

Acetobacter pasteurianus IFO 13751의 돌연변이주에 의한 다당류 생산성

김동석 · 류병호
경성대학교 식품공학과

Productivity of Polysaccharide by Mutant of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751

Dong-Seuk Kim and Beung-Ho Ryu

Department of Food Science and Technology, Kyungshung University

Abstract

In order to obtain the highest productivity of polysaccharide, acetic acid bacteria was used. Several acetic acid bacteria were investigated to the productivity of polysaccharide, an mutant, *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 selected among several acetic acid bacteria which can produce the polysaccharide by radiation of ultra-violet ray. *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 was shown 3 fold polysaccharide production than that of its parents. When the *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 was investigated under the condition of carbon source containing 5% sucrose, the highest amount of polysaccharide (45.95 mg/ml) was obtained. The polysaccharide production by *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5 was 55.10 mg/ml by using jar fermentor.

Key words: mutant, polysaccharide, ultra-violet ray, carbon source

서 론

다당류가 생리활성물질로 이용범위가 넓어지면서 자연에 산재해 있는 다당류에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나, 동식물에 들어 있는 다당류는 자원이 거의 한정되어 있어 대량으로 얻기는 어려운 실정이다. 이러한 문제점의 해결을 위하여 다당류 생산이 우수한 미생물들을 이용하여 대량생산을 유도하는 것은 매우 의의있는 일이라 생각되어진다.

미생물 배양에 의해 생성된 세포의 점질물들은 대부분이 다당류로 구성되어 있으며⁽¹⁻⁷⁾, 이 다당류는 생리활성물질로써 세균류⁽¹⁻⁴⁾, 곰팡이⁽⁶⁻⁸⁾ 및 해양미생물⁽⁹⁻¹²⁾에서 추출한 다당류가 항종양 활성이 강한 것으로 알려져 있다.

이들 미생물 중 세균이 다당류를 많이 분비하며, 특히 초산균은 초산 발효 중 당을 이용하여 다당류를 많이 생성하는데 이들은 주로 heteropolysaccharide로 구성되어져 있으며 생리활성이 높고 독성이 없는 것이 특징이다. 이러한 초산균은 *Acetobacter*속 및 *Gluconobacter*속으로, acidic polysaccharide⁽¹³⁾, cellulose⁽¹⁴⁾, levan⁽¹⁵⁾, dextran⁽¹⁶⁾ 및 soluble glucan 등⁽¹⁷⁾의 다당류를 생산한다. Valla와 Kjosbakken⁽¹⁸⁾은 *Acetobacter xylinum*을 계속

적인 돌연변이에 의해 생성된 세포의 다당류는 glucose, rhamnose, mannose 및 glucuronic acid로 구성되었다고 보고하였다. Tayama 등⁽¹³⁾은 *Acetobacter* sp. NBI 1022에 의해 생성된 acidic polysaccharide의 조성은 D-glucose, L-rhamnose, D-mannose, D-glucuronic acid 및 O-acetyl로 구성되었다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 실험실에서 계대 보관 중인 초산균과 식초에서 분리한 초산균들을 이용하여 당생산력이 우수한 돌연변이주를 선별하고 다당류의 생산을 위한 최적 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험실에서 계대 보관 중인 *Acetobacter aceti* IFO 13752, *Acetobacter aceti* IFO 3281, *Acetobacter aceti* IFO 3288 및 *Acetobacter pasturianus* IFO 13751과 식초박에서 분리한 초산균을 사용하였다.

배지 및 배양

분리용 배지(GYPA-CaCO₃)는 glucose 6.0%, yeast extract 1.0%, peptone 0.4%, acetic acid 0.2%, CaCO₃ 1.0%, agar 1.5%를 사용하였으며, 보관용 배지(GYP-CaCO₃)는 glucose 3.0% yeast extract 0.5%, peptone 0.2%, CaCO₃ 2.0%, agar 1.5%를 사용하였다⁽¹⁹⁾.

