

Kasugamycin 생산을 위한 연속 청정생물공정 개발

김창준, 박선옥*, 장용근+, 전계택*, 이종대**, 김상용***

한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터

*강원대학교 생명과학부

**한국생산기술연구원 중소기업지원본부

***한국생산기술연구원 자본재설비 기술개발센터

(1998년 2월 25일 접수, 1998년 7월 9일 채택)

Development of Continuous Clean Bioprocess for Kasugamycin Production

Chang Joon Kim, Sun Ok Park*, Yong Keun Chang+, Gie-Taek Chun*, Jong-Dae Lee** and Sangyong Kim***

Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon 305-701, Korea

*Division of Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**Small and Medium Sized Industries Services Center, Korea Institute of Industrial Technology, Seoul 152-050, Korea

***Industrial Equipment Technology R&D Center, Korea Institute of Industrial Technology, Chonan 330-820, Korea

요 약

방선균인 *Streptomyces kasugaensis*에 의해서 생산되는 이차대사산물인 kasugamycin 생산성 증대 및 단위 생산량 당 오염물질 배출량 저감을 위한 연속 고정화 배양을 수행하였다. 세포 고정화에 적합한 포자 수확을 위한 포자형성 촉진 배지 개발은 물론 고정화 담체로 사용한 셀라이트에 수확된 포자를 고정화시키는 방법을 확립하였다. 연속 고정화 배양 시 고정화세포의 유출을 방지함으로써 안정된 연속배양을 가능토록 하기 위한 decantor 형태의 고정화세포 분리기가 장착된 반응기를 사용하였다. 회석 속도 및 공급액 중의 기질 농도(당 농도, 인 농도)를 변화시키며 생합성된 kasugamycin 생산성 및 화학적산소요구량(COD)을 측정하였으며 이들을 현탁세포를 이용한 회분식 발효에서의 kasugamycin 생산성 및 발효 폐액 중의 COD 값과 비교하였다. 고정화 세포를 이용한 연속배양에서의 kasugamycin 생산성이 현탁세포를 이용한 회분식 발효에 비해 2.5배 높았으며, 동시에 단위 생산량 당 COD가 2.3배 저감되는 것으로 나타났다. 이것으로부터 연속 고정화 배양이 현탁 회분식 배양에 비해 kasugamycin 생산성 및 오염물질 배출 측면에서 유리한 청정 공정임을 확인할 수 있었다.

† Corresponding Author : 373-1, Kusong-dong, Yusong-gu, Taejeon 305-701, Korea

Tel : 042-869-3927, Fax : 042-869-8800

e-mail : ychang@sorak.kaist.ac.kr

주제어: kasugamycin, 고정화 세포, 연속배양, 고정화세포분리기, 화학적산소요구량

ABSTRACT : Continuous immobilized-cell culture was carried out for the production of kasugamycin, a secondary metabolite by a filamentous bacteria, *Streptomyces kasugaensis*, with an intention of reducing waste generation. A sporulation medium was developed for production of bulk amounts of spores, and the spores were entrapped into celite biosupports for immobilization. It was possible to effectively keep the immobilized-cells

inside the reactor during the continuous culture by an efficient immobilized-cell separator of decantor type on the outlet of the fermentor. Using this continuous immobilized-cell fermentor system, we investigated the effects of feed substrate and phosphate concentrations on kasugamycin production and chemical oxygen demand(COD). Comparing with the conventional suspended-cell batch culture, the kasugamycin productivity was observed to increase by 2.5 times, whereas COD per unit kasugamycin production decreased by 2.3 times in the continuous immobilized-cell culture. Based on these results, the continuous immobilized-cell system was considered to be a cleaner bioprocess than the conventional batch suspended-cell system.

Key Words: kasugamycin, immobilized cells, continuous culture, immobilized-cell separator, COD

1. 서론

이차대사산물(secondary metabolite), 소위 'idiolite' 는 일차대사산물(primary metabolite), 즉 당, 아미노산, 유기산 등과는 상이한 화학구조를 가지는 특별한 화합물이다. 이들은 β -락탐 고리, 아미노산, 사이클릭 펩타이드, 마크로사이클릭, unusual sugar, 퀴논 등과 같은 특이한 성분을 포함하고 있다(1). 이차대사산물은 미생물뿐만 아니라 식물에서도 다양하게 합성되며, 그 구조 또한 불규칙하다. 대표적인 예는 항생제로, 작은 분자량을 가지며 항생(antibacterial), 항진균(antifungal), 항종양(antitumor), 항바이러스(antiviral)의 특성을 갖는다(2).

이차대사산물의 대량 생산시 중요한 것으로 고생산성 균주와 생물공정의 개발을 들 수 있다. 생물공정의 경우 적정 생물 반응기의 선택 및 운전 전략이 생산물 농도, 불순물 농도, 기질 수율, 환경오염물질 배출량, 공정의 안정성을 좌우한다. 현재 산업적으로 널리 이용되고 있는 미생물에 의한 이차대사산물 생산을 위한 생물공정은 대부분 현탁 회분식 공정이나 이는 생산성이 떨어지며 매 회분 후에 세척공정이 필요하고 높은 인건비, 운전비, 설비투자 등 불리한 경제적 요인과 분리공정과 연계가 어렵다는 많은 단점을 가지고 있다. 이외에도 매 회분 배양시 생성된 세포를 폐기해야 하는 문제도 있는데 이는 제품생산을 위해 사용되어야 할 기질의 낭비를 초래할 뿐만 아니라 폐기되는 세포 자체가 환경오염물질이 된다는 부담을 안겨준다. 또한 이차대사산물의 생합성은 활동적인 세포생장이 끝

날 무렵에 시작되는 특성(non-growth-associated production mode)으로 인해 연속현탁배양 공정을 적용할 경우 낮은 세포증식 속도로 인해 생산성이 극히 낮을뿐만 아니라 wash-out이 쉽게 일어날 수 있는 조업상의 불안정성도 문제가 된다(3).

이에 반해 고정화 세포를 이용한 연속배양공정을 개발할 경우 한 번 생성된 세포를 무수히 반복 사용함으로써 기질사용 효율의 극대화 및 환경 부담의 최소화를 이룰 수 있다는 장점과 함께 생산균주의 비성장속도와 반응기의 회석속도를 서로 분리시킬 수 있으므로 생산단계에서 세포의 성장을 염려하지 않고 특정 배지 성분을 공급하지 않거나, 제한적으로 공급하는 등 다양한 배양법을 사용하여 높은 생산성을 얻을 수 있는 장점이 있다(4-7). 이는 높은 회석속도에서도 비생장의 또는 저생장의 생산균주를 생물반응기 내에 높은 농도로 유지시킬 수 있기 때문에 가능하다. 즉, 연속 고정화 세포 발효공정을 사용할 경우, 효율적인 기질 이용으로 원료의 활용도가 뛰어나 결과적으로 원료비를 크게 절감할 수 있을 뿐만 아니라 단위 생산량 당 유기 폐기물의 양도 큰 폭으로 줄일 수 있는 장점이 기대된다.

본 연구는 균사 형성 미생물인 방선균의 연속 고정화 배양을 통해 이차대사산물의 생산성 증대와 동시에 폐기물의 발생이 적은 청정 생물공정을 개발하는데 목적이 있다. Model product로 선정된 kasugamycin은 *Streptomyces kasugaensis*에 의해 생산되어 세포외로 분비되는 이차대사산물로서, 벼 도열병을 유발하는 곰팡이인 *Piricularia oryzae*의 성장을 저해하는 농약으로 사용되고 있다 (Fig. 1)(8).

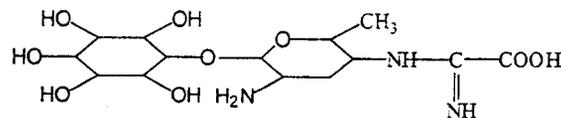


Figure 1. Structure of kasugamycin.

