

*Zoogloea ramigera*에 의한 생물고분자 생산에 관한 연구

안대희 · 권해수 · 정윤철
한국과학기술연구원 환경연구센터 수질환경연구실

The Production of Biopolymer by *Zoogloea ramigera*

Dae Hee Ahn, Hae Soo Kwon and Yun Chul Chung

Water Pollution Control Lab., Environment Research Center,
Korea Institute of science and Technology P. O. Box 131,
Cheongryang, Seoul, Korea.

ABSTRACT

Zoogloea ramigera 115 was cultured for biopolymer production and its bioflocculant usages. Cultural conditions of the organism were examined with regard to high production of the microbial polysaccharide. The most suitable medium was found to contain glucose as a carbon source, NaNO_3 as a nitrogen source, and yeast extract as an organic nutrient. The initial pH of 6.0 proved to optimal. The biopolymer was extracted effectively using ultrasonication and high speed centrifugation, followed by propanol addition. Jar test results indicate that the polysaccharide produced by the organism is an effective flocculant.

서 론

*Zoogloea*는 활성슬러지에 서식하는 주요 미생물로서 여러종류의 탄소, 질소원에서 다당류를 생성한다. 생성된 다당류는 세포의 응집과 중금속 흡착능력 등 슬러지의 물성에 영향을 미쳐, 슬러지의 분리, 궁극적인 폐수중의 BOD 저감에 주요한 기능을 담당하고 있다(1, 2, 3). Friedman(1968) 등이 하수로부터 분리하여 *Zoogloea ramigera*로 분류하였다(4).

*Z. ramigera*에 의하여 생성된 고분자 물질은 아직 정확한 구조가 밝혀져 있지 않지만 대개 glucose, galactose, pyruvate 등으로 구성되어 fibrillar cellulose 형태인 *Z. ramigera* 1-16-M 종류와 달리 수용성 capsule 형태의 다당류인 것으로 알려져 있다. Ikeda(1982) 등은 glucose, galactose, pyru-

vate 등이 11:3:1.5의 molar ratio로 구성되어 있는 것으로 보고하였다(5).

Gum의 점도는 25°C, 0.75% 수용액에서 2,000 cP에 이르는 높은 점도를 나타낸다. 또한 높은 hydrodynamic volume을 가지며 분자량은 $2.5-9 \times 10^6$ 으로 Xanthan gum의 3×10^6 보다 높은 값을 갖는다. 그리고 낮은 농도(0.1-0.5%)에서 pseudoplastic 성질을 가지며, 아울러 pH, 열, 기계적 전단응력에 대하여 매우 안정한 것으로 알려져 있다(6, 7, 8).

Zoogloea 생산 다당류는 Zooglan으로 부르고 있으며, 이상의 장점으로 인하여 여러 문헌에서 응집제로서의 사용가능성을 제시하고 있다(7, 9, 10). 또한 생성 floc의 중금속 흡착능력을 이용해서 폐수 중 중금속 제거를 위해 *Zoogloea* 생산 다당류를 이

용하는 실험실적 규모의 연구도 진행되고 있다(2, 11, 12).

본 연구에서는 생물응집제 개발을 목적으로 *Zoogloea ramigera* 115를 이용하여 최적 균주 배양 및 생물고분자 생성실험을 실시하고 응집효과를 고찰하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

대표적 flocc 생성균인 *Zoogloea ramigera* 115 (ATCC 25936)를 미국 ATCC로부터 구입 사용하였다. 균주 은행으로부터 분양받은 *Zoogloea ramigera* 115의 보관을 위하여는 Arginine medium (Arginine Hydrochloride 0.5 g/L, Alanine 1.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, K_2HPO_4 2.0 g/L, KH_2PO_4 0.5g/L, Glucose 5~25 g/L, Vitamin B_{12} 1.5×10^{-6} g/L)을 사용하였고, 균체 배양을 위한 기질의 조성은 다음과 같다(2) : Glucose 25 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $NaNO_3$ 0.5~1.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, Yeast extract 0.01 g/L.

