

## *Bacillus coagulans* DL-10이 생산하는 고분자 중합체의 특성과 생산조건의 최적화

김지모 · 손창우 · 서형필 · 문병주<sup>1</sup> · 도성국<sup>2</sup> · 이진우\*

동아대학교 생명자원과학대학 생물공학전공  
<sup>1</sup>응용생물학전공  
<sup>2</sup>생활과학대학 섬유공학전공

## Characterization of biopolymer produced by *Bacillus coagulans* DL-1 and optimization of its production

Ji-Mo Kim, Chang-Woo Son, Hyung-Phil Seo, Byung-Joo Moon<sup>1</sup>, Sung-Kook Do<sup>2</sup> and Jin-Woo Lee\*

Division of Biotechnology, <sup>1</sup>Division of Applied Biology, College of Natural Resources and Life Science,  
<sup>2</sup>Division of Textile Engineering, College of Human Ecology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

### Abstract

The microorganism isolated from soil was identified as *Bacillus coagulans* by morphological and biochemical analyses and API-50CH/B kit, which was an identification kit for *Bacillus* species, and named as *B. coagulans* DL-1. It produced an extracellular biopolymer. Maximum production of biopolymer was  $5.00 \pm 0.15$  g/ℓ in a 7 ℓ bioreactor with an aeration rate of 1.0 vvm and an agitation speed of 500 rpm when concentrations of glucose and yeast as the optimal carbon and nitrogen sources were 2.0% (w/v) and 0.25% (w/v), which were optimized with a flask scale. Gas chromatographic analysis showed that the biopolymer produced by *B. coagulans* DL-1 consisted of glucose and rhamnose and their molar ratios was about 9 : 1. Its average molecular weight was  $2.80 \times 10^5$  with gel permeation chromatographic (GPC) analysis.

**Key words** – Extracellular polysaccharide, *Bacillus coagulans*, gas chromatography, molecular weight

### 서 론

미생물이 생산하여 체외로 분비하는 고분자 중합체는 포식자의 식균작용과 사멸을 야기하는 급격한 건조 및 온도 등과 같은 외부환경에 대응하기 위한 생존 수단의 역할을 한다. 토양 중에는 이러한 미생물이 생산하는 고분자 중

합체가 함유되어 있어 토양 집합의 안정성과 보수성에 관여한다. 고분자 중합체의 생산은 여러 종류의 그람양성 및 음성 세균, 몇 종류의 조류 그리고, 다수의 균류에 의해 이루어지고 있다[8,19,21].

세포외 다당류(exopolysaccharides)는 여러 종류의 미생물에 의하여 생산되어 세포외 외부로 배출되는 수용성 혹은 불용성인 다당류의 총칭으로 특이한 화학적 구조를 갖는 고분자 물질이다. 이러한 세포외 다당류는 물리적인 특성이 다양하므로 유화제, 안정제, 접합제, 응고제, 응결제,

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 051-200-7593, Fax : 051-200-6993  
E-mail : jwlee@mail.donga.ac.kr

인화제, 필름 형성제, 농후제, 현탁제 등으로 식품, 화장품, 화학공업 및 환경산업에서 그 응용 범위가 매우 광범위하고 현재 이들의 산업적인 이용성의 증가로 인해 덱스트란, 산탄검, 풀루란, 커드란과 미생물생산 섬유소 및 알긴산 등 미생물 배양에 의하여 생산되는 다당류성 생물고분자의 대량생산에 대한 연구가 활발히 진행중 이거나 이미 개발되어 식품 및 의약품에 포함된 화학공업에 널리 사용되고 있다[12,21]. 특히, *Agrobacterium* 속의 균주가 생산하는 커드란을 분리·정제한 후 화학적으로 처리하여 얻은 유도체는 human immunodeficiency virus(HIV)의 생육을 억제하는 성질이 있으며 *Aureobasidium* 속 균주가 생산하는  $\beta$ -1,3/1,6 글루칸은 면역체계의 활성화 및 항암제로서의 효과가 보고되어서 의학 분야에까지 적용범위를 넓혀가고 있다[13,15,16,20].

본 연구에서는 수용성 고분자 중합체를 생산하는 능력을 가진 미생물을 토양에서 분리하고 형태학적 및 생리적 검사와 API-50CH/B kit를 사용하여 동정하였고, 이 미생물의 배양액에서 고분자 중합체를 분리·정제하고, 그 구성성분 및 분자량 등을 분석하여 미생물이 생산하는 고분자 중합체에 대한 기초적인 특성을 확인하였다. 또한, 고분자 중합체 생산의 최적 탄소원 및 질소원 등과 같은 배양조건을 확립하여 산업적인 이용을 위한 대량생산의 기본적인 자료를 확보하였다.