Kasugamycin이 발견된 이래 발효에 의한 생산성 향상을 위한 많은 시도가 있었으나(9-12), 연구의 대부분은 현탁세포를 이용한 회분식배양에 의한 생산성 향상, 균주 돌연변이를 이용한 고생산성 균주 개발, 적절한 탄소원과 질소원 탐색 및 운전전략 개발 등이었다. 본 연구에서는 균사형성 미생물인 *Streptomyces kasugaensis*의 고정화에 적합한 형태인 포자를 대규모로 회수하여, 이를 고정화 담체로 사용된 셀라이트에 고정화시키는 방법을 확립하고자 하였다. 또한 고정화세포 분리가 장착된 반응기를 이용하여 고정화 연속배양을 시도하였다. 이때 공급되는 제한 기질(당 및 인) 농도를 조절하며 kasugamycin 생산성 및 대표적인 환경부담 지표인 화학적 산소 요구량(COD)을 측정하였고, 이를 현탁세포를 이용한 회분식 발효 결과와 비교하였다.

2. 실험 방법 및 재료

2.1 생산 균주

본 연구에서는 한국 미생물 보존센터(Korean Culture Center of Microorganism)에서 분양받은 *Streptomyces kasugaensis*(KCCM 11390)를 사용하였다. YM broth(Difco Laboratory, USA; glucose, 10 g/L; peptone, 5 g/L; yeast extract, 3 g/L; malt extract, 3 g/L) 100 mL가 포함된 500 mL 플라스크에 균주 접종 후 30°C, 200 rpm의 조건으로 진탕배양하였다. 48시간 배양 후 배양액 7 mL를 멸균 글리세롤 3 mL가 들어있는 20 mL vial에 담고 -20°C 냉동실에 보관하며 사용하였다.

2.2 Bioassay 균주

*Pseudomonas fluorescens*는 kasugamycin에 의해 성장 저해를 받으므로 kasugamycin 정성·정량 분석을 위한 bioassay 균주로 사용되었다(10, 13, 14). 본 연구에서는 500 mL 플라스크에 nutrient broth(Difco laboratory, USA; peptone, 5 g/L; NaCl, 3 g/L; yeast extract, 2 g/L; beef extract, 1 g/L) 100 mL를 넣고 KCCM에서 분양받은 *P. fluorescens*(KCCM 11329)를 접종한 후 30°C, 200 rpm의 조건으로 진탕배양하였다. 72시간 배양 후, 배양액 7 mL를 멸균 글리세롤 3 mL가 들어있는 20 mL vial에 담고 -20°C 냉동실에 보관하며 사용하였다.

2.3 배지

Kasugamycin 생산배지로는 증류수 1 L당 maltose 40~10 g, NaCl 1 g, K_2HPO_4 0.5~0.05 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, soybean flour 추출액(멸균전 pH 7.0)의 조성을 갖는 배지를 사용하였고 maltose 및 soybean flour 추출액은 각각 따로 멸균 후 혼합하였다. Bioassay에는 증류수 1 L당 glucose 5 g, peptone 5 g, agar 15 g(멸균전 pH 7.0)의 조성을 갖는 고체배지를 사용하였다.

2.4 고정화 담체

고정화 담체로 사용된 celite grade 560(Manville Co., Ltd., USA)은 실리카(SiO_2) 성분인 규조토 90% (w/w), 그 외에 Al_2O_3 , Fe_2O_3 및 CaO 등의 무기물들로 구성되어있고, 다공도(porosity)는 70%이다. 또한 세공(pore) 크기는 거의 1~15 μm 의 범위에 있다. 대부분의 포자는 크기가 2~10 μm 범위에 있고, 이러한 셀라이트의 미세한 다공성 구조로 인해, 셀라이트는 포자를 입자 내부로 포획(entrapment)하기에 적합하다(15). 따라서 의약품 및 음료수 제조공정의 필터보조제로 사용되는 셀라이트는 위에서 지적한 특성과 더불어 가격이 싼 장점으로 인해, 최근에 미생물 고정화 담체로 사용하려는 시도가 꾸준히 있어왔다.

본 연구에서는 sieve를 이용하여 100 μm -500 μm 크기의 셀라이트를 추려내어 증류수로 여러번 세척하고 600 °C에서 12시간 소각하여 휘발성 물질을 제거한 후 120°C에서 멸균하고 다시 건조한 것을 사용하였다.

2.5 연속 고정화 배양

연속 고정화 배양시 top-driven 방식의 3 L 부피를 갖는 교반식 발효조((주) 한국발효기, Korea)를 사용하였다. 조업부피는 2 L, 배양 온도는 29°C였고 초기 pH는 2N-NaOH 용액을 사용하여 7.0으로 하였다. 배양 시작시 통기속도는 1 vvm, 교반속도는 203 rpm이었고 연속 배양시 반응기 내 고정화 세포농도가 증가함에 따라 산소제한이 걸리지 않도록 교반속도(202-486 rpm) 조절을 통해 용존산소농도가 포화농도의 약 10%를 유지하도록 조절하였다. pH 및 용존산소 측정전극은 미국의 Mettler-Toledo AG.에서 구입하였다.

사용된 반응기와 본 연구실에서 설계·제작한

고정화세포 분리기의 구조를 Fig. 2에 도시하였다.

