

*Brevibacterium ketoglutamicum*을 이용한 L-Ornithine 생산 연구 PART II: L-Arginine 제한공급에 의한 L-Ornithine 유가식 발효생산

류옥상 · 잠형욱 · 이홍원 · 정준기 · 장순재¹ · 유연우² · 박영훈*
생명공학연구소, ¹양지화학 연구소, ²아주대학교 공과대학 화학 · 생물공학부

High Production of L-Ornithine by L-Citrulline Auxotroph of *Brevibacterium ketoglutamicum* : PART II: Production of L-Ornithine by Controlled Feeding of L-Arginine. Ryu, Wuk-Sang, Hyung-Wook Jang, Hong-Weon Lee, Joon-Ki Jung, Soon-Jae Chang¹, Yeon-Woo Ryu², and Young-Hoon Park*. Biochemical Process Engineering Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. BOX 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea, ¹Yang Ji Chemical Co., Ltd., Ansan 425-110, Korea, ²Division of Chemical and Biotechnology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea – A highly productive fed-batch fermentation process was developed for the production of L-ornithine by using a new stabilized strain, *Brevibacterium ketoglutamicum* BK52. Fed-batch cultures with a continuous feeding of the complex medium were conducted on various operating conditions. The optimal concentration of phosphate in the complex medium was 2.1 g/L. The optimal feeding rate of L-arginine was 0.028 g/L/hr. The optimal feeding point of the complex medium was determined to be at 40 OD of the cell mass. The final L-ornithine concentrations within 64 hrs of cultivation in 5 and 50 liter fermenters were 73 g/L and 71 g/L, respectively. The maximum overall L-ornithine productivity was 1.14 g/L/hr which was about 2 times higher than that of the conventional fed-batch culture with intermittent feeding. The overall productivity of the fermentation system is remarkably improved by employing the optimized conditions, and it offers a significant potential for industrial application.

Key words : L-ornithine, L-arginine, fed-batch culture, complex medium

L-Ornithine 생산은 1957년 일본의 Ajinomoto사에서 L-arginine 영양요구성 변이주인 *Corynebacterium glutamicum* 을 사용하여 처음 시도되었다[9]. 그 후 많은 연구에 의해 이 균주에 있어 N-acetylglutamate kinase가 최종생성물인 L-arginine에 의하여 대사제어를 받는 가장 중요한 효소로 알려져 있으며[8, 18, 20-24] L-ornithine의 과생산을 위해서는 L-arginine의 N-acetylglutamate kinase에 대한 대사제어기작의 해제가 필수적인 것으로 이해되었다. 이는 배지내에 존재하는 필수 영양요구성 물질(growth factor)이며 제한기질(limiting nutrient)인 L-arginine의 농도를 적정 농도로 유지 또는 제한시켜주는 발효방법에 의해 가능성이 보고되고 있다[6, 21, 22].

L-ornithine 발효생산 사례를 보면 *Brevibacterium lactofermentum*의 L-arginine 영양요구성 변이주를 사용하여 포도당을 탄소원으로 28 g/L의 L-ornithine이 생산된 보고 [10]와 *n-hexadecane*을 탄소원으로 사용한 *C. hydrocarboclastus*의 경우 최대수율이 32%에 이르는 보고[17] 등이 있다. 또한 *Arthrobacter citreus*의 L-arginine 영양요구성 변이주의 경우 전분을 탄소원으로 사용하여 최대 40 g/L의 L-ornithine을

생산한 보고도 있다[13]. 그 외 *A. paraffineus*와 *Acinetobacter lwoffii* 등의 변이주를 사용하여 L-ornithine을 생산하고자 한 시도도 보고된바 있으나[2, 15] 주로 *C. glutamicum*, *B. flavum*, *B. lactofermentum* 등의 L-glutamic acid 생산 균주로부터 개발된 L-arginine 영양요구성 변이주를 획득하여 L-ornithine을 생산하고자 한 연구가 대부분이다[1, 11, 19].

