

## 메탄올로부터 *Methylobacterium organophilum*을 이용한 Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate와 다당류 Methylan의 최적 생산조건

김 재 연 · 김 선 원 · \*오 덕 근 · 임 현 수 · †김 정 회

한국과학기술원 생물공학과

\*우석대학교 식품공학과

### Optimal Production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and Polysaccharide Methylan by *Methylobacterium organophilum* from Methanol

Jae-Yeon Kim, Sun-Won Kim, Deok-Kun Oh\*, Hyun-Soo Lim and Jung-Hoe Kim†

Department of Biotechnology, Korea Advanced Institute of Science and Technology,  
Taejon 305-701, Korea

\*Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Chunju 565-800, Korea

#### ABSTRACT

The environmental and physiological factors affecting the production of exopolysaccharide (Methylan) and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB) by *Methylobacterium organophilum* were investigated. The maximum PHB content was obtained at 38°C whereas maximum polysaccharide concentration was 3.54g/ℓ at 30°C. Optimum pH was pH 7-8 for PHB production and pH 6-7 for polysaccharide production, respectively. Under the condition of Mo<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup> limitation with nitrogen limitation, the PHB accumulation was increased, whereas the polysaccharide production was decreased as compared with that of solenitrogen limitation. Under the condition of sole K<sup>+</sup> limitation, cell growth was significantly inhibited and no polysaccharide was produced. However, the PHB content was as high as 60% of dry cell weight. Effect of C/N ratios (methanol/ammonium) in the feeding solution was examined for the simultaneous production of polysaccharide and PHB. The higher ratio of C/N showed the lower cell growth, higher content of PHB in cells, and higher yield of polysaccharide.

#### 서 론

메탄올은 C<sub>1</sub> 화합물의 일종으로 생물공학분야에서 탄소원으로써 주목받고 있다(1). 다른 탄소원에 비해 공급량이 풍부하고 가격이 저렴하다는 경제적인 이유뿐만 아니라, 단세포 단백질(single cell protein), 아미노산, 생분해성 고분자, 각종 비타민 등의

생물학적인 생산도 가능하기 때문에 탄소원으로써의 이용가능성이 매우 높다. 특히, 생물공정에 있어서 원료로서 메탄올의 장점은 완전한 수용성이고 저장과 수송이 용이하며 고순도이면서 동시에 제한된 미생물에 의해서만 사용되기 때문에 다른 미생물에 의한 오염이 거의 되지 않는다는 장점도 함께 지니고 있다.

생분해성 플라스틱인 Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB)는 최근 난분해성 플라스틱으로 인한 환경문

† Corresponding Author

제가 심각해짐에 따라 그 대체물질로서 연구가 활발하게 진행되고 있다. 또한 PHB는 생분해성과 함께 생체적합성, 기계 차단성, 광학활성과 다른 고분자와 혼합 용이성 등 그 다양한 특성으로 인해 수술용 봉합사, 인공장기, 포장재, 자외선 차단용 화장품과 폴리에스터 대체용 등으로 용도 개발이 계속 이루어지고 있다(2).

다양한 미생물에 의하여 생산되는 세포외 다당류는 독특한 물리적 성질을 가지는 고분자이다. 다당류의 구조특성에 따라 겔 형성능력, 표면장력의 조절능력, 수분흡수성, 결합능, 점착능, 유희능 및 필름 형성능 등의 광범위한 특성을 가지므로 그 동안 식품, 화장품, 석유산업, 제지산업 등 각종 산업의 중요한 소재로써 사용되어 왔다. 최근에 와서는 각종 세균질병의 진단, 예방 또는 치료 등과 관련되는 생물활성을 갖는 소재로써 개발되고 있어 그 중요성이 더욱 높아지고 있다(3, 4).

본 연구에서는 메탄올 자화세균인 *Methylobacterium organophilum*이 배양조건 및 배지성분에 따라 PHB와 세포외 분비 다당류의 생성능력이 매우 우수함을 발견하였기에 배양의 환경인자들이 균체증식과 다당류 및 PHB의 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

사용한 균주는 *Methylobacterium organophilum* NCIB 11278중 다당류 생성능이 우수한 K-1 균주를 사용하였다(5). 배지성분은 탄소원 및 에너지원으로 메탄올, 질소원으로는 0.6g/l의  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 인산원으로는 1.31g/l의  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 와 2.13g/l의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . 그리고 무기염 ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ )이 함유된 화학합성 배지를 사용하였다.

