

최 중  
연구보고서

공장규모에서의 동물구충제의  
산업적 대량생산기술 개발에 관한 연구

(주)에스티알바이오텍  
강원대학교

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “공장규모에서의 동물구충제의 산업적 대량생산기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 7일

주관연구기관명 : (주)에스티알바이오텍

총괄연구책임자 : 이 상 종

세부연구책임자 : 나 정 결

연 구 원 : 이 봉 진

연 구 원 : 박 선 옥

연 구 원 : 이 창 진

연 구 원 : 전 주 미

위탁연구기관명 : 강원대학교

위탁연구책임자 : 전 계 택

위탁연구기관명 : 강원대학교

위탁연구책임자 : 정 연 호

# 요 약 문

## I. 제 목

공장 규모에서의 동물구충제의 산업적 대량생산기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구를 통해 공장 규모에서 생산하고자 하는 고효율성의 동물구충제인 에버멕틴은 *Streptomyces avermitilis*에 의해 생합성되는 macrocyclic lacton 계열의 동물구충제로서 주로 idiophase 단계(세포성장 cycle에서 볼 때 stationary phase)에서 생산되는 전형적인 미생물 이차 대사산물이다. 동시에 생합성되는 8개의 성분 중 가장 강력한 효능의 에버멕틴 B1a는 광범위한 구충활성을 가지고 있을 뿐만 아니라 기존의 구충제들과 cross-resistance를 갖고 있지 않으며 소량(0.0004 ~ 0.01%)만으로도 강력한 구충력을 나타내는 장점이 있다. *S. avermitilis*에 의한 에버멕틴 생산공정은 미생물이 갖는 독특한 morphology와 이차대사의 까다로운 생리학적 특성으로 인해 생물반응기의 설계 및 발효공정 최적화에 많은 어려움이 있으며, 특히 이차대사산물의 낮은 생산성으로 인해 경제성의 문제점이 제기되고 있다. *S. avermitilis*는 3차원적인 균사구조를 가지며 이에 기인하여 고농도 배양시 발효배양액에 심각한 점도 증가 현상이 발생한다. 고점도 배양액에서는 산소·영양분 공급능력의 한계에 따른 산소·영양분 고갈현상과 산소·영양분 고갈을 방지하기 위하여 무리하게 교반속도를 증가시킬 경우 이로 인해 발생하는 전단응력 때문에 실질적으로 균사형성 미생물의 고밀도 배양은 매우 어려운 실정이다.

에버멕틴의 생합성 과정에는 광범위한 효소반응이 관여하고 있는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 관점에서 볼 때, 돌연변이 유발원을 이용한 전통적인 돌연변이법은 주로 한정된 영역의 변이만을 유발시킬 가능성이 크므로 획기적인 생산성 증가를 보이기 힘들다는 단점이 존재한다. 따라서 본 연구에서는 기존의 고생산성 생산균주에 원형질융합을 통한 유전자 재조합을 유도하여 기존의 돌연변이법이 갖는 한계를 극복함과 동시에 대규모 발효조의 생산배양에서도 고생산성, 고안정성, 고재현성을 보이는 원형질체 융합 균주를 개발하고자 한다. 한편 기존의 에버멕틴 생산공정은 비자동 공정의 회분식 공정에 의존하고 있으므로 세포대사의 정확한 조절이 어려울 뿐만 아니라 생산성이 낮은 단점이 있다. 일반적으로 고생산성 균주 개발전략에 의해 개량된 균주를 사용하여 대규모 발효를 수행할 경우 균주 자체의 기능과 특성이 조금씩 때로는 크게 달라지므로 기질공급 전략이나 운전전략이 이에 따라 달라져야 한다. 즉 대규모 발효조에서의 에버멕틴의 생산성을 극대화하기 위해서는 효율적인 기질공급 전략은 물론 온도, pH, 통기조건, 교반속도 등의 배양조건을 최적으로 유지시키는 운전전략을 수립하여야 한다. 이를 수행하기 위해서는 수립된 전략들을 구현해 낼 수 있는 제어시스템 구축과 반응기 상태를 온라인으로 측정, 진단 및 자동 정밀 조절할 수 있는 최적제어이론에 근거한 발효공정자동화 시스템의 개발이 필수적이다. 즉 공정을 훌륭하게 나타낼 수 있는 배양모델의 수립과 미생물의 생리학적 변화에 대처할 수 있는 모델 업데이트 기법, 그리고 이를 기반으로 최적화를 수행하는 고급 제어알고리즘의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 에버멕틴 생산공정에 이러한 새로운 전문가 컴퓨터 제어시스템을 도입함으로써 배양환경의 진단 및 최적화를 통해 생산성을 극대화시키고 체계적으로 전체 공정을 감독하고 운전할 수 있는 혁신적인 생물공정을 개발하고자 한다. 최근의 연구동향에 따르면 생명공학 선진국의 경우 배양 scale-up 연구시 대형화된 화학공정에서 사용되고 있는 스케줄링 기법과 조직적인 공정설계법 및 공정통합법을 개선, 응용하려는 연구가 세계적인 제약회사들을 중심으로 활발히 진행되고 있으나

회사 기밀로 유지되고 있어 기술료를 주고도 이와 같은 기술을 입수하기 어려운 실정이어서 우리나라의 경우 기초기술 개발과 함께 대량생산 기술에 관심을 기울여야 할 것이다. 또한 기존의 turn-key 방식 수입공정으로는 채산성을 유지하기 힘들 것이므로 생물공정에 관한 핵심기술, 즉 고생산성 균주 개발, 생물공정의 독자적인 원천기술 개발, 공정 scale-up, 공정 통합 등에 관한 연구가 활발히 진행되어야 할 것이다. 그러므로 본 연구과제의 성공적 수행을 통해 에버멕틴 B1a의 대량 생산이 가능해 진다면, 고부가가치 동물구충제인 에버멕틴을 저가로 공급할 수 있어 세계시장에서의 경쟁력 우위를 확보할 수 있을 뿐만 아니라, 제시된 혁신적인 신공정의 개발로 인해 국내 생명공학 산업이 진일보할 수 있는 계기가 될 수 있을 것이다.

한편 방선균 *Streptomyces avermitilis*를 이용하여 동물 구충제 avermectin을 생산하는 공정을 산업화하기 위해서는 우수 세포주 선정 및 발효공정개발도 중요하지만 대량 분리 정제 공정의 개발도 중요하다. 그 이유는 발효공정에서 생산되는 산물은 여러 가지 미반응 기질, 부산물, 불용성 물질들이 포함되어 있어 불순물에 의한 부작용, 역가저하 등이 문제가 되기 때문에 효율적인 분리 정제 공정에 의해 일정한 함량 및 순도를 지닌 정제품을 개발해야 상품화될 수 있기 때문이다. 특히 avermectin의 경우 세포내에 생성물이 축적되는 intracellular product이기 때문에 훨씬 더 복잡한 분리공정이 요구되며 또한 관련 유도체가 8 가지나 되기 때문에 이중에서 약효가 우수한 B<sub>1a</sub>를 분리하는데 여러 단계의 정제단계가 요구된다. 따라서 avermectin 분리정제공정 설계 및 분리정제 공정의 최적화 여부가 상품의 경제성을 결정하게 되고 이에 따라 본 연구에서는 상업성이 있고 회사에게 수익을 가져오기 위한 효율적으로 설계된 분리정제 공정의 개발을 최종적인 목적으로 이를 위한 기초연구를 바탕으로 실용화 분리정제공정을 개발하고자 하였다.

특히 최근 산업 전분야에 청정공정으로의 전환이 세계적으로 요구되면서 2차대사산물의 분리정제 공정의 경우에도 친환경적인 침전법이나 막분리를 이용하는 공정이 선호되고 있기 때문에, 이러한 친환경적인 분리정제 방법의 가능성 타진이 필요하다. 또한 실제 상품생산을 위한 실용화된 상업적 scale의 분리정제 공정 개발을 위해서는 lab-scale의 기초연구로 개발된 공정을 바탕으로 pilot plant scale의 공정을 개발하고 실제 배양된 배양액을 적용하여 운전자료를 축적한 후 lab-scale 및 pilot-scale의 설계자료 및 운전자료들을 비교 분석하여 scale-up 전략 수립 및 설계인자 도출 등의 일련의 단계적 실용화 연구가 기본적으로 필요하다. 이를 위해 본 연구에서는 침전법 및 막분리를 중심으로한 에버멕틴의 분리정제의 가능성 타진뿐만 아니라 lab-scale의 분리정제 최적화를 바탕으로, pilot-scale에서의 에버멕틴 추출, 분리, 정제공정 개발 및 최적화, 공장규모에서의 통합 분리정제공정 설계, 개발 및 운전, scale-up 전략 수립, 경제적 타당성 평가 등을 추진하였다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구를 통해 개발될 생산균주가 실제로 산업용 에버멕틴 B1a 생산균주로 사용되기 위해서는 고생산성일 뿐만 아니라 고안정성, 고재현성의 특성이 확립되어야 하며 이러한 균주를 신속하고도 효율적으로 개발할 수 방법이 개발되어야 한다. 이를 위해 Scale down (miniature) 실험방법을 확립하여 avermectin B<sub>1a</sub> 생산 증가 변이주의 선별 및 분리를 신속하게 수행하였다. 또한 rational screening 방법을 적용하여 다양한 특성의 Avermectin B<sub>1a</sub>로의 방향성 생산 변이주의 유도를 시도했으며 revertant로의 back mutation을 방지하고자 하였다. 또한 기존의 고생산성 생산균주에 원형질융합을 통한 유전자 재조합을 유도하여 기존의 돌연변이법이 갖는 한계를 극복함과 동시에 대규모 발효조의 생산배양에서도 고생산성, 고안정성, 고재현성을 보이는 원형질체 융합 균주의 개발을 시도하였다. 다양한 방법을 적용하여 고생산성 원형질융합체, 즉 유전자 재조합체의 대량 선별 방법을 확립하여 고생산성 원형질융합체의 대량 선별 방법을 개발하고자 하였다. 또한 개발

된 고생산성 원형질 융합체의 유전적 안정성 조사를 통해 이들의 생산성을 지속적으로 안정하게 유지하는 균주개발 전략을 수립하였다. 특별히 고생산성 원형질 재조합균주들에 대해 플라스크 배양 중의 배양 생리학적 및 배양형태학적 특성 조사, 통계학적 방법을 적용한 생산배지 최적화 등 고생산성 생산균주의 배양 조건을 확립하는 연구를 수행하였다. 본 연구를 통해 궁극적으로는 기존의 돌연변이법이 갖는 균주개발의 한계를 극복함과 동시에 대규모 발효조의 생산배양에서도 고생산성, 고안정성, 고재현성을 보이는 원형질체 융합 균주의 개발을 시도하였다.

기존의 이차대사산물 생산공정의 경우 일반적으로 국내에서는 비자동화된 회분식 공정에 의존하고 있으므로 생산성이 일정 농도에 도달하면 더 이상의 세포대사의 정확한 조절 및 생산성 증가에 큰 어려움이 있다. 본 연구에서는 균주 개량을 통해 개발된 고생산성, 고안정성 생산균주의 대규모 발효조에서의 에버멕틴의 생산성을 극대화시키기 위해 발효조에서의 배양 생리학적 특성 및 배양 형태적 특성 조사, 물리화학적 배양 환경조건 (배지조성, 온도, pH, rpm, 통기량 등)이 에버멕틴 생산성에 미치는 영향을 구명하고자 하였다. 또한 최적의 DO profile을 시도하기 위한 정밀한 용존산소농도 제어 알고리즘의 개발 시도, 산소전달 특성 분석 및 효율적 산소 공급장치 설계 및 발효조 내에서의 진단응력 영향 평가 및 분석을 통해 최적의 배양 환경에 대한 조사를 시도하였다. 특별히 세포 농도 증가로 인한 점도 변화가 배양액에서의 산소물질전달계수에 미치는 영향의 집중 조사를 통해, 산소물질전달계수에 관한 배양 자료를 scale-up 공정 개발시 기본 자료로 사용하고자 하였다. 또한 배양의 재현성과 고생산성 균주의 생산 안정성을 공정상에서 구현하기 위해 생물배양 공정 자동제어시스템 구축과 반응기 상태를 온라인으로 측정, 진단 및 자동 정밀 조절할 수 있는 온라인 자동화 시스템을 구축하고자 하였다. 에버멕틴 B1a의 산업적 생산을 위해 필수적인 요소인 효율적인 전체공정 통합을 위해 전체공정 scheme 확정, 전체공정 전산모사 및 공정 자동화 기술 개발, 공정도 분석과 스케줄링 작업을 통한 공정설계 및 최적화, 공정 특성의 데이터-베이스화를 시도하였다. 이를 위해 효율적인 공정 운영을 위한 배양모델의 수립, 미생물의 생리학적 변화에 대처할 수 있는 모델 업데이트 기법을 통한 배양공정 모델링 기술 개발, 그리고 이를 기반으로 공정 최적화를 수행하는 고급 제어알고리즘에 대한 개발을 시도하였다. 궁극적으로는 이와 같이 개발된 배양공정 자동화 시스템을 이용하여 균주개발 전략을 통해 개발된 고생산성, 고안정성의 원형질 융합 균주가 대규모 발효기 배양에서도 그 배양 생리적 특성을 그대로 유지할 수 있는 방법에 대해서도 조사하였다.

한편 lab-scale의 기초연구를 바탕으로 pilot plant scale의 에버멕틴 분리정제 공정을 개발하기 위하여, lab-scale에서의 에버멕틴 추출, 분리, 정제 공정 개발 및 최적화를 시도하였다. 우선 최근 친환경적인 분리정제법인 침전법 및 막분리에 의한 에버멕틴의 정제법의 가능성을 조사하기 위하여 methanol과 NaCl을 이용한 침전법 및 한외여과를 이용한 막분리법을 시도하여 불순물의 제거 정도와 수율 등을 조사하였다. 또한 추출법을 중심으로 분리정제공정을 개발하기 위해 추출을 위한 최적 aqueous system과 최적 solvent system을 조사하였고, 이를 기반으로 용매와의 최적 접촉시간, partition coefficient와 selectivity의 관점에서 avermectin의 추출을 위한 최적의 용매 선정, aqueous phase와 solvent phase의 부피 변화에 따른 추출율의 변화조사를 통한 최적 용매부피비 선정 등 추출공정의 설계에 필요한 parameter들을 lab-scale의 최적화 실험을 통해 도출하였다. 또한 실제 최적 추출 조건을 배양액 모델 solution 및 실제배양액에 적용하여 추출성능을 확인하였다. 추출공정의 전 공정으로 생산균주의 회수를 위한 원심분리와 파쇄공정을 조사하였으며, 추출 후 공정인 crystallization 및 농축공정의 기초연구도 수행하였다.

Pilot scale의 분리정제 공정개발을 위해 새롭게 개발한 균주를 이용하여 50L fermentor에서 배양한 sample을 가지고 분리 정제를 수행하였다. Pilot 규모의 원심분리공정과 filter press를 중심으로 여과공정을 조사함으로써 최적 균체회수공정의 선정을 시도하였으며, 세포파쇄 공정으로 methanol 용매에 의한 세포파쇄를 검정하였다. 또한 Pilot 규모의 추출공정을 개발하기 위해 methylene chloride(용매): methanol-water aqueous phase를 최적 추출시스템으로 선정하였고, 용

매의 부피비 변화에 따른 추출율의 변화를 조사하였다. Rotary drum evaporator를 이용하여 avermectin의 농축을 수행하였고, avermectin의 결정화를 위하여 4°C의 교반조건에서 NaCl의 첨가에 따른 NaCl 공침법의 효율성을 조사하였다.

Pilot 규모의 분리정제 공정 시험 결과를 바탕으로, 3000 L 규모 배양 기준의 통합 분리정제 공정을 개발하였다. 이를 위해 우선 공정합성을 통하여 세포회수, methanol 파쇄, 세포조각 분리, 추출, 농축, 결정화, 여과, 건조, 분쇄에 이르는 통합 분리정제 공정의 PFD를 (process flow diagram) 개발하였고, 물질수지를 확립하고 이를 바탕으로 P&ID를 개발하였다. P&ID를 기반으로 통합분리정제 공정을 설치하고 운전함으로써 운전자료를 축적하였으며, lab-scale 및 pilot-scale의 설계자료 및 운전자료 분석, 설계식의 개발 및 설계인자 추정 및 도출 등을 통하여 scale-up 전략을 수립하였다. 한편 상업화 공정의 운전비 및 고정 투자비 예측 등의 분석을 통하여 경제적 타당성을 조사하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### (1) 연구개발 결과

*Streptomyces avermitilis*가 생산하는 이차대사산물인 8 종류의 avermectins (AVMs) 중 구충 효과가 가장 강력한 것으로 입증된 에버멕틴 B<sub>1a</sub> (AVM B<sub>1a</sub>)만을 대량으로 생산하는 방향성 균주 개발시, 초반부에 NTG나 UV에 의한 돌연변이 방법에 의해 우수한 균주를 선별할 수 있었으나, 이 균주개량 방법은 생산성이 일정량 이상이 되면 그 증가폭이 점차 감소하는 결과로 인해, 고생산성 균주의 경우 효율성 면에서 어느 정도 한계가 있는 것으로 나타났다. 따라서 개발된 고생산성 변이균주를 파트너로 이용하는 원형질 융합법에 의해 생산균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 획기적으로 향상시키고자 원형질체 융합체의 대량 선별시스템을 개발하여 고생산성, 고안정성의 융합 변이균주를 획득할 수 있었다. 특별히 표지인자가 없는 경우에도 원형질 융합체 선별이 용이한 방법 (즉 원형질체의 치사율이 99% 이상이 되도록 UV나 NTG를 처리한 후 융합을 시도하여 재생된 균주를 원형질 융합체로 간주하는 방법)을 도입한 결과, 대량선별 시스템으로 개발한 tube 배양시 고생산성의 모균주들에 비해 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 최고 3배 정도 향상된 균주들을 선별할 수 있었다. 한편 OMT (O-Methylthreonine)와 AZL (Azaleucine)에 동시저항성 (double resistant)을 갖는 double 저항성 균주들의 경우에도 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 큰 폭으로 향상됨을 관찰할 수 있었다. 특별히 NTG 방법에 의해 획득한 원형질 융합균주와 비교해 볼 때, UV 방법에 의해 획득한 원형질 융합균주의 AVM B<sub>1a</sub> 최대생산성이 모균주에 비해 더욱 큰 폭으로 향상되었으며, 안정적인 생산 패턴을 보여주었다. 그러나 고속 스크리닝 시스템으로 개발한 tube 배양시 고생산성 융합균주들의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성의 변동폭이 비교적 크게 나타나, tube 배양 중 용존산소의 결핍현상이 이와 같은 생산 불안정에 대한 원인중의 하나일 것으로 가정하고, tube 배양에 비해 용존산소 공급량이 훨씬 높은 플라스크 배양 (30ml배지/250ml플라스크)을 수행하였다. 그 결과 동일한 균주라도 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 tube 배양에 비해 3배까지 향상된, 거의 산업용 균주의 생산성을 갖는 균주를 획득할 수 있었다. 또한 본 연구에서는 고생산성 *S. avermitilis*에 의한 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성을 최대화시키기 위해, 최적 배양조건을 결정하기 위한 방법으로 반응표면분석법 (RSM)을 도입하였으며, 실험계획법으로는 중심합성계획법을 사용하여 중요한 배양인자인 생산배지 성분과 농도간의 상호영향을 조사하여 최적배지 성분을 결정할 수 있었으며, 이와 같이 개량된 배지 성분을 사용하였을 때, AVM B<sub>1a</sub>의 생산성이 더욱 향상된 것을 관찰할 수 있었다.

한편 *S. avermitilis*의 경우 고생산성 균주를 얻고도 back mutation되어 고생산성 균주를 잃어버리는 경우가 자주 발생하곤 하였다. 따라서 고생산성 균주를 개발하여 산업적으로 이용하기 위해서는 균주의 안정성이 가장 중요한 관건으로 나타나, 고생산성 융합균주의 생산

성 유지를 위해 균주의 보관과 배지조성, 그리고 포자형성 능력이 *S. avermitilis*의 이차대사 산물인 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성 및 생산균주의 안정성에 미치는 영향을 집중 조사하였다. 그 결과 고생산성 균주가 세대를 넘어 보관할 경우 포자형성이 육안으로도 확연히 알아볼 수 있을 정도로 잘 되지 않는 것을 확인할 수 있었는데, 이로부터 AVM B<sub>1a</sub>의 생산 안정성이 감소하는 이유가 고생산성 균주의 포자형성 능력이 떨어졌기 때문이라고 판단되었다. 다양한 배지 성분 에 대한 통계적인 분석 결과, 특별히 철(Fe)이 포자형성에 깊이 관여한다고 판단되어, AVM B<sub>1a</sub> 생산에도 영향을 줄 것이라는 가정 하에 Fe를 배지에 첨가하는 별도로 실험을 수행하였으며 또한 철에 대한 저항성을 지닌 고안정성 및 고생산성 원형질 융합균주를 균주 선별하였다. 그 결과 AVM B<sub>1a</sub>이 생산성이 18000 units/L 이상인 균주들이 상당량 선별되었음을 확인할 수 있었고, 특히 이들의 분포도가 매우 좁은 범위에서 존재하는 고무적인 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 포자 형성 및 AVM B<sub>1a</sub> 생합성과 같은 이차대사에 영향을 미치는 FeCl<sub>3</sub>에 의한 생산성 향상에 의한 것일 뿐만 아니라, 지속적이며 집중적인 screening의 결과라 할 수 있겠다. 본 실험에서 선별된 균주들 중에 생산성이 뚜렷하게 증가된 6개의 고생산성 균주들을 대상으로 4세대에 걸쳐 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성을 조사한 결과, 모든 고생산성 균주의 생산 안정성이 90% 이상으로 매우 안정한 것으로 나타났다. 이 중 5가지의 FeCl<sub>3</sub> 저항성 균주 균주들의 최대 AVM B<sub>1a</sub> 생산성은 모두 18000 units/L 이상으로 매우 높았고, specific production, specific production rate 모두 매우 높은 수준을 나타내었다. 또한 주목할 점은 4세대 동안 평균 94% 이상의 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성을 유지한다는 점이다. 본 연구를 통해 방선균인 *S. avermitilis* 균주의 낮은 유전적 안정성으로 인한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 감소 현상을 뚜렷하게 해결할 수 있는 방법을 개발하는 데 성공하였고, 본 균주들과 배양 조건을 바탕으로 AVM B<sub>1a</sub> 생산을 위한 scale-up 발효조 배양실험을 수행할 수 있었다.

또한 생산균주의 기본적인 배양 생리적 특성을 조사하여 AVM B<sub>1a</sub> 생산의 최적 조건을 발효기 배양을 통해 탐색한 결과, 배양 전반에 걸쳐 용존산소가 제한된 조건에는 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 극히 낮은 반면, 배양 자동화 시스템을 이용하여 용존산소를 30과 40%로 유지한 배양조건에서는 용존산소 제한 조건에 비해 최고 약 8배 정도 높은 생산성을 보였다. 또한 배양기 내로 순수산소를 공급한 결과, 배양 24 시간 이후부터 AVM B<sub>1a</sub>가 생합성되기 시작하였다. 이로부터 AVM B<sub>1a</sub> 생합성관련 유전자의 발현이나 생합성 효소의 활성화에 용존산소가 매우 중요한 요인으로 작용함을 알 수 있었다. 배양기 내로의 용존산소전달의 효율성을 조사하기 위해 기존에 사용하던 9-hole sparger와 자체 제작한 sintered steel sparger를 이용하여 교반기의 속도와 공기 공급량에 따른 산소전달계수 ( $k_La$ )를 측정·비교한 결과 sintered steel sparger가 9-hole sparger에 비해 약 두 배정도 높은 산소전달률을 보였으며 sintered steel sparger의 경우 낮은 교반기 속도에서도 높은 수준으로 용존산소유지를 유지할 수 있었다. 이는 산소전달능력이 높은 sparger의 사용으로 인해 교반기의 속도를 낮게 유지하여도 산소전달이 원활하였을 뿐만 아니라, 낮은 교반기의 속도로 인해 균사형성 미생물에 치명적인 전단응력이 뚜렷하게 감소되었기 때문으로 판단되었다. 또한 배양의 재현성과 고생산성 균주의 생산 안정성을 공정상에서 구현하기 위해 생물배양 공정 자동제어 시스템 구축과 발효조 상태를 온라인으로 측정, 예측 및 진단할 수 있는 온라인 자동화시스템을 구축함으로써 기존의 수동식 배양공정의 단점을 극복할 수 있었다. 특별히 온라인 가스 분석장치 시스템의 알고리즘 개발 및 온라인 설치로 인해 주요 배양 공정변수의 실시간 측정, 예측 및 정밀 제어가 가능해져, 용존산소의 경우 제어오차를 5% 이하로 달성할 수 있었으며, 조업변수의 경우에도 온라인 측정오차가 5% 이하로 유지됨을 확인할 수 있었다. 특히 scale-up factor로 가장 중요한 요소인 산소전달계수( $k_La$ )에 대한 온라인 측정방법이 개발되어서 정밀한 scale-up 공정개발이 가능해 졌다. 또한 AVM B<sub>1a</sub>의 산업적 생산을 위해 필수적 요소인 효율적인 전체 공정 scheme을 확정하였고, AVM B<sub>1a</sub> 생산공정 최적화를 수행하기 위한 제어 알고리즘 개발, modelling 작업 및 전산모사를 통해 효율적인 공정운영을 위한 배양 전략을 수립하였다. 이와 같

이 개발된 배양공정 자동화시스템을 이용하여 균주개발 전략을 통해 개발된 고생산성의 원질융합 균주에 대해 500리터 대규모 발효기에서 각 균주마다 2회에 걸쳐 반복 배양한 결과, 주목할 만한 계도 대부분의 균주들이 매우 안정적으로 AVM B<sub>1a</sub>를 고생산할 수 있는 배양생리적 특성 및 배양공정 특성을 보여주었다. 즉 컴퓨터 제어 배양공정 자동화시스템의 개발로 인해 돌연변이율이 매우 높은 고생산성의 균주를 대규모 발효조에서 배양할 지라도, 전체 공정의 조업 안정성, 지속성 및 생산 재현성이 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

최근에 주목받고 있는 친환경적인 분리정제법인 침전법의 도입 가능성을 조사하기 위하여 NaCl에 의한 공침법을 시도한 결과, 에버멕틴 B<sub>1a</sub>의 정제효과는 우수하나 35%의 낮은 회수율을 보여주어 에버멕틴의 초기농도가 아주 높지 않는 한 사용하기 어려움을 알 수 있었다. 또 다른 친환경 공정인 막분리에 의한 에버멕틴의 분리정제를 시도하였으나 이 경우에는 수율은 높지만 불순물이 거의 제거되지 않고 있음을 알 수 있어서 막분리나 침전법은 사용하기 어려운 공정임을 확인하였고, 이에 따라 추출법을 중심으로 분리정제공정의 개발을 시도하였다. 추출을 위한 최적 aqueous system과 최적 solvent system으로는 methanol/water(5:3)-dichloromethane (methylene chloride)과 acetone/water(5:3)-chloroform임을 알 수 있었다. 두 용매 추출시스템 모두 10분내에 평형을 이룸을 알 수 있었고, avermectin standard solution을 용매비 1:1로 추출한 결과 두 시스템 모두 99%이상의 높은 추출율을 얻을 수 있었다. Aqueous phase와 solvent phase의 부피 변화에 따른 추출율의 변화조사를 통해 용매의 상대적인 부피가 커질수록 추출율이 증가하였고, 이러한 경향은 acetone/water(5:3)-chloroform 추출시스템 보다는 methanol/water(5:3)-dichloromethane 추출시스템에서 더 심하게 나타났다. 또한 배양액 모델 solution을 용매비 1:1로 추출한 결과 avermectin이 고농도로 포함된 배양액 모델 solution은 avermectin standard solution을 추출할 경우와 같이 높은 추출율을 보였다. 하지만 실제배양액을 용매비 1:1로 추출한 결과, methanol/water(5:3)-methylene chloride의 경우에는 50%, acetone/water(5:3)-chloroform의 경우에는 35%로 추출율이 심하게 감소하였다. 이는 배지내의 성분으로 인해 두 상 사이에 dispersion band가 형성되고 많은 양의 에버멕틴이 중간 dispersion band층에 존재함으로써 추출율을 낮추기 때문이었다. 생산균주의 회수를 위한 원심분리공정의 설계 및 scale-up에 필요한 에버멕틴 생산균주의 settling velocity  $v_g$ 값은  $1.128 \times 10^{-3}$  cm/sec로 추정되었다. 세포파쇄는 methanol, acetone등의 유기용매를 이용하는 방법이 효율적임을 알 수 있었고, avermectin의 온도-용해도 곡선에서 기울기가 비교적 큰 acetone이나 methanol을 결정화를 위한 최적의 용매로 확인하였다.

한편 새롭게 개발한 균주를 이용하여 pilot scale의 분리정제 공정개발을 수행하였다. 새 균주에서는 에버멕틴이 intracellular product임을 확인하였다. Filter press를 중심으로 여과공정을 조사한 결과, flux와 고형물질 분리도의 측면에서 적정 membrane으로 DS 4 및 DS 5 membrane을 선정하였다. 또한 Pilot 규모의 추출공정을 개발하기 위해 methylene chloride(용매): methanol-water aqueous phase를 최적 추출시스템으로 선정하였고, 용매의 부피비 변화에 따른 추출율의 변화를 조사한 결과 lab scale의 결과와 마찬가지로 용매의 상대적인 부피가 커질수록 추출율이 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만 배양액을 이용하였기 때문에 1:1의 비율에서는 56%의 추출율 밖에 보여주지 않았고, 용매비가 3:1이 되어야 92%의 추출율을 확보할 수 있기 때문에 추출시 용매비율을 3:1으로 정하였다. Rotary evaporator를 이용하여 avermectin을 30g/L 까지 농축한 후 methanol로 용매교환하여, 4°C의 교반조건에서 NaCl 공침법에 의해 결정화를 수행하였다. NaCl의 첨가량이 많을수록 결정화 수율이 높아지나 결정내 avermectin B<sub>1a</sub>의 순도는 떨어짐을 알 수 있었다. NaCl 10% 첨가시 결정화율은 26.7 %이나, 결정내 avermectin B<sub>1a</sub>의 순도는 59%이었고 나머지는 avermectin B<sub>1b</sub> 이었으나 total avermectin의 순도는 99% 이상이었다.

또한 pilot 규모의 분리정제 공정 시험 결과를 바탕으로, 3000 L 규모 배양 기준의 통합 분리정제 공정을 위해 Pall sep.을 이용한 세포회수 공정, methanol 용매를 이용한 세포파쇄공정, Pall sep.을 이용한 세포조각 분리, methylene chloride에 의한 추출, evaporator를 이용한 농축, NaCl



공침법을 이용한 결정화, filter press에 의한 결정 여과, spray dryer에 의한 건조, mill을 이용한 분쇄공정 등 일련의 에버멕틴 분리정제 공정을 합성하였다. 이를 위해 우선 합성된 분리정제 공정의 PFD를 (process flow diagram) 개발하였고, pilot 시험결과를 기반으로 하여 물질수지를 확립하고 이를 바탕으로 P&ID를 개발하였다. 개발된 P&ID를 기반으로 통합분리정제 공정을 설치하고 운전함으로써 운전자료를 축적하였다. Pall sep.의 운전을 통해 세포 및 세포조각의 여과를 위한 최적의 TMP가 3bar임을 확인하였고, 시간에 따라 flux가 급감하였으며 이를 해결하기 위해 여과 온도를 증가시키는 전략을 개발하였다. 용매를 이용한 세포파쇄 공정에서는 10분정도의 접촉시간이면 *Streptomyces avermitilis* 세포가 파쇄되어 avermectin을 비롯한 세포내 물질을 유출시킴을 알 수 있었다. 추출공정에서는 용매 methylene chloride의 상대적 양에 따른 추출율의 변화를 조사한 결과 용매의 상대적 양이 증가할수록 추출율이 증가함을 알 수 있었고, 본 project에서 목표로 하는 수율을 만족하기 위해 용매의 부피비율을 3:1로 운전한 결과 예상보다 다소 낮은 88%의 추출율을 보였다. 추출기에서 용매와 수용액상을 7분에서 10분 정도 교반에 의해 접촉시키면 평형에 이르게 됨을 알 수 있었다. 농축과 결정화를 위해 evaporator에서 40g/L로 농축한 후에 4° C 조건에서 10% NaCl 공침법을 이용하여 결정화하고, 결정화 여액을 또다시 40g/L로 농축한 후에 결정화하는 작업을 반복하여 4차에 걸쳐 수행하였다. 농축과 결정화를 계속함에 따라 비록 추가로 얻어지는 crystal의 양은 줄어дна 계속적으로 crystal을 얻을 수 있음을 알 수 있었고 이에 따라 추출율은 계속 증가하여 4차에서의 수율은 91.3 %를 나타내었다. Crystallizer에서 형성된 결정을 filter press에서 결정을 회수한 후, spray dryer를 이용하여 건조하여 crystalline structure를 가진 avermectin의 결정을 얻었다. 건조 후 mill을 이용하여 powder 형태로 분쇄하였다. 한편 lab-scale 및 pilot-scale의 설계자료 및 운전자료 분석, 설계식의 개발 및 설계인자 추정 및 도출 등을 통하여 scale-up 전략을 수립하였다. 또한 상업화 공정의 운전비 및 고정 투자비 예측 등의 분석을 통하여 경제적 타당성도 분석하였다.

## (2) 활용에 대한 건의

본 연구개발결과의 활용계획을 개발된 세부 기술별로 요약하면 다음과 같다:

이차대사산물인 에버멕틴 B1a의 대규모 산업화 생산을 위해 본 연구를 통해 개발한 생산공정기술은 생물산업 관련 전 범위의 순수 및 응용기술을 모두 포함하고 있는 기술집약적 분야에 속한다. 즉 원형질체 융합기술을 이용한 고생산성 균주의 개발, 이를 이용한 생물반응기 설계·운전기술, 회수되는 목적산물의 친환경적인 고순도 분리정제 기술, 산업적 대량생산을 위한 배양공정 및 분리·정제공정의 scale-up 기술 및 자동화 기술까지도 포함되는 첨단 기술들이 서로 유기적으로 밀접하게 연관되어 있어, 본 연구를 통해 국내의 생물산업 관련 전반적인 기술 수준이 진일보할 수 있는 매우 중요한 계기가 될 수 있을 것이다.

한편 본 연구 결과 얻은 에버멕틴 B1a의 생산성과 생산 안정성, 생산 재현성 등은 본 연구진이 조사한 바에 따르면 (현재까지 발표된 연구논문에서 발표된 세계 각국의 에버멕틴 연구 그룹의 avermectin B1a 생산성과의 비교 결과임) 가장 훌륭한 것으로 확인되었다. 이러한 높은 생산성은 avermectin 사업화 추진에 가장 강력한 동기를 부여하고 있다. 또한 에버멕틴의 대량생산을 위한 대량 배양공정 기술과 대량 분리정제 공정기술의 중요한 scale-up 기반 기술 및 공정자동화 기술 등 주요 핵심기술이 거의 완성되어 있기 때문에 앞으로 10톤 이상에서의 배양 검증만 거친다면 산업화가 가능한 상태에 있다. 한편 이차대사산물 생합성의 특성에 대한 완벽한 이해 하에 통계적인 방법, 자동화 공정기술 및 다양한 공정의 기술융합으로 인해 에버멕틴 생산성 및 재현성에 있어서 선진국의 기술보다 진일보한 것으로 판단된다. 이러한 기술상의 진보는 특허가 만료되어 시장 쟁탈전이 벌어지고 있는 현 상황에서 추가 산업연구를 통해서 에버멕틴의 대규모 생산이 이루어질 경우 확실한 우위를 점할 수 있을 것으로 기대된다. 현재 에버멕틴에 대한 특허 보호기간이

만료되어 중국을 중심으로 한 개발도상국들이 선진국의 공장을 turn-key 방식으로 수입한 후, 저렴한 인건비를 무기로 시장에 진입하고 있으나 본 기술의 경우 선진국보다 진일보한 것으로 획기적인 생산단가 절감이 기대되므로 경쟁력 확보에는 문제가 없을 것으로 전망된다.

한편 본 과제를 통해 개발된 세포회수, methanol 파쇄, 세포조각 분리, 추출, 농축, 결정화, 여과, 건조, 분쇄에 이르는 에버맥틴의 분리정제 공정은 간단하면서도 전체 분리정제 수율이 높아 경제성이 우수한 분리정제 공정으로서, 에버맥틴의 대규모 생산이 실제로 이루어질 경우 분리정제 공정의 우위를 확보함으로써 에버맥틴의 가격 경쟁력을 향상시키는 데 활용될 수 있을 것이다. 또한 개발된 분리정제 공정은 에버맥틴 뿐만 아니라 추출을 필요로 하는 다른 미생물 유래의 이차대사 산물을 분리정제하는 데에도 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

## SUMMARY

Avermectins (AVMs) produced by *Streptomyces avermitilis* are secondary metabolites with high anthelmintic and insecticidal activities that were found to be considerably useful in agriculture and animal health. The AVMs are polyketides composed of eight closely related compounds, of which AVM B<sub>1a</sub> is the most important metabolite due to its high biological potency. To obtain high-yielding producers of AVM B<sub>1a</sub> in the initial stage of strain improvement program, we adopted traditional methodology such as mutagenesis of the producer microorganism using UV (ultraviolet light) and/or NTG (1-methyl-3-nitro-nitrosoguanidine). Since a precursor for AVM B<sub>1a</sub> biosynthesis is isoleucine and its biosynthetic pathway resembles that of fatty acid biosynthesis, an isoleucine-antimetabolite and an inhibitor of fatty acid biosynthesis were used to obtain various kinds of resistant mutants against these agents. The traditional mutation methods with the rational screening strategy were observed to be efficient for the rapid selection of AVM B<sub>1a</sub> high-yielding strains, but gradual decline in the productivity was observed when the production level reached a certain level with this mutation and selection method. In order to overcome such problems intrinsic in the traditional UV and/or NTG mutation methods and then to enhance AVM B<sub>1a</sub> productivity through protoplast fusion with high-producing strains as fusion partners, we established basic protocols necessary for protoplast fusion, and then obtained various kinds of protoplast fusants by adopting a massive strain-development procedure (a miniaturized strain screening system). An alternative fusion methods using UV and/or NTG mutation of the protoplasts were developed to screen genetic recombinants without specific selectable markers. In this method, the mutants obtained by protoplast fusion after UV and/or NTG treatment (leading to more than 99% death rate) of the respective fusion partner (respective protoplast) were regarded as DNA-recombined protoplast fusants. It was demonstrated that the protoplast recombinants obtained by UV mutation method were able to biosynthesize approximately 3 times higher level of AVM B<sub>1a</sub> in the stable manner, compared to that of the parallel high yielding mother strains. The results of the tube cultures used in the miniaturized strain-screening system, however, showed wide fluctuations in the AVM B<sub>1a</sub> production level, even when stable and high-producing strains were cultivated. From these results, it was assumed that lack of dissolved oxygen in the tube cultures might be one of the main factors for such unstable productivity. Accordingly, for the sufficient supply of dissolved oxygen, shaking flask cultures (30ml medium/250ml flask) for the high-yielding producers were performed. Notably enhanced production of AVM B<sub>1a</sub>, almost equal to the industrial level was obtained in the shaking flask fermentations, leading to approximately three times higher productivity compared to the corresponding tube cultures. Furthermore, for the maximized production of AVM B<sub>1a</sub> by the high-producing *S. avermitilis*, optimum culture conditions such as components and concentrations of the production medium were examined through application of statistical methodology such as a central composite design protocol of the response surface method (RSM).

In the process of strain-development program, it had been observed that very high-yielding mutants of *S. avermitilis* frequently returned to their parallel parent strains in terms of their

physiological characteristics, thus leading to decline in their AVM B<sub>1a</sub> productivity. These results implied that production stability of the high producers should be checked in order for the screened high-producers to be utilized in a scale-up bioprocess. For this purpose, we investigated the effects of long-term preservation methods, medium components and the producer's sporulation capability on AVM B<sub>1a</sub> production as well as biosynthetic stability of the high-yielding mutants. Notably, it was found in the screening process that the unstable and low-yielding mutants were not able to sporulate very well, implying that the sporulation capability of the mutants might be responsible for their reduced secondary metabolic activity for AVM B<sub>1a</sub> biosynthesis. Since trace metal element such as Fe was assumed to be closely involved in the sporulation metabolism of *Streptomyces*, we carefully investigated the effects of addition into the production medium of these metal compounds on the AVM B<sub>1a</sub> production and also tried to obtain stably high-yielding protoplast fusants resistant against toxic concentrations of FeCl<sub>3</sub>. Approximately 18000 units/L of AVM B<sub>1a</sub> production by the Fe-resistant fusants was observed and also these screened strains showed excellent sporulation capability with increased production stability as demonstrated in the narrow production range in the production-frequency histogram. Among the high-yielding protoplast fusants, 6 strains were intensively investigated in terms of their AVM B<sub>1a</sub> productivity and stability through cultivations for four generations. 5 strains out of the six were demonstrated not only highly productive in their specific production rate, but also very stable in their production capability, maintaining approximately 94% production level even after 4 generations. Through this screening strategy using protoplast recombinants, we were able to solve the intrinsic genetic instability phenomena frequently observed in the high-yielding mutants of *S. avermitilis*, and thus able to utilize these highly stable and productive strains for the mass production of AVM B<sub>1a</sub> in the scaled-up fermentors.

Fermentations were carried out under the various conditions using various-sized fermentor to investigate the AVM B<sub>1a</sub> productivity of the high-yielding mutants. It was found that AVM B<sub>1a</sub> production was very low in D.O.-limited conditions but greatly increased when D.O. was controlled around high levels using an on-line computer control system. According to increase in D.O. concentration, AVM B<sub>1a</sub> production was almost linearly increased, demonstrating that AVM B<sub>1a</sub> production is closely dependent on D.O. concentration, especially during the exponential phase of cell growth. In order to investigate oxygen transfer capability of a 9-hole sparger and a sintered steel sparger developed in our research group, oxygen transfer coefficient ( $k_{La}$ ) was measured according to agitation speeds and aeration rates.  $k_{La}$  of the sintered steel sparger was observed to be significantly higher than that of the 9-hole sparger. When fermentation was performed using the sintered steel sparger at an agitation speed of 250 rpm, maximum amount of AVM B<sub>1a</sub> was obtained. It was concluded that sufficient oxygen supply and reduction in shear stress due to low agitation speed were the major reasons for the remarkable enhancement in the production of AVM B<sub>1a</sub>.

On-line computer-controlled fermentation system was successfully developed in order to produce AVM B<sub>1a</sub> in scaled-up fermentors in a stable and reproducible manner. This on-line control and monitoring system enabled valuable fermentation parameters to be monitored and estimated on-line during the whole period of fermentation process. The algorithms for on-line calculation of oxygen uptake rate was developed to estimate the cell concentration of the producer microorganism during the fermentation. By dividing the oxygen uptake rate by the

total oxygen consumed, on-line estimation of specific growth rate of this culture was also possible. Use of gas analyzer system for vent oxygen analysis coupled with computer data acquisition has made this on-line information both very accurate (the error percent was within 5%) and readily available. It was possible to control dissolved oxygen level very accurately within 5% of the control value, so the effects of dissolved oxygen (DO) concentration and DO control modes on cell growth and AVM B<sub>1a</sub> production in the scaled-up fermentor could be investigated using the computer-controlled bioprocess system. Furthermore, by applying the algorithms, oxygen mass transfer coefficient ( $k_La$ ), the most important parameter for the scale-up of avermectin B<sub>1a</sub> fermentation process was accurately measured on-line during the whole fermentation period. Furthermore, for the optimization of AVM B<sub>1a</sub> fermentation bioprocess, efficient whole bioprocess scheme was established by applying the results from the modelling and simulation studies performed based on the actual AVM B<sub>1a</sub> fermentation data. Notably, when the computer-controlled fermentation system was utilized for mass production of in the 500 liter scaled-up fermentors by use of the high-yielding protoplast fusants (running of the fermentor 2 times for each strain), most of the strains were observed to produce significant amounts of AVM B<sub>1a</sub> in a very stable manner. In summary, it was confirmed that long-term, stable and reproducibe fermentation process was possible for the mass production of AVM B<sub>1a</sub> thanks to the development of the efficient computer-controlled fermentation system as well as high-yielding protoplast fusants.

The development of an optimum separation and purification process for avermectin is keenly required, because avermectin B<sub>1a</sub> should be separated from fermentation broth which contains 8 species of avermectin derivatives. The applicability of environmentally-friendly clean separation process applying precipitation or membrane was investigated. In case of precipitation method, the final purity of avermectin B<sub>1a</sub> was high enough, but low yield of 35% was obtained. On the other hand, almost no impurity was removed by applying UF membrane, while very high yield could be secured. Accordingly, the separation and purification process for avermectin was developed based on extraction process. The optimum aqueous phase and solvent phase for avermectin extraction was found to be methanol/water(5:3)-methylene chloride and acetone/water(5:3)-chloroform system. Both systems could reach to equilibrium within 10 minute, and showed more than 99% of extraction percentage when avermectin standard solution was extracted with 1:1 solvent to aqueous phase volume. It was observed that the percentage of extraction was increased with the volume ratio of solvent to aqueous phase. However, the percentage of extraction was reduced to 50% in case of methanol/water(5:3)-methylene chloride and to 35% in case of acetone/water(5:3) -chloroform system when actual avermectin fermentation broth was extracted with 1:1 solvent to aqueous phase volume. The reduction in the percentage of extraction was caused by the fact that some components in the broth helped forming a dispersion band between two phases and avermectin was trapped in the dispersion band. It was also found that avermectin producing cells could be easily disrupted by treating with solvent, and that methanol or acetone could be used as an optimum solvent for the crystallization.

Pilot scale investigation for developing an scaled-up separation and purification process was also performed using newly developed cell strain. It was confirmed that avermectin is intracellular product in the new cell strain. The optimum filter membrane was selected for filter press. Methanol/water(5:3)-methylene chloride extraction system was chosen as an

optimum pilot scale extraction system. It was observed that the percentage of extraction was also increased with the volume ratio of solvent to aqueous phase as same as lab-scale experiment. The volume ratio of solvent to aqueous phase should be at least 3:1 for guaranteeing 90% extraction yield. Avermectin was concentrated to 30g/L by using rotary evaporator, and crystallized at 4° C with NaCl addition. As the addition amount of NaCl increased, crystallization yield increased at the expense of decreasing avermectin B<sub>1a</sub> purity in crystal. When 10 % of NaCl was added, crystallization yield was 26.7%, while avermectin B<sub>1a</sub> purity was 59% and the remains was avermectin B<sub>1b</sub> in the crystal. However, the purity of total avermectin was over 99%.

An integrated separation and purification process for 3000L fermentation was developed based on the results of lab and pilot scale investigation. An integrated separation and purification process was synthesized by combining filtering for cell recovery, cell disruption by solvent, filtering for the removal of cell debris, extraction by methylene chloride, concentration by evaporator, crystallization with NaCl addition, crystal filtering by filter press, drying by spray dryer, and grinding by mill. A PFD and material balance was developed for the synthesized process based on the results of lab scale and pilot scale experiments. P&ID was developed and an integrated separation and purification process was installed according to the P&ID. The installed process was operated, and operation data were accumulated. It was confirmed that the optimum TMP(Trans-Membrane Pressure) of Pall separator for cell and cell debris filtering was 3 bar. The flux of filtrate was rapidly decreased with time and a strategy of increasing temperature was suggested for solving the flux diminution problem. Ten minutes of contact time was enough to release avermectin by solvent disruption. The percentage of extraction was also increased with the volume ratio of solvent to aqueous phase as same as pilot scale experiment. Eighty eight percentage(88%) of extraction was obtained with 3:1 solvent to aqueous phase volume. Extraction equilibrium was reached within 7 to 10 minutes. The repeated operation of concentration and crystallization were performed four times. Avermectin was concentrated to 40g/L by evaporator and crystallized at 4° C with NaCl addition. The remained supernatant was concentrated to 40g/L and crystallized again and again. As concentration and crystallization cycle proceeded, avermectin crystal was continuously formed even though the amount of crystal formed was decreased with cycle. The percentage of extraction was increased gradually to 91.3 % after four cycle of concentration and crystallization. A crystalline avermectine was produced after recovering crystals by filter press and drying. A dried crystal was ground by mill. In addition to that, a scale-up strategy was established through the analysis of design and operation data accumulated, the development of design equation, and the estimation of design parameters. The economic feasibility was also studied through the analysis of operating cost and capital investment of commercialized process.

# CONTENTS

	page
Chapter 1 Overview for the objectives and significances of the research -----	1
Chapter 2 Technical overview for research trends in domestic and foreign countries -----	7
Chapter 3 Research contents, scopes, methods, results and discussions -----	9
Section 1 Materials and methods -----	9
1. First research project -----	9
2. First-contract research project -----	17
3. Second research project and Second-contract research project -----	29
Section 2 Results and discussions -----	32
1. First research project -----	32
2. First-contract research project -----	81
3. Second research project and Second-contract research project -----	121
Chapter 4 Accomplishments and contributions to the related research fields -----	179
Section 1 Final goals of the research -----	179
1. Evaluation items, evaluation methods and research summary -----	180
Section 2 Annual research objectives and suggestions -----	181
Section 3 Contributions to the related research fields -----	184
Chapter 5 Comments on utilization of the research results -----	185
Chapter 6 Technical and scientific informations collected abroad during the research period -----	186
Chapter 7 References -----	187

# 목 차

	페이지
제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	7
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 -----	9
제 1 절 연구수행 방법 -----	9
1. 제 1 세부과제 -----	9
2. 제 1 세부위탁과제 -----	17
3. 제 2 세부과제 및 제2 세부위탁과제 -----	29
제 2 절 연구수행 내용 및 결과 -----	32
1. 제 1 세부과제 -----	32
2. 제 1 세부위탁과제 -----	81
3. 제 2 세부과제 및 제2 세부위탁과제 -----	121
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	179
제 1 절 연구개발 최종 목표 -----	179
1. 평가항목, 평가방법 및 연구결과 -----	180
제 2 절 연차별 연구개발 내용 및 건의 -----	181
제 3 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 -----	184
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획 -----	185
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보 -----	186
제 7 장 참고문헌 -----	187



# 제 1 장. 연구개발과제의 개요

## 1. 개발 대상기술(또는 제품)의 개요

- ▶ 본 연구과제에서 개발하고자 하는 에버멕틴은 토양미생물인 *Streptomyces avermitilis*에 의해 생합성되는 macrocyclic lacton 계열의 동물구충제로서 주로 idiophase 단계(세포성장 cycle에서 볼 때 stationary phase)에서 생산되는 전형적인 미생물 이차대사산물이다.

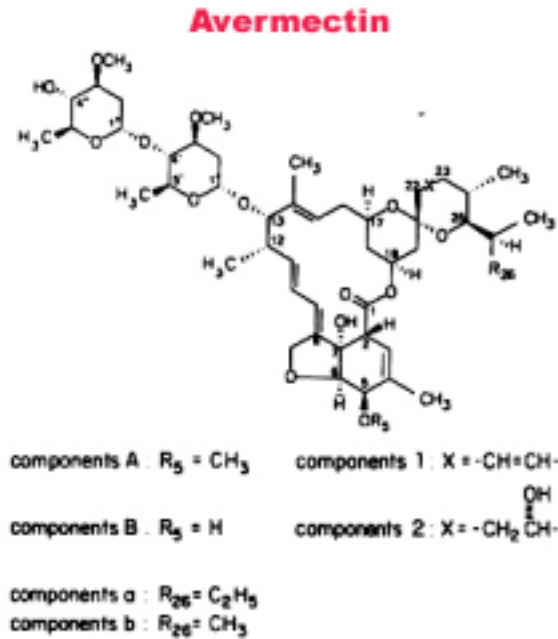


Fig. 1. Structure of avermectins

- ▶ 에버멕틴은 세가지 기능기의 종류에 따라 8개 화합물로 구성되어 있다. 즉 A<sub>1a</sub>, A<sub>2a</sub>, B<sub>1a</sub>, B<sub>2a</sub>의 4개 주성분과 A<sub>1b</sub>, A<sub>2b</sub>, B<sub>2b</sub>, B<sub>2b</sub>의 4개 부성분 등 8개 화합물의 혼합물로 생산되고 있다. 에버멕틴 생합성 관련 효소들의 낮은 specificity로 인해 각 성분들이 균체내에서 동시에 생산되며 이들의 생합성 비율은 미생물의 생리학적 상태에 의해 결정된다. 이중 B<sub>1a</sub>는 가장 강하고 광범위한 구충효과를 나타내고 있으며 별도로 abamectin으로 불려지고 있다. 특히 에버멕틴 B<sub>1a</sub>로부터 시장성이 큰 ivermectin이 유기화학적으로 합성되고 있다.
- ▶ 에버멕틴은 원래 사과나무와 같은 과수에 기생하는 진드기를 구제하기 위해 개발되었으나 읍과 같은 동물의 외부기생충증에 탁월한 효과를 발휘하였고 선충류를 비롯한 내부기생충에게 까지 효과가 있음이 밝혀져 1980년대 초반 처음 등장한 이래 한때는 miracle drug이라는 별명을 얻을 정도로 동물구충제 시장에 일대 혁신을 불러온 물질이다.
- ▶ 에버멕틴의 효과는 기생충들과 같은 분류군에 속하는 원형동물의 일종인 *Caenorhabditis elegans*를 대상으로 한 in vitro 구충실험을 통해서 입증되었으며 oxidobendazole보다는 약 500배, albendazole, febendazole, mebendazole보다는 1,000배, pyrvinium, flubendazole, thiabendazole보다는 5,000배, oxantel과 morantel보다는 무려 50,000배 더 높은 효능을 보여주

고 있다.

- ▶ 지난 십수년간 화학합성을 통해 동물구충제가 개발되어 왔으나 선택적인 구충활성만을 지니고 있어 기생충의 종류에 따라 서로 다른 화학구충제를 사용해야 하고 기존 구충제에 대한 저항성을 지닌 기생충 집단이 계속 새롭게 나타났기 때문에 그 적용 범위가 매우 제한적이었다. 이에 반해 에버멕틴은 광범위한 구충활성을 가지고 있을 뿐만 아니라 기존의 구충제들과 cross-resistance를 갖고 있지 않으며 소량(0.0004 ~ 0.01%)만으로도 강력한 구충력을 나타내는 장점이 있다.
- ▶ 에버멕틴의 세계시장 규모는 약 6,000억원 정도의 고부가가치 동물의약품이다. 에버멕틴에 대한 물질특허는 독일의 G. Alber-Schoberg에 의해 출원되었으며 미국의 Merck & Co.사와 Pfizer사가 독점적으로 판매하여 왔으나 1999년에 특허가 만료되어 현재는 여러 회사에서 시판하고 있다. 국내에서는 외국에서 생산된 원료를 수입하여 단순 가공을 거쳐 시판하는 정도로서 에버멕틴 원료 생산에 관한 연구가 거의 초보 단계에 머물러 있는 실정이다. 이에 따라 강원대의 전계택 교수 및 정연호 교수 연구진은 1995년부터 1998년까지 3년에 걸친 에버멕틴의 발효 공정 및 분리정제공정에 대한 lab-scale의 연구를 수행하였으며 그 이후에도 지속적으로 연구를 수행하여 경쟁력 있는 에버멕틴 생산에 관한 know-how를 다량 축적하고 있다.
- ▶ 그러나 lab-scale의 연구결과를 산업화하기 위해서는 최소한 5 톤 규모의 pilot-scale의 발효 공정 및 분리정제공정에 대한 연구가 필수적으로 이루어져야 한다. (주)에스티알바이오텍은 춘천시 생물산업벤처기업지원센터에 입주한 미생물 유래 이차대사산물의 생물의약품 원료 생산 전문업체로서 공정자동화 및 scale-up 기술에 대해 강점을 갖는 인력구조를 갖춘 생물산업 벤처기업이며 실제로 춘천시 생물산업벤처기업지원센터내에 설치된 pilot 규모의 발효기를 이용하여 다수의 시제품을 성공적으로 개발한 바 있다. 따라서 각자의 전문적인 know-how 및 기술을 갖추고 있는 (주)에스티알바이오텍과 강원대가 상호 협력하여 에버멕틴 생산에 관한 scale-up 연구가 성공적으로 이루어질 경우, 에버멕틴의 가격 경쟁력 있는 생산으로 인해 년 시장 6000억원 규모의 세계시장을 점유할 수 있을 것이다.

## 2. 에버멕틴 고생산성 균주 개발 및 pilot-scale에서의 에버멕틴 발효 공정 scale-up 연구 개발의 필요성

- ▶ 발효관련 산물의 산업적인 대량생산을 위해서는 고생산성 균주의 확보가 핵심적인 관건이다. 그 이유는 새로운 균주는 신규 물질특허로 이어지며 독점적인 물질생산을 법적으로 보장받게 되기 때문이다.
- ▶ 대부분의 이차대사산물은 미생물의 생장에 직접 요구되는 물질이 아니기 때문에 이차대사산물의 생산은 세포에 의해 적절하게 억제되고 있으며 산업적 생산을 위해서는 이차대사산물의 각 생합성 단계별 조절 기능의 결손 변이주, 즉 생산하고자 하는 이차대사산물을 과량 생산할 수 있는 변이주의 개발이 필수적이다.
- ▶ 또한, 에버멕틴은 전술한 바와 같이 8가지 혼합물 상태로 만들어지고 있으며 그 중에서도 B<sub>1a</sub> 화합물이 구충제로서의 효능이 가장 높기 때문에 전체 에버멕틴의 생산성 뿐만 아니라 B<sub>1a</sub>를 선별적으로 대량 생산할 수 있는 균주를 개발하는 것이 필요하다.
- ▶ 에버멕틴과 같은 이차대사산물의 생합성에는 광범위한 효소반응이 관여하고 있는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 관점에서 볼 때, 돌연변이 유발원을 이용한 전통적인 돌연변이법은 주로 한정된 영역의 변이만을 유발시킬 가능성이 크므로 획기적인 생산성 증가를 보이기 힘들다는 단점

이 존재한다.

- ▶ 현재 다양한 원핵생물과 진핵생물에서 유전자 재조합을 유도하여 기존의 돌연변이법이 갖는 한계를 극복하기 위해 원형질체 융합기술이 사용되고 있다. 특히 원형질체 융합기술은 방대한 유전자 분석이 이루어지지 않고 있는 방선균이나 곰팡이 같은 산업 미생물에서 그 사용이 증가하고 있는 추세이다. 원형질체 융합은 실제적으로 산업 균주의 생산성을 증가시키는 기술로 선진국에서는 널리 이용되고 있으며, 또한 최근에는 생합성 경로를 변화시켜 새로운 화학구조를 갖는 신물질 개발하는 목적으로도 이용되고 있다.
- ▶ 원형질체란 삼투압 안정제가 포함된 상태에서 lytic enzyme을 처리하여 세포벽을 제거한 세포를 말하며, polyethylene glycol (PEG)과 같은 융합 유도물질(fusogenic agent)이 존재할 때 원형질체 융합이 이루어지며 순간적인 hybrid나 diploid가 형성된다. Hybrid 단계 동안 유전자가 재배열하거나 유전적인 재조합이 발생하게 된다.
- ▶ *Bacillus*와 *Streptomyces*의 경우에는 재조합이 매우 높은 빈도로 일어나는 데, 그 주된 이유는 이들의 유전자가 세포질에 존재하기 때문이다. 그러나 진핵생물인 곰팡이의 경우, 원형질체 융합에서 반드시 핵융합이 수반되어야만 진정한 재조합체를 얻을 수 있기 때문에 어려움이 있다. 원형질체 융합기술에서 가장 중요한 단계는 원형질 융합체가 세포벽을 재생하고 colony를 형성하는 재생단계라 할 수 있다.
- ▶ PEG에 의해 유도된 원형질체 형성과 세포융합은 식물에서 최초로 발견되었으며, 그 후 animal, 균사형성 곰팡이, yeast, *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Streptosporangium* sp., *Staphylococcus* sp.에서도 성공하였다.
- ▶ 원형질체 융합은 유전적인 교환이 잘 일어나지 않는 미생물간의 유전자 재조합 빈도를 크게 향상시킨다. 융합은 같은 종간은 물론 다른 종간에서도 가능하며 심지어는 다른 속 사이에서도 이루어 질 수 있다. 또한 mating type이나 incompatibility factor, sex factor 등의 영향을 받지 않아 유전적 재조합 빈도를 증가시키는 장점을 가지고 있다.
- ▶ 원형질 융합체들은 전통적인 돌연변이 방법에 의해 얻은 아미노산 유사체에 대한 저항성 균주나 항생제 저항성 균주들의 한계를 동시에 극복하는 복합균주를 얻을 수 있다. 즉 아미노산 유사체 저항성 균주나 항생제 저항성 균주들은 이들 돌연변이주가 유도된 친주(mother strain)에 비해 생산성이 향상될 수 있으나 이러한 생산성 향상은 한계가 있으며 친주에 비해 성장속도가 느린 특징이 있다.
- ▶ 일반적으로 이들 저항성 균주들의 경우 아미노산 유사체나 항생제의 농도가 어느 수준 이상이 되면 더 이상의 생산성 향상이 어렵게 되거나 오히려 감소하는 경향이 있다. 따라서 단순 돌연변이주들이 갖고 있는 이러한 단점을 극복하기 위해 본 연구에서는 고생산성 변이주를 우선적으로 선별하고 이들의 원형질 융합에 의해 복합 저항성을 띤 균주를 얻고자 한다. 이들은 단순 변이주에 비해 유전함량의 증가로 유전적 안정성이 뚜렷하게 증가되어, 성장속도 및 에버맥틴 B<sub>1a</sub> 생산성 등과 같은 배양 생리학적 특성이 큰 폭으로 향상된 고생산성 균주들이 될 것으로 기대된다.
- ▶ Ferenczy 등은 nebramycin 혼합물을 생산하는 *S. tenebrarius*의 영양요구성 변이주의 원형질체 융합을 수행하였고, 그 결과 nebramycin 혼합물 중 1종의 물질만 생산하는 융합체를 얻었다. 또한 *S. kanamyceticus*의 영양요구성 변이주의 원형질체 융합을 수행한 결과, 융합 모세포에 비해 약 10배의 생산성이 증가한 원형질 융합체를 얻을 수 있었다. 다른 예로서, 원형질체 융합 방법으로 매우 빠르게 자라지만 cephalosporin 합성에 악영향을 끼치는 p-hydroxyphenicillin V를 낮은 수준으로 생산하는 *P. chrysogenum* 균주를 개발한 예도 있다.

- ▶ 본 연구팀은 예비실험으로 항생제에 저항성을 띠는 *S. avermitilis* 균주들의 avermectin B<sub>1a</sub> 생산성을 조사해 본 결과, 생산배지로의 접종량이 많을수록 생산성이 저하되는 현상을 확인할 수 있었다. 즉, 단위 시간당 성장속도( $\mu$ )가 빨라지면 생산균주는 영양분을 세포성장에 주로 이용하는 것으로 관찰되었다. 그러나 앞에서 언급한 예처럼 원형질체 융합기술을 이용한다면 세포성장과 이차대사산물 생산이 동시에 이루어지는 융합체를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.
- ▶ *S. avermitilis*에 의한 에버멕틴 생산공정은 미생물이 갖는 독특한 morphology와 이차대사의 까다로운 생리학적 특성으로 인해 생물반응기의 설계 및 발효공정 최적화에 많은 어려움이 있으며, 특히 이차대사산물의 낮은 생산성으로 인해 경제성의 문제점이 제기되고 있다.
- ▶ *S. avermitilis*는 3차원적인 균사구조를 가지며 이에 기인하여 고농도 배양시 발효배양액에 심각한 점도 증가 현상이 발생한다. 고점도 배양액에서는 산소·영양분 공급능력의 한계에 따른 산소·영양분 고갈현상과 산소·영양분 고갈을 방지하기 위하여 무리하게 교반속도를 증가시킬 경우 이로 인해 발생하는 전단응력 때문에 실질적으로 균사형성 미생물의 고밀도 배양은 매우 어려운 실정이다.
- ▶ 에버멕틴과 같이 미생물의 이차대사에 의해 얻어지는 이차대사산물은 일차대사산물과는 상이한 생합성 특성을 가지고 있다. 에버멕틴의 생산은 균체의 성장을 위해 필요한 물질이 아니며, 또한 이 물질의 생리학적 역할 역시 밝혀져 있지 않아 미생물 성장속도와 목적산물의 생합성 속도 사이의 관계를 규명하여 최적 조업조건을 결정하는 것은 어려운 일이다.
- ▶ 배양액 내에 미생물이 쉽게 이용할 수 있는 탄소원이 일정농도 이상 과량으로 존재할 경우 일차대사에 의한 세포성장은 매우 활발한 반면 에버멕틴 생산과 같은 이차대사는 심하게 저해받는 특성(catabolite repression)이 존재한다. 따라서 이러한 이차대사산물의 생산성 저해현상을 최소화하기 위한 기질공급 전략 개발이 필요하다. 즉 영양분의 상당부분이 이차대사로 이용되어 원하는 목적산물인 에버멕틴을 대량 생산할 수 있는 공정개발이 요구된다.
- ▶ 또한, 에버멕틴 생합성 경로에는 탄소원 뿐만 아니라 다른 영양분, 즉 질소원이나 Mg 이온과 같은 무기물도 중요한 영향을 미치기 때문에 배양액 내의 영양분 비율을 정밀하게 조절할 수 있는 고급 제어전략이 필요하다.
- ▶ 따라서 에버멕틴의 생산성을 극대화하기 위해서는 효율적인 기질공급 전략은 물론 온도, pH, 통기조건, 교반속도 등의 배양조건을 최적으로 유지시키는 운전전략을 수립하여야 한다. 또한 수립된 전략들을 구현해 낼 수 있는 제어시스템 구축과 반응기 상태를 온라인으로 측정, 진단할 수 있는 모니터링 시스템이 개발되어야 한다.
- ▶ 더구나 최근 이차대사산물 생산용 생촉매인 미생물자원의 대사생리학적 연구의 진행과 컴퓨터 및 관련 기기 산업의 급속한 성장에 힘입어 전통적인 수학적 제어보다 강건하고 빠른 인공지능형 제어기법을 이차대사산물 생산을 위한 생물공정 전반에 도입하려는 시도가 선진국을 중심으로 추진되고 있다. 에버멕틴 생산공정에도 이러한 새로운 전문가 컴퓨터 제어시스템을 도입함으로써 배양환경의 진단 및 최적화를 통해 생산성을 극대화시키고 체계적으로 전체 공정을 감독하고 운전할 수 있는 혁신적인 공정개발이 요구된다.
- ▶ 또한 기존의 에버멕틴 생산공정은 회분식 혹은 초보적인 유가식 공정에 의존하고 있으므로 세포대사의 정확한 조절이 어려울 뿐만 아니라 생산성이 낮은 단점이 있다. 따라서 기존공정보다 높은 생산성을 얻을 수 있도록 당사에서는 에버멕틴 생산공정에 최적 제어이론과 인공지능형 제어이론을 도입한 혁신적인 유가식 공정 개발을 통하여 세계시장에서의 경쟁력 확보를 추구하고자 한다.

- ▶ 균주 개발에 의해 개량된 균주를 사용하여 발효를 수행할 경우 균주 자체의 기능과 특성이 조금씩 때로는 크게 달라지므로 기질공급 전략이나 운전전략이 이에 따라 달라져야 한다. 이를 해결하기 위해서는 공정을 잘 나타낼 수 있는 모델의 수립과 미생물의 생리학적 변화에 대처할 수 있는 모델 업데이트 기법, 그리고 이를 기반으로 최적화를 수행하는 고급 제어알고리즘의 개발이 필요하다.
- ▶ 발효공정의 경우 일반적인 화학공정과 달리 산업적 대량생산을 위한 scale-up 연구에 많은 어려움이 존재하며 그 이유는 다음과 같다.
  - ① 생물공정 특유의 비선형성으로 인하여 공정에 영향을 미치는 물리학적, 화학적, 생물학적 변수들이 서로 연관되어 있어 공정을 정확하게 모사하기 힘들다.
  - ② 실험실이나 파일럿 규모에서 얻은 조업조건을 현장에 적용하기에 현실적이지 못한 경우가 많다.
  - ③ 발효조에서 나타나는 수력학적 특성에 대한 연구가 아직 초보적인 단계이고 대상 균주나 시스템에 따라 전혀 다른 거동을 나타내는 경우가 많다.
- ▶ Scale-up 연구와 함께 대형화된 화학공정에서 사용되고 있는 스케줄링 기법과 조직적인 공정 설계법 및 공정통합법을 개선, 응용하려는 연구가 세계적인 제약회사들을 중심으로 활발히 진행되고 있으나 회사 기밀로 유지되고 있어 기술료를 주고도 기술을 입수하기 어려운 실정이다.
- ▶ 따라서 우리나라의 경우 기초기술 개발과 함께 대량생산 기술에 관심을 기울여야 할 것이다. 또한 기존의 turn-key 방식 수입공정으로는 채산성을 유지하기 힘들 것이므로 생물공정에 관한 핵심기술, 즉 고생산성 균주 개발, 생물공정의 독자적인 원천기술 개발, 공정 scale-up, 공정 통합 등에 관한 연구가 활발히 진행되어야 할 것이다.
- ▶ 그러므로 본 연구과제의 성공적 수행을 통해 에버택틴의 대량생산이 가능해 진다면, 고부가가치 동물구충제인 에버택틴을 저가로 공급할 수 있어 세계시장에서의 경쟁력 우위를 확보할 수 있을 것이며 따라서 제시된 혁신적인 신공정의 개발이 절실히 요구된다.

### 3. 환경친화적 에버택틴 분리정제공정 기술 개발의 필요성

- ▶ 분리정제 분야의 기술발전 속도는 생물공정 전분야 중에서 가장 빠른 속도로 진행되어 왔다. 그 중에서도 특히 연속식 공정기술, 미생물발효 산물인 이차대사산물 분리정제기술, 에너지절약형 막분리 기술, 컴퓨터를 이용한 분리정제공정 자동화 기술 등을 개발하기 위하여 막대한 연구비를 투자하고 있다.
- ▶ 발효공정에서 생산되는 산물은 여러가지 미반응 기질과 부산물, 불용성 물질등이 포함되어 있어 이들을 그대로 사용할 경우, 특히 치료제인 경우 불순물에 의한 부작용, 역가 저하 등이 문제되어 일정한 함량 및 순도를 지닌 정제품으로의 분리정제가 필수적이다.
- ▶ 에버택틴은 미생물발효에 의해 생산되는 발효산물이다. 대부분의 발효산물은 생성물이 들어 있는 발효액 그 자체만으로는 상품화될 수 없고 반드시 분리정제 공정을 거쳐 순수한 형태로 정제된 후 소비자가 원하는 형태로 가공되어야 상품화될 수 있다.
- ▶ 에버택틴은 세포내에 생성물이 축적되는 세포내 산물 (intracellular product)이기 때문에 세포를 파쇄하여야 분리 정제가 가능하며 이로 인해 분리 공정이 훨씬 복잡하게 된다.
- ▶ 특히 에버택틴은 관련 유도체가  $A_{1a}$ ,  $A_{2a}$ ,  $A_{1b}$ ,  $A_{2b}$ ,  $B_{1a}$ ,  $B_{2a}$ ,  $B_{1b}$ ,  $B_{2b}$  등 8종류나 되고 이중 약효가 우수한  $B_{1a}$  및  $B_{1b}$ , 그 중에서도  $B_{1a}$ 만을 분리해 내는 여러 단계의 분리정제 공정이 요

구된다.

- ▶ 대부분의 생물산업 제품의 경우 배양액의 성분조성은 대단히 복잡함에도 불구하고 상대적으로 높은 순도가 요구된다. 또한 취급물질들이 대부분 열이나 화학적 변화에 민감하여 사용 가능한 단위공정도 제한을 받는 등 어려움이 존재하여 여러 단계의 분리정제 단위공정을 거쳐야 하며 이에 따라 분리정제 공정이 차지하고 있는 생산비용은 발효공정을 포함한 전체 공정의 절반 이상을 차지하게 된다. 또한 발효생물제품은 여러 단계의 분리정제 공정을 거치는 동안 손실되어 수율이 저하되기 때문에 분리공정의 최적화는 전체 공정의 경제성을 향상시킬 수 있는 절실한 과제이다.
- ▶ 따라서 상업성이 있고 회사에게 수익을 가져오기 위해서는 효과적이고 효율적이며 훌륭히 설계된 분리정제 공정의 개발이 필수적이며 이를 위한 기초연구 및 실용화 공정개발이 필요하다.
- ▶ 실용화된 분리정제 공정 개발을 위해서는 lab-scale의 기초연구를 바탕으로 bench-scale 및 pilot plant-scale의 공정을 개발하면서 scale-up에 따른 설계자료 및 운전자료를 비교 분석하여 scale-up 전략 수립 및 설계인자 도출 등의 일련의 단계적 실용화 연구가 기본적으로 필요하다.
- ▶ 따라서 최종목표인 실용화 공정개발을 위해서는 우수 세포주 개발, 발효공정, 분리정제 공정 등 각 기능상의 공정개발도 성공적으로 수행되어야 하지만 각 공정에서의 scale에 따른 단계적 연구도 유기적으로 연관되어 수행되어야 하므로 각 분리정제 단위공정 하나하나에 대한 기초적인 lab-scale의 연구를 바탕으로 이를 최적 조합한 bench-scale의 분리정제 공정의 개발이 pilot-scale의 분리정제 공정 개발 이전에 선행되어 수행되어야 한다.
- ▶ 강원대의 정연호 교수 연구팀에서는 1995년부터 1998년까지 3년에 걸친 에버멕틴의 분리정제에 관한 연구를 수행함으로써 세포 분리를 위한 원심분리 및 여과공정, 에버멕틴의 추출을 위한 세포파쇄 공정 및 1차 추출공정, 에버멕틴의 수율 및 순도 향상을 위한 2차 및 3차 추출공정, 효율적인 분리정제를 위한 향류 3단 연속식 추출공정, 추출공정의 대안으로서의 Preparative HPLC를 이용한 에버멕틴 분리정제 공정, B<sub>1a</sub> 및 B<sub>1b</sub>의 분리를 위한 Sephadex LH-20를 이용한 chromatography 공정, Crystallization 공정 등 에버멕틴의 분리정제 공정 개발을 위한 대부분의 기초적인 단위공정을 lab-scale로 개발한 바 있다.
- ▶ 하지만 실제 상품생산을 위한 실용화된 상업적 scale의 분리정제 공정 개발을 위해서는 이렇게 수행된 lab-scale의 기초연구로 개발된 공정을 바탕으로 pilot plant scale의 공정을 개발하고 실제 배양된 배양액을 적용하여 운전자료를 축적한 후 기초연구 자료, 그리고 bench-scale 및 pilot-scale의 설계자료 및 운전자료들을 비교 분석하여 scale-up 전략 수립 및 설계인자 도출 등의 일련의 단계적 실용화 연구가 기본적으로 필요하다.
- ▶ 한편 개발된 Preparative HPLC를 이용한 공정이나 크로마토그래피등을 이용한 공정등은 운전이 복잡하고 운전비용이 높아 비경제적이므로 될 수 있는 한 정제에 있어서도 추출공정을 이용하는 것이 바람직하다. 하지만 추출을 이용한 정제 공정에서도 톨루엔등의 비수용성 용매나 chlorinated solvent 등을 사용할 경우 운전상 위험을 초래할 뿐만 아니라 재회수하더라도 일부는 배출되어 심각한 환경문제를 일으키므로 이들의 사용은 최소로 하는 것이 바람직하다. 그러나 정연호 교수팀의 연구결과에 따르면 정제를 위한 최적의 추출용매는 acetone-water aqueous phase의 경우 chloroform, methanol-water aqueous phase의 경우 dichloromethane으로, 이들 선정된 두 용매인 chloroform 및 dichloro- methane은 모두 chlorinated solvent이므로 상용화에 있어서 취급상 또는 환경적으로 많은 문제점이 있다. 환경적으로 문제가 심각한 용매를 사용하는 경우 환경처리 비용도 무시 못할 만큼의 생산비용의 증가를 초래한다.

- ▶ 따라서 실용적인 에버멕틴의 분리정제 공정을 개발하기 위해서는 비수용성 용매나 기존의 연구에서 선정된 chloroform, dichloromethane 등의 chlorinated solvent를 사용하지 않는 새로운 환경친화적 청정 분리정제 공정의 개발이 요구된다. 또한 용매의 재사용이나 재순환을 촉진하기 위해 단일 용매만으로도 분리 및 정제가 가능한 분리정제 공정의 개발이 요구되므로 pilot-scale의 공정 개발에 앞서 이러한 새로운 분리정제 공정의 개발이 필요하다.
- ▶ 특히 최근 산업 전분야에 청정공정으로의 전환이 세계적으로 요구되면서 1997년 이후 미국과 일본을 중심으로 추출법이 아닌 수용성 용매를 이용한 침전법에 의한 정제법이 각광을 받게 되었다. 따라서 이러한 침전법에 의한 분리정제 방법의 기초연구 및 bench-scale, pilot-scale 공정으로의 개발이 절실히 요구된다.
- ▶ 이러한 침전법은 발효중 생산된 에버멕틴의 농도가 낮을 때에는 비효율적이나 농도가 높아질수록 효율이 높아진다. 한편 강원대의 전계택 교수 연구팀이 농특 연구 종료후에도 계속적인 균주 개발을 시도한 결과, 침전법이 효율적인 정도로까지 고생산성 균주를 확보한 상태이기 때문에 침전법을 중심으로 한 분리정제 공정의 개발이 요구되고 있다.
- ▶ 침전법에 의한 에버멕틴의 분리정제 공정을 위해서는 일차로 침전법에 의해 에버멕틴 유도체들을 추출물로부터 분리하고, 분리된 에버멕틴 유도체들로부터 에버멕틴 B<sub>1a</sub>을 또 다른 조건에서의 침전법을 이용하여 정제하는 공정을 개발하는 것이 바람직하다.

## 제 2 장. 국내외 기술개발 현황

- ▶ 에버멕틴과 같은 미생물 이차대사산물의 생산기술은 까다로울 뿐만 아니라, 생물산업의 경제성을 결정하는 가장 중요한 기술로 인식되어져 선진국에서 기술개발 노력이 매우 활발한 분야이다.
- ▶ 광범위 동물구충제인 에버멕틴은 다양한 임상실험을 통해 약효가 입증된 이래, 에버멕틴의 생합성 경로 등 기초이론에 대한 보고는 많이 이루어지고 있으나 고역가 균주 개발 및 발효공정 개발 등 생산기술에 대한 연구결과는 거의 발표되고 있지 않다. 일부 연구결과가 발표된 경우에도 이들은 실험실 수준의 정보만을 제한적으로 제공해 주고 있을 뿐, 생산 scale에서 생물공정 전반에 관한 연구는 회사를 중심으로 진행되어 그 결과가 know-how로서 외부에 전혀 알려지지 않고 있는 실정이다.
- ▶ 현재까지 에버멕틴 개발회사인 미국 Merck사의 기술개발 실적은 다음과 같다.
  - ① 전통적인 돌연변이법, 유전자재조합 방법 등을 통해 에버멕틴을 과량 생산할 수 있는 방선균 균주를 개발하였다.
  - ② 체계적인 배지 최적화 연구를 통해 세포 성장배지와 에버멕틴 생산배지를 개발하였다.
  - ③ Off-gas 분석을 통한 온라인 세포농도 측정법을 개발하였고 이를 통해 실시간으로 공정 상태를 감시할 수 있는 시스템을 구축하였다.
  - ④ 새로운 형태의 교반기를 개발하여 대형 발효조 운전시의 산소전달 문제를 상당부분 해결하였다.
  - ⑤ 위와 같은 공정개발과 함께 semi-synthetic derivatives를 통한 새로운 에버멕틴 계열의 약품을 개발하는 연구를 수행중인 것으로 알려져 있으나 자세한 사항은 알려지지 않고 있다.

- ▶ 에버맥틴은 1999년 특허 보호기간이 완료되어 현재 시장쟁탈전이 본격화된 상태이며 이에 대비해 세계시장을 공략하기 위해서는 경쟁국과의 가격 경쟁력 우위를 확보할 수 있는 효율적이고 새로운 독자적 원천기술의 에버맥틴 생산공정의 개발이 절실하게 요구된다.



## 제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 연구수행 방법

#### 1. 제 1 세부과제:

#### 에버멕틴 고생산성균주 개발 및 pilot-scale에서의 에버멕틴 발효공정 scale-up 연구

##### 가. 실험 균주 및 배양방법

본 연구에서는 균주개발을 통해 획득하였던 AVM B<sub>1a</sub> 고안정성 및 고생산성 변이주를 사용하였다. Solid stock은 *S. avermitilis*를 포자형성배지인 ISP 배지의 한천 사면배지에 접종한 후 28℃에서 7일간 배양한 후 균주를 4℃에 보관하여 필요시마다 사용하였다. 또한 20%의 glycerol이 포함된 liquid stock을 만들어 -80℃ 냉동고에 보관하였다. Seed culture는 성장 배지 30 ml을 250 ml 삼각 플라스크에 첨가하여 진탕배양기에서 28℃, 48시간동안 배양한 후 생산배지에 10%(v/v)로 접종하였다. 생산배지는 250ml 플라스크에 30ml을 첨가하고, 28℃, 230 rpm으로 7일간 배양하였다. 각 단계마다 오염여부를 확인하기 위하여 현미경을 통한 관찰을 수행하였다.

##### 나. 발효기 배양 실험

발효기에서의 배양은 산소전달이나 전단응력 등의 조건이 플라스크 배양과는 매우 다르므로 각 배지의 최적 조성비에도 차이가 있기 마련이나, 기본적으로는 플라스크 배양에서 얻은 결과를 토대로 다양한 배양 조건에서 발효기를 운영해야 한다.

28℃에서 7일간 배양한 사면배지에서 회수한 *S. avermitilis*의 포자를 100 ml의 성장배지가 포함된 500 ml 플라스크를 이용하여 seed culture를 수행하였다. 배양 조건은 28℃, 200 rpm으로 48시간 배양하였고, 생산배지가 첨가된 발효조로의 접종량은 10 % (v/v, 150ml)로 하였다. 발효조는 2.5L (1.5L의 조업부피)의 (주)한국발효기 제품을 사용하여 *S. avermitilis*의 배양 생리적인 특성을 조사하였다. 온도는 28℃를 유지하였고 발효 중 증발로 인한 배양액의 감소를 막기 위해서 humidifier를 공기 공급 라인에 설치하여, 공기 중의 수분 함량이 포화상태로 되게 하여 공급하였다.

##### 다. 유가식 배양 실험

배양 방법은 (2)의 방법으로 수행하였으며, 조업부피는 1.2 L로 시작하여 특정 시간 후에 일정 부피의 추가 영양분 용액을 Masterflex peristaltic pump를 이용하여 배양기내로 공급하였다.

##### 라. 전산제어 알고리즘 개발

###### 1) 전산제어 시스템

배양기로부터 나오는 전기적 신호는 A/D converter (AutoLab™, Lokas, Korea)를 통해 컴퓨터에 전송되었고 연산을 거친 제어신호는 D/A converter (AutoLab™, Lokas, Korea)를 통해 배양기에 전달되었다. pH, DO, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> 등 배양데이터들은 잡영에 의한 오차와 disturbance를 줄이

기 위해 software filter를 거친 후 다른 연산에 사용되었다. 각 데이터들의 미분값과 trend 등은 moving window를 통해 최근 30개 데이터를 구한 후 그 평균치로 계산하였다.

## 2) 용존산소농도 제어

고에너지를 필요로 하는 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성 증가를 위해서는 높은 교반속도 시 발생하는 전단 응력에 의한 악영향을 최소화시키면서, 용존산소 결핍 현상을 배양 중 적시에 해결해 주어야 한다. 이를 위해 교반속도와 통기량의 자동 조절에 의해 운영되는 용존산소 제어프로그램을 확립하였고, (주)Lokas의 AutoLabTM을 사용하여 배양기의 교반속도를 조절하였고 AALBORG Inc.사의 Mass flow controller를 통해 통기속도를 조절하였다. 우선 1차적인 제어로서 교반속도의 변화를 통하여 용존산소를 원하는 농도로 제어한 후, 미리 설정해 놓은 최대값에 도달하면 1차 제어가 그대로 유지되거나, 또는 2차 제어 (통기량 자동 조절)가 시작되도록 하였다. 또한 1차 제어와 2차 제어를 순차적으로 진행하지 않고 동시에 조절하는 경우, 즉 교반속도와 통기량을 동시에 증가시키는 조절방법도 병행하였다.

## 3) 배출가스 분석

배양기에서 나오는 배출가스 중 산소와 이산화탄소의 분압을 측정하기 위해 (주)Lokas의 GMATE 3000A 가스분석기를 사용하였다. 압력과 온도에 의한 영향을 보정하기 위해 발효조내로 유입되는 공기의 압력과 온도를 DELTA OHM SRL사의 passive pressure transmitter HD9409 T2와 temperature transmitter HD788 T5를 사용하여 측정하였다.

## 4) 유가식 배양

미생물의 성장속도가 둔화되면서 배지를 공급하기 시작하였다. feed rate profile은 모델에 기반하여 미리 계산하거나 대사상태에 따라 실시간으로 계산하였고 공급배지는 AutoLabTM을 통하여 컴퓨터에 연결된 Masterflex peristaltic pump를 통해 배양기내로 공급하였다.

## 마. 발효조 배양 및 배양공정자동화 시스템

5L의 발효조 (조업부피 3 L, 집종량 10% v/v)에서 배양하여 AVM B<sub>1a</sub> 생산량과 용존산소량, 균체량의 변화를 비교하였다. Sparger는 박테리아 배양시 주로 사용하는 9-hole sparger와 본 연구에서 개발된 sintered steel sparger를 사용하였고, 공기량은 1.0 vvm으로 일정하게 공급하였다. 그리고 교반기는 가장 일반적으로 사용하는 6-flat-blade disc-turbine impeller, 또는 본 연구 결과 개발된 paddle impeller를 사용하였으며, 교반속도는 150 rpm~350 rpm에서 수행하였다. 생산 배지는 RSM에 의해 개발된 최적생산배지 (탄소원인 soluble starch의 농도가 2.2배 증가된 생산 배지; 2.2X soluble starch 배지)를 사용하여 생산균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 향상시키고자 하였다.

배양공정 자동화를 위해 가스분석장치시스템 (gas-analyzer)를 이용하였다. 이를 위해 생산균주의 비성장속도 (specific growth rate) ( $\mu$ ) 등의 배양 중요 변수들 (즉 용존산소 (DO), 산소흡수율 (OUR), 이산화탄소발생율 (CER), 총산소흡수량 (SOUR), 총이산화탄소배출량(SCER), 산소전달계수 ( $k_{La}$ ), 세포농도 등)을 온라인 상에서 직접 측정할 수 있는 이론식을 확립하여 실제 배양 공정에 적용함으로써, 개발된 시스템의 정확도 및 효율성을 조사하였다. 배양공정 자동화시스템과 관련된 실험방법 및 이론식은 실험결과에서 상세하게 설명하였다.

## 바. 배양공정의 실시간 모니터링 및 조절을 위한 공정 자동화시스템 확립 및 실제 배양공정에의 적용

미생물 발효를 통한 이차대사산물의 생산에 있어서 가장 중요한 영향을 미치는 specific growth rate ( $\mu$ )의 실시간 측정 및 배양 공정으로의 적용은 생산성을 증가시키는데 매우 효과적인 방법으로 여겨지고 있다. 그러나 일반적인 방법을 통한 specific growth rate ( $\mu$ )의 실시간 측정이 거의 불가능하다. 왜냐하면 일정 배양 시점에서의 specific growth rate ( $\mu$ )의 측정을 위해서는 각 시점에서의 세포 농도가 필요한데, 균체 농도를 측정하는데 상당한 시간이 소요되기 때문이다. 또한 유가식 배양공정을 적용 시, 추가적인 배지를 첨가해주는 시점과, 컴퓨터 조절에 의해 자동으로 배지를 첨가해 주는 속도가 가장 중요한데, 이러한 시점과 속도를 결정해 주는 기준이 바로 specific growth rate ( $\mu$ )인 점을 고려한다면, 실시간으로 specific growth rate ( $\mu$ )를 측정할 수 있는 시스템을 구축하는 것이 가장 중요하다고 판단되었다. 기존의 방법에 의해 용존산소 농도 (DO)와 pH를 판단 기준으로 삼을 때, 두 종류 전극의 불안정성으로 인해 공정의 정확성을 확신할 수 없으며, 이 전극들을 이용해서는 온라인 상에서 specific growth rate ( $\mu$ )의 실시간 측정이 완전히 불가능하므로, 유가식 배양공정을 효율적으로 운전할 수 없는 커다란 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 가스분석장치 (gas-analyzer)를 이용해서 생산균주의 specific growth rate ( $\mu$ ) 등의 배양 중요 변수들 (즉 용존산소 (DO), 산소흡수율 (OUR), 이산화탄소발생율 (CER), 총산소흡수량 (SOUR), 총이산화탄소배출량 (SCER), 산소전달계수 ( $k_La$ ), 세포농도 등)을 온라인 상에서 직접 예측 및 측정할 수 있는 시스템 구축을 위한 이론식 확립 및 실제 배양 공정에서의 적용을 통해, 개발된 시스템의 정확도 및 효율성을 조사하고자 하였다.

