

## ***Bacillus licheniformis* ATCC9945a에 의한 생분해성 고분자 생산에 미치는 glycerol의 영향**

고영환\*, 김재하, Richard A. Gross<sup>1)</sup>

공과대학 식품공학과

<sup>1)</sup>미국 매사추세츠대학교 화학과

## **Effect of Glycerol on Production of Biodegradable Polymer by *Bacillus licheniformis* ATCC9945a**

Young Hwan Ko\*, Jae-Ha Kim, Richard A. Gross<sup>1)</sup>

*Department of Food Engineering, Cheju National University,  
Cheju, Chejudo, 690-756, Korea*

<sup>1)</sup>*Department of Chemistry, University of Massachusetts, One  
University Ave., Lowell, Massachusetts 01854, USA*

$\gamma$ -Poly(glutamic acid)( $\gamma$ -PGA) is a biodegradable polymer of natural origin which is excreted into the medium by *Bacillus licheniformis* ATCC9945a. *B. licheniformis* was grown in medium E(Leonard et al., 1958. J. Bacteriol., 76, 499) and modified medium E where glucose was substituted for glycerol at various concentrations. Aliquots were removed from each shake-flask culture and analyzed for  $\gamma$ -PGA production and carbon source utilization. Glucose was a better carbon source than glycerol for cell growth, and utilized at a faster rate than glycerol, citrate or glutamate. However, the presence of glycerol was required for an efficient production of  $\gamma$ -PGA. The function of glycerol for  $\gamma$ -PGA production was suggested to be an osmoregulator in addition to a carbon source.

## 서론

기존의 석유계화합물을 이용한 비닐 또는 플라스틱 제품은 용도의 다양성에도 불구하고, 자연의 자정작용에 의한 분해가 극히 어려워 자연환경을 파괴하는 원인물질 중의 하나로 지목되어 왔다. 따라서, 생분성이 있는 대체물질의 필요성이 대두되었고, 최근에는 그러한 물질을 이용한 고분자 제품들이 출하되고 있다.

미생물에 의해서 생산되고, 산업적으로 유용한 고분자들은 대부분이 다당류계열이다<sup>1)</sup>. *Xanthomonas campestris*에 의한 Xanthan gum, *Leuconostoc mesenteroides*에 의한 Dextran, *Alcaligenes faecalis*와 *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 curdian, *Aureobasidium pullulans*에 의한 Pullulan, *Pseudomonas elodea*에 의한 gellan, 그리고 *Azotobacter vinelandii*에 의한 alginate 등은 대표적인 다당류들이다.  $\gamma$ -Poly(glutamic acid)( $\gamma$ -PGA)는 *B. licheniformis* ATCC9945a<sup>2-6)</sup>와 같은 특성의 *Bacillus sp.*<sup>7-13)</sup>에 의해서 생산되는 세포외 고분자이다.  $\gamma$ -PGA는 polyamide 구조를 갖고 있으며,  $\alpha$ -carboxyl group 대신에  $\gamma$ -carboxyl group이 peptide결합을 이루고 있는 일종의 polypeptide이다<sup>5)</sup>.  $\gamma$ -PGA의 생산은 주로 *Bacillus anthracis*<sup>14,15)</sup>와 *B. licheniformis* ATCC9945a에 대해서 이루어졌다. *B. anthracis*는 그 병원성과  $\gamma$ -PGA 생산성을 연관시켜 최초로 연구된 균주이다. 세포의 생육을 위한 영양요구성,  $\gamma$ -PGA 생산을 위한 최적조건<sup>3,11,13)</sup>, 그리고 반복단위체인 *B.*

*licheniformis* ATCC9945a를 미국 glutamic acid의 [D]/[L]-stereoisomers<sup>9,16)</sup>에 대한 연구가 있었다.

