

알칼리 내성 *Bacillus* sp.의 생물고분자 생산조건 최적화

이신영 · 이범수 · 이근억

강원대학교 발효공학과

Optimization of Biopolymer Production from Alkali-Tolerant *Bacillus* sp.

Shin-Young Lee, Beom-Su Lee and Keun-Eok Lee

Department of Fermentation Technology and Engineering, Kangweon National University

Abstract

Cultural conditions for the biopolymer production by an alkali tolerant *Bacillus* sp. isolated from soil were investigated and determination of optimal conditions was carried out by response surface method. The maximal production of biopolymer was obtained after cultivation at 30°C for 36 hrs in the mixture of 8% soluble starch, 0.75% yeast extract, 0.1% NaNO₃, 0.05% MgSO₄·7H₂O and 1% Na₂CO₃ adjusted to pH 10. Under these conditions, about 44 g/l of biopolymer were produced. From the results of response surface analysis, optimal condition for the production of biopolymer were obtained at stationary point with 15.16 of C/N ratio, 34.62°C of temperature and 9.50 of pH. On the basis of these conditions, it was estimated that 66.84 g/l of the biopolymer could be produced.

Key words : alkali-tolerant *Bacillus* sp., biopolymer production, optimization, response surface analysis

서 론

저자 등은 전보⁽¹⁾에서 미생물을 이용한 유용물질 생산연구의 일환으로 토양으로부터 알칼리 내성 *Bacillus* sp.를 생물고분자의 생산균주로 분리하고 생성된 생물고분자의 몇몇 이화학적 특성에 대하여 보고한 바 있다. 지금까지 *Bacillus*속 다당생산 균주로는 *B. polymyxa* No. 271, *B. polymyxa* C3, *B. strain* F-573, *B. polymyxa* var. *lactoviscosus*, *B. subtilis* FT-3, *B. subtilis* var. *polysaccharolyticum*, *B. circulans*, *B. polymyxa* No.458 등이 알려져 있다⁽²⁻⁷⁾. 그러나 본 균주의 생물고분자는 pH 10의 알칼리성에서 발효생산되는 점 그리고 높은 단백질 함량과 uronic acid를 함유하지 않는 산성의 생물고분자라는 점에서 이미 알려진 *Bacillus*속 균주의 다당류와는 다른 특성을 나타낼 것으로 판단되었다.

따라서 본보에서는 전보의 일련 연구로서 이 알칼리 내성 *Bacillus* sp.의 생물고분자 생산을 위한 최적 배양 조건을 검토하였고, 반응 표면분석법에 의하여 생산 최적화를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 보존

본 연구의 균주는 전보⁽¹⁾에서 보고한 알칼리 내성 *Ba-*

cillus sp.이며, 전보⁽¹⁾에서와 같은 방법으로 보존하면서 이하의 실험에 사용하였다.

배지조제 및 배양방법

전보⁽¹⁾에서와 마찬가지로 생산용 배지 50 ml를 함유한 250 ml 삼각플라스크에 전배양액을 3%(v/v) 접종한 후 30°C에서 120 rpm으로 2일간 진탕배양하였다.

분석방법

균체량은 배양액을 적당히 희석하고 spectrophotometer(Spectronic 20, Milson Roy Co.)로 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다. 배양액 중의 포도당의 양은 DNS(dinitrosalicylic acid)법⁽⁸⁾ 및 glucose-oxidase법⁽⁹⁾으로 비색 정량하였고, 전분은 Nedeltscheva들의 방법⁽¹⁰⁾ 그리고 전당은 phenol-sulfuric acid법^(8,9)에 의하여 정량하였다. 한편, biopolymer의 분리 및 정량⁽¹¹⁾은 다음과 같이 행하였다. 배양액을 1/2로 희석하고 15,000 rpm에서 60분간 원심분리하여 균체를 제거하였다. 상등액에 2배량의 acetone을 첨가하여 침전을 얻었으며, 이를 다시 증류수에 용해시켰다. 다시 acetone으로 침전하여 이를 dry oven에서 105°C로 함량이 될 때까지 건조시킨 후 조생물고분자(crude biopolymer)로 하였으며 건조 중량으로 정량하였다.

생물고분자 생산의 진탕배양 조건 검토

접종비의 영향은 기본배지에 전배양액의 접종량을 1~5%로 변화시켜 30°C에서 40시간 진탕배양하여 조사하였고, 배지 액량의 영향은 1l 삼각플라스크에 접종비를

Corresponding author : Shin-Young Lee, Department of Fermentation Technology and Engineering, Kangweon National University, 192 Hyoja Dong, Chuncheon, Kangweon-do 200-701, Korea

Table 1. Values of independent variables and treatment conditions by the randomized experimental design

