

*Corynebacterium glutamicum*의 연속배양에 의한 L-lysine 생산

김 영 희 · 이 시 영 · 이 현 환 · *현 형 환
한국외국어대학교 생명공학과
(접수 : 2001. 8. 26., 게재승인 : 2001. 10. 25.)

Production of L-lysine by Continuous Culture of *Corynebacterium glutamicum*

Young-Hee Kim, See-Young Lee, Hyun-Hwan Lee, and Hyung-Hwan Hyun*
Department of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin 449-791, Korea
(Received : 2001. 8. 26., Accepted : 2001. 10. 25.)

Fed-batch culture, single stage and two stage continuous cultures of *Corynebacterium glutamicum* SH 35 for the production of L-lysine were performed and compared. In the case of fed batch culture, L-lysine concentration, L-lysine yield and L-lysine productivity was 129.2 g/L, 47.0% and 3.08 g/L/h, respectively. In a single-stage continuous culture, optimum dilution rate and pH was 0.1 h⁻¹ and 6.9, respectively, and optimum concentration of sugar and ammonium sulfate in a medium reservoir was 108 g/L and 25 g/L, respectively. Under the optimized conditions, 67 of cell concentration(OD₆₁₀), 44.2 g/L of lysine concentration, 41% of L-lysine yield and 4.39 g · L⁻¹ · h⁻¹ of L-lysine productivity were obtained. In a two-stage continuous culture, optimum dilution rate was 0.075 h⁻¹. Under the conditions, 103 of cell concentration(OD₆₁₀), 84.0 g/L of L-lysine concentration and 46% of L-lysine yield were obtained.

Key Words : L-lysine, production, *Corynebacterium glutamicum*, continuous culture

서 론

L-Lysine은 사람이나 동물의 체내에서 합성되지 않는 필수 아미노산 중의 하나로 식품이나 가축 사료의 첨가물로 이용되어 왔다(1-3). 1950년대 L-lysine의 생합성 경로가 연구된 이래로 현재 대부분이 Coryneform bacteria(*Corynebacteria*와 *Brevibacteria* species)를 이용한 발효에 의해 생산된다(2,4-6). 1970년대 이후로 꾸준히 생산이 증대되어 지난 20년간 20배 이상 그 양이 증가하였고 미생물 발효에 의해 연간 35만톤 이상 생산된다(7-9). 또한 전 세계적으로 lysine 소비는 매년 5-10% 정도 증가하고 있다(10). L-Lysine의 수요가 지속적으로 증대됨에 따라 생산성을 높이기 위한 많은 연구들이 이루어졌으며, 이에 따라 lysine을 대량 생산하기 위해 classical mutagenesis를 통해 lysine을 과잉 생산하는 돌연변이 균주를 얻거나 발효조건들을 개선해 나가고 있다(11,12).

미생물 발효에 의한 L-lysine 생산은 회분식 또는 유가식 배양으로 생산되어지고 있다. 회분식 배양은 발효 초기에 다

량의 탄소원과 질소원을 넣어주어 발효 말기에 높은 농도의 L-lysine의 축적이 일어나게 해 주는 것으로, 이 경우에는 발효 초기에 높은 농도의 탄소원과 질소원에 의한 osmotic pressure에 의해 균의 성장 및 lysine 생산이 저해되는 문제점이 있다. 그러므로 산업적인 lysine 생산에서는 균의 osmotic pressure에 따른 stress를 줄여주기 위해 osmoprotective compound를 첨가하여 회분식 배양을 하거나(13) 유가식 배양을 한다(14). 유가식 배양의 경우에는 회분식 배양 시 나타나는 문제점인 높은 농도의 당에 의한 균의 성장저해를 방지할 수 있으며, 또 다른 성장 저해 요소들을 배지에 낮은 농도로 유지되도록 첨가함으로써 lysine 생산성을 높이고자 하는 방법이다(3,11,14). 이러한 방법들은 유한한 시간 내에 발효가 끝나고 또한 발효 말기에도 lysine의 축적에 따른 lysine 생산 저해가 일어날 수 있는 단점을 가지고 있어(3) 생산성을 증대시키는데 어느 정도의 한계성을 가지고 있다.

