DBpia

김치로부터 분리된 Leuconostoc sp. strain YSK 균주에 의한 덱스트란 생산 조건의 최적화

Process Optimization of Dextran Production by Leuconostoc sp. strain YSK. Isolated from Fermented Kimchi

저자 (Authors)	황승균, 홍준택, 정경환, 장병철, 황경숙, 신정희, 임성팔, 유선균 Seung Kyun Hwang, Jun Taek Hong, Kyung Hwan Jung, Byung Chul Chang, Kyung Suk Hwang, Jung Hee Shin, Sung Paal Yim, Sun Kyun Yoo

출처 (Source)	생명과학회지 18(10), 2008.10, 1377-1383 (7 pages) Journal of Life Science 18(10), 2008.10, 1377-1383 (7 pages)
발행처 (Publisher)	한국생명과학회 Korean Society Of Life Science
URL	http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01077847
APA Style	황승균, 홍준택, 정경환, 장병철, 황경숙, 신정희, 임성팔, 유선균 (2008). 김치로부터 분리된 Leuconostoc sp. strain YSK 균주에 의한 덱스트란 생산 조건의 최적화. 생명과학회지, 18(10), 1377-1383.

이용정보 (Accessed)	계명대학교 114.71.5.212 2016/03/25 15:23 (KST)

저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.
이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.
You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

Journal of Life Science **2008** Vol. 18. No. 10. 1377~1383 ©JLS / ISSN 1225-9918

김치로부터 분리된 *Leuconostoc* sp. strain YSK 균주에 의한 덱스트란 생산 조건의 최적화

황승균 · 홍준택 · 정경환[1] · 장병철[2] · 황경숙[3] · 신정희[4] · 임성팔[5] · 유선균*

중부대학교 공과대학 한방 건강 식품학과, [1]충주대학교 식품생명공학과, [2]계명대학교 의과대학, [3]목원대학교 생명산업학부
[4]중부대학교 식품영양학과, [5]한국원자력 연구원

Received June 24, 2008 / Accepted October 23, 2008

Process Optimization of Dextran Production by *Leuconostoc* sp. strain YSK. Isolated from Fermented Kimchi. Seung Kyun Hwang, Jun Taek Hong, Kyung Hwan Jung[1], Byung Chul Chang[2], Kyung Suk Hwang[3], Jung Hee Shin[4], Sung Paal Yim[5] and Sun Kyun Yoo*. *Department of Oriental Medicine and Food Biotechnology, Joongbu University, Choobu-myun, Geumsan-gun, Chungnam, 312-702, Korea, [1]Department of Food and Biotechnology, Chungju University, 123 Geodan-ri, Iryu-myun, Chungju, Chungbuk, 380-702, Korea, [2]Department of Medical Genetic Engineering, Keimyung University School of Medicine and Institute for Medical Science, 194 Dongsan-dong, Jung-gu, Daegu 700-712, Korea, [3]Department of Biotechnology, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea, [4]Department of Food and Nutrition, Joongbu University, Daejeon 312-702, Korea, [5]Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 312-702, Korea* - A bacterium producing non- or partially digestible dextran was isolated from kimchi broth by enrichment culture technique. The bacterium was identified tentatively as *Leuconostoc* sp. strain SKY. We established the response surface methodology (Box-Behnken design) to optimize the principle parameters such as culture pH, temperature, and yeast extract concentration for maximizing production of dextran. The ranges of parameters were determined based on prior screening works done at our laboratory and accordingly chosen as 5.5, 6.5, and 7.5 for pH, 25, 30, and 35°C for temperature, and 1, 5, and 9 g/l yeast extract. Initial concentration of sucrose was 100 g/l. The mineral medium consisted of 3.0 g KH_2PO_4, 0.01 g $FeSO_4 \cdot H_2O$, 0.01 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g NaCl, and 0.05 g $CaCO_3$ per 1 liter deionized water. The optimum values of pH and temperature, and yeast extract concentration were obtained at pH (around 7.0), temperature (27 to 28°C), and yeast extract (6 to 7 g/l). The best dextran yield was 60% (dextran/g sucrose). The best dextran productivity was 0.8 g/h-l.

Key words : Kimchi, dextran, Box-Benken design, sucrose, yield, productivity

서 론

최근 GRAS (generally recognized for as safe)로 인정이 되고 있는 덱스트란, 잔탄, 젤란과 같은 기능성 의료 및 식품 소재들에 대한 관심이 급증하고 있다[1,13]. 이중에서 덱스트란은 *Leuconostoc mesenteroides* 균 계열이 생산을 한다[2]. *L. mesenteroides*는 효소 dextransucrase를 생산하는데, 이 효소는 슈크로즈를 글루코오스와 프럭토즈로 가수분해를 한다[5]. *L. mesenteroides*는 가수분해된 프럭토즈를 탄소원과 에너지원으로 사용을 하고 동시에 글루코스를 고분자 형태인 덱스트란을 합성에 이용을 한다[5,15,19]. 생산된 덱스트란의 크기와 구조는 *Leuconostoc*균주에 따라 다르며, 수백 개에서 천개 이상의 α-1,6 글루코오스 결합을 주사슬(back bone)로 하고 α-1,2 α-1,3 α-1,4 글루코오스 결합을 가지(branch) 형태로하는 글루코오스 고분자로 이루어진다[12,16,17].

