

## Beijerinckia Indica 배양을 통한 Heteropolysaccharide-7 생산 최적화

오검영 · 손정화 · 김기명 · 남수완<sup>1</sup> · 이진우<sup>2</sup> · 김성구\*  
부경대학교 생물공학과, <sup>1</sup>동의대학교 생물공학과, <sup>2</sup>동아대학교 생물공학과

**Optimization of Heteropolysaccharide-7 Production by *Beijerinckia indica*.** Wu, Jian-Rong, Jeong Hwa Son, Ki Myong Kim, Soo-Wan Nam<sup>1</sup>, Jin-Woo Lee<sup>2</sup>, and Sung-Koo Kim\*. Department of Biotechnology & Bioengineering Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, <sup>1</sup>Department of Biotechnology, Dong-Eui University, Busan 614-010, Korea, <sup>2</sup>Division of Biotechnology, Dong-A University, Busan 608-714, Korea – *Beijerinckia indica* was cultured in mineral salts medium (MSM) medium with various carbon and nitrogen sources to improve the production yield of heteropolysaccharide-7 (PS-7). At high C/N ratio, the high concentration of PS-7 was produced until 40 h of the culture, whereas most of the glucose as a carbon source was used for the cell growth at low C/N ratio. However, at the high C/N ratio, PS-7 accumulation stopped at 48 h of the culture due to the increasing viscosity of the culture broth would inhibit the cell growth. Therefore, the optimized value of C/N ratio was 33.3 (20 g/L glucose, 7.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) for the high production of PS-7. In the culture with various carbon sources, *B. indica* effectively used the hexoses or glucose-generating sugars for PS-7 formation. Especially, sucrose was the best carbon source for the high production of PS-7 (6.96 g/L) with a high viscosity (40772 cp). In the culture of *B. indica* with MSM medium containing 20 g/L glucose and 7.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> in a 5 l fermentor, the highest cell concentration was 2.5 g/L and the highest concentration of PS-7 was 7.5 g/L (35174 cp). The additional nitrogen sources of 7.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, glutamine and glutamate at 12 h of the culture after exhaustion of a nitrogen source regulated the metabolism of carbon sources, therefore the nitrogen sources could control PS-7 synthesis.

**Key words:** *Beijerinckia indica*, heteropolysaccharide-7, biosynthesis, nitrogen source, carbon source, viscosity

미생물에서 생산되는 다당류들은 이들의 고유한 구조적 특징에 기인한 물성과 다양한 기능성으로 식품, 의약품 및 생물산업등에서 널리 이용되고 있다[22]. 이들 다당류들 중 *Azotobacter indicus* var. myxogenes 부터 생산되는 다당류인 heteropolysaccharide-7(S-7 or PS-7)은 glucose와 rhamnose 그리고 uronic acid를 주성분으로 복잡한 구조를 이루고 있는데, 그 외에 *Sphingonomas paucimobilis* strain I-886이 생산하는 다당류와 유사하게 2-deoxysugar과 2-deoxy-D-hexauronic acid를 포함하고 있다[8, 9, 12, 15, 24]. PS-7의 물성은 gellan gum 류에 속하며 xanthan과 같은 고분자와 비교했을 때 약 2배 높은 점성을 가지고 있으며 뛰어난 가소성(pseudoplasticity)을 가지고 있다[21]. 또한 유화 안정성, 수분함유능, 점착성, 유희능 등의 특성으로 현재, 페인트, 잉크, 섬유, 필름 등의 공업분야에서 산업적 응용이 이루어지고 있다[20].

자연계에서 *B. indica*는 제한된 탄소원의 환경에서 metabolic pattern을 바꾸어 다양한 다른 성분들을 탄소원으로 이용하며 생존하고 있다. 즉, 이런 균의 특성을 이용하여

제한된 질소원 환경에서 다당류 생산을 향상시킬 수 있다 [10].

본 연구에서는 다양한 질소 및 탄소원 조건에서 *B. indica* 균을 배양하면서 PS-7 생산의 최적조건에 관한 연구를 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 기본 배양조건

*Beijerinckia indica* HS-2001는 *Beijerinckia indica* ATCC 21423를 자외선 조사를 통해 얻은 자외선 유도 변이주로서 MSM(mineral salts medium) agar plate에 배양하였다. MSM 배지는 5.0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 7.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.4 g/L Bacto yeast extract(Dofico Lab., Detroit, USA), 0.2 g/L Bacto peptone, 20 g/L glucose, 1 ml trace minerals solution(1% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.25% ZnSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.2% CuSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, and 0.25% Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O)의 조성을 가지며 pH 6.8로 조절하기 위하여 2 M NaOH를 살균 과정 전 배지에 첨가하였다.

