

Corynebacterium glutamicum 고정화 캡슐을 이용한 L-lysine 생산특성

정수환 · 이태종 · 박중곤[†] · 장호남*

경북대학교 공과대학 화학공학과
*한국과학기술원 화학공학과

(1994년 8월 19일 접수, 1994년 10월 28일 채택)

L-Lysine Production Using Encapsulated *Corynebacterium glutamicum*

Soo Hwan Cheong, Tae-Jong Lee, Joong Kon Park[†] and Ho Nam Chang*

Dept. of Chem. Eng., College of Eng., Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

*Dept. of Chem. Eng., and BPERC, KAIST, Taejeon 305-701, Korea

(Received 19 August 1994; accepted 28 October 1994)

요 약

미생물의 고농도 고정화 법으로서 고정화 캡슐을 사용하여 호기성 균주의 일종인 *C. glutamicum*을 캡슐내부에 고정화하고 배양특성을 살펴보았다. Surfactant가 포함된 calcium alginate 캡슐 내에 *C. glutamicum*을 고정화하여 성장배지에서 배양하는 경우 배지용액 liter당 50 g의 CaCO_3 와 10 g의 CaCl_2 를 첨가함으로써 캡슐막의 용해를 방지할 수 있었다. 배지 내의 yeast extract 농도를 10 g/l 이상으로 유지함으로써 캡슐내부 건조중량을 220 g/l 이상으로 유지할 수 있었다. 캡슐내부에 산소전달 속도를 증가시키기 위해서 hemoglobin을 미생물과 함께 고정화하였으며 이 때의 L-lysine 생산성은 약 30% 증가하고 캡슐내부의 건조중량은 약 40% 감소를 하였다. 이 효과는 고정화 캡슐을 5회 반복 사용할 때까지 유지되었다. 고정화 캡슐을 이용하여 플라스크 배양대신 산소공급 반응기 내에서 배양한 경우 150-200%의 L-lysine 생산농도 증가를 얻을 수 있었다.

Abstract—Fermentation characteristics of encapsulated *Corynebacterium glutamicum* using calcium alginate membrane were investigated. The dissolution of calcium alginate capsule in the growth medium of bacteria was prevented by adding 50 g CaCO_3 and 10 g CaCl_2 into one liter of growth medium. *C. glutamicum* encapsulated at the inside of the capsule sneaked out through the pore of capsule wall membrane. However the dried cell density in the capsule was maintained as 220 g/l by increasing the concentration of yeast extract to 10 g/l in the growth medium. We added a little amount of hemoglobin to the capsule core to increase the oxygen transfer rate in the capsule. The production rate increased by 30% and the dried cell density in the capsule decreased by 40%. The effect of hemoglobin was maintained for five batch runs. The concentration of L-lysine increased to about 150-200% by pumping 420 ml of air per minute in the reactor.

1. 서 론

균체를 고농도로 하여 생산성을 높일 수 있는 방법으로 발효조 내의 균체를 고정화하는 방법이 있다[1].

현재까지의 성공사례는 셀라이트에 미생물을 흡착시킴으로써 실험실 규모로서 가능성이 확인되었고[2] 이중 실관반응기는 실험실 규모로서의 연속조업이 성공하였다. 그러나, 실관반응기를 제외한 고정화 미생물반응기

에서는 일반적으로 공통적인 문제를 안고 있다. 담체에 부착된 미생물이나 담체 내에 포함된 미생물들이 성장하여 담체 밖으로 스며나오게 되어 용액 중으로 씻겨져 나오게 된다. 또한 미생물이 담체의 표면과 담체 내의 공극에서만 배양이 가능하므로 미생물의 배양영역이 매우 작으며 담체의 중심부근에서는 영양분 및 산소공급의 부족 등으로 미생물생존이 불가능한 영역도 생겨날 수 있다[3]. 또한 미생물을 담체에 고정화시켜 배양하는 경우에는 자유용액에서와 다른 주변환경에 따라 미생물의 형태나 특성이 변화될 수도 있다. 이와는 달리 이중 실관반응기는 미생물의 농도가 최대가 될 수 있다는 장점이 있으나[4] scale-up에 어려움이 있는 것으로 알려져 있다.

