

고밀도 유가식 배양에서 글루코스 공급 방법이 *Serratia marcescens*의 균체량에 미치는 영향

김 광 · 이 상 록 · 손 정 우 · †지 흥 석
동아대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 1998. 9. 5., 게재승인 : 1998. 12. 3.)

Effect of Glucose Feeding Strategy on Biomass of *Serratia marcescens* in High Density Fed-Batch Fermentation

Kwang Kim, Sang-Rok Lee, Jeong-Woo Shon, and Hong-Seok Ji†
Dept of Chemical Engineering, Dong-A Univ., Pusan 604-714, Korea
(Received : 1998. 9. 5., Accepted : 1998. 12. 3.)

Effect of glucose feeding strategy and initial concentration of glucose on *Serratia marcescens* ATCC 27117 in high cell density fed-batch fermentation was investigated. The final biomasses in batch, constant feeding, constant and exponentially feeding strategy at glucose starvation condition in fed-batch were 1.40, 5.07, 6.93 and 7.60 g/L at 40, 41, 24 and 40 hrs, respectively. Productivities of biomass were 0.035, 0.124, 0.289 and 0.190 g/L · h, respectively. As a result, constant feeding strategy at starvation condition was 1.5~8.6 times higher than other strategies. The relationship between dissolved oxygen and glucose feeding time was good identified in exponential feeding strategy and constant feeding strategy at starvation condition. And high cell density cultivation was obtained when minimal media was used.

Key Words : *Serratia marcescens* ATCC 27117, fed-batch fermentation, glucose feeding strategy, minimal media

서 론

회분식 배양(batch culture)의 반연속식 조작(semicontinuous operation)은 매시속에 포함되어 있는 성장 제한 기질이 연속적으로 공급되는 조작으로 페니실린, 빵효모 생산 그리고 폐부산물의 처리와 같은 공업적인 적용을 위해 실험적으로 발전해 오고 있다 이러한 형태의 배양조작은 “유가식 배양(fed-batch culture)”으로 정의된다(1). 또한 기질의 공급속도를 계속 변화시키면서 제한기질의 농도를 일정하게 유지시키는 유가식 배양은 “확장 배양(extended culture)”으로 알려지고 있다(2). 유가식 배양(fed-batch culture)은 미생물 배양의 한 방법으로서 회분식 배양 조작을 시행하는 과정 중에 새로운 배양액이나 성장 제한 기질 용액 또는 미생물의 성장을 제한하는 영양분인 아미노산, 비타민, 인산염, 황산염, 질소원, 미량의 금속이온 그리고 탄소원 등을 공급하며 조절하는 방법으로서 배양 기간 동안 영양분의 농도가 적합한 수준으로 유지되는 것이 가능하다(3-10). 이러한 배양 방법은 탄소원인 글루코스 농도에 영향을 받거나

성장 인자에 제한을 받는 미생물의 배양뿐만 아니라 짧은 배양 시간 내에 고밀도의 균체량을 얻는데도 유용하다(11-13). 유가식 배양에서 글루코스 농도나 비중식 속도의 같은 생물학적 공정에 있어서의 변수는 일반적으로 전체 공정 기간동안 글루코스 농도를 안정적이고 낮게 유지하기 위한 발효 기질(글루코스)의 첨가를 조절하는 기준으로 사용된다. 고도의 생산성을 요구하는 생물학적 생성물(bioproduct)을 얻기위해, 배지 공급 속도를 미리 결정하고 수행하는 앞먹임 제어(feedforward control)와 용존산소, pH 및 탄소원의 농도와 같은 발효 매개 변수들을 측정하여 그 정보에 의해 배지 공급 속도를 조절하는 되먹임 제어(feedback control)를 사용한 유가식 배양이 일반적으로 사용된다(14). 발효기 내로 영양분을 투입하기 위한 공급 시스템으로서 일정 비율 공급 방법(15-16), 지수적 공급 방법(2) 및 간헐적 공급 방법(4,13) 등이 있으며, 제어 지시 변수로서는 대사작용에 의한 호흡 속도와 pH, 그리고 고농도 세포 배양을 위해서 용존 산소가 중요한 변수로 고려될 수 있다(4,9,17). 따라서 배양액의 용존 산소 농도를 일정하게 유지시켜 주는 DO-stat.는 배양의 안정된 조작과 공기와 혼합된 산소를 독성 없이 발효기 내로 투입할 수 있고, 또한 높은 균체량을 얻는데 유용하다. 산업적 발효에 있어서 균체량과 효소 및 대사산물의 생산성 증가를 위해서 탄소원이 성장 제한 인자가 될 때, 탄소원을 공급하기 위한 되먹임 조절 지시 변수인 기질 농도 이외에 DO(dissolved

