

Pestalotiopsis sp. KCTC 8637P에 의한
세포외 생물고분자의 생산조건과 응집활성

문 성 훈 · †권 기 석 · 김 회 식 · 오 회 목 · 윤 병 대 ·
*신 기 선 · *배 경 숙 · **고 영 희 · ***홍 순 덕
생명공학연구소 환경미생물 전문연구Unit, *유전자은행,
효소 저해 전문연구Unit, *경북대학교 미생물학과

Culture Conditions and Flocculating Activity of
Exo-biopolymer Produced by *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P

Seong-Hoon Moon, Gi-Seok Kwon[†], Hee-Sik Kim, Hee-Mock Oh, Byung-Dae Yoon,
Kee-Sun Shin*, Kyung-Sook Bae*, Yung-Hee Kho**, and Soon-Duck Hong***

Environmental Microbiology Research Unit, *Korean Collection for Type Cultures, and
**Enzyme Inhibitor Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience
and Biotechnology, KIST, Taejon 305-333, Korea

***Dept. of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

ABSTRACT

A white rot fungus as a microbial source producing bioflocculant was isolated from rotted leaves and identified as *Pestalotiopsis* sp. M01. The flocculating activity and productivity of Pestan produced by *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P was determined by using Czapek-Dox medium as the inorganic salt source. The flocculating activity was highest at 3% sucrose and 0.3% KNO₃, pH 7, and 25°C, respectively. Whilst, the strain growth was highest at 3% sucrose, 0.3% KNO₃, pH 5, and 25°C, respectively.

서 론

각종 산업폐수내에 존재하는 콜로이드성 입자, 부유성 물질(suspended solid), 또는 식품산업에 이용된 세포 및 세포찌꺼기 등을 응집시키기 위해 사용되고 있는 응집제로는 크게 세 가지로 대별될 수 있다. 첫째, 무기응집제로써 aluminum sulfate, polyaluminum chloride(PAC) 등이 있으며, 둘째, 유기

합성 고분자로써 polyacrylic acid, polyacrylamide derivatives, 그리고 polyethylene imine 등이 여기에 속하며, 마지막으로 chitosan, sodium alginate, 그리고 미생물이 생산하는 미생물성 고분자응집제 등으로 구분할 수 있다. 이들 응집제는 그들의 특성과 성질에 따라 다양한 용도로 사용되고 있다(1-3). 이들 응집제중 유기합성 고분자응집제는 매우 낮은 비용과 높은 응집효과 때문에 점차 그 사용량이 증가하며, 오늘날 폐수처리 목적으로 가장 많이 사용

† Corresponding Author

되고 있다. 특히 응집제중 polyacrylamide는 자연계에서 분해되기 어렵고, 또한 그들의 단량체(acrylamide)는 신경독(4)과 강력한 발암물질로 작용한다는 보고가 있다(5). 한편, 천연 고분자응집제는 인체에 대해 매우 안전하고 생분해성이어서 주로 식품 산업에 사용되고 있으나, 그들의 응집활성은 대체로 낮다. 따라서 보다 강력한 응집활성을 가지며 또한 생분해성인 새로운 생물 고분자응집제 개발의 필요성이 절실히 요구되고 있다. 미생물이 생산하는 생물고분자중 *Rhodococcus erythropolis* S-1이 생산하는 응집제인 NOC-1의 생산 및 배양조건이 보고되었고(3, 6, 7), *Nocardia amara* YK-1을 이용한 응집제 생산(8)과 *Alcaligenes cupidus* KT201(9)과 *Bacillus* sp. PY-90을 이용한 다당류성 응집제의 생산을 보고하였으며(10), 또한 *Alcaligenes latus* B-16이 생산하는 다당류를 이용한 응집활성 및 adsorbents로서의 기능을 보고하였으며(11), 활성 오키에서 분리된 *Zoogloea ramigera* 115 균주의 산업폐수를 대상으로 응용된 몇몇 보고가 있다(12).

본 연구는 부식토 및 토양으로부터 점질물을 생산하며 높은 응집활성을 가진 균주를 분리하여, 이 균주가 갖는 형태학적 특성에 의한 동정과 최적 응집활성을 나타내는 배양조건을 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

응집활성을 갖는 미생물 균주를 탐색하기 위해 경북 북부지방의 부식토 및 토양을 대상으로 potato dextrose agar(PDA) 배지를 이용하여 분리된 곰팡이 균주를 최종 선별하여 M01로 명명한 후 현미경을 통한 균주의 형태 및 생리학적 특성을 비교하여 동정하였다. 동정된 균주는 최종검정을 거쳐 KCTC(Korea Collection Type for Cultures)로부터 일련번호를 받았으며, PDA 한천 배지에 배양 후 4℃에 보관하면서 한달에 한번씩 계대배양하였다.

