

## *Azotobacter vinelandii* 의 알긴산에 관한 연구

임미혜 · 이호용\* · 장성렬 · 최영길

한양대학교 자연과학대학 생물학과

\*상지대학 생물학과

## Alginate Production of *Azotobacter vinelandii*

Leem, Mi-Hyea, Ho-Yong Lee\*, Sung-Yeoul Chang, Yong-Keel Choi

Department of Biology, Hanyang University, Seoul, 133-791, Korea

\*Department of Biology, Sang Ji College, Wonju, Korea

**ABSTRACT:** In order to improve the production of bacterial alginate, *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789 was treated with 200  $\mu\text{g/ml}$  of MNNG for obtaining mutant strain. The mutant HB18 was selected, which produced the highest amount of alginic acid among the survival strains. The HB18 produced 5.4 g/l of alginic acid when batch cultured at 30°C for 160 hrs and its alginic acid showed high molecular weight and simple composition when compared with those of wild type.

**KEY WORDS** □ *Azotobacter vinelandii*, alginic acid.

알긴산은 식품, 의류산업을 비롯하여 약품, 화장품, 종이 등의 산업분야에서 다양한 목적으로 이용되는 일종의 천연산 껌(gum)류이다(Deavin, 1966).

알긴산은  $\beta$ -D-mannuronic acid(M)와 그의 5번 탄소 에피머인  $\alpha$ -L-guluronic acid(G)가 1,4-glycoside 결합으로 이룬 혼성중합체(Copolymer)로서 M block 과 G block 그리고 Mixed block 이 불규칙하게 섞여있는 구조를 가진다(Larsen 과 Haung, 1971; Haung 등, 1974; Linker 와 Evans, 1976; Sutherland, 1981). 이러한 알긴산은 생산하는 종(Species)에 따라 M 과 G 의 구성 성분 비(M/G ratio)를 달리 하며(Larsen 과 Haung, 1971; Haung 등, 1974), 이 M/G ratio 는 알긴산의 점도에 영향을 미친다(Smidsrørd 등, 1974).

일반적으로 알긴산은 갈조류의 성분으로서 널리 알려져 있으며(Haung 등, 1964), 상업적으로도 갈조류에서 얻은 알긴산이 이용되고 있다. 그러나 1964년 Linker 와 Jones 그리고 1965년 Gorin

과 Spenser 가 각각 *Pseudomonas aeruginosa* 와 *Azotobacter vinelandii* 에서도 exopolysaccharide 의 형태로 알긴산이 생산된다는 것을 밝힌 이래, 미생물의 알긴산 생산에 관한 연구도 상당히 진행되고 있다.

해조류로부터의 알긴산은 수질의 오염이나 기후 등에 따라 생산량이 저하될 수 있는 반면, 미생물로부터 생산되는 경우, 상기와 같은 환경요인에 영향을 받지 않고 적당히 조절된 환경내에서 저렴하게 생산해 낼 수 있다는 이점이 있다(Wells, 1977). 따라서 근래에는 세계 gum 생산량의 10% 이상을 차지하고 있는 알긴산의 생산증진을 위하여 미생물을 이용하려는 시도가 상당히 진행되고 있다.

그러나 우리나라에서는 1960 년대에 알긴산원조(Alginophytes)로부터 알긴산을 분리해 내는 실험에 관한 보고만 있었을 뿐이었다(이 등, 1967, 1968, 1970). 최근 우리나라에서도, 자원난을 해결해 줄 수 있는 최대의 자원으로서 미생물을 인식하여, 미생물을 이용한 신물질 개발의 일환으로

미생물이 분비하는 exopolysaccharide에 대하여 언급한바 있다(오, 1987).

따라서 본 실험에서는 알긴산을 분비하는 *A. vinelandii*를 이용하여, 야생형에 비하여 월등한 양의 알긴산을 분비하는 균주를 개발하는데 그 목적을 두었다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

*Azotobacter vinelandii* NCIB 8789를 John Sokatch 박사(University of Oklahoma, Health Science Center)로부터 직접 분주받아 실험에 사용하였다.

균주 배양 및 보관용 배지, 돌연변이 유도용 배지는 Newton 등(1953)이 사용한 배지를 변형하여 사용하였다.

균주의 배양은 30°C에서 70-80 rpm의 속도로 진탕배양하였다.

### 균체수의 측정

균체수는 분광광도계(Shimadzu double beam spectrophotometer, UV-150-02)를 사용하여 461 nm에서 균체의 흡광도(absorbance)로 배양 초기부터 배양 후 48시간까지 측정하였다.

