

## 무기염과 생물반응기의 종류가 Clavulanic acid의 생산에 미치는 영향

김 일 출 · †김 승 욱

고려대학교 화학공학과

(접수 : 1999. 5. 18., 게재승인 : 1999. 7. 20.)

### Effect of Inorganic Salts and Various Bioreactors on the Production of Clavulanic Acid

Il-Chul Kim and Seung-Wook Kim†

Department of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

(Received : 1999. 5. 18., Accepted : 1999. 7. 20.)

For the efficient production of clavulanic acid, a mutant strain *Streptomyces clavuligerus* KK was selected from *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 through mutation with NTG. *S. clavuligerus* ATCC 27064 produced about 200 mg/L of clavulanic acid when the medium was composed of 1%(v/v) glycerol, 1.5%(w/v) soybean flour, 0.1%(w/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2%(v/v) soybean oil. A selected mutant, *S. clavuligerus* KK, produced about 1150mg/L of clavulanic acid in the same medium. After the addition of  $\text{MgSO}_4$  to the basal medium, *S. clavuligerus* KK produced about 1550 mg/L of clavulanic acid, which shows about 1.3 times higher than that produced in the basal medium. In order to select the proper bioreactor for the production of clavulanic acid, a batch culture was performed in an airlift, a bubble column and a stirred tank bioreactors. In an airlift bioreactor, about 1350 mg/L of clavulanic acid was produced, in a bubble column bioreactor, about 1550 mg/L, in a stirred tank bioreactor, about 2200 mg/L, respectively. The production of clavulanic acid in stirred tank bioreactor was about 50% higher than that by an airlift and a bubble column bioreactors. According to this result, the stirred tank bioreactor was selected as a proper bioreactor.

Key Words : *Streptomyces clavuligerus* KK, clavulanic acid, basal medium, airlift bioreactor, bubble column bioreactor, stirred tank bioreactor

### 서 론

1971년 Lilly Research Laboratories에서 Higgens와 Kastner는 남미지방의 토양 시료에서 분리한 *Streptomyces*에서 새로운 두 가지의 cephalosporin계 항생제가 생산된다고 발표했다(4). 그들은 발견된 균주가 기존의 cephalosporin계 항생제 생산 균주와 다르다는 결론에 도달했으며 *Streptomyces clavuligerus*라는 이름을 붙이기에 이르렀다.

이 균주는 U.S Northern Regional Research Laboratory Collection에 NRRL 3585로 American Type Culture Collection에 ATCC 27064로 각각 보관되었다. 이 균주에 의해 생산되는 clavulanic acid가 처음 발견된 이후로 같은 물질을 생산하는 다른 균주가 있다는 것이 보고되어졌고, 물론 그 보고 건수는 극히 적다. 예를 들면 *S. jumonjinesis*나 일본의 토양 시료에서 동정된 균주인 *S. katsurahamanus*와 *Streptomyces* sp. p6621 등이 있다. 또한 *S. clavuligerus*는 clavulanic acid외에

cephamycin C, penicillin N, 7-(5-amino-5-carboxy-valeramido)-3-carba-moyloxymethyl-3-cephem-4-carboxylic acid도 생산하는 것으로 밝혀졌다(1, 2).

