

## 용존산소농도 조절에 의한 미생물 유래 Transglutaminase 생산

유계수, 전계택<sup>1</sup>, 신원선<sup>2</sup>, 정용섭

진북대학교 응용생물공학부, 강원대학교 생명과학부<sup>1</sup>, 한국식품개발연구원<sup>2</sup>

전화 (063) 270-2571, FAX (063) 270-2572

### Abstract

The effect of agitation speed and aeration rate on mTG production and cell growth by *Streptoverticillum morbarensense* was investigated. Dissolved oxygen was controlled by on-line computer-controlled fermentation system. The agitation speed and aeration rate of 2.5 L fermentor ranged from 330 to 360 rpm and 1 vvm to 4 vvm, respectively. The highest mTG production was 2.1 U/mL when dissolved oxygen level was 20%, and it was improved almost 1.1 times in comparison with that without dissolved oxygen control.

### 서론

생물반응기에서 교반은 기체의 분산, 혼합 및 물질과 열전달을 위해 필요한 전단력을 제공한다. 즉, 균류와 같이 균사를 형성하는 미생물들은 세포가 성장하면서 배양액내의 점도가 높아지게 되는데 교반속도를 증가시켜 산소전달을 향상시킬 수 있다. 그러나 과도한 교반속도는 강한 전단력으로 인해 세포의 성장에 악 영향을 미칠 수 있다. 따라서 적절한 교반속도 확립은 중요하다고 생각되어진다. 한편, 용존산소는 미생물 대사에 중요한 인자로 알려져 있다. 발효중 미생물의 산소 요구도는 발효조의 교반에 의한 산소공급과 균형을 이루어야 한다. 만일 이 요구를 충족시키지 못하면 배양액의 용존산소농도는 임계농도 이하가 되어 미생물 대사에 치명적인 피해를 가져올 수 있다. Zhou 등은 *Sephalosporium acremonium*에 의한 Cephalosporin C 합성에서 생산기간동안 최적 Cephalosporin C 합성을 위한 임계산소농도는 20%였으며, Hwang 등은 *Acetobacter xylinum BRC5*에 의한 셀룰로오스 생산에서 용존산소농도를 10% 유지했을 때 셀룰로오스 생산이 최적임을 보고하였다(1, 2). 따라서 미생물마다 용존산소 임계점이 다르기 때문에 생산물을 극대화하기 위한 용존산소농도에 관한 연구는 중요한 일이라 판단된다. 본 연구에서는 교반속도를 달리하여 교반속도가 생산량에 미치는 영향을 조사하였고, 발효동안 교반과 통기속도를 조절하여 미생물 유래 transglutaminase(mTG) 생산을 위한 최적의 용존산소농도를 확립하고자 하였다.

### 재료 및 방법

본 연구에 사용한 균주는 *Streptoverticillum mobaraense*(ATCC 29032)이다. 포자형성을 위한 고체배지로써 bacto agar를 사용하였으며, 30℃로 유지된 배양기에서 7~10일간 배양하였다. 포자수는 혈구계와 광학현미경을 사용해서 계수하였다. 성장배지의 조성은 glucose

0.5%, proteose peptone 0.2%,  $MgSO_4$  0.1%,  $K_2HPO_4$  0.2%이며, 성장배지에 접종된 포자 ( $10^8$  spores/mL)는 pH 7.0, 온도 30°C, 교반속도 250 rpm에서 진탕 배양되었다. 발효를 위한 접종량은 5%(v/v)로 하였다. mTG 생산을 위한 최적 생산배지조성은 soluble starch 5%, proteose peptone 2%, yeast extract 0.2%,  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  0.1%,  $MgSO_4$  0.1%, PPG 0.05% 이었고, pH는 2N HCl 또는 2N NaOH를 사용하여 7로 조정하였다. 배양에 사용된 반응기 부피는 2.5 L(KBT Co., LTD)로 조업부피 1.5 L에서 운전하였다. 용존산소 조절에 따른 자료 수집 및 제어는 Auto Lab LK 930(Lokas, Korea)시스템과 컴퓨터를 연결하여 자동으로 제어되도록 하였고, 발효중 발생하는  $O_2$ 와  $CO_2$ 는 가스분석기를 이용하여 분석하였다(Lokas, Korea). 산소의 공급은 공기압축기를 이용하여 발효기내로 공급하였으며, 통기속도는 1~4 vvm 범위 내에서 조절하였다. 교반속도는 330 ~ 430 rpm으로 용존산소농도에 따라 변화시키면서 실험을 수행하였다.

