

Corynebacterium glutamicum 고정화균체에 의한 L-라이신 연속발효

이인선[†] · 조정일*

계명대학교 식품가공학과

*고려대학교 농화학과

Continuous Fermentation of L-Lysine by Immobilized *Corynebacterium glutamicum*

In-Seon Lee[†] and Jung-Il Cho*

Dept. of Food Technology and Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

*Dept of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract

For the improvement of L-lysine productivity, development of the continuous fermentation system by a bioreactor assembly was attempted. Primarily, optimal conditions on the whole cell immobilization of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21514 were studied and 76.2% of immobilization ratio was obtained when the cells were entrapped with 4% *k*-carrageenan showing 4.0kg gel strength. A bioreactor system was set up using the immobilized cells was applied for the continuous production of L-lysine. The results obtained under the optimum conditions were compared with those of the batchwise fermentation. Experimental results obtained from 14day continuous fermentation showed 36.7% of sugar conversion to L-lysine while the productivity of L-lysine was disclosed as 4.96mg/ml/mg-dry cell weight/hr which is 2.5 times and 4.1 times higher than those of the batchwise fermentation by the intact cells and by the immobilized cells, respectively.

Key words : L-lysine production, immobilization, bioreactor

서 론

아미노산 발효에 있어서 산업적으로 중요한 L-라이신은 제한아미노산의 일종으로 식품이나 사료의 강화제 및 영양 개선이나 의약품 등으로 그 수요가 급증하고 있어 이의 생산성 향상에 관한 새로운 방법의 개발이 요구되고 있다.

오늘날의 L-라이신 발효는 주로 회분식에 의존하고 있는데 인력과 에너지의 낭비가 많고 생산 효율이 높지 못한 문제점들을 지니고 있다. 이를 해결하기 위한 시도중 현재 국내외적으로 크게 주목을 받고 있는 분야가 고정화 균체를 이용하는 생체반응기 (bioreactor system)의 개발에 관한 것이다. 이 방법은 기본적으로 균체를 물에 녹지 아니하는 담체에 고정화한 고정화 균체를 생체 촉매로 이용하는 것이므로 생균체를 이용

하는 회분식이나 연속식 발효법에 비하여 작업이 간편하고 생산 효율이 높으며 에너지를 절감할 수 있는 등의 많은 이점이 있을 것으로 기대되고 있다. 세포를 고정화하는 방법은 세포내 효소계 전체를 균체내에 단순히 고정화만 시키는 고정화 처리 균체, 균의 생육상태를 유지하도록 하는 고정화 정지 균체 및 균의 생육과 증식이 이루어지는 고정화 증식 균체 등으로 대별할 수 있는데¹⁾ 이 중에서 현재 고정화 증식 균체를 이용하는 경우 높은 효소 활성을 지속적으로 유지할 수 있는 장점 때문에 많은 관심이 모아지고 있다.

*Corynebacterium glutamicum*에 의한 L-라이신의 생합성은 diaminopimelic acid 회로를 경유하여 이루어지는 복합 효소계에 의한 다단계 반응으로서^{2,3)} L-라이신의 생산의 경우 상기한 고정화 증식 균체를 이용하려는 시도는 의의있는 일로 생각된다. 생체반응기를 이용하여 L-라이신을 공업적으로 생산한 예는 아직 국내외적으로 보고된 바 없으나, aspartate와 malate⁴⁾가 알

[†]To whom all correspondence should be addressed

려져있고, 우리나라에서는 Kim과 Ryu⁹⁾가 glutamate 에 대하여 각각 파일롯트 규모로 실험 보고한 바 있다.

본 실험에서는 L-라이신 생산균주인 *C. glutamicum*-균체를 포괄법으로 고정화하고, 이것을 이용하여 생체 반응기에 의한 L-라이신의 연속 생산 시스템의 개발에 관하여 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서 사용한 균주는 ATCC에서 분양받은 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21514(Thr⁻, Met⁻) 을 사용하였다.

배지 및 균체배양

종균배지 (polypeptone 1%, meat extract 0.5%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%)에 접종하여 30°C에서 12시간 배양하였다. 이를 L-라이신 생산용배지 (Table 1)에 접종한 후 원심분리하여 집균하였다.