Variables	Variable levels				
	-2	-1	0	1	2
C/N ratio(X_1)	2.67	6.67	10.67	14.67	18.67
Temperature(X_2)	16	23	30	37	44
pH(X_3)	7.5	8.5	9.5	10.5	11.5
Treatment number	X_1	X_2		X_3	
1	-1	-1		-1	
2	1	-1		-1	
3	-1	1		-1	
4	-1	-1		1	
5	1	1		-1	
6	1	-1		1	
7	-1	1		1	
8	1	1		1	
9	2	0		0	
10	-2	0		0	
11	0	2		0	
12	0	-2		0	
13	0	0		2	
14	0	0		-2	
15	0	0		0	
16	0	0		0	
17	0	0		0	
18	0	0		0	

3%로 하여 배지 액량을 50~450 ml로 달리하여 30°C에서 40시간 진탕배양하고 조사하였다. pH의 영향은 기본배지를 pH 6.5~10.5 범위의 각 단계 pH로 조절하여 40시간 진탕배양하고, 온도의 영향은 온도 25~45°C의 각 단계 온도에서 40시간 진탕배양한 후 각각 생육 및 생성 생물고분자를 측정하여 조사하였다. 한편, 배양시간의 영향은 기본배지를 사용하여 앞에서 얻어진 조건을 이용하고 2일간 배양하면서 기질소비, 균체중식 및 생물고분자의 생산에 대한 경시변화를 측정하여 조사하였다.

최적 배지 조성

탄소원의 영향은 기본배지에 glucose 대신 xylose, fructose, maltose, sucrose 및 soluble starch를 각각 1% (w/v)의 농도로 첨가하고 질소원의 영향은 glucose 대신 soluble starch 8%(w/v)를 넣은 기본배지에 polypeptone 및 yeast extract 대신에 soybean meal, tryptone, beef extract, malt extract, (NH₂)₂CO 등의 유기 질소원과 (NH₄)₂SO₄, NaNO₃, KNO₃, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂CO₃, NH₄NO₃ 등의 무기질소원을 각각 0.1~0.5%되게 첨가하여 pH를 10으로 조절한 후 30°C에서 40시간 진탕배양하고 각 배지에서의 생육 및 생성 생물고분자를 측정하여 조사하였다. 한편, 무기염류의 영향은 soluble starch 8%, yeast extract 0.75% 및 NaNO₃ 0.1%를 첨가한 배지에 MgSO₄·7H₂O, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄,

Table 2. Effect of inoculum size on the biopolymer production and cell growth

Inoculum size (v/v%)	Biopolymer (g/l)	Growth (O.D. 660 nm)
1	1.75	2.35
2	2.00	3.10
3	2.25	3.30
4	2.05	3.15
5	2.07	2.85

MnSO₄·5H₂O, CaCl₂를 각각 0.1% 농도로 첨가하고 pH를 10으로 조절하여 30°C에서 40시간 진탕배양한 후 생육 및 생물고분자를 정량하여 조사하였다.

반응 표면분석에 의한 생물고분자 생산의 최적화

생물고분자 생산의 최적화는 탄소원과 질소원의 비(C/N ratio), 온도 및 pH를 독립변수로 그리고 생물고분자 생산량을 종속변수로 하여 Table 1과 같이 18개의 처리조합으로 이루어진 중심합성 계획법⁽¹²⁻¹⁵⁾으로 실험을 행하고 박⁽¹⁵⁾의 반응 표면분석 프로그램을 응용하여 퍼스널 컴퓨터(IBM PC/AT)로 처리하였다.

반응 표면모형으로는 일반적으로 가정되며 간편하고 실용적인 다음 식 (1)과 같은 2차의 회귀모형을 적용하였다.

$$Y(I) = BE_0 + \sum_{i=1}^k BE_i X_i + \sum_{i < j}^k BE_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

여기서 k는 독립변수의 수, Y는 종속변수, X_i는 독립변수, BE₀, BE_{ij} 및 BE_i는 각각 중심점에서의 회귀계수, 선형계수 및 2차의 interaction 계수이다.

본 실험의 경우 3개의 독립변수를 사용하였으므로 K 값은 3이며 X₁, X₂ 및 X₃는 각각 C/N비, 온도 및 pH를 나타낸다. X₁, X₂ 및 X₃의 각 독립변수는 수준을 5로 하고 (Table 2 참조) 계산의 편의를 위하여 다음 식 (2)~(4)를 사용하여 -2~+2 범위의 code value를 갖도록 선형화 하였으며, 각 실험자료에 대한 분산분석(ANOVA)과 잔차를 구하였다.

$$X_1 \text{ code} = (X_{1 \text{ exp}} - 10.67)/4 \quad (2)$$

$$X_2 \text{ code} = (X_{2 \text{ exp}} - 30)/7 \quad (3)$$

$$X_3 \text{ code} = (X_{3 \text{ exp}} - 9.5)/1 \quad (4)$$

한편, 정상점(stationary point)은 2차 회귀식에 의해 산출한 상수값(BE)으로부터 반응식을 얻은 후 이 식을 미분하여 산출하였고, 이 때 독립변수와 종속변수의 상관관계는 ANOVA로 검정하였다.

