

Agrobacterium radiobacter에 의한 多糖類 生産에 關한 研究

李 啓 瑚 · 辛 賢 承

서울대학교 農科大學 食品工學科
(1982년 12월 3일 수리)

Studies on the Production of Polysaccharides by *Agrobacterium radiobacter*

Ke-Ho Lee and Hyun-Sung Shin

Department of Food Science and Technology
College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

A slimy non-spore-forming bacterium strain SAF-C isolated from bean stem and root was motile with flagella and identified to one of *Agrobacterium radiobacter*. Studies were made on the conditions necessary for maximal production of this acidic succinoglucan polysaccharide by this strain in shaken culture. Much production was observed with yeast extract, $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, distillers' dried solubles (D.D.S.), as nitrogen source in the medium composed of 4% glucose, 0.5% nitrogen source, 0.3% CaCO_3 . The yield was greatest with yeast extract and decreased in order with the above nitrogen source from 22.9% to 9.6 percent. A polysaccharide was produced in a yield of about 25% in a medium composed of 3% glucose, 0.4% D.D.S., 0.5% $\text{K}_2 \text{HPO}_4$, 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

緒 言

多糖類는 數世紀동안 人間에 依하여 發見되었고 開發되어 왔으며 이들 대부분은 植物體나 海藻類에서 獲得하였는 데, 季節이나 채취적기에 따라 化學的 組成과 性質이 다른 生産物을 내거나 또는 이들 生産物이 加工되어지는 途中에 酸과 알카리에 依하여 生物學的, 化學的 損傷을 입어 色·香氣·化學的 純粹도가 떨어지는 難點을 가지고 있어서 微生物에 依한 새로운 多糖類生産方法이 要求되어 왔다. 그 結果 dextran, xanthan gum, pullulan, yeast glucan, curdlan, succinoglucan, scrologlucan, 등이 開發되었고 그들中 몇가지가 重要하게

利用되고 있다.¹⁾ 그중 xanthan gum은 그것이 갖는 여러가지 獨特한 性質로 因하여 그 用途가 다른 微生物性 多糖類에 比하여 커질 展望이 있는데 succinoglucan도 이와 비슷한 性質을 가진 것이 밝혀져 이의 利用이 研究되고 있다.

土壤에서 分離된 *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*는 sucrose, glucose 또는 다른 糖을 가지는 培地에서 多量의 水溶性 β -D-glucan(succinoglucan)과 少量의 不溶性(1→3) β -D-glucan(curdlan)을 生産한다는 報告가 있었다.^{2,3,4)}

水溶性 β -D-glucan은 다른 多糖類와는 달리 그것이 含有하는 10%의 succinic acid때문에 succinoglucan이라고 하였다.³⁾ Harada와 Yoshimura는 succinoglucan이 아래와 같은 獨特한 變形流體

學的 性質을 가진다는 事實을 發表하였다.^{5,6)}

succinoglucon에는 H型, Ca型 및 Na型이 있는데 이 중 H型和 Ca型的 다당류를 1% 含有한 水溶性分散液의 粘度는 30°C에서 각각 높았고 Na型的 粘度는 매우 낮았다고 하였고, Ca型的 succinoglucon의 水溶性分散液의 粘度는 NaCl의 存在下에서나 pH의 큰 變化에서도 거의 影響을 받지 않는다고 보고하였다.

또 이 重合體는 *Flavobacterium*屬의 菌株에 依하여 生産되는 酵素인 succinoglucon depolymerase에 依하여서만 分解되며 다른 모든 微生物이 生産하는 酵素에 對하여 강한 抵抗性을 가지고 있으므로 이 重合體는 食品添加物이나 그外 多樣한 用途로 쓰일수가 있다.

또 이 多糖은 methylation과 periodate oxidation에 依하여 β-1, 3-, β-1, 4-그리고 β-1, 6-으로 連結된 glucose residues와 작은 量의 β-1, 3-으로 連結된 galactose residue로 構成되어져 있다는 것이 밝혀졌다.⁷⁾

*Agrobacterium tumefaciens*가 生産하는 水溶性 多糖類의 糖構成分과 linkage pattern이 succinoglucon의 그것과 거의 같다는 것이 알려졌다.^{8,9)}

*Agrobacterium fumeifaciens*는 水溶性多糖인 succinoglucon만을 生産하지만 *Agrobacterium rhizogenes*는 水溶性多糖과 不溶性多糖을 同時에 生産되는 水溶性多糖도 succinoglucon의 一種으로 밝혀졌다.^{10,11)}

