

다당류, 메틸란, 발효배양액의 점성특성과 메틸란 생산에 미치는 교반속도의 영향

오덕근² · 임현수¹ · 김정희^{1*}

¹한국과학기술원 생물공학과, ²우석대학교 식품공학과

초록 : *Methylobacterium organophilum*을 이용하여 메탄올로부터 유가식 배양법으로 고점도 다당류인 메틸란(methylan)의 생산시, 메틸란 배양액의 점성특성과 산소전달속도와 메틸란 생산 수율과의 관계를 조사하였다. 균체 농도의 증가는 배양액의 점성에 거의 영향을 주지 않았으나 배양시간의 경과에 따른 메틸란의 축적은 배양액의 점성특성을 비뉴턴성으로 변화시키며 동시에 급격한 점도 증가를 보였다. 배양시간의 경과에 따른 같은 농도하에서 메틸란의 점도를 측정할 결과 배양시간이 증가함에 따라, 점도가 현저하게 증가하였고 pseudoplasticity 정도는 약간 증가하였다. 그 원인을 조사하기 위하여 메틸란 구성 성분의 화학조성을 분석하였다. 구성성분 중의 유기산(pyruvic acid, uronic acid, acetic acid)의 함량이 메틸란 생성 초기인 34시간에 10%에서 배양말기인 72시간에서는 17%로 증가하였다. 즉, (-)전하를 띠는 산의 함량이 증가함으로 인하여 메틸란 분자내 chain간의 전기적 반발로 인하여 수용액 상태에서 메틸란 분자의 hydrodynamic domain의 증가로 추측되었다. 이와같이 메틸란의 농도 증가에 따른 점도의 증가는 배양도중 산소전달속도($k_L a$)의 급격한 감소를 초래하여 균체증식과 메틸란의 생산을 감소시켰다. 그러나 균체의 메틸란 생산능력에는 큰변화가 없어 단위 균체당 메틸란 수율(P/X)은 큰 차이가 없었다. 산소전달속도를 증가시키기 위하여 교반속도를 증가시킨 결과 메틸란의 농도, 비생산 속도 및 생산 수율이 거의 비례적으로 증가됨을 확인하였다(1995년 4월 22일 접수, 1995년 6월 16일 수리).

서 론

최근 생물공학기술의 발전과 더불어 다당류, 특히 미생물에 의해 생성되는 다당류 및 이의 유도체에 대한 많은 연구와 관심이 집중되고 있다. 미생물 유래 고분자인 다당류는 분자량, 구성당의 종류, 결합순서와 방법에 따라서 구조가 다양하고, 새로운 물리화학적 성질을 지닌 다당류의 개발이 가능하다. 또한 물리화학적 조건에 따라 겔형성능력, 유화능력, 표면장력의 조절능력, 수분 흡수능, 결합능, 점착능, 유희능 및 필름형성능 등의 광범위한 특성을 가지므로 페인트, 섬유공업, 제지, 화장품, 식품등 각종 산업적 응용면에서 많은 연구가 진행되어 왔다. 최근에 와서는 각종 세균 질병의 진단, 예방 또는 치료 등과 관련되는 생물활성을 갖는 의약품 소재로서의 중요성도 더욱 높아지고 있다.^{1,2)}

미생물이 생산하는 다당류는 분자량이 합성 고분자에 비하여 매우 커서 약 50만에서 300만에 이른다. 그 결과, 미생물 세포로부터 다당류가 분비되어 축적되면 점도가 급격히 증가하는 현상이 나타나고, 분비된 다당류의 종류와 농도, 분자량, 사슬형태등에 의하여 점성특성 또한 크게 영향을 받는다. 이와같이 다당류 축적으로 인한 점도 증가는 발효공정상 산소결핍과 발효조내의 배양액의 불완전한 혼합상태를 초래하여 궁극적으로는 다당류의 수율 감소 및 생산성의 저하를 초래한다.³⁾ 그리고 세포주위에 다당류 slime layer의 형성은 세포내로의

