

항진균물질을 생합성하는 *Pseudomonas aeruginosa*의 배양생리학적 특성 연구

송성기 · 윤권상 · 정용섭¹ · 전계택*

강원대학교 생명과학부, ¹전북대학교 응용생물공학부

Fermentation Studies on *Pseudomonas aeruginosa* Producing Antifungal Secondary Metabolite, PAFS. Song, Sung-Ki, Kwon-Sang Yoon, Yong-Seob Jeong¹, and Gie-Teak Chun*. Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, South Korea. ¹Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju 561-756, South Korea – When both fructose and galactose were added to a production medium as carbon sources, the productivity of PAFS (*Pseudomonas* Antifungal Substance) biosynthesized by *Pseudomonas aeruginosa* was observed to be reduced significantly due to the well-known phenomenon of catabolite repression. In order to overcome this phenomenon by use of fermentation bioprocess, fed-batch cultivation method was examined. In addition, a high producer mutant strain, AP-20 obtained by a rational screening method was tested for its productivity of PAFS in both batch and fed-batch fermentation processes. Notably fed-batch operation showed approximately 4 fold higher PAFS productivity than traditional batch operation process. It was appeared that galactose was utilized principally for the cell growth of *Pseudomonas aeruginosa* whereas large portion of fructose was used for the biosynthesis of PAFS. Furthermore it was observed that composition and feeding rate of production media should be optimized even in the fed-batch fermentation bioprocess. As an example, very slow feeding of carbon sources gave rather negative effect on the production of PAFS due to significant limitation of carbon and energy sources available for the producer microorganism.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, PAFS (*Pseudomonas* antifungal substance), catabolite repression, fed-batch cultivation

PAFS(*Pseudomonas* Antifungal Substance)는 그람 음성 박테리아인 *Pseudomonas aeruginosa*가 생합성하는 이차대사산물로서[1-4], 진균류의 균사생장 및 유성 혹은 무성포자 형성을 억제하는 새로운 항진균적 특성을 지니는 것으로 밝혀졌다[5,6,8,11]. 따라서 본 연구에서는 PAFS의 대량 생산을 위해 배지 최적화 및 고생산성 우량변이주의 지속적인 선별을 통해 야생형에 비해 월등히 높은 PAFS 생산성 및 유전학적 안정성을 보이는 생산균주를 확보하였고, 발효조 배양을 통해 생산균주의 배양생리학적 특성을 조사하고자 하였다.

유가식 배양(fed-batch culture)은 배양 중 배지를 발효과정대로 투입시키면서 운전하는 방법을 말하며, 투입배지의 농도 및 속도를 조절함으로써 발효기내의 영양분 농도를 정밀하게 조절할 수 있는 장점을 가지고 있다. 유가식 배양을 적용할 경우 초기배양액의 높은 탄소원 농도로 인해 이차대사가 저해되는 catabolite repression/inhibition 현상을 극복할 수 있을 뿐만 아니라, 이차대사에 큰 영향을 미치는 세포비성장속도(μ)를 조절할 수 있으므로 이차대사산물의 생산

성을 향상시킬 수 있다. 예컨대 Kumar 등은 Maltodextrin과 cornsteep liquor를 공급하는 유가식 배양을 통해 *Aspergillus terreus*에 의해 생합성되는 고지혈증 치료제인 lovastatin의 생산성을 회분식 배양에 비해 약 2배 향상시킬 수 있었고 [7], Xu 등은 방선균인 *Streptomyces avermitilis*의 탄소원 공급 유가식 배양에 의해 동물구충제로 사용되는 avermectin B1a의 생산성을 회분식 배양에 비해 약 2.1배 향상시켰다 [10].

본 연구팀은 PAFS에 관한 배양 생리학적 특성을 조사하는 이전의 실험의 결과에서 PAFS의 생산성 향상을 저해하는 주목할 만한 현상을 관찰한 바 있다[9]. 즉, 탄소원인 fructose와 galactose를 배지에 동시에 첨가하였을 때 catabolite repression 현상에 의해 galactose가 먼저 소비되고 fructose가 나중에 천천히 소비되는 현상이 나타나고, 실험균주가 쉽게 이용하는 galactose를 추가로 공급했을 때 PAFS 생산성이 더 이상 증가하지 않게 나타난 점이다. 이는 공급된 galactose가 이차대사산물 생산을 위해 사용되기보다는 세포 성장을 위해 먼저 사용된 것으로 추론할 수 있었다. 이와 같은 catabolite repression에 의한 PAFS 생산성 현상을 극복하기 위해서 본 연구에서는 회분식 배양을 비교 대상으로 하여, 두 가지 탄소원의 공급량과 유속을 달리하는 유가식 배양으로 PAFS의 생산성을 향상시키고자 하였다.

*Corresponding author

Tel: 033-250-8547, Fax: 033-241-4627

E-mail: gtchun@cc.kangwon.ac.kr

재료 및 방법

실험균주 및 배지

항생물질 분비 균주는 춘천근교 목장에서 분리하여 동정
 균: *Pseudomonas aeruginosa* KMCS1를 사용하였다. 균주는
 YPD배지에서 1일간 배양한 후 10%의 glycerol이 포함된
 liquid stock을 만들어 -20°C에서 보관하여 seed culture시 새
 로운 stock을 꺼내 사용하였으며, 기본 배지 조성은 다음과
 같다: Galactose 20 g/L, Fructose 30 g/L, Cottonseed flour
 3.5 g/L, NaCl 2 g/L, CaCO₃ 5 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L,
 FeSO₄ · 7H₂O 0.05 g/L, ZnSO₄ · 7H₂O 0.05 g/L, MnSO₄ ·
 7H₂O 0.05 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g/L.

