

SCP 생산용 메탄올 자화균주의 연속배양에 의한 배지 최적화

김 창 호 · *김 태 진 · 홍 석 인
고려대학교 화학공학과
*수원대학교 화학공학과

The Medium Optimization through Continuous Culture of an Methanol Utilizing Bacterium for SCP Production

Chang-Ho Kim, Tai-Jin Kim* and Suk-In Hong
Department of Chemical Engineering, Korea University
*Department of Chemical Engineering, Suwon University

ABSTRACT

Methanol-utilizing bacterium isolated from sewage samples in Seoul showed optimal temperature and pH of 33°C and 7.1 for growth, respectively. The maximum specific growth rate was 0.42hr⁻¹.

The minimum medium composition was reconstituted depending on the surplus and the deficit of each component in the basal medium at steady state. The optimal composition was given as(g/l):

Methanol 40, (NH₄)₂ SO₄ 2, KH₂PO₄ 1.5, K₂HPO₄ 0.2, H₃PO₄ 0.79, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.15, MgSO₄ · 7H₂O 1.5, FeSO₄ · 7H₂O 0.034, MnSO₄ · 4H₂O 0.005, CuSO₄ · 5H₂O 0.0027, CaCl₂ · 2H₂O 0.25, ZnSO₄ · 7H₂O 0.007, (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ · 4H₂O 0.00048, H₃BO₃ 0.00068, CoCl₂ 0.00024

Under the continuous culture with optimum medium the maximum cell productivity was 3.8g/l/hr at dilution rate 0.23hr⁻¹.

Maximum cell concentration and its protein content were 19.5g/l and 70% at dilution rate of 0.1hr⁻¹, respectively.

서 론

SCP(Single cell proteins)는 Bacteria, Algae, Yeast, Mold 와 같은 미생물의 건조세포를 총칭하는 말로서 1966년 C. L. Wilson에 의해서 처음으로 사용된 후 널리 사용되게 되었다.

SCP는 다음과 같은 세가지의 용도로 사용되어진다. 첫째 사람의 단백질 공급원으로, 둘째 향료와 같은 식품 첨가제로, 셋째 가축의 사료로 사용되어진다. 이와같이 식품으로 사용되기 위하여는 독성 및 병원성이 없어야 하고 핵산의 함유량이 낮아야 하며 소화가 잘되어야 한다.

현재 산업규모로 SCP 생산을 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 이때 가장 문제가 되는 것은 기질로 사용되는 탄소원의 비용이 기질의 종류에 관계없이 SCP 총생산비의 40-50%를 차지하는 것이다. 여기서 동기(Acration)와 반응열제거에 필요한 비용을 합하게 되면 총생산비의 65% 정도가 기질의 종류와 연관이 있다.

최근에 SCP 생산을 위한 탄소원으로 메탄올을 이용하는 것이 많이 연구되어졌다. SCP 생산을 위하여 메탄올을 이용하면 많은 장점이 있다. 메탄올은 다른 기질에 비하여 상대적으로 가격이 싸고, 화학공업에 의하여 대량생산되며 높은순도(99%이상)의 메탄올을 얻을 수 있다. 또한 메탄올은 물에 완전히 용해되므로 메탄올이 세포로 전달되는 과정인 물질전달의 문제가 없으며, 저장과 운반이 용이하고, 제한된 미생물만이 메탄올을 이용할 수 있으므로 오염문제를 최소화시킬 수 있다. 또한 메탄올 생산에 따른 산소요구량과 발생열량이 적다.

SCP 생산에 이용될 수 있는 많은 미생물 중에서 Bacteria와 Yeast에 관하여 많은 연구가 진행되었다. Bacteria는 세포내 함유단백질이 66-70%로 Yeast의 44-55%보다 높으며, 성장 속도가 빠른 장점이 있다. 한편 Yeast는 세포내 함유 단백질은 낮지만 핵산의 함유량이 Bacteria보다 낮고 세포의 크기가 크기 때문에 세포의 회수가 용이하다.

R. I. Mates 등은 연속배양 방식에 의한 배지 최적화에 관하여 보고 하였다. 이들은 단일 연속 발효조를 이용하여 균체수율(Y_x/s : Yield coefficient)를 계산하여 적정 메탄올량을 결정하였다.

L. Hoggstrom 등은 회분식 배양과 반연속배양, 단일연속배양, 두개의 발효조를 이용한 연속배양에서 SCP 생산성을 비교하였다. 두개의 발효조를 이용한 연속배양에서는 첫번째 발효조에서 고농도의 균체량을 얻은 뒤 반응기를 나오는 배양물을 다음 발효조로 보낸 후 첫번째 발효조를 통과한 공기를 다음 발효조의 통기에 이용하여 메탄올의 손실을 최소로 하였다. Shinji Goto는 Bacteria 세포의 일반적 조성을 이용하여 연속배양에 의한 배지에 최적화에 관한 연구를 하였다. 일반적 세포 조성에 의하여 만들어진 기본 배지를 이용하여 최소배지를 얻었다. 최소배지를 이용하여 다시 연속배양시켜 균체의 평형농도를 얻은 뒤 배지성분을 추가하여 최적배지를 얻었다. Teizi Urakami 등은 메탄올 자화균주인 BNK-84를 이용하여 장기간 연속배양시킨 후(200일간) 균체수율(Cell yield)과 세포내 함유단백질의 변화에 관하여 연구하였다. 균체수율은 배양시간이 경과함에 따라 점차 증가하여 최종적으로 48wt%를 얻었고 세포