Clavulanic acid는 *S. clavuligerus*에 의해 처음으로 발견된 천연물질로 구조적으로  $\beta$ -lactam ring을 가지고 있고 다른  $\beta$ -lactam 항생제인 penicillin과 cephalosporin의 황원자 대신 산소 원자로 대체되어 있다. Clavulanic acid의  $\beta$ -lactam ring은 기질의  $\beta$ -lactam ring과 유사해서 기질 속의  $\beta$ -lactamase를 acylation 시킴으로써  $\beta$ -lactamase의 작용을 못하게 한다(3, 4, 5). Clavulanic acid는 전형적인  $\beta$ -lactamase 저해제로서 내성 균용 광범위 항생물질로 알려져 있으며, 이것을 amoxicillin 또는 ticarcillin등과 일정비율로 혼합하여 사용함으로써 amoxicillin이나 ticarcillin이 방해받지 않고 강력한 살균작용을 발휘하도록  $\beta$ -lactamase를 무력화시킨다(6). 낮은 항균 활성을 가지고 있지만 *Staphylococci*가 생산하는  $\beta$ -lactamase와 *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus* 등이 분비하는  $\beta$ -lactamase에 대한 강력한 저해제로서 작용한다(7). Ampicillin이나 cephaloridine 등에 clavulanic acid를 첨가하여 penicillin 내성균주인 *S. aureus*, *K. aerogenes*, *P. mirabilis*, *E. coli* 등의 최소억제농도(MIC)를 현저히 낮추었다는 보고가 있다(8).

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea  
Tel. : 02-3290-3300 Fax : 02-926-6102  
e-mail : swkim@prosys.korea.ac.kr

Clavulanic acid에 관한 연구는 다른 항생제들에 비해 많은 연구가 이루어지지 않았다. 국내에서는 소수의 대학과 기업체만이 균주개발이나 최적발효조건 확립의 연구가 진행되고 있다. 그러나 최근 90년대에는 여러 가지 흥미를 끌만한 연구들이 발표되고 있다. 특히 관심을 끄는 연구는 최근 관심을 끌고 있는 morphology에 대한 연구이다. *S. clavuligerus* ATCC 27064를 이용해서 발효시킬 때, 발효조의 교반속도에 따른 clavulanic acid의 생산과 교반속도에 따른 morphology 변화를 연구했으며, 결론은 clavulanic acid의 생산성은 교반속도에 의해 큰 영향을 받지 못하며, morphology의 변화는 큰 교반속도에서 더 빨리 일어나며, morphology와 clavulanic acid의 생산성은 별 관계가 없다는 결론이다(9).

또다른 연구로는 *S. clavuligerus*에 의해 생산되는 항생제의 생합성이 균체의 농도에 미치는 영향에 관한 것으로 이 연구도 역시 morphology와 연관이 있으며, cephamycin C와 clavulanic acid를 생산하는 균체의 안정성은 배지의 영양분을 변화시키지 않고도 포자의 발아 후에 쉽게 얻어질 수 있으며, inoculum으로 사용된 포자의 농도가 중요한 역할을 한다는 연구이다(10).

이러한 연구 이외에 최근에는 *S. clavuligerus* 배양 중에 clavulanic acid가 배지내에서 생산과 동시에 분해도 일어나는데 배지내의 성분을 변화시켜 줌으로써 유전적 저해현상에 관한 연구가 수행되었다(11). 그러나 clavulanic acid의 생산에 관련된 연구는 아직 미진한 편이며 더 활발히 진행되어야 할 것 같다.

본 연구의 목적은 *S. clavuligerus* ATCC 27064로부터 clavulanic acid의 생산성을 높이기 위해 효율적인 균주를 개발하고, 개발된 균주를 이용하여 적절한 무기염의 확립과 적합한 생물반응기를 선정하는데 있다. 따라서 기존에 확립된 기본배지에 다양한 무기염을 이용하여 가장 적절한 배지를 확립하였으며, 확립된 배지를 이용하여 airlift 및 bubble column 생물 반응기와 교반식 생물 반응기에서 clavulanic acid를 효율적으로 생산하는 생물 반응기를 선정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064를 분양받아 NTG mutation을 통해 얻어진 균주이며, *Streptomyces clavuligerus* KK라 명명했다.

### 사용배지

균주는 Bennet 평판배지와 사면배지를 만들어 28℃에서 4일간 배양한 후 4℃에서 보관하였으며 종균배지로는 1% soybean flour, 2% dextrin, 0.2% soybean oil을 사용하였고, clavulanic acid의 기본생산배지로는 1.5% soybean flour, 1% glycerol, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2% soybean oil을 사용하였다.