발효조건

발효조로의 접종을 위한 seed culture의 배양조건은 YPD
 100 mL을 500 mL 삼각플라스크에 첨가하여 28°C, 250
 rpm으로 24시간 배양하였으며 반응기로의 접종량은 1%(v/
 v)로 하였다. 2.5 L(1.5 L의 조업부피)의 발효조를 사용하였
 고 배양 온도는 28°C, 교반속도는 200~400 rpm, 공기유량
 은 1.0~2.0 vvm으로 적절히 조절하였으며 pH는 조절하지
 않았다. 회분식 배양은 배지 내에 미리 배지 최적화를 통해
 결정된 탄소원인 galactose와 fructose를 첨가한 후 실시하였
 고, 유기식 배양에서는 한 종류의 탄소원을 미리 배지에 첨
 가시키고 다른 탄소원을 외부에서 공급하는 방식을 택하였
 으며, 공급되는 탄소원의 양과 공급 유속을 다양하게 변화
 시키면서 PAFS의 생산성을 관찰하였다. 기포제거액은 배양
 액의 포화 용존산소량을 감소시키는 결과를 가져오므로 기
 포제거 조절기에 의해 투입되도록 하여 가능한 한 최소화하
 여 첨가했다.

Agar piece(plug) method

Agar piece 방법에 의한 고생산성 균주 선별은 다음과 같
 이 수행되었다: 1.5%의 agar가 포함된 생산배지에서 1-2일
 정도 미리 배양된 *P. aeruginosa*가 놓여진 agar cylinder(6
 mm)를 감수성 균주(*Alternaria brassicicola*)가 pour plating
 된 PDA(Potato dextrose agar)배지 위에 생산균주가 성장한
 agar cylinder를 올려놓고 배양하였다. Agar piece 방법을 확
 립하기 위해 감수성 균주의 spore 농도, 배양 온도를 조절하
 였고, PAFS의 확산 속도 조절을 위해 계면활성제인 Triton
 X-100을 농도 별로 첨가하여 수행하였다.

Disc assay method

10 mL의 *P. aeruginosa* 배양액에 동량의 methanol을 첨
 가하여 1시간 동안 250 rpm, 28°C의 진탕배양기에서 추출
 한 후 1 mL의 sample을 취했다. Disc assay를 위해 PDA
 배지 위에 감수성 균주인 *A. brassicicola*를 pour plating 했
 다. 미리 준비한 disc를 agar 배지위에 올려놓고 배양액의 추

출 시료를 10 µl 접종하였다. *A. brassicicola*의 성장 속도를
 고려하여 배양 온도는 23°C 또는 28°C로 하여 48시간 동안
 배양한 후 disc 주변에 생성된 감수성 균주의 성장 저해환의
 크기를 측정하였다.

PAFS activity에 대한 bioassay에서 성장저해환의 직경 (mm)을 unit 단위로 전환

PAFS activity를 정량적으로 분석하기 위해 bioassay 방법
 을 사용하는 경우에 감수성 균주의 성장저해환의 크기는 고
 농도일수록 즉, 직경이 커질수록 직경의 차이는 작아도 실
 제농도는 큰 차이를 보이는 경향이 관찰되었다. 이러한 경
 우에 일반적으로 감수성 균주의 성장저해환에 대한 항생물
 질의 활성을 semi-log 좌표로 표현할 경우 직선화되는 것으
 로 알려져 있다. 본 실험의 경우 배지 최적화 실험에서 가장
 높은 PAFS 생산성을 보였던 배지 조성에서 배양하여 얻은
 배양 상등액으로 disc assay를 실시하여 관찰된 감수성 균주
 의 성장저해환의 크기를 이용하여 표준 저해곡선을 얻고자
 하였다.

PAFS activity를 정량적으로 분석하기 위해 bioassay 방법
 에 의해 얻은 성장저해환의 크기를 다음의 절차에 의해 unit
 단위로 전환하였다.

1000 unit의 PAFS activity에 대한 정의 :

감수성 균주 : *Alternaria brassicicola* 1×10⁶ spores/ml

접종량 : 10 µl

배지 : PDA 15 ml(15×100 mm petridish)

- agar depth 1.8 mm

배양 조건 : 28°C, 40 hours

성장저해환 (inhibition zone) 직경 : 24.4 mm

Fig. 1에 1000 unit의 sample을 1/5 배씩 증류수로 희석한
 후 bioassay 결과 얻은 표준 inhibition curve를 나타내었다.
 이 때 직선식은 다음과 같이 표현되었다.

$$\log_{10} Y = a + bX, Y = 10^{(a+bX)}$$

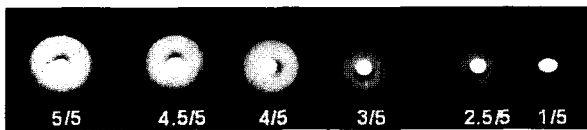
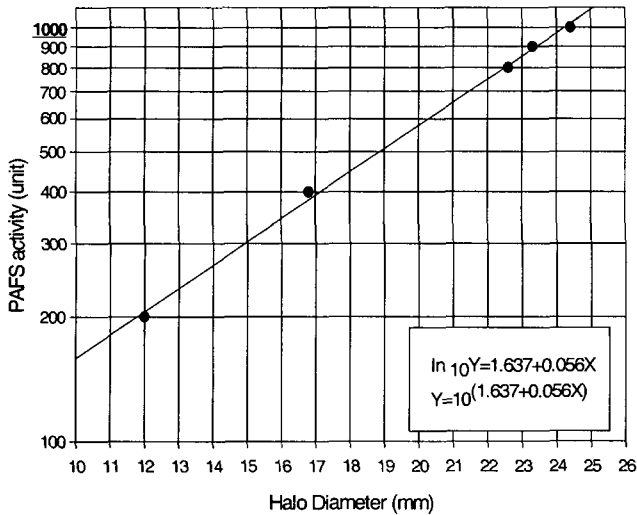
(a : 1.637, b : 0.056, X : 저해 환의 직경).

이상의 결과에 근거해서, 이후부터는 상기와 동일한 실험
 조건에서 bioassay를 수행한 후, PAFS 생산성을 나타내는
 성장저해환의 크기를 이 직선식에 의해 unit의 단위로 전환
 하여 표현했다.

