

Optimal Condition for the Production of Exopolysaccharide by Marine Microorganism 96CJ10356

이현상, 박신혜, 고성환, 이종호*, 이홍금

한국해양연구소 미생물실험실, 성균관대학교 생물학과*

전화 (0345) 400-6243, FAX (0345) 408-5934

Abstract

Marine microorganism strain 96CJ10356 produced exopolysaccharides, designated as EPS-R. To optimize culture conditions for the production of EPS-R, carbon, nitrogen, mineral salt, temperature, and pH were examined. STN medium was suggested as follow; sucrose 20, tryptone 10, NaCl 10, MgSO₄ 5, CaCl₂ 1, KH₂PO₄ 0.0076, K₂HPO₄ 0.0083, FeCl₂ 0.005, MnCl₂ 0.001, NaMoO₄ 0.001, ZnCl₂ 0.001 (g/l) and pH 7.0. About 9.23 g/l of EPS-R was obtained from the STN medium after cultivation for 120 h at 25°C in 5-liter jar fermentor with an aeration rate of 0.17 vvm. Apparent viscosity and flocculation activity of the culture broth were increased with the production of the EPS-R and the maximal values were reached to 415 cp and 1400 units/ml against 0.5 % activated carbon, respectively.

서론

많은 미생물들이 자연환경에서 세포외로 폴리머를 (extracellular polymeric substance, EPS) 분비하면서 생물막과 (biofilm) 같은 군집을 이루며 성장한다. 흔히 EPS로 표시되는 미생물성 다당류인 extracellular polysaccharide는 생물막에서 가장 많이 발견되는 EPS의 주성분으로 보고되었으며, 최근에는 단백질, 핵산, 인지질 등도 EPS의 주요 성분으로 발견되고 있다.⁽²⁾

미생물성 다당류는 조건에 따라 겔 형성능, 유화 안정능, 표면장력의 조절능, 물흡수능, 점착능, 윤활능 및 필름 형성능 등의 광범위한 기능성을 갖고있어 각종산업에 이용되고 있다. 또한 중금속 흡착능, 항종양 활성 및 항게양능을 갖는 EPS가 보고되어, 신 바이오 소재로서 산업적 잠재력이 크다.

다양한 생물자원 소재로부터 새로운 EPS의 발견이 요구되며, 현재까지는 *Zoogloea* sp.가 생산하는 zooglan⁽³⁾ 및 *Pseudomonas* sp.⁽⁴⁾, *Cyanotheca* sp.⁽⁶⁾, *Altermonas macleodii*⁽⁷⁾ 등에 의한 EPS가 보고되었고, 한국 연안으로부터 다당류를 생성하는 해양세균에 대한 보고는 *Zoogloea* sp. 정도로 그 수가 많지 않다.⁽¹⁾

본 연구에서는 제주도 서귀포 및 마라도 해안에서 분리한 새로운 균주 96CJ10356으

로부터 다당류 생산을 위한 배양조건을 조사하였다.

재료 및 방법

해양성 미생물 96CJ10356을 YMG 배지를 기본배지로 EPS-R 생산에 이용하였으며, 다당류 생산에 대한 영양원의 영향을 알아보기 위하여 해수가 첨가된 YMG 배지에 조사하고자 하는 영양원의 농도를 달리하여 배양하여 EPS-R의 생산을 비교하였다. 탄소원 (2%) 및 질소원 (0.5%)의 영향을 확인하였으며, NaCl (0~20%), MgSO₄ (0~2%), CaCl₂ (0~2%), 인산염 (1~50 mM)을 첨가하여 다당류 생성에 대한 mineral salt의 영향을 실험하였다. 온도와 pH의 영향을 각각 20~40℃와 3~11범위에서 조사하였다. 세포 성장 및 다당류 생성량은 건조중량(g/l)으로 측정하였다. Viscostar-R을 이용하여 배양액의 겔보기 점도를 측정하였으며, Nakamura의 방법에 따라 배양액의 응집활성을 측정하였다.⁽⁵⁾

결과 및 고찰

96CJ10356은 sucrose를 탄소원으로, tryptone을 질소원으로 하는 배지에서 가장 높은 수율의 EPS-R 생성을 하였으며, 탄소원과 질소원의 최적비율은 2:1 이었다 (Fig. 1). 성장 및 다당류 생성에 NaCl, MgSO₄, CaCl₂를 필수적으로 요구하여 (각각 1%, 0.5%, 0.1%의 최적농도) 해양성 세균임을 다시 한번 확인하였으며 (Fig. 2), 1 mM의 인산염을 첨가했을 때 EPS-R의 수율이 가장 높았다 (Fig. 3).

다당류 생성에 대한 최적 온도와 pH는 각각 25℃ (Fig. 4), pH 7 (Fig. 5) 이었다. 다당류를 생성하는 해양성 세균 96CJ10356을 5 liter 발효조를 사용하여 확정된 최적 조건 (Table 1)에서 배양한 결과, 배양시간에 따라 다당류의 생성이 점차 증가하여 9.23 g/l의 다당류를 생성하였으며, 다당류 생성과 함께 점도 및 응집활성도 증가하여 120시간 후에 각각 419 cps, 1400 unit/ml을 나타내었다 (Fig 6).

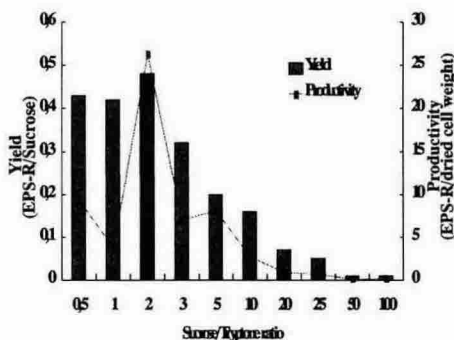


Figure 1. Effect of C/N ratio on the EPS-R production by the strain 96CJ10356. The bacterium was cultured in YMG medium (pH 7.0) containing 2% sucrose as carbon source and tryptone as a nitrogen source at 25℃ and 120 rpm for 7 days.