### 배양방법

포자형태의 균주가 항상 같은 활성을 가질 수 있도록 실험 전에 미리 제작해두었던 glycerol stock을 이용하여 종균을 만들고 이 때, 종균배지는 pH를 7.0으로 맞추어 rotary shaking incubator에서 300 rpm으로 3일간 배양한 후 clavulanic acid

생산배지에 2%(v/v) 접종하였다. 생산배지도 마찬가지로 pH는 7.0으로 초기에 맞추어 250mL 삼각플라스크 배양시 조업부피는 30mL로 하였으며, rotary shaking incubator에서 300rpm으로 28℃에서 배양했다.

### 분석방법

발효액의 clavulanic acid는 HPLC로 정량하였다. Detector로는 UV detector를 사용했으며, column으로는 Waters C<sub>18</sub> μ-bondapak을 이용하였고, 이동상으로는 0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 3.2)에 부피비로 8%가 되도록 acetonitrile을 섞어 사용하였다. 이동상의 속도는 1mL/min이며, UV detector의 파장은 227nm, injection volume은 20 μL로 하였다. 발효액의 glycerol도 역시 HPLC로 정량하였다. Detector로는 RI detector를 사용했으며, column으로는 Waters C<sub>18</sub> μ-bondapak을 이용하였고, 이동상으로는 0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 부피비로 10%가 되도록 acetonitrile을 섞어 사용하였다. 이동상의 속도는 1mL/min이며, injection volume은 20 μL로 하였다.

균체량 측정은 Colony forming unit(CFU)을 이용하였다. 발효액 1mL을 미리 준비해 놓은 멸균수가 9mL씩 담긴 tube에 serial dilution을 시키고 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>로 희석시킨 tube에서 0.1mL씩을 뽑아서 Bennet 평판배지에 도말하여 28℃에서 3일간 배양 후 colony의 수를 세어서 평균을 낸 값을 균체량으로 정했다.

### 생물 반응기

Airlift 및 bubble column 생물 반응기는 pyrex로 자체 제작했으며, sintered glass sparger를 통해서 공기를 공급하며, 온도는 water bath로부터 반응기의 water jacket에 온도가 조절된 물을 순환시켜 조절하였다. 각각의 반응기 조업부피는 1L로 동일하게 하였으며, 통기속도 역시 1vvm으로 동일하게 실험하였다.

교반식 생물 반응기로 2.5L jar fermentor(한국 발효기)를 사용하였다. 조업조건으로는 D.O값은 control하지 않았으며, 교반속도는 초기에 400 rpm으로 시작해서 반응기 자체에 설치되어 있는 DO meter의 값이 4 ~ 5ppm을 유지할 수 있도록 교반속도를 변화시켜 주었으며, 통기속도는 1vvm으로 하였고, 조업부피는 1.5L로 실험하였다.

## 결과 및 고찰

### 삼각플라스크에서의 회분식 배양

*S. clavuligerus* ATCC 27064 균주를 이용하여 배양했을 경우 5 ~ 6일에서 약 186mg/L 정도의 clavulanic acid가 생산되었으며, *S. clavuligerus* ATCC 27064 균주를 NTG mutation 시킨 후 선별된 균주를 *S. clavuligerus* KK로 명명하였고, 이 균주로 배양을 했을 경우 약 6배정도 높은 약 1150mg/L를 생산하였다(Figure 1).