Alcaligenes faecalis var. myxogenes 10C 3K는 不溶性인 cu rdlan-type의 多糖類를 少量, 水溶性 succinoglucon을 多量으로 同時에 生産하는데 반하여 이것의 變異株 10C 3K는 多量의 curdlan-type의 多糖과 少量의 succinoglucon을 生産하며 aniline blue 方法^{8,11,12)}에 依하여 AB배지 (glucose 1%, yeast extract 0.5%, aniline blue 0.005%, agar 2%, pH 7.2)에서 靑色聚落을 形成하는 性質을 適用하여 分離할 수 있음을 報告하였다.

특히 Hisamatsu¹³⁾는 *Agrobacterium*屬의 어떤 菌은 AB培地에서 白色과 靑色の 聚落中白色聚落을 形成하는 菌만을 分離하여 培養한 結果 거의 水溶性의 succinoglucon만을 生産한다는 事實을 밝힌바 있다.

이에 本 實驗에서는 微生物性 多糖類를 生産하기 爲하여 curdlan-type의 多糖類와 succinoglucon을 同時에 生産하는 *Agrobacterium*屬의 菌株를 分離·同定하고 이 菌株에 의한 多糖類生産의 諸

最適條件을 確立하기 爲하여 實驗한 結果를 報告한다.

實驗材料 및 方法

1. 材料

農村振興廳 作物試驗場에서 얻은 콩의 어린 모종

2. 方法

(1) 菌株分離 : 줄기나 뿌리에 異常이 생겨서 枯死하는 콩의 모종을 蒐集하여서 줄기와 뿌리 以外의 部分을 除去한 後 蒸溜水로 洗滌하고 tissue grinder로 가늘게 磨碎하였다. 500ml 삼각 flask에 蒸溜水 100ml를, 0.05% Tween 80 10ml와 試料 1g과 함께 넣고 oscillation 240, stroke 35cm로 30°C에서 1時間동안 진탕시켰다. 懸濁液을 白金耳로 T.G.Y. 培地(Trypton 0.5%, D-glucose 0.2%, yeast extract 0.5%, K₂HPO₄ 0.1%, 2% agar, pH 7.2)에서 streaking method로 하여 純粹分離하였다.

Agar培地上에서 菌의 聚落 周圍에 粘液을 生産하는 菌을 選取하고 MY broth(malt extract 0.3%, yeast extract 0.3%, D-glucose 1.0%, peptone 0.5%, pH 7.0)에 接種하여 30°C에서 oscillation 120으로 1日間 진탕培養시켰다. 이때 消泡劑로서 AZ(Disfoan-AZ(16-20-20R). AV. HW. 2117 日本油指株式會社 clouding point 19.5)를 300ppm 使用하였다.

이 培養物을 種菌으로 하여 같은 培地 95ml에 種菌 5ml를 加하여 같은 條件에서 진탕培養시켰다.

4日後 粘度가 높은 培養液을 生産하는 菌株를 選別하였다. 얻어진 두 菌株를 SAF-C, SAF-S라 하고 aniline blue 方法으로 分離하여 靑色聚落을 形成하는 curdlan-type의 多糖生産菌株를 各各 SAF-C-B, SAF-S-B라 하고, 白色聚落을 形成하는 succinoglucon 生産菌株를 各各 SAF-C-W, SAF-S-W하였고 SAF-C-W를 使用하여 實驗을 行하였다.

PY培地(peptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, agar 2%, pH 7.2)를 stock培地로 하였다.

(2) 菌同定 : 菌同定 實驗은 Bergey's Manual¹³⁾과 "A guide to the identification of the genera of Bacteria"¹⁴⁾ 方法에 準하여 실험하였다.

(3) 多糖類의 生産과 菌體分離 : 이제까지 報告

된 研究는 窒素源으로서 主로 yeast extract나 合成培地에서 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 使用하였는데 本實驗에서는 酒精廢液인 Distiller's Dried Solubles(D, D.S)를 使用하고자 하는 意圖에서 D.D.S.를 窒素源으로 하는 培地를 使用하였다. 한편 *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459에 依한 xanthan gum 生産에서는 D.D.S.를 使用하여 큰 效果를 얻은 것이 報告된 바 있다.^{15, 16, 17, 18)}

500ml 三角 flask에 95ml의 yeast extract⁹⁾ 培地(glucose 4%, yeast extract 0.5%, CaCO_3 0.5%, pH 7.2)와 合成培地⁹⁾(glucose 4%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{nH}_2\text{O}$ 0.002%, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, ZnCl_2 0.001%, CaCO_3 0.3%, pH 7.2)와 다음 3種類의 D.D.S. 培地 即

D.D.S. ①; glucose 2.5%, D.D.S. 0.4%, K_2HPO_4 0.5%, $\text{HgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%.

