

Alcaligenes faecalis에 의한 β -glucan의 생합성과 구조 분석

류 강·¹이 기 영·[†]이 은 규
한양대학교 화학공학과 생물공정연구소, 전남대학교 화학공학부·촉매연구소¹
(접수 : 2001. 8. 4., 게재승인 : 2001. 8. 24.)

The Structure Analysis and Biosynthesis of β -glucan by *Alcaligenes faecalis*

Kang Ryu, Ki Young Lee¹, and Eun Kyu Lee[†]

Department of Chemical Engineering, Bioprocess Research Laboratory, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea
Faculty of chemical Engineering and The Research Institute for catalysis, Chonnam National University,
Kwangju 500-757, Korea

(Received : 2001. 8. 4., Accepted : 2001. 8. 24.)

Biosynthesis of curdlan (β -1,3 glucan) was shown by fluorescence on cellulose medium. The highest production of curdlan was produced when glucose was used as a carbon source and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was used as a nitrogen source. β -form of curdlan was detected in the fingerprint region (890 cm^{-1}) by FT-IR spectrum and shown homogeneous β -1,3 glucan by ^{13}C NMR spectrum (C_1 -103 ppm, C_2 -73.2 ppm, C_3 -86.4 ppm, C_4 -68.7 ppm, C_5 -76.63 ppm, C_6 -61.2 ppm). Transition of structure from triple helix coil form to random coil form was appeared at 0.1 ~0.25 M NaOH concentration. It was shown that natural curdlan is a triple helix form in neutral but becomes weak in alkaline condition.

Key Words : β -glucan, curdlan, biosynthesis, FT-IR, ^{13}C NMR

서 론

많은 다양한 세균들은 세포 외 다당을 생산하는 것으로 알려져 있다. 세포 외 다당의 화학적 조성과 구조는 생산 균주의 종에 따라 밀접하게 의존한다. 일반적인 세균들의 세포 외 다당의 생산은 일차적으로 비성장기와 휴지기 사이에서 일어나는 2차 대사산물이 된다. 대부분의 미생물 유래의 세포 외 다당은 음이온성인데 이는 uronic acid와 유기산인 pyruvate에 기인하는데 uronic acid로는 glucuronic acid가 일반적이고 galacturonic acid, mannuronic acid도 확인된다. 그리고 미생물이 생산하는 세포 외 다당은 식품산업과 석유산업 그리고 의약에도 이용되는 등 다양한 응용이 가능하다(1,2). 이러한 세포 외 다당류 중 β -glucan의 일종인 curdlan은 *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*에 의해 생산되는 세포 외 다당으로 순수한 glucosidic 결합만으로 이루어져 있다. 이 세포 외 다당은 1962년 Harada 등(3)이 석유화학물질을 이용하여 성장할 수 있는 미생물로부터 처음 분리하였다. 이 균주로부터 자발적인 변이주 중에서 중성 다당을 합성하는 변이주를 분리하였

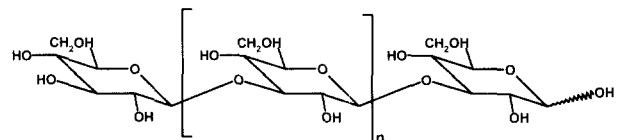


Figure 1. Repeating unit structure of β -1,3 glucan (curdlan).

고, 이러한 다당의 수용액을 가열하면 응고(curdle)하므로 curdlan이라고 명명하였다(4). 이어 Hugh G. Lowford 등(5)은 uracil의 영양요구성을 갖지 않는 균주를 개발하였다.

Curdlan의 구조는 Figure 1에서 보는 바와 같이 β -D-glucopyranose가 β -1,3의 결합으로 이루어진 다당이다. Curdlan은 glucose와 여러 탄소화합물로부터 발효를 통하여 쉽게 heat gelable β -1,3-glucan을 얻을 수 있다. 첨가된 glucose에서 다당류의 수율은 약 50%까지 올릴 수 있다고 보고되었다(6). β -glucan은 알칼리 수용액 중에서 0.24 N 이하에서는 helix 구조를 갖고 그 이상의 농도에서는 random coil로 되며 조성의 변화는 가역적이다(7, 8, 9). 이러한 β -1,3-glucan의 생산 및 응용이 국내에서도 활발히 진행되어 있다. 하지만 생합성된 curdlan의 생산적인 측면에서만 접근하여 분자적인 구조나 그 구조가 가지고 있는 특성의 연구가 미비한 상태이다.

