

용존산소 농도 조절이 미생물유래 Transglutaminase 생산에 미치는 영향

유재수·¹전계택·^{*}정용섭

전북대학교 농과대학 응용생물공학부,¹강원대학교 자연과학대학 생명과학부

(접수 : 2003. 3. 11., 게재승인 : 2003. 4. 30)

The Effect of Dissolved Oxygen on Microbial Transglutaminase Production by *Streptovorticillium morbaraense*

Jae-Soo Yoo, Gie-Taek Chun¹, and Yong-Seob Jeong^{*}

Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

¹Division of Life Sciences, Kangwon National University,

Chunchon 200-701, Korea

The effect of dissolved oxygen(DO) on microbial transglutaminase(mTG) production by *Streptovorticillium morbaraense* was studied in on-line computer controlled fermentation system. In order to control dissolved oxygen during fermentation, the agitation speed and aeration rate of 2.5 L fermenter ranged from 260 to 360 rpm and 0.3 to 3.9 L/min, respectively. The maximum microbial transglutaminase production was obtained at dissolved oxygen control(20%) condition among the various dissolved oxygen controlled batch cultures tested. The production of microbial transglutaminase with control of dissolved oxygen(20%) was about 2.12 U/mL which was 1.1 times higher than that obtained in batch culture without control of dissolved oxygen. Also, the highest microbial transglutaminase production was obtained in fed-batch cultures in which dissolved oxygen was controlled at 20%, and it was improved almost 1.3 times in comparison with that without control of dissolved oxygen. Maximal dry cell weight and microbial transglutaminase production were 13.2 g/L and 2.6 U/mL, respectively. Finally, it was also found that fed-batch fermentation with control of dissolved oxygen(20%) showed a good performance for the microbial transglutaminase production by on-line computer controlled fermentation system which may be generally applicable to other microbial cultures.

Key words : *Streptovorticillium morbaraense*, dissolved oxygen, on-line computer controlled fermentation system, microbial transglutaminase.

서론

Transglutaminase(TG)는 glutamyl 잔기의 γ -carboxamide group과 다양한 1차아민 사이에 acyl transfer 반응을 촉매한다. 이러한 TG의 가교형성 능력은 단백질을 구조적으로 변형시키고 단백질 식품의 기능적인 특성을 변화시킴으로써, 식품의 물성변화를 유도하여 다양한 식품의 제조를 가능하게 한다(1-8). 따라서 이러한 TG를 단백질 가교결합에 응용함으로써 식품의 질을 향상시키고, 식품이외의 다른 분야에도 응용함으로써 TG의 다양한 역할을 기대할 수 있다.

미생물 배양에 의한 이차대사산물의 생산은 미생물과 발효조건 사이의 관계를 최적화함으로써 향상시킬 수 있다(9). 발

효조건으로는 배지영양물의 종류와 농도, 용존산소, pH, 온도, 교반속도와 통기량 등이 있다.

*Streptovorticillium morbaraense*는 호기성 균주로서 발효 시 미생물의 산소요구량을 충족시킬 수 있는 배지내의 용존산소가 중요한 인자로 작용한다. 발효 중 미생물의 산소요구도는 발효조의 교반과 통기에 의한 산소공급과 균형을 이루어야한다. 만일 이 요구를 충족시키지 못하면 배양액의 용존산소 농도는 임계농도 이하가 되어 미생물대사에 치명적인 피해를 가져올 수 있다(10-14). 특히 균사를 형성하는 미생물의 경우 미생물이 성장함에 따라 발효액의 점도가 높아지면 산소전달은 급속히 감소된다(15-19). 산소전달을 극대화하기 위하여 과도한 교반속도의 증가는 교반 시 발생하는 전단력에 의해 생산 균주의 불활성 현상을 초래할 수 있다. 그러므로 미생물 발효를 최적에서 수행할 수 있는 생물반응기 운전 조건 확립이 필요하다.

Barberis(20) 등은 *Kluyveromyces fragilis*에 의한 β -Galactosidase 생산에서 최적의 용존산소 농도는 30%이었고,

^{*} Corresponding Author : Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

Tel : 063-270-2571, Fax : 063-270-2572

E-mail : ysjeong@moak.chonbuk.ac.kr

Masahiko(21) 등은 *Streptomyces lavendulae*에 의한 Moranoline 생산에서 용존산소 농도 20% 유지가 생산에 최적임을 보고했다. 또한 Hwang(22) 등은 *Acetobacter xylinum* BRC50에 의한 cellulose 생산에서 용존산소 농도 10% 유지가 생산에 최적임을 보고했다. 따라서 미생물마다 용존산소 임계점이 다르기 때문에 생산물을 극대화하기 위한 용존산소 농도 조절에 관한 연구는 중요한 부분이라 판단된다.