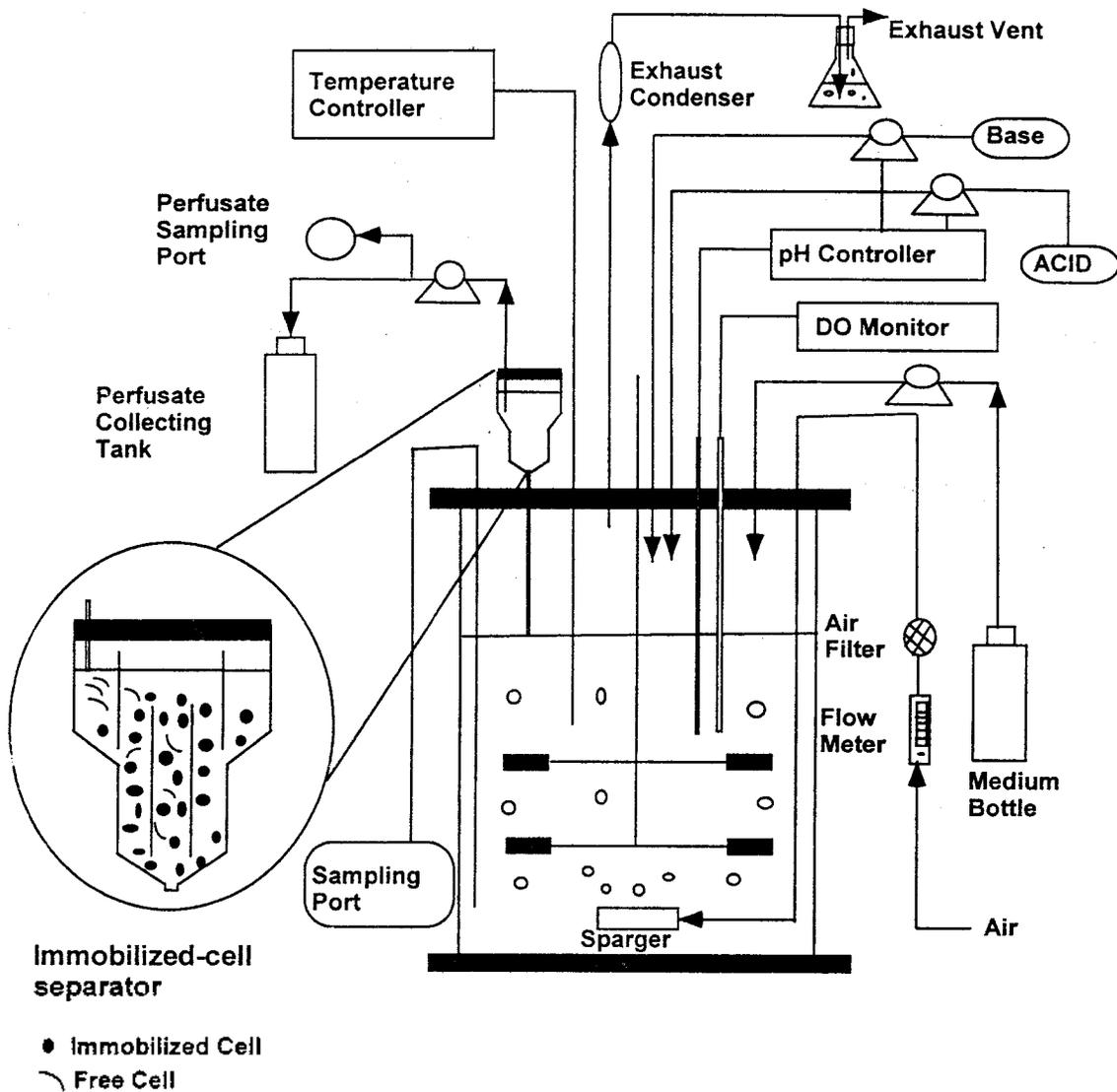


Figure 2. Schematic diagram of immobilized-cell reactor system.

본 시스템은 고정화세포(immobilized cell)의 유출을 방지하여 생물반응기 내에 고밀도의 고정화세포를 유지함으로써 kasugamycin을 안정적으로 연속 생산하기 위한 것이다. 고정화세포의 유출방지를 위한 세포분리기로서 막이나 필터, 또는 간격이 촘촘한 망을 이용할 경우, 곰팡이나 방선균과 같은 균사형성 미생물의 배양시에는 담체로부터 유리되는

세포들이 막이나 필터에 붙어 자라 세포 분리의 효율성을 현저히 저하시켜 공정운영이 거의 불가능하게 된다. 따라서, 셀라이트에 고정화된 균사형성 미생물의 효과적인 분리를 위해 분리기 내에서의 밀도차이와 유체의 흐름에 의해 고정화세포를 효율적으로 침전시켜 반응기 내로 되돌릴 수 있는 decantor 형태의 장치를 고안하였다. 이러한 세포분

라키를 이용한 고정화세포의 침전속도와 분리효율은 담체와 배양액의 밀도차, 배양액의 점도, 고정화세포 분리기 내의 유출액 선 속도, 담체의 직경 등 여러 요인에 의해 결정된다. 고정화세포 분리는 발효조로부터 연속적으로 배양액이 유출되는 관에 부착되며 고정화세포 분리를 거치는 동안 고정화세포가 부착된 담체는 배양액과의 밀도차에 의해 분리되어 반응기 내로 되돌려진다(16).

2.6 분석 방법

1) 건조균체중량(dry cell weight)

배양액 중의 세포농도는 건조균체중량으로 나타내었다. 반응기와 유출액에서 각각 10 mL씩 채취한 시료를 10,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 뽑아내어 기질 및 생성물 분석에 사용하였고 회수한 세포 및 담체를 중류수로 세척(3번 반복)하여 잔류 당 및 염들을 제거한 후 미리 정량하여 무게를 알고 있는 aluminum dish에 담아 80℃ 건조기에서 12시간 건조시킨 후 무게를 측정하여 담체와 세포의 중량합을 결정한 뒤 가열로(furnace)에서 600℃로 6시간 소각한 후 다시 무게를 측정하여 이 두 값의 차이에 의해 세포 농도 및 celite 농도를 결정하였다.

2) 세포부하량(cell loading)

위에서 결정된 값을 이용하여 세포부하량을 결정하였다. 즉, 발효조 내 세포농도에서 동일 시간대 유출액 중 세포농도를 뺀 후 이 값을 반응기내 celite 농도로 나누어 세포부하량을 계산하였다.

3) 당 농도

발효배지 중의 당(말토스)는 디니트로살리실산(DNS)법을 사용하여 정량하였다. 적절한 농도로 희석된 시료 1 mL에 자체 제조한 DNS 시약 2 mL을 혼합한 용액을 물 증탕으로 5분간 가열한 후 상온으로 냉각시켰다. UV/VIS spectrophotometer(Hewlett Packard 8453, San Francisco, USA)를 사용하여 550 nm에서 용액의 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 시료 중의 당 농도를 계산하였다.

4) 화학적 산소 요구량(COD)

COD 측정은 크롬법을 사용하였으며 (주) 유공 연구소에서 수행하였다. 현탁회분식 발효와 연속배양에서 시간대별로 채취한 시료를 120℃에서 15분간 멸균하여 배지중의 세포들을 모두 용리(lysis)시

킨 후 COD를 측정하였다.

5) Kasugamycin의 bioassay

Bioassay agar plate (25 cm × 35 cm × 5 cm) 위에 *P. fluorescens*를 도말한 뒤 직경 6 mm의 여과지(Whatman No 1, UK)로 된 디스크를 올려놓았다. 각 시간대별로 측정된 시료를 원심분리하여 수거한 상등액 5 µL를 디스크위에 떨어뜨리고 배양기(incubator)에 넣어 30℃에서 18시간동안 배양 후 inhibition zone의 크기를 측정하였다.

6) Kasugamycin의 정량 분석

Kasugamycin 정량분석을 위한 high performance liquid chromatography(HPLC) 분석을 수행하였다. 순수 kasugamycin 표준시료(Hokko Chemical Industry Co., Ltd., Japan)는 농업과학기술원 김경선 연구원이 제공하였다. UV/VIS 검출기(모델 L-6200, Hitachi, Japan)를 갖는 역상 HPLC와 YMC-Pack ODS-A 칼럼(250 mm X 4.6 mm I.D.; YMC Co., Ltd., Japan)을 사용하였으며, 이동상으로는 아세토나이트릴과 0.01 M sodium octyl sulfate 용액을 25 대 75로 혼합하여 pH를 3으로 조절한 것을 사용하였으며 유속은 0.5 mL/min이었다. 칼럼을 통과한 시료의 흡광도는 215 nm에서 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 대규모 포자 회수를 위한 *S. kasugaensis*의 포자형성 최적 배지 개발

이차대사산물 생산균주(주로 곰팡이, 방선균 중의 *Streptomyces*, *Bacillus*)의 고정화는 대부분 성장단계 중에 포자를 형성하는 균주의 독특한 생리학적 특성을 이용해서 이루어진다(17). 즉 수확된 생산균주의 포자를 다공성 담체의 공극에 고정화시키면 세포로 발아하여 이차대사산물을 생성하게 된다. 이러한 접근법의 잇점은 성장단계 또는 생산단계의 세포를 고정화시킬 때의 어려움을 겪지 않아도 된다는 점이다. 따라서 *S. kasugaensis*의 고정화를 위해서는 접종균(inoculum)으로 사용될 고농도의 포자를 마련하여야 한다. 본 연구에서 개발한 포자형성배지 VI는 방선균에서 포자형성 배지로서 널리 알려진 다양한 종류의 포자형성 배지(table 1)와 비교한 결과 포자형성 효과가 탁월하여 이를 세포고정화를 위한 고농

도의 포자생산을 위한 배지로 선택하였다. Table 1에 (+)의 갯수는 포자형성의 정도를 표시한 것이다.