본 연구자들은 이미 *B. ketoglutamicum* ATCC 21092로부터 24 g/L의 L-ornithine 생산역기를 보이는 L-citrulline 영양요구성 변이주인 *B. ketoglutamicum* BK1046을 개발한 바 있다[6]. 또한 이 변이주를 사용하여 총 2.5%의 glycine을 발효배지에 첨가함으로써 L-ornithine 생산수율이 1.5배 증가된 37 g/L의 L-ornithine을 생산한 결과 및 L-arginine과 phosphate를 동시에 제한시키는 연속배양법으로 revertant 수의 증가를 억제함으로써 발효공정의 안정성이 증가된 결과를 보고한 바 있다[7, 12].

지금까지 연속 배양 또는 유가식 배양에 의해 L-ornithine을 생산하고자한 연구는 본 연구자의 보고[6, 7, 12] 외에는 없는 것으로 판단된다. 본 논문에서는 균주 안정성이 증가된 *B. ketoglutamicum* BK52(KCTC 0141BP)를 사용하여 L-arginine의 연속적인 제한공급을 통해 L-ornithine 생산성과 생산수율을 최대화 할 수 있는 유가식 발효공정 기술을 보고하고자 한다.

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4440, Fax. 82-42-860-4594
E-mail: ypark@kribb4680.kribb.re.kr

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에서 사용한 균주는 *B. ketoglutamicum* BK52 (KCTC 0410BP)이다. 종균배지 및 최소배지로는 YPD medium(pH 7.3)과 M9 medium(pH 6.8)[4]을 각각 사용하였으며 필요에 따라 배지성분을 수정하여 사용하였다. L-ornithine 생산을 위한 플라스크 배양 및 유가식 배양용 기본 발효배지의 조성은 배지 liter당 60 g glucose, 10 g yeast extract, 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4 g KH_2PO_4 , 0.3 g Na_2HPO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g CaCO_3 , 1 ml 미량원소용액(2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ per liter of 0.1 N HCl)이며 pH를 4 N NaOH로 7.2로 조정하여 사용하였다. 유가식 발효에 첨가한 복합배지(complex medium)는 배지 liter당 660 g glucose, 15 g yeast extract, 50 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7 g KH_2PO_4 , 14 g Na_2HPO_4 , 3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.5 g L-arginine으로 조성되었다. 플라스크 배양은 30°C 진탕배양기(KSI-200L, 고려기기제작, 서울, 한국)에서 150 rpm의 조건에서 실시하였으며 72시간 진탕배양후 균체 농도 및 L-ornithine 농도를 측정하였다.

분석방법

균체 농도는 spectrophotometer(UVICON 430, Kontron Instruments, Italy)를 사용하여 측정하였으며 배양액을 생리 식염수(0.85% NaCl)로 희석하거나 CaCO_3 가 포함된 경우에는 0.1 N HCl로 적당히 희석한 후 600 nm에서 흡광도를 측정한 다음 dry cell weight으로 환산하였다. 포도당 농도는 Glucose & Lactate Analyzer(YSI 2000, USA)를 사용하여 측정하였으며 L-ornithine 농도는 Chinard[5]의 nin-hydrin 발색법을 사용하였다. 인산염(PO_3^-) 농도는 Taussky 등의 Spectrophotometric molybdovanado phosphate method를 사용하여 측정하였으며[16] L-arginine 농도 측정은 Rosenberg 등이 제시한 Napthanol-diacetyl 방법을 사용하였다[14].

결과 및 고찰

L-Arginine 농도가 L-Ornithine 생산에 미치는 영향

L-Ornithine 발효생산에 사용한 균주는 L-citrulline 영양 요구성 변이주로서 L-arginine을 세포내에서 생합성하지 못하므로 세포성장을 위해서는 L-arginine이 제한 기질로서 외부로부터 필히 공급되어야 한다. 따라서 최소액체배지를 사용한 플라스크 배양을 통해 첨가된 초기 L-arginine 농도에 따른 세포 성장 및 L-ornithine 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 1).