본 연구에서는 발효동안 교반속도와 통기속도를 일정한 범위에서 동시에 조절하여 용존산소 농도가 미생물유래 TG 생산에 미치는 영향 및 용존산소 농도에 따른 미생물유래 TG의 생산성 변화를 조사하고자한다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용한 균주는 *Streptoverticillium morbaraense*(ATCC 29302)이며, 균주의 활성을 유지하기 위하여 bacto agar 배지에서 2개월마다 계대배양하였다.

배지 및 배양조건

종배양을 위해 사용된 성장배지의 조성은 glucose 0.5%, proteose peptone 0.2%, $MgSO_4$ 0.1%, K_2HPO_4 0.2%이며, 성장배지 80 mL에 bacto agar 배지에서 취한 10^8 포자를 접종하여, pH 7.0, 온도 30°C, 교반속도 250 rpm에서 3일간 진탕 배양하였다. 생산배지 조성은 soluble starch 5%, proteose peptone 2%, yeast extract 0.2%, $NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$ 0.1%, $MgSO_4$ 0.1%, PPG 0.05%이었고, pH는 2 N HCl 또는 2 N NaOH를 사용하여 7.0으로 조정하였다.

발효조 배양

회분식 배양에 사용된 생물반응기(KBT Co., LTD, Korea)의 용기부피는 2.5 L이었고, 조업부피는 1.5 L이었다. 유가식 배양에서의 반응기 부피는 2.5 L이었고, 초기 배양 부피 1.3 L에 공급 배지 proteose peptone(20 g/L) 200 mL를 하루에 33 mL씩 6일 동안 간헐적으로 연속 공급하였다. 배지 공급은 연동 펌프(Cole-parmer instrument company, USA)를 이용하여 10초 들어가고 10분 멈추도록 조정하였으며, 시간당 1.4 mL를 공급하였다. 용존산소를 조절하지 않은 회분식 배양의 경우, 교반속도 330 rpm, 통기량 1 vvm(volume of air/volume of fluid/ min), 온도 30°C와 pH 7.0에서 10일 동안 발효를 수행하였다.

분석방법

건조균체농도를 측정하기 위해 일정량을 취하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상정액은 버리고 증류수를 넣어 혼합, 다시 원심분리하여 세척과정(3번)을 거친 후 105°C에서 항량을 구하였다. 효소활성은 J. E. Folk(23) 방법을 보완해서 측정하였고 1 unit는 1 μ mol L-glutamic acid γ -monohydroxamate가 생성되는 양으로 정하였다. 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준단백질로하여 Lowery(24) 방법으로 정량 하였다. 발효배양액의 잔류당은 Miller(25)가 제시한 dinitrosalicylic acid(DNS)를 이용하여 측정하였다. 전분함량은 Dubois(26) 방법을 보완해서 측정하였다.

배양액의 용존산소 농도 조절

배양액의 용존산소 농도 조절은 AutoLab LK V 2.0(Lokas, Korea) 시스템과 컴퓨터를 연결하여 자동으로 제어되도록 하였다. 제어 시스템의 구성은 Figure 1과 같다. 산소의 공급은 공기압축기를 이용하여 발효기내로 공급하였으며, 원하는 용존산소 농도는 일차적으로 통기속도 0.3-3.9 L/min 범위 내에서 배지내의 용존산소 농도를 측정하여 자동으로 통기속도를 조절하여 유지하였다. 그러나 통기속도 하나를 변화시켜 원하는 용존산소 농도로의 조절이 쉽지 않은 경우, 교반속도를 260-360 rpm 범위에서 동시에 변화시켜 원하는 용존산소 농도로 자동으로 조절되도록 하였다.

CO₂와 O₂ 농도 측정

반응기내에서 방출되는 CO₂와 O₂ 농도는 가스 분석기(Lokas, Korea)를 이용하여 측정하였다.