영양소의 전달과정을 저해하여 세포의 다당류 생성능을 저하시킨다는 보고도 발표되었다.⁴⁾ 그러므로 고점성 다당류의 발효공정에서는 발효조내 배양액을 완전한 혼합과 산소전달 속도를 증가시키기 위하여 효율적인 교반기의 설계와 교반속도의 조절은 가장 중요한 공정변수중의 하나이다. 본 연구에서는 고점도 다당류인 메틸란의 생산조건 확립에 이어⁵⁻⁷⁾ 발효배양액의 점성특성, 발효조의 교반속도와 산도전달속도간의 관계, 그리고, 교반속도의 증가에 의한 메틸란 생산성 향상에 대하여 살펴 보고자 한다.

재료 및 방법

미생물 및 사용배지

본 연구에 사용한 균주는 메탄올 자화 세균인 *Methylobacterium organophilum* NCIB 11278중 다당류 생성능이 우수한 K-1 균주를 사용하였다. 배지는 메탄올(DO-stat 방법에 의하여 공급하였으며 0.5% 이내로 조절), NH_4^+ 0.3 g/l, KH_2PO_4 2.52 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.24 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9 g/l, 금속이온($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13.2 $\mu\text{g/l}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.2 $\mu\text{g/l}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.52 $\mu\text{g/l}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.52 $\mu\text{g/l}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.16 $\mu\text{g/l}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.16 $\mu\text{g/l}$, H_3BO_3 0.12 $\mu\text{g/l}$)으로 구성된 완전 화학합성 배지를 사용하였다.⁵⁾

찾는말 : *Methylobacterium organophilum*, methylan, agitation, oxygen transfer rate

*연락처자

배양조건

한국발효기(주)에서 제작된 5L 발효조에서 배지는 3 L로 하여 배양하였다. 메탄올의 첨가는 고농도시 세포 증식에 대한 저해 현상을 막기 위하여 DO-stat를 이용하여 간헐적으로 공급을 하였다. 통기량은 1.0 vvm으로 하였고, 교반속도는 400~1200 rpm, pH는 7, 온도는 30 °C하여 배양 하였다.

산소 전달 속도의 측정

여러농도의 다당류 용액이 포함된 발효조에 통기를 중단하고 N₂를 공급하여 용존산소의 농도가 0이 되도록 한다음 일정한 속도로 통기하여 용존 산소의 농도 변화를 polarographic 전극(Ingold Electrode, Swiss)을 이용하여 측정하였다. 산소전달속도(k_La)는 전극에서 출력되는 신호를 BASIC으로 프로그램이된 IBM-PC를 연결하여 dynamic법을 사용하여 on-line으로 측정 하였다. 산소 전달 속도를 수식으로 표현하면 다음과 같다.

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C_L^* - C_L) \quad (1)$$

여기서, C_L은 시간 t에서 용액에서의 산소농도이고 C_L*은 용액에서의 포화 산소농도이다. 이때, 전극의 성능에 의한 지연(response time)는 다음 수식으로 보정하였다.⁸⁾

$$\frac{dC_p}{dt} = k_p (C_L - C_p) \quad (2)$$

여기서, C_p는 전극에서 측정되는 산소농도이고 k_p는 전극반응 속도상수이다. (1)식과 (2)식을 이용하여 Newton-Raphson 방법으로 전극지연이 보정된 산소전달속도를 구할 수 있었다.

메틸란의 정제

원심분리(10,000 rpm, 60분)와 막여과(0.45 μm, Millipore)로 배양액중 균체를 완전히 제거한후, 균체가 제거된 다당류 용액에 2배의 에탄올을 첨가하여 메틸란을 침전시킨후 증류수로 2회 세척후 증류수에 재용해하였다. 다당류 용액을 증류수로 투석한후, 동결 건조법으로 건조한후 분석시료로 사용하였다.

메틸란 화학성분의 분석

메틸란중 총당 함량은 phenol-sulfuric법⁹⁾으로 측정하였고, 단백질의 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry법¹⁰⁾으로 측정하였다. 메틸란의 완전한 가수분해는 121°C에서 1시간동안 1.0 M TFA(trifluoro-acetic acid)으로 수행하였다. TFA 가수분해후, 환원당은 DNS법¹¹⁾으로, uronic acid는 carbazol법¹²⁾으로 pyruvic acid는 Fridemann법¹³⁾으로, 그리고 acetic acid는 hydroxamic acid법¹⁴⁾으로 각각 측정하였다.

