

Effect of Nitrogen Source on the Change of UDP-glucose and β -1,3-glucan Concentration

박 양 호 · † 이 중 헌
조선대학교 생물화학공학과
(접수 : 2006. 6. 7., 게재승인 : 2006. 10. 4.)

Effect of Nitrogen Source on the Change of UDP-glucose and β -1,3-glucan Concentration

Yang Ho Park and Jung-Heon Lee†
Department of Chemical and Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
(Received : 2006. 6. 7., Accepted : 2006. 10. 4.)

In this research, analysis of UDP-glucose a precursor of β -1,3-glucan by high performance liquid chromatography (HPLC) was established using a reversed phase system. One of key metabolite UDP-glucose was selected and its concentration changes was measured with the change of fermentation conditions. The effects of fermentation conditions with/without nitrogen source for cell growth on β -1,3-glucan production were dependent on the UDP-glucose concentration. The UDP-glucose was synthesized rapidly during cell exponential growth period and maintained high during β -1,3-glucan production period. The UDP-glucose concentration was higher for β -1,3-glucan production fermentor than that for cell growth fermentor. The β -1,3-glucan production was optimal at pH 5.5 and synthesis of β -1,3-glucan was greatest at pH 5.5.

Key Words : β -1,3-glucan, UDP-glucose, nitrogen source

서 론

β -1,3-Glucan은 세포 조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포 증식과 재발을 억제하고 면역세포 기능을 활발하게 하는 인터루킨 (Interleukin), 인터페론 (Interferon)의 생성을 촉진하는 것으로 보고되고 있다(1, 2). 또한, 활성 β -glucan은 암세포가 있는 체내로 들어가 사이토카인 (Cytokine)을 생산시킴으로써 면역세포인 T세포, B세포의 활동을 지원하여 세포조직의 면역기능을 활성화시켜줌으로써 생체방어 효과를 높여준다고 알려지고 있다. 특히 *Agrobacterium sp.*에서 생산되는 β -1,3-glucan은 그 특성이 특이하여 식료품, 건축, 의약품 등에서 많은 관심을 받고 있다(3).

β -1,3-Glucan의 화학적 물리적 특성으로는 물에 불용이고 알칼리 용액에 녹아 고점도를 갖게 되며 산성용액에 의한 중화 반응으로 약간의 겔을 형성하는 특성이 있으며, 80°C

이상 가열하면, 탄력 있는 비가역적인 겔을 형성한다. 중화 반응 시 산성 용액의 첨가로 기포가 발생하는데 이로 인해 표면적이 넓은 다공성 겔이 된다. 최근에는 콘크리트 혼화제로 사용되어 강도를 증가시켜 주는 역할을 하며 그 수요가 지속적으로 증가하고 있고 서방성 농약제의 매트릭스 및 사료용 면역증강제로 사용되는 등 산업적 응용 분야가 계속 증가하고 있다(2-10). 이러한 산업적 활용도가 높기 때문에 물리·화학적 특성연구와 대량생산 공정의 연구에 지속적인 관심과 연구가 이루어지고 있다. 그러나 균주를 이용한 소규모 생산 공정의 최적화가 이미 진행된 상태에서도 여전히 생산량이 낮은 문제점이 있다. 이러한 문제점을 보완하고 높은 수득율을 얻기 위한 방안으로 미생물의 대사 과정을 예측하고 주요 대사물질을 측정하여 대사 과정을 제어하는 방법이 연구되고 있다.

β -1,3-Glucan의 생산성 극대화를 위하여 다양한 외부 환경 최적화에 관한 연구를 추진해와 세포의 metabolite를 이용한 생산 최적화가 거의 이루어진 상태이며 향후 외부 환경변화에 따른 세포내의 metabolite의 flux 변화 등의 모델을 통한 β -1,3-glucan의 생산성 향상에 관한 연구가 필요하다. β -1,3-glucan 합성의 전구체인 UDP-glucose의 농도를 향상시키기 위하여 uracil 첨가에 의한 β -1,3-glucan의 생산

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Tel : +82-62-230-7159, Fax : +82-62-230-7226
E-mail : leejh@chosun.ac.kr

능력 향상에 관한 연구결과를 발표하였으며 이러한 연구에서 세포외의 metabolite 측정만으로는 세포내에서 일어나는 현상을 규명하고 이를 이용하여 metabolite의 생산 증대에 한계가 있기 때문에 세포내의 metabolite의 flux 및 외부 조건의 변화에 따른 systematic한 model의 개발이 필요하다.