#### 1) 발효조에서의 가스 물질수지식 확립

산소흡수율의 측정은 배양기 내부의 세포 상태를 추정하는데 매우 필수적인 요소이다. 일반적으로 산소흡수율 (OUR) 및 이산화탄소발생율 (CER)을 측정하는 가장 효과적인 방법은 발효기 내로 공급되어 생산균주에 의해 이용된 후 배출되는 가스 중 산소의 mole fraction을 조사하는 방법인 산소물질수지방법(oxygen-balance method)으로 알려져 있다. 대부분 이차대사산물의 생산에 있어서 배양 상태를 최적화하는 것은 매우 어려운 작업이지만, 온도, pH, 교반속도, 통기량, 세포성장속도, 산소전달속도와 같이 이차대사에 큰 영향을 미치는 데이터를 컴퓨터를 통해 실시간으로 수집하고 분석한 후, 생산균주의 생리적 조건에 만족되도록 배양 변수를 온라인 상에서 직접 조절함으로써 최적의 배양 상태로 발효조를 운전할 수 있다. 중요한 배양변수의 온라인 계측을 위해 가장 중요시 되는 OUR (oxygen uptake rate) 및 CER (carbon dioxide evolution rate) 값의 측정은 다음의 가스 물질수지식에 의해 구할 수 있었다:

$$OUR = OTR = N_A = \frac{7.32 \times 10^5}{V} \left( \frac{Q_i \cdot P_i \cdot Y_i}{T_i} - \frac{Q_o \cdot P_o \cdot Y_o}{T_o} \right) \quad (1)$$

$$CER = \frac{7.32 \times 10^5}{V} \left( \frac{Q_i \cdot P_i \cdot C_i}{T_i} - \frac{Q_o \cdot P_o \cdot C_o}{T_o} \right) \quad (2)$$

$N_A$  : oxygen transfer rate (OTR) (mmol/L/hr)

$Q_i=Q_o=Q$  : Volumetric air flow rate (L/min)

$P_i, P_o$  : total pressure of inlet and outlet air (atm)

$Y_i, Y_o$  : mole fraction of oxygen at inlet and outlet air

$T_i, T_o$  : Temperature at inlet and outlet (K)

$C_i, C_o$  : mole fraction of carbon dioxide at inlet and outlet air

$7.32 \times 10^5$  : conversion factor [ $PV=nRT$ ]

(60min/1hr) · [mole/22.4 liter (STP)] · [273K/1atm]

2) 온라인 상에서 OUR 값의 측정에 의한 발효기 내의 세포농도 추정식 확립

소규모의 발효기인 경우, 일정시간 이후에 시료를 채취하여 세포농도를 측정할 수 있지만, scale-up된 industrial plant의 경우 시료를 채취하기 어려운 점이 있다. 또한 세포농도를 측정하는데 상당한 시간이 소요되는 고정상배양과 같은 경우에는 배양 중 실시간으로 세포 농도를 추정하는 것이 거의 불가능하다. 따라서 이러한 경우 발효기 내에서 세포의 성장 정도를 실시간으로 추정하기 위하여 다음과 같은 이론식을 확립하였다.

가) 세포유지를 위한 산소흡수율 (maintenance term)을 무시하는 경우:

$$OUR = Y_{o/x} \frac{dx}{dt} = \frac{1}{Y_{x/o}} \frac{dx}{dt} \quad (3)$$

이식을 좌우 변을 이항하여 세포 성장속도를 다음과 같은 식으로 구할 수 있었다.

$$\frac{dx}{dt} = Y_{x/o}(OUR) \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \int_0^x dx &= Y_{x/o} \int_0^t (OUR) dt, \text{ at } t=0, x=0 \\ &\approx Y_{x/o} \sum_{t=0}^t (OUR) \Delta t \\ \dot{X}(t) &= Y_{x/o} \cdot SOUR(t) \end{aligned} \quad (5)$$

여기서

$\dot{X}(t)$  : calculated cell concentration by use of *OUR* (g/L)

$X$  : real cell concentration from experiment (g/L)

$Y_{x/o}$  : cell yield based on oxygen (g cell/mmol  $O_2$ )

한편

$$SOUR(t) = SOUR(t-1) + \frac{1}{2} [OUR(t-1) + OUR(t)] \Delta t \quad (6)$$

여기서

$OUR(t)$  : current oxygen uptake rate (mmol/L/hr)

$OUR(t-1)$  : last oxygen uptake rate (mmol/L/hr)

$SOUR(t)$  : total oxygen consumed until time,  $t$  (mmol/L)

$SOUR(t-1)$  : total oxygen consumed until time,  $t-1$  (mmol/L)

나) 세포유지를 위한 산소흡수율 (maintenance term)을 고려하는 경우:

균사형성 미생물인 *Streptomyces*는 세포의 증식과는 별도로 세포의 유지에 이용되는 산소의 양을 무시하지 않는다면 이 상당히 많기 때문에 상기의 *SOUR*을 이용한 세포 농도의 추정은 부정확할 가능성이 높다. 따라서 용존산소의 물질수지식에 세포의 유지 (maintenance)를 위한 산소

흡수율을 고려해야 하며, 이는 다음식과 같이 ( $m_s X$ )항을 추가함으로써 나타낼 수 있다.

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR = OTR - \left( \frac{\mu X}{Y_{x/O_2}} + m_s X \right) \quad (7)$$

가정상상태 (pseudo-steady state)라고 가정할 경우,  $\frac{dC_{O_2}}{dt} = 0$ 이므로 (7) 식의 좌우 변을 재조정하면,

$$\left( \frac{\mu}{Y_{x/O_2}} + m_s \right) X = OUR \quad (8)$$

을 얻는다. 이식의 양변을 세포 농도인  $X$ 로 나누면,

$$\left( \frac{\mu}{Y_{x/O_2}} + m_s \right) = \frac{OUR}{X} \quad (9)$$

가 되면, 여기서 비성장속도인  $\mu$ 는 정의에 의하여,  $\mu = \frac{dx}{dt} \frac{1}{X}$  이므로, (9) 식은 다음과 같이 표현할 수 있다.

$$\frac{dx}{dt} = Y_{x/O_2} (OUR - m_s X) \quad (10)$$

본 계산식에서 필요한 상수인  $Y_{x/O_2}$  과  $m_s$ 의 값은 측정 가능한 상수로서, 실제로 측정한 세포 농도  $X$ 와  $OUR$ 를 실제로 측정한 세포농도  $X$ 로 나누어 결정된 specific  $OUR$  ( $\frac{OUR}{X}$ )과 실제 측정된 비성장 속도 ( $\mu$ )에 대한 직선의 그래프를 작성하였다. Y축 좌표를  $q_{O_2}$ 로, X축 좌표를 비성장속도 ( $\mu$ )로 하여 직선의 그래프를 얻게 되면, 이 그래프의 기울기가  $Y_{O_2/x}$ 가 된다. 역수를 취하면  $\frac{1}{Y_{x/O_2}}$  (mmol  $O_2$ /g cell)이 되어 구하고자 하는  $Y_{x/O_2}$ 를 구할 수 있고, 얻은 직선의 Y 절편이  $m_s$ 가 됨을 알 수 있다. 따라서 발효기 내 세포의 농도를 시료를 직접 채취하지 않고도 온라인 컴퓨터에 의해 추정이 가능하고, 그 결과에 따라 적절히 배양조건을 변화시키는 것이 가능한 것으로 확인되었다.

### 3) 온라인 상에서 단위시간당 세포비성장속도 ( $\mu$ )의 추정식 확립

이차대사산물의 생합성은 생산균주의 단위시간당 세포성장속도 ( $\mu$ )와 제한기질의 특성에 의해 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 그러나 이차대사산물의 생산성과 생산균주의 성장속도와의 관계는 따로 일정한 법칙이 있는 것이 아니며, 생산균주의 유전적 배경과 배양조건에 의한 환경적인 변화에 의해 이차대사산물의 생합성 경향이 다르게 나타난다고 보고된 바 있다. 실제적인 실험에서의  $\mu$ 값의 측정은 다음의 과정에 의해 구할 수 있다: 시간에 따른 세포성장곡선을 그래프로 나타내었을 때, 특정 시간  $t_n$ 에서의 접선의 기울기 값이 시간에 따른 세포의 증가량이며, 이것을 그 때까지의 세포농도로 나누어주면 단위시간당 세포의 성장속도인  $\mu$ 값을 얻을 수 있다. 그러나 상기 식

들의 적용을 통해 이미  $OUR$  값과  $SOUR$  값을 측정할 수 있었으므로, 다음의 간단한 논리에 의해  $\mu$  값을 측정할 수 있었다. 즉 세포농도인  $X$  값은 식(5)에 의해  $Y_{x/o} \cdot SOUR(t)$ 이고,  $\frac{dx}{dt}$ 의 값은 식 (4)에 의해  $\frac{dx}{dt} = Y_{x/o}(OUR)$ 으로 계산이 되므로, 다음의 수식을 적용함으로써 단위시간당 세포성장속도 ( $\mu$ )를 추정할 수 있었다.

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{Y_{x/o} \cdot OUR(t)}{Y_{x/o} \cdot SOUR(t)} = \frac{OUR(t)}{SOUR(t)} \quad (11)$$

4) 기체산소의 물질수지식에 의해 온라인 상에서 산소전달계수 ( $k_La$ ) 추정식 확립

컴퓨터를 통해 실시간으로 수집한 산소흡수율 (OUR)을 이용하여 산소전달 계수를 측정하는 방법으로 다음의 수식을 세울 수 있었다:

$$k_La = \frac{OUR}{C_L^* \left(1 - \frac{D \cdot O_2}{100}\right)} \quad (12)$$

여기서 OUR은 식(1)으로 구할 수 있고  $C_L^*$ 는 Henry의 법칙에 따라  $C_L^* = \frac{P_{O_2, out}}{H_{O_2}(T)}$ 의 공식을 이용하여 계산된다. 산소분압인  $P_{O_2, out}$ 은 배지내의 수압과 대기압을 고려하여 측정이 되어야 하나, 실험실 수준의 2.5 liter나 5 liter의 발효기에서는 수압을 고려하지 않고 1기압으로 가정해도 별 무리가 없는 것으로 관찰되었다. 그리고 Henry의 상수인  $H_{O_2}(T)$ 는 일반적인 생물공정공학의 Textbook 또는 Handbook에서 찾을 수 있다. 그러나 큰 규모 발효기의 경우 배양액이 non-Newtonian fluid의 유변학적 특성을 가지므로 배양액의 교반이 균질하게 이루어진다고 가정할 수 없다. 또한 배지의 양이 증가하여 산소의 분압이 대기압보다 커지게 되므로, 이러한 경우 산소분압인  $P_{O_2, out}$ 은 용존산소가 유입되는 sparger와 발효기에서 빠져 나가는 용존산소의 로그평균값을 사용하는 것이 적절하다고 판단되어, 다음의 식을 적용할 수 있을 것으로 판단되었다:

$$P_{O_2, lm} = \frac{P_{O_2, sparger} - P_{O_2, out}}{\ln\left(\frac{P_{O_2, sparger}}{P_{O_2, out}}\right)} \quad (13)$$

$$P_{O_2, sparger} = P_{O_2, out} + P_L$$

$$P_L = \rho gh \text{ (hydrostatic pressure at the sparger)}$$

#### 사. Dynamic method를 이용한 산소전달계수 ( $k_La$ ) 측정

이차대사산물의 주된 생산균주인 *Streptomyces*와 같은 방선균배양의 경우, 방선균의 독특한 형태로 인해 균체가 증가함에 따라 배양액의 점도가 점차로 증가하게 된다. 그 결과 공급된 공기 방울로부터 배양액으로의 산소 전달능력이 급격히 감소하게 되어 발효기의 설계 및 공정최적화에 많은 어려움이 발생한다.

일반적으로 균사체 형성 미생물 배양과 같이 용존산소가 심각하게 고갈되는 산소제한 배양의 경우 배양 중에 균체량을 증가시키기 위해서는 산소전달계수( $k_La$ )를 증가시켜야 한다. 이를 위해 배양액 내로 효과적인 산소 공급이 이루어 질 수 있도록 생물반응기의 배양조건을 극대화시키거나, 발효조 내로 고압력의 공기 또는 순수한 산소를 공급하는 방법을 강구해야 한다. 특히 AVMM

B<sub>1a</sub> 합성과 같은 이차대사는 일반적으로 용존산소가 생산성에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되어 있으므로 이차대사산물을 고농도로 생산하기 위해서는 무엇보다도 먼저  $k_{La}$ 에 대한 정밀한 분석이 이루어져야 한다.

Dynamic method는 세포 배양액과 호기적 미생물이 존재하는 발효에서 특별한 장치 없이 간편하고 비교적 정확하게  $k_{La}$ 를 측정할 수 있는 방법으로 기체산소에서 용존산소의 산소전달률 (O.T.R = oxygen transfer rate)을 나타내는 부피산소전달계수 (volumetric oxygen transfer coefficient,  $k_{La}$ )와 미생물의 산소흡수율 (O.U.R = oxygen uptake rate)을 계산하는 방법이다. 이 계산된  $k_{La}$  값이 궁극적으로 발효조의 규모확대를 위한 기반 자료로 이용되며,  $k_{La}$  값의 측정을 위한 이론적 근거는 다음과 같다.

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_{La} (C_{AL}^* - C_{AL}) - q_{O_2} X \quad (14)$$

$C_{AL}^*$ ; 기체상과 평형을 이룬 용존산소농도 [g O<sub>2</sub>/l]

$C_{AL}$ ; 발효배양액 내의 용존산소농도 [g O<sub>2</sub>/l]

$q_{O_2}$ ; 세포당의 산소흡수율 [specific oxygen uptake rate, g O<sub>2</sub>/l cell/h]

$X$ ; 배양액 내의 세포농도 [g cell/l]

배양 도중 어느 한 시점에서 공기의 공급을 멈추면 상기 식의  $k_{La}$ 는 0이므로 배양액의 용존산소농도는 다음 식을 만족하면서 감소하게 된다.

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = q_{O_2} X \quad (15)$$

그러므로 t에 대한  $C_{AL}$ 선의 기울기를 측정함으로써 세포의 산소흡수율(O.U.R.)인  $q_{O_2}X$ 를 측정할 수 있다. 일정 시점이 지난 후 공기를 다시 발효조로 공급하면, 발효조 내의 용존산소는 (1)식의 물질수지 식을 만족하면서 증가할 것이다. 이 때 (2) 식을 다시 정리하여 직선관계식으로 재배열하면 다음과 같다.

$$C_{AL} = C_{AL}^* - \frac{1}{k_{La}} \left( \frac{dC_{AL}}{dt} + q_{O_2} X \right) \quad (16)$$

(16) 식으로부터  $\left( \frac{dC_{AL}}{dt} + q_{O_2} X \right)$ 에 대한  $C_{AL}$ 의 플롯은 기울기가  $-1/(k_{La})$ 이며 y축의 절편이  $C_{AL}^*$ 인 직선이므로 이로부터 기울기를 계산함으로써 산소전달 계수인  $k_{La}$ 가 측정된다.

여기서  $C_{AL} = C_{AL}^0$  (final steady dissolved-oxygen concentration)일 때,

$$q_{O_2} = k_{La} (C_{AL} - C_{AL}^0) \text{ 이므로}$$

(16) 식은

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_{La} (C_{AL}^0 - C_{AL}) \quad (17)$$

이 된다. (17)식을  $t_2$ 와  $t_1$  사이에서 적분하여 정리하면

$$\ln\left(\frac{C_{AL}^0 - C_{AL1}}{C_{AL}^0 - C_{AL2}}\right) = k_{La} (t_2 - t_1) \quad (18)$$

가 되므로 좌변을 y 좌표로 우변의  $(t_2 - t_1)$ 을 x 좌표로 교반속도나 공기유량, sparger와 impeller의 종류 등의 변화에 따른 CAL을 도시하여 그 기울기로부터 산소전달계수를 구할 수 있게 된다.

본 연구에서는 용존산소를 많이 요구하는 AVM B<sub>1a</sub> 생산에 있어 최적의 용존산소 공급 방법을 탐색하기 위해 dynamic method를 이용하여  $k_{La}$ 에 영향을 미치는 교반기의 속도와 공기 공급량의 관계에 대하여 연구하였다. 이를 위해 두 종류의 sparger (즉, 9-hole sparger와 sintered steel sparger)와 두 종류의 impeller (즉, 6-flat-blade disc turbine impeller와 paddle impeller)를 통하여 효과적인 산소전달 방법을 확립하고자 하였다. 산소전달계수의 측정을 위하여 초당 하나의 데이터를 컴퓨터를 이용하여 받아들이고 물질수지식에 의한 계산을 모두 컴퓨터 내에서 수행하였다. 모든 전기적 신호를 컴퓨터에서 읽을 수 있도록 컴퓨터 내부에 (주)LOKAS의 AutoLab LK-910를 설치하여 일정시간동안 전달되는 데이터를 저장한 후 분석하였다.

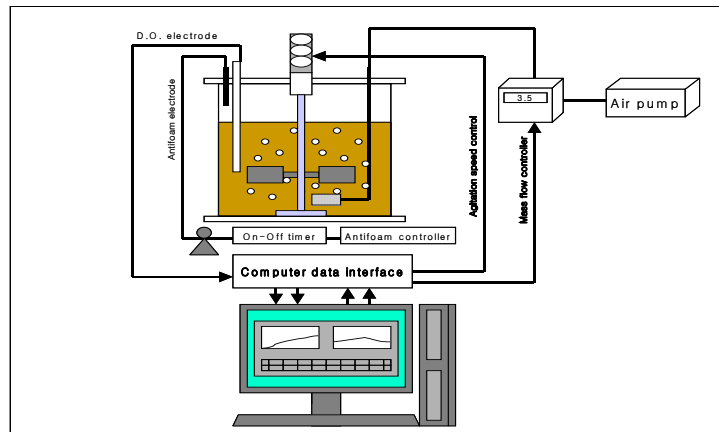


Fig. 2. Configuration of a on-line computer-controlled fermentation system



## 2. 제 1 세부 위탁과제:

### 원형질융합에 의해 안정성있는 avermectin B<sub>1a</sub> 고생산성 돌연변이주 개발 및 배양생리학적 특성 조사

Avermectins (AVMs)는 지방산과 합성경로를 공유하는 polyketide 계열의 물질로 방선균의 일종인 *Streptomyces avermitilis*가 이차대사산물로 생산하는 광범위 동물 구충제이다. AVMs는 포유동물의 소화기관 내 기생하는 기생충들뿐만 아니라 외부 기생충인 진드기와 같은 절지동물에 대해서도 강력한 구충효과를 가지고 있어 살충제로의 사용과 인간에 대해서도 사용이 가능하다고 알려져 있다. *S. avermitilis*에 의해 생합성되는 avermectin (AVM)은 생산균주의 균사에 축적되며, 주로 idiophase 단계 (세포성장 cycle에서 볼 때 stationary phase)에서 생산되는 전형적인 이차대사산물이다. pentacyclic 16-membered lactones의  $\alpha$ -1-oleandrosyl- $\alpha$ -L-oleandroside 유도체인 macrocyclic lactone 유도체의 한 종류인 AVMs는 aglycon 부분과 당 (sugar)부분으로 이루어져 있다. 즉, 세가지 기능기의 종류에 따라 A<sub>1a</sub>, A<sub>2a</sub>, B<sub>1a</sub>, B<sub>2a</sub>의 4개 주성분과 A<sub>1b</sub>, A<sub>2b</sub>, B<sub>2b</sub>, B<sub>2b</sub>의 4개 부성분, 즉 8개 화합물의 혼합물로 생산되고 있으며 (Fig. 3), 이 중에서 가장 강하고 광범위한 구충효과를 나타내고 있는 avermectin B<sub>1a</sub>(AVM B<sub>1a</sub>)는 별도로 abermectin으로 불려지고 있고, 시장성이 큰 ivermectin (IVM)은 AVM B<sub>1a</sub>로부터 유기화학적으로 합성된 유도체이다. 많은 항생물질의 생합성을 담당하는 유전자처럼 AVMs의 생합성 유전자인 avermectin polyketide synthase (PKS) 유전자 또한 clustering되어 있다. AVMs의 PKS는 multifunctional protein의 domain들이 각각 다른 활성을 보이는 type I 에 속하고 일반적인 PKS처럼 module의 형태를 지니고 있다.

예비 실험 결과 야생형의 생산균주는 동일한 조건에서도 AVM B<sub>1a</sub> 생산에 있어 큰 불안정성을 보였다. 이러한 불안정성은 avermectin PKS loading module의 starter unit으로 이용되는 branched carboxylic acid에 대한 매우 낮은 기질특이성에서 기인하는 것으로 판단된다. Avermectin PKS는 다양한 acyl unit을 이용해 AVMs를 형성하는데, labeling 연구에 의해 isoleucine (2-methylbutyryl-CoA)과 valine (isobutyryl-CoA)이 각각 small “a”와 “b” component의 전구체로 이용되고, avermectin aglycon은 starter unit과 7개의 acetate와 5개의 propionate unit의 extension에 의해 형성된다는 것이 밝혀졌다 (Fig. 4).

본 연구에서는 유전적 특성으로부터 기인한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성의 불안정성을 극복하고 고역가로 AVM B<sub>1a</sub>를 생산하는 *Streptomyces avermitilis* 균주를 개발하기 위해 protoplast 융합방법을 이용할 목적으로, 돌연변이 유발을 통한 AVM B<sub>1a</sub> 고생산성의 모균주 개발과 신속한 선별을 위한 scale down (miniature) 실험방법의 적용, 그리고 원형질체 융합방법에 의해 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 큰 폭으로 증가한 유전자 재조합체를 선별하고자 하였다.

#### 가. 사용균주

AVMs B<sub>1a</sub> 생산균주인 *Streptomyces avermitilis* ATCC 31272의 돌연변이주를 모균주로 사용하여 실험을 진행하였다. 실험에 사용한 균주는 liquid stock으로 -80℃ 냉동고에 보관하여 필요시마다 사용하였는데 *S. avermitilis*를 포자형성배지인 ISP (Table 1)배지에 접종한 후 28℃에서 8일간 배양한 후 곧바로 사용하였고, liquid stock은 *S. avermitilis*의 포자를 20%의 glycerol을 첨가하여 -80℃ 냉동고와 liquid nitrogen tank에 보관하였다.



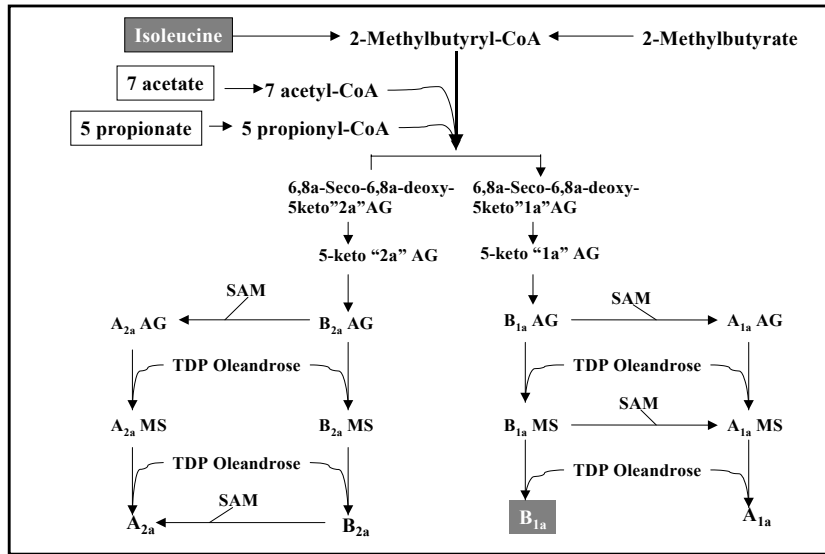


Fig. 4. Proposed pathway for biosynthesis of the AVM "a" in *S. avermitilis*.

#### 다. 사용배지

본 실험에서 사용된 성장배지와 생산배지는 Table 2, 3와 같고 최소배지는 Table 4와 같으며 protoplast의 regeneration에 사용된 배지는 최소배지에 205 g/l의 sucrose를 첨가하여 사용하였고(Table 5), 포자 형성에 쓰인 sporulation agar배지인 ISP는 Table 1과 같다. 배지의 열 멸균 시에 발생하는 현상인 침전과 갈변현상의 방지를 위해서 무기염류와 당을 분류하여 멸균한 후에 무균 상태에서 나머지 배지용액과 혼합하여 사용하였다.

Components	Concentration (g/L)
Malt extract	15
Yeast extract	5
Soluble starch	5
CaCO <sub>3</sub>	3
Agar	20

Table 1. The composition of ISP medium.

Components	Concentration (g/L)
Soluble starch	30
Yeast extract	15
Cornsteep liquor	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4

Table 2. The composition of growth medium

Components	Concentration (g/L)
Soluble starch	132
Soybean meal	10
Skim milk	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
PEG 2,000	2.5

Table 3. The composition of production medium.

Components	Concentration (g/L)
Glycerol	5
Agar	20
NaCl	2
KNO <sub>3</sub>	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.534
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.272
Trace elements solution	0.1

Table 4. The composition of minimal medium.

Components	Concentration (g/L)
Sucrose	205
Glycerol	5
Agar	20
NaCl	2
KNO <sub>3</sub>	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.534
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.272
Trace elements solution	0.1

Components	Concentration
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.1
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1
Distilled water	100ml

Table 5. The composition of regeneration medium. ※Trace element solution

## 라. 다양한 돌연변이 유발원

### 1) UV 변이 처리 방법

이차대사는 일차대사와는 달리 그 생합성 경로가 매우 복잡하다. 따라서 이차대사산물 고생산 변이주를 얻기 위해서는 비교적 온화한 조건의 돌연변이 유발원을 사용하여야 한다. 이를 위해 일반적으로 이용되는 UV에 의해 돌연변이주를 선별하고자 하였다. UV 변이처리 방법으로서 포자 형성 배지인 ISP 사면배지에 자란 포자를 증류수로 수거한 뒤 주사기 여과를 거쳐서 순수한 포자를 얻었다. 그리고 hemocytometer를 이용하여 회수한 포자를 계수한 뒤 rocker 위에 포자 현탁액 8 ml가 담겨있는 멸균된 유리 petri-dish를 올려놓은 후 온화하게 혼합하면서 UV를 조사하였다. UV 처리는 암소에서 254 nm의 15 W UV lamp (VIBER LOURMAT Co., VL-215C) 2개를 20 cm 거리에서 0초 ~ 300초 동안 30초에서 50초 간격으로 조사하였다. 그 후 0.1 ml씩 agar plate에 도말하여 각각의 조건에서 colony를 계수하여, UV를 처리하지 않은 control에 대한 백분율을 구하여 생존율이 99.9 %인 UV 처리시간을 변이조건으로 이용하였다. 즉 UV를 20 cm 거리로 유지하고 각 시간 별로 조사한 결과 270초에서 생존율이 99.9%임을 확인하여 이 조건하에서 *S. avermitilis*에 대한 UV 변이처리를 수행하였다 (Fig. 5(A)).

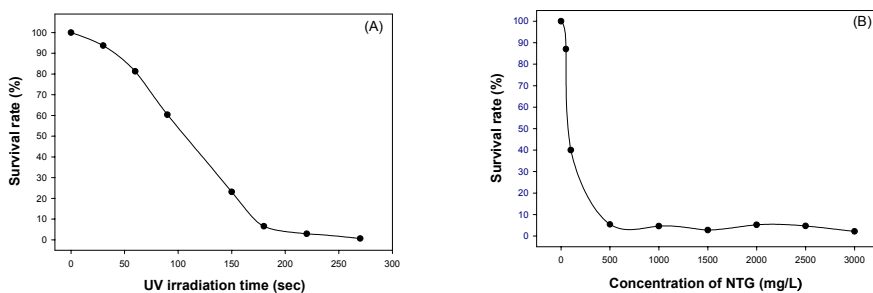


Fig. 5. Survival rate after (A) UV (at 254 nm) and (B) NTG treatment.

### 2) NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 변이 처리 방법

NTG 변이 처리방법은 UV 변이 처리방법과 동일한 과정을 통해 회수한 포자를 pH 9.0인 TM (Tris-Malate) buffer에 현탁한 후 0~3 mg/ml의 농도로 methanol에 녹인 NTG를 첨가하여 60분간 반응시킨 후 0.1 ml씩 agar plate에 도말하였다. 각각의 조건하에서 colony를 계수하여 NTG를 처리하지 않은 control에 대한 백분율을 구하여 생존율이 99.9 %인 NTG 처리 농도를 변이조건으로 이용하였다. 즉 처리시간은 60분으로 유지하고 각 농도 별로 NTG를 처리한 결과 3 mg/ml의

농도에서 생존율이 99.9%임을 확인하여 이 조건을 NTG 변이 조건으로 결정하였다(Fig. 5(B)).

#### 마. 균체 농도의 분석

균체 농도는 건조중량 (Dry Cell Weigh, DCW)을 이용하여 측정하였다. 균일한 sample 10ml을 얻어 15,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 남아있는 당 및 염들을 증류수로 3번 씻어내고 weighing dish에 담아 90°C dry oven에서 12시간 동안 건조한 후 건조중량을 1 l 당 세포농도로 환산하여 나타내었다.

#### 바. AVM B<sub>1a</sub> 추출 및 정량분석

Avermectin을 추출하기 위하여 sample로 취한 10ml의 *S. avermilitis* 배양액을 동량의 methanol을 첨가하여 혼합한 후에 12시간 동안 230rpm, 28°C의 진탕배양기에서 추출한 후 15,000rpm에서 20분간 2번 원심분리하여 AVM B<sub>1a</sub>를 포함하고 있는 1ml의 상등액을 취해 HPLC 정량분석을 실시하였으며, HPLC Chromatogram을 Fig. 4-4에 나타내었다. Avermectin B<sub>1a</sub> 표준 용액으로는 순수한 avermectin B<sub>1a</sub>를 100 mg/l ~ 500 mg/l의 농도로 methanol에 용해하여 사용하였고 HPLC 운전 조건은 다음과 같다:

Column : Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 $\mu$ m) (Kanto chemical co. INC.)

Mobile phase : 85% methanol : 15% D.W.

Column temperature : 40°C by temperature controller

Detector : M 720 absorbance detector (Younlin co. Korea)

Wave length : 246nm

Sample loop size : 20 $\mu$ l

Flow rate : 1.2 ml/min

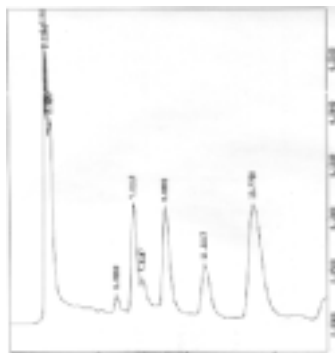


Fig. 6. HPLC chromatogram of AVMs

#### 사. 지방산 생합성 저해제와 아미노산 유사물질 저항성균주 분리 방법

본 실험에서는 지방산 생합성 저해제와 isoleucine 유사체를 이용하였다. 지방산 생합성 저해제에 대한 저항성 균주를 분리하기 위해 먼저 ISP 사면배지에서 자란 포자를 증류수로 수거한 뒤 주사기 여과를 거쳐서 순수한 포자를 회수하였다. 박테리아의 지방산 생합성 저해물질로서 pFAC (p-flouro phenoxy acetic acid)를 사용하였다. 이는 지방산과 그 생합성 경로를 공유하는 polyketide의 생합성의 양을 늘리기 위함이다 (Fig. 7). 즉, 지방산 합성 저해제가 있음에도 불구하고 성장하는 돌연변이주는 지방산 합성경로 뿐만 아니라 polyketide의 생합성 경로로의 대사가 더욱 왕성할 것이기 때문이다. 이러한 이유로 인하여 지방산 합성저해제에 대한 저항성을 띄는 변이주를 얻고자 UV와 NTG를 각각 처리하여 실험을 수행하였다. 열멸균에 의해 pFAC가 변성되는 것을 방지하기 위해 공극의 크기가 0.2  $\mu$ m의 여과지로 거른 뒤 최소 배지 (Table 4)에 첨가하여

사용하였다. 첨가되는 pFAC의 농도는 100 mg/l ~1200 mg/l의 농도로 점차 증가시켜 저항성 균주를 선별하였고, 매 실험마다 균주의 보관용으로 단일 colony를 한천사면배지에 접종하였다.

한편 polyketide 유도체인 AVM small "a" 성분의 생합성을 위해 starter unit로 1차 대사산물인 isoleucine에서 유래된 2-methylbutyryl-CoA가 사용된다. 따라서 avermectin B<sub>1a</sub>를 고생산하기 위해서는 우선 전구물질인 isoleucine의 생합성이 활발히 진행되어야 한다. 1차대사산물의 합성에 있어 가장 큰 영향을 미치는 feedback inhibition/repression 현상을 극복하기 위해 isoleucine의 유사물질인 OMT (o-methyl threonine)와 AZL (azaleucine)에 대한 저항성 돌연변이주를 얻고자 하였다. 따라서 OMT에 저항성을 나타내는 균주들은 일정량의 isoleucine을 합성한 후에도 계속적으로 isoleucine의 생합성이 진행되어 isoleucine이 다량 합성될 것으로 판단된다. 이로 인해 더욱 많은 전구체가 avermectin B<sub>1a</sub> 생합성 경로로 공급되어 궁극적으로 avermectin B<sub>1a</sub> 생합성량이 증가될 가능성이 높다. OMT가 열멸균에 의해 변성이 일어나기 때문에 공극의 크기가 0.2 μm인 여과지로 거른 뒤 한천배지에 첨가하여 사용하였고, 20 ~ 100 mg/l의 농도로 최소배지에 첨가하여 사용하였다. 저항성 균주의 선별을 위한 배지로는 최소배지를 사용하였다. 선별된 colony를 포자형성 배지로 옮겨 28°C에서 7일 동안 배양한 후 포자를 회수하여 성장배지에서 48시간 배양한 후 생산배지에 접종하여 7일간 배양하여 HPLC 정량분석을 통해 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 확인하는 절차를 거쳐 고생산 변이주를 선별하였다.

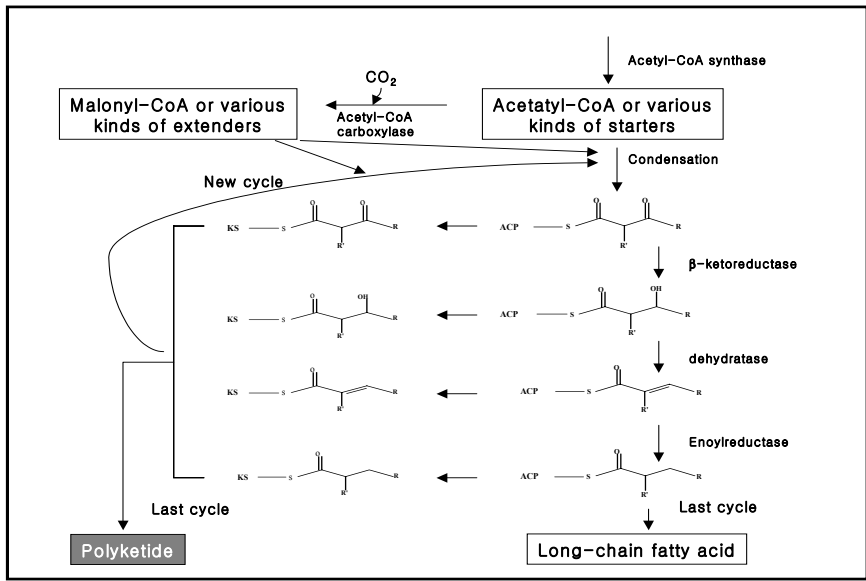


Fig. 7. Fatty acid and polyketide biosynthesis pathway.

또한 Isoleucine 유사체인 AZL에 대한 저항성 변이주도 AVMs 중 small "a" component의 전구체인 isoleucine을 과량으로 생합성하여 궁극적으로 AVM B<sub>1a</sub>를 과량으로 생산할 수 있을 것으로 생각될 뿐만 아니라 원형질체 융합시 표지유전인자로 이용이 가능할 것으로 판단되었다. 상기의 O-methylthreonine (OMT)의 실험방법과 마찬가지로 azaleucine (AZL)이 다양한 농도로 첨가된 각 각의 최소 한천 배지에 생산균주의 spore를 UV나 NTG와 같은 돌연변이 과정을 도입하거나, 또는 돌연변이 과정 없이 도달한 후 형성된 colony를 AZL의 저항성 변이주로 분리하였다. 이와 같은 isoleucine 저항성 고생산 균주는 과량의 isoleucine을 AVM B<sub>1a</sub> 생합성하는 이차대사로 이용할 수 있을 것이므로 8가지의 AVM 유사체 중 가장 탁월한 구충 효과를 나타내는 B<sub>1a</sub>로의 생합성 방향성을 향상시킬 수 있고, 생산물의 분리 정제단계의 비용을 최소화 할 수 있을 것으로 판단

되었다.

#### 아. 망간 (Manganese) 또는 철 (Ferrous)에 대한 저항성 균주 분리방법

안정적인 고생산성 균주를 선별하기 위해 포자형성에 큰 영향을 주는 것으로 알려진 Mn과 Fe에 대한 저항성 균주 선별을 수행하였다. 최소 배지에  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $MnSO_4$ ,  $FeCl_3$  또는  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  각각을 첨가한 후 멸균하여 저항성 배지를 만들었다. 그 후 위의 아미노산 유사물질 저항성 균주를 분리하는 방법과 같이 포자를 도말하여 28°C에서 배양하여 얻은 colony를 분리하였다. 또한 생산배지에  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $MnSO_4$ ,  $FeCl_3$ , 또는  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 여러 농도로 첨가하여, Mn과 Fe가 AVM B<sub>1a</sub> 생산성에 미치는 영향을 조사하였다.

#### 자. Scale down (miniature) 배양실험

고생산 균주의 선별에 있어서 중요한 것은 rational screening 방법으로 접근해가면서 가능한 한 짧은 시간 내에 많은 균주를 선별하여 생산성을 확인하는 것이다. 일반적으로 수행하던 shake flask 배양의 경우 250 ml flask에 50 ml의 배지를 사용하는데, 이러한 방법은 배지의 양과 실험 수행의 공간적인 문제 그리고 많은 실험기자재의 확보가 선행되어야 한다. 그러나 본 실험실에서 확립한 소규모 배양 실험의 경우 세포성장단계와 생산단계는 직경 30 mm의 test tube에 10 ml을 첨가하여 배양하였다. 그 결과 기존의 삼각플라스크를 사용하는 실험방법보다 많은 저항성 변이주들과 원형질 재조합체를 선별할 수가 있고, 이들로부터 고생산 변이주를 선별할 수 있다. Rational screening 방법에 근거하여 우선 지방산 생합성 저해제와 아미노산 유사물질에 저항성을 띄는 단일 균주를 얻어 두 개의 포자형성 agar slant에 접종하여 7일간 배양하여 하나의 사면배지는 stock 보관용으로 4°C에 보관하고, 다른 하나의 사면배지는 10 ml의 성장배지의 seed로 접종하여 48시간동안 배양하였다. 다시 10 ml의 생산배지에서 7일간 배양한 후 HPLC를 이용하여 고생산 변이주를 선별하였다. 여러 차례 이러한 과정을 반복하여 고생산균주를 얻게 되면 삼각 플라스크와 발효조를 거쳐 생산성을 재확인하였다. Miniature 배양실험을 Fig. 8에, 그리고 miniature 배양을 위한 신속한 균주선별 방법을 Fig. 9에 도식화하였다.





## 차. Revertant로의 back mutation 방지 방법 개발

*Streptomyces*는 회수한 spore의 0.1 % 이상이 자연적으로 유전자의 넓은 부분에서 손실이 일어날 정도로 유전자의 안정성이 매우 낮은 것으로 보고되어 있다. 이러한 특성으로 인해 유전적 안정성은 산업적인 목적으로 수행되는 *Streptomyces*의 배양에서 필수적으로 획득해야할 요인이다. *S. avermitilis*를 이용한 Jan novak 등의 실험 결과를 살펴보면 8회의 계대배양으로 최초 AVM 생산성이 완전히 상실되는 현상을 확인할 수 있다. 이러한 현상은 이차대사산물 생합성에 관련된 효소의 유전자가 계속적인 복제 과정 중 소실되었기 때문으로 판단된다. 본 연구에서는 *Streptomyces*가 가지고 있는 유전적인 불안정성을 최소화하기 위해 UV와 NTG를 이용한 돌연변이를 유도하여, AVM B<sub>1a</sub>를 안정적으로 고생산하는 균주를 선별하였고, 실험 수행 단계에서 유전자의 손실을 줄이기 위해 계대배양의 횟수를 최소화하고 계속적인 screening을 수행하여 단일의 유전형질을 유지시켰다.

## 카. 통계적 방법을 적용한 배지 최적화를 위한 실험 설계

본 연구에서는 통계적 방법을 도입하여 최적의 생산배지를 개발하기 위해 중심합성계획법으로 실험설계를 하고, 그 결과를 반응표면방법으로 분석하였다. 반응표면방법론 (Response Surface Methodology, RSM)은 처리 (독립변수, 원인)에 대한 반응 (종속변수, 결과)을 등고선 또는 삼차원 표면도로 나타내어 변수와 반응간의 함수관계를 자료로부터 추정하여 처리에 따라서 반응량이 어떻게 달라지는가를 예측하고, 어떠한 처리의 조합에서 반응량이 최적화 될 것인가를 찾아내는 분석방법이다.

### 1) 반응표면분석법을 이용한 AVM B<sub>1a</sub> 생산배지 농도 최적화 - 실험 계획 및 통계 분석

AVM B<sub>1a</sub> 생산의 최적화를 확립하기 위하여 배양인자인 4종류의 배지 성분 (주로 soluble starch, skim milk, soybean meal, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 각각의 농도변화가 AVM B<sub>1a</sub> 생산성에 미치는 영향을 반응표면분석법을 이용하여 분석하였다. 반응표면분석법을 위한 실험계획법으로는 중심합성계획법 (central composite design)을 사용하였다. 중심합성계획법은 중심점 (center points)과 축점 (axial points)을 2<sup>k</sup> 요인실험에 추가시킨 실험계획으로 중심합성계획에서는 중심점의 수는 제한이 없이 하나 이상이 되며 (0, 0, 0, 0)으로 설정하였고 축점의 수는 2k로 반응조건이 4개이므로 8개의 축점으로 하였다. 따라서 중심점의 수를 n<sub>0</sub>로 나타내면 중심합성계획의 횟수는 2<sup>k</sup>+2k+n<sub>0</sub>가 되므로 25개의 선정된 조건에서 실험을 실시하였다. 각각의 실험인자 변화에 따른 AVM B<sub>1a</sub> 생산성의 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 아래와 같은 2차 다항식에 적용시켰다.

$$f = y_0 + a_1 * X_1 + a_{11} * X_1^2 + a_2 * X_2 + a_{22} * X_2^2 + a_3 * X_3 + a_{33} * X_3^2 + a_{12} * X_1 * X_2 + a_{23} * X_2 * X_3 + a_{31} * X_3 * X_1 + a_4 * X_4 + a_{44} * X_4^2 + a_{14} * X_1 * X_4 + a_{24} * X_2 * X_4 + a_{34} * X_3 * X_4$$

여기서 f는 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 (mg/L)이며 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>는 각각의 배지성분이며 y<sub>0</sub>는 절편, a<sub>n</sub>은 회귀계수이다.

중심합성법에 의거해 얻은 실험결과를 바탕으로 sigma plot program을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 구하였다. 이 식으로부터 각각의 반응조건들에 대한 상호영향을 조사함으로써 AVM B<sub>1a</sub> 생산을 위한 최적 배양 조건을 구하였다. 또한 design expert program을 이용하여 확인 과정을 거쳤다. 이 때 전체 model에 대한 유의성은 sigma plot과 design expert program의 통계적 분석시 P값에 의해 결정되며 P<0.05일 때 유의성이 인정된다. 최적배양조건 결정값은 2차 다항식의 f값이 최대가 되는 지점을 3차원 반응 표면도와 contour plot을 이용하여 관찰하였다.

## 2) 통계학적 배지 최적화를 위한 Plackett-Burman(PB) Design 분석 - 배지 성분 조사

실험에서 효율적인 면이나 경제적인 면에서 탄소원, 질소원 그리고 다른 영양분의 선택은 가장 중요하다. 최근 이들을 선택하는 방법에 통계학적 방법을 이용하는데 엄청난 양의 실험수를 줄일 수 있고, 빠르고 확실하다는 장점이 있다. Plackett-Burman Design은 다양한 요인들 중에서 필요한 것을 선별해 낼 수 있는 통계학적 방법 중 가장 간단한 방법이나 요소들 간의 상호 교호 작용 이해에는 어려움이 있다. n-1개의 요인에 대한 실험을 수행하려면  $2^{n-1}$  가지의 실험을 수행하여야 하지만 Plackett-Burman Design은 n-1개 요인에 대한 높은 값(+1)과 낮은 값(-1)을 설정한 다음 n가지의 실험으로 결과를 얻을 수 있다. 이때 PB Design에서 n은 4의 배수이어야 한다. 각각의 실험조합에서 얻은 AVM B<sub>1a</sub>의 생산값을 Design Expert software (Stat-ease, Inc)를 사용하여 분석하였다.

### 다. 원형질체 융합

유전자형(genotype)이 서로 다른 세포 사이에서 유전자 교환이 일어나면 새로운 유전자형이 생긴다. 유전자 교환은 산업 미생물의 바람직한 성질만을 선택적으로 유지하고 바람직하지 않은 성질을 제외시킬 수가 있어 산업균주 개발에 좋은 수단이 되고 있다. 유전자 재조합의 효율을 증가시키는 방법의 하나로 개발된 원형질체 융합(protooplast fusion)은 유전자의 재조합율이 매우 높고 동종, 또는 이종, 나아가 다른 속 사이에서도 융합이 가능하여 유전자 교환에 매우 좋은 방법이 되고 있다.

원형질체 융합을 수행하기 위해 선행되어야 할 단계가 원형질체 형성이다. 원형질체(protooplast)란 삼투압 안정제가 포함된 상태에서 lytic enzyme을 처리하여 세포벽을 제거한 세포를 말하는데 (Fig. 4-8: *S. avermitilis*의 원형질체), polyethylene glycol (PEG)과 같은 융합 유도물질(fusogenic agent)을 첨가하면 원형질체 융합이 이루어져 순간적인 hybrid나 diploid가 형성된다. Hybrid 단계 동안 유전자가 재배열하거나 유전적인 재조합이 발생하게 된다. *Bacillus*와 *Streptomyces*의 경우에는 이들의 유전자가 세포질에 자연스럽게 존재하기 때문에 재조합이 매우 높은 빈도로 일어난다. 원형질 융합체들은 전통적인 돌연변이 방법에 의해 얻은 아미노산 유사체 저항성 균주들의 한계를 동시에 극복하는 복합균주를 얻을 수 있다. 즉 아미노산 유사체 저항성 균주나 항생제 저항성 균주들의 생산성은 이들 돌연변이주가 유도된 모균주 (mother strain)에 비해 향상되기는 하지만 어느 정도 한계가 있으며 모균주에 비해 성장 속도가 느린 특징이 있다.

일반적으로도 저항성 균주들의 경우 아미노산 유사체나 항생제의 농도가 어느 수준 이상이 되면 더 이상의 생산성 향상이 어렵게 되거나 오히려 감소하는 경향이 있다. 그러나 원형질 융합체는 단순 변이주에 비해 유전함량의 증가로 유전적 안정성이 뚜렷하게 증가되고, 성장속도 및 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 등과 같은 배양 생리학적 특성이 큰 폭으로 향상된 고생산 균주를 얻을 가능성이 높다.

### 1) 원형질체의 형성

*Streptomyces*의 sporulation 배지인 ISP 사면배지에서 8일간 배양한 실험균주의 포자를 회수하여 glycine이 첨가된 전배양 배지인 P-medium (Table 6)에 접종한 후 37°C, 230 rpm으로 48시간 동안 배양한 후에 4,000 rpm (3136×g)에서 10분 동안 원심분리하여 균체를 회수하였다. 남아있는 배지 성분을 제거하고 균체를 삼투압으로부터 보호하기 위해 M solution (Table 7)으로 2회 세척하고 0.6%의 lysozyme이 함유된 M solution에 최종 현탁시켜 28°C 진탕배양기에서 90분간 온화하게 진탕하였다. 이것을 2,000 rpm (784×g)에서 20분 동안 원심분리한 후 M solution로 2회 세척

하여 lysozyme을 제거한 뒤 cotton과 20-25 $\mu$ m의 여과지로 여과하여 균사를 제거하였다. 이와 같이 제조한 원형질체를 hemocytometer를 사용하여 원형질체를 계수하였다.

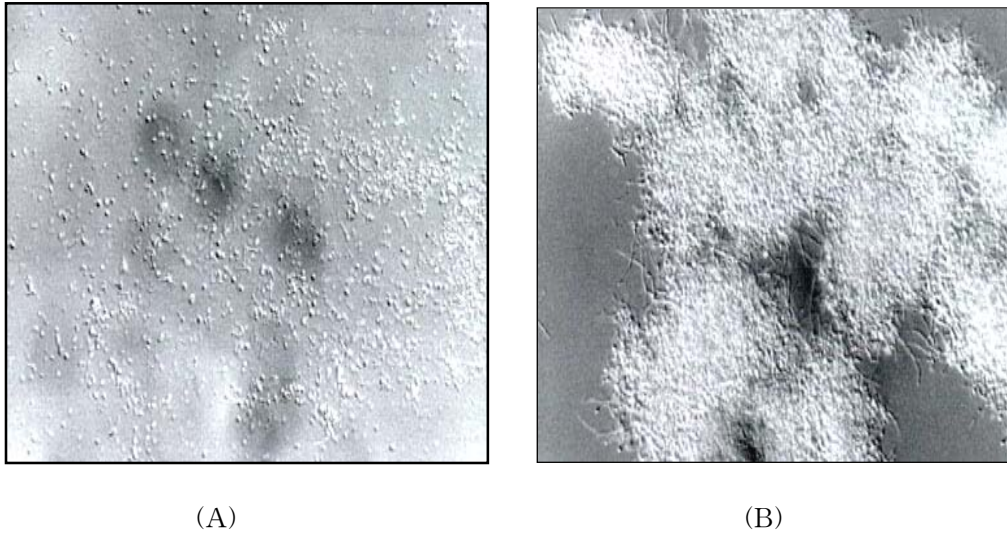


Fig 10. Microscopic photographs for *S. avermitilis*.  
(A) before lytic enzyme treatment, (B) after lytic enzyme treatment

Components	Concentration
Glycerol	10
Yeast extract	10
Sucrose	205
CaCl <sub>2</sub>	3
MgCl <sub>2</sub>	6
Glycine	10

Table 6. The composition of preculture medium (P-medium).

Components	Concentration (g/L)
Sucrose	205
CaCl <sub>2</sub>	3
MgCl <sub>2</sub>	6
KCl	0.075

Table 7. The composition of M sol'n (osmotic stabilizer)

## 2) 원형질체의 재생

상기와 같은 방법에 의해 형성된 원형질체를 M 완충액으로 적정배수 희석하여 0.6%의 agar가 포함된 soft 배지에 현탁한 뒤, 재생 배지 (regeneration agar)를 이용하여 pour plating하여 28 $^{\circ}$ C에서 5일 정도 세포벽을 재생시켰다. 원형질체 재생율의 비교를 위하여 3가지의 재생배지를 사용하였으며, 재생빈도는 다음과 같이 구하였다. 즉 hemocytometer로 계수된 원형질체의 수(A)와 이를 재생배지에 pour plating하여 나타난 colony의 수(B)를 측정하고 원형질체 현탁액을 삼투압 안정제가 첨가되지 않은 배지에 pour plating하여 나타난 colony의 수(C)를 측정하여 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Regeneration frequency} = (B - C) / A$$

A : number of protoplast plated  
B : number of colonies regenerated  
C : number of osmotic resistant cells

## 3) 원형질체 융합

상기의 방법으로 형성한 *Streptomyces avermitilis*의 원형질체  $1 \times 10^7$  protoplasts/ml을 2,000

rpm에서 20분간 원심분리하여 0.1ml의 M solution에 현탁시켰다. 이 현탁액에 1ml의 fusion solution (Table 8)을 가하고 28°C에서 180rpm으로 5분간 원형질체 융합을 유도한 후 4 ml의 M 완충액을 가하여 융합을 중지시키고 0.1ml를 soft agar에 혼합한 후 재생배지에 overlay하였다

Components	Concentration (g/L)
PEG 6,000	500
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3
MgCl <sub>2</sub> · 7H <sub>2</sub> O	6

Table 8. The composition of fusion solution.

#### 4) UV 조사에 의한 유전자 재조합체 선별 방법

상기의 방법에 의해 제조한 원형질체의 최종농도가  $1 \times 10^7$  protoplasts/ml이 되도록 UV를 조사(치사율 99% 이상)한 후, 0.1ml의 원형질체 현탁액과 fusion solution 1ml을 혼합하여 원형질체 융합을 유도하였다. 그리고 삼투압 안정제가 첨가되어 있는 재생배지에 overlay하여 28°C에서 배양하였다. 자외선 조사에 의하여 인접해 있는 pyrimidine의 염기가 thymine-thymine, thymine-cytosine, cytosine-cytosine의 이중체가 형성되어 돌연변이가 일어나는데, 형성된 이중체는 가시광선에 의해 원상으로 회복되게 된다. 그래서 원형질체를 담은 모든 실험 기구를 알루미늄 foil로 싸서 실험하여 가시광선에 의한 photoreactivation현상을 막았다. 본 실험에서 치사율이 99% 이상이 되는 시간동안 UV를 조사하였기 때문에 세포벽을 재생하여 성장한 colony는 유전자 재조합체라고 간주하여 선별하였다.

UV 처리는 암소에서 254nm의 15W UV lamp (VIBER LOURMAT Co., VL-215C) 2개를 25cm 거리에서 180~ 270 초 동안 50초 간격으로 조사하였다. 그 후 0.1ml을 pour plating으로 배양한 뒤, 각각의 조건에서의 colony를 계수하여, UV를 처리하지 않은 control에 대한 백분율을 구하여 생존율이 99.9%인 UV 처리시간을 변이조건으로 이용하였다. 즉 UV를 25cm 거리로 유지하고 각 시간 별로 조사한 결과 270초에서 치사율이 99.9%임을 확인하여 이 조건에서 *S. avermitilis*의 원형질체에 대한 변이처리를 수행한 후 융합을 시도하였다.

#### 5) NTG 처리에 의한 유전자 재조합체 선별 방법

NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)에 의한 변이주의 대부분은 GC pair를 AT pair로 변화된 염기전위이다. NTG는 높은 돌연변이율에 비해 낮은 치사율을 보이는 특징을 가지고 있어 가장 널리 사용되는 돌연변이 유발원이다.

상기 UV 처리에서 설명한 바와 동일한 이론과 방법에 의해 제조된 원형질체를 최종농도가  $1 \times 10^7$ /ml이 되도록 2.8 mg/ml의 NTG를 45분 동안 처리(치사율 99%)하여 2,000 rpm로 원심분리한 후 sucrose가 포함된 M solution으로 2번 세척하여 그것의 0.1ml과 1ml의 fusion solution을 혼합하여 원형질체 융합을 유도하여 재생배지에 overlay하여 배양하였다. 본 실험군주의 완전사멸 농도로 NTG를 처리하였기 때문에 세포벽을 재생하여 성장한 colony는 유전자 재조합체로 간주하여 선별하였다.

### 3. 제 2 세부과제 및 제 2 세부위탁과제: 환경친화적 에버멕틴 분리정제 공정 개발

#### 가. 세포배양

세포 및 세포배양법은 개발된 고생산성 균주와 배양액 조성을 계속하여 새롭게 적용하여 분리정제 실험을 위한 세포를 대량 배양하여 얻었다. 세포와 배양액에 관한 사항은 제1세부에서 설명한 연구 방법을 참조하면 되므로 여기서는 생략한다. 1차년도에 분리정제 연구를 수행하기 위한 세포의 대량 배양을 위해서는 진탕 플라스크 안에서 shaker를 이용하여 진탕 배양하거나 한국발효기의 2.5 liter fermentor를 이용하여 대량 배양하여 acetone 또는 methanol로 1차 추출한 후 농축하여 사용하였다. 2차년도에서는 그동안 새롭게 개발한 균주를 가지고 50L fermentor에서 배양한 sample을 가지고 분리 정제를 수행하였다. 3차년도에는 5,000 L 발효조에서 3,000 L 규모로 배양한 후 scale-up 공정의 분리정제 공정을 운전하였다.

#### 나. AVMs 분석

AVMs의 분석을 위한 조건을 확립하였으며 분리정제의 연구를 위한 모든 분석은 다음에 언급한 AVMs의 분석조건에 따라 수행하였다.

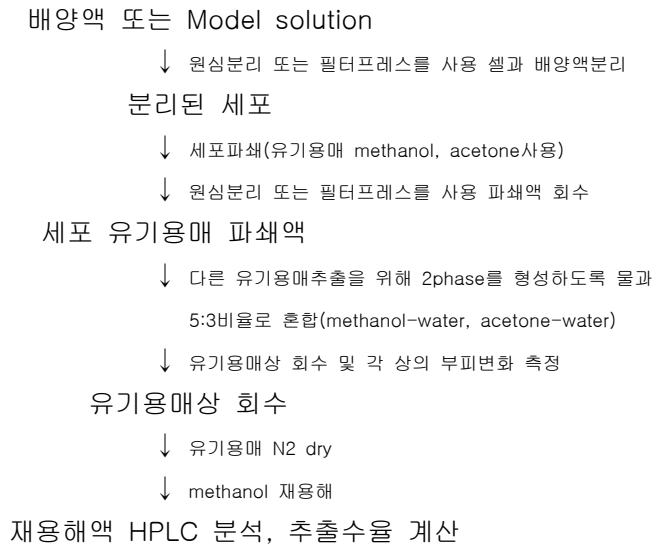
AVMs의 HPLC 분석조건

- column: waters bondapak C18-reverse phase column
- mobile phase: methanol:dH<sub>2</sub>O(85:15 v/v)
- flow rate: 1.2mL/min
- detector: uv-vis detector 246nm(영린기기 M720)
- column temperature: 40°C(영린기기, CTS 30 column oven)
- injection volume: 20 $\mu$ l

#### 다. 용매추출 공정개발

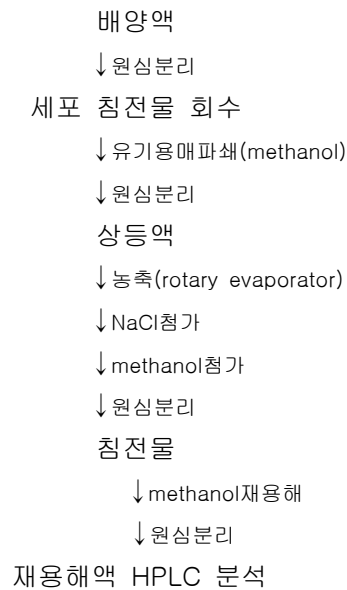
Partition coefficient와 selectivity의 관점에서 avermectin 추출에 적절한 용매를 선정하고 추출 공정 설계에 필요한 parameter들을 도출하기 위해 여러 solvent에 의한 acetone-water phase와 methanol-water phase의 추출효능을 다시 비교하였다. 이를 위해 먼저 methanol과 acetone에 대성 미생물에서 얻은 avermectin(B<sub>1a</sub> 90.7 %, B<sub>1b</sub> 5.6 %)을 녹여서 700 mg/L의 model solution을 제조한 후, solvent와 two phase를 형성할 수 있게 물을 5:3 비율로 첨가하여 acetone-water, methanol-water aqueous phase를 만들고 amyl acetate, pentane, benzene, toluene, hexane, cyclohexane, heptane, methylene chloride, chloroform, n-butylacetate등 여러 solvent로 추출을 하였다. 이를 위해 aqueous와 solvent의 부피 비를 2:1로 flask에 첨가하여 24시간 200rpm에서 진탕한 후 separatory funnel로 phase를 분리하였다. 분리후 각 solvent phase에서의 avermectin의 농도를 HPLC로 분석하고 material balance로부터 aqueous phase에서의 avermectin의 농도를 추정하여 percentage of extraction, partition coefficient, selectivity등 각 solvent에 따른 추출 효능을 비교하였다.

정제를 위한 최적의 추출용매인 acetone-water aqueous phase의 chloroform과 methanol-water aqueous phase의 dichloromethane을 중심으로 용매 접촉 시간에 따른 추출율과 aqueous phase와 solvent phase의 부피 변화에 따른 추출율의 변화를 조사하였다. 이를 위한 추출 과정을 도식적으로 나타내면 다음과 같다



**라. 세포 배양액으로부터 침전법에 의한 에버멕틴 분리 공정**

2.5 L 생물반응기에서 배양한 세포 배양액에 대성 미생물로부터 얻은 에버멕틴 B1a를 첨가하여 700 mg/L의 model solution을 제조한 후 제2세부의 추출 공정 개발과 동일한 방법으로 수행하였다. 세포 배양액으로부터 침전법에 의한 에버멕틴 분리 공정을 요약하면 다음과 같다.



**마. Pilot-scale에서의 에버멕틴 추출, 분리, 정제 공정 개발 및 최적화**

먼저 새로 개발된 product가 intracellular 임을 확인하였고, pilot 규모의 균체회수 공정개발을 위하여 원심분리공정으로 tubular bowl 고속원심분리기, Alpha laval Disc bowl 타입의 연속원심분리기의 사용가능성 여부를 검토하였다. 여과공정으로 Ruth 방정식을 이용하여 avermectin 생산균주의 specific cake resistance 값 등을 추정하여 향후 scale-up된 filter의 설계에 대비하였고 pilot 규모의 filter press test를 통하여 최적 membrane을 선정하였다. 막여과에 의한 분리 정제를 시험하기 위하여 microfiltration 공정으로는 8 µm pore size를 갖는 prefilter를 사용하였고, Satorius의 Ultra filtration unit을 이용하여 microfilter를 통과한 여과액(filtrate)에 남아있는 분자량 300,000 이상의 거대분자를 300K membrane으로 제거하고, 분자량 100,000 이상의 분자를 100K

membrane으로 제거한 후에, 여전히 남아있을 것으로 예상되는 분자량 10,000 이상의 불순물을 10K membrane으로 제거하였다. 한편 UF 공정에 대한 대안으로 추출공정을 시도하였으며, 용매로는 methylene chloride를 이용하였고 aqueous phase로는 methanol : water (5:3 v/v)를 사용하였다. methylene chloride(용매): methanol-water aqueous phase의 비율에 따른 추출율의 조사를 통해 최적 용매 비율을 선정하였다. 결정화를 위한 용매교환과 농축을 위하여 rotary drum evaporator를 이용하여 methylene chloride를 증발시킨 후, 재결정화 용매인 methanol로 용매교환하여 avermectin의 농도를 30g/L까지 농축시켰다. 또한 avermectin의 결정화를 위하여 chiller와 연결되는 교반조를 이용하여 온도를 4°C로 유지시키며 교반하였으며, 결정화 효율 증대를 위해 NaCl 공침에 따른 결정수율 및 정제도의 변화를 조사하였다.

#### **바. Pilot 규모 통합 분리정제공정 설계, 개발, 운전 및 scale-up 전략 확립, 경제적 타당성 평가**

2차년도의 pilot 규모의 분리정제 공정 시험 결과를 바탕으로, 3000 L 규모 배양 기준의 통합 분리정제 공정을 개발하였다. 이를 위해 우선 공정합성을 통하여 통합 분리정제 공정의 PFD를 (process flow diagram) 개발하였고, 물질수지를 확립하고 이를 바탕으로 P&ID를 개발하였다. P&ID를 기반으로 통합분리공정을 설치하고 운전함으로써 운전자료를 축적하였으며, lab-scale 및 pilot-scale의 설계자료 및 운전자료 분석, 설계식의 개발 및 설계인자 추정 및 도출 등을 통하여 scale-up 전략을 수립하였다. 한편 상업화 공정의 운전비 및 고정 투자비 예측 등의 분석을 통하여 경제적 타당성을 조사하였다.

## 제 2 절. 연구수행 내용 및 결과

### 1. 제 1 세부과제:

#### 에버멕틴 고생산성균주 개발 및 pilot-scale에서의 에버멕틴 발효공정 scale-up 연구

##### 가. 플라스크 배양 중의 배양 생리학적 특성 조사

###### 1) 세포 성장기간이 AVM B<sub>1a</sub> 생산성에 미치는 영향 조사

성장배지에서 세포 성장기간에 따른 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 확인하기 위해 ISP 포자형성 배지에서 회수한 생산균주의 포자를 성장배지에 접종 한 후 28℃에서 배양하였다. 그 후 24시간 간격으로 생산배지에 10%(v/v)으로 접종하여 배양한 후 flask를 회수하여 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성량을 HPLC 정량분석하였다. 실험의 정확도를 높이기 위해 4배수(quadruplicate)로 실험을 수행하였다. 실험 결과를 살펴보면 (Fig. 11) 2일 동안 성장한 생산균주를 생산배지에 접종할 경우 최고의 AVM B<sub>1a</sub> 생합성량을 보이지만 세포 성장기간이 길어질수록 급격히 감소하는 현상을 관찰할 수 있었다. 본 실험결과에 의해 생산배지로의 접종을 위한 세포성장기간은 2일로 결정하였다.

###### 2) 용존산소가 AVM B<sub>1a</sub> 생합성에 미치는 영향 조사

*Streptomycete*와 같은 호기성 미생물의 배양에 있어 배양액 내의 용존산소는 이차대사산물 합성에 매우 중요한 요인으로 작용한다. 본 실험에서는 *S. avermitilis*의 배양을 통한 AVM B<sub>1a</sub> 생산에 있어서 용존산소가 미치는 영향을 확인하기 위해 250 ml flask에서 용존산소에 따른 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성을 조사하였다. 250 ml의 flask에 10~130 ml 범위의 생산배지를 각각 첨가하고 접종량을 모두 10% (v/v)로 동일하게 한 후 28℃에서 7일간 배양하였다. AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 살펴보면 50 ml 이상의 배지량을 이용하여 배양한 경우, 생산성이 급격히 감소하는 것으로 나타났고, 균체량 또한 배지량이 70 ml 이상인 경우 크게 감소하는 것을 확인 할 수 있다 (Fig. 12). 이 결과는 동일한 크기의 flask 와 동일한 교반속도에서 배지에 녹을 수 있는 용존산소의 양은 일정한 반면, 배지량이 증가할 경우 균체량이 증가하므로 산소요구량이 증가하게 되어 최종적으로 산소고갈 상태에 이르게 되므로 생산균주가 세포성장 및 이차대사산물 합성에 필요한 산소가 부족해지기 때문에 일어난 현상으로 판단된다. 이로부터 균체의 성장과 AVM B<sub>1a</sub> 생합성에서 용존산소가 큰 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.



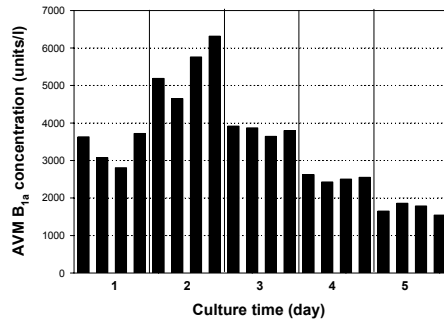


Fig. 11. Effect of culture time of growth cultivation on AVM B<sub>1a</sub> production

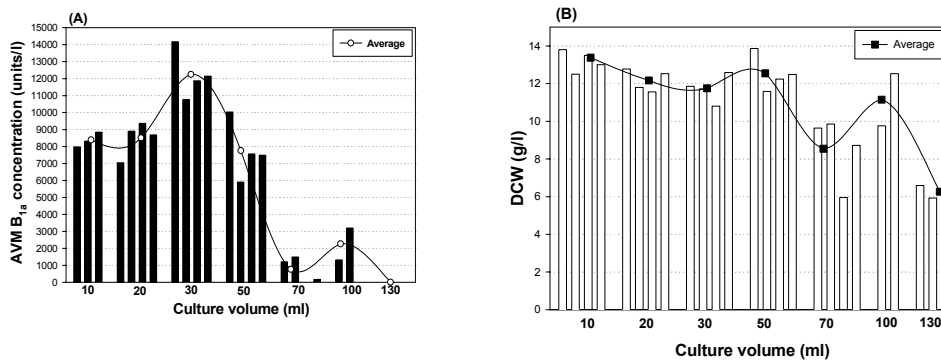


Fig. 12. (A)AVM B<sub>1a</sub> production and (B) dry cell mass according to culture volume in shake flask fermentatin

다음으로는 기존에 사용하던 생산균주인 OMT250-1과 반복적인 균주개발 방법을 통하여 획득한 균주인 ZH 4.0-1, ZH 4.0-5를 이용하여 AVM B<sub>1a</sub> 생산에 있어서 용존산소의 영향을 조사하였다. AVM B<sub>1a</sub> 생산에 있어서 최적화된 배지 (2.2X soluble starch)에서 용존산소가 미치는 영향을 확인하기 위해 250 ml flask에서 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성을 조사하였다 (Fig. 13). 250 ml의 flask에 10~130 ml 범위의 생산배지를 첨가하고 각각 flask에 상기에서 언급한 3종의 생산균주를 10% (v/v)로 동일하게 접종하여 7일간 배양하였다. 동일한 크기의 flask 및 rpm에서 배지에 녹을 수 있는 용존산소의 양은 일정하지만, 배지량이 증가할 경우에는 균체량에 비례하는 산소요구량이 증가하므로, 배지 부피가 높을 경우 산소고갈 현상이 쉽게 발생한다. AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 살펴보면, 3종의 생산 균주에서 배지 부피가 증가할 수록 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 급격히 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig 13A). 주목할 점은 ENP 88-207의 경우, 50 ml 이상의 배지부피에서는 AVM B<sub>1a</sub>를 거의 생합성하지 못하는 반면, 균주 개발을 통하여 획득한 고생산성 변이주인 ZH4.0-1과 ZH4.0-5는 각각 100 ml과 70 ml의 배지 부피에서도 AVM B<sub>1a</sub>를 생합성 하는 것을 관찰할 수 있었다. 이로써 상기의 변이주들이 기존균주에 비해 낮은 산소요구량을 보이는 균주이거나, 배지에 존재하는 산소를 더욱 쉽게 흡수하는 균주일 것이라는 추측이 가능하다. 또한 건조균체량을 비교해 본 결과, AVM B<sub>1a</sub> 생산성과 유사하게 배지량이 증가할 수록 급격히 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다 (Fig. 13B). 본 실험의 결과로부터 균체의 성장과 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 시 용존산소가 매우 큰 영

향을 미친다는 사실과 산소요구량을 감소시키거나 용존산소에 대한 친화도가 높아 배지 중의 용존산소를 쉽게 흡수할 수 있는 변이주 및 유전자 재조합체를 얻기 위한 균주개발이 필요함을 알 수 있다.

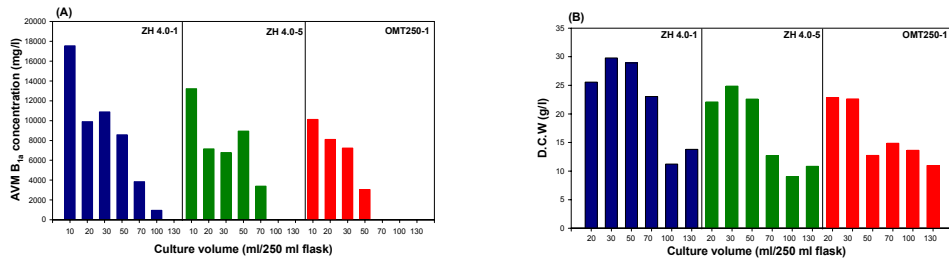


Fig. 13. Effect of culture volume on (A) AVM B<sub>1a</sub> production and (B) dry cell mass in various strains (2.2X soluble starch medium was used).

### 3) 탄소원의 종류 및 농도가 에버맥틴 B<sub>1a</sub> 생합성에 미치는 영향조사

에버맥틴은 acetyl-CoA가 전구체로 이용되는 polyketide 계열의 이차대사산물이므로 무엇보다도 탄소원의 농도에 큰 영향을 받을 것이라는 예상을 할 수 있다. 본 연구팀은 탄소원으로 사용되는 soluble starch의 농도를 변화시켜 에버맥틴 B<sub>1a</sub> 생합성량을 확인하였다. 사용균주는 변이주 중 안정성 및 생산성이 가장 높은 AZA4.5-2를 사용하였고, 250 ml flask에 30 ml의 부피로 배양을 수행하였다. 접종량은 10 % (v/v), 280°C에서 250 rpm으로 7일간 배양한 후 HPLC 정량분석을 수행하였다. 결과를 살펴보면 soluble starch의 농도가 증가할수록 에버맥틴 B<sub>1a</sub>의 생산성이 증가하는 경향을 보였고, 건조균체량 또한 탄소원의 농도가 증가할수록 뚜렷이 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 14). 상기의 결과로부터 기존 배지성분에 추가적인 탄소원을 첨가할 경우 에버맥틴 B<sub>1a</sub> 생산성이 증가할 것이라고 예상할 수 있었다.

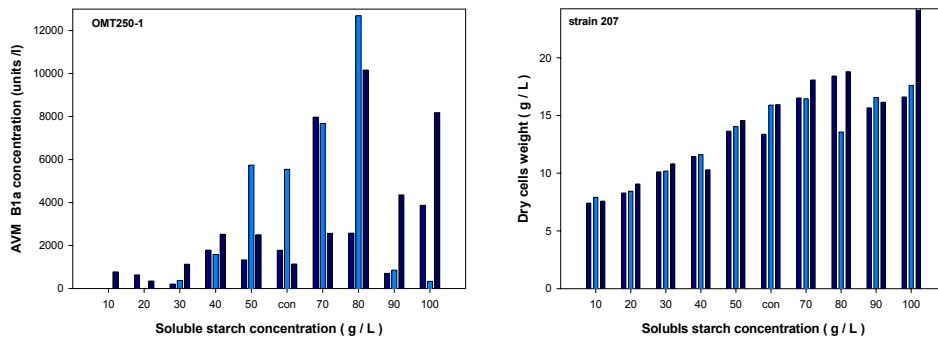


Fig. 14. Effect of concentration of soluble starch on AVM B<sub>1a</sub> production and dry cell mass in 250 ml flask cultivation (30 ml culture volume).

### 나. 발효조에서의 배양 생리학적 특성 조사 및 생산 안정성 조사

돌연변이 유도과 random screening 방법을 통하여 선별하였던 고생산 변이주 중 가장 안정적으로 AVM B<sub>1a</sub>를 생산하였던 ENP88-207 (OMT 저항성 변이주)를 2.5 L의 발효조 (조업부피 1.5L)에서 배양하여 AVM B<sub>1a</sub> 생산량과 용존산소량, pH, 균체량의 변화를 비교하였다. Sparger는 9-hole sparger를 사용하였고, 공기유입량은 1.0~1.5 vvm으로 조절하였다. 그리고 교반기는 6-flat-blade disc-turbine impeller (이하 turbine impeller)를 사용하였다.

교반기의 속도를 150 ~ 250 rpm으로 조절하여 배양한 경우, Fig. 15에서 나타난 바와 같이 용

존산소량이 배양 시작 후 급격히 낮아져 용존산소 수준이 “0”으로 유지되었다. 이 시기에는 생산 균주의 급속한 성장으로 인해 용존산소가 부족해지기 때문으로 보인다. 그리고 130시간 이후 용존산소가 증가하는데 이는 세포의 대사에 필요한 영양분이 고갈되어 용존산소의 흡수량이 줄어들었기 때문이다. pH의 변화를 살펴보면, 배양말기에 급격하게 증가하는 현상을 볼 수 있는데, 탄소원의 부족으로 인해 단백질을 탄소원으로 이용하면서 생성되는 암모니아 때문인 것으로 추측된다.

균체량의 변화를 살펴보면 배양 초기의 균체량이 상당히 높은 것을 확인할 수 있다. 이는 생산 배지의 몇몇 성분이 물에 녹지 않기 때문에 균체량 측정 시 오차로 작용한 것으로 보인다. 그러나 sample을 채취하여 확인한 결과 배양 후 약 3일 후부터 물에 녹지 않는 배지 성분들이 모두 소모되었기 때문에 실제 균체량의 증가는 점선의 경향을 보일 것으로 예상할 수 있다 (Fig. 15B).

AVM B<sub>1a</sub>의 생합성을 살펴보면 세포성장이 감소하는 시기부터 시작되는 전형적인 이차대사산물의 생합성 경향을 보여주었다. 생합성이 시작되는 시점은 용존산소 농도가 “0”이 해제되는 시점과 거의 일치하고, 매우 낮은 양으로 생산되었다(900 units/l). 이 결과로부터 AVM B<sub>1a</sub> 생합성이 용존산소의 유무에 매우 큰 영향을 받는다는 예상 할 수 있다

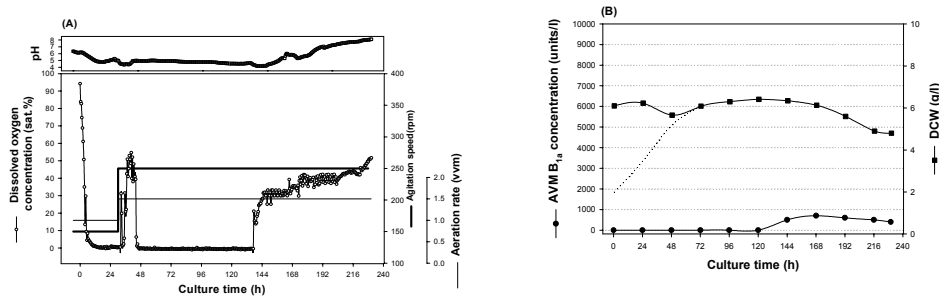


Fig. 15. Time course profiles of (A) DO concentration, agitation speed, aeration rate, and (B) dry cell mass and AVM B<sub>1a</sub> concentration in fermentation performed under the condition of DO limitation (9-hole sparger and 6-flat-blade disc turbine impeller used)

#### 다. AVM B<sub>1a</sub> 생산시 최적 용존산소 수준 탐색

상기의 실험 결과 AVM B<sub>1a</sub> 생합성이 용존산소 유무에 큰 영향을 받는다는 것을 확인하였기 때문에 교반기의 속도와 공기의 유입량을 동시에 조절하여 용존산소를 적정 수준 이상으로 유지하는 실험을 수행하였다. 교반기 속도의 최대값과 최소값은 각각 150 rpm과 300 rpm으로, 공기의 유입량은 1.0~1.5 vvm으로 설정하였다. 초반에 급격한 세포성장으로 인한 용존산소의 급격한 감소로 인해 원하는 수준의 용존산소인 30% (Fig. 16A)와 40% (Fig. 16B)를 유지하기 위해 교반기의 속도와 공기의 유입량이 급격히 증가하는 것을 확인하였다. 배양 후반부에 특정 영양분의 고갈로 용존산소가 증가하며, 따라서 교반기의 속도와 공기의 유입량도 자동적으로 점차로 감소하였다. 또한 용존산소의 농도가 점차 포화상태로 진행하면서 교반기의 속도와 공기의 유입량이 최소 설정값으로 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 배양 전반에 걸쳐 원하는 수준의 용존산소를 유지할 수 있었다.

용존산소 제한조건 (Fig. 15)과 비교하여 볼 때, 건조균체량은 두가지 조건 모두 약 40%정도 증가하였다 (Fig. 17A). 이로 인해 용존산소 제한 조건에서 용존산소 부족으로 인해 세포성장이 원활히 이루어질 수 없었다는 것을 알 수 있었다. AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 살펴보면 (Fig. 17B), 용존산소 제한조건의 경우 130시간부터 생합성이 시작된 반면, 용존산소를 30%와 40%로 유지시킨 경우에는 두 경우 모두 배양 48시간 이후부터 생합성이 시작되는 것으로 나타났고, 생산량 또한 용존

산소 30%조절의 조건에서는 최대 약 6배 (5,500 unit/l), 40% 조절의 조건에서는 약 9배 (8000 unit/l)정도 각각 증가하는 것으로 관찰되었다. 이는 플라스크 배양실험과 동일한 결과로서, 용존산소가 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성에 심각한 영향을 미친다는 것과, 용존산소가 높은 수준으로 존재해야만 AVM B<sub>1a</sub> 생합성량이 증가한다는 것을 제시해주는 결과이다.

또한 용존산소의 유지가 배양기간 중 어느 시점에서 AVM B<sub>1a</sub> 생합성에 영향을 미치는지를 조사하기 위해 배양 초반에는 용존산소를 “0”으로 유지시키다가 stationary phase에서 용존산소를 30%로 유지한 배양결과 (Fig. 18A)와 배양 초반부터 교반기의 속도를 350 rpm으로 유지하여, 배양 전반에 걸쳐 용존산소를 높은 수준으로 유지시키면서 배양 (Fig. 18B)한 결과를 비교하였다. 건조균체량은 두 조건에서 유사하였지만, AVM B<sub>1a</sub> 생합성능력을 비교해 본 결과(Fig. 19B), stationary phase에서 용존산소를 30%로 조절한 경우에는 용존산소가 “0”이 해제되는 96시간부터 AVM B<sub>1a</sub>가 생산되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 배양 초반에 용존산소를 30%로 유지한 배양 (Fig. 17A)의 경우 약 48시간부터 생합성이 시작되는 것과 비교하여 볼 때, 약 2일 정도 지연된 것이다. 그리고 최대 AVM B<sub>1a</sub> 생합성량 또한 초반부터 30%로 용존산소를 유지한 경우 (Fig. 17A)와 비슷하지만 생합성 속도가 더욱 느려짐을 확인하였다. 그리고 배양 초반부터 350 rpm으로 운전하여 용존산소를 높은 수준으로 조절한 경우 (그림 19B)에는 배양 48시간 후부터 AVM B<sub>1a</sub> 생합성이 시작되었고 최대 생합성량은 7,021 units/l였음을 확인하였다.

상기 결과로부터 다양한 배양 조건에서의 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 경향과 최대 생합성량을 비교해 보면 (Fig. 20), AVM B<sub>1a</sub>은 용존산소가 제한된 조건에서는 낮은 생산량을 보이고 (Fig. 20A), 배양기간 전반에 걸쳐 높은 수준으로 용존산소가 유지되는 경우에 활발하게 생합성되었으며 (Fig. 20B, C, E), 배양 전반에서 높은 교반기 속도를 유지한 경우 (Fig. 20E)보다 computer control system을 이용하여 전단응력을 최소화 한 경우 (Fig. 20C)에 높게 생합성되었다. 이러한 결과는 용존산소가 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 유전자의 turn-on이나 생합성 효소의 활성화에 막대한 영향을 끼치며, 생산균주가 전단응력에 의해 악영향을 받는다는 것을 제시해준다.

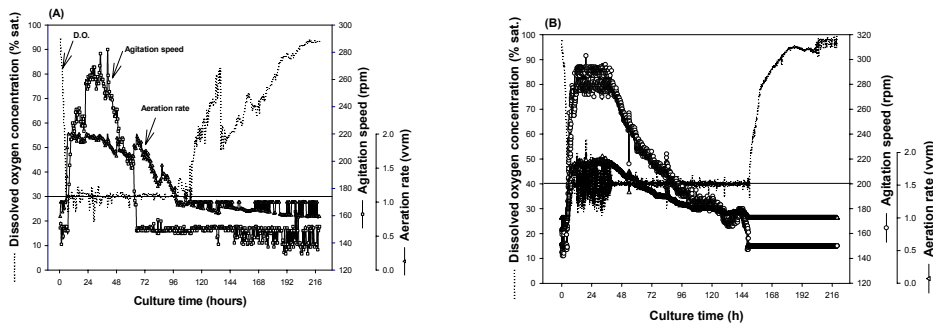


Fig. 16. Time-course profiles of D.O. concentration, agitation speed and aeration rate in (A) 30% D.O. and (B) 40% D.O. controlled-fermentations in 2.5 L bioreactor (9-hole sparger and turbine impeller used).

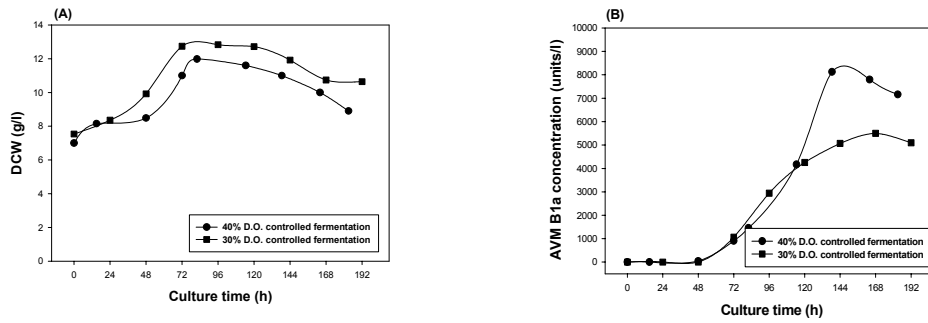


Fig. 17. (A) Dry cell mass and (B) AVM B<sub>1a</sub> production between 30% and 40% D.O. controlled-fermentations in 2.5L bioreactor.

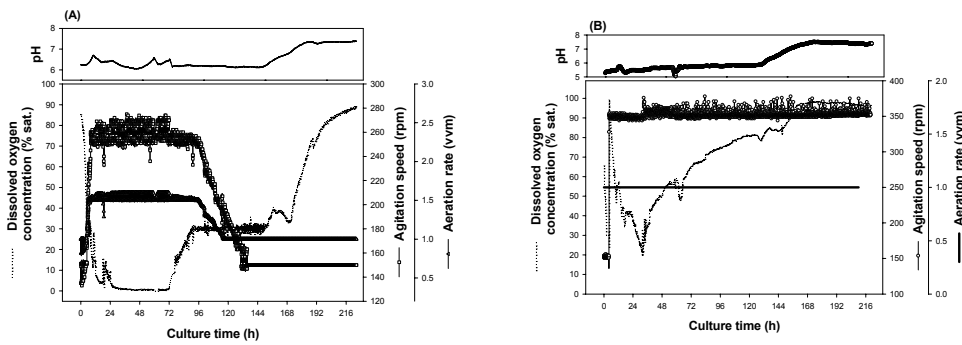


Fig. 18. Time-course profiles of D.O. concentration and agitation speed and aeration rate in fermentations performed (A) under the conditions of 30% D.O. during stationary phase and (B) D.O. controlled at high levels in 2.5 L bioreactor (9-hole sparger and turbine impeller used).

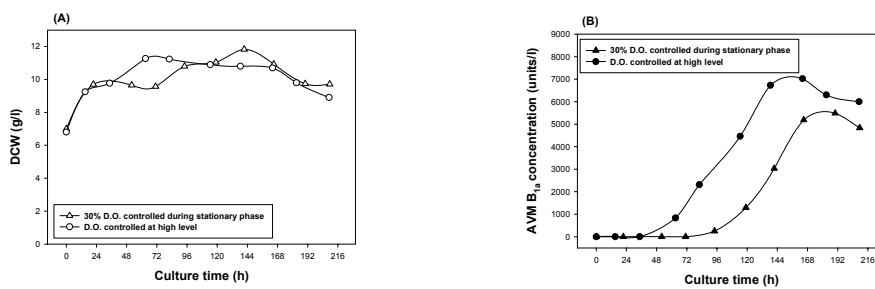
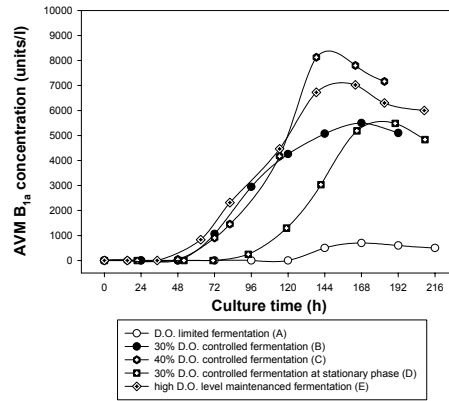


Fig. 19. (A) dry cell mass and (B) AVM B<sub>1a</sub> production in fermentations performed under the conditions of 30% D.O. during stationary phase and D.O. controlled at high levels in 2.5 L bioreactor.