그 결과 초기 L-arginine 농도가 200 mg/L까지는 L-arginine 농도가 증가될수록 균체 농도도 선형적으로 증가되었으며 다른 성분의 제한이 없을 경우 1 g/L의 L-

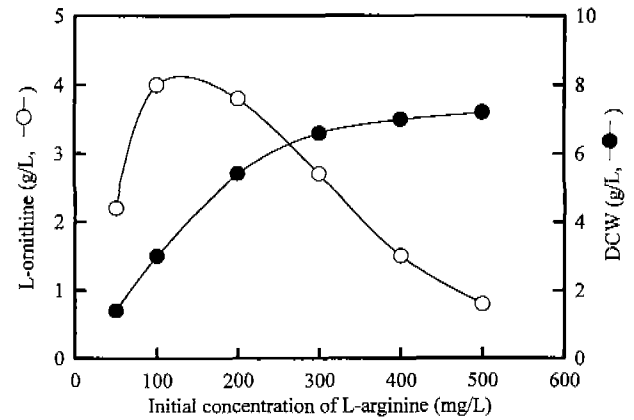


Fig. 1. Effect of L-arginine concentration on L-ornithine production.

arginine으로 33~35 g/L의 세포 농도가 생성되었다. 그러나 초기 L-arginine 농도가 200 mg/L를 초과하면서부터는 균체 농도가 선형적으로 증가되지 못했는데 이는 L-arginine의 기타 배지성분 및 용존산소등 다른 발효인자가 세포성장의 제한조건으로 작용한 때문인 것으로 추정되었다.

L-ornithine 생산의 경우 초기 L-arginine 농도가 100~150 mg/L일때 4.3 g/L로 최대값을 나타냈으며 L-arginine 농도가 300 mg/L를 초과하면서부터는 L-ornithine 생산이 급격히 감소되었는데 그 원인은 영양요구성 변이주의 L-arginine 소모속도가 초기 L-arginine 농도와는 무관하게 일정하기 때문에 일정 시간이 지난후에는 L-arginine이 공급 과잉상태가 되기 때문인 것으로 여겨진다. L-arginine이 배양액에 고농도로 잔존하게 되므로써 최종생성물저해 기작이 유발되어 탄소원의 대부분이 세포성장을 위해서만 소비되고 L-ornithine의 생산을 위해서는 소비되지 못하는 것이다.

반면에 필수 제한 기질인 배양액내 L-arginine 농도가 100 mg/L 이하의 낮은 농도로 존재하여 L-arginine 결핍 현상이 나타나게 되면 세포성장이 저해되므로써 세포의 대사활성과 L-ornithine 생산능력이 감소될 수 있고 또한 L-arginine 영양요구성이 상실된 revertant가 출현할 위험성이 증가되어 L-ornithine 생산이 감소되는 것이다.

따라서 여러번의 배양실험을 반복하여 배양액내 잔존하는 L-arginine 농도가 단위세포당 L-ornithine 생산속도(Q_p , 비L-ornithine 생산속도)에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2).

그 결과 배양액내 잔존하는 L-arginine 농도가 10~15 mg/L 사이에서 Q_p 즉, 단위 세포당 L-ornithine 생산능력이 최대로 나타났으며 따라서 배양액내 잔존하는 L-arginine 농도를 10~15 mg/L의 최적 농도로 유지시키는 유가식 발효 방법을 택하였다.

L-Arginine과 Phosphate 동시 제한이 L-Ornithine 생산에 미치는 영향

인산염은 L-arginine외에 세포의 대사활성에 관여하여 배

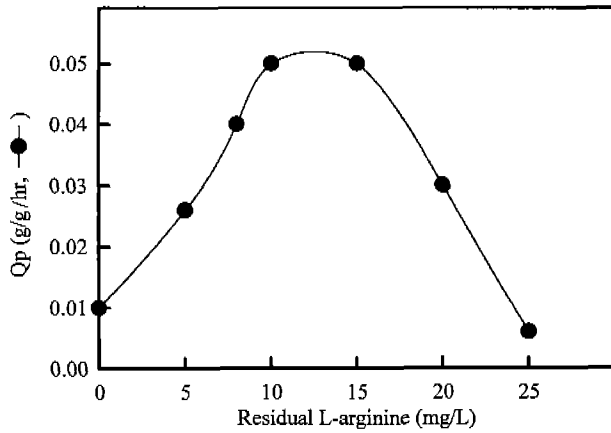


Fig. 2. Effect of residual L-arginine on specific production rate.

양과정의 균주 안정성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[20]. 이에 따라 인산염(PO_4^{3-})을 제2의 제한기질로 선정하여 L-ornithine 유가식 발효생산에 적합한 인산염 농도를 5 liter 발효조(KFC MK250, 한국발효기(주), 인천)에서 조사하였다(Table 1).

