

## 메탄올을 이용하여 성장하는 *Methylovorus* sp. strain SS10이 생산하는 세포외 다당류

추원호 · 송택선 · 김영민\*

연세대학교 이과대학 생물학과, 생물산업소재연구센터

제한통성 메탄올 자화세균인 *Methylovorus* sp. strain SS1은 최적 성장 조건하에서는 소량의 세포외 다당류(EPS)를 생산하였지만, 질소원이 결핍된 성장 조건하에서는 성장속도는 느렸지만 다량의 EPS를 생산하였다. EPS는 배지 내의 탄소대 질소 비율이 5.2일 때 가장 많이 생산되었다. EPS생산을 위한 최적 온도는 30°C이고 최적 pH는 6.5였다. EPS는 탄수화물과 단백질 및 약간의 피루브산으로 구성되어 있었고, 환원당으로는 다량의 포도당과 소량의 mannose가 존재하였다. 에탄올을 처리한 EPS(EPSae)에는 에탄올을 처리하지 않은 EPS(EPSbe)에 존재하던 피루브산이 존재하지 않았고, EPS보다 단백질의 양도 적고 점성도 낮았다. EPSbe의 점성은 NaCl에 의해 큰 영향을 받았는데, 0.5% (w/v) 농도의 NaCl 용액에서도 점성이 크게 떨어졌으며, 높은 온도에서는 점성이 비가역적으로 크게 증가하였다. Gel filtration 방법으로 조사한 EPSae의 분자량은  $2.5 \times 10^6$ - $3.5 \times 10^6$ 이었다. 냉동건조한 다당류를 전자현미경으로 관찰하였을 때, EPSbe는 섬유모양을 하였고, EPSae는 벌집모양의 망상구조를 하고 있었다.

**KEY WORDS** □ *Methylovorus* sp. strain SS1, methanol, extracellular polysaccharide

세균에서 유래된 유용물질의 생산에 대한 관심이 높아지면서, 기존 합성고분자 제품을 대체할 수 있는 생체고분자 생산에 대한 연구 등 세균이 생산하는 다당류와 그의 유도체에 대한 연구가 학문적인 면에서는 물론 응용적인 측면에서 많은 관심의 대상이 되고 있다(5).

세균이 생산하는 다당류는 기능에 따라 탄소 및 에너지원으로 세포내에 저장되는 세포내 다당류(intracellular polysaccharide)와 세포외로 분비되는 세포외 다당류(extracellular polysaccharide, EPS) 등 세 가지로 구분된다(27). 이 중에서 EPS는 아메바나 파지로부터 세균을 보호하거나 항체에 대한 장벽 역할을 하고, 환경에 존재하는 독성물질을 중화시키거나 금속이온과 착화합물을 형성하며, 건조한 환경에서 세포내의 수분 증발을 막는 등 세균의 생존과 관련된 여러 가지 기능을 수행함은 물론(34, 35), 식물과의 공생 관계에도 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(10, 30, 31). 이와 같은 EPS는 세균이 생산하는 다당류 중 가장 많이 생산되는 것으로 배양액으로부터의 분리와 회수 및 정제가 용이함은 물론, 다양한 물성 등으로 인하여 gel 형성제, 유화제, 안정제, 접합제, 응고제, 윤활제, 필름 형성제 등으로 다양하게 이용되고 있어 경제적인 측면에서의 잠재력이 높게 평가되고 있다(27, 35).

메탄올 등 일탄소화합물을 유일한 에너지 및 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있는 methylotrophic bacteria는 생태계에서 탄소순환에 중요한 역할을 담당하고 있을 뿐만 아니라, 높은 순도를 지니면서 물과 쉽게 혼합되고, 값이 저렴하고 풍부하게 존재하며, 제한된 일부 생물만이 기질로 사용

할 수 있는 메탄올을 이용하여 성장하면서 단세포 단백질은 물론, 각종 아미노산과 유기산, 비타민, 유용 효소, 다당류를 포함한 생분해성 고분자물질 등을 생산할 수 있다는 점에서 많은 관심의 대상이 되고 있는데(2, 3, 8, 9, 12, 14, 15, 19, 21, 23, 24, 33, 36). 현재까지 *Pseudomonas*속(24, 29), *Methylomonas*속(13), *Methylocystis*속(15), *Methylobacterium*속(8, 9), *Methylophilus*속(24, 33) 및 *Hyphomicrobium*속(19) 등을 대상으로 한 연구는 이들이 생산하는 EPS의 구성 성분과 물리적 특성이 서로 다르다는 것을 밝혔다. 이와 같은 사실은 동일한 기질인 메탄올을 이용하여 성장하는 methylotrophic bacteria들이 서로 다른 물성을 지닌 EPS를 생산하며, 메탄올로부터 EPS를 생산할 수 있는 새로운 methylotrophic bacteria를 분리하면 이 세균들로부터 지금까지 보고되지 않은 새로운 물성을 지닌 EPS를 분리해 낼 수 있음을 암시한다.