내 함유단백질은 84wt%로 배양기간 동안 거의 일정하다고 보고하였다. 이밖에 SCP 생산성 및 경제성을 증가시키기 위한 새로운 차원에서 많은 노력이 진행 중이다. 돌연변이에 의한 균주의 개량으로 큰 세포를 얻음으로써 세포 회수를 용이하게한 방법, 유전자 조작에 의한 균주의 개량법 및 컴퓨터제어를 이용하여 생산 과정을 자동화하는 방법 등이 연구되어지고 있다.

본 실험에서는 하천에서 분리한 균주를 이용하여 플라스크 배양을 통하여 최적 온도, 최적 pH, 균체 비증식속도(Specific growth rate), Ks, Ki 값을 결정한 후 연속 배양에 의하여 최적 배지의 조성을 결정하였다. 빠르고 쉽게 최적배지를 구하기 위하여 Bacteria 세포의 일반적 구성비와 일반적으로 사용하는 배지의 구성비를 이용하였다.

Bacteria 세포의 일반적 구성비를 기준으로 얻은 기초 배지를 이용하여 희석속도 $0.1hr^{-1}$ 에서 균체의 평형농도를 얻었다. 이때의 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액의 조성비를 이용하여 최소 배지를 구하였다. 여기서 얻은 최소배지를 가지고 다시 희석속도 0.1에서 균체의 평형농도를 구한 뒤 일반적으로 균체의 배양을 위하여 사용되는 배지의 조성비와 최소배지의 조성비를 비교하여 차이가 심한 KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ 의 농도를 변화시키면서 최대균체 농도를 얻는 최적 배지를 구하였다. 최적배지를 이용하여 희석속도를 $0.05-0.25hr^{-1}$ 로 변형시키면서 균체 생산성(Cell productivity)이 가장 큰 희석 속도를 SCP 생산을 위한 연속배양의 최적조건으로 결정하였다.

재료 및 방법

사용배지

균주의 배양에 사용된 배지는 Table 1과 같다.

멸균하는 동안 불용성 침전의 형성을 방지하기 위하여 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 따로 멸균하였으며 메탄올은 배지를 멸균시킨 다음 넣어주었다. 한편 연속배양에 사용된 배지의 조성은 Table 2와 같다.

사용균주

서울시 강동구 중랑천에서 4차례 채취한 채취하였다. 채취한 흙 5g을 250ml 플라스크에 넣고 0.9% NaCl 용액 100ml 넣었다. 1시간 동안 회전식 진동기(B. Brown Co.)에서 진탕시킨 후 1시간 동안 방치하여 현탁액을 얻었다. 메탄올을 탄소원으로 이용하는 균주를 분리하기 위하여 Table 1의 채집배지를 이용하였다. 500ml 플라스크

Table 1. Composition of culture medium

| Component | | Medium | | |
|---|------|--------|------|------|
| | | MA | MB | MC |
| Methanol | (g) | 5 | 10 | 10 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | (g) | 1 | 3 | 3 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | (g) | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| K ₂ HPO ₄ | (g) | 3 | 5 | 5 |
| KH ₂ PO ₄ | (g) | 1 | 1.5 | 1.5 |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | (mg) | 2 | 2 | 2 |
| MnSO ₄ · 4H ₂ O | (mg) | 2 | 2 | 2 |
| Yeast extract | (g) | 0.1 | 0.1 | - |
| Agar | (g) | - | 15 | - |
| Distilled water | (mg) | 1000 | 1000 | 1000 |

* Medium MA was used for enrichment culture, MB for isolation and purification, and MC for culture experiments.

크에 채집배지 100ml을 넣고 현탁액 10ml을 접종한 후 30℃에서 회전식 진동기로 40시간 배양시켰다. 여기서 얻은 배양액 10ml를 다시 채집배지 100ml가 들어있는 500ml 플라스크에 접종하여 같은 방법으로 40시간

배양시킨 후 환천고형배지에서 평판배양시킨 다음 배양기에서 40시간 배양 후 나타난 단일한 균락을 이용하였다.

분석방법

Cell Mass

배양물을 0.9% Saline으로 10~70배로 희석하여 Spectronic 20(Bausch & Lomb Co.)로 600nm에서 측정하였다. 건조세포무게는 배양물 20ml를 pore직경이 0.2μm인 Micromembrane Filter(Gelman Co.)를 이용하여 여과한 후 100~105℃에서 건조시켜 측정하였다.

