

Xanthomonas malvacearum 突然變異株의 Heteropolysaccharide 生產性에 關하여

李 啓 瑰·金 美 扇·朴 賛 英*

서울大學 農科大學 食品工學科, *豐韓醸酵
(1987년 1월 20일 수리)

Studies on Production of Heteropolysaccharide by Mutant
of *Xanthomonas malvacearum*

Ke-Ho Lee, Mi-Sun Kim and Chan-Yung Park*

Department of Food Science & Technology, College of Agriculture,
Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

The mutant with high productivity, *X. malvacearum* SNUF 560-6, was acquired from the *X. malvacearum* SNUF 560 with low productivity by UV-light irradiation. It was preserved in lyophilized stock culture and it was transferred to PDA slant to maintain viability fortnightly. Fermentations were started by retransferring to MY agar slant from PDA stock culture. The experiments for optimal xanthan gum production were studied in a chemically defined medium. Of the carbon and nitrogen sources tested, 0.4% sucrose medium and 10mM glutamic acid medium yielded the highest xanthan gum production respectively. The addition of 10g/l succinic acid stimulated xanthan gum production. Also 65mM PO₄⁻³ (12.6g/l KH₂PO₄) was effective on xanthan gum production. Finally, medium 1 and medium 2 which have high xanthan gum production potencies were achieved in this study.

The components of medium 1 and medium 2 were as follows:

Medium 1 : sucrose 40g/l glutamate 10mM

PO₄⁻³ 54mM (KH₂PO₄ 12.65g/l)

Citrate 2g/l

MgSO₄·7H₂O 0.2g/l

H₃BO₃ 0.005g/l

ZnO 0.006g/l

FeCl₂·6H₂O 0.0024g/l

CaCO₃ 0.02g/l

Medium 2 : Sucrose 40g/l (NH₄)₂SO₄ 2g/l

PO₄⁻³ 65mM (KH₂PO₄ 12.65g/l)

Succinate 10g/l

MgSO₄·7H₂O 0.02g/l

H₃BO₃ 0.06g/l

ZnO 0.006g/l

이 논문은 1986년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

$\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0024g/l
 CaCO_3 0.02g/l

緒 論

植物病原性 細菌인 *Xanthomonas*屬 菌株들은細胞外多糖을 生産하여 宿主植物體內의 導管을 폐쇄하여 植物體를 枯死케하는 원인으로 알려져 있으며, 이 病原菌을 培養하여 生産한 多糖類가 그 植物體內에서 생긴 多糖과 同一한 物質¹⁾임을 보고 한바 있고 이미 알려진 150여종²⁾의 菌體中 *X. campestris*, *X. phaseoli*, *X. carotae*, *X. malvacearum* 등이 많은 量의 多糖類를 生산하는 것으로 보고³⁾되어 있다.

一般的으로 *Xanthomonas*屬의 細菌이 生산하는 多糖類를 xanthan gum이라 하며 *Xanthomonas campestris*가 生산하는 polymer가 가장 높은 粘度를 나타냄을 보고⁴⁾하였다.

Xanthan gum은 분자량 約 2×10^6 정도의 polymer로 그 구조는 D-glucose(2.8M), D-mannose(3.0M), D-glucuronic acid(2.0M)가 主鎖를 이루고, 側鎖로 acetic acid(~4.7%)는 O-acetyl ester로 pyruvic acid(~3%)는 ketal linkage를 이루고 glucuronic acid는 K, Na, Ca鹽으로存在함을 밝힌 바^{5~7)}있다. 그 성질로서 pH 안정성^{8~9)}, 온도안정성,^{10~11)} 응제와 鹽과의 相容性^{8,12)}等 加工에 便利하고 有用한 特性으로 食品工業¹³⁾과 一般工業^{14~16)}에서 thickening agent, swelling agent, stabilizer, emulsifier, clarifying agent 등으로 쓰이고 있어 그 用途는 넓다.

Xanthan gum의 生產性 및 菌體의 增加에 미치는 영향등은 Schweiger¹⁷⁾, Lilly³⁾, Moraine¹⁸⁾, Rogovin¹⁹⁾, Souw²⁴⁾等의 연구뿐 아니라 大量生産의in 方法^{20~27)} 및 改變法^{28~37)}등이 보고되었다.

本論文에서는 *X. malvacearum*을 親菌株로 하여 보다 더 강력한 生産性의 突然變異株를 選拔하고자 UV-mutation시켰으며 合成釀酵培地上에서 xanthan gum 生産능력을 screen한 후 가장 生産능력이 우수한 突然變異株 *X. malvacearum* SAF-560-5를 選定하였으며 이 菌株가 多量의 xanthan gum을 生산하는데 必要한 釀酵工學의 最適條件을 檢討하였기에 보고 한다.

材料 및 方法

1. 菌 株

서울大學校 農大 食品工學科에 保管하고 있는 *Xanthomonas malvacearum* SNUF-560

2. 培 地

1) 菌株保存用 培地

A. Potato dextrose agar (PDA) media(pH 6.8)

*Potatoes 200g	Dextrose 20g
Agar 15g	Distilled water 1l

Autoclaved for 15 min. at 15 lbs pressure(121°C)

*Inquision from sliced potatoes

B. Malt yeast extract (MY) media (pH 7.0)

Malt extract 3g	Yeast extract 3g
D-glucose 10g	Peptone 3g
Distilled water 1l	

Autoclaved for 15min. at 15 lbs pressure(121°C)

2) 釀酵合成培地 (pH 7.0)

*D-glucose 20g	KH_2PO_4 5g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g	Citric acid 2g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g	H_3BO_3 0.006g
ZnO 0.006g	$\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0024g
CaCO_3 0.02g	Distilled water 1l

Autoclaved for 15min. at 15 lbs pressure(21°C)

* Autoclaved separately

3. 紫外線照射 및 突然變異株의 選擇

MY broth에서 4~6時間 培養後 菌株을 遠沈(7,000F, 30min) 操作으로 集菌하고 生理的食鹽水로 洗滌한 다음 菌 suspension 10mL를 一定한 電壓에서 20分以上 켜놓은 紫外線殺菌燈(2,080 erg/mm²)의 수직하 30cm, magnetic stirrer 위에 petri dish를 놓고 70rpm으로 교반하면서 30, 40, 60sec 照射後, MY agar의 平板培養에서 나타나는 colony를 釀酵合成培地에 接種하여 rotary shaker(oscillation 240 rpm)로 29~30°C에서 96時間 培養한 後에 培養液의 "flow-time"을 측정하여 粘度가 높은 突然變異株를 選擇하였다.