### 배양방법

유가식 배양을 위하여 5ℓ 발효조를 사용하였다. 발효조 내의 배지에 5%(v/v) 정도의 균을 접종하여 초기 배양 액량을 3ℓ로 하였다. 교반속도는 용존산소(DO) 농도를 포화농도의 20% 정도가 되도록 300rpm으로부터 시작하여 1,200rpm까지 서서히 증가시켰다. 통기량은 1vvm, 온도는 30℃, pH 7을 기준으로 하고 실험목적에 따라 특정인자들을 변화시켰다. 메탄올은 DO-stat 방법으로 공급하였다

(5). DO-stat 방법은 메탄올이 고갈되었을 때 순간적으로 용존산소농도가 증가한다는 사실에 기초하여 용존산소농도가 미리 정해진 수준보다 높아지게 되면 일정시간 동안 메탄올 공급펌프를 작동시켜 메탄올을 공급하는 on-off 조절 방식이다. 이때 질소원을 제외한 다른 모든 성분의 무기염들도 함께 공급하였다.

### 분석방법

균체량과 다당류량을 측정하기 위해 배양액을 적정비율로 희석한 후 12,000rpm에서 30분간 원심분리한 상등액을 다당류(메틸란)의 측정에 사용하고, 침전균체는 증류수로 세척하고 건조시킨 후 건조균체량을 측정하였다. 다당류의 측정은 앞에서 얻어진 원심분리 상등액에 2배의 에탄올을 첨가하여 10,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 세척하고 건조하여 측정하였다. PHB 농도는 6% SE-30이 처리된 Chromosorb WHP(100~120mesh)를 충전한 column을 사용하여 gas chromatography(Shimadzu GC-8A)로 분석하였다(6). 메탄올은 gas chromatography를 사용하여 PHB와 동일 분석조건으로 측정하였다. 질소원은 Indo-phenol 방법에 의해 측정하였다(7).

## 결과 및 고찰

### 다당류 및 PHB 생산에 관한 온도의 영향

다당류 또는 PHB 발효에 있어서 온도는 균체증식뿐만 아니라 산물생성에 영향을 주는 가장 중요한 인 중의 하나이다. 온도를 26℃로부터 38℃까지 변화시키면서 유가식 배양을 시도하였다(Fig. 1). 이때 pH는 7.0으로 고정하였다. 자료로서 나타내지는 않았지만 질소원의 농도는  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 초기에 0.6g/l만 첨가하였기 때문에 배양시작 후 약 15~18시간 후에 고갈되었다. Fig. 1로부터 발효공정에 관련된 인자들을 계산하여 Table 1에 나타내었다. 최대균체 농도는 온도가 증가할수록 약간 증가하였으나 큰 차이는 없었다. 최대 비증식속도는 26℃에서 34℃까지는 0.17( $\text{hr}^{-1}$ )에서 0.27( $\text{hr}^{-1}$ )까지 서서히 증가하였고 34℃와 38℃에서는 비교적 일정하였다(Table 1).

PHB 생산은 질소원의 고갈에 의해서 촉진되기 때문에 비증식속도가 낮은 26℃에서는 질소원 고갈 시간이 지연됨으로 인하여 PHB의 생산시작도 지연되었다. 최종 PHB의 함량은 온도가 증가할수록 증

Table 1. Effect of cultivation temperature on fermentation parameters under nitrogen limitation.

Parameter Temp(°C)	X (g/l)	PHB (g/l)	PS (g/l)	PHB/X %	PS/X (%)	$\mu_{max}$ (hr <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	Y <sub>PHB/S</sub> (g/g)	Y <sub>PS/S</sub> (g/g)
26	3.112	0.983	2.978	31	96	0.171	0.134	0.057	0.119
30	3.450	0.879	3.535	26	102	0.263	0.159	0.054	0.163
34	3.441	1.253	3.460	36	100	0.275	0.141	0.068	0.131
38	3.560	1.343	0.600	37	17	0.273	0.162	0.082	0.027

