

*Pseudomonas elodea*에 의한 Gellan Gum 생산(I)
- metabolic parameter의 추정 및 배양액의 유변학적 특성 -

*정 봉 우 · 박 선 호 · Dewey D. Y. Ryu
*전북대학교 공과대학 공업화학과
캘리포니아대(데이비스) 공과대학 화학공학과

Production of Gellan Gum by *Pseudomonas elodea* (I)
- Estimation of Metabolic Parameters and Rheological Properties of Culture Broth -

B. W. Chung*, S. H. Park and Dewey D. Y. Ryu
*Dept. of Chemical Technology, Chonbuk National University
Dept. of Chemical Engineering, University of California, Davis

ABSTRACT

A quantitative physiological approach has been employed to estimate the metabolic parameters such as specific uptake rates of nutrients and specific production rate in continuous culture of *Pseudomonas elodea* for gellan gum production. The estimated values of metabolic parameters are used for process improvement.

During the exponential growth phase, the specific growth rate was 0.16hr^{-1} in batch culture. The gellan gum concentration increased up to $0.7\text{ g dry weight}/100\text{ g broth}$ and the apparent viscosity of the culture broth was about $4,500\text{ cp.}(72\text{hrs culture})$. The ratio of specific uptake rate of carbon to that of nitrogen were found to be optimum at about $3.0\text{ mg-carbon}/\text{mg-nitrogen}$. With the improved medium, the maximum gellan production rate, $0.6\text{ g dry weight}/1/\text{hr}$, was obtained at $D=0.14\text{ hr}^{-1}$.

The shear stresses of culture broth were fairly well correlated with shear rates by using Casson equation and at highly viscous culture broth, oxygen transfer coefficient was greatly reduced.

서 론

*Pseudomonas elodea*에 의하여 생성되는 Gellan 형태의 세포외 다당류(exopolysaccharides)는 새로운 음이온 이종다당류(anionic heteropolysaccharide) 중의 하나로, 그 특이한 물성때문에 점증제(thickening agent), 현탁제

(suspending agent), 안정제(stabilizing agent) 및 식품, 의약 공업 등에 그 응용성이 증대되고 있는 수용성 고분자(water soluble biopolymer)이다(1-2).

Fig. 1에서와 같이 Gellan은 4개의 당이 반복되는 직선 상 음이온 다당류로 천연형태(native form)는 반복단위 마다 glucose의 6- 위치가 O-acetylation 되어 있다(3).

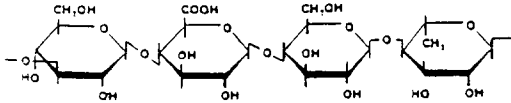


Fig. 1. Repeat unit of gellan gum.

Gellan 수용액은 낮은 농도에서 높은 점성을 나타낼 뿐 아니라 효소에 대한 저항력이 강하고 멸균조작 후에도 변성이 유발되지 않기 때문에 미생물 배양배지와 식물세포 배양시 agar 대용품으로 각광받고 있다(4).

현재 Gellan gum은 회분식 배양에 의하여 생산되고 있으며, 세포성장 및 생성물 형성에 관한 기초적인 정보의 부족으로 최적제어 및 생산성 향상에 장애가 되고 있다. Gellan gum의 구조 및 물리화학적 특성과 그의 응용에 대한 연구는 비교적 활발하나 발효공정에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 연속발효계에서 metabolic parameters를 추정하기 위하여 quantitative physiology를 적용하고 (5-6)이 값들로 부터 공정개선을 시도하였으며 배양액의 유변학적 특성과 산소전달에 미치는 영향도 검토하였다.

재료 및 방법

미생물 및 배지

본 실험에 사용한 미생물은 *Pseudomonas elodea* ATCC 31461이다. 균주의 퇴화와 변이를 줄이기 위하여 medium A에 37°C에서 24시간 계대배양 후 4°C에서 보관하였다. Medium A의 조성(g/l)은 다음과 같다: yeast extract, 3.0, malt extract, 3.0, Bacto-peptone, 5.0, dextrose, 10.0, agar, 20.0, 성장단계(growth stage)에 사용한 medium B의 조성(g/l)은, corn syrup, 37.5, K_2HPO_4 , 1.0, $NaNO_3$, 1.9, $MgSO_4$, 0.1, Promosoy, 0.5, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (mg/l), 5.0, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (mg/l), 0.024이다.

