

Streptococcus zooepidemicus 유래 히알루론산의 경제적 생산을 위한 연속배양 공정 개발

김수연, 전계택*
강원대학교 의생명과학대학

Received: August 19, 2020 / Revised: September 1, 2020 / Accepted: September 7, 2020

Development of Continuous Culture Process for Economic Production of Hyaluronic Acid (HA) Biosynthesized by *Streptococcus zooepidemicus*

Soo Yeon Kim and Gie-Taek Chun*

College of Biomedical Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

A continuous fermentation process was carried out to enhance hyaluronic acid (HA) production using *Streptococcus zooepidemicus* cells. During the 1st stage continuous operation from 8 h with a dilution rate of 0.029/h (D1), HA was produced in the range of 7.5–10 g/l. During the 2nd stage from 44 h with a dilution rate of 0.036/h (D2), HA production (8.28 g/l) was initially reduced to a small extent due to increase of dilution rate from D1 to D2, and then a new pseudo-steady state was formed within a few hours with a concurrent small variations of HA production. The HA amount produced during the latter part of the 2nd stage was stably maintained in the range of 8.28–9.48 g/l, about 4.7% less amount compared to the 1st stage. Due to 24% increase of dilution rate from D1 to D2, however, maximum volumetric productivity (DP) amounting to 0.341 g/l/h was obtained at 96 h during the 2nd stage. This maximum productivity obtained from the continuous culture turned out only a small increase (3%) as compared to the corresponding batch fermentation. However, it should be noted that, in the case of batch process, one run typically consists of serial stages of growth culture plus one final production culture. This implies that, if the continuous fermentation that practically needs no dead time necessary for the multi-stage growth cultures is run for longer period, the total amount of the accumulated HA would be far greater than the amount obtained from the corresponding batch culture performed for the identical period.

Keywords: Hyaluronic acid, *Streptococcus zooepidemicus*, batch fermentation, continuous culture, dilution rate, steady state

서론

히알루론산(Hyaluronic acid) (이하 HA로 표기)은 생체친화형 바이오폴리머의 하나로 피부나 관절 등에 집중 분포되어 있는 세포간 물질이며 천연 다당류 탄수화물로 모든 생체에서 발견된다. HA는 D-글루콘산과 N-아세틸 글루코사민의 동일한 반복 분자구조를 가지고 있으며 보통 분자량은 1,000 Da–10⁷ Da의 넓은 범위로 구성되어 있다[1]. HA 성분은 골관절염 치료에 중요한 역할을 한다. 특히, HA는 뼈

와 뼈 사이에서 완충 작용을 하는 연골과 관절을 부드럽게 하도록 관절에서 분비되는 연골 활액의 한 부분이라고 할 수 있으며, 연골조직에서 HA는 분자간의 결합을 도와서 관절의 움직임과 무게에 잘 견뎌 내도록 연골을 보강해주는 역할을 한다[1, 2]. 이외에도 HA는 안과 수술시 수술 보조재 및 안구 건조증 약물의 주성분으로 사용되기도 한다. 또한 주름 및 함몰된 피부조직의 보완에도 사용되는 등, 화장품 및 성형보조 재료로서도 널리 사용되고 있다[3]. 초기에 닭 비슬에서 추출한 HA가 상업화 되었으나, 그 생산방법과 안전성이 문제가 있는 것으로 알려져 있다. 최근에는 *Streptococcus zooepidemicus*와 같은 미생물의 배양기술을 통해 분자량과 순도가 높고, 안전성이 뛰어난 고품질의 HA를 대량 생산하고 있다[4, 5].

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-8547

E-mail: gtchun8547@gmail.com

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

*S. zooepidemicus*에 의한 고점도성 대사산물인 HA 생합성은 많은 산소량을 요구하는 대사과정이므로, 배양을 통해 HA의 생산성을 증가시키기 위해서는 일정 농도 이상의 용존산소를 유지하여야 한다. 그러나 HA 생산공정에 사용되는 생산균주의 고농도 회분식 배양 시, 고분자량의 HA의 독특한 분자구조로 인해 배양 후반기에 배양액에 심각한 점도 증가 현상이 발생한다. 이로 인해 배양기 내에서 용존산소의 전달속도가 감소하여 심각한 산소 및 영양분의 고갈 현상이 나타난다. 결국 HA의 생산성이 극대화되지 못하는 결과가 초래된다[6-9].

생산균주인 *S. zooepidemicus*는 lactic acid bacteria로 catalase가 없기 때문에 배양액내에 과량의 산소가 존재할 때 균주내의 활성산소로 인한 oxidative damage로 균주의 성장이 저하되는 것으로 알려져 있다[10]. 이러한 oxidative damage를 줄이기 위해 HA 생산균주는 균주 내부로 산소의 유입속도를 낮추게 하는 여러 가지 생리적 반응을 보이는데, 특별히 HA를 생합성하여 세포막 주위로 분비하는 반응을 보인다[7, 11, 12]. 따라서 본 균주를 배양하여 HA를 고농도로 생산하기 위해서는 배양액 내의 용존산소량과 산소전달속도가 매우 중요할 것으로 판단된다. 그러나 HA의 고유의 점도로 인해, 배양액내에 생산되는 HA의 농도가 높아질수록 배양액의 점도가 높아지면서 산소전달효율이 떨어지게 되고, 이로 인해 HA 생합성 관련 유전자의 발현과 관련 효소의 활성이 저해되면서 HA의 생산성도 감소할 것으로 생각된다. 이전에 본 연구진이 실험한 연구결과에서도 회분식 배양중 배양액으로의 산소전달속도를 증가시키기 위해 통기량을 증가시키고 동시에, 발효조 교반날개의 종류 및 직경 등의 변화를 통해 충분한 양의 용존산소를 공급하였을 때, HA의 생산성이 35% 이상 증가되는 결과를 얻을 수 있었다[13].

