

Agrobacterium sp. ATCC 31750의 고농도 세포배양

장정균, 차월석, 강시형, 박재익, 이증현

조선대학교 화학·고분자공학부

(062) 230-7218, FAX (062) 230-7226

Abstract

Agrobacterium sp. ATCC 31750(formerly *Alcaligenes faecalis* subsp *myxogenes*) was used to produce curdlan. Since the curdlan is secondary metabolite, it is important for curdlan production to increase cell concentration.

The fedbatch operation was used to increase cell concentration with addition of carbon and nitrogen sources. When the initial sucrose concentration was 20g/L, it was consumed in 24 hrs and the cell concentration was 6g/L in a batch culture. The sucrose solution(200g/L) was fed to control the sucrose concentration above 10g/L.

서론

미생물이 생산하는 다당(polysaccharide)은 식품, 화장품, 석유산업 및 제지산업 등 각종 산업의 중요한 소재로 사용되어 왔으며, 최근에는 콘크리트 구조강화제로서의 새로운 용도가 개발되었다(1). 이러한 다당은, curdlan, pullulan, zooglan, gellan, alginate 및 welan 등이 대표적인 것이다. 그중 커들란은 *Alcaligenes* 또는 *Agrobacterium* 속 균주가 생산하는 포도당이 베타-1,3 결합을 한 다당으로 1966년 일본의 Harada 그룹에 의해서 처음 발견되었으며, *Agrobacterium* sp. ATCC 31750 균주에 의해서 현재 가장 많은 curdlan이 생산되어지고 있다(2,3).

본 연구에서는 curdlan의 생산을 위한 고농도 세포를 생산하기 위하여 유가식 배양 방법 및 유량제어 기법을 개발하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 *Agrobacterium* sp. ATCC 31750으로서 종전에는 *Alcaligenes faecalis* subsp. *myxogenes*로 분류되었었다. 종배양 배지는 20 g/L sucrose, 5 g/L yeast extract, 그리고 5 g/L peptone, pH 7.0으로 이루어졌다. Batch 및 fed batch 배양액은 리터 당 30 g sucrose, 2.3 g NH_4Cl , 1 g KH_2PO_4 , 0.4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20mL의 미량원소 용액(0.1N HCl 1 리터에 5g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1g $\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 그리고 1g ZnCl 을 녹여서 만듦)이며 pH는 7.0으로 이루어졌다. 유가식 배양액의 공급액은 설탕의 농도가 10g/L 이하로 떨어졌을 때 15g/L 정도의 농도가 되도록 공급하였다. 5리터 발효조에서의 조업은 다음과 같이 수행하였다. 종배양 배지(200mL)에 균주를 접종하여 30°C에서 17시간 동안 진탕배양기에서 배양한 뒤, 그 배양액을 1.9 리터의 발효배지를 함유한 5리터 발효조에 옮겼다. 5리터 발효조에서 배양액의 pH는 암모니아수(14%)로 7.0으로 조절하여 세포 성장을 관찰하였다. 통기량은 0.3vvm으로 유지하였다(4).

분석방법

균체는 건조중량을 측정함으로써 결정하였다. 배양액 시료를 적절히 희석하여 4°C에서 30분간 5000rpm으로 원심분리하여 침전물을 증류수로 세척하여 105°C에서 24시간 건조하여

질량을 측정하였다. 탄소원으로 사용한 설탕의 농도는 phenol-H₂SO₄법을 이용하여 측정하였다(5).

결과 및 고찰

Batch culture를 통한 cell mass의 증가는 fig. 1에서 같이 리터당 6g 정도의 cell이 생산되었으며 설탕의 농도는 24시간 경과 후에 10g 이하로 떨어졌다. 따라서 고농도 cell을 생산하기 위한 유가식 배양의 공급액은 24시간 전후에 투입하였다. 공급액의 투입은 fig. 2에서 보여지는 것과 같이 24시간과 40시간에 투입하였다.

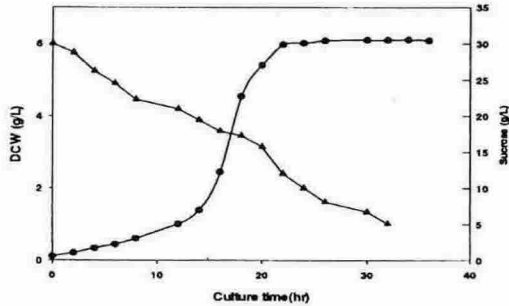


Fig. 1. Production of cell in batch culture. (● DCW ▲ sucrose)

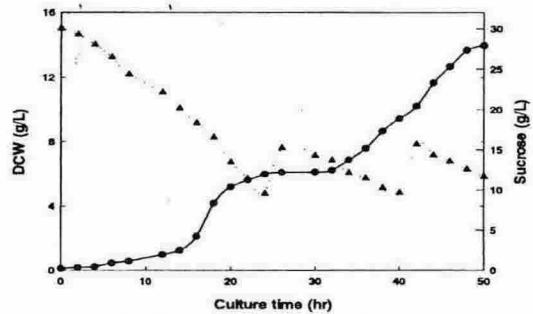


Fig. 2. Production of cell in fed-batch culture. (● DCW ▲ sucrose)

요약

Agrobacterium sp.에 의해 생산되는 커들란은 2차 부산물이기 때문에 이의 생산을 증대시키기 위해서는 고농도 세포배양이 필요하다. 본 연구에서는 고농도 세포배양을 실현하기 위하여 탄소원과 질소원을 제어 공급하는 방법을 이용하였다. 초기 탄소원의 농도가 20 g/L일 때 24시간 내에 모두 소모되었으며 생산된 세포의 농도는 6g/L였다. 고농도의 탄소원을 이용하여 배양조내의 설탕의 농도가 10g/L 이상이 되도록 제어하는 방법을 사용하였다.

참고문헌

1. Crescenzi, V. (1995), Microbial polysaccharides of applied interest, *Biotechnol. Prog.*, 251-259.
2. Paul, F., A. Morin, and P. Monsan (1986), Microbial Polysaccharides with actual potential industrial applications, *Biotechnol. Adv.*, 4, 245-259.
3. Harda, T., K. Fujimori, S. Hirose, and M. Masada (1996), Growth and β -Glucan 10C3 K production by a Mutant of *Alcaligenes faecalis* var *myxogenes* in Defined Medium, *Agr. Biol. Chem.*, 30, 764-769.
4. Phillip, K. R. and H. G. Lawford(1983), Curdlan : Its Properties and production in Batch and Continuous fermentations, *Prog. Ind. Microbiol.*, 18, 201-229.
5. M.Dubios, K.A.Gilles, J.K.Hamilton, P.A.Roberts and Fred smith (1958): Colorimetric Methods for Determination of Sugar and Related Substance, *Anal. Chem.*, 28, 350-356.