

*Pseudomonas putida*의 유가배양연구

김희정·송재양·*김인호
충남대학교 화학공학과
(접수 : 2002. 2. 28., 게재승인 : 2002. 6. 15.)

A Study of *Pseudomonas putida* Fed-batch Culture

Hee-Jeong Kim, Jae-Yang, Song and In-Ho Kim†
Dept. of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea.
(Received : 2002. 2. 28., Accepted : 2002. 6. 15.)

In order to obtain high density seed cells for biofiltration, we studied batch and fed-batch culture of *P. putida*. Studies were carried out to find optimum fermentation conditions such as pH, concentration of glucose and agitation speed. Specific growth rate of *P. putida* was dependent on agitation speed and a high rpm of 300 was necessary to carry out the efficient aerobic growth of *P. putida*. Specific growth rate was highest at pH 7. Feeding glucose and yeast extract continuously at the initial growth phase was the most effective way to get high cell density of *P. putida*.

Key Words : VOC, *Pseudomonas putida*, Fed-batch, Culture

서론

미생물을 이용하여 Volatile Organic Acid를 제거하는 생물학적 방법은 주로 유립을 중심으로 하여 지난 몇 년동안 많은 기초조사와 함께 폐수처리장, 음식료품공장 등에 사용되던 기존의 응용범위를 넘어서서 화학공장폐가스 처리에 이용되기까지 지속적인 발전을 하여 왔으며 최근에 들어서 미국도 이 방법의 중요성을 인식하고 이에 대한 연구를 활발히 진행하고 있다(1). Biofilter에서는 VOC 가스가 생물학적으로 활성화된 Filter를 통과할 때 Filter에 VOC성분이 흡착 또는 흡수된 후 그곳에 서식하고 있는 미생물에 의하여 분해 처리된다. 확산된 오염물질이 생물막 내의 호기성 생물분해로 인하여 산화하면서, 이산화탄소와 물 그리고 biomass를 생성하게 된다(2). 따라서, 실질적으로 생물학적 방법을 적용하기 위해서는 보다 많은 미생물 균체를 확보하는 것은 매우 중요하다(3).

*P. putida*는 휘발성 유기 화합물의 제거를 위한 바이오 필터에 쓰이는 대표적인 미생물이다(4). 미생물을 산업적으로 이용하기 위해서 보다 많은 균체량을 얻어야 하므로 플라스크를 이용한 소규모 배양보다는 발효조를 이용한 배양을 통해 많은 양의 세포를 한번에 얻는 것이 중요하다(5). 또한, 회분식 발효보다는 단속적으로 세포 성장에 필요한 기질을

공급함으로써 기질 저해 또는 이화생성물 억제를 극복하도록 하는 유가식 배양이 더욱 효율적이다. 본 단보에서 탄소원으로 포도당을 사용하여 *P. putida*를 배양하면서 기질 공급에 따른 미생물 성장을 살펴보고 보다 효율적인 기질 공급 조건을 찾고자 하였다.

실험 재료 및 방법

실험에 사용된 균주는 *Pseudomonas putida* (KCCM 11348, ATCC 12633)으로, 4℃, 고체 한천 배지에서 보관하였고 계대 배양은 한달 간격으로 수행하였다. 종균 및 발효조 배양은 포도당의 농도를 변화시킨 합성 배지(Table 1)에서 이루어졌다(6). MgSO₄ · 7H₂O, FeSO₄ · 7H₂O, MnSO₄ · H₂O와 CaCl₂는 침전 생성을 방지하기 위해, 각각 멸균하여 실험 직전에 넣어주었다. 포도당은 가열로 인한 갈변화를 막기 위해

Table 1. Composition of synthetic medium

Component	Concentration(per 1 L)
Glucose	x* g
Yeast extract	1 g
NH ₄ Cl	0.1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.0005 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.005 g
CaCl ₂	0.00375 g
0.1 M phosphate buffer(pH 7)	18 mL

*x-variable

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Kungdong 220, Yuseong, Daejeon 305-764, Korea.