pH was controlled at 7.0

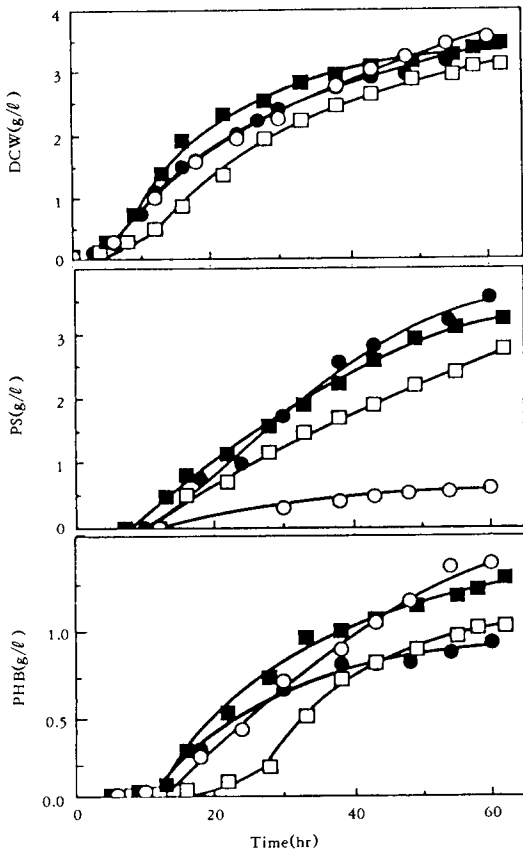


Fig. 1. Effect of cultivation temperature on cell growth (DCW), polysaccharide(PS) and PHB production. 26°C(□), 30°C(●), 34°C(■) and 38°C(○) at pH 7.0.

가추세를 보였으며 38°C에서 37%로서 가장 높았다. 다당류도 PHB와 같이 질소원이 고갈되면서 생성되었다. 다당류 생산은 온도에 따라 현저하게 차이가 나는데 30°C에서 3.54g/l로 최대값을 나타내었으며 특히 38°C에서는 전혀 생성되지 않았다. 단

위 균체당 다당류 농도(PS/X)와 메탄올에 대한 다당류 수율(PS/S)도 30°C에서 가장 높았다. 이상의 실험결과로부터 PHB의 생산을 위해서는 38°C가, 다당류의 생성을 위해서는 30°C가 최적 온도임을 알 수 있었다.

#### 다당류 및 PHB 생산에 관한 pH의 영향

생물고분자의 발효는 대개의 경우 pH 6~7.5 사이에서 수행되고 있다. 본 실험의 경우 pH 7로 조절하였으며 온도는 30°C로 유지하였다. 균체증식을 살펴 보면 pH 5에서는 거의 증식이 일어나지 않았고 pH 8에서는 약간의 지연시간을 보여주었다(Fig. 2). 최종 균체농도는 pH 6에서 8까지 거의 비슷하였지만, 세포 비증식속도는 pH 6~7 사이에서 0.24~0.26(hr<sup>-1</sup>)이었으며 pH 8에서는 최대값의 60%로 감소하였다(Table 2).

Suzuki 등도 PHB 생산을 pH 7에서 수행하였다(8, 9). PHB 축적은 pH 7과 8 사이에서는 큰 차이가 없었으나, pH 6인 경우 PHB의 양뿐만 아니라 메탄올에 대한 PHB 수율과 균체내 PHB 함량도 감소하였다. 다당류의 생산은 pH 6~7에서 최대값 3.2~3.5g/l이었으며 이밖의 범위에서는 급격히 낮아졌다. 그러므로 PHB의 생산은 pH 7~8이 최적 이었고 다당류의 생산은 pH 6~7이 최적이었음을 확인하였다. 또한, PHB와 다당류의 동시 생산을 할 경우에는 최적 pH는 7임을 알 수 있었다.

#### 다당류 및 PHB 생산에 관한 이온 결핍의 영향

다당류나 PHB의 생산은 불균형 영양 상태하에서 세포의 성장이 억제되면서 생산되는데 불균형 영양 조건은 많은 경우 특정 배지성분의 결핍 또는 농도 제한으로 인하여 유발된다. 보고된 바에 의하면 PHB는 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>4-</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> 등의 결핍에 의하여 촉진되었으며(10, 11, 12), 다당류는 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mo<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, K<sup>+</sup> 등의 결핍에 의하여 촉진되었다(13). 이와 같이 질소원

Table 2. Effect of cultivation pH on fermentation parameters under nitrogen limitation.

