

## 다당류를 생산하는 *Bacillus polymyxa* KS-1의 분리 및 생산 다당류의 특성

권기석\* · 주현규<sup>1</sup> · 오태광

한국과학기술연구원 유전공학연구소, <sup>1</sup>건국대학교 농화학과

### Isolation of Exopolysaccharide-Producing *Bacillus polymyxa* KS-1 and Some Properties of Exopolysaccharide

Kwon, Gi-Seok\*, Hyun-Kyu Joo<sup>1</sup> and Tae-Kwang Oh

KIST, Genetic Engineering Research Institute, P.O. Box 17, Taeduk Science Town, Taejeon 305-606, Korea

<sup>1</sup>Department of Agricultural Chemistry, Konkuk University, Seoul 133-140, Korea

**Abstract**— For the screening of new-functional and specific exopolysaccharide, a bacterium strain was isolated from soil through the two steps of screening. The isolated bacterium was identified as *Bacillus polymyxa* KS-1 according to the criteria of morphological, physiological, and chemical taxonomic analyses. The exopolysaccharide was composed of glucose:galactose:mannose and galactosamine in an approximate molar ratio of 1.00:0.36:1.02:1.10. The produced exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa* KS-1 was found to be revealed new acidic polysaccharide which did not contain pentose, ketose, starch, and uronic acid.

새로운 화학합성방법의 개발은 지금까지 심각한 환경오염원으로 문제시되었던 플라스틱을 자연계에서 생분해 가능한 고분자소재로 전환하려는 연구(1-4)가 활발하게 이루어져 왔고 이중 poly-β-hydroxybutyric acid(PHB)(5, 6), xanthan gum, dextran 및 pullulan 등은 실용화되고 있다. 이들 생분해성고분자는 의약품(7, 8), 식품첨가제(9, 10), 석유회수(11) 및 페인트(12) 등으로 다양하게 이용되기 때문에 이분야에 관한 연구노력은 점차 더 활성화되고 있다. 생분해성 고분자물질은 동물, 식물 및 미생물에 의해서 생산되는데 이중 미생물이 생산하는 고분자물질은 poly-β-hydroxybutyric acid(5, 6), biopolymer(13) 및 hyaluronic acid(14)에 대한 보고가 많이 되고 있다.

미생물에 의해 생산되는 고분자물질 중 세포밖으로 배출되는 복합다당류에 대한 연구는 선진외국에서 많이 행해지고 있지만, 최근 국내에서도 김 등(15), 윤 등(16), 변 등(17) 그리고 유 등(18)에 의해서

연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 점성이 강한 미생물다당류를 생산하는 균주를 토양에서 분리하여 동정하였고 분리 동정된 미생물이 생산하는 다당류의 일부 특성에 대한 연구를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 균주의 분리 및 보존

전국 토양 300여점의 시료를 0.5 g/l의 yeast extract가 첨가된 CzaPek 배지에 평판하여 30°C에서 배양한 후 점질물이 많이 생산되는 20여 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별 균주를 다시 동일한 액체배지에서 배양하여 점성이 가장 높은 균주 1주를 선택하여 분리 균주로 하였다. 분리 균주는 한천 평판배지에서 30°C로 24시간 배양 후 4°C에서 보존하였으며 매 1개월마다 계대배양하였다.

#### 배지 및 배양방법

생산에 사용한 배지는 윤 등(16)의 배지를 변형하여 사용하였다. 배지조제는 1l의 증류수에 glucose 30

**Key words:** Exopolysaccharide, *Bacillus polymyxa* KS-1, chemical taxonomical analyses

\*Corresponding author

g, yeast extract 2.5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  2.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3g, NaCl 0.5g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.01g 및  $\text{CaCO}_3$  0.1g을 녹인 후 1 N NaOH나 HCl로 pH를 7.0으로 조절한 다음 가압살균하여 사용하였다. 배양은 250 ml 삼각플라스크에 50 ml의 배지를 넣은 후 이미 20시간 전배양된 배양액을 4%(v/v) 수준으로 접종한 후 30°C 150 rpm으로 3일간 진탕배양하였다.

**분리균주의 동정**

분리균주의 형태·생리적 및 생화학적 성질은 기존의 방법(19, 20)에 따라 검사한 것을 기초로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(21)와 Macfaddin(19)의 "Biochemical tests for identification of medical bacteria(2nd ed.)" 및 "Manual for the identification of medical bacteria"(22)과 Gordon(23)의 "The Genus Bacillus"에 준하여 동정하였다.