본 연구에서는 회분식 배양의 이러한 문제점을 해결함과 동시에, 고생산성 변이주에 의한 HA의 시간당 생산성을 증가시키기 위해서, 최종 생산배양에서 연속식 배양공정을 도입하고자 하였다. 연속식 배양공정의 경우, 연속적으로 배지 교환을 해줌으로써 배양액 내에 고점도의 HA 축적으로 의한 산소전달계수가 감소하는 문제점을 해결할 수 있고, 또한 product inhibition 및 toxic 성분으로 인한 균주의 성장저해 현상을 막을 수 있을 것으로 판단된다. 또한 연속배양의 경우, 공급되는 배지의 조성과 배지공급 속도(희석속도)의 최적화를 통해, 발효조 내의 세포농도와 배양생리적 특성을 최적적으로 안정적으로 유지할 수 있어[14, 15], 용존산소 등 필수 영양분의 물질전달 제한 현상 때문에 발생하는 HA의 생산성 감소 효과를 효율적으로 방지할 수 있을 것으로 기대된다. 한편 HA 생산균주의 까다로운 영양 요구성 특성과 배양환경에 매우 민감하게 반응하는 HA 생합성 관련 효소의 활성 변화 등과 같은 생산균주의 배양생리적 특성으로 인해,

현재까지 HA 연속배양 공정 개발과 관련해서 보고된 연구 결과는 본 연구팀이 조사한 바에 의하면 극히 소수에 불과하다[15-18].

실험재료 및 방법

균주 및 균주보관

Streptococcus zooepidemicus (ATCC 39920)의 1단계 균주개량 과정을 통해 HA 생산성이 어느 정도 확인된 균주를 모균주(mother strain)로 이용하였다. 이 모균주들에 대해 다시 다양한 스크리닝 전략을 통해 개발된 HA 고생산성 변이주를 본 연구에서 사용하였다. 균주보관은 TSA (Tryptic soy agar) plate에 접종하여 1일 동안 37°C에 solid stock으로 보관하였으며 liquid stock으로 만들 때에는 50% glycerol이 함유된 증류수로 -80°C deep freezer에 냉동 보관하여, 필요시마다 꺼내어 사용하였다.

배지 및 발효조 배양 조건

배양 목적에 따라 고체배지(Tryptic soy agar) (TSA), 성장배지(GM), 개량된 생산배지(Modified production medium) (MPM)로 구분하였으며, 습식발효 시 침전과 Maillard 반응을 방지하기 위해 배지의 당과 무기염류는 농축용액으로 만들어 멸균한 뒤, 무균상태에서 나머지 배지성분 용액과 혼합하여 사용하였다. 종균 접종을 위해서 고체배지인 TSA에 균을 접종한 후 37°C에서 12시간 배양하여 형성된 단일 colony를 종균으로 사용하였으며, 이 colony를 50 ml의 성장배지가 들어있는 250 ml 플라스크에 접종한 후, 이를 진탕배양기에서 37°C, 200 rpm으로 9시간동안 1차 성장배양을 수행하였다. 1차 성장배양액을 500 ml flask(조업부피: 200 ml)에 10% 접종하여, 1차 성장배양과 동일한 배양 조건에서 2차 성장배양을 수행하였다. 이를 5 L 발효조(조업부피: 3 L)에서 최종 생산배양인 회분식 배양 또는 연속배양을 위한 접종균주(접종량: 10%)로 사용하였다. 본 연구에서 사용한 성장배지 조성은 다음과 같다: 포도당 10 g/l, Yeast extract 15 g/l, KH₂PO₄ 5 g/l, MgSO₄ 1 g/l. 발효조를 이용한 회분식 및 연속식 생산배양을 위한 배지는 이전 논문에서 최적화된 생산배지(PM) 조성에서, 탄소원인 포도당의 농도만을 이전의 30 g/l에서 40 g/l로 강화한 개량된 생산배지(MPM)를 사용하였으며, 그 배지조성은 다음과 같다: Glucose 40 g/l, Cottonseed flour 70 g/l, Corn steep liquor 24.5 g/l, NaHCO₃ 14.5 g/l, KH₂PO₄ 2.33 g/l, MgSO₄ 2.94 g/l, Glutamine 0.8 g/l, Lard oil 5 ml/l.

HA 생산을 위한 발효조 배양은 5 L top-driven 배양기를 이용하였다. pH 전극(Mettler-Toledo, Switzerland)과 용존산소 전극(Mettler-Toledo)을 통해 지속적으로 배양상태를

모니터링 하였다. 배양 도중의 지속적인 산소 공급으로 인한 배양액의 증발을 방지하기 위하여 공기공급 장치에 humidifier를 장착하였으며, sampling port를 이용하여 무균적으로 일정한 시간 간격으로 배양액을 취하였다. 배양 시점에 충분하게 공기(산소)를 공급하여 배양액이 용존산소(DO)로 포화되어 용존산소 농도가 더 이상 변화하지 않는 지점을 100% DO로 설정하였으며, 순수 질소가스를 이용하여 0 (zero) 값을 설정하였다. 용존산소 전극을 발효조의 교반축 하부에 있는 Rushton-turbine 교반날개 바로 위에 설치하였는데, 그 결과 교반으로 인해 발생하는 높은 전단응력에 의해 용존산소 전극의 fouling 현상(HA를 포함하는 고점도의 배양물들이 용존산소 전극의 멤브레인에 달라붙는 현상)이 방지되어 배양 중 용존산소 농도를 정확히 측정할 수 있었다.

pH 전극은 발효기 멸균 전에 standard solution (pH 4, pH 7)으로 미리 보정하였다. 회분식 및 연속식 배양 중 공기량은 1.0 vvm으로 일정하게 공급하였고, 배양 초기에 교반속도를 250 rpm으로 시작하여 배양액의 용존산소 농도에 따라서 최대 500 rpm까지 증가시키면서 발효기 배양을 수행하였다. 또한 거품(foam) 발생을 억제하기 위하여 소포제(antifoam)를 배양 전 미리 멸균한 뒤 발효기에 연결하여 사용하였다. 이 외에 연속배양을 위한 발효기 운전 조건은 연구결과 및 고찰 섹션에서 상세히 제시하였다.