† Corresponding Author : Department of Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8654, Japan
Tel : 03-3481-4472, Fax : 03-3481-4581
e-mail : kkim@seunghak.donga.ac.kr

oxygen)와 pH 등을 직접 측정하여 배지 공급 속도를 조절할 수 있다

그러므로, 본 연구에서는 동화 억제를 극복할 수 있고, 발효액의 점도를 낮게 유지시킴으로써 고밀도 세포 배양이 가능한 유가식 발효를 이용하여 *Serratia marcescens* ATCC 27117 균주의 배지 조성 중에 성장 제한 요소가 없는 조건 하에서 발효 시간에 따른 글루코스의 농도를 측정하여 기질의 공급 시기를 결정하고자 하였으며, 발효기 내의 기질 농도 변화가 용존 산소의 변화에 미치는 영향을 비교 검토하였고, 퇴먹임 제어 변수인 글루코스의 공급 방법을 달리하여 각각의 균체량과 균체생산성을 조사하여 최적의 글루코스 공급 방법을 결정하고자 하였다

재료 및 방법

미생물 배양 및 접종

본 연구에 사용된 미생물은 한국과학기술연구원 생명공학 연구소 유전자 은행(KCTC)으로부터 분양받은 *Serratia marcescens* ATCC 27117이며 chitin을 분해하는 효소인 chitinase를 발현하는 특성을 가지고 있다(18-21). 균주는 50mL의 YEPD 배지(yeast extract 1%, pepton 2%, glucose 2%)를 포함하고 있는 250mL Erlenmeyer flask에서 연속적으로 계대 배양되며, 이 때 배양조건은 30°C, 250rpm으로 incubator에서 교반 배양된다. 발효기로 접종할 시에는 6hr동안 배양한 배양액 30mL를 각각 회분식과 유가식 발효기로 접종하여 실행하였다

발효방법

실험에 사용된 발효기는 5L용량(working volume 3L)의 jar type 발효기(B. E. Marubishi Co., Ltd., Type MD)로서 자동 온도 조절기, 교반 속도 조절기, 용존산소(DO)센서(TOA Electronics Ltd., Type DY-220) 그리고 pH 센서(TOA Electronics Ltd., Type D26)를 부착하고 있으며 제어장치(B. E. Marubishi Co., Ltd., MDL-4CR)와 연결되어 자동으로 제어된다. 산소의 공급은 기포 발생기를 사용하여 여과 필터를 거쳐 발효기 안으로 투입되게 하였으며 유량은 0.5-1.5L/min 범위내에서 조절하였다. 교반속도는 용존산소수준을 일정하게 유지시키기 위해(22) 산소 공급 유량과 병행하여 100-300rpm 범위에서 조절하였다.

회분식 발효

회분식 발효에 사용된 배지 조성을 Table 1에 나타내었다. 3L의 배지를 포함하고 있는 발효기의 초기 글루코스의 농도는 YEPD 배지의 글루코스 농도 수준과 같게 하여 투입하였고, 실험에 들어가기에 앞서 121°C에서 20분간 멸균하여 사용하였다. 배양 도중에 발생하는 거품의 처리 또한 미생물의 성장에 중요한 영향을 미친다. 약간의 거품은 배지가 공급되는 기체와 비발동반하는 것을 최소화시켜주고 발효기 벽에서 미생물이 증식하는 것을 억제해 주므로 아무런 문제가 없지만 과잉될 때에는 세포 농도 분석을 위해 배양액을 채취할 때 방해할 일으킨다(1). 따라서 소포제의 투입시기를 결정함에 있어서 거품이 발효기 덮개까지 차 올랐을 때 소포제인 SIGMA사의 10% Antifoam C 5mL를 발효기 내로 투입하여 제거하였다. 교반속도는 250rpm으로 유지하였고, 배양온도는 30°C, 배지의 pH는 1N NaOH를 사용하여 7.0으로 맞추어 주었다.

