한국생물공학회지 제4권 제3호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 4. No. 3. 241-245 (1989)

균사 증식 담체를 이용한 유동층 생물반응기에서 Erythromycin의 생산

김 성 환 · 배 신 규 · 김 정 회
한국과학기술원 생물공학과

Production of Erythromycin Using a Carrier-Supported Mycelial Growth in a Fluidized-Bed Bioreactor

Sung H. Kim, Shin K. Bae and Jung H. Kim
Department of Biological Science and Engineering, KAIST, Chongryang P.O.Box 150, Seoul, Korea

ABSTRACT

A carrier-supported mycelial growth of *Streptomyces erythreus* was applied to erythromycin fermentation system using celite as a support material. Hyphal growth through the pore matrices of the materials showed anchorages and provided a stable biofilm growth. When the phospate concentration was limited to 0.8g corn steep liquor / L(corresponding to 40mg KH_2PO_4 / L), the specific production rate of erythromycin was increased from 557 μ g / g-cell·hr under unlimited condition to 2,898 μ g / g-cell·hr. A fluidized-bed bioreactor was operated for erythromycin production by a repeated fed-batch mode. The control of free mycelial concentration and the extension of production phase were considered important to maintain the reactor productivity at a desired level. The erythromycin production under phosphate-limited condition could be maintained for at least 600hrs.

Key Words : erythromycin, *Streptomyces erythreus*, fluidized-bed bioreactor, phosphate limitation

서 론

유동층 생물반응기는 일반 교반식 발효조보다 산소전달 능력이 우수하고 상대적으로 에너지 요구가 적으므로 최근 호기성 미생물 및 동물세포 배양에 많이 사용되어지고 있고(1,2), 또한 고정화 세포를 사용하여 항생제의 연속생산에 응용한 경우들도 보고 되었다(3,4,5,6). 사상균에 의한 항생제 발효시 공정상의 문제점은 배양이 진행됨에 따라 점도가 증가하고 이로 인한 산소전달 속도가 감소되어 항생제의 수율이 떨어지는 것이다. 고정화를 통해 사상균을 균사 증식 담체로 만들면 이러한 문제점이 어느정도 해결되며 또한 생물반응기에 적용하기가 용이해진다. 균사 증식 담체를 이용하여 생물반응기를 배양할 경우 장기간 동안 성공적인 조업을 하기 위하여는 균사 증식을 적당히 억제하여 배양액의 혼합을 좋게 하고 산소전달을 높여야 한다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 배지성분의 제한이 필요하다. 저자들은 이미 penicillin 생산이 celite에 고정화한 *Penicillium chrysogenum* 균의 균사 증식담체를 사용하여 유동층 생물반응기에서 배양할때 인산염을 제한하여 생물반응기의 조업상의 문제없이 30일 이상 균사 증식 담체의 활성을 안정하게 유지하였고 생산성도 높게 유지 시킬 수 있음을 보고 하였다(4).

따라서 본 연구는 *Streptomyces erythreus* 균을 담체에 고정화하고 유동층 생물반응기의 성공적인 조업을 위한 최적 인산염 제한 조건을 조사하고, 균사 증식 담체를 이용한 유동층 생물반응기에서 erythromycin의 생산에 대해 살펴 보고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

Streptomyces erythreus ATCC11635 균주를 erythromycin

생산을 위한 배양에 사용하였다. 보존 배지는 yeast extract 0.1%, beef extract 0.1%, tryptose 0.2%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001%, glucose 1%, agar 2%로 하였다. 복합 배지는 sucrose 3%, $(NH_4)_2SO_4$ 1%, NaCl 0.3%, corn steep liquor 3%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, propanol 0.1%, 무기염 용액 2% ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.025%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.005%를 포함한 용액)이었고, 인산제한 배지는 KH_2PO_4의 첨가없이 단지 corn steep liquor 속에 들어있는 인산 함량만을 인산원으로 하고 그 농도를 0.04−0.4%가 되도록 조절하였으며 나머지는 복합 배지와 동일하였다. 유동층 생물반응기에 사용된 배지는 sucrose 1%, $(NH_4)_2SO_4$ 1%, NaCl 0.3%, corn steep liquor 0.1%, propanol 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, 무기염 용액 2%이었다.