발효배지(production stage) medium C는 탄소원 및 질소원의 농도를 실험목적에 따라 변화시켰으며 그 조성(g/l)은 다음과 같다: corn syrup, 18.8-37.5, K_2HPO_4 , 0.05, $NaNO_3$, 0.5-1.9, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (mg/l), 2.5, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (mg/l), 0.24, 40% KOH용액으로 초기 pH를 6.5가 되도록 조절하였다.

장치 및 방법

생성물 생성단계의 회분식 배양은 Chemap fermenter (LF-7, Switzerland)에서 Medium C를 사용하여 37°C에

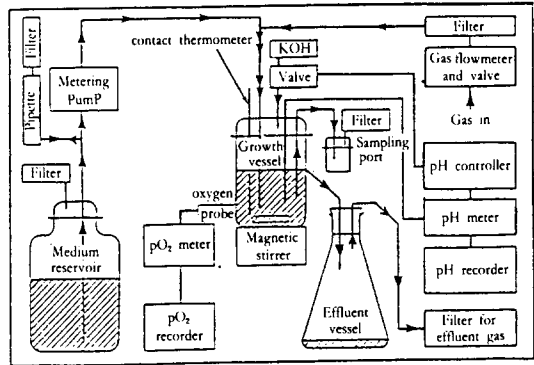


Fig. 2. A schematic diagram of continuous culture system.

서 72시간동안 수행하였다. 배양액의 부피는 5l이었으며 교반기는 6-blade turbine type을 사용하였고 medium B를 이용하여 jar fermenter(NBW, Bioflo, C)에서 24시간 배양한 배양액을 10%(V/V)집중하여 발효시켰다.

통기속도는 1.0vvm, 교반속도는 600-1200rpm으로 조절하여 용존산소 농도가 20%가 유지되도록 하였으며 소포제(Sag 5639)를 이용하여 거품 발생을 제어하였다. 배기가스는 7°C의 순환수를 이용하여 응축시켰다.

연속배양의 경우에는 회분식 배양이 정상기(stationary phase)에 도달했을 때 medium C를 첨가함으로써 개시하였으며 연동펌프의 유량을 조절하여 희석율을 변화시켰다. 정상상태(steady state)는 일정한 조건하에서 5회 이상의 배양액 치환이 일어난 후에 세포농도, 포도당 농도 및 생성물농도가 일정한 값을 나타낼 때로 정하였다.

분석방법

생성물의 건조중량은 초산으로 pH를 4.5로 조절한 시료용액 100g에 1ml의 Diazyme 1-200용액을 가하고 55-60°C에서 60분간 교반시킨 후 0.5ml의 45% KOH 용액을 첨가한 후 15분간 멸균한 다음 시료 두배량의 이소프로필알코올을 85°C 이상에서 가하여 침전시킨 후, 침유상의 물질을 60°C 진공건조기에서 일정한 무게가 될 때까지 건조하여 얻었다(7). 세포농도는 Laminometer (Turner, Model 20e)를 이용하여 ATP량을 측정하는 방법과 Viable cell count 방법을 사용하였다(8). 시료의 분산을 위하여 Sonicater를 사용하였으며 총 환원당의 농도는 Glucose Analyzer(Yellow springs Instrument, Model 23A)와 HPLC를 사용하여 측정하였다. 배양액의 점도는

Viscometer(Brookfield, Model LVT, Spindle#4)를 사용하여 25℃, 60rpm에서 측정하였다. 점도에 따른 산소전달계수를 측정하기 위하여 동력학적 방법(dynamic method)(9)을 이용하였다. 통기 중단 후 용존산소 곡선으로부터 산소 흡수속도를 계산하였으며 재통기 후 산소전달과 산소흡수가 동시에 일어날 때 물질수지식으로 부터 산소전달계수를 계산하였다.