배양조건

배양은 Czapek-Dox 배지(sucrose 30 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $NaNO_3$ 3 g/L, KCl 0.5 g/L, $FeSO_4$ 0.01 g/L in distilled water, pH 7.0)를 이용하여 25℃에서 각종 탄소원, 무기질소원 그리고 pH와 온도를 달리한 조건에서 5일간 120rpm으로 진탕 배양한 뒤 배양액을 원심분

리(8,000rpm, 25min)하여 상등액의 응집활성과 응집제 생산의 조건을 각각 조사하였다.

생물고분자 응집제 생산

모식된 Czapek-Dox 배지를 이용하여 전배양된 균주의 농도를 2% (v/v) 되게 접종한 후 25℃에서 5일간 배양한 후 원심분리(8,000rpm, 25min)하여 상등액을 차가운 95% 에탄올로 세포외로 분비된 생물고분자의 침전을 유도하여, 침전물을 회수하여 2회 반복으로 95% 에탄올로 씻은 후 dry oven(105~110℃)에서 건조하여 생물고분자 응집제의 생산량을 측정하였다.

Pestalotiopsis sp. KCTC 8637P에 의해 생성된 생물고분자 응집제는 균주의 속명에 근거하여 Pestan이라고 명명하였다.

응집활성

응집활성은 배양된 배양액을 원심분리(8,000rpm, 25min)한 후 상등액을 이용하여 kaolin clay(Junsei chemical Co.) 현탁액(5 g/L, pH 5.25)을 조제한 후, 100mL 비이커에 현탁액을 96mL 취하여 5.88% (w/v) $CaCl_2$ 용액(최종농도 8mM) 2mL을 첨가하고, 300rpm에서 급속교반으로 1분간 교반한 후 배양 상등액을 2mL 첨가하고 다시 급속교반과 완속교반(100rpm)을 각각 30초간 수행하고 3분간 정지시킨 후 그 상등액을 취하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 응집활성은 아래 식과 같이 계산하여 비교하였다.

$$\text{응집활성} = 1/A - 1/B$$

혹은 $(1/A - 1/B) \times \text{배양액의 희석 배수}$

A : 시료의 흡광도, B : 대조구의 흡광도

점도 측정

분리균주가 세포외로 생산하는 점질물의 점도를 조사하기 위해 배양액을 원심분리(8,000rpm, 25min)하여 얻은 상등액을 Brookfield Digital Rheometer(Model DV-III, U.S.A.)의 spindle No. 18(SC4-18)을 이용하여 각 용액의 겔보기 점도(apparent viscosity)를 측정하여 비교 조사하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

경상북도 북부지방 일원의 부식토 및 토양에서 분리한 균주를 대상으로 가장 높은 응집능을 갖는 균

Table 1. Characteristics of Isolated Fungal Strain, MO1.

1. Conidiomatal characters
Position(in relation to substrate): immersed, epidermal to subepidermal or peridermal
Dehiscence : irregular rupture
Type of stroma : acervular
Locular configuration : unilocular
2. Conidiogenous cell characters
Insertion : integrated
Shape : cylindrical
Pigmentation : hyaline
Ornamentation : smooth
3. Conidiophore characters
Shape : filiform, branched
Pigmentation : hyaline
Ornamentation : smooth
4. Conidial characters
Pigmentation : versicolored (pale brown to black)
Septation : euseptate, 4 septate
Shape : fusiform
Ornamentation : smooth
Guttulation : eguttulate
Appendages : apical, basal, endogenous (or as a persistent conidiogenous cell), single, cellular, simple irregularly branched, espathulate
Wall thickness : thick-walled



Fig. 1. Photomicrograph of Spore Apparatus of *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P ($\times 1,200$).

주를 분리하여 형태학적인 특징 및 포자의 형태를 관찰하였다. 곰팡이의 분류에서 가장 중요한 요소인 포자형성군의 포자에 대한 형태학적인 특성을 조사한 결과를 Table 1에 나타내었고, Fig. 1은 분리균주의 포자를 광학현미경으로 관찰한 것으로, 분리 균주의 포자형태는 격막이 4개 있고, 축수가 3~4개 이며, 전체적으로 고동색을 띄는 것이 가장 큰 특징으로 나타났다. 이상의 결과를 볼

때 본 균주는 포자를 형성하는 *Coeliomycetes*에 속하는 Genes(13)의 *Pestalotiopsis* sp.로 동정하여 *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P로 분류하여 명명하였다.

