

*Methylobacillus* sp. SK1의 고농도 유가배양

이 형 춘 · \*이 계 호 · \*\*김 시 옥  
서울보건전문대학  
\*서울대학교 농과대학  
\*\*조선대학교 자연과학대학

High Density Cultivation of *Methylobacillus* sp. SK1 in Fed-Batch System

Hyeong-Choon Lee, \*Ke-Ho Lee and \*\*Si-Wouk Kim  
Seoul Health Junior College  
\*College of Agriculture, Seoul National University  
\*\*College of Natural Science, Chosun University

ABSTRACT

*Methylobacillus* sp. SK1, an obligate methylotroph, was cultivated in a fed-batch culture using DO as a methanol feeding indicator with a micro computer-aided control system. While 2.07 g/l of cell density was obtained after 13 hr in the batch culture(initial methanol concentration: 1.0%(v/v)), 45.3 g/l of cell density was obtained after 17 hr by feeding methanol and metal ions in the fed-batch culture with oxygen supply.

The high density biomass was obtained in short cultivation time by fed-batch culture with feedback control, and consequently the biomass productivity was significantly increased. It was mainly due to extension of logarithmic growth period by methanol feeding without methanol inhibition and intensive aeration without DO limitation with microcomputer-aided control system.

서 론

메탄올은 생산량이 많고, 저렴하며, 순도가 높고, 용해성이 우수하기 때문에 SCP생산 원료로서 바람직하므로 (1) 메탄올로부터 SCP를 생산하는 것에 대한 연구(2, 3, 4, 5)와 검토(6, 7)가 활발히 수행되어 왔으며, 메탄올원료로부터 SCP가 상업적으로 생산되고 있다(8, 9).

그러나 메탄올은 저해기질이므로 배양액중에 일정농도 이상으로 함유되면 균의 증식을 억제할 뿐만 아니라 유효기를 연장시키므로(10) 단시간에 높은 농도의 균체를 얻을 수 없다. 또한 메탄올은 증발력이 크므로 배양

액중의 농도가 높을 경우 통기시에 휘산(揮散)되어 (11) 소실되는 양이 많아진다는 문제가 있는데 이러한 문제점들을 극복할 수 있는 방법이 유가배양법이다.

메탄올 이용균의 유가배양에 대한 연구의 발전과정을 고찰하면, 먼저 균의 증식에 따라서 메탄올을 일정속도로 공급하는 정속유가배양법(constantly-fed-batch culture) (12, 13)을 들 수 있다. 정속 유가배양에 있어서는 기질 공급속도는 일정한 반면 균체증식은 지수적이므로 균체가 어느 정도 증식하게 되면 균체의 기질요구를 충족시키지 못하게 되어 증식속도가 저하하게 된다. 이러한 문제점을 보완할 목적으로 지수적유가배양법(exponentially-fed-batch culture) (10, 14)에 대한 연구가 수행되었

다. 그러나, 정속유가배양법이나 지수적 유가배양법은 메탄올의 공급을 feedback이 없이 개방식으로 제어하므로 배양중에 일어날 수 있는 예기치 못한 변화에 대처하기가 힘들게 된다. 따라서, feedback 제어에 의한 유가배양이 바람직하며, 이 경우에는 적절한 제어변수(feedback parametes)의 계측치에 근거하여 기질을 공급하여야 한다. 이와 관련하여 Nishio등(15)은 pH를 제어변수로 사용하는 유가배양을 수행하여 *Pseudomonas* AM-1을 35.7 g / l 까지 배양하였음을 보고하였다. 그러나, Yano등(16)은 메탄올 이용균의 배양시 pH를 제어변수로 사용하는 것은 문제점이 있음을 지적하였으며, 자신들이 개발한 아날로그형 DO-stat(analog-type DO-stat)를 이용하여 용존산소(DO)를 제어변수로 하는 유가배양을 실시하여 *Protaminobacter ruber*를 85 g / l 까지 고농도로 배양하는데 성공하였다.

메탄올이용균의 고농도 유가배양에 대한 연구는 *Protaminobacter ruber*(16, 17)에 관한 것 한가지 정도이므로 더 다양한 종류의 메탄올 이용균에 대하여 연구될 필요가 있으며, 본 연구에서 사용한 *Methylobacillus* sp. SK1(18)은 국내에서 기초연구가 수행된 오직 메탄올만을 이용하는 균(obligate methylo-troph)으로써 비타민, 아미노산 등의 생육인자를 필요로 하지 않으며, 균체수율이 높고 증식속도가 빠르므로 SCP생산에 적합한 균으로 생각되었다.

또한 저자들은 마이크로컴퓨터를 이용한 유가배양 제어 시스템을 구성하고(19) *Methylobacillus* sp. SK1에 대하여 유가배양을 수행하여 제어시스템의 기능을 테스트함과 동시에 *Methylobacillus* sp. SK1의 고농도 배양의 가능성을 검토하였다.

따라서 본 연구에서는 마이크로컴퓨터 제어 배양시스템으로 *Methylobacillus* sp. SK1의 유가배양을 실시하여 고농도배양의 특성을 검토하였으며, 또한 회분배양, 공기공급에 의한 유가배양 산소공급에 의한 유가배양의 결과를 서로 비교함으로써 유가배양의 효율성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 균 주

본 연구에서 사용한 균주는 *Methylobacillus* sp. SK1(18)이었다.