Table 1. Composition of medium for *S. marcescens*

Component	Concentration (g/L)
Glucose	20
KH ₂ PO ₄	6.80
K ₂ HPO ₄	2.61
NaCl	10.00
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.00
MgSO ₄ ·(7H ₂ O)	0.123
CaCl ₂	0.0147
Trace Metal [*]	1.0%(v/v)

^{*}(in 1 L distilled water): 3.84g citric acid, 55.6mg FeSO₄·(7H₂O), 28.7mg ZnSO₄·(7H₂O), 16.9mg MnSO₄·(H₂O), 2.5mg CuSO₄·(5H₂O), 2.5mg CoCl₂, 6.2mg H₃BO₃

유가식 발효 1: Constant Feeding Strategy

발효기와 배지의 조성은 위에서 기술한 것과 같은 방법으로 준비하였고, 초기 글루코스 농도 수준을 일정하게 유지시키기 위해 매시간 농도를 측정하여 글루코스 공급용액 (500g/L)을 발효기 내로 투입하였다. 발효기 내부의 pH는 NaOH가 미생물을 용리시킴으로 28% 암모니아수를 사용하여 7.0으로 일정하게 유지시켰다(5). DO 수준은 공기 유량과 교반속도를 조절하여 30%로 유지하였다 초기 교반속도와 공기 유량은 각각 250rpm, 0.5L/min였지만, 발효기간동안 각각 최대 300rpm, 1.5L/min로 높여 주어 미생물로의 산소 전달을 증가시켰다.

유가식 발효 2: Constant Feeding at Starvation Condition

글루코스 농도를 제외한 나머지 조성의 농도는 위에서 기술한 바와 같고 탄소원인 글루코스의 초기 농도를 2g/L로 한 최소배지를 사용하였다. 최소배지는 미생물이 성장하기 위한 최소한의 탄소원만을 공급하기 위한 것으로 고밀도의 세포 배양을 위해 사용되는 배지이다 또한 기질 공급방법으로서 기질이 고갈된 시점에서 기질을 투입한 방법을 사용하였는데, 적은 비용으로 높은 플라즈미드 안정성과 단백질 생산성을 얻을 수 있는 방법으로 알려져 있다(4). 매 시간마다 글루코스의 농도를 측정하여 11hr, 14hr, 19hr에 각각 2g/L의 글루코스(500g/L)를 투입하였으며, 발효기 내부의 온도는 30°C로 유지하였고, pH는 28% 암모니아수를 사용하여 7.0으로 일정하게 유지시켰다.

유가식 발효 3: Exponential Feeding Strategy

최소배지를 사용하여 미생물의 증식 패턴에 맞추어 글루코스의 농도를 지수적으로 증가시키면서 공급하여 줌으로써 미생물 증식의 극대화를 얻고자 하였다. 매 시간마다 글루코스의 농도를 측정하여 글루코스가 완전히 고갈된 시간인 12hr, 17hr, 21hr에 각각 2g/L, 4g/L, 8g/L의 글루코스(500g/L)를 지수적으로 증가시키면서 투입하였으며 DO수준과 비교하였다. 발효기 내부의 온도는 30°C로 유지하였으며, pH는 28% 암모니아수를 사용하여 7.0으로 일정하게 유지시켰다.

글루코스 농도 측정(23)

글루코스의 농도측정은 Dimethylsalicylic acid(DNS)법을 변형하여 사용하였다. 매 시간마다 채취한 샘플을 7,500rpm에서 5분

간 원심분리한 후에 알맞게 희석한 상층액 50 μ l을 DNS시약 150 μ l와 혼합하고 5분간 끓는물에서 중탕시킨 후 상온으로 냉각시키고 Elisa plate에 옮긴 후 540nm에서 Elisa Reader(Anthos ht III, Anthos labtec, Instruments, Austria)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

건조균체량 측정

매시간마다 채취한 시료를 7,500rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상층액을 제외한 균체량(biomass)을 증류수로 세척하고 다시 원심 분리한다. 이 과정을 2회 반복한 후에 70-80 $^{\circ}$ C에서 건조시켜 수분을 완전히 제거하고 건조 무게를 달아 측정하였다. 또한 flow cell이 장착된 UV-Visible Spectrophotometer(UV-2101PC, Shimadzu Co, Japan)를 사용하여 660nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다

결과 및 고찰

회분식 발효

*S. marcescens*의 회분식 발효에 대한 결과를 Figure 1에 나타내었다. 배지 중의 초기 글루코스 농도는 YEPD 배지의 글루코스 농도와 같은 조건인 20g/L로하여 투입하였다. Figure 1에서 보는 것과 같이 처음 10hr 동안은 유아기를 나타내고 있으며, 그 이후에 대수증식기로 유도되어 초기에 투입한 글루코스는 40hr에 완전히 소모되었고, 이때 세포농도는 1.4g/L였다. 40hr 이후의 세포농도는 일정한 값을 나타내는 정지기에 도달하여 발효를 중단하였다.

