

오르니틴 생산을 위한 회분식 배양에서 산화환원전위와 상태변수들간의 상관관계

이태호 · 나정걸 · 장용근* · 정봉현¹

한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터, ¹한국과학기술연구원 생명공학연구소

Correlation between Redox Potential and State Variables in Batch Cultures for Ornithine Production. Lee, Tae Ho, Jeong Geol Na, Yong Keun Chang*, and Bong Hyun Chung¹ Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon 305-701, Korea, ¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Taejeon 305-600, Korea - In batch cultures of *Brevibacterium ketoglutamicum* for the L-ornithine production in which the pH and dissolved oxygen concentration were regulated constant, the profiles of redox potential were observed in parallel with the profiles of state variables such as cell, glucose, and ornithine concentrations. It was found that the redox potential had a close relationship with cell concentration and was also affected by ornithine concentration. The effects of ornithine and glucose on redox potential were examined in a separate series of experiments. Based on the experimental results, a correlation of redox potential to glucose, cell and ornithine concentrations has been proposed. The proposed correlation can be used for on-line estimation of ornithine concentration from on-line data of redox potential, glucose concentration, and cell concentration.

Key words: L-ornithine production, redox potential, correlation to state variables

산화환원전위(redox potential; E_h)는 전기 화학적으로, 주어진 환경에서 산화물에 대한 환원물의 상대적인 농도 비를 의미한다. 즉 이는 용해되어 있는 redox couple들이 갖는 전자의 수여 및 공여 능력을 종합적으로 대표하는 값이라 할 수 있다. 산화환원전위에 대한 연구의 하나로서 산화환원전위의 용존산소(DOC)에 대한 의존 관계를 이용하여 혐기성 조건과 흡사한(DOC probe 측정범위보다 낮은 범위) 상태에서 용존산소농도를 산화환원전위로부터 추정했다는 보고가 있었다[1, 4, 12, 13]. 미생물은 내부의 산화환원 반응을 통해 에너지를 얻은 후 ATP 형태로 저장하여 성장과 유지에 사용하기 때문에 일반적으로 미생물 배양시스템에 있어서의 산화환원전위는 평형상태에 있지 않는 것으로 알려져 있다[3]. 따라서, 산화환원전위와 미생물의 생리상태사이의 관련성에 관한 연구도 있는 바, Wimpenny는 산화환원전위가 TCA cycle과 respiration chain에 영향을 준다고 주장하였다[3]. 즉, 더 높은 호기상태로 갈수록 redox potential이 증가하며 tricarboxylic acid enzyme, cytochrome, ATP pool, 성장수율, 그리고 hydrogenase의 활성 등이 redox potential에 의존한다는 사실을 발견하였다. 또한 산화환원전위가 항생제 levorin A와 B 생합성에 영향을

미친다는 사실이 밝혀졌는데 산화환원전위 값이 높을 때는 levorin A 합성이 선호되었고 산화환원전위가 낮을 때는 levorin B 합성이 더 잘 이루어졌다[4]. Shibai 등은 산화환원전위가 inosine 합성에 미치는 영향을 연구하였다[11]. 공기유속과 교반속도의 조절에 의해 *B. subtilis*에 의한 inosine의 회분식 생산을 각기 다른 redox potential에서 시도하였다. 이들의 결과에 따르면 대사상태가 redox potential에 의해 강하게 영향을 받는 바, 각기 다른 redox potential에서 부산물의 종류가 다르며 산화환원전위가 -160 mV이상일 경우에는 inosine의 생산 없이 lactic acid만이 축적되었다. 이밖에도 cyanide, azide 또는 2,4-dinitrophenol을 첨가할 경우 세포가 산소소모를 하지 못하기 때문에 용존 산소농도가 증가함에도 불구하고, 산화환원전위가 감소하는 현상을 보임으로써 산화환원전위가 단지 용존 산소농도의 영향만을 나타내는 것은 아니라는 것을 관찰하였다.

