

*Xanthomonas campestris*에 의한 Xanthan gum 생산에 관한 연구

김재형 · \*유영제 · 이기영 · 윤종선  
전남대학교 공과대학 공업화학과  
생물화학공학연구소  
\*서울대학교 공과대학 공업화학과

A Study on the Production of Xanthan Gum  
by *Xanthomonas campestris*

J.H. Kim, Y.J. Yoo, K.Y. Lee and J.S. Yun  
Biochemical Engineering Lab., Dept. of Chemical  
Technology, Chonnam National University.  
\*Dept. of Chemical Engineering, Seoul  
National University

ABSTRACT

In the Xanthan gum fermentation by *Xanthomonas campestris*, there are problems of the large energy consumption by long fermentation time, the mass transfer of oxygen and nutrients by high viscous fermentation broth.

In this study, the media optimization and the fed batch fermentation were carried out to decrease fermentation time and increase Xanthan gum yield. The  $O_2$  uptake rate (OUR) and  $CO_2$  evolution rate (CER) which were obtained from the analysis of fermentation exit gas using a gas chromatograph were investigated.

As a result, the fermentation time decreased at optimal assimilable nitrogen concentration but increased at poor or rich assimilable nitrogen concentration, the Xanthan gum biosynthesis was stimulated under the limited condition of assimilable nitrogen source and the optimum fermentation medium was obtained as follow; Glucose = 30 g / l, Peptone = 8.0 g / l,  $K_2HPO_4$  = 2.0 g / l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  = 10 g / l, Sodium acetate = 20 g / l, Sodium pyruvate = 0.5 g / l.

As the agitation speed and nitrogen concentration increased, the  $O_2$  uptake rate and  $CO_2$  evolution rate increased. The OUR and CER were 37.3 mmol  $O_2$  / l hr and 20.2 mmol  $CO_2$  / l hr at peptone 11 g / l and agitation speed 990RPM, respectively.

In fed batch fermentation, the final concentration of Xanthan gum was enhanced up to 29 g / l.

서론

미생물에 의해 생산되는 Pullulan, Dextran, Sreoglucan 및 Xanthan gum 등과 같은 세포외 다당류(Exopolysaccharides)는 다양한 구조와 독특한 물리적 성질때문에 접착제(Binder), 윤활제(Lubricant), 응집제(Coagulant), 유화제(Emulsifier), 필름형성제(Film former), 안정제(Stabilizer), 현탁제(Suspending agent), 조밀제(Thickening agent), 교화제(Gelling agent) 및 식품, 의약, 제약, 화학공업등에 폭 넓게 응용되고 있는 수용성 생분

고분자(Water-soluble biopolymer)이다(1)

본 연구에서는 세포외 다당류로서 다양한 응용성때문에 상업적으로 그 중요성이 커지고 있는 Xanthan gum을 연구의 대상으로 하였다.

식물병원성 박테리아인 *Xanthomonas*속에 의해 생산되는 가지달린 음이온 이성다당류 (Branched anionic heteropolysaccharides)를 Xanthan gum이라 한다.

Fig. 1에 나타낸 것처럼 Xanthan gum은 외부 mannose의 4-, 6- 위치에 Pyruvic acid와 Acetal residue가 치환되어있고 내부 mannose의 6- 위치가 O-acetylation되어 있는 D-mannose, D-glucose, D-glucuronic acid로 구성된

5개당으로 기본단위를 가지며 (2,3), Xanthan gum의 X-ray 회절연구결과 단알나선구조 또는 이중나선구조로 존재한다고 보고된 바있다(1). Xanthan gum의 분자량은  $2 \sim 5 \times 10^6$  정도이며 5당기본단위의 분자량은 906.2 g / mol 이다(4).

Xanthan gum 수용액은 낮은 농도에서도 높은 점성을 보일 뿐 아니라 온도, pH, 염농도의 넓은 범위에서도 점성이 변하지 않고 장시간 동안 일정하게 유지되는 독특한 유변학적인 특성 때문에 (5,6) 증점제(Viscosifier), 식품첨가물, 의약, 제약공업등에 사용되고 있으며, 특히 원유회수향상제(Enhanced oil recovery: E.O.R)로서 Xanthan gum의 유용성은 입증된 바 있다. 1980년 전세계 Xanthan gum 생산량은 약 8,000톤이며 미국 내에서 3차원유회수방법(Tertiary oil recovery method)에 의해 43,000,000배럴을 회수하는 것으로 추정되며, 이때 1배럴의 원유를 회수하는데 약 0.5kg의 Xanthan gum과 같은 고점성고분자가 요구된다고 한다. 따라서 이방법에 의해 1일 100,000배럴의 원유를 회수하는데에는 50,000kg의 Xanthan gum이 소요되는데 이양은 전세계 1일 생산량의 2.1배에 해당된다(1).

Xanthan gum은 탄소원과 동화가능한 질소원이 제한될 때 합성되며 비교적 최근에 G.W. Pace등(7)에 의해 Xanthan gum 생합성경로가 제안되었는데 Entner-Doudoroff Pathway와 Tricarboxylic cycle은 *Xanthomonas campestris*에 의한 포도당으로부터 CO<sub>2</sub>가 발생되는 주요 이화작용경로를 잘 설명해 준다.

Xanthan gum의 의가소성(Pseudoplasticity)은 발효과정 중 임펠러근처의 진단속도 증가에 따라 점도가 감소하여 교반이 되지만 임펠러와 거리가 먼 발효조 벽면근처의 발효액은 점도가 높아 정체층(Stagnant region)이 생겨 발효조내의 물질전달, 특히 고점성 발효액에 공급된 공기가 분산되지 않고 큰 기포로 되는 합체현상(coalescence)이 일어나 산소전달이 분제시 되고 있다(8).