캡슐 고정화는 초기에 Lim[5, 6]에 의하여 2단계 캡슐 내 동물세포 고정화법이 개발되었다. 그 후 Wang 등[7]에 의하여 calcium chloride 현탁용액을 알지네이트 용액에 떨어뜨려 캡슐을 제조하는 1단계 캡슐제조법이 개발되었다. 최근 Cheong 등[8, 9]은 1단계 캡슐제조법을 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 고정화 배양하여 제반 특성을 고찰한 바 있었다. *S. cerevisiae*를 고정화하여 발효하는 과정에서 발생하는 이산화탄소로 인하여 캡슐은 파괴되었다. 그러나 캡슐막 제조시 고분자막에 계면활성제를 내포시켜 이산화탄소의 투과 속도를 1.7배 이상 증가시켜 발효 중 막의 파괴를 방지할 수 있었다. 또한 배지 내에 미량의 calcium chloride를 첨가하여 발효 중 막이 팽창하는 것을 방지할 수 있었고 그 결과 캡슐내부의 미생물 건조중량은 310 g/l에 달하였다. 기존의 bead를 이용한 효모고정화법에서는 bead 내부의 미생물은 bead 외부의 배지에 대한 격리효과를 전혀 기대할 수 없었지만 캡슐내부의 미생물은 캡슐외부의 배지에 대하여 격리효과가 완벽하였다. 에탄올 생산의 연속 공정에서 격리효과가 완벽하여 미생물이 배지에는 전혀 존재하지 않음에도 불구하고 고정화 bead를 이용한 경우와 에탄올 생산성이 거의 같았다.

*S. cerevisiae*에 의한 에탄올 생산은 혐기성 공정이었다. 그러나 많은 미생물이 호기성균주의 부류에 속하므로 호기성 균주의 일종인 *Corynebacterium glutamicum*을 선택하여 캡슐내부에 고정화하고 그 배양특성을 고찰하고자 하였다. 즉 본 연구에서는 크기가 *S. cerevisiae* 보다 작은 박테리아 균주를 선택하여 캡슐내부의 균주와 배지간의 격리정도 및 캡슐내부에서의 건조중량, 산소전달 증가를 위한 방안개발, 산소공급정도에 따른 생산성변화 등을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

Table 1. Compositions of growth and production media for the *Corynebacterium glutamicum*[11]

Composition	Production medium	Growth medium
D-glucose	100 g	45 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g	0.25 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	30 mg	10 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 g	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	40 g	5 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g	0.5 g
L-threonine	500 mg	
L-methionine	750 mg	
Biotin	200 µg	10 µl
Thiamine·HCl	200 µg	
Yeast extract	20 g	1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	15 mg	8 mg
CaCO ₃	50 g	50 g

2-1. 캡슐제조 및 미생물고정화

Calcium-alginate 캡슐제조에 사용된 재료는 sodium alginate(Yakuri, LOT 311304), CaCl₂(Duksan, LOT 712101), xanthan gum(Sigma, 40H0742), silicone oil (Shin-Etsu, KF-96) 및 surfactant이다.

캡슐의 제조방법은 먼저 0.6%(w/v) sodium alginate 용액을 준비하였다. 또한 용액 L당 13 g의 calcium chloride와 0.234 g xanthan gum을 녹이고 0.5 g의 surfactant를 첨가하여 만든 calcium chloride 용액도 준비하였다. Bead 제조에서와 반대로 sodium alginate 용액을 잘 회전시키고 여기에 calcium chloride 용액을 주사기로부터 drop으로 떨어 뜨려서 완전구형의 캡슐을 제조하였다[8, 9].

캡슐 내에 미생물을 고정화시키는 방법은 다음과 같다. 성장배지를 autoclave에 넣고 15분 동안 멸균후 laminar flow cabinet에서 30 ml의 성장배지에 *Corynebacterium glutamicum*(KCTC 3027)균주를 접종한다. Shaking incubator 내에서 30°C 140 rpm의 조건으로 약 24 시간 성장시킨후 배지용액 3 ml를 채취한 후 원심분리기(3,600 rpm)에서 *C. glutamicum*를 분리해낸다. 분리해낸 *C. glutamicum*를 50 ml의 calcium chloride 용액에 섞는다. *C. glutamicum*이 섞인 calcium chloride 용액을 사용하여 위에서 서술한 방법과 같이 고정화 캡슐을 제조한다. 성장배지에 고정화 캡슐을 넣어 *C. glutamicum*을 성장시킨후 생산배지에서 생산한다. 본 연구에서 사용된 성장배지 및 생산배지는 Table 1과 같다.

2-2. 분석법

캡슐 내의 균체 건조 중량 측정을 다음과 같이 하였다. 캡슐을 60개 제조하여 30개의 캡슐의 무게를 95℃의 항온 건조기에서 24시간 건조시켜 건조 무게를 측정하였다. 30개의 캡슐은 수일동안 배양한 후 95℃의 항온 건조기에서 24시간 건조시켜 건조 무게를 측정하여 그 차이를 미생물 건조 중량으로 취하였다.