### 결과 및 고찰

생물반응기에서 교반속도가 균체의 형태구조와 효소생산에 미치는 영향을 관찰하고, 용존산소농도를 자동 조절함으로써 mTG 생산을 높이고자 실험을 수행하였다. 회분식 배양에서의 교반속도는 258, 330, 400 rpm이었고, 온도 30°C, pH는 7로 조정하면서 운전하였다. 모든 교반속도에서 균체의 형태구조는 1 mm 이하의 펠릴 이었고, 건조균체량은 최대가 약 14 g/L로 서로 비슷한 값을 나타내었다. 효소생산은 330 rpm의 경우 배양 5일에 1.95 U/mL로 가장 높은 값을 나타내었다(Fig. 1). 258 rpm으로 운전 시 낮은 교반속도로 인하여 효소생산 시기가 늦어졌으며, 효소 생산 또한 낮은 값을 나타내었다. 400 rpm으로 운전시 효소생산은 1.2 U/mL로 감소하였으며, 이 결과는 전단력 영향 때문으로 판단되었다. 상기 실험결과를 토대로 교반속도 330 rpm에서 용존산소농도를 30%와 20%로 제한하면서 발효를 수행하였다. 지정된 농도의 용존산소를 유지하기 위하여 통기속도와 교반속도를 동시에 조절하였으며, 미생물의 전단력에 의한 영향력을 고려하여 우선적으로 통기속도가 증가 되도록 설정하였다. 통기속도의 증가만으로 지정된 용존산소를 유지할 수 없을 경우 교반속도가 동시에 자동적으로 작동되도록 하였다. 발효중 용존산소농도 30%를 유지하기 위해 통기속도는 최대 3.7 L/min, 교반속도는 360 rpm까지 증가되었다. 발효중 용존산소농도를 30%로 유지하였을 때 용존산소농도를 조절하지 않은 회분식 배양과 비교하여 건조균체량은 약 26% 증가된 반면 mTG 생산은 약 6.5배 감소하였다. 이 결과로부터 *S. mobaraense*의 경우 30%의 용존산소농도는 효소 생산보다 세포 성장만을 향상시켜주는 것으로 판단되었다. 따라서 용존산소농도를 20%로 제한하여 실험을 진행하였다. 발효중 용존산소농도를 20%로 고정한 경우 통기속도는 1.85 L/min까지 증가하였고, 교반속도는 약간 변화하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 발효 중 방출되는  $CO_2$ 와  $O_2$ 변화는 용존산소농도가 조절되는 시기에  $CO_2$  농도는 높게 유지하다가 그후 감소하는 경향을 보였다. 그리고  $O_2$  농도는  $CO_2$  변화와 반대로 서서히 증가하는 추세를 보여주었다(Fig. 4). 결과로부터  $CO_2$ 는 세포성장이 활발한 시기에 세포의 대사에 의해 대사산물로 방출되어 높게 유지됨을 알 수 있었다. mTG 생산은 배양 6일에 2.14 U/mL로 최대를 나타내었고(Fig. 3) 용존산소농도를 조절하지 않은 경우 보다 1.1배, 30%로 자동 조절했을 때 보다 6.8배 증가된 결과였다. 따라서 본 균주의 경우 용존산소농도

조질로 효소 생산은 회분식배양에 비해 약 10% 정도 증가하였으며, 용존산소농도가 보다 중요하게 적용되는 미생물에는 효과적으로 생산성을 높일 수 있는 시스템으로 판단되었다.

### 참고문헌

1. Zhou, W., K. Holzhauser-Rieger, M. Dor, and K. Schugerl(1992), Influence of dissolved oxygen concentration on the biosynthesis of cephalosporin C, *Enzyme Microb. Technol.* 14, 848~854.
2. Hwang, J. W., Y. K. Yang, J. K. Hwang, Y. R. Pyun, and Y. S. Kim(1999), Effect of pH and Dissolved Oxygen on Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in Agitated Culture, *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 88(2),183~188.
3. Kim, J. L., H. K. Kwon, G. T. Chun, and K. K. Lee(2000), Effect and Development of Automatic Control of Dissolved Oxygen on Growth of *Phellinus linteus* WI-001, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28(5),285~290.

