

L-leucine 발효의 최적화

신현철 · 하구선 · 김성준 · 조영제 · 전영중 · 이재홍*

제일제당(주) 종합연구소

Optimization of L-leucine Fermentation

Shin, Hyun-Chul, Gu-Sun Ha, Seong-Jun Kim, Young-Je Cho,
Yeong-Joong Jeon and Jae-Heung Lee*

R & D Center, Cheil Foods & Chemicals Inc.,

522-1, Dokpyong-Ri, Majang-Myon, Ichon-Kun, Kyonggi-Do 467-810, Korea

Abstract— The effects of pH, temperature and oxygen transfer rate(OTR) on L-leucine fermentation were investigated employing *Corynebacterium glutamicum* CH 1516 in 7l fermentor. The optimum pH, temperature and OTR were determined to be 7.0, 30°C and 0.21 kmole O₂/m³·hr, respectively. For the values of OTR lower than 0.19 kmole O₂/m³·hr a significant amount of lactic acid was accumulated, while the packed cell volume(PCV) was rapidly increased at higher OTR values above 0.23 kmole O₂/m³·hr and glutamic acid was produced to some extent. Scale-up studies for L-leucine fermentation which was carried out in 1200l pilot scale fermentor reaffirmed the results of 7l fermentation. The optimum redox potential value for L-leucine production was found to be -150 to -170 mV.

L-leucine은 필수아미노산의 일종으로 아미노산수액, 종합아미노산제제, 혈당강하제등 의약품으로 사용되며 제조방법은 추출법, 합성법, 발효법 3가지로 나눌 수 있다. 발효법에 의한 L-leucine의 제조는 *Salmonella typhimurium*(trifluoroleucine 내성주)(1-2), *Serratia marcescens*(α -aminobutyric acid 내성주 및 isoleucine leaky 복귀주)(3), *Brevibacterium lactofermentum*(2-thiazolalanine 내성 및 methionine, isoleucine 영양요구주)(4), *Corynebacterium glutamicum*(phenylalanine 영양요구주)(5) 등의 균주를 사용하여 이루어지고 있으며 이미 일본의 협화발효, 아지노모토 등은 공업화를 완료하였다.

본 연구에서는 L-leucine 생산을 목적으로 플라스크에서 발효조건을 1차 최적화한 후, 7l 발효조에서 2차 최적화하였다. 특히 공업적 생산을 위한 배지조성 및 배양조건(pH, 온도, 산소전달속도)을 최적화하여 1200l 실험공장에 공정확대를 시도하였다.

Key words: L-leucine, oxygen transfer rate, redox potential, scale-up

*Corresponding author

재료 및 방법

균주 및 사용배지

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032로부터 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)를 처리하여 획득한 *C. glutamicum* CH 1516(4-azaleucine, 2-thiazolalanine, O-methylthreonine 내성주)를 사용하였다. 7l 발효조의 본 배지로는 cane molasses(55%) 180 g, corn steep liquor 50 g, KH₂PO₄ 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, MnSO₄·5H₂O 0.01 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, biotin 0.0001 g, thiamine·HCl 0.00012 g, β -alanine 0.01 g, 공정수 1l를, 추가배지로는 원당 306 g/l, corn steep liquor 100 g/l를 사용하였다.

분석방법

총당은 Bertrand법에 의해 환원당을 정량하였고 optical density는 발효액을 증류수로 100배 또는 200배 희석한 뒤 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-leucine은 HPLC(Waters)로 분석, 정량하였고 packed cell volume은 최종발효액 100 ml를 취해서 4000×g

에서 20분간 원심분리한 후 측정하였다. 한편 산소 전달속도 측정은 sodium sulfite oxidation법(6)을 사용하였으며 실험방법은 다음과 같다. 즉 공정수를 발효의 최종부피까지 발효조에 투입하고 L-leucine 발효의 최적온도라고 생각되는 30°C 까지 온도를 상승시킨후 교반기를 서서히 교반시키면서 Na₂SO₃를 완전용해 시킨다. 발효조의 교반속도를 시험하고자 하는 속도까지 증가시킨후 CuSO₄·5H₂O 용액을 첨가하고 발효조로부터 일정시간 간격으로 Na₂SO₃ 용액을 취해 I₂ 용액과 반응시킨 다음 잔존하는 I₂를 Na₂S₂O₃ 용액으로 적정하여 산소전달속도를 측정하였다.