분리균주의 화학적 동정은 Suzuki 등(24)의 분류 방법을 이용하여 DNA base composition(G+C content), 세포내 fatty acids 형태(24), menaquinone 분석(25) 및 cell wall내 diaminopimelic acid(DAP) 형태(26) 등을 관찰하여 균 동정에 이용하였다.

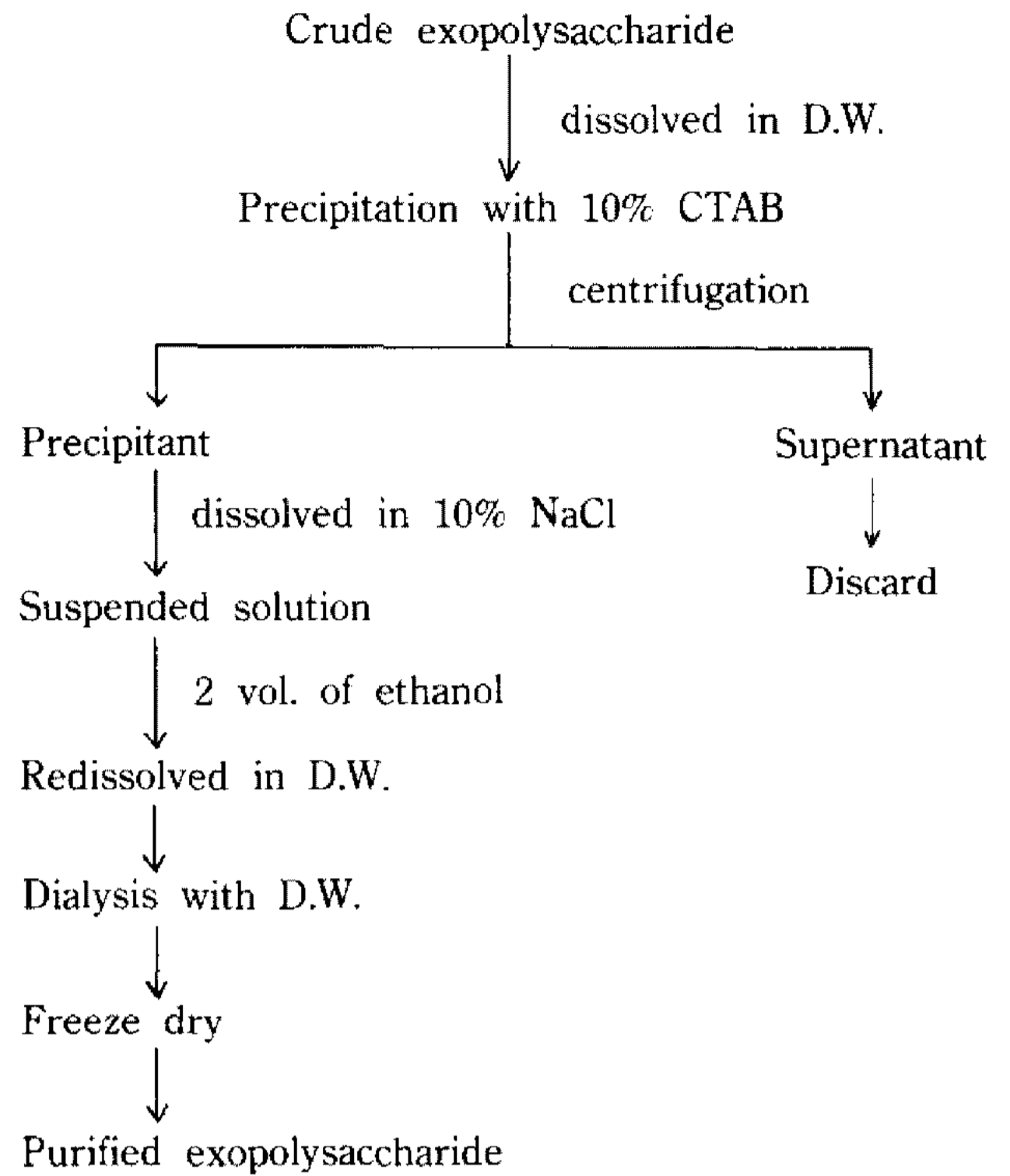
**다당류의 분리 및 정량**

분리균주에 의해서 생산된 배양액을 증류수로 3배 희석한 후 최종부피 1%(w/v) NaOH를 첨가하여 생산다당류와 균체를 유리시키고 15000 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거하였다. 원심분리 상등액에 2배량의 ethanol로 다당류를 침전시키고 70% ethanol에서 탈수 및 중화시킨 뒤 다시 70% ethanol로 침전물을 탈수하고 건조하여 조정제된 다당류를 얻었다. 이때 무게를 측정하여 생산된 다당류의 양으로 하였다.