### 건조중량 및 알긴산 생산량 측정

Jarman 등(1978)의 방법을 따랐으며, 세포 배양액 40 ml에 5 M NaCl 용액 0.8 ml과 0.5 M Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 용액 0.8 ml을 첨가하였으며, 혼합액은 24,000×g로 4°C에서 1시간 동안 원심분리(Beckman, rotor JA-20)하였으며, 이 때 상등액은 알긴산 생산량 측정에 침전물은 건조중량측정에 각각 사용하였다.

상기 침전물을 40 ml의 생리식염수에 한번 세척한 후, 미리 건조시켜 중량을 알고 있던 glass fiber filter(Whatman GF/F; pore size 0.7 μm)에 여과시켰으며, 여과지와 여과물은 60°C에서 6시간 건조시켜 균체의 중량을 측정하였다.

상기 상등액 20 ml를 60 ml의 iso-propanol과 혼합한 후 세계 흔들어 준 다음 4°C에서 10분 동안 incubation 시켰다.

이 때 생성된 섬유상 물질을 포함한 혼합액은 미

리 건조시켜 두었던 glass fiber filter(Whatman GF/A; pore size 1.6 μm)에서 6시간 건조시켜 알긴산의 중량을 측정하였다.

### 돌연변이 유도

**돌연변이원의 처리 및 생존률 측정**: 균체를 액체배지에 접종한 후, 균체가  $3-4 \times 10^8$  cells/ml 되는 시기에 세포배양액 10 ml를 취하여 멸균된 1 회용 원심분리관(50 ml 용량)에 옮긴 후, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리함으로써(Hitachi, 05 PR-22) 세포를 수확하였으며, 이를 10 ml의 0.5 M citrate 완충용액으로 세척한 다음 5 ml의 동일 완충용액으로 재현탁시켰다.

여기에 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) 용액을 최종농도 200 μg/ml 되게 처리하여, 30°C에서 정제배양하여서 1시간 간격으로 1 ml씩 수확하였다.

각 시간마다 수확된 세포배양액은 각각 액체배지로 세번 세척한 다음 serial dilution 방법으로 고체배지에서 평판도말하여 30°C에서 72시간 동안 배양하였으며 생존한 colony 수를 측정하여 생존률을 측정하였다.

**돌연변이주의 분리**: 실험균주에 MNNG 200 μg/ml를 처리한 다음 처리된 시간별로 생존한 colony를 무작위로 50주씩 새로운 고체배지에 도말하여 72시간 배양한 후, 이들 중 형태적으로 점액성을 우수하게 보이는 40주를 선별하였다.

이들 각각을 25 ml 액체배지에 일정량 접종하여 144시간 동안 30°C에서 진탕배양한 후 Jarman 등(1978)의 방법에 따라 알긴산을 정량하였으며, 이들 중 알긴산의 생산량이 야생종보다 높은 균주를 돌연변이주로 택하였다.

**알긴산의 전기영동**: Bucke(1974)의 방법에 따라, 6% gel에서 100 V로 전기영동을 실시하였으며, 전개된 gel은 0.08% alcian blue(Matheson Coleman & Bell)에 염색하여서, acetic acid에서 탈색시켰다.

탈색된 gel은 high speed TLC scanner(Shimadzu CS-920)를 이용하여 560 nm에서 scanning 하였다.

Standard polysaccharide로는 *Macrocystis pyrifera*에서 추출한 알긴산(Sigma)을 사용하였다. 알긴산 sample은 0.02 M Mops/NaOH(pH

7.2) 원충용액에 녹여 sucrose 를 10% 되게 첨가하였고, tracking dye 로는 bromophenol blue 를 사용하였다.

## 결 과

### MNNG 처리에 의한 돌연변이주의 분리

**생존률의 측정 :** 200  $\mu\text{g/ml}$  의 MNNG 처리에 대한 시간별 생존률과 2 시간 처리에 대한 농도별 생존률을 측정한 결과는 Fig.1 과 2와 같다.

### 알긴산 생산이 증진된 돌연변이주의 분리 :

MNNG 를 처리한 후 1 시간, 2 시간, 3 시간에 생존한 colony 를 돌연변이주의 분리방법으로 선별하여 144 시간 진탕배양한 다음 39 주 각각의 알긴산 생산량을 측정한 결과는 Table 1 과 같다.