### 배 지

본 실험에 사용된 배지의 조성은  $K_2HPO_4$  6.10g / l,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  3.04g / l,  $(NH_4)_2SO_4$  1.0g / l,  $NaNO_3$

1.0g / l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g / l,  $CaCl_2$  50mg / l,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  10mg / l,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  1mg / l,  $H_3BO_3$  1mg / l,  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$  5mg / l,  $ZnSO_4$  2mg / l,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$  2mg / l,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  10mg / l, Methanol 1.0%(v/v) 이었다. 단, 메탄올은 유가배양시 필요할 경우마다 일정량(8.04ml)씩 공급되었다.

### 배양방법

접종액은 보존균주 1백금니를 취하여 한천평판배지(메탄올 1.0%(v/v) 함유)에 도말한 후 35℃로 48시간 배양한 균 1백금니를 500ml 삼각플라스크에 들어있는 액체배지(메탄올 1.0%(v/v) 함유) 100ml에 접종하여 회전진탕배양기로 35℃, 20시간 진탕배양(200rpm)한 것을 사용하였다.

배양액의 양은 접종액을 포함하여 1 l로 하였고, 접종액의 양은 특별한 기술이 없는 경우 100ml로 하였다. 배양온도는 35℃로 하였으며, pH제어를 수행할 경우에는 28%암모니아수를 사용하여 배양액의 pH를 7.0으로 유지시켜 주었다. 소포체는 Silicone KM-72용액(20%(w/v))을 가압 멸균하여 사용하였다.

회분배양시에는 용존산소(DO)의 제어와 메탄올 공급의 제어를 수행하지 않았으며, 유가배양시에는 전보(19)에서 기술한 마이크로컴퓨터 제어 배양시스템이 의해 배양액의 용존산소(DO)를 2.5ppm으로 유지시켰으며, 배양액의 용존산소가 4.0ppm(공기공급에 의한 유가배양)또는 6.0ppm(산소공급에 의한 유가배양) 이상으로 증가할 때마다 메탄올을 일정량(8.04ml)씩 공급하였다.

### 분석방법

균 증식도의 측정에는 동일한 균 배양액에 대하여 Spectronic 20(Bausch & Lomb)로 660nm에서 OD(optical density)를 측정하는 동시에 건조중량을 측정하여 OD와 건조중량의 비를 구한 후 배양과정에서 측정된 OD 값을 질량농도(g/l)로 환산하였다. 측정결과 OD를 질량농도로 환산하기 위한 계수는 0.61( $r=0.998$ )이었다.

발효조의 산소전달속도(oxygen transfer rate)의 측정에는 아황산산화법(sulfite oxidation method)(20)에 의하였다.

## 결과 및 고찰

### 회분배양

*Methylobacillus* sp. SK1을 발효조로 배양할 경우의 기본적인 배양특성을 알아보기 위하여 교반속도 500 rpm, 통기량 1vvm의 조건으로 회분배양한 결과는 fig. 1과 같다.

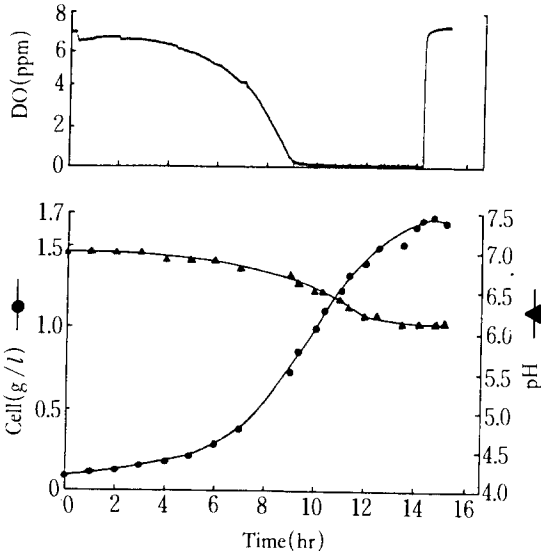


Fig. 1. Batch cultivation of *Methylobacillus* sp. SK1 at 35°C. Air flow rate and agitation speed were 1 l / min and 500rpm. Initial methanol concentration was 1% (v / v).

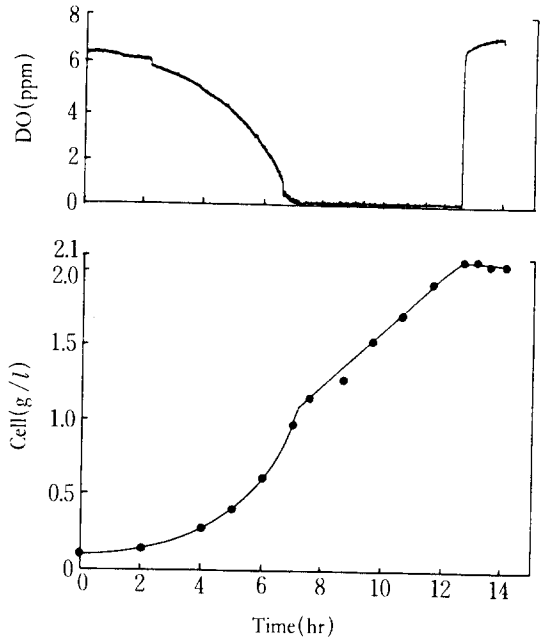


Fig. 2. Batch cultivation of *Methylobacillus* sp. SK1 at pH 7.0

균체농도는 초기 0.08g/l에서 15시간만에 최대 1.6g/l까지 도달 후 감소하였고, 증식양상은 배양후 5시간부터 9시간반까지 대수적으로 증식하였으며 그 이후 증식속도가 감소하였다. pH는 초기 7.0에서 계속 하강하여 말기에 6.0으로 되었다. DO는 초기 7.0ppm에서 균의 증식과 함께 감소되기 시작하여 9시간반만에 0ppm으로 되어 계속 유지되다가 약14시간에 배양액중의 메탄올이 완전히 소모되면서 급격히 증가하여 7.0ppm으로 되었다.

