

고점성 신규 생물고분자, Methylan



한국과학기술원 생물공학과 김정희·최준호

I. 서 론

최근 생물공학기술의 발전과 더불어 생물고분자(biopolymer), 특히 미생물에 의해 생성되는 다당 및 이의 유도체에 대한 많은 연구와 관심이 집중되고 있다. 미생물 유래 고분자인 생물고분자는 분자량, 구성당의 종류, 결합순서와 방법에 따른 구조의 다양성 때문에 기존의 다당류를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 새로운 물리·화학적 성질을 지닌 생물고분자를 개발할 수 있기 때문에 식품, 화장품, 화학, 생화학제제, 의약품 등의 다양한 산업적 응용면에서 많은 연구가 진행되어 왔다. *Xanthomonas campestris*가 생성하는 xanthan gum과 *Leuconostoc mesenteroides*가 생성하는 dextran은 이미 공업적으로 생산되어 석유회수 증진제, 유화제, 점착제, 물성조절제, 대용혈청 등으로 사용되어 왔다(1).

또한 생물공학분야에서 C_1 -화합물은 원료(raw material)로써 많은 주목을 받아왔으며, 이중 메탄올은 저렴한 가격, 고순도, 수용성 그리고 제한된 미생물에 의해서만 이용된다는 장점 때문에 단세포 단백질(SCP), 유기산, 아미노산 등의 생산에 관련된 발효공정에 탄소원으로써 사용되고 있다. 근래에 들어 메탄올의 생화학적 대사경로와 미생물 생리 등에 관한 전반적인 지식이 축적됨에 따라 메탄올의 미생물학적 이용에 관하여 활발한 연구가 진행되고 있다(2-4).

이와 같은 배경하에서 값이 저렴한 메탄올로부터 새로운 고점도성 생물고분자인 다당류의 생산과 활용은 산업적으로도 매우 흥미있는 분야이다. 본고에서는 최근 본 연구실에서 개발한 메탄올 자화세균(facultative methylotroph)인 *Methylobacterium or-*

*ganophilum*이 생산하는 신규의 고점성 다당류인 메틸란(methylan)의 생산 및 그 특성과 응용에 관하여 고찰하고자 한다.

II. 메틸란의 생산

메탄올로부터 미생물 발효에 의해 다당류를 생산하는 연구는 몇몇의 균주에 의해서만 보고되어 있을 뿐만 아니라 그 물리화학적 성질 및 물성학적 성질에 대한 보고는 매우 적은 편이다(5-12). 본고에서는 *M. organophilum*에 의해 메탄올로부터 신규의 다당류를 생산하는데 관여하는 인자와 대량생산을 위한 방법에 관해서 고찰하도록 하겠다.

메틸란의 생산은 배지내의 질소원인 황화암모늄이 결핍되어야만 생성되었으며 C/N 비율이 30 정도일 때 최대의 생산성을 얻을 수 있었다. Methylan의 생성도 다른 다당류의 경우와 같이 배지내의 C/N 비율이 높아야 다당류의 생성이 유리하다는 사실과 일치하였다(13-16). 탄소원 및 에너지원으로 사용된 메탄올은 소량으로도 그 독성이 있을 뿐만 아니라 기질 저해성이 관찰되었다(그림 1). Methylan의 생성에 있어서 메탄올의 초기농도는 0.5%(v/v)일 때가 생산성 면에서 유리하였으며 메탄올의 농도가 증가할수록 *M. organophilum*의 비생장속도는 감소하여 4.0%(v/v) 이상의 메탄올 농도에서는 세포의 성장이 완전히 저해되었다(15, 16). 또한 배지내의 미량원소 중 Fe와 Mo 이온이 결핍되었을 때에는 Methylan의 생성이 급격히 저해되었다(17, 18).

*M. organophilum*의 생장과 Methylan의 생성은 산성 상태(pH 5 이하)와 알칼리 상태(pH 8 이상)에서는 모두 저해되었으며 pH 6-7 사이에서 좋은