Glucose 농도측정은 PGO enzyme(Sigma, No. 510-A)을 사용하여 측정하였다. Sample 용액을 700배로 희석하여 희석된 용액 0.5 ml과 combined enzyme-color reagent solution 5 ml을 함께 시험관에 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨후 UV-VIS spectro-photometer(Shimadzu 1201)로서 파장 450 nm에서 O.D.를 측정하여 검량곡선으로부터 글루코즈 농도를 환산하였다.

L-lysine 농도는 Chinard의 방법[10]을 이용하여 측정하였다. 6 M H_3PO_4 0.4 ml와 glacial acetic acid 0.6 ml를 섞어 혼합산을 제조하였다. 이 혼합산 1 ml에 대하여 ninhydrin 25 mg을 첨가하고 70℃까지 가열하여 reagent solution을 만들었다. Sampling tube 내에 분석 대상 용액 1.0 ml과 reagent solution 1.0 ml를 넣은 후, sample tube를 100℃의 일정한 온도를 유지하는 항온조 내에서 60분간 보관하였다. Sample tube를 항온조에서 끄집어 낸 후 1.0 ml glacial acetic acid를 첨가한 다음 상온에서 냉각시켰다. 혼합물의 흡광도는 UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu 1201)를 사용하여 파장 440 nm에서 O.D.를 측정하여 검량곡선으로부터 L-lysine 농도를 환산하였다.

캡슐막 표면의 공극크기를 측정하기 위해서 SEM(scanning electron microscope) 사진 촬영을 하였다. SEM 사진 촬영을 하기 위해서는 캡슐표면에 금속도금을 하여야 한다. 이를 위하여 캡슐을 건조시켜야 하는데 건조하는 과정에서 캡슐은 찌그러들게 된다. 따라서 surfactant가 포함되지 않은 캡슐에 *C. glutamicum* 균주를 고정화시키고 약 20시간정도 배양을 하면 균주에 의하여 발생된 가스로 인하여 캡슐의 외부직경이 2.2 mm에서 약 3 mm 정도로 팽창을 하게 되며 캡슐내부는 미생물을 제외한 거의 대부분이 가스로 채워진다. 이 상태에서 100℃의 오븐에서 24시간 건조를 시키면 캡슐은 원형을 유지하였으며 이 때 캡슐의 표면에 금속도금을 하고 SEM 촬영을 하여 캡슐의 공극을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 배지 내에서 고정화 캡슐의 용해성 방지

*C. glutamicum*을 2장 재료 및 방법에서 제안된 바

Table 2. Effect of $CaCl_2$ concentration on the growth and production rates on L-lysine production

CaCl ₂ (g/l)	L-lysine(g/L·hr)			Dry weight (g/capsule·day)	
Fermentation					
	time	1 day	2 day	3 day	
0		0.100	0.028	0.006	0.00058
5		0.067	0.011	0.005	0.00058
10		0.046	0.014	0.002	0.00024
15		0.046	0.021	0.005	0.00024
20		0.113	0.016	0.005	0.00008
25		0.046	0.014	0.005	0.00008

와같이 calcium alginate 캡슐에 고정화시켜 121℃에서 멸균된 pH 7인 50 ml complex 배지[12]에 30개의 고정화캡슐을 투입하여 캡슐 내의 균주를 30℃에서 성장시키면 약 70분이 경과할 때 캡슐은 형태를 알아볼 수 없을 정도로 모두 녹았으며 defined 배지[12]에서도 동일한 상황이 일어나고 생산배지와 성장배지[11]에서는 막이 팽창하며 강도가 약해졌다.

배지 내에서 캡슐이 용해하는 것은 Table 1의 배지 조성에 나타나 있는 바와 같이 배지 내에 존재하는 K_2HPO_4 와 KH_2PO_4 의 두성분 때문으로 사료된다. 두 성분의 HPO_4^{2-} 와 $H_2PO_4^{-}$ 는 배지용액의 pH를 약 6.8로 유지하는 완충성분 역할을 하게 되고 일부 미량은 미생물의 먹이로 사용이 된다. 그러나 이 phosphate 이온은 calcium alginate 막속의 칼슘이온과 강력하게 결합을 하게 되므로 막은 단시간 내에 용해된다. 용액 중에 칼슘이온을 충분히 공급하여 막 내에서 이온결합을 하고 있는 칼슘이온에 phosphate 이온이 영향을 미치지 못하게 하였다. 즉 생산배지용액에 50 g/l의 $CaCO_3$ 과 5 g/l의 $CaCl_2$ 를 공급함으로써 막이 약간 팽창되기는 하지만 급속한 막의 용해는 방지할 수 있었고 10 g/l의 $CaCl_2$ 를 추가로 공급함으로써 막의 팽창도 방지할 수 있었다.

