

## *Enterobacter* sp.의 다당 생산에 미치는 탄소원 기질의 영향

이 주 하 · † 이 신 영

† 강원대학교 바이오산업공학부, 가농바이오(주)  
(접수 : 2004. 7. 30., 게재승인 : 2005. 2. 15.)

## Effects of Carbon Substrates on Exopolysaccharide Production by *Enterobacter* sp.

Ju-Ha Lee and Shin-Young Lee†

† School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea  
Ganong Bio Co. Ltd., Kyunggi 487-813, Korea

(Received : 2004. 7. 30., Accepted : 2005. 2. 15.)

The effects of carbon sources for exopolysaccharide production during batch cultivation of an *Enterobacter* sp. isolated from the composter were investigated. The highest amount of exopolysaccharide was obtained when lactose was used as carbon source. Lactose in medium was converted into glucose and galactose. Glucose was metabolized fast and was completely consumed, but about 20% of lactose was accumulated as galactose. On the other hand, enzyme activity was about 350~450 unit with the increase of lactose concentration. Thus, it was considered that the exopolysaccharide might be produced in the course of that lactose was hydrolyzed into glucose and galactose by  $\beta$ -galactosidase with respect to that enzyme activity on lactose hydrolysis was accorded to the exopolysaccharide production. When glucose and galactose were added to lactose medium, respectively, it could be considered that glucose was as a repressor and galactose was as a inducer for  $\beta$ -galactosidase synthesis even though the mechanisms were not elucidated. The increase of lactose concentration was almost ineffective to the specific growth rate ( $0.133\sim 0.151\text{ hr}^{-1}$ ) but showed the difference in the biomass content. The higher carbon source concentration, the more residual sugar remained. It was assumed that the optimum lactose concentration for exopolysaccharide production was  $30\sim 70\text{ g/L}$ . On the other hand, it was considered that the nitrogen acted as growth limiting nutrients to the cell growth. In the cases of 30 and 70 g/L of the fixed carbon concentrations, the increase of the nitrogen sources concentration caused a remarkable increase within the range of  $0.059\sim 0.225\text{ hr}^{-1}$  and  $0.141\sim 0.237\text{ hr}^{-1}$  of the specific growth rate, respectively, while there was no significant difference in biomass.

**Key Words :** *Enterobacter* sp., exopolysaccharide production, carbon substrates

### 서 론

그 동안 Lee 등(1)은 유기성 폐기물의 composting에 사용 하였던 토양 유래의 미생물 복합제제로부터 다당 생산 균주를 분리·동정하고, 생성 다당의 특성 및 다당 생산을 위한 배지 조성과 배양 조건을 검토한 바 있었다. 본 균주는 그람 음성의 내생포자를 형성하지 않는 통성 혐기성 세균으로 30℃에서 잘 생육하며, methyl red 반응에서 음성

을 보이는 *Enterobacter* sp.로 동정되었다. 생성 다당은 분자량 약  $3.7 \times 10^5$  dalton으로, 구성당은 mannose, galactose 및 galacturonic acid이었으며, 고점성으로 의가소성의 비뉴톤 유체거동을 보였고, 1.5% 이상의 농도에서 겔 형성능을 나타내었다(1, 2).

이 균주는 lactose, galactose, glucose, fructose 등의 여러 탄소원을 이용하는 것으로 확인되었으며, 특히 이당류인 유당을 탄소원으로 할 때 최대의 다당 생성을 보였다. 여러 미생물들을 대상으로 유당으로부터 다당 합성능을 조사한 결과에서 대부분의 미생물들이 다당을 합성하지 못 하였다고 한 Stauffer와 Leeder(3)의 보고에서 볼 수 있는 바와 같이, 일반적으로 lactose를 분해하여 다당을 생성하는 균주는 매우 드물므로, 본 균주의 이러한 기질 특성에 대한 검토의 필요성은 매우 높은 것으로 판단되었다.

† Corresponding Author : School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Tel : +82-33-250-6273, Fax : +82-33-243-6350

E-mail : sylee@kangwon.ac.kr

이 유당은 우유 중에 다량 함유되어 있는 이당류로서, 미생물은 먼저  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23)를 생산하여 glucose와 galactose로 분해함으로써 자화하고 있다. 일반적으로  $\beta$ -galactosidase 활성을 나타내는 미생물은 lactose에 의해 효소 생산이 유도되는 반면, glucose에 의해 효소 생산이 억제되므로, 당이  $\beta$ -galactosidase 유전자 발현의 조절물질로 작용한다고 생각되고 있다(4).

한편, 이들 이당류가 미생물로 투과되고 대사되는 과정에는 다음과 같은 3가지의 기작이 알려져 있다(4, 5, 6). 하나는 유당이 균체 내부로 직접 투과되어 균체내 효소인  $\beta$ -galactosidase의 작용을 받아 구성 단당류로 분해되는 과정이며, *E. coli*와 *Saccharomyces fragilis*는 대체로 이 과정을 통하여 이당류를 분해한다. 다른 하나는 *Pseudomonas saccharophila*나 *Lactic streptococci*에서 보고된 바와 같이, glucose의 대사산물인 PEP (phosphoenolpyruvate)의 존재 하에서 이당류가 인산화되어 투과되는 과정이다. 이 과정이 group translocation인데, 투과과정 중 용질의 인산화 변화가 수반되는 특징을 갖는다. Chassy 등(7)은 *Lactobacillus casei*의 경우 lactose의 투과는 lactose phosphotransferase system (Lac-PTS)을 통하여 이루어지며 세포 내에서 phosphogalactosidase로 분해된다고 보고하였고, 이 균의 starved cell은 고농도의 PEP를 함유하였다고 보고한 바 있다. 즉, 이 과정은 phosphoenolpyruvate dependent sugar phosphotransferase (PTS)로 잘 알려져 있으며(5, 8), membrane binding protein (permease)과  $Mg^{2+}$ 이 필요하다(9). PTS-system은 특히, 원핵생물에 널리 이용되고 있는 투과 과정으로, 여기에 속하는 미생물로는 Entner-Doudoroff pathway를 따르는 절대 혐기성균 및 대부분의 통성 혐기성균이 있다. 이 경우 sucrose는 sucrose-1-phosphate로 투과된 다음, glucose-1-phosphate와 fructose로 분해되며, lactose는 lactose-6-phosphate로 대사된다(10). 나머지 하나는 산화과정으로 lactose가 lactose dehydrogenase에 의해 lactobionate로 투과되어 gluconate와 galactose로 분해되며, 이는 *Pseudomonas graveolens*에서 보고되었다(11). 하지만 이들 기작 중에서 lactose가 permease-system를 통해 흡수된다는 것은 증명되었지만(12, 13), glucose와 galactose가 PTS-system로 흡수된다는 증거는 불충분하고, permease system이 PTS-system보다 다당 생합성에 더 유리하다는 것도 증명되지 않았다.