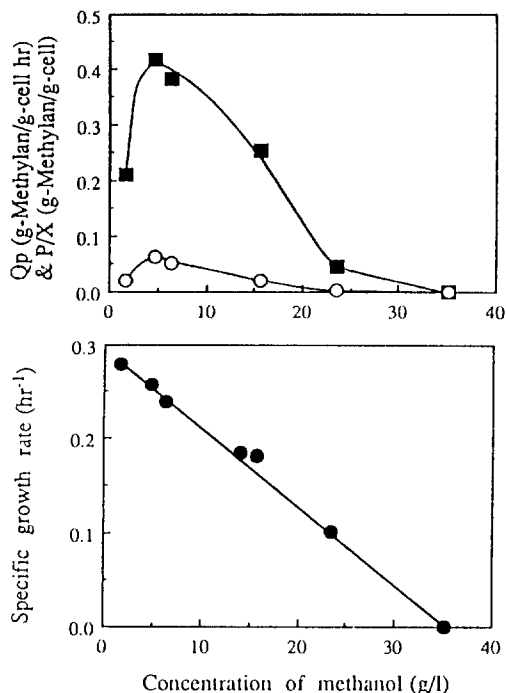


Fig. 1. Effect of methanol concentration on cell growth (●), Methylan yield (■), and specific production rate (○).

비생장속도와 Methylan 생산성을 보였다. 배양온도가 증가할수록 세포의 비생장속도는 증가하였으나 Methylan의 생산성은 30°C일 때가 최적임을 알 수 있었다. 회분식 배양에서의 Methylan은 pH 7.0, 온도 30°C에서 C/N 비율이 30인 배지를 이용하였을 때 0.35 g/l 생산되었으며 이때 세포의 농도는 약 0.9 g/l이었다. 실험에 사용된 *M. organophilum*이 facultative methylotroph (type II bacterium)이므로 Methylan의 생성을 증가시키기 위해 아미노산들과 Methylan의 구성성분들을 배지내에 첨가해준 결과, succinate, malate 그리고 glucose를 첨가하였을 때 Methylan의 생성은 2배 정도 증가하였다(17, 18) (그림 2).

Methylan의 대량생산을 위해 탄소원인 메탄올의 독성과 기질 저해성을 극복하기 위해서 유기식 배양방법을 이용하였으며 이때 공급방식은 DO-stat 방식을 이용하였다. Ammonium ion 농도 0.15 g/l에서 0.75 g/l까지 실험한 결과 균체증식은 배지중의 질소원의 농도에 비례하여 증가하였으나 Methylan의 생산농도는 ammonium ion 농도 0.6 g/l에서 약

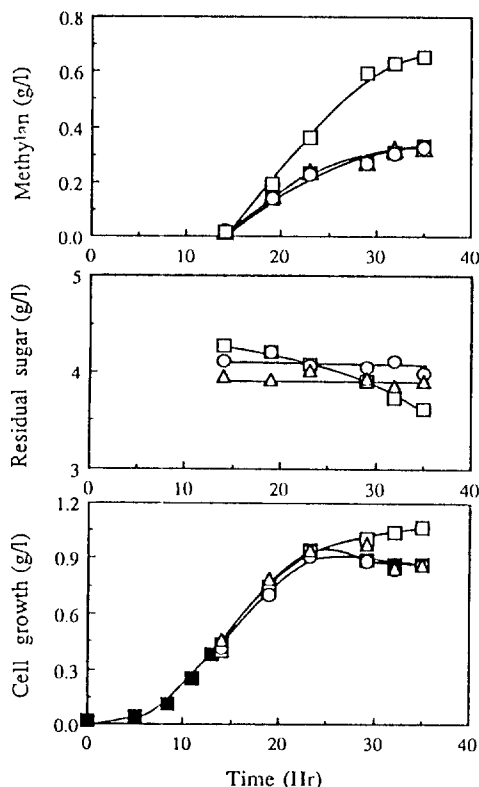


Fig. 2. Effects of sugar components of Methylan on cell growth and Methylan production. Glucose (□), galactose (○), mannose (△) and without sugar as a control (■).

8 g/l로 최고 값을 보여주었다. 초기 ammonium ion 농도가 증가할수록 과량의 ammonium ion에 의한 저해작용으로 비증식속도, 비다당류 생산속도와 비기질소비속도가 감소하였다(19). Ammonium ion 농도 0.45 g/l 이하에서는 다당류 생산에 대한 질소원의 저해작용이 크지 않았으나 그 이상의 농도에서는 비다당류 생산속도가 현저하게 감소함을 보여주었다. 고농도의 ammonium ion의 저해작용을 감소시키기 위해 ammonium ion의 농도를 발효 전 과정 동안 0.45 g/l 이하로 조절하여 총 0.75 g/l를 공급하여 12.5 g/l의 Methylan을 생산할 수 있었다(19). 이와 유사한 결과로 질소원의 고갈이 Xanthan, Pullulan 등의 다당류 생산에 필수적이고 또한 과량의 질소원이 균체증식은 촉진하지만 다당류의 생산은 저해한다는 보고가 있다(20, 21). Ammonium ion 첨가량을 증가시켜 실험한 결과에서도 12.5 g/l 이상은 증가되지 않았다. 이것은 다당류 농도 증가로