최적 인산염 농도를 결정하기 위하여 3.5 g/L의 L-arginine 이 포함된 배지에 인산염을 1.9 g/L, 2.1 g/L, 2.3 g/L의 농도로 각각 첨가한 복합배지를 세포대사활성이 둔화되는 시점인 발효경과후 24시간째부터 발효조에 연속적으로 공급하였다.

그 결과 인산염 농도가 2.1 g/L로 조성된 복합배지를 사용했을 때 다른 경우보다 발효시간 경과에 따라 발생하는 세포의 대사활성과 L-ornithine 생산성 감소가 방지되어 발효경과 75시간만에 180 OD의 균체 농도를 보였으며 66 g/L의 L-ornithine이 생산되므로써 대당수율은 25%, L-ornithine 생산성은 0.88 g/L/hr를 나타내었다.

한편 인산염 농도가 1.9 g/L로 조성된 복합배지의 경우 발효경과 70시간 이후에는 세포가 포도당을 이용하지 못해 세포성장이 중단되고 L-ornithine도 57 g/L으로 생산이 멈추었다. 따라서 발효를 70시간째에 끝낸 경우를 기준으로할 때 균체 농도는 150 OD, 대당수율은 27%, L-ornithine 생산성은 0.81 g/L/hr를 보였다.

마지막으로 복합배지내 인산염 농도를 2.3 g/L로 실험한 경우에는 복합배지 첨가후의 최대 세포 비성장속도는 복합배지내 인산염 농도가 1.9 g/L, 2.1 g/L일 때의 최대 세포 비성장속도인 0.03 hr^{-1} 에 비해 1.5배 증가된 0.047 hr^{-1} 로

발효경과 63시간째 균체 농도가 210 OD에 이른 후 세포 증식이 정지되었다. 결국 발효경과 70시간째 52 g/L의 L-ornithine이 생산되어 대당수율은 20%, L-ornithine 생산성은 0.74 g/L/hr 로 가장 낮았다.

이들 결과로부터 발효조내 인산염 농도가 L-arginine 농도보다 낮게 되면 균체 농도가 낮아지고 발효가 진행될수록 인산염 결핍 현상이 나타나 세포의 대사활성이 감소되어 세포의 L-ornithine 생산성과 대당수율이 낮아지게 된다는 것을 알 수 있었다.

반대로 발효조내 인산염 농도가 L-arginine의 농도보다 높게 되면 세포의 대사활성이 증가되고 세포성장 속도가 빨라져 균체 농도가 증가했지만 대사가 세포성장쪽으로 치우치게 되므로써 이 역시 균주의 L-ornithine 생산성에 악영향을 주게 된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 인산염의 최적 농도는 2.1 g/L으로 결정하였다.

이 결과는 L-ornithine 발효시 영양요구성 변이주 성장을 L-arginine과 인산염 동시제한에 의하여 조절할 수 있으며 세포의 대사활성 및 L-ornithine 생산성을 향상시킬 수 있는 L-arginine과 인산염의 최적 농도가 존재함을 뜻하는 것이다.

그러나 L-arginine과 인산염을 동시제한시키는 연속 배양법에서 인산염 농도가 높을수록 revertant 수가 증가되어 결국 L-ornithine 생산이 감소되었다는 보고[7]와는 달리 안정화된 균주 *B. ketoglutamicum* BK52를 사용한 본 유가식 발효에서는 각 인산염 농도별 revertant 수를 시간별로 측정해본 결과 모든 경우에서 초기의 revertant 농도인 10^7 cells/ml이 발효말기까지 그대로 유지되었다.

따라서 L-arginine과 인산염을 적정 농도로 동시에 제한시키는 방법은 revertant 출현이나 revertant 수의 증가를 방지하여 생산성이 증가되었다는 측면보다는 균주의 대사활성과 L-ornithine 생산성 양쪽 모두의 측면에서 최적의 조건을 만들어 주므로써 L-ornithine 생산수율이 증가되었고 균주의 L-ornithine 생산능력이 장시간 유지될 수 있다고 할 수 있다.