균체고정화

본 실험에서 사용한 담체는 k-carrageenan, polyacrylamide, calcium-alginate 및 agar를 사용하였으며 균체 고정화 방법은 다음과 같다.

k-carrageenan에 의한 고정화는 Tosa 등⁶⁾ 및 Sato 등⁷⁾의 방법에 따랐으며, gel을 만든 후 2×2×3 (mm³) 입

방크기로 절단하였다. Gel의 강도를 높여주기 위하여 0.3M KCl용액에 4°C에서 2시간 동안 침지한 후 멸균 증류수로 2회 세척하여 사용하였다. Polyacrylamide에 의한 균체고정화는 Nilsson 등⁸⁾과 Bang 등⁹⁾의 방법에 따라 고정하였으며, Ca-alginate에 의한 고정화는 Makiguchi 등¹⁰⁾ 및 White와 Portno¹¹⁾의 방법을 따랐으며, agar에 의한 고정화는 Karube 등¹²⁾의 방법에 따라 균체를 고정화하였다.

고정화 균체의 hardening방법

고정화 균체 8g을 0.088M HMDA (hexamethylene diamine)가 포함된 0.33M phosphate bufer (pH 7.0) 60 ml에 넣고 0°C에서 gentle shaking하여 10분간 반응시킨 후 12.5% glutaraldehyde용액을 5ml첨가하고 1시간 동안 반응시켰다¹³⁾. 멸균증류수로 2회 세척하여 전환반응에 사용하였다.

고정화 균체의 견고성 측정

고정화 균체의 견고성을 측정하기 위해서 Rheometer (Sun Kagaku Co., Ltd, type M-1107)를 사용하였다. 분석조건은 maximum force 2kg, chart speed 12mm/min, table speed 0.72mm/sec이었다.

고정화 균체의 활성도 측정

생균체 1g에 해당하는 고정화 균체, 7~8g을 종균 배지에 접종하여 30°C에서 진탕 배양하고, 고정화 균체를 mortar에 의하여 균질화시킨 후 0.1M tris-HCl 완충 용액 (pH8.0)에 현탁하여 580nm에서 흡광도를 측정하였다.

Aspartokinase (EC 2.7.2.4) 활성 측정

생균체의 aspartokinase의 활성 측정은 Shiio와 Miyajima¹⁴⁾의 방법에 따랐으며 이때 specific activity는 분당 단백질 mg당 생성된 aspartate hydroxamate의 mole 수로 정하였다.

고정화 균체의 경우, 생균체 1g에 해당하는 고정화 균체 7~8g을 mortar에 의하여 균질화시킨 후 0.1M tris-HCl 완충용액 (pH8.0)에 현탁하여 생균체와 동일한 방법으로 측정하였다.

단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등¹⁵⁾의 방법에 따랐다.

Table 1. Composition of medium for L-lysine production

D-glucose	10%
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0%
SPH*	1.5%
K ₂ HPO ₄	0.06%
MgSO ₄	0.04%
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.001%
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.001%
CSL (Be' 25)**	0.6%
Peptone	0.2%
CaCO ₃ ***	5
L-Homoserine	50mg
L-Leucine	100mg
L-Threonine	100mg
L-Methionine	200mg
Thiamine-HCl	100r
Biotin	50r

(Adjusted pH 8.0 and autoclaved at 120°C for 15min)

*SPH : soybean protein acid hydrolysate

**CSL : corn steep liquor (TN=4%)

***CaCO₃ : autoclaved, separately

L-라이신의 회분식 발효

생균체에 의한 L-라이신의 회분식 발효는 500ml 용량의 flask에 생산용 배지 20ml을 가하고 30°C에서 72시간 진탕 배양하였다.

고정화 균체에 의한 경우는 고정화 균체 7~8g을 50ml의 생산용 배지를 함유하고 있는 500ml 용량의 flask에 무균적으로 첨가 혼합하여 30°C에서 72시간 진탕 배양하였다.