이들 중 야생형의 최대 생산량인 3.4g/l 보다도 높고 돌연변이 중 가장 높은 생산량인 5.0g/l 의 알긴산을 생산하는 No.18 균주를 택하여 HB18 이라 명명하였다.

또한 Table 1에서 보는 바와 같이 HB18은 처리시간이 2 시간인 실험군(생존률 0.1%)에서 분리되었으며, 야생형보다 알긴산 생산량이 높은 돌연

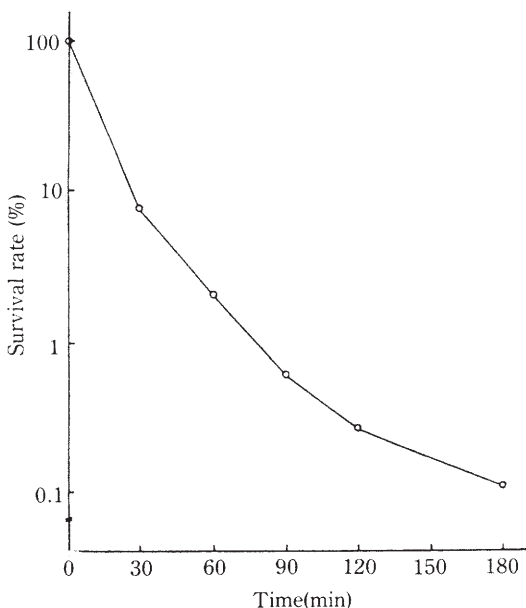


Fig. 1. Survival curves of *A. vinelandii* NCIB 8789 treated with 200  $\mu\text{g/ml}$  of MNNG for various time.

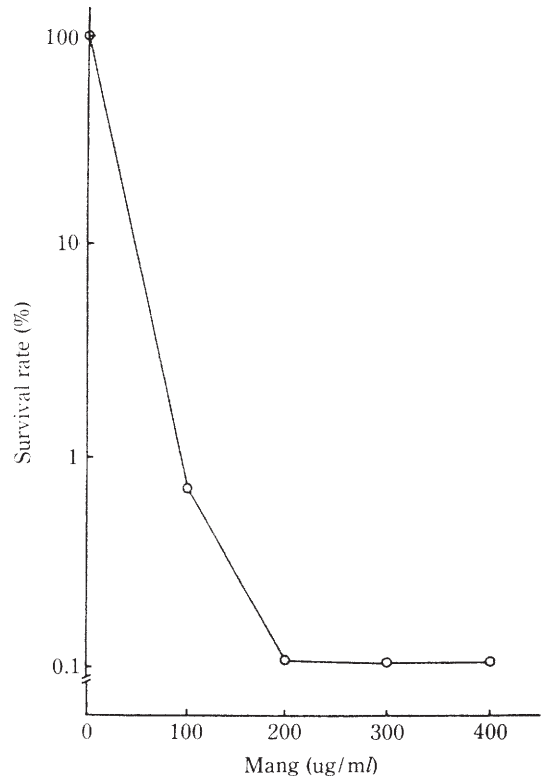


Fig. 2. Survival curves of *A. vinelandii* NCIB 8789 treated with various concentration of MNNG for 2 hr.

변이주의 유발빈도는 1 시간 처리시(생존률 2.1%) 보다 2 시간 처리와 3 시간 처리시(생존률 0.23%)에서 더 높은 경향을 나타내었다.

### 생장곡선

야생형과 돌연변이주 HB18의 생장도를 측정하기 위하여 시간에 따른 흡광도의 변화를 관찰한 결과는 Fig.3과 같다. Fig.3에서 보는 바와 같이 야생형과 HB18이 모두 40 시간 이후에 정지기에 이르지만 HB18은 야생형보다 생장이 저하되는 것을 알 수 있었다. 또한 Fig.3에는 나타나 있지 않지만 간헐적으로 측정한 건조중량의 측정치에서도 동일한 경향성을 보였는데, 예를 들어 41 시간의 배양시간에 야생형은 1.99g/l를 나타내는 반면, HB18은 1.77g/l를 나타내었다. 이 결과에 따르면 HB18은 야생형에 비해 0.9배의 생장도 감소를 나타낸다고 할 수 있다.