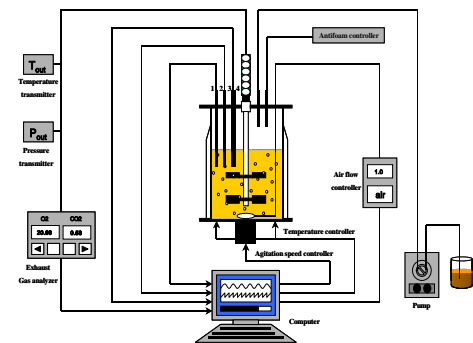


Figure 1. Configuration of on-line computer-controlled fermentation system : 1. Thermocouple 2. pH electrode 3. DO electrode 4. Exhaust condenser.

결과 및 고찰

용존산소 농도 조절 시스템에 의한 용존산소 농도 조절

발효를 하는 동안 용존산소 농도 조절 시스템(on-line computer-controlled fermentation system)의 실제 작동여부를 확인하고자, 용존산소 농도를 10-50%까지 조절하면서 교반속도와 통기속도의 변화를 관찰하여 Figure 2에 나타냈다. 발효 중 용존산소 농도 조절을 위해 통기속도 0.3-3.9 L/min, 교반속도 260 rpm 이상으로 작동되도록 설정하였고, 먼저 지정된 용존산소 농도 유지를 위해 통기속도가 우선적으로 작동되도록 하였으며, 만약 통기속도의 증가만으로 지정된 용존산소 농도를 도달할 수 없을 경우 교반속도와 동시에 작동되도록 하였다. 실험자료는 각각의 지정된 용존산소 농도에 대하여 1초마다 측정하여, 지정된 용존산소 농도가 상당기간 유지되는지 확인 할 수 있도록 50분 동안 수집하였다. 발효

초기 100%를 유지하던 용존산소 농도는 발효가 진행되면서 미생물의 성장으로 인하여 감소하였으며, 배양시작 10시간 후부터 바닥상태를 나타냈다. 용존산소 농도가 바닥상태에 도달한 후 용존산소 농도 10% 유지를 위해 원하는 값을 컴퓨터에 입력하자, 통기속도가 증가하기 시작하여 최대 2.1 L/min까지 증가되었고 교반속도는 최소값인 260 rpm으로 일정하게 유지되었다. 즉 용존산소 농도 10% 유지는 교반속도의 변화 없이 통기속도만으로 가능하였다. 또한 용존산소 농도 20-50% 유지를 위해서 조절하고자 하는 용존산소 농도 값을 컴퓨터에 입력하자 곧 통기속도는 최대값인 3.9 L/min까지 증가되었고, 통기속도만으로는 용존산소 농도 20%에 도달할 수 없었다. 원하는 용존산소 농도 값이 20%보다 증가하면 교반속도도 높게 증가되는 현상을 보여주었다. 용존산소 농도 20% 유지에는 305 rpm, 용존산소 농도 50% 유지에는 452 rpm까지 급격하게 증가됨을 알 수 있었다. 지정된 용존산소 농도 유지를 위해 용존산소 농도 자동 조절 시스템이 정확하게 작동됨을 확인할 수 있었다.

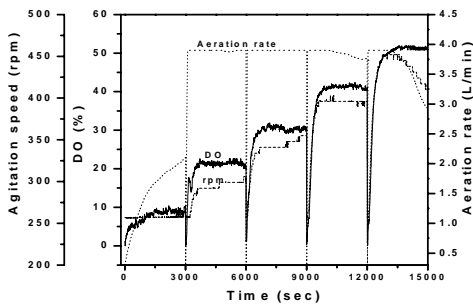


Figure 2. DO control mechanism by charging the agitation speed and aeration rate by using on-line computer-controlled fermentation system.

- : DO, - : aeration rate, - - - : agitation speed.

회분식 배양에서 용존산소 농도 조절에 의한 효소 생산
 용존산소 농도 자동 조절 시스템을 이용하여 회분식 발효에서 용존산소 조절이 효소생산에 미치는 영향을 구명하고자 용존산소 농도를 10-30%로 조절하여 실험을 수행하였다. 발효 중 용존산소 농도 조절을 위해 통기속도와 교반속도는 각각 0.3-3.9 L/min와 260-360 rpm으로 설정하였다. 과도한 전단력에 의한 미생물의 불활성을 고려하여 교반속도의 최고값은 회분식 배양에서 최대 생산성을 보여준 360 rpm으로 제한하였다(자료미제시). 지정된 용존산소 농도 유지를 위해 통기속도가 우선적으로 작동되도록 하였으며, 만약 통기속도의 증가만으로 지정된 용존산소 농도를 유지할 수 없을 경우 교반속도가 동시에 작동되도록 하였다. 용존산소를 조절하지 않고 일정한 교반속도에서 회분 배양한 실험을 대조구로 하였다(Table 1).

