

Gellan형 미생물 다당류의 연속생산

정 봉 우 · 이 은 미 · *장 광 엽 · **김 춘 영

전북대학교 공과대학 공업화학과

*전북대학교 자연과학대학 생물학과

**전북대학교 공과대학 화학공학과

Gellan-type Microbial Polysaccharide Production in Continuous Fermentation

Bong-Woo Chung, Eun-Mi Lee, *Kwang-Yeop Chang and **Chun-Yeong Kim

Dept. of Chemical Technology, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

*Dept. of Biology, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

**Dept. of Chemical Engineering, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

ABSTRACT

The Gellan-type polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea* (ATCC 31461) is one of the new heteropolysaccharides, having useful properties as gelling, suspending, stabilizing, emulsifying and binding agents in aqueous systems. Medium compositions for growth stage and production stage are improved. The problems of low cell concentration and poor productivity in highly viscous fermentation were attributed to inadequate mixing accompanied by insufficient oxygen transfer. During continuous culture, cell growth and polysaccharide production were greatly affected by the apparent viscosity, and they showed oscillation behavior, i.e. as the product concentration increases, cell concentration decreases. With improved culture conditions, the productivity of continuous culture increased up to $0.6\text{g}/\ell/\text{hr}$ (6-fold that of batch culture) at dilution rate, $D=0.14\text{hr}^{-1}$.

서 론

Gellan형 미생물다당류는 세포외 이중다당류(extracellular anionic heteropolysaccharide)로서 그 수용액은 물에 잘 녹고 낮은 농도에서도 높은 점도를 나타내기 때문에 각종 식품첨가제, 원유회수증진제 등 다양한 산업적 유용성으로 그 용도가 증대되고 있다(1-4).

Gellan은 효소에 대한 저항력이 강하고 멸균조작 후에도 변성이 유발되지 않기 때문에 배양배지 특히 식물세포의 배양에 적합하며 앞으로 유전자 조작된

균주의 발효를 통해 우수한 특성의 다당류가 기대된다(5-7).

현재 Gellan은 미국의 Kelco(Division of Merck & Co., San Diego)에서 회분식 배양에 의하여 생산되고 있으며 생산성 향상을 위한 연구가 수행되고 있다(8). 그러나 세포 성장 및 생성물 형성에 관한 자료의 부족으로 어려움을 겪고 있으며 많은 연구가 필요하다고 판단된다.

따라서 본 연구에서는 Gellan 생성에 관련된 기초 자료를 얻기 위하여 배지 조성에 관한 플라스크 배양실험, 비뉴우튼성을 나타내는 배양액의 유변학적

특성 및 교반 소요 동력 측정과 보다 효율적인 발효 공정 개발을 위하여 회분식, 유가식 및 연속식 배양을 수행하고 그 생산성을 비교하여 Gellan형 미생물 다당류의 대량생산에 관한 기본 자료를 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 American Type Culture Collection(Rockville, Maryland)으로부터 분양받은 *Pseudomonas elodea* ATCC 31461이다.

균주의 보존을 위해 YM agar 배지를 사용하여 2주일마다 계대배양하였으며 4°C 냉장고에 보관하였다. 접종용 배지는 ager-free YM배지를 사용하였다.

플라스크 배양실험에서는 탄소원으로 sucrose, dextrose를 10~50g/l 까지, 질소원으로는 Bacto-pepton(3~12g/l), Promosoy(0.3~0.9g/l), (NH₄)₂SO₄(1.0~2.0g/l)을 사용하였다.

회분식 및 연속식 배양시 사용한 배지의 조성은 Table 1과 같다.

배양초기에 멸균된 40% KOH 용액으로 배양액의 초기 pH를 6.5가 되도록 하였다.

Table 1. Media compositions for culture of *Pseudomonas elodea*.

