

중점제 생산을 위한 생물 반응기에 대한 연구

- *Xanthomonas Campestris*에 의한 xanthan gum 생산에서 질소원의 영향에 관한 연구 -

김 재 형 · 이 기 영 · *선우창신 · 김 운 용
진남대학교 공업화학과
*진남대학교 화학공학과

A Bioreactor for the Production of Viscosifier
- A Study on Effect of Nitrogen Source on the Production of Xanthan
Gum by *Xanthomonas campestris* -

Jae-Hyung Kim, Ki-Young Lee, Chang-Sin Sunwoo* and Un-Yong Kim
Department of Chemical Technology, Chonnam National University
*Department of Chemical Engineering, Chonnam National University

ABSTRACT

The effects of nitrogen sources(sodium glutamate and peptone) on the production of xanthan gum were investigated. The fermentation using sodium glutamate as a nitrogen source is longer than that of peptone. In the initial nitrogen concentration of 0.4-1.0 g/L, μ_s was about 2.0 and β_s was 1.2. The optimal yields were obtained when the carbon source/nitrogen concentration was 10-16. The fermentation time and product yields in the fermentation medium of mixed nitrogen source [sodium glutamate-N(0.75 g/L)+peptone-N(0.25 g/L)] were similar to those of peptone.

서 론

점성을 높이는 중점제로 상업생산되는 고분자로는 xanthan gum과 scleroglucan이 있다. 이중 식물 병원성 박테리아인 *xanthomonas campestris*에 의해 생산되는 xanthan gum은 5당의 화학적 구조를 기본 단위로 갖고, 식품, 화학, 에너지생산과 제약공업에 다양한 응용성을 가지며 (1,2) 조밀제(thickening agent), 필름형성제(film forming agent), 안정제(stability agent), oil 회수향상제(enhanced oil recovery), 농약의 전착제(attachment agent) 등 그 응용범위가 날로 확장되는 추세에 있다. xanthan gum 생산을 위한 발효는 통상적으로 탄소원이 충분한 상태에서 질소기질의 제한 조건 아래서 진행된다

(3, 4). 일반적으로 초기 질소기질의 공급 증가는 xanthan gum 생산 속도의 증가를 동반하는 동시에 세포농도와 증식속도의 증가를 일으키지만 이에 따라 최종 xanthan gum 농도가 반드시 증가하지는 않는다. 이것은 질소기질에 의한 xanthan gum 생산 저해와 (5) 배양액의 점성으로 인한 세포 주위에 얇은 층의 형성으로 기질의 확산 저해에 의한 xanthan gum 생산의 저해로 원인을 들릴 수 있다(6). 본 연구에서는 Monod식 보다 더 xanthan gum 발효에 일반적인 모델인 logistic equation (7)을 이용하여 세포농도를 아래 식으로 유도하였다.

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_s}\right) \quad (1)$$

Xanthan gum 농도는 Luedeking-Piret 식을 사용하여

(2)식으로 표현되고 탄소원 농도는 (3) 식으로 표현된다.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (2)$$

$$\frac{dC}{dt} = -A \frac{dX}{dt} + B X \quad (3)$$

여기서 A는 세포성장과 성장관련 Xanthan gum 생산에 대해 소비된 glucose를 특정지우는 상수이고 B는 세포유지와 비 성장관련 glucose 소비를 특정지우는 상수이다. (2), (3)식의 β 와 B는 정지상 실험자료를 평가하는데 편리하고 α 와 A는 성장관련 증식상 실험자료를 평가하는데 이용된다(8, 9).

Kim등(9)은 *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 균주가 동화하는 여러가지 질소원 중에서 sodium glutamate와 peptone의 생산물 생산 수율이 상당히 크다고 보고한 바 있다. 그러나 sodium glutamate를 질소원으로 한 발효배양은 지수성장기가 매우 길어 발효시간이 길며 이것때문에 동력비가 많이 소요된다는 단점이 있지만 가격이 저렴하다는 장점을 가지고 있고 peptone 질소원 발효는 유도기가 짧아 전체 발효시간이 짧지만 가격이 sodium glutamate 보다 고가라는 단점이 있다. 본 연구에서는 화학적으로 정의된 질소원(sodium glutamate)과 복합질소원(peptone) 그리고 혼합질소원(sodium glutamate + peptone)을 질소원으로 채용하여 xanthan gum 회분발효실험을 행하여 초기 질소농도변화가 xanthan gum 생산에 미치는 영향을 고찰하였다.