본 연구에서는 β -1,3-glucan의 주요 대사 물질로 UDP-glucose를 선정하고 HPLC를 이용하여 분석 조건을 확립하였다. 또한, 질소원의 변화에 따른 세포내 대사경로의 주요 물질인 UDP-glucose의 농도변화를 관찰하고 β -1,3-glucan의 생산 효율에 미치는 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 *Agrobacterium sp.* ATCC 31750을 사용하였으며, 종 배양 배지 조성으로 sugar 20 g/L, yeast extract 5 g/L, peptone 5 g/L로 제조 후 121°C에서 15 min 멸균 후 접종하였다. 30°C, 150 rpm에서 20 hr 배양 후 본 배양 접종 균주로 사용하였다. 본 배양 배지의 조성은 sugar 100 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NH_4Cl 4 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, 그리고 10 ml/L의 미량원소용액 (0.1 N HCl 1 L에 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2 g, $CaCl_2$ 0.5 g, $ZnCl_2$ 1 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 g을 혼합하여 제조)으로 배양액을 제조하였다. 본 배양 배지는 autoclave에서 121°C, 15 min 멸균 후 사용하였으며, pH 조절은 2 N HCl과 2 N NaOH을 사용하여 조절하였다.

시약 및 기기

이동상의 제조를 위해 HPLC급 Methanol (Fisher) Acetonitrile (Fisher), Phosphate buffer solution을 사용하였고, UDP-glucose 농도를 측정하기 위해 standard 시약으로 Uridine-5'-diphosphoglucose Disodium salt (Fluka, -18°C 냉동보관)를 사용하였다.

UDP-glucose 농도를 측정하기 위한 HPLC system은 Young-Lin SDV30 plus (Solvent degasser & Valve module), Young-Lin M930 Solvent delivery pump, Young-In M720 UV detector로 구성되었다. Column은 YMC-Pack Pro C18 (S-5 μ m, 12 nm, 250 \times 4.6 mm I.D.)을 이용하였다. 세포 파괴 장비로는 Sonic Dismembrator (Fisher 100 model)를 사용하고, 이물질을 제거하기 위해 High speed centrifuge (한국 한일 과학)를 사용하였다.

시료 전 처리

배양 공정에서 취한 sample을 세포 농도 2 g/L로 취하여 고속 원심분리기로 4°C, 12,000 rpm에서 10 min 원심분리를 하고 침전물을 증류수로 2회 세척한 후 다시 원심 분리하여 세포를 채취하였다. 침전된 세포에 이동상으로 사용한 50 mM Phosphate buffer solution 1 ml를 첨가 후 얼음물에 10 min 보관하였다. 세포내 단백질 변성 억제를 위해 얼음물에 보관한 상태에서 sonicator를 이용해 세포내 대사 물질을 취하였다. 4°C, 12,000 rpm에서 15 min 원심분리를

하여 대사물질이 녹아있는 상등액을 취했다. 주입 시료로 사용하기 전 0.2 μ m filter를 거쳐 이물질을 제거한 후 20 μ l 주입하였다.

이동상 제조

50 mM Phosphate buffer solution (pH 6.0)을 만든 후 Phosphoric acid를 이용하여 pH를 5.3으로 조절하였다. 0.45 μ m membrane filter를 이용하여 이물질을 제거한 후 Helium gas를 이용해 10 min 탈기시켜 이동상으로 사용 하였다.

발효공정

본 연구의 회분식 발효 공정에서는 working volume 3 L의 10%에 해당하는 종 배양 300 ml를 진탕배양기 30°C 150 rpm에서 20 hr 배양 후 본 배양 공정에 접종하였다. 초기 pH를 7.0으로 유지하여 세포 배양을 유도하였으며 질소원이 고갈되는 시점에서 pH를 5.5로 조절하여 β -1,3-glucan 생산을 유도하였다. 통기량은 0.5 vvm으로 유지하였고, 교반 속도는 300~600 rpm까지 용존 산소량이 10% 이상으로 유지되게 높여주면서 배양하였다.