균의 증식속도가 9시간반부터 감소하기 시작한 것은 9시간반에 배양액의 DO가 한계농도로 된 것과 한계기질(limiting substrate)인 메탄올의 감소 및 배양액의 pH하강이라는 복합적인 요인에 기인하였다고 본다. 또한, 본 균의 메탄올에 대한 균체수율이 0.4g/l(18)으로 보고되어 있으므로 배양액중의 메탄올이 균증식에 완전히 이용된다면 최대균체농도가 3.2g/l정도에 이를 것이나 1.68g/l로 얻어진 것은 통기에 의해 메탄올이 소실된 결과이다.

다음으로는 균배양에 있어서 또 하나의 변수인 배양액의 pH를 7.0으로 유지시킨 상태에서 회분배양한 결과는 Fig. 2와 같다. 균체농도는 초기 0.1g/l에서 DO가

0ppm이 되는 7시간반정도까지 대수적으로 증가하여 1.1g/l로 되었으며 그 후 메탄올이 완전 소모되어 DO가 급격히 증가하는 13시간반 정도까지 거의 직선적으로 증가하여 최대균체농도인 2.07 g / l로 되었다.

균증식이 7시간반이후 직선적인 증식을 보인 것은 pH제어에 의해 pH저하의 영향이 배제되고 DO만이 유일한 증식한계인자(growth limiting factor)로 되었기 때문이라고 생각된다. DO가 1.1g/l정도의 작은 균체농도에서 이미 한계농도로 된 것은 환원성기질인 메탄올을 이용하는 메탄올 이용균의 경우 산소요구량이 크기 때문이다. 이와 관련하여 Nagai(21)는 글루코오스기질에서 증식하는 미생물의 경우 산소에 대한 균체수율( $Y_{X/O}$ )이 31.0~42.2 g cell / mol  $O_2$ 인 반면, 메탄올 이용균에 있어서는 6.9~16.4g cell / mol  $O_2$ 에 불과함을 검토하였다. 메탄올이 완전 소모되는 시간이 pH제어를 하지 않은 경우보다 1시간반정도 단축된 것은 집중량의 차이에 의한 영향도 있겠으나 주요한 요인은 pH제어에 의해 균의 증식속도가 증가하였기 때문이며 이에 따라 메탄올의 증발에 의한 소실이 줄어드는 결과 최대균체농도도 pH제어를 하지 않은 경우보다 0.39g/l 증가하였다.

이상 회분배양에서는 배양액의 pH를 일정하게 유지할

경우 DO가 유일한 한계인자로 됨을 알 수 있었다. 따라서 유가배양을 실시하여 메탄올을 계속 공급하면서 배양액의 DO를 한계농도 이상으로 유지한다면 균의 대수적 증식을 더 길게 유지할 수 있을 것이다.

### 공기 공급에 의한 유가배양

공기공급에 의한 유가배양의 특성을 알아보기 위하여 마이크로컴퓨터 제어 배양시스템(19)에 의해 유가배양을 실시하였다. 통기조건은 배양초기에 교반속도 500 rpm, 공기유량 1.0l/min로 하였고, 균체농도의 증가로 산소이용률이 커짐에 따라 교반속도를 1200rpm까지 단계적으로 증가시켜 주었으며, 교반속도가 1200rpm에 도달한 후에는 공기유량을 최대 5.0l/min까지 수동으로 증가시켜 주었다. 배양결과는 Fig. 3과 같다.

균체농도는 초기 0.11g/l로 부터 배양액의 DO가 0ppm이 되는 12시간까지 대수적으로 증가하여 8.85g/l

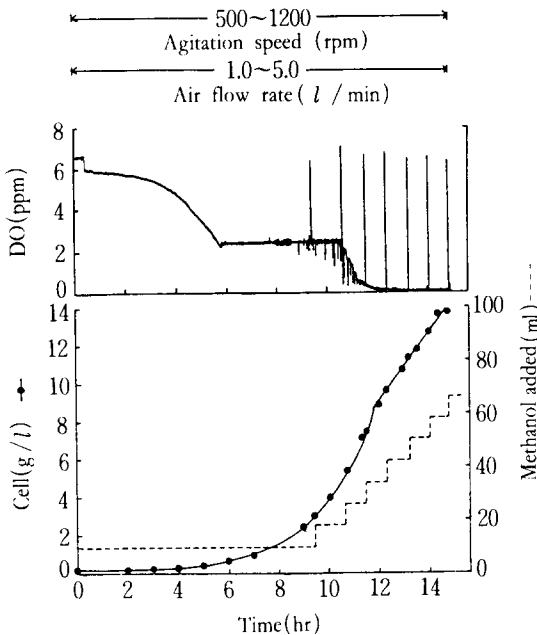


Fig. 3. Fed-batch cultivation of *Methylobacillus* sp. SK1 with microcomputer-aided control system.

