Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 19 No. 1, 76-81 (1991)

*Corynebacterium glutamicum*에 의한 Lysine 생산에 있어서 산화환원 전위가 발효속도론적 특성에 미치는 영향

이진희 · 김성준 · 이재흥*
제일제당(주) 가공식품개발센터

The Effect of Redox Potential on the Kinetics of Lysine Production by *Corynebacterium glutamicum*

Lee, Jin-Hee, Seong-Jun Kim and Jae-Heung Lee*
Foods R & D Center Cheil Foods & Chemicals Inc., 636 Guro-Dong, Guro-Gu, Seoul, Korea

Abstract — The effect of redox potential (ORP) on lysine production by a leucine auxotrophic regulatory mutant of *Corynebacterium glutamicum* on molasses medium was investigated in a 2-*l* jar fermentor at pH 6.9 and 32℃. At a dilution rate of $D=0.1\ h^{-1}$, a maximum yield of $Y_{P/S}=0.24$ was obtained in either carbon- or leucine-limited chemostat where the redox potential was between −60 mV and −100 mV. This level of redox potential corresponded to moderate oxygen deficiency. Under a high oxygen deficient condition of the redox potential of −130 mV (oxygen-limited chemostat), all the kinetic parameters such as $Y_{P/S}$, q_S and q_P were decreased significantly and significant amounts of byproducts including glycine, alanine and valine were accumulated in the culture, indicating that the control of redox potential is important in lysine fermentation. At the redox potential of −40 mV, on the other hand, large quantities of arginine (up to 0.38 g/*l*) and glutamic acid (up to 0.12 g/*l*) were produced. A maximum lysine productivity of 2.41 g/*l*/h was achieved at −66 mV under a carbon-limited condition.

아미노산 발효에 관한 연구에 의하면 용존산소가 여러 아미노산 발효특성에 중요한 요소로 작용함이 알려져 왔다(1-3). 아미노산 뿐만 아니라 항생제(4) 혹은 핵산관련 물질(5) 등의 호기적 발효에 있어서도 최적조건의 용존산소를 유지시켜 주는 것이 중요하다.

일반적으로 배양액 중의 용존산소의 양을 측정하는 데에는 용존산소 전극이 사용되지만, 이것으로는 0.01 mg/*l* 이하의 용존산소의 양은 측정하기 어려워 정확한 용존산소값을 알아내기 힘든 단점이 있다(6). 따라서 이와 같이 매우 낮은 농도의 용존산소의 양은 용존산소 대신 배양액 중의 산화환원 전위(ORP)를 측정함으로써 알아낼 수 있다(7-10). 실제 발효에 영향을 줄 수 있는 여러 환경요인 중 산화환원 전위를 제어함으로써 배양최적화 연구를 보고한 예가 있다(11).

통상 라이신의 공업적 생산은 유가식 발효를 이용하지만 이러한 유가식 발효에 있어서는 배양액의 산화환원 전위가 일정한 값으로 유지되는 것이 아니라 발효가 진행됨에 따라 크게 변하는 비정상상태(unsteady state)에서 운전되므로 발효 전과정에서 최적 용존산소의 양을 유지할 수 없다. 결국 라이신 발효에 있어서 용존산소의 영향을 정확히 파악하기 위해서는 정상상태(steady state)를 유지할 수 있는 연속발효(12)를 이용해야 하며, 더욱이 연속발효를 수행함으로써 유가식 발효에 비해 생산성을 크게 증가시킬 수 있는 이점도 있다.

지금까지 라이신 발효에 있어서 용존산소에 대한 연구는 많으나 대개 회분식 또는 유가식 발효방법을 이용한 것이고, 연속발효에 의해 체계적으로 연구되어

Key words: Redox potential (ORP), Chemostat, Dilution rate
*Corresponding author

있지는 않다. 본 연구에서는 공업적으로 많이 쓰이는 당밀을 원료로 사용하여 탄소원, 산소, 로이신 등을 제한시켜서 연속발효의 정상상태에서의 용존산소의 영향을 고찰하며 동시에 라이신 발효의 생산성을 크게 향상시키는 방법을 모색하는데 그 목적을 두었다.

재료 및 방법

사용균주

호모세린 및 로이신에 대하여 영양요구성을 지니며, 라이신 유사체에 대하여 내성을 갖는 변이주인 *Corynebacterium glutamicum* JS 231을 사용하였다.

배지

종균배양 배지는 40 g/*l* 포도당, 10 g/*l* peptone, 1.5 g/*l* K_2HPO_4, 0.5 g/*l* KH_2PO_4, 10 g/*l* yeast extract, 100 μg/*l* biotin, 200 μg/*l* thiamine-HCl, 3 g/*l* urea, 0.5 g/*l* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 g/*l* NaCl로 구성되었으며 pH는 KOH를 사용하여 7.2로 조절하였다.

본 배양시의 주발효 배지는 80 g/*l* 당, 11 g/*l* $(NH_4)_2SO_4$, 2.7 g/*l* NaCl, 1.0 g/*l* KH_2PO_4, 1.0 g/*l* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 400 mg/*l* threonine, 200 mg/*l* methionine, 540 μg/*l* thiamine·HCl, 325 μg/*l* biotin, 1625 μg/*l* niacinamide, 1625 μg/*l* calcium pantothenate, 920 mg/*l* leucine, 3 m*l*/*l* 소포제(5% AZ-20R)로 구성되었고, 살균시 당과 나머지 성분들은 별살하였다.