배양실험

500mL 삼각 플라스크에 100mL의 배지를 넣고 arginine medium에서 26°C로 3일 배양한 seed 1%를 접종하여 26°C에서 150rpm으로 rotary shaker에서 배양하였다. 탄소원으로 glucose, fructose, sucrose, 에탄올 등을 사용하여 실험하였고, 기질농도의 영향을 조사하기 위해 glucose량을 달리하여 실험하였다. 영양원을 달리한 실험에서는 arginine medium 중 alanine, arginine과 같은 유기영양원 대신 0.15%씩의 casamino acid, yeast extract, malt extract와 peptone등을 사용해 실험하였다. 또한 배양 기질의 질소원으로 NH_4Cl , $(NH_4)_2CO_3$, $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ 를 사용하여 각각 비교하였으며, 초기 pH의 영향실험으로 pH를 5~10으로 변화시켜 배양실험을 하였다.

응집실험

Jar test를 이용한 응집실험(5, 13)은 추출된 점성의 고분자 용액을 각각 0.5mL, 1mL, 3mL, 5mL씩 다른 양을 취해 응집실험을 하였다. 시료로는 5,000 ppm의 Kaolin이며 10% $CaCl_2$ 를 첨가하여 전체량을 200mL로 하였다. 처음 2분간은 소량의 고

분자 용액을 시료에 첨가하여 150rpm의 급속으로 혼합한 다음 다시 50rpm으로 속도를 줄여 20분간 정치 후 그 결과를 관찰하였다.

또한, $CaCl_2$ 용액을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우의 응집효과를 같이 비교하였다. 응집효과는 분광광도계(Hitachi U-2000)로 550nm에서 상등액의 optical density를 측정하였다.

생성된 생물고분자 및 건조 세포 정량

생성된 생물고분자는 autoclave 방법과 ultra-sonification과 high speed centrifuge 방법을 병행하여 추출하였으며 그 방법은 아래와 같다(2).

시료를 autoclave 에서 10분간 steaming 한 후 시료를 20초간 3번에 걸쳐서 sonicate 한다. sonicate된 시료와 증류수를 1 : 3의 비율로 섞은 다음 12,000g에서 40분간 원심분리하며 Pellet은 제거하고 상등액만 채취하였다. 채취된 상등액을 2차 centrifuge하여 pellet은 제거하고 남은 상등액만 채취하여 KCl을 함유한 propanol과 1 : 2의 비율로 섞은 후 4°C 냉장고에서 1시간 이상 보관하였다. 응집된 물질은 55°C vaccum oven에 일정한 무게가 될 때까지 건조시켜서 그 값을 측정하였다. 위 과정에서 생성된 pellet에 원래의 volume 만큼 증류수를 첨가한 후 20초간 3번에 걸쳐서 sonicate 하였다.

위 과정 중 시료와 증류수를 1 : 3의 비율로 섞은 과정에서부터 55°C vaccum oven에서 건조시키는 과정을 반복하여 생물고분자량을 측정하였다.

생성된 pellet은 105°C에서 2시간 동안 desiccation 시킨 후 0.2 μ m의 pore size를 갖는 membrane filter를 사용하여 건조시킨 다음 측정된 무게를 건조 세포무게로 결정하였다.

잔류기질의 농도측정

발효 중 잔류기질의 농도는 HPLC를 사용하여 측정하였다. 사용한 HPLC의 조건은 다음과 같다 : HPLC : Varian 2510, Column : Merck, Licrosorb NH_2 (10 μ m), Detector : Varian RI-40, flow rate : 1ml/min.

결과 및 고찰

colony 관찰

균주를 각각 tryptic soy broth와 arginine medium에서 배양한 후 현미경(배율 1000X)으로 관찰하였다(Fig. (1), (2)).