미생물 배양조건과 실험장치

본 실험에 사용된 미생물은 *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459이고 균주 배양배지 및 발효 배양배지의 조성은 Table 1과 같다. 균주는 2주마다 계대배양 하였다. 멸균된 성장배지 100ml가 들어있는 500ml 삼각 플라스크에 한천 사면배지에 보관된 균주 1 백급이를 접종하여 28°C, 220 RPM의 진탕배양기(KMC-8480-S, Vision Scientific Co.)에서 약 20시간 동안 배양하여 접종균으로 사용하였다. 멸균된 발효배양배지 2L가 들어있는 Jar fermenter에(BIOFLO II, New Brunswick Scientific Co.) 접종균 200ml를 접종하여 발효를 행했다. 발효조 운전조건은 pH 7.0, 30°C, 900 RPM, 1 VVM으로 하였다. 시료는 3-4시간마다 시료 채취구를 통해 30ml 채취하여 분석용으로 사용하였다.

Xanthan gum 농도측정

세포가 제거된 상등액 10ml에 에탄올 20ml를 가하여 xanthan gum을 침전시키고 냉동실에서 1일동안 방치한 후 17,000 RPM으로 다시 원심분리하여 90°C의 진공건조기에서 향량이 될때까지 건조한 후 무게를 칭량하여 xanthan gum 농도를 측정하였다.

질소원 농도의 측정

세포가 제거된 상등액 1ml에 K₂SO₄ 0.1g 과 30% 과산화수소 수용액 1ml를 가한 후 진한 황산 2ml를 가하여 소화시킨 후 여기에 40% NaOH 10ml를 가하고 microkjeldahl 증류장치를 이용하여 질소 함량을 측정하였다.

Table 1. Medium composition

Unit: [g / L]

Composition	Maintenance	Growth	Fermentation
Glucose	20	10	15-35
Peptone	5	5	2-10
Sodium L. glutamate			4-11
Yeast extract	3		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2	1	1
K ₂ HPO ₄			2
Sodium acetate			2
Sodium pyruvate			0.5
Agar	20		

세포 및 포도당 농도의 측정

참고문헌(9)와 같은 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

Sodium glutamate 질소원이 xanthan gum 생산에 미치는 영향

Fig. 1은 sodium glutamate 질소원이 세포 성장에 미치는 영향을 나타낸 것으로 초기 질소농도가 증가할수록 발효 말기 세포농도가 뚜렷하게 증가하는 것을 알 수 있다. 초기 질소농도의 증가에도 불구하고 약 20시간의 긴 적응기간(lag phase)을 가지며 약 25시간까지 각각의 질소농도에 대응하는 세포농도의 차이가 뚜렷이 나타나지 않고 그 이후 성장속도에 차이가 생겨 최종 세포농도는 각각의 질소농도에 따라 큰 차이를 보인다. Sodium glutamate를 질소원으로 사용한 xanthan 발효에서 세포농도(X)는 아래와 같은 식으로 표현된다(10).

$$X = X_0 \exp(\mu_{max} \cdot t) \tag{4}$$

Fig. 1의 실험 자료를 (4)식으로 계산하여 최소자승법에 의하여 선형화하고 직선의 기울기와 절편으로 부터 각각 μ_{max} 와 X_0 값을 구하였다. 또한 각 질소농도에 대응

