Korean J. Environ. Biol. 18(1) : 199~203(2000)

*Bacillus licheniformis*가 생산하는 Extracellular Biopolymer의 생산조건 및 이용특성

진 효 상 · 이 완 옥[1]

(전주대학교 생명과학부, [1]전주대학교 지역정책대학원 환경관리학과)

적 요 - 고추장에서 점물질을 생산하는 세균을 분리하고 *Bacillus licheniformis*로 동정하였다. 본 균주는 sucrose 6%, Yeast extract 0.1%, peptone 0.1%, NaCl 3%의 배지조성에서 pH를 6으로 조정하였을 때 점물질 생산량이 가장 높았고 생산량은 34 mg/250 ml였다. 이 점물질은 1% 농도에서 필름 형성능이 있었고, 0.25~1.00%의 시험범위에서 Kaolin을 침전시키고, 유산균 현탁액을 안정화시키는 능력을 나타내었다.

서 론

미생물이 생산하는 extracellular biopolymer (EBP)는 식물 및 해조류가 생산하는 다당류에 비해 가격이 높은 단점이 있지만 품질이 더 균일하고 공급이 일정하다는 장점을 지니며, 특수용도 제품을 생산하는데 필요한 기술 적용이 더 용이하기 때문에 근래에 더욱 주목되고 있다(Sutherland 1983).

지금까지 상업화된 미생물 다당류는 Alginate (*Azotobacter vinelandii*), Cellulose (*Acetobacter xylinum*), Curdlan (*Agrobacterium* sp.), Cyclodextrin (*Bacillus* sp.), Dextran (*Leuconostoc mesenteroides*), Gellan (*Auromonas elodea*), Hyallulonic acid (*streptococci*), Heparan (*E. coli* serotype K5), Pullulan (*Aureobasidium pullulans*), Scleroglucan (*Sclerotium rolfsii*), Succinoglycan (*Agrobasidium radiobacter*), Xanthan (*Xanthomonas campestris*) 등으로, 이들은 제과공업 등의 산업에서 접착제나 도료, 유화제, 필름 형성제, 안정제, 팽창제, 부형제, 이액(syneresis) 방지제 등으로 다양하게 사용되고 있다 (Sutherland 1996).

국내에서도 이에 대한 관심이 높아 *Zoogloea ramigera* (김 등 1995), *Ganoderma lucidum* (이 등 1996), *Methylobacterium organophilum* (최 등 1989), *Pseudomonas mendocia* (유 등 1989), *Bacillus polymixa* (권 등 1992), *Ganoderma lucidum* (이 등 1994), *Metarrhizium anisopliae* (최 등 1997), *Pestalotiopsis* sp. (문 등 1996) 등을 포함한 다수의 균들이 분리되고, 이들이 생산하는 biopolymer에 대한 연구가 이루어 졌다. 그러나 이들 균들은 주로 해수나 토양으로부터 분리된 것들이고 식품으로부터 분리된 것들은 매우 적다.

전통식품인 고추장에서는 발효후기에 고추장의 점도 등에 영향을 미치는 특이한 점물질을 생성하는 세균들이 많이 발견되지만 아직 이러한 세균들이 생산하는 EBP의 산업적 이용 가능성을 조사한 연구가 없다. 본 연구에서는 고추장에서 EBP를 생산하는 균주를 분리하여 동정하였고, EBP 생산을 위한 배양조건과 식품 및 환경 산업에의 이용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 균주의 분리 및 동정

고추장을 Ringer 용액에 순차적으로 10배씩 희석하고 적정 희석액을 YPD (Yeast extract 1%, Bactopeptone 2%, Dextrose 2%, Agar 2%) 평판배지 위에 도말한 다음 30°C에서 3일간 배양하였다. Colony의 모양이 점성과 중력작용으로 높이 융기된 균주를 분리하여 이들을 액체 배양한 후 점도가 가장 높은 균주를 선정하였다.

균주의 동정은 Norris 등의 *Bacillus* 동정을 위한 간편법 (Slepecky & Hemphill 1992)에 준하였다.

