

탄소원 조성 조절을 이용한 *Azotobacter indicus* var. *myxogenes* L3로부터 PS-7 생산 최적화

라채훈 · 김기명¹ · 허필우² · 이성재 · 김성구*
부경대학교 생물공학과, ¹고려대학교 생명공학부, ²부산 시청 통상협력팀

Optimization of PS-7 Production Process by *Azotobacter indicus* var. *myxogenes* L3 Using the Control of Carbon Source Composition. Ra, Chae Hun, Ki Myong Kim¹, Pil Woo Hoe², Sung Jae Lee, and Sung-Koo Kim*. Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, ¹School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, Korea, ²Trade & Investment Promotion Team, Busan Metropolitan City, Busan 611-735, Korea – The proteins in whey are separated and used as food additives. The remains (mainly lactose) are spray-dried to produce sweet whey powder, which is widely used as an additive for animal feed. Sweet whey powder is also used as a carbon source for the production of valuable products such as polysaccharides. Glucose, fructose, galactose, and sucrose as a supplemental carbon source were evaluated for the production of PS-7 from *Azotobacter indicus* var. *myxogenes* L3 grown on whey based MSM media. Productions of PS-7 with 2% (w/v) fructose and sucrose were 2.05 and 2.31 g/L, respectively. The highest production of PS-7 was 2.82 g/L when 2% (w/v) glucose was used as the carbon source. Galactose showed low production of PS-7 among the carbon sources tested. The effects of various carbon sources addition to whey based MSM medium showed that glucose could be the best candidate for the enhancement of PS-7 production using whey based MSM medium. To evaluate the effect of glucose addition to whey based media on PS-7 production, fermentations with whey and glucose mixture (whey 1, 2, 3%; whey 1% + glucose 1%, whey 1% + glucose 2% and glucose 2%, w/v) were carried out. Significant enhancement of PS-7 production with addition of 1% (w/v) and 2% (w/v) glucose in 1% (w/v) whey media was observed. The PS-7 concentration of 2% glucose added whey lactose based medium was higher than that of 1% glucose addition, however, the product yield Y_{PS} was higher in 1% glucose added whey lactose based MSM medium. Therefore, the optimal condition for the PS-7 production from the *Azotobacter indicus* var. *myxogenes* L3, was 1% glucose addition to 1% whey lactose MSM medium.

Key words: *Azotobacter indicus* var. *myxogenes* L3, heteropolysaccharide-7, whey, 5-L fermentor

서 론

미생물에서 생산되는 다당류는 고유한 구조적 특징에 기인한 물성과 다양한 기능성으로 인해 식품, 의약품 등 생물 산업에서 널리 이용되고 있다[8]. 이들 다당류들 중 *Azotobacter indicus* var. *myxogenes*로부터 생산되는 다당류인 heteropolysaccharide-7(PS-7)은 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 포도당과 rhamnose 그리고 uronic acid를 주성분으로 하여 *Sphingomonas paucimobilis* strain I-886이 생산하는 다당류와 유사한 2-deoxysugar와 2-deoxy-D-hexauronic acid를 포함하고 있다[3, 4]. PS-7의 물성은 gellan gum과 비슷하며 xanthan과 비교했을 때 약 2배 이상의 점성을 가지고 있으며 뛰어난 가소성을 가지고 있다. 또한 안정성, 수분함유능,

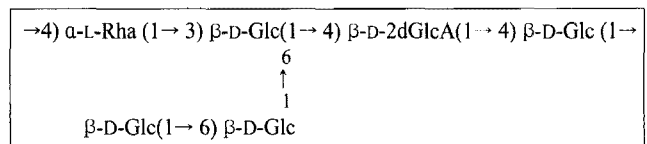


Fig. 1. Primary structure of PS-7 from *Azotobacter indicus* var. *myxogenes* ATCC 21423. Rha: rhamnose, Glc: glucose, 2dGlcA: 2-deoxy- glucuronic acid.

