

B. amyloliquefaciens 세포 성장에 미치는 포도당과 맥아당 농도의 영향에 관한 연구

차 월 석 · *박 승 규 · **김 종 수
조선대학교 공과대학 화학공학과
*우일수산주식회사
**이리농공전문대학 화학공학과

Effects of Concentrations of Glucose and Maltose on the Growth of *Bacillus amyloliquefaciens*

Wol-Suk Cha, *Seung-Kyu Park and **Jong-Soo Kim

Dept. of Chemical Engineering, Chosun University, Kwang-ju 501-759, Korea
*Wool IL Fisheries Co. LTD : 450-20. Wonsoo-RI Janghang-Eup Seocheon-gun Chungnam, Korea
**Dept. of Chemical Engineering, Iri National College of Agriculture & Technology

ABSTRACT

Cell growth and production of α -amylase, acetic acid and lactic acid were investigated in *Bacillus amyloliquefaciens*(ATCC 23350) flask culture with various carbon sources. Maximum dry cell density increased with increase in initial maltose concentration. Maximum dry cell density was the highest(1.4g / ℓ) at 10g/ ℓ of initial glucose concentration. With 10g/ ℓ of initial glucose concentration, maximum specific cell growth rate was obtained. Among the various carbon sources, maximum α -amylase production was obtained with 149 unit/ml at 20g/ ℓ of initial maltose concentration. With 5g/ ℓ of initial maltose concentration, maximum α -amylase production rate was obtained. By increasing carbon source concentration, acetic acid formation decreased. Acetic acid formation was higher in glucose than in maltose. By increasing carbon source concentration, lactic acid formation increased. Lactic acid formation was higher in maltose than in glucose.

서 론

미생물을 이용하여 경제성이 있는 생물공학 제품을 생산하기 위해서는 미생물을 고농도로 배양하는 것과 미생물에 의한 제품의 비생산속도(specific production rate)를 향상시키는 것이 필요하다. 미생물을 고농도로 배양시키기 위한 많은 연구가 수행되고 있는데, 현재까지 Yeasts 및 *E. coli*에 대해서는 많은 연구 결과가 보고되고 있다(1-4).

또한 여러 미생물들 중 Yeast 및 *E. coli*외에 산업적으로 중요한 것의 하나는 *Bacillus*이다. *Bacillus*는 그람 양성균의 특성을 갖고 있기 때문에 효소를 생산하여 세포 밖으로 분비하는 특성이 있어 최근 α -amylase, Protease, α -galactosidase 등의 효소 및 치료제 목적의 재조합 단백질 생산에 host cells 많이 이용되고 있다(5).

이러한 효소들 중 α -amylase(E.C.3.2.1.1, 1,4- α -D-glucan-glucanohydrolase)는 전분의 α -D-1,4-

glucosidic linkage을 무작위로 분해할 수 있는 효소로서 전분을 기질로 사용하여 포도당 제조, 양조, 기타 제약 및 섬유공업 등 여러 산업적 공정에 널리 이용되고 있다. 그리고 미생물에 의한 α -amylase는 정제와 대량의 생산이 쉽기 때문에 많이 연구가 되고 있고, 특히 *Bacillus S. P*에 의해서 생산되는 α -amylase는 열에 안정하며 공업적으로 유용하게 이용되고 있다(6).