현재 Xanthan gum은 회분식배양에 의해 생산되고 있으나 배양시간이 길어 동력소모가 크고 고점성 발효액에 의한 산소와 영양분들의 물질전달이 분제가 되고 있다. Xanthan gum 회수공정은 Ethanol, Iso-propanol 등의 알콜에 의해 침전분리하기 때문에 회수비용이 Xanthan gum 생산비용의 큰 부분을 차지한다. 그러므로 Xanthan gum 발효가 경제성을 갖기 위해서는 발효시간을 줄여 동력소모를 줄이고, 발효액부피당 최종 Xanthan gum농도를 높여 회수비용을 줄이는 것이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 이런 문제점들을 고려하여 배지 최적화와 교반속도, 질소원, 탄소원의 변화에 따른

산소흡수속도(OUR) 및 이산화탄소발생속도(CER)의 변화, 유가식배양(Fed-batch fermentation) 법에 주안점을 두고 실험하였다.

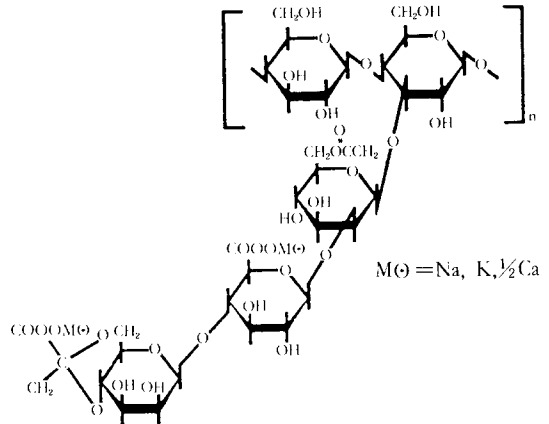


Fig. 1. Repeating unit structure of xanthan gum.

재료 및 방법

미생물

본 실험에 사용한 미생물은 식물병원성 박테리아인 *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459이다.

균주보관 및 배지

균주의 퇴화와 돌연변이(9)를 줄이기 위하여 2주일마다 YM agar에 탄소원, 질소원 및 Trace element로서 Magnesium sulfate를 보강한 균주지장배지(Maintenance medium)에 28℃에서 2일동안 계대배양한 후 사용할 때까지 4℃냉장고에 보관하였다. 성장배지(Growth medium)와 기본발효배지의 조성은 Table 1과 같으며 2N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 pH를 7.0으로 조절하였다. 발효배지는 실험목적에 따라 포도당농도, 질소원 및 질소원농도를 변화시켰으며 감색반응과 불용성인산염의 침전을 방지하기 위하여 포도당 및 Magnesium sulfate와 Peptone 및 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>로 분리하여 121℃, 15psig에서 25분동안 멸균하였다.

실험장치 및 방법

균체성장을 위한 플라스크배양의 경우 멸균된 성장배지 100ml가 들어있는 500ml 삼각플라스크에 Agar slant에 보관한 균주 1백균이를 접종하여 shaking incubator (KMC 84805, KOREA Manhattan Co.)에서 18

Table 1. Medium composition

Unit: [ g / l ]

Composition	Maintenance medium	Growth medium	Fermentation medium
glucose	20	10	15-30
peptone	5	5	5-11
yeast extract	3	-	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2	1	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	2
sodium acetate	-	-	2
sodium pyruvate	-	-	0.5
agar	20	-	-

0RPM, 28±1℃를 유지하여 약 20시간동안 배양하여 집중균으로 사용하였다.

플라스크에서의 회분식 배양은 멸균된 발효배지 100ml가 들어있는 500ml 삼각플라스크에 집중균 5ml를 접종하여 위에서와 같은 조건으로 48시간동안 배양하였다.

발효조를 이용한 회분식 및 유가식 배양은 멸균된 발효배지 2l가 들어있는 Jar fermenter(BIOFLO II, New Brunswick Scientific Co., USA)에 집중균 100ml를 접종하여 회분식으로 배양하였으며, 발효조 운전조건은 온도와 pH의 경우 각각 28℃, 7.0으로 제어하였고 교반속도는 990RPM, 통기속도는 1.0VVM으로 하였다. 유가식배양의 경우 회분배양을 행한 후 포도당이 고갈되었을때 포도당(25g-35g / 25ml water)을 실험에 따라 1회 또는 2회에 걸쳐 Inoculum Port를 통하여 첨가하였으며 시료채취는 3시간마다 Sampling port를 통해 30ml정도를 채취하여 분석용으로 사용하였다.

**발효배기가스의 분석**

발효배기가스를 분석하기위해 발효조에 gas chromatograph (GC-9A, Shimadzu Co. Japan)를 연결한 발효장치는 Fig. 2에 나타내었다.

공기중의 CO<sub>2</sub>를 분리하기 위한 Porapak Q칼럼과 공기중의 O<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub>를 분리하기위한 Molecular sieve 5A칼럼을 병렬로 연결하였으며, GC 운전조건은 Table. 2에 나타내었다. 매시간마다 Gas sampler(MGS-5, Shimadzu Co. Japan)을 이용하여 발효배기가스 2ml를 채취하여 Porapak Q칼럼에 흘려보내고 2.5분후에 다시 2ml을 Molecular sieve 5A칼럼에 흘려보내고 분석을

행하였는데, 발효배기가스 중의 주요성분인 질소, 산소, 이산화탄소중에서 불활성기체인 질소를 내부표준물질로한 Internal standard method 를 이용하여 몰백분율로 측정하였다. 발효배기가스의 전형적인 분리예를 Fig. 3에 나타내었다.