점착성, 윤활성 등의 성질을 현재 이용하여 페인트, 잉크, 섬유, 필름 등의 분야에서 산업적으로 응용되고 있다. *Azotobacter indicus* var. *myxogenes*는 토양유래 미생물로서 제한된 탄소원의 환경에서 metabolic pattern을 바꾸어 다양한 성분들을 탄소원으로 이용하여 생존한다. 이런 균의 특성을 이용하여 제한된 질소원 환경에서 다당류 생산을 향상시킬 수 있다[9]. 포도당을 비롯한 정제된 당을 이용한 발효 기법은 대체적으로 많은 비용이 소모되는 단점이 있어 정제 당을 대체할 수 있는 방법으로서 당을 함유하는 산업 부산

*Corresponding author

Tel: 82-51-629-5868, Fax: 82-51-620-6188

E-mail: skkim@pku.ac.kr

물을 이용하는 방법이 많이 시도되고 있다. 이러한 방법은 저가의 기질을 이용하여 고부가가치의 산물을 생산하는 경제적인 측면뿐만 아니라, 환경적으로 문제가 될 수 있는 부산물을 유용하게 이용함에 따라 환경적인 측면으로도 부가적인 효과를 노릴 수 있다. 유청(whey lactose)은 유가공산업에서 흔히 생산되는 부산물로서 재가공시에 들어가는 비용 때문에 사료로 사용하거나 폐기처분을 하는 실정이다. 유청에는 많은 양의 유당(lactose)이 포함되어 있으며, 가용성 단백질, 미네랄, 비타민 그리고 각종 유기성분이 존재하고 있는 고영양 배지성분이다. 따라서 유당을 분해하여 발효 기질로서 사용할 수 있는 균을 이용하여 고부가가치 산물을 생산한다면 매우 유용하게 이용할 수 있는 잠재성을 가지고 있다.

Azotobacter indicus var. myxogenes L3는 *Azotobacter indicus var. myxogenes*의 변이주로서 유당 분해효소를 가지고 있는 것으로 확인되었고 이 균주는 유당이 포함된 유청을 기질로 사용했을 때 PS-7을 생산할 수 있다는 연구보고가 있다 [9]. 그러므로 본 연구에서는 유청을 본 기질로 이용하였을 때 최대의 PS-7을 생산할 수 있는 당성분의 최적조건을 결정하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

사용 균주 및 기본 배양조건

Azotobacter indicus var. myxogenes L3는 기본 유청 배지 MSM(mineral salts medium) agar plate에 배양하였다. 기본 유청 배지MSM 배지는 5.0 g/L KH_2PO_4 , 0.1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.5 mM NH_4NO_3 , 0.4 g/L Bacto yeast extract(Difco Lab., Detroit, USA), 0.2 g/L Bacto peptone, 4 g/L glucose, 16 g/L lactose, 1 mL trace minerals solution (1% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25% $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2% $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)의 조성을 가지며 pH 6.8로 조절하기 위하여 2 M NaOH를 멸균과정 전 배지에 첨가하였다. Seed culture는 3 g/L Bacto yeast extract, 10 g/L lactose, 5 g/L Bacto peptone이 포함된 yeast lactose(YL) 배지로 배양하였다.

회분 배양은 5 L 생물반응기(KF-5, KFC, Incheon, Korea)에서 working volume 3 L로 하여 30°C, 500 rpm, 1.0 vvm으로 72시간 동안 배양을 실시하였다. 유청 배지는 Dlamini와 Peiris의 방법[1]을 이용하여 20 g/L 유청에 5.0 g/L KH_2PO_4 , 0.1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL의 trace mineral solution을 첨가하여 사용하였다.

유청 배지에 탄소원 첨가

Glucose, galactose, fructose 그리고 sucrose를 유청 배지(whey lactose)에 첨가되는 탄소원으로 사용하였다. 총 20 g/L의 탄소원 중 첨가된 탄소원은 0%(20 g/L whey lactose),

25%(15 g/L whey lactose, 5 g/L첨가탄소원), 50%(10 g/L whey lactose, 10 g/L 첨가탄소원), 75%(5 g/L whey lactose, 15 g/L첨가탄소원) 그리고 100%(20g/L첨가탄소원)로 유청 배지에 첨가하였다. 탄소원은 증류수에 용해하여 따로 멸균하여 배지에 첨가하였다. 배양은 진탕 배양기에서 200 rpm으로 30°C, 24시간 동안 배양한 seed culture를 250 mL baffled Erlenmeyer flask에 50 mL씩 배지에 5%의 양으로 접종하여 같은 조건으로 72시간 동안 배양하였으며 건조중량(DCW, Dry Cell Weight, g dcw/L), 점도(Viscosity, cP), PS-7의 생산량(g/L)을 측정하였다.