메탄올 농도측정

가스 크로마토그래피(Packard 437)를 사용하였다. 주입구(Injection), Column oven 및 검출기의 온도는 각각 300℃, 150℃, 300℃였다. 운반 가스는 질소 가스이며 수소가스와 공기를 연소 가스로 사용하였다. 노르말 부탄올을 내부표준용액으로 사용하여 0.4μl의 시료를 주입하였다.

배양액내의 질소량 측정

원심분리한 배양물의 상등액 20ml를 취하여 Kjeldahl 법에 의하여 잔여 질소량을 측정하였다.

Table 2. Relative concentration of individual elements in bacteria cells, commonly used cultivation media and calculated composition of basal medium

| Element | Cell (A) | Medium (B) | Component | Basal Medium | | | | | |
|---------|----------|------------|--|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|
| | | | | Methanol 20g / l | | Methanol 30g / l | | Methanol 40g / l | |
| | | | | A | B | A | B | A | B |
| N | 100 | 100 | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5.26g | 5.26g | 7.89g | 7.89g | 10.53g | 10.53g |
| P | 23 | 176 | KH ₂ PO ₄ | 0.165g | 2.315g | 0.248g | 3.47g | 0.33g | 4.63g |
| K | 14 | 201 | K ₂ HPO ₄ | 0.25g | 3.48g | 0.37g | 5.22g | 0.50g | 6.96g |
| S | 8.9 | 59 | Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O | 0.27g | | 0.405g | | 0.54g | |
| Mg | 4.9 | 15 | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.525g | 1.725g | 0.787g | 2.59g | 1.01g | 3.45g |
| Na | 3.2 | 66 | FeSO ₄ · 7H ₂ O | 0.017g | 0.115g | 0.026g | 0.17g | 0.034g | 0.23g |
| Ca | 3.0 | 11 | MnSO ₄ · 4H ₂ O | 2.5mg | 8mg | 3.8mg | 12mg | 5mg | 15mg |
| Cl | 2.5 | 123 | CaCl ₂ · 2H ₂ O | 0.125g | 0.480g | 0.188g | 0.72g | 0.25g | 0.96g |
| Fe | 0.3 | 2.2 | NaCl | | 1.880g | | 2.82g | | 3.76g |
| Zn | 0.14 | 0.13 | CuSO ₄ · 7H ₂ O | 1.4mg | 1.50mg | 2mg | 2.1mg | 2.7mg | 2.8mg |
| Cu | 0.03 | 0.04 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₄ · 4H ₂ O | 7mg | 7mg | 11mg | 11mg | 14mg | 14mg |
| Mn | 0.05 | 0.15 | H ₃ BO ₃ | 0.24mg | 10.8mg | 0.36mg | 16.2mg | 0.48mg | 21.6mg |
| Co | 0.003 | 0.02 | CoCl ₂ | 0.34mg | 0.55 | 0.51mg | 0.83mg | 0.68mg | 1.1mg |
| Mo | 0.002 | 0.09 | H ₃ PO ₄ | 0.12mg | 0.8mg | 0.18mg | 1.2mg | 0.24mg | 1.6mg |
| B | 0.006 | 0.01 | | 0.350g | 0.65g | 0.53g | 0.98g | 0.70g | 1.30g |

상등액 20ml에 증류수 30ml와 0.1N NaOH를 50ml 넣은 후 2/3를 증발시켰다. 이때 발생하는 암모니아를 0.2N H₂SO₄에 흡수시켜 0.2N NaOH로 적정하였다.

세포내 단백질량의 측정

완전히 건조된 세포 30ml을 분해촉매 CuSO₄(1g) + K₂SO₄(9g) 1g과 진한 황산 7ml 그리고 H₂O₂용액 1ml를 가한 후 투명한 푸른색이 나타날때 까지 가열하였다. 이렇게하여 얻은 시료를 Kjeldahl방법으로 질소의 양을 측정하였다. 단백질을 평균하여 16%의 질소를 포함하고 있으므로 Kjeldahl 방법으로 측정할 질소의 값에 6.25를 곱하여 단백질 함량을 구하였다.