## 재료 및 방법

### 토양미생물의 분리 및 동정

유기물이 풍부한 토양에서 수집한 토양 시료를 멸균된 생리식염수 (0.85% NaCl, w/v)로 희석한 후 nutrient agar 배지를 사용하여 평판 도말법으로 미생물을 분리하였다[124]. Gram 염색 및 광학 현미경을 통하여 균주의 형태적 특성을 관찰하였으며, glucose fermentation test, catalase test, oxydase test, 그리고 casein hydrolysis test 등과 같은 생화학적 검사를 통하여 분리한 미생물의 기초적인 특성을 확인하였다[14,23]. 분리한 균주의 동정은 미생물의 생육 정도에 따른 탄소원의 이용도를 비교하여, *Bacillus* 속 균주를 동정하는 API-50CH/B kit (bioMerieux Co., France)를 사용하였다[11].

### 배지 및 시약

분리한 균주의 생육 및 고분자 중합체를 생산하기 위한

배지의 조성은 5.0 g/ℓ  $K_2HPO_4$ , 1.0 g/ℓ NaCl, 0.2 g/ℓ  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.6 g/ℓ  $(NH_4)_2SO_4$ 와 2.5 g/ℓ yeast extract 이었다. 배지의 탄소원은 2% (w/v)의 포도당을 사용하였으며 121℃에서 별도로 멸균한 후 배지에 첨가하였다[6,22].

배지에 사용한 시약 및 Gram 염색 시약들을 비롯하여 glucose fermentation test, catalase test, oxydase test, 그리고 casein hydrolysis test용 시약 및 가스 크로마토그래피 분석용 시약 등은 Sigma사 (Sigma Chemical Co., USA)에서 구입하여 사용하였다. 균주의 생육을 위한 유기질소원으로써 이용성을 알아보기 위해 사용한 간장박은 간장의 대량 생산과정에서 발생하는 부산물로서 (주)오복식품에서 수급하여 본 실험에 사용하였으며, 간장박의 주요 구성성분은 탄수화물 (약 17%)과 단백질 (약 33%)이었다.

### 고분자 중합체의 생산

고체 배지에서 자란 균주의 콜로니를 한 백금이 취하여 250 ml 플라스크에 멸균시킨 50 ml의 배양액에 접종한 후, 200 rpm의 교반 속도로 30℃에서 24시간 동안 진탕 배양하였다. 탄소원의 농도는 2% (w/v)이었으며, 초기 배양액의 pH는 멸균 전에 6.5~6.8로 조절하였다.

본 배양은 전 배양과 동일한 배지를 사용하였으며, 500 ml 플라스크에 멸균시킨 100 ml의 배양액에 전 배양액을 5% (v/v) 농도로 접종하여 전 배양과 동일한 조건으로 배양을 실시하였다. 배지의 초기 pH는 멸균 전에 6.8로 조절하였고, 실험 목적에 따라 탄소원 및 질소원은 그 조성과 농도의 조건을 달리하여 실험하였다.

고분자 중합체의 대량생산은 7 ℓ 생물배양기를 사용하여 실시하였다. 초기 pH를 6.8로 조절한 5 ℓ의 배지를 7 ℓ 생물배양기에 주입하고 멸균한 후 전 배양액을 5% (v/v) 농도로 접종하였다. 배양온도는 30℃이었으며 통기량과 교반속도는 각각 1.0 vvm과 500 rpm이었다. 5일간 회분식 배양하면서 일정한 시간마다 무균적으로 배양액을 취하여 배지의 pH, 균체의 건조중량 및 생물고분자의 생산량을 측정하였다.

일정시간 배양된 균주의 배양액을 8,000×g로 20분 동안 원심 분리하여 균체를 제거한 상등액에 2배의 isopropyl alcohol을 첨가하고 4℃의 온도에서 12시간 동안 방치하였다. 이후 동일한 조건으로 원심분리를 실시하여 상등액을 제거하고 침전된 물질에 일정한 부피의 isopropyl alcohol

을 재 첨가 후 voltex mixer를 사용하여 섞어주었다. 본 과정을 2회 반복 실시하여 고분자 중합체를 세척하고, 다시 증류수에 녹인 다음 dialysis membrane (Spectrum Co., USA)을 이용하여 저분자물질과 염 성분을 제거한 후, -55℃에서 0.06 mTorr의 진공압력으로 24시간동안 동결건조를 실시하였다[10].