분석방법

세포농도는 570 nm에서 흡광도로 측정하였고, 메틸란

농도는 배양액을 희석한후 10,000 rpm에서 30분간 원심 분리한후 상등액을 2배의 에탄올을 첨가하여 메틸란을 침전시킨후 증류수로 2회 세척후 건조하여 무게를 측정 하였다. 점도는 MV1 sensor가 장착된 Haake Rotovisco Rheometer(Model RV2)를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

메틸란 배양액의 점성특성

*Methylobacterium organophilum*을 이용하여 유가식 배양에서 메틸란 발효중 시간에 따른 세포증식, 메틸란 생산 및 점성변화(consistency index와 flow behavior index)를 살펴본 결과 Fig. 1과 같았다. 메틸란은 질소원이 고갈된 직후부터 생성되었다.⁵⁾ 메틸란 배양액의 점도는 메틸란이 생성된 이후부터 급격한 변화를 보여주었다. 메틸란이 축적됨에 따라 약 5 g/l에서 consistency index는 3,600 mPa·sⁿ 까지 증가하였고, pseudoplasticity를 나타내는 지수인 flow behavior index는 0.26까지 감소 하였다.

메틸란 배양액의 시간에 따른 점성특성을 정확히 알기 위하여 시간별(34, 47, 60, 72시간) 배양액을 채취하여 정제한후 같은 농도로 시료를 준비한후 증류수에 재용해하였다. 배양시간에 따른 점성특성을 살펴본 결과, 배양시간이 경과 될 수록 같은 메틸란 농도에서 consistency index는 현저하게 증가하였으며 flow behavior index는 점진적으로 감소하여 0.24까지 떨어졌다. 그러나 배양시간 경과에 따른 flow behavior index값의 차이는

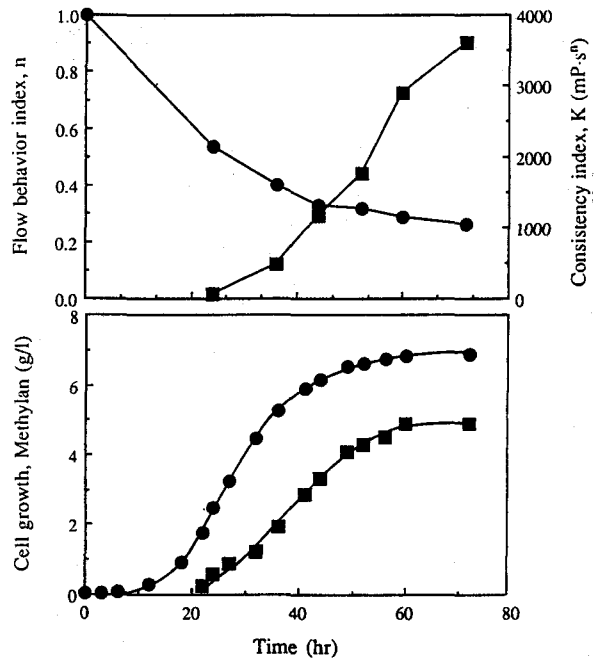


Fig. 1. Time courses of cell growth, methylan production, consistency index, and flow behavior index during the fermentation. Flow behavior index, n(●-●); consistency index, K(■-■); cell growth(●-●) and methylan production(■-■).

