

Bacillus sp. A29에 의한 다당류의 생산과 물성

안성구 · 서현호 · 이창호 · 오희목 · 권기석 · 이동희^{1*} · 윤병대

한국과학기술연구원 유전공학연구소 응용미생물 R.G. 환경미생물실

¹건국대학교 미생물공학과

Production and Rheological Properties of the Polysaccharide from *Bacillus* sp. A29

Ahn, Sung-Ku, Hyun-Hyo Suh, Chang-Ho Lee, Hee-Mock Oh,
Gi-Seok Kwon, Dong-Heui Yi^{1*} and Byung-Dae Yoon

Environmental Microbiology Laboratory, Applied Microbiology Research Group,
Genetic Engineering Research Institute, Korea Institute of Science and Technology,
P.O. Box 115, Taeduk Science Town, Taejeon 305-600, Korea

¹Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

Abstract — A bacterial strain producing highly viscous polysaccharide(A29 POL) was isolated from soil and identified as *Bacillus* sp. A29. The cultural conditions of the *Bacillus* sp. A29 for the polysaccharide production were dextrin 12%, soytone 0.2%, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.36%, L-alanine 0.01%, initial pH 6.8, and 30°C at pH 3 for 4 days. Final viscosity of the culture broth was 65,000 cp and then the amount of produced polysaccharide was 8.3 g/l. A29 POL was composed of glucose and xylose. A29 POL showed high viscosity at low concentration(0.1%) and in the presence of the salts such as NaCl or CaCl_2 . A29 POL showed high viscosity acid condition and at alkali condition and high pseudoplasticity in the presence of NaCl or CaCl_2 . It was shown that the viscosity at high temperature(80°C) was decreased but it was recovered at low temperature(20°C). A29 POL was able to form film and gel in the presence of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A29 POL had anionic charge.

미생물이 세포 밖으로 생산하는 미생물 다당류는 구성하는 구성당의 종류, 결합양식, 유도체 등에 따라 다양하고 독특한 특성을 가진다. 이러한 특성은 점도 조절, gel 형성, 유화안정, 보습, 점착, 응집, 윤활, film 형성 등(1, 2)이다. 산업적으로 유용한 다당류는 식품, 의료용, 화장품, 섬유, 제지공업, 도료, 원유의 3차 회수 및 세척 등에 이용되고 있으며 상업적인 잠재력도 매우 크다(3). 현재의 다당류의 연구는 새롭게 부가가치성이 높은 적성과 용도가 계속 발견되어 그 중요성이 더욱 높아지고 있다(4). 본 실험실에서는 미생물이 생산하는 다당류를 자연계에서 분리·선별하여 산업화하기 위한 연구를 수행(1, 2)하고 있으며, 이 논문에서는 독특한 특성을 보이는 다당류(A29 POL)의 특성 및 유변학적 물성에 대하여 검토·조사하였고, 다당류 생산균주를 동정하였기에 보고하는 바이다.

Key words: Polysaccharide, *Bacillus* sp.

*Corresponding author

실험재료 및 방법

다당류 생산 균주의 분리 및 선별

다당류 생산균주를 분리하기 위해 서울, 경기, 충청 일원의 산, 들, 하천, 공장지대 등에서 시료를 채취하여 이들 시료를 3단 희석하여 Table 1의 분리용 배지에 도말하여 30°C 에서 배양하였다. 배양 후 생성된 집락으로부터 점성을 가지거나 표면이 딱딱한 균주를 선별하고, 이들 분리 균주를 분리용 액체 배지에 백금으로 접종하여 30°C 에서 3일간 왕복 진탕배양(110 회/분)하여 점도가 높은 균주 A29를 선별하여 본 연구에 사용하였다.

균주 동정

선별된 균주 A29의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology(5), Macfaddin의 Biochemical tests for identification of medical bacteria(6) 및 Cowan and Steel의 Manual for the identification of

Table 1. Media for isolation

Glucose	2.00%
NH ₄ NO ₃	0.10%
K ₂ HPO ₄	0.10%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
pH	6.8
Tap water	

medical bacteria(7), Gorden의 The genus *Bacillus*(8)에 준하여 동정하였다.

균체량 측정

배양액을 생리식염수로 희석하여, spectrophotometer(DU 64 spectrophotometer, Beckman Co., LTD)를 사용하여 600 nm에서 O.D.로 측정하였다.

점도의 측정 및 유변학적 특성

배양시 점도의 측정은 Brookfield digital viscometer LVT DV-2를 사용하여 25°C에서 spindle No.3으로

측정하였으며, 상기의 점도계를 사용하여 A29 POL의 유변학적 특성을 xanthan gum(Junbunzlaur Xanthan Gesellschaft m.b.H., Austria, food grade)과 비교·검토하였다.

다당류의 정량

다당류의 정량은 spectrophotometer를 사용하여 490 nm에서 phenol-sulfuric acid method(9) 및 105°C에서 항량이 될 때까지 건조하여 건조중량으로 측정하였다.

다당류의 분리정제

배양액에 증류수를 가하여 1 : 1로 희석하고, 여기에 NaOH가 1%가 되도록 첨가하고 교반한 다음 원심분리기(H251 Kokusan Enshiki Co., LTD, Japan)로 25°C, 9,000×g로 30분간 원심분리하였다. 균체를 제거한 상등액을 중화한 후, 70% ethanol을 가하여 얻은 침전물을 95% ethanol로 3회 세척한 뒤 감압건조하고 마쇄하였다. 이 분말을 0.2%되게 얻은 증류수에 녹이고 50% TCA를 3%되도록 가하여 교반시킨 다음,