Flask 배양

250 mL flask에 50 mL 배지를 넣고 포자 현탁액(5×10^7 spores / mL)을 2 mL 접종하여 30℃, 250 rpm의 rotary shaker에서 배양하였다. 이때 포자 현탁액은 1 liter 크기의 세포 배양용 병의 바닥에 보존 배지를 이용하여 agar plate를 형성시키고 세포를 접종 후 30℃에서 약 10일간 incubation하였다. 생성된 포자는 1%의 Tween-80 용액을 이용하여 포자 현탁액을 만들었다. 다공성의 담체를 사용하여 균사 증식 담체를 배양할때는 포자를 흡착시킨 담체 5%(w/v)를 배지에 넣고 위와 같은 조건에서 배양하였다.

미생물의 고정화

고정화 물질로는 celite(Johns-Manville Corp., Denver)를 사용하였다. 고정화 방법은 Gbewonyo와 Wang (5)에 의해서 보고된 방법을 다음과 같이 변형하여 사용하였다. 적당히 희석된 포자 현탁액(5×10^7 spores/mL)과 완전히 멸균 건조된 celite를 비율이 1 : 5(w/v) 정도로 혼합한 뒤 2−3시간 방치한 후 담체에 흡착되지 않은 포자는 멸균수를 이용해 제거하였다. 이때 포자농도는 hemacytometer로 측정하였다.

유동층 생물반응기의 조업

유동층 생물반응기는 전 논문(3)에서 사용한 것과 동일한 것을 사용하였다. 72시간 배양된 균사 증식 담체를 5%(w/v)로 하여 생물반응기에 접종하였고 통기속도는 10 vvm으로 하여 배양하였다. 배양액의 온도는 30℃, pH는 7.3으로 조절하였다. 유동층 생물반응기는 반복유가식 방법으로 작동하였다 : 초기 부피 250 mL로 하고 25 mL / hr 속도로 일정하게 배지 용액을 공급하고 6시간 마다 분석을 위해 담체가 없는 배양액을 150 mL씩 회수하였다.

HPLC에 의한 Erythromycin 분석

분석 시료는 erythromycin을 추출하기 위하여 isoamyl acetate를 배양액에 첨가 시킨 후 12,000 rpm으로 원심분리하여 용매를 회수 후 제거하여 조제하였다. HPLC(Waters)에 의한 erythromycin 분석은 reversed-phase column(μ Bondapak C_{18}, Waters)을 사용하여 실시하였다. 용매로는 methanol : water : ammonia (80 : 19.9 : 0.1)를 사용하였으며 유속은 분당 1 ml 하였고 종근당 및 Sigma 제품의 erythromycin-A를 표준시료 물질로 사용하였다(7).

분석 방법

Erythromycin의 생물학적 정량은 paper-disc 법으로 결정하였으며 피검균은 *Bacillus subtilis* ATCC 6633을 사용하였고, 배지는 pepton 0.35%, yeast extract 0.3%, nutrient broth 0.4%, agar 1.5%를 사용하였다 (8). 균체량은 여과한 후 105℃에서 함량이 될때까지 건조시킨 후 측정하였다. 당의 정량은 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법으로 결정하였다(9). 인산염 정량은 Vaskovsky et al. 방법으로 수행하였다(10).

결과 및 고찰

균사 증식 담체의 제조

사상균의 포자를 흡착 할 수 있는 다공성 담체인 celite로 포자 흡착 정도를 시험하였다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 2시간 후에는 90%까지 포자가 흡착되었고 그 이상 시간이 경과했을때 흡착 정도는 더이상 크게 증가하지 않았다. 포자용액에서 celite의 pores로 흡착되는 것

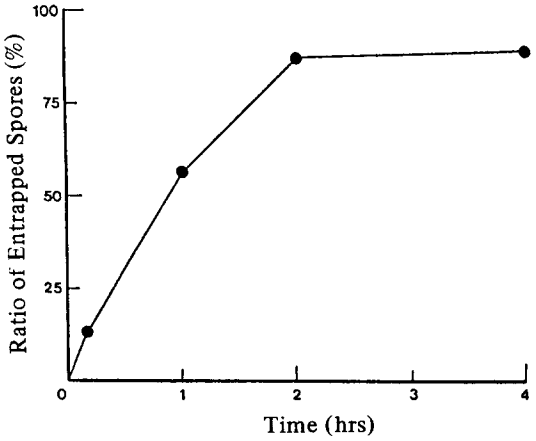

Fig. 1. Spore adsorption kinetics on celite.

