

Brevibacterium CH1의 유가 배양에 의한 Nitrile Hydratase의 생산

황준식¹ · 황영보² · 이처영 · 장호남*

한국과학기술원 생물공정연구센터 화학공학과.

¹국방과학연구소, ²유전공학연구소

Fed-Batch Culture of *Brevibacterium* CH1 for the Production of Nitrile Hydratase

Hwang, Jun-Sik¹, Young-Bo Hwang², Cheo-Young Lee and Ho-Nam Chang*

BioProcess Engineering Research Center and Department of Chemical Engineering, KAIST, Daeduk Science Town, Taejon 305-701, Korea

¹Explosive Train and Pyrotechnic Division, Agency for Defense Development, P.O. Box. 35, Taejon 305-600, Korea

²Biochemical Process Lab., Genetic Engineering Research Institute, P.O. Box. 17, Taejon 305-606, Korea

Abstract — The batch and fed-batch cultivations of *Brevibacterium* CH1 were carried out for the production of nitrile hydratase. In batch culture, with pH control the cell mass and the specific activity increased more 20% and 30%, respectively. The maximum growth rate was obtained at a glucose concentration of 20 g/l because of substrate inhibition. The fed-batch culture of *Brevibacterium* CH1 with constant substrate feeding gave a cell density of up to 68 g/l and nitrile hydratase activity was maintained at above 6.1 units/mg. The cell growth yield on carbon source was ca. 0.68 g/g glucose consumed. The total nitrile hydratase activity in this fed-batch mode increased up to 414.8 units/ml, which amounted to 4.4 times that of the batch culture.

미생물 공정에서 원하는 산물은 미생물 균체 자체 이거나 기질의 분해, 합성 대사산물이다. 세포단백질, 지질, 효소 등은 거의 세포내에 축적되어 세포밖으로 배출되지 않으므로 미생물 세포 그 자체가 생산물인 반면 에탄올이나 초산 등은 세포외로 배출된다. 어느 경우에도 축적될 수 있는 autocatalytic 기능을 갖고 있기 때문에 미생물 농도는 높을수록 좋다. 생물 반응기내에서 미생물 증가를 저해하는 요소는 산소를 포함하는 필수 영양소가 결핍되거나 성장저해대사산물이 축적되기 때문이다(1). 연속배양기에서는 이 결점을 피할 수 있으나 washout 현상 때문에 한계가 있고 담체 고정화법은 세포 자체를 생산 목표로 하는 전세포 효소(whole cell enzyme) 생산에는 사용하기 어렵다. 교반조내에 탄소원을 비롯한 영양소를 연속

적으로 공급해주는 유가배양방식(fed-batch culture)은 지금까지 고농도 배양에 많이 쓰이는 방식이다. 이 방식은 초기에 과량의 탄소원을 가함으로써 생기는 기질의 성장저해 현상을 방지할 수 있도록 기질의 소비속도에 맞추어 공급하는 방식으로 일정속도로 공급하거나 exponential feeding 등의 방법이 있다(2-4).

발효공정의 생산성을 높이기 위해서는 생물반응기내에 활성이 좋은 미생물을 고농도로 배양하는 것이 중요하다. Nitrile hydratase는 니트릴을 수화시켜 아마이드를 얻는 생전환에 이용되는 효소로 아마이드의 경제적 생산을 위해서는 이 효소의 생산성 향상이 요구된다. 본 연구에서는 nitrile hydratase의 생산성 향상을 위해 *Brevibacterium* sp. CH1을 유가식 회분 배양(fed-batch culture)으로 고농도 배양하였다. 배양과정에서 활성의 변화 및 균주 성장에 미치는 영향을 조사하였으며, 활성의 감소없이 고농도 세포배

Key words: *Brevibacterium* CH1, nitrile hydratase, fed-batch culture, specific activity, total activity

*Corresponding author

양을 하는데 주안점을 두었다.

재료 및 방법

균주

균주는 본 연구실에서 분리한 *Brevibacterium* sp. CH1을 사용하였다(6).