이에 본 연구는 *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*에 의해 생산되는 β -1,3-glucan인 curdlan의 탄소원과 질소원의 종류에

[†]Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Hanyang University, Ansan, Korea 425-791
Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779
E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

Table 1. Composition of Define Mineral Salts Medium for exopolysaccharide fermentation.

Components	Concentration (g/L)	
	Non-nitrogen limited	Nitrogen limited
Carbon sources		
D-glucose	45	55
D-galactose	45	
Lactose	45	
Nitrogen sources		
NH ₄ Cl	4	1.5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4	
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	
NaH ₂ PO ₄ ·12H ₂ O	22.5	7.5
K ₂ HPO ₄	7.5	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	0.005
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.005	
Trace elements		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.0 × 10 ⁻³	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	2.4 × 10 ⁻³	
H ₃ BO ₃	24 × 10 ⁻³	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	16 × 10 ⁻³	
CuSO ₄ ·4H ₂ O	1.6 × 10 ⁻³	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.4 × 10 ⁻³	

다른 생산성의 비교와 생산된 curdlan을 빠르게 배지중에서 확인할 수 있는 방법을 확립하고자 하였으며 생합성된 curdlan의 구조 및 분자적인 특성을 NMR과 FT-IR을 이용하여 규명하고 생산된 β -glucan의 구조적인 특성의 변화를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

본 실험에 사용된 균주는 *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* (ATCC 31750)을 사용하였다. 균주의 보관을 위해서 PY배지 (Peptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5%, pH 7.2)를 사용하여 4°C에서 1개월 간격으로 계대 배양하면서 실험하였다. Curdlan 생산 집락을 선별하기 위한 배지로는 AB 배지(D-glucose 2%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, aniline blue 0.005%, agar 1.5%, pH 7.2)를 사용하였으며 curdlan 생합성에 사용된 배지는 DMSM(Defined Mineral Salts Medium)을 사용하였다. DMSM의 성분 조성은 Table 1에 기술하였다. 발효배지의 멸균은 갈변현상과 염의 침전을 방지하기 위해 염수용액과 탄소원을 분리시켜 멸균한 다음 혼합하여 실험하였다. 탄소원으로는 glucose, galactose, lactose 등을 사용하였고 질소원으로는 NH₄Cl, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄를 사용하였다.

플라스크 배양 및 발효조를 이용한 회분식 배양

플라스크 배양은 PY 한천배지에 보관한 균주를 멸균된 탄소제한 DMSM(2% glucose) 5 mL에 한 백금이를 접종하여 30°C에서 12시간 전배양하고 150 mL DMSM에 전배양액 전체를 접종한 다음 30°C, 120 rpm의 조건으로 본 배양 실험을 하였다.



a) Photography of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* on AB agar plate



b) Photography of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* by optical microscopy ($\times 10$)

Figure 2. Photography of *Alcaligenes Faecalis* var. *myxogenes* on AB agar plate(a) and taken by optical microscopy ($\times 10$)

발효조 실험은 KF-7L 발효조 (한국 발효기(주))를 사용하였고 발효 용량은 3 L로 하였다. 집종 균체량은 3 g/L를 집종하여 실험하였으며 공기의 공급량은 0.33 vvm (volume of air \times working volume⁻¹ \times min⁻¹)으로 일정하게 공급하였다. 교반속도는 850 rpm, 온도는 30°C로 유지하였으며 pH는 4 N NaOH를 연동펌프로 자동주입하면서 세포성장기가 정지기 이전에는 7.2 \pm 0.2로 유지하고 정지기에 들어서면 5.9 \pm 0.2로 유지하였다.

