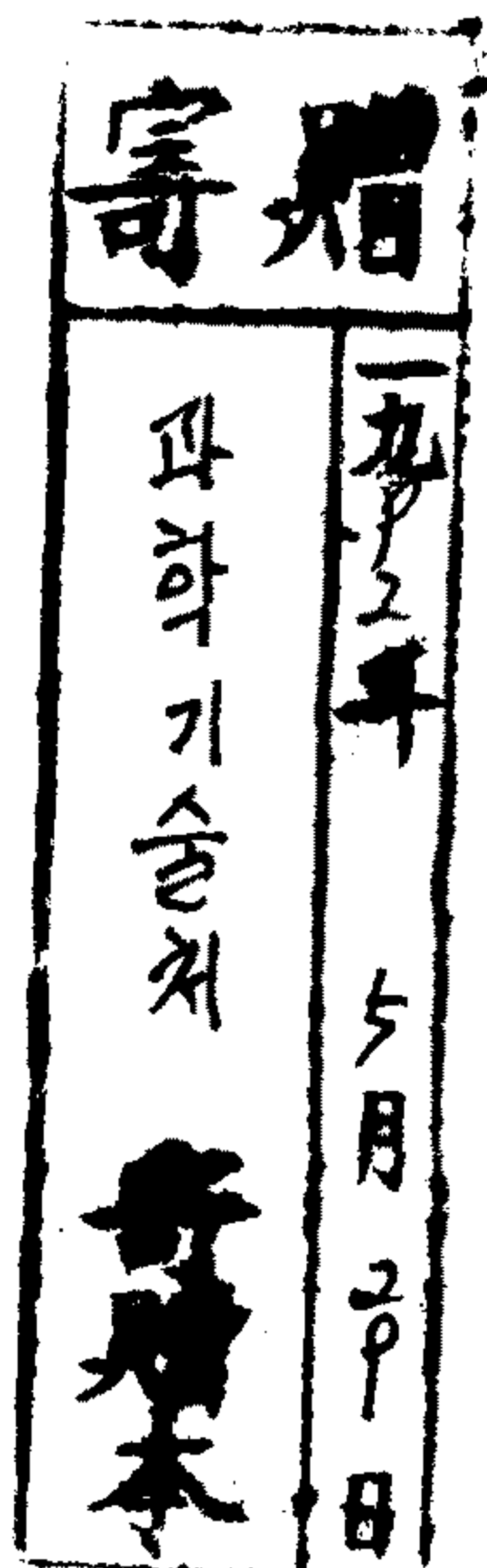


제 1 차년도
중간보고서

메탄올로 부터 신규 생물고분자의 생산을 위한 발효공정의 개발에 관한 연구

A Study on Development of Fermentation Process
for the Production of New Biopolymer
(Polysaccharide) from Methanol

연구기관
한국과학기술원



과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 "메탄올로 부터 신규 생물고분자의 생산을 위한 발효공정의 개발에 관한 연구" 과제의 제 1차년도 중간보고서로 제출합니다.

1991. 6. 15.

주관연구기관명: 한국과학기술원 생물공학과

총괄연구책임자: 김 정 희 (한국과학기술원 생물공학과 교 수)

연 구 원: 현 창 기 (한국과학기술원 생물공학과 박사과정)

최 준 호 (한국과학기술원 생물공학과 박사과정)

오 덕 근 (한국과학기술원 생물공학과 박사과정)

임 현 수 (한국과학기술원 생물공학과 박사과정)

정 홍 채 (한국과학기술원 생물공학과 석사과정)

김 상 용 (한국과학기술원 생물공학과 석사과정)

요 약 문

I. 제 목

메탄올로 부터 신규 생물고분자의 생산을 위한 발효공정의 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

다당류 (polysaccharide)는 몇가지의 당이 고분자를 이룬 일종의 biopolymer 이다. 그러므로 다당류의 용액은 점도가 매우 높은 것이 그 특징으로서, 페인트, 섬유공업, 제지, 화장품, 식품 등 각종 산업용 용도와 식용 및 제약용으로서 그 수요는 날로 증대되고 있으며, 이 물질에 대한 세계적인 관심이 고조되고 있다. 탄소원으로서 포도당을 이용하여 xanthan gum 이나 pullulan과 같은 다당류의 생산은 현재 미국, 일본, 볼란서 등에서 미생물 발효에 의하여 이루어지고 있다. 그러나 생물공업에서 가장 문제가 되고 있는 것은 발효 원료중 가장 큰 비중을 차지하고 있는 탄소자원을 어떻게 값이 싼 탄소원으로 대체하느냐 하는 것이다. 이러한 이유에서 methanol은 미래의 탄소원으로서 가장 유력시 되고 있다. Methanol은 석유화학 계열의 C₁-화합물의 일종으로서, 다른 탄소원에 비해 가장 풍부하며, 가격과 공급에 있어서 원활할 뿐만 아니라 수용성 (water miscibility)이 높다는 장점을 가지고 있다. Methanol을 자화하면서 다당류를 생산하는 미생물은 *Pseudomonas* 속, *Methylomonas* 속, 그리고 *Methylocystis* 속의 박테리아 정도일 뿐이다.

이상에서 볼 수 있듯이 methanol 에서 다당류의 생산은 비교적 최근에 알려진 사실이며, methanol을 생물학적 이용에 의하여 고부가가치의 생물제품을 생산하는 것을 석유화학 공업의 부산물 재이용 및 자원 활용의 측면에서 유망할 뿐만 아니라 methanol 자화세균을 이용한 다당류와 같은 고분자의 생산은 산업적으로도 매우 유용하다.

본 연구에서는 methanol을 고수율의 생물고분자인 다당류로 전환시킬 수 있는 methanol 자화세균인 *Methylobacterium organophilum*을 이용하여 다당류의 생산성을 증진시킬 수 있는 발효공정의 개발 및 생물고분자와 같은 고점도 발효공정에 적합한 생물반응기의 개발, 그리고 생성된 다당류의 점성 특성 규명을 그 목표로 한다.

III. 연구의 내용 및 범위

1. 발효조건 최적화

이전의 실험으로 확정된 다당류의 생산용 배지에서 다당류의 생산에 미치는 발효 조건의 중요한 인자인 온도, 교반속도 및 통기량 등을 조사하고 다당류 생산성을 증진시키는 최적조건을 찾는다.

2. 질소 고정 능력 향상 조건

본 균주는 질소 고정균 (nitrogen-fixer) 이므로 질소 고정에 관여하는 인자를 조절하여 다당류의 생산성 증진을 시도한다.

3. 질소원 조절에 의한 다당류 생산성 증가

고농도의 질소원은 다당류 생산을 저해하므로 질소원을 낮은 수준으로 유지하며 추가하여 다당류의 생산성을 증가시킨다.

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

1. 발효조건 최적화

이전의 실험으로 확정된 다당류의 생산용 배지에서 다당류 생산에 미치는 제반 발효조건과 다당류의 생산성을 증진시키기 위하여 유가식 배양을 수행하였다. 온도를 25

°C 부터 39°C 까지 변화시키면서, 온도가 균체증식 및 다당류의 생산에 미치는 영향을 살펴 보았다. 배양온도가 증가할 수록 최종 균체농도는 감소하였고, 최종 다당류 농도는 30°C에서 4.48 g/l로 최대값을 나타내었다. 비 증식속도는 36°C에서 0.3 hr⁻¹으로 최대값을 보였고 비다당류 생산속도는 30°C에서 0.064 g/g-hr 으로 최대값을 보였다. 균체 증식기에서는 균체증식 최적 온도인 36°C로 다당류 생산기에서는 산물 생성 최적온도인 30°C로 온도변환을 시킨 2단계 발효를 수행하였다. 그 결과 30°C로 배양 경우 보다 생산성은 증가 했으나 최종 다당류의 농도는 최종 세포농도 저하로 감소하였다. 균체증식과 다당류 생산은 산소가 제한되면 감소하고 산물생성 초기에서 높은 교반속도와 통기속도는 다당류 생성을 저해하므로 최종 다당류 농도를 향상 시키기 위해서는 용존산소량이 유지되는 범위에서 서서히 교반속도와 통기량을 증가시켜야 한다.

2. 질소 고정에 영향을 주는 인자들

본 균주는 질소 고정균 (nitrogen-fixer) 이므로 질소고정에 영향을 주는 Mo⁺⁺와 Fe⁺⁺ 이온과 용존산소의 영향을 조사하였다. Sodium molybdate (Na₂MoO₄·2H₂O)의 농도를 64 µg/l로 증가시키면 균체증식도 함께 약 2.4배 증가하였으며 그 이상의 농도 (6.4 mg/l)까지 에서는 Mo⁺⁺ 농도에 관계없이 비증식 속도가 일정하였고 균체농도도 6 g/l의 수준으로 일정하였다. 반면 Mo⁺⁺ 농도가 증가함에 따라 다당류의 생산은 증가하여 6.4 mg/l의 Mo⁺⁺를 첨가한 경우 다당류 농도 4.5 g/l로 Mo⁺⁺를 첨가하지 않은 경우보다 약 6배 증가하였다. Ferrous sulfate (FeSO₄·7H₂O)의 첨가는 균체증식 및 비증식 속도와 다당류 생산을 모두 증가시켜 10.4 mg/l 농도에서 균체건조중량 7.8 g/l, 다당류 농도 4.0 g/l로 최대값을 보였으나, 그 이상의 농도에서는 균체증식 및 비증식 속도와 다당류 농도가 감소하였다. 질소고정시 molybdenum은 균체증식보다 다당류 생성을 증가시키는 역할은 하였고, iron은 다당류 생성 보다 균체증식에 영향을 주어 iron 양은 균체증식을 증가시켜 다당류 생성을 증가시켰다. 질소 고정시기에서 용존산소가 제한되면 세포증식이 감소하고 그 결과 다당류 생성이 감소되었다.

3. 질소원 조절에 의한 다당류 농도의 증가

배양 과정에서 다당류의 생산은 배지 내의 질소원이 결핍 (nitrogen-limitation) 되었을때만 이루어 졌으며, 일단 질소원이 결핍되어 다당류의 생산이 시작되면 질소원을 다시 첨가하여도 세포의 성장이 회복되지 않았을 뿐만 아니라 다당류의 생산도 저해되었다. 배지 중의 iron 농도를 증가시킨 후 질소원이 결핍된 후 질소원을 다시 첨가하였을때도 세포증식과 다당류 생산이 저해되었으나 배지중의 molybdenum 농도를 증가시킨 후 질소원이 결핍된 후 질소원을 다시 첨가하였을때는 세포증식은 약간 저해되었으나 다당류의 생성은 회복되었다. 또한 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 기질 저해성 유무를 알아보기 위해 0.6 g/l에서 4.2 g/l의 농도에서 실험한 결과 농도가 증가할수록 비중식속도, 비기질 소비속도, 비다당류 생산속도가 낮아짐을 보여 주었다. 질소원이 배지내에서 결핍되기 전에 질소원이 첨가되었을 때에 균체의 증식은 계속해서 왕성하게 일어났으며, 질소원 농도를 낮은 수준으로 유지시키면서 총 3.0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 넣어 주었을때 12.5 g/l의 다당류를 얻을 수 있었다.

이상의 결과로 부터 생산된 polysaccharide는 소량으로는 현저히 높은 점도를 보임으로써 유체의 점도 증진제 등으로 이용될 수 있는 가능성이 매우 높음을 알 수 있었다. 또한 다당류의 고점도로 인하여 배양과정에서 발생하는 교반과 통기상의 문제점을 극복할 수 있는 고점도의 다당류 생산용 생물반응기 기술의 개발이 시급하다.

SUMMARY

For the production of polysaccharide with *Methylobacterium organophilum* from methanol, the fermentation process influencing the production of exopolysaccharide, nitrogen fixation-favored conditions and production by nitrogen regulation were investigated.

Fed-batch fermentations at various temperature ranging between 25°C to 39°C were studied. The maximum cell density decreased as fermentation temperature increased and the maximum product concentration was 4.48 g/l at 30°C. The specific growth rate had a maximum value of 0.3 hr⁻¹ at 36°C, whereas the specific production rate had a maximum value of 0.064 g/g-hr at 30°C. A two stage fermentation with temperature shift-down was carried out to optimize separately, at each stage, both cell growth (36°C) and polysaccharide formation (30°C) and then the polysaccharide productivity was increased compared to single stage fermentation at 30°C, however, the maximum polysaccharide concentration was decreased because the final cell density was relatively low.

Cell growth and polysaccharide production were severely decreased by oxygen-limitation and high speed of agitation or high rate of aeration at early production phase might be negatively affect the polysaccharide formation. For the increase of polysaccharide production, aeration rate and agitation speed must be gradually increased to maintain the certain level of dissolved oxygen during the fermentations

Effects of the concentration of Mo⁺⁺ and Fe⁺⁺ and the dissolved oxygen level, were studied because these conditions might alter the nitrogen fixation activity of the cells. When 6.4 mg/l sodium molybdate was added to the medium, cell

growth and product concentration were increased 2.4 and 5.7 fold, respectively, compared with no Mo^{++} - containing medium. The addition of FeSO_4 increased both cell growth and product concentration with increasing concentration up to 10.8 mg/l, but repressed by higher Fe^{2+} concentration. The increase of the molybdenum concentration affected not cell growth but polysaccharide production, however, the increase of the iron concentration increased cell growth which resulted in the increase of polysaccharide production.

The polysaccharide production was significantly stimulated by depletion of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in fermentation medium. The toxic effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on cell growth was observed at concentration above 1.8 g/l, and the specific growth rate, the specific production rate, and the substrate consumption rate were decreased as the concentration of ammonium sulfate was increased. To overcome these phenomena, by addition of ammonium sulfate before nitrogen depletion, the cell growth was maintained actively and polysaccharide production was obtained to 12.5 g-polysaccharide/l with 3.0 g/l of total $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ under controlled nitrogen concentration.

CONTENTS

I. INTRODUCTION	(16)
1. Overview	(16)
2. Literature Backgrounds	(17)
1) Methanol-utilizing bacterium	(17)
2) Application of methylotrophs	(19)
3) Physiology of nitrogen fixation	(19)
4) Production of extracellular polysaccharide	(21)
II. MATERIALS AND METHODS	(24)
1. Microorganism and Media	(24)
1) Microorganism	(24)
2) Chemicals	(24)
3) Culture media	(24)
2. Culture and Fermentation Conditions	(26)
1) Preparation of inoculum	(26)
2) Fed-batch culture operation	(26)
3. Analytical Methods	(27)
1) Determination of cell growth	(27)
2) Determination of polysaccharide	(27)
3) Determination of methanol	(27)
4) Determination of ammonium sulfate	(28)
5) Measurement of viscosity	(28)
6) Determination of mass transfer coefficient	(28)
III. RESULTS AND DISCUSSION	(30)
1. Optimization of Fermentation Process	(30)
1) Typical time course of polysaccharide fermentation	(30)
2) Effect of temperature on cell growth and polysaccharide production	(35)
3) Effect of agitation speed on cell growth and polysaccharide production	(44)
4) Effect of aeration rate on cell growth and polysaccharide production	(55)

2. Nitrogen Fixation-favored Conditions	(60)
1) Effect of oxygen limitation on cell growth and polysaccharide production	(60)
2) Effect of oxygen enrichment on cell growth and polysaccharide production	(60)
3) Effect of molybdenum on cell growth and polysaccharide production	(65)
4) Effect of iron on cell growth and polysaccharide production	(65)
3. Nitrogen Regulation	(70)
1) Time of ammonium addition and its effect on cell growth and polysaccharide production	(70)
2) Effect of initial concentration of ammonium sulfate on cell growth and polysaccharide production	(77)
3) Mass production by nitrogen regulation	(77)
IV. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	(84)
V. REFERENCES	(85)

목 차

제 1 장. 서 론	(16)
제 1 절. 개 요	(16)
제 2 절. 이론적 배경	(17)
1. 메탄올 자화세균	(17)
2. 메탄올 자화세균의 응용	(19)
3. 질소 고정의 생리 특성	(19)
4. 다당류의 생산	(21)
제 2 장. 재료 및 방법	(24)
제 1 절. 미생물 및 배지	(24)
1. 미생물	(24)
2. 시 약	(24)
3. 배양 배지	(24)
제 2 절. 배양조건	(26)
1. 균주의 조제	(26)
2. 유가식 배양법	(26)
제 3 절. 분석 방법	(27)
1. 균체량의 측정	(27)
2. 다당류의 측정	(27)
3. 메탄올의 측정	(27)
4. 질소원의 측정	(28)
5. 점도의 측정	(28)
6. 물질 전달 계수의 측정	(28)
제 3 장. 결과 및 고찰	(30)
제 1 절. 발효공정의 최적화	(30)
1. 다당류 발효 typical time course	(30)
2. 균체중식 및 다당류 생산에 미치는 온도의 영향	(35)
3. 균체중식 및 다당류 생산에 미치는 교반속도의 영향	(44)
4. 균체중식 및 다당류 생산에 미치는 통기량의 영향	(55)
제 2 절. 질소 고정 향상 조건	(60)
1. 균체중식 및 다당류 생산에 미치는 산소제한의 영향	(60)
2. 균체중식 및 다당류 생산에 미치는 산소첨가의 영향	(60)

3.	균체증식 및 다당류 생산에 미치는 몰리브덴의 영향	(65)
4.	균체증식 및 다당류 생산에 미치는 철의 영향	(65)
제 3 절.	질소원 조절	(70)
1.	균체증식 및 다당류 생산에 미치는 질소원 추가시기의 영향	(70)
2.	균체증식 및 다당류 생산에 미치는 질소원 농도의 영향	(77)
3.	질소원 조절에 의한 농도 향상	(77)
제 4 장.	결론 및 제안	(84)
제 5 장.	참고문헌	(85)

LIST OF TABLES

Table

1. The properties of methylotropic bacteria (18)
2. Polysaccharide production from methane/methanol (22)
3. The composition of culture medium (25)
4. Changes of chemical compositions of purified polysaccharide during the fermentation (37)
5. Effect of temperature on fermentation parameters (38)
6. Effect of agitation speed on fermentation parameters (52)
7. Effect of aeration rate on fermentation parameters (57)
8. Effect of the initial concentration of ammonium sulfate on fermentation parameters (78)

LIST OF FIGURES

Figure

1. Typical time course of polysaccharide fermentation (31)
2. Shear stress as a function of the shear rate at different fermentation times (32)
3. Dependence of the apparent viscosity on the shear rate at different fermentation times (33)
4. Time course of consistency index and flow behavior index during the fermentation (34)
5. Rheological properties of a polysaccharide isolated at different stages of fermentation (36)
6. Effect of temperature on cell growth and polysaccharide production (39)
7. Effect of temperature on specific production rate (41)
8. Effect of temperature shift down on cell growth and polysaccharide production (42)
9. Effect of cell mass on viscosity of culture fluid containing polysaccharide (43)
10. Relationship of consistency index and polysaccharide concentration for the fermentations of various temperatures (45)
11. Relationship of consistency index and flow behavior index for fermentation broths (46)
12. Variation of pseudoplastic characteristics with the progress of fermentation for the different temperature (47)
13. Changes of the values of mass transfer coefficient by changing aeration rate, agitation speed, viscosity and polysaccharide concentration (49)
14. Effect of agitation speed on cell growth and polysaccharide production (53)
15. Effect of agitation speed on specific production rate (54)
16. Relationship of consistency index and polysaccharide concentration for the fermentations of various agitation

speeds	(56)
17. Effect of aeration rate on cell growth and polysaccharide production	(58)
18. Relationship of consistency index and polysaccharide concentration for the fermentations of various aeration rate	(59)
19. Cultivation under nitrogen free medium but containing molybdenum favoring nitrogen fixation	(61)
20. Effect of oxygen limitation on cell growth and polysaccharide production	(62)
21. Effect oxygen enrichment on cell growth and polysaccharide production	(63)
22. Effect oxygen enrichment on cell growth yield and product yield	(66)
23. Effect of molybdenum concentration on cell growth and polysaccharide production	(68)
24. Effect of iron concentration on cell growth and polysaccharide production	(69)
25. Effect of additional ammonium ion on cell growth and polysaccharide production in medium containing the low concentration of molybdenum and iron	(71)
26. Effect of additional ammonium ion on cell growth and polysaccharide production in medium containing the high concentration of molybdenum and the low concentration of iron	(73)
27. Effect of additional ammonium ion on cell growth and polysaccharide production in medium containing the low concentration of molybdenum and the high concentration of iron	(75)
28. Effect of initial concentration of ammonium sulfate on cell growth and polysaccharide production	(79)
29. Effect of the feed of ammonium sulfate on cell growth and polysaccharide production (the total amount of added ammonium sulfate is 3.0 g/l)	(80)
30. Effect of the feed of ammonium sulfate on cell growth and polysaccharide production (the total amount of added ammonium	

- sulfate is 4.2 g/l) (81)
31. Effect of the feed of ammonia water on cell growth and polysaccharide production (83)

제 1 장. 서 론

제 1 절. 개 요

화학공업 및 생물공학 분야에 있어서 C_1 화합물은 원재료로서 많은 주목이 되고 있다. 특히 메탄올은 단세포 단백질 생산 (1) 뿐만 아니라 유기산 및 아미노산의 생산 시 발효과정 중 탄소원으로 사용되고 있다. 메탄올의 장점은 저가, 고순도 (>99.8%), 완전한 수용성과 제한된 미생물에 의해서만 이용될 수 있다는 것이다. 최근 메탄올의 미생물 대사에 관한 지식 축적이 많아져 미생물 분야에서 메탄올 사용이 많아지고 있다 (2).

다당류는 공업적으로 gel과 점도증진제, 식품안정제 및 의약품 생산에 사용되고, 석유 정제시에도 사용된다. 다당류의 개발은 현재 사용되고 있는 다당류와 거의 비슷한 성질의 제품을 찾거나 새로운 응용을 위해 더 좋은 점성학적 특성을 지닌 향상된 물질을 찾는 것에 주목적을 두고 있다.

다른 자원과 달리 미생물은 광범위한 다당류를 합성할 수 있기 때문에 미생물 배양을 통해 다양한 구조 및 성질을 지닌 다당류를 얻을 수 있고 그 적용도 다양하게 할 수 있다 (3, 4).

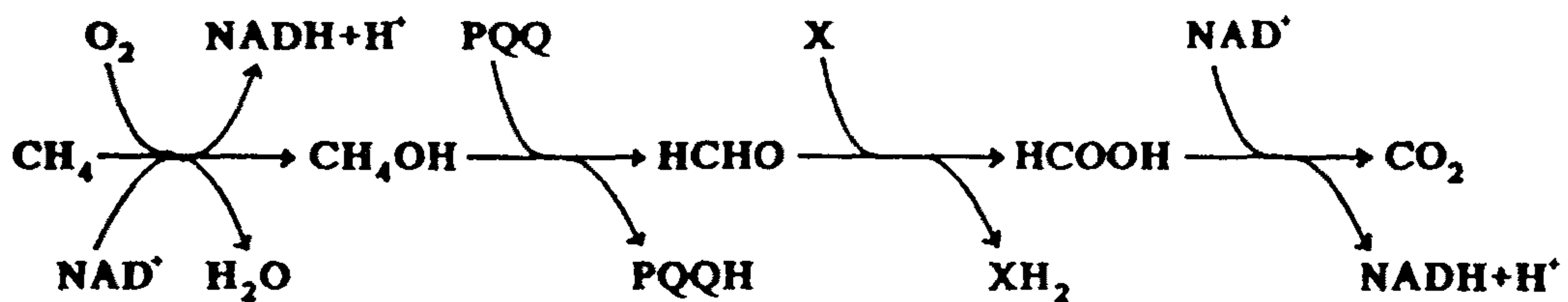
그러므로 메탄올을 탄소원으로 사용하여 다당류를 생산한다면 산업적으로 유리하다. 본 연구는 메탄올 자화세균인 *Methylobacterium organophilum*을 이용하여 다당류의 생산성 증가가 목적이다. 배양조건 (온도, 교반속도 및 통기량)이 균체중식과 다당류 생산에 미치는 영향을 살펴본다. 또한 본 균주는 질소고정균이므로 질소고정 능력을 향상시키는 조건을 찾고 질소원의 농도가 균체중식과 다당류 생산에 미치는 영향을 조사하고 다당류의 농도증가를 위해 질소원의 농도를 낮은 수준으로 유지시키면서 배양을 시도한다.

제 2 절. 이 논 저 배경

1. 메탄을 자화세균

메탄을 자화세균은 1906년도에 처음 발견 되었으며 (5), 탄소원 및 에너지원으로서 C_1 화합물을 사용할 수 있고 메탄올을 산화시켜 CO_2 를 발생시킨다. 몇 종류의 효모와 곰팡이를 제외하고 메탄 또는 메탄올을 탄소원 및 에너지원으로 사용할 수 있는 미생물은 대부분 세균이다. 알려진 메탄을 자화세균은 모두 그람 음성, 편성 호기성 (obligate aerobes) 이고 다양한 모양을 지녔다 (rods, vibrios, and cocci) (1, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

메탄올에서 자라는 세균은 intracytoplasmic 막을 많이 포함한다. 이러한 막들의 배열과 C_1 화합물 이용의 생화학 경로로 메탄올 자화세균을 두가지 타입으로 분류할 수 있다 (Type I과 Type II). Table 1은 Colby (12)에 의한 메탄올 자화세균의 분류를 생화학적 특성에 의해서 비교한 것이다. 거의 모든 메탄올 자화세균은 formaldehyde의 수준에서 탄소원 동화가 시작된다. 우선 메탄올 자화세균에 의한 메탄올에서 formaldehyde로 산화는 NAD-independent dehydrogenase (세균) 또는 oxidase (효모)에 의해서 촉진된다. 메탄올 자화세균에 있어서 메탄 또는 메탄올로 부터 이산화 탄소로 완전산화되는 경로는 다음과 같다;



Formaldehyde는 ribulose monophosphate 경로 (RuMP), serine 경로 및 xylulose monophosphate 경로 (XuMP) 중 한 경로로 동화된다. XuMP 경로는 메탄올 자화효

Table 1. The Properties of methylotropic bacteria.

	Type I Bacteria (RuMP pathway)	Type II bacteria (Serine pathway)	
Microorganism	<i>Methylococcus</i> <i>Methylomonas</i> <i>Methylobacter</i>	<i>Methylosinus</i> <i>Methylocystis</i> <i>Methylobacterium</i>	
TCA cycle	Incomplete	Complete	
Nitrogenase	present in some	present at all	
Chain length of main fatty acid in lipid	16 carbon atom	18 carbon atom	
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	present (NADP-specific)	absent during growth on methane	
6-phosphogluconate dehydrogenase	present (NADP-specific)	absent	
Pentose phosphate isomerase	high-level	low-level	
	<i>Methylococcus</i>	<i>Methylomonas</i> <i>Methylobacter</i>	All type bacteria
Isocitrate dehydrogenase	NAD ⁺ -specific	NAD ⁺ and NADP ⁺	NADP ⁺ -specific
Malate dehydrogenase	Low activity	High activity	High activity
Ribulose biphosphate carboxylase	+	-	-
Phosphoribulokinase	+	-	-
Growth at 45 °C	+	some +	-

모에만 나타나고, 메탄을 자화세균에서는 탄소원 이용방법 (serine 경로와 RuMP 경로)에 따라 두 군으로 분류된다 (13, 14, 15, 16).

2. 메탄을 자화세균의 응용

메탄올은 수용성과 고순도로 미생물 산업에 원재료로서 장점을 지니고 있어 메탄올을 자화세균을 이용한 발효산물 생산이 많이 시도되고 있다 (17, 18, 19). 메탄올을 이용한 메탄올 자화세균의 공업적 생산은 다음의 네 분야로 나누어진다.

- (1) 메탄올로 부터 단세포 단백질 (SCP)의 생산
- (2) 세포내/세포외 고분자의 생산
- (3) 메탄올 자화세균의 대사산물의 생산
- (4) 메탄올 자화세균을 생물 촉매 (biocatalyst)로 사용

메탄올 자화세균은 SCP 생산을 위한 좋은 세균으로 간주되어 왔고 (7) 이 분야에서 개발은 계속되고 있다 (20). 메탄올 자화세균은 많은 종류의 대사 산물, 예를 들면 아미노산 (21, 22), 비타민 (23), 조효소 (24, 25) 등을 축적함을 보여 주었다. 메탄올 자화세균의 경우 glycine을 첨가하여 serine을 생산하려면 많은 시도가 있었다. Pink 메탄올 자화세균에 의해서 비타민 B₁₂가 생산된다 (26, 27). 많은 메탄올 자화세균은 세포내 고분자인 poly- β -hydroxybutyrate (PHB)를 합성한다 (28, 29, 30, 31, 32). 메탄올 자화세균에 의한 다당류 생산은 메탄자화세균 (33, 34)과 메탄올 자화세균 (35, 36, 37, 38)에서 보고 되고 있다. 메탄올 자화세균인 *Methylomonas mucosa*에 의한 다당류 생산의 경우에는 많은 특허가 보고되고 있다 (39, 40, 41). 최근에는 메탄올 자화세균에 의한 화학적 반응들이 발견되고 있고 이것을 이용하여 생물촉매로서의 이용가능성을 제시하여 주고 있다. 또한 많은 효소분석과 생물학적 분석이 메탄올 자화세균의 생화학적 능력을 사용하여 개발되고 있다 (42).

