

다당류를 생산하는 미생물의 분리와 배양특성

손봉수* · 박석규¹ · 강신권 · 이상원 · 성치남² · 성낙계

경상대학교 식품공학과, ¹순천대학교 식품영양학과, ²생물학과

Isolation of the Exopolysaccharide Producing Microorganism and their Cultural Characteristics

Bong-Soo Son*, Seok-Kyu Park¹, Shin-Kwon Kang, Sang-Won Lee,
Chi-Nam Seong² and Nack-Kie Sung

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

¹Department of Food and Nutrition, ²Department of Biology, Sunchon National University,
Sunchon 540-742, Korea

Abstract — A screening was performed to isolate exopolysaccharide-producing microorganisms, which synthesized specific exopolysaccharide for the substitutive of commercial polysaccharides, from natural sources. Soil bacterium, one of 378 mucoid isolates, was finally selected as potential producer of polysaccharides which made the culture broth very viscous and thus examined in detail for optimal medium composition. Isolated strain was identified as *Xanthomonas* sp. EPS-1 from the results of morphological and biochemical characteristics. The composition of optimal medium for exopolysaccharide production was as follows: 50 g sucrose, 1.5 g peptone, 2 g KH_2PO_4 , 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g NaCl, 0.05 g CaCO_3 , 0.07 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.05 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 1 liter of distilled water. From the experiments of temperature and pH dependence, the optimal conditions for exopolysaccharide biosynthesis seemed to be 30°C and 8.0, respectively. About 14.9 gram of maximum exopolysaccharide per liter was obtained at the initial pH 8.0, 30°C and 250 rpm in a flask culture. The exopolysaccharide EPS-1 had such potential as an emulsifying agent and a gelling agent in comparision with commercial exopolysaccharide.

미생물성 다당류에 대한 연구는 1942년에 *Leuconostoc mesenteroides*가 생산하는 다당류인 dextran(1)이 혈장증량제로 개발된 이래 xanthan gum(2-4), pullulan(5-7) 등을 비롯한 여러 가지 다당류에 대하여 기초 및 응용연구가 진행되어 왔다.

이러한 미생물성 다당류는 분자량, 구성당의 종류, 결합순서, 결합양식, 결합위치 및 분지결합 유무에 따라 많은 종류가 존재하며 이들은 점성을 갖거나 분산을 용이하게 하는 성질을 갖는 물질로서 조건에 따라 젤 형성능, 유화안정능, 표면장력의 조절능, 물흡수능, 점착능, 윤활능 및 월름 형성능 등의 광범위한 기능성을 갖는다.

이러한 기능 때문에 식품산업에서는 샐러드 소스, 치이즈, 달걀 대용품, 푸딩, 음료, 분말스프 제조 등에 이용되며 식품분야 외에도 연마제, 점착제, 분무제,

세라믹제, 화장품, 잉크, 페인트 및 종이제조 등의 각종 산업에 이용되고 있다(2, 4, 8-10). 이와같이 미생물성 다당류는 물성이 다양하고 독특하여 각종 산업의 신소재로서 잠재력이 매우 크며, 미생물을 이용한 발효법에 의해 대량 생산할 수 있어 유망한 산업으로서의 가능성을 보여주고 있다.

본보에서는 기존의 *Xanthomonas campestris*와는 균주가 다르고, xanthan과는 구성성분과 물성이 다른 다당류(11)를 생산하는 균주로 *Xanthomonas* sp. EPS-1을 분리·동정하였으며, 또한 다당류의 최적 생산조건을 검토하고 이들의 응용가능성을 제시하기 위하여 몇가지 기초적인 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

다당류 생산균주의 분리

채취한 균원시료를 생리식염수로 3단 회석하여 분리용 배지(sucrose 3%, KH_2PO_4 0.1%, yeast extract

Key words: Exopolysaccharide, optimal culture condition, *Xanthomonas* sp.