배양조건

고체배지에서 따온 균락을 집종하여 33℃ 배양기에서 24시간 배양한 후 사용하였다. 500ml 삼각플라스크에 100ml의 MC배지를 넣고 종균배양액 1ml를 집종하여 회전식 배양기(B. Brown Co.)에서 30시간 동안 키웠다. 배양조건은 33℃, 150rpm이고 초기 pH는 1N NaOH로 7.1을 유지하였다. 발효에 이용된 반응기는 생물반응기(Biostat reactor, B.Brown Co.)로서 종균 배양은 고휘배지에서 따온 한개의 균락(Colony)을 10ml MC배지에 접종하여 항온기에서 24시간 동안 키웠다. 이것을 모두 MC 배지가 100ml 들어있는 500ml 삼각플라스크로 진동기에서 12시간 배양하여 6L 발효조에 접종하였다. 통기 속도는 2~3 vvm 이며 교반속도는 900~1200rpm, 온도는 33℃로 일정하게 유지하였다. 반응중에 생기는 기포는 소포제(Silicon, T. S. A. 732, Toshiba)로써 제거하였다. pH는 28% NH₄OH와 20% H₃PO₄를 사용하여 pH7.1로 자동조절시켰다. 회분식 배양에 사용된 발효조에서 연속 배양을 하기 위하여 반응기에 부착되어 있는 펌프를 통하여 새로운 배지를 공급하였으며 같은 양의 배양액을 Peristaltic pump(Gilson Co.)를 이용하여 뽑아내었다. 연속배양의 출발점은 MC 배지를 이용하여 회분식 배양시킨 다음 균체의 농도가 최고인 점에서 출발하였다.

실험데이터의 계산방법

균체비증식 속도

균체비증식속도(μ)는 대수증식기(log phase)에서 1차 반응으로 볼 수 있으므로, 최소자승법에 의해 다음 식에서 구하였다.

$$\mu = \frac{\sum(T_i - T)(X_i - X)}{\sum(T_i - T)}$$

이때, T_i = culture time

$$T = \frac{\sum T_i}{N}$$

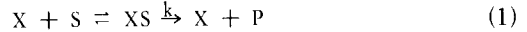
$$X_i = \ln(\text{cell O.D.})$$

$$X = \frac{\sum X_i}{N}$$

N = Number of coordinate

Inhibition constant (Ki)

알콜, 페놀 같은 기질은 과량존재 할 때 성장의 억제 효과를 준다고 알려져 있다[12]. 효소의 활성도에 기질이 미치는 영향을 나타내는 속도식을 이용하여 아래와 같은 속도식과 Mechanism를 얻을 수 있다.



기질의 억제작용을 XS의 혼성체에 대한 다른 기질의 작용에 기인 한다고 가정하면 아래와 같은 Mechanism을 얻을 수 있다.



식(1) Mechanism에서 속도 V 를 구하면,

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k[XS] \tag{3}$$

식 (1)과 (2) Mechanism에서 steady-state approximation을 적용하면,

$$\frac{d[XS]}{dt} = \frac{d[XS]}{dt} = 0 \tag{4}$$

식(3)과 (4)로 부터

$$V = \frac{V_{max} K_i [S]}{K_i K_s + K_i [S] + [S]^2} \tag{5}$$

식(5)는 표현을 바꾸어 아래와 같이 나타낼 수 있다.

$$\mu = \frac{\mu_{max} K_i [S]}{K_s K_i + K_i [S] + [S]^2} \tag{6}$$

이때 $[S] \gg K_s$ 인 경우를 취하면,

$$\frac{1}{\mu} \approx \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{[S]}{\mu_{max} K_i} \tag{7}$$

식(7)를 $1/\mu$ 와 $[S]$ 의 그래프로 표시하여 얻어진 직선의 기울기 ($1/\mu_{max} K_i$)로 부터 K_i 값을 구할 수 있다.

결과 및 고찰

메탄을 자화균주의 분리

세포 현탁액을 증균배양(Enrichment culture)하여 얻은 세포 배양액을 한천 고휘배지에 30℃로 평판 배양시켰다. 48시간 배양후 연노란색, 하얀색 그리고 분홍빛을 가진 균락들이 나타났다. 각각의 균락에 대하여 단일한 균락이 나타날 때까지 평판배양을 계속 실시하여 순수한 균체를 얻었다. 이들 균체를 배지에서 30시간 배양한 후 가장 빠르게 자라는 균체 A를 본 실험에 이용하였다 (Fig. 1 참고).

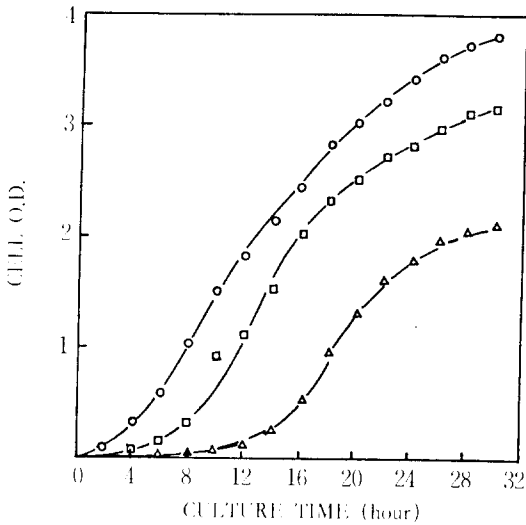


Fig. 1. Growth curve of isolated strain A, B and C in flask culture.
 ○: strain A
 □: strain B
 △: strain C