분석 방법

세포농도는 660 nm에서 분광광도계(Milton-roy, Spectronic 20D)로 흡광도를 측정하여 검량선에 의하여 환산하였다. 발효 배양액 중에 환원당의 측정은 Miller의 DNSA법을 546 nm에서 흡광도를 검량선에 의해 환산하였다. 균체가 생산하는 다당류가 beta 결합을 가지고 있는지를 확인하기 위하여 CF(Cellufluor, Polyscience Co.)를 고체 배지 1 mL당 1 μ L 씩 첨가하여 균체를 30°C에서 배양한 후 UV 램프(UVGL-25, UVP)로 암실에서 낮은 파장으로 조사하여 형광 유무를 관찰하였다.

β -glucan의 분리

생성된 β -glucan은 발효배양액에 동량의 1 N NaOH를 첨가하고 실온에서 15분간 교반하고 10,000 \times 에서 10분간 원

심분리를 한 후 상등액을 4 N HCl로 중화시킨 후 다시 10,000×g에서 10분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 상등액을 버린 후 침전물만을 취하고 3차 증류수로 현탁시킨 후 같은 조건에서 원심분리하여 회수하였다. 이와 같은 세척은 3회 반복하여 β -glucan에 남아 있는 염들과 불순물을 제거하였다. 회수된 β -glucan은 동결 건조하여 -20℃에서 보관하며 다음 실험에 사용하였다.

FT-IR과 ¹³C-NMR 분석

생합성된 β -glucan의 구조 및 성분을 분석하기 위하여 동결건조된 glucan을 KBr 중에 미량 넣어 잘 분쇄한 후 시료제조기로 박막을 만든 후 FT-IR(Nicoplet 520P, Polaris/ICON)로 분석하였다. 정확한 비고분석을 위해 기준물은 Sigma에서 시판하는 curdlan을 사용하였다. 동결 건조된 β -glucan을 다시 진공건조기에서 수분을 완전히 제거한 다음 500 μ L의 Me₂SO₄-d₆에 100 mg을 녹인 후 25℃에서 16시간 동안 FT-NMR(Varian 7.05, 300MHz)로 관찰하였다. 내부 표준물질로는 TMS (Tetramethylsilane)를 사용하였다.

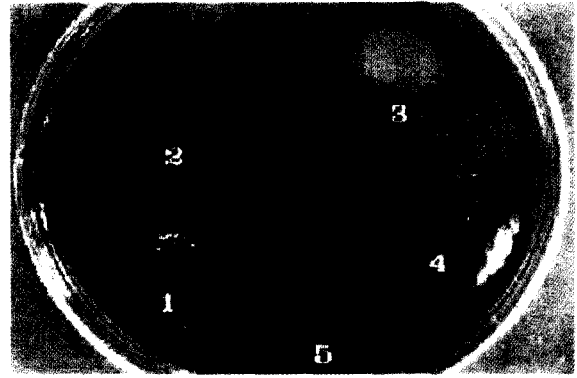
Helix-coil transition 분석

β -glucan의 성분적인 구조는 Ogawa의 방법(10)을 변형하여 실험하였다. 최종농도가 88 μ M이 되도록 0.001 N NaOH에 Congo Red (Sigma chemical Co.)를 녹였다. Laminaran은 β -1,3 linked triple-helix control로 사용하였다. Dextran은 random-coil control로 사용하였다. 모든 glucan은 0.001 N NaOH에 10 mg/mL로 준비하였다. 본 실험에서 분리 정제된 β -glucan과 다당의 표준물(250 μ L)은 Congo-Red-NaOH나 water-NaOH가 750 μ L 들어 있는 microcuvette에 첨가하여 잘 혼합한 후 UV-visible Spectrometer(UV Visible Recording Spectrometer, Shimadzu)를 사용하여 흡광도(λ_{max})를 측정하였다. Order-disorder transition을 보기 위해 Congo red-curdlan과 Congo red-다당 표준물의 용액에 대한 흡광도(λ_{max})는 0.001 N에서 1.0 N 까지의 NaOH 농도에서 측정하였다.