Kwong 등은 산화환원전위를 이용할 경우 아미노산 생산공정을 모니터링할 수 있다고 보고하였다[5]. 즉, 산화환원전위 값이 최소치를 보일 때 성장기에서 생산기로 전환됨을 알 수 있었다. 또한 이들은 산화환원전위와 DOC의 on-line 측정치로부터 *Corynebacterium glutamicum*의 대사상태 변화를 파악하는 방법도 제시하였다[6].

이상에서 알 수 있듯이 그 동안 대부분의 연구가 산화환원전위가 균체의 생리활성, 부산물 생산에 미치는 영

*Corresponding author
Tel. 82-42-869-3927, Fax. 82-42-869-3910
E-mail: ychang@sorak.kaist.ac.kr

향 또는 산화환원전위의 변화패턴으로부터 한 배양시스템의 대사상태의 변화를 파악하는 것에 대해 이루어져 왔다. 그러나, 산화환원전위를 보다 적극적으로 활용하면 단순한 대사상태의 변화를 추적하는 것을 넘어서 주요 상태변수를 온라인 모니터링할 수 있을 것이다. 물론 이를 위해서는 산화환원전위와 목표로 하는 측정변수들 간의 상관관계가 사전에 파악될 필요가 있다. 따라서, 본 연구에서는 회분식 발효에서 산화환원전위와 주요 상태변수들 사이의 상관관계를 도출하는 방법론을 제시하였으며 이를 일차대사산물로서 간 질환 치료에 사용되는 의약품 아미노산인 오르니틴(L-ornithine)[9] 회분식 배양에 적용하였다. 산화환원전위가 pH와 DOC에 의해 영향을 받지만, pH와 DOC값이 일정 수준으로 조절되고 있는 환경에서는 산화환원전위가 발효배지내의 조성변화에만 관련 있다는 점에 착안하여 DOC-stat, pH-stat 발효에서 산화환원전위의 시간에 따른 거동을 관찰하였으며 산화환원전위와 균체농도, 기질농도, product 농도 사이의 관계식을 구하였다.

이론적 배경

배양액의 산화환원전위는 DOC와 pH에 의해 가장 크게 영향을 받지만 다른 redox couple 물질들의 영향도 받으므로 이를 보다 보편화된 식으로 나타내면 다음과 같다.

$$E_n = f(\text{DOC}, \text{pH}, \text{Re}_i), \quad i=1, 2, 3, \dots \quad (1)$$

여기서 Re_i 는 각각 다른 redox couple 물질의 농도를 의미한다.

배양액 중의 redox couple로 작용하는 용존물질 농도는 세포가 기질을 비롯한 배지성분을 사용하여 얼마나 생성되었으며 얼마나 많은 product 및 부산물들을 만들었는지에 달려있다. 이 중 기질(S)과 생성물(P)은 정량이 가능하나 나머지 용존물질들은 규명 및 농도 정량이 불가능하거나 어렵다. 따라서 이러한 물질들이 갖는 산화환원전위에 대한 영향을 세포농도(X)에 통합함으로써 식 (1)을 변형시켜 식 (2)를 구하였다.

$$E_n = E_0 + g(\text{Re}_i) = E_0 + g(X, S, P) \quad (2)$$

즉 식 (2)에서 X항은 고형물질인 세포가 산화환원전위에 미치는 영향을 의미한다기 보다는 배양액 중의 S, P 이외의 기타물질들이 산화환원전위에 미치는 모든 영향을 종합한 것이라 할 수 있다. 여기서 E_0 는 pH, 온도, DOC에 의해서만 결정되는 값으로서 본 연구에서는 상수로 취급하였다. 식 (2)에서 함수 $g(X, S, P)$ 를 간단한 급수형태의 함수로 가정하면 다음과 같은 식이 얻어진다.

$$E_n = E_0 + a_0 + a_1X + a_2X^2 + \dots + b_1S + b_1S^2 + \dots + c_1P + c_2P^2 + \dots$$

$$= E_0' + a_1X + a_2X^2 + \dots + b_1S + b_1S^2 + \dots + c_1P + c_2P^2 + \dots \quad (3)$$

여기서 $E_0' = E_0 + a_0$ 이다.

재료 및 방법

균주

본 연구에서 사용한 미생물은 생명공학연구소에서 분양받은 *Brevibacterium ketoglutamicum* 1047로서 L-citrulline auxotroph이다. 냉장 보관은 -4°C에서 글리세롤 용액을 사용하여 행하였다.