그러나 발효 산물 축적에 의한 lysine 생산 저해를 줄일 수 있는 연속배양에 의한 lysine 생산에 관한 연구는 회분식 발효나 유가식 발효에 비해 많이 이루어지지 않았다. L-Lysine 생산에 있어 연속발효공정을 확립한다면 회분식 발효나 유가식 발효 시 발효 말기에 고농도의 lysine에 따른 생산성 저해에 대한 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라 높은 productivity를 유지하면서 장시간 lysine 생산이 가능하므로 생산성 향상을 가져올 수 있는 동시에 생산비 절감의 이점이 있을 수 있다.

*Corresponding Author : Department of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin-si, Kyungki-do 449-791, Korea
Tel : +82-31-330-4279, Fax : +82-31-333-1696
E-mail : hhhyun@san.hufs.ac.kr

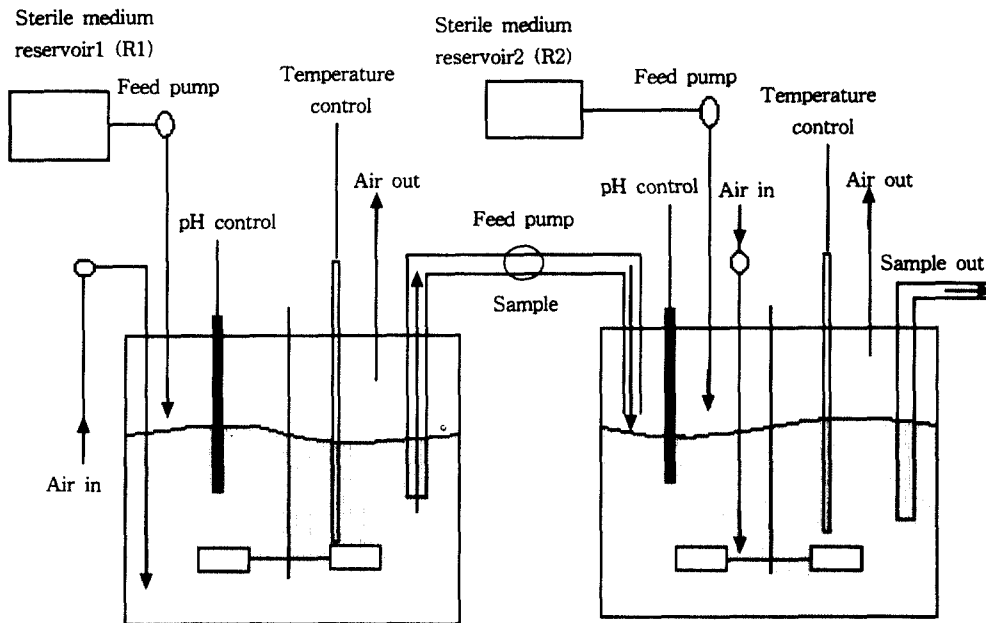


Figure 1. Schematic diagram of two-stage continuous fermentation system.

따라서 본 연구는 *C. glutamicum*의 유가식 배양과 연속 배양에 의한 L-lysine 생산성을 알아보고 L-lysine 생산성을 증대시키기 위한 2단계 연속 발효공정을 확립하고자 하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서는 *Corynebacterium glutamicum* SH 35 [S-aminoethyl-L-cystein(AEC)^r, α -amino- β -hydroxyvaleric acid(AHV)^r, temperature^r, fluoropyruvate(F-pyr)^s]를 이용하였다.

일반적인 균의 배양을 위해서는 SA 배지(glucose 10 g/L, urea 1 g/L, polypeptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, beef extract 5 g/L, NaCl 2.5 g/L, Agar 22 g/L)와 PS 배지(sucrose 50 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, urea 1 g/L, CSL 12 ml/L, polypeptone 10 g/L, yeast extract 10 g/L, nicotinic acid 3 mg/L, thiamine · HCl 1 mg/L, d-biotin 50 μ g/L, β -alanine 5 mg/L)를 사용하였다. 그리고 종배양을 위해서는 S 배지 [sucrose 36 g/L, 당밀 24 g/L, (NH₄)₂SO₄ 10 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, urea 1 g/L, CSL 36.5 ml/L, nicotinic acid 5.25 mg/L, thiamine · HCl 2 mg/L, β -alanine 5 mg/L, FeSO₄ · 7H₂O 5.5 mg/L, CuSO₄ 1 mg/L, AZ-20R 0.25 mL/L]를 사용하였다.