생산배지에 $CaCl_2$ 를 가함으로써 막의 용해성과 팽창성을 막을 수는 있었으나 $CaCl_2$ 가 고정화 균주의 성장과 생산성에 영향을 미칠 가능성이 있으므로 이에 대하여 검토하였다. 생산배지 50 ml에 30개의 고정화 캡슐을 투입하여 30℃, 140 rpm에서 플라스크 배양하면서 균주의 총진량과 L-lysine의 생산량을 검토하여 Table 2에 나타내었다. 이에 의하면 L-lysine의 생산량은 $CaCl_2$ 의 투여량에 큰 영향이 없으나 캡슐내부의 미생물 전체량은 $CaCl_2$ 의 투여량에 따라 감소됨을 알 수 있었다. 따라서 캡슐의 강도와 크기가 잘 유지되고 캡슐내부의 미생물 양이 비교적 많이 유지되는 농도인 10 g/l의 $CaCl_2$ 농



Fig. 1. SEM photograph of outer surface of capsule.

도를 사용하였다.

3-2. 캡슐 내 고정화 미생물의 격리효과

미생물의 크기가 3-5 μm 정도인 효모는 calcium alginate 캡슐 내에 고정화 되어 외부의 배지용액과 완전히 격리가 되었다[9]. 그러나 크기가 약 0.5-2 μm 정도인 박테리아는 캡슐 내에 완전히 격리되지 못하고 어느 정도 시간이 경과하면 배지용액으로 스며 나와 성장하였다. 이 원인을 분석하기 위하여 캡슐막의 표면을 SEM 사진 촬영을 하였다. SEM 사진 촬영을 하기 위해서는 수분이 없이 건조된 캡슐막 표면에 금속을 진공상태에서 coating하여야 한다. 그러나 surfactant가 포함된 캡슐은 고정화 균주를 배양하는 동안 발생된 가스가 막을 통하여 잘 빠져 나가므로 캡슐내부에 가스방울이 전혀 없고 100°C의 오븐에서 24시간 이상 건조시키면 캡슐이 쭉그러 들기 때문에 막 표면의 SEM 사진 촬영은 불가능하였다.

Surfactant가 포함되지 않은 캡슐에 균주를 고정화시키고 약 20시간 정도 배양을 하면 균주에 의하여 발생된 가스로 인하여 캡슐의 외부직경이 2.2 mm에서 약 3 mm 정도로 팽창을 하게 되며 캡슐내부는 미생물을 제외한 거의 대부분이 가스로 채워진다. 이 상태에서 100°C의 오븐에서 24시간 건조를 시킬 경우 캡슐의 형태가 거의 그대로 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. 이렇게 건조된 캡슐의 표면에 금속도금을 하고 SEM 촬영을 한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이에 의하면 막 표면의 공극의 직

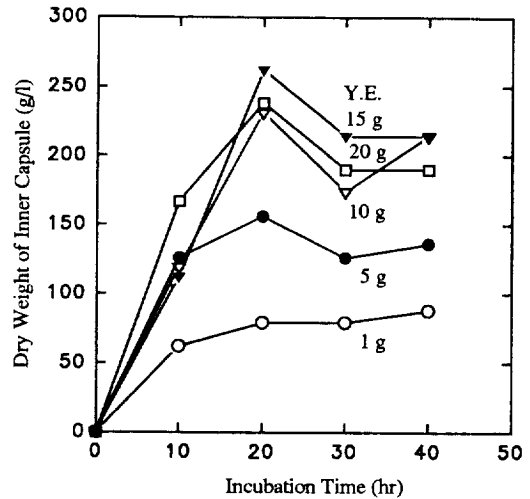


Fig. 2. The effect of yeast extract on the dried cell weight inside the capsule using encapsulated *C. glutamicum*.

경은 3-4 μm 를 넘지 않는 것으로 사료되었다. 따라서 효모의 경우는 격리효과가 100%에 달하지만 크기가 작은 박테리아의 경우 비록 캡슐막의 두께가 100 μm 에 달하고 막내부의 공극에 tortuosity가 존재하더라도 캡슐 밖의 배지용액으로 스며 나갈 가능성이 있음을 알 수 있었다.

3-3. Yeast extract의 농도에 따른 캡슐내부의 *C. glutamicum* 성장 및 L-lysine 생산

기존의 성장배지 내에는 yeast extract가 1 g/l 정도 밖에 들어 있지 않으므로 캡슐내부의 고정화 균주를 배양하기에는 yeast extract가 충분히 공급되어 있다고 보기 힘들다. 따라서 yeast extract의 농도를 높여가며 이의 농도변화에 따른 캡슐내부의 균주건조중량을 측정하였다. 즉 yeast extract의 농도를 1 g/l에서 20 g/l까지 높이면서 50 ml의 배지용액에 30개의 캡슐을 투입하고 30°C, 140 rpm의 조건에서 40시간동안 플라스크 배양한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 yeast extract의 농도가 15 g/l 이상이 되면 내부의 균주건조중량이 240 g/l 이상이 됨을 알 수 있었다. 또한 배양시간이 20시간이 될 때까지는 캡슐내부의 균주건조중량이 증가를 하다가 배양시간이 더 경과하게 되면 캡슐내부의 균주건조중량이 감소함을 알 수 있었다. 이 현상은 다음과 같이 해석이 가능하였다. 임의의 환경에서 캡슐 내에 고정화된 균주가 성장을 하게 되면 약 20시간까지는 그 조건하에서 계속 성장을 하여 최대의 균주밀도를 유지하게 된다. 그러나 Fig. 3에서 보