결과 및 고찰

Aniline Blue 배지와 Cellufluor 배지에서의 β -1,3 glucan (curdlan)의 생합성

Aniline Blue 배지에서 균을 도말한 후 2일 정도 배양하여 생합성되어 세포 밖으로 분비된 β -glucan의 염색을 관찰하였다(Figure 2). Figure 2. a는 일반카메라로 외형을 관찰하였고 Figure 2. b는 광학현미경으로 10의 배율로 관찰하였다. Aniline Blue 배지에서의 curdlan은 진한 청색의 광택이 있는 colony를 형성하였고 10배로 확대하여 본 결과는 colony 표면 전체에 거의 균일하게 매질 염색된 것으로 관찰되었다. β -1,3이나 1,4 결합을 가지고 있는 다당류가 Cellufluor에 대하여 특이적으로 형광성을 가지고 있는지 알아보기 위해 cellufluor 고체배지에 β -1,3 결합을 가지고 있는 Sigma사의 curdlan 표준품과 laminaran 표준품, 그리고 본 연구에서 분리한 curdlan과 β -1,3과 1,4 결합을 가지고 있는 zooglan, β 결합을 가지고 있지 않는 pullulan을 시험하였다(Figure 3). β 결합을 가지고 있는 시료들은 모두 UV하에서 형광성을 보였



a) common viewing photograph of various polysaccharides on CF agar plate



b) photography of various polysaccharides on CF agar plate under illuminated UV

Figure 3. Common viewing(a) and under illuminated UV photography of various polysaccharides on CF agar plate (①curdlan of in this study ② curdlan

Table 2. Fluorescent intensities of various polysaccharides

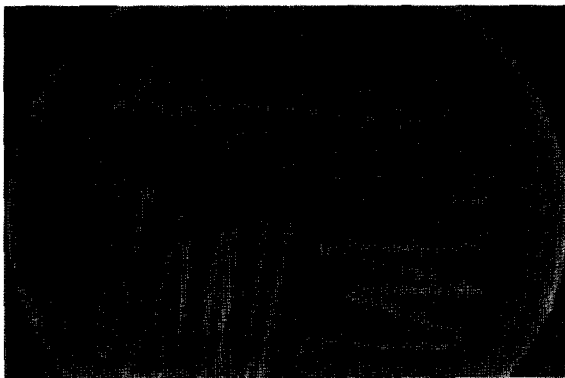
polysaccharides	Fluorescent properties
Curdlan ^a	+++++
Curdlan ^b	++++
Laminaran	++
Pullulan	ND
Zooglan ^c	+

^a: isolated in this study, ^b: produced Sigma Co., ^c: from reference 11

다. 특히 β -1,3 결합만을 가지고 있는 curdlan은 강한 형광성을 보였고 해조류에서 분리된 laminaran은 중간을 β -1,3과 1,4를 가지고 있는 zooglan은 약한 형광성을 보였지만 β 결합이 없는 pullulan은 형광성을 보이지 않았다(Figure 3. b). 이러한 결과는 Table 2에 나타내었다. 아울러 균체가 생산하는 다당이 β 결합을 가지고 있는 지를 확인하기 위해 생산 균주를 cellufluor가 첨가된 DMSM 배지에 도말하여 생합성의 여부를 확인하였다(Figure 4). β -1,3 glucan을 생산하는 *Alcaligenes faecalis*는 강한 형광성을 보였지만 생산하지 않는 *E.coli* (DH5 α)는 형광성을 보이지 않았다. 이 결과는 김등(11)이 앞서 보고한 결과와 유사하게 cellufluor가 β -결합을 가진 다당류에 특이적으로 형광을 보이는 것을 보여주었다.



a) Photography of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* on CF agar plate under illuminated UV



b) Photography of *E. coli* (DH5 α) on CF agar plate under illuminated UV

Figure 4. Photography of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*(a) and *E. coli* (DH5 α)(b) on CF agar plate under illuminated UV

Table 3. The broth of flask culture in various nitrogen sources after 144 hours

	(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ HPO ₄	NH ₄ Cl
Cell mass(g/L)	6.21	5.448	6.102
pH	4.10	4.08	4.23
Product(g/L)	12.9	9.68	11.43
Yield ^a	28.7	21.5	25.4

^a: product/carbon source \times 100(%)

Flask 배양시 탄소원과 질소원의 영향

질소원이 (NH₄)₂SO₄인 경우는 세포증식은 (NH₄)₂HPO₄에 비해 54%, NH₄Cl에 비해 20.4% 정도로 많았다. pH는 대체적으로 24시간을 전후로 급격히 떨어지기 시작하여 36시간 정도에 4.1에서 안정되었다. 생산량은 (NH₄)₂SO₄가 28.7%, (NH₄)₂HPO₄는 21.5%, NH₄Cl은 25.4%이었다. 이들 결과를 Table 3에 나타내었다.