유가식 배양의 경우 본배양에는 LM 배지 [sucrose 18 g/L, 당밀 12 g/L, (NH₄)₂SO₄ 40 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.6 g/L, KH₂PO₄ 0.6 g/L, CSL 20 mL/L, nicotinic acid 1.5 gm/L, thiamine · HCl 2.3 mg/L, d-biotin 200 μ g/L, FeSO₄ · 7H₂O 11 mg/L, AZ-20R 0.2 mL/L]를 사용하였으며 F 배지 (sucrose 270 g/L, 당밀 180 g/L, (NH₄)₂SO₄ 30 g/L d-biotin 600 μ g/L)를 첨가배지로 사용하였다.

Single-stage 연속배양에서는 첨가배지로 LM 배지에서

sucrose 64.8 g/L, 당밀 43.2 g/L, (NH₄)₂SO₄ 30 g/L로 농도를 바꾸어준 R1 배지를 사용하였다. Two-stage 연속배양에서는 second stage의 첨가배지로 LM 배지에서 sucrose 300 g/L, 당밀 200 g/L, (NH₄)₂SO₄ 100 g/L의 농도로 바꾸어준 R2 배지를 사용하였다.

배양방법

일반적인 균의 배양은 SA 배지에 균을 접종하여 30℃에서 36-40시간 계대배양 한 뒤 PS배지에 접종하여 30℃, 200 rpm로 진탕배양하였다.

유가식 배양에서 종배양은 PS 배지에 배양하여 pH 6.5이상(균체 농도OD₆₁₀ 5 이상)일 때 S 배지가 포함된 2.5L 발효조(코바이오택)에 5%(v/v)가 되도록 식균하여, 온도는 31.5℃, 통기량은 1 vvm, 교반속도는 700 rpm 그리고 NH₄OH를 이용하여 pH 6.9로 조절하여 배양하였다. 본배양은 종배양에서 균체농도(OD₆₁₀) 35-40 정도까지 배양한 뒤 LM 배지가 포함된 5 L 발효조(코바이오택)에 18%(v/v)가 되도록 식균하여, 통기량은 1 vvm, 교반속도는 850 rpm 그리고 NH₄OH를 이용하여 pH 6.9로 조절하여 배양하였다. 초기 발효조의 온도는 33℃로 유지하여 배양하면서, packed cell volume(PCV)이 8% 되었을 때 37℃로 올려주어 배양하였다. 발효 중 배양액 내 당농도는 1.0% 이하가 되지 않도록 적절한 때에 F 배지를 첨가하였다.

Single-stage 연속배양의 경우 S 배지가 포함된 1 L 발효조(New Brunswick Scientific co. INC)에 5%(v/v)가 되도록 식균하여, 온도는 33℃, 통기량은 3 vvm, 교반속도는 650 rpm 그리고 pH 6.9로 조절하여 배양한 뒤 균체 농도(OD₆₁₀) 35이상에서 R1 배지를 지속적으로 첨가해 주면서 배양하였다.

Two-stage 연속배양에서 first stage는 single-stage 연속배양과 동일하게 배양하였으며, second stage는 2.5 L 발효조(코바이오택)를 이용하여 first stage에서의 flow rate과 R2 배지의

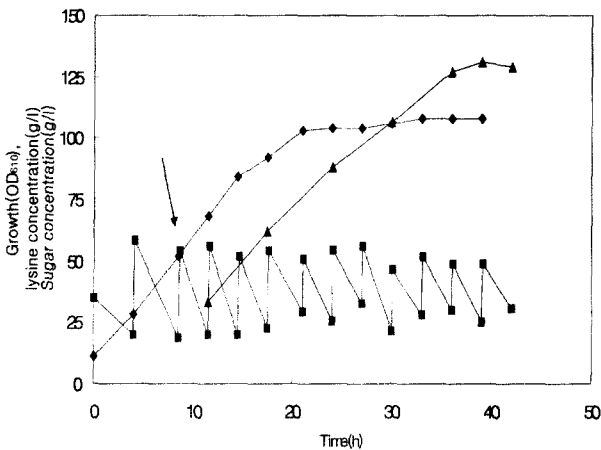


Figure 2. Time course of growth and lysine production by fed-batch culture of *Corynebacterium glutamicum* SH35. Experiments were conducted in a 5 L jar fermenter, which was controlled at pH 6.9 with NH₄OH, agitated at 850 rpm, and aerated 1 vvm, respectively. The arrow indicates a temperature shift from 33°C to 37°C. ◆ ; Cell concentration(OD₆₁₀), ■ ; Sugar concentration(g/L), ▲ ; Lysine concentration(g/L).

flow rate을 4 : 1가 되도록 하여 온도는 37°C, 통기량은 3 vvm, 교반속도는 650 rpm 그리고 pH 6.9 에서 수행하였다 (Figure 2).