그리고 *Bacillus S. P*들의 특성적 연구들을 보면 *Bacillus licheniformis*(7)와 *B. stearothermophilus*(8)는 maltose와 녹말을 사용하면 높은 효소활성을 얻을 수 있으며 glucose를 이용할 때 낮은 효소활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 *B. amyloliquefaciens*의 경우에 높은 효소 활성도는 maltose와 glucose와 전분을 사용하는 경우가 알려져 있다(9). *B. stearothermophilus*(10)에 의한 α -amylase 합성은 성장 중간에 이루어지는 반면 *B. subtilis*(11)와 *B. amyloliquefaciens*(12)에 의한 α -amylase 합성은 성장단계와 Postlog 성장단계 끝에 생합성된 것으로 알려졌다. α -Amylase 생산 양상에 대해서는 *B. amyloliquefaciens*의 경우 대수증식기(log-growth phase) 이후에서 크게 증가된 생산속도를 얻었고 대부분의 α -amylase가 분비되었을 때에는 사용된 탄소원(glucose, maltose, starch)에 무관하였다는 보고가 있다(12). 그러나 Coleman 등(13)은 α -amylase 합성이 탄소원의 억제에 의해서 영향을 받는다고보다는 핵산전구체 풀(nucleic acid precursor pool)의 크기에 의해서 조절된다고 주장하였다. 그러나 그의 이론의 약점은 Schaeffe 등(14)에 의해 지적되었듯이 성장 유전자(growth gene)와 외부 효소구조 유전자(exoenzyme structural gene)의 표현인 비유사성(disimilarity)에 대해서는 언급을 하지 않았기 때문에 리보솜(ribosome)합성과 관계 없는 많은 유전자들이 성장 중에 나타나는 것을 설명하지 못하고 있다.

*Bacillus S. P*종의 product 중 가장 중요한 α -amylase 생성은 그 기작에 대해서는 여러 방향으로 연구되고 있다. 즉 효과적인 생산 및 그 수율을 높이기 위한 기본 조건, 합성 및 분비를 조절하는 효소의 생합성 기구에 대해 연구가 되어지고 있으며(8, 11, 15-17), 저해제에 관해서 유 등(18)은 acetate, lactate, propionate가 저해성을 갖는다고 제시했고, Norman(19)은 기질로서 glucose 및 maltose를 이용하여 *Bacillus amyloliquefaciens* 성장시킬 수 있고 이로부터 α -amylase 생합성을 유도할 수 있다고 하

였다. 위와 같이 *Bacillus S. P*들을 이용하여 α -amylase 생성 가능 및 그 특성들에 대해서는 여러 사람들에 의해 많이 연구가 되고 있으나, 그 세포의 성장 조건과 α -amylase의 수율을 증가시키기 위한 방법 등이 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 플라스크 배양시 glucose, maltose의 농도에 따라 *Bacillus amyloliquefaciens*의 성장과 생성물과의 관계를 조사하였다.

실험재료 및 방법

균주

본 실험에 사용된 균주는 한국과학기술원 부설 유전공학센터에 있는 균주보관기관으로부터 분양 받은 *Bacillus amyloliquefaciens*(KTCC 23350)를 사용하였으며, nutrient agar 배지를 사용한 agar slant 상에서 4°C의 냉장고에 보관하여 사용하였고, 1개월마다 1회씩 계대배양하였다.

배지 및 배양

균체의 배양에 사용된 표준배지의 조성은 Table 1과 같으며 탄소원으로는 glucose를 사용하였고 포자 상태인 균주의 발아를 돕기 위하여 유기질소원으로 yeast extract를 사용하였다.

Glucose와 yeast extract, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 를 서로 분리하여 250ml 용량 삼각플라스크에 200ml를 취한 후 121°C, 15psi, 30min간 멸균하였다. 균주는 nutrient agar slant에서 보관한 *Bacillus amyloliquefaciens* 1 백금이를 접종하여 shaking incubator에서 37°C, 170rpm으로 48시간 배양 후 4°C 냉장고로 옮겨 보관하여 사용하였다.

플라스크 배양

500ml-삼각플라스크의 배양에서 배지를 300ml 사용하였으며, 그 성분 중 탄소원인 glucose와 maltose 농도를 각각 5g/l, 10g/l, 20g/l, 30g/l로 한 후 균주 배양액 10ml를 각각 접종하여 37°C, 170rpm, 삼각 flask 배양시 pH를 pH 7로 유지하면서 진탕 배양기를 이용하여 배양시켰으며, pH 7로 유지하기 위해서 1M-NaOH 용액을 사용하였다.

세포농도

세포농도는 분광광도계(Bausch & Lomb, Spectronic 20)를 이용하여 발효액 시료의 흡광도를

650nm에서 측정하여 미리 구한 표준곡선에 의하여 건조세포농도를 환산하였다. 표준곡선은 시료를 100ml씩 채취하여 원심분리하여 상등액을 제거하고 증류수로 침전물을 세 차례 씻은 뒤 건조오븐에서 $107 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 24시간 건조한 뒤 측정하였다.