결과 및 고찰

생물고분자 생산의 최적 배양조건

생물고분자 생산에 미치는 점중량의 영향을 검토한

Table 3. Effect of working volume on the biopolymer production and cell growth

Working volume (ml/l)	Biopolymer (g/l)	Growth (O.D. 660 nm)
50	2.70	4.00
150	2.35	3.40
250	1.95	2.85
350	1.47	2.55
450	1.00	2.25

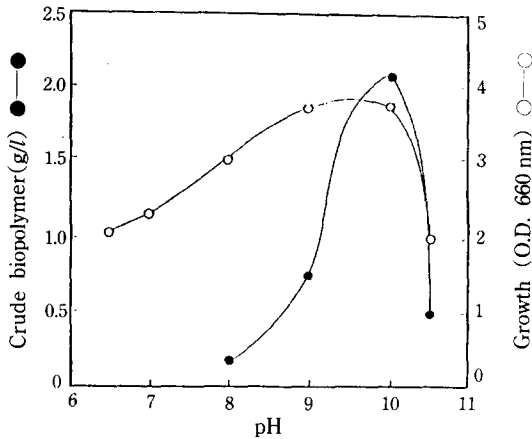


Fig. 1. Effect of the initial pH on the biopolymer production and cell growth

결과 Table 2에서와 같이 균체생육 및 생물고분자 생산은 접종비 3%에서 가장 높았다.

한편, 산소공급 조건의 생물고분자 생산에 관한 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

배지 액량 50 ml에서 가장 높은 균체생육 및 생물고분자 생산을 나타내었으며 배지 액량의 증가에 따라 감소하여서 호기조건이 생물고분자 생산의 큰 영향인자가 됨을 보였다. 그러나 최적 배지 액량은 생산성을 고려하여 150 ml로 하여 이하의 실험을 하였다. 대부분의 상업적 생물고분자 생산균주는 호기성 또는 통성 혐기성균으로 혐기 조건하에서는 에너지 생산의 낮은 효율 때문에 산소가 제한되지 않을 때 생물고분자의 생성이 높은 것으로 보고⁽¹⁶⁾되고 있다.

또, pH는 생물고분자 생산의 중요 인자이므로 생물고분자 생산 및 균체증식에 미치는 초기 pH의 영향을 검토하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다.

균체는 비교적 넓은 범위의 pH 6.5~10.5에서 생육하였으나 생물고분자의 생산은 pH 8.0~10.5에 따라 매우 민감하였으며 균체생육의 최적 pH는 9~10, 생물고분자 생산의 최적 pH는 10으로 호알카리 발효의 특징을 보였다. 알카리 발효법은 알카리 환경하에서 생육하는 호알카리 미생물에 의한 발효법으로 1969년 Horikoshi와 Akiba⁽¹⁷⁾에 의하여 최초로 개발된 발효법이며, 지금까지

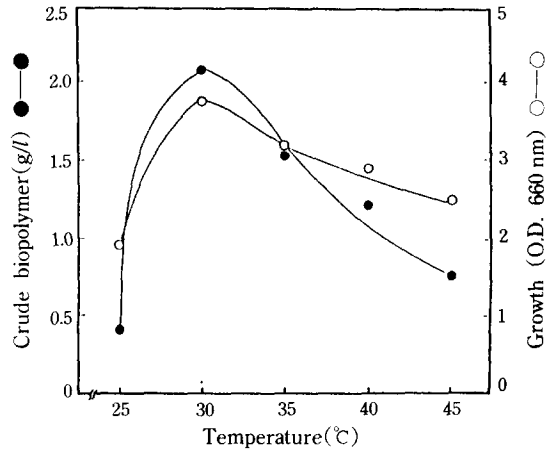


Fig. 2. Effect of temperature on the biopolymer production and cell growth

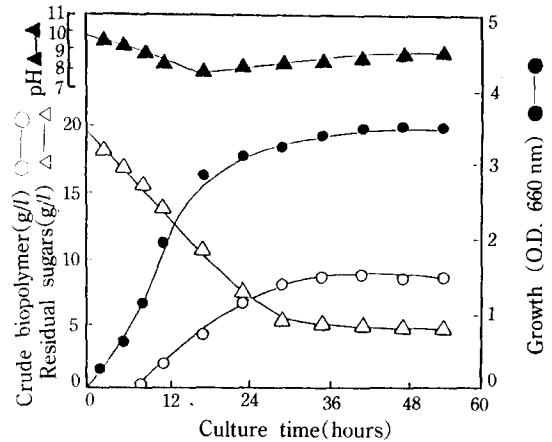


Fig. 3. Time course of biopolymer production by the isolated strain

알카리 발효법에 의한 미생물 생물고분자 생산에 관한 연구는 보고된 바 없다. 그 동안 미생물 생물고분자의 생합성 최적 pH는 세균의 경우 6.0~7.5, 곰팡이의 경우 4.0~5.5로 주로 중성 또는 약산성인 것으로 보고⁽¹⁴⁾되었다.

한편, 생물고분자 생산 및 균체증식에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다.