균체량 측정

세포의 균체량을 측정하기 위하여 반응기에서 sample 1 ml를 1.5 ml micro-tube에 담아 12,000 rpm에서 10 min 원심분리한 후 상등액은 버리고 침전된 세포와 β -1,3-glucan에 3 N NaOH 1 ml를 넣고 충분히 섞어 준 후 β -1,3-glucan이 모두 녹아나도록 30 min 방치하였다. 충분히 β -1,3-glucan을 녹여낸 후 12,000 rpm에서 10 min 원심분리하여 침전된 세포와 NaOH에 녹아있는 β -1,3-glucan을 분리하였다. 분리된 세포를 증류수로 3회 세척하여 염을 제거한 후 60°C 건조기에서 24 hr 건조시켜 건조 중량을 측정하였다.

β -1,3-glucan 측정

β -1,3-glucan의 생산량을 측정하기 위해 세포 분리 시 취한 β -1,3-glucan을 50 ml tube에 담고 HCl 1.5 ml를 넣어 잘 섞어 준다. 염을 제거하기 위하여 40 ml의 증류수를 넣고 3,000 rpm에서 10 min 원심분리를 하였다. 동일하게 증류수로 3회 세척한 후 60°C 건조기에서 48 hr 건조시킨 후 건조중량을 측정하였다.

UDP-glucose 농도 측정

UDP-glucose 농도 측정은 YMC-Pack pro C18 column을 이용한 RP-HPLC를 이용하여 UV 파장 254 nm, 이동상의 유속 1.0 ml/min으로 흘려주며 등용매 용리법을 이용하여 분석하였다. 시료 전처리를 하여 이물질을 제거한 후 20 μ l를 주입하여 세포내 UDP-glucose 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

β -1,3-Glucan Synthesis Metabolism

Agrobacterium sp. ATCC31750의 증식과정에서 가장 큰 특징은 질소원이 존재하는 환경에서는 세포 배양을 촉진

하고, 질소원이 고갈되면 대사 경로의 변화로 β -1,3-glucan을 합성하게 된다. 이 과정에서 UDP-glucose 라는 대사 물질이 발현되고 이는 β -1,3-glucan을 합성하는데 유일한 전구체이며 중요한 다리 역할을 한다(Fig. 1). 따라서 pH 및 질소원 유무에 따른 UDP-glucose 농도를 측정함으로써 대사경로의 모델개발에 이용하였다.

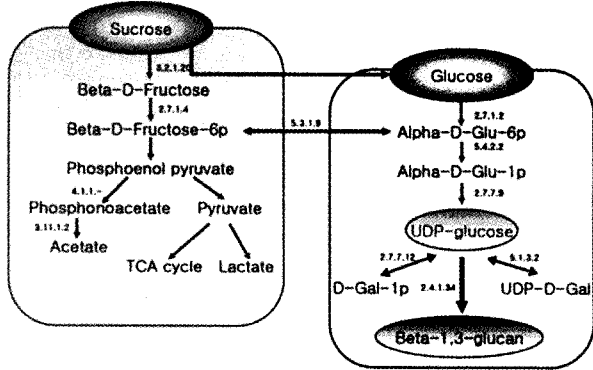


Figure 1. β -1,3-Glucan synthesis pathway.

회분식 배양 공정에서 UDP-glucose 농도 변화

본 연구의 회분식 발효공정에서는 배양용적 3 L의 10%에 해당하는 중 배양 300 ml를 진탕배양기 30°C, 150 rpm에서 20 hr 배양 후 본 배양 공정에 접종하였다. 질소원의 변화에 따른 영향을 살펴보기 위해 초기 NH₄Cl의 농도가 4 g/L로 하여 세포의 성장하고 있는 조건에서의 UDP-glucose 및 β -1,3-glucan의 농도를 측정하였으며 세포의 성장에 따라 질소원이 고갈된 후 생성되는 UDP-glucose 농도와 β -1,3-glucan의 생성 농도를 측정하였다. 발효시의 통기량은 0.5 vvm으로 유지하였고, 교반속도는 300~600 rpm까지 용존 산소량이 10% 이상으로 유지되게 제어하면서 배양하였다.

