

동결건조법이 Rifamycin 발효의 Starter Cell에 미치는 영향

이동희 · 조좌형¹ · 이노운*

건국대학교 미생물공학과, ¹이리농공전문대학 식품공학과

Effects of Lyophilization on Starter Cell of Rifamycin Fermentation

Yi, Dong-Heui, Choa-Hyung Cho¹ and No-Woon Lee*

Department of Microbiological Technology, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

¹Department of Food Engineering, Iri Agricultural and Technical College, Chonbuk 570-110, Korea

Abstract — Upon lyophilization of *Nocardia mediterranei*, the effects of cryoprotectants, cell concentration and drying time on viability were examined. The data were treated by computer according to response surface analysis. As a result, the maximum value of presumed viability was 39.3% under the optimal conditions of 11.6%(v/v) sucrose, 1.16×10^{11} (CFU/ml) cell concentration, and drying time for 6.18 hrs. We also used the starter cell of rehydrated solution after lyophilization in industrial production, obtained the fermentation pattern and the purity of rifamycin B which were the same with control (FVM) and it is possible for us to use *N. mediterranei* as a starter cell after the storage of lyophilization for 18 months.

항생제 발효공업에서 균주의 사용은 일반적으로 한천배지에 접종 후 계대배양하여 사용하고 있으나, 1회 계대하여 사용까지는 약 40~50일 소요된다. 균주의 계대작업이 빈번히 되풀이 되어, 여러 종류의 항생제를 생산하는 경우 계대작업시간이 많이 소요되며, 연속적인 계대작업으로 인한 유전적인 변이, 사용원료의 순도 및 여러 환경조건 등에 의해 균일하면서 높은 활성도를 가지는 균주를 발효공업에 이용하기는 쉽지 않다(1). 따라서 균주의 높은 활성을 잃지 않고 장기간 보존하면서 필요시 언제든지 사용할 수 있는 방법을 강구하는 것은 미생물 산업에 있어 매우 중요한 일이다. 현재 산업적으로 가장 많이 이용하고 있는 동결방법(2-4)은 장기 보존상 상당한 제한이 따르고 있는 실정이다.

Hammer(5)가 *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* 등의 세균을 장기보존하기 위하여 1911년 처음으로 lyophilization 방법을 적용하였다. 이 lyophilization시 survival에 미치는 영향 인자는 미생물의 성숙도, 배지의 영양 정도, 미생물의

농도, 미생물의 종류, 보호제의 조성, 동결속도, 건조 시간, 보존조건 및 rehydration 방법 등이 있다(6-9).

본 연구에서는 항결핵 치료제로 널리 사용하고 있는 rifamycin B(10, 11)를 생산하는 *Nocardia mediterranei* NCK-4를 동결건조시 생존도에 미치는 여러 인자 중 보호제 첨가효과, 미생물의 농도, 건조시간을 검토하였으며, 이 인자들을 반응표면분석법(12, 13)에 의해 실험한 data를 컴퓨터로 처리하므로 최적조건에 따른 생존도 최대치를 추정 분석하였다. 또한 동결 건조된 *N. mediterranei* NCK-4를 rehydration 후 계대배양없이 starter cell로 발효공업에 직접 이용한 경우 활성도에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 *Nocardia mediterranei* NCK-4를 한천배지에 계대배양한 후 전배양 배지에 배양한 액을 지름이 18 mm인 시험관에 7 ml씩 분주하여 -70°C 에서 급속동결시킨 FVM(frozen vegetative mycelium)을 종균으로 사용했다. 한천배지(agar medium)와 전배양 배지(seed medium) 조성은 이

Key words: Rifamycin lyophilization, starter cell, cryoprotectant, response surface analysis

*Corresponding author

등(14)의 보고 및 본배양 배지(main medium) 조성은 Rho(15)의 보고와 같다.

동결건조

10 ml vial에 균주액 1 ml를 넣고 -70°C에서 급속 동결시킨 후 lyophilizer(Labcon Co., U.S.A.)에 연결시켜서 0.005~0.01 torr 진공상태에서 5시간 건조 후 밀봉하여 동결 건조하였다. 이때 보호물질의 첨가효과를 관찰하기 위하여 전배양액을 원심분리(3000 rpm, 4°C)하여 상등액을 제거한 후 동일량의 0.8% NaCl, 10% sucrose, 10% skim milk, 10% glycerol, 5% Tween 80을 각각 첨가한 후 동결건조하여 rehydration시킨 다음 생존도를 측정하였다. 대조군은 physiological solution으로써 전배양 배지(14)를 첨가하였다.

배양조건

균주는 한천배지에서 28°C로 9일간 배양했으며, 전배양은 500 ml 전배양 배지가 들어있는 5 l round flask에 FVM 0.4%를 접종하여 reciprocal shaker(진폭 5 cm, 120 strokes/min)에서 28°C로 배양하였다. 본배양은 7 l jar fermentor(Marubishi Co., Ltd, Japan)에 4 l의 배지를 조제한 후 전배양액 5%(v/v)를 접종하여 온도 28°C, 통기량 0.5 vvm, 교반속도 400 rpm에서 발효하였다. 단 lyophilization 후 저장기간에 따른 활성도 실험은 500 ml 삼각 플라스크에 배지 40 ml를 분주한 후 5% 전배양을 접종하여 200 rpm rotary shaker에서 pH 조절과 glucose feeding없이 배양하였다.

분석방법

균체량 측정은 5 l round flask에서 전배양액을 배양시간별로 채취하여 10 ml 침전관에 취한 후 원심분리(3000 rpm, 15 min)하여 침전된 균체량을 전체 용량에 대한 백분율로 계산값을 PMV(packed mycelium volume, %)로 나타내었다.

Glucose 측정은 발효액을 원심분리(3000 rpm, 30 min)시킨 후 상등액을 발효 경과일수에 따라 0~5 일까지는 2 ml, 6일 이후에는 5 ml씩 50 ml volumetric flask에 취한 후 증류수로 포션을 맞추어 당분석기(YSI model 27, U.S.A)로 측정하였다.

생존도 및 활성도 측정에서 생존도(viability)는 이 등(14) 방법에 의해 측정하였으며, rifamycin B 농도는 Pasqualucci 등의 방법(16)으로 측정하였다. 이

때 rifamycin B 생산농도를 활성도(activity)로 정의하였다.

반응표면분석법

본 실험에서는 *N. mediterranei* NCK-4를 동결건조함에 있어 생존도 최적치와 최적조건을 구하기 위하여 Hill 등의 반응표면분석법(12, 13)을 적용하여 구하였으며, 반응표면의 모형을 설정하기 위해 다음과 같은 2차 회귀 모형을 택하였다(13).

$$\eta = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i < j}^k \beta_{ij} X_i X_j \tag{1}$$

독립변수의 (k)가 3인 경우, 반응표면이 회귀분석 방법에 의하여 추정되었을 때, 이 추정된 독립변수들의 최적반응조건의 결정은 식 (2)와 같이 표현된다.