배지

배지의 조성은 Table 1과 같으며 이들 배지의 초기 pH는 2N NaOH 용액을 사용하여 7.0으로 조정하였다. 이들 배지에서 포도당과 다른 성분은 121°C 에서 15분간 따로 멸균하여 식힌 후에 혼합하였다. Bacto peptone, yeast extract, malt extract는 Difco (Detroit Mich, USA) 제품이었고 포도당은 국산화학(주), (동경, 일본), 다른 시약은 관동화학(주)(동경, 일본) 제품을 사용하였다.

분석

균체농도(cell mass)는 610 nm에서 spectrophotometer(Beckman model, 35, Beckman Inst.)로 측정하였다. 세포의 건조중량(dry weight)은 배양액을 원심분리하여 0.85% NaCl 용액으로 두번 세척한 뒤 증류수로 한번 세척한 후 원심분리하여 105°C 에서 24 시간 건조하여 무게를 측정하였다. 610 nm에서 1 O.D. 에 대한 무게는 0.40 mg/ml였다.

포도당 농도는 배양액을 원심분리한 후 glucose analyzer(YSI model 23A, Yellow Spring Inst. Co., Yellow Spring, O.H.)로 측정하였다.

효소의 활성은 배양액 1 ml을 원심분리하여 상등액을 버린 후 3% 아크릴로니트릴 1 ml을 첨가하여 균일하게 교반하면서 25°C 에서 3분 동안 반응시킨 후 생성된 아크릴아마이드의 농도를 flame ionization detector를 갖춘 gas chromatography(Gow Mac 750)에 의해 분석하여 측정하였다. 작동조건은 column 온도, 180°C ; injector와 detector 온도, 210°C 이었고, solid phase가 chromosorb W 80~100 mesh이고 stationary phase는 carbowax 20 M 10%인 column을 사용하였다. Carrier gas는 helium을 사용하였으며 flow rate는 25 ml/min이었다. 효소의 활성 1 unit는 1분당 1 μmol의 아크릴아마이드를 생성하는 반응속도로 정의하였으며, 효소의 비활성(specific activity)과 총활성(total activity)은 각각 unit/mg과 unit/ml로 나타냈다.

Table 1. Composition of culture media

Component	M1 (g/l)	M2 (g/l)	M3 (g/l)
Glucose	varied	400	200
Yeast extract	4.5		15
Malt extract	4.5		15
Bacto peptone	7.5		20
NaCl	1.5		1.5
K ₂ HPO ₄	1.0		2.5
KH ₂ PO ₄	1.0		2.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3		1.0

배양

Seed culture : 250 ml의 Erlenmeyer flask에 50 ml의 M1 배지(포도당 농도 : 10 g/l)를 넣은 후 shaker에서 350 rpm, 28°C 로 24시간 배양하였다.

Jar-fermentation : 2l의 발효조(Biostat E, B. Braun, Germany)에서 28°C 로 조업하였다. Seed culture 50 ml를 working volume 1.2l의 발효조에 접종하고 pH는 2N NaOH 및 2N HCl 용액으로 pH controller에 의해 조절하였다. 회분배양시에 발효조의 공기주입속도(air flow rate)는 1 vvm으로, 교반속도는 500 rpm으로 조작하였다. 유가식 회분배양인 경우에 M1 배지(초기 포도당 농도 : 20 g/l)로 일정시간 배양 후 M2 혹은 M3 배지를 배양중간부터 peristaltic pump로 발효조에 공급하면서 고농도로 배양하였다. 유가식 회분배양시는 초기에 교반속도 500 rpm 및 공기 주입속도 1 vvm으로부터 시작하여 DO값을 50% 이상 유지하도록 교반속도와 공기 주입속도를 조절하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 발효조(working volume : 1.2l)에서 M1 배지와 초기 포도당 농도 12 g/l를 사용하여 pH를 조절하지 않고 실험한 결과로서 30시간 배양 후 균체농도 9.4 g/l를 얻었으며, pH는 배양 9시간 후에 pH 7.8까지 올라가다가 그 후에 떨어지기 시작하여 pH 6.3까지 떨어졌다. 효소 비활성(specific activity)은 exponential growth phase에서 최고 6 units/mg였고 그 후 떨어지기 시작하여 stationary phase에서 4.2 units/mg로 유지되었다. 포도당은 27시간 정도 지난 후에 거의 소모되어 균체는 stationary phase에 들어갔으며 균체는 더 성장하지 않았다.