히아루론산(HA)의 건조중량(Dry HA Weight) (DHW) 측정

HA의 건조중량(Dry HA Weight, DHW) 측정을 위해, 배양액을 4,000 rpm, 30분간 원심분리하여 균체가 제거된 상등액을 얻은 후, 55°C에서 60분 동안 180 rpm의 속도로 이 상등액을 교반하며 열을 가해준 후, 이로부터 단백질 성분을 제거하기 위해 1.5 ml tube를 이용하여 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 그 후 상등액에 8배량의 99.5% 에틸알코올을 서서히 가하고, 4°C에서 12시간 방치하여 HA를 침전시킨 다음, HA가 포함된 용액을 회수하였다. 회수한 용액을 weighing dish에 담아 80°C에서 12시간 건조시킨 후, 그 중량을 측정하여 g/l의 농도로 환산하였다. 이 때, Lowry method를 기반으로 한 DC protein assay (bio-rad, #5000111) 방법을 이용하여 측정된 단백질 양을 제거해줌으로써, 시료로부터 순수한 HA 건조중량을 계산하였다.

Carbazole assay를 이용한 히아루론산(HA) 농도 측정

HA의 건조중량을 측정하기 위해 배양액의 시료로부터 상등액을 취하여 에틸알코올에 침전시키는 과정까지는 동일하게 진행되었다. 2번의 에탄올 침전과정으로 얻은 시료(정제된 HA 용액)를 다음과 같은 carbazole 분석법에 의해 정량하였다[19]; 0.025 M sodium tetraborate·10H₂O가 용해된 H₂SO₄ 시약 2.5 ml에 시료 0.5 ml을 첨가한 후 99°C에서

10분간 가열하였다. 서서히 식힌 후에, 0.125% carbazole 시약을 0.1 ml 첨가하고, 다시 15분 동안 가열한 후 반응을 종결시켰다. Carbazole 비색반응을 마친 시료를 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 530 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

배양액 중의 잔류 포도당 분석

탄소원이자 에너지원으로 첨가된 잔류 포도당의 분석은 영동제약의 당분석 kit를 이용하여 수행되었다. 배양액을 10배 희석 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 분리한 후 3 µl의 시료에 240 µl의 G1을 첨가하여 5분간 반응시킨 후, 60 µl의 G2를 첨가하여 발색반응이 일어나도록 5분간 반응시켰다. 발색반응이 일어난 시료에 606 µl의 증류수를 첨가하여 준 후, Spectrophotometer를 이용하여 550 nm 파장에서 OD 값을 측정하고 glucose standard를 이용하여 배양액에 남아있는 포도당의 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

S. zooepidemicus 균주는 생리학적 특성상, 산소호흡 과정 중 발생하는 oxidative damage에 대처하기 위해, 세포 내로 산소의 유입속도를 낮추고자 HA를 생합성하여 이를 세포막 주위로 분비하는 것으로 알려져 있다[7, 10–12]. 따라서 본 균주를 배양하여 HA를 고농도로 생산하기 위해서는 배양액 내로 원활한 용존산소 전달이 필수적이다. 그러나 고분자 HA의 고유의 특성인 고점도로 인해, 회분식 배양으로 생산되는 HA의 농도가 증가할수록 배양액의 점도가 높아지면서 산소 전달 효율이 점차 감소하게 된다. 결과적으로 생산균주의 HA 생합성 관련 유전자의 발현과 효소의 활성이 저해되면서 HA의 생합성 능력이 감소할 수 있을 것으로 판단하였다. 따라서 본 연구에서는 회분식배양 공정의 후반부에 고점도성의 HA 축적으로 인한 산소전달속도의 감소 문제점을 해결함과 동시에, product inhibition 및 toxic 성분 축적으로 인한 균주의 성장저해 현상 등의 문제점을 함께 해결하고자, 최종 생산배양에서 연속식 배양공정을 적용하는 연구를 수행하였다.

연속배양 공정 개발 시 우선 고려해야 할 점은 생산배지의 공급시점과 공급속도이다. 배지 공급 시점에 따라 그 이후의 배양과정 동안 생산균주의 HA 생합성 활성이 영향을 받을 수 있으며, 그에 따른 metabolic flux의 변화로 인해 HA의 생산성이 달라질 수 있기 때문이다[20]. 배지의 공급시점은, 균주의 HA 생합성 능력이 활발히 유지되는 구간에서 이루어져야 하는데, 그 이유는 HA의 생산속도가 감소하기 시작하는 구간에서 배지를 공급하는 경우, HA의 생합성 능력은 낮으나, 세포 성장속도가 높은 균주들이 배양액을 우