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \tag{2}$$

추정된 회귀계수들 $\beta' = (\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23})$ 은 컴퓨터로 Jahng(17)의 program에 의해서 처리하여 구하였다.

각 독립변수의 code value가 -2~+2가 되도록 5수준에서 중심합성계획법(13, 18)을 활용하여 실험하였다.

결과 및 고찰

동결건조시 생존도에 미치는 영향

N. mediterranei NCK-4를 동결건조시 보호물질의

Table 1. Effect of lyophilization on the survival of *Nocardia mediterranei* NCK-4 in the presence of different cryoprotectants

Cryoprotectants	Viability (%)	
	After freezing at -70°C	After lyophilization
Physiological solution	100 (48 × 10 ⁹)*	12.5
0.8% NaCl		14.6
10% Sucrose		32.3
10% Skim milk		27.1
10% Glycerol		1.0
5% Tween 80		6.3

*Number of cell

종류에 따른 생존도(viability)에 대한 영향을 검토하기 위해 Table 1과 같이 실험한 결과, 10% sucrose 사용시 대조군인 생균수에 대해 약 32%로서 가장 높게 나타났으며, sucrose 농도별로 조사한 결과 Fig. 1과 같이 9~12% 범위에서 가장 높은 생존도를 나타내었다. 이 보호물질의 효과에 관한 작용기작은 아직 정확히 규명되고 있지 못하나, 보호물질이 미생물 세포의 투과성과 삼투압에 영향을 미치고 있는 것으로 보고된 경우도 있다(19). 또한 세포농도에 따른 영향은 Fig. 2와 같이 초기 세포수 약 40×10^9 인 *N. mediterranei* NCK-4를 0.8% NaCl로 희석($10^{-1} \sim$

10^{-4})하여 동결건조한 후 공기가 존재하는 상태에서 rehydration하여 생존도를 측정한 결과, 높은 생존도를 유지시키기 위해서는 미생물의 농도를 높이는 것이 필요함을 알 수 있었다. 이 원인은 미생물 자체가 protective colloid로 작용하기 때문에 상대적으로 생존

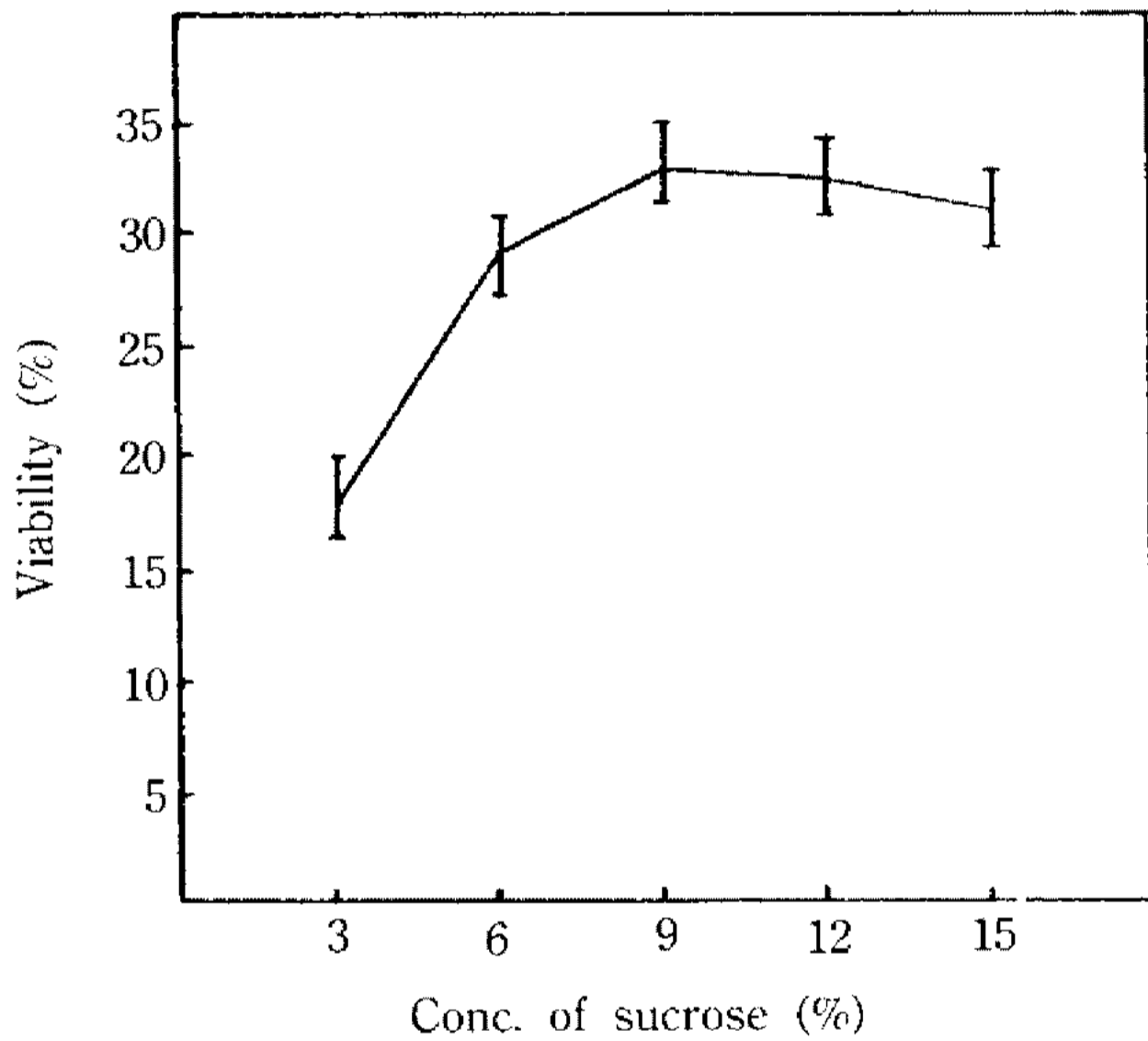


Fig. 1. Effect of sucrose concentration on the survival during lyophilization of *Nocardia mediterranei* NCK-4. Cell number: 40×10^9 , drying time: 5 hours