Components	Inoculum	Batch	Continous
Dextrose (g/l)	30	10-50	20
K ₂ HPO ₄ (g/l)	2.0	2.0	0.5
KH ₂ PO ₄ (g/l)	1.0	1.0	0.5
NaNO ₃ (g/l)	1.9	0.5-1.9	0.5
MgSO ₂ · 7H ₂ O (g/l)	0.1	0.1	0.1
Promosoy (g/l)	0.56	0.3-0.9	-
FeSO ₄ · 7H ₂ O (mg/l)	5.0	5.0	5.0
CoCl ₂ · 6H ₂ O (mg/l)	0.024	0.024	0.024
Antifoam (ml/l)	-	0.6	0.6

배양장치 및 방법

Seed culture는 50ml YM배지가 들어 있는 250ml Erlenmeyer flask에 접종시켜 37°C, 200rpm에서 36시간 배양하였다. 그 후 100ml의 배지가 들어 있는 500ml Erlenmeyer flask에 10ml 접종하여 플라스크 배양실험을 실시하였다.

회분식과 유가식 및 연속식 배양장치는 교반식 발효조(NBW, Bioflo IIC)에서 공기유입속도 1vvm,

교반속도는 600~1000rpm으로 조절하여 용존산소 농도가 포화농도의 20%가 유지되도록 하였으며 개략적 장치는 저자 등이 보고한 바와 같다(9).

유가식 배양의 경우에는 포도당의 농도가 10g/l 이하로 낮아지지 않도록 간헐적(intermittent)으로 공급하였으며(70시간까지) 100시간 동안 배양을 계속하였다.

연속배양의 경우에는 회분식 배양이 정상기에 도달하기 직전에 공급배지(조성은 Table 1 참조)를 연동펌프에 의해 회석률 0.06~0.18hr⁻¹ 범위에서 공급하였다. 이때 조업부피(working volume)는 2.5 l이었으며 거품발생을 억제하기 위하여 소포제(Sag 5639)를 사용하였다.

정상상태(steady state)는 일정한 조건하에서 배양액의 치환(replacement)이 5회 이상 일어난 후에 도달하였으며 이때 세포농도 포도당 농도 및 생성물 농도를 측정하여 계산하였다.

다당류 수용액의 교반동력 측정

발효조에 Gellan gum 수용액(1.0~3.0wt%)을 넣고 교반시켰을 때 소요동력을 측정하기 위하여 전류계와 전압계를 교반모터에 연결하였다. 발효조(25l)에 방해판(baffle)이 부착된 상태였으며 6-blade disk turbine 2개가 연결된 임펠라 교반 발효조에서 공기를 주입하지 않았을 때와 주입하였을 때(1vvm) 각각 측정하여 비교하였다.

분석방법

생성된 Gellan의 건조중량 측정기준은 다음과 같다. 시료 배양액 100g에 45% KOH용액 0.5ml를 가하고 15분간 멸균한 다음 85°C 이상에서 200ml의 이소프로필알코올을 가한다. 교반 후 침전시킨 침유상 물질을 200mesh stainless steel 여과망에서 거른 다음 진공건조기에서 항량이 될 때까지 건조하였다(10).

세포농도는 Serial dilution agar plate procedure(11)에 의해서 viable cell count를 구하였으며, ATP량을 측정하여 세포농도를 구하기 위하여 Luminometer(Turner, Model 20e)를 사용하였다(12).

배양액 중의 포도당의 농도측정에는 Glucose Analyzer(YSL, Model 27)를 이용하였으며 배양액의 겔보기 점도는 Brookfield viscometer(Model, LVF)를 사용하였다.