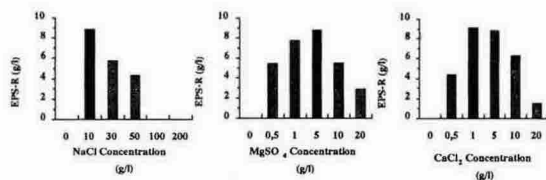


Figure 2. The effect of NaCl, MgSO₄, and CaCl₂ on the EPS-R production by the strain 96CJ10356. The strain was cultured in YMG medium (pH 7.0) at 25°C and 120 rpm for 7 days.

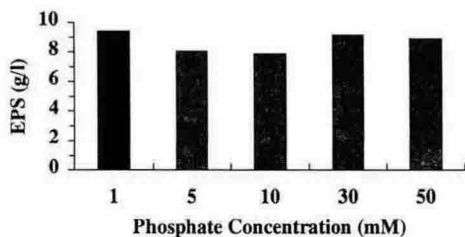


Figure 3. Effect of phosphate on the EPS-R production by the strain 96CJ10356. The strain was cultured at 25°C and 120 rpm for 7 days.

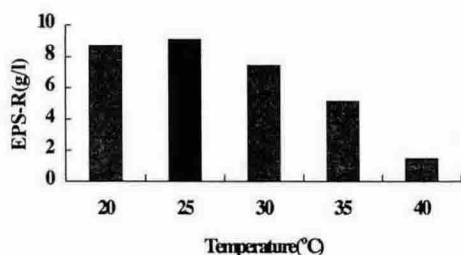


Figure 4. Effect of temperature on the EPS-R production by the strain 96CJ10356. The strain was cultured at 120 rpm for 7 days.

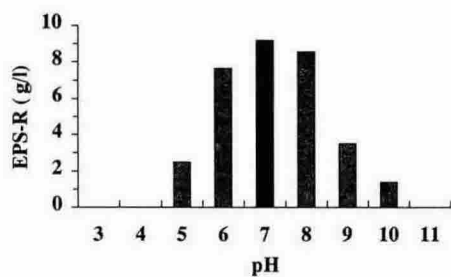


Figure 5. Effect of pH on the EPS-R production by the strain 96CJ10356. The stain was cultured in YMG medium at 25°C and 120 rpm for 7 days.

Component	Concentration (g/l)
Sucrose	20
Trypton	10
MgSO ₄	4
CaCl ₂	0.7
KH ₂ PO ₄	0.07
K ₂ HPO ₄	0.08
FeCl ₃	0.005
MnCl ₂	0.001
Na ₂ MoO ₄	0.001
ZnCl ₂	0.001

Table 1. Composition of STN medium for the production of EPS-R by the strain 96CJ10356.

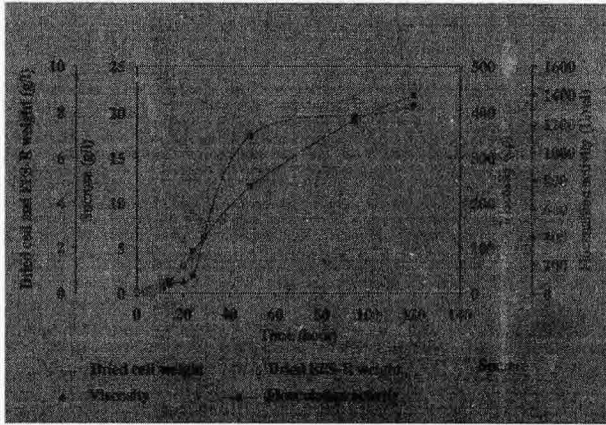


Figure 6. Time course of the EPS-R production by the strain 96CJ10356. The strain was cultured in a 5-liter jar fermentor with 3 liters of STN medium at 25°C, 300 rpm and 0.17 vvm.

감사

본 연구는 한국과학기술부의 BIOTECH2000 사업으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 장재혁, 배승권, 김봉조, 하순득, 공재열 (1998) 해양세균 *Zoogloea* sp.로부터 유용 다당류의 생산에 미치는 발효조건의 영향. *한국생물공학회지* **13**: 303-307
2. Dignac, M.-F., V. Urbain, D. Rybacki, A. Bruchet, D. Snidaro, and P. Scribe (1998) Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Wat. Sci. Tech.* **38**: 45-53 In: Wingender, J., T. R. Neu, and H.-C. Flemming(eds.) *Microbial extracellular polymeric substances - characterization, structure and function*. Berlin: Springer. pp 1-19
3. Ikeda, F., H. Shuto, T. Fukui, and K. Tomita (1982) An Extracellular Polysaccharide Produced by *Zoogloea ramigera* 115. *Eur. J. Biochem.* **123**: 437-445
4. Matsuda, M., and W. Worawattanamateekul (1993) Structural Analysis of a Rhamnose-Containing Sulfated Polysaccharide from a Marine *Pseudomonas*. *Nippon Suisan Gakkaishi.* **59**: 875-878
5. Nakamura, J., S. Miyashiro and Y. Hirose (1976) Screening, isolation and some properties of microbial cell flocculants. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 377-383
6. Philippis, R., M. C. Margheri, E. Pelosi, and S. Ventura (1993) Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *J. Appl. Phycol.* **5**: 387-394
7. Raguenes, G., P. Pignet, G. Gauthier, A. Peres, R. Christen, H. Rougeaux, G. Barbier, and J. Guezennec (1996) Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 67-73