\*Corresponding author

Tel: 82-51-620-6188, Fax: 82-51-620-6180

E-mail: skkim@pknu.ac.kr

### 배양방법

초기배양은 100 ml Erlenmeyer flask에 20 ml MSM 배지를 넣고 진탕 배양하였으며, 배양온도는 24°C, 교반속도는 200 rpm으로 24시간 동안 배양하였다. 같은 조건으로 초기 배양액 2.5 ml을 250 ml flask에 50 ml 배지에 접종하여(inoculation size 5%, v/v) 실험을 위한 seed culture로 사용하였다. 실험을 위한 본 배양은 500 ml 삼각 플라스크에 각각 다른 탄소원 및 질소원을 포함한 100 ml MSM 배지에 배양액 모두를 첨가하여 같은 조건으로 72시간 동안 실시되었다. 이와 병행하여 대량배양은, DO, pH, 온도 센서가 부착된 5 L fermentor(KF-5, KFC, Inchon, Korea)에 24시간 동안 배양한 배양액 150 ml를 3 L MSM 배지에 접종하여 배양을 48시간 동안 같은 조건으로 실시하였다.

### 배양산물의 분석방법

생산된 다당류에서 세포를 제거하기 위해 배양액을 2배의 증류수로 희석하여 4°C, 15,000×g에서 30분 동안 원심분리 후 상등액을 취하여 두 배의 isopropanol을 첨가하여 다당류를 4°C에서 24시간 동안 침전시켰으며 침전된 다당류는 10,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 제거한 후 회수하였다. Isopropanol로 세척한 후 105°C에서 4시간 동안 건조 후 얻어진 PS-7의 건조 무게를 측정하여 PS-7의 생산량을 구하였다. 또한 세포의 무게를 측정하기 위하여 첫 원심분리에서 얻어진 pellet을 증류수로 세척한 후 105°C에서 4시간 동안 건조한 후 세포의 건조중량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 배양 후 잔존 glucose양은 phenol-sulfuric acid assay 방법을 이용하여 측정하였다[7]. 배양액의 점도는 Brookfield 점도계 DV III을 30°C에서 사용하여 측정했으며 사용된 spindle은 SC4-34(Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, Mass.) 였다.

### C/N ratio의 영향

탄소원과 질소원의 비율 (C/N ratio)이 세포생육, PS-7생산, 점도, 잔존 glucose 그리고 pH에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 glucose를 탄소원으로 10, 20 그리고 30 g/L의 농도로 배지에 첨가하였고, 질소원으로 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>를 7.5 mM의 농도로 고정시켜 16.7, 33.3 그리고 50.0의 C/N ratio를 갖는 배지를 사용하였다. 이는 김[11]의 실험결과를 통하여 최대 세포 생육과 SP-7을 생산할 수 있는 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 7.5 mM의 농도를 참조하였다.

### 탄소원과 질소원의 영향

탄소원이 다당류 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 fructose, glucose, sucrose, glycerol, gluconate, glucosamine을 모두 20 g/L의 양으로 다른 탄소원을 첨가하지 않은 MSM 배지에 첨가하여 사용하였다. 또한 질소원의 영향을 알아보기 위하여, 20 g/L glucose을 포함한 MSM 배지에 다

양한 농도의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(0-12 mM), KNO<sub>3</sub>(0-25 mM), NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>(0-25 mM)를 각각 첨가하여 배양에 사용하였다. 또한 PS-7생산 조절의 가능성을 알아보기 위하여 20 g/L glucose와 7.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>을 포함한 MSM 배지에서 *B. indica*를 배양한 후 질소원을 모두 소모한 배양 12시간째 배양액에 7.5 mM이 되도록 0.2 ml NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, glutamate, 혹은 glutamine을 각각 첨가하여 질소원이 *B. indica*의 PS-7생산에 미치는 영향을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 다양한 C/N ratio에서의 *B. indica* 배양