*Methylovorus* sp. strain SS1은 말레이시아의 토양 시료로부터 분리한 새로운 제한통성 메탄올 자화세균으로 메탄올을 이용하여 성장할 때 EPS를 생산하는 것으로 밝혀졌다(32). 따라서 본 연구에서는 이 세균이 생산하는 EPS의 물성도 지금까지 보고된 EPS들의 물성과 다를 것임을 예상하고, 이 세균이 생산하는 EPS의 실용화를 위한 바탕을 마련하기 위하여 이 세균의 EPS 생산 최적조건과 생산된 EPS의 몇 가지 물리, 화학적 특성을 조사하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 실험균주 및 배양

*Methylovorus* sp. strain SS1(32)을 0.5%(v/v)의 메탄올이 첨가된 Kim과 Hegeman(20)의 기본염류배지를 변형시킨 배지(변형염류배지, cobalt nitrate 대신 cobalt chloride 첨가)에

\*To whom correspondence should be addressed

집중하고, 30°C에서 200 rpm의 속도로 진탕 배양하였다. 배양에 사용한 용기는 실험 목적에 따라 500-ml와 1,000-ml의 삼각플라스크 또는 1,000-ml의 용기가 장착되어 있고, 온도와 pH를 조절할 수 있으며, 용존산소를 파악할 수 있는 발효기(BIOFLO<sup>R</sup> Model C30, New Brunswick Scientific Co., Edison, New Jersey)를 사용하였다. 세균의 성장 양상은 Hitachi U-2000 분광분석기를 사용하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 조사하였다.

### 균체량 및 다당류 정량

배양액을 4°C에서 6,770×g로 30분간 원심분리한 후, 침전물을 수거하여 60°C의 건조기에서 12시간 동안 건조시켜 균체 건조중량을 결정하였고, 상등액에 존재하는 EPS의 양은 포도당을 표준당으로 사용하여 총 탄수화물의 양을 측정하는 phenol-sulfuric acid 방법(11, 14)으로 결정하였다.

### 단백질 정량

시료에 존재하는 단백질의 양은 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 Lowry 등(26)의 방법으로 결정하였다.

### EPS의 분리 및 순화

모든 과정은 4°C에서 수행하였다. 세균배양액을 6,770×g로 30분간 원심분리 한 후, 침전된 균체와 상등액 사이에 존재하는 물질을 수거하였다. 수거된 물질에 이 물질의 약 15배 부피에 해당하는 0.9% NaCl 용액을 첨가하여 6시간 동안 잘 휘저은 다음, 17,760×g로 10분 동안 원심분리하여 EPS속에 갇혀있던 세균들을 제거하였다. 균체가 제거된 다당류는 12시간 동안 증류수에 투석하여 염분을 제거하고, EPSbe(에탄올을 처리하지 않은 EPS)로 명명하였다. 염분이 제거된 EPSbe 시료에 약 2배 부피에 해당하는 에탄올을 첨가하여 잘 섞은 후, 17,760×g로 10분간 원심분리하고, 침전되어 있는 순화된 EPSae(에탄올을 처리한 EPS)를 수거하여 냉동건조하였다.

### 환원당 정량 및 분석

순화된 EPS에 존재하는 환원당의 양은 포도당을 표준당으로 사용하여 dinitrosalicylic acid 방법으로 결정하였다(4).

EPS를 구성하는 환원당의 종류는 가수분해한 EPS를 thin-layer chromatography(TLC)와 liquid chromatography를 수행하여 분석하였다. 가수분해된 EPS를 얻기 위해서는 먼저 10 mg의 EPS를 2 ml의 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액에 녹인 다음, 100°C에서 2시간 동안 가열하고, Ba(OH)<sub>2</sub>로 중화시킨 후, 17,760×g로 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 aspirator로 농축, 건조하였다.

건조된 가수분해 산물 4 mg을 1 ml의 증류수에 녹여 TLC를 위한 시료로 사용하였다. TLC는 0.443 g의 isopropylamine과 0.915 g의 benzoic acid가 포함된 15 ml의 증류수와 30 ml의 2-butanone, 20 ml의 2-propanol, 20 ml의 benzene이 혼합된 용매와 cellulose plate(Art. 5721, Kieselgel 60, E. Merck AG, Darmstadt, Germany)를 사용하거나 isopropanol과 ethylacetate 및 증류수가 6:1:3으로 혼합된 용매 또는 2-butanone과 acetate 및 메탄올이 3:1:1의 비율로 혼합된

용매와 silica gel plate(Art. 5735, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, E. Merck AG)를 사용하여 수행하였다. 전개가 끝난 plate는 silver nitrate-acetate 용액에 담구었다가 완전히 말린 후, 알칼리성 메탄올을 분무하여 발색시켰다(6).

산으로 가수분해한 EPS의 liquid chromatography는 Shimadzu LC-6A(Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)를 사용하여 수행하였는데, 이때 사용한 column과 분석조건은 다음과 같다. Column, Bondapak-amine(Waters Column Div., Millipore Corp., Milford Massachusetts), 0.39(i.d.)×30 cm; elute, water-acetonitril(15:85); flow rate, 1.5 ml/min; temperature, 25°C; refractive index detector(ERC-7522, Erma Inc., Tokyo, Japan).

### 피루브산 정량

EPS에 존재하는 피루브산의 함량은 다양한 농도의 피루브산(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)에 대한 lactate dehydrogenase의 표준반응속도(22)를 구한 다음, 산으로 가수분해한 EPS에 대한 lactate dehydrogenase의 반응속도를 측정하여 결정하였다.

### Infrared(IR) spectroscopy

건조된 EPS 분말과 KBr을 1:5의 비율로 혼합하여 막자사발에서 고르게 갈아 KBr pellet를 만든 후, IR spectrophotometer(IR-435, DR-1 Data Recorder, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)로 EPS의 IR 스펙트럼을 구하였다.

