

히알루론산 생산성 향상을 위한 *Streptococcus zooepidemicus* 균주 개량 및 발효조 배양공정 최적화

김수연, 전계택*
강원대학교 의생명과학대학

Received: August 19, 2020 / Revised: September 1, 2020 / Accepted: September 2, 2020

Strain Improvement and Bioprocess Optimization for Enhanced Production of Hyaluronic Acid(HA) in Bioreactor Cultures of *Streptococcus zooepidemicus*

Soo Yeon Kim and Gie-Taek Chun*

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

Strain improvement and bioprocess development were undertaken to enhance hyaluronic acid(HA) production by *Streptococcus zooepidemicus* cells. Using a high-yielding mutant strain, statistical medium optimization was carried out in shake flask cultures, resulting in 52% increase in HA production (5.38 g/l) at the optimal medium composition relative to the parallel control cultures. For sufficient supply of dissolved oxygen (DO), which turned out to be crucial for enhanced production of HA, agitation system and speed were intensively investigated in 5 L bioreactor cultures. Increase in oxygen mass transfer coefficient (k_{LA}) through increment of agitation speed (rpm) and 35% expansion of diameter of the newly-designed impellers showed significantly positive effects on HA production. By installing an expanded Rushton-turbine impeller for efficient break-down of sparged air, and an extended marine impeller above the Rushton-turbine impeller for efficient mixing of the air-born viscous fermentation broth, maximum amount of HA (9.79 g/l) was obtained at 450 rpm, 1.8 times higher level than that of the corresponding flask culture. Subsequently, the possibility of bioprocess scale-up to a 50 L bioreactor was investigated. Despite almost identical maximum HA production (9.11 vs 9.25 g/l), the average HA volumetric productivity (r_p) of the 50 L culture turned out only 74% compared to the corresponding 5 L culture during the exponential phase, possibly caused by shear damages imposed on the producing cells at the high stirring in the 50 L culture. The scale-up process could be successfully achieved if a scale-up criterion of constant oxygen mass transfer coefficient (k_{LA}) is applied to the 50 L pilot-scale bioreactor system.

Keywords: Hyaluronic acid, *Streptococcus zooepidemicus*, statistical medium optimization, agitation system, scale-up of bioreactor cultures

서론

히알루론산(Hyaluronic acid) (이후 HA로 표기)는 glucuronic acid와 N-acetylglucosamine의 disaccharide가 beta(1-3), beta(1-4)의 글리코시드 결합에 의해 2,000–20,000개로 연결된 unbranched glycosaminoglycan이다. HA는 extracellular

matrix의 주성분으로, 척추동물의 결합조직, 상피조직, 신경조직에서 발견된다. In vivo에서 분자량이 10^3 – 10^8 Da 범위에 분포하며, 높은 분자량과 구조적 특성으로 인해 점탄성, 흡수성, 생체적합성, 생분해성 등의 특성을 갖고 있다[1]. 이러한 물리화학적 특성으로 인해, HA는 관절치료제, 필러, 화장품, 점안제, 건강식품, 약물전달 재료 등의 다양한 분야에서 응용되고 있다[1–3]. HA의 세계 시장은 2016년에 약 72억 US\$에 달하였으며 2027년에는 약 166억 US\$의 규모로 성장될 것으로 예측되고 있다[4].

초기에는 닭 벼슬에서 추출한 HA가 최초로 상업화 되었

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-8547

E-mail: gtchun8547@gmail.com

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

으나, 최근에는 생물공학 기술의 발전으로 *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus thermophilus*, 재조합 *Bacillus subtilis*, 재조합 *Escherichia coli*와 같은 고생산성의 미생물들의 배양에 의해 고순도 및 고안정성의 HA를 생산하고 있다[5-8]. 미생물 배양을 통해 HA의 생산성을 증가시키려는 시도는, 주로 생산균주의 생화학적 특성 및 배양생리학적 특성의 이해에 기반한 고생산성 변이주 개발 및 배양공정 최적화 방법을 통해 이루어져 왔다[9-20]. HA의 생합성 경로를 요약하면 다음과 같다: 탄소원이 glucose-6-phosphate와 fructose-6-phosphate로 변형된 후, Has operon (hyaluronan synthase, UDP-glucose dehydrogenase, UDP-glucose pyrophosphorylase, N-acetyl-glucosamine-1-phosphate uridylyltransferase, glucose-6-phosphate isomerase)으로부터 발현된 효소들에 의해 HA의 구성단위인 disaccharide가 우선 생합성된다[10, 21]. 이 HA 생합성 경로에서 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 밀접하게 경쟁적인 관계에 있음을 제시하였다. 따라서 Shah 등은 *S. zooepidemicus*를 이용한 배양에서 전구체 물질들을 더 높은 비율로 HA 생합성 경로로 보내기 위해, 배양 중 sodium iodoacetate와 같은 해당작용(glycolysis) 저해제를 첨가하거나[22], Has operon 유전자들의 과발현 전략을 통해, HA의 생산성과 분자량이 약 2배 이상 증가하는 주목할 만한 연구결과를 보고한 바 있다[9]. 또한 많은 연구자들이 생체적용용의 의료용 HA를 과량 생산하기 위해, 대표적인 GRAS (generally recognized as safe) 미생물들인 *E. coli* [8], *C. glutamicum* [5], *Lactococcus lactis* [6, 10] 등에 Has operon 유전자들을 도입하여 HA 고생산성의 재조합 균주들을 개발하였고, 특별히 Cheng 등[5]의 경우 재조합 *C. glutamicum*의 배양을 통해 1 MDa 이상 고분자성 특성을 갖는 HA를 최대 8 g/l 이상 생산하는데 성공하였다.

본 연구에서 HA를 생산하기 위해 사용한 균주는 *S. zooepidemicus*로서 비호흡성의 특성도 가지고 있는 젖산균(lactic acid bacteria)의 일종이다. 이 균주는 혐기성 배양환경에서는 이화작용에 의한 에너지 생산을 위해 젖산을 최종 발효산물로 생산한다[23]. 한편 호기성 배양환경에서는 최종 전자수용체로 산소를 이용하는 respiration chain을 통해 더 높은 수율의 에너지를 얻고, 이로 인해 세포 생산성도 증가하지만, 배양액에 과량의 산소가 존재될 경우 균주 자체의 catalase가 존재하지 않기 때문에, 균주의 호흡과정 중에 발생하는 활성산소로 인한 oxidative damage로 인해 균주의

성장이 저하된다고 보고되었다[24, 25]. 활성산소의 이와 같은 부정적인 영향에 대처하기 위해, 이 균주는 세포내로 산소의 유입속도를 낮추게 하는 여러 가지 생리학적 반응을 보이는데, 그 중에서도 특히 HA를 세포막의 캡슐로 사용하기 위해 이를 생합성하여 세포외로 분비하는 반응이 잘 알려져 있다[19, 23, 25]. 특별히, 이 균주는 이화작용 중 TCA cycle 중 일부만(branched TCA cycle)을 운영하기 때문에, 온전한 TCA cycle을 돌리는 대다수 미생물들에 비해, 동화작용에서 고분자물질의 전구체로 이용되는 탄소골격물질들(carbon skeletons)이 제대로 공급되지 않아, 배양 중 그 영양 요구성이 비교적 까다로운 것으로 보고되었다[23, 26, 27]. 따라서 본 균주의 배양을 통해 HA를 고농도로 생산하기 위해서는, 이 균주의 이와 같은 생화학 및 배양생리학적 특성에 대한 이해가 우선되어야 하며, 또한 배양액 내의 용존산소량과 산소전달속도 등 물리화학적 배양환경 조절이 매우 중요할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 HA의 생산성을 증가시키기 위해, 모균주(mother strain)로부터 우량균주를 직접 선별할 뿐만 아니라, 돌연변이원인 EMS와 UV를 이용해서 scale-up 배양에도 적합한 고생산성 및 고안정성 특성을 갖는 우량변이주를 개발하고자 하였다. 또한 생산균주의 까다로운 배양생리학적 특성을 최대한 HA 생산성 증가로 유도하기 위해, 반응표면분석법(response surface method) (RSM)을 이용한 통계학적 배지 최적화 연구를 수행하였다. RSM을 최종적으로 적용하기 위해 one-factor-at-a-time (OFAT), full factorial design (FFD), steepest ascent method (SAM) 실험들을 순차적으로 실행하였다. 또한 선별된 우량균주와 최적화된 생산배지를 이용하여 5 L 발효조에서 회분식배양 공정 최적화 연구를 수행하였다. 특별히 용존산소 공급과 밀접하게 관련 있는 발효조의 교반날개 설계, 교반속도 및 통기량 등의 발효조 수준에서의 배양환경 조사를 통해 HA 생산성을 증가시키고자 하였다. 최종적으로는 5 L 발효조에서 최적화된 배양 조건을 50 L 발효조 배양에 적용하는 scale-up 배양도 수행함으로써, 발효조 배양을 통한 HA 대량생산의 산업화가 가능성을 확인하고자 하였다.

참고삼아, HA 고생산성 변이주 개발, 통계적 생산배지 최적화, 발효조 배양공정 개발, 배양공정 scale-up까지 생물공정 전반에 대한 전체 연구결과를, 본 논문과 같이 단일 논문 내용으로 정리해서 리뷰형식으로 발표된 논문은, 본 연구진이 조사한 바로는, 이 논문이 최초인 것으로 보인다. 특별히 결론 부분에서 언급하겠지만, 본 연구의 결과물들이 관련 산업체로 기술 이전되었고, 현재 산학협동 개발연구를 통해 HA 대량 생산을 위한 배양공정 및 분리정제 공정의 scale-up이 성공적으로 진행되고 있음은 주목할 만하다.