*S. clavuligerus* KK를 이용해서 삼각플라스크에서 회분식 배양을 한 결과를 Figure 2에 나타내었다. 균체농도는 배양 4일 만에 최대값(4×10<sup>9</sup> CFU)에 도달한 후 감소하는 경향을 보였고, pH는 초기 pH 7.0에서 천천히 감소하여 clavulanic acid의 농도가 최대값(약1100 mg/L)까지 생산되는 시간까지 감소하다가

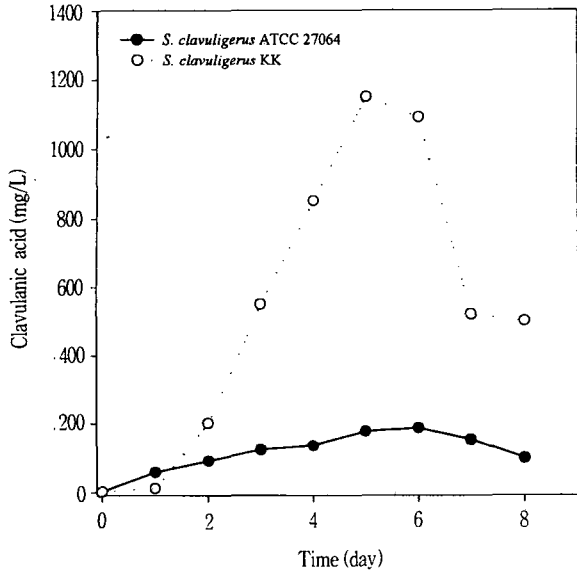


Figure 1. Production of clavulanic acid by *S. clavuligerus* ATCC 27064 and its mutant *S. clavuligerus* KK.

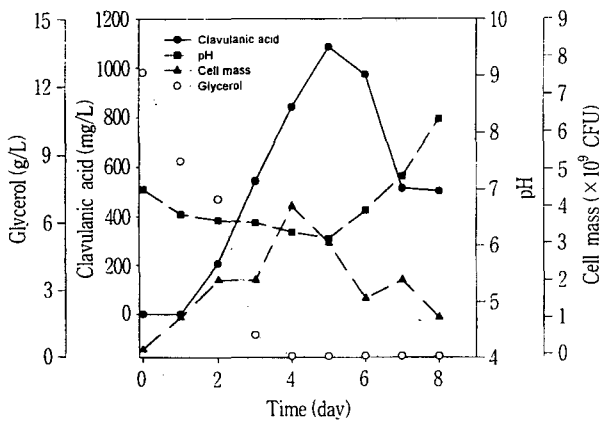


Figure 2. A batch culture of *S. clavuligerus* KK for the production of clavulanic acid in the sbake flask culture (Culture was carried out in the basal medium).

clavulanic acid의 생산이 감소되는 시점을 기준으로 다시 급격히 증가되는 경향을 보여주었다. 이러한 경향은 균체가 배지내의 당을 완전 소모한 후 대사과정 중에 생성된 아미노산을 탄소원으로 재사용함과 동시에 균체의 lysis에 따른 NH<sub>3</sub>의 발생으로 인해 pH가 다시 증가하는 것으로 보인다. 또한 탄소원인 glycerol은 3일 이내에 완전 소모되는 경향을 보이고 있다.

**무기염의 영향**

일반적으로 무기염은 항생제 생산에 막대한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(12). Clavulanic acid의 생산에 있어서도 무기염이 상당한 영향을 미친다고 보고되었다(1). 따라서 다양한 무기염이 *S. clavuligerus* KK에 의한 clavulanic acid 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 무기염으로는 FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> 다섯 종류를 다양한 농도로 첨가하여 실험하였다. 그 중에서 가장 많은 clavulanic acid를 생산한 각각의 무기염의 농도와 생산량을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Effect of inorganic salts on the production of clavulanic acid.

Inorganic slats	Optimized concentration(% w/v)	Clavulanic acid(mg/L)
FeSO <sub>4</sub>	0.03	1600
CuSO <sub>4</sub>	0.01	1250
MnSO <sub>4</sub>	0.02	1350
ZnSO <sub>4</sub>	0.02	1700
MgSO <sub>4</sub>	0.4	2000