*Corresponding author

0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, agar 1.5%, initial pH 7.0)에 상기 균원시료 혼탁액을 도말하여 30°C에서 2일 동안 배양한 후 생성된 colony로부터 점성을 갖는 균주를 1차적으로 분리하였다. 1차 분리된 균주는 분리용 배지의 조성과 같은 액체배지에 각각 1 백금이 씩 접종하여 30°C에서 3일간 250 rpm에서 진탕배양한 후 배양액을 원심분리하여 얻은 상징액에 isopropanol을 첨가한 다음 침전되는 다당류를 회수하여 건조기에서 건조된 다당류의 회수율이 높은 균주를 2차적으로 선별하였다. 2차 선별된 균주의 다당류를 용해한 후 5% α -naphthol 용액을 가하여 보라색 발색여부로써 다당류 유무를 확인한 다음 다당류의 생산성이 우수하고 기본적인 물성시험을 하여 특이성이 있는 균주를 최종 선별하였다(3, 8, 9).

분리균주의 동정

최종 선별된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(12)와 Schaad의 방법(13)에 준하여 동정하였다.

다당류의 분리

분리균주로부터 생산된 다당류의 분리는 배양액을 2배의 중류수를 가하여 잘 혼탁한 다음 원심분리(11,000×g, 30분)하였다. 다시 상징액에 2배의 isopropanol을 가하여 다당류를 침전시킨 후 동일 알콜로 2번 세척하여 동결건조한 것을 crude exopolysaccharide로 사용하였다.

플라스크 배양

다당류 생산을 위한 최적 배양조건은 분리용 배지를 이용하여 30°C에서 72시간 동안 250 rpm에서 진탕배양하는 것을 기본으로 하여 검토하였다. 각 항목의 최적조건 설정은 건조 균체량(105°C, 3시간 건조)에 대한 다당류의 생산비율이 상대적으로 높은 것을 택하였다. 배지조성을 결정하기 위해서 각종 탄소원 및 질소원은 각각 3% 및 0.5% 씩을 첨가하였고, 그외 염류 및 금속이온은 각 항목에 따라 농도를 달리하였다.

다당류의 점도측정

생산된 다당류 용액의 점도는 Brookfield synchloetic viscometer(LVT, U.S.A)의 spindle No. 1을 사용하여 측정하였으며 필요에 따라 UL-adapter를 부착하여 사용하였다.