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 변이주들을 본 연구에서 사용하였다. 균주보관은 고체배지인 Tryptic soy agar (TSA) 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), 성장배지(GM), 생산배지(PM)로 구분하였으며, 습식멸균 시 침전과 Maillard 반응을 방지하기 위해 배지의 당과 무기염류는 농축용액으로 만들어 멸균한 뒤 무균상태에서 나머지 배지성분 용액과 혼합하여 사용하였다. 종균 접종을 위한 단일 콜로니를 얻기 위해, 25% glycerol stock을 streaking method로 고체배지인 Tryptic soy agar (TSA)에 접종한 후, 37°C에서 12시간동안 배양하였다. 이 단일 colony를 7 ml의 성장배지가 담긴 50 ml 유리튜브에 접종하여 37°C에서 10시간 동안 200 rpm에서 1차 성장배양하였다. 이 배양액을 50 ml의 성장배지가 들어있는 250 ml 플라스크에 10% (v/v)로 접종한 후, 이를 진탕배양기에서 37°C, 200 rpm으로 4시간 동안 2차 성장배양을 수행한 후 이를 생산배양을 위한 접종균주(접종량: 10%)로 사용하였다. 최종 생산배양은 250 ml 플라스크 배양의 경우에는 조업부피 50 ml로, 5 L 발효조 배양의 경우에는 조업부피 3 L로 수행되었으며, 모두 37°C에서 약 24시간 동안 진행되었다. 본 연구에서 사용한 성장배지 조성은 다음과 같다: 포도당 10 g/l, Yeast extract 15 g/l, KH₂PO₄ 5 g/l, MgSO₄ 1 g/l. 5 L 발효조 회분식 배양을 위한 생산배지는 통계적 방법을 적용해 최적화된 배지(PM)를 이용하였으며, 그 배지조성은 다음과 같다: Glucose 30 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.

EMS (Ethylmethane sulfonate) 및 UV 변이처리 방법

돌연변이원인 EMS (Ethylmethane sulfonate) 및 UV는 생산균주의 염색체상에 다양한 염기서열 변화를 유도함으로써 생산균주의 변이율을 높일 수 있다. EMS 처리를 위해 TSA 배지에서 자란 단일 콜로니들을 20% glycerol이 포함

된 증류수로 수거하여 filtration을 통해 잔여물이 제거된 순수한 균체들을 취하였다. 수거한 균체들을 0.1 M TM buffer (pH 8.6)로 두 번 세척한 후, hemocytometer를 이용하여 1×10^5 cells/ml로 희석하였다. 0.1 M TM buffer에 현탁된 균체현탁액에 EMS stock으로부터 처리농도가 0-400 ug/ml (ppm)가 되도록 EMS를 첨가한 후, 28°C에서 150-180 rpm으로 교반하면서 약 10분간 반응시켰다. 이 후 1.5 ml microtube를 이용한 원심분리와(10,000 rpm, 4°C, 10분), deionized water를 이용한 3차례의 균체의 세척과정을 거친 후, 균체들을 모아 10-100 ul로 TSA agar 배지에 도말하였다. UV 역시 TSA 배지에서 자란 단일 콜로니들을 회수하여 최종 농도가 1×10^5 cells/ml가 되도록 현탁한 후, 멸균된 유리 petri dish에 총 부피 5 ml로 넣고 rocker 위에 놓은 뒤 온화하게 혼합하면서 UV를 조사하였다. 이 후 앞서 설명한 EMS의 경우와 동일한 세척과정을 거친 균체들을 수거해서 10-100 ul로 TSA agar 배지에 도말하였다. 최종적으로 TSA 배지상의 단일 콜로니들을 24-36시간 동안 배양하여 각각의 변이주들을 선별한 후, 플라스크 배양을 통해 이들의 HA 생산성을 비교 조사하였다.

통계적 방법을 적용한 생산배지 최적화

통계적 생산배지 최적화 방법을 수행하기 전에 우선적으로 하나의 요인을 여러 수준으로 놓고 나머지 요인들을 고정시켜 실험하는 one-factor-at-a-time (OFAT) 방법에 의해 탄소원과 질소원의 각 성분들이 HA의 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. OFAT 방법으로는 확인할 수 없는 각 성분 간의 상호작용의 정도를 확인하고 steepest ascent method (SAM)에 적용하기 위한 전단계 실험으로서 full factorial design (FFD) 방법을 적용하였다. 한편 FFD의 실험에 기초하여 각 배지성분의 최적 농도를 선정하기 위한 반응표면분석법(response surface method) (RSM)을 수행하였으며, 이를 위한 실험계획법으로 2^k 요인점(factorial points)에 중심점(center points)과 축점(axial points)을 추가시킨 중심합성계획법(central composite design) (CCD)을 이용하였다. 중심합성계획법에 의거해 얻은 배양결과를 Design-Expert 6.0 program을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 얻음으로써 각각의 배지성분들에 대한 상호 영향을 분석하고, 이 결과를 바탕으로 HA 생산량이 최대인 최적 배지조성을 결정하였다. 이 때 전체 model에 대한 유의성은 ANOVA 분석 시 주어지는 p 값에 의해 결정되며, p 값이 0.05 보다 작을 때 그 유의성이 인정된다고 간주하였다. 최적 배지농도는 2차 다항식의 Y 값인 HA의 생산농도가 최대로 되는 지점을 3차원 반응표면도와 contour plot을 이용하여 결정하였다.

5 L 발효조 및 50 L 발효조 운전

HA 생산을 위한 발효조 배양은 top-driven 형식의 5 L (Kobiotech, Korea) 및 bottom-driven 형식의 50 L (Kobiotech) 배양기를 이용하였다. pH 전극(Mettler-Toledo, Switzerland)과 용존산소(DO) 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 충분히 공기(산소)를 공급하여 배양액이 용존산소로 포화되어 용존산소 농도가 더 이상 변화하지 않는 지점을 100% DO로 설정하였으며, 순수 질소가스를 이용하여 0 (zero) 값을 설정하였다. pH 전극은 발효기 멸균 전에 standard solution (pH 4, pH 7)으로 미리 보정하였다. 배양 기간 중 pH는 10 N NaOH 용액과 3 N HCl 용액을 이용하여 7.2-7.5 범위로 자동 조절하였다. 회분식 배양 중 공기량은 1.0 vvm으로 일정하게 공급하였고, 배양 초기에 200 rpm으로 교반을 시작하여 배양액의 용존산소 농도에 따라서 5 L 배양기에서는 500 rpm까지, 50 L 배양기에서는 100 rpm으로 시작하여 최대 300 rpm까지 증가시키면서 발효기 배양을 수행하였다. 또한 거품(foam) 발생을 억제하기 위하여 antifoam 센서를 발효기에 부착하였으며 antifoam SAG 471 (Schering Plough, USA)을 배양 전 미리 멸균한 뒤 발효기에 연결하여 사용하였다. 이 외의 자세한 발효기 운전 조건은 결과 및 토의 섹션에서 별도로 제시하였다. 한편 scale-up 배양의 가능성을 확인하기 위한 50 L 발효조의 사양은 이전에 보고된 논문[28]에서와 동일하며, 5 L 발효조의 경우에도 본 연구에서 최적화된 교반기의 종류를 제외하고 그 나머지 사양은 이전과 동일하다[28].

히알루론산(HA) 분석

HA 정량분석을 위해, 배양액을 3200 rpm으로 30분간 원심분리하여 균체가 제거된 상등액을 회수하였다. 이 상등액에 8배량의 99% 에틸알코올을 혼합하여 4°C에서 12시간 동안 방치한 후, 다시 원심분리 과정(3200 rpm, 15분)을 수행하여 배양액으로부터 HA를 분리하는 과정을 진행하였다. 이 분리 과정을 2번 반복하여 HA가 포함된 시료를 deionized water에 용해시킨 후, uronic acid의 양을 측정하는 carbazole assay를 이용해서 최종 시료에 포함된 HA 양을 정량 분석하였다[29]. Carbazole assay 방법은 다음과 같다: 0.025 M sodium tetraborate·10H₂O가 용해된 H₂SO₄ 시약 2.5 ml에 시료 0.5 ml을 첨가한 후 99°C에서 10분간 가열하였다. 서서히 식힌 후, 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 및 유기산 분석

포도당 분석은 영동제약의 당분석 Kit를 이용하여 측정하였다. 배양액을 10배 희석 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 분리한 후 3 µl 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 O.D 값을 측정하고, glucose standard를 이용하여 배양액의 잔류 당의 농도를 측정하였다.

배양 중에 부산물로 생산되는 젖산과 같은 유기산을 측정하기 위해, 배양액을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 이 물질이 제거된 상등액 600 µl를 0.22 µm의 microfilter에 통과시킨 후 이를 HPLC 정량분석용 시료로 이용하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다:

- Column: Aminex HPX-87H Organic acid (Bio-Rad, USA)
- Mobile phase: 0.01 mM H₂SO₄ (distilled water)
- Column temperature: 35°C by temperature controller
- Detector: M720 absorbance detector (Younglin Co., Korea)
- Detection wave length: 214 nm
- Flow rate: 0.6 ml/min

결과 및 고찰

히알루론산(HA) 고생산성 균주 개발을 위한 random screening

산업용 균주 개발은 생산균주의 배양생리학적 및 배양형태적 특성을 변화시킴으로써 scale-up 배양에 적합한 특성을 갖는 고생산성 균주를 선별하는 과정이다. 본 연구에서는 돌연변이원 으로서 매우 효율적이라고 알려진 EMS (ethylmethane sulfonate)를 사용하여 random screening 방법에 의해 HA 고생산성 균주를 선별하고자 하였다. 알킬화제인 EMS는 주로 구아닌의 알킬화를 일으켜 DNA의 교차결합을 방해하며, 이후에 복제단계에서 G:C 결합을 A:T 결합으로의 치환 돌연변이를 일으키고, 유전자당 약 $5 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-2}$ 의 확률로 돌연변이율을 유도한다[26].