Fig. 2a는 M1 배지와 초기 포도당 농도 10 g/l를 사용하여 pH를 7로 조절하면서 실험한 결과로서 25시간 배양 후 균체농도는 11.6 g/l이었고, 효소 비활

성은 exponential growth phase에서 최고 8 units/mg였고, 그 후 떨어지기 시작하여 stationary phase에서 5.6 units/mg으로 유지되었다. 포도당은 25시간 후에 완전히 소모되어 균체는 stationary phase에 들어갔다. 결국 pH를 조절하여 줌으로써 균체농도와 효소의 비활성이 각각 20, 30% 정도 증가하였다. 따라서 pH 조절은 균체농도 및 효소생성에 상당한 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 이때 최대 성장속도는 0.16 h^{-1} 였다.

Fig. 2b는 M1 배지와 초기 포도당농도 20 g/l를 사용하여 pH 7로 조절하면서 실험한 결과로서 25시간 배양 후 균체농도는 15 g/l이었고, 균체의 최대 성장속도가 0.21 h^{-1} 로 10 g/l 포도당 농도로 배양할 때보다 성장속도가 빨랐다. 효소 비활성의 배양시간에 따른 변화 양상은 10 g/l 포도당 농도로 배양시와 같이 late exponential growth phase까지 증가하여 최대 9 units/mg이었고, stationary phase에 들어가면서 다시 감소하여 6 units/mg 이상으로 유지되었다. 효소의 총활성은 21시간 배양 후에 최고 94.5 units/m이었으며, 이때 균체와 효소의 생산성은 각각 $0.71 \text{ g/l}\cdot\text{h}$,

