

호알카리성 *Alcaligenes* sp.의 배양에 의한 γ -PGA의 생산

이 신 영 · 강 태 수 · *김 갑 수
강원대학교 공과대학 발효공학과
*샘표식품(주) 기술개발부

γ -PGA Production by Cultures of Alkalophilic *Alcaligenes* sp.

Shin-Young Lee, Tae-Su Kang and *Kap-Soo Kim

Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
*Research Lab., Sampyo Foods Co. Ltd., Seoul 132-040, Korea

ABSTRACT

Methods for production of γ -polyglutamic acid (γ -PGA) by an alkalophilic *Alcaligenes* sp. were investigated for batch and continuous culture processes. Both quantity and productivity of γ -PGA by *Alcaligenes* sp. in batch culture were gradually increased with the increase of glucose concentration up to 50g/l, but the maximal production yield of 63% was obtained at 10g/l of glucose concentration. The highest specific growth rate was about 0.25hr⁻¹ at 50g/l of glucose concentration, and substrate inhibition was observed at above 50g/l of glucose concentration. The highest γ -PGA formation about 11g/l in a batch system was obtained at 31°C, pH 10.0 and 87rpm. Productivity of 2.80g/l/hr for continuous cultivation was 9 times higher than the productivity for batch cultivation.

서 론

미생물이 생산하는 γ -PGA(polyglutamic acid)는 폴리펩타이드계 생분해성 고분자로 납두 점성의 주요인 성분이다(1, 2). 이 γ -PGA는 생분해성을 가질 뿐 아니라 인체에 대한 독성이 낮고, 비교적 싼 가격으로 생산할 수 있는 등 고분자로서의 우수한 특성을 가지므로 최근 환경문제의 심각성이 고조되면서 앞으로 생분해성 고분자의 소재연구에 매우 적합한 재료인 것으로 생각되고 있다(3-7).

그러나 γ -PGA의 성질은 불분명한 점이 많고 또, 생산균은 *Bacillus*속 균주에만 한정되어 있는 것으로 보고(8-18)되었는데, 전보(19)에서 저자 등은 호알카리성의 *Alcaligenes*속으로 동정된 한 균주가 pH 10의 알카리성에서 γ -PGA(γ -polyglutamic acid)를 발효생산함을 보고하였다.

지금까지 호알카리성 *Alcaligenes* sp.에 의한 γ -PGA 생산에 대한 연구는 없고, 또 알카리성에서의 발효생산이나 연속배양에 의한 보고예도 없다.

따라서 본 연구에서는 이 호알카리성 *Alcaligenes* sp.의 회분 및 연속배양에 의한 γ -PGA의 대량 생산성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에서 사용한 균주는 전보(19)에서 보고한 호알카리성의 *Alcaligenes* sp.이며 전보(19)에서와 마찬가지로 Akiba(20) 등의 한천 사면배지에서 30°C로 12시간 배양한 후 4°C에서 보존하였고, 4주마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

배지

전 배양 및 본 배양의 배지는 γ -PGA 생산을 위한 최적 배지로 보고(21)한 바 있는 포도당 10g/l, polypeptone 40g/l, KH₂PO₄ 2g/l, Na₂CO₃ 10g/l의 조성을 갖는 pH 10.0의 배지이며, 121°C에서 15분간 가압 살균하여 사용하였다.

회분배양 방법

회분배양은 생산용 배지 50ml을 함유한 250ml 삼각플라스크에 전 배양액 5%(v/v)을 접종한 후, 30°C에서 120rpm으로 48시간 배양하였다. 전 배양액은 보관중인 균주를 백금이로 보존용 배지 20ml를 함유한 100ml 삼각플라스크에 1회 접종하고, 30°C에서 15시간 진탕배양하여 사용하였고, 배지조성 중 탄소원인 포도당의 농도를 각각 달리하여 생산수율 및 비증식 속도를 구하였다.