D.D.S. ②; glucose 3%, 以外は ①과 同一한 造成

D.D.S. ③; glucose 4% D.D.S. 0.5% CaCO_3 0.3%를 各各 넣고 각각의 같은 培地에서 1日間 培養된 種菌 5ml씩을 接種하고 30°C에서 5日間 진탕培養시켰다.

培養液의 粘度가 높아지면서 1日까지는 oscillation 120으로 하고 1日後 부터는 200으로 진동수를 增加시켰다.

5日後 培養液의 粘度가 높아진 후 다음과 같은 方法으로 生産된 多糖類를 分離하였다.

培養液에 같은 量의 1N NaOH를 加하여 稀釋한 후 10,000 r.p.m.에서 10分間 遠心分離시켜 菌體를 分離한 후 남은 上澄液은 3N HCl로 中和시키고 다시 10,000 r.p.m.에서 10分間 遠心分離하여 沈澱物을 얻었다. 이것을 蒸溜水로 遠心分離에 依하여 3回 洗滌하고 acetone으로 脫水시킨 후 眞空乾燥器에서 乾燥시켰다. 이 乾燥物과 같은 重合體를 Nakanishi⁸⁾ 등은 curdian-type의 多糖이라고 報告하였다.

培養液에서 沈澱物을 除去하고 난 上澄液에 2배에 相當하는 95% ethanol을 2%의 KCl과 함께 넣고 이때 形成되는 凝固浮遊物을 10,000 r.p.m.에서 10分間 遠心分離시켜서 얻었다.

이것을 acetone으로 脫水시키고 眞空乾燥器를 使用하여 乾燥시켰다. 이 生産物을 Nakanishi⁸⁾ 등은 succinoglucan이라고 報告하였다. 以上은 curdian-type의 多糖과 succinoglucan을 同時에 다

량 生産하는 培養에서 위의 多糖類를 分離하는 方法이었는데 succinoglucan만을 거의 完全하게 生産하는 條件에서 培養된 培養液을 위와 같은 方法으로 處理한 結果 極히 少量의 curdian-type의 多糖을 生産하므로 NaOH로 稀釋하는 處理를 省略하여 다음과 같은 方法으로 生産된 多糖을 分離하였다.

生産된 培養液에 同量의 蒸溜水를 加하여 2배로 稀釋하고 10,000 r.p.m.으로 10分間 遠心分離하여 菌體를 除去한 後 上澄液에 2배의 ethanol을 2%의 KCl과 함께 加하여 凝固浮遊物을 形成케 한후 agar와 비슷한 重合體를 진지고 남은 것은 濾過시켜 얻었다. 위와 같은 處理를 거쳐 얻어진 것이 水溶性 多糖인 succinoglucan이었다고 보고하였다.^{2, 8)}

또 粘度가 높은 培養液을 遠心分離시켜서 얻은 沈澱物은 菌體와 함께 殘存의 CaCO_3 를 包含하고 있다. 이를 蒸溜水로 懸濁시킨 後 1,000 r.p.m.으로 3分間 遠心分離함으로써 CaCO_3 를 除去하였다. 얻어진 菌體를 蒸溜水로 2回 洗滌한 後 眞空乾燥器에서 90°C로 恒量이 될 때까지 乾燥시켰다.

(4) 糖定量: Fehling-Lehmann-Schoorl 變法¹⁹⁾에 依하여 行하였다.

(5) 相溶性¹⁶⁾: 25% aluminium sulfate 용액, 25% zinc chloride 용액, 15% sodium chloride 용액, 5% sulfuric acid, 5% nitric acid, 5% acetic acid, 10% hydrochloric acid, 25% phosphoric acid를 만들어 succinoglucan을 生産한 培養液을 適當量 加하고 그 相溶性 與否를 比較觀察하였다.

