

농축 배지 조절 유가식 배양에 의한 *Streptomyces avermitilis*의 산소전달계수 측정

오 종 현 · ¹전 계 택 · *정 용 섭
전북대학교 응용생물공학부 및 생물산업연구소, ¹강원대학교 자연과학대학 생명과학부
(접수 : 2001. 10. 10., 게재승인 : 2001. 10. 25.)

Determination of Oxygen Transfer Coefficient in Fed-Batch Culture of *Streptomyces avermitilis* with Concentrated Medium Control

Jong-Hyun Oh, Gie-Taek Chun¹, and Yong-Seob Jeong*
Division of Biotechnology and Research Institute of Bioindustry, Chonbuk National University, Chonju,
Chonbuk 561-756, Korea

¹Division of Life Science, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea
(Received : 2001. 10. 10., Accepted : 2001. 10. 25.)

The large-scale production of antibiotics by filamentous mycelial organism requires an adequate supply of dissolved oxygen. In terms of productivity, it means that oxygen transfer is the rate-limiting step. Therefore, the oxygen transfer coefficients(k_La) were determined in a broth involving a filamentous mycelial organism such as *Streptomyces avermitilis* for use in fermentations. To determine k_La in a stirred vessel, a great deal of effort is required to provide all the cells with a sufficient oxygen supply. To overcome the oxygen limitation in a batch culture, a fed-batch culture was applied to control the growth rate by an intermittent supply of nutrients. Thus, it was possible to maintain a suitable dissolved oxygen concentration at a low agitation rate. The optimal agitation speed was 350 rpm at low cell concentrations (below 7 g/L) by considering the efficiency of agitation and shear stress. The k_La was found to decrease from 64.26 to 29.12 hr⁻¹ when the biomass concentration was increased from 9.82 to 12.09 g/L. In addition, an increase in viscosity was also observed during the growth phase. By comparing the k_La values for the various agitation and aeration rates, it was found that the effect of an increase in k_La by aeration was reduced dramatically at high biomass concentrations. However, this effect was not observed when altering the agitation rate. This suggests that controlling the dissolved oxygen concentration by altering the agitation rate was more efficient than increase the aeration rate.

Key Words : avermectin, secondary metabolite, oxygen transfer coefficients, fed-batch, *Streptomyces avermitilis*.

서 론

Avermectin(AVM)은 방선균의 일종인 *Streptomyces avermitilis*가 이차대사산물로 생산하는 광범위 동물 구충제로서, 포유동물의 소화기관내 기생하는 기생충 들뿐만 아니라 외부 기생충인 이나 진드기와 같은 절지 동물에 대해서도 강력한 구충효과를 나타낸다. 그리고 식물 기생충(Coleoptera, Lepidoptera 등)에 대해서도 충분한 구충활성을 가지고 있어 살충제로의 사용과 인간에 대해서도 사용이 가능하다고 알려져 있다(1,2).

*Corresponding Author : Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea
Tel : +82-63-270-2571, Fax : +82-63-270-2572
E-mail : ysjeong@moak.chonbuk.ac.kr

방선균이나 곰팡이 유래 유용물질은 많이 알려져 있고, 대사과정이나 생리적 특성 및 효과 등에 대하여 많은 연구가 발표되어 있다. 그러나 산업적 생산공정에 대한 노하우는 산업체의 비밀로서 잘 알려져 있지 않아, 실제로 연구되어야 할 분야이다. 생물산업에 적용 가능한 생산공정이 개발된다면 생산용 최적 배지개발과 배양조건 확립, 대사산물 활성 효능 측정을 위한 효율적 분석 시스템 개발, 고 효율 생물공정개발(고정화 기술 개발, 유가식 배양공정 확립과 컴퓨터 제어 발효공정 확립 등), 산업적 규모로의 규모확대 기술 개발 및 분리정제 연속공정 개발 등이 필요하다. 특히 AVM 생산성 향상을 위한 균주개발, 탄소원과 전구체를 공급하는 유가식 배양법 확립 및 발효시 배출되는 가스의 농도를 측정하여 균체성장을 예측하는 방법 등에 관한 논문들이 최근에 여러 연구자 들에 의해 발표되었다(3-5).

*Streptomyces*와 같은 방선균의 호기적 이차대사 발효의 경우, 방선균의 독특한 형태와 까다로운 생리기능으로 인해 균체가 증가함에 따라 배양액의 점도가 증가하게 된다. 그 결과로 공급된 공기 방울로부터 배양액으로 산소의 전달능력이 급격히 감소하게되어 발효기의 설계 및 공정최적화에 많은 어려움이 있다(6,7). 균류의 성장형태는 배양액의 유변학적 특성에 중요한 영향을 미치며, 발효조의 운전에도 영향을 미칠 수 있다. 균사체로 성장하는 경우 발효가 진행됨에 따라 배양액의 점도 증가로 인하여 비뉴튼유체의 특성을 나타내며, 이로 인해 배양액의 물질전달 능력, 특히 가-액물질전달속도가 심각하게 감소하는 것으로 보고되었다(8).

균류의 경우, 배양액 내의 혼합효과 및 산소전달 속도를 증가시키기 위한 목적으로 교반속도 및 통기량을 증가시키는 경우, 세포 성장속도와 이차대사산물의 생산성이 심각하게 영향을 받을 수 있다(9).