생체 반응기에 의한 L-라이신의 연속식 발효

4% k-carrageenan에 고정화한 *C. glutamicum*의 고정화 균체 8g을 L-라이신 생산용 배지가 100ml 들어있는 500ml용량의 flask내에 무균적으로 투입하였다. 여

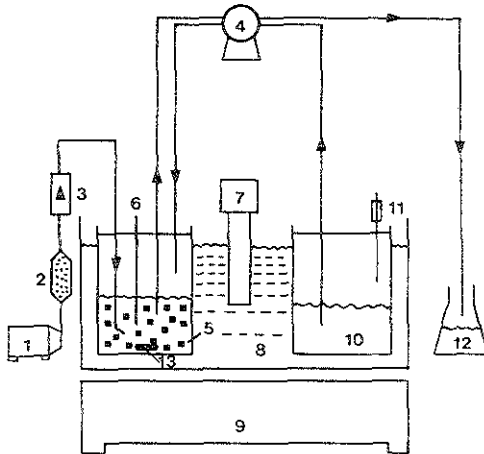


Fig. 1. Schematic representation of continuous-flow stirred-tank (CST) bioreactor system.

- 1. Air compressor
- 2. Glasswool filter
- 3. Air flow meter
- 4. Peristaltic pump
- 5. Immobilized cell
- 6. Sampling valve
- 7. Thermostat
- 8. Water bath
- 9. Magnetic stirrer
- 10. Medium reservoir
- 11. Air filter
- 12. Product reservoir
- 13. Magnetic bar

Table 2. Relative aspartokinase activities of *C. glutamicum* A-TCC 21514 immobilized in various carriers

Matrix	*Specific activity	Relative activity (%)
Intact cell	20.78	100
Polyacrylamide	12.95	62.3
k-carrageenan 3.0%	13.36	64.2
k-carrageenan 4.0%	15.84	76.2
Ca-alginate 5.0%	2.75	13.2
Agar 2.0%	5.56	26.7
Agar 4.0%	3.60	17.3

* Specific activity = nM/min/mg-protein

기에 통기 조절 장치를 부착하였고, 새로운 배지가 peristaltic pump를 통하여 일정한 유속으로 연속적으로 공급될 수 있는 형태 (Fig. 1)의 생체 반응기를 조립 제작하였다.

결과 및 고찰

균체의 고정화

담체내에 균체가 고정화되어 있는 양을 측정하는 방법으로서 L-라이신 생합성 경로상의 중심 효소로서 작용하는 aspartokinase의 활성을 고정화 전 후에서 측정하여 비교하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 4% k-carrageenan으로 처리한 경우가 76.2%의 효소 활성을 유지함으로써 가장 효과적이며 polyacrylamide (62.3%), 2% agar (26.7%), 5% Ca-alginate순으로 나타났다.

고정화 균체의 견고성

고정화 균체를 공업적 용도로 사용하기 위해서는 고정화 균체가 마찰에 의한 마모가 적고 외부의 압력에 대한 일정한 강도를 유지할 수 있어야 한다.

Table 3의 결과에 의하면 polyacrylamide가 가장 높은 5.5kg을 나타내었고 4% agar와 4% k-carrageenan은 각각 4.1kg와 4.0kg순으로 비교적 높은 값을 나타내었다.

고정화 균체의 활성도

고정화 균체의 담체 내에서의 활성도를 측정하여 본 결과 (Fig. 2) 4% k-carrageenan으로 처리한 경우가 가장 높은 활성을 유지하고 있음을 알 수 있었고, polyacrylamide가 그 다음이었다. 또, 4% k-carrageenan과 2% agar에 포괄시킨 고정화 균체는 배양 개시 후 48시간 경과했을 때 활성도가 steady state에 도달하였으나 polyacrylamide와 5% Ca-alginate에 의한 고정화 균체의 경우는 72시간경에 steady state에 도달하였다.

Table 3. Gel strength of the immobilized cells

Matrix	Item	Size (mm)	Surface area (mm ²)	Hardness (kg)
Polyacrylamide		2×2×3	35	5.5
k-carrageenan		2×2×3	35	3.1
	3.0%	2×2×3	35	4.0
	4.0%	2×2×3	35	4.0
Ca-alginate 5.0%	∅ 0.4		74.5	3.2
Agar 2.0%		2×2×3	35	2.3
Agar 4.0%		2×2×3	35	4.1

이상의 결과들을 종합해 볼 때 4% *k*-carrageenan에 포괄된 고정화 균체가 고정화을 균체의 생육활성도가 높으며 gel 강도가 우수하였으므로 앞으로의 생체 반응기에 사용하였다.