초기 세포배양공정에서의 UDP-glucose 농도 변화를 살펴 보았다(Fig. 2). 세포 농도가 증가하는 과정에서 측정된 UDP-glucose 농도를 보면 세포의 농도가 증가할수록 UDP-glucose 농도 역시 증가함을 볼 수가 있다. 이는 질소원이 존재하기 때문에 β -1,3-glucan은 생성되지 않으나, 세포배양 과정에서 세포내 대사물질인 UDP-glucose가 세포성장과 동시에 증가됨을 볼 수 있었다.

질소원 고갈시의 UDP-glucose농도 변화

Agrobacterium sp. ATCC31750 균주는 질소원의 유무에 의해 대사 경로가 변하는 것을 실험을 통해 알 수 있었다. 질소원이 존재하는 시점에서는 세포가 증식을 하고 질소원이 고갈되는 시점에서는 β -1,3-glucan 이라는 생체 고분자 물질을 생합성하게 된다. 본 연구에서는 본 배양 접종 후 1 day 지나면 질소원이 고갈되는데 이 시점까지 세포는 6.5 g/L 정도 증식을 하게 된다. 질소원이 고갈되는 시점부터 β -1,3-glucan을 합성하게 되는데 이때의 pH에 의한 영향을 살펴보기 위해 세포 배양 최적 pH인 7.0으로 유지한 조건에서 운전하였다. 질소원이 고갈되는 시점에서는 UDP-glucose 농도가 감소하는 경향을 보였다. 이는 세포 성장

과정에서 생성된 UDP-glucose가 β -1,3-glucan으로 전환됨으로써 감소하는 것으로 판단된다. pH 7.0을 유지한 공정에서는 UDP-glucose 농도가 감소한 후 β -1,3-glucan이 생산 되는데 까지 10 hr 정도 일정한 농도를 보이다 조금씩 증가하게 되는데 질소원이 고갈되는 시점부터 β -1,3-glucan 활성이 증가하고 있음을 UDP-glucose 농도를 측정함으로써 알 수가 있다. 이를 통해 β -1,3-glucan 생산 공정에서 질소원의 유무의 영향이 매우 큼을 알 수 있었으며, 이러한 조건들이 세포의 대사과정에 중요한 인자로 작용함을 알 수 있었다.

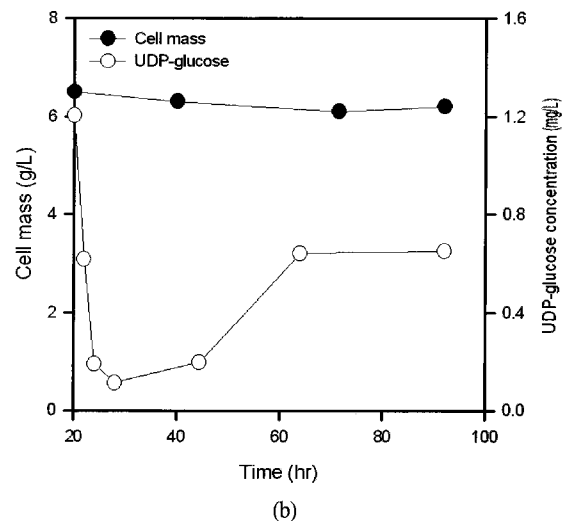
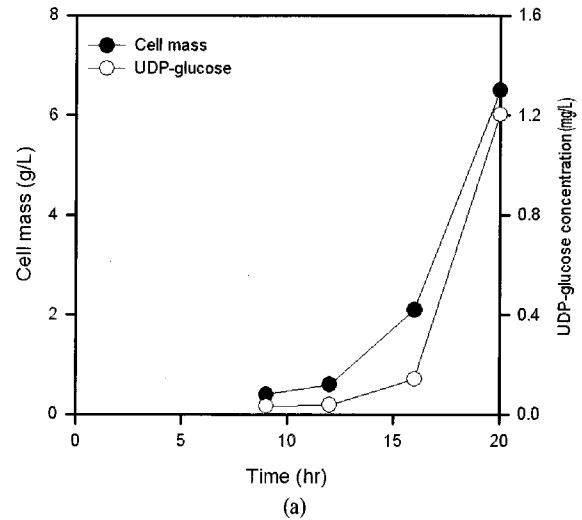


Figure 2. The changes of UDP-glucose concentration and cell mass in a batch fermentor for (a) cell growth and (b) beta-1,3-glucan production.