4. 菌株의 保管

PDA 斜面培地에 2週間마다 移植하여 0°C 冷藏庫에서 保存하고 MY 斜面培地에 移植하여 3日 以內에 酸酵合成培地에 移植하고 酸酵實驗을 하였다.

5. 菌株의 生育曲線

MY 斜面培地에서 1白金耳를 따서 酸酵合成培地에 接種하고 rotary shaker(oscillation 240 rpm)로 29~35°C에서 24時間 培養後 세로운 酸酵合成培地에 10% 接種하여 1~2時間마다 spectrophotometer 660nm에서 optical density를 측정하여 複 석 후 生育曲線을 작성하였다.

6. Xanthan gum 生產

MY 斜面培地에서 酸酵合成培地(50ml/500ml-erlenmyer flask)에 1白金耳 接種하여 rotary shaker(oscill, 240 rpm)에서 29~30°C로 24時間 培養하여 이를 starter로 하고 새로운 酸酵合成培地(50ml/500ml erlenmyer flask)에 10%가 되게 接種하여 rotary shaker(oscill, 240 rpm)로 30°C에서 96時間 培養하여 xanthan gum 生產能을 比較検討하였다.

7. 培養液의 分析

- 1) pH 測定 : E. Merck pH社 試驗紙 및 zero-matic pH meter.
- 2) 粘度測定 : Brookfield viscometer model LVT(25°C)
- 3) 糖定量 : 培養液에서 菌株와 xanthan gum 을 除去한 液을 酸加水分解(0.1N-HCl 30分 加水 함)한 後 Somogi-Nelson法으로 定量하였다.

4) 菌體量測定 :

- A. 培養液을 遠心分離(12,000G, 30分)한 後 生理的食鹽水로 洗滌하여 菌體를 모아 105°C乾燥器에서 恒量에 達할때까지 精조하여 건조 균체량을 측정하였다.
- B. 洗滌된 菌體를 증류수에 溶解시켜 複 석 하여 spectrophotometer 660nm에서의 OD로서 균체량을 측정하였다.

5) Xanthan gum의 分離

培養液을 증류수로 複 석 하여 300CP 以下가 되게 점도를 낮춘 다음 遠心分離(12,000G, 30分)하여 上澄液에 alcohol沈澱時 xanthan gum의 回收

率을 높이기 為하여 鹽類의 添加가 有效하고 한 Cadmus²⁸⁾ 方法에 따라 鈉 KCl 溶液 1%를 加하여 搅拌한 後 methanol을 2倍量 加하여 다시 搅拌하여 xanthan gum을沈澱시켰다. 이 液을 遠心分離(12,000G, 30分)하고沈澱物에 다시 acetone을 加하여 다시 遠心分離(12,000G, 30分)하여 脱水·脫色後 55~57°C 乾燥器에서 乾燥시켰다.

結果 및 考察

1. 紫外線照射에 依한 突然變異株選定

供試菌株인 *Xanthomonas malvacearum*에 UV-ray를 照射한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Effect of UV-ray irradiation on *X. malvacearum* SNUF-560

Irradiation dose. (sec.)	No. of X. mal. cell per ml	Death-rate. %	No. of treated colony	Rate of acquired colony. %
0	5.5×10^8			
30	6.3×10^6	98.86	3210	6.231
40	1.6×10^5	99.97	1740	6.954
60	3.2×10^4	99.994	4622	1.514

Magnetic stirrer上에 있는 petri dish속의 cell suspension에 UV-ray를 30, 40, 60sec 照射한 cell suspension을 複 석 하여 平板培養한 結果 survival rate가 1.14%, 0.03%, 0.006%이었으며一定時間 培養後 平板培地上에서 mucoid한 작은 colony(Sm)와 보다 크고 mucoid한 colony(L)가 임의의 比率로 나타났다. Sm과 L-colony를 따서 비교한豫備實驗으로 L-colony가 Sm colony보다 높은 粘度를 냈다는 것도 確認되었으므로 黃色色素를 形成하는 L-colony를 391個 임의로 選別하여 1次 變異株로 하고 screen하였다.

L-colony 391菌株에 대하여 MY broth에서 活性化시키고 이를 酸酵合成培地에 接種하여 29~30°C의 rotary shaker(oscill, 240rpm)에서 96時間 培養하여 높은 粘度를 나타내는 菌株 1個를 最終으로 選定하고 *Xanthomonas malvacearum* SNUF-560-5라 命名하고 이 變異株에 對하여 實驗을 계속하였다.

Cell suspension에 UV-ray를 40秒間 照射시킨 suspension에서 變異株의 收得率이 좋은 것으로

보아 이 菌株의 突然變異誘起 最適 照射時間은 40秒이 있다.

殺菌燈으로 쓰이는 UV-lamp는 253.7nm의 波長을 내며 DNA의 吸收波長이 260nm 근처임으로 UV-ray에 依한 變異는 DNA가 紫外線을 吸收하여 이웃해 있는 thymine base들의 dimerization에 依하여 base pair substitution이 일어나 變異가 誘起되며 visible light에 의해서 photoreactivation(正常回復)되는 것이라 생각되며一般的으로 照射最適線量은 death rate 99~99.99%인 때로 報告되어 있어 그와 비슷한 결과를 보여졌다.

2. 變異菌株의 保存

變異菌株의 back mutation 및 自然變異를 預防하기 위하여 lyophilization하여 保存하였다.