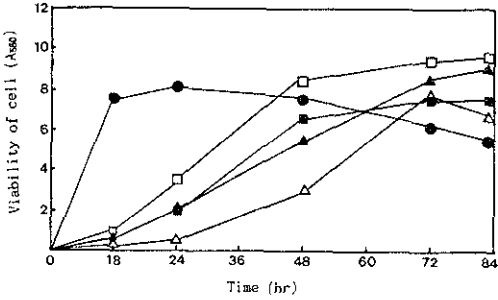


Fig. 2. Time profile on viability of immobilized cells of *C. glutamicum* ATCC 21514.
 △—△ : 5% Ca-alginate, ■—■ : 2% agar,
 ▲—▲ : Polyacrylamide
 □—□ : 4% *k*-carrageenan, ●—● : Intact cell

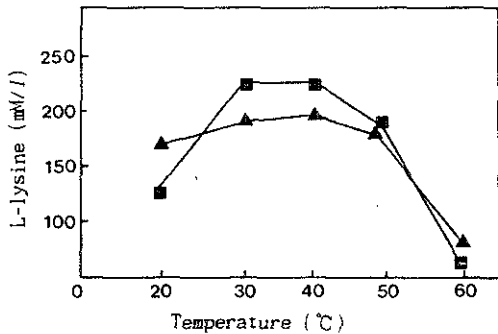


Fig. 3. Effect of temperature on L-lysine productivity.
 ■—■ : Intact cell, ▲—▲ : Immobilized cell

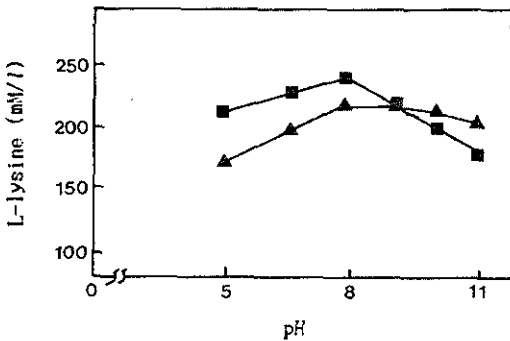


Fig. 4. Effect of pH on L-lysine productivity.
 ■—■ : Intact cell, ▲—▲ : Immobilized cell

L-라이신의 회분식 발효 조건

온도의 영향

Fig. 3에서 보는 바와 같이 생균체를 이용한 발효에 있어서 최적 온도는 30~35°C이었으며 20~40°C의 비교적 넓은 온도 범위에서 안정하게 L-라이신 발효가 진행되었다. 이에 반하여 고정화 균체는 생균체에 비하여 매우 안정된 넓은 온도 범위를 가지고 있었다. 즉, 20~40°C에서 안정하게 L-라이신을 생산하였으며, 따라서 고정화 조작에 의하여 열에 대한 안정성이 증가됨을 알 수 있었다.

pH의 영향

Fig. 4에서 보는 바와 같이 생균체의 경우는 pH 5.0~10.0 범위에서 L-라이신 생산량은 별다른 변화가 없었고 산성측에서 특히 안정적이었으며 최적 pH는 8.0이었다. 고정화 균체의 경우 최적 pH는 8.5 부근으로 오히려 알칼리 측에서 더욱 안정적인 경향을 나타내었다.

생체 반응기에 의한 L-라이신의 연속식 발효조건

희석율의 영향

Fig. 5에서 보는 바와 같이 희석율이 0.05~0.06hr⁻¹일 때 가장 높은 L-라이신 생산량을 나타내었으며, 0.1hr⁻¹ 이후는 급격하게 감소함을 알 수 있었다.

통기율의 영향

Fig. 6에서 보는 바와 같이 2v/v/m일 때 가장 높은 L-라이신 생성량을 나타내었으며, 2v/v/m미만일 때는 L-라이신 생성량이 현저하게 감소하였다.