균체 농도 및 당농도 분석

균체 농도 측정은 optical density(OD)와 pack cell volume (PCV)방법을 이용하였다. OD의 경우 균체 배양액을 증류수로 적절히 희석하여 spectrophotometer(Spectronic 20+, Milton Roy)를 이용해 610 nm에서 흡광도를 측정하였고, PCV는 균체 배양액 10 mL을 2000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 뒤 상등액을 이용하여 측정하였다.

배양액의 당농도 분석은 glucose(sigma)를 표준시료로 사용한 DNS 방법(17)으로 측정하였다.

L-Lysine의 정량

발효액 내 L-lysine농도의 정량은 paper chromatography를 이용하였다. 3 M chromatography paper(whatman)에 발효액을 점점하여 전개액(butanol : D.W : acetic acid의 비 3.5 : 2.5 : 1)에 16-18시간 전개한 뒤 paper를 건조시키고 0.2% ninhydrin

sol'n을 뿌린 다음 60°C에서 3분간 반응시켰다. 발색부위에 2% ninhydrin sol'n을 떨어뜨려 다시 3분간 반응시킨 뒤 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)로 발색부위를 적신 후 60°C에서 40분간 반응시켰다. 발색부위만 잘라 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)와 methanol이 1 : 1 로 섞인 용액 10 mL에 담고 1시간 정도 용출한 후 용액만 따라내어 2,500 rpm에서 5분간 원심분리 한 뒤 상등액을 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

유가식 배양에 의한 L-lysine 생산

균주 *C. glutamicum* SH 35에 의한 lysine 생산을 5 L 발효조를 이용하여 유가식 배양으로 수행하였다. 초기 당 농도에 의해 균의 생장이 저해되는 것을 방지하기 위해 발효 초기 당농도는 30 g/L로 하였으며 당이 고갈될 즈음에 추가배지 F를 첨가해 당의 농도가 10 g/L 이하가 되지 않도록 조절하면서 배양하였다(3,14,15). 초기 발효조의 온도는 생장 최적 온도인 33°C로 유지하여 배양하였으며 균체 농도(PCV)가 8%가 되는 시점에 온도를 37°C로 올려줌으로써 균체로 가는 탄소원의 흐름을 줄여 lysine 생산 수율을 높이고자 하였다. L-Lysine의 생산은 균의 생장과 함께 lysine 농도가 증가하는 양상을 나타내었으며, 균의 생장이 정지기에 도달한 21시간 이후에도 lysine의 농도는 계속 증가하다가 38시간 후에 최대 농도를 나타내었다(Figure 2). 유가식 배양에 의한 lysine 생산 결과 최종 발효액 중의 균체 농도(OD₆₁₀)는 108, lysine 농도는 129.2 g/L, lysine 수율은 47%이었으며, productivity는 3.08 g · L⁻¹ · h⁻¹였다.

Single-stage 연속배양에 의한 L-lysine 생산에서 탄소원 농도의 영향

균주 *C. glutamicum* SH 35의 single-stage 연속배양에 의한 최적 lysine 생산 조건을 확립하기 위해 연속배양에서 Reservoir 내의 탄소원 농도가 균의 생장 및 lysine 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Table 1). 연속배양에서는 결핍 요소(limited nutrient)의 농도에 의해 steady-state에서의 균체 농도가 조절되므로(15,16), 당의 농도를 60 g/L에서 116 g/L로 높였을 때, 균체 농도(OD₆₁₀)는 30에서 61로 증가하였고, lysine 농도, lysine 수율 및 lysine productivity 역시 당의 농도가 높아질수록 증가되었다. 당농도가 108 g/L일 때 균체 농도(OD₆₁₀)는

Table 1. Effects of sugar concentrations on the fermentation parameters in a single-stage continuous culture of *C. glutamicum* SH 35.^a

Sugar concentration of feeding medium (g/L)	Growth (OD ₆₁₀)	Residual sugarconcentration (g/L)	Lysine concentration (g/L)	Lysine yield (%)	Lysine productivity (g · L ⁻¹ · h ⁻¹)
60	35	0.5	21.3	35	1.07
75	45	0.2	29.9	39	1.50
85	47	0.4	33.6	39	1.68
93	52	0.3	33.4	36	1.67
103	58	0.2	39.5	38	1.97
108	61	0.2	40.3	37	2.01
116	61	8.0	40.3	37	2.02

^a Continuous culture was performed at dilution rate, 0.05 h⁻¹.

