최 종
연구보고서

미생물을 이용한 동물구충제의 대량 생산 및 산업화에 관한 연구

Studies on Mass Production of an Anthelimintic Agent Biosynthesized by Microbial Cells

Avermectin 생산 변이주 유도 및 분리

Development and Selection of High Yielding Mutant of Avermectin

Bench-scale에서의 avermectin 발효 공정 최적화, scale-up 연구 및 avermectin 분리 정제 공정 개발

Optimized Process Development for Fermentation and Purification of Avermectin in Bench Scale, and Basic Studies on Fermentation Process Scale-up

강 원 대 학 교

농 림 부

최 종 보 고 서

1998년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 “미생물을 이용한 동물 구충제의 대량 생산 및 산업화에 관한 연구”에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 8부

2. 최종보고서 디스켓 1매

1998. 12. 20.

주관연구기관 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 전 계 택 (인)

주관연구기관장 : 강원대학교 총장 직 인

농 림 부 장 관 귀하

제 출 문

농 림 부 장 관 귀 하

본 보고서를 “미생물을 이용한 동물 구충제의 대량 생산 및 산업화에 관한 연구” 의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20.

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 전 계 택

연 구 원 : 변 우 현

최 종 보 고 서 초 록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="4">(국문) 미생물을 이용한 동물 구충제의 대량 생산 및 산업화에 관한 연구</td></tr>
<tr><td colspan="4">(영문) Studies on mass production of an anthelimintic agent biosynthesized by microbial cells</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">강 원 대 학 교</td><td>총괄연구 책임자</td><td>(소속) 생명과학부
(성명) 전 계 택</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2">없 음</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비</td><td>계</td><td>230,000 천원</td><td>총연구기간</td><td>1995. 12. 1998. 12.
(3 년)</td></tr>
<tr><td>정부출연금</td><td>230,000 천원</td><td rowspan="3">총 참 여
연구원수
(명)</td><td rowspan="3">총 27 명
(내부 7 명)
(외부 20 명)</td></tr>
<tr><td>정부이외의
출 연 금</td><td></td></tr>
<tr><td>기업체 부담</td><td></td></tr>
</table>

□ 연구개발목표 및 내용

본 연구 개발의 최종목표는 방선균인 *S. avermitilis*의 발효를 통해 고 효율성 동물구충제인 avermectin B1a의 대량 생산하는데 있다. 이를 위해서 전통적 돌연변이 기술 및 유전공학적 기술을 이용한 고생산성 생산균주의 선별 및 재조합 기술, 고농도 생산을 위한 생물반응기 운전기술, 이로 부터 회수되는 avermectin B1a의 고순도 분리정제 및 제제화 기술, 산업적 대량 생산을 위한 scale-up에 대한 기초 조사등을 수행한다.

□ 연구성과

제1과제에서는 *Caenorhabditis elegans*를 이용해서 avermectin B1a에 대한 bioassay system을 개발했으며 UV와 MNNG 등의 돌연변이 유발원을 사용해서 변이주를 유도하고 분리하였다. 또한 avermectin 생산관련 유전자의 cloning 및 cloning된 유전자의 promoter 조작 등에 의해 발현율 증가에 대한 가능성을 타진했다. 제2과제에서는 Avermectin B1a 고생산 개량 변이주 선별, revertant로의 back mutation 현상 방지, 성장배지 및 생산배지 최적화, 생산배지로의 접종량 최적화, 플라스크 배양 및 생물반응기를 이용한 회분식 또는 유가식 배양 환경의 최적화등을 통해 avermectin 생산농도와 단위세포당 생산성을 큰 폭으로 증가시킬 수 있었다. 유가식배양을 도입한 결과 생산균주의 성장속도 조절이 가능해져 dynamic method에 의해서도 *kLa* 측정이 용이하였다. 고농도 배양의 경우, 통기량의 변화에 의해 *kLa*를 조절하는 것 보다 교반속도로 조절하는 것이 더 효율적이며, Rushton turbine과 Scaba impeller가 산소전달에 있어 우수한 교반기로 판명되었다. 한편 세포배양산물로부터 순수한 avermectin의 결정을 얻기까지 필요한 여러 분리정제 공정의 설계자료 및 scale-up 전략들이 수립되었으며, 이를 바탕으로 bench scale의 연속식 향류 3단 추출장치와 연속식 결정화 장치가 개발되었고 개발된 여러단계의 분리정제 공정을 통하여 세포배양물로부터 고순도의 avermectin 결정을 얻어내는데 성공하였다.

□ 연구성과 활용계획

*C. elegans*를 이용한 avermectin 검출 system은 균주 screening 수단으로 기여하게 될 것이며 *Streptomyces* 유전자 조작 기술은 차원높은 고생산 변이주의 유도를 위해 활용될 수 있을 것이다. 또한 균주 개량, 생물반응기 운전전략 및 배양조건의 최적화 등의 know-how는 avermectin 생산 산업화 공정에 쉽사리 적용될 수 있다. 발효공정 scale-up 시 대형화 기준으로 사용되는 부피물질전달계수 측정에 대한 연구방법이 확립되었으며, 이는 발효조의 부피당 동력 및 발효조 크기를 산출하는데 유용하게 활용될 수 있다. 한편 분리정제 공정에서 도출한 여러 설계자료들은 실제 상업화 avermectin의 분리정제 공정에 필요한 원심분리장치, 여과장치, 추출장치등의 설계에 이용될 것이며, 개발된 연속식 향류 다단 추출장치와 연속식 결정화 장치는 효율성이 우수하여 avermectin의 scale-up 생산에 활용할 수 있을 뿐만 아니라 다른 항생제의 추출이나 결정화에도 이용될 수 있다.

요 약 문

Ⅰ. 제 목

미생물을 이용한 동물구충제의 대량 생산 및 산업화에 관한 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

방선균에 의해 이차대사산물로 생산되는 macrocyclic lacton 계열의 avermectin의 발견으로 인해 동물구충제 시장의 일대 혁신적인 변화가 일어나고 있다. 즉 구충제로서의 강력한 활성 뿐만 아니라 진드기, 이 등의 외부 기생충에 대해서도 충분한 구충 효과가 입증되어, 이들을 미생물 발효에 의해 경제적으로 생산하고자 하는 시도가 세계 유수의 생물공학회사에서 적극적으로 추진되어 왔다. Avermectin은 생산균주인 *Streptomyces avermitilis*에 의해 A1a, A2a, B1a, B2a, A1b, A2b, B1b, B2b등의 8개 유도체로 생합성되나, 이중에서 B1a 가 가장 효율적이며 광범위한 구충효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 avermectin B1a 의 생합성 비율을 높이기 위한, 생산 방향성을 고려한 균주 개발의 필요성이 절실하다. 즉 미생물 발효를 통해 avermectin B1a을 대량 생산하기 위해서는 전통적 돌연변이 기술 및 유전공학적 기술을 이용한 고생산 방선균의 선별 및 재조합기술이 개발되어야 할뿐만 아니라, 이를 이용한 생물반응기 설계, 운전기술, 이로부터 회수되는 목적산물의 고순도 분리정제 및 제제화 기술, 산업적 대량 생산을 위한 scale-up 기술 등이 개발되어야 한다.

Avermectin과 같은 이차대사산물의 대량 생산을 위한 고생산성 균주 개발 및 발효공정 기술은 농업생물산업의 know-how 및 경제성을 결정하는 가장 중요한 기술로 인식되어져 선진국에서 기술 개발 노력이 매우 치열한 분야이다. 특정 미생물의 2차대사산물을 산업적으로 과량생산하기 위해서는 생산균주의 생장조건의 인위적 조절에 의해 생산을 자유로이 제어할 수 있는 변이주의 유도가 중요한 관건이 된다. 한편 *Streptomyces*속 세균이 속하는 방선균과 같이 균사를 형성하는 미생물은 그 독특한 morphology와 이차대사의 까다로운 physiology로 인해 생물반응기의 설계 및 발효공정 최적화에 많은 어려움이 있으며, 특히 이차대사산물의 낮은 생산성으로 인해 경제성의 문제점을 제기한다. 또한 독특한 3차원적인 균사구조로 인해 생산균의 성장에 따른 발효배양액의 점도 증가 현상은 생물반응기 내의 산소전달 능력을 급격히 감소시켜 생산균의 physiology에 심각한 변화를 초래하게 된다. 따라서 균사형성 미생물 발효 시 배양액 내의 산소제한 현상으로 인한 이차대사산물의 생산성 저해 요인은 bench-scale 및 규모확대 발효공정에서 해결되어야 할 가장 중요한 문제중의 하나이다. 이를 위해선 부피물질전달계수(kLa) 측정을 통한 정밀한 산소전달 mechamism에 대한 분석이 필요하다.

Avermectin은 세포 내에 생성물이 축적되는 intracellular product이기 때문에 세포를 파쇄하여야 분리 정제가 가능하게 되고 이로 인해 분리 공정이 훨씬 복잡하다. 특히 avermectin은 관련유도체가 A1a, A2a, A1b, A2b, B1a, B2a, B1b, B2b 의 8 종류가 되고 이중 약효가 우수한 B1a, B1b 의 avermectins, 그 중에서도 B1a를 분리해 내는데 여러 단계의 분리정제 공정이 요구된다. 대부분의 생물산업제품의 경우 배양액의 성분조성은 대단히 복잡함에도 불구하고 상대적으로 높은 순도를 요구된다. 또한 취급물질들이 대부분 열이나 화학적 변화에 민감하여 사용 가능한 단위공정도 제한을 받는 등 어려움이 있어서 여러 단계의 분리정제 단위공정을 거쳐야 하고 이에 따라 분리정제 공정이 차지하고 있는 생산비용은 발효공정을 포함한 전체공정의 절반이상을 차지한다. 또한 발효생물제품이 분리정제 공정을 거치는 동안 손실이 되어 수율이 저하되기 때문에 분리공정의 최적화는 전체 공정의 경제성을 향상시킬 수 있는 절실한 과제이다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

균주개발에 선행하여 해결해야 할 과제는 avermectin B1a의 손쉬운 bioassay 방법의 개발 및 확립이다. Avermectin은 선충류에 대한 독성을 나타내는 물질이기 때문에 일반적인 항생물질들처럼 bioassay가 쉽지 않다. 그러나 그 구조가 세균에 대해 광범한 항균작용을 나타내는 항생물질인 macrolide 계열 물질들과 유사한 구조이므로 각종 세균들을 대상으로 독성검출을 시도해 그 가능성을 검증해 보았다. 또한 avermectin이 곤충에 대해서도 독성을 갖기 때문에 배양 곤충세포를 이용, 독성 검출 system으로의 개발 가능성을 타진해 보았다.

균주의 변이체 유도를 위한 방법은 고전적 방법과 분자생물학적 방법을 각각 사용하여 별도로 진행되었다. 고전적 돌연변이체 유도에서는 자외선과 MNNG 같은 돌연변이원에 대한 *S. avermitilis*의 감수성, 즉 처리조건을 우선적으로 확립하고 이어 변이체들을 유도하였다. 유전자 cloning 방법을 적용한 균주 개량은 avermectin 생산관련 유전자들을 cloning하고 이들의 특징을 분석한 후 유전자의 발현율을 높이거나 아니면 단순히 유전자의 copy수를 많게 하는 방법 등으로 생산량을 증가를 시도하였다.

한편 Avermectin B1a의 고농도 생산을 위해서는 고생산성 개량균주의 유전학적 안정성 유지 및 배양 조건 최적화가 선행되어야 한다. 이를 위해 플라스크 배양에서 세포성장용 배지 및 산업용 생산배지 개발, 주된 탄소원 및 질소원 규명과 함께 배양중의 부산물의 축적, 또는 특정 기질의 과다 공급으로 인한 생산균주의 성장 방해 가능성 및 avermectin B1a 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 배지 중에 avermectin B1a의 precursor, 또는 inducer를 첨가했을 경우 이들이 생산세균의 avermectin B1a 생산성에 미치는 영향을 평가하였으며, 통계학적으로 가장 효율적인 고생산성 균주 선별 방법 확립 및 고생산성 균주가 revertant로의 back mutation 현상을 방지하는 전략을 수립하였다.

생물반응기를 이용한 배양의 경우 세포의 morphology 와 생산성과의 상관 관계 조사 및 세포농도 증가로 인한 점도 변화가 배양액에서의 산소물질전달계수에 미치는 영향을 조사하였으며 이 자료를 scale-up 공정을 위한 기본자료로 사용하고자 하였다. *Streptomycete*와 같은 방선균을 이용하여 이차 대사산물을 생산하기 위한 호기적 액상발효에서 중요한 요인중의 하나는 산소의 전달이다. 또한 pilot 규모의 발효기 설계나 생산 발효기로 규모를 확대하는 경우, 임계점 이상으로 용존산소농도를 유지하는 것은 매우 중요한 문제중의 하나이다. 이러한 관점에서 발효조의 효율적인 규모 확대를 위해서 통기와 교반속도의 변화 및 임펠러의 종류에 따른 산소전달계수(kLa)를 측정하였다. 특히 배양 중에 산소전달율 (oxygen transfer rate), 세포의 산소흡수율 (oxygen uptake rate)과 용존산소 수준에 대한 상관관계를 조사하였다. 또한 유가식 배양을 통해, feeding medium 중의 제한기질 (limiting substrate)의 농도 변화가 배양액 내의 용존산소 수준 및 세포의 성장속도와 avermectin B1a 생산성에 미치는 효과에 대해서도 조사하였다.

또한 전체 공정의 경제성을 향상시키기 위해서는 배양공정 뿐만 아니라 avermectin 분리정제 공정의 최적화가 선행되어야 한다. 이를 위하여 배양액으로부터 세포의 분리공정, 세포벽 파쇄 공정, 여러 단계의 추출공정, chromatography 공정, 생산용 HPLC에 의한 분리정제 공정, 결정화공정등 세포배양산물로부터 순수한 avermectin의 결정을 얻기까지 필요한 여러 과정의 분리정제 과정들에 관한 여러 가지 기초실험들이 lab-scale 혹은 bench scale로 수행되었고 이러한 기초 실험결과로부터 여러 가지 설계자료가 도출되었으며 동시에 최적 scale-up 전략들이 모색되었다. 한편 실험실 규모의 실험에서 얻은 자료를 바탕으로 scale-up된 규모의 공정 개발의 모델로서 연속식 향류 3단 추출장치와 연속식 결정화 장치가 개발되었고 이에 따른 최적 운전 전략이 수립되었다.

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

자외선과 MNNG 같은 돌연변이원에 대한 *S. avermitilis*의 감수성, 즉 처리조건을 우선적으로 확립하고, 이로부터 고생산성 avermectin B1a 변이체들을 유도하여 bench-scale에서의 avermectin 생합성 능력을 조사하였다. *Caenorhabditis elegans*를 이용한 bioassay system을 개발, 확립하였으며 이 방법을 UV와 MNNG 등의 돌연변이 유발원을 사용한 변이주 유도에 적용하여 avermectin 생합성능이 증가된 변이주들을 분리하였다. 유전자 조작방법을 이용한 avermectin 생산변이주 유도를 위해 avermectin 생산관련 유전자의 cloning을 시도하였다. Cloning된 유전자의 promoter 조작에 의한 발현율 증가 시도나 유전자 copy 수 조작에 의한 고생산균주의 유도를 위한 실험을 현재 진행 중에 있다.

Avermectin B1a 고생산 개량 변이주 선별, revertant로의 back mutation 현상 방지, 성장배지 및 생산배지 최적화, 생산배지로의 접종량 최적화, 플라스크 배양 및 생물반응기를 이용한 회분식 또는 유가식 배양 환경의 최적화등 본 연구를 통해 매 실험마다 증가된 avermectin B1a 생산 농도와 단위세포당 생산성, 그리고 생산성 향상이 일어난 원인에 대해서 하기의 표에 간단히 요약하였다. wild-type의 생산균주의 경우 농축된 배양액의 bioassay법에 의해서만 겨우 avermectin B1a의 존재를 확인할 수 있을 정도로 미미한 양을 생산하였으며, 이로부터 유도된 돌연변이주의 경우에도 초반에 avermectin B1a의 생산성이 거의 나타나지 않았다(약 16mg/L). 이 돌연변이주로부터 표에 명시된 모든 조건, 즉 균주 선별, 개량 및 배양공정 개발을 통해 avermectin B1a 생산성이 약 54배 이상 증가된 862 mg/L 까지 이르는 결과를 얻었다. 현재 유전학적으로 안정성이 우수한 고생산 변이주 (APPL-500, 600, 700, 800)를 확보한 상태이다.

산소전달계수(kLa)를 측정하기 위해 2.5 L 발효기에서 *S. avermitilis*를 배양한 결과 지수성장기의 산소흡수율(OUR)의 증가로 인해 적정 용존산소유지 및 kLa 측정이 어려웠고, 이를 극복하기 위해서 유가식배양을 도입하였다. 영양원의 단계적 공급으로 성장속도의 조절이 가능해졌으며, 낮은 교반속도에서도 적정 용존산소 농도를 유지할 수 있어서, dynamic method에 의해서도 kLa 측정이 용이하였다. 균체 농도가 증가할수록 점도가 증가하여 혼합(mixing)이 효과적이지 못한 이유로 인해 더 높은 교반속도가 필요하였다. 건조균체량이 고농도인 경우, 통기량의 변화에 의해 kLa를 조절하는것 보다 교반속도로 kLa를 조절하는 것이 더 효율적인 것으로 관찰되었다. 한편 dynamic method와 direct method의 비교에서는 dynamic method에 의한 OUR.과 kLa 값 측정시, 배양배지의 높은 점도로 인한 공기방울의 잔류로 인해 dynamic method에 의한 측정값이 direct method에 의한 값 보다 더 적게 나타났다. 임펠러가 산소전달계수와 배양 중의 용존산소 농도에 미치는 영향을 비교하기 위하여 Rushton turbine, Scaba, Intermig 및 Pitched blade impeller 네 가지 임펠러를 조사한 결과, Rushton turbine과 Scaba impeller가 우수한 것으로 판명되었다.

한편 세포배양산물로부터 순수한 avermectin의 결정을 얻기까지 필요한 여러 분리정제 공정의 설계자료 및 scale-up 전략들이 수립되었으며 이를 바탕으로 bench scale의 연속식 향류 3단 추출장치와 연속식 결정화 장치가 개발되었다. 배지로 부터 생산균주를 분리하는 공정으로 원심분리공정과 여과공정 설계에 필요한 parameter들을 도출하였고 세포파쇄공정은 기계적 방법대신 solvent에 의한 1차 추출로 충분한 것으로 나타났다. 추출공정에서 percentage of extraction과 selectivity의 관점에서 최적용매가 선정되었고 partition coefficient등 scale-up에 필요한 자료들이 도출되었다. 2차 추출에서 aceton-water aqueous phase의 경우 chloroform, methanol-water aqueous phase의 경우는 methylene chloride를 사용하는 것이 바람직하였다. 2차 추출 후에도 아직 많은 불순물이 존재하여 3차 추출이 필요하게 되었다. 이를 위한 최적의 aqueous phase와 용매(solvent)의 조합을 조사한 결과 aqueous phase로는 methanol-water 5:3 phase, solvent phase로는 methylene chloride를 사용하는 것이 가장 바람직하였다. 또한 Preparative HPLC를 이용한

avermectin의 분리정제를 시도한 결과 하나의 single peak 만을 보여줌으로써 거의 100 %에 가까운 순도를 얻을 수 있었다. 한편 효율적인 scale-up 분리공정 개발의 모델로 연속식 3단 향류 추출공정을 개발하였으며 개발된 공정은 연속식 생산에 따른 생산성 향상뿐만 아니라 추출율의 향상 면에서도 성공적이었다. 또한 air-lift 형태로 과포화 용액을 현탁 상태로 유지할수 있고 자체적으로 seed를 공급할 수 있는 연속식 crystallization 장치를 개발하였고 이로부터 균일하며 규칙적인 avermectin의 결정을 얻는데 성공하였다.

한편 본 연구개발결과의 활용계획을 개발된 세부 기술별로 요약하면 다음과 같다:

① 고생산성 균주 개발 기술

본 연구를 통해 얻어진, *C. elegans*를 이용한 avermectin 검출 system은 앞으로 avermectin B1a의 산업적 생산화에서 유용한 균주 screening 수단으로 기여하게 될 것이며 돌연변이 유발 조건 및 *Streptomyces* 유전자 조작 기술은 차원높은 고생산 변이주의 유도를 위해 활용될 수 있을 것이다.

② 발효기술 및 대량 배양 기술

본 연구를 통해 배지 및 배양조건 최적화 및 균주 개량에 의해 상기의 표에 요약한 바와 같이 높은 avermectin B1a 생산성을 얻을 수 있었다. 이러한 높은 생산성은 avermectin B1a 사업화 추진에 가장 강력한 동기를 부여하고 있다. 또한 생물반응기 운전 전략 및 배양 조건의 최적화 등이 이루어 졌으므로, 축적된 know-how는 scale-up된 avermectin B1a 생산공정에 쉽사리 적용될 수 있다. 한편 발효공정 scale-up 시 대형화 기준으로 사용되나 그 적용이 매우 까다로운 부피물질전달계수 측정에 대한 연구방법이 확립되었으며, 측정된 부피물질전달계수는 발효조의 부피당 동력 및 발효조 크기를 산출하는데 유용하게 활용될 수 있다. 또한 임펠러의 종류에 따른 부피물질전달계수를 측정함으로써 *Streptomyces* 기원 미생물 발효시 요구되는 산소요구량을 만족시킬 수 있는 최적의 임펠러에 관한 사양을 제시할 수 있다.

③ 대량 분리정제 기술

한편 분리정제 공정에서 도출한 settling time, specific cake resistance, compressibility, partition coefficient등의 여러 설계자료들은 실제 상업화 avermectin의 분리정제 공정에 필요한 원심분리장치, 여과장치, 추출장치등의 설계에 이용될 것이며, 개발한 연속식 향류 다단 추출장치는 생산성이 기존의 회분식 추출장치보다 월등히 높아서 avermectin의 scale-up 생산에 활용할 수 있을 뿐만 아니라 다른 항생제의 추출에도 적용될 수 있다. 개발한 preparative HPLC공정 역시 처리량은 낮으나 높은 순도의 avermectin을 얻을 수 있어서 scale-up후에 실제 생산에 활용할 수 있다. 또한 개발한 연속식 crystallizer도 seed가 필요없고 batch crystallizer보다 생산성이 우수하여 scale-up후에 실제 avermectin의 생산에 활용할 수 있을 뿐만 아니라 다른 항생제의 결정화 공정에도 이용할 수 있다.

Summary of strain improvement and process development leading to enhanced production of avermectin B1a, by various kinds of variants of *S. avermitilis*

Exp.	cell conc. (g/L)	avermectin B1a concentration (mg/L)	specific production (mg/g cell)	비 고
1	10.49	16.16	1.54	4가지 균주조사, APPL-200 변이주 선별
2	10.04	44.92	4.47	탄소원조사(malt extract)
	10.82	53.80	4.97	탄소원조사(galactose)
3	13.23	144.76	10.94	질소원조사(skim milk),탄소원으로 galactose(#1)
	16.84	171.35	10.18	질소원조사(skim milk powder),탄소원으로 galactose (#2)
4	14.23	230.82	16.22	질소원조사(peptonized milk), 탄소원으로 malt extract (#1)
	13.8	244.35	17.70	질소원조사(skim milk), 탄소원으로 malt extract (#2)
5	11.05	245.20	22.29	생물반응기에 의한 유가식배양, fructose와 skim milk 사용
5	14.94	234.24	15.68	질소원 확정후 탄소원재조사(malt extract), peptonized milk (#1)
	12.65	302.39	23.90	질소원 확정후 탄소원재조사(fructose), peptonized milk (#2)
6	14.73	287.45	19.51	질소원 확정후 탄소원재조사(malt extract), skim milk (#1)
	18.37	320.42	17.44	질소원 확정후 탄소원재조사(fructose), skim milk (#2)
7	23.95	299.60	12.51	탄소원과 질소원의 농도변화 (fructose+malt extract) (#1)
	24.04	383.91	15.98	탄소원과 질소원의 농도변화(malt extract+skim milk) (#2)
8	16.37	525.56	32.10	성장배지조사(sesame oil+PEG)
9	18.54	673.38	36.31	cottonseed flour 농도에 따른 영향 (#1)
	24.48	716.26	29.25	cottonseed flour 농도에 따른 영향 (#2)
	19.26	732.52	38.03	cottonseed flour 농도에 따른 영향 (#3)
10	21.80	817.10	37.40	고생산균주 선별, APPL-700, 최적 성장배지 및 생산배지 사용, 플라스크배양
	21.11	832.05	39.40	고생산균주 선별, APPL-500, 최적 성장배지 및 생산배지 사용, 플라스크배양
11	24.10	844.10	35.02	고생산균주 선별, APPL-700, 최적 성장배지 및 생산배지 사용, 발효조배양
	22.40	862.23	38.50	고생산균주 선별, APPL-500, 최적 성장배지 및 생산배지 사용, 발효조배양

SUMMARY

The goal of this research is to economically produce avermectin B1a, the most efficient anthelmintic agent of the 8 membered avermectin family, produced as secondary metabolites by *Streptomyces avermitilis*. The efficacy of avermectin B1a against nematode and anthropod parasites was unprecedented in potency and breadth of spectrum. Avermectin B1a (hereinafter avermectin) is also in commercial use as an agricultural pesticide, and its application is continuing to expand. In this study emphasizing on mass production of avermectin B1a, two projects were performed separately with the following purposes:

- 1st projest: Development and selection of high yielding mutant of avermectin B1a;
- 2nd project: Optimized process development for fermentation and purification of avermectin B1a in bench scale, and basic studies on fermentation process scale-up.

1st project:

Induction of *Streptomyces avermitilis* mutants showing enhanced capability for biosynthesis of avermectin was investigated. Both traditional and genetic manipulating mutagenesis methods were used for these purposes. This study included; 1) development of a avermectin bioassay system for selecting high level of avermectin producing mutants, 2) establishment of mutagen(s) treatment conditions for mutagenesis of *S. avermitilis* and 3) introduction and establishment of genetic manipulation methods for *Streptomyces* DNA such as transformation, vector selection, and protoplast fusion.

Avermectin bioassay system was developed using *Caenorhabditis elegans, a* free living nematode which has the same physiology as the parasitic nematode in livestock. No toxic response or inhibitory effect was observed in the tested bacterial cell and cultured insects cell systems. By traditional mutagenesis method, several high yielding mutants of avermectin were isolated and subsequently analyzed for their avermectin productivities in bench scale fermentations. One of the genes related avermectin biosysthesis was cloned. Application of gene manipulating methods using this cloned gene is still under investigation in order to induce high avermectin producing mutants.

2nd project:

For optimized process development and improvement for avermectin B1a fermentation, lots of sets of experiments have been carried out in both shake and bench-scale cultures of *S. avermitilis*, beginning with the original strain. Improvements in the fermentation process involved multiple parameters. These included strain improvement, determination of optimum inoculum amounts, seed and production media development, modification of fermentation parameters such as aeration and agitateion rates, and introduction of fed-batch operation process. Rapid enhancement in avermectin B1a productivity was possible due to development of a basal complex medium in order to investigate the nutritional and physiological requirements of the producer microorganism. The original strain produced very low amount of avermectin B1a, which could be detected only by bioassay method after several folds of

concentration of the extracted cell broth sample. A initial variant derived from the origial strain was observed to have the ability to produce approximately 16 mg/L of avermectin B1a. Through sustained improvements in the fermentation parameters as specified above, we were able to produce 862 mg/L of avermectin B1a resulting in approximately 54 times increase compared to the productivity of the initial mutant strain. In addition the high producer mutants (APPL-500, 600, 700 and 800) were proved to be stable as well as reproducibe in their avermectin B1a productivities after long-term subculture periods.

Furthermore another sets of parameters such as oxygen transfer coefficients(kLa) and dissolved oxygen(DO) concentration were measured to be utilized as basal data for scale-up of avermectin B1a, fermentation process. The kLa value decreased from 64.26 hr-1 to 29.12 hr-1 when biomass concentration increased from 9.82 g/L to 12.09 g/L due to increase in viscosity of the cell broth. By comparing kLa values obtained from various agitation speeds and aeration rates, we found that the effect of increase in kLa by aeration rates was reduced dramatically at high biomass concentrations, indicating that control of the DO level with variation of agitation speed was more efficient than with aeration rate. In addition the effects of agitation impellers on kLa value and DO level of the cell broth were studied using four kinds of impellers; Rushton turbine, Scaba, Intermig, and Pitched blade. It was found that Rushton turbine and Scaba were more efficient than others giving fairly high oxygen transfer rate.

For the development of optimum separation and purification process for avermectin, several experiments involving many steps of separation process have been carried out in both lab-scale and bench-scale. Several design parameters such as settling velociy of avermectin producing cells for the centrifuge process, and specific cake resistance for filtering process were evaluated for the scale-up of cell isolation process from fermentation broth. The mechanical cell disruption method could be replaced by 1st solvent extraction. Several design parameters such as percentage of extraction, partition coefficient, and selectivity were evaluated for extraction process and used as a basis for the selection of optimum solvents. The optimum solvent of 2nd extraction for the aceton-water aqueous phase was found to be chloroform, and that for methanol-water aqueous phase be methylene chloride. The 3rd extraction was tried because 2nd extraction of cell extract still had showed many peaks from impurities. It was found that metanol-water aqueous phase and methylene chloride solvent phase was most desirable combination for 3rd extraction. Furthermore, the separation and purification of avermectin by using Waters LC 4000 preparative HPLC was tried and almost pure avermectin could be obtained by this method. The separation of B1a from B1b was not possible by using Sephadex LH-20. It may be desirable not to separate B1a from B1b from the ecomomic point of view. A continuous 3 stage countercurrent extraction was developed for the efficient scaled-up extraction process, and successful operation of the process showed the improvement of not only extraction capacity due to continuous operation but also percentage of extraction due to multi-step countercurrent operation. Furthermore, a continuous crystallizer was developed based on the suspension of super-saturated solution by airlift action and on the self seeding mode. The crystal from the continuous crystallizer showed more uniform and regular crystals than that from non-agitated batch crystallizer.

CONTENTS

목 차

페이지

제 1 장. 서 론

제 1 절. 연구개발의 목적 및 중요성

- 지난 십 수년간 화학 합성된 동물구충제가 계속적으로 개발됐음에도 불구하고 이들의 적용 범위는 매우 제한적임. 그 이유는 기생충의 종류에 따라 서로 다른 화학구충제를 사용해야 한다는 점이며, 또한 기존의 구충제에 대한 저항성을 갖는 기생충 집단이 계속 새롭게 나타나기 때문임.

- 방선균에 의해 이차대사산물로 생산되는 macrocyclic lacton 계열의 avermectin의 발견으로 인해 동물구충제 시장의 일대 혁신적인 변화가 일어남. 즉 구충제로서의 강력한 활성뿐만 아니라 진드기, 이 등의 외부 기생충에 대해서도 충분한 구충 효과가 입증되어, 이들을 미생물 발효에 의해 경제적으로 생산하고자 하는 시도가 세계 유수의 생물공학회사에서 적극적으로 추진되어 왔음.

- Avermectin은 방선균의 일종인 *Streptomyces avermitilis*가 2차대사산물로 생산해 내고 있는, 포유동물의 소화기관내 기생하는 기생충들에 대해 강력한 구충효과를 갖고 있는 유도체들임.

- 그 효과는 기생충들과 같은 분류군에 속하는 원형동물의 일종인 *Caenorhabditis elegans*를 대상으로 한 *in vitro* 구충실험에서, 현재 사용되고 있는 Oxibendazole 보다는 약 500배, Albendazole, Febendazole, Mebendazole 보다는 1,000배, Pyrvinium, Flubendazole, Thiabendazole 보다는 5,000배, Oxantel과 Morantel 보다는 무려 50,000배 더 높은 효능을 보여주고 있음.

- *S. avermitilis*의 배양에서 생산되는 avermectin은 A1a, A2a, B1a, B2a의 4개 주성분과 A1b, A2b, B1b, B2b의 4개 부성분 등 8개 화합물의 혼합물로 생산되고 있으며 이중에서 가장 강하고 광범한 구충효과를 나타내고 있는 B1a는 별도로 abermectin 으로 불리워지고 있음. Avermectin의 세계시장 규모는 약 6,000 억원 정도인 고부가가치 동물의약품이며, 물질 특허가 1999년에 만료될 예정이므로 avermectin 생산을 위한 국내기술의 개발이 시급한 실정임.

1. 기술적 측면

- 미생물 발효를 통한 동물구충제인 avermectin의 산업화 기술은 유전공학, 생명공학, 수의학, 기생충학 등 농생물 관련 전 범위의 순수 및 응용기술을 포함하고 있음. 즉 전통적 돌연변이 기술 및 유전공학적 기술을 이용한 고생산 방선균의 선별 및 재조합기술, 이를 이용한 생물반응기 설계, 운전기술, 이로부터 회수되는 목적산물의 고순도 분리정제 및 제제화 기술, 산업적 대량 생산을 위한 scale-up 기술 및 동물실험까지도 포함하는 첨단의 기술들이 서로 유기적으로 연관되어 있어 농축산 관련 모든 기술이 진일보할 수 있는 매우 중요한 계기가 될 수 있음.

가. 고생산성 균주 개발의 중요성

- 발효 관련 산물의 생산을 위해서는 고생산성 균주의 확보가 가장 핵심적인 관건임. 새로운 균주는 신규 물질특허로 이어지며 독점적인 물질 생산을 법적으로 보장받게 되기 때문임.

- Merck사와 Pfizer사에서 특허 등록한 5개 균주를 ATCC를 통해 구매할 수는 있으나 이들을 사용한 직접적인 avermectin의 생산은 법적으로도 불가능할 뿐 만 아니라 균주의 생산성도 두 회사에서 직접 물질생산에 사용하고 있는 것보다는 훨씬 열등하기 때문에 독자적으로 균주를 개량, 보유해야할 필요성은 절실함.

- 방선균들은 그 생활사나 생리대사가 일반적인 세균들과는 매우 다르기 때문에 이들의 배양조건을 확실하게 파악한다는 것은 방선균을 이용한 각종 항생물질 등의 생산 전반에 큰 도움을 줄 수 있을 것임.

나. 미생물발효를 통한 생물공정 개발 및 분리정제 공정 기술 개발의 중요성

1) 미생물발효를 통한 생물공정 개발의 중요성

- Avermectin과 같은 이차대사산물의 대량 생산을 위한 발효공정 기술은 농업생물산업의 know-how 및 경제성을 결정하는 가장 중요한 기술로 인식되어져 선진국에서 기술 개발 노력이 매우 치열한 분야임. 특히 이차대사산물 생산용 생촉매인 미생물자원의 대사 생리학적 연구의 급진전과 컴퓨터 및 관련 기기 산업의 급속한 성장에 힘입어 이차대사산물 생산용 생물공정 전반에 대해서도 컴퓨터 제어시스템의 도입을 통한 최적제어 기술의 개념이 활발히 추진되고 있는 점을 감안할 때, 고부가가치 동물구충제 생산을 위한 생물공정 개발은 농축산 분야의 기술경쟁력을 크게 향상시킬 수 있음.

2) 분리정제 공정 기술개발의 중요성

- Avermectin은 세포내에 생성물이 축적되는 intracellular product이기 때문에 세포를 파쇄하여야 분리 정제가 가능하게 되고 이로 인해 분리 공정이 훨씬 복잡함. 특히 avermectin은 관련유도체가 A1a, A2a, A1b, A2b, B1a, B2a, B1b, B2b 의 8 종류가 되고 이중 약효가 우수한 B1a, B1b 의 avermectins, 그 중에서도 B1a를 분리해 내는데 여러 단계의 분리정제 공정이 요구됨.

- 대부분의 생물산업제품의 경우 배양액의 성분조성은 대단히 복잡함에도 불구하고 상대적으로 높은 순도를 요구됨. 또한 취급물질들이 대부분 열이나 화학적 변화에 민감하여 사용 가능한 단위공정도 제한을 받는 등 어려움이 있어서 여러 단계의 분리정제 단위공정을 거쳐야 하고 이에 따라 분리정제 공정이 차지하고 있는 생산비용은 발효공정을 포함한 전체공정의 절반이상을 차지함. 또한 발효생물제품이 분리정제 공정을 거치는 동안 손실이 되어 수율이 저하되기 때문에 분리공정의 최적화는 전체 공정의 경제성을 향상시킬 수 있는 절실한 과제임.

제 2 절. 연구개발 목표

- 제 1 과제 : Avermectin 생산 변이주 유도 및 분리

- 제 2 과제 : Bench-scale에서의 avermectin 발효 공정 최적화, scale-up 연구 및 avermectin 분리 정제 공정 개발

제 3 절. 연구개발 내용 및 범위

1. Avermectin 생산 변이주 유도 및 분리

가. 균주개발의 방향성을 고려한 균주 개발의 필요성

- 특정 미생물의 2차대사산물을 산업적으로 과량생산하기 위해서는 생산균주의 생장조건의 인위적 조절에 의해 생산을 자유로이 제어할 수 있는 변이주의 유도가 중요한 관건이 됨.

- 대부분의 2차대사산물은 미생물의 생장에 직접 요구되는 물질은 아니기 때문에 이의 생산은 세포에 의해 적절하게 억제되고 있는데 산업적인 생산을 위해서는 이 물질의 각 생합성 단계별 조절기능 결손 변이주, 즉 생산하고자 하는 2차대사산물을 과량으로 생산하는 변이주를 분리하는 것이 필요함.

- *Streptomyces avermitilis* 에서 생산돠는 avermectin은 전술한 바와 같이 8가지 혼합물 상태로 만들어지고 있으나 그 중에서 구충제로서의 효능과 그 작용범위가 가장 높은 것이 B1a 화합물이기 때문에 변이주를 유도할 때 가능하면 다른 화합물보다는 B1a를 과량으로 생합성할 수 있는 변이주를 유도해 내는 것을 그 목표로 해야함.

나. Bioassay 방법의 개발 및 확립

- Avermectin은 구충제이기 때문에 *S. avermitilis* 에 돌연변이 유발원을 처리하여 이 화합물을 많이 만들어 내는 변이주가 유도되었다 할지라도 이 변이주를 선별해 내기가 쉽지 않은 것이 변이주 분리 과정상의 가장 큰 난점임.

- 일반적으로 구충제의 MIC (minimal inhibitory concentration) 값의 결정에 사용되고 있는 방법은 포유동물 체내에 기생하는 기생충과 같은 분류군에 속하는 원형동물의 일종인 *Caenorhabditis elegans*를 이용하는 방법임.

- *C. elegans* 는 ‘uracil 요구주 대장균’을 먹이로 하여 시험관내에서 손쉽게 사육할 수 있으며 사육된 *C. elegans* 에 구충제를 각종 농도로 처리하여 생존율을 측정할 수 있는 것으로 알려져 있고 이 방법의 실험실적 확립은 avermectin 생산연구를 위해서는 반드시 필요한 과정으로 생각되고 있음.

- *C. elegans* 를 사용하는 방법은 정량적 측정방법의 일종이기 때문에 avermectin 생산 변이주의 일차적인 대량선별 (mass screening) 방법으로 사용하는데는 한계가 있기 때문에 세균 혹은 배양세포 등을 사용한 손쉬운 대량선별 방법의 개발을 모색할 필요성이 제기되고 있음.

다. Avermectin 생합성 관련 유전자들의 cloning 및 이들을 이용한 고생산균주 개발 응용

- Avermectin의 화학 구조의 다양성으로 미루어 이의 생합성에는 많은 유전자들이 관여하는 것으로 밝혀져 있으며 이들 중 avermectin 생합성 단계의 주요한 길목이 되는 효소들을 선택, cloning하여 이들을 조작하는 것이 생합성 조절의 중요한 관건임.

- Avermectin 생합성 유전자들을 대상으로 *Streptomyces*속 세균을 위한 cloning vector들인 pIJ702, pIJ922등을 사용하여 cloning을 수행할 것임.

- 다른 방선균들의 기 발표된 관련 유전자들의 염기서열을 이용한 cloning으로 avermectin 생합성 유전자를 확보하고자 함.

- Avermectin 생합성 단계의 핵심효소 관련 유전자를 이용한 각종 재조합 유전자 기법을 통해 생합성 효율이 획기적으로 개선된 변이주의 유도를 시도함.

2. Bench-scale에서의 avermectin 생산 공정 최적화 및 scale-up 연구

가. 방선균 발효공정 최적화의 필요성

- *Streptomyces*속 세균이 속하는 방선균과 같이 균사를 형성하는 미생물은 그 독특한 morphology와 이차대사의 까다로운 physiology로 인해 생물반응기의 설계 및 발효공정 최적화에 많은 어려움이 있으며, 특히 이차대사산물의 낮은 생산성으로 인해 경제성의 문제점을 제기함.

- 독특한 3차원적인 균사구조로 인해 생산세균의 성장에 따른 발효배양액의 점도 증가 현상은 생물반응기 내의 산소전달 능력을 급격히 감소시켜 생산세균의 physiology에 심각한 변화를 초래함.

- 배양액 내에 glucose와 같이 미생물이 쉽게 이용할 수 있는 carbon-source가 필요 이상의 과량으로 존재할 경우 일차대사에 의한 세포성장은 매우 활발한 반면 avermectin과 같이 원하는 산물을 생산하기 위한 이차대사는 심하게 저해 받는 특성이 있음 (catabolite repression). 따라서 균사형성 미생물 발효 시 배양액 내의 산소제한 현상과 생산세균의 catabolite repression현상으로 인한 이차대사산물의 생산성 저해 요인은 bench-scale 및 scale-up 발효공정에서 해결해야 할 가장 중요한 문제임.

- 이차대사산물을 생산하는 대다수 방선균의 경우 균사모양 세포의 shear sensitivity 현상으로 인해, 배양액 내에 산소전달계수를 증가시킬 목적으로 교반 속도와 통기량을 증가시키는 경우 일반적으로 세포성장속도와 이차대사산물의 생산력이 상당히 저해를 받음. 따라서 배양액 내의 용존 산소를 최적의 조건으로 유지시키기 위한 정밀한 "산소전달 control mechanism" 이 필요함.

- 이와 병행하여 catabolite repression에 의한 이차대사산물의 생산성 저해현상을 최소한으로 줄이기 위해 medium feeding strategy 개발을 통한 생산세균의 "phsiology control mechanism" 이 절대적으로 필요함. 즉 다양한 feeding strategy의 테스트를 통해 공급되는 영양분의 상당부분이 (일차대사로 이용되는 대신) 이차대사로 이용되어 원하는 산물인 avermectin을 최대한으로 생산해낼 수 있는 공정개발이 요구됨.

나. 고생산성 개량 균주의 유전학적 안정성 유지 및 배양 조건 최적화

- 플라스크 배양에서 생산세균의 성장과 관련된 변수 측정.

- 세포성장용 배지 및 산업용 생산배지 개발, 주된 탄소원 및 질소원 규명, 배지 성분 분석방법 확립.

- 배양중의 부산물의 축적, 또는 특정 기질의 과다 공급으로 인한 생산세균의 성장 방해 가능성 및 avermectin 생산성에 미치는 영향 조사.

- 배지 중에 avermectin의 precursor, 또는 inducer를 첨가했을 경우 이들이 생산세균의 avermectin 생산성에 미치는 영향 평가.