연속발효로 전환시 유가액의 조성은 균체성장에 필수적인 단 한 가지의 성분을 제한하고 나머지는 충분히 공급되도록 하였으며, 75~150 g/*l*의 당과 23.6 g/*l* $(NH_4)_2SO_4$, 1.5 g/*l* NaCl, 0.6 g/*l* KH_2PO_4, 0.55 g/*l* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 6.6 mg/*l* $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 6.6 mg/*l* $MnSO_4 \cdot H_2O$, 350 mg/*l* threonine, 160 mg/*l* methionine, 300 μg/*l* thiamine-HCl, 180 μg/*l* biotin, 910 μg/*l* niacinamide, 910 μg/*l* calcium pantothenate, 370~1400 mg/*l* leucine, 3 m*l*/l 소포제(5% AZ-20R)로 구성되었으며, 당과 나머지 성분들은 별살하였다. 또한 본 실험에서는 탄소원으로 포도당 대신에 당밀을 사용하였다.

발효조

2 *l* 발효조인 Biostat(B. Braun, 서독)을 사용하였다.

발효

Corynebacterium glutamicum JS 231을 1백금이 따서 50 m*l*의 종균배지를 함유한 250 m*l* 플라스크에 접종한 후 32℃, 220 rpm으로 고정된 진탕회전 배양기 내에서 15시간 동안 배양하였다.

배양이 끝난 종균은 접종량이 5%가 되도록 주발효 배지에 접종하였으며, 이 때의 통기량은 0.5 vvm, working volume은 1*l*로 유지하였으며, 배양액 중의 pH는 NH_4OH를 가함으로써 6.9로 일정하게 유지하였고 온도는 32℃였다. 또한, 발효 중 거품 발생을 방지하기 위해서 발효조내에 소포제 전극을 장치하고 거품 발생시 자동적으로 소포제가 투입되도록 하였다.

균체가 성장하여 대수증식기의 적정시점에 이르면 배양방법을 회분식에서 연속식으로 전환하였다.

ORP 전극(DKK, Type 6327L, 일본)은 사용하기 전 표준용액을 이용하여 보정하였다(13).

분석

균체의 농도는 배양액을 증류수로 100배 희석시킨 후 SPECTRONIC 20 (Milton Roy Company, U.S.A.)을 사용하여 562 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 나타내었다. 배양액의 균체량은 562 nm에서의 흡광도 값에 대한 건조균체량이 표준곡선을 구한 후 이로부터 건조균체량(X)을 역산하였다.

$$\text{건조균체량} = \text{O.D(at 562 nm)} \times 40 - 2 \quad (1)$$

여기서 O.D(at 562 nm)는 100배 희석한 배양액의 562 nm에서의 흡광도를 나타낸다. 환원당 정량은 Bertrand 방법을 사용하였으며, 라이신 염산염의 농도는 HPLC(Waters Model 703 Tri-Module Automation Systme, U.S.A.)를 사용하여 결정하였다. HPLC에서의 분리는 이온교환 크로마토그래피에 이은 post-column derivatization 방법을 사용하였으며, 이 때 사용한 용액은 OPA(ortho-phthalaldehyde) 용액이었고, column의 반응온도는 60℃이었다. Detector로는 fluorescence detector를 사용하였고, injection volume은 5 μ*l*, standard의 농도는 0.2 g/*l*이었다.