호기적 발효에서 산소분자는 공기방울에서 세포 안으로 여러 단계를 거쳐 전달된다. 각 단계마다 산소분자가 이동하기 위해서는 극복해야 할 저항들이 있는데 그 중에서 가장 고려해야 할 단계는 공기 방울을 둘러싸고 있는 액체 막에서의 산소전달이다. 미생물 세포가 액상에 분산되어 있고 발효 배지가 잘 교반될 때, 상기 단계가 속도제한 단계(rate limiting step)가 된다. 이 단계를 통해서 전체 산소전달속도가 조절된다(10).

일반적으로 균사체 형성 미생물 배양과 같이 용존산소가 심각하게 고갈되는 산소제한배양인 경우 배양 중에 균체량을 증가시키기 위해서는 산소전달계수(k_{La})를 증가시켜야 한다. 그러므로 배양액 내로 효과적인 산소 공급이 이루어 질 수 있도록 반응기의 배양조건을 극대화시키거나, 발효조 내로 고 압력의 공기 또는 순수한 산소로 대체하여 공급하는 방법이 강구될 수 있다. 따라서 고농도 균체 배양을 위한 전략뿐만 아니라 AVM과 같이 산소물질전달이 생산성에 영향을 미치는 이차대사산물을 고농도로 생산하기 위해서는 무엇보다도 먼저 k_{La} 에 대한 정밀한 분석이 이루어져야 함을 알 수 있다.

Dynamic method는 세포 배양액과 호기적 미생물이 존재하는 발효에서 특별한 장치 없이 간편하고 비교적 정확하게 k_{La} 를 측정할 수 있는 하나의 방법이다. 측정된 k_{La} 는 pilot나 생산 발효기로 규모 확대하는 경우와 발효시 임계점 이상으로 용존산소 농도를 유지하기 위해 고려해야 할 중요한 요인 중 하나이다. 그러므로 발효조의 효율적인 운용과 규모확대를 위해서 k_{La} 의 측정이 필요하다(11-13).

본 실험에서는 AVM를 생산하는 *Streptomyces avermitilis*의 발효에 필요한 적절한 산소공급전략과 규모확대를 위해 dynamic method에 의해 k_{La} 를 측정하였고, k_{La} 에 영향을 미치는 통기, 교반 및 균체량과의 관계에 대하여 연구하였다. 또한 회분식 배양에서 호기성 균주의 경우 지수성장기에 용존산소가 임계점이하의 바닥상태로 떨어지는 현상으로 인하여, 지수성장기에서 dynamic method에 의해 k_{La} 를 측정하는 것은 불가능하다. 그러므로 배지의 적절한 공급에 의해 용존산소가 임계점이하의 바닥상태로 떨어지는 현상을 극복할 수 있으며, 지수성장기뿐만 아니라 고농도의 균체에서도 dynamic method에 의해 k_{La} 를 측정할 수 있는 방법을 확립하고자 하였다.

Table 1. HPLC condition for Avermectin analysis

HPLC	Shimmazu(Class-LC 10)
Detector	UV-VIS detector(Shimmazu ,SPD-10A)
Wave length	244 nm
Temperature	40℃
Column	Waters, μ Bondapak C18 125 Å 10 μ m (300×3.9 mm)
Mobile phase	85% methanol
Flow rate	0.75 mL/min
Injection volume	20 μ L

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서 사용한 균주는 *Streptomyces avermitilis*(ATCC 31272)이다. FC-1 고체 사면배지에서 3개월마다 계대배양하였고, 냉장상태에서 보관하였다. 사면배지에서 백균이를 이용하여 한번 균을 취하여 액체 FC-1 배지에서 배양하였다. 그리고 glycerol liquid stock(3 ml glycerol과 7 mL 배양액)을 만들어 -70℃에서 냉동보관 하였고, 매 실험마다 접종용으로 사용하였다.

배양배지

배지는 당 성분의 같거나 무기물 성분의 침전을 막기 위하여 각 배지 성분을 따로 살균하여, 무균상자 안에서 각각의 성분을 혼합하여 사용하였다. 배지는 균주보관용 영양배지(FC-1), 성장배지와 생산배지로 구분하여 사용하였다. 영양배지의 조성은 glucose 80 g/L, trypton 40 g/L, urea 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L, NaNO_3 3 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, KCl 0.5 g/L, MgSO_4 0.5 g/L와 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L이다. 종배양을 위해 사용된 성장배지의 조성은 glucose 30 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L, NaCl 5 g/L, CaCO_3 2 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L와 sesame oil 40 ml/L이었다. 또한 생산배지의 조성은 malt extract 50 g/L, skim milk 10 g/L, CaCO_3 5 g/L, NaCl 2 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L와 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L이었다. 발효를 위한 배지의 pH는 각각 2N의 HCl과 NaOH를 이용하여 7.0으로 조절하였다.