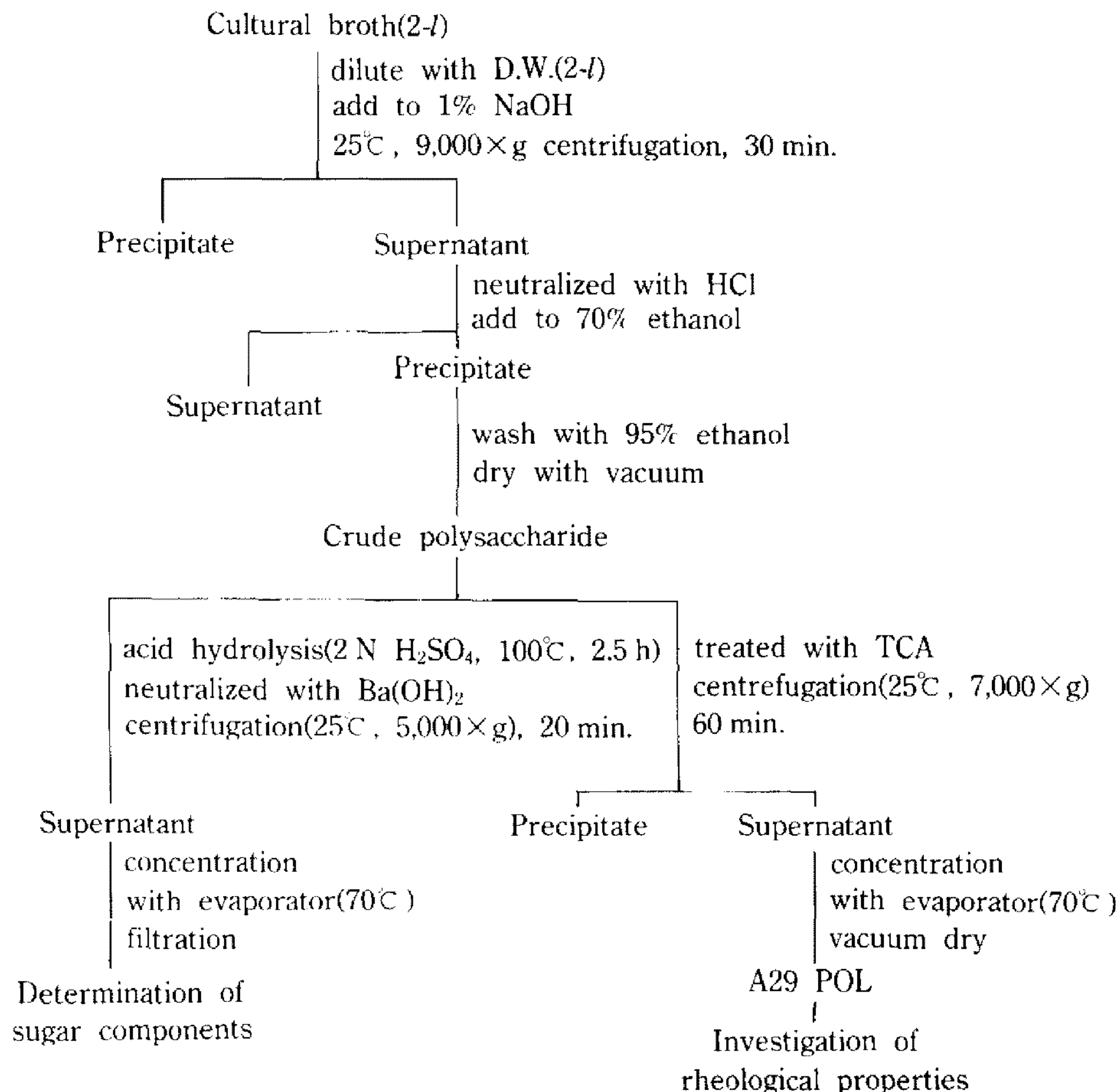


Fig. 1. Determination of sugar component and Purification procedure of A29 POL.

25°C, 7,000×g에서 30분간 원심분리하고 상등액을 분리하였다. 분리한 상등액을 70% ethanol로 처리하여 얻은 침전물을 70°C에서 감압건조하여 마쇄하였다. 이 분말을 사용하여 다당류의 유변학적 특성을 조사하였다(Fig. 1).

다당류의 당 구성

정제한 다당류의 당 구성을 조사하기 위해 50 mg의 다당류를 2 N H₂SO₄, 10 ml에 가하여 100°C에서 2.5 시간 동안 처리한 다음, Ba(OH)₂로 중화하고 25°C, 5000×g에서 30분 원심분리하여 침전을 제거한 후 감압 농축하였다. 이것을 100 μl되게 3차 증류수에 녹여 pore size가 0.2 μm인 membrane으로 여과하고 HPLC로 조사하였다. Column은 μ-Bondapak NH₂ column(Φ 3.9 mm×2.5 cm)을 사용하였고, mobile phase는 CH₃CN와 H₂O를 85 : 15의 비율로 하였으며, 유속은 1.5 mm/min으로 하였다. 시료는 10 μl를 주입하였다.

결과 및 고찰

균주 동정

다당류 생산균주, A29를 동정하기 위하여 아래의 고체 배지에서의 특징과 형태학적 특징, 생화학적 특징 등을 조사 하였다.

형태학적 특징 : 이 균주의 고체배지에서의 특징은, glucose-nutrient agar 배지에서 가장 생육이 좋았으며 glucose-asparagine agar, glycerol-asparagine agar, glucose-nitrate agar에서 잘 자랐다. 이들 배지에서의 균은 유백색이었고 colony의 form은 circular이었고 margin은 entire이며 elevation은 pulvinate 또는 convex였다. 이 외에도 potato dextrose agar, endo agar, NIH thioglycollate agar에서 잘 자랐으며, mannitol salt agar에서는 잘 자라지 않았다. 이 균주의 형태학적 특징은 Fig. 2와 같이 0.58 μm×3.05~4.82 μm인 간균이었다.

생화학적 특징 : 이 균주는 Gram 양성이고 acid fast test에 양성반응을 보였다. 포자를 형성하였으며, 포자의 위치는 central이었다. 운동성이 있으며, catalase, oxidase test에 양성이었다. 이 균주의 특성은 Table 2와 같았고, 이상의 결과로부터 이 균주는 *Bacillus* sp.로 밝혀졌으며, *Bacillus coagulans*와 유사한 특징을 보였다. 이 균주를 *Bacillus* sp. A29로 명명 하였다. *Bacillus* sp.가 생산하는 다당류로는 Elisashvili등(10)과 Ramsay등(11)이 levan의 생산을 발표하였고, Fukui등(12)은 *Bacillus polymixa*의 다당류 생