결과 및 고찰

배양온도 및 pH의 영향

Corynebacterium glutamicum CH 1516의 최적배양온도 및 pH를 검토하기 위하여 7l 발효조에서 발효를 실시한 결과 온도 30°C, pH 7.0에서 최고의 L-leucine 농도와 수율을 나타냈다(Fig. 1 & 2). 이후 L-leucine 발효실험은 이 조건에서 행하였으며 이는 Azuma 등(7)이 이미 보고한 배양조건과 유사한 결과를 나타냈다.

7l 발효조의 교반속도가 산소전달속도에 미치는 영향

7l 발효조의 산소전달속도는 통기량은 일정하게

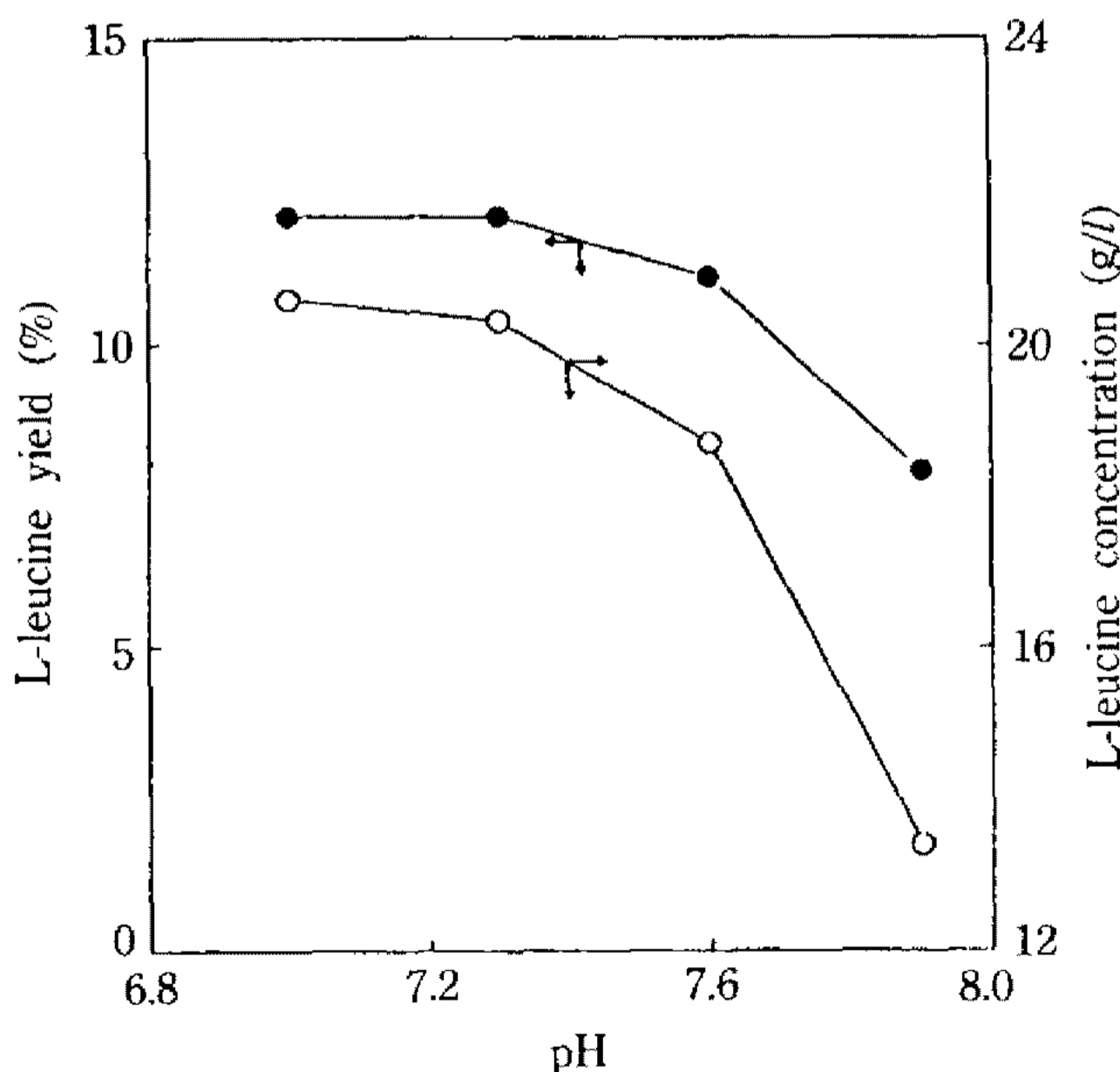


Fig. 1. Effect of pH on L-leucine production at 30°C in 7l fermentor. (●) L-leucine yield, (○) L-leucine.