α -amylase 활성(activity)

α -amylase 활성은 starch-iodine method(20)에 의하여 측정하였다. 배양액을 10,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액 0.5ml를 채취하여 0.04M pH 5.9 potassium phosphate 완충용액과 전분 기질 용액을 1:1로 혼합한 용액 5ml에 첨가하여 25°C 에서 25분간 반응시켰다. 0.1M HCl용액 5ml를 가하여 반응을 정지시킨 후 이 혼합물 0.5ml에 5ml의 iodine 용액을 첨가하여 발색시킨 후 660nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 구하였다. 여기서 α -amylase의 활성은 다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Activity (unit/ml)} = D \frac{R_0 - R}{R_0} \times 100$$

여기서 R_0 는 효소에 존재하지 않는 substrate-iodine complex의 흡광도이며, R 은 시료 혼합물의 흡광도이고, D 는 시료의 희석 비율이다.

탄소원 및 생성물 농도측정

Glucose, maltose, acetic acid, lactic acid의 농도는 fermentation monitoring column(BIO-RAD)이 부착된 HPLC(Waters 440)를 사용하여 측정하였으며, 용리액은 0.001 M- H_2SO_4 , column의 온도는 65°C , 유량은 0.8ml/min, 시료는 $20\mu\text{l}$ 를 주입하여 RI detector를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

탄소원에 따른 세포의 농도 및 비성장속도

*Bacillus amyloliquefaciens*의 성장과 탄소원 농도와의 관계를 알아 보기 위하여 탄소원인 glucose와 maltose를 각각 5g/l, 10g/l, 20g/l의 농도로 변화시켜 플라스크에서 배양한 결과 세포농도에 미치는 영향은 포도당의 경우 Fig. 1과 Table 2에서 나타났다. 최대 건조세포농도는 초기 glucose 농도가 10g/l 일 때 1.40g/l로 가장 높았으나, 차 등(21)의 발효조에 의한 회분식 배양시 초기 glucose 농도 10g/l 일 때 2.20g/l 보다는 0.80g/l 낮았고, 맥아당의 경우 Fig. 2와 Table 2에서 나타난 바와 같이 최대 건조세포농도는 초기 maltose 농도가 증가할수록 증가하는 경향성을 나타내어, 초기 maltose 농도 20g/l 일 때 1.15g/l로 가장 높았으나, 유(22)의 발효조에 의한 회분식 배양시 초기 maltose 농도 10g/l 일 때 2.15g/l 보다 1.0g/l 낮았다.

최대 균체수율($Y_{x/s}$)은 포도당의 경우 초기 glucose 농도 10g/l 일 때 0.21g/g로 가장 높았으며, 차 등(21)의 초기 glucose 농도 10g/l 일 때 0.41g/g 보다 낮았고, 맥아당의 경우 초기 maltose 농도 5g/l 일 때 0.16g/g로 가장 높았으며, 유(22)의 초기 maltose 농도 10g/l 일 때 0.65g/g보다 낮았다.

세포의 최대 비성장속도는 포도당의 경우 초기 glucose 농도가 10g/l 일 때 $0.061(\text{hr}^{-1})$ 로 가장 높았고, 차 등(21)의 초기 glucose 농도 10g/l 일 때 $0.124(\text{hr}^{-1})$ 보다는 낮았으며, 맥아당의 경우 초기 maltose 농도가 5g/l 일 때 $0.042(\text{hr}^{-1})$ 로 가장 높았으나, 유(22)의 초기 maltose 농도 10g/l 일 때 $0.240(\text{hr}^{-1})$ 보다는 낮았다. 탄소원으로 포도당과

Table 1. Composition of the media used throughout the study.

