

Zooglan 생산을 위한 *Zoogloea ramigera*의 배양조건의 최적화

권영은·박상옥·¹안장우·²정윤철·†서진호

서울대학교 식품공학과, 농업생물신소재연구센터, ¹청강문화산업전문대학 식품공학과, ²한국과학기술연구원 환경연구센터
(접수 : 1998. 11. 9., 게재승인 : 1999. 4. 3.)

Optimization of Growth Conditions for Production of Zooglan by *Zoogloea ramigera*

Young-Eun Kwon, Sang-Ok Park, Jang-Woo Ahn¹, Yun-Chul Chung², and Jin-Ho Seo[†]
Department of Food Science and Technology, Research Center for New Biomaterials in Agriculture,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea,

¹Department of Food Science and Technology, Chungkang College of Cultural Industries, Icheon 467-810, Korea,

²Environment Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

(Received : 1998. 11. 9., Accepted : 1999. 4. 3.)

Effects of growth conditions on the growth of *Zoogloea ramigera* and the production of zooglan were investigated. The production of zooglan was greatly reduced in the phosphate-limiting medium. NH_4Cl and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ improved cell growth when they were used as a nitrogen source. The medium containing 45 g/L of glucose and 27 g/L of NaNO_3 resulted in the highest production of zooglan at 18.5 g/L.

Key Words : *Zoogloea ramigera*, zooglan, medium optimization

서 론

Zooglan은 세포 외 다당류 중 활성오니의 주유머생물인 *Zoogloea ramigera*가 생산하는 고분자이다. *Zoogloea*는 같은 *Pseudomonadaceae* 계에 속하는 다른 균과 달리 특이하게 gelatinous matrix를 형성한다(1). Zooglan은 xanthan과 같은 음이온성 다당류로 물에 약간 녹으며 알칼리용액인 NH_4OH 와 NaOH 에서 용해도가 증가한다. 산 가수분해에서 얻은 구성성분을 보면 포도당이 주성분이며 cellulase에 의해 쉽게 분해되는 것으로 보아 β -1,4-glycosidic bond를 갖는 cellulose와 유사한 구조를 갖는 것으로 추정된다. 분자량은 대략 100,000 정도이며 포도당과 galactose, pyruvate가 22:6:3의 몰비율로 구성되어 있다(2,3). 포도당 사슬에 pyruvate가 연결되어 있는데 pyruvate의 carboxyl group이 음 전하를 가지며, 이 부분때문에 생물고분자의 중금속에 대한 친화력을 갖는 것으로 알려져 있다. Zooglan은 shear rate가 증가함에 따라 겔보기 정도가 감소하는 pseudoplastic 특성을 가진다(4). 음 전하를 띠는 zooglan은 일반 gum과 같이 식품산업에서 주로 사용되며 생성 flocc의 중금속 흡착능력을 이용해서 폐수처리시에 양 전하를 띠는 카드뮴과

코발트, 철, 니켈이온 등과 금속-고분자 화합물을 형성하여 원심 분리, 여과, 침전을 거쳐 중금속을 제거하는데 사용될 수 있다(5).

본 연구에서는 *Z. ramigera*를 이용하여 zooglan을 생산하기 위하여 배양 조건의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주, 배지 및 배양방법

본 연구에서 사용한 균주는 *Z. ramigera* 115(ATCC No. 25935)로 KCTC(한국유전자은행)에서 분양받았다. 균주 보관용으로 Table 1에 나와있는 배지를 사용하였으며, 26°C에서 2일간 키운 뒤 4°C에서 보관하면서 1개월마다 계대하였다. Zooglan 생산을 위한 배양용 조성은 Table 1과 같으며 탄소원과 기타 배지성분은 분리하여 121°C, 15분 동안 멸균한 후 혼합하여 사용하였다. 본 배양을 위한 접종용 균주는 5%(v/v)이었으며 26°C, 200 rpm으로 진탕배양하였다. 탄소원은 용도에 따라 포도당, 과당, 유당 등을 사용했으며 질소원은 NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 등을 사용하였다.

