

Zoogloea ramigera 115SLR의 다당류 생산에 영향을 미치는 인자

소한섭 · 김찬식¹ · 이삼빈*

계명대학교 식품가공학과, ¹제주대학교 원예생명과학부

Factors Affecting on the Production of Exopolysaccharides from *Zoogloea ramigera* 115SLR. Han-Sup Soh, Chan-Shick Kim¹, and Sam-Pin Lee*. Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea, ¹Faculty of Horticultural Life Science, Cheju National University, Cheju, 690-756, Korea – The production of exopolysaccharide from *Zoogloea ramigera* 115SLR in batch culture was affected by carbon sources, rifampicin concentration, inoculum size and cell density of starter culture. The increase of organic nitrogen concentration and cell density in defined medium by adding starter culture resulted in higher production of exopolysaccharide (EPS) within 2 days. Glucose and lactose as carbon sources showed EPS production of 10.7 g/L and 10.5 g/L, respectively. Higher EPS production was obtained with 2.5% (w/v) glucose. White sugar, brown sugar and galactose produced less than 10 g/L of EPS. The optical density of starter culture affected on EPS yield, producing over 10 g/L of EPS in the range of 1.0-1.7. In the presence of rifampicin, *Z. ramigera* 115SLR produced EPS of 12.9 g/L. Molecular weight of EPS produced with/without rifampicin was determined with 1.367×10^6 and 1.711×10^6 g/mol using HPSEC-MALLS-RI, respectively.

Key words: *Zoogloea ramigera*, exopolysaccharide production, batch culture

서 론

자연계에서 존재하는 생고분자물질(biopolymer)은 미생물, 식물, 동물 등에서 생산되어지는 천연 고분자물질로서 대부분이 생분해성 다당류이다. 이들의 고유한 구조적 특징에 기인한 물성과 다양한 기능성 때문에 식품, 의약품 및 생물산업 등에서 그 용도가 증가하고 있다[15]. 다당류(polysaccharide)들의 구조가 복잡한 것은 다양한 구성성분, 결합방식 및 결사슬 전하기들을 가지고 있기 때문이며, 이런 성질은 다당류 고분자의 용해성, 점도, 중금속흡착능 등 다당류들의 기능성에 영향을 미친다[26]. 특히, 미생물에서 생산되어지는 다당류들(exopolysaccharide)은 수용성 gum들로서 복잡한 구조와 특이한 이화학적 특성을 가지고있다[15].

현재 젖산균 *Leuconostoc mesenteroides*로부터 생합성되는 다당류인 dextran과 *Xanthomonas campestris*로부터 생합성되는 xanthan gum과 같은 생고분자들은 식품, 의학 및 생물분야 등 다양한 분야에서 상업적 제품의 형태로 이용되고 있다[27].

일반적으로 호기적 폐수처리물에서 분리된 *Zoogloea ramigera* 115는 Gram 음성균이며, 생합성되는 capsule type 다당류는 구조적 특징에 기인한 중금속 흡착능력이 보고되었으며[15], 이를 이용한 폐수 처리시 중금속흡착에 의해서

floc을 형성하며[7], pH, 열, 기계적 전단력에 대하여 매우 안정하여 원심분리, 여과, 침전을 거쳐 중금속을 용이하게 제거하는 데 사용될 수 있다[3]. Stauffer등[26]은 exocellular glycan인 zooglan의 점도 및 물성측정을 보고한 바 있다. Eason 등[7]은 *Z. ramigera* 115 균주로부터 NTG 처리에 의해서 수용성의 slime exopolysaccharide를 생합성 할 수 있으며, rifampicin항생제에 저항성을 갖는 돌연변이 균주인 *Z. ramigera* 115SLR을 분리하였다. *Z. ramigera* 115SLR균이 제한배지에서 생합성하는 slime형태의 생고분자물질(zooglan)은 glucose와 galactose로 구성된 주된 사슬에 pyruvic acid, acetic acid와 succinic acid를 치환기로 가지는 acidic polysaccharide이다[30].

일반적으로 미생물 다당류 생합성은 제한배지에 첨가된 탄소원에 대한 질소, 인산, 또는 유황성분 등의 비율 및 환경적 인자들에 의해서 영향을 받는다[2,4,6,28]. 미생물 다당류에 치환된 잔기들의 함량은 배지조성에 의해서 변화될 수 있으며, 이는 다당류의 물성에 크게 영향을 미친다[8]. Zooglan과 xanthan다당류 구성성분 중에서 pyruvic acid의 존재는 다당류에 음전하를 갖게 하며, 다당류의 용해성과 점도 등의 물성에 크게 영향을 준다.