균체생육 및 생물고분자 생산은 온도에 매우 민감하였으며 모두 30°C에서 최적이었다고 일반적으로 생육 최적온도와 생물고분자 생산의 최적온도는 거의 비슷하다고 한 보고⁽¹⁶⁾ 사실과 잘 일치하였다. 또 이 온도범위는 다당생산 균주인 다른 *Bacillus*속 균주의 최적 배양온도와도 잘 일치하였다^(4,7). Murao들⁽⁴⁾은 *Bacillus subtilis* FT-3 균주의 생물고분자 생산은 30°C에서 최적이라 하였고, Mistuda들⁽⁷⁾도 *Bacillus polymyxa* 균주에서 생육 최적온도는 30°C, 생물고분자 생산의 최적온도는 28°C라

Table 4. Effect of carbon sources on the biopolymer production and cell growth

Carbon sources	Biopolymer (g/l)	Growth
None	0	±
Xylose	0.07	+
Glucose	2.10	+
Fructose	1.70	++
Maltose	4.25	+
Sucrose	1.50	++
Soluble starch	5.50	+

Table 5. Effect of organic and inorganic nitrogen sources on the biopolymer production and cell growth

Nitrogen sources	Biopolymer (g/l)	Growth
None	0	±
Polypeptone	11.25	+
Soybean meal	10.75	+
Yeast extract	20.00	++
Tryptone	13.25	++
Beef extract	3.75	±
Malt extract	3.75	±
Peptone	5.00	+
Yeast extract + tryptone(1 : 1)	30.00	++
Yeast extract + polypeptone(1 : 1)	24.35	++
Tryptone + polypeptone(1 : 1)	17.50	++
(NH ₂) ₂ CO	0	±
(NH ₄) ₂ CO ₃	0	±
NaNO ₃	0	±
KNO ₃	0	±
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	±
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0	±
(NH ₄)NO ₃	0	±

Concentration of organic nitrogen : 0.5%(w/v)
 Concentration of inorganic nitrogen : 0.1%(w/v)

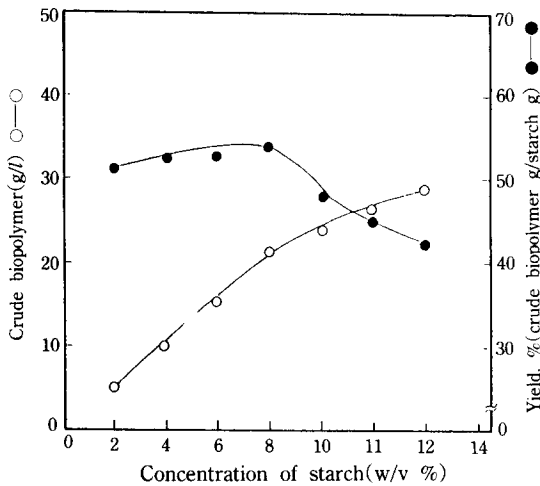


Fig. 4. Effect of soluble starch concentration on the biopolymer production

하였다.

생물고분자 생산에 미치는 배양시간의 영향을 살펴보기 위하여 배양 경시변화를 검토한 결과는 Fig. 3과 같다.

배양 초기기질의 급격한 소비와 더불어 균체의 생육도 활발히 진행되어 18시간 이후 일정값에 도달하였다. 생물고분자는 배양초기 pH가 감소되었다가 다시 증가하기 시작하는 12시간 이후 균체의 생육과 비례하여 생산량이 증가하였으며 36시간 이후 거의 일정한 최대값에 도달하였다.

따라서 이상의 결과로부터 집중비 3%, 배지액량 150 ml, 배양시간 36시간, 배양액의 pH 10 및 배양온도 30 °C를 진탕배양의 기본조건으로 설정하였으며, 이하의 최적 배지조성의 검토조건으로 하였다.

최적 배지조성

각종 당류를 탄소원으로 하여 균체생육 및 생물고분자 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 4와 같다.

균체의 생육은 fructose, sucrose 등 단당 또는 이당류에서 가장 좋았으나 생물고분자의 생산은 soluble starch에서 가장 높았다. 또, 전분의 농도를 달리하여(2~14

%) 생물고분자 생산량 및 대당수율을 검토한 결과에서는 Fig. 4와 같이 전분농도 8% 이상이 되면 집도 증가로 발효진행이 어려워 미미한 생물고분자 생산량의 증가를 보였고 대당수율은 급격히 저하하였다. 고농도에서의 대당수율의 감소는 탄소원의 생물고분자로의 전환효율과 관계되는 것으로 보이며, *X. campestris*에 의한 xanthan 생산에서도 탄소원인 포도당 농도가 증가함에 따라 포도당의 다당으로의 전환효율이 크게 감소한다고 보고되고 있다¹⁶⁾.