결과 및 고찰

회분식 발효공정에서의 용존산소의 영향

균체 성장과 라이신 발효 특성에 대한 용존산소의

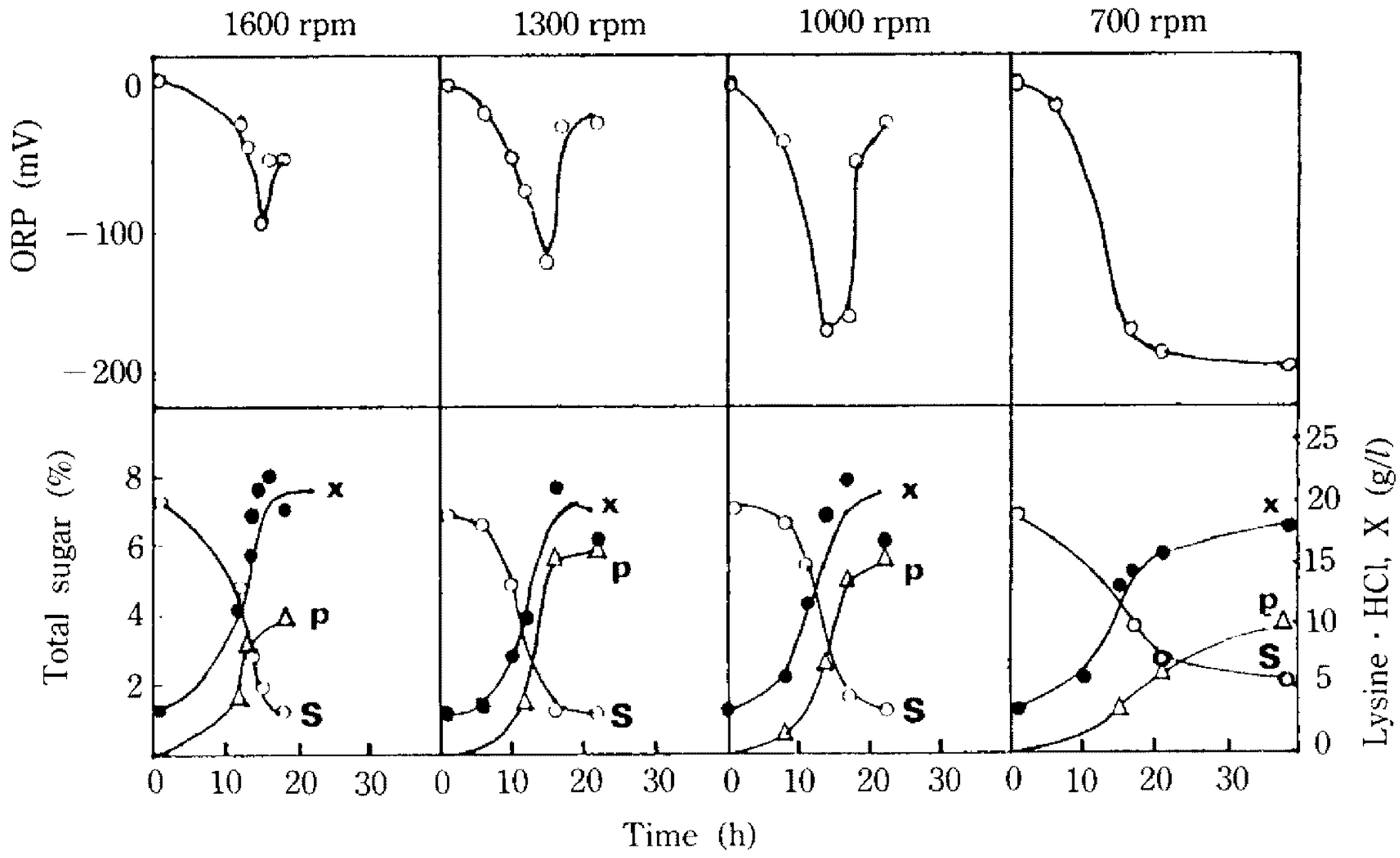

Fig. 1. Effect of ORP (Oxidation Reduction Potential) on lysine production in batch culture.

영향을 조사하기 위하여 발효조의 교반기 회전수를 변수로 하여 회분식 발효를 수행하였다. Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 용존산소가 제한될 경우(즉 회전수가 낮아서 낮은 산화환원 전위가 유지되는 경우) 균체 성장속도 및 라이신 생성이 현저히 저하됨을 알 수 있었고, 그 반대로 용존산소 농도가 높은 경우(즉, 회전수가 현저히 높아서 산화환원 전위가 높게 유지되는 경우)에도 라이신 생성이 저하됨을 알 수 있었다.

회분식 발효공정은 발효 처음부터 말기까지 정상상태에서 운전되는 것이 아니기 때문에 용존산소의 정량적 영향을 조사하기는 불가능 하지만 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 균체성장 및 라이신 생성에 있어서 용존산소 농도를 알맞게 유지시켜 줌이 라이신 발효에 중요함을 알 수 있었다.

탄소원이 제한되는 라이신 연속발효

앞서 언급했듯이 용존산소의 영향을 정량적으로 조사하기 위해 연속발효를 실시하였다. 희석률(dilution rate, D)이 0.1에서 유가액의 당밀 탄소원의 농도(S_o)를 상대적으로 낮게 유지하고, 교반기의 회전수를 변수로 하여 정상상태하에서 라이신 연속발효를 수행하였다.

정상상태하에서의 연속발효에서는

$$\mu = D \tag{2}$$

$$q_S = \frac{D}{X}(S_o - S) \tag{3}$$

$$q_P = \frac{D}{X}P \tag{4}$$

이며, 생산성(productivity)은 D · P가 된다. 여기서 μ는 균체의 比성장 속도상수를 나타내며 X, S, P는 각각 균체농도, 탄소원의 농도, 라이신 염산염의 농도를 나타낸다. 한편, q_S 및 q_P는 각각 比탄소원 소모속도 및 比라이신 생성속도를 나타낸다. Fig. 2는 탄소원이 제한되는 라이신 연속발효 결과를 나타내고 있는데 산화환원 전위치가 일정범위 즉, −60 mV에서 −100 mV 사이에서 대당수율 $Y_{P/S}$, q_S, q_P 모두가 최고치를 나타냄을 알 수 있었다.