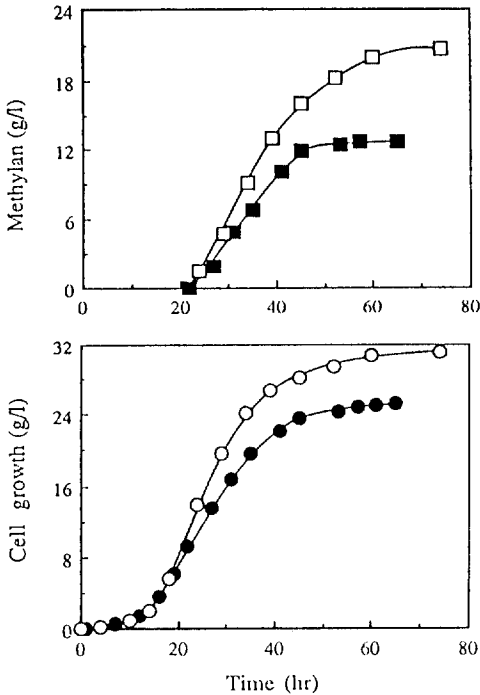


Fig. 3. Time courses of cell growth and Methylan production in classical fermentor and novel bioreactor. Total 1.13 g/l of ammonium ion was supplied. Symbols; Cell growth in fermentor (●) and bioreactor (○), and Methylan production in fermentor (■) and bioreactor (□).

인한 발효조의 물리적인 한계(고점도로 인한 불완전한 혼합)로 생각되어 혼합이 잘되는 새로운 생물반응기를 개발하여 Methylan 생산을 시도하였다(19). 이때 ammonium ion의 농도는 배양중에 0.15 g/l 이하로 유지하였고, 최종 균체농도 및 다당류 생성량은 전통적인 발효조에 비해 각각 20%와 60% 증가한 31 g/l와 20.6 g/l이었다(그림 3). 전단응력이 Methylan 생성에 미치는 영향을 알기 위하여 정해진 전단속도-전단응력을 공급하는 multi-disc mixer로 실험한 결과, 30 Pa 이하의 전단응력에서는 전단응력이 증가할수록 Methylan의 비생산속도가 증가하였고 30 Pa 이상에서는 비생산속도가 일정한 것을 알 수 있었다. 이것은 전단응력이 30 Pa 이하일 때는 세포주변에 생긴 다당류막(slime layer)에 의해 배지로부터 균체로 전달되는 물질전달이 Methylan 생산을 제한할 것이라는 것을 의미한다(그림 4).

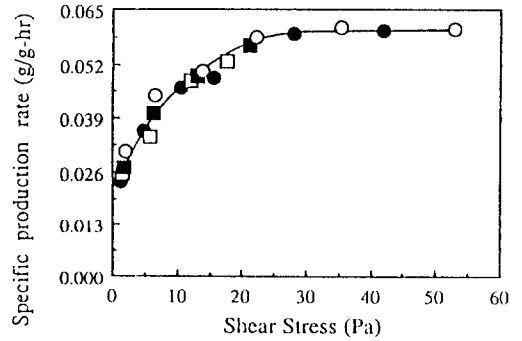


Fig. 4. Effect of shear stress on the specific production rate of Methylan. The symbols show different values of shear rate (1/sec); 130.8 (●), 261.5 (○), 392.2 (■) and 523.0 (○).

III. Methylan의 물리화학적 특성 및 물성학적 특성

생성된 Methylan은 배양액내의 미생물을 원심분리하여 제거하고 에탄올을 이용하여 생산된 다당류를 침전시킨 뒤 탈염과정을 수행함으로써 순수분리하였다. Methylan의 화학적 구성성분을 여러 분석 방법으로 분석한 결과 건조중량의 80%가 탄수화물로 구성되어 있으며 이들의 97%가 환원당으로 구성되어 있다(17, 18). 특이하게 Methylan은 건조중량의 6%가 단백질로 구성되어 있으며 이는 다당류 사슬의 음전하들과 정전기적 인력으로 결합되어 있다. Methylan은 glucose, galactose, mannose가 몰비(molar ratio)로 2 : 3 : 2로 구성되어 있으며 탄수화물 이외에 pyruvic acid, uronic acid들도 함유하고 있다(22, 23)(표 1).