결과 및 고찰

회분식 배양

플라스크 배양실험을 통하여 배양온도 및 배지조성을 최적화하였다. 온도는 37℃, 초기 pH는 6.5일 때 세포성장 및 생성물 생산성이 우수하였으며 탄소원으로는 포도당이, 질소원으로는 Promosoy와 Bacto-peptone이 ammonium sulfate보다 우수하였다. 탄소원으로는 포도당을 질소원으로는 Promosoy를 사용하여 탄소원/질소원의 비율을 변화시켜 배양한 결과 포도당 30g/ℓ와 Promosoy 0.6g/ℓ를 사용하였을 때 가장 좋은 결과를 나타냈다. 이러한 조건을 이용하여 2.5ℓ fermenter에서 60시간 동안 회분배양한 결과를 Fig. 1에 나타냈다.

최대세포농도는 6.0×10^8 cells/ml까지 증가하였고, 최대비성장속도(μ_{max})는 0.1 hr^{-1} , 포도당 소모에 대한 Gellan 생성수율($\Delta P/\Delta S$)은 0.38이었으며 회분식배양의 생산성(productivity)은 0.09g Gellan/ℓ/hr이었다.

또한 세포의 성장속도와 생성물의 생성속도 관계를 확인하기 위하여 Leudeking-Piret 관계식(13)을 적용한 결과 α 는 0.23, β 는 0.02임을 확인하였고, 이러한 결과는 *Pseudomonas elodea*를 이용한 Gellan형 미생물 다당류의 생산은 세포의 농도보다 세포의 성장속도에 대한 영향이 크다는 것을 나타낸다.

Fig. 2는 세포농도와 ATP함량의 관계를 나타낸 것으로 세포당 ATP함량은 1.02×10^{-14} g ATP/Cell로 나타났다. 세포벽에 붙어 있는 다당류 생성물을 분리하기가 용이하지 않기 때문에 이들의 상관관계는 그리 좋지 않으며 ATP함량의 측정으로 세포농도를 추정하기 위해서는 시료 전처리 방법 등의 개

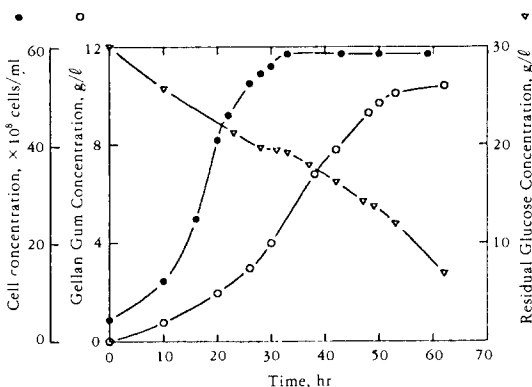


Fig. 1. Time courses of batch culture.

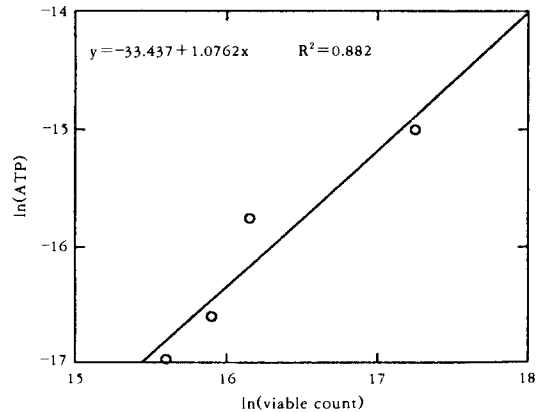


Fig. 2. Correlation between ATP concentration and viable count.

선이 필요하다고 판단된다.

Gellan 수용액의 유변학적 특성 및 교반동력

Gellan의 농도별 수용액에 대한 전단속도와 전단응력의 관계를 Fig. 3에 나타냈다. 2wt.% 수용액까지는 의가소성(pseudoplastic) 유체특성을 보이나 그 이상 농도의 수용액은 Casson body 유체특성으로 전이되며 Gellan 농도가 증가할수록 항복응력(yield stress)값도 증가하였다.