2. Biopolymer 생산량 측정

무기질이 혼합된 basal medium (K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, $CaCl_2$ 0.02 g trace element solution 0.1 ml) (Nakayama 1981)에 yeast extract, 당, 질소원, NaCl을 양을 조절하여 첨가한 액체

배지에 균을 4% 접종하고, 30°C에서 2~3일 진탕 배양한 다음 원심 분리하여(8,000 rpm에서 25분) 균을 제거하였다. 상등액에 차가운 메탄올을 가하여 polymer를 침전시킨 다음, 원심 분리하여(3,000 rpm, 10분) 모으고, 메탄올로 다시 한번 동일 과정으로 세척하였다. 세척한 침전물은 점물질 생산량을 비교하기 위해 dry oven(100 °C)에서 건조시킨 후 무게를 측정하였고, 용도 실험을 위해서는 소량의 물을 가한 후 −20°C에 냉동시키고, 냉동건조기에서 건조하여 사용하였다.

3. 용도실험

필름형성능, 해빙에 미치는 영향 등은 최 등(1997), 응집활성은 문 등(1996)의 절차대로 시행하였다. 안정성에 미치는 영향을 시험하기 위해서는 *Lactobacillus casei*를 MRS broth에 배양한 다음 원심분리하고, 침전된 균을 2배의 증류수에 현탁한 다음 동량의 polymer 용액을 가하고 48시간 냉장고에 보관한 다음 상층의 흡광도를 660 nm에서 측정 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 점물질 생산균의 분리 및 동정

분리한 균주는 Gram stain으로는 자색, Acid-fast stain에서는 포자는 적색으로, 균체는 청색으로 관찰되었고, 포자는 중앙에 위치하였다(Fig. 1). 또한 Norris의 간편법(Slepecky & Hamphill 1992)에 의할 때, 본 균주는 catalase 양성, VP test 양성, anaerobic test 양성, 50°C에서의 생육 양성, 7% NaCl에서 생육 양성 반응을 보여 *Bacillus licheniformis* 인 것으로 추정되어, *B. licheniformis* TH5로 잠정 명명하였다. *B. licheniformis*는 고추장(구 등 1996)과 된장(신 등 1985)의 숙성 중 나타나는 정상세균으로 알려져 있다.

본 균주의 다른 특성을 API 20E 동정킷을 이용하여 측정한 결과는 Table 1과 같다.

2. 점물질 생산 조건

1) 당 영향

기본 배지에서 당을 다른 종류로 교체하고 starter를 4% 접종한 다음 30°C에서 3일간 배양하고, 점물질 생성량을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 점물질은 saccharose 첨가에서 가장 높게 생산되었다. Saccharose를 분해하여 점물질을 생산하는 효소로는 levanase(Martin *et al.* 1989), levansucrase(Gay *et al.* 1983), fructosyltrasferase(Yun & Song 1996)이 알려져 있으나, 아직 *B. licheniformis*와의 관계는 상세히 알려져 있지 않아 현재 이에 대한 연구가 진행 중이다.

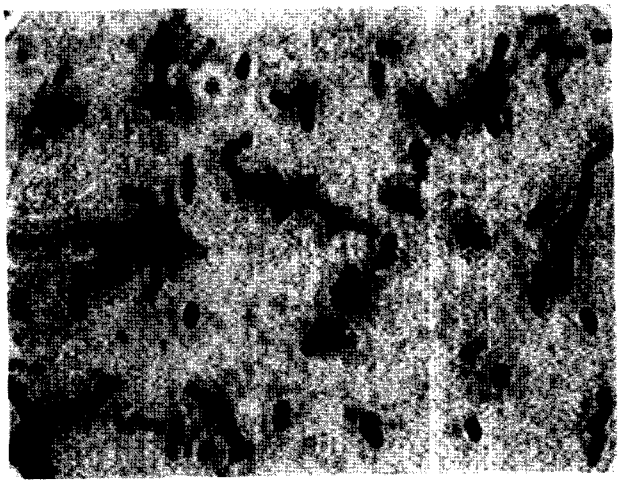

Fig. 1. Light micrograph (×1,500) of the bacteria and the spores in this study.

Table 2. Effect of sugar kinds on production of bio-polymer

Measurement	Blank	Glucose	Fructose	Lactose	Maltose	Saccharose
Absorbance	0.58	0.87	0.73	0.88	0.85	0.74
Cell mass (mg)	4	10	10	6	5	12
Biopolymer (mg)	2	2	9	5	3	12

Culture volume: 250 ml, Medium composition: Yeast extract 0.1%, Peptone 0.1%, NaCl 0.1%. Sugar concentration 2%, Culture time: 3 days

2) 경시적 변화

Saccharose 당을 첨가하고 배양 일수별로 점물질 생성량을 조사한 결과 Table 3에서와 같이 2~3일 배양에서 가장 많았다. 그러나 glucose의 경우에는 점물질 생성량이 적었으며, 발효 일수도 더 길었다. 일반적으로 biopolymer 생산에는 배양 일수가 3~8일로 다양하며