분석방법

Zooglan 농도와 건조 균체농도는 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 균체농도는 660 nm에서 배양액의 흡광도를 분광광도계(Hitachi, Japan)로 측정하였다. 배양액을 12,000×g에서 30분간 원심 분리한 후 sonication시키고 증류수로 1:3의 비율로 희석한 뒤 12,000×g에서 30분간 원심 분리하였다. 1차로 얻은 pellet과 상등액을 다시 원심 분리하여 얻은 2차 pellet을 함께 모아 상

† Corresponding Author : Dept. of Food Sci. & Tech.,
Research Center for New Bio-Materials in Agriculture,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Tel : 82-331-290-2583, Fax : 82-331-293-4789

e-mail : jhseo94@plaza.snu.ac.kr

URL : http://drseo.snu.ac.kr

Table 1. Medium composition for stock, pre- and main-cultures.

Components	Stock culture(g/L)	Pre-culture(g/L)	Main-culture(g/L)
Tryptone	17.0	-	-
Soytone	30	-	-
NaCl	50	-	-
K ₂ HPO ₄	25	-	-
Glucose	25	25	25
Tryptic soy agar	500	-	-
Arginine-hydrochloride	-	0.5	-
Alanine	-	1.0	-
MgSO ₄ · 7H ₂ O	-	0.2	0.2
K ₂ HPO ₄	-	20	2
KH ₂ PO ₄	-	0.5	1
Vitamin B ₁₂	-	15 × 10 ⁻⁶	-
NaNO ₃	-	-	variable
Yeast extract	-	-	0.01

등액의 2배에 해당하는 isopropanol을 첨가한 후 격하게 흔들었다. Isopropanol로 추출된 흰색 물질을 미리 칭량한 0.2 μm membrane filter(Whatman, USA)로 여과한 뒤 98°C에서 향량이 될 때까지 건조한 후 측정된 값을 zooglan량으로 하였다. 따로 모은 pellet을 98°C에서 향량이 될 때까지 건조시키고 0.2 μm membrane filter로 여과한 후 건조시켜 얻은 값을 건조균체량으로 하였다(6).

배양액 중의 포도당의 농도는 modified DNS 법(7)이나 glucose kit(영동제약)을 사용하여 측정했다. 배양액을 10,000×g에서 6분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 포도당 농도가 3.0 g/L 이하가 되도록 희석한 후 시료 0.5 mL에 DNS 용액 1 mL을 넣고 100 °C에서 5분간 반응시킨 후 찬물에서 급속히 냉각하여 반응을 정지시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하고 이 값을 표준곡선과 비교하여 계산하였다. 유당량은 Boehringer Mannheim kit(BM, Germany)을 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

배지성분 제한 효과

*Z. ramigera*의 균체증식과 zooglan 생산에 영향을 주는 배지 성분을 조사하기 위해 본 배양용 배지 조성에서 포도당, NO₃⁻, phosphate, MgSO₄를 각각 제한했다. 포도당을 제한한 실험구는 대조구에 45 g/L를 첨가하는 대신에 10 g/L를 넣어 주었고 NO₃⁻, phosphate, MgSO₄는 각각의 성분이 완전히 제거된 배지를 사용하였다. 실험 결과를 Table 2에 정리하였다 MgSO₄를 제한한 경우 대조구보다 포도당 소모는 느리나 zooglan 생산량에는 변화가 없었다. 질소원을 제한한 경우는 포도당의 이용이 급격히 감소하며 균체증식이 줄었다. Phosphate의 제한시 포도당의 소모량과 균체증식, zooglan 생산량이 모두 줄었는데, 대조구에 비해 균체량은 50%, zooglan 생산량은 5.5%로 감소하였다. 배지성분 중 phosphate 제한이 균체성장과 zooglan 생산에 가장 큰 영향을 미쳤다. 이러한 실험 결과는 *X. campestris*에

Table 2 Effects of limiting substrates on maximum dry cell mass and zooglan production

	Maximum dry cell weight concentration(g/L)	Maximum Zooglan concentraion(g/L)
Control	0.60	18
Phosphate	0.30	1.0
Glucose	0.28	3.0
Nitrate	0.35	7.5
Magnesium	0.70	19

의한 고분자 생산과 일치하며 *X. campestris*의 xanthan 생산시 영양소로 phosphate가 포도당보다 중요하였다(8).

