

## 연속배양을 통한 L-proline 발효공정의 최적화 연구

유지명, 최순용, 장형욱<sup>1)</sup>, 안성오<sup>2)</sup>, 조영일<sup>2)</sup>, 이홍원<sup>3)</sup>, 정준기<sup>3)</sup>  
 한남대학교 미생물학과, Acebiotech<sup>1)</sup>, 연세대학교 화학공학과<sup>2)</sup>,  
 한국생명공학연구원 Bio pilot-plant<sup>3)</sup>  
 전화 (042) 860-4513, FAX (042) 860-4516

### ABSTRACT

The continuous production of L-proline was studied using L-histidine auxotrophic mutant of *Corynebacterium acetoacidophilum* under various substrate limited conditions. Among the  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  and L-histidine limited conditions, the highest production of L-proline was observed under the L-histidine limited condition. Under  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  limited conditions, no or poor L-proline production was observed, respectively. For the kinetic parameters under L-histidine limitation, the specific rate of L-proline production was increased with dilution rate upto  $0.1\text{hr}^{-1}$  but decreased above  $0.1\text{hr}^{-1}$ . The volumetric rate of L-proline production was showed similar pattern with specific rate. The dried cell weight was gradually increased according to decrease the dilution rate. Specific rate of glucose consumption was proportionally increased with dilution rate. The results of continuous culture (higher production of L-proline at dilution rate  $0.1\text{hr}^{-1}$ ) will be used in fed-batch culture for the control of cell growth rate and mass production of L-proline.

### 서론

연속배양공정은 배지의 조성이나 배양온도 또는 pH등의 여러 가지 배양조건들을 일정하게 유지시키면서 회석속도의 조절에 의해 성장속도를 임의로 조절함으로써 그에 따른 세포의 생리상태나 대사활성 등을 조사할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 마찬가지로 세포의 성장속도를 일정하게 유지시킴으로서 배지조성이나 온도, pH등의 다른 변수를 임의로 조절하여 그에 따른 세포의 생리활성 변화를 조사할 수 있게 된다. 또한 세포의 성장과 산물의 생산에 적합한 조건하에서 정상상태를 오랜 시간동안 유지시킬 수 있음으로 해서 산물의 생산성을 증대시킬 수 있다는 장점을 나타내기도 한다. 따라서 L-proline의 효율적인 발효생산을 위해서는, 세포의 비성장속도가 L-proline의 생산에 미치는 영향을 조사할 필요가 있다.

본 연구에서는 L-proline 생산 균주인 histidine 영양요구성 *Corynebacterium acetoacidophilum* RYU3161을 사용한 연속배양 실험을 통해, 제한기질에 따른 L-proline 생산성 비교와 histidine 제한조건하에서 회석속도(비성장속도)가 L-proline 생산수율이나 비생산속도, 생산성 등에 미치는 영향을 살펴보았다.

### 재료 및 방법

본 실험에 사용한 균주는 histidine영양요구성 *Corynebacterium acetoacidophilum* RYU3161이며, fermentation initial media조성은 Glucose 60g/l,  $\text{MgSO}_4$  1g/l, Yeast extract 7g/l,

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g/l, Trace element(sol.) 1ml/l, Biotin,Thiamine(sol.) 1ml/l, histidine 제한조건하에서의 feeding media조성은 Glucose 100g/l, MgSO<sub>4</sub> 10g/l, Yeast extract 5g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15g/l, histidine 0.1g/l, Trace element(sol.) 3ml/l이며, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 제한조건하에서는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 5g/l로, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 제한조건하에서는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0g/l로 제한하였으며, histidine은 0.2g/l을 첨가해 주었다.

제한기질(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, histidine)에 따른 L-proline 생산성을 비교하기 위해 회석속도 0.06hr<sup>-1</sup>에서의 연속배양을 실시하였고, histidine 제한조건하에서 L-proline생산에 대한 회석속도의 영향을 살펴보기 위하여 0.03hr<sup>-1</sup>에서 0.13hr<sup>-1</sup>의 범위로 회석속도를 변화시켜가면서 연속배양을 수행하였다. 배양시작 후 약 10시간 가량을 회분식 배양을 하면서 균체를 증식시킨후 원하는 회석속도(0.0316hr<sup>-1</sup>, 0.06hr<sup>-1</sup>, 0.096hr<sup>-1</sup>, 0.132hr<sup>-1</sup>)에 맞추어 연속배양을 시작하였다.

### 결과

회석속도 0.06hr<sup>-1</sup>에서 연속배양 실험한 결과 제한기질에 따른 L-proline 비생산속도(Qp)는 histidine을 제한기질로 이용하였을 때 가장 높은 0.13hr<sup>-1</sup>을 나타냈으며, histidine 제한조건하에서의 연속배양은 회석속도 감소에 따라 균체 농도의 증가를 나타내었다. 포도당 비소비속도(Qs)는 회석속도 증가에 따라 증가하였으나 L-proline 비생산속도는 0.096hr<sup>-1</sup>이하의 회석속도 범위내에서 회석속도 증가에 따라 증가하다가 0.132hr<sup>-1</sup>에서 감소하였다. 생산성(productivity)은 L-proline 비생산속도와 비슷한 양상을 보였는데, 회석속도 증가에 따라 증가하여 0.096hr<sup>-1</sup>에서 0.87g/l의 최대값을 보인 후 다시 감소하였다. 또한 회석속도가 증가함에 따라 포도당에 대한 균체증식수율(Yx/s)은 비례적으로 증가하나 포도당에 대한 L-proline 생산수율(Yp/s)은 0.06hr<sup>-1</sup>의 회석속도에서 0.279g/g의 최대값을 나타낸 후 점점 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 최대의 L-proline 비생산속도와 생산성을 보이는 회석속도 0.096hr<sup>-1</sup>을 성장속도로 조절하여 유가식 배양공정에 이용할 경우 L-proline의 대량생산이 가능할 것으로 생각된다.