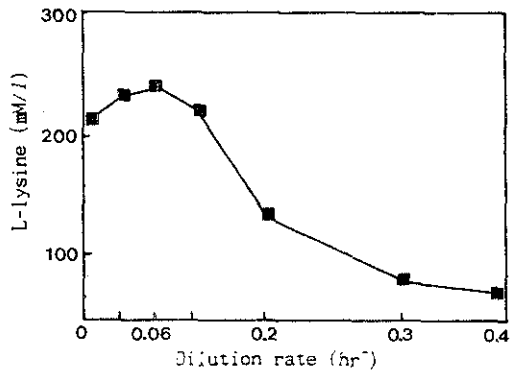


Fig. 5. Effect of dilution rate on L-lysine productivity by immobilized cells of *C. glutamicum* ATCC 21514.

L-라이신의 연속생산

앞에서 선정된 최적발효조건인 통기율 2v/v/m, 회석율 0.05hr, 30°C, pH 8.0에서 14일간 연속생산 하였다. 그 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 14일간 일정한 수준의 L-라이신 생산성이 유지됨을 알 수 있었다.

회분식과 연속식 발효에 의한 L-라이신 생산성 비교

이상의 최적조건하에서 회분식 및 연속식발효를 실시하여 얻은 결과를 비교한 바 Table 4에서 보는바와 같이 총공급당 전환율은 생균체 및 고정화균체에 의한 회분식발효의 경우 각각 31.9%, 32.4%이었으나, 연속식 발효의 경우는 36.7%로서 회분식에 비하여 각각 15%와 13%가 증가하였다.

다음, L-라이신생산율은 생균체 및 고정화균체에 의한 회분식발효의 경우 각각 1.96mg, 1.21mg이었으며, 연속식발효의 경우 4.96mg으로서 역시 회분식에 비하

여 각각 2.5배와 4.1배가 증가하였다. 또한 이는 14일 간의 발효성적이므로 발효기간이 길어질수록 그 증가 폭은 더욱 증가하리라 생각된다.

이상의 결과로서 bioreactor를 이용한 L-라이신의 연속생산은 기존의 회분식발효 보다 매우 효율적인 L-라이신 생산방법으로 생각되며, 특히 연속적인 조업과 공정의 단순화에 따른 노동력 및 경비절감은 물론 좁은 공간에서 단위면적당 높은 생산수율을 얻을 수 있는 바 이에 대한 지속적인 연구에 의해서 산업에의 응용성은 매우 높을 것으로 사료된다.

요 약

L-라이신 생산성의 향상을 목적으로 생체반응기를 이용한 연속발효시스템의 개발을 시도하였다. 먼저, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21514균체의 고정화조건에 대하여 검토하였는데 균체를 4% k-car-

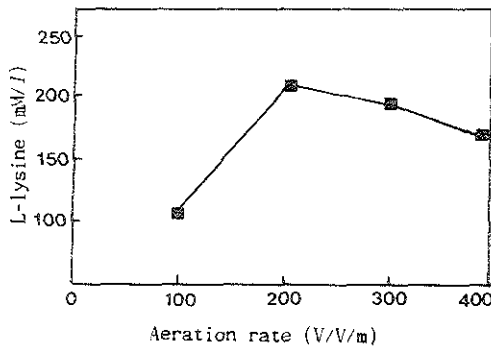


Fig. 6. Effect of aeration rate on L-lysine productivity by immobilized cells of *C. glutamicum* ATCC 21514.

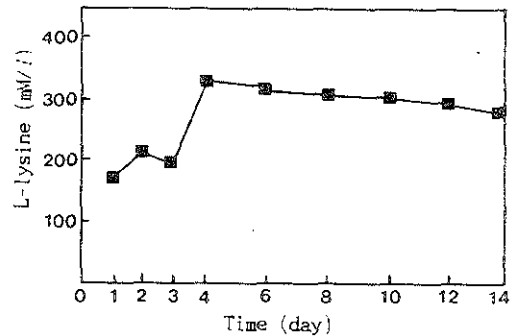


Fig. 7. Time profile on continuous L-lysine fermentation by a stirred fluidized-bed bioreactor system packed with immobilized cells *C. glutamicum* ATCC 21514.