Table 1. Solidified media tested for the sporulation of *Streptomyces kasugaensis*

| Media ^a | Components | Conc.(%) | Extent of sporulation ^b |
|--------------------|---|----------|------------------------------------|
| I | Malt extract(Difco) | 1.0 | (+) |
| | Yeast extract (Difco) | 0.4 | |
| | Glucose | 0.4 | |
| II | Beef extract (Difco) | 0.1 | (+) |
| | Yeast extract (Difco) | 0.1 | |
| | Casamino acids(Difco) | 0.2 | |
| | Glucose | 0.2 | |
| III | Corn-steep liquor (50% dry matter) | 1.0 | (++) |
| | Starch | 1.0 | |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.3 | |
| | NaCl | 0.3 | |
| | CaCO ₃ | 0.3 | |
| IV | Soluble starch | 1.0 | (+++) |
| | K ₂ HPO ₄ | 0.1 | |
| | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.1 | |
| | NaCl | 0.1 | |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.2 | |
| | CaCO ₃ | 0.2 | |
| | FeSO ₄ · 7H ₂ O | 0.001 | |
| | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0.001 | |
| | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.001 | |
| V | Soluble starch | 1.0 | (++) |
| | Peptone | 0.04 | |
| | Meat extract | 0.02 | |
| | Yeast extract | 0.02 | |
| | N-Z amine (type A) | 0.02 | |
| VI | Maltose | 1.2 | (+++++) |
| | K ₂ HPO ₄ | 0.03 | |
| | Soybean meal | 0.6 | |
| | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.01 | |
| | Soybean oil | 0.03 | |
| | NaCl | 0.1 | |
| | Peptone | 0.3 | |
| | pH 6.4 | | |

a: agar content: 2%

b: after 8 days of cultivation

3.2 세포 고정화 방법

본 연구에서는 전술한 바와 같이 생산균주의 포자를 이용하여 다공성의 셀라이트에 생산균주를 고정화하고자 하였다. 즉 공극률이 매우 높은 셀라이트로의 고정화 방식은 부착방식이기는 하지만,

방선균의 고정화 경우 셀라이트 기공에 고정화된 포자가 발아한 후 형성된 균사체가 작은 기공을 빠져나가지 못하고 갇히는 방식을 취하는 것이므로 흡착(adsorption)과 포획(entrapment)의 혼합형식이라고 할 수 있다(18, 19). 전체 고정화 방법을 Fig. 3에 요약하여 나타내었다.

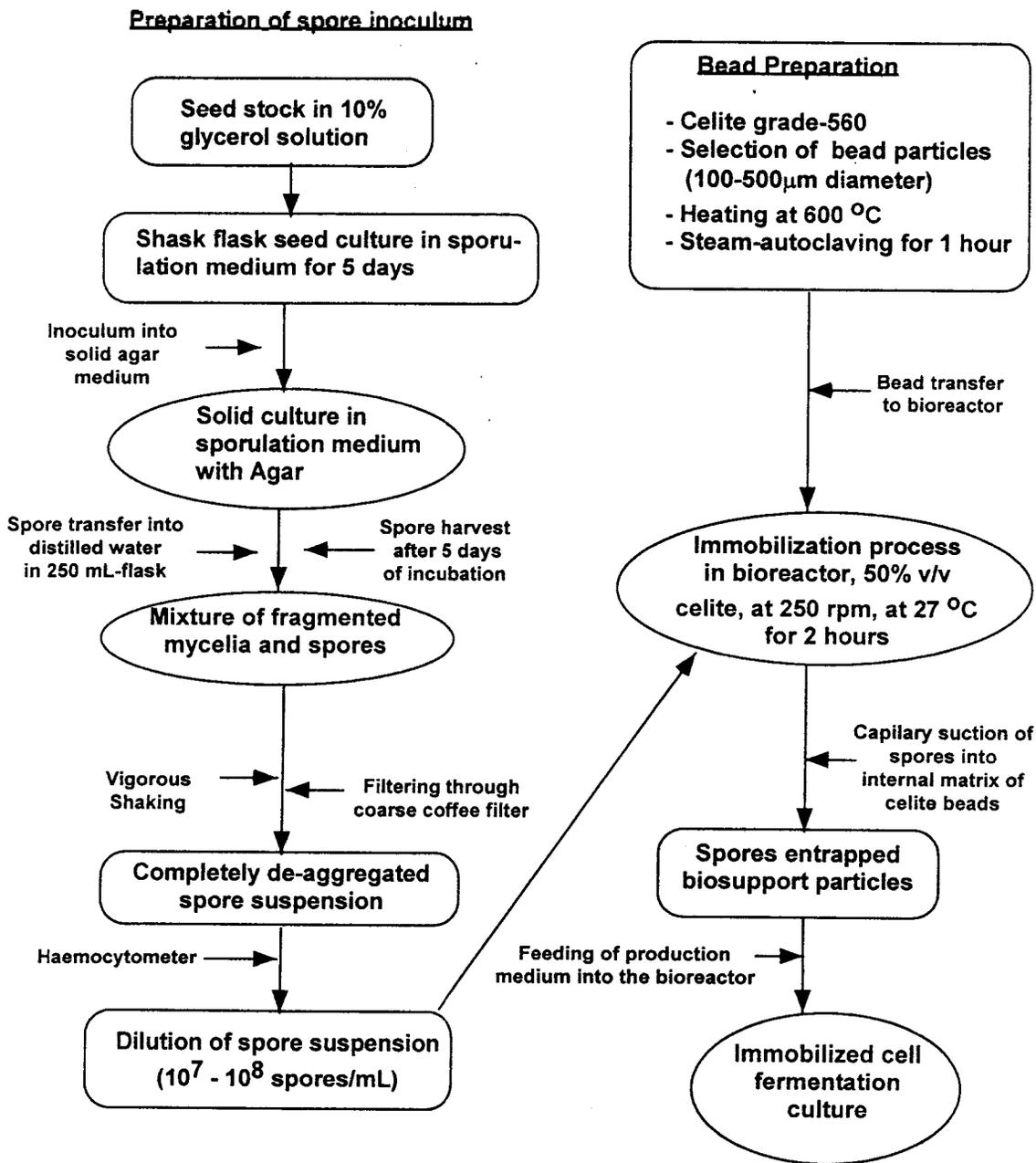


Figure 3. Flowchart for cell immobilization procedure.

먼저, 포자현탁액 제조시 충분히 자라서 포자가 형성된 균사를 agar로부터 떼어내어 250 mL 플라스크 내의 멸균수로 옮긴 후 magnetic bar로 약 30분간 격렬히 교반함으로써 덩쳐있는 포자를 deaggregation시켰다. 이렇게 준비된 농축 포자 용액을 coarse coffee filter를 이용하여 균사와 포자를 분리하였고 이것을 적절히 희석하여 초기 농도가 107~108 spore/mL로 조절하였다. 이 포자 현탁액을 연동펌프를 이용하여 반응기에 담겨있는 멸균된 셀라이트에 첨가하였다. 모든 공정의 매 단계는 멸균 상

태에서 수월하게 이루어졌다. 포자현탁액을 담체에 젖기만 할 정도로 첨가하면 모세관현상으로 각 담체의 내부기공에 효과적으로 스며들게 되는데 이런 과정 후에 27°C로 온도를 맞추고 1 vvm의 속도로 공기를 공급하면서 2시간 동안 배양하여 포자가 완전히 담체내에 정착 할 수 있게 하였다. 2시간 후 농축된 생산배지와 증류수로 부피를 맞추었다(최종 셀라이트 농도, 50% v/v).

세포가 고정화된 셀라이트의 전자현미경(SEM) 사진을 Fig. 4에 나타내었다.



Celite bead only



Celite bead + cells

Figure 4. Scanning electron microscope pictures of celite and immobilized cells ($\times 5000$).

이것은 상기의 방법에 의한 세포 고정화 단계를 거친 후 실제 배양공정에서 배양 182시간 후에 셀라이트에 고정화된 세포를 보여준다. 사진에서 볼 수 있듯이 셀라이트에 상당량의 세포가 고정화되어 있음을 알 수 있다.