Agar medium(g/l)		Growth medium(g/l)		Production medium(g/l)	
Nutrient agar	23.5	Glucose	10.0	Carbon source	10.0
		Yeast extract	1.0	Yeast extract	1.0
		K_2HPO_4	0.1	K_2HPO_4	0.1
		$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.1	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.1
		Sodium citrate	0.5	Sodium citrate	0.5
		$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
		CaCl_2	0.1	CaCl_2	0.1
		$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
		$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.1	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.1

*pH=7.0

Table 2. Specific growth rate(μ) and products of *Bacillus amyloliquefaciens* on various carbon source concentrations in flask culture.

Carbon source(g/ℓ)	X_{max} (g/ℓ)	E_{max} (unit/ml)	max. acetic acid(g/ℓ)	max. lactic acid(g/ℓ)	μ_{max} (hr ⁻¹)	ν_{max} (unit/mg-hr)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{E/S}$ (unit/mg)
Glucose 5	0.80	95.0	0.93	1.30	0.048	2.59	0.19	19.38
Glucose 10	1.40	76.0	0.94	3.80	0.061	0.63	0.21	7.76
Glucose 20	0.60	63.0	0.47	5.20	0.039	0.74	0.06	5.25
Maltose 5	0.80	93.0	0.62	2.90	0.042	3.26	0.16	18.98
Maltose 10	1.00	94.0	0.43	4.70	0.037	1.87	0.12	9.59
Maltose 20	1.15	149.0	0.64	8.20	0.042	2.09	0.09	9.31

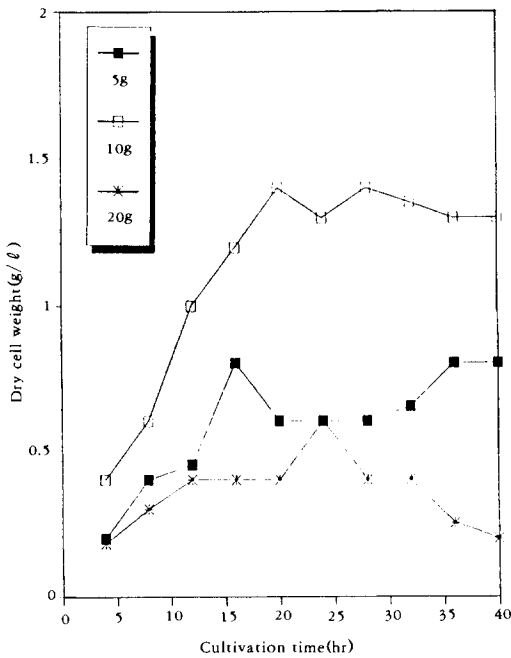


Fig 1. Cell growth formation in batch culture at Various initial glucose concentrations.

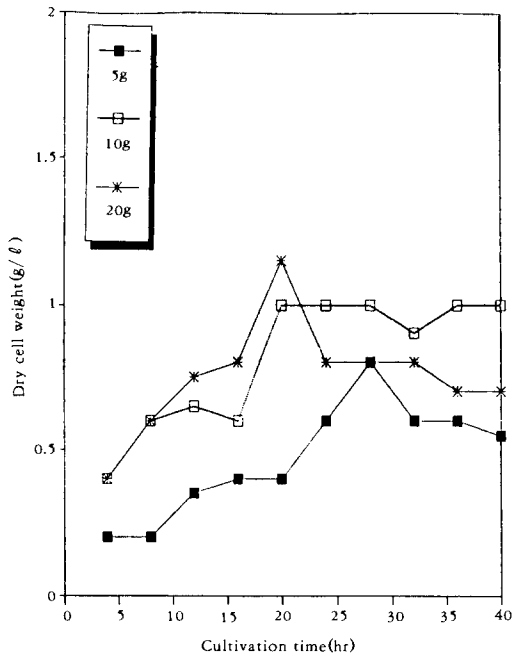


Fig 2. Cell growth formation in batch culture at various initial maltose concentrations.