생산용 배지 및 배양은 얇게 썰은 감자 20g에 수돗물

Corresponding author: Dong-Seuk Kim, Department of Food Science and Technology, Kyungshung University, 110-1, Daeyun-Dong, Nam-Gu, Pusan 608-736, Korea

100 ml를 가해 120°C에서 10분간 고압증기멸균한 다음 방냉한 후, 원심분리(10,000×g, 20 min)를 하여 고형물을 제거하고 상등액을 얻었다. 이 상등액 전량에 yeast extract 1g, polypeptone 1g, glycerol 2g 및 glucose 0.5 g을 가해 수돗물로써 100 ml로 한 것을 500 ml 배양 플라스크에 넣고 초산균을 접종하여 30°C에서 진탕하면서 30시간 전 배양을 행하였다. 본 배양 배지는 yeast extract 2.5g, polypeptone 1g, sucrose 30g 및 3%(v/v) ethanol 15 ml를 가하고, 1 N-NaOH로 pH 7.0으로 맞춘 다음 증류수로 500 ml로 하였다. 이것을 2l 삼각플라스크에 넣고 여기에 전 배양액 전부를 넣어 30°C에서 진탕하면서 5일간 본 배양을 행하였다²⁰⁾.

자외선 조사 및 돌연변이주의 선별

실험실에서 계대 보관 중인 초산균과 식초박에서 분리한 초산균 중 다당류 생산량이 가장 우수한 균주를 전 배양으로 30시간 배양하고 원심분리하여 생리식염수로 3회 세척한 후 부유시켜 균 부유액(1.0×10^7 cell/ml) 10 ml를 petri dish에 가하여 미리 20분 이상 켜놓은 자외선 살균 등(2,080 erg/mm²)의 수직하에서 30, 40 및 50 cm 간격으로 조절하여 자석교반기 위에 petri dish를 놓고 70 rpm으로 교반하면서 각각 30, 40 및 60초 조사 후 GYP-CaCO₃ agar 평판배지에 도달하여 생성된 colony를 수회 계대하여 생산용 배지에 접종하고 전 배양을 거쳐 본 배양시킨 후 배양액의 점도(VT-03, Rion, Japan)를 측정하여 점도가 높은 돌연변이주를 선별하였다²¹⁾.

돌연변이주의 생장조건

점도가 가장 높은 돌연변이주를 보관용 배지(GYP-CaCO₃)에서 1 백금이를 생산용 전 배양배지에 접종하고 rotary shaker로 30°C에서 30시간 배양 후 생산용 본 배양배지에 10% 접종하여 1~2시간마다 spectrophotometer(Shimadzu UV-160A, Japan)로 660 nm에서 흡광도를 측정하여 생장곡선을 작성하였다²¹⁾.

다당류 생산조건과 대량생산

탄소원의 영향은 생산용 배지로써 전 배양을 하고 본 배양배지에서는 탄소원으로 sucrose, mannose, xylose, maltose, fructose 및 glucose를 농도별로 첨가하여 다당류의 생산량, 균체량 및 pH를 조사하였다. 질소원의 영향은 생산용 배지의 전 배양과 본 배양배지를 기본 배지로 하여 질소원인 (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, NH₄H₂PO₄ 및 NaNO₃를 농도별로 첨가하여 다당류의 생산량, 균체량 및 pH를 조사하였다.

다당류의 대량생산은 생산용 배지로써 전 배양을 하고 본 배양은 10l jar fermentor(Microferm fermentor 114, New Brunswick Scientific Co., USA)로 온도는 30°C, 통기량은 0.4 vvm, 교반속도는 200 rpm으로 pH조절없이 5일간 배양하였다.

배양액의 성분분석

pH측정은 pH meter(Digital pH/Ion Meter, Model DP-215, Dong Woo Medical)를 사용하였다. 점도는 viscotester(VT-03, Rion Co., Ltd, Japan)을 사용하였다. 균체량은 UV-Visible Recording Spectrophotometer(Shimadzu UV-160A, Japan)을 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다당류의 정량은 페놀황산법⁽²²⁾에 준하여 실험하였다. Sucrose의 정량은 산가수분해법⁽²²⁾에 준하여 실험하였다.

다당류의 조제

배양액을 원심분리(10,000×g, 20 min)하여 균체를 제거시키고 상등액에 3배 용량의 isopropyl alcohol을 첨가한 후 생성된 침전을 원심분리하여 얻고 그 침전물을 물에 용해시킨 후 5% acetylmethyl ammonium bromide (CTAB) 용액을 침전이 더 이상 형성되지 않을 때까지 첨가하였다. 원심분리에 의하여 acidic polysaccharide-CTAB 복합체를 회수하여 20% sodium chloride 용액에 다시 용해시키고 흐르는 물에 48시간 동안 투석한 후 ethanol을 첨가하여 재침전을 시킨 다음 물에 다시 용해시켜 흐르는 물로 48시간 투석하여 진공 냉동 건조시켰다¹⁹⁾.