크게 나타나지 않았다(Fig. 2). 배양 시간의 경과에 따른 점도 증가의 원인을 조사하기 위하여 분자량을 측정된 결과 발효시간에 따라 큰 차이가 없이 약 200만 정도를 보여주었다. 배양시간에 따른 메틸란의 화학 조성의 변화를 조사해본 결과(Table 1) 발효가 진행됨에 따라 메틸란중 총당, 환원당과 단백질의 함량은 약간 감소하였으며, 반면에 pyruvic acid, uronic acid 및 acetic acid와 같은 산의 함량은 메틸란 생성 초기(34시간) 10%에서 배양 말기(72시간)에서는 17%까지 증가하였다. 특히 pyruvic acid는 2.17%에서 5.90%로 약 2.5배 증가하였다. 산의 함량의 증가는 수용액내에서 (-)전하의 증가를 의미하며, 이는 곧 메틸란 분자내 고분자 chain간의 정전기적 반발력의 증가로 인하여 메틸란 분자의 수용액내에서의 hydrodynamic domain이 증가되어 점도가 증가하는 것으로 추측된다. 유사한 예로 xanthan의 경우 pyruvic acid 함량이 증가하면 점도가 크게 증가한다는

결과도 보고되었다.¹⁵⁾ 배양액의 점도가 증가하면 산소 전달속도가 감소되어 산소의 세포내로의 확산 속도가 감소하고, 배양액의 혼합이 원활치 못하여 발효조내의 혼합이 안되는 지역(stagnant region)이 증가하게 되어 발효수율을 감소하는 결과를 초래하게 된다.

메틸란 농도와 교반속도가 산소전달속도에 미치는 영향

점성을 지닌 메틸란 용액에서 교반속도를 변화시키

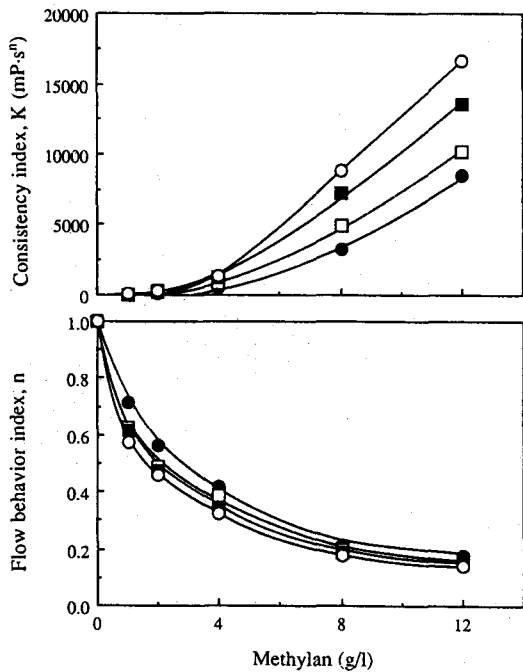


Fig. 2. Rheological properties of methylan solution isolated at different fermentation time. 34 hr(●-●); 47 hr(□-□); 60 hr(■-■) and 72 hr(○-○).

Table 1. Composition change of methylan during the fermentation.

Composition (w/w,%)	Time (hr)			
	34	47	60	72
Total sugar	82.8	79.5	77.7	76.6
Reducing sugar	77.8	72.0	68.1	68.1
Protein	6.95	6.01	5.26	4.70
Pyruvic acid	2.17	4.86	5.14	5.90
Uronic acid	7.86	9.72	11.10	11.10
Acetic acid	0.31	0.52	0.64	0.75

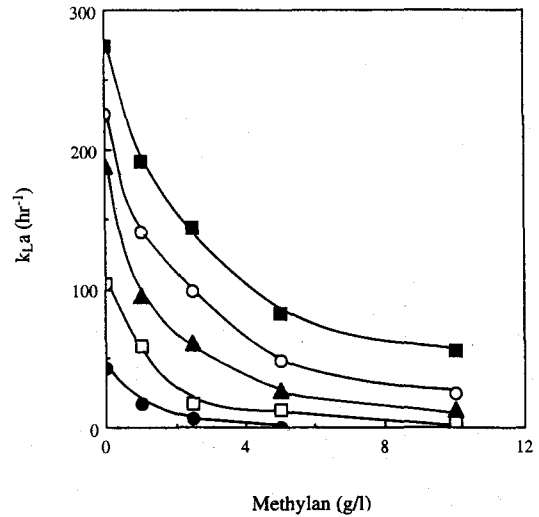


Fig. 3. Effect of methylan concentration on oxygen transfer coefficient. Agitation speed was 300 rpm(●-●); 500 rpm(□-□); 700 rpm(▲-▲); 900 rpm(○-○) and 1200 rpm(■-■)