Table 4. Comparison of L-lysine productivity between fermentation of batchwise and continuous operation

Cell form	Intact cells ^a	Immobilized cells	
		Batchwise ^b	Continuous ^c
Dry cell weight(DCW, mg)	184	300	300
Culture time(hr)	72	72	336
Total sugar supplemented(g)	2	5	168
Total amount of L-lysine accumulated(g)	0.52	1.31	50
Conversion ratio of sugar ^d (%)	31.9	32.4	36.7
Productivity of L-lysine ^e (mg)	1.96	1.21	4.96

^a Intact cells were cultured in 20ml media in 500ml flask (30°C, pH 8.0, 72hr)

^b Eight gram of immobilized cells corresponding to 1g of intact cells was cultured in 50ml media in 500ml flask (30°C, pH 8.0, 72hr)

^c Eight gram of immobilized cells corresponding to 1g of intact cells was cultured in 100ml media in 500ml flask of CST bioreactor (30°C, pH 8.0, 2v/v/m, 0.05/hr)

^d Conversion ratio of sugar (%) = $\frac{\text{total amount of L-lysine accumulated}}{\text{total amount of glucose} \times 146.2/180}$

^e L-lysine productivity = amount of L-lysine accumulated (ng)/mg DCW/hr/ml-reactor volume

rageenan에 포괄하였을 때 76.2%의 고정화율을 나타내었고, 절강도는 4.0kg이었다. 이 고정화균체를 사용하여 생체반응기를 제작하여 L-라이신의 연속생산에 응용하였으며, 최적조건하에서 얻은 결과를 회분식의 결과와 비교하였다. 14일간의 연속발효에서 얻은 실험결과 공급당의 L-라이신으로의 전환율은 36.7%이었고, L-라이신의 생산성은 4.96mg/ml/mg-dry cell weight/hr로서 생균체나 고정화균체에 의한 회분식발효의 경우에 비하여 각각 2.5배와 4.1배 높았다.

문 헌

- Chibata, I. and Wingard, L. B. : Immobilized microbial cells. Academic Press, New York, p.12 (1983)
- Ozaki, H. and Shiio, I. : Production of L-lysine by pyruvate kinase mutants of *Brevibacterium flavum*. *Agri. Biol. Chem.*, **47**, 1569 (1983)
- Shiio, I., Toride, Y. and Sugimoto, S. : Production of L-lysine by pyruvate dehydrogenase mutants of *Brevibacterium flavum*. *Agri. Biol. Chem.*, **48**, 3091 (1984)
- Fukui, S. and Tanaka, A. : Immobilized microbial cells. *Ann. Rev. Microbiol.*, **36**, 145 (1982)
- Kim, H. S. and Ryu, D. Y. : Continuous glutamate production using on immobilized whole-cell system. *Biotech. Bioeng.*, **24**, 2167 (1982)
- Tosa, T., Sato, T., Mori, T. and Chibata, I. : Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. *Biotech. Bioeng.*, **21**, 1697 (1979)
- Sato, T., Nishida, Y., Tosa, T. and Chibata, I. : Immobilization of *Escherichia coli* cells containing aspartate activity with k-carrageenan. *Biochim. Biophysica. Acta*, **570**, 179 (1979)
- Nilsson, K., Birnbaum, S., Flygare, S. Mosbach, K. and Brodelius, P. : A general method for the immobilization of cells with preserved viability. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 319 (1983)
- Bang, W. G., Benrendt, V., Lang, S. and Wanger, F. : Continuous production of L-tryptophan from indole and L-serine by immobilized *Escherichia coli* cells. *Biotech. Bioeng.*, **25**, 1013 (1983)
- Makiguchi, N., Maanobu, A. and Asai, Y. : Immobilization of a luminous bacterium and light intensity of luminous materials. *J. Ferment. Technol.*, **58**, 17 (1980)
- White, F. H. and Portno, A. D. : Continuous fermentation by immobilized brewers yeast. *J. Inst. Brew.*, **84**, 228 (1978)
- Karube, I., Urano, N., Matsunaga, T. and Suzuki, S. : Immobilization of cells to agar, agarose and sephadex supports. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 5 (1982)
- Bang, W. G., Lang, S., Sahm, S. and Wanger, F. : Continuous production of L-tryptophan by *Escherichia coli* cells. *Biotech. Bioeng.*, **25**, 999 (1983)
- Shiio, I. and Miyajima, K. : Concerted inhibition and its reversal by end product of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.*, **65** (6), 849 (1969)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Far, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** 285 (1951)

(1994년 1월 6일 접수)