結果 및 考察

1. 菌株 分離

菌分離培地인 TGY agar上에서 colony 周圍에 粘液質이 많아보이는 38菌株를 純粹分離하였다. 이들 分離菌株를 M.Y. broth에 接種하고 30°C에서 1日間 shaking culture하여 種培養을 完成하였고 이를 startor로하고 5%를 同一한 培地에 接種하지 4日間 30°C로 shaking culture하고 培養液別로 粘度를 測定比較하여 最高粘度를 나타내는 2菌株를 選拔하고 不溶性 gum質인 curdian type와 水溶性 gum質 type인 succinoglucan을 同時에 많이 生産하는 SAF-C와 SAF-S 菌株를 選定하였다. 또한 aniline blue法에 依하여 2菌株에 對한 gum

質生産性を比較檢討한바 SAF-C 菌株에서 거의 succinoglucan탄을 生産하는 菌株 SAF-C-W를 選定하였다.

2. 分離菌株의 特性和 同定

SAF-C와 SAF-S에 對하여 形態學的, 培養學的 生理學的 諸特性을 檢索하여 Bergey's manual¹³⁾에 對照한 結果, *Agrobacterium*속에 속하는 菌株인 것으로 判될 수 있고 菌株의 命名學的 特性 (Taxonomic description)은 다음과 같다. 形態學的 特性은 表 1에, 培養學的 特性은 表 2에, 生理學的 特性에 對하여는 表 3에 糖類醱酵에 의한 酸 및 gas 生成에 對하여는 表 4에 各各 表示하였다. 이 菌株들은 孢子를 形成하지 않는 gram陰性菌으로 桿狀이며 길이는 0.6~0.8×1.5~3.0μm 이고, 運動性이 있으므로 편모를 가지는 것으로 생각된다.

Agar培地에서의 聚落은 circular, convex, smooth, glistening, translucent하고 色素는 生産하지 않았다. 그러나, T.G.Y 培地에서 30日 가량 지나면 褐色을 띠고 表面은 불투명하며 거칠게 나타났다. 특히 SAF-S는 聚落表面에 주름이 생긴다. nutrient agar 培地上에서 聚落의 크기는 直徑이 1.2mm 정도로 작은 편이다. 靜置培養液은 24~36時間안에 混濁되며 pellicle을 形成한다.

斜面培養 糸狀(filiform)이며 stab culture에서는 絲狀이다. SAF-C는 gelatine을 數週間내에 조금 液化시키나 SAF-S는 전혀 液化시키지 않았다.

Table 1. Morphological characteristics of isolates from bean stem and roots.

Isolates	Size(μ)	Shape	Gram	Motility	Spore
SAF-C	0.6~0.8×1.5~3.0	rods	-	+	-
SAF-S	0.6~0.8×1.5~3.0	rods	-	+	-

Litmus milk는 中性이 되며 pellicle을 形成하는 것 外에 아무런 變化도 나타나지 않았다.

감자를 씻어서 껍질을 벗기고 alcohol lamp flame으로 表面을 殺菌한 後 7~8mm 두께로 橫斷하여 자르고 petridish에 넣어 無菌水로 半쯤 잠기게 한 후 表面에 損傷을 내어 이곳에 菌을 接種하고 감자가 軟하게 腐敗하는 것을 觀察한²⁰⁾ 結果 3日後에 SAF-C는 감자 크기의 2/3를, SAF-S는 9/10를 軟하게 腐敗시켰다.

Table 2. Cultural Characteristics of isolate from bean stem and roots

Isolates	Nutrient agar colony	Nutrient broth
SAF-C	Convex Circular Smooth pellicle strong Entire Translucent or opaque	strong
SAF-S	Convex Circular Smooth pellicle strong or Straitform Entire Translucent or opaque	strong

Nutrient agar slant	Gel-atin	Nutrient stab	Litmus milk	Tween 80
Moderate filiform translucent or opaque	Slow	Rapid	Alkali	-
Moderate filiform translucent or opaque	none	Rapid	Alkali	-

Starch liquefaction	Casein	Levan	Potato soft rot	Growth at 41°C
-	-	+	2/3 rot	-
-	-	+	9/10rot	-

Growth at 4°C	Pigment	Color
-	-	white
-	-	white

Malt extract나 yeast extract peptone 培地, 또 King B 培地(Difco peptone 20g, glycerin 10ml, KH₂PO₄ 1.5g, MgSO₄·7H₂O 1.5g, Agar 20g, 蒸溜水 1l, pH 7.2)에서 菌生育度를 比較한바 1日만에 거의 다 잘자랐으나 nutrient agar 培地에서는 다른 培地에서 보다 늦게 자랐다.