탄소원의 영향

Pestalotiopsis sp. KCTC 8637P의 생물고분자 응집체 생산조건을 조사하기 위해 기본 배지로 Czapek-Dox 배지를 이용하여, 각종 탄소원의 농도를 3%(w/v)로 고정하여 배양한 후 kaolin clay 현탁액에 대한 배양 상등액의 응집활성 및 점도를 조사하여 비교한 결과는 Table 2와 같다. 각종 탄소원에 대한 응집활성을 조사한 결과, 이당류인 sucrose에서 응집활성이 가장 높게 나타났으며, 그때의 겔보기 점도는 36.3cP를 갖는 점성물질을 생산하는 균주로서 분리균주의 생육 및 응집활성에 대해 sucrose가 가장 좋은 탄소원으로 조사되었다. Table 2에 나타난 결과를 보면, Pestan의 생산량과 응집활성이 일치하지 않는 것으로 보아, 첨가된 탄소원의 종류에 따라 생성된 세포의 다당류는 어떤 변화가 일어난다. 즉, 다당류를 구성하는 단량체의 함량, 분자량, 다당류의 전하 밀도 등의 변화가 일어나기 때문에 Pestan의 생산량과 응집활성이 일치하지 않는다. 고분자 즉 다가 전해질(polyelectrolyte)을 이용한 응집활성은 고분자의 분자량, 구

Table 2. Effect of carbon sources on the flocculating activity.

Carbon source (3%)	Final pH	DCW(g/L)	Pestan production(g/L)	Apparent viscosity(cP)	Relative flocculating activity(%)
Control	6.81	0.852	0.4	8.1	1.7
Arabinose	7.28	2.81	0.4	31.8	14.3
Xylose	6.00	0.08	0.4	23.4	1.5
Glucose	6.07	7.45	1.3	71.1	63.2
Galactose	7.29	2.36	0.9	8.1	1.6
Mannose	6.62	6.38	1.0	34.2	34.3
Fructose	6.78	5.43	0.9	30.6	72.7
Sucrose	6.23	8.47	1.2	36.3	100
Maltose	7.11	6.49	1.6	24.6	46.1
Lactose	7.44	2.79	1.3	12.3	30.8
Raffinose	7.00	6.30	1.6	62.4	70.6
Soluble starch	6.57	7.21	0.3	24.6	24.5
Dextrin	6.68	6.72	0.3	21.0	19.2

조, 전하밀도 등의 변화에 매우 의존적인 것을 알 수 있었다.

한편, 응집제를 생산하는 세균을 이용한 경우 탄소원의 영향에 대한 많은 연구 보고가 있으나(8-11), 세균과는 달리 곰팡이가 생산하는 응집제의 연구된 예는 많지 않으며, 분리된 *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P가 생산하는 응집제에 대해서는 지금까지 보고된 예는 없는 것으로 조사되었다.

질소원의 영향

질소원에 대한 *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P의 생육 및 응집활성을 조사하기 위해 탄소원으로는 sucrose를 정한 Czapek-Dox배지를 이용하여 각종 무기질소원을 0.3% (w/v) 되게 첨가한 배지를 이용하여 질소원에 대한 응집효과를 조사한 결과 Table

3과 같았다. 균주의 생육 및 응집활성에 관한 무기질소원의 효과는 KNO_3 를 첨가한 경우의 배양액에서 높은 응집활성을 보였으며, 무기질소원을 첨가하지 않은 경우에 있어서도 다소 높은 응집활성을 보였다. 이것은 다당류 생산균주의 생리적인 특징에서 질소원을 제한하였을 때의 균주의 생육 및 다당류 생산량이 증가한다는 보고(14)와 일치한다. 질소원으로 암모늄일 경우 암모니아가 소모됨에 따라 배지 내로 수소이온이 방출되면서 pH가 떨어지고, 질산염일 경우 질산기를 암모늄으로 환원하기 위해 수소이온이 배지로부터 제거되므로 pH가 높아진다. 이것으로 보아 *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P의 질소원의 이용양상은 일치하며, KNO_3 첨가시 균주의 생육과 응집활성이 가장 좋았다.

Table 3. Effect of Inorganic Nitrogen Sources on the Flocculating Activity.