본 연구에서는 *Enterobacter* sp.를 이용하여 다당 생산에 주로 사용되는 이당 (lactose)이나 단당 (glucose, galactose)의 단독 또는 이들의 혼합당 등 각종 탄소원 기질에 대한 다당 생산 효율성 및 각 탄소원에서의 발효 특성을 비교, 조사하였으며, 이로부터 다당 생합성의 대사경로에 대한 정보를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 보존

본 연구에 사용한 균주는 유기성 폐기물의 composting에 사용하였던 토양 유래의 복합 발효 미생물제제로부터 분리, 동정한 *Enterobacter* sp.이다(1). YM broth agar plate에서 24시간 배양하고, 점질성을 나타내는 colony를 분리하여 보

존용 배지(1)에서 30℃로 24시간 배양한 후, 4℃에서 보존하였고, 4주마다 계대배양하여 실험에 사용하였다.

### 배지 조성 및 조제

전배양 및 본배양의 배지는 lactose 10 g/L, Bacto-peptone 5 g/L, malt extract 3 g/L 및 yeast extract 3 g/L를 함유한 pH 7.0의 MYM (Modified Yeast Malt) broth 배지이었다(1). 탄소원과 질소원은 각각 분리하여 121℃에서 15분간 가압 살균한 후 혼합하여 사용하였고, pH는 살균 전에 1 N HCl 또는 1 N NaOH로 조절하였다.

### 배양

접종균의 전배양은 보관 균주를 30℃에서 24시간 동안 배양하여 활성화시킨 후, MYM broth 20 ml를 함유한 100 ml 삼각 flask에 백금이로 1회 접종하여 30℃, 120 rpm에서 20시간 진탕배양하였으며, 이를 전 배양액으로 사용하였다. 본 배양은 전 배양액을 배지 50 ml를 함유한 250 ml 삼각 flask에 4% (v/v) 접종한 후, 30℃, 120 rpm에서 40시간 동안 진탕배양하였다. 배양시 탄소원 및 질소원의 영향은 glucose, galactose, lactose 및 MCM [Mixed Carbon Medium ; glucose : galactose = 1 : 1 (w/w)]의 4종 탄소원에 대하여 당 농도를 10~90 g/L로 변화시켜 탄소원 및 이의 농도에 대한 영향을 검토하였다. 한편, 질소원 (Bacto-peptone, yeast extract)의 농도 효과는 탄소원의 농도를 30, 70 g/L로 고정하고 질소원 농도를 달리하여 조사하였다.

### 균체량의 측정

20시간 진탕배양한 배양액을 45,000×g에서 40분간 원심 분리하여 얻은 균체를 증류수로 2회 수세한 후, UV/Vis Spectrophotometer (Perkin-Elmer, 552S)를 이용하여 660 nm에서 OD (Optical Density)를 측정하였고, 균체량과 OD에 대한 표준곡선으로부터 건조 균체 중량으로 환산하였다.

### 다당 및 잔존당의 정량

다당의 생성량은 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 다음, 배양액에 2.5배량의 acetone을 가하고 침전된 침전물의 양을 70℃에서 12시간 건조한 후, desiccator에서 항량이 되었을 때의 중량을 건조 중량으로 하였다.

한편, 잔존당은 균체 및 생성물을 제거한 배양액을 회전증발기에서 최종 부피가 3 ml가 되도록 조절한 후, Biochemistry Analyzer (YSI, Model 2700)를 사용하여 lactose, glucose 및 galactose를 각각 측정하였다.

### $\beta$ -galactosidase 활성 측정

$\beta$ -galactosidase의 활성은 Miller(14)의 방법을 수정하여 다음과 같이 측정하였다. 배양액으로부터 얻은 균체 시료를 원심분리한 후, 증류수로 2회 세척하였다. 반응액으로는 Z buffer ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  16.1 g/L,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  5.5 g/L, KCl 0.75 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.246 g/L)와  $\beta$ -mercaptoethanol (2.7 mL/L)을 사용하였으며, pH는 1 N NaOH를 이용하여 7.0으로 조절하였다. 균체 현탁액과 Z buffer의 최종 부피는 1 mL로 하였고, 이 때 균체 현탁액은 50% (v/v)를 넘지

않도록 하였다. 부유상태의 세포는 chloroform (2-3 방울)과 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) 50  $\mu$ l를 첨가하고 10초간 vortex하여 permeabilized cell로 하였다. 이와 같이 하여 얻은 permeabilized cell을 포함한 반응액은 28 $^{\circ}$ C로 유지한 항온 수조에서 5분간 배양한 후, 0.1 M sodium phosphate buffer에 ONPG (o-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside)를 녹인 용액 (10 mg/mL) 200  $\mu$ l 첨가하여 5초간 흔들어진 다음, 7분 이상 효소 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (500  $\mu$ l)를 첨가하여 효소 반응을 정지하였으며, 반응이 정지된 용액은 다시 7,000  $\times$ g, 10분간 원심분리하여 cell debris를 침전 제거한 다음, 420 및 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 420 nm에서의 흡광도는 ONPG와  $\beta$ -galactosidase의 반응에 의해 생성된 o-nitrophenyl에 의한 흡광도와 cell debris에 의한 light scattering이 모두 포함된 값이며, 550 nm에서의 흡광도는 cell debris에 의한 light scattering의 값이므로, 보정계수 (1.75)를 곱한 후 OD<sub>420</sub> 값에서 감하여  $\beta$ -galactosidase activity를 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Units} = 1000 \times [(\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}) / (t \times V \times d \times \text{DCW})]$$

여기서 t는 반응시간(분), V는 시료 부피이고, d는 희석률이며, DCW는 dry cell weight (g/L)이다. 이때,  $\beta$ -galactosidase 1 unit은 1 nmol의 ONPG를 1분 동안 (28 $^{\circ}$ C, pH 7.0)에 o-nitrophenyl로 분해시키는 효소의 양으로 정의하였다.