당 분석

배양액 중에 잔류하는 galactose와 fructose의 농도를 측정
 하기 위해 HPLC를 이용하였다. HPLC 운전조건은 다음과
 같다.

Column : 10 µm Waters Carbohydrate analysis column
 (3.9×300 mm)(Millipore, Milford, MA, USA)



- * Define a 1000 unit as :
 - *Alternaria brassicicola* - 1×10^6 spores/ml
 - inoculum - $10 \mu\text{l}$, agar depth - 1.8mm
 - culture time - 40 hours
 - incubation temperature - 28°C
 - ⇒ halo diameter - 24.4 mm

Fig. 1. Determination of the standard inhibition curve of *A. brassicicola* by PAFS.

Precolumn : Bondapak precolumn for C18(4.6×20 mm)
 Mobile phase : Acetonitrile : Water = 80 : 20
 Column temperature : 25°C (room temperature)
 Detector & Condition : Waters 401 refractive index (RI) detector, Attenuator = 16×
 Data analysis : Waters 746 Data Module(Millipore, Milford, MA, USA)
 Injection valve : Waters U6K valve(Millipore, Milford, MA, USA)

결과 및 고찰

PAFS 고생산균주 대량선별을 위한 scale-down 실험 방법 확립 및 고생산 균주 선별

고생산 균주개발에 있어서 가장 중요한 단계중 하나는 얼마나 많은 균주를 얻느냐에 있다. 일반적인 균주개발 방법은 모균주로부터 얻어진 각각의 분리주를 얻어 성장 단계와 발효 단계의 배양 후 배양액의 bioassay를 통해 상위 10~20%의 분리주를 선별하고, 이를 플라스크 배양과 좀더 scale-up된 발효조 배양으로 생산 단계를 증가시켜 생산성을 향상시키게 된다. 본 실험에서는 PAFS 고생산 균주를 대량으로 선별하기 위해 scale-down 실험을 수행하였다. scale-down

실험은 기존의 실험방법을 소규모화 시킴으로써, 사용되는 배지와 실험 기자재의 비용을 줄일 수 있으며 또한 유기용매 등의 사용과 발효 찌꺼기의 감소 등의 장점이 있다. *P. aeruginosa*의 현탁 배양액으로부터 colony를 분리하여 각각의 colony를 agar plug assay를 통해 일차로 상위 10% 정도의 고생산성 균주를 선별한 뒤 50 mL tube로 옮겨 seed 배양을 하였다. 이때 배지는 주로 10 mL의 성장 배지를 사용하였으며 한번에 500개 정도씩 수행가능하기 때문에 대량 선별이 가능하였다.

성장배지가 10 mL 첨가되어있는 50 mL 튜브에 모균주로부터 UV 처리를 통하여 획득한 약 1000여개의 돌연변이주를 각각 접종한 후, 28°C 에서 250 rpm으로 1일간 배양하였고, 그 후 10 mL의 생산배지를 함유하고 있는 50 mL 튜브에 상기의 성장배양액을 1 mL 접종한 후 2일간 회분식 배양을 수행하여 각 돌연변이주의 PAFS의 생산성을 살펴보았다. 선별된 돌연변이주들이 비록 동일한 모세포주로부터 선별되었음에도 불구하고 PAFS의 생산 농도는 disc bioassay 결과, 6-28 mm에 이르는 광범위한 분포를 보여주는 것으로 나타났다. 빈도수가 가장 높은 PAFS 생산 범위는 약 20 mm 범위로서 1000개의 돌연변이주 중 151개(15%)가 이 범위의 생산성을 보여주었다. 한편 28 mm 이상의 PAFS 생산성을 보이는 고생산 변이주도 7종이 있음이 확인되었다(자료 미제시).

상기의 실험에 의해 획득한 PAFS 고생산성 변이주 중 유전적으로 안정적인 PAFS 고생산 변이주의 재선별 과정은 통계적으로 성공률이 매우 높다고 밝혀진 다음의 절차에 의해 수행되었다. 즉 PAFS의 생산성이 높게 나타난 약 50개의 돌연변이주를 선별하여 이 중 revertant로의 back mutation 현상이 나타나지 않는 균주를 선별하기 위해, glycerol stock과 agar slant를 준비한 후 성장배지와 생산배지에서 3배수로 플라스크배양(3×50 250 mL 플라스크)을 이전과 같은 배양조건에서 수행하였다. 최종적으로 4종의 고생산 균주를 확보하여 이들을 각각 AP-10, AP-20, AP-30, AP-40으로 명명하였으며, 3배수로 수행한 플라스크 배양 2일째의 평균 PAFS 생산량은 disc bioassay 결과 각각 21.3 mm, 28.2 mm, 26.3 mm, 25.7 mm인 것으로 관찰되었다. 3배수 실험 결과 대부분 평균값 근처의 생산량을 나타내는 것으로 보아 고생산균주의 안정도가 꽤 높은 것으로 확인되었다. 이 결과로부터 생산성이 가장 우수한 것으로 판명된 AP-20 균주를 최종적으로 선별하여 하기의 생물반응기를 이용한 회분식 배양 및 유가식 배양 실험에 이용하였다.

생물반응기에서 회분식 배양과 유가식 배양 결과 비교

본 실험에서는 생물 반응기를 이용하여 유가식 배양을 통해 PAFS의 생산성을 향상시키고자 하였다. 유가식 배양은 배양 초반부터 탄소원인 fructose를 외부에서 공급하였고, 공급되는 속도를 달리하여(Table 1) 생산균주인 *P. aeruginosa*

Table 1. Carbon source feeding rate according to culture period in fructose feeding fed-batch culture systems in 2.5 L stirred tank bioreactors

	Culture time (hr)	Medium flow rate (ml/min)	on-off time (min)	
			on	off
Fed-batch fermentation 1	0 ~ 35	0.012	0.4	0.5
	35 ~ 60	0.021	0.5	0.5
	60 ~ 80	0.035	0.6	0.4
Fed-batch fermentation 2	0 ~ 80	0.032	0.6	0.4

의 배양 생리학적 특성과 이차대사산물의 생산성과의 관계를 조사하였다.