일반적으로 탄소원과 질소원의 비는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 미생물의 생육 패턴에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[23]. 세포는 모두 12-16시간 사이에 최대 농도에 도달하였고, 이후 감소하였다. 30 g/L glucose 첨가에서 세포는 1.78 g/L로 증식하였고, 10 그리고 20 g/L glucose에서 세포농도는 각각 2.18 g/L와 2.24 g/L까지 증식하였다. Fig. 1에서 보듯이, 균체의 생산과 PS-7의 생산, 그리고 균체의 glucose 이용간의 관계는 높은 연관성을 가지고 있는 것을 볼 수 있었다. 대체적으로 높은 C/N 농도에서 높은 점도의 PS-7생산이 증가된다는 연구결과들과[14, 17, 20] 마찬가지로, 본 연구에서도 C/N ratio가 증가할수록 PS-7 생산을 증가시킬 수 있었다. 선정된 세가지 C/N ratio에서 보여주는 PS-7 생산, 배양액의 점도 그리고 균체생산의 경향이 각각 특이적으로 차이가 있었다. 높은 glucose 농도(30 g/L)에서 세포는 초기 PS-7의 생산이 월등하게 증가되었다가 급격하게 감소하고, 점차적으로 균체와 PS-7 생산이 40시간 이후 정체기에 이르게 되는 것을 볼 수 있는데 반해, 10 g/L glucose 첨가한 배지에서는 균체의 생산이 더 많음에도 불구하고 PS-7 생산은 유의적으로 다른 glucose 첨가수준의 배지보다 적었으며, 잔존 glucose의 양이 거의 남아있지 않은 것으로 보아, 균체 생산으로 대부분의 glucose가 소모된 것으로 추측할 수 있었다. 20 g/L 포도당 첨가 배지에서 균체 생산량은 높을 뿐 아니라 지속적으로 PS-7이 배양 종료되는 시점까지 생산되는 결과는, 30 g/L 포도당 첨가 배지에서 배양 40시간 이후에 균체생산과 PS-7 생산이 중지되는 것과 비교되는 것으로, 결과적으로 20 g/L 포도당 첨가수준이 PS-7 생산에 적절한 조건인 것으로 보인다. Becker 등[4]의 보고에 의하면 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*를 이용한 Xanthan gum의 생산에 있어서 배양액의 점도 증가는 배양기 내부로의 산소의 공급과 배양액의 혼합에 부의 효과를 주어 균체의 생산과 Xanthan의 생산을 저하시켰다고 하였다. Banik 등[3]은 *Pseudomonas* sp.를 통한 gellan류의 다당류 생산에 있어서 gellan이 균체외로 배출되는 다당류임에도 불구하고 배양액의 다당류는 균체를 캡슐화하는 효과를 주어 배양액에서 생육이 원활하지 못하고 결국 균체 생