γ -PGA 생산의 최적 회분배양 조건

γ -PGA 생산의 최적 회분배양 조건은 온도, pH 및 회전속도(rpm)를 독립변수로 그리고, γ -PGA 생산량을 종속변수로 하여 Table 1과 같이 21개의 처리조합으로 이루어진 중심합성 계획법(22-24)으로 실험을 행하고 박(25)의 반응표면분석 프로그램을 응용하여 퍼스널 컴퓨터(IBM PC/AT)로 처리하였다.

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

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

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

본 실험의 경우 3개의 독립변수를 사용하였으므로 K값은 3이며 X₁, X₂ 및 X₃는 각각 온도, pH 및 교반 회전수를 나타낸다. X₁, X₂ 및 X₃의 각 독립변수는 수준을 5로 하고(Table 1 참조) 계산의 편의를 위하여 다음 식(2)-(4)를 사용하여 -2~+2 범위의 code value를 갖도록 선형화하였으며, 각 실험자료에 대한 분산분석(ANOVA: Analysis of Variance)과 잔차를 구하였다.

$$X_1 \text{code} = (X_{1\text{exp}} - 30) / 5 \dots\dots\dots (2)$$

$$X_2 \text{code} = (X_{2\text{exp}} - 10) / 1 \dots\dots\dots (3)$$

$$X_3 \text{code} = (X_{3\text{exp}} - 85) / 30 \dots\dots\dots (4)$$

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

Variables	Variable levels				
	-2	-1	0	1	2
Temperature(X ₁)	20	25	30	35	40
pH(X ₂)	8	9	10	11	12
Agitation(X ₃)	25	55	85	115	145
Treatment No.	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
19	0		0		0
20	0		0		0
21	0		0		0

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

연속배양

연속배양은 2.6 l의 jar fermentor(Marubishi MD-250)를 사용하여 working volume 1 l에 전배양액 5%(v/v)를 접종하였고, 31°C, pH 10, 통기속도 2.2vvm 그리고 교반속도 90rpm의 조건하에서 약 20시간 동안 회분배양한 다음, 회석물을 0.1-0.5hr⁻¹로 조절하면서 연속배양하였다. 연속배양은 연속배양조에서 회분배양으로 대수기 말기에 도달하였을 때(15시간) 시작하였으며, 각 경우 정상상태는

균체농도를 측정하여 확인하였다.

분석방법

균체량은 배양액을 5 또는 10배로 희석하고 spectrophotometer(Spectronic 20, Milson Roy Co.)로 660nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다. 또, 배양액중의 잔존 포도당의 농도는 DNS(dinitrosalicylic acid)법 또는 glucose oxidase법으로 정량하였다(26, 27).

한편, γ -PGA의 분리 및 정량은 다음과 같이 행하였다(19). 배양액을 2배로 희석하고 15,000rpm에서 60분간 원심분리하여 균체를 제거하였다. 상등액 부피의 2배량에 상당하는 acetone을 첨가하여 침전을 얻었으며, 이를 다시 증류수에 용해시켰다. 다시 acetone으로 침전하여 침전물을 drying oven에서 105°C로 함량이 될 때까지 건조시킨 후 crude γ -PGA를 얻었다.

결과 및 고찰

회분배양

γ -PGA 생산용 최적 배지(20)를 사용하여 회분배양의 경시변화를 검토한 결과는 Fig. 1과 같다.

배양초기 탄소원 기질의 급격한 소비와 더불어 균체의 생육도 활발히 진행되어 30시간 이후 일정값에 도달하였다. γ -PGA는 배양 초기 pH가 감소되었다가 다시 증가하기 시작하는 20시간 이후 균체의 생육과 비례하여 생산량이 증가하였으며, 40시간 이후 거의 일정한 최대값에 도달하였다.