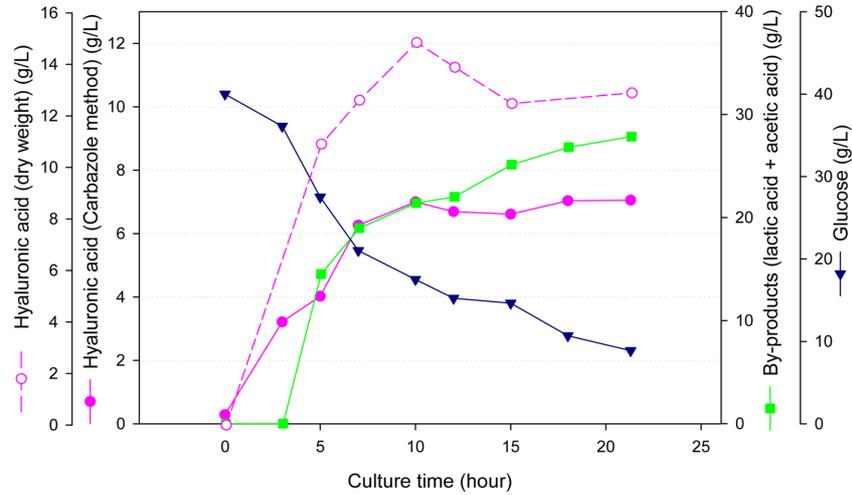


Fig. 1. Time-course profiles of the concentrations of hyaluronic acid (HA) measured by dry weight and Carbazole method, lactic acid, acetic acid and glucose in the batch culture of *S. zooepidemicus* performed with a modified production medium (MPM) in a 5 L bioreactor.

점하는 현상이 발생할 수 있기 때문이다.

Fig. 1에 연속배양에서의 배지공급 시점과 연속배양 결과와의 비교를 위해, 대조군으로서 5 L 발효조에서 최대 500 rpm까지의 교반속도로 수행한 회분식 배양결과를 제시하였다. 이 배양에서는 이전 논문에서 최적화된 생산배지(PM)의 조성에서, 탄소원인 포도당의 농도만을 10 g/l 더 증가시킨, 개량된 생산배지(MPM)를 사용하였다. 배양 결과, 10시간 경과까지는 높은 속도로 HA를 생산하다가, 그 이후에는 생산량(농도)이 거의 일정하게 유지되는 경향을 보이는데, 이 결과에 근거해서 연속배양 시 8시간 경에 배지공급을 시작하기로 결정하였다. 또한 회분식 배양 시 지수성장기에서의 평균 포도당 소모속도(0.112 g/min)를 참고해서, 연속배양 중 이와 비슷한 양을 생산균주에게 제공하기 위해, 2배 농축(2X)된 조성의 개량생산배지(MPM)를 1.45–1.8 ml/min의 속도로 발효조로 공급하였다. 이와 같이 비교적 낮은 공급속도에서도 연속배양 공정이 제대로 수행되고 있는지 확인하기 위해, 5 L top-driven 배양기(3 L 조업부피)의 내부와 배양기로부터 유출된 배양액을 동시에 샘플링 하여 각 배양변수를 비교 분석하였다. 그 결과 발효조 내부와 발효조 유출액의 HA 농도 및 잔류 포도당 농도가 거의 차이가 나지 않은 것으로 확인되어, 본 논문에서는 샘플의 재현성 및 안정성이 다소 높게 나타난 발효조 내부의 샘플에 대한 분석 결과를 제시하였다.

Fig. 2A에 제시한 대로, 이전의 회분식 연구결과를 반영하여 배양기간 내내 pH는 7.2–7.5, 온도는 37°C로 유지하였고, 공기는 전 배양기간 동안 1 vvm으로 일정하게 공급하였다. 반면 교반속도는 초기에 250 rpm으로 시작하여, 연속배

양 중 생산균주의 산소요구량을 충분히 만족시키기 위해 500 rpm까지 증가시켰다. 연속배양을 위해, 약 8시간까지 회분식으로 배양을 진행하다가, 연동펌프를 가동하여 배지공급을 시작하였는데, 이 때 희석속도(D)를 0.029/h (1.45 ml/min)로 시작하여 배양 44시간 경에 0.036/h (1.8 ml/min)로 증가시킨 후, 배양 종료시점(약 96시간)까지 이 희석속도를 유지하였다.

Fig. 2B에 제시한 바와 같이, 회분식 배양 종료시점인 8시간의 HA의 생산량은 3.85 g/l이었으며, 희석속도가 0.029/h(D1)인 1단계 연속배양 기간 동안 초기부터 꾸준히 증가하다가, 배양 약 24시간에서 44시간까지 HA의 생산농도가 7.5–10 g/l (건조 HA인 경우는 13.97–14.2 g/l)로 거의 일정한 가정상상태(pseudo steady state)에 도달하는 것으로 보인다. 이후 배양 44시간 경에 희석속도를 0.036/h(D2)로 증가시킨 결과, 희석속도의 변화로 인해, 잠시동안 안정적인 배양상태가 해제되었으며, 그 결과 HA 생산농도가 8.28 g/l (건조 HA인 경우는 11.63 g/l)까지 일시적으로 감소하다가, 다시 새로운 가정상상태에 접근해 가는 것으로 보인다. 이 경우의 HA 생산농도는 8.28–9.48 g/l (건조 HA의 경우는 11.0–13.37 g/l)로서, 희석속도가 D1인 1단계 연속배양의 경우에 비해 4.7% 정도 약간 감소한 상태로, 배양 종료시점까지 비교적 안정적으로 유지되는 것으로 나타났다.