*B. licheniformis* ATCC9945a에 의해서 합성분비되는  $\gamma$ -PGA는 체세포외, 수용성, 음이온성 고분자로 식용이 가능하다. 그리고 [D]-와 [L]-isomers의 구성비는 배양액중의  $Mn^{++}$  이온농도에 따라서 조절되는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. Leonard 등(1958)에 따르면, *B. licheniformis* ATCC9945a를 medium E 배지에 37 °C에서 250 rpm으로 96 시간 동안 shake-flask 배양하면,  $\gamma$ -PGA를 최대농도 19.6 g/l 까지 얻을 수 있었다고 하였다. 그런데, medium E의 조성을 보면, 매우 높은 농도의 탄소원을 사용하고 있음을 알 수 있다. 그 중에서도 glycerol 농도가 8%로 가장 높았다. 더구나, TCA cycle이  $\gamma$ -PGA의 합성과 관련되어있는지에 대한 물질대사기구조차 명확하지 못하다<sup>8)</sup>. *B. licheniformis* ATCC9945a에 의한  $\gamma$ -PGA 생산용 medium E의 조성은 다음과 같은 의문을 제기하였다; 1) 100 g/l이상의 탄소원을 투입하여 최적조건에서 배양했음에도 불구하고  $\gamma$ -PGA의 농도는 19.6 g/l로, 탄소원은 어떻게 대사되는가? 2)  $\gamma$ -PGA의 생산에 있어서 고농도로 함유된 glycerol의 생리적 기능은 무엇인가? 3) glucose가 glycerol대신에 사용될 수 있을 것인가? 그래서 Medium E의 구성성분 중 고농도인 glycerol을 glucose로 대체하여 세포의 생육, 탄소원의 이용 및  $\gamma$ -PGA 생산을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 미생물균주

종균협회(American Type Culture Collection)로 부터 분양받아 사용하였다. 균주는 액체질소하에서 보관하였으며, 배양용 배지에 접종전에 해동시켜 사용하였다.

### Shake-flask 배양

Leonard 등(1958)이 제안한 medium E의 조성을 Table 1에 나타낸 바와 같이 glycerol를 glucose로 대체 사용함으로써 변형시켜서 사용하였다.

Table 1. Culture medium composition for  $\gamma$ -PGA production by *B. licheniformis* ATCC9945a

Component	Concentrations(g/l) for each batch culture					
	E*	L	M	N	O	P
Glucose	0.0	40.0	50.0	60.0	70.0	80.0
Glycerol	80.0	40.0	30.0	20.0	10.0	0.0
L-Glutamic acid	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Citric acid	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
NH <sub>4</sub> Cl	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.104	0.104	0.104	0.104	0.104	0.104

pH's for each batch culture were adjusted to 7.4 with NaOH.

\* Batch culture E had original medium E as determined by Leonard et.al.(1958).

1,000ml의 삼각 flask에 배양액을 200ml씩 넣고, 냉동보존중인 *B. licheniformis* ATCC9945a 배양액0.5

ml를 해동시켜 섞음으로써 접종하였다. 접종 후 37 °C에서 250 rpm으로 진탕 배양하였고, 배양기간 중에 무균적으로 소량씩 채취하여 경시적 변화를 분석하였다.

### $\gamma$ -PGA 농도와 분자량의 결정

각각의 배양액으로부터 채취한 시료를 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과한 후 HPLC에 주사하였다.  $\gamma$ -PGA의 농도와 분자량 결정을 위한 HPLC 가동조건은 전보<sup>2)</sup>와 같다.

### 탄소원농도의 결정

glucose, glycerol, citrate 그리고 glutamate의 농도는 효소학적 방법으로 결정하였다(Boehringer Mannheim Biochemicals). 각각의 배양액을 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과한 후 Boehringer Mannheim Biochemicals의 방법에 따라 전처리하고 사용하였다. 구체적인 분석방법 및 순서는 제품설명서에 나와 있다.

### 균체농도의 측정

배양기간 중의 균체농도의 변화는 흡광도로 간접측정하였다. 배양액의 optical density를 UV/VIS-spectrophotometer로 660 nm에서 읽었다.

## 결과 및 고찰

여러수준의 glucose와 glycerol를 함유한 배양액을 각각 96 시간 배양하는 동안에, 배양액의 탁도 변화를 측정하였다(Fig. 1).