결과 및 고찰

회분식 배양

생산수율(production yield) 및 생산성(productivity)을 평가하기 위하여 72시간동안 회분식 배양한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 세포의 농도는 35시간 후에 4.2×10^8 cells/ml까지 증가하였고 점점 감소되어 60시간이 지난 후에는 2.5×10^8 cells/ml이 되었다.

대수증식기(exponential growth phase)에서 비증식속도(specific growth rate)는 $0.16hr^{-1}$ 이었으며 81.3%의 corn syrup이 소모되었다. 배양액의 겔보기점도는 4,500cp였으며, 생성물의 농도는 0.69 g dry weight / 100 g broth이었다. 생산수율 및 생산성등 회분식 배양의 결과를 연속식의 경우와 비교하여 Table. 1에 나타냈다. 72시간동안 회분식 배양의 경우는 0.24 g dry weight / g corn syrup의 생산수율과 0.08 g dry weight / l / hr의 생산성을 나타낸 반면, 탄소원과 질소원의 농도 비를 최적화한 배지를 사용하여 연속식 배양을 함으로써 회식율 $0.14hr^{-1}$ 일때 생산수율 2.5배, 생산성 7.5배의 증가를 꾀할 수 있었다. 생성물의 농도(dry weight yield)와 점도관계

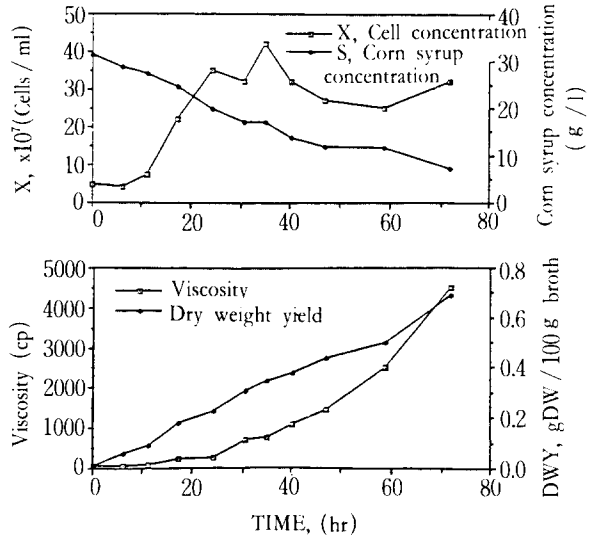


Fig. 3. Time courses of batch culture.

를 Fig. 4에 나타냈으며 매우 좋은 상관관계를 보였다. 이는 생성물 농도에 따라 겔보기 점도가 대수적으로 증가함을 나타낸다.

연속식 배양

질소원 농도를 변화시켜 Gellan 생성이 최대가 되는 탄소원과 질소원농도의 비 값은 3.0mg-carbon / mg-nitrogen 임을 알 수 있었다(Table. 2). 이러한 조성의

Table 1. Comparison of batch and continuous culture

	Batch (final)	Continuous(steady state) D(hr ⁻¹)			
		0.06	0.10	0.14	0.18
Medium C (g / l)	CS 37.5 NaNO ₃ 1.9	CS 26.3 NaNO ₃ 0.5			
Cell concentration (cells / ml)	3.5×10^8	4.7×10^9	3.6×10^9	2.1×10^9	1.5×10^{10}
Dry weight yield (%)	0.70	0.70	0.60	0.43	0.26
Viscosity (cp)	4500	4200	3200	1800	800
Productivity (g DW / l / hr)	0.08	0.41	0.58	0.60	0.31
Production yield (g DW / g CS)	0.24	0.68	0.82	0.59	0.36

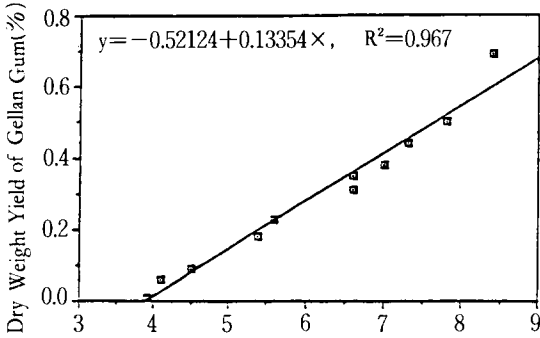


Fig. 4. Polysaccharide concentration and broth viscosity.