다당류의 분리는 Fig. 1에 나타낸 과정에 따라서 cetyltrimethylammonium bromide(이하 CTAB로 표기)에 의한 침전, 투석 및 동결건조하여 정제다당류를 얻어 용매용해도, 발색반응 및 IR spectrum 측정에 사용하였다.

**분석방법**

균체량은 배양액을 적당히 희석하여 spectrophotometer(Hitachi U-1100 spectrophotometer)로 660



**Fig. 1. A procedure of the purification of crude exopolysaccharide.**

nm에서 흡광도를 측정하고 희석한 배양액을 원심분리하여(15000 rpm, 20 min) 침전물을 생리식염수로 2번 수세한 뒤 oven(85°C, 3 hr)에서 함량이 될 때까지 건조 후 평량하여 균체량으로 하였다. 한편, 다당류의 정색반응은 Anthrone 반응, Molisch 반응, Seliwanoff 반응, Bial 반응, Benedict 반응, 요오드-전분 반응 및 Ninhydrin 반응을 상법(27)에 따라 발색시켜 관찰하였다.

적외선흡수스펙트럼은 I.R. spectrometer(FTIR, FTS-20/80, Biorad, Digilab. Division)를 사용하여 KBr 정제법(27)으로 조제 후 측정하였다. 다당류를 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 로 100°C에서 2시간 가수분해하고  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 로 중화하여 원심분리하여 membrane filter( $\phi 0.25 \mu\text{m}$ )로 여과한 후 농축하여 가수분해 시료로 하였다. 가수분해된 시료를 이용하여 다당류의 구성당을 조사하기 위해 RI detector를 이용한 HPLC(Beckman, U.S.A.)로 증류수를 용매로 하여 분당 0.5 ml씩 용출하면서 표준당류와 retention time을 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**분리균주의 균학적 성질**

Table 1. General characteristics of the isolated strain

Characteristics	Isolated strain
Oxygen relation	Facultative
Gram staining	Positive
Spore staining	Positive
Cell shape	rod
Cell size	rod (0.8×2~8 μ) ellipsoidal (1×2~4 μ) spore (1×1~2 μ)
Motility	Motile
Hydrolysis of casein	positive
Hydrolysis starch	positive
Hydrolysis Tween 80	positive
Liquifaction of gelatin	negative
Nitrate reduction	positive
Indole production	negative
H <sub>2</sub> S production	negative
Voges-proskauer test	positive
Methyl red reaction	negative
Citrate utilization	positive
Urea utilization	negative
Catalase	positive
Oxidase	positive
O/F test	positive/positive
LV (egg-yolk reaction)	positive
Lysozyme sensitivity	positive
Growth at 4% NaCl	negative
Growth at 40°C	negative
MacConkey's	negative

Yeast extract 0.5 g/l가 첨가된 CzaPek 배지(탄소원 glucose)에서 분리한 다당류생산 균주의 형태적 특성 및 미생물 동정에 필요한 일반적인 특성은 Table 1과 같다. 형태적 특성은 간균으로서 시간의 경과에 따라 세포모양이 ellipsoidal한 형태로 변화되고 그 후 spore 형성이 되어지는 전형적인 다당류생산 균주의 특성을 나타내었다. Cowan 등(22)의 검색표에 의하면 Gram 양성의 간균으로서 내생포자를 형성하는 세균은 *Bacillus* sp.와 *Clostridium* sp.의 균주가 있으며 *Bacillus* sp. 균주는 catalase 양성이며 대부분 호기성균으로서 보고하였으나 분리균주인 KS-1은 혐기적 조건에서도 균생육 및 점질물 형성이 관찰되었다. 한편 Smith 등(28)은 *Bacillus* sp. 균주의 일반적 특성으로서 포자형성, 전분의 이용 및 V-P test의 양성반응을 보고한 것과 분리균주와는 일치함으로서



Fig. 2. Scanning Electron Micrograph of isolated strain (Hitachi S450 EM. X13000).