3. 질소고정의 생리적 특성

많은 메탄을 자화세균은 공기중 질소를 고정할 수 있다. 모든 질소고정 효소들은 저 농도의 산소농도에 의해서 불활성화 되고 많은 량의 ATP를 요구한다. 그 결과 질소고정은 정교하게 조절된다. 질소고정에 관여하는 nif gene (gene for nitrogen fixation) 발현과 nitrogenase 역가는 질소원, 산소, 무기염, 온도에 의해서 조절된다. 질소를 고정할 수 있는 능력에도 불구하고, 많은 세균들은 질소 고정시 공통적인 특성이 거의 없다. 모든 균은 hydrogenase를 생산하고, 어떤 균은 포자를 생성하고, 대부분은 균체 외 capsule을 지니고, 많은 균이 PHB를 축적하고, 모든 경우 높은 산소농도에 민감하다.

가. 암모니아

비공생 질소고정 세균은 암모니아 존재시 nitrogenase 역가가 나타나지 않는다. *Azotobacter*의 질소고정 배양시 암모니아를 첨가하면 nitrogenase 역가가 저해된다는 보고들이 있다 (43). 그러나 이미 존재한 nitrogenase는 약 3 세대 동안 안정하고 질소고정과 암모니아 동화가 함께 일어난다. 반대로 많은 논문에서는 *Azotobacter vinelandii* 또는 *Clostridium pasteurianum*의 질소고정 배양시 암모니아의 첨가에 의해서 nitrogenase 역가가 저해되지 않는다는 것을 보여 주었다 (44, 45).

나. 산소

산소는 세가지 방법으로 질소고정을 방해한다. 유전자 수준에서는 산소는 nitrogenase 합성의 repression에 작용한다 (46). 또한 산소는 dinitrogenase reductase에 대해서 비가역적으로 손상을 일으키고 이때 dinitrogenase reductase는 nitrogenase 보다도 산소에 더 민감하다. 산소는 nitrogenase에 대해 가역적으로 저해한다 (47). Nitrogenase의 역가는 과량의 산소에 의해 저해되고 산소농도가 적어지면 다시 회복된다.

다. 몰리브덴과 철

Bortels (48)은 질소고정과 몰리브덴 사이의 관계를 규명했다. 질소고정시 *Azotobacter vinelandii*의 증식은 몰리브덴을 요구하나 암모니아 배지에서 균체의 성장시에는 요구하지 않았다. 많은 경우 몰리브덴 제한시 질소고정이 일어나지 않았다. 몰리브덴은 nitrogenase 효소의 한부분으로 요구되고 철과 함께 조효소를 구성한다. 여러 실험결과에서 몰리브덴은 nitrogenase 합성을 촉진하였다 (48, 49).

암모니아 존재시 보다 질소 고정시 철은 질소 고정균의 nitrogenase와 ferredoxin에서 요구된다. 세균의 질소고정 능력은 철에 대한 요구와 민감도에 따라 다르다. *Beijerinckia indica*는 200 ppm의 철이 있는 배지에서 질소고정을 할 수 있지만 *A. vinelandii*에 의한 질소 고정시에는 200 ppm에서 크게 질소고정 능력이 손상된다.

4. 세포의 다당류의 생산

세포의 다당류는 구조와 성질이 매우 다양하다 (3). 그 결과 미생물에 의해 생산된 다당류는 식품의 안정제, 유화제 또는 점도 강화제 또는 석유정제시 첨가제 또는 실험실 연구시 선택적인 흡착제 등 다양한 적용 범위를 지녔다 (4). 미생물 세포에서의 다당류는 세가지로 구분된다; (1) 에너지와 탄소원 저장하는 세포내 다당류, (2) 세포벽의 성분으로 세포 구조의 성분을 구성하는 구조 다당류, (3) 세포외 다당류 (34, 35, 36, 37, 38, 42, 51, 52). 메탄올로 부터 다당류 생산하는 미생물의 예는 Table 2에 요약되어 있다.

세포외 다당류의 생산은 배지조성에 영향을 받는다. 일반적으로 높은 비율의 탄소원/질소원에서 다당류 생성이 촉진된다 (53). 또한 환경조건 (pH, 온도, 통기량, 교반 속도, 점도 등)에 의해서도 세포증식과 다당류 생성이 영향을 받는다 (54). 다당류 발효에서 배지의 점도는 생물고분자의 축적으로 10^3 정도 증가한다. 다당류 생성기에서

Table 2. Polysaccharide production from methane/methanol.

Microorganism	Substrate	Polymer Composition
<i>Methylocystis parvus</i> strain OBBP	Methanol	D-Glucose, L-Rhamnose
<i>Methylomonas mucosa</i>	Methanol	D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose, Pyruvate
<i>Methylomonas methanolica</i>	Methanol	-
<i>Pseudomonas vicogena</i>	Methanol	D-Allose, D-Mannose, D-Glucose, D-Galactose, D-Glucuronic acid
<i>Pseudomonas methanica</i>	Methane	Glucose, Galactose, Mannose, Fucose, Rhamnose
<i>Hyphmicrobium</i> sp. JTS-811	Methanol	Glucose, Galactose, Xylose
<i>Pseudomonas olevorans</i>	Methanol	Glucose, Galactose, Xylose
<i>Pseudomonas</i> S46B1	Methanol	Glucose

세포증가에 따라 다당류 생성이 증가되지만 이 시기에서는 비생산속도가 계속 감소한다 (55, 56). 이러한 현상에 대한 여러 설명이 제안되었다.

(1) 물질 전달 계수 ($k_L a$)는 점도가 증가함에 따라 감소하고, 점도증가는 산소농도를 제한시키고 그 결과 다당류 생산속도의 감소를 초래한다 (57).

(2) 점액층이 세포 주위에 서서히 형성되고 이것은 영양물질들의 확산을 차단하는 역할을 한다 (55, 57).

(3) 점성의 배양액은 잘 교반되지 않는다 (58).

발효조의 정체된 부분의 미생물은 시간이 경과되면 좋지 않은 환경, 예를 들면 pH의 감소, 기질의 고갈을 초래한다. 이것은 효과적인 반응기 부분 (effective reactor volume)의 감소를 의미한다. 효과적인 반응기 부분을 증가시키기 위해 기포탑 반응기 (Dubble column reactor) (59, 60)와 구조를 변형시킨 발효조 (61) 등이 제안되었다.

제 2 장. 재료 및 방법

제 1 절. 미생물 및 배지

1. 미생물

이 연구에 사용한 균주는 Technologie de Compiègne (France) 대학의 J. M. Lebeault 박사에게 의해 분양 받은 *Methylobacterium organophilum* (NCIB 11278) 이었다 (62, 63).

2. 시 약

메탄올은 Merck (Germany) 회사 제품이었고 잔탄검은 Kelco 회사 제품이었다. 다른 시약은 모두 시약 수준을 사용하였다.

3. 배양 배지

배지 성분은 Table 3에 나타났다. 미생물 보관은 -20°C 에서 동결상태로 보관하였다.

Table 3. The composition of culture medium.

	maintenance	inoculum/growth	fermentation
methanol		0.5 %(v/v)	0.5 %(v/v)
methylamine-HCl	6.75 g/l		
(NH ₄) ₂ SO ₄		1.0 g/l	0.3 g/l
KH ₂ PO ₄	1.0 g/l	1.305 g/l	0.63 g/l
K ₂ HPO ₄	2.12 g/l		
Na ₂ HPO ₄		2.13 g/l	1.06 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100 mg/l	0.45 g/l	0.45 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg/l	3.3 mg/l	3.3 mg/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/l	1.3 mg/l	1.3 mg/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	500 µg/l	130 µg/l	130 µg/l
ZnSO ₄ ·4H ₂ O		130 µg/l	130 µg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O		40 µg/l	40 µg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	500 µg/l	40 µg/l	40 µg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O		40 µg/l	40 µg/l
H ₃ BO ₃		30 µg/l	30 µg/l
agar	18 g/l		*

* ; pH 7.0, controlled with 5 N-KOH/NaOH.

제 2 절. 배양조건

1. 균주의 조제

균주를 조제하기 위해 agar plate 위의 단일 colony를 50 ml의 배지가 포함된 250 ml의 삼각 flask에 옮긴 후, NBS 진탕 배양기에서 30°C, 250 rpm으로 20시간 동안 배양하였다. 그후 배양액의 1%를 새로운 증식배지에 옮겨 12시간 동안 같은 조건으로 배양하여, 이 배양액을 발효조의 inoculum으로 사용하였다.

2. 유가식 배양법

유가식 배양을 위해 5 l home-made 발효조를 사용하였다. 생산배지에 3 - 5% 정도의 배양된 균을 접종하였고 발효조건은 다음과 같았다. Working volume = 3.0 l, 교반속도 = 300 - 1,200 rpm, 통기량 = 1 vvm, 온도 = 30°C, pH = 7. 메탄올은 DO-stat 방법으로 공급하였다. DO-stat 방법은 메탄올이 고갈되었을때 순간적으로 용존산소가 증가한다는 사실에 기초하여 용존산소가 미리 정해진 수준보다 높아지게 되며 일정시간 동안 펌프를 작동시키는 방법이다.

제 3 절. 분석 방법

1. 균체량 측정

균체의 optical density는 Spectronic 21 (Bausch & Lomb)를 사용하여 570 nm에서 측정하였다. 건조균체량은 다음 방법으로 측정하였다; 배양액의 5 ml을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상등액은 버리고 원심분리를 이용하여 증류수로 2회 세척하였다. 세척된 균체를 aluminum foil dish에 넣어 105°C에서 24시간 동안 건조시킨 후 무게를 측정하였다. 건조균체량과 optical density와의 직선관계로부터 보정식으로 부터 optical density를 건조균체량으로 변환하여 사용하였다.

$$DCW (g/l) = 0.28136 \times OD (570 \text{ nm}) - 0.00227$$

2. 다당류의 측정

배양액을 회석한 후 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 모아 Phenol-sulfuric 방법 (61)으로 측정하거나, 이 상등액에 2배의 absolute ethanol을 첨가하여 5,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 다당류를 침전시키고 ethanol로 두번 세척시킨다. 세척된 다당류는 105°C에서 24시간 동안 건조시킨 후 측정하였다.

3. 메탄올의 측정

균체를 제거한 후 잔존 메탄올의 농도는 gas chromatography (Hewlett-Packard)를 사용하여 측정하였다. 3% OV-17/chromosorb 101로 포장된 stainless steel column을 사용하였다. 작동조건은 다음과 같다.

운반 gas : 헬륨 + 공기

연소 gas : 수소

Column : Chromosorb 101 80/100 mesh
Detector : Flame ionization detector, 200°C
Injector 온도 : 150°C
Oven 온도 : 125°C

4. 질소원의 농도 측정

균체를 제거한 후, 암모니아의 농도는 Indo-phenol 방법으로 분석하였다 (64).

5. 점도의 측정

Haake Rotovisco Rheometer, Model RV2를 MV1 sensor 또는 NV sensor를 사용하여 점도를 측정하였다. 온도조절은 외부의 순환 온도조절기를 사용하여 25°C로 일정하게 유지하였다. Dial을 돌린 후 일정 값에 도달한 후 전단속도와 전단응력을 측정하였고 겔보기 점도는 주어진 식으로 계산하였다.

6. 물질 전달 속도의 측정

물질 전달 속도, $k_L a$ 은 polarographic probe (Ingold Electode, Swiss)를 이용하여 dynamic 방법으로 측정하였다. 이때 막에 의한 전극반응의 지연은 Newton-Raphson 방법을 사용하여 IBM-PC AT로 다음과 같이 보정하였다.

액상에서의 산소전달속도는

$$\frac{dC_M}{dt} = k_L a (C_M^* - C_M) \quad (1)$$

이고, 여기서 C_M 은 시간 t 에서 배지의 용존산소 농도를 나타내고 C_M^* 은 주어진 조건에서 평형 상태에서 포화농도이고, $k_L a$ 는 물질전달계수이다. 용존산소농도를 0 에서 100%

로 순간적으로 변화시켰을때 산소전극이 일차반응을 보여 준다면 전극반응은

$$\frac{dC_P}{dt} = k_P (C_M - C_P) \quad (2)$$

으로 나타낼 수 있고, 여기서 C_P 는 전극에 의한 용존산소농도이고 k_P 는 전극 상수이다 초기 조건이 $C_P = C_L = C_0$ 이라 하면,

$$C_M = C_M^* (1 - e^{-k_L a t}) + C_0 e^{-k_L a t} \quad (3)$$

$$C_P = C_M^* - \frac{C_M^* - C_0}{k_P - k_L a} (k_P e^{-k_L a t} - k_L a e^{-k_P t}) \quad (4)$$

로 나타낼 수 있고, 식 (5)를 다시 쓰면

$$\frac{C_M^* - C_P}{C_M^* - C_0} = \frac{k_P e^{-k_L a t} - k_L a e^{-k_P t}}{k_P - k_L a} \quad (5)$$

$$Y_P = \frac{C_M^* - C_P}{C_M^* - C_0} \quad (6)$$

이다. Newton-Raphson 방법을 사용하면 다음과 같다.

$$f(k_L a) = k_L a (Y_P - e^{-k_P t}) - k_P (Y_P - e^{-k_L a t}) \quad (7)$$

$$f'(k_L a) = Y_P - e^{-k_P t} - k_P t e^{-k_L a t} \quad (8)$$

$$k_L a(2) = k_L a(1) - \frac{f(k_L a)}{f'(k_L a)} \quad (9)$$

BASIC 으로 program을 작성하여 $k_L a$ 를 구했다.

제 3 장. 결과 및 고찰

제 1 절. 발효공정의 최적화

1. 다당류 발효의 typical time course

질소원으로 1.2 g/l ammonium sulfate가 포함된 배지에서 *M. organophilum*을 유가식 배양한 결과가 Fig. 1에서 보여준다. 질소원은 20시간 정도에서 고갈되었고 질소원의 고갈은 다당류 생성을 촉진했다. *M. organophilum*은 공기중의 질소를 고정할 수 있으므로 질소원 제한 후에도 균체증식은 계속 되었고 72시간 배양 후 최종 균체량은 6.8 g/l 이었고 다당류의 농도는 4.9 g/l 이었다.

다당류 발효시의 전단속도와 전단응력의 관계는 Fig. 2에서 보여준다. 발효가 진행됨에 따라 다당류 생성량이 많아지므로 전단응력의 값들은 증가하였다. 초기 다당류 생성기에서는 물성이 Newtonian 성에 가까웠으나 시간이 지남에 따라 non-Newtonian 성질 중 pseudoplasticity가 증가하였다. 물성학적 결과를 power-law 식 $\tau = K\gamma^n$ 로 적용할 수 있다. 이때 τ 는 전단응력, γ 는 전단속도 K 는 consistency index, n 은 flow behavior index 이다.

배양시간에 따른 전단속도에 미치는 걸보기 점도의 영향을 이중 log 좌표에 나타냈다 (Fig. 3). 실험결과가 직선으로 잘 나타났으며 이때 직선의 기울기는 배양액의 pseudoplasticity 이다. 이것은 배양액의 물성이 power-law 형태 $\mu_{app} = K\gamma^{n-1}$ 로 잘 표현될 수 있음을 의미한다. 이때 μ_{app} 는 걸보기 점도이다. 발효시간이 지남에 따라 기울기와 절편 즉, μ_{app} , n 값이 증가하였다.

Fig. 4는 다당류 발효시 consistency index와 flow behavior index의 변화는 나타냈다. 다당류가 생성됨에 따라 배양액의 물성이 변화하였다. 발효가 진행됨에 따라 물성이 non-Newtonian 정도가 커져 consistency index는 증가하였고 flow behavior index는

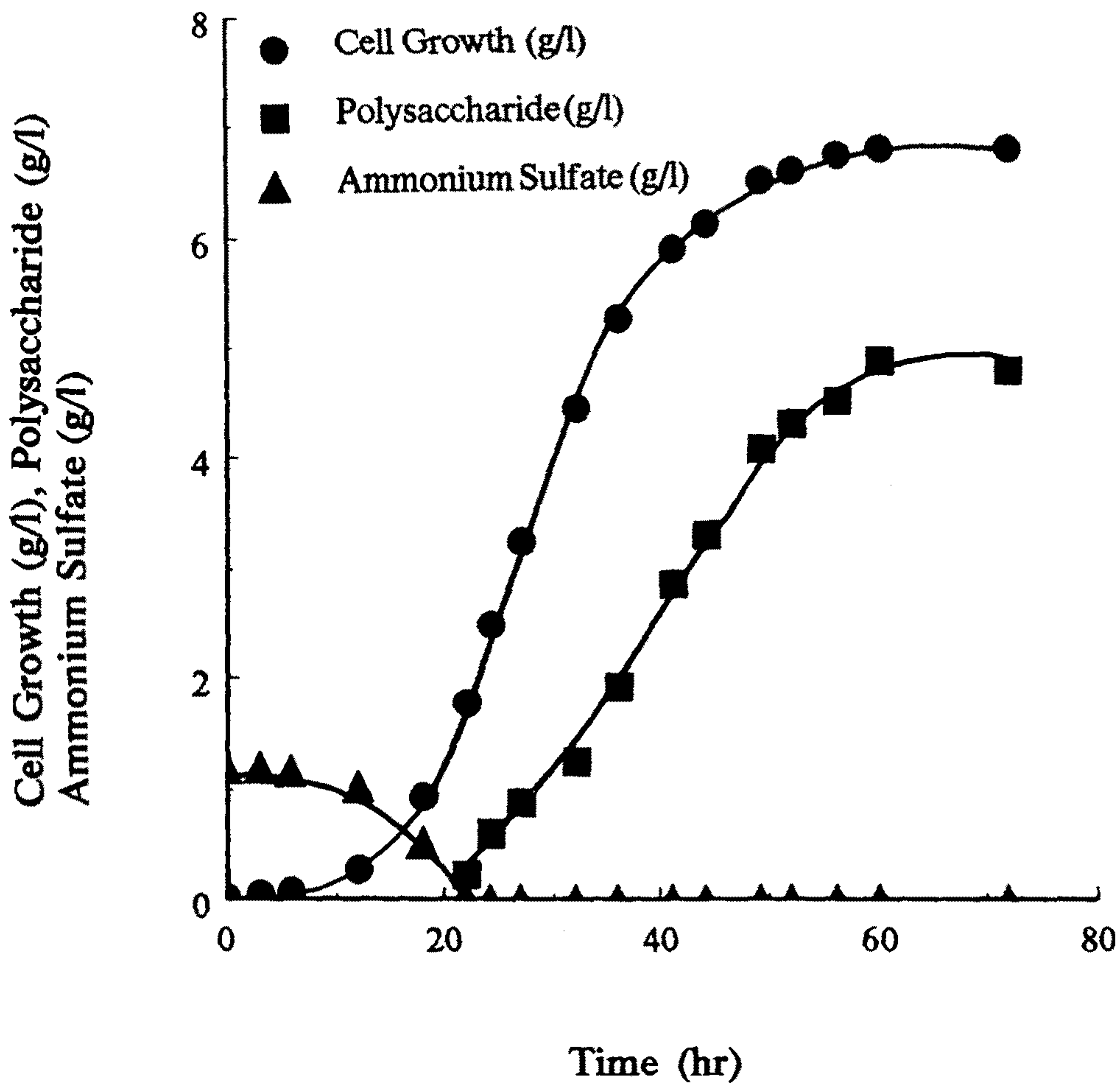


Fig. 1. Typical time course of polysaccharide fermentation

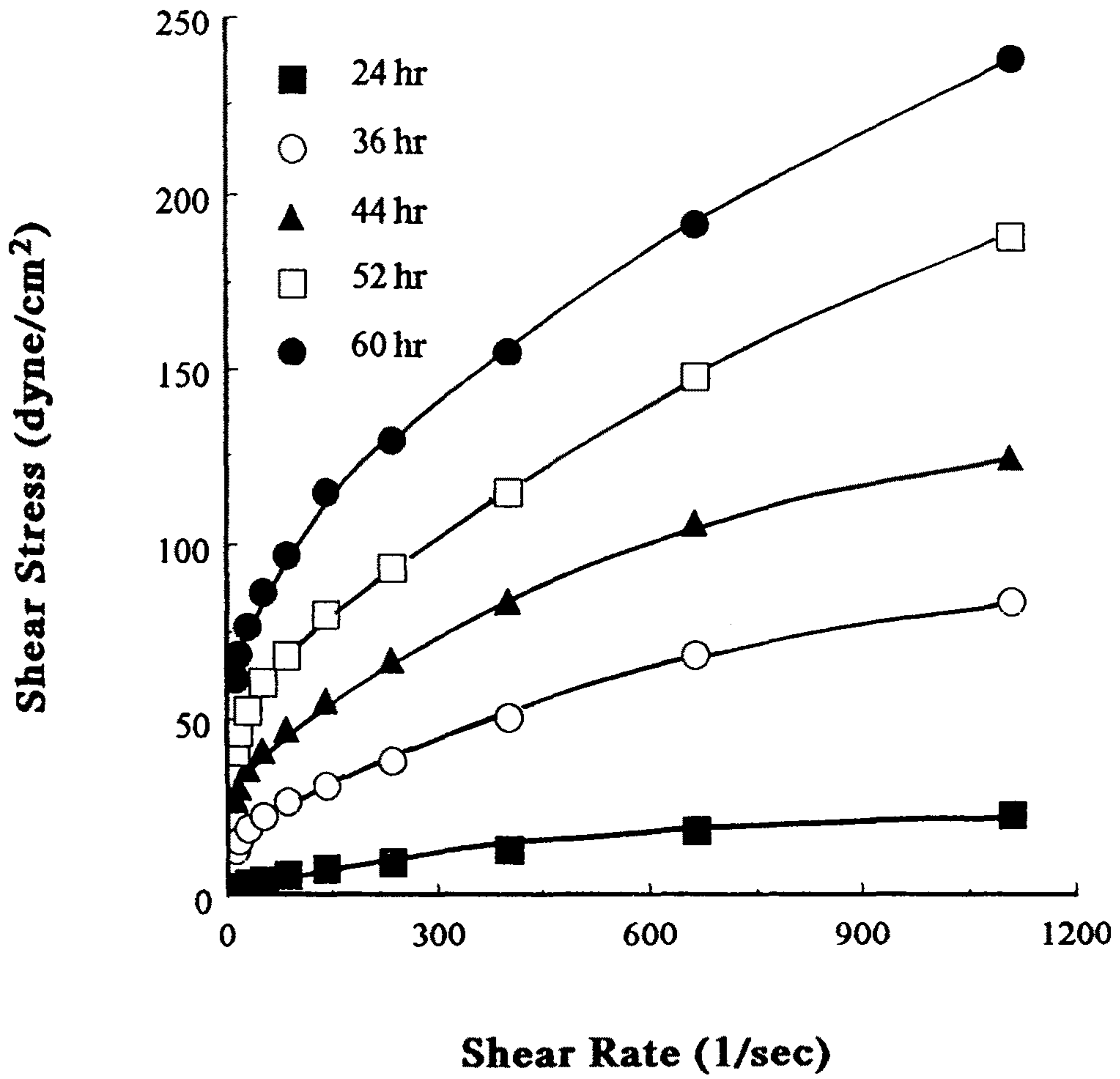


Fig. 2. Shear stress as a function of the shear rate at different fermentation times

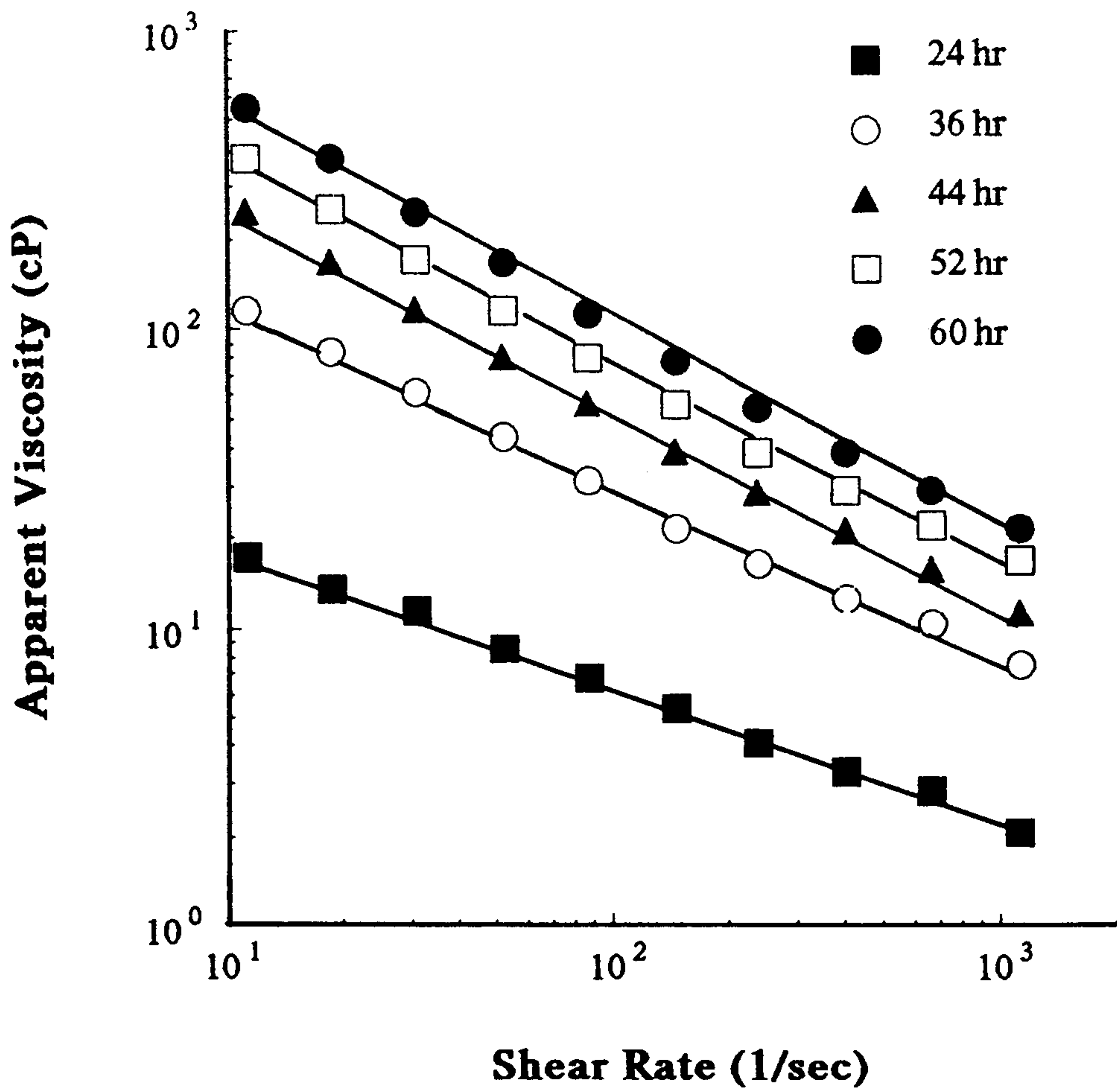


Fig. 3. Dependence of the apparent viscosity on the shear rate at different fermentation times

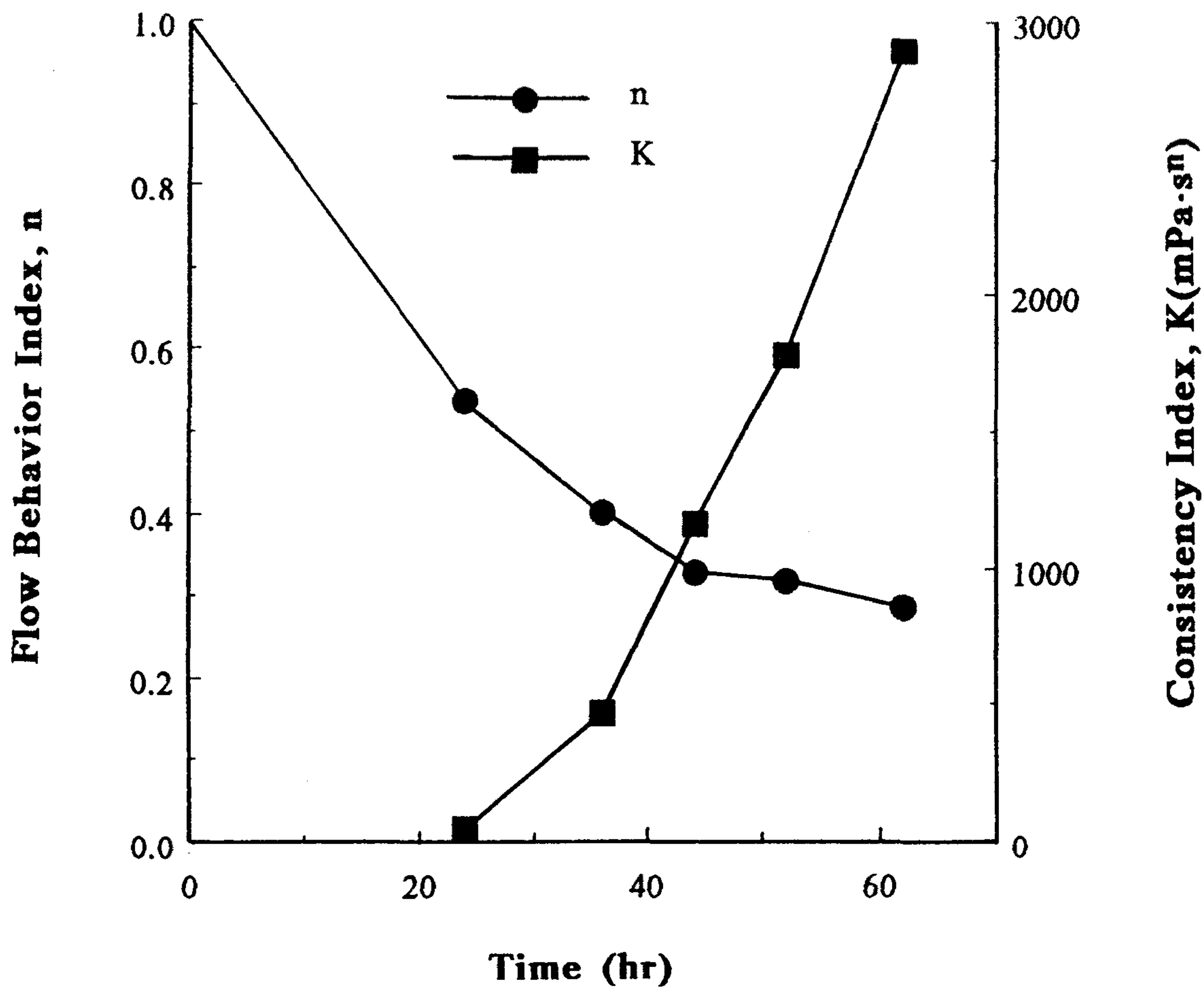


Fig. 4. Time course of consistency index and flow behavior index during the fermentation

감소하였다. 60시간에서 K 값은 2,900 mPa 이었고 n 값은 0.29 이었다.