- 통계학적으로 가장 효율적인 고생산성 균주 선별 방법 확립 및 고생산성 균주가 revertant로의 back mutation 현상 방지 전략 확립

다. 생물반응기에서의 avermectin 생산성 향상 연구

- 생물반응기에서 교반기의 종류, 회전속도와 직경의 변화가 생산세균의 성장 및 사멸에 미치는 효과와 세포의 morphology 및 생산성에 미치는 영향을 정량적으로 분석.

- 세포 농도 증가로 인한 점도 변화가 배양액에서의 기질 (substrate) (즉 carbon source 또는 산소 등)의 물질전달계수에 미치는 영향 조사.

- 교반 속도가 생물반응기 내의 산소공급에 미치는 효과와 생산세균의 shear에 대한 민감성 및 avermectin 생산성에 미치는 영향 비교 분석.

- 배양 중에 산소전달율 (oxygen transfer rate)과 세포의 산소흡수율 (oxygen uptake rate)의 관계 조사 및 각 세포 농도에서의 critical dissolved oxygen level 조사를 통해 배양액 중의 용존 산소를 정밀 control할 수 있는 mechnism 확립.

- 유가식 배양 중 feeding medium 중의 제한기질 (limiting substrate)의 농도 변화가 세포의 성장속도와 avermectin 생산성에 미치는 효과 조사.

- 용존 산소의 최적제어와 연계하여 배양액 내의 carbon-source 농도의 최적 수준 유지를 위한 medium feeding strategy 및 control mechanism 확립.

3. avermectin 분리 정제 공정 최적화

가. avermectin 분리정제 공정 최적화의 필요성

- avermectin은 방선균의 균사내에 생성물이 축적되는 intracellular product이므로 용매를 이용한

세포의 파쇄 및 추출에 의해서 분리 정제가 가능하고 이로 인해 분리 공정이 훨씬 까다롭고 복잡함.

- 특히 avermectin은 관련된 유도체가 A1a, A2a, A1b, A2b, B1a, B2a, B1b, B2b 의 8 종류가 되고 이 중 약효가 우수한 B1a, B1b 의 avermectins, 그 중에서도 B1a를 분리해내는데 여러 단계의 분리정제 공정이 요구됨.

- avermectin과 같은 동물의약품의 경우 상대적으로 높은 순도가 요구되어 다단계의 분리정제 단위 공정을 거쳐야 하고 이에 따라 분리정제 공정이 차지하는 생산비용은 전체 생산 원가의 절반 이상을 차지하는 것이 보통임. 따라서 다단계 분리정제 공정을 거치는 동안 목적산물의 수율의 감소를 최소화하기 위한 분리공정의 최적화는 전체 공정의 경제성에 직접적인 영향을 미치는 매우 중요한 연구 과제임.

나. 생산세균의 분리 및 이로부터의 avermectin 분리 정제 및 결정화 연구

- 배양액으로 부터 생산세균 분리 연구
  - 원심분리 공정 연구
  - 여과 공정 연구 :

- 세포파쇄 연구
  - 다양한 세포파쇄 방법 연구 (Ultrasonic vibrator, Dyno-Mill, Ball mills, Lipid dissolution by solvent 등)
  - 최적 파쇄 공정 선택

- 생산세균으로 부터 avermectin 추출 연구
  - 최적 추출 용매 선택
  - 용매 추출 시스템에서 avermectin의 상평형 연구
  - bench scale 연속식 향류 다단추출 공정 개발

- Chromatography 공정 개발
  - prep HPLC 공정 연구
  - Sephadex LH-20 chromatography 연구

Polishing (finishing) 공정 개발
  - crystallization 공정 연구
  - 연속식 crystallization 공정 개발

제 4 절. 연차별 연구개발 목표 및 내용

연 도 / 세부과제 및 주요내용	1996년 (1차년도)	1997년 (2차년도)	1998년 (3차년도)	비 고
제 1 과제 : Avermectin 생산 변이주 유도 및 분리				
- Bioassay 방법개발	———			
- 돌연변이원 처리조건 확립	———	———		
- 변이주 유도	———	———	———	
- 변이주 특성결정		———	———	
- Vector 개발	———			
- 생합성 유전자 cloning	———	———	———	
- Cloning된 유전자를 이용한 고생산균주 개발 응용			———	
제 2 과제 : bench-scale에서의 avermectin 발효 공정 최적화, scale-up 및 avermectin 분리 정제 공정 개발				
- 고생산균주 선별 및 플라스크 배양 조건 최적화	———	———	———	
- 반응기의 최적화 적용	———	———		
- 회분식 배양공정 연구		———	———	
- 유가식 배양공정 연구		———	———	
- Scale-up을 위한 기반 연구		———	———	
- 유가식배양에서의 산소 전달 분석			———	
- 필수영양분 제한조건의 유가식 배양연구			———	
- 세포분리, chromatography 공정 개발	———	———		
- 추출공정 연구	———	———		
- 연속식 추출 공정 개발			———	
- Crystallization 공정 개발			———	

제 2 장. 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. Avermectin 생산 변이주 유도 및 분리 (제 1세부과제)

1. 서 론

현재 avermectin 생산의 특허를 갖고 있는 미국 Merck와 Pfizer사에서 American Type Culture Collection(ATCC)에 avermectin 생합성 균주로 등록한 균주들은 생합성율이 낮을 뿐만 아니라 avermectin 유도체들도 A1a, A2a, B1a, B2a, A1b, A2b, B1b, B2b등의 8개 화합물 혼합체로 생산하고 있다. 강하고 광범한 구충효과를 나타내고 있는 것으로 알려진 B1a 을 많이 얻어야하는 공업적 생산에 이들 등록 균주들을 직접 이용하는데는 문제가 있다. 따라서 생합성 비율을 높이는 것을 물론 화합물의 생산 방향성을 고려한 균주 개발의 필요성이 대두되었다. 이를 위해 우선 수행, 해결해야 할 연구과제는 avermectin B1a (이후 avermectin으로 명명)의 손쉬운 bioassay 방법의 개발 및 확립이다. Avermectin은 선충류에 대한 독성을 나타내는 물질이기 때문에 일반적인 항생물질들처럼 bioassay가 쉽지 않다. 그러나 그 구조가 세균에 대해 광범한 항균작용을 나타내는 항생물질인 macrolide 계열 물질들과 유사한 구조이므로 각종 세균들을 대상으로 독성 검출을 시도해 그 가능성을 검증해 보았다. 또한 avermectin이 곤충에 대해서도 독성을 갖기 때문에 배양 곤충세포를 이용, 독성 검출 system으로의 개발 가능성을 타진해 보았다.

한편 균주의 변이체 유도를 위한 방법은 고전적 방법과 분자생물학적 방법을 각각 사용하여 별도로 진행되었다. 고전적 돌연변이체 유도에서는 자외선과 MNNG 같은 돌연변이원에 대한 *S. avermitilis*의 감수성, 즉 처리조건을 우선적으로 확립하고 이어 변이체들을 유도하였다. 유전자 cloning 방법을 적용한 균주 개량은 avermectin 생산관련 유전자들을 cloning하고 이들의 특징을 분석한 후 유전자의 발현율을 높이거나 아니면 단순히 유전자의 copy수를 많게 하는 방법 등으로 생산량을 증가를 시도하였다.

2. 재료 및 방법

가. Avermectin 생산균주

미국 Merck 사와 Pfizer 사에서 개발, ATCC (American Type Culture Collection)에 등록한 *Streptomyces avermitilis* 균주들인 ATCC 31267, ATCC 31271, ATCC31272, ATCC 31780, ATCC 53567, ATCC 53568의 6개 균주를 구매, 수집하여 모균주로 사용하였다.

이들의 배양은 포자의 발아를 위한 배지는 YEME 배지(0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% bacto peptone, 1% glucose)를 사용하였다. 포자의 회수는 YEME 한천배지에서 10일간 배양한 *S. avermitilis* 에서 얻었는데, 우선, 10 ㎖의 멸균 증류수를 넣고 멸균된 접종 loop로 배지의 표면을 문질러 잘 자란 *S. avermitilis*를 현탁시켰다. 이렇게 얻은 현탁액을 멸균된 시험관에 넣고 포자의 균질화를 위해 2 3분간 vortexing을 하고 현탁액을 cotton wool을 넣은 멸균된 주사기로 여과하였다. 여과된 포자 현탁액은 배지 성분을 제거하기 위해 원심 분리하고 멸균 증류수로 2 회 세척하여 사용했다. 포자의 보존은 0.05M TES buffer(pH 8.0)에 재 현탁하여 4℃에서 1주일 정도 보존을 하거나 glycerol를 최종 20%로 맞추고 70℃에서 장기간 보존 시켰다. 액체배양을 위한 배지로 최종 농도 34% sucrose, 1% glucose, 0.5% $MgCl_2$ 를 함유하는 YEME 배지

로 사용하였으며, 액체 배양을 시작하기 전에 0.05M TES buffer(pH 8.0)에 현탁된 포자액을 50℃ 항온수조에서 10분간 온도충격을 가했다. 여기에, 같은 양의 pre-germination medium을 넣고 37℃ shaking water bath에서 2 3 시간 진탕 배양한 후 원심분리하여 pre-germinated 포자를 얻었다. 이것을 YEME 액체 배지에 접종하여 27℃에서 A640 이 0.5가 될 때까지 키워 DNA 분리, 형질전환, 원형질체 융합등에 사용하였다. Avermectin 생산을 위한 production media로 10% PEG를 포함하는 trypticase soy broth를 사용하여 7 일간 배양하였다.

나. Avermectin의 bio-assay를 위한 target 생물

Avermectin에 감수성이 있는 것으로 알려져 있는 *Caenorhabditis elegans*를 이용한 bioassay system의 개발을 위해 이 동물의 사육 방법 및 생장, 생식저해 정도 측정방법의 확립이 우선적으로 요구되었다. 앞서의 언급에서 처럼 *C. elegans* 외에 손쉬운 target 생물의 개발을 목적으로 하여 각종 미생물들과 배양 곤충세포도 target 생물로의 이용가능성이 타진되었다.

막 투과성 변이주들인 *Salmonella typhimurium* TA100, *Salmonella typhimurium* TA98의 두 균주에 대한 감수성 여부를 결정코자 하였으며 이외에 *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* MV1190, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium fertuitum*, *Micrococcus luteus*, *Alkaligenes faecalis*, *Pseudomonas aerugenosa* NCTC10490, *Proteus vulgalis* ATCC6059, *Corynebacterium diptheriae*, *Shigella flexneri* ATCC203, *Seratia spp.*, *Neiseria sicca*, *B. subtilis* BD170 등에 대한 감수성 포함여부도 동시에 실험되었다. *Salmonella typhimurium* TA100, *Salmonella typhimurium* TA98의 두 균주는 잘 알려진 바와 같이 mutagen을 검출하는 Ame's 균주들로서 막 투과성 변이(*rfa*)를 일으켜 물질의 세포내 유입이 비교적 용이하게 일어나는 균주들이다.

바퀴벌레나 horn fly (*Haematobia irritans*) 및 *Musca domestica* 등과 같은 곤충의 유충 및 성충에 대해 avermectin이 치사효과에 근거하여 비교적 취급이 용이한, 배양중인 *Spodoptera frugiperda*(SF-9) ovary cell line에 대한 AVR과 IVR의 효과를 조사하였다.

다. 배양 및 생장저해 검증

원형동물 *C. elegans* 는 'uracil 요구주 대장균'을 먹이로 하여 시험관내에서 손쉽게 사육할 수 있으며 이들에 대한 avermectin과 ivermectin의 생장저해는 처리 1주일이 지난 시점에서 균주 배양 상등액을 처리하고 개체 수 증가에 대한 관찰로 평가되었다.

각종 미생물을 사용한 생장 저해검증은 한천배지 상에서 *S. avermitilis* 배양 상등액을 각 검증 미생물 배양현탁액과 cross streaking하여 18시간 배양 후 생장저해에 의한 clear zone이 나타나는지의 여부를 확인하였다.

라. *S. avermitilis*의 변이주 유도를 위한 돌연변이 유발원의 선별 및 처리조건 확립

돌연변이 유발원에 대한 *S. avermitilis*의 LD99 LD999를 결정하고 그 조건으로 유발원을 처리하여 변이주들을 분리하였다.

1) UV light

Magnesium sulfate 완충액에 현탁시킨 포자를 적당량 멸균된 glass petridish에 담고 U.V lamp(20W) 직하 25cm에서 25초동안 조사하여 L.D. 99%를 얻었다. 이 때 포자 현탁액은 shading

effect를 방지하기 위해 조사되는 동안 rocker위에서 가볍게 진탕시켜 주었다. 방선균은 photoreactivation system이 있는 것으로 알려져 있어 모든 실험은 암소에서 수행하였다.

2) MNNG(N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine, NTG)

Acetone에서 10 mg/ml이 되도록 녹인 MNNG를 최종 농도가 30㎍/㎖이 되도록 포자 현탁액에 처리하여 30℃ shaking water bath(40rpm)에서 1 시간 배양하였다. 배양 직후 phosphate buffer(pH 7.0)에 재 현탁하고 YEME 배지에 도말하여 L.D. 50%를 얻었다.

마. 방선균의 형질전환

포자 현탁액을 glycine이 첨가된 S 배지에 접종하여 27℃에서 36시간 동안 진탕 배양한 후 균체를 회수하였다. 이를 P3 완충액으로 2 회 세척하고 lysozyme이 함유된 P3 완충액에 최종 현탁하여 30℃ 항온수조에서 2 시간 처리하였다. 이것을 cotton wool filter로 여과하여 균사를 제거하고 원심분리 한 후 PWP 완충액으로 2회 세척하여 원형질체를 얻은 다음 여기에 polyethylene glycol (PEG)을 이용하여 유전자적으로 조작된 covalently closed circular DNA를 원형질체내로 집어넣었다. Protoplast의 재생은 PWP 완충액으로 적정배수 희석하여 미리 건조된 R2 재생배지에 도말하였다.

바. 방선균의 원형질체 융합

서로 다른 균주를 세포수의 최종 농도가 2 5×10⁸/㎖에서 1:1이 되도록 혼합한 후 원심 분리하여 PWP 완충액에 현탁시키고 여기에 융합 유도물질인 polyethylene glycol(PEG)를 이용하여 2종 또는 그 이상의 서로 다른 균주간에 인위적인 세포질 융합이 일어나도록 유도하였다. 방선균의 경우 PEG를 매개로 하는 원형질체 융합은 30℃에서 일정시간 방치하여 융합을 유도하고 PWP 완충액을 첨가하여 융합을 중지시킨 후에 R2 재생 배지에 도말하였다.

사. 생산관련 유전자의 cloning

Avermectin의 생합성 관련 유전자의 분리를 목적으로 colony hybridization 방법을 이용하였다. Avermectin 생합성 관련 유전자에 대한 정보는 Genebank를 통해 얻었다. Macrolide 기본골격 생합성경로, side chain 변조과정, glycosylation 과정에 작용하는 유전자를 대상으로 하여 염기서열 관련 정보를 수집하였다.

Colony hybridization은 *S. avermitilis* ATCC 31271의 염색체 DNA와 *E. coli* cloning vector를 다양한 제한효소로 자른 다음 ligation mixture에서 ligation한 다음 *E. coil* MV1190을 숙주로 형질변환을 유도하였다. 해당 selective marker가 들어 있는 한천 배지 상에 도말하고 형성된 colony를 nylon membrane으로 옮겼다. Colony가 옮겨진 nylon membrane을 denaturation sloution, neturalized solution, prehybridization solution, hydridization solution에 순차적으로 반응시켜 probe와 nylon membrane상의 DNA와 공유결합을 유도한다. 합성한 탐침은 biotin으로 표지되어 있어 CSPD를 기질(substrate)로 하여 생합성 관련 유전자를 분리하고자 하였다.

아. PCR product cloning

*Saccharopolyspora erythrea*에서 유래된 primer를 이용하여 PCR product를 얻었다. *S.*

avermitilis KCCM 40226(ATCC 31271)의 Chr. DNA를 대상으로 genomic PCR을 수행하여 얻어진 genomic PCR product는 Promega Co. pGEM T-easy vector의 3'-T overhang에 연결하여 재조합 plasmid를 만들고 *Escherichia coli* MV1190을 숙주로하여 형질전환을 유도하였다. 형질전환은 Cohen et al. 의 방법에 따라 competent cell을 만들어 사용하였다. PCR product가 삽입된 재조합 plasmid를 갖고 있는 형질전환체 선별은 β-galactosidase 활성을 이용한 α-complementation과 ampicillin 저항성을 이용하였다. 이렇게 얻어진 재조합 plasmid는 DNA 염기서열 결정을 위한 주형으로 사용하였다.

자. 염기서열 결정 및 분석

DNA 염기서열 결정은 Sanger의 dideoxy chain termition 방법을 바탕으로 Parmacia Co. ALFTM express autocycle sequencing kit 제품과 pGEM T-easy vector의 M13 forward/Reverse sequencing primer binding site를 이용하여 양방향으로 염기서열을 결정하였다.

DNA 염기서열 분석은 염기서열 분석 프로그램인 DNASIS(Hitachi Software Engineering Co. Ltd)을 사용하여 정리하였고, 염기서열의 상동성 검색을 위해 미국의 NCBI에서 제공하는 Blastn과 Blastx를 이용하였다. 이외에도, Genbank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)와 EBI (http://www.ebi.uk)에 구축된 염기서열 database를 상동성 검색에 이용하였다. ORF(Open Reading Frame) 확인은 DNASIS를 사용하였다.

3. 결과 및 토의

가. Avermectin의 bio-assay 방법 개발

일반적으로 구충제의 MIC (minimal inhibitory concentration) 값의 결정에 사용되고 있는 방법은 포유동물 체내에 기생하는 기생충과 같은 분류 군에 속하는 원형동물의 일종인 *Caenorhabditis elegans*를 이용하는 방법이다. *C. elegans* 는 'uracil 요구주 대장균'을 먹이로 하여 시험관내에서 손쉽게 사육할 수 있으며 사육된 *C. elegans* 에 구충제를 각종 농도로 처리하여 생존율을 측정할 수 있는 것으로 알려져 있고 이 방법의 실험실적 확립은 avermectin 생산연구를 위해서는 반드시 필요한 과정으로 생각되고 있다. *C. elegans* 를 사용하는 방법은 정량적 측정방법의 일종이기 때문에 avermectin 생산 변이주의 일차적인 대량선별 (mass screening) 방법으로 사용하는 데는 한계가 있어서 세균을 사용한 대량선별 방법의 개발도 모색되었다. 구체적인 연구수행 소 과제들은 1) *C. elegans* 배양조건 및 이를 사용한 bio-ssay 방법의 확립 2) Avermectin 감수성 균주의 탐색 3) 돌연변이에 의한 Avermectin 감수성 균주의 유도 및 분리 4) Avermectin 감수성 균주룰 사용한 bio-ssay 방법의 개발 이었다. *C. elegans*를 사용한 bio-ssay system 의 개발은 기정 사실화된, 확실성이 있는 목표였으나 *C. elegans*의 배양과정 등에서 세심한 주의가 요구되는 불편함이 있다. 따라서 부수적으로 배양이 용이한 세균을 사용하여 avermectin의 bio-assay system 개발 시도로서 avermectin 감수성 균주의 탐색을 광범하게 시도하였으나 감수성 균주를 발견하지 못하였다. 결과적으로 원래 목표로 했던 bio-ssay system인 *C. elegans*를 사용한 system을 개발, 확립하였으며 이를 통해 avermectin 생산 변이주의 선별을 수행하였다.

1) Bio-assay 방법의 개발 시도 및 확립

Avermectin을 생산하는 *S. avermitilis* 균주의 선별을 위해서는 avermectin에 감수성을 나타내는 생물인 선충류와 곤충을 bio-assay system으로 사용해야 한다. 그러나 *S. avermitilis* 균주 간의 미세한 생산량 차이를 분별하기 위한 system으로는 이들 생물들은 부적절하다. 배양기간이 짧고 취급이 용이한 생물을 사용한 avermectin 검출 system의 개발을 위한 다각적인 시도가 수행되었다.

가) 세균을 사용한 bio-assay system 개발 시도

Avermectin에 대한 세균의 감수성과 관련된 초기연구 결과는 감수성 세균이 존재하지 않는다는 보고가 있었으나 막 투과성 변이주에 대한 감수성여부는 보고된 바 없었기 때문에 이들 변이주들인 *Salmonella typhimurium* TA100, *Salmonella typhimurium* TA98의 두 균주에 대한 감수성 여부를 결정코자 하였으며 이 실험에는 본 실험실에서 보관하고 있는 균주들인 *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* MV1190, *Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Mycobacterium fertuitum, Micrococcus luteus, Alkaligenes faecalis, Pseudomonas aerugenosa* NCTC10490, *Proteus vulgalis* ATCC6059, *Corynebacterium diptheriae, Shigella flexneri* ATCC203, *Seratia spp., Neiseria sicca, B. subtilis* BD170 등에 대한 감수성 포함여부도 동시에 실험되었다. *Salmonella typhimurium* TA100, *Salmonella typhimurium* TA98의 두 균주는 잘 알려진 바와 같이 mutagen을 검출하는 Ame's 균주들로서 막 투과성 변이(*rfa*)를 일으켜 물질의 세포내 유입이 비교적 용이하게 일어나는 균주들이다. Avermectin이 erythromycin과 같은 macrolide 계열의 화학 물질로서 그 크기가 크기 때문에 막 투과성 변이주들에서의 감수성 여부를 기대하였으나 부정적인 실험 결과를 얻었다.

나) 배양 곤충세포를 사용한 bio-assay system 개발 시도

바퀴벌레나 horn fly (*Haematobia irritans*) 및 *Musca domestica* 등과 같은 곤충의 유충 및 성충에 대해 avermectin이 치사효과가 있다는 보고(Appel *et al*., 1995; Marley *et al*., 1993; Fabre *et al*., 1987)에 근거하여 비교적 취급이 용이한, 배양중인 *Spodoptera frugiperda*(SF-9) ovary cell line에 대한 AVR과 IVR의 효과를 조사하였으나 avermectin과 ivermectin 모두에서 0.01㎎/㎖에서 0.2㎎/㎖의 농도로 1일부터 7일까지 관찰하였으나 독성을 관찰하지 못하였다.

다) *Caenorhapditis elegans*를 사용한 bio-assay system 개발시도

Douch(1994) 와 Graham(1981)의 nematode에 대한 보고에 근거하여 포유동물 체내에 기생하는 기생충과 같은 분류 군으로 통하는 원형동물의 일종인 *Caenorhapditis elegance*를 대상으로 avermectin 과 ivermectin 에 대한 효과를 조사하였다. 이 화학물질은 선충류를 비롯한 각종 내·외부 기생충의 구충에 효과적인데 이것의 작용은 다른 구충제와는 달리 신경세포간 또는 신경세포에서 근육세포로 억제 신경신호를 전달하는 GABA(gamma amino butyric acid)라는 물질의 분비를 자극하고 GABA 수용기에 결합을 항진시켜 신경전달을 마비, 사멸시키는 것으로 알려져 있다. 원형동물에 대한 avermectin 과 ivermectin의 저해는 처리 1주일이 지난 시점에서 50배의 개체 수 증가에 대한 관찰로 평가되는 것이 일반적이다(Table 1.1 과 1.2).

위의 자료를 통해 *C. elegance*를 이용한 bio-assay 가 최선의 방법인 것으로 평가되었으며 운동성과 분열 저해 농도는 각각 2㎍/㎖, 1㎍/㎖으로 결정되었다. 이는 0.0001 0.0002%의 avermectin과 ivermectin 용액의 검출이 가능하기 때문에 균주 배양 상등 액만으로도 효과적인 변이주 선별이 가능하다는 것을 의미한다.

나. 전통적 돌연변이 방법에 의한 avermectin 고생산 균주 개발

1) Streptomyces avermitilis의 변이주 유도를 위한 돌연변이 유발원 처리조건의 확립

Avermectin을 많이 만들어 내는 변이주를 유도하기 위해 UV light와 MNNG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine, NTG)에 대한 *S. avermitilis*의 LD99 LD999를 결정하고, 그로부터 성장과정동안 한천배지나 액체배지 상에서 형태적인 미묘한 차이를 보이거나 갈변화(*S. avermitilis*의 melanin-like 유전자)가 저해, 억제되어 표현형상의 차이를 나타내는 변이주들을 분리하였다. 이렇게 얻은 변이주들을 한천배지상에 옮겨 enrichment 시키고 avermectin 생산력의 차이를 구별하기 위해 각각의 균주를 독립적으로 FC1 배지에서 4일 동안 전배양한 후 이것을 avermectin production media(Table 1.3)로 옮겨 10일간 배양을 하여 avermectin 생산배지에서 10일간 배양 후 균체 만을 얻어 MeOH과 $CHCl_3$을 이용하여 avermectin을 추출을 하고 그로부터 *Caenorhapditis elegance*를 대상으로 한 bio-assay를 통해 avermectin 생산능력을 검색하였다. 선충류를 이용한 bio-assay의 1차 검색결과를 토대로 대조군으로 설정한 야생형에 비해 미묘한 차이를 보이는 균주는 고속 크로마토그라피를 통해 최종적인 avermectin 생산 능력의 변이정도를 확인하였다.

2) 변이주 분리 및 특성 결정

여러 돌연변이 유발원에 대한 *Streptomyces avermitilis*의 독성을 결정하고, 그로부터 성장과정동안 한천배지나 액체배지상에서 형태적 변이를 보이거나 갈변화(*Streptomyces avermitilis*는 melanin-like 인자 소유)가 저해, 억제되어 표현형상의 차이를 나타내는 변이주들을 분리하였다. 이와 같은 방법으로 얻은 변이주들을 한천배지 상에 옮겨 enrichment 시키고, avermectin 생산력의 차이를 구별하기 위해 각각의 균주를 독립적으로 FC1 배지에서 4일 동안 전배양을 하고 이것을 F4.5(탄소원과 질소원, 각각 4, 5%) 배지로 옮겨 9일간 배양을 하였다. Avermectin 생산배지에서 9일간 배양이 끝나면, 균체만을 얻어 MeOH과 $CHCl_3$을 이용하여 avermectin을 추출을 하고, 그로부터 *Caenorhapditis elegance*를 대상으로 한 bioassay를 통해 avermectin 생산능력을 검색하였다. Bioassay는 다음과 같다. *C. elegance*를 S medium(S basal+S Basal, Table 1.4)으로 액체배양하고 추출한 avermectin을 DMSO(dimethyl surfoxide)에 현탁하여 *C. elegance*이 자라고 있는 24-well ELIZA plate에 순차적으로 희석하여 *C. elegance*의 운동성과 분열정도를 확인하였다. 선충류로 분류되는 *C. elegance* 가 MeOH과 $CHCl_3$와 같은 유기용매에 감수성을 보이지만, 1%의 DMSO(dimethyl surfoxide)에는 저해 받지 않는다. 선충류를 이용한 1차 검색결과를 토대로 대조군으로 설정한 야생형에 비해 미묘한 차이를 보이는 균주는 고속 크로마토그라피(High pressure liquid chromatography, HPLC)를 통해 avermectin 생산 능력의 변이정도를 정량적으로 확인하였다.

미국 Merck에서 ATCC에 등록한 *Streptomyces avermitilis* 균주중 ATCC 31271(KCCM 40226)은 ATCC 31267에 자외선을 조사하여 얻은 avermectin 생산 증가 변이주로 ATCC 31267 보다 약 4배 가량의 생산량의 증가를 보이는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 연구에서는 ATCC 31271(KCCM 40226)를 중점적으로 공략하였다. 전통적인 돌연변이 방법으로 avermectin 생산 증가 변이주를 유도시킨 결과, ATCC 31271에 자외선과 MNNG를 단독으로 처리하여 돌연변이를 유도시킨 것에 비해 혼용하여 사용한 경우에 보다 나은 결과를 얻을 수 있었다. ATCC 31271에 MNNG를 처리하여 얻은 변이 균주 #49는 한국종균협회(KCCM)으로부터 구매한 *Streptomyces avermitilis* 균주들이 YEME 배지상에서 36 시간부터 colony 를, 96 시간부터는 포자를 형성하는 것과는 달리 colony를 형성하는데 72 시간이 걸렸다. 액체배양의 경우 10일 배양하는 동안 pellet을 전혀 형성하지 못했으며 긴 막대형으로 자랐다. 건조 균체량은 10 일 배양 후 5.000 rpm 에서

10 분간 원심분리하고 증류수로 2 회 세척하여 105℃에서 항량이 되도록 건조시켜 측정하였는데 ATCC 31267에 비해 25% 정도의 생육을 보였으며 avermectin 생산량 증가를 보였다. ATCC 31267은 성장하는 동안 pigmentation을 하여 갈변화를 보이는데 비하여 #49는 전혀 pigmentation 을 하지 않았다.

생산량 차이의 비교, 분석은 MeOH/CHCl3 추출물에 의한 bioassay 결과를 근거로 하였다. 분석한 균주의 대부분은 미묘한 생산량의 차이(30 75%)를 보이거나 구분이 모호한 경우가 많았으나 *C. elegance*를 대상으로 한 bioassay에서 parent strain(ATCC 31271(KCCM 40226))에 비해 avermectin 생산이 다소 증가된 것들을 확인 할 수 있었다.

3) *Streptomyces avermitilis*로부터 avermectin의 extraction

가) 기계적 방법 과 물리화학적 방법

Avermectin은 intracellular molecule로 mycelium 내에 축적되기 때문에 세포 밖으로 추출해 내야 한다. 일반적으로 homogenizer, Waring blender, sonicator 등을 사용하는 기계적 방법과 유기용매를 사용하는 물리화학적 방법이 주된 세포파쇄법이다. Homogenizer는 산업 현장에서 대규모 처리에 실제로 흔히 사용되고 있으며 실험실 수준에서는 Waring blender, sonicator를 주로 사용한다. 본 연구에서는 최종산물인 avermectin의 회수율을 높이기 위해서 기계적 방법에 Sodium Lauryl sulfate(SDS), Triton X-100, Tween 80과 같은 계면활성제를 혼용해 보았지만 탁월한 효과를 기대 할 수 없었다. 그래서 기계적 방법 과 유기용매 처리를 병행해서 사용해 보았다. 우선 세포 배양액을 원심 분리하여 10배 농축한 후 아래와 같이 기계적 방법으로 세포를 파쇄하고 여기에 유기용매를 처리 하였다.

1.	Bead Beator	→ Solvent treatment	→ Evaporation	→ Concentration
2.	Sonication	→ Solvent treatment	→ Evaporation	→ Concentration
3.	Waring blender	→ Solvent treatment	→ Evaporation	→ Concentration
4.	Solvent treatment	→ Evaporation	→ Concentration	

C. elegance 의 운동성 저해 정도로 각 공정의 수율을 비교, 검색한 결과는 기계적 방법에 의한 전 처리 과정 없이 유기용매를 단독으로 사용 한 경우가 나머지와 차이가 없었다.

나) Methanol/chloroform 추출법

유기용매를 다양하게 사용하여 각각의 수율을 비교해 보았다. 산업적으로 penicillin을 얻을 때 사용하는 ether, acetone, 및 methanol(MeOH) 등으로 처리를 한 다음 *C. elegance*의 저해 정도를 비교해 보았다. 결과는 MeOH에 의한 avermectin의 추출이 탁월한 것으로 밝혀졌다. 그러나, MeOH이 지용성, 수용성 모두에 효과가 있어 polyketide 만을 선택적으로 분리 해 내야 할 필요가 생겼고, CH_3Cl에 의한 partition efficiency를 통해 문제를 해결했다(Pang *et. al.* 1994). 최종적으로 확립된 MeOH/CH_3Cl 추출법은 다음과 같다.

MeOH(50%) extraction → Add equal vol. of CH_3Cl → Only CH_3Cl Layer, harvest → Evaporate to dryness → Concentration

한국종균협회에서 구매, 분주한 *S. avermitilis* 균주중 ATCC 31271은 ATCC 31267에서 유래된 avermectin 고생산 변이주로 약 4 배의 생산량 차이를 보이는 것으로 알려져 있고, 본 연구에서 확립된 MeOH/CH3Cl extraction - bio-ssay system으로도 두 균주간의 생산량의 차이를 비교할 수 있었다.

다. Avermectin 생산관련 유전자의 cloning 및 재조합기술

1) 방선균의 유전자조작방법 확립

앞서 언급한 바처럼 방선균의 형질전환 방법과 원형질체 융합방법이 확립되었다. 돌연변이 유발원을 이용한 전통적인 돌연변이법이 주로 한정된 영역의 변이만을 유발시킬 수 있다는 가능성을 보완하기 위해서 어느 정도 생산량 증가를 보이는 변이주를 원형질체 융합법을 통해 상호 유전자를 교류시켜 보다 우수한 avermectin 고 생산 균주를 얻을 수 있다. 이 방법은 각각의 균주가 갖는 우수한 형질을 하나의 세포 내에서 보다 앞선 새로운 형질로 발현시킬 수 있다는 장점을 갖고 있다. 현재 널리 사용되고 있는 대표적 항생물질인 tetracycline을 생산하는 균주인 *Streptomyces aureofaciens*의 경우에도 균주 개발이 conjugational mating에 의한 유전자 재조합을 이용한 것으로 알려져 있다. 이 원형질체 융합법은 유전자 재조합 빈도가 높고 특별한 mating system이 없는 균주에서도 적용이 가능하기 때문에 산업용 균주의 개량에 적합하다. 또한, *Streptomyces, Streptosporangium, Brevibacterium, Streptococci* 등의 세균에서 연구가 잘 이루어져 있고 지금까지 *Streptomyces griseus*에서 40여종, *Bacillus subtilis*에서 60종 이상의 항생물질이 보고된 것을 감안한다면 유사한 새로운 유도체의 생산을 기대할 수 있다.

2) Vector system 의 확보 및 재조합 전략 수립

방선균의 형질전환은 보편적으로 pIJ series의 plasmid를 사용하고 있다. 그중 pIJ702는 mel 유전자와 tsr(thiostrepton resistance) 유전자를 갖는 5.8kb의 plasmid로서 *Bam*H Ⅰ, *Xho* Ⅰ, *Cla* Ⅰ, *Eco*R Ⅴ, *Pvu* Ⅱ, *Big* Ⅱ, *Sph* Ⅰ, *Kpn* Ⅰ 등의 보편적으로 사용되는 제한 효소 인식 부위를 갖고 있기 때문에 이들 부위를 이용하여 원하는 유전자를 cloning 할 수 있다(Katz *et al.*, 1983).

Melainne 생합성에 관여하는 *mel* 유전자와 *tsr* 유전자를 포함하고 있는 5.8kb의 pIJ702(*S. lividance* KCTC1167) 와 pSPC100(*S. lividance*) cloning vector를 통해 avermectin 생합성 관련 유전자를 cloning 하려고 시도했다. pIJ702에 single site로 존재하는 *Bam*H, *Xho* Ⅰ, *Cla* Ⅰ, *Pvu* Ⅱ, *Big* Ⅱ 제한 효소를 이용하여 ATCC 31271의 chromosomal DNA를 partial digestion을 하고 각각의 제한 효소로 자른 pIJ702와 연결시켜 ligation mixture를 얻었다(Table 1.5).

3) Avermectin 생합성 관련 유전자의 cloning을 위한 숙주의 개발

가) 돌연변이에 의한 avermectin 생산 결여 균주의 분리

Avermectin의 작용기작은 다른 구충제와는 달리 신경세포간 또는 신경세포에서 근육세포로 억제신경 신호를 전달하는 GABA(gamma amino butyric acid)의 분비를 자극하고 GABA 수용기에 결합을 항진시켜 신경 전달의 마비를 초래, 사멸시킨다. 선충류를 포함한 원형동물에 대한 avermectin의 저해능은 처리 1주일이 지난 시점에서 50배의 개체수 증가 여부에 대한 관찰로 최종 평가되는 것이 일반적이다. *Caenorhapditis elegance*(*C. elegance*)를 대상으로 avermectin에 대한 운동성과 증식 저해 농도가 각각 2㎍/㎖, 1㎍/㎖정도의 농도에서 효과가 나타남이 확인된 바 있다. 이는 0.0001 0.0002%의 avermectin 농도만으로도 정량적인 분석이 가능하기 때문에 소량의 배양 추출액만으로도 효과적인 변이주 선별이 가능하다는 것을 의미한다. 이를 기준으로 하여

*S. avermitilis*에 대해 LD99 LD999의 효과를 나타내는 돌연변이 유발원 처리조건을 확립하여 이 조건으로 변이주를 유도하였다.

Avermectin은 intracellular molecule로 균사체내에 축적되기 때문에 세포 밖으로 추출해야 한다. Avermectin 생산배지에서 10일간 배양이 끝나면 균체만을 얻어 전통적 추출용매인 MeOH으로 처리하여 avermectin을 포함한 여러 대사산물을 얻어낸다. MeOH은 수용성/지용성에 대하여 탁월한 추출능을 가지고 있어 지용성인 avermectin 만을 선택적으로 분리하기 위해 CH_3Cl에 의한 partition efficiency를 수행하였다(Pang *et. al.* 1994). MeOH/CH_3Cl은 bio-assay에 이용하는 *C. elegance*에 해를 입히기 때문에 진공증발로 남아있는 MeOH과 CH_3Cl를 휘발시키고 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 최종 현탁시켜 *C. elegance*를 대상으로 bio-assay를 수행하였다.
Avermectin 생산관련 유전자들의 cloning을 위해서는 avermectin 생산이 결여된 숙주를 확보할 필요성이 있다. 돌연변이유발원 처리로 얻어진 변이주를 검색하여 avermectin 생산능력이 저하되거나 결여된 변이주를 분리하고, 이들을 avermectin 생합성 관련 유전자를 cloning하기 위한 숙주로 이용하고자 하였다.

나) Avermectin 생산 결여 균주의 분리 및 특성 결정

ATCC 31271에 MNNG를 처리하여 얻은 변이주들에 대해 *C. elegance*를 대상으로 bio-assay에 의한 생산량의 차이를 검색하던 중 갈변화를 보이지 않으며 생산량이 감소한 변이주 #417을 얻은 바 있다. 변이주 #417는 YEME 성장배지상에서 enrichment 하는 동안 안정된 2가지 균주로 분리할 수 있었으며 각각 #4171과 #4172로 명명하였다. 이들이 안정적으로 avermectin 생산이 완전하게 결여된 변이주인지 아니면 단순히 생산 저해를 받고 있는 가를 알아보기 위해 MeOH/$CHCl_3$ 추출물을 고속 크로마토그라피(High pressure liquid chromatography, HPLC)로 생산량 차이를 비교, 분석하였다. 돌연변이 유발원의 독립적 사용에 의한 변이주의 분리가 어느 정도 이루어진 시점에서 UV Light와 MNNG를 혼용하여 돌연변이 유도를 시도하였다. Kitasato 연구소의 Ikeda group에 의하면, 적어도 3곳에 돌연변이가 일어나야 single component avermectin 생산 균주를 얻을 수 있다고 알려져 있다. 보다 안정된 균주를 만들기 위해 숙주는 avermectin 생산이 증가, 저해된 변이주를 대상으로 수행하였다. ATCC 31271는 *mel*-like 유전자를 가지고 있어 그에 근거한 갈변화의 정도의 차이, parent strain과 비교할 때 YEME 성장배지상의 표현형질에 미묘한 차이가 생긴 균주를 우선적으로 선택하여 다음과 같은 변이주를 분리 할 수 있었다 (Table 1.6).

(1) Complementation

(가) Shuttle vector pWHM3

Avermectin 생산 변이주를 얻기 위해 사용한 S. *avermitilis* ATCC 31271(KCCM 40226)의 염색체 DNA를 Chater *et al.*(1982)의 방법에 따라 얻었다. pWHM3는 대장균과 방선균간의 shuttle vector로 *mel*(melanin), *tsr*(thiostrepton resistance), β-galactosidase(α-complementation), *bla* (β-lactamase) 유전자를 갖는 7.2kb의 plasmid로서 *Bam*H, *Xba* I, *Sma* I, *Eco*R I, *Pst* I, *Hin*d III, *Sst* I, *Kpn* I 따위의 보편적으로 사용되는 제한 효소 인식 부위를 multicloning site로 갖고 있기 때문에 이들 제한 효소 인식 부위를 이용하여 avermectin 생합성 유전자를 다양하게 cloning 할 수 있다. 염색체 DNA와 shuttle vector인 pWHM3를 여러 제한 효소를 이용하여 완전 가수분해 한 다음 ligation을 통해 재조합 plasmid를 만들고 *Escherichia coli* MV1190을 숙주로 하여 형질전환을 유도하였다. 대장균에서는 β-galactosidase 활성을 이용한 α-complementation과 ampicillin으로 재조합 plasmid를 갖고 있는 형질전환체를 선별하였다. 각각의 형질전환체로부터 얻어진 재조합 plasmid는 원형질체를 이용한 형질전환법과 electroporation을 통해 avermectin

생산 결여 균주로 옮겼다. *Bacillus, Staphylococcus*와 같은 gram 양성 세균들은 Ca^{+2}, Mg^{+2} 의 2가 양이온을 이용한 competence 효율이 낮아 형질전환이 쉽지 않기 때문에 Hopwood *et al.*, Mervyn *et al.* 의 방법에 따라 원형질체를 이용한 형질전환을 사용하였으며 다음과 같다. 포자 현탁액을 glycine이 첨가된 S 배지에 접종하여 27℃에서 36시간 동안 진탕 배양한 후 균체를 회수하였다. 이를 P3 완충액으로 2 회 세척하고 lysozyme이 함유된 P3 완충액에 최종 현탁하여 30℃ 항온수조에서 2 시간 처리하였다. 이것을 cotton wool filter로 여과하여 균사를 제거하고 원심분리 한 후 PWP 완충액으로 2회 세척하여 원형질체를 얻은 다음 여기에 polyethylene glycol (PEG)을 이용하여 유전자적으로 조작된 covalently closed circular DNA를 원형질체내로 집어넣는다. Protoplast의 재생은 PWP 완충액으로 적정 배수 희석하여 미리 건조된 R2 재생배지에 도말하였다. 방선균에서의 형질전환체의 구별은 pWHM3에서 부여된 thiostrepton 저항성의 유·무로 결정하였다. 재조합 plasmid를 갖고 있는 형질전환체의 avermectin 생산능력 복구 여부는 FC1/avermectin production media를 이용하여 배양한 다음 avermectin을 추출하여 *C. elegance*를 대상으로 bio-assay를 통해 수행하고 있다.

(나) pIJ702(*S. lividance* KCTC1167)

Melainne 생합성에 관여하는 *mel* 유전자와 thiostrepton resistance(*tsr*) 유전자를 포함하고 있는 5.8kb의 pIJ702 cloning vector를 통해 avermectin 생합성 관련 유전자를 cloning 하려고 시도하였다. pIJ702에 single site로 존재하는 *Bam*H, *Xho* I, *Cla* I, *Pvu* II, *Big* II 제한 효소인식부위를 이용하여 ATCC 31271의 염색체 DNA를 완전 가수분해하고 각각의 제한 효소로 자른 pIJ702와 연결시켜 ligation mixture를 만들어 원형질체를 이용한 형질전환법으로 avermectin 생산 결여 균주에 형질변이를 유도하여 avermectin 생산능력 복구를 확인 중에 있다.