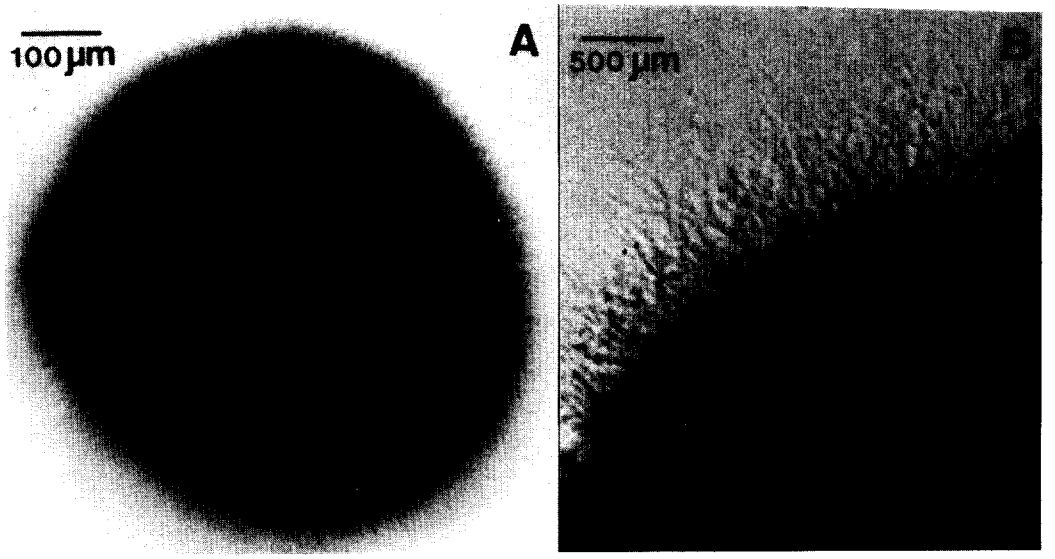

Fig. 2. Microscopic figures of immobilized mycelia on celite.

은 모세관 현상에 기인된 것 같다. 초기 포자 농도는 5×10^7 spores/mL 이고 celite 당 흡착된 포자수는 2×10^8 spores/mL 로 추정된다.

Streptomyces erythreus 의 포자를 담체에 흡착 시킨 다음, 복합배지에 옮겨 72시간 동안 배양하면서 pellet 형성 과정을 관찰 하였다. 그 결과 시간이 경과함에 따라 서서히 담체내에 흡착된 포자들이 발아가 된 후 담체를 중심으로 균사의 증식이 잘 형성되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 2). 이때 *Penicillium* 균의 균사 증식 담체(3)와의 차이점은 celite 표면에 노출된 균사의 길이가 짧은 것이다. 이 원인은 사상 곰팡이의 균사 크기에 비하여 방선균의 균사 크기가 작기 때문인 것으로 생각된다.

회분식 배양에서 균사 증식과 Erythromycin 생산에 미치는 인산염의 영향

고농도의 무기인산은 세포 증식을 촉진하고 대부분의 항생제 생산을 억제한다는 것이 알려졌다(1). 이러한 관점에서 배지중의 무기인산염은 전혀 첨가하기 않고 corn steep liquor 속에 포함된 인산염만을 인산원으로 하여 세포 증식과 erythromycin 생산에 미치는 인산염의 영향을 살펴 보았다. 고농도의 인산염(2 g KH_2PO_4 / L에 해당)이 있는 복합 배지에서 배양 했을때 여러 인산염 제한 배지에서 배양했을 때보다 비증식 속도와 균사 증식이 현저히 촉진되었지만 최종 erythromycin 농도는 큰 차이가 없었다(Fig. 3). Fig. 4는 복합 배지에서와 여러 농도의 인산염 제한 배지에서의 비 erythromycin 생산 속도의 변화를 보여 준다. 비 erythromycin 생산 속도의 값은 복잡 배지에서 557 μ g / g-hr 이였고, 인산염