凍結乾燥된 菌을 MY broth에서 活性化시킨 MY平板培地에서 增殖시키고, PDA 培地에서 30°C, 24時間 斜面培養하여 0°C에서 保管하고 2주마다 새로운 PDA 培地에 移植하면서 酵酶實驗을 하였으나 實驗途中 菌培養液의 粘度가 낮아지는 경우가 Fig. 1에서와 같이 현저하게 나타났다.

그리므로 3個月마다 PDA 斜面培地로부터 平板培養法에서 純粹分離를 하며 能力 優秀菌株를 選定, 保管하였다.

Cadmus等²⁸⁾은 *Xanthomonas campestris*의 移植培養하는 中에 2종류의 variant가 生겼는데 최소한 14日間隔으로 MY培地에 移植하면 6번 옮겨심을 때까지 variant의 出現比率를 1:1로 즐일 수 있다고 報告한 바 있다.

3. 菌株의 自然變異

純粹分離한 後 potato dextrose agar(PDA)斜面培地에서 2週間經過한 菌을 malt yeast extract agar 平板培地에서 30°C, 48時間 培養한 後의 colony 形態를 觀察한 結果는 Table 2에서와 같다.

Corey等²⁹⁾은 *Xanthomonas phaseoli*가 4가지의 colonial variant를 갖는데 이 중 多糖類의 生

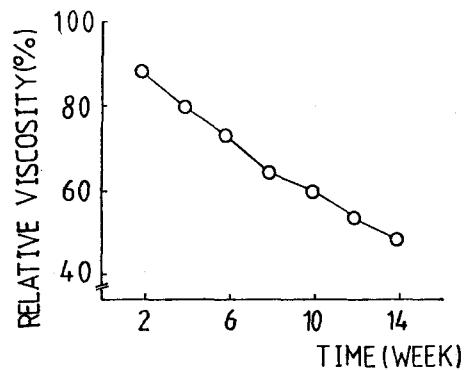


Fig. 1. Reduction rate of viscosity during preservation of *X. malvacearum* at 0°C.

產이 떨어지는 variant는 多糖生成機能의 gene數가 적어졌다는 것을 밝혔으며, Cadmus等²⁸⁾은 *X. campestris*가 2가지의 variant를 갖는다고 報告한 바 있다. 이러한 事實로 미루어 *Xanthomonas*屬의 많은 種이 colonial variation을 하는 것으로 추측할 수 있고 본 實驗에서도 variant는 UV-ray 照射後 MY平板培地에서도 0.52% 比率로 나타났다.

4. 菌의 生育과 xanthan gum의 生產

MY broth에서 活性化시킨 starter를 酵酶合成培地에 接種하고 振盪培養(oscill, 240rpm, 29~30°C)하여 1~2時間마다 菌生育度를 O.D.로서 plot 한 結果의 生育曲線은 Fig. 2와 같다.

X. malvacearum SNUF-560-5는 lag phase가 짧고, 生育開始 4時間~10時間의 logarithmic phase이며 이때의 generation time은 2.74時間이었다.

$$z = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = 2.19$$

$$td = \frac{t}{z} = \frac{6}{2.19} = 2.74(\text{hr})$$

z : 世代數, N₀ : 最小의 菌數,

N : 一定時間後의 菌數,

t : 經過時間, td : 世代時間.

Table 2. Characteristics of variant of *X. malvacearum* SNUF-560

	Pigment	Shape	Variant rate (%)
Normal	Yellow	Smooth mucoid large	94.3
Variant 1	Yellow	Rough not mucoid large	1.9
Variant 2	White	Smooth not mucoid small	3.8

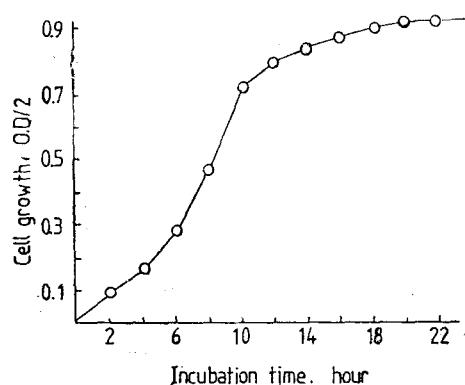


Fig. 2. Growth curve on *X. malvacearum* SNUF-560-5.

이것은 Moraine等³⁹⁾이 사용한 天然培地에서의 5.9時間과相當한 差異를 나타냈는데 Rogovin⁴⁰⁾等은 窒素源으로 (DDS) distiller dried solubles (DDS)를 使用한 培地에서 NH_4^+ 의 添加로 菌體의 生育을 約 2倍정도 앞당겼다고 報告한 바 있는데 本 實驗에서 使用한 酸酵合成培地 組成에는 이미 窒素源으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 使用했으므로 菌生育을 앞당길 수 있었던 것 같다.

10%의 starter를 酸酵合成培地에 接種하고 shaking culture(oscill, 240 rpm)를 29~30°C에서 96時間하면서 pH 糖濃度 菌體量의 消長을 보면 xanthan gum 生產性을 본結果는 Fig. 3에서와 같다.

培養過程中 pH 變化를 보면 pH control 없이 42時間동안은 약간 떨어지는 경향이 있으나 42時間

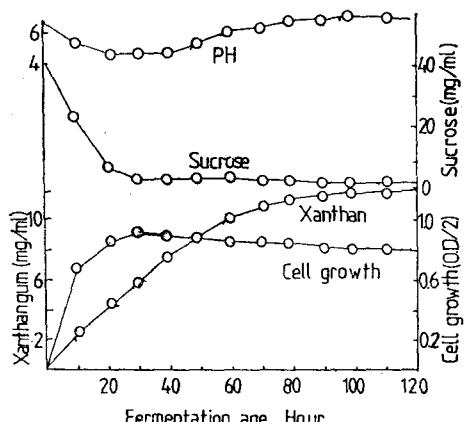


Fig. 3. Time course on sucrose consumption, cell growth xanthan gum production and pH.