Fig. 1. *Z. ramigera* 115 in the tryptic soy broth. (24h)



(a)



(b)



(c)

Fig. 2. *Z. ramigera* 115 in the arginine medium.(a : 24h, b : 48h, c : 72h)

Fig. 1 경우에는 seed에서 1%로 tryptic soy broth에 집중한 후 24시간 경과한 후인데 세포분리가 거의 되지 않아 실타래처럼 늘어진 모양을 이루고 있다. 반면에 Fig. 2의 (a) 경우는 arginine medium에서 배양한 지 24시간이 경과한 사진으로 Fig. 1에 비해 비교적 세포분리가 잘 일어난 경우로 세포주변에 싸고 있는 matrix 부분이 하얗게 관찰되고 있다. 시간이 경과할수록 생물고분자의 생성에 의해 점도가 상승하게 되며 120 시간 이후 점도가 50cP.로서 tryptic soy broth에서 5일 배양한 경우 10cP.인데 비해 5배 높이가 나타났다.

탄소원의 영향

탄소원으로 glucose, fructose, sucrose, 에탄올을 각각 25g/L로 하여 발효실험을 실시하여 각각의 세포성장곡선과 점도변화를 나타냈다(Fig.(3), (4)).

탄소원이 에탄올인 경우는 세포성장을 거의 볼 수 없었고, 반면에 fructose가 가장 높은 세포성장률을 기록하였으며, glucose는 40시간 이후 부터 정지기에 이르고 거의 100시간 가까이 되면서 부터는 세포의 사멸기가 되었다. 점도는 glucos가 216 시간에 350cP.로 가장 높은 점도를 나타내며, fructose, sucrose, 에탄올등을 사용한 경우 점도는 작게 나타났다.

유기영양원의 영향

Arginine medium 중 1.5g/L의 유기질소원인 alanine과 arginine 대신 casamino acid, yeast extract, malt extract, peption등을 각각 동량으로 첨가하여 실험 관찰하였다(Fig. (5), (6)).

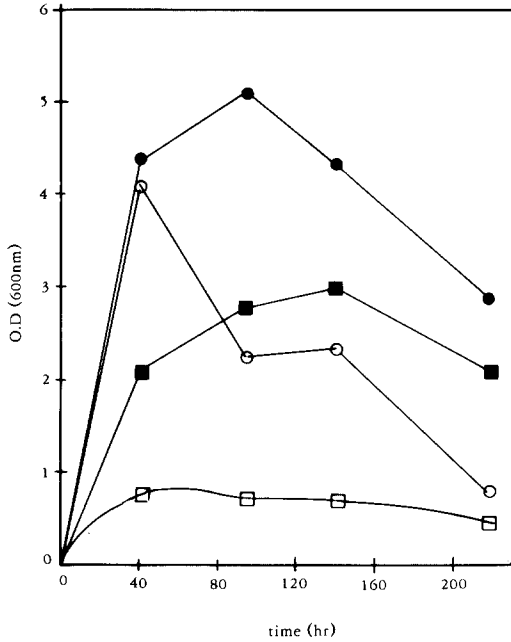


Fig. 3. Cell growth at various carbon sources.
○ glucose ● fructose ■ sucrose □ ethanol