결과 및 고찰

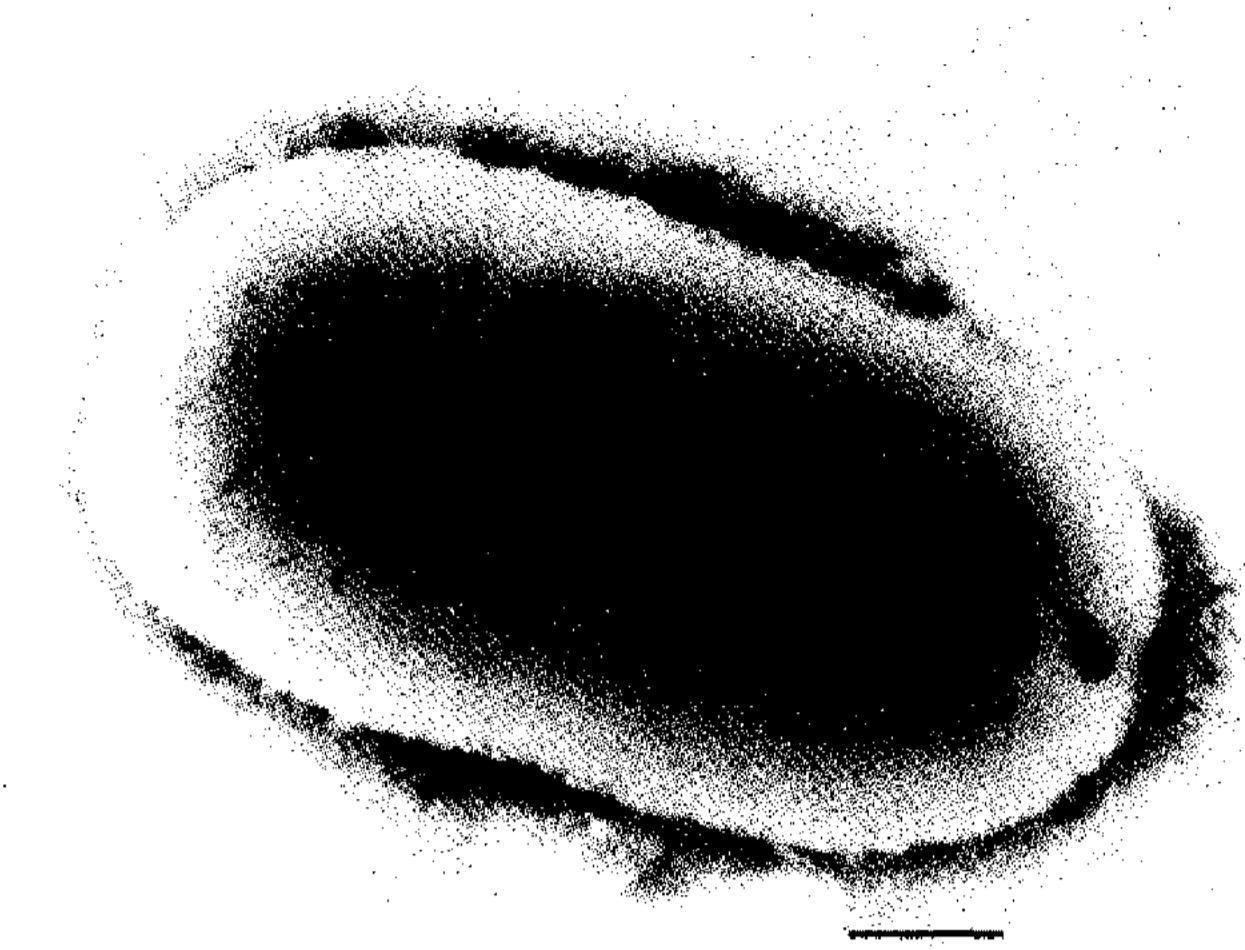


Fig. 1. Electron micrograph of the isolated strain, EPS-1.

Bar represents 0.1 μ m.

분리균주의 동정

분리균주는 Gram 음성, 간균으로 크기는 $0.4 \times 0.8 \sim 1.0 \mu$ m로 운동성을 가진 편성 호기성 세균으로 배양일수에 따라 형태가 변화되지는 않았다(Fig. 1). colony 색깔은 배지를 달리하였을 경우에도 노란색을 띠었고 외형적으로는 wrinkled colony를 형성하고 있으며, colony가 한천배지상에서 쉽게 분리되지 않을 정도로 접착성이 강하였다. 또한 분리균주는 oxidase와 catalase를 생성하였으며 starch는 분해하는 반면 skim milk와 casein은 분해하지 못하였다. 분리균주는 37°C까지 성장하였으나 40°C 이상에서는 성장하지 않았고 NaCl 농도가 4% 이상일 때도 성장이 되지 않았으며 Voges-Proskauer test와 indole test는 음성이었다.

또한 분리균주는 glucose와 sucrose에 대하여 발효능도 있었고 산도 생성하였으나, 그외 대부분의 탄수화물에 대해서는 발효능은 있었으나 산은 생성하지 못하였다. 특히 xylose, casein 및 acetic acid 등에서는 균체 생육이 전혀 이루어지지 않았다.

분리균주는 형태학적 및 배양학적 특성들이 *Xanthomonas* 속의 특성들과 일치하고 있으며(Table 1, 2), 특히 mucoid growth를 하고 있는 점과 전분을 가수분해하는 점, 최대 생육온도가 37°C 전후인 점, NaCl 내성이 3%인 점 및 포도당과 자당으로부터 산을 생성하는 점 등은 *Xanthomonas campestris*와 거의 일치하고 있으나 skim milk를 분해하지 못하는 점과 arabinose와 galactose로부터 산을 생성하지 못하는 점 등은 *X. fragariae*와 유사하였다. 따라서 분리균주는 *X. campestris* 혹은 *X. fragariae*의 변이주이거나

Table 1. General characteristics of the isolated strain

Characteristics	Results
Morphology	Rod
Cell size	0.4×0.8~1.0 μm
Motility	+
Gram staining	-
Voges-Proskauer test	-
Indole test	-
Oxidase test	+
Catalase test	+
Growth anaerobically	-
Yellow colonies on YDC agar	+
Growth on MS agar	-
Mucoid growth	+
Growth at 37°C	+
40°C	-
Growth at 3% NaCl	+
4% NaCl	-
Protein digestion	-
Hydrolysis of starch	+
Hydrolysis of casein	-

YDC: Yeast extract-Dextrose-Calcium carbonate

MS: Miller-Schroth

제 3의 균주로 추정할 수 있을 것으로 예상되어 *Xanthomonas* sp. EPS-1으로 동정·명명하였다.