발효과정 중의 배양액 (배양시간 34시간, 47시간, 60시간, 72시간)을 정제한 후 같은 다당류 농도로 다시 녹여 점도를 측정된 결과 Fig. 5와 같았다. 발효가 진행됨에 따라 같은 농도의 다당류에서 consistency index는 서서히 증가했고, flow behavior index는 서서히 감소했다. 이것은 배양중에는 다당류의 생합성이 계속 일어나고 세포의 다당류의 생합성 능력은 다당류의 분해능력 보다 큰 결과라고 할 수 있다.

발효 과정중 정제한 다당류의 화학조성의 변화를 Table 4에 나타냈다. 발효과정 중 시간이 진행됨에 따라 총당, 환원당, 단백질의 양은 감소했으나 acids (pyruvic acid, uronic acid와 acetic acid)의 양은 증가했다. 발효가 진행됨에 따라 다당류의 성분 중 acid 조성의 증가는 정제된 다당류의 점도 증가를 일으키는 것 같다. 이러한 추론은 다당류의 pyruic acid 성분은 다당류의 점도 증가를 일으킨다는 보고에 기인한 것이다 (65).

2. 균체중식 및 다당류 생산에 미치는 온도의 영향

다당류 발효에 있어서 온도는 균체중식 뿐 아니라 산물생성에 영향을 주는 가장 중요한 요인 중 하나이다 (66, 67). 25°C로 부터 39°C 사이로 온도 변화시키면서 유가식 배양을 시도했다 (Table 5, Fig. 6).

가. 균체중식에 미치는 온도의 영향

일반적으로 최대 균체농도는 온도가 25°C에서 39°C로 증가할 수록 감소하였다. 균체중식 수율 ($Y_{X/S}$)은 사용된 메탄올 농도에 따른 증가된 균체농도를 좌표에 나타낸 후 기울기로 부터 구했다. Table 5에서 알 수 있듯이 균체중식 수율은 25°C의 0.26에서 39°C의 0.21 까지 감소하였다. 높은 농도에서의 낮은 수율은 높은 온도의 높은 균체 사멸속도로 부터 기인된 것 같다. 비중식속도는 균체농도의 값과 시간을 semilog

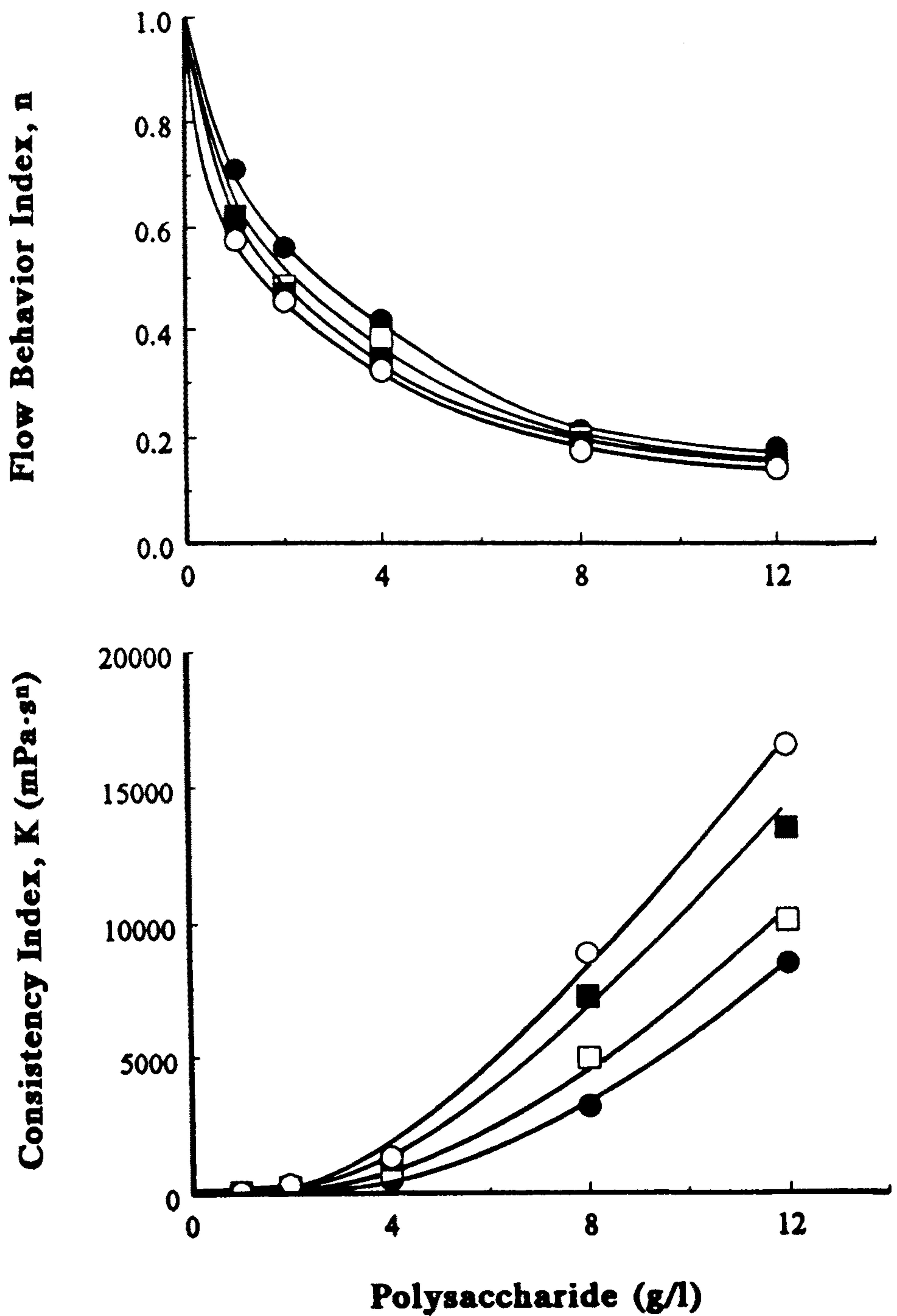


Fig. 5. Rheological properties of a polysaccharide isolated at different stages of fermentation. Culture times were 34hr(●), 47hr(□), 60hr (■), and 72hr(○).

Table 4. Changes of Chemical Components of Purified Polysaccharide during the Fermentation

Time (hr) Components	w/w (%)			
	34	47	60	72
Total Sugar	82.8	79.5	77.7	76.6
Reducing Sugar	77.8	72.0	68.1	68.1
Protein	6.95	6.01	5.26	4.70
Pyruvic Acid	2.17	4.86	5.14	5.90
Uronic Acid	7.86	9.72	11.1	11.1
Acetic Acid	0.31	0.52	0.64	0.75

Table 5. Effect of temperature on fermentation parameters.

Temperature (°C)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	μ^{max} (hr ⁻¹)	Q_p^{max} (g/g-hr)	Q_s^{max} (g/g-hr)	X_s (g/l)	P^{max} (g/l)	R_p (g/l-hr)
25	0.2568	0.1454	0.1767	0.0428	0.6881	6.9754	2.668	0.0606
28	0.2535	0.1551	0.1997	0.0554	0.7878	6.8910	2.824	0.0637
30	0.2272	0.1767	0.2291	0.0645	1.0084	6.8000	4.480	0.0961
33	0.2207	0.1452	0.2495	0.0519	1.1305	6.6097	3.419	0.0676
36	0.2208	0.1081	0.3000	0.0460	1.3587	6.3565	2.226	0.0536
39	0.2138	0.0279	0.2023	0.0042	0.9926	5.0341	0.431	0.0109
36 → 30	0.2214	0.1708	0.2968	0.0469	1.3405	6.3283	3.920	0.1456

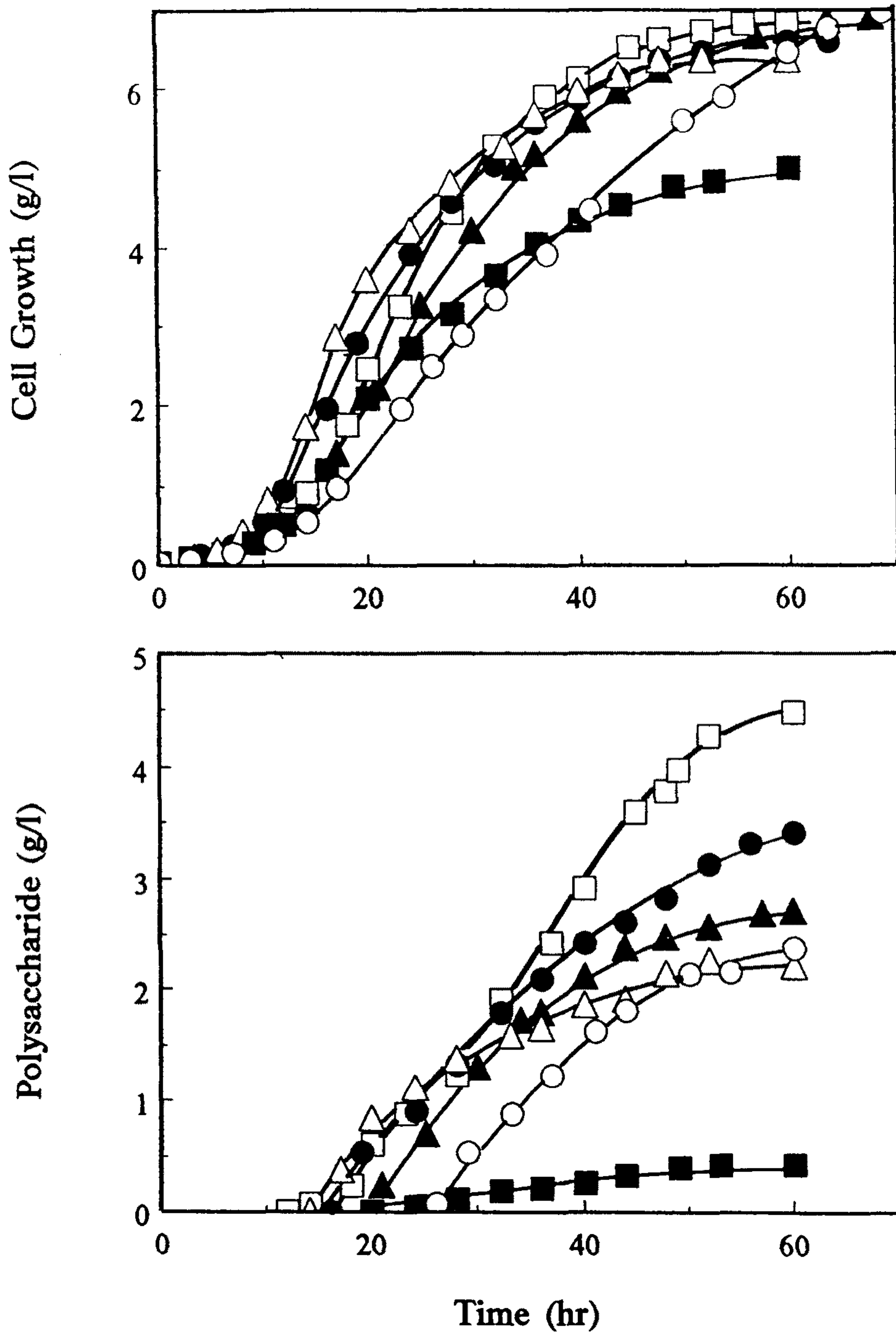


Fig. 6. Effect of temperature on cell growth and polysaccharide production. 25 °C (○), 28 °C (▲), 30 °C (□), 33 °C (●), 36 °C (△), 39 °C (■).

그래프로 나타낸 후 기울기로 부터 구했다. 비증식속도는 36°C에서 0.3 hr⁻¹으로 최고 값을 보여 주었다.

나. 다당류 생산에 미치는 온도의 영향

30°C에서 최종 다당류 농도와 다당류 생성 수율 ($Y_{P/S}$)이 최대값을 보였다. 30°C 보다 높은 온도에서 최종 다당류 농도와 다당류 생성 수율이 온도가 증가함에 따라 급격히 감소하였는데 이는 30°C 이상의 온도에서는 메탄올이 다당류 생성 보다 maintenance에 많이 사용된 것 같다.

시간에 따른 비다당류 생산속도는 polynomial 식을 사용한 curve fitting 방법에 의해 구하였다. Fig. 7에서 보듯 비생산 속도는 30°C에서 최대 이었다. 발효가 진행됨에 따라 비생산속도는 초기 다당류 생산기에서 최대값을 나타낸 후 서서히 감소되는데 이것은 다당류가 축적됨에 따라 점도가 증가하고, 점도증가는 산소와 메탄올의 전달속도를 떨어 뜨려 일어난 결과로 생각된다.

다. 균체증식과 다당류 생산에 미치는 온도 이동의 영향

균체증식의 최적온도는 36°C 이고 다당류 생성의 최적온도는 30°C 이고 본 다당류 발효는 균체증식기와 다당류 생성기가 뚜렷히 구분되므로 균체증식기에서는 36°C로 배양하다가 다당류 생성기에서는 30°C로 배양하는 이단계 발효법을 시도하였다 (Fig. 8). 이 단계로 발효한 결과 균체증식의 양상은 36°C의 배양과 같았고 최종다당류 생성은 최종 균체농도가 30°C의 배양보다 낮아 저하되었다. 그러나 다당류의 생산성은 이 단계 발효의 경우 0.146 g/l-hr로 30°C의 발효보다 2배 증가하였다.

라. 점도에 미치는 배양온도의 영향

배양액과 균체 제거 후 다당류 용액의 점도의 차이는 매우 작다 (Fig. 9). 이것은 균체의 존재는 발효액의 점도에 거의 영향을 미치지 못하는 것을 의미한다. 다당류 농

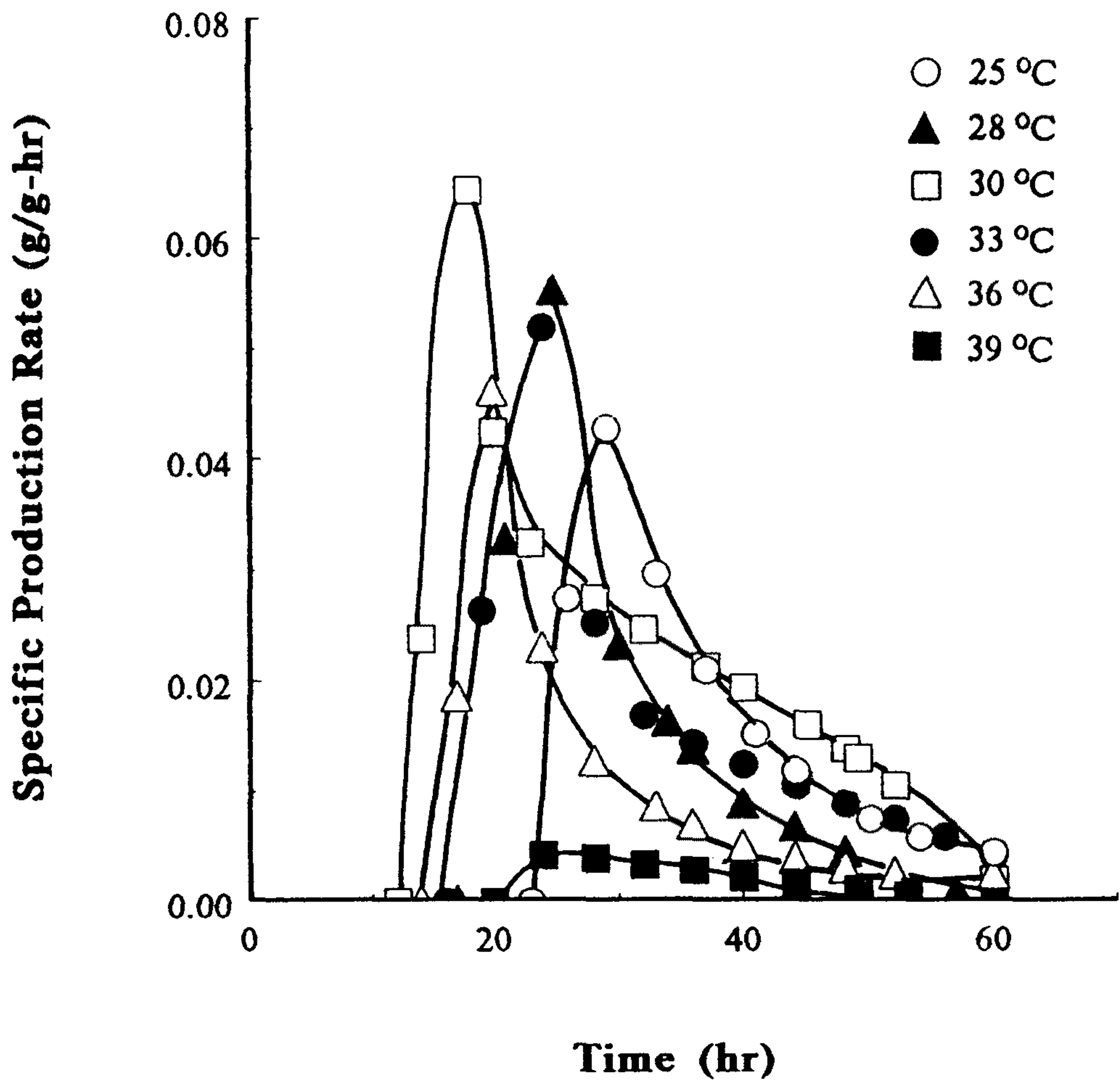


Fig. 7. Effect of temperature on specific production rate

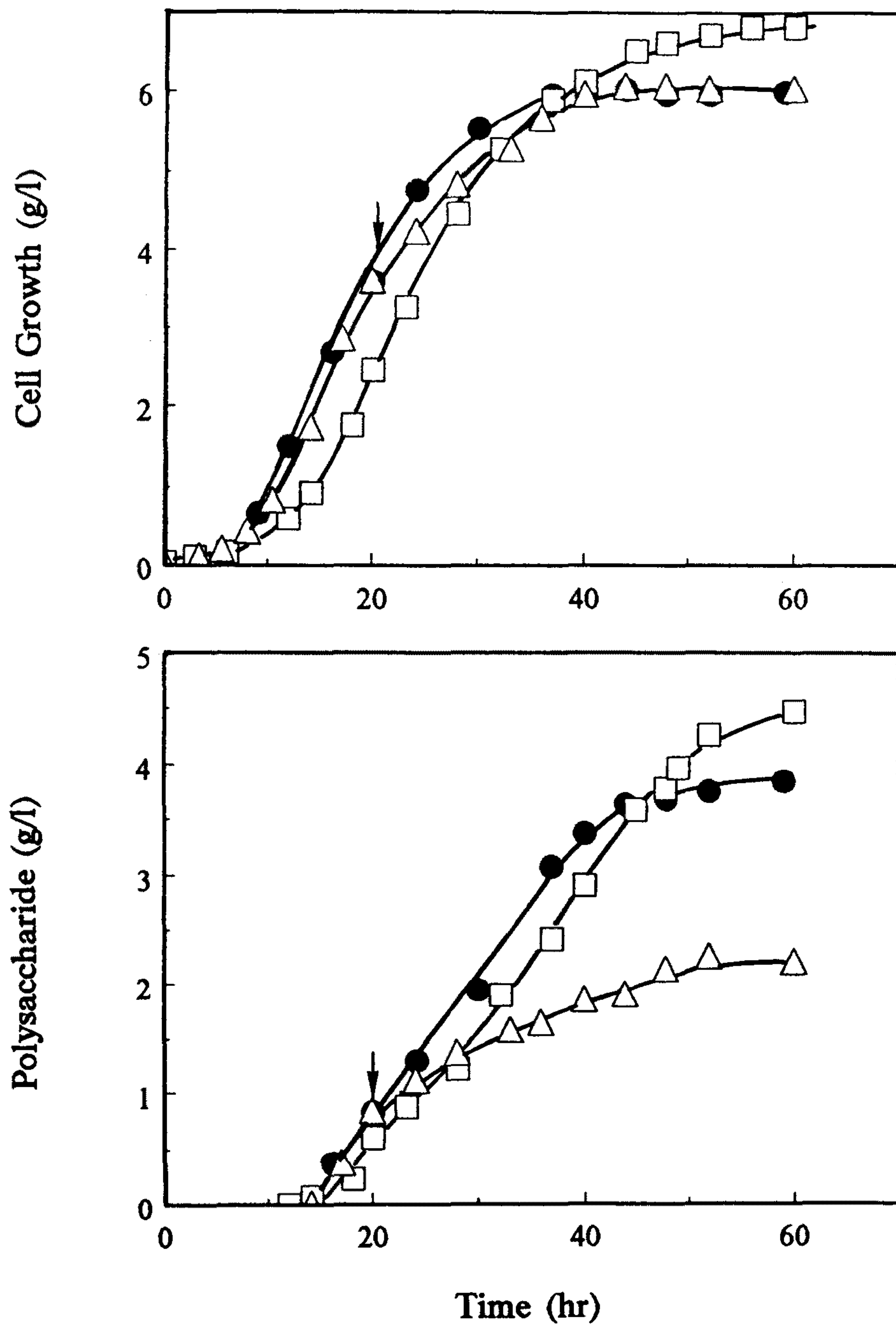


Fig. 8. Effect of temperature shift-down from 36 °C to 30 °C on cell growth and polysaccharide production. 30 °C (□), 36 °C (△) 36 °C → 30 °C (20 hr) (●).

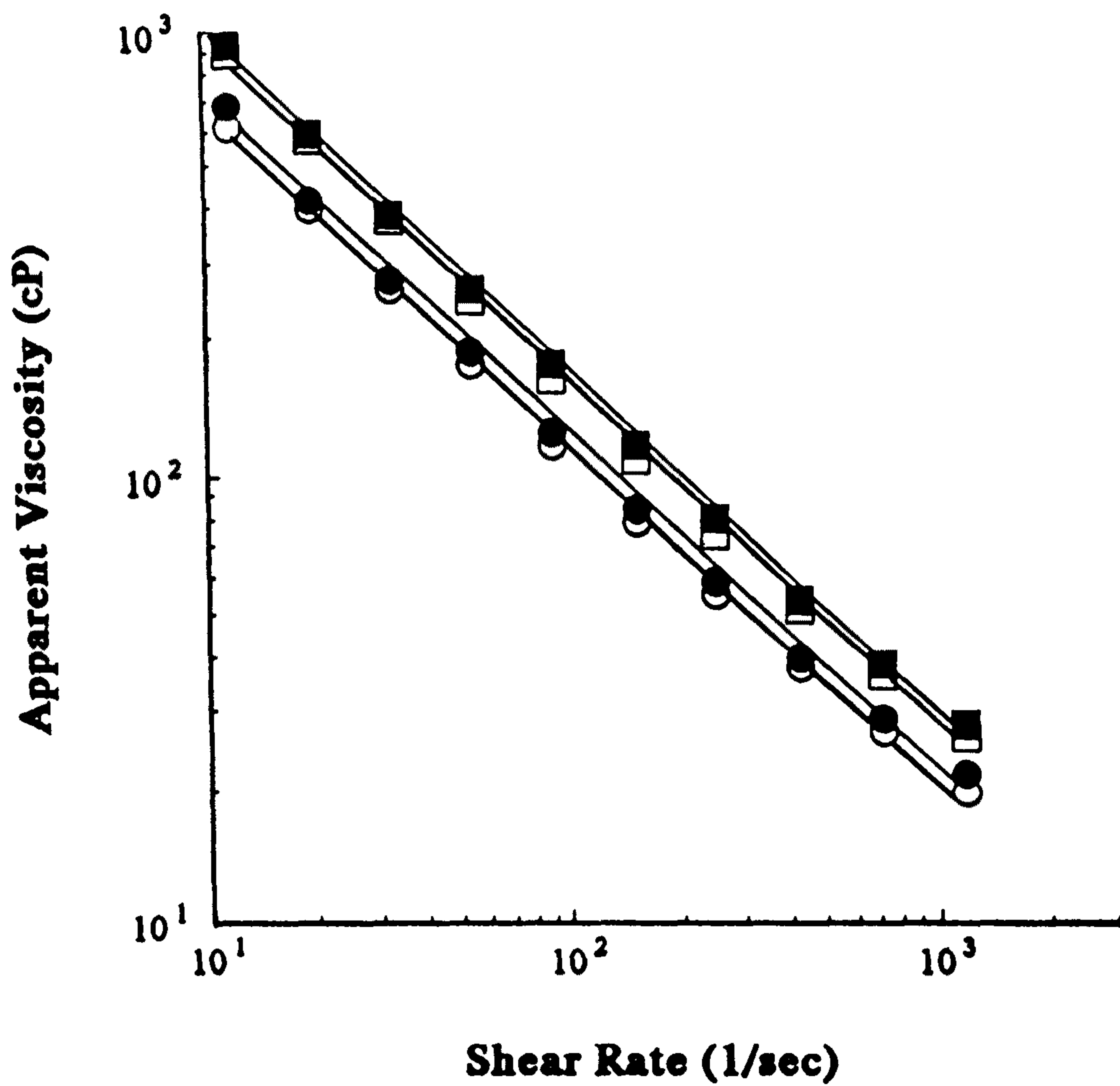


Fig. 9. Effect of cell mass on viscosity of culture fluid containing polysaccharide. Filtered broth(○,□) and unfiltered broth(●,■).

도에 따른 consistency index의 관계를 조사하면 다음 식을 따른다.

$$K = AP^B \quad \ln K = \ln A + B \ln P$$

여기서 A와 B는 상수이고, K는 consistency index 이고, P는 다당류의 농도이다. Fig. 10에서 보여 주듯이 온도가 증가할 수록 A값은 감소하였지만 B 값은 온도에 관계없이 거의 일정하였다. 이것은 같은 다당류 농도에서 배양온도가 증가할수록 배양액의 점도가 감소되었음을 보여준 것이다.

Nedonchelle와 Schults (68)는 전분용액의 물성연구로 부터 다음식을 유도하였다.

$$\ln K(t) = \ln(\tau_0) - n(t) \ln(\gamma_0)$$

여기서 τ_0 와 γ_0 는 상수이다. 다른 배양온도에서 얻은 결과를 식을 적용하면 배양조건 (온도, 질소원의 양, 교반속도, 통기량)에 상관없이 식에 잘 일치함을 보였다 (Fig. 11)

Fig. 12는 다른 배양온도에서는 consistency index와 flow behavior index의 변화를 나타낸 것이다. 다당류의 농도와 점도와의 밀접한 관계가 있었고 발효가 진행됨에 따라 배양액의 pseudoplasticity는 증가되었다. 30°C에서는 consistency index 값이 최대였고 flow behavior index 값은 최소였다. 이것은 30°C에서 최종 다당류 농도가 최대였고 다당류 농도와 consistency index와의 관계는 지수적 비례관계 때문이다.

3. 균체중식과 다당류 생산에 미치는 교반속도의 영향

가. 여러가지 조건 변화에 의한 발효조의 물질 전달 계수

Fig. 13은 여러가지 조건 (통기량, 교반속도, 점도, 다당류 농도)을 변화에 따른 물질 전달 계수 ($k_L a$)의 변화를 보여준다. 물질 전달 계수는 통기량과 교반속도가 증가할수록 증가하였고 다당류 농도와 점도가 증가할수록 감소하였다. 일반적으로 물질 전달 계수는 다음 식을 따른다.