#### 고분자 중합체의 조성당 측정

토양에서 분리한 미생물이 생산한 고분자 중합체의 구성물질을 가스 크로마토그래피를 사용하여 확인하였다. 표준 시료를 포함한 시료의 전처리 과정은 0.5 mg의 시료에 methanol과 acetyl chloride를 20 : 1 (v/v)의 비율로 혼합한 용매를 300  $\mu$ l을 가하고 교반 하면서 70℃에서 24시간 동안 방치한 후, *t*-buthanol 30  $\mu$ l을 첨가하여 분해반응을 정지시켰다. 실온에 30분간 방치시킨 후, 질소 가스를 이용하여 시료를 건조하고, 100  $\mu$ l의 Tri-Sil Z (Pierce Co., USA)를 가하여 실온에 2시간 방치한 뒤에 분석하였다[10]. 분석에 사용된 기종은 HP 5890 series II (Hewlett Packard Co., USA)이었으며, 검출기는 flame-ionization을 사용하였고, HP 7673 injector를 사용하여 시료를 주입하였다. 사용한 컬럼은 5%의 phenylmethyl siliconed로 표면에 처리된 실리카 컬럼 (Supelco, Bellefont, Pa)으로 크기는 30 m×0.32 mm이었다. 운반가스는 산소가 제거된 질소가스를 사용하였으며 유속은 2.9 ml/min 이었다. 분석 온도는 140℃에서 분당 7℃씩 상승시켜 260℃까지의 범위에서 분석하였다.

#### 고분자 중합체의 분자량 측정

Gel permeation chromatography (GPC)를 사용하여 토양에서 분리한 균주가 생산한 고분자 중합체의 분자량 측정하였다. TSL PW<sub>XL</sub> 컬럼 (Viscotek, USA)을 장착한 Viscotek 사(USA)의 GPC를 사용하여 분석하였으며 RI detector를 사용하여 분자량을 측정하였다. 이동 상으로 1.0 ml/min 유속의 증류수를 이용하였고, 시료의 농도는 5.0 mg/ml이었으며 주입 전에 0.45  $\mu$ m (pore-size) filter로 거른 후, 1회 분석에 100  $\mu$ l를 주입하였다[9]. 표준 곡선은 분자량  $5.8 \times 10^3$ 에서  $1.0 \times 10^6$ 까지의 pullulan (Sigma Co., USA)을 사용하여 작성하였다.

#### 균체량의 측정

건조균체량은 일정시간 배양한 배양액을 8,000×g로 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 침전물을 배양액과 동일한 부피의 증류수를 사용하여 2회 세척한 후, 105℃에서 24시간 동안 건조하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 토양 미생물의 특성

토양에서 분리한 균주를 Gram 염색과 광학 현미경을 사용하여 관찰한 결과, 운동성이 있는 Gram 양성균의 간균임을 확인하였고, glucose fermentation test, catalase test, oxydase test, 그리고 casein hydrolysis test 등을 실시한 결과, 포도당을 기질로 사용하여 발효할 수 있는 능력을 확인하였으며 catalase test와 oxydase test 결과를 통하여 호기성 미생물임을 확인하였다(Table 1). Casein hydrolysis test에서는 casein을 분해하는 caseinase 활성이 있음을 확인하였다. 분리한 균주를 API-50CH/B kit를 사용하여, API lab. program (bioMerieux Co., France)으로 분석한 결과, 99% 이상의 유사성을 가지는 *Bacillus coagulans*로 확인되어 *B. coagulans* DL-1으로 명명하였다. 포도당을 포함한 50 종류의 탄소원에 대한 이용도를 확인한 결과 20 종류의 탄소원을 기질로 이용할 수 있음을 확인하였다.

#### 탄소원의 종류에 따른 고분자 중합체의 생산성

탄소원의 종류가 *B. coagulans* DL-1의 생산과 고분자 중합체의 생산에 미치는 영향을 조사하였다 (Table 2). 실험에 사용한 탄소원들의 농도는 2% (w/v)였으며 질소원은 0.25% (w/v) yeast extract이었다. 사용한 탄소원은 단당류인 포도당, fructose, mannose와 이당류인 sucrose, maltose 그리고, 다당류인 dextrin과 starch를 사용하였다. 배양온도는 30℃였으며, 배양시간은 3일이었다. 단당류인 포도당을 사용한 경우에 생산량은  $4.50 \pm 0.14$  g/ℓ로 가장 높았으며, 이당류인 sucrose은  $4.30 \pm 0.14$  g/ℓ의 생산량을 보여 glucose와 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나, 다당류인 dextrin과 starch를 탄소원으로 사용하였을 시에 배양액 중에 완전히 용해되지 않아 정확한 균체량을 측정할 수 없었으며, 고분자 중합체를 분리하기 위해서 균체를 제거한 상등액에 유기 용매를 첨가할 때, 이들 탄소원이 고분자 중합체와 동시에 침전되는