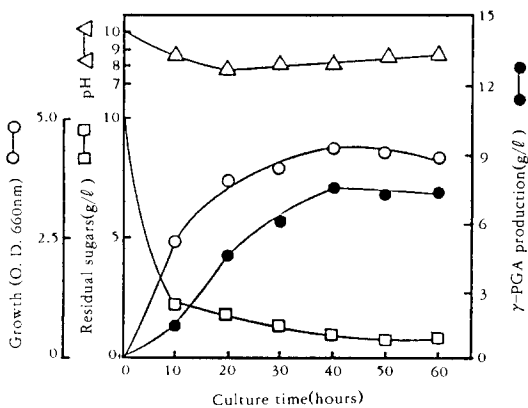


Fig. 1. Time course of the γ -PGA production and growth behavior of *Alcaligenes* sp. from modified medium under batch cultivation.

일반적으로 다당류와 같은 생물고분자는 C/N비가 높을수록 생산량이 증가하므로(28) 질소원 농도를 고정시키고, 포도당 농도를 증가시키면서(5-110g/l) 균체생육 및 γ -PGA 생성량을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다.

균체량은 포도당의 농도증가에 따라 완만한 증가 경향을 보였으나, γ -PGA의 생산량은 포도당 농도 50g/l 까지 증가하다가 거의 일정한 최대값을 나타내었다. γ -PGA의 최대 생산량은 포도당의 농도 50g/l 에서 약 12g/l 이었다. 이를 C/N비로 나타내어 살펴보면 C/N비 1.25까지는 C/N비 증가에 따라 γ -PGA 생성량도 증가되나 이 이상에서는 γ -PGA 생성량은 거의 일정한 값 범위이었다. 본 고분자는 C/N비가 클수록 그 생성량이 높아지는 대부분의 다당류(28)와는 달리 낮은 C/N비에서 그 생성량이 높은 특징을 보였다. Burton(29) 등도 *Rhizocladia mansonii* NRRL Y-6272에 의한 다당 생산에서 낮은 C/N비의 유지가 필요하다고 하였으며, 이는 이 다당이 아미노당으로 구성되어 있기 때문이라 하였다.

한편, 서로 다른 포도당 농도에서 균체와 γ -PGA 생성에 따른 수율, 생산성 및 전환율을 산출한 결과는 Table 2와 같다.

포도당의 초기농도에 상관없이 모든 경우에서 약 97% 이상의 기질 전환율을 보여서 잔존 포도당의 농도는 초기농도에 관계없이 거의 소비됨을 보였다. 또, 포도당 농도가 증가할수록 기질 소비에 따른 균체 및 γ -PGA의 생산수율은 감소경향을 보였고, 생산성은 증가경향을 보였다. 생산성은 포도당 농도 50g/l 에서 0.30g/l/hr의 최대값을 얻을 수 있었

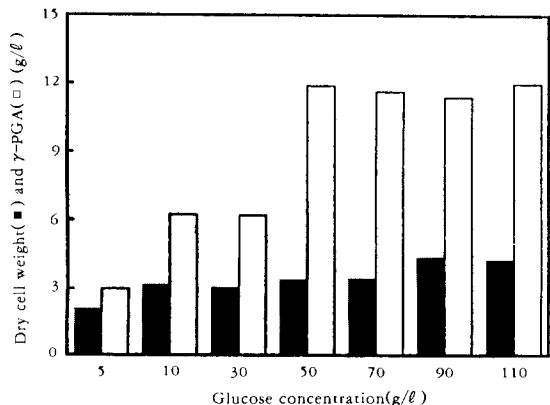


Fig. 2. Effect of glucose concentration on dry cell weight and γ -PGA production.

Table 2. Effect of glucose concentration on the γ -PGA production in batch culture.

포도당 concentration(g/l)	$Y_{P/S}$ *	$Y_{X/S}$ *	Productivity (g/l/h)	Substrate conversion(%)
5	0.62	0.42	0.078	99.8
10	0.63	0.32	0.156	99.8
30	0.24	0.11	0.180	98.5
50	0.24	0.07	0.300	97.9
70	0.17	0.05	0.291	97.0
90	0.13	0.05	0.285	96.5
110	0.11	0.04	0.300	97.9