고정시키고 교반기의 교반속도를 증감시키면서 sodium sulfite oxidation법으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같은 산소전달속도와 교반속도간의 상관관계를 구할 수 있었으며 이를 L-leucine 발효의 최적 산소전달속도를 검토하는데 이용하였다. 한편 산업적 아미노산 생산 현장에서는 산소전달속도측정을 위해 통상적으로 sodium sulfite oxidation법을 많이 사용

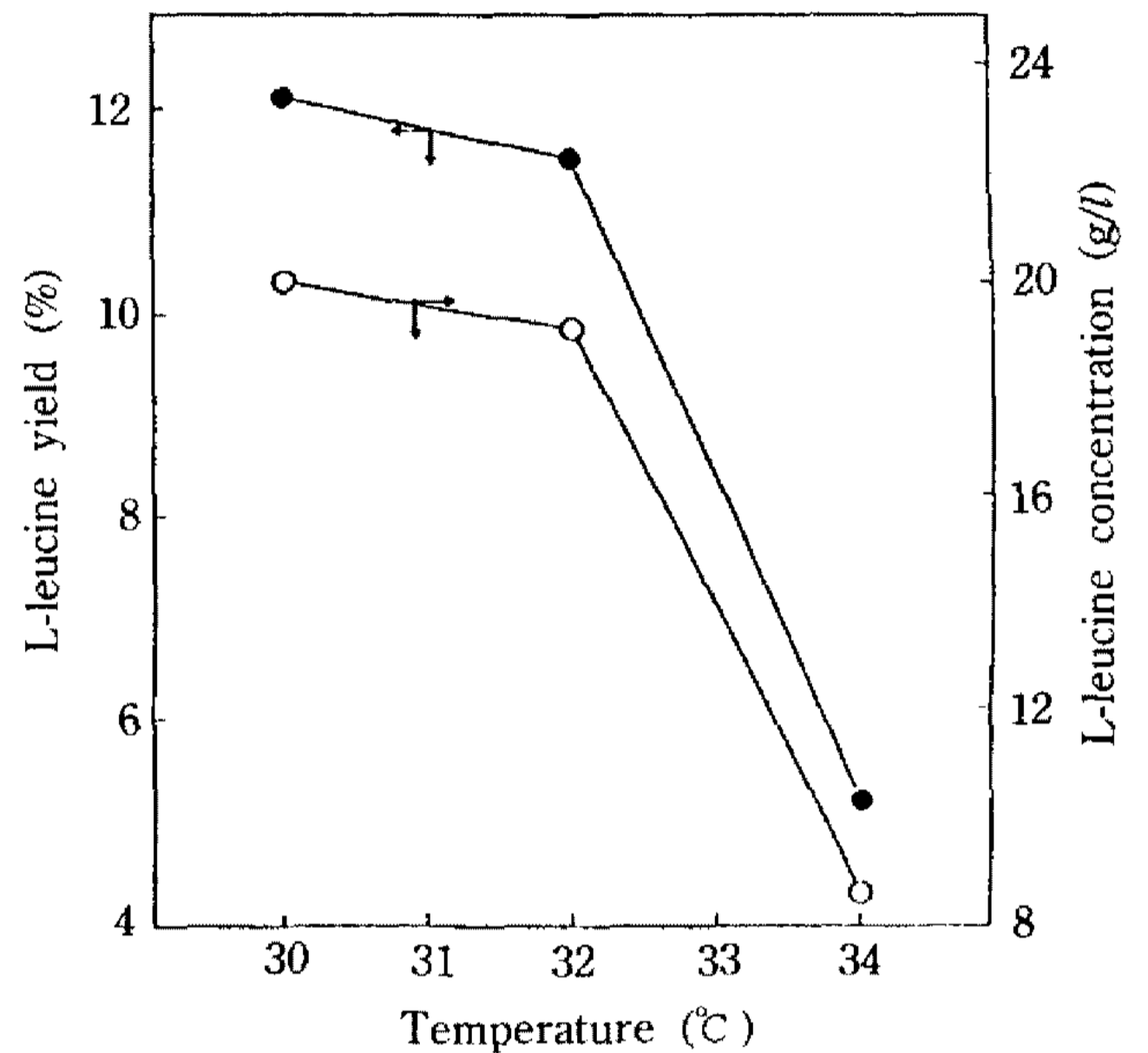


Fig. 2. Effect of temperature on L-leucine production at pH 7.0 in 7l fermentor. (●) L-leucine yield, (○) L-leucine.