최근 다당류의 기능성 향상을 위해서 다당류 생합성에 관여하는 유전자를 조작하는 방법으로 biopolymer engineering이 시도되고 있으며 [18, 11], 앞으로 *Z. ramigera* 균은 유용한 기능성 미생물다당류의 생산균주로 이용될 수 있다고 본다. 이 zooglan은 *X. campestris*로부터 생산되는 xanthan gum과 유사한 물성을 가지며[10, 26], 구조적으로 β -linkage

*Corresponding author
Tel. 82-53-580-5554, Fax. 82-53-580-5554
E-mail: splee@kmu.ac.kr

를 포함하여서 기능성 및 생리활성 물질의 소재로 가능성이 있음에도 불구하고 현재 다당류의 생산기작 및 산업적인 활용방안이 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 zooglan 다당류의 산업적 대량생산 및 이용을 위한 기초연구로서 *Z. ramigera* 115SLR을 이용한 batch culture로부터 zooglan 다당류의 생합성에 영향을 미치는 인자들을 조사하고, 다당류 생산의 최적조건에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주

Zoogloea ramigera 115SLR은 capsule형성 균주인 *Zoogloea ramigera* 115(ATCC25935)로부터 slime형성과 rifampicin항생제에 내성을 갖는 돌연변이 균주이다. 균주의 보존을 위해서 4°C에 보관된 *Z. ramigera* 115SLR균은 5일간격으로 trypticase soybroth(TSB) agar plate를 이용하여 30°C에서 1일간 계대 배양하여 4°C에 보관하였다.

TSB배지(Difco, USA)는 pancreatic digest of casein 17 g, papaic digest of soybean meal 3 g, sodium chloride 5 g, dipotassium phosphate 2.5 g, dextrose 2.5 g의 조성을 지닌다. 주기적으로 TSB배지(rifampicin 50 µg/ml)에서 배양된 배양액(1 ml)에 동량의 40% glycerol(121°C, 15 min)을 혼합한 후 -70°C liquid nitrogen에서 급속 동결하여 -70°C 초저온 냉동고에 보관하면서 사용하였다

배지 및 배양방법

다당류생산을 위한 균주의 제한배지(defined medium)로서 1L에 2 g K₂HPO₄, 1 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.01 g yeast extract, 25 g glucose(pH 6.8)을 포함하도록 제조하였다. 다당류생산에 미치는 인자들로서 탄소원의 종류 및 농도, 항생물질 rifampicin의 농도, 종균 접종량, 종균 배양액의 균체농도 등을 고려하였다. 다당류 생산은 진탕배양기(SI 900R, Jeio Tech, Korea)를 이용하여 30°C에서 250 rpm으로 진탕배양하였다.

종균 배양액

균 접종을 위한 종균 배양액은 TSB agar plate에서 1일간 배양된 단일 colony를 취하여 rifampicin의 농도가 50 µg/ml가 되도록 첨가된 TSB배지에 접종한 후 진탕배양기에서 30°C, 250 rpm으로 22시간 배양후 다당류생합성을 위한 제한배지 100 ml에 1-10%(v/v) 수준으로 접종하였다.

탄소원 종류 및 농도

탄소원으로는 glucose, lactose, galactose, 백설탕 및 흑설탕을 각각 이용하여 다당류 생산에 미치는 효과를 조사하였다. 탄소원은 일정농도로 조제한 후 121°C에서 15분간 살균하여 냉각한 후 제한배지에 첨가하였다. 제한배지는 500 ml 삼각 플라스크에 100 ml씩을 넣어서 다당류 배양에 이용하였으며, 탄소원의 농도는 1, 2.5, 4% 수준으로 첨가하면서 다당류 생산 효과를 측정하였다.

탄소원의 농도는 1, 2.5, 4% 수준으로 첨가하면서 다당류 생산 효과를 측정하였다.

Rifampicin 항생제

100% 메탄올에 용해시킨 rifampicin(50 µg/ml)은 종균 배양액인 TSB배양액에는 최종농도가 50 µg/ml이 되도록 첨가하였으며, 일반적인 다당류 생합성을 위한 제한배지에는 최종 농도가 25 µg/ml이 되도록 혼합하였다. 2.5% glucose를 포함하는 제한배지에 rifampicin농도를 0-100 µg/ml의 수준으로 첨가하여 다당류 생산량을 비교하였다.