Tel : +82-42-821-5685, Fax : +82-42-822-8995

Email : ihkim@cnu.ac.kr

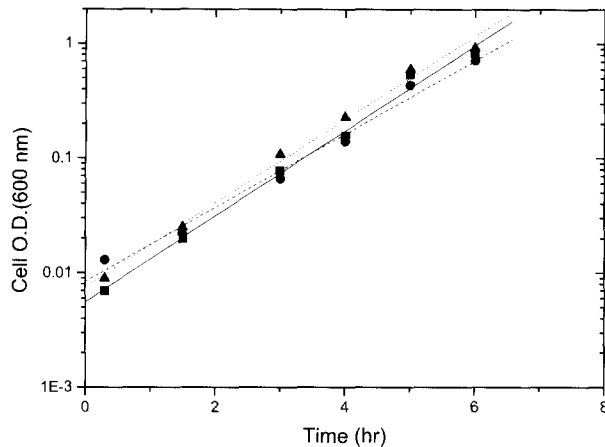


Figure 1. Specific growth rate at the different concentration of initial glucose (1~5 g/L) in flask culture, ■ (1 g/L), ● (2 g/L), ▲ (5 g/L).

따로 멸균하였다.

균체 농도는 분광광도계(CE1020, CECIL)를 사용하여 600 nm에서 측정된 O.D.(optical density)로 결정하였고 Glucose Trinder(Sigma, U.S.A.)발색시약을 사용하여 포도당 농도를 분석하였다. 발색시약 1 mL에 5 μ L의 시료를 넣은 후, 37°C의 항온조에서 15분간 발색시켰다. 발색된 시료에 증류수 3 mL를 넣어 희석한 후, 분광광도계를 사용하여 505 nm에서 흡광도를 측정하여 검정곡선에 의해 정량분석 하였다. 배양액 중의 유기산 농도의 변화를 유기산 HPLC 칼럼(Phenomemax, Rezex)과 황산 0.1%가 포함된 증류수를 용리액으로 하여 측정하였다.

종배양은 합성배지에 포도당 농도 2 g/L로 하여 10시간 동안 진탕배양기(비전과학, KMC8480)에서 30°C, 150 rpm, 100 mL배지 조건에서 배양하였다. 본배양은 소형 발효기(Applikon, Holland)에서 부피는 2 L, 통기 속도는 1 vvm으로 하여 수행하였다. 진탕배양은 초기 포도당의 농도에 따른 초기 비성장 속도의 변화를 관찰함으로써, 종배양에서의 포도당 농도와 배양 시간을 결정하였다. 회분발효실험은 교반 속도와 pH를 변화시키면서 수행하였다. 유기식 배양을 위한 공급 기질용액은 증류수에 포도당 또는 포도당과 yeast extract를 첨가하여 사용하였고, pH는 28%의 암모니아수 용액을 이용하여 pH를 조절하였다.

결과 및 고찰

플라스크 배양에서 초기 포도당의 농도를 1, 2, 5 g/L로 변화시켰을 때, 비성장 속도를 살펴보면 0.35, 0.32, 0.36 h^{-1} 로 포도당 농도 변화에 따라 큰 차이가 없음을 보였다(Figure 1). 또한, pH 변화에 관해 살펴보면, Figure 2와 같았다. 초기 포도당 농도가 2, 5 g/L일 때는 8시간 이후에 pH가 3.5 근처에서 고정되었고 세포 성장이 중단되었다. 초기 포도당 농도가 1 g/L일 때는 pH 감소 속도가 2, 5 g/L보다 작았다. Figure 2에서 보면 초기 포도당의 농도가 1 g/L인 경우, 포도당의 소모가 모두 이루어진 8시간 이후 유기산을 사용하여 미생물이 증식하므로 pH가 증가하는 것을 알 수 있었다. 종배양은 포도당 2 g/L를 포함하는 배지에서 10시간으로 결정하였다.

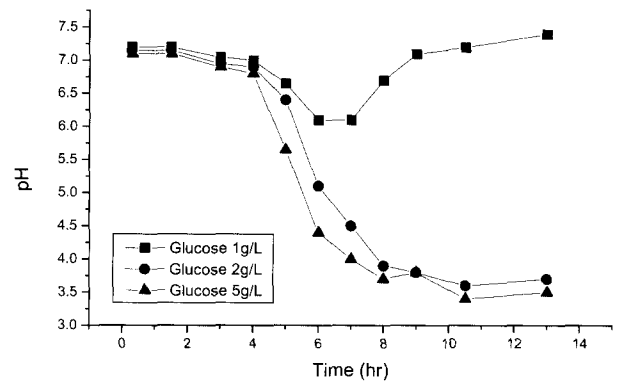


Figure 2. The pH profile at the different concentration of initial glucose (1~5 g/L) in flask culture, ■ (1 g/L), ● (2 g/L), ▲ (5 g/L).