정제된 Methylan 수용액의 물성을 조사한 결과 0.05% 이상의 농도에서 비뉴턴성 유체중 pseudoplastic 유체의 성질을 가지고 있으며 농도가 증가함에 따라 겔보기 점도의 증가가 월등히 높았다. 또한 다당류의 농도와 consistency index 그리고 flow behavior index간의 상관관계를 얻을 수 있었다(그림 5와 6). 1% 용액에서의 consistency index는 18,000 centipoise로써 Xanthan gum에 비해 10배 정도 높은 점성을 보일 뿐만 아니라 flow behavior index 역시 0.15로써 높은 pseudoplasticity를 보여주고 있다(17, 18). Methylan 용액의 점도는 pH 2부터

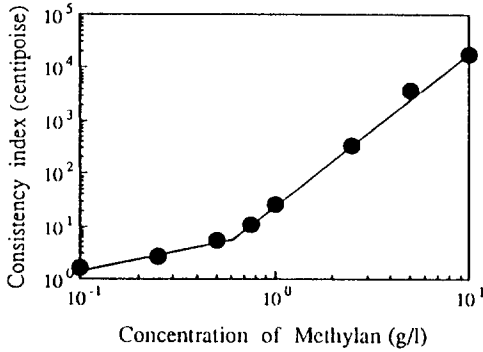


Fig. 5. Relationship between Methylan concentration and consistency index.

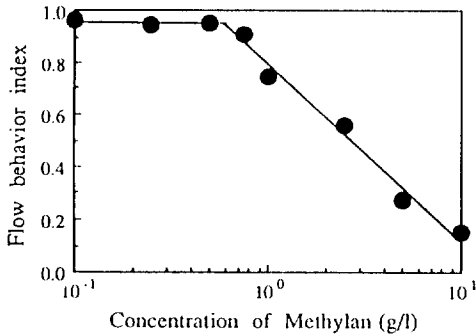


Fig. 6. Relationship between Methylan concentration and flow behavior index.

pH 12의 구간에서 안정하였지만 온도에 대해서는 60°C 이상에서 급격히 감소하였다(16, 17).

분리제한 Methylan의 분자량은 GPC(Gel permeation chromatography)와 light scattering method에 의해 측정된 결과 $2\sim 4 \times 10^6$ dalton으로써 고분자량을 지니고 있음을 알 수 있었다(21, 22). 또한 capillary viscometer를 이용하여 고유점도를 측정된 결과 hydrodynamic volume이 2,000 ml/g으로써 매우 큰 molecular domain을 지니고 있다. Methylan의 고유점도가 염의 종류와 농도에 따라 변화되는 사실로부터 전형적인 polyelectrolyte로서의 성질을 지니고 있을 뿐만 아니라 수용액내에서 conformation 유지에 수소결합과 negatively charged group들의 정전기적 인력이 중요한 역할을 수행함을 알 수 있었다.

Methylan의 이상과 같은 물리·화학적 성질로부터 다양한 산업적 응용가능성을 찾을 수 있었다.

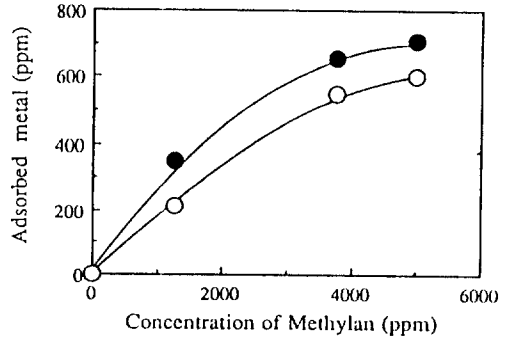


Fig. 7. Effect of Methylan concentration in adsorption of copper (●) and cadmium (○) by Methylan.

Table 1. Chemical components of Methylan.