### EPS의 점도 조사

Digital viscometer(Model DV-II, Brookfield Engineering Labs. Inc., Stoughton, Massachusetts)의 #2와 #3 spindle을 사용하여 EPS의 농도와 pH, 온도, 점도계의 회전수에 따른 점성의 변화를 측정하였다. 이때 EPSae가 EPSbe와 서로 다른 물성을 나타내었기 때문에 이들의 물성을 각각 조사하였다.

### EPS의 형태 조사

냉동건조된 EPSbe와 EPSae를 막자사발로 갈아 증류수에 녹인 다음, 다시 냉동건조하여 굵으로 도금한 후, 주사전자현미경(S-450, Hitachi Co., Tokyo, Japan)으로 각각의 형태를 관찰하였다.

## 결 과

### EPS 생산에 대한 질소원의 영향

Methylovorus sp. SS1을 sodium nitrate, ammonium sulfate, ammonium chloride, ammonium phosphate, urea 등 다섯 가지 질소원이 질소농도로 환산하여 0.212%(w/v) 또는 0.064%(w/v)의 농도로 첨가된 변형염류배지에 접종하여 초기 정체기까지 배양한 다음, 생산된 EPS의 양을 측정하였다. 이때 이 세균은 sodium nitrate를 첨가한 배지에서 성장할 때 가장 많은 EPS를 생산하였고, 모든 질소원의 경우 전반적으로 높은 농도의 질소원이 포함된 배지에서 성장할 때 보다는 낮은 농도의 질소원이 포함된 배지에서 성장할 때 약 5-10배 정도 더 많은 EPS를 생산하였다(Table 1). 한편, ammonium sulfate를 첨가한 배지에서 성장한 세균이 점도가

**Table 1.** Effect of the sources and concentrations of nitrogen on the production of EPS<sup>a</sup>

Nitrogen sources	Conc (%)	EPS (g/L)	Cell dry wt (g/L)	Product yield <sup>b</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0.04	1.3	0.03
NaNO <sub>3</sub>		0.06	2.7	0.02
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.212	0.05	3.3	0.02
NH <sub>4</sub> Cl		0.05	1.8	0.03
Urea		0.04	2.5	0.02
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0.4	0.1	4.0
NaNO <sub>3</sub>		0.5	0.7	0.7
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.064	0.4	1.1	0.4
NH <sub>4</sub> Cl		0.4	0.6	0.7
Urea		0.3	0.5	0.6

<sup>a</sup>The medium contained 0.5% (w/v) methanol. Data are the mean values of three experiments.

<sup>b</sup>EPS produced per cell dry weight.

높은 EPS를 생산하고 product yield도 가장 높았기 때문에 *Methylovorus* sp. SS1의 EPS 생산을 위한 가장 우수한 질소 원인으로 ammonium sulfate를 선정하였다.

### 성장시기에 따른 EPS의 생산

변형염류배지에 ammonium sulfate 등 다섯 가지의 질소 원을 질소농도로 0.064%(w/v)가 되게 첨가한 후 세균을 배양하면서 세균의 성장 양상과 EPS의 생산량을 조사하였을 때, 성장 양상은 질소원의 종류에 의해 큰 영향을 받지 않았고, 모든 질소원의 경우에 정체가 초기부터 EPS의 생산이 시작되어 거의 동일한 양이 지속적으로 생산되다가 정체가 후기에서 감소하였다.

### EPS 생산에 미치는 배지내의 탄소 대 질소 비율의 영향

일정한 양의 메탄올(156 mM)과 ammonium sulfate(15 mM)에 대해 서로 다른 농도의 ammonium sulfate(5-151 mM)와 메탄올(15.5-468 mM)이 각각 첨가된 변형염류배지에 세균을 접종하여 균체와 EPS의 생성 양상을 비교하였을 때, 메탄올의 농도가 일정한 경우나 ammonium sulfate의 농도가 일정한 경우 모두 탄소 대 질소의 비율이 5.2일 때 가장 많은 EPS가 생성되었다(Table 2).

### EPS 생산에 미치는 배양온도와 pH의 영향

156 mM의 메탄올과 30 mM의 ammonium sulfate가 포함된 변형염류배지에 *Methylovorus* sp. SS1을 접종하여 24-50°C에서 배양하였을 때, 30°C에서 성장한 세균이 가장 많은 EPS를 생산하였다.

156 mM의 메탄올과 30 mM의 ammonium sulfate가 첨가된 다양한 pH의 변형염류배지에 세균을 접종하여 30°C에서 배양하였을 때, pH 6.5의 배지에서 성장한 세균이 가장 많은 EPS를 생산하였다.