라. Avermectin 생합성 관련 유전자 조작을 통한 생산 변이주의 유도 및 분리

1) 생산관련 유전자의 cloning

가) Hybridization by synthethic short probe

Avermectin의 생합성 관련 유전자의 분리를 목적으로 한 colony hybridization 방법을 이용하기 위한 전제 조건으로는 avermectin 생합성 관련 유전자에 대한 정보의 확보이다. Avermectin 생합성 경로는 크게 세가지로 구분된다. Macrolide 기본골격 생합성경로, side chain 변조과정, glycosylation 과정 등이 그것이다.

S. avermitilis 에서 생산되는 avermectin은 A1a, A2a, B1a, B2a의 4개 주성분과 A1b, A2b, B1b, B2b의 4개 부성분의 8개 화합물의 혼합물로 구성되며 이중에서 가장 강하고 광범한 구충효과를 나타내고 있는 것은 B1a 이다. Avermectin의 8개 아단위(subunit)중 a와 b group의 구분은 avermectin의 C-25 치환분(substituent)이 S(+)-α-methylbutyryl coenzyme A〔S(+)-α-methylbutyryl CoA〕에서 유래된 sec-butyl 잔기인지 isobutyryl-CoA에서 유래된 isopropyl 잔기인지에 의해 결정되며 branched-chain α-keto acid dehydrogenase(BCDH), *bkd*FGH gene cluster(1.4kb)가 여기에 관여하는 것으로 알려져 있다(Pizer, 1995). BCDH는 multienzyme complex로 *Pseudomonas putidia*의 BCDH, *Bacillus subtilis*와 *Bacillus stearothermophilus*에서의 pyruvate dehydrogenase(PDH)/ BCDH dual-purpose complex 와 상당히 연관이 있고, 여기서 사용한 degenerated primer의 일부를 avermectin 생합성 관련 유전자를 얻기 위한 탑침(probe)으로 사용하였다. Hybridization에 이용되는 탐침의 길이는 20 30 bases가 일반적이기는 하지만 우리가 사용한 탐침(25mer, CGAGC/TCGGC/GACG, G/CGCCA/CCTCC)이 non-specific 하게 반

응을 일으켜 길이가 보다 긴 새로운 탐침의 합성이 필요하게 되었다. BCDH는 avermectin back-bone인 polyketide aglycon의 형성이 완성되고 나서 일어나는 변형기작(modification)의 일환으로 avermectin 생합성 관련 유전자 집단에 별개로 존재할 가능성이 있다.

Colony hybridization은 *S. avermitilis* ATCC 31271의 염색체 DNA와 *E. coli* cloning vector를 다양한 제한효소로 자른 다음 ligation mixture에서 ligation한 다음 *E. coil* MV1190을 숙주로 형질변환을 유도하였다. 해당 selective marker가 들어 있는 한천배지 상에 도말하고 형성된 colony를 nylon membrane으로 옮겼다. Colony가 옮겨진 nylon membrane을 denaturation sloution, neturalized solution, prehybridization solution, hydridization solution에 순차적으로 반응시켜 probe와 nylon membrane상의 DNA와 공유결합을 유도한다. 합성한 탐침은 biotin으로 표지되어 있어 CSPD를 기질(substrate)로 하여 생합성 관련 유전자를 분리하고자 하였다.

나) Genomic PCR

다른 한편 방선균에서 생산되고 있는 2차 대사산물들의 기본 골격 생합성 관련 유전자들은 생합성과정에 작용하는 효소들의 순서에 따라 유전자가 집단(gene cluster)으로 배열하고 있는 것으로 알려져 있다. Avermectin 기본골격의 생합성 관여 유전자들도 이런 구조로 배열되어 있기 때문에 이들 유전자의 일부를 cloning으로 얻는다면 그에 인접한 나머지 avermectin 생합성 관련 유전자들도 쉽게 cloning할 수 있다. Macrolide 계열 항생물질인 erythromycin을 생산해 내는 *Saccharopolyspora erythrae*의 macrolidr 기본골격 생합성 유전자들은 fatty acid synthase (FAS) 와 비슷한 활성을 갖는 유전자들로 구성되어 있다. 이들은 을 이루며 이런 module이 6개가 연이어 나타나는 형태로 세포내에 존재하는 것으로 알려져 있다. 이중 acetyltransferase 효소의 알려진 아미노산 서열로부터 염기서열을 추정, 두 개의 oligo(5'- GGG CGA ACT CCT CGG CGA GTC AAG GGT TTT -3'와 5'-GCG CCG CCA TCG ACA CAT TGA TGA CCT GTG -3')를 합성, 이들을 탐침으로 사용하여 잡종분자형성에 의한 cloning을 수행하였다.

Streptomyces avermitilis 에서 생산되고 있는 2차 대사산물로써 avermectin은 macrolide, polyenes, 기타 macrocyclic lactones, macrolactam 항생제를 포함하는 macrocyclic lactone 계열의 polyketide 이다. 일반적으로 macrolide나 polyenes 항생물질은 복잡한 거대분자인 type I PKS(polyketide synthase)에 의하여 분자내의 macrocyclic lactones부분을 합성하게 된다.

가장 잘 알려져 있는 macrolide 계열의 항생물질인 erythromycin은 방선균인 *Saccharopolyspora erythrea*(이전에는 *Streptomyces erythrea*로 불려짐)가 생산하는 14환의 lactone ring(erythronolide)에 desosamone과 cladinose라는 두 개의 당분자가 연결되어 있는 구조이다. 이는 macrolactone ring에 2개의 olendrose당이 붙고 methylation이 일어나 만들어지는 avermectin과 매우 유사하다.

Erythromycin의 생합성에는 적어도 30단계 이상의 효소반응을 요구하며 이중 초기의 13단계는 아마도 거대한 복합효소인 erythronolide synthase(PKS)라는 효소에 의하여 중재되어 1분자의 propionic acid와 6분자의 methylmalonic acid의 축합반응으로 lactone ring을 형성하게 된다. Erythromycin의 생합성 유전자는 이미 cloning 및 유전자 해석이 완료된 상태이며 이로부터 정교한 화학물질의 합성이 유전자에 간직되어 있는 유전정보에 의하여 명확히 지시되고 있음이 알려져 있다. 축합반응에 관여하는 생합성유전자는 acyl carrier protein, acetyltranaferase, dehydratase, enoylreductase, ketoreductase, ketoacyl-ACP synthase, 혹은 thioesterase 유전자가 4개 내지 6개가 조합되어 한 단위체인 module을 구성하고 있으며 이들이 2 4개 반복적으로 나타나는 복잡한 구조를 이루고 있다. Non-specific binding을 해결하기 위한 긴 길이의 probe를 합성하기 위한 시도로 *S. erythrea*의 *ery*A를 구성하는 유전자군의 AT(acyl transferase)를 암호화하는 부위로부터 유래된 일종의 degeneration primer (5'- GGG CGA ACT CCT CGG CGA

GTC AAG GGT TTT -3'와 5'-GCG CCG CCA TCG ACA CAT TGA TGA CCT GTG -3') 를 합성, *S. avermitilis* KCCM 40226(ATCC 31271)의 Chr. DNA를 대상으로 genomic PCR을 수행하여 약 470 bp의 PCR product(Fig. 1.1)를 얻었다 (Donadio, et. al., 1991).

다) PCR product cloning

*Saccharopolyspora erythrea*에서 유래된 primer를 이용하여 얻어진 PCR product가 단일 절편(fragment)이기는 하지만 avermectin과 지방산(fatty acid) 그리고 *Streptomyces avermitilis*에서 생산되는 독성이 강한 물질인 oleic acid는 상당히 유사한 synthase가 각각의 합성에 관여하는 것으로 알려져있어 얻어진 PCR product의 염기서열을 결정 할 필요가 있다. *S. avermitilis* KCCM 40226(ATCC 31271)의 Chr. DNA를 대상으로 genomic PCR을 수행하여 얻어진 genomic PCR product는 Promega Co. pGEM T-easy vector의 3'-T overhang에 연결하여 재조합 plasmid를 만들고 *Escherichia coli* MV1190을 숙주로 하여 형질전환을 유도하였다. 형질전환은 Cohen et al. 의 방법에 따라 competent cell을 만들어 사용하였다. PCR product가 삽입된 재조합 plasmid를 갖고 있는 형질전환체 선별은 β-galactosidase 활성을 이용한 α-complementation 과 ampicillin 저항성을 이용하였다. 이렇게 얻어진 재조합 plasmid는 DNA 염기서열 결정을 위한 주형으로 사용하였다.

라) 염기서열 결정 및 분석

DNA 염기서열 결정은 Sanger의 dideoxy chain termition 방법을 바탕으로 Parmacia Co. ALFTM express autocycle sequencing kit 제품과 pGEM T-easy vector의 M13 forward/Reverse sequencing primer binding site를 이용하여 양방향으로 염기서열을 결정하였다(Fig. 1.2와 Fig. 1.3). 분석된 결과로부터 *Streptomyces erythrea* 의 acyl transferase 와 동일한 유전자임을 확인할 수 있었다(Fig. 1.4).

마) Biotin-labelled Probe synthesis

Avermectin 생합성의 첫 번째 단계는 polyketide synthase가 building block으로 쓰이는 단순한 구조의 카르복시산을 연속적으로 연결하여 탄소사슬을 형성하는 과정이다. Macrolide polyketide synthase는 기다란 ORF안에 여러개의 효소가 암호화되어 있는 module 구조가 연속적으로 늘어서있는 mutifunctional enzyme system으로서 각 module의 구조는 비슷하며 생합성하는 polyketide의 크기에 비례하여 여러 차례 반복되는 것으로 알려져 있다. Avermectin 생합성 관련 유전자도 상당히 높은 유사성의 module이 연속배열로 구성되어있는 것으로 알려져 있어, macrolide polyketide로서 가장 잘 연구된 erythromycin에서 유래된 primer를 이용하여 얻어진 PCR product를 probe로 이용하여 그 주변을 포함하고있는 module을 온전하게 확보하려는 시도를 위해 Library Screening을 수행할 필요성이 있다. 그래서, Library Screening을 하기 위한 probe는 genomic PCR에 이용하였던 Right/Leftward Primer와 Biotin-14-dATP를 사용하여 biotin화된 probe를 만들었다.

바) Cosmid library

S. avermitilis Chr. DNA를 *Bam*HⅠ제한효소로 자른 다음 shuttle cosmid vector pKC505에 ligation하여 *E. coli* 에서 ampicillin과 spiramycin 저항성을 이용하여 biotin화된 probe를 이용하여 colony hybridization을 수행하고 있다. Colony hybridization는 nylon membrane에 replica로 colony를 옮겨 lysis, denaturation, renaturation, prewashing을 거치고, 42℃에서 2 4시간 prehybridization과 biotin화된 probe를 이용하여 20 24시간동안 hybridization 시켰다. 이것을

BM Co.의 biotin luminescent detection kits(CSPD)로 반응 시킨 후, X-ray 필름에 감광시켜 positive signal을 확인하여 probe에 상보적인 flanking region을 확인하고 있다.

2) Cloning된 유전자를 이용한 고생산균주 개발 응용

방선균의 형질전환은 보편적으로 pIJ 계열이나 그 유래의 plasmid를 운반체(vector)로 사용하고 있다. 그중 pWHM3는 대장균과 방선균간의 shuttle vector로 *mel*(melanin), *tsr*(thiostrepton resistance), β-galactosidase(α-complementation), *bla*(β-lactamase) 유전자를 갖는 7.2kb의 plasmid로서 *Bam*H, *Xba*Ⅰ, *Sma*Ⅰ, *Eco*RⅠ, *Pst*Ⅰ, *Hin*dⅢ, *Sst*Ⅰ, *Kpn*Ⅰ 따위의 보편적으로 사용되는 제한 효소 인식 부위를 multicloning site로 갖고 있기 때문에 이들 제한 효소 인식 부위를 이용하여 avermectin 생합성 유전자를 다양하게 cloning 할 수 있다.

Avermectin 생산 증가 변이주를 얻기 위해 사용한 S*treptomyces avermitilis* ATCC 31271(KCCM 40226)의 염색체 DNA를 Chater *et al.*(1982)의 방법에 따라 얻었다. 염색체 DNA와 shuttle vector인 pWHM3를 여러 제한 효소를 이용하여 완전 가수분해 한 다음, ligation을 통해 재조합 plasmid를 만들고 *Escherichia coli* MV1190을 숙주로 하여 형질전환을 유도하였다. 대장균에서는 β-galactosidase 활성을 이용한 α-complementation과 ampicillin으로 재조합 plasmid를 갖고 있는 형질전환체를 선별하였다. 각각의 형질전환체로부터 얻어진 재조합 plasmid는 원형질체를 이용한 형질전환법과 electroduction을 통해 avermectin 생산 결여 균주로 옮겼다. *Bacillus*, *Staphylococcus*와 같은 gram 양성 세균들은 Ca^{+2}, Mg^{+2} 의 2가 양이온을 이용한 competence 효율이 낮아 형질전환이 쉽지 않기 때문에 Hopwood *et al.*, Mervyn *et al.* 의 방법에 따라 원형질체를 이용한 형질전환을 사용하였다. Protoplast의 재생은 PWP 완충액(Table 1.7)으로 적정 배수 희석하여 미리 건조된 R2 재생배지(Table 1.7)에 도말하였다. 방선균에서의 형질전환체의 구별은 pWHM3에서 부여된 thiostrepton 저항성의 유·무로 결정하였다. 재조합 plasmid를 갖고 있는 형질전환체의 avermectin 생산 능력 복구 여부는 FC1, F4.5 배지를 이용하여 배양한 후 avermectin을 MeOH/$CHCl_3$ 추출하여 bioassay를 통해 확인하였다. 분석한 균주의 대부분은 미묘한 생산량의 차이를 보이거나 구분이 모호한 경우가 대부분이었다.

3) 원형질체 융합방법에 의한 변이체 유도를 통한 균주 개발

Streptomycin은 *Streptomyces griseus*에서 합성되는 이차대사산물로 생합성과정이 자세히 밝혀져 있으며 생합성유전자들도 이미 cloning 되어 상당부분의 유전자 기능이 밝혀져 있다. 한 분자의 streptomycin을 생합성하는데는 약 30종 이상의 특별한 효소반응이 필요한 것으로 알려져 있고 *Streptomyces avermitilis*의 2차 대사산물로써 avermectin도 상당히 광범위한 효소반응이 관여 할 것으로 생각되어지고 있다. 이러한 관점에서 볼 때, 돌연변이 유발원을 이용한 전통적인 돌연변이법은 주로 한정된 영역의 변이만을 유발시킬 수 있어 획기적인 생산량 증가를 보이는 변이주를 유도하기 위해서는 기존의 보편적인 방법과 차별화 시킬 수 있는 새로운 것이 필요하다. 따라서, 보다 우수한 avermectin 고 생산균주의 확보를 위한 원형질체 융합법은 기존의 돌연변이법이 갖는 한계를 극복할 수 있다. 원형질체 융합이란 세포질 융합을 유도하고자 하는 서로 다른 균주를 세포수의 최종 농도가 2 5×10⁸/㎖에서 1:1이 되도록 혼합한 후 원심 분리하여 PWP 완충액에 현탁시키고 여기에 융합 유도물질인 polyethylene glycol(PEG)를 이용하여 2종 또는 그 이상의 서로 다른 균주간에 인위적인 세포질 융합이 일어나도록 유도하는 방법이다. 방선균의 경우, PEG를 매개로 하는 원형질체 융합은 30℃에서 일정시간 방치하여 융합을 유도하고 PWP 완충액을 첨가하여 융합을 중지시킨 후에 R2 재생 배지에 도말하였다. 이 방법은 각각의 균주가 갖

는 우수한 형질을 하나의 세포내에서 보다 앞선 새로운 형질로 발현시킬 수 있다는 장점을 갖고 있다. 현재 널리 사용되고 있는 대표적 항생물질인 tetracycline을 생산하는 균주인 *Streptomyces aureofaciens*의 경우에도 균주 개발이 conjugational mating에 의한 유전자 재조합을 이용한 것으로 알려져있다. 이 원형질체 융합법은 유전자 재조합 빈도가 높고 특별한 mating system이 없는 균주에서도 적용이 가능하기 때문에 산업용 균주의 개량에 적합하다. 또한, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Brevibacterium*, *Streptococci* 등의 세균에서 연구가 잘 이루어져 있고 지금까지 *Streptomyces griseus*에서 40여종, *Bacillus subtilis*에서 60종 이상의 항생물질이 보고된 것을 감안한다면 유사한 새로운 유도체의 생산도 기대할 수 있다. 원형질체 융합을통한 유도체의 avermectin 생산 능력 증가 여부는 FC1, F4.5 배지를 이용하여 배양한 후 avermectin을 MeOH/CHCl3 추출하여 bioassay를 통해 확인하였다. 분석한 균주의 대부분은 미묘한 생산량의 차이를 보이거나 구분이 모호한 경우가 대부분이기는 하지만 우수한 균주 유도를 위한 접근 방법이 확률적이기 때문에, 어느 정도의 시간 소모는 필요한 것으로 생각된다.

Table 1.1. Inhibition of *C. elegans* mobility by avermectin and Ivermectin

Time / Conc.	3hrs*	12hrs	18hrs
Control	-	-	-
AVR(4μg/mℓ)	+++	+++	+++
〃 (2μg/mℓ)	+++	+++	+++
〃 (1μg/mℓ)	-	+	+
〃 (0.1μg/mℓ)	-	-	-
〃 (0.01μg/mℓ)	-	-	-
IVR (4μg/mℓ)	+++	+++	+++
〃 (2μg/mℓ)	+++	+++	+++
〃 (1μg/mℓ)	-	+	+
〃 (0.1μg/mℓ)	-	-	-
〃 (0.01μg/mℓ)	-	-	-
0.4% DMSO	-	-	-

* -, no-effect

Table 1.2. Inhibition of *C. elegans* reproduction by avermectin and ivermectin

day / Conc.	1 day	4 day
Control	-	-
AVR(4μg/mℓ)	-	+++
〃 (2μg/mℓ)	-	+++
〃 (1μg/mℓ)	-	+++
〃 (0.1μg/mℓ)	-	-
〃 (0.01μg/mℓ)	-	-
IVR (4μg/mℓ)	-	+++
〃 (2μg/mℓ)	-	+++
〃 (1μg/mℓ)	-	+++
〃 (0.1μg/mℓ)	-	-
〃 (0.01μg/mℓ)	-	-
0.4% DMSO	-	-

* -, no-effect

Table 1.3. Media for *Streptomyces avermitilis*

YEME(g/L)		FC 1(g/L)		Avermectin production media (g/L,pH7.0)	
Yeast extract	3	Glucose	80	Glucose	45
Bacto-pepton	5	Trypton	40	Peptonized milk	24
Malt extract	3	Urea	2	PEG2000	2.5
Glucose	10	$(NH_4)_2SO_4$	0.5	Yest extract	2.5
After autoclaving		KH_2PO_4	0.5		
2.5M $MgCl_2$	2 ml/l	KCl	2		
		$MgSO_4$	0.5		
		$NaNO_3$	3		
		$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1ml/L		
※ Make up to 1 liter					

Table 1.4 . Liquid medium of *C. elegance*

S medium		
S basal		
1M potassium citrate pH6	10 ㎖	
Trace metals solution	10 ㎖	
1M CaCl2	3 ㎖	
1M MgSO4	3 ㎖	
		Total 1 litre
S Basal		
NaCl	0.1 M (f.c)	
potassium phosphate pH6	0.05 M (f.c)	
Cholesterol(5㎎/㎖ in EtOH)	1 ㎖	
		Total 1 litre
Trace Metals Solution		
Disodium EDTA	5 mM (f.c)	
FeSO4	2.5 mM (f.c)	
MnCl2	1 mM (f.c)	
ZnSO4	1 mM (f.c)	
CuSO4	0.1 mM (f.c)	
		Total 1 litre
※ Autoclave and keep in the dark		

Table 1.5. Clong vectors

Vector	Size, kbp	Genetic markersa	Main cloning site(s)
pIJ30	6.3	ampb, tetc, tsrd	*Pvu* II, *Sal* I, *Sst* II
pUC19	2.7	amp, β-gale	*Eco*R I, *Pst* I, *Hin*dIII, *Sal* I
pIJ486	6.2	tsr	*Cla* I, *Pst* I, *Bcl* I
pWHM1	4.1	amp, tsr, β-gal	*Cla* I, *Nco* I
pIJ702	5.8	tsr, melf	*Bgl* III, *Sph* I, *Sst* I
pWHM3	7.2	amp, tsr, β-gal	*Eco*R I, *Bgl* II, *Hin*dIII
pKC505	18.7	aprg	*Bam*H I

a x=Selectable markers.
b Gene encoding a betalactamase.
c Tetracycline resistance.
d Thiostrepton resistance.
e Promoterless gene; α-complementation.
f Gene for formation of a melanin pigment.
g Apramycin resistance.

Table 1.6. Avermectin production-deficient mutant of *Streptomyces avermitilis*

균주의 특성	균 주
Avermectin 생산 결여	#N10, #N101, #N102, #N103, #NU8
Avermectin 생산 저해	#4171, #4172, #4173, #NU6, #NU18, #NU181, #NU182, #NU7, #104, #304, #NU15, #NU151, #NU152, #NU153

※ N, MNNG ; NU, MNNG+VU Light

Table 1.7. Buffers and regeneration medium for Streptomyces protoplst

Component	Medium	Buffer solution	
	R2	P3	PWP
Sucrose	103.00 g	137.00 g	137.00 g
Glucose	10.00 g		
K_2SO_4	0.25 g		
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	10.12 g	1.00 g	2.50 g
Casamino acid	0.1 g		
KH_2PO_4*	0.05 g		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$*	2.95 g	0.75 g	2.95 g
L-proline*	3.00 g		
0.25M TES Buffer(pH7.2)*	100 ㎖	100 ㎖	100 ㎖
Trace element solution**	2 ㎖		
NaCl		4.10 g	4.10 g
Agar	22 g		
Total volume with distilled water	1 ℓ	1 ℓ	1 ℓ

* Sterilized seperately

** Trace Metals Solution

$ZnCl_2$	40 ㎎	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10 ㎎
$FeCl_3 \cdot 6H_2$	200 ㎎	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	10 ㎎
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	10 ㎎	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	10 ㎎
Total 1000 ㎖			
※ Autoclaved and kept in the dark			

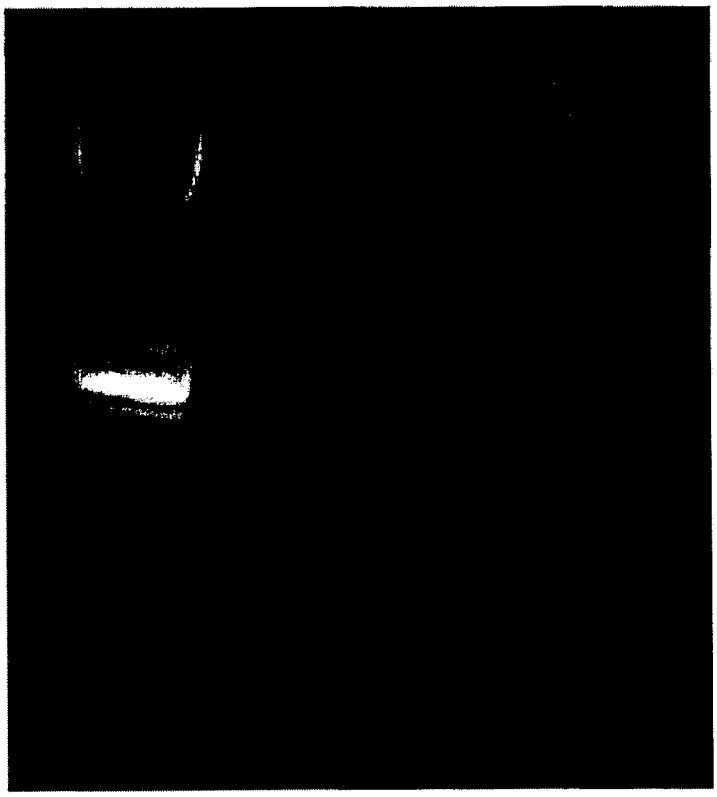


Fig. 1.1. Genomic PCR product

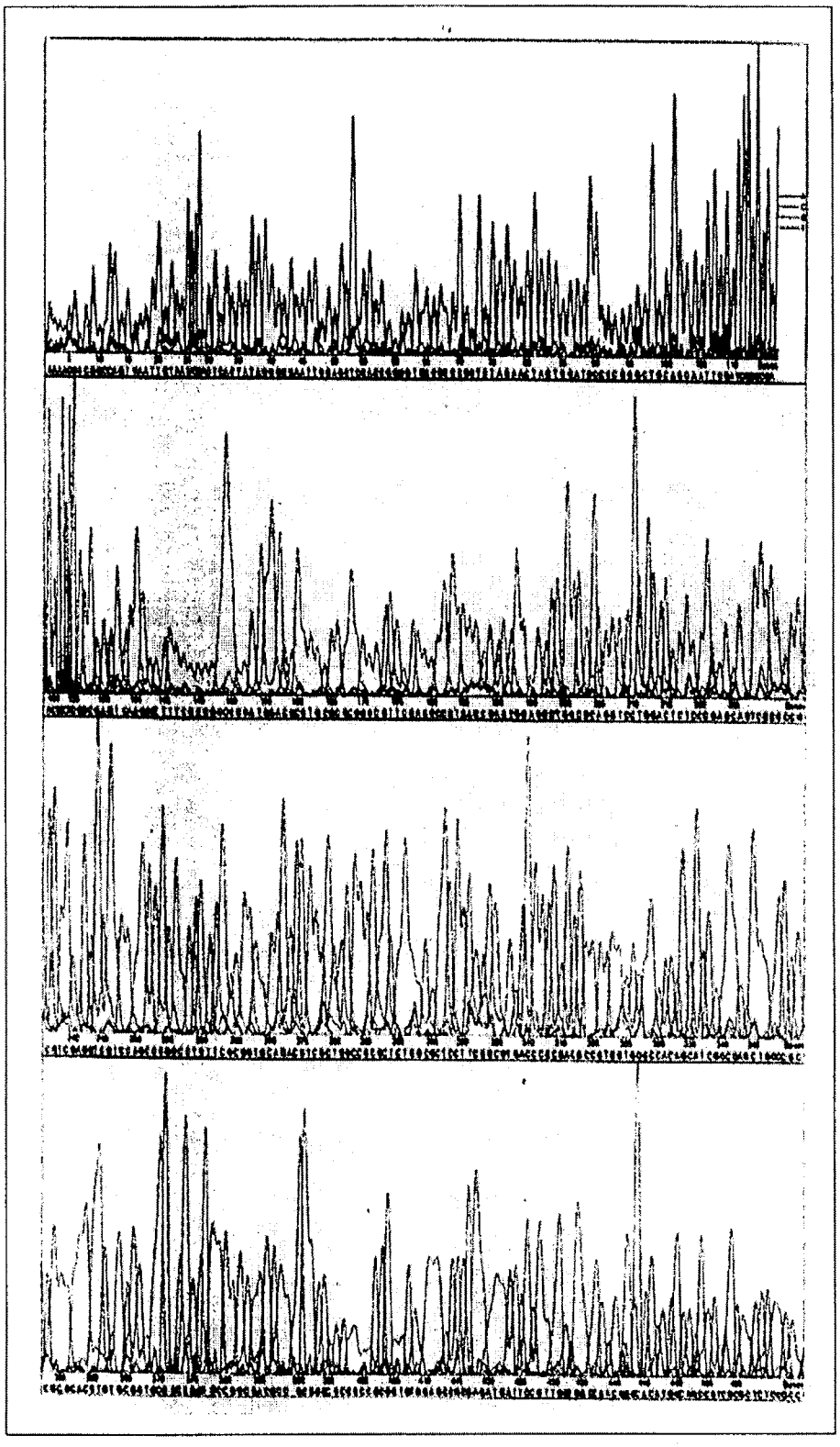


Fig. 1.2. M13 forward primer sequencing

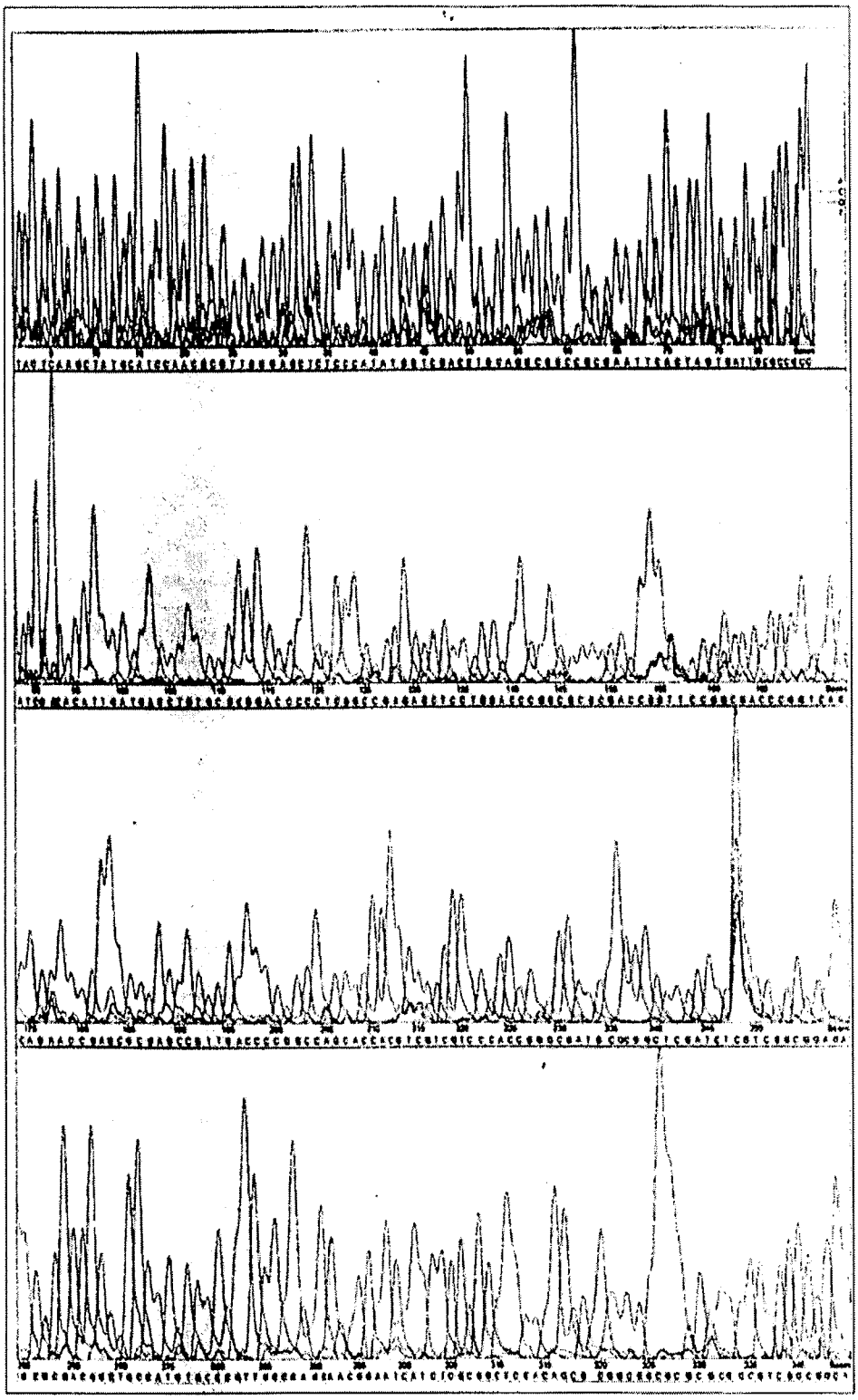


Fig. 1.3. M13 backward primer sequencing

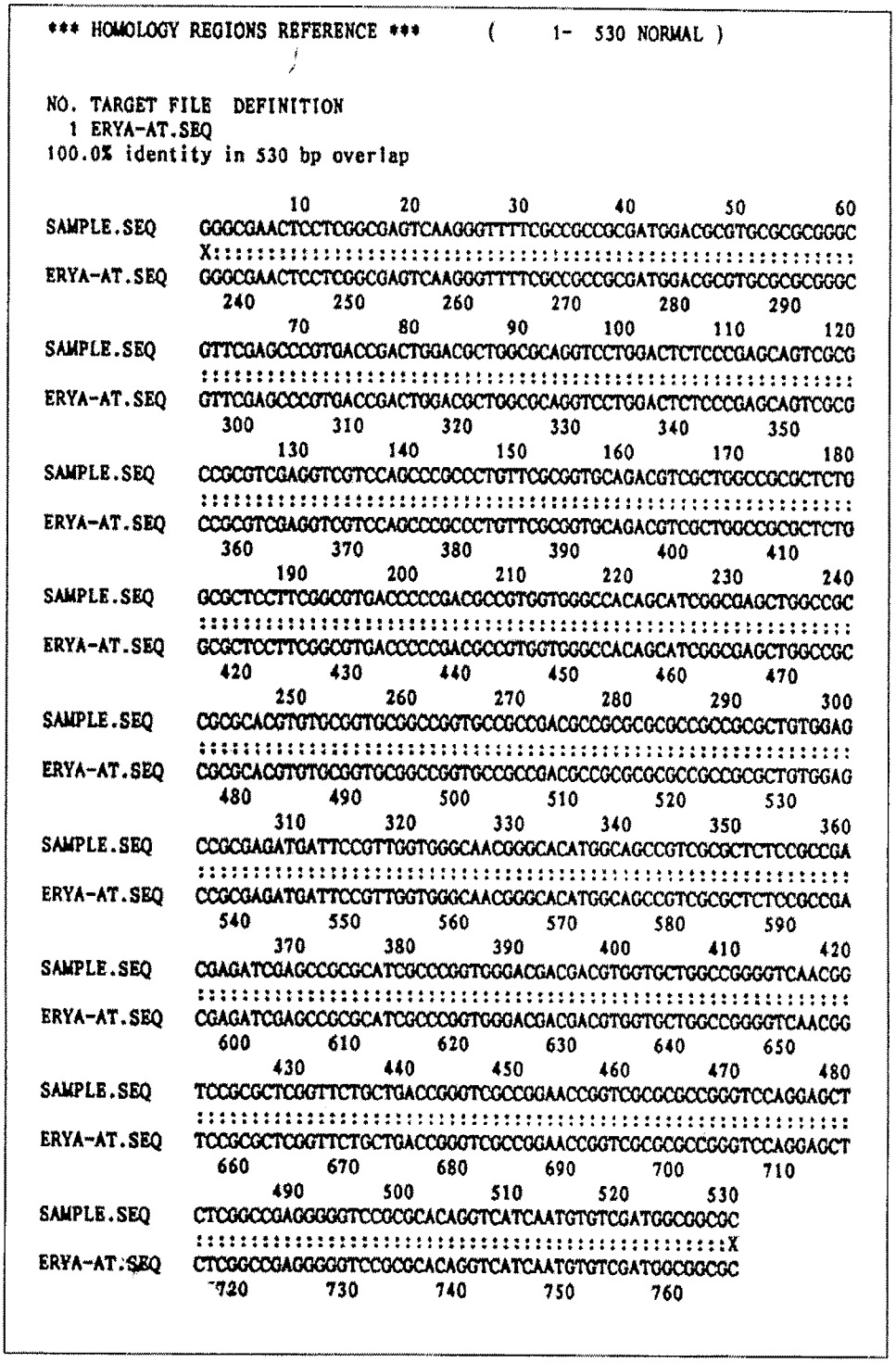


Fig. 1.4. Base sequence homology between acyltransferase gene of eryA and genomic PCR product

제 2 절. Bench-scale에서의 avermectin 발효공정 최적화, scale-up 및 avermectin 분리 정제 공정 개발 (제 2세부과제)

1. 서 론

Avermectin B1a(이후 avermectin) 발효공정 개발을 위해서는 생산균주인 *Streptomyces avermitilis*의 형태학적 또는 생리학적 조절에 따른 이차대사산물의 과량생산 유도 및 이차대사의 특성을 최대한 이용하는 효과적인 생물공정 개발이 이루어져야 한다. 즉 *Streptomyces avermitilis*와 같은 방선균으로부터의 이차대사산물 대량 생산공정 개발은 생산균주의 독특한 형태학적 면과 이차대사의 까다로운 생리학적 특성으로 인해 생물반응기의 설계 및 생물공정 최적화에 큰 어려움이 있다. 또한 이차대사산물의 낮은 생산성으로 인한 경제성의 문제점을 고 생산균주의 개발과 병행하여 발효공적의 최적화를 통해 극복해야 한다.

방선균의 경우, 생산균주의 성장에 따른 발효 배양액의 점도의 급속한 증가 현상은 생물반응기 내의 산소전달 능력을 급격히 감소시킨다. 또한 균사모양으로 인한 shear sensitivity현상으로 인해, 배양액 내에 mixing 효과 및 산소전달속도를 증가시키기 위한 목적으로 교반 속도와 통기량을 증가시키는 경우, 일반적으로 세포성장속도와 이차대사산물의 생산력이 심각하게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 즉 생물반응기에서 교반기의 회전속도와 직경의 변화가 생산균주의 성장 및 사멸에 미치는 효과와 세포의 morphology 및 생산성에 미치는 영향을 정량적으로 분석하여야 한다. 따라서 생물반응기의 운전전략 수립 및 전 생산공정의 경제성을 검토하는 것이 avermectin과 같은 균사형성 미생물 유래의 이차대사산물 생산에서 고려해야 할 필수적인 요소이다.

한편 이차대사산물 생합성의 경우, 세포성장에 쉽게 이용될 수 있는 영양분의 catabolite product에 의해 세포성장에 비교적 큰 영향을 미치지 않는, 또는 비 필수적으로 간주되는 이차대사 관련 효소의 생합성이 억제되는 현상인 catabolite repression 현상이 거의 항상 발견되곤 한다. 즉 Carbon catabolite regulation이 가장 잘 알려진 경우로, cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate(cAMP)가 CRP(cAMP Receptor Protein)와 복합체를 이뤄 operon의 promotor site에 결합함으로써 RNA polymerase에 의한 structural gene의 전사를 자극한다. cAMP의 농도가 이 control mechanism에서 중요한 요소로서, cAMP는 adenylate cyclase에 의해 ATP로부터 생합성된다. 그리고 glucose와 같이 쉽게 이용될 수 있는 carbon source는 adenylate cyclase의 활성을 저하시킴으로써 cAMP의 합성을 방해한다고 알려져 있다. 따라서 배양액 내에 glucose와 같이 미생물이 쉽게 이용할 수 있는 탄소원이 필요 이상의 과량으로 존재할 경우 일차대사에 의한 세포 성장은 매우 활발한 반면 avermectin과 같이 원하는 산물을 생산하기 위한 이차대사는 심하게 저해 받을 것이다. 그러므로 균사형성 미생물 발효 시 배양액 내의 산소제한 현상과 생산세균의 catabolite repression현상으로 인한 이차대사산물의 생산성 저해 요인은 이차대사산물 생산 발효공정에서 반드시 해결해야 할 가장 중요한 문제점이다.

본 연구에서 대량 생산하고자 하는 avermectin은 호기성이며 균사형성 방선균인 *Streptomyces avermitilis*에 의해 세포 내 축적 이차대사산물로 생합성되는 동물구충제이다. avermectin의 높은 시장성을 감안할 때 효과적인 균주개발 기술 (제 1세부과제) 및 분리정제 기술과 유기적으로 연관되어서, 생산균주의 생리학적 특성을 최대한으로 이용하는 효과적인 avermectin 생산 공정이 개발되어야 한다. 이와 관련하여 avermectin의 대량생산을 위한 생물반응기 운전기술 개발(bench-scale에서의 avermectin 발효공정 최적화 및 scale-up 연구)에 대한 다음 분야의 연구가 중점적으로 수행되어야 한다:

- 발효조 내의 물리학적, 화학적 및 생화학적인 배양 환경의 최적화;
- 발효조에서의 대규모 배양을 위한 효율적인 산소공급 전략 개발;
- 발효조에서의 효율적인 산소공급을 위한 산소전달계수 (*kLa*) 분석;
- 회분식배양 기술의 문제점 분석을 통한 유가식배양 기술 개발;
- 배양 공정의 scale-up 전략 개발.

한편 *Streptomyces avermitilis*를 이용하여 동물 구충제 avermectin을 생산하는 공정을 산업화하기 위해서는 우수 세포주 선정 및 발효공정 개발도 중요하지만 대량 분리 정제 공정의 개발도 중요하다. 그 이유는 발효공정에서 생산되는 산물은 여러 가지 미 반응 기질, 부산물, 불용성 물질들이 포함되어 있어 불순물에 의한 부작용, 역가 저하 등이 문제가 되기 때문에 효율적인 분리 정제 공정에 의해 일정한 함량 및 순도를 지닌 정제 품을 개발해야 상품화될 수 있기 때문이다. 대부분의 생물산업제품의 경우 배양액의 성분조성은 대단히 복잡함에도 불구하고 상대적으로 높은 순도가 요구될 뿐만 아니라 분리대상 물질들이 대부분 열이나 화학적 변화에 민감하여 사용가능한 단위공정도 제한을 받는 등 어려움이 있어서 여러 단계의 분리정제 단위공정을 거쳐야하고, 이에 따라 분리정제 공정이 차지하고 있는 생산비용은 발효공정을 포함한 전체공정의 절반 이상을 차지하고 있다. 게다가 발효생물제품이 분리정제 공정을 거치는 동안 손실되어 수율이 저하되기 때문에 분리공정의 최적화는 전체 공정의 경제성을 향상시킬 수 있는 절실한 과제이다. 특히 avermectin의 경우 세포 내에 생성물이 축적되는 intracellular product이기 때문에 훨씬 더 복잡한 분리공정이 요구되며 또한 관련 유도체가 8 가지나 되기 때문에 이중에서 약효가 우수한 B1a를 분리하는데 여러 단계의 분리단계가 요구된다. 따라서 avermectin 분리공정 설계 및 분리공정의 최적화 여부가 상품의 경제성을 결정하게 되고, 이에 따라 효율적이고 경제적인 분리정제공정의 개발도 배양 공정의 개발과 병행하여 수행될 필요가 있다. 한편 분리정제된 avermectin을 소비자가 원하는 형태로 가공하기 위해서는 crystallization이 반드시 필요하기 때문에 효율적인 결정화공정의 개발도 분리정제 공정의 개발과 함께 요구된다.

2. 재료 및 방법

가. 균주 보관 및 inoculum 준비

생산균체인 *S. avermilitis*를 solid (SSM)배지(agar 20g/L)에 접종한 후 28oC 에서 5일간 배양한 solid culture를 -80oC 냉동실에 보관한 후 이를 stock culure로 이용하였으며 필요시마다 liquid stock culture (하기에 기술)를 만들기 위한 inoculum으로 사용하였다. 또한 (FC-1)배지에서 3일간 배양한 후 균주배양액 대 glycerol용액의 부피비가 7:3으로 조성된 liquid stock culture (30ml vial에 10ml 씩 보관)를 만들어 -20oC 냉동실에 보관한 후, 매 실험 때마다 이 liquid stock을 세포성장배지(GM)에서 seed culture하기 위한 inoculum으로 이용하였다(다양하게 조사된 GM의 성분은 연구 수행 내용에 기술). 그러나 이 경우에 균주의 avermectin 생산성이 매우 불안정한 것으로 판명되어 실험 중반부터 *S. avermilitis* 의 spore를 inoculum으로 이용해서 생산성에 있어서 재현 가능한 glycerol stock을 준비할 수 있었다 (연구수행 내용에 기술하였음). 이를 위해 본 연구실에서 개발된 *S. avermilitis*의 solid sporulation medium (연구수행 내용 참조)으로부터 대량의 spore를 얻고자, 멸균된 환경에서 Whatmann #1 filter를 이용한 "spore 회수공정"을 확립한 후, glycerol stock으로 준비된 1x106 spores/ml 를 seed culture를 위한 inoculum으로 접종하였다.

