

Bacillus sp. 세균이 생산하는 Extracellular Polysaccharides



KIST 유전공학연구소 미생물공학실 윤 병 대

I. 서 론

미세물의 균체의 다당류(extracellular polysaccharide : ECP)는 미생물 주위에 capsule 또는 slime을 형성하는 1,2차 대사산물로서 일반적으로 10개 이상의 단당 및 유도단당으로 구성되어 있고, 구성당의 종류, 결합양식, 분자량의 차이 등에 따라 독특한 물성 및 특성을 나타내는 수용성 gum으로 특징지을 수 있다.

생리·생화학적 흥미에서 출발한 ECP에 관한 연구는 학문적 기초결과의 축적과 함께 그 고유기능에 따라 gel 형성제, 분산·유화제, 응집제, 보습제, 점증제 등으로 개발되어 식품, 의료, 화장품 및 기타 화학공업의 주요 첨가제로 사용되고 있으며, ECP 응용분야의 확대에 따른 단위 시장성 증대는 ECP 연구를 한층 더 활성화 할 것으로 기대된다.

*Leuconostoc mesenteroides*에서 생산된 dextran이 혈장증량제로 개발되면서 산업화로 연결된 ECP는 현재까지 다양한 미생물이 생산하는 수백종 이상의 ECP가 발견되었으며, dextran을 비롯한 xanthan gum, pullulan, scleroglucan, curdlan, zanflo 등 십여종의 ECP가 산업적으로 생산, 이용되고 있다.

발견된 ECP에 비해 실제 산업적으로 생산되는 ECP의 수가 훨씬 적은 것은 이들 기존 ECP의 우수한 물성 및 물성의 공통성에도 기인하지만, 새로운 고분자특성을 갖는 ECP 및 그 생산미생물의 탐색과 이의 응용개발연구에 상당한 노력과 시간을 필요로 하기 때문이다.

한편, 현대사회의 다양한 문명은 ECP 이용분야에 있어서도 그 다양성과 함께 고도의 기능성을 요구하고 있고, 생분해성 biopolymer에 대한 사회적 요구

확대는 보다 가시화된, 현실적 연구성과를 요구하고 있다. 여기에 최근의 급속한 발전을 보이고 있는 biotechnology는 동·식물 유래 polysaccharides를 미생물에서 생산하는 생산체계전환과 기존의 ECP의 인위적 물성개량에 의한 특수용도로의 개발 및 잠재적 응용성 확대에도 중요한 역할을 하고 있어 앞으로의 연구결과가 주목된다.

본고에서는 현재 본 연구실에서 수행중인 3종의 *Bacillus* sp. 세균이 생산하는 ECP에 관한 물성연구결과 및 개발방향 등에 관해 기술하고, ECP에 관한 review는 국내·외적으로 발표한 우수한 논문들이 다수 있으므로 참고문헌의 소개만으로 생략한다.

II. Bacillus sp. LK-1의 ECP

A) 동정

토양에서 분리한 LK-1 균주는 Y-czapek 배지(czapek 배지에서 yeast extract를 첨가한 배지)에서 배양할 경우 배양시간의 경과에 따라 cell의 형태가 rod type에서 ellipsoidal cell로 전환하는 특징을 보였다(Fig. 1). 또, Table I의 화학적 동정(지방산, quinone, 세포벽 구성성분 및 GC 함량) 결과는 *Bacillus* sp. 세균과 일치하며, 기타 생리·생화학적 성질은 다른 *Bacillus* sp. 세균과 상이점이 있어 이 균주를 *Bacillus* sp. 세균 중 신균주로 단정하고 최종적으로 *Bacillus* sp. LK-1으로 명명하였다.

B) ECP 성질

Bacillus sp. LK-1은 glucose : glucuronate : xylose : mannose의 구성비가 1 : 2 : 1 : 2인 ECP(pol-II로 명명)를 생산하며, 이 pol-II를 다음과 같이 현재

Table 1. Characteristics of *Bacillus* sp. LK-1.