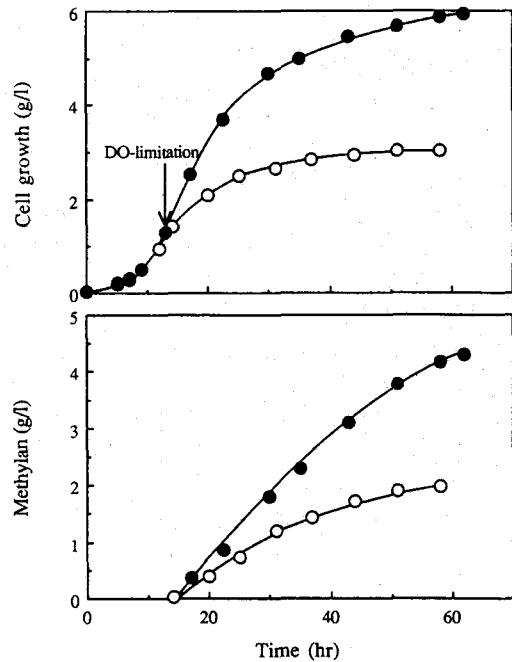


Fig. 4. Effect of dissolved oxygen limitation on cell growth and methylan production. DO control at 20%(●-●) and DO limitation (○-○).

면서 산소전달속도(k_La)를 측정하였다(Fig. 3). 메틸란의 농도가 증가함에 따라 점도가 증가 하고, 점도가 증가함에 따라 산소전달속도가 급격히 감소 되었다. 따라서 발효도중 메틸란의 농도 증가에 의한 산소 전달속도의 감소를 보충하기 위하여는 교반속도를 조절하여야 함을 알 수 있었다. 예를 들면, 교반속도 500 rpm에서 메틸란이 없는 경우 k_La 가 100 hr^{-1} 이었지만 메틸란의 농도가 5 g/l 로 존재하면 k_La 가 10 hr^{-1} 으로 감소하고 이를 다시 100 hr^{-1} 으로 증가 시키려면 교반속도를 1200 rpm으로 증가시키면 가능하다.

메틸란 발효시 용존 산소의 영향

용존산소 농도가 균체증식, 메틸란 생산, 그리고 메틸란 생성 능력에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 4). 용존산소 농도를 제한하여 배양한 경우 초기에는 용존산소 농도를 20%로 유지하였고, 메틸란이 생성되는 시점(질소원의 고갈이 메틸란의 생성을 촉진 시킴으로 질소원이 고갈되는 시점⁵⁾)에서 통기량과 교반속도를 조절하여 용존산소 농도를 거의 0% 근처로 하였다. 용존산소를 제한하지 않고 배양한 경우는 배양 전과정 동안 용존산소 농도를 20%로 유지하기 위하여 통기량과 교반속도를 조절하였다. 용존산소를 제한하면 균체농도와

메틸란 생성이 현저하게 감소하였으나, 균체농도가 감소되는 것과 비례하여 메틸란 생성도 감소되어 배양중 단위세포당 생산하는 메틸란 수율(P/X)은 큰 차이가 없었다(Fig. 5). 이것은 용존산소가 세포성장에만 영향을 미치고 세포가 지닌 메틸란 생산 능력에는 영향을 미치지 않는 것을 의미한다.