배지를 이용하여 희석율을 0.06에서 0.18 hr⁻¹까지 변화시켜 연속배양을 실시한 결과를 Fig. 5, 6 및 7에 나타냈다. 일정한 희석율 상태에서 평균체류시간의 5배 시간 이후에 정상상태에 도달하였으며 이는 세포농도, 점도 및 생성물 농도가 일정한 값을 나타냄으로써 확인하였다. Gellan gum의 최대 생성속도는 희석율 0.14hr⁻¹일 때 0.602 g dry weight / l / hr이었다.

Fig. 5에 희석율 변화에 따른 정상상태에서의 세포농도와 생성물 농도를 나타냈으며 희석율을 0.18hr⁻¹로 증가시켰을 때 세포농도가 급격히 증가됨을 나타내고 있다. 이러한 현상은 높은 희석율에 따른 질소원 농도의 증가로 세포성장 조건에 유리하게 작용했을 것으로 추정되며 또 다른 이유는 희석율 증가에 반비례하여 배양액의 점도가 낮아지기 때문에(1000 cp이하) 혼합효과가 증대되어 물질전달(산소 및 영양소)이 용이해지기 때문으로 추측된다. 생성물 농도는 희석율 증가에 따라

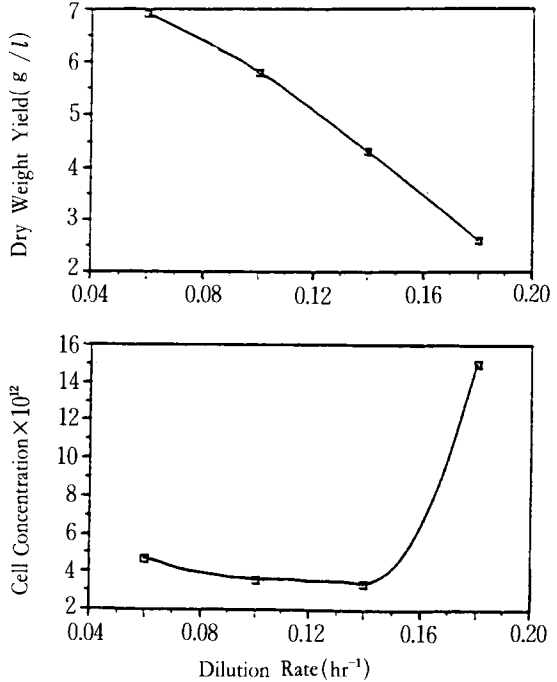


Fig. 5. The effect of dilution rate on cell concentration and product concentration.

감소되며, 이는 생성물 생산보다 세포 성장 조건에 유리한 방향으로 변화되기 때문인 것으로 판단된다.

Fig. 6은 희석율에 따른 Gellan gum의 생산성과 corn syrup의 소비 속도를 계산한 결과이다. Gellan gum의 생성속도는 극대값을 나타내는 반면 corn syrup의 소비속도는 0.575 g / l / hr까지 증가하였다. Fig. 7에는 생성물의 비생산속도(specific production rate of polysaccha-

Table 2. Effect of sodium nitrate concentration on continuous culture (D=0.03hr⁻¹, V=6.5.l, 1 vvm, 550 rpm)

FEED		STEADY STATE VALUES			
Corn Syrup Concentration (%)	Nitrate Concentration (mgNO ₃ -N / l)	Dry weight yield (%)	Uptake rate of carbon (mg-C / l / hr)	Uptake rate of nitrogen (mg-N / l / hr)	Q(C) Q(N)
2.5	66.8	0.19	23.6	1.19	19.8
3.2	111.4	0.54	6.6	2.29	2.9
2.5	176.5	0.42	29.4	3.96	7.4
2.5	267.5	0.31	31.2	2.79	11.2