* : Product yield

** : Cell growth yield

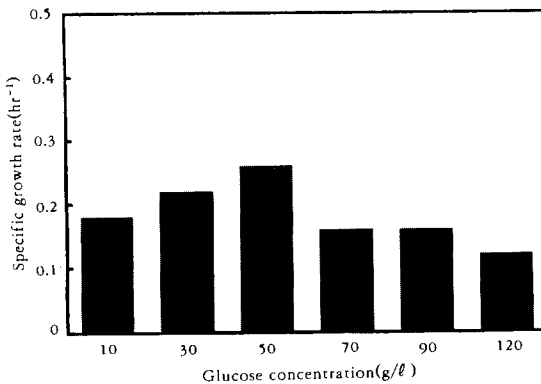


Fig. 3. Effect of glucose concentration on the specific growth rate by *Alcaligenes* sp.

으나 생산수율은 24%로 낮았고 균체수율도 매우 낮았다. 반면, 포도당 농도 10g/l에서는 비증식속도는 낮았으나 63%의 최대 생산수율 및 32%의 균체수율을 얻을 수 있었다.

아울러 기질 농도별 비증식속도를 구한 Fig. 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 균체의 비증식속도 μ 는 초기 포도당 농도가 증가함에 따라 증가하여 50g/l에서 약 0.25hr⁻¹의 최고값을 나타내나, 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하여 고농도의 기질에 의한 생육저해(substrate inhibition) 현상을 나타냄을 알 수 있었다.

그러므로 비증식속도는 낮았으나 최대의 생산수율을 보인 포도당 농도 10g/l를 최적 탄소원 농도로 하였으며, 이 농도에서의 최적 회분배양 조건을 구하기 위하여 온도, pH 및 회전속도(rpm)를 독립변수로 그리고 γ -PGA 생산량을 종속변수로 하여 γ -

Table 3. Least-square estimation of dependent variables.

No.	Y(I)	YE(I)	YR(I)
1	5.75	7.38	-1.6268
2	4.66	5.92	-1.2631
3	5.18	6.33	-1.1531
4	4.75	5.23	-0.4806
5	6.21	6.33	-0.1243
6	8.28	7.73	0.5482
7	5.27	4.61	0.6582
8	9.59	8.57	1.0219
9	6.09	6.48	-0.3938
10	4.98	3.98	0.9987
11	5.44	5.94	-0.5038
12	7.26	6.15	1.1087
13	2.61	3.79	-1.1763
14	5.48	3.70	1.7812
15	11.12	11.03	0.0878
16	11.13	11.03	0.0978
17	11.08	11.03	0.0478
18	11.20	11.03	0.1678
19	11.00	11.03	-0.0322
20	11.40	11.03	0.3678
21	10.90	11.03	-0.1322

Y(I) : Experimental results of biopolymer concentration (g/l)

YE(I) : Estimated values of biopolymer concentration (g/l) by the least-square method

YR(I) : Residues

Table 4. Values of regression coefficients calculated for the biopolymer production.

Regression coefficient	Standard error	T-value	Stationary points	
Beta 0	11.032	0.432	25.509**	
Beta 1	0.626	0.292	2.144**	Xo1 0.243 31.21
Beta 2	-0.052	0.292	-0.178	Xo2 0.018 10.02
Beta 3	0.022	0.292	0.075	Xo3 0.072 87.17
Beta11	-1.450	0.228	-6.372	
Beta12	0.364	0.413	0.881	
Beta13	0.989	0.413	2.396*	
Beta22	-1.246	0.228	-5.477	
Beta23	0.106	0.413	0.257	
Beta33	-1.822	0.228	-8.010	

Expected Y value = 11.05

Coefficient of determination = 0.9108

Table 5. ANOVA table for the biopolymer production.

Factor	Square Sum	Degree of Freedom	Square Mean	Fo
Regression	152.97	9	16.996	12.47**
Error	14.99	11	1.363	
Total	167.96	20		

** : significance at P>0.99

PGA 생산의 최저값을 반응표면 분석법에 의하여 조사하였다. 그 결과는 Table 3~5 및 Fig. 4, 5와 같다.

