

Pseudomonas sp.의 連續培養에 있어서의 細胞의 收率 및
化學的 組成에 미치는 溫度的 影響

金 昌 珍 · 李 永 祿

(高麗大學校 大學院 生物學科)

Effects of temperature on the biomass yield and the chemical
composition of *Pseudomonas* cells in continuous culture.

KIM, C.J. and Y.N. LEE

(Dept. of Biology, Graduate School, Korea University)

ABSTRACT

Effects of temperature on the growth characteristics and the chemical composition of *Pseudomonas* cells grown under glucose-or methanol-utilizing continuous culture were studied.

In a glucose-utilizing continuous culture, optimum dilution rate, agitation, pH, and temperature, for the higher biomass yield were 0.45hr⁻¹, 7000rpm, pH 7.5, and 30°C, respectively. But, in a methanol-utilizing continuous culture, they were 0.125hr⁻¹, 600rpm, pH 8, and 30°C, respectively. In the glucose-utilizing continuous culture, the maximum production rate of the cells was 1.48g. dry wt./1/hr at a dilution rate of 0.45hr⁻¹, and the cell yield was 0.46g. dry wt./g. glucose.

In the methanol-utilizing continuous culture, the maximum production rate of the cells was 0.33 g. dry wt./1/hr. at a dilution rate of 0.125hr⁻¹ and the cell yield was 0.44g. dry cell/g. methanol.

The contents of protein of the cells increase with the increase ingrowing temperature (from 15 to 30°C), more or less, while the contents of RNA and carbohydrate of the cells decreased. However, DNA contents of cells growth under the various temperature ranges didn't change.

As the temperature of cultivation rises at a constant dilution rate, the efficiency of RNA in protein synthesis was increased, showing the decreases in the ratio of RNA to protein.

緒 論

著者들은 우리 나라 자연환경에서 메탄올을 資化하는 *Pseudomonas* sp. 161을 分離하여 그 특성을 조사하고 (Lee et al. 1978), 그 生體量 收率에 미치는 炭素源의 影響(Joo and Lee)과 이에 따른 代謝活性의 變化(Bae and Lee, 1982) 등을 추적하여 보고한 바 있다. 本研究에 있어

서는 이 *Pseudomonas* sp.의 連續培養에 있어서의 細胞의 收率 및 化學的 組成에 미치는 溫度的 影響을 조사하여 몇 가지 所見을 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

본 연구실에서 分離 同定한 메탄올 資化細菌

인 *Pseudomonas* sp. (Strain No. 161)을 실험 재료로 사용하였다.

2. 培地의 組成

Kouno *et. al.* (1973)의 BMM培地(Basal Methanol Medium), 또는 이培地에서 메탄올을 포도당으로 대체한 포도당 배지를 사용하였다. BMM培地의 組成은 다음과 같다. $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 3g; kH_2PO_4 2g; K_2HPO_4 7g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g; Yeast extract 0.1g; Biotin $10\mu\text{g}$; Thiamin-HCl $100\mu\text{g}$; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2mg에 1% 메탄올과 증류수를 가해 1l가 되게 한다.

3. 連續培養

연속배양은 New Brunswick Bioflo Model C-30 Chemostat로 행하였는데, 그 조작은 다음과 같이 하였다. 먼저 Chemostat의 滅菌할 부분을 멸균하여 設置하고 medium pump를 이용하여 medium reservoir에서 배양조로 培地를 흘려보내 培地가 배양조에 거의 차게 되었을 때 pumping을 중단하고 BMM 배지에서 3일간 전배양한 種菌 10ml를 接種하였다. 이어 Chemostat의 조절기구를 作動시키고, batch 狀態에서 細胞의 生長이 뚜렷이 일어나면 (약 6時間後) medium pump를 다시 작동시켜 일정량의 배지를 흘려보내고 流出되는 배지는 수확조에 수집하였다. 15~20시간 후면 細胞의 濃度가 一定한 狀態(steady state)에 이르게 되는데 이때의 배양조 속의 현탁액을 얻어 細胞의 生長률과 培養餘液의 基質濃度 등을 測定하였다.

