

*Pseudomonas putida*의 고농도 배양을 위한 발효 기초 연구

김희정, 김인호

충남대학교 공과대학 화학공학과

전화 (042) 821-7675, Fax (042) 822-8995

Abstract

High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* is often necessary for the VOC removal bioreactor. Supplying the feeding solution of C and N sources could accelerate the growth of cells. We changed the component of feeding solution and feeding time, showing that *P. putida* could be grown to a high density.

서론

*Pseudomonas putida*는 휘발성 유기 화합물의 제거를 위한 바이오 필터에 주로 쓰이는 미생물이다. 미생물을 산업적으로 이용하기 위해서 발효조를 이용한 배양을 통해 많은 양의 세포를 얻어야 하는 경우가 자주 있다. 이를 위해서는 회분식 배양보다는 유가식 배양이 더 효율적이다. 유가식 배양은 단속적으로 세포 성장에 필요한 기질을 공급함으로써 기질 저해 또는 이화생성물 억제를 극복하는 고농도 배양 전략이라 할 수 있다. *Pseudomonas*의 배양에 있어서, 알칸류, 카르복시산, 지방족 화합물과 같은 유기 화합물을 탄소원으로 사용할 수 있다. 그러나, 값이 싼 포도당을 기질로 이용하여 배양을 하게 된다면 더욱 경제적이다. 포도당을 이용한 발효는 에탄올과 이산화탄소 이외에 젖산, 초산, 주석산 등 여러 종류의 산과 알코올류, 아세톤과 같은 유기 용매류 등 여러 가지 포도당의 발효산물을 얻을 수 있다. 미생물의 대사산물은 미생물의 성장에 있어 저해작용을 하므로, 대사산물에 대한 이해는 매우 중요하다. 본 연구에서 발효조를 이용하여 *Pseudomonas putida*를 배양하면서, 기질의 농도와 발효산물 분석을 통해 보다 나은 배양 조건을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

실험에 이용된 미생물은 *Pseudomonas putida* (ATCC 12633)이고 4℃, 고체 한천 배지에서 보관하였다. 미생물 배양에 사용된 액체 배지 조성은 증류수 1ℓ 당 glucose 5 g, yeast extract 1 g, NH₄Cl 0.1 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, FeSO₄·7H₂O 0.0005 g, CaCl₂ 0.00375 g, 0.1M phosphate buffer(pH=7) 18 ml이었다.

종배양은 진탕 배양기에 30 ℃, 150 rpm으로 교반하여 12시간 동안 종균 배양하였다. 이 종균 배양 10 %을 발효조에서 접종하고, 공급용액과 pH 조절액을 이용하여

실험 조건을 조정하면서 발효 실험을 수행하였다. 유가식 배양을 위한 공급 용액은 증류수에 포도당 또는 포도당과 yeast extract를 첨가하여 사용하였고, pH는 28 %의 암모니아수 용액을 이용하여 7로 조절하였다.

균체 농도는 분광광도계(CE1020, CECIL)를 사용하여 600 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 시료는 원심분리 후 상등액만을 취하여 Glucose Trinder(Sigma, U.S.A.)를 이용하여 발색시킨 후 505 nm에서의 흡광도 값으로 포도당의 농도를 결정하였다. 대사 산물로 나오는 여러 가지 유기산의 농도는 컬럼(Rezex column, Phenomenex, U.S.A.)을 이용한 HPLC로 분석하였다. 이동상은 0.05% 황산용액(Special grade, Junsei Chemical Co., Ltd., Japan), 유속은 0.5 ml/min로 하였다.

결과 및 고찰

공급 용액으로 포도당만을 사용하였을 때 세포 농도의 변화와 포도당 농도 변화는 Fig. 1과 같이 나타난다. 공급 용액으로 포도당 1 g/l 당 yeast extract 0.5 g/l의 농도로 하여 주입한 결과는 Fig. 2와 같다. 이 때, 비성장속도는 0.95 h^{-1} 로 Fig. 1의 포도당만을 주입하였을 때의 비성장속도인 0.44 h^{-1} 보다 2배 정도의 증가를 보였다. 또한, 12시간 이후부터는 포도당의 농도가 더 이상 감소하지 않는 Fig. 1의 결과와는 달리, 12시간 이후에도 꾸준한 포도당의 감소를 보여 미생물이 계속 기질을 소비하며 자라고 있는 것을 알 수 있다.

본 연구 결과를 통해 공급 용액으로 포도당만을 쓰게 되면, 탄소원 이외 다른 기질들이 부족하여 12시간 이상 자라지 않는 것을 알 수 있다. 공급 용액의 성분과 공급시간 등을 조절하여 보다 많은 양의 균체를 얻을 수 있기 위해 유기산 분석 등 여러 실험 자료를 제시할 예정이다.

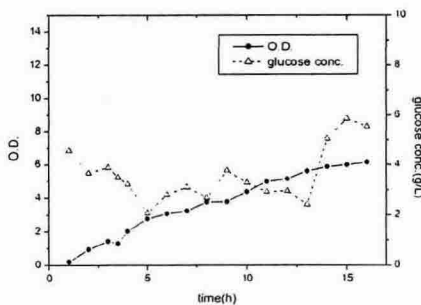


Fig. 1. Bacterial(●) and glucose (△) profiles in fed-batch by using feeding solution as only glucose.

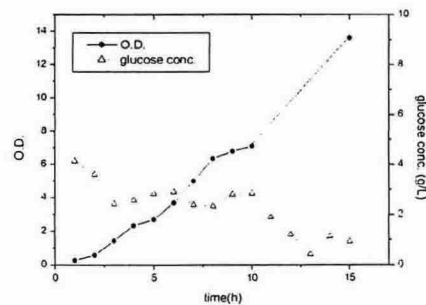


Fig. 2. Bacterial(●) and glucose (△) profiles in fed-batch by using feeding solution as glucose and yeast extract.