복합배지내 L-Arginine 공급속도가 L-Ornithine 생산에 미치는 영향

유가식 배양에 있어서의 제한 기질의 공급속도는 세포의 대사활성에 직접적인 영향을 미치는 발효인자라고 할 수 있다[7]. 이에 따라 L-ornithine 생산능력을 장시간 유지시키기 위한 L-arginine 공급속도를 결정하였다. 즉, 복합배지내

Table 1. Fermentation parameters depending on different concentration of PO_4^{3-}

Concentration of phosphate (g/L)	Fermentation time (hrs)	μ_{max} (hr^{-1})	Maximum cell mass (X_m , g/L)	L-ornithine produced (g/L)	Productivity (g/L/hr)
1.9	70	0.03	34	57	0.81
2.1	75	0.03	41	65	0.88
2.3	70	0.047	48	52	0.74

포함되어 있는 L-arginine이 0.021 g/L/hr, 0.028 g/L/hr, 0.036 g/L/hr의 속도로 각각 맞추어져 제한 공급되도록 세포의 대사활성이 둔화되는 시점인 발효경과 24시간째부터 복합배지를 연속적으로 공급하는 L-ornithine 유가식 발효를 실험하였다(Table 2).

그 결과 복합배지 첨가후 최대 세포 비성장속도는 L-arginine 공급속도가 0.021 g/L/hr, 0.028 g/L/hr, 0.036 g/L/hr일 때 각각 0.029 hr⁻¹, 0.041 hr⁻¹, 0.056 hr⁻¹로 나타나 L-arginine 공급속도 증가에 따라 최대 세포 비성장속도도 증가되었다.

또한 L-ornithine 생산을 보면 L-arginine 공급속도를 0.028 g/L/hr로 실험한 결과 세포의 대사활성이 감소되지 않아 발효경과 65시간째 68 g/L의 L-ornithine이 생산되는 가장 좋은 결과를 보여 대당수율은 26%, L-ornithine 생산성은 1.04 g/L/hr로 나타났다. L-arginine 공급속도가 0.021 g/L/hr일 때는 발효경과 78시간째 60 g/L의 L-ornithine이 생산되어 대당수율은 23%, L-ornithine 생산성은 0.77 g/L/hr로 나타났으며 L-arginine 공급속도를 0.036 g/L/hr로 올리면 발효경과 84시간째 66 g/L의 L-ornithine이 생산되어 대당수율은 25%, L-ornithine 생산성은 0.78 g/L/hr의 결과를 보였다. 이때 발효시간이 길어진 이유는 L-arginine과 함께 공급된 다른 영양성분 특히 포도당이 배지에 과잉 축적되어 일어난 현상이라고 볼 수 있다.

결과적으로 L-arginine을 0.028 g/L/hr의 속도로 공급했을 때 발효시간이 가장 짧았고 L-ornithine 생산성 및 생산수를 증가에 가장 좋은 결과를 나타냈으므로 이를 유가식 발효공정에서 L-arginine의 최적 공급 속도로 결정하였다.

L-Ornithine 고생산성 유가식 발효생산

우선 복합배지 첨가시점을 결정하기 위하여 발효조내의 균체 농도가 각각 20 OD, 40 OD, 60 OD, 70 OD의 시점에서 복합배지 공급을 시작하는 실험을 5 liter 발효조에서 수행하였다(Table 3).

그 결과 균체 농도가 40 OD가 되는 시점에 복합배지를 공급하기 시작했을때 발효초기의 세포 대사활성이 둔화되지 않고 발효말기까지 최적으로 유지되므로써 L-ornithine 실제 생산 기간 및 대당수율 측면에서 가장 좋은 결과를 보였다. 이때 균체농도가 40 OD가 되는 시점이 보통 발효 시작후 13시간~15시간째가 되는데 발효가 보통 65~70시간 정도 진행된다는 것을 고려하면 사실상 발효초기부터 복합

Table 3. Effect of cell concentration at the addition point of complex medium

Cell mass (OD)	Period of L-ornithine production (hrs)	Yp/s (g/g)	Productivity (g/L-hr)
20	55	0.18	0.75
40	52	0.27	1.14
60	37	0.26	1.04
80	33	0.20	0.80

배지가 공급된다는 것을 의미한다.

이상의 실험에서 최적화된 여러 조건 등을 모두 종합하여 만들어진 탄소원, 유기질소원, 무기염류, L-arginine이 동시에 포함된 복합배지를 발효말기까지 연속적으로 제한 공급하는 유가식 발효공정을 5 liter 발효조에서 최적화하여 기존의 간헐 주입 방법에 의한 유가식 배양과 비교하였다 (Fig. 3).