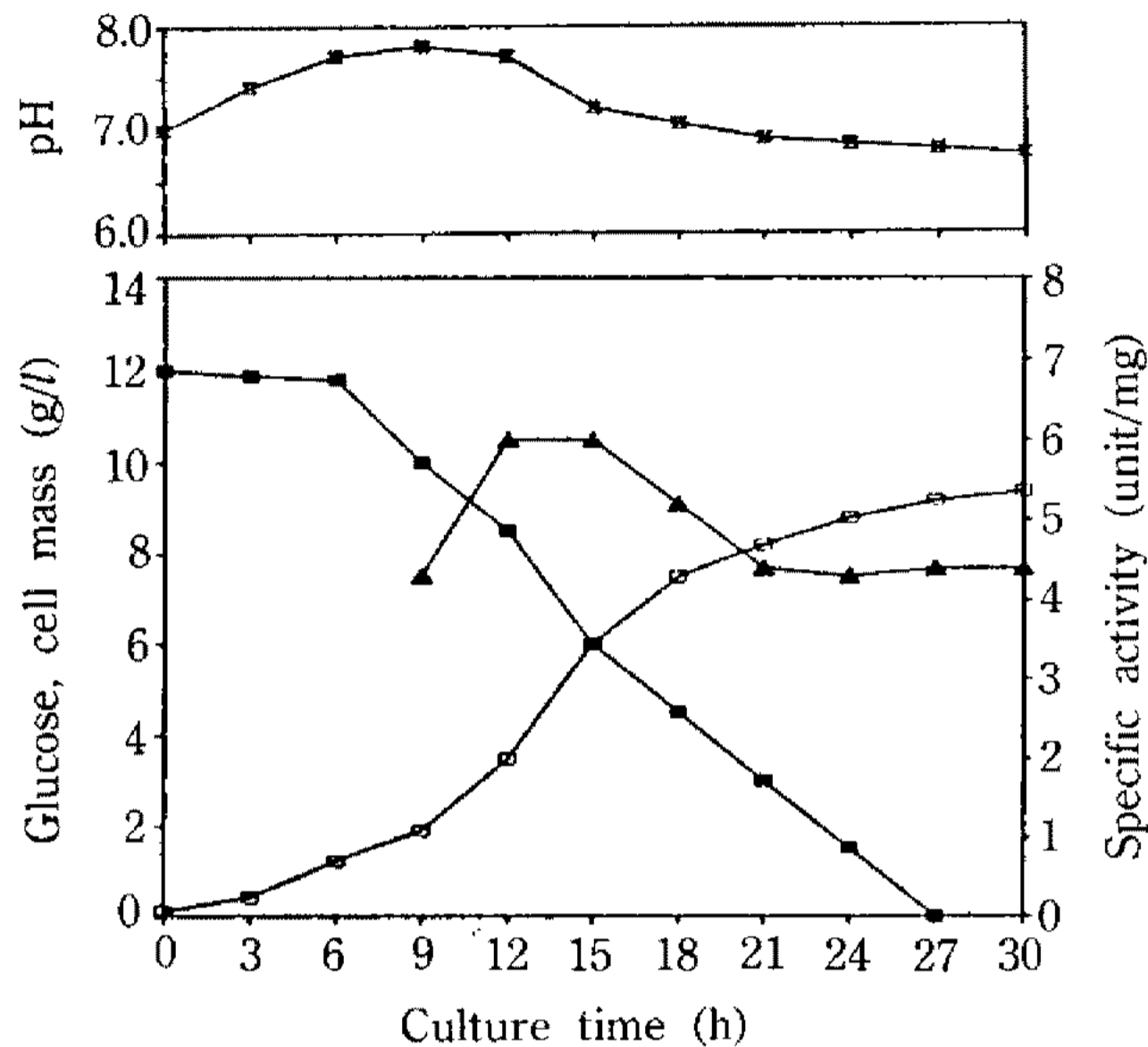


Fig. 1. Growth and activity curve in a batch culture without pH control.

⊗: pH, □: cell mass, ■: glucose concentration, ▲: specific activity.