다당류 회수 및 생산량 측정

생산된 다당류에서 cell을 제거하기 위하여 배양액을 2배의 증류수로 희석하여 10,000 rpm으로 20분간 원심분리 한 후 상등액을 취하여 2배 부피의 isopropanol을 첨가하여 다당류를 상온에서 침전시켰다. 침전된 다당류는 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 회수하였으며, 동일부피의 95% ethanol로 세척한 후 Speed vacuum(VS-802, VISION, Korea)에서 5분간 진공건조 시켰다. Phenol/sulfuric acid assay 방법[21]을 이용하여 정제된 다당류의 농도를 측정하였으며 모든 시료는 3회 측정하여 평균값을 사용하였다. 정제된 다당류를 사용하여 standard curve를 설정하였다.

분자량 측정

정제된 다당류는 2차 증류수에 0.4%(w/v)로 용해시킨 후 microfilter membrane(Millipore, 0.45 µm)을 통과시킨 여액을 high-performance size-exclusion chromatography(HPSEC) 장치를 이용하여 분자량을 측정하였다. Injection valve(1000ul sample loop, Model 7021, Rheodyne), P2000 Pump (Spectra System, Thermo separation products, San Jose, CA, USA), He-Ne laser source(λ=632.8 nm)를 이용하는 Multi-angle laser-light-scattering detector(Dawn DSP-F, Wyatt Tech. Corp., Santa Barbara, CA), RI detector(RI-71, Shodex, Showa Denko, Tokyo, Japan)가 장치된 HPSEC-MALLS-RI를 이용하여 실온에서 측정하였다. TSK Gel 5000PW 컬럼을 사용하였으며, 이동상은 0.02% NaNO₃를 포함하는 증류수를 사용하였으며, flow rate는 0.4 ml/min이었다.

결과 및 고찰

배양시간에 따른 다당류 생산

다당류 생산속도 및 생산량은 미생물 생육환경 인자들에 의해서 좌우될 수 있다. 일반적으로 *Zoogloea* 종균 배양액 1%를 접종하여 250rpm에서 배양하는 경우에 3g/L정도의 다당류를 생산하는데 4일 이상 소요되었다[19]. 탄소원으로

Table 1. Comparison of the productivity and yield of EPS according to fermentation time.

Fermentation time (h)	Productivity (g/Lh)	EPS yield (g/L)
12	0.08	1.03
36	0.21	7.63
48	0.21	10.28

2.5% glucose와 종균 배양액의 농도가 7%(v/v)로 접종된 제한배지에서 배양시간에 따른 다당류 생산은 Table 1에서 나타나고 있다. 배양시간 36시간부터 다당류 생산은 급격하게 증가되기 시작하면서 점도가 급격하게 증가되었으며, 48시간 까지 다당류 생산속도는 0.21g/(L·h) 및 생산량은 10.28 g/L로 최적조건을 보였다.

따라서 종균 배양액이 7% 수준으로 첨가된 제한배지에서 다당류 생산을 위해서는 최소 36시간이 필요하며, 48시간 이상 배양시에는 배양액의 높은 점도와 기포의 형성으로 다당류 회수 및 측정에 어려움이 있었다. 따라서 제한배지에서 다당류의 생산을 위해서는 최대 48시간까지의 배양시간이 다당류 생산을 위한 최적 배양시간이라고 사료되었다

종균 배양액 및 cell pellet접종에 따른 다당류 생산

Z. ramigera 115SLR를 이용하여 제한배지에서 다당류를 생산하는 경우에 종균 배양액의 접종량이 다당류의 생산량 및 생산속도와 관련이 있는 것으로 사료되어 다당류생산에 미치는 영향을 측정하였다. 2.5% glucose를 탄소원으로 하는 제한배지에서 종균 배양액 또는 cell pellet 접종에 따른 효과를 알아보기 위해 rifampicin이 첨가된 TSB 배지에서 배양된 종균배양액을 1, 5, 7, 10 ml 그리고 7 ml 종균 배양액에서 회수한 cell pellet을 rifampicin을 첨가하지 않은 100 ml 제한배지에 접종하여 30°C, 250rpm에서 48시간 동안 배양하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 1 ml 접종시보다 5 ml 접종시에 다당류 생산이 급격하게 증가하면서 약 3.5배에 해당하는 8.42 g/L의 다당류를 생산을 보였다. 배양액 7 ml 접종 시에는 10.28 g/L의 다당류생산을 보였으며 10 ml 접종에서는 약간의 증가하는 경향을 보이면서 12.5 g/L를 나타내었다. 동일 배양조건에서 cell pellet만을 접종하는 경우 0.48 g/L로 다당류 생산이 미비하였다.