분석방법

건조균체량(dry cell weight, DCW)은 균질혼합기에서 균질화 과정을 거친 배양액 시료를 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상정액을 버린 후 증류수를 넣어 와류 혼합을 하고 다시 원심분리하는 세척과정(3번 반복)을 거친 후 105℃에서 항량을 구하여 측정하였다. 발효 배양액의 잔류당은 Dinitrosalicylic acid(DNS)를 이용한 환원당 측정 방법에 의해 측정하였다(14). 그리고 발효배지와 메탄올을 같은 비율로 섞어 진탕배양기에서 200 rpm과 실온으로 1시간 동안 진탕한 후, 고형분을 거름종이(Whatman, No. 4)와 0.2 μ m 막으로 여과하여 HPLC로 avermectin을 정량분석 하였다. Avermectin을 분석하기 위한 HPLC 조건은 Table 1과 같다(15).

플라스크 배양

산소전달계수 측정을 위한 발효의 종배양을 위해 27°C에서 활성화시킨 glycerol liquid stock을 100 mL의 성장배지를 함유한 500 ml 삼각플라스크에 접종하여, 27°C와 200 rpm의 배양조건에서 5일간 배양하였다.

발효조 배양

실험에 사용된 발효조는 2.5 L 용량(조업부피 1.5 L)의 발효조(코바이오텍, Korea)로서 자동온도조절기, 교반속도조절기, 용존산소센서, pH센서와 소포계센서를 부착하고 있으며 자동으로 제어된다. 교반속도(200-500 rpm)와 통기량(1-2 vvm)의 조절로서 배양액 내의 용존산소량을 포화용존산소 농도의 10% 이상으로 유지하였다. 온도는 27°C로, pH는 각각 2 N의 HCl과 NaOH를 이용하여 7.0으로 조절하였다. 그리고 발효중 생성되는 기포제거를 위해 실리콘 소포제 DS-200(삼진화학, Korea)을 사용하였다.

유가식 배양의 경우는 균체 성장을 조절하기 위하여 두가지 방법을 사용하였다. 순수한 물 1.3 L에 균을 접종한 후, 회분식 배양에서 사용한 배지를 200 mL에 녹인 농축배지를 배양조기부터 연동펌프를 사용하여 하루에 한번 20 mL을 발효기간 동안 총 10회 공급하여 실험을 수행하였다. 그리고 다른 경우는 초기 배지 1.3 L에서 회분식 배양을 우선 실시하여 균체가 정상상태에 도달한 후, 생산배지를 5배 농축한 농축배지 200 ml을 하루에 한번 40 mL씩 발효기간 동안 총 5회 공급하여 발효를 수행하였다.

k_{La} 측정

통기와 교반에 대한 효율을 측정하기 위하여 150~650 rpm 사이의 교반조건과 0.5~3.0 vvm 사이의 통기조건에서 dynamic method를 이용하여 k_{La} 를 측정하였다. Dynamic method를 이용하여 k_{La} 측정을 위한 물질수지식으로부터 시간에 따른 적분 결과는 다음과 같다.

$$k_{La} = \frac{\ln \left[\frac{C_L^* - C_L(t_1)}{C_L^* - C_L(t_2)} \right]}{t_2 - t_1}$$

여기서 C_L^* 는 대기압에서 공기와 평형인 물에서의 산소 최고농도, C_L 는 발효조 배양액에서의 산소농도 그리고 t_1 과 t_2 는 각각 발효조 배양액에서의 산소농도를 측정할 시간이다. 결국 k_{La} 는 $(t_2 - t_1)$ 에 대해 $\ln \left[\frac{C_L^* - C_L(t_1)}{C_L^* - C_L(t_2)} \right]$ 를 도실했을 때의 기울기이다(4,5).

결과 및 고찰

교반과 통기 조건에 의한 k_{La} 의 변화

통기를 1 vvm 혹은 2 vvm으로 고정된 후, 교반속도를 100 rpm에서 500 rpm까지 변화시키면서 회분식 생물반응기에서 k_{La} 를 측정하였다. 회분식 생물반응기 가동 중 dynamic method를 사용하여 1 vvm에서 다양한 교반속도와 건조균체질량 3.0 g/L와 4.02 g/L에서 구한 k_{La} 의 값을 Table 2에 나타냈다. 교반속도가 100 rpm에서 500 rpm으로 증가함에 따라 k_{La} 값이

Table 2. Real example of k_{La} in terms of rpm at fixed aeration 1 vvm

rpm	k_{La} (hr ⁻¹)	
	D.C.W. (3.0 g/L)	D.C.W. (4.02 g/L)
100	21.96	46.94
200	37.08	n.a.
300	75.96	71.35
400	178.56	n.a.
500	216.36	152.06

n.a. means not available.

Table 3. Real example of k_{La} in term of rpm at fixed aeration 2 vvm

rpm	k_{La} (hr ⁻¹)		
	D.C.W.(3.24 g/L)	D.C.W.(4.02 g/L)	D.C.W.(9.24 g/L)
100	42.84	56.34	19.8
200	65.88	n.a.	29.52
300	106.56	90.14	57.6
400	176.04	n.a.	82.8
500	176.76	162.9	169.56

n.a. means not available.

증가함을 알 수 있었으며, 교반속도의 일정한 증가에도 불구하고 측정된 k_{La} 값의 증가폭은 일정하지 않았다. 건조균체질량이 상대적으로 낮은 3.0 g/L인 경우 교반속도가 300 rpm에서 500 rpm으로 증가했을 때 k_{La} 는 3배정도 증가하는 큰 변화를 보여주었다. 달리 표현하면, 균체농도가 작은 경우 같은 조건에서 교반속도의 증가에 따른 k_{La} 의 변화 폭이 큰 것을 알 수 있었다.