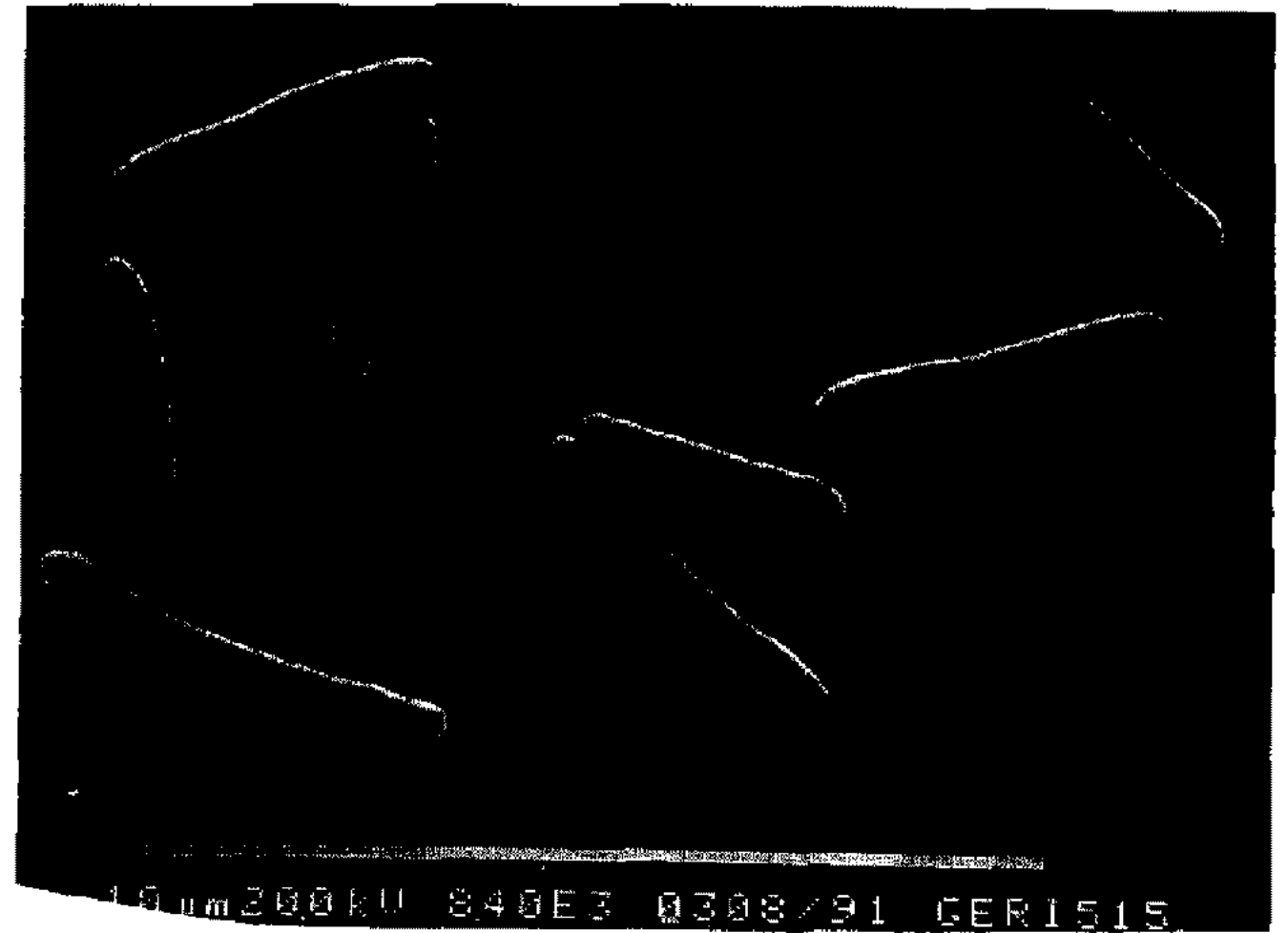


Fig. 2. Morphology of *Bacillus* sp. A-29.

산을 보고하였다.

Jar fermentor 배양

Jar fermentor(Mitsuwea KMJ-18, 3-1)에서 배양한 결과를 Fig. 3에 나타내었으며 배양조건 및 운전조건을 Table 3에 나타내었다. Fig. 3에 의하면 배양시간에 따른 pH의 변화는 36시간까지 감소하다가 36시간 이후 거의 변화가 없었고, 균체의 증식은 24시간 후부터 69시간까지 대수증식기를 보였으며 69시간 이후 둔화되었다. 점도는 48시간 이후 급격히 증가하여 84시간에 65,000 cp의 최대치에 이르렀으며 이때의 생산된 다당류의 양은 8.3 g/l이었다. 배양중 점도의 상승으로 인하여 48시간 이후에는 배양액내의 교반과 통기가 잘 되지 않았다. Tanzer등(13), Jeans등(14), Pace등(15)은 다당류의 생성이 대부분 산화반응에 의하여 중합되므로 점도의 증가로 인한 산소전달의 결핍으로 대사작용에 저해가 있다고 하였다. 다당류의 생산은 균체의 증식과 대체로 일치하며, 균체의 증식이 둔화된 후에도 점도가 증가하는 것을 볼 수 있었다.

A29 POL의 특성 및 물성

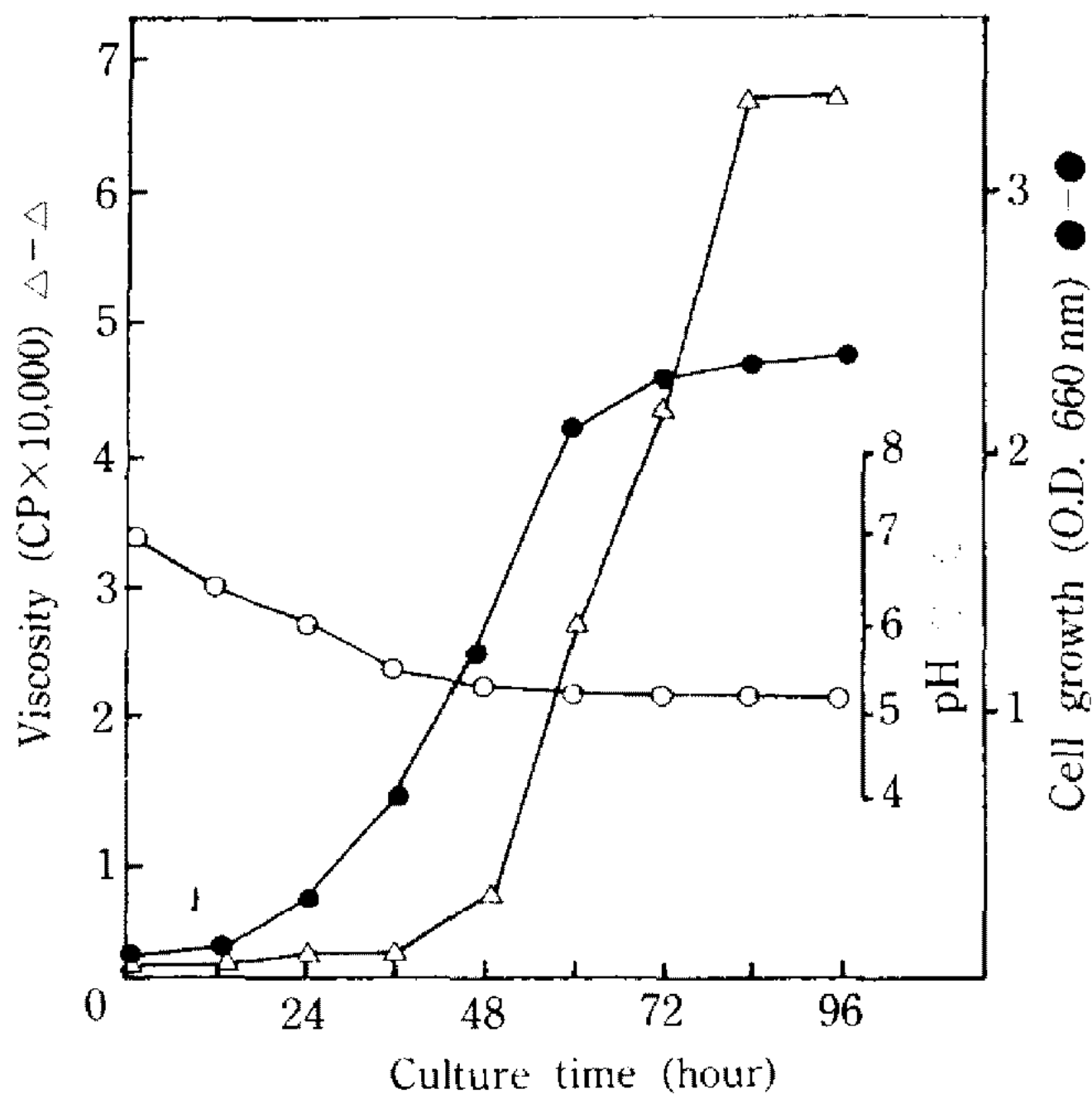
A29 POL의 당 조성 : Fig. 4의 결과에 의하면 A29 POL의 구성당은 glucose와 xylose임을 확인할 수 있었으며 이들의 구성 mole 비율은 8 : 1이었다.