맥아당을 이용한 플라스크 배양의 결과 최대 건조세포농도는 맥아당의 경우가 높았고, 최대 균체수율과 세포의 최대 비성장속도는 포도당의 경우가 약간 높았다. 또한 차 등(21)의 발효조 배양과 비교할 때 플라스크에 의한 배양시 최대 건조세포 농도, 최대 균체수율, 세포의 최대 비성장속도가 낮은 것은 플라스크 배양시 공기를 주입시키지 않았기 때문으로 생각되며, 건조세포농도가 낮은 것은 Maiorella(23)에 의해 보고된 바와 같이 발효시 생성된 acetic acid가 세포막을 통한 phosphate 전달을 화학적 간

섭에 의해 방해하여 세포성장을 저해하기 때문으로 생각된다.

탄소원에 따른 α -amylase의 활성 및 비생성속도
탄소원 농도에 의한 *Bacillus amyloliquefaciens*의 최대 α -amylase 생산은 포도당의 경우 Fig. 3과 Table 2에서 나타내었다. 실험결과에서 초기 glucose 농도가 증가함에 따라 α -amylase 생성이 감소하였고, 초기 glucose 농도 5g/ℓ 일 때 95.0unit/ml로 가장 높았으며, 차 등(21)의 초기 glucose 농도

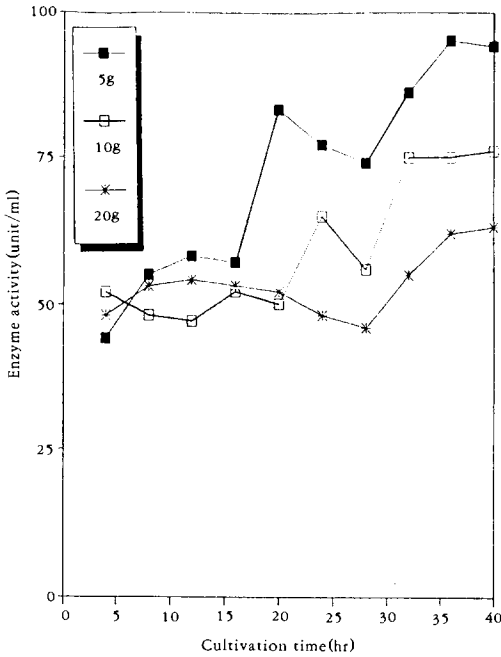


Fig 3. α -Amylase formation in batch culture at various initial glucose concentrations.

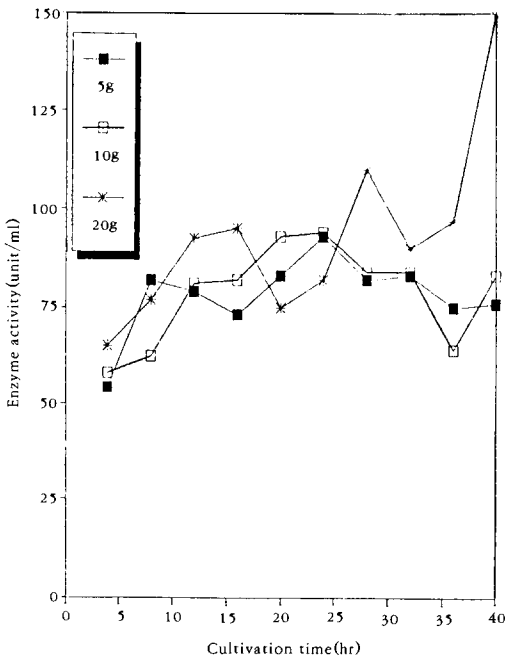


Fig 4. α -Amylase formation in batch culture at various initial maltose concentrations.

5g/l 일 때 127.0unit/ml보다는 낮았다. 맥아당의 경우 Fig. 4와 Table 2에서 보는 바와 같이 초기 maltose 농도가 증가할수록 증가하였고, 초기 maltose 농도 20g/l 일 때 149.0unit/ml로 가장 높았으며, 유(22)의 초기 maltose 농도 10g/l 일 때 215.0unit/ml보다도 낮았다. 최대 α -amylase 생산량은 맥아당이 포도당보다 더 높은 것을 알 수 있었다.