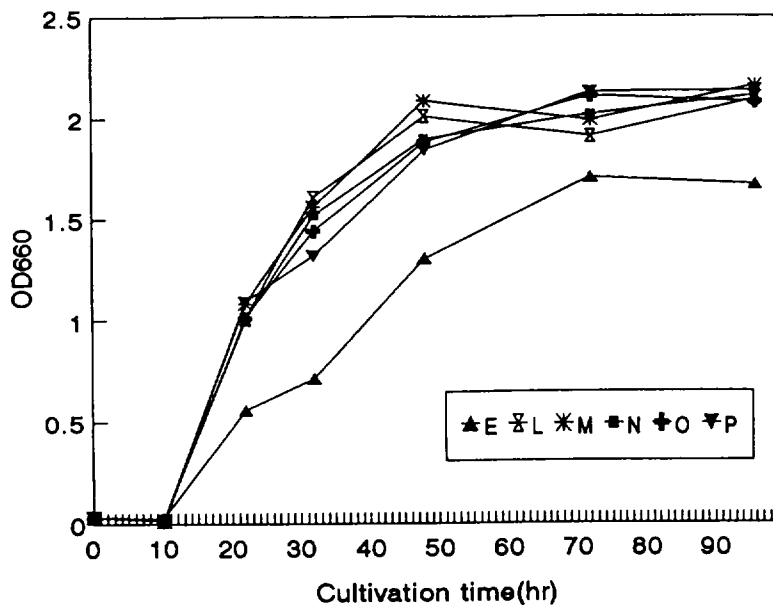


Fig. 1. Changes in optical density at 660 nm for each batch culture during the cultivation of *B. licheniformis* ATCC9945a. The compositions of media for batch cultures E through P are described in detail in Table 1.

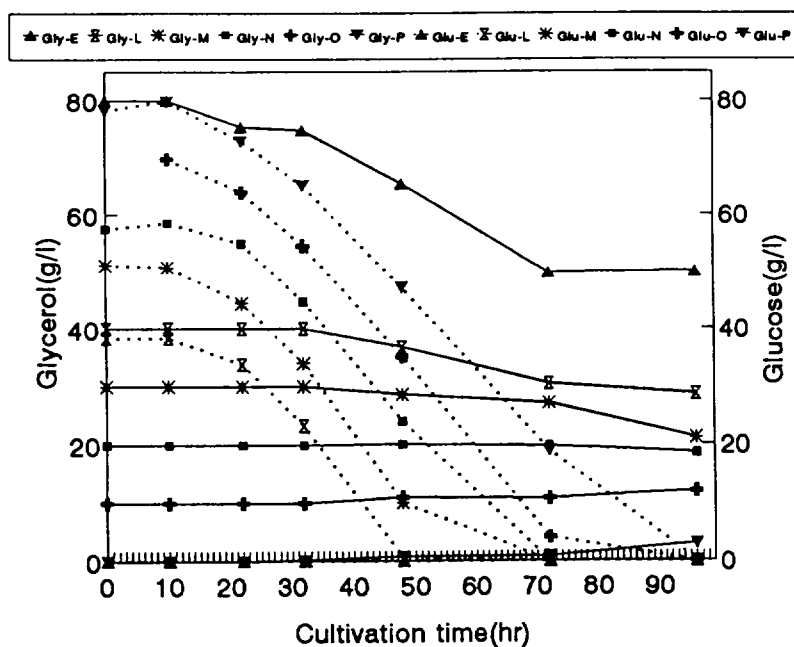


Fig. 2. Changes in glycerol and glucose concentrations for each batch culture during the cultivation of *B. licheniformis* ATCC9945a. The compositions of media for batch cultures E through P are described in detail in Table 1.

glucose는 균체의 생육을 촉진하는 효과가 있었다. 회분배양 E는 glucose를 함유하지 않은 반면에 L에서 P까지 각각의 회분배양은 40 - 80 g/l 범위의 glucose를 함유하고 있었는데, glucose가 배양액 중에 첨가된 경우에는 예외 없이 배양액의 탁도가 증가하였다. 그렇지만, glucose농도의 차이는 *B. licheniformis* ATCC9945a의 생육에 별다른 영향이 없었다.

glycerol의 농도에 구애받음이 없이 거의 일정한 속도로 이용되었다. 더구나 glucose가 고갈되기 전에는 glycerol이 이용되지 않았다(Fig. 2). 이는 균체의 생육에는 glucose가 glycerol보다 더 좋은 탄소원임을 제시한다. 뿐만 아니라, Fig. 2 와 3의 기울기를 비교해보면, glucose는 citrate나 glutamate에 비해서 훨씬 빠른 속도로 이용되었다.