Methanol of 8.04ml was fed at each peak of dissolved oxygen. When agitation speed reached the maximum level, air flow rate was increased manually.

가 되었고 그 이후에는 거의 직선적으로 증가하여 약 15시간만에 13.78g/l에 도달하였다. DO는 초기 6.8ppm으로부터 하강하여 2.3ppm에 도달한 6시간에 제어시스템을 가동하기 시작하였으며, 그 이후에는 배양액의 DO가  $2.5 \pm 0.2$ ppm으로 유지되다가 배양 11시간정도에서 다시 하강하기 시작하여 12시간에 0ppm으로 되었다. 메탄올은 초기의 10ml가 완전 소모되는 9시간반부터 7회에 걸쳐 재공급되었으며, 총 66ml가 공급되었다. 메탄올 공급시간의 간격은 초기 72분에서 균체농도가 증가함에 따라 53분까지 단축되었으나 DO가 0ppm으로 되고, 증식양상이 직선적으로 되면서 간격이 거의 일정하게 유지되었다.

DO가 0ppm이 되는 12시간까지 증식속도가 감소하지 않고 대수적으로 증식하고 있으므로 공기대신에 산소를 공급하여 배양액의 DO를 한계농도 이상으로 유지시킨다면 대수증식을 연장시켜 균체농도를 더 높일 수 있다고 생각되었다. DO가 0ppm으로 된 이후 증식속도가 감소하여 직선적인 증식을 보이고 있으나 균체농도가 시간당 1.86g/l로 비교적 높게 증가하고 있는 것은 균의 활성이 손상을 입지 않고 유지되었기 때문이라 생각되었다.

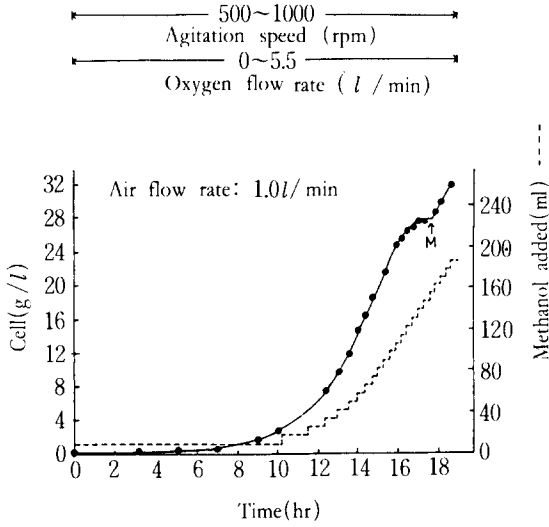
DO가 배양말기까지  $2.5 \pm 0.2$ ppm으로 비교적 변동폭이 좁게 유지된 것은 공기만을 통기하여 주었으므로 DO 전극의 반응이 민감하지 않았기 때문이라 생각되었다.

초기에 투여한 10ml의 메탄올이 9시간반만에 고갈된 것은 회분배양에 비해 3시간정도 빠른 결과로써 이는 배양액의 DO를 한계농도 이상으로 유지시킴으로써 균이 계속 대수적으로 증식하였기 때문이다. 균증식이 빨라졌으므로 메탄올의 소실도 줄어들어서 초기의 10ml로부터 얻어진 균체농도가 3.03g/l로써 회분배양에 비해 0.96g/l 증가하였다.

### 산소공급에 의한 유가배양

배양액의 최대균체농도를 증가시키기 위하여 산소의 공급에 의한 유가배양을 실시하였다. 통기조건은 공기유량을 1.0l/min로 유지시키고 교반속도를 초기 500 rpm으로부터 1000rpm까지 단계적으로 증가시켜 주었으며 교반속도가 1000rpm에 도달한 후에는 산소유량을 0l/min로부터 5.5l/min까지 증가시킴으로써 배양액의 DO를 배양말기까지 2.5ppm으로 유지시켰다. 배양결과를 Fig. 4에 나타내었다.

균체농도는 초기 0.1g/l에서 약 5시간의 유도기를 거쳐 14시간까지 대수적으로 증가하였으나 그 이후에는 증식속도가 감소되기 시작하여 17시간에 27.6g/l에 도달한 후 더 이상 증식하지 않고 정체기로 들어갔다.



**Fig. 4. Effect of mineral ions on the fed-batch culture of *Methylobacillus* sp. SK1 under continuous oxygen supply.** When agitation speed reached 1000rpm, oxygen flow rate increased semiautomatically. Air flow rate was kept constant (lvvm). Trace mineral ions (M) were added at the arrow mark.

DO가 한계농도 이상으로 유지됨에도 불구하고 17시간에 증식이 정체된 것은 산소의 공급으로 균체가 높은 농도로 축적되어 영양요구량이 증가하는 결과 배양액중의 영양성분이 고갈된 때문이라 생각되었다. 또한, 예비 실험의 결과 질소와 인의 혼합물( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0g/l, NaNO<sub>3</sub> 1.0g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.10g/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 3.04g/l, 마그네슘(MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g/l), 칼슘(CaCl<sub>2</sub> 50mg/l) 및 철(FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10mg/l)은 재공급할 경우 균의 증식이 재개되지 않았기 때문에 이들 성분은 고갈되지 않은 것으로 판단되어 나머지의 미량원소 혼합물(CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1mg/l, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1mg/l, MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 5mg/l, ZnSO<sub>4</sub> 2mg/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 2mg/l, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10mg/l)을 약18시간에 공급한 결과 증식이 재개되어 약19시간만에 균체농도가 32.0g/l에 도달하였다. 미량 원소혼합물의 공급으로 증식이 재개된 것으로 보아 배양액의 미량원소중의 어떤 성분이 고갈된 것이라 생각되었다.