Table 1. Characteristics of *B. licheniformis* TH5 on API 20E test

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H_2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU
−	+	−	+	+	−	+	±	−	+	+	+

MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO_2
+	−	+	−	+	−	+	−	−

Table 3. Effect of cultivation time on production of biopolymer

Sugar	Measurement	Culture time (day)				
		1	2	3	4	5
Saccharose	Absorbance	0.70	0.81	0.74	0.75	0.75
	Cell Mass (mg)	8	11	12	10	6
	Biopolymer (mg)	8	12	12	10	6
Glucose	Absorbance	0.66	0.88	0.86	0.90	0.86
	Cell Mass (mg)	10	12	10	11	9
	Biopolymer (mg)	1	2	2	7	6

Culture volume: 250 ml, Medium composition: Sugar 2%, Yeast extract 0.1%, NaCl 0.1%, Peptone 0.1%

Table 4. Effect of saccharose concentration on production of biopolymer

Measurement	Concentration (%)					
	2	4	6	8	10	12
Absorbance	0.81	0.84	0.89	0.78	0.76	0.76
Cell mass (mg)	11	16	17	13	14	15
Biopolymer (mg)	12	27	29	54*	76*	133*

Culture volume: 250 ml, Medium composition: NaCl 0.1%, Yeast extract 0.1%, Peptone 0.1%, Cultivation time: 48 hour
* Undesirable substances were precipitated with biopolymer.

(권 등 1992; 이 등 1996; 최 등 1997) 대개 3일인 점과 비교해볼 때, 본 균주의 polymer 생산을 위한 배양기간은 짧았다.

3) Saccharose 농도의 영향

당을 보강할 때 어떤 농도가 가장 좋은지를 알아보기 위해 2~12%의 범위에서 조사한 결과를 Table 4에 제시하였다. 당농도가 4~6%일 때 점물질 생성이 가장 좋았으며, 8% 이상의 농도에서는 점질물이 아닌 침전물이 다량 생성되어 좋지 않았다. 일반적으로 점질물 생산을 위한 배지 조성에서는 C/N ratio (sucrose weight/peptone weight)가 가장 중요한 것으로 알려져 있으며, Yoo와 Chung (1989)은 *Pseudomonas delafieldii*에 의한 bioplymer 생산에서 C/N ratio가 30~200의 범위에서 좋았다고 하였다. 본 실험의 결과 C/N ratio가 40~60에서 좋은 것으로 나타나 유사한 결과를 보여주었다.

4) N-source의 영향

Peptone 이외의 다른 무기 질소원의 영향을 검토한 결과는 Table 5와 같다. 점질물 생산에 있어서 무기질소원은 peptone에 비해 좋지 않았다. 이러한 결과는 Yoo와 Chung (1989)의 *Pseudomonas delafieldii*에 의한 biopolymer 생산 조건에서와 같은 결과이며, *Bacillus* sp.에 의한 Cycloinulooligosaccharide fructanotransferase

Table 5. Effect of nitrogen sources on production of biopolymer

Measurement	NH_4NO_3	NH_4Cl	$(NH_4)_2SO_4$	Urea	Peptone
Absorbance	0.79	0.73	0.76	0.72	0.89
Cell mass (mg)	15	14	15	12	17
Biopolymer (mg)	18	16	17	16	29

Culture volume: 250 ml, Medium composition: NaCl 0.1%, Yeast extract 0.1%, Sucrose 6%, N-source concentration 0.1 %

Table 6. Effect of NaCl concentration on production of biopolymer

Measurement	Concentration (%)					
	0	0.1	0.5	3	6	10
Absorbance	0.78	0.89	0.89	0.91	0.79	0.78
Cell mass (mg)	13	17	18	19	19	13
Biopolymer (mg)	14	29	29	30	8	5

Medium composition: sucrose 6%, yeast extract 0.1%, peptone 0.1%

의 생산(Kim *et al.* 1996)에서도 peptone은 가장 적절한 질소원이었다.

5) NaCl 농도의 영향

본 균주는 염도가 높은 식품에서 분리되었으므로 배지 중의 염도의 영향을 조사하였다.

그 결과 Table 6에서와 같이 0.1~3%의 범위에서 비슷하였지만 조사된 농도 중 3%에서 가장 좋았다. 그러나 그 이상의 농도에서는 첨가하지 않은 경우에 비해 생육은 저해되지 않았지만 점물질 생산은 낮았다.