본 실험에서는 효율적으로 변이주를 선별하기 위해 0-400 ppm의 다양한 농도의 EMS를 모균주(mother strain)에 10분 동안 반응시켰을 때, 약 99%의 사멸율을 보이는 250 ppm의 처리조건을 적용해서, HA 고생산성 균주의 선별 작업을 계속 수행하였다. 생산성뿐만 아니라 재현성도 높은 안정적인 변이주를 선별하기 위해, EMS 변이를 통해 HA 고생산성 변이주를 선별한 후에는, 이들로부터 유전적 안정성

Table 1. The amount of hyaluronic acid (HA) produced in shake flask cultures of the various mutants of *S. zooepidemicus*, which were screened randomly from the survivors after treatment of ethylmethane sulfonate (EMS) as a mutagen (99% death rate).

Round of mutagenesis	Mother strain (control)	1 st round (with EMS treatment)	2 nd round (without EMS treatment)	3 rd round (with EMS treatment)	4 th round (without EMS treatment)	5 th round (with EMS treatment)	6 th round (without EMS treatment)	7 th round (with EMS treatment)
HA production level								
Number of strains screened	37	27	37	39	37	34	38	20
Average HA production (g/l)	3.05	3.38	3.43	4.15	3.98	3.70	3.93	4.26
Maximum HA production (g/l)	4.11	4.45	3.90	5.48	5.04	4.39	5.42	5.07
Minimum HA production (g/l)	2.02	2.16	2.78	3.31	2.30	2.68	2.88	3.77

이 높은 균주를 다시 선별하기 위해 이들을 더 이상 변이처리 하지 않고 우량 균주를 선별하는 과정을 반복 수행하였다. 이러한 균주개발 과정을 총 7차례 수행해서 얻은 결과를 Table 1에 요약해서 제시하였다. 대조군으로 모균주의 생산성을 확인하기 위해 변이처리 과정 없이 무작위로 37개의 단일 콜로니를 선별한 후, 최적화된 생산배지(PM)에서의 플라스크 배양을 통해 이들 각각의 HA 생산성을 확인한 결과, 2.02–4.11 g/l 범위에 분포하며, 평균 생산량은 3.05 g/l 정도인 것으로 나타났다. Table 1에 제시된 바와 같이, 변이원 처리를 통한 균주 선별과정이 진행됨에 따라, 각 균주들의 HA 평균 생산량과 최대 생산량이 점차로 높아지는 경향을 확인할 수 있었다. 특별히 3 회차 균주선별 단계에서 HA 생산성이 5.48 g/l에 이르는 고생산성의 균주를 선별할 수 있었는데, 이 생산성은 대조군인 모균주의 최대 생산성에 비해 약 33% 증가한 수치이다.

이미 언급한 대로, 99%의 사멸을 조건에서 무작위적으로 돌연변이를 유도하였기 때문에 HA의 생산성이 현저히 낮은 균주가 발생할 수 있었음에도 불구하고, 선별된 변이주들 모두가 최소 생산성 면에 있어서 모균주보다 더 높게 나타났다는 점은 주목할 만 하다. 최종 단계인 7 회차 균주선별 단계에서 관찰된 최소생산량은 3.77 g/l으로, 다른 선별단계의 최소생산량과 비교할 때 가장 높은 수치였으며, 특별히 모균주에 비해서는 86% 정도 높은 것으로 나타났다. 이 결과로부터 생산균주의 HA 생합성 능력이 어느 정도 세포의 생존 능력과 상관관계가 있다고 추론할 수 있었다. 실제로 Cleary 등[23–25, 28]은 생산균주인 *S. zooepidemicus* 자체에 catalase가 존재하지 않기 때문에, 유기탄소원의 산화과정 중에 발생하는 활성산소가 세포성장에 부정적으로 영향을 미치며, 따라서 이 균주는 이에 대처하기 위해 HA를 생합성하여 세포 외로 분비한다고 보고한 바 있다. 한편 데이터로 제시하지는 않았으나, T:T dimer를 일으키는 변이원인 UV 처리를 통해 균주개발을 수행한 결과, 각 변이주들의 HA 생

산성이 넓은 범위에 걸쳐 분포하고 있고, 약 5 g/l 정도의 최대 생산성을 보이는 균주도 선별할 수 있었으나, 이러한 변이주들의 경우 생산 재현성이 불안정한 것으로 관찰되었다.

상기 실험 결과는 연구 초반에 수행된 결과를 제시한 것으로, 균주개발 초반부에는 EMS 처리를 통한 무작위적 균주선별(random screening) 전략이 HA 고생산성 균주를 개발하는데 어느 정도 효과가 있음을 알 수 있었다. 하지만 random screening 전략에 의한 균주 개발은 그 특성상 상당한 시간과 노동력을 필요로 하는 작업임에 유의할 필요가 있다. 따라서 상대적으로 이미 높은 생산성을 가지는 변이주들을 이용해서, 이보다 더 높은 생산성을 갖는 변이주들을 효율적으로 선별하기 위해서는 더욱 많은 균주들을 신속히 조사할 수 있는 rational screening 전략이 도입되어야 한다. 현재 본 연구팀에서도 이미 획득한 우량변이주를 이용하여, anti-metabolites 저항성 특성의 HA 고생산성 변이주들을 개발하고 있다. 특별히 가장 중요한 배지성분인 고농도 탄소원에 의해 유발되는 catabolite repression 현상으로 인한 HA 생산성 감소 현상을 극복함으로써, 더 높은 비율의 탄소원을 (세포 성장이 아닌) HA 생합성 경로로 이용할 수 있는 변이주들을 개발하고 있다. 또한 이러한 균주들의 배양생리적 특성을 최대한 보조해 줄 수 있는 생산배지 최적화에 대한 연구도 지속적으로 수행하고 있다. 참고삼아, Shah 등[22]은 비록 균주(*Streptococcus* sp.) 개발 전략을 통한 것은 아니지만, 이 균주의 배양전략 개발을 통해, 이화작용 유래의 대사 전구체 물질들이 더 높은 비율로 HA 생합성 경로로 이용될 수 있도록, 배양 중 sodium iodoacetate와 같은 해당작용(glycolysis) 저해제를 첨가하여 HA의 생산량과 분자량이 각각 2배, 33% 이상 증가하는 연구결과를 보고한 바 있다.

히알루론산(HA) 생산성 향상을 위한 통계적 배지 최적화

HA 생산균주인 *S. zooepidemicus*의 경우, 이화작용 중 TCA cycle 중 일부(branched TCA cycle)만을 운영하기 때문

에, 온전한 TCA cycle을 갖는 대다수 미생물들에 비해, 동화 작용에서 고분자물질의 전구체로 이용되는 탄소골격물질들(carbon skeletons)의 공급이 수월하지 않아, 배양 중 그 영양 요구성이 비교적 까다로운 것으로 알려져 있다[23, 26, 27]. 따라서 본 균주의 배양을 통해 HA를 고농도로 생산하기 위해서는, 이 균주의 이와 같은 생화학 및 배양생리적 특성에 기반한 최적배지가 개발되어야 한다. 본 연구에서는 생산균주의 까다로운 영양요구 특성을 최대한 HA 생합성 경로로 유도하는 생산배지를 개발하기 위해, 반응표면분석법을 이용한 통계학적 배지 최적화 연구를 설계하였다. 이를 위한 실험계획법으로 중심합성계획법(central composite design, CCD)를 이용하였다. 한편 반응표면분석법을 최종적으로 적용하기 위해 one-factor-at-a-time (OFAT), full factorial design (FFD), steepest ascent method (SAM) 실험들을 순차적으로 실행하여 생산배지 성분 및 농도를 최적화하는 연구를 수행하였다.