**결과 및 고찰**

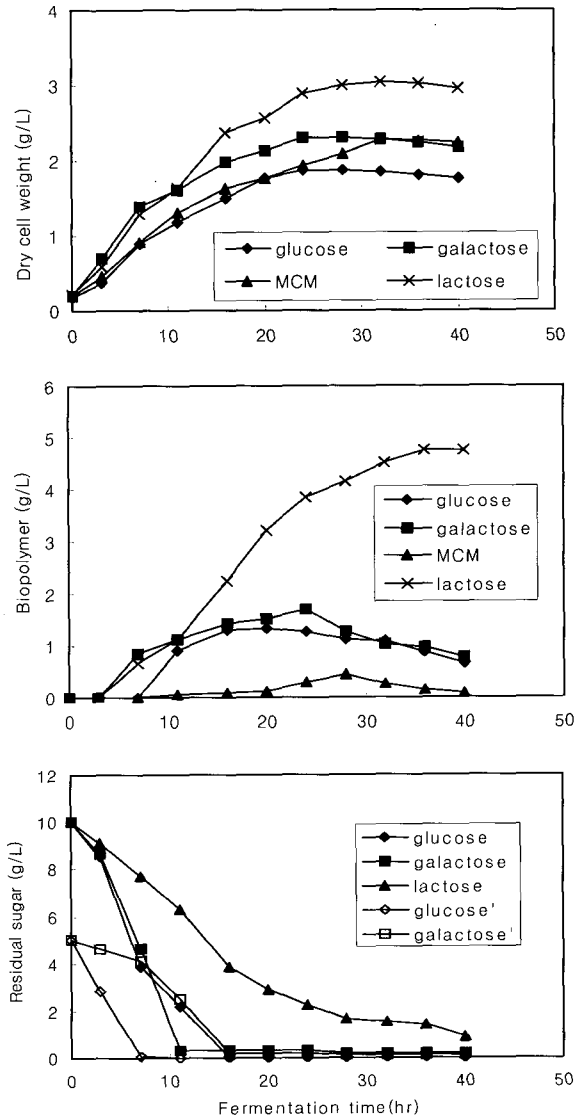
**다당 발효에 미치는 탄소원 기질 (단당 및 이당류) 종류의 영향**

일반적으로 다당류 발효에 널리 이용되는 탄소원은 glucose와 같은 단당이다. 그러나 sucrose나 lactose와 같은 이당류를 이용하는 균주도 보고되고 있으며(15, 16, 17), 특히, *Zoogloea ramigera*는 lactose를 기질로 사용하여 중급속 흡착 능이 우수한 생물 응집제인 고점성의 다당류를 생성하는 것으로 보고되었다(18).

본 균주도 단당보다는 이당인 lactose에서의 자화능이 더 높은 특징을 나타내었으므로(1), 이에 대한 보다 자세한 검토의 필요성이 높았으며, 따라서 단당류 (glucose, galactose), 이당류(lactose) 및 단당류의 1 : 1 혼합물 (MCM)을 기질로 하여 배양하면서 균체, 세포외 다당 및 잔존당의 변화를 측정하였고, 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

균체량은 각 탄소원 모두에서 대체로 배양의 경과에 따라 서서히 증가하다가 대략 배양 20시간이 경과하면서 일정해지는 경향을 나타내었다. 그러나 배양 40시간에서의 균체량은 1.86~3.05 g/L 범위로 큰 차이를 보였고, glucose를 기질로 한 경우에서 가장 낮은 값 (1.86 g/L)을 보였으며, MCM (약 2.26 g/L) 및 galactose (약 2.30 g/L)는 서로 비슷하였다. 반면, lactose를 기질로 한 경우는 단당이나 단당의 혼합물에서보다 평균 1.43배 증가된 3.05 g/L의 가장 높은 균체 증식을 보였다. 또 다당 생산량도 lactose에서

배양한 경우가 약 4.8 g/L로 가장 높아서 다른 탄소원인 glucose (1.34 g/L), galactose (1.71 g/L), MCM (1.45 g/L)에 비해서 각각 약 3.6, 2.8 및 3.3배 높았다. 또 lactose의 경우는 배양 40시간까지 다당 생성량이 계속 증가하는 경향을 보였지만, 단당 및 이들의 혼합 기질에서는 배양 24-28시간 이후에 다당의 생성량이 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 생성된 다당이 균체 생육에 필요한 영양분으로 재이용(19)되는 것으로 생각되었다.



**Figure 1.** Time course of dry cell weight, biopolymer production and residual sugar in culture medium (MCM was consisted of glucose and galactose (1 : 1, w/w)).

한편, 각 탄소원의 당 소비 경향을 보면, 배양 시간의 경과에 따라 glucose나 galactose와 같은 단당류는 이당류인 lactose보다 먼저 소모되어 배양 16시간 쯤에는 거의 고갈되었다. 그러나 lactose의 경우는 시간 경과에 따라 서서히 소비되어 배양 40시간에서도 약 초기 농도의 10%에 상당하는 1 g/L의 잔존량을 보였다. 또 단당의 혼합 기질인 MCM에서도 단일 단당류 탄소원의 경우와 비슷하게 당이

급격히 소비되어 8-16 시간 이후 고갈되었으나, glucose가 galactose보다 먼저 소비되어 다른 연구자들의 결과와 잘 일치하였다(20, 21).