산소전달이 비성장 속도에 미치는 영향을 조사하기 위해 발효기의 교반 속도를 150, 200, 300 rpm으로 하여 본배양 실험을 수행하였다. 교반속도가 증가함에 따라, 비성장속도가 0.24, 0.29, 0.42 h^{-1} 로 증가하였다. 교반속도를 150 rpm에서 200 rpm으로 증가시켰을 때는 비성장 속도가 20%가 증가한 반면, 150 rpm에서 300 rpm으로 증가시켰을 때는 75%의 급격한 증가를 나타냈다. *P. putida*가 호기적 조건에서 잘 성장한다는 것을 보여주는 증거이다. 이후 발효기에서 수행된 본배양실험은 교반속도 300 rpm으로 고정하였다.

초기 포도당의 농도를 5 g/L로 하여 회분배양실험을 수행하였다. pH가 5이하로 떨어지는 이후에는 비성장 속도가 0.27 h^{-1} 에서 0.008 h^{-1} 로 급격히 떨어져 미생물 성장이 거의 멈추었다(Figure 3(A)). *P. putida*의 성장에 있어 pH의 영향이 매우 크다는 것을 관찰할 수 있다. 암모니아수를 이용하여 pH가 5.0 이하로 떨어지지 않게 조절하여 본배양을 수행하였다(Figure 3(B)). pH를 조절하지 않은 경우와는 달리 12시간 이상 0.28 h^{-1} 의 비성장속도를 유지하며 자라는 것을 볼 수 있었다. 발효 개시 후 3시간 동안 pH가 7.0에서 5.0로 떨어지는 동안 포도당 농도가 5 g/L에서 4 g/L로 감소하며 3시간 이후 포도당 농도 변화가 없는 것으로 보아 pH를 7.0로 조절하면 포도당의 소모가 잘 이루어져 추가적인 포도당 공급이 필요할 것으로 예상되었다.

초기 포도당의 농도는 5 g/L로 하고, 28%의 암모니아수 용액을 이용하여 pH를 7.0으로 조절하면서 유기식 배양 실험을 수행하였다. 외부에서 포도당을 2.5 g/L의 농도로 5 mL를 6시간과 12시간에 주입한 경우(Figure 4(A)) 비성장 속도가 0.42 h^{-1} 이나, 10 시간 이후에 0.09 h^{-1} 로 성장이 거의 멈추었다. 대수적 성장이 이루어지는 초기에 포도당을 연속적으로 공급한다면, 미생물 성장을 가속화할 수 있을 것으로 사료되어 1 g/L 농도의 포도당 용액을 0.5 mL/min으로 속도로 3시간이후부터 연속적으로 공급하였다(Figure 4(B)). 12시간까지 비성장속도가 0.40 h^{-1} 으로 유지되었다. 그러나, 12시간 이후로 포도당을 공급하며 배양을 해도 포도당의 소모도 이루어지지 않고 균체량이 더 이상 증가하지 않았다. 공급 용액으로 포도당만을 사용하였기 때문에, 탄소원 이외에 다른 영양분이 부족한 것으로 생각되었다. 따라서, 포도당을 주입할 때 질소원인 yeast extract도 같이 공급하였다. 포도당 1 g/L와 yeast extract 0.5 g/L용액을 주입한 결과는 Figure 5와 같

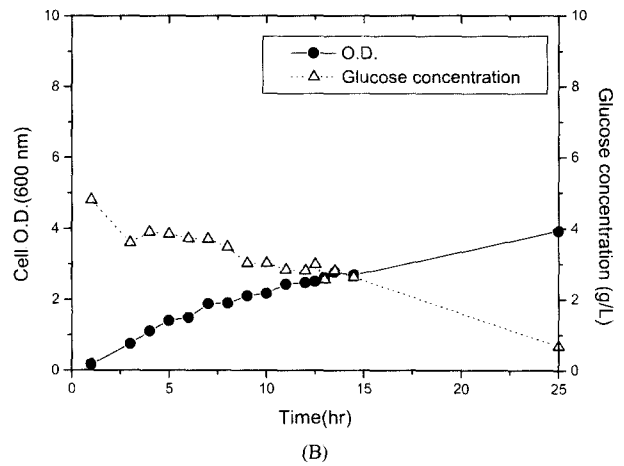
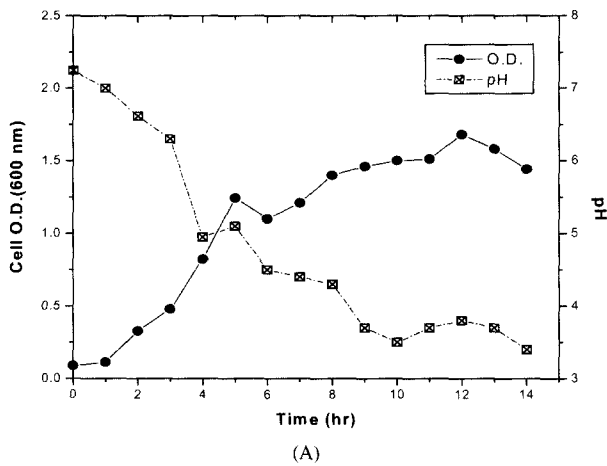


Figure 3. A: Bacterial(●) and pH(□) profiles in fermenter without pH control; B: Bacterial(●) and glucose(△) profiles in fermenter with pH control of 5.0 using ammonium hydroxide solution.