Parameter	X (g/l)	PHB (g/l)	PS (g/l)	PHB/X %	PS/X (%)	$\mu_{max}$ (hr <sup>-1</sup> )	$Y_{XS}$ (g/g)	$Y_{PHB}$ (g/g)	$Y_{PS}$ (g/g)
pH 5	0.076	0.004	0.000	6	0.000	0.014			
pH 6	3.160	0.975	3.150	31	100	0.242	0.141	0.044	0.141
pH 7	3.450	1.103	3.535	31	102	0.263	0.159	0.054	0.163
pH 8	3.380	1.190	2.680	35	79	0.155	0.154	0.054	0.122

Temperature was fixed at 30°C

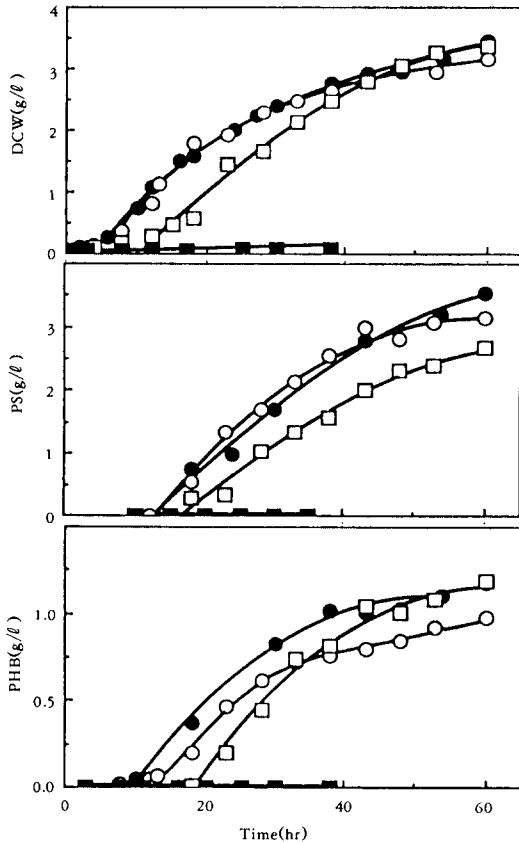


Fig. 2. Effect of cultivation pH on cell growth (DCW), polysaccharide(PS) and PHB production. pH 5(■), pH 6(○), pH 7(●) and pH 8(□) at 30°C.

및 금속이온의 결핍이 생물고분자의 생성을 촉진하므로 질소원 제한조건하에서 금속이온의 결핍실험을 수행하였다.

배양조건은 온도 30°C, pH 7이고 초기 질소원 농도는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6g/l 이었다. Control은 금속이

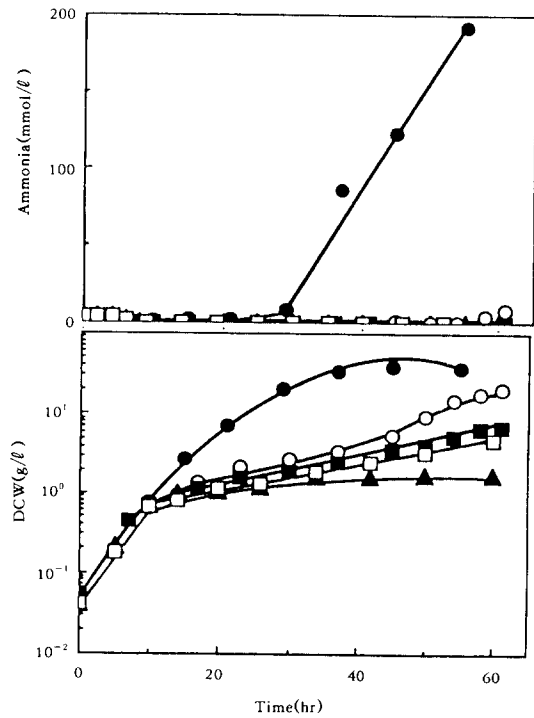


Fig. 3. Effect of C/N ratio of feeding medium on NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration and cell growth. C/N ratio of 7.8(●), 10(○), 20(■) and 30(□), only methanol(▲) at pH 7.0 and 30°C.

은 결핍이 없는 것을 의미한다(Table 3). Mo<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 결핍 배지에서는 균체증식은 control과 큰 차이가 없었고, PHB 축적량은 증가한 반면 다당류의 농도는 감소하였다. 특히 Mg<sup>2+</sup> 결핍의 경우 Mn<sup>2+</sup>이나 Mo<sup>2+</sup> 결핍보다 그 효과가 크게 나타나 PHB 농도는 1.96g/l 까지 증가하였고 다당류의 생산은 2.03g/l 까지 감소하였다. Fe<sup>2+</sup> 결핍 경우는 균체내 PHB 함량은 변화가 없었으나, 균체농도,

Table 3. Effect of metal ion deficiency under  $\text{NH}_4^+$  limitation on fermentation parameters.