以後는 pH 6~7의 安定한 수준을 유지하였고 糖濃度의 變化는 初期 24時間 동안은 添加量의 90%가 同化되었으며, 菌體의 logarithmic phase 末期인 8~10時間부터 xanthan gum의 生産이 促進되어 60時間까지는 生產速度가 旺盛하였으며 60時間以後는 완만한 증가를 보였고 96時間 인때에 가장 많이 生産되었음을 볼 수 있다. Moraine等³⁹⁾은 5% D-glucose을 包含한 天然培地에서 40時間以上 經過한 後에도 糖濃度 2% 以下로는 소모되지 않는다고 報告하였다.

5. Xanthan gum 酸酵生產 最適條件

1) 炭素源의 影響

Glucose는 xanthan gum 生產에 基本的인 炭素源으로 쓰이고 있어 本 實驗에서는 glucose 2%를 包含하는 酸酵合成培地를 基本培地로 하고 여기에 sucrose, mannose, xylose, maltose, fructose를 濃度別로 더욱 添加하여 xanthan gum 生產能의 效果를 比較한 結果는 Fig. 4에서와 같이 sucrose 3% 添加區가 最高이었고 fructose 0.5% 添加區가 다음이었고 sucrose 4~5% 添加區는 xanthan gum 生產이 減少되었으므로 阻害되는 현상이 있다. 또한 maltose, mannose 3%區와 xylose 2%에서 비슷한 傾向을 보였다.

*Xanthomonas*屬의 xanthan gum 生合成과 酶素特異性에 對하여는 아직 確實히 밝혀져 있지 않지만一般的으로 heteropolysaccharide의 生產은 培地中에 添加된 炭素源의 一部가 Entner-Doudoroff pathway, Pentose cycle, TCA cycle을 거쳐 energy와 biomass를 生產하고 나머지 monosaccharide는 sugar nucleotide의 形態로부터 polysaccharide chain으로 形成되는 것 같다.

Souw等²⁴⁾은 *X. campestris*의 炭素源으로 sucrose 4%를 使用하였을 때 좋은 效果를 얻었다고 報告하였으며 *X. malvacearum*도 sucrose와 glucose와의 比較實驗에서 Fig. 5와 같이 sucrose 4%에서 xanthan gum의 生產이 가장 좋게 나타났다. 또한 glucose의 多量添加로 菌增殖 및 xanthan gum 生產이 阻害되나 sucrose의 경우는 無視할정도로 微弱한 阻害가 있었을 뿐이었다.

2) 有機酸의 影響

Sucrose 4%를 함유하는 培地에 citrate 0.2%로 하여 有機酸 영향을 接種하는 基本培地로 하고 lactate, oxalate, pyruvate, succinate, α -keto glutarate를 농도별로 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5%

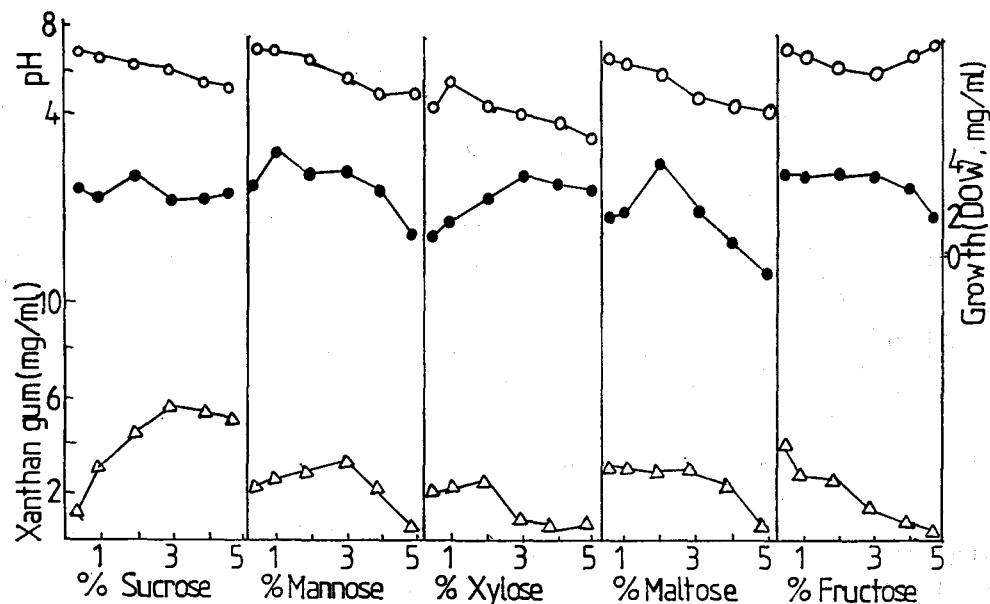


Fig. 4. Effect of addition of increasing concentration of carbohydrate on xanthan gum production and growth in the basal medium.

Basal medium: glucose 20g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/l, KH_2PO_4 5g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/l, citric acid 2g/l, H_3BO_3 0.006g/l, ZnO 0.006g/l, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0024g/l, CaCO_3 0.02g/l, pH 7.0

Rotary shaker(oscillation 240rpm), 29~30°C, 96hr

DCW; Dry cell weight, —○— pH, —●— Growth, —△— Xanthan gum.

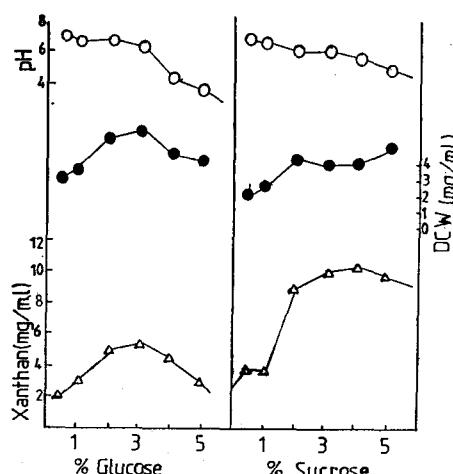


Fig. 5. Effect of sucrose or glucose concentration as carbon source on xanthan gum production.

Incubation was at rotary shaker(oscillation 240rpm) and 29~30°C, for 96hrs.