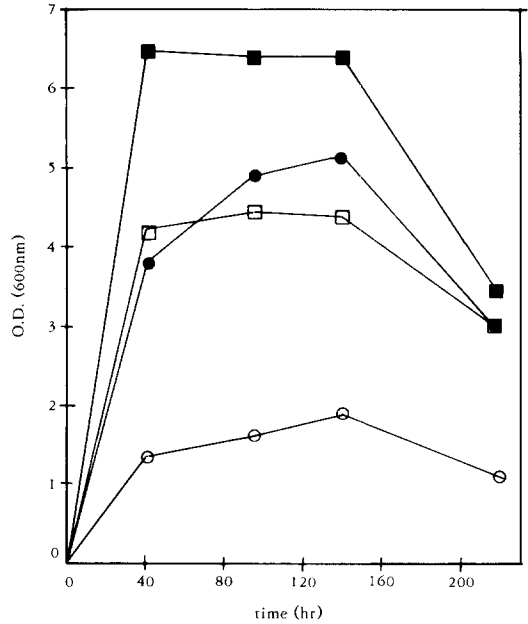


Fig. 5. Cell growth at various organic nutrients.
● casamino acid ■ yeast extract ○ malt extract
□ peptone

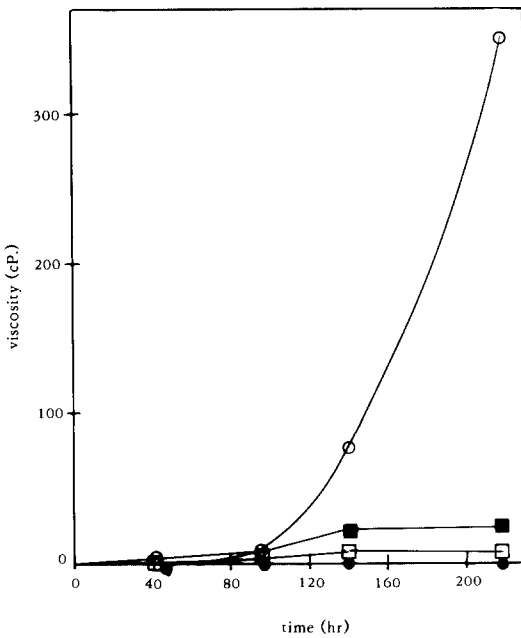


Fig. 4. Viscosity at various carbon sources.
○ glucose ■ fructose □ sucrose ● ethanol

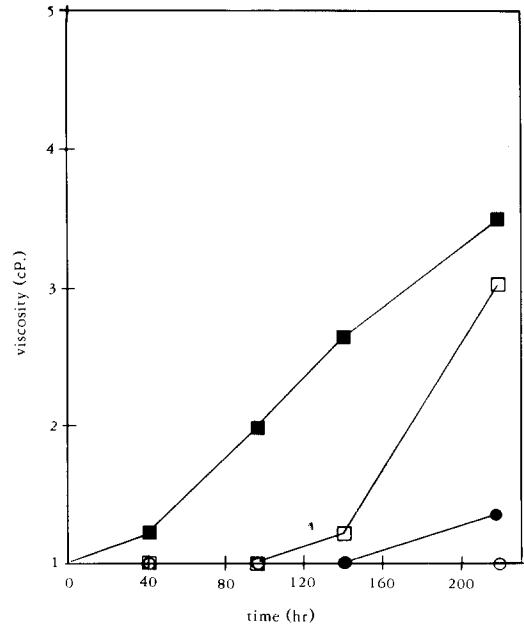


Fig. 6. Viscosity at various organic nutrients.
○ casamino acid □ yeast extract ■ malt extract
● peptone

yeast extract가 가장 높은 세포성장을 보여주었으며, 점도는 yeast extract와 malt extract가 높은 값을 나타내었다. 따라서 세포성장효과를 감안해 영양원으로 yeast extract를 사용하였다.