	Maximum AVM B <sub>1a</sub> concentration (units/l)	D.C.W at maximum AVM B <sub>1a</sub> concentration (g/l)	Specific production (units AVM B <sub>1a</sub> /g DCW.)
A	900	4.9	183.6
B	5500	10.5	523.8
C	8125	10.8	752.3
D	5487	9.74	563.3
E	7021	10.7	656.1

Fig. 20. Comparison of AVM B<sub>1a</sub> production according to various fermentation conditions in 2.5 L bioreactor.

#### 라. 산소전달 특성 및 효율적 산소공급장치 설계

기존에 사용하던 9-hole sparger와 배양액 내로 매우 작은 공기방울이 공급되도록 고안된 개량형 sparger를 자체 제작하여 2.5 L 발효조에서 생산균주를 배양 시 용존산소와 교반기의 속도 및 공기유입량의 변화양상을 살펴보았다. 이전의 실험 결과, 9-hole sparger를 이용할 경우, 원활하게 산소를 공급하기 위해서는 교반속도를 350 rpm 정도로 유지시켜야 했기 때문에, 개량형 sparger를 이용한 배양에서도 동일하게 교반속도를 350 rpm으로 유지하며 비교실험을 수행하였다. 두 조건 모두 공기유입량은 0.5~ 1.0 vvm으로 조절하였다. 용존산소의 변화를 살펴보면 9-hole sparger의 경우 (Fig. 21A), 배양 24시간이 경과된 시점에서 용존산소가 포화용존산소의 20%수준까지 감소하다가 천천히 증가한 반면, 개량형 sparger의 경우 (Fig. 21B)에는 배양기간 전반에 걸쳐 높은 수준으로 용존산소가 유지되는 것으로 나타났다. 두 가지 조건 모두에서 용존산소의 공급이 원활하였기 때문에 배양 48시간 이후부터 AVM B<sub>1a</sub>가 생합성되기 시작하였다. 최고 AVM B<sub>1a</sub> 생합성량은 9-hole sparger의 경우 7,000 unit/l이고 개량형 sparger의 경우 7,600 unit/l로서 거의 유사하였고 (Fig. 22B), 건조 균체량은 개량형 sparger가 9-hole sparger 보다 약 30% 높게 나타났다 (Fig. 22A).

이 두 종류의 sparger에 대하여 산소전달 계수 ( $k_{La}$ )를 dynamic method를 이용하여 조사하였다. 교반기의 속도와 공기 공급량에 따른 용존산소의 변화를 컴퓨터를 이용하여 받아들이고 용존산소의 변화를 측정된 결과 중 하나를 Fig. 23에 나타내었다. 배양액 대신 증류수를 이용하였고,

공기의 공급량을 1.0 vvm으로 고정하고 각 sparger에서 교반기의 속도에 따른 용존산소의 결과를 ‘실험재료 및 방법’에 제시한 식에 의해 계산하였고, 그 결과를 Fig. 24에 제시하였다. 각각의 교반 속도에 대해서 정확한 직선이 얻어진 점으로 보아 실험이 정확히 수행되었음을 확인할 수 있었으며, 또한 교반속도의 증가에 따라 산소 전달효과가 증가하여 산소전달계수인 기율기값이 증가하는 것으로 관찰되었다. 교반기의 속도에 따른  $k_La$ 를 계산한 결과, 동일한 교반기 속도에서 개량형 sparger가 9-hole sparger보다 약 2배정도 높은 산소전달 계수를 나타내었다 (Fig. 25A). 이 것은 개량형 sparger가 공기를 보다 작게 공급하여, 배양액과 접촉이 가능한 공기의 표면적이 늘어나므로 산소전달이 더욱 원활히 이루어졌기 때문으로 판단된다.

한편 교반기의 속도를 250 rpm으로 고정하고 두 가지 sparger를 이용하여 공기 공급량에 따른 산소전달계수를 알아보았다 (Fig. 25B). 교반기의 속도에 따른  $k_La$ 의 증가와 동일하게, 개량형 sparger를 이용한 조건에서 더욱 높게 나타났다. 그러나 공기공급량을 1.0vvm 이상으로 증가시킬 경우 산소전달계수의 증가는 거의 이루어지지 않았다. 이는 빠른 공기의 공급에 의해 impeller 주위로 공기가 몰려 있다가 배양액에 녹지 않고 밖으로 즉시 빠져나가는 "channeling 현상"에 의한 것이라 추측된다. 두 가지 sparger 모두에서 교반기의 속도를 증가시킨 경우의 산소전달계수는 약 2배정도 증가하지만 공기공급량을 증가시킨 경우는 약 0.5배 정도의 증가하는 것으로 나타났다. 이것은 미생물의 발효에 있어서 교반기의 속도를 증가시키는 것이 공기 공급량을 증가시키는 것보다 산소전달을 증가시키는데 더욱 효율적이라는 사실을 보여주는 결과라 하겠다.

개량형 sparger를 이용할 경우, 동일한 교반기 속도에서 9-hole sparger보다 훨씬 높은 산소전달률을 보였기 때문에 이후의 실험에서는 모두 개량형 sparger를 이용하여 배양 실험을 수행하였다.

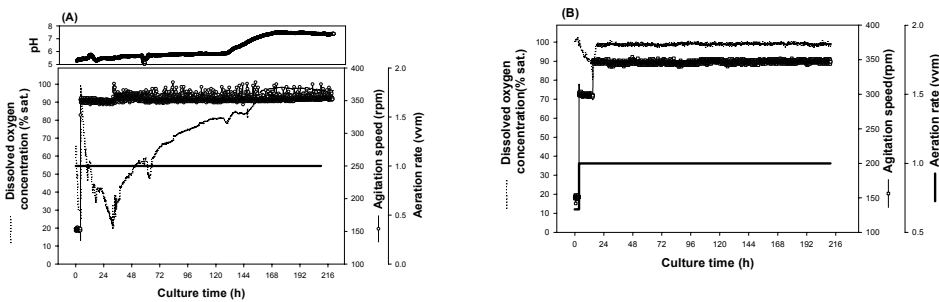


Fig. 21. Time-course profiles of D.O. concentration, agitation speed and aeration rate in fermentations performed with (A) 9-hole sparger and (B) STR sparger in 2.5 L bioreactor (6-flat-blade disc-turbine impeller used).

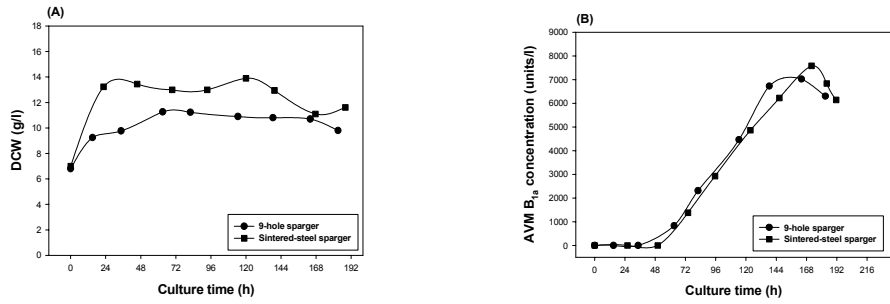


Fig. 22. Dry cell mass (A) and AVM B<sub>1a</sub> production (B) in fermentations performed with 9-hole sparger and STR sparger in 2.5 L bioreactor.

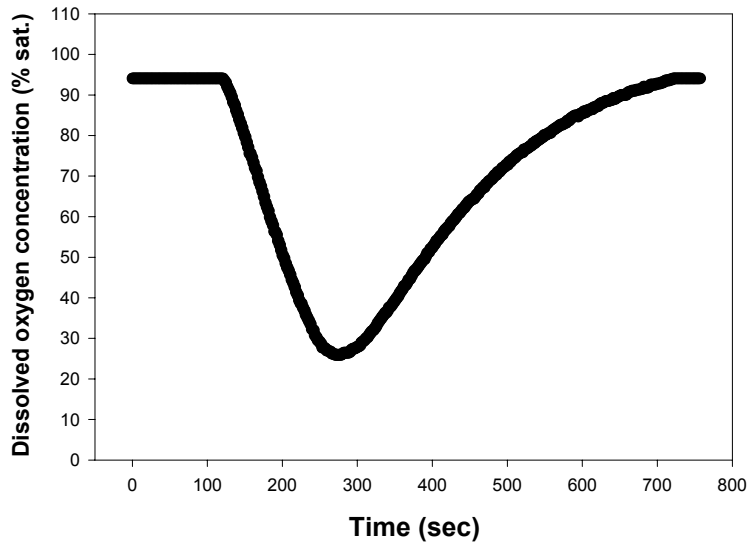


Fig. 23. Change in dissolved oxygen concentration according to time for determination of  $k_L a$  by use of dynamic method.



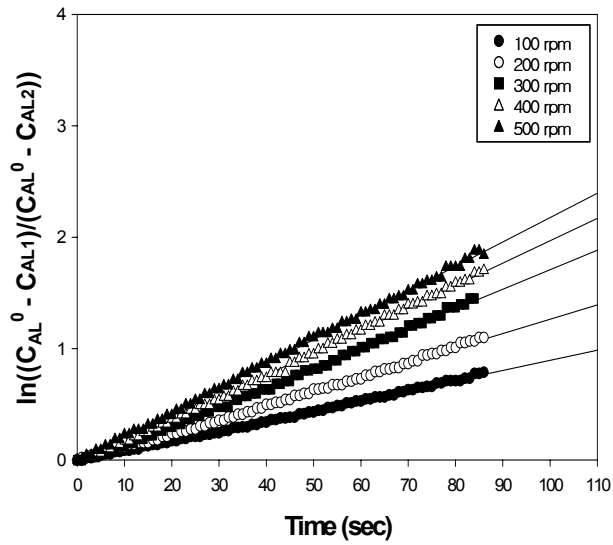


Fig. 24. Real example for the plot of  $\ln((C_{AL}^0 - C_{AL}^1)/(C_{AL}^0 - C_{AL}^2))$  versus  $(t_2 - t_1)$  for  $k_L a$  determined by the dynamic method (agitation speed from 100 rpm through 500 rpm with a fixed aeration rate 1vvm).

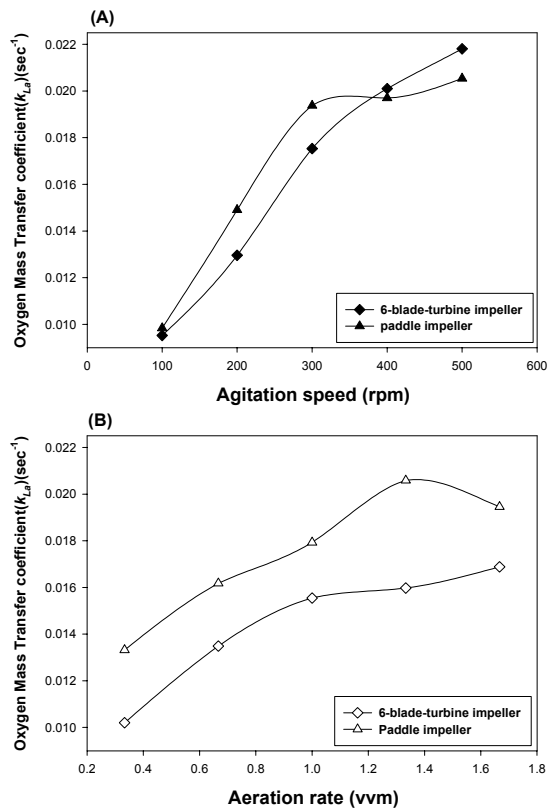


Fig. 25. Comparison of oxygen mass transfer coefficient ( $k_L a$ ) as a function of (A) agitation speed and (B) aeration rate between 9-hole sparger and sintered steel sparger.

## 마. 전단응력 영향 평가 및 분석

### 1) 교반기의 회전 속도에 따른 영향 : 생산균주의 형태학적 변화 및 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 조사

일반적으로 균사형성 미생물은 발효조 배양 시 산소전달과 혼합을 위해 사용되는 교반기로 인한 전단응력 (shear stress)에 매우 민감한 것으로 알려져 있다. 교반기에 의한 공기의 분쇄는 산소전달에는 효율적이지만 세포의 측면에서 볼 때 세포형태 및 대사 등에 심각한 변화를 초래한다.

상기의 실험에서 확립된 최적의 공기 공급기인 개량형 sparger를 이용하여 교반속도가 AVM B<sub>1a</sub> 생산과 생산균주의 성장 및 형태학적 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 공기 공급량을 0.5~1 vvm으로 조절하고 교반기의 속도를 250, 350, 450 rpm으로 각각 고정하여 실험 한 결과 개량형 sparger의 산소전달률이 높기 때문에 용존산소는 모든 조건에서 배양 전반에 걸쳐 80% 이상의 수준으로 유지되는 것을 관찰할 수 있었다 (data 미제시). 모든 조건에서 건조균체량은 평균 15 g/l 정도로 유사하였으나 (Fig. 26A), 생산균주의 pellet 크기를 살펴본 결과 (Fig. 26B) 교반속도가 증가할수록 점차적으로 감소하는 현상을 관찰할 수 있었다. 이는 교반속도가 증가함으로써 생산균주가 더욱 큰 전단응력을 받아 나타난 현상으로 판단된다. AVM B<sub>1a</sub> 생합성 경향을 살펴보면 (Fig. 27), 모든 경우에서 배양 48시간부터 생합성이 시작되는 것을 알 수 있다. 이것은 앞에서 언급한 바대로 배양 초반에 용존산소가 충분히 공급되어 용존산소 부족에 의한 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 저해 현상이 없었기 때문인 것으로 판단된다. 그리고 최대 생산량은 동일하게 약 7일 후에 도달하였다. 각각의 조건에서 AVM B<sub>1a</sub> 생합성량을 비교해본 결과, 250 rpm으로 배양한 경우가 가장 높은 생산성을 보였고 (9,867 units/l), 교반기의 속도가 증가할수록 생합성량이 오히려 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 본 실험균주 또한 타 균사형성 미생물과 같이 전단응력에 대해 매우 민감한 특성을 보임을 알 수 있었다.

상기의 결과를 요약하기 위해서 Fig. 28에 개량형 sparger와 9-hole sparger를 이용하였을 때, 각각의 rpm에서의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 제시하였다. 9-hole sparger의 경우 350 rpm까지 교반속도가 증가할수록 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 큰 폭으로 증가하는 것으로 보아 용존산소가 AVM B<sub>1a</sub> 생합성에 막대한 영향을 미침을 알 수 있었다. 이와는 대조적으로 개량형 sparger의 경우에는 낮은 교반속도인 250 rpm에서 가장 높은 생산성을 보였다. 이러한 현상은 산소전달능력이 뛰어난 개량형 sparger를 이용할 경우 (9-hole sparger의 2배), 교반속도를 상당 수준 낮추어도 AVM B<sub>1a</sub> 생합성에 막대한 영향을 미치는 용존산소가 원활하게 공급될 뿐만 아니라 낮은 교반속도로 인해 균사형성 미생물에 치명적인 전단응력이 최소화되었기 때문에 나타난 결과로 판단된다. 요약하면, 용존산소에 대하여 매우 의존적인 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성을 위하여 산소전달률이 높은 개량형 sparger로 공기를 공급함으로써 전단응력을 최소화한 결과, 배양 중 용존산소가 제한된 조건 (900 units/l)에 비해 약 11배 이상 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성이 증가하는 것으로 관찰되었다.

### 2) 교반기의 종류에 따른 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 및 산소전달계수 비교

상기의 실험 결과에 의해, AVM B<sub>1a</sub>는 용존산소의 수준에 의해 그 생합성 여부가 결정되지만, 생산균주는 타 균사형성 미생물과 같이 전단응력에 매우 큰 영향을 받는다는 것을 확인하였다. 따라서 용존산소를 높은 수준으로 유지하면서 동시에 전단응력을 최소화하는 조건을 확립하여야 한다. 이를 위해 두 종류의 impeller 즉, 기존에 사용하던 turbine impeller와 paddle impeller를 사용하여 이들의 산소전달 능력을 비교 조사하고자, dynamic method에 의해 산소전달계수를 측정하였다 (Fig. 29).

각 교반기의 속도에 따른 산소전달계수 ( $k_{La}$ )를 측정된 결과, 300 rpm 이하에서는 paddle impeller가 약 1.2배 높게 나타났으나, 300 rpm 이상으로 교반속도를 증가시킨 경우에는 더 이

상 증가하지 못하였고, 400 rpm에서는 오히려 turbine impeller보다 감소하였다 (Fig. 29A). 또한 공기 공급량에 따른 산소전달계수를 비교한 결과 paddle impeller의 경우, 1.4 vvm의 공기 공급 시에는 channeling 현상이 발생하여 산소전달계수가 오히려 감소하는 현상이 나타났다 (Fig. 29B). 따라서 공기 공급량이 증가한다고 해서 산소공급량이 동일한 경향으로 증가하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

산소전달계수의 측정 결과, 400 rpm 이하에서는 turbine impeller보다 paddle impeller의 산소전달률이 높음을 확인하였으므로, paddle impeller 이용 시 최적의 교반속도를 결정하기 위해 교반속도를 250 rpm과 350 rpm으로 유지하여 배양하였다. 건조 균체량과 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성을 비교해 본 결과 (Fig. 30A), 배양 96시간 후에 두 가지 조건 모두 급격히 감소하는 것을 관찰할 수 있다. 이는 배양 중 paddle impeller의 높은 blade height (65 mm)에 의해 배양액의 수면과 접촉하여 기포가 다량 생성되었고, 생성된 기포에 의해 생산균주가 발효조의 glass vessel에 부착되었기 때문으로 판단된다. 한편 AVM B<sub>1a</sub> 생합성면에서 볼 때 (Fig. 30B), 250 rpm에서 1 liter당 약 6,000 units가 생산된 반면 350 rpm에서는 거의 생산이 되지 않은 것으로 나타났다. 이는 turbine impeller를 이용해서 교반속도를 250 rpm으로 유지한 경우(약 10,000 units/l)에 비해 매우 낮은 생산성인데, 그 이유는 paddle impeller의 높은 height로 인한 생산균주의 손실과, 높은 교반속도 시 paddle impeller에서 turbine impeller에 비해 더욱 큰 전단응력이 발생하기 때문으로 추측된다.

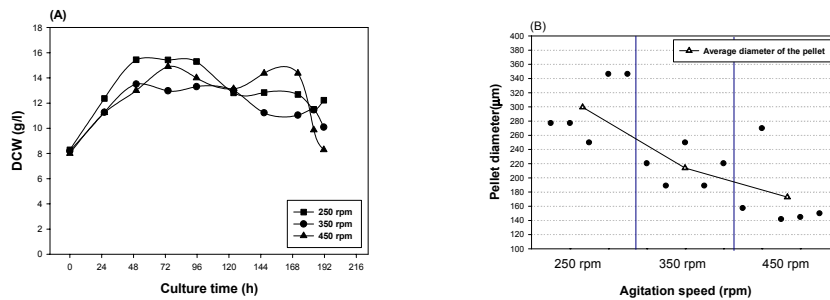


Fig. 26. (A) dry cell mass and (B) the pellet diameter according to agitation speed in fermentations performed with hole sparger in 2.5 L bioreactor (6-flat-blade disc turbine impeller used).

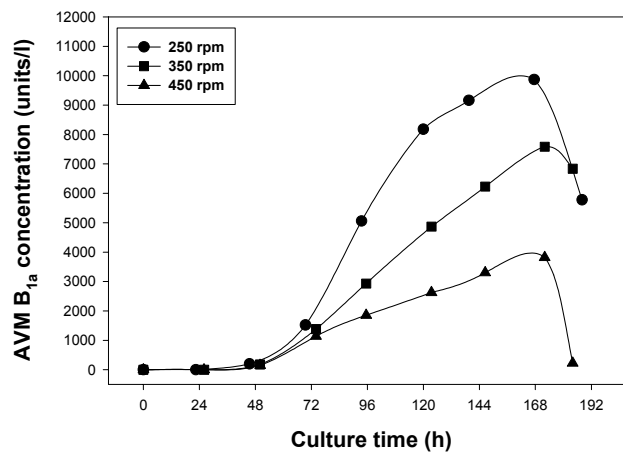
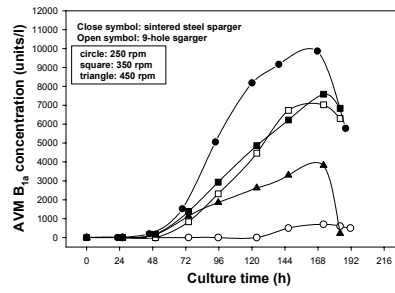


Fig. 27. AVM B<sub>1a</sub> production according to agitation speed in fermentations performed with hole sparger in 2.5 L bioreactor (6-flat-blade disc turbine impeller used).



	Maximum AVM B <sub>1a</sub> concentration (units/l)	
	개량형 sparger	9-hole sparger
250 rpm	9867.4	900
350 rpm	7582.6	7021.5
450 rpm	3816.5	N.D

Fig. 28. AVM B<sub>1a</sub> production according to agitation speed in fermentations performed with 9-hole sparger and 개량형 sparger (6-flat-blade disc turbine impeller used).

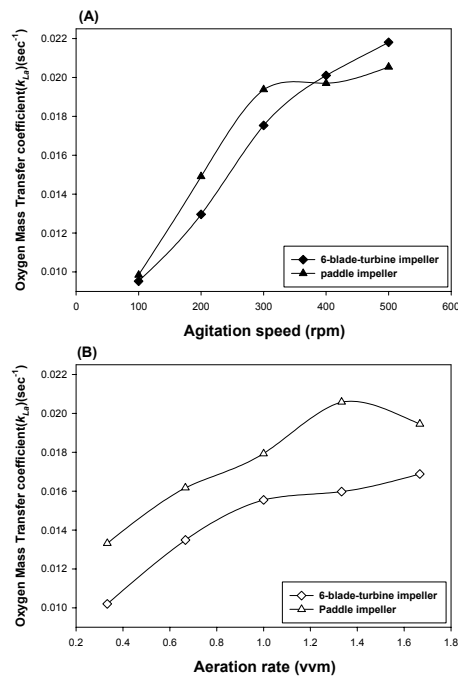


Fig. 29. Comparison of oxygen mass transfer coefficient( $k_{La}$ ) as a function of (A) agitation speed and (B) aeration rate between 6-flat-blade disc turbine impeller and paddle impeller.

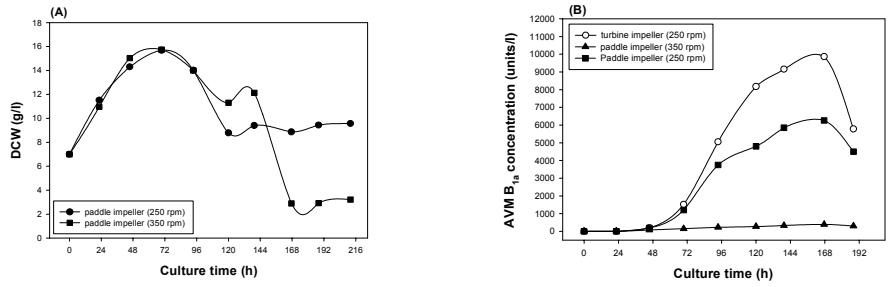


Fig. 30. (A) dry cell mass and (B) AVM B<sub>1a</sub> production according to agitation speed in fermentations performed with paddle impeller in 2.5 L bioreactor.

**바. 유가식 배양을 통한 에버랙틴 B<sub>1a</sub> 생산성 향상 연구**

1) 일시적으로 영양분을 공급하는 유가식 배양을 통한 생산균주의 배양 생리적 특성 연구

탄소원으로 이용되는 soluble starch의 농도가 증가할수록 에버랙틴 B<sub>1a</sub> 생합성량이 증가하지만, 배양 초반부터 생산균주가 대사하기 쉬운 탄소원이 다량 존재할 경우 catabolite repression/inhibition에 의해 에버랙틴 B<sub>1a</sub> 생합성이 급격히 감소된다는 결과 (데이터 미제시)로 인해, 본 연구팀은 유가식 배양의 필요성을 인식하게 되었다.

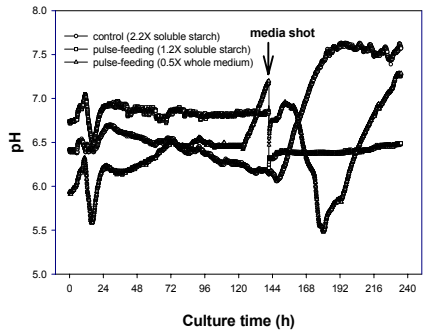


Fig. 31. Time-course profiles of pH under the conditions of batch culture and pulse-fed batch cultures (1.2X soluble starch or 0.5X whole medium is added to fermentors at 144 hours) in 2.5 L bioreactor.

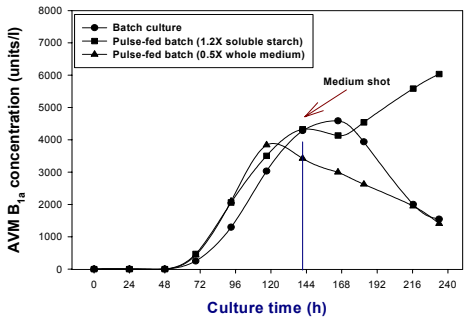


Fig. 32. Time course profiles of AVM B<sub>1a</sub> production under the conditions of batch and pulsed-fed batch culture (1.2X soluble starch or 0.5X whole medium is added to fermentors) in 2.5 L bioreactor

본 연구팀은 이전의 발효기 실험을 통해 생산균주의 배양 시 약 168시간 이후에 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성량이 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 이는 배지 내에 존재하는 영양분 중 특정 성분이 고갈되었기 때문으로 판단된다. 이 시기에 외부에서 영양분을 추가로 공급할 경우, AVM B<sub>1a</sub> 생합성 경향이 어떻게 변화하는지 하기 위해 다음과 같은 실험을 고안하였다. 1.2X soluble starch (132 g)와 0.5X의 전체 배지를 각각 증류수에 용해시켜 부피가 300 ml이 되도록 한 후에 발효조 배양 약 144시간에 일시적으로 공급하는 유가식 배양을 수행하였다. pH의 변화양상을 살펴보면 회분식 배양의 경우 144시간 이후에 pH가 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 31). 이러한 현상은 배양액 내의 탄소원의 고갈로 인해 생산균주가 질소원의 탄소를 이용하게 되었고, 이로 인해 부산물인 암모니아가 생성되었기 때문으로 판단된다. 그러나 144시간에 추가적으로 영양분을 공급한 유가식 배양의 경우 pH가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 본 현상은 생산균주가 추가적으로 공급된 탄소원을 대사하여 유기산을 형성하기 때문으로 판단된다.

AVM B<sub>1a</sub> 생합성을 살펴보면, 회분식 배양의 경우 약 168시간 이후부터 급격히 감소하는 것을

관찰할 수 있었고 (Fig. 32, 4700 units/l), 0.5X의 전체 배지를 첨가한 유가식 배양의 경우, 회분식 배양의 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 경향과 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 건조균체량을 살펴 보면 (Fig. 33), 0.5X의 전체배지를 첨가한 이후에 건조균체량이 급격히 증가하는 현상을 관찰할 수 있다. 이는 0.5X 전체 배지가 추가로 공급될 경우 첨가된 영양분이 거의 대부분 1차 대사에 사용되었기 때문인 것으로 판단된다. 1.2X soluble starch (132 g)을 공급한 유가식 배양의 경우를 살펴보면, 168시간까지 회식효과에 의해 AVM B<sub>1a</sub> 생합성량이 약간 감소하다가 시간이 갈수록 다시 증가하여 최고 약 6000 units/l에 도달하였다 (Fig. 32). 유가식 배양과 회분식 배양간의 건조균체량을 비교해 보면 약 5 g/L의 차이를 보인다. 유가식 배양의 경우, 외부에서 첨가되는 탄소원의 부피 (300 ml)를 고려하여 기존 배지 성분을 농축한다 (1500 ml에 해당하는 영양분을 1200 ml의 증류수에 용해시킴). 따라서 유가식 배양에서 배지의 농도가 짙어지게 되므로 회분식 배양보다 세포의 성장이 더욱 활발히 이루어진 것으로 판단된다. 상기의 실험을 통해 AVM B<sub>1a</sub> 생합성에 있어서 탄소원이 매우 중요한 요인으로 작용한다는 것을 알 수 있었다.

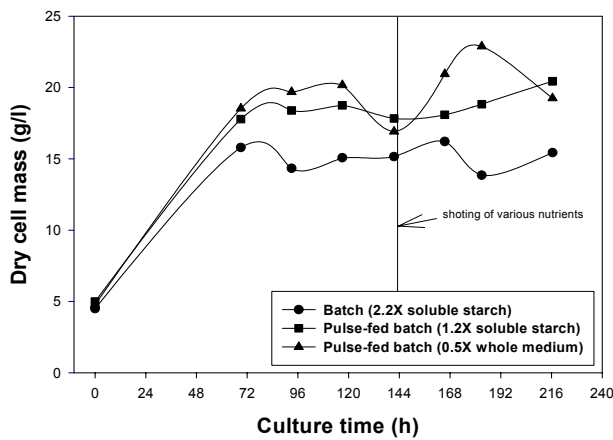


Fig. 33. Time-course profiles of dry cell mass under the conditions of batch and pulse-fed batch culture (1.2X soluble starch or 0.5X whole medium is added to fermentations) in 2.5 L bioreactor.

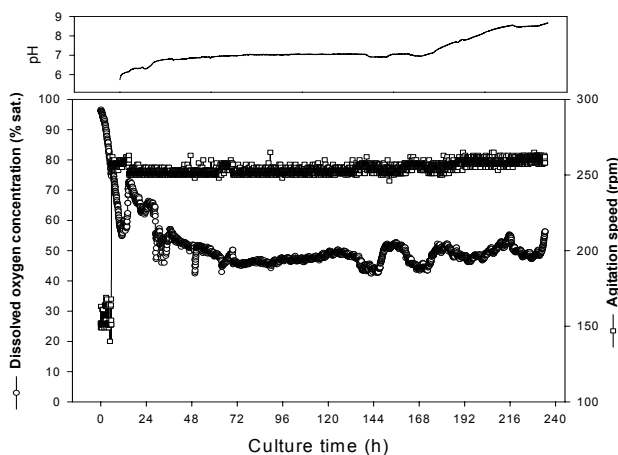


Fig. 34. Time-course profiles of DO concentration and agitation speed and pH in batch culture in 2.5 L bioreactor (carbon source of production medium is 1X soluble starch)

- 2) 연속적인 유가식 배양 시 공급되는 탄소원의 종류가 AVM B<sub>1a</sub> 생합성에 미치는 영향 조사  
 상기의 실험을 통해 탄소원이 추가로 공급될 경우 AVM B<sub>1a</sub> 생합성량이 증가한다는 사실을 확

인한 후, 연속적으로 탄소원을 공급하는 유가식 배양 조건에서 추가 공급하는 탄소원의 종류가 AVM B<sub>1a</sub> 생합성에 미치는 영향을 확인하는 실험을 수행하였다. 대조군으로 회분식 배양 (1X soluble starch)을 수행하였고, 배양 시작 24시간 후부터 0.0347 ml/min의 속도로 1.2X soluble starch 및 동량의 glucose를 발효조 내로 각각 공급하는 유가식 배양을 수행하였다. Fig. 34~38에는 회분식 배양과 유가식 배양의 각종 profile을 나타내었다. pH 변화 양상을 살펴보면 대조군인 회분식 배양의 경우 168 시간부터 pH가 급격히 증가하는 반면, 두 가지 조건의 유가식 배양의 경우에는 pH가 낮게 유지되는 것을 관찰할 수 있다. 이러한 결과는 두 가지 조건의 유가식 배양의 경우 배양 전반에 걸쳐 탄소원이 공급되는 반면, 회분식 배양의 경우 추가적인 탄소원 공급이 없기 때문에 배양 말기로 갈수록 배양액 내에 존재하는 탄소원이 모두 고갈되기 때문으로 판단된다. 용존 산소의 변화양상을 살펴보면 세 가지 조건 모두 배양 기간 전반에 걸쳐 용존 산소 수준이 약 50% 이상 유지되는 것을 관찰할 수 있다. 이는 본 연구팀에서 자체 개발한 개량형 sparger의 높은 산소전달율에 의한 것으로 판단된다.

AVM B<sub>1a</sub> 생산량을 살펴본 결과, 회분식 배양 (1.0X soluble starch)의 경우, 배양 192 시간에 약 4000 units/l의 AVM B<sub>1a</sub>가 생산된 후 그 양이 감소하는 경향을 보인 반면, 1.2X soluble starch를 외부에서 공급한 유가식 배양의 경우, 배양 말기까지 지속적으로 증가하여 최고 9000 units/l를 생산하는 것을 볼 수 있다 (Fig. 38). 또한 1.2X glucose를 외부에서 공급한 경우, 배양 초반에는 soluble starch를 공급한 경우와 유사한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 보이지만 144시간 이후에 감소하는 것을 볼 수 있다 (5700 units/l). 본 실험의 결과를 요약하자면 다음과 같다:

첫째, 추가적으로 탄소원을 외부에서 공급하는 유가식 배양의 경우, 배양 전반에 걸쳐 탄소원이 공급되므로 polyketide 계열의 이차대사산물인 AVM B<sub>1a</sub> 생합성량이 회분식 배양에 비해 최고 100 % 이상 증가되었다.

둘째, 생산균주가 대사하기 쉬운 glucose보다는 soluble starch를 외부에서 첨가하는 경우, AVM B<sub>1a</sub> 생합성이 더욱 촉진되었다.

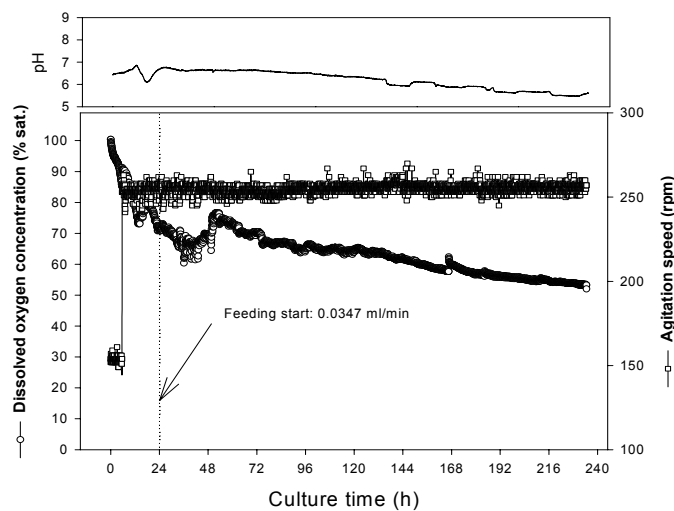


Fig. 35. Time-course profiles of DO concentration and agitation speed and pH in continuous fed-batch cultivation (1.2X soluble starch is added to fermentor by 0.0347 ml/min after 24 hours) in bioreactor

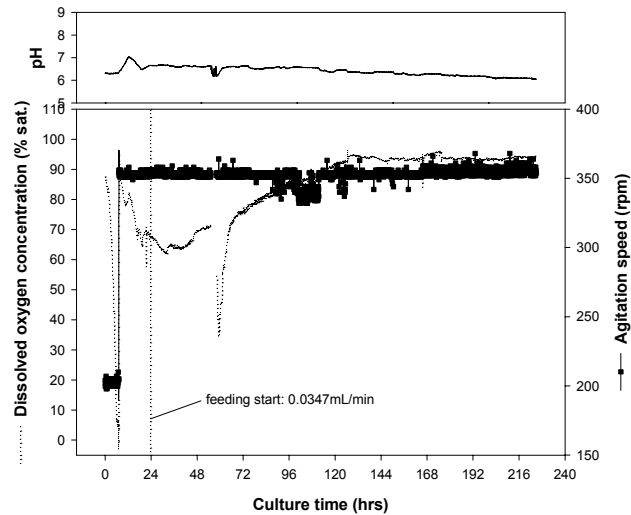


Fig. 36. Time-course profiles of DO concentration and agitation speed and pH in continuous fed-batch cultivation (1.2X glucose is added to fermentor by 0.0347 ml/min after 24 hours) in 2.5 L bioreactor.

### 3) 탄소원인 soluble starch의 농도가 AVMB<sub>1a</sub> 생합성에 미치는 영향 조사

앞서 수행한 실험에서는 생산균주가 사용하는 전체 soluble starch의 농도가 달랐기 때문에 회분식 배양과 유가식 배양간의 효율성을 비교할 수 없었다. 따라서 본 연구팀은 2.2X soluble starch를 첨가한 회분식 배양과 1X soluble starch의 기존 배지에 1.2X 와 1.5X soluble starch를 배양 시작 24시간 후부터 공급하는 유가식 배양을 수행하였다. Scale-up시 나타나는 문제점을 살펴보기 위하여 본 실험은 50L 발효조에서 수행하였다. 건조균체량을 살펴보면 이전의 결과와 같이, 유가식 배양에 비해 회분식 배양에서 높게 나타난 것을 볼 수 있다 (Fig. 39). 그리고 세 가지 조건에서의 AVMB<sub>1a</sub> 생합성량을 알아본 결과, soluble starch를 첨가하고 초반부터 배양한 회분식 배양에서 가장 높은 생산성을 보였다 (약 13000 units/l) (Fig. 40). 본 실험의 결과는 탄소원인 soluble starch의 농도가 2 배 이상 증가할지라도 catabolite repression/inhibition을 초래하지 않고, 오히려 활발한 이차대사를 유도한다는 사실을 입증해 준다. 따라서 이후의 모든 실험에서 기본 배지의 soluble starch 농도를 2.2배 증가시켜 사용하기로 결정하였다. 또한 50L 발효조에서 AVMB<sub>1a</sub>의 생산성이 높게 유지됨을 알 수 있었으며 향후 생산 scale에서의 실험을 통해 산업 시스템에 적합한 AVMB<sub>1a</sub> 생산공정을 개발하고자 한다.

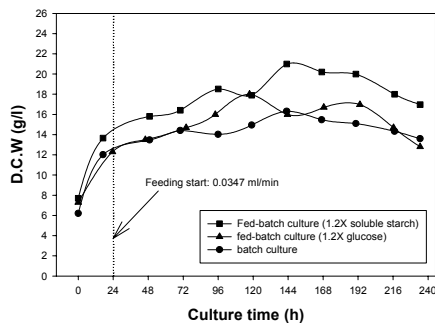


Fig. 37. Time-course profiles of dry cell mass in batch and continuous fed-batch cultivations in 2.5 L bioreactors.

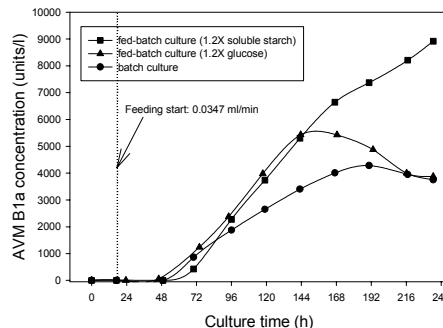


Fig. 38. Time-course profiles of AVMB<sub>1a</sub> productions in batch and continuous fed-batch cultivations in 2.5L bioreactors.



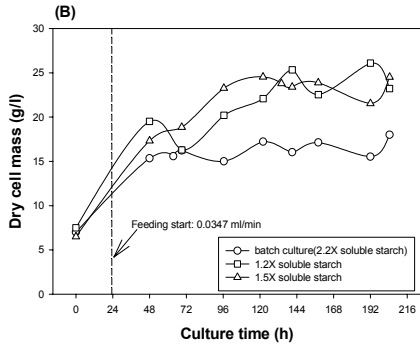


Fig. 39. Time-course profiles of dry cell mass in batch and fed-batch cultivations (1.2X or 1.5X soluble starch is added to fermentor by 0.0347 ml/min after 24 hours).

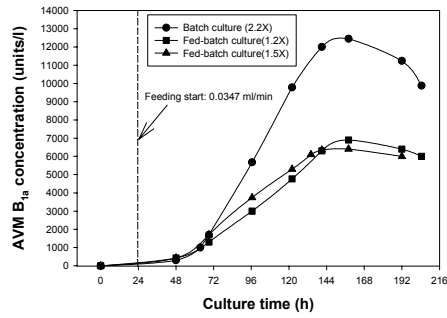


Fig. 40. Time-course of profiles of AVM B<sub>1a</sub> productions in batch and fed-batch cultivations (1.2X or 1.5X soluble starch is added to fermentor by 0.0347 ml/min after 24 hours).

#### 4) pH-stat fermentation을 통한 탄소원의 공급

상기의 결과로부터 2.2X soluble starch를 첨가하여 생산균주를 배양할 경우라도 약 144시간 이후에는 AVM B<sub>1a</sub> 생산량이 감소되고, 본 시점에서 pH의 급격한 증가 현상을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 탄소원의 고갈로 인한 결과라고 판단되었다.

본 연구팀은 pH가 급격히 증가하는 시점이 탄소원이 모두 고갈되는 시점과 일치한다는 사실에 착안하여 탄소원을 이용한 pH 유지 배양 (pH-stat fermentation)을 수행하였다. 즉 발효조에 설치되어 있는 pH 측정기의 산 펌프(acid pump)에 pH를 6.5로 조정된 soluble starch 및 glucose 농축 용액을 각각 연결하였다. 그 후에 회분식 배양을 시작한 후, 약 144시간부터 pH 측정기의 펌프를 작동시켜 발효조 내의 pH를 6.0으로 유지하도록 하였다. pH 변화경향을 살펴보면, 회분식 배양의 경우 144시간부터 pH가 급격히 증가하지만 glucose를 이용하여 pH를 유지하는 배양에서는 pH가 낮은 상태로 유지되는 것을 볼 수 있다 (Fig. 41). 그러나 soluble starch를 이용하여 pH를 유지하는 배양의 경우, pH 6.0을 유지하기 위해 다량의 농축 soluble starch 용액이 발효조 내로 공급되었음에도 불구하고 pH가 6.5이하로 감소하지 않았다. 이는 soluble starch가 천천히 대사되었기 때문인 것으로 판단된다. 건조균체량을 살펴보면 soluble starch를 이용한 경우 144시간 이후에 급격히 증가한 것을 알 수 있다 (Fig. 42). 이는 pH를 조절하기 위해 외부에서 공급한 soluble starch가 불용성의 상태로 이용되지 못한 채 배지 내에 존재하여 건조균체량에 포함되었기 때문으로 판단되었다. 또한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 비교해본 결과 (Fig. 43), 조절을 전혀 하지 않은 회분식 배양의 AVM B<sub>1a</sub> 생합성량에 비해, soluble starch 및 glucose를 이용하여 pH를 유지시키는 배양에서 오히려 낮은 생산성을 보였다.

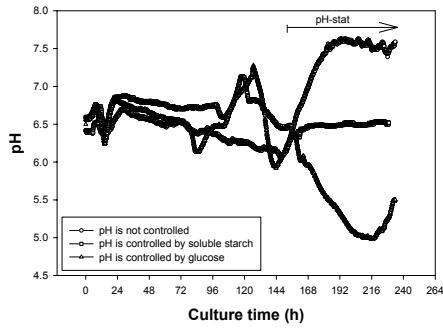


Fig. 41. Time-course profiles of under the conditions of pH-stat fermentations and pH-not controlled fermentation in 2.5 L bioreactors.

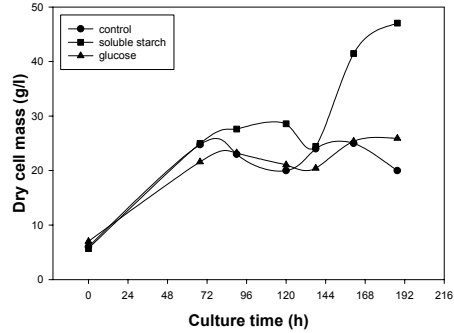


Fig. 42. Time-course profiles of dry cell mass under the conditions of pH-stat fermentations and pH-not controlled fermentation in 2.5 L bioreactors.

AVM B<sub>1a</sub>와 같은 이차대사산물 생합성에 있어서 세포비성장속도 ( $\mu$ )는 정밀하게 조절되어야 한다. 그러나 상기의 결과는 세포의 배양생리적 상태를 확인할 수 없는 상태에서 추가로 탄소원이 공급됨으로 인해 세포비성장속도가 변화하게 되어 AVM B<sub>1a</sub> 생합성이 중단되었기 때문에 판단되었다. 상기의 방법으로 유가식 배양을 반복적으로 수행한 결과, AVM B<sub>1a</sub> 생산성의 재현성이 일정하지 않은 것으로 나타났다 (데이터 미제시). 이러한 유가식 배양의 문제점을 해결하기 위해서, 컴퓨터에서 자동으로 연산된 fermentation 변수를 이용하여 생산균주의 배양생리적 상태를 적시에 확인 할 수 있는 배양공정 자동화시스템을 확립하였으며 (하기에 결과 제시), 이를 바탕으로 영양분의 공급시점 및 영양분의 속도가 자동으로 조절되는 유가식 배양 공정을 확립하고자 하였다.

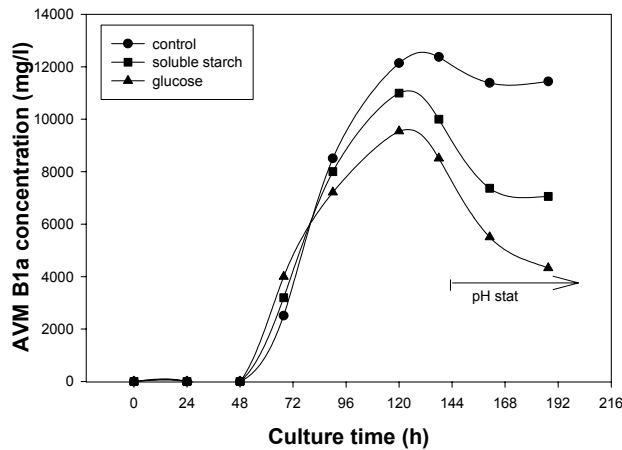


Fig. 43. Time-course profiles of AVM B<sub>1a</sub> production under the conditions of pH-stat fermentations and pH-not controlled fermentation in 2.5 L bioreactors.

#### 사. 순수 산소 공급을 통한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 향상 연구

본 연구에서는 용존산소 제한 문제를 해결하기 위해 순수 산소를 공급하는 발효조 배양을 수행하였다. 생산 배지는 2.2X soluble starch 배지를 이용하였고, 발효기는 5 L bottom-driven fermentor (조업부피 3 L)를 이용하였다. 그리고 sparger는 sintered-steel sparger, impeller는 2개

의 6-flat-blade turbine impeller를 이용하였다. 순수 산소의 공급량은 0.5 ~ 1.5 L/min으로, 그리고 대기 공급량은 2.5 ~ 1.5 L/min으로 조절하여 배양 전반의 통기량은 1 vvm이 되도록 조절하였다 (Fig. 44A). 또한 교반속도는 용존산소 수준을 고려하여 150 ~ 350 rpm으로 조절하였다. 또한 Fig. 44B에 나타난 공기의 온도 및 압력을 근거로 이산화탄소 생성율 (*CER*)을 계산하여 생산균주의 상태를 실시간 측정 및 분석하였다. Fig. 45A에는 순수산소를 공급한 조건과 그렇지 않은 조건의 용존산소 변화 양상을 나타내었다. 순수산소를 추가로 공급하지 않은 경우, 교반속도를 350 rpm까지 증가시켰음에도 불구하고 10 % 이하의 용존산소를 나타내었다. 그러나 순수산소를 공급한 조건에서는 배양 전반에 걸쳐 용존산소 수준인 거의 100 % (1기압 공기에 대한 용존산소의 포화용해도를 100%로 정의함)를 유지하였다. 두 조건에서의 pH 변화양상을 살펴보면 (Fig 45B), 순수산소를 공급하지 않는 경우보다 순수산소를 공급하는 경우에서 pH 변화가 빠른 것으로 관찰되었는데 이러한 현상은 순수 산소를 공급하여 배양액 내의 용존산소 결핍이 해제되어 생산균주의 대사가 활발히 이루어졌기 때문으로 판단된다. 배양 192시간에 순수산소를 공급한 조건에서는 pH가 다시 증가하는 경향을 보이는 반면, 순수산소를 공급하지 않는 경우는 192시간 이후에도 계속적으로 pH가 감소하였다. 이로부터 대조군과 비교하여, 순수산소를 공급한 조건에서 탄소원의 소모가 빠르게 이루어 졌음을 알 수 있다.

Fig. 46에는 두 가지 경우에서의 이산화탄소 생성율 (*CER*)을 나타내었다. 본 실험에서는 순수 산소 첨가에 의해 배출가스 중 산소의 농도가 가스분석기의 산소 측정 범위 (30 %)를 벗어났기 때문에 산소흡수율 (*OUR*)의 측정이 불가능하였다. 그러나 respiratory quotient (RQ)가 거의 1이라는 사실에 착안하여 산소흡수율 대신 이산화탄소 생성율을 이용하여 생산균주의 대사상태를 관찰할 수 있었다. 순수산소를 공급한 경우, 배양 24시간에 약 70 mmol CO<sub>2</sub>/L/hr의 이산화탄소 생성율을 보인 후 감소하는 경향을 보였다. 그러나 용존산소를 공급하지 않은 조건에서는 배양 초반부에 배양기에서 제공할 수 있는 용존산소가 생산균주의 산소요구량에 미치지 못해 이산화탄소 생성율이 약 30 mmol CO<sub>2</sub>/L/hr로 감소한 것으로 관찰되었다. Fig. 47에는 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 및 건조균체량을 나타내었다. 순수산소를 공급하지 않는 경우, 약 70시간이 경과한 후에야 비로소 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성이 시작되어 최고 12,500 unit/l의 생산성을 보였다 (Fig. 47A). 주목할 점은 Fig. 45A의 용존산소 농도 변화 경향에 나타난 바와 같이, AVM B<sub>1a</sub>의 생합성이 개시되는 시점이 용존산소의 결핍이 해소되는 시점과 일치한다는 점이다. 상기 현상과는 대조적으로, 순수산소를 공급해서 배양하는 경우에는 약 24시간 이후부터 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성이 시작되었으며, 이는 대조군에 비해 약 48시간이나 생산 시점이 앞당겨진 매우 주목할 만한 결과이다. 또한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성도 대조군에 비해 약 30 % 향상된 것으로 나타났다. 이는 AVM B<sub>1a</sub> 생합성에 있어서 용존산소가 미치는 영향을 직접적으로 보여주는 중요한 결과라고 할 수 있다. 즉, 생산균주가 대사하기에 충분한 용존산소가 존재할 경우, 세포의 성장과 이차대사산물의 생합성이 동시에 이루어짐으로써 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 증가뿐만 아니라 배양시간도 단축될 수 있음을 알 수 있었다. 두 가지 배양 조건에서의 건조균체량을 비교해 본 결과, 대조군에 비해 순수산소를 공급해 준 배양의 경우에 세포 성장도 활발히 이루어 졌음을 확인할 수 있었다 (Fig. 47B).

한편 가스분석장치를 이용해서 생산균주의 배양생리학적 특성을 분석할 수 있는 본 연구 결과는 공정의 비생산성(*q<sub>p</sub>*)을 향상시키기 위하여 컴퓨터로 조절되는 정밀한 유가식 배양 전략을 체계적으로 수립하는데 중요하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 전반부의 유가식 배양 실험결과 이미 제시한 바와 같이, 추가적인 영양분을 특정 전략 없이 유가식으로 첨가한 경우, 생산균주의 생리학적 특성을 적시에 정확하게 진단할 수 있는 방법이 없어서 재현성이 낮았고, 그에 따라 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 또한 일정하지 않은 결과를 얻었다. (데이터 미제시). 그러나 본 연구에서 확인한 바대로 유가식 배양 전략의 한 가지 방법으로 가스분석장치에 의한 이산화탄소 생성율을 이용할 때, 이산화탄소생성율 (*CER*)이 세포의 대사 및 상태를 비교적 정확하게 예측할 수 있는 방법이므로 유가식 배양이 체계적으로 이루어 질 수 있을 것으로 판단된다. 즉 용존산소가 충분히 공

급되는 경우, 배양액 내의 영양분이 고갈되면 세포의 대사가 감소하게 되고, 그로 인해 이산화탄소 생성을 또한 감소하게 된다. 현재 반복적인 실험을 통해 이산화탄소 생성율과 AVM B<sub>1a</sub> 비생 산성 ( $q_p$ )간의 관계를 살펴보는 실험을 진행하고 있다. 궁극적으로 이러한 데이터를 기반으로 하여 이산화탄소 배출율을 배양중 정밀하게 조절함으로써 추가되는 배지 양이 자동으로 조절되어, 재현성이 우수한 유가식 배양 공정을 확립하는 실험이 진행 중에 있다.

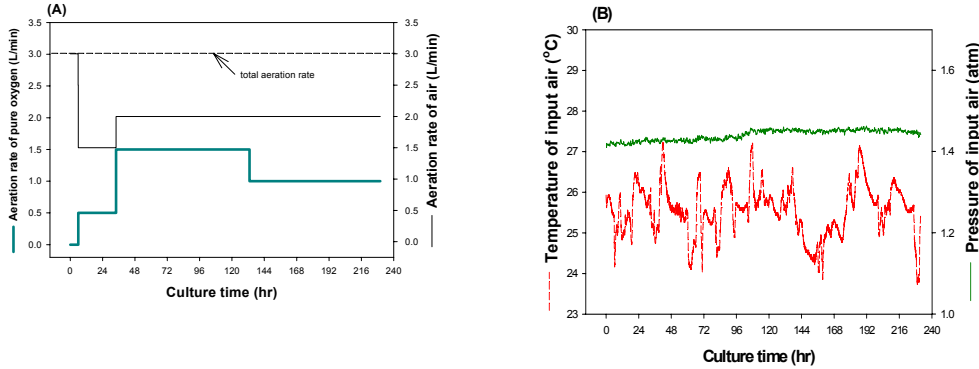


Fig. 44. Time-course profiles of (A) aeration rate of pure oxygen and air, and (B) temperature and pressure of input air in batch cultivation performed in a 5 L bioreactor (2.2X soluble starch medium and OMT250-1 strain were used).

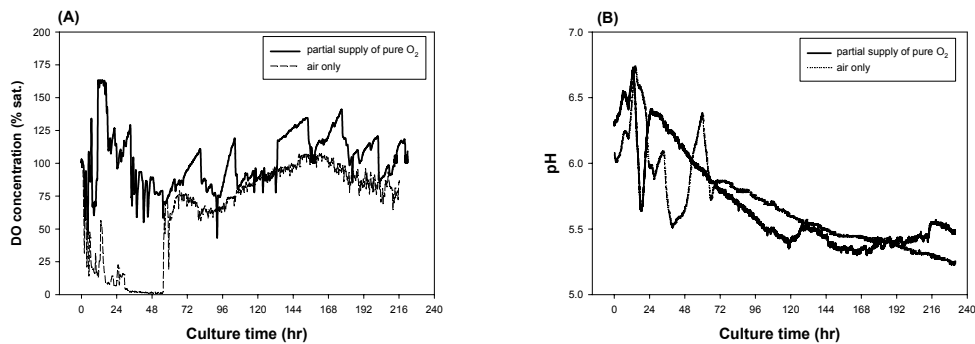


Fig. 45. Time-course profiles of (A) DO concentration and (B) pH in batch cultivation performed in a 5 L bioreactor (2.2X soluble starch medium and OMT250-1 strain were used).

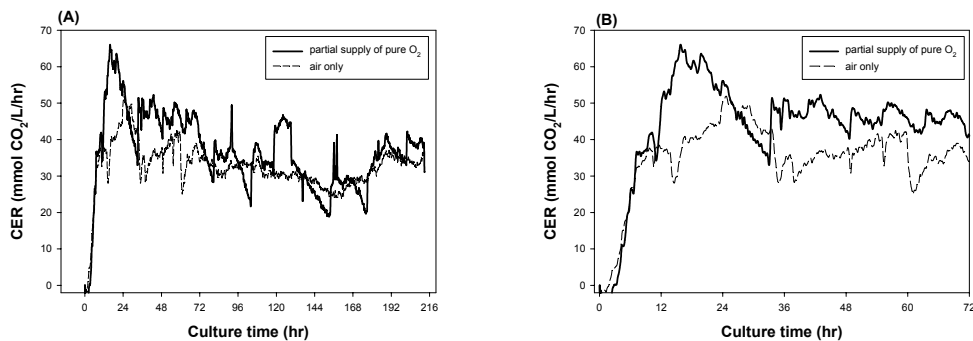


Fig. 46. Time-course profiles of carbon dioxide evolution rate (*CER*) (A) for the whole fermentation period and (B) until the initial 72 hours in batch cultivation performed in a 5 L bioreactor (2.2X soluble starch medium and OMT250-1 strain were used).

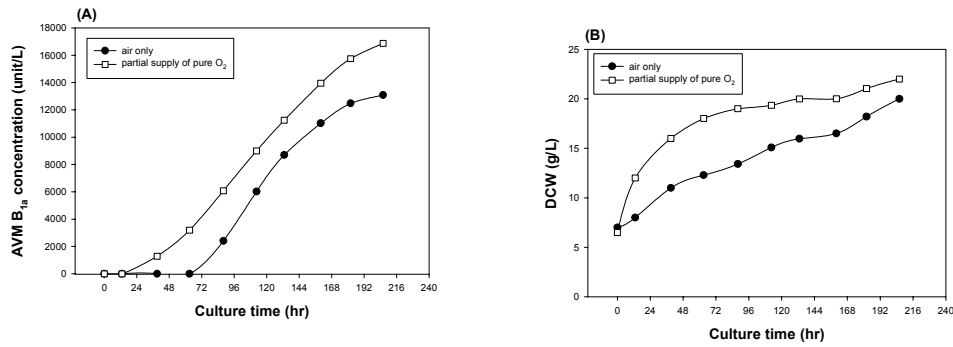


Fig. 47. Time-course profiles of (A) AVM B<sub>1a</sub> production and (B) dry cell mass in batch fermentation performed in a 5 L bioreactor (2.2X soluble starch medium and OMT250-1 strain were used).

#### 아. 발효조 배양에서의 AVM B<sub>1a</sub>의 축적

막투과성의 고생산성 균주개발을 위해 rational screening을 수행하던 중 배양액 내에 antifoam을 첨가할 경우, 플라스크 바닥에 노란색 침전물(yellow resin으로 명명)을 형성하는 균주를 발견하였고 (Fig. 48A), 이를 SEC-32라고 명명하였다. 형성된 yellow resin을 회수하여 TLC (thin layer chromatography)를 이용해 분석해 본 결과, 대부분이 AVMs인 것으로 확인되었다 (Fig. 48C). 이는 물에 대한 용해도가 매우 낮은 AVMs가 생합성되어 일부가 세포 밖으로 분비된 후 용해되지 못하고, AVM B<sub>1a</sub>가 surfactant에 용해되어 플라스크 바닥에 묻힌 것으로 생각되었다. 이러한 현상의 재현성을 확인하기 위해 본 균주를 이용하여 surfactant를 첨가한 2.5 L 발효조 배양을 수행하였다. 8일간 배양한 후 발효조 바닥 및 glass vessel에 부착되어 있던 yellow resin을 분리하였다 (Fig. 48B). Yellow resin으로부터 AVM B<sub>1a</sub>을 정량분석하기 위해 배양후 회수한 resin을 methanol에 녹인 후 10분간 15,000 rpm에서 원심분리하여 세포 및 배지 성분을 제거하였다. 그 후 weighing dish에 상등액을 분고 무게를 측정 한 후, 약 24시간 동안 흡입 건조기로 methanol을 증발시킨 후 다시 무게를 측정하여 순수한 yellow resin의 양을 계산한 결과 약 5.918 g을 얻을 수 있었다. 이 yellow resin을 다시 methanol에 녹인 후, HPLC 정량분석을 수행한 결과 (Fig. 48D). 발효조 전체에서 회수한 resin (antifoam)에 약 11,000 units의 AVM B<sub>1a</sub>가 존재하는 것으로 확인되었다 (한편 발효조 내의 전체 broth에 존재하는 AVM B<sub>1a</sub>는 약 15,000 units/2.5 L bioreactor으로 계산됨). 생산된 전체 양으로만 비교하면 antifoam phase에 비해 배지 broth에 약 30% 이상의 AVM B<sub>1a</sub>가 더 존재하는 것으로 보인다(Fig. 49A). 그러나 발효조 내의 전체 broth는 약 1,500 g인 반면, 첨가된 antifoam의 약은 불과 3 g인 것을 감안하면 antifoam phase내에 축적된 AVM B<sub>1a</sub> 양은 매우 높다는 것을 알 수 있다. AVM B<sub>1a</sub> 생산량을 1 g의 cell broth, 1 g의 DCW, 1g의 antifoam으로 다시 계산해 본 결과, 그 차이가 명확하게 드러남을 알 수 있었다 (Fig. 49B). 즉 cell broth 1 g에는 약 10 units의 AVM B<sub>1a</sub>가 존재하는 반면, 1 g의 DCW에는 800 units, 그리고 1 g의 antifoam에는 약 1,800 units의 AVM B<sub>1a</sub>가 존재하는 매우 고무적인 결과를 얻을 수 있었다.

AVM B<sub>1a</sub>가 antifoam phase에 효율적으로 축적되는 특성으로 인해 AVM B<sub>1a</sub> 고생산을 위한 균주개발 방법을 제시할 수 있다. 즉, intracellular product인 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성을 증가시키는 방법으로 막투과성 변이주를 개발하는 전략이다. 일반적으로 대부분의 intracellular product는 end product에 의해 feedback inhibition 또는 repression을 받게 되어 일정량 이상이 생합성되면, 더 이상의 생합성이 불가능한 단점을 가지고 있다. 이 경우 투과성 변이주는 (i) end product인 AVM B<sub>1a</sub>를 세포 밖으로 효율적으로 분비함으로써 feedback inhibition 또는 repression 현상을 피

할 수 있을 뿐만 아니라, (ii) 세포 외로 분비된 AVM B<sub>1a</sub>가 배지 broth가 아닌 antifoam phase에 축적됨으로써, 세포와 배지 사이의 AVM B<sub>1a</sub>에 대한 평형상태가 이루어지지 않게 되어 지속적인 AVM B<sub>1a</sub>의 세포외 분비를 진행시킬 수 있을 것이다. 한편 이와같은 특성의 막투과성 변이주를 선별하기 위해서 다양한 균주개발 전략을 시도할 수 있을 것이다 즉, (i) G(+) bacteria의 세포벽을 파괴하는 penicillin에 대한 저항성 변이주 (ii) 세포막의 구성성분인 fatty acid 합성 시 coenzyme으로 작용하는 biotin에 대한 영양요구성 변이주, (iii) tween 80과 같은 fatty acid 유사체에 대한 저항성 변이주, 또는 (iv) glycerol에 대한 영양요구성 특성을 갖는 변이주들을 개발할 경우, 이들은 막투과성의 증가로 인해 생합성된 AVM B<sub>1a</sub>가 효율적으로 세포외로 분비되는 고생산성 균주일 가능성이 높다. 또한 분비된 AVM B<sub>1a</sub>가 빠른 속도로 배지로부터 antifoam phase로 이동할 뿐만 아니라 완전하게 축적될 수 있도록, 세포에는 독성이 거의 없으면서 AVM B<sub>1a</sub>를 선택적으로 축적 (용해)할 수 있는 적정한 양의 비극성 용매를 발효조 내로 제공할 경우, 고생산성·고분비성 생산균주에 의한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성의 극대화를 이룰 수 있는 “extractive fermentation bioprocess (생산물추출 병행 생물공정)”가 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

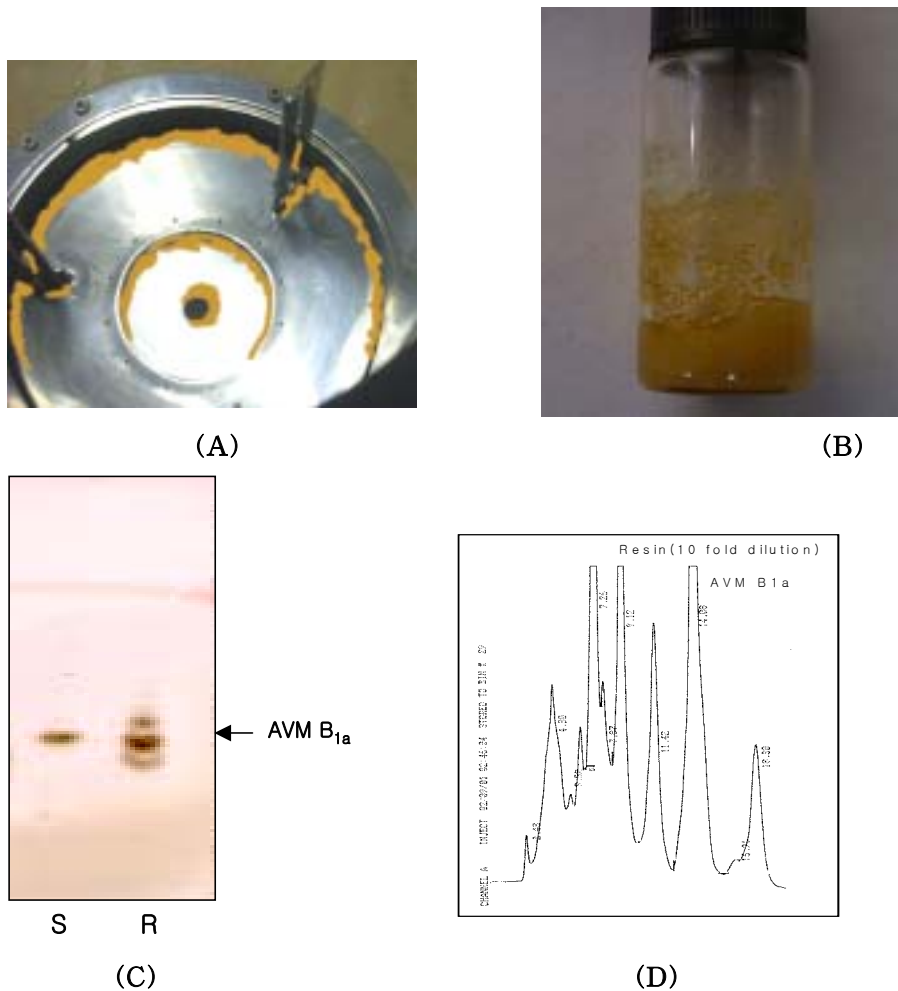


Fig. 48. Photographs for yellow resin in (A) the bottom of the fermentor and in (B) a harvesting bottle, and (C) the assays of TLC and (D) HPLC assay for the yellow resin (S; sample, R; resin).

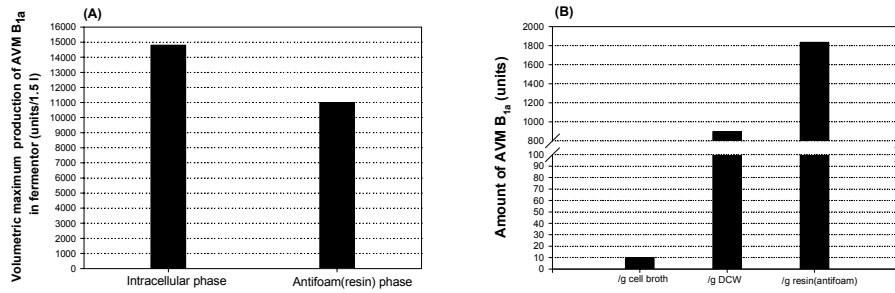


Fig 49. Amount of AVM B<sub>1a</sub> in the medium and in the yellow resin. (A) Maximum volumetric AVM B<sub>1a</sub> production (total amount in the 1.5 liter fermentor) in intracellular phase and antifoam phase and (B) specific AVM B<sub>1a</sub> production based on the unit mass of cell broth, DWC, and resin.

### 자. 용존산소농도 제어 알고리즘 개발

#### 1) software filter를 통한 잡영(noise) 제거

에버맥틴 배양 중의 DO와 O<sub>2</sub> 분압 profile이 Fig. 50에 나타나 있다. 배양 초기 미생물의 활발한 성장으로 DO가 급격히 감소하였고 영양분이 고갈되면서 다시 증가하였으며 DO가 증가하는 시점부터 에버맥틴이 생성되기 시작하였다.

배양공정중에 발생하는 공정 데이터들은 생물공정의 특성 때문에 많은 잡영이 발생하게 된다. 특히 균사형성 미생물의 경우, 균사체의 크기가 박테리아에 비해 훨씬 크기 때문에 측정 probe가 오염되기 쉬우며 이때문에 일반 미생물 배양보다 잡영 문제가 더욱 심각하게 된다.

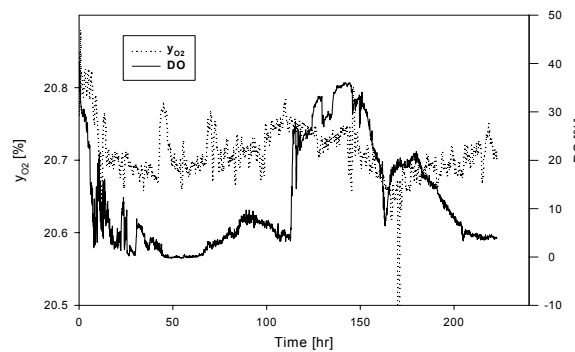


Fig. 50. 에버맥틴 배양시 DO 및 O<sub>2</sub> 분압 (w/o filtration)

잡영의 효과적인 제거가 없을 경우 제어기의 값이 크게 흔들리므로 정확한 제어가 불가능하며 특히 scale-up시, 제어장치의 과도한 on/off 오동작으로 성능뿐만 아니라 제어장치의 수명에도 악영향을 끼칠 수 있다. 또한, 배양공정 제어에서는 DO나 O<sub>2</sub> 분압 등 측정 변수를 바로 사용하지 않고 비성장속도, OUR 등, 미분이나 적분을 거친 processed data를 사용하기 때문에 잡영에 의한 영향이 증폭될 수 있다. 잡영이 제거되지 않는 O<sub>2</sub> 분압 데이터를 사용하여 OUR를 계산한 결과가 Fig. 51에 나타나 있다. 그림에서 나타난 바와 같이 O<sub>2</sub> 분압 데이터보다 OUR값이 잡영의 영향으로 크게 흔들리는 것을 관찰할 수 있다.

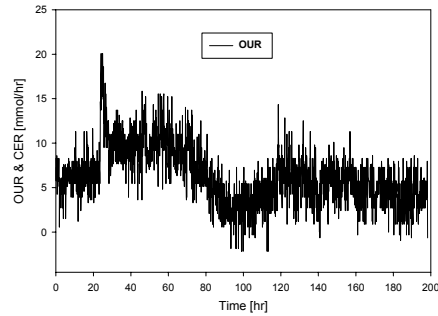


Fig. 51. OUR profile (w/o filter)

배양공정에서 발생하는 잡영을 제거하기 위하여 두가지 software filter를 적용하였다.

가) moving window system

$$m(N) = \frac{1}{w} \sum_{n=N-w}^N p(n)$$

m : filtered data

w : window size

p : transmitter input

N : current state

Moving window system에서는 측정장치로부터 나오는 데이터 w개의 평균값을 공정 데이터로 사용한다. 새로운 데이터 p(n)이 입력되면 p(n-w)가 삭제되고 다시 w개의 데이터의 평균값을 구하는 방식으로 잡영을 제거하게 된다. 전산 모사 결과 w>30인 경우 잡영을 효과적으로 제거할 수 있었다. 그러나 moving window system에서는 과거의 데이터를 오랜기간동안 저장하고 있어야 하는 단점이 존재하여 본 연구과제에서는 1st order filter를 사용하여 잡영을 제거하였다.

나) 1st order filter

$$m(N) = w \cdot p(N) + (1 - w) \cdot m(N - 1)$$

m : filtered data

p : transmitter input

w : weighting factor (0 < w < 1)

1st order filter에서는 현재 데이터와 과거의 데이터를 가중치에 따라 곱한 후 평균을 구하는 식으로 잡영을 제거한다. weighting factor가 클수록 현재의 데이터에 가중치를 두게 된다. 1st order filter에 의해 잡영을 제거한 OUR profile이 Fig. 52에 나타나 있다.



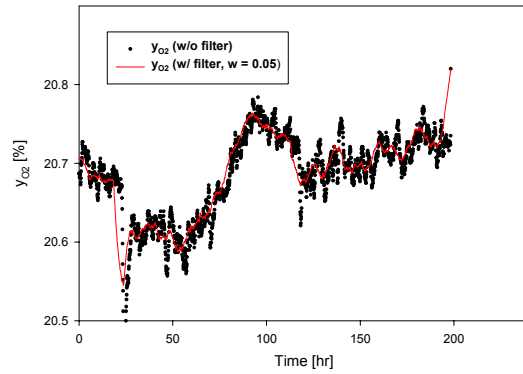


Fig. 52.  $y_{O_2}$  profile w/ data filter ( $w = 0.05$ )

## 2) 용존산소농도 제어 알고리즘 개발

대부분 상업적으로 생산되는 이차대사산물의 경우, 배양의 상태를 최적화하는 것은 매우 어렵고 까다로운 작업이다. 미생물의 배양조건, 즉 온도, 용존산소, pH, 교반기의 속도 및 공기공급량, 세포의 성장속도 등에 따라 이차대사는 매우 크게 영향을 받는다. 이러한 data들은 컴퓨터 상에서 분석하고 조건에 만족하도록 직접 조절 가능한 신호전달체계로 바꿔 줌으로써 최적의 배양조건을 유지할 수 있다.

*Streptomyces*와 같은 방선균의 호기적 이차대사 발효 시 방선균의 독특한 형태와 까다로운 생리적 특성으로 인해 발효기의 설계 및 공정 최적화에 많은 어려움이 있다. 독특한 삼차원적인 많은 가지를 뻗은 실모양의 균사체 구조(highly branched filamentous mycelial structure)로 인해 균체가 증가함에 따라, 배양액의 점도가 증가하게 되고 산소의 전달능력이 급격히 감소하게 되므로 세포의 대사에 매우 중요한 용존산소의 수준을 적정수준으로 유지하기 위해 교반기의 속도와 공기공급량을 증가시켜야 한다. 그러나 일반적으로 전단응력(shear stress)에 민감한 *Streptomyces*가 계속적으로 높은 수준의 교반속도에 노출 될 경우에는 세포가 악영향을 받을 수 있다. 이러한 교반기의 속도와 공기공급량의 조절에 있어, 사람이 직접 용존산소를 제어하지 않고 on-line computer control system을 이용 시 교반기의 속도와 공기 공급량의 제어를 동시에 수행할 수 있다.

대부분의 산업적 배양공정에서 용존산소농도의 조절은 작업자의 경험에 의존한 매뉴얼 방식으로 진행되거나 단순한 비례제어에 의해 이루어지고 있는 실정이다. 매뉴얼 제어의 경우 작업자의 숙련도에 따라 시스템의 성능이 크게 달라질 수 있고 비례제어기는 offset을 해결할 수 없다는 치명적인 단점이 존재한다. 본 연구에서는 이러한 단점을 해결하기 위해 미분항을 넣은 PD 제어기를 개발하였다. 제어기에 사용된 제어식은 다음과 같다.

### 가) RPM and MFC feed back control

제어식1 :  $\{(D.O. \text{ set value} - \text{현재 D.O. value}) \times \text{적용율}\}$

+ 현재 RPM 제어출력값 = 새로운 RPM 제어출력값

제어식2 :  $\{(D.O. \text{ set value} - \text{현재 D.O. value}) \times \text{적용율}\}$

+ 현재 MFC 제어출력값 = 새로운 MFC 제어출력값

위와 같은 제어방식으로 용존산소농도를 조절한 결과가 Fig. 53에 나타나 있다.

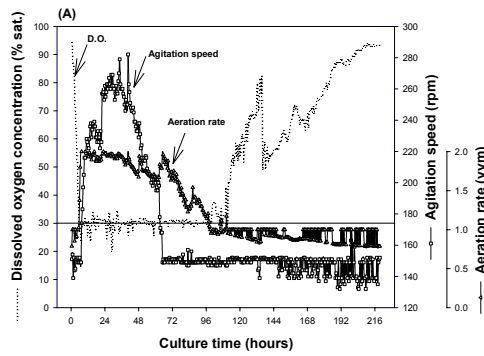


Fig. 53. Time-course profiles of D.O. concentration ( $DO_{set} = 30\%$ )

제어기에 미분항이 포함될 경우 offset은 제거할 수 있으나 진동(oscillation)이 발생하여 시스템이 불안정해지는 단점이 존재한다. Fig. 54에 나타나듯이 배양 24~48시간 사이에 oscillation이 발생하는 것을 관찰할 수 있다. 배양공정시에는 미생물의 성장, 배지의 공급, 소포제의 첨가, 대사산물의 축적 등으로 인한 동특성 변화가 계속해서 발생하므로 고정된 매개변수를 갖는 PID 제어기로는 원하는 성능을 나타낼 수 없으며 심지어 어떤 경우에는 매뉴얼 제어 방식보다 나쁜 결과를 나타낼 수 있다. 따라서 공정의 특성에 따라 제어기 변수를 개선시키는 autotuning 기법의 도입이 필수적이다. 현재까지 개발된 많은 용존산소농도제어기의 경우 공정모델을 수립한 후 모델에 기반하여 제어기의 매개변수를 바꿔주는 방식으로 작동된다. 그러나 이러한 모델 기반 제어기의 경우 모델의 성능에 제어기의 성능이 크게 달라지고 외부 요인에 대한 강건성이 떨어지므로 적용분야가 비교적 한정되었다. 특히 이차대사산물 배양공정과 같이 미생물이 균사형태로 자라고 불용성 고형물질을 배지로 사용할 경우 이러한 외부 disturbance의 영향이 더욱 크다고 할 수 있다. 본 연구에서는 이러한 단점을 해결하기 위해 자기동조 제어기를 도입하였다.

#### (1) digital PID 제어기

일반적인 PID 제어식은 다음과 같다.

$$P(k) = P(k-1) + K[\{e(k) - e(k-1)\} + \frac{T}{\tau_i} e(k) + \frac{\tau_d}{T} \{e(k) - 2e(k-1) + e(k-2)\}]$$

$P(k)$ 는 제어기 출력이며  $e(k)$ 는 오차,  $T$ 는 샘플링 시간,  $K$ ,  $\tau_i$ ,  $\tau_d$ 는 각각 제어기 매개변수이다. 갑작스런 오차가 발생하였을 때 제어기의 과도한 출력을 방지하기 위해 오차항 대신 현재의 측정변수를 사용한 아래와 같은 형태의 제어식을 사용한다.

$$P(k) = P(k-1) + K[\{-C(k) - C(k-1)\} + \frac{T}{\tau_i} C(k) + \frac{\tau_d}{T} \{C(k) - 2C(k-1) + C(k-2)\}]$$

#### (2) Tuning strategy

PID 제어기의 세가지 매개변수 모두를 동조(tuning)하는 것이 가장 바람직하겠으나 제어시스템의 부하를 고려하여 가장 큰 영향을 끼치는  $K$ 값을 동조 변수로 설정하였다. 제어변수 동조를 위한 heuristic rule은 아래와 같다.

- ㉓ IF  $C_{cov}(k) > C_{covset}$  AND  $P_{cov}(k) > P_{covset}$   
 THEN  $K(k) = K(k-1) - \alpha_1 C_{cov}(k)$
- ㉔ IF  $C_{cov}(k) < C_{covset}$  AND  $|\text{Offset}(k)| > \text{Offset}_{crit}$   
 THEN  $K(k) = K(k-1) + \alpha_2 |\text{Offset}(k)|$
- ㉕ ELSE  $K(k) = K(k-1)$

이때,  $C_{cov}$ 는 DO의 분산,  $P_{cov}$ 는 제어기출력값의 분산(covariance), Offset은 오차의 평균이다. Heuristic rule에 기반한 autotuning 제어기의 성능이 Fig. 55에 나타나 있다. 그림에서 나타나듯이, 시스템의 진동 현상을 효과적으로 제거하는 것을 알 수 있다. 본 제어기의 장점은 초기 K값이 잘못 설정되었다더라도 신속히 적절한 K값을 동조해줌으로써 시스템의 성능을 유지시켜줄 수 있다는 점이다. 또한, 향후 연구를 통해 적분항( $\tau_I$ ), 미분항( $\tau_D$ )을 자동동조할 수 있는 효과적인 제어기를 만들 경우 본 과제와 같은 이차대사산물 생산에 효과적으로 적용할 수 있으리라 기대된다.

이차대사산물 배양공정에서 용존산소농도제어는 시스템 성능 유지는 물론, 대사상태 추정에 필요한 배출가스 분석에도 필수적이다. 본 연구에서 개발한 제어기를 사용하여 현재 배출가스 분석을 통해 에버맥틴 생산공정을 해석하는 프로그램을 작성 중이며 이러한 대사상태 해석에 기반한 유가식 공정 알고리즘을 개발 중에 있다.

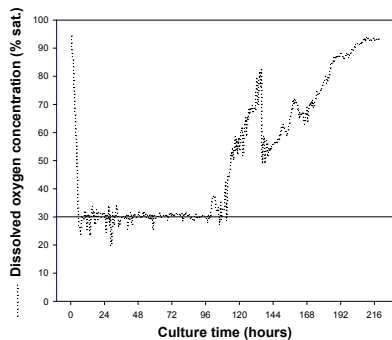


Fig. 54. Time-course profiles of D.O. concentration ( $DO_{set} = 30\%$ ) (Fixed PD controller)

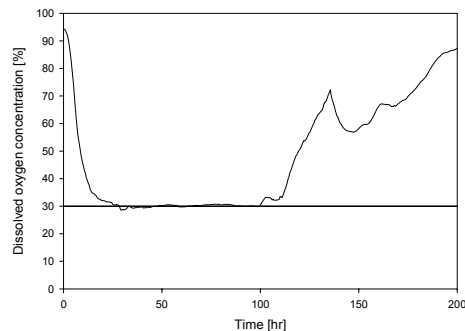


Fig. 55. Time-course profiles of D.O. concentration ( $DO_{set} = 30\%$ ) (autotuning PID controller)

#### 차. 배양공정 자동화시스템 확립 및 배양 공정에서의 적용

##### 1) 공장 자동화를 위한 온라인 모니터링 시스템 및 제어기 설계

산업 규모에서의 배양에는 불용성 복합 배지가 배지 성분에 포함되는 경우가 많다. 이는 정제된 합성 배지의 경우 배지단가가 높아 생산 원가를 상승시킬 수 있고, 에버맥틴 생산 공정과 같이 이차대사산물의 경우 불용성 배지의 첨가가 오히려 생산성을 높일 수 있기 때문이다. 그러나, 불용성 배지가 포함될 경우 배지 내의 환경 변수들을 제대로 측정할 수 없어 공정 개발시 난점으로 기능하게 된다. 불용성 배지의 사용 이외에, 에버맥틴 등의 고부가가치 이차대사산물을 생산하는

균주들은 균사 형성 미생물들이 많아 일반 세균 배양에서처럼 신속히 배양 변수들을 가늠하기 힘들다.

따라서, 배양 공정의 적절하고 신속한 제어를 위해서는 대사 상태를 온라인으로 추정하는 시스템의 개발이 필수적이다. 본 연구에서는 산업적 대량 생산 배양시스템에 기 개발된 시스템을 적용하기 위하여 대형 발효조의 수력학적 특성을 알고리즘에 새로이 도입하였고 개선된 세포 농도 추정 알고리즘을 실제 20톤 배양공정에 적용하였다. 또한, 교반속도 혹은 기체공급속도 등의 제어 변수를 이용하여 배양공정을 모사할 수 있는지 가능성을 검토하여 보았다.

## 2) 배양공정 자동화 시스템 개발

생산균주의 발효조 배양 중에 변화하는 주요 배양변수의 수집하고 이를 분석함으로써 배양 공정을 최적화할 수 있는 on-line computer control 및 monitoring system을 구축하였다. 배양공정 데이터 수집 및 분석을 위한 프로그램으로는 Autolab V2.0을 이용하였고, 배양 중 발생하는 배출가스의 성분 분석을 위해 가스분석기 시스템을 연결하였다. 본 연구에서 설계된 배양공정 자동화 시스템과 상기에서 설립한 이론식의 정확성을 테스트하기 위해, AVM B<sub>1a</sub> 생산균주인 *Streptomyces avermitilis* OMT250-1을 2.2X soluble starch (132 g/L) 배지가 첨가된 5 liter 발효조 및 500 liter 발효조에서 배양하면서 DO, pH, 배출가스 농도 등 주요배양 변수를 온라인 상에서 수집하였다.

## 3) 배출가스 온라인 분석 및 추정방법 확립

산소흡수율은 가스분석기를 이용하여 발효기로부터 배출되는 가스를 이용하여 분석하였다. 배양 공정 중 기체 산소의 물질 수지식으로부터 산소흡수율을 도출하면 다음과 같다.

$$OUR = \frac{(Q_i P_i y_i / RT_i - Q_o P_o y_o / RT_o)}{V_L} \quad (4)$$

여기서

OUR : mmol/L/min

V<sub>L</sub> : broth vol., L

Q : mass flow rate of air, L/min

P : total pressure, atm

y : mole fraction of oxygen

T : temp., °K

R : gas constant, 8.205x10<sup>-5</sup> (L)(atm)/(mmol)(K)

을 나타낸다. 이 때, 기체의 유량은 공급 기체와 배출 기체의 몰(mol)수가 변함에 따라 바뀌게 되는데, 이를 보정하기 위해 다음과 같은 보정식이 필요하다.

$$Q_i P_i n_i / T_i = Q_o P_o n_o / T_o \quad (5)$$

$$Q_o P_o / T_o = Q_i P_i / T_i \left( \frac{n_i}{n_o} \right) \quad (6)$$

여기서 n은 배양 중 변하지 않는 불활성 기체인 질소의 몰분율을 나타낸다. 따라서, 산소흡수율은 식 (7)과 같이 정리할 수 있다.

$$\therefore \text{OUR} = \frac{Q_i P_i / R T_i (y_i - y_o (\frac{n_i}{n_o}))}{V_L} \quad (7)$$

공급기체와 배출기체에서 질소의 물분율은 아래식으로부터 얻을 수 있다.

$$n_i = 1 - y_i - h_i - c_i \quad (8)$$

$$n_o = 1 - y_o - h_o - c_o \quad (9)$$

$h$ 와  $c$ 는 각각 수증기의 물분율과 이산화탄소의 물분율을 나타낸다.

공급 혹은 배출되는 가스 성분의 농도를 나타낸 Autolab V2.0의 구성을 Fig. 56에 제시하였으며 배양 중 산소흡수율과 이산화탄소 생성율을 Fig. 57에 나타내었다.



Fig. 56. Table of data acquisition and parameter analysis system.

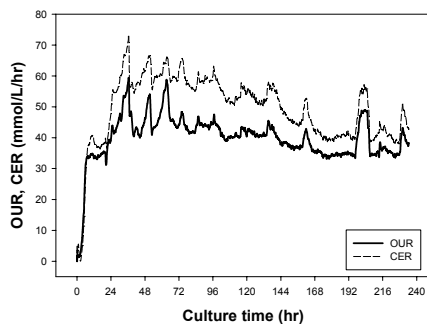


Fig. 57. Time-course profiles of oxygen uptake rate and carbon dioxide evolution rate in the batch fermentation

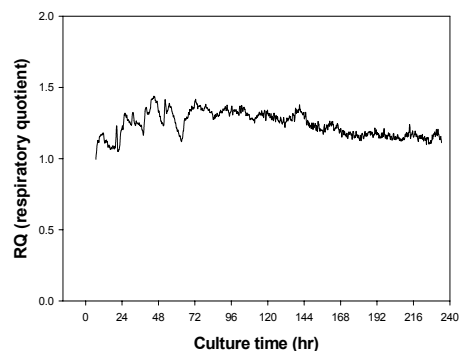


Fig. 58. Time-course profiles of respiratory quotient in the batch fermentation

그림에서 나타난 바와 같이 산소흡수율 및 이산화탄소생성율은 배양 48시간째까지 증가하다가 이후 일정하게 유지되었고 배양 144시간째 이후로 서서히 감소하는 패턴을 나타내었다. 배출가스 패턴과 에버택틴 생산 곡선을 비교하면 몇 가지 흥미로운 점을 관찰할 수 있다. 산소흡수율 및 이

산화탄소 생성율이 증가하는 배양 48시간째까지 균체는 영양분을 급격히 소모하며 활발히 성장한다. 이 후, 세포 성장이 더더지면서 에버랙틴이 생산되기 시작하는 전형적인 이차대사 배양의 특성을 나타낸다. 이 때, 에버랙틴 생산 시점과 가스 데이터의 증가가 멈추는 시점이 정확히 일치하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 영양분의 고갈 및 배양환경의 변화 등으로 에버랙틴 생산이 멈추면서 산소흡수율 및 이산화탄소생성율은 감소하게 된다.