일반분석

균체증가량과 PS-7 생산량은 Wu[9]의 방법으로 측정하였다. 잔당 측정은 phenol sulfuric acid method를 사용하였다 [2]. 잔당은 최초 첨가된 당의 총량에 대한 퍼센트로 나타냈다. 물성측정은 Brookfield programmable LVD-VIII digital viscometer (Brookfield engineering laboratories, Stoughton, MA, USA)를 이용했으며 adapter로 SC4-34 spindle을 사용하였다.

결과 및 고찰

유청 배지첨가 탄소원에 따른 PS-7의 수율 변화

유청 배지를 배지로 사용할 경우 일반적으로 다당류의 생산량은 낮고 균체의 성장이 높게 나오는 경향이 있다[9]. 이는 유청에 포함된 질소성분에 의해 C/N ratio가 낮아서 균체 성장이 촉진되므로 많은 양의 당성분이 균체 성장에 사용되는 결과로 볼 수 있다. 그래서 유청 배지를 배지로 하고 첨가한 각 탄소원의 PS-7생산 효과를 살펴보면 fructose, glucose와 sucrose의 첨가가 PS-7의 생산을 다른 당에 비해 향상시킴을 알 수 있었다(Fig. 2). 그러나 galactose의 경우 첨가량이 증가될수록 오히려 PS-7의 생산량이 감소되는 경향을 나타내었다. 절대량의 비교에 있어서는 glucose의 첨가가 fructose나 sucrose에 비해 PS-7 생산에 나은 효과를 보이고 있지는 않았으나 가격이나 미생물의 이용성을 고려할 때 glucose 첨가로 PS-7 생산이 가장 합리적인 것으로 판단된다. 이는 Wu[9]의 논문에서 *Azotobacter indicus var. myxogene*가 glucose-generating sugars를 기질로 사용했을 때 PS-7 생산을 증가시킨다는 보고와도 일치한다. 비용적인 측면과 PS-7의 생산 경향을 비교해봤을 때 sucrose의 경우는 비효율적인 측면, fructose, galactose는 PS-7의 생산경향 측면으로 인해 glucose를 유청에 첨가할 탄소원으로 선택하는 것이 적절하다고 판단되었다.

따라서, 유청 배지만 사용한 경우 다른 탄소원을 첨가하였을 경우보다 높은 균체생산량을 보여 주고 있다. 즉 유청만을 사용하였을 경우는 많은 균체량 생성으로 PS-7생산량은 전체적으로 줄어드는 것을 알 수 있다(Fig. 3). Fructose

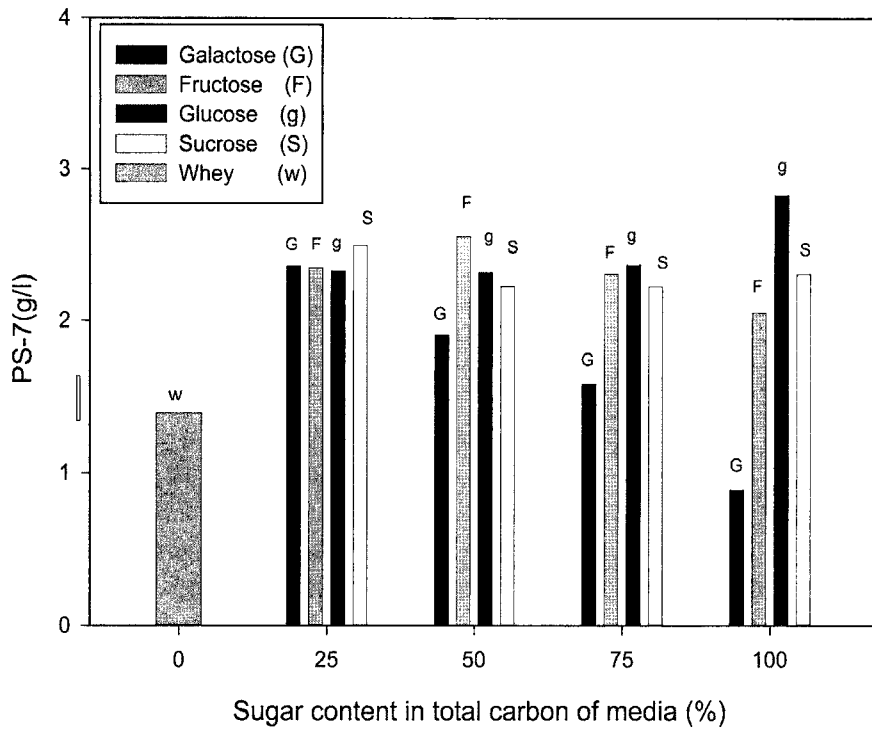


Fig. 2. Effect of carbon sources and concentration on PS-7 production of *Azotobacter indicus var. myxogenes* L3 in whey based MSM medium in shake flask (total sugar concentration 20 g/L).