질소원의 영향

탄소원은 glucose로서 25g/L를, 유기영양원은 yeast extract 0.01g/L를 사용하고, 질소원으로는 0.5% NaNO₃, 0.17% Urea, 0.31% NH₄Cl, 0.38% (NH₄)₂SO₄, 0.38% (NH₄)₂HPO₄ 등의 동량의 질소량을 사용하여 균체량과 점도를 관찰하였다(Fig. (7), (8)). 균체량은 NaNO₃가 가장 낮게 나타나는 반면 점도는 160시간 이후부터 증가하여 258시간에는 715 cP.로써 Urea, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄등을 사용한 경우의 점도는 100 cP.이하인데 비해 가장 높은 점도를 나타내고 있다. 이것은 Table 1에서 보는 바와 같이 258시간 이후의 pH의 변화에서 설명되어 질 수 있다. 즉 질소원으로 NaNO₃를 쓸 경우는 초기 pH의 변화가 거의 없는 반면 가장 점도가 낮은 NH₄Cl의 경우는 초기 pH에 비해 최종 pH가 4.84로서 낮은 산성을 나타냄을 알 수 있다. 따라서 질소원으로는 점도가 높고 pH 변화가 작은 NaNO₃를 사용하였다.

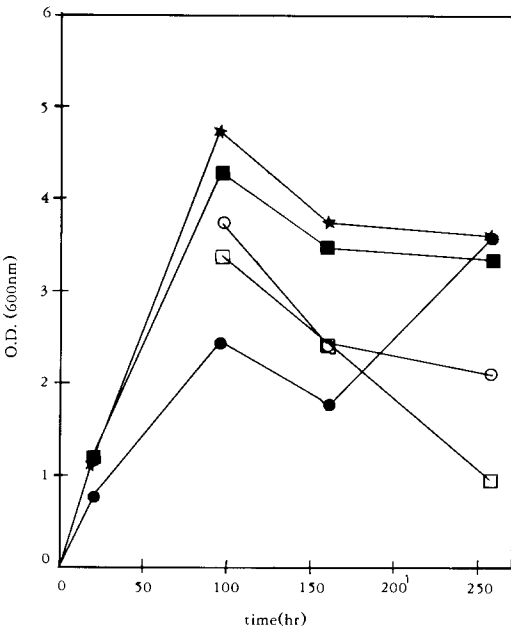


Fig. 7. Cell growth at various nitrogen sources. □ urea ○ (NH₄)₂HPO₄ ★ (NH₄)₂SO₄ ● NaNO₃ ■ NH₄Cl

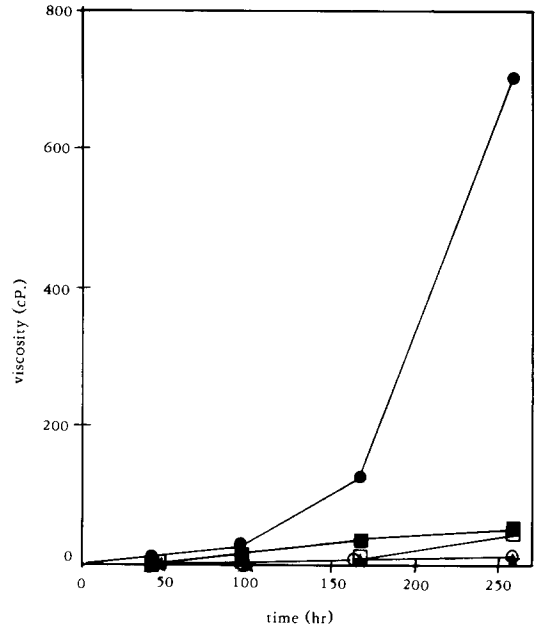


Fig. 8. Viscosity at various nitrogen sources. □ urea ■ (NH₄)₂HPO₄ ★ (NH₄)₂SO₄ ● NaNO₃ ○ NH₄Cl

Table 1. Initial pH changes at various nitrogen sources.