4. 生長率 및 菌體收率의 測定

細胞의 生長률은 steady state에 있어서의 배양액의 吸光度를 660nm에서 측정하여 구하거나, 배양액 40ml를 10,000rpm에서 10분간 원심분리시킨 후 증류수로 세척하여 105°C 에서 하룻밤 동안 건조시켜 건조중량으로 測定하였다.

steady state에 있어서의 菌體의 收率は $Y = X/(S_0 - S)$ 로부터 산출하였고, 菌體生産率 $P = DX$ 로부터 구하였다. 여기서 Y는 菌體收率, X는 菌體濃度, S_0 는 培養 初期의 基質濃度, S는 steady state에 있어서의 발효조 내의 기질농도를 나타내고, P는 菌體生産率, D는 稀釋率을 나타낸다.

5. 基質의 濃度測定

培養餘液 속의 메탄올의 농도는 Boos and

Rahway (1948)의 방법에 따라 KMnSO_4 를 써서 메탄올을 포름알데히드로 산화시킨 다음 크로모트로프산으로 發色시켜 580nm에서의 吸光度로 測定하였다. 또한 배양액 속의 포도당의 농도는 Somogi (1952)의 방법에 따라 측정하였다.

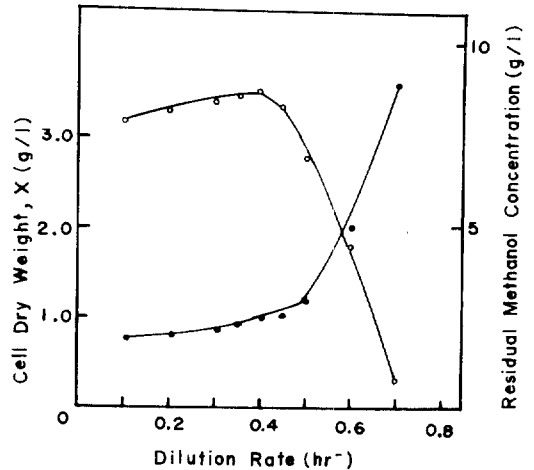


Fig. 1. Effect of dilution rate on the cell growth and residual glucose concentration in continuous culture of *Pseudomonas* sp. using glucose as a carbon source: ○—○, Cell growth, ●—●; methanol concentration.

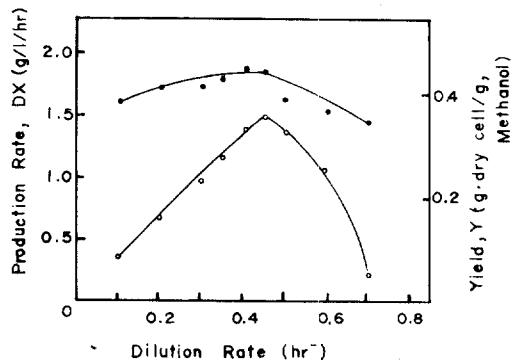


Fig. 2. Effects of dilution rate on the production rate and biomass yield in continuous culture of *Pseudomonas* sp. using glucose as a carbon source. ○—○; production rate, ●—●; biomass yield.

6. 細胞의 分割

수확한 세포는 전과 같은 방법(Lee and Lee, 1972)으로 분획하여 정량하였다. 즉, 細胞는 먼저 50mM phosphate buffer (pH 7.0)로 두 번

씻은 다음 5%의 cold PCA (perchloric acid)로 냉산가용성 물질을 추출하고 지질은 EtOH: Ether (3:1)로 세 번 계속 추출하였다. 酸不溶性 非脂質 標品은 Schmidt-Thanhauser (1945)의 방법에 따라 0.5N KOH로 처리하여 37°C에서 16~18시간 동안 RNA를 가수분해 시켜 불용성인 침전물(다당류)을 제거하고 5%의 PCA로 증화한 후 같은 량의 PCA를 가하여 2.5% 용액이 되도록 하였다. 상등액(RNA 분획)을 원심분리로 분리하고 침전된 DNA단백은 5% PCA로 90°C에서 15분간 가열하여 DNA를 가수분해 시킨 후 단백질을 분리하였다.