다당류 생산을 위한 최적 배양조건

앞의 분리용 기본배지를 이용하여 최적 배양온도를 실험한 결과, 20~40°C의 범위 중 30°C에서 다당류의 생산성이 가장 높았으며, 초기 pH는 pH 3~11의 범위에서 pH 8이 상대적으로 생산성이 높았다(data 생략).

탄소원은 미생물성 다당류의 생산과 물성에 큰 영향을 미치므로 fructose를 비롯하여 cellobiose, galactose, maltose, mannitol, raffinose, sorbitol, sorbose, xylose, sucrose, dextrose, lactose, inulin, potato starch 등 14종의 탄소원을 이용하여 실험한 결과, sucrose가 가장 높은 생산성을 보였으며 sucrose 농도는 5%일 때가 가장 양호하였다(data 생략).

또한 질소원은 미생물의 성장과 다당류 생산을 위한 효소의 생합성에 아주 중요한 인자이므로 NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂C₂O₄·H₂O, CH₃COONH₄, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, NH₄Cl, (NH₄)₂HPO₄, NH₄H₂PO₄, Ca(NO₃)₂·4H₂O, NaNO₃, (NH₂)₂CO 등의 무기질소원과 peptone, yeast extract, casein, trypton, soyton, soybean meal, malt extract, skim milk, beef extract

Table 2. Fermentation test of various carbohydrates by the isolated strain

Carbohydrates	Fermentation	Acid production
Glucose	+	+
Sucrose	+	+
Mannose	+	-
Galactose	+	-
Raffinose	+	-
Lactose	+	-
Maltose	+	-
Arabinose	+	-
Mannitol	+	-
Dextrin	+	-
Soluble starch	+	-
Glycerol	+	-
Sorbitol	+	-
Xylose	-	-
Casein	-	-
Acetic acid	-	-

Table 3. Effect of C/N ratio on the exopolysaccharide production by *Xanthomonas* sp. EPS-1

Peptone conc. (g/l)	C/N ratio	EPS ¹ (g/l)	DCW ² (g/l)	Productivity ³	Final pH
0.5	100	4.0	1.9	2.10	6.7
1.0	50	9.4	2.0	4.70	6.7
1.5	33	11.5	2.2	5.23	6.4
2.0	25	8.0	2.3	3.48	6.2
3.0	17	6.2	2.5	2.48	6.2
5.0	10	3.1	2.9	1.07	6.2
10.0	5	1.3	2.9	0.45	5.9
30.0	2	0	3.0	-	6.3

¹Exopolysaccharide, ²Dry cell weight, ³Productivity=EPS/DCW

등의 유기 질소원을 이용하여 실험한 결과, 무기질소원보다 유기질소원의 생산성이 상대적으로 월등히 높았으며 그 중 peptone이 가장 높은 생산성을 보였다(data 생략). 그리고 플라스크 배양에서 C/N ratio를 조사하기 위하여 5% sucrose에 peptone을 각 농도 별로 첨가하여 실험한 결과, 최적 C/N ratio는 33으로 나타났다(Table 3). 미생물성 다당류를 생산하는데 C/N ratio는 10~40 정도 요구된다는 결과(13)와는 비슷한 경향을 나타내었으며, *Xanthomonas* sp.(14)와 *Azotobacter* sp.(15) 균주 등을 탄소원이 제한되었을 때 다당류의 생산이 많았다는 보고들로 미루어 보아,

Table 4. Composition of optimal medium for the production of exopolysaccharide by *Xanthomonas* sp. EPS-1

Component	Concentration (g/l)
Sucrose	50.0
Peptone	1.5
KH ₂ PO ₄	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.0
NaCl	3.0
CaCO ₃	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.07
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.05