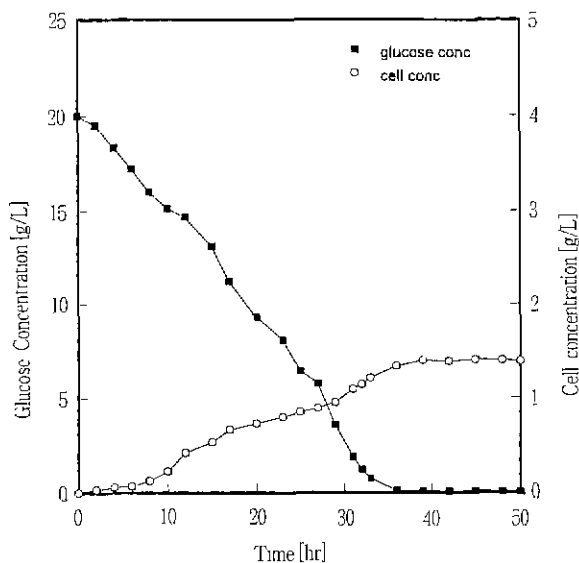


Figure 1. Cultivation results of *S. marcescens* in batch culture.

유가식 발효 1: Constant Feeding Strategy

회분식 배양에서 사용한 배지의 조성파 농도를 배양이 끝날 때까지 일정하게 유지시키기 위해 글루코스의 투입을 일정비율로 지속적으로 투입시키는 배양 방법을 택하여 최종 균체 생성량을 회분식 배양과 비교하였다. 실험 결과는 Figure 2에 나타내었다. 배양조건에 있어서 용존산소는 교반속도와 산소 공급

유량을 각각 250-800rpm, 0.75-0.8L/min 범위내에서 조절하여 30%로 조절하였다 투입되는 글루코스 용액의 농도는 500g/L의 진한농도로하여 적은 양을 첨가함으로써 발효기 내의 초기 글루코스 농도 수준을 유지할 수 있도록 하였다. 또한 실제 글루코스 측정에 의한 투입시기의 결정 외에 용존 산소와의 관계를 이용하여 글루코스 투입시기를 예측하기 위해서 용존산소와 글루코스 농도사이의 상관관계를 비교하였다. Figure 2의 세포농도변화에서 보듯이 6hr의 유아기를 거쳐 7hr이후부터 세포농도가 선형으로 증가하는 대수증식기를 나타내며 41hr에 최대균체량인 5.07g/L을 얻을 수 있었다. 이것은 회분식 배양에서 얻은 균체량의 3.6배에 해당하는 양이다. 용존산소의 변화는 8hr 까지는 30%를 유지하다가 점차 감소하여 대수증식기 초기단계인 10hr부터 20%로 감소하여서 배양 전 기간동안 이 수준을 유지하였는데, 일정 기질 공급에 의하여 균체의 대사작용이 계속 진행되고 있으므로 그에따른 용존산소는 크게 변화하지 않았다. 이 원인은 배양액 중에 기질 농도가 감소하게 되면 용존산소는 급격히 증가하게 되는데, 여기서는 배양 전 기간동안 기질의 농도가 일정하게 유지되었기 때문일 것이다.

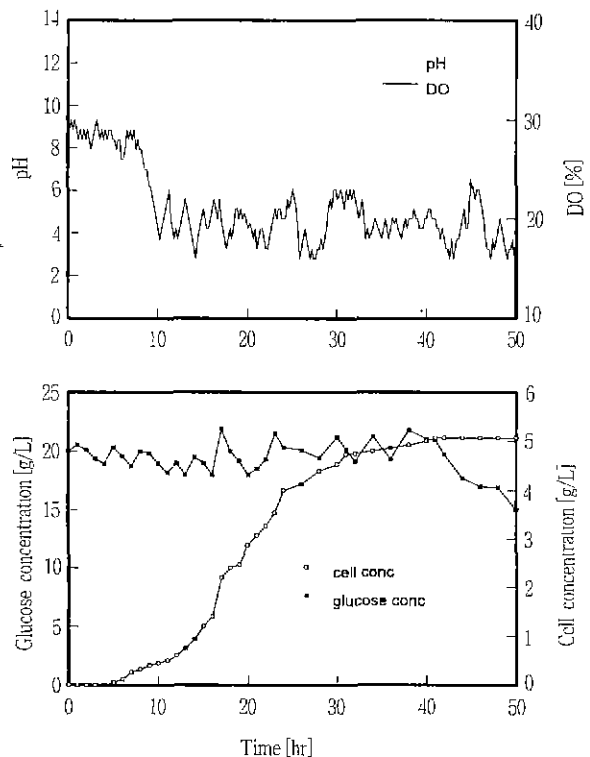


Figure 2. Cultivation results of *S. marcescens* in fed-batch culture with constant glucose feeding strategy.