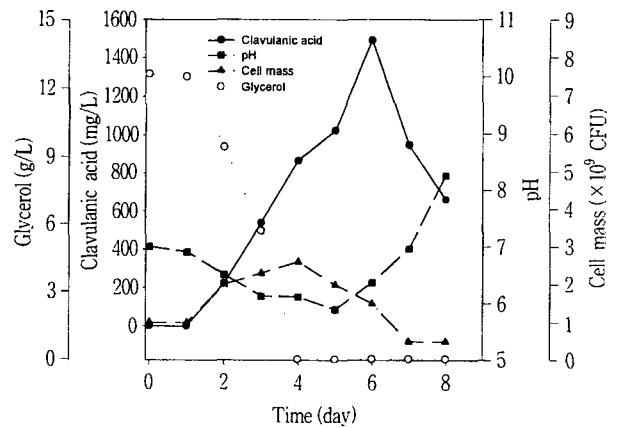


Figure 3. A batch culture of *S. clavuligerus* KK for the production of clavulanic acid in the shake flask culture (Culture was carried out in the basal medium containing MgSO<sub>4</sub>).

0.03%(w/v) FeSO<sub>4</sub>에서 clavulanic acid가 약 1600mg/L로 생산되었고, 0.01%(w/v) CuSO<sub>4</sub>의 경우 약 1250mg/L, 0.02%(w/v) MnSO<sub>4</sub>에서는 약 1350mg/L의 clavulanic acid를 생산함을 보였고, ZnSO<sub>4</sub>의 경우는 0.02%(w/v)에서 약 1700mg/L의 clavulanic acid를 생산하였다. 특히 MgSO<sub>4</sub>의 경우 0.4%(w/v)의 농도에서 약 2000mg/L의 clavulanic acid를 생산하여 사용된 무기염들 중 가장 높은 값을 보여주었다. 이러한 결과로부터 다양한 무기염 중 MgSO<sub>4</sub>가 가장 적합한 무기염임을 알 수 있었으며, 이후의 실험에서 기본 생산배지에 0.4%(w/v) MgSO<sub>4</sub>를 첨가하여 배양하였다.

Figure 3은 MgSO<sub>4</sub>가 첨가된 생산배지에서 삼각플라스크 배양을 한 결과이다. Glycerol의 소모속도와 pH 및 균체량은 Figure 2와 거의 같은 경향을 보여주었으나, clavulanic acid의 생산은 약 500mg/L가 증가하였다.

**Airlift 및 bubble column 생물 반응기에서의 clavulanic acid의 생산**

Figure 4는 airlift와 bubble column 생물 반응기에서의 clavulanic acid의 생산 결과를 보여준다. Airlift와 bubble column 생물 반응기의 조업조건은 두 경우 모두 통기속도를 1vvm, 조업부피는 1L로 하였다. 결과에서 볼 수 있듯이 airlift 생물반응

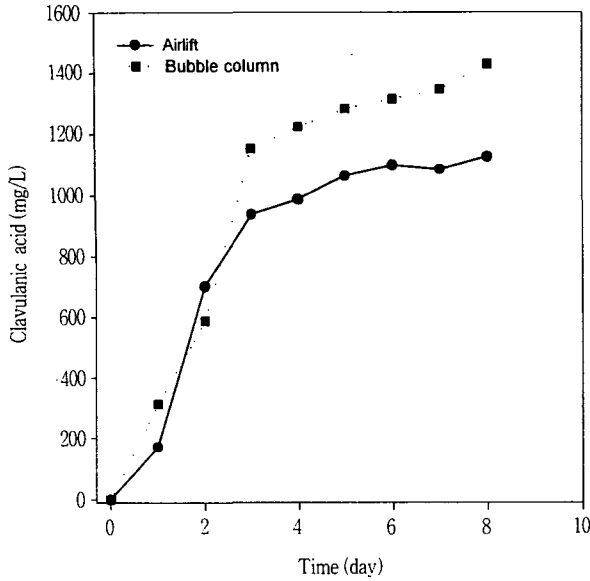


Figure 4. Production of clavulanic acid in the airlift and bubble column bioreactor(air flow rate : 1vvm).