7. 分析

각 분획기에 있어서의 炭水化物的 含量은 Scott and Melvin (1953)의 방법에 따라 Anthrone으로 처리하여 정량하였고, 핵산의 含量은 DNA 및 RNA 분획의 흡광도를 260nm에서 측정하였다.

Schmidt-Thanhauser의 방법으로 분리한 세포의 RNA 분획에는 다량의 단백질이 용출되므로 (Aoki and Hase, 1964) 잔여 단백질 분획과 RNA 분획은 그 일부를 취하여 6N H₂SO₄로 가수분해시킨 후 아미노산의 양을 Ninhydrin 반응으로 정량하여 (Troll and Cannn, 1953) 각각 alkali-stable protein과 alkali-labile protein의 含量을 측정하였다.

結果 및 考察

3. 細胞의 生長 및 收率에 미치는 稀釋率의 影響

炭素源으로 포도당을 사용한 *Pseudomonas*의 연속배양에 있어서 희석율의 변화에 따른 細胞의 生長과 포도당의 소비량과의 상관관계를 Fig. 1에 표시하였다. 細胞의 生長은 희석율이 증가함에도 불구하고 거의 일정한 값을 나타내었으나 D=0.45hr⁻¹ 이상에서는 급격히 감소하였고, D=0.70hr⁻¹ 이상에서는 거의 wash out 되었다.

한편 稀釋率에 따른 菌體의 生産率과 基質에 대한 菌體의 收率의 변화는 Fig. 2에 표시하였다. 최고의 菌體收率은 D=0.40hr⁻¹에서 얻어졌는데 그 값은 0.46 g-dry weight/g-glucose였다. 그러나 菌體生産率을 기조로하여 최적희석율을

구한다면 그 값은 0.45hr⁻¹ 이었고, 이 때의 菌體生産率은 1.480g dry wt./l/hr 이었다.

탄소원으로 메탄올을 사용한 *Pseudomonas*의 연속배양에 있어서 희석율의 변화에 따른 菌體의 生長과 메탄올 소비량과의 관계를 Fig. 3에 표시하였다. 희석율이 증가함에 따라 발효조 내의 菌體의 濃度는 점차로 감소하였고, D=0.125hr⁻¹ 이상에서는 급격히 감소하여 D=0.225hr⁻¹

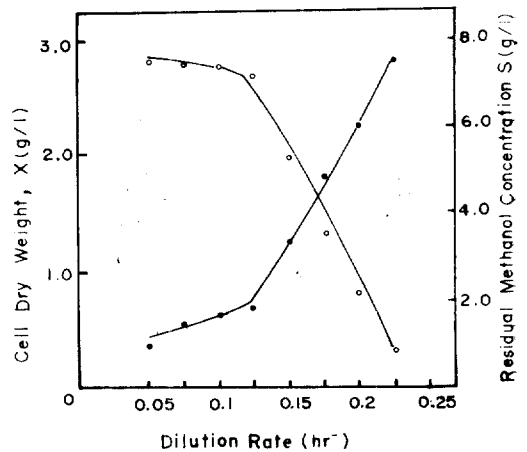


Fig. 3. Effects of dilution rate on the cell growth and residual methanol concentration in continuous culture of *Pseudomonas* sp. using methanol as a carbon source. ○—○; cell dry weight, ●—●; residual methanol concentration.

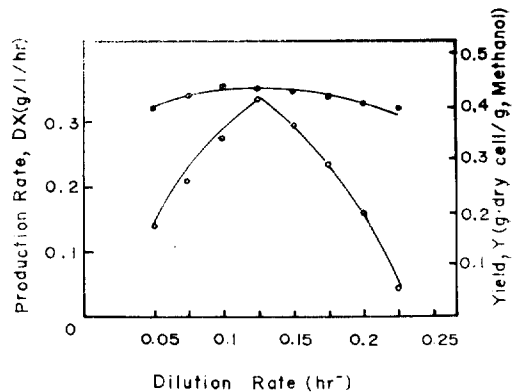


Fig. 4. Effects of dilution rate on the production rate and biomass yield in continuous culture of *Pseudomonas* sp. using methanol as a carbon source. ○—○; production rate, ●—●; biomass yield.