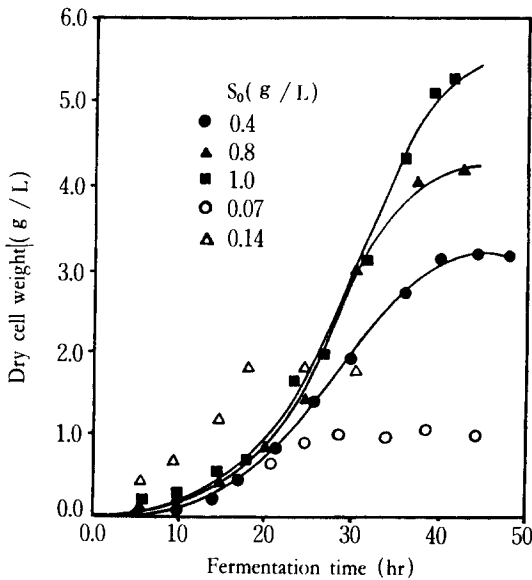


Fig. 1. Experimental data obtained with sodium glutamate nitrogen source for the three values of S_0 shown for dry cell weight. Open symbols indicate experimental results of reference(10).

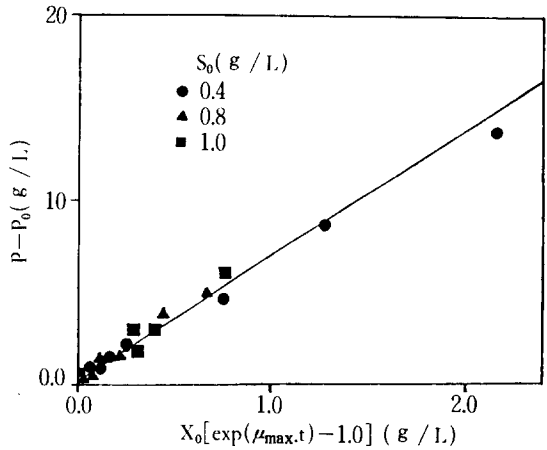


Fig. 2. Sodium glutamate nitrogen source: experimental data in exponential growth phase plotted as $p-p_0$ VS. $X_0[\exp(\mu_{max} \cdot t) - 1.0]$.

하여 생산되는 xanthan gum의 시간경과 자료를 기초로 지수성장기동안의 xantha gum 생산량을 알아보면 $dX/dt = \mu_{max} X$ 이므로 (2)식에 $dX/dt = \mu_{max} X$ 를 대입하고 적분하여 (5)식을 얻었다.

$$P - P_0 = (\alpha + \beta / \mu_{max}) X_0 [\exp(\mu_{max} \cdot t) - 1.0] \tag{5}$$

Fig. 2은 (5)식을 작도한 것으로 지수성장기 동안 xanthan gum 생성은 $(\alpha + \beta / \mu_{max})$ 에 비례한다는 것을 알 수 있다. 따라서 지수성장기 동안 생성되는 xanthan gum (E_p)은 아래와 같이 쓸 수 있다.

$$E_p = (\alpha + \beta / \mu_{max}) X (X - X_0) \tag{6}$$

여기서 E_p 는 지수성장기 동안 생성된 xanthan gum이다. S_0 에 따라 각기 다른 상수를 갖는 직선이 나타난다. 정지상은 $dX/dt = 0$ 이고 $X = X_s$ 이며 $\beta_s = (dP/dt)_s / X_s$ 이다. Pinches 와 Pallent(10)는 sodium glutamate를 질소원으로 채용 했을 때 성장상 동안에 질소원이 완전히 고갈된다고 보고한 바 있고 Moraine과 Rogovin(6)은 distilers' dried soluble을 질소원으로 사용한 xanthan 발효에서 세포성장이 멈춘 이후에도 초기에 공급한 질소의 절반가량이 남아있다고 보고한 바 있지만 본 실험에서 채용된 두 질소원의 경우는 발효말기에 탄소원은 완전 고갈되었으나 발효가 끝난 이후에도 초기에 공급된 질소가 완전 고갈되지는 않았다(Fig. 3). 또한 발효 20시간까지 초기에 공급된 질소의 절반 정도가 급격히 분해되었지만 질소의 급격한 분해가 세포성장을 보다 빠르게 유도하지 못함으로써 긴 지수성장기를 갖는다는 것을 알 수 있었다. Fig. 4는 질소의 소비가 세포 성장에