본 연구에서는 이전의 생산배지에서의 생산성이 3.54 g/l로서, 생산 재현성이 우수해서 배지 최적화 연구에 적합하다고 판단되는 변이주를 생산균주로 사용하여 플라스크 배양을 수행하였다. 데이터로 제시하지는 않았으나, 다양한 탄소원과 질소원을 조사하는 OFAT의 실험을 통해, HA의 생산성을 높이는데 복합질소원 성분인 Cottonseed flour과 Corn steep liquor가 중요한 배지 성분임을 확인하였다. 두 종류의 질소원과 주요 배지성분인 포도당, KH_2PO_4 , MgSO_4 포함하는 총 5가지 배지성분을 이용해서 통계학적인 방법을 통해 고농도의 HA가 생산되는 배지조성을 찾고자 하였다. 먼저, HA에 대한 각 배지성분의 주효과와 배지성분간의 상호작용을 조사할 수 있는 FFD 실험을 진행하였다. Center point를 중점(0)으로 하고, 총 5가지 배지성분인 각 요인(factor) (즉 A는 포도당, B는 Cottonseed flour, C는 Corn steep liquor, D는 KH_2PO_4 , E는 MgSO_4 를 각각 의미함)의 농도를 2가지 수준(+, -)으로 설계한 32가지(factorial point)의 배지조합과 중점(center point)에서의 배지조합(4반복)을 합하여, 총 33가지의 배지조합을 설계하여, 각 배지조합에서 HA 생산을 위한 36개의 플라스크 배양을 수행하였다 (여기서 33번에서 36번까지의 플라스크 배양은 4반복 실험으로 모두 중점의 배지조합으로 수행되었음). 이 실험 결과에 대한 ANOVA 분석을 통해, 결과의 유의성과, 5가지의 배지성분(각 factor)이 HA 생산성에 미치는 영향을 나타내는 다음의 1차모델식을 얻을 수 있었다.

$$\begin{aligned} \text{HA} = & +2.66 - 0.17A + 1.08B + 0.083C + 0.29D - 0.36E \\ & - 0.067AB + 0.087AC + 0.12AD - 0.093AE - 0.12BC \\ & - 0.16BD + 0.3BE - 0.2CD + 0.15CE + 0.07DE \quad (1) \end{aligned}$$

(여기서 A는 포도당, B는 Cottonseed flour, C는 Corn steep

liquor, D는 KH_2PO_4 , E는 MgSO_4 를 각각 의미하며, AB, BD, CD 등은 이들 요인들 간의 교호작용을 의미함).

상기의 33가지의 배지조합을 이용한 각 플라스크 배양에서 생산된 HA의 농도는 0-3.91 g/l까지 넓은 분포를 보였으며, 가장 높은 HA 생산량(3.91 g/l)은 28번 조합(A(+), B(+), C(-), D(+), E(+))의 배지조성에서 관찰되었다(Fig. 1A). 제시된 1차 모델식의 p-value는 0.0003으로 매우 유의성이 있는 것으로 확인되었다. 각 배지성분들의 상호 미치는 영향을 나타내는 교호작용 그래프들을 분석한 결과, A, C, D, E 각 성분에 대하여 B가 모두 높아지는 방향에서 HA 생산성이 높게 나오는 것으로 확인되었다.

식 (1)의 각 요인(배지성분)에 대한 회귀계수 추정값을 기반으로 하여, 중점(center point)에서 최고점까지 최단 거리로 도달할 수 있는 steepest ascent method (SAM)을 수행하는 실험을 설계하였다. HA의 생산농도가 최고인 값을 나타내는 최고점까지 가는 길은 많겠지만 가장 빨리 접근할 수 있는 길은 가장 가파른 경사도를 보여주는 길이 될 것이다. 따라서 상기 FFD 실험에서 얻은 1차 모형식(1)을 근거로 하여 가장 가파른 경사도를 보여주는 기울기를 구하여 HA의 생산 농도가 거의 최대가 되는 배지성분들의 수준조합을 알아내고자 SAM 설계에 의한 축차실험(sequential experiments)을 수행하였다. 이를 위해 비교적 영향이 덜한 것으로 확인된 E 성분은 제외하고, 나머지 4가지 배지성분(즉, A: 포도당, B: Cottonseed flour, C: Corn steep liquor, D: KH_2PO_4)의 조합으로 플라스크 배양을 수행하였다. 그 결과 각 요인의 회귀계수 추정값을 이용하여 계산된 최적점까지의 최단거리는(r value)는 20.35였으며, 중점으로부터 각 요인의 증감의 정도(new step)는 A, B, C, D의 각 배지성분에 대해 각각 -0.36, 2.88, 0.22, 0.05, -0.08로 계산되었다. 이를 바탕으로, new step이 적용된 10가지 배지조합과 1개의 중점 배지조합으로 구성된, 총 11개의 배지조합으로 2반복의 플라스크 배양을 진행하였다. Fig. 1B에 제시한 대로, 중점에서 9번 배지조합에 이르기까지 HA의 생산성이 점차 증가하는 경향을 보여주었는데, 특히 9번 조합에서 HA의 생산성이 4.92 g/l로 가장 높게 나타났다. 실제로 중점에서 10번까지의 배지조합은 탄소원대 질소원의 비(C:N ratio)가 점차 감소하는 방향으로 설계된 것인데, 이 결과로부터 생산균주인 *S. zooepeidemicus*의 경우, C:N ratio가 낮은 조건, 즉 질소원 대비 탄소원의 농도가 낮은 배양 환경에서 HA 생합성 능력이 증가하는 배양생리적 특성이 있음을 유추할 수 있었다. 즉 생산균주인 *S. zooepeidemicus*의 본질적인 까다로운 영양요구 구성 특징으로 인해 자체만의 이화작용으로는 세포성장 및 HA 생합성에 필요한 전구체 물질들을 충분히 합성할 수 없어, 이들의 일부 또는 전부를 배지성분인 복합질소원으로부터 공급받는 것처럼 보인다. SAM 실험 결과, 1번부터 10번

까지의 배지조합에서 HA의 생산량이 증가하다가 감소하는 것으로 나타났으므로, 조사된 범위 근처에 HA 생산성이 가장 높은 최적 배지조성이 존재할 것이라 판단하였다.

상기의 SAM 실험에 의해 HA 생산량이 최대인 최적의 배지조합을 근사적으로 찾을 수 있었다. 따라서 생산성이 가장 높았던 SAM의 9번 배지조합을 중심으로 하여 이 부근에서 최적점을 구하는 반응표면분석법(response surface method) (RSM)을 수행하였다. RSM은 각 요인들의 영향을 2차 모델식을 이용해서 분석하는 방법으로, 분석 결과가 1차 모델식으로 표현되는 FFD 보다 배지간의 상호작용을 더 정밀하게 분석할 수 있는 큰 장점이 있다. RSM을 위한 실험 계획법으로 중심합성계획법(central composite design) (CCD)를 이용하였다. A, B, C, D(여기서 A는 포도당, B는 Cottonseed flour, C는 Corn steep liquor, D는 KH₂PO₄를 각각 의미함)를 요인으로 하여 총 4회의 RSM 실험을 수행한 결과, C, D의 최적점을 어느 정도 확인할 수 있었다 [테이타 미제시]. 따라서 이 후에는 실험결과를 효율적으로 도출하기 위해 최종적으로 A, B 두 요인만을 이용하는 RSM 실험을 재설계하여 배지 최적화 연구를 계속 진행하였다. 즉 4개의 factorial points와 4개의 축점(axial points), 5반복의 중심점(center points)으로 구성된 총 9개의 배지조합을 이용해서 플라스크 배양을 수행하였다. 그 결과 각 배지조합에 대한 HA 생산성은 3.77-5.38 g/l 범위에 분포하였으며(Fig. 1C), 특별히 A, B가 (-, +)의 조건인 3번 배지조합에서 그 생산성이 5.38 g/l로 가장 높게 나타났다. 본 RSM 실험에서도 이미 SAM에서 확인된 것과 같이 탄소원대 질소원의 비(C:N ratio)가 낮은 배지조합에서 HA 생성이 높게 나타나는 것으로 확인되었다. 이 배양 결과에 대한 ANOVA 분석을 통해, 결과의 유의성과, 2가지의 배지성분(각 factor)이 HA 생산성에 미치는 영향을 나타내는, 다음과 같은 2차 모델식을 얻을 수 있었다. 여기서 각 항의 계수는 Design-Expert 6.0 program을 이용하여 다중 회귀분석하여 얻은 수치이다.

$$HA = +4.75 - 0.14A + 0.37B - 0.13A^2 - 0.25B^2 - 0.25AB \quad (2)$$

(여기서 A는 포도당, B는 Cottonseed flour을 각각 의미하며 AB는 이들 요인간의 교호작용을 의미함). 상당히 유의성 있는 2차 모델식 (2)를 얻을 수 있었으며, 또한 B, B², AB에 대해 유의성 있는 결과를 확인할 수 있었다. ANOVA 분석 결과, 최적점으로 3번 조합과 동일한 배지조합이 제시되었는데(최적 배지조성은 '실험재료 및 방법'에 제시되어 있음), 이 경우 예상되는 HA 생산량은 5.12 g/l로, 3번 조합으로 실제 수행한 플라스크 배양의 생산량인 5.38 g/l과 비교할 때, 95% 이상 일치하는 결과임을 확인할 수 있었다. 또한 이 결과는 앞서 실험한 SAM의 축차 실험을 통해 근사적으로 얻은 최