Table 4는 Table 3의 독립변수 입력자료와 추정값을 이용하여 다중회귀분석을 행한 결과로 표에서 볼 수 있는 바와 같이 2차 회귀식을 사용했을 때 유의성이 있었고, 0.9548의 회귀계수를 얻을 수 있었다. 이를 식으로 나타내면 다음 식과 같다.

$$Y = 11.032 + 0.626X_1 - 0.052X_2 + 0.022X_3 - 1.450X_1^2 + 0.364X_1X_2 + 0.989X_1X_3 - 1.246X_2^2 + 0.106X_2X_3 - 1.822X_3^2$$

한편, Table 4는 종속변수와 독립변수들의 다중상관계수와 잔차를 요인으로 하여 이 식의 종속변수 변량에 대한 독립변수의 영향을 검토한 분산분석(ANOVA)의 결과이다.

다중상관계수(REGRE)의 제곱합은 152.97, 잔차(RES1)의 제곱합은 14.99로 91.08%의 정확성을 나타내었다. 또, 유의수준을 검정하는 자유도와 F-값도 양호한 값(12.47 : p>0.99)을 나타내어 종속변수와 독립변수의 상관관계가 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 온도 31℃, pH 10 및 교반속도 87rpm의 값에서 얻어졌다. 이때 γ -PGA 생산량은 약 11g/l 이었고, 이는 자료화하지는 않았으나 위 조건으로 실험한 결과와도 잘 일치하였다.

한편, 온도와 pH의 변화에 따른 γ -PGA 생성량을 등고선으로 나타낸 결과인 Fig. 4를 살펴보면 γ -PGA 생산량은 pH보다는 온도에 더 민감함을 보였고, 정상점 부근에서 비교적 안정하여 정상점에서 멀어질수록 γ -PGA 생산은 급격히 감소하였다.

온도와 교반속도에 따른 γ -PGA 생산의 등고선 변화양상도 그림으로 나타내지는 않았지만 Fig. 4의 경우와 비슷하게 온도의 영향이 큰 것으로 나타났

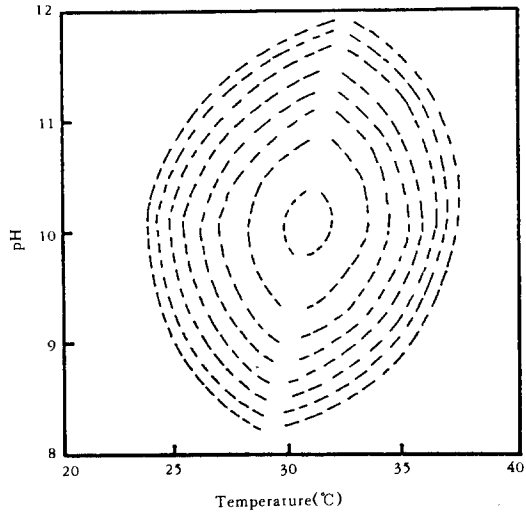


Fig. 4. Contour plot of pH versus temperature at different γ -PGA concentrations (g/l).

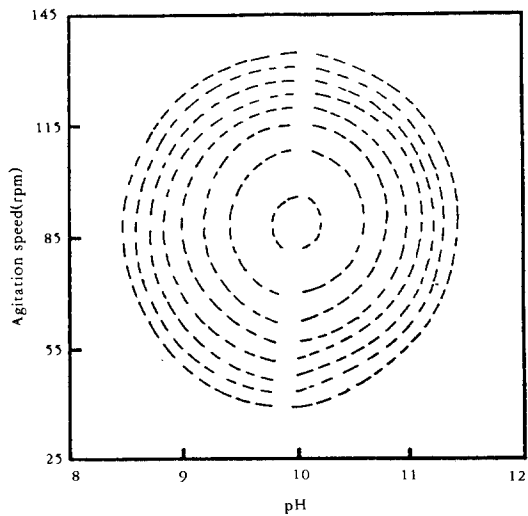


Fig. 5. Contour plot of pH versus rpm of agitation at different γ -PGA concentrations (g/l).