고농도 유가배양중의 영양성분의 유가와 관련하여 Yano등(16)은 영양성분을 질소와 인 및 무기성분의

두그룹으로 나누어 실험적으로 구한 요구량에 근거하여 공급하였으며, Yano등(22)과 Mori등(23)은 탄소원을 제외한 거의 모든 영양성분에 대해 각각의 요구량을 측정 한 후 좀더 면밀한 공급으로 각 성분의 축적으로 인한 증식의 저해를 방지토록 하였다. 또한 Suzuki등(24)은 무기영양 성분을 배양중에 연속적으로 자동공급하는 방법을 연구하여 *Candida brassicae*의 배양에 적용하였다.

메탄올은 배양중에 22회 재공급되었고, 총 187ml가 공급되었다. 앞의 실험의 결과 배양중에 미량원소 성분이 고갈되었으며, 산소유량을 5.5l/min까지 증가시킬 경우 극심한 통기조건으로 인해 기포가 심하게 발생하여 그 제어가 곤란하였고, 유도기가 5시간 정도로 길었다. 따라서 배양액중의 미량원소의 농도가 충분히 유지될 수 있도록 미량원소를 고갈되기 훨씬 전(약12시간)에 공급하고, 통기조건에 있어서는 최대산소유량을 5.0l/min로 낮추는 대신 최대교반속도를 1200rpm으로 높여주며, 유도기를 단축시키기 위해 집종액량을 300ml로 한 조건에서 최대로 축적할 수 있는 균체농도를 알아보기 위하여 유가배양한 결과는 Fig. 5와 같다.

균체농도는 초기 0.22g/l에서 약3시간의 유도기를 거쳐 약12시간까지 대수적으로 증가하였고, 그 이후에는 증식속도가 서서히 감소하기 시작하였으며 약15시간만에 40.9g/l에 도달하여 더 이상 증가하지 않으므로 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.0g을 공급한 결과 균증식이 재개되어 17시간에 최대균체농도인 45.3g/l에 도달한 후 17시간 반까지 더이상 증식을 보이지 않았다.

집종량을 100ml로 한 것에 비해 유도기가 약2시간 단축된 것은 집종량을 증가시켰기 때문이며, 결과적으로 더 짧은 시간에 더 높은 균체농도에 도달할 수 있었다.

DO가 한계농도 이상으로 유지되며 미량원소의 공급으로 영양성분이 충분히 존재한다고 생각되는 약12시간에 이미 증식속도가 감소하기 시작한 것은 메탄올 이용률에서는 아직 *Escherichia coli*의 경우와 같은 저해대산산물(23)이 보고되어 있지 않으므로 주로 메탄올 결핍의 반복에 의한 활성의 손상때문이라 생각되었으며, DO가 0ppm에 도달한 후 공기공급에 의한 유가배양에서와 같이 직선적인 증식을 보이지 않고 정체된 것은 주로 이러한 활성손상의 누적에 기인한 것이라 생각되었으나 영양물질의 결핍에 의한 가능성도 배제할 수 없다. 배양 약16시간에 Mg<sup>2+</sup>의 공급으로 균증식이 재개된 것은 균체농도 40.9g/l에서 Mg<sup>2+</sup>성분이 결핍되었기 때문이다.

DO는 제어를 시작한 4시간 이후 2.5±0.2 ppm으로

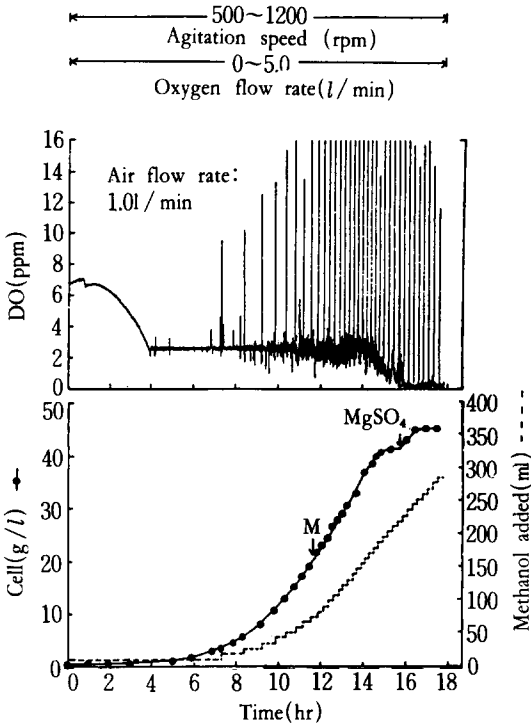


Fig. 5. Fed-batch cultivation by adding mineral ions(M) and  $MgSO_4 \cdot 7H_2O(1g)$  under oxygen supply.