덱스트란은 1940년대 이래로 비교적 작은 분자량의 덱스트란(MW=50,000 to 100,000)들이 혈류 증량제로사용이 되고 있다 [13]. 최근에 순환계 내에서 장기간 약효를 지속할 수 있도록 의약용 단백질 수송을 위한 고분자 운반체(macromolecular carrier)에 대한 연구가 활발하게 진행이 되어 오고 있다. 이들 중 덱스트란은 urokinase [7], lactamase [14], heparin [18], recombinant human growth factor [3,4] 등과 결합(conjugation)하거나 미립구(microsphere) 형태로 제조를 하여 단백질 등을 encapsulation시켜 운반체로서 잠재적인 가능성이 있는 것으로 알려져 왔다[6].

현재까지 상업적인 덱스트란의 생산은 주로 *Leuconostoc mesenteroides* B-512에 하여 생산이 되고 있다[8,9]. *L. mesenteroides* B-512 덱스트란은 95%가 α-1,6 글루코스 결합을 주사슬(back bone)로 하고 5% α-1,3 글루코스를 가지(branch) 형태하는 고분자이다. 하지만 최근에 고분지 형태의 텍스트란에 대한 의료, 화장품, 식품 등 응용 분야가 확대 되면서 새로운 균주들에 의하여 생산이 되는 새로운 구조를 가진 덱스트란의 생산에 대한 연구가 진행하고 있다[9,10,21]. 따라서 본 연구는 발효 김치로부터 우수한 덱스트란 생산 균주를 분리하여 표면반응 분석법에 의한 덱스트란 생산 최적 발효 공정을 확립하였다.

***Corresponding author**
Tel : +82-41-750-6206, Fax : +82-41-750-6422
E-mail : skyoo@joongbu.ac.kr

계명대학교 | IP: 114.71.5.212 | Accessed 2016/03/25 15:23(KST)

재료 및 방법

균주의 분리 및 배양

덱스트란 생산 균주는 잘 발효된 배추김치를 구입하여 직접배양법(enrichment culture technique)으로 분리하였다. 균주의 분리 방법은 전에 기술된 방법을 부분적으로 응용하여 사용하였다[22]. 김치 액체 국물에서 한 백금이를 취하여 MRS (Difco. NJ. USA)평판 배지에 옮겨 30°C에서 48 시간을 배양한 후 유산균으로 보이는 콜로니들을 선택을 하였다. 덱스트란 생산 가능 균을 분리하기위하여 슈크로즈을 5% 함유한 TSA (Difco. NJ, USA)에 옮겨 24시간 배양을 하였다. 덱스트란 생성하는 콜로니들을 선별하여 5% (w/v) 슈크로즈를 함유한 염(salt) 액체 배지로 옮긴 다음 덱스트란 생산 능력을 평가하였다.

실험에 사용된 모든 균주는 염배지(mineral medium; MM); KH_2PO_4 3 g/l; FeSO4 · H_2O 0.01 g/l; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l; NaCl 0.01 g/l; $CaCl_2$ 0.05 g/l를 이용하여 배양하고 보관을 하였는데, 한천 염배지(MMA)는 MM에 1.5% 한천을 넣고 만들었다. 위의 염배지에 효모 추출물(yeast extract)을 포함하였을 때는 MMY로 표기를 하였다. 실험하기 전까지 균주는 2% 과당과 0.5% 효모 추출물을 포함하고 있는 MMA배지를 20×125 mm 테스트 튜브에 사면배지를 만들어 5°C에 보관을 하였다. 실험 균주는 사면배지에서 한 백금이에 해당하는 균체량을 2% 과당과 0.5% 효모 추출물을 포함하고 있는 10 ml MMA가 들어 있는 25×150 mm 테스트 튜브에 옮기고 30°C, 200 rpm에서 24 시간 배양 후 사용하였다.

반응표면 분석을 위한 실험 계획

덱스트란 생산 최적 조건을 구하기 위하여 모든 실험 계획은 3개의 독립변수 즉, 배양 온도, 배양 초기 pH, 효모 추출물의 농도를 각각 30°C, pH 6.5, 0.5%로 하는 center run을 5번 반복을 포함하여 총 17개의 처리 조합으로 구성을 하였다. Box-Benken design은 세 가지의 중요한 절차에 따라 진행이 되는데, 첫째는 계획된 실험(designed experiment)에 따라 통계적으로 실험을 수행하고, 둘째는 수식 모델의 계수(coefficients of model)를 구하고, 셋째는 모델의 적합성을 판정하는 것으로 진행이 된다. 본 실험에서의 반응 변수들은 덱스트란 생산량, 덱스트란 생산 수율, 균체량 생산, 덱스트란 생산 속도로 하였다.

통계적인 계산을 원활히 하기 위하여 독립 변수를 다음과 같이 표준화 (code)하여 사용을 하였다. 세 개의 변수들을 각각 X1 (온도), X2 (pH), X3 (효모 추출물)로 하였다. 표준화의 값들은 다음과 같은 공식에 의하여 수 할 수 있고 그 값을 Z로 하였다.

$$Z = (X - X^0)/\Delta X \quad (1)$$

X^0는 표준화 값의 중심 값이고 X는 표준화 값이다. ΔX는 1 단위만큼의 증가 또는 감소하는 값의 크기이다. 실험 결과에 대한 분석은 표면 반응 분석법으로 사용을 하였으며 최적 공정 조건을 나타내는 다중 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^{k} B_i X_i + \sum_{i=j=1}^{k} B_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

여기서 Y는 predicted response 이고 본 실험처럼 3개의 변수가 있을 경우에는 k값이 3이 되고 궁극적으로 다음과 같은 식으로 표현된다.