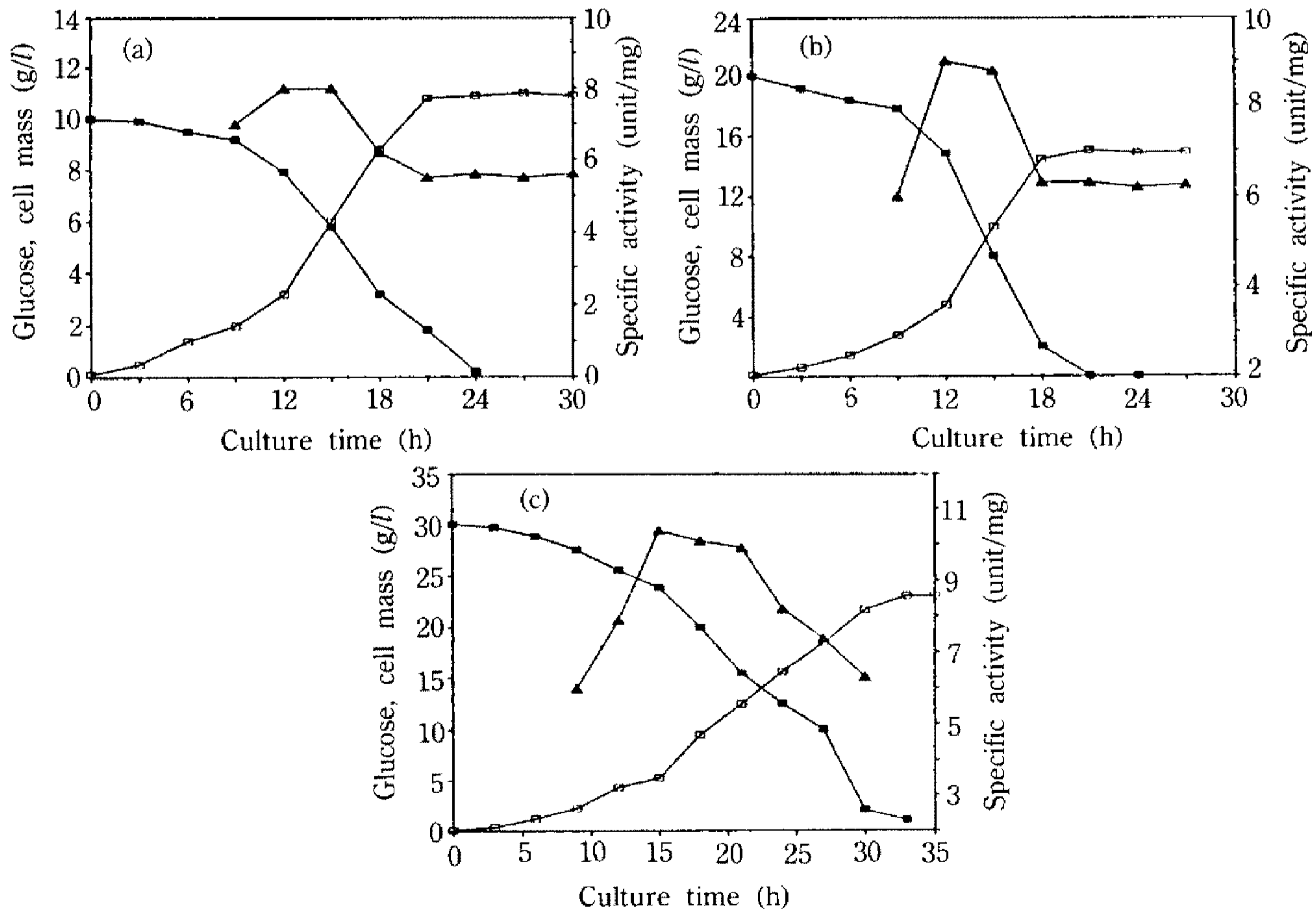


Fig. 2. Growth and activity curve in a batch culture with pH control (a) glucose concentration, 10 g/l; (b) glucose concentration, 20 g/l; (c) glucose concentration, 30 g/l.

□: cell mass, ■: glucose concentration, ▲: specific activity.

Table 2. Comparisons of the productivity and enzyme activity according to culture mode

	Batch (Fig. 2b)	Fed-batch (Fig. 4b)
Culture time (h)	21	78
Cell mass (g/l)	15	68
Specific activity (unit/mg)	6.3	6.1
Total activity (unit/ml)	94.5	414.8
Cell productivity (g/l·h)	0.71	0.87
Enzyme productivity (unit/ml·h)	4.5	5.3

4.5 units/ml·h이었다(Table 2).

Fig. 2c는 M1 배지와 초기 포도당 농도 30 g/l를 사용하여 조업한 결과인데 최대 성장속도가 0.11 h⁻¹로, substrate inhibition으로 인해 포도당 농도가 10 g/l, 20 g/l때보다 성장이 느렸다. 효소 비활성 및 균체농도의 변화 양상은 10 g/l, 20 g/l의 포도당 농도로 조업할 때와 비슷한 양상을 보였으며, 32시간 배양 후 균체농도는 23 g/l이었다. 특이한 사항은 성장속도가 느려져 exponential growth phase가 길어짐으로써 비활성의 변화 양상도 포도당 농도 10 g/l, 20 g/l때보다 증가하였다가 감소하는 폭이 넓어졌다. 결국에 포도당 농도를 높여서 배양하는 것은 substrate inhibition을 받기 때문에 성장속도가 포도당 농도가 증가할수록 느려지므로 고농도 배양을 위해서는 유가식 회분배양이 요구된다.

Fig. 3은 18시간까지 회분배양한 후 포도당 400 g/l (M2 배지)를 공급속도(feeding rate) 10 ml/h로 연속적으로 공급(continuous feeding)하면서 유가식 회분배양한 결과이다. 56시간 배양 후 균체농도는 42 g/l이었고, 포도당은 계속 축적되어 농도가 증가하는 것을 보여주고 있다. 그러므로 포도당 농도를 20 g/l 이하로 유지하기 위해서 포도당 농도를 200 g/l로 줄이고 질소원(nitrogen source)과 다른 배지를 첨가한 M3 배지를 사용한 유가식 회분배양을 시도하였다.

Fig. 4a는 15시간 배양 후부터 9 ml/h의 공급속도로 M3 배지를 연속적으로 공급하면서 pH를 조절하지 않고 유가식 회분배양한 실험결과로, 64시간 배양 후 균체농도는 28 g/l로 회분배양보다는 조금 높았으나 고농도 배양은 되지 않았다. 결국은 pH 조절이 고농도 배양을 위해서 중요하다는 것을 알 수 있었다.