Inorganic nitrogen source (0.3%)	Final pH	DCW(g/L)	Pestan production(g/L)	Apparent viscosity(cP)	Relative flocculating activity(%)
Control	6.49	1.09	1.3	11.4	64.4
NaNO_3	6.54	1.56	1.6	5.1	19.4
KNO_3	6.66	4.61	1.7	22.5	100
NH_4NO_3	2.67	2.02	0.5	4.8	42.4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.22	1.88	0.7	4.5	12.9
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	6.00	2.52	1.2	9.0	33.5
NH_4Cl	2.72	1.93	0.8	5.7	22.7

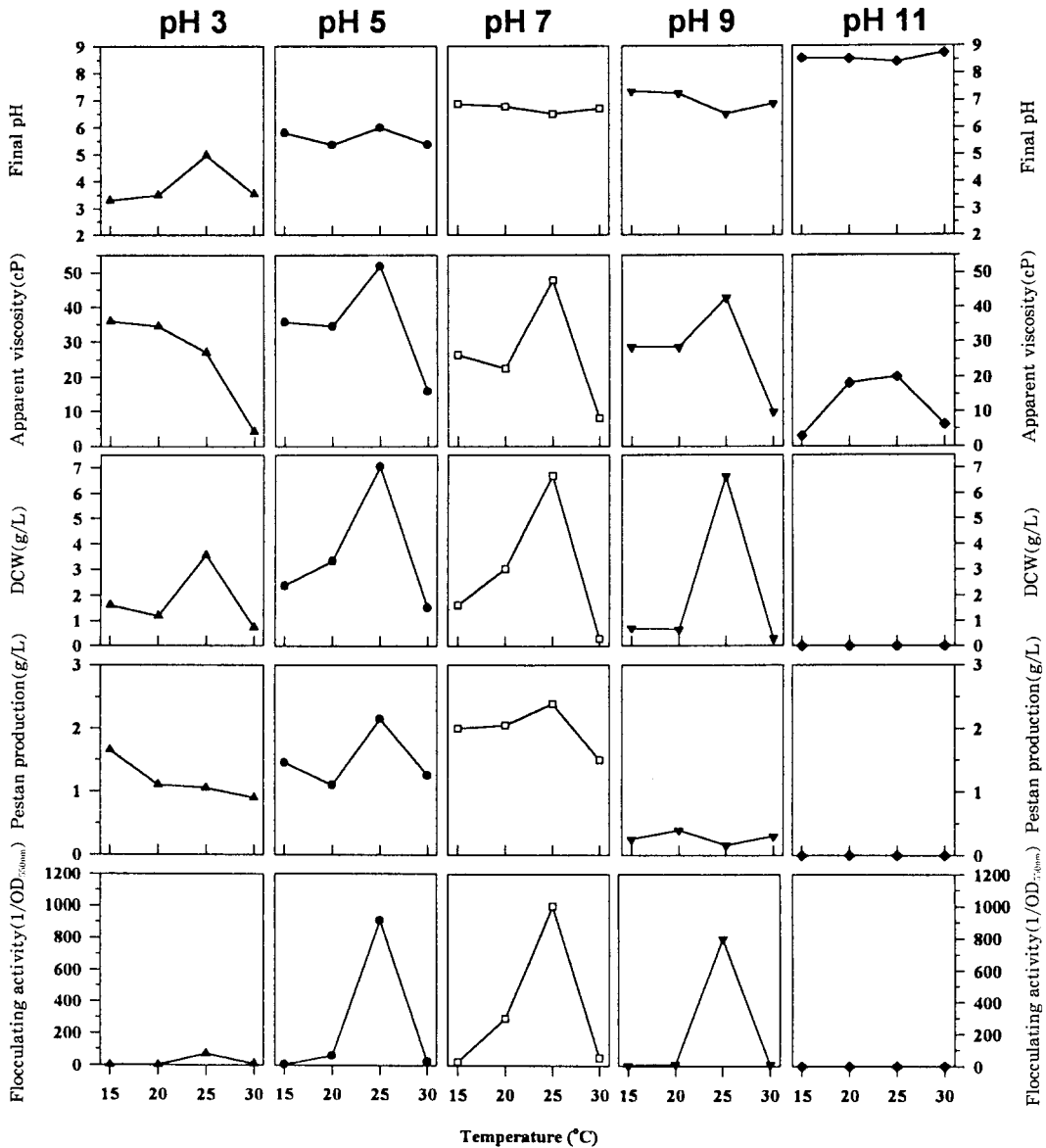


Fig. 2. Effect of pH and Temperature on the flocculating activity, apparent viscosity, and Pestan production by *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P.