3.3 연속 고정화 배양

세포 고정화 후, 생산배지(말토스, 40 g/L; K₂HPO₄, 0.5 g/L)를 사용하여 고정화 세포의 회분식 발효를 수행하였다. 배양개시 90시간 후 연속 공정으로 전환하였으며, 회분식 발효에서 사용한 것과

동일한 조성을 갖는 배지를 0.05 hr⁻¹의 희석속도로 공급하며 이차대사관련효소의 활성이 높은 많은 양의 세포를 반응기 내에 축적시키고자 하였다. 그 후 92시간을 더 운전한 후 0.1 hr⁻¹의 희석속도로 전환하였고, 동일한 희석속도에서 공급 배지중의 탄소원 및 인 농도를 변화시키며 kasugamycin 생산성에 대한 그 영향을 관찰하였다.

Fig. 5에 나타내었듯이 배양 후 227시간만에 담체는 세포로 포화된 것으로 판단되며, 이때의 세포 부하량(cell loading)은 90 mg cells/g celite였다.

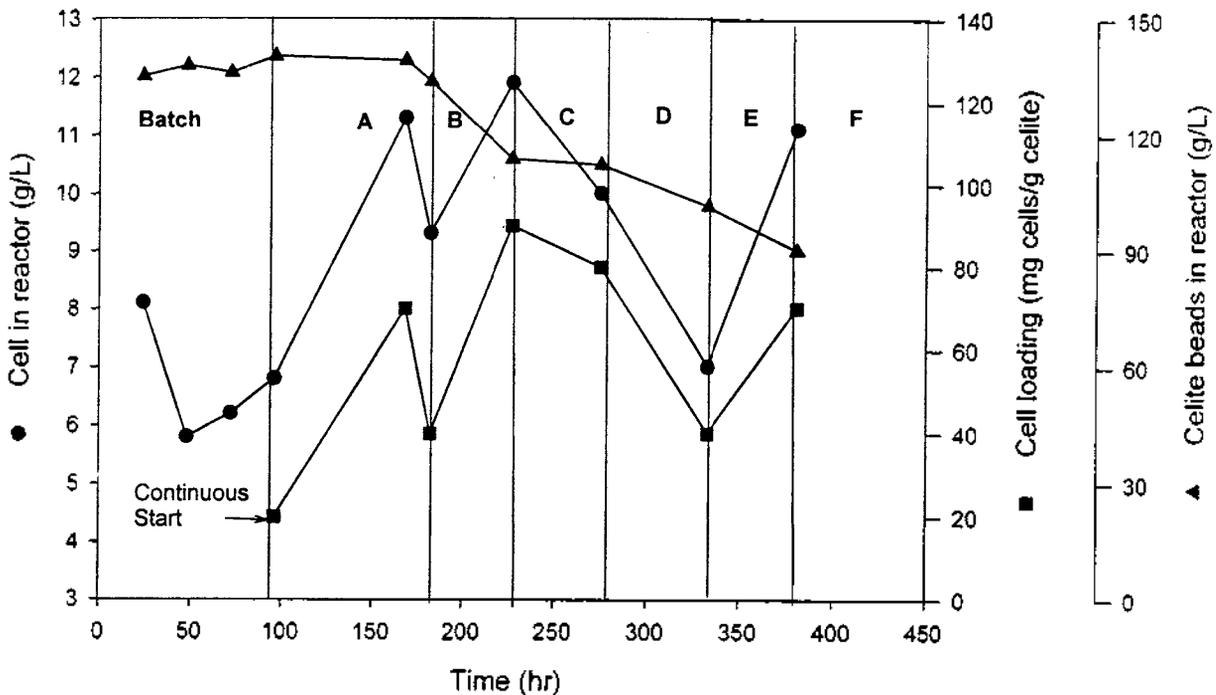


Figure 5. Cell concentrations inside reactor in continuous immobilized-cell culture.

- A: dilution rate, 0.05 hr⁻¹; feed maltose conc., 40 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.5 g/L
- B: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 40 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.5 g/L
- C: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 20 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.5 g/L
- D: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 10 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.5 g/L
- E: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 40 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.05 g/L
- F: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 10 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.05 g/L.

한편 세포부하량은 고정화세포에 의한 담체의 포화정도를 나타내는 값으로서 고정화세포의 양을

나타내는 중요한 지표이다. 그러나 본 실험에서 측정된 세포농도로부터 계산된 세포부하량은 다소 유

동적인 경향을 보였다. 즉, 세포부하량은 96시간 후(공급 당농도 40 g/L, 회석속도 0.05 hr⁻¹) 20 mg cells/g celite에서 168시간 후 70 mg cells/g celite로 증가하였고 182시간 후에는 40 mg cells/g celite로 감소하였다. 또한 227 시간 후(공급 당농도 40 g/L, 회석속도 0.1 hr⁻¹) 90 mg cells/g celite로 최대값을 보였고 275시간 후(공급 당농도 20 g/L, 회석속도 0.1 hr⁻¹) 80 mg cells/g celite로 일정값을 유지했으나 333시간 후(공급 당농도 10 g/L, 회석속도 0.1 hr⁻¹) 다시 40 mg cells/g celite로 감소하였다.

세포부하량이 낮게 측정된 182 시간대 반응기 내 세포 농도는 9.3 g/L인 반면, 세포부하량이 거의 일정하게 유지된 275 시간대 값은 10 g/L로 반응기 내 세포 농도는 두 경우 비슷했으나 182시간대의 세포부하량은 275 시간대 값의 절반이었다. 또한 Fig. 6에 나타낸 유출액 중의 세포 및 셀라이트 농도는 275시간대의 경우 각각 0.9 g/L 와 0.1 g/L인 반면 182시간대의 경우 각각 3.4 g/L와 2.3 g/L로서 182 시간대의 유출액 중에는 상당량의 셀라이트가 함유되었다.