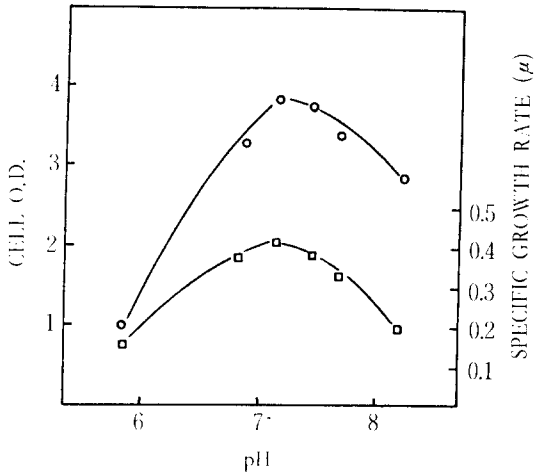


Fig. 2. Effect of initial pH on cell growth.
 (Temp.: 30°C, Culture time: 30h)
 ○: Cell O. D.
 □: Specific growth rate(μ)

초기 pH의 영향

초기 pH가 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배지의 초기 pH를 2N NaOH와 20% HCl를 이용하여 5.5~8.5까지 변화시켰다. 이때 사용한 배지는 MC배지였다. 초기 pH변화에 따른 증식곡선 및 한체비증식곡선은 Fig. 2에 나타나 있다. 이때의 배양온도 및 시간은 각각 30°C 및 30h 이었다.

한체는 pH 7.0~7.5 사이에서 양호한 증식곡선을 나타내었으며 pH 7.1에서 최대 비증식 속도를 나타내었다.

배양온도의 영향

배양온도가 한체의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양온도를 25°C에서 40°C까지 변경하면서 온도의 영향을 관찰하였다. 이때 사용한 배지는 MC배지였고 초기 pH는 7.1로 하였다. Fig. 3에 나타나 있듯이 분리된 한체는 25°C~37°C사이에서는 정상적인 성장을 하였으나 40°C에서는 거의 성장하지 않았다. 33°C에서 가장 큰 한체비증식속도 $\mu=0.42hr^{-1}$ 를 얻었다.

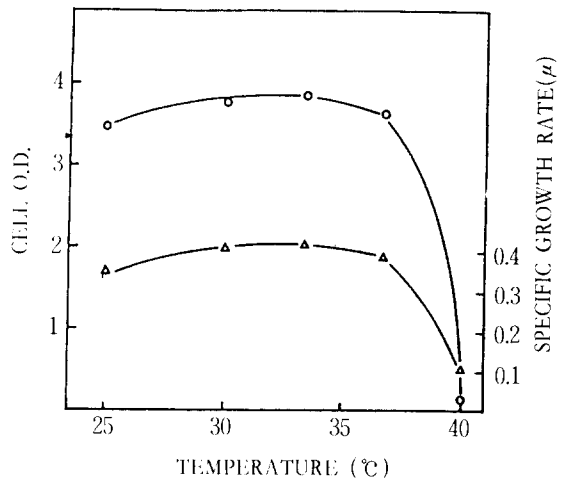


Fig. 3. Effect of temperature on cell growth.
 (pH: 7.1, Culture time: 30h)
 ○: Cell O. D.
 △: Specific growth rate (μ)

탄소원 및 에너지원으로서 메탄올 농도의 영향

Saturation constant (Ks) 결정

메탄올 농도를 0.7~10 mg/l 까지 변화시키면서 분리

스키 배양에 의한 초기속도법을 이용하여 각 농도에서 한체 비증식속도를 결정하였다. 이때 종말배양시 배양액

속에 남아있는 메탄올량을 최소로 하기 위하여 중간배양 배지내의 메탄올농도를 0.8 g / l 를 이용하여 30시간 배양하여 세포농도를 0.35 g / l 까지 키웠다. 기질농도와 균체 비증식 속도에 관한 Fig. 4의 결과를 이용하여 Monod 관계식으로 구한 Ks의 값은 1.2mg / l 이었다.

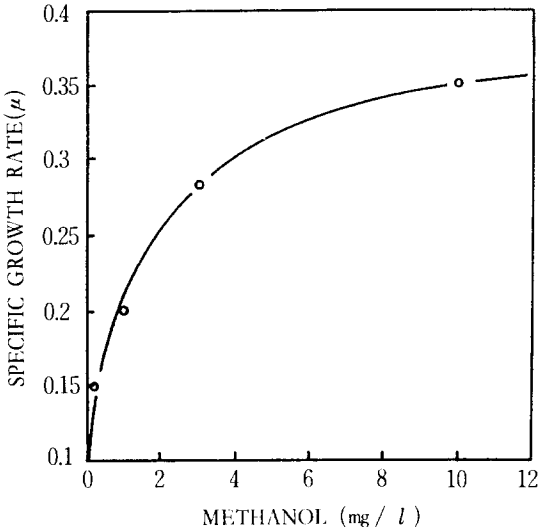


Fig. 4. Specific growth rate(μ) plotted as a function of substrate concentration.