Fig. 2에 나타난 바와 같이 회분식 배양에서는 이용 가능한 탄소원이 충분하므로 40시간까지 용존산소가 고갈상태에 있는 반면, fructose를 공급하는 유가식 배양에서는 배양 시작 후 15시간 이후부터 용존 산소의 양이 급격히 증가함을 알 수 있다. 이러한 현상은 당의 소비 양상을 살펴봄으로써 확인될 수 있다(Fig. 3). 회분식 배양에서는 탄소원이 배양 말기까지 존재하였고, fructose를 공급하는 유가식 배양에서는 약 40시간 후 배지내의 탄소원이 고갈되었다. PAFS 생산성 면에서는 두 경우 모두 galactose를 소비하고 fructose를 소비하기 시작하는 시점부터 생산성이 증가하였고, 회분식 배양에 비해 유가식 배양의 경우 약 460% 향상된 PAFS 생산성을 보였다(Fig. 4). 또한 유가식 배양에서 fructose 공급 속도가 느린 경우(Fig. 4, fermentor 2)에 PAFS 생산성을 확인해 본 결과, 배양 시작 후 약 30시간까지는 fermentor 1과 유사한 경향성을 보이지만 그 이후에는 감소하였다. 위

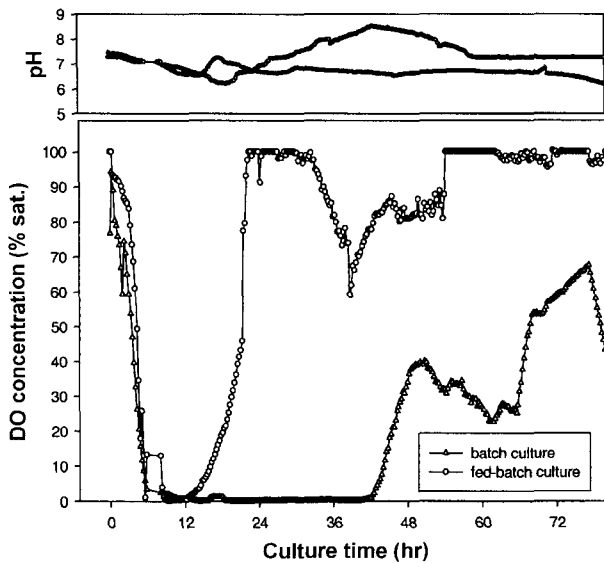


Fig. 2. Comparison of time-course profiles of dissolved oxygen concentration in batch and fed-batch culture systems in 2.5 L stirred tank bioreactors.

실험의 결과를 종합해 볼 때 생산균주는 galactose를 이용해 세포성장과 이차대사산물 합성을 위한 유전자발현을 하고

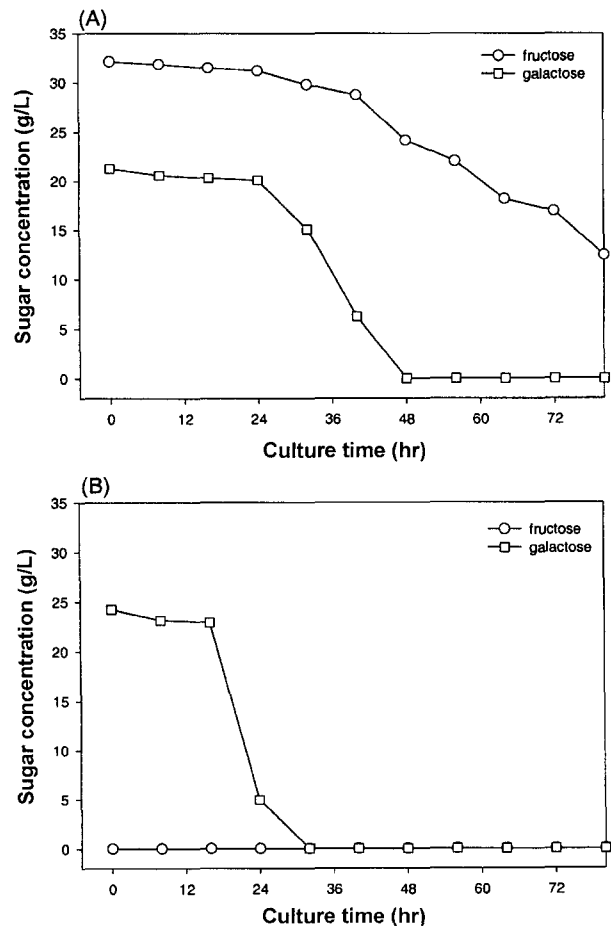


Fig. 3. Time-course profiles of sugar concentrations in (A) batch culture and (B) fructose fed-batch culture systems in 2.5 L stirred tank bioreactors.

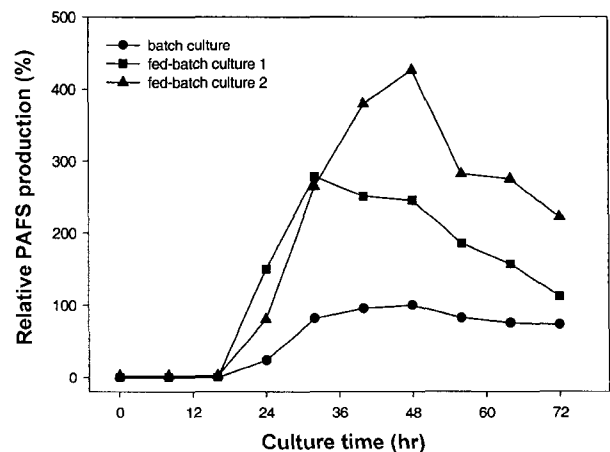


Fig. 4. Time-course profiles of PAFS production in batch and fed-batch culture systems in 2.5 L stirred tank bioreactors (the maximum PAFS production of batch culture was defined as 100%).