최대 효소수율($Y_{E/S}$)은 포도당의 경우 초기 glucose 농도가 5g/l 일 때 19.38unit/mg로 가장 높았으며, 차 등(21)의 초기 glucose 농도가 5g/l 일 때 25.50unit/mg보다는 낮았다. 맥아당의 경우 초기 maltose 농도가 5g/l 일 때 18.98unit/mg로 가장 높았다. 최대 효소수율은 초기 포도당이나 맥아당의 농도가 낮을수록 높았다.

α -Amylase의 최대 비생성속도는 포도당의 경우 초기 glucose 농도가 5g/l 일 때 2.59unit/mg-hr로 가장 높았으며, 차 등(21)의 초기 glucose 농도 10g/l 일 때 2.35unit/mg-hr보다는 약간 높았다. 맥아당의 경우 초기 maltose 농도가 5g/l 일 때 3.26unit/mg-hr로 가장 높았다. α -Amylase의 최대 비생성속도는 포도당보다 맥아당이 더 높은 것을 알 수 있었다. 플라스크 배양에서도 최적의 α -amylase 생산량, 효소수율, 비생성속도를 얻기 위해서는 배양시 공기를 주입하여, 세포의 성장과 α -Amylase 생성에 대한 영향은 앞으로 연구되어야 할 것이다.

탄소원에 따른 acetic acid 및 lactic acid 생성

플라스크 배양 중 탄소원 농도에 따른 *Bacillus amyloliquefaciens*에 의해 생성되는 최대 acetic acid 생성은 Fig. 5, 6과 Table 2에서 보는 바와 같이 포도당의 경우 초기 glucose 농도가 증가함에 따라 감소하였으며, 초기 glucose 농도가 10g/l 일 때 0.94g/l로 가장 높았으며, 차 등(21)의 초기 glucose 농도 5g/l 일 때 0.53g/l 보다 높았다. 맥아당의 경우 초기 maltose 농도 20g/l 일 때 0.64g/l로 가장 높았고, 최대 acetic acid 생성량은 포도당이 맥아당보다 약간 높았다.

최대 lactic acid 생성은 Fig. 7, 8과 Table 2에서 보는 바와 같이 포도당의 경우 초기 glucose 농도가 증가할수록 증가하였으며, 초기 glucose 농도 20g/l 일 때 5.20g/l로 가장 높았고, 차 등(21)의 초기 glucose 농도 20g/l 일 때 2.24g/l 보다 높았다. 맥아당의 경우 초기 maltose 농도가 증가할수록 증가하였으며, 초기 maltose 농도 20g/l 일 때 8.20g/l로 가장 높았다. 탄소원이 포도당인 경우 acetic

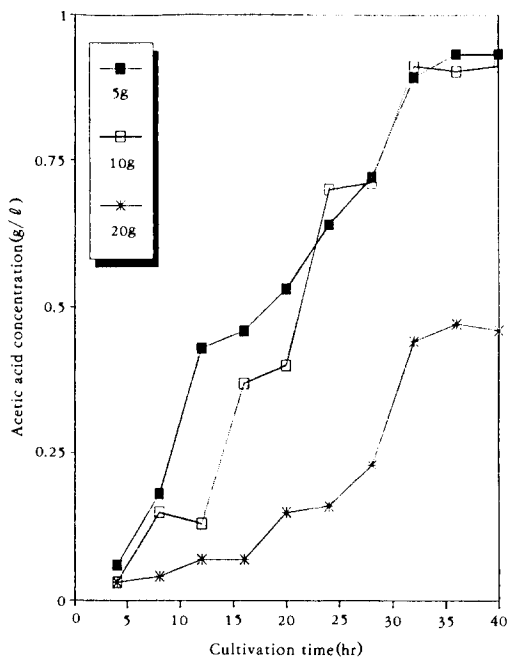


Fig 5. Acetic acid formation in batch culture at various initial glucose concentrations.

