

Effect of pH on production of gellan by *Pseudomonas elodea* ATCC 31461

임성미, 이지현, 김성구

부경대학교 생물공학과

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

Abstract

The gellan was extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea* ATCC 31461 at aerobic condition. Gellan provides various functionalities such as gelling, suspending, stabilizing, emulsifying and binding properties in aqueous systems. In this study, the effect of pH on the cell growth and the gellan production were evaluated in shake-flasks and in 5ℓ batch fermentor. In the shake-flasks culture, maximum gellan production was obtained with 1.66g/ℓ when initial pH was 7.0. The batch fermentation was performed in the medium pH control ranged pH 5.5-8.5. The maximum gellan production of 1.97g/l was obtained with constant pH 6.0.

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 제거한다¹⁾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 있다³⁾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 배양 배지 조성의 최적화가 우선시 되어야한다. 따라서 배양 배지의 탄소원의 농도와 질소원의 종류 및 농도를 조절에 관한 실험에 이어서 배지의 초기 pH와 fermentor를 이용한 pH 조절 실험을 통해 gellan 생산에 있어서의 최적 pH 조건을 알아보았다.

재료 및 방법

사용 균주

사용된 균주는 *Pseudomonas elodea* ATCC 31461로 agar 배지에서 4°C로 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°C, 200rpm으로 배양하여 초기 pH 조절에 의한 영향을 알아보았다. 발효조 실험은 발효동안 pH를 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.5로 조절하여 pH-stat에 의한 *P. eldoea*의 gellan 생산성에 대하여 알아보았다. 사용된 발효조는 5L Jar Fermentor이고, 배지 3L를 넣고 30°C, 400rpm, 1.5vvm의 조건으로 운전하였다.

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°C에서 10 min 동안 heating하여 deacetylation 시켰다. 균체를 얻기 위해서 12,000rpm, 10 min 동안 원심분리 하였다. 상등액을 따라내고 침전된 세포를 분리하여 105°C에서 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°C에서 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°C 진공하에서 isopropanol을 증발시킨 후 배양액과 동량의 증류수를 넣어 조절한 후 잔당량을 측정하였다. Total residual sugars는 phenol-sulfuric acid 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

1) 배양초기 pH의 영향

각 배양액의 초기 pH를 달리하여 *P. elodea*의 균체 성장 및 gellan 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Table 1). 배양한 결과, 초기 pH 3.5에서 7.0까지는 균체량과 gellan 생산이 지속적으로 증가하여 pH 7.0에서 최대 gellan 생산량, 1.66g/ℓ를 나타내었다. 이때의 productivity는 0.0231g/ℓ/hr이었다. 그 후, pH가 증가할수록 균체량과 gellan 생산량은 감소하여 *P. elodea*의 성장 및 gellan 생산을 위한 최적의 initial pH는 7.0으로 같음을 알 수 있다.

2) pH 조절에 의 영향

5L Jar Fermentor를 이용하여 배지의 pH를 5.5에서 8.5로 각각 조절하면서 운전하였다(Table 2). 일반적으로 pH는 미생물 유래 다당류의 생산에 관련된 중요한 인자로서 배양기간 중 pH를 조절하지 않는 경우에는 균체 증식과 다당류 생산을 저해하는 것으로 보고되어 있다⁶⁾. 본 균주의 경우에도 배양기간동안 일정 pH를 유지하는 것이 하지 않는 것 보다 균체의 성장과 다당 생산을 증가시키는 것으로 나타났다. 최대 균체량과 gellan 생산량은 배지를 pH 6.0으로 조절하였을 때 나타났다. 이때 균체량은 pH를 조절하지 않았을 때보다 2배 이상 높은 1.48g/ℓ이고, gellan 생산량은 1.97g/ℓ로 나타났다.

배양액의 initial pH 실험의 결과 pH 7.0에서 최대의 gellan 생산량과 균체량을 나타내었으나 발효조를 이용하여 pH를 일정하게 조절한 경우는 pH 6.0이 optimum condition이었다. 이는 초기 pH 7.0의 경우, 배양시간의 경과에 따라 발효부산물에 의한 pH의 저하로 지수증식기에서 pH가 약 6.0 부근을 나타내었으며 이때 최대의 비증식속도를 나타낸 결과와 비교할 때 최적의 pH가 6.0임을 알 수 있다.

Table 1. Effect of initial pH of culture broth on the cell growth and gellan production by *P. elodea*.

pH	DW(g/l)	GW(g/l)	Productivity (g/l)	Utilized sugar(g/l)
3.5	0.44	0.58	0.0081	2.60
4.5	0.50	0.74	0.0103	3.16
5.5	0.55	0.76	0.0105	3.90
6.5	0.69	1.20	0.0167	5.80
7.0	0.80	1.66	0.0231	5.98
7.5	0.75	1.45	0.0201	5.87
8.0	0.69	1.46	0.0203	5.60
8.5	0.66	1.38	0.0192	5.21

Table 2. Effect of constant pH of culture broth on the cell growth and gellan production by *P. elodea*

pH	DW(g/l)	GW(g/l)	Productivity (g/l)	Utilized sugar(g/l)
No	0.68	1.52	0.0211	5.23
5.5	1.17	1.84	0.0256	6.76
6.0	1.48	1.97	0.0274	7.91
6.5	0.77	1.93	0.0268	5.86
7.0	1.01	1.86	0.0258	7.39
7.5	1.07	1.86	0.0258	6.02
8.5	0.89	1.77	0.0246	5.45

요약

gellan 생산의 최적 pH 조건을 알아보기 위해 삼각플라스크와 회분식 발효를 이용하여 실험하였다. 삼각플라스크 내에서 초기 pH 7.0은 1.66g/ℓ의 gellan을 생산하였고, 회분식 발효에서는 pH 5.5-8.5의 범위에서 pH를 조절하면서 실험한 결과, pH 6.0에서 균체량(1.48g/ℓ) 및 gellan 생산량(1.97g/ℓ)이 최대값을 나타내었다.

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
- 6) Sutherland, I. W. , "Microbial Polysaccharides and Polysaccharase" (1979), Academic Press, 1-34