한편 상기 데이터에서 건조된 HA 농도가 carbazole 방법에 의한 분석 수치보다 더 높게 나타났는데, 그 주된 이유는 세포 외부로 덜 분비된 HA를 자신들의 표면에 부착하고 있는 세포들 때문으로 보인다. 즉, 이 세포들의 일부가 원심분리 과정에서 완전하게 분리되지 않은 채로 상등액에 일부 포

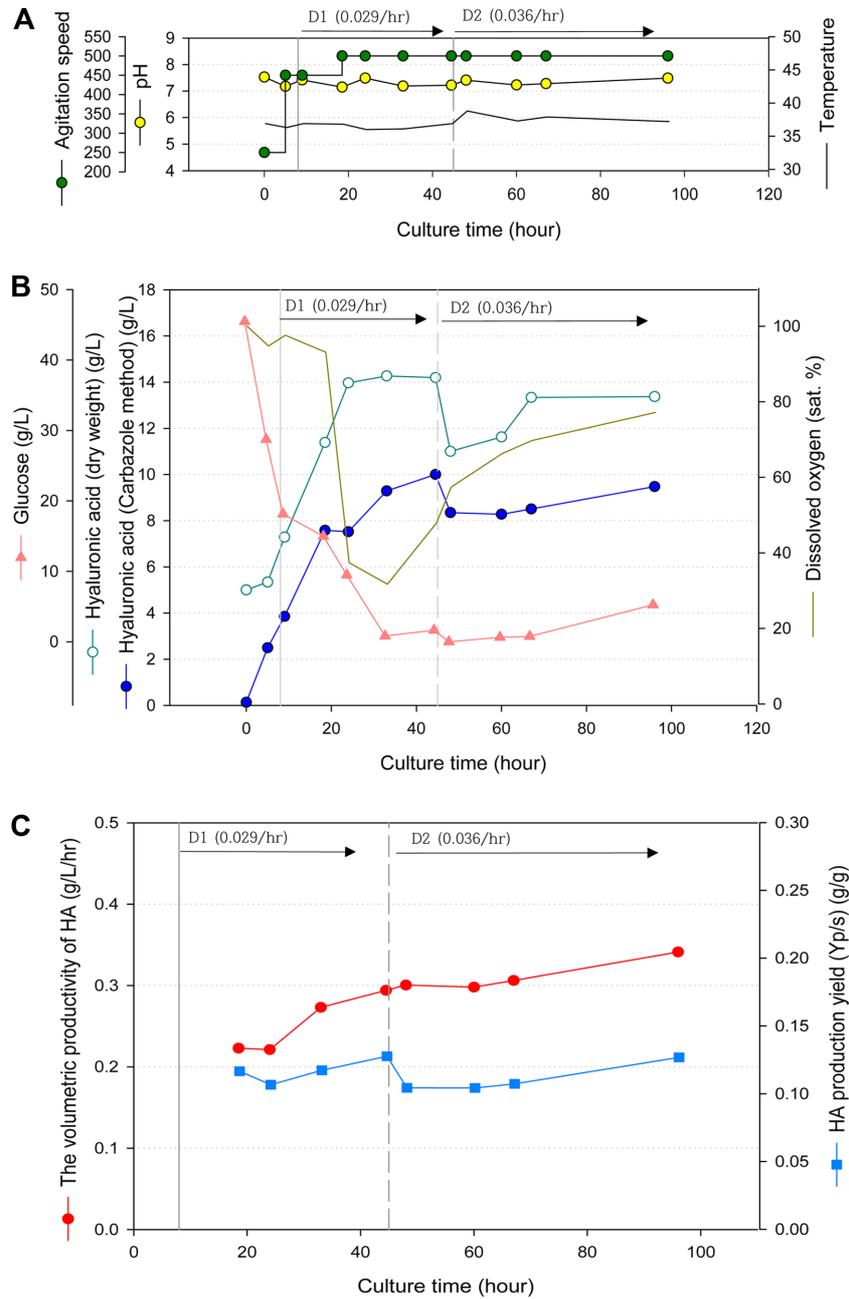


Fig. 2. Time-course profiles of fermentation parameters in the continuous culture of *S. zoepidemicus* performed with a modified production medium (MPM) in a 5 L bioreactor. Batch operation was carried out just prior to the start of the 1st stage continuous culture at 8 h with a dilution rate of 0.029/h (D1), and then followed by the 2nd stage continuous culture at 48 h with a dilution rate of 0.036/h (D2) until the end of the fermentation (96 h): (A) Agitation speed (rpm), pH and temperature, (B) The concentrations of glucose, hyaluronic acid(HA), lactic acid(LA) and dissolved oxygen(DO), (C) The volumetric productivity of HA (DP) (D: dilution rate, 1/h; P: HA concentration, g/l) and HA production yield based on glucose (Y_{p/s}).

함되어, 최종 건조된 HA 양에 포함되기 때문으로 판단된다 (반면 carbazole 분석법에 의해서는 세포 외로 분비된 HA 양만 측정됨). 이와 같이 희석속도를 D1에서 D2로 약 24% 증

가시킴에 따라 HA의 생산농도가 감소하는 이유는 생산균주의 HA 생합성 패턴이 어느 정도 세포성장과 연관(partially growth-associated pattern)되어 있기 때문으로 보이는데, 실