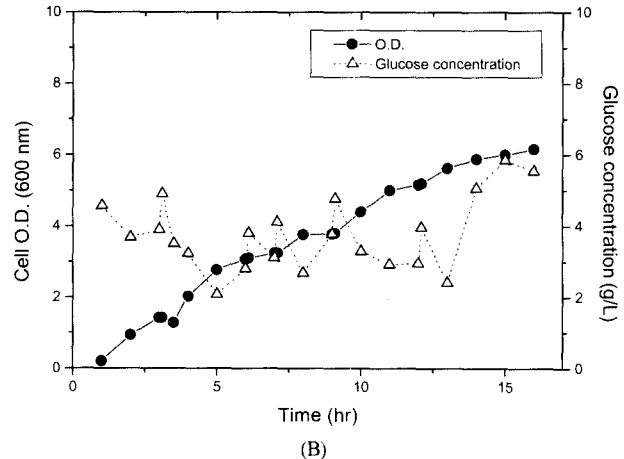
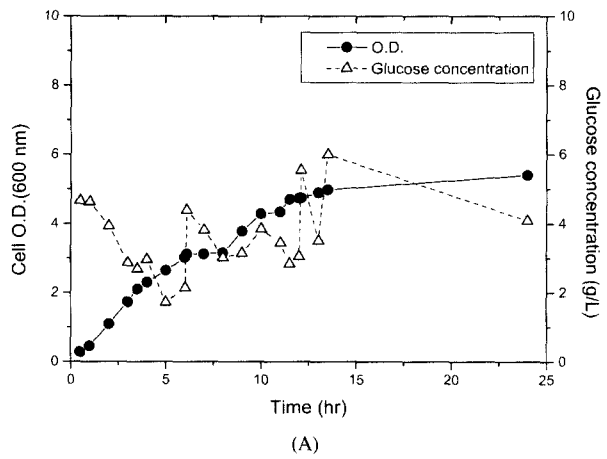


Figure 4. A: Bacterial(●) and glucose(△) profiles in fermenter with two pulses of glucose; B: Bacterial(●) and glucose (△) profiles in fed-batch by feeding glucose solution.

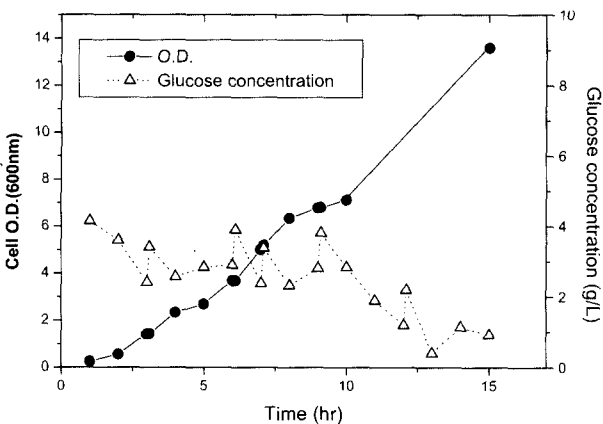


Figure 5. Bacterial(●) and glucose (△) profiles in fed-batch by feeding a solution of glucose and yeast extract.

다. 이 때, 비성장속도는 0.95 h^{-1} 로 Figure 4(A)의 포도당만을 주입하였을 때의 비성장속도인 0.42 h^{-1} 보다 2배 정도의 증가를 보였다. 또한, 12시간 이후부터는 포도당의 농도가 더 이상 감소하지 않는 Figure 4의 결과와는 달리 17시간 이후에

도 꾸준한 포도당의 감소를 보여 미생물이 계속 기질을 소비하며 자라고 있는 것을 알 수 있다.