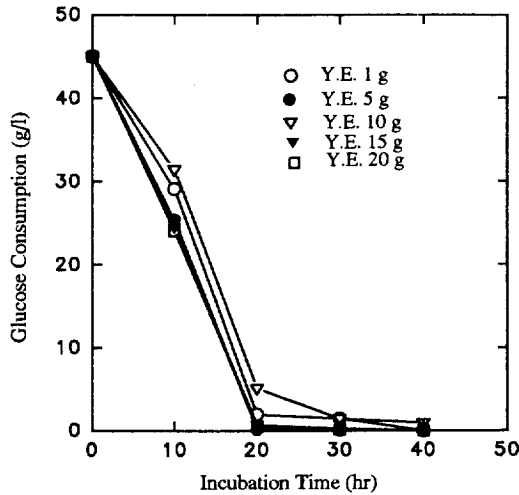


Fig. 3. The effect of yeast extract on glucose consumption using encapsulated *C. glutamicum*.

이는 바와 같이 20시간이 지나면 glucose의 농도가 거의 0이 되므로 캡슐 외부로부터의 영양분 공급 등의 균형이 깨어지게 된다.

따라서 캡슐속의 미생물이 막 벽을 뚫고 외부의 성장배지 용액속으로 스며나오거나 캡슐내부에서 미생물들의 lysis에 의해서 캡슐내부 건조중량이 감소할 가능성이 있다. 그러나 약 30시간이 지난 후부터는 캡슐내부의 균주건조중량이 일정하게 유지되었다. 배지 내의 yeast extract 농도가 증가하여 캡슐 벽을 통한 영양분의 공급속도가 증가되므로 캡슐내부의 균주건조중량은 증가하지만 캡슐의 크기나 표면적 등의 한계에 의하여 캡슐내부의 최대건조중량은 약 200-220 g/l에 달하는 것으로 나타났다.

성장배지 내의 yeast extract의 농도에 따른 L-lysine의 생산성을 살펴보았다. 성장배지 내의 yeast extract의 농도가 높아지면 캡슐내부의 균주건조중량은 yeast extract의 농도가 15 g/l이 될 때까지 증가를 하였다. 그러나 L-lysine의 생산은 Fig. 4에서 보이는 바와 같이 배지 용액 중의 yeast extract의 농도에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 균주의 성장은 Fig. 4에서 보이는 바와 같이 glucose의 농도가 거의 0이 될 때까지 즉, 약 20시간 동안 계속되지만 L-lysine의 생산은 약 10시간 동안 계속되었다. 따라서 glucose의 농도가 0이 될 때까지 초기의 10시간 동안은 성장과 생산이 동시에 일어나지만 후기의 10시간 동안은 균주의 성장만이 일어남을 알 수 있었다.

3-4. 캡슐 내 Hemoglobin의 첨가에 따른 *C. glutamicum* 성장

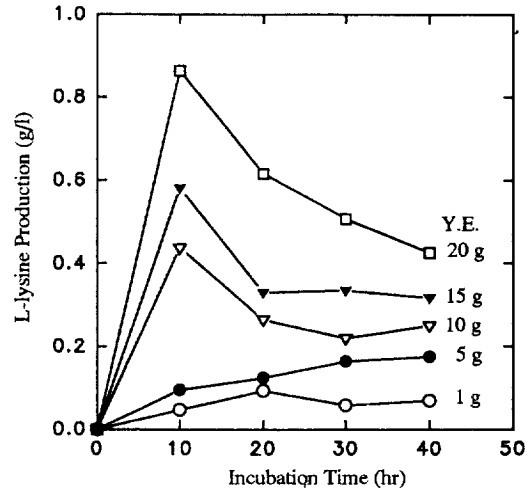


Fig. 4. The effect of yeast extract on L-lysine production using encapsulated *C. glutamicum*.

micum 성장

캡슐 내부에 균주를 고정화하여 배양하면 *S. cerevisiae*의 경우는 캡슐 내부의 균주건조중량이 310 g/l에 달하며 *C. glutamicum*은 200-220 g/l 정도가 되었다. *S. cerevisiae*의 경우는 facultative 균주이므로 캡슐에 고정화되어 일단 고농도로 배양이 되어 생산단계에 도달하게 되어도 산소의 공급에 큰 문제가 없으나 *C. glutamicum*과 같은 박테리아는 호기성 균주이므로 산소의 공급이 매우 중요한 문제가 된다. 따라서 본 연구에서는 캡슐내부에 산소 전달속도를 증가시키기 위하여 O_2 및 CO_2 의 수송에 적합한 hemoglobin을 캡슐 제조시에 첨가하여 이에 따른 *C. glutamicum*의 성장속도를 검토하였다.