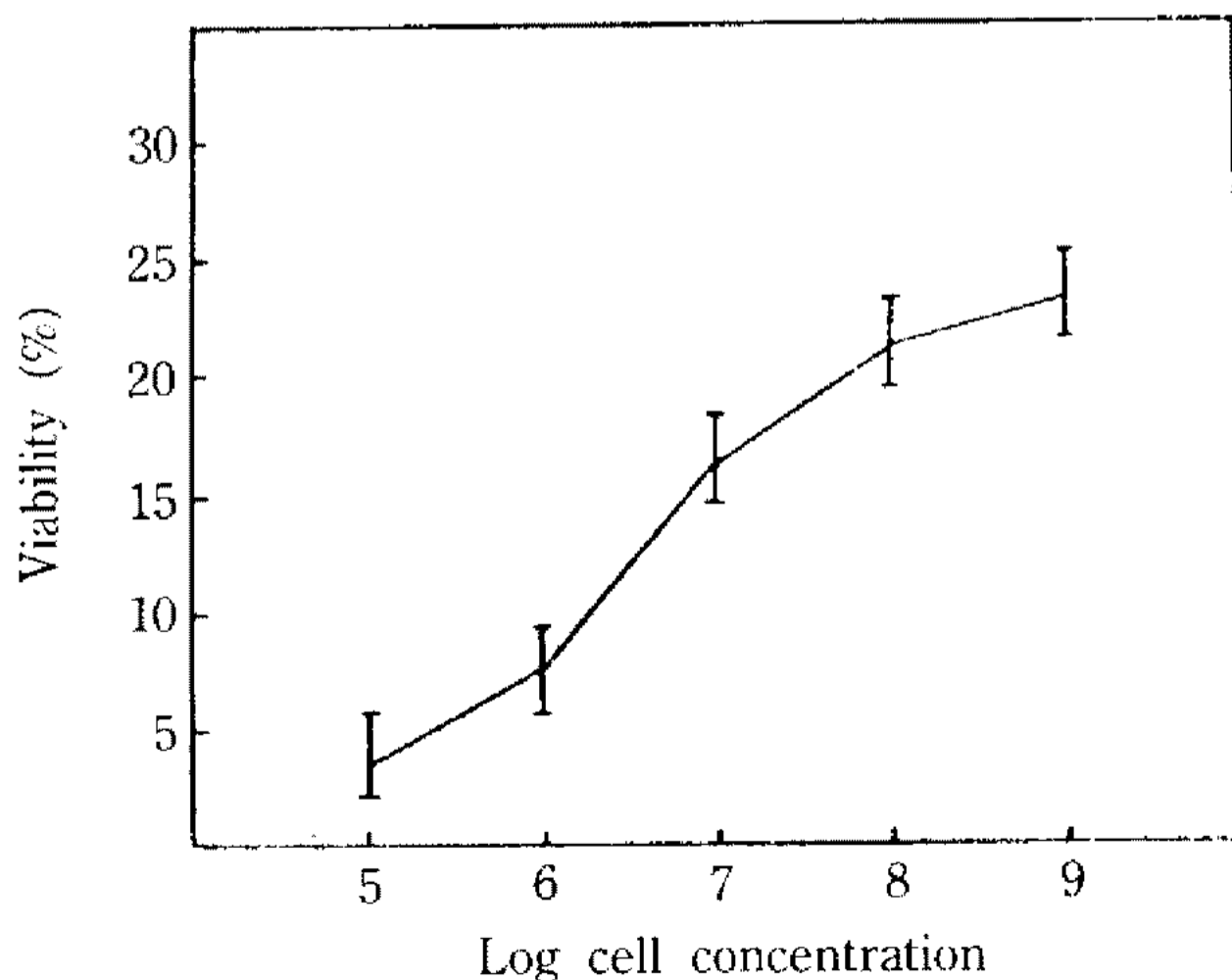


Fig. 2. Effect of cell concentration on the survival during lyophilization of *Nocardia mediterranei* NCK-4. Cryoprotectant: 0.8% NaCl, drying time: 5 hours

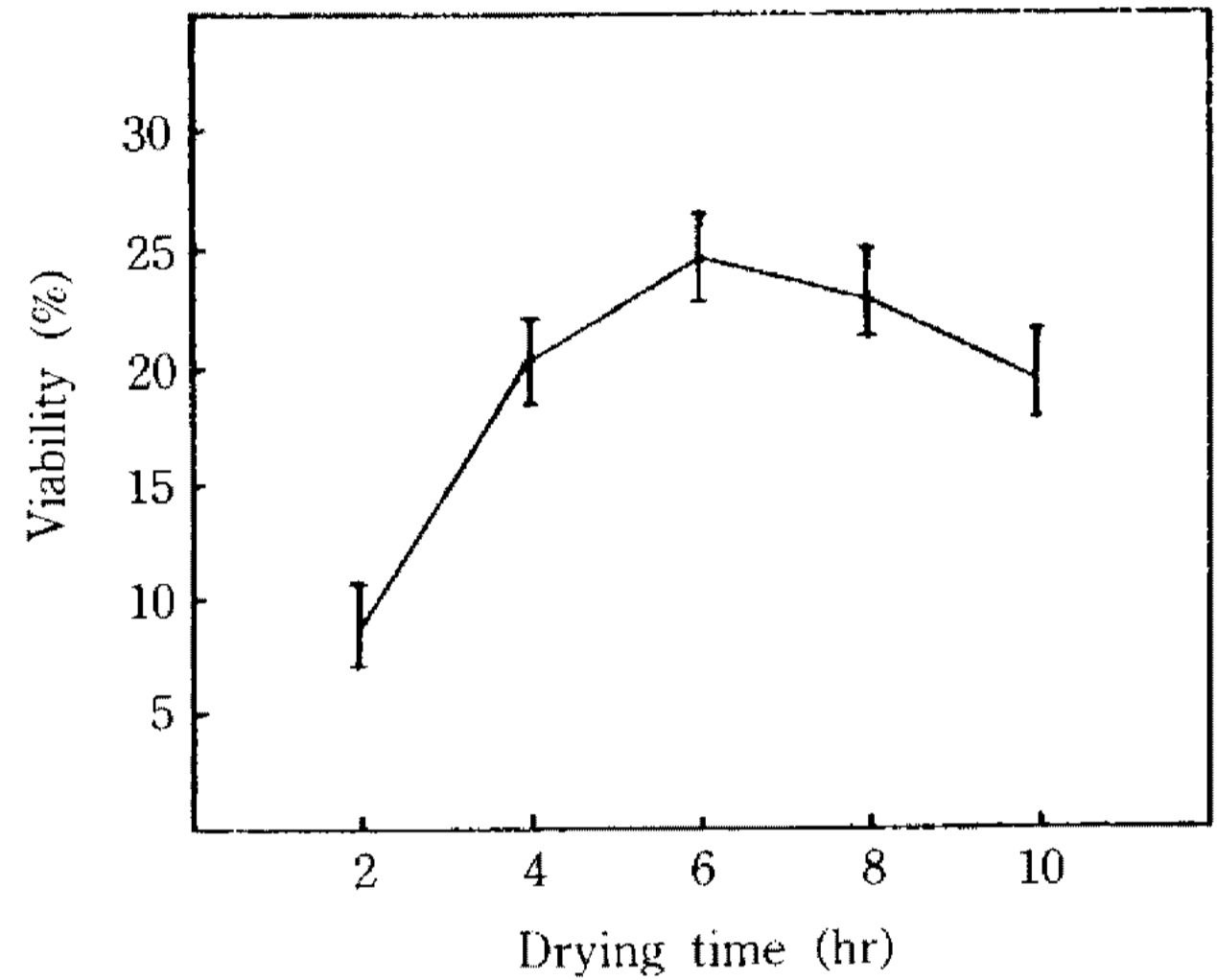


Fig. 3. Effect of drying time on the survival during the lyophilization of *Nocardia mediterranei* NCK-4. Cryoprotectant: 0.8% NaCl, cell number: 1.5×10^9