DCW; Dry cell weight —○— pH, —●— Growth, —△— Xanthan gum

2.0% 첨가하여 xanthan gum 생산성을 비교한 결과는 Fig. 6에서와 같이 citrate만을 첨가했을 때 보다 succinate 1.0%, α -keto glutarate 0.5%, pyruvate, 0.75%에서 많은 gum을 축적하였으며 그 중 succinate, 1.0% 첨가구에서 14mg/ml의 gum이 생산되어 최고치를 나타내었고 그以上の 농도로 첨가하였을 때는 pH가 변하여 菌生育의 감소와 gum 생산성이 현저히 阻害되었다.

3) 窒素源의 영향

培地의 질소원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4Cl , NaNO_3 , urea를 각각 첨가하여 xanthan gum 생산성을 비교한 결과는 Fig. 7과 같다.

Fig. 7에서 같이 glutamate를 질소원으로 하였을 때는 基本培地의 질소원인 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 보다 gum 생산성이 2.6倍가 증가되어 최고치를 보였고 NH_4NO_3 은 1.6倍, NaNO_3 은 1.4倍로 각각 증가하였다.

Souw等²⁴⁾이 實驗한 結果에서 *X. campestris*는 amino acid 中 glutamate가 가장 効果的으로 利用한다고 報告하였는데 本 實驗菌株인 *X. malv-*

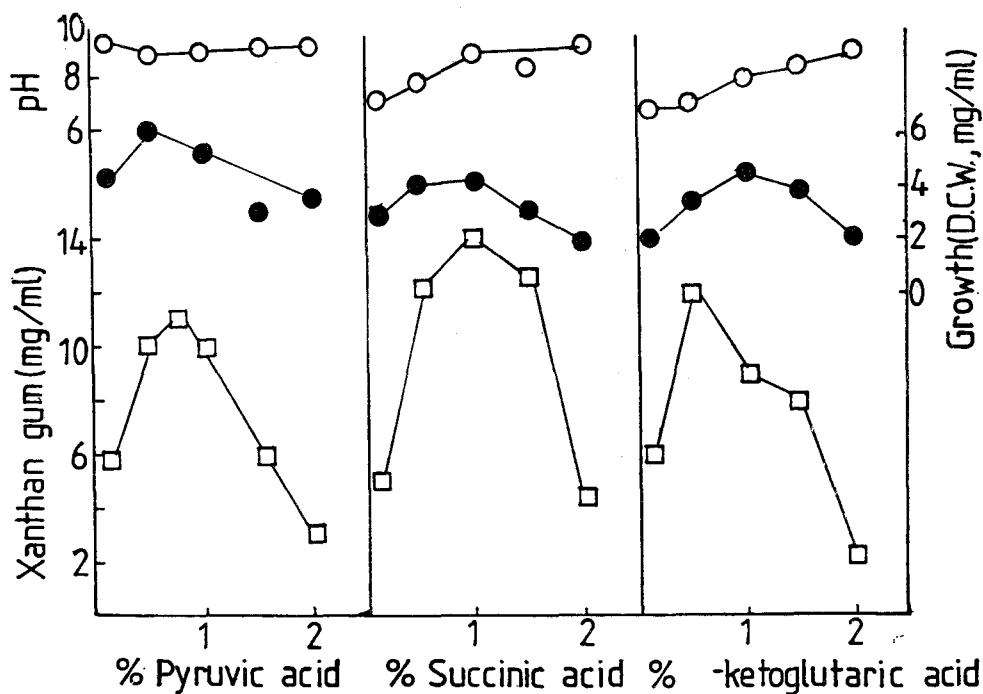


Fig. 6. Effect of addition of increasing concentration of organic acid on xanthan gum production.
 Basal medium: sucrose 40g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/l, KH_2PO_4 5g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/l, citric acid 2g/l, H_3BO_3 0.006g/l, ZnO 0.006g/l, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0024g/l, CaCO_3 0.02g/l pH 7.0
 Incubation was at rotary shaker (oscillation 240rpm), 29~30°C for 96hrs.
 DCW; Dry cell weight, —○— pH, —●— Growth, —△— Xanthan gum.

*acearum*은 glutamate 10mM 농도를添加한 区에서 最高值인 16.05g/l의 xanthan gum을蓄積하였으며無機窒素源보다 두드러진效果가 있었음을 나타내었다. 한면窒素源의濃度別 xanthan gum 生產能을比較하여 보면窒素源을高濃度로添加함에 따라菌의生育度는增加하는傾向을보였으나 xanthan gum의生成은急速한減少倾向을보았다. 高濃度의窒素源은糖을菌體增殖에만利用하도록誘引한다는事實을알았으므로窒素源의最適濃度는最大의 xanthan gum을釀酵生产할 수 있는 가장낮은濃度로制限시켜야 한다는最適條件를確立하였고 아울러서 이는 xanthan gum釀酵生产에重要한因子가됨을 알 수 있다.

4) 窒素源으로 distillers dried solubles(DDS) 의効果

糖蜜을原料로한酒精蒸溜廢液의濃縮物인 DDS 1과 고구마를原料로한酒精蒸溜廢液의濃縮物인

DDS 2 두가지를濃度別로窒素源으로添加하여 xanthan gum 生產能을比較한結果는 Fig. 8에서와같이 DDS 1의添加區가 DDS 2添加區보다菌體와xanthan gum 生產에效果가 좋았고 DDS 1을 0.5%添加하였을 때 3g/l의 xanthan gum을生产할 수 있었다.