### 알긴산 생산량 측정

배양시간에 따른 균주의 알긴산 생산량의 변화

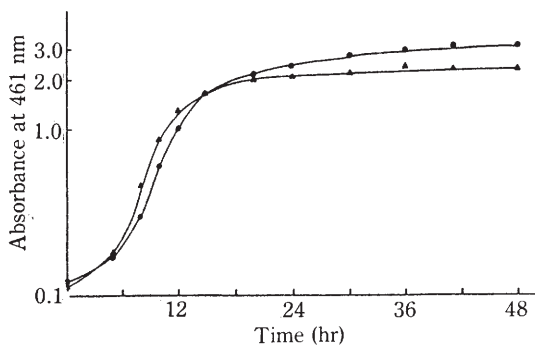
**Table 1.** The amount of alginic acid produced by 39 strains.

Strain NO	Alginic acid g/l	Strain NO	Alginic acid g/l
1	2.04	21	3.74
2	2.17	22	4.69
3	1.94	23	3.45
4	3.97	24	2.47
5	1.92	25	3.39
6	2.03	26	4.08
7	1.98	27	4.25
8	2.29	28	2.24
9	3.15	29	4.37
10	3.18	30	3.19
11	3.39	31	3.09
12	3.30	32	4.00
13	3.50	33	4.49
14	3.81	34	3.01
15	4.05	35	4.80
16	4.16	36	3.78
17	3.02	37	4.29
18	5.00	38	2.27
19	3.24	39	1.76
20	4.17		

NO 1-13: MNNG-treated for 1 hr

NO 14-26: MNNG-treated for 2 hr

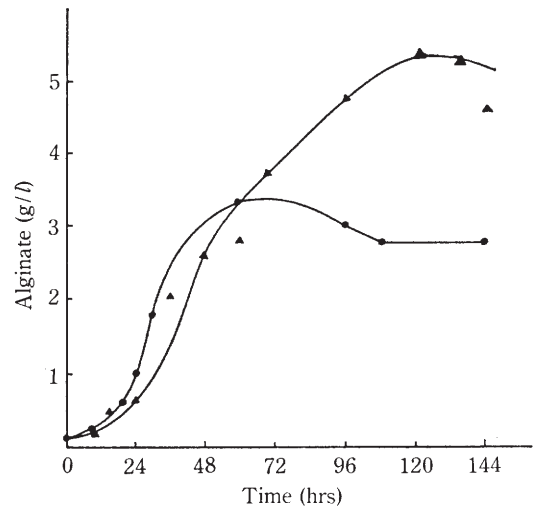
NO 27-39: MNNG-treated for 3 hr

**Fig. 3.** Growth curve of *A. vinelandii* NCIB 8789 and HB 18.

They were cultured in Newton's medium at 30°C. ●-●: will type, ▲-▲: HB 18

를 측정된 결과는 Fig.4와 같다.

생장곡선의 경우와는 달리 알긴산 생산량이 야생형은 24 시간 후에 생산량이 급격히 증가하기 시

**Fig. 4.** Alginic acid production of *A. vinelandii* NCIB 8789 and HB18.

They were cultured in Newton's medium at 30°C. ●-●: wild type, ▲-▲: HB 18

작하여, 배양 후 60 시간에 3.6g/l의 최대 생산량을 보였으며 점차 감소하였다.

한편 HB18은 역시 배양 24 시간 후에 생산량이 급격히 증가하였으나 120 시간이 되어서야 5.4g/l의 최대 생산량을 보였다.

따라서 HB18은 야생형에 비해 두배나 늦은 배양시간에 1.6배의 수율을 보이는 것으로 나타났다.

#### 알긴산의 전기영동상의 비교

야생형과 HB18이 생산하는 알긴산을 분석하기 위하여 PAGE를 실시한 결과는 다음과 같다.

Fig.5에서 보는 바와 같이 standard로 사용한 알긴산은 갈조류인 *Macrocystis pyrifera*에서 추출한 것으로서 고분자가 비교적 많은 polydispersed band를 나타내었다(Lane A와 B).

야생형 균주에서 추출한 알긴산은 배양시간에 따라 비교해 본 결과 배양 24 시간(Fig.5의 C)의 경우 고분자에서 저분자 사이의 분자가 일률적으로 보이는 polydispersed band를 나타내었다.