각종 유기 및 무기질소원이 균체생육과 생물고분자 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 5와 같다. 무기질소원에서는 생물고분자 생산이 인정되지 않았으나 유기질소원은 모두 생물고분자 생산에 영향을 주었다. Yeast extract-tryptone(각 0.25%)의 조합에서 약 30 g/l로 생물고분자 생산이 가장 양호하였으므로 이의 첨가농도의 영향을 검토한 결과 yeast extract와 tryptone을 각각 1%씩 총 2% 첨가하였을 때 42.25 g/l로 가장 많은 생물고분자를 생산하였으며 이 이상의 농도에서는 감소하였다. 고농도에서의 생물고분자 생산의 감소는 과량의 질소원이 존재할 경우 발효중에 mass transfer가 방해되기 때문인 것으로 추정된다. 한편 이 농도에서 yeast extract와 tryptone의 비를 달리하였을 때는 Fig. 5에서와 같이 yeast extract와 tryptone을 각각 1.34%(w/v) 및 0.66%(w/v)로 첨가한 경우에서 가장 많은 생물고분자를 얻을 수 있었으며 생물고분자 생산량은 약 45 g/l이었다.

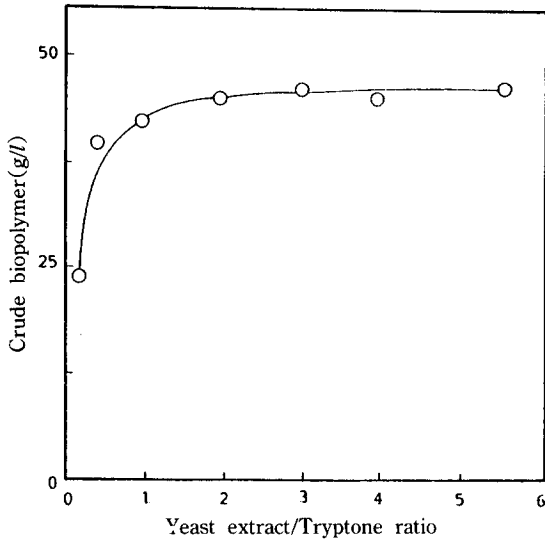


Fig. 5. Effect of the yeast extract and tryptone ratio on the biopolymer production

그러나 Table 6에서 보는 바와 같이 무기질소원이 yeast extract 및 tryptone과 공존하는 경우에는 생물고분자 생산의 증가를 보였으며 암모니아 상태의 질소보다는 NO₃염 형태의 질소원에서 다소 높은 경향이였다. 이러한 결과는 Mitsuda들⁽⁷⁾이 *Bacillus polymyxa*에 의한 다당 생산 연구에서 무기질소원 단독으로는 다당생산이 없었으나 polypeptone 0.5%와 공존한 경우 다당생산이 크게 증가되었다는 보고와 잘 일치한다.

그러므로 33.75 g/l 최대의 생물고분자 생산을 보였던 yeast extract-NaNO₃의 첨가농도를 달리하여 다당생산에 미치는 영향을 검토하였으며 그 결과는 Table 7과 같다. Yeast extract 0.75%와 NaNO₃ 0.1%일 때 39.25 g/l의 최대생산량이 얻어졌으나 yeast extract-tryptone 각 1.34 및 0.66%의 조합에서 얻은 결과(45 g/l)보다는 다소 낮았다.

이상에서 얻어진 질소원의 최적농도를 탄소원의 농도와 관련지어 C/N비로 비교하면 yeast extract-tryptone의 경우는 4 : 1, yeast extract-NaNO₃는 9.4 : 1로 비교적 낮은 C/N비를 나타내는 특징을 보였다. 일반적으로 질소원은 균체생육과 다당생산에 모두 필요하나 과잉 질소원은 기질의 다당으로의 전환을 감소시켜 균에 따라 다르기는 하나 C/N비가 10 : 1로 제한된 경우에 다당생산이 높은 것으로 보고되고 있다⁽⁸⁾. 그러나 Burton들⁽¹⁹⁾은 *Rhinochadiella mansonii* NRRL 7-6272에 의한 다당 생산 균주에서 고농도 질소원이 필요하다고 하였으며 이는 다당이 amino당으로 구성되어 있기 때문이라 하였다.

그러므로 생물고분자 생산은 yeast extract-tryptone에서 가장 높았으나 실제 산업적 발효에서는 질소원 농도가 낮은 것이 유리하므로 C/N비가 높았던 yeast extract

Table 6. Effect of inorganic nitrogen sources on the medium containing organic nitrogen sources

	Biopolymer(g/l)			
	None	(NH ₄) ₂ SO ₄	NaNO ₃	KNO ₃
Yeast extract(0.5%)	20.00	30.00	33.75	29.25
Tryptone(0.5%)	13.25	17.25	21.25	18.75
Polypeptone(0.5%)	11.25	16.25	16.25	19.75
Yeast extract(0.25%) + tryptone(0.25%)	30.00	29.50	31.00	29.25
Yeast extract(0.25%) + polypeptone(0.25%)	24.35	25.00	27.25	22.50
Tryptone(0.25%) + polypeptone(0.25%)	17.50	19.00	19.70	15.30

Table 7. Effect of concentrations of nitrogen sources on the biopolymer production

Yeast extract (w/w%)	Biopolymer(g/l)			
	NaNO ₃ (w/v%)			
	0	0.1	0.3	0.5
0.10	2.50	7.50	2.50	2.50
0.25	10.50	17.50	11.75	10.00
0.50	20.00	32.50	19.00	18.25
0.75	30.60	39.25	31.75	29.75
1.00	30.00	37.25	31.25	26.25

0.75%-NaNO₃ 0.1%를 최적질소원 조성으로 하였다.