에서는 거의 wash out 되었다. 한편 희석률에 따른 菌體生産率과 基質에 대한 菌體收率의 변화는 Fig. 4에 표시하였다. 최대의 菌體收率は $D=0.1hr^{-1}$ 에서 얻어졌는데 그 값은 0.44g dry wt./g. methane에 달하였다. 最大의 菌體生産率は $D=0.125hr^{-1}$ 에서 얻어졌는데, 그 값은 0.337g·dry wt./l/hr. 이었다. 연속배양 중 상당량의 基質이 소비되지 않고 남아 있었는데 최적 희석률에 있어서도 배지의 기질 농도는 약 25% 정도가 이용되지 않고 남아 있었다.

2. 細胞의 生長에 미치는 溫度 및 다른 환경요인의 影響

*Pseudomonas*의 연속배양에 있어서 細胞의 生長에 미치는 溫度 및 攪拌效果를 Fig. 5 및 Fig. 6에 각각 표시하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 供試菌株는 30°C에서 가장 잘 자랐으나 45°C 이상의 溫度에서는 거의 자라지 아니하였다. 따라서 본 實驗에 사용한 *Pseudomonas* sp.는 好中溫性菌株임을 알 수 있었다. 배양조 속의 培地는 Magnetic Stirrer로 계속 攪拌하였는데, Fig. 6에서 보는 바와 같이 細胞의 生長은 메탄올 배지에서나 포도당 배지에서 다같이 600rpm의 교반으로 극대치에 달하였다.

*Pseudomonas*의 연속배양에 있어서의 탄소원의 농도 및 pH의 변화에 따른 細胞의 生長差를 Fig. 7 및 Fig. 8에 각각 표시하였다. Fig. 7에

서 보는 바와 같이 供試菌株는 炭素源으로 메탄올을 사용하였을 때에는 1%의 메탄올 농도에서 극대의 生長을 하였고, 2%의 메탄올농도에서도 비교적 잘 자란다는 것을 알 수 있었다. 그러나

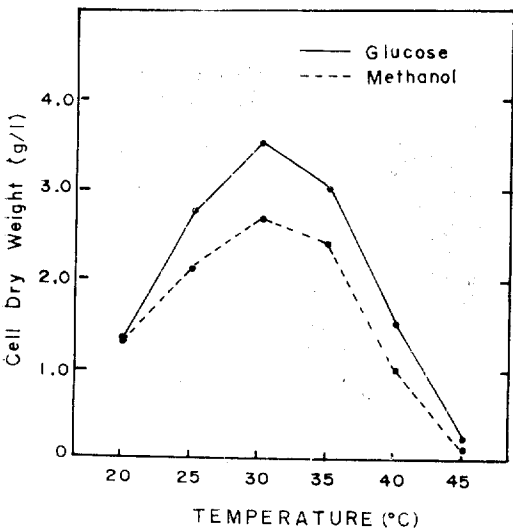


Fig. 5. Effect of temperature on the bacterial growth in continuous culture.

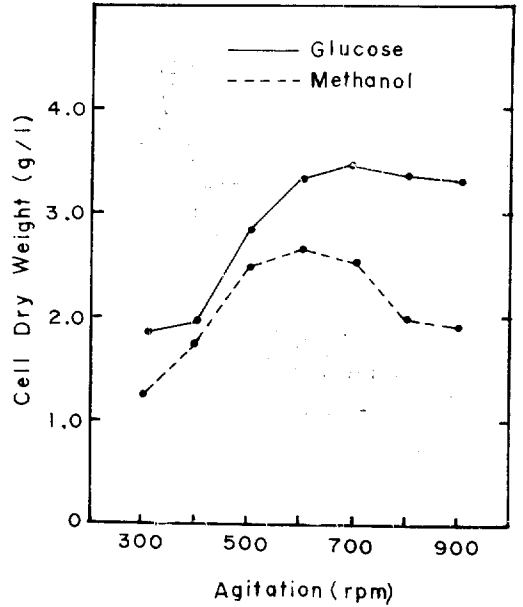


Fig. 6. Effect of agitation on the bacterial growth in continuous culture.