Table 1. Morphological and physiological characteristics of *B. coagulans* DL-1

Characteristics	<i>B. coagulans</i> DL-1	Characteristics	<i>B. coagulans</i> DL-1
Morphological		$\alpha$ -Methyl-D-mannoside	-
Shape	rod	$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	-
Gram stain	+	N-Acetyl-glucosamine	+
Motility	+	Amygdaline	-
Optimum temperature	30°C	Arbutine	-
Growth in air	+	Esculine	-
		Salicine	+
Physiological		Cellobiose	+
Glucose fermentation test	+	Maltose	+
Catalase test	+	Lactose	-
Oxydase test	-	Melibiose	+
Casein hydrolysis test	+	Saccharose	+
Glycerol	-	Trehalose	+
Erythiol	-	Inuline	-
D-Arabinose	-	Melezitose	-
L-Arabinose	+	D-Raffinose	+
Ribose	+	Amidon	-
D-xylose	+	Glycogen	-
L-Xylose	-	Xylitol	-
Adonitol	-	$\beta$ -Gentiobiose	+
$\beta$ -Methyl-xyloside	-	D-Turnose	-
Galactose	+	D-lyxose	-
D-Glucose	+	D-Tagatose	-
D-Fructose	+	D-Fucose	-
D-Mannose	+	L-Fucose	-
L-Sorbose	-	D-Arabitol	-
Rhamnose	+	L-Arabitol	-
Dulcitol	-	Gluconate	+
Inositol	-	2-Ketogluconate	-
Mannitol	+	5-Ketogluconate	-
Sorbitol	+		

+ : Positive reaction, - : Negative reaction

Table 2. Effect of carbon sources on cell growth and production of biopolymer produced by *B. coagulans* DL-1<sup>a</sup>

Carbon sources	pH <sup>b</sup>	DCW <sup>c</sup> (g/ ℓ)	Polymer (g/ ℓ)	Y <sub>p/s</sub>	Y <sub>x/s</sub>	Y <sub>p/x</sub>
Glucose	5.44	1.20±0.14	4.50±0.14	0.23	0.06	3.75
Fructose	5.81	2.53±0.12	2.67±0.06	0.13	0.13	1.06
Mannose	5.43	3.10±0.00	3.50±0.14	0.18	0.16	1.13
Sucrose	5.28	1.20±0.14	4.30±0.14	0.22	0.06	3.58
Maltose	5.76	2.60±0.10	3.15±0.07	0.16	0.13	1.21

a Results obtained after 3 days culture at 30°C in the medium with 2%(w/v) carbon source

b. Final pH of the medium

c. Dry cells weight

문제점이 확인되어 실험 결과에서 제외하였다. 따라서 포도당이 균체의 성장 및 고분자 중합체의 생산을 위한 *B. coagulans* DL-1의 우수한 탄소원임을 알 수 있었다.

탄소원의 농도에 따른 고분자 중합체의 생산성

탄소원으로 0~20% (w/v)의 포도당을 사용하여 *B. coagulans* DL-1의 성장과 고분자 중합체의 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Table 3). 포도당의 농도가 2% 일 때 고분자 중합체의 생산량은  $5.10 \pm 0.14$  g/l로 가장 높았다. 이후 포도당의 농도가 증가할수록 고분자 중합체의 생산량은 감소하였다. 탄소원인 포도당의 농도가 증가함에 따라 고분자 중합체의 생산량이 감소하는 것과는 달리 균체의 건조중량은 증가하였다. 그러나 균체의 생산 수율 ( $Y_{x/s}$ )은 고분자 중합체의 생산 수율 ( $Y_{p/s}$ )과 같이 감소하였다. 이는 미생물 배양에 의한 고분자 중합체의 생산에 있어서 일반적인 현상으로 볼 수 있는 catabolite repression에 의한 결과로 추정되며 토양에서 분리한 *B. coagulans* DL-1도 포도당에 대한 catabolite repression 현상을 나타냄을 알 수 있었다[2,5]. 따라서, *B. coagulans* DL-1를 배양하여 고분자 중합체의 생산성을 향상시키기 위하여 포도당에 대한 catabolite repression을 극복한 변이주를 획득하거나 유가식 및 연속 배양과 같은 배양방법을 개발하여야 할 것이다.

질소원의 종류에 따른 고분자 중합체의 생산성

질소원의 종류가 *B. coagulans* DL-1의 성장과 고분자 중

합체의 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Table 4). 사용한 질소원은 yeast extract와 bacto peptone 그리고, 간장박 등과 같은 유기질소원으로 첨가 농도는 0.25% (w/v)이었다. Yeast extract를 사용한 경우의 고분자 중합체 생산량은  $5.00 \pm 0.14$  g/l로 가장 높았으며, 식물체에서 유래한 유기질소원인 bacto peptone과 간장 생산공정의 부산물인 간장박을 사용한 경우의 고분자 중합체 생산량은 각각  $1.03 \pm 0.06$ 과  $1.07 \pm 0.06$  g/l이었다. yeast extract는 아미노산, 펩타이드 및 단백질 등과 비타민 B 및 무기질소원이 풍부한 질소원으로 미생물의 생육 촉진은 물론, 효소 등의 생산성 향상에 중요한 역할을 한다[17,18]. 따라서, 일반적인 산물 생산에 우수한 질소원으로 알려진 yeast extract가 *B. coagulans* DL-1에 의한 고분자 중합체의 생산을 위한 우수한 질소원임을 알 수 있었다.