### EPS의 화학적 조성

산으로 가수분해한 EPSae를 TLC와 liquid chromatography 방법으로 분석하였을 때, EPS를 구성하는 환원당은 주로

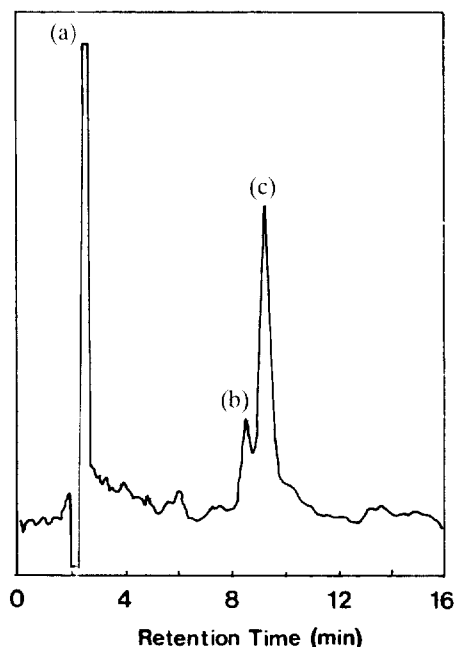
**Table 2.** Effect of C/N molar ratios on the production of EPS under the constant ammonium sulfate and methanol concentrations<sup>a</sup>

Growth condition	C/N molar ratio	EPS (g/L)	Cell dry wt (g/L)	Product yield <sup>b</sup>
Constant (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concn (15 mM)	1.0	0.01	0.14	0.07
	1.3	0.01	0.20	0.05
	2.1	0.02	0.30	0.07
	2.6	0.03	0.30	0.10
	3.4	0.10	0.38	0.26
	5.2	0.18	0.35	0.51
Constant methanol concn (156 mM)	10.4	0.20	0.46	0.43
	31.2	0.18	0.44	0.41
	1.0	0.31	1.20	0.26
	1.3	0.33	1.18	0.28
	2.1	0.31	1.11	0.28
	2.6	0.31	1.05	0.30
	3.4	0.32	0.89	0.36
	5.2	0.39	0.10	3.90
	10.4	0.21	0.09	2.33
	31.2	0.17	0.08	2.13

<sup>a</sup>Cells were cultivated under the constant concentration of nitrogen or carbon. Data are the mean values of three tests.

<sup>b</sup>EPS produced per cell dry weight.

포도당과 mannose로 나타났으며, 포도당이 훨씬 많이 존재하였다(Fig. 1). 또한 EPSbe에는 총탄수화물 1 mg당 971 g의 단백질과 4.3 g의 피루브산이 존재하였으나, EPSae에는 총탄수화물 1 mg당 494 g의 단백질이 존재하고 피루브산은



**Fig. 1.** Liquid chromatogram of acid-hydrolyzed EPS. Liquid chromatography of the acid-hydrolyzed EPSae was performed using Bondapak-amine column (3.9 cm, i.d. × 30 cm) under the conditions described in Methods. Symbols: Solvent front (a), mannose (b), and glucose (c).

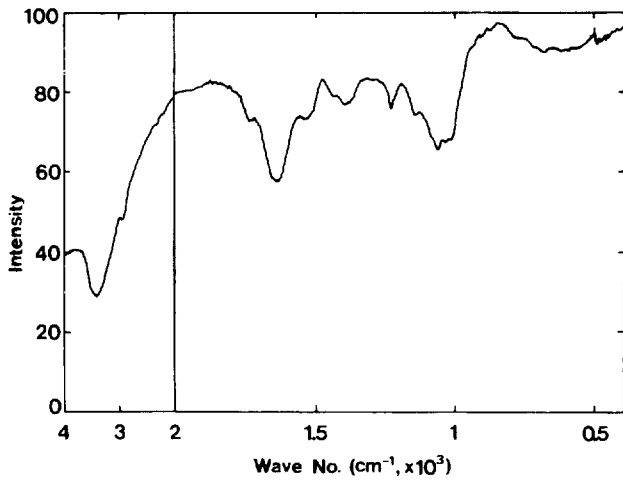


Fig. 2. IR spectrum of EPS. The spectrum was obtained using a pellet of EPSae and an IR spectrophotometer.

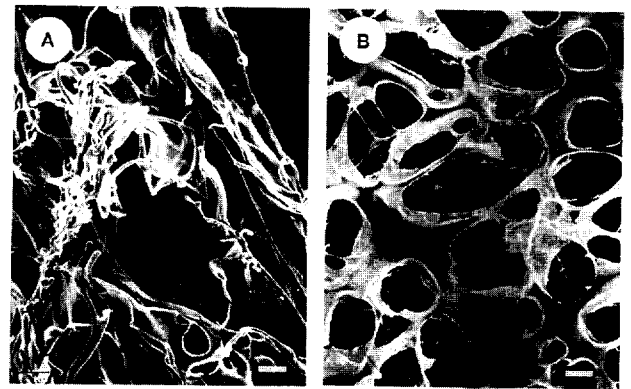


Fig. 4. Scanning electron micrographs of EPS. The lyophilized EPSbe (A) and EPSae (B) were coated with gold in ion coater and subjected to scanning electron microscopy. The bar represents 50  $\mu\text{m}$ .

검출되지 않았다.

**EPS의 IR 스펙트럼**

정제된 EPSae는  $3,400\text{ cm}^{-1}$  부근에서 다당류의 전형적인 O-H stretching 흡수 peak를 나타내었고,  $2,800\text{-}2,900\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C-H stretching 흡수 peak를 나타내었으며,  $1,600\text{ cm}^{-1}$ 에서 C=O기 특유의 흡수 peak를 나타내는 한편,  $1,000\text{-}1,100\text{ cm}^{-1}$ 에서 C-O기 특유의 흡수 peak도 나타내었다(Fig. 2). 또한 이 EPS는 모든 당에서 전형적으로 나타나는  $1,000\text{ cm}^{-1}$ 와  $1,200\text{ cm}^{-1}$  부근에서의 흡수 peak와 amino group의 존재를 나타내는  $1,610\text{-}1,650\text{ cm}^{-1}$ 에서의 peak도 형성하였다.