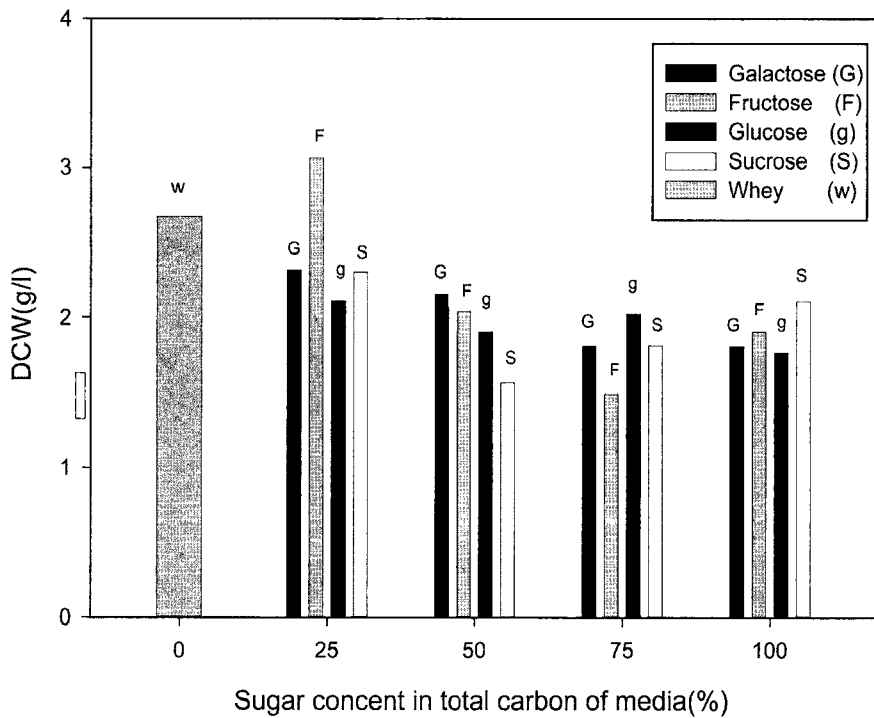


Fig. 3. Effect of carbon sources and concentration on cell growth of *Azotobacter indicus var. myxogenes* L3 in whey based MSM medium in shake flask (total sugar concentration 20 g/L).

의 경우 첨가량이 증가함에 따라 균체량이 줄어드는 것을 확인할 수 있으며, glucose의 경우는 균체량 변화가 많지 않은 결과를 보였다. Sucrose의 경우 50% 이상의 농도에서는 비례하여 균체량이 늘어나는 것을 관찰할 수 있었다. 전체적

으로 볼 때 50~75% 사이에서 균체생산량이 제일 낮은 것으로 판단된다.