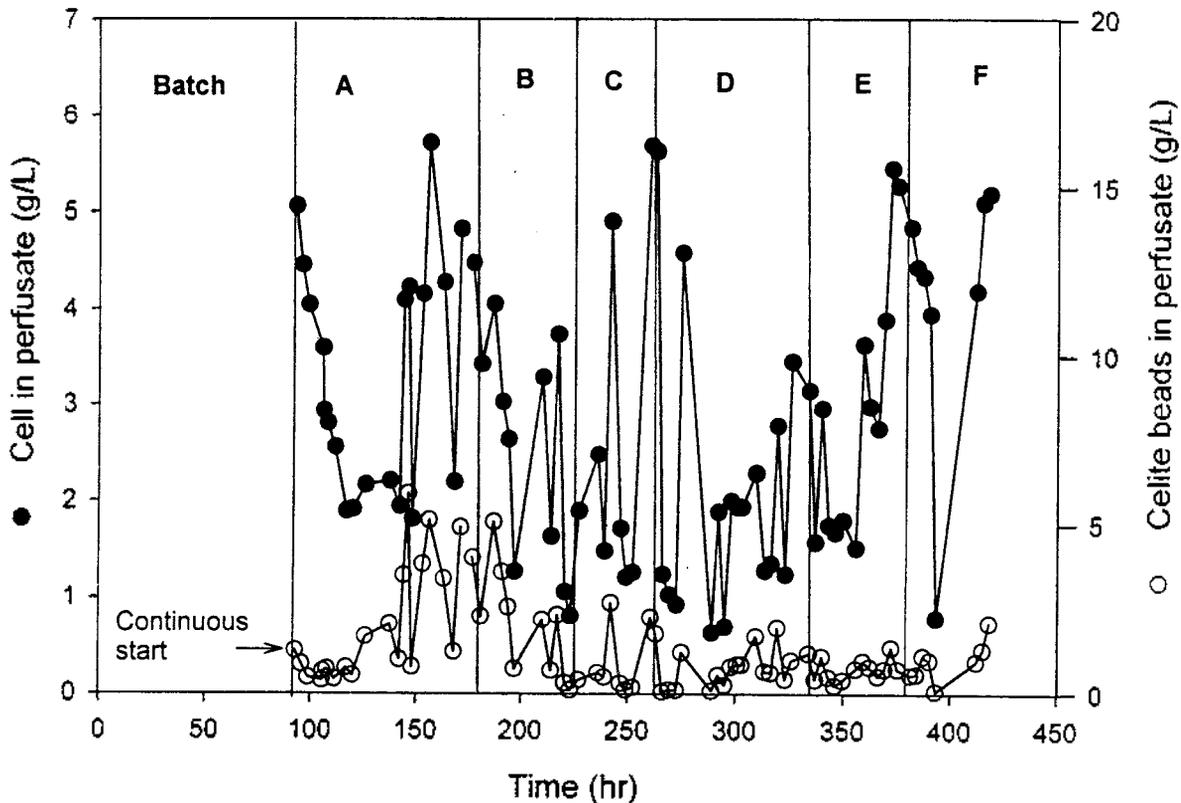


Figure 6. Cell and celite concentrations in perfusate in continuous immobilized-cell culture.

- A: dilution rate, 0.05 hr⁻¹; feed maltose conc., 40 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.5 g/L
- B: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 40 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.5 g/L
- C: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 20 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.5 g/L
- D: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 10 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.5 g/L
- E: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 40 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.05 g/L
- F: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 10 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.05 g/L.

따라서 182시간대 세포부하량이 낮게 측정된 것은 상당량의 셀라이트가 유출액으로 빠져나왔기 때문이고, 이것이 유출액 중의 세포농도를 높여 세포부하량 계산에 오차를 나타낸 것으로 유추된다. 이러한 셀라이트 유출현상이 나타나는 것은 조업이 장기화됨에 따라 균사체가 세포분리기 벽면에 달라붙음으로 인해 세포 분리기의 분리효율이 감소하였기 때문으로 판단되었다. 이러한 이유로 인해 본 연구에서는 배양개시 271 시간대에 고정화세포분리기

를 교체하여 지속적인 조업을 하였다.

또한 세포부하량이 낮게 측정된 333 시간대의 반응기 내 세포농도는 7.0 g/L, 유출액 중 세포 및 셀라이트 농도는 3.1 g/L 와 1.2 g/L였다. 이것은 182 시간대 값과는 대조적으로 유출액 중 셀라이트 및 세포 농도도 낮았으나 세포부하량이 낮게 측정된 것은 셀라이트 유출로 인한것이라기 보다 반응기 내 고정화세포 농도가 낮았기 때문인 것으로 판단되었다.

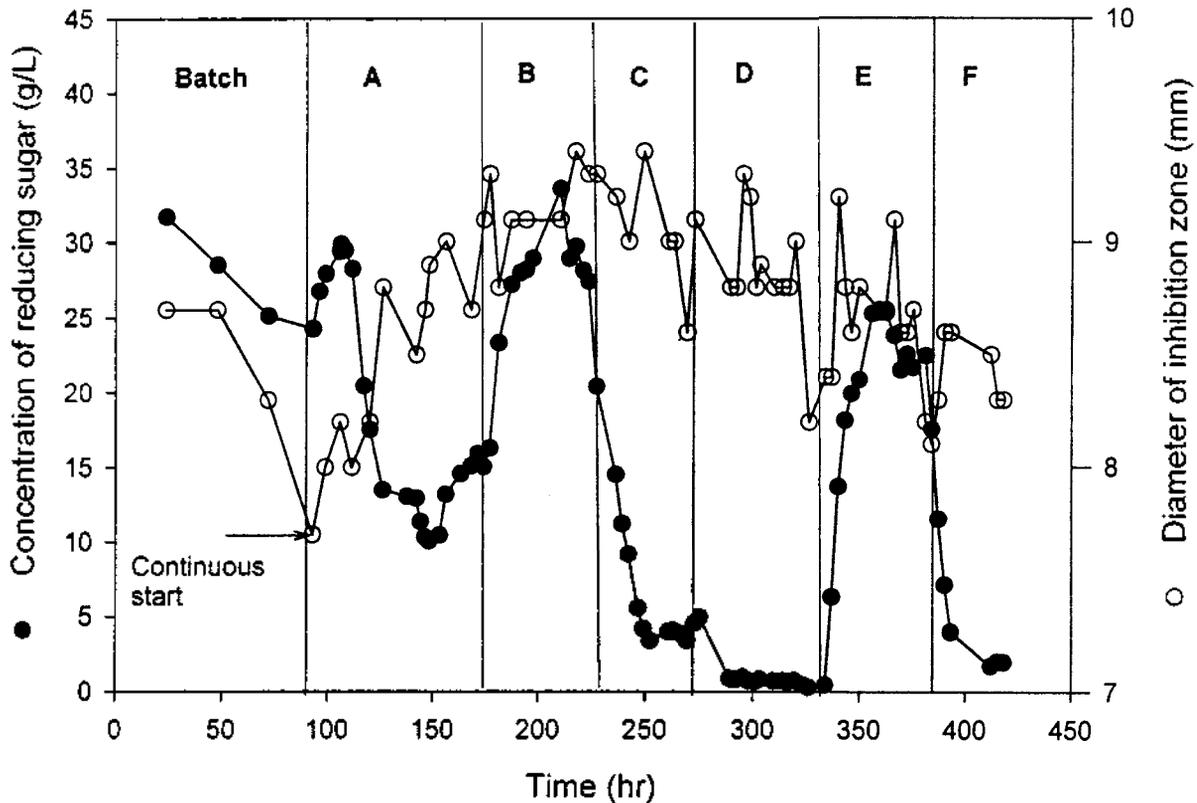


Figure 7. Maltose and kasugamycin concentrations in perfusate in continuous immobilized-cell culture.

- A: dilution rate, 0.05 hr⁻¹; feed maltose conc., 40 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.5 g/L
- B: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 40 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.5 g/L
- C: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 20 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.5 g/L
- D: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 10 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.5 g/L
- E: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 40 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.05 g/L
- F: dilution rate, 0.1 hr⁻¹; feed maltose conc., 10 g/L; feed K₂HPO₄ conc., 0.05 g/L.

즉, 이 시간대에 상당량의 유리세포(3.1 g/L)가 측정되었고, 공급되는 탄소원(10 g/L)이 거의 소모(0.4 g/L)(Fig.7)되는 것으로 보아 담체표면에 고정화

된 세포에 의해 공급되는 기질이 모두 소비되고 담체 세공 내부로 갈수록 점차 탄소원이 고갈되어 담체세공 내부에 고정화된 세포의 생장을 저해함으

로써 전체적으로 셀라이트에 고정화된 세포농도를 감소시켜 세포부하량이 감소하는 것으로 유추되었다. 이와 비슷한 현상이 셀라이트에 고정화된 *Streptomyces cattleya*를 이용한 thienamycin 연속생산

연구를 수행한 Arcuri등(20)에 의해 보고된 바 있다.

그러나 이러한 현상에 대해 좀 더 체계적이고 반복적 실험을 수행함으로써 그 원인을 체계적으로 규명 할 필요가 있다고 사료된다.