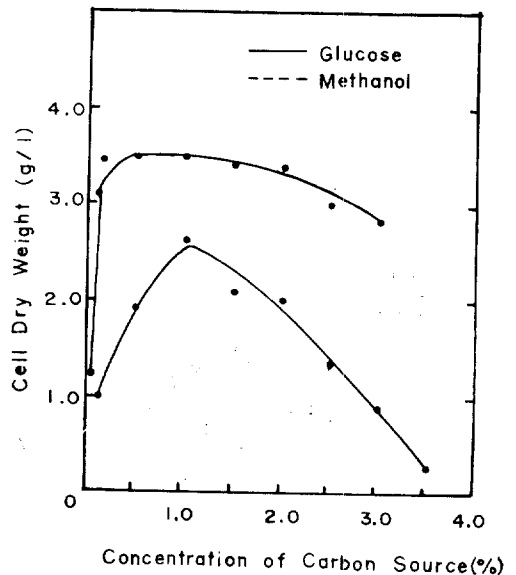


Fig. 7. Effect of substrate concentration on the bacterial growth in continuous culture.

보다 높은 메탄올 농도에서는 심한 독성효과가 있었다. 炭素源으로 포도당을 사용하였을 때에는 0.5%의 포도당 농도에서 極大의 生長을 하였고, 3% 이상의 포도당 농도에서도 메탄올의 경우와는 달리 독성효과를 나타내지는 아니하였다. 연속배양 중 一定한 pH를 지속시키기 위해서는 1N HCl과 5N NaOH 용액을 써서 자동적인 titration system을 활용하였는데, Fig. 8에서 보는 바와 같이 細胞의 生長은 BMM 배지나 포.

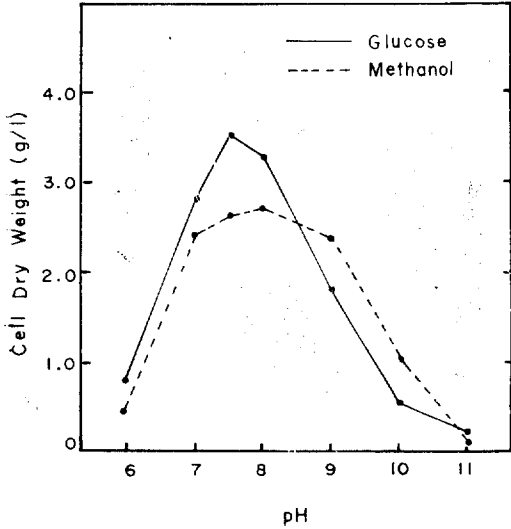


Fig. 8. Effect of pH on the bacterial growth in continuous culture.

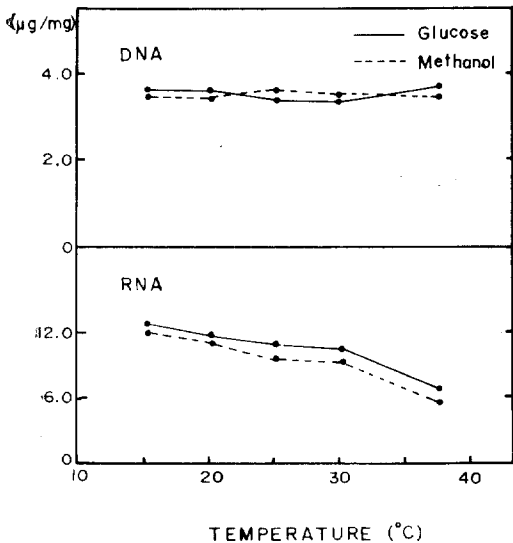


Fig. 9. Effect of temperature on the DNA and RNA content of the cells grown in continuous culture using different carbon source.