회분식 배양 공정에서 세포 성장 조건에 맞추어 배양 공정을 운전하였을 때의 UDP-glucose 농도와 β -1,3-glucan 농도를 Fig. 3에 나타내었다. 초기 세포 성장 환경에서는 UDP-glucose 농도가 증가하다가 질소원이 고갈되는 시점에서 급격히 농도가 감소함을 볼 수 있다. 이후 10 hr 정도 큰 변화 없이 유지되다 β -1,3-glucan이 합성되는 시점에서 조금씩 증가하고, β -1,3-glucan 생산량이 증가하는 시점에서 UDP-glucose 농도 역시 증가하였다. 그러나 β -1,3-glucan 생

산 활성이 감소하는 시점부터는 UDP-glucose 농도 역시 큰 변화 없이 일정하게 유지됨을 볼 수 있다. pH를 세포 성장 조건인 7.0으로 유지하여 주었기 때문에 β -1,3-glucan의 생산성은 높지 않았고 UDP-glucose 농도도 낮은 측정값을 나타내고 있다.

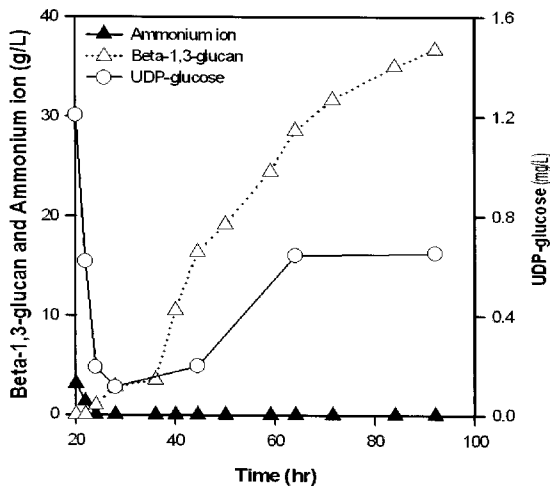


Figure 3. Change of β -1,3-glucan and nitrogen source concentration in a batch fermentor (at pH 7.0).

연속 배양기에서 발효 상태의 변화에 따른 UDP-glucose 농도변화

회분식 배양 공정에서는 단일 반응기에서 세포 성장과 커들란 생산 공정을 모두 일어나게 운전하였으나 세포 배양 공정과 커들란 생산 공정의 환경이 서로 다른 점을 감안하여 2단 연속 배양 공정을 도입하였다. 본 연구에서는 2단 연속배양공정을 개발하여 첫 번째 발효조는 질소원이 존재 하에서 세포의 성장이 일어나는 세포배양공정, 두 번째 발효조는 질소원이 고갈된 상태에서 운전하는 β -1,3-glucan 생산공정으로 운전하였다. 세포배양공정과 β -1,3-glucan 생산공정의 환경이 서로 다른 점을 감안하여 2단 연속 배양공정을 도입하였다. 첫 번째 반응기에서는 세포 성장에 최적인 조건으로 배양하고 두 번째 반응기에서는 질소원이 고갈된 조건에서 β -1,3-glucan 생산 최적조건으로 제어하여 β -1,3-glucan 생산성을 최적화 하고자 하였다. 또한, 2단 연속 배양 공정으로 운전하였을 때의 UDP-glucose 농도를 측정함으로써 회분식 배양 공정과 연속 배양 공정에서의 UDP-glucose의 농도 차이를 조사하였다.