통기량 2 vvm에서 건조균체질량과 교반속도의 변화에 따른 k_{La} 의 변화를 Table 3에 나타내었다. 건조균체질량이 적은 경우(3.24 g/L) 통기량 2 vvm의 조건에서 교반속도에 의한 k_{La} 에 대한 효과는 400 rpm 이상에서는 큰 차이가 없는 것으로 측정되었다. 이 경우는 균체량이 상대적으로 적어 400 rpm 이상에서는 교반에 의해 용존산소가 충분히 공급됨으로 k_{La} 의 변화에 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다. 그러나 균체량이 9.24 g/L로 증가한 경우 상대적으로 점도가 증가하여 산소전달이 용이하지 않음으로 용존산소가 포화상태에 이르지 못하고 교반속도의 증가에 따라 k_{La} 가 계속 증가하는 경향을 나타냈다. 건조균체질량이 9.24 g/L의 경우 400 rpm까지는 k_{La} 값이 건조균체량이 3.24 g/L인 k_{La} 값의 44.8%-54.1%에 해당하는 것을 알 수 있었다. 즉 건조균체질량이 증가하면 k_{La} 값은 감소해서, 건조균체질량이 약 3배 증가하면 k_{La} 값은 반절 정도로 감소하였다.

Table 2와 3으로부터 공기의 공급을 1 vvm에서 2 vvm으로 2배 증가시킨 경우(건조균체질량 4.02 g/L), 모든 교반속도에 대해 2 vvm 경우의 k_{La} 값이 약간 큰 값을 보여 주었으나, 1 vvm에서 2 vvm으로 공기의 공급량이 2배 증가한 것에 비해 k_{La} 값의 증가는 실제로 미미하였다.

상기 실험을 토대로 발효 초기 즉 건조균체질량이 적은 경우는 400 rpm 이하의 교반속도가 최적이며, 건조균체질량이 높은 경우는 500 rpm 이상의 교반속도가 미생물에 산소공급을 위하여 좋을 것으로 판단되었다. 또한 생물반응기 운전시 원활한 산소공급을 하기 위한 방법으로 전단력이 생성물

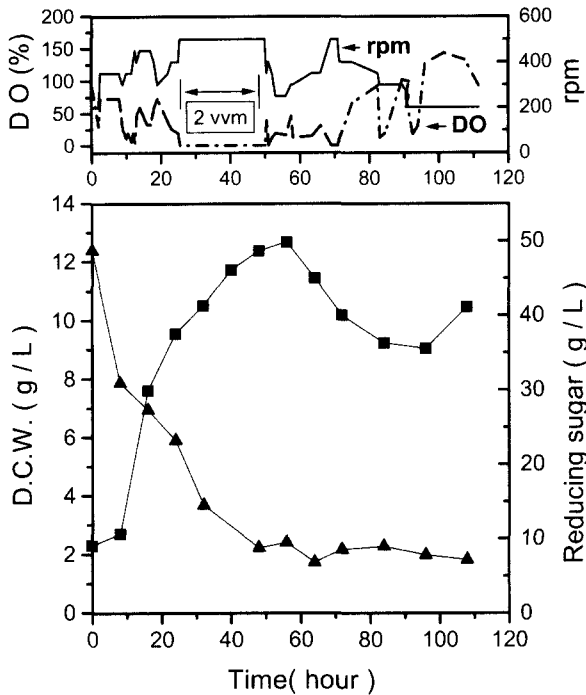


Figure 1. Time course changes of cell growth in batch culture of *Streptomyces avermitilis* at variable agitation speeds, 27°C, and 1-2 vvm. -■-; DCW, -▲-; Reducing sugar.

생산에 미치는 영향이 미미하다면 통기속도를 증가시키는 것 보다는 교반속도를 증가시키는 것이 효과적이라고 판단되었다.

배지의 공급에 의한 용존산소 조절과 균체량의 변화에 따른 k_{La} 측정

용존산소의 조절이 호기적 조건의 미생물 배양 시 미생물 성장과 생성물의 생산성을 높이기 위해 매우 중요한 요인으로 알려져 있다. 그러므로 용존산소의 조절을 위한 운전조건을 확립하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다.

용존산소 값을 10% 이상으로 유지하기 위해서 교반속도를 200 rpm에서 500 rpm의 범위에서 수동으로 조절하였으며 결과를 Figure 1에 나타냈다. 지수성장기 초기에서 교반속도를 300 rpm에서 450 rpm으로 조절함으로 용존산소를 평균 25~70%로 유지할 수 있었으나, 지수성장기 후반부에서는 교반속도를 500 rpm으로 조절하고 통기량을 2 vvm으로 증가시켰음에도 용존산소는 바닥상태를 나타냈다. 지수성장기 이후에는 교반속도 범위 200 rpm과 400 rpm 사이에서 25%~100%의 용존산소를 유지하였다. 이와 같이 지수성장기에서 통기속도와 교반속도를 높게 하여도 용존산소를 조절하는 것은 한계가 있었고, 바닥상태의 용존산소 농도로 인하여 dynamic method에 의한 k_{La} 측정도 불가능하였다. 그러므로 배지성분을 제한하여 공급하는 유가식 배양을 통하여 지수성장기에서 미생물 성장을 완만하게 조절함으로써, 용존산소 농도를 적절하게 유지하는 것이 가능할 것으로 판단되었다. 또한 Figure 1에 나타낸 것과 같이 미생물의 대수기적 성장이 48 시간 이내에 종결되고, 이 기간 후에는 영양분의 고갈로 인해 미생물의 균체가 감소하는 현상이 측정되었다.