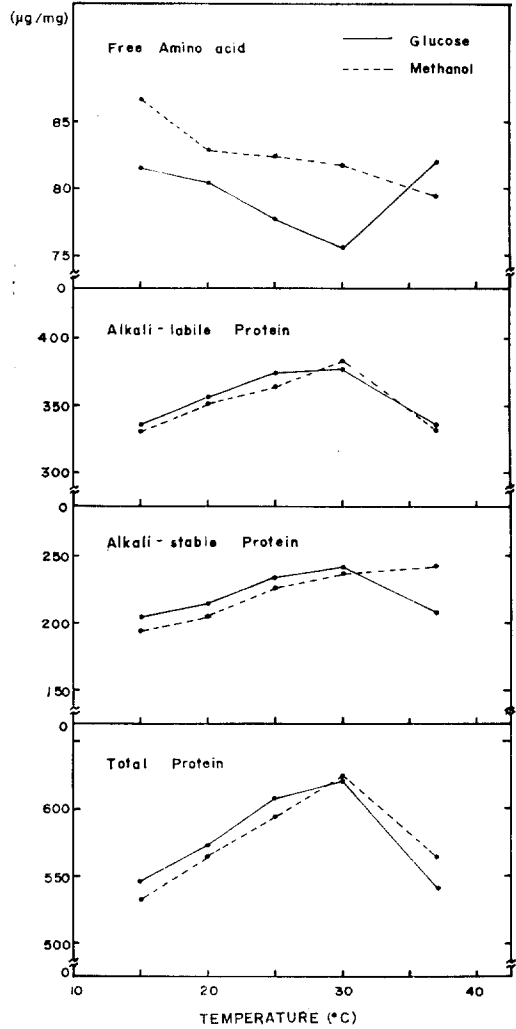


Fig. 10. Effect of temperature on the content of ninhydrin reactive substances in each fraction of the cells grown in continuous culture.

도당 배지를 막론하고 pH 7~8에서 극대의 生長率을 나타내었다.

3. 菌體의 化學的組成에 미치는 溫度의 影響

炭素源을 달리하는 *Pseudomonas*의 연속배양에 있어서의 生育溫度에 따른 細胞의 DNA 및 RNA 含量의 變化를 Fig. 9에 표시하였다. 細胞의 DNA 含量은 生育溫度와는 관계없이 거의 일정한 값을 나타내었으나 RNA 含量은 供試溫度 범위 내에서는 溫度가 증가함에 따라 현저히 감소하는 경향을 나타내었다. Fig. 10에서는 生育溫度에 따른 細胞의 여러가지 分割에 있어서의

닌히드린 반응물질의 含量象化를 표시하였다. Fig. 10에서 보는 바와 같이 유리 아미노산을 포함하는 cold PCA 可溶性 分割의 닐히드린 반응물질의 함량은 탄소원에 관계없이 30°C 까지는 溫度가 增加함에 따라 점차로 감소하였다. 그러나 전체 단백질 함량은 供試溫度 범위 내에서는 온도가 높아짐에 따라 점차로 增加하여 30°C에서 極大值를 나타내었다. 炭素源으로 메탄올을 사용한 細胞의 단백질 함량은 비교적 낮은 生育溫度에서는 포도당을 사용한 細胞의 그것보다 약간 감소하였으나, cold PCA 可溶性 닐히드린

反應物質의 양은 포도당에서 자란 細胞의 그것보다 오히려 높은 값을 나타내었다. 그러나 비교적 높은 溫度(37°C)에서 자란 細胞에 있어서는 오히려 그 反對였다. Fig. 11에서 보는 바와 같이 탄소원으로 포도당을 사용한 세포의 전체 炭水化合物 含量은 메탄올에서 자란 細胞의 그것에 비해 생육온도에 관계없이 약간 증가하였다.