제로 희석속도의 증가로 인해 배양기 내 세포농도가 다소 감소하면서 발생한 현상으로 판단된다. 즉 D2 희석속도에서는 시간이 경과함에 따라 생산균주의 비성장속도(specific growth rate)에 비해 D2인 희석속도가 다소나마 더 높기 때문인 것으로 보인다. 실제로 생산균주의 활발한 대사활동으로 배양 약 36시간 까지 용존산소 농도가 급격하게 감소하다가 그 이후 점차로 증가하는 것으로 나타났는데(Fig. 2B), 그 이유는 약 18.5시간에 교반속도를 450 rpm에서 500 rpm으로 증가시킨 결과, 산소물질전달계수(k_La)의 증가로 인해 배양액으로의 용존산소 공급속도(OTR)가 증가한 것이 우선적인 원인인 것으로 보인다. 또한 2단계 연속배양에서 시간에 따른 용존산소 농도의 증가 현상과 병행해서, 잔류 포도당의 농도도 초반부에 거의 0(zero)를 유지하다가 약 60시간부터 소량씩 증가하는 현상이 관찰되었다. 이 결과로부터, 본 균주는 2단계 배양 중반부터 탄소원 이외의 다른 필수 배지 성분이 부족한 영양 불균형 상태를 겪고 있는 것으로 보이며, 이로 인해 세포비성장속도가 어느 정도 감소한다고 해석할 수 있었다. 사실 상기의 추론을 보다 정확하게 뒷받침하기 위해서는 실제로 배양 시간에 따른 세포농도를 측정해야 하지만, 생산균주들이 배양액에 고점도로 존재하는 HA와 분리할 수 없을 정도로 복잡하게 엮인 상태로 존재하기 때문에, 정확한 세포농도(X) (g cell)의 측정이 불가능한 문제점이 발생하였다. 한편 본 연구에서는 용존산소 전극을 교반축 하부에 있는 Rushton-turbine 교반날개 바로 위에 설치하

여, 강력한 교반으로 인해 발생하는 전단응력으로 인해 용존산소 전극의 fouling 현상(HA를 포함하는 고점도의 배양물들이 용존산소 전극의 멤브레인에 달라붙는 현상)을 방지하여 배양 중 용존산소의 농도를 정확하게 측정할 수 있었다.

Fig. 2C에 배양시간에 따른 HA의 부피생산성(DP) (희석속도 × HA 생산농도) [g/l/h]을 제시하였다. D1 및 D2 각각의 희석속도로 연속배양을 수행하였으므로, 각 희석속도에서의 부피생산성 변화 경향은 Fig. 2B에 제시한 HA 생산농도 변화 경향과 동일하게 나타났다. 주목할 점은 배양 44시간에 희석속도를 D1에서 D2로 약 24% 증가시킨 결과, D2에서 HA의 부피생산성(DP)이 D1 대비 더 높은 경향을 보여준다는 점이다. 그 결과, 공급배지의 희석속도가 D2, 즉 0.036/h이면서, 잔류 포도당의 농도가 약 5.2 g/l인 배양 96시간에서 HA 생산성이 0.341 g/l/h로서 가장 높은 것으로 나타났다. 연속배양중 탄소원이자 에너지원인 포도당에 대한 HA 생산수율($Y_{p/s}$)도 Fig. 2C에 함께 제시하였다. 여기서 HA 생산수율($Y_{p/s}$)은 다음과 같이 기질(S)인 포도당과 생산물(P)인 HA의 물질수지식을 적용하여 계산하였다: 즉 각 희석속도에서 포도당과 HA의 농도가 정상상태에 도달하였다고 가정하고, $P = Y_{p/s} (S_0 - S)$ (여기서 S_0 = 공급되는 포도당 농도; P와 S는 특정 희석속도에서 정상상태인 HA와 포도당의 농도) 식을 적용하였다. 희석속도에 따른 HA 생산수율($Y_{p/s}$)은 D1의 경우 0.107–0.128 g HA/g glucose, D2의 경우 0.104–0.127 g HA/g glucose의 범위에 존재하는 것으로 계

Table 1. Comparison of the major fermentation parameters among the batch and continuous bioreactor cultures performed by our research group, and other continuous cultures carried out by other groups such as Reference 15, 16, 17 and 18, respectively.

Fermentation parameters		Residual glucose concentration (S)(g/l)	Maximum HA production (P)(g/l)	HA production yield based on glucose ($Y_{p/s}$) (g/g)	Volumetric HA production rate (DP) (g/l/h)	Remarks
Bioreactor operation						
	*Batch culture	8.89	7.05	0.227	0.331	†Modified production medium (MPM) used
	**Continuous culture					
	0.029 (D1)	1.66	10.00	0.128	0.29	†2X MPM supplied
	0.036 (D2)	5.24	9.48	0.127	0.341	†2X MPM supplied
Other continuous cultures	0.02		N.A		0.117	Reference #16
	0.07		2.5		0.175	Reference #17
	0.10		0.145		0.015	Reference #18
	0.40		0.66 ± 0.04		0.264	Reference #15

*The parameters of the batch bioreactor culture were calculated based on the data until 21.3 h of fermentation.
 **Batch operation was carried out just prior to the start of the 1st stage continuous culture at 8 h with a dilution rate of 0.029/h (D1), and then followed by the 2nd stage continuous culture at 48 h with a dilution rate of 0.036/h (D2) until the end of the fermentation (96 h).
 †The modified production medium (MPM) consists of the same composition as the previously used production medium (PM) except glucose concentration, which is 40 g/l instead of 30 g/l of the PM. During the continuous operation, 2 times concentrated (2X) MPM was supplied during the whole fermentation period.

산되었다. 한편 연속배양 공정의 중요 배양변수인 q_p (specific production rate)[g HA/g cell/l], q_s (specific substrate uptake rate)[g glucose/g cell/l] 및 세포당 생산수율($Y_{p/x}$) (g HA/g cell)은, 이미 언급한 대로, 고점도의 HA와 함께 묻쳐 있는 생산균주를 따로 분리할 수 없어, 정확한 세포농도(X) (g cell)의 측정이 불가능하였기 때문에 본 연구결과에는 제시하지 않았다.