당을 포함하는 제한배지에서 다당류의 생산은 탄소원과 질소원의 비율에 의해서 크게 좌우되며, 유기 질소원에 의해 미생물 생육 촉진 및 다당류 생산이 증가된다고 보고된 바 있다[27]. Table 2에서 나타난 바와 같이 다당류 생산량이 가장 높은 경우는 종균 배양액인 TSB첨가에 의해 유기 질소원 함량이 높아진 상태이다. 이는 유기 질소원의 증가에 의해 다당류 생산이 증가된다는 보고와도 일치하는 결과이다. 한 백금이의 균주를 4.5% glucose를 탄소원으로 하는 제한배지에 접종하여 28°C에서 175 rpm으로 flask에서 7일간 배양시에 2.9 g/L의 다당류 생산이 보고된 바[13] 있으

Table 2. Comparison of EPS productivity according to C/N ratio.

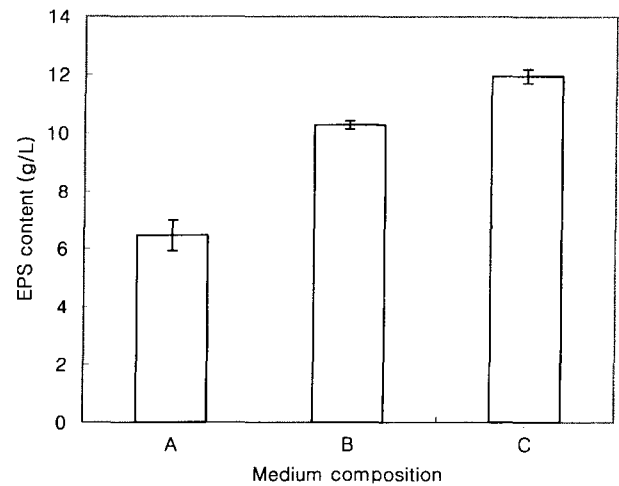
Starter (ml)	C/N ratio	EPS production (g/L)*
1	11	2.37 ± 0.53
5	8.3	8.42 ± 0.86
7	7.3	10.28 ± 0.14
10	6.25	12.58 ± 0.85
Cell pellet	12.5	0.4 ± 0.03

* Mean ± standard deviation

며, Lee 등[16]이 2.5% glucose 와 1%의 종균을 접종하여 flask 배양에서 4일후에 3.8 g/L의 다당류를 생산한 결과[16]들과 비교해 볼 때, 제한 배지에 TSB에서 배양된 종균 배양액을 7%(v/v) 수준으로 첨가하는 것은 유기 질소원의 비율 및 초기 세균의 농도를 높여주어 다당류생산에 매우 효과적이었으며, 배양시간 2일 이내에 10 g/L이상의 다당류의 생산이 가능하였다. 특히, 10 ml 종균 배양액의 첨가는 C/N 비율이 6.25로 가장 낮은 조건이며, 첨가된 탄소원(2.5%)의 50%가 다당류로 전환되었음을 알 수 있었다.

Glucose 농도 효과

본 배양액의 탄소원인 glucose 농도를 1%, 2.5%, 4%로 조절하여 종균 배양액을 7 ml를 접종하여 30°C에서 48시간 동안 발효시킨 결과를 Fig. 1에 나타내고 있다. Glucose농도가 증가되면서, 4%에서 11.95 g/L로 다당류 생산이 가장 높았으며, 2.5%는 10.28 g/L, 1%는 6.45 g/L를 나타내었다. 4% glucose존재 하에서 12 g/L로 가장 높은 다당류 생산을 보였지만, 탄소원의 다당류로의 전환비율은 2.5% glucose 경우에 41%에서 4% glucose를 사용하는 경우에는 30%로 낮아졌다. 일정한 농도의 탄소원에서 유기 질소원에 의해 다당류 생산이 높아진 경우인 C/N 비율 7.3을 나타내는 2.5%

**Fig. 1. Effect of glucose concentration on the exopolysaccharide production in defined medium by *Z. ramigera* 115SLR.**

A : 1% glucose B : 2.5% glucose C : 4% glucose

Optical density of the cell : 1.71

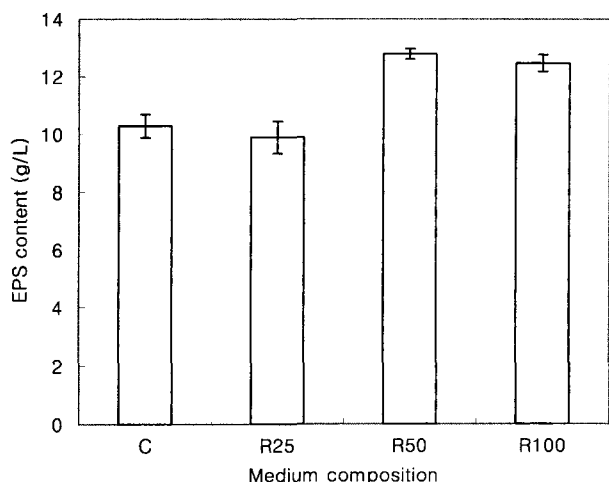


Fig. 2. Effect of rifampicin on the exopolysaccharide production in defined medium by *Z. ramigera* 115 SLR.