**산소흡수속도와 이산화탄소발생속도의 계산**

GC를 이용한 발효배기가스의 분석을 행하여 얻은 산소, 이산화탄소의 몰백분율로부터 발효조 입출구의 몰질수지를 세워 산소흡수속도(O<sub>2</sub> Uptake Rate: OUR)와 이산화탄소발생속도(CO<sub>2</sub> Evolution Rate: CER)을 계산하였으며 계산식은 아래와 같다.(10, 11)

$$OUR = \frac{G_c}{V} \left( 21.045 - \frac{78.928 y_{O_2}}{100 - y_{O_2} - y_{CO_2}} \right)$$

$$CER = \frac{G_c}{V} \left( 0.027 - \frac{78.928 y_{CO_2}}{100 - y_{O_2} - y_{CO_2}} \right)$$

여기서 G<sub>c</sub> = 시간당 발효조에 공급되는 공기의 몰유속(mol / hr)

V = 발효액의 부피 ( l )

y<sub>O<sub>2</sub></sub> = 발효배기가스 중 산소의 몰분율(부차원)

y<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 발효배기가스 중 이산화탄소의 몰분율(부차원)

**건조세포질량측정**

세포질량은 원심분리 후 침전세포를 65℃ 진공건조기 (ISOTEMP, Model 281, Fisher Scientific Co.)에서 일정부위가 될때까지 건조하여 얻은 세포질량을 측정하는 방법과 분광광도계(Spectronic 20D, Milton Roy Co, USA)를 이용하여 650nm에서 흡광도를 측정하여 보정

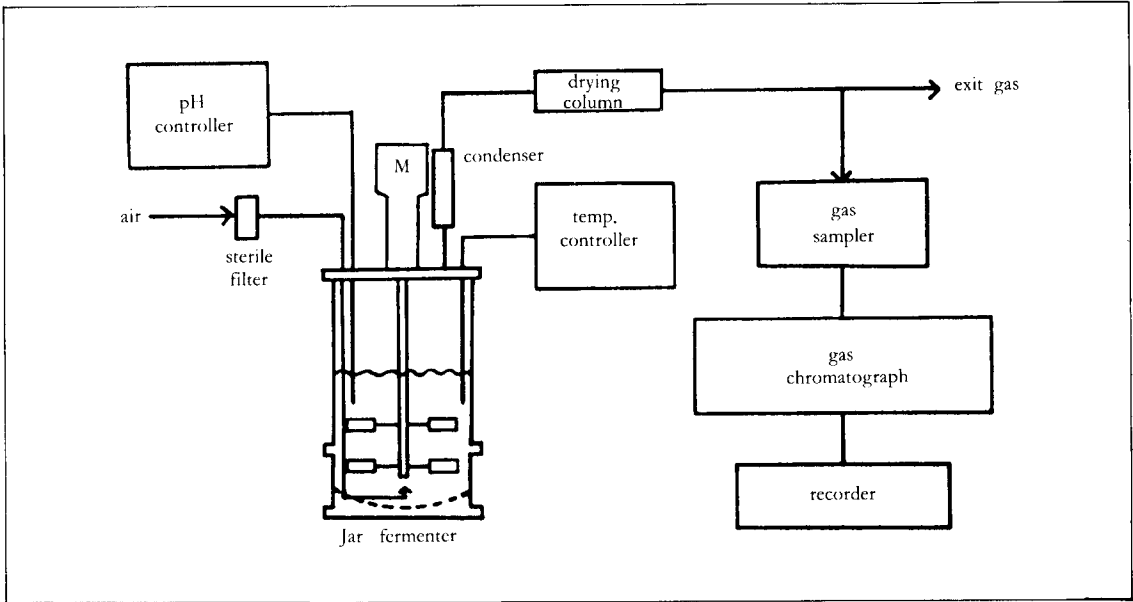


Fig. 2. Schematic diagram of the fermentation system coupled gas chromatograph.

Table 2. Gas chromatograph operation conditions

Item	Quantity
Model	Shimadzu Co, Gc-9A
Detector	Thermal Conductivity Detector
Column material	Col.1 Porapak Q Col. 2 Molecular sieve 5A
Column size	3mm×3m (stainless steel)
Carrier gas	Argon
Flow rate	Col.1 10ml / min Col.2 14ml / min
Column oven temp.	95°C
Detector temp.	130°C

곡선으로부터 건조세포질량을 결정하는 방법을 사용하였다.

**시료중의 세포제거**

발효액의 침성에 따라 증류수를 가한 후 15,000RPM에서 30분동안 원심분리하여 세포를 제거한 상층액으로 다음의 분석을 행하였다.

**Xanthan gum 농도의 측정**

Xanthan gum 농도는 상층액 5ml에 KCl를 포화시킨

2%(V/V) 에탄올 10ml을 가하여 Xanthan gum을 침전시키고 냉동실에서 1일동안 방치한 다음 10,000RPM

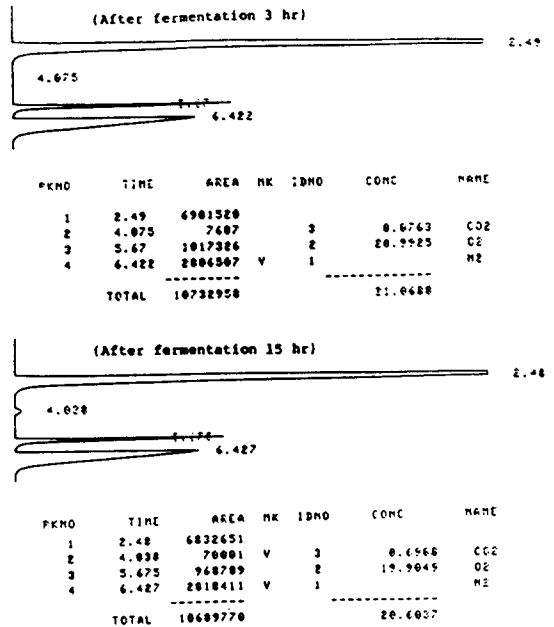


Fig. 3. Chromatogram of CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> during the xanthan fermentation by Gas chromatograph.

에서 원심분리하여 65°C의 진공건조기에서 일정무게가 될때까지 건조 후 무게를 측정하였다.