다. 또, Fig. 5는 pH와 교반속도에 따른 변화양상으로 서로 비슷한 영향을 미치는 것으로 나타났다.

따라서 γ -PGA 생산은 온도와 교반속도의 변화에 큰 영향을 받았으며, pH 변화에는 크게 영향을 받지 않음을 알 수 있었고, 회분배양에서의 최적 γ -PGA 생산조건을 다음 식으로 표현할 수 있었다.

$$Y = 11.032 + 0.626X_1 + 0.989X_1X_3$$

연속배양

γ -PGA의 생산 최적 배지 및 회분배양 조건을 이용하여 연속배양을 행한 결과는 Fig. 6과 같다.

희석률이 증가함에 따라 γ -PGA 생성량은 감소하는 경향이였으며, 희석률 0.5hr⁻¹에서는 wash out이 일어났다. γ -PGA의 최대 생산성은 희석률 0.40hr⁻¹에서 2.80g/ℓ/h로 회분배양의 0.30g/ℓ/h보다 약 9배의 큰 증가를 보였으며, 이 희석률에서의 γ -PGA 생성수율 Y_{PS}는 0.7이었다. 그러므로 working volume 1ℓ의 연속배양조에서 이 희석률로 회분배양과 같이 3~4일 배양할 경우 81~108g/ℓ의 γ -PGA를 얻을 수 있다. 이는 γ -PGA 생산에 있어서의 연속배양의 유효성을 입증해 주는 결과이며, 장기간에 걸쳐 생산을 할 때 연속배양에 의하여 γ -PGA의 대량생산이 가능함을 보여주는 사실이라 할 수 있다. 지금까지 *Bacillus*속 균종에 의한 γ -PGA 생산의 연속배양은 보고된 바 없으며, 회분배양시 최대의 γ -PGA 생산량도 *Bacillus subtilis* FO2-1에 의해 37℃, 3~4일의 shaking culture로 25~50g/ℓ가 얻어지는 것으로 보고되어 있다.

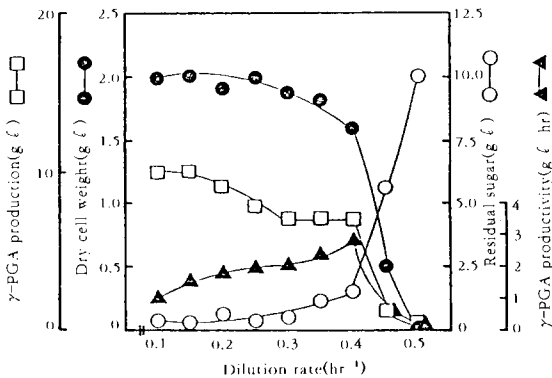


Fig. 6. Effect of dilution rate on dry cell weight, γ -PGA production, residual sugar and γ -PGA productivity during a continuous culture of *Alcaligenes* sp.

요 약

호알카리성 *Alcaligenes*속의 한 균종을 이용하여 peptide계 생분해성 고분자인 γ -PGA (polyglutamic acid)의 회분 및 연속배양에 의한 대량 생산성을 조

사하였다. 회분배양시 γ -PGA의 생성량 및 생산성은 포도당 농도 50g/ℓ 까지 포도당의 농도증가에 따라 증가하였으나 최대 생산수율은 10g/ℓ의 포도당 농도에서 얻어졌으며, 이때의 수율은 63%이었다. 또, 비증식속도는 포도당 농도 50g/ℓ에서 약 0.25hr⁻¹로 최대값을 나타냈으나, 이 이상의 농도에서는 고농도 기질에 의한 균체생육의 저해를 나타내었다. 온도, pH 및 교반속도(rpm)를 독립변수로 한 반응표면 분석에 의한 γ -PGA 생산의 최적 회분배양 조건은 배양온도 31℃, pH 10 및 회전속도 87rpm의 정상점에서 얻어졌으며, 이 조건에서 γ -PGA의 생산량은 약 11g/ℓ로 추정되었다. 연속배양의 경우 wash out은 희석률 0.5hr⁻¹에서 일어났으며, 희석률 0.40hr⁻¹일 때 최대 생산성을 나타내었고, 최대 생산성은 2.80g/ℓ/h로 회분배양보다 약 9배 높았다.