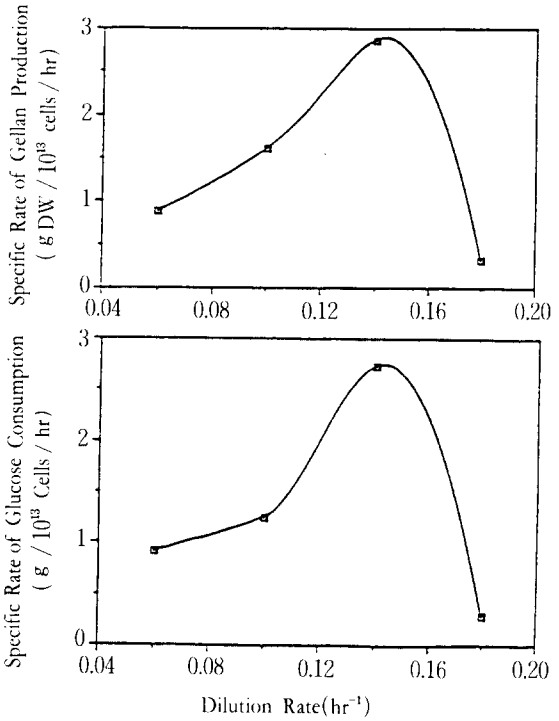
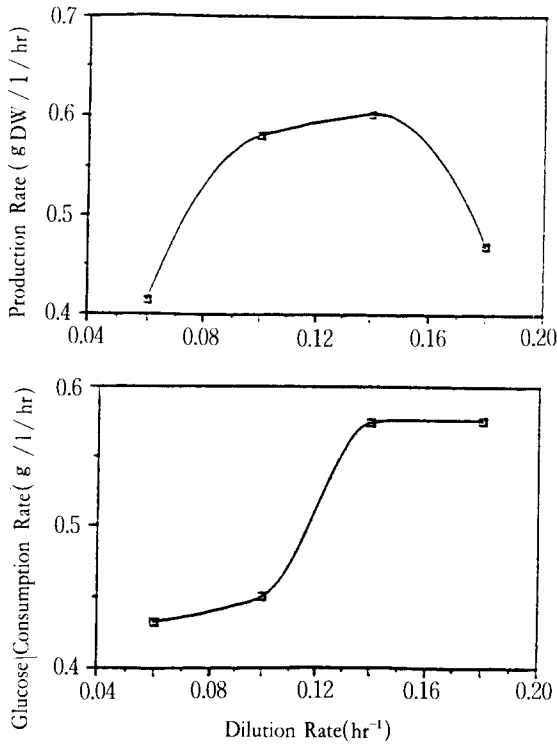


Fig. 6. The effect of dilution rate on glucose consumption rate and production rate.

Fig. 7. The effect of dilution rate on specific rates of glucose consumption and gellan production.

ride) 와 포도당의 비흡수속도(specific uptake rate of glucose)를 회석율에 대해 도시한 것이다. 회석율 0.1 4hr⁻¹에서 비생산속도는 2.9 g dry weight / 10¹³cells / hr 로 최대값을 나타냈으며, 포도당의 비흡수속도 역시 182.2mg-C / 10¹³ cells / hr로 최대값을 보여주고 있다.

배양액의 유변학적 특성

배양액의 겔보기 점도를 전단속도를 변화시켜 측정된 결과를 Fig. 8에 나타냈다. 이러한 결과는 Casson equ-

ation¹⁰⁾에 잘 부합되었으며 각 시료에 대한 항복응력 (yield stress) 값은 112.4(A), 88.4(B), 및 79.2(C) dyn / cm²이었다.