Table 2. Chemotaxonomic analysis of the isolated strain

Parameters	
G+C molar content	45.2~47.0%
Diaminopimelic acid isomer	meso type
Menaquinone	MK-7
Cellular fatty acid	2C-type(branched type)

분리균주는 *Bacillus* sp.로 추정되며, *Bacillus* sp.에서 glucose로부터 산과 gas를 발생하는 균주로는 *B. circulans*, *B. macerance*와 *B. polymyxa*가 있으나 분리균주 또한 glucose에서 산과 gas를 발생(Table 3)한 것과 아울러 Fig. 2에서 보듯이 전형적인 *B. polymyxa* 형태인 점으로 보아 *Bacillus polymyxa*와 매우 유사한 균주임이 관찰되었다. 화학적 동정결과는 Table 2와 같이 DNA의 G+C 함량의 몰비가 45.2~47.0%로서 *B. polymyxa*와 유사한 수치를 보였으며, cell내 peptidoglycan 형태는 meso-DAP 형태를 취했으며 cell내 fatty acids의 형태는 2C type인 branched type을 그리고 menaquinone의 형태는 표준균주인 *B. laevolacticus* KCTC3117과 대조시 MK-7을 갖는 것으로

**Table 3. Fermentation test of various carbohydrates by the isolated strain**

Carbohydrates	Acid production	Gas production
Glucose	*+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Maltose	+	+
Arabinose	+	+
Xylose	+	+
Sucrose	+	+
Mannitol	+	+
Glycerol	**-	-
Amylopectin	+	+
Inulin	-	-
Dextrin	+	+
Soluble starch	+	+

\*+: production, \*\* -: non-production

**Table 4. Solubility test of 1% exopolysaccharide solution by various solvents**

Solvent	Properties
H <sub>2</sub> O	+* (strong pasty)
HCHO	+ (slightly pasty)
HCOOH	+ (watery)
Benzene	-**
Acetone	-
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	-
5 M NaOH	+ (paste, yellowish)
5 M HCl	+ (watery)