농도별 점도 : A29 POL과 xanthan gum을 0.1%에서 0.8%까지 녹여 점도를 측정하였다. Fig. 5의 결과, xanthan gum보다는 낮은 점도를 보였으나 0.1%의 낮은 농도에서도 비교적 높은 점도(120 cp)를 보였다.

Shear rate의 영향 : 점도계 spindle의 분당 회전수를 60, 30, 12, 6 등으로 달리하여 A29 POL과 xan-

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of A29

		Carbohydrate Utilization		
		Carbohydrate	Gas production	Acidification
Gram stain	+			
Shape	rod			
Motility	+			
Growth in air	+			
Spore	+	Arabinose	+	+
Spore position	central	Fructose	+	+
Growth at 45°C	+	Glucose	+	+
Growth at pH 5.7	+	Mannose	+	+
MR test	+	Ribose		-
VP test	-	Galactose	+	+
NaCl tolerance		Xylose	+	-
2%	+	Cellobiose	+	+
5%	+	Lactose	+	+
7%	-	Maltose	+	+
Nitrate reduction	+	Sucrose	+	+
Citrate utilization	+	Trehalose	+	+
KCN utilization	-	Raffinose	+	+
Urase production	+	Inulin	-	+
Lipase production	+	Dextrin	+	+
Indole production	-	Soluble starch	+	+
Starch hydrolysis	+	Potato starch	-	+
Gelatin hydrolysis	-	Mannitol	+	+
Casein hydrolysis	+	Myo-inositol	-	-
Esculin hydrolysis	-	Sorbitol	-	-
Tetrasolium red	+	Arabitol	-	-
Acid fast	+			
Catalase	+			
Oxidase	+			

**Fig. 3. Growth and polysaccharide production by *Bacillus* sp. A-29 in a 3-L jar fermentor.****Table 3. Cultural condition in jar fermentor**

Culture Condition		Operating Condition	
Dextrin	12.0%	Medium volume	3-l
Soytone	0.2%	Impeller agitation	300 rpm
SnCl ₂ ·2H ₂ O	0.02%	Air flow rate	1.0 vvm
Na ₂ HPO ₄	0.36%	Inoculum size	2%
L-Alanine	0.01%	Culture time	96 hours
Initial pH	6.8	Temperature	30°C
Tap water		Sampling	20 ml/6 hours

than gum 용액의 점도를 측정하였다. Fig. 6의 결과는 shear rate가 증가할 수록 점도가 감소하는 pseudoplastic의 특성을 나타내었다. NaCl 또는 CaCl₂ 등을 첨가하지 않은 경우에는 xanthan gum의 점도가 A29 POL보다 높았으나 0.1% 되도록 첨가한 A29 POL은 xanthan gum에 비하여 높은 점도와 의가소성(pseudoplastic)을 보였다. 이러한 경향은 NaCl을 첨가하였을 때보다 CaCl₂를 첨가하였을 때 더 큰 것으로

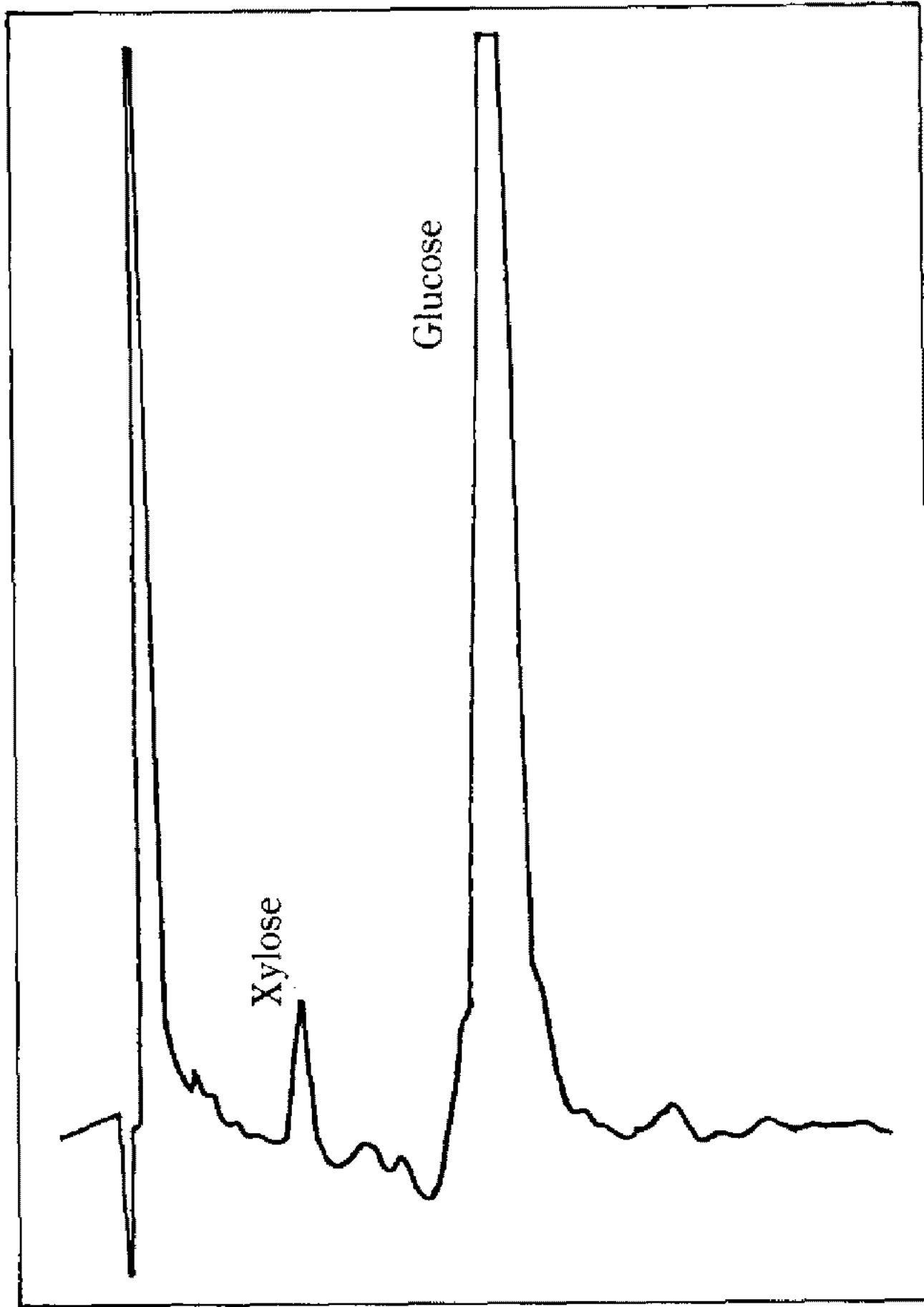


Fig. 4. HPLC elution pattern of A-29 POL hydrolysate.