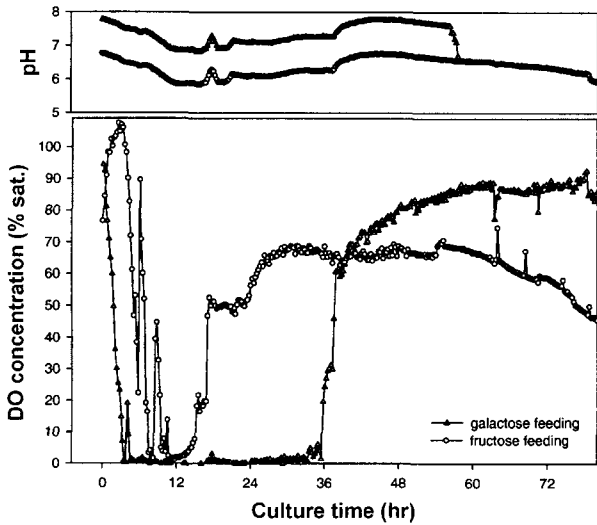


Fig. 5. Time-course profiles of DO and pH in galactose and fructose fed-batch cultures in 2.5 L stirred tank bioreactors.

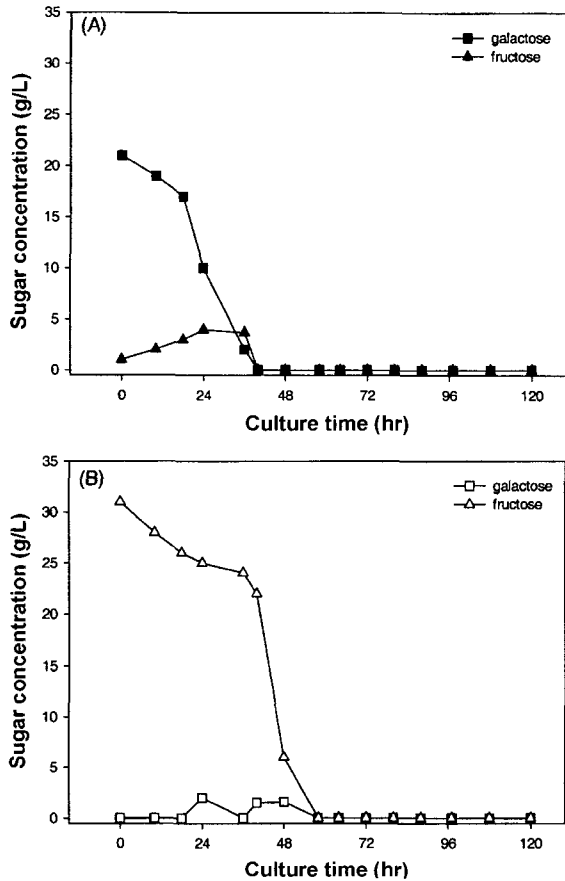


Fig. 6. Time-course profiles of fructose and galactose concentration in (A) fructose and (B) galactose fed-batch culture systems in 2.5 L stirred tank bioreactors.

fructose를 이용하여 PAFS를 합성하는 것으로 추론되며, 너무 느린 탄소원의 공급은 세포 성장에 제한요소로 작용하여 이차대사산물 합성을 저해하는 것으로 판단된다.

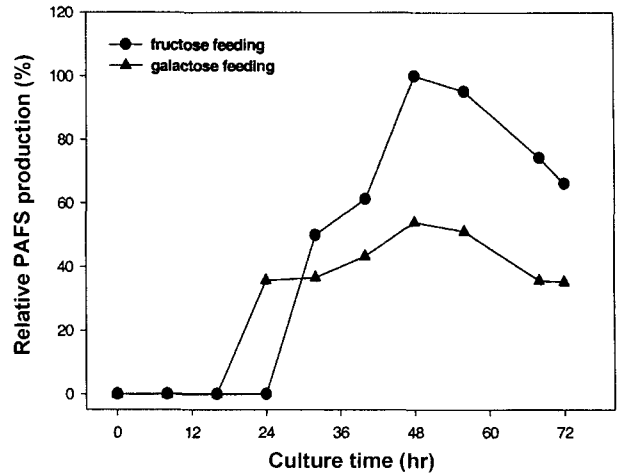


Fig. 7. Time-course profiles of PAFS production in fructose and galactose fed-batch culture systems in 2.5 L stirred tank bioreactors (the maximum PAFS production of fructose fed-batch culture was defined as 100%).

생물반응기를 이용한 유기식 배양에서 공급되는 탄소원의 종류에 따른 배양 결과 비교

상기의 실험들을 바탕으로 fructose를 공급하는 유기식 배양과 galactose를 공급하는 유기식 배양에서의 용존산소의 변화양상을 비교하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 두 경우 모두 각각의 발효조에 존재하는 탄소원을 소모하여 약 4시간 만에 용존산소가 10% 이하로 급격히 저하되었다. Fructose를 공급하는 유기식 배양의 경우는 배지 내의 galactose 20 g/L를 소모하여 약 20시간 후 용존산소가 증가하는 반면, galactose를 공급하는 유기식 배양에서는 fructose 30 g/L를 소모해 약 40시간 후 급격하게 용존산소가 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 현상과 당 소비양상은 유사한 경향성을 보였다(Fig. 6). Fructose를 공급하는 유기식 배양 시 배양 초반 galactose가 풍부할 때, 공급되는 fructose는 이용되지 못하고 배지 내에 축적되었고 galactose가 거의 다 소비된 후 그 양이 감소하였다. 반면 galactose를 공급하는 유기식 배양에서는 쉽게 이용이 가능한 galactose가 천천히 배지 내로 공급됨에 따라 생산 균주는 배지 내에 존재하는 fructose를 이용하게 되었고, 배양 60시간 전후에 탄소원이 모두 고갈되었다. 위 실험에서의 PAFS 생산성을 비교해 본 결과 galactose를 공급하는 유기식 배양에서의 PAFS 생산 시기는 fructose를 공급하는 유기식 배양보다 앞섰지만 계속 증가하지 못하고 약 20%의 PAFS 생산성 저하를 보였다(Fig. 7).