이는 flask 배양에서는 배양액의 규모가 작아 생성된 다당의 양을 시간별로 확인하는 것이 불가능하였다. 그래서 탄소원인 당의 소비로 생성된 다당의 양을 간접적으로 확인하였고 생산량은 최종 생산량을 표시하였다. 탄소원이 glucose인 경우가 당의 소비 및 최종 β -glucan의 생산량이 가장 많았고 lactose, galactose의 순이었다. 최종 curdlan의 생산량을 보면 glucose가 28.7%, galactose가 14.26%, lactose는 18.7%이

Table 4. The broth of flask culture in various carbon sources after 144 hours

	Glucose	Galactose	Lactose
Cell mass(g/L)	6.21	6.104	5.333
pH	4.10	4.03	4.27
Product(g/L)	12.9	6.43	8.42
Yield ^a	28.7	14.2	18.7

^a: product/carbon source \times 100(%)

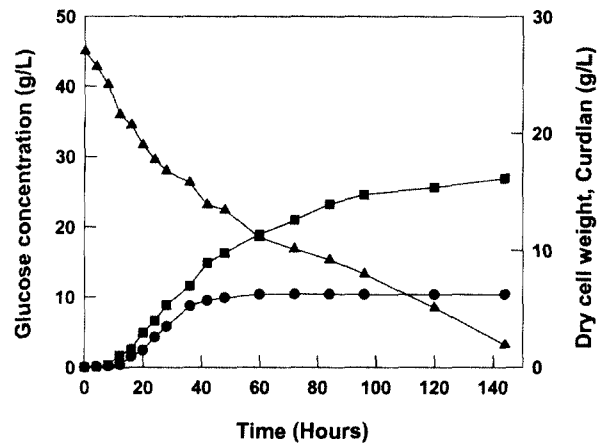


Figure 5. Kinetics of fermentation of curdlan by *Alcaligenes faecalis*(ATCC 31750) with 4.5% glucose as a carbon source. (\blacktriangle : glucose, \bullet :DCW, \blacksquare : curdlan)

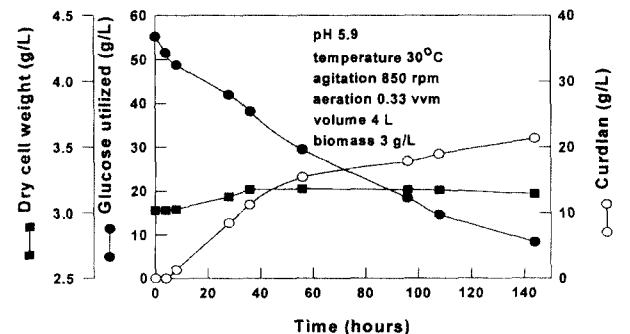


Figure 6. Curdlan production by *Alcaligenes faecalis*(ATCC 31750) with 5.5% glucose and nitrogen limited medium.

었다. 이들의 결과는 Table 4에 나타내었다.

발효조를 이용한 회분식 배양

발효조를 이용한 회분식 배양은 flask 배양에서 가장 좋은 수율을 보인 glucose와 (NH₄)₂SO₄를 탄소원, 질소원으로 사용하여 실험하였다.

탄소원이 glucose인 경우, 농도를 45 g/L로 하고 질소원을 제한하지 않은 실험을 Figure 5에 나타내었다. 균체량은 6.22 g/L, curdlan 생산량은 16.15 g/L로 glucose 투입량 대비 다당 전환율은 35.7%로 flask 배양에 비해 7.2%가 상승하였다. 이는 flask 배양에 비해 교반 속도와 배양액중의 용존 산소량이 증가됨에 따른 상승으로 생각된다.