Table 1. Comparison of mTG production, dry cell weight and specific activity between batch and fed-batch cultures without control of DO

Culture type	mTG(U/mL)	DCW(g.L)	Specific Activity(U/mg)
Batch	1.95	14	0.035
Fed-batch	2.21	12.7	0.048

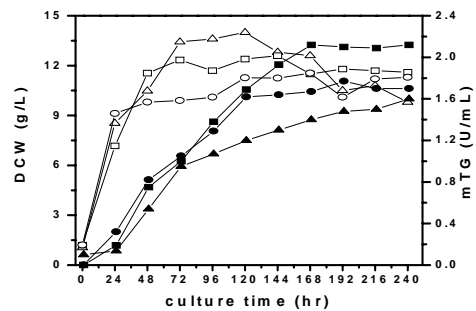


Figure 3. Comparison of mTG production and dry cell weight by on-line computer-controlled fermentation system at different DC saturation during batch culture. -△- : 10% DO, -□- : 20% DO, -○- : 30% DO, opened symbol : dry cell weight, closed symbol : mTG.

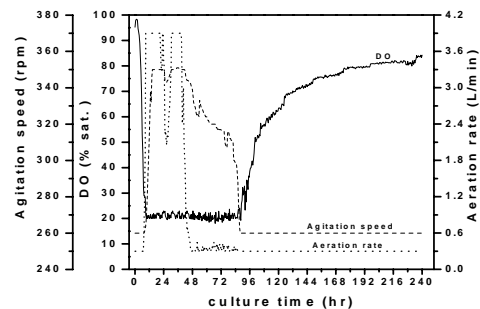


Figure 4. Time course profiles of DO, agitation speed, aeration rate in a 2.5 L batch fermenter culture. DO was maintained at about 20%, controlled by on-line computer-controlled fermentation system. - : DO, ... : aeration rate, - - - : agitation speed.

용존산소 농도 조절에 따른 mTG 생산과 세포 성장에 대한 회분식 배양 결과를 Figure 3에 나타냈다. mTG 생산은 용존산소 농도를 20%로 유지했을 경우 배양 7일에 2.12 U/mL로 대조구(1.95 U/mL)보다 약 1.1배 향상되었고, 용존산소 농도를 10%와 30%로 조절했을 경우 효소생산은 각각 1.6과 1.67

U/mL로 대조구(1.95 U/mL)보다 낮은 효소생산을 나타냈다. 건조균체량은 용존산소 농도를 20%로 유지했을 경우 12.6 g/L로 최대값을 나타냈고, 용존산소 농도를 낮게 유지할수록 증가하는 경향을 나타냈다.

지정된 용존산소 농도 유지를 위해 용존산소 농도 조절 시스템에 의해 작동되는 통기속도와 교반속도의 변화를 Figure 4에 나타냈다. 발효가 시작되면서 미생물들은 대수적으로 증가하여 용존산소 농도는 감소되었고 발효시작 10시간 후부터 지정된 용존산소 농도(20% DO)로 조절되기 시작하였다. 통기속도는 지정된 농도로 조절되는 시기에 모두 최대값인 3.9 L/min까지 증가하였고, 원하는 용존산소 농도 값이 높으면 최대 교반속도는 증가하는 경향을 보였다(Table 2). 발효 후 통기속도와 교반속도는 최소값인 0.3 L/min와 260 rpm으로 각각 일정하게 유지되었다.

Table 2. Effect of controlling dissolved oxygen concentrations by on-line computer-controlled fermentation system on mTG yield and max. DCW

Parameter	10%	20%	30%
Maximum aeration rate (L/min)	3.9	3.9	3.9
Maximum agitation speed (rpm)	307	351	360
Maximum CO ₂ conc.(%)	0.63	0.99	0.65
Maximum dry cell wt. (g/L)	14	12.6	11.5
Maximum mTG production (U/mL)	1.6	2.12	1.67

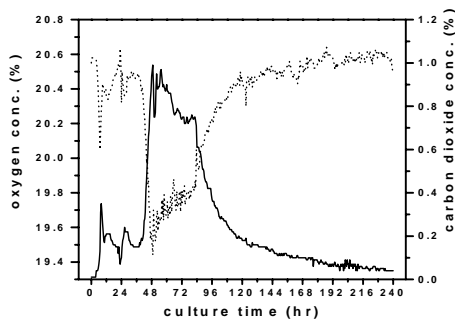


Figure 5. Time course profiles of oxygen and carbon dioxide concentration by on-line computer-controlled fermentation system at 20% DO saturation. - : carbon dioxide, : oxygen concentration.