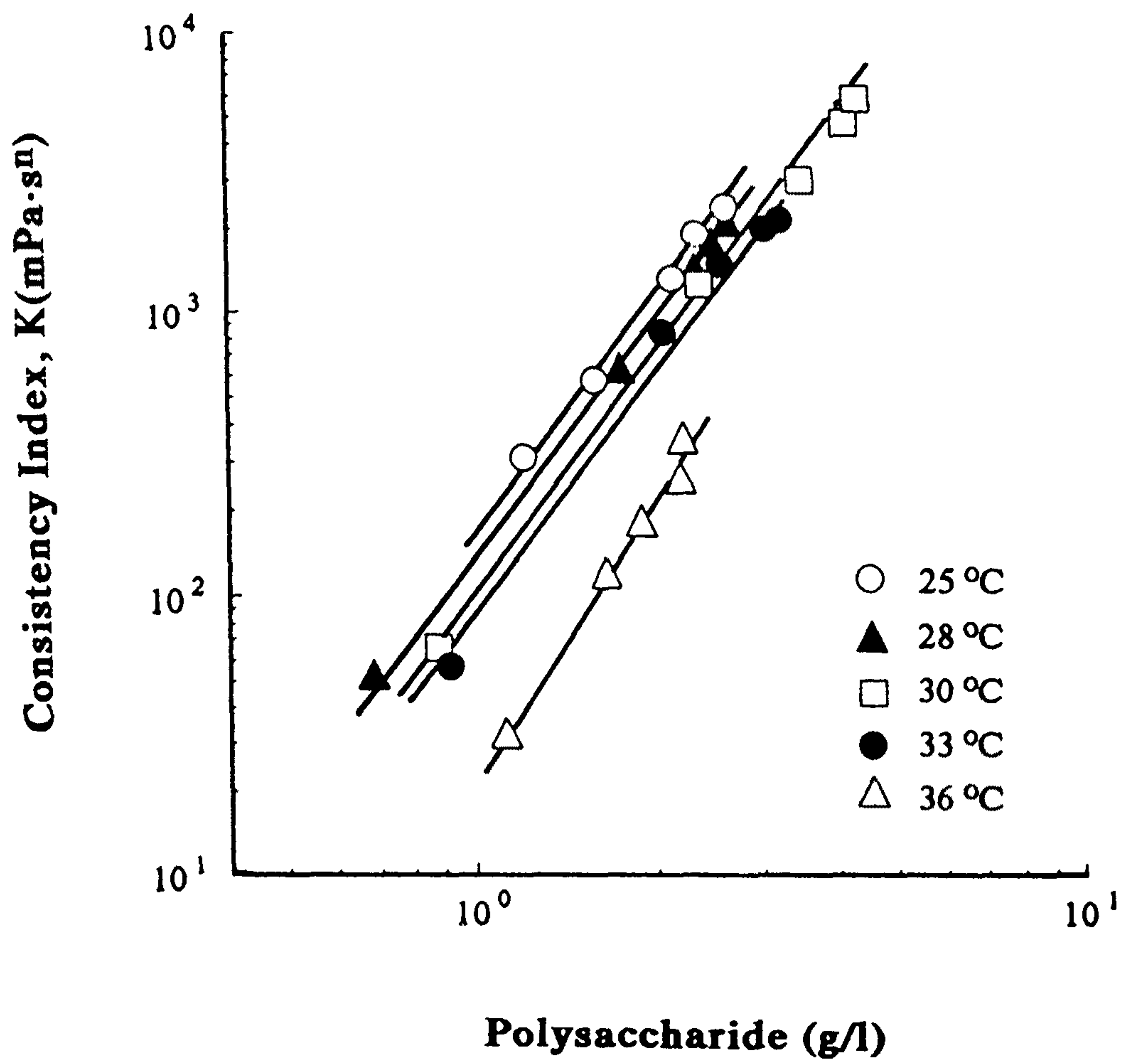


Fig. 10. Relationship of consistency index and polysaccharide concentration for the fermentations of various temperatures

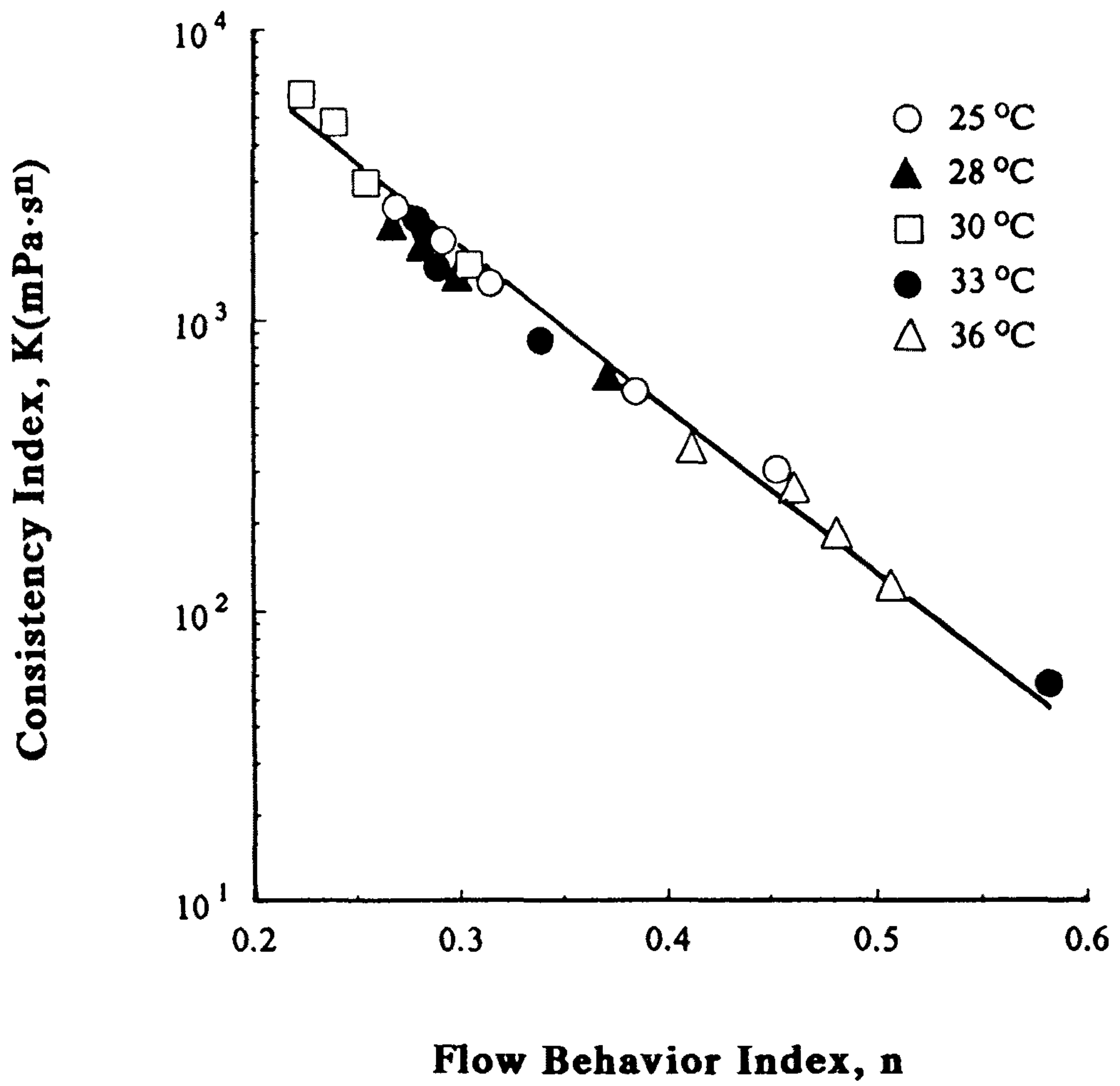


Fig.11. Relationship of consistency index and flow behavior index for fermentation broths

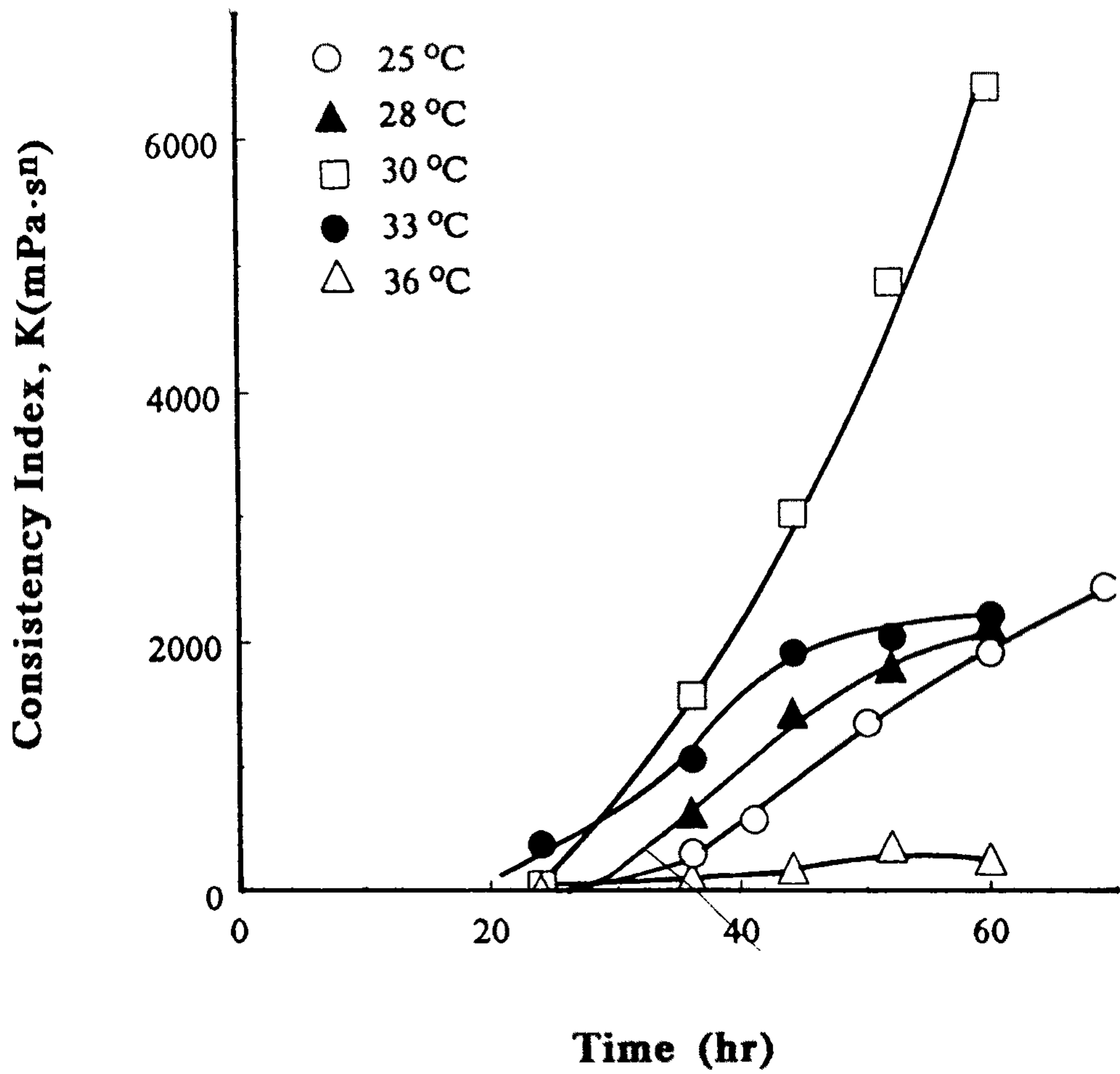
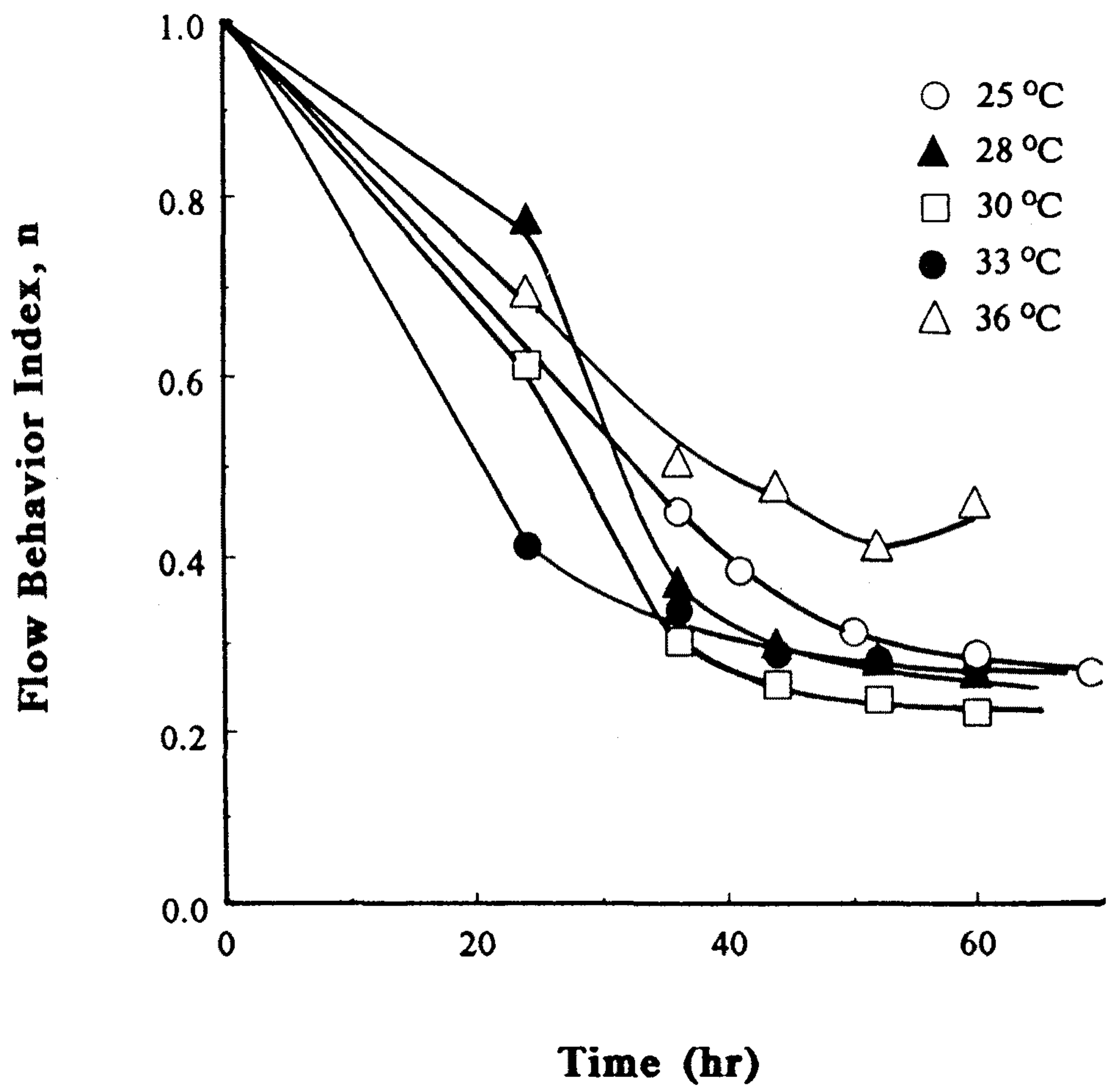


Fig.12. Variation of pseudoplastic characteristics with the progress of fermentation for the different temperature



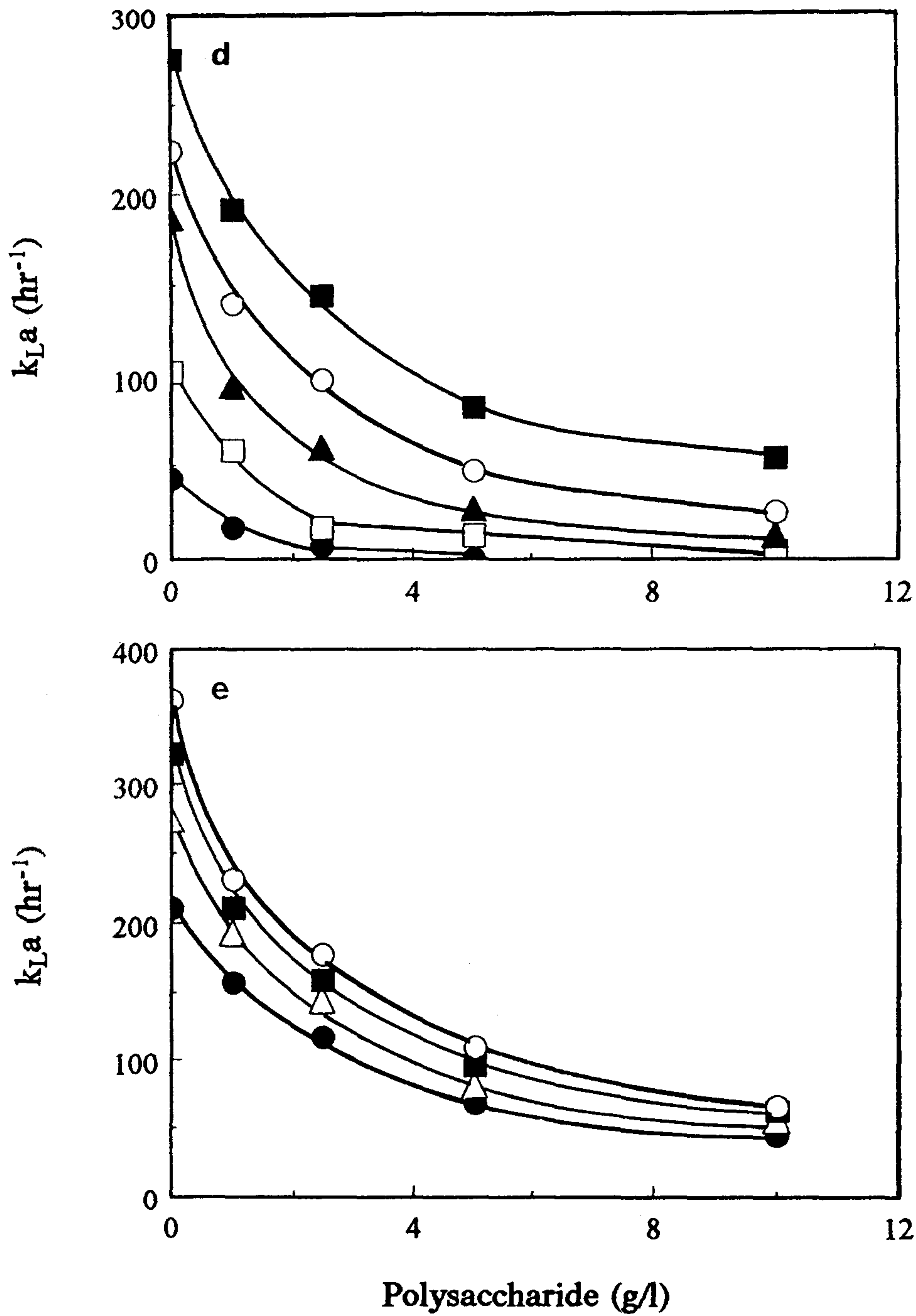
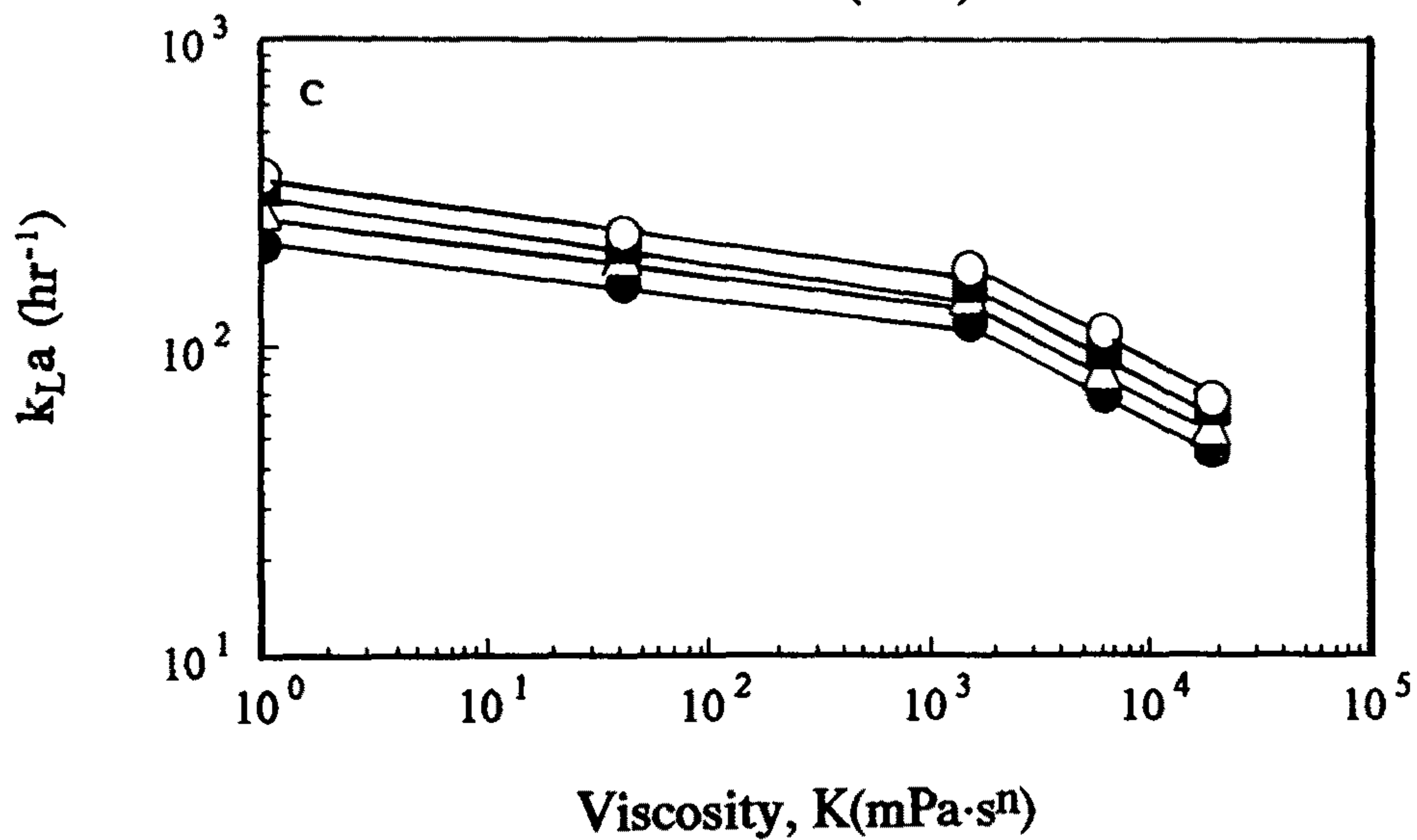
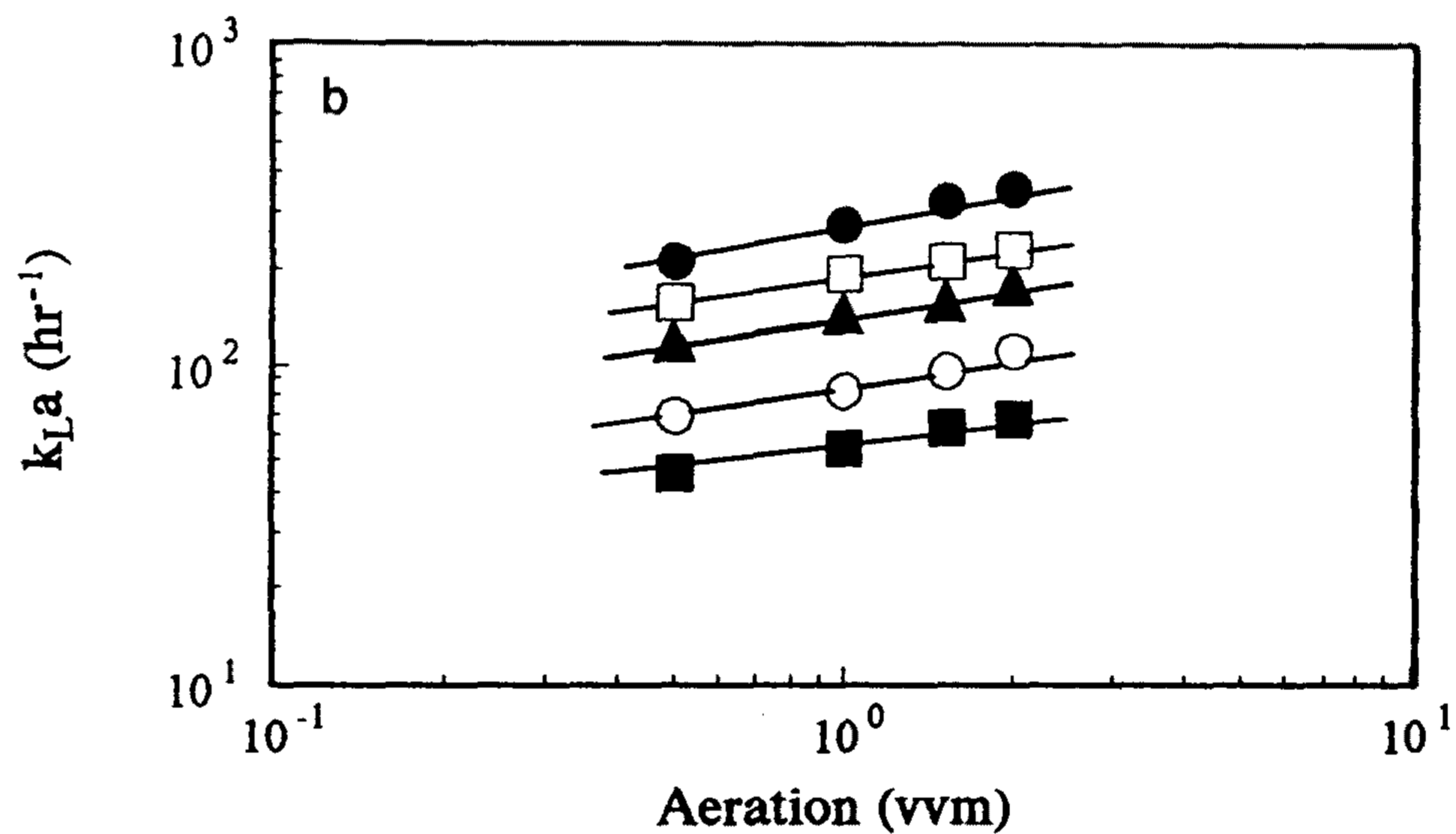
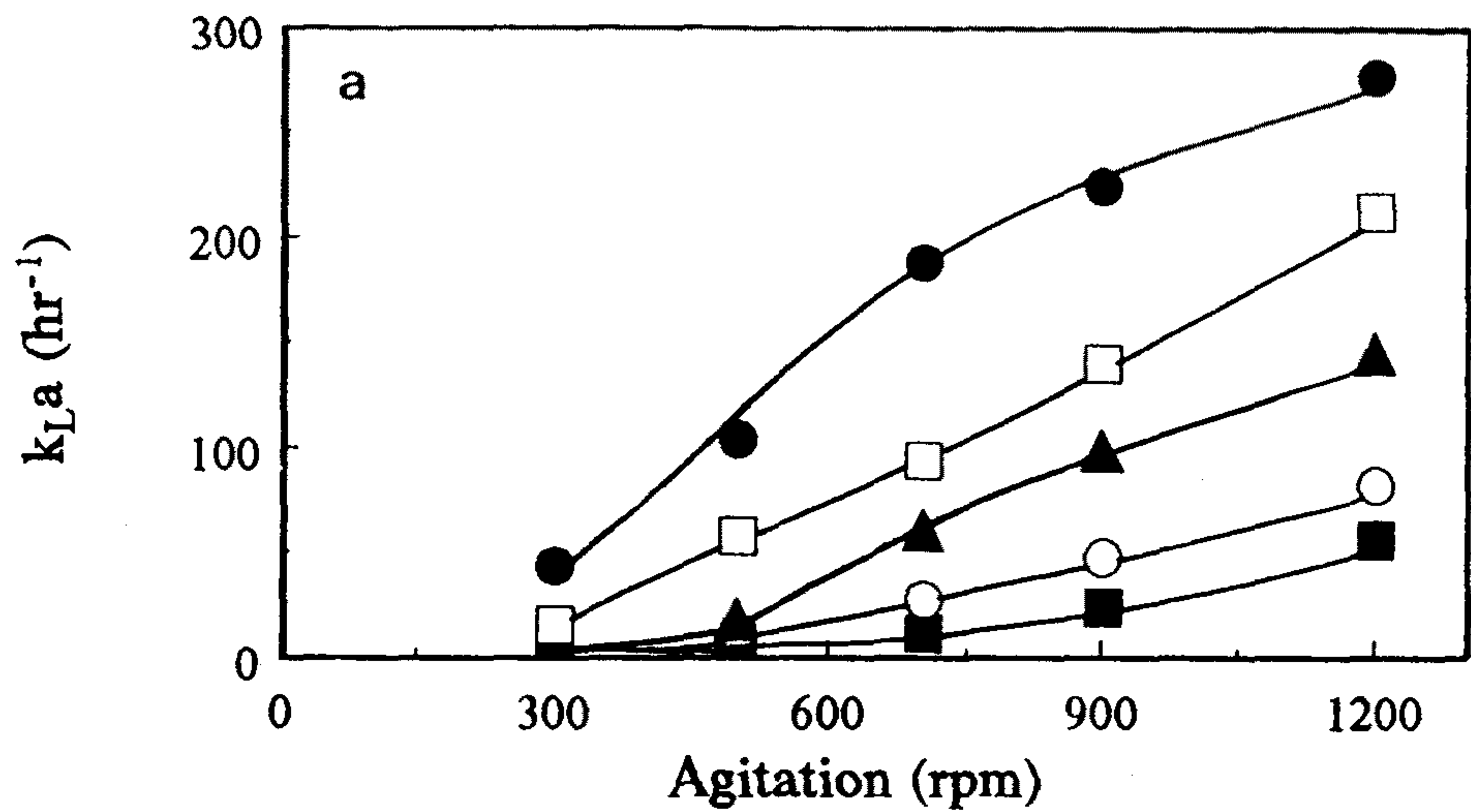


Fig. 13. Dependence of mass transfer coefficient on a) aeration rate b) agitation speed c) viscosity d) & e) polysaccharide concentration. a) & b) polymer 0 g/l (●), polymer 1 g/l (□), polymer 2.5 g/l (▲), polymer 5 g/l (○), polymer 10 g/l (■) c) & d) 0.5 vvm (●), 1.0 vvm (△), 1.5 vvm (■), 2.0 vvm (○) e) 300 rpm (●), 500 rpm (□), 700 rpm (▲), 900 rpm (○), 1200 rpm (■).



$$k_L a = K (Pg/V)^\alpha V_s^\beta \mu_{app}^{-\gamma}$$

여기서 $k_L a$ 는 물질 전달 계수 (hr^{-1})이고 Pg/V 는 단위부피당 gassed power 이고, V_s 는 superficial 공기 속도 (cm/min) 이고 μ_{app} 는 겔보기 점도 (cP) 이고, K 는 비례상수이다. 실험결과로 부터 다당류 용액의 겔보기 점도가 1,500 $mPa \cdot S$ 보다 적을 때 발효조의 물질 전달 계수는 다음과 같았다.

$$k_L a = K (Pg/V)^\alpha V_s^{0.32} \mu_{app}^{-0.088}$$

다당류 용액의 겔보기 점도가 1,500 $mPa \cdot S$ 보다 클때는 발효조의 물질 전달 계수는 다음 식을 보여 주었다.

$$k_L a = K (Pg/V)^\alpha V_s^{0.32} \mu_{app}^{-0.38}$$

물질 전달 계수는 발효과정중 다당류가 축적됨에 따라 감소되고 발효가 진행됨에 따라 교반속도나 통기량을 증가 시킴으로써 물질 전달 계수의 감소를 어느 정도 막을 수 있다.