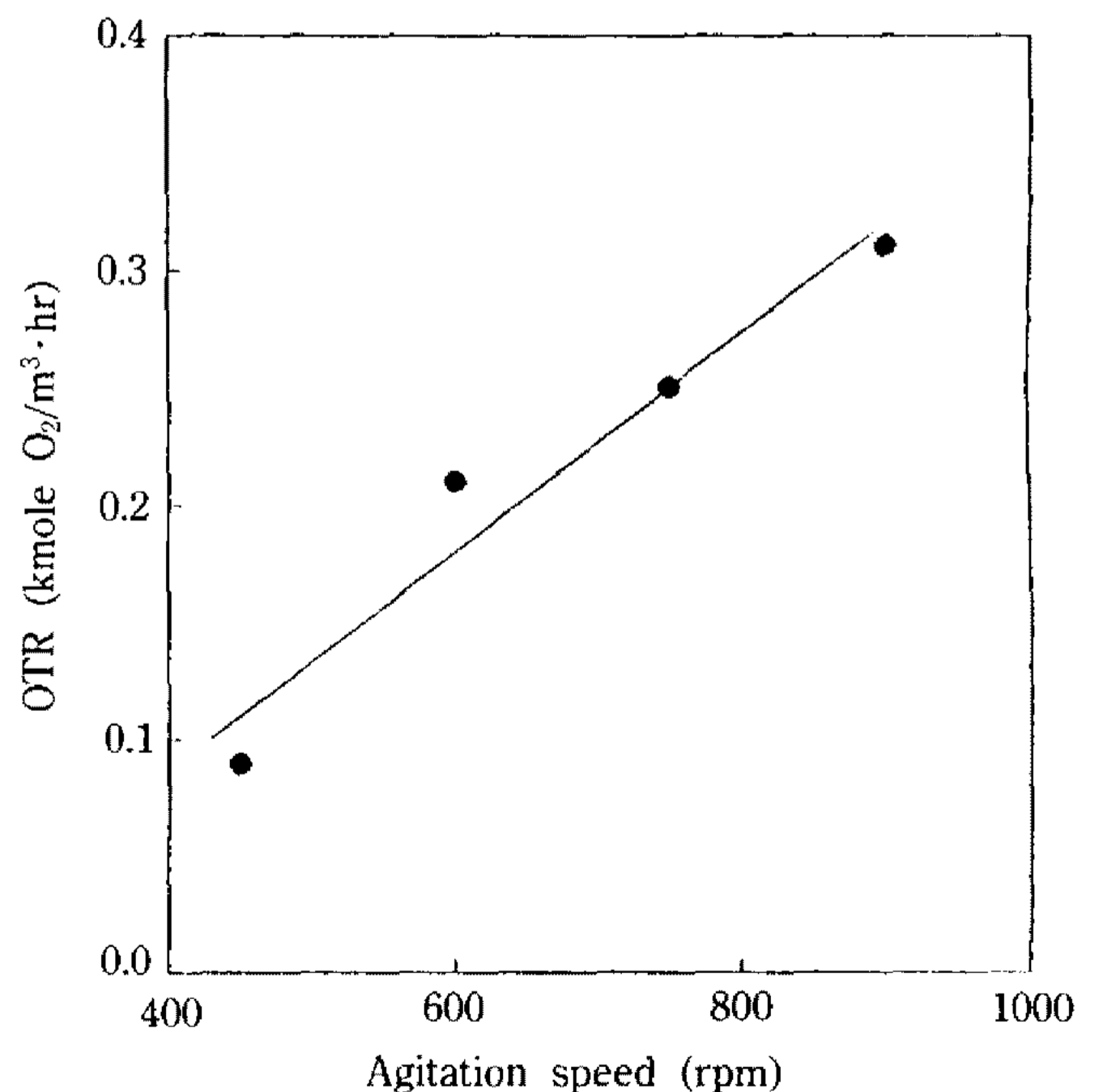


Fig. 3. Effect of agitation speed on oxygen transfer rate at 30°C and 1 vvm in 7l fermentor.