Fig. 5는 캡슐속에 균주를 고정화한 후 yeast extract의 농도가 1 g/l인 성장배지에서 배양시킬 때 hemoglobin의 첨가에 따른 균주의 성장과 L-lysine의 생산성을 비교하여 나타난 것이다. 여기서 Hemo. 1은 캡슐제조시 $CaCl_2$ 용액에 hemoglobin을 0.05 g/l 첨가한 경우이고 Hemo. 2는 캡슐제조시 sodium alginate와 $CaCl_2$ 용액 양쪽 모두에 hemoglobin을 0.05 g/l 첨가하였으며 No Hemo.는 hemoglobin을 첨가하지 않은 경우이다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 yeast extract의 농도가 매우 낮은 경우는 hemoglobin의 첨가가 균주의 성장이나 생산성에 큰 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다.

따라서 배지 내의 yeast extract 농도를 10 g/l로 높여 hemoglobin 첨가효과를 측정하였다. Hemoglobin을 첨가하여 배양하면 Fig. 6에 나타난 바와 같이 균주건조중량은 약 40% 가량 감소를 하였고 L-lysine의 생산량은

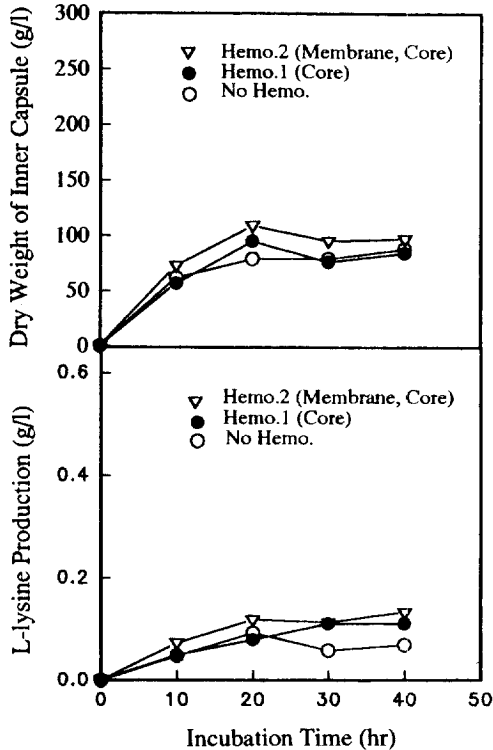


Fig. 5. The effect of hemoglobin on L-lysine production and dry weight cells inside the capsule using encapsulated *C. glutamicum*.

(Hemo. 1: 0.05 g/l hemoglobin in the core, Hemo. 2: 0.05 g/l hemoglobin in the core and membrane, Yeast extract: 1 g/l)

오히려 약 30% 가량 증가했음을 알 수 있었다. 이는 hemoglobins의 투여로 캡슐내부의 산소전달이 잘 일어나 glucose의 섭취량이 균주의 성장보다는 L-lysine의 생산에 대부분 사용되었음을 알 수가 있었다. 이를 균주의 증량에 대한 L-lysine의 생산비로 살펴보면 배양 시간이 약 35시간 경과되었을 경우 hemoglobin을 첨가하지 않은 경우는 0.11×10^{-2} g lysine/g cell이며 hemoglobin을 첨가한 경우는 0.25×10^{-2} g lysine/g cell이었다. 따라서 hemoglobin을 첨가함으로써 2.3배의 단위균주당 생산성을 증가시킬 수 있었다.