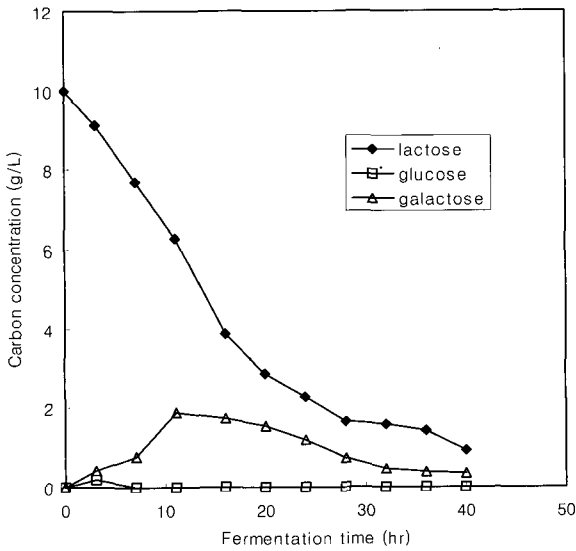


Figure 2. Time courses of sugar utilization in culture medium on lactose.

이와 같이, 단당 및 단당의 혼합 탄소원인 경우보다는 lactose에서의 균체 생육 및 다당 생산량이 매우 높았으므로, 본 균주는 lactose를 효율적으로 이용하여 균체 생육 및 다당을 생합성하는 것으로 생각되었다. 따라서 lactose의 이용성을 좀 더 자세히 살펴보기 위하여 lactose를 단일 탄소원으로 사용한 배지에서 배지 중에 존재하는 잔존 당량의 시간에 따른 변화를 조사하였다(Fig. 2).

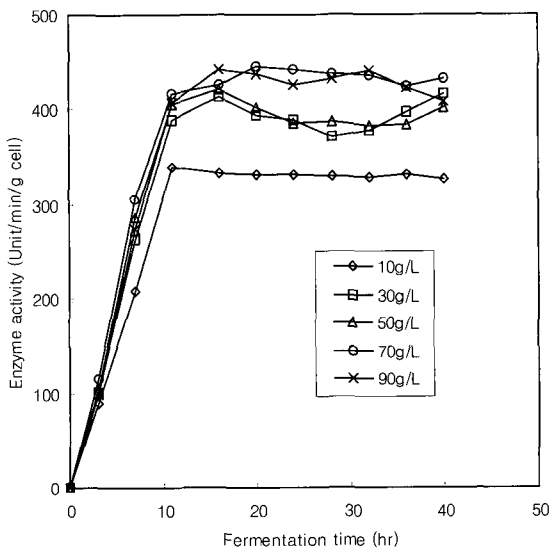


Figure 3. Effect of the different concentrations of carbon source (lactose) on enzyme activity.

배양 10시간째에 공급량의 20% 정도가 galactose로 발효액에 축적되어 서서히 감소하였고, glucose는 소량이 존재

하였으나, 곧 고갈되었다. 이는 lactose가 구성당인 glucose와 galactose로 분해되면서 균체 생육 및 다당이 생성되는 것을 의미하므로, 본 균주에서의 다당 생성은 유당의 분해 효소 작용이 매우 중요한 역할을 하는 것으로 추정되었다.

따라서 농도를 달리한 lactose 배지에서  $\beta$ -galactosidase 활성의 경시 변화를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다.

대체로  $\beta$ -galactosidase의 활성도는 배양 시간이 경과함에 따라 10시간까지 급격히 증가하였으며, 이후 일정한 값을 보였는데, lactose의 농도가 증가함에 따라 10 g/L를 제외하고는 큰 차이를 보이지 않았다. 이 때, 효소 활성도는 약 350~450 unit 범위이었다. 따라서 lactose가 세포내  $\beta$ -galactosidase에 의해서 glucose와 galactose로 분해되면서 이들이 균의 생육과 다당 생산에 영향을 준다고 생각되었다.

한편, lactose 배지에 glucose와 galactose를 동량비로 첨가하여 탄소원의 농도를 30 g/L로 하였을 경우의 효소 활성도를 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

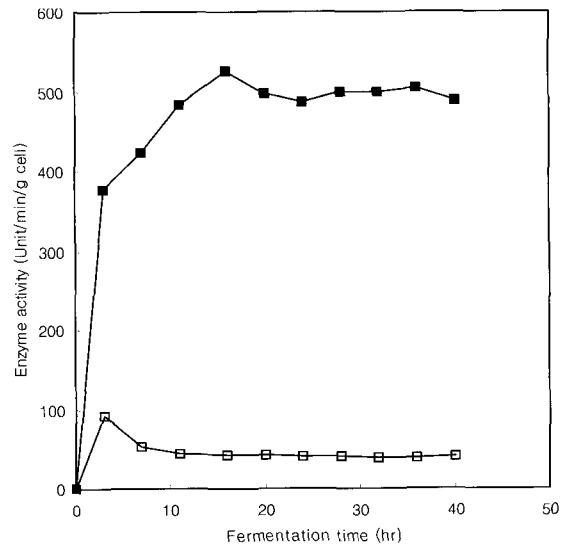


Figure 4. Effect of glucose and galactose addition on the enzyme activity in the medium containing lactose (-□-: Lactose + Glucose (1 : 1, w/w), -■-: Lactose + Galactose (1 : 1, w/w)).

Glucose 및 galactose를 첨가하였을 경우의 효소 활성도는 약 50 및 500 unit를 보여, 효소의 생성에 있어서 세포내 glucose와 galactose는 각각 repressor와 inducer로 작용(11, 22, 23)하는 것으로 생각되었다. 자료화하지는 않았지만, 다당 생성량은 각각 약 1.70 및 3.59 g/L이었다. Kim 등(21)은 *Zoogloea ramigera*는 lactose (45 g/L) 배지에서 발효할 때 공급된 유당의 40%에 해당하는 glucose와 galactose가 배양액내에 존재하였으며, 세포내로 흡수된 유당은 유당 분해 효소의 작용을 받아 단당으로 분해된 후 다당 합성에 이용되었고, 이 때 이용되지 않은 단당들은 세포외로 배출되었다가 다시 단당의 형태로 재흡수된다고 추측하였다. 또 Yoon 등(20)도 호알칼리성 *Bacillus* sp.를 lactose의 단일 탄소원에서 배양하였을 경우, 단당으로 분해된 glucose는 빠르게 이용하였으나 galactose는 배지 중에 축적되었다고 하였는데, 축적된 galactose는 glucose가 존재할

때는 이용되지 않고 glucose가 소모되면 비로소 이용된다 고 하여 본 균주와 일치하는 결과를 보고한 바 있다.

