



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시**. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**동일조건변경허락**. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

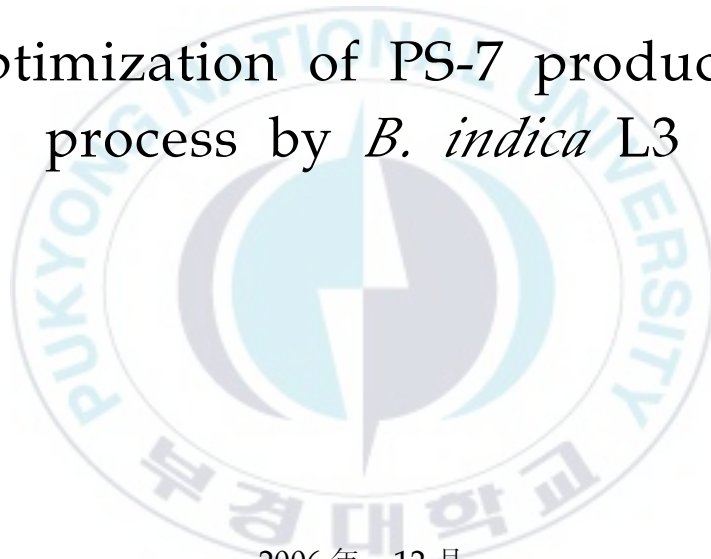
이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

*B. indica* L3를 통한 PS-7 생산 최적화

Optimization of PS-7 production  
process by *B. indica* L3



2006 年 12 月

부경대학교대학원

생물공학과

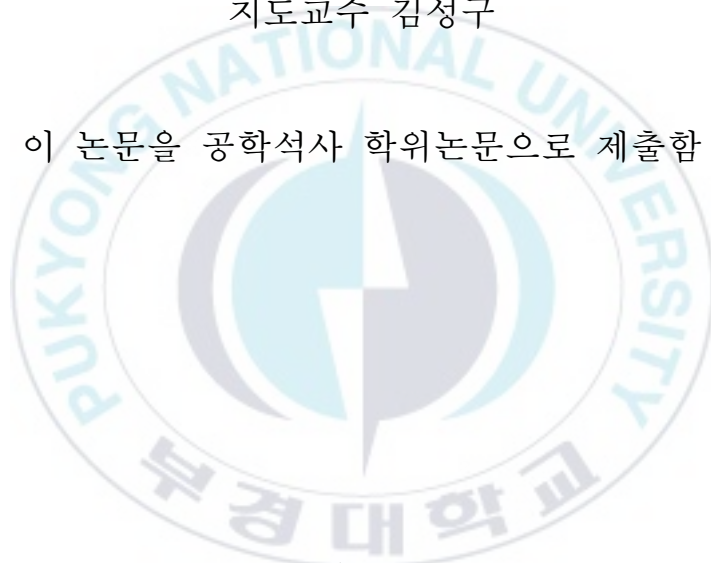
허 필 우

공 학 석 사 학 위 논 문

*B. indica* L3를 통한 PS-7 생산 최적화

지도교수 김성구

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함



2006 年 12 月

부경대학교대학원

생물공학과

허 필 우

# 허필우의 공학석사 학위논문을 인준함

2007년 2월



주	심	이학박사	김기홍	인
위	원	공학박사	김성구	인
위	원	수산학박사	남윤권	인

<차 례>

Abstract

1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	5
2.1. 사용균주 및 기본배양조건	5
2.2. 유청배지에 탄소원 첨가	5
2.3. 일반분석	9
2.4. 통계분석	9
3. 결과 및 고찰	17
3.1. 탄소원에 따른 PS-7의 생성	17
3.2. RSM을 통한 배지의 최적화	27
4. 결 론	35
5. 감사의 글	38
6. 참고문헌	39

<표 차 례>

<Table 1> Applications of Gellan Gum in Food. -----	4
<Table 2> Composition of Mineral Salt Medium Agar Plate. -----	7
<Table 3> Level and code of variables. -----	15
<Table 4> Central Composite Design(k=3). -----	16
<Table 5> Response surface level combinations of independent variables in the experimental design and responses of dependent variables. -----	30
<Table 6> Regression Coefficients and Analyses of Variance. -----	31

<그림차례>

<Fig. 1> Primary structure of PS-7 from <i>Azotobacter indicus</i> var. <i>myxogenes</i> ATCC 21423 -----	3
<Fig. 2> Typical colony of <i>B. indica</i> grown in glucose-based MSM medium -----	8
<Fig. 3> Effect of carbon sources and concentration on PS-7 production of <i>B. indica</i> L3 -----	19
<Fig. 4> Effect of carbon sources and concentration on cell growth of <i>B. indica</i> L3 -----	20
<Fig. 5> Effect of carbon sources and concentration on viscosity of <i>B. indica</i> L3 -----	21
<Fig. 6> Effect of carbon composition of medium on PS-7 production of <i>B. indica</i> L3 -----	24
<Fig. 7> Effect of carbon composition of medium on viscosity of <i>B. indica</i> L3 -----	25
<Fig. 8> Effect of carbon composition of medium on residual sugar of <i>B. indica</i> L3 -----	26
<Fig. 9> Effect of glucose, whey and ammonium nitrate concentration on the dried cell weight(DCW) of <i>B. indica</i> L3 -----	32
<Fig. 10> Effect of glucose, whey and ammonium nitrate concentration on the PS-7 production of <i>B. indica</i> L3 -----	33
<Fig. 11> Effect of glucose, whey and ammonium nitrate concentration on the viscosity(c) of <i>B. indica</i> L3 -----	34

## *Optimization of PS-7 production process by B. indica L3*

Pil Woo Heo

Department of Biotechnology and Bioengineering,  
The Graduate School  
Pukyong National University

### Abstract

Polysaccharide generated from microbes is widely utilized in food, medical and biological industries due to its physical nature and various functionality originated from its own structural characteristics. The hetropolysaccharide-7 (PS-7), one of polysaccharides, is being applied to relevant industries for its nature of high viscosity, plasticity, excellent suspending ability, water-absorbing ability, adhesiveness and lubricating ability.

Although cheese whey is a nutrient-rich dairy byproduct from cheese production process, it contains a potential to be widely used, if it applies to the production of high value-added products by utilizing microbes separated from lactose. PS-7 can be obtained through the medium of whey maintained on *B. indica* L3 which contains lactose utilizing enzyme. The study was implemented to identify the optimum conditions of increasing the yields of PS-7 by using the medium composition with whey.

In the examination of the effects of each carbon source contained cheese whey, sucrose addition showed to increase the production of PS-7 than that of other sugar contents. As a whole, while the increment of galactose and fructose decreased the PS-7 production during cultivation, the increment of glucose increased the PS-7 production.

The increment of dextrose was identified to increase the production of PS-7 of the *B. indica* L3 and through the optimization with three-dimensional response surfaces, the increment of carbon sources like dextrose and whey along with the increment of nitrogen sources increased the production of PS-7 steadily, and in the case of proper combination of carbon sources and nitrogen sources, it generated the maximal production.



## 1. 서 론

미생물에서 생산되는 다당류는 고유한 구조적 특징에 기인한 물성과 다양한 기능성으로 인해 식품, 의약품 등 생물 산업에서 널리 이용되고 있다[1,2]. 이들 다당류들 중 *Azotobacter indicus* var. *myxogenes*부터 생산되는 다당류인 heteropolysaccharide-7(S-7 or PS-7) [Fig. 1] 은 포도당과 rhamnose 그리고 uronic acid를 주성분으로 하여 *Sphingonomas paucimobilis* strain I-886이 생산하는 다당류와 유사한 2-deoxysugar 와 2-deoxy-D-hexauronic acid를 포함하고 있다[3-7]. PS-7의 물성은 gellan gum류에 속하며 xanthan과 같은 고분자와 비교했을 때 약 2 배 높은 점성을 가지고 있으며 뛰어난 가소성을 가지고 있다 [Table 1] . 또한 뛰어난 안정능, 수분함유능, 점착능, 유탄능 등으로 현재 페인트, 잉크, 섬유, 필름 등의 공업 분야에서 산업적 응용이 이루어지고 있다. *Beijerinckia indica* ATCC 21423은 토양유래 미생물로서 제한된 탄소원의 환경에서 metabolic pattern을 바꾸어 다양한 다른 성분들을 탄소원으로 이용하여 생존한다. 이런 균의 특성을 이용하여 제한된 질소원 환경에서 다당류 생산을 향상시킬 수 있다.

포도당을 비롯한 정제된 당을 이용한 발효기법은 대체적으로 많은 비용이 소모되는 단점이 있어 정제당을 대체할 수 있는 방법으로서 당을 함유하는 산업 폐기물을 처리하는 방법이 많이 시도되고 있다. 이러한 방법은 저가의 기질을 이용하여 고부가가치의 산물을 생산하는 경제적인 측면뿐만 아니라, 환경적으로 문제가 될 수 있는 폐기물을 유용하게 이용함에 따라 환경적인 측면으로도 부가적인 효과를 노릴 수 있다. 유청(whey lactose)은 유가공산업에서 흔히 생산되는 산업 부산물로서 재가공시에 들어가는 비용 때문에, 이를 사료로 사용하거나 폐기처분을 하는 실정이다. 유청에는 많은 양의 유당

(lactose)이 포함되어 있으며, 가용성 단백질, 미네랄, 비타민 그리고 각종 유기성분이 존재하고 있는 고영양 배지성분이다. 따라서 유당을 분해하여 발효 기질로서 사용할 수 있는 균을 이용하여 고부가가치 산물을 생산한다면 매우 유용하게 이용할 수 있는 잠재성을 가지고 있다.