**포도당농도와 질소원농도의 측정**

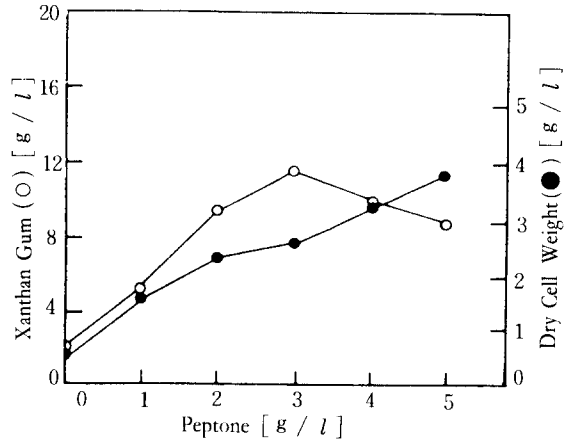
발효액중의 포도당농도는 DNS method(12)에 의해 측정하였으며, 질소원농도는 상층액 1ml에 촉매로서 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 g과 30%NaOH 1ml를 가한 후 진한황산 2ml를 가하여 소화시킨 후 Micro-Kjedahl distillation method(13)로 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**최적질소원**

Table 3은 Peptone, Yeast extract, Corn steep liquor (CSL)와 같은 복합질소원과 Sodium L-glutamate, Ammonium sulfate, Urea등과 같은 질소원을 이용하여 48시간동안 플라스크배양한 결과이다. 복합질소원의 경우 세포수율(Y<sub>x/s</sub>)은 Yeast extract가 Peptone보다 약간 컸으나 Xanthan gum 수율(Y<sub>p/s</sub>)는 Peptone이 Yeast extract 보다 더 컸다.

Peter Jones등(14)은 질소원이 Peptone인 경우에 비하여 CSL일때 Xanthan gum수율이 높고 발효시간도 단축되었다고 하였으나, 본 연구에서는 CSL이 Xanthan gum 발효에 부적합한 질소원으로 나타났다. 무기질 소원인



**Fig. 4. Effect of peptone concentraion on the cell growth and xanthan gum production.**

Ammonium sulfate, Urea는 세포성장 및 Xanthan gum 합성이 거의 일어나지 않았으나 아미노산의 일종인 Sodium L-glutamate 경우에는 세포수율과 Xanthan gum 수율이 높았으며 세포수율은 Peptone보다 낮으나 Xanthan gum수율은 거의 비슷하게 나타났다.

Fig.4와 Fig.5는 Peptone과 Sodium L-glutamate를 질소원으로 하여 플라스크배양한 결과로서 질소원이 없는 경우 세포성장과 Xanthan gum 합성이 일어나지 않았으

**Table 3. Effect of nitrogen sources on the cell growth, xanthan gum production and yields**

	Nitrogen Source	Concentration (g/l)	Cell mass (g/l)	Xanthan gum (g/l)	Y <sub>x/S</sub> (g/g)	Y <sub>p/s</sub> (g/g)	Y <sub>p/x</sub> (g/g)
Complex Nitrogen media	Peptone	3.0	2.6	11.4	0.12	0.57	4.56
	Yeast extract	4.0	2.8	8.5	0.14	0.43	3.03
	Corn Steep Liquor	2.0	1.0	4.8	0.05	0.24	4.80
Defined Nitrogen Media	Sodium L-glutamate	3.0	1.9	11.2	0.09	0.56	6.02
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.0	0.4	2.3	0.02	0.11	5.75
	Urea	3.0	0.7	2.7	0.04	0.14	3.85

Basal media: glucose 20 g/l  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g/l  
 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 g/l

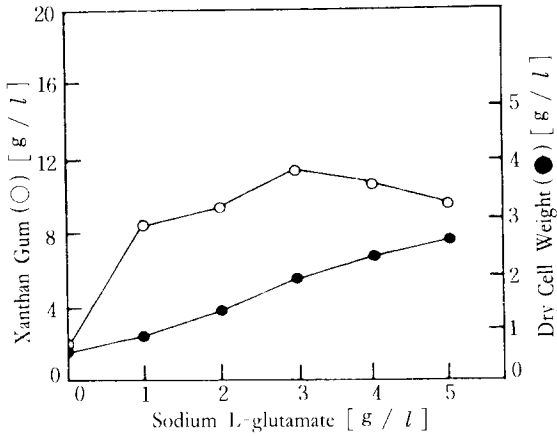


Fig. 5. Effect of sodium L-glutamate concentration on the cell growth and xanthan gum production.

며, 최적질소원 농도이상에서는 세포성장은 촉진되었으나 Xanthan gum 합성은 저해되었다. 결과적으로 질소원이 제한된 상태에서 Xanthan gum의 합성이 촉진됨을 알수 있었다.

**Magnesium sulfate의 영향**

Mg<sup>2+</sup>이온은 포도당 이화작용에서 cofactor로서 작용한다(15).

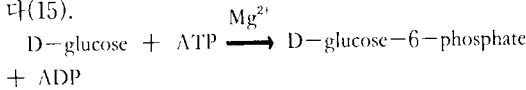


Fig.6은 Magnesium sulfate 농도별로 플라스크배양한 결과로서 Magnesium sulfate가 없는 경우 세포성장 및 Xanthan gum 합성이 일어나지 않았으므로 Magnesium sulfate는 Xanthan gum 합성에 필수적이었다.

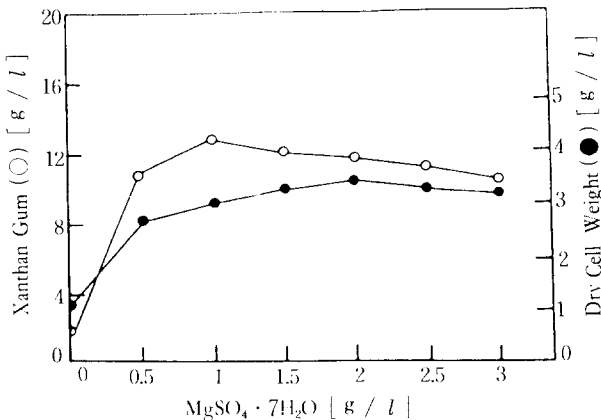


Fig. 6. Effect of magnesium sulfate on the cell growth and xanthan gum production.