질소원의 농도를 1.5 g/L로 낮추고 점종 균체량을 3 g/L로 점종하여 질소제한 배지에서의 발효를 하였다(Figure 6). 세

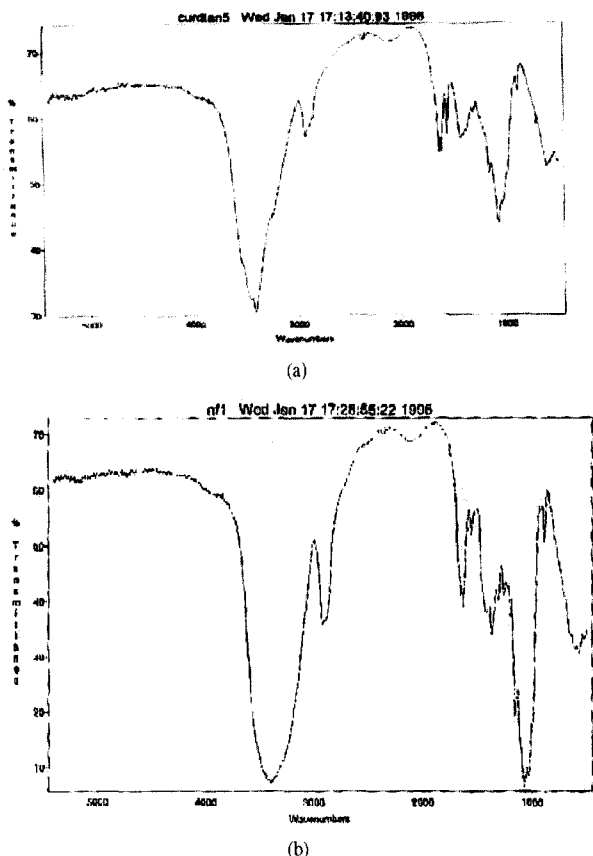


Figure 7. FT-IR spectrum of Sigma Co.'s curdlan(a) and curdlan isolated in this study(b)

포성장기가 정지기 이전에는 7.2 ± 0.2 로 유지하고 정지기에 들어서면 5.91 ± 0.2 로 유지하면서 발효하였다. Glucose의 농도는 55 g/L로 하였다. 질소제한 배지에서의 세포성장의 정지기는 대략 36시간이었고 최종 균체량은 3.15 g/L이었고 최종 curdlan 생산량은 21.35 g/L였다. 생산 수율을 보면 38.32%로 질소가 제한되지 않은 회분식 배양에 비해 3.02%가 증가된 값을 보였다. 탄소원의 소비는 46.65 g/L(84.82%)로 질소가 제한되지 않은 회분식 배양에 비해 8.2%가 감소된 값을 보였다. 아울러 단위 균체당 curdlan의 단위 생산량은 질소제한배지는 6.78(curdlan g/cell g)이었으며 질소를 제한하지 않은 배지는 2.6(curdlan g/ cell g)이었다. 이는 질소가 제한되지 않은 배양이 세포의 증식에 필요한 질소원이 풍부하여 세포가 증식이 되고 이 증식에 탄소원의 일부가 이용

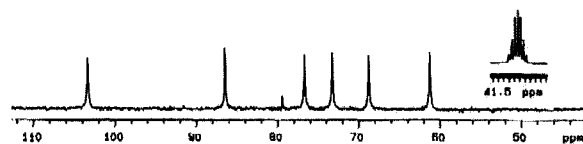


Figure 8. 300MHz ^{13}C -NMR spectrum of isolated curdlan in this study in $\text{Me}_2\text{SO}_4\text{-}d_6$

되어 소모된다고 생각된다. 하지만 질소가 제한된 배양에서는 세포의 증식이 멈추게되고 탄소원이 그만큼 제한적으로 세포 증식에 사용되어지며 탄소원 대부분이 curdlan의 생합성에 소모된다고 판단된다.