탄소원 첨가에 따른 점성(viscosity) 정도를 관찰하면 전체적으로 첨가당의 농도를 높여 갈수록 점성이 증가하는 것을

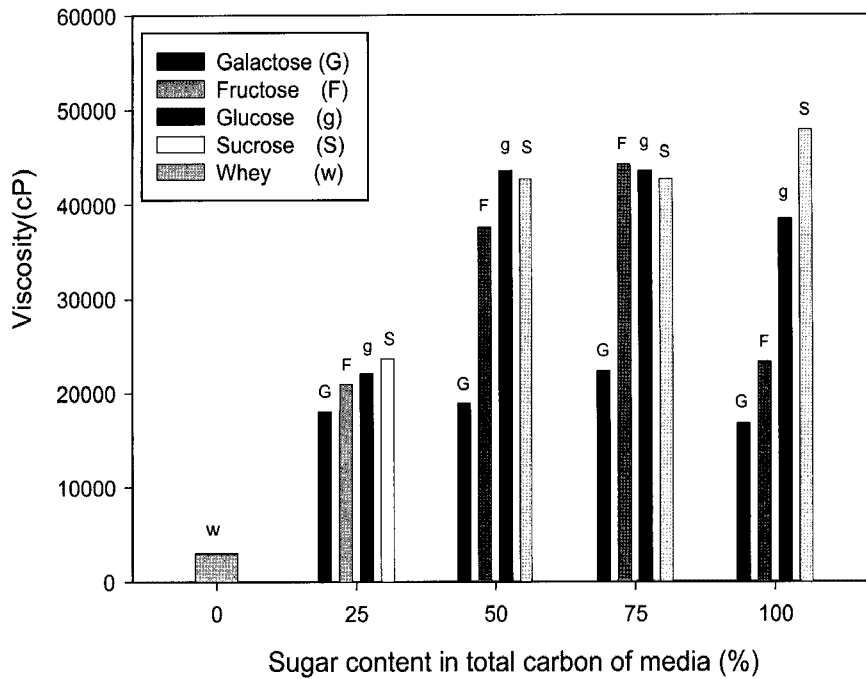


Fig. 4. Effect of carbon sources and concentration on Viscosity of *Azotobacter indicus* var. *myxogenes* L3 in whey based MSM medium in shake flask (total sugar concentration 20 g/L).

볼 수 있다(Fig. 4). 유청 배지의 경우 생산된 PS-7의 점도가 300 cP로 매우 낮은 점도를 나타내고 있다. Sucrose, glucose와 fructose의 경우 거의 정비례하여 점성이 증가하다가 첨가량이 50% 이상에서는 변화를 나타내지 않았다. galactose첨가의 경우는 점도의 변화가 거의 없다는 것을 알 수 있다. Flask 배양으로는 PS-7 생산의 경우로 기본 유청 배지MSM 배지에 glucose를 첨가하는 것이 최적이라는 것을 확인하였다. 이를 기초로 기본 유청 배지에 glucose 첨가량을 조절하여 5 L 발효조로 PS-7을 생산하였다.

기본 유청 배지에 glucose첨가량 변화에 따른 PS-7의 생산량의 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 유청 1%, 2%, 3%, 유청 1%+glucose 1%, 2%, 그리고 glucose 2%를 배지로 PS-7의 생산량을 살펴본 결과 유청과 glucose를 함께 첨가한 것이 유청이나 glucose 만을 배지의 탄소원으로 사용했을 때보다 PS-7의 생산량이 월등히 향상되는 것을 알 수 있었다. 유청 1%, 유청 2%, 유청 3%, glucose 2%를 탄소원으로 사용하였을 경우, 처음 40시간까지 PS-7의 농도가 증가하다가 이후 70시간까지는 PS-7의 농도의 변동이 없었다. 탄소원으로 유청과 glucose를 각각 사용하는 경우 모두 PS-7의 양이 1 g/L 이상 증가되지 않았다. 유청 1%에 glucose 1%를 혼합한 경우에는 20시간까지 급격한 PS-7농도의 증가를 관찰할 수 있었으며 유청과 glucose를 배지로 단독 사용했을 경우보다 3배의 농도로 3 g/L의 PS-7을 생산했다. 한편 유청 1% 배지에 glucose 2%를 첨가하여 배양한 경우는 PS-7의 농도가 4 g/L으로 실험군에서 최고의 생산량을 얻을 수 있었다.

배지 내 glucose 농도 변화에 따른 점성(viscosity)의 변화는 PS-7의 생산량의 변화와 비슷한 패턴을 나타내었다. 유청을 배지로 단독으로 사용하였을 경우 점성의 변화가 나타나지 않았으며, glucose 2%를 단독으로 사용하였을 경우는 10,000 cP를 나타내었다. 그러나 유청과 glucose를 혼합하여 탄소원으로 사용한 경우 유청 1%와 glucose 1%를 배지로 사용한 경우 60,000 cP를, 유청 1%와 glucose 2%일 경우에는 65,000 cP의 점성을 나타내었다. 이는 PS-7의 생산량이 많아질수록 점도가 증가한다는 것을 고려해 볼 때 당연한 결과이지만 또한 점성의 증가가 PS-7단위 g당 증가분 보다 높다는 것으로 보아 분자량의 증가도 함께 일어난다는 것을 알 수 있었다.