*Beijerinckia indica* L3는 *Beijerinckia indica* ATCC 21423의 변이주로서 유당 분해효소를 가지고 있는 것으로 확인되었고 이 균주는 유당이 포함된 유청을 기질로 사용했을 때 PS-7을 생산할 수 있다는 연구보고가 있다[8]. 본 연구는 유청을 본 기질로 이용하였을 때 최대의 PS-7을 생산할 수 있는 최적 조건을 결정하기 위하여 수행하였다.

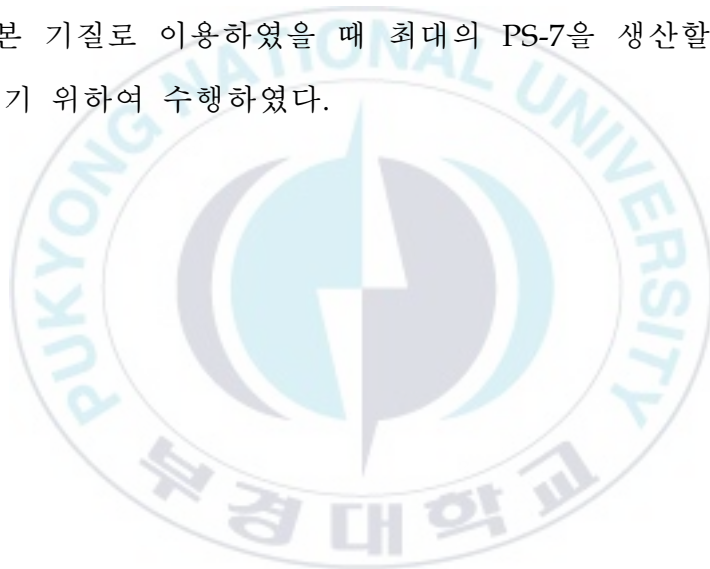




Table 1. Applications of Gellan Gum in Food

<b>Application area</b>	<b>Example of products</b>	<b>Conventional gelling/ thickening agents used in the past</b>
Water-based gels	Dessert gels, aspics	Gelatin, alginate, carrageenan
Confectionery	Starch jellies, pectin jellies, fillings, marshmallow	Pectins, starches, gelatine, agar, xanthan/locust bean gum
Jams and marmalades	Diet-jams, imitation jams, bakery fillings	Pectin, algin, carrageenan
Pie fillings and puddings	Instant desserts, pie fillings, canned/pre-cooked puddings	Starches, carrageenan, alginate
Fabricated foods	Restructured meat, fruits and vegetables	Alginate, carrageenan/locust bean gum
Pet foods	Canned/gelled pet food	Alginate, carrageenan/ locust bean gum
Dairy products	Yogurt, milk shakes, gelled milk, ice cream	Carrageenan, gelatine, alginate
Icings and toppings	Bakery icings, canned toppings	Agar, starches, pectin, xanthan/guar gum

## 2 재료 및 방법

### 2.1 사용균주 및 기본 배양조건

*Beijerinckia indica* L3는 MSM(mineral salts medium) agar plate에 배양하였다 [Fig. 2]. MSM 배지는 5.0 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 7.5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.4 g/L Bacto yeast extract(Difco Lab., Detroit, USA), 0.2 g/L Bacto peptone, 4 g/L glucose, 16 g/L Lactose, 1 mL trace minerals solution(1%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1%  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.25%  $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.2%  $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.25%  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )의 조성을 가지며 pH 6.8로 조절하기 위하여 2 M NaOH를 멸균과정 전 배지에 첨가하였다. Seed culture는 3 g/L Bacto yeast extract, 10 g/L lactose, 5 g/L Bacto peptone이 포함된 yeast lactose(YL) 배지로 배양하였다.

유청 배지는 Dlamini 와 Peiris 의 방법을 이용하였다 [8]. 20 g/L 유청에 5.0 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mL 의 trace mineral solution을 첨가하여 사용하였다.

### 2.2. 유청배지에 탄소원 첨가

Glucose, galactose, fructose 그리고 sucrose를 유청배지(whey lactose)에 첨가되는 탄소원으로 사용하였다. 탄소원은 0, 25, 50, 75 그리고 100%(w/v)으로 첨가하였다. 탄소원은 증류수에 용해하여 따로 멸균하여 배지에 첨가하였다. 배양은 진탕 배양기에서 200 rpm으로 30°C, 24 시간동안 배양한 seed

culture에서 250 mL baffled Erlenmeyer flask에 50 mL의 유청 배지를 넣고 5%의 양을 접종하여 같은 조건으로 72시간동안 배양하였으며 건조균체 중량 (DCW, Dry Cell Weight), 점도(Viscosity), PS-7의 생산량을 측정하였다.



Table 2. Composition of Mineral Salt Medium Agar Plate

Composition	Concentration (g/l)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
Bacto yeast extract	0.4
Bacto peptone	0.2
glucose	4.0
Lactose	16
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	7.5mM
trace minerals solution	1.0mL



Fig. 2. Typical colony of *B. indica* grown in glucose-based MSM medium.



## 2.3 일반분석

균체증가량과 PS-7 생산량은 Wu[9]의 방법으로 측정하였다. 잔당 측정은 phenol sulfuric acid method를 사용하였다[10]. 잔당은 최초 첨가된 당의 총량에 대한 퍼센트로 나타냈다. 물성측정은 Brookfield programmable LVD-VIII digital viscometer(Brookfield engineering laboratories, Stoughton, MA, USA)를 이용했으며 사용된 어댑터는 SC4-34 spindle을 사용하였다. 고유점도는 Ubbelohde (Bukwang Co., Busan Korea) 모세관 점도계를 이용하였으며 항온 수조(30℃)에서 행하였다. 이는 질소원 첨가된 것과 10 mM ammonium nitrate를 배지에 첨가했을 때를 비교하였다. 생산된 PS-7을 충분히 세척한 이후, 24시간 동안 동결건조를 하였고 이를 2.0 N NaOH에 녹여 시료로서 사용하였다. 고유점도는 Huggins 와 Kraemer 공식으로 구하였다 [11,12].

$$(1) \eta_{sp}/C = [\eta] + k'[\eta]^2C \text{ ----- Huggins equation}$$

$$(2) \ln \eta_r/C = [\eta] - k''[\eta]^2C \text{ ----- Kraemer equation}$$

$\eta_{sp}$ 는 polymer solution의 specific viscosity이고 C와 K'는 Huggins 상수이다. 또한  $\eta_r$ 은 relative 점도이고 k''는 주어진 polymer solution에서 Kraemer 상수이다.

## 2.4 통계분석

실험의 통계분석은 1950년 처음 제안된 이래 공정산업에 널리 활용되고 있는 표면반응방법(RSM ; Response Surface Methodology)을 사용하였다

[13-18]. 표면반응방법은 여러 개의 설명변수(독립변수)가 복합적인 작용을 함으로써 어떤 반응변수(종속변수)에 변화를 주고 있을 때, 이러한 반응의 변화가 이루는 반응표면에 대한 분석방법을 말한다. 독립변수는 어떤 반응에 영향을 미치는 여러 가지 인자(factor)를 말하며, 일반적으로 독립변수들은 임의로 조절될 수 있는 양적변수(quantitative)이다. 반응표면방법을 통하여 얻고자 하는 것은 주로 독립변수들과 종속변수 간의 함수관계를 데이터로부터 추정하여 독립변수들의 값의 변화에 따라서 반응량(종속변수의 값)이 어떻게 달라지는가를 예측한다. 또한, 어떠한 독립변수의 값들이 반응량을 최적화(optimize) 시킬 수 있는가를 찾아낸다.

실험초기에는 일반적으로 공정조건이 최적점에서 멀리 떨어져 있다. 따라서 반응표면을 1차 모형으로 상정하여 실험을 행하고, 이 데이터를 이용하여 회귀분석한 다음, 추정된 1차모형의 계수를 이용하여 공정조건의 이동방향을 결정한다. 즉 최적점(정상부위)으로 가는 가장 빠른 방향인 최대경사로를 따라 실험을 하는 점들을 결정하게 된다. 최적점을 찾아서 축차적인 실험을 계속 진행하게 된다. 정상부위에 가까워지면 반응변수의 증가율은 둔해지면서 좀 더 진행하면 오히려 감소하게 된다. 정상부위에 도달하였다는 것이 판단되면 추가실험을 통하여 2차 모형으로 반응표면을 좀 더 정확히 추정한 다음, 민감도 분석 및 최적화를 시도한다.

1차 반응표면 모형식을 위한 실험계획법은  $2^k$ 형 요인실험과 심플렉스 계획법(simplex design) 등이 있다. 심플렉스 계획법은 분산분석에서 오차항의 자유도가 0이 되는 포회계획(saturated design)이므로 회귀계수의 유의성 검정 및 모형의 적합결여검정 등을 행할 수 없는 단점이 있다. 따라서 1차 반응표면 모형식을 위한 실험계획법은  $2^k$ 형 요인실험이 주로 사용된다. 이때 적합결여 검정 및 곡률효과(curvature effect) 탐지를 위하여 중심점을 추가한 실험

험계획이 사용된다.