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{12}X_2X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 \quad (3)$$

실험 후에 확정 된 결과들의 통계 분석은 Design Expert (Couresy: Stat-ease Inc.,Statistics Made Easy, Minneapolis, USA)를 사용하였다. 독립변수들의 값의 선택은 예비 실험에서 얻은 결과로부터 선택을 하여 X_1 (온도)는 25°C (-1), 30°C (0), 35°C (+1)로 정하고, X_2 (pH)는 5.5(-1), 6.5(0) 7.5(+1)로 하고 X_3 (효모 추출물의 농도)는 0.1(-1), 0,5(0), 0.9(+1)%로 하였다(Table 1). 덱스트란 생산 발효는 50 ml MM를 담고 있는 250 ml 배양 플라스크를 이용하였는데, 각각 플라스크 배양에 대하여 1% (v/v)의 배양액을 접종하였다.

분석 방법

균체량의 측정은 *Leuconostoc* sp. strain YSK를 5% (v/v) 슈크로즈를 포함한 1,000 ml MMY를 30°C에서 24시간 동안 배양 한 후 멸균된 50 ml 배양 시험관 튜브에 20개로 나누어 옮겨 담은 후 원심분리기를 사용하여 상층액과 균체를 분리하였다. 분리된 균체들을 하나의 배양 시험관 50 ml에 모으고, 균체를 완충용액을 이용하여 3차례 세척 하였다. 세척된 균체를 완충용액을 이용하여 단계별로 희석을 하였다. 정량의 희석된 균체 용액으로부터 일정량을 알루미늄 그릇에 넣고 건조기를 이용하여 건조 균체량을 측정하였다. 희석된 균체용액에서 건조 균체량의 측정과 같은 비율의 균체용액을 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 흡광도를 측정을 하였다. 건조 균체량과 흡광도를 이용하여 표준곡선을 그리고 발효 중 균체량 측정하였다.

덱스트란 양은 gravimetric method를 이용하여 측정을 하였다. 배양 시험관(50 ml)을 잘 세척을 한 다음 건조기에서 건조 후 무게를 측정하였다. 배양 시험관에 일정양의 배양액

Table 1. levels of independent variables in Box-Benken design

X_i	Independent variables	Level		
		-1	0	+1
X_1	Culture temperature (C°)	25	30	35
X_2	Culture pH	5.5	6.5	7.5
X_3	Yeast extract concentration	0.1	0.5	0.9

계명대학교 | IP: 114.71.5.212 | Accessed 2016/03/25 15:23(KST)

(20 ml)를 옮기고 원심분리를 하여 균체를 제거 하였다. 상등액을 무게가 측정된 배양 시험관에 옮기고, 40 ml 알코올(100%)를 첨가하여 덱스트란을 침전시켰다. 침전된 덱스트란이 들어 있는 시험관을 진공건조기에서 건조를 한 후 무게를 측정하여 시험관의 무게를 뺀 후 덱스트란 양을 계산하였다. 발효 공정 중 슈크로즈 양은 TLC (thin layer chromatography)에 의하여 분석을 하였다. TLC의 전개 용매는 85 ml Acetonitrile, 20 ml Ethyl Acetate, 20 ml 1-Propanol , 15 ml Water의 비율로 혼합을 하여서 사용하였으며, 발색 시약은 5% H_2SO_4를 알코올에 혼합하여 제조 사용하였다. 사용된 슈크로즈의 양은 densitometry 방법에 의하여 분석을 하였다 (Scion Image, Frederick, Maryland, USA).

결과 및 고찰

김치로부터 덱스트란 생산 균주 분리

소매점에서 플라스틱 포장 상태의 발효 김치(Fig. 1A)를 구입즉시 5°C 냉장고에 보관 후 김치 액을 무균 적으로 MRS 배지에 도말하였다. 배양기에서 30°C의 조건으로 48시간 배양 한 후에 그림과 같이 흰색의 광택을 띠는 전형적인 유산균으로 보이는 콜로니들을(Fig. 1 B and C) 선별하여 반복하여 새로운 MRS 배지에 배양을 하였다. 우수 덱스트란 생산 균주 (Fig. D)을 선별하기 위하여 TSB+5% 슈크로즈를 포함한 petri-dish에 배양을 하였다. 선별된 균주들은 10 ml MMY+2% 슈크로즈 배지에 접종하여 30°C 배양기에서 24시간 배양 하였다. 덱스트란의 생산의 정도는 배양액으로부터 TLC를 이용하여 소비된 슈크로즈 양을 측정 비교하고, 생산된 덱스트란 양은 위에서 언급된 분석 방법에 의하여 측정을 하였다. 최종적으로 분리된 균주를 *Leuconostoc* sp. strain SKY라고 잠정적으로 명명을 하였다.