나. 균체증식과 다당류 생산에 미치는 교반속도의 영향

다른 조건들은 일정하게 하고 300 - 1,200 rpm의 범위에서 교반속도가 균체증식과 다당류의 생산에 미치는 영향을 조사하였다 (Table 6, Fig. 14). 교반속도 300 rpm에서 배양한 경우, 질소원이 고갈되기 전에 용존산소가 제한되었다. 그 결과 균체증식과 다당류의 생산이 현저히 감소하였다. 균체증식기에 용존산소의 제한하면 균체가 손상되어 균체증식과 다당류의 생산이 현저히 감소됨을 알 수 있었다. 교반속도 400 rpm 이상에서는 용존산소가 질소고정기 (질소원 고갈 후)에 제한 되었다. 이 경우 균체증식은 용존산소가 제한되는 시점에서 균체증식 속도가 감소하여 교반속도가 감소할수록 최종 균체량이 감소하였다. 그러나 다당류 생산은 큰 차이가 없었고 교반속도 900 rpm의

Table 6. Effect of agitation speed on fermentation parameters.

Agitation Speed (rpm)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	μ^{max} (hr^{-1})	Q_p^{max} (g/g-hr)	Q_s^{max} (g/g-hr)	X (g/l)	P (g/l)	S (g/l)
300	0.2253	0.0424	0.2290	0.0535	1.0608	2.9801	0.417	13.572
400	0.2245	0.1421	0.2297	0.0588	1.0231	5.6249	2.650	25.942
600	0.2269	0.2126	0.2305	0.0727	1.0159	6.6097	4.635	27.500
900	0.2259	0.1871	0.2326	0.0647	1.0297	7.0880	4.788	32.426
1200	0.2265	0.1700	0.2328	0.0609	1.0278	7.3131	4.324	33.207

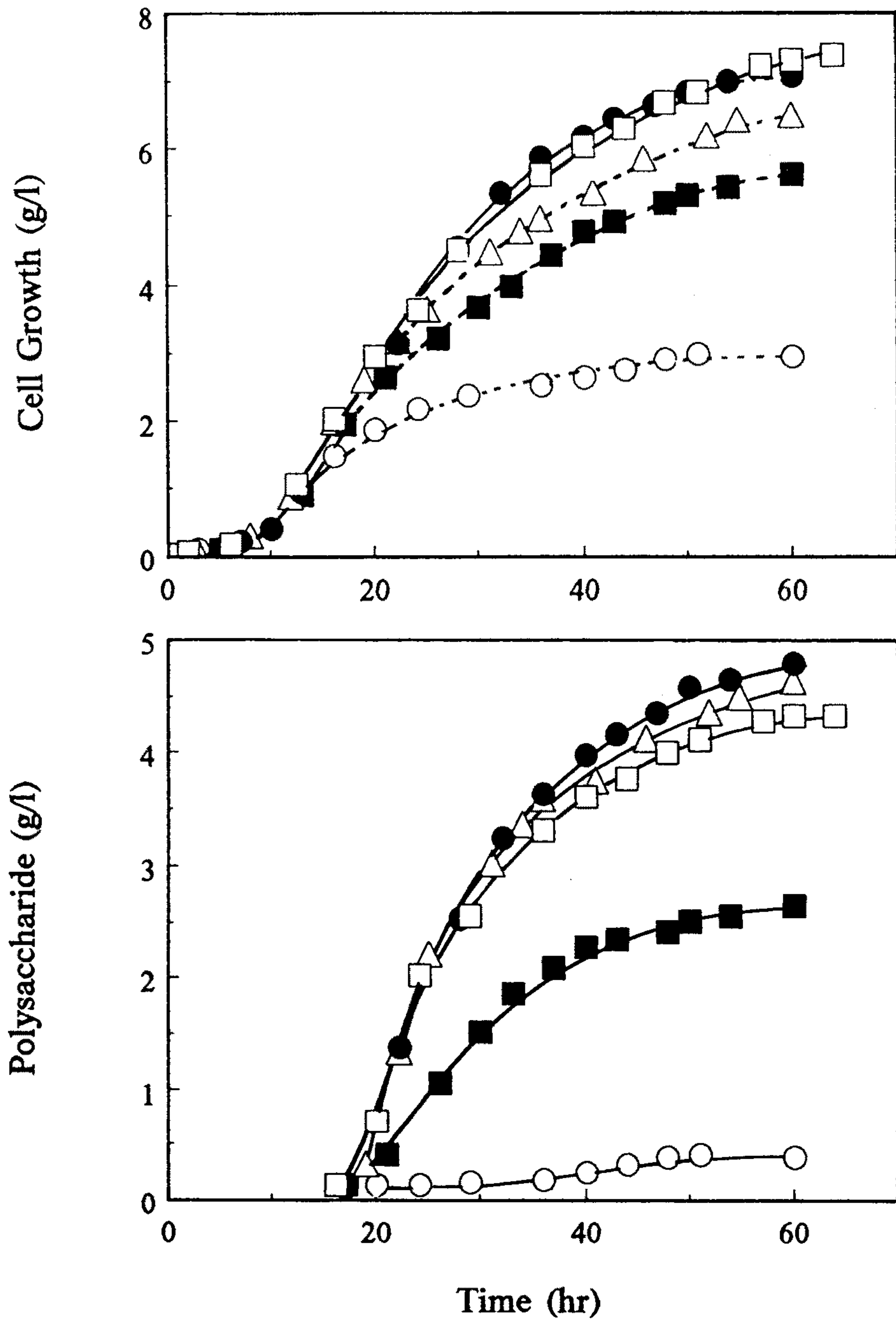


Fig. 14. Effect of agitation speed on cell growth and polysaccharide production. 300 rpm (○), 400 rpm (■), 600 rpm (△), 900 rpm (●), 1200 rpm (□), (- - -, $pO_2 = 0$).

배양에서 4.8 g/l 로 최대값을 보여 주었다. 이것은 초기 다당류 생성기에서 높은 교반 속도는 균체의 다당류 생성능력을 저해하기 때문이다 (Fig. 15). 교반속도 400 rpm에서 배양한 경우 다당류 생성 후반기에서 다당류 농도의 증가가 더 이상 일어나지 않은 것은 불완전한 배양액의 혼합에 기인한 것이다. 다른 다당류 발효의 경우 (60, 69) 배양시 교반속도가 증가할수록 다당류 생성을 증가하였으나 균체중식은 일정하였다. 이러한 차이는 *M. organophilum*의 경우 다당류 생성기 (질소원 제한 상태) 에서도 공기 중의 질소를 고정할 수 있는 특성 때문이다.

다. 점도 미치는 배양 교반속도의 영향

다른 교반속도로 배양할 때 배양액의 consistency index와 다당류 농도와의 관계를 이중 log 좌표에 나타낸 결과 Fig. 16과 같았다. 같은 다당류 농도에서 배양액의 점도는 배양 교반속도가 높을 수록 증가하였다. 이러한 차이는 교반속도가 높을 수록 다당류의 polymerization 정도가 커진 결과로 생각된다.

4. 균체중식과 다당류 생산에 미치는 통기량의 영향

통기량이 균체중식과 다당류 생산에 미치는 영향을 살펴 보았다 (Table 7, Fig. 17). 통기량이 증가할 수록 균체중식과 다당류의 생산이 증가하였고 통기량의 증가는 다당류의 생산 증가 보다 균체량의 증가에 더 큰 영향을 주었다. 균체수율 ($Y_{X/S}$)과 비 증식속도는 통기량의 변화에 대하여 일정하였으나 최대 비다당류 생산속도, 최대 기질 소비속도와 다당류 생성수율 ($Y_{P/S}$)은 통기량이 증가함에 따라 약간 감소하였다. 다른 통기량으로 배양할 때 배양액의 consistency index와 다당류 농도와의 관계를 이중 log 좌표에 나타낸 결과 Fig. 18과 같았다. 같은 다당류 농도에서 배양액의 점도는 배양 통기량이 증가할수록 증가하였다. 이러한 차이 역시 통기량이 증가할수록 다당류의 polymerization 정도가 커진 결과로 생각된다.

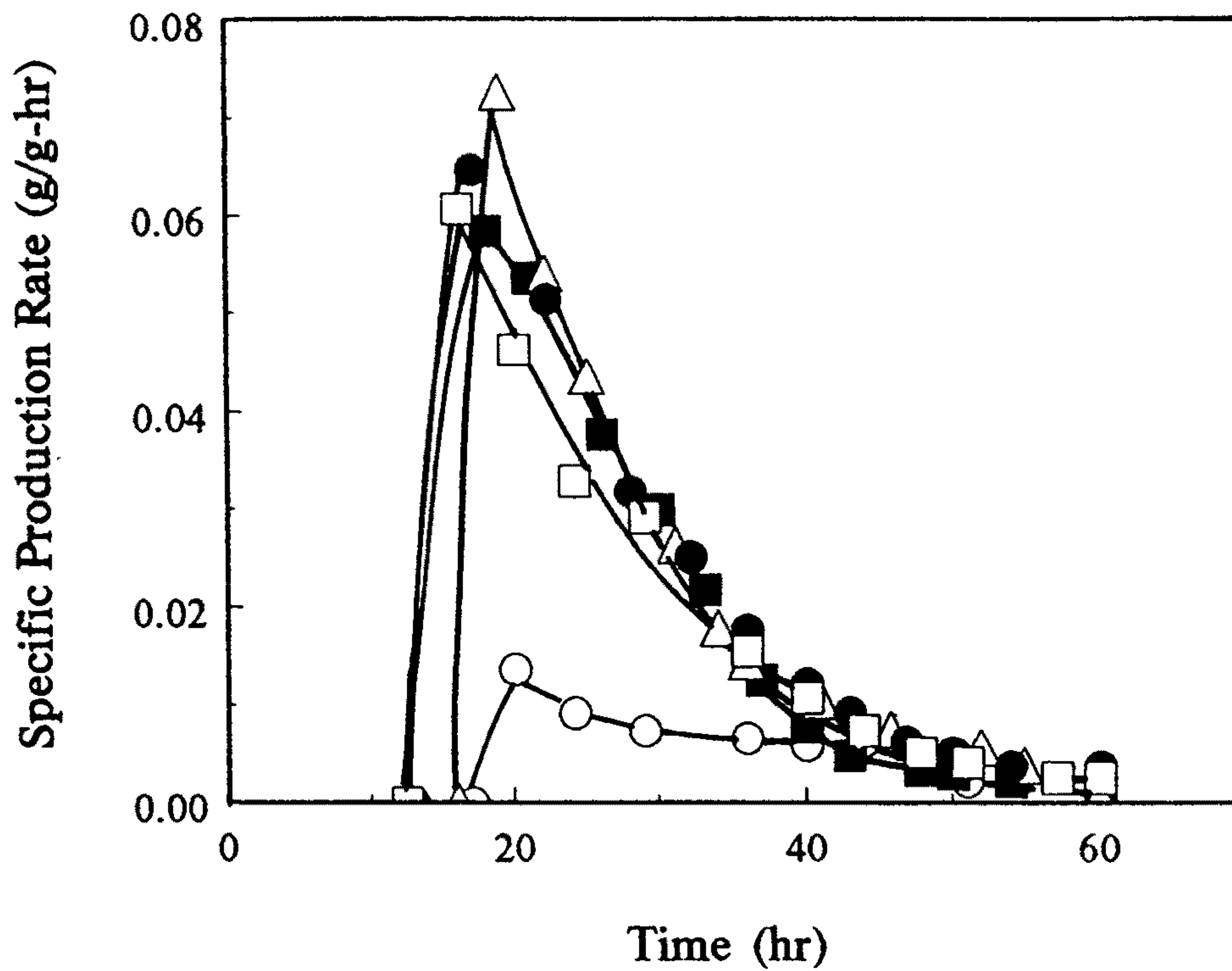


Fig.15. Effect of agitation speed on the specific production rate of polysaccharide. The symbols are the same as Fig. 14.

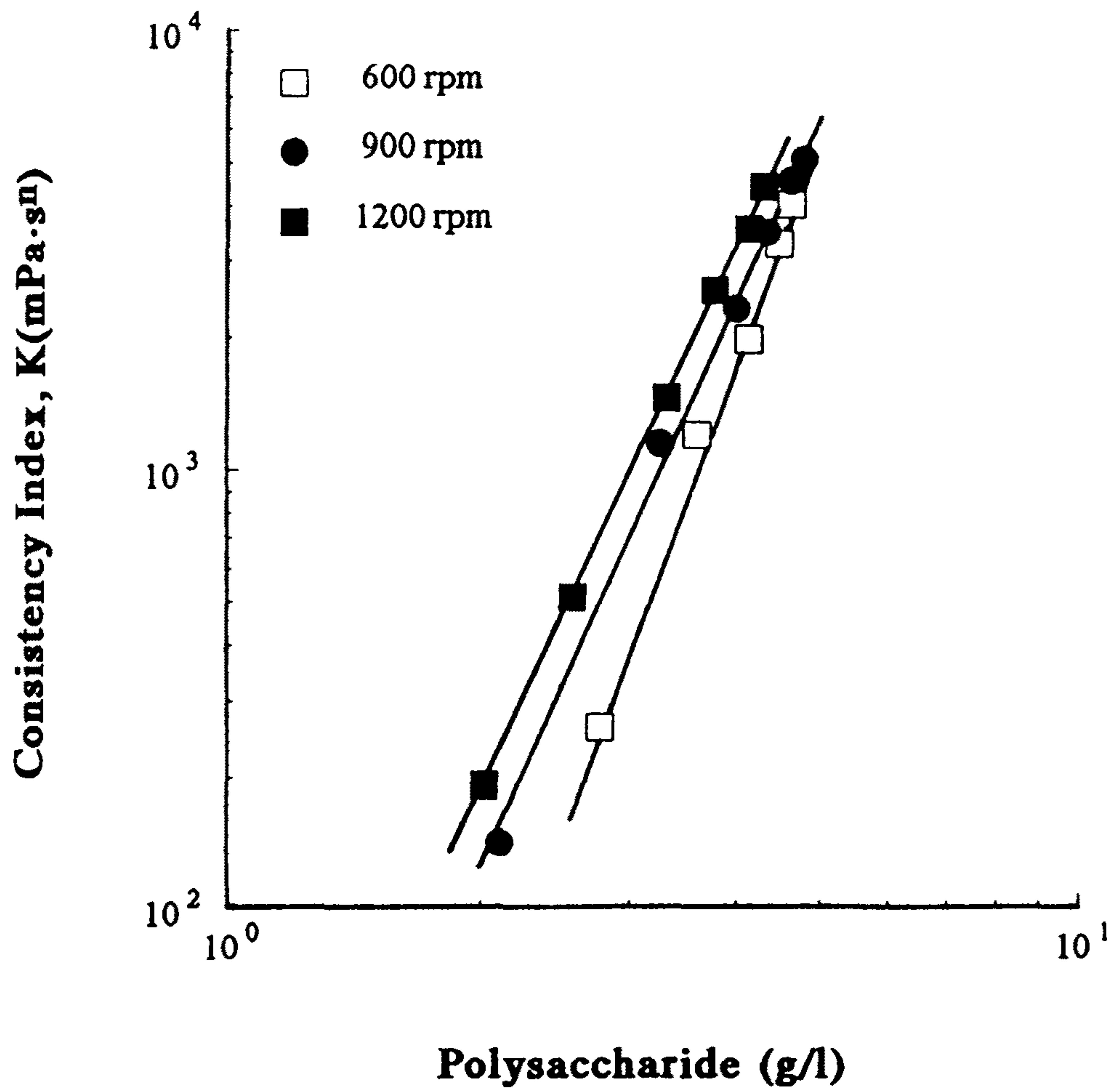


Fig. 16. Relationship of consistency index and polysaccharide concentration for the fermentations of various agitation speeds

Table 7. Effect of aeration rate on fermentation parameters.

Aeration Rate (vvm)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	μ^{max} (hr^{-1})	Q_p^{max} (g/g-hr)	Q_s^{max} (g/g-hr)	X (g/l)	P (g/l)	S (g/l)
0.5	0.2247	0.2024	0.2315	0.0722	1.0303	6.3283	4.426	30.042
1.0	0.2259	0.1871	0.2316	0.0647	1.0297	7.0880	4.788	32.425
2.0	0.2294	0.1704	0.2328	0.0597	1.0148	7.7850	4.979	33.824

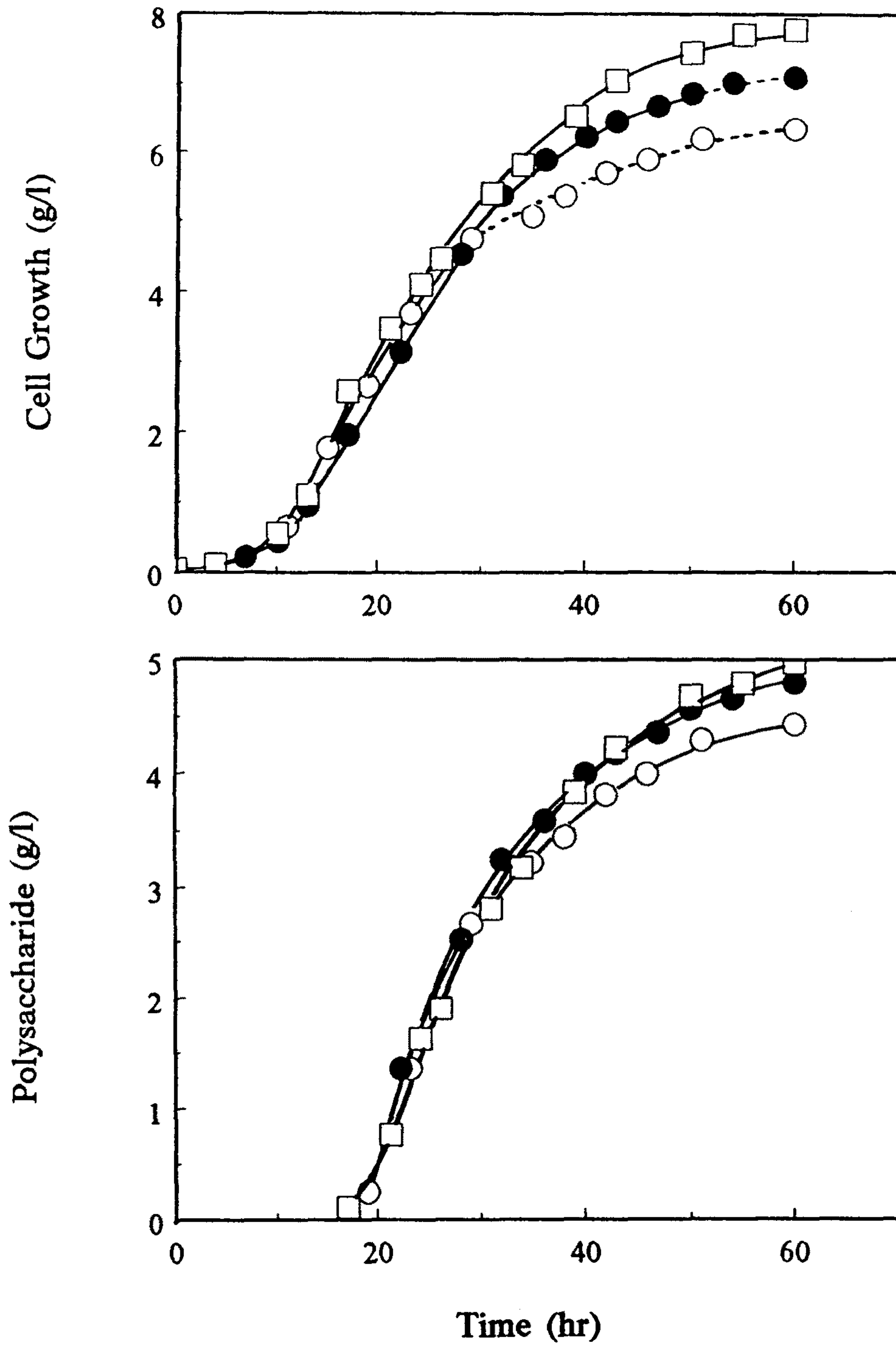


Fig. 17. Effect of aeration rate on cell growth and polysaccharide production. 0.5 vvm (○), 1.0 vvm (●), 2.0 vvm (□), (- - - -, $pO_2 = 0$).

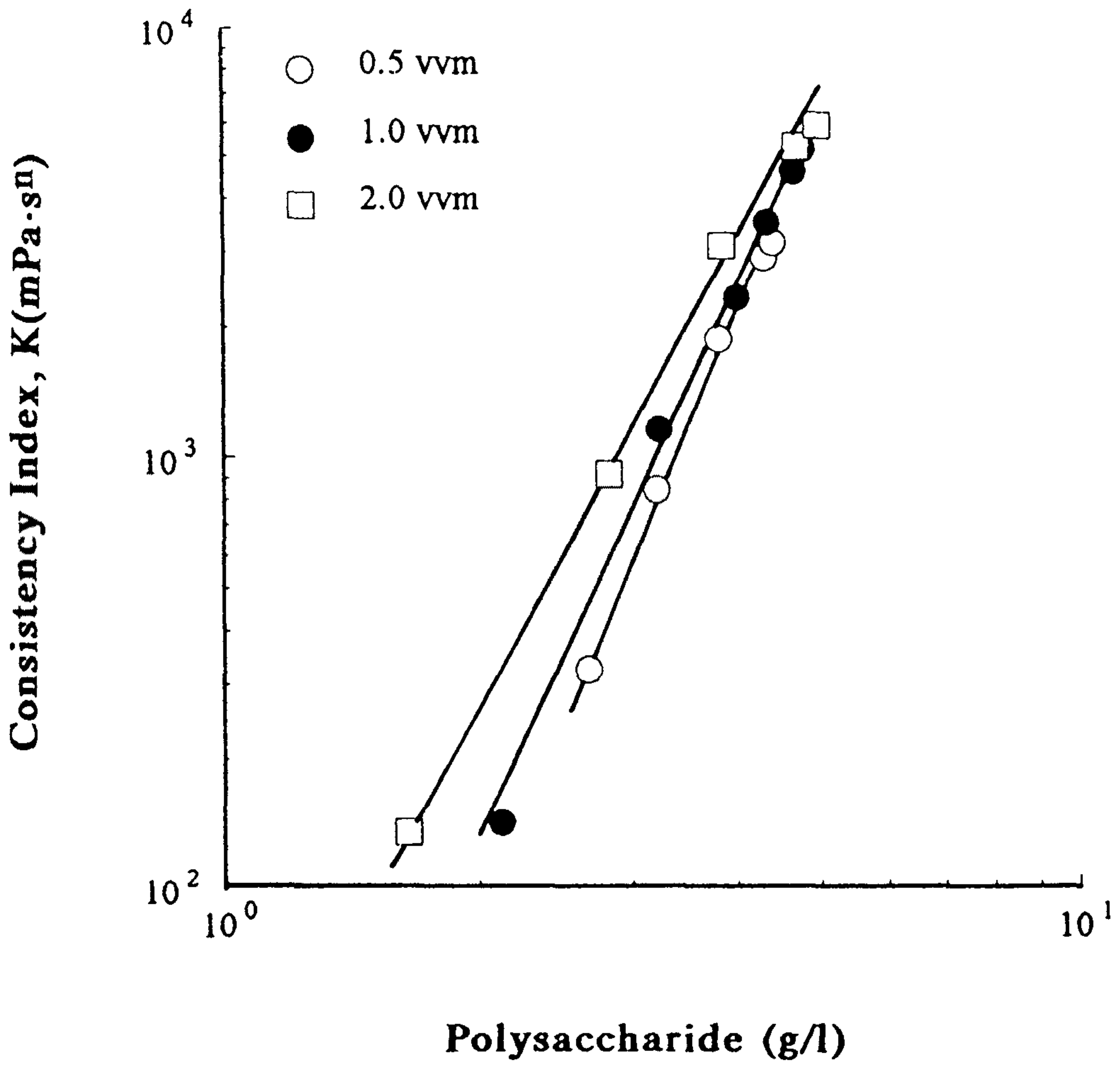


Fig. 18. Relationship of consistency index and polysaccharide concentration for the fermentations of various aeration rate

제 3 절. 질소 고정 능력의 향상 조건

질소 고정균은 일반적으로 많은 양의 다당류를 생산한다는 보고가 있다 (70, 71). 많은 메탄을 자화세균, 특히 serine 경로를 지닌 type II 세균은 질소를 고정할 수 있다 (72). Type II 세균인 *M. organophilum* 공기중의 질소를 유일한 질소원으로 하여 질소를 고정할 수 있다. 집중한 후 초기 균체농도를 2.6 g/l로 하여 질소원이 없는 배지에서 유가식 배양을 한 결과 Fig. 19에 나타냈다. 질소 고정에 의해서 균체증식은 15 g/l 가까이 다당류의 농도는 6.5 g/l 까지 증가하였다. 25시간 후에는 다당류 생성 속도가 급격히 떨어짐을 보여 주었다. 이것은 메탄올외에 다른 요인이 균체증식보다 다당류 생성을 제한한 것 같다.

1. 균체증식 및 다당류 생산에 미치는 산소제한의 영향

질소원이 고갈된 후 부터 용존산소 농도를 20%로 유지하여 배양한 경우와 용존산소를 제한하여 배양한 경우를 Fig. 20에 나타냈다.

발효과정 중 용존산소 농도 20%를 유지하기 위해 통기량과 교반속도를 임의로 변화시켰다. 용존산소 농도의 제한은 질소원 고갈 시점 부터 통기량과 교반속도를 변화시켜 용존산소 농도를 4% 이하로 유지시켰다. 산소제한으로 균체증식과 다당류 생산이 감소하였으나 생산 수율 (P/X)는 용존산소의 농도에 상관없이 일정하였다. 이것은 산소 제한으로 균체역가나 다당류의 생산경로가 손상되지 않고 감소된다는 것을 보여준 것이다.