첫 번째 발효조는 세포 배양 공정으로써 cell mass와 β -1,3-glucan 생산량 그리고 UDP-glucose 농도를 Fig. 4에 나타내었다. 세포 접종 후 질소원이 고갈되어 가는 시점인 31 hr부터 연속 배양 공정으로 운전하였다. 초기 세포 농도가 증가함에 따라 UDP-glucose 농도가 크게 증가하다 질소원이 고갈되는 지점에서 농도가 감소함을 보이고 있으며, 연속배양으로 운전을 전환하고 질소원을 주입함으로써 세포 성장을 유도하여 UDP-glucose 농도가 크게 감소하지 않고 일정한 농도를 유지하고 있음을 알 수 있다. UDP-glucose 농도가 일정하게 유지되는 때부터 β -1,3-glucan의 생산량이 일정하게 유지 되는데 이는 생산성에 대한 활성

의 유지로 볼 수 있겠다. Fig. 5는 질소원이 고갈되기 전 연속공정으로 전환한 시점에서의 크로마토그램을 나타내었다.

두 번째 발효조는 β -1,3-glucan 생산을 유도하기 위해 pH 7.0, 발효용량을 4 l로 운전을 하였으며, 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 세포가 성장하는 과정에서 UDP-glucose 농도가 증가하였고 첫 번째 발효조에서 유입되는 세포에 의해서 UDP-glucose 농도가 감소하지 않고 증가하는 현상을 보이고 있다. β -1,3-glucan이 생성되는 초기 지점에서 높은 농도를 보이고 있으며, β -1,3-glucan 생산이 일정하게 유지 되는 부분에서는 UDP-glucose 농도가 조금 감소함으로써 β -1,3-glucan 생산 활성이 감소하고 있음을 보여주고 있다.

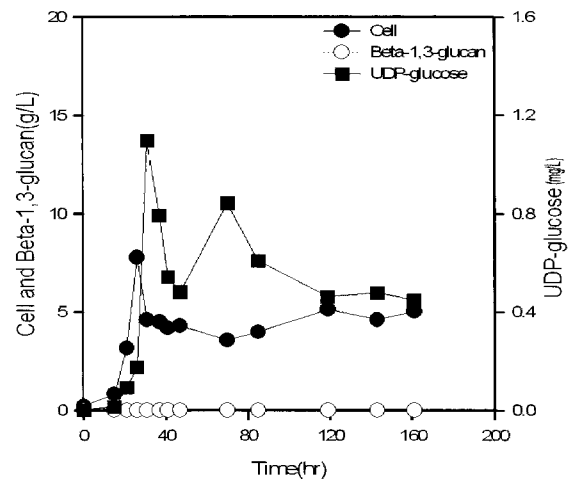


Figure 4. Change of cell mass, β -1,3-glucan production, UDP-glucose concentration in a cell growth fermentor.

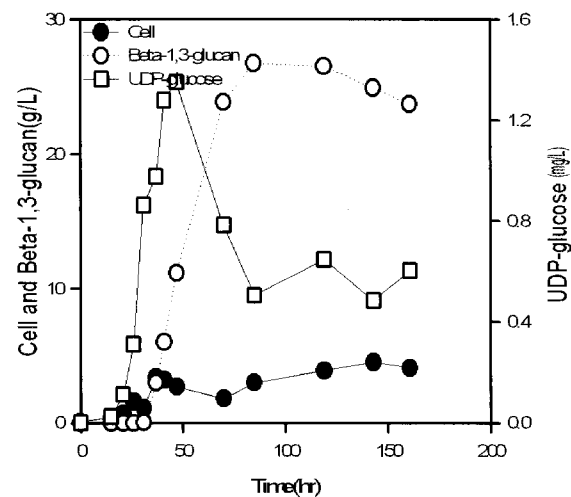


Figure 5. Change of cell mass, β -1,3-glucan and UDP-glucose concentration in a β -1,3-glucan production fermentor.