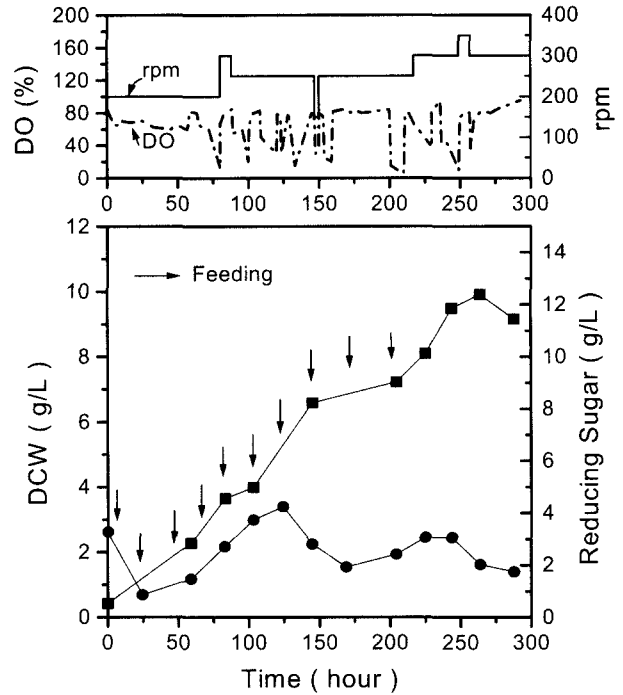


Figure 2. Time course changes of cell growth in fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis* at variable agitation speeds, 27°C, and 1 vvm. -■-; DCW, -▲-; Reducing sugar.

이러한 균체 감소현상을 피하고 미생물의 성장속도를 조절하기 위하여 농축배지를 사용한 유가식 배양을 실시하였고, 이를 통하여 다양한 조건에서의 k_{La} 측정을 위한 미생물 배양 조건을 확립할 수 있었으며, 그 결과를 Figure 2에 나타냈다. 배지 제한을 통해 미생물의 성장속도를 조절함으로써 낮은 교반속도에서도 용존산소를 높은 범위로 유지하여 다양한 조건에서의 k_{La} 측정이 가능하였다. 또한 배지 공급을 조절함으로써 미생물의 성장을 효과적으로 제어할 수 있었다.

이와 같은 환경에서 측정된 교반과 통기에 대한 k_{La} 의 결과를 Figure 3과 4에 나타냈다. 균체량 7 g/L 이하의 범위에서 다양한 교반속도에 의한 k_{La} 의 변화를 살펴보면 150-350 rpm의 범위에서 k_{La} 가 급격하게 상승하였다. 그러나 350 rpm 이상에서는 k_{La} 상승폭이 둔화되는 것을 알 수 있었다. 이것으로 이 범위의 균체량에서는 350 rpm에서 산소전달속도의 효율이 최대치에 이른다는 것을 예측할 수 있다. 그러므로 균체량 7 g/L 이하의 범위에서는 미생물의 성장과 관련이 있는 전달력을 고려할 때 350 rpm 정도의 교반속도가 산소전달을 위한 최적조건으로 생각되었다. 균체량이 7 g/L보다 큰 경우는 교반속도의 변화에 따른 k_{La} 의 변화가 상대적으로 작은 것을 알 수 있었으며, 120 hr⁻¹ 이상의 k_{La} 를 유지하기 위해서는 교반속도를 350 rpm보다 높게 조절해야 할 것으로 판단되었다.

Figure 4에 나타낸 바와 같이 균체량이 7 g/L보다 적은 경우 통기속도의 증가에 대하여 k_{La} 가 미미하게 증가하거나 변화하지 않는 경향을 보여주었다. 이는 교반속도가 450 rpm으로 상당히 높아 통기속도가 k_{La} 에 미치는 영향이 상대적으로 작기 때문으로 판단되었다. 그러나 균체량 7 g/L 이상에서는 통기의 변화에 의한 k_{La} 는 확연하게 낮게 측정되었다.

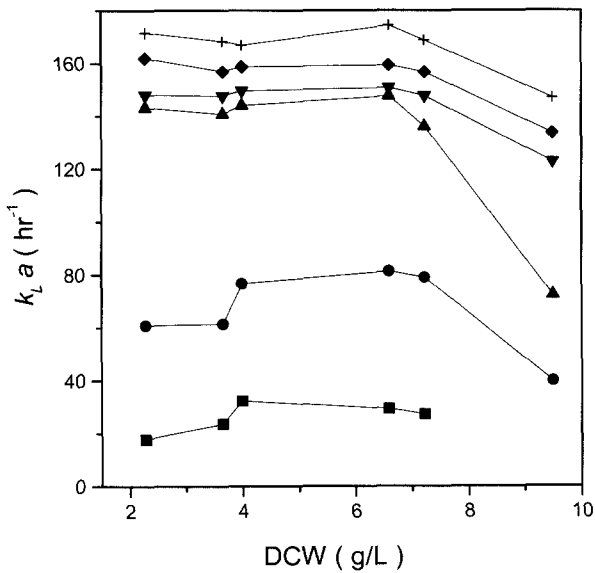


Figure 3. Effect of cell concentration on k_{La} in fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis* at various agitation speeds and 1 vvm. -■-; 150 rpm, -●-; 250 rpm, -▲-; 350 rpm, -▼-; 450 rpm, -◆-; 550 rpm, -+-. 650 rpm.