Sucrose를 5% 包含하는 nutrient 培地上에 接種하여 3日後에는 levan과 같은 크고 흰 粘液性的 덩글게 튀어나온 모습의 多糖類를 形成하는 것을 觀察하였다.²⁰⁾

Indole은 生成하지 않고 hydrogen sulfide를 生成하였고 urea를 加水分解하며 nitrate를 還元하였으며, casein, starch, Tween 80을 分解하지 않았다. NH₃를 生成하지 않고, methylene blue test는 陽性, methyl red test는 陰性, Voges-Proskauer test는 陽性을 나타내었다.

Carbohydrate-peptone-beef extract 培地에서

Table 3. Physiological characteristics of isolates from bean stem and roots

Isolates	Oxidase	Catalase	H ₂ S	NH ₃	Nitrate reduction	NaNO ₃	KNO ₃
SAF-C	+	+	+	-	+	+	-
SAF-S	+	+	+	-	+	+	-

Indole	V.P. test	M.R. test	Urease	Methylene Blue	Citrate
-	+	-	+	+	+
-	+	-	+	+	+

malate	Fumarate	lactate
-	-	-
-	-	-

notes: V.P.; Voges-Proskauer
M.R.; Methyl Red
± ; used questionably

Table 4. Acids producibility from carbohydrates by the isolates from bean stem and roots

Isolates	Trehalose	Xylose	Glucose	Sucrose	Mannose	Starch	Mannitol
SAF-C	+N	+N	+N	+N	+N	-N	-N
SAF-S	+N	+N	+N	+N	+N	-N	-N

+ : acid produced
- : acid not produced
N: NO gas

糖을 利用하여 gas 生成없이 酸을 生成하였다(例; sucrose, glucose, mannose, xylose, trehalose) citrate는 이용하나 KNO₃는 이용하지 않았으며 mannitol도 利用하지 않았으며, lactate, fumarate, malate 등은 炭素源으로 利用되지 않았다. 好氣性이며 最適溫度는 25~30°C, 生育 pH範圍는 4.2~12.0이며 最適 pH는 6.5~8.5이었다.

本菌株가 citrate를 利用하므로 *Rhizobium*屬과 區別되고 窒素源으로 amino酸을 利用하며 또한 nitrate를 還元하는 것 등의 特性으로 보아 *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi*와 區別되고 tomato에 菌을 接種한 結果, gel을 形成하지 않는 것이 差異點으로 觀察確認되었으므로, *Agrobacterium tumefaciencie*와 區別할 수 있다. 그러나, litmus milk의 變化와 lactate, fumarate, malate를 利用하지 않는 것이 Bergey's manual의 그것과 달라서 確證할 수는 있으나, Nakanishi⁹⁾에 依하면 *Agrobacterium tumefaciencie*의 curdlan-type의 多糖은 전혀 生産하지 않고 水溶性多糖類만 生産한다고 報告하였는데 이 菌株는 不溶

性의 curdlan-type의 多糖類를 生産하므로 이 事實이 本菌株가 *Agrobacterium radiobacter*의 한 變種임을 뒷받침해 줄 수 있어 *Agrobacterium radiobacter* SAF-C, SAF-S라 同定하였다.

3. 多糖의 生産과 菌體分離

*Agrobacterium*屬에 屬하는 菌株에 대한 多糖類 生産培地는 Nakanishi⁸⁾, Harada¹¹⁾에 依하여 yeast extract 培地 및 合成培地를 摘用하여 窒素源을 DDS로 바꾸고 glucose 2.5%인 培地에 SAF-C와 SAF-S를 培養한 結果는 다음 表 5와 같다.

全體 多糖生産量에 比例하여 SAF-C는 SAF-S보다 더 높은 粘度를 가진 培養液을 生産할 수 있었다.

SAF-C는 SAF-S보다 curdlan-type의 polysaccharide와 succinoglucan을 더 많이 生産한 반면 菌體量은 오히려 적어서 生産多糖類對 菌體量의 比가 매우 크게 나타났으므로 興味있는 것을 確認할 수 있었다.