발효 중 방출되는 CO₂와 O₂농도는 용존산소가 조절되는 시기에 왕성한 세포생장과 세포대사로 인하여 O₂ 농도는 감소되고 CO₂ 농도는 상대적으로 증가하였다. 특히 용존산소 농도를 20%로 유지했을 경우 CO₂ 농도는 0.99%로 가장 높게 측정되었다(Figure 5). 따라서 미생물마다 용존산소 임계점이 다르기 때문에 다른 용존산소 농도에서 생산물의 차이를

나타내는 것은 타당한 것으로 판단되어진다(10-14).

유가식 배양에서 용존산소 농도 조절에 의한 효소 생산

유가식 배양공정은 높은 기질 또는 영양분의 농도에 의한 세포생장의 억제, 부산물의 생성에 의한 생육억제 및 호기성배양에서의 용존산소량의 제한과 같은 고농도 세포배양에서 일어나는 문제점들을 최소화시킨다(27). Zhu(28) 등은 공급되는 기질중 고농도 질소원이 발효 중 생산된 mTG와 가교를 형성하여 효소생산이 오히려 저하됨을 보고하였다.

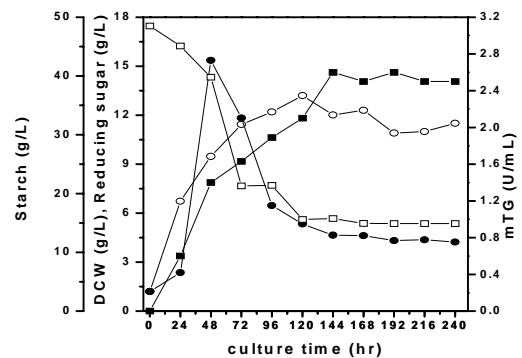


Figure 6. Time course profile of mTG production by on-line computer-controlled fermentation system at 20% saturation during fed-batch culture. -○- : DCW, -■- : mTG, -●- : reducing sugar, -□- : starch.

본 연구에서는 상기 결과를 토대로 질소원인 proteose peptone(20 g/L)을 6일 동안 연속적으로 공급하여 실험을 수행한 결과 회분식 배양보다 유가식 배양에서 효소생산과 비활성(specific activity)이 각각 1.1과 1.7배 향상됨을 확인할 수 있었다(Table 2). 또한 회분식 배양 실험에서 확인된 용존산소 농도 20%를 유가식 배양에 적용함으로써 수율을 향상시킬 수 있으리라 판단되었다. 유가식 배양에서 용존산소 농도를 20%로 조절했을 때의 실험결과를 Figure 6-8에 나타냈다. Figure 6은 mTG 생산에 대한 실험결과이며, 발효가 진행되면서 효소생산과 세포생장은 증가되기 시작하여 효소생산은 배양 6일에 2.6 U/mL, 건조균체량은 배양 5일에 13.2 g/L로 최대를 나타냈다. 용존산소 농도를 20%로 조절한 회분배양 보다 효소생산이 약 1.2배 향상되었다. 발효 중 용존산소 농도 유지를 위해 조절된 통기속도와 교반속도의 변화를 Figure 7에 나타냈다. 발효 중 용존산소 농도 조절은 회분식 배양조건과 동일하며, 용존산소 농도 20% 유지를 위해 통기속도는 최대 3.9 L/min, 교반속도는 299 rpm까지 각각증가하는 경향을 보였다. 그리고

발효 105시간 이후부터 통기속도와 교반속도는 최소 설정값으로 일정하게 유지되었다. 발효가 진행되는 동안 방출되는 O₂와 CO₂의 변화를 Figure 8에 나타냈다. 방출된 O₂ 농도는 균체가 빠르게 증식되는 발효 초기에 더욱 감소되었고, CO₂ 농도는 반대로 높게 측정되었다. 또한 CO₂ 농도는 회분배양의 경우보다 높게 측정되어 균체량의 증가 또는 효소 생산증가를 예측할 수 있었다.