생물고분자 생산에 미치는 각종 무기염류의 영향을 살펴본 결과는 Table 8과 같다.

0.1% MnSO₄·7H₂O 첨가시는 균체생육은 좋았으나 생물고분자 생산은 무첨가시 보다 크게 저하됨을 보였다. 그러나 다른 무기염류에 대해서는 모두 무첨가시 보다 생물고분자 생산에 다소 높은 효과를 보였으며 MgSO₄·7H₂O와 NaCl에서 가장 많은 량을 생산하였다.

한편, 각종 무기염류중 가장 효과가 컸던 Mg²⁺와 Na⁺를 농도별로 첨가하여 균체생육 및 생물고분자 생산에 미치는 영향을 조사한 결과에서는 농도에 따른 뚜렷한 차이는 없었으나 0.05% Mg²⁺에서 최대의 다당 생산(44.25 g/l)을 나타내었으며 이 이상의 농도에서는 오히려 감소하였다.

이상의 결과로부터 생물고분자의 최대 생산량은 soluble starch 8%, yeast extract 0.75%, NaNO₃ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05% 및 Na₂CO₃ 1%(pH 10)로 추정하였으며, 본 배지에서 배양온도 30°C에서 36시간 이상 진탕배양(120 rpm)하였을 때 생물고분자 생산량은 약 44 g/l(대당수율 약 55%)의 최대값을 나타내었다.

반응 표면분석에 의한 생물고분자 생산의 최적조건

반응 표면분석은 독립변수가 복합적인 작용을 하므로서 종속변수에 영향을 주고 있을 때, 이러한 반응의 변화가 이루는 반응 표면에 대한 통계적인 분석방법으로,

Table 8. Effect of inorganic salts on the biopolymer production and cell growth

Inorganic sources (w/v%)	Biopolymer (g/l)	Growth
None	30	+
MgSO ₄ ·7H ₂ O	44.45	++
NaCl	42.50	++
K ₂ HPO ₄	40.75	+
KH ₂ PO ₄	39.00	+
MnSO ₄ ·5H ₂ O	20.25	++
CaCl ₂	37.00	+
FeSO ₄ ·7H ₂ O	34.50	+

Table 9. Least-square estimation of dependent variables

No	Y(I)	YE(I)	YR(I)
1	18.59	19.50	-0.9119
2	47.58	46.71	0.8744
3	15.01	14.71	0.2994
4	24.30	21.92	2.3794
5	43.58	44.96	-1.3794
6	49.24	48.54	0.7006
7	21.65	21.52	0.1256
8	53.10	51.19	1.9119
9	66.29	66.84	-0.5583
10	9.53	9.98	-0.4463
11	15.30	15.28	0.0212
12	16.40	17.42	-1.0213
13	40.74	42.80	-2.0588
14	35.21	34.15	1.0587
15	41.04	41.29	-0.2500
16	41.04	41.29	-0.2500
17	41.04	41.29	-0.2500
18	41.04	41.29	-0.2500

Y(I) : Experimental results of biopolymer concentration (g/l), YE(I) : Estimated values of biopolymer concentration(g/l) by least-square method, YR(I) : Residue of biopolymer

독립변수와 종속변수간의 함수관계를 자료로부터 추정하여 독립변수값의 변화에 따른 종속변수값의 예측 또는 독립변수값의 어떤 값에서 반응량이 최적화 될 수 있는가를 탐색할 수 있는 방법이다^(12, 15).

따라서 본 연구에서는 C/N비, 온도 및 pH를 독립변수로 그리고 생물고분자 생산량을 종속변수로 하여 생물고분자 생산의 최적값을 반응 표면분석법에 의하여 산출하였으며, 그 결과를 Table 9~11 및 Fig. 6, 7에 나타내었다.

Table 9는 입력자료인 생물고분자 생산량의 실험값(Y(I))으로부터 최소자승법에 의하여 생물고분자 생산의 추정값(YE(I))을 구하고 Y(I)와 YE(I)의 잔차를 산출한 결과이며, 추정값의 최대치는 66.84 g/l였다.