발효를 위한 seed의 준비는 성장배지인 100ml의 GM 배지(500ml Erlenmeyer flask 사용)에 glycerol stock을 10ml 취하여 접종한 후 200rpm, 28oC에서 5일간 배양하여 지수기 성장 단계에 있는 활성 높은 1%-10% (v/v)의 seed culture를 다양한 성분의 생산배지(PM)에 접종하였다 (PM의 성분은 연구 수행 내용에 각 경우마다 기술). 각 단계마다 오염여부의 확인을 위하여 현미경을 통한 관찰을 병행하였다.

나. 균주 보관용 배지 성분

사용한 균주 보관용 배지의 종류는 다음과 같다. 배지의 열에 의한 멸균 시에는 침전과 갈변현상의 방지를 위해, sugar와 무기염류는 농축용액으로 만들어 각각 따로 멸균한 후에 멸균상태에서 나머지 media용액과 혼합하여 사용하였다.

- Semi Synthetic Medium (SSM) 조성:

glucose 80g/l; tryptone 40g/l; urea 2g/l; NaNO3 3g/l; KH2PO4, 2g/l; KCl, 0.5g/l; MgSO4 0.5g/l; FeSO4.7H2O solution (10g/l) 1ml/L.

- FC 1 배지 조성

성 분	농 도 (g/L)	성 분	농 도 (g/L)
Trypton	40	Urea	2
(NH4)2SO4	10	NaNO3	3
KH2PO4	2	KCl	0.5
MgSO4	0.5	FeSO4·7H2O	0.2 mL
Glucose	80		

다. 실험 장치 및 배양 방법

발효조에서의 배양은 산소전달, shear stress등의 조업조건이 플라스크 배양과는 매우 다르므로 각 배지의 최적조성비에도 차이가 있기 마련이나, 기본적으로는 플라스크 배양에서 얻은 결과를 토대로 여러 조업조건 및 feeding조건에서 발효조를 운영하였다.

발효조로는 2.5 liter 부피의 한국발효기(주) 제품을 사용하였고 조업부피는 2 liter로 하였으며, 온도는 28oC, 교반속도는 150-500rpm, 공기유량은 1.0-2.0vvm에서 운영하였다. 교반속도와 통기량의 자동조절을 통해 배양액 내의 용존산소량을 적정 수준으로 조절함으로써, 교반시 발생하는 shear stress로 인한 생산균주의 inactivation현상을 최소화하는 생물반응기 운전 전략을 확립하였다. 배양 중의 pH는 4N의 NaOH와 H2SO4를 이용하여 조절하였다. 기포제거액의 경우 배양액의 포화 용존산소량을 감소시켜 결과적으로 배양액 내로의 산소전달계수 (oxygen transfer rate coefficient, *kLa*)에 악 영향을 미치므로 기포제거 조절기에 의해 투입되는 기포제거액을 가능한 한 최소화하였다. 각종 기포제거액이 산소전달계수와 세포성장에 미치는 영향을 조사한 결과 Union Carbide Products 사에서 제조한 antifoam인 SAG-471이 가장 훌륭한 기포제거제로 판명되었다. 발효조 배양을 위한 avermectin 생산배지로 플라스크 배양에서 조사한 다양한 종류의 생산배지 성분을 이용하였으며, 매 실험마다 inoculum으로서 5일이 경과하여 지수기 성장단계에 있는 활성 높은 seed를 1-10 % (v/v)의 부피로 발효조에 접종하였다. 각각의 발효조 배양 실험

에 대한 특별한 조건은 매 실험 결과마다 상세하게 기록해 놓았다.

라. 분석 실험

1) 세포농도 측정

균체농도는 Dry Cell Weight (DCW)를 이용하여 측정하였다. 균일한 sample을 얻기 위하여 homogenizer에서 균질화 과정을 거친 10ml의 발효액을 원심 분리하여 상등액을 버린 후 증류수를 넣어 vortex 혼합을 하고 다시 원심 분리하는 세척과정을 세 번 거쳤다. 90℃에서 24시간 동안 건조한 후 질량을 측정하였다.

2) 배양액중의 잔류 carbohydrate 측정

배양액 중에 남아있는 탄소원은 HPLC 방법을 이용하여 측정하였다. HPLC 운전조건은 다음과 같으며 HPLC chromatogram과 standard curve는 Fig. 2.1 및 Fig. 2.2에 나타내었다.

- Column: Supercosil LC-NH2 column (4.6 x 250mm) (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA)
- Precolumn: mBondapak precolumn for C18 (4.6 x 20mm)
- Mobile phase: Acetonitrile:Water = 750:250
- Detector & Conditions = Waters R401 refractive index (RI) detector, Attenuator = 16X
- Pump & Flow rate: Waters 501 (Millipore, Milord, MA, USA), 2 ml/min constant flow
- Data analysis: Waters 746 Data Module (Millipore, Milord, MA, USA)
- Injection valve: Waters U6K valve (Millipore, Milord, MA, USA)
- Column temperature: 20℃ by temperature controller
- Sample loop size: 10ml

3) avermectin 추출 및 HPLC에 의한 분석

Sample로 취한 10ml의 *S. avermitilis* 배양액을 동량의 methanol를 이용하여 12시간 동안 200 rpm의 shaker에서 추출한 후 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 avermectin을 포함하고 있는 상등 용액 1 ml를 취했다. HPLC의 전처리과정으로 이 용액을 0.2 ㎛의 microfilter에 통과시킨 다음 HPLC를 이용하여 avermectin의 농도를 정량 분석하였다. HPLC 운전조건은 다음과 같으며, HPLC chromatogram과 standard curve를 Fig. 2.3 및 Fig. 2.4에 나타내었다.

- Column: Waters Bondapak C18 reverse phase column (3.9 x 300mm) (Millipore, Milord, MA, USA)
- Precolumn: Bondapak precolumn for C18 (4.6 x 20mm)
- Mobile phase: methanol:water = 850:150
- Detector & Conditions = UV-VIS detector, Waters 486 (Millipore, Milord, MA, USA), 246nm, AT 0.02
- Pump & Flow rate: Waters 501 (Millipore, Milord, MA, USA), 1.2 ml/min constant flow
- Data analysis: Waters 746 Data Module (Millipore, Milord, MA, USA)
- Injection valve: Waters U6K valve (Millipore, Milord, MA, USA)
- Column temperature: 40℃ by temperature controller
- Sample loop size: 20 microliter

4) 배양액 내의 용존산소 측정 및 각종 impeller에 의한 산소전달계수(kLa) 측정

교반속도의 자동 조절을 통해 배양액 내의 용존산소량을 적정 수준(즉 specific oxygen uptake rate가 용존산소 농도에 의해 영향을 받지 않는 critical dissolved oxygen level인 C_{cr} 근처에 용존산소량을 유지)으로 유지시키기 위해서는 배양액 내의 용존산소량을 정확히 측정하여야 한다. 실험 결과 *Streptomyces*와 같은 균사형성 미생물의 경우 세포가 성장함에 따라 용존산소 전극(D.O. probe)의 fouling 현상 (세포의 부착성 때문에 전극의 membrane에 생산균주가 고정화되는 현상)으로 인해 전극의 민감도가 심각하게 저해받는 것으로 나타났다. 이를 해결하기 위해 전극 바로 밑에 turbulence를 인위적으로 일으키기 위한 turbine impeller를 설치하여 세포가 전극에 부착하지 못하도록 반응기를 운전함으로써 배양액 내의 용존산소를 정밀하게 측정할 수 있었다. 이는 정확한 용존산소 측정을 위해 D.O. 전극의 위치가 매우 중요함을 제시하며, 그 결과 교반속도와 통기속도에 의한 산소전달 특성 분석에 대한 실험이 효과적으로 수행될 수 있었다.

배양 중의 배지 내에 녹아 있는 용존산소 농도에 대한 기준 값은 다음의 방법에 의해 결정되었다: 배지를 멸균 후 seed를 발효조에 접종하기 전에 질소 가스를 1vvm의 속도(이때 교반속도는 150 rpm임)로 공급함으로써 polarographic 용존산소 전극에 의해 측정된 용존산소 농도가 최하점에 도달된 후 더 이상의 변화가 없는 점을 용존산소 농도가 0 %인 점으로 정하였다. 그 다음 질소공급을 중단하고 1vvm의 속도(이 때 교반속도는 200 rpm임)로 약 1시간 동안 공급함으로써 용존산소 전극에 의해 측정된 용존산소 농도가 최고점에 도달한 후 더 이상의 변화가 없는 점을 용존산소 농도가 100%인 점(포화 용존산소 농도)으로 정하였다.

한편 임펠러의 산소전달에 대한 효율을 비교하기 위하여 Rushton turbine, Scaba, Pitched blade, Intermig impeller를 사용하여 발효하면서 kLa를 측정하였다. 사용된 임펠러의 특성을 하기 표에 나타내었다.

Characteristics of impellers used for determination of oxygen mass transfer rate (kLa)

Impeller	Flow	Impeller diameter/ tank diameter ratio (D/T)	Blade height/ impeller diameter ratio (W/D)	No. blades (n)	Angle of blades (α[°])
Rushton turbine	Radial	0.59	0.22	6	90
Scaba	Radial	0.61	0.22	4	90
Pitched blade	Axial	0.58	0.23a	3	45
Intermig	Counter	0.56	-	2×2(2)	2×24(27)

aprojected blade height/impeller diameter ratio.

또한 배양액 내로의 산소전달계수(kLa)의 측정은 100 650 rpm 사이의 교반조건과 0.5 3.0 vvm 사이의 통기조건에서 측정하여 비교하였고, 임펠러 비교를 위한 kLa 측정은 300과 500 rpm, 1 vvm의 조건에서 수행하였다. 교반조건과 통기조건에 대한 kLa 조사에서는 dynamic method를 이용하였고, 임펠러 비교를 위한 조사에서는 dynamic method와 direct method를 동시에 사용하였

다. Dynamic method에서 *kLa*가 측정되는 동안 발효기의 용존산소는 발효기의 레코더와 연결된 Multi-Lab Card(PCL-812PG)를 통해서 컴퓨터와 연결되어, 소프트웨어(LAPTECH pro)에 의해 저장되었다가, origin 프로그램(Microcal Softwave Inc.)에 의해서 *kLa*를 계산하였다. 용존산소농도는 O2 sensor(METTLER TOLEDO, 12/220 T-Type)를 이용하여 측정하였다. Direct method에서 기체 산소농도를 측정하기 위해서 가스분석기 (Analytical Development CO. LTD, 5000 series)를 사용하였다. 또한 압력 게이지와 유량계를 통해서 inlet과 outlet에서의 공기 압력과 유량을 *kLa*측정 시 같이 측정하였다. 이에 대한 자세한 내용은 "결과 및 토의" 항에서 다시 다루었다.

마. 분리정제 실험

1) 세포배양 및 avermectin 분석

세포 및 세포배양법은 개발된 고생산성 균주와 배양액 조성을 계속하여 새롭게 적용하여 분리정제 실험을 위한 세포를 대량 배양하여 얻었다. 세포와 배양액에 관한 사항은 위에서 설명한 연구 방법을 참조하면 되므로 여기서는 생략한다. 세포의 대량 배양을 위해서는 진탕 플라스크 안에서 shaker를 이용하여 진탕 배양하거나 한국발효기의 2.5 liter fermentor를 이용하여 대량 배양하여 acetone 또는 methnol로 1차 추출한 후 농축하여 사용하였다. 한편 avermectin의 분석을 위한 조건을 확립하였으며 분리정제의 연구를 위한 모든 분석은 위에서 언급한 avermectin의 분석조건에 따라 수행하였다.

2) 원심분리 공정

원심분리기의 용량과 운전조건의 기본이 되는 settling velocity를 lab-scale의 centrifuge test를 통해 추정하였다. 실험실 규모의 tubular bowl centrifuge를 사용하여 flask에서 배양한 배양산물을 5000rpm으로 원심 분리하면서 시간에 따라 supernatant를 sampling하여 absorption의 변화를 spectrophotometer 600 nm 에서 측정하였다. Supernatant의 흡수도가 더 이상 변화하지 않는 시간을 settling time으로 하여 사용한 cemtriguge의 geometry를 이용하여 avermectin 생산균주의 settling velocity를 구하였다.

3) 여과공정

Lab scale의 filter test를 통하여 scale up에 필요한 여러 가지 parameter, 즉 avermectin 생산균주 cake의 specific cake resistance 값, compressibility 등을 추정하여 향후 rotary drum filter 등의 scale-up 된 filter의 설계에 대비하였다. 이를 위하여 lab scale 의 filter (Area = 2.2685 cm2)를 이용하여 30 mmHg, 40 mmHg, 50 mmHg, 60 mmHg 의 진공으로 fermenration broth로부터 avermectin 생산균주를 여과하였다. 이때 filter funnel을 꼭지 달린 삼각 flask로 연결하고 aspirator를 이용하여 진공을 유지하였고 진공도는 bypass valve를 이용하여 조절하였다. 여과 시 시간에 따른 여과된 배양액의 부피를 측정한 후 Ruth plot에 의하여 각 진공도에 따른 specific cake resistance의 값을 구하였고 이로부터 compressibility를 구하였다. Ruth plot으로부터 specific cake resistance를 추정하기 위해 Ostwald 점도계로 점도를 추정하였고 fermentation broth의 밀도도 측정하였다.

4) 세포파쇄 공정 및 1차 추출

Avermectin은 intracellular product이므로 일단은 세포파쇄공정을 통하여 세포내의 avermectin을 세포 밖으로 유출 시켜야 한다. Avermectin 생산균주의 효율적인 세포파쇄공정을 선정하기 위

해 Waring blender, homogenizer, 초음파 파쇄기 등의 산업체에서 주로 이용하는 기계적 방법에 대한 공정과 solvent 처리에 의한 화학적 공정(1차 추출)을 시험하였다. Fermentation broth를 원심 분리한 후 cell mass와 buffer 혹은 solvent의 부피비율을 1:1로 조절한 후 위에서 언급한 기계적 방법이나 methanol, aceton의 solvent에 의해 처리한다. 이때 처리시간별로 buffer 혹은 solvent에 유출된 avermectin을 HPLC에 의하여 분석함으로써 각 방법에 따른 파쇄효율을 비교하였다.

5) 2차 추출공정개발

Partition coefficient와 selectivity의 관점에서 avermectin 추출에 적절한 용매를 선정하고 추출공정 설계에 필요한 parameter 들을 도출하기 위해 여러 solvent에 의한 acetone-water phase와 methanol-water phase의 추출효능을 비교하였다. 이를 위해 먼저 methanol과 acetone에 avermectin을 녹이고 solvent와 two phase를 형성할 수 있게 물을 5:3 비율로 첨가하여 acetone-water, methanol-water aqueous phase를 만들고 toluene, hexane, 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.

6) 3차 추출공정 개발

실제 배양액을 chloroform 또는 dichloromethane(methylene chloride)으로 2차 추출을 하여도 많은 불순물의 peak가 계속 잔존함이 발견되어 3차 추출이 필요하게 되었다. 이러한 3차 추출을 위한 partition coefficient와 selectivity의 관점에서 본 최적의 aqueous phase와 용매의 조합을 선정하고 3차 추출공정 설계에 필요한 parameter들을 도출하였다. 3차 추출을 위해 대량 생산한 acetone 추출물(aqueous phase)을 먼저 2차 추출 용매인 chloroform으로 대량 추출하여 모든 추출실험에 사용함으로써 시료의 균일화를 유지하였다. 이때 분리정제의 실험을 명확한 기준아래에서 수행하기 위해 chloroform추출물에 avermectin standard를 첨가하여 일정한 avermectin 농도(200 mg/l)의 시료를 분리정제를 위한 starting material로 사용하였다. Chloroform추출물을 gas blower concentrator로 휘발시키면서 여러 가지 aqueous phase와 용매교환을 하였다. Aqueous phase를 위해 methanol과 ethylene glycol 5:1의 비율, 2:5의 비율로 구성된 methanol-ethylene glycol aqueous phase, 그리고 methanol 과 water 5:3의 aqueous phase도 만들었다. 이렇게 조제된 aqueous phase를 가지고 여러 가지 용매(toluene, hexane, heptane, methylene chloride, chloroform, n-butylacetate)로 위의 2차 추출공정에서 설명한 방법대로 추출한 후 solvent 상에서의 농도를 측정하여 percentage of extraction, selectivity, purity등 추출효능을 비교하였다. 또한 이를 바탕으로 추출을 위한 최적 aqueous system과 최적 solvent system을 확립하였을 뿐만 아니라 partition coefficient 등 추출공정 설계에 필요한 parameter 들을 도출하였다. 이때 aqueous phase와 solvent phase와의 volume 비율은 methanol-glycol 2:5 aqueous phase 의 경우는 1:1이고 그 외의 경우는 aqueous phase 2 : solvent phase 1의 비율을 사용하였다.

7) Preparative HPLC를 이용한 avermectin 분리정제

청정공정인 Preparative HPLC를 이용한 avermectin의 분리정제를 시도하여 대량정제에의 이

용 가능성을 타진해 보았다. 3차 추출 공정과 마찬가지로 대량 배양한 세포를 acetone으로 대량 추출한 후, 분리정제 실험을 명확한 기준아래에서 수행하기 위해 acetone 추출물에 avermectin standard를 첨가하여 일정한 avermectin 농도 (1000 mg/l)의 시료를 만들어 분리정제를 위한 starting material로 사용하였다. 또한 실제 고생산 균주를 이용한 세포 추출물로부터의 분리정제를 위하여 실제 고농도 세포로부터 methanol을 이용하여 avermectin을 1차 추출한 후 methanol 추출물로부터의 sample volume 10 ml을 Preparative HPLC에 주입하여 분리하였다. Preparative HPLC는 Water 사의 LC 4000 model을 사용하였으며 column으로는 Waters 사의 10 ㎛ Bondapak C18 reverse-phase preparative column (2.5 ⌀ X 30 cm)을 사용하였다. Column은 PrepPAK module에 장착하여 사용하였다. 또한 solvent로는 85:15 (vol/vol)의 methanol-water를 사용하였고 유량은 20 ml/min을 사용하였다. Sample은 5ml 과 10 ml을 plunger pump를 이용하여 주입하였다.

8) Sephadex LH-20를 이용한 chromatography

Sephadex LH-20를 이용하면 분자의 크기에 따라 혼합물을 분리할 수 있기 때문에 avermectin B1a와 B1b를 분리할 목적으로 시도되었다. 먼저 Sephadex LH-20를 methanol에 넣어 충분히 swelling한 후 chromatography column에 공기가 들어가지 않도록 packing시킨다. 이때 column은 1.0 ⌀ X 30 cm 의 크기를 사용하였다. 먼저 methanol을 계속 흘려주어서 평형에 다다르게 하였다. 그후에 sample을 injection하고, liquid head 차이에 따른 중력에 의해 계속하여 methanol을 흘려주면서 effluent를 fraction collector로 받았다. 이때 하나의 fraction당 부피는 0.5 ml이었고 methanol의 유속은 4ml /min 이었다.

9) 향류 3단 연속식 추출공정

분리정제공정을 효율적으로 수행하기 위해서는 연속식 공정이 필요하고 연속식 공정일지라도 경우에 따라서는 다단식으로 반복된 추출을 수행하여 원하는 만큼 충분히 추출할 필요가 있다. 본 연구에서는 연속식 다단 추출공정 중에서 aqueous phase 와 solvent phase를 서로 다른 방향으로 접촉시킴으로써 보다 추출효율을 증가시킬 수 있는 향류 3단식 연속 추출장치를 개발하였다. 이 장치와 공정에 관한 자세한 사항은 뒤의 결과 및 토의에서 자세히 다룰 예정이다.

이렇게 개발된 연속식 추출장치를 이용하여 avermectin의 추출이 실제로 가능한지 검증하고 또한 실제 회분식 1단 추출보다 얼마나 성능이 향상되었는지를 조사하기 위해 acetone-water(5:3) aqueous phase와 methanol-water aqueous phase에 대한 추출실험을 시도하였다. acetone-water(5:3) aqueous phase를 위해서는 세포로부터 acetone으로 1차 추출한 후 물을 가하여 acetone-water(5:3) aqueous phase를 만들고 avermectin을 300 mg/ L로 조절하였다. 이러한 aqueous phase를 50mL/min의 속도로, solvent phase로는 chloroform을 25mL/min의 속도로 향류 접촉시킨 후 각단 출구 solvent phase에서 시간에 따라 sampling하여 HPLC로 avermectin의 농도를 조사하였다.

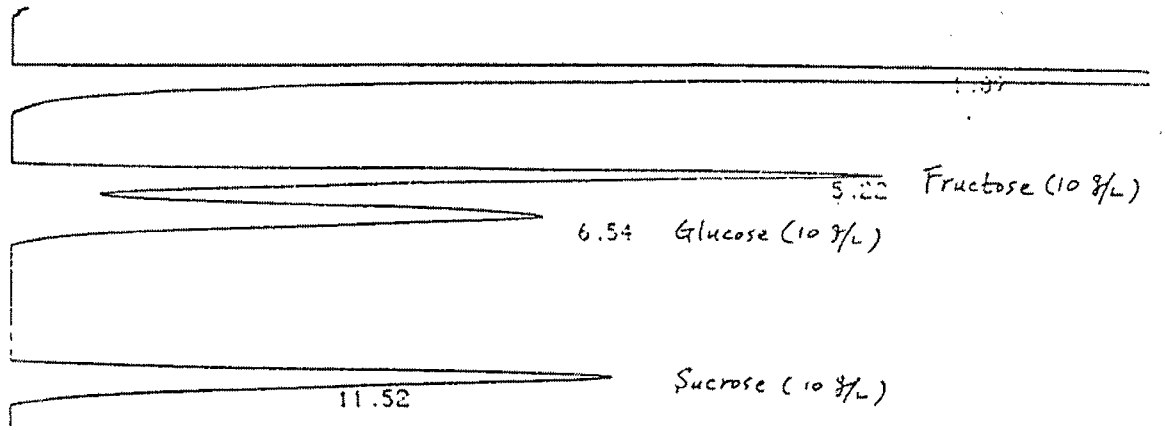
Methanol-water aqueous phase도 마찬가지로 세포로부터 methanol로 1차 추출한 후 물을 가하여 methanol-water(5:3) aqueous phase를 만들고 avermectin을 300 mg/ L로 조절하였다. 이러한 aqueous phase를 50mL/min의 속도로, solvent phase로는 methylene chloride을 25mL/min의 속도로 향류 접촉시킨 후 각단 출구 solvent phase에서 시간에 따라 sampling하여 HPLC로 avermectin의 농도를 조사하였다. 또한 aqueous phase와 solvent phase와의 volume비를 1:1로 변

화시킬 때의 추출 효율의 변화를 조사하기 위해 flow rate를 각각 20 mL/min.으로 조절하여 접촉시켰다.

10) Crystallization

먼저 목적물인 avermectin의 결정화를 위한 최적의 용매를 선정하기 위해 여러 가지 용매에 따른 avermectin의 온도-용해도 곡선을 구하였고 이에 따라 최적의 용매를 선정하였으며 이를 바탕으로 생산성을 높이기 위한 연속식 crystallizer를 개발하였다. Avermectin의 여러 가지 solvent에서의 온도-용해도 곡선을 구하기 위해 각 온도에서 avermectin 결정과 포화되어 공존하는 solvent 용액에서의 avermectin의 농도를 HPLC에 의해 구하여 plot하였다. 이때 사용한 용매는 methanol, hexane, toluene, aceton, heptane등이다.

연속식 결정장치의 개발을 위한 기초실험을 위한 batch crystallization에서는 끓는 점까지 온도를 높이면서 evaporation시키다가 용액이 과포화가 되면 각각 4o C로 고정된 water bath에 용액을 옮긴 후 한쪽은 교반을 하지 않고 생성된 crystal을 현미경으로 관찰하였고 다른 쪽은 계속 교반을 하면서 seed를 넣어 crystal을 만들면서 현미경으로 crystal의 size 및 균일성을 관찰하였다. 또한 기초실험에서 얻은 전략을 바탕으로 air-lift 형태로 과포화 용액을 현탁상태로 유지할 수 있는 연속식 crystallizer를 개발하였으며 이에 대한 자세한 사항은 뒤의 결과 및 토의에서 자세히 언급할 예정이다.



11/15/94 11:56:38 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 95 INDEX 95 SIG 1

PEAK#	HT.	RT	PK HT BC
1	81.304	1.89	131420 01
2	8.073	5.22	13065 02
3	4.878	6.54	7895 03
4	5.845	11.52	9459 01
TOTAL	100.		161839

Fig. 2.1. HPLC chromatogram for carbohydrates analysis

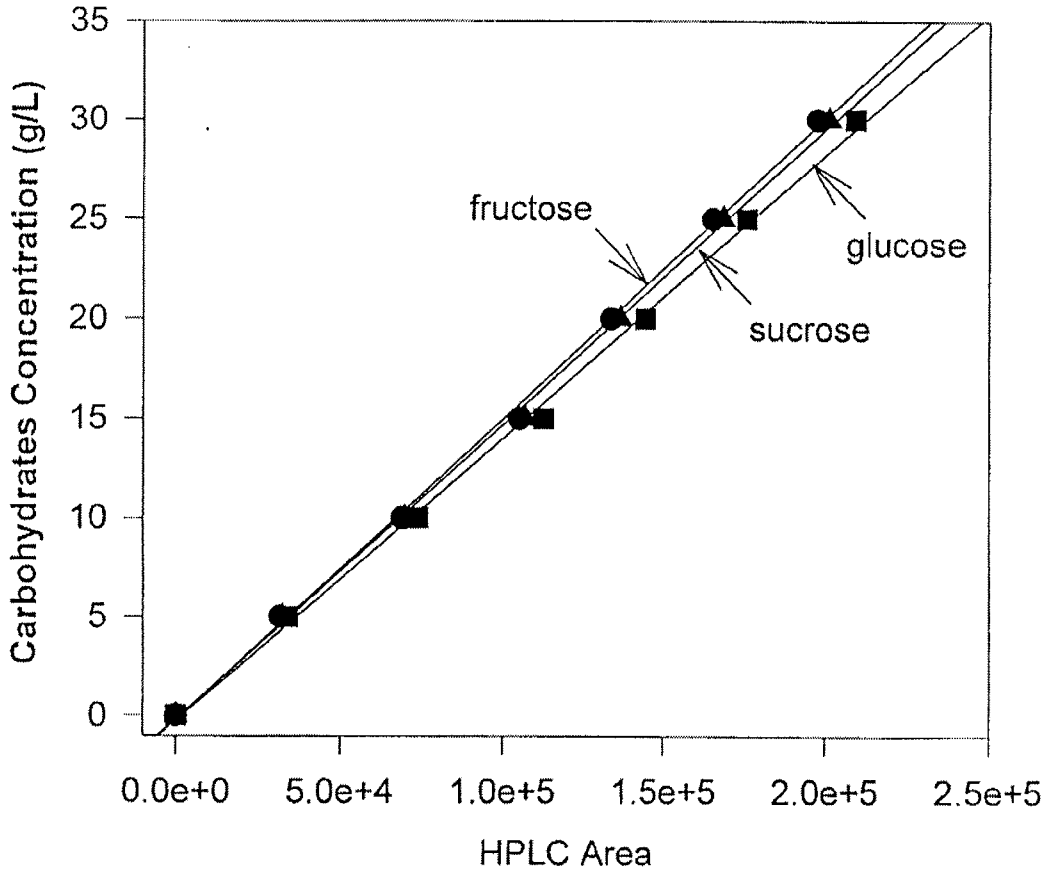


Fig. 2.2. Standard curve for carbohydrates determination (HPLC method)

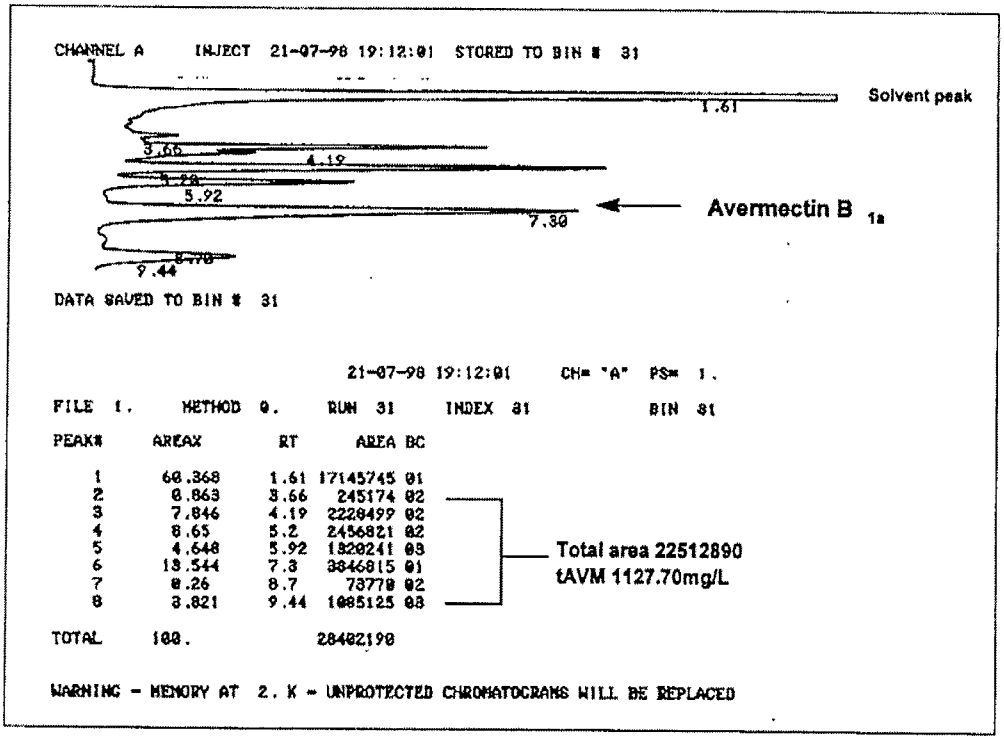


Fig. 2.3. HPLC chromatogram for avermectin B_{1a}

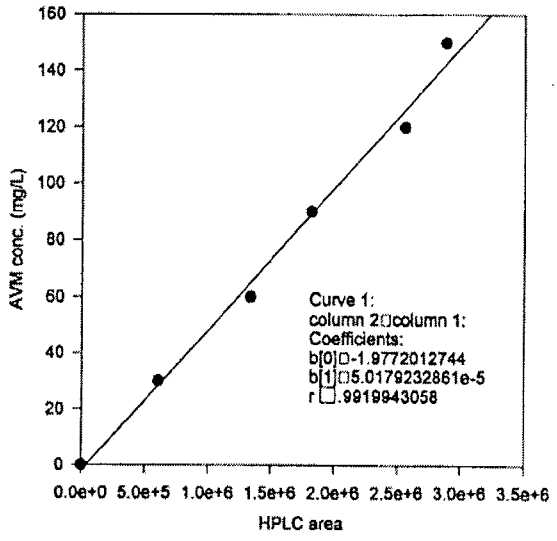


Fig. 2.4. Standard curve for avermectin B_{1a} determination

3. 결과 및 토의

가. Bench-scale에서의 avermectin 발효공정 최적화 및 균주 개량

1) 선별된 *Streptomyces avermitilis*를 이용한 avermectin 고생산성 배지 최적화 및 균주 조작 (shake flask 배양)

제 1세부과제에서 bioassay법에 의해 avermectin B1a (이후부터는 avermectin B1a를 단지 avermectin으로 표기함) 생산성을 어느 정도 나타내는 471종의 돌연변이주에 대해 기본 생산배지인 (PM-1)과 (PM-2)에서 그 생산성을 우선 조사하였다. Seed culture는 20mL tube에 2mL 부피로 28℃, 200rpm에서 5일간 배양한 후 다시 50mL tube에서 10mL의 생산배지에 0.2mL씩 접종하여 8일간 배양하였다. (PM-1)과 (PM-2)에서의 avermectin에 대한 각 생산균주의 생산분포도를 Fig. 2.5와 Fig. 2.6에 나타냈다. Seed culture를 위해 사용된 배지는 (PM-2)를 기본 조성으로 했다. 두 종류의 생산배지 모두 배지 최적화가 이루어지지 않은 상태임에도 불구하고 어느 정도 생산성 있는 균주가 발견되었으며(10-40 mg/L), (PM-1) 보다는 (PM-2)가 avermectin 생합성에 더욱 양호한 기본 생산배지로 판명되었다. (PM-1)과 (PM-2)에 대한 각각의 배지 성분 및 조성은 다음과 같다:

(PM-1): glucose 45g/L, peptonized milk 24g/L, yeast extract 2.5g/L, polyglycol P-2000 2.5g/L;
(PM-2): glucose 30g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 10g/L, $CaCO_3$ 5g/L, NaCl 2g/L, K_2HPO_4 0.5g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g/L, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/L.

이 균주 선별 실험 결과로부터 고생산균주의 가능성이 있는 4 종류의 *Streptomyces avermitilis* 생산균주를 선별한 후, 플라스크 배양에 의해 가장 중요한 배지성분인 다양한 탄소원, 질소원 등이 생산균주의 성장과 avermectin 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 돌연변이주의 선별시의 배양 조건과는 달리 seed culture는 500mL flask에 100mL 부피로 28℃, 200rpm에서 5일간 배양한 후 다시 250mL flask에 50mL의 (PM-1) 또는 (PM-2) 생산배지로 0.5mL씩 접종하여 8일간 배양하였다. Avermectin과 같은 이차대사산물의 대량 생산을 위해서는 다양한 precursor와 inducer, inhibitor에 대한 연구가 필수적이다. 지금까지 보고된 바에 의하면 avermectin의 생합성 경로인 polyketide 경로와 fatty acid의 생합성 경로가 매우 유사함을 알 수 있고, 또한 두 생합성 경로 모두 precursor로 acetyl CoA가 이용됨을 알 수 있다. 이를 바탕으로 해서 배지에 공급된 탄소원이 fatty acid를 합성하는데 가능한 한 덜 이용되고 대신 polyketide를 합성하는데 더 많은 양이 이용되도록 하기 위해 다양한 종류의 배지 성분을 조사하였다. 이차대사산물은 주로 아미노산이나 핵산 같은 다양한 일차대사의 중간산물로부터 만들어지기 때문에 이차대사산물의 생산성을 향상시키기 위해 다양한 아미노산을 함유하고 있는 복합 배지 성분과 순수 아미노산 등을 첨가하는 연구도 시도되었다.

용존산소의 효과를 보기 위해 일반 플라스크와 baffled 플라스크로 나누어 실험하였고 생산배지는 (PM-1)과 (PM-2)를 사용했으며, 여기에 soybean oil(5%)을 추가로 첨가한 것과 첨가하지 않은 것으로 나누어 실험하였다. Bioassay 결과와 상기의 tube를 사용한 균주 선별 실험에 의하면 4 종류의 균주 모두 어느 정도 avermectin 생산성이 있는 것으로 나타났으나 (30-40mg/L), 플라스크 배양에 의한 본 실험 결과에 따르면 APPL-200 (최대 16mg/L)을 제

외한 나머지 균주들은 avermectin 생산성을 나타내지 못하였다 (Fig. 2.7, Fig. 2.8). 균체성장에 있어서도 (PM-1) 배지보다 (PM-2) 배지에서 대부분이 10g/L 이상으로 측정되었고 oil이 첨가된 배지에서 더욱 많은 균체성장을 보였다. 따라서 이 후의 실험부터는 APPL-200 균주만을 가지고 실험하였으며 생산을 위한 기본배지로 (PM-2) 배지를 사용하였다.

가) 탄소원의 영향

현탁배양에서 avermectin 생산에 미치는 탄소원의 영향을 Fig. 2.9와 2.10에 나타냈다. 탄소원을 제외한 나머지 생산배지의 조성은 상기에 기술한 바와 같으며 각 탄소원의 농도는 30g/L였고 oil 만이 탄소원으로 사용된 경우는 30mL/L였으며 glucose와 oil이 동시에 포함된 것은 30g/L에 oil이 10mL/L이었다. Seed culture는 500mL flask에 100mL 부피로 28℃, 200rpm에서 5일간 배양한 후 다시 250mL flask에 50mL의 (PM-2) 배지로 0.5mL씩 접종하여 8일간 배양하였다.

배양 후의 최종 균체농도는 glucose와 perilla oil인 경우 최대 22.8g/L로 나타났으며, 대부분 10g/L정도를 얻을 수 있었다. 또한 생성된 avermectin 농도는 탄소원이 galactose의 경우 53.79mg/L, malt extract의 경우 44.92mg/L이었으며 glucose와 sesame oil을 동시에 첨가한 경우 24.87mg/L인 것으로 나타났다. 위 결과를 바탕으로 질소원에 대한 avermectin의 생산성을 조사하는 실험에서 탄소원으로서 galactose와 malt extract를 선택하였고 seed culture시 avermectin의 induction을 위해서 sesame oil을 10mL/L을 첨가하였다.

나) 질소원의 영향

본 실험에서는 여러 가지의 다양한 질소원(54종류)이 avermectin 생산성에 미치는 영향을 조사했으며 amino acid도 질소원에 포함시켰다. 질소원을 제외한 나머지 생산배지의 조성은 동일하며 탄소원으로서 galactose와 malt extract를 이용하였다. 각 질소원의 농도는 10g/L이고 아미노산의 경우는 6g/L이었다. Seed culture(sesame oil을 10mL/L 포함)는 500mL flask에 100mL 부피로 28℃, 200rpm에서 5일간 배양한 후 다시 250mL flask에 50mL의 (PM-2) 배지로 0.5mL씩 접종하여 8일간 배양하였다.

Galactose를 탄소원으로 사용했을 경우에는 skim milk powder에서 171.35mg/L의 생산성을 보였으며 skim milk, peptonized milk등의 milk 성분에서 100mg/L 이상의 비교적 높은 생산성을 보였다 (Fig. 2.11, 2.12, 2.13, 2.14). Malt extract가 탄소원인 경우에는 skim milk에서 244.37mg/L로 최대 생산성을 나타냈으며 galactose에서와 마찬가지로 skim milk powder 및 peptonized milk에서 180mg/L이상의 높은 생산성을 나타내었다 (Fig. 2.15, 2.16, 2.17, 2.18). 주목할 만한 결과는 탄소원이 malt extract인 경우 질소원으로 가장 손쉽고 값싸게 구할 수 있는 soybean meal과 soybean flour에서 175mg/L와 132mg/L를 얻을 수 있었다는 점이다. 특히 아미노산중 lysine에서 97mg/L을 얻었다. 이로부터 avermectin의 합성 시 precursor의 공급 물질로서 lysine이 중요한 역할을 한다고 추측할 수 있다 (Table 2.1).

다) 질소원을 확정한 상태에서 탄소원의 재조사

탄소원을 제외한 나머지 생산배지의 조성과 배양 조건은 상기에 기술한 바와 같으며 각 탄소원의 농도는 30g/L였고 oil 만이 탄소원으로 사용된 경우는 30mL/L이었으며 sesame oil과 glycerol이 각각 10mL/L씩 첨가되었다. 이전에 질소원에 대한 조사 결과, peptonized milk와 skim milk가 가장 높은 생산성을 나타냈으므로 질소원을 peptonized milk와 skim milk로 확정한 상태에서 다시 탄소원을 조사하였다. 질소원이 peptonized milk일 때 탄소원이 fructose의 경우에서 약 300mg/L의 생산성을 보였으며 여전히 galactose와 malt extract에서

230mg/L 정도의 생산성을 보였다 (Fig. 2.19, 2.20, 2.21). 질소원이 skim milk일 때도 마찬가지로 탄소원이 fructose의 경우에서 약 320mg/L의 생산성을 보였으며 동일하게 galactose와 malt extract에서 200mg/L 이상의 생산성을 보였다 (Fig. 2.22, 2.23, 2.24). 이상의 탄소원과 질소원에 대한 조사에서 나타난 결과로부터 추론한 결과 높은 생산성을 나타내는 탄소원인 malt extract, 질소원인 peptonized milk, skim milk 또는 skim milk powder 성분의 공통적인 특징은 polyketide의 생합성 경로에서 중요한 coenzyme로 작용하는 vitamin이 어느 정도 포함되어 있다는 점이다.

Table 2.1. N-sources showing good production of avermectin with galactose or malt extract as a C-source in shake flask cultures of *S. avermitilis* APPL-200

N source	C source : galactose		C source : malt extract	
	cell mass (g/L)	avermectin (mg/L)	cell mass (g/L)	avermectin (mg/L)
skim milk	13.23	144.757	13.8	244.374
peptonized milk	13.29	111.654	14.23	230.816
skim milk powder	16.84	171.348	16.43	181.634
soybean flour	13.88	63.868	11.71	175.009
soybean meal	12.37	19.168	13.61	132.067
corn steep liquor	11.48	52.618	10.02	105.656
tryptic soy broth	11.7	87.802	12.26	105.350
peptone(soybean)	10.7	86.648	8.8	79.920
soytone	9.76	87.825	11.76	97.245
lysine	11.93	10.97	11.41	90.322

라) 선별된 탄소원의 농도, 아미노산, Mg++ 그리고 yeast extract를 첨가한 경우 avermectin 생합성에 미치는 영향

탄소원의 재조사 실험에서 malt extract, galactose 그리고 fructose인 경우에 높은 avermectin 생산성을 나타냈다. 따라서 이들을 단일 탄소원 또는 복합 탄소원으로 배지에 첨가했을 때의 영향을 살펴보았다. 가장 높은 생산성을 보였던 fructose(30g/L)를 기본 탄소원으로 하여 malt extract와 galactose를 각각 30, 20, 10, 5, 그리고 2g/L의 농도로 첨가하였다. 기존의 대조구로서 fructose가 30g/L인 경우 110mg/L의 생산성을 보였고 galactose를 첨가한 경우는 대조구와 별로 차이가 없었으나, malt extract를 30g/L를 첨가한 경우 216.8 mg/L로서 가장 높은 avermectin 생산성과 비생산성 (specific production)을 보였다(Fig. 2.25와 Fig. 2.26). 주목할 점은 동일한 배양조건이라도 실험 결과가 재현가능하지 않고 각 경우에 avermectin의 생산성이 차이를 보이는 현상이다. 이는 현재 사용하고 있는 균주가 유전학적인 면에 있어서 그 안정도가 떨어져서 배양중 variant가 다량으로 생겨나기 때문인 것으로 추정된다. 그러나 이러한 현상은 이차대사산물 생산시 균주 선별작업이 면밀히 진행되지 않은 경우 흔히 나타나는 현상으로서, 후반부에 안정적인 고생산 균주선별이 이루어졌을 때 별로 문제시되지 않는 것으로 판

명되었다.