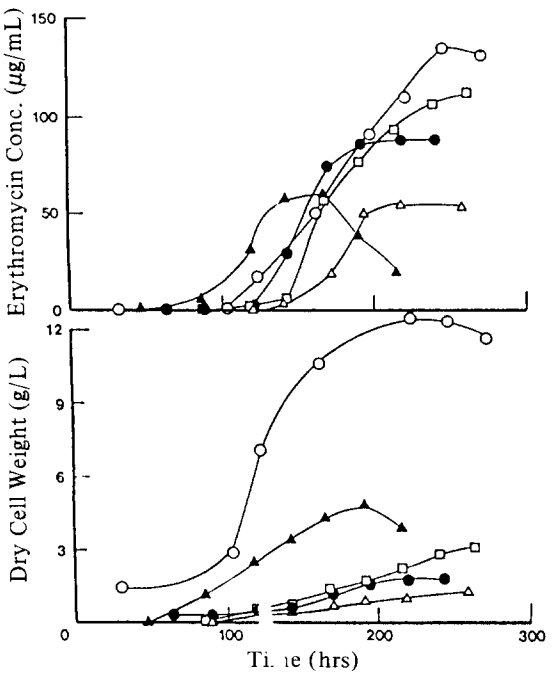

Fig. 3. Effects of corn steep liquor concentration on cell growth and erythromycin production in batch fermentation.
- △ **0.4 g/l corn steep liquor**
- ● **0.8 g/l corn steep liquor**
- □ **2.0 g/l corn steep liquor**
- ▲ **4.0 g/l corn steep liquor**
- ○ **Rich medium**

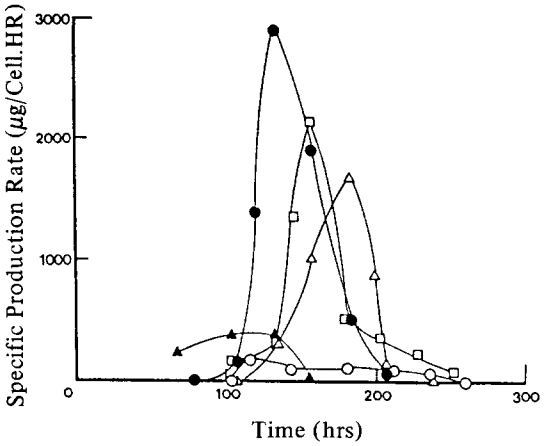

Fig. 4. Effect of corn steep liquor concentration on specific production rate of erythromycin in batch fermentation.
- △ **0.4 g/l corn steep liquor**
- ● **0.8 g/l corn steep liquor**
- □ **2.0 g/l corn steep liquor**
- ▲ **4.0 g/l corn steep liquor**
- ○ **Rich medium**

제한 배지중 corn steep liquor 농도가 0.8 g / L (40mg KH_2PO_4 / L에 해당)일때 최고값 2,898 μ g / g·hr을 보여 주었다. 물론 이때 corn steep liquor 속에 들어 있는 다른 성분의 영향도 함께 작용하였으리라 판단되기 때문에 합성배지를 이용하여 corn steep liquor의 첨가없이 인산염의 농도를 조절하여 실험한 결과 그 농도가 50–70 mg / L 일때 erythromycin의 비생산속도는 최대값 1,000–1,100 μ g / g·hr를 나타냈다(12). 그 이상의 농도에서는 비생산속도는 현저히 감소하였다. 이것으로 미루어 보아 corn steep liquor의 영향은 주로 인산염 때문인 것으로 판단되었다. 이상의 결과는 유동층 생물반응기의 조업시 corn steep liquor 양의 조절을 통한 인산염의 농도를 최적수준으로 제한, 조절하면 균사 증식 담체의 활성을 최대화 시킬 수 있음을 나타낸다.