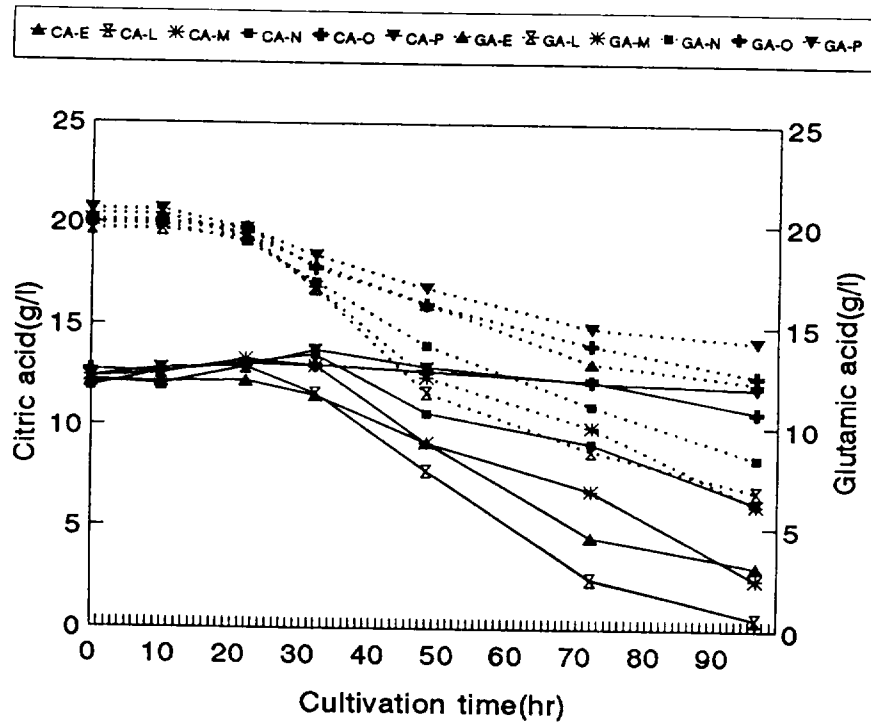


Fig. 3. Changes in citric acid and glutamic acid concentrations for each batch culture during the cultivation of *B. licheniformis* ATCC9945a. The compositions of media for batch cultures E through P are described in detail in Table 1.

균체 배양중의 탄소원 농도 변화추이를 glucose와 비교하였다(Fig. 2 and 3). Glucose는 초기의 glucose 또는

따라서 균체의 생육을 위해서는 glucose가 가장 적절한 탄소원임을 알 수 있었다.

ATCC9945a 균주에 의한  $\gamma$ -PGA 생산에 있어서 기본적인 관심사는 glucose를 glycerol 대신에 사용하는 것이었다. 96시간 동안 배양 후, 최종  $\gamma$ -PGA의 농도를 비교해보면 배양 초기의 glucose와 glycerol 농도에 따라 현저하게 차이를 알 수 있었다(Fig. 4).

았다. 회분배양 L의 경우에 그 농도는 20.5 g/l에 상당하였다. *B. licheniformis* ATCC9945a에 의한  $\gamma$ -PGA 생산과 관련하여 glycerol의 기능에 대해서 알려진 것은 없다. Glycerol이 없어도 ATCC9945a 균주는  $\gamma$ -PGA를 합성할 수 있었으나, glycerol에 의해서 촉진

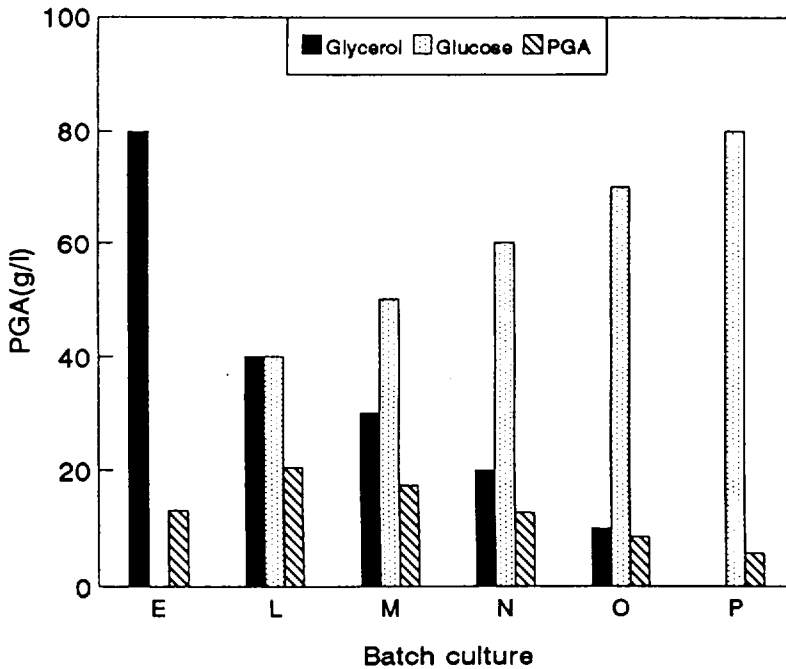


Fig. 4. The final  $\gamma$ -PGA concentrations after 96 hrs' cultivation of *B. licheniformis* ATCC9945a depending upon the initial glycerol and glucose concentrations. The compositions of media for batch cultures E through P are described in detail in Table 1.