한편 macrolides 계열의 항생제 생산에 큰 영향을 미치는 Mg^{++} 이온을 여러 농도로 첨가한 경우 저농도로 유지될 때 높은 생산성을 보였다 (Fig. 2.25). 아미노산을 생산배지에 추가로 더 첨가한 경우 모든 경우에서 avermectin 생합성이 심각히 저해받는 것으로 나타났다 (Fig. 2.27). 또한 yeast extract가 소량이라도 첨가된 경우에도 avermectin 생산을 저해하는 점으로 보아 (Fig. 2.25), avermectin 생합성 경로는 배지 중의 C/N 비율에 따라 그 생합성이 정밀하게 조절되는 전형적인 이차대사 경로임을 알 수 있다.

마) 탄소원과 질소원의 농도변화에 따른 영향

탄소원의 대사속도는 biomass의 형성 및 일차 또는 이차대사산물의 생산에 심각한 영향을 미친다. 따라서 탄소원의 농도에 따라 avermectin 생산성에 어떠한 영향이 있는지를 높은 생산성을 나타냈던 3가지 탄소원인 malt extract, galactose 그리고 fructose를 사용해서 조사하였다. 단일 탄소원으로서 각각의 농도를 10 80g/L까지 변화시켰으며, 또한 탄소원으로서의 기능뿐만 아니라 다양한 growth factor를 함유하고 있는 복합 탄소원인 malt extract를 다양한 농도로 첨가하여 실험하였다. 그리고 적정 질소원의 농도를 결정하기 위해 skim milk의 농도를 10, 20, 그리고 30g/L로 변화시켜 가며 실험을 수행하였다.

Skim milk가 10g/L일 경우 단일 탄소원으로 malt extract가 40, 50, 60g/L일 때 모두 350mg/L이상의 높은 avermectin 생산성을 나타냈으나, galactose 또는 fructose를 단일 탄소원으로 사용한 경우는 최대 생산량이 150mg/L에 지나지 않았다(Fig. 2.28). 복합 탄소원으로 fructose 30g/L에 malt extract 20g/L를 첨가한 경우 약 300mg/L의 최대 생산성을 보였고 이때 malt extract의 농도를 변화시킨 경우도 비교적 높은 생산성을 나타내었다. 그러나 복합 탄소원으로 galactose 30g/L에 다양한 농도의 malt extract를 첨가한 경우는 100mg/L 미만의 낮은 생산성을 보였다. 본 실험에서 높은 생산성을 보인 배양 조건과 결과를 Table 2.2에 요약하였다.

Table 2.2 Composition of top 5 carbon sources producing large amounts of avermectin in shake flask cultures for 8 days

carbon source (g/L)	cell concentration (g/L)	avermectin (mg/L)	specific production (mg/g cell)
malt extract 60	31.16	384.08	12.33
malt extract 50	24.03	383.91	15.98
malt extract 40	26.31	351.65	13.37
fructose 30 + malt extract 20	23.95	299.60	12.51
fructose 30 + malt extract 40	33.90	282.41	8.33

동일한 탄소원의 농도를 사용할 지라도 질소원인 skim milk의 농도를 20g/L와 30g/L로 높였을 경우에는 avermectin 생합성이 현저히 감소하는 것으로 관찰되었다(Fig. 2.29, Fig. 2.30). 하지만 skim milk의 농도에 따른 균체량은 별로 차이가 나지 않았다. 이로부터 *S. avermitilis*가 avermectin을 생산함에 있어 skim milk에 의해 catabolite repression 또는 inhibition을 심하게 받음을 알 수 있다. 각각의 skim milk 농도에 따른 avermectin의 비생산성을 Fig. 2.31- 2.33

에 제시하였다. 특히 Fig. 2.33에 나타난 바와 같이 skim milk의 농도가 30g/L일 때 어떤 종류의 탄소원을 사용할지라도 avermectin의 비생산성이 거의 없음은 다시 한번 avermectin 생합성에 관련된 효소의 활성 또는 효소 합성 기작이 배지 중의 C/N 비율에 따라 매우 정밀하게 조절됨을 제시하는 결과이다. Fig. 2.34에 skim milk 농도에 따른 avermectin 생산성을 비교해서 제시하였다.

바) 다양한 성장배지와 생산배지로의 접종량에 따른 영향

현재까지의 실험 결과 생산배지의 성분과 농도에 대한 최적화가 어느 정도의 단계에 이르렀으므로 본 실험에서는 다양한 성장배지 조성이 avermectin 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 이전의 실험 결과 높은 avermectin 생산성을 보였던 2 가지의 생산배지에 inoculum을 다양한 농도로 접종하여 실험을 수행하였다. 여러 가지 성장배지는 그 동안의 배지 최적화 과정 실험을 수행하는 과정에서 균체 생산량이 높았던 5 종류의 배지와, avermectin 생산성이 높게 나타난 5 종류의 배지를 각각 사용하였다(총 10 종류의 성장배지 사용). 이때 2가지 생산배지, 즉 (P-1)과 (P-2)로의 접종량을 1, 3, 5, 8, 그리고 10%(v/v)로 변화시켜, 접종량이 avermectin의 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 성장배지와 생산배지의 조성을 Table 2.3에 정리하여 나타냈다.

사용된 성장배지가 (B-2) (galactose 40g/L)일 경우 3% 접종시 (P-1)에서 avermectin 생산량이 약 500mg/L로서 최대인 것으로 나타났다(Fig. 2.35-2.37). 모든 경우에서 접종량이 비교적 적은 양일 때 (1-5% v/v) 높은 avermectin 생산성을 나타냈고, 균체량은 20g/L 정도로 거의 일정한 경향을 보였다. 생산배지의 경우 탄소원이 단일 탄소원으로 malt extract가 50g/L인 (P-1)의 경우가 fructose 30g/L에 malt extract 20g/L가 혼합된 탄소원인 (P-2)보다 현저하게 avermectin의 생산성이 증가하는 결과를 보였다(Fig. 2.38과 Fig. 2.39 비교).

사) 성장배지에 첨가된 다양한 oil과 생산배지로의 접종량이 avermectin 생산성에 미치는 영향

상기의 성장배지 조사 실험에서 성장배지의 종류와 생산배지로의 접종량에 따라 avermectin의 생산량이 크게 영향을 받는 것으로 관찰되어, 이번 실험에서는 이전 실험에 대한 추가실험으로서 다양한 oil이 성장배지에 첨가된 경우 avermectin 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 oil이 전혀 첨가되지 않은 성장배지와, 계면활성제로 polyethylen glycol(PEG)을 sesame oil에 함께 첨가한 성장배지에 대해서도 조사하였다. 모든 oil을 4ml/L의 양으로 성장배지에 첨가했으며 생산배지 (P-1)에 전 실험과 동일하게 접종량을 변화시켜 접종함으로써 접종량이 avermectin 생산성에 미치는 영향도 조사하였다.

Fig. 2.40과 2.41에 나타난 바대로 oil의 종류에 따라 avermectin의 생산성은 크게 변화하지 않는 것으로 나타났다. 기존의 sesame oil을 첨가한 경우 1% 접종시 약 250mg/L의 생산성을 나타낸 반면, PEG를 sesame oil과 함께 첨가한 성장배지에서 1%로 접종한 경우 avermectin 생산량이 2배 이상인 약 530mg/L 이상의 높은 생산성을 나타냈음은 주목할 만하다. 특히 이 경우에 비생산성 면에 있어서도 다른 경우에 비해 현저하게 높은 수치를 보이는 것으로 관찰되었다 (Fig. 2.42, Fig. 2.43). 그러나 조사된 모든 경우에서 접종량이 증가함에 따라 avermectin의 생산성이 감소하는 결과로 보아, 성장배지 내에 남아 있던 oil이 생산배지로 어느 정도 옮겨가게 되면 fatty acid pathway와 밀접한 연관이 있는 avermectin 생합성 경로인 polyketide pathway가 심각하게 저해 받는다고 추측할 수 있다.

Table 2.3 Various cell growth media and production media tested for avermectin production

Tested seed media (growth media):

catagories of growth media	media producing high concentration of cell mass	media producing high concentration of avermectin
A group (only fructose)	(A-1) fructose 80g/L	(A-2) fructose 30g/L
B group (only galactose)	(B-1) galactose80g/L	(B-2) galactose 40g/L
C group (only malt extract)	(C-1) malt extract 80g/L	(C-2) malt extract 50g/L
D group (fructose+malt extract)	(D-1) fructose 30g/L+ malt extract 60g/L	(D-2) fructose 30g/L+ malt extract 20g/L
E group (galactose+malt extract)	(E-1) galactose 30g/L+ malt extract 60g/L	(E-2) galactose 30g/L+ malt extract 20g/L

Tested production media:

(P-1): malt extract 50g/L, skim milk 10g/L (equivalent to medium (C-2))

(P-2): fructose 30g/L+malt extract 20g/L, skim milk 10g/L (equivalent to medium (D-2))

아) 최적화된 성장배지와 접종량 하에서 cottonseed flour와 인(phosphate)의 농도가 avermectin 생산성에 미치는 영향

현재까지의 실험 결과 최적화된 성장배지(GM-1로 명명: sesame oil과 PEG 동시 함유, 생산배지로 1% v/v 접종)와 (P-1)에 근거한 생산배지를 이용해서 인(phosphate)이 avermectin의 생합성에 미치는 영향을 조사하였다 (인의 농도를 0, 0.5, 1. 2.5, 4, 6, 8, 10g/L로 변화시켜 실험). 또한 이차대사산물의 생산 시 다양한 아미노산과 vitamin 등의 성분을 공급하기 위해 종종 첨가되곤 하는 cottonseed flour(10g/L)를 첨가하는 실험도 인에 대한 실험과 병행하여 수행하였다.

Fig. 2.44**에 나타난 바와 같이 인이 비교적 낮은 농도(1g/L 미만)로 존재할 때 높은 avermectin의 생산성을 보였으며, 인의 농도가 높아질수록 avermectin 생합성이 저해되는 것으로 나타났다. 또한 cottonseed flour를 (P-1) 생산배지에 추가로 첨가한 경우에도 인의 농도 증가에 따른 avermectin 생산성 감소 경향이 뚜렷하게 나타났다. 그러나 이 경우에 있어서 인이 0.5g/L 이하의 저 농도로 존재할 때 avermectin의 생산성이 약 700mg/L에 이르는 높은 값에 이르렀으며 비생산성 또한 큰 폭으로 증가했음은 주목할 만하다(Fig. 2.44). 이 결과에 근거해서 저농도의 인(0.5g/L)를 포함한 생산배지에 cottonseed flour의 농도를 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40g/L로 다양하게 변화시켜 실험한 결과, cottonseed flour가 2-5g/L로 첨가된 경우 약 750mg/L 정도의 높은 avermectin 생산성을 보였다(Fig. 2.45). Cottonseed flour와 인이 첨가됨으로써 avermectin 생산성이 큰 폭으로 증가한 배양 조건과 그 결과를 Table 2.4에 요약하였**

다. 한편 cottonseed flour와 비슷한 역할을 하리라 기대되었던 yeast extract를 첨가한 경우 2g/L의 농도일 때 약 65mg/L의 생산성을 보일 뿐 그 이상의 농도로 첨가해준 경우는 avermectin의 생합성이 현저하게 저해 받음을 알 수 있었다(Fig. 2.45).

Table 2.4 Effect of cottonseed flour and phosphate on cell growth and avermectin production

conditions	cell concentration (g/L)	Aaermectin concentration (mg/L)	specific production (mg/g cell)
no cottonseed flour + phosphate 0.5g/L	18.75	388.48	20.72
cottonsed flour only 10g/L	21.18	679.38	32.07
cottonseed flour 2g/L + phosphate 0.5g/L	19.26	732.52	38.03
cottonseed flour 5g/L + phosphate 0.5g/L	24.48	716.26	29.25
cottonseed flour 10g/L + phosphate 0.5g/L	18.54	673.38	36.31

자) 성장배지와 생산배지를 확정한 상태에서 APPL-200으로부터 고생산 변이주 재선별

APPL-200 변이주를 이용한 배지 최적화에 대한 상기 실험 도중 다양한 종류의 variant가 배양 중에 발생하며, 이로 인해 avermectin 생산성이 불규칙하게 관찰되는 현상이 종종 발견되곤 했다. 현재까지의 실험 결과 다음 조성의 성장배지와 생산배지, 그리고 inoculum 조건에서 avermectin 생산성이 가장 높은 것으로 나타났으며 이 최종의 성장배지를 (GM-1)으로, 생산배지를 (FPM-1)으로 각각 명명하였다. 각각의 배지성분 및 조성은 다음과 같다:

(GM-1):

glucose	30g/L	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05g/L
$(NH_4)_2SO_4$	2g/L	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05g/L
$CaCO_3$	5g/L	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05g/L
NaCl	2g/L	sesame oil	40ml/L
K_2HPO_4	0.5g/L	polyethylene glycol 2000	2.5g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1g/L		

Inoculum 량: 1% (v/v)

(FPM-1):

malt extract	50g/L	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1g/L
skim milk	10g/L	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05g/L
$CaCO_3$	5g/L	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05g/L
NaCl	2g/L	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05g/L
K_2HPO_4	0.5g/L	cottonseed flour	2g/L

APPL-200 변이주로부터 고생산변이주의 재선별 과정은 통계적으로 성공률이 매우 높다고 밝혀진 Fig. 2.46의 절차에 의해 수행되었다. 즉 (FPM-1) 고체생산배지 상에서 자란 APPL-200 균주로부터 빠른 성장 속도를 보이는 200종의 colony를 선별하여 이들의 성장과 avermectin 생산성을 플라스크 배양을 통해 재조사하였다. Seed culture는 (GM-1) 배지를 이용해서 500mL flask에서 100mL 부피로 28℃, 200rpm에서 5일간 배양한 후, 50mL의 (FPM-1) 생산배지를 함유하고 있는 250mL flask에 0.5mL씩 접종하여 8일간 배양하였다. 200종의 colony에 대한 각 생산균주의 세포 성장 및 avermectin 생산분포도를 Fig. 2.47과 Fig. 2.48에 나타냈다. 8일 후의 최종 세포 농도는 대부분 17.5-24.5 g/L로서 비교적 비슷한 성장속도를 보여주는 것으로 관찰되었다 (Fig. 2.47). 이와는 대조적으로 avermectin 생산성 면에서 볼 때, 선별된 균주들이 비록 동일한 APPL-200 고생산 변이주로부터 더 이상의 돌연변이 절차 없이 선별되었음에도 불구하고 avermectin 생산 농도가 215-875 mg/L에 이루는 광범위한 분포를 보여주는 것으로 나타났다 (Fig. 2.48). 빈도수가 가장 높은 avermectin 생산 범위는 약 750 mg/L로서 400개의 colony 중 36개(9 %)의 colony가 이 범위의 생산성을 보여주었다. 한편 850 mg/L이상의 avermectin 생산성을 보이는 고생산 변이주도 4종이 있음이 확인되었다. 이 결과로부터 Fig. 2.46에 제시된 방법대로 avermectin 생산성이 높게 나타난 20개의 콜로니를 선별하여 revertant로의 back mutation 현상이 거의 없는 것으로 나타난 gycerol stock 과 agar slant를 준비한 후, 최적화 된 성장배지(GM-1)와 생산배지(FPM-1)에서 4배수로 플라스크배양 (4x20 플라스크)을 이전과 같은 배양조건에서 수행하였다. 최종적으로 4종의 고생산 균주를 확보하여 이들을 각각 APPL-500, APPL-600, APPL-700, APPL-800으로 명명하였으며, 4배수로 수행한 플라스크 배양 8일째의 각각의 평균 세포농도와 평균 avermectin 생산량을 하기의 Table 2.5에 요약하였다 (4배수 실험 결과 대부분 평균값 근처의 생산량을 나타내는 것으로 보아 고생산균주의 안정도가 꽤 높은 것으로 확인됨):

Table 2.5. Summary for average avermectin production and cell growth of 4 high yielding mutants cultivated in shake flasks for 8 days

high yielding producer	average avermectin concentration (mg/L)	average cell concentration (g/L)	average specific production (mg avermectin /g cell)
APPL-500	832	21.1	39.4
APPL-600	803	20.9	38.4
APPL-700	817	21.8	37.4
APPL-800	811	22.1	36.7

한편 이들 각각에 대한 2 리터 생물반응기에서의 avermectin 생산 결과 및 세포성장 경향은 하기의 3)의 나)항에 배양 중의 용존산소 프로파일과 함께 제시하였다.

차) avermectin 생합성 경로인 polyketide pathway를 최대한 이용하는 고생산 돌연변이주 개발 전략 제시 및 morphology에 대한 연구 방향 제시

이미 확보된 APPL-500, 600, 700, 800 균주를 다시 돌연변이시켜 더욱 높은 avermectin 생산성을 나타내는 변이주를 확보하기 위해서 Fig. 2.46의 돌연변이주 개발 전략을 따를 것이나, 기존의 random mutation 방식과 병행해서 하기의 polyketide pathway의 특성을 최대한 이용하는 균

주 개발 전략을 수행 중에 있다. Fig. 2.49에 도식적으로 나타낸 바와 같이 avermectin 생합성을 위한 polyketide pathway는 fatty acid의 생합성 경로와 많은 부분을 공유하며, 특히 두 가지 생합성 경로 모두 acetyl CoA를 전구체로 이용한다. 한편 Fig. 2.49에 소개된 cerulenin은 fatty acid aynthetase(FAS)의 non-competitive inhibitor로서 작용하여 균류나 yeast, 또는 세균 등의 성장을 저해하는 항생제적 특성을 지니고 있다. 대부분의 미생물에서 생성되는 polyketide 계통의 이차대사산물은 acetyl CoA와 malonyl CoA의 head-to-tail condensation에 의해 생성되는데, cerulenin은 이 condensation 반응을 담당하는 β-keto acyl thioester synthetase의 활성을 특이하게 저해시킨다고 알려져 있다. 따라서 cerulenin의 사용과 더불어 cerulenin에 대한 저항성 균주를 선별할 경우, fatty acid 생합성에 사용되기 위한 전구체가 fatty acid 합성쪽 보다 polyketide 생합성 방향으로 사용되어 avermectin 생합성이 증가될 수 있을 것으로 기대된다.

한편 고생산 균주 개발 시 항상 염두에 두어야 할 사항으로는 *streptomyces*와 같은 균사형성 미생물의 경우 액상배지에서 균사(filamentous) 또는 원형(pellet) 모양의 두 가지 형태(morphology)로 자란다는 점이다. 보고된 바에 의하면 생산균체의 morphology가 종종 균류 배양에서 물질전달 효과로 인해 일차대사산물 또는 이차대사산물의 생산성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 *Aspergillus niger*나 *Aspergillus terreus*에서 생산되는 citric acid나 itaconic acid의 경우는 pellet 형태가, *Penicillium chrisogenum*과 *Rhizopus arrhizus*에서 각각 생성되는 penicillin과 fumaric acid의 경우는 filamentous 형태가 생산성에 더 유리한 것으로 나타나 있다. 본 연구팀도 avermectin 생산균주인 *S. avermitilis* 변이주의 배양 중의 morphology를 비교관찰함으로써, avermectin의 생산성과 생산균주의 morphology와의 상관관계에 대한 연구를 진행 중에 있다.

2) revertant로의 back mutation 현상 방지를 위한 glycerol stock 준비 및 특성 조사

생물반응기에서 생산배지를 이용한 avermectin 생산을 위해서는 세포 성장배지에서 배양한 1-10% (v/v)의 vegetative cell로 구성되어 있으며 revertant로의 back mutation이 발생하지 않는 inoculum이 필요하다. 한편 이 inoculum을 준비하기 위해서는 고농도의 생산균주 spore를 마련하여야 한다. 본 연구에서는 돌연변이 결과 얻은 고생산균주의 유전학적 성질을 유지하는 inoculum으로 실험을 수행하고자, 10% glycerol stock으로 -80℃ 에 보관한 stock culture를 spore들로만 구성되도록 실험 방법을 고안하였다. 이를 위해 생산균주의 유전학적 성질에 변화를 거의 초래하지 않는 sporulation medium의 개발이 생산발효조에서 재현 가능한 결과를 지속적으로 얻기 위해 가장 기초적이면서 중요한 과제로 판단되었다.

본 연구에서 개발한 sporulation medium VI (SPM)를 방선균에서 sporulation medium로 널리 알려진 다음의 5가지 종류의 sporulation 배지 (Table 2.6)와 비교한 결과 고생산 변이주의 avermectin 생산 안정성이 입증되어 이를 고농도의 spore로 구성된 glycerol stock을 준비하기 위한 배지로 선택하였다. Table 2.6에 (★)의 개수로 sprulation의 정도를 표시한 바대로 sporulation medium **VI** (SPM)를 이용하여 준비된 spore glycerol stock을 -80℃에서 5개월 동안 보관한 후 생산배지(FPM-1)에서 avermectin 생산성을 조사한 결과 고농도의 sproe로 인해 growth medium(GM-1)에서의 세포성장이 lag phase없이 활발히 진행될 뿐만 아니라 (5일간 shake flask 배양), 생산배지에서의 avermectin 생산성 (8일간 플라스크 배양)도 stock을 준비할 때의 배양과 비교해서 거의 100%를 유지하였다. 반면에 기타 다른 종류의 sporulation medium (Table 2.6)를 이용하여 준비한 glycerol stock의 경우 세포 성장배지에서의 lag phase의 기간이 길게 (2일간) 나타났으며, 이를 inoculum으로 사용했을 때의 avermectin 생산성은 stock을 준비할 때의 배양에

비해 약 70-80% 정도를 유지하는 것으로 나타났다 (생산배지에서의 플라스크 배양은 28oC, 200rpm에서 8일 동안 수행했으며, 250mL flask에서 50mL의 배양부피로 실험하였다. 각 실험마다 5일이 경과하여 지수기 성장단계에 있는 활성 높은 1% (v/v)의 seed culture를 inoculum으로 사용하였다).

Table 2.6. Solidified medium tested for the sporulation of *Streptomyces avermitilis*, a avermectin producing microorganism ((★) : extent of sporulation after 10 days cultivation in 2 % agar containing media)

sporulation media	component	composition
sporulation medium Ⅰ (★)	malt extract yeast extract glucose	1.0% 0.4% 0.4%
sporulation medium Ⅱ (★★)	beef extract yeast extract casamino acids glucose	0.1% 0.1% 0.2% 0.2%
sporulation medium Ⅲ (★★★)	corn-steep liquor (50% dry matter) starch (NH4)2SO4 NaCl CaCO3	1.0% 1.0% 0.3% 0.3% 0.3%
sporulation medium Ⅳ (★★★★)	soluble starch K2HPO4 MgSO4·7H2O NaCl (NH4)2SO4 CaCO3 FeSO4·7H2O MnCl2·4H2O ZnSO4·7H2O	1.0% 0.1% 0.1% 0.1% 0.2% 0.2% 0.001% 0.001% 0.001%
sporulation medium Ⅴ (★)	soluble starch peptone meat extract yeast extract N-Z amine (type A) agar	1.0% 0.04% 0.02% 0.02% 0.02% 2.0%
sporulation medium Ⅵ (SPM) (★★★★★)	maltose soybean meal soybean oil NaCl Minki (amino acid mixture) K2HPO4 MgSO4·7H2O agar pH	1.2% 0.6% 0.03% 0.1% 0.3% 0.03% 0.01% 2.0% 6.4

3) 생물반응기에서 회분식배양과 유가식배양에 의한 avermectin 생산성 조사

가) 생물반응기에서의 유가식배양 (fed-batch culture)에 의한 avermectin 생산성 조사 (APPL-200 돌연변이주)

APPL-200 생산균주의 배지 최적화를 위한 플라스크 배양과 병행해서 생물반응기를 이용한 회분식배양을 지속적으로 수행했다. 그 결과 심각한 산소제한 조건에서 배양이 지속됨을 관찰할

수 있었다 (250 rpm의 경우 약 5일간, 350 rpm의 경우 약 3일간, 500rpm의 경우 약 2.5일간 용존산소 농도가 0 ppm으로 유지됨) (실험결과 미 제시). 즉 생산배지를 이용하여 다양한 통기량 (1-2 vvm)과 교반속도(250, 350, 500 rpm)를 이용한 회분식배양 (batch culture) 결과 모든 경우에서 배양개시 후 2.5일이 경과된 시점부터 (이 때의 세포 농도는 약 3 g/L이며 pH는 7.0으로 조절) 세포의 산소흡수율 (OUR)이 매우 높아 배양액 내의 용존산소(DO) 농도가 0 ppm으로 유지되었다. 이 경우 지수기 성장단계에서 생산균주의 세포흡수율이 산소공급율(OTR)에 비해 지나치게 높아 반응기의 산소전달 능력인 교반속도와 통기속도의 조절로는 산소제한 조건을 극복할 수 없는 것으로 나타났다. 이 결과로부터 산소제한 배양 조건을 극복함과 동시에 타 영양분인 탄소원과 같은 필수 영양분을 제한조건으로 하는 운전조건을 확립하기 위해서는 회분식배양 만으로는 공정개발이 불가능함을 알 수 있었다.

일반적으로 일차대사에 매우 적응되어 세포성장이 활발한 *Streptomyces*는 avermectin과 같은 이차대사 산물을 효과적으로 과도생산(overproduction)하지 못하므로 배양 중 생산균주의 성장을 어느 정도 제한하는 생물반응기의 운전전략 개발이 필수적이다. 즉 특정 제한기질로 세포의 성장을 제한시킴으로써 전체 대사의 균형을 깨고 대사 흐름을 원하는 이차대사방향으로 유도하는 것이다. 한 예로서, 이차대사산물의 생합성 시 탄소원이 배지 내에 일정 농도 이상으로 유지되면, 이차대사 관련 효소의 생합성이 억제되는 carbon catabolite repression 현상이 종종 나타나곤 한다. 반면에 주목할 점은 탄소원이 배지 내에 너무 낮은 농도로 유지되는 경우, 세포성장이 저해를 받아 이차대사산물의 volumetric productivity (Qp, $Qp=qpX$; qp=specific production rate (g product/g cell/hr), X=cell concentration(g/L))가 감소하게 된다는 점이다. Catabolite repression 또는 inhibition에 의한 이차대사산물 생합성 저해 효과를 적절히 완화시키기 위한 유가식배양 (fed-batch culture)법은 탄소원을 지속적, 또는 간헐적으로 공급함으로써 배지 중의 탄소원 농도를 이차대사산물 생산에 방해되지 않을 정도로 유지시킬 수 있으며, 동시에 지속적인 세포성장도 이룰 수 있는 배양 방법으로 제시되어 왔다.

본 연구에서는 유가식배양에 의해 탄소원의 농도와 용존산소를 다양하게 조절함으로써 용존산소가 아닌 탄소원이 제한기질(limiting-substrate)인 배양 조건하에서 대사흐름(metabolic flux)을 이차대사산물인 avermectin의 생합성 방향으로 유도하고자 하였다. 즉 다양한 조건의 유가식배양을 통해 APPL-200 변이주의 성장에 저해효과가 없는 것으로 판명된 용존산소 농도를 유지함 (약 10% 포화용존산소 농도 이상)과 동시에 catabolite repression 또는 inhibition 현상을 극복할 수 있도록 탄소원 농도를 가능한 한 낮은 농도로 유지시키고자 하였다.

유가식 배양에서 초기배지의 성분은 상기의 배지 최적화 과정 도중에 개발된 배지인 (PM-2)에 skim milk (10g/L)가 첨가된 생산배지 성분을 사용했으며, 약 10일 동안 다양한 속도로 공급된 배지의 성분은 초기배지 성분과 동일하나 fructose만 농도를 35g/L, 45g/L, 55g/L, 65g/L로 다양하게 조절하였다. 유가식배양은 배양시작 후 약 65시간 경부터 실시하였다. 배지 공급속도가 너무 높을 경우 발효조내의 전체 배지 부피를 과도하게 증가시켜 세포농도를 희석시킬 우려가 있으므로, 상기와 같이 탄소원 농도를 변화시켜 가며 실험을 진행하였다. 또한 배지내의 탄소원의 농도를 원하는 농도로 유지시키기 위해 간헐적 공급 또는 연속 공급의 방법을 병행하였다.

Fig. 2.50은 유가식배양에서 교반속도, 배지공급 속도 및 공급배지의 fructose 농도등의 배양조건을 정밀하게 조절함으로써 용존산소를 10% 포화 농도 이상으로 유지함 (Fig. 2.51)과 동시에 avermectin 생산단계인 배양 후반부에 fructose의 농도를 매우 낮은 수준으로 지속적으로 유지할 수 있었음을 보여 준다. 이 경우에 배양 100 시간에서 220 시간까지 매우 낮은 수준의 탄소원 농도에도 불구하고 세포 농도가 거의 감소하지 않고 약 10 g/L 근처에서 지속적으로 유지됨으로써 (Fig. 2.50), 유가적으로 공급되는 영양분의 많은 부분이 avermectin 생합성으로 이용될 수 있었음 (Fig. 2.53 의 fed-batch culture 1의 결과)은 주목할 만하다.

Fig. 2.52와 Fig. 2.53은 다양한 배지 농도와 공급속도의 조절을 통해 수행한 세 가지 종류의 유가식 배양 결과이다. 모든 경우에 용존산소 농도는 10% 이상으로 유지시킴으로써 유가식 배양이 탄소원 제한 조건에서 수행되도록 하였다. Fig. 2.52와 Fig. 2.53을 동시에 비교해 보면 배양 후반부에 세포 농도가 감소하지 않은 채 비교적 일정 수준으로 유지될 때, avermectin의 생산성이 가장 크게 나타났음을 알 수 있다. 일반적으로 유가식배양에서 탄소원 제한 조건에 의해 세포 성장이 어느 정도 저해를 받는 경우, 이차대사산물의 생산성이 뚜렷이 증가하는 경향이 있으나, 본 실험의 결과 비록 유가식배양일지라도 심각한 탄소원 제한 현상으로 인해 세포성장이 배양 후반부에 오히려 감소하는 경우에는 이차대사산물의 생합성이 뚜렷이 저해 받음을 알 수 있다. 현재 상기 플라스크 실험에서 최적화된 생산배지 성분과 다양한 유가식배양 전략에 의해 세포성장도 활발한 가운데 avermectin의 생산성을 늘리고자 하는 연구를 계속 진행 중에 있다.

나) 성장배지 및 생산배지가 확정된 상태에서 4 종류의 고생산변이주의 생물반응기에서의 회분식 배양 연구 (APPL-500, 600, 700, 800 변이주)

상기 1)항의 (자)항에서 이미 설명한 최적화된 성장배지(GM-1)와 생산배지(FPM-1)를 이용해서 최종적으로 선별된 4종의 고생산 균주 (APPL-500, APPL-600, APPL-700, APPL-800)에 대해 생물반응기에서의 각각의 발효 특성을 조사한 결과를 Fig. 2.54와 Fig. 2.55에 나타냈다. 플라스크 배양에서와 마찬가지로 발효 8일째에 APPL-500의 avermectin의 생산성(862 mg/L) 및 세포농도(22.4 g/L)가 최대로 나타났다. 특히 APPL-500의 경우 6일째 이후인 배양 후반부에도 avermectin의 생산력이 감소하지 않은 채 오히려 약간 더 증가한 점은 주목할 만 하다. APPL-700의 경우 배양 6일 째 844 mg/L의 avermectin 생산성을 보였으나 그 이후 비교적 급속도로 감소해서 배양 8일 째에는 705 mg/L까지 감소하는 것으로 관찰되었다. APPL-600과 APPL-800의 경우 Table 2.5에 나타낸 바대로 플라스크 배양 시에는 avermectin 생산농도가 800mg/L 이상을 유지했으나 생물반응기에서는 비교적 낮은 생산성을 보였다 (배양 8일째 각각 560 mg/L와 542 mg/L). 본 실험 결과 APPL-500이 가장 훌륭한 avermectin 고생산 변이주로 나타났으나, 현재 이 고생산변이주 뿐만 아니라 나머지 세 균주에 대해서도 돌연변이주를 지속적으로 선별하는 작업을 진행하고 있다 (상기 (1)항의 (차)항에서 균주 개발 전략 설명).

Fig. 2.56은 APPL-500 변이주에 대해 다양한 교반 속도(200-500 rpm, Fig. 2.56(A)) 및 통기 속도(1-2 vvm, Fig. 2.56(B))에서 용존산소의 변화 (Fig. 2.56(C))를 나타낸 결과이다. 모든 교반속도와 통기속도에서 지수기 성장 기간 내내 생산균체의 oxygen uptake rate (OUR)가 반응기 내로 공급되는 oxygen transfer rate (OTR)보다 훨씬 높아 배지 내 용존산소 level은 거의 0 ppm으로 나타났다. 이는 균체의 성장속도가 limiting substrate로서 C-source가 아니라 산소에 의해 매우 심각하게 영향을 받고 있음을 뜻하며, 실제로 이와 같은 현상은 매 회분식배양 마다 관찰된 바 있다. 한편 Fig. 2.56(C)에 나타난 바와 같이 용존산소가 급격히 증가하는 약 120시간 경에 용존산소가 아닌 탄소원에 의해 세포성장이 제한을 받는 것으로 보인다. 본 실험의 지수기 성장 단계에서 나타난 바와 같이 oxygen limited culture인 경우 $OUR=OTR$ (자세한 사항은 "나"항 참조)의 산소물질수지식이 성립하며 이때 세포성장속도(r_X)는 배지 중의 용존산소 농도가 0 ppm 일 때 $k_La C^*$로 계산된다 (k_La:산소전달계수, 1/hr; C^*:포화용존산소 농도, mg/L). 즉 방선균 배양과 같이 산소가 심각하게 고갈되는 oxygen limited culture인 경우 배양 중에 세포생산성을 증가시키기 위해서는 k_La를 증가시켜 배양액 내로 효과적인 산소 공급(OTR)이 이루어 질 수 있도록 반응기의 배양조건을 극대화시키거나, C^*를 증가시키기 위해 고 압력의 공기 또는 순수산소를 이용하는 방법이 강구될 수 있다. 따라서 고농도 배양을 위한 전략을 개발하려면 하기에 제시된 바와 같이 무엇보다도 먼저 산소전달계수에 대한 정밀한 분석이 이루어 져야 하며, 이를 토대로

scale-up 전략도 개발되어야 함을 알 수 있다.

4) 고생산 변이주 선별, 배지 최적화를 위한 shake flask 배양 및 생물반응기 배양에 의한 avermectin 생산성 증가에 대한 실험 결과 요약

고생산 변이주 선별, revertant로의 back mutation 현상 방지, 성장배지 및 생산배지 최적화, 생산배지로의 접종량 최적화, 플라스크 배양 및 생물반응기의 배양 환경의 최적화를 통해 현재까지 이룬 avermectin의 부피생산성과 단위세포당 생산성 증가 경향을 Fig. 2.57과 Fig. 2.58에 요약해서 나타내었다. 또한 매 실험마다 증가된 avermectin 생산 농도와 생산성 향상이 일어난 원인에 대해서도 Table 2.7에 간단히 명시하였다. Wild-type의 생산균주의 경우 농축된 배양액의 bioassay법에 의해서만 겨우 avermectin의 존재를 확인할 수 있을 정도로 미미한 양의 avermectin을 생산하였으며, 이로부터 유도된 돌연변이주의 경우에도 초반에 avermectin 생산성이 거의 나타나지 않았다(약 16mg/L). 이 돌연변이주로부터 상기에 명시된 모든 조건, 즉 균주개량 및 배양 공정 개발을 통해 avermectin 생산성이 약 54배 이상 증가된 862 mg/L 까지 이르렀음은 매우 주목할 만하다. 현재 앞서 설명한 바와 같이 유전학적으로 안정성이 우수한 고생산 변이주 (APPL-500, 600, 700, 800)를 확보한 상태이므로, 현재까지의 실험방법에 근거해서 균주개발 및 공정개발을 병행할 경우 조만 간에 avermectin 생산성이 산업적 수준에 이를 수 있을 것으로 기대된다.

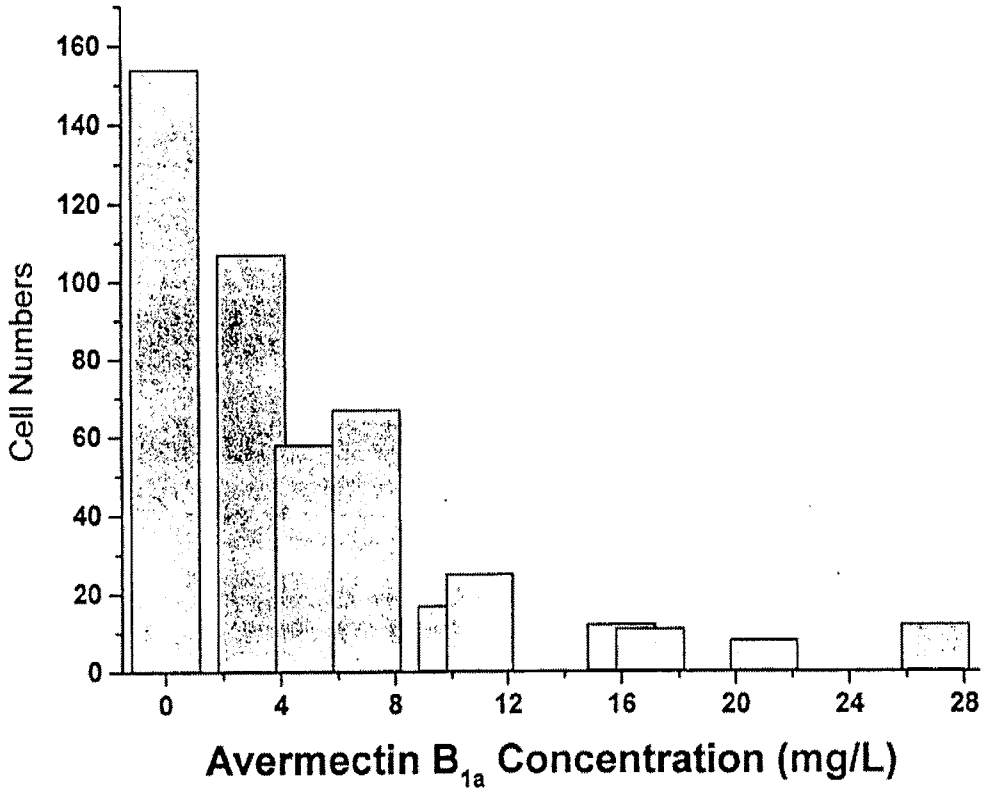


Fig. 2.5. Histogram for avermectin production by variants cultivated in 50 mL test tubes containing 10 mL of (PM-1) production medium

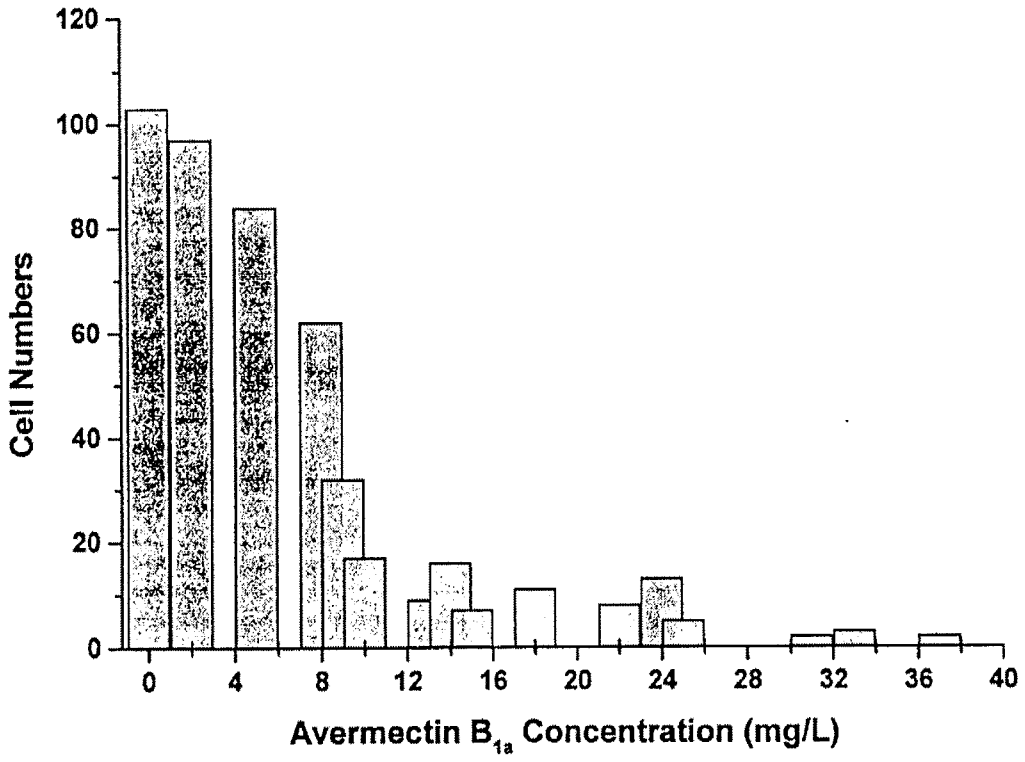


Fig. 2.6. Histogram for avermectin production by variants cultivated in 50 mL test tubes containing (PM-2) production medium

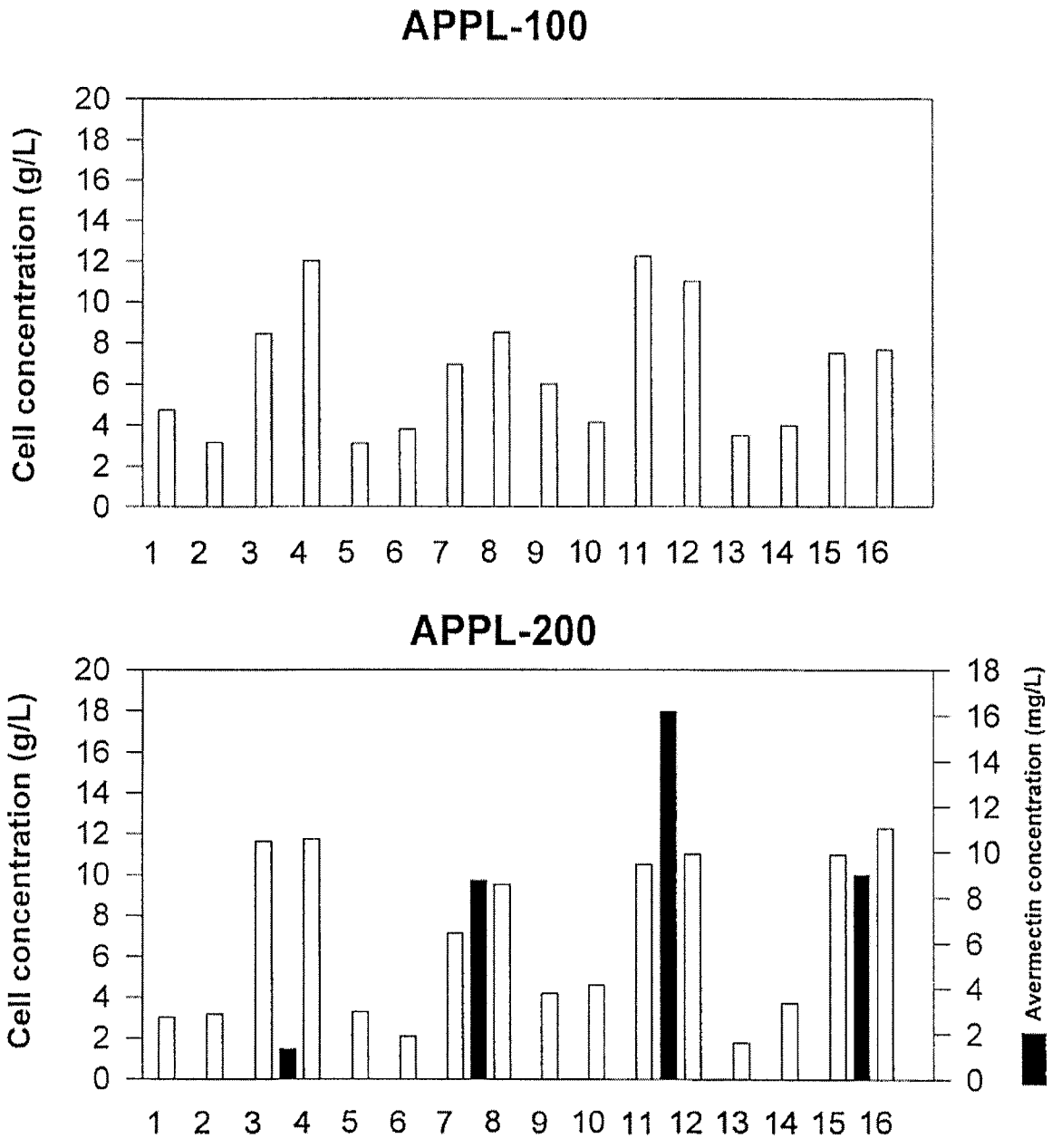


Fig. 2.7. Test of mutant strains for cell growth and avermectin production (APPL-100 and APPL-200)