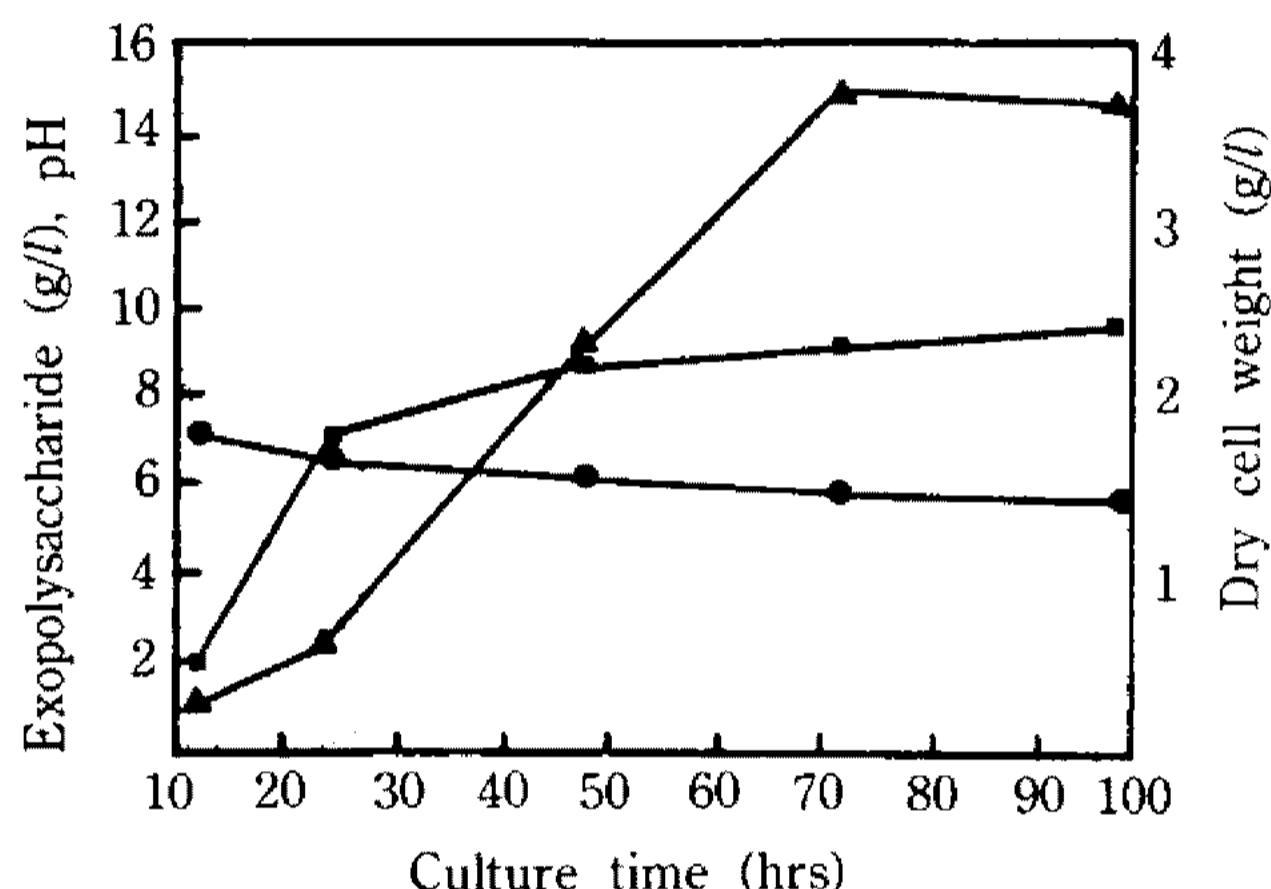


Fig. 2. Growth curve and exopolysaccharide production of *Xanthomonas* sp. EPS-1 cultured at 30°C for 100 hrs with the shaking.

■: Dry cell weight, ●: pH, ▲: Exopolysaccharide

균주와 생산되는 다당류의 특성에 따라 C/N ratio는 상이하다는 것을 알 수 있었다.