2. 균체증식과 다당류 생성에 미치는 산소첨가의 영향

산소첨가가 균체증식과 다당류 생성에 미치는 영향을 보기 위해서 배양을 수행 하였다 (Fig. 21). 용존산소 농도는 총 통기량은 일정하게 유지시키면서 순수산소를 약

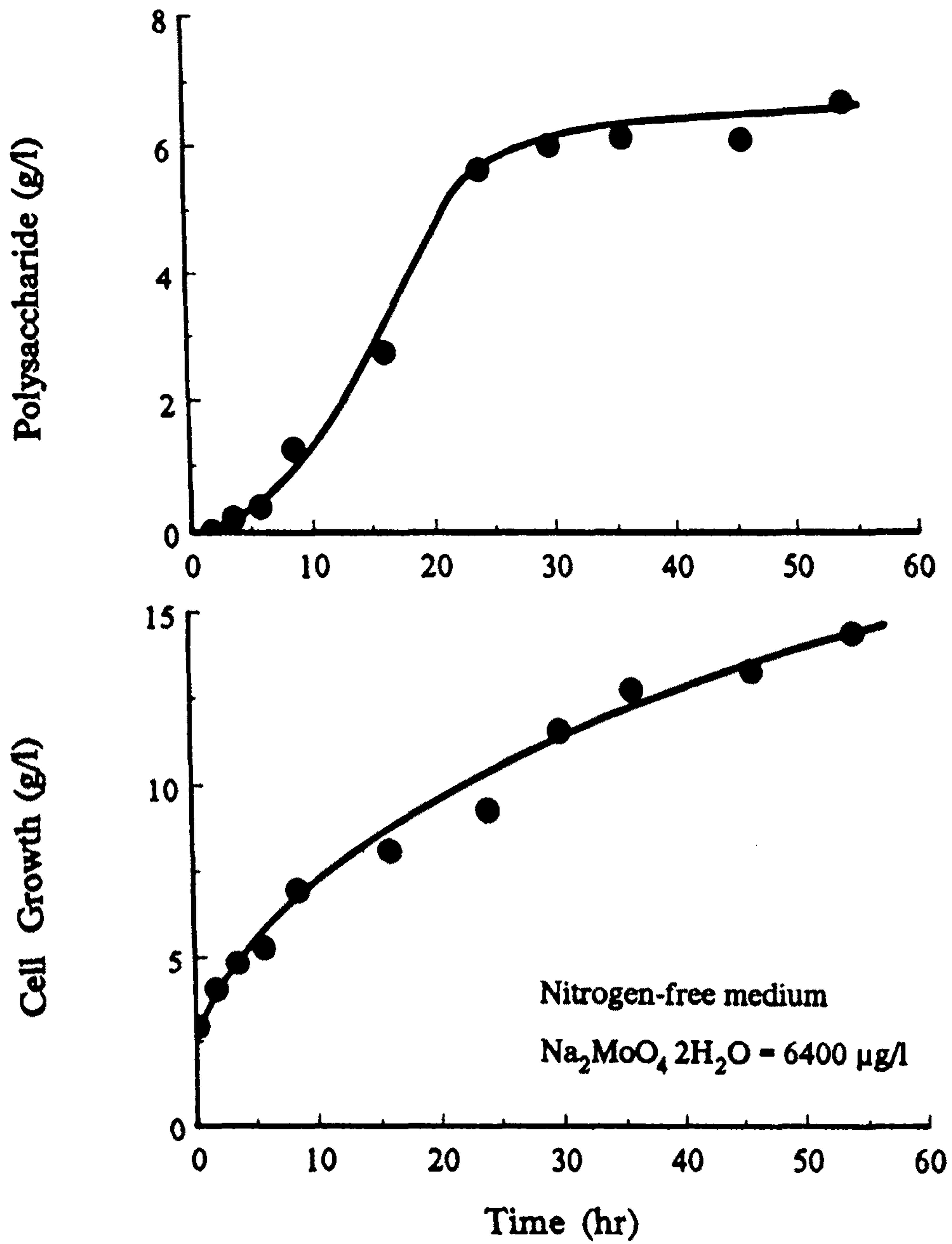


Fig.19. Cultivation under nitrogen free medium but containing molybdenum favoring nitrogen fixation (molybdenum=6.4mg/l).

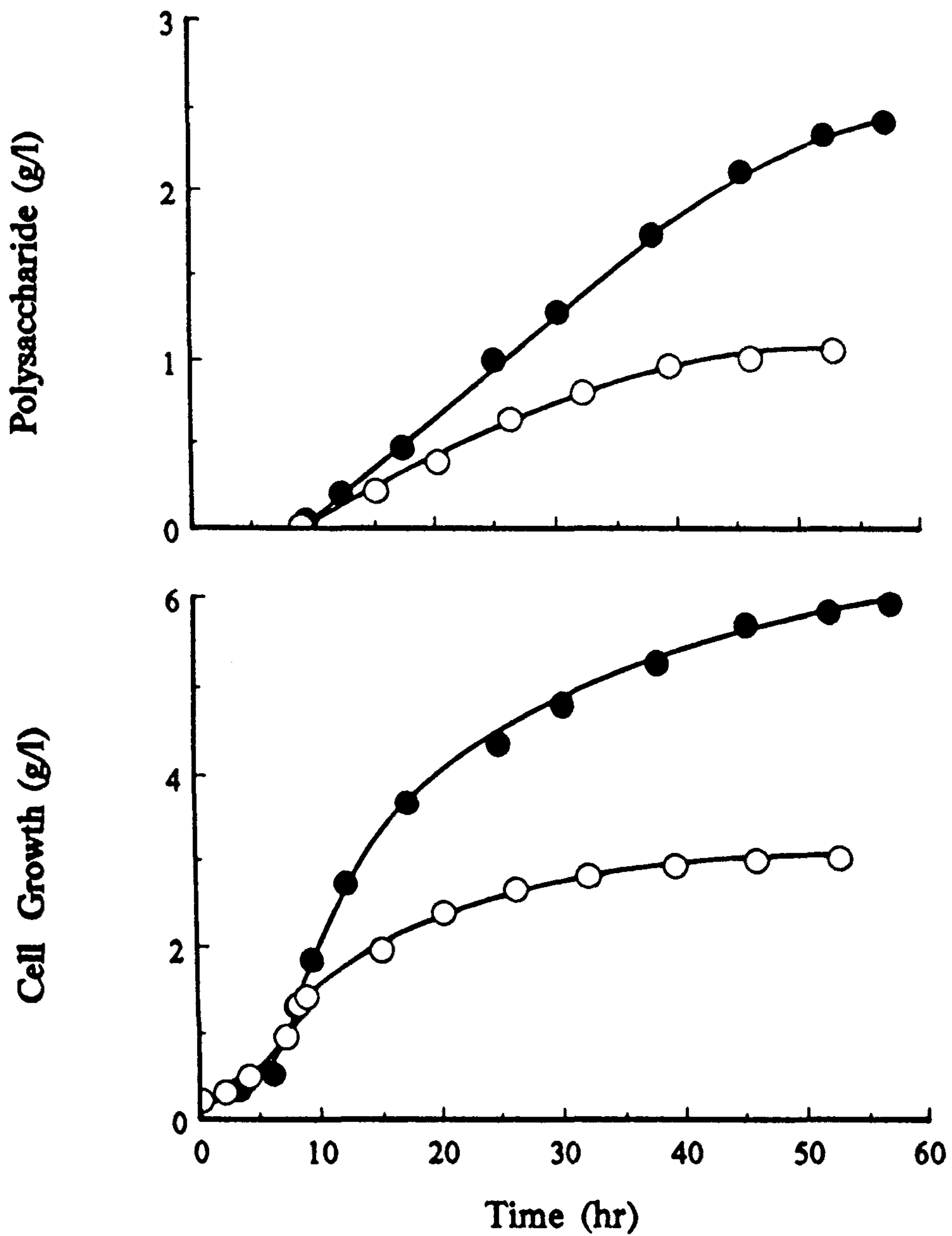


Fig. 20. Effect of oxygen limitation on cell growth and polysaccharide production. Dissolved oxygen of control as 20 % (●) was maintained roughly at 1.5ppm. Oxygen limitation (○) was begun after nitrogen limitation.

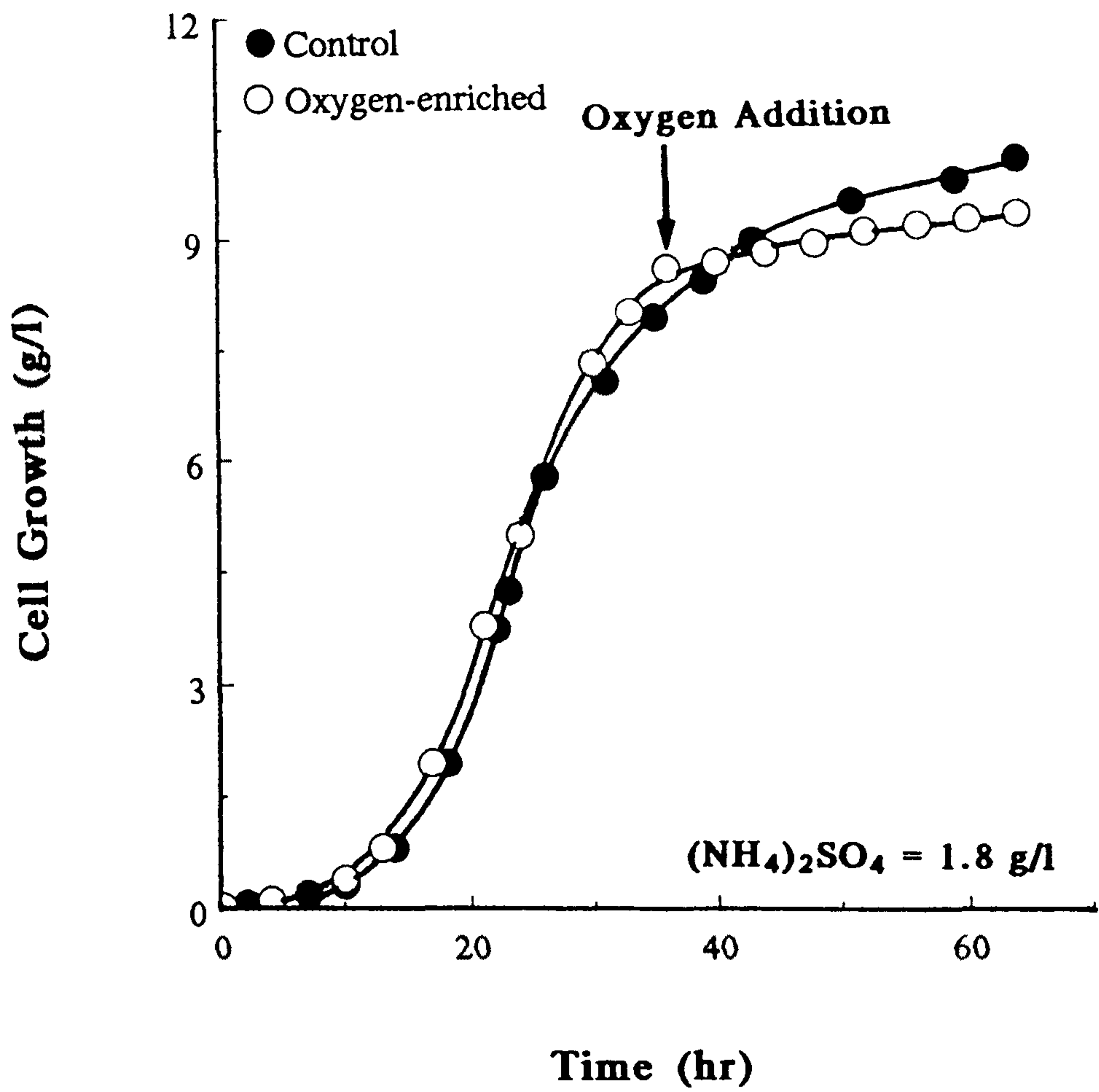
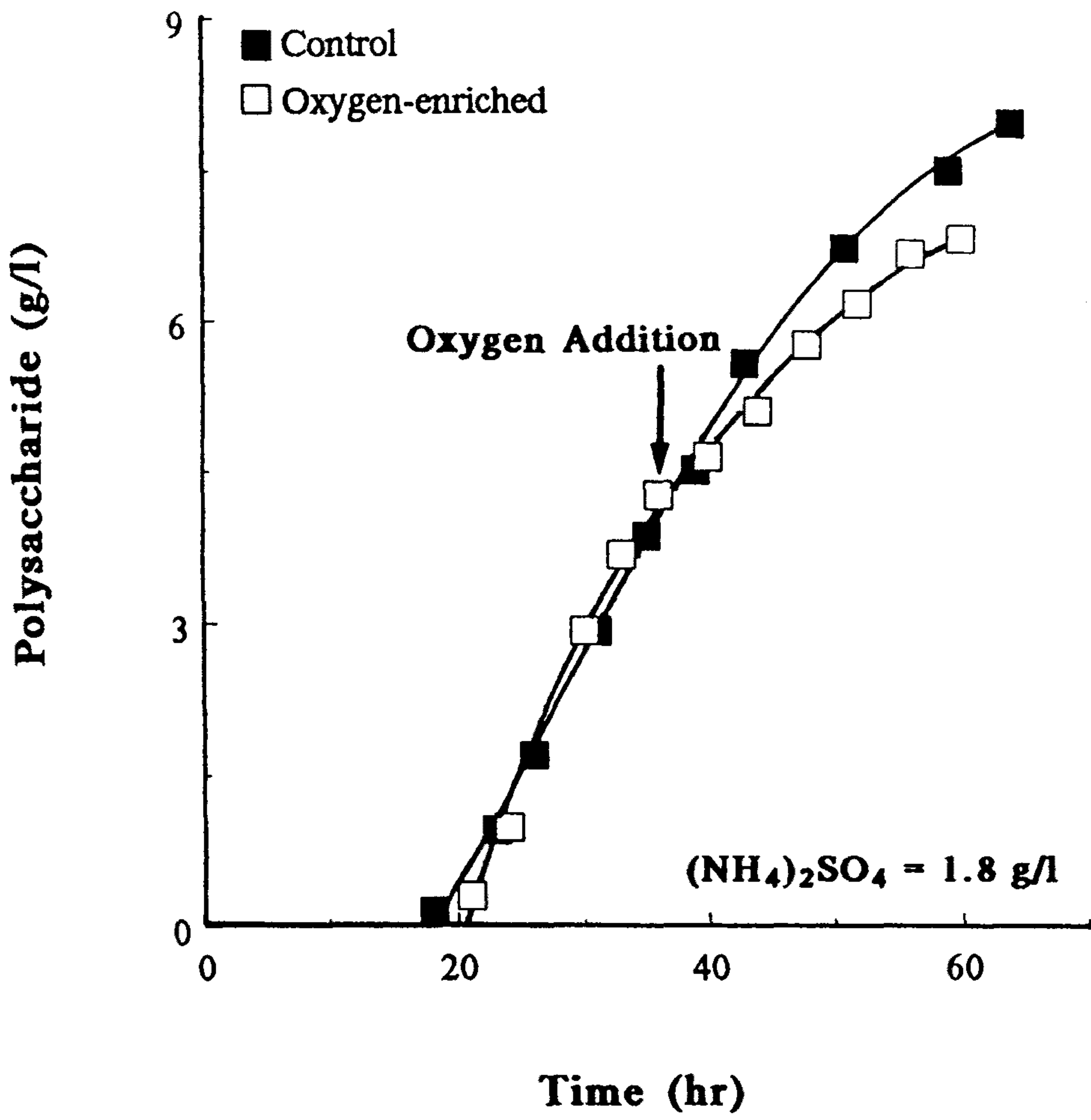


Fig. 21. Effect oxygen enrichment on cell growth and polysaccharide production



10% 정도 추가시켜 20% 수준을 유지하였다. 산소첨가 공기로 배양한 경우 공기로 배양한 경우보다 균체증식과 다당류의 생산은 감소하였으나 이때 생산 수율 (P/X)은 산소분압에 관계없이 일정하였다. 균체에 대한 산소첨가의 저해작용은 균체증식과 다당류의 생산 뿐 아니라 메탄올에 대한 균체수율 ($Y_{X/S}$)과 다당류 생성 수율 ($Y_{P/S}$)에도 나타난다 (Fig. 22). 균체수율과 다당류 생성수율은 산소첨가가 시작된 시점에서 급격히 감소한다. 이러한 현상은 산소가 세포의 질소 고정능력을 저하시키므로 질소 고정의 환경을 유지시키기 위해 많은 메탄올이 사용된 것으로 생각된다.

3. 균체증식과 다당류 생성에 미치는 몰리브덴의 영향

질소 고정에 중요한 인자인 몰리브덴이 균체증식과 다당류의 생성에 미치는 영향을 보기 위해서 sodium molybdate 농도를 0 mg/l에서 6.4 mg/l으로 변화시키면서 배양을 수행하였다 (Fig. 23). 몰리브덴이 없는 배지에서는 몰리브덴을 첨가한 경우보다 균체증식 및 다당류 생성이 현저히 감소하였다. 몰리브덴을 첨가하여 배양한 경우 몰리브덴 농도를 증가시킬 수록 균체량과 비균체 증식속도는 변화가 없었으나 다당류의 양은 증가하였다. 몰리브덴은 질소고정에 중요한 인자이고 특히 다당류 생성에 영향을 주었다.

4. 균체증식과 다당류 생산에 미치는 철의 영향

철이 균체증식과 다당류의 생산에 미치는 영향을 살펴보기 위해 ferrous sulfate를 0 mg/l에서 20.8 mg/l으로 변화 시키면서 배양을 수행하였다 (Fig. 24). 균체증식과 비증식속도와 다당류 생산은 ferrous sulfate 농도가 10.4 mg/l 까지 증가하였으나 10.4 mg/l 이상으로 증가할 경우 오히려 감소하였다. 이때 생산수율 (P/X)은 철의 농도에 상관없이 거의 일정하였다. 질소 고정시 중요한 인자중 한 요소인 철은 다당류 생성보다 균체증식에 영향을 주었고 그 결과 균체증식 정도에 비례하여 다당류가 생성됨을 보여 주었다.

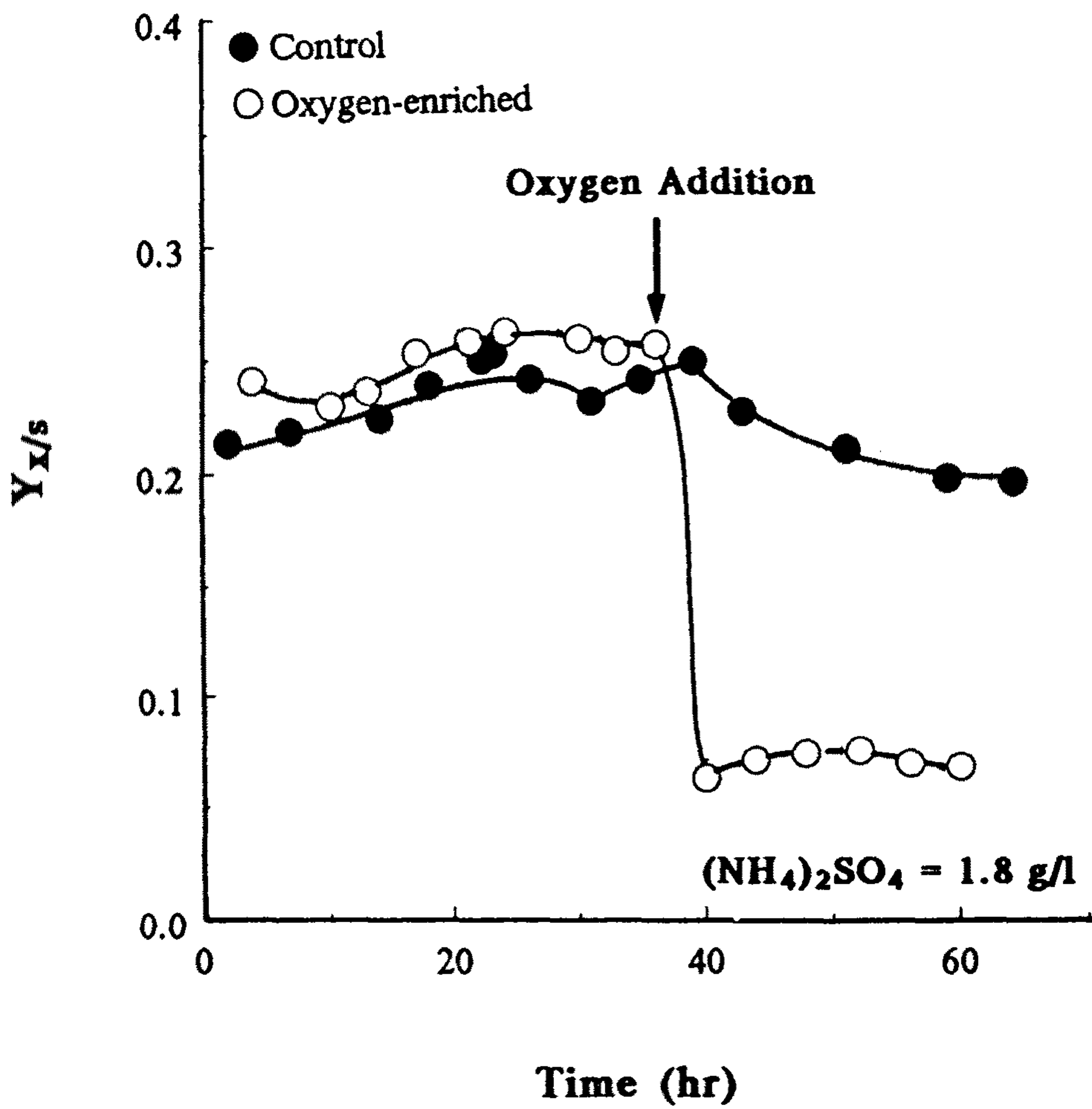
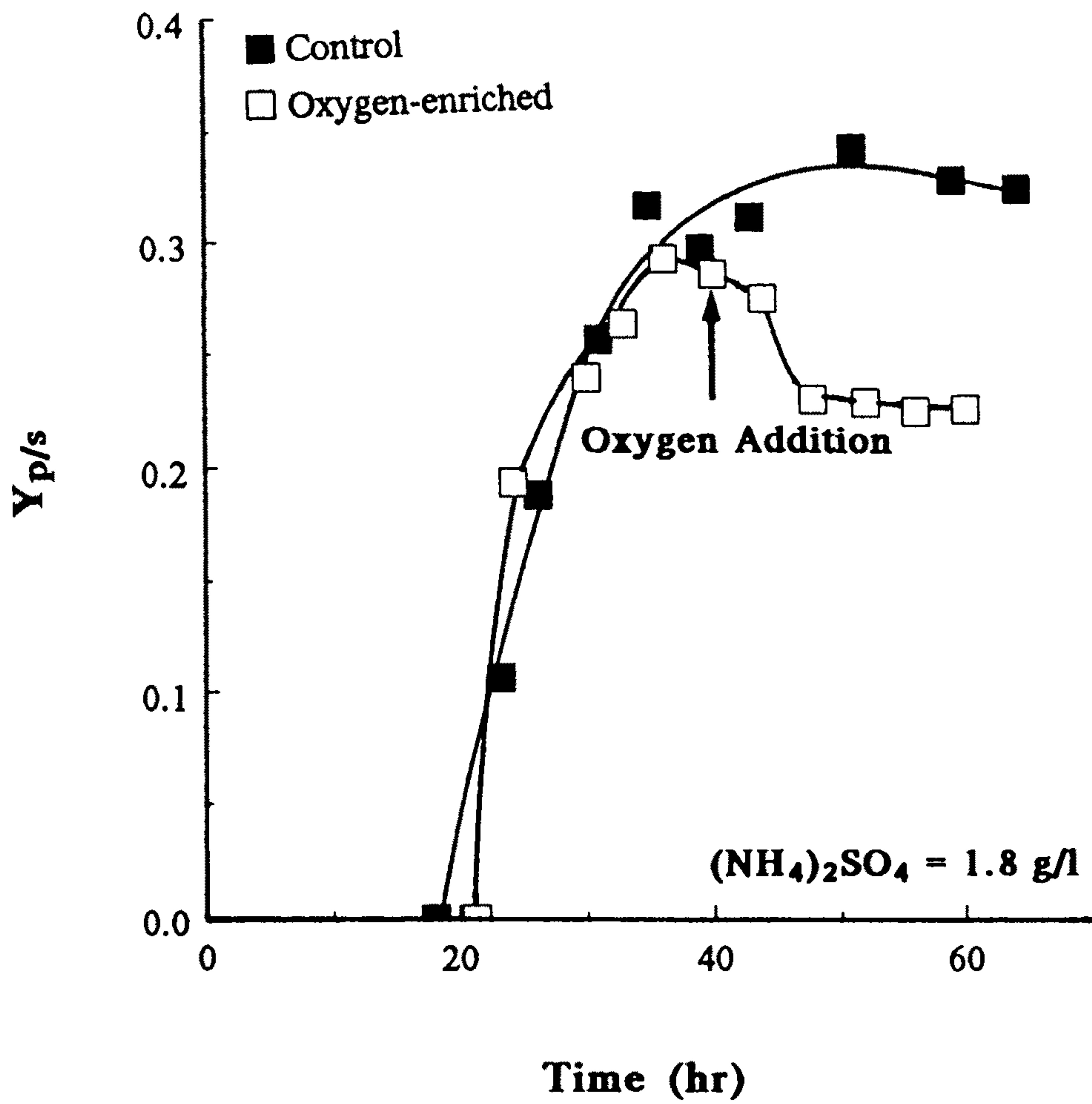


Fig. 22. Effect oxygen enrichment on cell growth yield and product yield



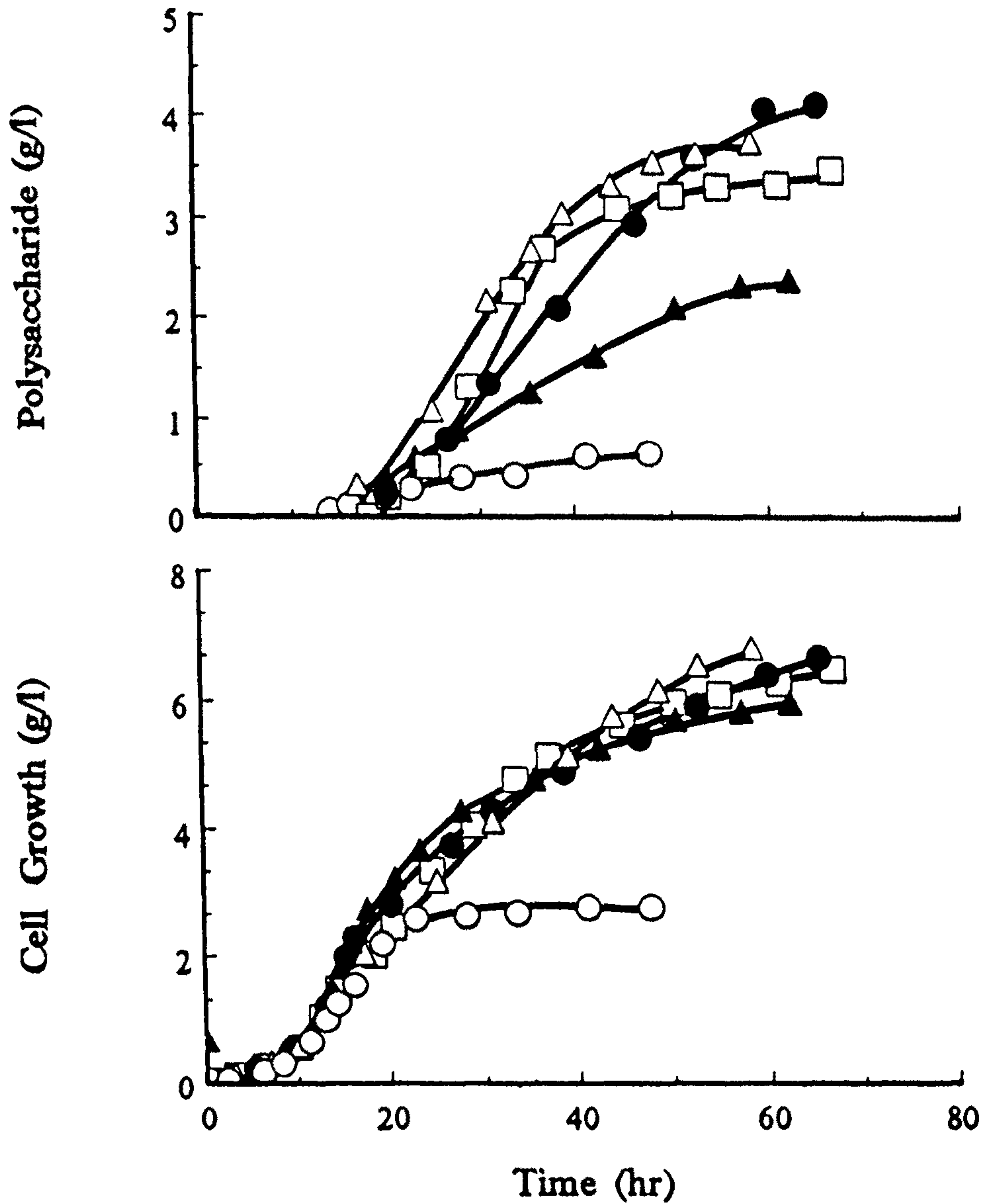


Fig. 23. Effect of molybdenum concentration on cell growth and polysaccharide production. Molybdenum concentrations were 0mg/l (○), 0.064mg/l(▲),0.32mg/l (□), 0.64mg/l(△), 6.4mg/l(●).