이 범위의 산화환원 전위는 용존산소가 약간 결핍되는 정도(moderate oxygen deficiency)의 영역이다. 그러나 용존산소 농도, 즉 산화환원 전위가 아주 높거나(−40 mV 이상) 또는 아주 낮을 때(−100 mV 이하), 대당수율 및 발효 반응속도 상수값 모두가 상대적으로 낮은 것을 알 수 있었다. 이러한 영역에서 특히 대당수율이 저하되는 이유를 알아보기 위하여 발효액 중의 부산물 분석을 수행해 본 결과 높은 산

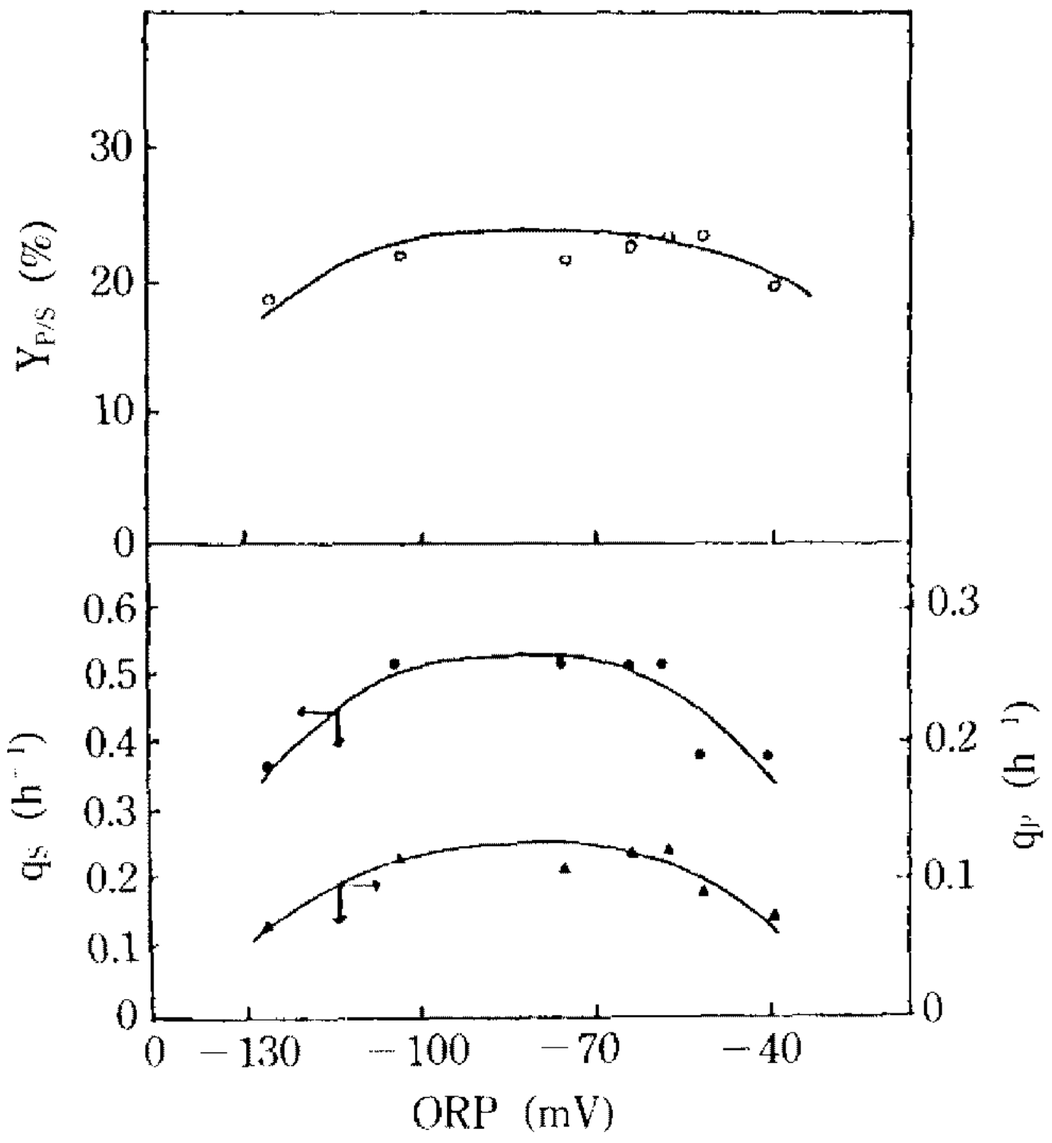

Fig. 2. Effect of ORP on the kinetics of lysine production in carbon-limited continuous culture at D=0.1 h^{-1}.