Curdlan-type의 多糖은 中性이고 succinoglucan

Table 5. Formation of Curdlan-type polysaccharide and succinoglucon by the strains of *Agrobacterium* in D.D.S medium

Isolates	Apperance on AB plates	Curdlan		Succinoglucon	
		mg/100ml	Yield(%)	mg/100ml	Yield(%)
SAF-C	White and Blue	458	18.3	225	9
SAF-S	White and Blue	416	16.6	200	8

Isolates	Dry wt of cells produced mg/100ml	Polysaccharides/Dry wt of cells			Residual glucose mg/10ml
		cardlan	succinoglucon	total poly-saccharide	
SAF-C	129	3.5	1.7	5.3	8.2
SAF-S	180	1.74	1.1	3.42	76

Tap water was used

Initial pH. 7.0

Medium: glucose 2.5%, D.D.S 0.4%, K₂HPO₄ 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.001%

Incubation: 5 days at 30°C Oscillation 120 in first 24hrs

220 after first 24h

은 酸性인데 succinoglucon 生産量에 比例하여 각 培養液의 pH가 5.9, 6.0으로 變하였다. 殘糖量을 確認해보면 SAF-C는 2.5%의 glucose를 거의 다 利用하였는데 反하여 SAF-S는 0.76%의 glucose를 남기고 있어서 糖의 多糖類로의 轉換率은 SAF-C가 SAF-S보다 크게 높았다는 것을 確認할 수 있다(35.4% 對 26.4%). 그러므로, SAF-S는 培養時 培地の 糖의 濃度를 2.5% 以下로 내릴 수 있

는 可能性을 나타내고 있다.

AB plate上的 聚落을 觀察하면 curdlan-type의 多糖을 生産하는 靑色の 聚落이 succinoglucon을 生産하는 白色 聚落에 比하여 훨씬 작는데 培養液에서는 curdlan-type의 多糖類를 더 많이 生産하는 것으로 나타났다.

Succinglucon만의 生産性을 알기 위하여 succinoglucon을 조금 더 많이 生産하는 菌株인 SAF-

Table 6. Effect of crude organic nitrogen sources and inorganic salts on polysaccharide and cell production

Isolates	Nitrogen Source	Final pH	Polysaccharide Produced	
			Mg/100ml	Yield(%)
SAF-C.W.	(NH ₄) ₂ HPO ₄	6.6	400	10.0
	Yeast Extract	6.3	914	22.9
	D.D.S.	6.6	382	9.6

Strain	Dry weight of cells produced		Polysaccharide/ Dry wt of cells	Residual glucose mg/10ml
	mg/100ml	Yield(%)		
SAF-C.W.	25	0.63	16.0	—
	227	5.68	4.0	10
	372	9.30	1.0	238

Tap water was used for yeast extract medium and D.D.S. medium. Distilled water was used for (NH₄)₂HPO₄ medium and other mineral were added.

Basal medium: glucose 4%, nitrogen source 0.5%, CaCO₃ 0.3%

Incubation: 5 days at 30°C

oscillation 120 within first 24hrs

oscillation 220 after first 24hrs

C를擇하여 AB 方法으로 白色聚落을 分離하여 SAF-C.W를 얻었다.

有色 colony인 SAF-CW菌에 對하여 위에 言及한 세 種類의 窒素源을 가지는 培地의 效果를 알아보기 위하여 窒素源의 組成量을 모두 같게 한 培地를 만들어 SAF-C.W를 接種, 培養하여 다음 表 6과 같은 結果를 얻었다.

Yeast extract를 窒素源으로 하는 培地에서 다른 어떤 窒素源보다 더 많은 多糖이 生産되었는데 培養時間 經過에 따른 多糖類의 生産, glucose의 消費 및 菌體의 增殖의 變化는 그림 1과 같다.

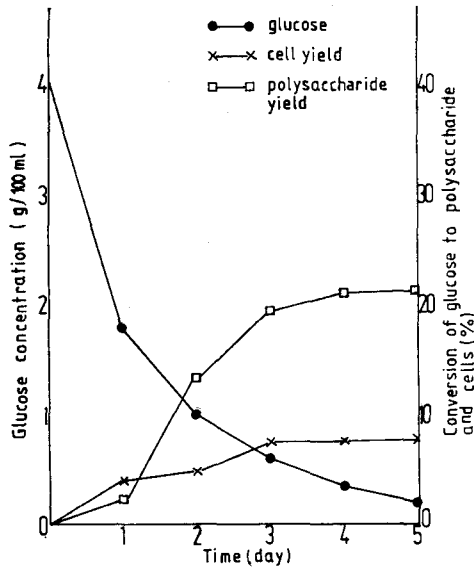


Fig. 1. Time course of production of polysaccharide containing succinic acid and cells of *Agrobacterium radiobacter* S-AF-C.W. in yeast extract medium.