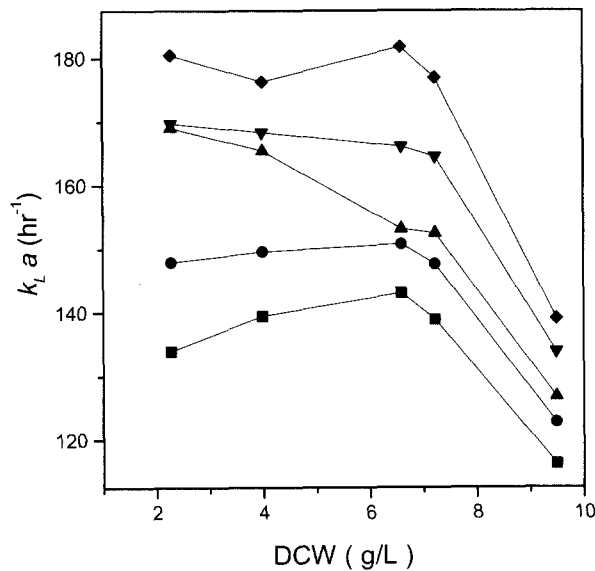


Figure 4. Effect of cell concentration on k_{La} in fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis* at various aeration rates and 450 rpm. -■-; 0.5 vvm, -●-; 1.0 vvm, -▲-; 1.5 vvm, -▼-; 2.0 vvm, -◆-; 3.0 vvm.

배지의 유기식 공급에 의한 고농도 균체 성장 유도 및 k_{La} 측정

고농도 균체량에서 k_{La} 의 변화를 알아보기 위하여 회분식 배양에서 대수적 성장이 끝난 후 정제기에 이르렀을 때, 계속해서 농축배지를 공급하여 고농도의 균체량을 얻었으며 결과를 Figure 5에 나타냈다. 산소전달계수의 측정은 농축배지 공급이 끝나고 당이 고갈됨에 따라 용존산소가 상승하는 시기를 이용하여 실시하였다. 예상대로 균체량이 증가함에 따라 k_{La} 가 급격히 감소함을 알 수 있었고, 그 결과는 Figure 6과 7에 나타내었다. 균체량의 증가에 따라 발효액 점도 상승

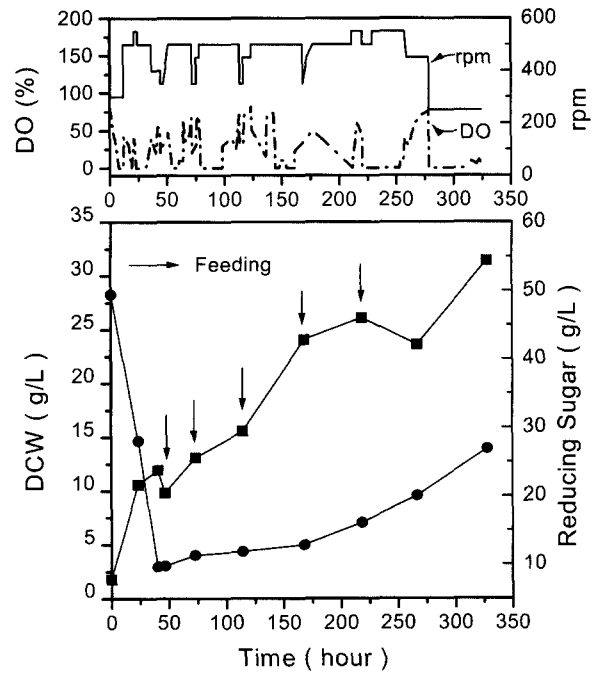


Figure 5. Time course changes of cell growth in fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis* at variable agitation speeds, 27°C, and 1 vvm. -■-; DCW, -▲-; Reducing sugar.

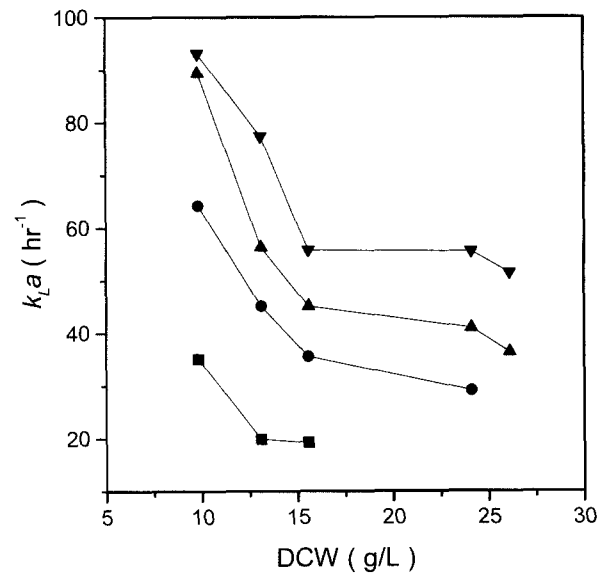


Figure 6. Effect of cell concentration on k_{La} in fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis* at various agitation speeds and 1 vvm. -■-; 350 rpm, -●-; 450 rpm, -▲-; 550 rpm, -▼-; 650 rpm.