플라스크 배양에 의한 유기식 배양법 확립 및 유기식 배양용 배지 최적화

Galactose 보다는 fructose를 공급하는 유기식 배양이 더욱 높은 PAFS 생산성을 보인다는 상기의 실험 결과에 근거하여 PAFS 생산배지의 최적 조건을 찾기 위해 플라스크 실

실험을 수행하였다. 플라스크를 이용한 유기식 배양방법은 발효조를 사용하지 않고도 유기식 배양 실험조건을 동시에 다양하게 조절하여 여러 조건으로 실험 할 수 있는 장점이 있다. Seed는 YPD 배지에서 28°C, 250 rpm, 24시간 배양한 후 500 mL 삼각플라스크에 1%(v/v)로 접종하였으며, 각각의 삼각플라스크에는 Cottonseed flour 35 g/L, NaCl 2 g/L, CaCO₃ 5 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.05 g/L, ZnSO₄ · 7H₂O 0.05 g/L, MnSO₄ · 7H₂O 0.05 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g/L를 동일하게 첨가하였으며, galactose와 fructose는 그 농도를 다르게 첨가하였다. Fructose의 공급은 timer를 사용하여 조절하였으며 timer의 on-off time을 1.5분과 8분으로 하였고, peristaltic pump를 이용해 0.053 mL/min의 공급속도를 유지하게 하여 최종부피가 80 mL가 되도록 하였다. 플라스크 배양에 의한 유기식 배양시스템을 Fig. 8에 제시하였다. 다양한 배양조건에서 PAFS의 생산성은 3일간 배양한 후 얻은 시료의 bioassay를 통해 확인하였으며 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 유기식 배양이 대부분에서 회분식 배양보다 더 높은 PAFS 생산성을 나타내었고, 특히 galactose 40 g/L, fructose 20 g/L인 경우에 PAFS 생산성이 가장 높은 것으로 나타났다. 이 경우에 *A. brassicicola*에 대한 성장저해환은 타 조건과는 비교가 될 정도로 뚜렷하게 관찰되었다.

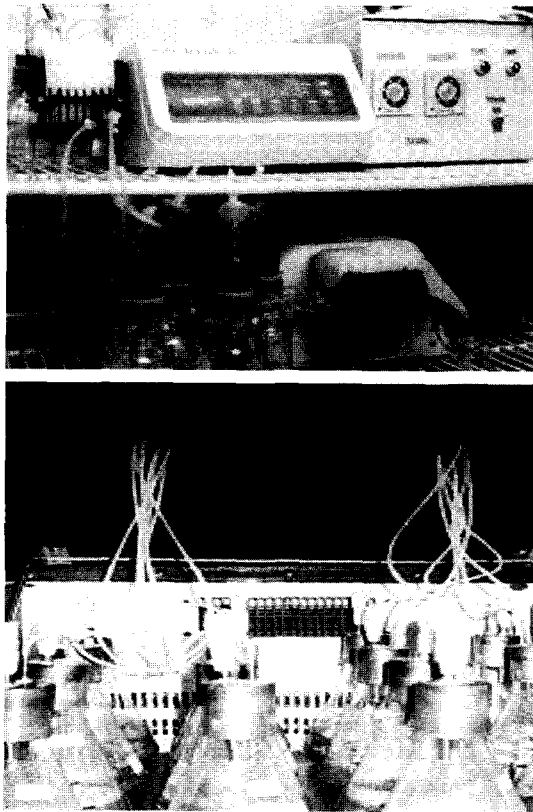


Fig. 8. Photographs of fed-batch culture systems in shake flask cultures.

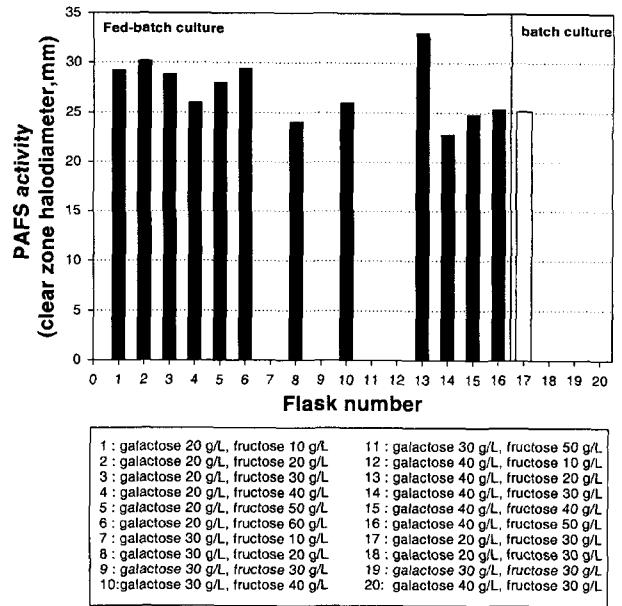


Fig. 9. Comparison of PAFS production in fructose fed-batch culture systems performed with various concentrations of carbon sources in 500 ml shake flask cultures (feeding rate : 0.053 ml/min).

생물반응기에서 유기식 배양의 배지 공급 유속과 조성에 따른 PAFS 생산성 비교

플라스크를 이용한 유기식 배양 결과 가장 적절하다고 판단되는 배양 조건인 galactose 40 g/L, fructose 20 g/L

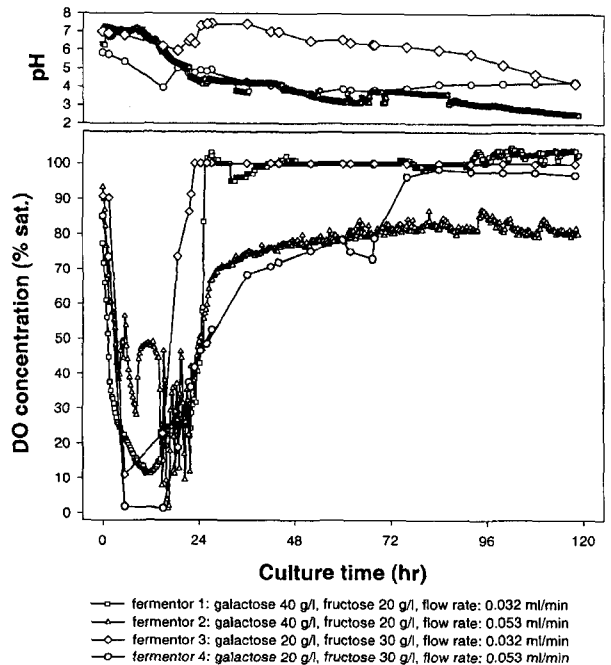


Fig. 10. Time-course profiles of D.O concentration in fructose fed-batch culture systems performed with various concentrations of carbon sources and feeding rates in 2.5 L stirred tank bioreactors.