위의 結果는 Harada¹¹⁾의 實驗結果와도 비슷하다. (NH₄)₂HPO₄를 窒素源으로 하는 合成培地에서 生産된 全體 多糖의 量은 적었지만 生産된 多

糖 對 菌體量의 比率는 特異할 程度로 높게 나타났다.

이같은 結果는 다른 實驗에서는 發見되지 않았다. D.D.S. 培地에서 多糖의 生産性은 가장 낮았지만 菌體의 增殖은 좋았다. 그러므로, 위와 같은 D.D.S.培地의 組成은 菌體增殖에 알맞는다고 할 수 있겠다. pH는 酸性多糖인 succinoglucan의 生産量과 一致하고 있다.

D.D.S. ①培地에서 SAF-C의 全體 多糖類生産量에 比하여 D.D.S. ③培地에서 SAF-C.W의 多糖 生産量이 너무 적어서 glucose 3%, D.D.S.0.4%, K₂HPO₄ 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, pH 7.2의 組成을 가진 D.D.S. ②培地를 使用하여 多糖을 生産하여 表 7과 같은 結果를 얻었다.

pH의 變化가 多糖의 生産量만큼 있지는 않았지만 더 많은 多糖을 生産한 D.D.S. ②培地가 더 낮은 pH를 나타내었다.

위의 結果로 多糖을 生産하는 D.D.S.培地의 組成은 D.D.S.②培地의 것이 D.D.S.③의 것보다 훨씬 더 높게 生産되었으며 아울러서 CaCO₃보다는 K₂HPO₄와 MgSO₄·7H₂O가 더 효과가 있었고 glucose의 濃度도 4%보다는 3%가 더 適當하다는 것을 알 수 있었다. 또 殘糖量을 考慮해 볼때, 2.5% 内外가 3%보다 더 經濟的이라 할 수 있겠다.

D.D.S.②培地에서의 多糖 收得率을 24.6%이었고 培養時間에 따른 多糖類生産, glucose消費 및 菌體增殖의 變化는 그림 II와 같다.

4. 相溶性

各菌株의 培養液에 對하여 使用한 모든 溶液과 의 相溶性을 比較觀察한 結果 훌륭한 相溶性을 나타내었으며 curdlan-type의 多糖을 生産한 SAF-C의 培養液을 加한 溶液中에는 多量의 凝固物이 存在하였으며, 또한 SAF-S의 培養液에서도 많은 量의 凝固物이 存在하였다. 凝固物은 不溶性인 cur-

Table 7. Comparison of D.D.S.(2) and D.D.S.(1) medium for polysaccharide and cells production

Isolates	medium	Polysaccharide produced		Dry weight of cells produced		Polysaccharide/Dry wt of cells (mg/100mg)	Residual glucose (mg/100ml)	
		mg/100ml	Yield(%)	mg/100mg	Yield(%)			
SAF-CW	DDS(2)	739	24.6	140	4.6	5.3	90	6.3
SAF-CW	DDS(3)	382	9.6	372	9.3	1.0	238	6.6

Tap water was used. Initial pH 7.2

D.D.S.(2): glucose 3%, D.D.S. 0.4%, K₂HPO₄ 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.01%

D.D.S.(3); glucose 4%, D.D.S. 0.5%, CaCO₃ 0.3%

Incubation: 5 days at 30°C

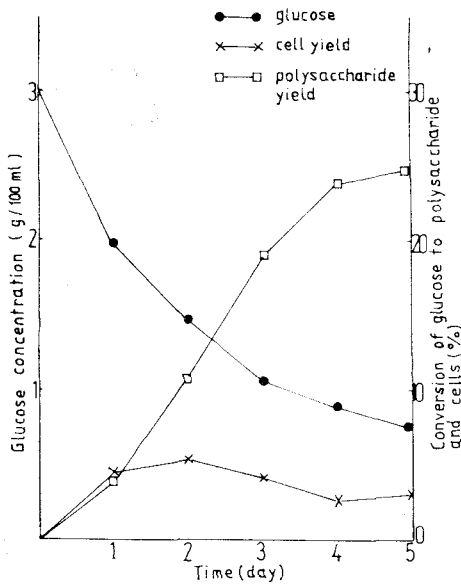


Fig. 2. Time course of production of polysaccharide containing succinic acid and cells of *Agrobacterium radiobacter* SAF-C.W. in D.D.S. ② medium.

dlan-type의 다당類인 것 이었다.