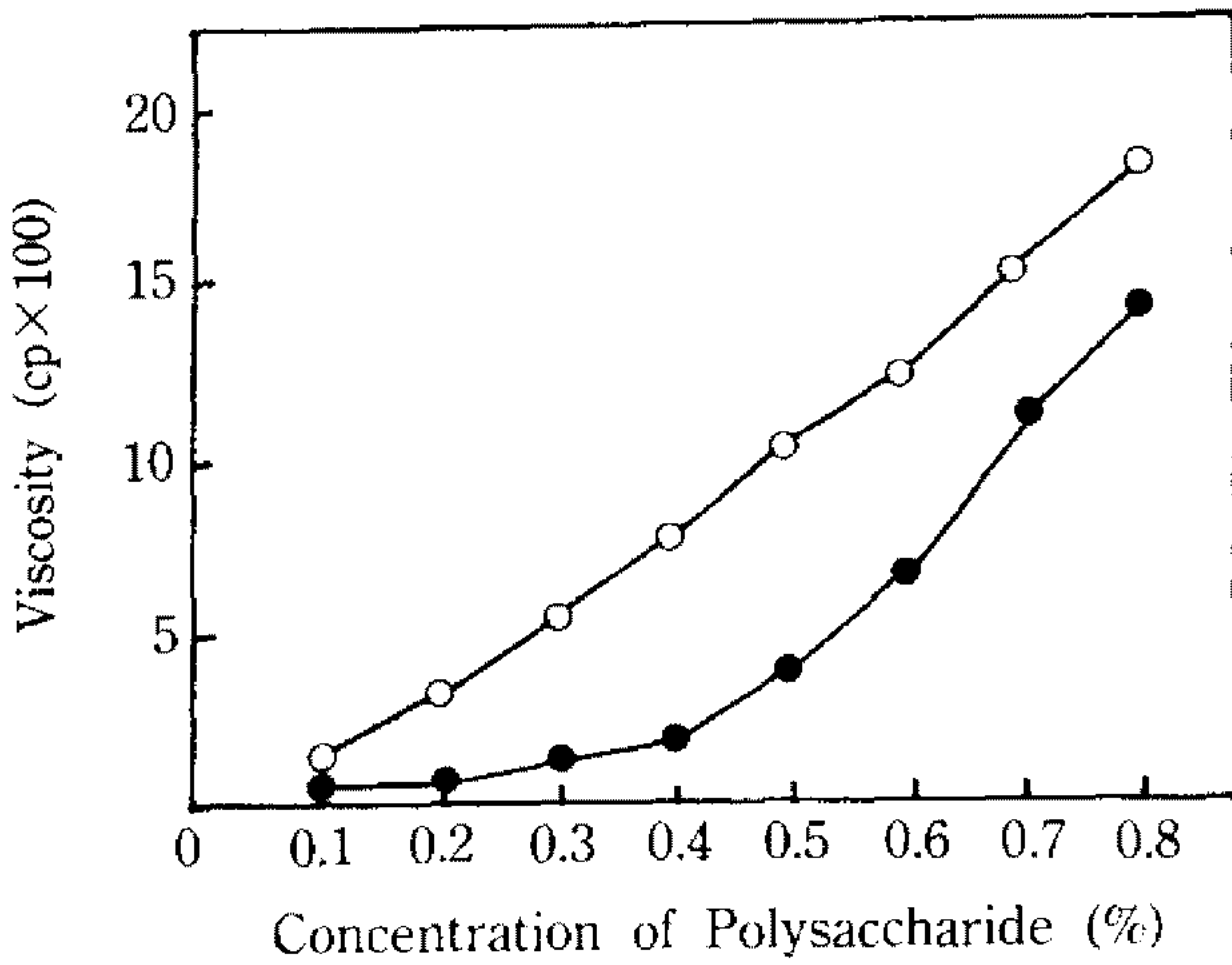


Fig. 5. Effect of polysaccharide concentration on viscosity.

A-29 ●-●, Xanthan gum ○-○.

나타났다.

온도에 의한 영향: A29 POL과 xanthan gum 용액을 water bath에서 진탕하면서 20°C 에서 80°C 까지 10°C 간격으로 점도를 조사하였고, 80°C 에서 냉각하면서 조사하였다. Fig. 7의 결과는 xanthan gum이 80°C 까지의 열에 안정함을 보였으며 NaCl보다는