칼륨이온과 인산은 미생물 증식시 RNA 합성, 세포벽의 구조 및 역할에 영향을 주어 다당류 생합성에 관여하므로, KH₂PO₄ 농도에 따른 영향을 조사한 결과 최적농도는 2 g/l였다(data 생략). 그외 다당류 생산에 영향을 미치는 염류와 금속이온을 조사한 결과, MgSO₄, NaCl 및 CaCO₃의 최적농도는 각각 2 g/l, 3 g/l 및 0.05 g/l로 나타났으며, FeSO₄ 및 MnSO₄의 최적농도는 각각 0.07 g/l와 0.05 g/l로 나타났다(data 생략). 이상의 결과들로부터 *Xanthomonas* sp. EPS-1을 이용한 다당류 생산시 최적배지 조성은 Table 4와 같다.

플라스크 배양에서의 균체생육과 다당류 생산

확정된 최적배지(Table 4)를 사용하여 30°C에서 250 rpm으로 진탕배양하였을 경우, 다당류 EPS-1의 생산은 배양시간 경과에 따라 생산량이 증가되었으며

Table 5. Solubility of the exopolysaccharide EPS-1 in various solvents

Solvents	Properties
H ₂ O	+(Strong pasty)
Formaldehyde	+(Strong pasty)
Benzene	-
Acetone	-
Chloroform	-
Ethylether	-
Ethanol	-
Methanol	-
Formic acid	+(Watery)
5 N-NaOH	+(Slightly pasty)
5 N-HCl	+(Slightly pasty)

+: Soluble, -: Insoluble

Table 6. Effect of salts on gel formation of the exopolysaccharide EPS-1 solution with added salts

Salts (0.02%)	Viscosity (cp)		
	0.73 ¹	1.83	3.67
Control	259	162	106
NaCl	333	163	105
Na ₂ B ₄ O ₇	249	151	100
KCl	263	160	104
MgCl ₂	362	183	113
MgSO ₄	420	240	150
CaCl ₂	392	187	114
BaCl ₂	414	237	146
FeSO ₄	491	243	160
CuSO ₄	386	220	143
ZnCl ₂	244	125	82

¹Shear rate (sec⁻¹)

72시간 후에는 최고치가 유지되었고 배양액 리터당 약 14.9 g의 최대생산량이 얻어져 29.8%의 수율을 나타내었다(Fig. 2). 또한 균체량은 배양 48시간 후 일정하게 유지되었고, pH는 균체성장과 아울러 떨어지기 시작하여 pH 6.2를 유지하였다.

다당류의 용해성

Xanthomonas sp. EPS-1이 생산하는 다당류는 담백색의 섬유상 물질로서 용매에 대한 용해성을 조사해 본 결과(Table 5), 물, formaldehyde, formic acid, NaOH, HCl 등에는 용해성이 우수하였지만 benzene을 비롯한 유기용매에는 불용성 침전을 형성하였다.

다당류의 젤 형성능

다당류 EPS-1 용액에 각종 염을 0.2%(w/v) 되도록

Table 7. Emulsion formation test of the exopolysaccharide EPS-1 and some other polysaccharide corn oil (olive oil)

Polysaccharides	Emulsion stability (hrs)					
	1	12	96	120	144	168
EPS-1	++(++)	++(++)	++(++)	++(-)	+(-)	+(-)
Xanthan gum	++(++)	++(++)	++(++)	++(-)	+(-)	+(-)
Guar gum	++(++)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Sodium alginate	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Arabic gum	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Locust bean gum	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)

++: Complete emulsion, +: Partially separated emulsion, -: Complete separated

첨가하여 점도의 변화를 전단 속도별로 측정한 결과 (Table 6), 첨가한 염이 알칼리금속의 1가 양이온일 경우는 Na^+ 이온을 제외하고는 큰 영향이 없었으나 알칼리 토금속의 2가 양이온은 모두 겔 형성 능력이 높았으며, Mg^{2+} 염인 경우 음이온에 의해서도 영향을 받는 것으로 나타났다. 그리고 전이금속의 2가 양이온이 첨가되었을 때 역시 좋은 효과를 보여주었다. 이러한 점은 다당류 EPS-1과 염 사이에 착물형성, cross-linking 효과 및 이온 회합효과를 가지기 때문인 것으로 생각된다(15). 특히 염류중 식품산업에 이용되는 NaCl , CaCl_2 , MgCl_2 및 MgSO_4 등의 경우 겔 형성능이 아주 우수하므로 식품보조제로서 용도가 넓을 것으로 생각된다.