Gram staining		Oxidase	Catalase	Motility			O/F	Spore		
+		-	+	+			-	+		
H ₂ S	VP	Enzyme Activity								
		Nitrate	Arg.	Lys.	Orn.	Ure.	Trp.	β-Glu.	β-Gal.	
-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	
Hydrolysis			Carbohydrate (Acid/Gas)							
Casein	Gelatin	Starch	Glu.	Man.	Ino.	Sor.	Rha.	Suc.	Sal.	Xyl.
+	+	+	-/-	-/-	-	-	--	-/-	-	-/-
Fatty Acid			Quinone			Cell Wall		GC Content (mol%)		
Branched-type			MK-7			meso-DAP		42		

+: Positive, -: Negative



Fig. 1. Morphology of *Bacillus* sp. LK-1. A: Early log phase, B: Mid-log phase.

시판중인 xanthan gum과 물리화학적 성질을 비교하였다.

a) 점도: Pol-II와 xanthan gum의 농도를 0.1-1.0%로 조정하여 점도변화를 비교한 결과, 동일농도에서 pol-II가 xanthan gum보다 높은 점도를 보였으며, 1.0% 농도에서는 상대적으로 10배 이상 높은 것으로 나타났다(Fig. 2). 한편, pol-II는 2.0% 농도에서 gel화가 일어나며, 3.0% 농도에서는 고무처럼 늘어나는 성질(viscoelasticity)이 있다.

b) Shear rate: Pol-II 및 xanthan gum을 0.3% 농도에서 shear rate를 비교한 결과, rpm의 증가에 따라 점도가 감소하는 pseudoplasticity를 보였다(Fig. 3).

c) 열, pH 및 염의 점도에 대한 영향: Pol-II 및 xanthan gum의 점도에 대한 열의 효과는 저온에서는 모두 높은 점도를 나타내었으나 온도가 증가함에 따라 점도는 감소하는 pattern을 보였다(Fig. 4). pH의 효과는 xanthan gum의 경우 전 pH에서 상

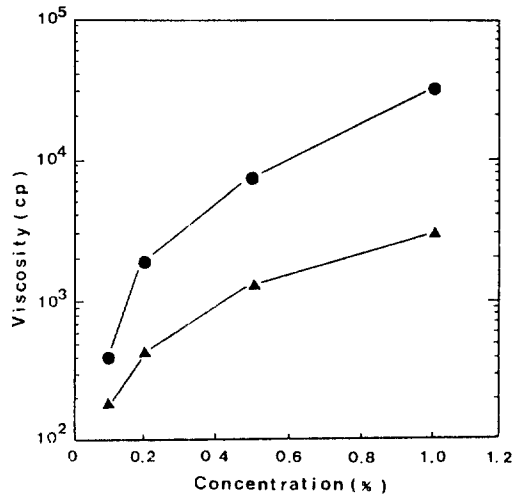


Fig. 2. Comparison of viscosity at different concentration of pol-II and xanthan gum. ●: pol-II, ▲: xanthan gum.

당히 안정한 상태를 보였으나, pol-II의 경우 pH 7-9 사이에서는 안정하나 그 외의 pH에서는 점도가 급격히 감소하는 현상을 나타내었다(Fig. 5). 염의 효과는 NaCl을 첨가하여 검토하였으며, pol-II의 경우 NaCl의 농도증가에 따라 점도는 점차 감소하였으나 xanthan gum의 경우 그다지 영향을 받지 않았다(Fig. 6).

d) 기타 pol-II의 특성 및 성질: pol-II의 분자량은 80만 이상인 것으로 나타났으며, X-ray crystallography의 결과는 무결정성으로 나타났다. DSC thermogram의 결과 86°C 부근에서 단일흡열 peak가 관찰되었다. 한편, pol-II를 film 형성한 후 rheovib-