Table 2. Input data of viability of *Nocardia mediterranei* NCK-4

No.	Y	X ₁	X ₂	X ₃
1	12.5	-1	-1	-1
2	15.0	-1	-1	1
3	25.0	-1	1	-1
4	27.5	-1	1	-1
5	16.5	1	-1	-1
6	19.0	1	-1	1
7	32.5	1	1	-1
8	33.0	1	1	1
9	27.5	0	0	0
10	28.0	0	0	0
11	30.0	0	0	0
12	18.0	-2	0	0
13	25.0	2	0	0
14	14.0	0	-2	0
15	34.0	0	2	0
16	8.0	0	0	-2
17	18.0	0	0	2

Y: viability (%)

X₁: code value of concentration of sucrose

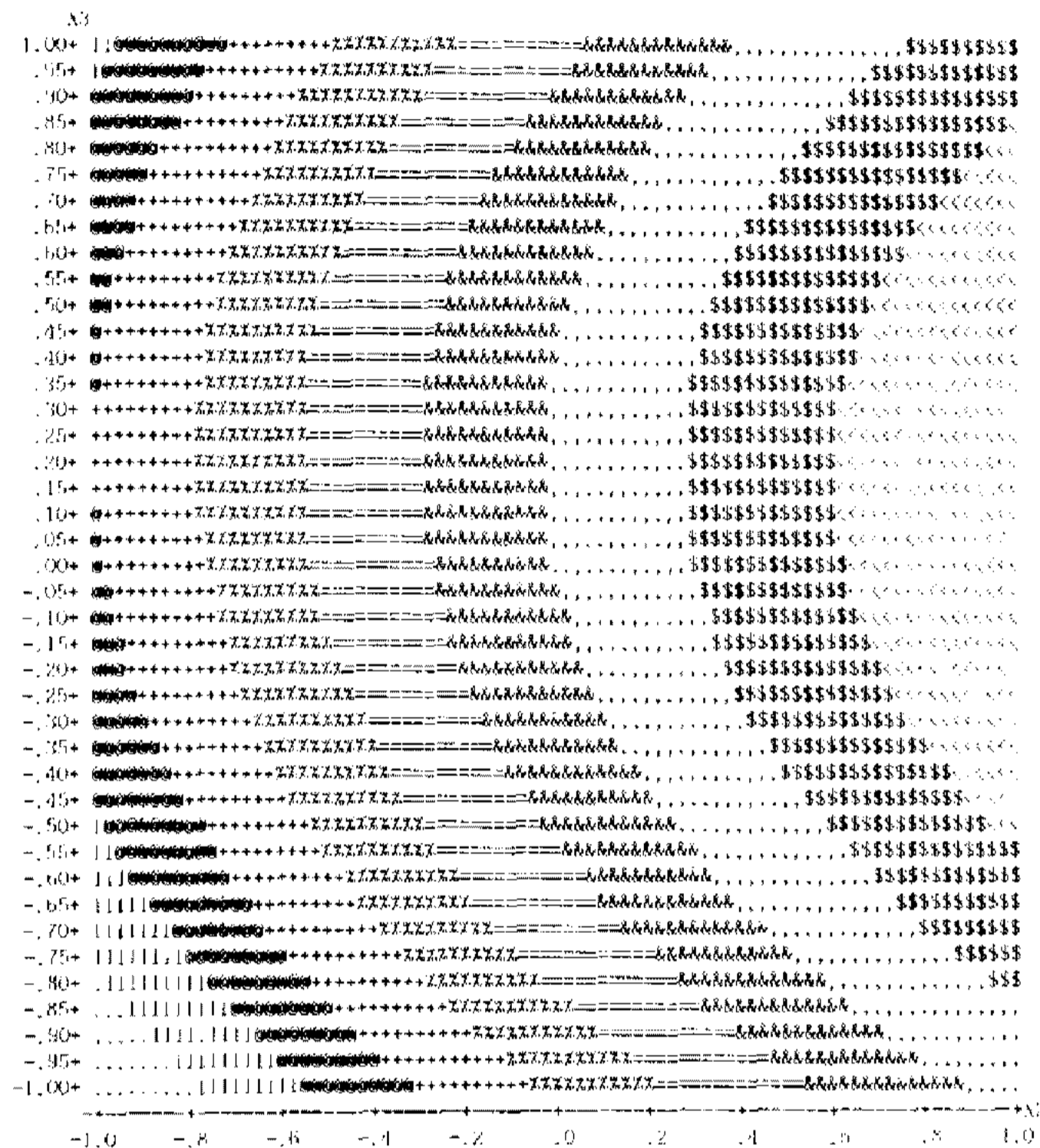
X₂: code value of concentration of *N. mediterranei*

X₃: code value of drying time

도가 높아지는 것으로 추측한 보고도 있다(1). 동결 건조 시간에 따른 영향은 Fig. 3과 같이 약 6시간이 최적조건으로 나타났다.