탄소원의 영향

Zooglan 생산에 대한 여러 종류의 탄소원의 영향을 조사하기 위해 탄소원을 함유한 인산 완충용액을 이용하여 배양하였다. 포도당, galactose, 유당, 과당을 탄소원으로 사용하여 초기농도를 25%(w/v)로 조절하여 배양했다. 유당을 탄소원으로 했을 때 zooglan 생산이 최고였으나 생산성면에서는 포도당(0.32 g/L · h)과 galactose(0.38 g/L · h)를 사용했을 때보다 뒤졌다(Table 3). 유당을 탄소원으로 한 경우 14시간 이후부터 β-galactosidase의 활성이 높았고 76시간에는 유당을 완전히 소모했다. *Z. ramigera*의 β-galactosidase 활성도는 Stauffer와 Leeder(9)의 연구에서 이미 입증되었다. 이와 같은 사실은 유청이 탄소원으로 이용가능함을 제시하였다. 유당 함유배지에서 zooglan 생산성이 낮은 것은 *Z. ramigera*를 유당에 적응시키지 않았기 때문인 것으로 추정되었다. 일반적으로 고분자 생산을 위한 탄소원은 포도당이 좋은 탄소원으로 보고한 결과(10,11)와 일치하지는 않았지만, 이후의 실험에서는 생산성과 경제적인 면을 고려하여 포도당을 탄소원으로 사용하였다.

Table 3. Effects of carbon sources on maximum dry cell mass, zooglan concentration and productivity

Carbon source	Maximum dry cell weight concentration(g/L)	Maximum Zooglan concentration(g/L)	Productivity (g/L · hr)
Galactose	0.95	11.5	0.38
Sucrose	1.40	11.9	0.23
Fructose	0.60	13.0	0.27
Glucose	0.65	15.8	0.32
Lactose	1.43	17.8	0.24

질소원의 영향

탄소원을 포도당으로 고정하고 무기 질소원과 유기 질소원의 효과를 알아보기 위해 포도당을 25 g/L로 첨가한 phosphate 배지에 sodium nitrate 1 g/L와 같은 질소원 농도가 되도록 각종 질소원을 첨가했다. 무기질소원으로 (NH₄)₂SO₄, NaNO₃, NH₄Cl를 사용하였고 유기질소원으로 alanine, arginine hydrochloride를 넣은 뒤 인산 완충용액 배지에서 배양하였다. 균체 증식에는

Table 4 Dependence of maximum dry cell mass, zooglan concentration and productivity on nitrogen sources.

Nitrogen source	Maximum dry cell weight concentration(g/L)	Maximum Zooglan concentration(g/L)	Productivity (g/L · hr)
NH ₄ Cl	1.10	15.0	0.29
Alanine	0.80	15.7	0.32
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.15	16.0	0.31
NaNO ₃	0.65	16.5	0.34
Arginine-HCl	0.50	18.5	0.24

(NH₄)₂SO₄와 NH₄Cl를 이용한 경우 균체량이 높은 것으로 보아 *Z. ramigera*의 균체증식에 ammonium염이 효과적인 질소원인 것으로 생각되었다. Arginine hydrochloride를 함유한 배지에서 최대 zooglan 생산을 얻었으나 생산성에서 NaNO₃와 NH₄Cl를 함유한 배지보다 크게 뒤졌기 때문에(Table 4) Zooglan 생산량과 생산성을 고려하여 NaNO₃를 질소원으로 선택했다.

탄소원(C)과 질소원(N) 비의 영향

포도당의 농도를 25 g/L로 고정시킨 뒤 NaNO₃의 농도를 변화시키면서 그 영향을 살펴보았다. C/N 비가 60일 때 zooglan 생산과 균체증식 모두 가장 우수하였다. C/N 비가 60인 경우는 초기에 zooglan 생산량은 적으나 20시간 이후 포도당의 소모가 급격히 증가하면서 zooglan 생산도 함께 빠르게 증가했다(Figure 1) C/N 비가 30인 경우 zooglan 생산이 가장 적었다(Table 5).