L-ornithine 발효 시작 후 균체농도가 40 OD에 이른 시점에 L-arginine이 3.5 g/L, 인산염 농도가 2.1 g/L로 포함된 복합배지를 특히 L-arginine 공급속도가 0.028 g/L/hr가 되도록 제한하여 발효말기까지 연속적으로 공급하였다. 그 결과 세포의 대사활성이 적절히 유지되고 발효시간 경과에 따른 L-ornithine 생산능력 저하 현상이 발생되지 않으므로써 L-ornithine 생산수율이 기존 공정에 비해 크게 증가되었다.

결과적으로 유가식 발효공정을 최적화하므로써 발효경과 64시간째 73 g/L의 L-ornithine이 생산되어 대당수율은 28 % (molar yield 38%), L-ornithine 생산성은 1.14 g/L/hr로

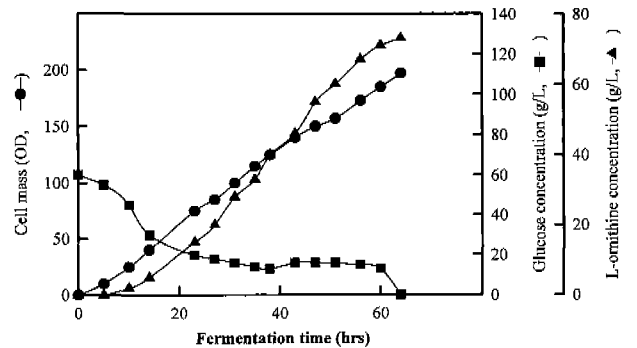


Fig. 3. Time profile of cell mass, glucose, and L-ornithine concentration during fed-batch culture with continuous feeding of the complex media in 5 liter jar fermenter.

Table 2. Fermentation parameters depending on feeding rate of L-arginine

Feeding rate of L-arginine (g/L/hr)	Fermentation time (hrs)	μ_{max} (hr ⁻¹)	Maximum cell mass (X_m , g/L)	L-ornithine produced (g/L)	Productivity (g/L/hr)
0.021	78	0.029	23	60	0.77
0.028	65	0.041	26	68	1.04
0.036	84	0.056	25	66	0.78

나타났다. 이 결과를 기존 공정한 간헐 주입 방법을 사용한 유기식 배양과 비교한 결과는 Table 4와 같다.

즉, 발효시간이 96시간에서 64시간으로 30시간 이상 단축되었으며 생산성도 0.61 g/g/hr에서 1.14 g/g/hr로 2배 정도 증가된 결과를 나타내었다.

L-Ornithine 유기식 발효생산 공정의 Scale-up

5 liter 발효조에서 최적화한 L-ornithine 생산 유기식 발효공정을 50 liter 발효조(Bioengineering, Wald, Switzerland)로 scale-up하였다. 일반적으로 호기성 발효의 경우 scale-up시 통기 교반 문제가 제한조건이 될 수 있어 이를 먼저 해결하여야 하는데 이때 산소의 부피전달계수(K_{La} , volumetric transfer coefficient)가 scale-up의 매개변수 또는 지표로서 중요한 의미를 가진다[3]. 이 K_{La} 값은 발효조내 geometric ratio, 기체 유량, 교반속도, 유체특성에 의존하여 발효기간 동안 변할 수 있다.

따라서 Dynamic method[3]를 이용하여 5 liter 발효조와 50 liter 발효조에서 교반속도(rpm) 변화에 따른 K_{La} 값을 측정하여 비교하였다(Fig. 4).

이때 5 liter 발효조에서는 impeller 직경이 발효조 직경의 4/10인 six-blade turbine type impeller 1개를, 50 liter 발효조에서는 impeller 직경이 발효조 직경의 3/10인 six-

Table 4. Comparison of fed-batch culture with intermittent feeding and continuous feeding of complex medium

Fermentation parameters	Intermittent feeding	Continuous feeding
Fermentation time (hrs)	96	64
Cell mass (g/L)	49	48
L-ornithine produced (g/L)	59	73
Yp/s (g/g)	0.22	0.28
Molar yield (%)	30	37
Productivity (g/L-hr)	0.61	1.14