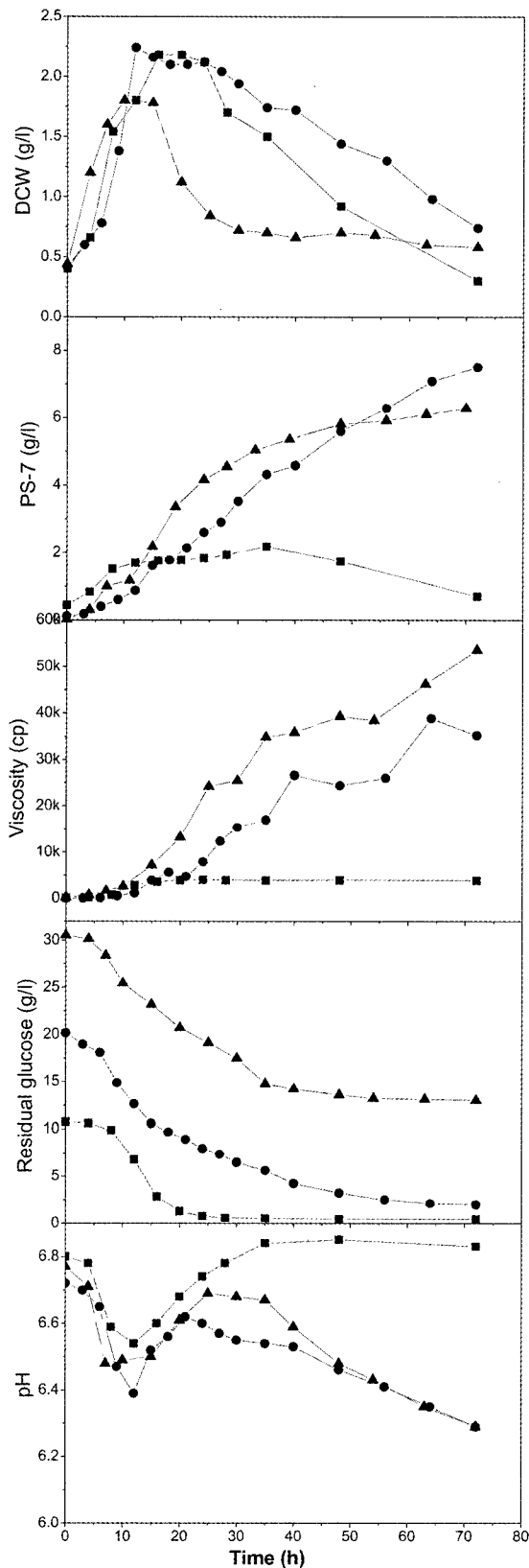


Fig. 1. Effect of different concentration of glucose with 7.5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . ■, glucose 10 g/L; ●, glucose 20 g/L; ▲, glucose 30 g/L. (Results were from the cultures in 5-L fermentor).

산을 저하하는 효과를 주었음을 현미경으로 관찰하기도 하였다. 따라서 본 실험에서 높은 glucose 농도에서 생산되는 PS-7는 배양액의 점도를 증가시켜 물질전달 제한(mass transfer limitation)으로 인한 균의 생육을 저해하는 것으로 보인다. 그러나 세포의 빠른 사멸에도 불구하고 30 g/L의 glucose 첨가배지에서 생산된 PS-7의 점도는 53509 cp로 10 g/L와 20 g/L glucose 조건에서 얻어진 최고 PS-7의 점도보다 높은 것으로 관찰되었다. 배양액 pH 변화는 20 그리고 30 g/L glucose 조건 모두 감소, 증가, 그리고 감소하는 것으로 나타났는데 이는 *B. indica*의  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  이용 때문인 것으로 보였고, 이 결과는 Thorne 등 [24]의 *Sphingomonas*를 이용한 exopolysaccharides 생산에 관한 연구와 일치하였다. Thorne 등은 배양 9시간에 해당하는 시점에  $\text{NH}_4^+$ 의 고갈과 함께 pH의 감소, 균체의 대수기의 종료 그리고 다당류의 생산이 시작되었음을 관찰하였다. 10 g/L glucose 조건에서 세포의 성장으로 pH가 6.4로 떨어졌다가 배양 24시간 이후부터는 다시 6.8로 증가 후 배양 시간 내내 변화가 없었다. 이는 배양액 내 glucose의 고갈로 세포성장이 멈추었기 때문인 것으로 사료된다.

PS-7 생산을 위한 탄소원의 효과

Table 1에서 나타난 바와 같이 20 g/L의 sucrose 조건에서 성장한 *B. indica*은 최고농도의 PS-7(6.9 g/L)을 생산하였다. 그리고 20 g/L의 glucose와 fructose 조건에서 성장한 *B. indica*의 경우 각각 6.4 g/L과 4.74 g/L의 PS-7을 생산하였다. 결과적으로 *B. indica* 배양에서 고점도 고농도의 PS-7 생산을 위해서는 20 g/L의 sucrose가 최적 탄소원임을 알 수 있었다[2, 10]. 탄소원으로 glucosamine을 첨가한 경우, 다른 탄소원에서 보다 세포의 생육(2.66 g/L DCW)을 촉진시켰지만 반대로 PS-7생산(0.08 g/L)을 억제 시키는 것으로 나타났다. 이는 세포 내로 흡수된 glucosamine이 분해되면서 나오는 암모니아가 세포 생육을 촉진시키는 반면에 다당류의 생산을 억제시키는 것으로 예측할 수 있다. Glycerol을 탄소원으로 이용할 경우, 세포는 거의 성장하지 않았고, PS-

Table 1. Effect of carbon source on growth and polysaccharide production (72 hr culture in shake flask).

Carbon source	DCW (g/l)	PS-7 (g/l)	Viscosity (cp)
Glucose	0.60	6.4	38950
Fructose	0.56	4.72	25615
Sucrose	0.52	6.96	40772
Glucosamine	2.66	0.08	36
Glycerol	0.60	0.80	120
Gluconate	1.72	2.08	100
GLC+0.5%Gluconate	0.82	5.28	26694
FRU+0.5%Gluconate	0.54	5.96	34673
SUC+0.5%Gluconate	0.79	5.84	29184

\* GLC: Glucose, SUC: Sucrose, FRU: Fructose.