Residual sugar에 대한 결과는 유청 1%에 glucose 1% 배지의 경우 residual sugar는 25~30시간 발효가 진행되면서 거의 소모 되어서 낮은 농도로 떨어짐을 볼 수 있다. 반면 유청 배지(1%, 2%, 3%)와 유청 1%+glucose 2% 배지의 경우 30~40%의 미사용 당이 존재함을 알 수 있었다. 특히 유청 배지의 경우 PS-7 생산량이 적고 또한 점도도 낮음을 관찰하였는데 이는 flask 배양시와 동일한 결과를 보여 주었다. 이러한 유청 배지의 결과는 유청내에 포함된 질소성분이 균체 성장을 촉진하여 PS-7의 생산량을 감소시킨다는 것을 알 수 있었다. 즉 탄소/질소비(C/N ratio)가 유청 배지에서 낮으므로 다당류인 PS-7생산량이 낮다는 것이다. 유청 배지에 glucose의 첨가가 PS-7의 생산량에 중요한 영향을 미치고 있다는 것을 알 수 있었으나 과량의 glucose 첨가로 PS-7생산량 증가에는 영향을 주지 않는다. Wu[9]는 *Azotobacter*

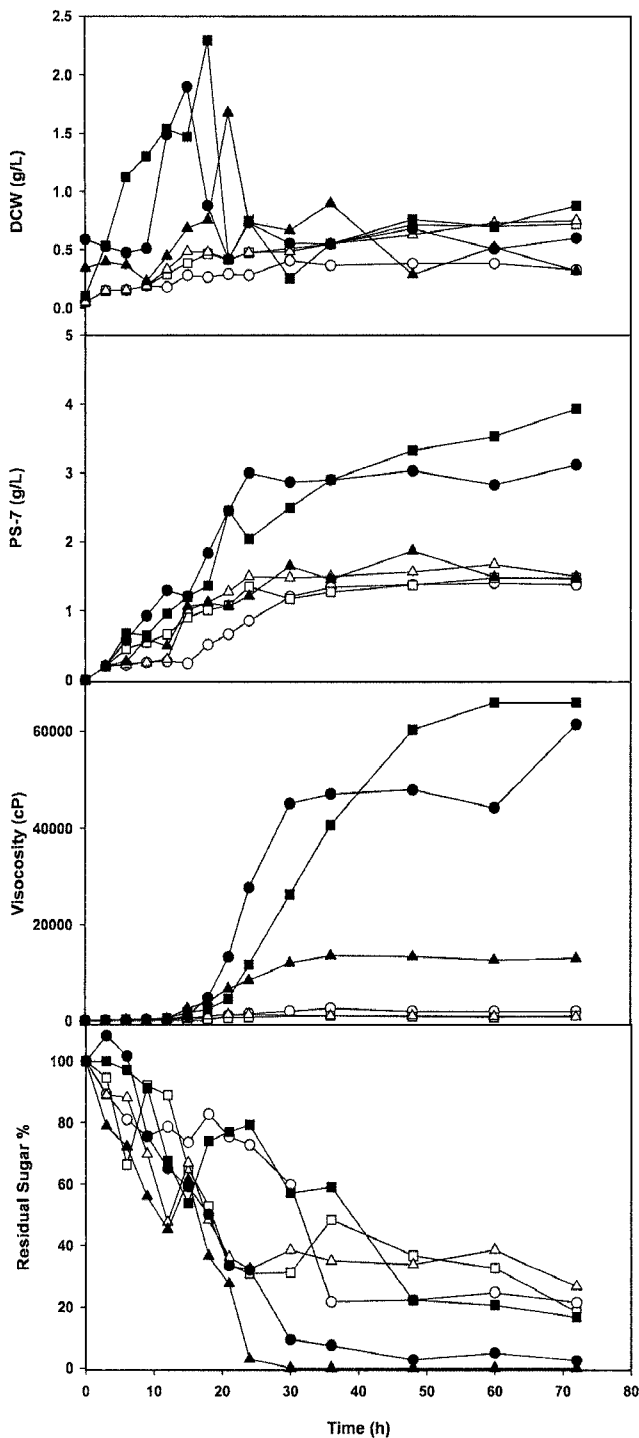


Fig. 5. Effect of carbon composition of medium on cell growth and PS-7 production of *Azotobacter indicus* var. *myxogenes* L3 (○, whey 1%; □, whey, 2%; △, whey 3%; ●, whey 1% + glucose 1%; ■, whey 1% + glucose 2%; ▲, glucose 2%).