Glycerol이 함유되지 않은 회분배양 P와 다른 회분배양간에 최종  $\gamma$ -PGA 농도를 비교해보면, glycerol의 존재가  $\gamma$ -PGA의 농도를 증가시켰음을 알 수 있었다. 그러나, glucose와 glycerol을 탄소원으로 병용(회분배양 L에서 M까지)했을 때가 glycerol만을 사용(회분배양 E)했을 때보다  $\gamma$ -PGA의 농도가 높

되었다. 몇몇 fungi에서 glycerol은 삼투압조절제(osmoregulator)로 알려져 있다<sup>18)</sup>. 그와 같은 기능이 ATCC9945a 균주에서도 작용하고 있을 수 있다. Fig. 5에 따르면, glutamic acid에 대한  $\gamma$ -PGA의 수율은 glycerol 농도와 비례하였다.

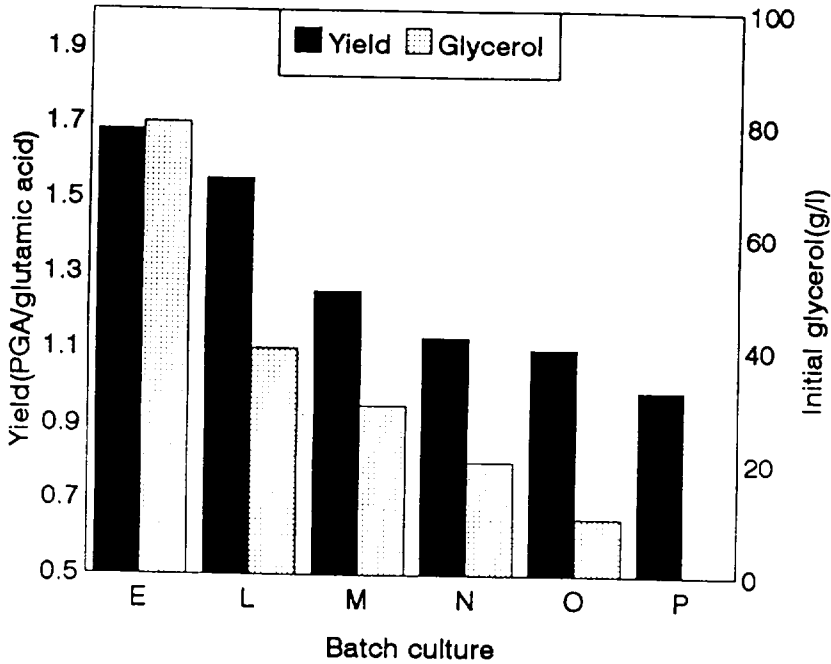


Fig. 5. The yields of  $\gamma$ -PGA for glutamic acid consumed after 96 hrs' cultivation of *B. licheniformis* ATCC9945a depending upon the initial glycerol concentrations. The compositions of media for batch cultures E through P are described in detail in Table 1

수율이 1.0보다 높은 이유는 glutamic acid 이외에 다른 탄소원이  $\gamma$ -PGA의 골격형성에 이용되었기 때문이다. *B. licheniformis* ATCC9945a 균주에 있어서  $\gamma$ -PGA 합성 후반기에 관련된 효소들이 세포막에 결합되어 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>5,6)</sup>. 따라서, glycerol의 삼투압조절작용은 glutamic acid가  $\gamma$ -PGA로 전환되는 물질대사에 관련된 효소들을 안정화 또는 활성화 시키는데 기여할 수 있다.