반응표면분석법을 이용한 동결건조법의 생존도 최적화

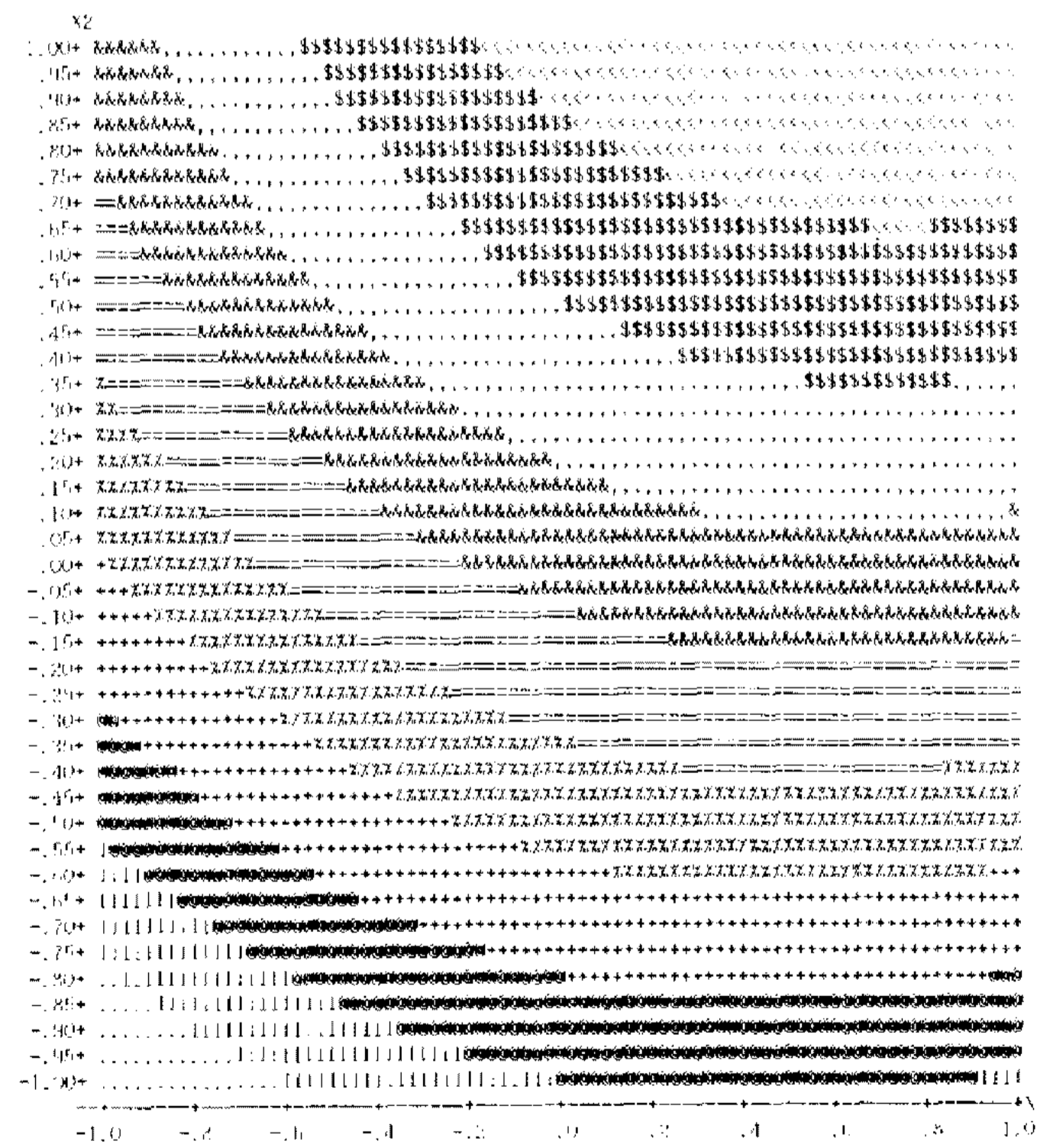
독립변수인 sucrose 농도, cell 농도, 건조시간의



A



B



C

Fig. 4. Contour plots for viability (Y) of *Nocardia mediterranei* NCK-4.

Stationary point: A=1.192, B=3.064, C=0.089, range of contour plot-B:

- : 25.9<Y<27.2, 1 : 27.3<Y<28.6, @ : 2.86<Y<29.9, + : 29.9<Y<31.2, %: 31.2<Y<32.6
- = : 32.6<Y<33.9, & : 33.9<Y<35.2, , : 35.2<Y<36.6, \$: 36.5<Y<37.9, < : 37.9<Y<39.2

code value를 -2~+2가 되도록 5수준(level)으로 조절하여 중심합성계획법에 준하여 실험한 결과 Table 2와 같은 자료를 얻었다. 이 자료를 program에 의해 컴퓨터로 처리한 결과 식 (2)은 아래와 같은 식 (3)과 같이 나타낼 수 있다. 이 식 (3)이 적합한지 알아보기 위하여 분산분석(ANOVA : analysis of va-

$$Y_{\text{viability}} = 28.80 + 2.19X_1 + 5.94X_2 + 1.75X_3 - 1.71X_1^2 - 1.09X_2^2 - 3.84X_3^2 + 0.63X_1X_2 - 0.25X_1X_3 - 0.25X_2X_3 \quad (3)$$

riance)을 수행한 결과 F value가 23.0을 나타내었다. 따라서 F-분산표에 의해서 F(0.01)=6.72보다 커서 99%의 유의성을 가짐을 알 수 있었다. 또한 얻어진 회귀값의 추정치와 실제값 사이의 차이는 3.0을 넘지 않았으며, 식 (3)을 X_1, X_2, X_3 에 대해 편미분하여 정상점(stationary point)을 구한 결과 $X_1=1.192$ (sucrose 농도 : 11.6%), $X_2=3.064$ (cell 농도 : 1.16×10^{11} CFU/ml), $X_3=0.089$ (건조시간 : 6.18 hr)이었으며, 이 최적조건(정상점)에서 추정된 *N. mediterranei* NCK-4를 동결건조 후 최대생존도는 약 39.3%으로 나타내었다. 식 (3)에 대한 등고선도(contour plot)는 Fig. 4와 같다. 이 등고선도에서 정상점은 추정된 최대점을 나타내었으며, A의 최대치 1.192, B는 3.064, C는

0.089이었다.

Starter cell 사용이 rifamycin 발효에 미치는 영향

산업균주를 동결건조시킨 후 계대배양없이 starter cell로 직접 사용하는 것은 생산의 균일화 및 original culture의 특성을 유지하기 위해 시도되었다(20).

본 실험은 *N. mediterranei* NCK-4를 보호제인 sucrose 10%(w/v), cell 농도 약 7.6×10^{10} /ml, 건조시간 6 hrs 조건에서 동결건조한 후 공기를 허용하여 rehydration한 균주(생존도 약 37%)를 starter cell이라 정의하여 사용하였다. 이 starter cell 0.4%(v/v) 및 1.2%(v/v)와 대조균인 FVM 0.4%(v/v)를 각각 전배양 배지에 접종하여 균의 증식속도를 분석한 결과 Fig. 5와 같다. Starter cell 1.2%를 접종한 경우는 대조균인 FVM 0.4% 접종한 경우와 거의 비슷하게 약 46시간 배양시에 stationary phase 초기에 도달하였으나, starter cell를 0.4% 접종한 경우에는 약 56시간 배양시에 stationary phase 초기에 도달하였다. 따라서 이 경우 균증식 속도가 약 10시간 정도 느린 원인은 활성도의 저하보다는 생존도가 떨어지므로 접종한 cell 농도가 대조균인 FVM 0.4% 접종시보다 약 53%가 낮기 때문으로 사료된다.