indicus var. *myxogene* L3의 galactosidase의 activities에 대하여 조사를 하면서, *Azotobacter indicus* var. *myxogene* L3의 lactose 대사가 다른 박테리아와 마찬가지로 glucose에 의해 catabolite repression[6, 7]하에 있다는 것을 제시하였으며 glucose의 사용 후 lactose가 흡수되어서 PS-7으로 전환된다고 보고하였다. 그래서 소량의 glucose첨가가 PS-7 생산

에 유효하였다고 판단된다. Jurgен[5]은 질소가 통제된 상황에서 호기적으로 자라는 세포들은 생물 균체 생산(biomass production)을 위해 일정한 C/N(carbon/nitrogen) ratio를 유지해야 하며 이 이상의 추가 탄소원을 저장하여 exopolysaccharide로 전환한다고 제안하였다. 이와 같이 C/N ratio가 polysaccharide의 생산에 중요한 역할을 한다는 결과를 실험에서 보여주었다. 본 실험의 결과에서도 배지에서 적절한 C/N ratio가 다당류 발효에서 중요한 변수임을 보여주었다.

요 약

Flask 배양으로 기본 유청 배지MSM를 배지로 하고 첨가한 각 탄소원의 PS-7생산 효과를 살펴보면 fructose, glucose와 sucrose의 첨가가 PS-7의 생산을 다른 당에 비해 항상시킴을 알 수 있었다. 그러나 galactose의 경우 첨가량이 증가될수록 오히려 PS-7의 생산량이 감소되는 경향을 나타내었다. 여러가지 배양 변수를 고려한 결과 glucose의 첨가가 최적임을 확인하였다.

5 L 발효조에 의한 PS-7 생산의 경우 유청과 glucose를 함께 첨가한 것이 유청과 glucose 만을 배지의 탄소원으로 사용했을 때 보다 PS-7의 생산량이 월등히 향상되는 것을 알 수 있었으며, 유청 1%와 glucose 1% 배지의 경우 PS-7 생산량이 3 g/L를 생산하였다. 유청 1%와 glucose 2% 배지의 경우 4 g/L의 PS-7의 생산하였으나 잔당량이 30~40%가 남아 생산효율(yield)면에서는 떨어짐을 알 수 있었다. 배지내 Glucose농도 변화에 따른 점성(viscosity)의 변화는 PS-7의 생산량의 변화와 비슷한 패턴을 보이지만 분자량 증대에 따른 점도의 증가는 훨씬 높게 나타났다.

본 실험의 결과 일반적으로 C/N ratio가 다당류인 PS-7생산에 중요한 역할을 하고 있으며, 유청 1%+glucose 1% 배지를 사용할 때 높은 점도와 수율의 PS-7을 얻을 수 있는 최적 배지임을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2005학년도 부경대학교 기성회 학술연구비에 의하여 연구되었음.

라채훈은 부산광역시지원 BB21사업에서 장학금을 지원받음에 감사 드리며, 이성재는 교육 인적 자원부지원 해양바이오식의약 전문인력양성사업에서 장학금(2006-2007)을 지원받음에 감사 드립니다.

REFERENCE

1. Dlamini, A. M. and P. S. Peiris. 1997. Production of high viscosity whey broths by lactose utilizing *Xanthomonas campestris* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1483-1485.

2. Dubois, M., Ka. 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.
3. Falk, C., P. E. Jansson, M. Rinaudo, A. Heyrad, G. Widmalm, and P. Hebbbar: 1996. Structural studies of the exocellular polysaccharide from *Sphingomonas aucimobilis* strain I-886. *Carbohydr. Res.* **285**: 69-79
4. Gulin, S., A. Kussak, P. E. Jansson, and G. Widmalm. 2001. Structural studies of S-7, another exocellular polysaccharide containing 2-deoxy-arbino-hexuronic acid. *Carbohydr. Res.* **311**: 285-290.
5. Jurgen, O. 2000. Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 321-333
6. 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.
7. Saier, M. H., G. M. Cook, J. Deutscher, I. T. Paulsen, J. Reizer, and J. J. Ye. 1996. Catabolite repression and inducer control in gram-positive bacteria. *Microbiol.* **142**: 217-230
8. Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* **16**: 41-46.
9. Wu, J. R., J. H. Son, K. M. Kim, S. W. Nam, J. W. Lee, and S. K. Kim. 2005. Optimization of heteropolysaccharide-7 production by *Beijerinckia indica*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 117-122.

(Received Jan. 11, 2008/Accepted Feb. 29, 2008)