7 생산 또한 0.8 g/L로 낮은 수치를 보였으며 점도 또한 120 cp로 낮았다. Gluconate를 탄소원으로 이용할 경우, DCW는 1.72 g/L로 비교적 높았고, 2.08 g/L의 비교적 낮은 PS-7 생산과 100 cp의 낮은 점도를 보였다. 결과적으로 *B. indica*는 PS-7 생산을 위해서 탄소원으로 hexose 또는 glucose-generating 당을 효율적으로 이용하는 것으로 보인다.

*Pseudomonas sp.*와 *B. indica*는 일반적으로 Entner Doudoroff(ED) pathway, pentose phosphate pathway, 그리고 TCA cycle을 탄소원 대사 경로로 이용하고 있다[14, 24]. Gluconate를 탄소원으로 사용하였을 때, *B. indica*가 생육한다는 점에서 이용 대사경로를 확인할 수 있다. *B. indica* 내에서 gluconate는 gluconate kinase에 의해서 gluconate-6-phosphate로 전환될 수 있고 결국 ED pathway와 the PP pathway로 대사된다[4, 25]. 따라서 gluconate의 존재가 *B. indica*의 hexose 대사와 동화작용에 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단된다. Table 1은 몇가지 탄소원에 따른 *B. indica*의 성장 및 PS-7 생산을 보여주고 있다. 20 g/L의 fructose를 포함한 MSM 배지에 gluconate를 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우 보다 더 높은 농도의 PS-7 생산을 보였다. 이는 gluconate가 triose-3-phosphate, pyruvate, triose-3-phosphate로 전환되면서 triose-3-phosphate cycling을 이용하게 되고 따라서 fructose는 gluconeogenesis를 거쳐 바로 PS-7 생산에 이용되기 때문으로 판단된다[27]. 그러나 sucrose와 glucose를 함유한 MSM 배지에 gluconate가 첨가된 경우는 오히려 PS-7 생산을 감소시켰다. 중간 대사물인 glucose-6-phosphate는 glucose-1-phosphate로 전환되어 다당류 생산에 이용된다. 이때 탄소원으로 glucose 혹은 sucrose를 함유한 배지 내에 gluconate가 있으면 phosphoglucoisomerase(*pgi*) 기능이 억제되고 따라서 triose-3-phosphate cycling을 이용할 수 없어 PS-7 생산이 억제되는 것으로 판단된다[5, 17, 18].

#### PS-7생산을 위한 질소원의 효과

세 가지 종류의 질소원  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ 을 각각 함유한 MSM 배지에서의 *B. indica*의 생육과 PS-7 생산에 대한 결과를 Fig. 2에 나타내었다.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  존재 하에서(Fig. 2A), 세포는 지속적으로 성장하여  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  농도가 4 mM에서 8 mM로 증가할 때 0.44 g/L에서 2 g/L로 균체생산이 증가하였다.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 0 mM에서 4 mM까지 증가에 따라 PS-7 생산 또한 증가하여 4 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에서 최고 6.4 g/L을 생산하였고 이후  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에 따라 생산되는 PS-7의 농도는 급격히 감소하였다.  $\text{KNO}_3$ (Fig. 2B) 존재 하에서는, PS-7 생산은 균체성장과 함께 서서히 증가해서 12.5 mM의  $\text{KNO}_3$ 농도에서 최고 생산량인 4.1 g/L이 생산되었다.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (Fig. 2C) 존재 하에서는,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  농도가 12 mM에서 20 mM로 증가할 때 균체생장은 0.5 g/L에서 1.44 g/L로 증가하였다. PS-7 생산은  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 농도가