분산분석 결과 추정된 1차 반응표면 모형식이 타당하다고 하면, 아직 최적점(정상부위)에 도달하지 않았다는 증거이다. 이 경우 최적점(정상부위)로 가는 가장 빠른 방향인 최대경사경로를 따라 축차적인 실험을 실시하여 정상부위를 파악하여야 한다. 이 방법을 최대 경사법(method of steepest ascent)이라 한다. 최대 경사로를 결정하기 위해서는 추정된 1차 반응표면식의 계수를 이용한다. 방향(최대경사경로)이 결정된 후에는, 축차적인 실험을 위한 실험점 간의 간격(step size)을 결정해야 한다. 실험점 간의 간격은 요인배치나 부분요인 배치를 통한 실험에서 얻은 경험에 의존하여 적절하게 구하게 된다.

정상부위에 도달하였다는 것이 판단되면 추가실험을 통하여 2차 모형으로 반응표면을 좀더 정확하게 추정한 다음, 민감도 분석 및 최적화를 시도한다.  $2^k$ 형 요인배치법으로는 2차 모형의 추정이 불가능하며, 각 독립변수에 대하여 적어도 3수준 이상을 고려하여야 한다. 2차 반응 표면식을 추정하기 위한 실험계획을 수립할 때 일반적으로, 추적된 값이 관측된 값과의 근접함, 순수오차의 추정 및 적합결여 검정 가능여부, 추가적인 실험에 의한 고차모형의 수립, 최소의 실험회수 등을 고려하여야 한다.

2차 반응표면 모형식을 추정할 수 있는 실험계획으로는  $3^k$ 형 요인배치법, 중심합성계획, 면중심 중심합성계획, Box-Behnken 계획 등이 있다. 여기서  $3^k$ 형 요인배치법은 실험회수가 다른 실험계획보다 많으며, 회전성을 갖고 있지 않는 등 단점이 많으므로, 2차 반응표면 모형식 추정을 위한 실험계획으로는 잘 사용되지 않는다.

중심합성계획(Central Composite Design; CCD)은 1951년에 George Box와 K.B. Wilson에 의해 고안되어 지금까지 반응표면분석의 대표적인 실험계획

으로 이용되고 있다. 중심합성계획을 사용하면, 2차 모형의 제공항들의 효율적인 추정이 가능하고, 실험계획의 바람직한 특성인 직교 블록화(orthogonal blocking) 및 회전성(rotatability)의 구현이 용이하다. 직교적으로 블록화된 설계들은 모형 항들과 블록 효과들이 독립적으로 추정되도록 하고, 회귀 계수들의 변동을 최소화한다. 회전가능(rotatable) 설계들은 설계 중심으로부터의 거리가 동일한 모든 점들에서의 예측분산을 일정하게 하는 바람직한 성질을 가지고 있어, 예측의 질을 향상시킨다. 중심합성계획은 중심점을 포함한 요인배치 실험점(꼭지점)과 축점으로 이루어진다. 독립변수의 수가  $k$ 이라면, 요인실험점의 수가  $2^k$ 이고 축점의 수가  $2k$ 이고, 중심점에서의 반복회수가  $n_c$ 인 경우 총 실험회수는  $2^k+2k+n_c$ 가 된다. 독립변수의 수가 3인 경우의 중심합성계획이 Table 3에 제시되어 있다. 축점의 위치를 나타내는  $\alpha$ 의 값은 중심합성계획이 바람직한 성질을 갖도록 결정되어 진다 [19].

2차 반응 표면 모형식이 추정되었으며, 반응변수를 최적화하는 최적공정 조건(optimal response condition)을 구할 수 있다.

실험에서는 독립변수로서 유청(% , w/v medium, X1), 포도당(% , w/v medium, X2), ammnoium nitrate(mM, X3)였으며 종속변수로서는 건조균체량(DCW, g/L), PS-7(g/L) 그리고 점도 (cP)로 정하였다. 독립변수는  $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $1$ , 그리고  $\alpha$ 로 코드화를 시켰다. 코드에 해당하는 실제 값은 여러번 반복 실험을 통하여 결정할 수 있었다. 각 코드에 해당하는 실제값은 [Table 3]에 나타나있다. 독립변수가 모두 3가지로서 총 실험은 17회( $2^3+2\times 3+3$ )가 된다. 중앙점은 3회 반복실험을 하였다 [Table 4].

얻어지는 데이터는 회귀분석(regression analysis)를 통하여 알 수 있다. 회귀분석이란 변수들간 관련성을 규명하기 위하여 어떤 수학적 모형을 가정하고, 이 모형을 측정된 변수들의 자료로부터 추정하는 통계적 방법을 말한다.

변수들 사이의 함수관계를 나타내기 위한 수학적 모형을 회귀모형이라 한다. 회귀모형을 상정하고 데이터로부터 이 모형을 추정한 다음, 추정된 회귀식은 예측 및 최적화에 이용하게 된다. 여기서 함수관계를 나타내는 변수들은 두 종류로 구분하는데, 하나는 종속변수이고 다른 하나는 독립변수이다. 종속변수(dependent variable)는 성능 특성치 또는 반응변수이며, 독립변수(independent variable)는 종속변수에 영향을 미치는 변수이다.

회귀분석은 회귀모형에 따라 여러 가지로 구분되는데 일반적으로 널리 사용되는 회귀분석은 독립변수가 하나이고 종속변수 y와의 관계가 직선인 단순회귀, 독립변수가 2개 이상이고 y와의 관계가 1차 선형함수인 다중회귀, 독립변수가 하나이고 종속변수 y와의 관계가 2차곡선 이상인 곡선회귀, 다중회귀와 곡선회귀를 합친 다항회귀, 회귀계수들이 선형으로 표현되지 않는 비선형 회귀로 나눈다.

본 실험에서는 다음과 같은 회귀식으로 나타낼 수 있다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \text{ ----- 식 [1]}$$

$b_{ij}$ 의 값은 회귀 계수(regression coefficient)이고  $X_1, X_2, X_3$ 의 값은 코드화된 독립변수의 값이다. 모든 통계 계산은 SAS/STAT™ 통계 패키지를 통하여 수행되어졌다.

회귀모형의 적합성을 검증하기 위해 분산분석, 결정계수(coefficient of determination), 잔차분석(residual analysis), 적합성 결여 검정(lack of fit test)을 이용한다. 추정된 회귀모형이 유용한 것인지 아니면 쓸모없는 것인지를 알아보는 방법으로 분산분석을 이용한다. 또 다른 방법인 결정계수는 총 변동에 대한 회귀선에 의해 설명되는 변동의 비율로 정의할 수 있다. 결정계수(coefficient of determination)는 총 변동을 설명하는데 있어서 회귀선에 의

하여 설명되는 변동이 기여하는 비율을 의미하므로 회귀선의 기여율이라고도 한다. 결정 계수 값의 범위는  $0 \leq R^2 \leq 1$ 이며,  $R^2$ 이 1에 가까울수록 추정된 회귀선을 유용하며, 이 값이 0에 가까워지면 추정된 회귀선을 쓸모가 없어진다. 종속변수의 실제 값과 회귀식에 의한 추정 값과는 차이가 있기 마련이며, 이 차이를 잔차(residual)이라고 하며, 잔차분석을 통하여 오차의 가정 및 모형의 가정을 검토할 수 있다. 적합성 결여 검정(lack of fit test)은 모형의 적합성을 검정하고자 할 때 사용하는 방법으로, 이 방법은 정해진 x의 수준에서 관측 값 y들의 반복적으로 측정된 경우에 가능한 검정방법이다 [20].





Table 3. Level and code of variables.

Variables	Symbols	Coded levels		
		-1	0	1
Whey (%)	X1	1	2	3
Glucose (%)	X2	1	2	3
Ammonium nitrate (mM)	X3	5.0	7.5	10.0

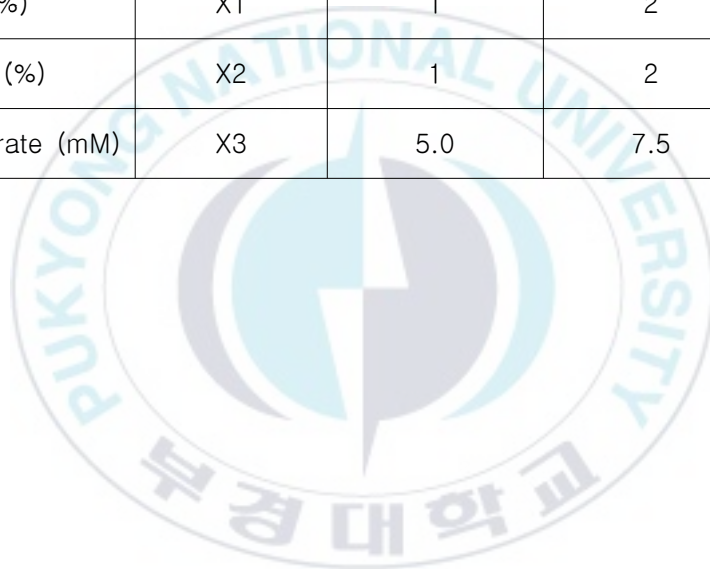


Table 4. Central Composite Design( $k=3$ )

실험번호 Design Point	$X_1$	$X_2$	$X_3$	내 용
1	-1	-1	-1	요인실험점, 꼭지점 ( $2^k=2^3=8$ 개)
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	$-\alpha$	0	0	축점 ( $2^k=2 \times 3=6$ 개)
10	$\alpha$	0	0	
11	0	$-\alpha$	0	
12	0	$\alpha$	0	
13	0	0	$-\alpha$	
14	0	0	$\alpha$	
15	0	0	0	중심점 ( $n_c$ 개)
16	0	0	0	
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	
$14+n_c$	0	0	0	



### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 탄소원에 따른 PS-7의 생성

유청 배지를 기본으로 첨가된 각 탄소원의 효과를 살펴보면 sucrose의 첨가가 PS-7의 생산을 다른 당에 비해 향상시킴을 알 수 있었다 [Fig. 3]. 대체로 fructose, galactose의 경우 첨가량이 증가될수록 오히려 PS-7의 생산량이 감소되는 추세를 보이고 있었으며 glucose의 경우 첨가량이 증가될수록 PS-7의 생산량이 증가되는 것을 알 수 있었다. 비록 절대량의 비교에 있어서는 glucose의 첨가가 다른 당에 비해 PS-7 생산에 큰 효과를 보이고 있지는 않았으나 첨가량에 따라 PS-7의 생산이 증가되는 것을 고려해 볼 때 어느 정도의 glucose 첨가량이 최대의 PS-7 생산이 가능한 것으로 보인다. 이는 Wu[8]의 논문에서 *B.indica*가 glucose-generating sugars를 기질로 사용했을 때 PS-7 생산을 증가시킨다는 보고와도 일치한다. 비용적인 측면과 PS-7의 생산 경향을 비교해봤을 때 sucrose의 경우는 비용적 측면, fructose, galactose는 PS-7의 생산경향 측면으로 인해 glucose를 유청에 첨가할 탄소원으로 선택하는 것이 적절하다고 판단되었다.