Table 1에 대조군으로 수행한 회분식 배양과, D1과 D2에서의 연속배양에서 얻은 주요 배양변수들의 값을 비교 제시하였다. 포도당 기준 HA 생산수율($Y_{p/s}$)의 경우, 회분식 배양이 0.227 g HA/g glucose로 연속배양(0.128 g/g) 대비 약 44% 더 높은 것으로 나타났다. 이는 회분식 배양에서 생산균주들이 연속배양에 비해 탄소원이자 에너지원인 포도당을 더 효율적으로 HA 생합성 쪽으로 사용하고 있음을 의미하는데, 이러한 연속배양의 저조한 결과에 대해 다음과 같이 해석할 수 있었다: 본 연구에서 사용한 생산배지는 회분식 배양에서 HA를 ‘partially growth-associated pattern’으로 생합성하는 생산균주의 배양생리적 특성에 맞추어서 최적화된, 어느 정도 불균형적인 배지조성임에 유의할 필요가 있다. 그 결과, 이미 언급한 대로, 이러한 회분식 배양용 최적 배지가 연속배양 공정에 적용되었을 때, 불균형 조성비로 인해 세포비성장 속도가 낮기 때문에 시간이 경과함에 따라 용존산소 농도가 점차 증가하는 경향을 확인한 바 있다(Fig. 2B). 실제로 Shah 등[21]은 HA의 생합성 기작을 조사한 연구에서, glucose-6-phosphate 및 fructose-6-phosphate와 같은 대사전구체 물질(즉 이화작용의 탄소골격물질)들이 HA 생합성 경로 및 그 외의 다른 3가지 경로(pentose phosphate 경로, 해당작용 및 세포벽 생합성 경로)로 경쟁적으로 사용되므로, 궁극적으로는 세포성장과 HA의 생합성이 서로 경쟁적인 관계에 있음을 보고한 바 있다. 따라서 효율적인 연속배양 공정을 개발하기 위해서는, 생산균주의 HA 생합성 기작 및 배양생리적 특성에 기반해서, 연속배양에 적합한 최적 생산배지, 즉 대사전구체 물질(즉 이화작용의 탄소골격물질)들이 세포성장 경로와 HA 생합성 경로로 균형적으로 이용되어, 궁극적으로는 HA가 ‘growth-associated mode’로 생합성되는 생산배지 개발이 필수적으로 보인다. 또한 새롭게 개발된 배지조성 하에서, 연속배양 공정에 적합한 배양생리적 특성을 갖는 변이주들의 개발도 병행되어야 함을 알 수 있다.

반면에 가장 중요한 배양변수인 최대 HA 부피생산성(DP) 면에서는, D2의 연속배양이 대조군인 회분식 배양(21.3시간 기준)에 비해 3% 정도 소량 증가(0.341 vs. 0.331 g/l/h) 하는 것으로 나타났다. 비록 그 증가폭이 미미하지만, 연속배양 공정의 경우, 회분식 배양에서는 반드시 요구되는 다단계의 성장발효조 배양 단계를 거치지 않고도, 최종 연속배양 공정만

을 장기간 운영할 수 있는 매우 큰 공정상의 이점에 주목할 필요가 있다. 즉 산업용 회분식 배양 공정의 경우, 최종 대규모 생산발효조를 Lag-phase 없이 효율적으로 운전하기 위해서는, 반드시 다단계 성장배양 과정을 거치면서 충분히 번식한 일정량의 생산균주를 최종 생산발효조로 접종(약 10% v/v)하여야 한다. 따라서 한 Cycle의 회분식 배양공정을 운영하는 데 걸리는 전체 배양시간은 실제로 ‘다단계 성장발효조 배양 기간 + 최종 생산발효조 배양 기간’으로 구성된다. 반면에 다단계 성장배양 단계를 필요로 하지 않는 연속배양 공정의 경우, 균주의 생산 안정성만 유지된다면 그 생산배양 기간도 연장할 수 있어서, 시간당 HA 부피생산성 면에서 볼 때, 회분식 배양 대비 큰 폭으로 증가될 수 있는 공정상의 큰 장점이 존재한다. 실제로 Table 1에 제시한 회분식 배양의 평균 부피생산성을 계산할 때, 최종 생산발효조를 운전한 기간인 21.3시간만을 기준으로 계산하였으므로, 실제 다단계 성장발효조 배양을 위해 필요한 추가시간까지 고려한다면 그 부피생산성은 연속배양 대비 큰 폭으로 감소할 것으로 판단된다. 또한 연속배양 공정을 도입할 경우, 회분식 배양에서 나타나는 문제점인 매 회분배양 후 대규모의 발효조를 세척, 멸균하는 비효율적인 공정을 제거할 수 있는 장점도 더불어 강조되어야 할 것으로 보인다.

참고삼아, Table 1에 현재까지 HA를 생산하기 위해 연속배양 공정을 적용한 다 연구팀들의 시간당 부피생산성도 함께 제시하였다[15–18]. 생산균주의 배양 생리적 특성, 생산배지 조성 및 배양 환경 등에 있어서 실로 다양하게 차이 나지만, 이번 실험에서 본 연구팀이 얻은 HA 부피생산성을 다른 연구팀들이 보고한 수치(0.015–0.264 g/l/h)와 비교하면, 비록 연구 초반기의 결과임에도 불구하고, 1.3–22.7배 정도 더 높음을 알 수 있다. 따라서 지속적인 연속배양용 균주 개량, 생산배지 및 발효조 운전조건 최적화 등의 연구를 통해, 효율적인 HA 연속생산 공정이 개발될 경우, 전통적인 회분식 배양공정을 대체할 수 있는 경쟁력 있는 공정이 될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구에서는 히아루론산(Hyaluronic acid) (HA)의 시간당 부피생산성(g/l/h)을 증가시키기 위해, 이전의 회분식 배양결과를 바탕으로 *S. zoepidemicus*를 이용한 연속식 배양공정을 개발하고자 하였다. 약 8시간까지 회분식으로 발효조를 운영한 후, 0.029/h의 희석속도(D1)로 48시간까지 1단계 연속배양을, 그 후 약 96시간까지 0.036/h의 희석속도(D2)로 최종 2단계 연속배양을 수행하였다. 회분식 배양 말기에 HA의 생산량은 3.85 g/l이었으며, 1단계 연속배양 기간 동안에는 7.5–10 g/l(건조 HA인 경우는 13.39–14.2 g/l)의 농도로

