Erik Jansson, Bengt Lindberg, and Paul A. Sandford, "Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*" (1983), Carbohydrate Research, 124, 135-139
- 2) Kenneth S. Kang, George T. Veeder, Peter J. Mirrasoul, Tatsuo Keneko, Ian W. Cottrell "Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: Production and basic properties" (1982), Applied and Environmental Microbiology, Vol. 43, No. 5, p. 1086-1091
- 3) Kenneth S. Kang and George T. Veeder, "Polysaccharide S-60 and bacterial fermentation process for its fermentation" (1982), US. Patent, 4,326,053
- 4) Kenneth S. Kang and George T. Veeder, "Fermentation process for preparation of polysaccharide S-60" (1983), US. Patent, 4,377,636
- 5) Jane E. Harris, "Gelrite as an agar substitute for the cultivation of mesophilic *Methanobacterium* and *Methanobrevibacter* species" (1985), Applied and Environmental Microbiology, Vol. 50, No. 4, p. 1107-1109