Table 2. Summary of parameter values evaluated from the experimental data

Parameter	Units	Values		
Initial conditions				
S_0	g s-glutamate-N / L	0.4	0.8	1.0
Growth phase				
X_0	g (x) / L	0.052	0.063	0.078
μ_{\max}	h^{-1}	0.125	0.145	0.156
Y	g (x) / g (N)	1.14	1.57	0.45
$\alpha + \beta / \mu_{\max}$	g (p) / g (x)		8.0 ^a	
$\Lambda + B / \mu_{\max}$	g (c) / g (x)		6.8 ^a	
Stationary phase				
X_s	g (x) / L	3.12	4.10	4.69
t_s	h	40	36	36
$(dp/dt)_s$	g (p) / L h			
$(dc/dt)_s$	g (c) / L h	0.41	0.52	0.61
B_s	g (c) / g (x) h	0.565	0.714	0.789
β_s	g (p) / g (x) h	0.181	0.174	0.168
		0.128	0.126	0.13

Parameter	Units	Values		
Initial conditions				
S_0	g peptone N / L	0.4	0.8	1.0
Growth phase				
t_s	h	28	25	20
X_s	g (x) / L	4.27	5.09	5.44
U_{\max}	h l	0.26	0.26	0.27
X_0	g (x) / L	0.058	0.114	0.233
Y	g (x) / g (N)	13.16	9.95	8.398
Λ	g (c) / g (x)		1.75 ^a	
B	g (c) / g (x) h		0.445 ^a	
α	g (p) / g (x)		0.3 ^a	
β	g (p) / g (x) h		0.305 ^a	
Stationary phase				
B_s	g (c) / g (x) h	0.19	0.20	0.23
β	g (p) / g (x) h	0.09	0.115	0.175

a: Parameter estimate for data at all S_0 taken together.

(2)식에 대입하고 적분하면 (13)식이 된다.

$$\frac{C_0 - C}{X - X_0} = \Lambda + B \frac{X_s}{X - X_0} \left[\frac{\ln(X_0/X)}{\mu_{\max}} + t \right] \quad (12)$$

$$\frac{P - P_0}{X - X_0} = \alpha + \beta \frac{X_s}{X - X_0} \left[\frac{\ln(X_0/X)}{\mu_{\max}} + t \right] \quad (13)$$

(12)식 과(13)식을 plot한 Fig. 8,9는 성장상과 정지상으로 뚜렷하게 구분된다. Fig. 10은 정지상 자료를 각각의 S_0 로 plot한 것으로 정지상에서의 B인 B_s 는 0.2 전후

를 보였고 정지상에서의 β 인 β_s 는 0.12 전후를 보였다. Pinches와 Pallent의 실험결과(10)는 S_0 가 0.07에서 0.3으로 증가함에 따라 B_s 와 β_s 가 증가함을 보였지만 본 실험에서는 sodium glutamate 질소원과 peptone 질소원 사이에서 질소원 차이가 따른 차이는 없었고 0.4-1.0 g / l의 S_0 범위에서 B_s 와 β_s 는 상수를 보였다.

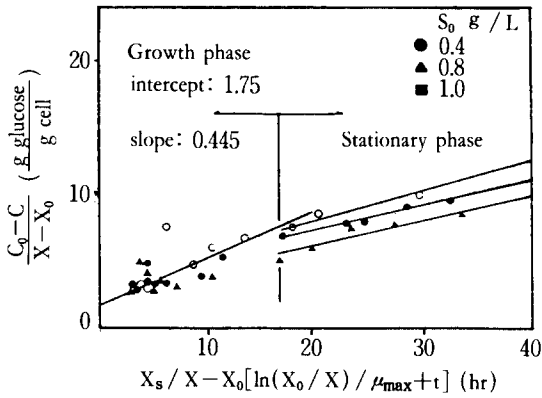


Fig. 8. Peptone nitrogen source: experimental data plotted in terms of eq. (12).