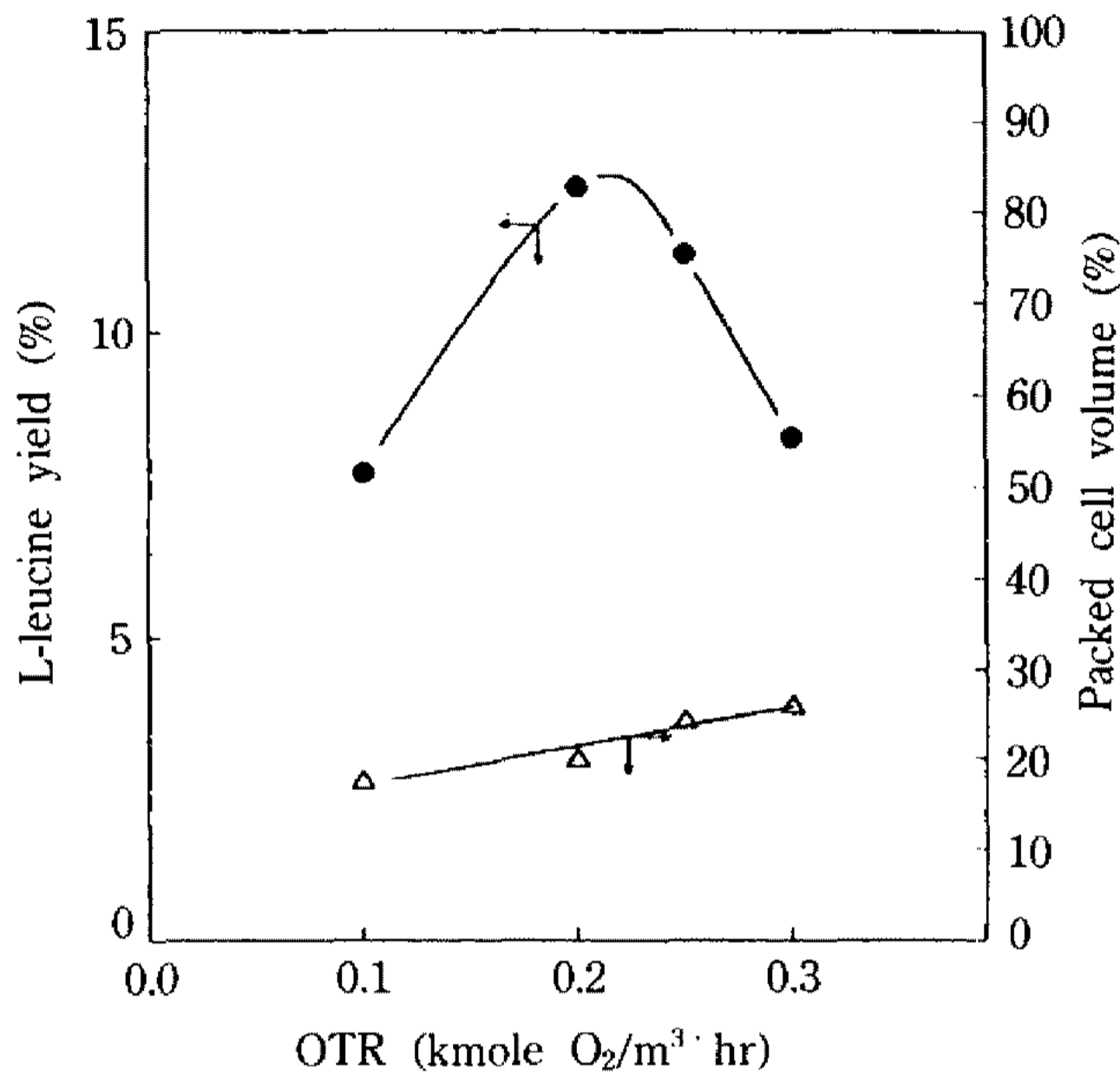


Fig. 4. Effect of oxygen transfer rate on L-leucine yield at 30°C, pH 7.0 and 1 vvm in 7l fermentor. (●) L-leucine yield, (△) packed cell volume

하는데 이는 공정수를 이용한 산소전달속도 측정값을 현장에 적용시켜도 발효결과에 큰 영향을 끼치지 않을뿐 아니라 작업이 간편하고 비용이 저렴하기 때문이다. 따라서 본 L-leucine 연구도 이 방법을 사용하여 7l 및 1200l 발효의 최적산소전달속도를 측정하였다.