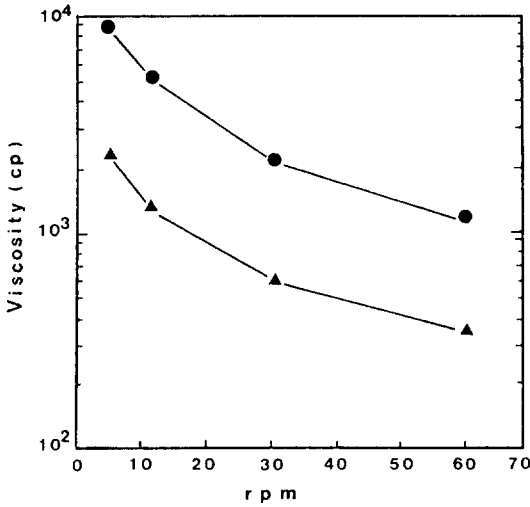


Fig. 3. Effect of shear rate on pol-II viscosity. ●: pol-II, ▲: xanthan gum.

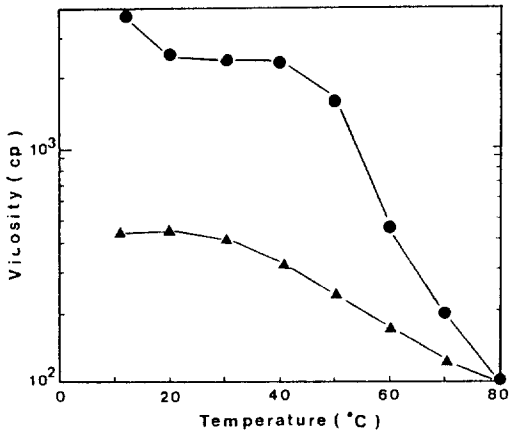


Fig. 4. Effect of temperature on pol-II viscosity. ●: pol-II, ▲: xanthan gum.

ron pattern을 측정 한 결과 상온에서는 2 GPa로 온도상승과 함께 감소하다가 80°C 부근에서 다시 상승하는 현상이 나타나며 200°C 부근에서 열분해가 일어났다(Fig. 7). 이러한 pol-II의 vibron pattern은 다른 ECP와는 성질이 전혀 다른 특이적 성질 중의 하나이다.

III. Bacillus coagulans LAM 91의 ECP

토양에서 분리한 *B. coagulans* LAM 91이 생산하는 ECP(An-29)는 glucose와 xylose가 8:1의 조

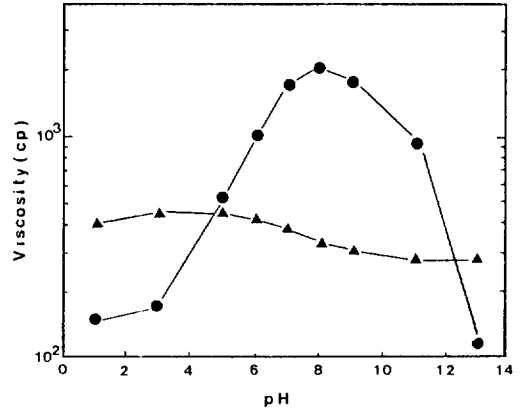


Fig. 5. Effect of pH on pol-II viscosity. ●: pol-II, ▲: xanthan gum.

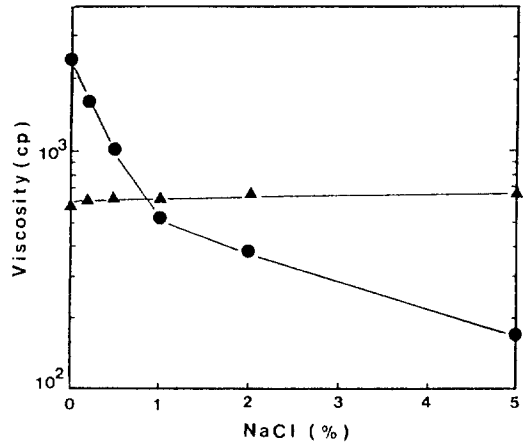


Fig. 6. Effect of NaCl concentration on pol-II viscosity. ●: pol-II, ▲: xanthan gum.