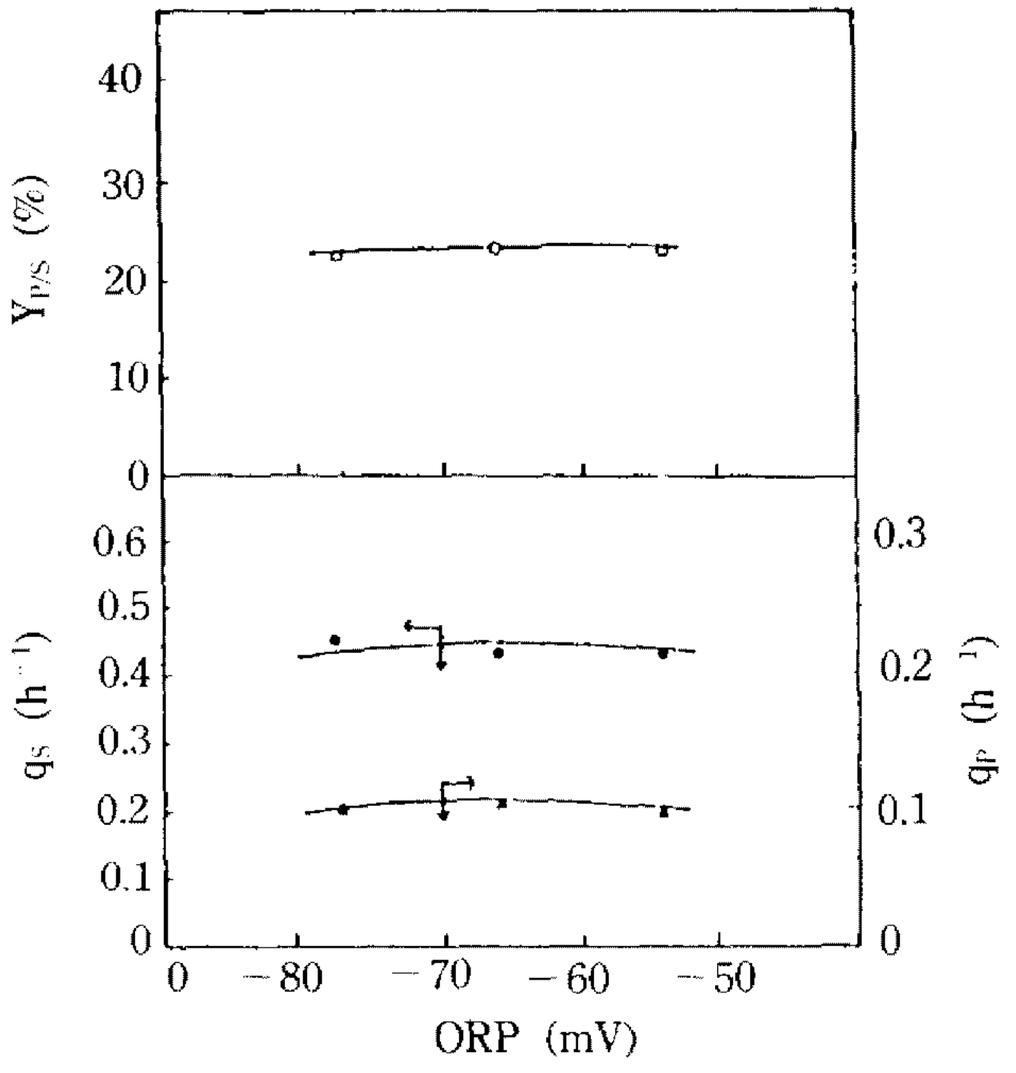

Fig. 4. Effect of ORP on the kinetics of lysine production in leucine-limited continuous culture.
(S_o = 100 g/*l*, 1400 rpm, D=0.1 h^{-1})