Fig. 4b는 15시간 배양 후부터 88시간 배양 후까지 9 ml/h의 공급속도로 M3 배지를 연속적으로 공급하면서 pH를 조절하면서 유가식 회분배양한 실험결과

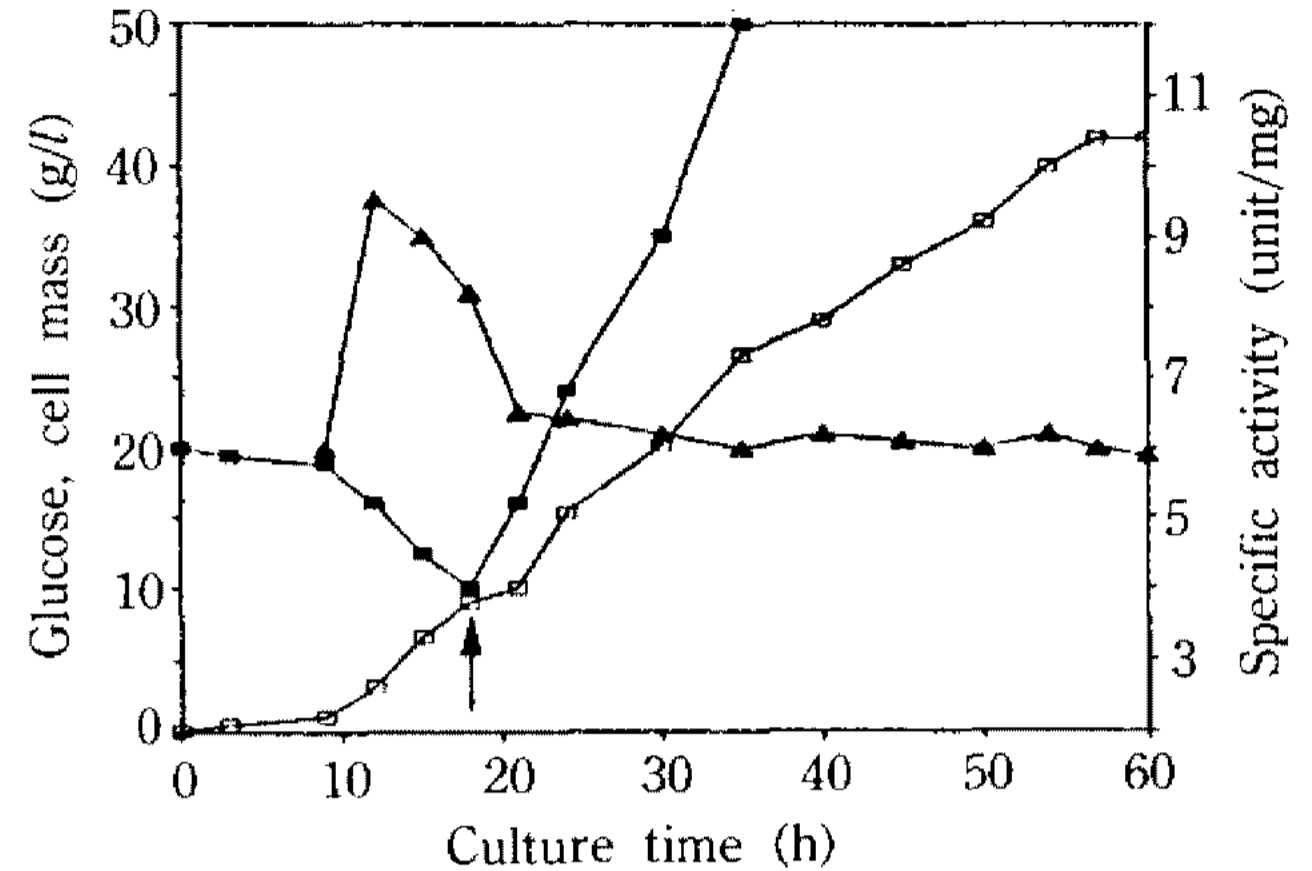


Fig. 3. Growth and activity curve in a continuous glucose feeding fed-batch culture (arrow: start of glucose (M2 medium) feeding, feeding rate: 10 ml/h).