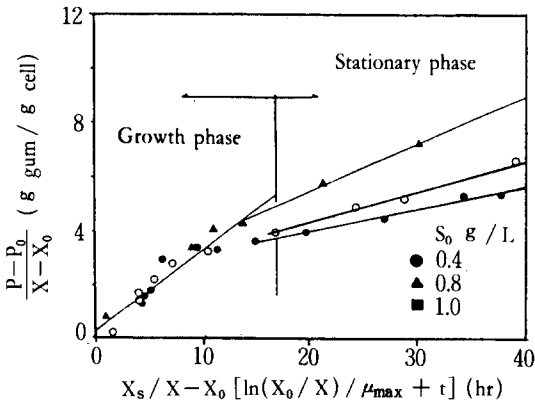


Fig. 9. Peptone nitrogen source: experimental data plotted in terms of eq. (13).

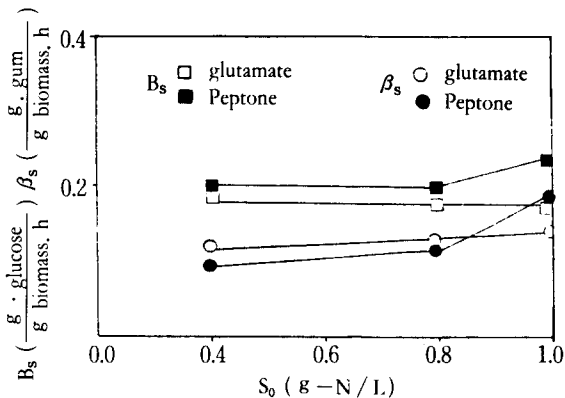


Fig. 10. The relationship between β_s or B_s and initial nitrogen concentration, S_0 .

탄소/질소농도의 최적비

탄소/질소농도가 너무 작으면 세포 성장은 활발하지 만 탄소원의 대부분이 세포성장에 사용되므로 xanthan 은 적게 생산되고 탄소/질소농도가 너무 크면 세포 성장이 제대로 이루어지지 않기 때문에 세포가 생산하는 xanthan 량이 적어지므로 xanthan gum의 생산량을 최대로 하기 위해서는 적절한 탄소/질소농도로 발효를 시작하는 것이 중요하다. Fig. 11에 나타냈듯이 xanthan gum 수율은 탄소/질소농도의 비가 10-16일 때 최대값을 보였다.

Xanthan gum 생산에서 혼합질소원의 영향

Fig. 10과 Fig. 11의 결과를 바탕으로 sodium glutamate 질소원이 갖는 긴 적응기간을 줄이기 위하여 적응기간이 거의 없는 혼합질소원[Peptone-N(0.25 g/L)+ Sodium glutamate-N(0.75 g/L)]을 질소원으로 하는 발효실험을 수행하였다. 혼합 질소원은 peptone 질소원의 첨가로 peptone 질소원의 장점인 발효초기 빠른 질소의 분해에 의한 세포성장 속도의 증가로 sodium glutamate 질소원이 갖는 약 20시간의 긴 지수성장기를 13-14 시간으로 줄일 수 있었다. 또한 sodium glutamate 질소원이 정지상에서 peptone 질소원 보다 탄소원에 대한 xanthan 생산수율($Y_{p,c}$)이 크므로 peptone만을 질소원으로 채용한 발효 보다 혼합질소원을 채용한 발효가 xanthan gum의 최대 수율을 기대할 수 있다. 결론적으로 혼합질소원이 같은 질소농도에서 가장 수율이 좋은 peptone과 발효시간

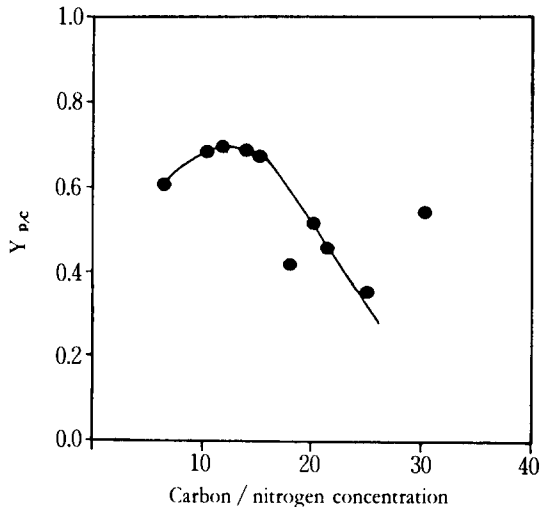


Fig. 11. Effect of [carbon/nitrogen concentration] on $Y_{p,c}$.