6) pH의 영향

본 균주를 분리한 고추장은 pH가 4.0으로 산성이었으므로 산에 내성이 있는 균주임을 알수 있다. 따라서 산성과 중성영역에서 균주의 생육과 점질물 생산에 적절한 pH를 조사하였는데, 그 결과는 Table 7과 같다. 생육과 점물질 생성 모두 pH 6에서 가장 좋았다. 본 점물질 생성은 sucrose첨가시에 가장 크기 때문에 levansucrase 등의 효소가 관여하는 것으로 가정해볼 수 있는데, 이러한 가정은 levanase, fructosyltransferase의 최적 pH가 5.5 (Martin *et al.* 1989; Yun & Song 1996), levansucrase가 6.0 (Gay *et al.* 1983)인 점에 의해 지지된다.

3. 점물질의 용도

1) 응집활성

점물질은 환경산업에서 부유성 물질 및 세포찌꺼기를 응집 침전시키는데 이용되는 경우가 있으므로, 문 등 (1996)의 절차에 따라 Kaolin clay의 응집활성을 조사하

Table 7. Effect of pH on production of biopolymer

Measurement	pH4	pH5	pH6	pH7
Absorbance	0.11	0.80	1.02	0.88
Cell Mass (mg)	10	18	20	16
Biopolymer (mg)	2	26	34	28

Medium composition: sucrose 6%, yeast extract 0.1%, peptone 0.1% NaCl 3%

Table 8. Effect of biopolymer concentration on the precipitation of Kaolin clay

Concentration of Polymer(%)	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
Absorbance at 560 nm	0.708	0.428	0.341	0.423	0.446

To 96 ml of Kaolin clay (5 g/L) suspension in a beaker, 2 ml of 7.78% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ solution was added. After 1 min of violent agitation, 2 ml of polymer solution was added. After 30 second of violent agitation and 30 second of gentle agitation, the solution was standed still for 30 minute. The absorbance of the upper part of the solution was measured at 560 nm.

Table 9. Effect of biopolymer concentration on the ice melting

Concentration of Polymer	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
Time needed to Melting (min)	25.5	30.4	29.2	26.3	25.8

Time for melting of ice slant to flat water was measured. Ice slant was made from 5 ml of biopolymer solution at −20°C refrigerator.

였다. 그 결과 Table 8에서와 같이 응집활성을 보였으며 활성은 농도 의존적이었고 0.5%에서 가장 우수하였다.

2) 필름형성과 해빙속도에 미치는 영향

다당류는 식품공업 등에 있어서 수분 및 형태 유지에 이용되므로, 본 biopolymer의 이러한 성질을 조사하기 위하여 최 등(1997)의 절차에 따라 film 형성능과 해빙 지연력을 살펴보았다. 점질물 1% 용액을 유리판에 펼치고 실온에서 24시간 건조 후, desiccator에서 24시간 건조시킨 결과 투명하고 광택있는 필름이 형성되었다.

또한 점물질이 얼음의 해빙속도에 미치는 영향을 조사하였을 때 Table 9의 결과를 얻었다. 본 biopolymer는 얼음의 해빙을 지연시켰지만 그 효과는 매우 작았고, 최 등(1997)의 biopolymer와는 달리 농도 증가에 따라 효과가 증가되지 않았다.

3) 안정제로서의 역할

Pectin과 같은 polymer는 발효음료 제조시 안정제로 사용된다. 본 biopolymer의 안정제로서의 역할을 살펴보기 위해 *Lactobacillus casei*를 증류수에 현탁한 다음 농

Table 10. Effect of biopolymer concentration on the stabilization of cell suspension

Concentration of Polymer	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
Absorbance	0.10	0.33	0.31	0.47	0.64

도별로 biopolymer를 첨가하고 세포의 침전을 시간별로 측정한 결과 Table 10과 같았다. 균 현탁액은 biopolymer가 첨가된 용액에서 더욱 안정하였고, 0.25～1.0%의 시험 범위에서 농도가 높을수록 세포 침전은 더욱 크게 저지되었다.

감사의 말

본 논문은 1998학년도 전주대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

구민선, 김영수, 오훈일, 김종규(1996) 고추장의 향미 생산 우수 균주 선발 및 동정. 한국산업미생물학회지 **24** : 439-444.

권기석, 주현규, 오태광(1992) 다당류를 생산하는 *Bacillus polymixa* KS-1의 분리 및 생산 다당류의 특성, 한국산업미생물학회지 **20** : 34-39.