□: cell mass, ■: glucose concentration, ▲: specific activity.

이다. 발효조내의 배지부피는 초기의 0.855 l에서 증가하여 88시간 배양 후에는 1.2 l로 증가하였다. 이때 산소결핍은 교반속도 및 공기주입속도를 변화시켜 DO 수준을 50% 이상 유지시켜 해결하였다. 88시간 배양 후 균체농도는 68 g/l로 고농도 배양이 되었다. 비활성은 6.1 units/mg으로 유지되었고 이때 포도당 농도는 20 g/l에서부터 28 g/l까지 점진적으로 증가하였다. 이 경우에 Y_{x/s}(cell growth yield)는 0.68 g cell/g glucose consumed이었다. 회분배양과 유가 배양에 따른 균체와 효소의 생산성과 효소의 활성을 비교한 결과를 Table 2에 나타냈다. 효소의 총활성은 배양시간에 따라 증가하여 78시간 배양 후 최대 414.8 units/ml(=균체농도 68 g/l×효소 비활성 6.1 units/mg)이었으며, 회분배양에 비해 4.4배 증가하였다. 또한 유가배양 결과 균체와 효소의 생산성도 회분배양에 비해 약간 증가하였다.

Fig. 4c는 Fig. 4b의 실험과 같이 15시간 배양 후부터 9 ml/h의 공급속도로 M3 배지를 연속적으로 공급하면서 pH를 조절하면서 유가식 회분배양한 실험 결과로 산소결핍 및 성장저해 물질을 방지하기 위하여 순수한 산소를 주입하면서 조업한 결과이다. 순수한 산소를 사용하여도 균체 성장속도는 조금 빨랐으나 최종 균체량이 많이 증가하지 않았다. 이는 공기 사용시에 교반속도와 공기 주입속도를 조절하여 DO를 50% 이상 유지하여 주어서 산소의 limitation에 걸리지 않았고 성장저해물질인 유기산 등이 많이 생성되지 않았기 때문이다.