이러한 Gellan 수용액을 발효조에서 교반할 때 교반동력을 측정된 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 교반속도 증가에 따라 동력소모가 급격히 증가하였으며 Gellan의 농도가 증가할수록 소요동력은 적게 측정되었다. 이는 비뉴우튼성 유체의 전형적인 특징으로

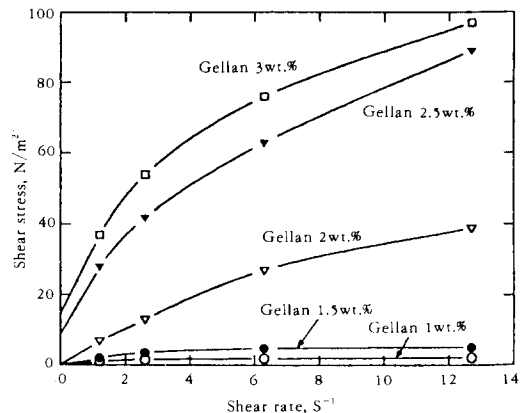


Fig. 3. Rheograms of Gellan solution.

교반속도 증가에 따른 겔보기 점도 감소에 그 원인이 있다.

또한 발효시에는 공기를 유입하게 되기 때문에 교반동력에 미치는 포기(aeration)의 영향을 고찰하기 위하여 공기유입속도 1vvm에서 포기시 교반동력(Pg)과 비포기시 교반동력(Pu)의 비를 측정하여 Fig. 5에 나타냈다. 고점도일수록 포기에 따른 동력 소모가 감소하였으며 기포의 분산이 용이하게 일어나는 교반속도에서 교반동력이 최소를 나타냈으며 그 이상의 교반속도에서는 기포의 크기가 감소되고 포기의 영향은 감소하였다. 이러한 경향은 Michel 등(14)의 결과와 유사하였다.

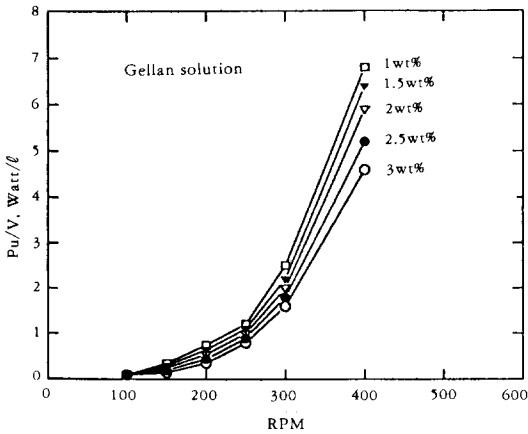


Fig 4. Power consumption(Pu) in the Gellan solution.

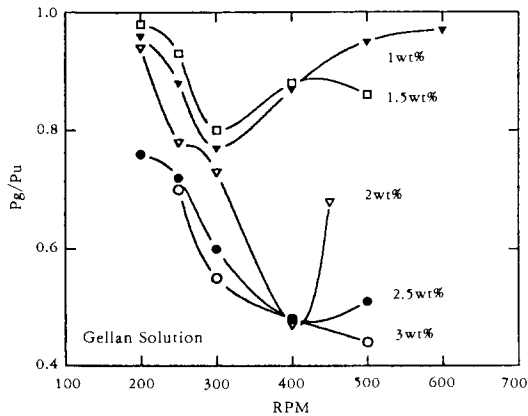


Fig 5. Gassed power consumption(Pg) vs. ungassed power consumption(Pu) in the Gellan solution.

유가식 배양

초기배양 부피를 1ℓ로 하여 36시간 회분배양 후 포도당의 농도가 10g/ℓ 이하로 감소되지 않도록 간헐적으로 배지를 공급하여 전체부피가 2.5ℓ로 될 때까지 100시간 동안 유가식 배양을 실시하였다. 이때 공급배지의 조성은 Table 1에 나타냈으며 질소원의 농도를 감소시켜 세포 성장보다는 생성물 형성이 유리하도록 하였다. 이러한 유가식 배양의 결과를 Fig. 6에 나타내었다.