결과 및 고찰

균주의 선택

본 실험실에서 1주일 간격으로 계대 보관 중인 초산균과 식초박을 멸균 생리식염수에 회석하여 GYP-CaCO₃ 분리용 배지에 도달하고 자란 colony를 80균주씩 분리하였다. 분리한 초산균을 생산용 배지에 한 백금이씩 접종하여 배양을 거친 배양액의 점도를 측정된 결과 *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751이 7.50 cp(centipois)로써 가장 높은 점도를 나타내어 이를 공시균주로 하여 다당류 생산량이 우수한 변이주를 구하는데 이용하였다. 식초박에서 분리한 균주들은 점도가 그다지 높지 않은 것으로 나타났다(Table 1). 본 균주의 다당류 생산량은 Minakami 등⁽¹⁹⁾의 *Acetobacter pasteurianus* subsp. *estunensis* IFO 13751에 의한 배양액의 점도(18 cp)보다 낮은 값을 나타내었는데, 이는 배지의 조성, 배양조건의 차이에서 오는 것으로 생각된다.

자외선 조사에 의한 돌연변이주의 선별

공시균주인 *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751을 생산용 전 배양배지로 배양한 후 집균하고 멸균 생리식염수로 세척한 다음 세포부유액을 자석교반기 상에 있는 petri dish에 넣고 자외선 조사한 세포부유액을 분리용 배지에 일정시간 배양 후 평판배지 상에서 점질이 풍부한 colony를 임의로 20개씩 선정하여 생산용 배지에 배양한 결과, 작은 colony보다 큰 colony가 높은 다당류 생산량을

Table 1. Viscosities of polysaccharide produced by *Acetobacter* sp.

Strains	Viscosity (cp)
<i>Acetobacter aceti</i> IFO 13752	1.50
<i>Acetobacter aceti</i> IFO 3281	1.50
<i>Acetobacter aceti</i> IFO 3288	2.05
<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 13751	7.50
<i>Acetobacter</i> sp. No. 20	1.60
<i>Acetobacter</i> sp. No. 43	1.52
<i>Acetobacter</i> sp. No. 74	1.45

Table 2. Selection of mutants induced by UV-ray irradiation of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751

Mutant number	Polysaccharide (mg/ml)
1	27.62
2	36.37
3	37.25
4	32.49
5	43.27
6	30.17
7	17.24
8	26.29
9	25.81
10	12.16
11	18.53
12	22.69
13	30.03
14	37.11
15	14.62
16	26.79
17	23.43
18	13.31
19	17.21
20	16.94

나타내었으며, 40 cm 거리에서 40초간 조사한 조건이 다른 조건에 비하여 다당류의 생산량이 많은 것으로 나타났다. 이 균주의 돌연변이 유기 최적 조사거리는 40 cm(2,080 erg/mm²), 시간은 40초간이었다. Table 2는 *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751의 다당류 생산량을 나타낸 것으로 40 cm 거리에서 40초간 조사하였을 때 변이주 중 No.5가 43.27 mg/ml로 친주의 12.05 mg/ml보다 약 3배의 높은 다당류 생산량을 나타내었다. 이 변이주를 *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5라고 명명하고 실험에 계속 사용하였다.

돌연변이주의 생장곡선

Acetobacter pasteurianus IFO 13751-5를 1 백금이 따서 생산용 전 배양배지에서 활성화시킨 starter를 본 배양배지에 10%가 되도록 접종하여 30°C에서 2시간마다 균의 생장을 흡광도로 측정한 결과 36시간에 가장 높은 것으로

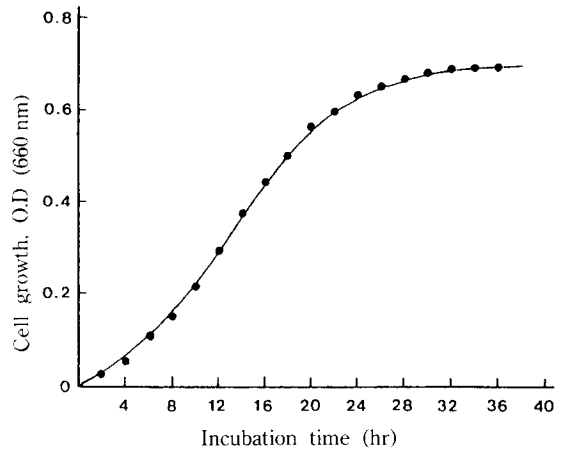


Fig. 1. Growth curve of *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5

나타났다(Fig. 1).