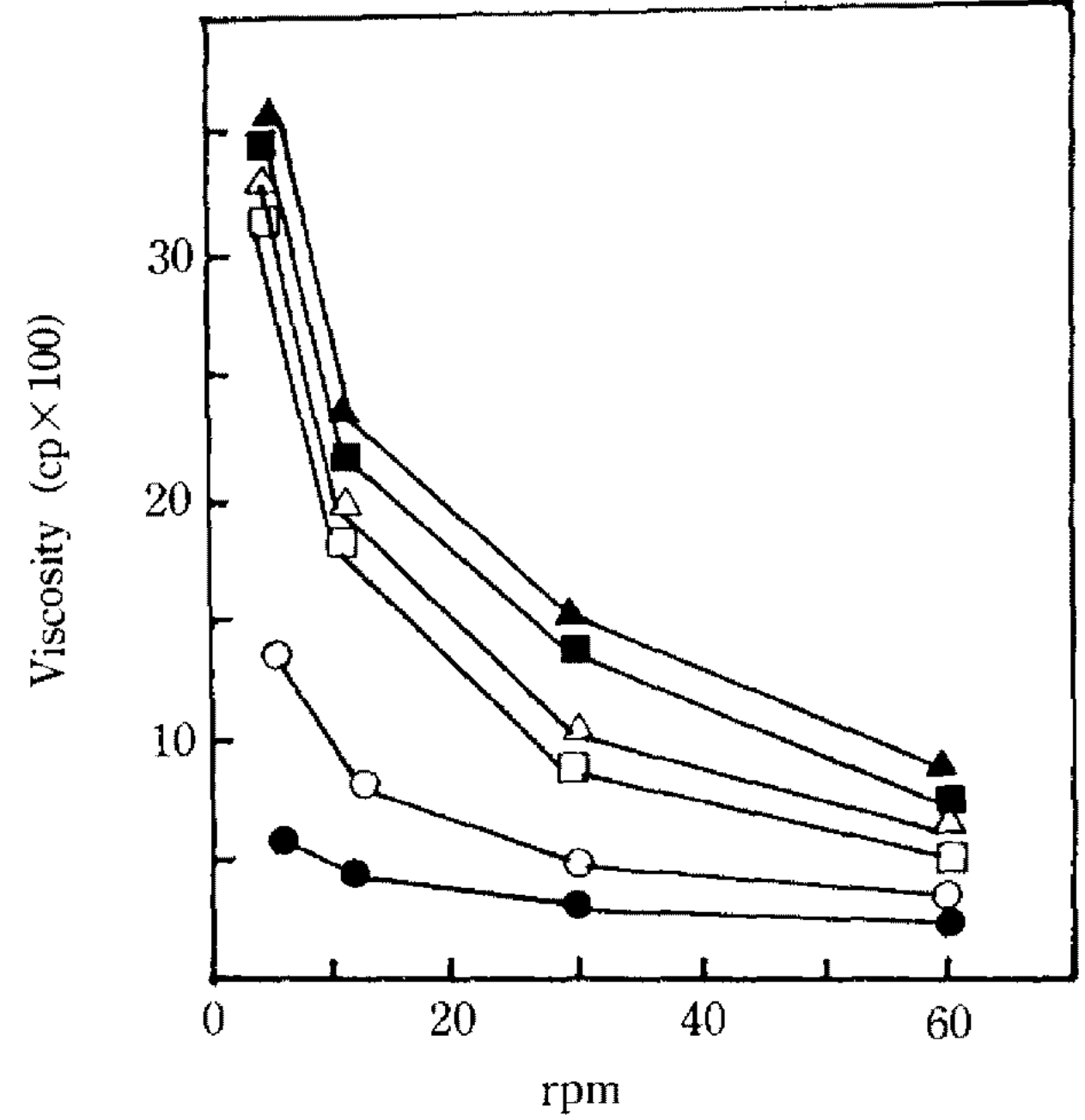


Fig. 6. Effect of shear rate-shear stress on viscosity. A-29 POL (0.5%) ●-●, Xanthan gum (0.5%) ○-○, + CaCl₂ (0.1%) ▲-▲, + CaCl₂ (0.1%) △-△, + NaCl (0.1%) ■-■, + NaCl (0.1%) □-□.

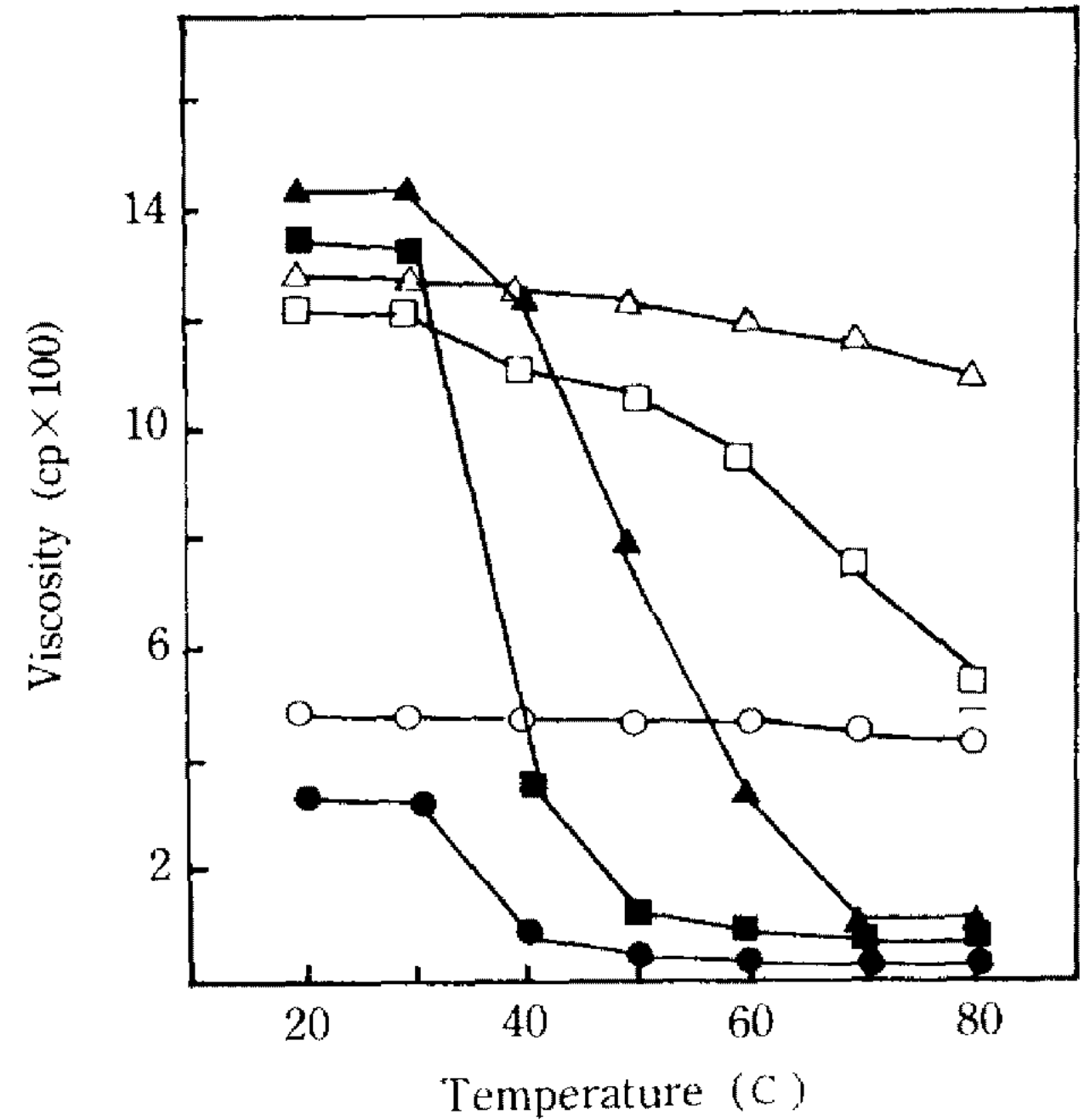


Fig. 7. Effect of temperature on viscosity.

A-29 POL (0.5%) ●-●, Xanthan gum (0.5%) ○-○, + CaCl₂ (0.1%) ▲-▲, + CaCl₂ (0.1%) △-△, + NaCl (0.1%) ■-■, + NaCl (0.1%) □-□.

CaCl₂를 첨가하였을 때 더욱 안정하였다. 반면에 A29 POL은 30°C 에서 40°C 사이에 점도가 급격히 떨어짐을 볼 수 있었다. NaCl 또는 CaCl₂를 0.1%를 첨가했을 때는 낮은 온도(20~30°C)에서 xanthan gum보다 높은 점도를 보였으나, NaCl을 첨가하였을 때는