그러나이러한效果는 Morain等³⁹⁾과 Rogovin等¹⁹⁾이 DDS 0.5~0.8%添加區에서 매우效果의이었다고報告한것에比하여本實驗에서使用한 DDS의效果는그만못하게나타나서相當한差異가있었는데이는 crude한中류폐액을單純히加熱에依하여濃縮만을시킨것임으로不純物의濃縮物에서오는어떤阻害素에依하여 xanthan gum生产에不良한영향을미치는것같거나또는 DDS의保管上잘못으로어떤成分變化가있지않았나推測된다. 그러므로 DDS의精製 및蛋白質, 糖, amino acid, 微量元素그밖의 어떤영양소등의定量分析을한後使用하거나또는 DDS

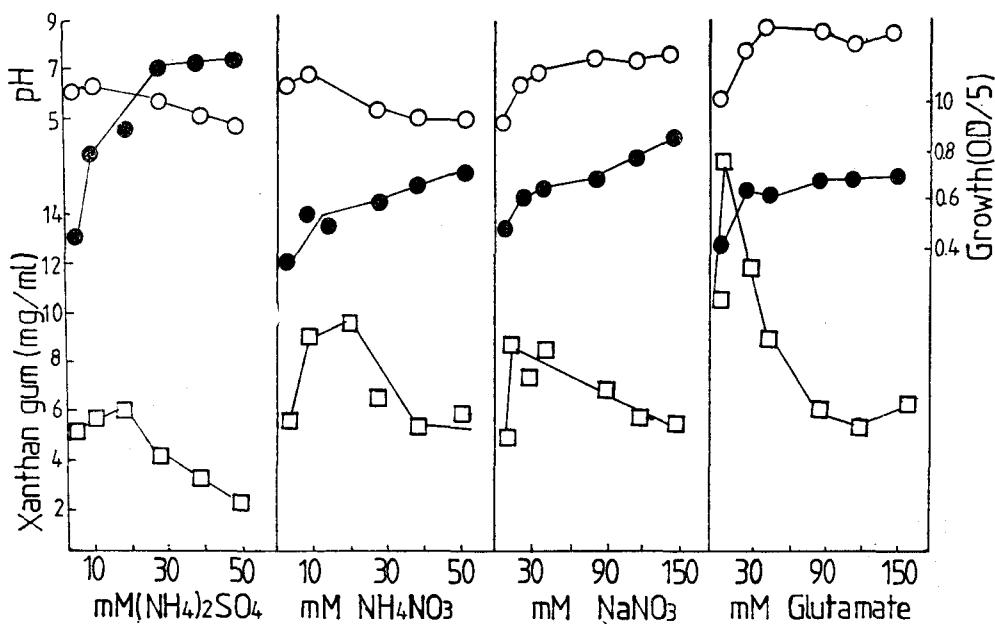


Fig. 7. Effect of increasing concentration of sole nitrogen sources on xanthan gum production.
 Basal medium: sucrose 40g/l, KH_2PO_4 , 5g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/l, citric acid 2g/l, H_3BO_3 , 0.006g/l, ZnO 0.006g/l, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0024g/l, CaCO_3 0.02g/l, pH 7.0
 Incubation was at rotary shaker (oscillation 240rpm) and 29~30°C for 96hrs.

—○— pH, —●— Growth, —△— Xanthan gum

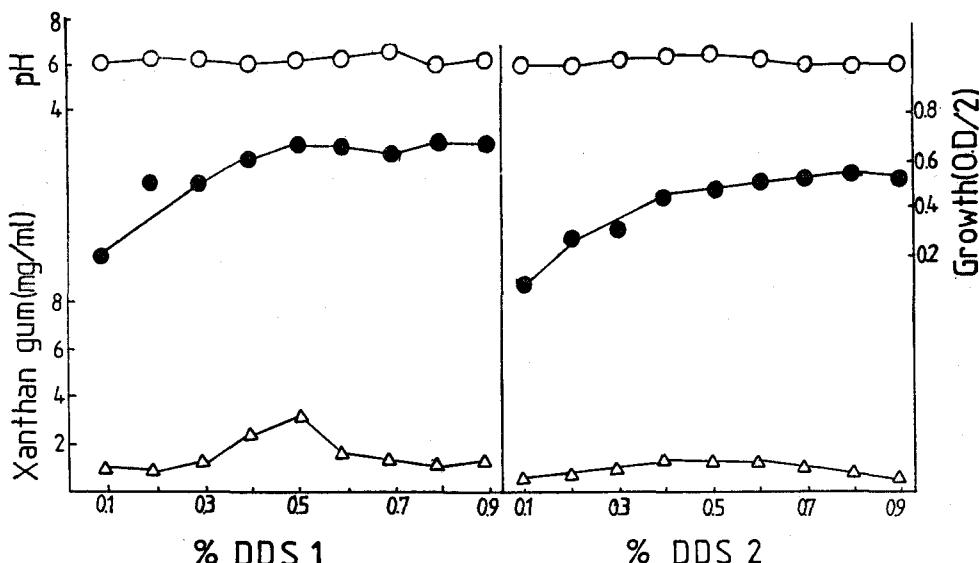


Fig. 8. Effect of increasing concentration of D.D.S. as nitrogen source on xanthan gum production.
 Basal medium: sucrose 40g/l, KH_2PO_4 , 5g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/l, Citric acid 2g/l, H_3BO_3 , 0.0006g/l, ZnO 0.006g/l, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0024g/l, CaCO_3 0.02g/l.
 Incubation was at rotary shaker (oscillation 240rpm) and 29~30°C for 96hrs.

—○— pH, —●— Growth, —△— Xanthan gum.

의 fraction別, 濃縮方法의 改善等으로 效果의 利用方案을 講究하여야 하겠다.

5) 磷酸 이온의 影響

Xanthan gum 酵酵生産에 영향을 미칠 것이라 생각되어 인산농도를 20mM에서 100mM 농도까지 10mM 간격으로 농도를 KH_2PO_4 로 조정한 酵酵培地에서 培養하여 比較検討한結果는 Fig. 9와 같다. Fig. 9에서 PO_4^{3-} 65mM(KH_2PO_4 1.265%)에서 가장 높은 生産性을 보였고 이보다 높은 농도에서는 *xanthan gum* 生産에 阻害作用이 있었다. 인산이온은 KH_2PO_4 로 培地中에 添加됨으로서 酵酵過程中에 生産되는 酸性代謝產物 때문에 誘發되는 pH 低下를 막는 buffer action으로 상상할 수 있겠다. 또한 菌體增殖과 *xanthan gum* 生成에 쓰이는 ATP에 關與함으로서 인산이온의 添加는 *xanthan gum* 生成에 重要한役割을 하는 것이라 생각된다.