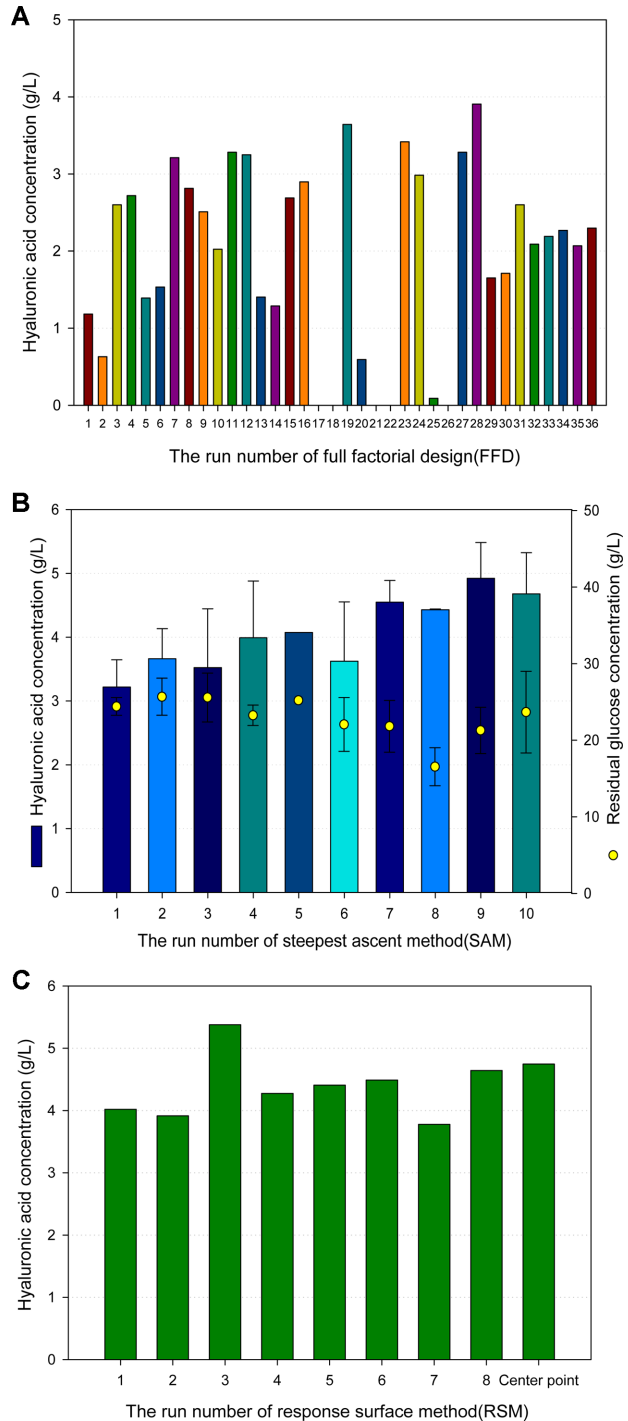


Fig. 1. Hyaluronic acid production in shake flask cultures performed for statistical optimization of the production medium composition. (A) The amount of HA produced in each shake flask culture performed according to the full factorial design (FFD), (B) The amount of HA produced in each shake flask culture performed according to the steepest ascent method (SAM), (C) The amount of HA produced in each shake flask culture performed according to the response surface method (RSM).

적 조건과 별로 다르지 않음을 제시하는데, 이로부터 SAM을 이용한 축차실험이 효과적이었음을 유추할 수 있었다. 지금까지의 통계학적 배지 최적화 실험을 통해 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다: 배지 최적화 이전에 사용되던 생산배지를 이용한 플라스크 배양에서 HA 생산량은 3.54 g/l이었으나, FFD, SAM, RSM의 단계적인 통계적 배지 최적화 방법을 적용함으로써, HA 생산량이 최대 5.38 g/l에 이르는, 약 52% 향상된 결과를 얻을 수 있었다.

5 L 발효조 배양을 통한 히알루론산(HA) 생산성 향상

*S. zooepeidemicus*의 HA 생합성은 균주의 호흡과정 중에 발생하는 활성산소로 인한 oxidative damage를 최소화하기 위한 방어기작이라고 잘 알려져 있다[23–25, 28]. 따라서 본 균주의 발효조 배양을 통해 HA를 고농도로 생산하기 위해서는, 생산균주의 이러한 생리적 특성을 고려해서, 발효조 내의 용존산소 공급과 관련 있는 산소전달속도(*OTR*) 등이 가장 중요한 배양변수가 될 것으로 판단하였다. 한편 *OTR*를 증가시키기 위해서는, 우선적으로 발효기의 산소전달능력을 의미하는 배양변수인 k_La , 즉 산소물질전달계수(oxygen mass transfer coefficient)의 값을 증가시켜야 한다. 이 k_La 는 다음과 같이 발효기의 운전조건 및 배양액의 유변학적 특성과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 잘 알려져 있다[3, 30, 31].

$$k_La = (P/V)^{\alpha} (V_s)^{\beta} (\eta_{app})^{-\omega} \propto (\text{rpm})^{\alpha} (\text{vvm})^{\beta} (\eta_{app})^{-\omega}$$

여기서 k_La 는 산소물질전달계수[1/s]로서, 이 중 k_L 는 액상 물질전달속도[m/s]이고 a 는 계면적[m²/m³], P/V 는 단위 부피당 교반날개(impeller)에 의한 동력소비량, V_s 는 기체 공압속도(superficial air velocity), η_{app} 는 배양액의 겔보기 점도, rpm (revolutions per minute)은 교반날개의 분당회전수, vvm은 배양액 부피(volume) 대비 분당 공기공급량(volume per minute), α , β , ω 는 지수인자이다.

따라서 발효조 배양에서 용존산소 공급속도의 증가를 통해 HA 생산성을 증가시키고자, 본 연구에서는 주로 산소물질전달계수(k_La)에 영향을 미치는 발효조 운전전략을 조사하였다. 즉 단위 부피당 교반날개에 의한 동력소비량인 P/V 는 발효조에 부착된 교반날개의 종류, 직경, 개수 및 교반속도 등에 의해 주로 영향을 받으므로, 이에 대한 연구를 집중적으로 수행하였다. 배지 최적화를 위한 플라스크 배양에서 사용했던, 고생산성이며 재현성이 높았던 생산균주를 이후 5 L 및 50 L 발효조 배양 실험에서도 계속 사용하였다. 발효조 배양 시 용존산소 공급속도 등 배양환경이 플라스크 배양과 크게 다르지만, 이전의 플라스크 배양에서 최적화된 배지 조성을 발효조 배양에 그대로 적용하였다. 5 L 발효조(조업 부피 3 L)를 이용해서, 배양액의 pH는 7.2–7.5 범위에서

조절하고, 공기량은 1.0 vvm으로 일정하게 공급하면서, 37°C에서 약 24시간 동안 배양을 수행하였다. 가장 중요한 운전조건인 교반속도는 각 배양마다 다양하게 변화시켜가며, 교반속도가 HA 생산성에 미치는 영향을 조사하였다.

5 L 발효조를 이용해서 다양한 배양환경이 HA 생산성에 미치는 연구를 수행하던 중에, 원래 발효조(직경: 165 mm)에 부착되어 있는 2개의 6-blade Rushton turbine 교반날개(직경: 85 mm, blade 길이: 20 mm)를 이용해서 교반하는 경우, HA 생산량 증가로 인한 배양액의 고점도 현상으로 인해, 배양 중반에 500 rpm까지 교반속도를 높여도 발효조의 외곽 부분에 dead space가 발생하는 현상을 관찰하였다. 이 경우 발효조 전체 부분에 용존산소를 포함한 영양분들의 균질하게 전달되지 않아, 궁극적으로는 생산 균주의 배양 생리적 특성의 변화로 인해 젯산과 같은 부산물들의 생합성이 증가하는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 배양액의 혼합력을 강화하기 위해 교반날개의 직경을 기존 대비 1.35배 확장시킨 2개의 6-blade Rushton turbine 교반날개(직경: 115 mm, blade 길이: 25 mm)를 사용하여, 새로이 고안된 교반날개가 HA 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 확장된 교반날개의 경우, 동일한 교반속도에서도 배양액의 혼합력을 더 증가시킬 수 있으므로, 기존 교반날개의 교반속도(400 rpm) 보다 낮은 300 rpm 조건에서 24시간 동안 발효조 배양을 수행하였고, 그 결과를 Table 2에 비교 제시하였다. 주목할 만하게도, 배양 17시간 기준 HA 생산량(P) [g/l], 평균 HA 생산속도(r_p) [g/l/hr] 및 평균 포도당 소모속도(r_s) [g/l/hr] 등이 거의 비슷한 수준인 것으로 나타났다. 또한 시간에 따른 HA 생산경향 및 포도당 소모 경향도 매우 흡사한 것으로 관찰되었는데, 이 결과로부터 기존 교반날개 대비 100 rpm이나 낮은 교반속도(400 vs 300 rpm)에서도 확장된 교반날개의 우수한 교반력과, 그에 따른 산소전달계수(k_La)의 증가로 인해 배양액 내로의 산소전달능력이 강화되었음을 유추할 수 있었다. k_La 에 대한 상기의 식에 제시된 대로, k_La 는 교반속도의 지수승에 비례할 정도로 rpm에 대한 의존도가 매우 큰 점을 고려할 때, 25%나 낮은 교반속도에서도 생산균주가 거의 동일한 배양 생리적 특성을 보인 것은 주목할 만하다. 또한, 플라스크 배양에서와 동일한 생산균주 및 배지조성에서 발효조 배양을 수행했지만, 발효조의 경우 스파저 및 교반날개를 통한 원활한 용존산소 공급으로 인해, 단지 표면통기(surface aeration)에만 의존하는 플라스크 배양에 비해 HA 생산성이 약 36% (7.33 g/l vs 5.38 g/l) 정도 비교적 큰 폭으로 증가하는 것으로 나타났는데, 이로부터 다시 한번 원활한 용존산소 공급이 HA 생산성 향상에 미치는 긍정적인 효과를 유추할 수 있었다.

한편 확장된 교반날개를 사용한 상기 발효조 배양에서도 배양 후반에 HA 축적으로 인한 배양액의 고점도 현상으로

Table 2. Comparison of fermentation parameters obtained from the two cultures of 5 L bioreactor, each of the bioreactor equipped with 2 different-sized Rushton-turbine impellers. The bioreactor with the standard-sized impellers was operated at the agitation speed of 400 rpm, and with the large-sized impellers at the agitation speed of 300 rpm, respectively.