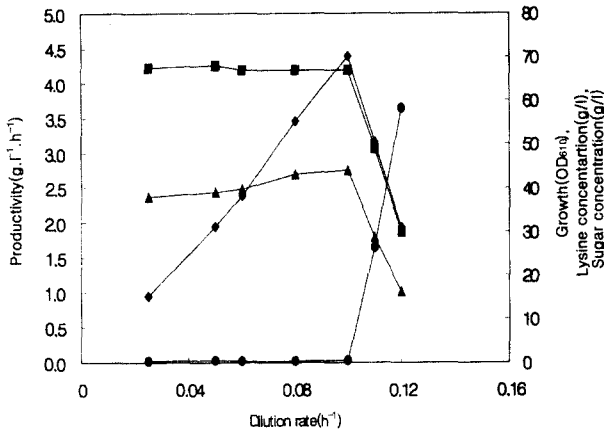


Figure 3. Steady-state values of cell growth, lysine concentration and lysine productivity in a sugar-limited continuous culture. Experiments were conducted in a 1L jar fermenter that contained 154 mL of R1 medium, was controlled at pH 6.9 with NH₄OH, agitated at 650 rpm and aerated at 3 vvm. ● ; sugar concentration(g/L), ◆ ; lysine productivity(g · L⁻¹ · h⁻¹), ■ ; Cell growth(OD₆₁₀), ▲ ; Lysine concentration(g/L).

61로 당농도를 60 g/L로 하였을 때 보다 균체 농도가 1.7배 정도 증가하였으며 이때 lysine 농도 및 productivity는 각각 40.3 g/L, 2.01 g · L⁻¹ · h⁻¹로, 당농도 60 g/L일 때보다 각각 2 배정도 증가하였다. 그러나 당농도를 108 g/L로 하였을 때까지는 잔존당이 0.5 g/L이하였으나 당농도가 116.0 g/L인 경우 잔존당이 8.0 g/L이었다. 또한 당농도가 116 g/L의 경우와 108 g/L인 경우를 비교하였을 때 균체 농도, lysine 농도 및 lysine productivity는 거의 비슷한 수준이었다. 탄소원의 경우 균의 성장과 유지 그리고 lysine 생산에 이용되는데(15,16), 당농도 108 g/L 이상에서는 균체에 의한 당 소모속도보다 당 공급 속도가 더 크기 때문에 잔존당으로 남아 있게 되는 것으로 사료되며, single-stage 연속 배양에 의한 lysine 생산에서 적절한 당농도는 108 g/L로 결정되었다.

Single-stage 연속배양에 의한 L-lysine 생산에서 dilution rate의 영향

연속배양의 경우 product 생성 비율은 dilution rate에 따라 달라지므로(2,15), 탄소원이 결핍요소인 single-stage 연속배양에서 dilution rate이 균의 성장 및 lysine 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Figure 3). Dilution rate이 0.025 h⁻¹에서 0.100 h⁻¹로 증가함에 따라 균체 농도(OD₆₁₀)는 67로 일정하였으나 lysine 농도 및 lysine 수율은 약간 증가하였다. Dilution rate 0.025 h⁻¹에서 lysine 농도는 38.0 g/L, lysine 수율은 35.2%

그리고 productivity는 0.95 g · L⁻¹ · h⁻¹였으나, dilution rate이 0.100 h⁻¹인 경우 lysine 농도는 6.0 g/L가 증가된 44.0 g/L, 수율은 41.0%, productivity는 4.39 g · L⁻¹ · h⁻¹이었다. 그러나 dilution rate이 0.110 h⁻¹, 0.120 h⁻¹로 높아짐에 따라 균체 농도(OD₆₁₀)는 각각 49,30으로 감소하였으며, lysine 농도는 29 g/L, 16 g/L, productivity는 3.14 g · L⁻¹ · h⁻¹, 1.94 g · L⁻¹ · h⁻¹로 감소하였다. steady state에 있는 연속배양에서는 dilution rate이 specific growth rate(μ)과 같으므로 dilution rate이 0.110 h⁻¹ 이상일 경우 dilution rate이 maximum specific growth rate(μ_{max})보다 높아져 균체가 washing out되어(15) 나타난 결과로 사료된다. Phosphate가 결핍요소인 연속배양에서는 dilution rate이 0.04 h⁻¹였을 때 lysine productivity가 가장 높은 것으로 보고 되었으나(6) 탄소원이 결핍요소인 연속배양에서는 dilution rate이 0.100 h⁻¹일 때 가장 높은 productivity(4.39 g · L⁻¹ · h⁻¹)를 보였다. 따라서 탄소원이 결핍요소인 single-stage 연속배양에 의한 lysine 생산에서 최적의 dilution rate은 0.100 h⁻¹로 판단된다.