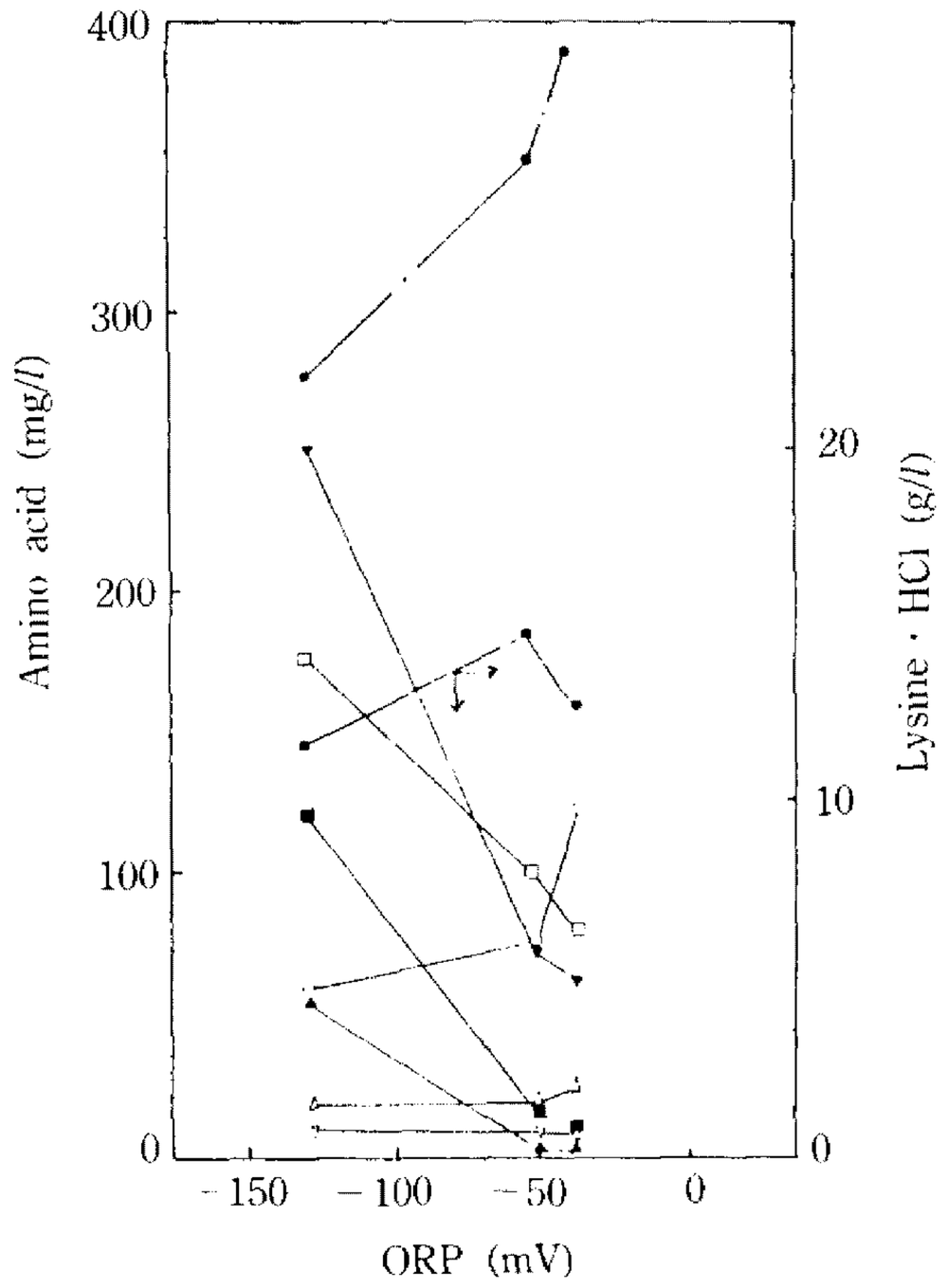

Fig. 3. Byproducts produced in lysine fermentation at various ORP conditions at D=0.1 h^{-1}.
●—·—●: arginine ○—○: glutamic acid
■—■: valine □—□: leucine
▼—▼: alanine ▽—▽: aspartic acid
▲—▲: glycine △—△: threonine

화환원 전위에서는 glutamic acid, arginine 등이 다량 축적되는 반면, 용존산소가 극도로 결핍되는 범위에서는 valine, glycine, alanine 등이 다량 생성되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

이러한 사실들은 회분식 발효에서의 용존산소의 영향에 대한 결과와 유사한 경향을 보여 주는 것으로서, 겉보기로만 알 수 있었던 용존산소의 중요성을 연속발효를 통하여 정량적으로 설명할 수 있었다.

로이신이 제한되는 라이신 연속발효

본 실험에서 사용된 균주는 로이신 영양요구주이었다. 따라서 탄소원과 그 밖의 영양성분들은 충분히 공급하고 배지성분 중 로이신의 양에 의해서 균체성장이 제한되도록 하여 라이신 연속발효를 수행하였다. 첨가되는 로이신의 양은 용존산소의 농도가 아주 높거나 또는 아주 낮지 않은 범위, 즉 정상상태에서의 산화환원 전위치가 −100 mV에서 −60 mV 사이가 유지되도록 결정하여 공급하였다.

Fig. 4에서와 같이 로이신에 의해 제한되는 라이신 발효는 산소가 제한되지 않는 한 대당수율 $Y_{P/S}$, q_S, q_P가 크게 변화하지 않는 것을 알 수 있었다.

산소가 제한되는 라이신 연속발효

산소가 제한되는 라이신 연속발효 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에서 알 수 있듯이 산화환원 전위가 −160 mV에서 −130 mV로 증가함에 따라 대당수율 $Y_{P/S}$ 및 q_S, q_P가 모두 증가되고, Fig. 2에서와 같이 −100 mV에서 −60 mV 범위에서 최대가 되는 것을 알 수 있었다. 따라서 산소가 극도로 제한되면 라이신 생성이 극히 불량해짐을 알 수 있었다.

이와 같이 탄소원, 로이신, 산소가 각각 제한되는 연속발효의 결과를 종합해 볼 때 라이신 발효에 있어서 산소가 제한되지 않는 한 대당수율 및 발효 반응속도 상수값이 저하되지는 않으며, 결국 용존산소의 농도가 라이신 발효에 있어서 매우 중요하다는 사실과 최적 용존산소 농도는 용존산소 전극으로는 측정하기 어려운 −100 mV에서 −60 mV 정도의 산화환원 전위치를 갖는 즉, 용존산소가 약간 결핍(moderate oxygen deficency)되는 영역이라는 것을 알 수 있었다.