따라서, 가스 데이터의 분석과 데이터 처리를 통해 배양 공정을 정확히 패턴화할 수 있을 뿐만 아니라 온라인 제어 알고리즘 수립이 가능하다.

산업적 대량규모의 배양 공정에서는 오염의 위험 때문에 잦은 샘플링을 통한 off-line 분석이 용이하지 못하다. 또한, 본 연구에서 대상으로 하는 에버랙틴 생산균주의 경우 균사를 형성하며 자라므로 샘플링 라인이 막히는 현상이 발생하기 쉬워 배양기 내부의 샘플을 정확히 취하기 어렵다는 단점이 존재한다. 그러나, 본 연구에서 개발한 배출 가스 분석 시스템은 off-line 분석 없이도 배양기 내의 상태를 완벽히 나타낼 수 있으므로 이용 가치가 막대하리라 예상된다.

#### 4) 세포 농도 온라인 추정시스템 개발

대부분의 배양 공정에서 가장 주요한 상태변수는 생축매로 작용하는 세포의 농도이다. 에버랙틴과 같은 이차대사산물의 생산에 있어서도 세포농도 및 세포 비성장속도는 배양 생산성에 가장 큰 영향을 미치는 매우 중요한 배양변수이다. 본 연구에서는 배양기간 동안 세포비성장속도를 실시간으로 모니터링함으로써 생산균주의 대사상태를 정확하게 파악하고자 하였다. 총 산소흡수량과 산소흡수율에 대한 분석 데이터를 이용하여 배양기간 동안 실시간으로 세포비성장속도를 추정하였다. 세포 유지를 위한 산소 요구량을 무시할 만하다고 가정하였을 때, 산소흡수율 OUR은 다음과 같은 식으로 표시할 수 있다.

$$OUR = \frac{\mu X}{Y_{X/O_2}} \quad (10)$$

산소 수율이 일정하다고 가정하고 양 변을 적분하면,

$$\int OUR dt = \int \frac{\mu X}{Y_{X/O_2}} dt = \frac{X}{Y_{X/O_2}} \quad (11)$$

식 (10)과 (11)을 나누면 세포 비성장 속도를 얻을 수 있다.

$$\mu = \frac{OUR}{\int OUR dt} \approx \frac{OUR}{\sum OUR(k)\Delta t} = \frac{OUR}{SOUR} \quad (12)$$

또한 세포농도는 식 (11)로부터 다음과 같이 구할 수 있다.

$$X = Y_{X/O_2} \cdot SOUR \quad (13)$$

온라인 상에서 비산소흡수율과 비성장속도의 연관성이 직선 관계를 보이므로, linear regression 분석을 통해 산소에 근거한 세포수율  $Y_{X/O_2}$  (yield factor)과  $m_s$  (maintenance coefficient)를 산출할 수 있었다. 식 (13)을 이용해서 온라인 분석을 통해 예측된 세포량과, 실험적으로 오프라인 상에서의 측정을 통해 얻은 실제 세포량을 비교한 실험결과를 제시하였다 (Fig. 60). 배양기간 동안 off-line으로 얻은 세포 농도 profile을 우수하게 나타낼 수 있는 것으로 나타났다. 이는 시료 채취를 하지 않고도 실시간으로 세포의 총 산소흡수량을 온라인으로 분석함으로써 건조세포량을 유추할 수 있음을 제시해 주는 매우 유용한 결과이다.

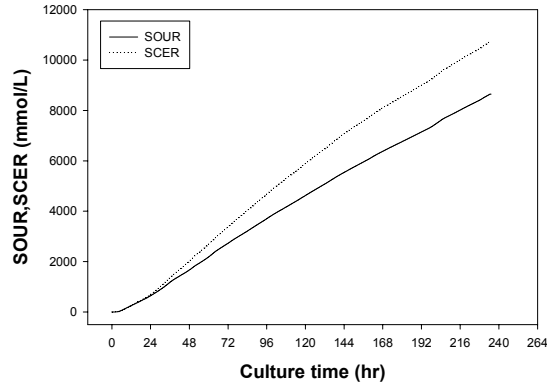


Fig. 59.. Time-course profiles of total oxygen uptake rate (SOUR) and total carbon dioxide evolution (SCER) in the batch fermentation

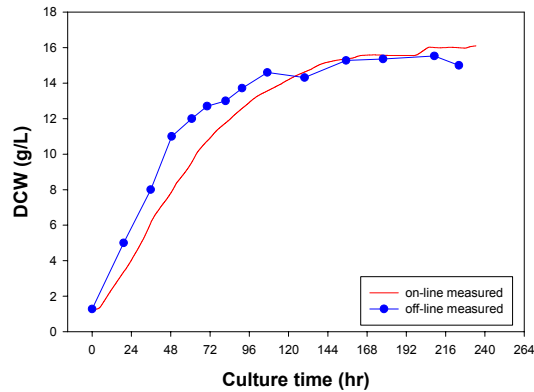


Fig. 60. Comparison of cell concentration estimated based on the on-line data of gas analyzer system against the actual dry cell mass in the batch fermentation

#### 5) 세포 농도 온라인 추정시스템의 대규모 배양에의 적용

실험실에서 이루어지는 소규모 배양과 달리 대규모 배양에서 본 연구에서 개발한 시스템을 사용하기 위해서는 다음과 같은 사항을 고려하여야 한다. 첫째, 배양기의 규모가 커짐으로 해서 배양기 상단부와 하단부에서 압력차가 발생하며, 이로 인해 기체 분압이 달라지게 된다. 둘째, 대형 발효조의 경우, uniform한 mixing을 기대하기 힘들다. 이러한 점을 고려하기 위해 배양기의 수력학적 특성을 고려하여 알고리즘을 일부 수정하였다. 개발된 알고리즘을 실제 20톤 배양에 적용하였고 off-line에서 얻은 결과와 비교하였다(Fig. 61, 62, 63). 그림에서 나타난 바와 같이 본 알고리즘을 이용하여 대규모 배양에서도 성공적으로 세포 농도 및 당농도를 실시간으로 추정할 수 있었으며 이는 에버택틴 생산뿐만 아니라 여타 유용산물 생산 배양공정에 광범위하게 적용할 수 있으리라 기대된다.

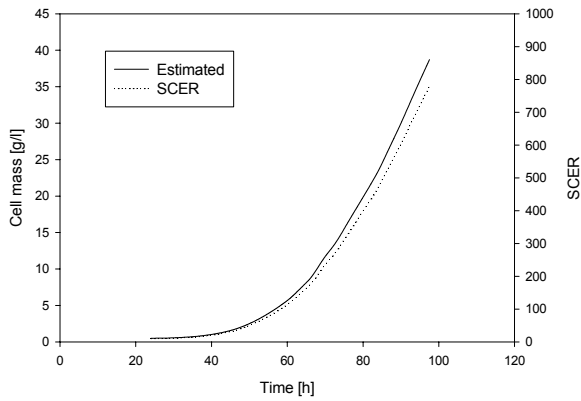


Fig. 61. Time-course profiles of total carbon dioxide evolution (*SCER*) and estimated cell mass in the 20 kL fermentation

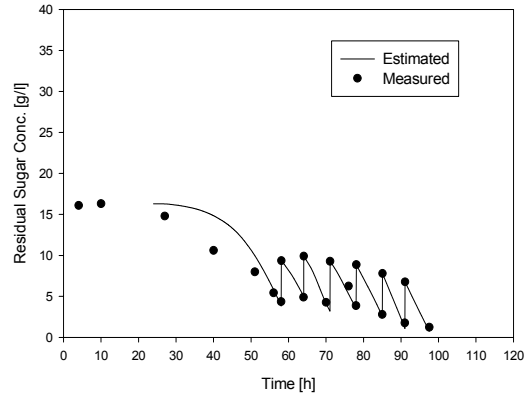


Fig. 62. Comparison of sugar concentration estimated against the actual sugar concentration in the 20 kL fermentation

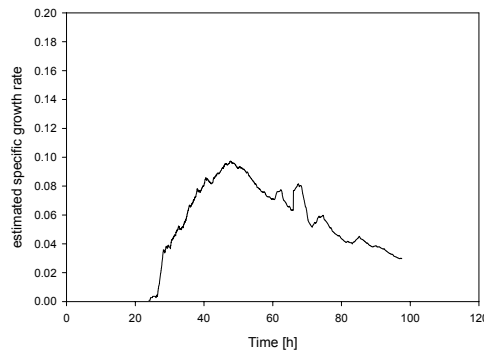


Fig. 63. Time profile of specific growth rate in the 20 kL fermentation

#### 카. 온라인 상에서 기체산소 물질수지식에 의한 산소전달계수 ( $k_{La}$ ) 측정법 확립

대부분의 미생물의 성장 및 이차대사산물 생합성에 있어서 산소전달은 매우 중요한 요소로 작용한다. 즉 산소요구 정도는 세포에 따라 다르지만, 이차대사산물의 생합성은 고에너지를 요구하는 이차대사이므로, 배양 중에 항상 최적의 용존산소를 발효조 내로 공급해 주어야 한다. 배양기 내로 공급되는 용존산소량을 측정하기 위해서는 용존산소의 물질수지식에 근거하여 실험실적으로 산소전달계수 ( $k_{La}$ )를 측정한다. 온라인 상에서의 기체산소 물질수지식을 이용하는 식(22)에 의해 실시간으로 산소전달계수를 측정할 결과를 Fig. 64에 제시하였다. 주목할 점은 본 연구 결과, 용존산소 전달의 기준이 될 뿐만 아니라 발효조 scale-up시 가장 중요한 인자로 사용되는 산소전달계수를, 용존산소 물질수지식에 기초해서 계산하는 dynamic method를 이용하지 않고 (dynamic method의 경우 배양액의 용존산소 농도가 낮으면 배양 중 산소전달계수를 측정할 수 없음), 기체산소의 물질수지식에 근거해서 측정할 수 있는 시스템이 확립되었다는 점이며, 그 결과 배양액의 용존산소 수준에 관계없이 언제든지 온라인 상에서 산소전달계수를 측정할 수 있게 되었다는 점이다.



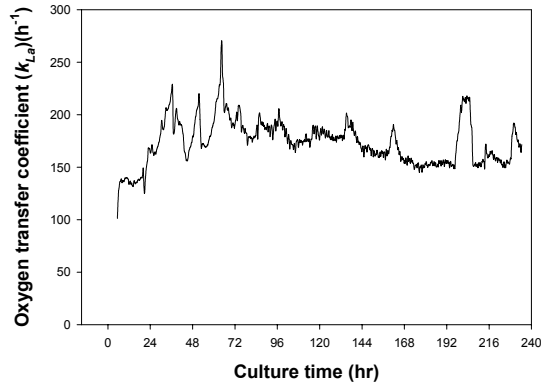


Fig. 64. Time-course profile of oxygen transfer coefficient ( $k_La$ ) in the batch fermentation performed in a 5 L bioreactor (OMT250-1 strain and 2.2 X soluble starch medium were used).

#### 타. 에버랙틴 생산 배양공정 모델링

효과적인 제어와 시스템 설계를 위해서는 우수한 성능을 지니면서도 계산 부담이 적은 효율적인 모델의 수립이 필수적이다. 본 과제에서는 균체생장과 에버랙틴 생산, 기질 소비에 대한 모델을 수립하였고 모델 예측치와 실험 데이터를 비교함으로써 그 성능을 관찰하였다.

##### 1) 균체성장

에버랙틴 생산균주의 성장에 대해 변형된 Monod kinetics를 적용하였다. 전형적인 Monod type의 kinetics에서는 미생물의 비성장속도( $\mu$ )를 배지 중의 제한기질 농도를 이용하여 다음과 같이 나타낸다.

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (1)$$

그러나, 균사형성 미생물의 경우 균체 농도가 증가할수록 물질전달 저항이나 내인 대사로 인하여 점차 비성장속도가 감소하므로 이러한 영향을 반영하기 위하여 (1)식을 아래와 같이 균체 농도에 의한 억제항을 첨가하였다.

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s X + S} \quad (2)$$

##### 2) 에버랙틴 생산

산물 생산 kinetics를 나타내는 모델로 널리 사용되는 식은 Ludeking-Piret가 제안한 것으로 아래와 같은 형태를 띄고 있다.

$$\pi = \alpha\mu + \beta \quad (3)$$

그러나 본 연구의 에버랙틴 생산 시스템은 전형적인 이차대사산물로써 에버랙틴 생산이 세포 성장기에는 거의 이루어지지 않고 idiophase에 생산되므로 위 식으로 생산 kinetics를 제대로 표현할 수 없으며 Ludeking-Piret식에서는 기질이 고갈되더라도 산물을 계속 생산되는 것으로 나타나기 때문에 본 시스템에 적합하지 않은 것으로 판명되었다. 따라서 본 연구에서는 기질저해 kinetics 형태의 모델을 사용하였다. 이차대사산물의 경우 기질농도가 낮아 영양분 제한이 걸릴 경우 생산이 이루어지고 기질농도가 충분할 경우에는 세포가 균체 성장 대사로만 영양분을 사용하게 되므로 본 연구에서 제안하는 기질저해식이 잘 들어맞으리라 기대된다. 본 연구에서 사용한 에버랙틴 생산 모델은 다음과 같다.

$$\pi = \frac{\pi_m S}{K_p + S + \frac{S}{K_i}} \quad (4)$$

### 3) 기질소비

배양액내의 기질은 크게 균체생장과 산물생산, 그리고 세포활성유지에 사용되므로 아래와 같은 형태로 나타내었다.

$$\sigma = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{\pi}{Y_{P/S}} + m \quad (5)$$

회분식 배양으로부터 얻은 실험 데이터들로부터 위 식을 사용하여 모델링하였다. 모델링 결과를 Fig. 65에 나타내었다. 그림에서 나타나듯이 모델이 매우 우수하게 배양 kinetics를 설명하고 있음을 알 수 있다.

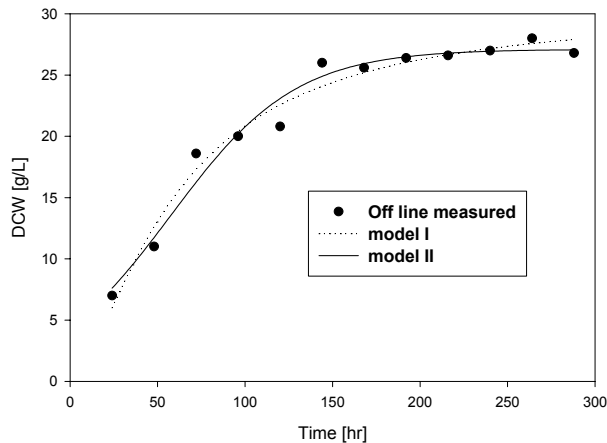


Fig. 65. Modelling for the process for the production of avermectin B1a.

### 과. 발효조내 용존산소농도 변화 전산모사

일련의 실험과정을 거쳐 에버멕틴의 생합성에 있어 용존산소의 영향이 지대함을 알 수 있었다. 따라서 본 과제에서는 에버멕틴 발효에서 제어 알고리즘에 따른 발효조내 용존산소농도의 변화를 살펴봄으로써 효율적인 용존산소농도 제어를 개발하고자 하였다. 에버멕틴 생산균주의 성장과 산소소모도는 회분식 배양으로부터 얻은 데이터를 통해 모델링하였다. 우선 배양기내 용존산소농도를 조절하지 않았을 때의 결과를 Fig. 66에 나타내었다. 그림에서 나타나듯이 용존산소농도는 배양이 진행됨에 따라 지속적으로 떨어져 16시간 이후로는 설정치보다 낮은 값을 나타내었으며 균체의 성장도 지체되었다. 산업적 배양공정에서 널리 사용되는 단순 비례제어기에 의한 용존산소농도 제어 결과를 Fig. 67에 나타내었다. 비례제어 상수의 값에 따라 offset 또는 진동이 발생하며, 단순 비례 제어기만으로는 복잡한 발효공정의 동특성을 제대로 조절할 수 없음을 알 수 있다. Fig. 68은 비례적분제어기를 사용하였을 때 배양기내 용존산소농도와 균사체 성장을 나타낸 것이다. 배양기내 용존산소농도가 설정치로 훌륭하게 제어됨을 알 수 있다. 비례적분미분제어기가 일

반적인 화학공정에서 가장 우수한 성능을 보이는 것으로 알려져 있으나, 생물공정과 같이 시변적이고 외부 교란에 민감한 시스템의 경우 미분제어기의 포함은 시스템의 안정성을 해치는 결과를 초래하기도 한다. 따라서 본 과제에서는 비례적분제어기를 사용하여 배양기내 용존산소농도를 조절하였고 제어기의 매개변수값은 전산모사를 통해 최적화된 값을 계산하였다. 일반적으로 제어기의 매개변수값을 구하기 위해서는 막대한 양의 실험과 튜닝과정을 거쳐야 하나 본 과제에서는 배양기의 상태를 정확하게 모사할 수 있는 모델을 세움으로써 실험 및 계산과정을 크게 줄일 수 있었다.

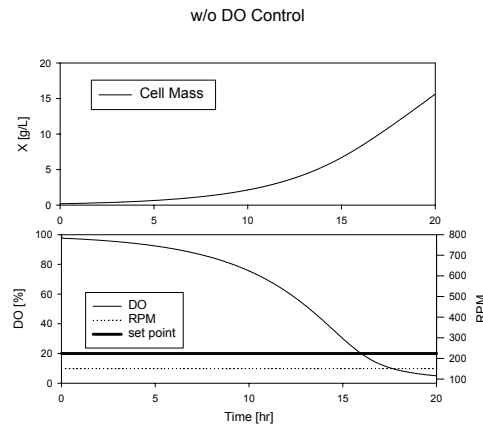
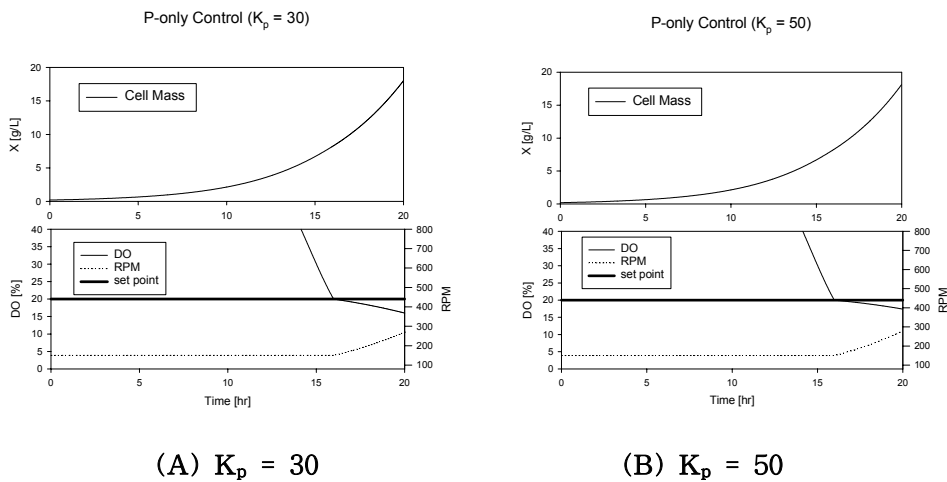


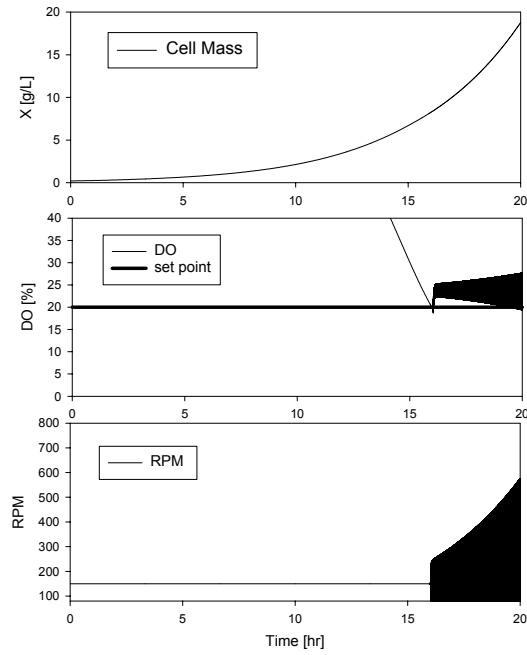
Fig. 66 용존산소를 제어하지 않을 경우 세포농도와 DO변화 (simulation study)



(A)  $K_p = 30$

(B)  $K_p = 50$

P-only Control ( $K_p = 6000$ )



(C)  $K_p = 6000$

Fig. 67. 단순비례제어기 사용시 용존산소농도 변화

PI Control ( $K_p = 50, \tau_i = 0.005$ )

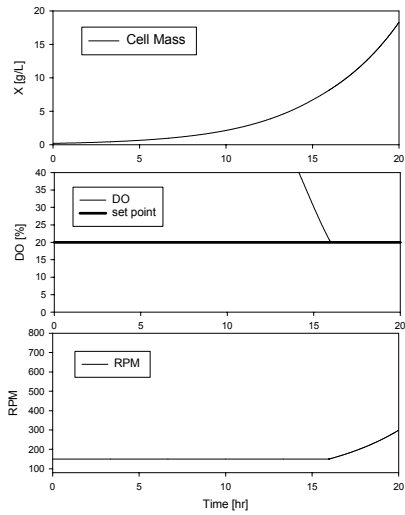


Fig. 68. 비례적분제어기 사용 시 용존산소 농도 변화

Track Control

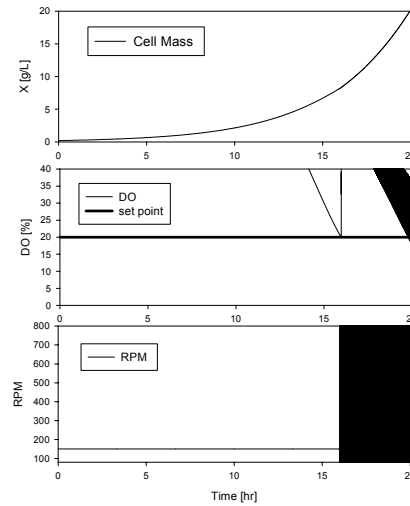


Fig. 69. track 제어기 사용 시 용존산소 농도 변화

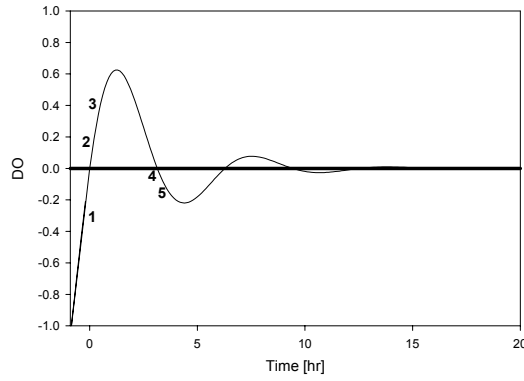


Fig. 70. DO 제어시 나타나는 overshoot 및 undershoot 현상

### 가. 교반속도 분석을 통한 배양공정 온라인 추정 시스템 개발

지금까지 배출가스 분석을 통해 배양공정을 정확히 모사할 수 있는 온라인 추정 시스템을 개발하였다. OUR이나 CER 등의 가스 데이터들은 손쉽게 측정할 수 있으며 정확하게 시스템을 파악할 수 있으나, 일반적으로 기체 분석기의 가격이 높고 잦은 보정(calibration) 작업이 필요한 단점 역시 존재한다. 본 연구에서는 이러한 단점을 보완하기 위하여 배양시 제어 입력 변수인 교반속도나 통기속도로부터 배양공정을 온라인으로 추정할 수 있는 자동화 시스템을 개발하고자 하였다.

용존산소가 일정하게 유지되는 조건에서 세포 성장 및 OUR, OTR은 다음과 같은 관계를 갖는다.

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR = 0 \quad (14)$$

$$OTR = k_L a \cdot (C^* - C_{O_2}) \quad (15)$$

$$OUR = \frac{\mu X}{Y_{X/O_2}} \quad (16)$$

식 (15)에서  $C_{O_2}$ 를 설정값에 가깝게 유지할 수 있으므로  $(C^* - C_{O_2})$ 항은 상수라 가정할 수 있다. 또한, 산소전달계수  $k_L a$ 는 교반속도 혹은 낮은 범위의 통기속도에 대하여 선형함수로 나타낼 수 있다. 따라서, 본 연구에서 OTR은 교반속도에 비례한다고 가정하였다.

$$OTR = a \cdot RPM \quad (17)$$

식 (14)와 (16), (17)로부터 아래와 같은 식을 얻을 수 있다.

$$RPM = \frac{\mu X}{Y_{X/O_2} \cdot a} \quad (18)$$

산소 수율이 일정하다고 가정하고 양 변을 적분하면,

$$\int RPM dt = \int \frac{\mu X}{Y_{X/O_2} \cdot a} dt = \frac{X}{Y_{X/O_2} \cdot a} \quad (19)$$

식 (18)을 (19)로 나누면 세포 비성장 속도를 얻을 수 있다.

$$\mu = \frac{RPM}{\int RPM dt} \approx \frac{RPM}{\sum RPM(k) \Delta t} = \frac{RPM}{SRPM} \quad (20)$$

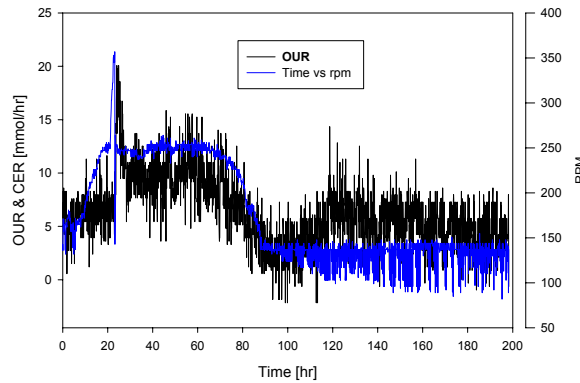


Fig. 71. Comparison of oxygen uptake rate against RPM in the batch fermentation

Fig. 71에 배출가스 분석에 의해 얻은 OUR값과 배양 도중의 RPM값을 나타내었다. 이 때 용존 산소농도의 설정치는 20%였다. 결과를 보면 RPM profile은 OUR profile과 상당히 유사한 패턴을 나타냄을 알 수 있다. 이는 식에서 예측한 것과 동일한 결과로, 고가의 기체 분석 없이 배양 도중 RPM만을 측정하더라도 배양 상태를 정확히 판단할 수 있는 가능성을 시사하는 것이다. 또한, 배출가스 분석값은 잡영이 심해 별도의 필터가 필요하나 제어 입력 변수를 측정치로 사용함으로써 잡영이 거의 없는 데이터를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 교반속도에 의한 배양 상태 분석시에 필수적인 선결 요인은 정밀한 용존산소농도 제어기의 개발인데, 본 연구에서는 이미 모델에 기반한 강력한 용존산소농도 제어기를 개발한 상태였으므로 본 시스템의 적용이 수월하였다고 생각된다.

대규모 배양에서 용존산소농도를 제어하기 위해 교반속도를 변화할 경우, 큰 동력비가 발생하고, 전단응력이 강해져 균사에 영향을 미칠 수 있어 대개 일정부분까지는 교반속도에 의한 제어를 하고 이후, 통기속도로 용존산소농도를 제어하게 된다. 이러한 점을 고려하여 현재 통기속도 profile에 의한 배양 상태 분석이 가능한지 검토중이다.

### 나. 공정 특성의 데이터베이스화 및 공정 모델링 개발

공정 개발시 모델 수립의 필요성은 다음과 같이 정리할 수 있다.

- ① 공정을 효과적으로 설계하고 최적화하기 위해서는 우수한 모델의 수립이 필수적이다.
- ② 실험자는 가능한 한 적은 실험 데이터로부터 많은 정보를 얻기 위해 효율적인 실험 설계가 필요하며 이 때 정확한 모델이 요구된다.
- ③ 모델을 이용하여 공정의 동적 특성 및 steady-state에서의 거동을 파악할 수 있다.
- ④ 모델은 제어기의 설계 및 튜닝에 유용하다.

따라서, 우수한 성능을 지니면서도 계산 부담이 적은 효율적인 모델의 수립이 필수적이다. 본 과제에서는 전년도 연구를 통해 균체생장과 에버택틴 생산, 기질 소비에 대한 모델을 수립하였고 그 성능을 검증한 바 있다.

배양 공정을 모델링하는 전형적인 과정은 다음과 같다.

- ① 모델구조 선정: 회분식 혹은 연속식 배양에서 얻은 데이터를 토대로 배양 동역학이 Monod 형태인지, 기질 저해 형태인지 등을 결정한다.
- ② 모델 매개변수 계산: 민감도 분석에 의해 모델에 큰 영향을 미치는 변수들을 선정하고 이를 문

현값 또는 실험 데이터로부터 계산한다.

이러한 과정에서 가장 핵심적인 부분은 모델구조를 선정하는 작업인데 모든 조건에 대해 잘 들어맞는 모델 구조를 선정하는 것은 매우 어려운 과정이다. 또한, 대부분의 모델 매개변수들은 회분식 배양 데이터로부터 얻어지는데 비해 실제 적용은 유가식 배양에서 이루어지는 경우가 많다. 유가식 배양과 회분식 배양에서의 배양 환경은 차이가 있으므로 회분식 배양에서 얻은 모델을 그대로 유가식 배양에 적용하기 어렵고 따라서, 별도의 개선 작업이 다시 반복되어야 한다.

실제 생산 현장에서 얻어지는 데이터는 주로 정성적인 형태이다. 즉, “DO가 갑자기 상승하면, 오염의 가능성이 높다.”처럼 수식이 아닌 문장으로 표현된다. 이러한 지식은 매우 유용한 정보이나 수학적 모델로 나타낼 수 없어 그 적용에 한계가 존재할 수밖에 없다. 본 연구에서는 현장에서 얻어지는 정성적 데이터를 이용하고, 새로운 상황이 발생하더라도 쉽게 변화가 가능한 유연한 형태의 구문론적 모델을 수립하였다. 이를 위하여 퍼지 시스템을 모델링 작업에 이용하였다.

퍼지 시스템은 규칙 기반 구조에 내재된 불확실성을 처리하기 위해 개발된 인공지능 기법의 하나로 다음과 같은 강점을 지니고 있다.

- ① 불확실한 데이터를 처리하고 추론할 수 있다.
- ② 충분치 못한 데이터에 대해서 action을 취할 수 있다.

따라서, 배양공정과 같은 비선형적인 복잡한 시스템에 적합하여 제어기 수립 등에 응용하려는 시도가 있어 왔다.

본 연구에서는 퍼지 시스템을 이용하여 전년도 연구에서 얻은 실험 결과로부터 정성적 모델을 수립하였고 이를 실제 실험에 적용하였다.

## 1) 배양 특성 추출

이전의 실험 결과로부터 에버맥틴 배양 공정에 있어 다음과 같은 사실을 확인할 수 있었다.

- ① 생산균주가 대사하기 쉬운 glucose보다 soluble starch를 외부에서 첨가하는 경우, 에버맥틴 B<sub>1a</sub> 생합성이 더욱 촉진되었다.
- ② polyketide계열의 이차대사산물인 에버맥틴의 생산성은 soluble starch의 농도에 영향을 받았는데 탄소원 농도가 높을 경우 catabolic repression에 의해 생산성이 감소하였다.
- ③ 배양 초반부터 생산균주가 대사하기 쉬운 탄소원이 다량으로 존재할 경우 에버맥틴의 생합성이 급격히 감소하였다.
- ④ 추가적으로 탄소원을 외부에서 공급하는 유가식 배양의 경우, 배양 전반에 걸쳐 탄소원이 공급되므로 polyketide계열의 이차대사산물인 에버맥틴 B<sub>1a</sub> 생합성량이 회분식 배양에 비해 최고 100% 이상 증가하였다.
- ⑤ 세포비성장 속도가 정밀하게 조절되지 않을 경우 세포의 배양생리학적 특성이 변화하여 오히려 회분식 배양보다 좋지 않은 결과를 얻었다.
- ⑥ 세포가 활발히 성장하는 세포 성장 단계에서는 산소흡수율이 증가한다.
- ⑦ 에버맥틴 생산시 산소흡수율은 일정한 값을 갖는다.
- ⑧ 영양원이 고갈하면 세포 성장은 물론 에버맥틴 생합성도 멈추게 된다.

## 2) 퍼지 모델 수립

제한 기질의 종류가 하나이고 (본 시스템의 경우 soluble starch), 세포 유지에 필요한 에너지를 무시할 만하다고 가정하면, 다음과 같은 물질수지식을 수립할 수 있다.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (21)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\sigma X \quad (22)$$

$$\frac{dP}{dt} = \pi X \quad (23)$$

유가식 배양에서는 기질 공급에 따라 부피가 변화하므로 물질수지식은 아래와 같이 수정되어야 한다.

$$\frac{dXV}{dt} = \mu XV \quad (24)$$

$$\frac{dSV}{dt} = FS_F - \sigma XV \quad (25)$$

$$\frac{dPV}{dt} = \pi XV \quad (26)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (27)$$

이 때, 모델링의 목적은 비속도식인  $\mu$ ,  $\sigma$ ,  $\pi$  등을 상태 변수인  $X$ ,  $S$ ,  $P$  등으로 표현하는 것이다. 수학적 모델에서 모델 구조를 선정하는 작업 대신 퍼지 모델에서는 규칙을 세우고 모델 매개 변수 계산 대신 각각의 멤버 함수들을 최적화하는 방식으로 모델링이 이루어진다. 이러한 작업에 의해 구축된 모델은 규칙의 삽입과 제거, 수정에 의해 모델 구조가 유연하게 변화할 수 있으므로 손쉽게 개선이 가능하여 쉽게 적용할 수 있는 강점이 존재한다.

이전의 실험으로부터 추출한 데이터로부터 모델을 수립하였고, 그 결과를 Fig. 72와 73에 나타내었다.

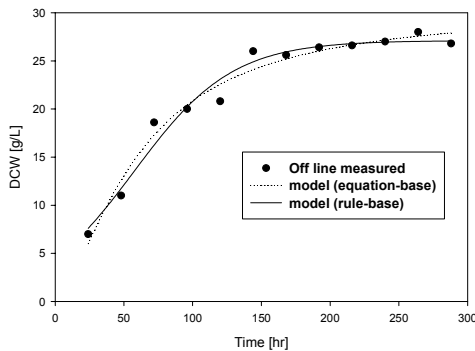


Fig. 72. Modeling for avermectin fermentation process (cell mass)

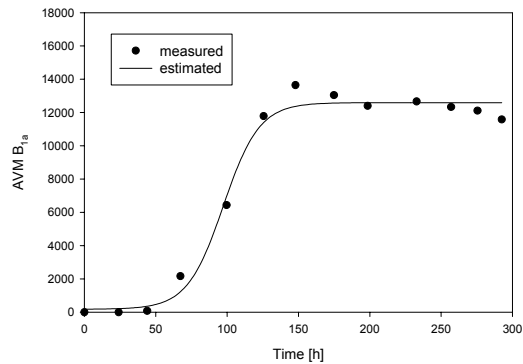


Fig. 73. Modeling for avermectin fermentation process (AVM B<sub>1a</sub>)

그림에서 나타나듯이 정성적인 퍼지 모델로도 수학적 모델 못지 않게 시스템을 정확히 모사할 수 있었으며 유연한 특성을 가지므로 실제 현장에서 그 장점이 더욱 부각되리라 기대된다.

본 과제에서 개발한 공정에 따라 500 L 발효조에서 에버멕틴 시제품을 얻을 수 있었으며 현재 생산 규모인 5톤 및 30톤 배양에 대해 기 개발된 공정의 타당성을 검토하고 있다.

#### 다. 접종량에 따른 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 및 배양 parameter 비교

이차대사산물 생합성에 큰 영향을 미치는 변수인 비성장속도 ( $\mu$ )는 생산배지의 접종량, 생산 배지의 조성 및 배양조건 등에 의해 결정된다. 본 연구에서는 접종량에 따른 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 및 건조균체량을 비교하였고, 상기의 실험에서 확립된 배출가스 분석 시스템을 이용해서 중요 배양변수인 *OUR*과 *CER*을 비교분석하였다. 2.5 L bottom-driven fermentor (조업부피 1.5 L)를 이용하



여 발효기 배양을 수행하였다. 생산배지는 배지 최적화를 통해 AVM B<sub>1a</sub> 생합성을 위한 최적 배지로 선택된 2.2X soluble starch 배지를 이용하였다. 성장배양은 500 ml flask에 100 ml의 성장배지를 첨가한 후 spore를 접종하여 28°C, 230 rpm으로 48 시간동안 배양한 후, 발효기로 1, 5, 10 % (v/v)으로 접종하였고 공기는 sintered steel sparger를 이용하여 1 vvm으로 공급하였다. 교반은 6-flat-blade turbine impeller를 이용하였고, 교반속도는 용존산소 수준을 고려하여 150 ~ 250 rpm으로 조정하였다. Fig. 74A에는 세가지 조건에서의 산소흡수율을 나타내었다. 산소흡수율을 살펴보면, 접종량이 10% (v/v)인 경우 lag phase 없이, 배양 초반부터 급격히 증가하여 약 48시간에 최고의 산소흡수율 (약 33 O<sub>2</sub> mmol/L/hr)을 나타내었다. 접종량이 1 % 혹은 5 % 인 경우에도 유사한 결과를 확인 할 수 있었다. 또한 산소흡수율의 수준이 접종량에 비례하는 것을 볼 수 있다. 이러한 결과는 산소흡수율이 배양액 내의 세포농도를 반영하기 때문으로 판단된다. 배양 조건이 동일한 경우, 배양 말기로 가면 배양액 내의 영양분의 고갈로 인하여 접종량과 관계없이 산소흡수율이 모든 조건에서 유사한 수준으로 감소하는 것이 일반적인데, 본 결과의 경우, 모든 조건에서 약 48시간 이후의 산소흡수율은 배양시간에 관계없이 거의 일정하게 유지되었다. 이는 세 가지 조건에서 모두 용존산소가 심각하게 제한되었기 때문으로 판단되었다 (데이터 미제시). 배지 최적화가 이루어지기 전에 사용되었던 1X soluble starch (60 g/L)배지를 이용하여 생산균주를 배양할 경우, 탄소원이 비교적 소량 사용되어 상기의 운전조건으로도 용존산소가 배양 전반에 걸쳐 높은 수준으로 유지되었지만, 플라스크 배양을 이용한 배지 최적화를 통해 획득한 생산배지인 2.2X soluble starch (132 g/L)배지를 이용할 경우, 생산균주의 증식 및 대사가 더욱 활발해짐으로 인해 동일한 운전조건으로 배양하더라도 용존산소가 제한되는 결과를 보인 것으로 추론할 수 있다. 즉, 세 가지 조건에서 배양 말기까지 배양액 내에 영양분이 어느 정도 존재함에도 불구하고 용존산소가 제한됨으로 인해 생산균주의 대사가 저해되었고, 이로 인해 배양 말기에 도달하더라도 산소흡수율이 크게 감소하지 않은 것으로 판단된다. Fig. 74B의 이산화탄소생성을 또한 산소흡수율과 유사한 경향을 보였다.

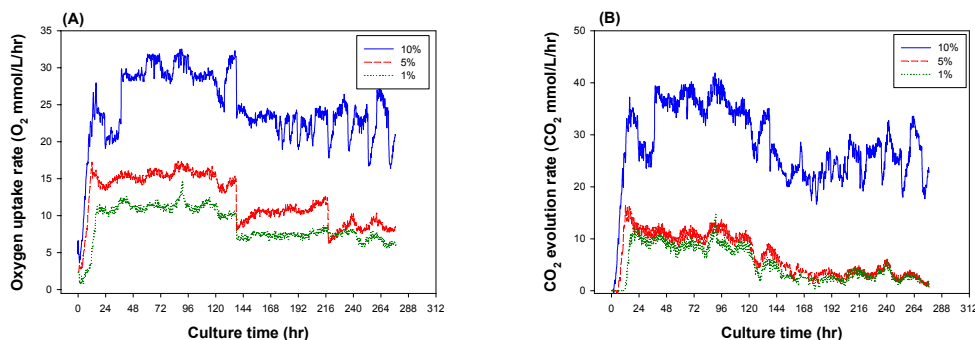


Fig. 74. (A) Oxygen uptake rate (*OUR*) and (B) carbon dioxide evolution rate (*CER*) according to inoculum size in the batch fermentations performed in a 2.5 L bioreactor (OMT250-1 strain and 2.2 X soluble starch medium were used).

본 실험에서의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 및 건조 균체량을 Fig. 75에 나타내었다. 우선 건조균체량을 살펴보면, 접종량이 클 경우 배양 전반에 걸친 건조균체량 또한 큰 것을 확인할 수 있다 (Fig. 75A). 배양 초기 접종된 생산균주가 일정 농도까지 성장 한 후, 탄소원의 점차적인 고갈과 함께 세포의 성장 및 대사에 필수적인 용존산소 요구량이 발효조에서 공급할 수 있는 용존 산소량을 초과함으로써 인해 생산균주의 성장 속도 및 대사가 제한되고 있음을 알 수 있었다. AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 비교한 결과 (Fig. 75B), 1 %와 5 % 접종한 조건에 비해 10 % 접종한 조건에서 약 2배 높은 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 나타내었다. 상기의 여러 결과들은 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 뿐만 아니라 생산균

주의 성장에 있어서도 접종량이 매우 중요한 요인이라는 것을 입증해 주는 결과이다.

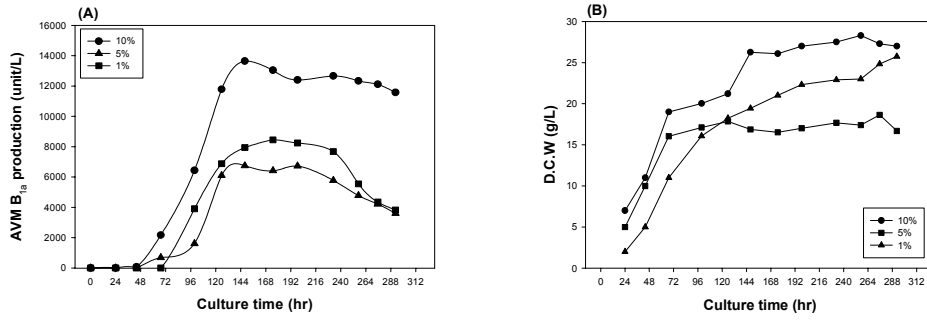


Fig. 75. Time-course profiles of (A) AVM B<sub>1a</sub> production and (B) dry cell mass according to inoculum size in batch fermentations performed in a 2.5 L bioreactor (OMT250-1 strain and 2.2 X soluble starch medium were used).

#### 라. 종균 배양공정 선정 및 설계

주발효(main fermentation)의 생산성은 비성장속도나 기질소모속도, 용존산소 농도 뿐만 아니라 전단계에서 공급되는 종균의 상태에 크게 좌우된다. 전년도 연구를 통해 접종량에 대한 균체량 및 에버맥틴 생산성을 살펴 본 결과, 접종량이 높을수록 균체량 및 에버맥틴 생산성이 좋았으며 OUR, CER 등 대사상태를 나타내는 지표 역시 높은 값을 나타내었다 (Fig. 76, 77). 따라서, 종균 배양단계를 순차적으로 거처가며 충분한 접종량을 공급하는 것이 바람직하나 산업적 대량 생산에서는 다음 사항이 고려되어야 한다. 첫째, 전배양 단계가 많아질수록 종균 배양기가 추가되어야 하므로 공장 건설비가 높아지는 단점이 있다. 둘째, 이송 단계가 많아지면 오염의 확률도 그만큼 높아지게 된다.

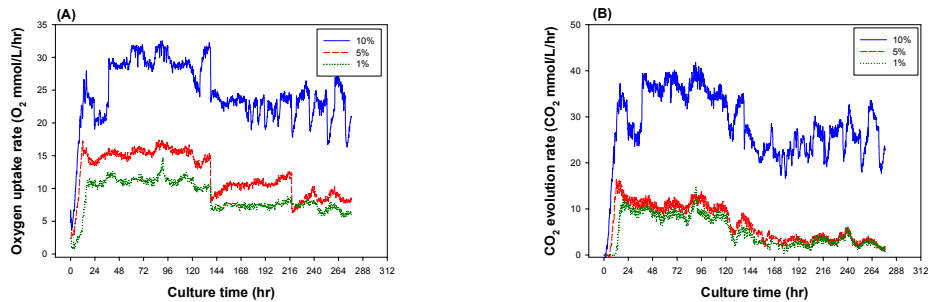


Fig. 76. (A) Oxygen uptake rate (OUR) and (B) carbon dioxide evolution rate (CER) according to inoculum size in the batch fermentations performed in a 2.5 L bioreactor

이러한 점을 고려하여 종균 배양 공정을 수립하였다 (Fig. 78). 1번 전략은 접종량을 10%로 고정한 것으로 lab scale에서의 실험 결과를 토대로 수립한 것이며 2번째 전략은 주배양조에서의 접종량(10% v/v)을 제외하고 나머지 종균 배양은 1% 접종량으로 고정한 것이다. 그림 5-1을 보면 접종량에 관계없이 모든 조건에서 약 48시간 이후 대사 활성이 크게 증가하지 않는 것으로 나타났으며 이는 세가지 조건에서 모두 용존산소가 심각하게 제한되었기 때문이다. 그러나, 주배양과 달리 희석된 배지를 사용하는 종균 배양에서는 용존산소가 크게 문제가 되지 않아 낮은 접종량에서도 세포의 활성이 크게 저하되지 않을 것으로 판단된다. 또한 전년도 연구 결과를 바로 적용하기 위해 주배양이 2.5 L 배양기에서 이루어지는 점을 감안하여 생산 단계의 접종량은 10%로 결정하

였다.

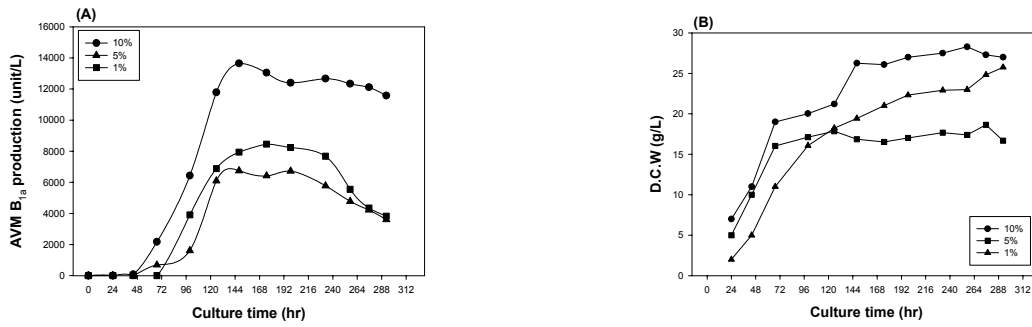


Fig. 77. Time-course profiles of (A) AVM B<sub>1a</sub> production and (B) dry cell mass according to inoculum size in batch fermentations performed in a 2.5 L bioreactor

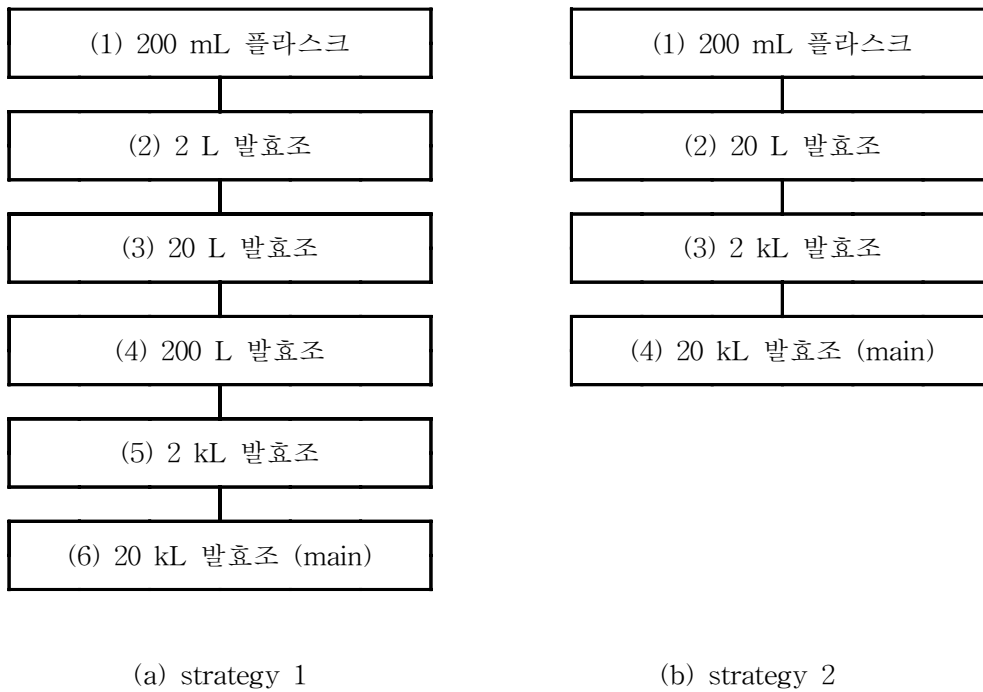


Fig. 78. Process development for cell growth stage

원하는 균체량을 얻는데 필요한 시간은 지수성장을 가정하였을 때 다음의 식으로 표현할 수 있다.

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

$$t_{10} = \frac{\ln 10}{\mu} = \frac{2.303}{\mu} \quad (2)$$

$$t_{100} = \frac{\ln 100}{\mu} = \frac{4.605}{\mu} \quad (3)$$

위 식에 의하면, 접종량의 변화에 상관없이 최종 배양 단계까지 걸리는 시간은 일정하다. 그러나, 균사 형성 미생물의 경우 일정 농도 이상 균체가 성장하면 물질전달 저해 현상이 발생하여 균체는 선형적으로 증가하게 된다. 따라서, 접종량이 달라질 경우, 전체 평균 배양 시간이 달라질 수 있는데 본 연구에서는 이러한 영향을 고려하기 위하여 간단한 세포 성장식을 모델링하였으며 이송 조건을 최적화하기 위하여 다음과 같은 이송 조건에 대하여 전산모사를 수행하였다 (Table 9).

Table 9. Conditions for simulation studies

	200 mL	2 L	20 L	200 L	접종균체량
1	60 h	60 h	60 h	60 h	30 kg
2	120 h	-	120 h	-	30 kg
3	96 h	-	96 h	-	30 kg

전산모사결과를 Fig. 79와 Table 10에 나타내었다.

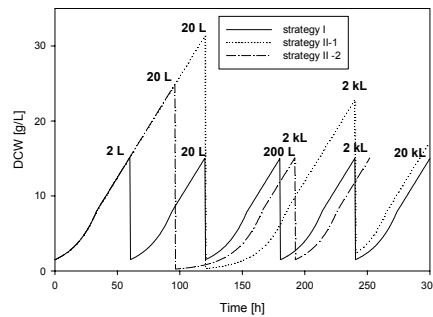


Fig. 79. 배양 전략에 따른 평균배양 공정 profile

Table 10. 이송시점 및 평균배양 시간

	200 mL	2 L	20 L	200 L	2 kL	평균배양시간
1	60 h	60 h	60 h	60 h	60 h	300 h
2	120 h	-	120 h	-	50 h	290 h
3	96 h	-	96 h	-	60 h	252 h

Table 10에 나타나듯이, 평균 배양 공정 전략을 수립함으로써 평균배양시간을 크게 줄일 수 있으며 필요한 평균 배양기의 개수를 최소화함으로써 생산원가를 저감할 수 있을 것으로 기대된다. 다만, 균사형성 미생물의 경우 morphology 역시 공정의 성능을 결정하는 주요한 변수이며 접종량에 따라 균사의 morphology가 크게 달라질 수 있으므로 이에 대한 면밀한 확인 작업이 필요할 것이다.

마. 500L 발효기 배양을 통한 고생산성 AVM B<sub>1a</sub> 생산균주의 생산 안정성 조사 및 생산 균주간의 배양 생리적 특성 비교 연구

본 연구에서는 제1위탁과제인 균주개발 연구를 통해 획득한, Fe 저항성을 지닌 고생산성·고안정성의 원형질융합 균주들을 이용하여 5L 및 50L 발효기에서 성장배양한 후, 500L (조업 부피: 350L) scale-up 발효기에서 생산배양을 수행하였다. 실험실 수준에서 생산성이 높은 균주라 하더라도 배양 규모가 증가하면 배양 조건이 확연히 변화하기 때문에 생산 균주의 생산성이 감소하는 것이 일반적인 현상이다. 또한 본 실험에서는 유전적으로 안정성이 매우 낮다고 알려진 방선균 배양을 목적으로 하고 있기 때문에, 대규모 배양조건에서 생산균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성을 확인하는 절차는 산업화 생산을 목적으로 할 경우 매우 중요한 단계라고 할 수 있다.

본 연구에서는 고생산 균주들의 유전적 안정성을 대규모 500L 발효기에서 조사하기 위해 각 균주들을 동일한 조건에서 2회씩 배양하였다. Fig. 80A에는 원형질 융합체를 모균주로 하여 선별한 0.7 ppm의 FeCl<sub>3</sub>에 대한 저항성 균주 중 가장 높은 생산성을 보인 SM-4 균주를 이용하여 500 L 발효기에서 배양 생리적 특성 및 생산균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성을 조사하였다. 각 균주들을 2회씩 배양하였지만 배양변수들의 변화경향이 유사하기 때문에 1차 배양의 결과만을 나타내었다. 우선 배양 기간 동안의 용존산소 변화 양상을 살펴보면, 배양 10시간부터 급격히 감소하다가 20시간을 전후로 해서 약 80% 까지 증가하여 배양 말기까지 높은 수준으로 유지되는 것을 볼 수 있다. 다음으로 pH 변화양상을 살펴보면, 배양이 지속될수록 5.4까지 감소하는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 생산균주가 탄소원을 소모하면서 유기산을 생성하기 때문으로 판단된다. 일반적으로 배양액 내의 탄소원이 고갈되면 pH가 다시 증가된다. 그러나 본 배양에서는 pH가 다시 증가되는 현상을 발견할 수 없었다. 이를 근거로 본 배양에서는 배양 말기까지 탄소원이 고갈되지 않은 것으로 판단된다. Fig. 80B에는 본 배양에서의 이산화탄소 생성율을 나타내었다. 변화 양상을 살펴보면 배양 시작 후 약 20시간에 가장 높은 수치를 보이고 배양 말기까지 감소하는 것을 볼 수 있다. 이러한 경향은 용존산소의 변화경향과 일치하는 것으로, 배양 초기에 세포의 성장이 활발히 일어난다는 것을 추론할 수 있다. 본 배양에서의 건조균체량 및 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 Fig. 81에 나타내었다. 우선 건조균체량을 살펴보면 배양 초기부터 약 10 g/L의 건조균체량을 보이는데, 이는 배지 성분 중 불용성 물질에 의한 것으로 판단된다. 그러나 약 72시간부터 배양 말기까지 건조균체량은 크게 증가하지 않는 것을 확인할 수 있다. 이러한 현상은 상기의 용존산소 및 이산화탄소 생성율에서 언급하였듯이, 배양 초기에 세포의 성장이 급격히 이루어지고 그 이후에는 천천히 일어나기 때문으로 판단된다. 또한 2회의 배양에서의 건조균체량 변화 양상이 거의 일치하는 것을 볼 수 있다. 다음으로 AVM B<sub>1a</sub> 생산경향을 살펴보면 세포성장 속도가 감소하는 약 72시간부터 생합성이 시작되는 것을 볼 수 있는데 이러한 경향은 이차대사산물 생합성의 일반적인 현상이라고 할 수 있다. 1차 배양에서의 최고 생산성은 약 14000 units/L이지만 2차 배양에서는 약 12000 units/L의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 나타내었다. 약 2000 units/L의 차이로 보이지만 500L의 대규모 발효기 조건과 생산균주 자체가 고생산성 원형질융합 균주임을 감안할 경우, AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성이 꽤 높다고 판단할 수 있었다.

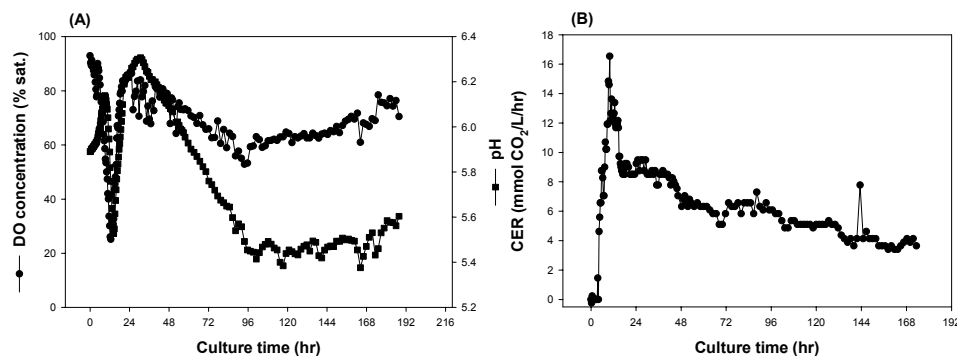


Fig. 80. Time-course profiles of (A) DO concentration and pH and (B) carbon dioxide evolution rate in 500 L fermentor with SM-4 strain.

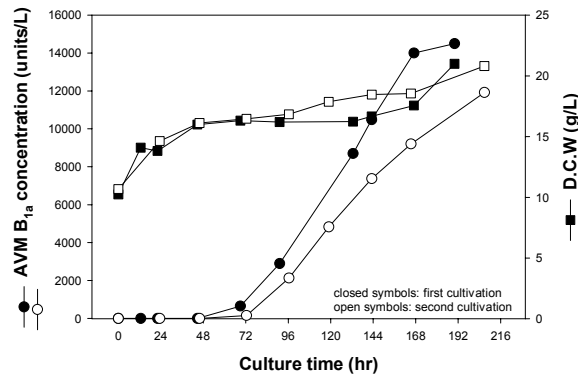


Fig. 81. Time-course profiles of AVM B<sub>1a</sub> concentration and dry cell weight in 500 L fermentor with SM-4 strain.

다음으로 FeCl<sub>3</sub> 1.0 ppm에서 저항성을 보인 SAM-18 균주의 배양 생리적 특성 및 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성을 조사하기 위해 500L 발효기에서 2회 배양을 수행하였다. Fig. 82A에는 본 실험에서의 용존산소 및 pH 변화경향을 나타내었다. 2 차례의 실험에서의 용존산소 및 pH 변화경향은 거의 동일하게 나타났다. 그러나 건조균체량 및 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 살펴본 결과, 건조균체량은 거의 동일하지만 2회 배양간의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 크게 차이나는 것으로 확인되었다 (Fig. 82B). 이러한 현상은 유전적 불안정성에서 기인하는 것으로 생각된다. 본 균주는 SM-4 균주와는 최대 AVM B<sub>1a</sub> 생산성은 비슷하지만 생산 안정성은 매우 낮기 때문에 대규모 배양을 통한 AVM B<sub>1a</sub> 생산에 이용하는데 있어 적합하지 못한 균주로 판단되었다.

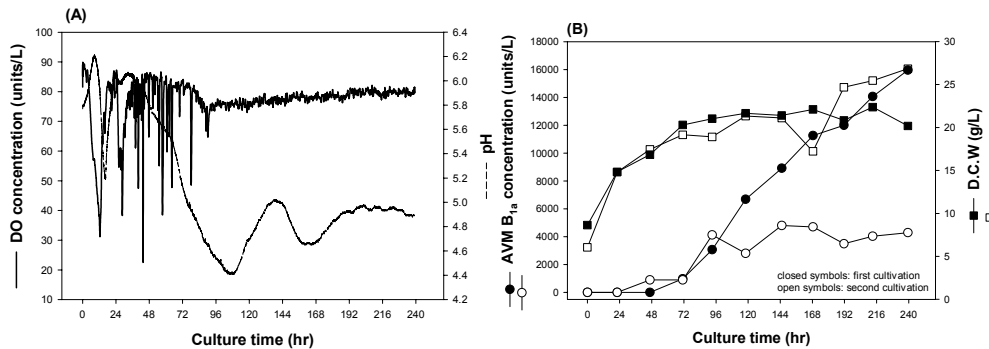


Fig. 82. Time-course profiles of (A) DO concentration and pH and (B) AVM B<sub>1a</sub> concentration and dry cell weight in 500 L fermentor with SAM-18 strain.

Fig. 83A에는 지속적인 Fe 저항성 균주 선별 과정을 거쳐 선별한 균주인 SAM-18.3.9의 2회 배양에서의 용존산소 변화경향 및 이산화탄소 생성율을 나타내었다. 용존산소 변화 경향 및 이산화탄소 생성율은 상기의 균주들과 거의 동일한 것으로 나타나므로 생산균주의 배양 자체는 원활히 수행되었다는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 83B에는 건조균체량 및 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 나타내었다. 건조균체량은 2회의 배양에서 거의 동일한 것을 확인하였고 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 또한 192시간에서 약 15000 units/L로 유사한 것을 확인할 수 있었다.

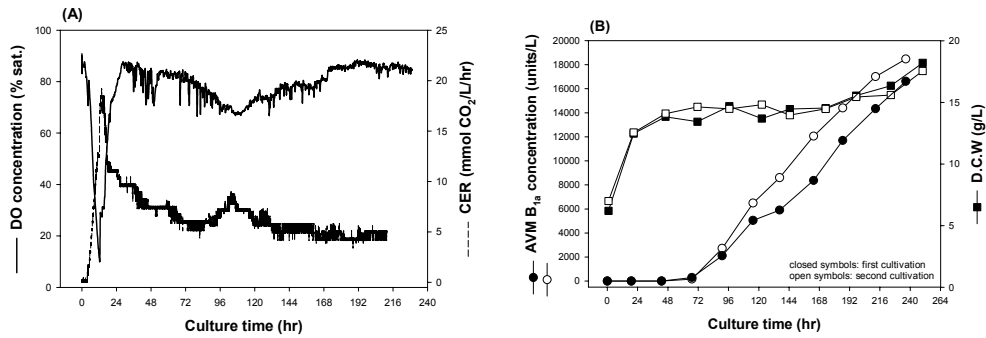


Fig. 83. Time-course profiles of (A) DO concentration and carbon dioxide evolution rate and (B) AVM B<sub>1a</sub> concentration and dry cell weight in 500 L fermentor with SAM-18.3.9 strain.

Fig. 84에는 1.5 ppm의 FeCl<sub>3</sub>에 저항성을 보이는 SSM-6균주의 각종 배양 parameter를 나타내었다. 용존산소 변화 경향 및 이산화탄소 생성율을 상기의 균주들과 거의 동일한 것을 알 수 있었다. 그러나 AVM B<sub>1a</sub> 생산성은 타 균주에 비해 약 30 % 이상 향상된 것으로 확인되었을 뿐만 아니라, 2회 배양에서의 생산성이 거의 유사하여 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성 또한 매우 높다는 것을 알 수 있었다. 본 균주는 대규모 배양을 통한 AVM B<sub>1a</sub> 생산의 산업화에 있어서 매우 적합한 균주라고 판단되었다. Table 11에 500 L 발효기를 이용한 배양 실험에서 사용된 균주들의 AVM B<sub>1a</sub> 생산 관련 parameter를 제시하였다. 배양기간을 192시간으로 고정하여 비교한 결과, FeCl<sub>3</sub>에 대한 저항성을 늘리면서 지속적으로 screening을 수행한 결과 SSM-6 균주의 경우 SM-4균주와 비교할 때, 최대 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 약 30% 향상된 것을 확인할 수 있었다. 그리고 specific production rate 또한 향상된 것을 확인할 수 있었다. 주목할 점은 균주 개발이 진행되면서 2회의 500 L 배양간의 최대 AVM B<sub>1a</sub> 생산성의 차이가 감소한다는 점이다. 다시 말해서 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성이 크게 증가한다는 점이 매우 중요하다고 할 수 있다. 본 연구결과를 요약하면 Fe에 대한 저항성의 원형질융합 균주를 선별하면서 생산균주가 가지고 있는 유전적 불안정성을 획기적으로 극복할 수 있었고, 500L 발효기 배양에서의 안정성을 확인함으로써 대규모 배양을 통한 AVM B<sub>1a</sub>의 산업적 생산이 가능하다는 주목할 만한 결과를 제시할 수 있었다.

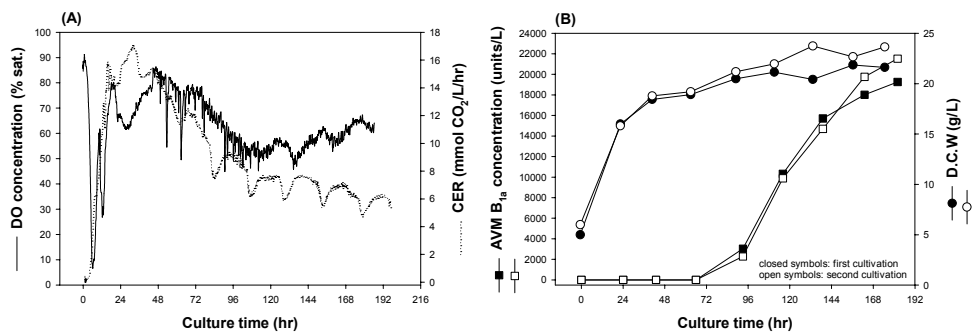


Fig. 84. Time-course profiles of (A) DO concentration and carbon dioxide evolution rate and (B) AVM B<sub>1a</sub> concentration and dry cell weight in 500 L fermentor with SSM-6 strain.

		AVM B <sub>1a</sub> production (units/L)	D.C.W (g/L)	specific production (units AVM B <sub>1a</sub> /hr)	specific production rate (units AVM B <sub>1a</sub> /g cell/hr)	deviation of the AVM B <sub>1a</sub> production between two cultures (units/L)
SM-4	1st	14492	21.0	75.5	3.6	3690
	2nd	10802	20.5	56.3	2.7	
SAM-18	1st	12120	21.3	63.2	2.5	7879
	2nd	4241	25.0	22.1	0.9	
SAM-18.3.9	1st	12200	16.1	63.5	3.9	3220
	2nd	15420	16.3	80.3	4.9	
SSM-6	1st	18200	22.3	94.8	4.2	1250
	2nd	19450	23.1	101.3	4.4	

Table 11. Comparison of parameters related to AVM B<sub>1a</sub> production between four strains in 500 L fermentor (culture time was 192 hours)



## 2. 제 1 세부 위탁과제:

### 원형질융합에 의해 안정성있는 avermectin B<sub>1a</sub> 고생산성 돌연변이주 개발 및 배양생리학적 특성 조사

#### 가. 돌연변이 유발을 통한 AVM B<sub>1a</sub> 생산 증가 변이주의 선별 및 배양(250ml 플라스크 배양)

##### 1) 지방산 생합성 저해제에 대한 저항성 균주 선별

AVM B<sub>1a</sub> 고생산 균주를 얻기 위해 모세포로 사용된 *S. avermitilis* ATCC 31272의 변이주에 대해 NTG를 이용하여 돌연변이를 유도하여 획득한 약 30개의 단일 균주의 배양액에 동량의 methanol을 첨가하여 AVM B<sub>1a</sub>를 추출한 뒤 HPLC 정량분석을 실시하였다. 분석 결과 모균주는 AVM B<sub>1a</sub>를 거의 생산하지 못하는 것으로 확인되었고, 지방산 합성 저해제인 pFAC 100 mg/l에 대한 저항성을 보인 균주들이 0 ~ 4200 unit/l의 다양한 생산성을 보였다 (Fig. 85). 본 실험의 결과로 모균주가 유전적 특성이 다른 두 개 이상의 세포로 구성된 population이라는 것과 유전적인 특성으로 인해 이차대사산물의 합성이 안정되게 이루어지지 않음을 알 수 있어 지속적인 screening을 통해 AVM B<sub>1a</sub>를 안정적으로 합성하는 단일 colony를 얻어야 한다는 것을 확인할 수 있었다. 돌연변이를 유발시킬 경우 DNA의 double strand 중 하나의 strand에서만 돌연변이가 일어날 수 있다. 이러한 경우 돌연변이 유발과 random screening을 병행하여 유전적으로 동일한 colony를 획득하여야 한다. 이를 위해 5번 균주의 단일 포자들을 얻은 후 2일 동안 성장배지에서 배양한 후, 3개의 동일한 생산배지에 동일하게 접종하여 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 확인하였다 (Fig. 86). 그 결과 동일한 배양 조건에도 불구하고 생산 tube마다 다른 생산성을 보였다. 이러한 불안정성은 *streptomyces*에서 보여지는 유전적 불안정성, 즉 높은 자발적 돌연변이율 (spontaneous mutation rate)과 서론에서 언급했던 avermectin PKS loading medoule의 낮은 기질 특이성으로부터 기인한 결과인 것으로 판단된다.

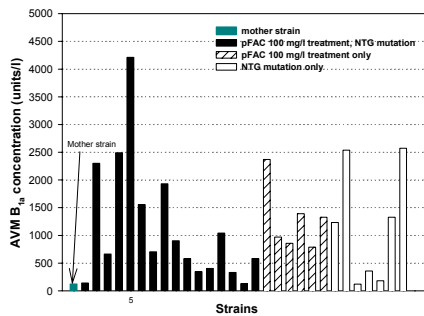


Fig. 85. AVM B<sub>1a</sub> production by various mutants resistant to fatty acid biosynthesis inhibitor (pFAC).

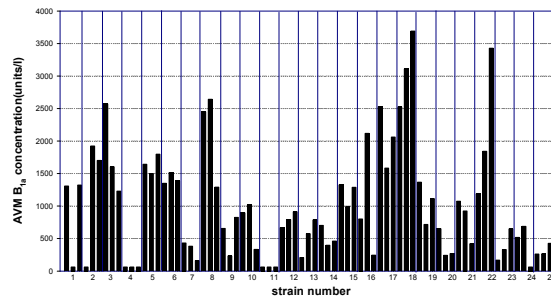


Fig. 86. AVM B<sub>1a</sub> production by various strains derived from further random screening in triplicate test tube cultivations (10 ml culture volume).

지방산 생합성 저해제에 대한 저항성 변이주는 지방산과 생합성 경로를 공유하는 polyketide 대사산물의 생합성이 동시에 증가되거나, 혹은 지방산 합성량이 낮아도 생존 가능한 균주일 것이다. 본 실험에서는 전자의 경우를 기대하여 PFA-1을 모균주로 하여 pFAC의 농도에 따른 저항성 균주를 선별하였다. 200~1200 mg/l의 pFAC를 최소한천배지에 첨가하여 pFAC에 대한 저항성 변이주를 선별한 결과 다양한 생산성을 보이는 균주들을 선별할 수 있었다 (Fig. 87). 이 중 가장 높은 AVM B<sub>1a</sub> 생산량을 보였던 pFAC 200 mg/l의 저항성 균주를 PFAC-1.8이라 명명하였다. 그리고 계속해서 저항성을 증가시키기 위하여 이 변이주를 모균주로 하여 300 mg/l의 pFAC에 대한 저

항성 돌연변이주를 선별한 결과 (Fig. 88), AVM B<sub>1a</sub> 생산량이 큰 폭으로 증가하여 11,000 units/l 을 나타내는 균주를 선별하여 pFAC 182라고 명명하였다. 또한, random screening을 수행하여 선별한 colony들의 생산성이 거의 일정한 것을 확인할 수 있었는데, 이는 pFAC 저항성 변이주 또한 초기 모균주보다 안정성이 크게 증가하였음을 제시해 주는 결과이다. Fig. 89는 지방산 생합성 저해제인 pFAC를 이용하여 rational screening을 수행한 종합적인 결과이다. 지방산 합성저해제에 대한 저항성 균주는 낮은 AVM B<sub>1a</sub> 생합성량을 보였던 초기 모균주에 비해 생산성과 안정성이 월등히 증가한 것을 볼 수 있다.

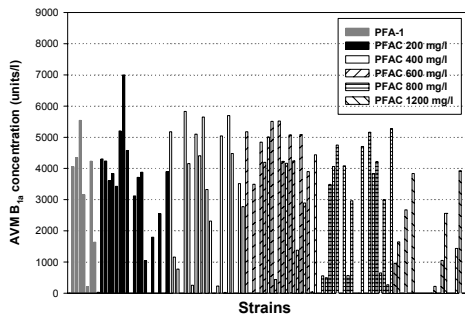


Fig. 87. AVM B<sub>1a</sub> production by various fatty acid biosynthesis inhibitor (pFAC)- resistant mutants in test tube cultivations (10 ml culture volume).

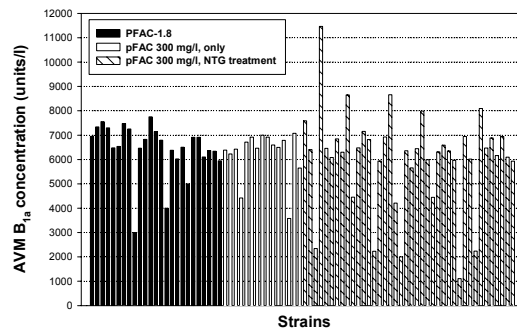


Fig. 88. AVM B<sub>1a</sub> production by resistant mutants against 300 mg/l of pFAC in test tube cultivations (10 ml culture volume).

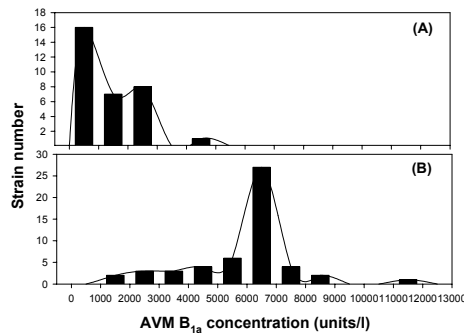


Fig. 89. Histograms for (A) initially screened unstable mutants and (B) stable mutants derived from treatment of 300 mg/l of fatty acid biosynthesis inhibitor (pFAC).

## 2) AVM B<sub>1a</sub>로의 방향성 생산 변이주 유도: PFA-1 변이주 이용 및 250ml 플라스크 배양

실험방법의 "사"에서 언급했던 것처럼 isoleucine 유사체인 OMT (O-methyl threonine)에 대한 저항성 변이주는 AVMs 중 small "a" component의 전구체인 isoleucine을 과량으로 생합성하여 궁극적으로 AVM B<sub>1a</sub>를 과량 생산할 수 있고 이로 인해 AVM B<sub>1a</sub>로의 생합성량을 증가시켜 방향성이 향상될 것으로 판단된다. 이러한 전략에 따라 이전의 random screening에 의해 획득한 18번 균주를 PFA-1이라 명명하고, NTG에 의해 돌연변이를 유도하여 isoleucine antimetabolite인 OMT에 대한 저항성 균주를 선별하기 위해 최소배지에 여러 농도의 OMT를 첨가하여 실험하였다 (Fig. 90). 10~80 mg/l의 OMT가 첨가된 배지에서 생존한 colony에 대한 생산성을 확인해 본 결과 AVM B<sub>1a</sub> 생산성은 0~7,000 units로 다양한 생산성을 보였고 이 중 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 증

가된 변이주가 있는 반면 모균주보다 낮은 생산성을 보이는 균주도 관찰되었다. 한편 한번의 실험으로 변이주의 저항성을 급격히 증가시킨 경우 (OMT 80 mg/l), 생산성이 오히려 모균주보다 낮은 것을 볼 수 있다. 이러한 현상은 균주 개발에 있어서, 계획적이고 체계적으로 저항성을 증가시켜야 생산성 또한 유사하게 증가한다는 것을 제시해주고 있다. 본 실험의 결과 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 능력이 우수한 2개의 균주를 분리하여 ENP1.78, ENP1.88로 명명하였다. 지속적인 돌연변이와 screening에 의해 모균주보다 생산성이 증가한 변이주를 선별할 수 있었지만, 모균주가 AVM B<sub>1a</sub> 생산의 불안정성을 보였기 때문에 생산의 안정성을 확인해 보았다. Fig. 91은 선별된 몇 종의 변이주를 성장배지에서 배양한 후에 동일한 조성의 3개의 생산배지에 접종하여 250ml 플라스크에서 배양한 후 (triplicate 배양), AVM B<sub>1a</sub>의 생합성량을 비교한 결과이다. 각각의 변이주마다 약간의 생산성 차이는 있었지만 초기 모균주 보다 안정성이 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

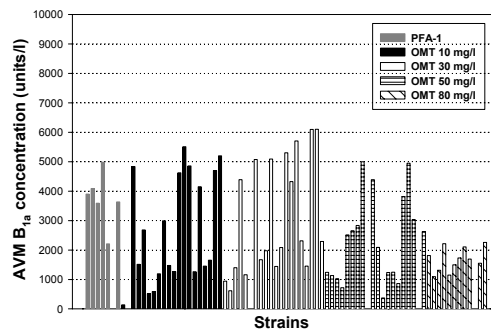


Fig. 90. AVM B<sub>1a</sub> production by isoleucine anti-metabolite resistant mutants in 250ml flask cultivations (50 ml culture volume).

저항성을 증가시키기 위해 OMT 50 mg/l에서 저항성을 띄었던 ENP1.78을 NTG를 이용하여 돌연변이를 유도하여 OMT 80 mg/l의 농도에서 저항성 돌연변이주를 선별한 후 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성능력을 확인하였다 (Fig. 92). AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 소실된 변이주도 선별되었지만, 모균주에 비해 약 20% 향상된 생산성을 보이는 변이주를 선별할 수 있었고 이 변이주를 ENP88-69이라 명명하였다. 또한 이번 실험의 모균주였던 ENP-1.78을 돌연변이를 유도하지 않고 random screening한 결과 선별된 colony들의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 거의 일정한 것을 확인할 수 있었다. 이는 초기 불안정한 모균주에서는 관찰할 수 없었던 현상으로, 변이주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산에 있어서 안정성이 크게 증가되었음을 제시해 주는 결과이다. 연속적으로 저항성을 높이기 위하여 ENP88-69을 OMT 100 mg/l의 농도에서 저항성 돌연변이주를 선별하였다 (Fig. 93). 그 결과 모균주에 비해 약 2배의 생산성을 보이는 변이주를 분리할 수 있었고, 이 균주를 ENP88-207이라 명명하였다.

Fig. 94에 OMT의 농도에 따른 변이주들의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성에 대한 histogram을 나타내었다. 초기에 screening된 불안정한 돌연변이주 (A)의 대부분이 0에서 4000 unit/l로 낮은 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 보이는 반면, OMT의 농도를 높여가며 돌연변이를 유도한 결과 선별된 변이주 (B, C)는 고생산성인 균주의 portion의 증가로 인해 x축의 오른쪽으로 치우치는 것을 확인할 수 있었다.

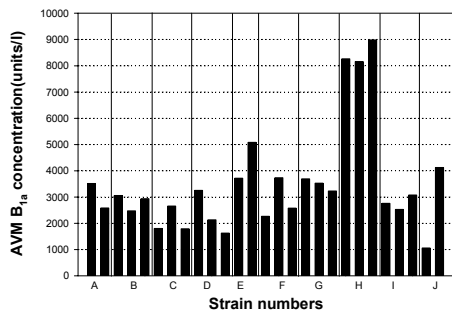


Fig. 91. AVM B<sub>1a</sub> production by various strains derived from rational screening method in triplicate 250ml shake-flask cultivations (50 ml culture volume).

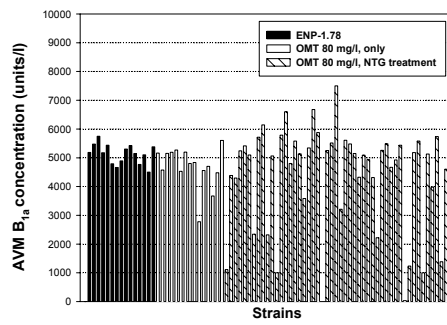


Fig. 92. AVM B<sub>1a</sub> production by resistant mutant against 80 mg/l of OMT in 250ml shake-flask cultivations (50 ml culture volume).

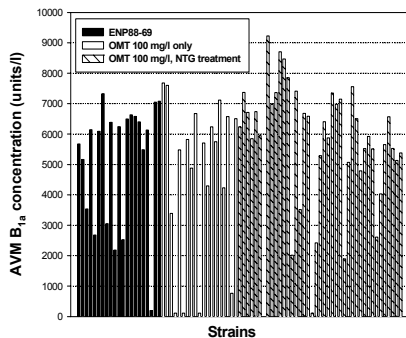


Fig. 93. AVM B<sub>1a</sub> production by resistant mutant against 100 mg/l of OMT in 250ml shake-flask cultivations (50 ml culture volume)

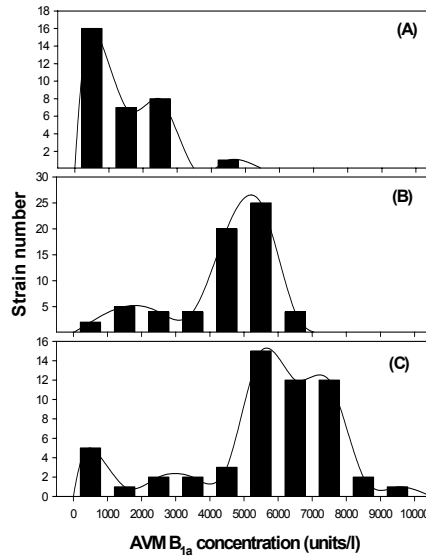


Fig. 94. Histograms for (A) initially screened unstable mutants, and stable mutants derived from treatment of (B) 80 mg/l and (C) 100 mg/l of isolucine antimetabolite (*O*-methyl threonine)

### 3) AVM B<sub>1a</sub> 생산의 최적배지 탐색: 초반 선별된 생산균주를 이용한 생산배지 성분 조사

이차대사산물의 생산은 일차대사와는 달리 배지의 성분에 매우 큰 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 동일한 이름의 배지라고 하더라도 제조 회사와 생산되는 시기에 따라 배지의 조성이 어느 정도는 달라지기 때문에 배지의 선택은 이차대사산물 생산에 있어 매우 중요하다. 본 실험에서는 각각 20 여종의 탄소원과 질소원 중 AVM B<sub>1a</sub> 생산이 최적으로 이루어지는 배지를 탐색하였다. 포자형성 배지에서 생산균주의 포자를 회수한 후 실험방법에 제시한 성장배지에서 2일간 28℃에서 배양한 후 생산배지에 10% (v/v)으로 접종하였다. 생산의 기본 배지 조성은 다음과 같다: skim milk 15 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/l, PEG 2000 2.5 g/l.

상기의 기본 배지에 다양한 탄소원을 60 g/l로 첨가하고 질소원으로 yeast extract 10 g/l로 첨가하여 배양을 수행하였다. 배양 결과 soluble starch를 탄소원으로 첨가한 경우 AVM B<sub>1a</sub>가 약



## 나. 균주개발과 병행한 반응표면분석법을 이용한 AVM B<sub>1a</sub> 생산배지 최적화

1) 초기 생산배지에 대한 반응표면 분석법 수행 - 균주개발 중간 단계에서 선별된 생산균주 이용  
 이차대사 산물에 의해 생산되는 이차대사 산물의 경우, 세포 성장배지와 생산배지의 성분은 판  
 이하게 다르다. 즉 성장배지의 경우 가능한 한 높은 농도의 생산균주를 얻을 수 있는 배지 성분  
 이 선호되지만, 생산배지의 경우 배양액 내에 미생물이 쉽게 이용할 수 있는 탄소원이 필요 이상  
 의 과량으로 존재할 경우, 세포 성장은 원활한 반면 원하는 산물을 생산하기 위한 이차대사는 심  
 하게 catabolite repression을 받을 수 있으므로 생산배지 성분 및 농도에 대한 정밀 조정이 필요  
 하다. 이러한 이차대사의 생리학적 특성으로 인해, 이차대사산물인 AVM B<sub>1a</sub>의 경우도 생산배지  
 성분을 최적화 시킬 때 그 생산성이 극대화될 수 있을 것으로 판단되었다. 균주 개발 과정 중 중  
 간단계에서 선별된 안정적인 생산균주를 이용해서 초기 생산배지 성분의 최적 농도를 결정하기  
 위해 통계학적 반응표면 분석법인 중심합성계획법 (central composite design, CCD)을 수행하였  
 다. 그 설계와 실험결과를 Table 12과 Fig. 97A에 나타내었다. 성장배지에서 2일간 배양한 생산균  
 주를 설계에 의해 정해진 각각의 성분이 첨가된 생산배지에 10% (v/v)으로 접종하여 7일간 배양  
 하여 AVM B<sub>1a</sub>의 생산량을 비교 조사하였다. RSM 분석 결과 X<sub>1</sub>과 X<sub>3</sub>의 P값이 0.05이하로 유의  
 한 것을 알 수 있었다. 즉 soluble starch와 skim milk 그리고 soybean meal이 서로 연관관계가  
 있다고 나타났다. 2차 회귀모형식을 추정하였을 때, AVM B<sub>1a</sub>는  $y=341.9223+52.8401*X_1-44.1599X_3^2$  이었다. Soluble starch와 soybean meal의 상관관계를 살펴본  
 결과, 최적점을 확인하지는 못하였지만 soluble starch의 농도가 증가할수록 AVM B<sub>1a</sub>의 생산이  
 증가하고, soluble starch와 skim milk의 상관관계에서도 soluble starch가 중요한 요인으로 작용한  
 다는 것을 알 수 있었다.

2) 개량된 생산배지에 대한 반응표면 분석법 재수행-고생산성 균주 이용

상기의 초기 생산배지를 이용한 실험 결과에 의해 soluble starch의 농도를 더욱 증가시킨 개량  
 된 생산배지에 대해 실험설계를 다시 하여 반응표면분석을 재수행 하였다. 본 실험에 사용한 균주  
 는 AZL 저항성 변이주로서 상기 RSM실험에서 사용했던 균주보다 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 약 3배 이  
 상 향상된 안정성이 검증된 균주이다. 본 연구과정중 생산균주가 고생산성 균주로 점점 개량됨에  
 따라 이들 균주들의 생리학적 특성도 점차로 변화하였으므로, 이들의 특성에 맞추어 배지 성분 및  
 농도를 다시 최적화해야 하는 필요성이 제시되었다. 배지 성분 조사를 위해 통계학적 방법인  
 Plackett-Burman 방법을 수행하지 않았으나, 대신 정해진 배지 성분의 농도를 최적화하기 위해  
 통계학적 방법인 반응표면분석법 (RSM)을 이용하여 연구를 수행하였다 (Table 13, Table 14). 회  
 귀계수와 P값에 (Table 15) 따라 반응 표면 2차 회귀모형식을 구한 결과식은 다음과 같다.

$$Y = 485.9156+61.2946*X_4-83.2740*X_1^2 \\ -100.0941*X_3^2+91.6366*X_1*X_3$$

분석 결과로부터 얻어진 P값에 의해 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 경우 P<0.05로 유의성이 인정되었으나, soluble  
 starch, skim milk, soybean meal의 경우에는 P>0.05로 유의성이 없는 것으로 나타났으며, soluble  
 starch와 soybean meal 간의 교호작용만을 확인할 수 있었다. Soluble starch와 soybean meal의  
 농도 변화에 따른 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성을 3차원 반응표면 및 contour plot을 이용하여 도식화하였  
 다 (Fig. 97B). AVM B<sub>1a</sub>의 생산성을 최대로 해주는 배지농도는 soluble starch의 경우 대략 100  
 g/l였으며, soybean meal의 경우에는 대략 10 g/l임을 알 수 있었다.

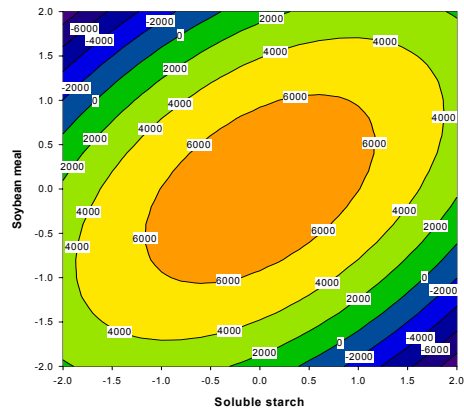
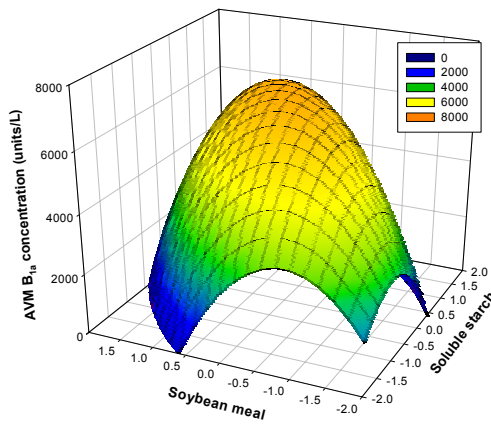
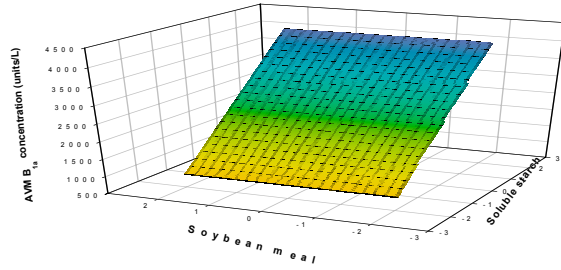


Fig. 97. (A) Above: Response surface of AVM B<sub>1a</sub> production (1st experiment) (B) Below: Response surface of AVM B<sub>1a</sub> production (2st experiment) (below) (3-D response surface and contour plot of AVM B<sub>1a</sub> concentration as function of soluble starch and soybean meal).