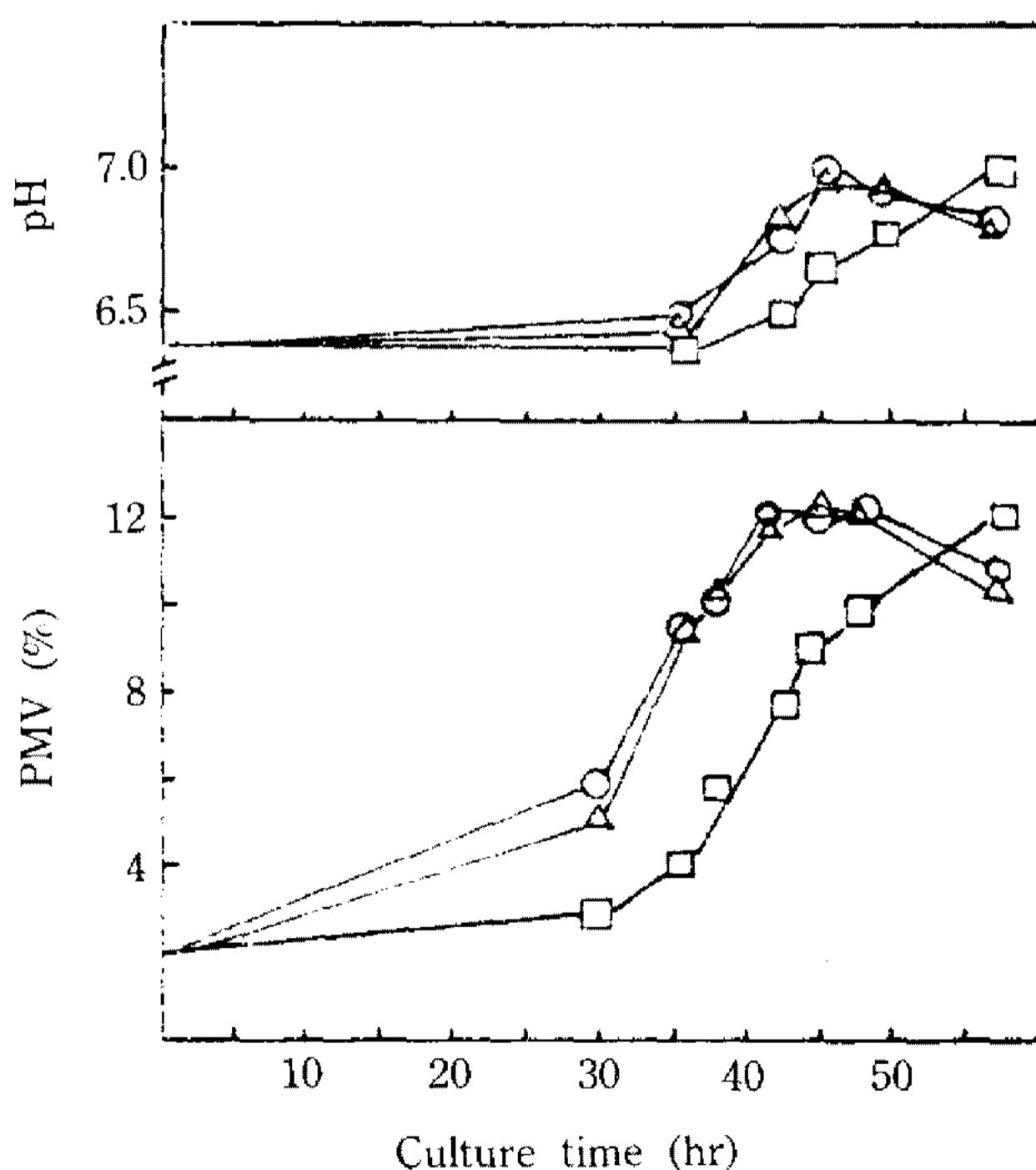


Fig. 5. Effect of inoculum size of starter cell on growth of *Nocardia mediterranei* NCK-4.

○-○: 0.4%(v/v) FVM (control), △-△: 1.2%(v/v) starter cell, □-□: 0.4%(v/v) starter cell

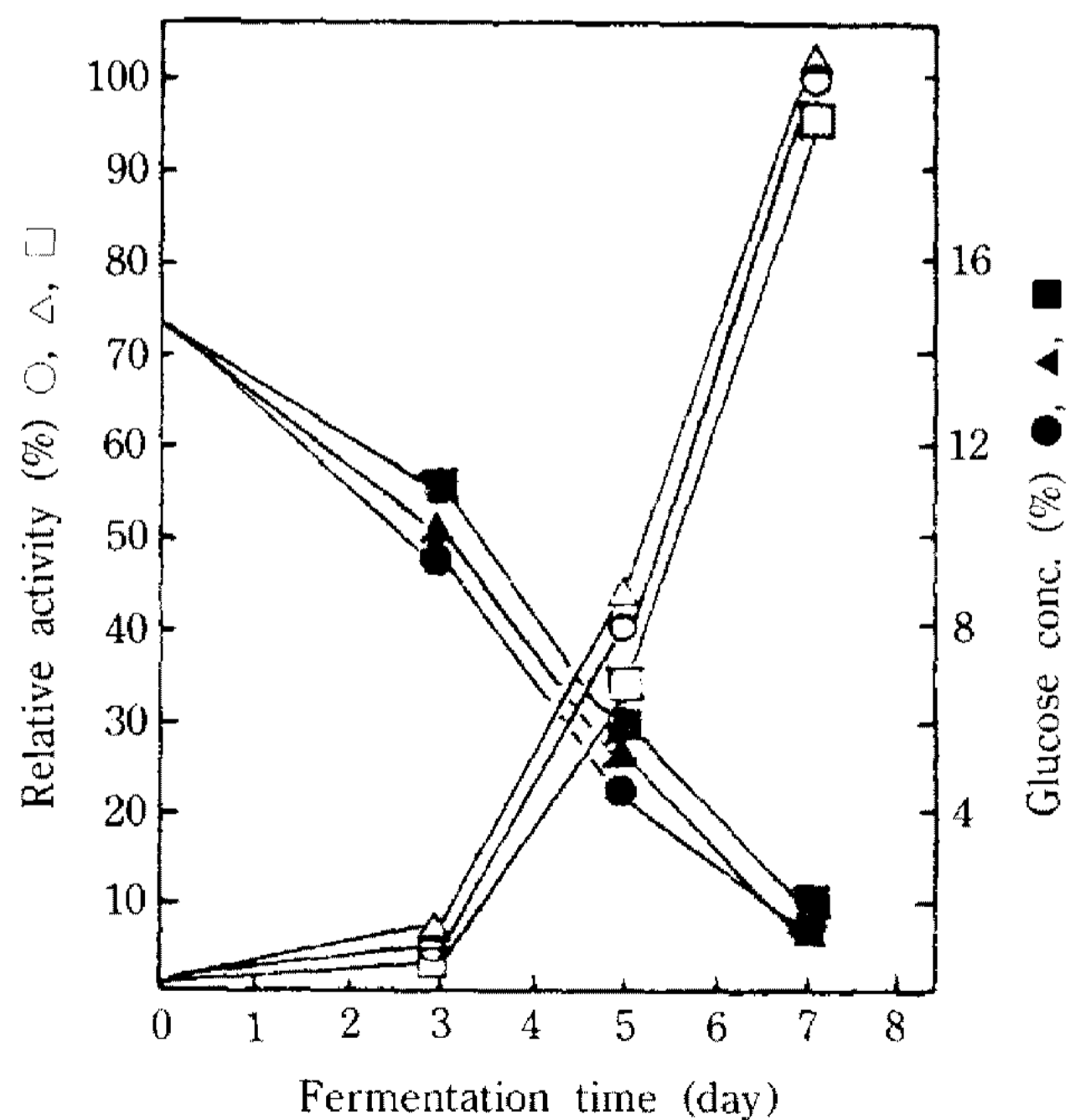


Fig. 6. Effect of inoculum size of starter cell of seed medium on rifamycin fermentation.