기의 경우는 clavulanic acid의 최대 농도가 약 1100 mg/L로 8 일째에 생산되었으며, bubble column 생물 반응기의 경우도 역시 최대농도가 약 1450 mg/L로 8일째에 생산되어 삼각플라스크 배양과 비교했을 경우 airlift 생물 반응기의 경우는 차이가 거의 없었으며, bubble column 생물 반응기의 경우는 약 350 mg/L 정도가 더 생산된 것을 확인할 수 있었다.

두 생물 반응기에서 특징적인 것은 약 3일째까지 clavulanic acid의 생산이 급속하게 증가하다가, 이후 8일째까지는 점진적으로 증가한다는 것이다. 또한 삼각플라스크 배양과는 달리 clavulanic acid의 생산 및 분해속도가 느린데, 이것은 공기에 의한 교반이 물질전달 효율을 감소시킴에 의한 것으로 생각된다.

**교반식 생물 반응기에서의 clavulanic acid의 생산**

Figure 5는 교반식 생물 반응기에서 회분식 배양을 한 결과이다. 교반식 반응기에서 배양의 결과는 삼각 플라스크배양과는 다소 차이가 있었는데, 우선 pH의 경우 삼각 플라스크에서는 초기부터 감소했지만, 교반식 생물 반응기에서는 3일까지 pH 8.0까지 증가하다가 3일 이후부터 급격히 감소되어 7일째에 pH 5.5까지 감소되어 그 이후 다시 증가하는 경향을 보여 주었다. 균체량은 삼각 플라스크 배양에서 보다 약 10배정도 증가하였고, 3일 이후부터 급격히 성장하여 6일째에  $5 \times 10^{10}$  CFU/mL 정도까지 증가하다가 감소하였다. Clavulanic acid의 생산은 배양 3일째부터 시작되어 5일째에는 약 700 mg/L, 6일째에는 최대 약 1500 mg/L 정도까지 생산되었는데, 삼각 플라스크에서 배양한 결과(Figure 3)와 큰 차이가 없었다. 이것은 균체량의 증가에 따른 산소제한성 때문인 것으로 생각되었다. 따라서 좀 더 향상된 clavulanic acid 생산성을 얻기 위해서 교반식 생물 반응기의 조업조건을 변화시켜 줄 필요가 있었으며, 교반속도를 배양중의 DO값에 따라 변화시키며 실험을 하였고 그 결과를 Figure 6에 나타내었다. 물론 조업조건 중에서는 통기속도 역시 고려해 볼 수 있었지만 배양액이 시간이 갈수록 점도가 커

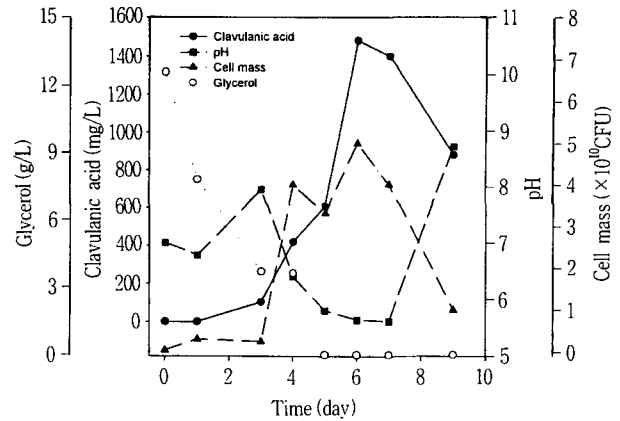


Figure 5. A batch culture of *S. clavuligerus* KK in a 2.5L stirred tank bioreactor(air flow rate : 1vvm, agitation speed : 400rpm).