Table 12. The level of independent variables (1차 수행)

	-2	-1	0	+1	+2
SS	40	50	60	70	80
SK	8	9	10	11	12
SM	11	13.5	15	16.5	18
PP	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6

Table 13. The level of independent variables (2차 수행)

	-2	-1	0	+1	+2
SS	60	80	100	120	140
SK	5	10	15	20	25
SM	4	7	10	13	16
PP	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9

※ SS : Soluble starch; SK : Skim milk; SM : Soybean meal; PP : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Table 14. The central composite design for the 4 independent variables (variables are combined by  $2^k$  factorial point, central point and axial point).

	SS	SK	SM	PP
1	+	+	+	+
2	+	+	+	-
3	+	+	-	+
4	+	+	-	-
5	+	-	+	+
6	+	-	+	-
7	+	-	-	+
8	+	-	-	-
9	-	+	+	+
10	-	+	+	-
11	-	+	-	+
12	-	+	-	-
13	-	-	+	+
14	-	-	+	-
15	-	-	-	+
16	-	-	-	-
17	+ $\alpha$	0	0	0
18	- $\alpha$	0	0	0
19	0	+ $\alpha$	0	0
20	0	- $\alpha$	0	0
21	0	0	+ $\alpha$	0
22	0	0	- $\alpha$	0
23	0	0	0	+ $\alpha$
24	0	0	0	- $\alpha$
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0



Table 15. Coefficients of regression equations for the response surface method obtained by use of sigma plot software program.

	Coefficient	Std. Error	t	P
<b>y0</b>	<b>485.9156</b>	<b>89.5107</b>	<b>5.4286</b>	<b>&lt;0.0001</b>
a1	28.8391	22.3777	1.2887	0.2057
a2	-20.0552	22.3777	-0.8962	0.3761
a3	28.1629	22.3777	1.2585	0.2163
<b>a4</b>	<b>61.2946</b>	<b>22.3777</b>	<b>2.7391</b>	<b>0.0096</b>
<b>a11</b>	<b>-83.2740</b>	<b>28.5260</b>	<b>-2.9192</b>	<b>0.0060</b>
a22	-32.2513	28.5260	-1.1306	0.2657
<b>a33</b>	<b>-100.0941</b>	<b>28.5260</b>	<b>-3.5089</b>	<b>0.0012</b>
a44	-53.7329	28.5260	-1.8836	0.0677
a12	-37.5610	27.4069	-1.3705	0.1790
a23	-38.7997	27.4069	-1.4157	0.1655
<b>a31</b>	<b>91.6366</b>	<b>27.4069</b>	<b>3.3436</b>	<b>0.0019</b>
a14	41.7546	27.4069	1.5235	0.1364
a24	9.6119	27.4069	0.3507	0.7278
a34	37.5756	27.4069	1.3710	0.1789

**다. Rational screening에 의한 AVM B<sub>1a</sub> 고생산성 균주 신속 선별 (10ml 배지의 miniature tube 배양 시스템 적용)**

일반적으로 고생산 균주 개발에 있어서 가장 중요한 단계 중 하나는 가능한 한 대량의 균주를 테스트하여 그 가운데서 고생산성을 지닌 균주를 신속히 선별하는데에 있다. 본 연구에서 개발한 Miniature 배양 방법은 기존의 실험방법을 소규모화 시킴으로써 사용되는 배지와 실험 기자재의 비용을 줄일 수 있으며, 또한 유기용매 등의 사용과 발효 찌꺼기를 감소시킬 수 있는 장점이 있다. 일반적으로 전형적인 균주 개발 시스템을 가동시에 일주일당 1인당 약 500개의 플라스크 배양을 수행할 수 있으며, 이 경우 고생산 균주를 얻을 확률이  $10^{-4}$ 임을 고려할 때 단기간에 고생산성인 새로운 균주를 얻을 확률은 매우 낮을 수 밖에 없다. 따라서 고생산 변이주의 신속한 선별을 위해 miniature 실험 (10ml tube 이용)을 통한 변이주의 대량선별 방법을 시도하였으며, 그 실험방법은 다음과 같다 (Fig. 98).

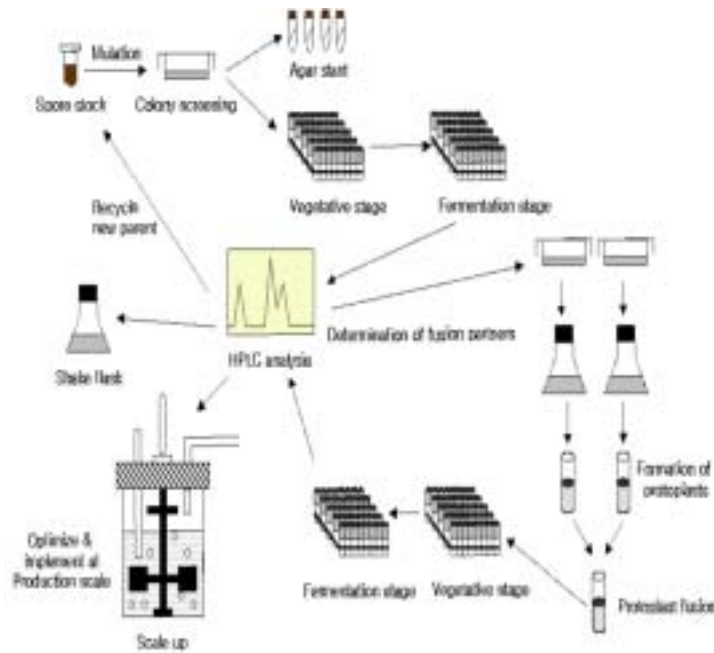


Figure 2. Schematic representation of a protoplast fusion system.

Fig. 98. Schematic representation of a rapid screening system for selection of high yielding mutants and protoplast fusants.

우선 mother 균주의 포자현탁액으로부터 각각의 분리주를 얻어 agar slant에서 배양하여 충분한 양의 포자를 수거하였다. 이 포자를 적당량 취하여 가장 바람직한 morphology를 제공하는 10 ml의 성장배지에 접종하여 약 5일간 tube 배양을 수행한 후, 다시 10ml의 생산배지에 일정량 접종하여 7-8일 정도의 tube 배양을 수행하였다. 그 결과 기존의 250ml 플라스크 배양 시 사용되는 배지양보다 5~10배 이상 감소된 양으로 배지 비용을 절감할 수 있었을 뿐만 아니라 다량의 균주를 쉽게 처리할 수 있었다. 성장 단계와 생산 단계의 tube 배양 후, 정확한 HPLC 방법을 적용하여 상위 10~20 %의 고생산 분리주를 선별하였고, 이를 4배수로 250ml 플라스크 배양(50ml 생산배지 사용)과 scale-up된 발효조 배양 (5ℓ)을 통해 생산성을 확인하는 절차를 거쳤다. 원형질융합을 통한 변이주 선별 뿐만 아니라 단순변이주 선별에도 이러한 miniature 실험을 적용함으로써 고생산 균주 선별을 보다 신속하게 수행하고자 하였다 .

#### 1) 아미노산 유사체에 대한 단일 저항성 변이주 선별(miniature tube 배양시스템 적용)

Random screening에 의하여 분리한 실험 균주 중 AVM B<sub>1a</sub> 생합성 능력이 우수한 균주를 RS-1이라 명명하고, 이 균주를 isoleucine의 아미노산 유사체인 O-methylthreonine(OMT) 및 azaleucine(AZL)이 다양한 농도로 첨가된 각각의 최소 한천 배지에 UV나 NTG와 같은 돌연변이 과정 없이 도달한 후 형성된 colony를 분리하였다. 분리된 colony를 사면배지에 접종하여 7일간 28°C에서 배양한 후 포자를 30ml test tube에 10ml 부피의 성장배지에 접종한 후 48시간 동안 28°C, 230 rpm에서 배양하였다. 이와 같이 배양된 생산균주를 10ml 부피의 생산배지로 10% (v/v)으로 접종하여 7일간 배양하였다.

#### 가) Azaleucine(AZL)에 대한 저항성 균주 선별

AZL 저항성 균주를 선별하기 위한 최소 처리(MIC) 농도를 결정하기 위해 AZL을 증류수에 녹인 뒤 최종 농도가 0~4.0 mg/ℓ가 되도록 최소배지에 첨가하여 살아 남은 세포수를 측정하였다. 그 결과 2.0 mg/ℓ 이상에서 99.9%의 높은 치사율을 보였다 (Fig. 99). HPLC 정량분석을 수행한

결과, 모균주인 RS-1의 경우 매 실험시 마다 평균 4,000~4,500 units/ℓ의 AVM B<sub>1a</sub>가 생합성되었으나 다양한 농도의 AZA에 대한 저항성 균주들의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성은 10ml tube 배양시 매우 넓게 분포되어 있는 것으로 나타났다 (Fig. 100). Azaleucine 2.8 ppm에 저항성을 보인 균주 중 약 5,500 units/ℓ로 모균주에 비해 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 다소 향상된 AVM B<sub>1a</sub>를 생합성한 변이주를 ZH2.8이라고 명명하였다. AZL 0.4 ppm에서 저항성을 띤 균주도 모균주에 비해 생산성이 높았으나 계대배양시 생산성이 떨어지는 등 균주의 안정성이 떨어져 선별에서 제외시켰다. 본 실험의 histogram에서도 알 수 있듯이 초기 균주 개발시에는 대부분이 0~1,000 units/ℓ의 낮은 범위로 X축의 왼쪽에 치우쳐 분포하는 것을 확인할 수 있었다. 대부분의 변이주는 모균주보다 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성이 감소하는 것으로 나타났지만 ZH2.8 (5,500units/ℓ)이나 ZH3.0-6 (6,500units/ℓ), ZH3.5-31 (9,600units/ℓ)과 같이 모균주 보다 향상된 생산성을 보이는 균주도 획득할 수 있어, AZL에 대한 저항성 균주 개발을 계속 진행할 경우 고생산성 균주를 획득할 수 있을 것으로 판단되었다 (Fig. 101, 102).

3.0에서 5.0 ppm의 AZL에 대한 저항성 변이주를 선별한 결과도 상기의 실험 결과와 마찬가지로 변이주들은 매우 다양한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 나타냈다. AZL 4.0 ppm에 대한 저항성을 보인 변이주 중 약 9,200 units/ℓ의 생산성을 보인 변이주를 획득할 수 있었고 이 균주를 ZH 4.0-1로 명명하였다 (Fig. 103, 104). 본 실험 결과, 특정 농도의 AZL 저항성 균주에서의 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성이 특별히 뛰어나지는 않았지만 대체적으로 3.0 ppm~3.5 ppm의 AZL 농도에서 저항성을 보인 균주들이 그 이상의 AZL농도에서 저항성을 띤 균주들 보다는 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 좀 더 안정된 것으로 나타났다. 즉 Fig. 105과 Fig. 106에 나타난 바와 같이 저항성을 급격히 높일 경우 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 오히려 감소하는 결과를 보여주었다. 이러한 현상은 균주 개발에 있어서, 계획적이고 체계적으로 저항성을 증가시켜야 생산성 또한 점진적으로 증가될 수 있음을 제시해주고 있다. 주목할 점은, AZL에 대한 저항성 균주 선별 결과를 나타낸 histogram에서도 알 수 있듯이 균주 개발을 거듭할수록 X축의 AVM B<sub>1a</sub>의 생산 범위가 더욱 넓어졌으며, 생산성이 높은 오른쪽으로 점점 치우쳐 분포되는 모양으로 변해 갔다는 점이다.

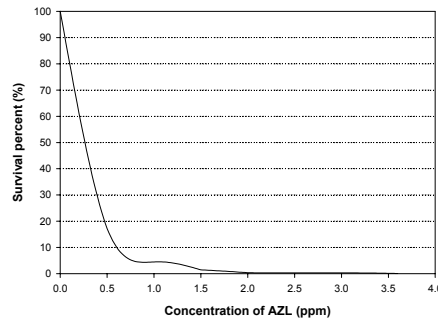


Fig. 99. Survival percent according to the azaleucine concentration.

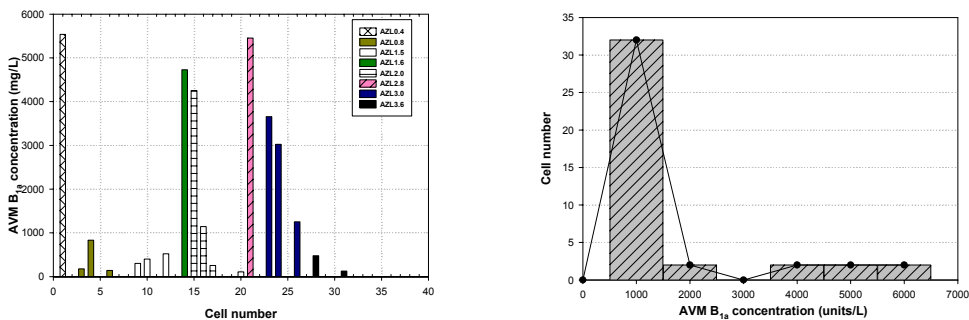
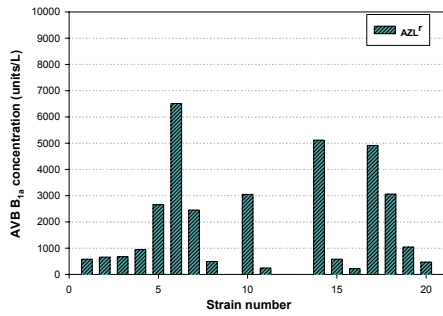
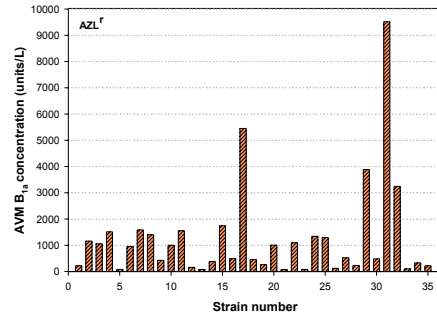


Fig. 100. AVM B<sub>1a</sub> production and histogram by the initial mutants resistant against various concentrations of AZL.

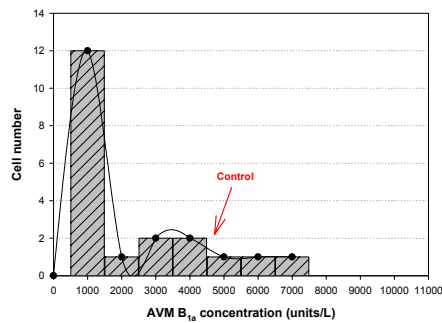


(A)

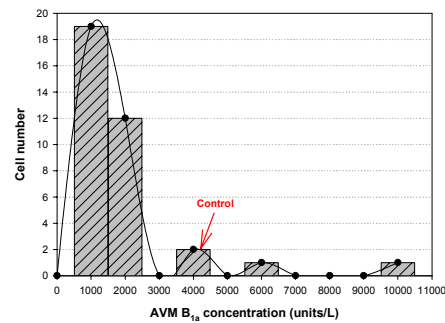


(B)

Fig. 101. Comparison of avermectin B<sub>1a</sub> production by the initial mutants resistant against various concentrations of AZL. (A) AZL 3.0ppm, (B) AZL 3.5 ppm



(A)



(B)

Fig. 102. Comparison of AVM B<sub>1a</sub> production by the initial mutants resistant against various concentrations of AZL. (A) AZL 3.0 ppm, (B) AZL 3.5 ppm

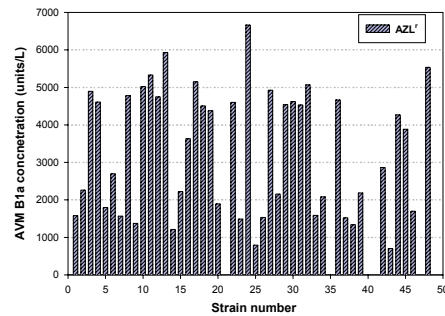
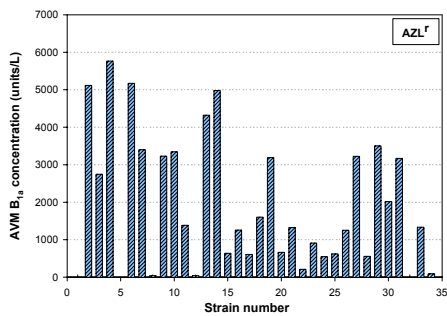


Fig. 103. AVM B<sub>1a</sub> production by the mutants against various concentration of AZL in the middle screening stage (10ml culture volume).

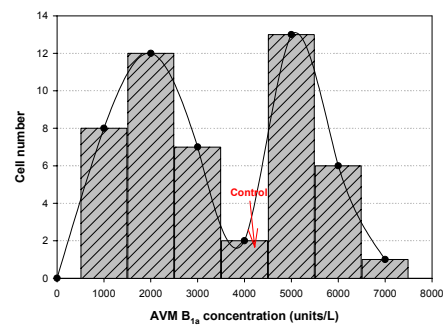
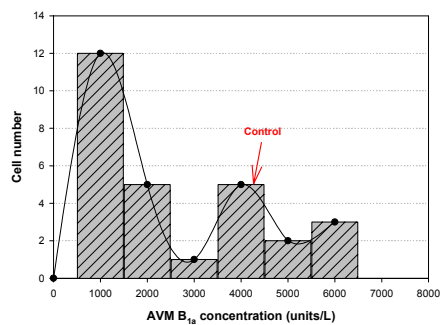


Fig 104. Histogram for AVM B<sub>1a</sub> production as shown in Fig. 103.

요약하면, Isoleucine 유사체 저항성 균주 선별을 통해 고생산성 균주 및 원형질체 융합시 사용할 다양한 partner를 획득하기 위해 여러 농도에서 AZL 저항성 균주 선별을 miniature 배양을 통해 계속 수행한 결과, 0 units/ℓ 에서 최고 10,000 units/ℓ 의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 보여주는 균주들이 나타났으며, 이들 중 계대배양을 통하여 생산성에 대한 안정성 조사를 거쳐, 재선별된 균주들을 원형질체 융합시 fusion partner로 사용하였다. 이에 대한 결과는 후반부의 원형질체 융합에 대한 결과에서 제시하도록 하겠다. 또한 본 실험 균주의 특성상 용존산소가 AVM B<sub>1a</sub> 생산성에 큰 영향을 주는 것으로 발효조 배양 결과 확인된 바 있어, 이런 고생산성 균주들을 flask 배양을 통해 생산성을 재확인해 본 결과, 동일한 균주임에도 불구하고 이전의 tube 배양에서의 AVM B<sub>1a</sub>의 생성성에 비해 최고 6배인 25,500 units/ℓ 까지 생산성이 향상된 결과를 얻을 수 있었다(후반부에서 자세한 결과 제시).

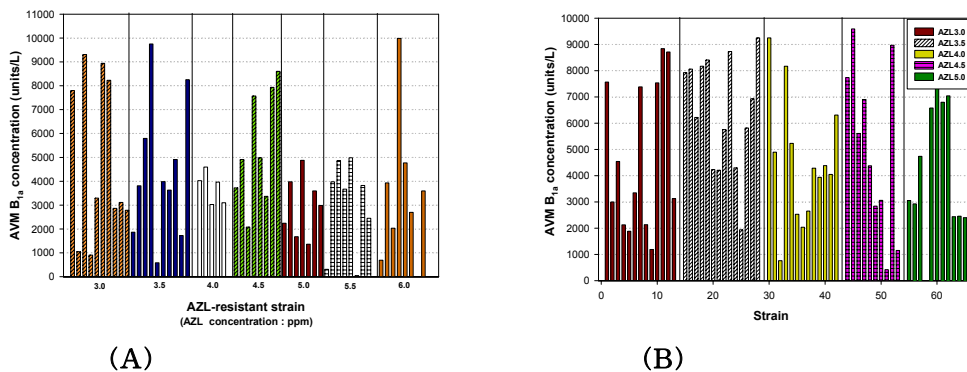


Fig. 105. AVM B<sub>1a</sub> production by the AZL resistant mutants according to various AZL concentrations.

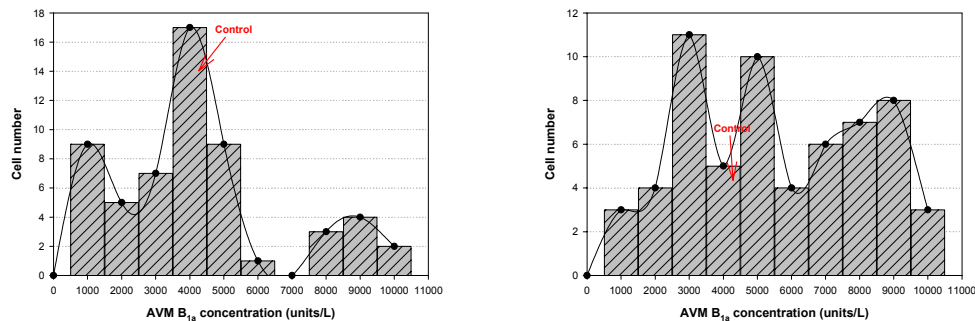


Fig. 106. Histogram for AVM B<sub>1a</sub> production as shown in Fig. 105.

나) O-methyl threonine(OMT)에 대한 저항성 균주 선별(miniature tube 배양시스템 적용)

원형질체 융합을 시도할 경우 두 가지 이상의 선택인자가 필요하기 때문에 isoleucine의 또 다른 아미노산 유사체인 OMT (o-methyl threonine)에 대한 저항성 변이주를 획득하고자 하였다. RS-1을 모균주로 하여 다양한 농도의 OMT에 대한 저항성 변이주를 선별한 후 miniature 배양을 수행하였다. 선별된 OMT 저항성 변이주들은 azaleucine 저항성 변이주와 마찬가지로 매우 다양한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 보여주었다. 대부분 모균주 보다 낮은 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 보였지만, 모균주 보다 생산성이 다소 향상된 균주를 TH100-2라 명명하고(Fig. 107), 그 균주를 모균주로 하여 OMT의 농도를 높혀 저항성 균주를 선별한 결과, OMT 150 ppm에서 저항성을 보인 변이주들 중 약 5,600 units/ℓ 의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 보인 변이주를 TH150-5이라 명명하였고(Fig. 107, 108),

계대배양을 통한 안정성 조사를 거쳐 재현성이 어느 정도 유지되는 것을 확인한 후 원형질체 융합시 fusion partner로 사용하고자 하였다. 그러나 fusion partner로 사용하기에는 선별된 OMT 균주의 저항성이 너무 낮은 것으로 판명되어(후반부에 데이터 제시), OMT의 저항성을 더 높이는 실험을 수행하였다. 그 결과 이전의 선별 때보다 AV M B<sub>1a</sub>의 생산성이 향상된 다수의 균주들을 획득할 수 있었으나 계대배양을 통한 균주의 안정성 조사시 대부분의 균주들의 AV M B<sub>1a</sub>의 생산 능력을 잃어 버리는 불안정성을 보여 주었다. OMT에 대한 저항성 균주는 histogram에서도 볼 수 있듯이 균주 개발이 진행 될 수록 생산성이 다양하게 나타났으나 (즉 AV M B<sub>1a</sub>의 생산성을 나타내는 X축의 범위가 0~9,200 units/ℓ로 넓어지기는 했으나), X축의 오른쪽으로 치우치는 경향을 보여주지는 않았다(Fig. 109, 110). 다시 말해 AV M B<sub>1a</sub>의 생산성 면에서 볼 때 대부분의 OMT 저항성 균주는, 대부분의 AZL에 대한 저항성 균주의 AV M B<sub>1a</sub>의 생산성 분포와는 대조적으로, 0~3,000 units/ℓ의 비교적 낮은 범위에서 X축의 왼쪽 편으로 여전히 치우쳐 분포하는 것으로 관찰되었다. 이 결과로부터, OMT 단일 성분에 대한 저항성 균주의 선별에 의한 AV M B<sub>1a</sub>의 생산성 증가 전략은 어느 정도 한계가 있는 것으로 판단되었다.

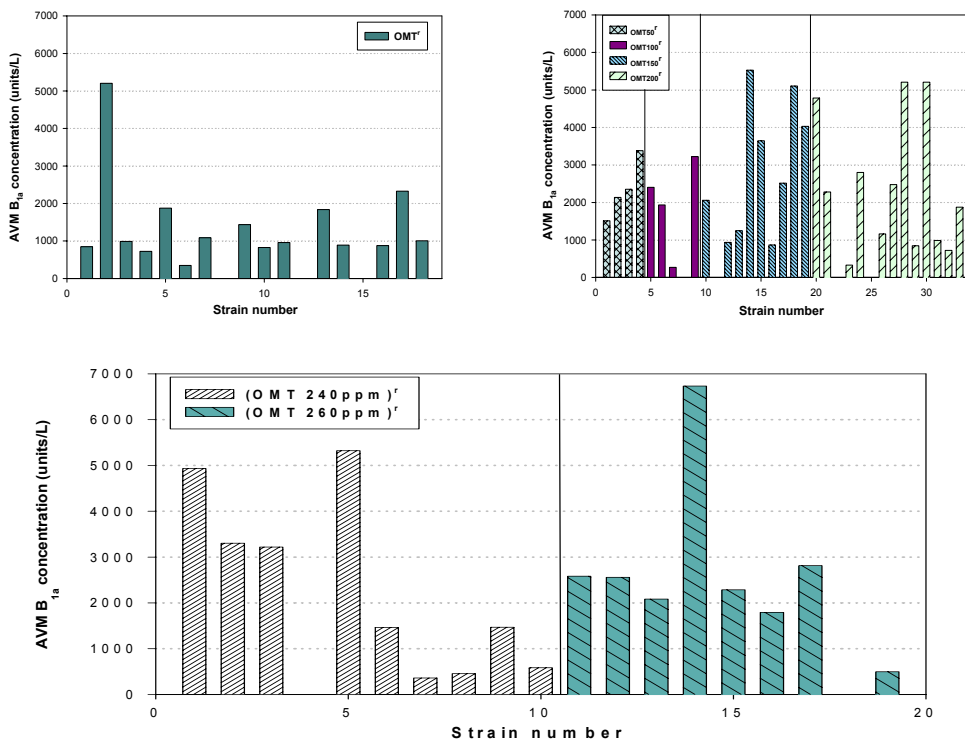


Fig. 107. AV M B<sub>1a</sub> production by the initial mutants resistant against various concentrations of OMT

#### 다) 아미노산 유사체들에 대한 중복 저항성을 갖는 변이주 선별

상기의 연구에서는 AV Ms 중 small "a" component의 전구체인 isoleucine을 과량으로 생합성하여 궁극적으로 AV M B<sub>1a</sub>를 과량 생산하기 위해 isoleucine 유사체인 AZL과 OMT 각각에 대한 저항성 변이주를 선별하고자 하였다. 본 연구에서는 AZL과 OMT에 대한 동시 저항성을 갖는 균주를 선별함으로써, 어떠한 균주 개발 방법이 더 효과적인지를 확인하고자 하였으며, 특히 AZL과 OMT 각각에 대해 저항성을 갖는 균주를 융합 파트너로 하여 얻어진 원형질체 융합 균주와의 AV M B<sub>1a</sub> 생산성(후반부에 데이터 제시) 비교를 통해, 체계적인 균주 개발 전략을 제시하고자 하였다.

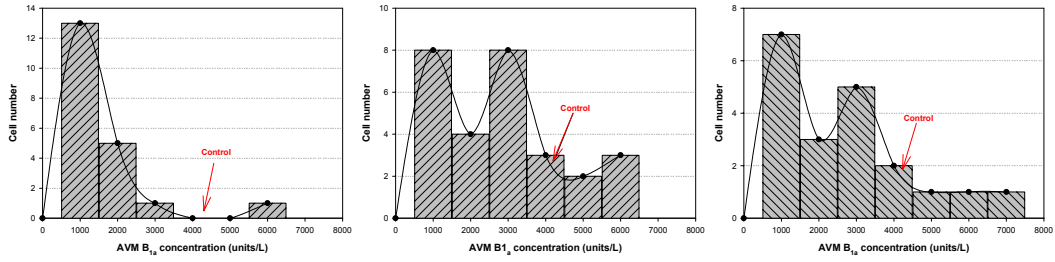


Fig. 108. Histogram of AVM B<sub>1a</sub> production by the initial mutants resistant against various concentrations of OMT.

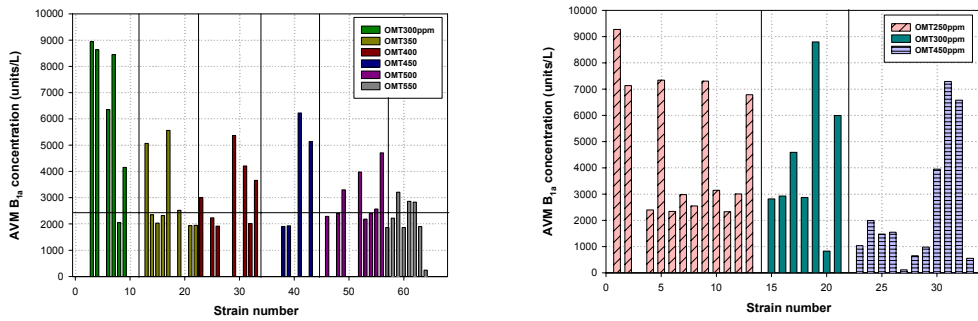


Fig. 109. AVM B<sub>1a</sub> production by the mutants resistant against various concentrations of OMT.

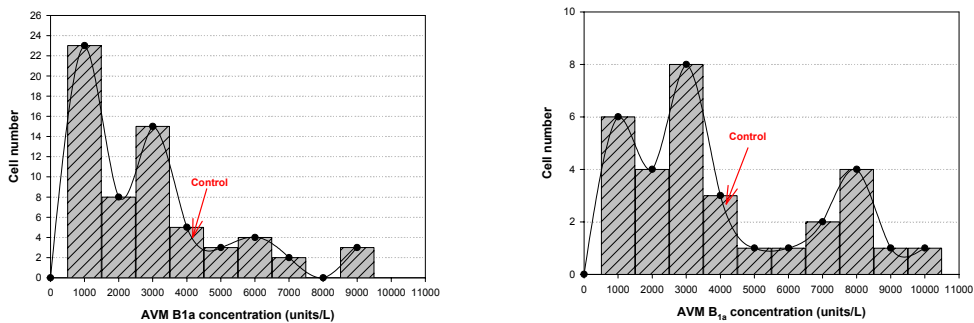


Fig. 110. Histogram for AVM B<sub>1a</sub> production by the mutants resistant against various concentrations of OMT.

생산 균주는 OMT 150 ppm에서 저항성을 보인 TH150-5을 사용하여 다양한 농도의 AZL이 첨가된 최소 한천배지에서 UV나 NTG와 같은 돌연변이 과정 없이 분리하였다. 그 결과 매우 다양한 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성이 나타났는데 (Fig. 111, 112), 대부분의 저항성 균주들의 생산성이 모균주보다 낮았지만, 주목할 점은 모균주에 비해 생산성이 약 2~3배 정도 큰폭으로 향상된 균주들도 다수 획득할 수 있었다는 점이다. 요약하면 아미노산 유사체들에 대한 중복 저항성 균주를 선별함으로써 원형질체 융합을 통한 유전자 재조합체의 생산성(후반부에 데이터 제시)과 비슷하게 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 뚜렷하게 증가되었으며, 이는 중복저항성을 효과적으로 갖게 하는 원형질체 융합방법을 통한 균주개발 전략이 매우 효율적일 수 있음을 제시해 주는 결과이다.

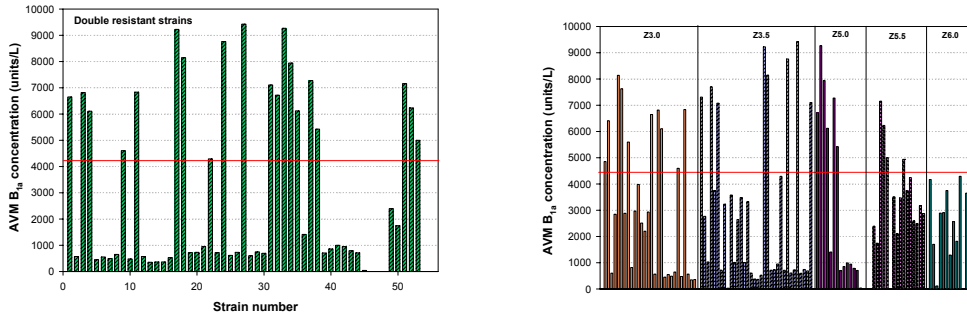


Fig. 111. AVM B<sub>1a</sub> production by the double resistant mutants against OMT (150mg/L) and various concentrations of AZL.

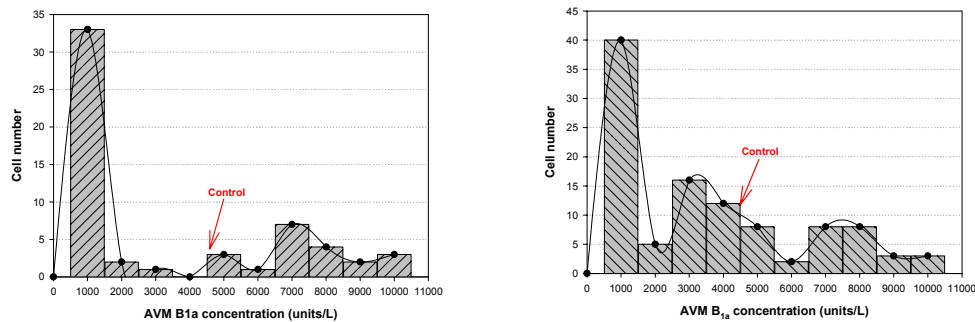


Fig. 112. Histogram for AVM B<sub>1a</sub> production as shown in Fig. 5-2-27.

#### 라. 원형질체 융합방법에 의한 AVM B<sub>1a</sub> 고생산성 균주 선별

##### 1) 원형질체 형성 및 재생조건

##### 가) Glycine 농도의 영향

일반적으로 세포벽을 헐겁게 하여 원형질체 형성을 촉진한다고 알려져 있는 glycine에 대해, 그 농도가 원형질체 형성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 0%에서 2.0% (v/v)의 glycine이 첨가된 전배양 배지에 생산균주를 접종하여 배양한 뒤, lysozyme을 처리하여 원형질체 형성 정도를 비교 조사하였다. 37°C에서 48시간 배양하여 균체를 회수한 후 건조 균체량을 측정하고 lysozyme을 처리하여 형성된 원형질체의 수, 그리고 원형질체의 형성 시간을 관찰하였다 (Fig. 113). Glycine을 1.0% (v/v) 농도로 첨가하여 전배양 한 경우에서 최대량의 원형질체가 형성되었으며, 1.0% 이상의 농도에서는 균체 생육이 크게 저해되고 원형질체의 수가 급격히 감소하는 현상이 나타났다. 따라서 이후의 원형질체 형성을 위한 생산균주의 전배양시 glycine을 1.0% (v/v)으로 첨가하기로 결정하였다.

##### 나) 전배양 최적 시간 조사

*Streptomyces*는 일반적으로 exponential phase와 stationary phase 사이에 존재하는 transition phase에서 최대 원형질체 형성과 최대 재생을 보이며, 이 시기에 균체는 낮은 성장률에 비해 영양분을 다량 축적하기 때문에 원형질체 재생에 있어 효과적이라고 보고된 바 있다. 실험균주의 transition phase를 탐색하기 위해 7개의 250ml flask에서 50ml의 전배양 배지를 첨가하고, 포자 현탁액을 접종하여 37°C에서 배양하면서 24시간마다 1개의 flask를 회수해 건조균체량을 측정하였다. Fig. 114에서와 같이 배양 시작 직후 약 48시간에 transition phase에 도달하는 것을 확인하였으며, 따라서 원형질체 형성을 위한 전배양 시간을 48시간으로 결정하였다.



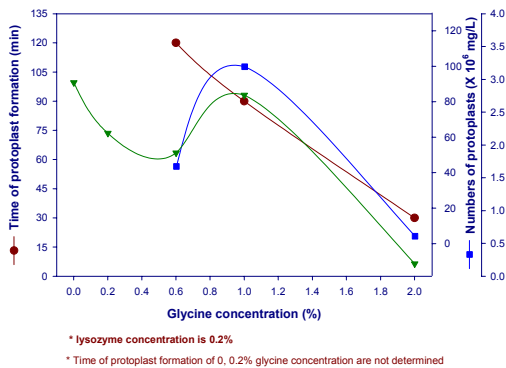


Fig. 113. Protoplast formation time, protopalst and dry cell mass according to the conc. of glycine supplementd into the P-medium.

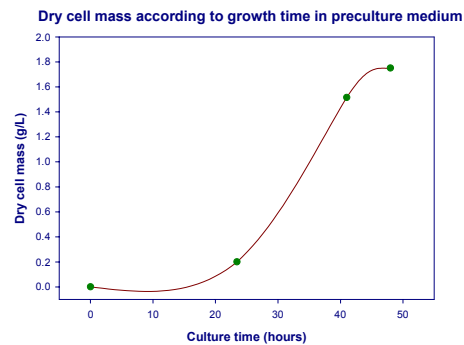


Fig. 114. Time-course profile of dry number cell mass in P-medium

다) Lysozyme 처리 농도의 영향

세포벽을 분해시키기 위해 처리하는 효소인 lysozyme은 세포벽인 peptido-glycan의 N-acetylmuramic acid(NAM)과 N-acetyl-glucosamine (NAG)간의 glycoside bond를 분해하는 효소이다. Lysozyme의 최적 농도를 결정하기 위해서 상기의 실험 결과에 의해 결정된 방법으로 실험균주를 전배양 시킨 후 lysozyme을 0.2%에서 0.6% (v/v)의 농도로 60분 동안 처리하여 형성된 원형질체의 재생빈도 (regeneration frequency)를 조사하였다(Fig. 115). 그 결과 0.6% (v/v) lysozyme을 처리한 경우에서 가장 높은 regeneration frequency ( $3 \times 10^{-1}$ )를 보였다.

라) Lysozyme 처리 시간의 영향

*Streptomyces* 속의 원형질체 형성에 lysozyme 처리 시간은 30분에서 4시간이 적당하다고 보고 되어 있다. Lysozyme의 처리 시간이 원형질체의 형성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 상기에 결정된 0.6% (v/v)의 농도로 10분에서 110분까지 lysozyme을 처리한 후, 형성된 원형질체 수를 조사하였다. 그 결과, 본 실험균주의 경우 lysozyme을 처리한 후 90분까지는 원형질체 형성율이 급속히 증가하지만, 그 이후에는 원형질체 형성이 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 Figac 등이 보고한 lysozyme의 처리시간은 1 ~ 2시간이 원형질체 형성에 효과적이라는 결과와 유사했다.

마) M solution (삼투압 안정제)의 pH의 영향

원형질체를 제조할 때는 세포 내의 팽압과 배양액의 삼투압을 동일하게 하는 삼투압 안정제 (osmotic stabilizer)를 넣어 주어야 한다. 원형질체는 세포벽이 없으므로 삼투압 안정제를 넣어 주지 않으면 원형질체가 되는 즉시 세포는 터져서 세포질이 유출되게 된다. 삼투압 안정제의 최적 pH를 조사하기 위해서 다른 방선균들에서 원형질체 형성시 적당하다고 보고된 pH6.6을 기준으로, M 완충액의 pH를 6.0, 6.6, 그리고 7.2로 조정하여 원형질체의 재생빈도를 조사해 본 결과, 타 방선균과 유사하게 pH6.6의 M 완충액을 사용한 경우 가장 높은 재생 빈도(regeneration frequency)를 보였다.

바) 재생배지(Regeneration medium)의 종류에 따른 영향

일단 형성된 원형질체는 본래의 균사체로 재생되어야 한다. *S. avermitilis*의 원형질체를 정상

균사체로 재생시키기 위해서 다른 방선균에서 사용되었던 3가지의 재생배지(이하 A, B, C라 명명함)를 가지고 본 균주의 원형질체를 overlay하여 28℃에서 8일 동안 배양한 뒤 재생빈도를 조사하였다. 그 결과 A배지에서의 재생빈도가 B와 C 배지에 비하여 높은 재생빈도를 보였다(Fig. 116).

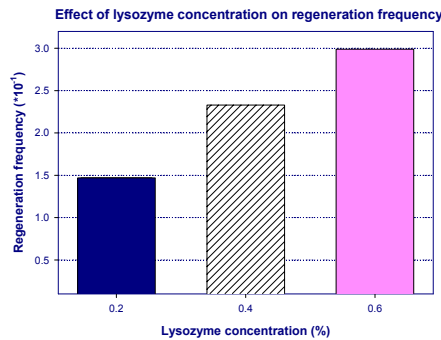


Fig. 115. Regeneration frequency according to various lysozyme concentrations.

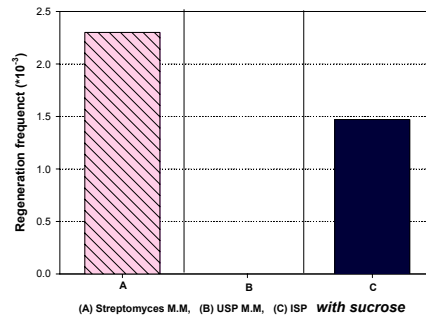


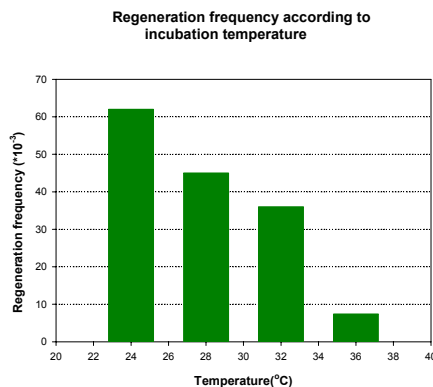
Fig. 116. Comparison of regeneration frequency according to various kinds of regeneration medium.

사) 재생배지(Regeneration medium)의 pH의 영향

재생배지의 pH가 원형질체 재생에 미치는 영향을 조사하기 위해서 상기에서 선택된 A 재생배지의 pH를 타 방선균의 원형질체의 재생에 적합하다고 알려진 pH6.5를 기준으로 pH5.8, 6.0, 6.5, 7.2, 7.7로 조정하여 재생빈도를 조사한 결과, pH6.5에서 가장 높은 재생빈도를 보였다.

아) 원형질체 재생시 온도의 영향

원형질체의 재생빈도 (regeneration frequency)에 온도가 미치는 영향을 확인하기 위하여 24℃에서 36℃의 조건에서 원형질체 재생에 적합한 배양 온도를 조사하였다. 상기의 방법들을 통해 형성된 원형질체를 재생배지에 overlay하고 각각의 온도에서 배양한 결과 (Fig. 117), 24℃에서 재생빈도가 가장 높았으나 colony germination 시간이 길기 때문에 원형질체 재생체의 안정성에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각되어 원형질체 재생 시 배양 온도는 28℃로 결정하였다.



24℃	28℃	32℃	36℃
11days	5days	6days	9days

Fig. 117. Regeneration frequency and germination period of colony according to incubation temperature.

자) 원형질체의 보관조건

상기의 방법을 통해 형성된 원형질체를 이용해 효율적인 조사를 수행하기 위해, 형성된 원형질

체를 보관하는 방법을 조사하였다. 일반적으로 세포를 안정적으로 보관하기 위해서  $-180^{\circ}\text{C}$  liquid nitrogen tank를 이용하는 경우가 많다. 본 연구에서는 liquid nitrogen tank에서 형성된 원형질체를 보관 시, 온도에 의해 원형질체가 파괴되는 현상을 최소화하는 조건을 탐색하기 위해 다양한 조건으로 보관용액을 제조하여 liquid nitrogen tank에 보관한 후 보관 시간에 따른 원형질체의 재생빈도 (regeneration frequency)를 조사하였다 (Fig. 118). 보관용액의 조건은 다음과 같다.

1. DMSO 10% + FBS 20% + M solution 70%
2. DMSO 10% + FBS 20% + Glycerol 10% + M solution 60%
3. DMSO 10% + Glycerol 20% + M solution 70%
4. FBS 20% + Glycerol 10% + M solution 70%

각각의 조건에서 배양 일수에 따른 원형질체의 재생 빈도를 확인 한 결과, (1)번 조건에서  $1 \times 10^{-2}$ 의 가장 높은 재생빈도(regeneration frequency)가 나타났으며, 상기의 조건으로 보관할 경우 원형질체의 재생빈도는 보관 일수에 영향을 받지 않는다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 118, 119). 본 실험의 결과로 인해 형성된 원형질체의 보관이 가능하게 되어 원형질체 융합을 통한 AVM B<sub>1a</sub> 고생산 균주 선별을 더욱 신속히 수행할 수 있게 되었다.

## 2) 원형질체 융합 조건 조사

원형질체의 원형질막은 5~6nm 두께의 인지질 이중층으로 구성되어 있다. 원형질막의 친수성과 막 중간 부위의 소수성 사이에 배척현상이 일어나며 또한 친수성인 인산기는 (-)전하를 갖기 때문에 두 세포가 근접하면 전기적 반발현상이 일어나 세포 융합이 쉽게 일어나지 않는다. 원형질체는 자연적으로 두 개 이상의 세포가 서로 융합될 수 있으나 그 빈도가 매우 낮아 외부적인 요인에 의하여 융합 빈도를 증가시킬 수 있다.

원형질체 융합에 가장 많이 사용되는 물질은 polyethylene glycol(PEG)인데, 비이온성이며 수용성 계면활성물질인 PEG는 원형질체 융합에 가장 일반적으로 사용되는 융합 촉진물질(fusogen)이다. PEG는 융합용액중 물분자를 흡수하여 원형질체간의 결집(aggregation)을 유도한다. PEG에 의한 융합은 PEG의 분자량, 농도 등에 따라서 재생빈도에 영향을 미친다고 보고되었다. 또한 PEG의 처리시간도 매우 중요한데, 5분 정도이면 융합이 충분히 일어나며 만약 그 이상이 되면 세포가 손상을 입어 생존력이 떨어진다는 보고에 따라, PEG의 처리시간을 5분으로 고정하여 본 실험의 원형질 융합을 수행하였다.

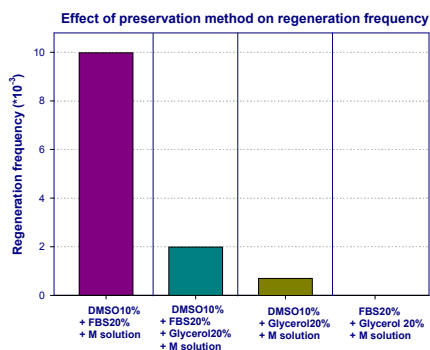


Fig. 118. Regeneration frequency according to the method for protoplast preservation in a liquid nitrogen tank.

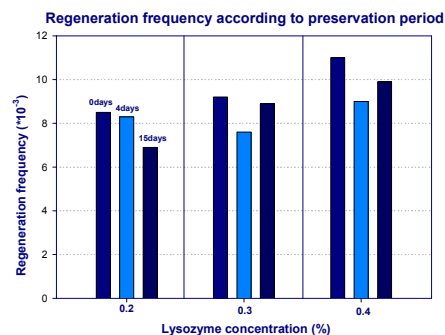


Fig. 119. Regeneration frequency according to preservation period in a liquid nitrogen tank

가) Polyethylene glycol (PEG) 분자량 조사

본 연구에서는 두 개 이상의 selectable marker를 가진 변이주를 획득하지 못하였으므로, 유전자 재조합빈도(recombination frequency)를 직접 확인할 수 없었다. 그러나 재생 빈도(regeneration frequency)가 높은 조건에서 재조합빈도 또한 높을 것으로 판단하여 본 실험을 수행하였다.

Fig. 120에 제시한 바와 같이 실험균주의 원형질체를 형성한 후 다양한 분자량의 PEG를 50%(v/v) 농도로 고정하여 원형질체 융합을 시도한 결과, 분자량이 6,000인 PEG를 이용하여 융합을 시도한 조건에서 가장 높은 재생빈도를 확인하였다. 본 실험의 결과로 이후의 원형질체 융합시 분자량 6,000의 PEG를 이용하였다.

나) Polyethylene glycol (PEG) 농도의 영향

곰팡이의 원형질체를 이용하여 원형질체 융합을 시도한 경우 일반적으로 약 30%의 PEG를 사용했을 때 가장 높은 재조합 빈도를 보인다고 알려져 있고, *Streptomyces*의 경우에는 이보다 높은 40-50% 정도의 농도가 적합하다고 보고되어 있다. 상기 실험에 의해 결정된 PEG 6,000의 농도를 10에서 50% (v/v)으로 다양하게 결정한 후 원형질체 융합을 시도하였다 (Fig. 121). 그 결과 50%의 PEG에서 가장 높은 재생빈도(regeneration frequency)를 보였다.

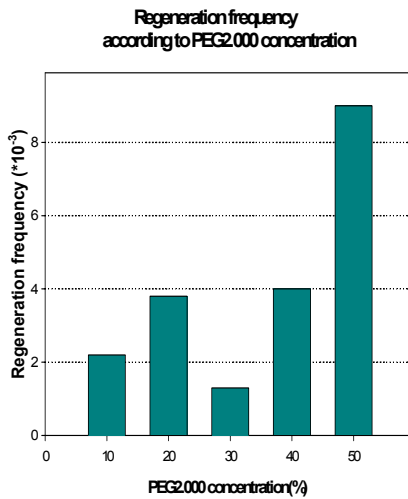


Fig. 120. Regeneration frequency according to PEG 2000 concentration.

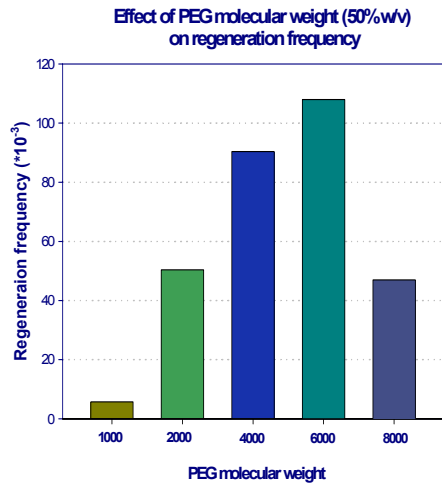


Fig. 121. Regeneration frequency according to molecular weight of PEG.

3) 돌연변이법에 의한 원형질 융합체의 선별방법 확립

유전자 재조합체만을 특이적으로 선별하는 각 단계는 원형질체 융합 방법에서 가장 중요한 단계이다. 즉 유전자 재조합체를 선택적으로 선별하기 위해서 표지 유전인자를 갖게하는 것이 우선 요구된다. 그러나 일반적으로 표지 유전인자로 이용되는 안정적인 영양요구성 변이주를 획득하는 것이 방선균에서는 어려울 뿐만 아니라, 모균주에 비해 이차대사 산물의 생산성이 현저하게 낮아지거나 소실되는 특징을 보인다. 또한 antimetabolite로 작용하는 아미노산 유사체에 대해 일정 농도 이상의 저항성을 갖는 균주를 선별할 경우, 생산성이 더 이상 증가하지 않는 경향을 보이는 문제점이 있다.

본 실험에 사용된 *S. avermitilis*의 경우도 원형질체 융합시 표지 유전자로 사용하고자 영양 요구성 변이주 선별 실험을 수행하였으나, 다른 방선균에서와 마찬가지로 선별 가능성이 굉장히 낮

았으며 선별된 균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 매우 낮게 나타났다. 또한 방성균 자체의 유전적인 불안정성으로 인해 영양요구성 균주가 선별이 되었다하더라도 야생균주형으로 되돌아가는 일이 빈번하게 발생하였다. 한편 융합시 표지 유전자로 사용하기 위한 아미노산 유사체에 대한 저항성 균주 선별하기 위해, 다양한 균주들을 이용해서 실험을 수행했음에도 불구하고 상호 교차 저항성을 갖는 균주를 선별해 낼 수 없었다 (Fig. 122).

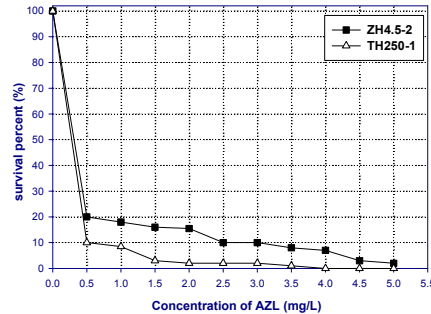


Fig. 122. Survival percent of ZH4.5-2 (resistant against AZL 4.5ppm) and TH250-1 (resistant against OMT 250ppm) according to the concentrations of azaleucine.

따라서 원형질체 융합방법에서 유전자 재조합체를 획득할 수 있는 또 다른 선별 방법인 UV 조사와 NTG 처리에 의한 돌연변이를 이용하는 방법을 선택하였다. 하기에 설명하겠지만 UV 조사와 NTG 처리에 의한 유전자 재조합체 선별의 전반적인 결과 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성이 다양하게 나타나기는 했으나, 원형질체 융합을 수행하여 얻어진 유전자 재조합체들의 경우 원형질체 융합을 수행하기 전 균주인 모균주들보다 생산성이 더 우수한 균주들을 선별해 낼 수 있었으며, histogram에서 볼 수 있듯이 실험을 거듭하며 고생산 균주들을 다수 얻어낼 수 있었다.

이 결과로 미루어 볼 때 원형질체 융합을 통한 AVM B<sub>1a</sub>의 고생산 균주 선별시엔 표지 유전자에 의한 선별을 할 수 없더라도 돌연변이원을 이용하여 유전자 재조합체를 얻을 수 있으며, 본 균주의 경우 UV 조사나 NTG 처리에 의한 것 모두에서 유전자 재조합체에 의한 AVM B<sub>1a</sub> 고생산성 균주를 얻을 수 있는 것으로 나타나 이 두 가지의 방법을 병행하여 균주개발을 수행하였다.

#### 가) NTG 처리에 의한 원형질 융합체의 선별 방법 확립

원형질체의 치사율이 약 99%가 되도록 NTG를 처리한 후 융합을 시도하여 재생된 균주를 선별하는 방법이다. 본 방법을 이용할 경우 표지 유전자가 없는 경우에도 유전자 재조합체 선별이 용이해지며, 생산성이 현저히 감소하는 영양 요구성 변이주를 획득할 필요 없이 원형질체 융합을 수행할 수 있기 때문에 다양한 유전적 특성을 지니는 유전자 재조합체 선별이 가능할 것으로 판단하였다.

원형질 융합 partner로서 OMT 저항성 균주인 TH 균주들과 AZL 저항성 균주인 ZH 균주들을 이용하여 이전에 확립된 최적조건을 이용해서 두 가지 균주의 원형질체를 형성한 후, 치사율이 99%가 되는 2.8 mg/ml 의 NTG를 처리하였다. 그리고 NTG를 처리한 2종의 원형질체 각 0.1ml에 1ml의 fusion solution을 첨가하여 28°C, 180 rpm의 조건에서 5분간 원형질 융합을 시도한 후 재생 배지에 overlay하여 28°C에서 10일간 배양한 결과, 원형질 융합을 수행하지 않은 경우에는 거의 모든 원형질체가 사멸되었으나, 원형질체 융합을 수행한 경우에는 NTG 처리를 하지 않은 대조군에 비해 최고 48%까지 회복된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 123).

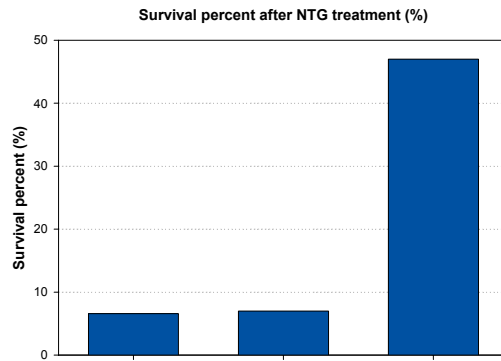


Fig. 123. Effect of NTG treatment on non-fused protoplasts and fusants as represented by the survival percent.

나) UV조사에 의한 원형질 융합체의 선별 방법 확립

상기의 NTG 처리에 의한 유전자 재조합체 선별법과 마찬가지로 원형질체의 치사율이 약 99%가 되도록 NTG를 처리한 후 융합을 시도하여 재생된 균주를 선별하는 방법이다. 본 방법을 이용할 경우에도 표지 유전인자가 없는 경우에도 유전자 재조합체 선별이 용이해지며, 생산성이 현저히 감소하는 영양 요구성 변이주를 획득할 필요없이 원형질체 융합을 수행할 수 있다.

원형질융합 partner로서 OMT 저항성 균주인 TH 균주들과 AZL 저항성 균주인 ZH 균주들을 이용하였다. 이전에 확립된 최적조건을 이용해 두 가지 균주의 원형질체를 형성한 후 30초 간격으로 254nm의 UV를 조사하였다. 그리고 치사율이 약 99%가 되는 시점인 180초, 220초, 270초로 UV를 조사한 2종의 원형질체를 fusion solution과 1 : 10으로 혼합하여 28℃, 180 rpm의 조건에서 5분간 원형질 융합을 시도하였다. 그리고 재생 배지에 overlay하여 28℃에서 10일간 배양한 결과, 원형질 융합을 수행하지 않은 경우에는 거의 모든 원형질체가 사멸되었으나 원형질체 융합을 수행한 경우에는 UV조사를 수행하지 않은 대조군에 비해 최고 38%까지 회복된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 124, 125).

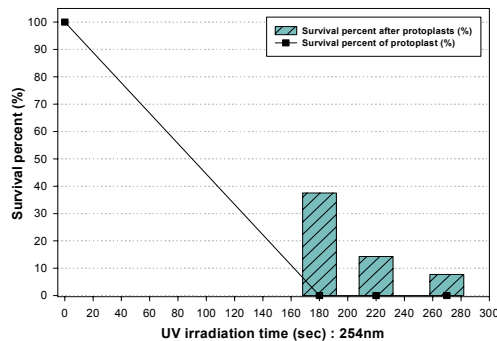


Fig. 124. Comparison of survival percent of the PEG induced fusants and regenerants derived from UV-treated protoplasts.

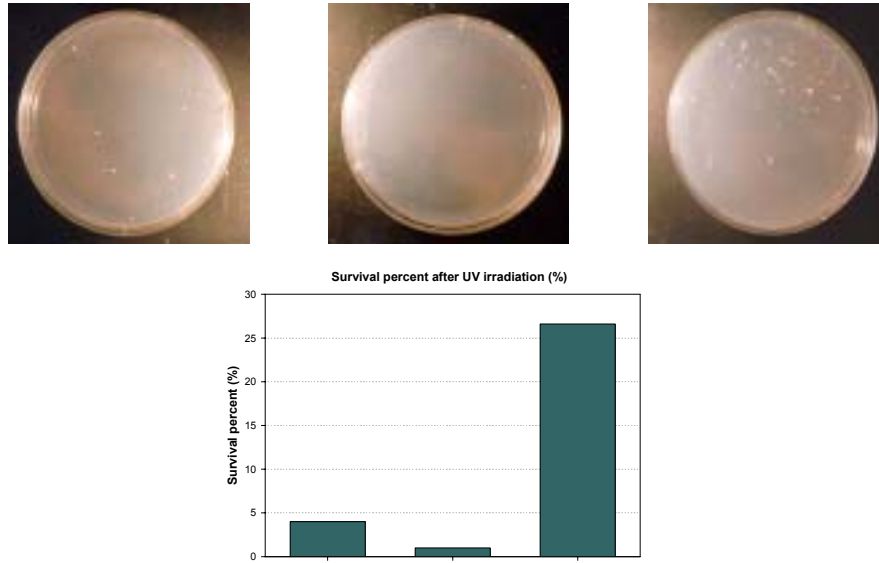


Fig. 125. Effect of UV irradiation on non-fused protoplasts and fusants as represented by the survival percent.

본 결과는 UV 조사에 의한 유전자의 손실로 인해 생존력을 상실한 원형질체가 유전자 재조합을 수행하여 생존력을 회복하였음을 제시해 준다. 일반적으로 원형질체 융합방법에서 유전자 재조합율 (recombination frequency)이 약  $1 \times 10^{-3}$ 인 것을 감안해 볼 때, 본 연구에서 개발한 UV 조사를 통한 선별방법은 유전자 재조합체의 선별 확률을 획기적으로 증대시킬 수 있는 방법으로 판단되었다. 즉 특별한 표지 유전자를 구하지 않고서도 UV 조사를 통해 유전자 재조합체 선별이 가능함을 확인하였다.

#### 4) 원형질 융합체의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 분포 조사

앞에서 설명한 방법을 통해 형성된 원형질체의 융합을 시도한 후 재생된 colony들의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 확인해 보기 위해 10ml culture tube에서 miniature 배양을 수행하였다. 실험균주는 random screening에서 선택된 RS-1과 AZL 저항성 균주 그리고 OMT 저항성 균주들을 사용하였다. 대조군으로 원형질을 형성하지 않은 균주를 사용하였고, 원형질체 융합 단계를 거치지 않은 단순 재생체, 원형질체 융합을 시도한 putative fusants, 그리고 UV 및 NTG에 의한 유전자 재조합체를 10ml culture tube에서 배양하여 각각 group의 생산성을 비교 분석하였다.

#### 가) 추정(putative) 원형질 융합체의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 분포 조사

원형질 재생체 중에서 유전자 재조합체를 선택적으로 찾아내기 위해 표지유전인자를 획득해야 하지만 표지 유전인자를 확립하는 것이 방선균에서는 어려울 뿐만 아니라, 모균주에 비해 생산성이 현저하게 낮아지는 등의 문제점이 있는 것으로 관찰되었다. 본 연구에서는 두 개 이상의 표지 유전인자(selectable marker)를 가진 변이주를 획득하지 못하였으므로, 원형질체를 만들어 PEG로 융합 반응시킨 후 재생배지에서 자라나는 colony의 대부분이 유전자 재조합체일 것이라는 판단 하에 이들을 추정 원형질융합체 (putative fusants)라 명명하고, 원형질융합에 의한 균주개발의 가능성을 조사하기 위해 10ml tube 배양에 의해 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성을 조사하였다.

실험균주는 random screening을 통해 선별한 RS-1을 사용하였으며 실험 결과 대체적으로 다양한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 126, 127). 대조군과 단순 원형질 재생체 (regenerants)에 비해 생산성이 2배 이상 향상된 균주들을 확인할 수 있었음은 주목할 만하며

(Fig. 127), 이 결과로부터 유전자 재조합체 개발이 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성 향상에 긍정적인 영향을 미친다는 사실, 즉 앞으로 대량의 원형질 융합체에 대한 생산성 조사를 지속적으로 수행할 경우 고생산 융합체를 얻을 가능성이 꽤 높다는 것을 알 수 있었다.

나) NTG 처리에 의한 원형질 융합체의 AVM B<sub>1a</sub> 분포조사

UV에 의한 유전자 재조합체 선별 방법외에, 선택유전인자가 없이도 재조합체를 선별할 수 있는 방법중의 하나가 NTG 처리에 의한 유전자 재조합체 선별방법일 것으로 판단되었다.

실험 결과 UV에 의한 원형질체 융합법의 결과와 마찬가지로 다양한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 보여 주었는데, 모균주의 평균 생산성에 비해 2배 정도까지 생산성이 향상된 균주를 획득할 수가 있었다. 원형질체 융합의 fusion partner인 대조균이 4,800 units/ℓ의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 보인 반면, 원형질 융합체는 7,900 units/ℓ의 생산성을 보여 대략 1.6배 정도의 생산성이 향상된 것을 확인할 수 있었으며, 생산성이 8,400 units/ℓ로 약 2배 정도 향상된 균주도 획득할 수 있었다 (Fig. 128, 129).

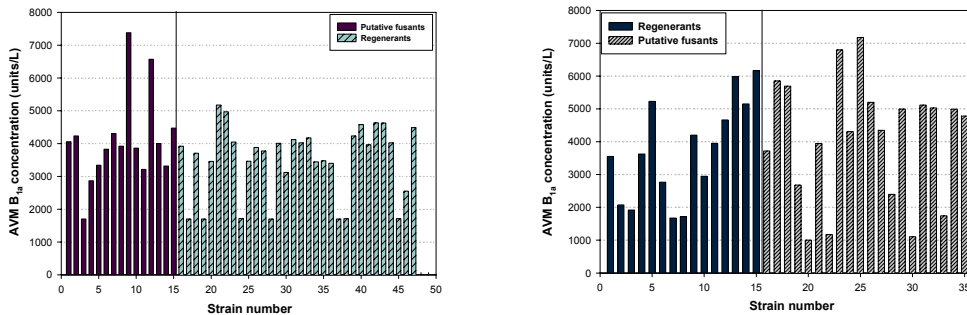


Fig. 126. AVM B<sub>1a</sub> production by regenerants and putative fusants. (RS-1) × (RS-1)

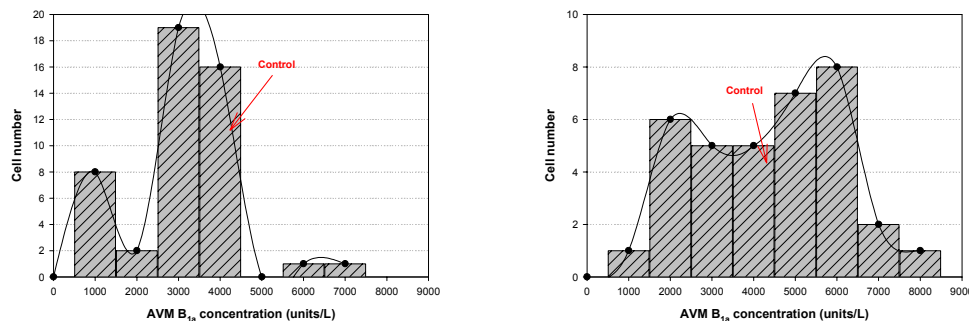


Fig. 127. Histogram for AVM B<sub>1a</sub> production as shown in Fig. 5-2-42.

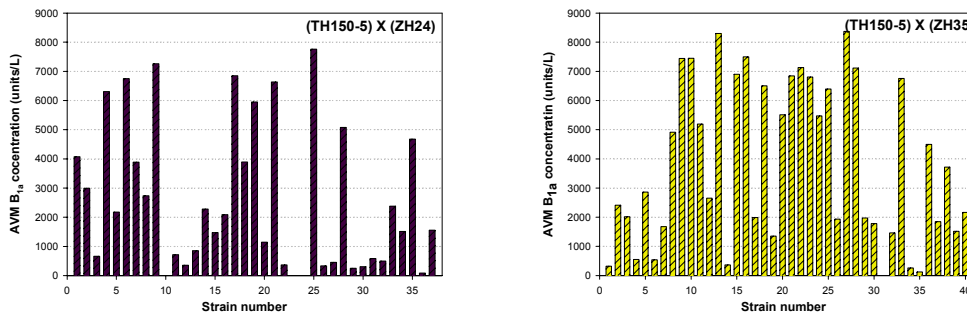


Fig. 128. AVM B<sub>1a</sub> production by the recombinants derived from protoplast fusion through NTG mutation of the protoplasts (NTG exposure time of 45min was applied).



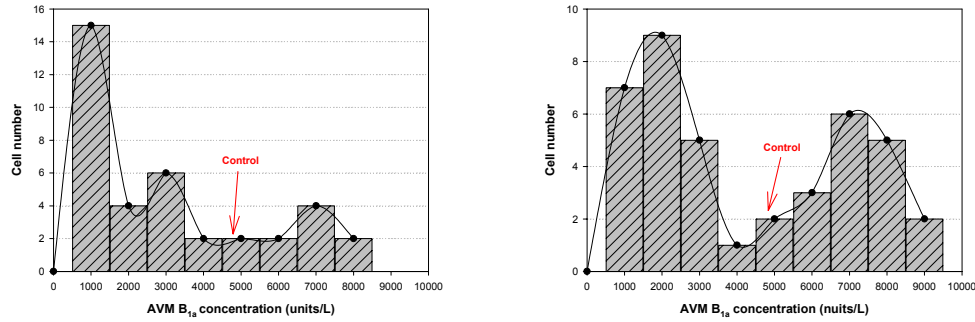


Fig. 129. Histogram for AVM B<sub>1a</sub> production as shown in Fig. 5-2-44.

다) UV 조사에 의한 원형질 융합체의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 분포 조사

본 연구에서는 두 개 이상의 표지 유전인자(selectable marker)를 가진 변이주를 획득하지 못하였으므로, UV 조사에 의한 원형질체 융합법을 사용하여 유전자 재조합체를 선별하였다. 그 결과 균주 개발 초기에는 AVM B<sub>1a</sub>의 농도가 모균주와 비교했을 때 별 다른 차이를 보이지 않았으며 매우 불안정한 상태를 나타내었으나 (Fig. 130), 균주개발이 진행 될 수록 다양한 생산성을 나타내며에도 불구하고, 2~3배 정도까지 생산성이 큰폭으로 향상된 균주들을 다수 확인할 수 있었다 (Fig. 131, 132). 또한 안정한 fusion partner를 이용하여 원형질체 융합을 수행한 결과 (Fig. 133), 2종의 모균주의 AVM B<sub>1a</sub> 평균 생산성에 비해 생산성이 2~3배 정도 향상되었고 매우 안정된 생산 경향을 보여주었다. 이는 안정한 균주를 fusion partner로 이용하여 원형질체 융합을 시도하였기 때문에, 원형질체 융합에 의한 유전자 재조합체도 안정한 생산성을 보이는 것이라 생각된다. 그러므로 균일한 생산성의 우수 균주들을 다수 획득하기 위해서는 원형질체 융합을 위한 fusion partner의 선별 단계에서 균주의 안정성 조사를 충분히 거친 후에 원형질체 융합을 수행하는 것이 옳은 방법이라고 판단된다. 본 결과로부터 UV에 의한 원형질체 융합법이 특별한 표지 유전인자가 없이도 유전자 재조합체를 선별하는데 커다란 문제점이 없는 효율적인 방법임을 알 수 있었다. 또한 NTG에 의해 얻어진 원형질 융합균주의 AVM B<sub>1a</sub>의 분포 및 최대 생산성과 비교해 볼 때, UV에 의한 원형질 융합균주의 생산성이 더 높았으며 매우 안정된 결과를 보여주었다.

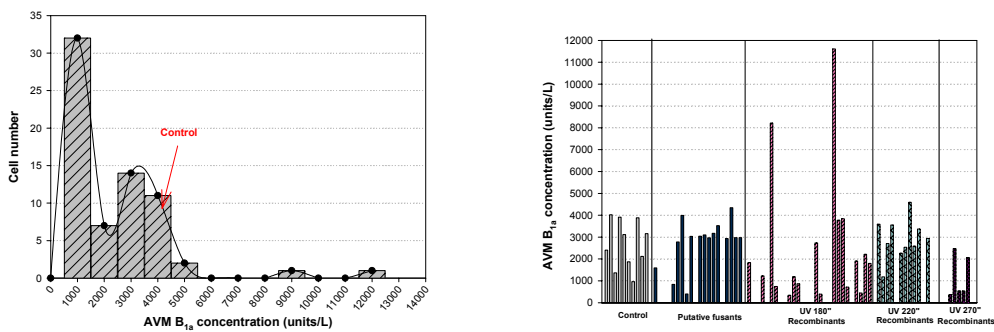


Fig. 130. AVM B<sub>1a</sub> production by the recombinants derived from protoplast fusion through UV mutation of the protoplasts (various UV exposure time was applied).

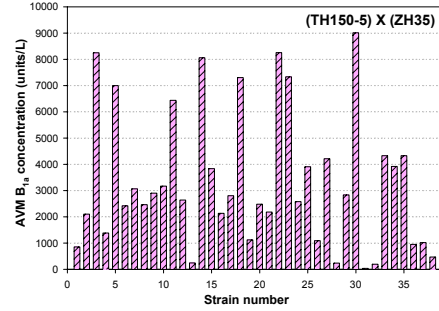
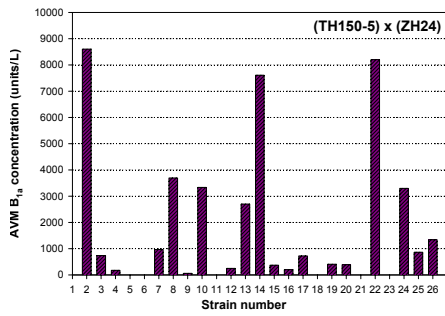


Fig. 131. AVM B<sub>1a</sub> production by the recombinants derived from protoplast fusion through UV mutation of the protoplasts (230sec of UV exposure time was applied).

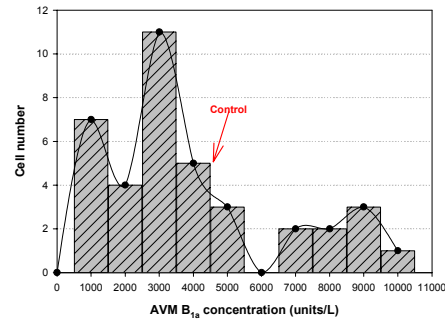
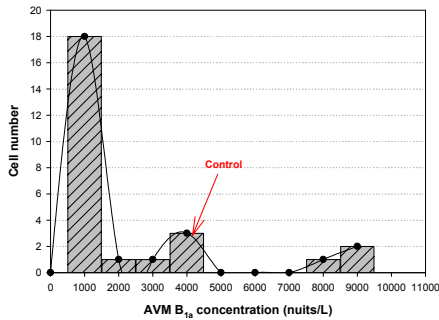


Fig. 132. Histogram for AVM B<sub>1a</sub> production as shown in Fig. 5-2-47.

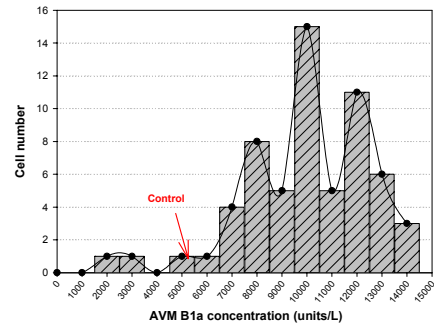
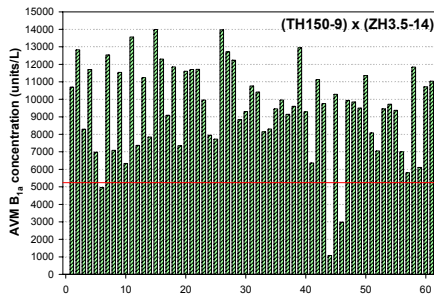


Fig. 133. AVM B<sub>1a</sub> production by the recombinants derived from protoplast fusion through UV mutation of the protoplasts (UV exposure time of 280sec was applied).

상기의 miniature 배양에 의한 rapid screening system을 적용함으로써 얻어 낸 지금까지의 결과들을 요약해서 제시하면 다음과 같다: 고생산성 균주를 파트너로 이용하는 원형질 융합법에 의해 생산균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 지속적으로 향상시키고자 원형질체 융합에 필요한 기본 실험 조건을 확립할 수 있었고, 대량 선별시스템을 이용하여 다양한 융합 변이주를 선별할 수 있었다. 특별히 표지인자가 없는 경우에도 원형질 융합체 선별이 용이한 방법 (즉 원형질체의 치사율이 99% 이상이 되도록 UV나 NTG를 처리한 후 융합을 시도하여 재생된 균주를 원형질 융합체로 간주하는 방법)을 도입한 결과, 대량선별 시스템으로 개발한 tube배양시 모균주들에 비해 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 최고 3배 정도 향상된 균주들을 선별할 수 있었다. 한편 OMT (O-Methylthreonine)와 AZL (Azaleucine)에 동시저항성 (double resistant)을 갖는 double 저항성 균주들의 경우에도 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 큰 폭으로 향상됨을 관찰할 수 있었다. 이로부터 AVM B<sub>1a</sub> 생산균주의 경우 원형질체 융합법과 저항성 균주 선별을 병행한 균주개발 전략이 적합함을 알 수 있었다. 한편 안

정적인 생산성을 보이는 우수 균주들을 다수 획득하기 위해서는, 원형질체 융합을 위한 fusion partner의 선별 단계에서부터 균주의 안정성 조사를 충분히 거친 후에 원형질체 융합을 수행하는 것이 좋은 방법이라 생각되며, 또한 UV와 NTG에 의한 원형질체 융합법이 특별한 표지 유전자가 없이도 유전자 재조합체를 선별하는데 커다란 문제점이 없는 효율적인 방법임을 알 수 있었다. AVM B<sub>1a</sub>의 분포 및 최대 생산성을 NTG에 의해 얻어진 원형질 융합균주와 비교해 볼 때, UV에 의해 얻어진 원형질 융합균주의 생산성이 모균주에 비해 3배 정도 향상되었으며, 매우 안정적인 것으로 나타났다. 이로부터 UV에 의한 원형질체 융합 방법에 의해 생산성이 우수하고 안정적인 유전자 재조합균주를 다량 선별할 수 있는 효과적인 방법임을 알 수 있었다 (Fig. 134, Table 16).

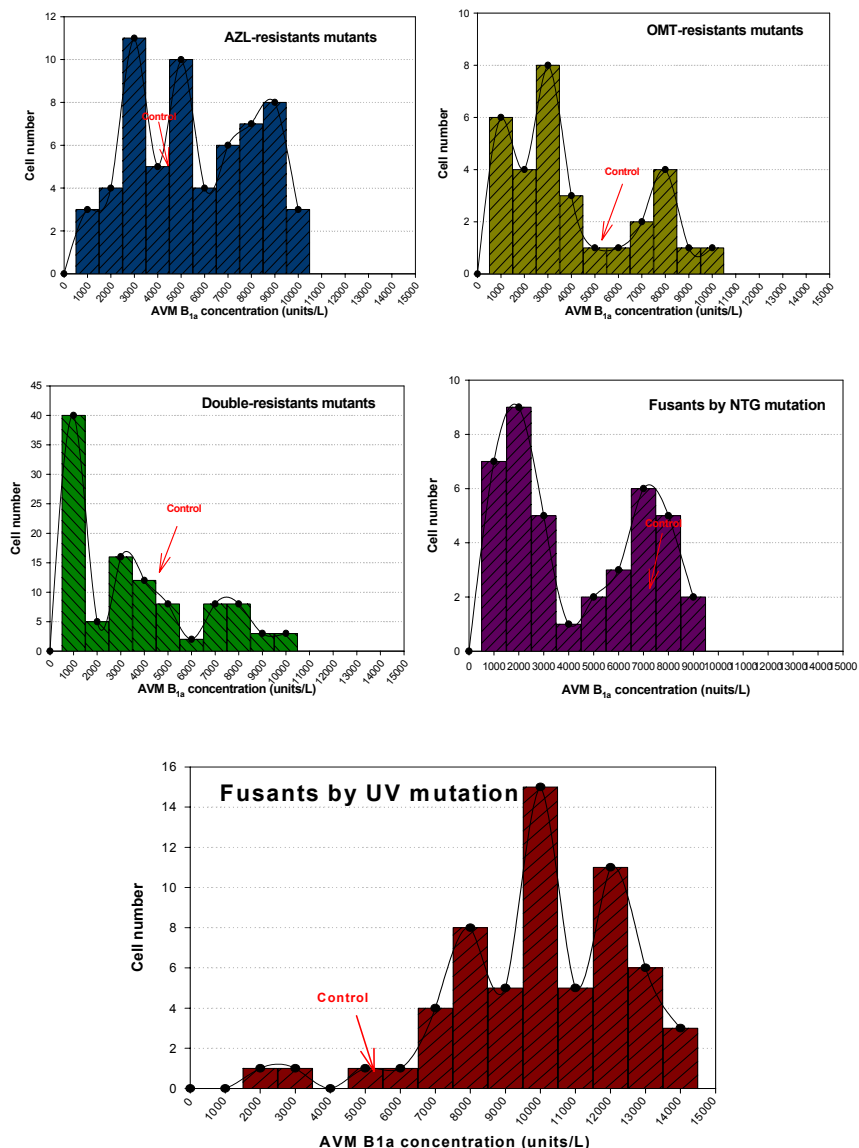


Fig. 134. Comparison of histogram for AVM B<sub>1a</sub> productivity of each mutant strain.

	Max. AVM B <sub>1a</sub> concentration (units/L)	Increased fold
Control	4,800	1.0
AZL-resistant mutants	10,000	2.1
OMT-resistant mutants	9,200	1.9
Double-resistant mutants	9,300	1.9
Recombinants by NTG	8,200	1.7
Recombinants by UV	14,200	3.0

Table 16. comparison for AVM B<sub>1a</sub> productivity and increased fold of each mutant strain.

#### 마. 고생산성 변이주 및 원형질융합 균주의 배양 생리학적 특성 조사

##### 1) AVM B<sub>1a</sub>의 precursor 첨가에 의한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 조사

AVM B<sub>1a</sub>의 생산을 증가시킬 수 있는 방법으로 AVMS 중 small "a" component의 전구체 (precursor)인 isoleucine을 생산 배지중에 첨가하면 AVM B<sub>1a</sub>의 생산을 촉진하여 과량으로 생산할 수 있을 것으로 생각하여, 안정성 조사를 거친 AVM B<sub>1a</sub> 고생산성 균주인 AZL 저항성 균주를 가지고 기존 생산배지에 isoleucine을 0 g/l에서 10 g/l까지 첨가하여 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성을 조사하였다. 그리고 발효조 배양 결과 배양액의 용존산소 농도가 AVM B<sub>1a</sub> 생산성에 심각한 영향을 미치는 사실을 확인했으므로(data 미제시), 본 연구에서는 산소 공급에 의한 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성 제한 현상을 극복하기 위해 10ml tube 대신 250ml flask (30 ml배지 사용)로 실험을 수행하였다. 그 결과 (Fig. 135), precursor의 농도가 높아질수록 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성이 거의 0에 가까운 결과를 얻었다. 이는 배양액에 첨가한 isoleucine이 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성 향상을 위한 전구체 역할을 하지 못하고, 대신 일차대사산물 생산을 위한 carbon source 및 nitrogen source로 사용된 것으로 생각된다. 즉 본 연구에서 개발한 생산균주는 세포 내에서 isoleucine을 생합성하는 능력이 뛰어나, 이를 AVM B<sub>1a</sub>의 생합성 경로로 어느 정도 이용하는 것으로 보이나, 배양액 내에 첨가해 준 isoleucine을 세포 내로 흡수할 때에는 AVM B<sub>1a</sub>의 전구체로 직접 사용하지 않는 것으로 보인다. 그러나 주목할 점은 Fig. 135에 제시된 바와 같이 isoleucine이 전혀 첨가되지 않은 경우 균주 ZH4.0-4의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 평균 228000 units/l로서 기존의 10ml tube 배양에서 얻은 최대 생산성에 비해 약 3배정도 증가했다는 점이다. 이는 10ml tube배양 시 예상한 바대로 용존산소 제한 현상이 심각하며, 250ml flask(30ml배지)에서는 용존산소 결핍현상이 어느정도 극복되어 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성이 큰폭으로 증가한 것으로 보인다.

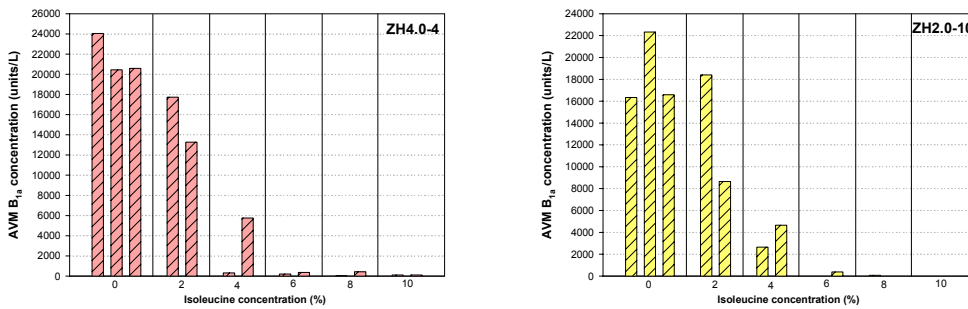


Fig. 135. AVM B<sub>1a</sub> production according to supplement of various concentrations of isoleucine into the basal production medium.

## 2) Dextrin 첨가에 의한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 조사

Soluble starch 와 특성이 비슷하나 점도가 낮고 가격이 저렴한 carbon source인 dextrin으로의 전부 대체가 가능한지를 확인하는 실험을 수행하였다. 즉 기존배지에서 soluble starch 대신 dextrin을 0~120 g/l 로 첨가하여 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성을 조사하였는데, dextrin으로 대체한 경우 기존 배지에서 배양한 대조군 보다 생산성이 훨씬 떨어지는 경향을 볼 수 있었다 (Fig. 136). 그러나 본 실험에서도 주목할 점은 상기의 precursor 실험 결과와 동일하게 250ml flask (30ml 배지)를 본 실험에서도 사용하였으므로 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 매우 높게 나타났다는 점이다. 또한 soluble starch를 132 g/l 사용한 경우에 60 g/l 을 사용한 배지보다 약 30% 이상 증가한 것으로 나타났을 뿐만 아니라 triplicate로 배양한 생산균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 거의 비슷하게 나타났음을 본 연구결과 얻은 고생산성균주의 생산성이 꽤 안정화되었음을 제시해 주는 것이다. 한편 이와 같이 soluble starch를 전반부에 60 g/l 에서 132 g/l 로 변경한 이유는, 이미 앞서 실험 결과를 제시했던 바대로, 초반에 사용했던 기본생산배지를 근거로 통계학적 배지 최적화 방법인 반응표면분석법 (RSM)을 수행한 결과 soluble starch의 농도가 증가할수록 AVM B<sub>1a</sub>의 생산성이 증가한 것으로 나타나, 다양한 농도의 soluble starch가 AVM B<sub>1a</sub> 생산성에 미치는 영향을 조사한 결과, 132 g/l 에서 생산성이 최대로 나타났기 때문이다 (Fig. 137). 한편 60 g/l 의 soluble starch에 dextrin을 다양한 농도 (20g/l ~120g/l)로 첨가하여 수행한 경우에는 dextrin이 20 g/l 또는 40 g/l 존재할 때 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 132 g/l 의 soluble starch를 사용했던 기존의 배지와 거의 유사한 결과를 보였으나, 그 절대 생산성은 균주 보관시 문제점으로 인해 꽤 떨어지는 것으로 관찰되어 본 연구에서는 그 결과를 제시하지 않았다.

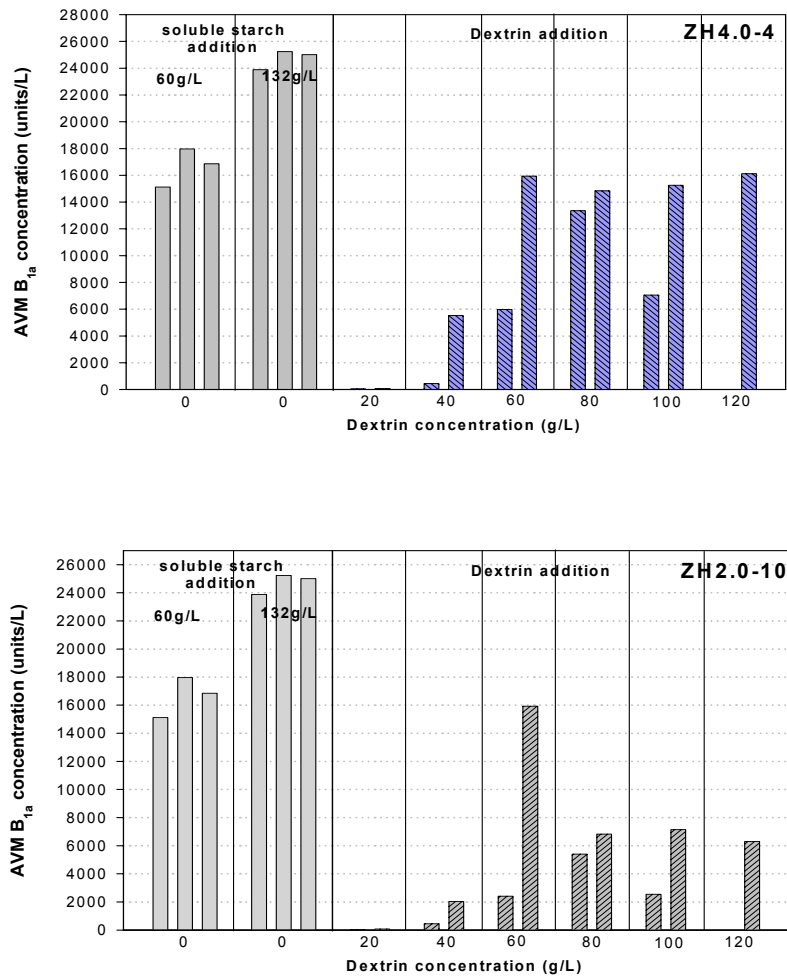


Fig. 136. AVM B<sub>1a</sub> production by various high yielding mutants according to dextrin addition.