성비로 구성되어 있으며, 농도에 따른 점도 변화를 비교한 결과, 전농도에서 xanthan gum보다 낮은 것으로 나타났다(Fig. 8). 또, An-29도 다른 다당류와 마찬가지로 pseudoplasticity를 나타내었으며, 염의 첨가에 의해 점도가 상승하며 열에 대한 안정성도 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 9). 이때 Na^+ 이온보다 Ca^{++} 이온을 첨가하였을 때 보다 높은 효과를 나타내었다. 또, An-29는 pH 3 부근에서 가장 높은 점도를 나타내며, pH의 상승과 함께 점도는 감소하였다(Fig. 10).

한편, An-29의 일반적 특성으로는 anthron과 phenol에는 반응하나, feehling, benedict 및 barfoed 반응은 음성을 나타내었다. 용해성시험에서는 water,

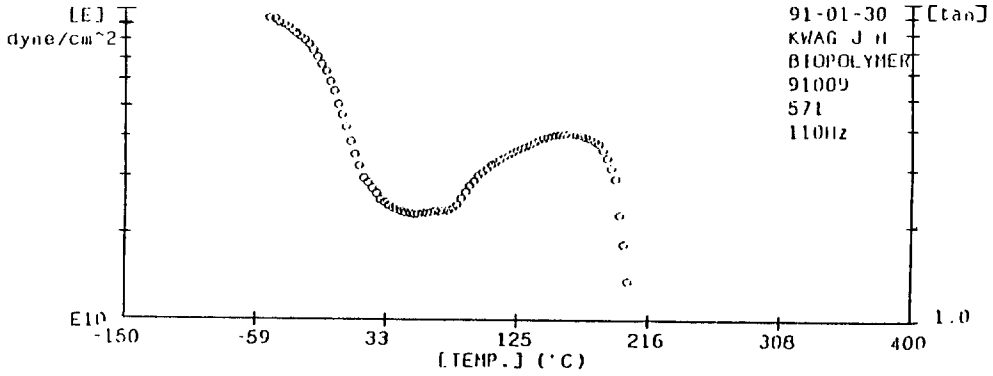


Fig. 7. Rheovibron pattern of pol-II.

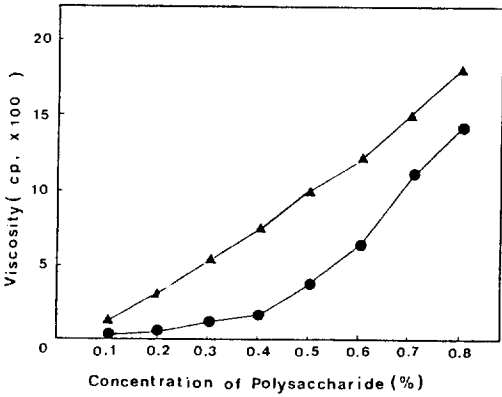


Fig. 8. Effect of polysaccharide concentration on viscosity. ●: An-29, ▲: xanthan gum.

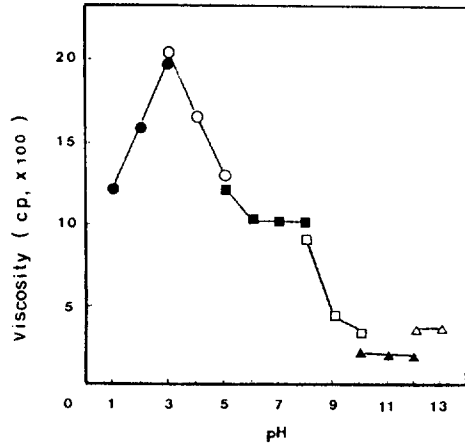


Fig. 10. Effect of pH on viscosity.