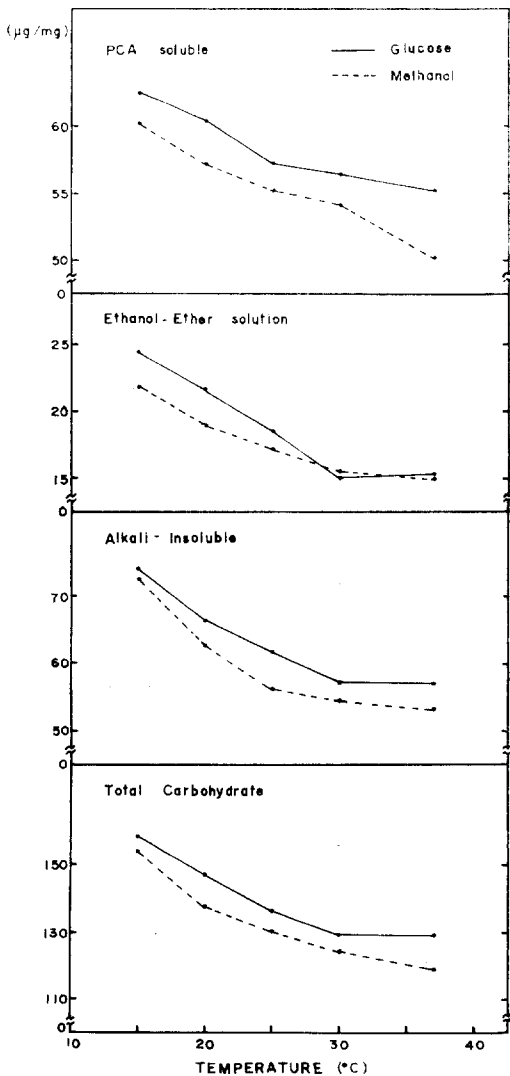


Fig. 11. Effect of temperature on the carbohydrate content of the cells grown in continuous culture using different carbon sources.

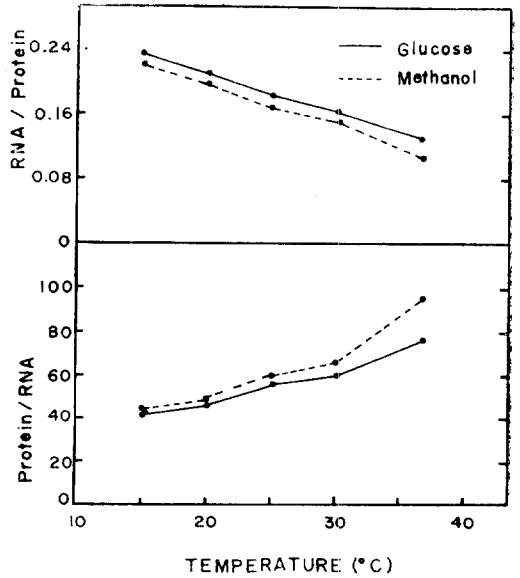


Fig. 12. Efficiency of RNA in protein synthesis as a function of temperature.

그러나 이들 細胞의 炭水化合物 含量은 어떤 炭素源에서 자랐거나 간에 生育溫度가 높아짐에 따라 조금씩 減少하는 경향을 나타내었다.

이러한 結果는 Farrell and Rose (1967) 및 Brown and Rose (1968) 등이 *Candida utilis*의 연속배양에서 溫度가 增加함에 따라 細胞의 炭水化合物 含量이 약간씩 감소한다고 한 보고와 잘 부합된다. 그리고 蛋白質 合成에 있어서의 RNA의 效率의 변화를 Fig. 12에 표시하였다. Fig. 12에서 보는 바와 같이 일정한 稀釋率에서는 溫度가 增加함에 따라 細胞의 蛋白質 含量에 대한 RNA 含量의 비율이 감소하는 경향을 나타내어 供試溫度 범위 내에서는 溫度가 增加함에 따라 蛋白質 合成에 있어서의 RNA의 效率은 증가함을 알 수 있었다. 이러한 結果는 Alroy and Tannenbaum(1973)에 의한 *Candida utilis*에서의 실험 結果와 비슷하다.

摘 要

메탄올 및 포도당을 각각 탄소원으로 하는 *Pseudomonas* sp.의 連續培養에 있어서의 細胞의 收率에 미치는 稀釋率, 基質의 濃度, 攪拌, pH 및 溫度 등의 影響을 측정 比較하고, 生育溫度에 따른 菌體의 化學的 組成의 變化를 추적하였다.