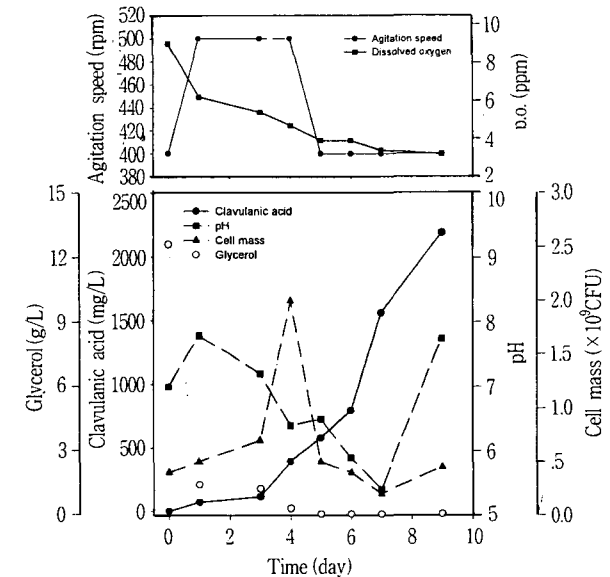


Figure 6. A batch culture of *S. clavuligerus* KK in a 2.5L stirred tank bioreactor. Agitation speed was varied with dissolved oxygen concentration(air flow rate : 1vvm).

지기 때문에 실제 실험을 해본 결과 1vvm으로 할 때나 0.5vvm 또는 1.5vvm으로 조절할 때 DO값은 배양액에서 차이를 보이지 않았기 때문에 통기속도는 본 실험의 조업조건에서 고려해 주지 않았으며 단지 교반속도만을 고려해서 실험을 하였다. 또한 교반속도를 조절해 줌에 있어서는 임펠러의 전단응력이 균체에 심한 타격을 주는 것을 막기 위해서 필요이상으로 급격하게 증가시키지 않았다. Figure 6에서 볼 수 있듯이 우선 균체의 성장시간이 단축된 것을 볼 수 있었으며, 균체에 의해 glycerol은 2일만에 완전히 소모되었으며, clavulanic acid의 생산 역시 같은 7일째에 1700 mg/L까지 생산되었고, 그 이후로도 계속 생산되어 2250 mg/L까지 생산되는 결과를 볼 수 있었다. DO값의 변화는 발효시작 후 24시간이 지나면 반응초기의 용존산소농도 측정치(약10ppm)로부터 거의 0으로 떨어지는 경향이 있는데, 이때 교반속도를 400rpm에서 500rpm으로 올려주면 용존산소농도는 4.5ppm을 유지한다. 그러면서 용존산

Table 2. Comparisons of production yield and productivity in various bioreactor systems.

Bioreactor mode	$Y_{p/s}^{*a}$	$P(\frac{mg}{L \cdot day})^{*b}$
Shake flask	0.12	241.67
Airlift bioreactor	0.08	137.50
Bubble column bioreactor	0.11	181.25
Stirred-tank bioreactor	0.12	250.00
Stirred-tank bioreactor with control of agitation speed	0.18	250.00

\*a : Production yield (mg/L of clavulanic acid / mg/L of carbon source(glycerol))

\*b : Productivity (maximum concentration of clavulanic acid/ reaction time)

소농도는 계속해서 조금씩 감소하다가 5일 이후에는 더 이상 변화를 보이지 않는데, 이 때 교반속도를 400rpm으로 감소시켜도 용존산소농도는 급격하게 떨어지거나 변화되지 않았다. 또한 7일째를 기준으로 하여 clavulanic acid의 생산을 airlift와 bubble column 생물 반응기와 비교하면 각각 650 mg/L, 400 mg/L가 더 향상된 생산성을 보였다. 이는 위에서도 언급하였듯이 발효액이 시간이 지날수록 점도가 높아지기 때문에 임펠러에 의한 교반이 산소전달을 원활히 하는데 도움을 주기 때문인 것으로 보인다. 결과적으로 교반속도를 변화시켜 줌으로써 산소전달을 용이하게 하여 clavulanic acid의 생산수율을 약 50% 높일 수 있었다. Table 2는 각각의 시스템에서 생산수율과 생산성을 보여준다. 생산성은 교반식 반응기에서의 두가지 시스템에서 모두 250 mg/L · day로 가장 높았으며, 생산수율은 교반식 반응기에서 교반속도를 변화시켜 준 시스템에서 0.18로 가장 높아, 실험된 시스템 중 이 경우가 clavulanic acid의 생산에 적합한 것으로 나타났다.