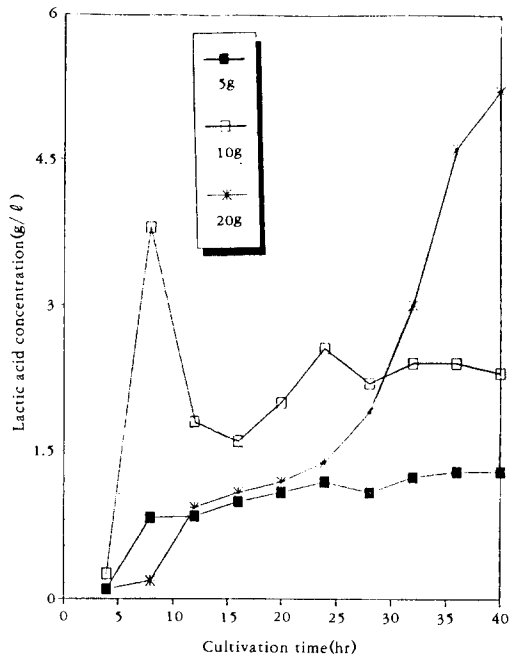


Fig 7. Lactic acid formation in batch culture at various initial glucose concentrations.

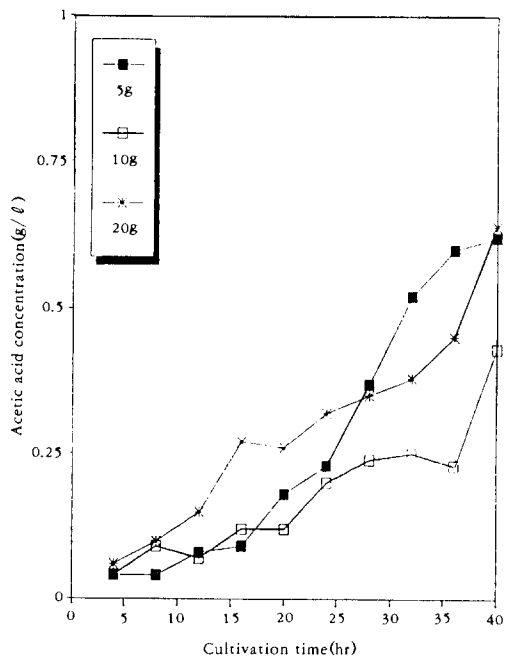


Fig 6. Acetic acid formation in batch culture at various initial maltose concentrations.

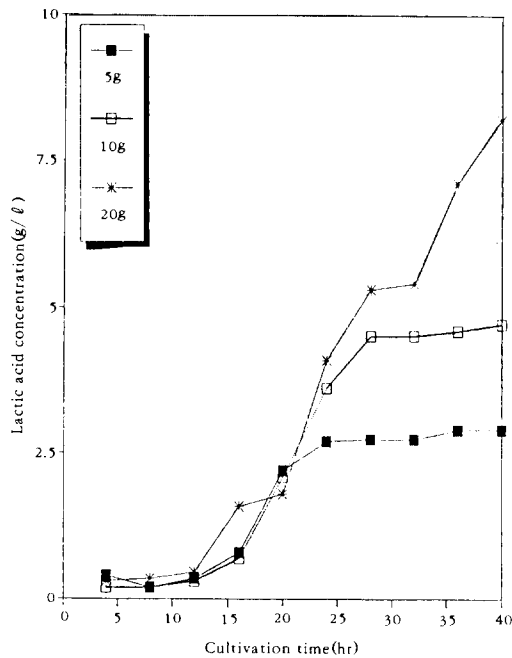


Fig 8. Lactic acid formation in batch culture at various initial maltose concentrations.

acid나 lactic acid의 생성량이 플라스크 배양시에 차 등(21)의 발효조 배양시보다 더 많이 생성되는 것은 배양시 공기를 주입시키지 않았기 때문으로 생각되며, 또한 세포밀도와 효소생성이 감소되는 것으로 보아 탄소원, 세포, 효소와 생성된 acetic acid나 lactic acid와의 기작 관계에 대해서도 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