3-5. 캡슐내부에 첨가한 Hemoglobin 효과의 지속

캡슐 내부의 산소전달 효과를 높이기 위하여 캡슐내부에 hemoglobin을 0.05 g/l 첨가함으로써 단위 균주당의 생산성을 크게 증가시킬 수 있었다. 그러나 hemoglobin은 분자의 크기가 6.8 nm, 분자량은 64,500에 불과

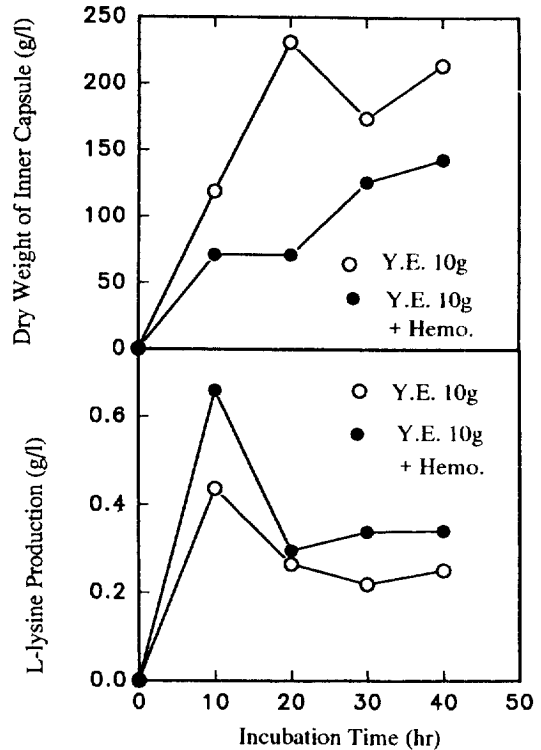


Fig. 6. The effect of encapsulated hemoglobin on the L-lysine production and dry weight of cells inside the capsule using the growth medium containing 10 g yeast extract per liter.

하고 SEM 사진 촬영결과 나타난 캡슐 표면의 공극 직경은 3-4 μm 이고 캡슐막의 두께는 100 μm 정도이다. 따라서 비록 캡슐내부벽의 calcium alginate는 좀 더 dense하고 막 내부 공극의 tortuosity가 크고 박테리아 만큼 자신의 의지로 움직일 수 있는 능력이 없다고 하더라도 hemoglobin이 캡슐벽면 밖으로 빠져 나갈 가능성이 있다.

또한 *C. glutamicum*은 auxotrophic 균주로서 hemoglobin의 globin 폴리펩티드 사슬에 포함되어 있는 574 개의 아미노산 잔기 중 일부를 먹이로 이용할 가능성이 있다. 그러므로 hemoglobin의 첨가효과가 얼마나 오랫동안 지속될 것인가를 조사할 필요성도 있으며 이에 대한 실험적 조사방법은 매우 힘들다고 하겠다. 왜냐 하면 캡슐내부에 고정화된 균주가 캡슐내부에서 어느 정도의 밀도이상 배양이 되면 캡슐밖으로 빠져 나가 배지용액 속에서 성장을 하게 된다. 이 경우 캡슐 외부에서의 균주량이 캡슐 내부의 균주량보다도 많게 된다면 상대적으로 산소가 충분한 배지 내의 균주에 의한

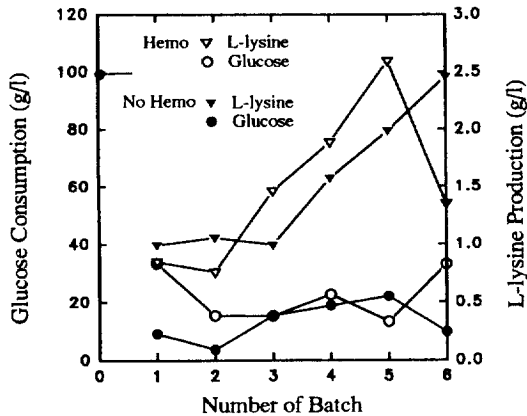


Fig. 7. The preservation of hemoglobin effect on L-lysine production and glucose consumption using encapsulated *C. glutamicum*.

L-lysine 생산이 지배적이 될 것이므로 캡슐 내부의 hemoglobin에 의한 산소 전달 효과에 대한 실험적 측정은 매우 힘들어진다. 따라서 각 batch의 생산배지 교환시에 배양기의 벽면을 철저히 청소하고 군주가 고정화된 캡슐 30개를 pH 7인 50 ml의 성장배지에서 24 시간 배양한 후 glucose 농도가 100 g/l인 생산배지 50 ml에서 24시간마다 배지를 교환하면서 생산한 경우에 대해 Fig. 7에 나타내었다. 결과로는 각 batch에서 glucose는 거의 다 소모가 되며 적어도 5 batch까지는 hemoglobin의 산소전달 효과가 유지되는 것으로 나타났다.

3-6. 유동성 회분식 반응기를 이용한 산소공급의 효과

고정화 캡슐을 사용하여 L-lysine을 생산하는 경우 산소 공급의 영향에 대한 검토로서 캡슐내부에 hemoglobin을 첨가하여 효과를 보았다. 따라서 본 실험에서는 플라스크 배양과 달리 배지에 공기를 직접 공급함으로써 배지 내의 용존산소 농도를 높여서 L-lysine을 생산해 보았다. 유동성 회분식 반응기의 직경은 5 cm, 높이 20 cm인 실린더형으로 하였고 공기는 420 ml/min의 속도로 glass wool과 필터를 이용하여 정화된 공기를 공급하였다.