김동운, 이재찬, 이기영, 류화원, 김재형(1995) 유청으로부터 유용물질 생산, 한국생물공학회지 **10** : 221-229.

문성훈, 권기석, 김희식, 오희목, 윤병대, 신기선, 배경숙, 고영회, 홍순덕(1996) *Pestalotiopsis* sp. KCTC8637P에 의한 세포외 생물고분자의 생산조건과 응집활성, 한국생물공학회지 **11** : 470-475.

신순영, 김영배, 유태종(1985) *Bacillus licheniformis*와 *Saccharomyces rouxii* 첨가에 의한 된장의 풍미향상, 한국식품과학회지 **17** : 8-14.

유진영, 정동효(1989) 고점도 다당류생산 미생물의 분리 및 특성, 한국식품과학회지 **21** : 453-459.

이권행, 정 훈, 이중우, 한만덕, 최경숙, 오두환(1994) *Ganoderma lucidum* IY009로부터 분리된 항암성 다당류의 정제 및 구조분석, 한국산업미생물학회지 **22** : 190-196.

이신영, 강태수(1996) 영지(*Ganoderma lucidum*) 균사체의 액체배양에 의한 세포 외 생물고분자의 생산조건과 특성, 한국산업미생물학회지 **24** : 111-118.

최용석, 옥승호, 유주현, 배동훈(1997) *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok이 생산하는 Biopolymer YU-122의 물리화학적 특성, 한국식품과학회지 **29** : 138-144.

최준호, 이운택, 김정희, 이준식(1989) Methylobacterium organophilum에 의한 메타놀로 부터 생성되는 새로운 생물고분자, 한국산업미생물학회지 **17** : 397-402.

Gay P, DL Coq, M Steinmetz, E Ferrari & JA Hoch (1983)

Cloning structural gene sacB, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: Expression of the gene in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **153** : 1424-1431.

Kim HY, JB Park, YM Kwon & YJ Choi (1996) Production of cycloinulooligosaccharide fructanotransferase from *Bacillus* sp. CFC1, *J. Microbiol. Biotech.* 6 : 397-401.

Martin I, M Debarbouille, A Klier & G Rapoport (1989) Induction and metabolite regulation of levanase synthesis in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* **171** : 1885-1892.

Nakayama K (1981) Source of industrial microorganisms, Biotechnology Vol. 1. Microbial Fundamental, ed by HJ Rehm and G Reed, Verlag chemie Weinheim, pp. 363-364.

Yun JW & SK Song (1996) Continuous production of fructooligosaccharides using fructosyltransferase immobilized on ion exchange resin, *Biotech. Bioprocess Eng.* **1** : 18-21.

Yoo JY & DH Chung (1989) Cultural condition for biopolymer production by *Pseudomonas delafieldii*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17** : 468-474.

Slepecky RA & HE Hemphill (1992) The genus *Bacillus*-Nonmedical. The ProKaryotes VolII 2nd ed., A Balows, HG Truper, M Dworkin, W Harder and KH Schleifer, Springer-Verlag, New York, p. 1668.

Sutherland IW (1983) Extracellular polysaccharide, Biotechnology, Vol. 3, ed. by H. Dellweg, Verlag Chemie GmbH., Weinheim, pp. 531-574.

Sutherland IW (1996) Extracellular polysaccharide, Biotechnology, Volume 6, Products of Primary Metabolism, ed. by M. Roehr, VCH Verlagsgesellschaft mbH., Weinheim, pp. 613-657.

Production Condition and Utilities of Extracellular Biopolymer from *Bacillus licheniformis*

Hyo-Sang Jin and Wan-Ok Lee[1]

(School of Life Science, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea,
[1]Dept. of Environmental Management, Graduate School of Regional Policy, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea)

Abstract - A bacterium that produce biopolymer was isolated from Gochujang, one of Korean traditional fermented foods, and identified as *Bacillus licheniformis*. The production of biopolymer was highest and 34 mg/250 ml, when the baterium was cultivated in condition of sucrose 6.0%, Yeast extract 0.1%, peptone 0.1%, NaCl 3.0%, and pH 6.0. The 1% solution of this biopolymer was able to form a translucent and glossy film. And the solution of biopolymer was found to precipitate Kaolin solution and also stabilize the suspension of lactic acid bacteria within the test range of 0.25~1.00%. [*Bacillus licheniformis*, Biopolymer].