Impeller size (Agitation speed)	2 standard-sized Rushton-turbine impellers (400 rpm)	2 large-sized Rushton-turbine impellers (300 rpm)
*Fermentation parameters		
P (g/l)	7.33	7.01
Maximum HA production		
r_p (g HA/l/hr)	0.40	0.41
Average volumetric HA production rate		
r_s (g glucose/l/hr)	0.43	0.43
Average glucose consumption rate		

*The fermentation parameters were calculated based on the data until 17 hours of fermentation.

인해 dead space가 발효조 외곽 부분에 산발적으로 여전히 발생하는 것으로 나타났다. 따라서 배양액의 혼합력의 강화가 더 필요하다고 판단하여 확장된 3-blade marine-type의 교반날개(직경: 115 mm, blade 길이: 52 mm)를 새로이 설계하여, 교반날개의 배치와 교반속도를 최적화하는 실험을 설계하였다. 그 결과, Rushton turbine-type의 교반날개만을 교반축 상하로 2개 설치하는 경우보다, 하부에는 Rushton turbine-type 교반날개를, 40 mm 상부쪽으로는 marine-type의 교반날개를 각각 설치한 경우에, 발효조 전체에서 배양액의 혼합이 균질하게 효과적으로 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다. 데이터로 제시하지는 않았으나, Table 2의 실험과 동일한 배양조건에서, 확장된 Rushton turbine 교반날개만을 2개 사용한 배양보다, 확장된 marine 교반날개와 Rushton turbine 교반날개가 함께 부착된 교반시스템을 사용한 경우에 HA 생산성이 약 6% 증가하는 결과를 얻을 수 있었다(이 때 최대 교반속도는 두 배양 모두 350 rpm으로 진행함). 이는 스파저 바로 위에 위치한 Rushton turbine 교반날개가 스파저에서 나오는 공기방울들을 효과적으로 작은 크기로 분쇄하고, 그 위쪽에 위치한 marine 교반날개가 분쇄된 공기방울들과 배양액을 효율적으로 균질하게 혼합시키는 효과 때문인 것으로 판단되었다.

따라서 교반축 하부에는 Rushton turbine 교반날개, 상부에는 marine 교반날개가 설치된 교반시스템을 사용하여 교반속도를 최적화하는 발효조 배양 실험을 수행하였다. 교반날개 확장의 효과와 마찬가지로, 교반속도(rpm)의 증가는 기체-액체 접촉면에서의 산소물질전달속도(k_L) [m/s] 뿐만 아니

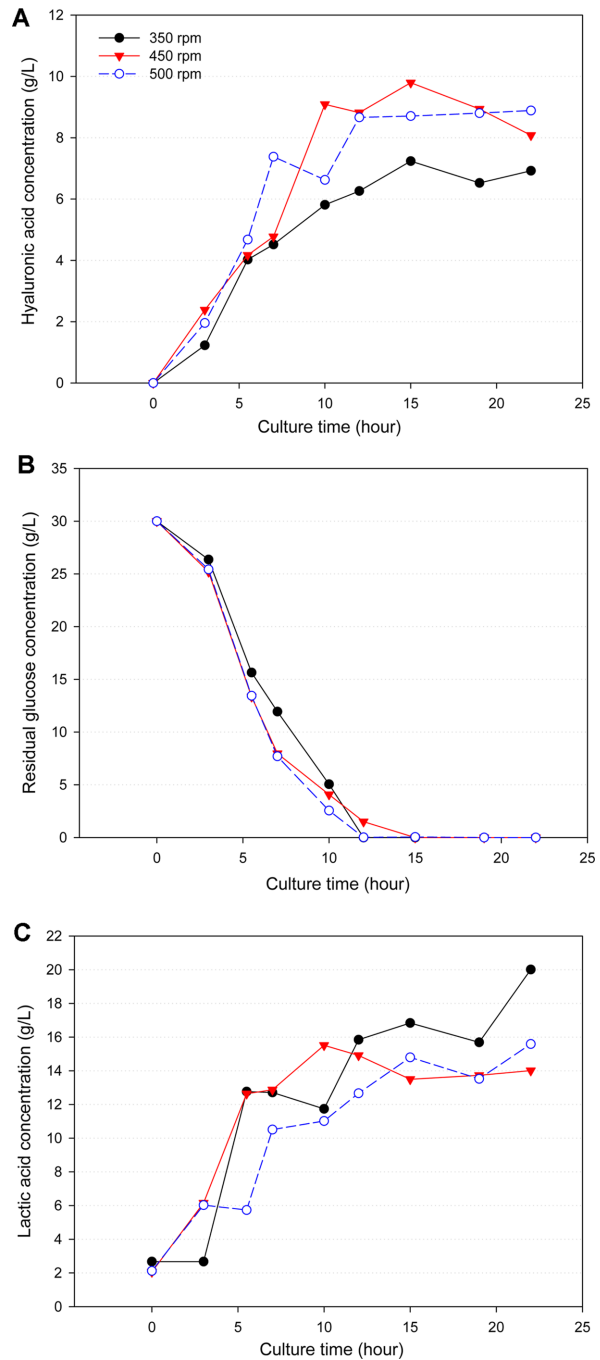


Fig. 2. Time-course profiles of (A) hyaluronic acid (HA) production, (B) glucose consumption and (C) lactic acid production in the 5 L bioreactor cultures. Three sets of comparative fermentations were carried out under the agitation speeds of 350, 450, and 500 rpm, respectively. The agitation system of each bioreactor was identical, consisting of the expanded Rushton-turbine impeller (just above the ring-type sparger for efficient break-down of the sparged air), and the extended marine impeller above the Rushton-turbine impeller for efficient mixing of the air-born viscous fermentation broth.

Table 3. Comparison of fermentation parameters obtained from the 5 L bioreactor cultures. Three sets of comparative fermentations were carried out under the agitation speeds of 350, 450, and 500 rpm, respectively. The agitation system of each bioreactor was identical, consisting of the expanded Rushton-turbine impeller (just above the ring-type sparger for efficient breakdown of the sparged air), and the extended marine impeller above the Rushton-turbine impeller for efficient mixing of the air-born viscous fermentation broth.

*Fermentation parameters	Agitation speed		
	350 rpm	450 rpm	500 rpm
P (g/l)	7.24	9.79	8.71
Maximum HA production			
S (g/l)	0	0	0
Residual glucose concentration			
r_p (g HA/L/hr)	0.50	0.65	0.58
Average volumetric HA production rate			
r_s (g glucose/L/hr)	2	2	2
Average glucose consumption rate			
$Y_{p/s}$ (g HA/g glucose)	0.24	0.33	0.29
HA production yield based on glucose			

*The fermentation parameters were calculated based on the data until 15 hours of fermentation.

라, 스파저로부터 나오는 공기방울의 부피당 표면적(a) [m^2/m^3]을 증가시키기 때문에, k_{LA} 로 계산되는 산소물질전달계수를 효율적으로 증가시킨다고 알려져 있다[31–33]. 특별히 본 연구팀은 고등균류를 이용한 scale-up 배양공정 연구에서 공기 공급속도(vvm)보다는 교반속도(rpm)를 증가시키는 것이 k_{LA} 증가로 인한 산소전달속도(OTR) 향상에 훨씬 크게 기여한다고 보고한 바 있다[28]. 따라서 본 연구에서는 공기공급 속도는 1 vvm으로 고정한 채, 350, 450 및 500 rpm의 교반속도에서 약 23시간 동안 각각의 발효조 배양을 수행하였고, 그 결과를 Fig. 2 및 Table 3에 비교 제시하였다. 배양 약 6시간 이후로 교반속도에 따른 HA 생산속도가 달라졌으며, 모든 배양에서 약 15시간 경에 HA의 생산량이 최대에 도달하며(Fig. 2A), 그에 따라 배양액의 점도도 매우 높아져서 500 rpm의 높은 교반속도에도 배양액이 어느 정도 정제되는 현상이 관찰되었다. 또한, 모든 배양에서 고농도의 HA와 생산균주가 서로 복잡하게 엮인 상태인, 고점도의 배양물들이 용존산소전극 말단 부분의 멤브레인에 달라붙는 fouling 현상이 발생하곤 하여, 세포농도 뿐만 아니라, 배양액 중의 용존산소 농도를 정확하게 측정하는 것이 거의 불

가능하였다. 교반속도가 350 rpm인 배양의 경우, 다른 배양에 비해 비교적 낮은 교반속도로 인한 산소전달속도의 감소 현상으로 인해 HA 최대생산성이 가장 낮은 것(7.24 g/l)으로 관찰되었다. 중간 교반속도인 450 rpm에서 HA 최대생산량이 9.79 g/l로 가장 높게 나타났는데, 이는 350 rpm에서 보다 약 35% 정도, 500 rpm의 경우(8.89 g/l)보다는 10% 정도 증가한 수치이다. 한편 배양 말기에 도달하면서 450 rpm과 500 rpm에서의 HA 생산성이 거의 비슷한 것으로 보아, 1 vvm의 통기량에서 450 rpm 정도의 교반속도로 발효조를 운전할 경우, 비교적 충분한 양의 용존산소가 공급되는 것으로 보인다(Fig. 2A). 배양시간에 따른 잔류포도당 농도는 모든 배양에서 비슷한 경향을 보여주었으며(Fig. 2B), 배양 부산물로 생합성되는 젖산의 생산량은 예상한 대로 용존산소 공급속도가 가장 적어 HA 생산성이 가장 낮은 350 rpm의 배양에서 가장 높은 경향을 보였으며, 450 rpm과 500 rpm의 경우에는 배양 말기에 거의 비슷한 수준으로 나타났다(Fig. 2C). 이로부터 450 rpm 배양의 경우에 소모된 탄소원을 가장 높은 비율로(경쟁 경로인 세포생산과 젖산 생합성 쪽이 아닌) HA 생합성 경로로 효율적으로 이용하고 있음을 유추할 수 있었다. 실제로 Table 3에 각 교반속도에서 배양 15시간 기준으로 계산한 배양변수를 비교 제시하였는데, 기질의 효율적 이용에 대한 척도인 최대 HA 수율($Y_{p/s}$) 면에서 볼 때, 450 rpm의 경우가 0.33 g HA/g glucose로 가장 높은 것으로 나타났다. 또한, HA 평균생산속도(r_p)의 경우에도 450 rpm 배양이 0.65 g/L/hr로 최대치를 보였으며, 반면 포도당 평균소모속도(r_s) 면에서는 세 배양 모두 2 g/L/hr로 동일한 것으로 확인되었다.