질소원의 농도에 따른 고분자 중합체의 생산성

질소원으로 0~0.50% (w/v)의 yeast extract를 사용하여 *B. coagulans* DL-1의 성장과 고분자 중합체의 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Table 5). 질소원인 yeast extract의 농도가 증가함에 따라 고분자 중합체의 생산량이 증가하여 yeast extract의 농도가 0.25% (w/v)에서 가장 높은 생산량을 나타냈다. 이 때의 고분자 중합체 생산량은  $4.79 \pm 0.09$  g/l이었으며, 탄소원에 고분자 중합체의 생산 수율 ( $Y_{p/s}$ ) 및 균체의 생산 수율 ( $Y_{x/s}$ )은 각각 0.24 및 0.06이었고, 세

Table 3. Effect of glucose on cell growth and production of biopolymer produced by *B. coagulans* DL-1

Glucose (% w/v)	pH	DCW (g/l)	Polymer (g/l)	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$
0	6.95	$0.93 \pm 0.06$	$1.03 \pm 0.12$	-	-	1.11
2	5.34	$1.17 \pm 0.06$	$5.10 \pm 0.14$	0.26	0.06	4.36
5	3.91	$3.07 \pm 0.06$	$2.65 \pm 0.07$	0.05	0.06	0.86
10	4.32	$3.00 \pm 0.10$	$2.63 \pm 0.12$	0.03	0.03	0.88
15	4.56	$3.85 \pm 0.07$	$2.73 \pm 0.06$	0.02	0.03	0.71
20	4.62	$6.20 \pm 0.14$	$3.35 \pm 0.07$	0.02	0.03	0.54

Table 4. Effect of nitrogen sources on cell growth and production of biopolymer produced by *B. coagulans* DL-1

Nitrogen sources	pH	DCW (g/l)	Polymer (g/l)	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$
Yeast extract	5.46	$1.03 \pm 0.15$	$5.00 \pm 0.14$	0.25	0.05	4.85
Bacto peptone	3.80	$1.27 \pm 0.06$	$1.03 \pm 0.06$	0.05	0.06	0.81
Soybean pomace	3.60	-	$1.07 \pm 0.06$	0.05	-	-

Table 5. Effect of yeast extract on cell growth and production of the biopolymer produced by *B. coagulans* DL-1

Yeast extract (% w/v)	pH	DCW (g/ l)	Polymer (g/ l)	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$
0	3.82	0.80 ± 0.06	0.97 ± 0.10	0.05	0.04	1.21
0.05	3.80	1.43 ± 0.05	1.56 ± 0.12	0.08	0.07	1.09
0.10	3.96	1.70 ± 0.00	2.17 ± 0.04	0.11	0.09	1.28
0.15	5.51	1.23 ± 0.08	4.14 ± 0.11	0.21	0.06	3.37
0.20	5.52	1.04 ± 0.10	4.66 ± 0.05	0.23	0.09	4.48
0.25	5.58	1.14 ± 0.07	4.79 ± 0.09	0.24	0.06	4.20
0.30	5.03	1.56 ± 0.09	3.96 ± 0.03	0.20	0.08	2.54
0.40	5.12	2.12 ± 0.11	3.74 ± 0.03	0.19	0.11	1.76
0.50	5.21	2.60 ± 0.06	3.33 ± 0.16	0.17	0.13	1.28

포의 건조중량 1g 당 고분자 중합체의 생산 수율 ( $Y_{p/x}$ )은 1.20이었다. 이 후, yeast extract의 농도가 증가할수록 고분자 중합체의 생산량은 감소하였다. 이는 yeast extract가 미생물의 생육 및 산물의 생산에 있어서 우수한 질소원이나 미생물을 이용한 고분자 중합체의 생산에서 보는 바와 같이 배지에 첨가한 질소원의 일정한 농도 이상에서는 산물의 생산에 부정적인 효과를 나타낼 수 있다는 결과와 일치하는 것이다[4].