산소전달속도가 L-leucine 발효에 미치는 영향

산소전달속도를 증감시키면서 7l 발효조에서 L-leucine 발효를 실시한 결과 산소전달속도가 낮은 범위(0.19 kmole O₂/m³·hr 이하)에서는 배지중의 용존산소의 극한결핍으로 L-leucine 수율이 낮았으며 당소모속도가 상당히 지연되었다. 반면 높은 범위(0.23 kmole O₂/m³·hr 이상)에서는 PCV가 급격히 증가하여 L-leucine 수율이 낮았으며, 0.21 kmole O₂/m³·hr의 범위에서 수율이 가장 높은 최적의 산소전달속도가 됨을 알 수 있었으며(Fig. 4), 이 지표를 1200l 실험공장에 그대로 적용하였다.

산소전달속도가 L-leucine이외의 부산물생성에 미치는 영향

산소전달속도가 0.19 kmole O₂/m³·hr 이하에서는 lysine, alanine 등 기타 아미노산이 1.5~3.0 g/l 축적되었으며 특히 lactic acid가 상당량(8~10 g/l) 축적되었다. 한편 산소전달속도가 증가함에 따라 L-leucine 이외의 타아미노산과 lactic acid의 축적량이 감

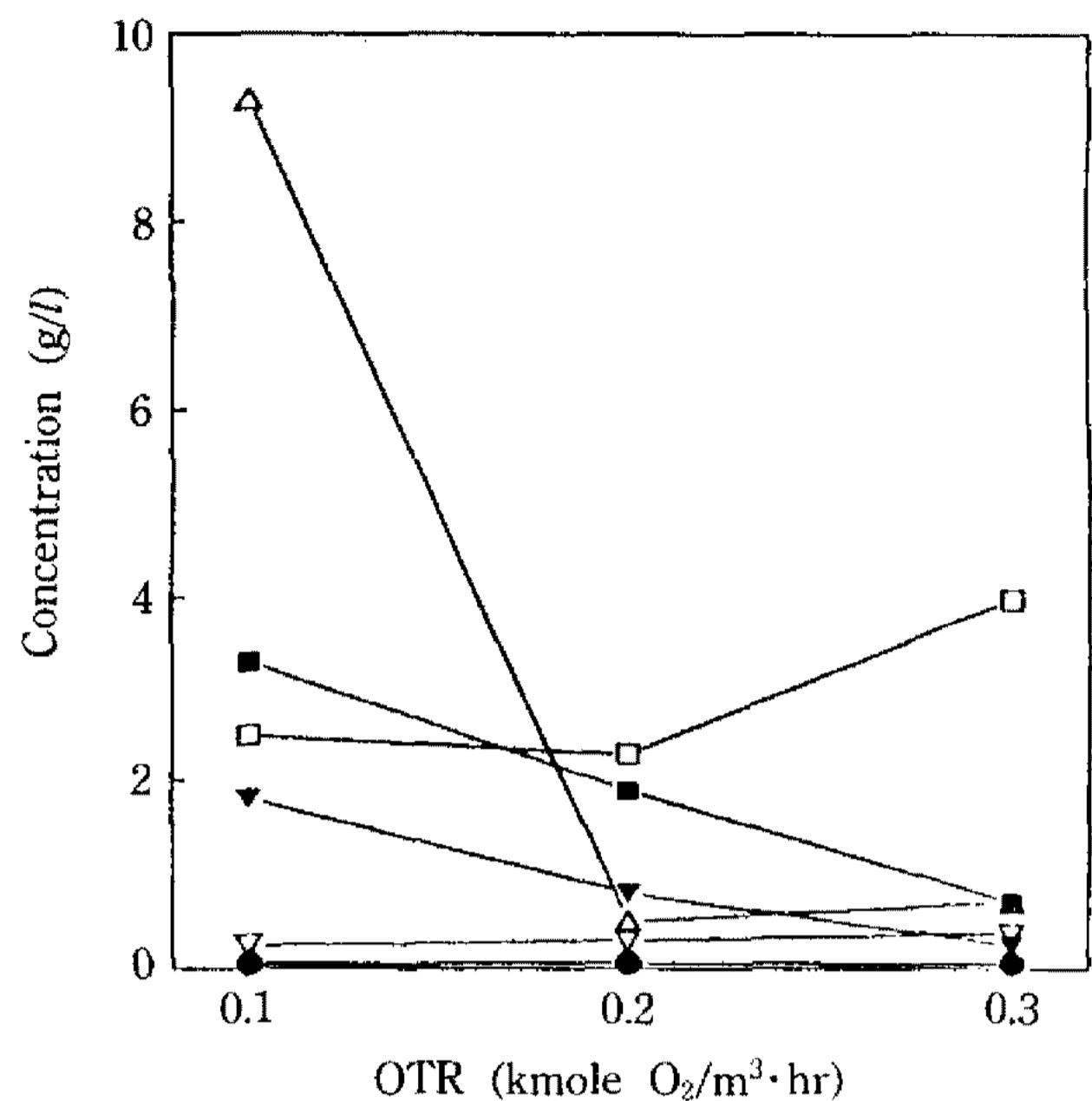


Fig. 5. Effect of oxygen transfer rate on the accumulation of other amino acids and lactic acid in 7l fermentor.