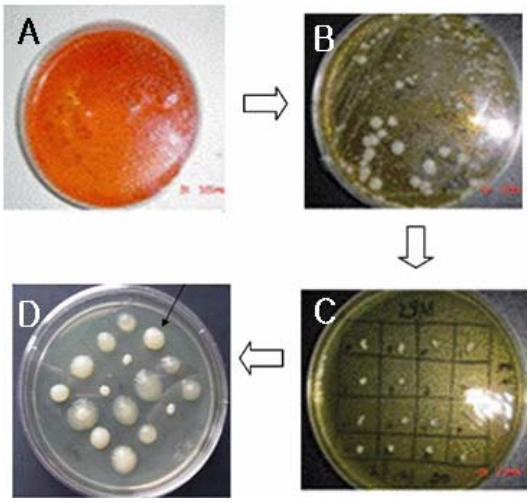

Fig. 1 Bacterial isolation from fermented kimchi broth. A: fermented kimchi broth, B and C: colonies on MRS medium, and D: colonies capable of producing dextran. D medium consisted of TSA + 5% sucrose.

Leuconostoc sp. strain SKY에 의한 덱스트란 생산 최적화

Leuconostoc sp. strain SKY를 이용하여 슈크로즈로부터 덱스트란 생산의 최적 조건 요인들인 배양온도, pH, 효묘 추출물의 농도의 3개의 실험변수에 대하여 Box-Benken 디자인으로 실험을 설계하여 얻어진 실험 결과를 Table 2에 나태 내었다. 덱스트란 생산의 효율성을 나타내는 중요한 요인들인 총 덱스트란 생산량, 균체량, 덱스트란 생산 수율, 덱스트란 생산 속도의 측정값이 Table 2에 보여준다. 실험 결과 덱스

Table 2. Experimental data of dextran production, biomass, dextran yield, and productivity by *Leuconostoc* sp. strain SKY

Sample	Temperature	pH	Yeast extract	Dextran (g/l)	Cell mass	Yield	Productivity
1	-1	-1	0	9.20	1.8	0.19	0.38
2	1	-1	0	6.20	1.74	0.13	0.25
3	-1	1	0	18.80	2.40	0.55	0.56
4	1	1	0	16.20	2.17	0.28	0.55
5	-1	0	-1	11.40	1.70	0.24	0.47
6	1	0	-1	5.20	0.69	0.10	0.21
7	-1	0	1	16.80	1.70	0.49	0.48
8	1	0	1	8.80	2.50	0.18	0.36
9	0	-1	-1	3.90	1.24	0.08	0.16
10	0	1	-1	10.50	1.80	0.45	0.46
11	0	-1	1	8.30	1.78	0.17	0.34
12	0	1	1	14.50	2.50	0.35	0.56
13	0	0	0	20.50	2.80	0.63	0.75
14	0	0	0	22.40	2.79	0.61	0.79
15	0	0	0	19.80	2.85	0.59	0.69
16	0	0	0	20.50	2.59	0.64	0.85
17	0	0	0	23.20	2.49	0.57	0.78

계명대학교 | IP: 114.71.5.212 | Accessed 2016/03/25 15:23(KST)

트란 생산은 3.90-22.40 g/l이고, 균체량 생산은 0.69-2.85 g/l, 수율은 0.10-0.64, 생산 속도 0.16-0.85 g/l-hr의 범위에서 측정값이 얻어졌다.

Table 2의 실험 결과를 이용한 회귀식에 대한 분산분석의 결과는 반응표면분석법에 의해 수립된 모델의 적합성 여부를 알려준다. quadratic 회기 모델의 분산 분석 결과가 Table 3에서 보여준다. 이들의 결과에 따르면 덱스트란 생산, 균체 생산, 덱스트란 생산 수율, 덱스트란 생산 속도 들은 배양 온도, 배양 pH, 효모 추출물의 농도에 의하여 영향을 받는 다는 것이 95% 수준 이내에서 유의성이 인정되었다. 모델 결정계수(determination coefficient) R^2은 실험값(observed value)와 예측값(predicted value)과 상호연관(correlation) 정도를 보여주는데, 덱스트란 생산량 0.96, 균체 생산량 0.97, 덱스트란 생산수율 0.97, 생산 속도 0.96이므로 단지 이 모델은 3-4% 범위에서 설명되지 않는다는 것을 보여준다. 적합결여(lack of fit)테스트 검정에서는 유의성이 나타나지 않아 본 실험에 사용한 모델이 매우 적절함을 알 수 있다. Table 4는 모델의 회귀계수를 나타내는 것으로 덱스트란 생산, 균체량 생산, 수율, 생산 속도들이 3가지의 요인들에 대하여 크게 영향을 받는 것으로 나타났다(P<0.05). 본 실험 결과 배양 온도, pH, 효모 추출물에 대한 영향은 1차, 2차, 교호항(cross product term)에서 모두 유의성이 나타나 요인들의 단독 또는 교호적으로 영향을 미침을 알 수 있다. 이들에 대한 회귀식은 Table 5에 있다.

표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되어 예측 최대 덱스트란 생산은 효모 추출물의 농도 0.5%에서 덱스트란의 생산은 온도보다 더 큰 영향을 주는 것으로 나타났다. pH가 5.5부근에서 서서히 증가하다가 7.2 근처에서 최고 생산량을 보여주다가 더 이상의 pH 에서는 생산량이 감소하는 결과를 보여 주었다(Fig. 2A). 온도 또한 25°C에서 서서히 생산량이 증가하다가 27-28°C에서 최고

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for fitted second-order polynomial model and lack of fit for dextran production

Source	DF	Sum of squares			
		Dextran[a]	Cell mass[b]	Yield[c]	Productivity[d]
Model	9	611.48[e]	5.487[e]	0.633[e]	0.647[e]
Residual	7	23.42	0.145	0.018	0.023
Lack of Fit	3	15.07[f]	0.048[f]	0.015[f]	0.009[f]
Pure Error	4	8.35	0.096	0.003	0.013
Cor Total	16	650.99	15.758	0.678	0.702

[a]Coefficient of correlation (R^2) for dextran production was 0.96.
[b]Coefficient of correlation (R^2) for cell mass was 0.97.
[c]Coefficient of correlation (R^2) for dextran yield was 0.97.
[d]Coefficient of correlation (R^2) for dextran productivity was 0.96.
[e]Significant at 5% level.
[f]All the lack of fits were not significant.