#### 고분자 중합체의 대량 생산

토양에서 분리한 *B. coagulans* DL-1의 배양 시간에 따른 성장과 고분자 중합체의 생산성을 측정하였다 (Fig. 1). 탄소원으로 2% (w/v)의 포도당을 사용하고 질소원으로 0.25% (w/v)의 yeast extract를 사용한 배지에서 120시간 동안 배양하였다. 배양액의 pH는 배양 시작과 동시에 감소하여 24시간에 4.3을 나타냈으며 이 후 서서히 증가하였다. 건조

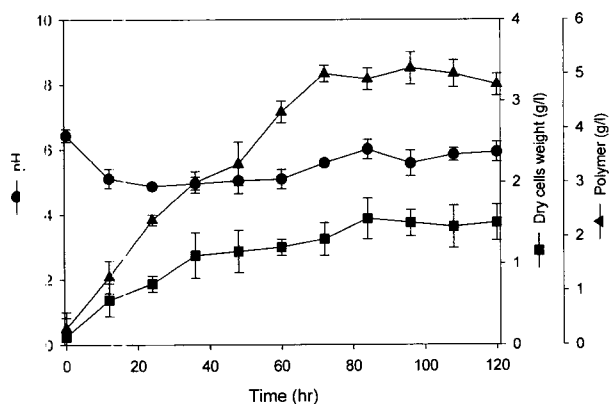


Fig. 1. Cell growth and production of the biopolymer produced by *B. coagulans* DL-1.

중량으로 나타낸 세포의 생장은 배양시간에 36시간까지 급격히 증가하였으나 이 후, 84시간까지는 서서히 증가하였다. 고분자 중합체의 생산은 세포의 성장과 함께 증가하여 72시간에 최고 5.00 ± 0.15 g/ l의 생산성을 나타내었으며 이때의 건조세포중량은 1.32 ± 0.20 g/ l이었다. 탄소원에 대한 고분자 중합체 ( $Y_{p/s}$ ) 및 균체의 생산 수율 ( $Y_{x/s}$ )은 각각 0.25 및 0.07이었고, 세포의 건조중량 1g 당 고분자 중합체의 생산 수율 ( $Y_{p/x}$ )은 3.79이었다.

#### 고분자 중합체 조성당의 분석

*B. coagulans* DL-1이 생산하는 고분자 중합체를 분리·정제하여 고분자 중합체를 구성하는 성분을 가스 크로마토그래피로 분석하였다 (Fig. 2). 고분자 중합체의 주요 구성

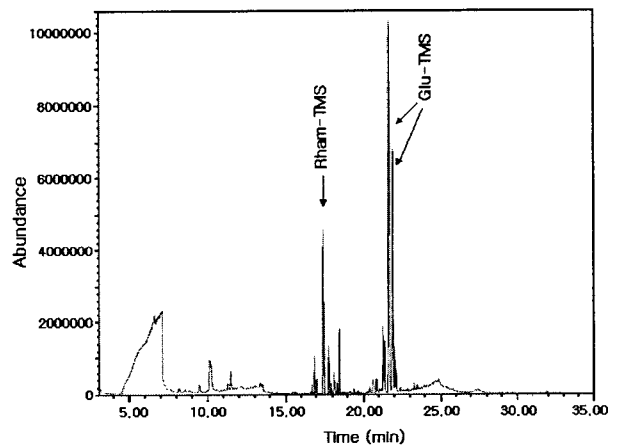


Fig. 2. Gas chromatographic spectrum of sugar-TMS (trimethylsilyl) components of the biopolymer produced by *B. coagulans* DL-1. Glu, glucose; Rham, rhamnose.

성분은  $\alpha$  형과  $\beta$  형 아노머 (animer)를 나타내는 피크의 retention time과 피크의 넓이 비율을 표준 물질과 비교하여 확인하였다. 가스 크로마토그래피에 시료를 주입한 후 17.40 분에 나타난 피크는 람노오스(rhamnose)로 확인되었으며  $\alpha$  형 아노머와  $\beta$  형 아노머 포도당에 해당하는 피크는 각각 21.65 분과 21.94 분에서 확인되었다. 각 피크의 넓이를 비교한 결과, *B. coagulans* DL-1이 생산하는 고분자 중합체를 구성하는 포도당과 람노오스의 구성 비율은 약 9 : 1 이었다. 기능성 고분자 중합체의 한 종류인 젤란(gellan)은 포도당과 람노오스로 구성되어 있으며 젤란의 대체 물질로 개발중인 heteropolysaccharide-7(PS-7)은 포도당과 람노오스가 4.5 : 1에서 4.7 : 1 정도의 비율로 구성되어있다[7]. 젤란은 1988년 일본에서 식품 첨가물로 승인을 받았으며 식품에 첨가하는 안정제와 증점제로서 1992년 미국 식품의약품 안정청의 승인을 받은 미생물이 생산하는 고분자 중합체로 국내에도 많은 양 수입하고 있으나 전 세계적으로 미국의 NeutraSweet 사에서 독점 생산하고 있는 실정이다.