다당류 생산조건과 대량생산

변이주인 *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5의 다당류 생산 최적조건을 찾기 위하여 탄소원을 0.5~5%의 농도별로 첨가하여 pH, 균체량 및 다당류의 생산량에 대한 영향을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 다당류의 생산량은 sucrose 5% 첨가 때가 45.95 mg/ml로 최고의 생산량을 나타내었고, xylose 5% 첨가 때가 41.27 mg/ml로 다음 순이었다. 그리고 mannose, maltose, fructose 및 glucose는 4%를 첨가했을 때 최고의 생산량을 나타내었고, 5%를 첨가했을 때는 오히려 감소하는 경향을 보였다. Ameyama 등⁽²³⁾은 *Acetobacter aurantium*속의 탄소원으로 sucrose 5% 첨가 때가 가장 우수한 효과를 얻었다고 보고하였다. 본 실험에서는 glucose를 첨가한 경우 균의 생장은 양호하였지만 배양액의 점도는 그다지 상승하지 않았고, sucrose를 첨가한 경우 다른 탄소원에 비해 균의 생장이 양호하였다.

질소원의 영향은 생산용 배지를 기본배지로 하여 질소원을 0.5~50 mM의 농도별로 각각 첨가하여 다당류 생산량을 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. (NH₄)₂SO₄ 5 mM일 때 다당류 생산량은 45.50 mg/ml로 가장 높게 나타났으며, 농도의 증가에 따라 생산량은 감소하는 경향을 보였고 NH₄H₂PO₄와 NaNO₃는 30 mM과 40 mM에서 가장 높게 나타나다가 농도의 증가에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 생산용 배지를 기본배지로 하여 질소원을 첨가하지 않은 결과와 비슷한 생산량을 나타내므로 질소원의 영향은 크게 관계하지 않는 것으로 생각된다.

다당류의 대량생산을 목적으로 생산용 전 배양배지에서 다양한 starter를 10l jar fermentor로 본 배양을 행하여 시간에 따른 pH, 균체량, 탄소원 소비량 및 다당류

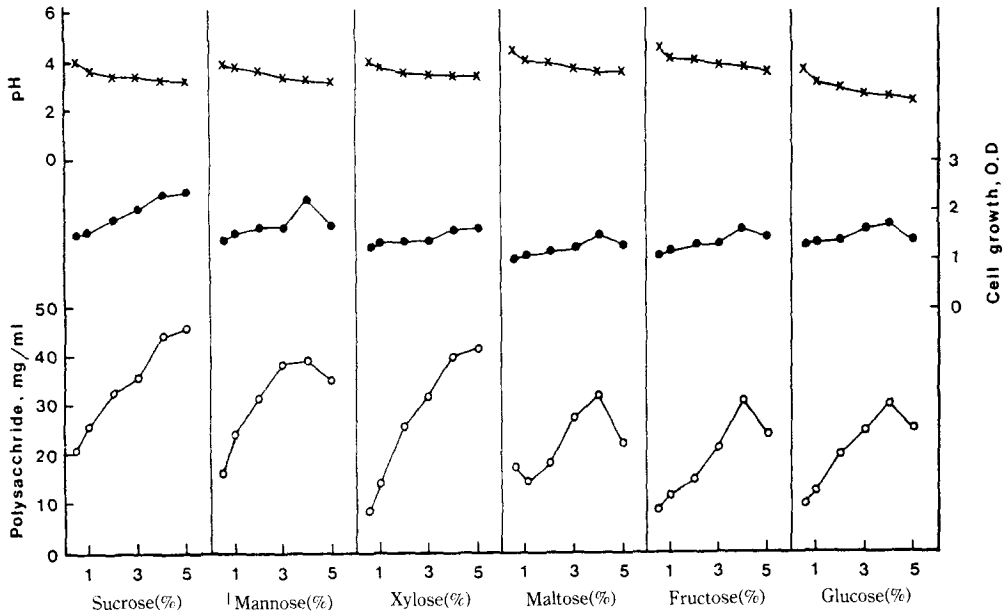


Fig. 2. Effects of carbon sources on polysaccharide production by *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5