인산염 제한 조건에서 유동층 생물반응기의 조업

인산원을 corn steep liquor 1 g / L 로 하는 인산염 제한 조건에서 반복 유가식 방법으로 유동층 생물반응기의 조업을 수행하였다(Fig. 5). 160시간 이후에는 고정화되지 않은 균사의 농도가 2.0 g / L 정도로 일정하여 혼합 및 산소 전달 문제는 없었고 균사 증식 담체의 직경은 540 μ m 로 최대치를 나타낸 후 시간이 경과함에 따라 균사 증식 담체의 직경이 서서히 감소하고 현미경 상에 담체에 부착된 균사가 떨어지는 것이 보였으며, erythromycin 생산도 감소되는 경향을 보였다. 장기간의

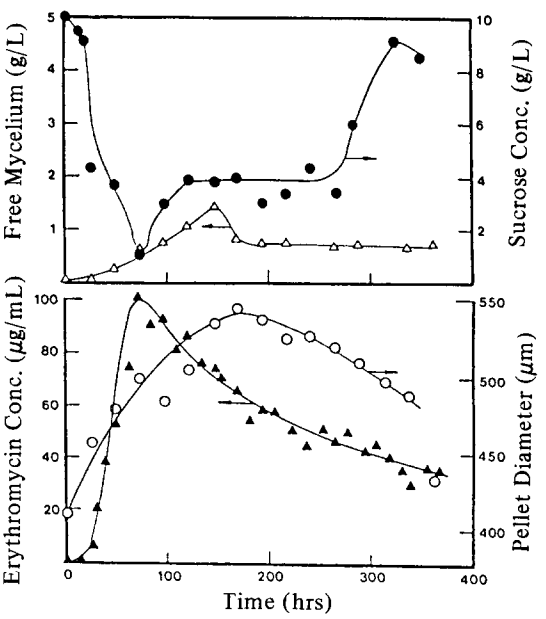

Fig. 5. Erythromycin production by repeated-fed batch operation with phosphate-limited medium (1 g corn steep liquor/l) in an air-life bioreactor.

인산염 제한 상태는 균사의 활성에 영향을 주어 erythromycin 생산을 감소시킨 것 같다. Erythromycin의 생산성을 비교하면 복합 배지를 이용한 회분식 배양보다 인산염 제한 배지의 유동층 생물반응기 배양의 경우 약 2–3배 높았다.

유동층 생물반응기의 배양액에서의 erythromycin의 종류를 알아보기 위해서 배양 시간별(40시간, 100시간)로 HPLC로 분석하였다(Fig. 6). 표준 시료는 종근당과 Sigma의 erythromycin A를 사용하였다. Erythromycin A peak 전에 용매의 peak가 나타났고, erythromycin A peak는 시료 주입후 10.7분 후에 나타났다. 3가지 시료 모두 HPLC chromatogram이 표준 시료 물질과 같아서 생물반응기의 배양액의 erythromycin은 주로 erythromycin A로 확인 되었다.

균사 증식 담체 활성의 안정화

생물반응기를 오랜 동안 조업할 수 있는 것은 공정의 경제적 측면에서 중요하다. 600시간까지 인산염을 제한하여 반복 유가법으로 성공적인 조업을 했을지라도, 장기간 후에는 균사 증식 담체의 erythromycin 생산 활성이 감소되는 것이 보여진다. 이것은 오랜 기간 인산염을 제한하면 세포 활성이 떨어지기 때문인 것 같다. Kuenzi (13)가 제안한 가정을 이 system에 적용하면, 세포내 인

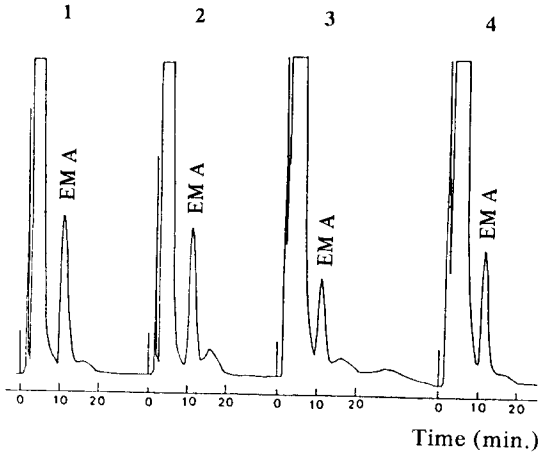

Fig. 6. A reverse phase chromatogram of erythromycin A in the fermentation broth of fluidized-bed bioreactor.
1. Jongkundang Co. 3. 40 hr
2. Sigma Co. 4. 100 hr
***EM A: Erythromycin A**