#### 논 의

일반적으로 돌연변이가 일어날 확률은 생존률이 0.1-1% 되는 수준에서 높다고 알려져 있으므로(Miller, 1974) 본 실험의 경우도 이와 부합되는지

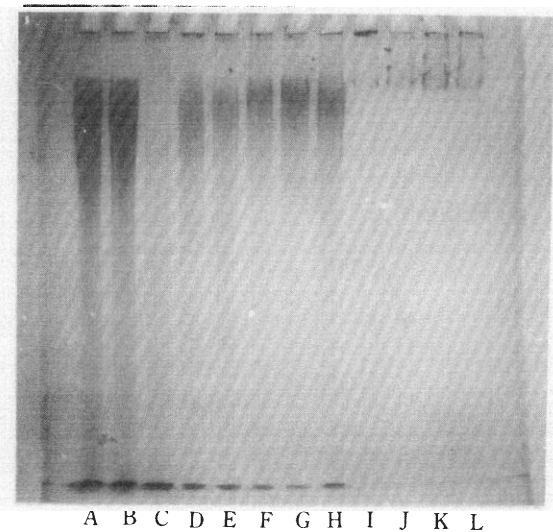


Fig. 5. Electrophoresis of alginic acid.

- A: *M. pyrifera*
- B: *M. pyrifera*
- C: Wild type (24 hr culture)
- D: Wild type (48 hr culture)
- E: Wild type (72 hr culture)
- F: Wild type (96 hr culture)
- G: Wild type (120 hr culture)
- H: Wild type (144 hr culture)
- I: HB 18 (24 hr culture)
- J: HB 18 (72 hr culture)
- K: HB 18 (120 hr culture)
- L: HB 18 (144 hr culture)

의 여부를 알아보기 위하여, 생존률이 다른 실험 군들간의 비교를 시도하였다. 그 결과 생존률이 0.28%와 0.12%인 실험군에서 알긴산 생산이 증진된 돌연변이가 발생하는 빈도가 높은 경향을 나타내었으므로, 이와 유사한 실험에서도 1% 이하의 생존률을 보이는 조건으로 돌연변이원을 처리하는 것이 바람직하다고 추측된다.

한편, 야생형의 최적조건에서 생장도 및 알긴산 생산량을 측정한 결과 HB18은 0.9 배의 생장도를 보인 반면, 1.6 배의 알긴산을 생산하였다. 따라서 HB18의 성장을 위한 최적조건을 개발한다면 좀 더 많은 알긴산을 생산하리라 예측할 수 있었다. 이것은 Chen 등(1983, 1985)의 보고와도 일치하는데, 그들은 처음에 *A. vinelandii* NCIB 9068을 이용하여 5.54g/l의 생산량을 보이는 균주를 개발하였으며, 다시 그들의 최적조건을 찾아 1.12 배 즉 6.22g/l의 알긴산을 생산하도록 유도하였다.

HB18의 배양시간에 따른 알긴산의 생산양상을

살펴보면, 알긴산은 야생형과 HB18의 경우 모두 대수기(24 시간)에 생산이 급격히 증가하며, 생장이 더이상 증가하지 않는 시기에 최대의 생산량을 보이는 것으로 나타났다. 이것은 배양시간에 따른 알긴산의 생산량 곡선과 생장곡선이 일치한다는 Deavin 등(1977)의 결과와 상반되나, 본 연구결과는 알긴산이 secondary product라는 일반적인 설명과 부합된다(Couperwhite와 MacCallum, 1975; Lawson과 Sutherland, 1978; Horan 등, 1981).

마지막으로 HB18과 야생형이 생산해낸 알긴산의 전기영동상에서의 양상을 비교해보면, 야생형의 경우 배양초기에는 다양한 분자량을 보이는 분자들이 일률적으로 분포하는 반면, 배양시간이 증가함에 따라 고분자 물질의 상대빈도가 높아지는 결과를 나타내었다. 이로부터 알긴산은 저분자의 상태로 분비된 다음 고분자의 물질로 중합(polymerization)된다고 추측할 수 있다. 또한 120 시간 이후의 배양시간에는 다시 고분자의 상대빈도가 감소하고 저분자의 밀도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었는데 이것은 배양 후기에 alginase가 분비되어 알긴산을 분배한다는 Davidson 등(1977)의 결과와 일치하였다. 이러한 alginase의 분비는 알긴산의 대량생산을 위한 발효공학에서 상당히 문제가 되고 있다. 따라서 상기와 같은 가수분해 효소를 만들어내지 못하는 돌연변이주를 개발하든지 아니면 alginase inhibitor를 개발하는 연구도 좋은 과제라 사료된다.

한편 HB18의 경우 배양시간에 관계없이 상당히 높은 분자량의 양상을 보였으며 야생형에서 볼 수 있는 polydispersed가 아닌 단순한 분자상태를 나타내었으므로, 높은 점도를 필요로 하는 상품생산에 이용가치가 크며, 분자량의 크기에 따른 분포가 적으므로 조작시 유리할 것으로 판단된다.