Table 4. Estimated coefficient for the filled second oder polynomial representing the relationship between the response and process variables

Factor	Coefficient			
	Dextran	Cell mass	Yield	Productivity
Intercept	21.28	2.70	0.61	0.77
Linear				
Temperature	-2.48	-0.06	-0.097	-0.062
pH	4.05	0.29	0.13	0.12
Yeast extract	2.18	0.38	0.040	0.055
Quadratic				
Temperature	-3.71	-0.43	-0.16	-0.16
pH	-4.97	-0.25	-0.15	-0.17
Yeast extract	-7.02	-0.63	-0.19	-0.22
Interactions				
pH×Temperature	0.10	-0.043	-0.053	0.031
pH×Yeasr extract	-0.45	0.45	-0.044	0.036
Yeast extract×Temperature	-0.10	0.041	-0.049	0.021

Table 5. Polynomial equations calculated by response surface program. X_1: Temperature (°C), X_2: pH, X_3: yeast extract (g/l)

Response	Second oder polynomial equations	R^2
Dextran production	$Y=21.28+2.48X_1+4.05X_2+2.18X_3+0.10X_1X_2-0.45X_1X_3-0.10X_2X_3-3.71X_1^2-4.97X_2^2-7.02X_3^2$	0.96
Biomass	$Y=2.70-0.060X_1+0.29X_2+0.38X_3-0.043X_1X_2+0.45X_1X_3+0.041X_2X_3-0.43X_1^2-0.25X_2^2-0.63X_3^2$	0.97
Dextran yield	$Y=0.61-0.097X_1+0.13X_2+0.040X_3-0.053X_1X_2-0.044X_1X_3-0.049X_2X_3-0.16X_1^2-0.15X_2^2-0.19X_3^2$	0.97
Productivity	$Y=0.77-0.062X_1+0.12X_2+0.055X_3+0.031X_1X_2+0.036X_1X_3-0.021X_2X_3-0.16X_1^2-0.17X_2^2-0.22X_3^2$	0.96

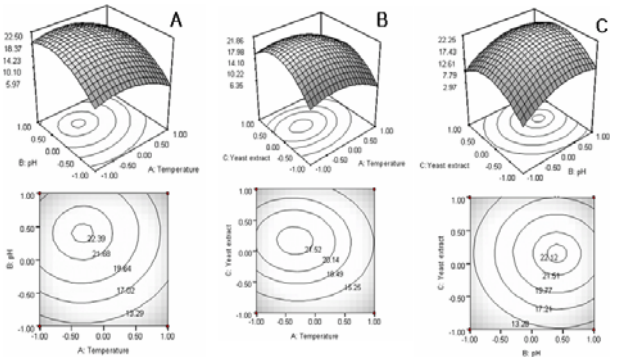

Fig. 2. Contour and 3D plots of response surface. Effect of temperature and pH (A), temperature and yeast extract (B), and effect of temperature and pH (C) on the production of dextran by *Leuconostoc* sp. strain SKY.

계명대학교 | IP: 114.71.5.212 | Accessed 2016/03/25 15:23(KST)

많이 생산되었으며 이후로는 감소하였다. 최대 예측 덱스트란 생산량은 약 22.5 g/l 이었다. Fig. 2B에서 보듯이 효모 추출물의 농도는 덱스트란생산에 온도보다 더 영향을 주는 것으로 보이는데, 효모 추출물의 농도가 낮을 때에는 농도변화에 대하여 덱스트란 생산량의 변화가 큰 반면에 농도가 약 0.5% 이상에서는 생산량의 변화가 크지 않았다. Fig. 6에서와 마찬가지로 온도의 변화에 의해 생산되는 덱스트란의 변화보다는 효모 추출물의 농도의 변화에 상당히 민감하였다. 효모 추출물의 농도 약 0.56%와 온도 약 27-28°C 근처에서 정상점이 나타났는데, 이것이 덱스트란 생산의 최대점이 되어 그 값은 약 21.89 g/l이었다. Fig. 2C은 덱스트란 생산에 대하여 배양 pH와 효모 추출물의 농도에 영향에 대한 표면 반응이다. 덱스트란의 생산은 효모 추출물보다 pH에 의하여 크게 영향을 받는 것으로 보여 지는데, pH 7.0과 효모 추출물의 농도 5.5% 근처에서 정상점이 나타났다. 이곳이 최대 덱스트란 생산조건이 되는 것으로 보이는데, 덱스트란 생산량은 약 22.3 g/l이었다. 종합적으로 보면 덱스트란 생산에 가장 영향을 미치는 것은 배양 pH 이고 다음에 효모 추출물의 농도 그리고 온도의 순으로 나타났다.