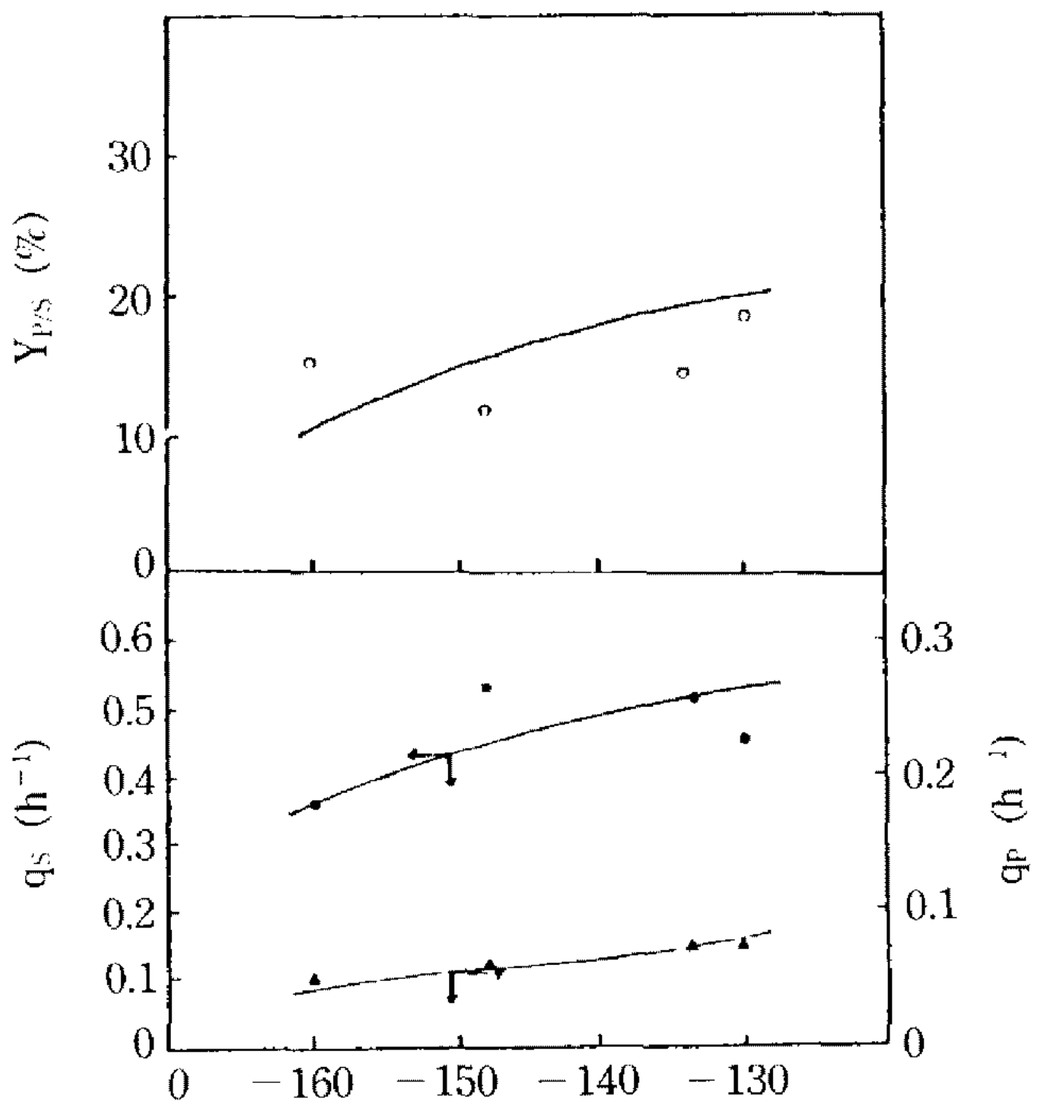

Fig. 5. Effect of ORP on the kinetics of lysine production in oxygen-limited contiuous culture.

라이신 연속발효 공정의 최적화

연속발효로 라이신 발효의 생산성을 향상시키기 위하여 첨가되는 당농도, 로이신의 양을 일정하게 하고 정상상태하에서 희석률을 변화시켜 실험하였다.

Fig. 6에서 알 수 있듯이 희석율 0.1 h^{-1}에서 최대의 라이신 생산성을 얻을 수 있었다. 그러나 이 경우에는 산소가 제한되기 때문에 첨가당의 농도를 낮추어 탄소원이 제한되도록 하여 줌으로써 정상상태에서의 산화환원 전위치를 −100 mV 이상으로 올려 생산성을 더욱 향상시킬 수 있었다.

Table 1에서 비교해 본 것과 같이 탄소원을 제한시킴으로서 산화환원 전위치 −66 mV에서 최대로 2.41 g/*l*/h의 라이신 생산성을 얻을 수 있었으며, 이는 보통의 유가식 발효 경우보다 2.1배의 높은 생산성을 보여주는 결과이다.