**다당 발효에 미치는 lactose 농도의 영향**

질소원의 농도를 고정한 후, 각 탄소원의 농도를 10 g/L 에서 30 g/L로 증가시키고 각 농도에서의 kinetic parameter 를 산출하여 Table 1에 나타내었다.

**Table 1.** Effect of various carbon sources on the kinetic parameters of the cell growth and biopolymer production

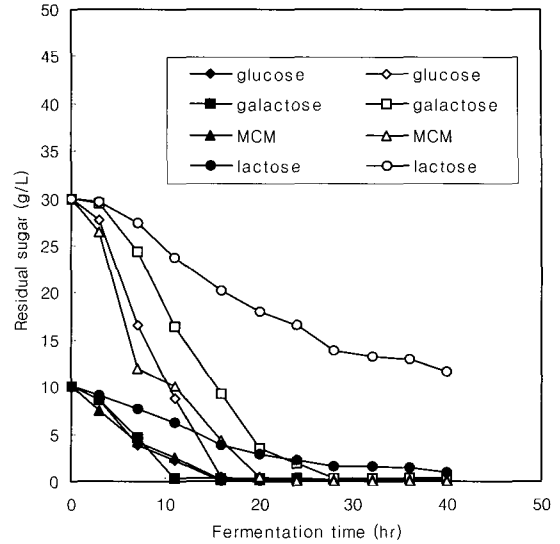
| Carbon Source    | DCW <sup>a</sup> (g/L) | Biopolymer (g/L) | $\mu^b$ (hr <sup>-1</sup> ) | $Y_{X/S}^c$ (g/g) | $Y_{P/S}^d$ (g/g) |
|------------------|------------------------|------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Glucose</b>   |                        |                  |                             |                   |                   |
| 10 g/L           | 1.863                  | 1.4              | 0.104                       | 0.159             | 0.067             |
| 30 g/L           | 2.456                  | 1.73             | 0.094                       | 0.082             | 0.05              |
| <b>Galactose</b> |                        |                  |                             |                   |                   |
| 10 g/L           | 2.302                  | 1.710            | 0.130                       | 0.201             | 0.205             |
| 30 g/L           | 2.416                  | 2.165            | 0.141                       | 0.067             | 0.068             |
| <b>MCM</b>       |                        |                  |                             |                   |                   |
| 10 g/L           | 2.289                  | 1.450            | 0.105                       | 0.207             | 0.104             |
| 30 g/L           | 2.687                  | 1.785            | 0.145                       | 0.076             | 0.051             |
| <b>Lactose</b>   |                        |                  |                             |                   |                   |
| 10 g/L           | 3.048                  | 4.770            | 0.133                       | 0.301             | 0.523             |
| 30 g/L           | 3.214                  | 7.815            | 0.147                       | 0.154             | 0.424             |

a : Dry Cell Weight                      b : Specific Growth Rate  
 c : Growth Yield                         d : Product Yield

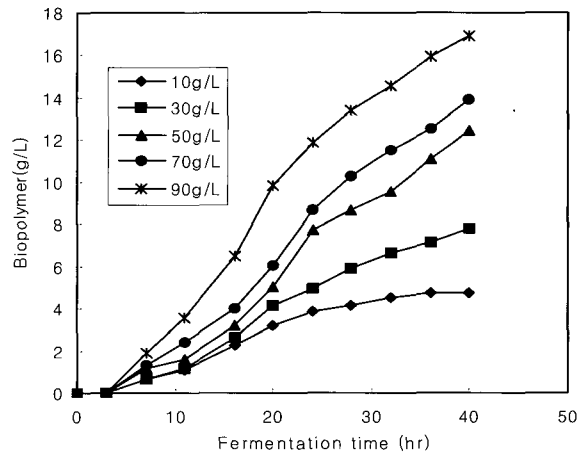
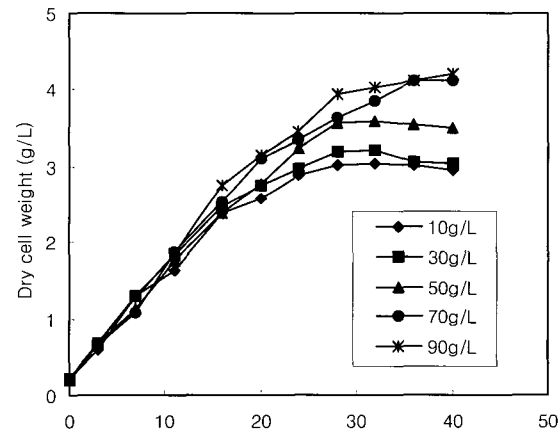
표에서 보는 바와 같이, 균체량은 대체로 농도의 증가로 증가하였으며, glucose, galactose, MCM 및 lactose의 순으로 각각 1.32, 1.01, 1.13 및 1.02 배의 증가를 보였다. 또 다당 생성량도 탄소원 농도 증가에 따라 각각 1.3, 1.3 및 1.5배로 증가하였으며, 이때 lactose에서의 다당 생성량은 7.82 g/L로, 단당에 비하면 당 농도의 증가로 약 4.6배 이상 증가된 값으로서 현저한 다당 생성량의 증가 효과를 나타내었다. 한편, 비증식속도도 각 탄소원에 따라 차이를 보여서 glucose  $\cong$  MCM < galactose < lactose 순으로 높았다. 각 탄소원의 당 농도가 10 g/L일 경우의 비증식속도는 0.105~0.133 hr<sup>-1</sup> 범위이었으나, 당 농도를 30 g/L로 하여 증가한 경우는 glucose를 제외하면 비증식 속도가 0.141~0.147 hr<sup>-1</sup>로, 당 농도의 증가로 비증식속도가 다소 증가하는 경향을 보였다. Straight 등(24)은 lactose의 농도가 1.1 g/L 이하일 때와 2.5~5.0 g/L로 농도를 증가시킨 세균의 배양 결과에서, 1.1 g/L 이하로 배양하였을 때는 비증식 속도가 0.40 h<sup>-1</sup>가 된 반면에, 고농도 (2.5~5.0 g/L)로 배양한 경우는 비증식속도가 0.44~0.76 h<sup>-1</sup>로 증가하였음을 보고하였다.