FT-IR과 ^{13}C NMR에 의한 성분 및 구조 분석

본 실험에서 최종적으로 생산되어 분리 정제한 curdlan을 FT-IR로 분석한 결과는 작용기 주파수 영역의 $1050 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 에서 broad한 형태의 C-O-C stretch가 $1300 \sim 1450 \text{ cm}^{-1}$ 에서 약간 broad한 형태의 CH bend, 2920 cm^{-1} 에서 CH stretch, $3200 \sim 3600 \text{ cm}^{-1}$ 에서 OH등의 작용기가 보이고 1200 cm^{-1} 이하의 지문영역에서는 890 cm^{-1} 에서 β -form의 흡수피크가 관찰되었다(Figure 7). 그리고 정확한 탄소수와 그 결합구조를 살펴보기 위해 ^{13}C -NMR분석을 하였다(Figure 8). 40 ppm에서 용매인 $\text{Me}_2\text{SO}_4\text{-}d_6$ 가 관찰되었고 103.2 ppm에서 C_1 이 84.6 4ppm에서 C_3 , 76.63 ppm에서 C_5 , 73.2 ppm에서 C_2 , 68.7 ppm에서 C_4 , 61.2 ppm에서 C_6 가 동일한 양으로 검출되었다. 이는 Saito등(14)이 보고한 측정치(C_1 :103.5 ppm, C_2 :74.3 ppm, C_3 :89.8 ppm, C_4 :68.8 ppm, C_5 :75.5 ppm, C_6 :61.8 ppm)와 거의 일치함으로 보아 β -glucan인 curdlan으로 확인되었다. 이에 대한 chemical shift 비교는 Table 5에 나타내었다.

Helix-coil transition 분석

Curdlan의 triple-helix coil형태에서 random 형태로의 전이는 0.1과 0.25 N NaOH 농도사이에서 흡광도의 최대값이 급격히 떨어지는 것이 확인되었다(Figure 9). β -1,3-linked triple-helix control인 laminaran은 0.1과 0.2 N NaOH 농도 사이에서 흡광도의 최대값이 급격한 전이를 보였고 random-coil control인 Dextran은 흡광도의 최고치가 급격한 변화를 보이지 않았다. 정제된 curdlan은 중성 상태에서 triple-helix coil 형태를 가지지만 알칼리 상태에서는 그 구조가 약해져 denature 됨을 알 수 있다. 이는 본 연구에서 생산 및 분리정제된 curdlan이 중성상태에서 정확한 triple-helix coil 형태를

Table 5. 300MHz ^{13}C -NMR spectra of curdlan in this study and references.

	Chemical shifts of references(ppm)			Chemical shifts in this study (ppm)
	anhydrous ^a	hydrate ^b	Other β -1,3glucan ^c	
C1	104.5	104.3	103.01	103.2
C2	73.5	73.8	72.83	73.2
C3	89.8	87.3	86.22	86.4
C4	68.8	69.1	68.41	68.7
C5	75.5	75.8	76.33	76.6
C6	61.8	61.2	60.87	61.2

^a, ^b, ^c. Taken from references 12, 13, 14.

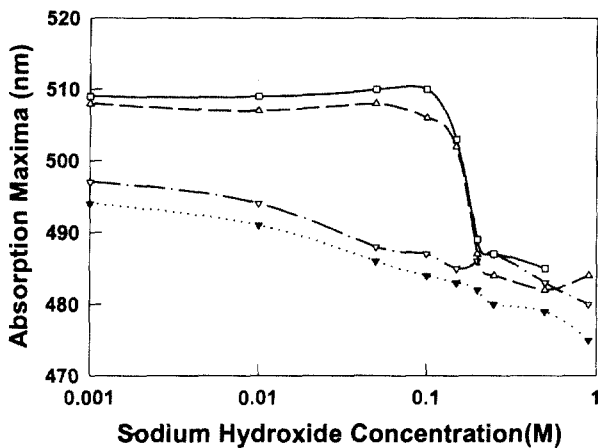


Figure 9. Helix coil transition of β -1,3 glucan in the presence of Congo Red and various concentration of NaOH (\blacktriangledown : Congo Red, ∇ : dextran, \square : curdlan, \triangle : Laminaran)

갖춘 β -1,3 glucan이라는 것으로 확인되었다.