탄소원에 따른 Dry cell weight는 전체적으로 양이 줄어드는 것을 알 수 있다 [Fig. 4]. Fructose의 경우 농도에 반비례하여 양이 줄어드는 것을 뚜렷하게 확인할 수 있으며, glucose의 경우는 그 변화가 많지 않은 결과를 보였다. sucrose의 경우 50%이상의 농도에서는 다소 비례하여 그 양이 늘어나는 것도 관찰할 수 있었다.

탄소원에 따른 점성(Viscosity) 정도를 관찰하면 전체적으로 농도를 높여 갈수록 점성이 증가하는 것을 볼 수 있다 [Fig. 5]. sucrose의 경우 거의 정비

레하여 증가하다가 농도 75%와 100%에는 변화가 없었다. 대체로 galactose의 경우는 양의 변화가 거의 없다는 것도 알 수 있다.



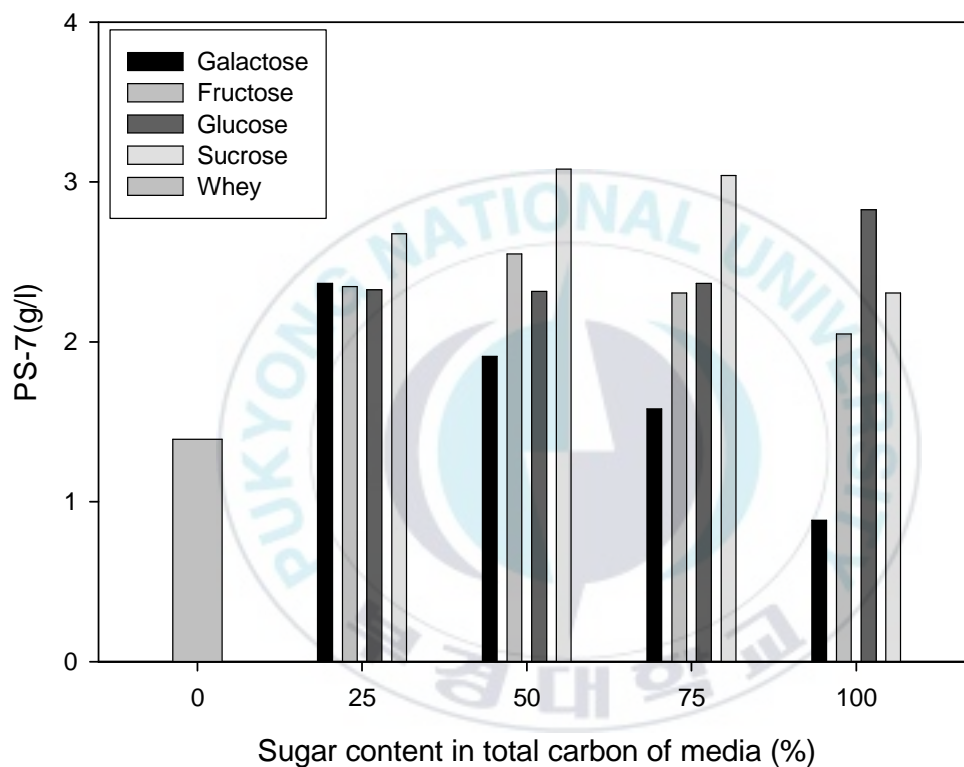


Fig. 3. Effect of carbon sources and concentration on PS-7 production of *B. indica* L3 in whey based MSM medium in shake flask (total sugar concentration 20 g/L)

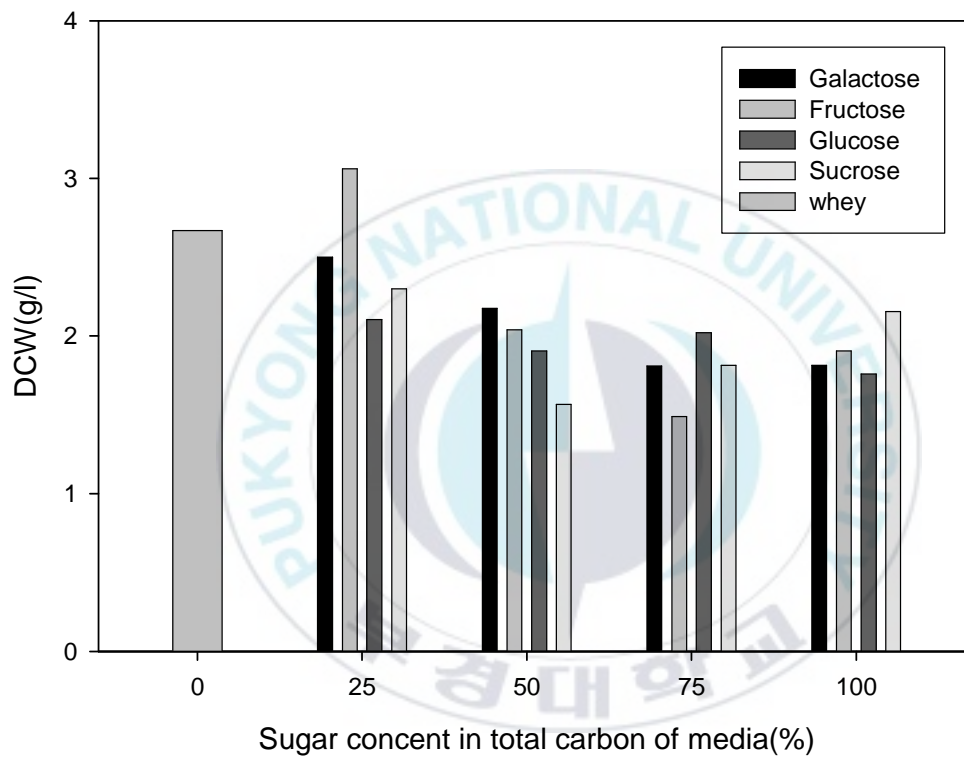


Fig. 4. Effect of carbon sources and concentration on cell growth of *B. indica* L3 in whey based MSM medium in shake flask (total sugar concentration 20 g/L)

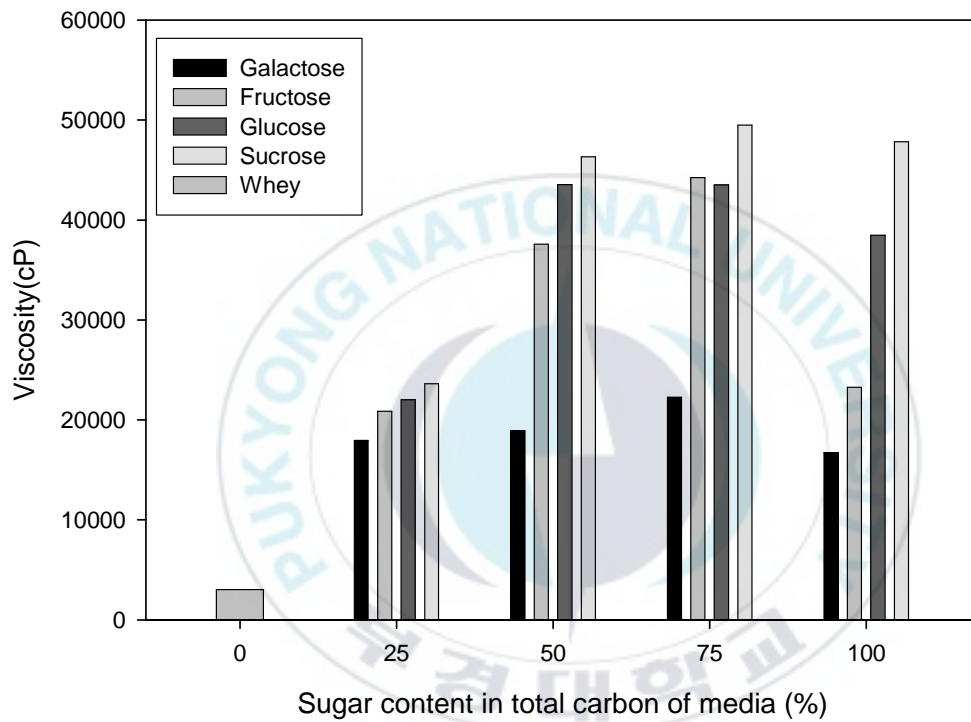


Fig. 5. Effect of carbon sources and concentration on Viscosity of *B. indica* L3 in whey based MSM medium in shake flask (total sugar concentration 20 g/L)