Symbol C means medium without rifampicin and R indicates medium with rifampicin.

Optical density of the cell : 1.86

의 glucose 함량이 다당류 생산에 가장 효과적이었음을 알 수 있었다(Table 2).

Rifampicin 첨가효과

다당류 생산균주로서 *Z. ramigera* 115SLR은 수용성 slime 형태의 다당류를 생산하면서 rifampicin에 저항성을 갖는 돌연변이 균주로서 항생제 첨가에 따른 다당류 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 2.5% glucose 농도를 포함한 제한배지 100 ml에 rifampicin을 첨가하지 않은 경우와 25, 50, 100 µg/ml을 첨가한 경우에 평균 배양액을 각각 7 ml를 접종하여 30°C에서 48시간 동안 배양시킨 결과 rifampicin을 50 µg/ml 첨가한 경우에 12 g/L로 가장 높은 다당류 생산을 보였으며, 100 µg/ml의 경우에는 다당류 생산량이 약간 감소하였다.

반면에 rifampicin 항생제를 처리하지 않은 경우에는 약 10 g/L의 다당류를 생산하였다(Fig. 2). 이는 *X. campestris*의 다당류 생산시 항생제 처리가 다당류 생산을 약 14% 증가시켰다는 결과와 일치하는 것으로, 항생제에 내성이 있는 균주로부터 다당류를 생산하는 경우에 항생제 첨가가 효과적인 것으로 사료된다[25].

그러나 EPS 생산에서 일정량의 rifampicin 항생제 첨가가 다당류 생산에 효과적일지라도 생산된 다당류의 정제시에 항생제 제거 공정이 필요하게 되며, 항생제의 비싼 가격을 고려할 때 산업적으로 다당류 생산시에 제한배지에 rifampicin을 첨가하지 않는 것이 다당류 생산량은 다소 적을지라도 경제적인 면에서 유리하다고 사료된다.

탄소원의 종류

본 배양액의 탄소원으로서 2.5%(w/v) 수준의 glucose, galactose, lactose, white sugar, brown sugar를 각각 첨가하

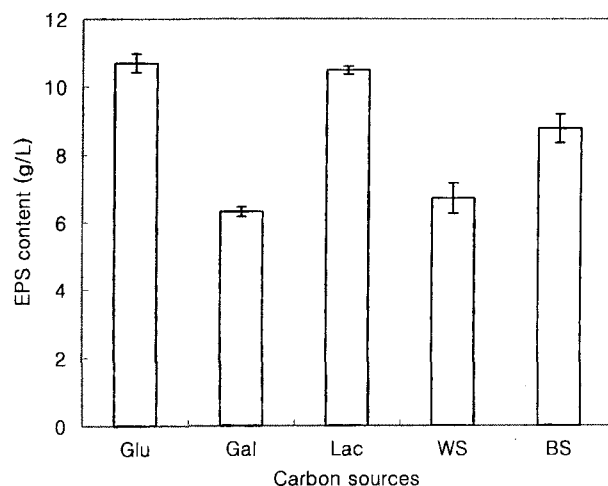


Fig. 3. Effects of different carbon sources on EPS production

Glu : glucose, Gal : galactose, Lac : lactose,

WS : white sugar, BS : brown sugar

Optical density of the cell : 1.0

여 30°C에서 48시간 동안 발효시킨 결과는 Fig. 3과 같이 glucose 10.7 g/L, lactose 10.5 g/L, brown sugar 8.7 g/L, white sugar 6.7 g/L, galactose 6.3 g/L의 다당류를 생산하였다. 이 결과는 *Z. ramigera* 115를 이용하여 2.5% 농도의 탄소원 함량을 기준으로 종균을 5%접종하여, 26°C, 200 rpm으로 76시간 배양시 glucose 15.8 g/L, lactose 17.8 g/L, sucrose 11.9 g/L, galactose 11.5 g/L의 다당류를 생산한 결과[13]와 비교해 볼 때 다소 적은 다당류를 생산하였지만, 생산성은 glucose가 0.32 g/L · hr, lactose가 0.24 g/L · hr로 glucose가 다당류 생산에 효과적임을 보고하고 있으며, 일반적으로 glucose를 이용시에 다당류 생산에 효과적이었다는 결과[1, 14]와 일치한다.