0.4% FVM (control: ○, ●), 1.2% starter cell (△, ▲) and 0.4% starter cell (□, ■)

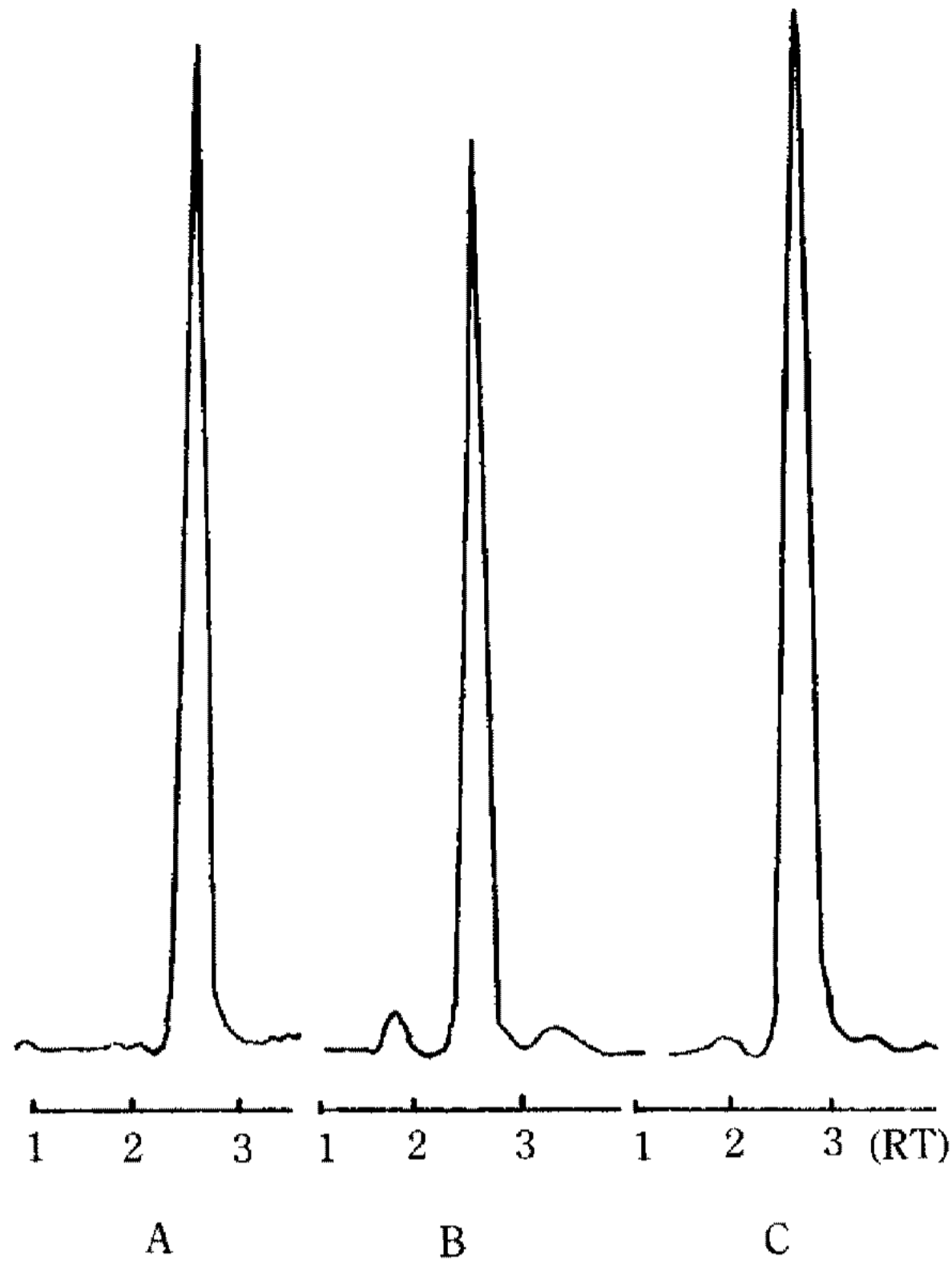


Fig. 7. High performance liquid chromatogram of rifamycin B in fermentation broth.

A: 0.4%(v/v) FVM was used at seed medium
 B: 1.2%(v/v) starter cell was used at seed medium
 C: 0.4%(v/v) starter cell was used at seed medium
 RT: retention time (min)

또한 전배양에서 얻은 starter cell을 사용하여 본 배양의 발효를 수행한 결과 Fig. 6과 같이 전배양에 starter cell을 1.2% 접종한 경우의 발효 pattern은 대조군인 FVM 0.4%를 사용한 경우와 거의 같은 경향을 보였으며, 이 발효액을 HPLC(high performance liquid chromatography, column: μ Bondapak C₁₈, wavelength: 275 nm)로 rifamycin B 순도를 분석한 경우 역시 Fig. 7과 같이 유사한 경향을 나타내었다. 그러나 전배양에 starter cell 0.4% 접종한 경우는 56 시간 배양시에 stationary phase 초기에 도달하였으므로, 이 전배양을 접종한 발효에 있어 Fig. 6과 같이 대조군에 비해 다소 느린 경향을 보였으며, rifamycin B 순도 역시 하락된 자료를 보였다. 이 실험결과 접종한 cell 농도를 고려하여 starter cell을 발효공업의 종균으로 사용하여도 대조군인 FVM 사용시에 비해 rifamycin B 생산성 및 수율이 하락되지 않았다. Lyophilization 저장기간에 따른 활성도(activity)의 영향에 있어서 Fig. 8과 같이 24개월부터는 활성도가 저하되는 경향을 나타내었다. 따라서 lyophilization 후