과 교반 효율의 저하로 인하여 250 rpm 이하에서 k_{La} 측정이 불가능하였다. 일정한 교반속도에서 균체량이 증가하면 k_{La} 의 값은 감소하는 경향을 보여주었으나, 균체량 15 g/L 이상에서는 k_{La} 의 감소 폭이 확실하게 작아짐을 알 수 있었다.

통기속도의 변화에 따른 k_{La} 의 변화도 교반속도에서의 결과와 유사했으며, 균체량 15 g/L 이상에서 통기변화에 대한 k_{La} 의 감소 폭이 역시 작아지는 것을 알 수 있었다. 균체량의 농도변화에 따른 교반과 통기에 대한 k_{La} 값을 비교할 때, 고

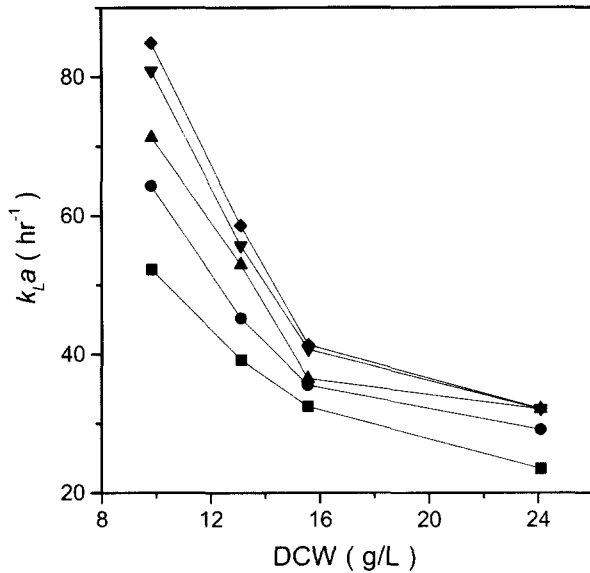


Figure 7. Effect of cell concentration on k_{La} in fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis* at various aeration rates and 450 rpm. -■-; 0.5 vvm, -●-; 1.0 vvm, -▲-; 1.5 vvm, -▼-; 2.0 vvm, -◆-; 3.0 vvm.

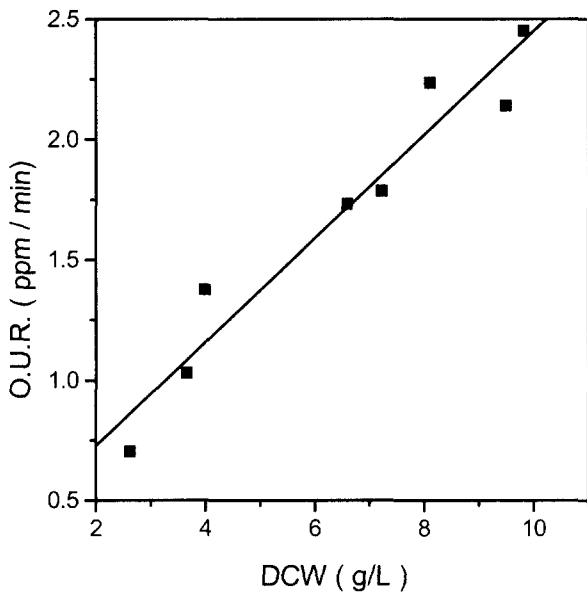


Figure 8. Linear regression analysis to correlate oxygen uptake rate with cell concentration in fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis*.

농도의 균체량에 도달할수록 통기에 의한 k_{La} 의 증가 효과가 미미하므로, 고농도 균체량에서는 교반속도의 변화로 용존산소를 조절하는 것이 적절함을 알 수 있었다. 그 이유는 산소 전달에 영향을 끼치는 발효배지 내 공기방울의 표면적 증가가 균체량이 증가할수록 임펠러의 전단력에 의한 공기 방울의 분산효과에 크게 의존하기 때문인 것으로 생각된다(4).

균체량과 산소흡수율

Figure 2의 발효과정 중 균체의 증가에 대한 산소흡수율(O.U.R., oxygen-uptake rate)을 계산하여 Figure 8에 나타내었다. 여기서 균체량에 대한 산소흡수율의 기울기는 q_{O_2} (specific

oxygen-uptake rate)가 된다. 본 실험에서 구한 *Streptomyces avermitilis* q_{O_2} 의 값은 약 0.215 mg O_2 /g cell · min(0.8 m mole O_2 /g cell · hr)으로, 페니실린 발효에서 *Penicillium chrysogenum* q_{O_2} 가 1.2 m mole O_2 /g cell · hr로 측정된 결과보다 약간 작은 값을 나타내었다(16). 산소흡수율과 건조균체 질량과의 선형단순곡선화법에 의한 관계식은 다음과 같다.

$$O.U.R. = 0.2154 X + 0.2964$$

이 때의 상관계수는 0.969이었으며, X는 건조균체질량으로 단위는 g/L이다.