본 실험결과에서도 glucose와 lactose가 각각 0.22 g/L · hr로 가장 높은 생산율을 나타내었으며, 이는 유청을 이용하여 zooglan 다당류를 생산할 수 있다는 보고[13]를 고려할 때, 치즈제조시의 부산물인 유청의 활용에도 응용 가능하다고 사료된다.

종균 배양액의 균체농도 효과

제한배지에 접종되는 종균 배양액의 생육정도에 따른 균체농도를 UV spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도 값을 측정하여 0.4, 1.0, 1.5, 1.7, 1.86인 조건의 배양액을 다당류 생산을 위한 종균으로 제한배지에 접종하였다. 접종된 종균 배양액의 흡광도가 높을수록 다당류 생산은 증가하였으며, 흡광도가 1.0~1.71 범위에서 다당류생산은 10 g/L 수준으로서 가장 높았으며, 흡광도 1.8 이상에서는 8.5 g/L로서 다당류 생산이 감소하였다(Fig. 4). 반면에 균 생육이 초기 대수기에 해당하는 흡광도가 0.4인 배양액을 종균으로 사용하는 경우 비교적 낮은 다당류 생산(6.8 g/L)을

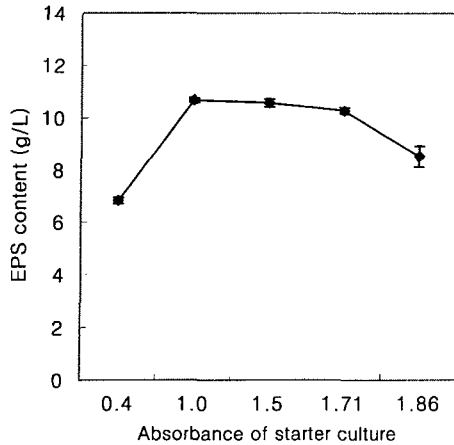


Fig. 4. EPS production according to the cell density of starter culture.

Number indicate the means value of optical density at 600nm

나타내었다.

따라서 *Z. ramigera* 115SLR로부터 제한배지를 이용하여 48시간 내에 적어도 10 g/L의 다당류를 생산하기 위해서는 배양액 종균의 초기 cell density가 중요한 인자임을 알 수 있었다. 종균 배양액의 흡광도 1.0~1.71 범위는 비교적 높은 값으로, 균주의 생육과정에서 대수기를 지나 정지기(stationary phase)에 해당되는 시기로 사료된다. 종균 배양액을 7% 수준으로 제한배지에 접종함으로써 균이 생육이 가속화되어 동시에 균의 생육이 정지기 상태에 빠른시간에 도달하면서 48시간에 10 g/L이상의 다당류를 생산하는 것으로 판단된다.

Norberg와 Enfort[22]는 *Zoogloea* 균주는 제한배지에서 균의 생육이 정지기에 도달하면서 다당류 생산이 증가되면서 배양액의 점도가 급격하게 증가된다고 보고하였다. 반면에, 흡광도 1.8이상에서는 균 생육의 정지기를 지나면서 균의 활성저하로 다당류의 생합성 능력이 감소되는 것으로 사료된다[21].

다당류의 분자량 측정

다당류 생산을 위한 최적 배양조건에서, rifampicin을 가한 경우와 가하지 않은 경우에 생산된 다당류를 회수하여 0.45 μm filter로 여과한 후 분자량을 측정한 결과는 Fig. 5에서 보여주고 있다. Rifampicin이 없는 배양액으로부터 생산된 다당류의 분자량은 1.711×10^6 (g/mol)을 보였으며, rifampicin이 첨가된 배양액의 다당류의 분자량은 1.367×10^6 (g/mol)로 약간의 차이를 보였다. 이 분자량 값은 Brown과 Lister[3]가 측정한 분자량 $2.5-9 \times 10^6$ (g/mol) 보다 적은 값이며, Ikeda 등[12]이 *Z. ramigera* 115 wild-type 균주로부터 생산된 capsule다당류를 GPC로 측정한 분자량 1×10^6 (g/mol)보다 조금 큰 값을 보였다.