고농도 메탄올의 영향 및 K_i값 결정

메탄올 농도를 5-40 g / l 까지 변화시키면서 플라스크 배양에 의하여 각 농도에서 균체 비증식 속도를 구하였다. 각 농도에서 얻어진 결과인 Fig. 5에 의하면, 메탄올 농도가 20 g / l 이상에서 기질에 의한 억제작용이 발생하는 것을 알 수 있다. (7)의 관계식을 이용하여 구한 Inhibition constant (K_i)는 4.67mg / l 이었다.

금속이온 (Mg, Fe, Mn, Zn, Cu) 농도의 영향

배지의 금속이온이 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MC배지를 이용하여 연속배양에 앞서 플라스크 배양을 실시하였다.

각 금속이온의 농도범위는 연속배양에 사용되는 기초 배지를 기준으로 삼았다. Mg, Fe, Mn, Zn, Cu 이온의 Source로 각각 MgSO₄ · 7H₂O, FeSO₄ · H₂O, MnSO₄ · 4H₂O, ZnSO₄ · 5H₂O, CuSO₄ · 5H₂O를 이용하였다.

각각의 금속이온이 균체에 미치는 영향을 조사하기

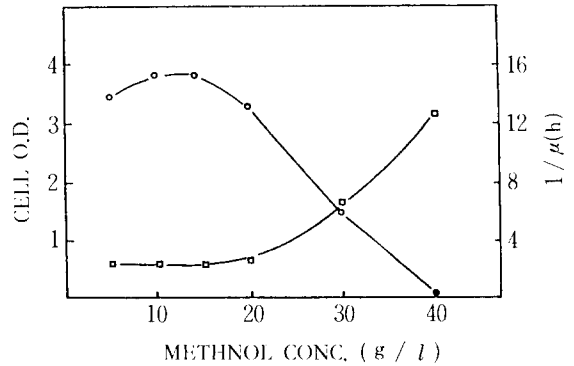


Fig. 5. Effect of methanol concentration on cell growth.

(Temp.: 33°C, pH: 7.1, Culture time: 30h)

○ : Cell O. D.
□ : 1/μ

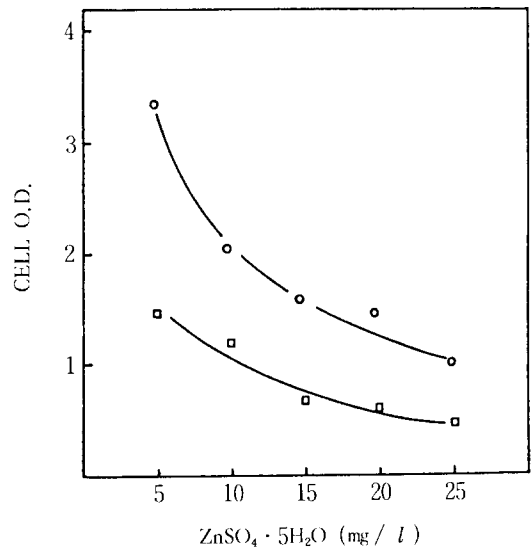


Fig. 6. Effect of Zn⁺⁺ concentration on cell growth.

○ : 15 hours culture
□ : 30 hours culture

위하여 15시간 및 30시간 플라스크 배양 시켰다. Fe 이온과 Mn이온의 농도가 증가함에 따라 균체 농도는

약간 증가하였으며 Mg이온 및 Cu이온은 균체의 성장에 큰 영향을 미치지 않았다. 반면 Zn이온에서는 Fig. 6에 나타나 있듯이 $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ 의 농도가 10 g/l 이상에서 균체의 성장이 심하게 억제되었다. 이때 사용된 MC배지는 각 금속 이온의 효과를 관찰하기 위하여 Mn, Fe 이온을 제거하였다.

회분식 배양

연속배양에 앞서서 플라스크 배양에서 얻은 최적 조건(온도 33°C , pH 7.1)을 이용하여 회분식 배양을 실시하였다(Fig. 7). 사용한 배지는 MC배지였으며 15시간 배양 했을 때 최고 균체농도가 2.6 g/l 였다. 이때 균체생산성은 $0.17\text{ g dry cell weight/l/hr}$ 였다. 15시간 이후 균체의 농도는 서서히 떨어지기 시작하였으며 용존산소의 농도는 급격히 증가하였다. 회분식 배양의 세포농도가 가장 높은 지점에서 연속배양을 출발 하였다.

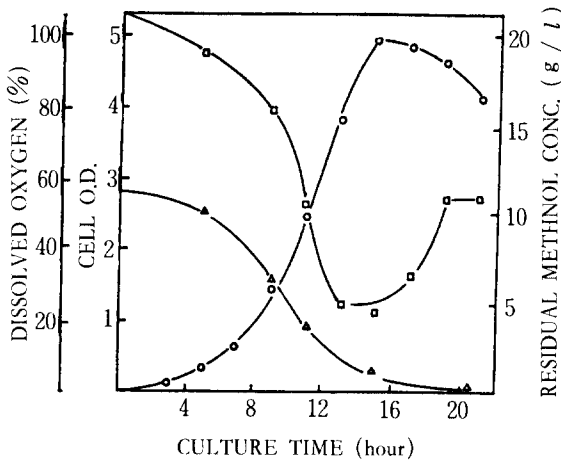


Fig. 7. Growth curve in batch culture.