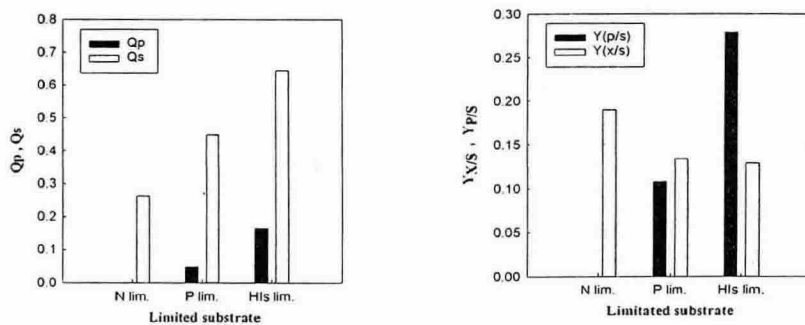
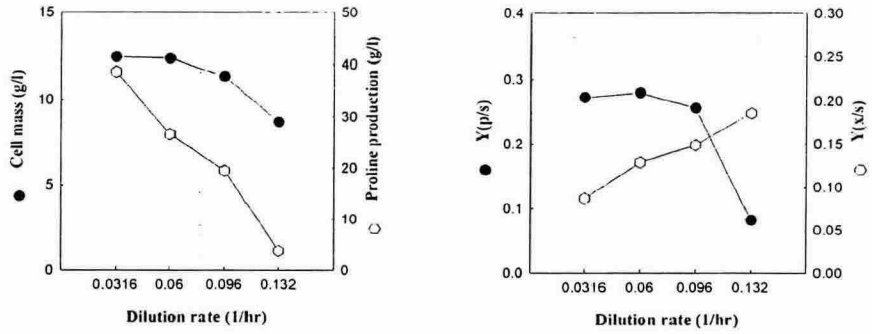


Fig.1. Qp, Qs and Yx/s and Yp/s in continuous culture with limited substrate(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, histidine);

Yx/s: 균체증식수율, Yp/s: L-proline 생산수율, Qp: L-proline비생산속도 Qs: 포도당비소비속도

Fig.2. Cell mass, L-proline production and Y(p/s), Y(x/s) with dilution rate under



histidine imitation:  $Y_x/s$ : 균체 증식수율,  $Y_p/s$ : L-proline 생산수율

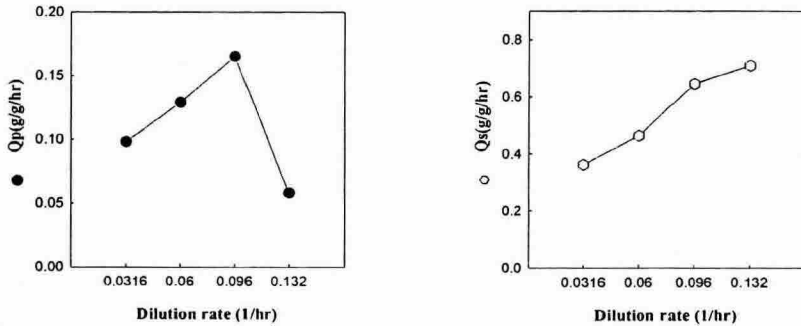


Fig.3.  $Q_p$ (L-proline생산속도) and  $Q_s$ (포도당소비속도) with dilution rate under histidine limitation

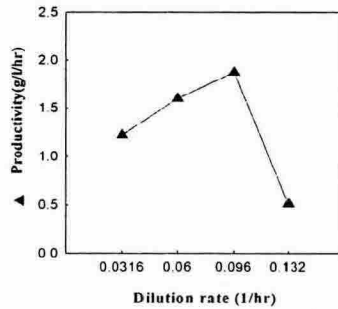


Fig.4. Productivity with dilution rate under histidine limitation

참고문헌

1. 최대건, "Brevibacterium ketoglutamicum Arginine 영양요구주를 이용한 오르니틴의 생산"(1995)
2. Azuma T and Nakanishi T, "Factors affecting L-arginine production in the continuous culture of an L-arginine producer of *Corynebacterium acetoacidophilum*" J.ferment.Technol., 66, 285-290
3. Cooney C L, Continuous culture of microorganism: An overview and perspective, Annal. N. Y. Acad., 295-314
4. Hirao T, Nakano T, Azuma T, Sugimoto M and Nakanishi T, L-lysine production in continuous culture of L-lysine hyperproducing mutant of *Corynebacterium glutamicum*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 32, 269-273