Leuconostoc sp. strain SKY의 균체량 생산

Leuconostoc sp. strain SKY에 의한 균체량 생산표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되어 예측 최대 균체량 생산은 효모 추출물의 농도 0.5%에서 균체량 생산은 덱스트란의 생산과는 달리 배양 pH 보다 배양 온도에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 균체량의 측정은 단위 균체량에 의하여 덱스트란 생산효율을 평가하는데 지표가 된다. pH가 5.5부터 pH 6.75 근처까지 균체량의 생산이 2.79 g/l까지 증가하다가 이 후에는 감소하기 시작하였다(Fig. 3A). 온도에 의한 영향을 보면 25°C부터 서서히 생산량이 증가하다가 28°C에서 최고점을 고비로 감소하기 시작을 하고 35°C 근처에서는 1 g/l 이하로 떨어졌다. Fig. 3B에서 보듯이 효모 추출물에 의한 균체량 생산을 보면 균체량 생산은 온도보다 덜 영향을 주는 것으로 보이는데, 효모 추출물의 농도가 낮을 때에는 농도변화에 대하여 균체량의 변화가 큰 반면에 농도가 약 0.5% 이상에서는 생산량의 변화가 크지 않았다. Fig. 3B에서와 마찬가지로 온도의 변화에 의해 생산되는 균체량의 변화보다는 효모 추출물의 농도의 변화에 상당히 민감하였다. 효모 추출물의 농도 약 0.56%와 온도 약 27-28°C 근처에서 정상점이 나타났는데, 이것이 균체량 생산의 최대점이 되어 그 값은 약 2.85 g/l이었다. Fig. 3C은 균체량 생산에 대하여 배양 pH와 효모 추출물의 농도에 영향에 대한 표면 반응이다. 균체량의 생산은 효모 추출물보다 pH에 의하여 크게 영향을 받는 것으로 보여 지는데, pH 7.0과 효모 추출물의 농도 5.5% 근처에서 정상점이 나타났다. 이곳이 최대 균체량 생산 조건이 되는 것으로 보이는데, 덱스트란 생산량은 약 22.3 g/l이었다. 종합적으로 보면 균체량 생산에 가장 영향을 미치는 것은 배양 pH이고 다음에 효모 추출물의 농도 그리고 온도의 순으로 나타났다.

Leuconostoc sp. strain SKY 덱스트란 생산 수율

Leuconostoc sp. strain SKY에 의한 생산 수율에 대한 표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되고 예측 최대 덱스트란 생산 수율은 효모 추출물의 농도 0.1%에서부터 증가하다가 0.55% 근처에서 최대값을 보이고 다음부터는 감소하기 시작을 하였다. 온도의 영향을 보면 균체량 생산은 덱스트란의 생산과는 달리 배양 pH 보다 배양 온도에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 균체량의 측정은 단위 균체량에 의하여 덱스트란 생산 효율을 평가하는데 지표가 된다. pH가 5.5부터 pH 6.75 근처까지 균체량의 생산이 2.79 g/l까지 증가하다가 이 후에는 감소하기 시작하였다(Fig. 4A). 온도에 의한 영향을 보면 25°C 부터 서서히 수율이 증가하다가 28°C 근처에서 최고점(0.63)을 고비로 감소하기 시작을 하고 35°C 근처에서는 0.15 이하로 떨어졌다. Fig.

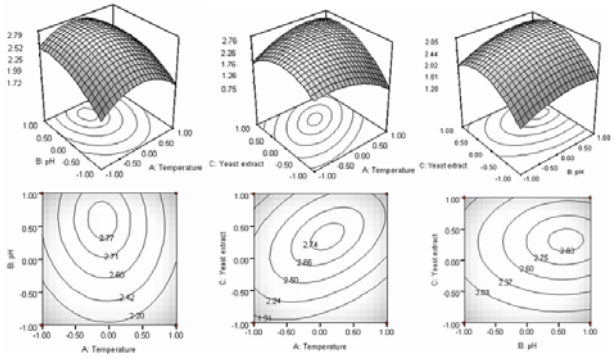

Fig. 3. Contour and 3D plots of response surface. Effect of temperature and pH (A), temperature and yeast extract (B), and effect of temperature and pH (C) on the production of biomass by *Leuconostoc* sp. strain SKY.

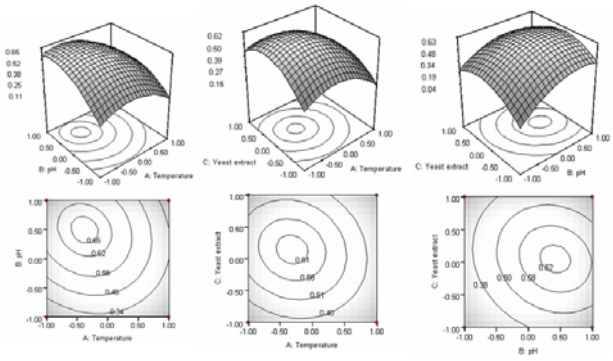

Fig. 4. Contour and 3D plots of response surface. Effect of temperature and pH (A), temperature and yeast extract (B), and effect of temperature and pH (C) on the yield of dextran by *Leuconostoc* sp. strain SKY.