배지내 Glucose농도 변화에 따른 PS-7의 생산량의 변화를 [Fig. 6] 을 통하여 나타내었다. 유청 1, 2, 3%, 유청 1%+glucose 1, 2%, 그리고 glucose 2%를 배지로 하여 전체 탄소원의 조성을 달리하여 PS-7의 생산량을 살펴본 결과 그림과 같이 유청과 glucose를 함께 첨가한 것이 유청이나 glucose 만을 배지의 탄소원으로 사용했을 때 보다 PS-7의 생산량이 월등히 향상되는 것을 알 수 있었다. whey 1%, whey 2%, Whey 3%, glucose 2%를 탄소원으로 사용하였을 경우, 처음 40시간 정도 양이 증가하다가 이후 70시간까지는 양의 변동이 없다. 결국 네 가지 탄소원(whey 1%, whey 2%, whey 3%, glucose 2%) 각각 사용의 경우 모두 PS-7의 양이 1g/ℓ에 수렴되어 종결되었다. whey 1%와 glucose 1%를 혼합한 경우 처음 시작부터 20시간까지 급격한 증가세를 보이다가 이후 큰 변화가 없지만 whey와 glucose를 단독으로 사용했을 경우보다 3배의 효율을 보이면서 3g/ℓ의 양을 생산해 내었다. 한편 whey 1%와 glucose 2%를 혼합하여 사용하였을 경우는 시간의 흐름과 거의 정비례하여 증가하면서 4g/ℓ으로 실험군에서 최고의 생산량을 보이고 있다.

배지내 Glucose농도 변화에 따른 점성(Viscosity)의 변화는 PS-7의 생산량의 변화와 비슷한 모습을 보이지만 차이는 더 크게 나타난다 [Fig. 7]. whey를 단독으로 공급했을 때는 점성에 거의 변화가 나타나지 않았으며 glucose 2%를 사용하였을 경우는 10,000cP를 나타내었다. 그러나 whey와 glucose를 혼합하여 탄소공급원으로 사용하면 whey 1%와 glucose 1%의 경우는 60,000cP를, whey 1%와 glucose 2%일 경우에는 65,000cP의 점성을 나타내고 있다. 이는 PS-7의 생산량이 많아질수록 점도, 즉 끈적임이 증가한다는 것을 고려해 볼 때 당연한 결과이기도 하지만 그 차이가 PS-7의 생산량보다 많이 나고 있다.

같은 실험의 경우, residual sugar에 대한 결과는 정반대의 모습을 보여준다 [Fig 8] . 실험 후 70시간이 경과하면 glucose 2%를 배지에 공급한 경우와 whey 1%와 glucose 1%를 공급한 경우 residual sugar는 0%에 가깝게 줄어들고 나머지도 20-30% 근처에 머물고 있다.



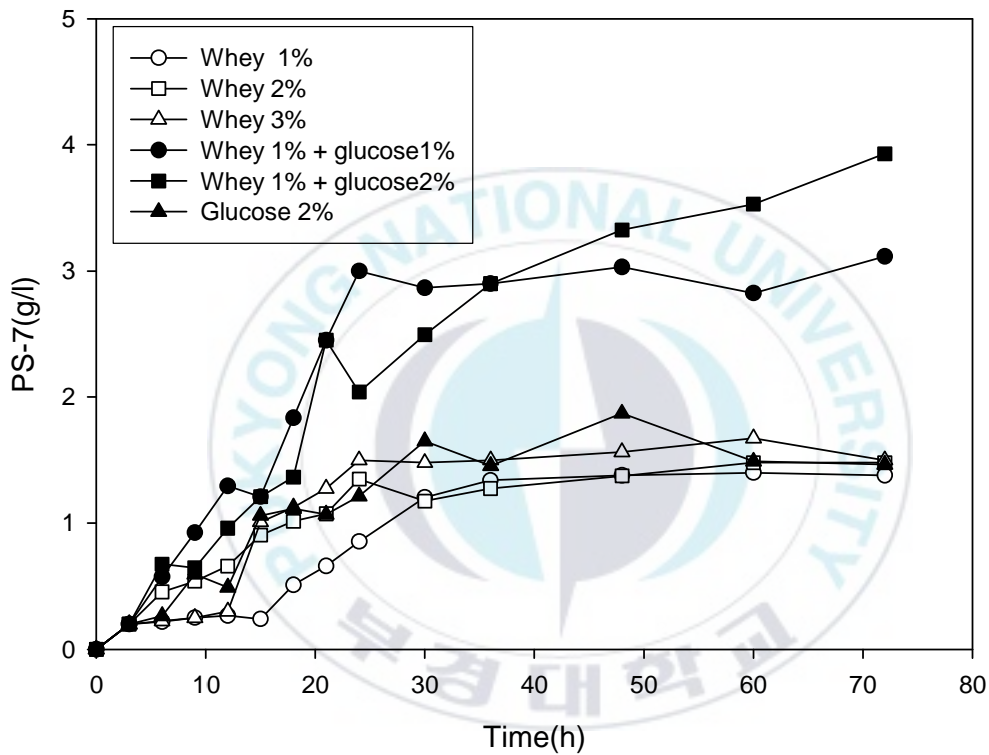


Fig. 6. Effect of carbon composition of medium on PS-7 production of *B. indica* L3



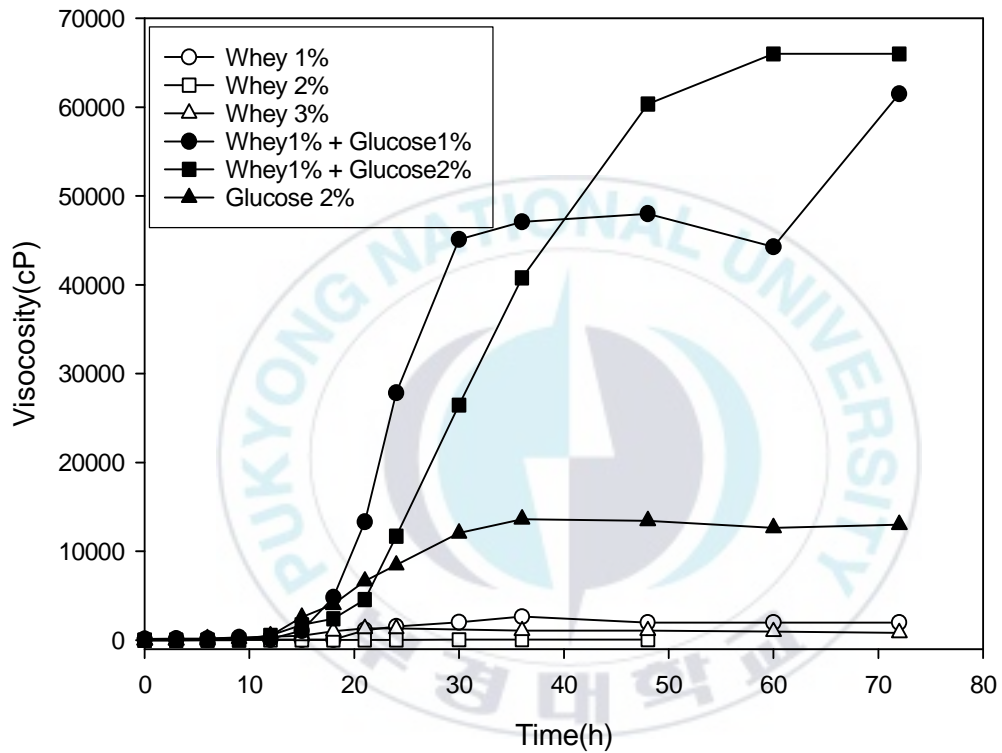


Fig. 7. Effect of carbon composition of medium on viscosity of *B. indica* L3

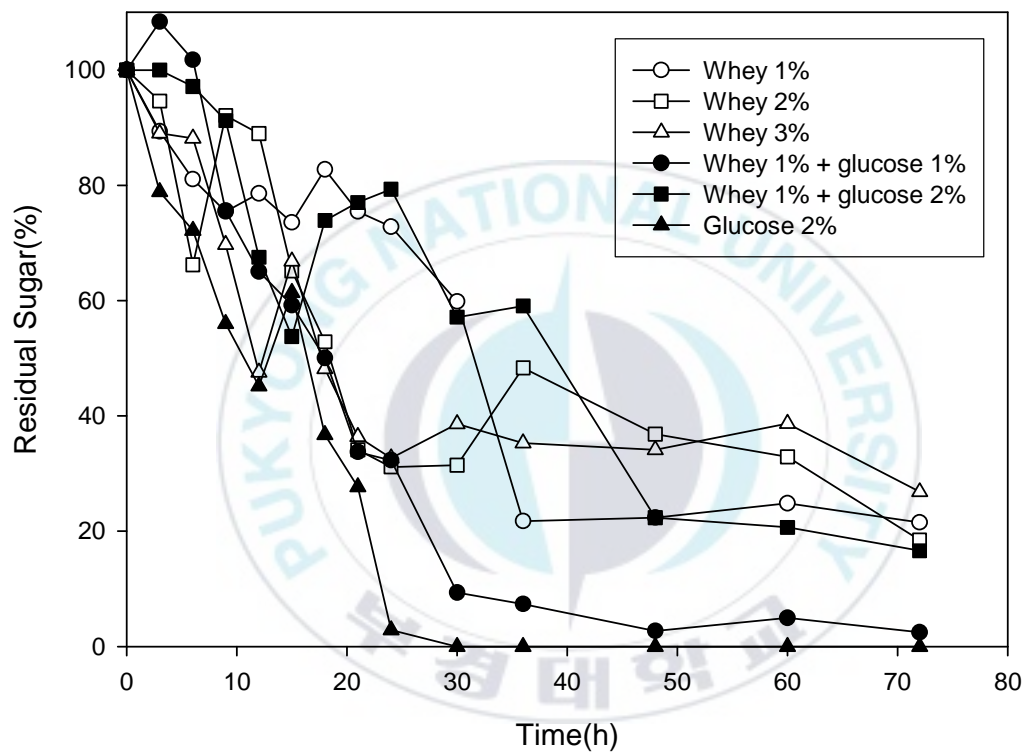


Fig. 8. Effect of carbon composition of medium on residual sugar of *B. indica* L3