(Fig. 10, fermentor 1 and 2)과 기존에 사용된 배지 조성인 galactose 20 g/L, fructose 30 g/L(Fig. 10, fermentor 3 and 4)의 조건을 가지고 fructose의 공급속도를 달리한 유가식 배양을 수행하여 *P. aeruginosa*의 배양 생리학적 특성과 이차대사산물의 생산성과의 관계를 살펴보았다. 그 외의 배지 조성은 4가지 조건 모두 다음과 같이 동일하다: Cottonseed flour 35 g/L, NaCl 2 g/L, CaCO₃ 5 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.05 g/L, ZnSO₄ · 7H₂O 0.05 g/L, MnSO₄ · 7H₂O 0.05 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g/L. Fig. 10에 나타난 바와 같이 용존산소의 소모 경향성은 거의 비슷하였다. 이 때의 당 소비양상을 Fig. 11에 제시하였다. 4가지 조건에서 모두 소비성이 높은 galactose를 빠르게 이용하는 전형적인 소비 경향을 보였고 약 30시간을 전후하여 galactose는 모두 고갈되었다. 당 소비양상 또한 4가지 조건에서 유사한 경향성을 보였으나 fermentor 2(galactose 40 g/L, fructose 20 g/L, flow rate: 0.053 mL/min)의 경우 탄소원의 공급속도가 빠른 관계로 시간이 지날수록 배지 내에 fructose가 축적된 후 이용되는 것을 확인할 수 있었다.

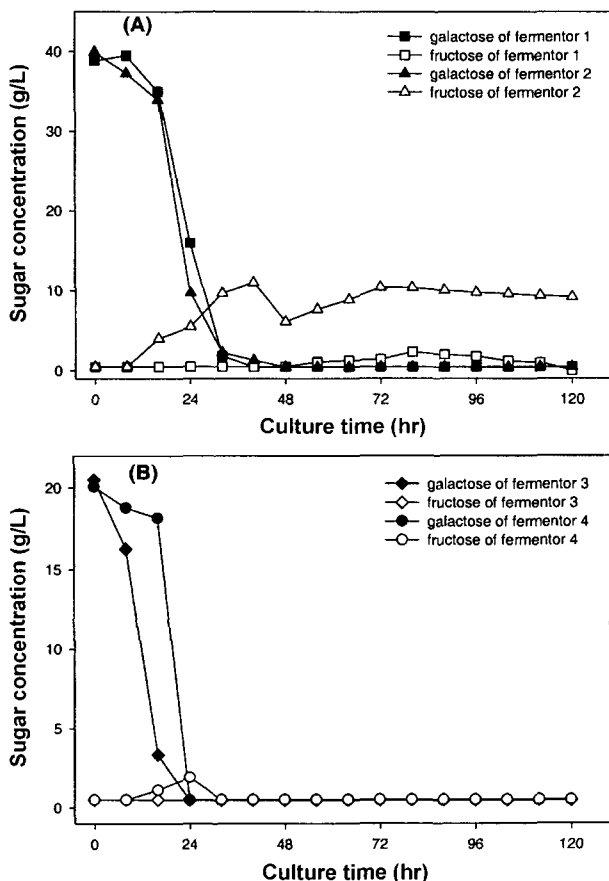


Fig. 11. Time-course profiles of sugar concentrations in fed-batch culture systems performed with various concentrations of carbon sources and feeding rates in 2.5 L stirred tank bioreactors.

각각의 배양 조건에 대한 PAFS 생산성을 확인해 본 결과 뚜렷하게 차이는 것으로 관찰되었다(Fig. 12). 4가지의 조건 모두 배지 내에 galactose가 고갈되는 약 30시간을 전후하여 PAFS 생산성이 증가하기 시작하였다. 초기에 galactose 40 g/L로 존재하고 fructose 20 g/L를 0.032 mL/min의 속도로 공급한 경우(Fig. 12, fermentor 1)에는 배양시작 후 약 30시간부터 PAFS생산이 시작되어 배양 말기까지 높은 생산성을 보였다. 이는 세포성장과 이차대사산물의 생합성에 관련된 유전자의 발현에 사용될 것이라는 galactose가 기존에 사용하던 농도보다 더 높아 세포성장이 더욱 활발했을 뿐만 아니라, 느린 탄소원의 공급속도에 의해 catabolite repression이 극복되어 이차대사산물의 합성이 촉진된 것으로 판단된다. 반면에 fructose의 공급속도가 너무 빠른 경우(Fig. 12, fermentor 2(0.053 mL/min))에는 catabolite repression에 의해 PAFS 생산성이 증가하지 못하는 것으로 생각된다. 상기의 결과를 요약하기 위해 galactose의 초기량이 20 g/L이고 30 g/L의 fructose를 0.032 mL/min의 속도로 공급했을 경우의 PAFS 생산량을 100%로 정의한 경우, 각각의 비교 배양에 대한 상대적인 PAFS의 생산량을 Table 2에 나타내었다. 초기부터 40 g/L의 galactose가 존재하고 fructose 20 g/L를 0.032 mL/min의 속도로 공급한 경우 PAFS 생산성이 약 580% 향상된 것으로 관찰되었다. 본 실험의 결과로부터 생물반응기에서의 유가식 배양이 회분식 배양에서보다 PAFS 생산성이 월등히 향상되었음을 확인할 수 있었으며, 또한 유가식 배양일지라도 배양 조건에 따라 그 생산성이 뚜렷하게 차이가 나는 것으로 관찰되었다.