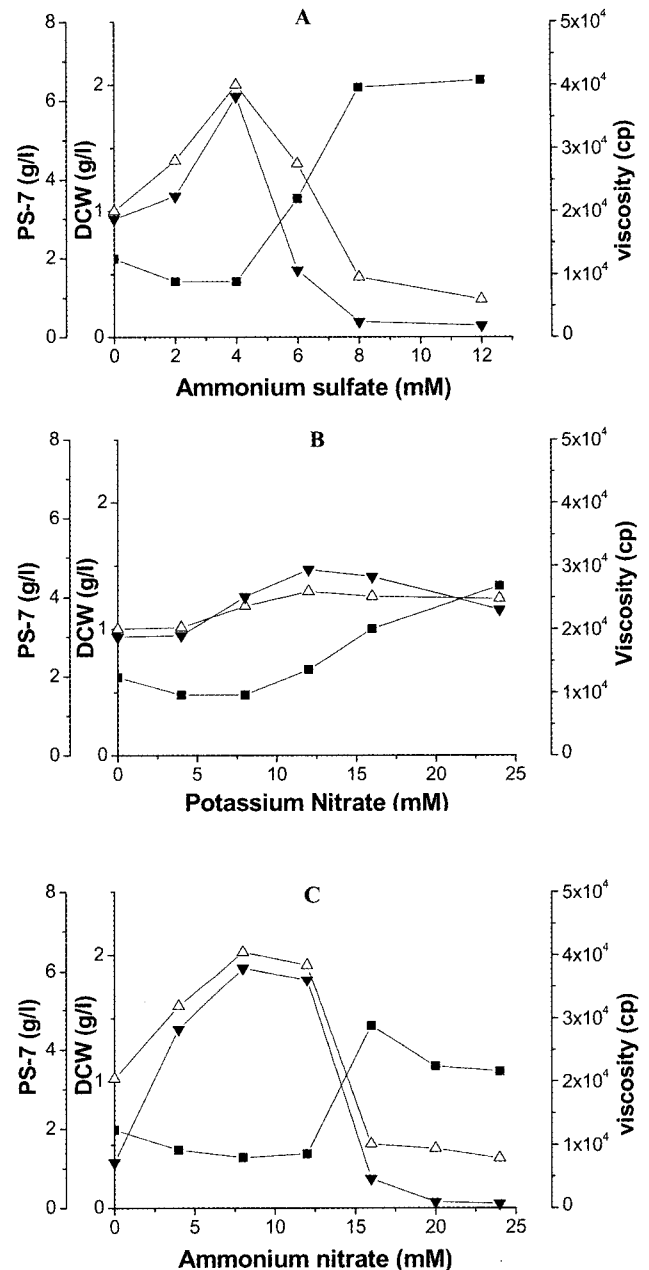


Fig. 2. Effect of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$  and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  on growth and polysaccharide production. ■, DCW; △, PS-7; ▼, Viscosity.

8 mM에서 12 mM으로 증가할 때 최고 6.48 g/L(점도 38033 cp)으로 생산되었다. 결론적으로 배양환경에서 질소의 농도는 세포의 생육 및 PS-7 생산에 영향을 미쳤다. 암모니아는 세포 내에서 세포 증식에 바로 활용될 수 있었으나 nitrate를 포함한 배지에서는 *B. indica*에 의한 PS-7생산이 상대적으로 낮았다.

#### Nitrogen signal을 통한 PS-7 생산조절

세균의 질소원 대사에 있어서 질소원은 크게 glutamine

**Table 2. Effect of nitrogen signal molecular on the cell and PS-7 production<sup>a</sup>.**

	DCW (g/l)	PS-7 (g/l)	Viscosity (cp) <sup>b</sup>	Residual glucose (g/l)
Control <sup>c</sup>	0.24	6.64	5732	2.3
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.28	6.56	4219	1.2
Glutamate	0.74	5.60	3213	2.1
Glutamine	1.46	1.92	599	10.6

<sup>a</sup> *B. indica* was cultured in MSM medium containing initial 7.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> in 250 ml shake flask for 72 hr and 7.5 mM of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, Glutamate, Glutamine were added into the culture at 12 hr

<sup>b</sup> Viscosity was determined using a SC4-34 spindle at 9 rpm

<sup>c</sup> The culture was performed in MSM without addition of nitrogen source.

synthetase/glutamate synthetase(GS/GOGAT) pathway와 glutamate dehydrogenase pathway 경로를 거치는데, 특히 GS/GOGAT 경로는 질소의 이용성에 의해 제어되지만, glutamine과 2-keto-glutarate의 비율이 이 system의 발현에 영향을 미치게된다[1]. 세포 내 glutamine과 2-ketoglutarate/glutamine 비율에 영향을 미치는 가용질소의 signal은 세포의 대사를 조절하고, 결국은 탄소원 이용에 영향을 주게된다. 또한 탄소원 이용을 통해 2-ketoglutarate가 TCA-cycle을 거칠 수 있도록 유도하게 되므로 배지 내 질소원은 탄소원에 의한 PS-7 합성을 촉진 시키는 역할을 한다.