탄소원으로 초기 glucose 농도와 초기 maltose 농도를 5g/l, 10g/l, 20g/l로 한 후 *Bacillus amyloliquefaciens*(ATCC 23350) 균주를 이용하여 플라스크 배양시의 세포 성장과 생성물 생성에 대한 연구를 수행하였다. 균주의 최대 건조세포농도는 초기 maltose 농도가 증가할수록 증가하였으나, glucose에서는 초기 농도가 10g/l 일 때 가장 높았다. 최대 비성장속도는 초기 glucose농도가 10g/l 일 때 0.060(hr⁻¹)로 가장 높으며, maltose에서는 초기 농도가 5g/l 일 때 0.042(hr⁻¹)이었다. 균주에 의해 생성되는 최대 α -amylase 생산은 초기 maltose 농도가 10g/l 일 때 149.0unit/ml로 가장 높았으며, 초기 maltose 농도가 증가할수록 증가하였다. 최대 비성장속도는 초기 maltose 농도가 5g/l 일 때 3.26unit/mg-hr로 가장 높았으며, glucose보다는 maltose에서 더 높았다. 균주에 의해 생성되는 최대 acetic acid는 탄소원의 초기 농도가 증가함에 따라 감소하며, 초기 glucose 농도 10g/l 일 때 0.94g/l로 가장 많이 생성되었고, lactic acid는 탄소원의 초기 농도가 증가할수록 증가하였으며, 초기 maltose 농도가 20g/l 일 때 8.20g/l로 가장 많이 생성되었다.

사용기호

X_{max} : maximum dry cell concentration(g/l)
 E_{max} : maximum enzyme activity(unit/ml)
 μ_{max} : maximum specific dry cell growth rate (hr⁻¹)
 ν_{max} : maximum specific enzyme production rate (unit/mg-hr)
 $Y_{X/S}$: maximum cell growth yield coefficient based on glucose or maltose uptake(g/g)
 $Y_{E/S}$: maximum enzyme production yield based on glucose or maltose uptake(unit/mg)

참고문헌

1. S. Aiba, S. Nagai and Y. Nishizawa(1976), *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1001.
2. G. Williams(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 631.
3. J. C. Fieschko, et al.(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1113.
4. N. Shimizu, et al.(1988), *J. Ferment. Technol.*, **66**, 187.
5. Y. H. Yoo, T. W. Cadman, J. hong and R. T. Hatch(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 426.
6. K. L. Kindle(1983), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **8**, 153.
7. N. Saito and K. Yamamoto(1975), *J. Bacteriol.*, **121**, 848.
8. N. E. Welker and L. L. Campbell(1963), *J. Bacteriol.*, **86**, 1202.
9. J. Fukumoto, T. Yamamoto and D. Tsuru (1957), *Nature*, **180**, 438.
10. N. E. Welker and L. L. Campbell(1963), *J. Bacteriol.*, **86**, 681.
11. G. Coleman(1967), *J. Gen. Microbiol.*, **49**, 421.
12. G. Coleman and M. A. Grant(1966), *Nature*, **211**, 306.
13. G. Coleman and W. H. Elliot(1962), *Biochem. J.*, **83**, 256.
14. P. Schaeffer(1969), *Bacteriol. Rev.*, **33**, 48.
15. J. Fukumoto, T. Yamamoto, D. Tsuru and K. Ichikawa(1957), In Proc. Intern. Symp. Enz. Chem., Tokyo and Kyoto, **2**, 479.
16. J. Fukumoto, T. Yamamoto and D. Tsuru (1957), In Proc. Intern. Symp. Enz. Chem., Tokyo and Kyoto, **2**, 366.
17. N. E. Welker and L. L. Campbell(1963), *J. Bactriol.*, **86**, 1202.
18. S. Yuki and Y. Ueda(1968), *Jpn. J. Genet.*, **43**, 21.
19. Y. J. Yoo, T. W. Cadman, J. Hong and R. T. Hatch(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 357.
20. B. E. Norman(1981), In Enzyme and Food processing(Ed. Birch, G. G., Brakeborough, N. & Parker, K. J.), Applied Science Publishers pp. 15.
21. W. S. Cha, C. K. Kim and J. S. Kim(1993),

- Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 457.
22. Y. J. Yoo, J. Hong and R. T. Hatch in press. (1986), Comparison of α -amylase Activities from Different Assay Methods, *Biotechnol. Bioeng.*
23. B. Maiorella, H. W. Blanch and C. R. Wilke (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1155.