유지되다가 산소의 공급을 개시한 6.7시간 이후 산소유량이 증가함에 따라 변동의 폭이 넓어졌으며 배양후기에는  $2.5 \pm 1.0ppm$ 으로 되었다. 또한 균체농도가  $42.8g/l$ 에 도달한 16시간에  $0ppm$ 으로 되었다. 메탄올의 고갈에 의한 DO의 증가는  $9.0ppm$  이상이었으며 배양후기로 갈수록 더 높아지는 양상을 보였다. Yano등(25)은 공기유량  $1.0l/min$ , 최대교반속도  $1000rpm$ , 최대산소유량  $2.0l/min$ 의 조건에서 마이크로컴퓨터를 이용한 DO제어 시스템으로 유가배양시 DO를  $2.0 \pm 0.4 ppm$ 으로 제어하였음을 보고하였는데, 본 연구에서는 교반속도  $1200rpm$ , 공기유량  $1.0l/min$ , 산소유량  $2.1l/min$ 인 약10시간만에  $2.0 \pm 0.3ppm$ 으로 제어되고 있으므로 본 연구의 결과가 더 우수하였다. 이것은 Yano등(25)의 경우 9bit A/D 변환기를 사용하여 DO를 제측한 반면 본 연구에서는 12bit A/D변환기를 사용한 것이 주요한 요인이라 생각되었다. 다만 본 연구에서는 산소유량을 반자동으로 조작하므로 DO가 순간적으로 증가하는 경우가 있었으나 이 경우에도 비교적 빠르게 제어능도로 복귀하였

다. 비교적 빠르게 제어능도로 복귀하였다. 배양후기에 산소유량의 증가로 DO의 변동폭이 넓어졌으나 극심한 통기조건에 비해서는 무리없이 제어되는 것이라 생각되었다.

메탄올은 배양중에 34회 재공급되었고, 총 284ml가 공급되었다. 메탄올 공급시간의 간격은 최초 63분에서 균체농도가 증가함에 따라 단축되기 시작하여 말기에 12분까지 단축되었으나 약15시간 이후에는 다소 증가되어 14분으로 되었다. 메탄올 공급시간의 간격이 약15시간 이후 증가하기 시작한 것은 이시간에  $Mg^{2+}$ 가 결핍되기 시작하여 균의 증식속도가 감소되었기 때문이며  $Mg^{2+}$ 의 공급에 의해 증식이 재개되기는 하였으나 즉시 DO가 한계농도로 되면서 균의 증식이 정체되었기 때문에 공급시간간격이 더이상 단축되지는 못하였다.

**회분배양과 유가배양의 비교**

회분배양, 공기공급에 의한 유가배양 및 산소공급에 의한 유가배양에 있어서의 최대균체농도 및 최대균체농도에 도달한 배양시간을 비교한 결과는 Fig. 6과 같다. 최대균체농도는 회분배양의 경우가  $2.07g/l$ , 공기공급에 의한 유가배양의 경우가  $13.7g/l$ , 산소공급에 의한 유가배양의 경우가  $45.3g/l$ 로써 공기공급에 의한 유가배양으로 회분배양의 6.6배, 산소공급에 의한 유가배양으로 회분배양의 21.9배 더 많은 균체를 얻었다. 또한, 산소공급에 의한 유가배양의 경우 공기공급에 의한 유가배양의 경우보다 3.3배 더 많은 균체를 얻었다.

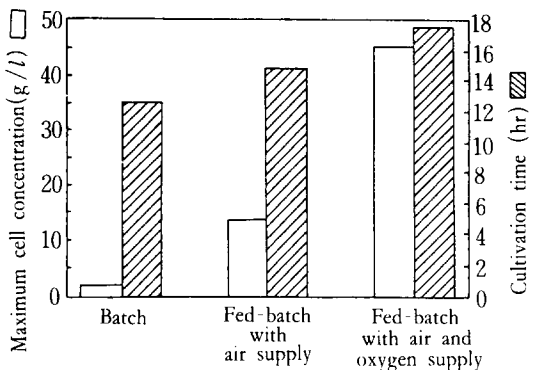


Fig. 6. Comparison of batch cultivation with fed-batch cultivations in maximum cell concentration and cultivation time required to reach the maximum cell concentration.

최대균체농도에 도달한 배양시간은 회분배양의 경우 12시간 36분, 공기공급에 의한 유가배양의 경우 14시간 48분, 산소공급에 의한 유가배양의 경우 17시간 30분으로써 공기공급에 의한 유가배양의 경우는 회분배양의 1.2배이고 산소공급에 의한 유가배양의 경우는 회분배양의 1.4배에 불과하였다. 산소공급에 의한 유가배양의 경우 접종량의 증가에 의한 유도기의 단축시간(2시간)을 고려하더라도 회분배양의 1.5배정도로써 유가배양에 의한 최대균체농도의 증가에 비해 배양시간의 증가는 미소하였다. 즉, 유가배양으로 단시간에 높은 농도의 균체를 얻을 수 있었으며 산소의 공급으로 유가배양의 효율을 증대시킬 수 있었다.

이처럼 유가배양으로 짧은 시간에 고농도의 균체를 얻을 수 있는 것은 메탄올을 저해농도 이하로 유지시키면서 DO신호에 의해 계속 공급함과 동시에 배양액의 DO를 한계농도 이상으로 유지시켜 균의 대수증식기를 계속 연장시킴으로써 가능한 것이다. 이러한 관점에서 회분배양, 공기공급에 의한 유가배양 및 산소공급에 의한 유가배양에 있어서의 대수증식기를 서로 비교하기 위해서 각 경우에 있어서는 시간에 따른 균체농도의 상용대수값을 동일한 스케일로 나타내어 직선구간의 시간길이를 비교한 것을 Fig. 7에 나타내었다. 대수증식기의 길이가 회분배양에서는 3시간 42분, 공기공급에 의한 유가배양에서는 6시간 42분, 산소공급에 의한 유가배양에서는 7시간 42분으로 공기공급에 의한 유가배양에서는 회분배양에 비해 3시간, 산소공급에 의한 유가배양에서는 회분배양에 비해 4시간 더 연장되었음을 확인할 수 있었다.