Magnesium sulfate 0.5-3 g/l 범위에서 세포성장은 거의 비슷하게 나타났으며 1 g/l에서 최적 Xanthan gum 수율을 보였으나 그 이상의 농도에서는 Xanthan gum 수율이 감소하였다. 또한 균주의 보관시 YM agar에 Magnesium sulfate를 첨가하여 배양한 결과 colony의 집성이 향상되었으며 발효실험시 오염이 줄어들어 Magnesium sulfate는 균체안정성에도 기여하는 것으로 고려된다.

**유기산의 영향**

Xanthan gum 기본단위에 치환된 pyruvate 함량은 Xanthan gum의 품질을 결정하고 pyruvate와 O-acetyl residue 함량은 Xanthan gum의 특성인 증점능력(Viscosifying ability)의 중요한 인자이다(16,17). 그리고 Xanthan gum 생합성경로중에서도 pyruvate와 acetyl CoA가 수반되기 때문에 본 실험에서는 유기산으로 sodium pyruvate와 sodium acetate를 선택하였다.

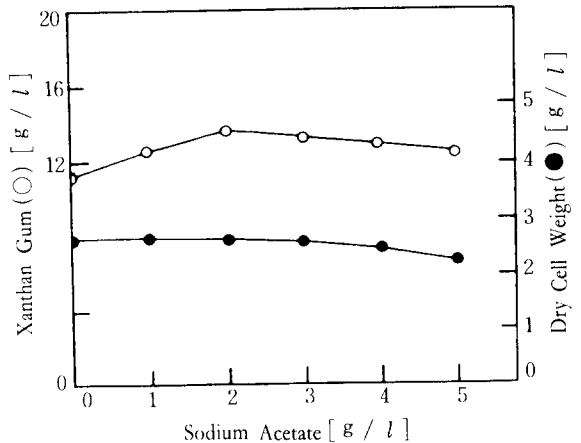


Fig. 7. Effect of sodium acetate on the cell growth and xanthan gum production.

Fig.7은 기본발효배지에 sodium acetate를 첨가하여 배양한 결과를 나타낸 것으로서 4 g/l까지는 세포성장이 거의 비슷하나 그 이상의 농도에서는 세포성장을 저해하였으며 sodium acetate 2 g/l에서 최적 Xanthan gum 수율을 보였다. Fig.8은 sodium acetate 2 g/l sodium pyruvate를 첨가하여 배양한 결과로서 sodium pyruvate 농도가 증가할수록 세포성장이 저해됨을 알수 있었고 sodium pyruvate 0.5 g/l에서 최적 Xanthan gum 수율을 보였다. Souw와 Demain(18)은 succinate, pyruvate, α ketoglutarate와 같은 유기산의 첨가는 Xanthan gum 합성을 촉진시킨다고 하였는데, 본 실험에서는 유기산으로서 sodium acetate와 sodium pyruvate

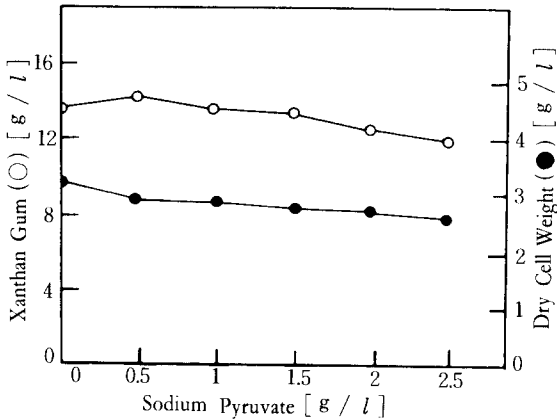


Fig. 8. Effect of sodium pyruvate on the cell growth and xanthan gum production.

를 첨가한 결과 세포성장은 약간 저해되나 Xanthan gum 함성을 촉진시킴을 보였다.

**교반속도와 영향**

Fig.9는 990RPM에서 배양한 결과를 나타낸 것이며, Table 4.에서 보는 바와 같이 600RPM에서 발효시간이 28시간 소요되는데 비해 990RPM에서는 24시간으로 단축되었으며 세포수율 및 Xanthan gum 수율이 향상되었다.

이때 배출되는 발효배기가스를 분석하여 얻은 산소 흡수속도와 이산화탄소 발생속도를 세포성장속도와 비교하여보면 Fig.10에 나타낸 바와 같이 600RPM, 990RPM 모두 발효10시간후에 최대 세포성장속도를 보였으며 같은 시간이 최대 산소흡수속도와 이산화탄소 발생속도를 보였다. 이로서 산소흡수속도와 이산화탄소 발생속도는 세포성장속도와 비례함을 보였다.

결과적으로 교반속도가 커짐에 따라 세포성장속도, 산소흡수속도 및 이산화탄소 발생속도가 증가함을 보였다.

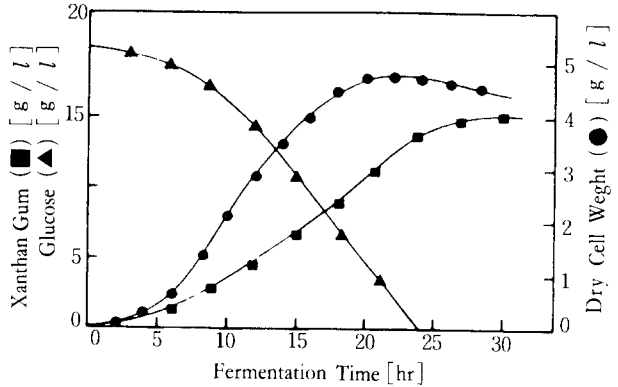


Fig. 9. Batch fermentation with *X. campestris* at agitation speed 990RPM.