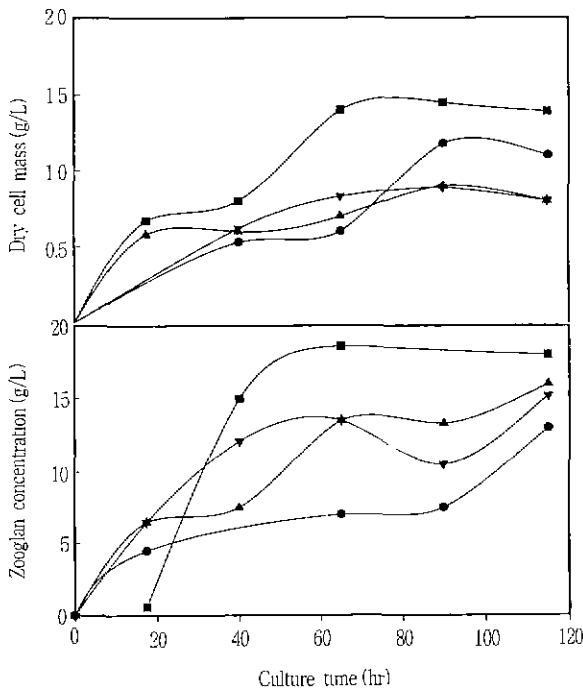


Figure 1. Fermentation profiles of *Zoogloea ramigera* grown at 26°C and pH 7.3 for various C/N ratios (● C/N ratio 30, ■ C/N ratio 60, ▲ C/N ratio 90, ▼ C/N ratio 120).

Table 5. Effect of carbon/nitrogen ratio on maximum dry cell mass, zooglan concentration and productivity.

C/N ratio	Maximum dry cell weight concentration(g/L)	Maximum Zooglan concentration(g/L)	Productivity (g/L · hr)
30	1.19	13.0	0.12
60	1.50	18.5	0.29
90	0.90	16.5	0.14
120	0.85	15.5	0.13

요 약

활성오니의 주요 미생물인 *Zoogloea ramigera*의 증식과 zooglan 생산에 영향을 미치는 배양조건에 대하여 연구하였다. *Z. ramigera*의 증식과 zooglan 생산에 영향을 미치는 성분의 영향을 살펴보기 위해 특정성분을 제한한 결과 phosphate 제한시 zooglan의 생산이 현격하게 감소하였다. 탄소원으로 포도당 이외에 유당을 이용한 zooglan 생산이 우수하였다 질소원으로 사용된 NH₄Cl와 (NH₄)₂SO₄가 세포 증식을 향상시켰다. 포도당과 NaNO₃의 비가 60일 경우 포도당의 초기농도가 45 g/L일 때 zooglan 생산이 18.5 g/L로 가장 높았다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 지정 서울대학교 농업생명연구소 연구센터의 지원을 받아 수행한 것으로 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참 고 문 헌

- Margaritis, A. and G. W. Pace (1985), Microbial Polysaccharides, *Comprehensive Biotechnol.* 3, 1005-1044.
- Dugan, P. and D. Stoner (1989), Chap. 20 The genus *Zoogloea* in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Holt, J.G and Krieg, N (ed), 3952.
- Ikeda, F. (1982), An extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera* 115, *Eur. J Biochem.*, 123, 437
- Norberg, A. and S. Enfors (1982). Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*, *Appl. Environ Microbiol.*, 44(5), 1231.
- Rha, C. (1989), Method for utilization of an exocellular polysaccharide isolated from *Zoogloea ramigera*. U.S. Patent 4,851,393.
- Schwartz, R. and E. Bodie (1986), Production of high-viscosity whey-glucose broths by a *Xanthomonas campestris* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(1), 203-205.
- Chaplin, M. F. and J F Kennedy (1986). Carbohydrate analysis, IRL press, Oxford.
- Molina, O. and R Fitzsimons (1993), Effect of corn steep liquor on xanthan production by *Xanthomonas campestris*, *Biotechnol. Lett.*, 15(5), 495-498.

9. Stauffer, K. and J. Leeder (1978), Extracellular microbial polysaccharide by fermentation on whey or hydrolyzed whey, *J. Food Sci.*, 43(3), 756-758.
10. Lacroix, C. and A. Leduy (1985), Effect of pH at the batch fermentation of pullulan from sucrose medium, *Biotechnol. Bioeng.*, 27(2), 202-207.
11. Williams, A. and J. Wimpenny (1971), Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIb 11264 grown in batch culture, *J. Gen. Microbiol.*, 102, 13