### 3.2 RSM(Response Surface Methodology)을 통한 배지의 최적화

[Table 5] 는 세 가지의 독립변수의 조성에 따라 배양 72 시간에 해당하는 DCW(Dry Cell Weight), PS-7, 그리고 점도의 변화에 대한 결과이다. 독립변수(independent variable)는 모두 3가지로 whey lactose(% , w/v medium, X1), 포도당(% , w/v medium, X2), ammonium nitrate(mM, X3)이며, 종속변수(dependent variable)는 PS-7(Heteropolysaccharide-7), DCW(Dry Cell Weight), Viscosity, 모두 3가지 변수를 사용했다. 본 실험을 위한 중심합성계획(Central Composite Design; CCD)의 실험은 꼭지점 8개( $2^k=2^3$ ), 축점 6개( $2 \times k=2 \times 3$ ), 중심점(Central point) 3개로 모두 17포인트이다. [Table 5] 의 결과를 토대로 식 [1] 에 나타난 회귀식을 구하였으며 모든 통계적 프로그램은 SAS/STAT statistical package로 계산하였다 [Table 6] .

회귀계수(Regression coefficient)값과 회귀식의 적합성 검정을 위하여 F-test 와 분산분석(ANOVA)을 시행하였다. [Table 6] 에서 결정계수(R square, coefficient of determination)의 값은 PS-7생산량, DCW, 점성에서 각각 0.72, 0.63, 0.85로써 유용한 값이라고 할 수 있다. 테이블에서  $b_0$ 는 단순회귀분석(simple linear regression analysis)에서 절편을 의미한다.  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ 는 단순(linear) 회귀 계수이며,  $b_{11}$ ,  $b_{22}$ ,  $b_{33}$ 은 2차항(quadratic) 회귀 계수,  $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{23}$ 은 2항교차(Two-factor cross) 회귀 계수이다.

회귀식을 근거로 하여 작성된 3차원 반응 표면 분석결과로 유청 및 glucose가 ammonium nitrate의 농도(5.0mM, 7.5mM, 1.0mM의  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )에 따라 세포생장, PS-7 생산 및 점도에 미치는 효과를 나타내고 있다 [Fig. 9, 10, 11] .

세포의 건조 균체 중량(Dry Cell Weight)은 glucose의 양에 관계없이

whey lactose 2.0%농도에서 최대 세포생장을 나타내는 안장모양의 분포를 보여주고 있다 [Fig 9] . 이는 유청에 존재하는 유당의 농도가 세포의 성장을 조절하는 기작이 있는 것으로 추측할 수 있으나 확실한 규명이 앞으로 필요할 것으로 보인다. 특이한 점은 ammonium nitrate의 농도에는 상관없이 비슷한 추이로 움직인다는 것이다.

유청 및 glucose가 ammonium nitrate의 농도(5.0mM, 7.5mM, 1.0mM의 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)에 따라 PS-7 생산에 미치는 효과를 살펴보면 유청 배지에 glucose의 첨가와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>의 증가는 PS-7 생산을 증가시키는 것을 알 수 있다 [Fig. 10] . 우선 5.0, 7.5, 10.0mM의 ammonium nitrate의 농도에서 glucose의 증가는 PS-7의 생산량을 증가시킨다. 최고 생산량은 각 ammonium nitrate의 농도에서 glucose와 whey의 농도가 최고에 있을 때이다. 탄소와 질소의 공급원의 비율에 의해서 PS-7의 생산량이 달라지고 있다는 것을 알 수 있으며, 경사도로 봐서 whey보다는 glucose의 첨가가 PS-7의 생산량에 더 중요한 영향을 미치고 있다는 것을 알 수 있다. 또한 일정농도 이상에서는 큰 변화가 없다는 것도 알 수 있다. Wu [21] 는 *B. indica* L3의 galactosidase의 activities에 대하여 조사를 하면서, *B. indica* L3의 lactose 대사가 다른 박테리아와 마찬가지로 glucose에 의해 catabolite repression하에 있다는 것을 제시하였다 [22, 23, 24] . Jurgen [24] 은 질소가 통제된 상황에서 호기적으로 자라는 세포들은 생물 총량 생산(biomass production)을 위해 일정한 C/N(carbon/nitrogen) ratio를 유지하기 위해 추가의 carbon을 이화시키거나 저장한다고 제안하였다. 다른 연구자들은 C/N ratio가 polysaccharide의 생산에 중요한 역할을 하고 있다는 실험들을 보여주고 있다. 본 실험의 결과 배지에서 C/N ratio가 중요한 역할을 할 수 있는 질소의 출발점이 될 수 있다는 것을 보여준다.

PS-7의 생산량은 점도(viscosity)와도 직접적인 관련이 있고 PS-7의 생산량과 점도의 변화는 매우 유사한 삼차원 표면 반응으로 나타나고 있다 [Fig 1 1]. 10.0mM의 ammonium nitrate에서 점도는 40,000cp이지만, 그보다 낮은 농도의 5.0mM과 7.0mM의 ammonium nitrate의 농도에서는 50,000cp의 높은 점성을 보여준다. 그러나 높은 유청 농도와 포도당의 농도에서의 점도는 PS-7 생산추이와 일치하지 않았으며 어느 수준 이상에서 점도의 증가는 일어나지 않았다.

매우 높은 농도의 질소원의 첨가는 균체의 성장에 큰 효과를 줄 수 있으나 균체의 대사산물에 대한 효과는 떨어진다는 보고가 있었고, 유청 내부에는 가용성 단백질 저급 펩타이드들이 존재할 수 있어, 오히려 ammonium nitrate와 같은 질소원을 첨가할 경우 균체의 성장에만 영향을 주고 PS-7의 생산에 있어서는 역효과의 가능성을 추측할 수 있었다.

점도의 감소는 또한 생성되는 PS-7의 분자량적 변화를 추측할 수 있어 이를 확인하기 위하여 고유점도를 측정하였다. 측정된 시료는 질소원이 첨가되지 않은 유청 배지와 10mM ammonium nitrate가 첨가된 유청배지였으며 고유점도는 0.110, 0.090으로서 ammonium nitrate의 첨가는 고유점도를 감소시킨 것으로 보아, 분자량적 감소가 일어났음을 알 수 있었다. 특히 Huggins 상수  $k$ 는 매우 크게 차이가 났으며 각각 13.33, 51.85로서  $k$  상수는 용매와 반응에 따라 영향이 크며, 분자크기가 작을 수록 내부 혹은 외부의 작용기가 노출되거나 반발되기 쉬워질 수 있다는 것을 암시한다. 따라서 크게 고유점도는 떨어지지 않았으나 Huggins 상수를 통하여 분자구조적인 변화가 매우 크다는 것을 알 수 있었다.

Table 5. Response surface level combinations of independent variables in the experimental design and responses of dependent variables.

Design Point	Independent variable			Dependent variable		
	Whey lactose (% w/v)	Glucose (% w/v)	Ammonium Nitrate (mM)	PS-7 <sup>a</sup> (g/L)	DCW <sup>b</sup> (g/L)	Viscosity (cP)
	X1	X2	X3			
1	-1	-1	-1	2.07	2.73	31733
2	-1	-1	1	1.07	2.51	16616
3	-1	1	-1	3.20	1.63	45590
4	-1	1	1	2.70	3.23	38511
5	1	-1	-1	2.85	1.70	58727
6	1	-1	1	2.98	2.39	46969
7	1	1	-1	3.41	3.01	51708
8	1	1	1	4.00	1.07	38331
9	- $\alpha$	0	0	3.18	1.56	50449
10	$\alpha$	0	0	3.00	1.23	53688
11	0	- $\alpha$	0	2.84	3.26	46790
12	0	$\alpha$	0	3.24	7.49	43010
13	0	0	- $\alpha$	3.56	5.77	53088
14	0	0	$\alpha$	2.50	2.85	32273
15 c	0	0	0	2.82	3.64	45350
16 c	0	0	0	2.81	3.55	42460
17 c	0	0	0	2.77	3.80	47700

a: Polysaccharide-7, b: Dry cell Weight, c: Central points

Table 6. Regression Coefficients and Analyses of Variance.