그러나 당 소비의 경시변화를 나타낸 Fig. 5에서 보면, 당 농도의 증가로 단당의 경우는 당의 소비 속도가 빨라지고, 결국 고갈되었지만, 다당 생성이 가장 높았던 lactose의 경우는 당의 소비속도가 오히려 늦어졌고, 특히 배양 40시간 후의 잔존량이 높아져 초기 농도 10 g/L일 때는 9.2%, 30 g/L일 때는 38.5%의 잔존 비율을 나타내어 당 농도의 증가로 더 많은 양의 당이 소모되지 않고 잔존되는 경향을 나타내었다. 따라서 lactose 농도의 증가로 균체 및 다당 수율은 감소함을 알 수 있었으나, 균체량의 증가는 적은 반면, 생성 다당의 양이 상대적으로 많이 증가한 점

을 고려한다면(Table 1), 증가된 당은 초기 증식에 영향을 주나 배양이 경과함에 따라 균체의 생육보다는 다당 생성성에 이용되었을 것으로 추정되었다.



**Figure 5.** Changes of residual sugar under the different concentrations of carbon sources (Closed form: 10 g/L, Opened form: 30 g/L).

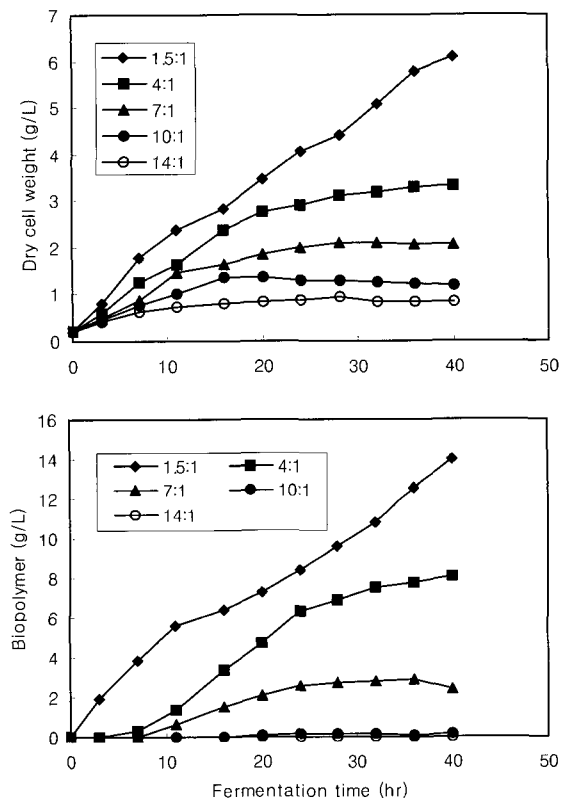


**Figure 6.** Effect of the different concentrations of lactose on dry cell weight and biopolymer production.

**다당 발효에 미치는 C/N비의 영향**

일반적으로 다당 생성에 적합한 C/N 비는 10~40 : 1로 알려져 있는데, Son 등(25)은 *Pseudomonas* sp. HJ에 의한 PHA (polyhydroxy alkylate) 생산에 있어서 C/N 비의 증가가 다당 생성에 유리하며, 최대의 PHA 축적률은 C/N 몰비가 95.2일 때 얻어졌다고 보고하였다.

따라서 질소원의 농도를 고정하고, 탄소원인 lactose의 농도를 30 g/L 이상으로 증가시켜 C/N 비를 달리하면서 균체량 및 생성 다당량을 조사하였으며, 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다.



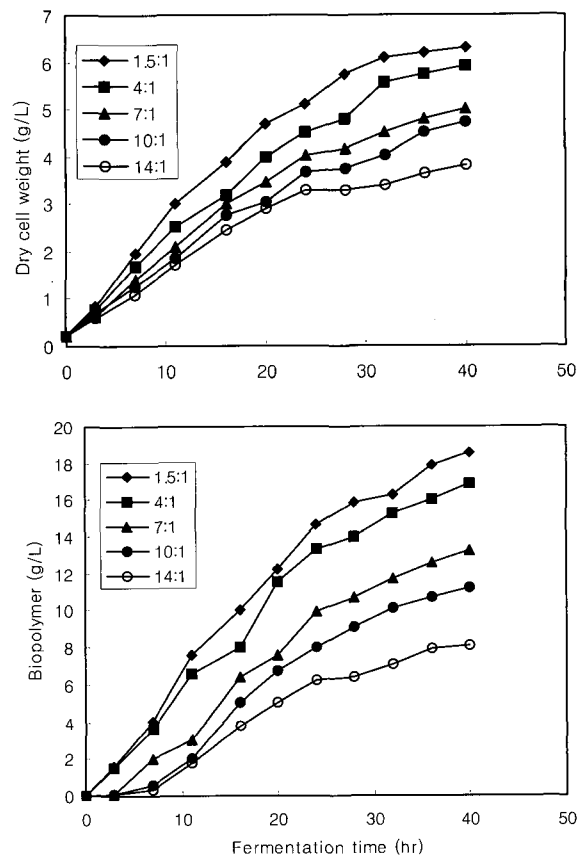
**Figure 7.** Influence of C/N ratio on cell growth and biopolymer production at 30 g/L of lactose concentration.