유가식 발효 2: Constant Feeding at Starvation Condition

고밀도의 균체량 생성을 얻기 위해서 유가식 배양에서 기질 공급 방법으로 기질이 완전히 소모되었을 때 투입하고 최소배지를 사용하였다. 배지중의 초기 글루코스 농도는 2g/L이며, 매 시간마다 글루코스의 농도를 측정하여 완전히 소모된 시간에 일정량의 글루코스(2g/L)를 투입하여 최종 균체 생성량을 비교하였으며 그 결과를 Figure 3에 나타내었다.

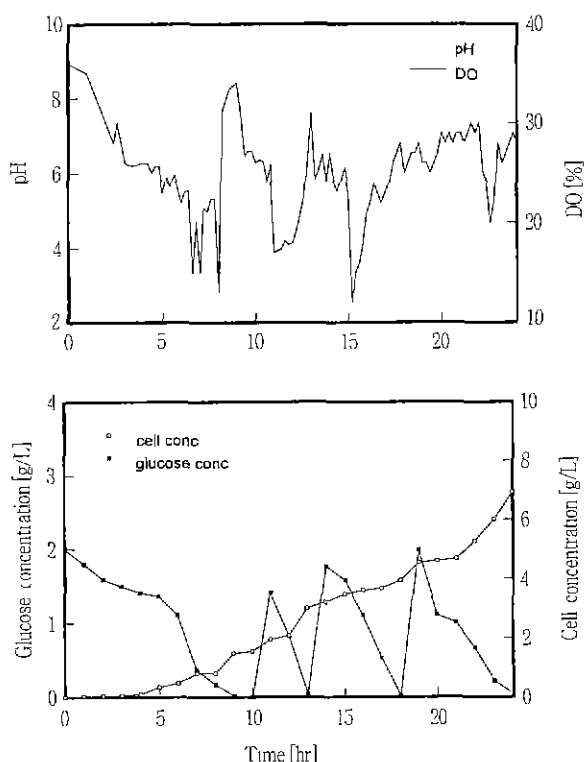


Figure 3. Cultivation results of *S. marcescens* in fed-batch culture with constant glucose feeding strategy at starvation condition.

발효기 내의 글루코스 투입은 글루코스가 완전히 소모된 시간인 11hr, 14hr, 19hr 에 각각 2g/L씩 투입하였으며, 이 때의 균체량은 각각 1.93, 3.20, 4.53g/L 였다. 최종 균체량은 24hr에서 6.93g/L 이었으며, 일정 비율 공급 방법에 비하여 짧은 시간안에 보다 많은 균체량을 얻을 수 있었다. 글루코스 투입시기와 용존산소와의 관계는 Figure 3에서와 같이 균체량이 증가 할수록 용존산소량은 감소하다가 글루코스 농도가 고갈되는 시점인 11hr, 14hr, 19hr 전후에서 급격히 증가함을 보여주고 있다. 이 때 균체의 증식속도는 서서히 감소하였고, 글루코스를 첨가한 직후 균체의 증식속도는 다시 증가하였다.

유기식 발효 3: Exponential Feeding Strategy

기질의 공급 형태에 따른 균체 생성량의 비교실험을 위하여 글루코스가 고갈된 시점에서 공급되는 글루코스의 양을 지수적으로 증가시켜 투입하였다. Figure 4는 지수적으로 기질을 공급했을 때의 균체 생성량, 글루코스농도, 용존산소와 pH의 변화를 나타낸 것이다. 글루코스의 투입은 글루코스가 고갈된 시간인 12hr, 17hr, 21hr, 41hr에 각각 2, 4, 8, 16g/L로 지수적으로 증가시켜서 배양기 내부로 투입하였다. 미생물의 증식곡선은 6hr 동안의 유야기를 거쳐 7시간 이후부터 대수증식기로 유도되었으며 40hr에서 최대의 균체량인 7.6g/L에 도달하였다. 그리고, 8g/L의 글루코스를 투입한 21hr 이후부터는 탄소원인 글루코스의 양이 충분함에도 불구하고 증식이 천천히 이루어 지다가 글루코스 농도가 2g/L 이하로 떨어진 30hr 이후부터 증식속도가 급격히 증가하여 균체량의 증가가 비교적 일정했던 결핍상태에서 글루코스 일정 비율 공급 방법과는 대조를 이루었다. 이것은