배양 배지 및 조건

종균배양에 쓰인 성장배지는 YPD배지이었다(yeast extract 10 g/L, glucose 20 g/L, peptone 10 g/L; pH 7.0). 종균배양은 250 mL의 플라스크에서 12시간 동안 행하여졌다. 발효배지의 조성은 다음과 같다.: 포도당 100 g/L, yeast extract 10 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 g/L, KH_2PO_4 0.75 g/L, Na_2HPO_4 1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, trace element solution. 회분식 배양은 배양부피 2.5리터인 전산화된 발효조 시스템에서 이루어졌다(Bio Stat E, B. Brown Biotechnology, U.S.A.). 배양기 및 각종 센서들을 포함한 전체 장치의 구성도를 Fig. 1에 나타내었다. 배양온도는 30°C이었고 pH는 암모니아수를 이용하여 7.0으로 유지하였다. 통기속도를 1 vvm으로 고정한 상태에서 교반속도(150 ~ 1,000 rpm) 조작을 통해 DOC를 제어함에 있어서 보다 정밀한 제어를 위해 Lee 등에 의해 개발된 autotuning proportional-integral-derivative(PID) 제어기를 사용하였으며[7, 8] DOC는 포화 값의 10, 30, 50%로 유지시켰는데 오차 ±1% 이내의 범위에서 DOC의 정밀제어

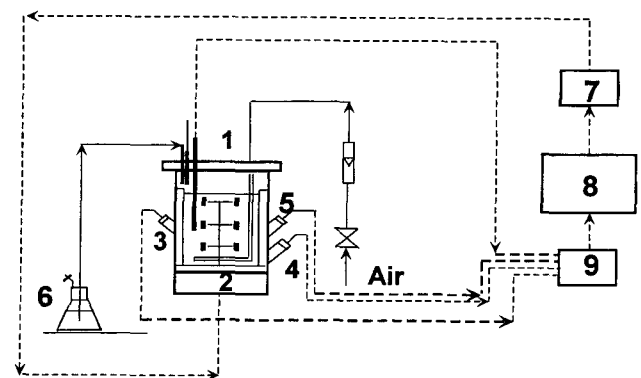


Fig. 1. Bioreactor system.

- 1. Mass spectrometer
- 2. Jar fermentor
- 3. pH electrode
- 4. DOC electrode
- 5. redox potential electrode
- 6. NH_4OH solution
- 7. D/A converter
- 8. Personal computer
- 9. A/D converter

가 가능하였다.

분석

건조균체 농도는 10 mL의 sample을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리, 증류수 세척 과정을 세 번 반복한 후 80°C에서 12시간동안 건조하여 결정하였다. 균체농도는 흡광분석기(UVICON 930, UVICON, USA)로 600 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 얻었다. 포도당은 Gluco-E Kit(영동제약)을 사용하여 분석하였고 오르니틴 분석에는 Chinard에 의해 제시된 방법을 이용하였다[2]. DOC는 막형 DOC 전극(Ingold, Germany)을 사용하여 측정하였으며 pH 및 산화환원전위도 Ingold사의 해당 전극을 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

산화환원전위의 거동

Fig. 2A 에는 DOC가 10%로 유지된 회분식 발효에서의 산화환원전위 거동이 나타나 있다. 산화환원전위 값은 크게 네 단계, 1)급격한 증가, 2)일정한 값을 유지, 3)느린 증가, 4)급격한 증가로 나눌 수 있는데 각 단계들은 균체, 기질, 생성물의 농도 변화에 기초하여, 미생물의 대사상태의 변화로 설명될 수 있다. 첫 번째 구간에서는 산화환원전위 값이 초기의 매우 짧은 시간동안 급격히 감소하였다가 빠른 속도로 증가하였다. 이러한 산화환원전위의 초기 감소현상은 균체의 지연기(lag phase)에서 일어나는 현상으로 이미 보고된 바 있다[6]. 균체성장은 짧은 지연기를 지난 후 급격한 증가를 보였다(Fig. 2B). 이후 두 번째 구간에서는 배지내의 L-arginine이 고갈되면서 균체성장이 지연되기 시작한 것으로 보였으며 산화환원전위 값은 67 mV로 거의 일정하게 유지되었다. 한편