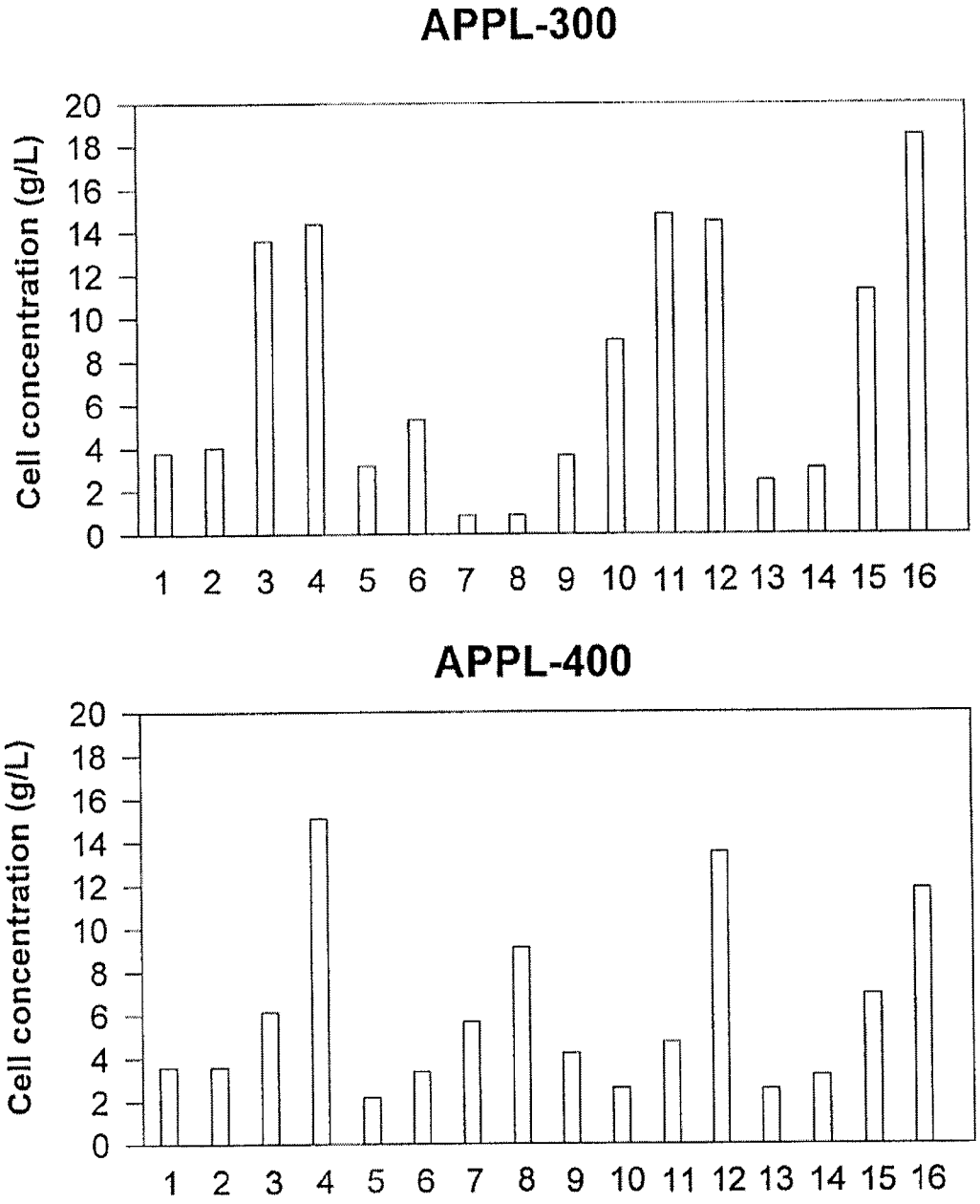


Fig. 2.8. Test of mutant strains for cell growth and avermectin production (APPL-300 and APPL-400)

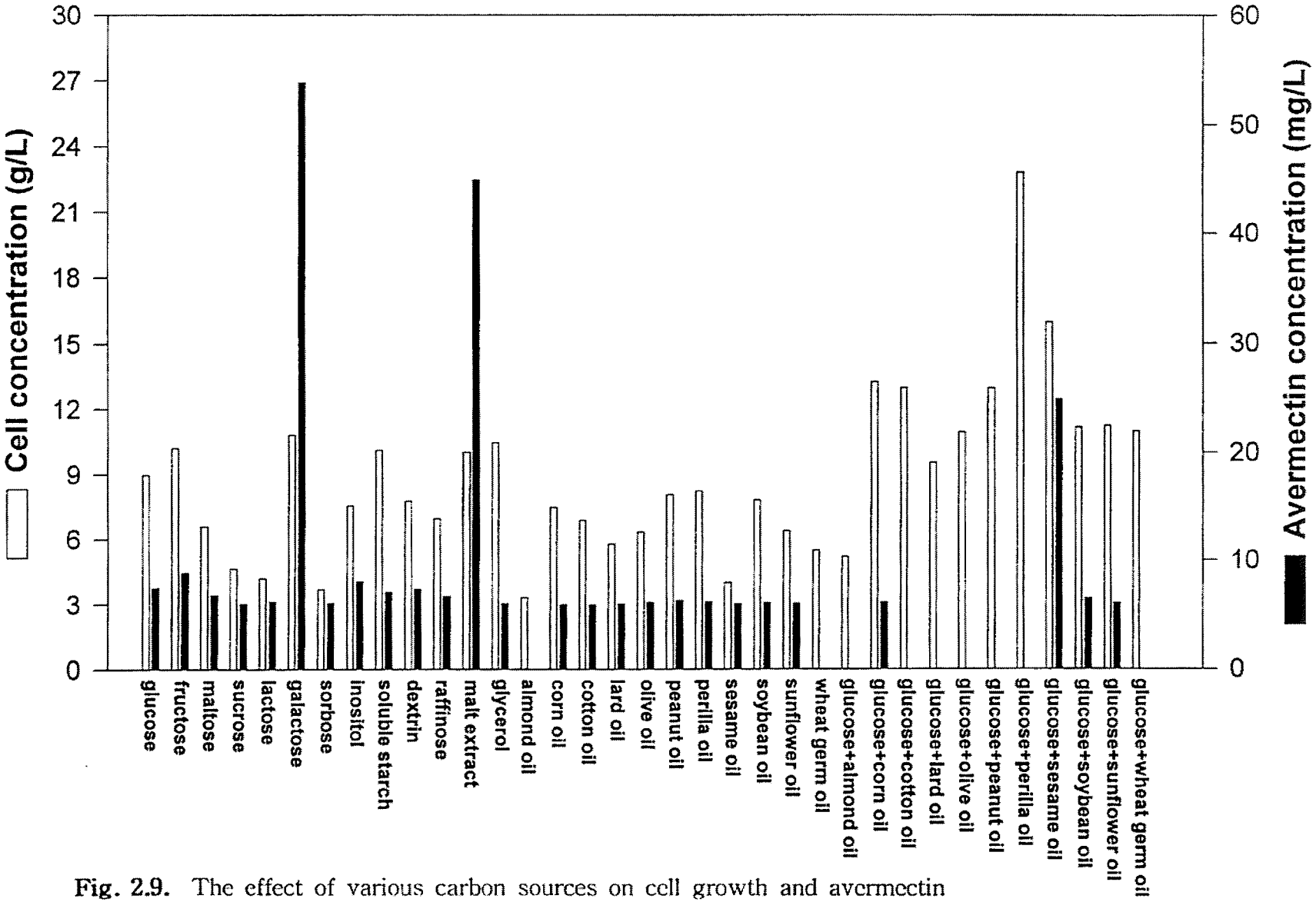


Fig. 2.9. The effect of various carbon sources on cell growth and avermectin production

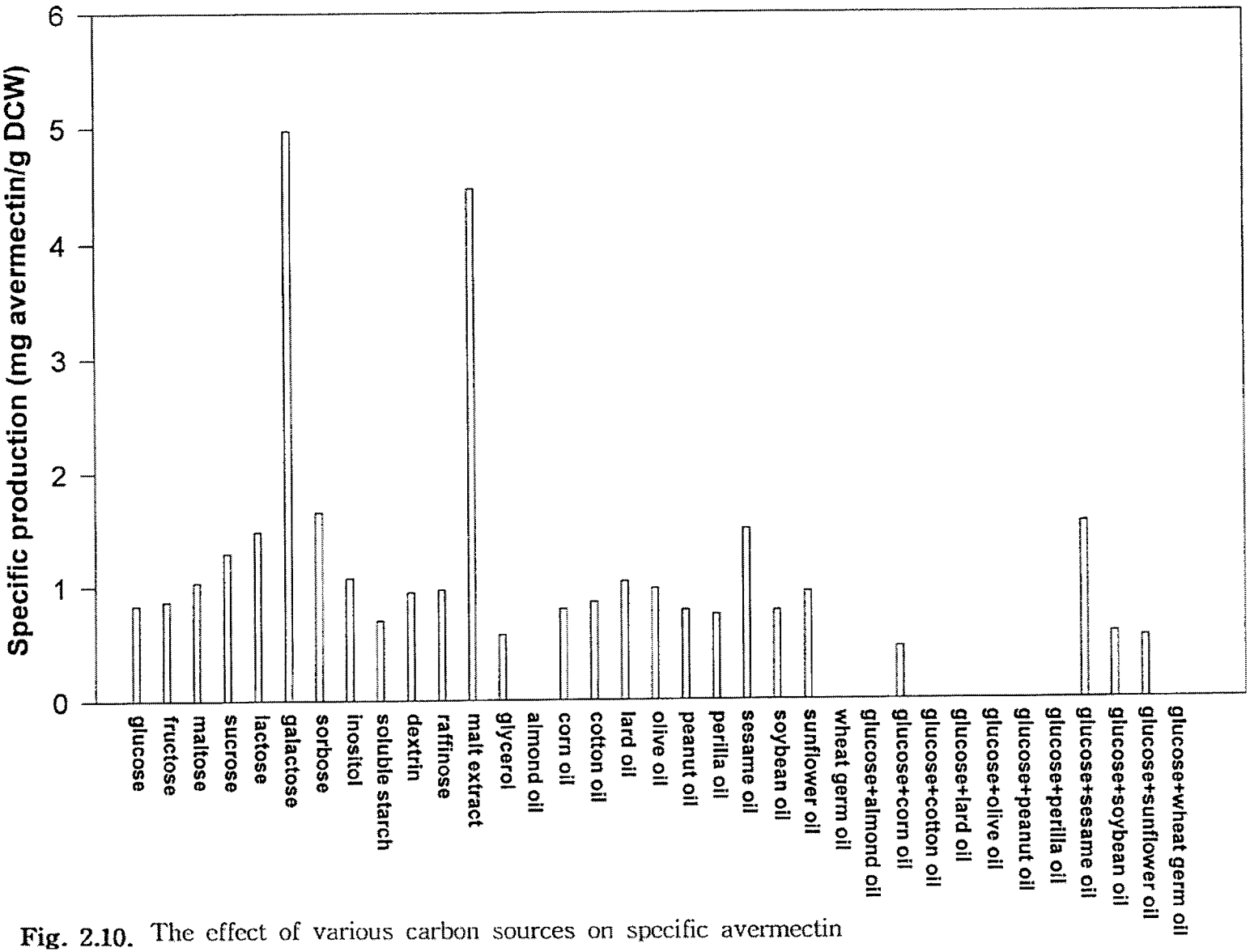


Fig. 2.10. The effect of various carbon sources on specific avermectin production

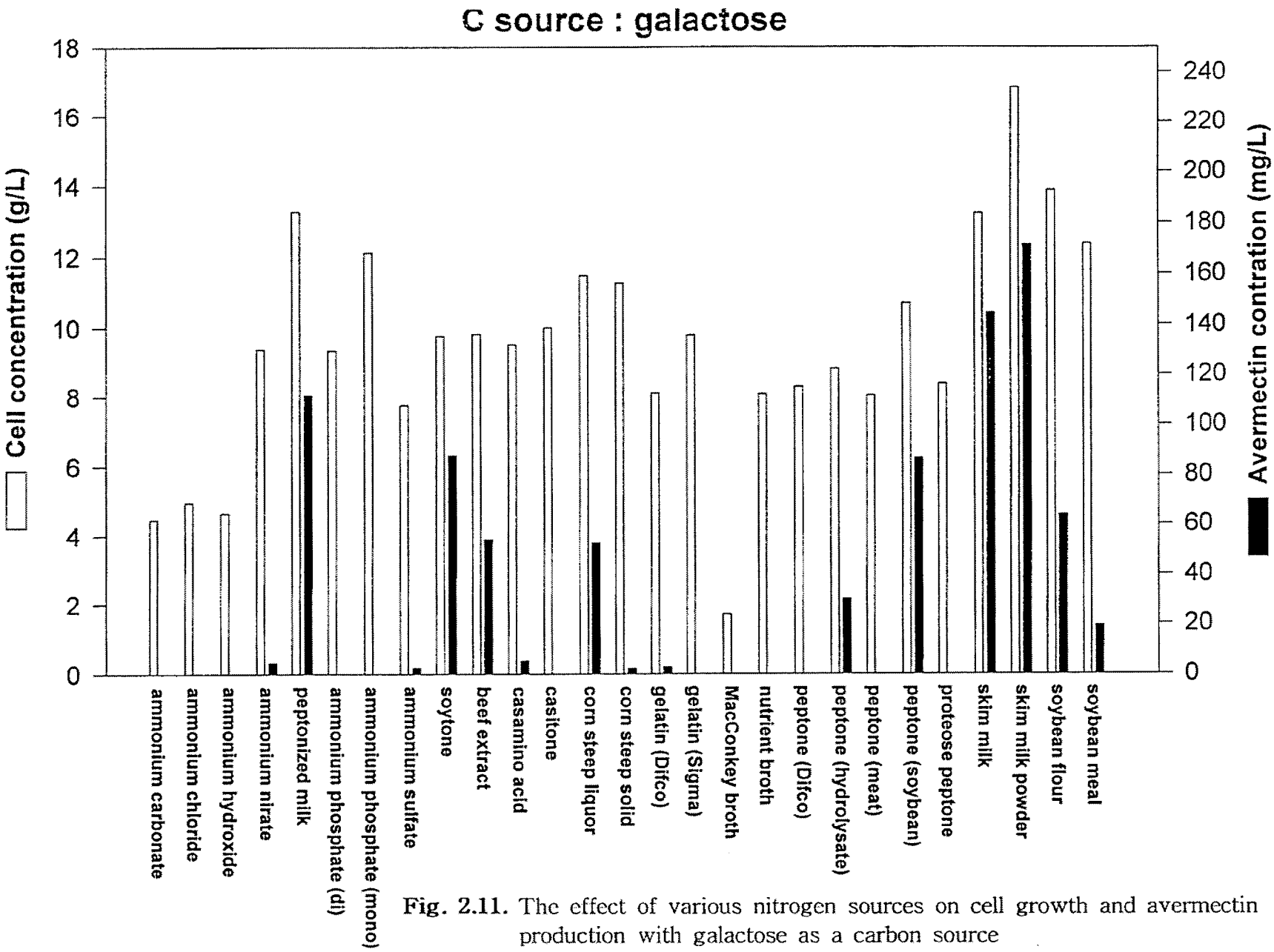


Fig. 2.11. The effect of various nitrogen sources on cell growth and avermectin production with galactose as a carbon source

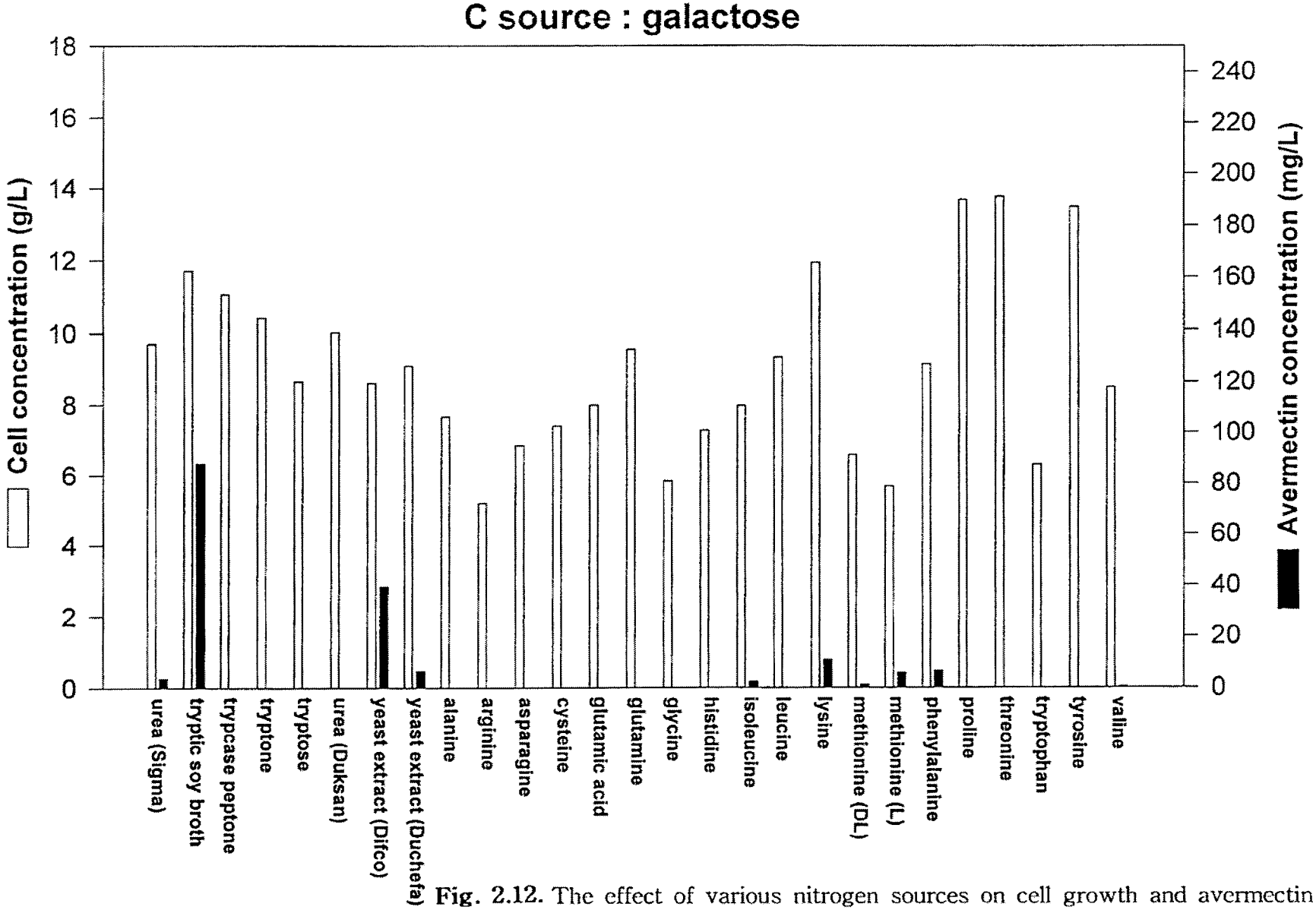


Fig. 2.12. The effect of various nitrogen sources on cell growth and avermectin production with galactose as a carbon source

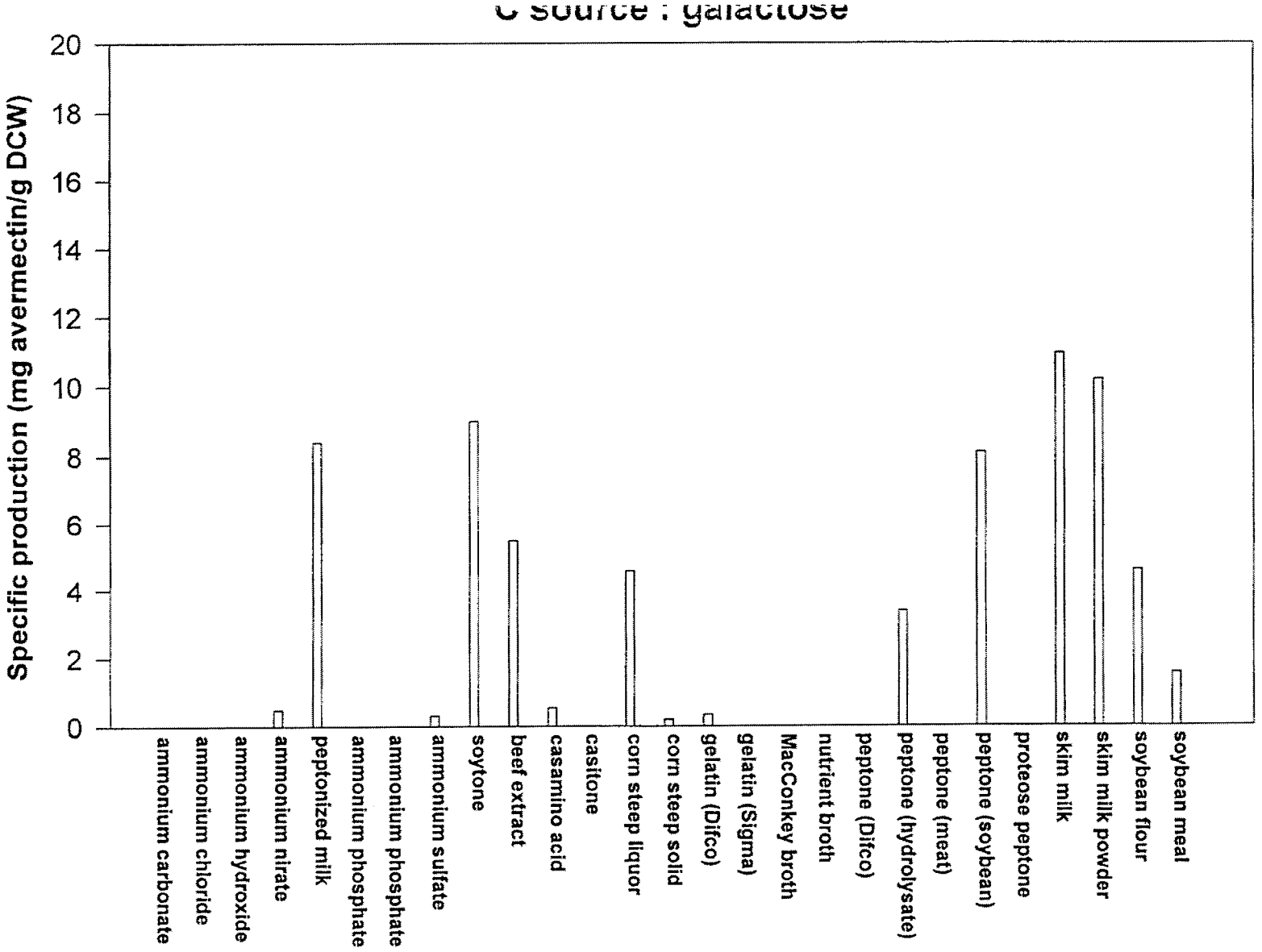


Fig. 2.13. The effect of various nitrogen sources on specific avermectin production with galactose as a carbon source

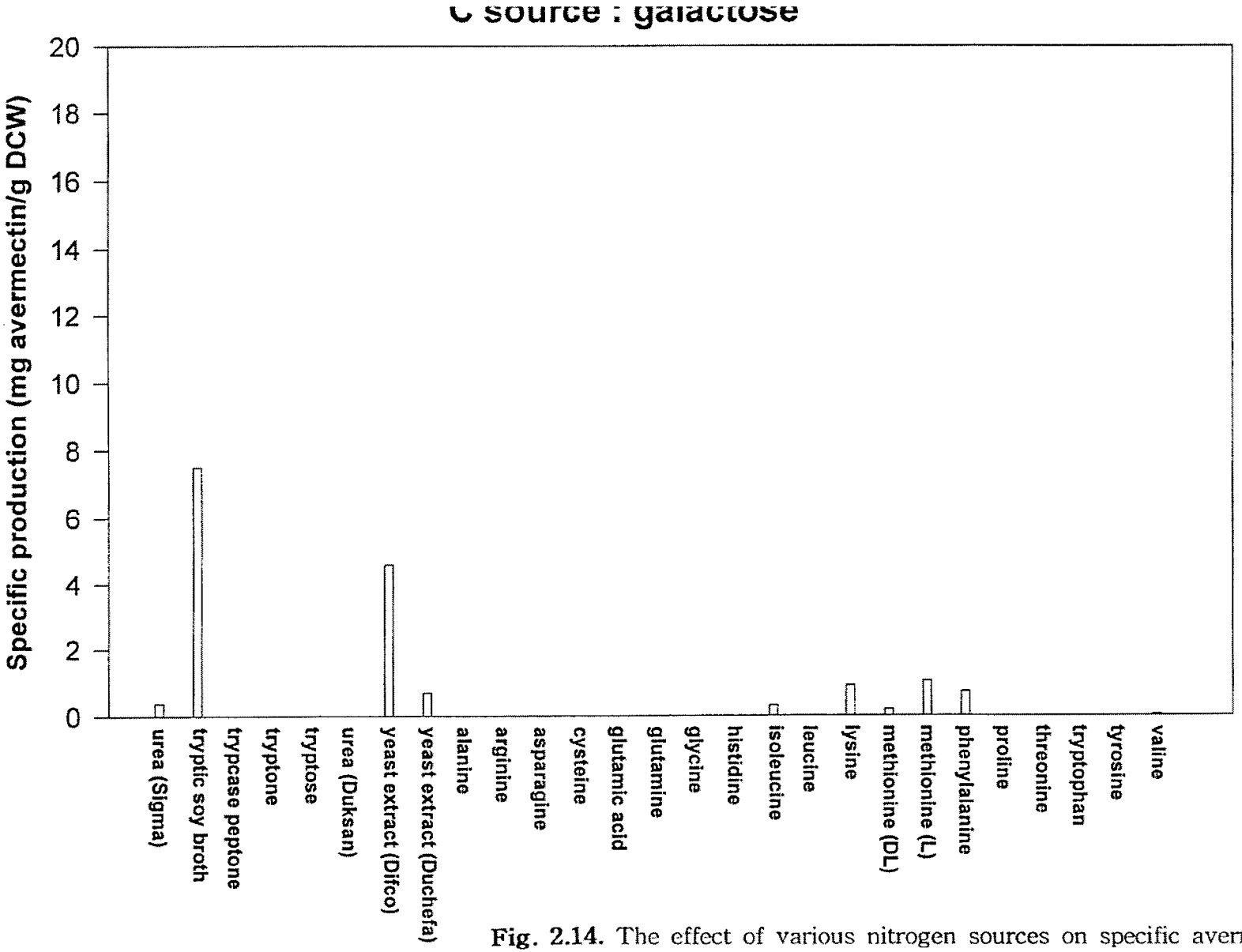


Fig. 2.14. The effect of various nitrogen sources on specific avermectin production with galactose as a carbon source

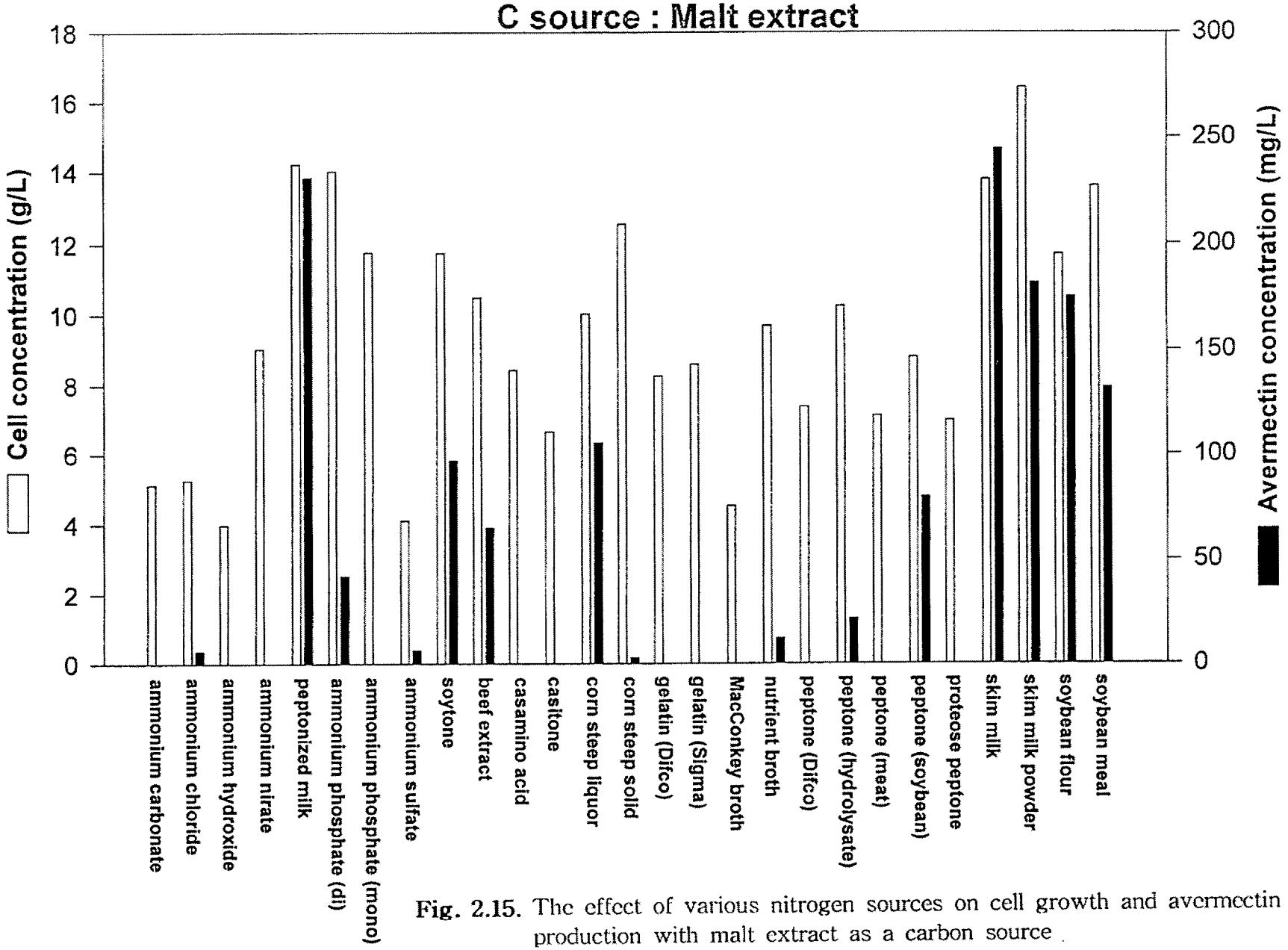


Fig. 2.15. The effect of various nitrogen sources on cell growth and avermectin production with malt extract as a carbon source .

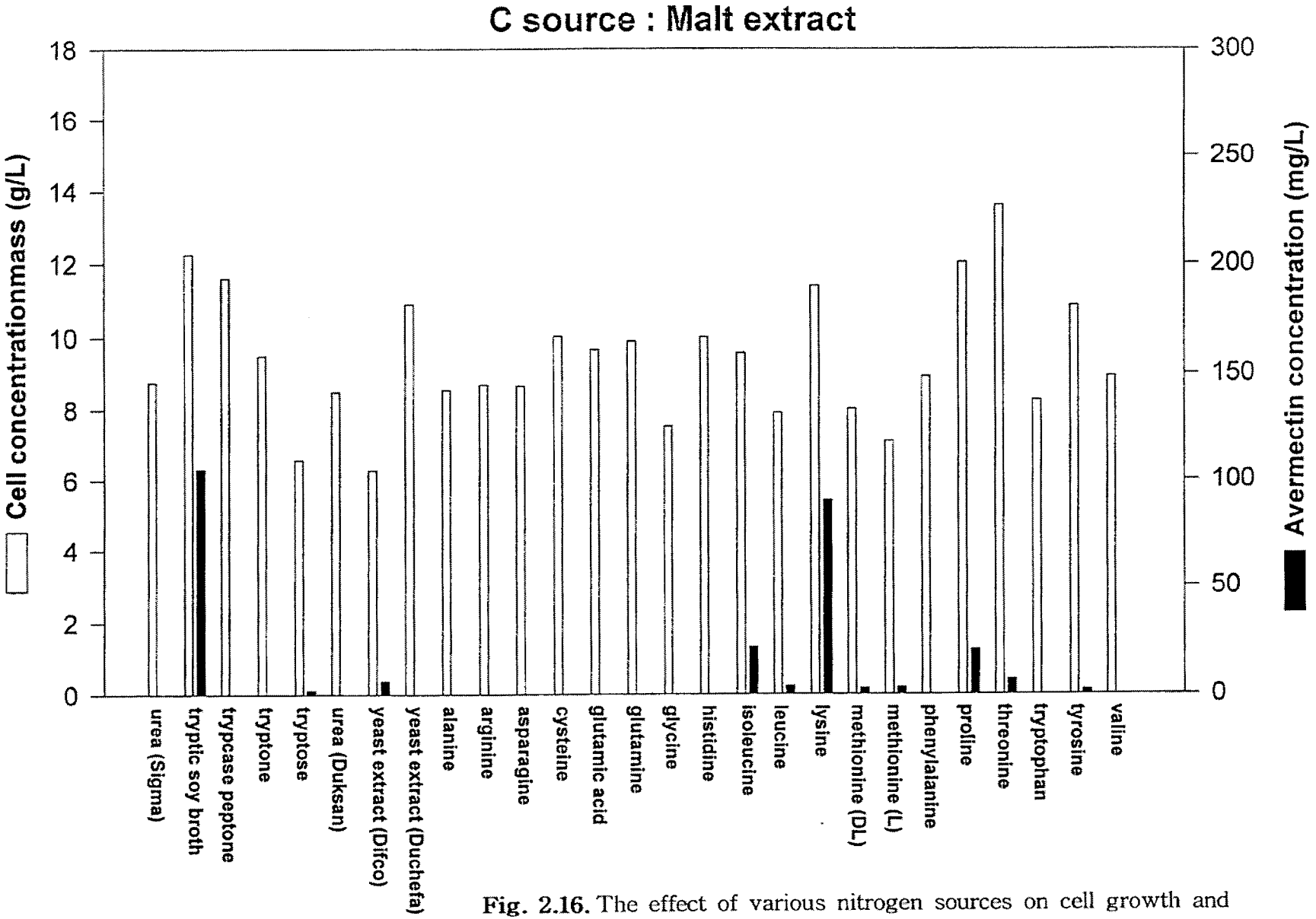


Fig. 2.16. The effect of various nitrogen sources on cell growth and avermectin production with malt extract as a carbon source

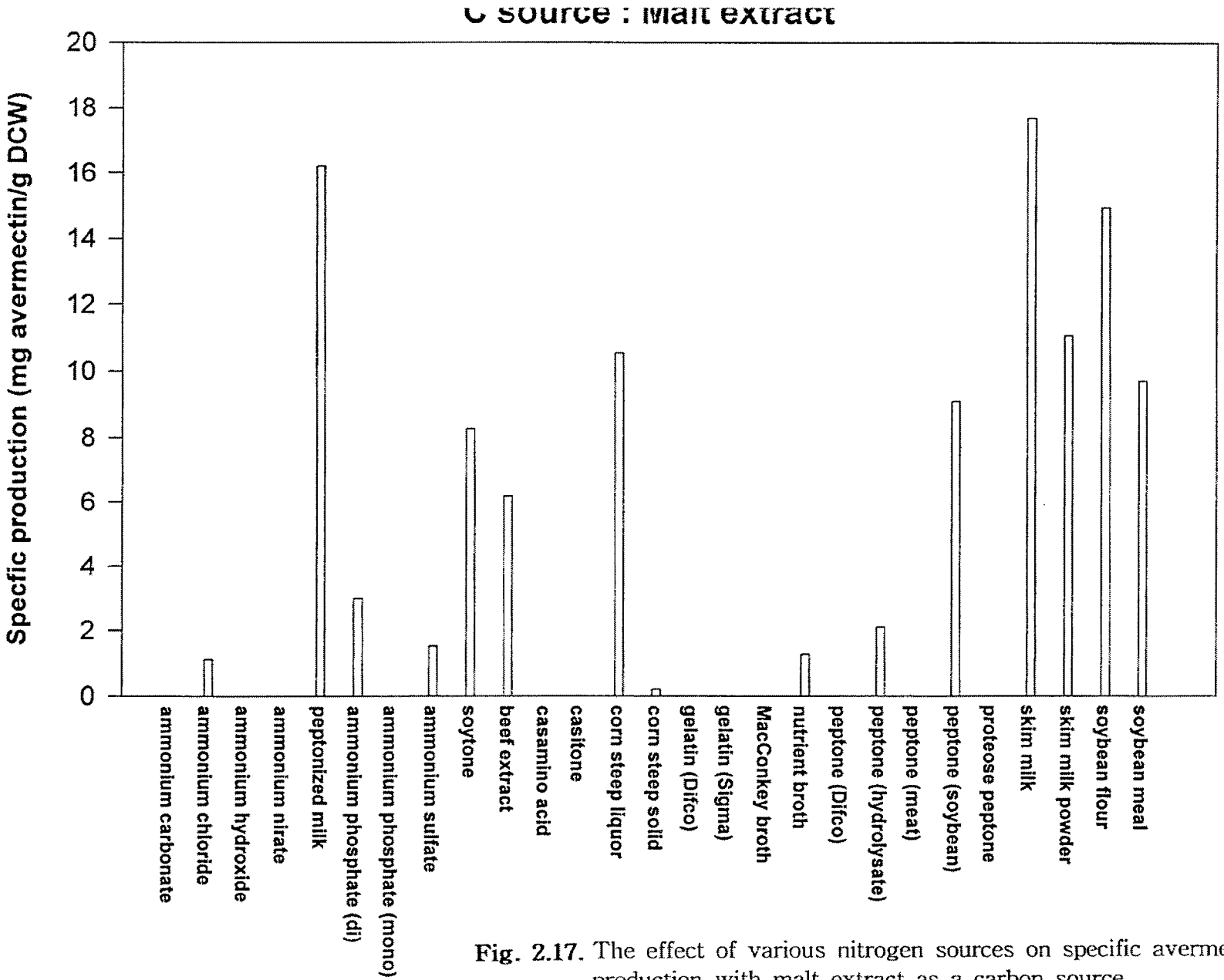


Fig. 2.17. The effect of various nitrogen sources on specific avermectin production with malt extract as a carbon source

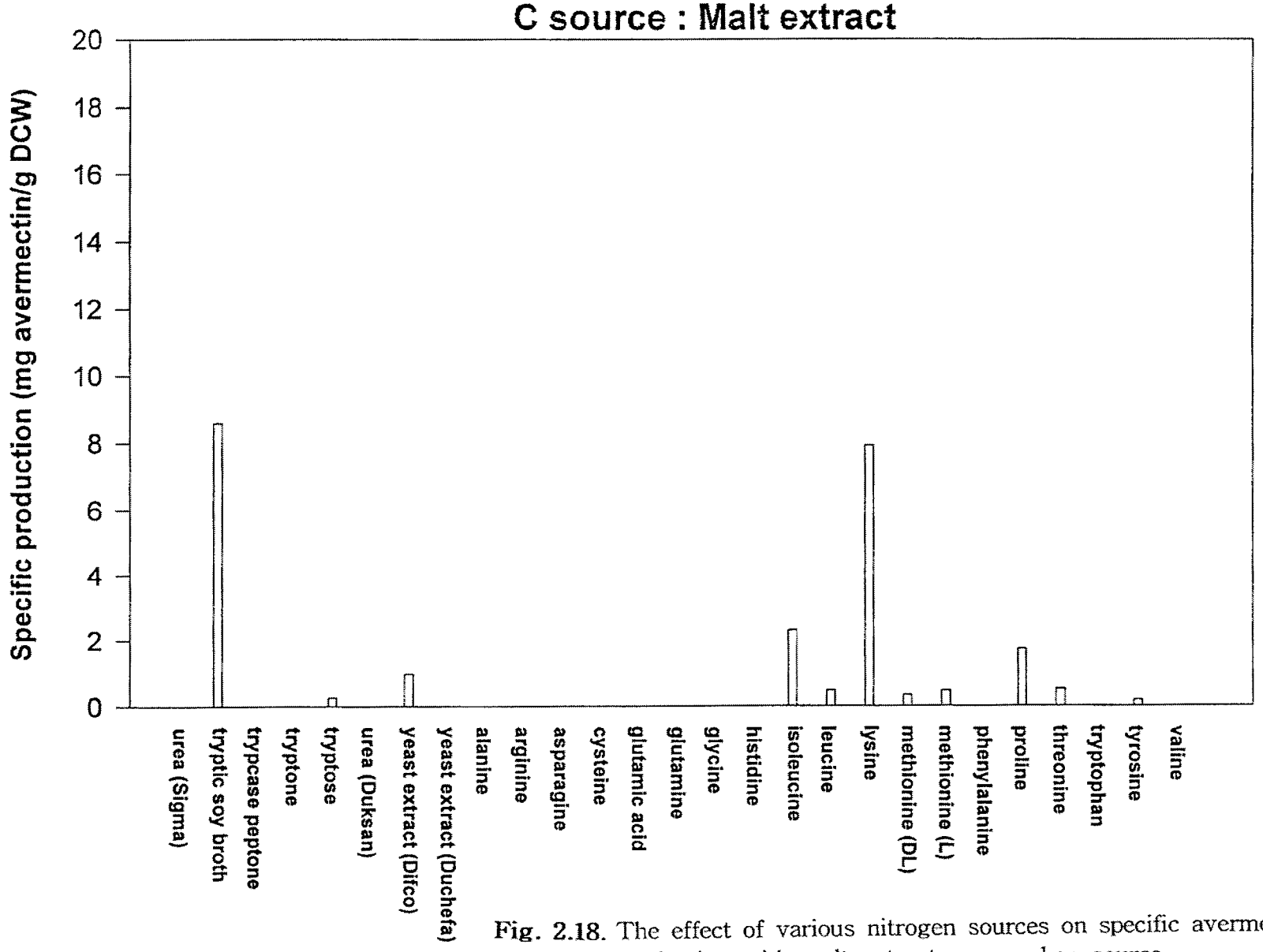


Fig. 2.18. The effect of various nitrogen sources on specific avermectin production with malt extract as a carbon source