Single-stage 연속배양에 의한 lysine 생산을 유가식 배양에 의한 lysine 생산과 비교해 보았을 때 유가식 배양의 경우 lysine 수율이 47%로 연속배양에 의한 lysine 수율 41%보다 6% 정도 높게 나타났다. 그러나 lysine productivity의 경우 유가식 배양의 의한 경우에는 3.08 g · L⁻¹ · h⁻¹ 인 반면 연속 배양의 경우에는 42%가 높은 4.39 g · L⁻¹ · h⁻¹가 얻어졌다. 따라서 lysine 생산을 위한 연속배양은 유가식 배양에 비해 lysine 수율이 낮으나, 높은 productivity를 유지하면서 장시간 lysine 생산이 가능하므로 lysine 생산성 향상을 가져올 수 있을 것으로 사료된다.

Single-stage 연속배양에 의한 L-lysine 생산에서 pH의 영향

발효에 의한 lysine 생산에서 pH는 lysine 유출에 영향을 주는 요소 중의 하나로 알려져 있으므로(3), single-stage 연속 배양에서 pH가 균의 성장 및 lysine 생산에 미치는 영향을 조사하였다. pH를 6.0 - 8.0으로 조절하여 연속배양을 수행하였을 때 균체 농도는 pH의 변화에 관계없이 일정하였으나, lysine 농도, lysine 수율 및 lysine productivity는 pH에 따라 변화되는 것으로 나타났다(Table 2). pH 6.0으로 조절하여 연속 배양을 수행한 결과 lysine 농도, lysine 수율 및 lysine productivity는 각각 35.7 g/L, 35%, 3.57 g · L⁻¹ · h⁻¹로 가장 낮았으며, pH 6.9로 조절하면서 배양한 경우는 lysine 농도, lysine 수율 및 lysine productivity 는 각각 43.9 g/L, 41%, 4.39 g · L⁻¹ · h⁻¹로 증가하였다. 그러나 pH가 8.0으로 높아지면 lysine 농도, lysine 수율 및 lysine productivity는 감소하였다. 이는 pH 6.9가 lysine 유출에 가장 적절하기 때문에 균체

Table 2. Effect of pH on fermentation parameters in a single-stage continuous culture of *C. glutamicum* SH 35.^a

pH	Growth (OD ₆₁₀)	Consumed sugar concentration (g/L)	Lysine concentration (g/L)	Lysine Yield (%)	Lysine productivity (g · L ⁻¹ · h ⁻¹)
6.0	69	102.1	35.7	35	3.57
6.5	68	105.2	39.6	38	3.96
6.9	67	107.8	43.9	41	4.39
8.0	67	105.0	38.5	38	3.85

^a Continuous culture was performed at dilution rate, 0.05 h⁻¹.

Table 3. Effects of nitrogen concentrations of fermentation parameters in a single-stage continuous culture of *C. glutamicum* SH 35.^a

Ammonium sulfate concentration of feeding medium (g/L)	Growth (OD ₆₁₀)	Consumed sugar concentration (g/L)	Residual nitrogen concentration (g/L)	Lysine concentration (g/L)	Lysine yield (%)	Lysine productivity (g · L ⁻¹ · h ⁻¹)
15	48	92.4	2.52	37.9	41	3.42
20	62	108.5	3.00	47.8	44	4.30
25	68	108.2	5.12	44.0	41	3.96

^a Continuous culture was performed at dilution rate, 0.05 h⁻¹.

Table 4. Effects of dilution rates on the fermentation parameters of second-stage in two-stage continuous culture system.