L-arginine의 고갈이 오르니틴 생성을 촉진시킨 것으로 보인다. L-arginine 고갈 환경이 지속됨에 따라 L-arginine auxotroph의 특성을 잃어버린 복귀돌연변이체가 나타나면서 건조 균체 질량은 다시 증가하기 시작하였다(세 번째 단계). 이 때, 산화환원전위가 다시 증가하는데 그 기울기는 첫 번째 단계에 비해 작았다. 포도당이 완전히 소비된 네 번째 단계에서는, 산화환원전위가 다시 급격히 증가한다. 포도당 고갈에 따른 산화환원전위의 변화는 Oktyabr'kii와 Smirnova에 의해서도 보고된바 있다[10]. 42시간 배양 후 최종 건조균체질량은 18.0 g/L이었고 L-오르니틴 농도는 14.2 g/L이었다.

높은 DOC 수준에서도 유사한 거동이 나타나는지 살펴 보았다. DOC가 30%일 때의 결과가 Fig. 3에 나타나 있다. 산화환원전위는 초기 10시간 동안 균체가 빠른 성장을 보임으로써 급격히 증가하였고 10시간 이후(10~21시간) 균체성장이 지연되면서 그 증가속도가 현저히 떨어졌다(Fig. 3A). 세 번째 단계(21~42시간)에서는 산화환원전위가 시간에 따라 천천히 증가하다가 포도당이 고갈된 후에는, DOC 10% 실험에서와 마찬가지로 급격히 증가하는 현상이 관찰되었다(Fig. 3B). 45시간 배양 후 최종 건조균체질량은 18.3 g/L이었고 오르니틴 농도는 19.2 g/L이었다.

Fig. 4는 DOC가 50%인 실험의 결과이다. 시간에 따른 건조균체질량, 포도당, L-오르니틴 농도 변화와 산화환원전위의 거동을 비교하였을 때 앞서의 두 경우와 유사한 결과를 얻었다. 52시간의 배양 후 최종 건조균체질량은 15.1 g/L이고, 오르니틴 농도는 28.1 g/L였다.

산화환원전위, 균체, 기질, 생산물 농도의 거동을 자세히 비교, 관찰한 결과 일관된 현상을 발견할 수 있었다. 즉, 오르니틴의 농도가 낮을 경우에는 산화환원전위가 균체 성장에 매우 의존하는 것으로 보이나, 배양이 진행

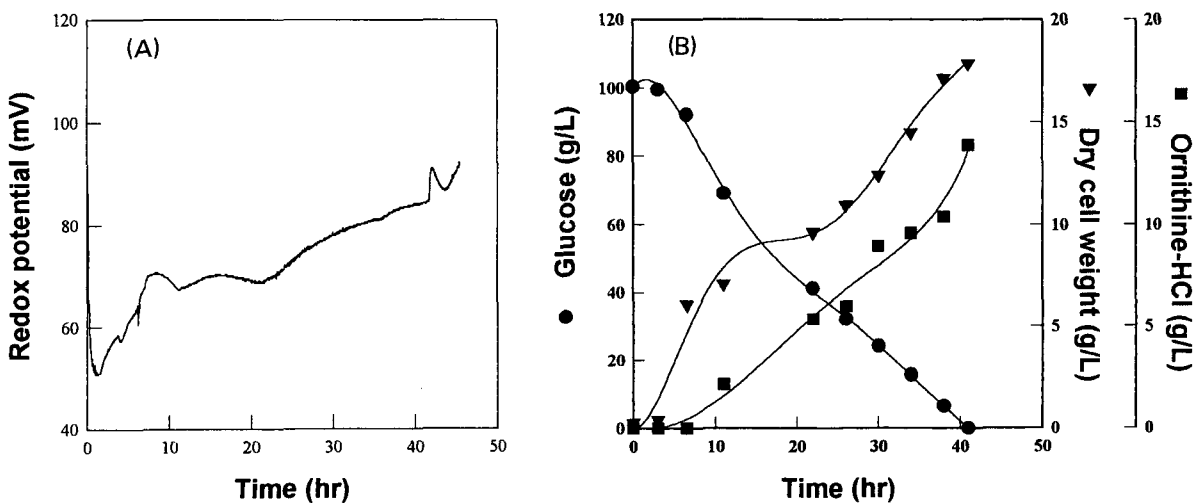


Fig. 2. Profiles in DOC 10% culture.
(A) redox potential. (B) Dry cell weight, glucose, L-ornithine concentration.