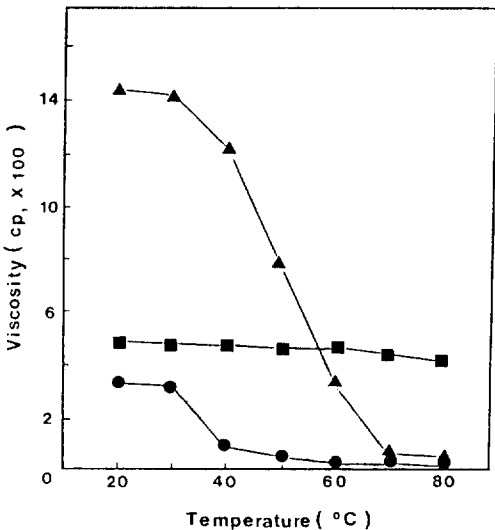


Fig. 9. Effect of temperature on viscosity. ●: An-29, ■: An-29 + CaCl (0.1%), ▲: xanthan gum.

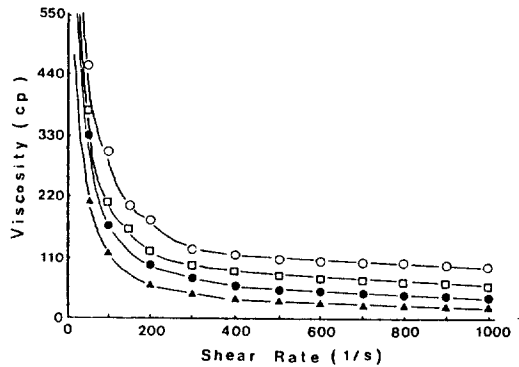


Fig. 11. Relationship between shear rate and viscosity of 1.0% PS-1 supplemented with NaCl or CaCl₂. ●: PS-1, □: PS-1 + NaCl (0.25%), ●: PS-1 + CaCl₂ (0.25%), ▲: Xanthan gum.

pyridine, hexan, benzene 및 chloroform에는 용해 하였으며, ethanol, methanol, acetone, glycerol 등

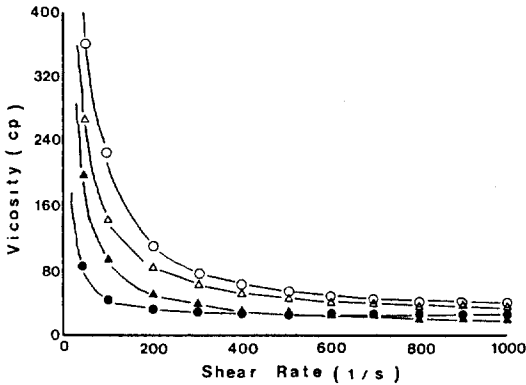


Fig. 12. Effect of CaCl_2 on shear rate and viscosity of 1.0% PS-1 and xanthan gum with autoclave. \blacktriangle : xanthan gum (autoclave), \bullet : PS-1 (autoclave), \triangle : xanthan gum (autoclave, CaCl_2), \circ : PS-1 (autoclave, CaCl_2).

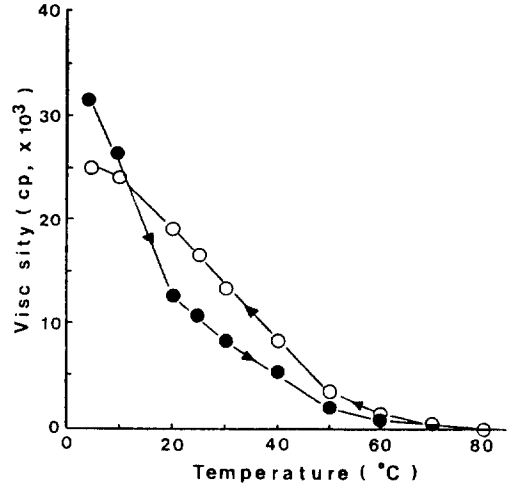


Fig. 14. Effect of temperature on 1.0% PS-1 viscosity.