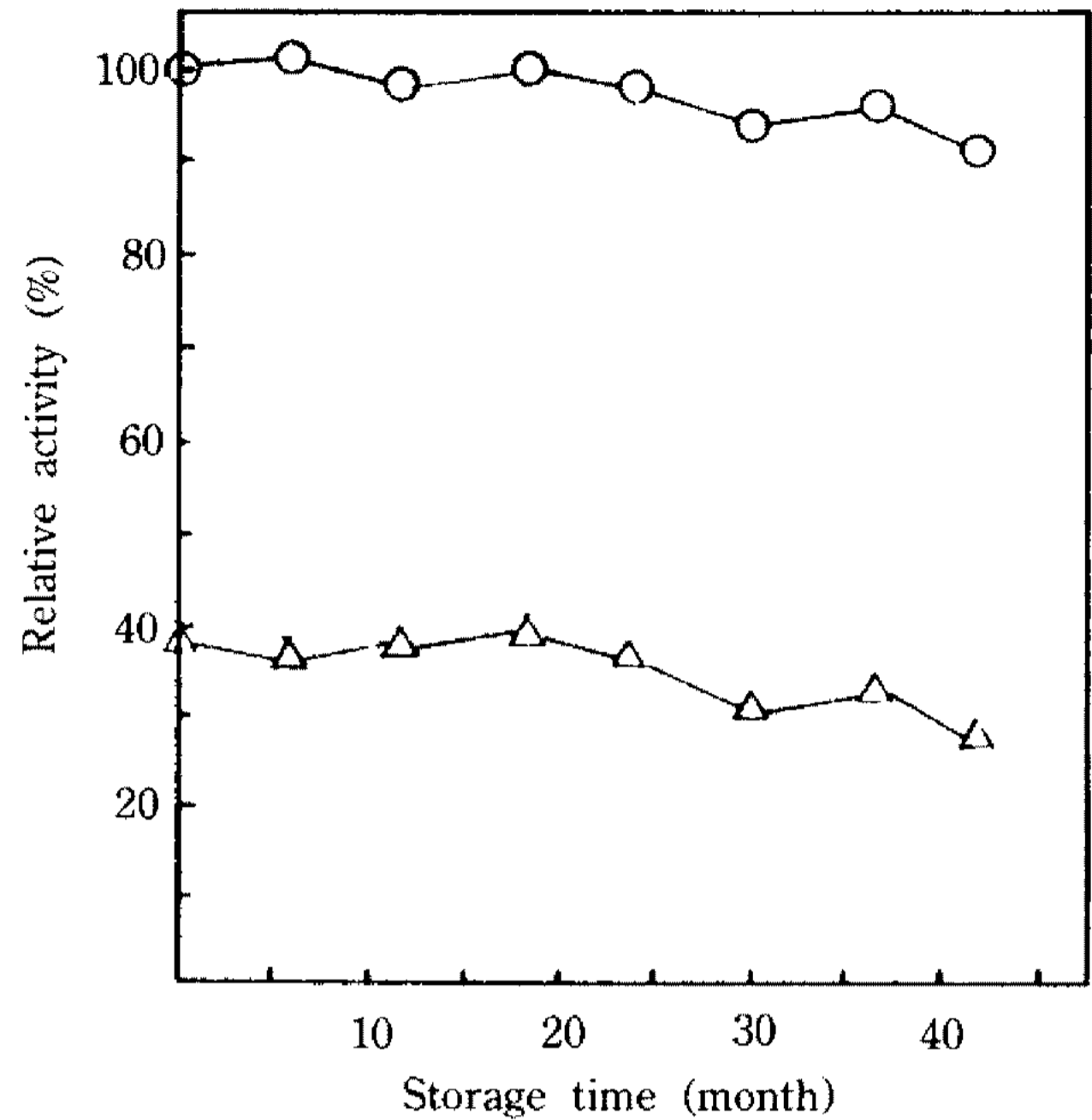


Fig. 8. Effect of storage time of lyophilization on rifamycin fermentation.

○-○: fermentation during 7 days, △-△: fermentation during 5 days

약 18개월 정도는 starter cell을 산업균주의 종균으로 사용할 수 있다.

요 약

Nocardia mediterranei NCK-4를 동결건조시 생존도에 미치는 영향을 검토하기 위해 보호물질의 종류와 농도, cell 농도 및 건조시간에 대해 실험한 data를 반응표면분석법을 활용하여 분석한 결과, 추정된 최대치의 생존도는 39.3%이었으며, 이 최적 조건은 sucrose 11.6%(v/v), cell 농도 1.16×10^{11} (CFU/ml), 건조시간 6.18 hrs로 나타났다.

N. mediterranei NCK-4를 동결건조하여 rehydration한 후 계대배양없이 starter cell로서 발효생산에 사용가능성을 검토한 결과, 전배양시 대조군인 FVM (frozen vegetative mycelium)과 거의 비슷하게 cell의 농도를 맞추어 발효함으로써 가능하다. 따라서 이 starter cell은 lyophilization 후 약 18개월간 저장하여 안정하게 사용할 수 있었다.

참고문헌

1. Rhee, S.K. and M.Y. Park. 1980. Effect of freezing and lyophilization on lactic starter cell. *Kor. J.*

- Appl. Microbiol. Bioeng.* **8**: 19-25.
2. Nath, J. and J.O. Anderson. 1975. Effect of freezing and freeze-drying on the viability and storage *Lilium longiflorum* L. and *Zea mays* L. pollen. *Cryobiology* **12**: 81-88.
 3. ITO, T. and T. Yokoyama. 1983. Preservation of *Basidiomycete* cultures by freezing. *IFO Res. Comm.* **11**: 60-70.
 4. Watanabe, J., S. Sawairi, T. Okuda and H.B. Maruyama. 1984. Preservation of microbial activities. *Jap. J. Freezing and Drying* **30**: 71-76.
 5. Hammer, B.W. 1911. A note on the vacuum desiccation of bacteria. *J. Med. Res.* **24**: 527-530.
 6. Gomez, R., M. Takano and A.J. Sinskey. 1973. Characteristics of freezing-dried cells. *Cryobiology* **10**: 368-374.
 7. Heckly, R.J. and R.L. Dimmik. 1968. Correlations between free radical production and viability of lyophilized bacteria. *Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 1081-1085.
 8. Tsvetkov, T. and R. Brankova. 1983. Viability of *Micococi* and *Lactobacilli* upon freezing and freezing-drying in the presence of different cryoprotectants. *Crybioloigy* **20**: 318-328.
 9. Kusaka, T. 1985. Preservation of the antibiotic producing ability of a *streptomycete* by lyophilization for 13 years. *IFO Res. Comm.* **12**: 101-106.
 10. Sensi, P. and J.E. Thiemann. 1967. Production of rifamycins. *Progr. Indus. Microbiol.* **6**: 21-60.
 11. Alvarez, A.M., A. Gelita, B. Resendiz, V. and F.N. Rodriguez. 1990. A strain of *Nocardia mediterranei* that produces a mixture of rifamycin B and W. *Biotechnol. Lett.* **12**: 283-288.
 12. Hill, W.J. and W.G. Hunter. 1966. A review of response surface methodology. *Technometrics* **8**: 571-590.
 13. 朴聖炫. 1983. 現代實驗計劃法. Pp. 575-625. 大英社.
 14. 이동희, 이노운, 최남희. 1992. 동결건조법에 있어 *Nocardia mediterranei*의 세포막 손상과 재수화 방법에 따른 생존도. *산업미생물학회지* **20**: 243-248.
 15. Rho, Y.T. 1986. Rheological characteristics of rifamycin B fermentation broth and optimization for rifamycin B production by rheological approaches. Department of Microbiology, Graduate School, Seoul National University, M.S. Thesis.
 16. Pasqualucci, C.R., A. Vigevani, P. Raddelli and G.G. Gallo. 1970. Improved differential spectrophotometric determination of rifamycins. *J. Pharm. Sci.* **59**: 695-687.
 17. Jang, D.J. 1990. A study on batch fermentation of demeclocycline. Graduate School of Engineering, Yonsei University, M.S. Thesis.
 18. Atkinson, B. and F. Mavituna. 1983. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. Pp. 266-292, The Nature Press, N.Y.
 19. Heckly, R.J. 1961. Preservation of bacteria by lyophilization. *Adv. Appl. Microbiol.* **3**: 1-76.
 20. Jayachandran, T., R. Balakrishnan, S. Krishnaswami and A. R. Vedanayakam. 1973. The effect of lyophilization on the viability of certain strains of starter bacteria. *Cheiron.* **2**: 52-54.

(Received July 9, 1992)