질소원	initial pH	final pH
NaNO ₃	7	7.30
NH ₄ Cl	7	4.84
(NH ₄) ₂ CO	7	5.47
(NH ₄) ₂ SO ₄	7	4.93
(NH ₄) ₂ HPO ₄	7	4.97

탄소원을 달리한 C/N 비의 영향

탄소원으로 glucose 이외에 lactose를 사용하여 C/N비를 30에서 100까지 변화시켜 균체증식과 점도를 비교한 결과를 Table 2에 나타내었다. C/N 비가 낮을수록 균체증식도가 높게 나타나며 점도는 C/N 비의 증가와 함께 높게 나타났다. 그러나 glucose와 lactose는 각각 130과 90이상에서 균체증식에 제한을 받으면서 점도는 떨어지게 된다. 가장 높은 점도를 나타내는 것은 glucose 경우 90, lactose의 경우 60으로 나타났다. 따라서 생물고분자의, 형성에 있어서 C/N 비가 중요한 요소가 된다는 것을 알 수 있었다.

Table 2. Effects of C/N ratio on the production of biopolymer.

C/N ratio	Glucose		Lactose	
	O.D.	Viscosity(cP.)	O.D.	Viscosity(cP.)
30	4.1	532	4.1	3938
60	3.6	1264	4.1	11531
90	3.1	36146	2.9	62
130	1.7	109		

Jar test에 의한 응집실험

5,000 ppm kaolin과 10% CaCl₂가 혼합된 시료 (200mL)에 추출한 생물고분자 용액을 첨가하여 응집실험을 실시하였다. Table 3의 O.D. 값에서와 같이 생물고분자의 농도가 0.5mg~3mg에서 거의 완전한 정화능력을 보여주었다.

Table 3. Result of flocculation test of biopolymer.

시 료	Biopolymer(mg)	Supernatant O.D.(550 nm)
Kaolin+Ca ⁺⁺	0	0.42
	0.2	0.04
	0.5	0.01
	0.7	0.02
	1.0	0.03
	3.0	0.03
	5.0	0.09
	10.0	0.16
	25.0	0.41

요 약

생물응집제 개발을 목적으로 *Zoogloea ramigera* 115를 이용하여 균주배양 및 생물고분자 생성실험을 실시하였다. 다당류의 최고 생성물을 얻을 수 있는 최적기질로 탄소원으로는 glucose, 질소원으로는 NaNO₃ 유기영양원으로는 yeast extract가 선택되었다. 초기 pH가 6일 때 가장 높은 세포성장과 점성을 나타내었다. 생성된 생물고분자는 ultrasonica-

tion과 고속 원심분리를 거친 후 propanol 첨가에 의해 효율적으로 추출되었다. 생물고분자는 jar test에 의한 응집실험에서 높은 침강성을 보여 응집제 사용가능성을 확인하였다.

참고 문헌

1. Crabtree, K. and Boyle, W : J. Water Pollut Control Fed., **38**, 1968(1966)
2. Norberg, A. B. and Enfors, S : Appl. Environ. Microbiol. **44**, 1231(1982)
3. Parker, S. and Aufman, W. J., : J. Water Pollution Control Fedderation **43**, 1817 (1971).
4. Friedman, B. A. and Dugan, P. R. : J. Bacteriol., **95**, 1903(1968).
5. Ikeda, F., et al : Eur. J. Biochem., **123**, 437 (1982).
6. Cooper, T. A., et al : Presented as poster paper at ACS 198th National meeting, Miami, USA,(1989).
7. Sinskey, A., et al : Biotechnology in Food Processing(3ed. Harlander S. K., and Lavuza, T. P.) Noyes Publ., New Jersey, Ch. **6**(1986).
8. Nakamura, T., et al. : Elsevier Science Publ., Amsterdam, **399**(1987).
9. Esser, K. and Kues, U. : Process Biochem., **21**, (1983).
10. Magaritis, A. and Pace, G. W. : Comprehensive Biotechnology, Pergamon Press, New York, **3**, 1005(1985).
11. Brown, M. J. and Lester, J. N. : Water Res., **13**, 817(1979).
12. Norberg, A. and Rydin, S. : Appl. Environ. Microbiol., **44**, 1231(1982).
13. Parsons, A. B. and Dugan, P.R. : Appl. Microbiol. **21**, 657(1971).