산염 pool의 고갈은 erythromycin 생산에 대한 2차 대사에 영향을 주어 erythromycin 농도의 감소를 일으킨다고 설명될 수 있다. 균사 증식 담체의 활성 감소는 corn steep liquor를 2 g / L로 첨가시켜서 일시적으로 회복시킬 수 있었다(Fig. 7).

요 약

Streptomyces erythreus 의 포자를 다공성의 celite를 담체로 이용하여 미세구멍조직내에 흡착후 배양하여 얻은 균사 증식 담체를 erythromycin의 발효에 응용하였다. 이때 균사체는 담체의 내부에서부터 포자가 발아하여 담체 표면으로 성장되어 나왔기 때문에 부착성이 강하고 매우 안정한 biofilm growth를 보여 주었다. 발효시 배지중의 corn steep liquor의 양을 0.8 g / L 첨가하여 인산원의 농도를 40 mg KH_2PO_4 / L 정도로 하였을 때 항생제 비생산 속도는 최대값 2,898 μ g / g-cell·hr로서 인산원이 제한되지 않은 배지에서 얻은 비생산속도 557 μ g / g-cell·hr 보다 약 4배의 증가효과를 보였다. 유동층 반응기를 이용한 연속 발효 공정에서도 인산원의 제한에 의하며 세포의 항생제 합성 활성은 약 600시간 이상 유지 되었다.

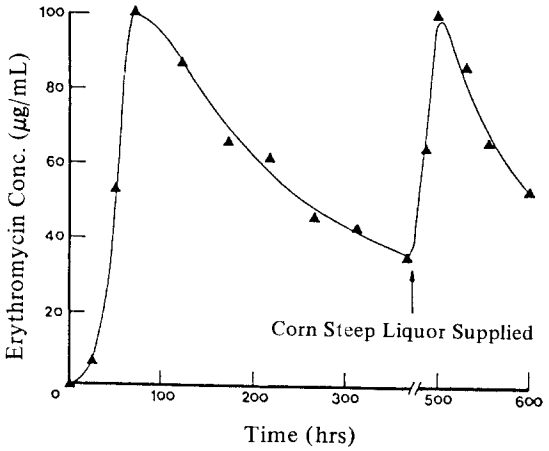

Fig. 7. Response of erythromycin productivity on the additional supply of corn steep liquor.

감 사

본 연구는 1986-1989년도 한국과학재단 목적기초 연구비로 수행되었으며 연구비의 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Margaritis, A. and J. B. Wallace : *Bio/Technol.*, **2**, 447(1984).
2. Malfeit, J. L., D. J. Wilcox, D. J. Mercer and L. D. Baker : *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 863(1981).
3. Kim, J. H., D. K., Oh, S. K. Park, Y. H. Park, and D. A. Wllis : *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1838(1986).
4. Oh, D. K., C. K. Hyun, J. H. Kim and Y. H. Park ; *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 569(1988).
5. Gbewonyo, K. and D. I. C. Wang : *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 967(1983).
6. Y. H. Park, E. Y. Kim, W. T. Seo, K. H. Jung and Y. J. Yoo : *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 409(1989).
7. Giuliano, P., P. C. Gian and C. Germano : *J. chromatogr.*, **269**, 33(1983).
8. Hahn, F. E. : Antibiotics I., Springer-Verlag, New York, p. 378(1967).
9. Miller, G. L. : *Anal. Chem.*, **31**(3), 427(1959).
10. Vaskovsky, V. E., E. Y. Kostestsky and I. M. Vasendin : *J. Chromatogr.*, **114**, 129(1975).
11. Martin, J. F. : *Adv. Biochem. Eng.*, **7**, 105(1977).
12. Kim, S. H. : *Master Thesis.* KAIST(1987).
13. Kuenzi, M. T. : *Arch. Microbiol.*, **128**, 78(1980)

(Received November 17, 1989)