세포농도는 60시간까지는 증가하였으나 그 이후에는 감소하는 경향을 나타냈는데 이는 생성물 증가에 따른 배양액의 점도 증가로 물질전달의 장애가 심각한 것으로 판단되었다.

생성물의 농도는 60시간 이후에 급격히 증가하여 11g/ℓ까지 도달하였으며 이는 회분식의 경우보다 향상된 값이며 생산성은 약간 증가된 0.11g Gellan/ℓ/hr 값을 얻었다.

연속배양

연속조업의 안정성을 확인하기 위하여 900시간 동안 낮은 희석률 범위에서 실험한 세포농도와 배양액의 겔보기점도를 Fig. 7에 나타냈다. 겔보기 점도가 증가하는 동안에는 세포농도가 감소하며, 세포농도가 감소하여 생성물 농도가 낮아지고 겔보기 점도가 감소되면 서서히 세포농도는 증가한다. 이러한 경향은 회분식 배양의 결과와도 일치하는 것으로 점도 증가로 인한 물질전달 장애 특히 산소공급속도가 크게 제한받는 것으로 이해될 수 있다.

연속조업에 대한 정상상태(steady state)는 각 희석률마다 평균체류시간의 5배 이상의 시간이 경과한 후에 도달하였으며 이는 세포농도, 배양액의 겔보기 점도 및 생성물농도가 일정한 값에 수렴하는 것으로

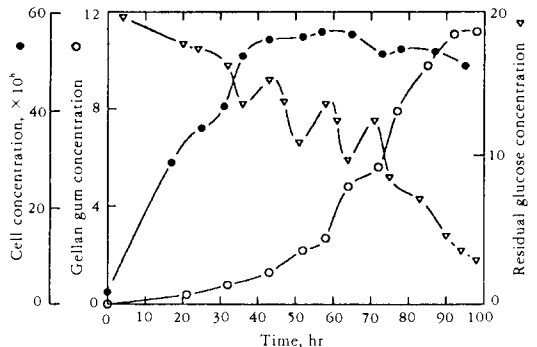


Fig 6. Time courses of fed-batch culture.

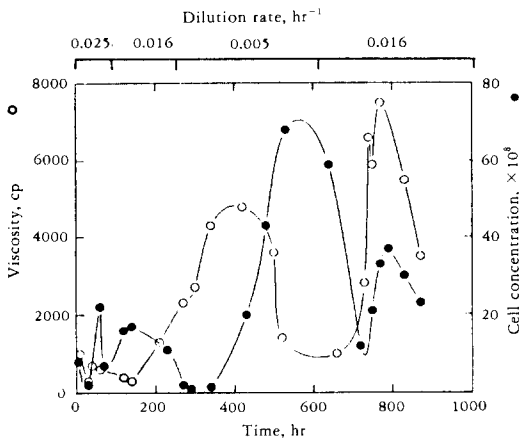


Fig 7. Apparent viscosity and cell concentration of the continuous culture.

Table 2. Yield and productivity of various culture modes.

Culture mode	Yield ($\Delta P/\Delta S$)	Productivity (gGellan/l /hr)	Gellan concentration(g/l)
Batch	0.38	0.09	9
Fed-batch	0.25	0.11	11
Continuous (Steady state)	D=0.06hr ⁻¹	0.44	6.9
	D=0.10hr ⁻¹	0.31	5.8
	D=0.14hr ⁻¹	0.23	4.3
	D=0.18hr ⁻¹	0.13	0.468

확인하였다.

회석률을 0.06, 0.10, 0.14 및 0.18hr⁻¹ 등으로 변화시켜 얻은 결과를 Table 2에 회분식, 유가식과 함께 비교하였다.