### 결 론

$\gamma$ -Poly(glutamic acid)( $\gamma$ -PGA)는 생분해성 고분자로 *Bacillus licheniformis* ATCC9945a에 의해 생산되어 배양액 중으로 분비된다. *B. licheniformis*를 고농도의 glycerol를 함유한 medium E(Leonard et al., 1958. J. Bacteriol., 76, 499) 또는 glycerol 대신에 glucose를 탄소원으로 대치한 modified medium E에 배양하였다. Shake-flask를 이용한 배양기간 중에 소량의 배양액을 시료로 채취하여,  $\gamma$ -PGA의 생산, 탄소원의 이용 등에 대해서 분석하였다. Glucose는 glycerol보다 세포의 생육에 더 좋은

탄소원이었으며, glycerol, citrate 또는 glutamate보다 더 빠른 속도로 이용되었다. 그렇지만,  $\gamma$ -PGA의 생산성을 향상시키기 위해서는 glycerol을 필요로 하였다.  $\gamma$ -PGA의 생산과 관련하여 glycerol은 탄소원이외에 삼투압조절제로서 작용할 것이라고 제안하였다.

### 참 고 문 헌

1. Linton, J. D., S. G. Ash and L. Huybrechts : Microbial polysaccharides in Biomaterials ed. by David Byrom, Stockton Press, New York, USA, pp. 215-261, 1991.
2. Birrer, G. A., Anne-Marie Cromwick, and R. A. Gross :  $\gamma$ -Poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a : physiological and biochemical studies, Internat. J. Biol. Macromol. 16(5), 265-275, 1994.
3. Leonard, C. G., R. D. Housewright, and C. B. Thorne : Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol., 76, 499-503, 1958.
4. Mclean, R. J. C., D. Beauchemin, L. Clapham, and T. J. Beveridge : Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC9945, Appl. Environ. Microbiol., 56(12), 3671-3677, 1990.
5. Troy, F. A. : Chemistry and biosynthesis of the poly( $\gamma$ -D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*, J. Biol. Chem., 248(1), 305-324, 1973.
6. Troy, F. A. : Capsular poly- $\gamma$ -D-glutamate synthesis in *Bacillus licheniformis*, Methods in Enzymology, 113, 146-168, 1985.
7. Cheng, C., Y. Asada, and T. Aida : Production of  $\gamma$ -polyglutamic acid by *Bacillus licheniformis* A35 under denitrifying conditions, Agri. Biol. Chem., 53(9), 2369-2375, 1989.
8. Goto, A. and M. Kunioka : Biosynthesis and hydrolysis of poly( $\gamma$ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. Biosci. Biotech. Biochem., 56(7), 1031-1035, 1992.
9. Hara, T., Y. Fujio, and S. Ueda : Polyglutamate production by *Bacillus subtilis*(natto), J. Appl. Biochem., 4, 112-120, 1982.
10. Housewright, R. D. : The biosynthesis of homopolymeric peptides, in The Bacteria Volume III : Biosynthesis ed. by I. C. Gunsalus and R.Y. Stainier, Academic Press, New York, USA. pp. 389-412, 1962.
11. Kubota, H., T. Matsunobo, K. Uotani, H. Takebe, A. Satoh, T. Tanaka, and M. Taniguchi : Production of poly( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01, Biosci. Biotech. Biochem., 57(7), 1212-1213, 1993.
12. Thorne, C. B., C. G. Gomez, H. E. Noyes, and R. D. Housewright



- : Production of glutamyl polypeptide by *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol., 68(3), 307-315, 1954.
13. Ward, R. M., R. F. Anderson, F. K. Dean : Polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis* NRRL B-2612 grown on wheat gluten, Biotechnol. Bioeng., 5, 41-48, 1963.
14. Roelants, G. E. and J. W. Goodman : Immunochemical studies on the poly- $\gamma$ -D-glutamyl capsule of *Bacillus anthracis*. IV. The association with peritoneal exudate cell ribonucleic acid of the polypeptide in immunogenic and nonimmunogenic forms, Biochemistry, 7(4), 1432-1440, 1968.
15. Thorne, C. B. : Capsule formation and glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*, Symposia of the Society for General Microbiology, No.VI, Bacterial Anatomy, pp. 68-80, 1956.
16. Thorne, C. B. and C. G. Leonard : Isolation of D- and L-Glutamyl polypeptides from culture filtrates of *Bacillus subtilis*, J. Biol. Chem., 233(5), 1109-1112, 1958.
17. Cromwick, Anne-Marie and R. A. Gross : Effects of manganese(II) on *Bacillus licheniformis* ATCC9945a physiology and  $\gamma$ -poly(glutamic acid) formation, Internat. J. Biol. Macromol. 17(5), 259-267, 1994.
18. Beaver, R. S. and E. P. Laracy : Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, J. Bacteriol., 168(3), 1358-1365, 1986.