**EPS의 분자량**

표준탄수화물로 사용한 다양한 크기의 dextran(10,000, 70,000, 500,000, 2,000,000)(Sigma Chemical Co.)과 Sepharose 6B column( $1.6 \times 124\text{ cm}$ )을 사용하여 Andrews(1)의 방법으로 EPSae의 분자량을 측정된 결과 약  $2.5 \times 10^6\text{-}3.5 \times 10^6$ 으로 밝혀졌다.

**EPS의 점성**

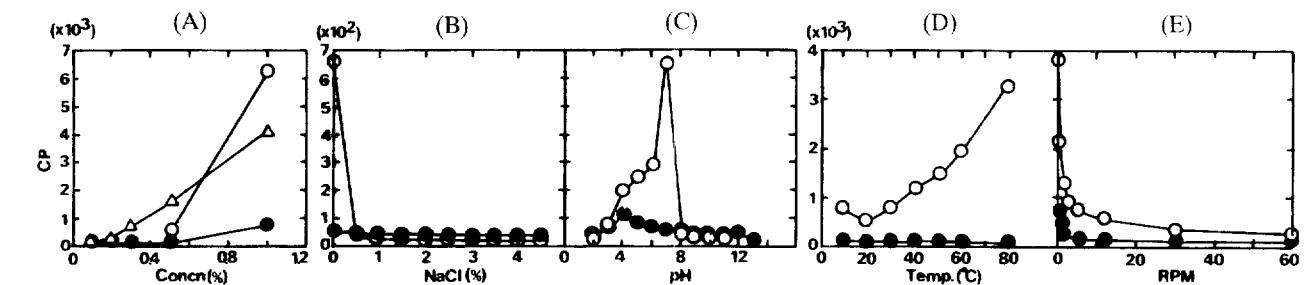


Fig. 3. Effect of various factors on the viscosity of EPS. The viscosities of EPSbe (○) and EPSae (●) were determined under various conditions as described below. (A) Effect of EPS concentration. The viscosities of different concentrations of EPSbe, EPSae and xantham gum (—△—) were determined at  $25^\circ\text{C}$  and pH 7.0. (B) Effect of NaCl concentration. The viscosities of 0.25% EPSbe and 0.5% EPSae were determined under various concentrations of NaCl at  $25^\circ\text{C}$  and pH 7.0. (C) Effect of pH. The viscosities of 0.25% EPSbe and 0.5% EPSae were determined at  $25^\circ\text{C}$ . (D) Effect of temperature. The viscosities of 0.5% EPSbe and 0.5% EPSae were measured at pH 7.0. (E) Effect of shear rate. The viscosities of 0.5% EPSbe and 0.5% EPSae under different shear rates were determined at  $25^\circ\text{C}$  and pH 7.0.

$25^\circ\text{C}$ 와 pH 7.0에서 EPS의 농도에 따른 점성의 변화를 관찰하였을 때, EPSae가 EPSbe보다 전반적으로 매우 낮은 점성을 나타내었고, EPSbe와 EPSae 모두 농도가 낮아짐에 따라 점도가 급격히 떨어지는 경향을 나타내었으며, 1% 농도에서는 EPSbe의 점도가 xantham gum보다 더 높았다(Fig. 3A). 그리고 동일한 조건에서 0.5%의 EPSae는 NaCl의 농도에 따른 점성의 변화를 거의 나타내지 않았으나, 0.25%의 EPSbe는 낮은 농도(0.5%, w/v)의 NaCl 용액에서도 점도가 급격히 떨어지는 경향을 나타내었다(Fig. 3B). 또  $25^\circ\text{C}$ 에서 0.5%의 EPSae의 점성은 pH의 변화에 큰 영향을 받지 않았고, 0.25%의 EPSbe는 pH 7.0을 중심으로 약간의 pH 변화에도 점성이 급격히 감소하였다(Fig. 3C). 그리고 pH 7.0에서 0.5%의 EPSae는 온도가 높아질수록 점도가 떨어졌으나, 0.5%의 EPSbe는 온도가 높아질수록 비가역적으로 점성이 증가하였고(Fig. 3D), EPSbe와 EPSae 모두  $25^\circ\text{C}$ 와 pH 7.0의 조건에서 shear rate가 증가하면 점성이 감소하는 pseudo-plasticity를 나타내었다(Fig. 3E).

**EPS의 형태**

건조된 EPS를 전자현미경으로 관찰하였을 때, EPSbe는

굵은 섬유에 가느다란 섬유들이 얽혀 있는 모양을 하고 있었고, EPSae는 벌집과 같은 망상구조를 하고 있었다(Fig. 4).