Parameter limitation comp.	X (g/l)	PHB (g/l)	PS (g/l)	PHB/X (%)	PS/X (%)	$\mu_{max}$ (hr <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{PHB/S}$ (g/g)	$Y_{PS/S}$ (g/g)
Control	3.450	1.173	3.535	34	102	0.263	0.159	0.054	0.163
Mo <sup>++</sup>	3.310	1.658	3.100	50	94	0.241	0.155	0.078	0.146
Fe <sup>++</sup>	2.559	0.872	2.241	34	88	0.215	0.130	0.045	0.114
Mn <sup>++</sup>	3.153	1.215	2.711	39	86	0.240	0.138	0.053	0.119
Mg <sup>++</sup>	3.690	1.956	2.025	53	55	0.266			
only K <sup>+</sup> *	0.730	0.435	0.000	60	0	0.203	0.045	0.027	0

\* Only K<sup>+</sup> was deficient in the presence of sufficient amount of nitrogen source

Table 4. Effect of feeding of C/N ratio in the medium on fermentation parameters.

Parameter C/N ratio (mol/mol)	X (g/l)	PHB (g/l)	PS (g/l)	PHB/X (%)	PS/X (%)	$\mu_{max}$ (hr <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{PHB/S}$ (g/g)	$Y_{PS/S}$ (g/g)
only MeOH	1.920	0.858	2.198	45	110	0.269	0.118	0.053	0.134
7.8	37.63	6.849	0.5	18	1.0	0.266	0.280	0.051	0.004
10	19.86	1.924	2.990	10	15	0.268	0.244	0.028	0.039
20	8.812	2.813	6.133	32	90	0.267	0.197	0.070	0.177
30	4.242	1.935	3.638	45	85	0.267	0.172	0.086	0.132

PHB, 다당류 모두가 감소하였다. 질소원의 제한없이 단지 K<sup>+</sup>만의 결핍의 경우 균체증식에 대한 저해가 심하여 최종 균체농도가 0.73g/l 이었고 질소원이 제한되지 않아서 다당류 생성은 전혀 일어나지 않았으며 PHB 함량은 60%까지 증가하였다. 이온 결핍 실험을 종합하여 보면 PHB의 생산을 위해서는 K<sup>+</sup> 또는 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>와 Mg<sup>2+</sup>의 2중 결핍이 가장 좋았고 다당류 생산을 위해서는 질소원 결핍이 필수조건이었다. 그러나 질소원의 결핍에 의한 다당류 생산의 경우에는 PHB가 세포 내에 20~30% 정도 축적된 반면, K<sup>+</sup>만의 결핍의 경우에는 다당류의 생성이 전혀 일어나지 않고 PHB만 축적되는 특징을 보였다.

다당류 및 PHB 생산에 관한 C/N 비율 변화에 대한 영향

일반적으로 생물고분자의 생산은 많은 세균과 곰팡이에서 높은 탄소원 대 질소원의 비율에 의해서 촉진된다(14, 15). 다당류와 PHB의 생성이 질소원의 농도에 의하여 크게 영향을 받고 있으므로 다른 비율의 탄소원/질소원의 지속적인 첨가를 통해 질소원의 결핍 정도에 따른 균체의 증식, PHB 생성, 다

당류의 생성에 대한 영향을 살펴 볼 수 있다. 유가식 배양에서 공급되는 배지내의 탄소원/질소원의 물비를 7.8, 10, 20, 30으로 달리하였고 이 때, 질소원으로 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 대신 암모니아수를 사용하였다. 메탄올만 첨가하는 경우는 C/N 비율이 30인 경우와 같은 양의 암모니아를 초기에만 넣어주었고 유가배양 동안에는 첨가하지 않았다.