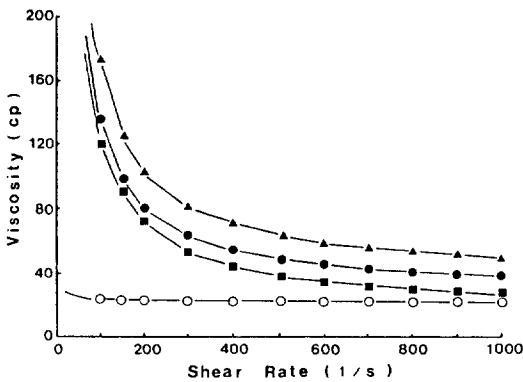


Fig. 13. Relationship between shear rate and viscosity of 1.0% PS-1 according to different pH. \blacksquare : 2.0, \bullet : 6.0, \blacktriangle : 10.5, \circ : 12.5.

에는 침전하는 것으로 나타났고, 특히 CTAB 및 CPC에 침전하는 것은 An-29가 산성다당류임을 의미한다. 이외에도 Mg, Na 및 Mn 염을 첨가함으로써 gel 형성능은 무첨가에 비해 증가하며, 이때 열을 가하면 gel 형성능은 더욱 증가한다.

IV. *Bacillus polymyxa* KS-1의 ECP

B. polymyxa KS-1으로 최종 명명된 이 균주는 glucose : galactose : galactosamine : mannose의 구성비가 1 : 0.4 : 1 : 1인 ECP(PS-1)을 생산한다.

A) 점도 및 염의 효과

1.0% 농도에서 PS-1과 xanthan gum의 shear

rate에 따른 점도변화를 비교한 결과, PS-1의 점도는 xanthan gum보다 다소 높았으며, pseudoplasticity를 나타내었다(Fig. 11). 이때 염의 첨가에 의한 점도변화는 An-29와 마찬가지로 현저히 증가하는 현상을 보였고 Na^+ 이온에 비해 Ca^{++} 이온이 보다 효과적이었다. 염의 첨가에 의한 점도증가 현상, 특히 1가 이온에 비해 2가 이온이 보다 효과적인 것은 ECP 분자간의 side chain과 backbone 사이의 van der waals 힘과 수소결합의 증가로 설명된다. 한편, 염(CaCl_2)은 ECP의 열에 대한 안정성 증대에도 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 12).

B) pH의 점도에 대한 영향

PS-1의 점도에 대한 pH 효과를 검토한 결과 pH 2-10.5 범위에서는 상당히 안정한 것으로 나타났으며, pH 12 이상에서는 점도가 현저히 감소하였다(Fig. 13). PS-1의 pH에 대한 안정성은 xanthan gum에 비해 강알칼리역에서는 다소 떨어지지만, 그밖의 ECP에 비해서는 상당히 우수한 안정성이 인정된다.

C) 열의 점도에 대한 효과

PS-1의 점도는 온도상승에 따라 점차 감소하여 60°C 부근에서의 점도는 거의 없는 상태이며, 고온에서 저온으로 온도를 변화시킬 때 점도가 복원되는 reversible fluid성은 우수한 것으로 나타났다(Fig. 14).

D) PS-1의 분산능

PS-1의 분산능을 corn oil을 대상으로 xanthan

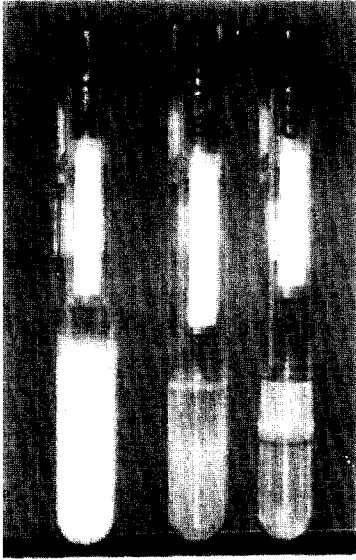


Fig. 15. Comparison of emulsifying activity. A: PS-1, B: xanthan gum, C: Na-alginate.

gum 및 Na-alginate와 비교 검토하였다. 그 결과, Fig. 15와 같이 PS-1의 분산능이 아주 우수한 것으로 나타났으며, 다른 식물성 oil을 대상으로 한 실험결과에서도 비슷한 경향을 보였다. 그밖에 PS-1은 film 형성제, gelling agent로서의 사용가능성도 인정되었다.