Hemoglobin이 첨가된 고정화 캡슐 30개를 진탕배양기 30°C, 140 rpm의 조건으로 성장배지에서 24시간 배양한 후 생산배지에서 한 batch 당 24시간씩 조업하여 얻은 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 결과에 의하면 배지 용액에 직접 공기를 공급할 경우의 L-lysine의 생산은 약 150-200%의 증가를 얻을 수 있으며 최고 3.8 g/l

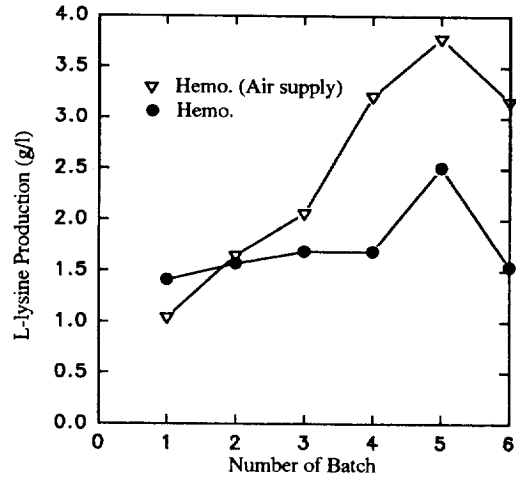


Fig. 8. The effect of air supply in the production medium on the rate of L-lysine production using encapsulated *C. glutamicum*.

농도의 L-lysine을 생산할 수 있었다.

4. 결 론

Surfactant가 포함된 calcium alginate 캡슐 내에 *C. glutamicum*을 고정화하여 성장배지에서 배양하는 경우 캡슐이 용해되었으며, 배지용액 liter당 50 g의 CaCO_3 와 10 g의 CaCl_2 를 첨가함으로써 캡슐막의 용해를 방지할 수 있었다. 캡슐 내의 *C. glutamicum*의 경우는 배지 내로 새어나왔으나, 배지 내의 yeast extract 농도를 10 g/l 이상으로 높임으로써 캡슐내부 건조중량을 220 g/l 이상으로 유지할 수 있었다. 캡슐내부의 산소전달 속도를 증가시키기 위해서 캡슐제조시 hemoglobin을 0.05 g/l 첨가한 경우 L-lysine의 생산성은 약 30% 증가하고 캡슐내부의 건조중량은 약 40% 감소하였다. 따라서 hemoglobin을 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우보다 단위균주당 생산성이 2.3배 증가하였다. 이 hemoglobin 효과는 고정화 캡슐을 24시간 조업단위로 5회 반복 사용할 때까지 유지되었다. Hemoglobin이 첨가된 고정화 캡슐을 이용하여 플라스크 배양으로 L-lysine을 생산하면 생산수율은 0.0192 g lysine/g glucose이고 100 ml의 배양액에 420 ml/min의 속도로 공기를 공급할 경우 생산수율은 0.0343 g lysine/g glucose로서 공기를 공급함으로써 1.8배의 생산수를 증가가 있었다.

감 사

본 연구를 위하여 연구비를 지원해준 생물공정연구

센터에 감사드립니다.

참고문헌

1. Black, G. M., Webb, C., Matthews, T. M. and Atkinson, B.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 134(1984).
2. Kim, J. H., Oh, D. K., Park, S. K., Park, Y. H. and Wallis, D. A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1838(1986).
3. Kurosawa, H., Nomura, N. and Tanaka, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 716(1989).
4. Ku, K., Kuo, M. J., Delente, J., Wildi, B. S. and Feder, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 79(1981).
5. Lim, F. and Sun, A. M.: *Science*, **210**, 908(1980).
6. Lim, F.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **10**, 81(1984).
7. Nigam, S. C., Tsao, I. F., Sakoda, A. and Wang, H. Y.: *Biotechnol. Techniques*, **2**, 271(1988).
8. Cheong, S. H., Park, J. K., Kim, B. S. and Chang, H. N.: *Biotechnol. Techniques*, **7**, 879(1993).
9. Cheong, S. H., Park, J. K. and Chang, H. N.: *HWA-HAK KONGHAK*, **31**(6), 788(1993).
10. Chinard, F. D.: *J. Biol. Chem.*, **199**, 91(1952).
11. Nasri, M., Dhouib, A., Zorguani, F., Kriaa, H. and Ellouz, R.: *Biotechnol. Letters*, **11**, 865(1989).
12. Kiss, R. D. and Stephanopoulos, G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 75(1992).