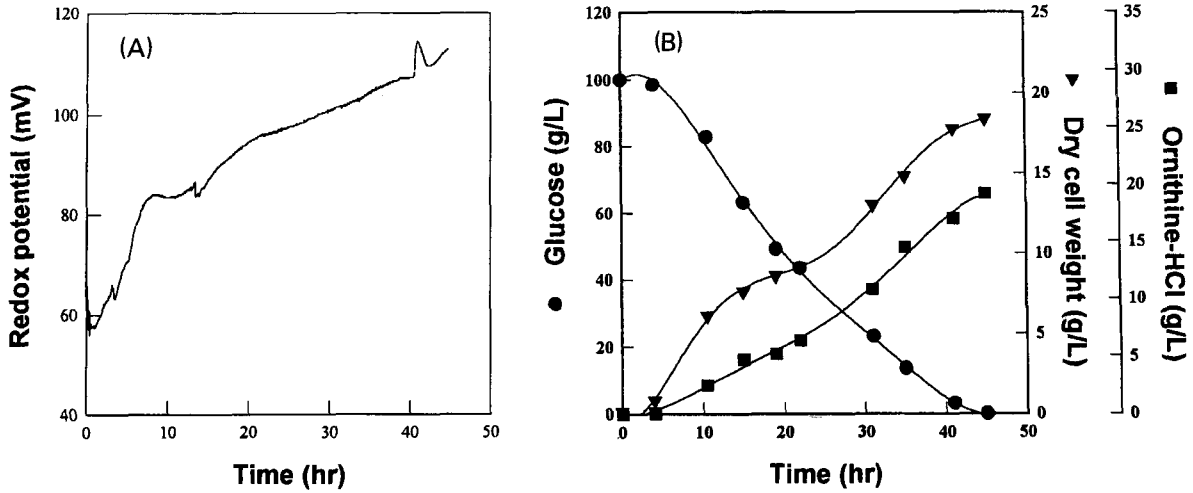


Fig. 3. Profiles in DOC 30% culture. (A) redox potential. (B) Dry cell weight, glucose, L-ornithine concentration.

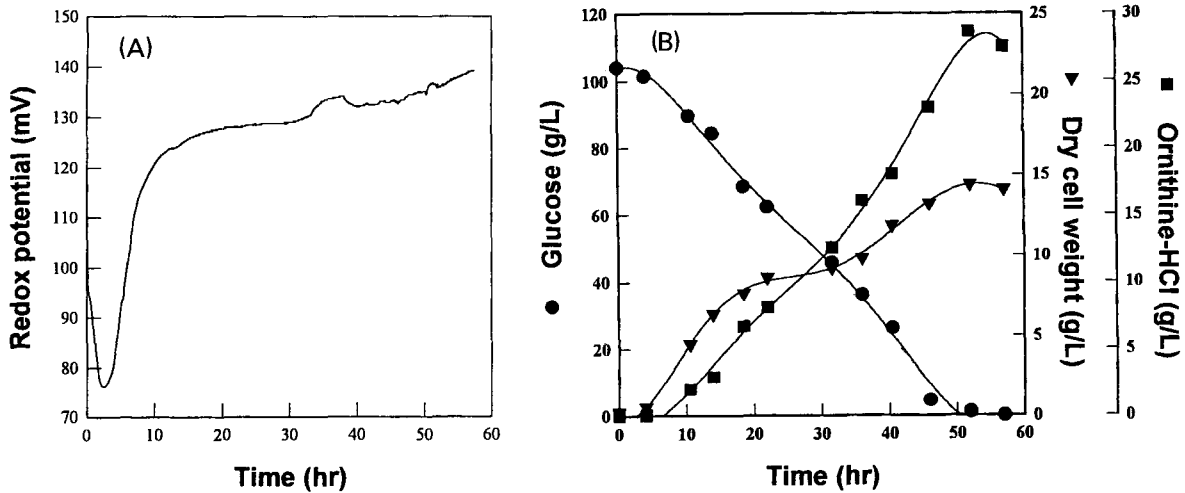


Fig. 4. Profiles in DOC 50% culture. (A) redox potential. (B) Dry cell weight, glucose, L-ornithine concentration.