## 고찰

메탄을 자화세균은 균체 성장이 억제된 환경에서 메탄올의 산화 결과로 생산된 포름알데하이드를 세포구성물질로 동화하지 못하기 때문에, 생산된 포름알데하이드가 세포내에 축적되어 세포의 피해가 유발된다. 따라서 이 포름알데하이드의 축적을 피하기 위한 기작이 작동하게 되는데, 먼저 메탄올 탈수소효소의 활성이 낮아져 포름알데하이드의 생산이 저하되고, 그래도 생산되는 포름알데하이드는 다당류 생산에 이용되어 포름알데하이드에 의한 세포의 손상이 방지된다(33). 메탄올을 기질로 이용하여 성장하면서 EPS를 생산하는 *Methylovorus* sp. SS1은 ribulose monophosphate 경로를 통하여 세포구성 물질을 합성하는데(32), 이 경로는 에너지 효율면에서 serine 경로보다 유리하기 때문에 에너지가 많이 소비되는 EPS의 생산을 위해서는 serine 경로를 이용하는 세균보다 ribulose monophosphate 경로를 이용하는 세균이 더 적합하다(24).

지금까지 연구된 바에 의하면 EPS의 생산에서 가장 중요한 요건은 탄소 및 에너지원으로 이용되는 기질 이외에 어떤 영양분이 결핍된 환경을 만들어 주는 것이다(17, 23-25, 28, 33, 35, 37). 특히 질소원의 결핍은 단백질과 핵산의 합성을 억제하여 균체생성에 큰 영향을 미치고, 절대 호기성세균의 경우에는 산소의 결핍이 대사작용에 큰 영향을 주며, 질소나 산소 이외에 유황(17, 18)과 인(7, 17, 37) 등의 결핍도 정상적인 대사현상을 저해하여 EPS의 생산량을 높이는 것으로 보고되었다.

성장시기에 따른 *Methylovorus* sp. SS1의 EPS 생산양상을 조사하였을 때, 지수성장기까지는 거의 생산되지 않던 EPS가 정체기에 들어가면서 생산되기 시작하였는데, 이는 메탄올의 대사가 균체생성이 필요한 시기에는 EPS 생산보다 균체 합성쪽으로 진행되다가 어떤 영양분의 고갈로 인하여 균체 합성속도가 떨어지기 시작하면 남아있는 탄소원을 다당류로 전환하고 있음을 나타낸다. 이와 같은 사실은 배지에 첨가한 탄소 대 질소의 비율이 낮을 때보다 높을 때에 다당류가 더 많이 생산된 결과와도 일치한다.

일반적으로 EPS 생산을 위한 세균의 성장온도는 20-30°C가 가장 적합한 것으로 알려져 있는데(35), *Methylovorus* sp. SS1도 30°C에서 가장 많은 EPS를 생산하였다. 이와 같은 사실은 이 세균의 최적 성장온도가 40°C인 것을 감안하면(32), EPS 생산을 위한 최적온도와 세균성장을 위한 최적온도가 서로 다를 수 있음을 나타낸다. 한편, 이 세균의 EPS 생산을 위한 최적 pH는 6.5로 나타났는데, 이는 이 세균의 성장을 위한 최적 pH와 일치하였고(32), 몇 가지 다른 세균들의 EPS 생산을 위한 최적 pH(pH 7.0)와 유사한 것으로 나타났다(8, 19, 23, 29, 33, 37).

*Methylovorus* sp. SS1의 EPS는 메탄올 자화세균 중 *Methylocystis parvus* OBBP(15)와 *Pseudomonas viscogena* JS-1004(29), *Hyphomicrobium* sp. JTS-811(19), *Methylobacterium or-*

*ganophilum*(8, 9) 등이 생산하는 EPS는 물론, 다양한 세균들이 생산하는 EPS의 구성당으로 가장 많이 알려진 포도당과 *P. viscogena* JS-1004(29)와 *M. organophilum*(8, 9)의 EPS에서 발견되는 mannose를 주된 환원당으로 가지고 있었고, 다당류에서 일반적으로 관찰되는 O-H나 C-H stretching은 물론, C=O 등 다양한 기의 흡수 peak를 나타내었는데, 이는 이 EPS가 화학적으로 전형적인 다당류의 특징을 가지고 있음을 보여준다. 그리고 Sepharose 6B column을 이용하여 정제된 EPS를 gel filtration 했을 때 다당류 분획과 단백질 분획이 일치한 것과 정제된 EPS로부터 상당량의 단백질이 검출된 것 및 IR spectrum의 분석결과 등은 *Methylovorus* sp. SS1의 EPS가 단백질을 함유하고 있음을 나타내는데, 이와 같은 사실은 *M. organophilum*이 생산하는 methylan에서도 확인된 바 있다(8, 9). 그러나 특이한 점은 이 세균의 EPS를 에탄올로 침전시키면 단백질의 함량이 떨어지고, methylan(8, 9)의 경우와는 달리 피루브산이 검출되지 않는 한편, 점성이 떨어지고, 물리적인 형태도 달라진다는 것이다. 에탄올 처리에 의한 단백질의 감소와 피루브산의 소실 현상은 EPSbe에 존재하는 피루브산과 일부 단백질들이 *Methylovorus* sp. SS1이 생산하는 EPS의 고유한 구성 성분이 아니고, EPS에 비특이적으로 결합된 세균 세포의 구성 성분일 가능성을 시사한다. 또한 지금까지 보고된 미생물 유래의 다당류들은 고온으로 처리할수록 점도가 떨어지는 것이 일반적인데, *Methylovorus* sp. SS1의 EPSbe의 경우는 온도가 올라갈수록 비가역적으로 더 높은 점성을 보이고, 1% 용액은 xanthan gum보다 더 높은 점성을 보이거나 더 희석을 하면 다른 다당류보다 점도의 감소 정도가 더 심하게 나타나며, NaCl과 같은 염을 처리하면 점도가 급격히 떨어지는 특이한 성질을 보였는데, 이와 같은 물성은 기존에 보고된 다당류들의 물성과 다른 것으로 이 세균의 EPS가 새로운 성질의 다당류일 가능성과 함께 에탄올 처리에 의해 제거된 피루브산과 일부 단백질들이 EPSbe의 특이한 물성과 관련이 있을 가능성을 암시해 준다. 한편, 미생물 다당류의 크기는 일반적으로  $2 \times 10^5 - 3 \times 10^6$  정도이나,  $8 \times 10^4$ 의 아주 작은 것이나  $1.5 \times 10^7$  정도의 아주 큰 것도 보고된 바 있는데(34, 35), *Methylovorus* sp. SS1의 EPS는 상대적으로 큰 편에 속하는 것으로 생각된다. 또한 음전하를 띠는 중합체와 반응하였을 때 침전을 형성하는 cetyltrimethylammonium bromide(31)를 정제된 EPS 용액에 처리했을 때, xanthan gum의 경우보다는 양이 적었지만 침전물이 형성되는 것으로 보아 이 세균의 EPS가 약한 음전하를 띠고 있는 산성 다당류로 짐작된다(결과 제출양음).