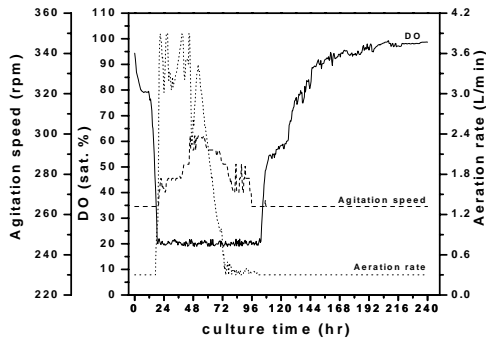


Figure 7. Time course profiles of DO, agitation speed, aeration rate in a 2.5 L fed-batch fermenter culture. DO was maintained at about 20%, controlled by on-line computer-controlled fermentation system. - : DO, ... : aeration rate, - - - : agitation speed.

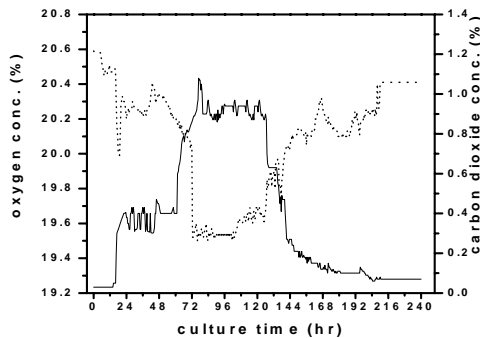


Figure 8. Time course profiles of oxygen and carbon dioxide concentration by on-line computer-controlled fermentation system at 20% DO saturation during fed-batch culture. - : carbon dioxide, ... : oxygen concentration.

결과적으로 상기결과를 요약하면 효소생산은 용존산소 농도를 조절하지 않은 회분배양(1.95 U/mL)과 유가식 배양(2.21 U/mL)보다 각각 약 1.3배와 1.2배 향상됨을 알 수 있었다. 따라서 *S. morbarae*에 의해 생산되는 미생물 유래 transglutaminase의 최적 용존산소 농도는 약 20%로 판단되었다. 그리고 용존산소 농도의 조절이 미생물의 배양에 중요한

경우, 사용된 용존산소 농도 조절 시스템은 최종 생성물의 생산성을 높일 수 있는 효과적인 장치로 판단된다.

요약

*Streptoverticillium morbarae*로부터 미생물유래 transglutaminase 생산을 위하여 최적의 용존산소 농도를 구명하였다. 용존산소는 용존산소 농도 자동 조절 시스템에 의해 조절되었다. 발효 중 용존산소 농도 조절을 위하여 통기속도는 0.3-3.9 L/min, 교반속도는 260-360 rpm으로 각각 범위를 설정하였다. 용존산소 농도를 조절한 다양한 회분식 배양에서 용존산소가 20%일 때 최대 미생물유래 transglutaminase 생산이 가능하였다. 회분배양에서 용존산소 농도를 20%로 조절한 경우 미생물유래 transglutaminase 생산은 2.12 U/mL이었고, 용존산소를 조절하지 않은 회분식 배양의 미생물유래 transglutaminase 생산보다 1.1배 향상되었다. 역시 가장 높은 미생물유래 transglutaminase 생산은 용존산소를 20%로 조절한 유가식 배양에서 가능하였으며, 용존산소를 조절하지 않은 회분식 배양의 미생물유래 transglutaminase 생산에 비교해서 1.3배 증가하였다. 최대 건조균체량과 미생물유래 transglutaminase 생산은 각각 13.2 g/L와 2.6 U/mL이었다. 용존산소를 20%로 용존산소 농도 자동 조절 시스템에 의해 조절한 유가식 배양은 미생물 유래 transglutaminase 생산에 적절하였으며 다른 미생물 배양에도 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