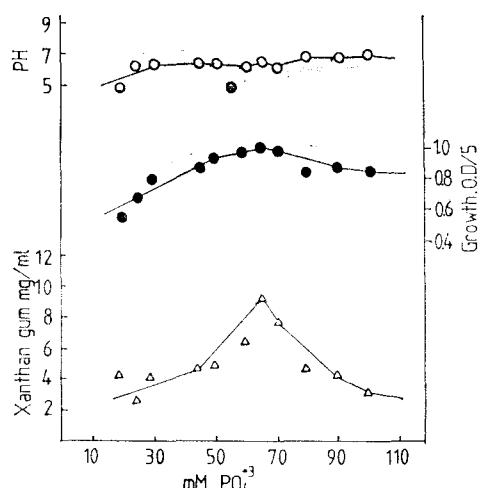


Fig. 9. Effect of phosphate concentration on xanthan production.
Basal medium: sucrose 40g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/l, KH_2PO_4 5g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/l, citric acid 2g/l, H_3BO_3 0.006g/l, ZnO 0.006g/l, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0024g/l, CaCO_3 0.02g/l pH 7.0.
Incubation was at rotary shaker(oscillation 240rpm) and 29~30°C for 96 hours.
—○— pH, —●— Growth,
—△— Xanthan gum.

6) Agitation의 영향

*Xanthomonas malvacearum*은 好氣性菌일 것으로 예상되어 120, 180, 240, 300rpm으로 배양

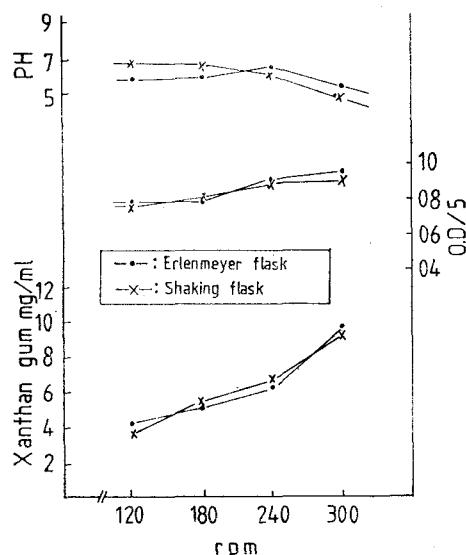


Fig. 10. Effect of increasing agitation on xanthan gum production. Basal medium: sucrose 40g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/l, KH_2PO_4 5g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/l, citric acid 2g/l, H_3BO_3 0.006g/l, ZnO 0.006g/l, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0024g/l, CaCO_3 0.02g/l pH 7.0.
Incubation was at 29~30°C for 96 hours.

초기부터 agitation을 固定시켜 배양하여 *xanthan gum* 生産能을 비교한 결과는 Fig. 10에서와 같이 300rpm에서 가장 效果가 커으며 그 이상에서 더욱 좋은 결과가 기대된다. Shaking flask와 erlenmeyer flask 배양에서 gum 生産性 차이는 무시할 정도이다. *Xanthomonas*屬은 酵酵中에 細胞外에 *xanthan gum*을 축적함으로 培養液의 粘度가 上昇하여 aeration에 지장이 생기게 된다. 그런데 本菌株은 好氣性細菌이고 aeration과 *xanthan gum* 生成의 關係가 있어 fermentor에 依한 agitation과 aeration을 충분히 함으로서 生産性을 높일 수 있음을 알 수 있다.

Moraine 등³⁹⁾은 fermentor의 impeller speed를 550~1,000rpm으로 점점 증가시킴이 효과적이 있다고 보고한 바 있다.

6. Xanthan gum 生產培地 組成의 再調整

Xanthan gum 生產 最適 酵酵培地의 組成을 檢討한 결과는 Table 3에서와 같이 basal medium에 질소원과 유기산을 각각 替代시켜 *xanthan*

Table 3. Effect of recombined composition of medium on xanthan gum production.

Nitrogen source	Organic acid source	Xanthan gum (mg/ml)
glutamate 10mM	succinate 10g/l	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ 2g/l	succinate 10g/l	10.5
glutamate 10mM	citrate 2g/l	12
(NH ₄) ₂ SO ₄ 2g/l	citrate 2g/l	9.2

Basal medium: sucrose 40g/l KH₂PO₄ 12.65g/l MgSO₄·7H₂O 0.2g/l H₃BO₃ 0.006g/l ZnO 0.006g/l, FeCl₂·6H₂O 0.0024g/l CaCO₃, 0.02g/l

gum 生成能을 비교하면 sucrose 40g/l, glutamate 10mM, succinate 1%, PO₄⁻³ 65mM을 포함하는 培地에서 5g/l의 gum이 生成되었고 이 培地에 glutamate 代身 (NH₄)₂SO₄ 2g/l를 첨가하였을 때 gum은 10.5g/l가 生成되었으며, sucrose 40g/l, glutamate 10mM, citrate 2g/l, PO₄⁻³ 65mM를 포함하는 酸酵合成培地에서 12g/l의 gum이 생성되어 最高의 收率을 나타내었다.

이 結果로 보아 培地中에 glutamate와 citrate를 함께 添加하였을 때 아미노酸과 단백질 代謝에 重要한 물질인 glutamate와 citrate 분해로 생기는 oxalacetate등이 TCA cycle을 더욱 活動的으로 이끌어서 많은 에너지를 내게되며 이것이 個體의 증식과 xanthan gum의 生產을 높하게 되는 것 같다. 그러나 glutamate와 succinate를 培地 중에 同시添加했을 때는 菌體의 증식도 줄지 않고 xanthan gum의 生成도 나빴으며, (NH₄)₂SO₄와 succinate를 同시에添加했을 때는 좋은 結果를 보였다. 이러한 원인을 究明하기 위해 이 菌株의 酵素特異性에 대한 生化學의 研究가 必要하며, NH₄⁺가 代謝에 주는 重要性等도 밝혀져야 될 것이다.