*Methylovorus* sp. SS1의 EPS는 다른 종류의 미생물이 생산하는 EPS와는 다른 양상으로 생산된다. 즉, 배지 전체의 점도를 높이면서 생산되는 것이 아니라, 배지속에서 덩어리를 이루거나 풀어서 있다가 원심분리시 침전된 균체와 상등액 사이에 위치하게 되는데, 이는 EPS의 생산을 위한 세균 배양과 생산된 EPS의 수확을 용이하게 한다. 이와 같은 EPS의 생산과 수확의 용이성은 발효 기질인 메탄올이 지니고 있는 여러 가지 장점 및 생산된 EPS가 나타내는 몇 가지 독특한 물성과 함께 이 세균을 이용한 메탄올로부터의 EPS 생산이 실용 가능성이 있음을 나타낸다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구비(91-05-00-17)와 연세대학교 생물산업소재연구소연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금(94-05-05-1)의 부분 지원에 의해 수행된 것입니다. 저자 중 송택선 박사는 한국학술진흥재단의 지원에 의한 박사후 연수과정생이며, 연세대학교 이과대학 대학원중심대학에서도 연수비의 일부를 지원받고 있습니다.

## 참고문헌

1. **Andrews, P.** 1965. The gel filtration of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**, 595-606.
2. **Anthony, C.** 1982. The biochemistry of methylotrophs. Academic Press, Inc., London.
3. **Anthony, C.** 1986. Bacterial oxidation of methane and methanol. *Adv. Microbial Physiol.* **27**, 113-210.
4. **Bernfeld, P.** 1955. In S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds.), *Methods in enzymology*, Vol. 1, p. 149-158. Academic Press, New York.
5. **Brierly, C.L., D.P. Kelley, K.J. Seal and D.J. Best.** 1985. In I.J. Higgins *et al.* (eds.), *Biotechnology; Principles and applications*, p. 187. Blackwell Scientific Pub., Oxford.
6. **Chaplin, M.F.** 1986. Monosaccharides, p. 1-36. In M.F. Chaplin and J.F. Kennedy (eds.), *Carbohydrate analysis: a practical approach*, IRL Press, Oxford.
7. **Chida, K., G. Shen, T. Komada, and Y. Minoda.** 1983. Acidic polysaccharide production from methane by a new methane-oxidizing bacterium H-2. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 275-280.
8. **Choi, J.H., D.K. Oh, J.H. Kim, and J.M. Lebeault.** 1991. Characteristics of a novel high viscosity polysaccharide, methylan, produced by *Methylobacterium organophilum*. *Biotech. Lett.* **13**, 417-420.
9. **Choi, J.H., U.T. Lee, J.H. Kim, and J.S. Rhee.** 1989. New extracellular biopolymer produced by *Methylobacterium organophilum* from methanol. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**, 397-402.
10. **Dazzo, F.B. and W.J. Brill.** 1977. Receptor site on clover and alfalfa roots for *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 132-136.
11. **Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Revers, and F. Smith.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-355.
12. **Faust, U. and P. Prave.** 1983. Biomass from methane and methanol, p. 84-108. In *Biotechnology*, Vol. 3. Verlag Chemie, Weinheim.
13. **Haggstrom, L.** 1977. Mutant of *Methylobacterium methanolicum* and its characterization with respect to biomass production from methanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 567-576.
14. **Herbert, D., D.J. Phipps, and R.E. Strange.** 1971. Chemical analysis of microbial cells, p. 265-302. In J.R. Norris and D.W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*. Academic Press, London.
15. **Hou, C.T., L.I. Laskin, and R.N. Patel.** 1979. Growth and polysaccharide production by *Methylocystis parvus* OBBP on methanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 800-804.
16. **Hsieh, K.M., L.W. Lion, and M.L. Shuler.** 1994. Production of extracellular and cell-associated biopolymer by *Pseudomonas atlantica*. *Biotechnol. Lett.* **12**, 449-454.
17. **Jarman, T.R., L. Deavin, S. Slocombe, and R.C. Righelato.** 1978. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 59-64.
18. **Jarman, T.R. and G.W. Pace.** 1984. Energy requirements for microbial exopolysaccharide synthesis. *Arch. Microbiol.* **137**, 231-235.
19. **Kanamaru, K., Y. Iwamuro, Y. Mikami, Y. Obi, and T. Kasaki.** 1982. 2-O-methyl-D-mannose in an extracellular polysaccharide from *Hyphomicrobium* sp. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 2419-2424.
20. **Kim, Y.M. and G.D. Hegeman.** 1981. Purification and some properties of carbon monoxide dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *J. Bacteriol.* **148**, 904-911.
21. **Lidstrom, M.E. and D.I. Stirling.** 1990. Methylotrophs: Genetics and commercial applications. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 27-58.
22. **Lineweaver, H. and D. Burk.** 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658-666.
23. **Linton, J.D., M. Evans, D.S. Jones, and D.N. Gouldney.** 1987. Extracellular succinoglucan production by *Agrobacterium radiobacter* NCIB 11883. *J. Gen. Microbiol.* **113**, 2961-2969.
24. **Linton, J.D., P.D. Watts, R.M. Austin, D.E. Haugh, and H.G.D. Niekus.** 1986. The energetics and kinetics of extracellular polysaccharide production from methanol by micro-organisms processing different pathways of C<sub>1</sub> assimilation. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 779-788.
25. **Linton, J.D., R.M. Austin, and D.E. Haugh.** 1984. The kinetics and physiology of stipitactic acid and gluconate production by carbon sufficient growing in continuous culture. *Biotechnol. Bioengin.* **26**, 1455-1464.
26. **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randal.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
27. **Magaritis, A. and G.W. Pace.** 1985. Microbial polysaccharides, p. 1006-1044. In M.Y. Murray *et al.* (eds.), *Comprehensive biotechnology*. Pergamon Press, Oxford.
28. **Mian, F.A., T.R. Jarman, and R.C. Righelato.** 1978. Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **134**, 418-422.
29. **Misaki, A., Y. Tsumuraya, and M. Kakuta.** 1979. D-allose-containing polysaccharide synthesized from methanol by *Pseudomonas* sp. *Carbohydr. Res.* **75**, C8-C10.
30. **Morris, E.R., D.A. Ress, G. Young, M.D. Walkinshaw, and A. Darke.** 1977. Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution: a role for polysaccharide conformation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its host. *J. Mol. Biol.* **110**, 1-16.
31. **Robertsen, B.K., P. Aman, A.G. Darvill, M. McNeil, and P. Albersheim.** 1981. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.* **67**, 389-400.
32. **Seo, S.A. and Y.M. Kim.** 1993. Isolation and character-