(△) lactic acid, (■) lysine, (□) glutamic acid (▼) alanine, (▽) isoleucine, (●) valine

소되는 반면 glutamic acid의 축적량이 증가되는 것으로 보아 배지중의 상당량의 탄소원이 TCA cycle을 따라 균체로 전환되는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다(Fig. 5).

1200l 실험공장에의 공정확대

7l 발효조에서 최적화된 배양조건에서 산소전달속도를 지표로 1200l 실험공장에 공정확대를 시도한 결과 L-leucine 발효농도 및 수율, 당소모속도 등은 7l 발효조의 결과와 거의 일치했으며 산화환원전위 -150~-170 mV에서 L-leucine이 왕성하게 생성되었다(Fig. 6).

1200l 실험공장에서 산소섭취속도와 당소모속도와의 관계

1200l 실험공장에서 L-leucine 발효의 산소섭취속도(oxygen uptake rate)에 대한 당소모속도(sugar consumption rate)의 비율 및 L-leucine생산성을 phase 별로 조사한 결과 대수기보다 정지기에서 산소섭취속도에 대한 당소모속도의 비율이 높았으며 또한 L-leucine생산성도 높았다. 이는 L-leucine 발효 특성상 배양액내 용존산소가 어느정도 제한되어 세포의 성장이 제한된 조건(정지기)에서 L-leucine 발효가 가장