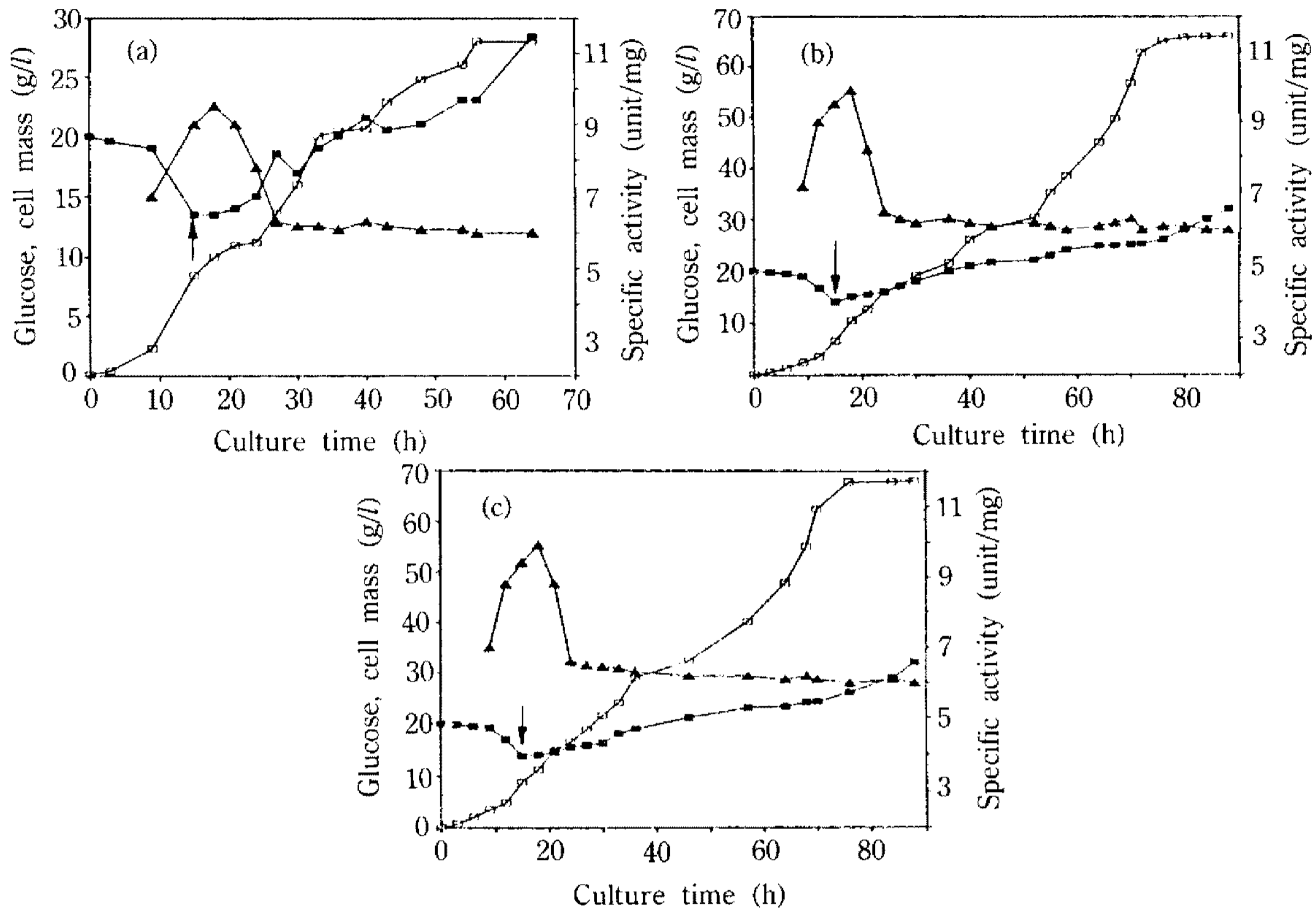


Fig. 4. Growth and activity curve in a continuous feeding fed-batch culture (a) without pH control; (b) with pH control; (c) with pure oxygen supply.

Arrow: start of M3 media feeding, feeding rate: 9 ml/h.

□: cell mass, ■: glucose concentration, ▲: specific activity.

요 약

Brevibacterium CH1의 회분배양 결과 최적의 초기 포도당 농도는 20 g/l이었고, 균체의 최대 성장속도는 0.21 h^{-1} 이었다. pH를 조절하여 줌으로써 균체농도와 효소의 비활성이 각각 20, 30% 정도 증가하였다. 따라서 pH 조절은 균체농도 및 효소생성에 상당한 영향을 주는 것을 알 수 있었다. M3 배지를 연속적으로 공급하면서 유가식 회분배양 한 결과 88시간 배양 후 균체농도는 68 g/l로 고농도 배양이 되었으며, 비활성은 6.1 units/mg으로 유지되었다. 효소의 총활성은 배양시간에 따라 증가하여 80시간 배양 후 최대 414.8 units/ml이었으며, 회분배양에 비해 4.4배 증가하였다. 이 경우에 $Y_{x/s}$ (cell growth yield)는 0.68 g cells/g glucose consumed이었다.

감사의 말

본 연구는 1989~1990년 과학기술처의 첨단요소과제로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Landwall, P. and T. Holme. 1977. Removal of inhibitors of bacterial growth by dialysis culture. *J. Gen. Microbiol.* **103**: 345-349.
2. Yoshida, F., T. Yamane and K. Nakamoto. 1973. Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. *Biotechnol. Bioeng.* **15**: 257-264.
3. Yamane, T. and H. Hirano. 1977. Semi-batch culture of microorganism with constant feed of substrate. *J. Ferment. Technol.* **55**: 380-386.
4. Lim, H.C., B.J. Chen and C.C. Creagen. 1977. An analysis of extended and exponentially fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 1671-1679.
5. Lee, C.W. 1987. High density cell culture of *S. cerevisiae* and recombinant *E. coli* in a membrane cell recycle fermenter. Ph.D. Thesis. KAIST, Seoul.
6. Chang, H.N., C.Y. Lee and J.S. Hwang. 1989. Isolation of *Brevibacterium* sp. CH1 and properties of its enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 429-435.

(Received September 19, 1992)