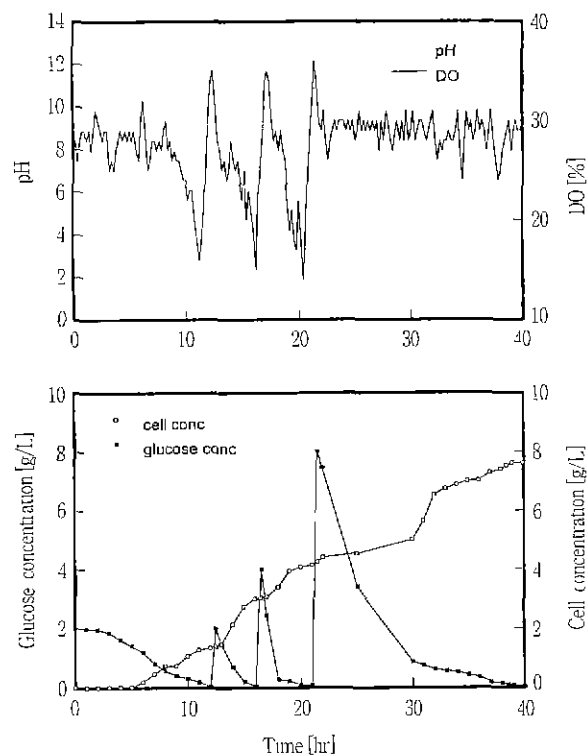


Figure 4. Cultivation results of *S. marcescens* in fed-batch culture with exponential glucose feeding strategy.

대수증식기 후반인 21-30hr사이에 글루코스의 농도가 과잉으로 공급되어 최소배지에서의 배양에 비하여 미생물의 증식에 영향을 미치고 있기 때문이다.

Figure 5는 위에서 실행한 배양방법에 따라 *S. marcescens*의 균체량의 변화를 비교한 것이다. 발효기 조건을 일정하게 유지시켜준 유기식 배양에서의 최종균체량이 회분식배양에 비해서 훨씬 높았으며, 유기식 배양중에서도 기질인 글루코스의 공급을 달리하였을 때, 최종균체량에서 차이점을 나타내었다. 회분식 배양과 유기식 배양에서 글루코스의 일정비율공급방법, 글루코스 결핍상태에서의 일정비율공급방법 그리고 지수적 공급방법의 최종균체량과 배양시간은 각각 1.40, 5.07, 6.93, 7.60g/L와 40, 41, 24, 40hr이었으며 각각의 균체 생산성은 0.035, 0.124, 0.289 및 0.190g/L·h 이었다. 최종 균체량만을 가지고 비교하였을 경우에는 유기식 배양에서 지수적 공급방법이 가장 높았지만 단위시간당 균체 생산성에서는 글루코스 결핍상태에서의 일정비율공급방법이 1.52배 정도 높게 나타났으며, Figure 6에서 나타낸 바와 같이 균체량이 2g/L일 때 증식수율은 각각 0.07, 0.23, 0.78 및 0.68으로 가장 높게 나타났다.

용존산소와 글루코스의 투입시기에 대한 상관관계는, 용존산소는 글루코스 공급시기를 조절하고, acetate생성물을 최소화하며 발효기 내의 글루코스 농도의 조절을 가능하게 한다. 그리고, 세포의 산소 흡수 속도는 배지 성분의 상태에 따라 변화한다. 기질 결핍 상태에서 세포의 호흡 속도는 급격히 감소하며, 탄소원이 유일한 기질로 작용하는 최소배지에서는 글루코스가 소모되면 산소 흡수 속도가 급격히 감소하므로 이에 의존하여 용존산소 농도는 증가한다. Figure 2-4에서 나타난 바와 같이 글루코스가 완전히 소비된 기질 제한 시점에서 일정비율과 지수적으