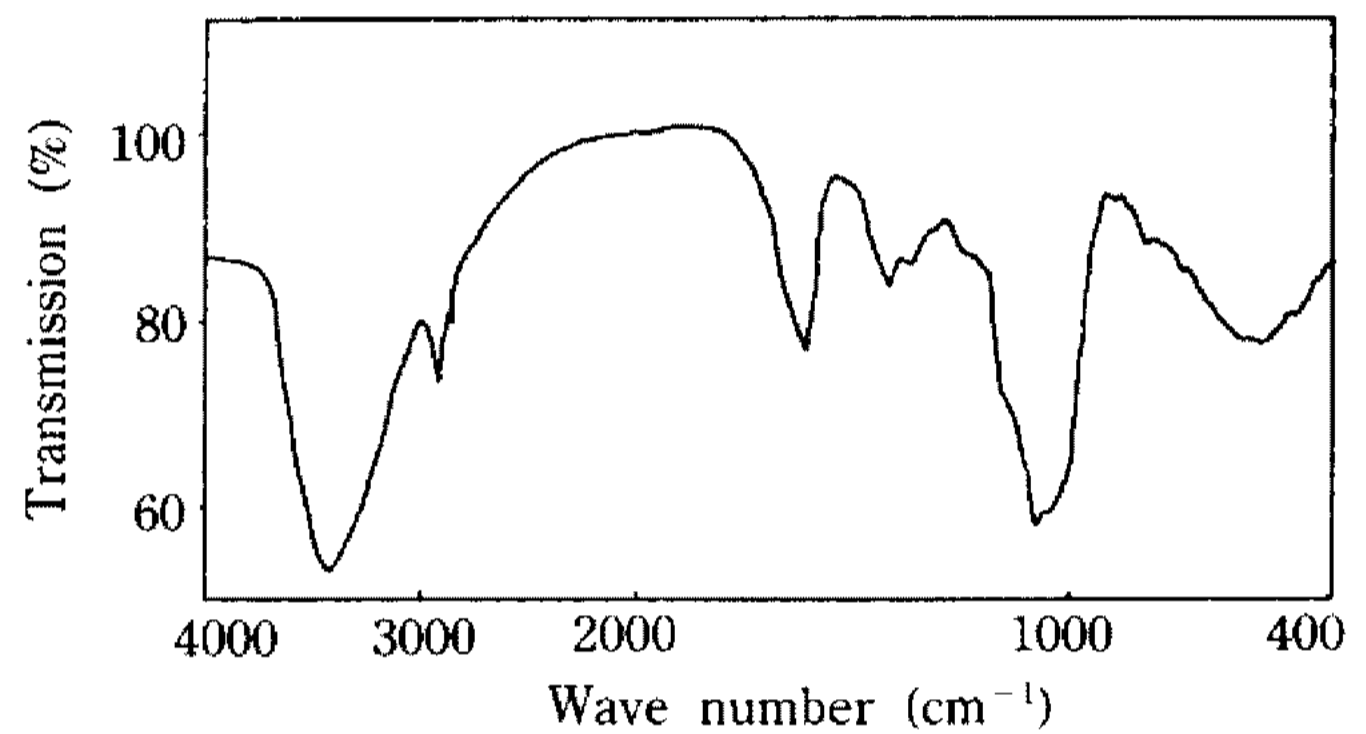
\*+: soluble, \*\* -: insoluble

*Bacillus* sp.와 아주 유사한 결과를 얻었으며 지금까지 *Bacillus* sp.에서 다당류생산 균주로 보고된 것은(29-31) *B. polymyxa* C-3, D1, S-8, *B. polymyxa* No. 271, No. 458 그리고 *B. polymyxa* var. *lactoviscous*와 *B. strain* F-573 그리고 *B. subtilis* FT-3, *B. subtilis* var., *B. circulans* 등이 있다. 그러나 gelatin 액화력, 배지내 3% NaCl 첨가시 생육 및 40°C에서의 생육치 못하는 점 등은 *B. polymyxa*와 다른 생리적 현상을 보여 분리균주는 *B. polymyxa*의 다른 형태인 것으로 보아 최종적으로 *B. polymyxa* KS-1으로 명명하였다(이하 분리균주는 *B. polymyxa* KS-1으로 표기).

**생산다당류의 물리화학적 특성**

**Table 5. Color reactions of the purified exopolysaccharide and hydrolysate**

Test	Purified exopolysaccharide	Hydrolysate
Anthrone reaction	Positive	Positive
Molisch reaction	Positive	Positive
Benedict reaction	Negative	Negative
Bial reaction	Negative	Negative
Seliwanoff reaction	Negative	Negative
Iodine reaction	Negative	Negative
Ninhydrin reaction	Negative	Positive



**Fig. 3. Infra-red absorption spectrum of the purified exopolysaccharide with KBr pellet.**

조정제한 다당류는 백색의 침유상으로서 배양액에서의 향긋한 냄새와는 달리 무취, 무미를 보였으며 각종 용매에 대한 용해도는 Table 4와 같이 formic acid, formaldehyde, H<sub>2</sub>O, 5 M NaOH, 5 N HCl에는 매우 잘 용해되는 성질을 보였으나, 각종 alcohol류나 Benzene 그리고 DMSO에서는 용해되지 않는 특성을 나타내었다. 한편 정제한 다당류에 대한 정색반응은 Table 5와 같다.

정제한 다당류 시료는 당의 일반 반응인 Anthrone 반응 및 Molisch 반응에서 양성이었으며 Bial, Seliwanoff 반응 및 요오드 반응에서는 모두 음성을 나타내는 것으로 보아 다당류내 pentose, ketose 그리고 전분은 존재하지 않음을 알 수 있었다. 그리고 Benedict 반응에서 음성을 나타내어 시료의 비환원성을 나타내었으며, 다당류의 가수분해 산물을 이용한 Ninhydrin 반응에서는 가수분해하지 않은 상태와 다른 결과를 보고한 예(32)와 일치하였다. 또한 양이온세제인 CTAB에 대부분이 침전되는 것으로 보아 본 다당류는 산성미생물 다당류임을 알 수 있었다. 분리균주인 *B. polymyxa* KS-1에 의해 생산된 다당류내