또한 점도에 따른 산소전달계수(k_L·a) 값을 dynamic method에 의해 측정된 결과를 Table. 3에 나타냈다. 2, 500 cp까지는 비교적 산소전달계수 값의 변화가 심하지 않았으나 3700 cp의 배양액에서는 그 값이 현저히 감소 되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 고점도 배양액에서 산소전달의 문제가 중요한 제한요인이 된다는

Table 3. Effect of viscosity on K_L·a(@ 1.2 vvm, 1200 rpm)

Viscosity (cp)	D.O. (ppm)	Cell concentration (cells / ml)	Oxygen uptake rate (mmol O ₂ / l / hr)	k _L ·a (hr ⁻¹)
1500	1.3	2.1×10 ⁹	28.44	173
2500	0.6	1.7×10 ⁹	11.04	154
3700	0.6	5.3×10 ⁹	11.46	105

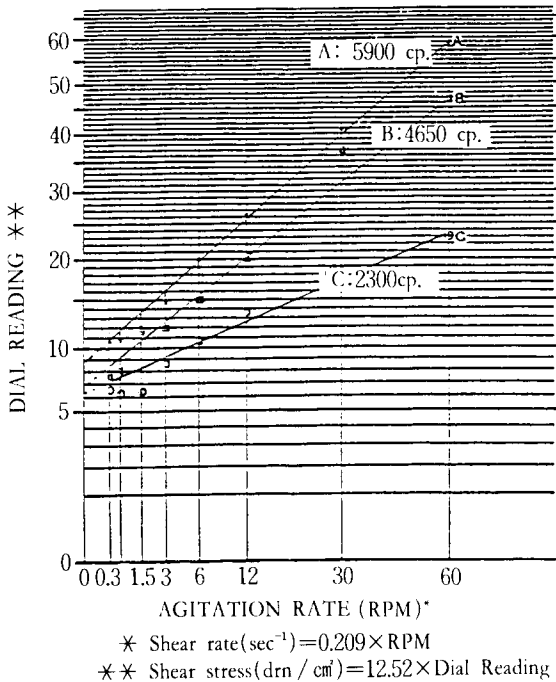


Fig. 8. Rheological behavior of culture broth.

사실을 나타낸다.

요 약

*Pseudomonas elodea*에 의한 Gellan gum 생산시 이에 관련된 기초자료를 얻기 위하여 회분식 및 연속식 발효를 하였다. 회분식 배양의 결과로 부터 비성장속도는 0.16hr^{-1} 이었으며 72시간 배양 후의 점도는 4500 cp, 생성물 농도 $0.7 \text{g dry weight/100 g broth}$, 및 생산성은 $0.08 \text{g dry weight/l/hr}$ 이었다.

연속식 배양을 통하여 최적 탄소원과 질소원의 농도비(3.0mg-carbon / mg-nitrogen)를 결정하였으며 Gellan gum의 최대 생성속도는 희석율 0.14hr^{-1} 에서 $0.6 \text{g dry weight/l/hr}$ 이었다. 이러한 조건에서 각종 metabolic parameter 값을 계산하였다. 또한 배양액의 유변학적 특성은 Casson equation에 잘 부합됨을 확인하였고, 배양액의 점도와 산소전달계수를 측정하여 고점도 배양시 산소전달의 장애현상을 조사하였다.

감 사

본 연구는 88년도 분교부 해외과건 연구로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. K. S. Kang and G. T. Veeder, Polysaccharide S-60 and bacterial fermentation process for its fermentation, US. patent 4,326,053(1982).
2. K. S. Kang and G. T. Veeder, Fermentation process for preparation of polysaccharide S-60, U. S. patent 4,377,636(1983).
3. P. Jansson, B. Lindberg, and P. A. Sandford, *Carb. Res.* **124**, 135(1983).
4. J. E. Harris, *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1107(1985).
5. D. Y. Ryu and Hospodka, *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 289(1980).
6. D. Y. Ryu, R. Andreotti, M. Mandels, B. Gello, and E. T. Reese, *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1887(1979).
7. K. S. Kang, G. T. Veeder et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1086(1982).
8. A. D. Marlene, D. M. William, *Bioluminescence and Chemiluminescence*, Academic Press, New York, 1981.
9. D. I. C. Wang et al., *Fermentation and Enzyme Technology*. John Wiley & Sons: New York, 1979, Chapter 9.
10. A. Margaritis and J. E. Zajic., *Biotechnol., Bioeng.* **20**, 939(1978).

(Received; September 10, 1990, Accepted; October 26, 1990)