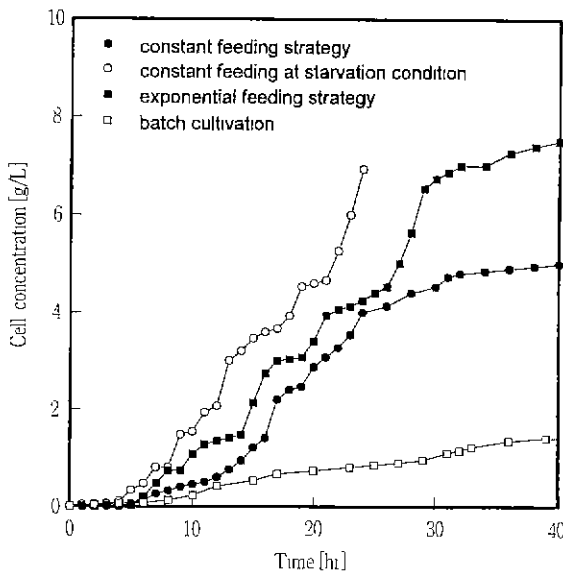


Figure 5. Comparison with cell concentration according to different feeding strategy in fed-batch and batch cultivation.

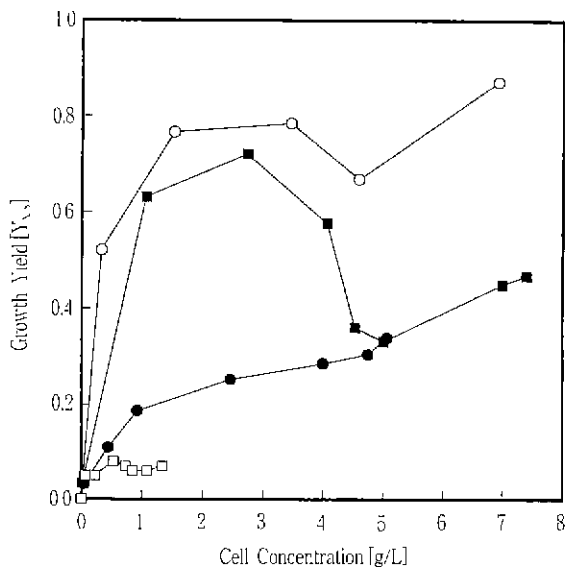


Figure 6. Comparison with overall growth yield according to different feeding strategy in fed-batch and batch cultivation. ($Y_{N/S}$: g cell/g glucose)

로 글루코스를 투입한 단계(strategy)에서는 용존산소가 급격히 증가하였으나, 배양 전기간 동안 초기의 글루코스 농도를 일정하게 유지한 방법에서는 미생물이 성장하는 데 아무런 제한 요소가 없었고, 그로 인해 산소 흡수 속도 또한 거의 일정하게 유지되었으므로 용존산소의 변화가 거의 없었다. 또한 발효기 내부로 투입한 모든 첨가 용액들은 미생물의 증식에는 아무런 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

요 약

5L 발효기에서 글루코스의 투입방법과 배지의 초기 글루코스 농도에 따른 유가식 배양에 의한 *S. marcescens*의 증식에 미치는 영향에 대해서 연구하였다. 발효기 조건을 일정하게 유지시켜준 각 유가식 배양에서의 최종균체량이 회분식배양에 비해서 훨씬 높았으며, 유가식 배양중에서도 기질인 글루코스의 공급을 달리하였을 때, 최종균체량에서 차이를 나타내었다. 회분식 배양과 유가식 배양중에서 글루코스의 일정비율공급방법, 글루코스 결핍상태에서의 일정비율공급방법 그리고 지수적 공급방법의 최종균체량은 1.40, 5.07, 6.93 및 7.60g/L 이고, 그 때의 배양시간은 40, 41, 24 및 40hr이었다. 그리고 균체 생산성은 0.035, 0.124, 0.289 및 0.190g/L·h 이었다. 최종 균체량만을 가지고 비교하였을 경우에는 유가식 배양중에서 지수적 공급방법이 가장 효율적이지만 단위시간당 균체 생산성에서는 글루코스 결핍상태에서의 일정비율공급방법이 1.52배 정도 높게 나타났으므로 가장 효과적인 배양 방법임을 알 수 있다. 용존산소와 글루코스 투입시기의 상관관계에서 나타난 바와 같이 글루코스 결핍상태에서 일정비율로 공급한 방법과 지수적으로 공급한 방법에서 좋은 일치를 보여주었다.