초기 포도당의 농도를 5 g/L 로 하고, 28%의 암모니아 수용액을 이용하여 pH를 7.0으로 조절하면서 수행한 유기식 배양 실험에서 매시간 발효액을 샘플링하여 얻은 상등액으로부터 유기산 농도를 분석하였다. 유기산 농도 변화를 보면 Figure 6(A)와 같이 나타난다. 미생물 성장이 활발할 때 구연산 농도가 증가하고 성장이 둔화되면 구연산 농도가 감소하였다. 포도당과 yeast extract를 함께 공급하여 더 많은 미생물 균체를 얻은 경우(Figure 5)도 같은 방법으로 발효액의 상등액을 취하여 유기산 농도를 분석한 결과는 Figure 6(B)와 같다. 포도당과 yeast extract를 공급한 경우 10시간 이후도 미생물 성장이 활발하였고 포도당 소모속도가 컸으며 구연산 농도가 감소하면서 아세트산 생성 속도도 빨랐다.

요약

교반속도가 증가함에 따라, 비성장속도가 증가하여 *P. putida*가 유기적 조건에서 더 잘 자라함을 알 수 있다.

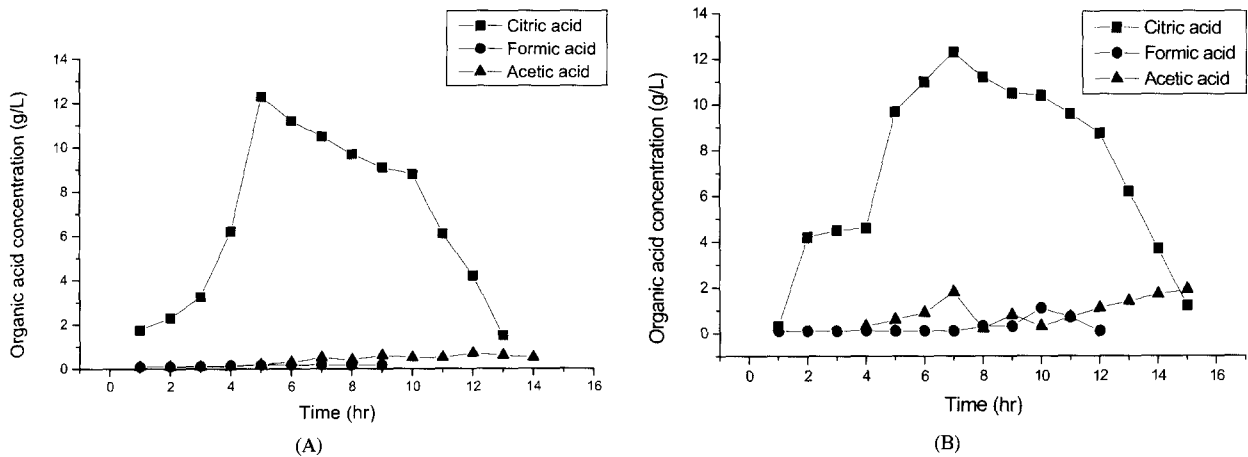


Figure 6. A: Organic acid profiles in fed-batch by feeding the solution of glucose. B: Organic acid profiles in fed-batch by feeding the solution of glucose and yeast extract.

를 조절하지 않았을 경우와 달리 암모니아 수용액을 이용하여 pH를 5.0, 7.0으로 조절했을 때, 포도당의 소모량이 증가할 뿐 아니라 비성장 속도가 증가하였다($\mu=0.27 \rightarrow 0.42$). 포도당만을 공급할 것이 아니라 yeast extract와 같은 유기 질소원 다른 기질도 같이 공급함으로써, 보다 많은 균체량을 얻을 수 있었다.

감 사

본과제는 과학기술부용역과제(환경99-05)와 인하대학교 초정밀분리기술연구센터의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Leson, G. and A. M. Winter (1991), Biofiltration : an innovative air pollution control technology for VOC emissions, *J. Air Waste Magmt. Assn.* **41**, 1045-1054.
2. Yoon, I. K. and C. H. Park (2000), Degradation of volatile organic compound mixtures using a biofiltration system, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**(5), 501-506.
3. Kim, G. J. and I. Y. Lee, D. K. Choi, S. C. Yoon and Y. H. Park (1996), High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* BM01 using glucose, *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**(3), 221-224.
4. Choi, W. J., E. Y. Lee, and C. Y. Choi (1998), Effect of dissolved oxygen concentration on the metabolism of glucose in *Pseudomonas putida* BM014, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **3**, 109-111.
5. Arvin, E., B. K. Jensen, and A. T. Gundersen (1989), Substrate interreaction during aerobic biodegradation of benzene, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(12), 3221-3225.
6. Rehm, H. J. and C. Reed (1993), *Biotechnology: Biological Fundermental*, VCH, New York.