REFERENCES

1. Yasueda, H., Y. Kumazawa, and M. Motoki (1994). Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream(Pagrus Major), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 2041-2045.
2. Ando, H., M. Adachi., K. Umeda., A. Matsuura., M. Nonaka., R. Tanaka, and M. Motoki (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganism, *Agric. Biol. Chem.* **53**(10), 2613-2617.
3. Gerber, U., U. Jucknischke., S. Putzien, and H. L. Fuchsbaue (1994). A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptoverticillium morbarae*, *Biochem. J.* **299**, 825-829.
4. Somet, K. A (1997). Study of new protein ingredient by transglutaminase, *Shouhin Kougok.* **12**, 18-25.
5. Kuraishi, C., J. Sakamoto, and T. Soeda (1996). The usefulness of transglutaminase for food processing. *Biotechnology for Improved Foods and Flavors*(ACS Symposium Series 637), American Chemical Society, 29-38 .
6. Kumazawa, Y., H. Sakamoto., H. Kawauiri, and M. Motoki(1995). Determination of ϵ -(γ -glutamyl)lysine in several fish eggs and muscle proteins, *Fisheries Sci.* **62**, 331-332.
7. Motoki, M. and K. Seguro (1998). Transglutaminase and its use for food processing, *Fd. Sci. & Technol.* **9**, 204-210.
8. Sakamoto, H., K. Yamazaki., C. Kaga., Y. Yamamoto, R. Ito, and Y. Kurosawa (1996). Strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during chinese noodle processing, *Nippon Shokuhin Kaga., Kogku Kaishi.* **43**, 598-602.
9. Milner, J. A., D. J. Martin, and A. Smith (1996). Oxygen transfer conditions in the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*, *Enz. Microb. Technol.* **18**, 507-512.

10. Steel, M. R. and W. D. Maxon (1966), Dissolved oxygen measurements in pilot and production-scale novobiocin fermentation, *Biotechnol. and Bioeng.* **8**, 97-108.
11. Vardar, F. (1983), Problems of mass and momentum transfer in large fermentors, *Process Bioche.*, **18**, 21-23.
12. Stanbury, P. F., A. Whitaker, and S. J. Hall (1994), Principles of fermentation technology, 2nd ed., p246-249, Pergamon, Oxford.
13. Zhou, W., K. Holzhauser-Rieger, M. Dors, and K. Schugerl (1992), Influence of dissolved oxygen concentration on the biosynthesis of cephalosporin C, *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 848-854.
14. Kim, J. L., H. K. Kwon, G. T. Chin, and K. K. Lee (2000), Effect and development of automatic control of dissolved oxygen on growth of *Phellinus linteus* WI-001, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**(5), 285-290.
15. Pazouki, M. and T. Panda (2000), Understanding the morphology, *Biopro. Eng.* **22**, 127-143.
16. Packer, H. L. and C. R. Thomas (1990), Morphological measurements on filamentous microorganism by fully automatic image analysis, *Biotechnol. and Bioeng.* **35**, 870-881.
17. Nielsen, J (1992), Modeling the growth of filamentous fungi, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 187-223.
18. Claus, L. Johansen., L. Coolen, and J. H. Hunik (1998), Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations, *Biotechnol. Prog.* **14**, 233-240.
19. Amanullah, A., B. Tuttiett, and A. W. Nienow (1998), Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations, *Biotechnol. and Bioeng.* **57**, 198-210.
20. Barberis, S. E. and R. F. Segova (1997), Dissolved oxygen concentration controlled feeding of substrate into *Kluyveromyces fragilis* culture, *Biotechnol. Techniques.* **11**, 797-799.
21. Masahiko, K., T. Noriyuki, K. Yohsuke, K. Kiyotaka, M. Shigeaki, Y. Masashi, and E. Yohji (1995), Effect of dissolved oxygen and pH on moranolone(1-Deoxynojirimycin) fermentation by *Streptomyces lavendulae*, *J. Ferment. and Bioeng.* **79**(4), 391-394.
22. Hwang, J. L., Y. K. Yang, J. K. Hwang, Y. R. Pyun, and Y. S. Kim (1999), Effect of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture, *J. Biosci. and Bioeng.* **88**(2), 183-188.
23. Folk, J. E (1970), Transglutaminase, p889-890, Academic press, New York.
24. Suelter, C. H. (1985), A Practical guide to enzymology, p 31, John Wiley & Sons, Inc., Michigan.
25. Miller, G. L (1960), Dinitrosalicylic acid reagent for determination for reducing sugar, *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.
26. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith (1956), Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* **28**(3), 350-356.
27. Yee, L. and H. W. Blanch (1992), Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *E. coli*, *Biotechnol.* **10**, 1550-1556.
28. Zhu, Y., Rinzema, A. Tramper, E. de Bruin, and J. Bol (1998), Fed-batch fermentation dealing with nitrogen limitation in microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 251-257.