참 고 문 헌

1. 上肥 義治(1990), 生分解性 高分子材料, P. 11, 工業調査會, 東京.
2. 藤井 久雄(1986), 化學と 生物, **24**, 67.
3. R. B. Woodward and C. H. Schram(1947), *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1552.
4. 今堀 和友, 山川民夫(1975), 生化學辭典, P. 1205, (株)東京化學同人, 東京.
5. 藤本 康夫(1974), ポリアミノ酸 -應用と 展望-, 講談社サイエンティフィック, 東京.
6. G. Ivanovics and V. Bruckner(1937), *Z. Immunitatsforsch.*, **90**, 304.
7. M. Bovarnick(1945), *J. Biol. Chem.*, **145**, 415.
8. C. B. Thorne, C. G. Gomez, H. E. Nocys and R. D. Housewrite(1942), *J. Bacteriol.*, **168**, 307.
9. C. G. Leonard, R. D. Housewrite and C. B. Thorne(1957), *J. Bacteriol.*, **76**, 499.
10. C. B. Thorne, D. M. Molner and C. G. Gomez (1956), *Bacteriol. Proce. Soci. Am. Bacteriologist*, **107**, 67.
11. R. M. Ward, R. F. Anderson and F. K. Dean (1963), *Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 41.
12. G. P. Giadstone(1939), *Brit. J. Expt. Path.*, **20**, 189.
13. C. R. Brewer and W. G. Mcvillough(1945), *Arch. Biochem.*, **10**, 65.
14. C. B. Thorne, G. R. Blind and R. D. House-

- write(1953), *J. Bacteriol.*, **65**, 472.
15. 谷口 誠(1989), 特開平 1-174397.
 16. 喜田 節子, 橋田渡, 寺本四郎(1956), 醸工, **34**, 542.
 17. 藤井 久雄(1962), 日農化, **36**, 1000.
 18. 村尾 尺夫(1969), 高分子, **16**, 1204.
 19. 이신영, 강태수, 김갑수, 유주현(1993), peptide계 생분해성 고분자 생산균주의 분리 및 생성고분자의 특성, 한국생물공학회지, 출판중.
 20. T. Akiba and K. Horikshi, *Alkalophilic Microorganisms: A New Microbial World*, P. 1, Japan Scientific Co. Press, Tokyo(1982).
 21. 김갑수(1992), 호알카리성 *Alcaligenes* sp.에 의한 peptide계 생분해성 고분자 물질에 관한 연구, 강원대학교 대학원 박사학위논문.
 22. W. G. Cochran and G. M. Cox(1957), *Experimental Designs*, P. 343, John Wiley & Sons, Inc., New York.
 23. L. E. MaDaniel, E. C. Bailey, S. Ethiraj and H. P. Andrew(1976), *Dev. Ind. Microbiol.*, **17**, 91.
 24. R. Greasham and E. Inamine(1986), Nutritional Improvement of Processes. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, A. L. Demain and N. A. Solomon eds, p. 41, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 25. 朴聖炫(1986), 現代實驗計劃法, P. 573, 大英社.
 26. M. F. Chaplin and J. F. Kennedy(1986), *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, P. 3, IRL Press, Oxford.
 27. 中村道德, 鈴木繁男(1980), 澱粉科學ハンドブック, P. 190, 朝倉書店, 東京.
 28. C. L. Brierley, D. P. Kelly, K. J. Seal and D. J. Best(1986), *Biotechnology: Principles and Applications*, J. Huggins, D. J. Best and J. Jones, eds, P. 163, Blackwell Scientific Pub., Oxford.
 29. K. A. Burton, M. C. Cadmus, A. A. Lagada, P. A. Sandford and P. R. Waston(1976): *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1669.