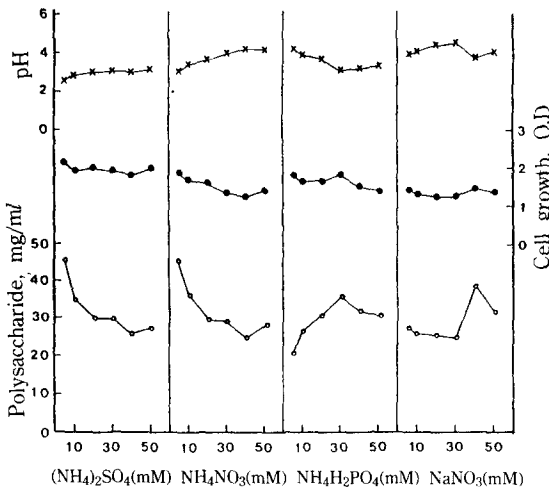


Fig. 3. Effects of nitrogen sources on polysaccharide production by *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5

생산량을 Fig. 4에 나타내었다. pH는 시간이 경과함에 따라 점점 감소하기 시작하여 pH 3.2까지 감소하였고, 다당류의 생산량은 36시간까지는 급격하게 증가하다가 그 이후부터는 안정한 수준을 유지하였으며, 72시간에서 55.10 mg/ml의 최대 생산량을 나타내었다. 한편, sucrose의 소비량은 시간이 경과함에 따라 감소하였고, 다당류와 비교하면 거의 반대현상을 나타내었다. 다당류의 생산량이 플라스크 배양에서 보다 다소 높은 생산량을 나타내는 것은 본 균주가 호기성세균이고, 통기

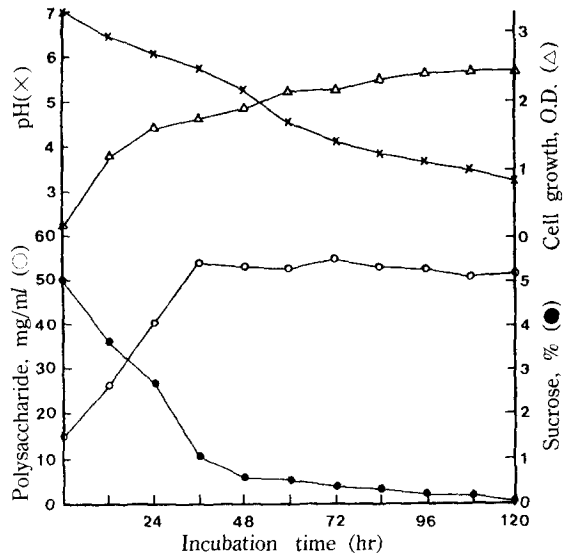


Fig. 4. Time course of sucrose consumption, cell growth, pH and polysaccharide production by *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5

량과 교반량이 충분한 발효조에 의해 발효시킴으로써 생산량을 높일 수 있는 것으로 사료된다.

다당류의 분리 및 정제

Fermentor에 의해 대량생산한 배양액을 Minakami 등의 방법⁽¹⁹⁾에 따라 분리 정제하여 최종적으로 진공

동결건조한 건조분말 다당류는 18.93 g/l을 얻었으며, 이러한 결과는 대량생산의 가능성을 보여주고 있다.

요 약

초산균의 변이주 중 다당류 생산량이 우수한 균주를 선별한 결과 *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5가 친주보다 약 3배의 다당류 생산량을 나타내었다. 돌연 변이주인 *Acetobacter pasteurianus* IFO 13751-5의 최적 배양조건을 검토한 결과 탄소원은 sucrose로써 5% 첨가시 45.95 mg/ml로 가장 높게 나타났다. 다당류를 대량생산할 목적으로 jar fermentor를 이용하여 생산된 다당류는 72시간에서 55.10 mg/ml의 최대 생산량을 나타내었다. 이 배양액을 분리 정제하여 진공 동결건조한 다당류는 18.93 g/l을 얻었다.