발효조 pH 변화에 따른 UDP-glucose 및 β -1,3-glucan 생산

pH의 변화에 따른 β -1,3-glucan의 생산 속도 및 UDP-glucose농도 변화를 조사하기 위해 2번째 발효조의 pH를 5.5로 제어하여 세포농도, β -1,3-glucan농도 및

UDP-glucose의 농도 변화를 측정하였다. 그 결과는 Table 1에 정리되어 있으며 pH 5.5로 운전한 결과 UDP-glucose 농도 및 합성되는 glucan의 농도가 향상됨을 관찰할 수 있었다. pH를 7.0으로 고정하여 운전한 공정에서는 전체적으로 낮은 농도 값을 나타내고 있으며, pH를 커들란 생산 최적 조건인 5.5로 낮추어 커들란 생산을 유도한 공정에서는 높은 농도를 나타내고 있다. 또한, pH를 조절하는 순간부터 UDP-glucose 농도가 증가함으로써 커들란 생산에 높은 활성을 갖게 됨을 알 수 있었다. 이는 이전 실험의 결과에서 β -1,3-glucan을 생산하는 시기에는 발효조의 pH를 5.5로 제어함으로써 생산량이 극대화 되는 현상과 일치하는 것을 볼 수 있었다.

Table 1. Effect of pH on UDP-glucose and β -1,3-glucan concentration using two stage continuous fermentor

	pH 5.5	pH 7.0
Cell mass	5.1	4.8
β -1,3-glucan	34	25
UDP-glucose	0.83	0.58

요 약

UDP-glucose는 β -1,3-glucan 합성의 중요한 전구체로 이를 측정함으로써 세포 내의 glucan synthesis 대사의 활성도를 추정할 수 있는 중요한 지표가 됨을 본 연구 결과를 통하여 알 수 있었다. UDP-glucose는 세포 성장기에 다량 생산되다가 β -1,3-glucan 합성하는 시기에 일정한 농도가 되며 β -1,3-Glucan 합성 메카니즘에서 glucose를 운반하는 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 2단 연속 발효조를 이용하여 세포 성장 발효조와 β -1,3-glucan 생산 발효조에서 UDP-glucose 변화를 관찰하여 β -1,3-glucan 생산시 농도가 높음을 관찰할 수 있었다. β -1,3-Glucan 생산 발효조의 pH를 5.5로 조절함으로써 UDP-glucose의 농도를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 β -1,3-glucan의 생산 속도를 최적화할 수 있었다.

감 사

본 연구는 조선대학교 2004년 교내 연구비의 지원으로 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Harada, T, Fujimori, K, Hirose, S. and M. Masada (1966), Growth and β -1,3-glucan 10C3K production by a Mutant of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* in Defined edium, *Agr. Biol. Chem.* **30**, 764-769.
2. Mao, X. I. and C. P. Jiang (1993), Economic macrofungi of Tibet, *Beijing Science & Tcehnology Press*, 1-651.
3. Jang, J. K. (2001), Optimization of Curdlan Production by *Agrobacterium* sp. ATCC 31750, (M.S. Thesis), Chosun University, GwangJu.
4. Naohito, O., Noriko, N., Miura, M. N., and Y. Toshiro (2000), Antitumor 1,3- β -Glucan from cultured Fruit Body of *Sparassis crispa*, *Biol. Pharm. Bull.* **23**(7), 866-872.
5. Kimura, H., Nakagawa, T., Mastukura, A., and T. Suzuki (1973), New temo-gellable polysacchride-containing foodstuffs, US patent **3**, 754-925.
6. Kim, S. W., Ahn, S.G., Se O, W. T., Kwon, K. S., and Y. H. Park (1998), Rheological properties of a novel high viscosity polysaccharide, A49, produced by *Bacillus polymyxa*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 178-181.
7. Rajaram, A. P., Michael F. D., and F. M. Michael (2002), Design of Reactive extraction systems for Bioproduct Recovery, *AIChE Journal* **8**(3), 514-526.
8. Crescenzi, V. (1995), Microbial Polysaccharides of Applied Interest, *Biotechnol. Prog.* **11**, 251-259.
9. Lee, J. H., S. E. Shin, and K. H. Rhee (2002), An Experimental Study on the Enhancement Fluidity and Strength of Concrete with Curdlan, *HWAHAK KINGRAK* **40**, 400-403.
10. Selbmann L., Crognale S., and M. Petruccioli (2004), Beta-glucan production by *Botryosphaeria rhodina* in different bench-top bioreactors, *J. Appl. Microbiol.* **96**(5), 1074-81.