7.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 존재 하에서, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>는 배양 12시간째 거의 소모되는 것을 앞선 연구에서 확인하였다[27]. 따라서 배양 12시간째, 각각 7.5 mM의 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, glutamine, glutamate을 첨가한 MSM 배지에서의 *B. indica* 배양 결과를 Table 2에 나타내었다. 7.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 존재 하에서 PS-7 생산은 대조군(12시간 이후 질소원을 첨가하지 않은 배양)과 비교했을 때 큰 차이를 보이지 않았고, 배양액 점도는 오히려 낮았다. 반면에 glucose의 소비는 촉진되어 다른 배양과 비교했을 때 제일 낮은 농도인 1.2 g/L의 glucose가 배양액에 잔존하였다. 7.5 mM Glutamine 존재 하에서는 PS-7 생산이 억제되었고, 반면에 세포 생육은 대조군(0.24 g/L)에 비하여 약 5 배 이상(1.46 g/L) 증가하였다. 반면에 세포의 glucose 이용을 억제하여 배양 종료 시 10.6 g/L의 높은 glucose 양이 잔존하였다. 이 결과로, glutamine은 세포 내에서 세포 생육을 위한 단백질 합성에 이용되는 동시에 세포의 탄소원 이용률을 억제하여 phosphotransferase system (PTS) 의존 당류의 운반과 질소원의 대사활동을 조절하는 것으로 보였다[6, 26]. 결론적으로, 질소원은 *B. indica* 내에서 탄소원 대사를 조절하는 역할을 하는 것으로 나타났다.

## 요 약

*Beijerinckia indica*를 통한 Heteropolysaccharide-7(PS-7)

생산 최적화를 위해 다양한 탄소원과 질소원을 첨가하여 다른 배지 조성들이 PS-7에 미치는 영향을 조사하였다. 높은 C/N ratio에서 PS-7 생산을 배양 40시간까지 효과적으로 증가시킬 수 있었으며 낮은 C/N ratio에선 탄소원으로 첨가한 glucose가 균체의 생산에 사용되었을뿐 PS-7의 생산은 낮았다. 하지만, 높은 C/N ratio에서는 배양액의 점도로 균체의 생산이 정체하는 것으로 보아 본 실험에서는 20g/l glucose와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 7.5 mM으로 33.3의 C/N ratio가 PS-7생산에 적절한 비율인 것으로 관찰되었다. 다양한 탄소원을 첨가한 결과, *B. indica*는 PS-7 생산을 위하여 탄소원으로 hexose 또는 glucose-generating 당을 효율적으로 이용할 수 있었다. *Beijerinckia indica*를 이용한 PS-7 생산을 위해 첨가한 다양한 탄소원 중 sucrose 농도가 최고의 PS-7(6.96 g/L)을 생산 하였다. 5 l 배양기를 이용한 배양에서 탄소원 20 g/L glucose, 질소원 7.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>이 포함된 MSM 배지 내 배양된 *B. indica*의 세포 농도가 최고 2.5 g/L이었고, 생산된 최고 PS-7농도는 7.5 g/L(35174 cp)으로 나타났다. 질소원이 완전히 소모된 12시간 이후, 7.5 mM의 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, glutamine, glutamate을 첨가한 MSM 배지에서의 *B. indica* 배양 결과, 질소원이 *B. indica* 내에서 탄소원 대사를 조절하는 역할을 하는 것을 관찰할 수 있었으며 최종적으로 PS-7의 생산을 조절할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 해양수산부 마린 바이오 21 사업의 지원에 의하여 이루어진 것으로 (P-2004-02) 연구비 지원에 감사 드립니다. 또한 저자인 Wu, Jian-Rong은 부산시 Brain Busan 21 사업에서, 그리고 손정화, 김기명은 교육부 Brain Korea 21 사업에서 인건비를 지원 받았으며 이에 감사 드립니다.

## REFERENCES

- Arcondeguy, T., T. Jack, and M. Merrick. 2001. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol. Molecul. Biol. Rev.* **65**: 85-105.
- Ashtaputre, A. A. and A. K. Shah. 1995. Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from sphingomonas paucimobilis GS1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1159-1162.
- Banik, R. M., B. Kanari, and S. N. Upadhyay. 2000. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 407-414
- Becker, A., F. Katzen, A. Puhler, and L. Ielpi. 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical & genetic perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 145-152.
- Boza, Y., L. P. Neto, F. A. A. Costa, and A. R. P. Scamparini. 2004. Exopolysaccharide production by encapsulated *Beijerinckia* cultures. *Proc. Biochem.* **39**: 1201-1209.
- Charbit, A. 1996. Coordination of carbon and nitrogen