#### 고분자 중합체의 분자량 분석

*B. coagulans* DL-1이 생산하는 고분자 중합체의 분자량을 gel permeation chromatography (GPC)를 사용하여 분석하였다(Fig. 3). 탄소원과 질소원으로 각각 2% (w/v)의 포도당과 0.25% (w/v)의 yeast extract를 사용하여 72시간

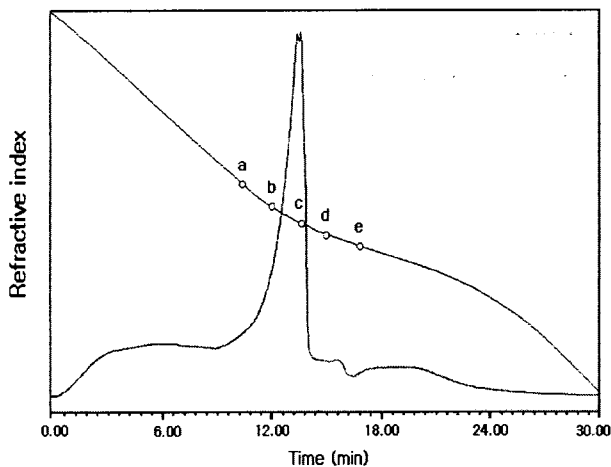


Fig. 3. Gel permeation chromatographic analysis of the biopolymer produced by *B. coagulans* DL-1. Molecular weights of pullulans as markers: a,  $1.0 \times 10^6$ ; b,  $3.8 \times 10^5$ ; c,  $1.0 \times 10^5$ ; d,  $4.8 \times 10^4$  and e,  $5.8 \times 10^3$

배양한 *B. coagulans* DL-1의 배양액에서 분리·정제한 고분자 중합체의 평균 분자량은 약  $2.80 \times 10^5$ 이었다. 현재 산업적으로 생산되고 있는 젤란의 평균 분자량은 약  $1.00 \times 10^5$ 이며 pullulan의 평균 분자량은 배양 조건 및 사용한 균주에 따라  $1.50 \times 10^4$ 에서  $1.00 \times 10^7$ 정도이다[19].

토양에서 분리한 *B. coagulans* DL-1이 생산하는 고분자 중합체는 구성 당의 종류와 구성 당의 비율 및 분자량 등으로 미루어 보아 현재 알려진 기능성 고분자 중합체와는 다른 새로운 물질임을 확인하였으나, 구성 당의 종류와 구성 당의 비율로 미루어 보아 젤란과 PS-7과 유사하였다. 따라서, *B. coagulans* DL-1이 생산하는 고분자 중합체는 젤란 및 PS-7의 대체 물질로서 개발할 수 있는 가능성이 있다고 말할 수 있다. *B. coagulans* DL-1이 생산하는 고분자 중합체를 젤란과 PS-7 등과 같은 기능성 고분자 중합체로 개발하기 위하여 각 구성성분을 연결하는 결합구조 등과 같은 화학 구조적 정보 및 물리적 특성에 대한 연구는 물론 생산성 향상을 위한 배양학적 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

고분자 중합체를 생산 능력이 있는 균주를 토양에서부터 분리하여 형태학적 및 생화학적인 특성을 확인하고 *Bacillus* 속 균주를 동정하는 API-50CH/B kit를 사용하여 동정한 결과, *Bacillus coagulans*로 확인되어 *B. coagulans* DL-1으로 명명하였으며 고분자 중합체를 생산하여 체외로 분비하는 균주임을 확인하였다. 플라스크 실험을 통하여 고분자 중합체 생산을 위한 *B. coagulans* DL-1의 최적 탄소원과 질소원 및 각각의 최적 농도는 2% (w/v) 포도당과 0.25% (w/v) yeast extract임을 확인하였다. 플라스크 실험에서 확립한 최적 배지조건과 1.0 vvm의 통기량 및 500 rpm의 교반속도로 7 l 생물배양기를 사용하여 수행한 회분식 배양에서의 최대 고분자 중합체 생산량은  $5.00 \pm 0.15$  g/l 이었다. 가스 크로마토그래피를 사용하여 *B. coagulans* DL-1이 생산한 고분자 중합체의 구성 성분을 분석한 결과, 포도당과 람노오스로 구성되어 있으며 포도당과 람노오스의 구성 비율은 약 9 : 1 이었다. 또한 평균 분자량을 gel permeation chromatography로 측정된 결과,  $2.80 \times 10^5$ 이었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부의 농림기술개발연구 (과제관리번호 201119-3) 지원으로 수행되었으므로 이에 감사를 드립니다.