회석률이 증가하면 수율과 생성물 농도는 감소하였으며 생산성은 회석율이 0.14hr⁻¹일 때 가장 우수한 값을 나타냈으며 이는 회분식에 비해 6배 증가된 값이다. 이러한 결과는 대량생산시 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

앞으로 산소전달의 장애를 극복하기 위한 연구와 생성물을 연속적으로 분리하는 공정의 개발 등이 이루어진다면 보다 큰 생산성 향상을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

Gellan형 미생물 다당류를 생산하는데 관련된 기

초 자료를 얻기 위하여 배지조성, 배양온도 및 초기 pH등에 대한 플라스크 실험을 수행하였으며 이를 근거로 회분식, 유가식 및 연속배양을 실시하였다. 또한 배양액의 비뉴우튼성 유체 특성을 조사하였고 이때의 교반동력을 측정하였다.

플라스크 배양을 통하여 얻은 결과를 이용하여 회분식 배양의 최적조건을 확립하였으며 각종 metabolic parameter들을 추정하였다. 유가식과 연속식 배양을 통하여 생산성 향상을 시도한 결과 유가식과 연속식 배양에서 생산성 향상을 꾀할 수 있었다. 고점성 배양액에서의 물질전달 장애현상을 극복하기 위한 일련의 연구가 필요하다고 사료되며 이로부터 생산성 향상을 크게 기대할 수 있을 것으로 보인다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 지원(관리번호 911-1005-029-2)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. K. S. Kang and G. T. Veeder(1982), US Patent, 4, 326,053.
2. K. S. Kang and G. T. Veeder(1983), US Patent, 4, 377,636.
3. P. E. Jansson, B. lindbreg and P. A. Sandford (1983), Structural Studies of Gellan Gum, an Extracellular Polysaccharide Elaborated by *Pseudomonas Elodea*, *Carbohydrate Res.*, **124**, 135-139.
4. M. A. O'Neill, R. R. Selvendran and V. J. Morris(1983), Structure of the Acidic Extracellular Gelling Polysaccharide Produced by *Pseudomonas Elodea*, *Carbohydrate Res.*, **124**, 123-133.
5. P. E. Jansson, N. Savitri Kumar and B. Lindbreg(1986), Structural Studies of a Polysaccharide(S-88) Elaborated by *Pseudomonas ATCC 31554*, *Carbohydrate Res.*, **156**, 156-172.
6. V. Caroll, G. R. Chilver, D. Franklin, M. J. Miles and V. J. Morris(1982), Studies of the Extracellular Polysaccharide from *Pseudomonas elodea*, *Int. J. Biol. Macrol.*, **4**, 432-433.

7. V. Carroll, G. R. Chilver, D. Franklin, Miles and V. J. Morris and S. G. Ring(1983), Rheology and Microstructure of the Microbial Polysaccharide from *Pseudomonas elodea*, *Carbohydrate Res.*, **114**, 181-191.
8. P. E. Jansson, B. Lindberg, G. Widmalm and P. A. Sandford(1985), Structural Studies of an Extracellular Polysaccharide(S-130) Elaborated by *Alcaligenes* ATCC 31555, *Carbohydrate Res.*, **139**, 217-223.
9. B. W. Chung et al.(1990), *K. J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 35-240.
10. K. S. Kang and G. T. Veeder et al.(1982), *Appl. Environ., Microbiol.*, **43**, 1086.
11. I. W. Sutherland(1981), *Xanthomonas* Polysaccharides-Improved Methods for Their Comparison, *Carbohydr. Polymers*, **1**, 107-115.
12. A. D. Marlene and D. M. William(1981), *Bio-luminescence and Chemiluminescence*, Academic Press, N. Y.
13. Pil Kyung Lee, Ho Nam Chang and Byung Hong Kim(1989), Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 in Continuous Fermentation, *Hwahak Konghak*, **27**, 1-6.
14. B. J. Michel and S. A. Miller(1962), *J. AIChE.*, **8**, 262-266.