## 요 약

*S. clavuligerus* ATCC 27064 균주는 약 200 mg/L의 clavulanic acid를 생산하였지만, 이 균주를 NTG에 의해 돌연변이 시킴으로써 얻어진 *S. clavuligerus* KK를 같은 배양조건에서 약 5배 많은 1150 mg/L의 clavulanic acid를 생산하였다. 무기염이 첨가되지 않은 clavulanic acid의 기본 생산 배지에서는 clavulanic acid의 생산량은 1150 mg/L였으나 다양한 무기염 중에서 MgSO<sub>4</sub>가 첨가된 배지에서는 약 2000 mg/L나 생산되었다. 따라서 기본 배지조성인 1%(v/v) glycerol, 1.5%(w/v) soybean flour, 0.1%(w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2%(v/v) soybean oil에 0.4%(w/v) MgSO<sub>4</sub>를 첨가함으로써 clavulanic acid의 생산을 높일 수 있었다.

Airlift 와 bubble column 및 교반식 생물반응기에서 회분식 배양을 했을 경우 clavulanic acid의 생산은 airlift 생물 반응기에서는 1100 mg/L, bubble column 생물 반응기에서는 1450 mg/L, 교반식 생물 반응기에서는 1500 mg/L가 생산되어, 교반식 반응기가 적절하다고 생각되며 이는 배양액이 시간이 지날수록 점도가 높아지기 때문에 임펠러에 의한 교반 효과가 있는 교반식 반응기에서 물질전달이 가장 용이하기 때문인 것으로 보인다.

다. 특히 교반식 생물 반응기에서 용존산소농도에 따라 교반속도를 조절하여 회분식 배양을 했을 경우가 수율이 0.18, 생산성은 250mg/L · day로 가장 우수하게 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정연구과제(961-1105-032-2)로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Romero, J., P. Liras, and J. F. Martin(1984), Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 318-325.
- Romero, J., P. Liras, and J. F. Martin(1988), Isolation and biochemical characterization of *Streptomyces clavuligerus* mutants in the biosynthesis of clavulanic acid and cephamycin C\*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 510-516.
- Fisher, J., R. L. Charnas, and J. R. Knowles(1978), Kinetic studies on the Inactivation of *Escherichia coli* RTEM  $\beta$ -lactamase by clavulanic acid, *Biochemistry*, **17**-11, 2180-2184.
- Butterworth, D., Clavulanic acid : Properties, Biosynthesis, and Fermentation, pp. 225-235.
- Rolinson, G. N.(1991), Evolution of Beta-lactamase inhibitors, *Review of Infectious Diseases*, **13**, S727-S732.
- Brown, A. G., D. Butterworth, M. Cole, G. Hanscomb, J. D. Hood, C. Reading, and G. N. Rolinson(1976), Naturally occurring  $\beta$ -lactamase inhibitors with antibacterial activity, *J. Antibiot.*, **29**, 668-669.
- Spratt, B. G., V. Jobanputra, and W. Zimmermann (1977), Binding of thienamycin and clavulanic acid to the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* k-12, *Antimicrob. Agents. chemo.*, **12**-3, 406-409.
- Reading, C. and M. Cole(1977), Clavulanic acid : a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*, *Antimicrob. Agents. Chemo.*, **11**-5, 852-857.
- Belmar-Beiny, M. T. and C. R. Thomas(1991), Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: Effect of stirrer speed in batch fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 456-462.
- Sanchez, L. and A. F. Brana(1996), Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *Microbiology*, **142**, 1209-1220.
- Mayer A. F. and W. D. Deckwer(1996), Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 41-46.
- Vandamme, E. J.(1984), In *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, Marcel Dekker, INC.