감사의 말

본 연구는 1989년도 한국과학재단의 연구비지원에 의하여 수행된 연구결과의 일부로 이에 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

- Shioda, A., Kaneko, Y. and Doi, S.: Studies on the production of polysaccharides by microorganisms. *J. Ferment. Technol.*, **47**, 623(1969)
- Harada, T. and Yoshimura, T.: Production of cells and polysaccharide from ethyleneglycol by a non-spore-forming soil bacterium. *Hakkokogaku*, **42**, 615(1964)
- Inoue, K., Korenaga, H., Tanaka, N.G., Sakamoto, N. and Kadoya, S.: The sulfated polysaccharide-peptidoglycan complex potently inhibits embryonic angiogenesis and tumor growth in the presence of cortisone acetate. *Carbohydr. Res.*, **181**, 135(1988)
- Yoo, J.Y., Koo, Y.J., Shin, D.H. and Chung, D.H.: Polysaccharide production by a gram negative facultatively anaerobic rod. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 98 (1988)
- Nakayama, S., Shirakawa, T. and Ohnishi, T.: Production and some properties of slimy polysaccharide produced by acetic acid bacteria. *Hakkokogaku*, **57**, 31 (1979)
- Sasaki, S., Kodama, K., Uchida, K. and Yoshino, H.: Antitumor activity of *Aspergillus* cell walls. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1219(1985)
- Singh, P.P., Whistler, R.L., Tokuzen, R. and Nakahara, W.: Scleroglucan, an antitumor polysaccharide from *Sclerotium glaucanicum*. *Carbohydr. Res.*, **37**, 245(1974)
- Sasaki, S., Kodama, K., Uchida, K. and Yoshino, H.: Antitumora activity of cell walls of microorganisms. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2807(1985)
- Okutani, K.: Antitumor activity of polysaccharide preparation from marine bacteria. *Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, **26**, 75(1974)
- Okutani, K.: Antitumor polysaccharides produced by a marine *Vibrio*-I. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **42**, 367 (1976)
- Okutani, K.: Antitumor and immunostimulant activities of polysaccharide produced by a marine bacterium of the genus *Vibrio*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 1035(1984)
- Ryu, B.H., Chi, B.H., Kim, D.S., Jang, M.K., Kim, H.S. and Chung, S.J.: Antitumor activity of protein-polysaccharides produced from *Vibrio anguillarum*. *Kor. J. Food Hygiene*, **3**, 111(1988)
- Tayama, K., Minakami, H., Entani, E., Fujiyama, S. and Masai, H.: Structure of an acidic polysaccharide from *Acetobacter* sp. NBI 1022. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 959(1985)
- Hestrin, S. and Schramm, M.: Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. J.*, **58**, 345(1954)
- Pabst, M.J.: Levan and levansucrase of *Actinomyces viscosus*. *Infect. Immun.*, **15**, 518(1977)
- Hehre, E.J. and Hamilton, D.M.: The biological synthesis of dextran from dextrans. *J. Biol. Chem.*, **192**, 161(1951)
- Colvin, J.R., Chene, L., Sowden, L.C. and Takai, M.: Purification and properties of a soluble polymer of glucose from cultures of *Acetobacter xylinum*. *Can. J. Biochem.*, **55**, 1057(1977)
- Valla, S. and Kjosbakken, J.: Isolation and characterization of a new extracellular polysaccharide from a cellulose-negative strain of *Acetobacter xylinum*. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 599(1981)
- Minakami, H., Entani, E., Tayama, K., Fujiyama, S. and Masai, H.: Isolation and characterization of a new polysaccharide-producing *Acetobacter* sp. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2405(1984)
- Nomura, Y., Susisawa, K., Adachi, O. and Ameyawa, M.: Reduction of off-flavors in food materials with acetic acid bacteria. *Nippon Nogeikagaku kaishi*, **61**, 1079(1987)
- Lee, K.H., Kim, M.S. and Park, C.Y.: Studies on production of heteropolysaccharide by mutant of *Xanthomonas malvacearum*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **30**, 77(1987)
- 日本食品工業學會 食品分析法編集委員會: 食品分析法, p.185(1984)
- Ameyama, M. and Kondo, K.: Carbohydrate metabolism by the acetic acid bacteria. part VI. Characteristics of the intermediate type strains. *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 724(1967)

(1991년 1월 18일 접수)