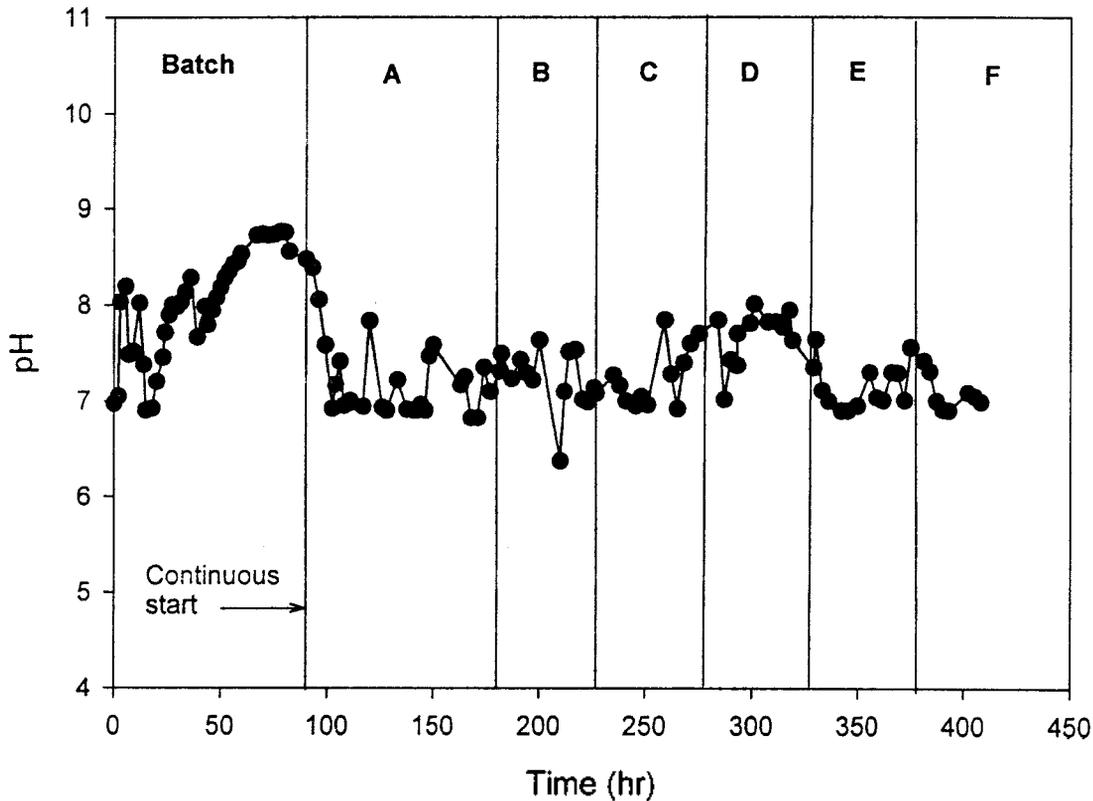


Figure. 8 Time profiles of pH in continuous immobilized-cell culture.

- A: dilution rate, 0.05 hr^{-1} ; feed maltose conc., 40 g/L; feed K_2HPO_4 conc., 0.5 g/L
 B: dilution rate, 0.1 hr^{-1} ; feed maltose conc., 40 g/L; feed K_2HPO_4 conc., 0.5 g/L
 C: dilution rate, 0.1 hr^{-1} ; feed maltose conc., 20 g/L; feed K_2HPO_4 conc., 0.5 g/L
 D: dilution rate, 0.1 hr^{-1} ; feed maltose conc., 10 g/L; feed K_2HPO_4 conc., 0.5 g/L
 E: dilution rate, 0.1 hr^{-1} ; feed maltose conc., 40 g/L; feed K_2HPO_4 conc., 0.05 g/L
 F: dilution rate, 0.1 hr^{-1} ; feed maltose conc., 10 g/L; feed K_2HPO_4 conc., 0.05 g/L.

Fig. 8에 도시한 pH 변화를 보면, B 구간까지는 대략 pH 7.5를 유지하였으나 C 구간 후반부터 증가하여 D 구간에서는 약 8.0을 유지하였고 E 구간 말기에는 7.4였다. Fukagawa 등(12)은 kasugamycin 생성시 pH 증가를 보고하였다. 이들은 말토스 15 g/L, 대두분(soybean meal) 15 g/L 및 초기 pH를 6.0으로 조절한 배지를 사용하여 플라스크를 이용한 현탁 회분식 발효를 수행하였는 바, 배양 개시 후 1일 부터 kasugamycin 생성과 더불어 pH

증가가 있었고 kasugamycin 생합성이 최고조에 도달한 배양말기인 6일째에는 pH가 8.0에 이르렀다고 보고하였다. 이러한 측면과 kasugamycin이 약염기성이라는 것을 고려한다면 pH 증가 시점이 kasugamycin 생합성 시기라고 유추된다.

Fig. 7에 나타낸 유출액의 kasugamycin 정량을 위한 bioassay 결과를 보면 최대값과 최소값의 차이는 1.1 nm 정도였다. 이것은 각 실험구간대에서의 kasugamycin 농도가 비슷한 것인지 혹은 bioassay로

는 정량적인 데이터를 제시하기에 부족한 것인지는 더욱 연구가 필요하다고 판단되었다. 그러나 kasugamycin 생합성이 활발한 시점에 pH가 증가한다는 문헌의 보고를 참고함은 물론 효과적인 기질 활용으로 인해 유출액 중 당 농도가 최소화되는 조건을 찾을 때 D 구간이 그 기준에 가장 합당하였다. D 구간 말기의 유출액 수 개를 선정하여 HPLC를 이용한 정량 분석을 수행하여 kasugamycin을 정량한 후 그 평균값을 추후 수행한 현탁세포를 이용한 회분식 결과와 비교하였다.

3.4. 회분식 현탁배양과 연속 고정화 배양시 kasugamycin 생산성 및 COD 비교

연속 고정화 배양에서 측정된 kasugamycin 생산성 및 COD를 비교하기 위해 현탁세포를 이용한 별도의 회분식 발효를 수행하였다. 현탁회분식 발효에서 사용한 배지조성은 고정화세포의 회분식 배양시 사용한 것과 동일하였다. 접종균주는 -20℃에 보관중인 생산균주를 YM 배지에서 48시간 배양한 것을 사용하였다. COD는 유기물이 산화제에 의해 산화될 때 소비되는 산소량으로서 발효폐액 중의 공해 유발성 유기물의 양을 예측할 수 있는 지표중의 하나이다. 회분식 현탁 발효시 세포농도는 배양 개시 36시간까지 계속 증가하였고, 그 이후부터 증가 속도는 점차 둔화되어 발효종료시점인 배양 후 140시간 경에는 9.3 g/L에 이르렀다. 한편, 발효 폐액중의 COD 농도는 105,400 µg/mL이었다. 이러한 회분식 발효 결과를 연속배양 시 유출액(공급 당농도: 10 g/L)에서 측정된 값과 비교하였다. 유출액 중 세포농도는 3.1 g/L였고 COD 농도는 8,200 µg/mL로 회분식 배양에서 발생한 발효폐액중의 COD 농도보다 훨씬 낮았다. 그러나 이러한 비교 보다는 단위 kasugamycin 생산량 당 배출 COD로 비교하는 것이 타당성이 있으므로 먼저, 두 경우에 대한 kasugamycin의 생산성을 구하였다. 연속 고정화 배양(6.8 µg/mL·hr)이 회분식 배양(2.69 µg/mL·hr)보다 2.5배 높은 생산성을 나타내었다. 위에서 구한 COD값과 생산성 데이터를 이용하여 단위 kasugamycin 생산량 당 COD를 계산하였다. 단위 kasugamycin 생산량 당 COD는 회분식 발효의 경우 271.1 µg COD/µg kasugamycin인 반면, 연속배양 시의 것은 120.4 µg COD/µg kasugamycin으로 연속 고

정화 배양 시에 약 2.3배나 저감효과를 나타내었다.