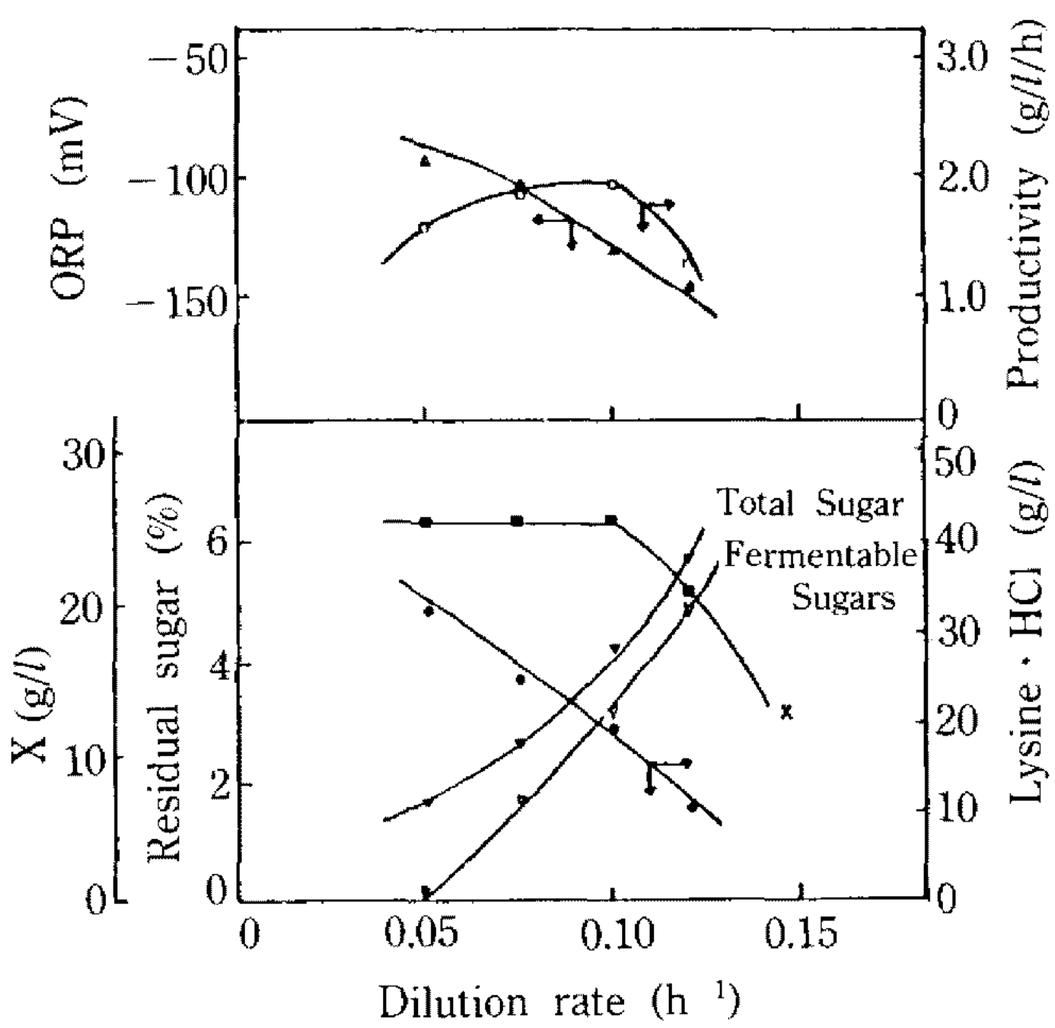

Fig. 6. Effect of dilution rate of lysine productivity. (S_o = 150 g/*l*, leucine = 930 mg/*l*, 1400 rpm)

Table 1. Comparison of productivity at various fermentation conditions

S_o (g/*l*)	Leucine (mg/*l*)	D (h^{-1})	Agitation (rpm)	ORP (mV)	S (g/*l*)	P (g/*l*)	Productivity (g/*l*/h)	Remark
100	930	0.1	1200	−60± 2	12	20.6	2.06	Carbon-limited
125	930	0.1	1400	−66± 3	16	24.1	2.41	Carbon-limited
150	930	0.1	1400	−130± 10	42	19.2	1.92	Oxygen-limited

요 약

2*l* 발효조에서 pH 6.9, 온도 32℃일 때 당밀배지를 이용하여 *Corynebacterium glutamicum*의 영양요구성 유사체 내성변이주에 의한 라이신 발효시 산화환원 전위(ORP)가 라이신 발효속도의 특성에 미치는 영향을 조사하였다.

희석률이 0.1 h^{-1}일 때 탄소원이 제한되건 로이신이 제한되건 산소가 제한되지 않는 한 최대의 대당수율 24%를 보였으며, 이 때의 산화환원 전위 값은 −60 mV와 −100 mV 범위에 해당하였다. 산화환원 전위 값이 −130 mV의 매우 낮은 용존산소 조건하에서는 대당수율 및 q_s, q_p 등의 발효 반응속도 상수값들이 크게 감소 하였으며, glycine, alanine, valine을 포함하는 발효 부산물의 축적량이 매우 높아졌다. 반면에 산화환원 전위값이 −40 mV 정도의 높은 용존산소 범위하에서는 많은 양의 arginine(0.38 g/*l*)과 glutamic acid(0.21 g/*l*)가 축적되었다. 이는 라이신 발효에 있어서 산화환원 전위의 조절이 매우 중요함을 보여주는 결과로 사료된다. 연속발효에 의한 라이신의 최대 생산성은 2.41 g/*l*/h로서 유가식 발효 경우보다 2.1배의 높은 생산성을 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. Akashi, K., H. Shibai and Y. Hirose: *J. Ferment. Technol.* **57**, 321(1979).
2. Hirose, Y.: In "Biotechnology of Amino Acid Production", Kodansha Ltd., Tokyo, Vol. **24**, 67 (1986).
3. Akashi, K., S. Ikeda, K. Kobayashi, H. Shibai and Y. Hirose: *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 27 (1978).
4. Ho, C.S. and M.D. Smith: *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 668 (1986).
5. Shibai, H., A. Ishizaki, H. Mizuno and Y. Hirose: *Agric. Biol. Chem.* **37**(1), 91 (1973).
6. Radjai, M.K., R.T. Hatch and T.W. Cadman: *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 657 (1984).
7. Kjaergaard, L. and B.B. Joergensen: *Biotechnol. Bioeng.* **9**, 85 (1979).
8. Winter, E.L., G. Rao and T.W. Cadman: *Biotechnol. Techniques*, **2**, 233 (1988).
9. Shibai, H., A. Ishizaki, K. Kobayashi and Y. Hirose: *Agric. Biol. Chem.* **38**, 2407 (1974).
10. Dahod, K.S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 2123 (1982).
11. Daniels, W.F., D.A. Parker, R.W. Johnson and L.E. Schneider: *Biotechnol. Bioeng.* **7**, 529 (1965).
12. Ackerson, M.D., E.C. Clausen and J.L. Gaddy: *Appl. Biochem. Biotech.* **20/21**, 511 (1989).
13. Ishizaki, A., H. Shibai and Y. Hirose: *Agric. Biol. Chem.* **38**(12), 2399 (1974).

(Received January 21, 1991)