생산되었다. 계속된 2단계 연속배양에서는, 희석속도의 증가로 인해, 초반에 잠시 HA 생산성이 8.28 g/l (건조 HA인 경우는 11.63 g/l)까지 감소하다가, 서서히 증가하면서 다시 새로운 정상상태로 접근해 가는 현상을 관찰할 수 있었다. 2단계 연속배양에서의 HA 생산량은 약 8.28–9.48 g/l (건조 HA의 경우는 11.0–13.37 g/l) (1단계 연속배양 대비 약 4.7% 소량 감소)로서, 배양 종료까지 비교적 안정적으로 유지되는 것으로 나타났다. 그렇지만 HA의 부피생산성(DP)=(희석속도 × HA 생산농도)(g/l/h)은 희석속도를 D1에서 D2로 약 24% 증가시킨 결과, 2단계 기간인 배양 약 96시간 경에 최대 0.341 g/l/h에 이르는 것으로 관찰되었는데, 이는 대조군으로 수행한 회분식 배양의 평균 부피생산성(0.331 g/l/h)에 비해 3% 가량 소량 증가된 수치이다. 하지만, 연속배양 공정의 경우, 회분식 배양에서는 반드시 요구되는 다단계의 성장배양 단계를 진행하지 않고도, 최종 생산배양 공정만을 연속적으로 수행할 수 있으므로, 회분식 배양공정의 전체 배양시간(즉 다단계 성장발효조 배양 기간 + 최종 생산발효조 배양 기간)을 기준으로 비교한다면, 연속배양의 HA의 부피생산성이 회분식배양 대비 큰 폭으로 향상될 수 있을 것으로 판단된다. 한편 본 연속배양 연구에서 사용한 생산배지는 회분식 배양에서 생산균주의 배양생리적 특성에 맞추어서 최적화된 배지임을 고려할 때, 연속배양 공정에 적용될 수 있는 최적배지가 개발된다면, 장기간 생산 안정성을 유지하면서 동시에 부피생산성도 증가하는, 경제적인 연속배양 공정이 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgment

This work was carried out by the support of "STR Biotech Co., Ltd, South Korea".

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Kogan G, Šoltés L, Stern R, Gemeiner P. 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett.* **29**: 17-25.
- Schanté CE, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF. 2011. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **85**: 469-489.
- Kim KH, Kim KT, Kim YH, Kim JG, Han CS, Park SH, Lee BY. 2007. Preparation of oligo hyaluronic acid by hydrolysis and its application as a cosmetic ingredient. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **33**: 189-196.
- Liu L, Liu Y, Li J, Du G, Chen J. 2011. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb. Cell Fact.* **10**: 99.
- Schiraldi C, La Gatta A, De Rosa M. 2010. Biotechnological production and application of hyaluronan. *Biopolymers.* **20**: 387-412.
- Kim SJ, Park SY, Kim CW. 2006. A novel approach to the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 1849-1855.
- Duan XJ, Niu HX, Tan WS, Zhang X. 2009. Mechanism analysis of effect of oxygen on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 299-306.
- Duan XJ, Yang L, Zhang X, Tan WS. 2008. Effect of oxygen and shear stress on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 718-724.
- Zhang X, Duan XJ, Tan WS. 2010. Mechanism for the effect of agitation on the molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chem.* **119**: 1643-1646.
- Pedersen MB, Gaudu P, Lechardeur D, Petit MA, Gruss A. 2012. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **3**: 37-58.
- Cleary PP, Larkin ANNICE. 1979. Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A streptococci. *J. Bacteriol.* **140**: 1090-1097.
- Condon S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* **3**: 269-280.
- Kim SY. 2015. *Strain Improvement and Bioprocess Optimization for Industrial Production of Hyaluronic Acid*. M.S. Kangwon National University, Republic of Korea.
- Herbert D, Elsworth R, Telling RC. 1956. The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *Microbiology* **14**: 601-622.
- Blank LM, McLaughlin RL, Nielsen LK. 2005. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. *Biotechnol. Bioeng.* **90**: 685-693.
- 張利燮, 鄭教民. 1987. Chemostat Culture 에서의 Hyaluronic Acid 生産에 關한 研究. *KSBB J.* **1**: 25-28.
- Ellwood DC, Evans CGT, Dunn GM, McInnes N, Yeo RG, Smith KJ, 1995. Fermentech Medical Ltd., Edinburgh, UK, assignee. Production of hyaluronic acid. US Patent 5,411,874.
- Ståhl, S. 2003. U.S. Patent No. 6,537,795. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Bitter T. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* **4**: 330-334.
- Chen SJ, Chen JL, Huang WC, Chen HL. 2009. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. *Korean J. Chem. Eng.* **26**: 428-432.
- Shah MV, Badle SS, Ramachandran KB. 2013. Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. *Biochem. Eng. J.* **80**: 53-60.