결론적으로, 현재까지의 연구결과를 고찰해 볼 때, *S. zooeidemicus*를 통한 HA 생산공정은 생산균주의 배양 생리적 특성, 이 특성을 최대한 이용할 수 있는 배지조성 최적화, 배양 중 용존산소 최적 공급전략 등, 생물학적 및 물리화학적 변수가 서로 밀접하게 연관되어있는 복잡한 생물공정임을 파악할 수 있었다.

50 L 발효조 배양을 통한 히알루론산(HA) 생산공정 scale-up 가능성 조사

250 ml 소규모 플라스크 배양에서 최적화된 배지조성으로 bench-scale인 5 L 발효조 배양을 수행할 때, 효율적인 용존산소 공급과 균질한 혼합을 위해 교반날개의 크기, 종류, 배치 및 교반속도를 최적화한 결과, 450–500 rpm의 범위에서 HA 생산성이 플라스크 배양 대비 약 1.7–1.8배(9.79 및 8.89 vs. 5.38 g/l) 더 높게 안정적으로 재현됨을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 HA 생산공정의 scale-up 가능성을 확인하기 위해, pilot 규모의 50 L 발효조(35 L의 조업 부피) 배양을 수행하였다. 본 실험에서 사용된 50 L 발효조

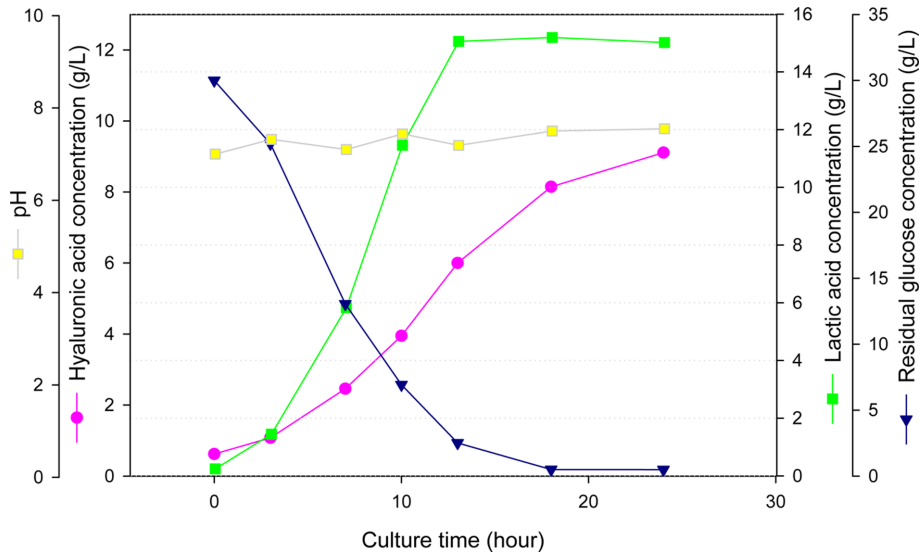


Fig. 3. Time-course profiles of pH, hyaluronic acid (HA) production, lactic acid production and glucose consumption in the 50 L pilot-scale bioreactor culture of *S. zooepidemicus*. The 50 L fermentation was performed under the operating conditions of maximum agitation speed of 300 rpm and a constant aeration rate of 1.0 vvm.

의 사양은 다음과 같다: 2개의 6-blade Rushton turbine 교반날개(직경: 133 mm, blade 길이: 28 mm), 300 mm의 발효조 직경, 485 mm의 배양액 높이, 3개의 30 mm 폭 배플.

50 L 발효조 배양도 5 L 배양과 동일하게, 배양액의 pH를 7.2-7.5로 조절하고, 공기량을 1.0 vvm으로 일정하게 공급하면서, 37°C에서 약 24시간동안 수행되었다. 가장 중요한 운전조건인 교반속도의 경우에는, 이전의 연구 결과[28], 동일한 교반속도(200 rpm 기준)에서 50 L 발효기의 산소전달 계수(k_{La}) 값이 5 L 발효기에 비해 약 1.4배 더 높은 것으로 확인되었으므로, 배양 초기에 100 rpm으로 시작하여 배양액의 용존산소 농도에 따라서 최대 300 rpm까지 증가시키면서 배양을 수행하였다. Fig. 3에 제시한 대로, 배양 시작과 동시에 HA의 생산량이 점차로 증가하다가 배양 24시간인 종료시점에서 최대량인 9.11 g/l까지 도달하였다. HA의 생산량이 증가함에 따라 배양액의 점도도 지속적으로 높아져서, 5 L 발효조 배양의 경우와 마찬가지로, 배양 말기에는 배양액의 정체 현상이 어느 정도 관찰되었다. 50 L 발효조 배양에서도, 배양 중반 이후 고점도의 배양물들이 용존산소전극 말단의 멤브레인에 달라붙는 fouling 현상으로 인해 용존산소 농도를 정확하게 측정하는 것이 거의 불가능하였다. 배양 15시간 경에 배양액의 포도당은 거의 고갈된 것으로 보이며(실제 샘플링이 12시간과 18시간에서 취해졌기에 아주 소량 남은 것처럼 보이거나 포도당이 소모되는 속도를 고려할 때 15시간에는 0일 것으로 판단됨), 이 시간 경에 배양 부산물로 생성되는 젖산의 생산량은 최대에 도달하는 것으로 나타났는데, 이는 450 rpm 및 500 rpm의 5 L 발효조 배양

Table 4. Comparison of fermentation parameters obtained from the 5 L bench-scale and the 50 L pilot-scale bioreactor cultures performed with the high-yielding cells of *S. zooepidemicus*. The 50 L fermentation was performed under the operating conditions of maximum agitation speed of 300 rpm, and the two 5 L fermentations under 450 rpm and 500 rpm, respectively, as specified in Table 3. The air was supplied constantly at 1 vvm for all bioreactor cultures.

Fermentation parameters	Bioreactor size	†5 L bench-scale bioreactor cultures	50 L pilot-scale bioreactor culture
P (g/l)			
Maximum HA production		9.25	9.11
S (g/l)			
Residual glucose concentration		0	0
* r_p (g HA/l/hr)			
Average volumetric HA production rate		0.62	0.46
* r_s (g glucose/l/hr)			
Average glucose consumption rate		2.0	1.9
$Y_{p/s}$ (g HA/g glucose)			
HA production yield based on glucose		0.31	0.30

*The fermentation parameters such as r_p and r_s were calculated based on the data until 15 hours of fermentation.

†Average value of the fermentation parameters obtained from the two 5 L bioreactor cultures of 450 rpm and the 500 rpm, respectively, as specified in Table 3.

에서의 경향과 거의 일치하는 결과이다.

위의 50 L 발효조와 이전의 5 L 발효조에서 얻은 배양변수를 Table 4에 비교 제시하였다(5 L 결과는 450 rpm과 500 rpm 배양의 평균값임). 주목할 만하게도 50 L에서 얻은 HA 최대생산량(9.11 vs 9.25 g/l), 포도당 기준 최대생산율($Y_{p/s}$) (0.30 vs 0.31 g/g) 및 평균 포도당 소모속도(r_s) (1.9 vs 2.0 g/l/hr) 모두 다 5 L 배양에서 얻은 각각의 수치들과 거의 비슷한 것으로 나타났다. 반면 지수기 성장단계인 배양 15시간까지의 HA 평균생산속도(r_p)는 50 L 배양이 0.46 g/l/hr로서 0.62 g/l/hr인 5 L 배양 대비 약 74% 정도 수준에 머무는 것으로 확인되었다. 이 결과는, 50 L 발효조 배양의 경우, 300 rpm 교반 시 발생하는 전단응력에 의해 생산균주의 대사작용이 부정적으로 영향을 받았음을 암시한다. 실제로 균사형성 고등균류[15]나 *Streptomyces*[34]를 이용한 발효조 배양에서 교반속도를 일정 수준 이상으로 증가시킬 때, 배양액으로의 용존산소 전달속도는 증가하지만, 동시에 전단응력을 과도하게 발생시킴으로써 세포막에 악영향을 끼쳐 생산성이 감소하는 결과들이 보고된 바 있다. 결론적으로, 상기 결과는 scale-up 배양에서 HA 생산속도를 비슷한 수준으로 얻기 위해서는, 생산균주의 전단응력 민감성(shear damage)을 우선적으로 고려하면서, 각 크기의 발효조마다 교반날개 설계 및 교반속도 등의 최적화 연구가 수행되어야 함을 암시한다. 일반적으로 호기성 배양공정의 scale-up 시, 각각의 발효조에서 동일한 산소전달계수(k_La)를 얻을 수 있는 발효기 운전조건이 가장 중요한 요소로 알려져 있다 [3, 31]. 본 연구팀도 고등균류인 *Aspergillus terreus* 유래의 이타콘산(Itaconic acid) 생산공정 개발연구에서, 적절한 용존산소 공급이 이타콘산 생산성 향상에 중요한 요인임을 확인하고, 이에 근거해서 산소전달계수(k_La)에 근거한 배양공정 scale-up 전략을 적용한 결과, 50 L 발효조 배양에서 5 L 배양에서와 거의 동일한 배양패턴 및 배양변수들을 얻을 수 있었다[28].