초기 pH와 온도의 영향
초기 pH의 영향

배지의 초기 pH를 3~11로 조절한 후, 15, 20, 25, 30, 35, 그리고 40°C에서 이들을 각각 5일간 진탕 배양하였다. *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P가 갖는 응집활성을 pH와 온도별 영향을 조사한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서와 같이 *Pest-*

alotiopsis sp. KCTC 8637P의 생육 pH는 일반적으로 곰팡이의 최적 생육 pH 범위인 약산성범위(pH 3-6)에서 가장 좋은 생육을 나타내는 것과 일치하였으며, pH 5에서 최적의 균주생육을 나타내었다. pH 9는 균주의 생육이 거의 없었고, pH 11에서는 균주가 자라지 않았다. 응집활성과 Pestan생성은 pH 7에서 가장 좋았다. 이것은 균주가 최적 생육조

건을 유지하기 위해 균주의 주변 환경을 알맞은 성장조건으로 만들기 위해 방어기능을 가진 세포의 생물고분자의 인위적인 유도로 많은 생물고분자를 생성한 것으로 생각된다. 또한 *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P에 대해 외부 환경요인인 배지의 pH변화로 의도적인 stress를 가할 때 Pestan 생산성 향상과 높은 응집활성을 유도할 수 있을 것으로 생각되며, 배지의 pH변화는 생물고분자의 응집에 관여하는 관능기(functional group)의 변화와 함량변화를 유도하여 응집활성에 변화를 유발하는 것으로 생각된다.

온도의 영향

초기 pH 7에서의 각 온도에 대한 결과도 Fig. 2에 함께 나타내었다. 그림에서와 같이 일반적으로 곰팡이의 경우 20~25℃의 온도 범위에서 생육이 양호하며, *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P의 온도에 따른 응집활성 및 생육 정도가 일치하였으며, 최적생육 및 응집활성은 25℃에서 가장 높았다. 이러한 결과는 *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P는 중온성 균주로서의 생리적인 특성을 갖는 것으로 나타났다. 35℃ 이상의 온도에서는 균주가 자라지 않은 것으로 나타났으며, 이는 *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P의 생육 및 고분자 생합성에 관여하는 효소가 35℃ 이상에서 실활이 된 것으로 생각되며, 또한 이들 효소들은 온도에 매우 민감한 것으로 생각된다.

요 약

썩은 나무 앞에서 세포의 생물고분자 응집제를 생산하는 흰 곰팡이를 분리하여 *Pestalotiopsis* sp. M01로 동정하였다. 이 균주가 생산하는 생물고분자 응집제의 응집활성에 대한 배양 조건을 무기염 배지인 Czapek-Dox 배지를 기초로 하여 탄소원, 질소원, 배지의 pH별, 그리고 온도별로 조사하였다. 그 결과로서 응집활성 조건은 3% sucrose, 0.3% KNO₃, pH 7, 그리고 25℃에서 최대 응집활성을 나타내었다. 반면에 이 균주의 생육 조건은 3% sucrose, 0.3% KNO₃, pH 5, 그리고 25℃에서 최대 생육을 나타내었다.

참고 문헌

1. J. Nakamura, S. Miyashiro, and Y. Hirose (1976-I), *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 377.
2. J. Nakamura, S. Miyashiro, and Y. Hirose (1976-II), *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 619.
3. R. Kurane, K. Takeda, and T. Suzuki(1986-I), *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2301.
4. S. Budavari(1989), *The Merck Index*, 11th ed., p. 21, Merck & Co. Inc., U.S.A.
5. K. L. Dearfield and C. O. Abermathy(1988), *Mutant. Res.*, **195**, 45.
6. R. Kurane, K. Takeda, K. Toeda, and T. Suzuki(1986-I), *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2309.
7. M. Takeda, R. Karate, J. Koizumi, and I. Nakamura(1991), *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2663.
8. M. Takeda, J. Koizumi, H. Matsuoka, and M. Hikuma(1992), *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 408.
9. K. Toeda and R. Kurane(1991), *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2793.
10. H. Yokoi, O. Natsuda, J. Hirose, S. Hayashi, and Y. Takasaki(1995), *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 378.
11. R. Kurane and Y. Nohata(1991), *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1127.
12. K. Carbtree, W. Bolye, E. McCoy, and G. A. Rohlich(1966), *J. Water Pollut. Control Fed.*, **38**, 1968.
13. B. C. Sutton(1980), *The Coelomycetes ; Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata*, 1st ed., p. 250, Robert MacLehose and Co. Ltd., Great Britain.
14. F. Garcia-Ochoa, V. E. Santos, and A. P. Fritsch(1992), *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 991.