교반속도가 메틸란 발효에 미치는 영향

용존산소 농도는 세포의 증식 정도를 제한할뿐 세포의 메틸란 생성능력에 큰 영향이 없으므로 산소전달속도의 향상으로 인하여 비례적으로 메틸란의 생산량이 증가할 것이다. 교반속도를 400 rpm에서 1200 rpm까지 변화시키면서 균체증식 및 메틸란 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 6, Table 2). 교반속도를 400 rpm과 600 rpm으로 하여 배양한 경우 메틸란이 생성되는 동안에 용존산소가 고갈되어 균체증식이 감소하고 그 결과 비

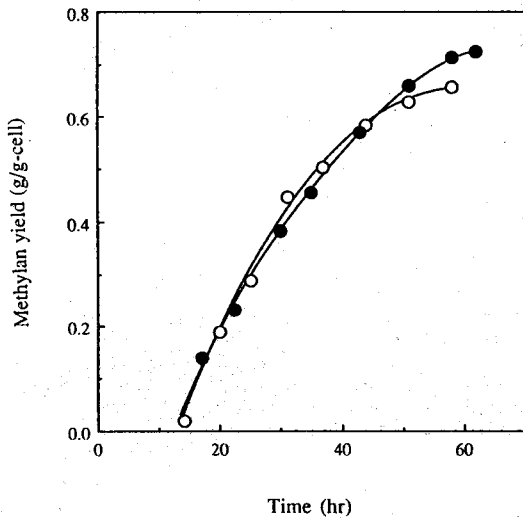


Fig. 5. Effect of dissolved oxygen tension on cell growth and methylan yield. Symbols were the same as in Fig. 4.

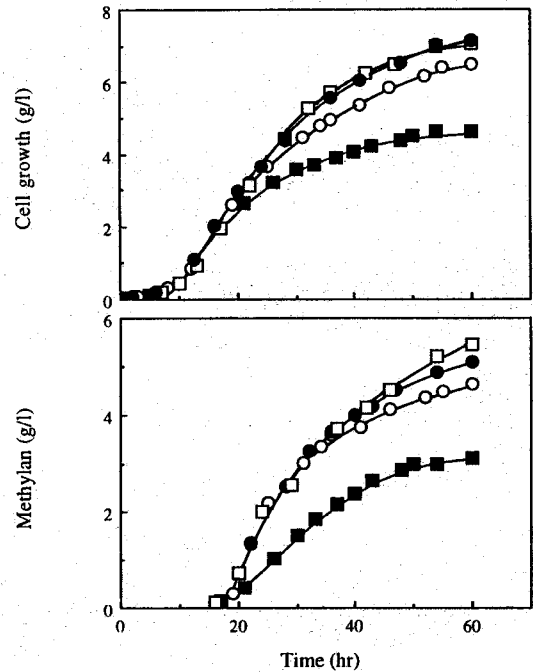


Fig. 6. Effect of agitation speed on cell growth and methylan production. The agitation speed was changed at 25 hr. 400 rpm (■-■); 600 rpm(○-○); 600→900 rpm(●-●); 600→1200 rpm(□-□).

Table 2. Effect of agitation speed on methylan fermentation.

Agitation speed (rpm)	Final cell growth (g/l)	Final methylan production (g/l)	Maximum specific production rate (g/g-hr)	Specific methylan yield (P/X)
400	4.63	3.10	0.064	0.67
600	6.61	4.66	0.069	0.70
900	7.09	4.79	0.065	0.67
1200	7.31	4.32	0.061	0.59
600→900	7.13	5.10	0.072	0.72
600→1200	7.05	5.45	0.074	0.77

례적으로 메틸란 생산이 감소되었다. 용존산소는 세포가 지닌 메틸란 생산 능력에는 영향을 미치지 않기 때문에 메틸란 수율(P/X)은 큰 차이가 없었다. 교반속도를 증가시키면서 배양을 할 수록 메틸란 생산성이 증가할 것이라고 생각하였으나, 900 rpm 이상에서는 메틸란의 비생산속도와 세포당 메틸란 생성수율은 감소하기 시작하였다. 이것은 배양 초기부터 고속의 교반으로 인하여 세포가 기계적인 손상을 받을 수 있음을 암시한다. 이를 확인하기 위해서 초기 교반속도를 600 rpm으로 배양하다가 메틸란이 2g/l 정도 생성 되었을 때 교반속도를 각각 900 rpm과 1200 rpm으로 증가 시켰다. 교반속도가 증가할 수록 메틸란의 농도, 비 생산속도, 수율이 증가됨을 볼 수 있었다(Table 2). 1200 rpm으로 증가 시켰을 때 메틸란 생성 수율이 다소 증가된 원인으로는 교반속도의 증가로 영양소 확산의 장벽으로 작용하는 세포주변에 형성된 slime layer가 더 효율적으로 제거 되어 일어난 결과로 생각된다.⁴⁾