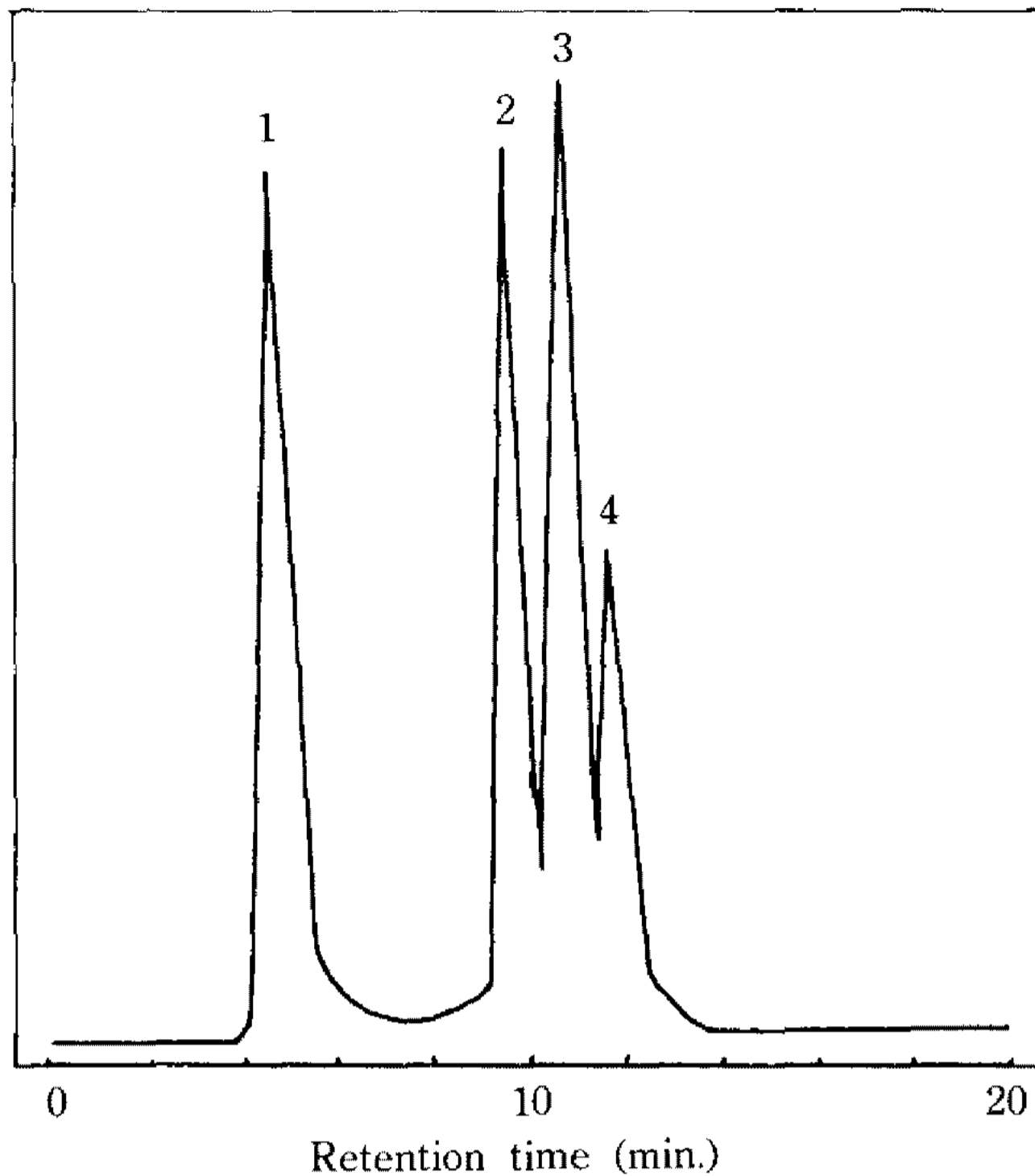


Fig. 4. High performance liquid chromatogram of the hydrolysate of exopolysaccharide KS-1.

1: Galactosamine, 2: Glucose, 3: Mannose, 4: Galactose

Molar ratio, 1:2:3:4=1.10:1.00:1.02:0.36

Column:  $\mu$ -Spherogel Carbohydrate, Size: 7.5 mm $\times$ 30 cm

Detector: Refractive index detector, Solvent: H<sub>2</sub>O, Flow rate: 0.5 ml/min..