Coefficient	Polysaccharide-7 production (g/L)	Dry cell weight (g/L)	Viscosity (cP)
bo	3.426	-4.610	-7253.4
b1	-0.1978	7.725**	14923.0
b2	0.4558	-0.7388	21329.0*
b3	-0.3232	0.6423**	5550.2
b11	-0.00207	-1.632	1171.8
b22	-0.02708	0.3534	-2413.5
b33	-0.004734	-0.02867	-563.8
b12	-0.1487	0.04625	-6426.1**
b13	0.1110	-0.1320	-147.0
b23	0.0480	-0.0405	320.9
R-square	0.7217	0.6369	0.8499
F	2.02	1.36	4.40
Probability of F	0.1836	0.3487	0.0318

\*Significant at 10% level, \*\*significant at 5% level, \*\*\*significant 1% level



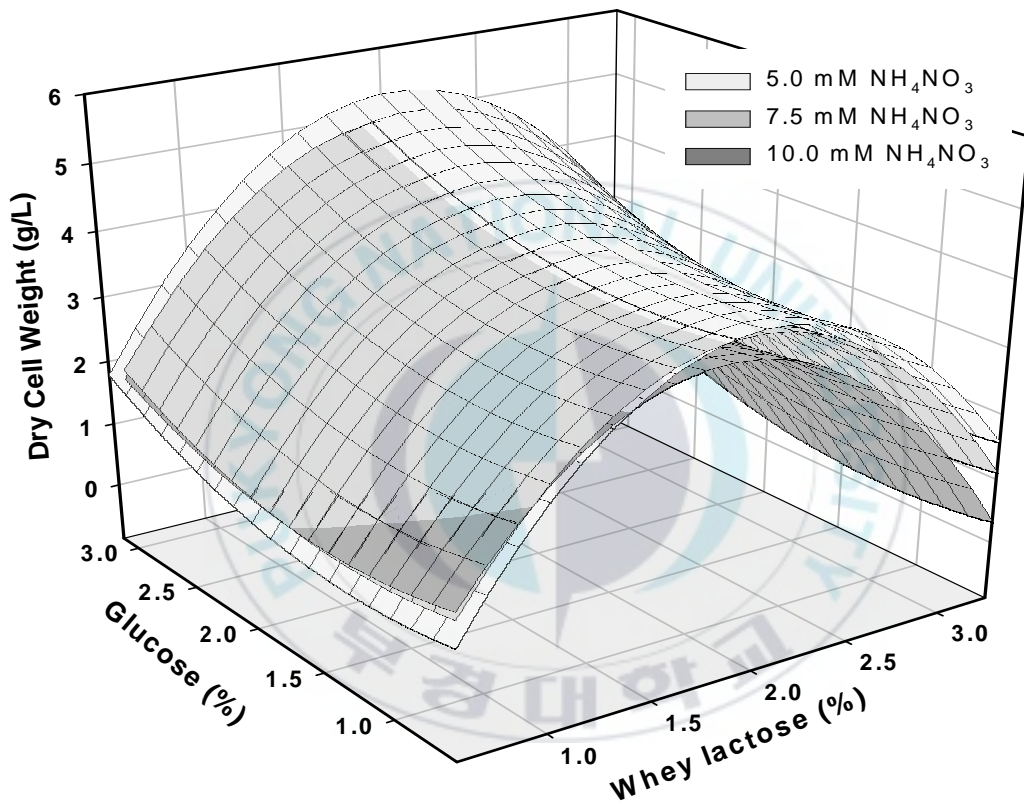


Fig. 9. Effect of glucose, whey and ammonium nitrate concentration on the dried cell weight(DCW) of *B. indica* L3



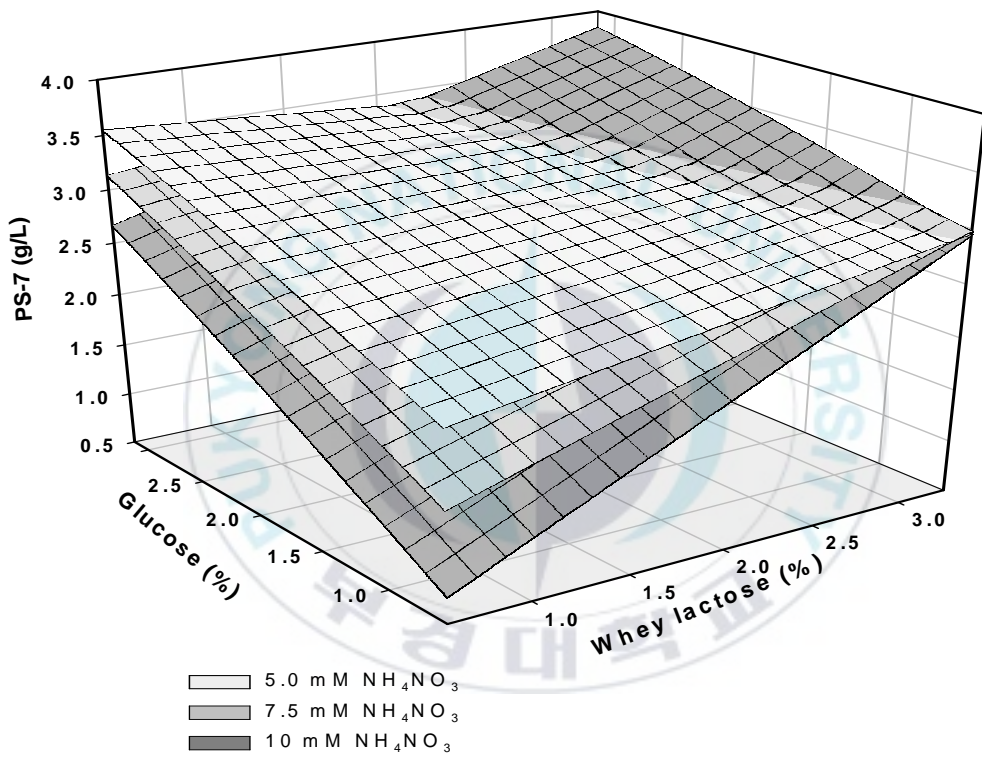


Fig. 10. Effect of glucose, whey and ammonium nitrate concentration on the PS-7 production of *B. indica* L3

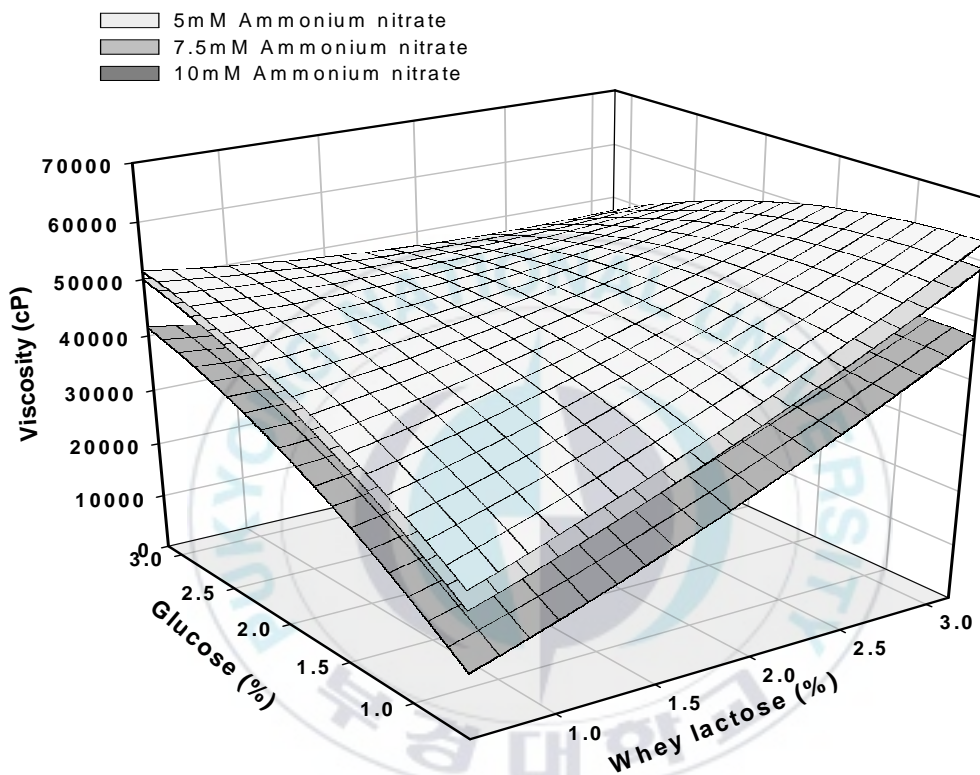


Fig. 11. Effect of glucose, whey and ammonium nitrate concentration on the viscosity(c) of *B. indica* L3

#### 4. 결론

유청 배지를 기본으로 첨가된 각 탄소원의 효과를 살펴보면 sucrose와 glucose의 첨가가 PS-7의 생산을 다른 당에 비해 향상시킴을 알 수 있었다. 절대량의 비교에 있어서는 glucose의 첨가가 다른 당에 비해 PS-7 생산에 큰 효과를 보이고 있지는 않았으나 첨가량에 따라 PS-7의 생산이 증가되는 것을 고려해 볼 때 어느 정도의 glucose 첨가로 최대의 PS-7 생산이 가능한 것으로 보인다. Dry cell weight의 경우는 탄소원의 첨가에 대하여 전체적으로 양이 줄어드는 것을 알 수 있다. 탄소원에 따른 점성(Viscosity) 정도를 관찰하면 전체적으로 농도를 높여 갈수록 점성이 증가하는 것을 볼 수 있다.