참 고 문 헌

1. Bikales, N. M. (1973) In "Water Soluble Biopolymers" Dalton, H., Ed., pp 227-242, Plenum Publishing Corp., NY, U.S.A.
2. Sutherland, I. W. (1983) In "Comprehensive Biotechnology" Dellweg, H. Ed., pp 531-574, Verlag Chemie GmbH, Germany.
3. Peters, H. U., H. Herbst, P. G. M. Hesselink, H. Lunsdorf, A. Schumpe and W. D. Decker (1989) The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 361-366.
4. Funahashi, H., K. I. Hirai, T. Yoshida and H. Tagushi (1988) Mechanistic analysis of xanthan gum production in stirred tank. *J. Ferment. Technol.* **66**, 355-364.
5. Choi, J. H., D. K. Oh, J. H. Kim and J. M. Lebeault (1990)

- Characteristics of a novel high viscosity polysaccharide, methylan, produced by *Methylobacterium organophilum*. *Biotechnol. Lett.* **13**, 417-420.
6. 오덕근, 임현수, 김정희 (1995) *Methylobacterium organophilum*에 의한 메탄올로부터 메틸란의 생산에 대한 암모니아 이온의 영향. *한국생물공학회지* **10**, 170-175.
 7. 김재연, 김선원, 오덕근, 임현수, 김정희 (1995) 메탄올로부터 *Methylobacterium organophilum*을 이용한 Poly- β -hydroxybutyrate와 다당류 Methylan의 최적 생산조건. *한국생물공학회지* **10**, 176-182.
 8. Bandyopadhyay, B. and A. E. Humphrey (1967) Dynamic measurement of volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnol. Bioeng.* **9**, 533-544.
 9. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith (1959) Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
 10. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 11. Miller, G. L. (1967) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
 12. Bitter, T. and H. M. Muir (1962) A modified method for the determination of uronic acid by carbazol reaction. *Anal. Biochem.* **4**, 330-334.
 13. Friedemann, T. E. and G. E. Haugen (1943) Determination of pyruvic acid in polysaccharide. *J. Biol. Chem.* **147**, 415-442.
 14. MaComb, E. A. and R. M. McCready (1957) Determination of acetyl in pectin and acetylated carbohydrate polymer. *Anal. Chem.* **29**, 819-823.
 15. Smith, I. H., K. C. Symes, C. J. Lawson and E. R. Morris (1981) Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. *Int. J. Biol. Macromol.* **3**, 129-133.

Effect of Agitation on Production of Methylan and Rheological Characteristics of Methylan Fermentation Broth

Deok Kun Oh², Hyun Soo Lim¹, Jung Hoe Kim^{1*} (¹Department of Biotechnology, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea; ²Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Chunju 565-800, Korea)

Abstract : Production of a high viscosity exopolysaccharide, methylan, by *Methylobacterium organophilum* from methanol was carried out in fed-batch cultures and the rheological properties of methylan fermentation broth were studied. Bacterial biomass showed little influence on viscosity, but the accumulation of methylan caused the increase of viscosity. With proceeding fermentation, the viscosity at the same concentration of methylan was significantly increased and methylan solution showed slightly higher pseudoplasticity. The composition changes of methylan were investigated at various fermentation times. Contents of total sugar, reducing sugar and methylan were decreased but contents of acids(pyruvic acid, uronic acid and acetic acid) were increased with the culture time. It was considered that the increased content of acids resulted in the increase of the hydrodynamic domain in the solution due to charge repulsion. Consequently, the solution viscosity increased in proportion to the acids contents of methylan. Cell growth and methylan production were severely decreased by the limitation of dissolved oxygen. However, the cellular activity for methylan production was almost constant regardless of the level of dissolved oxygen. As a result, the high speed of agitation increased the methylan production, the specific production rate of methylan, and the methylan yield of the cell.

*Corresponding author