- : Cell O. D.
- : Dissolved oxygen(%)
- △: Residual methanol conc.(g/l)

연속배양

기초배지에 의한 연속배양

플라스크 배양에서 얻은 최적조건(온도 33°C , pH 7.1)을 이용하여 연속배양을 실시하였다. 회석속도를 $0.05\sim 0.25$ 까지 변형시키면서 메탄올 농도가 20 g/l ,

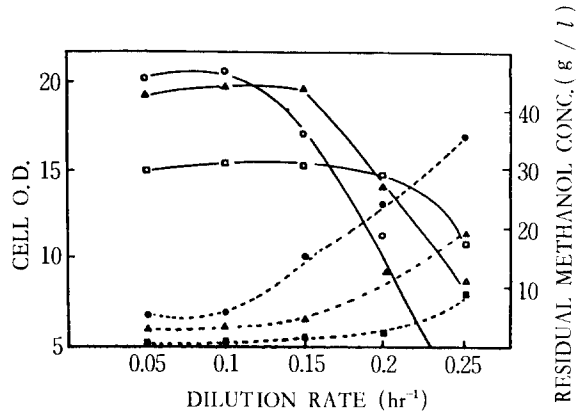


Fig. 8. Cell concentration and residual methanol concentration vs. dilution rate in continuous process.

The respective methanol concentrations(g/l) in feed were as follow; $20(-\square-, \dots-\blacksquare\cdots)$, $30(-\triangle-, \dots-\blacktriangle\cdots)$ and $40(-\circ-, \dots-\bullet\cdots)$

30 g/l , 40 g/l 인 기초배지를 이용하여 얻은 결과가 Fig. 8에 나타나 있다. 기초배지의 메탄올 농도에 관계없이 회석속도가 0.1 일때 최고의 균체 농도를 얻었다. 이때 얻은 균체의 농도와 이론적 균체수율($Y_x/s=0.5$)에 의한 균체농도를 비교해 보면 배지의 농도가 낮은 곳에서는 이론균체 농도와 거의 비슷한 균체농도를 (20 g/l) 보였으나, 배지농도가 40 g/l 에서는 큰차이(9 g/l)를 나타내었다. 이같은 차이를 극복하기 위해서 메탄올 농도 40 g/l 회석속도 0.1hr^{-1} 에서 얻은 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액으로 부터 각 물질의 농도를 구한 후 최소 배지(Minimum medium) 조성을 구하였다. 균체의 농도가 증가할수록 배양액의 색깔이 연녹색에서 옅은갈색으로 변화하였다. 용존산소가 0에 가까울 때 공기의 공급속도를 2 vvm 에서 3 vvm 으로 증가시키고 교반속도를 900 rpm 에서 1200 rpm 으로 증가시켰다.

최소배지에 의한 연속배양 및 배지의 최적화

회석속도 0.1hr^{-1} 에서 최소배지를 이용하여 균체의 평형농도를 얻었다. 이때의 얻은 균체의 농도는 10.3 g/l 였으며 이 값은 기초배지에 의해서 얻은 균체의 농도 11 g/l 보다 조금 낮은 값이다.

최소배지의 조성표 Table 2에 나타나 있는 일반적으로 세포 배양에 사용되는 배지의 조성을 비교하여 많은

Table 3. The composition of optimum in continuous culture

| Component | Concentration |
|---|---------------|
| CH ₃ OH | 40 g / l |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 4 g / l |
| KH ₂ PO ₄ | 1.5 g / l |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 1.5 g / l |
| H ₃ PO ₄ | .7 g / l |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | .25 g / l |
| K ₂ HPO ₄ | .2 g / l |
| Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O | .15 g / l |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 34mg / l |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 7mg / l |
| MnSO ₄ · 4H ₂ O | 5mg / l |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 2.7mg / l |
| H ₃ BO ₃ | .68mg / l |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O | .48mg / l |
| CoCl ₂ | .24mg / l |

차이가 있는 PO₄, Mg, Mn, Fe, Zn 성분의 영향을 조사하였다. PO₄ 영향을 조사하기 위하여 KH₂PO₄를 이용하였다. KH₂PO₄농도를 1g / l로 하였을 때 균체의 농도가 크게 증가하여 15.5 g / l였으며, KH₂PO₄ 농도를 1.5 g / l로 하였을 때 균체의 농도가 16.6 g / l였다. KH₂PO₄ 농도를 1.5 g / l 고정할 후 Mg, Mn, Fe, Zn 성분의 영향을 관찰하였다. MgSO₄ · 7H₂O 농도를 1.5 g / l로 하였을 때 균체의 최고농도 19.5 g / l를 얻었으며 Mn, Zn는 균체의 농도에 거의 영향을 미치지 않았다. FeSO₄ · 7H₂O 농도를 0.034 g / l에서 0.05 g / l로 상승시켰을 때 플라스크 배양에서 나타난 결과와 달리 균체의 농도가 조금 감소하였다. 위의 결과를 이용하여 최적배지 조성을 얻었다(Table 3).