균체량은 lactose 농도가 낮을수록 빨리 정지기로 이행되었고, 당 농도가 높을수록 약 4~8시간이 연장되어 정지기로 이행하였다. 또 배양 20시간이 경과한 후 각 농도에서 균체량의 차이를 보이기 시작하였으며, 자료화하지는 않았지만, 배양 20시간 이전의 비증식속도는 0.13 hr<sup>-1</sup>~ 0.151 hr<sup>-1</sup>의 범위로 C/N 비에 상관없이 거의 비슷하였다. 그러나 각 농도에서의 최종 균체량은 당 농도 10, 30, 50, 70 및 90 g/L 순으로 높아져 각각 3.05, 3.21, 3.60, 4.12 및 4.21 g/L를 나타내었다. 따라서 탄소원인 lactose의 농도 증가는 비증식속도에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났고, 최대 균체량의 농도에 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또 다당도 대체로 배양 3시간 이후부터 생성되기 시작하였으며, 90 g/L의 경우에서 가장 많은 약 17 g/L의 다당 생성을 나타내었다. 그러나 고농도의 탄소원을 사용할 경우는 배지내에 잔존하는 당의 양도 높아져서 수율

측면에서는 감소하였다. 따라서 다당 생산의 최적 lactose 농도 범위는 30-70 g/L인 것으로 판단하였다.

Fig. 7 및 8은 탄소원의 농도를 30 및 70 g/L로 고정하고 질소원의 농도를 변화시켜 균체 및 다당 생성량을 조사한 결과이다.

질소원의 농도가 3 g/L(C/N ratio = 14 : 1)에서 30 g/L (C/N ratio = 1.5 : 1)로 증가함에 따라 최대 균체량 및 생성 다당량도 증가하여 질소원 농도 30 g/L일 때의 균체량 및 생성 다당량은 각각 약 6 g/L 및 14 g/L로, 10 g/L일 때의 값 (3.21 g/L 및 7.82 g/L)보다 각각 약 1.87배 및 1.79배 증가하였다(Fig. 7). 이 때의 C/N비는 1.5 : 1로 매우 낮았으며, 이는 질소원의 농도 수준이 당의 생성에 큰 영향을 주기 때문이라 생각되었다.



**Figure 8.** Influence of C/N ratio on cell growth and biopolymer production at 70 g/L of lactose concentration.

또 탄소원의 농도를 70 g/L로 고정하고 후 질소원의 농도를 변화시킨 결과(Fig. 8)에서도 질소원의 농도가 증가함에 따라 균체량 및 다당 생성량이 증가함으로써 Fig. 7과 비슷한 경향을 나타내었는데, 질소원의 농도가 35 g/L (C/N ratio = 1.5 : 1)일 때 최대의 균체량 및 다당 생성량을 나타내어 각각 6.31 및 18.54 g/L의 값을 보였다. 그러나 수율면에서는 30 g/L보다 다소 감소하였다. 아울러 자료화하지는 않았지만, 당 농도 30 g/L일 때의 비증식속도는 질소원의 농도가 증가함에 따라 0.059 hr<sup>-1</sup>에서 0.225 hr<sup>-1</sup>로 크게 증가하였으며, 균체량도 0.83 g/L에서 6.09 g/L로 큰 차

이를 보이며 증가하는 경향을 보였다. 또 당 농도가 70 g/L 일 경우의 비증식속도도 질소원 농도의 증가에 따라  $0.141 \text{ hr}^{-1}$ 에서  $0.237 \text{ hr}^{-1}$ 로 증가하였지만, 당 농도 30 g/L일 경우보다는 증가 폭이 다소 낮아졌고, 균체량도  $3.815 \text{ g/L}$ 에서  $6.31 \text{ g/L}$ 로 약 1.7배 낮아졌다. 이러한 결과는 Ahn 등 (18)이 *Zoogloea ramigera* 115를 이용한 생물 고분자 생산 실험에서, 탄소원의 농도를 고정된 상태에서의 C/N 비의 증가는 질소원이 제한되는 시간을 빠르게 함으로써 세포의 활동이 생물 고분자 생산 방향으로 전환되었다고 보고한 사실과는 상반되었는데, 본 균주의 경우, 질소원이 균체 증식에 필요한 제한 기질로 작용하기 때문이라 생각되었다. 결국 C/N 비의 증가는 상대적으로 질소원 농도의 감소를 의미하므로, 균체 생육이 감소되고, 이에 따라 다당의 생성도 감소되었다고 볼 수 있다. 이와 같이 낮은 C/N 비에서의 다당 생성이 높은 것은 예외적으로 Burton 등(26)이 *Rhinochlamydomonas* NRRL Y-6272에 의한 다당류의 생산에서 보고한 바 있다.

## 요 약

유기성 폐기물의 composting에 사용된 토양유래의 복합 발효 미생물 제제로부터 분리, 동정된 다당 생성 균주인 *Enterobacter* sp.를 이용하여 서로 다른 기질 및 이의 농도에 따른 발효 특성을 조사하였다. 본 균주는 단당 및 단당의 혼합 탄소원인 경우보다는 lactose에서의 균체 생육 및 다당 생산량이 매우 높아 lactose를 효율적으로 이용하는 특징을 보였다. 공급된 lactose는 20% 정도가 galactose로 발효액에 축적되어 서서히 감소하였고, glucose는 소량이 존재하였으나, 곧 고갈되었다. 한편, lactose 농도를 증가시킨 결과, 효소 활성도의 증가 폭은 약 350~450 unit를 나타내었다. 즉, lactose의 분해 효소 활성도는 다당 생성 경향과 잘 일치하여  $\beta$ -galactosidase에 의해 lactose가 구성당인 glucose와 galactose로 분해되는 과정에서 다당이 생성되는 것으로 추론되었다. 또 lactose 배지에 첨가한 glucose와 galactose는 각각 효소 생성의 repressor와 inducer로써 작용하는 것으로 판단하였다. 한편, 탄소원 농도를 증가한 결과, 비증식속도 ( $0.133 \sim 0.151 \text{ hr}^{-1}$ )에는 거의 영향을 미치지 않았고, 균체량의 차이를 나타내었으며, 고농도의 탄소원을 사용할 경우는 배지내의 잔존 당량이 높아져 수율이 감소하였으므로, 다당 생산의 최적 lactose 농도는  $30 \sim 70 \text{ g/L}$ 인 것으로 판단하였다. 반면, 탄소원의 농도를 각각 30 및 70 g/L로 고정시킨 후, 질소원의 농도를 달리하였을 때는 질소원 농도의 증가로 균체량보다는 비증식속도가  $0.059 \sim 0.225 \text{ hr}^{-1}$  및  $0.141 \sim 0.237 \text{ hr}^{-1}$ 로 크게 증가하므로 질소원이 증식 속도의 제한 기질로 작용하는 것으로 판단하였다.