**발효조 및 배양과정의 산소전달속도**

발효조의 산소전달속도를 알아보기 위하여 3종류의 통기조건에 대하여 산소전달속도(oxygen transfer rate,  $g\ O_2/l \cdot hr$ )를 측정된 결과(Fig. 8), 교반속도 500rpm, 공기유량 1.0l/min의 조건에서는 1.20g  $O_2/l \cdot hr$ 였으며, 교반속도 1200rpm, 공기유량 5.0l/min의 조건에서는 10.25g  $O_2/l \cdot hr$ 였고, 교반속도 1200rpm, 공기유량 1.0l/min, 산소유량 5.0l/min에서는 48.59g  $O_2/l \cdot hr$ 였다. 교반속도 500rpm, 공기유량 1.0l/min에서의 결과는 유사한 조건에서 측정된 Solomons와 Perkin(26)의 측정치(약 1.7g  $O_2/l \cdot hr$ ), Elsworth(27)의 측정치(약 1.7g  $O_2/l \cdot hr$ )의 70% 및 63%에 해당하는 값으로써 발효조의 산소전달능력은 크지 않은 것으로 생각되었다.

다음으로 아황산 산화법으로 측정된 산소전달속도가 배양과정에서 균체농도의 증가등에 의한 배양액 물성의

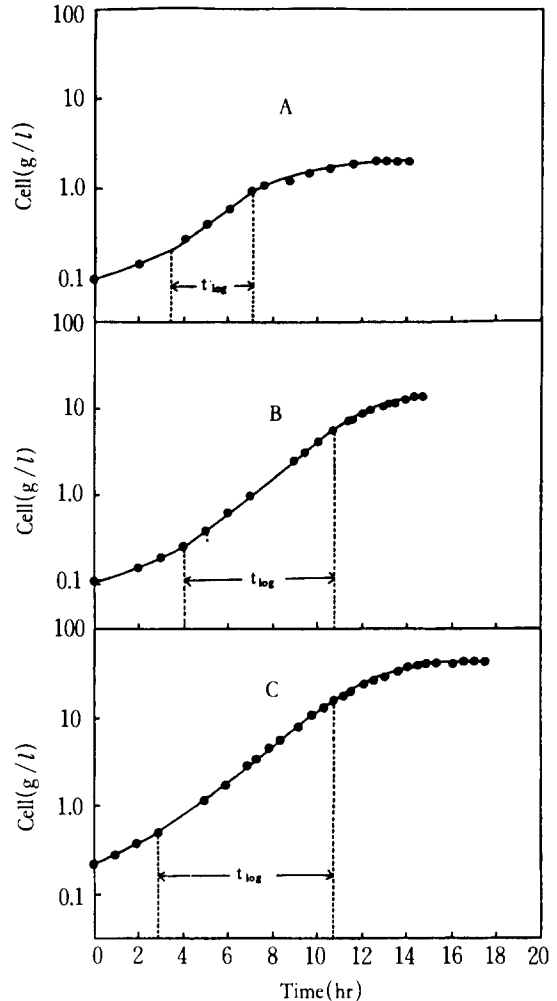


Fig. 7. Comparison of log periods( $t_{log}$ ) for batch and fed-batch cultivations.

A: Batch: 500rpm, 1.0 l air · min<sup>-1</sup>

B: Fed-batch: maximum 1200rpm, maximum 5.0 l air · min<sup>-1</sup>

C: Fed-batch: maximum 1200rpm, maximum 5.0 l  $O_2 \cdot min^{-1}$ , 1.0 l air · min<sup>-1</sup>

변화 또는 소포제 첨가에 의해 감소하는가를 알아보기 위하여 위에서 기술한 각 통기조건에서의 산소전달속도와 각 통기조건에서 얻을 수 있는 균체농도, 즉 각 통기조건으로 배양시 배양액의 DO가 0ppm에 도달하는 시점의 균체농도를 비교한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 그림

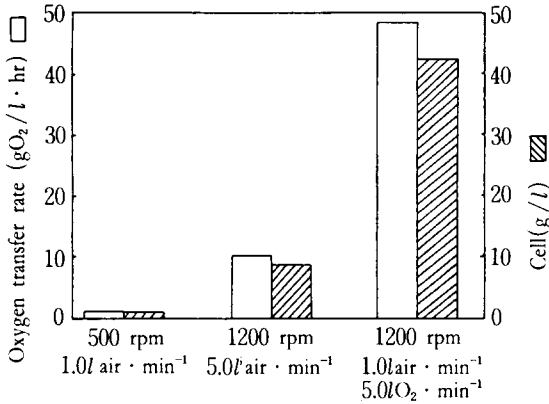


Fig. 8. Oxygen transfer rates measured by sulfite oxidation method and cell concentration just prior to reaching zero level of DO at three aeration conditions.

에서와 같이 세가지 통기조건에서의 산소전달속도에 대한 균체농도의 비가 각각 0.92, 0.87, 0.88로써 거의 차이가 없으므로 배양과정에서 산소전달속도가 그다지 감소하지 않았다고 생각되었다. 따라서 산소전달속도가 더 큰 발효조를 사용하여 통기조건을 개선한다면 산소전달속도의 증가에 비례하여 최대균체농도를 증가시킬 수 있다고 생각되었다.