되어 오르니틴 농도가 증가하면 그 관계가 모호해진다는 점이다. 이로부터 오르니틴 자체도 산화환원전위에 매우 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

산화환원전위와 발효 상태변수와의 상관관계

산화환원전위에 대한 기질농도(포도당)와 생성물(오르니틴)농도의 영향을 살펴보기 위한 별도의 실험을 행하였다. 이때, pH는 7.0으로 고정하였고 용존산소는 질소가스를 불어넣어 완전히 제거하였다. 실험결과 Fig. 5A와 5B에 나타나 있듯이, 산화환원전위가 포도당과 오르니틴 농도와 관련이 있는 것으로 밝혀졌으며 각각에 대한 관계식은 아래와 같이 일차식과 이차식으로 각각 표현될 수 있었다.

$$E_h = -0.323 \cdot S + 89.3 \quad (4)$$

$$E_h = 0.063 \cdot P^2 - 4.360 \cdot P + 94.8 \quad (5)$$

그러나, 특정 균체농도의 현탁액을 준비하는 어려움과 동시에 각종 배지성분과 부산물의 영향도 균체농도에 포함시켜야 하는 문제 때문에 균체농도가 산화환원전위에 미치는 영향은 별도의 실험을 통해 알아볼 수 없었다.

식 (3), (4), (5)를 종합하여 S, P, X를 모두 포함하는 식을 구하였다.

$$E_h = E'_0 + a_1 \cdot X + a_2 \cdot X^2 + \dots - 0.323 \cdot S + 0.063 \cdot P^2 - 4.360 \cdot P \quad (6)$$

식 (6)을 이용하여 회분식 발효실험에서 얻은 데이터를 regression함으로써 E'_0 , a_1 , a_2 를 구하였는데, 산화환원전위가 균체농도의 일차함수로 나타내질 수 있음을 알 수 있었다(즉, $a_0=0$). 계산결과 얻은 계수들을 Table 1에