계명대학교 | IP: 114.71.5.212 | Accessed 2016/03/25 15:23(KST)

4B에서 보듯이 덱스트란 생산 수율에 대한 효모 추출물의 pH와 효모 추출물의 영향을 보면 효모 추출물의 농도가 낮을 때에는 농도변화에 대하여 균체량의 변화가 큰 반면에 농도가 약 0.5% 이상에서는 수율의 변화가 크지 않았다. 덱스트란 수율은 덱스트란 생산처럼 pH에 크게 영향을 받은 것으로 보인다. 수율에 대한 pH의 영향은 덱스트란 생산에 미치는 영향과 비슷하였는데, 최고 생산 수율은 pH 7.0 근처에서 확정 되었다. Fig. 4C의 그림처럼 덱스트란 수율에 대한 온도와 pH를 보면 온도의 변화에 의해 생산되는 생산 수율의 변화보다는 pH에 의한 변화에 좀 더 민감함을 보였다. pH 7.0과 온도 29°C 근처에서 정상점이 나타났다. 이곳이 최대 수율 조건이 되는 것으로 보이는데, 덱스트란 수율은 약 0.79 이었다. 종합적으로 보면 균체량 생산에 가장 영향을 미치는 것은 배양 pH이고 다음에 효모 추출물의 농도 그리고 온도의 순으로 나타났다.

Leuconostoc sp. strain SKY 에 의한 덱스트란 생산 속도

표면 반응의 분석결과 정상점(stationary point)이 최대점으로 판명되어 예측 최대 덱스트란 생산 속도는 효모 추출물의 농도 0.5%에서 덱스트란의 생산 속도는 온도보다 pH의 영향이 더 큰 것으로 나타났다. 생산 속도는 pH가 5.5부근에서 서서히 증가하다가 7.0 근처에서 최고 생산 속도를 보여주다가 더 이상의 pH에서는 생산 속도가 감소하는 결과를 보여 주었다(Fig. 5A). 온도 또한 25°C에서 서서히 생산 속도가 증가하다가 27-28°C에서 최고조에 도달을 하였으며 이후로는 감소하였다. 최대 예측 덱스트란 생산 속도는 약 0.80 g/l-hr이었다. Fig. 5B에서 보듯이 효모 추출물의 농도는 덱스트란 생산에 온도보다 더 영향을 주는 것으로 보이는데, 효모 추출물의 농도가 낮을 때에는 농도 변화에 대하여 덱스트란 생산 속도의 변화가 큰 반면에 농도가 약 0.5% 이상에서는 생산량의 변화가 크지 않았다. Fig. 16에서와 마찬가지로 온도의 변화에 의한 덱스트란 생산 속도는 효모 추출물의 농도의 변화에 상당히 민감하였다. 효모 추출물의 농도 약 0.56%와 온도 약 27-28°C 근처에서 정상점이 나타났는데, 이것이 덱스트란 생산 속도가 최대값이 되어 약 0.78 g/l-hr이었다. Fig. 5C는 덱스트란 생산 속도에 대하여 배양 pH와 효모 추출물의 농도에 영향에 대한 표면 반응이다. 덱스트란의 생산 속도는 효모 추출물보다 pH에 의하여 크게 영향을 받는 것으로 보여 지는데, pH 7.0과 효모 추출물의 농도 5.5% 근처에서 정상점이 나타났다. 이곳이 최대 덱스트란 생산 속도가 되는 것으로 보이는데, 덱스트란 생산 속도는 0.79 g/l-hr. 종합적으로 보면 dextran 생산 속도에 가장 영향을 미치는 것은 배양 pH이고, 다음에 효모 추출물의 농도 그리고 온도의 순으로 나타났다.

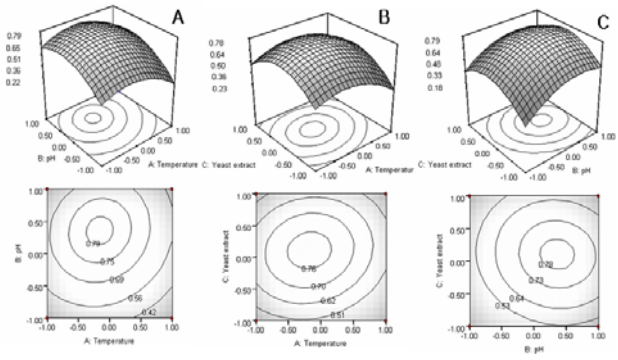

Fig. 5. Contour and 3D plots of response surface. Effect of temperature and pH (A), temperature and yeast extract (B), and effect of temperature and pH (C) on the productivity of dextran by *Leuconostoc* sp. strain SKY.

요 약

본 연구는 발효 김치 액으로부터 덱스트란 생산 균주를 분리하고 생산 최적 생산 조건을 설정하기 위하여 반응표면분석법을 이용하였다. 발효 조건의 독립변수들은 배양 온도, pH, 효모 추출물의 농도, 온도, 기질의 농도로 정하고 Box-Benken 디자인를 이용하여 실험을 설계하였다. 최종 분리된 균주는 *Leuconostoc* sp. strain SKY로 잠정적으로 명하였다. 연구 결과 덱스트란 생산은 3.90 - 22.40 g/l이고, 균체량 생산은 0.69-2.85 g/l, 수율은 0.10-0.64, 생산 속도 0.16-0.85 g/l-hr의 범위에서 분석이 되었다. 표면반응분석 결과 덱스트란 생산에 가장 영향을 미치는 것은 배양 pH이고 다음에 효모 추출물의 농도 그리고 온도의 순으로 나타났다. 균체량 생산에 가장 영향을 미치는 것은 배양 pH이고 다음에 효모 추출물의 농도 그리고 온도의 순으로 나타났다. 생산 수율에 가장 영향을 미치는 것은 배양 pH 이고 다음에 효모 추출물의 농도 그리고 온도의 순으로 나타났다. 덱스트란 생산 속도에 가장 영향을 미치는 것은 배양 pH이고 다음에 효모 추출물의 농도 그리고 온도의 순으로 나타났다. 결론적으로 최적 생산 조건은 온도는 27-28°C이고, pH는 7.0이며, 효묘 추출물은 6-7%의 범위에서 결정이 되었다. 이러한 조건에서 생산된 덱스트란 양은 22g/l이고, 생산 수율은 약 60%정도이며, 생산 속도는 0.8g/l/hr이었다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(R01-2006-000-10323-0).