Chemical Components	Contents (w/w, %)	
	Purified Methylan	Partially purified Methylan
Total Sugar	80.4	65.4
Reducing Sugar	77.9	57.6
Protein	6.1	4.7
Pyruvic Acid	5.1	4.2
Uronic Acid	12.4	9.2
Inorganic Ash	—	22.2
Elemental Analysis	Contents	
Carbon	40.1	31.2
Hydrogen	6.1	4.8
Oxygen	52.7	41.0
Nitrogen	0.72	0.56
Sulfur	0.32	0.25
Ash	—	22.21

낮은 농도로써도 높은 점도를 나타내므로 점도조절제로써 이용가능성이 매우 높은 것으로 생각된다. Methylan의 구조에 중요한 역할을 수행하는 negatively charged group들은 양이온들과 정전기적 상호작용에 의해 net work를 형성하며 조건에 따라 겔을 형성한다. 또한 gelatin과 함께 complex coacervation agent로써 microencapsulation하는데에도 사용가능하다. 특히 Methylan은 여러 다양한 염용액과 반응하여 flocc을 형성함으로써 중금속 이온의 제거와 유용금속의 농축에 사용할 수 있을 것으로

생각된다. Cd이나 Cu의 경우 건조중량의 20-25% 정도까지 중금속 이온을 흡착하였다(그림 7).

IV. 결 언

Methylan은 신규의 고점도성 다당류로써 생분해성이 용이함으로 환경오염문제를 극복할 수 있기 때문에 기존의 다른 다당류나 합성고분자 물질을 대체할 수 있을 뿐만 아니라 식품, 의약품, 화장품 산업 등에 널리 이용이 가능할 것으로 생각되며, 또한 배양방법과 화학적 변형방법 등으로 다양한 구조와 특성을 지닌 Methylan 유도체를 생성함으로써 그 응용범위는 더욱 확대될 것으로 기대된다.

V. 참고문헌

1. Crueger, W. and Crueger, A. (1984) *Biotechnology: Textbook of Industrial Microbiology*. Science Tech. Inc. Madison, pp. 288-291.
2. Tani, Y., Kato, N. and Yamada, H. (1978) *Adv. Appl. Microbiol.*, **24**, 165-186.
3. Kato, N., Tani, Y. and Yamada, H. (1983) *Adv. Biotechnol. Process*, **1**, 171-202.
4. Dostalek, M. and Molin, M. (1975) *Single cell proteins* (S.R. Tanner baurn & D.I.C. Wang, Eds.) pp. 119-144, CRC Press Inc.
5. Hou, M.N., Ralph, B.J. and Richard, R.A.D. (1978) *Aust. J. Biol. Sci.*, **31**, 311-316.
6. Hou, C.T., Laskins, A.I. and Patel, R.N. (1979) *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 800-804.
7. Tam, K.T. and Finn, R.K. (1977) *ACS Symp. Ser.* **45**, 58-80.
8. Kanamaru, K., Iwasmuro, Y., Mikami, Y., Obi, Y. and Kisai, T. (1982) *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2419-2424.
9. Misaki, A., Tsumuraya, Y., Kauta, M., Take-moto, H. and Oigarash, T. (1979) *Carbohydr. Res.* **75**, C8-C10.
10. Savins, J.G. (1977) US Patent, 4,006,058.
11. Finn, R.K. (1976) US Patent, 3,933,218.
12. Finn, R.K. (1977) US Patent, 4,061,585.
13. Sutherland I.W. (1979) In: *Microbial Polysaccharides and Polysaccharides* (Berkeley, R.C. W. Eds.) pp. 1-34, Academic Press, New York.
14. Demain, A.L. (1972) *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **22**, 345-362.
15. Kim, J.H., Choi, J.H., Oh, D.K. and Lebeault, J.M. (1990) *Asia-Pacific Biochem. Eng. Conf.* '90, 229-234.
16. Kim, J.H. and Choi, J.H. (1989) *Proc. Int. Symp. New Microorg. Products*, 172-183. Organized by Kor. Soc. Indust. Microbiol. Bioeng.
17. Kim, J.H., Choi, J.H. and Lebeault, J.M. (1991) US Patent, 5,064,759.
18. Kim, J.H., Choi, J.H. and Lebeault, J.M. (1992) Korea Patent. 047659.
19. Kim, J.H., Oh, D.K. and Choi, J.H. (1991) 2nd Korea-US Joint Seminar on Bioprocess Technology, 13-18, Organized by KOSEF and NSF.
20. Souw, P. and Demain, A.L. (1979) *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 1186-1192.
21. Auer, D.P.F. and Seviour, R.J. (1990) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 637-644.
22. Choi, J.H., Lee, U.T., Kim, J.H. and Lebeault, J.M. (1989) *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 377-402.
23. Choi, J.H., Oh, D.K., Kim, J.H. and Lebeault, J.M. (1991) *Biotechnol. Lett.* **13**, 417-420.