Dilution rate in second stage (h ⁻¹)	Growth (OD ₆₁₀)	Sugar conc. of feeding medium in second stage (g/L)	Residual sugar in second stage (g/L)	Total consumed sugar conc. (g/L)	Lysine conc. (g/L)	Yield (%)
0.05	105	110	11.4	186.0	83.1	45
0.075	103	110	12.0	184.4	84.0	46
0.1	98	100	10.4	176.0	79.8	45
0.2	90	100	28.8	152.6	69.2	45
0.3	86	100	41.1	145.4	62.8	43
0.4	75	100	53.0	133.4	57.0	43
0.5	69	100	60.2	126.3	54.3	43

농도는 다른 pH와 비교하였을 경우 일정하였으나, lysine 농도, lysine productivity 및 lysine 수율이 높은 것으로 생각되며 lysine 생산을 위한 연속배양에서 가장 적절한 pH로 판단된다.

Single-stage 연속배양에 의한 L-lysine 생산에서 질소원 농도의 영향

균 배양 시 질소원의 농도가 낮으면, cell은 잉여 탄소원을 세포내의 reserve material들의 형태로 축적하게 되므로(16) 연속배양에 의한 lysine 생산에서 reservoir내의 질소원 농도가 균의 성장 및 lysine 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 질소원인 ammonium sulfate의 농도가 15 g/L, 20 g/L, 25 g/L으로 높아질수록 균체 농도(OD₆₁₀)는 각각 48, 62, 68로 증가하였다. Ammonium sulfate의 농도를 20 g/L, 25 g/L로 연속배양을 수행하였을 때 소모된 당량은 거의 차이를 보이지 않았으나, 균체 농도(OD₆₁₀)는 각각 62, 68로 ammonium sulfate 농도가 25 g/L일 때 높게 나타났다. 그러나 lysine 농도는 각각 47.8 g/L, 44.0 g/L으로 ammonium sulfate가 25 g/L 첨가되었을 때보다 20 g/L 첨가되었을 때, lysine 수율이 3% 정도 높은 결과를 나타내었다(Table 3). 이는 연속배양 시 질소원의 농도가 낮을 경우 질소원의 결핍으로 균의 생장은 낮아지게 되고, 잉여 탄소원은 lysine 생성으로 가게 되어 나타난 결과로 사료된다.

Two-stage 연속배양에 의한 L-lysine 생산

Single-stage 연속배양을 수행한 결과 유가식 배양에 의한 lysine 생산보다 productivity의 향상은 있었으나 lysine의 농도 및 수율이 낮은 문제점이 있었다. 이러한 문제점을 개선하고자 first stage는 균이 성장하는 조건으로 하고 second stage는 product를 생산하는 조건으로 하여 생산성을 향상시킬 수 있는 two-stage 연속배양을 수행하였다. 균의 성장을 위한 first stage는 탄소원이 결핍요소인 single-stage 연속배양과 동일하게 수행하였으며 product 생산을 위한 second stage는 온도를

37°C로 높여 균의 성장으로 가는 탄소원의 흐름을 낮추어줌으로써 lysine 생산으로 가는 탄소원의 양을 증대시켜 lysine 농도 및 lysine 수율을 높이고자 하였다. Lysine 생산을 위한 two-stage 연속배양에서 second stage의 dilution rate에 따른 균의 성장, 당의 소모량과 lysine 생산량을 관찰한 결과 dilution rate이 0.5 h⁻¹에서 0.075 h⁻¹로 낮아질수록 균체 농도, lysine 농도 및 수율이 증가하는 것으로 나타났다. Second stage의 dilution rate을 0.075 h⁻¹로 하였을 경우 lysine 농도는 84 g/L였으며 lysine 수율은 유가식 배양에 의한 lysine 생산수율(47%)과 유사한 정도인 46%로 나타났다. 그러나 dilution rate이 0.05 h⁻¹로 낮아지게 되면, lysine 농도 및 수율이 감소하는 결과를 보였다.

Two-stage 연속배양으로 lysine을 생산하였을 경우 lysine 농도는 single-stage 연속배양(44 g/L)에서보다 약 2배 증가하였으며, 수율 역시 single-stage 연속배양의 41%보다 약 4-5%가 증가된 45-46%로 나타났다. 이 결과로 two-stage 연속배양을 통해 single-stage 연속배양에서 lysine 농도 및 수율이 낮은 점을 보완할 수 있으며 산업적인 이용가능성도 있을 것으로 사료된다.