References

1. Alsop, R. M. 1983. Industrial production of dextran in

계명대학교 | IP: 114.71.5.212 | Accessed 2016/03/25 15:23(KST)

"Progress in industrial Microbiology", *In* Bushell, M. E. (ed.), Vol. **1,** Elsevier Amsterdam **18,** 1-44.
2. Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87,** 113-130.
3. Battersby, R., W. Clark, E. Hancock, N. Puchulucampanella, D. Haggarty and D. Harding. 1996. Sustained release of recombinant human growth hormone from dextran via hydrolysis of animine bond. *J. Control Rel.* **42,** 143-156.
4. Cadee, J. A., W. Groot, W. Jiskoot and W. E. Hennink. 2002. Release of recombinant human interleukin-2 from dextran-based hydrogels. *J. Control Release* **17**, 1-13.
5. Dols, M., W. Chraibi, M. Remaud-Simeon, N. D. Lindley and P. F. Monsan. 1997. Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Appl. Envrion. Microbiol.* **63**, 2159-2165.
6. Hennink, W. E., O. Franssen, W. N. E. van Dijk-Wolthuis and H. Talsma. 1997. Dextran hydrogels for the controlled release of proteins. *J. Control Release* **48**, 107-114.
7. Jin, F., Y. Cheng and K. Toda. 1988. Distribution model for the intact urokinase and urokinases modified by soluble macromolecules in rat and mouse bodies. *Radioisotopes* **27**, 441-447.
8. Kim, D. and J. F. Robyt. 1994. Selection of *Leuconostoc mesenteroides* mutants constitutive for glucansucrases. *Enzyme Microbiol Technol.* **16,** 1010-1015.
9. Kim, D., K. H. Park and J. F. Robyt. 1998. Acarbose effect for dextran synthesis, acceptor and disproportionation reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase. *J. Microbiol. Biotechnol*. **8**, 287-290.
10. Kim, D., Y. M. Kim, M. R. Park and D. H. Park. 1999. Modification of Acetobacter xylinum bacterial cellulose using dextransucrase and alternansucrase. *J. Microbiol. Biotechnol*. **9**, 704-708.
11. Kim, D., Y. M. Kim, M. R. Park, H. J. Ryu, D. H. Park and J. F. Robyt. 1999. Enzymatic modification of cellulose using *Leuconostoc mesenteroides* B-742CBM dextransucrase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 529-533.
12. Kobayashi, M and K. Matsuda. 1974. The dextransucrase isoenzymes of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Biochim. Biophys. Acta.* **370**, 441-449.
13. Leathers, T. D. 2005. Dextran. In biotechnology and Bioploymer. pp. 575-597, Vol. **1,** Wiley-VCH.
14. Mikolajczyk, S. D., D. L. Meyer, R. Fagnani, M. S. Hagan, K. L. Law and J. J. Starling. 1966. Dextran modification of a Fab β-lactamase conjugate modulated by variable pre-treatment of Fab with amine-blocking reagents. *Bioconjug. Chem.* **7**, 150-158.
15. Miller, A. W and J. F. Robyt. 1986. Functional molecular size and structure of dextransucrase by radiation inactivation and gel electrophoresis. *Biochimi. Biophysi. Acta.* **870**, 198-203.
16. Paul, F. D. E., Auriol and P. Monsan. 1984. Production and purification of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 (F). In Enzyme engineering 7, A. I. Laskin, G.T. Tsao, and L. B. Wingard, pp. 267-271. New York Academy of Science, New York, NY.
17. Robyt, J. F. 1986. Encyclopedia of polymer science and technology, pp. 752-767, 4th eds., John Wiley & Sons, New York, USA.
18. Teien, A. N., R. Odegard and T. B. Christensen. 1975. Heparin coupled to albumin, dextran and ficoll: influence on blood coagulation and platelets, and *in vivo* duration. *Thromb. Res.* **7**, 273-284.
19. Tsuchiya, H. M., H. J. Koepsell, J. Corman, J. Bryant, G. Bogard, V. H. Feger and R. W. Jackson. 1952. The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol*. **64**, 5241-5246.
20. Tsuchiya, H. M. 1960. Detxransucrase. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**, 1777-1788.
21. Yoo, S. K., D. O. Kim and D. F. Day. 2001. Co-production of dextran and mannitol by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Microbiol. Biotechnol*. **11**, 880-883.
22. Yoo, S. K., S. S. Hur, K. M. Kim, S. H. Song and K. S. Whang. 2005. Optimization of mannitol production by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY. *J. Life Sci.* **15**, 374-381.

계명대학교 | IP: 114.71.5.212 | Accessed 2016/03/25 15:23(KST)