참 고 문 헌

1. Yoshida, F., T. Yamane, and K. I. Nakamoto (1973), Fed-Batch Hydrocarbon Fermentation with Colloidal Emulsion Feed, *Biotechnol. Bioeng.* 15, 257-270.
2. Lim, H. C., B. J. Chen, and C. C. Creagan (1977), An Analysis of Extended and Exponentially-Fed-Batch Cultures, *Biotechnol. Bioeng.* 19, 425-433.
3. Hasenwinkle, D., E. Jervis, O. Kops, C. Liu, G. Lesnicki, C. A. Haynes, and D. G. Kilburn (1996), Very High-Level Production and Export in *Escherichia coli* of a Cellulose Binding Domain for Use in a Generic Secretion-Affinity Fusion System, *Biotechnol. Bioeng.* 55, 854-863.
4. Cheng, C., Y. L. Huang, and S. T. Yang (1997), A Novel Feeding Strategy for Enhanced Plasmid Stability and Protein Production in Recombinant Yeast Fedbatch Fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* 56, 23-31.
5. Ryu, H. W., S. K. Hahn, Y. K. Chang, and H. N. Chang (1997). Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by High Cell Density Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Phosphate Limitation, *Biotechnol. Bioeng.* 55, 28-32.
6. Kim, B. S., S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, and S. I. Woo (1994), Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) by Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Glucose Concentration Control, *Biotechnol. Bioeng.* 43, 892-898.
7. Saucedo, V. M. and M. N. Karim (1997), Experimental Optimization of a Real Time Fed-Batch Fermentation Process Using Markov Decision Process, *Biotechnol. Bioeng.* 55, 317-327.
8. Lee, J. H., J. Hong, and H. C. Lim (1997), Experimental

- Optimization of Fed-Batch Culture for Poly- β -Hydroxybutyric Acid Production, *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 697-705.
9. Zhou, W., C. C. Chen, B. Buckland, and J. Aunns (1997), Fed-Batch Culture of Recombinant NS0 Myeloma Cells with High Monoclonal Antibody Production, *Biotechnol. Bioeng.* **55**, 783-788.
 10. Zangirolami, T. C., C. L. Johansen, J. Nielsen, and S. B. Jorgensen (1997), Simulation of Penicillin Production in Fed-Batch Cultivations Using a Morphologically Structured Model, *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 593-604.
 11. Mori, H., T. Yano, T. Kobayashi, and S. Shimizu (1979), High Density Cultivation of Biomass in Fed-Batch System with DO-Stat, *Journal of Chemical Engineering of Japan* **12**, 313-319.
 12. Yamane, T., M. Fukunaga, and Y. W. Lee (1996), Increased PHB Productivity by High-Cell-Density Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus*, a Growth-Associated PHB Producer, *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 197-202.
 13. Collins, L. D. and A. J. Daugulis (1997), Biodegradation of Phenol at High Initial Concentrations in Two-Phase Partitioning Batch and Fed-Batch Bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* **55**, 155-162.
 14. 박태현 (1998), 유가식 발효에 의한 재조합 단백질 생산공정의 최적화, *한국화학공학회 생물화공*, **12**(2), 58-64
 15. Hosler, P. and M. J. Johnson (1953), Penicillin from Chemically Defined Media, *Ind. Eng. Chem.* **45**, 871-874.
 16. Yamane, K., H. Suzuki, M. Hirotsu, H. Ozawa, and K. Nisizawa (1970), Effect of Nature and Supply of Carbon Sources on Cellulase Formation in *Pseudomonas fluorescens var cellulosa*, *J. Biochem.* **67**, 9-18.
 17. Higareda, A. E., L. D. Possani, and O. T. Ramirez (1997), The Use of Culture Redox Potential and Oxygen Uptake Rate for Assessing Glucose and Glutamine Depletion in Hybridoma Cultures, *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 555-563.
 18. Cosio, I. G., R. A. Fisher, and P. A. Carroad (1982), Bioconversion of Shellfish Chitin Waste Pretreatment, Enzyme Production, Process Design, and Economic Analysis, *J. Food Sci.* **47**, 901.
 19. Carroad, P. A. and R. A. Tom (1978), Bioconversion of Shellfish Chitin Wastes: Process Conception and Selection of Microorganism, *J. Food Sci.* **43**, 1158.
 20. Tom, R. A. and P. A. Carroad (1981), Effect of Reaction Conditions on Hydrolysis of Chitin by *Serratia marcescens* QM B1466 chitinase, *J. Food Sci.* **46**, 646.
 21. Moiseev, J. and E. T. Reese (1969), The Chitinase of *Serratia marcescens*, *Can. J. Microbiol.* **15**, 689.
 22. Amanullah, A., B. Tuttiett, and A. W. Nienow (1998), Agitator Speed and Dissolved Oxygen Effects in Xanthan Fermentations, *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 198-210.
 23. Miller, G. L. (1985), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry* **5**, 426-428.