본 실험의 결과를 요약하면, 처음으로 시도한 50 L scale-up 배양 연구임에도 불구하고, HA 최대생산성 면에서 볼 때 5 L 발효조 결과와 거의 동일한 수준(98.5%)에 도달하는 생산량을 얻었음에 유의할 필요가 있다. 따라서 scale-up시 발효조의 교반시스템에 대한 체계적인 연구가 더 진행된다면, HA 생산속도도 증가시킬 수 있는 최적화된 scale-up 배양공정 개발이 가능할 것으로 기대된다.

실제로 본 연구팀은 지금까지의 연구결과를 바탕으로, 산업적으로 HA를 대량 생산하기 위해 산학협동으로 산소전달계수(k_La)에 근거해서, 500 L 및 5,000 L 발효조를 이용한 배양공정 scale-up 연구를 집중적으로 수행하고 있다. 또한 (n-1) 단계의 성장용 발효조에서 (n)단계의 최종 생산용 발효조의 접종량 및 접종시간에 대한 추가적인 연구를 통해 HA

생산성을 더욱 향상시키고 있다. 이 외에도 지속적인 균주개발, (플라스크 배양이 아닌) 발효조 배양을 통한 성장배지 및 생산배지 최적화, 최종적으로 분리정제 공정 개발을 통해 경제적인 HA 생산용 생물공정을 완성해 가고 있다.

요 약

Streptococcus zooepidemicus 유래의 세포의 고분자물질인 히알루론산(hyaluronic acid) (HA)을 대량 생산하기 위해, 균주 개발, 생산배지 및 배양공정 개발에 관한 연구를 수행하였다. HA 고생산성 변이주를 선별하기 위해 약 99%의 사멸률을 보이는 ethylmethane sulfonate (EMS) 처리조건을 적용해서, 지속적인 random screening 방법으로 고생산성, 고안정성의 변이주들을 선별할 수 있었다. HA를 고농도로 생산하기 위해서는, 이 균주의 생화학 및 배양생리적 특성에 기반한 최적 배지개발이 필수적이라고 판단하여, one-factor-at-a-time (OFAT), full factorial design (FFD), steepest ascent method (SAM) 및 response surface method (RSM) (반응표면분석법)을 순차적으로 적용하여 통계적 배지 최적화 실험을 수행하였다. 최적 배지조성에서 플라스크 배양에 의한 HA 생산성은 5.38 g/l로서, 이전 배지(3.54 g/l)에 비해 약 52% 향상된 생산량을 얻을 수 있었다. 또한 선별된 우량균주와 최적화된 생산배지를 이용하여 5 L 발효조에서 배양공정 최적화 연구를 수행하였다. 이 균주의 생리학적 특성을 고려할 때, HA 생산성을 높이기 위해서는 (배양 중 HA 축적으로 인해 고점도를 띠는) 배양액으로의 충분한 용존산소 공급이 매우 중요한 요인인 것으로 판단되었다. 따라서 용존산소 공급과 밀접하게 관련있는 발효조의 교반시스템(교반날개 종류, 크기 및 배치 등) 및 교반속도에 대한 최적화 연구를 수행하였다. 그 결과, 교반축 하부에는 Rushton turbine-type, 상부에는 marine-type의 확장된 교반날개(기존 대비 직경 1.3배 확장)가 설치된 경우, 450 rpm에서 강화된 혼합력과 충분한 용존산소 공급으로 인해 HA 생산성이 기존 플라스크 배양 대비 약 1.8배(9.79 vs. 5.38 g/l) 더 높은 것으로 확인되었다. 최종적으로 HA 배양공정의 scale-up 가능성을 확인하기 위해, pilot 규모의 50 L 발효조 배양을 최대 300 rpm의 교반속도에서 수행하였다. 처음으로 시도한 50 L 배양임에도 불구하고, HA 최대 생산성 면에서 볼 때, 5 L 발효조 결과와 거의 동일한 수준(98.5%) (9.11 vs 9.25 g/l)의 생산량을 얻을 수 있었다. 반면 지수기 성장단계인 배양 15시간까지의 50 L 배양의 HA 평균생산속도(r_p)는 0.46 g/l/hr로서 0.62 g/l/hr인 5 L 배양 대비 약 74% 정도에 머무는 것으로 나타났다. 따라서 생산 발효조의 scale-up 시, 생산균주의 전단응력 민감성(shear damage)을 함께 고려하면서, 산소전달계수(k_La)를 기반으로 하는 교반시스템에 대한 체계

적인 연구가 진행된다면, HA 생산속도도 증가될 수 있는 긍정적인 결과를 얻을 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.
- Song HL, Kwon T, Lee JW. 2016. The global market trend and perspectives of hyaluronic acid. *J. Chitin Chitosan.* **21**: 1-5.
- Shukla V, Parasu Veera U, Kulkarni P, Pandit A. 2001. Scale-up of biotransformation process in stirred tank reactor using dual impeller bioreactor. *Biochem. Eng. J.* **8**: 19-29.
- Grand view research. Hyaluronic Acid Market Size Worth \$16.6 Billion By 2027 | CAGR: 8.1%. Available from <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-hyaluronic-acid-market> (Accessed on Aug. 10, 2020).
- Cheng F, Gong Q, Yu H, Stephanopoulos G. 2016. High-titer biosynthesis of hyaluronic acid by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. J.* **11**: 574-584.
- Prasad SB, Jayaraman G, Ramachandran KB. 2010. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**: 273-283.
- Izawa N, Serata M, Sone T, Omasa T, Ohtake H. 2011. Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. *J. Biosci. Bioeng.* **111**: 665-670.
- Mao Z, Shin H, Chen R. 2009. A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**: 63-69.
- Chen WY, Marcellin E, Hung J, Nielsen LK. 2009. Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Biol. Chem.* **284**: 18007-18014.
- Prasad SB, Ramachandran KB, Jayaraman G. 2012. Transcription analysis of hyaluronan biosynthesis genes in *Streptococcus zooepidemicus* and metabolically engineered *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 1593-1607.
- Hasegawa S, Nagatsuru M, Shibutani M, Yamamoto S, Hasebe S. 1999. Productivity of concentrated hyaluronic acid using a Maxblend[®] fermentor. *J. Biosci. Bioeng.* **88**: 68-71.
- Heo BY. 2013. *Strain Improvement and Statistical Medium Optimization for Enhanced Production of Hyaluronic Acid by Streptococcus zooepidemicus*. M.S. Kangwon National University, Republic of Korea.
- 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.
- Lai ZW, Rahim RA, Ariff A, Mohamad R. 2011. Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. *Afr. J. Microbiol. Res.* **5**: 2114-2123.
- Armstrong DC, Johns MR. 1997. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2759-2764.
- 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.
- 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.
- Lai ZW, Rahim RA, Ariff AB, Mohamad R. 2012. Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed. *J. Biosci. Bioeng.* **114**: 286-291.
- Blank LM, Hugenholtz P, Nielsen LK. 2008. Evolution of the hyaluronic acid synthesis (has) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic *Streptococci*. *J. Mol. Evol.* **67**: 13-22.
- 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.
- 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.
- Condon S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* **3**: 269-280.
- Cleary PP, Larkin A. 1979. Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A streptococci. *J. Bacteriol.* **140**: 1090-1097.
- Rhaese HJ, Boetk NK. 1973. The molecular basis of mutagenesis by methyl and ethyl methanesulfonates. *Eur. J. Biochem.* **32**: 166-172.
- Armstrong DC, Cooney MJ, Johns MR. 1997. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 309-312.
- Shin WS, Lee D, Kim S, Jeong YS, Chun GT. 2013. Application of

- scale-up criterion of constant oxygen mass transfer coefficient ($k_L a$) for production of itaconic acid in a 50 L pilot-scale fermentor by fungal cells of *Aspergillus terreus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 1445-1453.
29. Bitter T, Muir HM. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* **4**: 330-334.
30. Alves FG, Filho FM, De Medeiros Burkert JF, Kalil SJ. 2010. Maximization of β -galactosidase production: A simultaneous investigation of agitation and aeration effects. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**: 1528-1539.
31. Herbst H, Schumpe A, Deckwer W. 1992. Xanthan production in stirred tank fermenters: Oxygen transfer and scale-up. *Chem. Eng. Technol.* **15**: 425-434.
32. Mehmood N, Olmos E, Marchal P, Goergen J, Delaunay S. 2010. Relation between pristinomycin production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, $k_L a$. *Process Biochem.* **45**: 1779-1786.
33. Bodizs L, Titica M, Faria N, Srinivasan B, Dochain D, Bonvin D. 2007. Oxygen control for an industrial pilot-scale fed-batch filamentous fungal fermentation. *J. Process Control.* **17**: 595-606.
34. Roubos JA, Krabben P, Luiten RG, Verbruggen HB, Heijnen J. 2001. A quantitative approach to characterizing cell lysis caused by mechanical agitation of *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Prog.* **17**: 336-347.