본 실험에서 수용성 slime형태의 다당류의 분자량은 HPSEC-MALLS-RI를 이용한 절대 분자량을 의미하는 것으로 앞에서 보고된 값과는 분자량에서 차이를 예측할 수 있

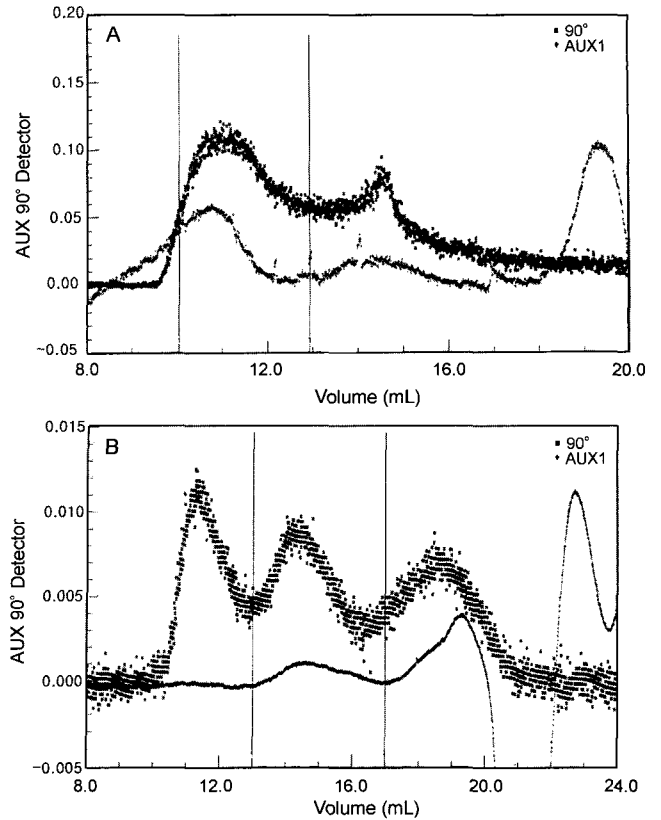


Fig. 5. Molar mass distribution of zooglan produced from defined medium with/without rifampicin for 48 hours.

A : with rifampicin, B : without rifampicin

다. Casas등[5]은 xanthan gum의 분자량이 배양온도에 의해서 차이가 있음을 보고한 바 있다. 따라서 미생물 다당류의 분자량의 분포는 발효시간, 배지조성등의 환경인자를 포함하는 발효조건에 의해서 기인될 수 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 한국과학재단 지정 계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

요 약

Zoogloea ramigera 115SLR로부터 zooglan 다당류의 생산을 위한 최적조건에 관한 연구를 수행하였다. 탄소원으로 2.5%의 glucose와 lactose를 이용하였을 때 각각 10.7, 10.5 g/L의 다당류를 생산하였으며, galactose, white sugar, brown sugar의 경우는 각각 6.4, 6.7, 8.7 g/L의 다당류 생산을 보였다. 2.5% glucose가 첨가된 제한배지에서 종균 배양액(TSB 배지)을 7 ml 이상 접종함으로써 종균 1 ml를 접종하여 생산된 다당류(2.37 g/L) 보다 약 4배의 높은 다당류 생

산(10.28 g/L)을 보였다. 종균 배양액을 5 ml 이상 접종시에 배양 36시간 이후부터 다당류를 생산하였으며 48시간 배양 시에 10 g/L 이상의 다당류 생산이 가능하였다. 탄소원으로서는 또한, 종균 배양액의 흡광도가 1.0~1.7일 경우에 10 g/L 이상의 다당류를 생산하였으며, 이 범위를 벗어나는 경우에는 다당류 생산이 저해되었다. 배양액에 rifampicin 첨가는 12 g/L 이상의 다당류 생산을 보였으며, 다당류 분자량은 1.367×10^6 (g/mol)로서 rifampicin을 가하지 경우 1.711×10^6 (g/mol)와 약간의 차이를 보였다.