**질소원의 영향**

최적 질소원실험에서 *Xanthomonas campestris*에 의해 동화가능한 질소원으로 나타난 peptone과 sodium L-glutamate를 질소원으로 하여 발효조실험을 행한 결과를 보면 Fig.11 및 Fig.12와 같다. Peptone 질소원에는 발효시간이 32시간소요되는데 비해 sodium L-glutamate에서는 발효시간이 39시간으로 길어졌는데 이는 Fig. 12에 나타낸 것처럼 발효초기의 세포성장 및 포도당 소비가 거의 없는 긴 유도기(Lag phase)때문이라 생각되며, 이에 비해 peptone 질소원에서는 유도기가 거의 없음을 알수 있었다. 앞의 플라스크 배양과 마찬가지로 세포성장은 peptone 질소원에서 더 우수하나 Xanthan gum 수율은 두 질소원에서 거의 비슷하게 나타났다. 따라서 *Xanthomonas campestris* 배양시 질소원으로서 sodium L-glutamate에 비해 유도기가 짧아 발효시간을 단축시켜주는 peptone 질소원 농도의 영향을 요약한 Table 5.에서 보는 바와 같이 peptone 5g/l에서 발효시간이 36시간인데 비해 peptone 8g/l에서는 26시간으로 발효시간이 크게 단축되었으나 peptone 11g/l

Table 4. Effects of agitation speed on the xanthan gum fermentation.

Agitation speed [RPM]	Fermentation time [hr]	Maximum cell mass [g/l]	Xanthan gum [g/l]	OUR max [mmol/l·hr]	CER max
600	28	3.7	14.5	18.7	10.8
990	24	4.6	15.2	21.2	13.5

Glucose = 20 g / l

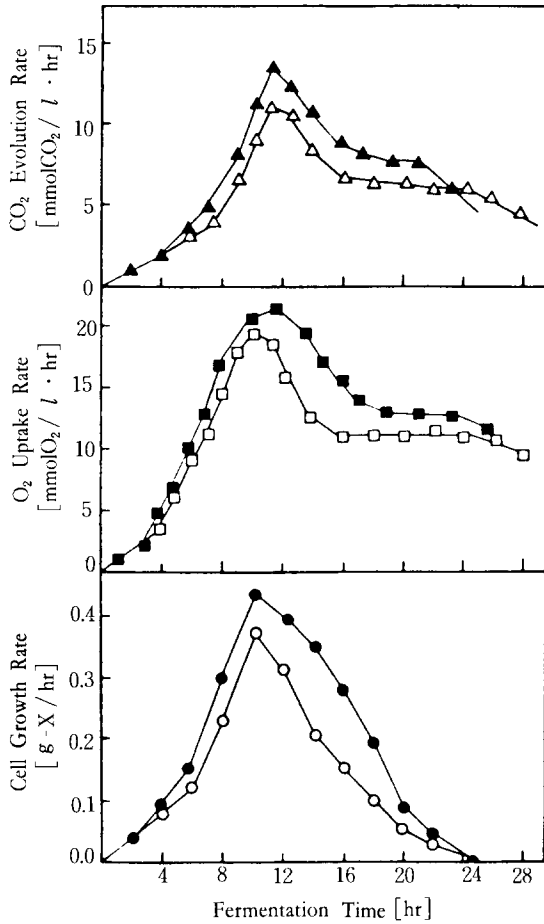


Fig. 10. Cell growth rate, O<sub>2</sub> uptake rate (OUR) and CO<sub>2</sub> evolution rate (CER) on the agitation speed. (open symbol: 600RPM, closed symbol: 990RPM)

에서는 오히려 발효시간이 증가하였는데, 이는 과도한 질소원에 의해 성장기가 길어졌기 때문이라 생각된다. 동화가능한 질소원이 증가함에 따라 세포농도, 산소흡수속도 및 이산화탄소발생속도는 증가하였으나 적정농도이상의 peptone 질소원에서는 Xanthan gum 수율이 감소함을 보였다. 포도당 30 g/l에서 회복배양시 질소원은 peptone 8 g/l가 최적이었으며, Fig.13은 peptone 8 g/l에서 배양한 결과를 나타낸 것이다.

Fig.14는 peptone 질소원에 따른 산소흡수속도와 이산화탄소발생속도를 나타낸 결과로서 peptone 5 g/l에 비해 peptone 8 g/l에서 산소흡수속도와 이산화탄소발생속도가 크게 증가함을 보였는데, 이는 많은 질소원에 의해 세포성장기 촉진되었기 때문이다. Fig.15는 탄소원

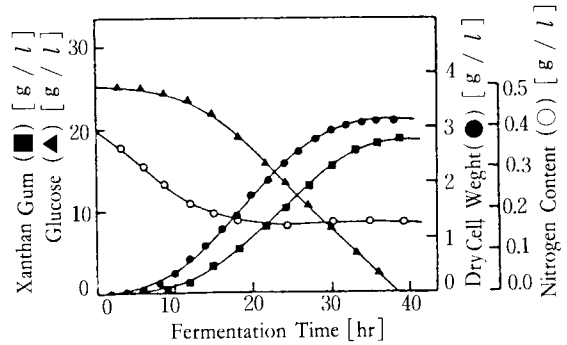


Fig. 11. Experimental data obtained with sodium L-glutamate nitrogen source.