요 약

본 연구에서는 *Alcaligenes faecalis*에 의해 생산되는 세포의 다당류인 β -glucan의 생합성에서 탄소원, 질소원의 영향과 생합성된 curdlan의 구조를 살펴보았다. 먼저 β -glucan의 생합성을 확인하기 위해 Aniline Blue 배지에서 청색 colony들을 선별하고 Cellufluor 배지에서 형광성을 보임으로 β -1,3 glucan의 생합성을 확인하였다. Flask 배양에서는 탄소원이 glucose이고 질소원이 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 일 때 가장 많은 β -glucan을 생산하였다. 탄소원을 glucose로 질소원을 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 사용한 발효조 배양에서는 flask 배양에 비해 생산량이 7.2%가 증가되었다. 질소원을 제한한 발효에서는 최종 생산수율이 38.82%였고 질소원을 제한하지 않은 발효보다 3.02%가 증가되었다. 분리 정제된 curdlan의 FT-IR의 분석에서는 지문영역인 890 cm^{-1} 에서 β -form이 관찰되었고 ^{13}C -NMR 분석에서는 C_1 -103.5 ppm, C_2 -74.3 ppm, C_3 -89.8 ppm, C_4 -68.8 ppm, C_5 -75.5 ppm, C_6 -61.8 ppm에서 검출되어 homogeneous β -1,3 glucan으로 확인되었다. curdlan의 triple-helix coil 형태에서

random coil 형태로의 전이는 0.1에서 0.25 N NaOH의 농도에서 일어남이 확인되어 중성 상태의 curdlan은 triple-helix coil 형태를 가지지만 알칼리 상태에서는 그 구조가 약해져 random-coil로 전이 되어짐을 알 수 있었다.

이는 본 연구에서 분리 정제된 curdlan이 정확한 β -결합을 가진 glucan임이 확인되었으며 생합성된 curdlan의 구조와 분자적인 특성을 확인하였다. 본 연구를 통하여 β -결합을 가지는 glucan의 신속한 선별법을 구축할 수 있었고 이는 새로운 기능을 가지는 β -glucan 생합성 효소나 분해효소의 탐색에 이용될 것으로 기대된다.

REFERENCES

- Cottrell, Matsuda, K. (1980) Industrial potential of fungal and bacterial polysachharides, Fungal Polysachharides., Sanford, P. A. 251-270
- S. Nagasawa, (1976) New Food Ind., **18**, 29, In Japanese
- Harada, T. and Yoshimura T., (1964) J. Ferment. Technol. **42**, 615.
- Harada, T., Misaki, A., and Saito, H. (1968) Arch. Biochem. Biophys. **124**, 292.
- Lawford, H.G., (1982) United States Patent 4 355 106. Issued Oct, 1982
- Phillips, K. R. and Lawford, H.g. (1982) Progress in Industrial Microbiology. **18**. 201-229
- Maeda, I., Saito, H., Masada, M., Misaki, A., and Harada, T. (1967) Agr. Biol. Chem. **31**, 1184
- Kimura, H., Moritaka, S., and Suzuki, S., (1973) M. J. Food Sciences **38**, 668
- Konno, A., Azeti, Y., and Kimura, H. (1974) Abstract of the Annual Meeting of Agr. Chem. Soc. Japan p 310.
- K. Ogawa, T. Ohki, N. Takasuka, and T. Sasaki, Carbohydr. Res., **58**, 293-305 (1977)
- K. Y. Lee, S. B. Chun, B. OW. Kim, K. Ryu, and Y. S. You, (1996) Zooglan Gene Cloning of *Zoogloea ramigera* 115, Korean J. Biotechnol. Bioeng. **11**, 115-123
- Saito H., Tabeta R., Yokoi M., and Erata T., (1987) Bull. Chem. Soc. JPN., **60**, 4259
- Hazime Saito, M. Yoyoki, and Y. Yoshioka, (1989) Macromolecules, **22**, 3892-3898
- Williams, D. L., Henry A. Pretus, et al. (1992) Carbohydr. Res., **235**, 247-257