배지내 Glucose농도 변화에 따른 PS-7의 생산량의 변화를 관찰한 결과 유청과 glucose를 함께 첨가한 것이 유청이나 glucose 만을 배지의 탄소원으로 사용했을 때 보다 PS-7의 생산량이 월등히 향상되는 것을 알 수 있었다. whey 1%와 glucose 1%의 경우 처음 시작부터 20시간까지 급격한 증가세를 보이다가 이후 큰 변화가 없지만 whey와 glucose를 단독으로 사용했을 경우 보다 3배의 효율을 보이면서 3g/ℓ의 양을 생산해 내었다. 한편 whey 1%와 glucose 2%를 사용하였을 경우는 시간의 흐름과 거의 정비례하여 증가하면서 4g/ℓ으로 최고의 생산량을 기록했다. 배지내 Glucose농도 변화에 따른 점성(Viscosity)의 변화는 PS-7의 생산량의 변화와 비슷한 모습을 보이지만 차이는 더 크게 나타났다. whey를 단독으로 공급했을 때는 점성에 거의 변화가 나타나지 않았으며 glucose 2%를 사용하였을 경우는 10,000cP를 나타내었다. 그러나 whey와 glucose를 혼합하여 탄소공급원으로 사용하면 whey 1%와 glucose 1%의 경우는 60,000cP를, whey 1%와 glucose 2%일 경우에는 65,000cP의 점성을 나타내고 있다.

RSM(Response Surface Methodology)을 통한 배지의 최적화실험에서는 세

가지의 독립변수의 조성에 따라 배양 72 시간에 해당하는 DCW(Dry Cell Weinght), PS-7, 그리고 점도의 변화에 대한 결과를 관찰하였다. 독립변수 (independent variable)는 모두 3가지로 whey lactose, glucose, ammnoium nitrate이다. 회귀계수(Regression coefficient)값과 회귀식의 적합성 검정을 위하여 F-test와 분산분석(ANOVA)을 시행하였다. 결정계수(R square, coefficient of determination)의 값은 PS-7생산량, DCW, 점성에서 각각 0.72, 0.63, 0.85로써 유용한 값을 획득하여 신뢰성을 보장받았다. 회귀식을 근거로 하여 작성된 3차원 반응 표면 분석결과로 유청 및 glucose가 ammonium nitrate의 농도(5.0mM, 7.5mM, 1.0mM의 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)에 따라 세포생장, PS-7 생산 및 점도에 미치는 효과는 세포의 건조 균체 중량(Dry Cell Weight)에서는 glucose의 양에 관계없이 whey lactose 2.0%농도에서 최대 세포생장을 나타내는 안장모양의 분포를 보여주고 있다. 유청 및 glucose가 ammonium nitrate의 농도(5.0mM, 7.5mM, 1.0mM의 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)에 따라 PS-7 생산에 미치는 효과를 살펴보면 유청 배지에 glucose의 첨가와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>의 증가는 PS-7 생산을 증가시키는 것을 알 수 있다. 우선 5.0, 7.5, 10.0mM의 ammonium nitrate의 농도에서 glucose의 증가는 PS-7의 생산량을 증가시킨다. 최고 생산량은 각 ammonium nitrate의 농도에서 glucose와 whey의 농도가 최고에 있을 때이다. 또한, 낮은 농도에서 탄소원의 공급은 PS-7의 생산량 변화에 큰 영향을 미치지 못하지만 높은 질소 농도에서 glucose와 whey 농도의 변화는 PS-7의 생산에 상당히 중요한 영향을 미치며, 최고의 PS-7 생산량을 결정하는 탄소와 질소의 최적비율(optimal ratio)이 존재한다는 것을 알 수 있다. 본 실험의 결과 일반적으로 C/N ratio가 중요한 역할을 하고 있으며, 일정한 농도 이상에서는 C/N ratio가 의미가 없다는 것도 알 수 있다. 또한 whey 보다는 glucose의 영향이 크다는 것도 알 수 있다.

결론적으로 본 실험의 반응 표면 분석은 통계적으로 신뢰성 있는 결과로 나타난 것을 토대로 하였을 때, 포도당의 첨가는 유청배지를 이용한 *Beijerinckia indica* L3의 PS-7 생산을 크게 증대시키는 것으로 나타났으며 표면 반응 분석을 통한 최적화 실험을 통하여 봤을 때, 포도당, 유청과 같은 탄소원의 증가와 함께 질소원의 증가는 PS-7의 생산을 꾸준히 증대시켰으며, 그 적절한 탄소원/질소원의 비율(C/N ratio)일 때 최대의 생산량을 보이는 것을 알 수 있었다.



## 5. 감사의 글

가장 먼저, 2년 동안의 짧지 않은 학업기간 동안에 온전한 시간을 투자하지 못함에도 애정으로 지도해주신 김성구 교수님께 감사드립니다. 또한, 김기홍 교수님과 남윤권 교수님의 가르침을 통하여 많은 것을 배웠습니다. 고맙습니다.

실험을 도와주신 김기명 박사님과 라채훈님께 감사드리며, 김지현님, 공수정님을 비롯한 실험실원들에게도 고마움을 전합니다. 입학과 졸업을 함께 하게 된 하유미님과 김윤임님의 배려가 무사히 학업을 마치는데 큰 힘이 되었습니다. 두 분은 더 훌륭한 일들을 많이 하실 거라고 믿고 있습니다. 특별히, 논문 발표와 작성에 아낌없는 충고와 조언을 해주신 김병진 박사님과 이남규 박사님께도 감사드립니다.

여러 가지 부족한 면이 많은 저에게 든든한 후원자가 되어 주신 양문석 과장님과 황동철 계장님, 김두문 주무님, 최연화 님에게도 깊은 감사를 드립니다.

나의 소중한 동반자인, 미경의 인내가 없었다면 만학은 꿈도 꾸지 못했을 것입니다. 동호와 동희에게도 공부한다는 핑계로 함께 하지 못한 시간에 대한 미안한 마음이 있습니다. 좋은 남편 그리고 아빠가 되도록 노력할게.

마지막으로, 소중한 기회를 주신 부산광역시청과 국립 부경대학교에 감사드립니다. 평생 공부하는 학생이 되겠습니다. 감사합니다.

## 6. 참고문헌

1. Sutherland, I.W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* 16: 41-46.
2. Sutherland, I.W. 2001. Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria. *Int. Dairy J.* 1: 663-674.
3. Falk, C., P.E. Jansson, M. Rinaudo, A. Heyrad, G. Widmalm and P. Hebbar: 1996. Structural studies of the exocellular polysaccharide from *Sphingomonas aucimobilis* strain I-886. *Carbohydr. Res.* 285: 69-79
4. Gulin, S., A. Kussak, P.E. Jansson, and G.Widmalm. 2001. Structural studies of S-7, another exocellular polysaccharide containing 2-deoxy-arbino-hexuronic acid. *Carbohydr. Res.* 311:285-290.
5. Kang, S.K. and W.H. McNeely. 1976. Polysaccharide and bacterial fermentation process for its preparation. *US Patent* 3,960,832.
6. Lee, J.W., W.G.Yeomans, A.L.Allen, R.A.Gross, and D.L. Kaplan. 1997. Compositional consistency of a heteropolysaccharide-7 produced by *Beijerinckia indica*. *Biotechnol. Lett.* 19:803-807.
7. Thorn, L., M.J. Mikolajczak, R.W. Armentrout, and T.J. Pollock. 2000. Increasing the yield and viscosity of exopolysaccharides secreted by



*Sphingomonas* by augmentation of chromosomal genes with multiple copies of cloned biosynthetic genes. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 25:49-57.

8. Dlamini, A.M. and P.S. Peiris. 1997. Production of high viscosity whey broths by lactose utilizing *Xanthomonas campestris* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1483-1485.
9. Wu, Jian-Rong. 2005. Thesis for PhD, Pukyong National University, Busan, Korea.
10. Dubois, M., Ka.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
11. Raju, K. and M. Yaseen. 1992. A new equation for estimating  $[\eta]$  from single-viscosity measurement in dilute solution. *J. Appl. Polym. Sci.*, 45:67
12. Gillespie, T. and M.A. Hulme. 1969. On the single-point determination of intrinsic viscosity. *J. Appl. Polym. Sci.*, 13:2031.
13. Abell, M. L., Braselton, J. P., and Rafter, J. A. (1999). *Statistics with Mathematica*, Academic Press.



14. Hastings, K. J.(2000). Introduction to Probability with Mathematica, Lewis Publishers, Inc.
15. Karian, Z. A. and Tanis, E. A.(1999). Probability and Statistics: Exploration with Maple, Prentice Hall.
16. Rafter, J. A., Braselton, J. P., and Abell, M. L.(2003). Statistics with Maple, Academic Press.
17. Rose, C. and Smith, M. D.(2002). Mathematical Statistics with Mathematica, Springer Verlag.
18. Myers, R. H. and Montgomery, D. C.(2002). Response Surface Methodology, John Wiley, 56p.
19. 이승훈, 2006, Minitab을 이용한 공학통계 자료분석, 이레테크.
20. SAS Institute, SAS/STAT User's Guide, version 6, 4<sup>th</sup> ed., Cary, NC, 1990
21. Wu, JR. 2005. Studies on the production of heteropolysaccharide-7 by *Beijerinckia indica*. Thesis for Ph.D. Pukyong National University. Korea.

22. Fu, J.F. and Y.H. Tseng. 1990. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. Appl. Environ. Microbiol. 56: 919-923
23. Saier, M.H., G.M. Cook, J. Deutscher, I.T. Paulsen, J. Reizer, and J.J. Ye. 1996. Catabolite repression and inducer control in gram-positive bacteria. Microbiology 142:217-230
24. Jurgen, O. 2000. Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence: FEMS Microbiol. Rev. 24:321-333