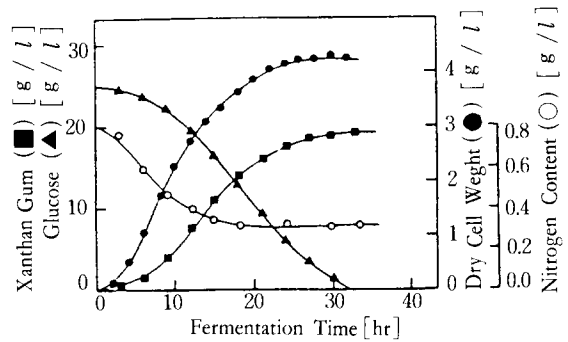


Fig. 12. Experimental data obtained with peptone nitrogen source.

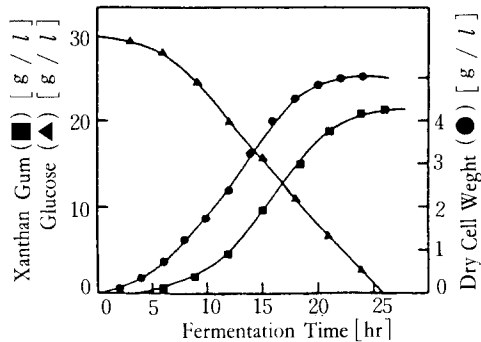


Fig. 13. Experimental data obtained with peptone nitrogen source. [peptone = 8 g/l]

에 따른 산소흡수속도와 이산화탄소발생속도의 결과로서 포도당 15 g/l에 비해 포도당 30 g/l에서 산소흡수속도와 이산화탄소발생속도가 증가하였으며, 포도당 15 g/l에서 산소흡수속도와 이산화탄소발생속도의 급격한 감소는 포도당의 고갈에 의한 세포성장기 정지되었기 때문이라 생각된다. 이로서 산소흡수속도와 이산화탄소발생속도는 교반속도(Fig. 10) 뿐만아니라 질소원, 탄소원의 영향을 받을 수 있었다.



Table 5. Effects of peptone concentration as nitrogen source

Peptone nitrogen [ g / l ]	Fermentation time [ hr ]	Maximum cell mass [ g / l ]	Xanthan gum [ g / l ]	OUR max [ mmol / l · hr ]	CER max [ mmol / l · hr ]
5	36	4.3	19.3	18.3	12.6
8	26	5.2	21.5	30.8	17.6
11	30	6.0	20.6	37.3	20.24

Glucose = 30 g / l

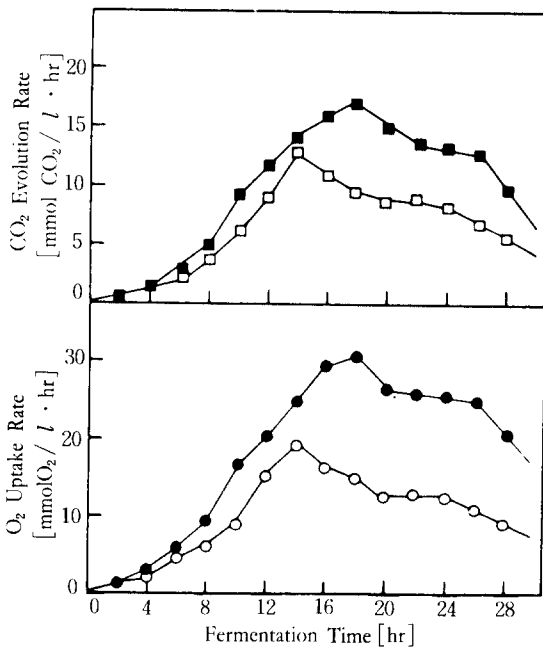


Fig. 14. O<sub>2</sub> uptake rate(OUR) and CO<sub>2</sub> evolution rate (CER) on the peptone nitrogen concentration. (open symbol: No=5 g / l, closed symbol: No=8 g / l )

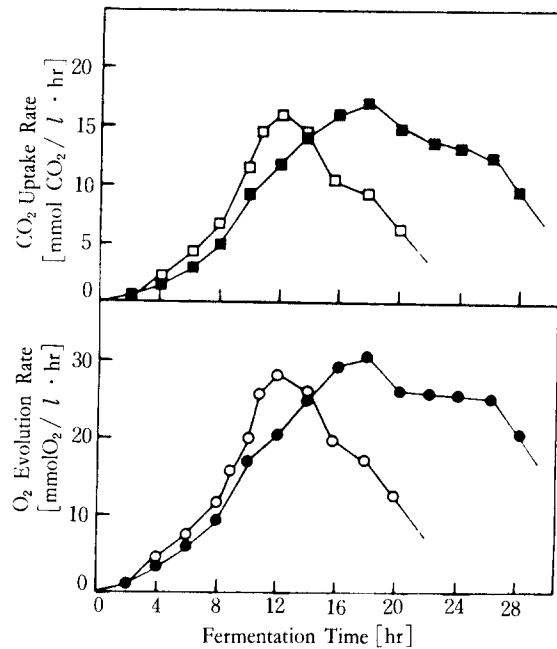


Fig. 15. O<sub>2</sub> uptake rate(OUR) and CO<sub>2</sub> evolution rate (CER) on the glucose concentrations.(open symbol: So=15 g / l, closed symbol: So=30 g / l )

**유가식 배양**

유가식배양은 질소원을 peptone 8 g / l로 하여 회분식배양을 한 후 포도당이 고가되었을때 포도당 (25 g - Glucose / 25ml - Water)을 실험에 따라 1회 또는 2회에 걸쳐 inoculum port로 주입하여 유가식배양을 행하였다. Fig.16은 초기 포도당농도를 30 g / l로 하여 회분배양후 포도당을 1회 주입한 결과로서 발효42시간만에 최종 Xanthangum 농도는 29 g / l이었으며 Fig.17은 초기 포도당농도를 15 g / l 로 하여 포도당을 2회

주입하여 배양한 결과로서 발효43시간만에 최종 Xanthan gum 농도는 28 g / l 이었다.