- metabolism. *Res. Microbiol.* **147**: 513-518.
7. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
  8. Falk, C., P. E. Jansson, M. Rinaudo, A. Heyraud, G. Widmalm, and P. Hebbar. 1996. Structural studies of the exocellular polysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* strain I-886. *Carbohydr. Res.* **285**: 69-79.
  9. Gulin, S., A. Kussak, P. E. Jansson, and G. Widmalm. 2001. Structural studies of S-7, another exocellular polysaccharide containing 2-deoxy-arabino-hexuronic acid. *Carbohydr. Res.* **311**: 285-290.
  10. Jin, H., H. S. Kim, S. K. Kim, M. K. Kim, M. K. Shin, J. H. Kim, and J. W. Lee. 2002. Production of heteropolysaccharide-7 by *Beijerinckia indica* from agro-industrial byproducts. *Enzyme Microb. Technol.* **30**: 822-827.
  11. Kim, H. S. 1999. Production of Heteropolysaccharide-7 by *Beijerinckia Indica* with Agro-Industrial Byproducts as the Substrate. Ms thesis, Dong-A University, Busan, Korea.
  12. Kang, S. K. and W. H. McNeely. 1976. Polysaccharide and bacterial fermentation process for its preparation. US Patent 3,960,832.
  13. Kim, M. K., I. Y. Lee, J. H. Ko, Y. H. Rhee, and Y. H. Park. 1996. Higher intracellular levels of uridine monophosphate under nitrogen-limited conditions enhance metabolic flux of curdlan synthesis in *Agrobacterium* species. *Biotechnol. Bioeng.* **62**: 317-323.
  14. Klinke, S., M. Dauner, G. Scott, B. Kessler, and B. Withot. 2000. Inactivation of isocitrate lyase leads to increased production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 929-913.
  15. Lee, J. W., W. G. Yeomans, A. L. Allen, R. A. Gross, and D. L. Kaplan. 1997. Compositional consistency of a heteropolysaccharide-7 produced by *Beijerinckia indica*. *Biotechnol. Lett.* **19**: 803-807.
  16. Oelze, J. 2000. Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 321-333.
  17. Peekhaus, N. and T. Conway. 1998. What is for dinner? : Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 3495-3502.
  18. Portais, J. C. and A. M. Delort. 2002. Carbohydrate cycling in microorganisms: what can <sup>13</sup>C-NMR tell us? *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 375-402.
  19. Ramirez-Castillo, M. L. and J. L. Uribealarea. 2004. Improved process for exopolysaccharide production by *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae* by a fed-batch strategy. *Biotechnol. Lett.* **26**: 1301-1306.
  20. Standford, P. A. 1979. Exocellular Microbial polysaccharides, In: Advance in carbohydrate chemistry & biochemistry, Vol. 136. Academic Press, London.
  21. Standford, P. A. and J. Baird. 1983. Industrial utilization of polysaccharide, In: polysaccharide II. Academic Press, London.
  22. Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *TIBTECH* **16**: 41-46.
  23. Sutherland, I. W. 2001. Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria. *Int. Dairy J.* **1**: 663-674.
  24. Thorne, L., M. J. Mikołajczak, R. W. Armentrout, and T. J. Pollock. 2000. Increasing the yield and viscosity of exopolysaccharides secreted by *Sphingomonas* by augmentation of chromosomal genes with multiple copies of cloned biosynthetic genes. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **25**: 49-57.
  25. Vartak, N. B., C. C. Lin, J. M. Cleary, M. J. Fagan and M. H. Saier Jr. 1995. Glucose metabolism in *Sphingomonas elodea*: pathway engineering via construction of a glucose-6-P dehydrogenase insertion mutant. *Microbiology* **141**: 2339-2350.
  26. Wang, Y. P., A. Kolb, M. Buck, J. Wen, F. O'Gara, and H. Buc. 1998. CRP interacts with promoter-bound  $\sigma^{54}$  RNA polymerase and blocks transcriptional activation of the *dctA* promoter. *EMBO* **17**: 786-796.
  27. Wu, J. R., J. H. Son, H. J. Seo, K. H. Kim, Y. K. Nam, J. W. Lee, and S. K. Kim. 2005. Metabolic flux analysis of *Beijerinckia indica* for PS-7 production. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **10**: 91-98.

(Received June 7, 2005/Accepted June 13, 2005)