## REFERENCES

- Kim, D. J. and S. Y. Lee (2001), Isolation of the exo-polysaccharide producing *Enterobacter* sp. and some physicochemical properties of the polysaccharide produced by this strain, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 370-375.
- Lee, J. H. and S. Y. Lee (2002), Rheological properties of culture broth during exo-polysaccharide fermentation of *Enterobacter* sp., *Food Eng. Prog.* **6**, 10-16.
- Stauffer, K. R. and J. G. Leeder (1978), Extracellular microbial polysaccharide production by fermentation on whey or hydrolyzed whey, *J. Food Sci.* **43**, 756-758.
- Wanner, B. L., R. Kodaira, and F. C. Neidhardt (1978), Regulation of lac operon expression: Reappraisal of the theory of catabolite repression, *J. Bacteriol.* **136**, 947-954.
- Postma, P. W. and J. W. Lengeler (1985), Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system of bacteria, *Microbiol. Rev.* **49**, 232-269.
- Dills, S. S., A. Apperson, M. R. Schmidt, and M. H. Saier (1980), Carbohydrate transport in bacteria, *Microbiol. Rev.* **44**, 385-418.
- Chassy, B. M. and J. Thompson (1983), Regulation of lactose-phosphoenol pyruvate-dependent phosphotransferase system and  $\beta$ -D-Phospho-galactoside galactohydrolase activities in *Lactobacillus casei*, *J. Bacteriol.* **154**, 1195-1203.
- Thompson, J. and T. D. Thomas (1977), Phosphoenolpyruvate and 2-phosphoglycerate: Endogenous energy source(s) for sugar accumulation by starved cells of *Streptococcus lactis*, *J. Bacteriol.* **130**, 583-595.
- Scarborough, G. A. (1985), Binding energy, conformational change and the mechanism of transmembrane solute movements, *Microbiol. Rev.* **49**, 214-231.
- Crow, V. L., G. P. Davey, L. E. Pearce, and T. D. Thomas (1983), Plasmid linkage of the D-tagatose 6-phosphate pathway in *Streptococcus lactis*: Effect on lactose and galactose metabolism, *J. Bacteriol.* **153**, 76-83.
- Vakil, J. R. and K. M. Shahani (1969), Carbohydrate metabolism of lactic acid cultures. II. Different pathways of lactose metabolism of *Streptococcus lactis* and their sensitivity to antibiotics, *J. Dairy Science* **52**, 162-168.
- Wilson, D. B. (1978), Cellular transport mechanisms, *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 933-965.
- Flatt, J. H., T. A. Cooper, J. M. Gonzalez, and D. E. Dogger (1992), An anionic galactomannan polysaccharide gum from a newly-isolated lactose-utilizing bacterium. II. Fermentation kinetics and lactose transport, *Biotechnol. Prog.* **8**, 335-339.
- Müller, J. B., D. J. Scott, and N. K. Amy (1987), Molybdenum-sensitive transcriptional regulation of the *ChlD* locus of *E.coli.*, *J. Bacteriol.* **169**, 1853-1860.
- Shin, Y. C., H. S. Lee, and S. M. Byun (1990), Application and production of pullulan, *Biochem. Engin. Biotechnol.* **4**, 48-55.
- Shin, Y. C., J. K. Han, and S. M. Byun (1990), Effects of aeration rates and rheological properties of fermentation broth on pullulan fermentation, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **22**, 533-538.
- Landon, R. S., R. C. S. Law, and C. Webb (1993), Fermentation broth rheology during dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 (F) as a possible tool for control, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 251-257.
- Ahn, D. H. and Y. C. Chung (1992), Biopolymer production of *Zoogloea ramigera* in batch, fed-batch and continuous culture processes, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 196-202.
- Haggstrom, L. and C. Forberg (1986), Significance of an extracellular polymer for the energy metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: A hypothesis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 234-239.
- Yoon, S. S., C. M. Kim, R. Ryung, and J. H. Yu (1991), Transport and utilization of lactose by alkalophilic *Bacillus* sp., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 128-134.
- Kim, D. W., J. C. Lee, K. Y. Lee, H. W. Ryu, and J. H. Kim (1995), A useful material production from whey: Effect of carbon sources on zooglan production by *Zoogloea ramigera*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **10**, 221-229.
- Paigen, K. and B. Williams (1970), Catabolite repression and other

- control mechanisms in carbohydrate utilization, *Adv. Microb. Physiol.* **4**, 251-354.
23. Lee, J. K. (1995), Mechanism of carbon catabolic repression by Gram-positive bacteria and enteric bacteria, *The Microorganism and Industry* **21**(3), 262-269.
24. Straight, J. V., D. Ramkrishna, S. J. Parulekar, and N. B. Jansen (1989), Bacterial growth on lactose: An experimental investigation, *Biotechnol. Bioeng.* **34**, 705-716.
25. Son, H. J., K. P. Min, and S. J. Lee (1995), Production of poly(Hydroxy-butyric-Co-Hydroxyvaleric) acid by *Pseudomonas* sp. HJ, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **10**, 349-357.
26. Burton, K. A., M. C. Cadmus, A. A. Lagada, P. A. Sandford, and P. R. Watson (1976), A unique biopolymer from *Rhinoctadiella mansonii* NRRL Y-6272: Production in 20 liter fermentors, *Biotechnol. and Bioeng.* **18**, 1669-1673.