유가식배양의 경우 미생물이 거의 정지상 (starionary phase)에 도달하였으므로 포도당으로부터 Xanthan gum 으로의 높은 전환율을 보였다. 따라서 회분식배양에 비해 최종 Xanthan gum농도를 크게 높일 수 있으므로 유가식배양에 의한 Xanthan gum 생산이 더 경제적인 것으로 고려된다.

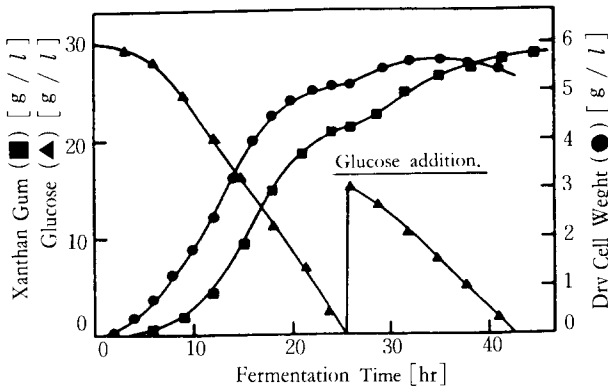


Fig. 16. Fed-batch fermentation data. [So=30 g / l]

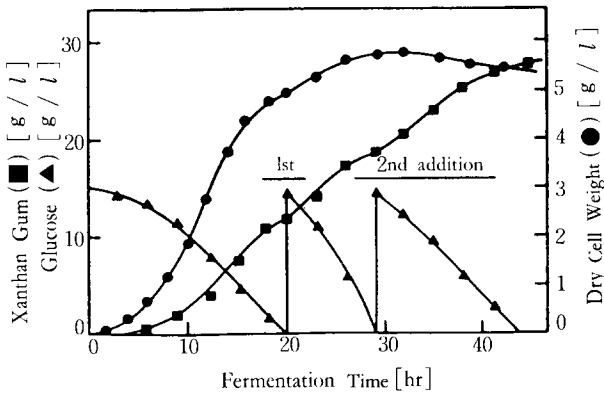


Fig. 17. Fed-batch fermentation data. [So=15 g / l]

## 결 론

*Xanthomonas campestris*에 의한 회분식 및 유가식배양을 하여 Xanthan gum을 생산한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *Xanthomonas campestris* 균주의 배양시 ammonium sulfate, urea 등의 무기질소원은 동화되지 않았으며 peptone, sodium L-glutamate는 동화가능한 최적질소원이었다.
2. 유기산으로서 sodium acetate, sodium pyruvate의 첨가는 Xanthan gum 합성을 촉진하였으며 적정량의 동화가능한 질소원의 경우 발효시간이 단축되었으나 동화가 능한 질소원이 적거나 과다한 경우에는 발효시간이 길어졌다.
3. Xanthan gum 생합성은 동화가능한 질소원이 제한된 상태에서 최적합성되었으며 아래와 같은 최적

발효배지가 얻어졌다.

Glucose = 30 g / l, Peptone = 8.0 g / l,  $K_2HPO_4$  = 2.0 g / l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  = 1.0 g / l, Sodium acetate = 2.0 g / l, Sodium pyruvate = 0.5 g / l

4. Gas chromatograph를 이용한 발효배기가스의 분석 결과 교반속도, 질소원 및 탄소원농도가 커질수록 산소흡수속도(OUR)와 이산화탄소발생속도(CER)은 증가하였으며 교반속도 990RPM, peptone 질소원 11 g / l에서 OUR = 37.3mmol  $O_2$  / l · hr, CER=20.2mmol  $CO_2$  / l · hr이었다.
5. 회분식배양에 비해 유가식배양은 발효 43시간만에 최종 Xanthan gum 농도를 29 g / l로 높여 생산성과 경제성을 향상시킬 수 있음을 보였다.

## 참 고 문 헌

1. Murrey Moo-Young(1975), *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, 49. Microbial Polysaccharides, Pergamon press.
2. L.Ielpi, R.O. Couso and M.A. Dankert(1981), *Biochem. and Biophys. Research communication*, **102**,(4), 1400.
3. Thonart, M.Paquot, L. Hermans and H.Alaoui (1985), *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 235.
4. I.J. Higgins, D.J. Best and J.Jones(1985), *Biotechnology*, p. 186~202, Blackwell Scientific publications.
5. Kelco Co. catalog.
6. B.Atkinson and F. Mavituna(1983), *Biochemical Engineering and Biotechnolgy Handbook*, P. 1048~1053, The nature press.
7. T.R.Jarman and G.W.Pace(1984), *Arch. Microbiol.*, **137**, 231.
8. H.Funahashi, K. Harai and T.Yoshida(1988), *J.Ferment. Technol.*,**66**,(1) 103.
9. K.A. Baucr and L.Altos(1983), U.S.Patent 4,400, 467.
10. A.Pons, C.G. Dussap and J.B. Gros(1989), *Biochem. and Biotechnol.*, **33**, 394.
11. Nam S.W., Chol C.S. and Kim J.H.(1989), *Kor J. Appl. Microbiol. Bioengin.*, **17** (3), 241.

12. G.L.Miller(1959), *Analytical Chemistry*, **31**, (31) 426.
13. L.N.Srikar and R.Chandru(1983), *J.Fd. Technol.*, **18**, 129.
14. J.F.Kennedy, P.Jones and A. Barker(1982), *Enzyme Microb. Technol.*, **4**,39.
15. Alan Scragg(1988), *Biotechnology for Engineering*, p.102~105, Ellis Horwood Limited.
16. P.Rogovin, A.Jeanes, M.C.Cadmus and C. A.Knutson(1976), ARS—NC--51, U.S. Department of Agriculture.
17. M.E. Ramirez, L.Fucikovsky, F.G.Jimenez and E.Galindo(1988), *App. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 5.
18. P.Souw and A.L. Demain(1979), *Applied and Environmental Microbiology*, **37**, (6) 1186.

(Received January 23, 1990)