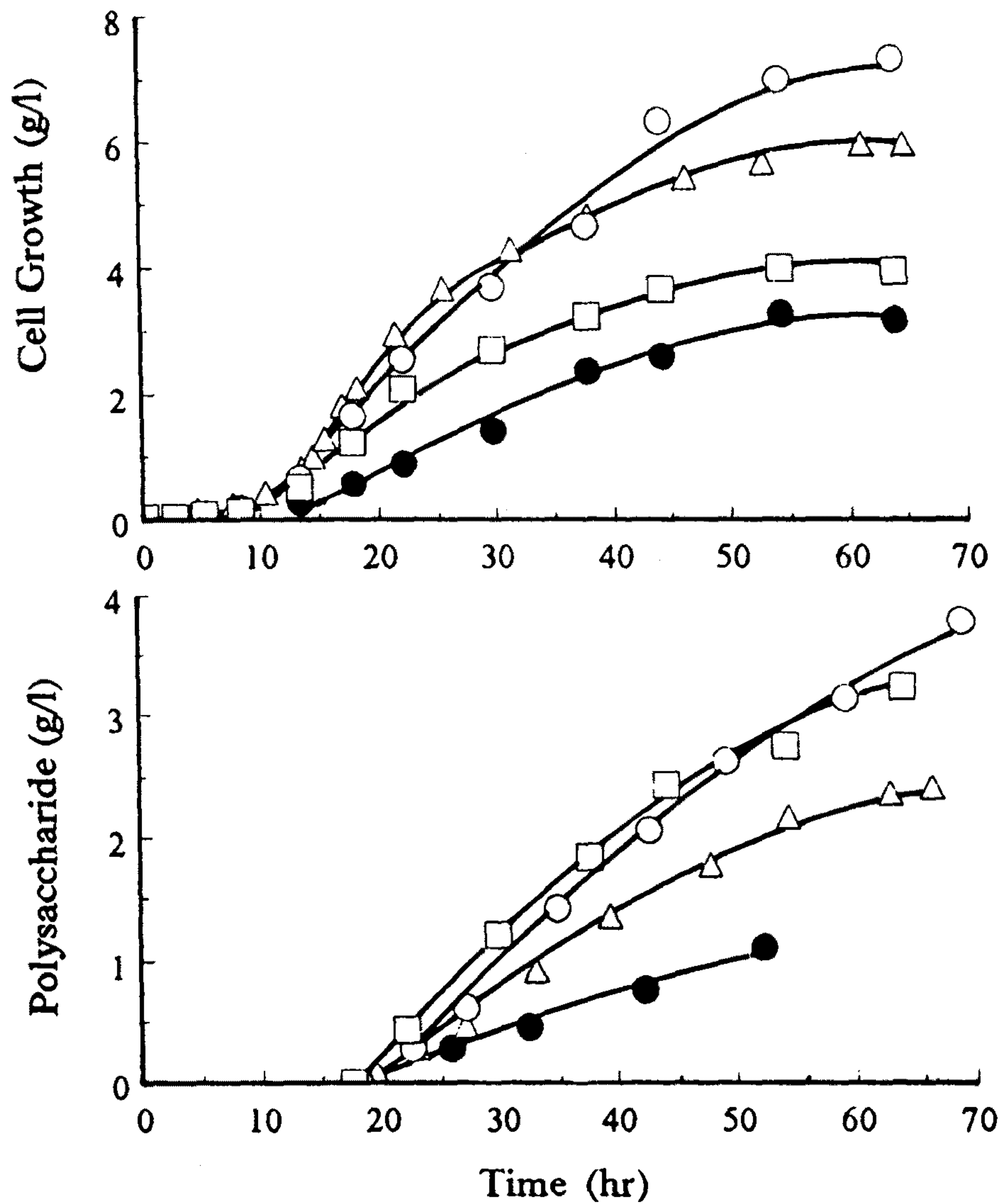


Fig.24. Effect of iron concentration on cell growth and polysaccharide production. Iron concentrations were 0mg/l(●), 2.08mg/l(△), 10.4mg/l(○), 20.8mg/l(□).

제 4 절. 질소원 조절

1. 균체중식 및 다당류 생산에 미치는 질소원 추가 시기의 영향

질소원 추가시기가 균체중식 및 다당류 생산에 미치는 영향을 보기 위해서 저농도의 몰리브덴과 철이 포함된 배지에서 질소원을 질소원이 고갈되는 시기를 기준으로 다른 시기에 첨가하였다 (Fig. 25). 초기 0.6 g/l ammonium sulfate의 배지에서 배양하다 질소원이 고갈되기 전에 0.6 g/l의 ammonium sulfate를 첨가했을 경우 초기 1.2 g/l ammonium sulfate 배지에서의 배양결과와 균체중식과 다당류 생성이 거의 비슷한 양상을 보였으나 초기 0.6 g/l ammonium sulfate의 배지에서 배양하다 질소원이 고갈된 후 0.6 g/l의 ammonium sulfate를 첨가한 경우는 균체중식과 다당류의 생성이 현저히 감소하였다. 저농도의 몰리브덴과 철이 포함된 배지에서 질소원이 고갈되기 전에 질소원을 첨가하면 균체중식과 다당류 생성에 영향이 없으나 질소원 고갈 후 질소원을 첨가하면 균체중식과 다당류 생성이 크게 감소됨을 보여 주었다. 이것은 저농도의 몰리브덴과 철이 포함된 배지에서는 질소 제한시기 (= 질소 고정 시기)에서 질소 고정에 관여하는 효소들이 첨가된 ammonium에 의해 저해 받아서 일어난 결과로 생각된다 (73).

질소 고정에 중요한 인자중 하나인 몰리브덴 농도를 증가시킨 배지에서 질소원이 고갈된 후 질소원의 추가의 영향을 보았다 (Fig. 26). 그 결과 초기 1.2 g/l ammonium sulfate의 배양보다 초기 0.6 g/l ammonium sulfate에서 배양하다 질소원 고갈 후 0.6 g/l ammonium sulfate를 추가하여 배양한 경우 질소 고정시 몰리브덴은 균체중식에는 영향을 주지 않고 다당류 생산에만 영향을 주는 인자임으로 고농도의 몰리브덴은 질소원 고갈 후 질소원 추가시 다당류 생산능력을 회복시켜주는 역할을 하였다.

질소 고정에 중요한 인자의 하나인 철 농도를 증가 시킨 배지에서 질소원이 고갈된 후 질소원의 추가 영향을 보았다 (Fig. 27). 고농도의 철이 함유된 배지에서 초기

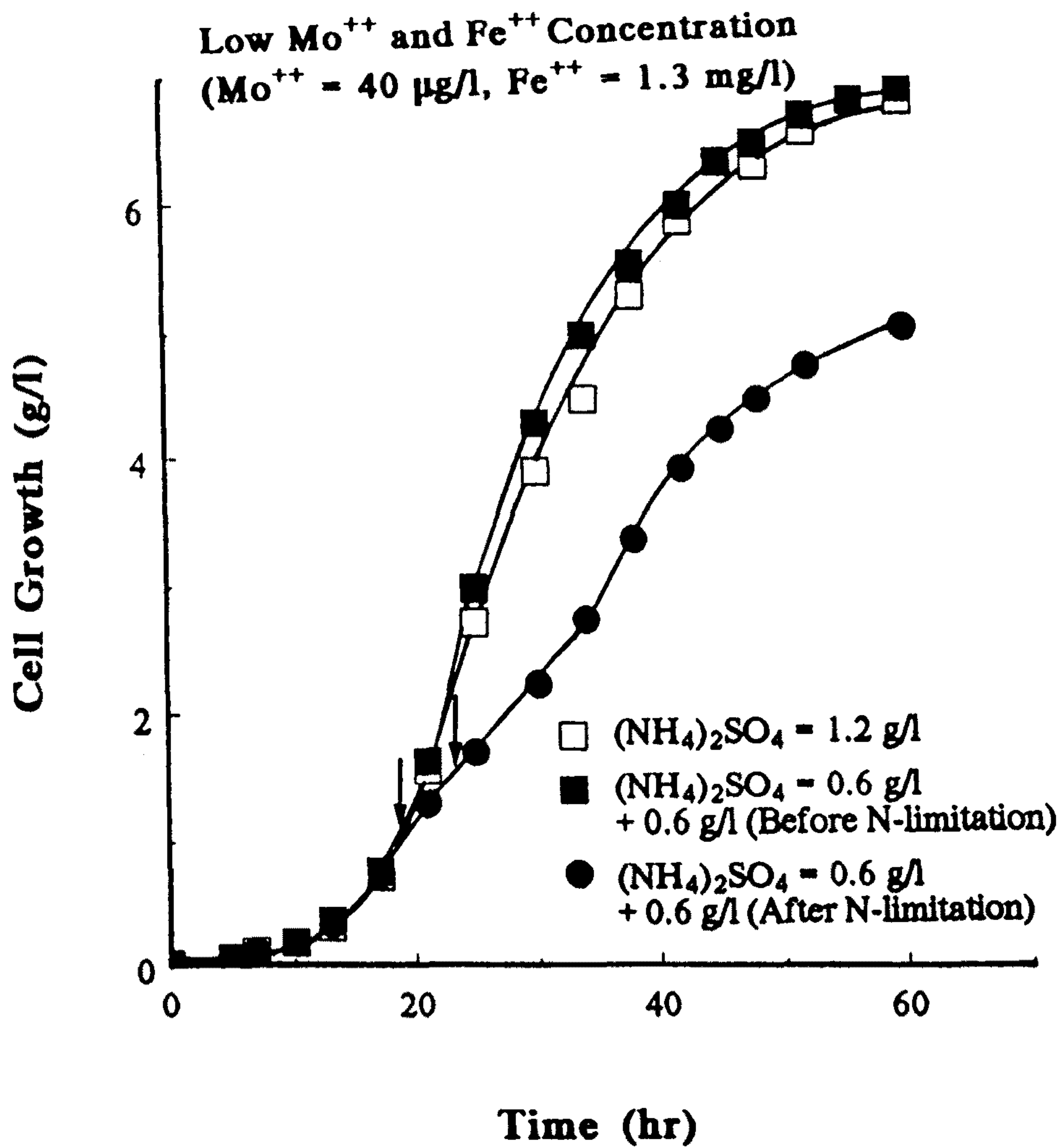
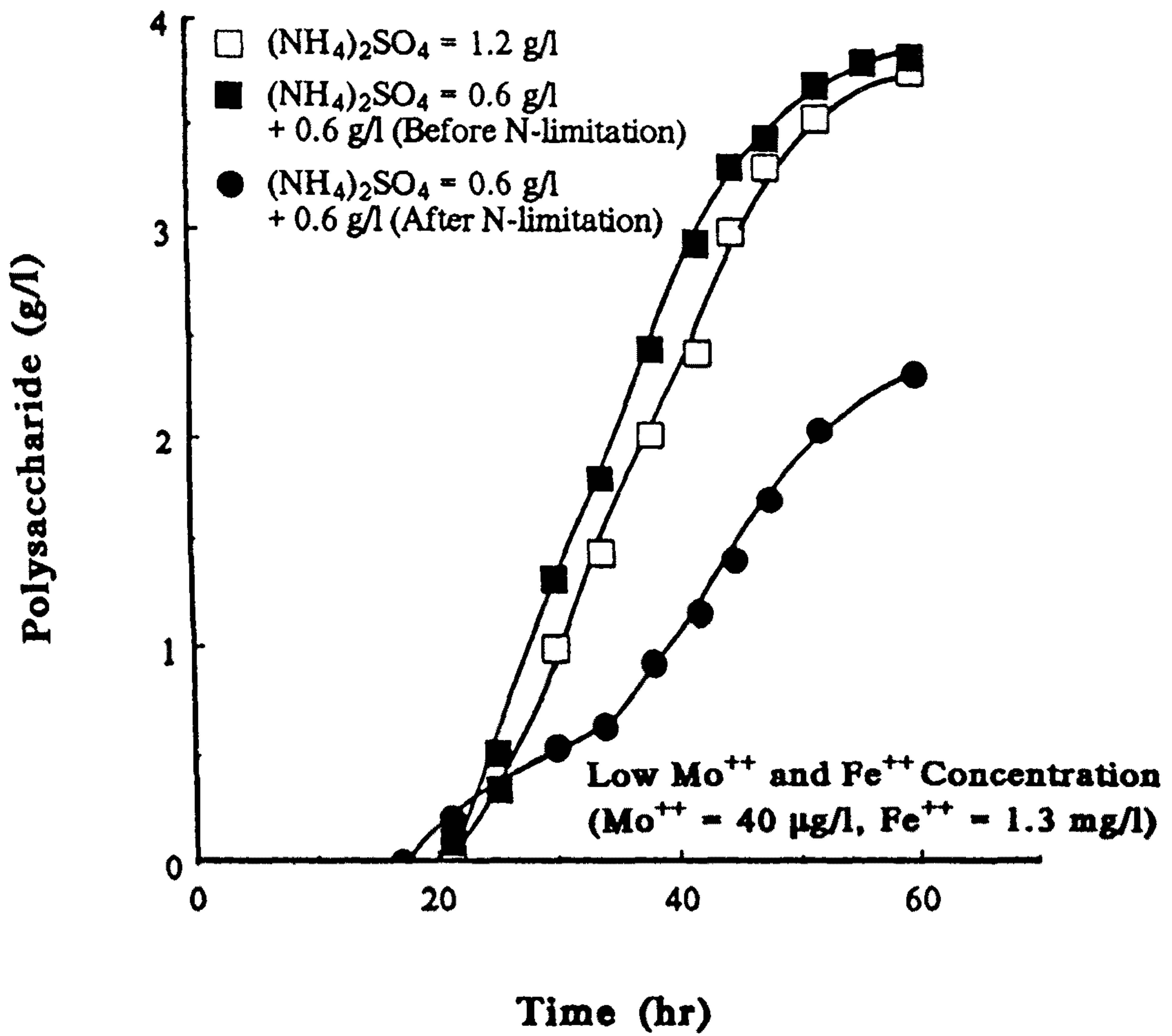


Fig. 25. Effect of additional ammonium ion on cell growth and polysaccharide production in medium containing the low concentration of molybdenum and iron



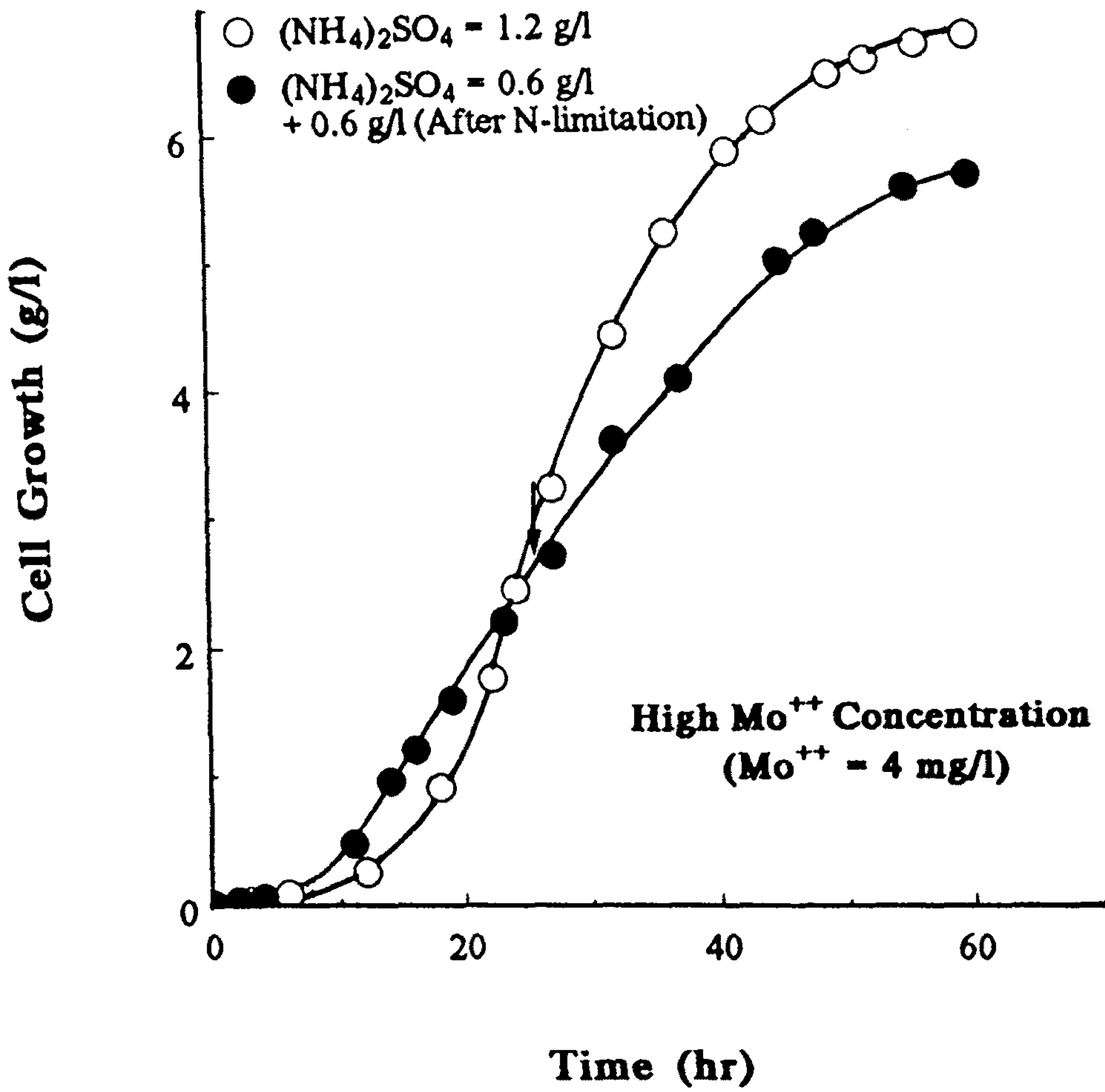
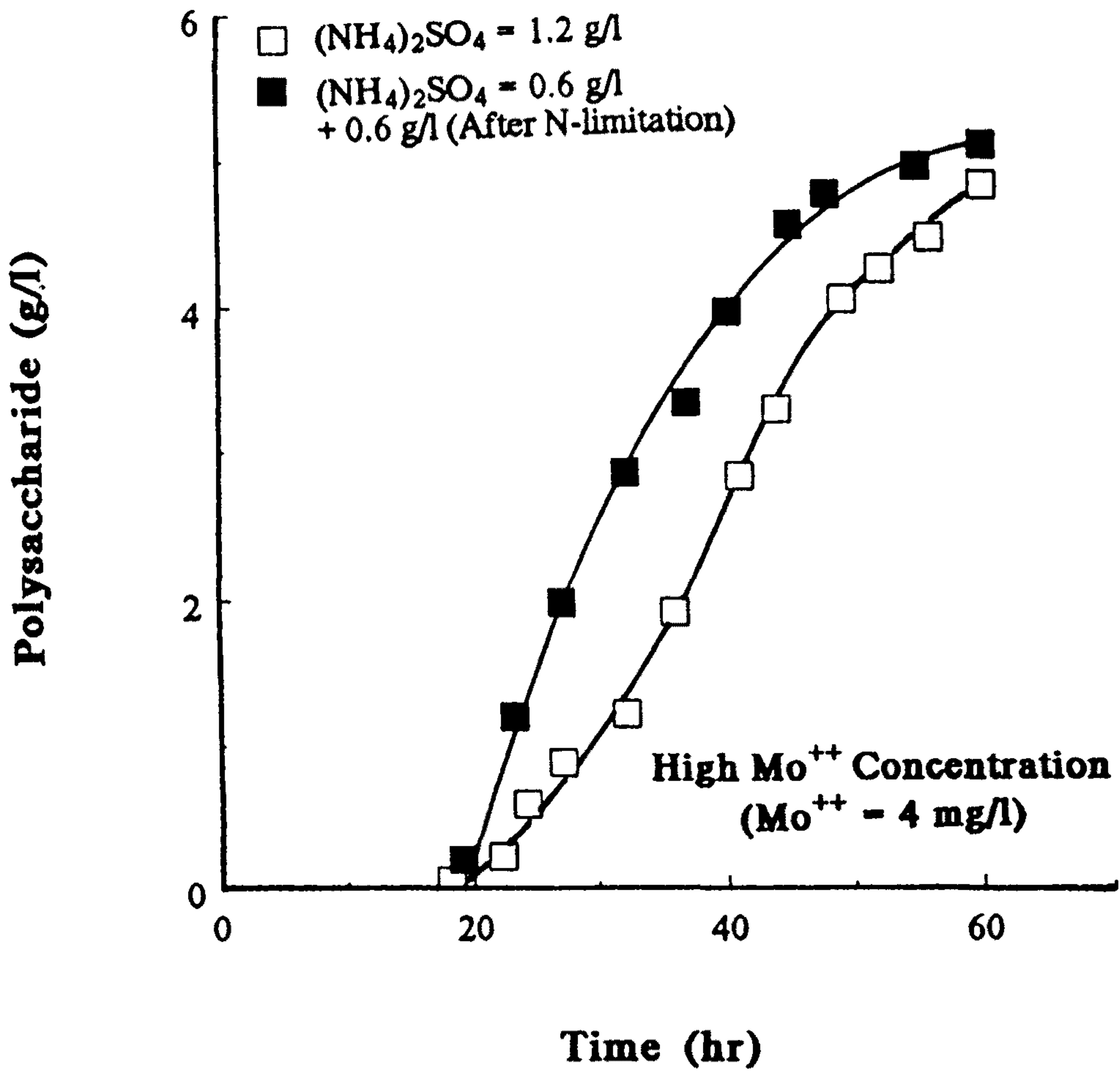


Fig. 26. Effect of additional ammonium ion on cell growth and polysaccharide production in medium containing the high concentration of molybdenum and the low concentration of iron



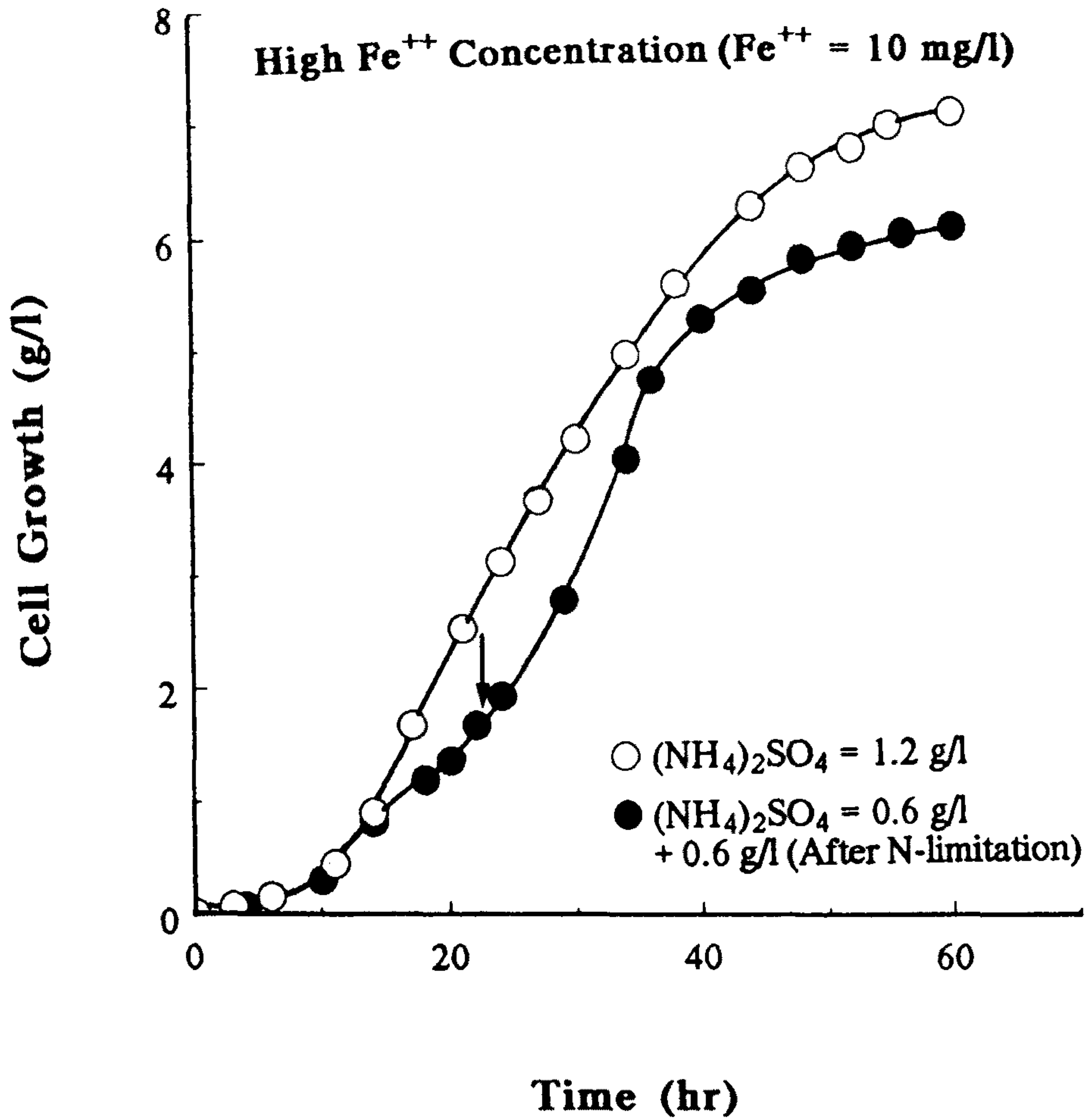
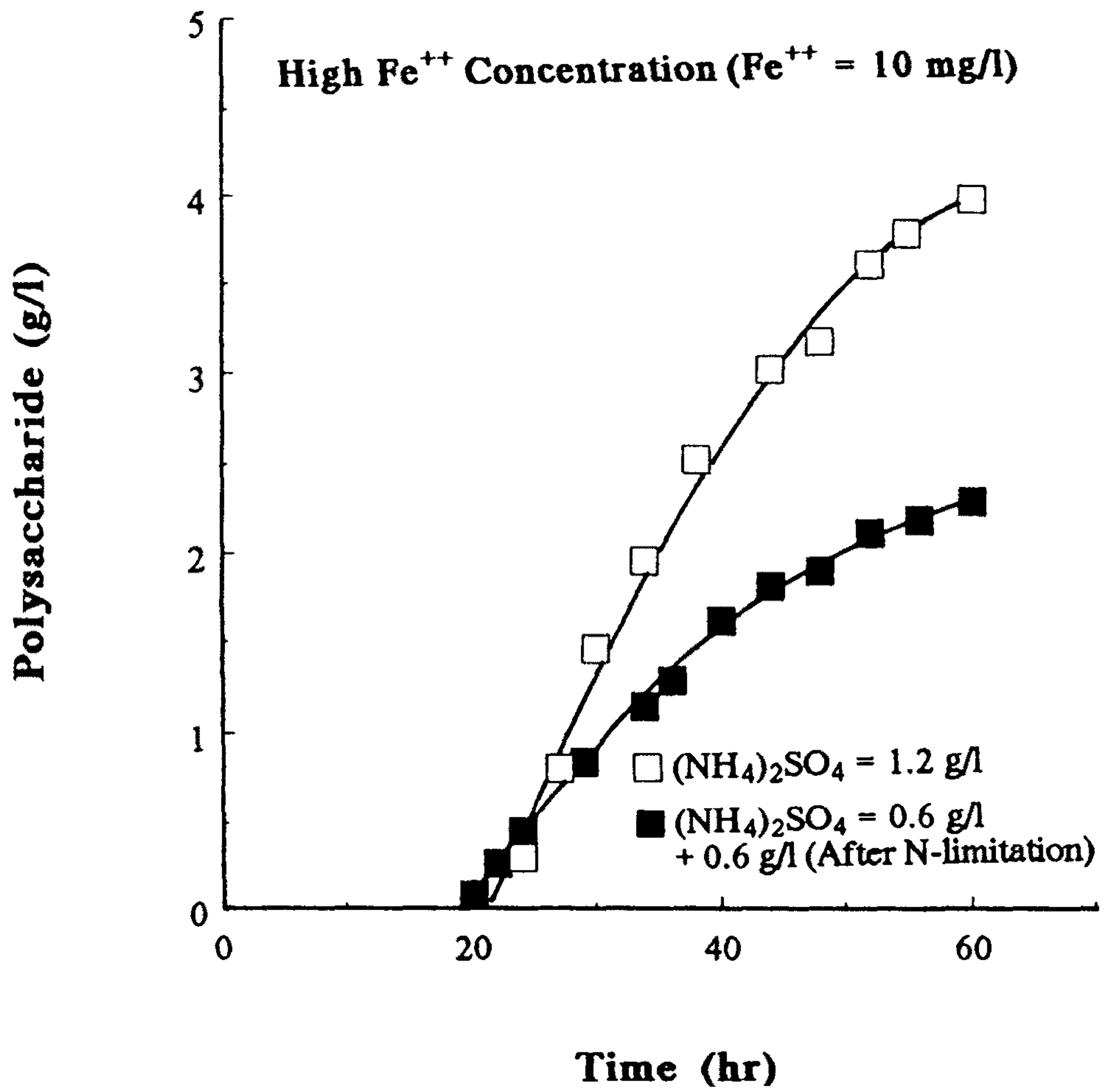


Fig.27. Effect of additional ammonium ion on cell growth and polysaccharide production in medium containing the low concentration of molybdenum and the high concentration of iron



1.2 g/l ammonium sulfate 배양 보다 초기 0.6 g/l ammonium sulfate에서 배양하다 질소원 고갈 후 0.6 g/l ammonium sulfate를 추가하여 배양한 경우 균체증식과 다당류 생산 모두 감소하였다. 고농도의 철은 질소원 고갈 후 질소원을 추가시키면 균체증식과 다당류 생산능력을 회복시켜 주지 못하였다.

2. 균체증식과 다당류 생산에 미치는 질소원 농도의 영향

일반적으로 많은 세균과 약간의 곰팡이에서 높은 비율 C/N은 다당류 생산을 촉진하고 (45, 74) 다당류의 생산은 질소원의 고갈에 의해서 촉진된다 (27, 28, 29, 54). 질소원 농도가 다당류 생산에 미치는 영향을 보기 위해서 ammonium sulfate 농도를 0.6 g/l에서 4.2 g/l로 변화시키면서 유가식 배양을 하였다 (Table 8, Fig. 28). 균체증식은 배지 중의 질소원 농도에 비례하여 증가 하였으나 다당류의 생산농도는 상대적으로 낮은 질소원 농도, 특히 2.4 g/l에서 8 g/l으로 최고값을 보여 주었다. 질소원의 농도 1.8 g/l 이상에서는 저해작용이 비증식속도, 비다당류 생산속도와 비기질속도에서 현저하게 나타났다.