結論的으로 D.D.S.培地는 succinoglucan 生産에 有用함이 밝혀졌다. 그러나 D.D.S. ②培地에 培養하였을 때 殘存糖量이 0.9%나 되는데 最初의 glucose의 濃度を 낮추어야 할지 또는 다른 mineral source를 培地에 供給하여야 할지 더 研究하여야 할 必要性이 있으며 또 D.D.S. 自體의 成分分析이 이루어져야 할 것 같다.

要 約

病든 콩의 줄기와 뿌리에서 分離한 bacteria菌株 SAF-C는 運動性이 있으며 同定한 結果 *Agrobacterium radiobacter*임이 밝혀졌다. 또 aniline blue 方法으로 이 菌株中 水溶性 多糖만을 거의 完全하게 生産하는 菌株를 選別하고 SAF-C.W라 하였다. 振盪培養에서 SAF-C.W의 높은 酸性, 水溶性多糖의 生産條件을 찾기 위하여 본 實驗이 行하여졌다.

많은 量의 多糖이 glucose 4%, CaCO₃ 0.3% 窒素源으로 yeast extract, (NH₄)₂HPO₄ 및 distillers dried solubles(D.D.S.)을 0.5% 包含하는 各各의 培地에서 生産되었으며, 그 生産率은

22.9%, 10%, 9.6%이었다. 또 glucose 3%, D.D.S. 0.4% K₂HPO₄ 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.01%의 組成을 가지는 培地에서 多糖收得率 25%를 記錄하였다.

引用文獻

- Rose, A.H.: Economic Microbiology, 2 : 327, (1978)
- Harada, T., Yoshimura, T., Hidaka, H., and Koreeda, A.: Agr. Biol. Chem., 29 : 757, (1965)
- Harada, T.: Arch. Biochem. Biophys., 112 : 65, (1965)
- Harada, T., Amemura, A., Saito, H., Kanamara, S., and Misaki, A.: Hakko Kogaku Zasshi, 46 : 679, (1968)
- Harada, T., Yoshimura, T.: J. Ferment. Technol., 42 : 615, (1964)
- Tokuya Harada: Process Biochemistry, 21 ~25, January(1974)
- Hiroshi Saito, Akira Misaki, and Tokuya Harada: Agr. Biol. Chem., 34 : 1683, (1970)
- Nakanishi, I., Kimura, K., Suzuki, T., and Mikawa, I.: J. Gen. Appli. Micro., 22 : 1, (1976)
- Zevenhuizen, L.P.T.M.: J. Gen. Microbiol., 68 : 239, (1971)
- Makoto Hisamatsu, Kazue Sano, Akinari Amemura, and Tokuya Harada: Carbohydrate Research, 61 : 89, (1978)
- Hisamatsu, M., OTT. I., Amemura, A., and Harada, T.: J. Gen. Microbiol., 103 : 375, (1977)
- Nakanishi, I., Kimura, K., Kasui, S. and Yamazaki, E.: Carbohydrate Research, 32 : 47, (1974)
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.: Bergey's manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition, 1098~1146, Williams Wilkins, Baltimore, (1974)
- V.B.D. Skermann, A guide to the identification of the Genera of Bacteria, The williams Baltimore, (1959)
- 杉本要, 微生物してよる多糖の合成と分解, 高

- 分子, 26卷 2月號(1977年)
16. Anderson, R.F., in "Biochemistry of Industrial Microorganisms", Academic Press, New York, 1963, Chapt. 8.
 17. Rogovin, S.P., Anderson, R.F., and Cadmus, M.C.: J. Biochem and Microbiol. Technol. and Eng. 3 : 51, (1961)
 18. Cadmus, M.C., Rogovin, S.P., Burton, K. A., Pittsley, J.E., Knnison, C.A., and Allene J.: Candadian J. Microbiol., 22 : 942, (1976)
 19. 東京大學 農學部編: 實驗農藝化學, 下卷, 9587, (1912)
 20. Iraj Misaghi and Grogan, R.G.: Phytopathology, 59 : 1430, (1969)
 21. Curtis Eklund and Charles, E. Lankford: Laboratory Manual for General Microbiology, 282, Prentice-Hall, (1977)