요 약

L-lysine의 생산을 *Corynebacterium glutamicum* SH35을 이용하여 유가식 배양법과 연속 배양법으로 수행하였다. 유가식 배양에 의한 lysine 생산을 조사한 결과 최종 발효액 중의 lysine 농도는 129.2 g/L, lysine 수율 및 productivity는 각각 47%, 3.08 g · L⁻¹ · h⁻¹이었다. Single-stage 연속 배양에서 dilution rate에 따른 균의 성장 및 lysine 생산을 조사한 결과, critical dilution rate은 0.100 h⁻¹으로 이때 균체농도(OD₆₁₀)는 67, lysine 농도는 44.0 g/L 그리고 lysine 수율 및 productivity는 41%, 4.39 g · L⁻¹ · h⁻¹이고 lysine 연속배양 시 최적의 dilution rate이었다. 또한 lysine 생산을 위한 medium reservoir 내의 최적 탄소원 농도, 최적 질소원(ammonium sulfate) 농도

및 최적 pH는 각각 108 g/L, 25 g/L 및 6.9이었다. 유가식 배양법과 single-stage 연속 배양법에 의한 lysine 생산에서, productivity는 유가식 배양의 경우 $3.08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 인 반면, 연속 배양에서는 $4.39 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 유가식 배양법에서보다 약 1.4배 정도 증가하였다. 연속 발효 공정을 통해 생산 역가의 향상은 있었으나, lysine 농도와 수율이 낮아 이에 대한 해결책으로 two-stage 연속 배양 방법을 수행하였다. 그 결과, 연속 배양 발효 수행시보다 lysine 농도는 2배 정도 증가하였으며, lysine 수율은 46%로서 유가식 배양과 비슷한 정도로 얻어졌다. 이러한 실험 결과로 미루어 lysine 생산 역가 향상을 위한 방법으로 two-stage 연속배양의 산업적인 이용가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 한국학술진흥재단의 지원(KRT-1998-020-E3106)에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Hopwood, D. A. (1981), The genetic programming of Industrial microorganisms, 245(3), pp30-42, Sci. Am
- Robert, D., R Kiss, and G. Stephanopoulos (1992), Metabolic characterization of a L-lysine-production strain by continuous culture, *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 565-574
- Kelle, R., B. Laufer, C. Brunzema, D. Weuster-Botz, R. Kramer, and C. Wandrey (1996), Reaction engineering analysis of L-lysine transport by *Corynebacterium glutamicum*, *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 40-50
- Hiros, Y. and H. Shibia (1980), Amino acid fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 115-125
- Coello, N., G. J. Pan, and M. J. Lebeault (1992), Physiological aspects of L-lysine production; effect of nutritional limitations on a producing strain of *Corynebacterium glutamicum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 259-262
- Eggeling, L. (1994), Biology of L-lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*, *Amino Acid*, **6**, 216-272
- Kiss, R. D. and G. Stephanopoulos (1991), Metabolic activity control of the L-lysine fermentation by restrained growth fed-batch strategies, *Biotechnol. Prog.*, **7**, 501-509
- Hodgson, J. (1995), Bulk amino-acid fermentation; Technology and commodity trading, *Bio. Technology*, **12**, 152-155
- Eggeling L. and H. Sahm (1999), L-glutamate and L-lysine; traditional products with impetuous developments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 146-153
- Cremer J., L. Eggeling, and H. Sahm, (1991), Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1746-1752
- Hadj, S. A., M. P. Queric, A. M. Deschamps, and J. M. Lebeault (1998), Optimization of L-lysine production by *Corynebacterium sp.* in fed-batch cultures, *Biotechnol. Let.*, **10**(8), 583-586
- Takiguchi, N., N. Fukui, N. Shimizu, H. Shimizu, and S. Shioya (1998), Method of *Corynebacterium glutamicum* fermentation time extension with high lysine production rate by leucine addition, *J. Ferm. Bioeng.*, **86**(2), 180-184
- Kawahara, Y., Y. Yoshibara, S. Ikeda, H. Yoshii, and Y. Hirose (1990), Stimulatory effect of glycine-betaine on L-lysine fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 87-90
- Weuster-Botz, D., R. Kelle, M. Frantzen, and C. Wandrey (1997), Substrate controlled fed-batch production of L-lysine with *Corynebacterium glutamicum*, *Biotechnol. Prog.*, **13**, 387-393
- Cuger, D. and A. Cruger (1990), *Biotechnology; A textbook of industrial Microbiology*, p2, pp67-70, pp164-169, Sinauer Associates, Inc. · Sunderland, MA 01375
- Wang, D. I. C., C. L. Cooney, A. L. Demain, P. Dunnill, A. E. Humphrey, and M. D. Lilly (1979), *Fermentation and enzyme technology*, pp101-104, p108, John Wiley & Sons. Inc.
- Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, **31**, 426