

## Effect of fermentation conditions on biopolymer production with *Agrobacterium sp.*

문찬준, 이미희, 이중헌, 권규혁  
조선대학교 공과대학, 화학·고분자공학부  
전화 (062) 230-7259, Fax (062) 230-7226

### 서 론

Biopolymer는 주로 식물, 동물 및 미생물에 의해 생합성되며 구성성분 및 구조에 따라 각기 다른 특성을 보유하며 독특한 biopolymer의 특성을 산업용 및 식품용 등으로 이용하게 된다. 산업적으로 유용한 biopolymer를 대량생산하기 위해서는 우수한 생산 균주의 선택 및 최적화된 배양방법을 개발하는 것이 중요하며 최근 미생물을 이용한 다당류 생산이 가장 활발히 연구되고 있다. 미생물에 의해 생산되는 biopolymer는 생산 균주의 특성 및 균주의 배양방법에 따라서 분자량, 구성당의 순서, 결합양식, 결합위치 및 가지 유무 등이 다른 광범위한 다당이 생성되고 이들은 겔 형성능, 유화안정성, 표면장력 조절능, 물 흡수능, 접착능, 운환능 및 필름 형성능이 각기 다른 특성을 갖는 biopolymer가 생산된다.<sup>1)</sup>

본 연구에서는 *Agrobacterium sp.* 미생물을 이용하여 여러 배양조건(반응기, 탄소원의 농도 변화, 조절 pH)의 변화에 따른 세포 성장 특성, biopolymer의 생산 및 생성물들의 특성을 비교 분석하여 생산에 필요한 최적환경을 조사하고자 한다.

### 재료 및 방법

**균주 및 보존 :** 본 연구에 사용한 균주는 *Agrobacterium sp.*의 일종으로 nutrient agar 배지에서 30°C로 2일간 배양 후, 4°C에서 보관하였고 2주마다 계대배양을 하면서 생체활성을 유지하였다.

**배지조성 :** 본 연구에 사용된 종배양 배지 조성은 sucrose 20-60g/L, yeast extract 5g/L, pepton 5g/L(pH 7.0)으로 조성하였으며 본 배양 배지 조성은 sucrose 30g/L, 50g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g/L, NH<sub>4</sub>Cl 4g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g/L, 그리고 10ml의 미량원소 용액(0.1N HCl 1리터에 5g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2g MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 1g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g ZnCl<sub>2</sub>를 녹여 만듦)이고 초기 pH는 7.0으로 하였다. 배지는 121°C에서 15분간 멸균 후에 사용하였으며 pH 조절은 2N HCl, 2N NaOH로 조절하였다.

**배양방법 :** 본 연구에서는 본 발효의 5%에 해당하는 flask medium 100ml를 만들어 shaking incubator에서 17시간 동안 전배양한 후에 1.9L의 본 배지에 접종하였다. 본 배지의 초기 pH는 7.0이고, 배양온도는 30°C로 하였으며, 교반속도는 초기에는 300rpm에서 시작하였으며 용존 산소결핍을 막기 위하여 700 rpm까지 증가 시켰으며 통기량은 2vvm으로 조절하여 배양하였다.

**분석방법** : 균체량은 centrifuge를 이용하여 6000 rpm에서 15분동안 원심분리하여 침전된 균체를 80°C dry oven에서 24시간 건조시켜 건조중량을 측정하였고, 최종 생산물인 biopolymer는 에탄올에 침전시켜 회수하여 80°C dry oven 24시간 건조시켜 건조중량을 측정하였으며, ammonium 이온분석은 indophenol 방법<sup>2)</sup>으로 분석하였으며 Sucrose 농도는 1N HCl을 이용하여 100°C에서 15분간 가수분해시킨 후 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법<sup>3)</sup>을 이용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

**반응기에 따른 biopolymer 생산특성변화** : 반응기에 따른 biopolymer 생산특성 비교 실험에서는 bubble column reactor와 stirred tank reactor를 이용하여 산소 전달 효율과 agitation에 의한 stress의 영향이 생산물에 미치는 영향을 조사하였다. 실험결과 반응기 내의 물질전달 속도가 큰 stirred tank reactor에서 생산물의 생성속도가 빠른 것으로 관측되었으며 생성된 biopolymer의 점도도 큰 것으로 관측되었다.

**초기 탄소원의 농도에 biopolymer의 생산특성변화** : 탄소원의 변화에 따른 biopolymer의 생산 특성을 조사하기 위해 초기 sucrose의 농도를 변화시켜 biopolymer의 생산 특성을 조사하였다. 초기 sucrose의 농도가 30g/L 였을 때 발효시작 후 24시간 내에 sucrose가 세포성장 과정에서 모두 소모되었으며 생성된 발효액의 점도가 크지 않았으나 초기 sucrose 농도를 50g/L 이상으로 증가시킨 경우에는 biopolymer의 농도는 증가하지 않으나 점도가 크게 증가하여 분리에 어려움이 있었다.

**pH 변화에 따른 biopolymer의 생산 및 생산된 biopolymer의 특성변화** : 발효기의 pH를 6.0, 7.0, 8.0으로 제어하면서 biopolymer의 생산특성을 조사하였다. pH 6에서는 생성된 biopolymer의 점도는 낮았으며 pH 7에서는 세포의 성장속도가 빠르나 biopolymer의 생성과 함께 점도가 pH 6에서보다 빠르게 증가하였다. pH 8에서 생성된 biopolymer는 회색을 띠는 것을 관찰 할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Lee, I. Y., S. W. Kim, J. H. Lee, M. K. Kim, I. S. Cho, Y. H. Park (1999), A High Viscosity of Curdlan at Alkaline pH Increases Segregational Resistance of Concrete. *Koeran J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 114-118.
2. Srienc, F., Arnold, B., Bailey, J.E. (1984) Characterization of intracellular accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 982-987
3. Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.