독립변수의 입력자료와 Table 9의 추정값을 이용하여

Table 10. Values of regression coefficients calculated for the biopolymer production

Regression coefficient	Standard error	T-value	Stationary points
Beta0	41.290	0.774	53.314**
Beta1	14.217	0.401	35.469**
Beta2	-0.536	0.401	1.336
Beta3	2.162	0.401	5.394**
Beta11	-0.720	0.343	2.098**
Beta12	0.761	0.567	1.343
Beta13	-0.146	0.567	0.258
Beta22	-6.235	0.343	18.165**
Beta23	1.099	0.567	1.938*
Beta33	-0.704	0.343	2.050*

Coefficient of determination=0.9976

$$Y = 41.290 + 14.217X_1 + 2.612X_3 - 0.720X_1^2 - 1.009X_2^3 - 0.704X_3^3$$

Table 11. ANOVA table for the biopolymer production

Factor	Square sum	Degree of freedom	Square mean	Fo
Regression	4239.23	9	471.025	183.24**
Error	20.56	8	2.571	
Total	4259.79	17		

**Significance at p>0.99

다중회귀분석을 행한 결과는 Table 10과 같으며 표에서 볼 수 있는 바와 같이 2차의 회귀식을 사용했을 때 유의성이 있었고 0.9976의 다중회귀계수를 얻을 수 있었다. 이를 식으로 나타내면 다음 식과 같다.

$$Y = 41.290 + 14.217X_1 + 2.612X_3 - 0.720X_1^2 - 6.235X_2^2 + 1.009X_2X_3 - 0.704X_3^2$$

한편 Table 11은 종속변수와 독립변수들의 다중상관계수와 잔차를 요인으로 하여 이 식의 종속변수 변량에 대한 독립변수의 영향을 검토한 분산분석(ANOVA ; Analysis of Variance)의 결과이다.

다중상관계수(REGRE)의 제곱합은 4239.23, 잔차(RES1)의 제곱합은 20.56으로 99.5%의 정확성을 나타내었다.

또 유의수준을 검정하는 자유도와 F-value도 양호한 값(p>0.99)을 나타내어 종속변수와 독립변수의 상관관계는 뛰어난 것을 알 수 있었으며 따라서 위에서 얻은 2차 회귀식의 각 변수들 사이에는 유의성이 높음을 알 수 있었다.

위 식을 미분하여 정상점을 구한 결과 정상점은 C/N비 15.16, 온도 34.62°C 및 pH 9.50의 값에서 얻어졌으며, 이때 생물고분자 생산량은 66.84 g/l로 추정되었다.

한편 C/N비와 온도의 변화에 따른 생물고분자 생성

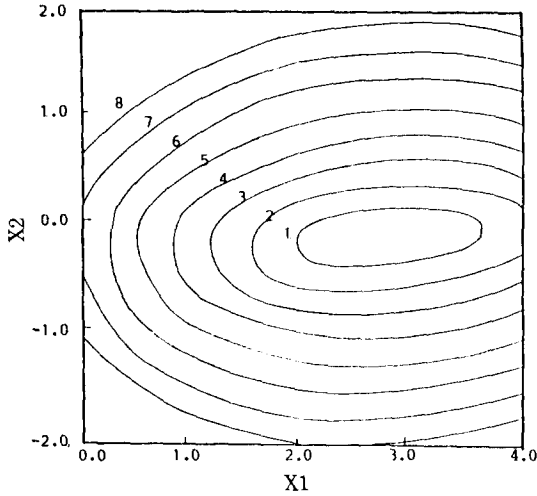


Fig. 6. Contour plot of C/N ratio (X1) versus temperature (X2) for biopolymer
 Y1=66.84, Y2=64.06, Y3=61.27, Y4=58.49, Y5=55.70,
 Y6=52.92, Y7=50.13, Y8=47.35

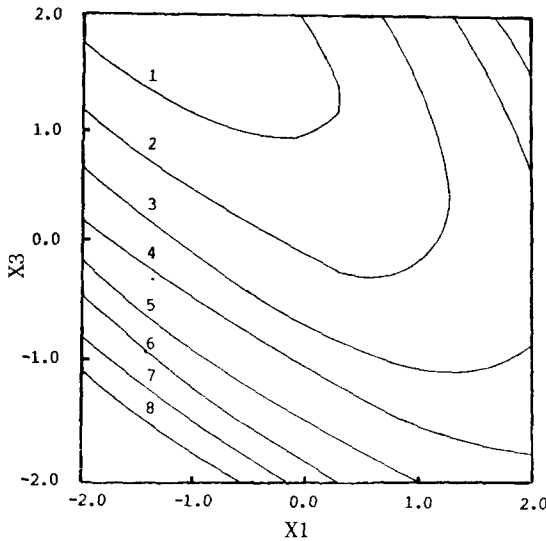


Fig. 7. Contour plot of C/N ratio (X1) versus pH (X3) for biopolymer
 Y1=66.84, Y2=64.06, Y3=61.27, Y4=58.49, Y5=55.70,
 Y6=52.92, Y7=50.13, Y8=47.35

량을 등고선으로 나타낸 결과인 Fig. 6을 살펴보면 생물고분자 생산량은 C/N비 보다는 온도에 더 민감함을 보였고 정상점 부근에서 비교적 안정하여 정상점에서 멀어질수록 생물고분자 생산은 급격히 감소하였다.