Fig. 3은 균체농도와 암모니아 변화를 나타낸 것이다. 첨가하는 C/N 비율이 7.8일 때만 제외하고 다른 경우는 암모니아 농도가 제한되어 더 이상의 배지 내 축적은 없었다. 균체증식은 첨가되는 질소원에 의해 촉진되므로 C/N 비율이 낮을수록 최종균체 농도는 비례적으로 증가하였다. PHB 생산은 C/N 비율이 7.8에서 0.85g/l 로서 가장 높았으나, 이것은 균체의 농도가 37.6g/l 로 다른 경우에 비해서 현저히 높기 때문이라 생각되었다(Table 4). 균체중 PHB 함량은 C/N 비율이 큰 경우 높게 나타나 메탄올만 첨가한 경우와 C/N 비율이 30인 경우에 45%로 가장 높았다. 최종 다당류의 농도는 C/N 비율 20의 경우 6.1g/l 로 가장 많이 생성되었지만 이것 역시 높은 균체농도로 인한 다당류의 절대량이 최대값으로 나타난 것이고 단위균체당 다당류의 생

성은 C/N 비율이 높을수록 증가하였다. 결론적으로 C/N 비율이 높을수록 균체증식은 억제되었으나 건조균체중량당 PHB 함량과 다당류의 생성은 증가하는 추세를 보였다.

## 요 약

*Methylobacterium organophilum*을 이용하여 다당류(메틸란)와 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB)의 생산에 영향을 주는 환경 및 생리적 인자들을 조사하였다. PHB 축적을 위하여는 38°C, 다당류의 생산을 위하여는 30°C가 최적이었다. pH의 경우는 PHB의 축적은 pH 7~8, 다당류의 생산은 pH 6~7이 최적이었다.

질소원 제한 상태하에서의  $Mo^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , 또는  $Mn^{2+}$  등의 결핍조건에서는 질소원만의 제한조건보다 PHB 축적은 증가하였으나, 다당류 생산은 감소하였다. 질소원의 제한없이  $K^+$ 만의 결핍조건에서는 균체증식도 억제되었고 다당류도 생성되지 않았지만 건조균체중량당 PHB 함량은 60%까지 증가하였다. PHB와 다당류의 동시 생산을 위한 C/N 비율의 효과는 C/N 비율이 높을수록 질소원의 제한효과 때문에 균체증식은 감소되었지만 건조균체중량당 PHB 함량과 다당류의 생성은 현저히 증가하였다.

## 감 사

본 연구는 과학기술처 선도기술개발사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. U. Faust and P. Prave (1983), Biomass from methane and methanol. pp. 83-103, In H. Dellweg(ed.). Biotechnology, Vol. 3, Verlag Chemie GmbH, New York.
2. P. A. Homes (1985), Applications of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate -a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.*, **16**, 32-36.
3. I. W. Sutherland (1983), Extracellular polysaccharides. pp. 531-574. In H. Dellweg(ed.), Biotechnology, Vol. 3, Verlag Chemie GmbH, New York.
4. A. Margaritis and G. W. Pace (1985), Microbial polysaccharides. pp. 1005-1043. In M. Y. Murray(ed.), Comprehensive Biotechnology, Vol. 3, Pergamon Press, Oxford.
5. Choi, J. H. D. K. Oh, J. H. Kim and J. M. Lebeault (1991), Characteristics of a novel high viscosity polysaccharide, Methylan produced by *Methylobacterium organophilum*. *Biotechnol. Lett.*, **13**, 417-420.
6. G. B. Braunegg, Sonnleitner and R. M. Lafferty (1978), A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 29-37.
7. W. T. Bolleter, C. J. Bushman and P. W. Tidwell (1961), Spectrophotometric determination of ammonia as indol-phenol. *Anal. Chem.*, **33**, 592-594.
8. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu (1986), Mass production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322-329.
9. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu (1986), Mass production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 487-491.
10. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu (1986), Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fed-batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 366-369.
11. M. Daniel, J. H. Kim, M. Daniel and J. M. Lebeault (1992), "Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of PHB by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas 135*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 702-706.
12. Choi J. H., J. H. Kim, M. Daniel and J. M. Lebeault (1989), "Optimization of Growth Medium and Poly- $\beta$ -hydroxybutyric Acid Production from Methanol in *Methylobacterium organophilum*", *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 392-396.
13. G. W. Pace and R. C. Righelato (1980), Pro-

- duction of extracellular microbial polysaccharides. *Adv. Biochem. Eng.*, **15**, 41-70.
14. P. Souw and A. L. Demain (1979), Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 1186-1192.
15. Y. C. Shin (1988), Studies on the production of exopolysaccharide pullulan from *Aureobasidium pullulans*. Ph. D. thesis, KAIST, Korea.