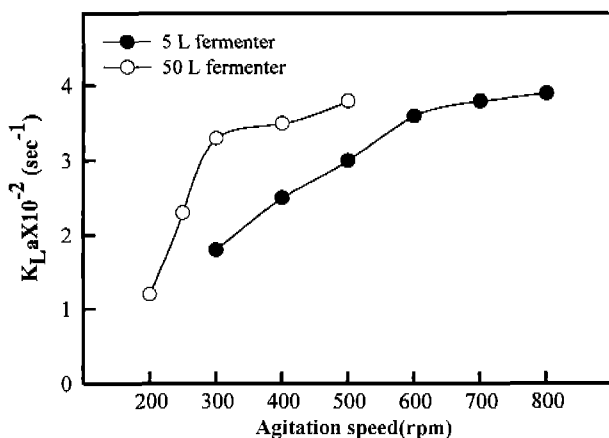


Fig. 4. Effect of agitation speed to volumetric transfer coefficient (K_{La}) at 5 liter and 50 liter fermenter.

Table 5. Scale-up of L-ornithine fermentation

Fermentation parameters	5 liter fermenter	50 liter fermenter
Fermentation time (hrs)	64	64
Cell mass (g/L)	48	47
L-ornithine produced (g/L)	73	71
Yp/s (g/g)	0.28	0.27
Molar yield (%)	37	36
Productivity (g/L-hr)	1.14	1.11

blade turbine type impeller 2개를 사용하였다.

그 결과 교반속도가 400 rpm을 넘어서면서부터 교반속도에 의한 두 발효조사이의 K_{La} 값이 비슷해지기 시작하여 교반속도가 500 rpm일 때 5 liter 발효조와 50 liter 발효조의 K_{La} 값은 각각 $3.4 \times 10^{-2}(\text{sec}^{-1})$ 와 $3.7 \times 10^{-2}(\text{sec}^{-1})$ 으로 나타났다. 이런 결과들로 얻어진 2 liter 발효조와 5 liter 발효조 사이의 K_{La} 값에 대한 상관관계를 고려하여 5 liter 발효조에서 50 liter 발효조로 scale-up시 K_{La} 값을 일정하게 유지시키기 위해 균체 농도 증가에 맞추어 통기량 및 교반속도를 조절하였다. 또한 5 liter 발효조에서 얻은 결과를 50 liter 발효조에서 재현하기 위하여 5 liter 발효조에서 최적화한 조건을 50 liter 발효조에 동일하게 적용하였다. 이때 교반속도를 균체 농도 증가에 따라 400에서 700 rpm까지 증가시켜 발효조내 DOT를 30% 이상으로 유지시켰다.

그 결과 발효초기에 보인 세포의 대사활성 및 L-ornithine 생산능력이 발효말기까지 지속적으로 유지되어 발효경과 64시간째 41 g/L의 균체 농도와 71 g/L의 L-ornithine이 생산되었다. 이때 대당수율 및 L-ornithine 생산성이 각각 27%(molar yield 37%)와 1.11 g/L/hr로 나타나 5 liter 발효조에서의 결과가 재현되었다(Table 5).

요 약

본 연구에서는 안정화 균주로 확보된 *Brevibacterium ketoglutamicum* BK52(KCTC 0410BP)를 사용하여 L-ornithine을 생산하기 위한 유기식 발효공정 기술을 확립하였다. 먼저 L-ornithine 생산속도가 최대가 되는 발효액내 잔존 L-arginine 농도는 10~15 mg/L로 나타났다. 유기식 배양시 연속적으로 공급되는 복합배지내 인산염 농도 및 L-arginine 공급속도를 최적화한 결과 각각 2.1g/L와 0.028 g/L/hr로 나타났다. 이때 복합배지의 첨가시점은 균체농도가 40 OD일때 L-ornithine 생산성이 가장 좋았다. 결국 발효액내 L-arginine 농도가 10~15 mg/L로 제한되어 유지되도록 L-arginine이 포함된 복합배지를 연속적으로 제한 공급하는 방식에 의해 최적 L-ornithine 유기식 발효 방법을 확보할 수 있었다. 이러한 5 liter 발효조에서의 운전 결과는 50 liter 발효조로의 scale-up에서도 재현성있는 결과를 나타내

어 모두 27% 이상의 대당수율과 1.11 g/L/hr 이상의 높은 생산성을 보이므로써 발효경과 64시간만에 70~73 g/L의 L-ornithine이 생산되었다. 특히 이 생산성은 기존의 간헐 주입 방법에 의한 유기식 배양과 비교하여 약 2배 정도 증가된 결과로서 산업적 생산에도 응용될 수 있을 것으로 판단되었다.