이차대사산물(non-growth associate)은 그 특성상 활발한 세포생장기 보다는 기질 제한 조건하에서 활발히 생성된다고 알려져 있다(21). 따라서 연속 고정화 배양시 이차대사산물인 kasugamycin 생산성 증대를 위해 쉐라이트에 고농도의 세포를 고정화시킨 후 공급되는 탄소원의 농도를 적절히 조절하여 (10 g/L) 기질제한조건을 가함으로써 탄소원이 고정화 세포의 성장보다는 maintenance에만 소모되도록 함으로써 활발한 생합성 활동을 유도할 수 있었다. 그 결과 kasugamycin 생산성은 회분식에 비해 2.5배 향상되었고 유출액 중의 COD 유발성 물질인 유리 세포 및 탄소원 농도를 낮게 유지시킬 수 있었다. 따라서 연속 고정화 배양이 회분식 배양보다 kasugamycin 생산성 뿐만 아니라 단위 생산량 당 COD 측면에서 월등히 우수함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Table 2에 종합적으로 정리되어 있다.

Table. 2. Comparison kasugamycin productivity and COD in batch suspended-cell culture and in continuous immobilized-cell culture

| | Batch suspended-cell culture | Continuous immobilized-cell culture |
|---|------------------------------|-------------------------------------|
| Kasugamycin concentration (µg/mL) | 388.7 | 68.1 |
| Fermentation time or retention time (hr) | 144 | 10 |
| COD concentration (µg/mL) | 105,400 | 8,200 |
| Productivity (µg kasugamycin/mL·hr) | 2.7 | 6.8 |
| COD/unit kasugamycin production (µg COD/µg kasugamycin) | 271.1 | 120.4 |

4. 결론

본 연구에서는 쉐라이트에 *S. kasugaensis*를 고정화시킨 후 연속배양을 수행하였다. 먼저, 균사형성 곰팡이 및 방선균의 고정화에 적합한 형태가 포

자상태이므로, 대규모 포자형성 배지를 개발함은 물론 적합한 고정화 방법도 확립하였다. 고정화세포를 이용한 연속배양실험에서는 공급되는 기질 중에 탄소원인 말토스 농도를 변화시키는 물론 인 농도도 변화시켜 가며 kasugamycin의 생산성 및 기타 반응기 내에서 일어나는 현상을 관찰하였다. 그 결과 회석속도 0.1 hr⁻¹에서 공급되는 당 농도가 10 g/L이고 K₂HPO₄ 농도가 0.5 g/L인 조건이 kasugamycin 생산성 및 오염물질 배출이라는 측면에서 가장 좋은 것으로 판단되었다. 이 결과를 현탁 세포를 이용한 회분식 발효결과와 비교했을 때, 고정화 세포를 이용한 연속배양에서의 kasugamycin 생산성이 현탁 회분식 발효에 비해 2.5배 향상되었음은 물론 단위 kasugamycin 생산량 당 COD가 2.3배 저감되었다.

이것은 연속 고정화 배양이 현탁 회분식에 비해 kasugamycin 생산성 및 오염물질 배출 측면에서 훨씬 유리한 청정 공정임을 시사한다.

감 사

본 연구는 통상산업부 주관 1996년도 청정생산 기술개발사업에 의한 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 kasugamycin 표준시료 공급은 물론 HPLC를 이용한 kasugamycin 정량분석에 조언을 주신 농업과학기술원의 김경선 연구원님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Crueger, W., and Crueger, A. : "In Biotechnology, A Textbook of Industrial Microbiology" 2nd edn., Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA, pp229-273(1989).
2. Masurekar, P. S. : "In Biotechnology of Filamentous Fungi", Butterworth-Heinemann, Boston, pp241-301(1992).
3. Stanbury, P. F., Whitakev, A., and Hall, S. J. : "Principles of Fermentation Technology" 2nd edn., Pergamon, London, pp13-33(1995).
4. Dalli, M., and Chau, P. C. : Production of Actinomycin D with Immobilized Streptomyces parvullus under Nitrogen and Carbon Starvation Conditions, Biotechnol. Lett., 10, pp 331-336(1988).
5. Berk, D., Behie, L. A., Jones, A., Lesser, B. H., and Gaucher, G. M. : The Production of the Antibiotics Patulin in a Three Phase Fluidized Bed Reactor. I. Effect of Medium Composition, Can. J. Chem. Eng., 62, pp112-119(1984).
6. Jones, A., Berk, D., Lesser, B. H., Behie, L. A., and Gaucher, G. M. : Continuous Production of Patulin by Immobilized Cells of Penicillium Urticae in a Stirred Tank Reactor, Biotechnol. Lett., 5, pp785-789(1988).
7. Oh, D. K., Hyun, C. K., Kim, J. H., and Park, Y. H. : Production of Penicillin in a Fluidized-Bed Bioreactor Using a Carrier-Supported Mycelial Growth, Biotechnol. Bioeng., 32, pp569-573(1988).
8. Umezawa, H., Okami, Y., Hashimoto, T., Sahara, Y., Hamada, M. and Takenchi, T. : A New Antibiotic, Kasugamycin, J. Antibiot. Ser. A, 18, pp101-103(1965).
9. Fukagawa, Y., Sawa, T., Takeuchi, T., and Umezawa, H. : Studies on Biosynthesis of Kasugamycin. I, J. Antibiot., 21, pp50-54(1968).
10. Ichikawa, T., Date, M., and Ozaki, A. : Improvement of Kasugamycin-producing Strain by the Agar Piece Method and the Prototroph Method, Folia Microbiologica, 16, pp218-224(1971).
11. Yagi, Y., Kitamura, I., Okamura, K., and Ozaki, A. : Production of Kasugamycin by Streptomyces kasugaensis, J. Ferment. Technol., 49, pp117-121(1971).
12. Umezawa, H., etc. : High Yielding Preparation of Kasugamycin, Japanese Patent, JP-;J58170494;07.10.83(1984).
13. Takeuchi, T., Ishizuka, M., Takayama, H., Kureha, K., Hamada, M., and Umezawa, H. : Pharmacology of Kasugamycin and the Effect on Pseudomonas Infection, J. Antibiot. Ser. A, 18, pp107-110 (1965).
14. Hamada, M., Hashimoto, T., Takahashi, T., Yokoyama, S., Miyake, M., Takeuchi, T., Okami, Y., and Umezawa, H. : Antimicrobial Activity of Kasugamycin, J. Antibiot. Ser. A, 18, pp104-106(1965).

15. Chun, G.-T. : ph. D. Thesis, Dept. of Chemical and Biochemical Engineering, Rutgers, the State University of New Jersey(1992).
16. Lee, T. H., Park, S. K., Chang, Y. K., and Chun, G.-T. : Development of Immobilized Cell Separator and Its Application to Immobilized Continuous Process for the Cyclosporin A., Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, pp717-725(1996).
17. Karube, I., Suzuki, S., and Vandamme, E. J. : "In Biotechnology of Industrial Antibiotics", Marcel Dekker, New York, pp761-789(1984).
18. Gbewonyo, K. and Wang, D. I. C. : Enhancing Gas-Liquid Mass Transfer Rates in Non-Newtonian Fermentations by Confining Mycelial Growth to Microbeads in a Bubble Column, Biotechnol. Bioeng., 25, pp2873-2887(1983).
19. Broad, D. F., Foulkes, J. and Dunnill, P. : The Uptake of *Aspergillus Ochraceus* Spores on Diatomaceous Particles and Their Use In the 11 α -Hydroxylation of Progesterone, Biotechnol. Letters, 6, pp357-362(1984).
20. Arcuri, E. J., Slaff, G., and Greasham : Continuous Production of Thienamycin in Immobilized Cell Systems, Biotechnol. Bioeng., 28, pp842-849(1986).
21. Demain, A. L. : "Secondary Metabolites: Their Function and Evolution", Ciba Foundation Symposium, John Wiley & Sons, NY, 171, pp3-23(1992).