C/N비와 pH에 따른 생물고분자 생산의 등고선 변화 양상도 Fig. 7과 같이 Fig. 6의 경우와 비슷하게 pH의 영향이 큰 것으로 나타났고, 또, 그림으로 나타내지는 않았지만 온도와 pH에 따른 변화양상은 pH의 영향이

더 큰 것으로 나타났다. 따라서 생물고분자 생산은 pH에 가장 큰 영향을 받았으며 온도에 따라서는 다소 영향을 받았으나 오히려 C/N비에는 거의 영향을 받지 않음을 알 수 있었고 최적 생물고분자 생산조건을 다음 식으로 표현할 수 있었다.

$$Y = 41.290 + 2.612X_3 - 6.235X_2^2 + 1.009X_2X_3 - 0.704X_3^2$$

요 약

토양으로부터 생물고분자의 생산균주로 분리한 알칼리 내성 *Bacillus* sp.의 생물고분자 생산을 위한 최적 배양 조건을 검토하였고, 반응 표면분석법에 의한 생산 최적화를 수행하였다. 최대의 생물고분자 생산은 soluble starch 8%, yeast extract 0.75%, NaNO₃ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05% 및 Na₂CO₃ 1%(pH 10)의 조성배지에서 배양 온도 30°C로 36시간 이상 진탕배양하였을 때 얻어졌으며, 이때의 생물고분자 생산량은 약 44 g/l(대당수율로는 약 55%)이었다. C/N비, 온도 및 pH를 독립변수로 한 반응 표면분석에 의한 생물고분자 생산의 최적조건은 C/N비 15.16, 배양 온도 34.62°C 및 pH 9.50의 정상점에서 얻어졌으며, 이 조건에서 생물고분자의 생산량은 66.84 g/l로 추정되었다.

감사의 말

본 연구는 한국학술진흥재단의 1989년도 자유공모과제 연구비 지원에 의하여 수행된 바 재단에 깊은 사의를 표합니다.

문 헌

1. 이신영, 이범수, 신원철, 권익부, 유주현: 생물고분자 생산 알칼리내성 균주의 분리 및 특성. 한국식품과학회지, 23, 161(1991)
2. Ninomiya, E. and Kizaki, T.: Highly viscous polysaccharide produced by *Bacillus polymyxa* No.271. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 44, 270(1970)
3. Shioda, A., Yasuda, K., Kaneko, Y. and Doi, S.: Studies on the production of polysaccharides by microorganism(III). *J. Ferment. Technol.*, 49, 30(1971)
4. Muraio, S., Morita, N. and Takahara, Y.: Sugar component of the polysaccharide produced by *Bacillus subtilis* FT-3. *J. Ferment. Technol.*, 51, 653(1973)
5. 村尾澤夫, 鹽澤朝夫, 高原義之, 橋本光木: 日本特許公告, 52-12789(1977)
6. 石川秀雄, 木村良和, 鈴木茂生: 日本特許公告, 52-4635(1977)
7. Mitsuda, S., Miyata, N., Hirota, T. and Kikuchi, T.: High-viscosity polysaccharide produced by *Bacillus polymyxa*. *J. Ferment. Technol.*, 59, 303(1981)
8. Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F.: *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, p.3(1986)
9. 中村道德, 鈴木繁男: 澱粉科學ハンドブック. 朝倉書店,

- 東京, p.190(1980)
10. Nedeltscheva, M., Stoilkov, G. and Popova, S. : A modified analysis method of starch determination by iodine spectrophotometry. *Starch*, **27**, 27, 298(1975)
 11. 松田和雄 : 多糖の分離・精製法. 學會出版センター, 東京, (1987)
 12. Cochran, W.G. and Cox, G.M. : *Experimental Designs*. John Wiley & Sons, Inc., p.343(1957)
 13. MaDaniel, L.E., Bailey, E.C., Ethira, J.S. and Andrew, H.P. : Application of response surface optimization techniques to polyene macrolide fermentation studies in shake flasks. *Dev. Ind. Microbiol.*, **17**, 91(1976)
 14. Greasham, R. and Inamine, E. : Nutritional improvement of processes. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Demain, A.L. and Solomin, N.A. (ed), American Society for Microbiology, Washington, D.C., p.41(1986)
 15. 朴聖炫 : 現代實驗計劃法. 大英社, p.573(1986)
 16. Kang, K.S. and Cottrell, I.W. : Polysaccharides. In *Microbial Technology*, Pepler, H.J. and Perlman, D.(ed), Academic Press, New York, Vol.1, p.417(1979)
 17. Horikoshi, K. and Akiba, T. : *Alkalophilic Microorganisms : A New Microbial World*. Japan Scientific Co. Press, Tokyo, p.1(1982)
 18. Brierley, C.L., Kelly, D.P., Seal, K.J. and Best, D.J. : Materials and biotechnology. In *Biotechnology : Principles and Applications*, Huggins, J., Best, D.J. and Jones, J.(ed), Blackwell Scientific Pub., Oxford, p.163 (1985)
 19. Burton, K.A., Cadmus, M.C., Lagada, A.A., Sandford, P.A. and Watson, P.R. : A unique biopolymer from *Rhinoctadiella mansonii* NRRL Y-6272 : Production in 20 liter fermentors. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1669(1976)
-
- (1990년 12월 24일 접수)