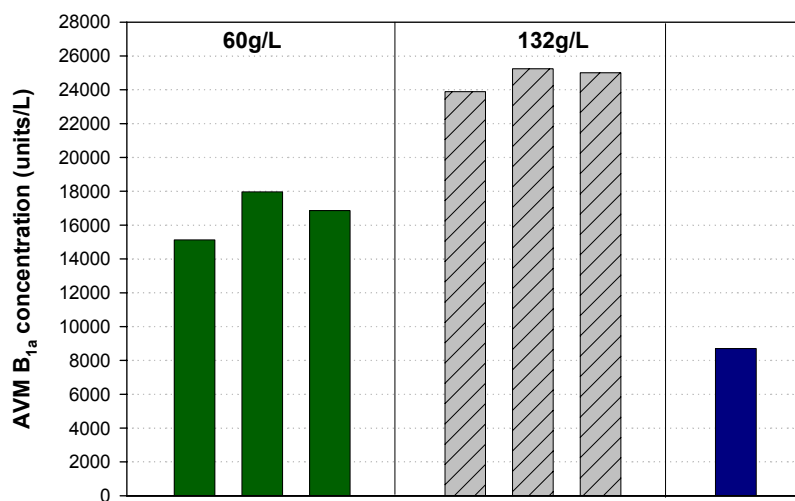


Fig. 137. AVM B<sub>1a</sub> production by various high yielding mutation according to soluble starch concentration (strain: ZH4.0-4).

바. 고생산성 변이주 및 고생산성 원형질융합 균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성 조사

1) 균주보관방법에 따른 생산균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산안정성 조사: 고생산성 변이주 사용

균주의 안정성에 균주의 보관 또한 심각한 영향을 주기 때문에 다음과 같은 실험을 수행하였다. 기존의 균주의 보관 방법이었던 solid stock으로 4°C 냉장 보관을 하는 방법과 liquid stock으로 -80°C와 liquid nitrogen tank에 보관하는 방법을 비교 실험하였다. Stock을 꺼내어 ISP 배지에 접종하였을 때, 초기 생산균주들이 자라는 속도나 상태는 4°C와 liquid nitrogen tank에서 보관하였을 때가 더 좋게 나타났다. 그러나 포자형성 단계에서는 4°C와 -80°C는 별 차이가 없었으나 liquid nitrogen tank에 보관하였던 생산균주의 경우에 특히 포자형성이 잘 되지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 생산성은 결과에 제시한 바와 같이 동일한 균주를 4°C 보관한 것 (Fig. 138), -80°C에 보관한 것(Fig. 139), 그리고 liquid nitrogen tank에 보관한 것 (Fig. 140)을 비교하였을 때, -80°C에 보관하는 것이 생산성이 가장 잘 유지되는 것을 알 수 있었다. 생산성이 2000-3000 units/L 정도인 균주들은 4°C에 보관하여도 생산성이 비교적 훌륭히 유지되지만, 생산성이 높은 균주들의 경우에는 감소하는 것을 경향을 보였다. 초기 모균주로 사용된 ENP88-207의 경우 생산성이 3000 unis/L 정도이기 때문에 냉장보관이 가능하였지만, 지속적인 균주 선별에 의해 개량된 고생산성 균주의 경우에는 냉장보관을 하면 생산성에 심각하게 부정적인 영향을 미친다는 결론을 얻을 수 있었다. Liquid nitrogen tank에 보관할 경우, 초기 생산균주의 상태가 좋지만 생산성이 심각하게 떨어지는 몇몇의 균주가 발견되었고, 만약 stock의 보관 조건을 확립한다면 -80°C에 보관할 경우보다 더 좋을 수도 있을 것이라 예상되지만, 대량의 균주선별 시 많은 시간이 요구되고 경제적 부담이 커질 것이라는 판단 하에 -80°C 보관이 가장 적절하다고 생각하였다.

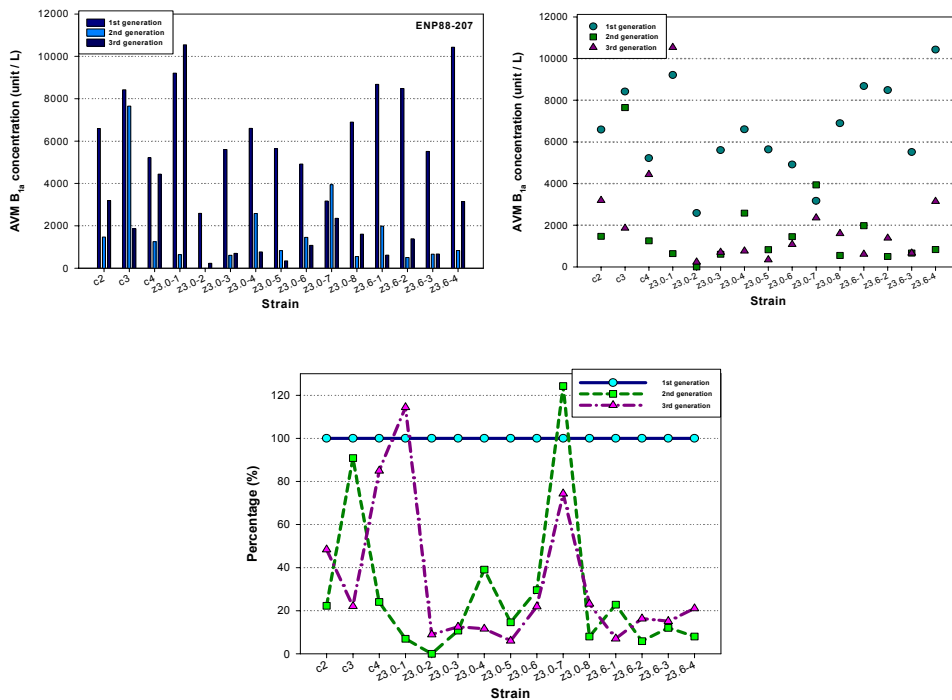


Fig. 138. Comparison of AVM B<sub>1a</sub> production in each generation and stability percentage of the strains preserved at 4°C refrigerator.

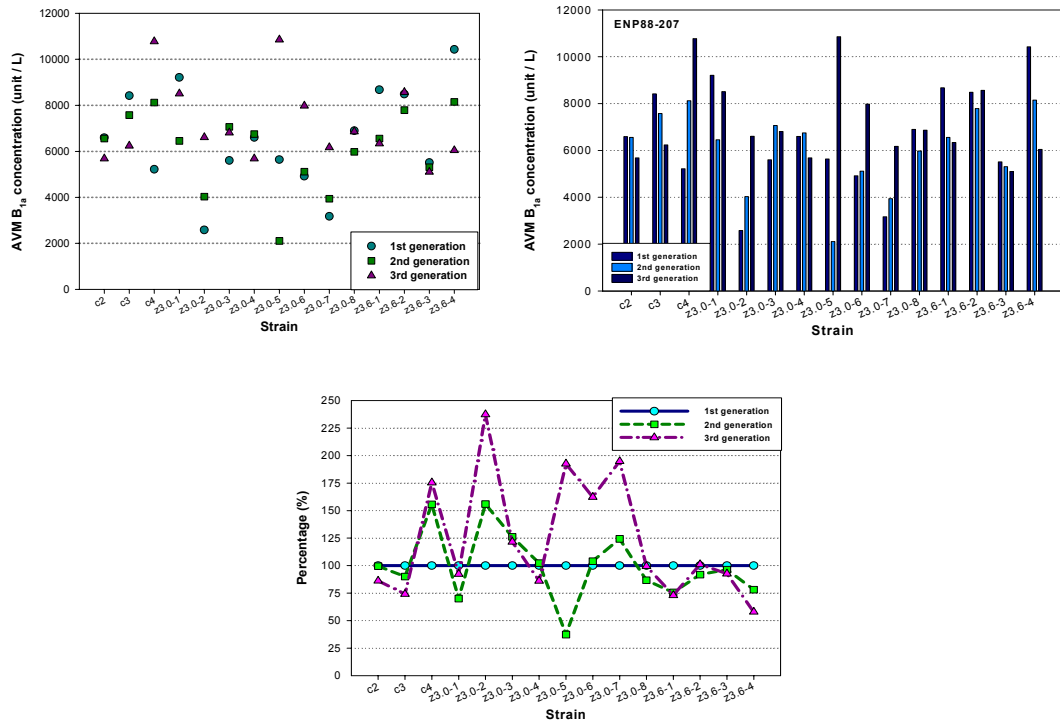


Fig. 139. Comparison of AVM B<sub>1a</sub> production in each generation and stability percentage of the strains preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer.

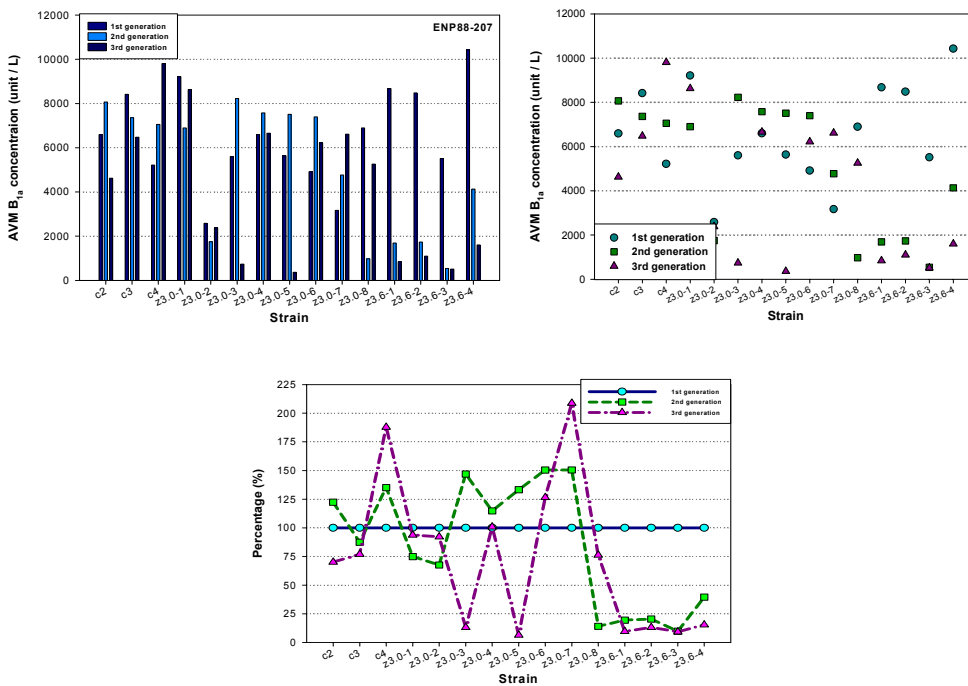


Fig. 140. Comparison of AVM B<sub>1a</sub> production in each generation and stability percentage of the strains preserved at liquid nitrogen tank.

2) 고생산성 균주의 세대에 따른 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 분포 및 생산안정성 조사

방선균이 유전적으로 불안정하여 특이성을 빠른 속도로 소실하기 때문에 처음 저항성 균주를



선별할 당시 주었던 농도 그대로 아미노산 유사물질을 최소 배지에 첨가하여 균주의 특성을 잃어 버리지 않도록 하면서 균주를 선별하여 이들의 생산 안정성을 조사하여 보았다. 여러 번의 선별 실험을 수행해 본 결과, 사용했던 아미노산 유사물질의 농도에서 고생산성 균주가 가장 많이 나타났고, 그 이상의 농도에서는 그 빈도수가 확연히 떨어졌기 때문에 저항성 농도를 더 높이지 않은 채 선별압 (selection pressure)을 주어가면 고생산성 균주를 선별하였다.

AZL 4.0 ppm에 대한 저항성을 보이는 고생산성 변이주로 선별된 ZH4.0-10 균주의 경우 균주 선별과정을 거친 후 생산성이 매우 높은 균주들을 얻을 수 있었으나, 생산성이 넓은 범위로 분포하고 있을 뿐만 아니라 (Fig. 141), 세대가 지남에 따라 생산성이 심각하게 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 142). 본 현상은 생산균주의 유전적 불안정성에 의한 것으로 판단된다. 한편 OMT 250 ppm에 대한 저항성 균주의 경우 처음 선별한 당시 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 약 16000 units/L 이상의 고생산 균주들을 선별할 수 있었다 (Fig. 143) 그러나 세대에 따른 생산 안정성을 확인해 본 결과, 세대가 지날수록 급격히 감소하였으며(테이타 미제시), 이로부터 선별된 고생산성 균주의 경우에도 4세대에 걸친 실험결과 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 큰 폭으로 흔들리는 것으로 나타났다. 생산성이 그다지 높지 않은 균주 선별단계에서는 세대에 걸친 생산균주의 AVM B<sub>1a</sub> 안정성이 어느 정도 유지되는 것으로 관찰되었으나, 균주 선별단계를 지속적으로 거치면서 고생산성 균주로 개발됨에 따라 이와 같이 생산 안정성이 큰 폭으로 흔들리는 부정적인 결과를 관찰할 수 있었다. 생산성이 높은 균주들 가운데서 생산성이 안정적으로 유지되는 균주를 선별해야 생산배양을 위해 장기간 성장배양을 수행해야 하는 산업용 균주로 사용될 수 있다. 그러므로 고생산성 균주들을 장기간 보관 또는 배양 후에도 일정한 생산성을 유지하도록 하는 방법이 개발되어야 하는 가장 큰 문제점이 본 연구결과 제시되어 생산 안정성을 유지하기 위한 실험 조건을 찾아내기 위한 연구를 집중적으로 수행하였다.

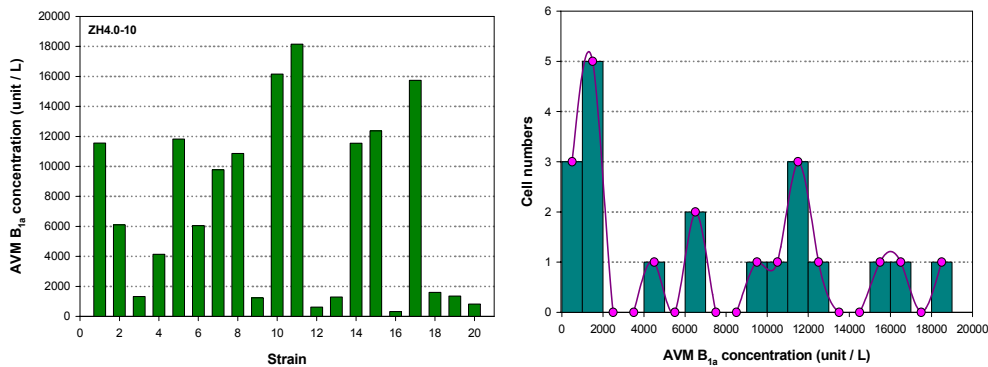


Fig. 141. Production and histogram of AVM B<sub>1a</sub> of ZH4.0-10 strains resistant against 4.0 ppm of AZL.

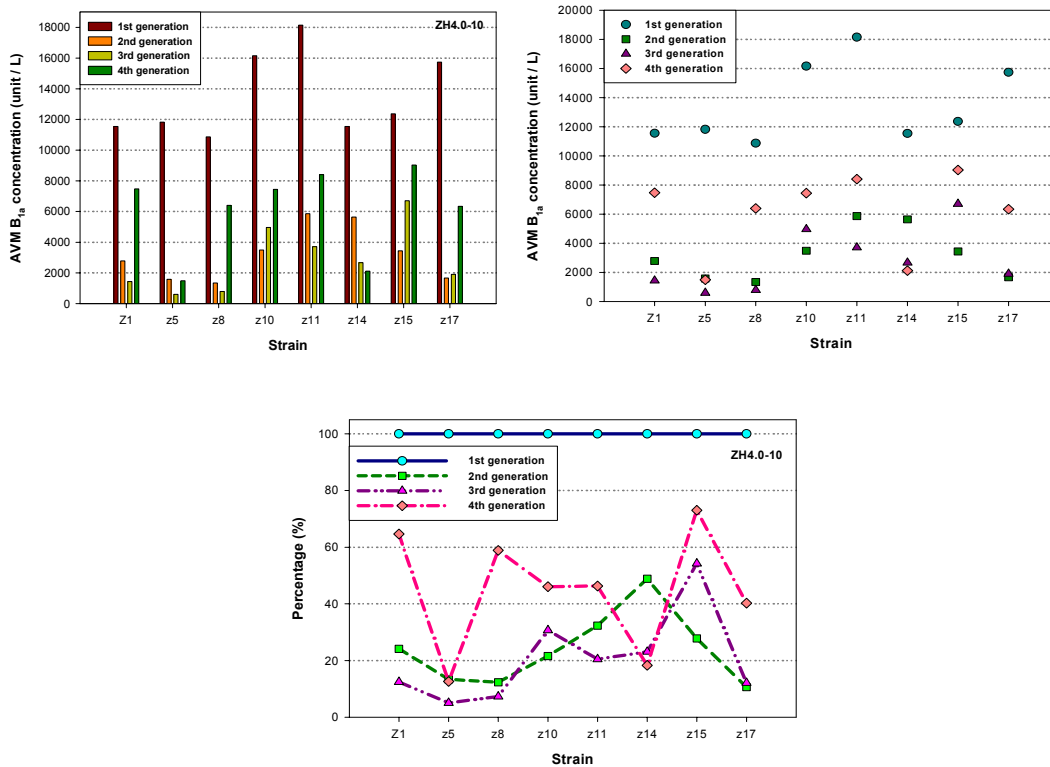


Fig. 142. Comparison of AVM B<sub>1a</sub> production in each generation and stability percentage of the strains selected in Fig. 141.

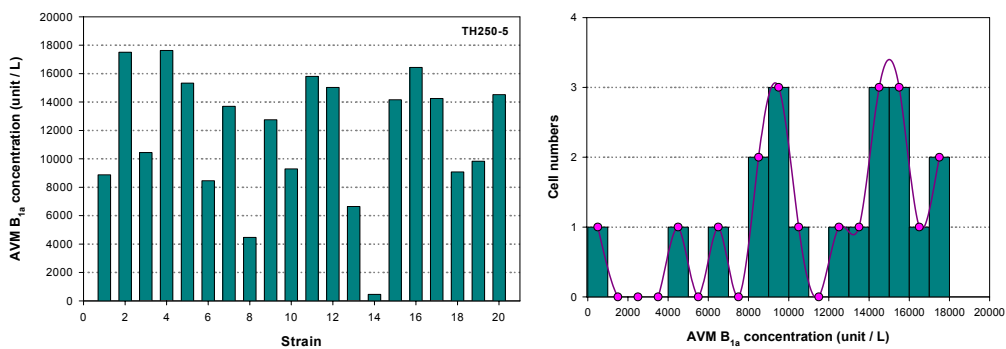


Fig. 143. Production and histogram of AVM B<sub>1a</sub> TH250-5 resistant against 250 ppm of OMT.

3) 통계적 생산배지 성분 조사를 통한 균주의 생산 안정성 조사 (Plackett Burman 방법 적용)

이차대사산물 생산 시 생산배지 역시 균주의 안정성에 큰 영향을 주기 때문에 배지성분에 대한 조사 실험을 다시 수행하였다. 이 실험은 통계학적인 성분 조사를 위해 효율적 방법인 Plackett Burman Design 방법을 사용하여 기존 배지 성분을 교체하고자 하는 목적으로 실험을 수행하였다 (Table 17). 결과를 넣지 않았지만 첫 번째 실험은 실험의 대조군으로 수행한 기존 배지를 제외하고는 모든 배지 조합에서 생산성이 높게 나타나지 않았다. 이로부터 현재 본 연구에서 사용하고 있는 기본 배지 성분이 거의 최적화 되어 있기 때문에 다른 성분을 첨가하거나 대체하는 것이 힘들다는 것을 확인할 수 있었다. 본 실험결과 생산성에 도움이 되는 요소를 찾지는 못하였지만 (Fig. 144), 다음 항에서 제시한 바와 같아 철(Fe)이 포자형성에 깊이 관여한다고 판단되어, AVM B<sub>1a</sub> 생산에도 영향을 줄 것이라는 가정 하에 Fe를 배지에 첨가하는 별도로 실험을 수행하였다.

Ingredient	Concentration of ingredient		Combination											
	-	+	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	(g/L)													
Soluble starch	20	60	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Glucose	5	10	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
Dextrin	10	20	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
Glycerol	5	10	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Cottonseed flour	1	3	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5	2	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
Yeast extract	1	5	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Skim milk	5	10	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Soybean meal	5	10	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	1	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
MgSO <sub>4</sub>	0	1	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-

Table 17. Plackette-Burman design for screening of nutrients with their ranges.

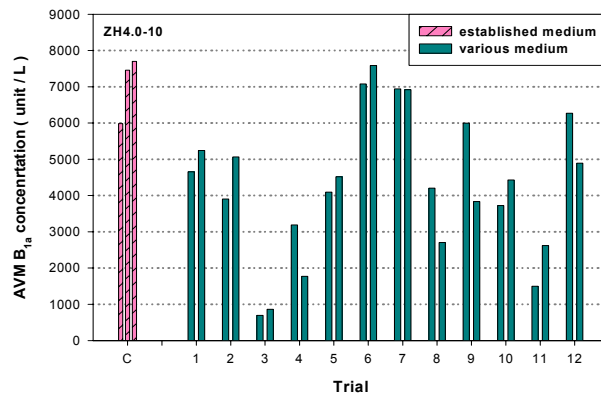


Fig. 144. Comparison of AVM B<sub>1a</sub> production in the established medium and the combination medium according to Plackette-Burman design.

#### 4) 철에 대한 저항성 균주 선별을 통한 고생산성 및 고안정성의 원형질융합 변이주 선별

상기에서 이미 관찰한 바와 같이 8000-12000 units/L 정도의 생산성을 보이는 균주의 경우에는 생산성을 어느 정도 유지하지만, 14000 units/L 이상 되는 고생산성 균주는 세대가 지나면서 8000 units/L 정도 혹은 그 이하로 생산성이 감소하는 것을 확인하였다. 그 이유를 밝혀내기 위해 고생산성 균주의 physiology와 morphology를 예의주시해서 관찰한 결과, 일반 균주의 경우 사면배지에 접종하면 보통 하얗게 자라다가 7일 정도면 배지 표면이 짙은 회색의 포자로 모두 덮이는데 반해, 본 실험을 통해 선별한 고생산 균주의 경우 세대가 넘어갈수록 자라는 속도가 점점 늦어질 뿐만 아니라, 포자형성 시기도 현저히 늦어져 배양 8일째에도 포자 형성율이 1세대에 비해 약 15-30% 정도로 감소하는 특성이 있는 것을 알 수 있었다. 종종 균주를 선별할 때 포자가 전혀 형성되지 않는 균주가 선별되는 경우도 있는데, 이 경우에는 colony가 하얗게 자라기는 하지만 포자형성과 AVM B<sub>1a</sub>가 전혀 생산되지 않는 주목할 만한 결과를 얻을 수 있었다. 하지만 위의 포자형성이 늦어지는 생산균주는 AVM B<sub>1a</sub>를 어느 정도 생산하는 것으로 보아, 만약 이 균주들에게 포자형성 능력을 회복시켜 주면 생산성 또한 회복 될 수 있으리라 생각되었다. 따라서 농도에 따라 세포 성장 및 대사에 악영향을 주지만 포자형성과 같은 세포의 분화 및 대사조절에 영향을 미친

다고 보고된 Fe에 대해 저항성을 갖는 균주를 개발할 경우, 본 균주들의 포자형성 능력이 우수할 것이라고 예상되어 Fe에 대한 저항성 특성을 갖는 AVM B<sub>1a</sub> 고생산성 및 고안정성 균주를 얻고자 하였다.

5) 철에 대한 저항성을 지닌 원형질 융합체 선별을 통한 고안정성 및 고생산성 균주 선별

본 연구진은 원형질 융합체를 이용하여 Mn과 Fe에 대한 저항성 균주를 선별하고자 하였다. 결과를 제시하지는 않았지만 Mn의 경우, 생산균주의 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 판단되어, 본 실험부터는 Fe에 대한 저항성 균주만을 선별하고자 하였다. 실험균주는 고생산성의 원형질 융합균주인 SMJ-3를 이용하였고, 0.7 ppm의 FeCl<sub>3</sub>에 대한 저항성 균주를 선별하고자 하였다. Fig. 145에 저항성 균주들의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 및 생산성 분포도를 나타내었다. AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 6000-14500 units/L로 다양하지만 대부분의 균주들이 약 8000 units/L의 생산성을 나타내는 것으로 확인되었다. 본 실험에서 획득한 균주들 중 약 11개의 균주들을 이용하여 4 세대에 걸친 AVM B<sub>1a</sub>의 생산 안정성을 확인하는 실험을 수행하였다. 실험 방법은 상기의 “실험 재료 및 방법”에 제시하였다. 각 세대의 배지에는 0.7 ppm의 FeCl<sub>3</sub>를 첨가하여 배양하였다. 결과를 살펴보면 예상과 달리, 대부분의 균주들의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 세대를 거치면서 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 146). 본 결과는 생산균주가 지닌 전형적인 유전적 불안정성에서 기인하는 것으로 생각되고, 이에 의해 생산균주의 Fe에 대한 저항성을 증가시키고자 하였다.

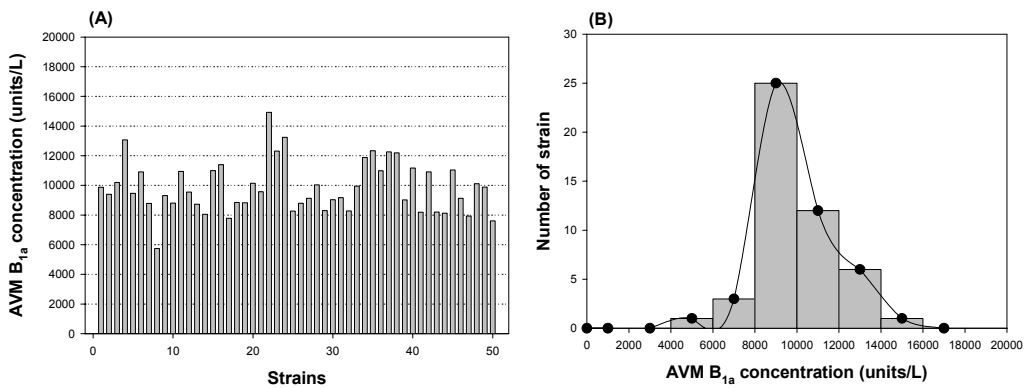


Fig. 145. (A) AVM B<sub>1a</sub> production and (B) histogram of SMJ-3 strains resistant against 0.7 ppm of FeCl<sub>3</sub> in 50 ml shake flask cultivation (30 ml culture volume).

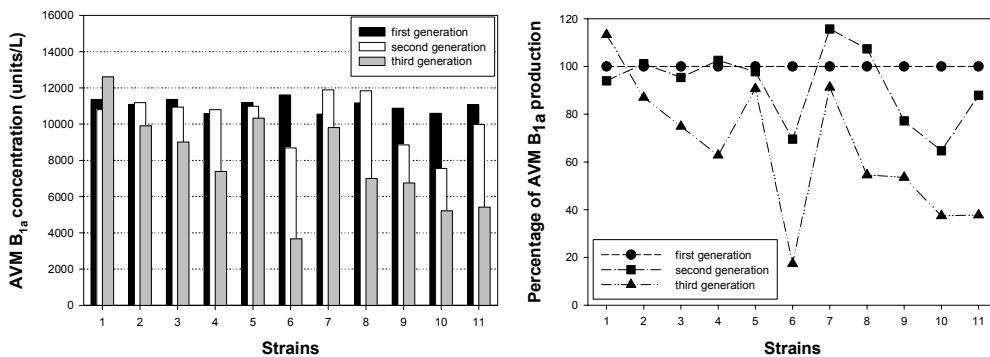


Fig. 146. Comparison of AVM B<sub>1a</sub> production in each generation and stability percentage of the strains selected in Fig. 145.

상기에서 획득한 균주 중 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 및 안정성이 비교적 우수하다고 판단된 균주를

SM-4라고 명명하고 1.0 ppm의 FeCl<sub>3</sub>에 대한 저항성 균주를 선별하고자 하였다. 선별된 저항성 균주들의 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 및 분포도를 살펴보면, 모균주인 SM-4 (14500 units/L)과 비교하여 볼 때 그리 크게 증가되지 않은 것을 확인할 수 있었고, 생산성이 비교적 넓게 분포하는 것으로 확인되었다 (Fig. 147). Fig. 148에는 본 균주들 중 7개의 균주들의 4세대에 걸친 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성을 확인한 결과를 나타내었다. 7개 균주 중 약 2개의 균주의 생산 안정성이 4세대 동안 80% 이상으로 비교적 훌륭한 것으로 판단되었다.

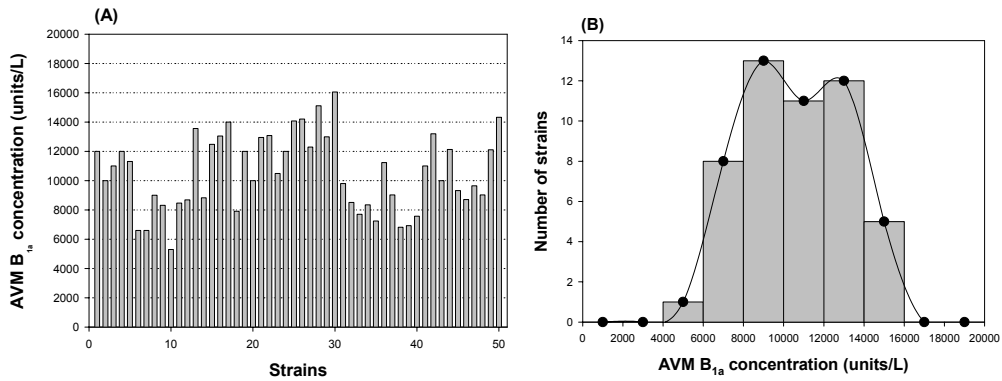


Fig. 147. (A) AVM B<sub>1a</sub> production and (B) histogram of SM-4 strains resistant against 1.0 ppm of FeCl<sub>3</sub> in 50 ml shake flask cultivation (30 ml culture volume).

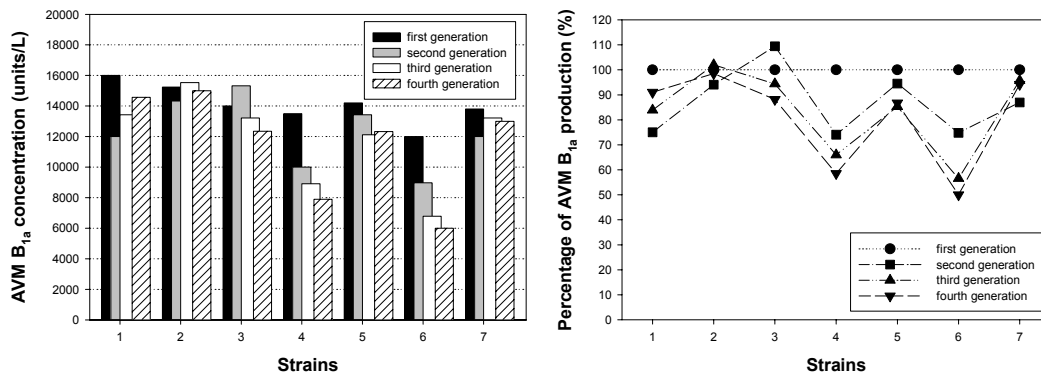


Fig. 148. Comparison of AVM B<sub>1a</sub> production in each generation and stability percentage of the strains selected in Fig. 147.

앞 실험 결과 획득한 2개의 고생산성 균주 중 생산성이 높은 균주를 SAM-18이라 명명하고 FeCl<sub>3</sub>에 대한 저항성을 증가시키고자 FeCl<sub>3</sub>가 1.2 ppm 첨가된 최소배지에서 screening을 지속적으로 수행하였다. Fig. 149에는 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 및 생산성 분포도를 나타내었다. 우선 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 살펴보면 모균주 (16000 units/L)에 비해 생산성이 약 10% 증가된 균주들을 선별할 수 있었다. 분포도를 살펴보면 전체적인 생산성은 증가하였으나 8000-20000 units/L로 비교적 넓게 분포하는 것으로 확인되었다. 본 실험에서 획득한 균주들 중 6개의 고생산성 균주들의 4세대에 걸친 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성을 확인하였다 (Fig. 150). 주목할 만하게도 3번 균주를 제외한 모든 생산균주들의 생산 안정성이 눈에 띄게 증가한 것을 확인할 수 있다. 1번 균주의 경우 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성뿐만 아니라 생산성 또한 18000 units/L로 매우 높은 것으로 나타났다. 그리고 실험 균주들의 포자 형성양상을 살펴본 결과 배양 약 4일 제부터 시작하여 매우 활발히 진행되는 것을 확인할 수 있었다. 본 주목할 만한 결과는 Fe가 생산균주의 분화 및 세포 대사가 일차대사에서 이차대사로 전환되는 기작에 영향을 특별히 미치기 때문으로 판단되었다.

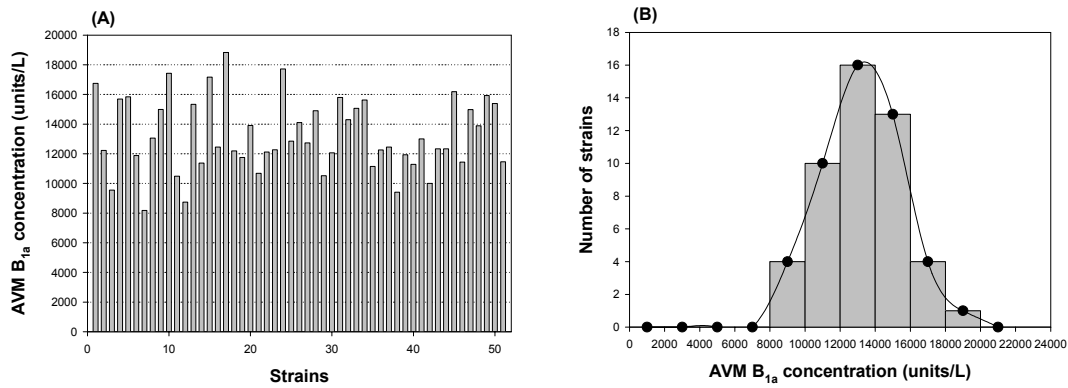


Fig. 149. (A) AVM B<sub>1a</sub> production and (B) histogram of SAM-18 strains resistant against 1.2 ppm of FeCl<sub>3</sub> in 50 ml shake flask cultivation (30 ml culture volume).

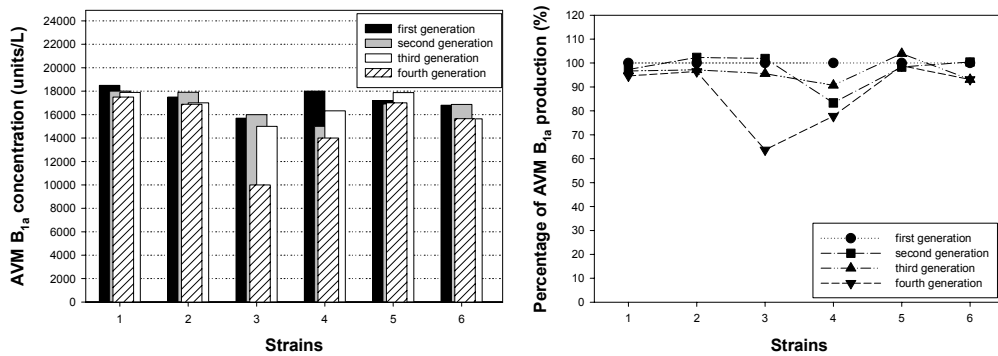


Fig. 150. Comparison of AVM B<sub>1a</sub> production in each generation and stability percentage of the strains selected in Fig. 149.

상기의 실험 결과 획득한 고안정성 고생산 균주를 SAM-18.3이라 명명하고 지속적으로 Fe에 대한 저항성을 증가시키고자 하였다. SAM-18.3 균주를 모균주로 하여 1.5 ppm의 FeCl<sub>3</sub>에 대한 저항성 균주들을 선별하였고 그 결과를 Fig. 151에 나타내었다. 우선 AVM B<sub>1a</sub> 생산성을 살펴보면 모균주에 비해 약 10% 증가한 고생산성 균주를 선별할 수 있었다. 한편 분포도의 경우 전체적인 생산성은 증가하였지만 그 분포는 여전히 비교적 넓은 것으로 판단되었다. 본 실험에서 획득한 균주들 중 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 높은 5개의 균주를 선별하여 세대에 따른 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 변화를 집중적으로 조사하였다 (Fig. 152). 이전 실험과 마찬가지로 실험 균주 모두의 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성이 85% 이상으로 매우 높은 것으로 판단되었다. 본 결과는 생산균주가 유전적으로 매우 불안정한 방선균임을 감안할 때 매우 주목할 만한 결과라 할 수 있겠다.

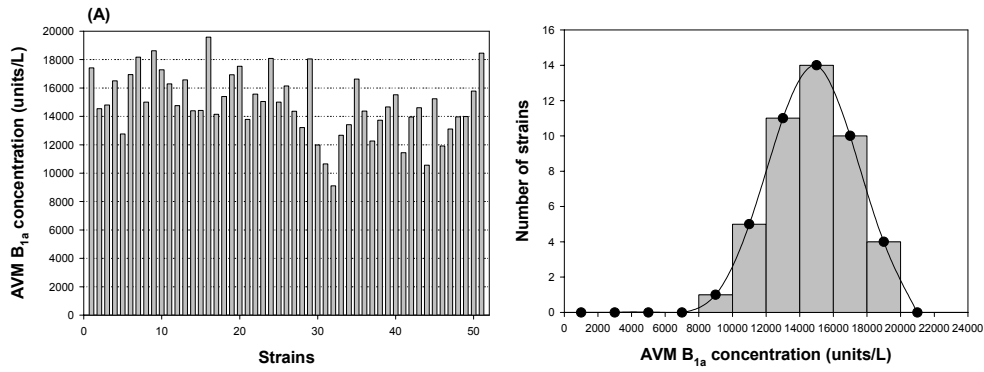


Fig. 151. (A) AVM B<sub>1a</sub> production and (B) histogram of SAM-18.3 strains resistant against 1.5 ppm of FeCl<sub>3</sub> in 50 ml shake flask cultivation (30 ml culture volume).

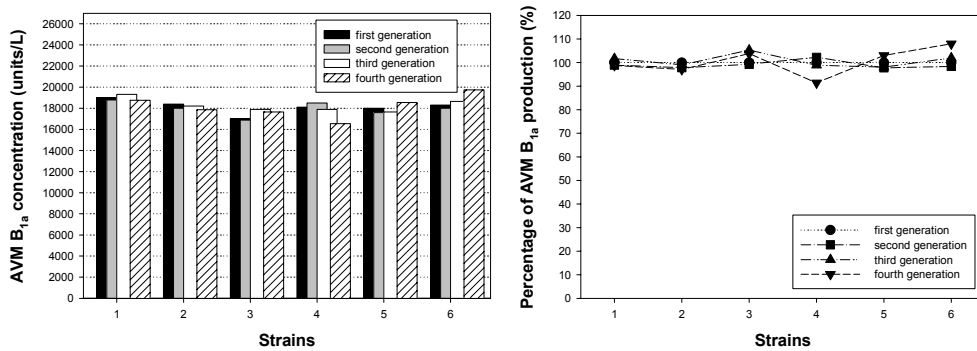


Fig. 152. Comparison of AVM B<sub>1a</sub> production in each generation and stability percentage of the strains selected in Fig. 151.

상기의 실험에서 AVM B<sub>1a</sub> 생산성이 가장 높은 저항성 균주를 SSM-6이라 명명하고 1.5 ppm의 FeCl<sub>3</sub>가 첨가된 최소배지에서 screening을 지속적으로 수행하였다. AVM B<sub>1a</sub>이 생산성이 18000 units/L 이상인 균주들이 상당량 선별되었음을 확인할 수 있었고 (Fig. 153), 특히 이들의 분포도가 매우 좁은 범위에서 존재하는 고무적인 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 포자 형성 및 AVM B<sub>1a</sub> 생합성과 같은 이차대사에 영향을 미치는 FeCl<sub>3</sub>에 의한 생산성 향상에 의한 것일 뿐만 아니라, 지속적이며 집중적인 screening의 결과라 할 수 있겠다. 본 실험에서 선별된 균주들 중에 생산성이 뚜렷하게 증가된 6개의 고생산성 균주들을 대상으로 4세대에 걸쳐 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성을 조사하였다 (Fig. 154). 예상과 같이 모든 실험 균주의 생산 안정성이 90% 이상으로 매우 안정한 것으로 나타났다. Table 18에는 SSM-6를 모균주로 하여 선별한 5가지의 FeCl<sub>3</sub> 저항성 균주 균주들의 AVM B<sub>1a</sub>의 생산에 관련한 각종 parameter를 나타내었다. 최대 AVM B<sub>1a</sub> 생산성은 5가지 균주 모두 18000 units/L 이상으로 매우 높았고, specific production, specific production rate 모두 매우 높은 수준을 나타내었다. 특히 주목할 점은 4세대 동안 평균 94% 이상의 AVM B<sub>1a</sub> 생산 안정성을 유지한다는 점이다. 본 실험을 통해 본 연구진은 생산균주의 낮은 유전적 안정성으로 인한 AVM B<sub>1a</sub> 생산성 감소 현상을 해결할 수 있는 방법을 고안하는 데 성공하였고, 본 균주들과 배양 조건을 바탕으로 AVM B<sub>1a</sub> 생산을 위한 scale-up 배양실험을 수행하도록 주관 연구기관에 본 연구로부터 얻은 고생산성 고안정성의 원형질융합 균주를 넘겨주었다.

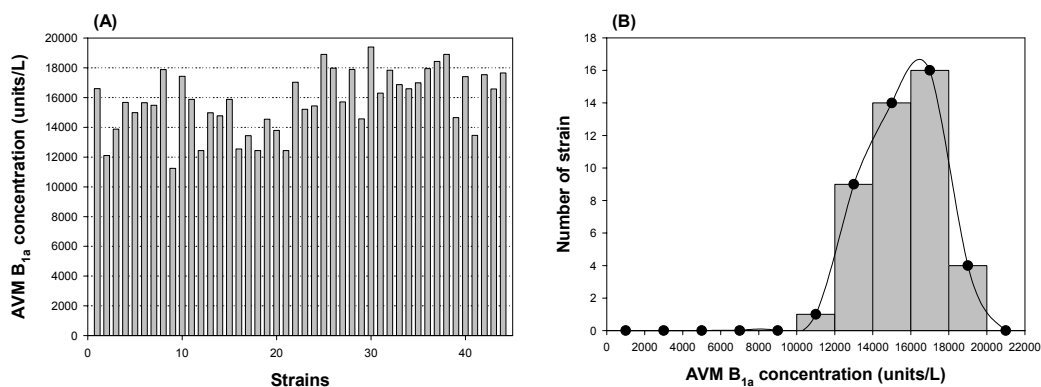


Fig. 153. (A) AVM B<sub>1a</sub> production and (B) histogram of SSM-6 strains resistant against 1.5 ppm of FeCl<sub>3</sub> in 50 ml shake flask cultivation (30 ml culture volume).

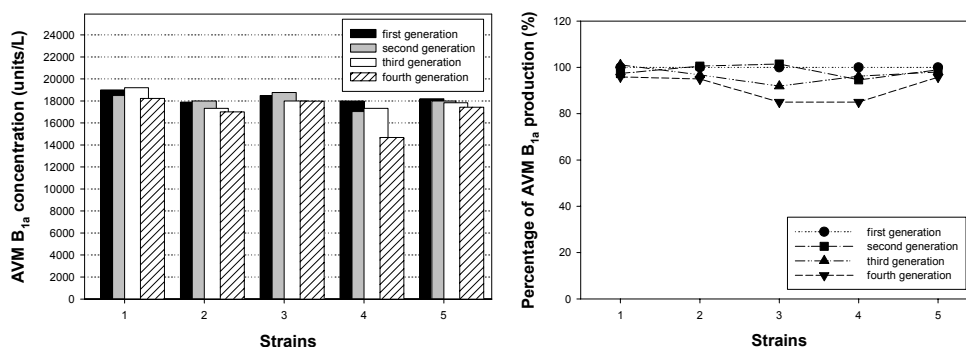


Fig. 154. Comparison of AVM B<sub>1a</sub> production in each generation and stability percentage of the strains selected in Fig. 153.

#	maximum AVM B <sub>1a</sub> production (units AVM B <sub>1a</sub> /L)	maximum dry cell weight (g/L)	specific production (units AVM B <sub>1a</sub> /hr)	specific production rate (units AVM B <sub>1a</sub> /g cell/ hr)	average stability of AVM B <sub>1a</sub> production during 4 generations (%)
1	19000	24.1	98.9	4.1	98.6
2	17900	22.6	93.2	4.1	98.1
3	18500	23.4	96.3	4.1	94.6
4	18000	20.9	93.8	4.4	94.0
5	18200	23.2	94.8	4.1	98.2

Table 18 . Comparison of parameters related to AVM B<sub>1a</sub> production between five strains obtained through continuous strain improvement programs with protoplast fusants.



### 3. 제 2 세부과제 및 제 2 세부위탁과제: 환경친화적 에버멕틴 분리정제공정 개발

#### 가. lab-scale에서의 에버멕틴 추출, 분리, 정제 공정 개발 및 최적화 (1차년도)

##### 1) Avermectin의 분석조건 확립

각 단위공정 상에서 가능한 여러 장치 중 최적 장치의 선정이나 전체적인 단위공정의 최적조합은 각 장치나 단위공정의 성능비교를 통해 이루어져야 하는데 이러한 성능비교는 각 장치나 단위공정을 거친 stream에서의 avermectin의 순도 및 수율의 측면에서 평가되어야 한다. 따라서 시험되는 여러 장치나 여러 가지 다른 단위공정의 down stream에서 avermectin의 농도를 측정하는 것은 효율적인 분리공정의 개발을 위해 가장 기본적으로 필요하다. 그러므로 본 연구에서는 추출 등의 분리정제 공정 연구를 수행하기 전에 먼저 분석 시스템을 확립하고 그에 따른 최적 분석 조건을 확립하였다.

Avermectin의 분석을 위해서는 HPLC (영린사)를 이용하였으며 column으로는 Waters 사의 10  $\mu\text{m}$  Bondapak C<sub>18</sub> reverse-phase column (0.38 X 30 cm)을 사용하였고 영린기기 M720 detector를 이용하여 uv 246nm에서 측정하였다. 이때 column 온도를 40° C로 유지시켰으며 solvent로는 85:15 (vol/vol)의 methanol-water를 사용하였고 유량은 1.2 ml/min.을 사용하였으며 sample은 20  $\mu\text{l}$ 를 주입하였다. Fig.155는 avermectin B<sub>1a</sub>의 standard curve를 나타내고 있다. 이 그림에서 avermectin 농도 0-700 mg/l의 범위에서 직선적인 관계를 확인하였고 이에 따라 이 범위에서 calibration curve를 작성하여 차후의 추출공정 개발에 사용하고 있는 중이다. Fig.156는 각각 다른 농도의 standard solution의 HPLC chromatogram peak 모양을 나타내고 있다.

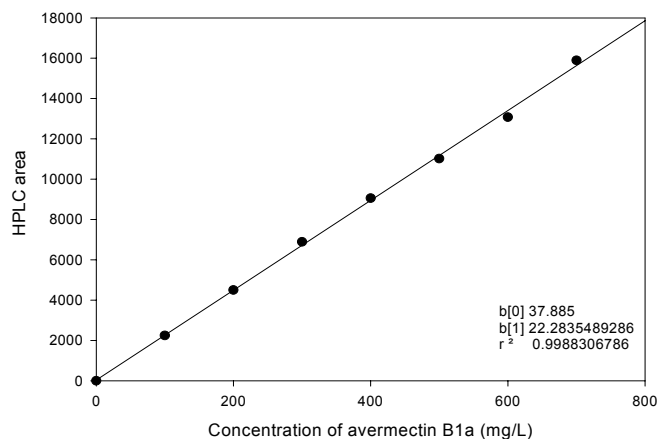


Fig.155. Standard curve of avermectin B1a

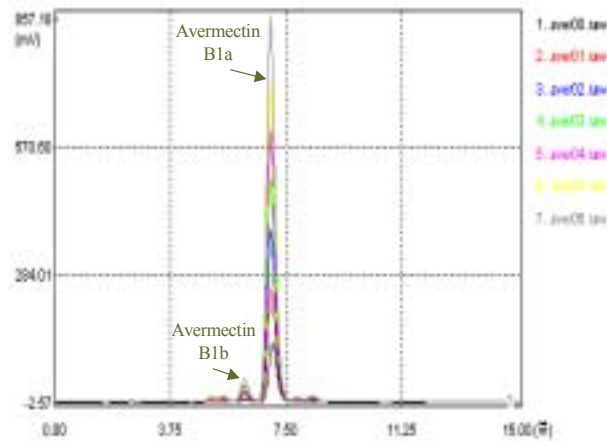


Fig.156. Chromatogram of standard avermectin B<sub>1a</sub> and B<sub>1b</sub>

## 2) 추출공정

추출공정에서 가장 중요한 것은 효율적인 용매의 선정이다. 이상적인 용매는 partition coefficient가 커서 원하는 물질을 solvent phase로 많이 이동시킬 뿐만 아니라 selectivity가 커서 원하는 물질만을 이동시켜야 한다. 이밖에 값이 싸야 하고 생성품이나 환경에 무독해야 하는 것도 이상적 용매로서 중요한 성질이다. 본 연구에서는 partition coefficient와 selectivity의 관점에서 avermectin의 추출을 위해 적절한 용매를 선정하고 추출공정의 설계에 필요한 parameter들을 도출하려 하였다. 이를 위해 기존에 조사되지 않았던 amyl acetate, pentane, benzene, cyclohexane 등을 포함하여 앞의 실험 방법에서 열거한 여러 solvent에 의한 acetone-water phase와 methanol-water phase의 추출효능을 비교함으로써 추출을 위한 최적 aqueous system과 최적 solvent system을 확립하였다.

이때 성능평가에 사용된 parameter인 partition coefficient, percentage of extraction과 selectivity의 정의는 다음과 같다. Aqueous phase H liter와 solvent phase L liter가 평형에 이룬 후 aqueous phase에서의 용질의 농도를 y, solvent phase에서의 용질의 농도를 x 라고 하면 partition coefficient K는 다음과 같이 주어진다.

$$K = \frac{x}{y} \quad (1)$$

초기 용질농도 y<sub>F</sub>인 F liter의 aqueous phase가 추출을 위해 공급되었다면 percentage of extraction p는 다음과 같이 주어진다.

$$p = \frac{Lx}{F y_F} \quad (2)$$

두 용질 A 와 B가 동시에 추출되고 A가 원하는 물질일 때 B에 대한 A의 selectivity β<sub>AB</sub>는 다음과 같이 주어진다.

$$\beta_{AB} = \frac{K(A)}{K(B)} \quad (3)$$

이러한 partition coefficient, percentage of extraction과 selectivity의 값이 클수록 분리정제의 성능 면에서 우수한 solvent와 aqueous phase의 조합(combination)을 나타내고 있다. 이러한 실험 결과 data에 보여주고 있지 않지만 최적 추출의 용매로 acetone-water aqueous phase의 경우 chloroform을 사용하거나 methanol-water aqueous phase의 경우 dichloromethane을 사용하는 것

이 바람직하다는 기존의 결과를 재확인하였고 이러한 결과는 다음 Fig.158, Fig.159에서 확인 할 수 있었다.

가) 에버멕틴의 추출시 용매와의 접촉시간에 따른 추출 성능 비교

이상 추출(two phase extraction)은 두 상 간의 partition을 바탕으로 분리하는 공정으로 partition은 두 상 간의 평형에 기반을 두고 있다. 따라서 모든 추출과정에서는 평형에 이를 때까지 충분한 접촉이 필수적이며 여러 운전 변수에 따른 추출 성능에 대한 평가는 반드시 평형에 이른 후 내려야 한다. 따라서 용매와의 접촉시간에 따른 추출 성능 비교를 통해 평형에 이르는 시간을 추정하는 것이 모든 추출 실험에 앞서 기본적으로 수행되어야 한다. Fig.157은 에버멕틴의 추출시 용매와의 접촉시간에 따른 추출 성능 비교를 나타낸 것으로서 용매접촉 후 일어나는 부피 변화에 의하여 접촉 후 농도에 약간의 차이가 있지만 대부분 초기 접촉 후 농도를 유지함을 알 수 있었다. 이를 통해 acetone-water aqueous phase와 chloroform solvent phase, 그리고 methanol-water aqueous phase와 dichloromethane solvent phase은 순간적으로 평형에 이르는 것을 알 수 있었고 10분 정도의 접촉만으로 충분함을 알 수 있었다.

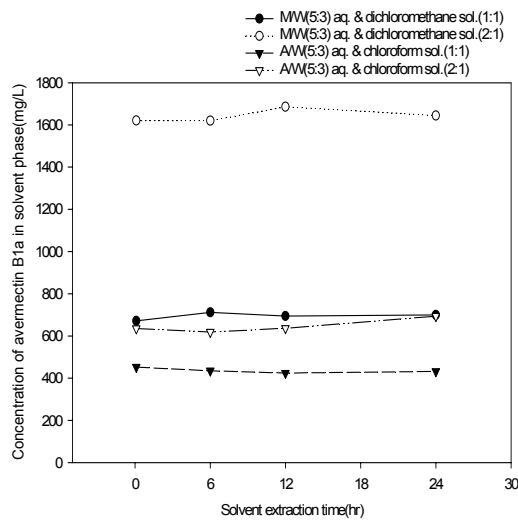


Fig.157 용매와의 접촉시간에 따른 에버멕틴의 추출 성능 비교  
M: methanol, W: dH<sub>2</sub>O, aq: aqueous phase, sol: solvent phase

나) 최적 용매의 선정

Fig.158는 Methanol/Water(5:3) aqueous phase와 dichloromethane solvent phase의 1:1 비율에 의한 1차 및 2차 추출결과를 나타낸 것으로, 용매상으로 99%이상의 에버멕틴이 추출이 된 것을 여러번의 실험을 통하여 확인하였고 (lane 4) 수용액상에 남아 있는 에버멕틴은 약 0.5%이하임을 알 수 있어서 (lane 2) Methanol/Water(5:3) aqueous phase에 대한 최적 용매는 dichloromethane 임을 재확인하였다. 추출율이 99%이상이라는 사실을 재확인하기 위해 남아 있는 수용액 상을 dichloromethane으로 재 추출 한 결과 용매상이나 (lane 5) 수용액 상 (lane 2)에 avermectin이 존

재하지 않음을 알 수 있어서 이미 1차 추출로 대부분이 용매상으로 추출되었음을 확인할 수 있었고 1차 추출 후 추가적인 추출 step이 불필요함도 알 수 있었다.

또한 Fig.159는 Acetone/Water(5:3) aqueous phase와 chloroform solvent phase의 1:1 비율에 의한 1차 추출 결과를 나타낸 것으로, 용매상에는 99%이상의 에버맥틴이 추출되어 이동한 것을 여러번의 실험을 통하여 확인하였고 (lane 3) 수용액상에 남아 있는 에버맥틴은 약 0.5%이하임을 알 수 있어서 (lane 4) Acetone/Water(5:3) aqueous phase에 대한 최적 용매는 chloroform임을 재 확인하였다.

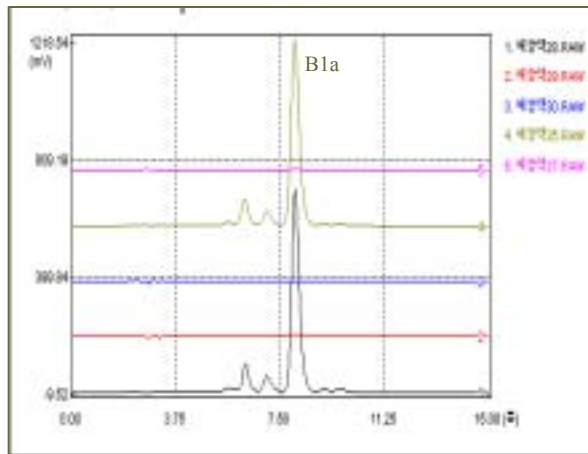


Fig.158. Methanol/Water(5:3) aqueous phase의 dichloromethane에 의한 용매추출(1:1 v/v) 후 각 상의 HPLC 크로마토그램

(lane1. 용매추출 전 수용액상의 크로마토그램,  
lane2. 1차 추출 후 수용액상의 크로마토그램,  
lane3. 2차 추출 후 수용액상의 크로마토그램,  
lane4. 1차 추출 후 용매상의 크로마토그램,  
lane5. 2차 추출 후 용매상의 크로마토그램)

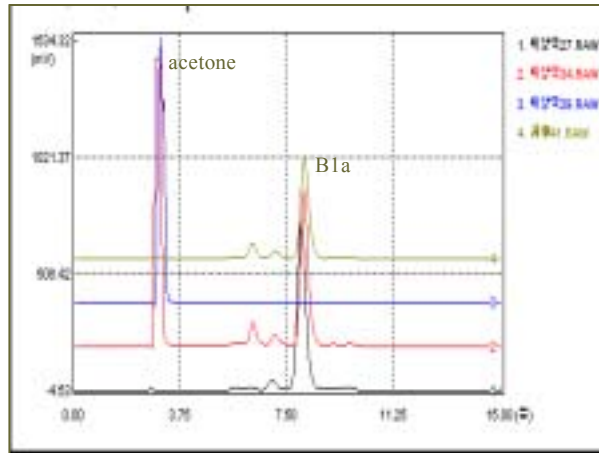


Fig.159. Acetone/Water(5:3) aqueous phase의 chloroform에 의한 용매추출(1:1 v/v) 후 각 상의 HPLC 크로마토그램  
 (lane1. Standard avermectin 700mg/L, lane2. 용매추출 전 수용액상의 크로마토그램, lane3. 1차 추출 후 수용액상의 크로마토그램, lane4. 1차 추출 후 용매상의 크로마토그램)

다) aqueous phase와 solvent phase의 부피 변화에 따른 추출율의 변화

Fig.160은 methanol/Water(5:3) aqueous phase와 dichloromethane solvent phase의 부피비율을 2:1로 변화시켜 1차 및 2차 추출을 수행한 결과를 나타낸 것으로, 1차 추출에서는 용매상에 95% 이상(lane4), 수용액 상에 5% 가량(lane2)이 추출되지 않고 잔류함을 확인하였다. 따라서 Fig.158에서 보여준 부피 비율 1:1의 결과와 비교하면 용매의 상대적인 부피가 줄어들수록 추출율이 줄어들 수 있었다. 이에 따라 2차 추출에도 용매상으로 어느 정도 에버멕틴이 추출됨을 알 수 있었다(lane5). 하지만 추출율을 높이려고 용매의 상대적 부피를 늘일 경우 용매의 사용 증가에 따른 추가적 경제 부담이 문제되므로 경제성을 고려한 최적화가 필요하다. Fig.161은 acetone/Water(5:3) aqueous phase와 chloroform solvent phase의 부피비율을 2:1로 변화시켜 1차 추출을 수행한 결과를 나타낸 것이다. 이그림에 의하면 1차 추출에서는 용매상에 99%이상(lane3)의 에버멕틴이 추출이 된 것을 여러번의 실험을 통하여 확인하였고, 수용액상에 남아 있는 에버멕틴은 약 0.5%이하로(lane4) 이러한 결과는 methanol/Water(5:3) aqueous phase와 dichloromethane solvent phase 용매 추출 시스템보다는 추출율이 높음을 확인하였다. 따라서 acetone/Water(5:3) aqueous phase와 chloroform solvent phase의 추출 시스템에서는 용매의 부피 변화에 따른 추출율의 변화가 심하지 않기 때문에 용매의 사용을 최소화 할수 있도록 용매의 상대적인 부피 비율이 적을수록 유리함을 알 수 있었다.

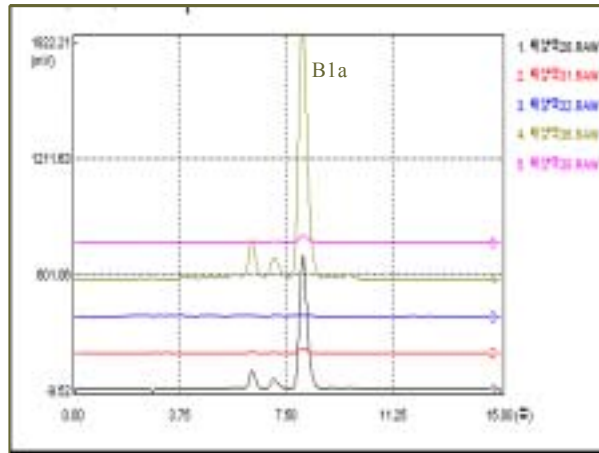


Fig.160. Methanol/Water(5:3) aqueous phase의 dichloromethane에 의한 용매추출(2:1 v/v) 후 각 상의 HPLC 크로마토그램

(lane1. 용매추출 전 수용액상의 크로마토그램,  
lane2. 1차 추출 후 수용액상의 크로마토그램,  
lane3. 2차 추출 후 수용액상의 크로마토그램,  
lane4. 1차 추출 후 용매상의 크로마토그램,  
lane5. 2차 추출 후 용매상의 크로마토그램

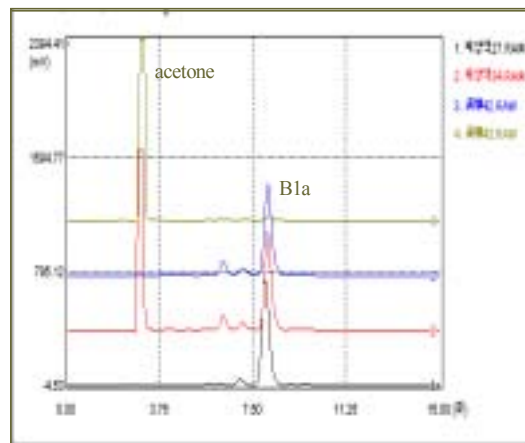


Fig.161. Acetone/Water(5:3) aqueous phase의 chloroform에 의한 용매추출(2:1 v/v) 후 각 상의 HPLC 크로마토그램

(lane1. Standard avermectin 700mg/L크로마토그램, lane2. 용매추출 전 수용액상의 크로마토그램, lane3. 1차 추출 후 용매상의 크로마토그램, lane4. 1차 추출 후 수용액상의 크로마토그램

Fig.162는 Methanol/water(5:3)-dichloromethane 추출시스템과 acetone/water(5:3)- chloroform 추출시스템에서의 용매 부피 비율 변화에 따른 에버맥틴 B1a와 B1b의 추출율을 비교한 것으로 여태까지의 결과를 에버맥틴 B<sub>1a</sub>와 B<sub>1b</sub>까지 고려하여 종합적으로 나타낸 것이다. 이 그림에 의하면 각 용매 시스템에서의 용매상으로의 추출율이 100%이상으로 나올 경우도 있었으나 이것은 실험상 부피측정에 의한 예러로 보여지며, 여러번의 실험결과를 통하여 두 용매 추출 시스템에서의 에버맥틴 B<sub>1a</sub>와 B<sub>1b</sub>의 용매상의 1차 추출 수율은 95~99%정도이고, 1차 추출 후 수용액상에 남아 있는 에버맥틴의 잔류량은 0.5~5%이상임을 알 수 있어서 선정된 용매 추출 시스템은 에버맥틴 B<sub>1a</sub>뿐만 아니라 에버맥틴 B<sub>1b</sub>의 추출에도 우수한 시스템임을 알 수 있었다. 하지만 이 사실은 에버맥틴 B<sub>1a</sub>의 함량을 높이려면 추가적인 정제 step이 필요하다는 점도 시사하고 있다. 또한 이 그림은 용매의 상대적인 부피가 줄어들수록 추출율이 줄어드는 사실을 잘 보여주고 있고 이러한 경향은 에버맥틴 B<sub>1a</sub>와 B<sub>1b</sub> 모두 해당되며 acetone/Water(5:3)-chloroform 추출시스템 보다는 methanol/water(5:3)-dichloromethane 추출시스템에서 더 심하게 나타나고 있음을 잘 보여주고 있다.

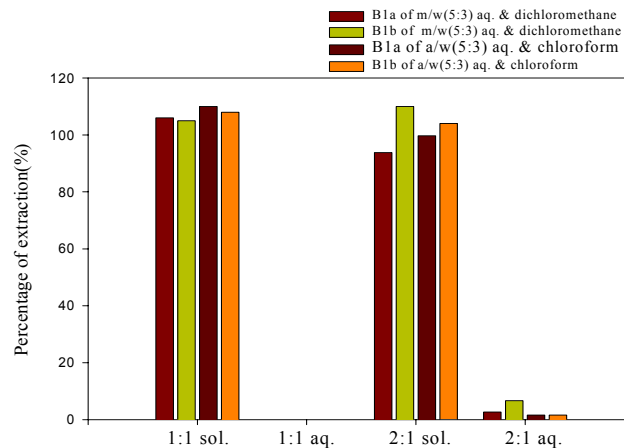


Fig.162. Methanol/water(5:3)-dichloromethane 추출시스템과 acetone/water(5:3)-chloroform 추출시스템에서의 용매 부피 비율 변화에 따른 에버맥틴 B<sub>1a</sub>와 B<sub>1b</sub>의 추출율 비교

Fig.163 역시 또 다른 실험에서 methanol/water(5:3)-dichloromethane 추출시스템과 acetone/water(5:3)-chloroform 추출시스템에서의 용매 부피 비율 변화에 따른 에버맥틴 B<sub>1a</sub>의 추출율을 비교한 것으로 이 그림 역시 각 용매 시스템에서의 용매상으로의 추출율이 100%이상 넘는 것은 실험상 부피측정에 의한 예러로 보여지며, 1차 추출 후 수용액상에 남아 있는 에버맥틴의 잔류량은 0.5~5%이상임을 알 수 있어서 선정된 용매 추출 시스템이 우수한 시스템임을 재확인할 수 있었다. 또한 이 그림 역시 용매의 상대적인 부피가 줄어들수록 추출율이 줄어드는 사실을 잘 보여주고 있고 이러한 경향은 acetone/water(5:3)-chloroform 추출시스템 보다는 methanol/water(5:3)-dichloromethane 추출시스템에서 더 심하게 나타나고 있음을 재확인 할 수 있었다.

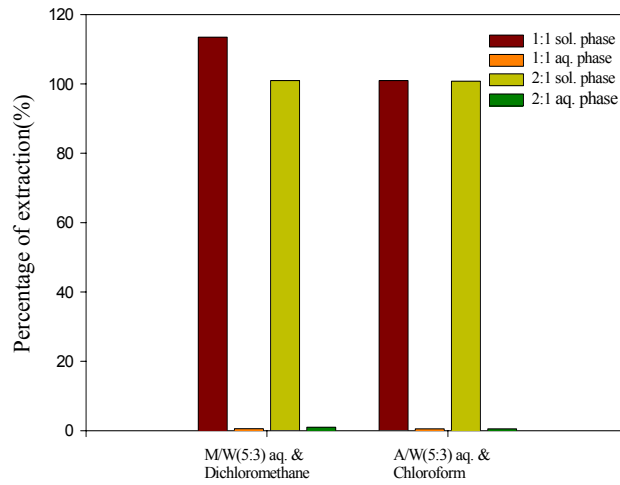


Fig.163. Methanol/water(5:3)-dichloromethane 추출시스템과 acetone/water(5:3)-chloroform 추출 시스템에서의 추출율 비교

위 그림에서 각 용매 시스템에서의 용매상으로의 추출율이 100%이상으로 나올 경우도 있었으나 이것은 실험상 부피측정에 의한 에러로 보여져서 두 추출 공정에서 액상과 용매상의 접촉 비율을 1:1, 2:1 뿐만아니라 3:1, 4:1, 5:1까지 넓혀서 이에 따른 부피 변화를 조사하여 그 결과를 Fig.164와 Fig.165에 나타내었다.

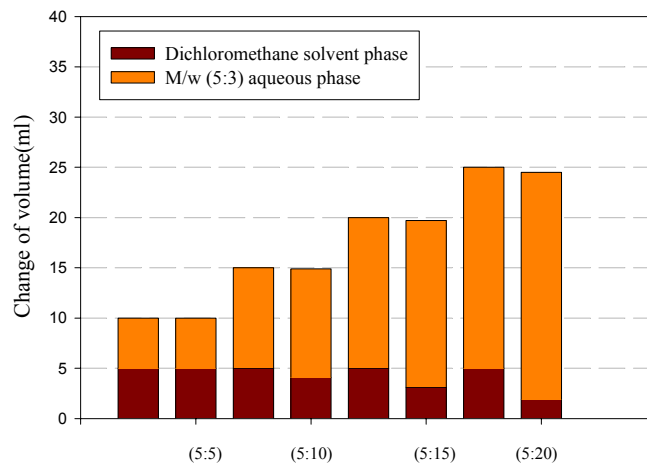


Fig.164. Methanol/water(5:3)-dichloromethane 추출시스템에서의 용매 부피 비율 변화에 따른 부피변화



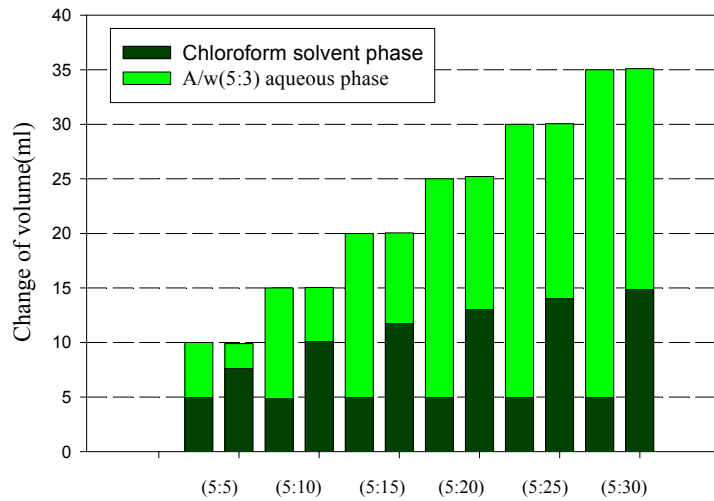


Fig.165. Acetone/water(5:3)-chloroform 추출시스템에서의 용매 부피 비율 변화에 따른 부피변화

한편 Fig.166와 Fig.167에서는 액상과 용매상의 접촉비율을 5:1까지 넓힌 영역에서 Fig.164와 Fig.165에서 보여준 부피변화를 고려한 회수율의 변화를 보여주고 있다. Fig.166에서는 Dichloromethane을 이용한 추출 공정에서 액상과 용매상의 접촉 비율이 1:1, 2:1의 경우에는 95%이상의 회수율을 보여주고 있지만, 3:1, 4:1의 경우에는 회수율이 현저히 감소하는 것을 보여주고 있다. 이에 반해 Fig.167에서는 Chloroform을 이용한 추출 공정에서 액상과 용매상의 비율이 1:1, 2:1의 경우 역시 마찬가지로 95%이상의 회수율을 보여주고 있고, 3:1, 4:1, 5:1정도의 비율에서도 90%가까운 회수율을 나타냄을 보여주고 있다. Fig.166과 Fig.167에서는 액상과 용매상의 접촉비율을 5:1까지 넓힌 영역에서도 Fig.162, Fig.163에서 보여준 것처럼 역시 용매의 상대적인 부피가 줄어들수록 추출율이 줄어드는 사실을 잘 보여주고 있다. 또한 이러한 경향은 액상과 용매상의 접촉비율을 5:1까지 넓힌 영역에서도 acetone/water(5:3) -chloroform 추출시스템 보다는 methanol/water(5:3)-dichloromethane 추출시스템에서 더 심하게 나타나고 있음을 재확인할 수 있었다. 앞서 지적한대로, 유기용매로 추출하는데 있어서 적은 유기 용매의 사용은 경제적 효율면에서는 물론이고 환경적인 면을 고려할 때에도 상당히 중요하게 여겨지는 사항임에도 불구하고, Fig.166과 Fig.167에서 확인되었듯이 용매의 부피비율을 줄일 경우에 추출율이 감소하는 것이 문제점이어서 경제성을 고려한 최적화가 필요하다. 이러한 것들을 종합적으로 고려할 때, 두 추출 공정중에서는 비교적 적은 양의 용매 사용을 사용하더라도 회수율이 높게 유지될 수 있는 acetone-water(5:3)액상과 chloroform 용매상을 이용한 추출 공정이 더욱 유리할 것으로 생각된다.

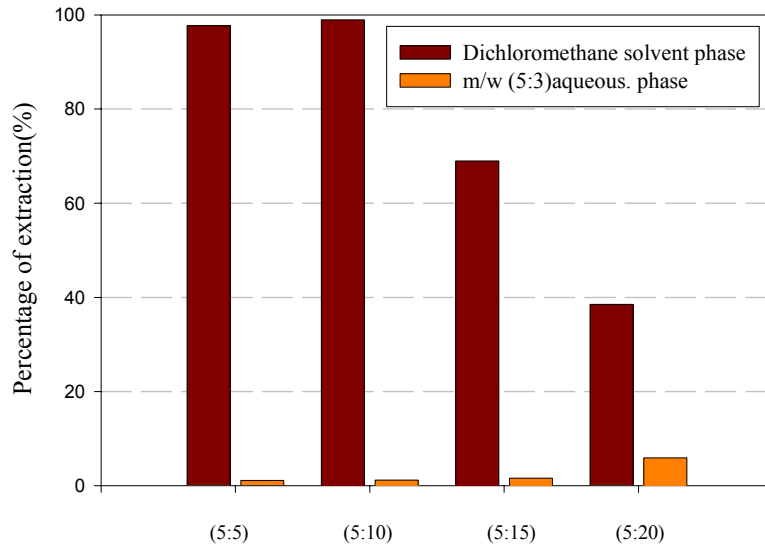


Fig.166. Methanol/water(5:3)-dichloromethane 추출시스템에서의 용매 부피 비율 변화에 따른 회수율의 변화

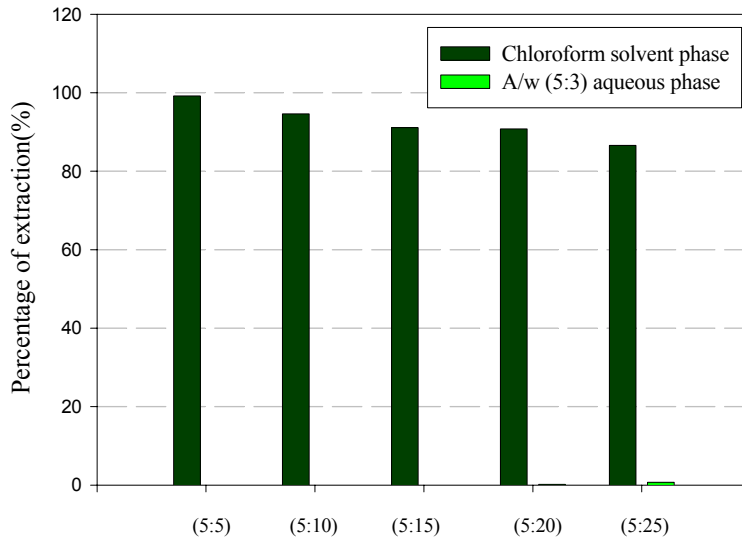


Fig.167. Acetone/water(5:3)-chloroform 추출시스템에서의 용매 부피 비율 변화에 따른 회수율의 변화

## 나. 침전법을 이용한 추출 및 분리정제 공정 개발 (1차년도 위탁)

### 1) 생산균주의 회수를 위한 원심분리와 파쇄

본 연구의 생산균주의 회수를 위해 공장규모에서 흔히 사용하는 원심분리기를 선정하기 위한 기본 설계변수인 settling velocity를 lab-scale의 bottle centrifuge test를 통해 추정함으로써 원심분리기의 용량과 운전 조건의 확립을 위한 기초 자료를 구하였다. 이 settling velocity는 연속식 centrifuge의 용량인  $\Sigma$ 값을 결정하는데 중요한 역할을 한다. 전 project에서도 settling velocity를 구하였으나 지금은 생산균주가 달라져 현재 균주의 settling velocity를 구하였다.

보통의 연속식 분리공정에 사용되는 tubular bowl centrifuge나 disc type centrifuge는 그 geometry에 의해  $\Sigma$ 값이 달라진다. 이  $\Sigma$ 값은 길이의 제곱의 차원을 가진 값으로서, 분리되는 particle과는 관계없고 오직 원심분리기의 크기와 생긴 모양에 따라 결정되는 값이다. 예를 들면 tubular bowl centrifuge의 경우  $\Sigma$ 값은 다음과 같이 계산된다.

$$\Sigma = \frac{2\pi l R^2 \omega^2}{g} \quad (1)$$

여기서  $l$ 은 tube bowl의 높이,  $R$ 은 tube bowl의 축으로부터 벽면까지의 거리 (반지름),  $\omega$ 는 각속도로 나타낸 회전 속도이다.

또한 disc type 원심분리기의 경우  $\Sigma$ 값은 다음과 같이 계산된다.

$$\Sigma = \frac{2\pi n \omega^2}{3g} \times (R_0^3 - R_1^3) \cot \theta \quad (2)$$

여기서  $n$ 은 disc의 개수,  $\omega$ 는 각속도로 나타낸 회전 속도,  $R_0$ 는 원심분리기의 반경,  $R_1$ 은 중심축으로부터 disc까지의 거리,  $\theta$ 는 disc의 기울어진 각도이다. 따라서 보통 원심분리기 제조업자들은 각각 제품의 모델마다  $\Sigma$ 값의 정보를 제공한다.

한편 cell particle의 settling velocity( $v_g$ )는 원심분리기의 종류와는 무관한 고유의 값으로 보통 stroke의 법칙에 의하여 다음의 식에서 구한다.

$$v_g = \frac{d^2}{18\mu} (\rho_s - \rho) g \quad (3)$$

여기서  $d$ 은 cell particle의 직경,  $\rho_s$ 는 cell particle의 밀도,  $\rho$ 는 배양액의 밀도,  $g$ 는 중력가속도,  $\mu$ 는 배양액의 점도이다.

만일 위에 기술한 모든 정보를 얻을 수 있다면  $V_g$ 를 계산할 수 있게 되고 공정의 처리 용량에서 결정될 원심분리기의 처리용량을  $Q$ 라고 하면 다음의 식이 성립된다.

$$Q = v_g \Sigma \quad (4)$$

따라서 만일 균주의 settling velocity( $V_g$ )를 계산할 수 있게 되면 주어진 처리용량( $Q$ )으로부터  $\Sigma$ 값을 계산하여 이에 따라 적절한 원심분리기를 선정할 수 있게 된다. 그러므로  $V_g$  값의 추정은 scale-up에 가장 중요하다.

하지만 (3)식에서의 모든 parameter들을 다 추정하지 못하기 때문에 작은 scale의 원심분리기로부터 이 값을 estimation하여 scale-up에 이용하는 것이 중요하다. 실험실 규모의 centrifuge를 사용하여 fermentor에서 배양한 배양산물을 5000rpm으로 원심분리하면서 시간에 따른 supernatant의 변화를 spectrophotometer 600nm에서 측정하였고 그 결과를 Fig.168에 나타내었다. 이 그림에 따르면 약 10분이면 더 이상 원심분리가 진행되지 않고 실제로도 cell이 없는 supernatant를 얻을 수 있었다.

한편 사용한 원심분리기의 geometry, rpm, 실험에서 얻은 settling time 사이에는 다음과 같은 식이 성립한다.

$$v_g = \frac{g \ln\left(\frac{R_0}{R_1}\right)}{t\omega^2} \quad (5)$$

여기서  $g$ 는 중력가속도,  $R_0$ 는 회전축으로부터 bowl 밑까지의 거리,  $R_1$ 은 회전축으로부터 수면까지의 거리,  $\omega$ 는 각속도,  $t$ 는 Fig.168에서 구한 settling time이다. 이렇게 구한 *Streptomyces avermitilis*의  $v_g$ 값은  $1.128 \times 10^{-3}$  cm/sec로 bacteria의  $10^{-7}$  order에 비하면 크다. 그 주요 원인은 mycelia를 형성하기 때문에 bacteria 보다는 particle의 평균 직경이 크기 때문이라고 사료된다. 여기에서 구한 settling velocity는 먼저 project에서 구한 값과 거의 같기 때문에 *Streptomyces avermitilis*의  $v_g$ 값은 균주가 개발되더라도 거의 일정하므로 앞으로 고생산성 균주가 추가로 개발되더라도 이 값을 사용하여 식(4)에 대입함으로써 처리용량  $Q$ 로부터 원심분리기의 용량인  $\Omega$ 값을 계산하는데 사용하여 적절한 크기의 원심분리기를 선정할 수 있게된다. 한편 Fig.169는 유기용매 (methanol, acetone)를 사용하여 12시간 shaking incubator에서 세포를 파쇄한 후 원심분리하여 얻어진 상등액을 HPLC분석하여 생산균주의 avermectin생산 여부를 확인한 chromatogram을 보여주고 있다. 이를 통해 생산 균주는 따로 기계적인 방법을 사용하지 않더라도 methanol, acetone등의 유기용매로 충분히 파쇄할 수 있음을 알 수 있었고 이를 통해 침전법을 사용하여 avermectin을 분리정제하더라도 분리정제의 첫 step은 methanol이나 acetone의 extract가 될 것임을 알 수 있었다.

한편 HPLC분석 결과 생산균주는 약 82mg/l정도의 생산성을 보였다. 따라서 각 세포 파쇄액에 standard avermectin을 약 700-800mg/l의 농도로 가하여 추출 공정 및 침전법에 관한 연구를 수행하였고, 한편으로는 아무런 처리도 하지 않은 순수 세포 파쇄액만을 가지고 추출 공정에 관한 연구를 수행하였다.

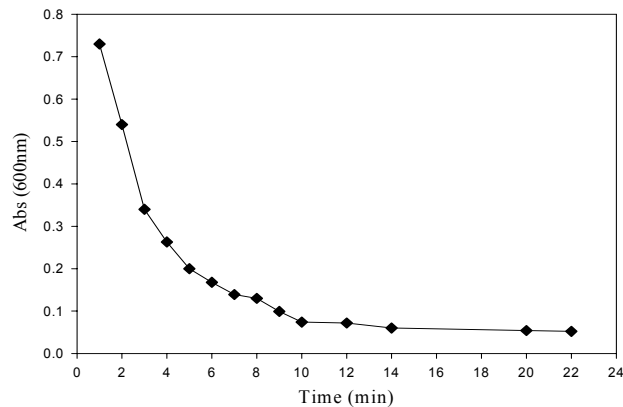


Fig.168. 원심분리 시간에 따른 상등액의 흡광도 변화 (at 5,000rpm)

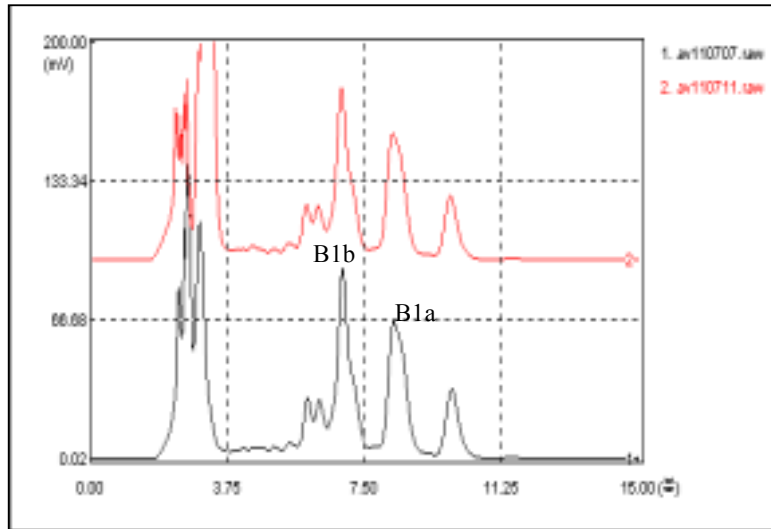


Fig.169. 유기용매에 따른 세포과쇄액의 크로마토그램  
(under; methanol과쇄액, upper; acetone과쇄액)

## 2) 세포 배양액 model solution으로부터 용매 추출 공정

제 1 세부에서의 실험결과에 따르면 methanol/water(5:3)-dichloromethane 추출시스템과 acetone/water(5:3)-chloroform 추출시스템에서의 에버멕틴 B<sub>1a</sub>와 B<sub>1b</sub>의 용매상의 1차 추출 수율은 95~99%정도이었다. 하지만 이러한 높은 추출율은 다른 미반응 배지성분 및 세포 생성물이 포함되어 있지 않은 순수 standard solution을 대상으로 추출한 경우에 이루어진 것이다. 실제 배양액에는 여러 가지 미반응 기질, 부산물, 불용성 물질들이 포함되어 있어 에버멕틴의 상평형에 영향을 미칠 것이 예상되며, 이에 따라 실제 배양액을 대상으로 한 용매 추출공정의 개발이 요구된다. 세포 배양액으로부터 용매 추출 공정 개발을 위해 에버멕틴 생산균주를 이용하여 배양한 후 배양액을 메탄올을 이용하여 세포과쇄를 하였으나, 에버멕틴이 충분히 생산되지 않아 대성미생물에서 얻은 에버멕틴 standard를 첨가하여 model solution을 만든 후 추출실험을 수행하였다.

Fig.170은 avermectin 700 mg/L를 첨가한 model solution으로부터 methanol/water(5:3)-dichloromethane 용매추출 시스템을 이용한 에버멕틴의 추출실험 결과로 standard solution을 사용하였을 경우와 마찬가지로 용매추출 후 수용액상에는 에버멕틴이 거의 남아있지 않았으며(밸런스 데이터 없음) 용매상에는 많은 양의 에버멕틴이 존재함을 알 수 있었다.

Fig.171은 avermectin 700 mg/L를 첨가한 model solution으로부터 acetone/water(5:3)-chloroform 용매추출 시스템을 이용한 에버멕틴의 추출실험 결과로 Fig.170의 경우와 마찬가지로 용매추출 후 수용액상에는 에버멕틴이 거의 남아있지 않았으며(밸런스 데이터 없음) 용매상에는 많은 양의 에버멕틴이 존재함을 알 수 있어서 세포 배양액으로부터 acetone/water(5:3)-chloroform 추출시스템에 의한 에버멕틴의 추출이 가능함을 확인할 수 있었다.

또 다른 실험에서 methanol과쇄액으로 만든 model solution으로부터 dichloromethane을 이용한 추출공정과 acetone과쇄액으로부터 만든 model solution으로부터 chloroform을 이용한 추출 공정을 비교해보았다. Fig.172와 Fig.173은methanol-water(5:3)액상과 dichloromethane 용매상의 액-액 접촉을 통한 추출 공정 결과의 chromatogram과 회수율을 보여주고 있고, Fig.174와 Fig.175는 acetone-water(5:3)액상과 chloroform 용매상의 액-액 접촉을 통한 추출 공정 결과의 chromatogram과 회수율을 보여주고 있다. Fig.172와 Fig.173에서 dichloromethane 용매상을 사용한 추출에서는 standard avermectin이 높은 농도로 가해진 액상과의 1:1접촉에서는 100% 가까운

높은 회수율을 보여주고 있고, 액상과의 2:1접촉에서도 93%가량의 높은 회수율을 보였다. 또한 Fig.174와 Fig.175에서는 chloroform 용매상을 이용한 추출공정에서 높은 농도의 standard avermectin이 첨가된 액상과의 1:1접촉에서는 역시 100%가까이 회수됨을 보여주고 있고, 2:1 접촉 또한 98%의 높은 회수율을 보여주고 있어서 두 추출 공정 모두 model solution 같이 높은 농도의 액상과의 접촉에서는 매우 높은 회수율을 보여주고 있음을 알 수 있었다.