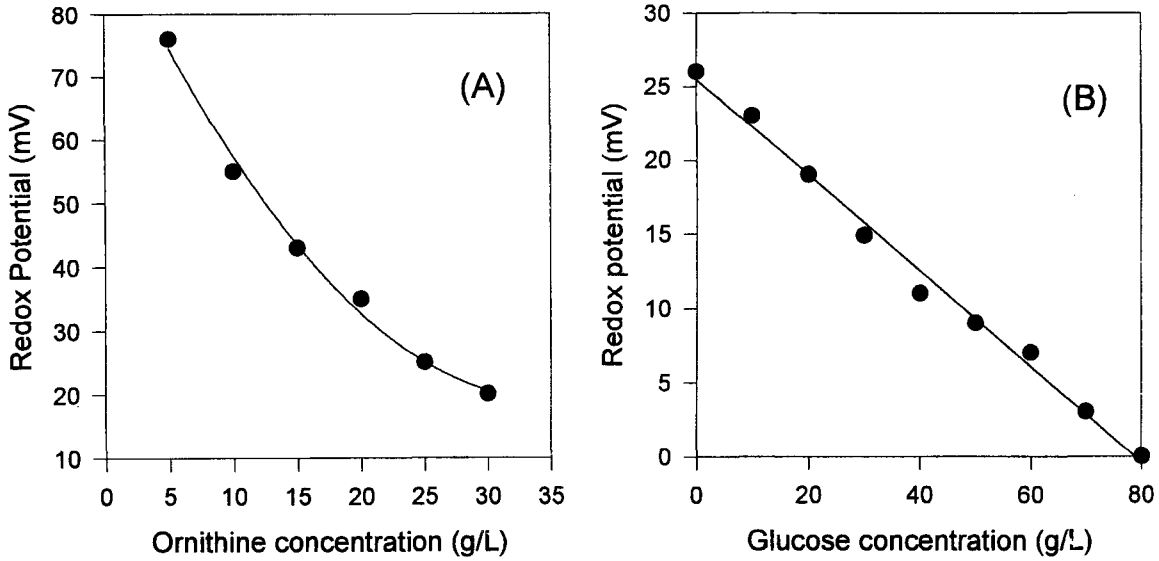


Fig. 5. (A) Effect of L-ornithine concentration on redox potential in DOC-stat. (B) Effect of glucose concentration on redox potential in DOC-stat.

Table 1. Coefficients for the correlation of redox potential to cell, substrate, and product concentrations

	E_0	a_1	b_1	c_1	c_2	Correlation factor
DOC 10%	82.15	2.62	-0.323	0.063	-4.361	0.997
DOC 30%	94.58	4.29	-0.323	0.063	-4.361	0.992
DOC 50%	124.4	6.35	-0.323	0.063	-4.361	0.987

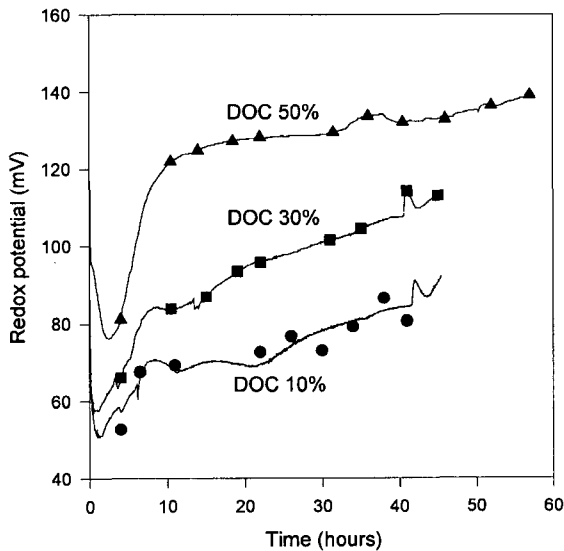


Fig. 6. Comparison of calculated redox potential from Eq. 8 with measured values at various DOC level; measured values (); calculated values (●: DOC 10%; ■: DOC 30%; ▲: DOC 50%)

정리하였다. 모든 경우에 대해 상관계수(correlation factor) 값이 0.987 이상이였다. 이러한 높은 상관계수 값과 Fig. 6으로부터 알 수 있듯이 만족할만한 상관식이

얻어졌음을 알 수 있었다.

Table 1에 나타나 있듯이 E_0 와 a_1 은 DOC 값에 따라 다른 값을 보였다. E_0 의 경우 산화환원전위가 DOC의 영향을 받으므로 DOC값에 따라 변하는 것이 당연한 것으로 생각된다. 균체농도에 대한 계수(a_1)가 DOC에 따라 변하는 것은 DOC level에 따라 부산물의 생성수율 및 포도당을 제외한 기타 기질(yeast extract 등)의 소모가 달라지기 때문일 것으로 생각된다.

이상으로 오르니틴 회분식 배양에서의 산화환원전위와 발효 상태변수들과의 상관관계를 알아보았다. 이는 생물공정공학 관점에서 중요한 의미를 가진다. 즉, 산화환원전위와 균체 및 포도당 농도는 on-line으로 어렵지 않게 측정될 수 있는 반면, 오르니틴의 분석은 복잡한 분석방법이나 시간을 요구하는 전 처리 과정 때문에 on-line으로 수행되기 매우 어렵다. 이러한 상황에서, 본 연구에서 구한 상관관계는 산화환원전위, 포도당, 세포농도의 on-line data로부터 오르니틴 농도의 on-line 추정에 응용 가능할 것이다.