당의 결합양식 또는 구성성분을 추정하기 위해 정제 다당류의 적외선 흡수 spectrum을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 당류 및 단백질에 특이적으로 나타나는 3400 cm<sup>-1</sup>에서의 강한 흡수(33)가 관찰되었으며 2880~2980 cm<sup>-1</sup> 부근의 C-H stretching(34)을 1400 cm<sup>-1</sup>와 1600 cm<sup>-1</sup> 부근에서는 carboxyl기의 흡수가 (35) 관찰되었으나, 주로 uronic acid 흡수를 나타내는 carbon산 이량체의 C-O stretching이 나타나는 1725 cm<sup>-1</sup> 부근의 흡수는 관찰되지 않은 것으로 보아 본 시료에는 uronic acid가 함유되지 않은 것으로 나타났다. 기타 finger print region 중 800~900 cm<sup>-1</sup>에서의 낮은 peak는 다당류내  $\beta$ -glucosidic 결합이 (36) 함유되어 있어 이미 보고된 *Bacillus* sp.에 의한 다당류 생산균주의 적외선 흡수 spectrum(31, 37, 38)과는 차이를 나타내었다. 또한 *B. polymyxa* KS-1이 생산하는 다당류가 함유하는 구성당을 HPLC한 결과는 Fig. 4와 같이 glucose:galactose:mannose:galactosamine의 분비를 나타내어 이미 보고된 *Bacillus*

sp.(31, 37, 38)에서의 구성당과는 다른 특징을 나타내었다.

## 요 약

미생물에 의해 체외로 분비하는 다당류생산 균주를 토양으로부터 분리하여 이 균주에 대한 형태학, 생리학적 성질과 화학적 동정방법을 이용하여 동정하였으며 이 균주에 의해 생산된 다당류의 물리화학적 성질을 조사하였다.

분리된 균주는 *Bacillus* sp. 중 *Bacillus polymyxa*와 아주 유사한 형태와 특성을 나타내어 *Bacillus polymyxa* KS-1으로 동정하였으며 생산된 다당류의 용매에 대한 용해도, 정색반응 및 적외선 흡수 spectrum을 조사한 결과 물, formic acid, formaldehyde에는 잘 용해되었으며, 다당류내 pentose, ketose 그리고 전분은 함유되지 않았으며 uronic acid가 함유되지 않음을 알 수 있었다. *B. polymyxa* KS-1이 생산하는 다당류의 구성당은 glucose, galactose mannose 그리고 galactosamine으로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 그리고 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)에 침전되는 것으로 보아 산성다당류인 것으로 나타났다.

## 참고문헌

1. Sticksel, P.R. and R.B. Engdahl. 1984. Air pollution. Pp. 624-649. In Other, K. (ed.), *Encyclo. of Chem. Tech.* 3rd ed. Vol. 1. John Wiley & Sons, New York
2. Huang, S.J. 1985. Biodegradable polymers. Pp. 220-243. In Mark, H.F., N.M. Bikales, C.G. Overberger, and G. Menges, (eds.), *Encyclo. of Polymer Sci. and Eng.* 2nd ed. Vol. 2. John Wiley & Sons, New York
3. 유영제. 1988. 미생물 Biopolymer의 개발. 미생물과 산업. 14: 17-21
4. Brierly, C.L., D.P. Kelly, K.J. Seal, and D.J. Best. 1985. *Biotechnology*. Pp. 186-204. Blackwell Scientific Pub., Oxford
5. Marchessault, R.H. 1988. History of polyalkanoate research. *Polymer preprint*. 12: 584-585
6. King, P.P. 1982. *Biotechnology*. An industrial view. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32: 2-8
7. Glicksman, M. 1982. *Food Hydrocolloides*. Pp. 125-149. CRC Press, Vol. I