REFERENCES

- Ahn, D. H., H. S. Kwon, and U. C. Chung. 1992. The production of biopolymer by *Zoogloea ramigera*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **7**: 166-171.
- Beyenal H. and A. Tanyolac. 1997. A combined growth model of *Zoogloea ramigera* including multisubstrate, pH, and agitation effects. *Enzyme Microbiol. Technol.* **21**:74-78.
- Brown, M. J. and J. N. Lester. 1979. Metal removal in activated sludge: the role of bacterial extracellular polymer. *Water Res.* **13**: 814-819.
- Cacik, F., R. G. Dondo, and D. Marqués. 2001. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. *Comput. Chem. Eng.* **25**: 409-418.
- Casas, J. A., V. E. Santos, and F. Garcia-Ochoa. 2000. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme Microb. Technol.* **26**: 282-291.
- Chang, M. W., Y. S. Kang, J. W. Hong, J. D. Kim, and J. Y. Kong. 1995. Production conditions of two polysaccharides from marine bacterium *Zoogloea* sp. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **10**: 518-524.
- Easson, D. D. 1987. A recombinant DNA approach to the design and synthesis of novel polysaccharides. MIT, Ph.D. Thesis.
- Flores-Candia, J. L. and W. D. Deckwer. 1999. Effect of the nitrogen source on pyruvate content and rheological properties of xanthan. *Biotechnol. Prog.* **15**: 161-168.
- Friedman, B. A. and P. R. Dugan. 1968. Identification of *Zoogloea* species and the relationship to zoogloeal matrix and floc formation. *J. Bacteriol.* **169**: 2144-2153.
- García-Ochoa, F., V. E. Santos, J. A. Casas and E. Gómez. 2000. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnol. Adv.* **18**: 549-579.
- Hassler, R. A. and D. H. Doherty. 1990. Genetic engineering of polysaccharide structure: production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Prog.* **6**: 182-187.
- Ikeda, F., H. Suto, T. Sato, T. Fukui, and K. Tamita. 1982. An extracellular polysaccharide produced by *Zoogloea ramigera* 115. *Eur. J. Microbiol.* **2**: 437-445.
- Kim, D. W., J. C. Lee, K. Y. Lee, H. W. Ryu, and J. H. Kim. 1995. A useful material production from whey: effect of carbon sources zooglan production by *Zoogloea ramigera*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **10**: 221-229.
- Kwon, Y. E., S. O. Park, J. W. Ahn, Y. C. Chung, and J. H. Seo. 1999. Optimization of growth conditions for production of zooglan by *Zoogloea ramigera*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**: 255-258.
- Lee, H. K., W. C. Bae, W. Jin, W. J. Jung, S. P. Lee, and B. C. Jung. 1998. Comparison of heavy metal adsorption between *Zoogloea ramigera* and *Zoogloea ramigera* 115 SLR. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 83-88.
- Lee, S. P. and C. S. Kim. 1999. Functional properties of exopolysaccharide produced from *Zoogloea ramigera* 115SLR by genetic modification. *Food Sci. Biotechnol.* **8**: 128-133.
- Lee, S. P., O. S. Kwon, and A. J. Sinskey, 1996. Localization of genes involved in exopolysaccharide biosynthesis in *Zoogloea ramigera* 115SLR. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 321-325.
- Lee, S. P. 1998. Biopolymer engineering: genetic control of microbial exopolysaccharide biosynthesis. *Food Industry Nutr.* **3**: 44-51.
- Lee, S. P. and Y. Min. 2000. Cloning and sequencing of a gene involved in the biosynthesis of exopolysaccharide in *Zoogloea ramigera* 115SLR. *J. Biomed. Lab. Sci.* **6**: 1-9.
- Ló, Y. M., S. T. Yang, and D. B. Min. 1991. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 689-694.
- McNeil, B. and L. M. Harvey. 1993. Viscous fermentation products. *Crit. Rev. Biotechnol.* **13**: 275.
- Norberg A. B. and S. Enforts. 1982. Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1817.
- Papagianni, M., S. K. Psomas, L. Batisilas, S. V. Paras, and D. A. Kyriakidis. 2001. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. *Process Biochem.* **37**: 73-80.
- Paterson-Beedle, M., J. F. Kennedy, F. A. D. Melo, L. L. Lloyd, and V. Medeiros. 2000. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydr. Polym.* **42**: 375-383.
- Rodriguez, H., L. Aguilar, and M. Lao. 1997. Variations in xanthan production by antibiotic-resistant mutants of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 626-629.
- Stauffer, K. R., J. G. Leeder, and S. S. Wang. 1980. Characterization of zooglan-115, an exocellular glycan of *Zoogloea ramigera* 115. *J. Food Sci.* **45**: 946-952.
- Sutherland I. W. 2001. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Intern. Dairy J.* **11**: 663-675.
- Sutherland, I. W. 1979. Microbial exopolysaccharides. *TIBS* **4**: 55-59.
- Sutherland, I. W. 1990. The properties and potential of microbial exopolysaccharides. *Chimicaoggi.* **4**: 9-14.
- Troyano, E., S. P. Lee, C. K. Rha, and A. J. Sinskey. 1996. Presence of acetate and succinate in the exopolysaccharide produced by *Zoogloea ramigera* 115 SLR. *Carbohydr. Polym.* **31**: 35-40.

(Received May 7, 2002/Accepted Aug. 12, 2002)