요 약

의료용 아미노산인 오르니틴을 생산하는, 용존산소농도와 pH가 일정하게 유지되는 회분식 배양에서 산화환원전위의 시간에 따른 변화를 주요 발효 상태변수들(균체, 포도당, 오르니틴 농도)과 함께 관찰하였다. 산화환원전위는 배양상태를 반영하는 네 개의 다른 구간을 나타내었으며 특히 균체농도의 변화와 밀접한 관계가 있으며 오르니틴 농도에 의해서도 영향을 받음을 알 수 있었다. 산화환원전위와 발효상태변수들과의 상관관계를 구

하기 위해 먼저 오르니틴 및 포도당이 산화환원전위에 미치는 영향을 별도의 실험을 통해 알아보았다. 이들 실험 결과들을 바탕으로 하여 산화환원전위의 발효상태변수에 대한 상관관계를 제시하였다. 이 상관관계는 산화환원전위, 포도당 농도, 균체농도의 on-line data로부터 오르니틴 농도를 on-line 추정하는데 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

용어설명

E_{ho}	; Redox potential (mV)
E_0	; Constant (mV)
E_0'	; Constant (mV)
P	; Ornithine concentration (g/L)
B	; Byproduct concentration (g/L)
S	; Glucose concentration (g/L)
X	; Cell concentration (g/L)
a_1, a_2, a_3, \dots	; Coefficients for cell
b_1, b_2, b_3, \dots	; Coefficients for glucose
c_1, c_2, c_3, \dots	; Coefficients for ornithine

참고문헌

1. Akashi, K., S. Ikeda, H. Shibai, K. Kobayashi, and Y. Hirose. 1978. Determination of redox potential levels critical for cell respiration and suitable for L-leucine production. *Biotechnol. Bioeng.* **20**: 27–41.
2. Chinard, F. P. 1952. Photometric estimation of proline and ornithine. *J. Biol. Chem.* **199**: 91–95.
3. Halling, P. J. 1990. pH, dissolved oxygen and related sensors, pp. 131–147. In B. McNeil and L.M. Harvey (eds.), *Fermentation*, IRL Press, London.
4. Kjaergergaard, L. 1976. Influence of redox potential on glucose catabolism of chemostat grown *Bacillus licheniformis*. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **2**: 215–220.
5. Kwong, S. C. W. and G. Rao. 1991. The utility of culture redox potential for identifying metabolic state changes in the amino acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 1034–1040.
6. Kwong, S. C. W., L. Randers, and G. Rao. 1992. On-line assessment of metabolic activity based on culture redox potential and dissolved oxygen profiles during aerobic fermentation. *Biotechnol. Prog.* **8**: 576–579.
7. Lee, S. C., Y. B. Hwang, H. N. Chang, and Y. K. Chang. 1991. Dissolved oxygen concentration regulation using auto-tuning PID controller in fermentation process. *Biotechnol. Techniques* **5**: 85–90.
8. Lee, S. C., Y. B. Hwang, T. H. Lee, Y. K. Chang, and H. N. Chang. 1994. Characteristics and performance of auto-tuning PID controller for dissolved oxygen concentration. *Biotechnol. Prog.* **10**: 447–450.
9. Lee, T. H., Y. K. Chang, W. S. Ryu, B. H. Chung, and Y. H. Park. 1996. Physiological effect of medium components on the production of L-ornithine, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **1**: 41–45.
10. Oktyabr'kii, O. N. and G. V. Smirnova. 1986. Changes in the redox potential of the medium for *B. subtilis* cultures and their connection with the electrical parameters of the cells. *Biophysics* **31**: 503–508.
11. Shibai, H., A. Ichizaki, K. Kobayashi, and Y. Hirose. 1974. Simultaneous measurement of dissolved oxygen and oxidation-reduction potentials in the aerobic culture. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 2407–2411.
12. Srinivas, S. P., G. Rao, and R. Mutharasan. 1988. Redox potential in anaerobic and microaerobic fermentation, pp. 1187–1206. In L. E. Erickson and D. Y. C. Fung (eds.), *Handbook on Anaerobic Fermentation*, Marcel Dekker, New York.
13. Wimpenny, J. W. 1969. The effect of Eh on regulatory processes in facultative anaerobes. *Biotechnol. Bioeng.* **11**: 623–629.

(Received December 6, 1997)