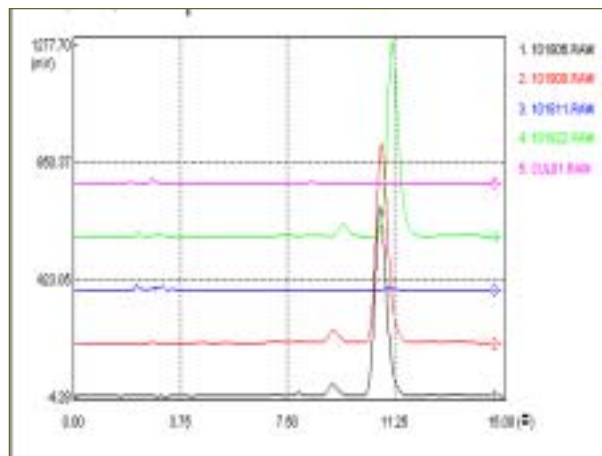


Fig.170. 에버멕틴 배양액으로부터 methanol/water (5:3)-dichloromethane 용매추출 시스템을 이용한 에버멕틴의 추출  
 lane1. Standard avermectin 700mg/L, lane2. 1:1 추출 후 용매상의 크로마토그램, lane3. 1:1 추출 후 수용액상의 크로마토그램, lane4. 추출 전 수용액상의 크로마토그램

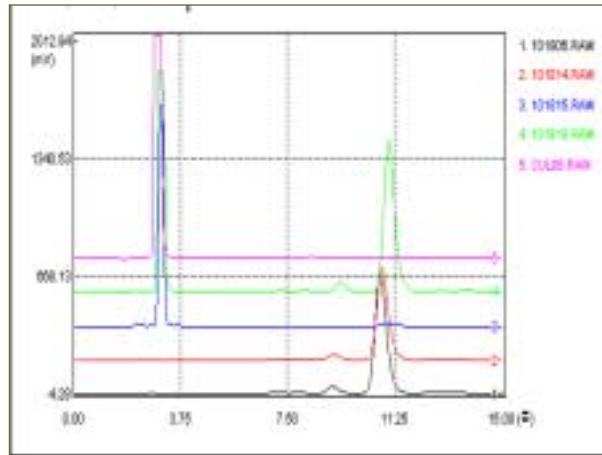


Fig.171. 에버멕틴 배양액으로부터 acetone/water(5:3)-chloroform 용매추출 시스템을 이용한 이용한 에버멕틴의 추출  
 lane1. Standard avermectin 700mg/L, lane2. 1:1 추출 후 용매상의 크로마토그램, lane3. 1:1 추출 후 수용액상의 크로마토그램, lane4. 추출 전 수용액상의 크로마토그램

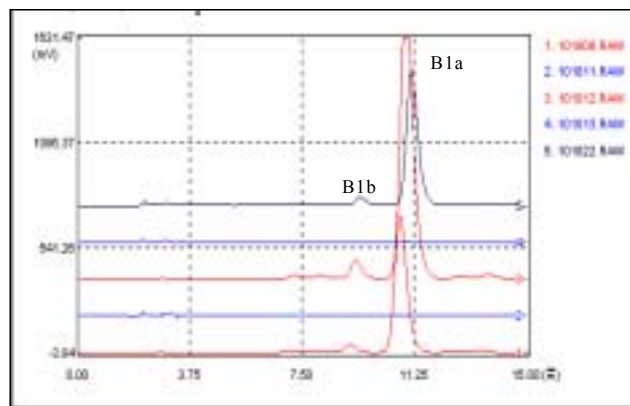


Fig.172. 에버멕틴 배양액(adding std. B1a700ppm) 으로부터 methanol/water (5:3)- dichloromethane 용매추출 시스템에서의 추출용매상의 부피비율에 따른 각 상에서의 HPLC 크로마토그램  
 (lane5. M/W(5:3)액상 공급액(methanol과쇄액+std B1a 700ppm, lane4. 2:1추출 후 액상, lane3. 2:1추출 후 용매상, lane2. 1:1추출 후 액상, lane1. 1:1추출 후 용매상)

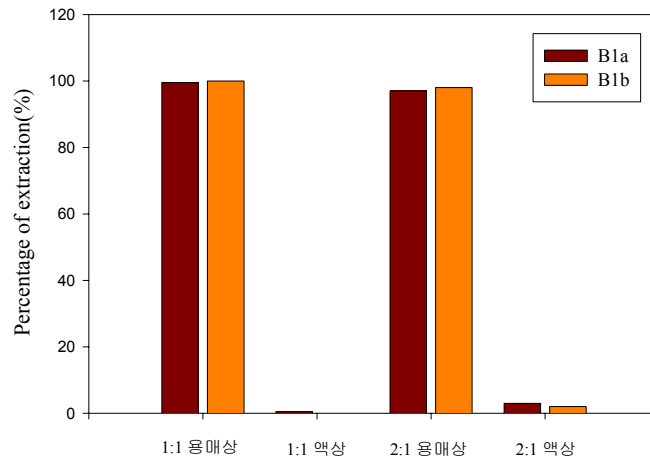


Fig.173. 에버멕틴 배양액(adding std. B1a 700ppm)으로부터 methanol/water (5:3)-dichloromethane 용매추출 시스템에서의 추출용매상의 부피비율에 따른 avermectin의 회수율 비교

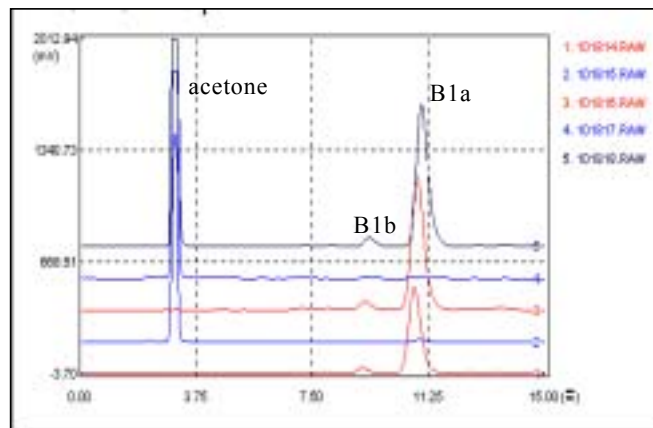


Fig.174. 에버멕틴 배양액(adding std. B1a 800ppm)으로부터 acetone/ water(5:3)-chloroform 용매추출시스템에서의 추출용매상의 부피비율에 따른 각 상에서의 HPLC 크로마토그램

(lane5. A/W(5:3)액상 공급액(acetone 과채액+std. B<sub>1a</sub> 800ppm), lane4. 2:1추출 후 액상, lane3. 2:1추출 후 용매상, lane2. 1:1추출 후 액상, lane1. 1:1추출 후 용매상)



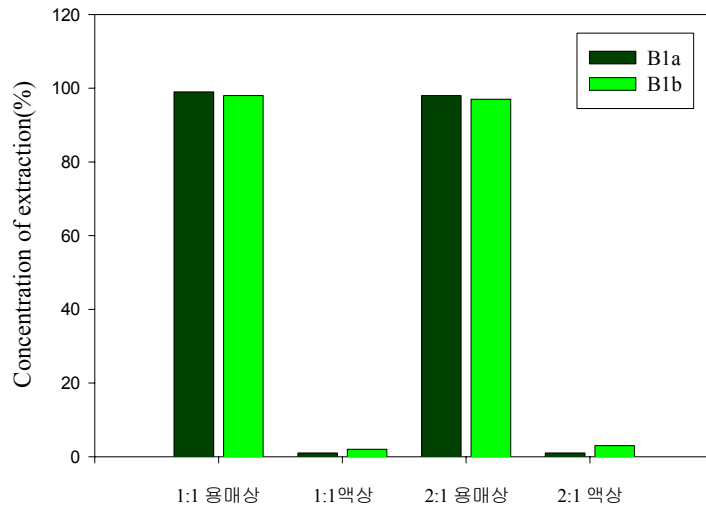


Fig.175. 에버멕틴 배양액(adding std. B<sub>1a</sub> 800ppm)으로부터 acetone/water(5:3)-chloroform 용매추출시스템에서의 추출용매상의 부피비율에 따른 avermectin의 회수율 비교

### 3) 세포 배양액으로부터 용매 추출 공정

위에서는 에버멕틴의 생산량이 적어 standard를 첨가하여 추출 실험을 하였으나 침전법과는 달리 추출법의 경우에는 초기 농도가 중요하지 않으므로 세포 배양액으로부터 직접 용매 추출을 수행하였다. 이를 위해 에버멕틴 배양액을 메탄올로 추출하여 분석한 세포과쇄액(20mL)을 가지고 (standard첨가 되지 않음) 유기용매 추출한 후 용매상의 HPLC 크로마토그램을 조사하였다. Fig.176은 에버멕틴 세포 배양액으로부터 methanol/water(5:3) -dichloromethane 용매추출 시스템을 이용하여 에버멕틴을 추출한 결과의 HPLC 크로마토그램을 보여주고 있다. 이 그림의 아래에 보이는 붉은 선은 1:1(20mL:20mL)추출 후 용매상의 크로마토그램으로 앞의 불순물 피크가 없어지고 용매상의 농도가 추출에 사용된 과쇄액에 비하여 절반가량으로 줄어들음을 알 수 있었고 이러한 이유는 dispersion band의 영향 때문으로 보인다. 한편 위에 파란 선은 2:1(20mL:10mL)추출 후 용매상의 크로마토그램으로 농도는 추출에 사용된 농도와 비슷하나 용매상의 부피가 줄어들은 농축 효과를 고려하면 추출율은 절반정도임을 알 수 있었다.

Fig.177과 Fig.178은 두 번에 걸친 에버멕틴 세포 배양액으로부터 methanol/water(5:3) -dichloromethane 용매에 의한 에버멕틴 B<sub>1a</sub>와 B<sub>1b</sub>의 추출 실험에서 추출율을 조사한 결과를 나타낸 것으로 Fig.176에서 예측한 대로 추출율이 50%정도 밖에 되지 않음을 확인할 수 있었다. 이렇게 순수 standard solution을 대상으로 추출할 경우 보다 추출율이 절반 정도로 낮은 이유는 앞에서 언급하였듯이 실제 배양액을 이용하여 용매추출할 경우 dispersion band가 출현하기 때문으로 생각되어진다.

Fig.179는 에버멕틴 세포 배양액으로부터 acetone/water(5:3) -chloroform 용매추출 시스템을 이용하여 에버멕틴을 추출한 결과의 HPLC 크로마토그램을 보여주고 있다. 이 그림의 아래에 보이는 붉은 선은 1:1(20mL:20mL)추출 후 용매상의 크로마토그램으로 앞의 불순물 피크가 없어지고 용매상의 농도가 추출에 사용된 과쇄액에 비하여 절반가량으로 줄어들음을 알 수 있었고 이러한 이유 역시 dispersion band의 영향 때문으로 보인다. 한편 위에 파란 선은 2:1(20mL:10mL)추출 후

용매상의 크로마토그램으로 농도는 추출에 사용된 농도보다 감소하였고 용매상의 부피가 줄어들은 농축효과를 고려하면 추출율은 절반정도임을 알 수 있었다.

Fig.180과 Fig.181은 두 번에 걸친 에버멕틴 세포 배양액으로부터 acetone/water(5:3)-chloroform 용매에 의한 에버멕틴 B<sub>1a</sub>와 B<sub>1b</sub>의 추출 실험에서 추출율을 조사한 결과를 나타낸 것으로 추출율이 acetone/water(5:3)-chloroform 용매추출 시스템보다 낮은 35%정도 밖에 되지 않음을 확인할 수 있었다. 이렇게 acetone/water(5:3)-chloroform 용매에 의한 추출이 순수 standard solution을 대상으로 추출할 경우 보다 추출율이 더욱 더 낮은 이유는 실제 배양액을 methanol/water(5:3)-dichloromethane 용매추출 시스템을 이용하여 용매 추출할 경우보다 dispersion band의 문제가 훨씬 심각해지기 때문으로 생각되어진다.

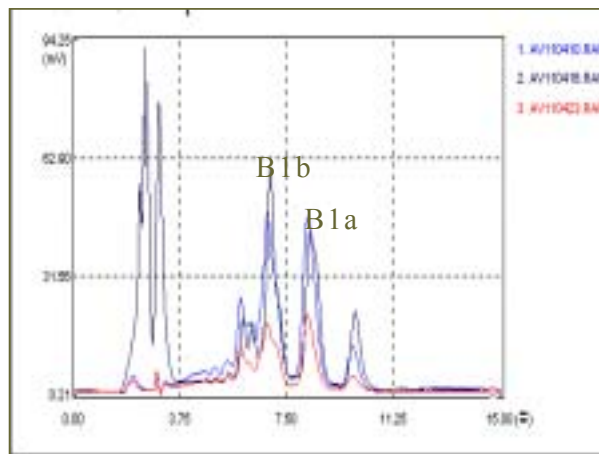


Fig.176. 에버멕틴 배양액으로부터 유기용매를 이용한 에버멕틴의 추출 크로마토그램  
Methanol/water(5:3)-dichloromethane 용매추출 시스템의 적용

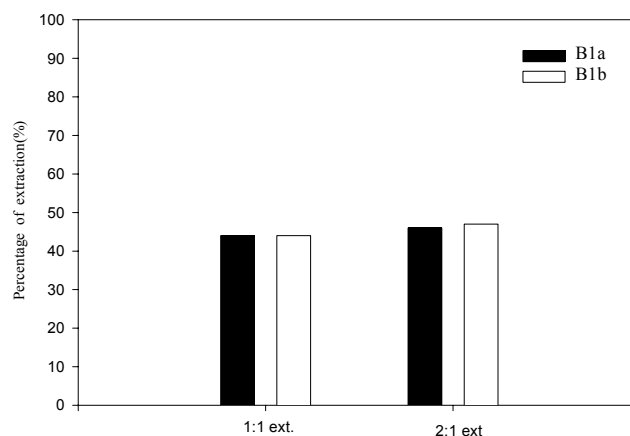


Fig.177. 에버멕틴 배양액으로부터 유기용매를 이용한 에버멕틴의 추출율-1차 실험  
Methanol/water(5:3)-dichloromethane 용매추출시스템의 적용

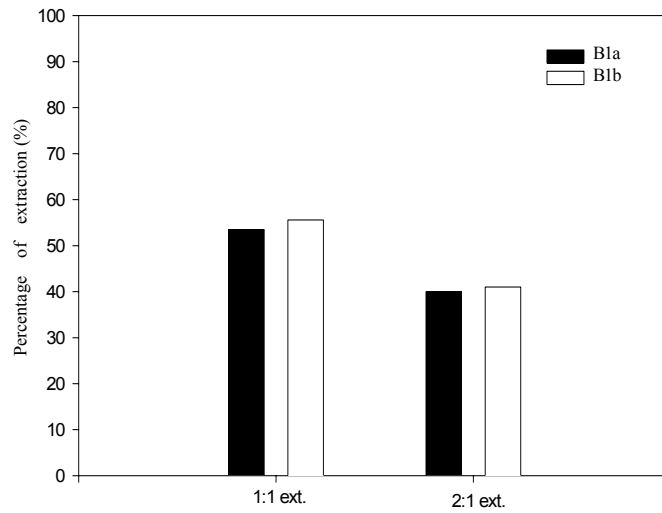


Fig.178. 에버멕틴 배양액으로부터 유기용매를 이용한 에버멕틴의 추출율-2차 실험  
Methanol/water(5:3)-dichloromethane 용매추출시스템의 적용

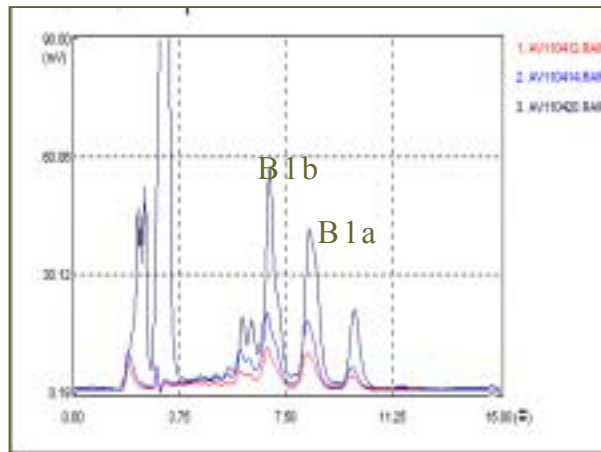


Fig.179. 에버멕틴 배양액으로부터 유기용매를 이용한 에버멕틴의 추출 크로마토그램  
Acetone/water(5:3)-chloroform 용매추출 시스템의 적용

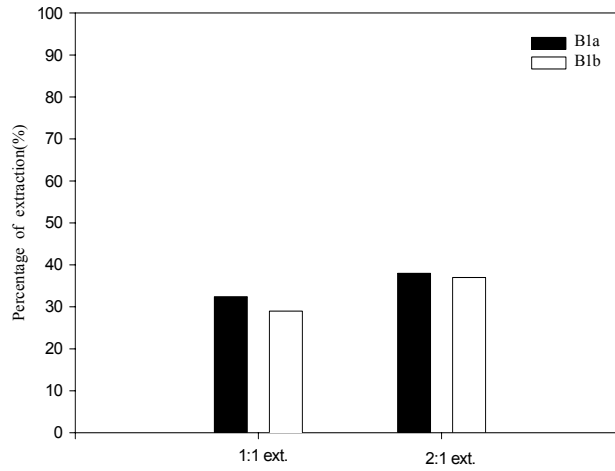


Fig.180. 에버멕틴 배양액으로부터 유기용매를 이용한 에버멕틴의 추출율-1차 실험  
Acetone/water(5:3)-chloroform 용매추출시스템의 적용

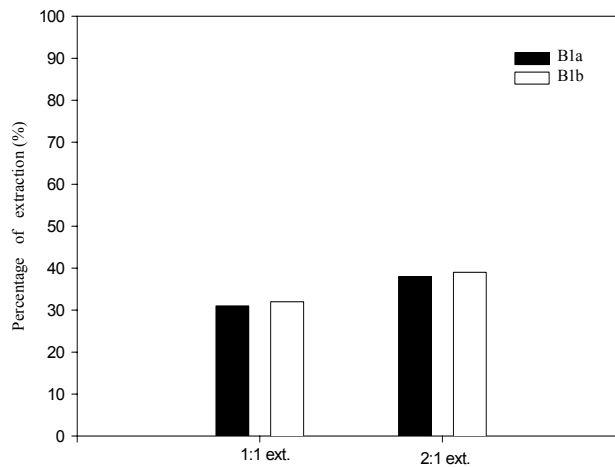


Fig.181. 에버멕틴 배양액으로부터 유기용매를 이용한 에버멕틴의 추출율-2차 실험  
Acetone/water(5:3)-chloroform 용매추출시스템의 적용

위에서 실제 배양액을 이용하여 용매추출할 경우 dispersion band가 출현하기 때문에 standard solution을 대상으로 추출할 경우 보다 추출율이 낮아질 것이라는 추측을 하였는데 그러한 사실을 확인하기 acetone/water(5:3) -chloroform 용매추출 시스템에서의 dispersion band 층에 에버멕틴이 존재하는지 조사하였고 그 결과를 Fig.182에 나타내었다. 이 그림에서 아래의 검정 선이

standard 에버멕틴의 크로마토그램이고, 위의 파란 선이 배양액으로부터 용매추출 시 생겨나는 dispersion band층을 10배 희석한 크로마토그램이다. 이 그림에 의해 많은 양의 에버멕틴이 중간 dispersion층에 존재하는 것을 확인하였고 이에 따라 실제 배양액의 용매 추출 시에는 배양액의 전처리를 통하여 dispersion band를 최소화하여야만 추출수율을 높일 수 있다는 결론을 얻었다.

Fig.183은 methanol/water(5:3)-dichloromethane 용매추출 시스템에서의 dispersion band층에 에버멕틴이 존재하는지 조사한 그림으로 HPLC 분석 시간을 길게 하여 후반부에 검출되는 peak이 있는지를 확인하였으며 세포배양액으로부터 methanol/water(5:3) -dichloromethane 용매추출 시스템을 이용한 에버멕틴의 추출을 저하원인이 dispersion band임을 확인하였다. Fig.184는 acetone/water(5:3) -chloroform 용매추출 시스템에서 배양액으로부터 추출할 경우 추출을 저하원인이 dispersion band임을 다시 한번 확인하면서 HPLC 분석 시간을 길게하여 후반부에 검출되는 peak이 있는지를 확인한 실험 결과이다.

이상에서 실제 배양액을 사용하여 용매 추출할 경우 많은 양의 에버멕틴이 중간 dispersion band층에 존재함으로써 추출율을 낮추는 주요 원인이 됨을 알 수 있었고, 이러한 dispersion band층에 대한 문제는 세포파쇄 후 microfiltration 및 ultrafiltration에 의해 해결할 수 있음을 최근 확인됨으로써 앞으로 더 정밀한 조사가 요구되고 있다.

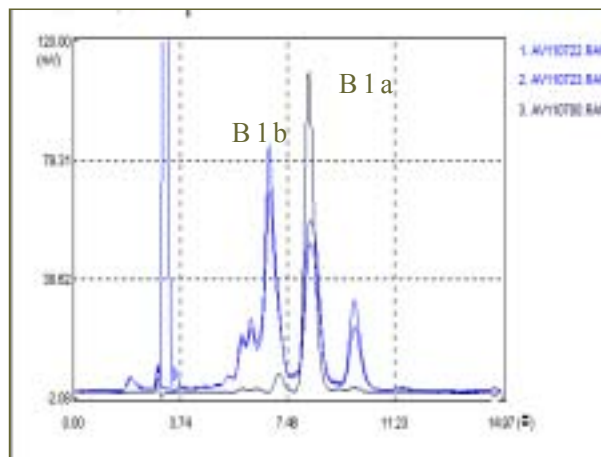


Fig.182. Standard avermectin 100mg/L의 크로마토그램과 acetone/water(5:3)-chloroform 용매추출시스템에서의 dispersion band 10배 희석액의 크로마토그램 비교

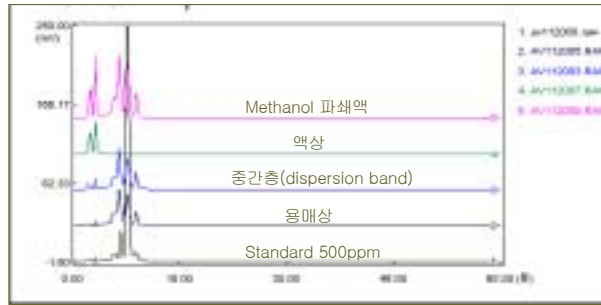


Fig.183. Methanol 파쇄액의 용매추출 시 각 상의 HPLC크로마토그램

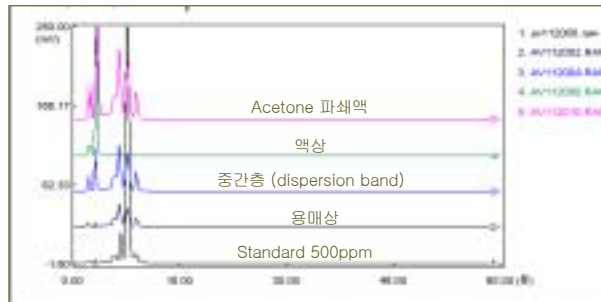


Fig.184. Acetone 파쇄액의 용매추출 시 각 상의 HPLC크로마토그램

4) 침전법을 이용한 세포 배양액으로부터 에버멕틴의 분리 공정 개발

Fig.185는 앞의 연구방법에서 설명한 방법대로 methanol과 NaCl을 사용하여 침전시킨 침전물을 회수하여 HPLC를 통하여 분석한 결과를 나타내고 있다. 이 그림의 아래 붉은 선은 정제하기 전 세포파쇄 원액의 크로마토그램을 나타내고 위의 검정 선은 침전물로부터 회수된 침전물의 크로마토그램을 나타내고 있음으로써, 이 그림은 avermectin B<sub>1a</sub>의 peak가 정제하기 전의 크로마토그램보다 증가하였음을 보여주고 있다. 총 avermectin 유사체 가운데 33%를 차지하던 에버멕틴 B<sub>1a</sub>가 65%로 증가하였으나 회수율은 다소 낮게 35%의 회수율을 보여줌으로써 침전법에 의한 에버멕틴의 분리는 수율은 낮으나 정제 효과가 우수한 것을 알 수 있었다.

Fig.186은 methanol과 NaCl을 사용하여 침전시킨 침전물을 제거한 상등액의 HPLC chromatogram과 정제하기 전 세포파쇄액의 HPLC chromatogram을 비교한 결과를 나타내고 있다. Fig.185에서는 침전물에 상대적으로 에버멕틴 B<sub>1a</sub>의 peak이 증가하였음을 보여주었으나, 이와는 반대로 Fig.186에서는 침전물을 제거한 상등액내의 B<sub>1a</sub>의 peak가 다른 유사체에 비해 줄어들었음을 보여주고 있어 에버멕틴 B<sub>1a</sub>가 침전물 상으로 효율적으로 정제됨을 알 수 있었다. 이는 NaCl이 methanol에 대해 불용성으로서 침전되면서 에버멕틴을 같이 침전시키는 가운데 다른 유사체들로부터 분리시키는 기작에 의한 듯하나 보다 많은 조사가 진행되어야 결론을 내릴 수 있겠다. 하지만 상등액에 여전히 상당한 농도의 에버멕틴 B<sub>1a</sub>가 존재함으로써 분리 회수율이 떨어짐도 알 수 있었다.

Fig.187은 염 침전법에 의한 에버멕틴의 정제 시 순도 변화를 나타낸 것으로 침전물로 에버멕틴 B<sub>1a</sub>가 분리 정제됨을 보여주고 있다. 이 그림에 의하면 상등액에도 어느 정도 avermectin이 존재함을 보여주고 있어 분리 회수율이 낮음을 알 수 있고, 침전물 재용해 회수액에는 95%이상 에버멕틴 유도체가 차지하고 있어 불순물이 많이 제거 되었으며 특별히 에버멕틴 B<sub>1a</sub>의 상대적인 양

이 증가한 것을 보여줌으로써 침전법이 에버멕틴 B1a의 정제에 우수함을 다시 확인시켜 주고 있다.

염 침전법에 의한 에버멕틴의 정제 시 중요한 점은 에버멕틴의 초기농도로서 염에 의해 유기용매 내에서 염과 함께 침전될 수 있는 적절한 농도까지 농축해 주는 것이 가장 중요하다. 왜냐하면 다른 실험에서 낮은 농도의 에버멕틴 배양액을 가지고 동일한 방법으로 실험한 결과에 의하면 낮은 농도에서는 침전된 에버멕틴 보다는 염 침전 후 상등액내에 많은 양의 에버멕틴이 침전되지 않고 녹아있는 것을 확인한 바 있기 때문이다.

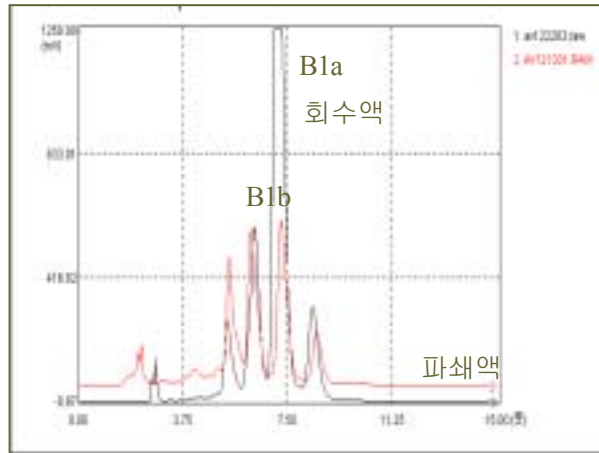


Fig.185. Methanol, NaCl 침전물로부터 회수된 avermectin의 HPLC chromatogram과 정제하기 전 세포파쇄액의 HPLC chromatogram 비교

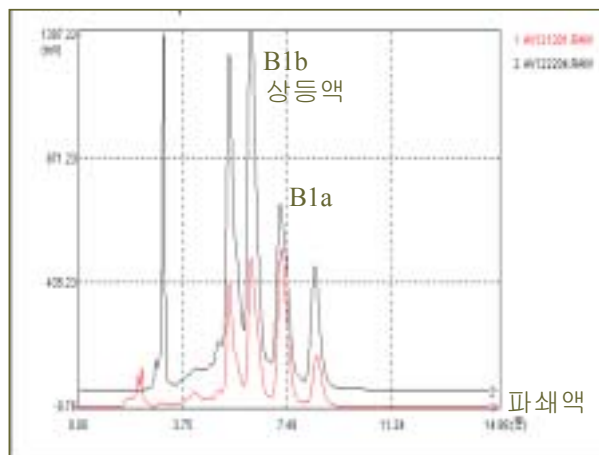


Fig186. Methanol, NaCl 침전 후 침전물이 제거된 상등액의 HPLC chromatogram과 정제하기 전 세포파쇄액의 HPLC chromatogram 비교

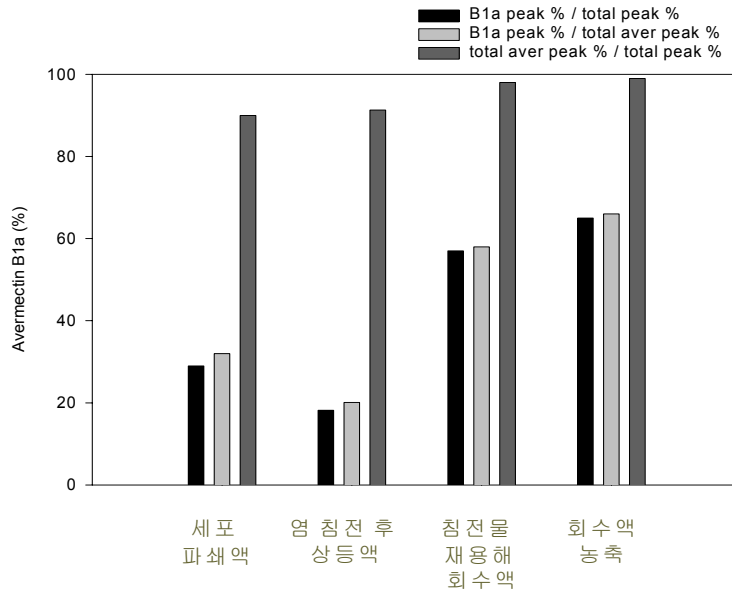


Fig.187. 염 침전법에 의한 에버멕틴의 정제 시 순도 변화

#### 다. Pilot-scale에서의 에버멕틴 추출, 분리, 정제 공정 개발 및 최적화 (제 2 세부과제 및 제 2 위탁과제: 2차년도)

1차년도에서는 moldel solution 또는 세포배양액에 standard를 첨가하여 avermectin분리정제를 위한 기본 전략을 수립하였다. 하지만 2차년도에서는 그동안 새롭게 개발한 균주를 가지고 50L fermentor에서 배양한 sample을 가지고 분리 정제를 수행하였다.

##### 1) Intracellular avermectin 확인

새로 개발된 product가 intracellular인지 extracellular product인지 파악하는 것은 분리정제 공정 개발에 기본이 된다. 따라서 새롭게 개발된 생산 균주가 생산하는 avermectin이 cell 내에 존재하는지 cell 외로 배출되는지 확인하기 위하여 세포배양액을 원심분리하여 배양액의 상등액, 세포, 세포를 포함한 배양액 원액을 각각 methanol 1:1로 추출한 후 methanol 분획을 경우에 따라 다시 원심분리한 후에 HPLC로 분석하였고 그 결과를 Fig. 188, 189, 190에 나타내었다. Fig 188은 고/액 분리하지 않은 세포배양원액을 메탄올로 파쇄한 다음, 원심분리한 상등액을 분석한 것으로서 앞의 큰 peak는 불순물을 나타내고, 뒤의 peak는 순서대로 avermectin A<sub>2a</sub>, B<sub>1b</sub>, B<sub>1a</sub>, A<sub>1b</sub>를 나타내고 있다. 이 그림에서 알 수 있듯이 세포는 여러 가지 avermectin B<sub>1a</sub>를 비롯한 여러 가지 avermectin derivative를 생산하고 있음을 알 수 있었다. 하지만 avermectin이 세포안에 생성되고 있는지 배양액으로 배출시키는지 확인할 수 없다. Fig. 189는 세포 배양액을 원심분리 하여 상등액은 제거하고 세포를 회수한 후 메탄올로 세포를 파쇄하면서 추출한 다음, 원심분리하여 그 상등액을 취하여 분석한 결과를 나타내고 있다. 그 결과 Fig. 189와 같이 avermectin A<sub>2a</sub>, B<sub>1b</sub>, B<sub>1a</sub>, A<sub>1b</sub>의 peak를 확인할 수 있어서 이들 product들은 세포내에 축적되는 intracellular product 임을 알 수 있었다. Fig. 190은 세포 배양액을 원심분리 한 후 그 상등액을 HPLC로 분석한 chromatogram으로 배양액에는 이러한 product들을 포함하고 있지 않아 다시 한번 생산 균주에서 avermectin은 intracellular product 임을 알 수 있었다. 따라서 이러한 intracellular product를 분리 정제하기 위해서는 그 첫 번째 step으로 세포와 배양액을 분리하는 여과 공정이나 원심분리 공정



이 필요하다.

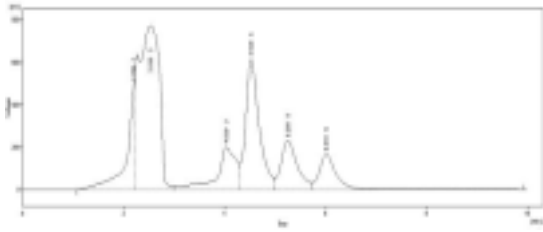


Fig. 188. 배양액원액의 메탄올 추출액의 HPLC chromatogram

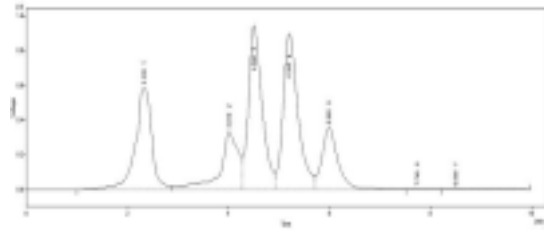


Fig. 189. 메탄올 세포과쇄액의 HPLC chromatogram

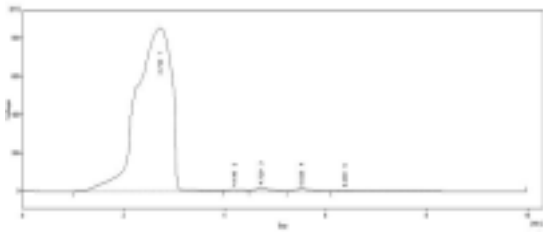


Fig. 190. 세포 배양액을 원심분리 한 후 상등액을 HPLC로 분석한 chromatogram

## 2) Pilot 규모의 균체 회수공정 개발

위에서 avermectin 생산균주가 intracellular product임이 밝혀졌기 때문에 avermectin의 분리정제에 앞서 세포와 배양액을 분리하는 여과 공정이나 원심분리 공정의 개발이 필요하다.

### 가) 원심분리공정

Pilot 규모의 균체 회수공정으로 먼저 원심분리공정을 검토하였다. 주관 기관이 입주하고 있는 춘천시바이오산업진흥원에서 보유하고 있는 pilot 규모의 tubular bowl 고속원심분리기를 사용하여 배양액을 분리한 결과 효과적인 고액분리는 가능하였으나 처리속도가 늦어 scale-up 시 원하는 생산성을 얻기 위해서는 장치의 capacity를 대폭 증가시켜야 하는 단점이 존재하였다. Fig 191은 사용한 tubular bowl 고속원심분리기를 나타내고 있다. 이에 따라 Alpha laval Disc bowl 타입의 연속원심분리기와 막진동 분리기 (Pall sep. USA)의 사용가능성 여부를 검토하였다. Alpha laval원심분리기는 연속 분리가 가능하며 처리속도 또한 1 ton/hr로써 filter press 공정을 대체하여 고형물을 분리할 수 있는 공정으로써 평가되었다. Fig. 192는 사용한 Alpha laval Disc bowl 타입의 연속원심분리기를 나타내고 있다. 막진동 분리기 역시 빠른 처리속도 (1000 L/hr 이상)와 진동에 의한 fouling 방지라는 장점을 지니고 있어 고형물질 제거 공정으로 이용할 만하다. 그러나 막진동 분리기와 판 Disk 타입 연속원심분리기는 고가의 장비로서 초기 시설비 부담이 있으며 회수해야 할 고형물이 완전히 압착되지 않아 물을 많이 포함된 슬러리 형태로 남게 된다. 따라서 많은 양의 배양액을 단시간 내에 처리하면서 초기 투자비 부담이 없는 filter press 공정을 균체회수 공정으로 선정하였다.



Fig. 191. Pilot 규모의 tubular bowl 고속원심 분리기



Fig. 192. Pilot 규모의 Alpha laval Disc bowl 타입의 연속원심분리기

#### 나) 여과에 의한 균체회수 공정

Avermectin 포함 세포배양액의 여과공정의 개발을 위해서는 lab scale의 filter test를 통하여 여러 가지 parameter들을 추정함으로써 차후 scale-up을 위해서도 기초 설계 자료들을 확보하는 것이 중요하다. 따라서 Ruth 방정식을 이용하여 avermectin 생산균주의 specific cake resistance 값을 추정하여 향후 filter press 나 rotary drum filter 등의 scale-up된 filter의 설계에 대비하는 것이 중요하다.

Darcy의 법칙으로부터 유도된 정압여과에 관한 유속과 압력차와의 관계식은 다음과 같다.

$$\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta P}{\mu[\alpha\rho_0(V/A) + R_M]} \quad (1)$$

여기서 A는 filter area, V는 filtrate volume,  $\Delta P$ 는 압력차,  $\mu$ 는 점도,  $\alpha$ 는 specific cake resistance,  $\rho_0$ 는 mass of cake solid per volume of filtrate,  $R_M$ 은 filter medium의 저항이다. 이 식을 0시간에서 filtrate volume(V)을 zero로 하고 변수분리하여 적분하면 다음과 같은 Ruth 방정식을 얻게 된다.

$$\left(\frac{At}{V}\right) = K\left(\frac{V}{A}\right) + B \quad (2)$$

여기서 K는  $\frac{\mu\alpha\rho_0}{2\Delta P}$ , B는  $\frac{\mu R_M}{\Delta P}$  으로  $(At/V)$ 와  $(V/A)$ 를 plot하면 직선 관계를 얻게 되고 이의 slope에서 specific cake resistance  $\alpha$ 값을 얻게 된다.

#### ① Avermectin 생산균주의 여과 특성

먼저 project인 “미생물을 이용한 동물 구충제의 대량 생산 및 산업화에 관한 연구”에 의하면 lab scale 의 filter (Area = 2.2685 cm<sup>2</sup>)를 이용하여 30 mmHg, 40 mmHg, 50 mmHg, 60 mmHg의 진공으로 여과실험한 결과를 Ruth plot하고 그 직선의 기울기와 점도 (1.17 c.p ; Osteald 점도 계로 측정),  $\rho_0$  (0.003 g/cm<sup>3</sup>) 등을 대입하여 specific cake resistance  $\alpha$ 값을 구한 결과 각각 1.35 x 10<sup>13</sup> cm/g, 1.33 x 10<sup>13</sup> cm/g, 1.07 x 10<sup>13</sup> cm/g, 1.90 x x 10<sup>13</sup> cm/g이었다.

한편 대부분의 생화학적 물질들은 압축성이기 때문에 그 해석이 위의 경우와 같이 간단하지 않다. 압축성일 경우 cake이 압축될수록 여과속도가 줄어든다. 이러한 cake의 압축성정도를 다음의 식으로 나타낸다.

$$\alpha = \alpha'(\Delta P)^S \quad (3)$$

이때  $\alpha'$ 는 cake particle의 크기와 모양에 관계된 상수이고 S는 압축성의 종류를 나타내는

compressibility이며 보통 0.1-0.8 사이의 값을 갖게 되고 이 값이 zero 이면 완전 비압축성을 나타내고 1에 가까이 커질수록 압축성이 큰 것을 나타낸다. 이 compressibility를 구하기 위해 여러 압력차에 따르는 specific cake resistance  $\alpha$  값의 변화를 log-log 그래프에 plot하여 그 기울기로 부터 S 값을 구한 결과 0.2586로서 avermectin을 생산하는 *Streptomyces avermitilis* 의 경우 거의 rigid 하다 할 수 있다.

이상에서 avermectin 생산균주는 filter의 저항을 무시하여 (2)식에서 B는 무시하고, avermectin 생산균주는 rigid하여 incompressible cake이라 가정하여, filter press의 면적 A와 여과 처리 volume V, 여과시간 t와의 다음 관계식 (4)를 얻어 주어진 여과시간에 필요한 filter press의 면적 A를 구하여 필요한 filter press의 frame 개수를 결정하였다.

$$A = V \sqrt{t \left( \frac{\mu \alpha \rho_s}{2 \Delta p} \right)} \quad (4)$$

### ② Filter press 이용 균체 회수 공정

*Streptomyces avermitilis* 배양액으로부터 세포 등의 고형물질을 제거하는 공정으로 filter press 공정을 시도하였다. 다양한 배양액의 점도와 잔여 배지의 농도에 대해 filter press 공정의 성능을 비교하였다. Avermectin 배양공정에서는 세포가 배지를 모두 소모하였을 경우에는 filter press 공정이 더 나은 성능을 보였으나 세포가 배지를 충분히 사용하지 않아 고형물이 남아 있을 경우 membrane fouling으로 성능이 급격히 떨어짐을 알 수 있었다. Filter press와 같은 막분리 공정에서 고형물질로 인한 membrane의 손상 및 fouling 현상이 가장 큰 문제가 되며 공정의 성능 및 경제성을 좌우하는 주요한 요인이다. 따라서 고형물질을 완벽히 제거하면서 높은 flux를 나타내는 membrane을 선정하기 위해 국내외에서 판매되는 막들을 사용하여 filter press 공정을 수행하였고 flux와 고형물질 분리도를 관찰함으로써 적정 membrane을 선정하였다. 시험된 여과막은 DS 2-9, 8777X, 444X, 46X32, 85X 이었으며 이 중 DS 4 및 DS 5 membrane을 제외하고는 대부분의 여과막의 경우 고형물질들이 여과막을 통과해 버리거나 반대로 여과막을 전혀 통과하지 못하여 배양액으로부터 고형물질을 제거하기 위한 여과막으로 사용이 불가능함을 보여주었다. Fig 193은 사용한 pilot 규모의 filter press를 나타내고 있다.



Fig. 193. Pilot규모의 filter press

### 3) 세포파쇄공정

Avermectin은 intracellular product이므로 avermectin 생산균주를 filter press에 의해 회수한 후에 세포를 파쇄해야 한다. 세포 파쇄는 화학적 방법, 기계적 방법이 있으나 먼저 project에서는

용매에 의한 과쇄법이 선정되었다. 따라서 filter press에 의해 균체를 회수한 후에 methanol에 의해 세포벽을 과쇄하였다. 여과공정을 수행하기 전에 배양액과 균체 전체를 methanol에 의해 과쇄하였을 경우를 simulation 하기 위하여 같은 부피의 물을 더 첨가, 희석하여 methanol:water 1:1 solution을 막여과 공정의 feed로 사용하였다.

#### 4) 막여과에 의한 분리 정제

##### 가) microfiltration 공정

Ultrafiltration을 비롯한 막 분리 공정에 있어서 가장 심각한 문제점으로써 고형물질에 의한 fouling을 들 수 있다. 이것은 막의 운전에서 얼마나 fouling을 줄일 수 있는가에 따라서 막의 수명을 결정하고 막 분리 공정에서 얼마나 시간을 단축할 수 있는지를 결정하기 때문에 큰 size의 고형물질은 물론, 미세한 고형물질이라도 전처리 공정에서 제거해 주는 것이 중요하다. Methanol에 의해 과쇄된 세포에서 cell debris를 제거하기 위해 원래는 다시 filter press를 사용하여 하나 아직까지는 scale이 크지 않기 때문에 8  $\mu\text{m}$  pore size를 갖는 prefilter를 사용하여 미세한 고형물질을 추가로 제거한 후 한외 여과공정을 수행하였다. 하지만 현재 본 과제에서 사용한 prefiltration 공정은 cross flow 방식이 아닌 dead end 방식이기 때문에 prefilter가 자주 막히는 문제가 발생하여 cross flow 형식의 microfiltration 공정이 요구된다. Fig. 194는 microfiltration의 결과를 나타내고 있다.

##### 나) ultrafiltration

배양액 내에 남아 있는 여러 가지 불순물들을 UF에 의해 제거 할 수 있다면 용매 추출을 하지 않는 청정 분리 정제 공정을 확립할 수 있게 된다. 따라서 8  $\mu\text{m}$  pore size의 microfilter를 통과한 여과액(filtrate)에 남아있는 분자량 300,000 이상의 거대분자를 300K membrane으로 제거하고, 분자량 100,000 이상의 분자를 100K membrane으로 제거한 후에, 여전히 남아있을 것으로 예상되는 분자량 10,000 이상의 불순물을 10K membrane으로 제거하려는 시도를 하였다. 이를 위해 Satorius의 Ultra filtration unit을 이용하여 순차적으로 prefilter된 여과액의 한외여과를 수행하였으며 사용한 ultrafiltration unit의 대략적인 모식도를 다음의 Fig. 195에 나타내었다.

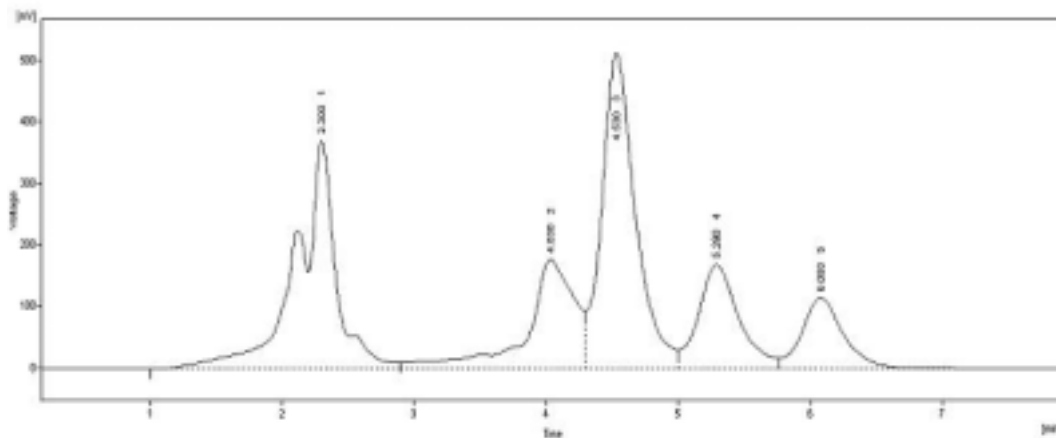


Fig. 194. 세포 과쇄액을 Microfiltration한 chromatogram

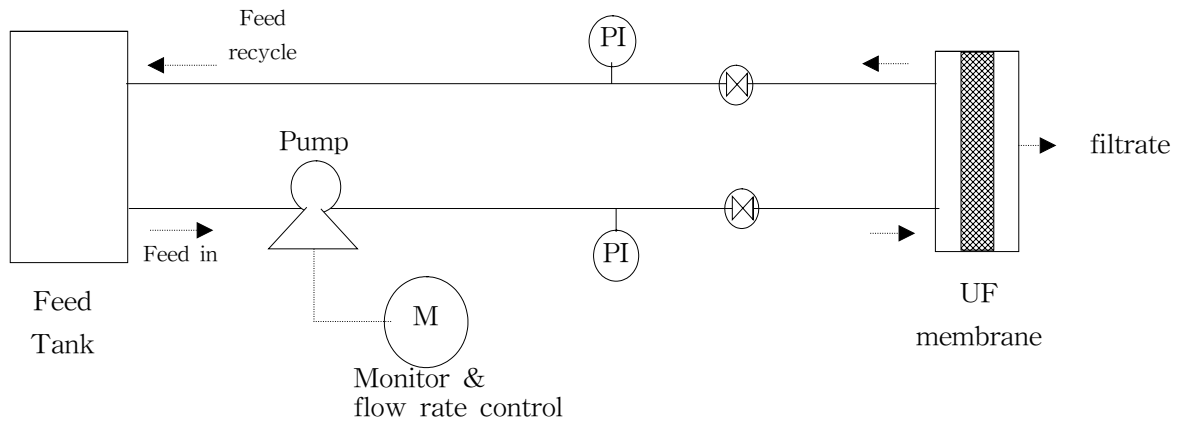


Fig. 195. UF filtration system

Feed의 압력을 1.5 bar, retentate의 압력을 0.5 bar로 유지하여 한외여과를 수행하였고, 100K membrane을 통과할 때의 처리된 filtrate의 유속은 대략 200ml/min 이었으며 시간에 따라 일정한 유속을 유지하였다. 시료를 처리하는 동안 거의 일정한 유속을 유지함을 통해 UF membrane의 표면층의 gel 형성은 시료를 처리하고 있는 동안에는 심각하게 일어나지 않음을 알 수 있었다.

Fig. 196은 300K membrane 통과 후의 chromatogram을, Fig. 197은 10K membrane 통과 후의 chromatogram을 보여주고 있다. Fig. 194에서 보여주고 있는 UF system feed의 chromatogram과 비교하면 거의 chromatogram pattern이 같으므로 불순물이 거의 제거되지 않고 있음을 알 수 있었다. 따라서 UF 공정을 이용하여 avermectin을 분리정제하는 것이 비효율적이므로 세포 파쇄 후 추출 공정을 이용한 분리공정을 시도하였다.

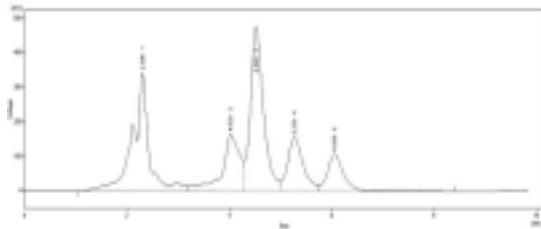


Fig. 196 UF 300K 투과액의 chromatogram

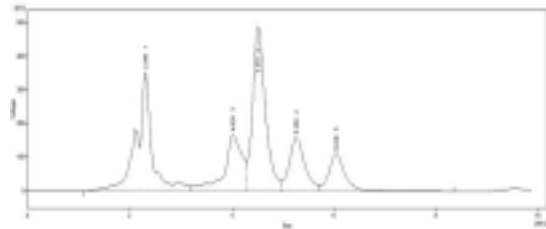


Fig. 197. UF 10K 투과액의 chromatogram

#### 5) Pilot 규모의 avermectin 추출 공정

UF에 의한 avermectin의 분리정제에서 불순물이 효과적으로 제거되지 않았기 때문에 추출공정을 시도하였다. 추출공정의 용매로는 1차년도에서 최적 용매로 선정된 methylene chloride를 이용하였고 methylene chloride 에 최적인 aqueous phase로는 먼저 project에서 사용한 methanol : water (5:3 v/v)를 사용하기 위하여 물을 더 첨가하였다. Avermectin의 추출공정을 위해서는 Fig. 198와 같은 pilot 규모의 추출장치를 이용하였다.



Fig. 198. Pilot 규모의 추출장치

Fig. 199는 추출 전 aqueous phase feed로 제조한 methanol : water (5:3 v/v)의 chromatogram을 나타내고 있다. 네 종류의 avermectin peak 앞 부분에 불순물이 있음을 알 수 있었다. 이러한 불순물을 제거하고 효능이 우수한 avermectin B<sub>1a</sub>만을 정제하기 위하여 추출을 시도하였다.

Fig. 200, 201, 202는 methylene chloride(용매): methanol-water aqueous phase의 비율을 각각 1:1, 2:1, 3:1로 용매의 상대적 양을 증가시키면서 추출한 결과를 나타내고 있다. Fig. 203과 비교해 보면 추출에 의해 앞부분의 불순물 peak가 많이 줄어들었음을 알 수 있었다. 불순물은 많이 제거되었지만 Fig. 200의 경우 feed에 있던 avermectine 중 일부만이 용매상으로 이동하여 추출율이 낮음을 알 수 있었다. 따라서 추출율을 증가시키기 위하여 용매의 상대적인 양을 증가시켰으며, 이때 Fig. 201과 Fig. 203에서 볼 수 있듯이 용매의 양이 증가되면서 회석효과로 peak의 높이는 많이 줄어드나, 회석을 고려하더라도 추출율은 높아짐을 알 수 있었다.

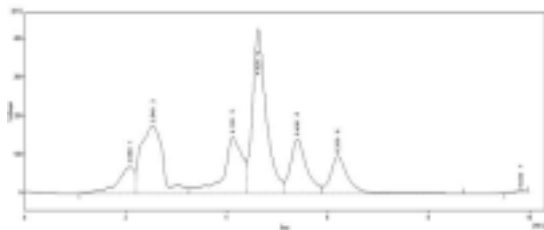


Fig. 199. 추출 Feed (UF 처리액의 methanol : water, 5:3 부피 비율) chromatogram

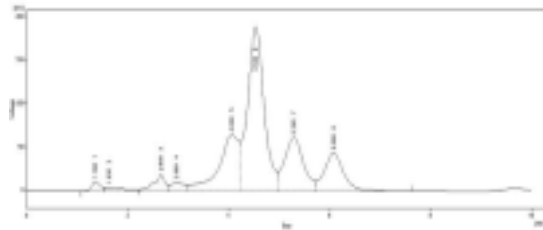


Fig. 200. methylene chloride로 methanol-water liquid를 1:1 추출 한 chromatogram

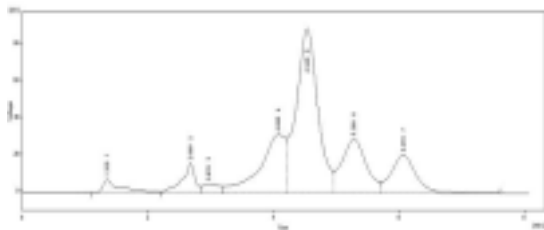


Fig. 201. methylene chloride로 methanol-water liquid를 2:1 추출 한 chromatogram

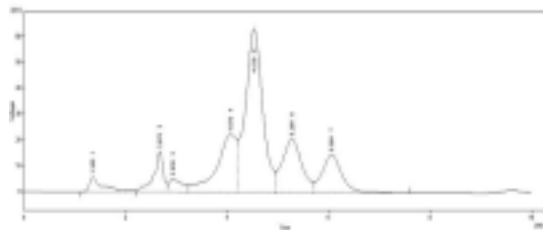


Fig. 202. methylene chloride로 methanol-water liquid를 3:1 추출 한 chromatogram

한편 용매의 상대적인 양에 따른 추출율의 효과를 더 자세히 조사하기 위하여 용매의 부피가 수용액의 부피보다 작은 영역에서의 추출율을 조사하였다. Fig. 203과 204는 methylene chloride(용매): methanol-water aqueous phase의 비율을 각각 1:2, 1:3으로 추출하였을 때의 결과를 나타내고 있다. 용매에서의 농축 효과를 고려하더라도 용매의 상대적인 양이 줄어들면서 추출율이 낮아짐을 알 수 있었다.

보통 용매추출에서는 접촉 전후의 용매상과 수용액 상의 부피변화가 없는데 methylene chloride(용매): methanol-water aqueous phase의 경우에는 부피 변화가 있어 추출율을 산정하는데 고려해야 한다. 따라서 정확한 추출율의 계산을 위해 접촉 전후의 부피 변화율을 조사하였고 그 결과를 표 19 및 Fig. 205에 나타내었다. 부피비율 변화의 결과에 따르면 부피비가 1:1을 한계점으로 용매의 상대적 부피가 크면 (methylene chloride(용매): methanol-water aqueous phase 2:1, 3:1) 접촉 후 용매의 상대적 부피가 더 늘어남을 알 수 있고, 이러한 현상은 용매의 상대적인 양이 늘어날 수 록(3:1) 심화됨을 알 수 있었다. 또한 거꾸로 수용액의 상대적 부피가 큰 경우 (methylene chloride(용매): methanol-water aqueous phase 1:2, 1:3) 접촉후 수용액의 상대적 부피가 더 늘어남을 알 수 있고, 이러한 현상은 수용액의 상대적인 양이 늘어날 수 록(1:3) 심화됨을 알 수 있었다.

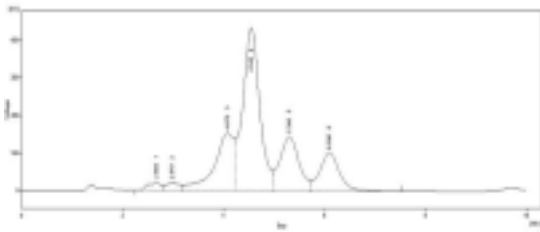


Fig. 203. methylene chloride로 methanol-water liquid를 1:2 추출 한 chromatogram

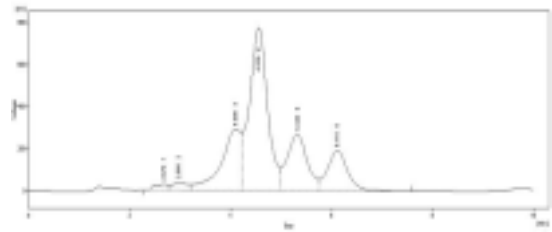


Fig. 204. methylene chloride로 methanol-water liquid를 1:3 추출 한 chromatogram

Table 19. Methylene chloride - methanol/water(5:3) 추출시스템에서의 접촉 전후의 부피변화 조사

부피비율		methylene chloride	M/W(5:3) aqueous
3:1	접촉전	60	20
	접촉후	63	17
2:1	접촉전	40	20
	접촉후	41	19
1:1	접촉전	20	20
	접촉후	20	20
1:2	접촉전	20	40
	접촉후	15	45
1:3	접촉전	20	60
	접촉후	11	69

다음에는 수용액에 남아 있는 avermectin의 양은 부피율 변화와 material balance에 의해 구하였고, 이를 바탕으로 추출율을 구하였다. Aqueous phase H liter와 solvent phase L liter가 평형에 이른 후 aqueous phase에서의 avermectin의 농도를 y, solvent phase에서의 avermectin의 농도를 x 라고 하면 partition coefficient K는 다음과 같이 주어진다

$$K = \frac{x}{y} \quad (5)$$

초기 avermectin 농도  $y_F$ 인 F liter의 aqueous phase가 추출을 위해 공급되었고, 용매에는 avermectin이 포함되어 있지 않다면 avermectin의 mass balance는 다음과 같이 된다.

$$Hy_F + Lx(=0) = Hy + Lx \quad (6)$$

이때 percentage of extraction p는 다음과 같이 주어진다 .

$$p = \frac{Lx}{Hy_F} \quad (7)$$

식 (7)을 이용하여 용매의 상대적인 비율에 따른 추출율을 산정한 결과가 표 20과 Fig. 205에 나타나 있다.

Table 20. Methylene chloride solvent의 상대적 비율에 따른 추출율의 변화

methylene chloride : M/W(5:3) liquid	3:1	2:1	1:1	1:2	1:3
percentage of extraction(%)	91.9%	68.3%	55.9%	39.8%	35.4%

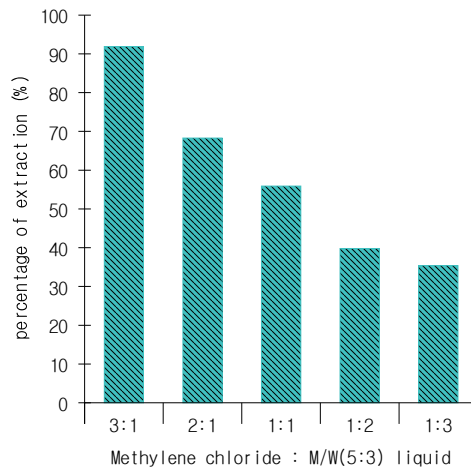


Fig. 205. Methylene chloride solvent의 상대적 비율에 따른 추출율의 변화

Fig. 205에 따르면 용매의 상대적인 비율이 높아질수록 추출율이 높아짐을 알 수 있었다. 이는 다음의 이론적인 해석에서도 설명이 가능한 현상이다. 즉, 식 (7)을 식(5)와 결합하여 다시 쓰면

$$p = \frac{Lx}{Hy_F} = \frac{Lx}{Hy + Lx} = \frac{\frac{Lx}{Hy}}{1 + \frac{Lx}{Hy}} = \frac{E}{1 + E} = \frac{1}{\frac{1}{E} + 1} \quad (8) \text{ 이 된다.}$$

여기서 E는 extraction factor라하고 다음과 같이 정의된다.

$$E = \frac{Lx}{Hy} = \frac{KL}{H} \quad (9)$$

추출율에 영향을 미치는 extraction factor는 partition coefficient K와 용매의 부피 L, 수용액의 부피 H의 함수이다. 여기에서 partition coefficient K는 주어진 온도에서 일정한 값을 가지므로 결국 용매와 수용액의 부피 비율만이 변수가 된다. 따라서 식 (9)에 의하면 용매의 상대적인 부피비율



이 높을수록 E 값이 커지게 되고, E 값이 커지면 식 (8)에 의해 추출율 p값이 커지게 되며 이러한 경향은 Fig. 5-92의 avermectin의 추출에서도 잘 보여지고 있다.

Fig. 205에서 알다시피 용매의 상대적인 양이 높을수록 추출율은 높아지나 용매가 많이 사용되어 운전비가 많이 들므로 추출율과 용매 사용량 간의 최적화가 필요하다.

#### 6) Pilot 규모의 avermectin 농축 공정

Fig. 200-204에서 알 수 있듯이 methylene chloride 추출에 의해 불순물은 많이 제거되었으나 avermectin A<sub>2a</sub>, B<sub>1b</sub>, A<sub>1b</sub> 등 다른 avermectin derivative들은 제거가 되지 않아 avermectin B<sub>1a</sub>의 순도가 낮다. 따라서 결정화 또는 재결정화에 의한 avermectin B<sub>1a</sub>의 정제를 시도하였다. 이를 위해 우선 rotary drum evaporator를 이용하여 methylene chloride를 증발시킨 후, 1차년도에서 선택한 재결정화 용매인 methanol로 용매교환하여 avermectin의 농도를 30g/L까지 농축시켰다.

#### 7) Avermectin 결정화 공정

결정화(crystallization)는 균일한 액상으로부터 고체 입자를 얻는 과정으로 보통 순도를 증가시키거나, 다음의 마무리공정인 여과나 건조공정을 용이하게 하거나, 소비자가 원하는 형태로 가공하기 위해 수행하는 분리정제 공정의 마무리 공정이다. 또한 이러한 결정화 공정을 위해서는 과포화 상태를 만들어야하는데 이를 위해 농축공정이 요구된다. 목적물인 avermectin의 결정화를 위한 최적의 용매를 선정하기 위해 여러 가지 용매에 따른 avermectin의 온도-용해도 곡선에서 기울기가 비교적 큰 acetone이나 methanol을 결정화를 위한 최적의 용매로 재확인하였다. 그 이유는 대부분의 용매들이 비점이 낮아 냉각의 범위가 한정되어 있고 이때 온도-용해도 곡선의 기울기가 비교적 큰 acetone이나 methanol을 선택할 경우 같은 냉각온도 차이에 의해 석출되는 양이 많기 때문이다. Acetone이 methanol보다 온도-용해도 곡선의 기울기가 크지만 친환경적인 methanol을 결정화 용매로 사용하였다.

한편 전 project에서 결정화를 위해 현탁 상태의 유지가 중요하다는 결론을 얻었으므로, avermectin의 결정화를 위하여 chiller와 연결되는 교반조를 이용하여 온도를 4°C로 유지시키며 교반하였으며, 결정화 효율 증대를 위해 NaCl 공침법의 효율성을 조사하였다.

Fig. 206은 NaCl을 첨가하지 않았을 때의 avermectin 결정의 chromatogram을 나타내고 있다. 앞의 불순물 peak 및 다른 avermectin derivative도 상당히 제거되어 avermectin B<sub>1a</sub>의 순도가 상당히 올라가 있음을 알 수 있었다. Fig. 207은 결정화공정에 의하여 생성된 avermectin의 결정을 보여주고 있다.

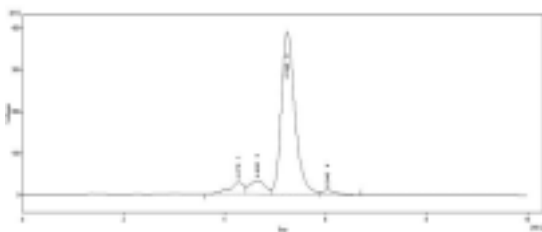


Fig. 206. Avermectin 결정화 chromatogram (No NaCl)

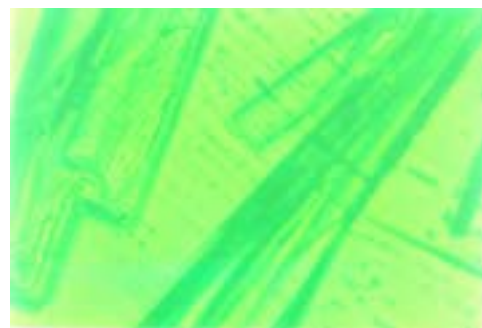


Fig. 207. Avermectin crystal

하지만 결정으로 생성되는 수율이 낮아 NaCl 공침법을 시도하였다. Fig. 208, 209, 210은 각각 NaCl 2%, 5%, 10%를 첨가하여 결정화를 수행한 후의 chromatogram을 보여주고 있다. 그림에 의하면 Fig. 206과 비교해 볼 때, 결정화 수율은 올라가지만 앞의 불순물 peak가 보여 정제도는 약

간 낮아짐을 알 수 있었다. 이를 확인하기 위해 NaCl 공침에 따른 수율 및 정제도의 변화를 조사하였으며, 표 21 및 Fig. 211은 이를 바탕으로 결정화 수율의 변화를 조사한 결과를 나타내고 있고, 표 22 및 Fig. 212에서는 정제도의 변화를 조사한 결과를 나타내고 있다.

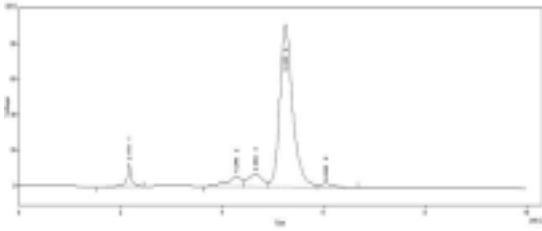


Fig. 208. Avermectin 결정화 chromatogram  
(2 % NaCl 공침)

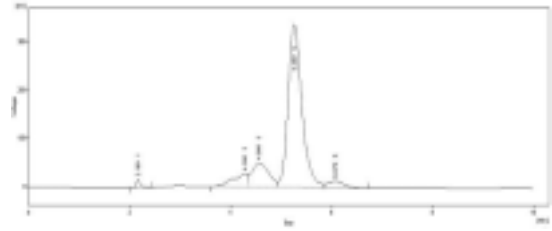


Fig. 209. Avermectin 결정화 chromatogram  
(5 % NaCl 공침)

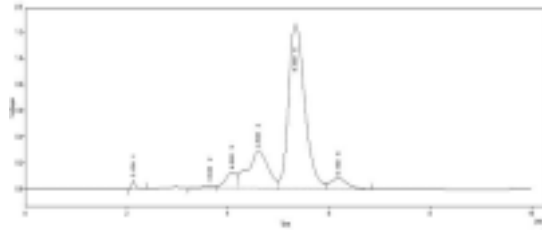


Fig. 210. Avermectin 결정화 chromatogram  
(10 % NaCl 공침)

Table 21. NaCl 농도에 따른 avermectin B<sub>1a</sub>의 결정화 효율의 변화

NaCl 농도	0%	2%	5%	10%
Percentage of Crystallization(%)	1.2%	3.0%	10%	26.7%

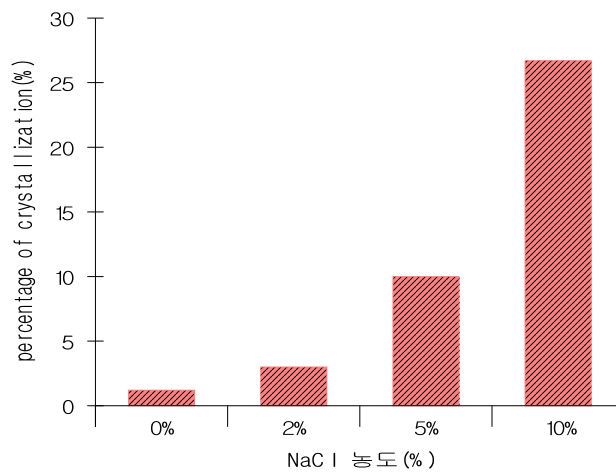


Fig. 211. NaCl 농도에 따른 avermectin B<sub>1a</sub>의 결정화 효율의 변화

Table 22. NaCl 농도에 따른 avermectin B<sub>1a</sub> 및 B<sub>1b</sub>상대적 비율의 변화

NaCl 농도	B <sub>1a</sub> (%)	B <sub>1b</sub> (%)
0%	76	24
2%	84	16
5%	63	37
10%	59	41

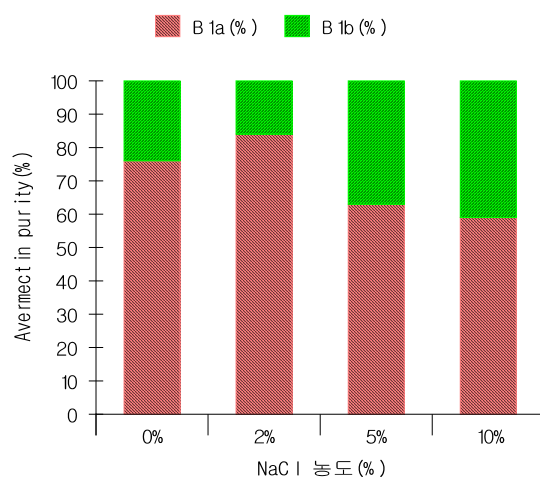


Fig. 212. NaCl 농도에 따른 avermectin B<sub>1a</sub>의 순도 변화

Fig. 211에 의하면 NaCl의 양이 많아질수록 결정화 수율이 높아짐을 알 수 있었으나, Fig. 212에 의하면 avermectin B<sub>1a</sub>의 순도는 떨어짐을 알 수 있어서 순도에 따른 avermectin의 제품가격 및 수율을 고려하여 최적의 NaCl 농도를 산정할 필요가 있다.

한편 Methylene chloride의 사용을 줄이기 위해 한외여과 과정 다음에 solution 추출 과정을 거치지 않고 바로 농축시켜 결정화 과정을 시도하였다. 하지만 Fig. 196, 197에서 알 수 있듯이 한외막 여과 과정에서 불순물을 효과적으로 제거시키지 못한 결과로 불순물로 인해 효과적인 농축이 이루어지지 않았으며, 이에 따라 추출공정 없이 불순물을 성공적으로 제거하기는 불가능함을 알 수 있었다. 따라서 추출공정을 기반으로 분리정제를 확립해야함을 알 수 있었고, 이러한 모든 결과를 종합하여 2차년도에서 pilot test를 거쳐서 확립한 avermectin의 분리정제 공정은 다음과 같다.

배양--> filter press에 의한 균체 회수 --> methanol에 의한 파쇄 --> filter press 또는 prefilter에 의한 cell debris 제거 --> methylene chloride에 의한 추출 --> 농축 및 methanol로 용매 교환 --> 결정화 (NaCl 공침법)

라. pilot 규모 통합 분리정제공정 개발 및 scale-up 전략 확립

1) 통합 분리정제공정 합성

2차년도에서 pilot test를 거쳐서 확립한 avermectin의 분리정제 공정은 다음과 같다. Avermectin 생산균주가 intracellular product임이 밝혀졌기 때문에 avermectin의 분리정제에 앞서 세포와 배양액을 분리하는 여과 공정이나 원심분리 공정의 개발이 필요하다. 원심분리공정의 경우, 막진동 분리기와 판 Disk 타입 연속원심분리기는 고가의 장비로서 초기 시설비 부담이 있으며 회수해야 할 고형물이 완전히 압착되지 않아 물이 많이 포함된 슬러리 형태로 남게 된다. 따라서 많은 양의 배양액을 단시간 내에 처리하면서 초기 투자비 부담이 없는 filter press 공정을 균체회수 공정으로 선정하였다.

Avermectin 생산균주를 Pall separator에 의해 회수한 후에 avermectin은 intracellular product 이기 때문에 세포를 파쇄해야 한다. 세포 파쇄는 1차 project에서 선정한 methanol용매에 의한 파쇄법을 그대로 선정하였다. 세포파쇄 후 cell debris의 제거를 위하여 또 다시 Pall separator를 사용하여 cell debris는 버리고 permeate를 정제한다.

청정분리정제공정인 한외여과의 경우 불순물이 효과적으로 제거되지 못하여 추출공정 없이 불순물을 성공적으로 제거하기는 불가능하다는 결론을 얻었고, 이에 따라 최적 용매로 선정된 methylene chloride에 의한 추출공정을 주요 분리정제 공정으로 선정하였다.

결정화를 위해 농축 공정으로는 대용량에 적합한 evaporator를 사용하기로 하였고 결정화는 crystallizer에서 NaCl 공침법을 이용하기로 하였다. 결정화 후에 filter press에서 결정을 회수한 후 건조하고 powder 형태로 분쇄한다.

2) 통합 분리공정의 PFD(process flow diagram) 개발

이상의 분리공정을 Block Diagram으로 정리하면 Fig. 213과 같다.

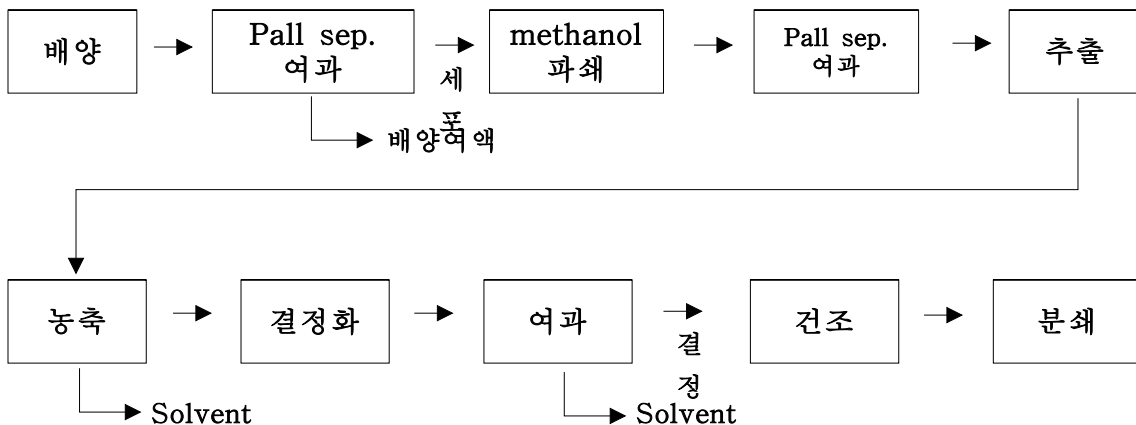


Fig. 213. Block diagram of avermectin

위의 Block diagram을 바탕으로 다음 Fig.214와 같은 PFD(process flow diagram)를 개발하였다.

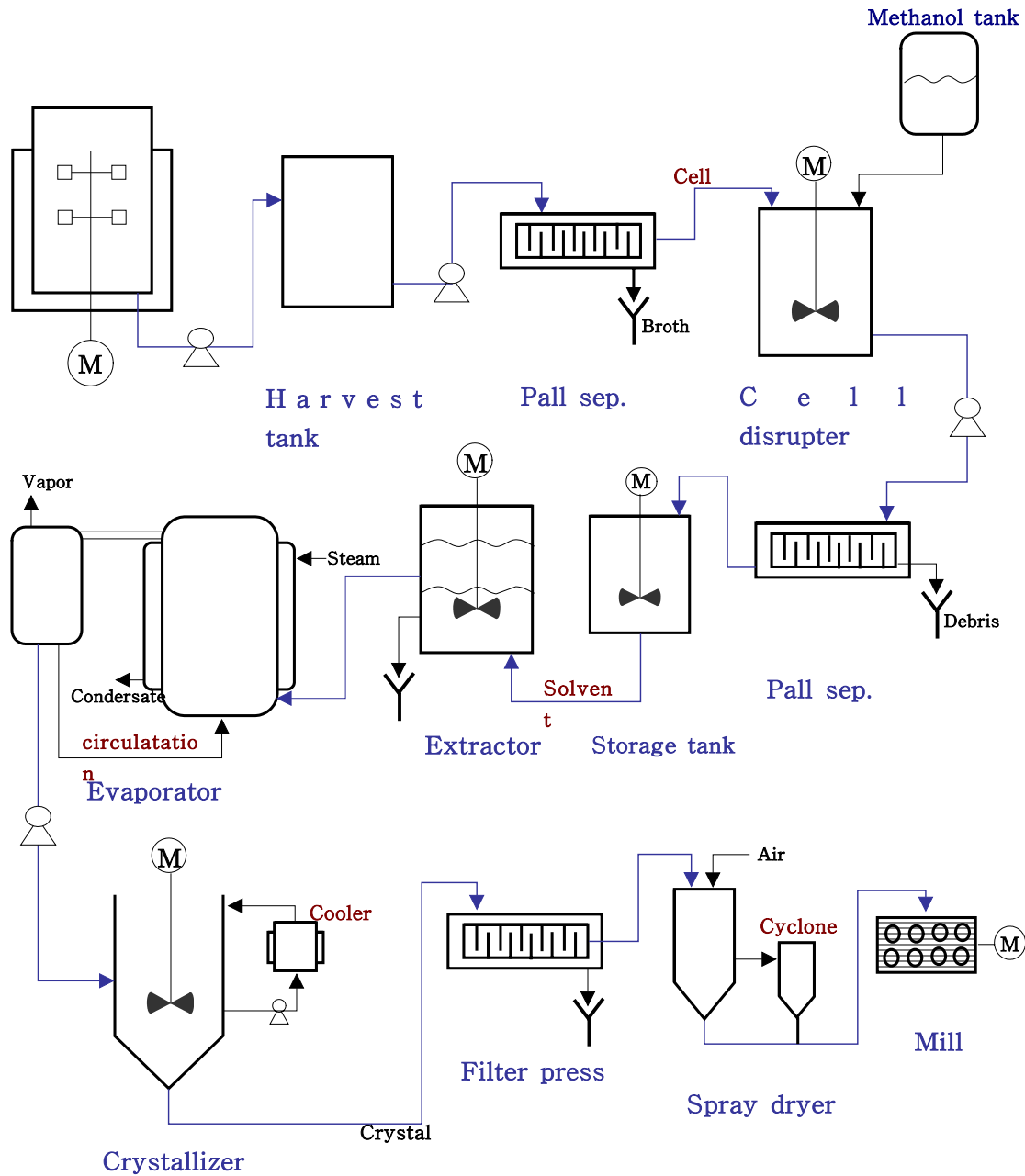


Fig. 214 통합분리정제 공정의 PFD

3) 통합 분리정제 공정 설계 및 개발  
 물질수지식 확립

Design basis:

세포농도: 20 g/L

Avermectin 생산성: 5g /L,

생산량: 3000 L (세포:60 Kg, avermectin:15 Kg)

물질수지 개요

가) Harvest tank

용량 1 Batch: 3,000 L(working volume)

Vessel 용량 4,000 L

나) Pall sep. 여과

Feed: 3,000 L

세포(retentate):  $20 \text{ g/L} \times 3,000 \text{ L} = 60 \text{ kg}$

Broth: 2,940 L (discard)

다) Cell disrupter

2차년도의 결과에서 avermectin을 결정화 전에 5/L에서 methanol에 30g/L까지 농축하였으므로 6배 농축함.

필요 solvent의 양:  $3,000 \times \frac{1}{6} = 500 \text{ L}$

추출 시 용매 methanol: water 5:3 기준

필요 methanol의 양  $500\text{L} \times \frac{5}{8} = 313 \text{ L}$  (cell disrupter의 working volume)

Cell disrupter vessel의 용량: 500L

라) cell debris 제거용 Pall sep.

Feed: 313 (methanol) + 60(cells) = 373 L

cell debris (retentate): 60 kg (discard)

Broth: 313 L

Auxiliary storage tank: working volume - 313 L

vessel volume - 500 L

마) Extractor

Aqueous phase volume:

methanol:water(5:3) 500 L (water 187 L 추가)

2차년도에의 결과에서 전체 분리정제 공정의 성능목표인 에버멕틴 회수율 80% 이상을 달성하기 위하여 methylene chloride의 상대적 양은 3:1이 되어야함. 왜냐하면 methylene chloride의 상대적 양이 3:1일 경우 avermectin의 추출율은 91.9 %로 추정됨.

∴ Solvent phase volume:  $500\text{L} \times 3 = 1500 \text{ L}$

Extractor: working volume - 2,000 L

vessel volume - 2,500 L

바) Evaporator

avermectin 30 g/L 까지 농축

avermectin의 양 : 92 % 회수율 기준-  $15 \text{ kg} \times 0.92 = 13.8 \text{ kg}$

Evaporator 주위의 mass balance는 다음과 같다.

$$\text{total balance} : 1500 = V + L$$

$$\text{avermectin balance} : 13800 = 0 + 30 L$$

$$\therefore L = 460 \text{ Liter}, V = 1,040 \text{ Liter}$$

사) Crystallizer

최종 회수율 80%를 위한 결정화율을 역으로 계산하면 다음과 같다.

$$\text{최종 회수 avermectin} = 15 \text{ kg} \times 0.8 = 12 \text{ kg}$$

$$\text{crystallizer feed에서의 avermectin} = 13.8 \text{ kg}$$

$$\therefore \text{crystallizer에서의 수율} : 87 \%$$

수율 87 %를 위해서 recycle 하여 2,3차 결정화가 필요함.

1차 결정화

$$\text{NaCl } 10 \% \text{ 공침시 수율} : 27 \%,$$

$$\text{crystal} : 13.8 \times 0.27 = 3.73 \text{ Kg}$$

$$\text{supernatant} : (13.8 - 3.73) \text{Kg} / 460 \text{L} = 10.07 \text{Kg} / 460 \text{L} = 0.0219 \text{ Kg/L} = 21.9 \text{ g/L}$$

2차 농축 (40g/L 까지 농축)

$$\text{total balance} : 460 = V + L$$

$$\text{avermectin balance} : 10070 = 0 + 40 L$$

$$L = 252 \text{ Liter}, V = 208 \text{ Liter}$$

2차 결정화

$$\text{supernatant } 21.9 \text{g/L의 농도} : 21.9 \text{ g/L} \times 252 \text{ L} = 5.52 \text{ Kg}$$

$$\text{crystal} : 10.07 - 5.52 = 4.55 \text{ kg}$$

3차 농축 (40g/L 까지 농축)

$$\text{total balance} : 252 = V + L$$

$$\text{avermectin balance} : 5520 = 0 + 40 L$$

$$L = 138 \text{ Liter}, V = 114 \text{ Liter}$$

3차 결정화

$$\text{supernatant } 21.9 \text{g/L의 농도} : 21.9 \text{ g/L} \times 138 \text{ L} = 3.02 \text{ Kg}$$

$$\text{crystal} : 5.52 - 3.02 = 2.5 \text{ kg}$$

$$\text{3차까지의 수율} : \frac{(3.73 + 4.55 + 2.5)}{13.8} = 78.1 \%$$

목표 수율(80 %)이 모자라므로 4단에 걸친 농축 및 결정화를 수행하거나, 1단에서의 농축을 40 g/으로 할 필요가 있음.

4) P&ID 개발

개발된 PFD(process flow diagram)와 mass balance를 이용하여 P&ID를 개발하였다. P&ID는 기업의 Know-how이기 때문에 본 보고서에는 다음 Fig.215와 같이 추출 및 농축부분의 일부만 소개하기로 한다.

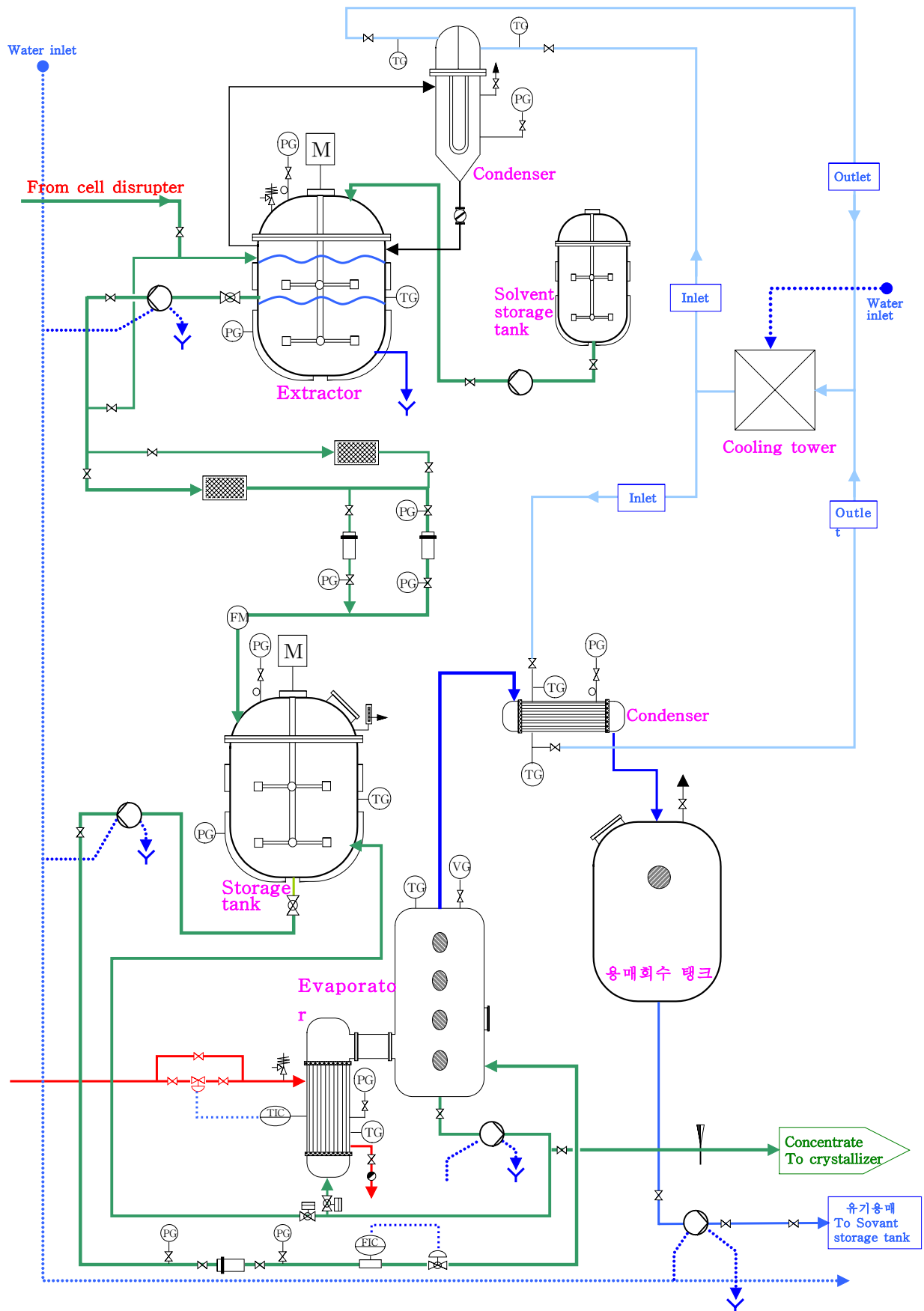


Fig. 215 추출 농축 공정의 P&ID



5) 통합된 분리 정제 공정 설치

다음의 사진은 설치된 분리정제 공정을 보여주고 있다.



Fig.216. Harvest Tank



Fig.217. Pall sep.



Fig.218. Extractor



Fig.219. Evaporator



Fig. 220. Crystallizer



Fig.221. Filter press



Fig. 222. Spray dryer

#### 마. 개발된 분리정제 공정의 운전

##### 1) Pall Sep. 운전

막 분리 공정에 있어서 가장 심각한 문제점으로써 고형물질에 의한 fouling을 들 수 있다. 막의 운전에 있어서 얼마나 fouling을 줄일 수 있는가에 따라서 막의 수명을 결정하고 막 분리 공정에서 얼마나 시간을 단축할 수 있는지를 결정하기 때문에 fouling을 줄이는 것이 중요하다. 막진동분리기는 고가이지만 진동에 의한 fouling 방지뿐만 아니라 빠른 처리 속도의 장점을 가지고 있기 때문에 3000 Liter정도의 대용량을 위해서는 filter press보다 유리하므로 본 통합 분리정제공정에서는 막진동분리기(Pall sep., USA)를 이용하여 세포와 세포 파쇄 후의 세포 debris를 제거하였다.