최적배지에 위한 연속배양

균체의 생산성을 최대로 하기 위하여 최적배지를 이용하여 희석속도를 0.05~0.25hr⁻¹까지 변경시키면서 각 희석속도에서 균체농도와 균체생산성을 조사하였다. Fig. 9에 도시된 바와 같이 희석속도 0.23hr⁻¹일 때 최대 균체생산성 3.8 g / l / h를 얻었다.

요 약

서울 인공의 생활하수에서 배탈을 이용하는 박테리

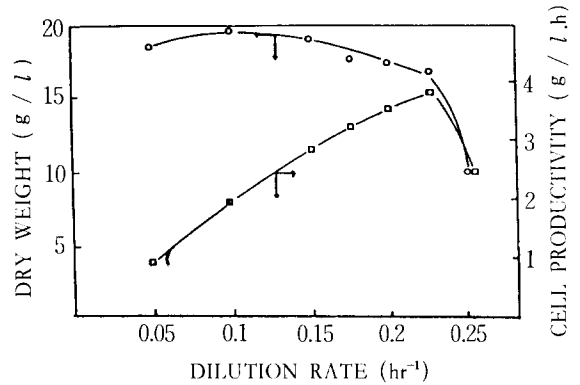


Fig. 9. Cell productivity and dry cell weight vs. dilution rate in continuous culture. ○: Dry weight(g / l) □: Cell productivity(g / l.h)

아를 분리하였다. 이의 최적 성장을 위한 온도 및 pH는 각각 33℃ 및 7.1이었다.

최대비성장율은 0.42hr⁻¹을 나타내었다. 최소 배지조성은 기본배지의 양을 안정상태에서 연속발효법으로 구하였으며, 그 조성은 다음과 같다(g / l);

- Methanol 40, (NH₄)₂SO₄ 2, KH₂PO₄ 1.5,
- K₂HPO₄ 0.2, H₃PO₄ 0.79, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.15,
- MgSO₄ · 7H₂O 1.5, FeSO₄ · 7H₂O 0.034,
- MnSO₄ · 4H₂O 0.005, CuSO₄ · 5H₂O 0.0027,
- CaCl₂ · 2H₂O 0.25, ZnSO₄ · 7H₂O 0.007,
- (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 0.00048, H₃BO₃ 0.00068,
- CoCl₂ 0.00024

최적 배지 조건에서 구한 최대 세포생산성은 3.8 g / l / hr였으며, 이때의 희석율은 0.23hr⁻¹이었다.

최대 세포농도와 그때의 단백질의 함량은 각각 19.5 g / l 및 70%였으며, 이때의 희석율은 0.1hr⁻¹이었다.

참 고 문 헌

1. C. I. Cooney(1975), Microbial growth on C-compound, The Society of Fermentation Technology, Japan, 18 3.
2. S. Goto, M. Yamamoto, O. Kondo, R. Okamoto, and A. Takamatsu(1978), J. Ferment. Technol., **56**, 516.
3. S. Goto, R. Okamoto, J. kuwajima and A. Takenetsu

- (1976), *J. Ferment. Technol.*, **54**, 213.
4. P. H. Calcot(1981), *Continuous cultures of cell*, CRC press, Boca Raton, Florida, Vol. 1
 5. R. I. Mateles and E. Battat(1974), *Appl. Microbiol.* **28**, 901.
 6. T. Urakami, S. Minagwa, I. Terao and I. Nagai(1984), *J. Ferment. Technol.*, **62**, 523.
 7. Y. Miyaska, C. Rha, A. J. Sinkay(1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 2065.
 8. Y. Miyasaki, A. J. Sinskey, J. Deangelo and C. Rha (1980), *J. Food. Sci.*, **45**, 558.
 9. J. D. Windass(1980), *Nature*, **287**, 396.
 10. M. J. Roll, P. J. Hennigan, R. D. Mohler, W. A. Weigand, and H. Lim(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1191.
 11. R. I. Mateles(1971), *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 581.
 12. D. I. C. Wang, C. L. Cooney, A. L. Demain, P. Punill, A. E. Humphrey, and M. D. Lilly(1979), *Fermentation and Enzyme Technology*, Wiley-Interscience Publication, New York
 13. S. Yamada, K. Nabe, M. Wada, and I. Chibata(1977), *J. Ferment. Technol.*, **55**, 436.
 14. J. H. Kim, D. Y. Ryu(1976), *J. Ferment. Technol.*, **54**, 427.
- (Received; October 30, 1990, Accepted; December 30, 1990)**