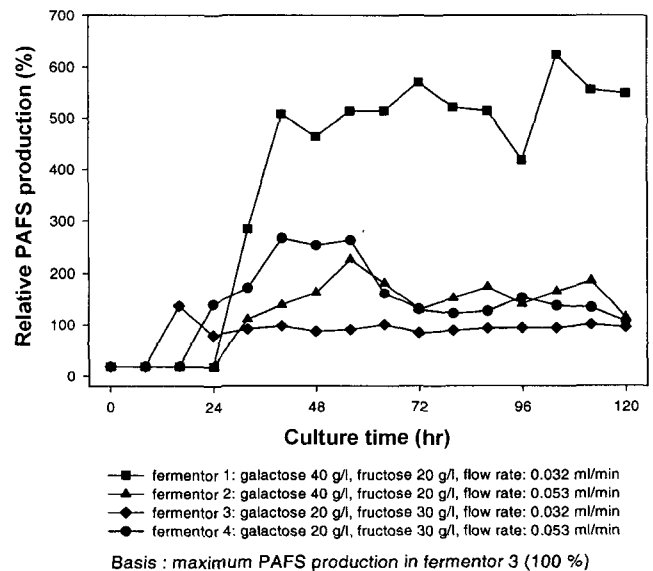


Fig. 12. Time-course profiles of PAFS production in fed-batch culture systems performed with various concentrations of carbon sources and feeding rates in 2.5 L stirred tank bioreactors (the maximum PAFS production in fermentor 3 was defined as 100%).

요 약

Fructose와 galactose를 배지에 동시에 사용하였을 때 *catabolite repression*에 의한 PAFS 생산성 저해 현상을 극복하기 위해서 본 연구에서는 두 가지 탄소원의 공급량과 유속을 달리하는 유기식 배양으로 PAFS 생산성을 향상시키고자 하였다. 또한 통계적으로 성공률이 매우 높다고 밝혀진 실험방법에 의해 모균주로부터 고생산변이주를 선별하여 생산성이 가장 우수한 것으로 판명된 AP-20 균주를 생물반응기를 이용한 회분식 배양 및 유기식 배양 실험에 이용하였다. 생물반응기에서의 유기식 배양이 회분식 배양에서보다 PAFS 생산성이 약 4배 이상 향상되었음을 확인할 수 있었다. 또한 생산균주의 배양생리학적 특성으로서 *Pseudomonas aeruginosa*는 galactose를 이용해서 세포성장과 이차대사산물-생합성과 관련된 유전자의 발현을 하고 fructose를 이용하여 PAFS를 생합성하는 것으로 추론되며, 너무 느린 탄소원의 공급은 세포성장에 제한요소로 작용하여 이차대사산물의 생합성을 저해하는 것으로 판단되었다. 한편 유기식 배양일지라도 배양 조건에 따라 그 생산성이 뚜렷이 차이가 나는 것으로 관찰되었다. 즉 galactose의 초기량이 20 g/L이고 fructose 30 g/L를 0.032 mL/min의 속도로 공급했을 경우의 PAFS 생산량을 100%로 정의했을 때, 초기부터 40 g/L의 galactose가 존재하고 20 g/L의 fructose를 0.032 mL/min의 속도로 공급한 경우에 PAFS 생산성이 약 580% 향상된 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청에서 지원한 연구비(Grant 81510-655)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Abe, M. and T. Nakazawa. 1994. Characterization of hemolytic and antifungal substance, cepalycin, from *Pseudomonas cepacia*. *Microbiol. Immunol.* **38**: 1-9.
2. Cook, R. J. and A. D. Rovira. 1976. The role of bacteria in the biological control of *Gaeumannomyces graminis* by suppressive soils. *Soil Biol. Biochem.* **8**: 269-273.
3. Dowling, D. N. and F. O'Gara. 1992. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* **12**: 133-141.
4. Fenton, A. M., P. M. Stephens, J. Crowley, M. O'Callaghan, and F. O'Gara. 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,2-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3873-3878.
5. Guttererson, N. 1990. Microbial fungicides: Recent approaches to elucidating mechanisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**: 69-91.
6. Jee, H. H., C. K. Nam, and C. H. Kim. 1988. Studies on the biological control of Phytophthora blight of red-pepper. I. Isolation of antagonistics and evaluation of antagonistic activity in vitro and green house. *Kor. J. Pl. Pathol.* **4**: 305-312.
7. Kumar, M. S., S. K. Jana, V. Senthil, V. Shashanka, S. V. Kumar, A. K. Sadhukhan. 2000. Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. *Proc. Biochem.* **36**: 363-368.
8. Min, B. J., S. H., Roh, and C. T. Cho. 1990. Biological control of Fusarium wilt of strawberry by antagonistic bacterium, *Pseudomonas gladioli*, in greenhouse. *Kor. J. Pl. Pathol.* **6**: 461-466.
9. Park, S. O., S. K. Song, K. S. Yoon, Y. H. Jeong, S. J. Lee, Y. S. Jeong, and G. T. Chun. 2000. Enhanced production of antifungal substance (PAFS) biosynthesized by *Pseudomonas aeruginosa*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 341-348.
10. Xu, Z., and P. Cen. 1999. Stimulation of avermectin B_{1a} biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* by feeding glucose and propionate. *Biotechnol. Lett.* **21**: 91-95.
11. Yoon, K.S., B.Y. Min, H.T. Choi, J.K. Lee, and K.W. Kim. 1999. Microscopic examination of the suppressible action of antifungal substance from *Pseudomonas aeruginosa* on asexual sporulation of fungi. *J. Microbiol.* **37**: 27-34.

(Received Sep. 30, 2003/Accepted Feb. 2, 2004)