Table 3. Effects of sodium glutamate and peptone nitrogen source on the fermentation time

	Nitrogen conc. (g / L)	$Y_{p,c}$	Fermentation Time(hr)
Sodium glutamate	0.4	0.556	48
	0.8	0.633	42
	1.0	0.702	38
Peptone	0.4	0.557	36
	0.8	0.690	34
	1.0	0.736	30
S-glutamate(0.5)+ Peptone(0.5)	1.0	0.733	30
S-glutamate(0.75)+ Peptone(0.25)	1.0	0.736	30

및 생산물 생산수를 그리고 물리적 특성(점성)이 유사하므로 혼합질소원으로 xanthan gum 생산하면 xanthan gum의 생산원가를 줄일 수 있다. 왜냐하면 1991년 12월 한국 시약센터 판매가격은 peptone 1 lb가 45,000원 인데 비해 sodium glutamate 1 lb는 15,000원이기 때문이다. 이것은 혼합질소원이 갖는 경제적 장점이다.

질소원이 발효시간에 미치는 영향

Table 3은 질소원이 발효시간에 미치는 영향을 나타낸 것이다. Sodium glutamate 질소원은 같은 질소농도를 함유한 peptone 질소원 보다 발효시간이 8-12시간 정도 길었다. 이것은 발효초기 빠른 질소의 분해가 세포성장 속도를 증가시키지 못해서 기인한 긴 적응기간의 영향으로 생각된다. 또한 혼합질소원은 같은 질소농도를 가지는 pepton 질소원과 비교했을 때 발효시간 및 생산물의 생산수율이 같았다. 이것은 peptone 및 sodium glutamate 질소원이 갖는 각각의 장점을 혼합질소원이 갖고 있기 때문으로 생각된다.

요 약

*Xanthomonas campestris*에 의한 xanthan gum 생산에서 질소원의 영향에 관한 연구 결과를 요약하면 아래와 같다.

Sodium glutamate를 질소원으로 채용한 xanthan gum 생산 발효에서 세포 생산량에 대한 생산물 생성량, 세포 생산량에 대한 탄소원 소비량은 초기질소농도에 독립적이었다. 0.4-1.0 g / L의 S_0 범위에서 B_s 와 β_s 는 상수를 보였고 sodium glutamate 질소원과 peptone 질소원 사이에

서 질소원 차이에 따른 차이는 없었다. Xanthan gum 생산수율은 탄소 / 질소농도가 10-16일 때 최대값을 보였다. Peptone 질소원은 sodium glutamate 질소원보다 세포 성장에 더 효율적이다. Peptone 만을 질소원으로 사용한 발효와 혼합질소원을 질소원으로 사용한 발효가 생산물 생산수율 및 발효시간이 유사하므로 xanthan gum 생산시 혼합질소원을 질소원으로 사용할 경우 xanthan 생산 원가를 절감할 수 있다.

감 사

본 연구를 수행하는데 연구비를 지원하여 주신 한국 과학재단에 심오한 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. A. Mulchandani and J. H. T. Luong(1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 639.
2. K. A. Bauer and L. Altos (1983), *U. S. Patent* **4**, 400, 467.
3. K. Kato and M. Shioeaka (1973), *U. S. Patent* **3**, 912, 591.
4. P. Rogovin, A. Jeanes, M. C. Cadmus and C. A. Knutson (1979), ARS-NC-51, U. S. Department of Agriculture, 11.
5. P. Souw and A. L. Demain (1979), *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 1186.
6. R. A. Moraine and P. Rogovin (1973), *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 225.

7. R. M. Weiss and D. F. Ollis (1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 859.
 8. Malcolm P. Stevens (1990), *Polymer Chemistry*, Second edition, **40**, Oxford University press, New York.
 9. J. H. Kim, K. Y. Lee and J. S. Yeun (1990) 한국생물공학회, **5**, 25.
 10. A. Pinches and L. J. Pallent (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1484.
- (Received; October 28, 1991, Revised; November 15, 1991, Accepted; December 5, 1991)**