V. 결 론

지금까지 자연계로부터 분리한 *Bacillus* sp. 세균이 생산하는 ECP에 관한 일반적 성질 등을 기술하였다.

자연계로부터 우수한 물성의 ECP를 탐색하기 위해서는 i) 다양한 ECP 생산미생물의 분리 ii) 분리된 ECP의 구조와 기능과의 상관관계 및 물리·화학적 성질 규명 iii) 실제적 응용을 위한 실험실 규모의 응용기술 등이 개발되어야 하며, 이 연구과정에서 축적되는 결과를 iv) 새로운 기능성 ECP 탐색법 개발에 응용하는 일련의 연구체계가 필요하다고 생각한다.

미생물 유래의 xanthan gum은 물과의 친화성, 낮은 농도에서의 높은 점도 및 pseudoplasticity, pH의 변화 및 염의 첨가에 대한 높은 안정성 등의 특성으로 인하여 현재 가장 범용되는 대표적인

ECP이며, 이후 개발된 ECP의 경우에는 xanthan gum에 비해 부분적으로 물성의 우수성이 인정되어 특수용도로의 개발에 성공한 예가 대부분이다.

본 연구실에서는 기본적으로 xanthan gum보다 우수한 물성의 ECP를, 최종적으로는 새로운 기능성 ECP를 개발하여 사회적 요구확대에 대응하기 위하여, 먼저 다양한 탄소원(methanol, hydrocarbon 등)을 이용하여 ECP 생산미생물을 분리하고, ECP의 구성성분조사 및 생산미생물의 동정 그리고 상기 ii), iii), iv) 항에 관한 기초연구를 수행하고 있다.

본 고에 소개한 *Bacillus* sp. 세균들이 생산하는 3종의 ECP는 이러한 일련의 연구과정에서 얻어진 결과로서, 현재까지 밝혀진 생산미생물의 동정결과, ECP의 구성성분 및 구성성분의 조성비, ECP의 특성 등이 지금까지 발표된 논문 및 관련특허 등과 비교한 결과 아직 보고된 예가 없어 신규 ECP일 가능성이 높다. 또 이들 3종의 ECP는 xanthan gum에 비해 높은 점도 및 pseudoplasticity(pol-II 및 PS-1), 우수한 응집효과 및 gel 형성능(An-29), 분산능(PS-1) 등이 인정되어 이 방면의 응용을 위한 구체적인 연구를 진행 중에 있다.

Review of biopolymer

1. 생분해성 고분자의 개발 추세 및 방향-이용현. 유전공학 1991. 여름호 p. 44-
2. Biopolymer-유영제. 유전공학 1987. 가을 p. 58-
3. 미생물 polysaccharides의 생합성과 물성-이신영. 생물화공 제4권 제1호 24-32, 1990.
4. Microbial Technology Chapter 13 Polysaccharide K.S. Kang and I.W. Cottrell 2nd ed. vol. 1, 417-, 1979.
5. Bacterial Exopolysaccharides: In Advances in Microbial Physiology, 1972. Vol. 8, 143-, I.W. Sutherland.
6. Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides: In Advances in Microbial Physiology. I.W. Sutherland 1981. vol. 23, 80-
7. Biosynthesis of Polysaccharides by Prokaryotes: In Ann. Rev. Microbiol. S.J. Tonn and J.E. Gander, 1979. vol. 33, 169-