Table 1. DCW and enzyme activity during batch culture by various agitation speeds

agitation speed (rpm)	DCW (g/L)	enzyme activity (U/mL)	protein (mg)	specific activity (U/mg)
258	14.2	1.38	42.97	0.032
330	14	1.95	55.0	0.035
400	13.6	1.23	47.32	0.026

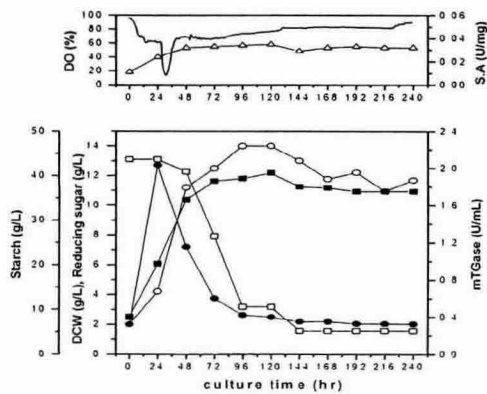


Figure 1. Time course of mTG production at 330 rpm, 1vvm, pH 7.0, 30°C and 5% inoculum during the batch culture.

○-; DCW, ■-; mTG, ●-; reducing sugar, □-; starch, △; specific activity, —; DO.

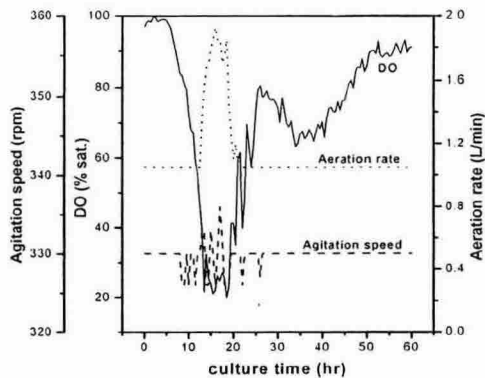


Figure 2. Time course profiles of DO, agitation speed, aeration rate in a 2.5 L batch fermenter culture at 30 °C and 330 rpm for 60 hrs. DO was maintained at about 20%, controlled by on-line computer-controlled fermentation system. - ; DO, ...; aeration rate, --- ; agitation speed.

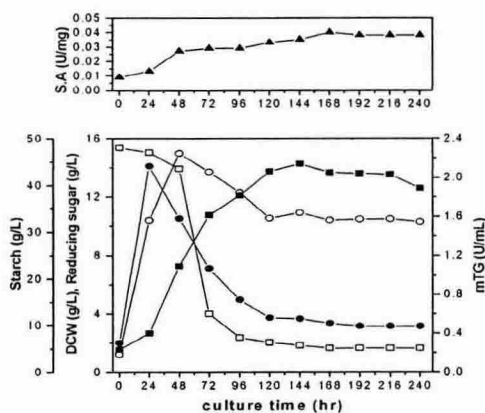


Figure 3. Time course profile of mTG production by on-line computer-controlled fermentation system at 20% saturation level during the batch culture. -○-; DCW, -■-; mTG, -●-; reducing sugar, -□-; starch, -▲-; specific activity.

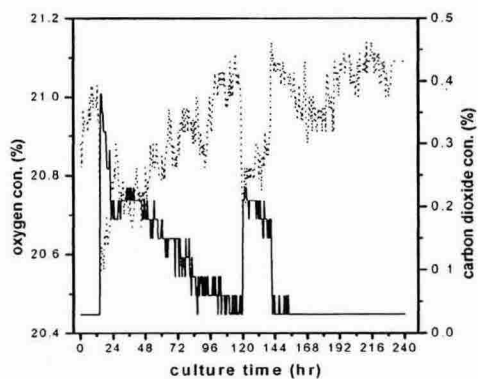


Figure 4. Time course profile of oxygen and carbon dioxide concentration by on-line computer-controlled fermentation system at 20% DO saturation level. ...; oxygen concentration, -; carbon dioxide concentration.