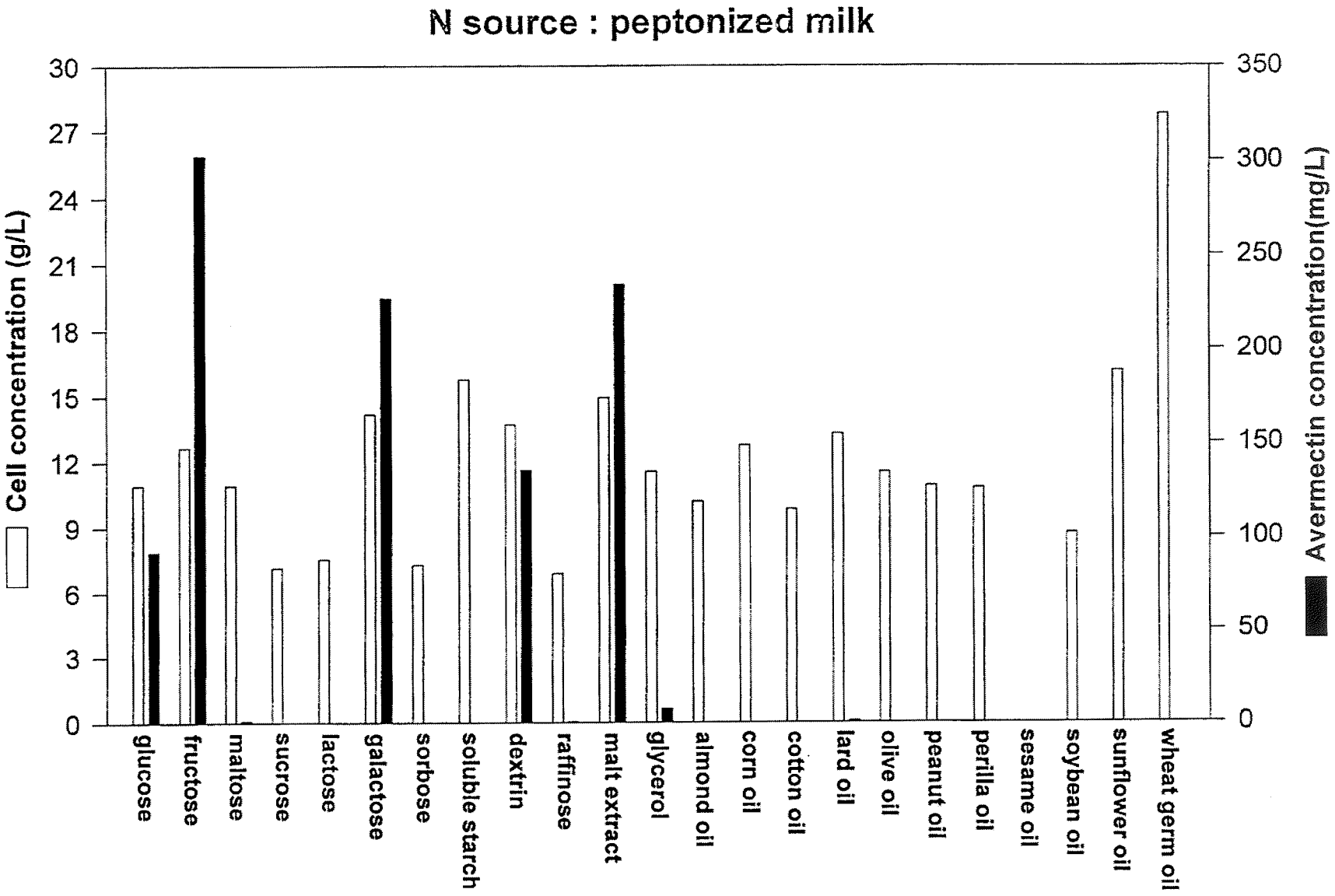


Fig. 2.19. The effect of various carbon sources on cell growth and avermectin production with peptonized milk as a nitrogen source

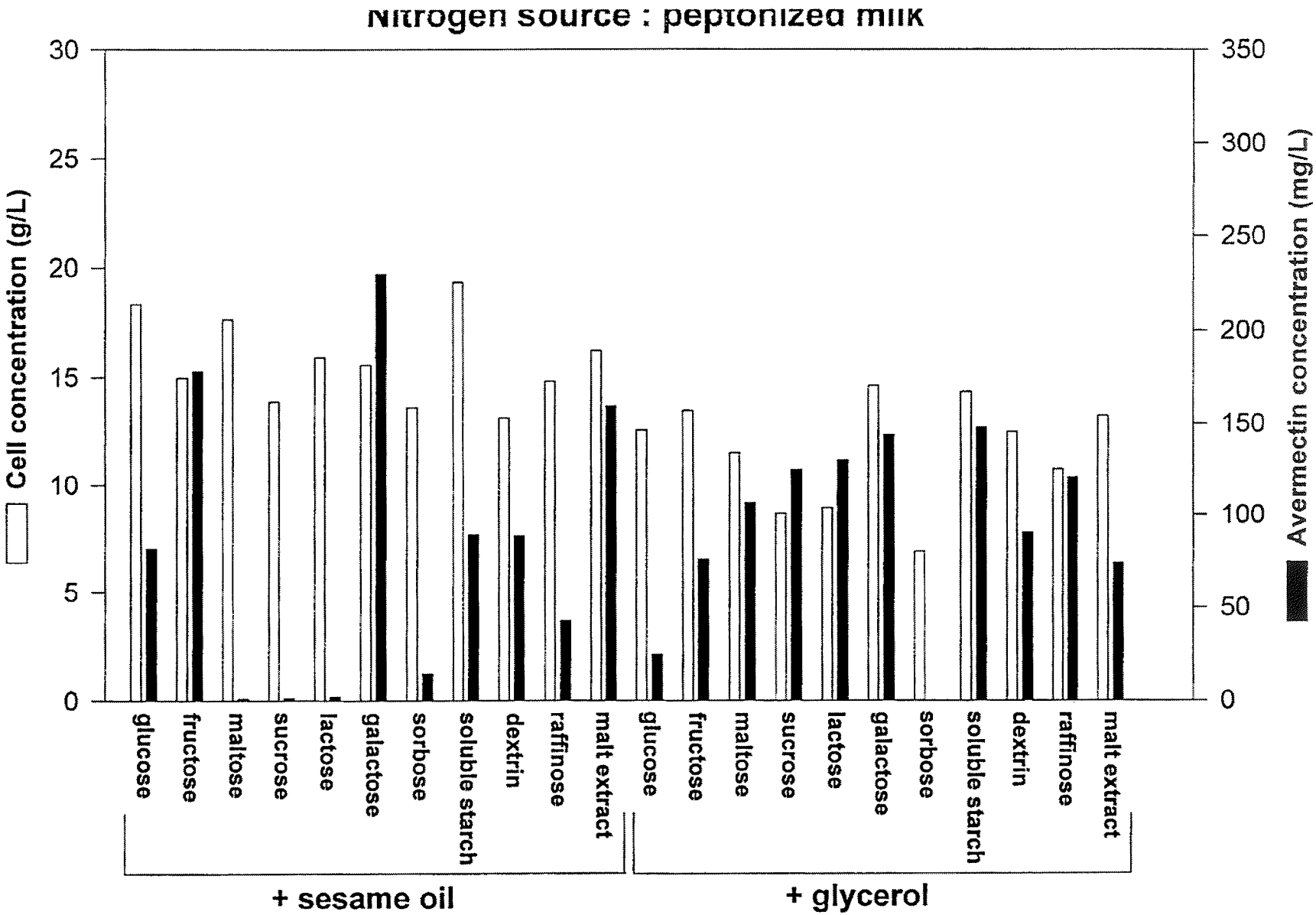


Fig. 2.20. The effect of various carbon sources (plus sesame oil and plus glycerol) on cell growth and avermectin production with peptonized milk as a nitrogen source

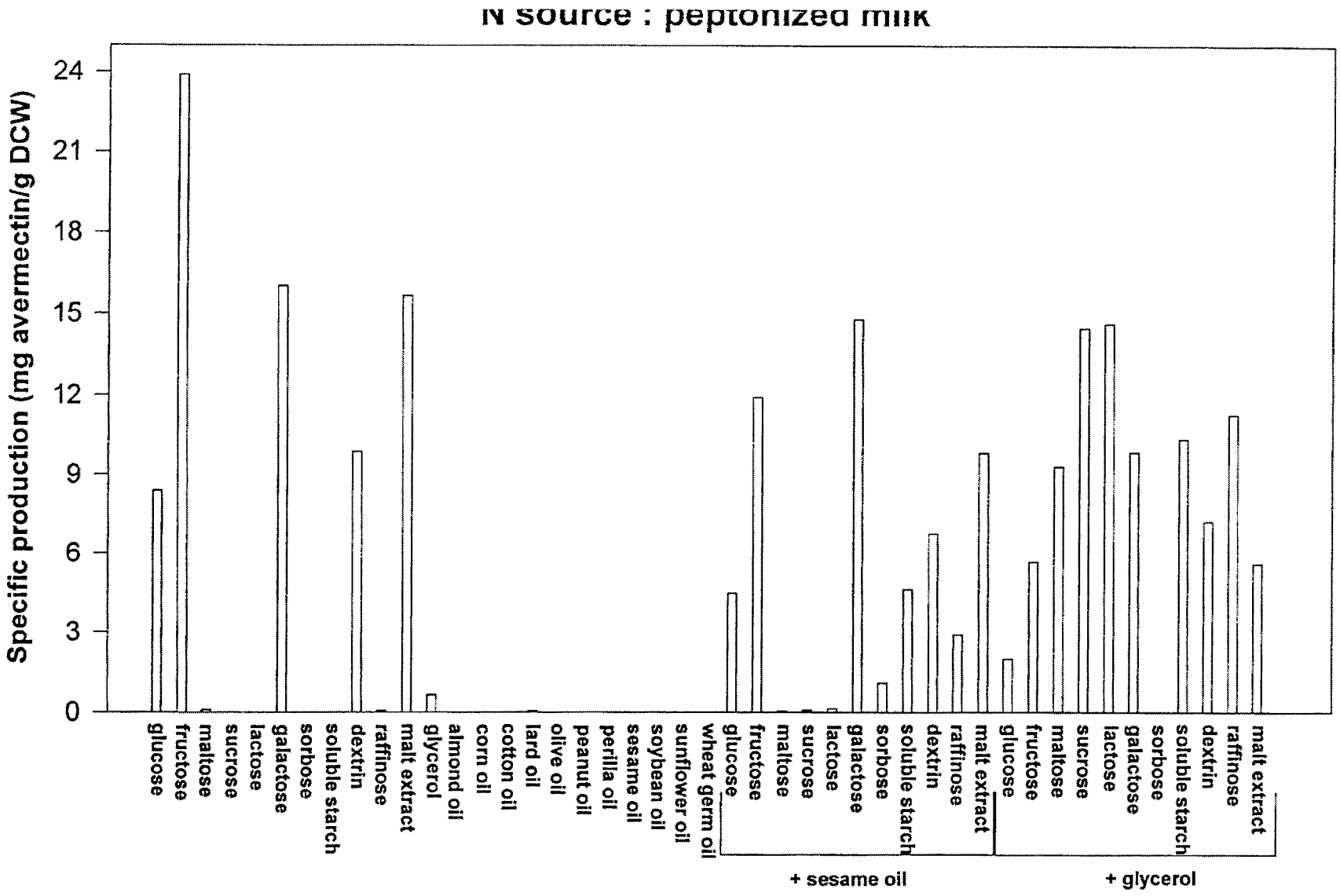


Fig. 2.21. The effect of various carbon sources (plus sesame oil and plus glycerol) on specific avermectin production with peptonized milk as a nitrogen source

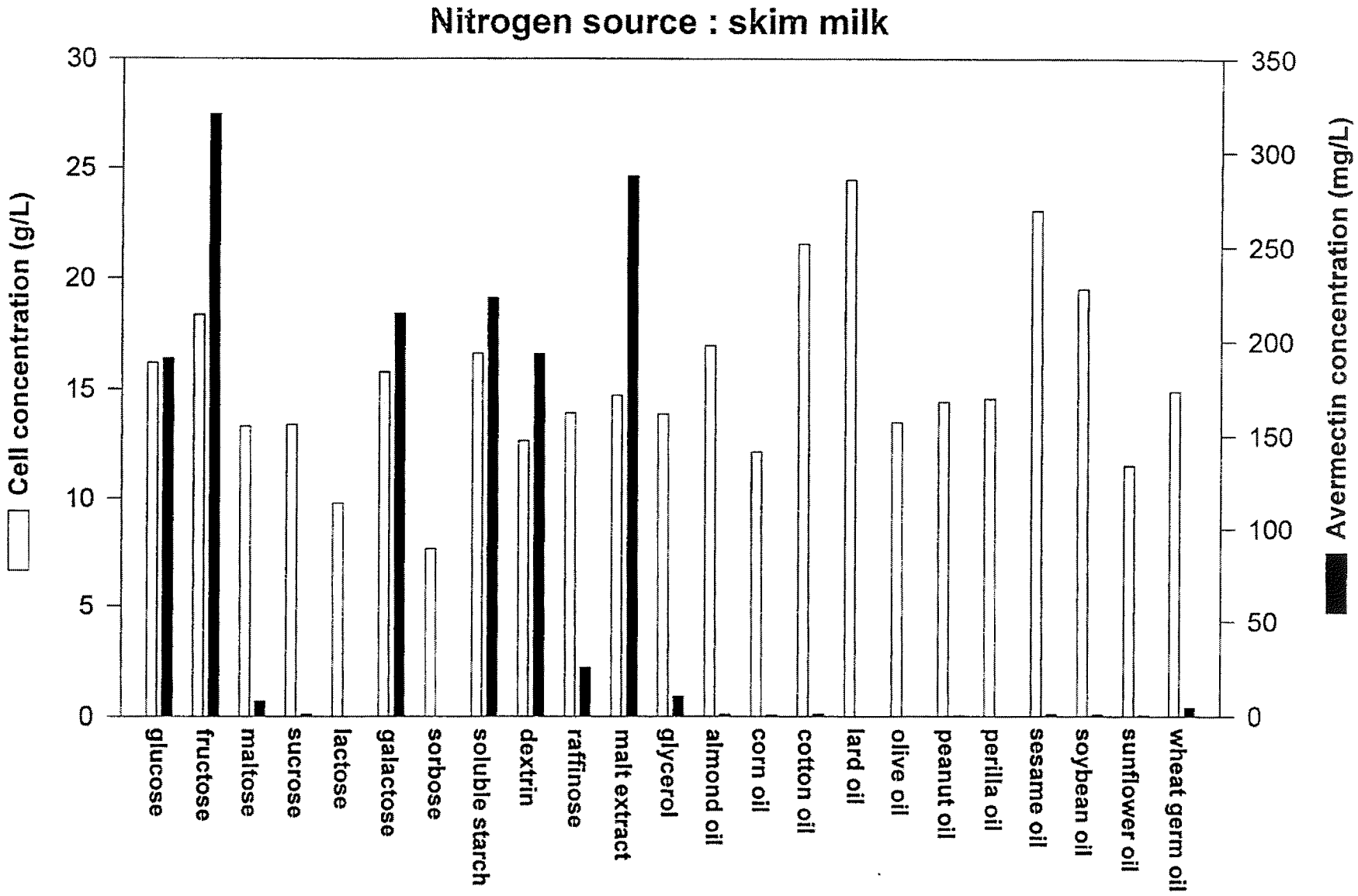


Fig. 2.22. The effect of various carbon sources on cell growth and avermectin production with skim milk as a nitrogen source

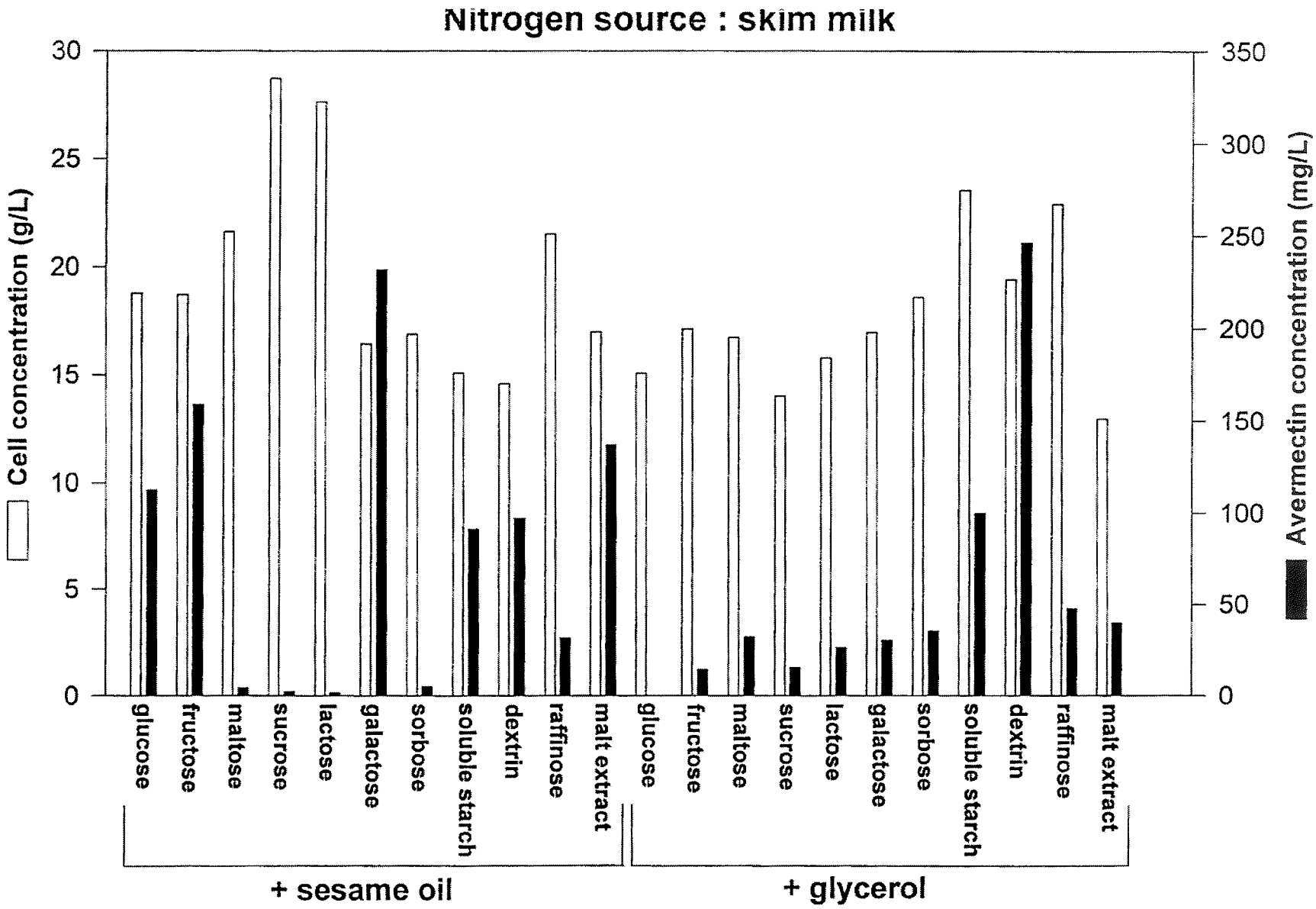


Fig. 2.23. The effect of various carbon sources (plus sesame oil and plus glycerol) on cell growth and avermectin production with skim milk as a nitrogen source

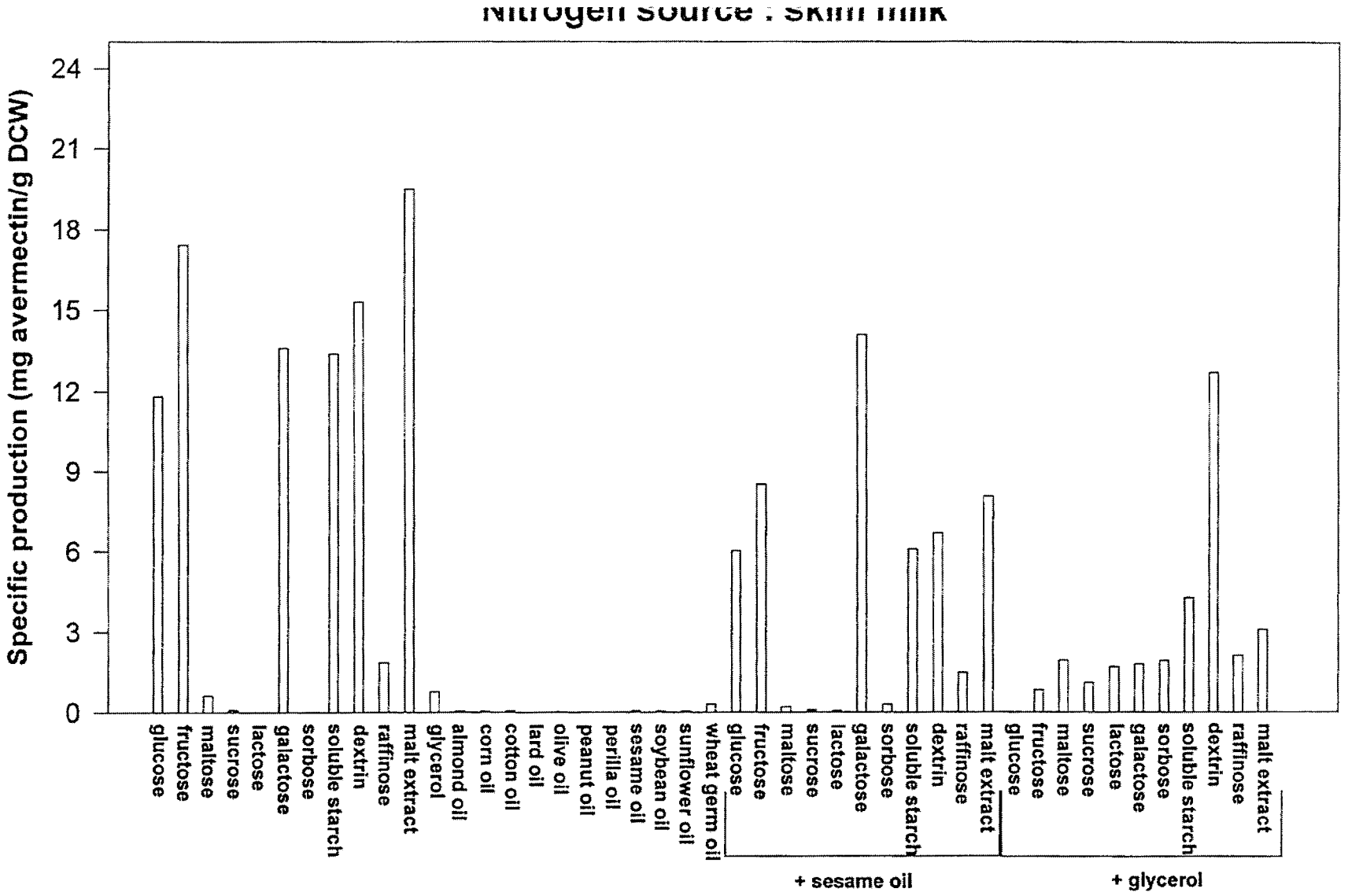


Fig. 2.24. The effect of various carbon sources (plus sesame oil and plus glycerol) on specific avermectin production with skim milk as a nitrogen source

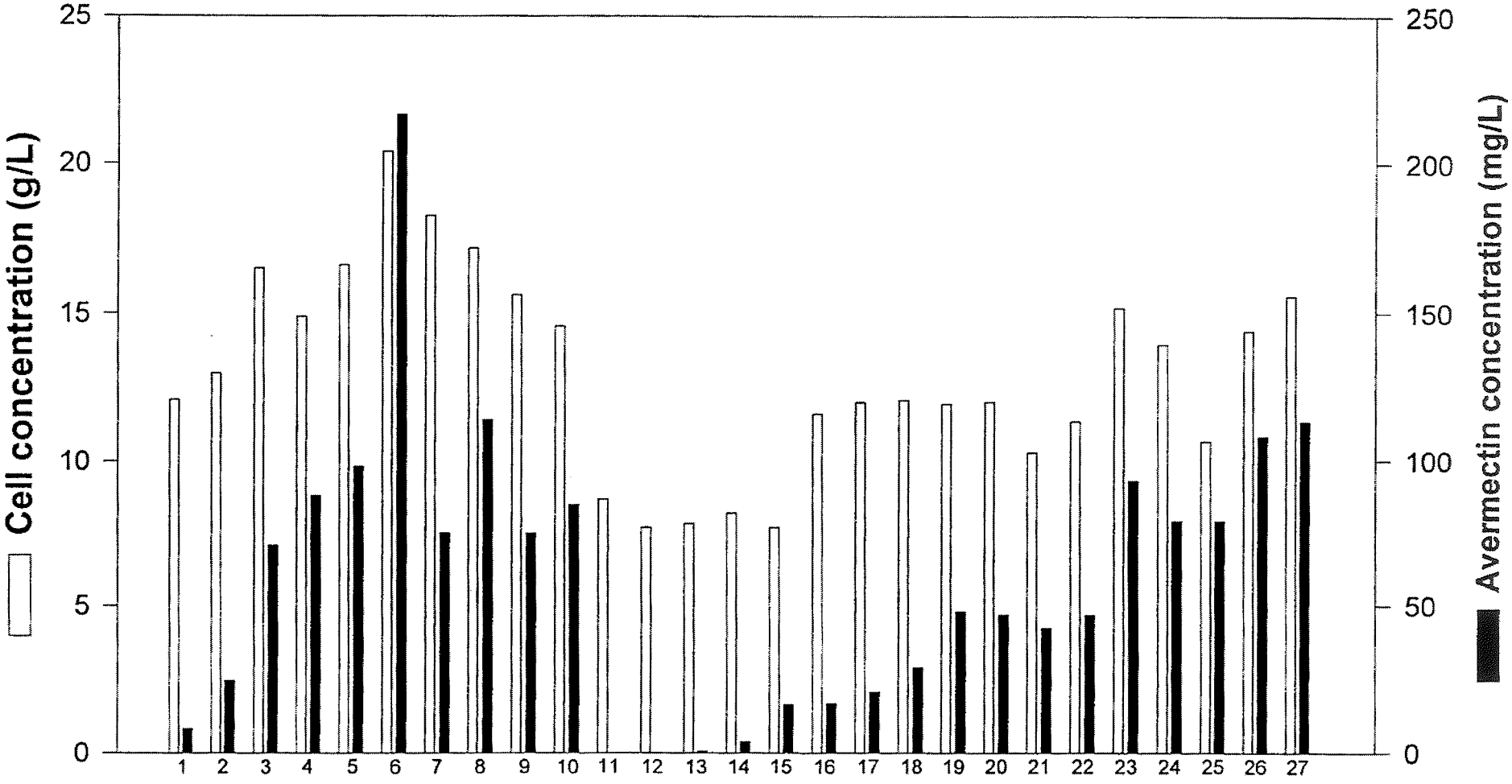


Fig. 2.25. The effect of efficient carbon sources, yeast extract and magnesium phosphate on cell growth and avermectin production

1~5 ; galactose 30, 20, 10, 5, 2g/L
6~10 ; malt extract 30, 20, 10, 5, 2g/L
11~15 ; yeast extract 10, 8, 6, 4, 2g/L
16~25 ; $MgSO_4$ 5, 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.8, 0.6, 0.4g/L
26, 27 ; control, galactose 30g/L
Basal medium : + fructose 30g/L

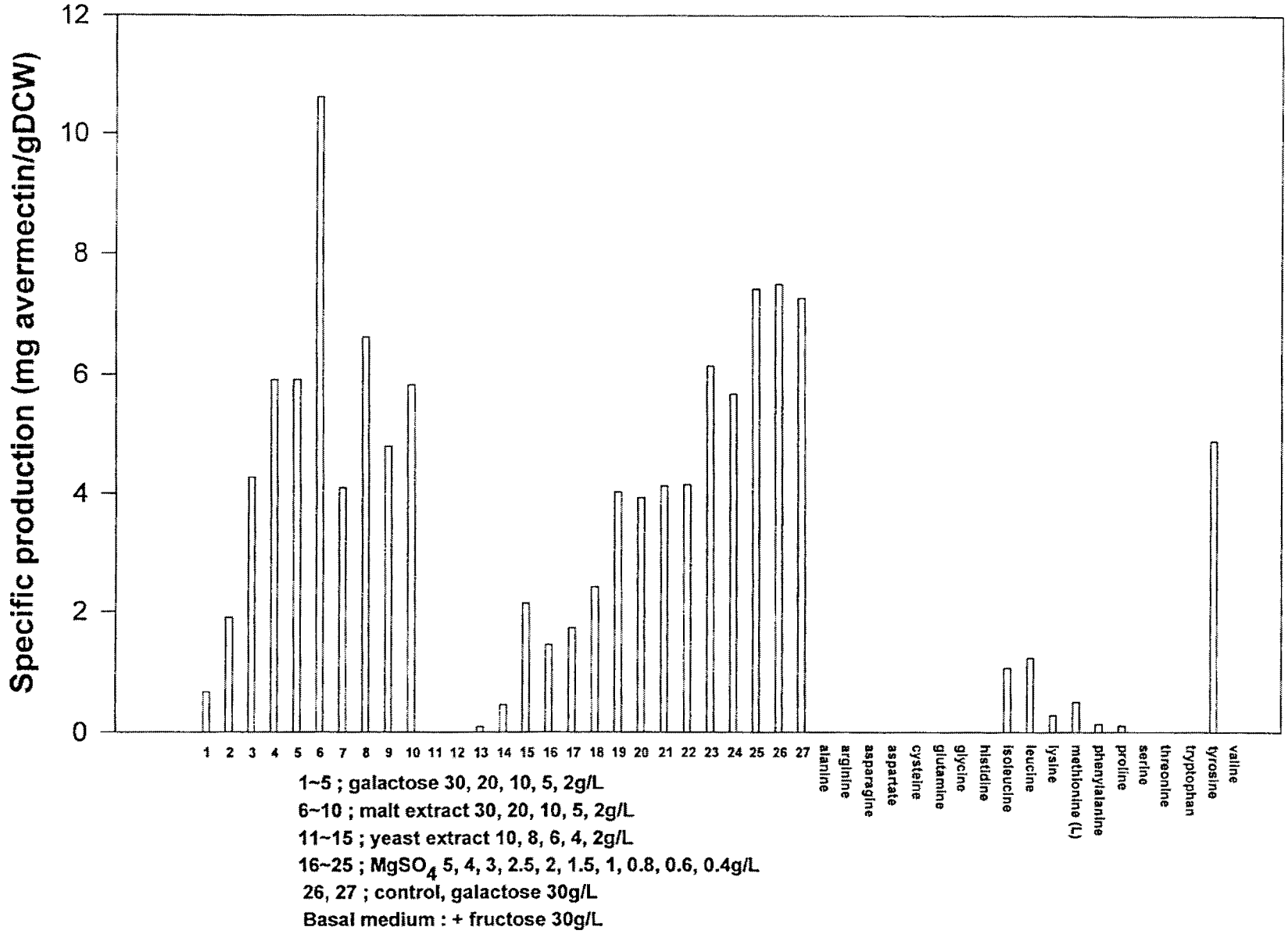


Fig. 2.26. The effect of efficient carbon sources, yeast extract, magnesium phosphate and amino acids on specific avermectin production

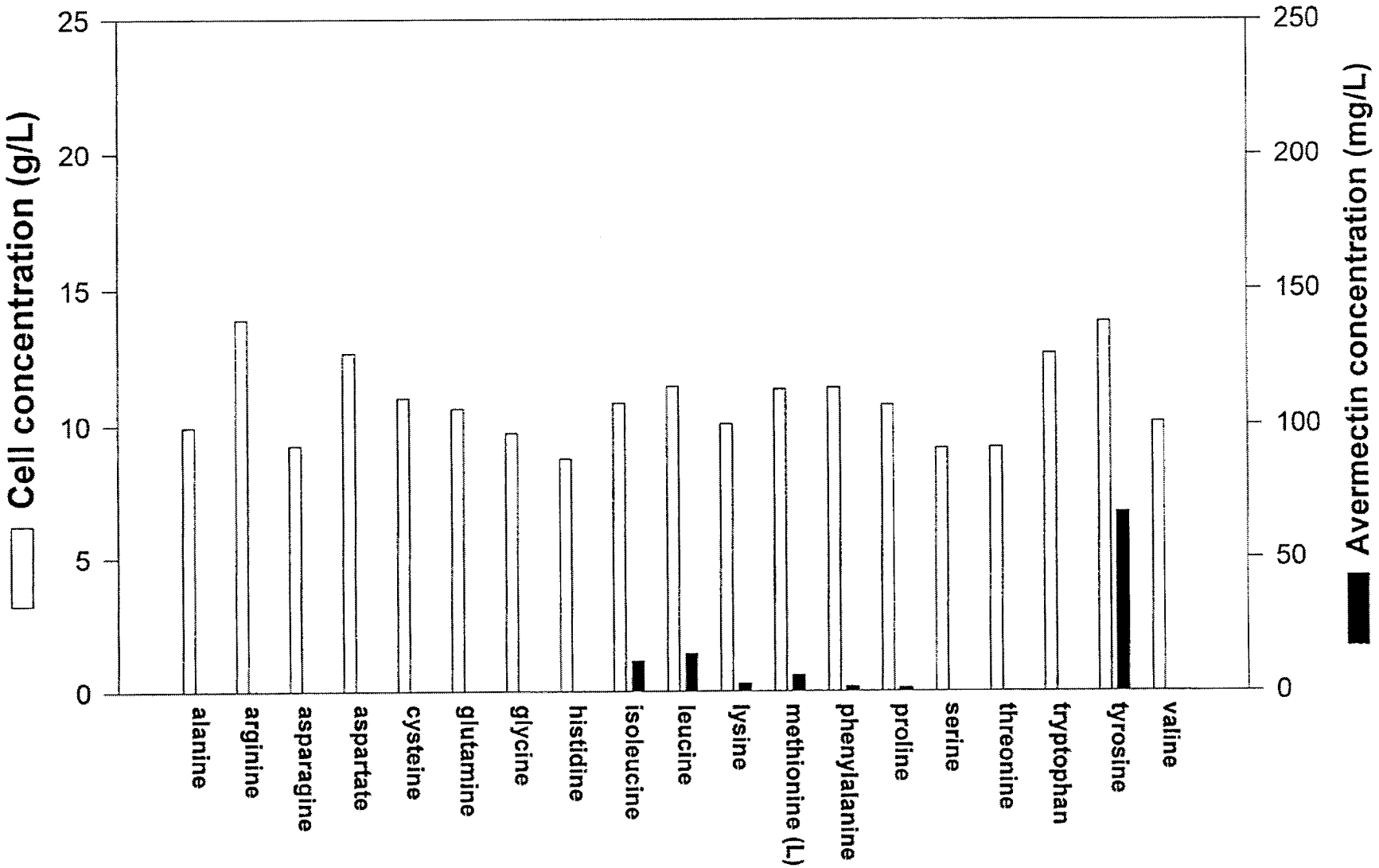


Fig. 2.27. The effect of amino acids on cell growth and avermectin production

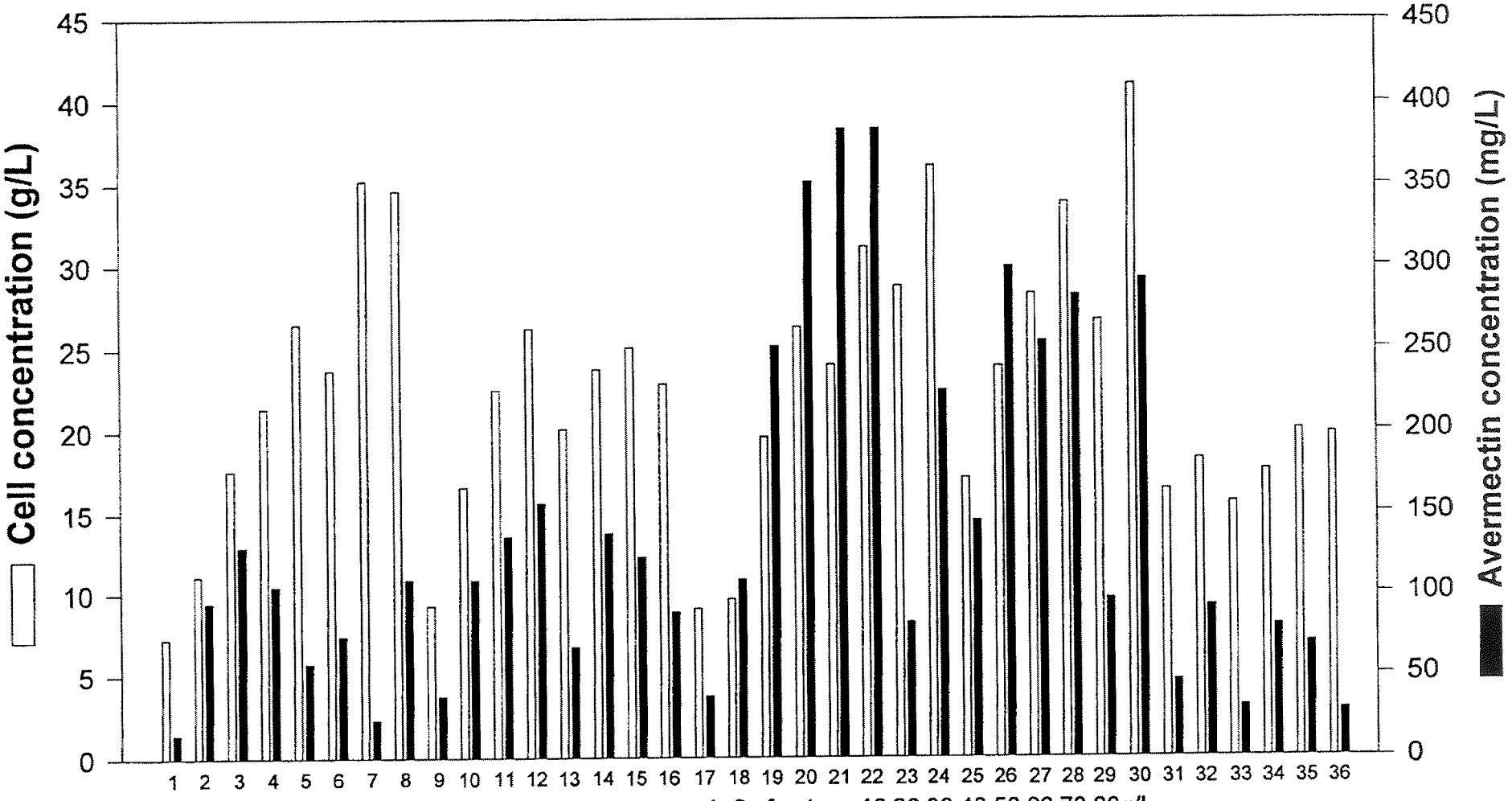


Fig. 2.28. The effect of efficient carbon source and their concentration on cell growth and avermectin production with skim milk (10 g/L) as a nitrogen source

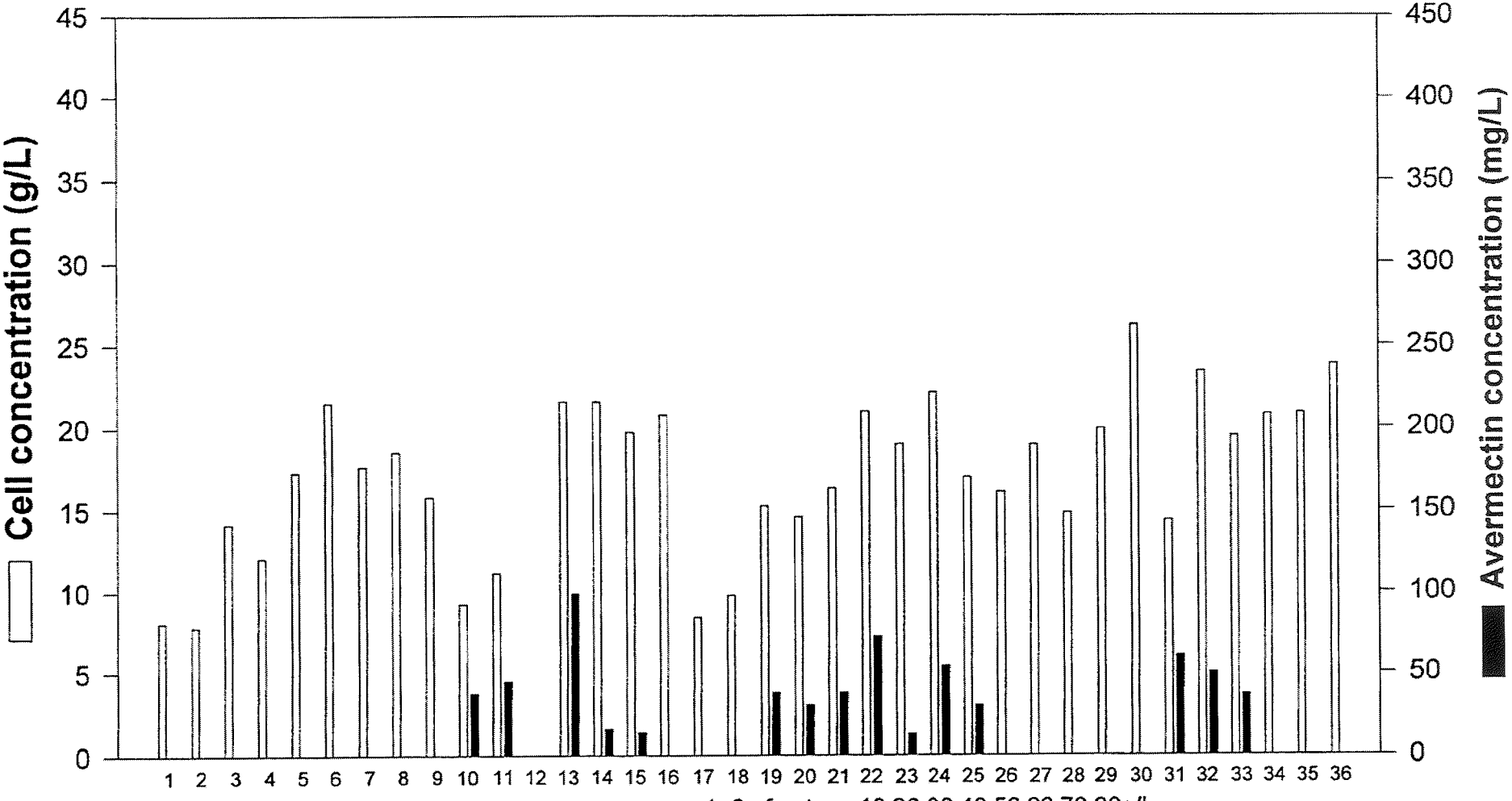


Fig. 2.29. The effect of efficient carbon source and their concentration on cell growth and avermectin production with skim milk (20 g/L) as a nitrogen source