## 참고 문헌

1. Ahn, S. G., H. H. Suh, C. H. Lee, S. H. Moon, H. S. Kim, K. H. Ahn, G. S. Kwon, H. M. Oh and B. D. Yoon. 1998. Isolation and characterization of a novel polysaccharide producing *Bacillus polymyxa* A49 KCTC 4648P. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 171-177.
2. Anwar, M. N., M. Suto and F. Tomita. 1996. Isolation of mutants of *Penicillium purpurogen* resistant to catabolite repression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 684-687.
3. Chaplin. M. 1982. A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **123**, 336-341.
4. Chung, D. Y., Y. S. Cho, C. H. Chung, D. I. Chung, K. Kim and J. W. Lee. 1998. Improved production of curdlan with concentrated cells of *Agrobacterium* sp. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **6**, 107-111.
5. Ebbole, D. J. 1998. Carbon catabolite repression of gene expression and condition in *Neurospora crassa*. *Fungal Gen. Biol.* **25**, 15-21.
6. Gandhi, H. P., R. M. Ray and R. M. Patel. 1997. Exopolymer production by *Bacillus* species. *Carbohydr. Polym.* **34**, 323-327.
7. Jin, H., H. S. Kim, S. K. Kim, M. K. Shin, J. H. Kim and J. W. Lee. 2002. Production of heteropolysaccharide-7 by *Beijerinckia indica* from agro-industrial byproducts. *Enz. Microbiol. Technol.* **30**, 822-827.
8. Lee, j. w. 1999. Microbial modification of extracellular polysaccharides. *J. Life Science* **9**, 69-80.
9. Lee, J. W., W. G. Yeomans, A. L. Allen, F. Deng, R. A. Gross and D. L. Kaplan. 1999. Biosynthesis of novel exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5265-5271.
10. Lee, J. W., W. G. Yeomans, A. L. Allen, D. L. Kaplan, D. Frank and R. A. Gross. 1997. Exopolymers from curdlan production: incorporation of glucose-related sugars by *Agrobacterium* sp. strain ATCC 31749. *Can. J. Microbiol.* **43**, 149-156.
11. Logan, N. A. and R. C. Berkeley. 1984. Identification of *Bacillus* strain using the API system. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1871-1882.
12. Paul, F., M. Andre. and P. Monsan. 1986. Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* **4**, 245-259.
13. Paul, P. J., W. Jason, K. Dariusz, J. W. Thomas, F. Andrzej, L. S. Aleksander, T. Mitsuo, T. Takashi, T. Mimura and S. F. Michael. 1996. Role of the V2, V3, and CD4-binding domains of GP120 in curdlan sulfate neutralization sensitivity of HIV-1 during infection of T lymphocytes. *Virology* **226**, 217-227.
14. Hynes, W. L. and J. R. Tagg. 1985. A simple plate assay for detection of group A streptococcus proteinase. *J. Microbiol. Meth.* **4**, 25-31.
15. Seljelid, R., J. Boegwald, J. Hoffman and O. Larm. 1984. A soluble  $\beta$ -1,3-D-glucan derivative potentiates the cytostatic and cytolytic capacity of mouse peritoneal macrophages in vitro. *Immunopharmacol.* **7**, 69-73.
16. Seo, H. P., J. M. Kim, H. D. Shin, T. K. Kim, H. J. Chang, B. R. Park and J. W. Lee. 2002. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 376-380.
17. Sharmila, M., K. Ramanans and N. Sethunathan. 1989. Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorous insecticides by soil enrichment and bacterial cultures. *Can. J. Microbiol.* **35**, 1105-1110.
18. Shen, C. F., N. Kosaric and R. Blaszyk. 1993. Properties of anaerobic sludge as affected by yeast extract, cobalt and iron supplements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 132-137.
19. Slodki, M. E. and M. C. Cadmus. 1978. Production of microbial polysaccharide. *Adv. Appl. Microbiol.* **23**, 19-54.
20. Soung, C. Y., Y. Takashi, M. Toru, Y. Kaneko, N. Hideki, Y. Naoki and U. Toshiyuki. 1995. Synthesis of curdlan sulfates having inhibitory effects in vitro against AIDS viruses HIV-1 and HIV-2. *Carbohydr. Res.* **276**, 425-436.
21. Sutherland, I. W. and D. C. Ellwood. 1979. Microbial exopolysaccharides in polymers of current and future potential, pp. 107-150, In Bull, A. T., D. C. Ellwood and C. Ratledge (eds.), *Microbial. Technology. Current State. Future Prospects*, Cambridge University Press Inc., Cambridge.
22. Ueda, S., K. Fusita, K. Komatsu and Z. Nakashima. 1963. Polysaccharide produced by the genus pull-



- ularia. *Appl. Microbiol.* **11**, 211-215.
23. Valero M., L. A. Hernandez-Herrero, P. S. Fernandez and M. C. Salmeron. 2002. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Food Microbiol.* **19**, 491-499.
24. Wollum, A. G. 1982. *Methods of soil analysis, Part 2: Chemical and microbiological properties*, pp. 781-802, 2nd eds, American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin.

(Received January 28, 2003; Accepted April 17, 2003)