7. Xanthan gum의 沈澱, 分離

Alcohol 첨전과 methyl alcohol, ethyl alcohol, isopropyl alcohol 등이 溶劑로 使用될 수 있으나 butyl alcohol 이상은 침전효과가 없었다. 이 중 isopropyl alcohol을 배양액의 2배를 첨가할 때가 가장 침전효과가 좋았으며 methyl alcohol, ethyl alcohol도 비슷한 효과를 볼 수 있었다. Alcohol 침전시 회수율을 높이기 위해 염류의 첨가가 유효하다고 보고한 바 있으며 본 실험에서는 saturated KCl 1%를 첨가하였다. 그러나 더

욱 적당한 염류나 그의 첨가농도를 검토하므로써 배양액에서 xanthan gum의 收率을 높일 수 있을 것 같다.

要 約

Xanthan gum의 生產力이 있는 *Xanthomonas* SNUF-560 菌株에서 紫外線 照射方法으로 生產能이 優秀한 變異株를 選擇해서 동결乾燥法으로 保存했으며 PDA培地에서 2週마다 移植하여 生產實驗에 使用하였다.

最適酸酵培地의 檢討에서 炭素源으로 sucrose 40g/l, 壓素源으로 glutamic acid 10mM, 有機酸으로 succinic acid 10g/l, PO₄⁻³ 65mM일 때 각각 좋은 結果를 얻었으며, 最終的으로 培地 1과 培地 2에서 각각 1,050cp(12g/l), 900cp(10.5g/l)를 얻었으며 組成은 다음과 같다.

培地 1 : sucrose 40g/l, glutamate 10mM, PO₄⁻³ 65mM(KH₂PO₄ 12.65g/l), citrate 2g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2g/l, H₃BO₃ 0.006g/l, ZnO 0.006g/l, FeCl₂·6H₂O 0.0024g/l CaCO₃ 0.02g/l

培地 2 : sucrose 40g/l, (NH₄)₂SO₄ 2g/l PO₄⁻³ 65mM(KH₂PO₄ 12.65g/l) succinate 10g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2g/l H₃BO₃ 0.006g/l, FeCl₂·6H₂O 0.0024g/l CaCO₃ 0.02g/l

參 考 文 獻

1. Sutton, J.C. and P.H. Williams: Can. J. Botany, 48 : 545(1970).
2. Buchanan, R.E. and N.E. and N.E. Gibbons: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed. Williams & Wilkins Co. (1974).
3. Lilly, V.G., H.A. Watson and J.G. Leach: Appl. Microbiol. V. 6 : 105(1958).
4. Edlin, R.L.: U.S. patetn 3, 695 : 236(1972).
5. Bjorndal, H., Hellerquist, C.G., Lindberg, B. and Svensson, S. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 9 : 610 (1970).
6. Jansson, P.E., Kenne, L. and B. Lindberg: Carbohydr. Res., 45 : 275 (1975).
7. Lindberg, B., Lörngern, J. and Thompson, J.L.: Carbohydr., Res., 28: 351 (1973).

8. Kelco社 Catalogue(1975).
9. 植田三郎：三晶(株)社內實驗報告(1976).
10. Kang, K.S. and P. Kovacs: ACS symposium (1976).
11. Jeanes, A., J.E. Pittsley and F.R. Senti: J. Applied polymer Sci., 5 : 519(1961).
12. Kovacs, P.: Food Tech., 27 : 261(1973).
13. Glicksman, M.: Food Tech., 19 : 943(1965).
14. U.S. Patent 3,245 : 871(1966).
15. 特公昭 42-7 : 277(1967).
16. U.S. Patent 3, 784 : 681(1974).
17. Schweigger: U.S. Patent 3, 236~831.
18. Moraine, R.A. and P. Rogovin: Biotetch. Bioeng., 8 : 511(1966).
19. Rogovin, S.P., R.F. Anderson and M.C. Cadmus: J. Biochem. Microbial. Technol. Eng., 3 : 51(1961).
20. McNeely, W. H.: U. S. patent 3,433,708 (1969).
21. Rogovin, S. P.: U. S. patent 3,485,719 (1969).
22. Cadmus, M.C., M.O. Bogby, K.A. Burton and I.A. Wolff: U. S. patent 3,565,763 (1971).
23. Miescher, G.M.: U. S. patent 3,455,786 (1969).
24. Souw, P. and A.L. Demain: Applied Environ. Microbiol., June (1979).
25. Jeans, A., J.E. pittley and F.R. Senti: J. Appl. polym. Sci., 5 : 519
26. Rogovin, S.P., W.J. Albrecht and V. Sohns: Bioteech. Bioeng., 7 : 161(1965).
27. Albrecht, W.T., V.E. Sohns and S.P. Rogovin: Biotech. Biocng., 5 : 91 (1963)
28. Cadmus, M.C., S.P. Rogovin, K.A. Burton, J.E. pittsley, C.A. Knutson and A. Jeanes: Can. J. Microbiol., 22 : 942 (1966).
29. Rogovin, S. P. and W. J. Albrecht: U.S. Patent 3,119,812(1964).
30. McNeely, W.H. and J. J. O'connell: U.S. Patent 3,232,929(1966).
31. Pattan, J.T. and W.E. Holman' U.S. patent 3, 382,229(1968).
32. O'connell, J.J.:U.S. Patent 3,355,477(1967).
33. Colin, P. and V. Guibert: U.S. patent 3,591,578(1971).
34. Colegrave, G. T.: U. S. patent 3,516,983 (1970).
35. Leder, H.J., and G.M. Miescher: U.S. patent 3,316,241(1967).
36. Jeanes, A.R. and J.H. Sloneker: U.S. patent 3,000,790(1961).
37. Jeanes, A.R. and J.H. Sloneker: U.S. patent 3,096,293(1963).
38. Corey, R.R. and M.P. Starr: J. Bacteriol., 74 : 141~145(1957).
39. Moraine, R.A. and P. Rogovin: Biotechnol. and Bioeng., 8 : 381~391(1971).
40. Rogovin, P. and R.A. Moraine: Biotechnol. and Bioeng., 15 : 225 (1973).