REFERENCES

- Aida, K., L. Chibita, K. Nakayama, K. Takinami, and H. Yamada. 1986. *Biotechnology of Amino Acids Production*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Ammund, O. O., G. Mackinnon, and I. J. Higgins. 1983. Increased L-ornithine production by an *arg* mutant of *Acinetobacter lwoffii*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 252–253.
- Blanch, H. W. and D. S. Clark. 1997. Transport processes, pp.343–413. *Biochemical Engineering*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Calton, B.C. and B. J. Brown. 1981. Gene mutation, pp. 222–242. *Manual of Methods for General Bacteriology*. ASM, Washington DC.
- Chinard, F. P. 1952. Photometric estimation of proline and ornithine. *J. Biol. Chem.* **199**: 91–95.
- Choi, D. K., W. S. Ryu, B. H. Chung, S. W. Nam, and Y. H. Park. 1992. Production of L-ornithine by citrulline auxotrophic mutants of glutamate-producing bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 102–107.
- Choi, D. K., W. S. Ryu, B. H. Chung, S. W. Nam, and Y. H. Park. 1996. Production of L-ornithine by citrulline auxotrophic mutants of *Brevibacterium ketoglutamicum* in dual substrate limited continuous culture. *J. Ferm. Bioeng.* **81**: 216–219.
- Davis, B. D. 1955. Intermediates in amino acid biosynthesis, pp. 257–268. *Advances in Enzymology*. Interscience Publishers Ltd., London.
- Kinoshita, S., K. Nakayama, and S. Udaka. 1957. The fermentative production of L-ornithine. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 276–277.
- Kinoshita, S., K. Nakayama, S. Udaka, and S. Kitada. 1957. US patent No. 2988489.
- Kinoshita, S. and K. Tanaka. 1972. *The Microbial Production of Amino Acid*, pp. 263–324. John & Wiley and Sons, New York.
- Nam, S. W., D. K. Choi, W. S. Ryu, H. W. Jang, B. H. Chung, and Y. H. Park. 1994. Effect of glycine on L-ornithine production by a citrulline auxotroph of *Brevibacterium ketoglutamicum* and stoichiometric analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 95–101
- Okumura, S., M. Shibuya, F. Yoshinaga, and N. Katsuya. 1966. US patent No. 3532600.
- Rosenberg, H., A. H. Ennor, and J. F. Morrison. 1956. The estimation of arginine. *Biochem. J.* **63**: 153–159.
- Tanaka, K., K. Oshima, and Y. Tokoro. 1966. US patent No. 3574061.
- Taussky, H. H. and E. Shore. 1953. A microcaloric method for the determination of phosphate. *J. Biol. Chem.* **202**: 675–678.
- Uchio, R., S. I. Otsuka, and I. Shiio. 1967. Microbial production of amino acids from hydrocarbons. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 303–312.
- Udaka, S. 1966. Pathway-specific pattern of control of arginine biosynthesis in bacteria. *J. Bacteriol.* **91**: 617–621.
- Udaka, S. 1972. *Amino Acid Fermentation*, p. 139. Kyoritsu Shuppan, Co., Ltd. Japan.
- Udaka, S. and S. Kinoshita. 1958. Studies on L-ornithine fermentation. I. The biosynthetic pathway of L-ornithine in *Micrococcus glutamicus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**: 272–282.
- Udaka, S. and S. Kinoshita. 1958. Studies on L-ornithine fermentation. II. The biosynthetic pathway of L-ornithine in *Micrococcus glutamicus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**: 283–288.
- Vogel, H. J., W. D. McElroy, and B. Glass. 1955. *Amino Acid Metabolism*, p. 335. Johns Hopkins, Baltimores. USA.
- Yoshida, H., K. Araki, and K. Nakayama. 1979. Mechanism of L-arginine production by L-arginine production mutants of *C. glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 105–111.
- Yoshida, H., K. Araki, and K. Nakayama. 1979. N-Acetylglutamate-acetylornithine acetyltransferase-deficient arginine auxotroph of *C. glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 1899–1903.

(Received June 19, 1999)