- erization of a restricted facultatively methylotrophic bacterium *Methylovorus* sp. strain SS1. *Kor. J. Microbiol.* **31**, 179-183.
33. Southgate, G. and P.M. Goodwin. 1989. The regulation of exopolysaccharide production and of enzymes involved in C<sub>1</sub> assimilation in *Methylophilus methylotrophus*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2859-2867.
34. Sutherland, I.W. 1977. Microbial exopolysaccharide synthesis, p. 40-57. In P.A. Sandford and A. Laskin (eds.), *Extracellular microbial polysaccharides*. ACS, Washington, D.C.
35. Sutherland, I.W. 1983. Extracellular polysaccharides. In *Biotechnology*, Vol. 3, p. 533-574, Verlag Chemie, Weinheim.
36. Tani, Y., K. Yamada, Y. Sakai, and V. Vongsuvanert. 1990. Biocatalytic and fermentative production of useful chemicals by processes using methylotrophs. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 285-290.
37. Williams, A.G. and J.W. Wimpenny. 1978. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **104**, 47-57.

(Received April 30, 1997/Accepted June 30, 1997)

---

**ABSTRACT: An Extracellular Polysaccharide Produced by *Methylovorus* sp. Strain SS1 Growing on Methanol**

**Won H. Choo, Taeksun Song, and Young M. Kim\*** (Molecular Microbiology Laboratory, Department of Biology, and Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea)

*Methylovorus* sp. strain SS1, a restricted facultative methylotrophic bacterium, growing on methanol was found to produce small amount of extracellular polysaccharide (EPS) under the optimal growth conditions, while it produced large amount of the polysaccharide under nitrogen limitation. The optimal ratio of carbon to nitrogen for EPS production were found to be 5.2. The optimal temperature and pH for EPS production were 30°C and 6.5, respectively. The EPS consisted of carbohydrate, protein and small amount pyruvic acid. The reducing sugars in the EPS consisted mainly of glucose and a small amount of mannose. The EPS treated with ethanol (EPSae) was found to have several properties different from those of the EPS which was not treated with ethanol (EPSbe); the EPSae contained no pyruvic acid. It also contained less protein and showed much lower viscosity than the EPSbe. The viscosity of EPSbe was very sensitive to NaCl and decreased sharply upon exposure of the polysaccharide to even 0.5% (w/v) NaCl solution. The viscosity, however, was increased irreversibly upon exposure of the saccharide to high temperature. The molecular weight of EPS was estimated to be  $2.5 \times 10^6$  to  $3.5 \times 10^6$  using Sepharose 6B column chromatography. Scanning electron microscopy revealed that the lyophilized EPSbe and EPSae have a structure of thread-like fibers and a mesh-like structure resembling bee-hive, respectively.