이상에서 보는 바와 같이 본 실험에서 분리한 균주 HB18은 야생형에 비해 높은 알긴산 수율을 보였으며, 분자량이 높고 단순한 알긴산을 분비하고 있었다. 따라서 이 균주의 알긴산 수율을 높이려면 이에 적당한 최적조건을 개발하여 최대의 알긴산을 생산하도록 유도하는 것이 바람직할 것이며, 이들이 생산하는 알긴산을 이용하려면 실제 이용되고 있는 알긴산과의 비교 분석을 통하여 안정성 문제도 고려되어야 할 것으로 사료된다.



## 적 요

알긴산을 생산하는 *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789에서 알긴산의 생산이 우수한 돌연변이를 유도하기 위하여 MNNG를 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다.

MNNG 처리 후 생존한 colony들 중 알긴산을 가장 많이 생산하는 균주를 택하여 HB18이라 명명하였다.

HB18은 30°C에서 160 시간 진탕배양하였을 때 5.4g/l의 알긴산을 생산하였으며, HB18의 알긴산은 전기영동 실험으로 관찰한 결과 야생형에 비해 그 분자량의 크기가 크며, 야생형에서 보여준 polydispersed band가 아닌 단순한 분포를 나타내었다.

## REFERENCES

1. 이민재, 정영호, 홍순우, 하영칠, 1967. 알긴산 원조에 관한 연구(제 1보). 과학기술처 연구개발 사업보고서, pp.1-40.
2. 이민재, 홍순우, 엄규백, 하영칠, 1968. 알긴산 원조에 관한 연구(제 2보). 과학기술처 연구개발 사업보고서, pp.1-32.
3. 이민재, 하영칠, 김중균, 1970. 알긴산 원조에 관한 연구(제 3보). 과학기술처 연구개발 사업보고서, pp.1-34.
4. 오두환, 1987. 식품용 신물질의 탐색, 미생물을 이용한 신물질 탐색과 개발 심포지움, pp. 161-188.
5. Bucke, C., 1974. Polyacrylamide gel electrophoresis of alginic acid. *J. Chromatogr.* **89**, 99-102.
6. Chen, W.P., J.Y. Chen, and C.L. Su, 1983. Production of bacterial alginate by mutant of *Azotobacter vinelandii*. *Natl. Sci. Coun. Mon.* **11**, 1977-1207.
7. Chen, W.P., J.Y. Chen, S.C. Chang, and C.L. Su, 1985. Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 543-546.
8. Couperwhite, I. and M.F. McCallum, 1975. Polysaccharide production and the possible occurrence of GDP-D-mannose dehydrogenase in *Azotobacter vinelandii*. *Antoni van Leeuwenhoek.* **41**, 25-32.
9. Davidson, I.W., C.J. Lawson, and I.W. Sutherland, 1977. An alginate lyase from *Azotobacter vinelandii* phage. *J. Gen. Microbiol.* **98**, 223-229.
10. Deavin, L., 1976. The production of polysaccharide by *Azotobacter vinelandii*. Ph. D. thesis. Brunel University, U.K.
11. Haug, A., 1964. Report NO. 30. Norwegian Institute of Seeweed Research, Trondheim.
12. Haug A., B. Larsen, and O. Smidsrød, 1974. Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydr. Res.* **32**, 217-225.
13. Horan, N.J., T.R. Jarman, and E.A. Dawes, 1981. Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzyme involved in its biosynthesis. *J. Gen. Microbiol.* **127**, 185-191.
14. Jarman, T.R., L. Deavin, S. Slocombe, and R.C. Righelato, 1978. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of extracellular synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 59-64.
15. Larsen, B. and A. Haug, 1971. Biosynthesis of alginate. Part I: Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* (LIPMAN). *Carbohydr. Res.* **17**, 287-296.
16. Lawson, C.J. and I.W. Sutherland, 1978. Polysaccharides. In: *Economic Microbiology*, Vol. 2, (ed) Rose, A.H., Academic Press. pp. 327-392.
17. Smidsrød, O., 1974. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel states. *Discuss. Faraday Soc.* **57**, 263-374.
18. Sutherland, I.W., 1981. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Adv. Microbiol. Physiol.* **23**, 79-150.
19. Sutherland, I.W., 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall poly-saccharides. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 243-270.
20. Wells, J., 1977. Extracellular microbial polysaccharide a critical overview. In: *Extracellular Microbial Polysaccharides*, (ed) Lawson, D., *Am. Chem. Soc.* pp. 299-313.

(Received May. 2 1989)