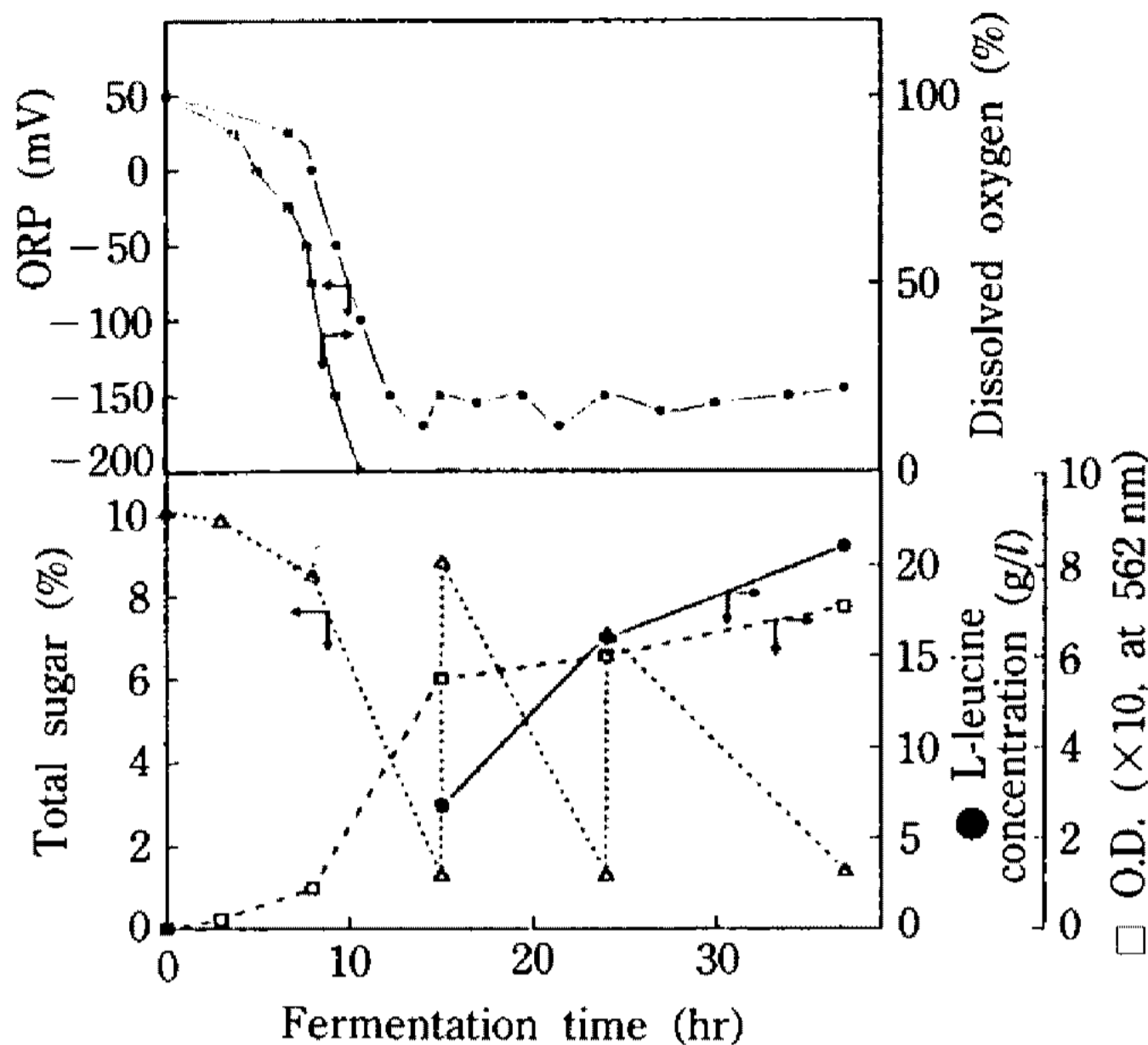


Fig. 6. A typical time course of L-leucine fermentation at optimum condition in 1200l pilot plant. (●) ORP, (□) dissolved oxygen, (△) total sugar, (●) L-leucine, (□) O.D.

Table 1. Changes in the ratio of oxygen uptake rate to sugar consumption rate and L-leucine productivity during the course of L-leucine fermentation

	Growth phase		
	Lag	Exponential	Stationary
OUR/SCR	1.33	0.80	1.13
L-leucine productivity (g/l·hr)	0.40	0.71	0.81

*OUR(oxygen uptake rate, mmole O_2 /l·hr), SCR(sugar consumption rate, mmole sugar/l·hr)

왕성하게 일어난다는 것을 증명해주고 있었다(Table 1).

요 약

Corynebacterium glutamicum CH 1516(L-leucine 생산주)를 사용하여 7l 발효조에서 배양온도 및 pH, 산소전달속도 등을 최적화한 결과 각각 30°C, 7.0, 0.21 kmole O_2 /m³·hr이었다. 산소전달속도가 0.19 kmole

O_2 /m³·hr보다 낮은 조건에서는 상당량의 lactic acid가 축적되었고 0.23 kmole O_2 /m³·hr보다 높은 조건에서는 glutamic acid가 생성되고 PCV가 크게 증가하였다. 한편 1200l 실험공장에의 L-leucine 생산을 위해 7l 발효조에서 최적화된 배양조건을 적용하여 산소전달속도를 지표로 공정확대를 실시한 결과 7l 발효조와 거의 대등한 결과를 얻을 수 있었으며 산화환원전위 -150~-170 mV에서 L-leucine이 왕성하게 생산되었다.

참고문헌

1. Calvo, R.A. and J.M. Calvo. 1967. Lack of end-product inhibition and repression of leucine synthesis in a strain of *Salmonella typhimurium*. *Science* **156**: 1107-1110.
2. Calvo, J.M., M. Freundlich and H.E. Umbarger. 1969. Regulation of branched amino acid biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: isolation regulatory mutants. *J. Bacteriol.* **97**: 1272-1282.
3. Kisumi, M., S. Komatsubara and I. Chibata. 1973. Leucine accumulation by isoleucine revertants of *Serratia marcescens* resistant to α -aminobutyric acid: lack of both feedback inhibition and repression. *J. Biochem.* **73**: 107-115.
4. Tsuchida, T., F. Yoshinaga, K. Kubota, H. Momose and S. Okumura. 1974. Production of L-leucine by a mutant of *Brevibacterium lactofermentum* 2256. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 1907-1911.
5. Araki, K., H. Ueda and S. Saigusa. 1974. Fermentative production of L-leucine with auxotrophic mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 565-572.
6. Corman, J., H.M. Tsushiya, H.J. Koepsell, R.G. Benedict, S.E. Kelly, V.H. Feger, R.G. Dworschack and R.W. Jackson. 1957. Oxygen absorption rates in laboratory and pilot plant equipment. *Appl. Microbiol.* **5**: 313-318.
7. Azuma, T., T. Nakanishi and H. Hagino. 1987. Properties of revertants appearing in L-leucine fermentation culture broth. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 3245-3249.

(Received October 9, 1992)