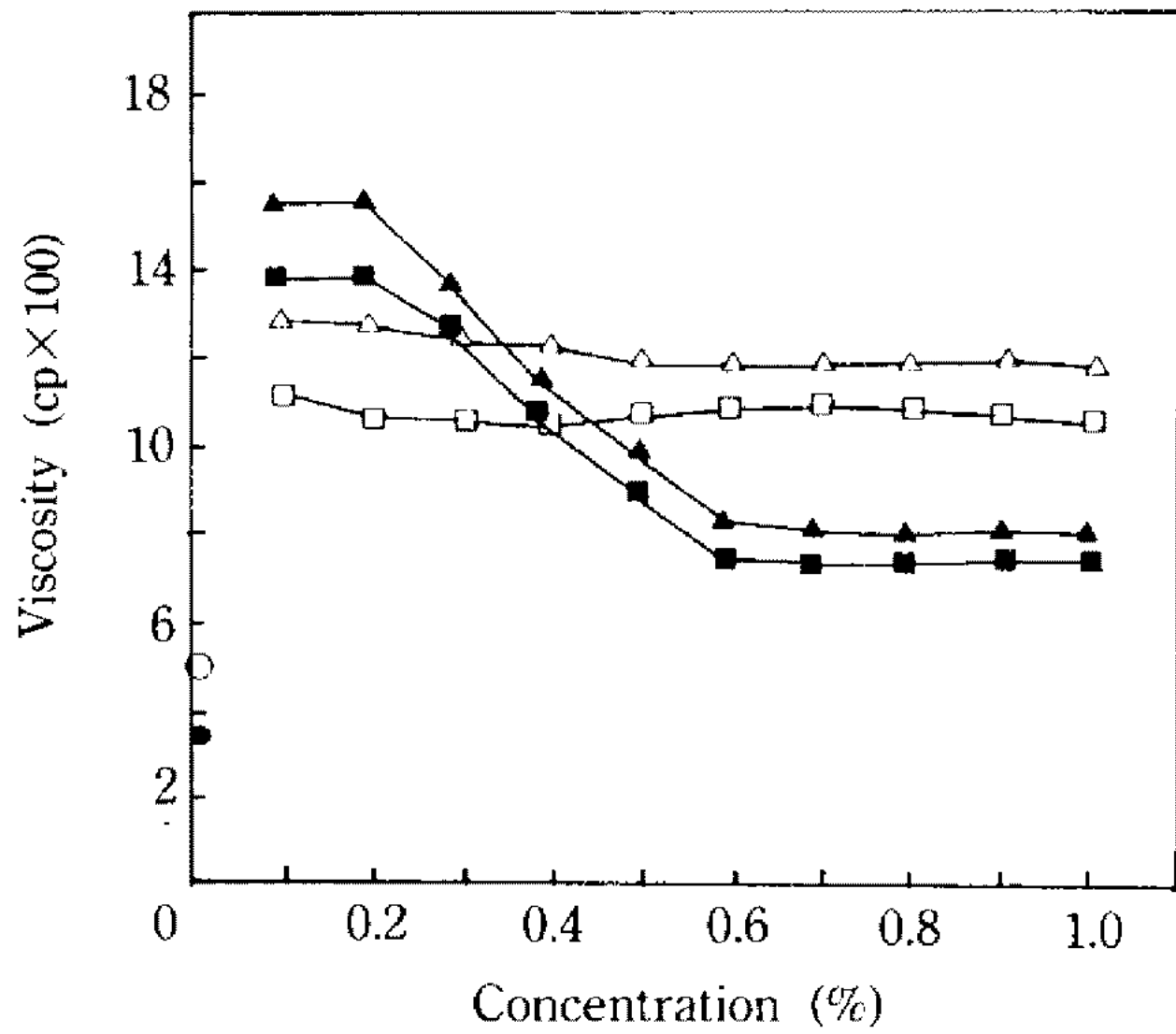


Fig. 8. Effect of salt concentration on viscosity.
A-29 POL (0.5%) ●-●, Xanthan gum (0.5%) ○-○, + CaCl₂ (0.1%) ▲-▲, + CaCl₂ (0.1%) △-△, + NaCl (0.1%) ■-■, + NaCl (0.1%) □-□.

40°C 에서 점도가 급격히 떨어졌으며 CaCl₂을 첨가하였을 때는 NaCl보다는 완만하게 떨어졌다. NaCl보다는 CaCl₂을 첨가하였을 때, 열에 안정함을 보였다. Xanthan gum과 A29 POL 모두 20°C 로 냉각하면 원래의 점도로 수복됨을 보였다.

염농도에 의한 영향 : A29 POL과 xanthan gum 용액에 NaCl과 CaCl₂를 0.1%에서 1%까지 첨가하면서 점도 측정하였다. Fig. 8의 결과는 NaCl 또는 CaCl₂를 0.1%에서 1%까지 첨가하였을 때 xanthan gum은 안정하였으며, A29 POL은 염에 의한 영향을 크게 받았다. 염을 0.1% 첨가하였을 때 xanthan gum의 경우보다 점도가 급격히 상승하였으며 첨가된 염의 농도를 0.3% 이상 증가시켰을 때, A29 POL은 점도가 0.6% 첨가 시까지는 완만하게 감소하는 경향을 보였다. 0.7%에서 1%까지 첨가한 경우는 점도의 변화가 없었다.

pH에 의한 영향 : A29 POL의 pH 변화에 따른 점도 특성을 조사하기 위해 여러가지 완충액을 사용하여 다당류 용액을 제조하였으며 그에 따른 점도를 측정하였다. 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다. A29 POL은 pH에 크게 영향을 받았다. 산성 조건에서는 높은 점도를 보였으며 알칼리 조건에서는 낮은 점도를 보였다. pH 3에서 가장 높은 점도를 보였으며 더욱 낮은 pH에서는 점도가 감소하였다. 이러한 특징은 김등(1)이 발표한 다당류(POL-II)와도 상이하였다.