## 요 약

메탄올이용균인 *Methylobacillus* sp. SK1의 균체생산효율을 증대시킬 목적으로 마이크로컴퓨터 제어 배양기를 이용해 고농도 유기배양을 수행하였다. 배양액의 초기 메탄올농도를 1.0%(v/v)로 하여 회분배양할 경우 배양 13시간만에 2.07g/l의 균체농도에 도달하였다. 공기공급에 의한 유기배양에서 최대교반속도 1200rpm, 최대공기유량 5.0l/min의 조건으로 배양시 약 15시간만에 13.7g/l의 균체농도에 도달하였다. 산소공급에 의한 유기배양에서 최대교반속도 1200rpm, 공기유량 1.0l/min, 최대산소유량 5.0l/min의 조건으로 배양시 17시간만에 45.3g/l의 균체농도에 도달하였다. 균의대수 증식기를 공기공급에 의한 유기 배양으로 회분배양에 비해 약3시간, 산소공급에 의한 유기배양으로 회분배양에 비해 약 4시간 더 연장할 수 있었다. 즉, 유기배양으로 단시간에 높은 농도의 균체를 얻은 것은 feedback 제어에 의해 메탄올을 저농도 이하로 유지시키면서

용존산소를 한계농도 이상으로 제어함으로써 균의 대수적 증식을 연장시킨 결과이다. 산소공급에 의한 유기배양중 균체농도 27.6g/l에서 미량원소성분이 결핍되었고, 42.8g/l에서 Mg<sup>2+</sup> 성분이 결핍되었으므로 배양중에 추가공급되었다.

## 참 고 문 헌

1. T. Urakami, T. Iwao and I. Nagai(1982), *J. Ferment. Technol.*, **60**(4), 287.
2. U. Faust, P. Präve and D. A. Sukatsch(1977), *J. Ferment. Technol.*, **55**(6), 609.
3. H. William and H. C. Lim (1981), *Biotech. Bioeng.*, **23**, 235.
4. T. Urakami, S. I. Minagawa, I. Terao and I. Nagai (1984), *J. Ferment. Technol.*, **62**(6), 523.
5. A. Prokop, H. D. Ratcliffe, M. I. Fatayer, N. Al-Awadhi, A. Khamis, M. Murad, C. Bond and I. Y. Hamdan (1984), *Biotech. Bioeng.*, **26**, 1085.
6. D. G. MacLennan, J. S. Gow and D. A. Stringer (1973), *Process Biochem.*, **8**(6), 22.
7. U. Faust and W. Sittig (1980), *Adv. Biochem. Eng.*, **17**, 63.
8. U. Faust and P. Präve (1983), *Biotechnology*, (H. Dellwey, ed.), Vol. 3, 84, Verlag Chemie, Weinheim.
9. American Society for Microbiology (1983), *Methylo-trophy and Methanogenesis*, **74**, A. S. M., Washington D. C.
10. T. Yamane, M. Kishimoto and F. Yoshida (1976), *J. Ferment. Technol.*, **54**(4), 229.
11. K. Minami, M. Yamamura, S. Shimizu, K. Ogawa and N. Sekine(1978), *J. Ferment. Technol.*, **56**(1), 35.
12. T. Yamane and S. Hirano(1977), *J. Ferment. Technol.*, **55**(2), 156.
13. T. Yamane and S. Hirano(1977), *J. Ferment. Technol.*, **55**(4), 380.
14. H. C. Lim, B. J. Chen and C. C. Creagan (1977), *Biotech. Bioeng.*, **19**, 425.
15. N. Nishio, Y. Tsuchiya, M. Hayashi and S. Nagai (1977), *J. Ferment. Technol.*, **55**(2), 151.
16. T. Yano, T. Kobayashi and S. Shimizu(1978), *J. Ferment. Technol.*, **56**(4), 416.
17. T. Yano, H. Mori, T. Kobayashi and S. Shimizu (1979), *J. Ferment. Technol.*, **57**(2), 91.
18. 김시욱 (1989), 연세대학교 박사학위 논문



19. 이형춘, 이계호, 허윤행 (1990), 한국생물공학회지, **5**(3), 307.
  20. American Society for Microbiology (1981), *Manual of Methods for General Bacteriology*, 72.
  21. S. Nagai (1979), *Adv. Biochem. Eng.*, **11**, 49.
  22. T. Yano, H. Mori, T. Kobayashi and S. Shimizu (1980), *J. Ferment. Technol.*, **58**(3), 259.
  23. H. Mori, T. Yano, T. Kobayashi and S. Shimizu (1979), *J. Chem. Eng. Japan*, **12**(4), 313.
  24. T. Suzuki, H. Mori, T. Yamane and S. Shimizu (1985), *Biotech. Bioeng.*, **27**, 192.
  25. T. Yano, T. Kobayashi and S. Shimizu (1981), *J. Ferment. Technol.*, **59**(4), 295.
  26. G. L. Solomons and M. P. Perkin (1958), *J. Appl. Chem.*, **8**(4), 251.
  27. R. Elsworth, V. Williams and R. Harris-Smith (1957), *J. Appl. Chem.*, **7**, 261.
- (Received; October 19, 1990, Revised; November 19, Accepted; November 30, 1990)**