3. 질소원 조절에 의한 농도 증가

Ammonium sulfate의 농도가 1.8 g/l 이하에서는 질소원의 저해가 크지 않으므로 다당류 생산 농도를 증가시키기 위해 질소원을 간헐 추가 또는 exponential 추가로 ammonium sulfate의 농도를 1.8 g/l 이내로 조절하면서 총 첨가된 ammonium sulfate의 량이 3.0 g/l 되게 하여 배양을 하였다 (Fig. 29). 그 결과 추가방법에 관계없이 균체증식은 거의 일정하였으나 다당류의 생산은 초기에 3.0 g/l의 ammonium sulfate 첨가한 경우 보다 ammonium sulfate 량을 1.8 g/l 이내로 유지시킨 경우 12.5 g/l로 약 두배 증가하였다.

총 첨가된 ammonium sulfate의 농도를 4.2 g/l로 하는 발효를 수행한 결과 추가

Table 8. Effect of the initial concentration of ammonium sulfate on fermentation parameters.

Initial $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Concentration(g/l)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	μ^{max} (hr ⁻¹)	Q_p^{max} (g/g-hr)	Q_s^{max} (g/g-hr)	X (g/l)	P (g/l)	S (g/l)
0.6	0.2362	0.1638	0.2395	0.0682	1.0140	3.245	2.270	17.265
1.2	0.2272	0.1767	0.2291	0.0640	1.0084	6.823	4.884	37.203
1.8	0.2167	0.1927	0.2108	0.0645	0.9728	9.846	7.526	53.011
2.4	0.2414	0.2118	0.2000	0.0572	0.8285	11.912	8.020	55.012
3.0	0.2933	0.1497	0.1803	0.0310	0.6147	15.191	6.348	60.141
4.2	0.2998	0.1022	0.1682	0.0199	0.5610	19.074	5.164	65.254

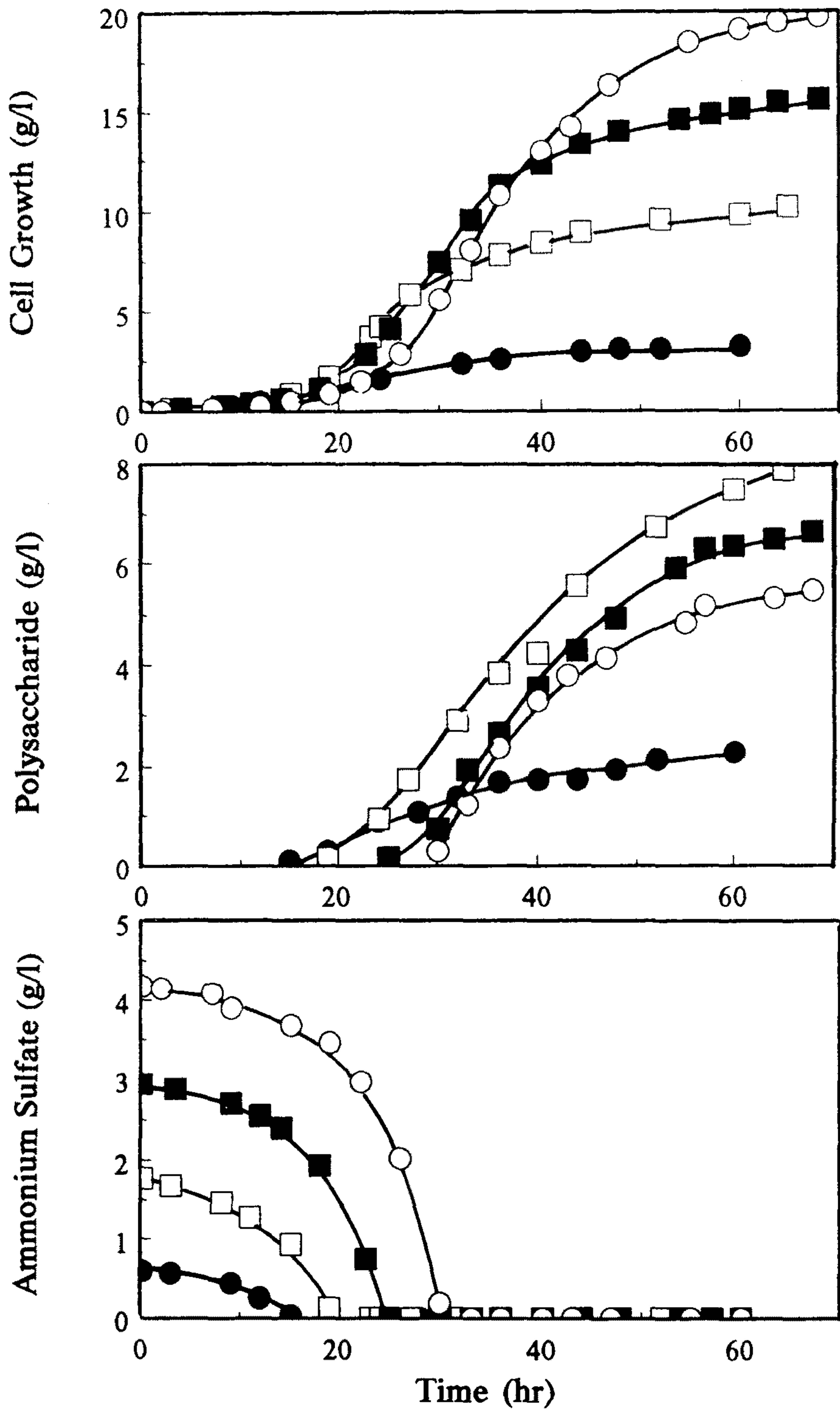


Fig. 28. Effect of the initial concentration of ammonium sulfate on cell growth and polysaccharide production. 0.6 g/l (●), 1.8 g/l (□), 3.0 g/l (■), 4.2 g/l (○).

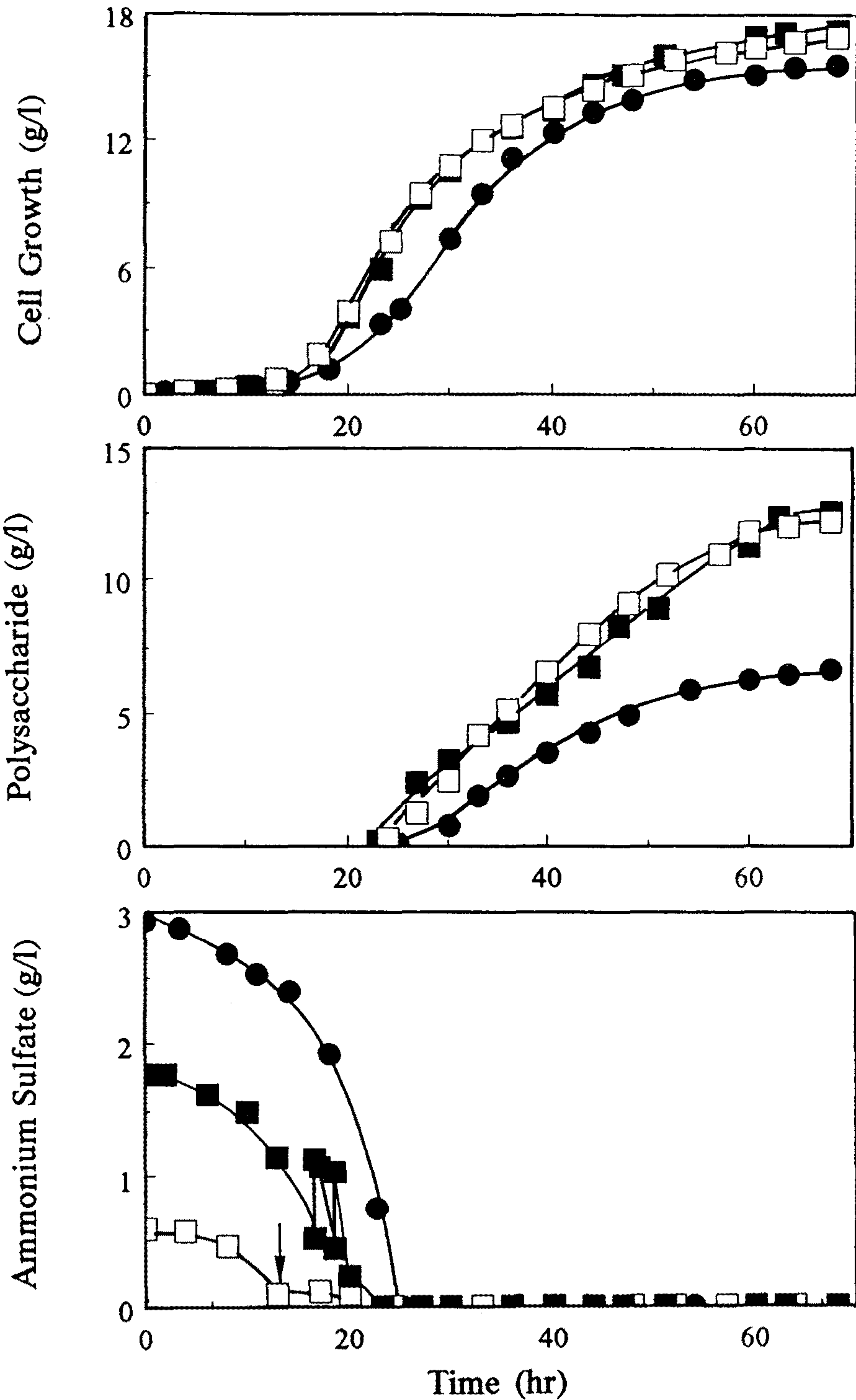


Fig. 29. Effect of the feed of ammonium sulfate on cell growth and polysaccharide production. (the total amount of added ammonium sulfate is 3.0 g/l.) initial feeding (●), intermittent feeding (■), exponential feeding (□).

방법 (초기, 간헐, exponential)에 상관없이 균체중식과 다당류의 생산은 일정하였다 (Fig. 30). 이것은 배양중 ammonia 이온과 함께 첨가된 고농도의 sulfate 이온이 균체의 다당류 생산능력을 저하시켜 일어난 결과로 생각되었다.

배지 중 sulfate 이온을 제거하기 위해서 ammonium sulfate 대신 암모니아수를 질소원과 pH 조절용으로 사용하여 총 첨가량 1.125 g/l의 암모니아 (균체중식으로 볼 때 4.5 g/l의 ammonium sulfate에 해당)를 사용한 배양을 시도 하였다 (Fig. 31). Sulfate 이온의 영향은 제거 되었으나 발효조의 물리적인 한계로 다당류 생성은 45시간 이후에서는 12.7 g/l 이상 증가되지 않았다. 이러한 발효조의 물리적인 한계 (다당류 농도 증가로 인해 점도 증가를 불안정한 혼합을 초래)를 극복하기 위해서는 새로운 생물반응기를 개발하여야 한다.

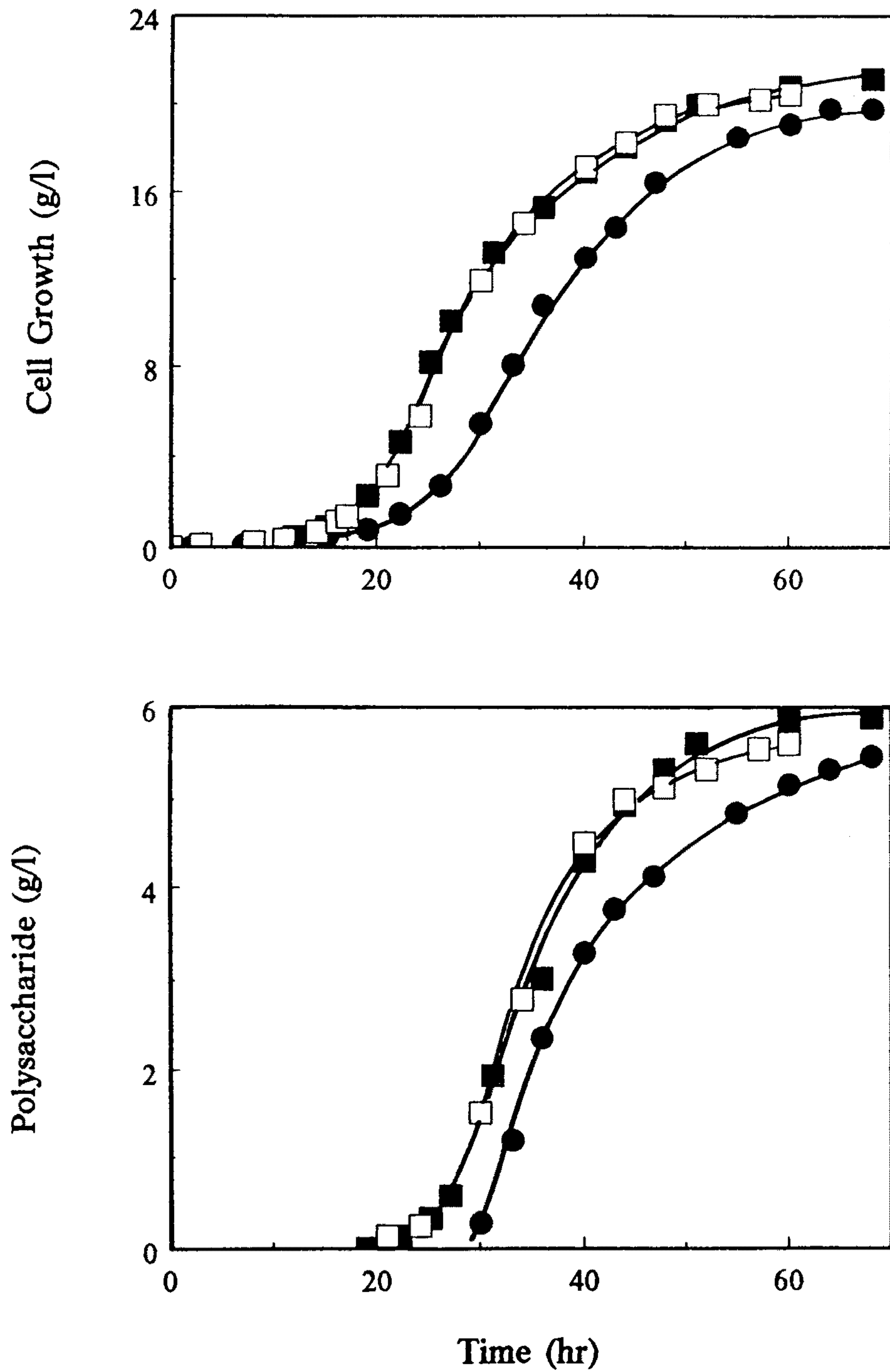


Fig. 30. Effect of the feeding of ammonium sulfate on cell growth and polysaccharide production. (the total amount of added ammonium sulfate is 4.2 g/l.) initial feeding (●), intermittent feeding (■), exponential feeding (□).

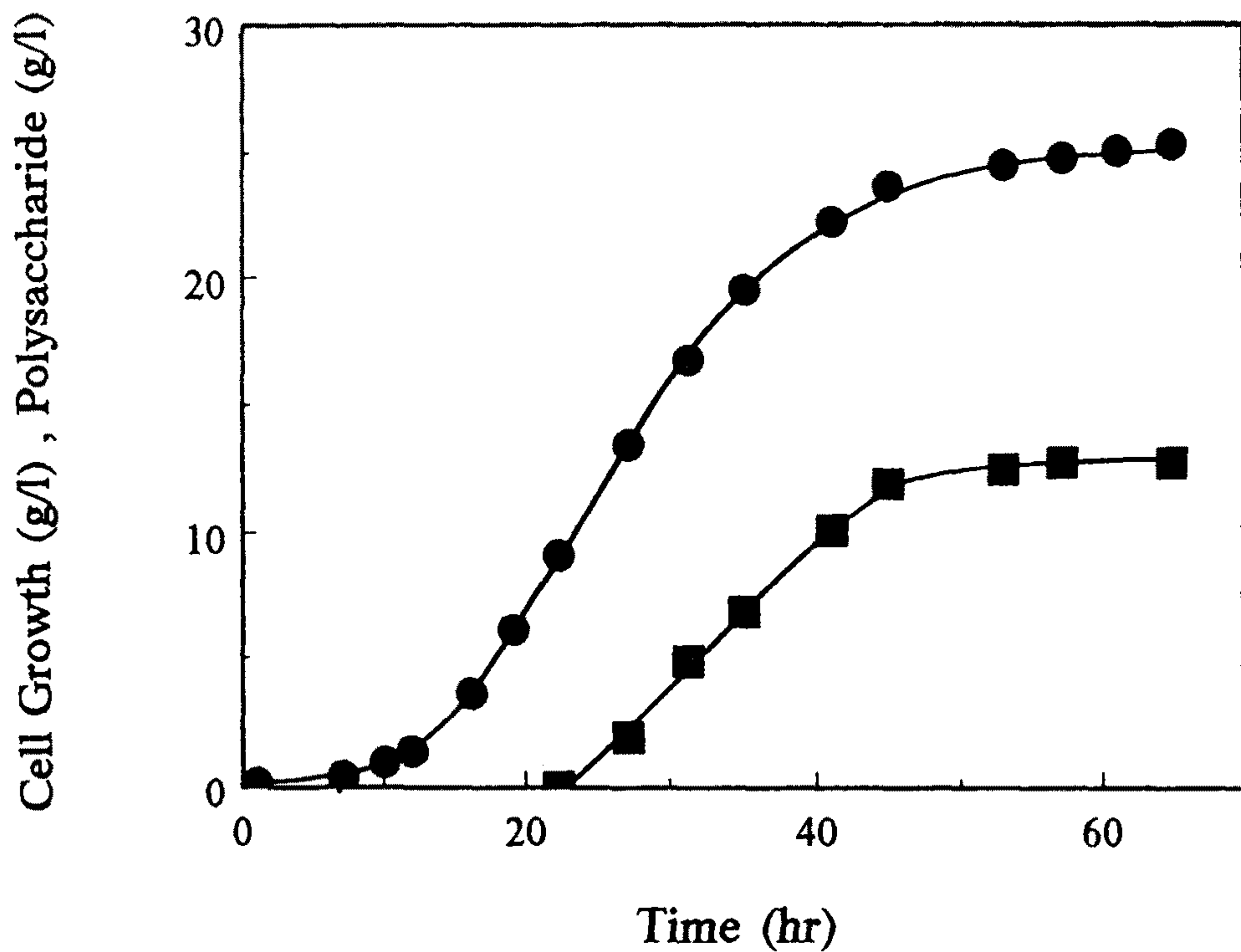


Fig. 31. Effect of the feed of ammonia water on cell growth and polysaccharide production. (the total amount of added ammonia water is 1.125 g/l and this corresponds 4.5 g/l of ammonium sulfate.) cell growth (●), polysaccharide production (■).

제 4 장. 결론 및 제안

이 연구의 주목적은 발효공정의 최적화, 질소 고정의 향상조건, 질소원의 농도 조절을 통한 다당류의 농도 증가에 있다. 중요한 결론은 다음과 같다.

1. 25°C에서 39°C까지 온도를 변화시키며 유가식 배양을 하였다. 비균체 증식 속도는 배양온도 36°에서 0.3 hr⁻¹으로 최대값을 보였으며, 비 다당류 생산속도는 30°C에서 0.064 g/g-hr로 최대값을 보였다. 균체 증식기에서 36°C로 배양하다가 다당류 생성기에서는 30°C로 배양하는 이단계 발효법을 수행한 결과 30°C의 발효보다 다당류의 생산성은 증가 했으나 최종 균체량의 감소로 다당류의 농도는 감소되었다.

2. 균체증식과 다당류 생산은 배양중에 용존 산소가 결핍되면 감소하고, 초기 다당류 생성기에 높은 통기량과 교반속도에서도 감소하므로 다당류의 생산을 증가하기 위해서는 발효 과정중 특정 수준으로 용존산소를 유지하면서 서서히 통기량과 교반속도를 증가시켜야 한다.

3. 용존 산소의 수준, 몰리브덴과 철을 균의 질소고정 능력에 영향을 미치는 인자이므로 이러한 인자가 균체증식 및 다당류 생산에 미치는 영향에 대해 살펴 보았다. 배지중 몰리브덴이나 철이 없으면 균체증식과 다당류 생산이 크게 감소되었다. 배지중 몰리브덴 농도의 증가는 균체증식에는 영향을 주지 않았으나 다당류 생산을 증가 시켰으나 배지 중의 철의 농도의 증가는 다당류 생산능력 보다 균체증식에 영향을 주었다.

4. 질소원이 고갈된 후 질소원을 첨가하면 균체증식과 다당류 생산이 질소원이 고갈되기전 질소원을 첨가하여 배양한 경우에 비해 감소하였으나 고농도의 몰리브덴을 포함한 배지에서는 다당류의 생산이 회복되었다. 다당류의 생산의 질소원의 농도에 의해서 크게 영향을 받는다. Ammonium sulfate 농도가 1.8 g/l 이상에서는 비증식속도, 비기질 소비 속도와 비다당류 생산속도가 현저히 감소했으므로 질소원 농도를 낮은 수준으로 유지시키면 질소원을 추가하는 방법으로 다당류 농도를 12.5 g/l 까지 올릴 수 있었다.

제 5 장. 참고문헌

1. U. Faust, and P. Prave (1983), In "Biotechnology" vol. 3, (H. Dellweg, eds.), pp. 83-103, Verlag Chemie GmbH
2. Y. Tani (1984), Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 12, 63-65
3. N.M. Bikales (Ed.) (1973), In "Water soluble polymers", pp 227-242, Plenum Publishing Corp., New York, N.Y
4. R.A. Moraine, and P. Rogovin (1971), Biotechnol. Bioeng., 13, 381-391
5. N.L. Sohngen (1909), Zentralbl. Bakteriol. Parasitenke. Abt., 15, 513, No. 2
6. C. Anthony (1982), In "The Biochemistry of Methylootrophs" Academic Press
7. C.T. Hou (1984), In "Methylootrophs ; Microbiology, Biochemistry, and Genetics", CRC press. Inc
8. J.W. Foster, and R.H. Davis (1966), J. Bacteriol., 91, 1924-1931
9. Tom E.Patt, et al., (1974), J. Bacteriol., 120, 955-964
10. Y. Chalfan and R.I. Mateles (1972), Appl. Microbiol., 23, 135-140
11. Christoper, L. Haber et al. (1983), Science, 221, 1147-1153
12. J. Colby, H. Dalton, and R. Wittenbury (1979), Annu. Rev. Microbiol., 33, 481
13. J.R. Quayle (1972), Advan. Microbiol. Physiol., 7, 119-203
14. J.R. Quayle (1961), Annu. Rev. Microbiol., 15, 119-152
15. D.W. Ribbons, J.E. Harrison, and A.M. Wadzinski (1970), Annu. Rev. Microbiol., 24, 135-158
16. M.B. Kemp, and J.R. Quayle (1967), Biochem. J., 102, 94-102
17. Y. Tani, N. Kato, and H. Yamada (1978), Adv. Appl. Microbiol., 24, 165
18. Y. Tani, and H. Yamada (1980), Biotech. Bioeng., Suppl., 1, 163
19. N. Kato, Y. Tani, and H. Yamada (1983), Adv. Biotechnol. Process., 1, 171

20. M. Dostalek, and N. Molin (1975), In "Single Cell Proteins" (S.R. Tannenbaum, and D.I.C. Wang, eds., CRC press Inc., pp 119-144
21. T. Oki et al. (1973), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 79-83
22. H. Keune, H. Sahm, and F. Wagner (1976), *Eur. Appl. Microbiol.*, **2**, 175
23. T. Yano, T. Kobayashi, and S. Shimizu (1978), *J. Ferment. Technol.*, **54**, 416
24. T. Urakami, and K. Kogamata (1981), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **27**, 381
25. Y. Natori, and T. Nagasaki (1978), *Agr. Biol. Chem.*, **42**, 1999
26. A. Tanaka, et al. (1974), *J. Ferment. Technol.*, **52**, 921-924
27. M. Andriantsoa, et al. (1984), *Biotechnol. Lett.*, **6**, 783-788
28. K.A. Powell, B.A. Collinson, and K.R. Richardson (1980), *Eur. Pat. Apply.*, **80 300 432.4**
29. T. Suzuki, T. Yamane, and S. Shimizu (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322-329
30. T. Suzuki, T. Yamane, and S. Shimizu (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 366-369
31. T. Suzuki, T. Yamane, and S. Shimizu (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 370-374
32. Imperial Chem. Inds. Ltd. (1979), *British Patent*, 006,079
33. M.N. Huq, B.J. Ralph, and P.A.D. Richard (1978), *Aust. J. Biol. Sci.*, **31**, 311-316
34. C.T. Hou, A.I. Laskin, and R.N. Patel (1979), *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 800-804
35. K.T. Tam, and R.K. Finn (1977), *ACS Symp. Ser.*, **45**, 58-80
36. K. Kanamaru, et al. (1982), *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2419-2424
37. A. Misaki, et al. (1979), *Carbohydr. Res.*, **75**, C8-C10
38. A.M. Egorov, et al. (1976), *Chem. Abstr.*, **85**, 90069m
39. J.G. Savins (1977), *U.S. Patent*. 4,006,058
40. R.K. Finn (1976), *U.S. Patent*. 3,932,218

41. R.K. Finn (1977), U.S. Patent. 4,061,585
42. R.J. Cook, and C. Anthony (1978), *J. Gen. Microbiol.*, **109**, 265-274
43. C. Laane, W. Krone, W. Konings, H. Haaker, and C. Veeger (1980), *Eur. J. Biochem.*, **106**, 39-46
44. Vinod K. Shan and Winston J. Brill (1981), *J. Bacteriol.*, **148**, 884-888
45. C. Davis and W. J. Brill (1972), *Biochem. Biophys. Acta.*, **256**, 498-511
46. F.G. Bergersen, G.L. Turner, A.H. Gilson, and W.F. Dudman (1976), *Biochem. Biophys. Acta.*, **444**, 164-174
47. Anton Hartmann and Robert H. Burris (1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 944-948
48. V.K. Shah, R.A. Ugalde, J. Imperial, and W.J. Brill (1984), *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 231-257
49. M.R. Jacobsen, R. Premakumar, and P.E. Bishop (1986), *J. Bacteriol.*, **166**, 161-167
50. Winston J. Brill, Ann L. Steriner, and Vinod K. Shan (1974), *J. Bacteriol.*, **118**, 986-989
51. C. Kazuhiro, et al. (1983), *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 275-280
52. K. Kanamaru, et al. (1982), *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2411-2417
53. I.W. Sutherland (1979), In "Microbial Polysaccharide and Polysaccharidases", ed., R.C.W., Berkeley, G.W
54. A.C. Demain (1972), *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **22**, 345-362
55. R.A. Moraine and P. Rogovin (1973), *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 225
56. H. Herbst, H.U. Peters, I.S. Suh, A. Schumpe and W.D. Dekwer (1988), *Chem. Eng. Tech.*, **60**, 407
57. H. Funahashi, M. Maehara, H. Taguchi and T. Yoshida (1987), *J. Chem. Eng. Jap.*, **20**, 16
58. A.W. Nienow and T.P. Elson (1988), *Chem. Eng. Res. Des.*, **66**, 5
59. A. Pons, C.G. Dussap and J.B. Gros (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 394
60. H.U. Peters, et al. (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1393
61. H. Lawford, J. Keenan, K. Philips and W. Orts (1989), *Biotechnol. Letts.*, **11**, 11

62. Daniel (1987), M.S. thesis, Univ. Compigne, France
63. M. Dubois, et al. (1956), *Anal. Chem.*, **28**, 350-356
64. M.W. Weatherburn (1967), *Anal. Chem.*, **39**, 971
65. A. Margaritis and G.W. Pace (1985), In "Comprehensive Biotechnology" (M. Moo-Young ed.) **3**, 1022, Pergamon Press, Oxford
66. B. McNeil and B. Kristiansen (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 521
67. C.H. Shu and S.T. Kang (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 454
68. Y. Nedonchelle, and R.A. Schultz (1967), *C.R. Acad. Sci. Ser. C.* **265**, 16
69. B. McNeil and B. Kristiansen (1987) *Biotechnol. Letts.*, **9**, 101
70. T.R. Jarman, (1979), In "Microbial Polysaccharides and Polysaccharidases." (R.C.W. Berkeley, G.W. Gooday and D.C. Ellwood, eds.), pp.35-50, Academic Press London, New York and San Francisco
71. K.S. Kang, and McNeely, W.H. (1977), In "Extracellular Microbial Polysaccharides" (P.A. Sandford and A. Laskin. eds.), American Chemical Society Symposium, American Chemical Society, Wahsington, **45**, 220-230
72. T.E. Patt, G.C. Cole, J. Bland, and R.S. Hanson (1974), *J. Bacteriol.*, **120**, 955-964
73. Y. Aharonowitz, and A.L. Demain (1979), *Can. J. Microbiol.*, **25**, 61-67
74. Y.C. Shin (1988), Ph.D. thesis, KAIST, Korea.