고농도 균체 발효시 k_{La} 증가를 위해서는 통기보다 교반에 의한 조절이 더 효과적임을 알 수 있었고, 균체량의 농도에 따라 교반속도를 조절한다면 용존산소의 제한도 어느 정도 극복할 수 있을 것으로 판단되었다.

요 약

균사형성 미생물에 의한 항생물질의 대량생산은 적절한 산소공급이 요구되며, 산소전달속도는 생산성에 영향을 미치는 속도제한단계이다. 그러므로 발효에 이용하기 위해 *Streptomyces avermitilis*와 같은 균사형성 미생물 배양액에서의 산소전달계수를 측정하였다. 그러나 회분식 배양에서 k_{La} 측정을 위한 적절한 용존산소 유지가 어려웠으며, 이를 극복하기 위해서 유가식 배양을 도입하였다. 배지의 단계적 공급으로 미생물의 성장속도를 조절할 수 있었고, 낮은 교반속도에서도 적정 용존산소의 유지가 가능하였으며, 결과적으로 k_{La} 측정도 용이하였다. 7 g/L이하의 낮은 균체량에서는 350 rpm의 교반속도가 교반효율과 전단응력을 고려했을 때 가장 적절한 조건임을 알 수 있었다. 그러나 균체가 증가할수록 배양액 점도가 증가하여 혼합이 효과적이지 못한 이유로 더 높은 교반속도가 필요하였다. 통기량의 증가에 의한 k_{La} 증가는 건조균체질량이 고 농도 일수록 미미하였다. 그러므로 높은 균체농도에서는 이차대사산물에 영향을 주지 않는 범위에서 교반속도를 증가하여 용존산소 농도를 조절하는 것이 통기속도의 조절보다 더 효율적 일 것으로 판단되었다.

감 사

본 연구의 결과는 1995년 - 1998년 농림부 농림기술개발사업 연구비 지원에 의하여 연구되었으므로 관계당국에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Stapley, E. O. and H. B. Woodruff (1982), Avermectins, Antiparasitic Lactones Produced by *Streptomyces avermitilis* Isolated from A Soil in Japan, Genetics, Biosynthesis, Actions & New Substances, In *Proc. An International Conference on Trends in Antibiotic Research*, H. Umezawz, A. L. Demain, T. Hata and C. R. Hutchinson Eds.; Japan Antibiotics Research Association, 1982, Tokyo, pp154-170.
2. D. B. Sattelle (1988), *Biotechnology in Perspective*, 1st

- ed., p29, Hobsons Publishing, Washington D. C.
3. Aikawa, M., S. A. R. Lopes-Shikida, M. F. Lemos, J. G. C. Pradella, and G. Padilla (1999), Screening of Spontaneous and Induced Mutants in *Streptomyces avermitilis* Enhances Avermectin Production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 558-562.
 4. Xu, Z. and P. Cen (1999), Stimulation of Avermectin B1a Biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* by Feeding Glucose and Propionate, *Biotechnol. Lett.*, **21**, 91-95.
 5. Gbewonyo, K., D. Jain, G. Hunt, S. W. Drew, and B. C. Buckland (1989), On-line Analysis of Avermectin Fermentation Cell Growth Kinetics in an Industrial Pilot Plant, *Biotech. Bioeng.*, **34**, 234-241.
 6. Packer, H. L. and C. R. Thomas (1990), Morphological Measurements on Filamentous Microorganisms by Fully Automatic Image Analysis, *Biotech. Bioeng.* **35**, 870-881.
 7. Humphrey, A. (1998), Shake Flask to Fermenter: What Have We Learned?, *Biotechnol. Prog.* **14**, 3-7.
 8. Stanbury, P. F., A. Whitaker, and S. J. Hall (1994) Principles of Fermentation Technology, 2nd ed., p264, Pergamon, Oxford.
 9. Nash, C. H. and F. M. Huber (1971), Antibiotic Synthesis and Morphological Differentiation of *Cephalosporium acremonium*, *Appl. Microbiol.*, **22**, 6-10.
 10. Doran, P. M. (1995), Bioprocess Engineering Principles, 1st ed., p200, Academic Press, London.
 11. Tuffile, C. M. and F. Pinho (1970), Determination of Oxygen-Transfer Coefficients in Viscous Streptomycete Fermentations, *Biotech. Bioeng.* **12**, 849-871.
 12. Wang, S.-J. and J.-J. Zhong (1997), Comparison of O₂ Transfer Characteristics between a New Centrifugal Impeller and a Flat-bladed Turbine Impeller, *Biotech. Techniques*, **11**(10), 763-767.
 13. Pouliot, K., J. Thibault, and G. Acuna Leiva (2000), *K_{La}* Evaluation during the Course of Fermentation using Data Reconciliation Techniques, *Biopro. Eng.* **23**, 565-573.
 14. Miller, G. L. (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
 15. Pivnichny, J. V., J. S. K. Shim, and L. A. Zimmerman (1980), Direct Determination of Avermectin in Plasma at Nanogram Levels by High Performance Liquid Chromatography, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1447-1450.
 16. Ryu, D. Y. and J. Hospodka (1980), Quantitative Physiology of *Penicillium chrysogenum* in Penicillin Fermentation, *Biotech. Bioeng.* **22**, 289-298.