##### 가) Pall sep.을 이용한 세포의 분리

Avermectin을 생산하는 *Streptomyces avermitilis*를 3000 liter 배양 후 harvest tank 에 보관

한다. 춘천시 바이오산업진흥원에 설치된 Pall 사의 막진동분리기인 Pall sep.(pore size= 0.45 $\mu$ m, total membrane area = 40 m<sup>2</sup>, 0.4 m<sup>2</sup> × 100 장)을 이용하여 세포분리를 시도하였다.

Pall sep. 같은 Cross flow 여과 방식에서 permeate로 여과되어 나오는 여과속도(flux)는 처리 용량을 결정하게 되고, 그 처리 용량에 따라 조업시간이 결정되기 때문에 최적 여과속도(flux)조건을 선정하는 것이 중요하다. 여과속도(flux)를 결정하는 요인으로는 여과액이 고유하게 지나는 농도나 점도 등과, feed 압력 및 retentate 압력 등의 조업인자를 들 수 있다. 하지만 여과액의 농도나 점도는 고유한 성질이므로 이미 결정되어 있기 때문에, Feed 압력 및 retentate 압력에 따라 결정되는 횡막압(TMP)에 따라 여과속도(flux)가 결정이 된다. 따라서 펌프의 속도 및 막에 허용되는 압력범위 내에서 장기간 안정적으로 운전할 수 있는 조건을 결정하여야 한다.

Fig. 223 에서 나타나듯이 TMP가 증가할수록 용액의 여과속도가 좋아짐을 알 수 있다. 그러나 여과막이 물리적으로 견딜 수 있는 압력이 존재하기 때문에 여과속도를 올려주기 위하여 TMP를 무리하게 증가시킬 경우 오히려 retentate의 압력에 의해 펌프가 저항을 받아 feed속도가 감소됨을 알 수 있었다. 따라서 적정 TMP와 feed 압력, retentate 압력 조건을 찾는 것이 중요하며 이에 따라 막 면적을 계산하여야 한다. Fig.223에서 최적 TMP가 3bar이므로 Feed압력(P<sub>i</sub>) 3.5bar의 경우에 retentate 압력 2.5이 최적이다. 따라서 Feed압력(P<sub>i</sub>)은 3 bar ~ 4 bar, retentate 압력(P<sub>o</sub>)은 2 ~ 3 bar의 범위에서 운전하는 것이 장치에 부담을 주지 않으면서 최적의 여과속도를 낼 수 있는 운전조건임을 알 수 있었다.

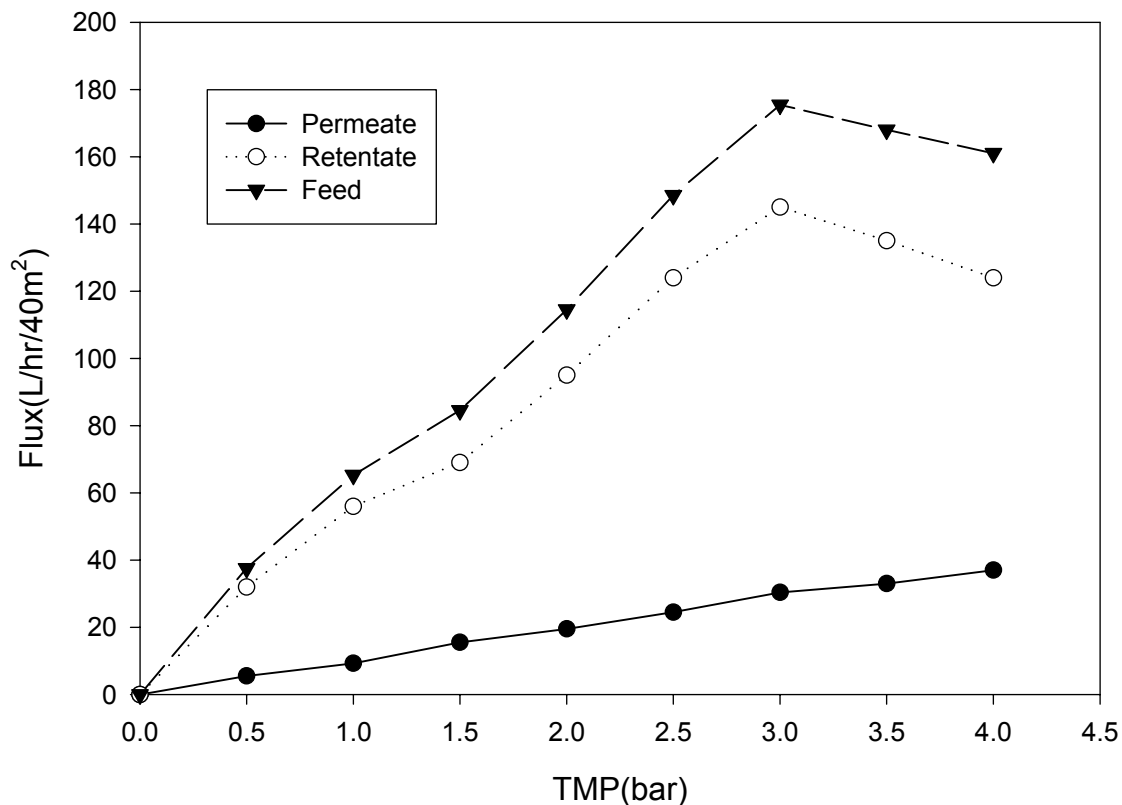


Fig. 223. Pall sep.에서 TMP에 따른 Permeate, retentate, feed의 flux 변화 (cell 분리)

Fig. 224는 TMP 3bar의 경우 시간에 따른 permeate의 통과 volume의 변화를 나타낸다. 시간이 지남에 따라 cake이 쌓여서 flux(slope)가 줄어들음을 알 수 있다. 초기에 30L/hr/m<sup>2</sup>의 flux가 3

시간후에는 7.5L/hr/m<sup>2</sup>으로 급감하여 filter를 더 이상 계속하기 어려워진다. Filter가 더 이상 계속하기 어려우면 온도를 올려 점도를 낮추어 flux를 높여주는 방법을 시도할 수 있다. 특히 avermectin은 intracellular product이지만 열에 안정하므로 온도를 올려서 세포를 분리하더라도 큰 문제가 없을 것으로 예상된다.

Fig.225는 여러 온도에서의 시간에 따른 permeate의 통과 volume을 나타내고 있다. 예상대로 온도가 올라가면서 flux가 증가됨을 알 수 있었다. 이는 온도가 올라갈수록 배양액의 점도가 감소하기 때문이며 cell의 단백질이 일부 변성이 되어 compressibility  $\alpha$ 의 값이 감소되어 cell이 rigid하게 되어 여과가 용이해지기 때문으로 해석할 수 있다. Fig.225에 의하면 온도의 상승으로 flux가 증가하여 40° C의 경우에는 3시간에 50° C의 경우에는 2시간 안에 3000 Liter를 처리할 수 있음을 알 수 있었다. 50° C의 경우에 2시간 후에는 처리해야 할 sample이 없어서 더 이상 처리하지 않았다(plot한 data는 2시간 처리한 volume). 온도를 높일 경우 처리시간이 짧아지지만, 온도를 높일 경우의 에너지 비용을 고려하여 최적 온도를 결정해야 한다.

Pall sep.을 통과한 permeate는 버리고 여과 cake인 세포를 회수하여 cell disruption 공정으로 보낸다.

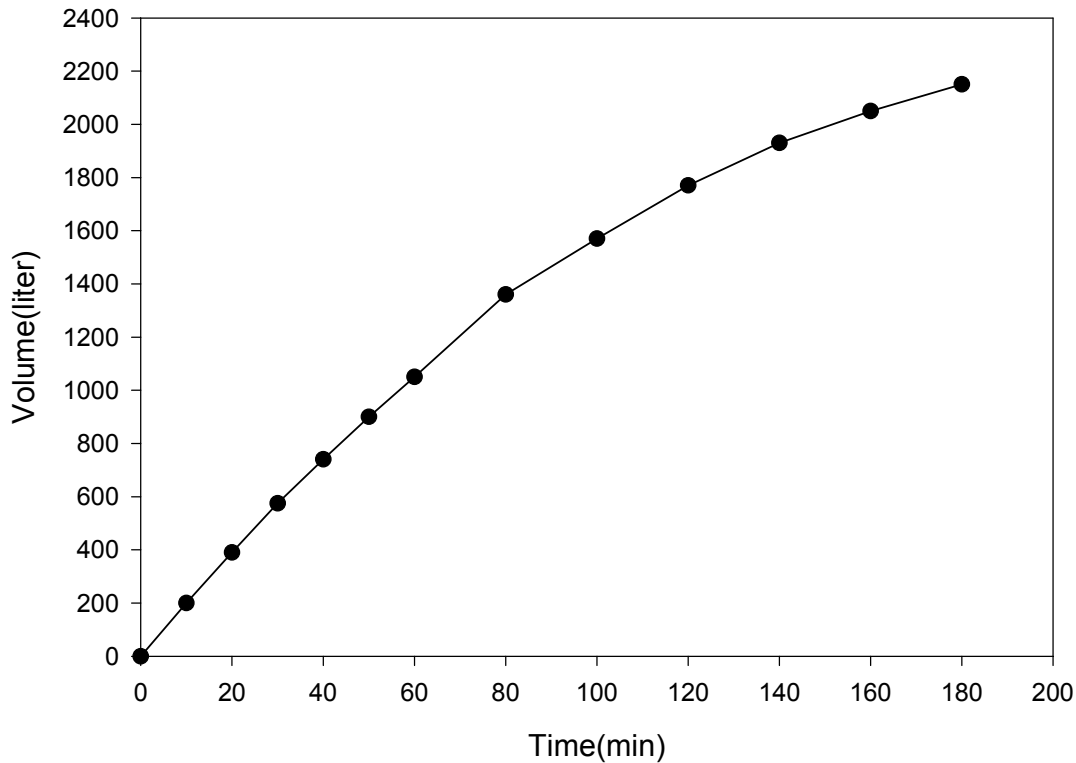


Fig. 224. 시간에 따른 permeate의 통과 volume (cell 분리)

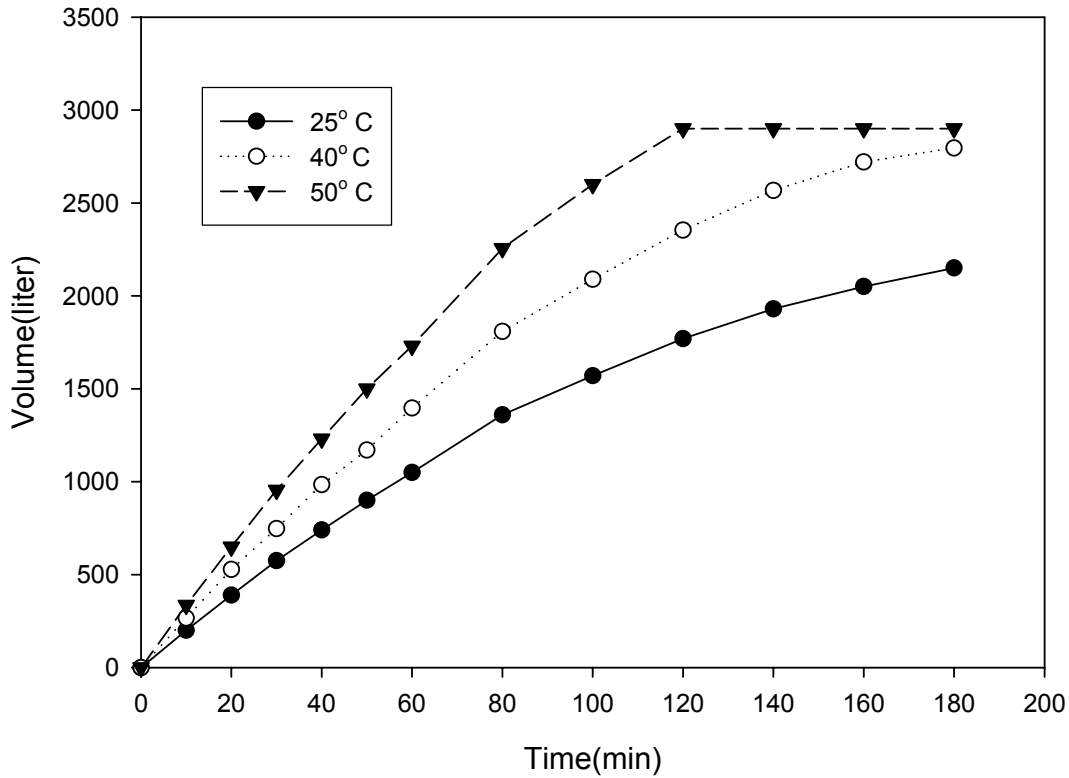


Fig. 225. 온도에 따른 permeate 통과속도의 변화 (cell 분리)

나) Cell disrupter의 운전

Avermectin은 intracellular product이므로 Pall sep.을 이용하여 세포를 분리한 후에 세포를 파쇄해야한다. 세포 파쇄는 화학적 방법, 기계적 방법이 있으나 2차년도 결과에 따라 용매에 의한 파쇄법을 시도하였다. 용매에 의한 파쇄는 추출기를 그대로 이용할 수 있는 장점이 있다. Fig. 226은 Pall sep.을 이용하여 분리한 세포에 methanol 313L를 추출기에 첨가하여 교반하면서 세포를 파쇄할 경우 시간에 따른 세포의 파쇄율을 조사한 결과를 나타낸 것이다. 이때 100 % 파쇄시 avermectin의 농도는 충분한 시간 파쇄하여 더 이상 supernant의 avermectin의 농도가 증가하지 않은 농도( $C_{max}$ )를 기준으로 하였다. Fig. 226에 따르면 10분정도의 접촉시간이면 *Streptomyces avermitilis* 세포가 파쇄되어 avermectin을 비롯한 세포내 물질을 유출시킴을 알 수 있었다.

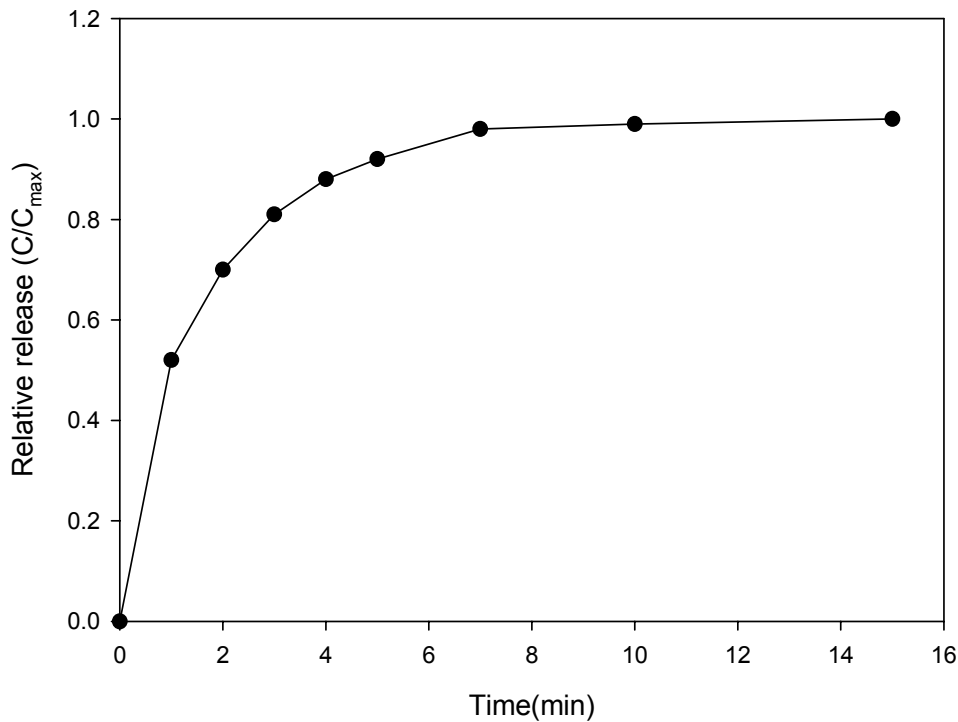


Fig. 226. Methanol에 의한 *Streptomyces avermitilis* 의 세포파쇄에 따른 avermectin의 release kinetics

다) Pall sep.을 이용한 세포조각(cell-debris)의 분리

Cell disrupter에서 세포파쇄 후 다시 Pall 사의 막진동분리기인 Pall sep.(pore size= 0.45 $\mu$ m, total membrane area = 40 m<sup>2</sup>, 0.4 m<sup>2</sup> × 100 장)을 이용하여 세포조각(cell-debris)을 분리하여 버리고 permeate를 회수한다.

Pall sep.을 이용하여 세포를 분리할 경우와 마찬가지로 TMP에 따른 여과속도(flux)의 변화를 조사함으로써 최적의 TMP를 결정하였다. Fig. 227은 그 결과를 나타내는 그림으로 세포를 분리할 경우와 마찬가지로 TMP가 증가할수록 용액의 여과속도가 좋아짐을 알 수 있다. 하지만 세포를 분리할 경우에 비해 flux가 전체적으로 줄어들었음을 알 수 있었고, 이는 cell-debris의 평균 size가 세포에 비해 현저히 작을 뿐만 아니라 세포가 5배 정도로 농축되어 cake의 형성이 빠르기 때문으로 생각된다. 그림에 의하면 Fig. 223과 마찬가지로 여과막이 물리적으로 견딜 수 있는 압력이 존재하기 때문에 여과속도를 올려주기 위하여 TMP를 무리하게 증가시킬 경우 오히려 retentate의 압력에 의해 펌프가 저항을 받아 feed속도가 감소됨을 알 수 있었다. 이런 이유로 Fig. 227에서 최적 TMP이 3bar임을 알 수 있었으며, 세포를 분리할 경우와 같은 조건임을 알 수 있었다. 이는 Pall sep.에 공급하는 Feed압력(P<sub>i</sub>) 3.5bar의 경우에 retentate 압력 2.5 bar가 최적임을 시사하고 있다.

Fig.228은 TMP 3bar의 경우 시간에 따른 permeate의 통과 volume의 변화를 나타낸다. 이 그림 역시 세포분리의 경우와 같이 시간이 지남에 따라 cake이 쌓여서 flux(slope)가 줄어들음을 알 수 있다. 초기에 6L/hr/m<sup>2</sup>의 flux가 약 100분후에는 3.5L/hr/m<sup>2</sup>으로 급감하며 1 batch 분인 313 Liter를 처리하는데 100분 정도가 걸린다는 것을 알 수 있었다.

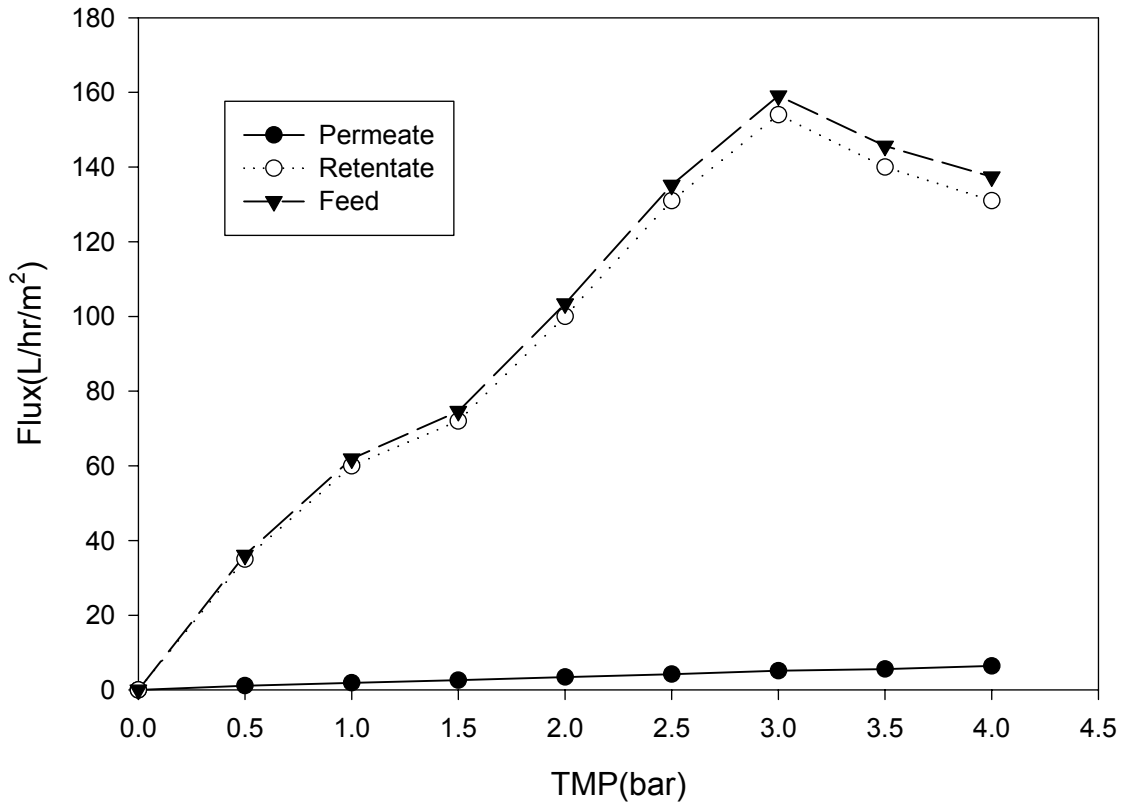


Fig. 227. Pall sep.에서 TMP에 따른 Permeate, retentate, feed의 flux 변화 (cell-debris 분리)

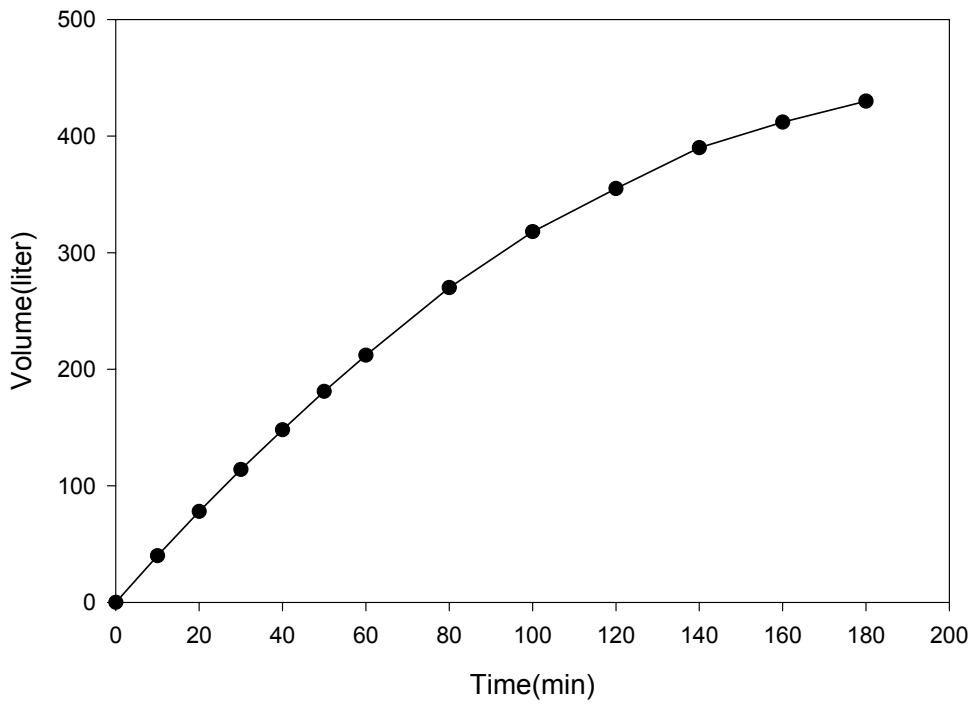


Fig. 228. 시간에 따른 permeate의 통과 volume (cell debris 분리)

2) 추출 (Extraction)

Pall sep.을 이용하여 세포조각(cell-debris)을 분리제거한 후에 최대 용량 3000 L 추출기에 permeate를 모았다. 물을 187 L 추가함으로써, 최적 aqueous phase인 methanol:water 5:3 solution 500 L를 만들었다. 최적용매로 선정된 methylene chloride를 500L, 1000L, 1500L로 부피를 달리하여 첨가한 후에 avermectin의 추출율의 변화를 조사하였다.

Fig. 229는 solvent인 methylene chloride의 상대적 양에 따른 추출율의 변화를 나타낸 것으로 methylene chloride의 상대적 양이 증가할수록 추출율이 증가함을 알 수 있었고, 이는 이론적 예측 및 2차년도 결과와도 잘 일치함을 알 수 있었다. 용매의 상대적인 양이 높을수록 용매가 많이 사용되고 농도가 희석되어 evaporator에서의 load가 증가하나, 본 project에서 목표로 하는 수율을 만족하기 위해 solvent: aqueous phase의 부피비율을 3:1로 운전하는 것이 바람직하다. 이 조건에서 운전한 결과 추출율은 2차년도의 결과(91.9 %)보다는 다소 낮은 88%의 추출율을 보였다. 이는 2차년도의 pilot 운전시와 비교하여 온도차이 때문에 partition coefficient가 차이가 난 것 때문으로 분석된다.

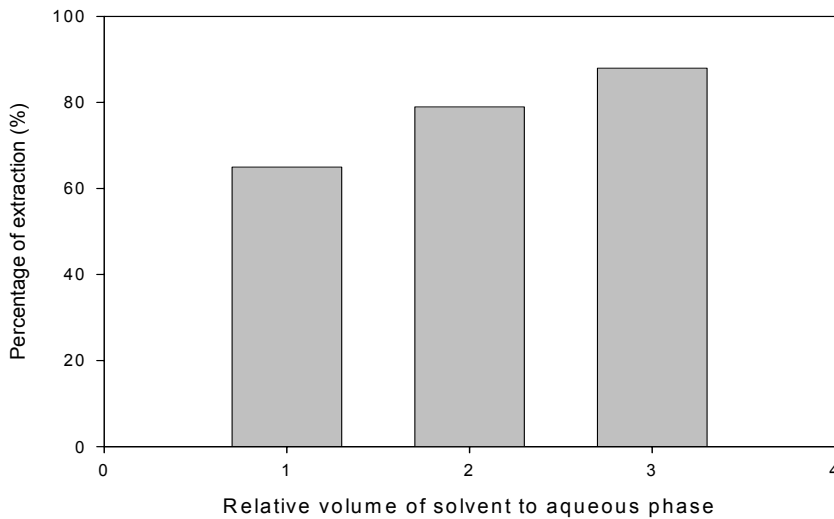


Fig. 229. Methylene chloride의 상대적 비율에 따른 추출율의 변화

다음은 extraction operation을 얼마나 오래해야 하는지를 조사하기 위해서 평형에 다다른 비율인 fractional approach to equilibrium ( $E_b$ ) 가 시간에 따라 변하는 정도를 조사하였다. 이때  $E_b$  값은 다음과 같이 정의된다.

$$E_b = (C - C_0) / (C_E - C_0)$$

where C: concentration of avermectin in solvent phase at a certain time

$C_0$ : concentration of avermectin in solvent phase at time=0

$C_E$ : concentration of avermectin in solvent phase at equilibrium

Fig. 230에 따르면 7분 정도면 거의 평형에 다다른 것을 알 수 있어서, 용매와 수용액을 7분에서 10분 정도 교반에 의해 접촉시키면 avermectin이 충분히 추출됨을 알 수 있었다. 이는 Fig. 226에서 보여준 바와 같이, 세포파쇄기에서 product가 거의 유출되는 시간이 10분이라는 결과와 거의



일치하고 있다. 왜냐하면 같은 추출장치를 이용하여 용매에 의해 세포파쇄를 하였기 때문이다. 따라서 실제 용매에 의한 세포파쇄에서 세포막의 파쇄보다는 평형에 다다른 물질저항이 더 크게 작용함을 알 수 있어서 교반 등 용매와의 접촉 효율이 더 중요함이 추측가능하다.

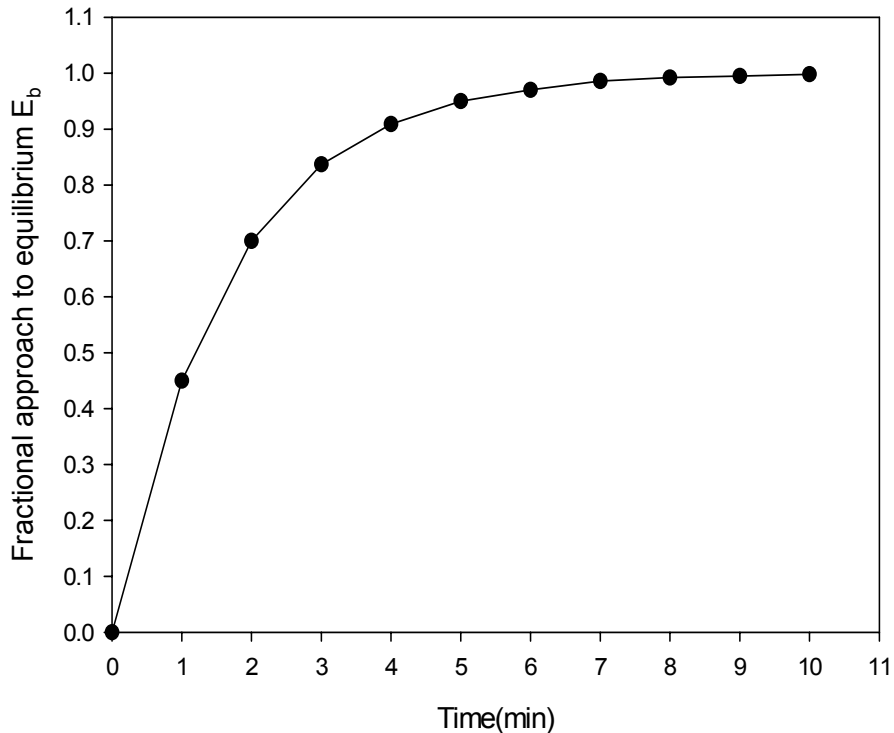


Fig. 230. 시간에 따른 fractional approach to equilibrium ( $E_b$ )

### 3) 농축 및 결정화

결정화를 통해 avermectin의 정제와 더불어 crystal 형태를 얻기 위해서는 우선 결정화전에 30g/L 정도로 농축해야 한다. 이를 위하여 Fig. 219와 같은 evaporator를 이용하여 methylene chloride를 증발시킨 후, 지정된 농도로 methanol을 첨가한다. 이때 30g/L로 농축할 경우 material balance에서 제시하듯이 3차에 걸친 농축 및 결정화를 거치더라도 목표수율 80%를 달성할 수 없으므로 40g/L로 농축한 후에 Fig. 218에서 보여지는 것과 같은 추출기에서 4° C 조건에서 10% NaCl 공침법을 이용하여 결정화하고, 또다시 40g/L로 농축한 후에 결정화하는 작업을 반복하여 4차에 걸쳐 수행하였다. Fig. 231은 결정화 장치로 공급되는 feed에서의 avermectin의 농도가 40g/L로 유지할 수 있도록 4차에 걸친 증발기를 통한 농축의 과정을 보여주는 그림이다. 예상대로, 증발차수에 따라 농축액의 부피가 감소함을 나타내고 있다. Fig. 232은 4차에 걸친 결정화의 과정에서 얻은 crystal의 양과 supernatant에서의 avermectin의 양을 나타낸 그림이며, 1차의 supernatant에 포함되어 있는 avermectin의 양이 형성된 crystal의 양보다 많기 때문에 이를 회수할 필요가 있다는 것을 알 수 있었다. 이에 따라, avermectin의 지속적인 회수를 위해 supernatant를 다시 증발기에서 40g/L로 농축시켜 2차 결정을 시도하였고, 이를 4차에 걸쳐 반복 운전하였다. 농축과 결정화를 계속함에 따라 비록 추가로 얻어지는 crystal의 양은 줄어들지만 계속적으로 crystal을 얻을 수 있음을 알 수 있었다. Fig. 233는 같은 결과를 결정화에 따른 추출율의 변화로 나타낸 것이다. 그림에서 알 수 있듯이 지속적인 농축과 결정화의 결과로 3차에서의 수율은 84%, 4차에서의 수율은 91.3%를 나타내고 있으므로, 결정화 단계에서의 목표 수율인 87%를 달성하기 위해서는 4 batch cycle이 요구됨을 알 수 있었다.

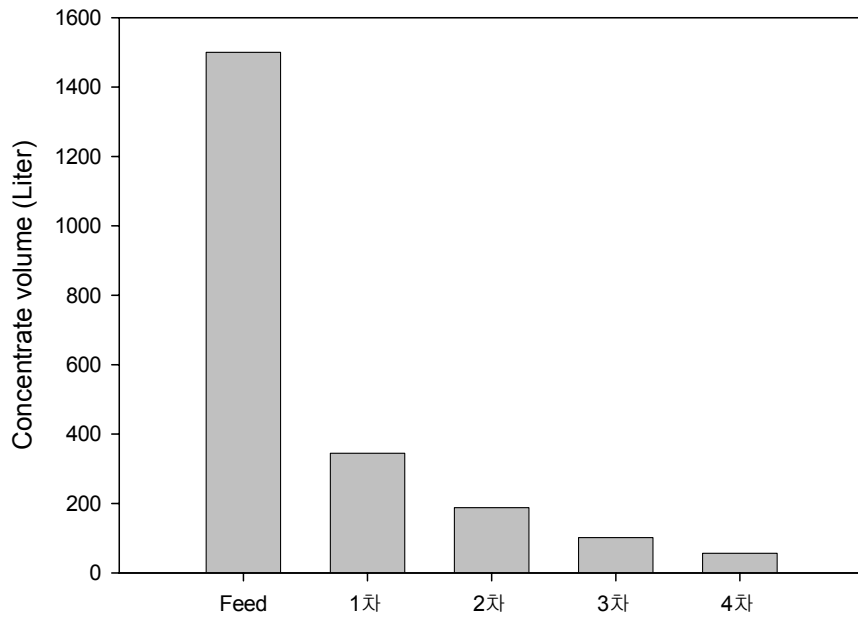


Fig. 231. 농축 차수에 따른 농축액 부피의 변화

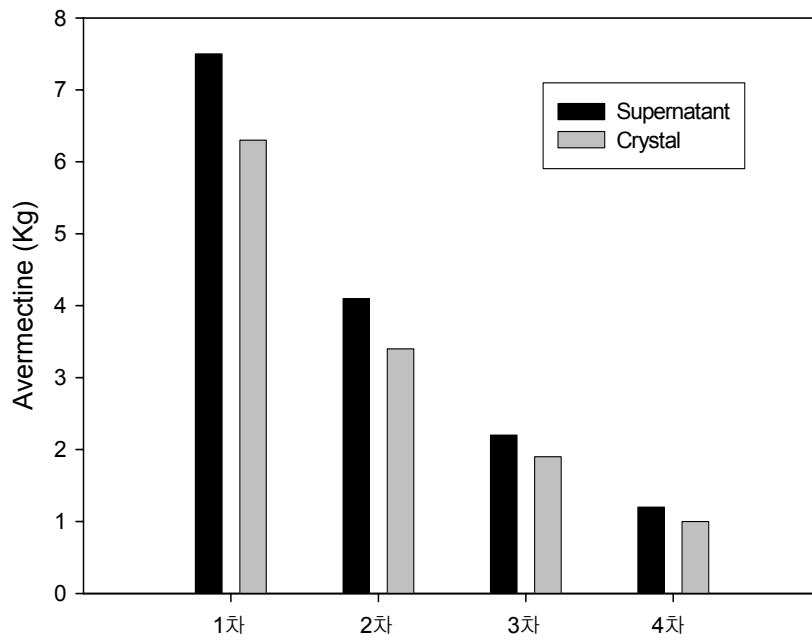


Fig. 232. 결정화 차수에 따른 supernatant와 crystal에서의 avermectin의 양 변화

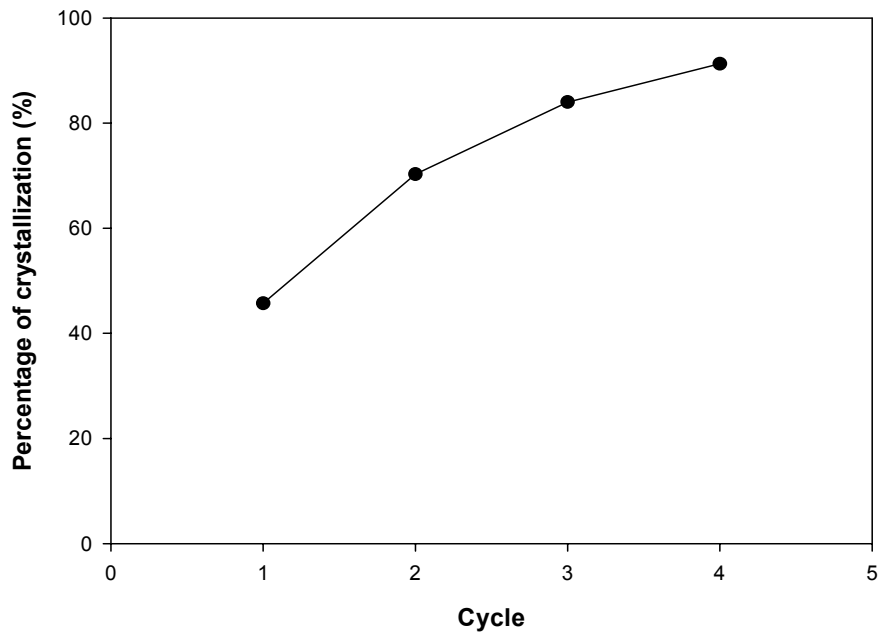


Fig. 233. 결정화 차수(cycle)에 따른 결정화 수율의 변화

#### 4) Spray dryer에 의한 건조

Crystallizer에서 형성된 결정을 filter press에서 결정을 회수한 후, 건조하기 위하여 Fig. 에 보여주는 것과 같은 spray dryer를 이용하여 건조 하였다. Fig. 234는 최종 건조된 avermectin의 결정을 보여주는 그림으로 crystalline structure를 보여주고 있음을 알 수 있었다. 건조 후 mill을 이용하여 powder 형태로 분쇄하였다.

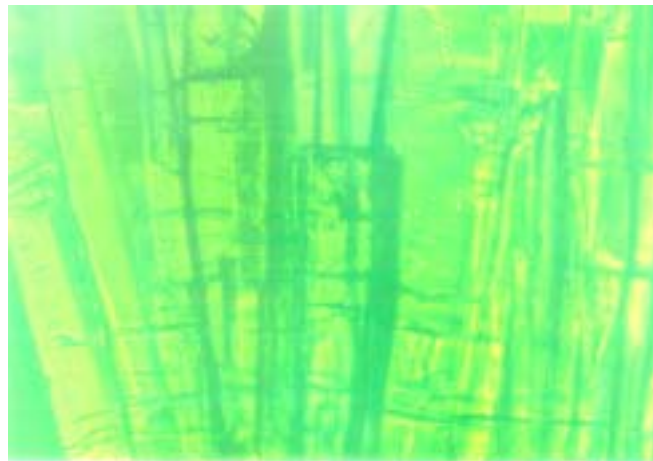


Fig. 234. Avermectin crystal

#### 바. 통합 분리정제공정의 운전자료 검토 및 scale-up 전략 연구

##### 1) lab-scale 및 pilot-scale의 설계자료 및 운전자료 분석

lab-scale 의 운전 자료는 상기 내용 중 1차년도 보고서에, pilot-scale의 운전자료 분석은 상

기 내용 중 2,3차년도의 보고서 내용에 나와 있다.

2) 설계식의 개발 및 설계인자 추정 및 도출

가) Pall sep. 분리

Pall sep.의 경우에도 기본적인 filter의 원리가 작동되므로 Darcy의 법칙으로부터 유도된 다음의 Ruth equation이 기본 설계식이 된다.

$$\left(\frac{At}{V}\right) = K\left(\frac{V}{A}\right) + B$$

여기서 A는 filter area, V는 filtrate volume,  $\Delta P$ 는 압력차,  $\mu$ 는 점도,  $\alpha$ 는 specific cake resistance,  $\rho_0$ 는 mass of cake solid per volume of filtrate,  $R_M$ 은 filter medium의 저항이라 할 때, K는  $\frac{\mu\alpha\rho_0}{2\Delta P}$ , B는  $\frac{\mu R_M}{\Delta P}$  이다.

Lab-filter를 이용한 실험으로부터, (At/V)와 (V/A)를 plot하면 직선 관계를 얻게 되고 이의 slope에서 specific cake resistance  $\alpha$ 값을 얻게 되며 이는 filter의 표면적을 결정하는 주요한 설계인자 이다.

이상에서 avermectin 생산균주는 filter의 저항을 무시하여 윗식에서 B는 무시하고, avermectin 생산균주는 rigid하여 incompressible cake이라 가정하여, filter press의 면적 A와 여과 처리 volume V, 여과시간 t와의 다음 관계식을 얻어 주어진 여과시간에 필요한 filter press의 면적 A를 구하여 필요한 filter 의 면적을 결정할 수 있다.

$$A = V\sqrt{t\left(\frac{\mu\alpha\rho_0}{2\Delta p}\right)}$$

아니면 본 pilot plant에서 사용한 것 같이 이미 알려진 모델의 경우 surface area A (본 연구의 Pall sep.은 40m<sup>2</sup>)가 확정된 경우에는 다음의 식을 이용하여 V의 volume을 처리하는데 걸리는 시간을 예측할 수 있다.

$$t = \frac{\alpha\mu\rho_0}{2\Delta P} \left(\frac{A}{V}\right)^2$$

나) cell disrupter

Cell disrupter에 의해 product가 release되는 속도는 흔히 1차 kinetics로 설명이 된다. Product가 파쇄되어 배양액으로 release 되는 속도  $dC_r/dt$ 는 아직 release 되지 않은 농도,  $C_{r,max}-C_r$ 에 비례한다. 따라서

$$\frac{dC_r}{dt} = K_b (C_{r,max}-C_r)$$

이것을 적분하면

$$\ln \frac{C_{r,max}}{C_{r,max}-C_r} = -K_b t$$

$$C_r = C_{r,max} (1 - \exp(-K_b t))$$

이때  $K_b$  는 교반 정도에 따라 결정되는 상수이며, 실험적으로 결정해야 한다.

다) 추출

초기 avermectin 농도  $y_F$ 인 F liter의 aqueous phase가 추출을 위해 공급되었고, 용매에는 avermectin이 포함되어 있지 않다면 avermectin의 mass balance는 다음과 같이 된다.

$$H y_F + L x(=0) = H y + L x$$

이때 H는 aqueous phase 부피, L은 solvent phase의 부피, y는 aqueous phase에서의 avermectin의 농도, x는 solvent phase에서의 avermectin의 농도이다. Avermectin의 percentage of extraction p는 다음과 같이 정의되어진다.

$$p = \frac{Lx}{H y_F}$$

Percentage of extraction을 위의 mass balance와 결합하여 다시 쓰면

$$p = \frac{Lx}{H y_F} = \frac{Lx}{Hy + Lx} = \frac{\frac{Lx}{Hy}}{1 + \frac{Lx}{Hy}} = \frac{E}{1 + E} = \frac{1}{\frac{1}{E} + 1} \quad \text{이 된다.}$$

여기서 E는 extraction factor라하고 다음과 같이 정의된다.

$$E = \frac{Lx}{Hy} = \frac{KL}{H}$$

여기서 또한 K는 avermectin의 solvent phase와 aqueous phase에서의 partition coefficient로

$$K = \frac{x}{y} \quad \text{로 정의 된다.}$$

따라서 추출율에 영향을 미치는 extraction factor는 partition coefficient K와 용매의 부피 L, 수용액의 부피 H의 함수이며, lab-scale의 실험에서 K 값을 도출하고, scale-up시 원하는 추출율을 위한 L/H의 값을 결정하여 운전하면 된다.

추출기의 용량이나 운전시간을 설계하기 위해서는 평형에 이르는 추출속도를 예측할 수 있어야 한다. 추출기에서의 수용액상과 용매상의 물질전달은 다음 식으로 나타낼 수 있다.

$$L \frac{dC_s}{dt} = K_s a V_m (C_{se} - C_s)$$

여기서 L은 solvent 부피,  $V_m$  은 추출기 부피,  $K_s$  는 solvent phase 기준의 평균 물질전달 계수,  $C_s$  는 solvent phase에서의 avermectin의 농도,  $C_{se}$  는 aqueous phase에서의 농도와 평형인 solvent phase에서의 농도 a 는 액적(droplets)의 size와 부피분율에 따라 결정되는 specific area( $m^2/m^3$ ) 이다.

한편 평형에 다다른 비율을 추출과정의 진행정도로 나타내는 것이 편리하므로, 다음과 같이 정의되는 fractional approach to equilibrium ( $E_b$ ) 가 시간에 따라 변하는 속도로 추출속도를 나타낼 수 있다.

$$E_b = (C_s - C_{s0}) / (C_{sf} - C_{s0})$$

where  $C_s$ : concentration of avermectin in solvent phase at a certain time

$C_{s0}$ : concentration of avermectin in solvent phase at time=0

$C_{sf}$ : concentration of avermectin in solvent phase at the end of process

$$E = K \frac{L}{H} = \frac{C_{se} - C_{fe}}{C_{sf} - C_s} \quad \text{여기서 } C_{se} = K C_r$$

위의 세식을 결합하면 다음과 같이 된다.

$$E_b = 1 - \exp \left[ \frac{-K_s a V_m \left[ 1 + K \frac{L}{H} \right] t}{L} \right] = 1 - \exp(-bt)$$

따라서 추출기의 교반에 관계되는 물질전달계수, specific area와 추출율에 관계되는 solvent와 수용액상의 부피, 분배계수(K) 등과 관련이 있는 상수 b를 small scale에서 구하고 이를 이용하여 추출속도를 예측하며, 이를 바탕으로 추출기의 주어진 시간 내에서의 운전을 위한 추출기의 용량이나, 주어진 용량에서 필요한 운전시간을 결정한다.

라) 증발

증발기에서는 필요한 steam의 양과 열전달 면적이 주요한 설계식이다. 증발기에서의 물질수지는 다음과 같다.

$$F = C + V$$

여기서 F는 feed의 mass flow, C는 concentrate의 mass flow, V는 발생 vapor의 mass flow이다. Vapor에는 avermectin을 포함하고 있지 아니하므로,

$$F C_f = C C_c$$

여기에서  $C_f$  는 Feed에서의 avermectin 농도,  $C_c$  는 Concentrate에서의 avermectin 농도이다. 따라서 이 두 식을 결합하면

$$V = C (C_c - C_f) / C_f$$

이 식으로부터 증발기의 용량 (보통 시간당 증기 발생량으로 나타냄)을 구할 수 있다. 증발기에 필요한 steam의 양은 energy balance로부터 다음과 같이 주어진다.

$$S = C \left[ \frac{C_c - C_f}{C_f} \right] \frac{\Delta h_v}{\Delta h_s}$$

여기서 S는 증발에 필요한 steam의 양,  $\Delta h_v$  는 증발되는 조건에서의 vapor의 kg당 enthalpy,  $\Delta h_s$  는 공급되는 steam의 kg당 enthalpy이다.

S 값이 결정되면 열전달 방정식에 의거하여 다음과 같이 증발기의 열전달 면적이 결정된다.

$$Q = UA \Delta T_e$$

$$\therefore A = \frac{Q}{U\Delta T} = \frac{S\Delta h_s}{U\Delta T}$$

마) 결정화

결정화 장치의 크기나 운전시간을 결정하기 위해서는 결정화 속도를 예측할 수 있어야 한다. 보통 교반 속도가 증가하면 crystal과 주변의 유체 사이의 상대속도가 증가하여 diffusion controlled crystallization에서 벗어나서 최대의 결정 성장 속도를 보여준다. 따라서 상대적 속도가 낮은 경우에는 diffusion control, 높은 속도에서는 surface reaction control이 되며, 일반적인 경우 다음과 같이 결정화 속도를 나타낼 수 있다.

$$\frac{dM}{dt} = \left[ \frac{A}{1/k_m + 1/k_r} \right] (c - c^*)$$

여기서  $c$ 는 용액에서의 농도,  $c^*$ 는 포화용액에서의 농도,  $k_m$ 은 물질전달계수,  $k_r$ 은 표면반응상수,  $A$ 는 crystal의 표면적,  $M$ 은 crystal의 질량이다.  $k_m$ 은 점도나 교반정도 같은 용액의 성질과 관계되지만  $k_r$ 은 그렇지 않다.  $k_m$ 은 온도에 따라 크게 변하지 않지만  $k_r$ 은 냉각에 따라 크게 변할 수 있다. 하지만  $M$ 과  $A$ 를 포함하고 있는 위식은  $M$ ,  $A$  값을 알기 어려워 사용하기 어렵다. 대신에 다음과 같이 정의되는 characteristic crystal length를 사용하면 쉬워진다.

$$l = 6M/\mu A$$

한변의 길이가  $l$ 인 cubic crystal인 경우  $M = \rho l^3$ ,  $A = 6l^2$ 이며, 직경이  $l$ 인 구형 crystal인 경우  $M = \frac{\pi}{6} \rho l^3$ ,  $A = 6\pi l^2$ 이다. 여기서  $\mu$ 는 crystal의 모양에 따른 기하학적인 인자이다. 이러한 관계를 위식에 대입하여 정리하면 다음과 같은 crystal의 성장에 관한 식을 얻을 수 있다.

$$\frac{dl}{dt} = \left[ \frac{\{2\phi_A/\phi_v\rho\}}{1/k_m + 1/k_r} \right] (c - c^*) = k_g (c - c^*)$$

따라서 crystal의 기하학적 인자, 밀도, 물질전달계수, 표면반응속도 등으로 구성된  $k_g$  값을 구하는 것이 중요하다.

3) scale-up 기준과 scale-up 인자 결정 등 scale-up 전략 수립

가) Pall sep. 분리

주어진  $t$ 라는 시간에  $V$ 의 volume을 처리 하는데 필요한 membrane의 surface area를 구하는 것이 scale-up의 기준이며 다음 식을 이용하는 것이 scale-up의 전략이다.

$$A = V \sqrt{t \left( \frac{\mu \alpha \rho_0}{2\Delta p} \right)}$$

이때 필요한 scale-up 인자로 배양액의 점도는 1.17 c.p,  $\rho_0$ 는 배양액중 균체의 농도로 배양결과에 따라 달라지나 본 과제의 경우 목표치인 0.02 g/cm<sup>3</sup>이다. Specific cake resistance  $\alpha$ 값은 30 mmHg, 40 mmHg, 50 mmHg, 60 mmHg의 압력차( $\Delta P$ )에서 각각 1.35 x 10<sup>13</sup> cm/g, 1.33 x 10<sup>13</sup> cm/g, 1.07 x 10<sup>13</sup> cm/g, 1.90 x x 10<sup>13</sup> cm/g이다.

나) Cell disrupter

원하는  $C_r/C_{r,max}$ 에 다다를 수 있는 시간을 구하는 것이 일정 부피를 처리하기 위한 Cell disrupter의 용량을 결정하는데 기준이 되며, 다음 식을 이용하는 것이 scale-up의 전략이다.

$$C_r = C_{r,max} (1 - \exp(-K_b t))$$

이때 필요한 scale-up 인자로는  $K_b$  이며, Fig.226의 결과를 위식에 regression하면  $K_b$  값이 0.55임을 추정할 수 있다.

다) 추출

추출기에서는 주어진 추출율  $p$ 를 달성하기 위한 용매의 비율을 추정할 수 있어야 추출기의 용량을 정할 수 있다.

$$p = \frac{Lx}{Hy + Lx} = \frac{Lx}{Hy} \cdot \frac{1}{1 + \frac{Lx}{Hy}} = \frac{E}{1 + E} \quad \text{이때} \quad E = \frac{Lx}{Hy} = \frac{KL}{H} \quad \text{이다.}$$

따라서 주어진  $p$ 에 따른  $E$ 값을 먼저 구하고 주어진 배양액 volume  $H$  liter를 처리하기 위한 solvent의 volume  $L$ 은 다음 식에서 구한다.

$$L = \frac{EH}{K}$$

추출기의 용량은 처리 배양액  $H$ 와 위에서 구한  $L$ 을 합한 volume으로 정한다.  $L$ 을 구하기 위해 필요한 정보는 avermectin의 methylene chloride에서의 partition coefficient인  $K$  값으로 Fig. 205에 의해 추정된 avermectin의  $K$  값은 2.04 이다.

한편 설계된 용량의 추출기에서 평형에 다다를 때까지 걸리는 시간을 예측하는 것도 scale-up 운전전략을 위해 필요하다. 다음의 식에 의하여 주어진 fractional approach to equilibrium에 다다르기 위한 시간  $t$ 를 구할 수 있다.

$$E_b = 1 - \exp\left[\frac{-K_s a V_m \left[1 + K \frac{L}{H}\right] t}{L}\right] = 1 - \exp(-bt)$$

$$\therefore t = \left(\frac{1}{E_b}\right) \ln\left(\frac{1}{1 - b}\right)$$

따라서 추출기의 scale-up 운전을 위해 필요한 scale-up인자인 상수  $b$ 를 small scale에서 구하는 것이 중요하다. 이는 Fig.230의 결과를 위식에 regression함으로써 구할 수 있는데 추정된 scale-up 인자인  $b$ 값은 0.6이며, 이를 바탕으로 주어진 용량에서 필요한 운전시간을 결정하거나 같은 성능을 보장하기 위한 교반 속도 등 운전 조건 등을 결정한다.

라) 증발

증발기에서는 열전달 면적이 scale-up의 기준이 된다. Feed에서의 avermectin 농도가  $C_f$  로 주어지고,  $C$  kg의 concentrate에서의 avermectin 농도를  $C_c$  까지 농축하려고 할 때, 증발기에 필요한 steam의 양  $S$ 는 energy balance로부터 다음과 같이 주어진다.

$$S = C \left[ \frac{C_c - C_f}{C_f} \right] \frac{\Delta h_v}{\Delta h_s}$$

여기서  $\Delta h_v$  는 증발되는 조건에서의 vapor의 kg당 enthalpy,  $\Delta h_s$  는 공급되는 steam의 kg당



enthalpy이다.

위식으로부터 S 값이 결정되면 다음의 열전달 방정식에 의해 증발기의 열전달 면적이 결정된다.

$$\therefore A = \frac{Q}{U\Delta T} = \frac{S\Delta h_s}{U\Delta T}$$

따라서 scale-up에 필요한 설계인자는 필요한 concentrate의 생산량, 공급액에서의 avermectin 농도  $C_f$ , 농축하고자 하는 농도  $C_c$ , 등이고, 추가적으로 small scale에서 heat transfer coefficient U 값을 추정함으로써 scale-up 증발기를 설계할 수 있다.

#### 사. economic feasibility study

1) cost analysis: 상업화 공정의 운전비 및 고정 투자비 예측

가) 매출액 계산 기준

설정기준:

Avermectin 생산수율 : 5kg/톤

Avermectin 판매단가: 780,000원/kg

50톤 배양의 공장 건설비: 50억원

나) 연 매출액 : 51억원

기준: 50톤배양에서의 반복배양 batch 수 = 70batch/년 (5days/batch)

년 배지소모량 : 50톤/batch × 70 batch/년 × 0.75 = 2,625 톤/년(75 % full 가정)

년 매출액: (배지 1톤당 매출액) × (년 배지소모량)

= (780,000원/kg × 5kg/톤 × 0.5) × 2,625 톤/년 = 51 억원

(정제 수율 50% 가정)

다) 매출원가 산출

① 재료비: 50톤 배양기에서 1년간 제품을 생산하는데 소모되는 비용

배지비용: 15만원/톤 × 2,625 톤/년 = 393,750,000 원

정제비용: 30만원/톤 × 2,625 톤/년 = 787,500,000 원

② 인건비: 4인

4인 × 2,400만원/년 = 96,000,000원/년

③ 조업유지비용

시설보수/유지비용: 공장건설비의 5% = 250,000,000 원

유틸리티 비용: 매출액 대비 1 % = 51,000,000 원

④ 공장소모품(폐수처리비용 포함): 매출액 대비 0.5 % = 25,500,000원

⑤ 기타경비(물류비용포함): 매출액 대비 0.5 % = 25,500,000원

⑥ 공장 감가상각비: 공장건설비의 20 % = 1,000,000,000/년

라) 총생산 비용: 2,630,000,000 원

마) 연 avermectin 생산량

5kg/톤 × 0.5 × 2,625 톤/년 = 6,563 kg/년

바) avermectin kg 당 제조원가: 400,730원/kg

2) 목표 ROI 및 break-even point를 위한 공정변수 목표 설정

현재의 cost analysis 기준으로 하면 연간 순수익은 5,100,000,000-2,630,000,000 = 2,470,000,000원이며 고정 투자비는 50억원이다. 따라서 현재의 ROI는 다음과 같다.

$$\text{ROI} = (5,100,000,000 - 2,630,000,000) / 5,000,000,000 \times 100 = 49.4 \%$$

이를 기준으로 break-even point를 구하면 약 2년 이다. 현재 은행 이자가 5% 미만인 상황에서 위의 ROI나 break-even point로는 economic feasibility가 충분히 있다는 결론을 내릴 수 있다. 한편 목표 ROI 및 break-even point를 이미 넘었으므로, 목표 ROI 및 break-even point를 위한 공정변수 목표 설정은 하지 않아도 되며, 지금 제시된 공정변수 목표인 avermectin 생산수율 5kg/톤 과 정제 수율 50 % 만 지켜지면 아무런 문제가 없다.

## 제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절. 연구개발 최종 목표

본 연구의 최종목표는 동물구충제 에버멕틴의 대량생산을 위한 경제성 있는 첨단 생물공정 개발로서, 연구 주체는 주관기관인 (주)에스티알바이오텍이 수행하는 제1세부 주관과제 및 제2세부 주관과제과 강원대학교의 전계택 교수가 위탁연구책임자인 제 1 세부 위탁과제, 그리고 정연호 교수가 위탁연구책임자인 제 2 세부 위탁과제로 구성되어 있다. 본 연구목적을 달성하기 위해 제 1 세부 과제에서는 에버멕틴 고생산성균주 개발 및 pilot-scale에서의 에버멕틴 발효공정 scale-up 연구를 수행했으며, 제 2세부과제에서는 에버멕틴 분리정제공정 개발 연구를 수행했다. 각 세부과제와 관련된 위탁연구는 하기의 연차별 연구개발 목표 및 내용에 관한 표에 단계적으로 제시해 놓은 바대로 효과적으로 수행되었다.

총괄적으로 요약하면 동물구충제 에버멕틴의 대량생산을 위한 경제성 있는 첨단 생물공정 개발을 위해 가장 중요한 다음의 6개 분야에 대한 연구가 집중적으로 이루어 졌다:

- ① 원형질체 융합에 의한 고안정성의 에버멕틴 B<sub>1a</sub> 고생산성 돌연변이주 개발
- ② 에버멕틴 생산 돌연변이주의 배양생리학적 특성 조사
- ③ 에버멕틴 생산 유가식 발효공정 최적화 및 scale-up
- ④ 에버멕틴 분리정제 공정 개발 및 scale-up
- ⑤ 발효공정, 분리정제 공정의 효과적 통합을 통한 전체 공정의 최적화
- ⑥ 생물반응기 최적화 및 생물반응기 내 주요 조업변수의 온라인 측정 기술 및 전산제어 기술 개발

이에 대한 연구결과에 대해 평가방법 및 평가항목, 그리고 연구결과를 을 다음의 표에 요약 제시하였다. 표에 제시한 바대로 에버멕틴 B<sub>1a</sub>의 고생산성, 고안정성의 균주의 개발, 발효공정 자동화시스템의 개발 및 온라인 가스분석시스템 분석장치시스템 알고리즘 개발 및 온라인 설치로 인해 대형 발효조에서의 효율적인 조업과 경제적인 생산이 이루어 졌으며, 또한 에버멕틴 회수율 80% 이상, 순도 95% 이상의 경제적이고 효율적인 scale-up 분리정제공정의 개발 및 배양 공정과의 통합을 통하여 전체 공정의 경제적 우위를 확보함으로써 에버멕틴의 가격 경쟁력을 향상시킬 수 있었다.

## 1. 평가항목, 평가방법 및 연구결과

평가항목	평가방법	연구 결과
에버멕틴 고생산성 균주 개발	생산된 에버멕틴의 농도 5 g/L 이상	고생산성, 고안정성의 원형질융합 균주의 개발 및 rapid screening system, miniature 배양시스템의 개발로 인해 대규모 균주 선별이 가능해짐. 그 결과 최종 목표 에버멕틴 B <sub>1a</sub> 생산성 달성.
에버멕틴 B <sub>1a</sub> 방향성 균주 개발	전체 에버멕틴 중 B <sub>1a</sub> 함량 80 % 이상	Rational screening 방법을 적용한 고방향성 균주 개발 및 이들의 원형질융합균주 개발로 인한 고안정성 균주개발 가능했음. 그 결과 최종 목표 에버멕틴 B <sub>1a</sub> 방향성 균주 확보.
에버멕틴 생산 유가식 발효공정 최적화	회분식 조업보다 생산성 향상	온라인 가스분석시스템에 의한 생산균주의 배양생리적 특성을 온라인 상에서 측정 및 예측가능하게 됨. 그 결과 유가식배양을 위한 nutrient feeding 전략 개발로 인한 목표 달성.
에버멕틴 분리·정제공정 최적화	에버멕틴 순도 95% 이상 에버멕틴 회수율 80% 이상	효율적인 scale-up 분리·정제공정 개발을 통한 최종 목표 달성
에버멕틴 생산공정 scale-up	500 리터 이상 대형 발효조에서 생산성 유지	5리터, 50리터 발효조에서와 동일한 생산성 및 균주 안정성 유지. 특히 scale-up factor로 온라인 측정 가능한 산소전달계수( $k_La$ )의 적용으로 인해 정밀한 scale-up 이 가능해 짐.
Scale-up 에버멕틴 분리·정제공정 개발	대형발효조 배양액 처리	3000L 배양액 처리용 scale-up된 분리정제 공정의 개발 및 scale-up 전략 수립.
전체공정의 통합을 통한 최적화	전체공정 scheme의 효율성	컴퓨터 제어 공정시스템 개발로 인한 전체 공정의 조업 안정성, 지속성, 재현성 및 효율성 확보.
조업변수 온라인 측정 기술 및 전산제어 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 용존산소농도 제어 알고리즘의 성능 (오차 5% 이하)</li> <li>- 조업변수 온라인 측정 기술의 성능 (오차 10% 이하)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 온라인 가스 분석장치시스템 알고리즘 개발 및 온라인 설치로 배양 공정변수의 실시간 측정 및 예측 가능 및 정밀 제어 가능해짐.</li> <li>- 용존산소농도 제어 오차 5% 이하 달성.</li> <li>- 조업변수 온라인 측정 오차 5% 이하 달성.</li> </ul>

상기 연구결과를 얻기 위한 연차별 주요 연구내용 및 범위를 하기의 제2절에 표로 제시하였다. 연차별 연구내용 및 범위의 최종목표가 결국은 상기의 6개 분야에 대한 연구결과를 획득하는 것이었다는 점에 근거해 볼 때, 연차별 연구의 최종 목표도 예정대로 순조롭게 진행되었으며, 그 결과 본 연구를 통해 동물구충제 에버멕틴 B<sub>1a</sub>의 대량생산을 위한 경제성 있는 첨단 생물공정을 개발할 수 있었다고 결론지을 수 있었다.

## 제 2 절. 연차별 연구개발 내용 및 범위

### 1. 제1차년도 주요 연구개발 내용 및 범위

구 분	주요 개발내용 및 범위	
1차년도	<p><b>제 1 세부과제</b></p> <p>에버멕틴 고생산성 균주 개발 및 pilot-scale에서의 에버멕틴 발효공정 scale-up 연구</p>	<p><b>돌연변이 유발을 통한 에버멕틴 B<sub>1a</sub> 고생산성 및 방향성 증가 균주 개발 (제 1 세부 위탁과제)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 고생산성 균주의 신속 선별을 위한 Scale-down (miniature) 실험방법 확립</li> <li>- 돌연변이 유발을 통한 에버멕틴 B<sub>1a</sub> 생산 증가 변이주의 선별 및 분리</li> <li>- 에버멕틴 B<sub>1a</sub>의 막투과성 분비 변이주 유도</li> <li>- 에버멕틴 B<sub>1a</sub>로의 방향성 생산 변이주 유도</li> <li>- revertant로의 back mutation 방지 방법 개발</li> </ul> <hr/> <p><b>회분식 공정 scale-up 및 lab-scale에서의 유가식 공정 개발 (제 1 세부 주관과제)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 에버멕틴 B<sub>1a</sub>생산의 최적배지 탐색</li> <li>- 플라스크 배양 중의 배양 생리학적 특성 조사</li> <li>- 플라스크 배양 중의 배양 형태적 특성 조사</li> <li>- 발효조에서의 배양 생리학적 특성 조사 및 생산 안정성 조사</li> <li>- 탄소원, 질소원, 인 농도가 균체성정 및 에버멕틴 생산성에 미치는 영향 구명</li> <li>- 물리화학적 환경조건 구명 (배지조성, 온도, pH, rpm, 통기량 등)</li> <li>- 최적 DO profile 계산</li> <li>- 용존산소농도 제어 알고리즘 개발</li> <li>- 산소전달 특성 분석 및 효율적 산소 공급장치 설계</li> <li>- 전단응력 영향 평가 및 분석</li> <li>- 회분식 공정 scale-up 테스트를 통한 scale-up 변수 선정</li> <li>- 공정 모델링 및 다양한 feeding strategy에 의한 유가식 배양공정 조업 모드 결정</li> </ul>
	<p><b>제 2 세부과제</b></p> <p>환경친화적 에버멕틴 분리정제공정 개발</p>	<p><b>lab-scale에서의 에버멕틴 추출, 분리, 정제 공정 개발 및 최적화 (제 2 세부 주관과제)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 환경친화적 수용성 용매에 의한 균체로부터의 에버멕틴의 추출 공정의 최적화</li> <li>- 침전법을 이용한 추출액으로부터 에버멕틴 분리공정의 최적화</li> <li>- 침전법을 이용한 에버멕틴 B<sub>1a</sub> 정제공정의 최적화</li> <li>- 결정화공정 최적화</li> <li>- 농축공정 최적화</li> </ul> <hr/> <p><b>침전법을 이용한 추출 및 분리정제 공정 개발(제 2 세부 위탁과제)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- lab-scale avermectin 추출공정 개발</li> <li>- 침전법을 이용한 avermectin 분리공정 개발</li> <li>- 침전법을 이용한 avermectin B<sub>1a</sub> 정제공정 개발</li> </ul>

## 2. 제2차년도 주요 연구개발 내용 및 범위

구 분	주요 개발내용 및 범위	
2차년도	<p><b>제 1 세부과제</b></p> <p>에버멕틴 고생산성 균주 개발 및 pilot-scale에서의 에버멕틴 발효공정 scale-up 연구</p>	<p><b>에버멕틴 B<sub>1a</sub> 고생산균주의 원형질체 융합 방법 및 신속 선별 방법 확립 (제 1 세부 위탁과제)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 돌연변이 유발을 통한 selective marker 형성 균주 선별</li> <li>- 원형질체 형성 조건 조사</li> <li>- 원형질체 융합 조건 확립</li> <li>- 원형질 융합체의 세포벽 형성 조건 확립</li> <li>- 원형질 융합체의 배양 생리학적 특성 조사 및 배지 최적화</li> <li>- 고생산성 원형질 융합체의 신속 선별을 위한 scale-down 실험방법 확립</li> <li>- 고생산성 원형질 융합체의 대량선별 방법 확립</li> </ul>
		<p><b>유가식 공정 최적화 및 scale-up (제 2 세부 주관과제)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 공정 모델 개선 및 기질공급속도 최적화</li> <li>- 대사상태의 온라인 측정법 개발</li> <li>- scale-down법과 전산모사에 의한 대형 발효조 운전조건 확립</li> <li>- dimensional analysis에 의한 scale-up 변수 도출</li> <li>- regime analysis에 의한 scale-up 변수 선정 및 최적화</li> <li>- scale-up시 산소전달을 감안한 산업배지 개발</li> <li>- feeding tank 설계 및 최적 기질공급 전략 수립</li> </ul>
	<p><b>제 2 세부과제</b></p> <p>환경친화적 에버멕틴 분리정제공정 개발</p>	<p><b>pilot-scale에서의 에버멕틴 추출, 분리, 정제공정 개발 및 최적화 (제 2 세부 주관과제)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- pilot 규모의 균체 회수공정 개발 (여과 공정 및 원심분리 공정)</li> <li>- pilot 규모의 추출장치의 설치 및 운전</li> <li>- pilot 규모의 농축 및 유기용매 회수공정의 설치 및 운전</li> <li>- pilot 규모의 결정화 공정의 설치 및 운전</li> </ul>
		<p><b>pilot규모 분리정제 공정 설계 및 scale-up 전략 확립 (제 2 세부 위탁과제)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- pilot 규모의 생산 미생물의 회수공정 설계 및 scale-up 전략 확립</li> <li>- pilot 규모의 추출장치의 설계 및 scale-up 전략 확립</li> <li>- pilot 규모의 avermectin 농축 및 결정화 공정의 설계 scale-up 전략 확립</li> </ul>

### 3. 제3차년도 주요 연구개발 내용 및 범위

구 분	주요 개발내용 및 범위	
3차년도	<p><b>제 1 세부과제</b></p> <p>에버맥틴 고생산성 균주 개발 및 pilot-scale에서의 에버맥틴 발효공정 scale-up 연구</p>	<p><b>고생산성 원형질 융합체의 대량선별을 통한 에버맥틴 B<sub>1a</sub>의 생산성 증가 및 배양 생리학적 특성 조사</b></p> <p>(제 1 세부 위탁과제)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 고생산성 원형질 융합체의 대량선별</li> <li>- 원형질 융합된 고생산성 균주의 유전적 안정성 조사</li> <li>- 고생산성 원형질 융합체의 플라스크 배양중의 배양 생리학적 특성조사</li> <li>- 고생산성 원형질 융합체의 플라스크 배양중의 배양 형태적 특성 조사</li> <li>- 고생산성 원형질 융합체의 발효조에서의 배양 생리학적 특성 조사 및 생산 안정성 조사</li> </ul>
		<p><b>공정통합 및 시제품생산 (제 1 세부 주관과제)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전체공정 scheme 확정</li> <li>- 전체공정 전산모사 및 공정 자동화 기술 개발</li> <li>- 공정도 분석과 스케줄링 작업을 통한 공정설계 및 최적화</li> <li>- 공정 특성의 데이터-베이스화</li> <li>- 사용자 편의적 대화형 인터페이스 및 소프트웨어 제작</li> <li>- 배양공정과 분리정제공정 통합</li> </ul>
	<p><b>제 2 세부과제</b></p> <p>환경친화적 에버맥틴 분리정제공정 개발</p>	<p><b>통합 분리정제공정 개발 및 운전 경제적 타당성 평가 (제 2 세부 주관과제)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 통합 분리정제공정 설치 및 운전</li> <li>- 통합 분리정제공정의 공장화 전략 확립</li> <li>- pilot-scale의 통합 분리정제공정 설치 및 운전</li> <li>- economic feasibility study</li> <li>- 에버맥틴 분리정제 공정의 최적화</li> <li>- 시제품 생산</li> </ul>
		<p><b>pilot 규모 통합 분리정제공정 설계 및 scale-up 전략 확립 (제 2 세부 위탁과제)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-pilot-scale의 통합 분리정제공정 설계</li> <li>-통합 분리정제공정의 scale-up 전략 확립</li> </ul>

### 제 3 절. 관련분야의 기술발전예의 기여도

본 과제를 통해 확보할 수 있었던 주요 핵심기술은 다음과 같다:

- ① 원형질융합방법에 의한 고생산성, 고안정성, 고방향성의 생산균주 개발 기술
- ② 방선균 유래 이차대사산물의 발효 생산기술 및 발효공정 scale-up 기술
- ③ 방선균 유래 이차대사산물의 분리정제 기술 및 분리정제 공정 scale-up 기술
- ④ 생물반응기 시스템 설계 및 제작 기술
- ⑤ 컴퓨터 제어의 전문가 시스템에 의한 공장 자동화 기술

이차대사산물인 에버멕틴 B<sub>1a</sub>의 대규모 산업화 생산을 위한 상기의 생산공정기술은 생물산업 관련 전 범위의 순수 및 응용기술을 모두 포함하고 있는 기술집약적 분야에 속한다. 즉 원형질체 융합기술을 이용한 고생산성 균주의 개발, 이를 이용한 생물반응기 설계·운전기술, 회수되는 목적산물의 친환경적인 고순도 분리정제 기술, 산업적 대량생산을 위한 배양공정 및 분리·정제공정의 scale-up 기술 및 자동화 기술까지도 포함되는 첨단기술들이 서로 유기적으로 밀접하게 연관되어 있어, 본 연구를 통해 국내의 생물산업 관련 전반적인 기술 수준이 진일보할 수 있는 매우 중요한 계기가 될 수 있을 것이다.

더구나 방선균을 이용한 이차대사산물 생산공정의 경우 안정적이고 지속적인 균주개발이 까다로울 뿐만 아니라 배양공정 자체도 매우 불안정하여 (곰팡이에 의한 이차대사산물 생산공정과는 달리) 자체 균주개발에서부터 배양공정, 분리정제 공정에 이르기 까지 국내에서는 성공한 사례가 거의 없기 때문에, 본 연구 결과 제시된 다양한 연구개발 내용 및 방법은 단지 에버멕틴 B<sub>1a</sub>의 대규모 생산 뿐만 아니라 이차대사산물 유래 고부가가치 생물의약품의 경제적 대량생산기술의 확보 측면에서 커다란 이정표가 될 수 있을 것이다.



## 제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

- ▶ 본 연구 결과 얻은 에버멕틴 B<sub>1a</sub>의 생산성과 생산 안정성, 생산 재현성 등은 본 연구진이 조사한 바에 따르면 (현재까지 발표된 연구논문에서 발표된 세계 각국의 에버멕틴 연구 그룹의 avermectin B<sub>1a</sub> 생산성과의 비교 결과임) 가장 훌륭한 것으로 확인되었다. 이러한 높은 생산성은 avermectin 사업화 추진에 가장 강력한 동기를 부여하고 있다. 한편 본 과제를 통해 개발된 세포회수, methanol 파쇄, 세포조각 분리, 추출, 농축, 결정화, 여과, 건조, 분쇄에 이르는 에버멕틴의 분리정제 공정은 간단하면서도 전체 분리정제 수율이 높아 경제성이 우수한 분리정제 공정으로서, 에버멕틴의 대규모 생산이 실제로 이루어질 경우 분리정제 공정의 우위를 확보함으로써 에버멕틴의 가격 경쟁력을 향상시키는 데 활용될 수 있을 것이다. 또한 에버멕틴의 대량생산을 위한 대량 배양공정 기술과 대량 분리정제 공정기술의 중요한 scale-up 기반 기술 및 공정자동화 기술 등 주요 핵심기술이 거의 완성되어 있기 때문에 앞으로 10톤 이상에서의 배양 검증만 거친다면 산업화가 가능한 상태에 있다. 한편 이차대사산물 생합성의 특성에 대한 완벽한 이해 하에 통계적인 방법, 자동화 공정기술 및 다양한 공정의 기술융합으로 인해 에버멕틴 생산성 및 재현성에 있어서 선진국의 기술보다 진일보한 것으로 판단된다. 이러한 기술상의 진보는 특허가 만료되어 시장 쟁탈전이 벌어지고 있는 현 상황에서 추가 산업연구를 통해서 에버멕틴의 대규모 생산이 이루어질 경우 확실한 우위를 점할 수 있을 것으로 기대된다.
- ▶ 현재 에버멕틴에 대한 특허 보호기간이 만료되어 중국을 중심으로 한 개발도상국들이 선진국의 공장을 turn-key 방식으로 수입한 후, 저렴한 인건비를 무기로 시장에 진입하고 있으나 본 기술의 경우 선진국보다 진일보한 것으로 획기적인 생산단가 절감이 기대되므로 경쟁력 확보에는 문제가 없을 것으로 전망된다.
- ▶ 앞으로 우리나라 축산의 규모는 점점 기업화, 대형화 되어 가는 추세로 영농조합의 형성도 빠르게 형성되고 있다. 이와 같은 체제에서 가축 기생충 감염에 의한 도산을 방지하고 가축의 생산성 극대화를 위해 동물의약품은 대량으로 활용될 것이며 따라서 에버멕틴의 활용은 점점 더 늘어날 것으로 예측되어 안정적인 매출을 기대할 수 있다.
- ▶ 향후 대략 3년 이내에 춘천시 생물산업벤처기업지원센터에서 군사형성 미생물배양만을 위한 10-20톤급 이상의 대규모 배양 임대시설이 계획 중에 있다. 이 사업이 제대로 추진되도록 춘천시와 유기적인 기술 협조하에 매우 효율적인 공장시설이 들어설 수 있도록 협력함으로써, 본 연구 결과 개발한 에버멕틴 B<sub>1a</sub> 배양공정 및 분리정제 공정을 대규모 시설에서 재평가하고 그와 함께 본격적인 생산을 계획하고 있으며, 이를 토대로 본사에서 자체적인 공장을 건설하여 본격적인 생산에 착수할 예정이다.
- ▶ 에버멕틴의 상품화에 이어 본 과제를 통해 확보한 핵심기술로 경쟁력을 확보할 수 있는 후보 상품들을 발굴하여 연구개발함으로써 시장 변동에 능동적으로 대처해 나갈 예정이다.
- ▶ 본 연구를 통해 복합 저항성을 갖는 균주를 얻는다면 단순 변이주에 비해 유전함량의 증가로 유전적 안정성이 뚜렷하게 증가되고, 성장속도 및 에버멕틴 B<sub>1a</sub> 생산성이 큰 폭으로 향상되어 획기적인 생산단가의 절감이 기대된다. 또한 에버멕틴 B<sub>1a</sub>로의 생합성 방향성을 높임으로 인해 불순물 제거효과를 나타내어 에버멕틴의 상품성을 제고할 수 있을 것이다.
- ▶ 에버멕틴은 시장의 큰 변동 없이 안정적인 시장을 유지하고 있다. 에버멕틴의 세계시장 규모는 최근 수년간 년 5억 달러 수준 이상을 유지하고 있으며, 국내의 원료 수입 규모도 년 50억원 수준을 유지하고 있다. 에버멕틴의 향후 시장도 현재의 수준 이상을 계속 유지할 것으로 예측

하고 있다. 또한 인간의약품이기도 한 이버멕틴 시장의 증가 추세는 이버멕틴 합성의 원료물질인 에버멕틴의 수요량을 증가시킬 것으로 기대하고 있다.

- ▶ 현재 물밀 듯이 밀려오는 외국 농수산물의 영향으로 국내 동물사육 농가의 경쟁력은 날로 약해지고 있는 실정이다. 동물사육 농가는 비싼 사료 값과 함께 동물기생충에 의한 감염으로 인한 도산의 염려가 늘 도사리고 있는 상태이다. 따라서 본 연구를 통하여 고농도 및 대규모 에버멕틴 생산공정이 개발될 경우 생산비용의 절감과 가축의 폐사율 감소로 인해 축산농민의 부담이 줄어들고 축산업의 대외 경쟁력 강화에 큰 도움이 될 것이다.

## 제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- ▶ 세계 각국에서 발표된 에버멕틴 B1a 관련 특허: 배양 공정 특허, 유전자 조작관련 특허, 분리정제과정 관련 특허등 약 70 여편의 중요 특허 확보후, 특허경향 분석 및 산업화 연구에 참고.
- ▶ 세계 각국에서 발표된 에버멕틴 B1a 관련 주요 논문: 배양관련 논문, 유전자 조작 관련 논문등 약 100 여편의 중요 논문 내용 분석 및 연구에 참고.
- ▶ 에버멕틴 B1a 생산 관련 주요 전문 서적 확보. 특히 다음의 전문서적은 이차대사산물인 에버멕틴 B1a의 생산, 산업화를 위해 반드시 참고해야 할 필수 전문서적으로 판단됨:
  - Ivermectin and Abamectin, W. C. Campbell (Ed.), Springer-Verlag New York, 1989.
  - Basic Bioreactor Design, K. van't Riet and J. Tramper, Marcel Dekker, 1991.
  - Bioreactor System Design, J. A. Asenjo and J. C. Merchuk (Eds.), Marcel Dekker, 1995.
  - Actinomycetes in Biotechnology, M. Goodfellow, S. T. Williams and M. Mordarski (Eds), Academic Press, 1988.
  - Secondary Metabolites: Their Function and Evolution, Ciba Foundation Symposium 171, John Wiley & Sons. 1992
  - Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes, S. Shapiro (Ed.), CRC Press, 1988.
  - The Biology of Actinomycetes, M. Goodfellow, S. T. Williams and M. Mordarski (Eds), Academic Press, 1983.
  - Bioseparation, P.A, Belter, E.L. Cussler and W.S. Hu, Wiley-Interscience, 1988
  - Bioprocess Engineering-basic concepts, M.L. Shuler, F. Kargi, Prentice-Hall, 1992
  - Bioprocess Engineering Principles, P.M. Doran, Academic Press, 1995
  - Product Recovery in Bioprocess Technology, Biotechnology by Open Learning, Butterworth-Heinemann, 1992

## 제 7 장   참고문헌

- Stapley, E. O. and H. B. Woodruff (1982), Avermectins, antiparasite lactones produced by *Streptomyces avermitilis* isolated from a soil in Japan, genetics, biosynthesis, actions & new substances, Proc. An International Conference on Trends in Antibiotic Research 1982 (H. Umezawz, A. L. Demain, T. Hata and C. R. Hutchinson eds), pp. 154 - 170, Japan Antibiotics Research Association, Tokyo.
- Egerton, J. R., D. A. Ostlind, L. S. Blair, C. H. Eary, D. Suhayda, S. Cifelli, R. F. Riek and W. C. Campbel (1979), *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(3), 327-38.
- Burg, R.W., B. M. Miller, E. E. Baker, J. Birnbaum, S. A. Currie, R. Hartman, Yu-lin Kong, R. L. Monaghan, G. Olson, I. Rutter, J. B. Tunac, H. Wallic, E. O. Stapley, R. Oiwa, and S. Omura (1979), Avermectin, new family of potent anthelmintic agents : Producing organism and fermentation, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(3), 361-367.
- Ikeda, H., H. Kotaki, and S. Omura (1987), Genetic Studies of Avermectin Biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*, *J. Bacteriol.*, 169(12), 5651-5621.
- Albers-Schonberg, G., B. H. Arison, J. C. Chabala, A. W. Douglas, P. Eskla, M. H. Fisher, A. Lusi, H. Mrozik, J. L. Smith, and R. L. Tolman (1981), Avermectins. Structure Determination, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 4216-4221.
- Ikeda H., Nonomiya T., Usami M., Ohta T., Omura S. (1999), Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9504-9514.
- Andrew F. A. Marsden, B. Wilkinson, J. Cortes, N. J. Dunster, J. Staunton, P. F. Leadlay (1998), Engineering Broader Specificity into an Antibiotic-Producing Polyketide Synthase. *Science*, 279, 199-202.
- Smith, J. E. (1986), Concepts of Industrial Antibiotic Production, In *Perspective in Biotechnology and Applied Microbiology* (Alani, D. I. and Moo-Young, M. eds.), p. 105-142, Elsevier, London.
- Pauline, M. Doran (1995) In *Bioprocess Engineering Principles*, pp.190-213, Academic Press Inc., San Diego.
- 김승욱, 이진석, 정용섭, 조영일, 홍석인 (1994), *생물화학공학*, pp.228-269, 희중당.
- 정용섭, 김동일, 김익환, 이재관, 전계택, 정연호, 조규현, 최정우, 홍억기 (2001), *생물공정공학-이론과 실제*- pp.231-265, 월드사이언스.
- Ryu, D. Y. and A. E. Humphrey (1972), A reassessment of Oxygen-Transfer Rates in Antibiotics Fermentations, *J. Ferment. Technol.*, 50(6), 424-431.
- Demain, A. L. and Solomon, N. A.,(1986) In *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, 170-184, American Society for Microbiology Washington, D.C.
- Fodor, K., and L. Alföldi. 1976. Fusion of protoplast of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 73: 2147-2150.
- Hopwood, D. A. 1981. genetic studies with bacterial protoplasts. *Annu. Rev. Microbiol.* 35: 237-272.

- Oh, Y. K., J. L. Speth, and C.H. Nash. 1980. Protoplast fusion with *Streptosporangium viridogriseum*. *Dev. Ind. Microbiol.* 21: 219-226.
- 김상조, 양호석, 김정우, 이광무, 정구현, 송석길, 민경복, 김재천(1995), 대한민국특허, 특 1995-0012898.
- Ferenzy, et al. (1998), Process for the improvement of antibiotic production by in vivo genetic recombination. United States patent 4729951.
- Katz et al (1992). Biologically pure cultures of streptomyces and use Thereof in macrolide antibiotic production. United States patent 5149639.
- Method of obtaining streptomyces protoplast capable of efficient cell regeneration. United State patent 4159226.
- Sagara, Y., K. Fukui, F. Ota, N. Yoshida, T. Kashiyama and M. Fujimoto, (1971). *Japan J. Microbiol.*, 15, 73-84.
- Baltz, R. H. and P. Matsushima (1981), *J. Gen. Microbiol.* 127, 137-146.
- J.-N. Volf and J. Altenbuchner.(1998) Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Molecular Microbiology.* 27(2), 239-246.
- Jan Novak etc,(1993) Instability of the production of avermectins, sporulation, and pigmentation in *Streptomyces avermitilis*. *Can. J. Microbiol.*, vol. 39, 265-267.
- J. R. Egerton, D. A. Ostlind, L. S. Blair, and C. Campbell (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the B1a component. *Antimicrob. Agents Chamother.* 15, 372-376.
- F.J. Matthews (1991). Process for isolation of avermectin B1 components with improved purity and subsequent isolation of B2 components. *US Pat.* 5,077,398
- Miller, T. W., Louis chait., D. J. Cole, L. J. Cole, J. E. Flor, R. T. Goegelman, V. P. Gullo, Joshua H., A. J. Kempf, W. R. Krellwitz, R. L. Monaghan, R. E. Ormond, K. E. Wilson, Gerge Albers-schönberg, and Irving Putter(1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties. *Antimicrob. Agents Chamother.*, 638-371.
- J. R. Hofsetter (1981). Process for the purification of lincomycin. *US Pat.* 4,317,903
- C.H. Pang, K. Matsuzaki, H. Ikeda, H. Tanaka, and S. Omura(1995). Production of 6,8-Seco-6,8a-deoxy Derivatives of Avermectins by a Mutant Strain of *Streptomyces avermitilis*. *J. of antibiotics* 48(1)
- J.V. Pivnichny, J-S. K. Shim, L.A. Zimmerman (1983). Direct determination of avermectins in plasma at nanogram levels by high-performance liquid chromatography. *J. of Pharmaceutical Sciences* 72(12)
- Z. C. Wu, X. Zhang, R. F Xu and J. Chen (1998) Solvent extraction of lincomycin with neutral donor extractants. *Separation science and technology* 33(2), 259-269

에버멕틴 배양공정 특허, 유전자조작 관련 특허, 분리정제과정 관련 특허등 약 70 여편의 중요 세계 특허.

에버멕틴 B<sub>1a</sub> 생산 관련 주요 전문 서적:

- Ivermectin and Abamectin, W. C. Campbell (Ed.), Springer-Verlag New York, 1989.
- Basic Bioreactor Design, K. van't Riet and J. Tramper, Marcel Dekker, 1991.
- Bioreactor System Design, J. A. Asenjo and J. C. Merchuk (Eds.), Marcel Dekker, 1995.
- Actinomycetes in Biotechnology, M. Goodfellow, S. T. Williams and M. Mordarski (Eds), Academic Press, 1988.
- Secondary Metabolites: Their Function and Evolution, Ciba Foundation Symposium 171, John Wiley & Sons. 1992
- Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes, S. Shapiro (Ed.), CRC Press, 1988.
- The Biology of Actinomycetes, M. Goodfellow, S. T. Williams and M. Mordarski (Eds), Academic Press, 1983.
- Bioseparation, P.A, Belter, E.L. Cussler and W.S. Hu, Wiley-Interscience, 1988
- Bioprocess Engineering-basic concepts, M.L. Shuler, F. Kargi, Prentice-Hall, 1992
- Bioprocess Engineering Principles, P.M. Doran, Academic Press, 1995
- Product Recovery in Bioprocess Technology, Biotechnology by Open Learning, Butterworth-Heinemann, 1992