8. Sutherland, I.W., and D.C. Ellwood. 1979. In Bull, A.T., D.C. Ellwood, and C. Ratledge (eds.), *Microbial Technology*. Cambridge University Press, SGM symposium series No. 29: 107-119.
9. Fukui, H., M. Tanaka, and A. Misaki. 1985. Structure of a physiologically active polysaccharide produced by *Bacillus polymyxa* S-4. *Agri. Biol. Chem.* 49: 2343-2349.
10. Pilnik, W. and F.M. Rombouts. 1985. Polysaccharides and food processing. *Carbohydr. Res.* 142: 93-105.
11. Morris, E.R., D.A. Rees, M.D. Walkinshaw, and A. Darke. 1977. A role for polysaccharide conformation in regulation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its plant host. *J. Mol. Biol.* 110: 1-16.
12. Lindroth, T.A. and Jr. P.E. Winston. 1982. Use of heteropolysaccharide S-156 in latex paint. *U.S. Patent* 4,342,672.
13. Sutherland, I.W. 1979. Enhancement of polysaccharide viscosity of mutagenesis. *J. Appl. Biochem.* 1: 60-70.
14. Bracke, J.W. and K. Thacker. 1985. Hyaluronic acid from bacterial culture. *U.S. Patent* 4,517,295
15. 김정희, 최준호. 1991. 메탄올로부터 생산되는 고점성을 갖는 신규다당류 Methylan의 용액 특성. *생물화공.* 5: 75.
16. 윤병대, 이경, 박찬선, 안종석, 민태익. 1991. Biopolymer 생산 미생물의 탐색 및 생산된 Biopolymer의 특성. *한국산업미생물학회 1991년 춘계 학술발표대회 논문초록* Pp. 21-28.
17. 신용철, 이현수, 변시명. 1990. 플루란의 응용과 생산. *생물화공.* 4: 48-55.
18. Yoo, J.Y., Y.J. Koo, D.H. Shin, and D.H. Chung. 1988. Polysaccharide production by a Gram negative facultatively anaerobic rod. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 16: 98-104.
19. Macfaddin, J.F. 1984. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. Williams & Wilkins, 2nd edition.
20. Cappuccino, J.G. and N. Serman. 1983. *Microbiology; A Laboratory Manual*. Pp. 51-80. Addison-Wesley Publishing Co., Inc.
21. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. P. 215. Williams & Wilkins, 2nd eds., Vol. II.
22. Cowan, N.R. and K.J. Steel. 1965. *Manual of the Identification of Medical Bacteria*. P. 215. Cambridge Univ. Press, London.
23. Gorden, R.E. 1975. The Genus *Bacillus*, In *Agriculture Handbook Stock number 202-275-2091*. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
24. Suzuki, K. and K. Komagata. 1983. Taxonomic significance of cellular fatty acid composition in some coryneform bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 188-200.
25. Collins, M.D., M. Goodfellow, D.E. Minnikim, and G. Alderson. 1985. Menaquinone composition of mycolic acid containing actinomycetes and some sporoactinomycetes. *J. Appl. Bacteriol.* 58: 77-86.
26. Schleifer, K.H., and P.H. Siedle. 1985. *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Pp. 202-232. Academic Press.
27. Pazur, J.H. 1986. Neutral polysaccharide. Pp. 55-96. In Chaplin, M.F., and J.F. Kennedy (eds.) *Carbohydrate analysis*. IRL Press, Oxford, Washington DC.
28. Smith, N.R., R.E. Gorden, and F.E. Clark. 1952. Aerobic Spore-forming Bacteria. *U.S.D.A. Agricultural Monograph No.* 16: 3-12.
29. Mitsuda, S., N. Miyata, T. Hirota, and T. Kikuchi. 1981. High-viscosity polysaccharide by *Bacillus polymyxa*. *J. Ferment. Technol.* 59: 303-309.
30. Yang, J.Y. 1991. *Production and characterization of levan by Bacillus polymyxa D1*. Ph.D. Thesis Seoul Natl. Univ.
31. 杉澤公, 山本正典, 野村辛弘, 藤井修. 1985. 多糖類の製造法. *日本特許公報* 60-2194.
32. Lee, S.Y., B.S. Lee, W.C. Shin, I.B. Kwon, and J.H. Yu. 1991. Isolation and characterization of biopolymer producing alkali-tolerant bacterial strain. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 23: 161-166.
33. Friedman, B.A., P.R. Dugan, R.M. Pfister, and C.C. Ramsen. 1968. Fine structure and composition of the Zoogloeal matrix surrounding *Zoogloea ramigera*. *J. Bacteriol.* 96: 2144-2153.
34. Heyn, A.N.J. 1975. The infrared absorption spectrum of dextran and its bound water. *Biopolymers.* 13: 475-506.
35. Barker, S.A. and R. Stephens. 1954. Infra-red spectra of carbohydrates. part IV, *J. Chem. Soc.* 4550-4554.
36. Miyata, N., S. Mitsuda, T. Hirota, and T. Kikuchi. 1981. High-viscosity polysaccharide produced by *Pestalotiopsis* sp., *J. Ferment. Technol.* 59: 311-317.
37. 三崎旭, 福井秀夫, 田中稔. 1984. 多糖類及びその製造並びたそれを有効成分とする降マレスロール剤. *公開特許公報*. 59-38204.
38. 三澤公, 山本正典, 野村辛弘, 藤井修. 1986. 多糖類の製造法. *公開特許公報*. 61-239897.

(Received November, 16, 1991)