다당류의 유화안정성

다당류 EPS-1의 분산효과를 조사하고자 corn oil과 olive oil 40 ml에 중류수를 60 ml 씩 첨가하여 다당류를 1% (w/v) 되게 조절하여 O/W type을 형성시킨 후 경시적으로 조사한 결과(Table 7), corn oil을 이용하였을 때는 다른 다당류에 비하여 다당류 EPS-1과 xanthan gum은 144시간 경과 후 부분적으로 액층이 분리되기 시작하였고 olive oil의 경우에는 corn oil 보다 불안정하여 96시간 경과 후부터 분리되기 시작하여 120시간에서는 액층이 완전히 분리되었다. 따라서 다당류 EPS-1은 응집제로서 보다 분산제로서 응용가능성이 높다.

요 약

토양으로부터 다당류를 생산하는 미생물을 분리하고 생성능이 우수한 한 균주를 최종 선정하여 균학적 성상을 조사한 결과 *Xanthomonas* 속과 거의 일치하였다. 최적배지 조성은 sucrose 50 g, peptone 1.5 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, NaCl 3 g, CaCO_3 0.05

g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.07 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, 중류수 1리터였다. 최적 플라스크 배양에서 다당류 14.9 g/l가 생산되었으며, 이때 수율은 29.8%였고 생산된 다당류는 분산효과와 겔 형성능이 우수하였다.

참고문헌

1. Glicksman, M. 1982. Food hydrocolloides. Vol. I. Pp. 125-149. CRC Press, U.S.A.
2. Fu, J.F. and Y.H. Tseng. 1990. Construction of lactose utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 919-923.
3. Michel, R., J. Seviour and L.M. Pethica. 1987. Exocellular polysaccharide production by isolates of *Epococcum purpurascens*. *Biotech. Letters*. **9**: 741-744.
4. 김배형, 유영체, 이기영, 윤종선. 1990. *Xanthomonas campestris*에 의한 xanthan gum 생산에 관한 연구. 한국생물공학회지 **5**: 25-36.
5. Desmond, P., F. Auer and R.J. Seviour. 1990. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotech.* **32**: 637-644.
6. Dufresne, R., J. Thibault and R. Lencki. 1990. The effect of pressure on the growth of *Aureobasidium pullulans* and the synthesis of pullulan. *Appl. Microbiol. Biotech.* **32**: 526-532.
7. Silman, R.W., W.L. Bryon and T.D. Leathers. 1990. A comparision of polysaccharides from strains of *Aureobasidium pullulans*. *FEMS Microbiol. Reviews* **71**: 65-70.
8. Irene, B.M., P.E. Jansson and B. Lindberg. 1990. Structural studied of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 7A. *Carbohydrate Research*. **198**: 67-77.
9. Marra, M. 1990. Structural characterisation of the exocellular polysaccharides from *Cyanospira capsulata*. *Carbohydrate Research*. **197**: 338-344.

10. Martins, L.O., L.C. Brito and S.C. Isabel. 1990. Roles of Mn²⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ on alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **12**: 794-799.
11. 손봉수, 박석규, 강신권, 이상원, 성낙계. 1995. *Xanthomonas* sp. EPS-1이 생산하는 다당류의 리올로지 특성. 산업미생물학회지 **23**:
12. Peter, H.A.S., S.M. Nicholas, M.E. Sharpe and J.G. Holt. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1, Pp. 140-211, Williams & Wilkins, U.S.A.
13. Schaad, N.W. 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, Pp. 1-54. B.C. A.P.S.
14. Berkely, C.L., D.P. Kelly, K.J. Seal and D.J. Best. 1985. Biotechnology: Principles and Application, Pp. 187. Blackwell Scientific Pub., Oxford.
15. Sutherland, I.W. and D.C. Ellwood. 1979. Microbial Technology Current State, Future Prospects, Pp. 107. U.S.A.
16. Jarman, T.R., L. Deavin, S. Slocombe and R.C. Righelato. 1978. Investigation of the effect environment conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 59-64.
17. 권기석. 1992. *Bacillus polymyxa* 변이주가 생산하는 exopolysaccharide KS-1의 특성. 전국대학교 박사 학위 논문.

(Received 20 December 1993)