供試菌株의 최적생장을 위한 배양조건은 1%의 탄소원에서 30°C, pH 7~8, 攪拌率 600rpm이었다. 탄소원으로 메탄올을 사용하였을 때의 최적 회색율은 0.125hr⁻¹ 이었고, 菌體生産率은 0.337g.dry weight/l/hr, 菌體收率은 稀釋率 0.10hr⁻¹에서 0.44g.dry weight/g.Methanol이었다. 탄소원으로 포도당을 사용하였을 때의 최적 회색율은 0.45hr⁻¹이었고, 菌體生産率은 1.48g.dry weight/l/hr, 菌體收率은 稀釋率 0.40hr⁻¹에서 0.46g.dry weight/g. glucose이었다.

生育溫度에 따른 細胞의 化學的 組成의 變化는 RNA 및 炭水化物 含量이 供試溫度 범위 내에서는 온도가 증가함에 따라 약간 감소하는 경향을 나타내었으나, 蛋白質 含量은 온도가 증가함에 따라 약간씩 증가하여 30°C에서 極大值를 나타내었다. 그러나 DNA 含量은 거의 同一하였다. 一定한 稀釋率에서는 溫度가 증가함에 따라 단백질 함량에 대한 RNA 함량의 比率이 감소하는 경향을 나타내어 供試溫度 범위 내에서는 溫度가 增加함에 따라 蛋白質 合成에 있어서의 RNA의 効率は 增加함을 알 수 있었다.

引 用 文 獻

1. Alroy, Y., and S.R. Tannenbaum, 1973. The influence of environmental condition on the macromolecular composition of *Canada utilis*. *Biotech. Bioeng.*, **15**, 239~256.
2. Aoki, S. and E., Hase, 1964. De-and Regeneration of chloroplast in the cells of *Chlorella protothecoides*. 1. Synthesis of nucleic acid and protein in relation to the process of regeneration of chloroplast. *Plant and Cell Physiol.*, **5**, 474~484.
3. Bae, K.S., and Y.N. Lee, 1982. Studies on the metabolic activities of *Pseudomonas* sp. in different Carbon Sources. *Kor. J. Microbiol.*, **16**, 161~172.
4. Boos, R.N., and N.J. Rahway, 1968. Quantitive colorimetric microdetermination of methanol with chromotropic acid reagent. *Anal. Chem.*, **20**, 964~965.
5. Brown, C.M., and A.H. Rose, 1968. Effects of temperature on composition and cell volume of *Candid utilis*. *J. Bacteriol.*, **97**, 261~172.
6. Farrell, T., and A.H. Rose, 1967. Temperature effects on microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, **21**, 101~120.
7. Joo, M.J., and Y.N. Lee, Effects of carbon

- sources and dilution rate on the biomass yield of methanol utilizing *Pseudomonas* sp. in continuous culture. *The Sciences and Technologies Korea Univ.* **22**, 155~160.
8. Kouno, K., T. Oki., H. Nomure, and A. Ozaki, 1973. Isolation of new methanol-utilizing bacteria and its thiamine requirement for grow. *J. Gen. Microbiol.*, **19**, 11~20.
9. Lee, Y.N., and C.S. Lee, 1972. Effect of glucose on the growth and composition of *Chlorella* cells in continuous culture. *The Sciences and Technologies, Korea Univ.*, **13**, 35~40.
10. Lee, Y.N., K.S. Bae. and C.H. Park, 1978. A biological study on the methanol-utilizing bacteria. *Kor. J. Microbiol.*, **16**, 170~179.
11. Schmidt, G., and S.J. Thanhauser, 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **161**, 83~89.
12. Scott, T.A., and E.H. Melvin, 1953. Method in carbohydrate analysis. *Anal. Chem.*, **25**, 1650.
13. Somogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19~23.
14. Troll, W., and R.K. Cannon, 1953. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino acid and imino acid. *J. Biol. Chem.*, **200**, 803~811.