A29 POL의 기타 특성

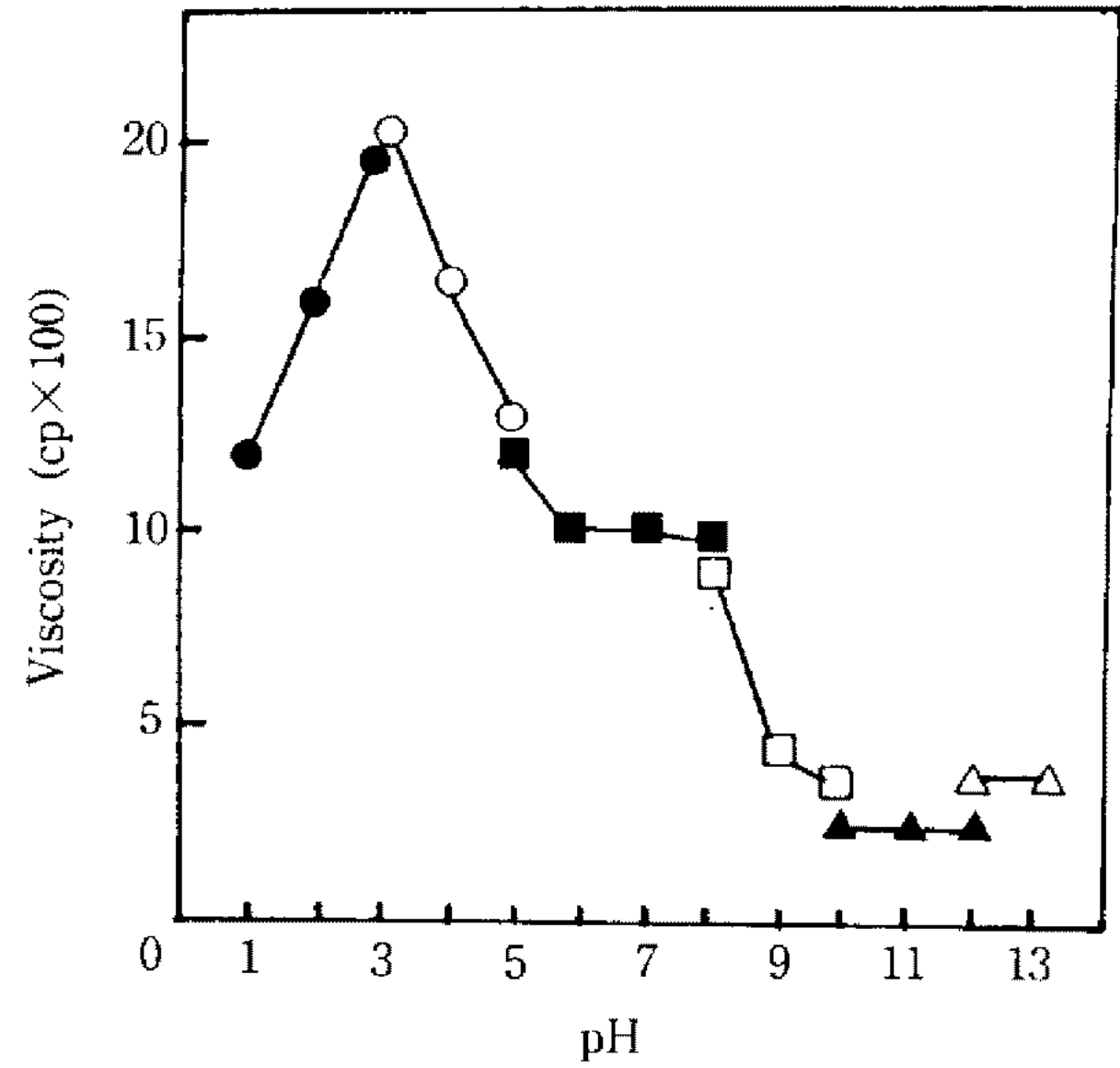


Fig. 9. Effect of pH on viscosity.
KCl-HCl buffer ●-●, Citric acid buffer ○-○, Phosphate buffer ■-■, Boric acid-NaOH buffer □-□, Na₂HPO₄-NaOH buffer ▲-▲, NaOH-HCl buffer △-△.

A29 POL의 당 특성을 조사한 결과 anthrone reaction과 phenol reaction에 반응하며, Fehling, Benedict, Barfoed reaction에 음성이며 Seliwanoff, bial reaction에 음성이었다. 이것은 A29 POL이 당 일반 시험에는 반응하지만 환원력이 없고 ketose와 pentose가 없는 것을 나타낸다. 이것은 HPLC로 구성당을 조사한 결과가 glucose와 xylose였던 것과 일치한다. 또, A29 POL은 water, pyridine, hexane, benzene, chloroform등에 용해되며 투명한 용액을 형성하였다. Ethanol, methanol, acetone, glycerol, isopropanol, propandiol 등의 용매와 CTAB(cetyltrimethylammoniumbromide)와 CPC(cethylpyridiniumchloride)에 침전되었다. CTAB, CPC에 침전된 것은 A29 POL이 anionic polysaccharide임을 의미한다. 이외에도 MgSO₄·7H₂O, Na₂CO₃·H₂O, MnSO₄·7H₂O 등을 첨가하였을 때 gel을 형성하였으며, 이것을 100°C 에서 5분간 가열한 뒤에 더욱 효과가 있었고, film을 형성할 수도 있었다.

요 약

높은 점도를 보이는 다당류를 생산하는 균주 A-29를 선별하여 특성을 조사한 결과 *Bacillus* sp.으로 동정되었다. 배지 조성을 dextrin 12%, soytone 0.2%, SnCl₂ 0.02%, Na₂HPO₄·12H₂O 0.36%, L-alanine 0.01%으로 하고 초발 pH를 6.8으로 하여 30°C 에서 4일간

배양하였을 때 배양액의 점도는 65,000 cp였다. Jar fermentor 배양에서 생산된 A29 POL의 양은 8.3 g/l이었으며, A29 POL의 당당류 조성은 glucose와 xylose가 8:1의 mole 비율로 구성되어 있었다. A29 POL은 0.1%의 낮은 농도에서도 높은 점성을 나타냈고 의가소성의 성질을 보였다. 특히 NaCl과 CaCl₂ 등의 염에 의하여 크게 영향을 받으며 0.1%의 염 첨가시 점도가 급격히 증가하였고 의가소성도 더욱 증가하였다. 첨가된 염 농도가 0.3에서 0.6%까지 증가하였을 때, 완만한 감소를 보였다. 또한 높은 온도에서는 점도가 낮아졌지만 온도를 낮추었을 때는 점도가 다시 회복되는 현상을 보였다. 산성의 영역에서 높은 점도를 보였고 pH 3에서 가장 높았다. 알칼리성에서 낮은 점도를 보였다. A29 POL은 anionic polysaccharide이며 film을 형성할 수 있었다. MgSO₄·7H₂O, Na₂CO₃·H₂O, MnSO₄·7H₂O 등의 금속이온을 첨가하였을 때 gel을 형성하였다.

참고문헌

1. 김양효, 안성구, 서현효, 김혜자, 윤병대. 1993. *Bacillus* sp. LK-1의 exopolysaccharides(POL-II) 생산 및 특성. 한국산업미생물학회지 **21**: 478-485.
2. 서현효, 이문호, 김희식, 박찬선, 윤병대. 1993. *Bacillus* sp. A56을 이용한 응집제 생산. 한국산업미생물학회지 **21**: 486-493.
3. Sutherland, I.W. 1983. Extracellular Polysaccharides. Pp. 531-574. In *Biotechnology*, vol. 3. (Verlag Chemie GmbH, Weinheim).
4. Yalpani, M. 1987. Commercial polysaccharides: recent trends and developments in Progress in biotechnology, *Industrial polysaccharides*, vol. 3. Pp. 311-335. Elsevier, New York.
5. Peter, H.A.S., S.M. Nicolas, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Baltimore, London.
6. Macfaddin, J.F. 1984. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Williams and Wilkins.
7. Cowan, N.R., and K.J. Steel. 1965. *Manual of the identification of medical bacteria*. Pp. 215. Cambridge Univ. Press, London.
8. Gordon, R.E. 1975. The Genus *Bacillus*. Agriculture Handbook stock number 202-275-2091. U.S. Department of Agriculture, Washington D. C.
9. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
10. Elisashvili, V.I. 1984. Levan synthesis by *Bacillus* sp. *Appl. Biochem. Microbiol.* **20**: 82-87.
11. Ramsay, J.A., D.G. Cooper, and R.J. Neufeld. 1989. Effects of oil reservoir conditions on the production of water-insoluble levan by *Bacillus licheniformis*. *J. Gen. Microbiol.* **7**: 155-165.
12. Fukui, H., M. Tanaka, and A. Misaki. 1985. Structure of a physiologically active polysaccharide produced by *Bacillus polymixa* S-4. *Agri. Biol. Chem.* **49**: 2343-2349.
13. Tanzer, J.M., W.I. Krichevsky. 1970. Linear growth kinetics of plaque-forming *Streptococci* in the presence of sucrose. *J. Gen. Microbiol.* **58**: 125-133.
14. Jeans, A. 1974. New hydrocolloid of interest to the food industry. *Food. Technol.* May, 34-40.
15. Pace, G.W., and R.C. Righelato. 1980. Production of extracellular microbial polysaccharides. *Adv. Biochem. Eng.* **15**: 41-70.

(Received February 23, 1994)