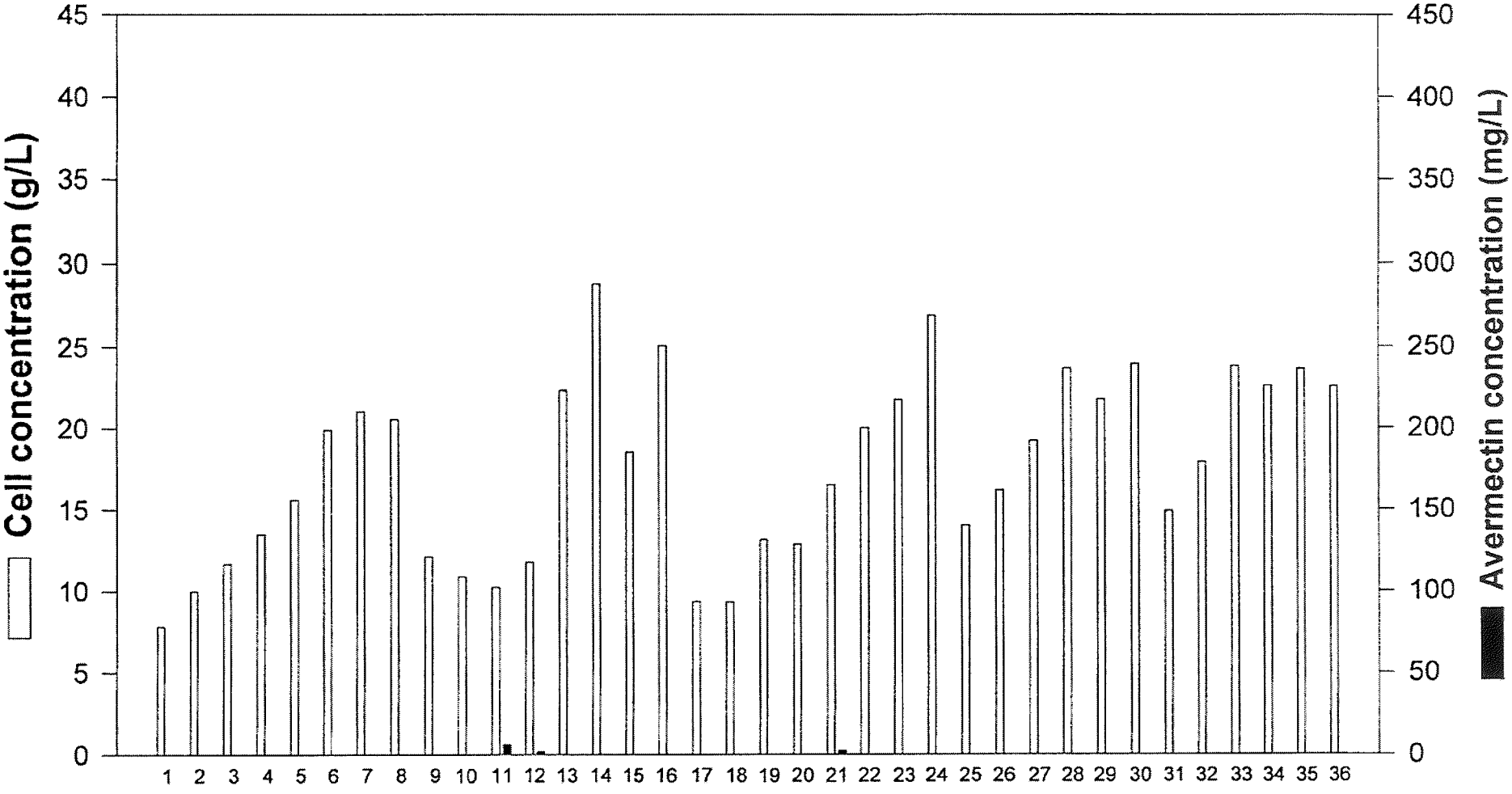


Fig. 2.30. The effect of efficient carbon source and their concentration on cell growth and avermectin production with skim milk (30 g/L) as a nitrogen source

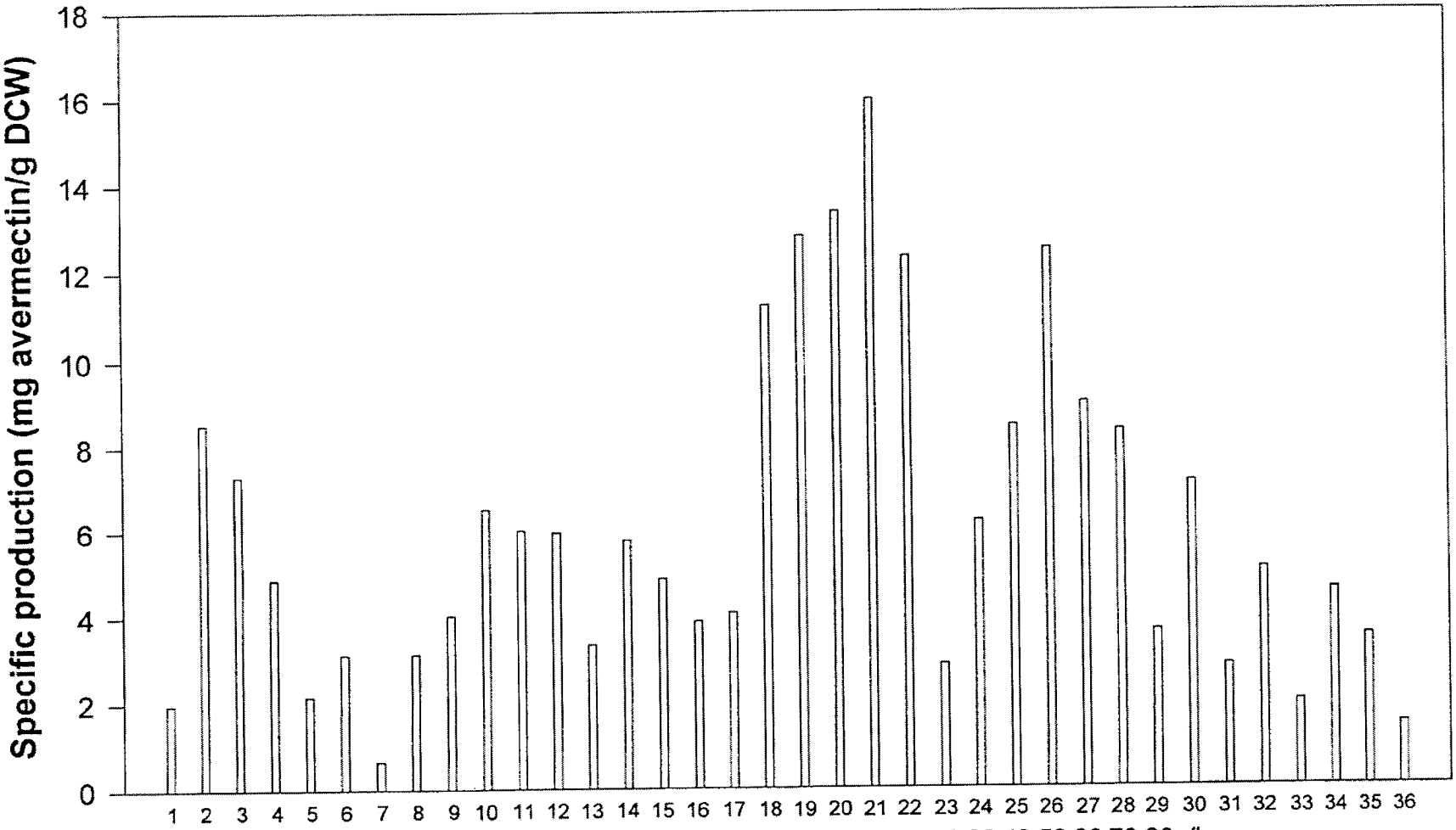


Fig. 2.31. The effect of efficient carbon source and their concentration on specific avermectin production with skim milk (10 g/L) as a nitrogen source

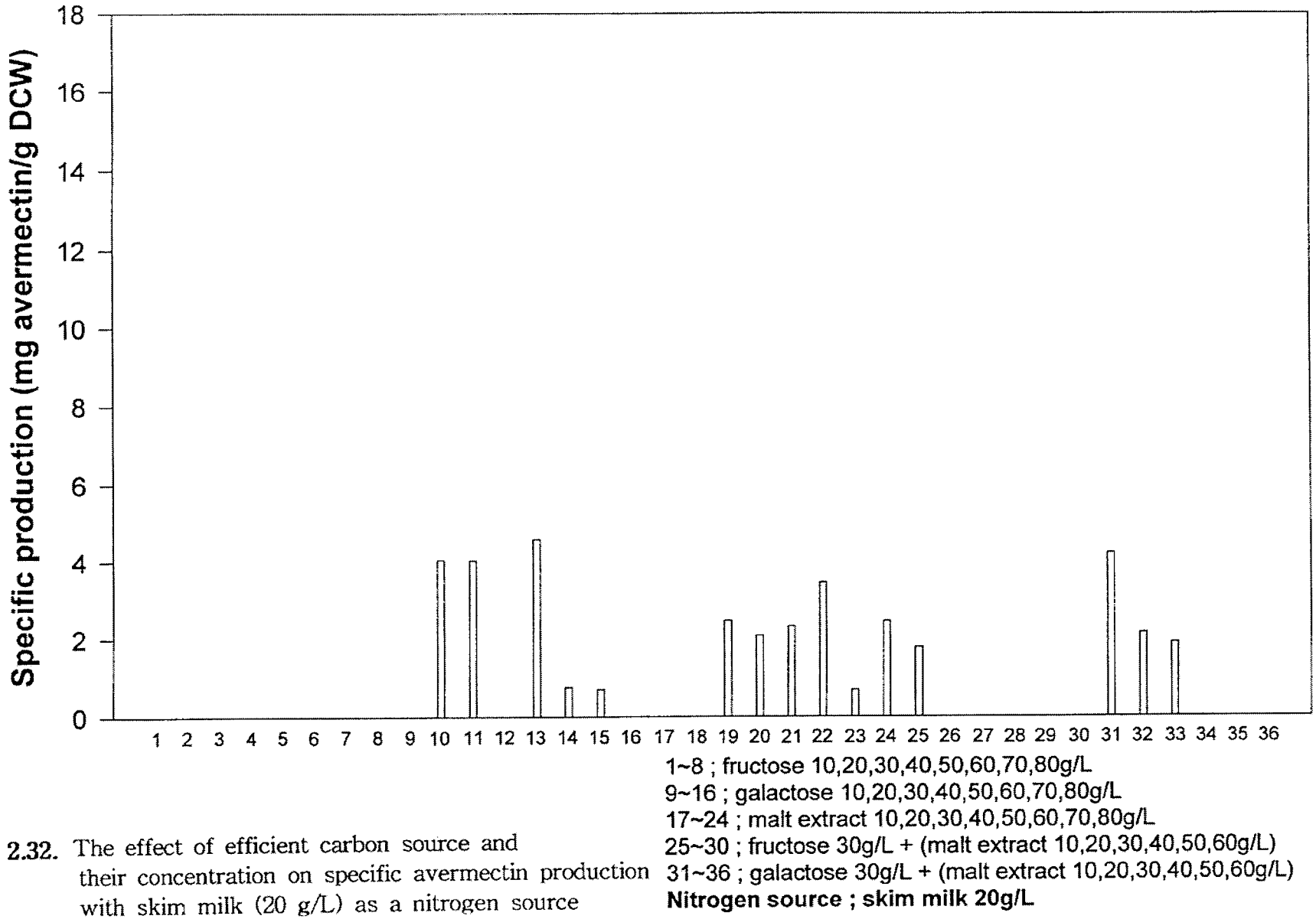


Fig. 2.32. The effect of efficient carbon source and their concentration on specific avermectin production with skim milk (20 g/L) as a nitrogen source

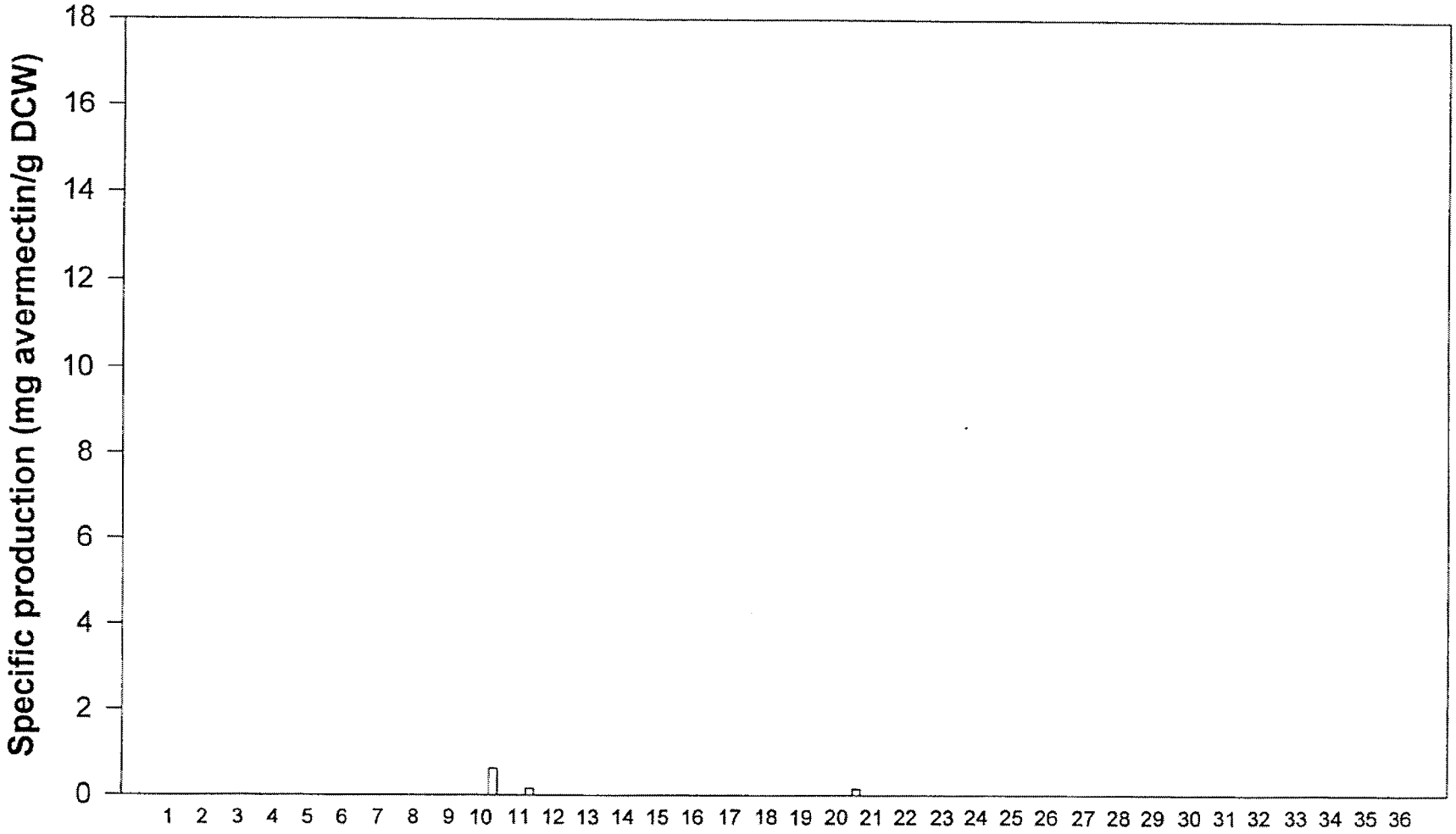


Fig. 2.33. The effect of efficient carbon source and their concentration on specific avermectin production with skim milk (30 g/L) as a nitrogen source

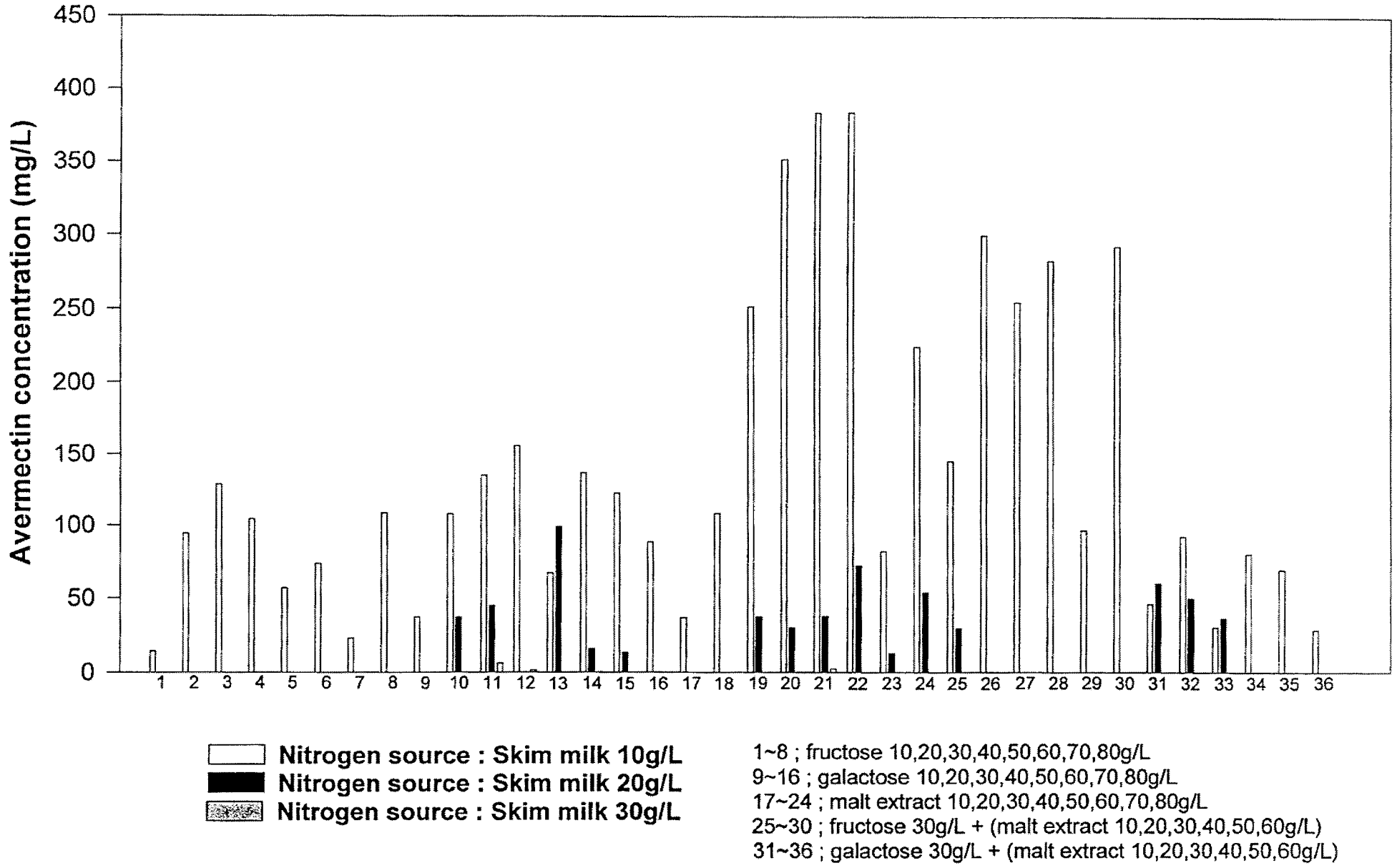


Fig. 2.34. The effect of various concentrations of skim milk (N-source), and fructose, galactose and malt extract (C-sources) on avermectin production

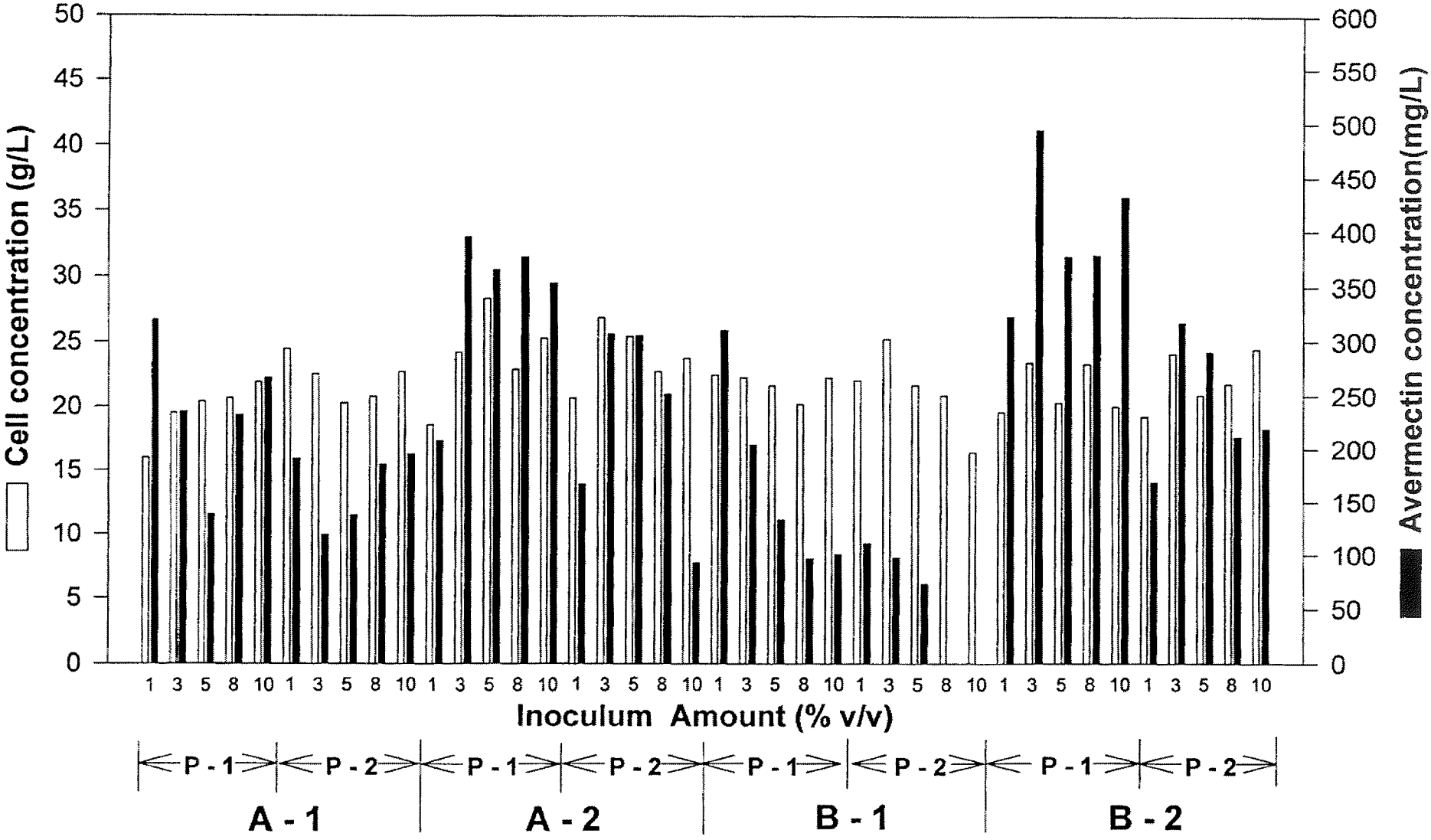


Fig. 2.35. The effect of inoculum amount and various growth media on cell growth and avermectin production in shake flask cultures of *S. Avermitilis* performed with two kinds of production media, (P-1) and (P-2) (Experiment #1)

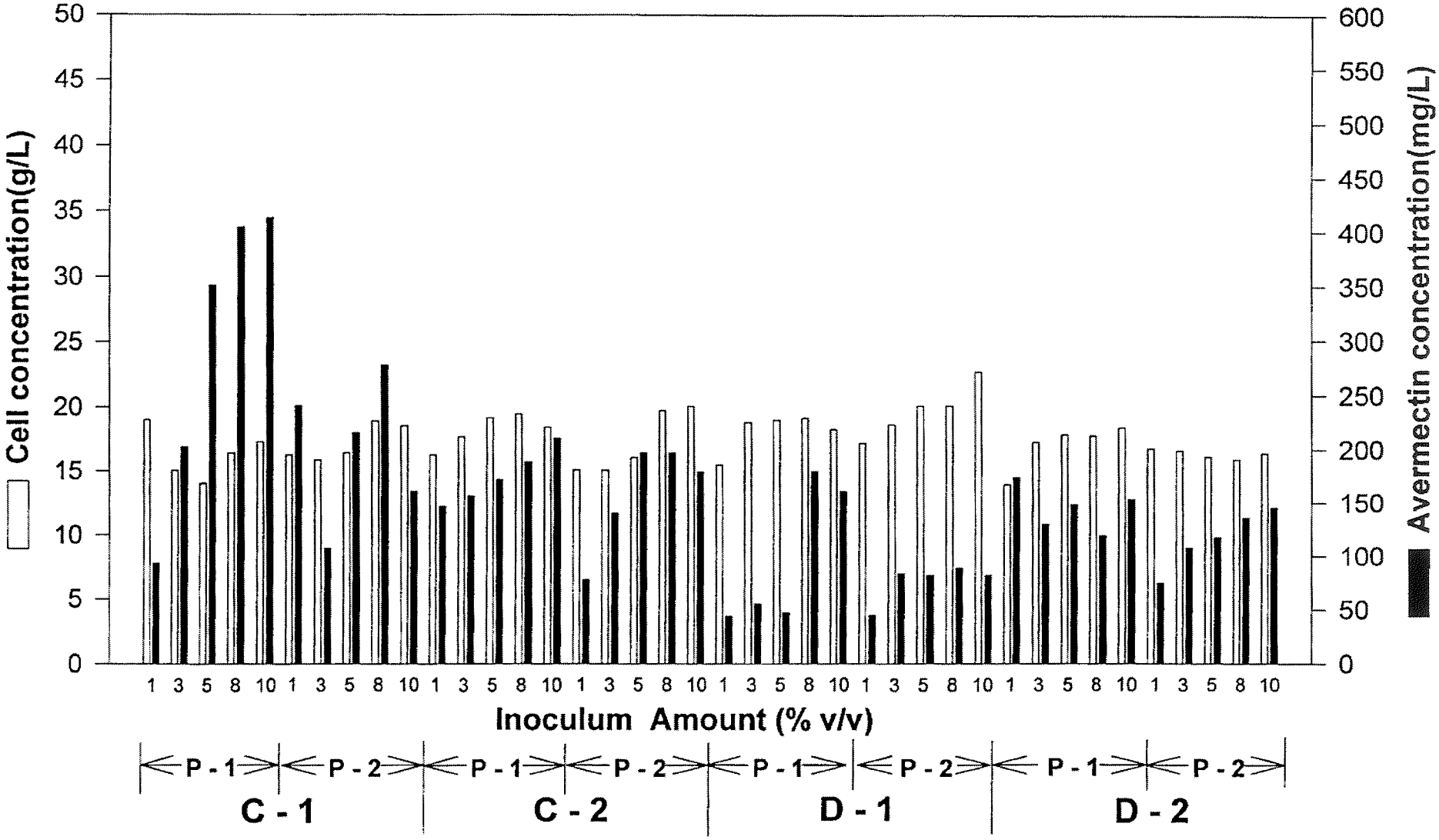


Fig. 2.36. The effect of inoculum amount and various growth media on cell growth and avermectin production in shake flask cultures of *S. Avermitilis* performed with two kinds of production media, (P-1) and (P-2) (Experiment #2)

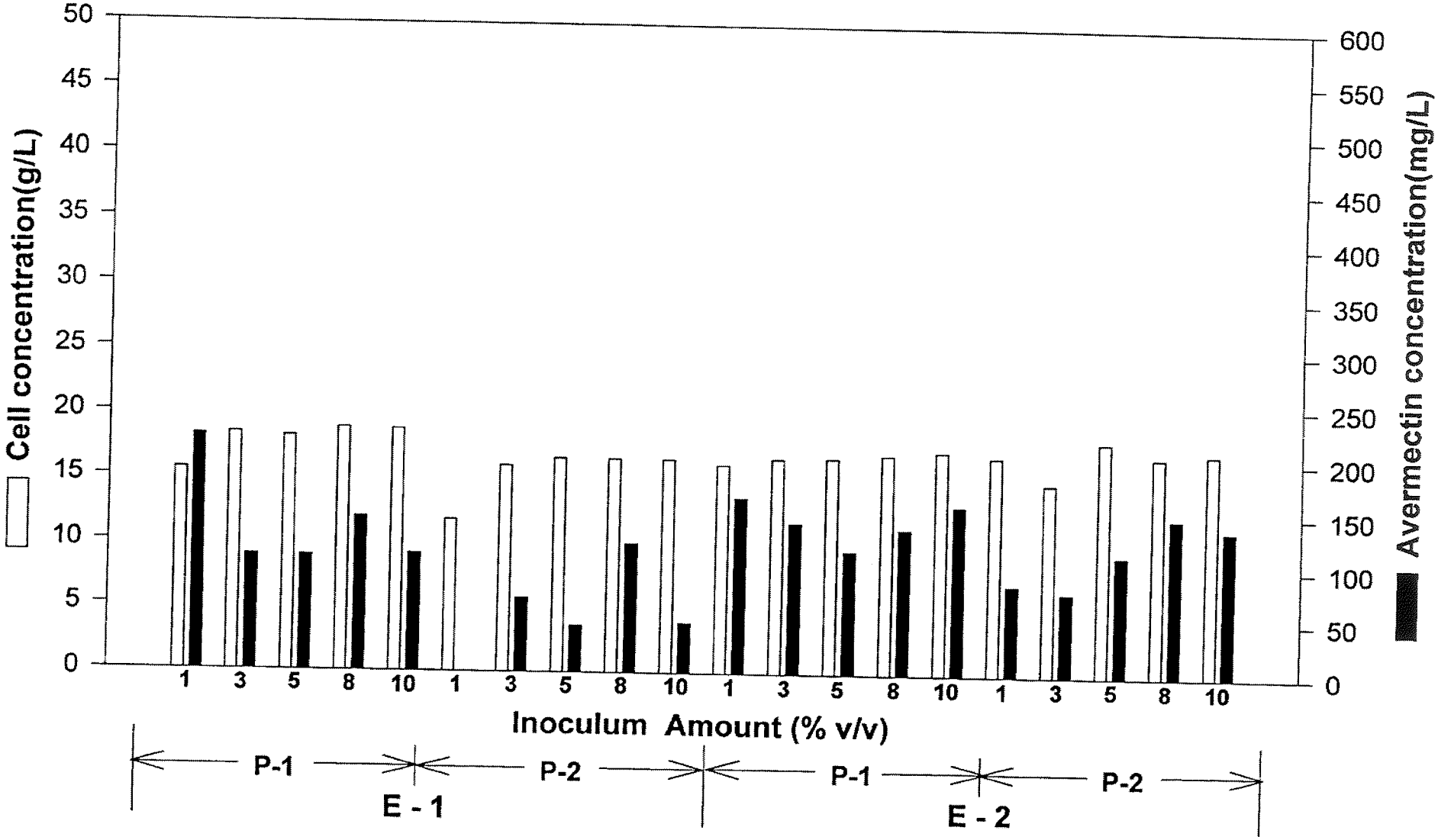


Fig. 2.37. The effect of inoculum amount and various growth media on cell growth and avermectin production in shake flask cultures of *S. Avermitilis* performed with two kinds of production media, (P-1) and (P-2) (Experiment #3)

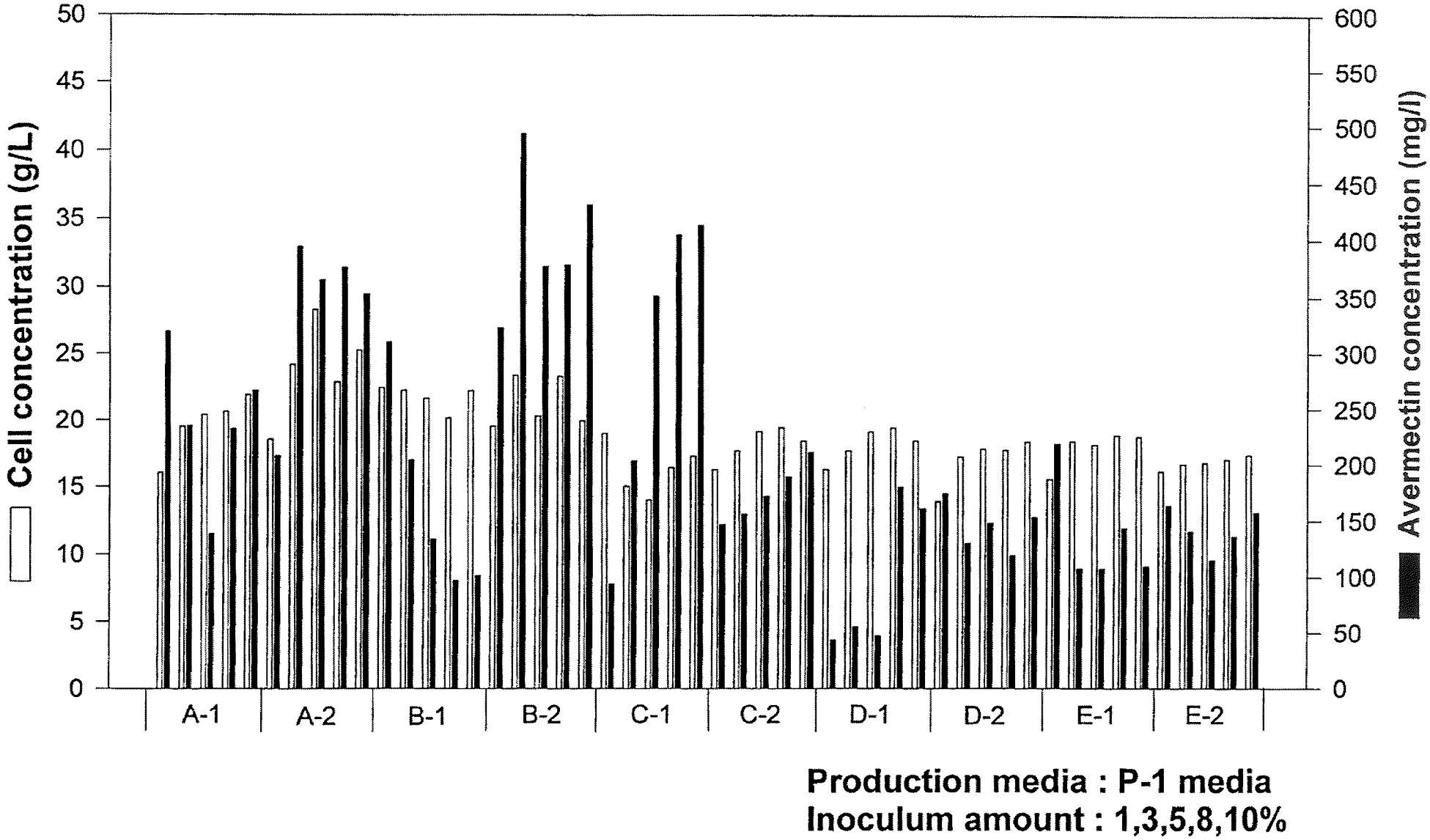


Fig. 2.38. The effect of inoculum amount and various growth media on cell growth and avermectin production in shake flask cultures of *S. Avermitilis* performed with production medium, (P-1)

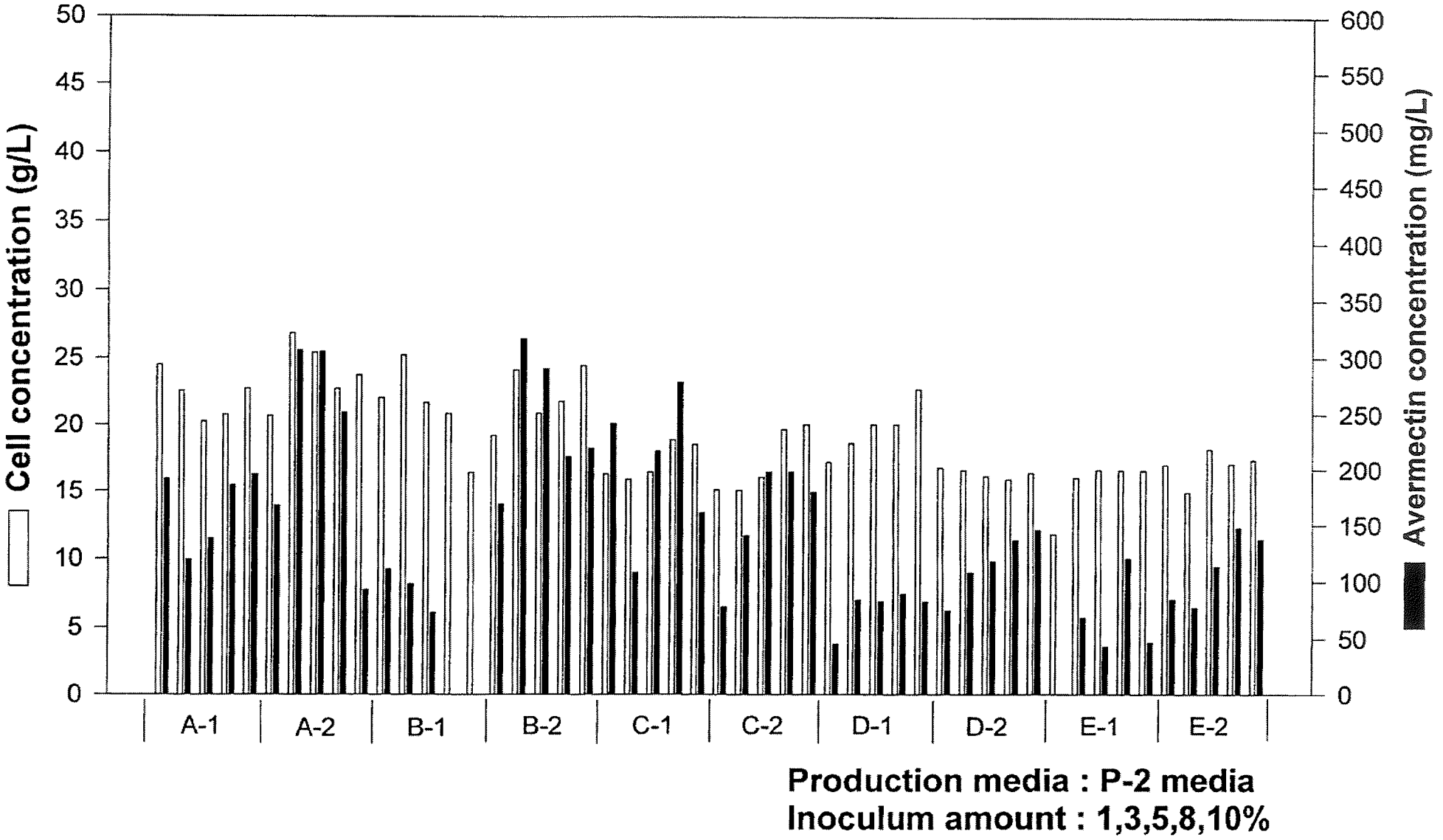


Fig. 2.39. The effect of inoculum amount and various growth media on cell growth and avermectin production in shake flask cultures of *S. Avermitilis* performed with production medium, (P-2)

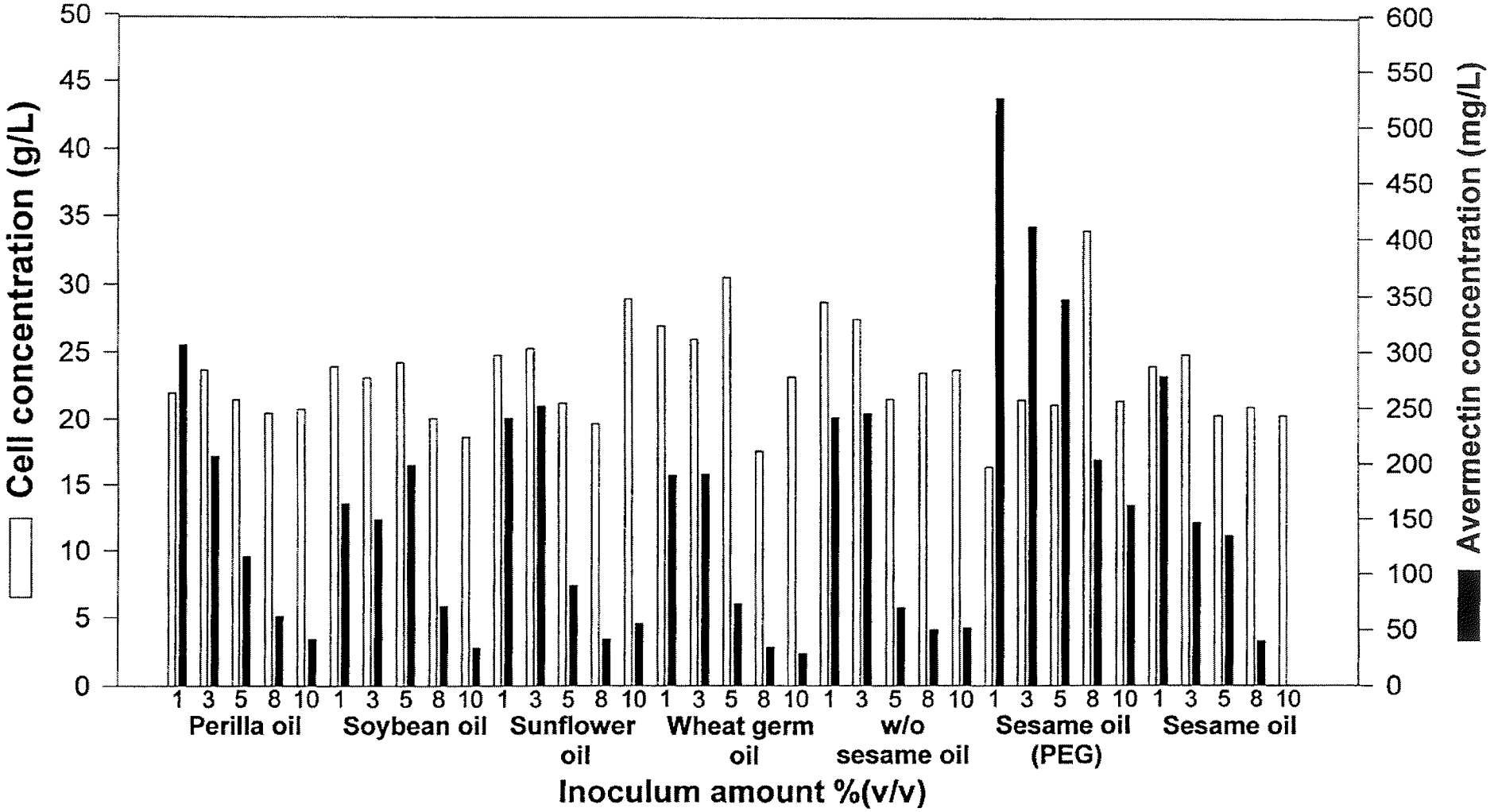


Fig. 2.40. The effect of inoculum amount and different growth media supplemented with various kinds of oils on cell growth and avermectin production
(data I)

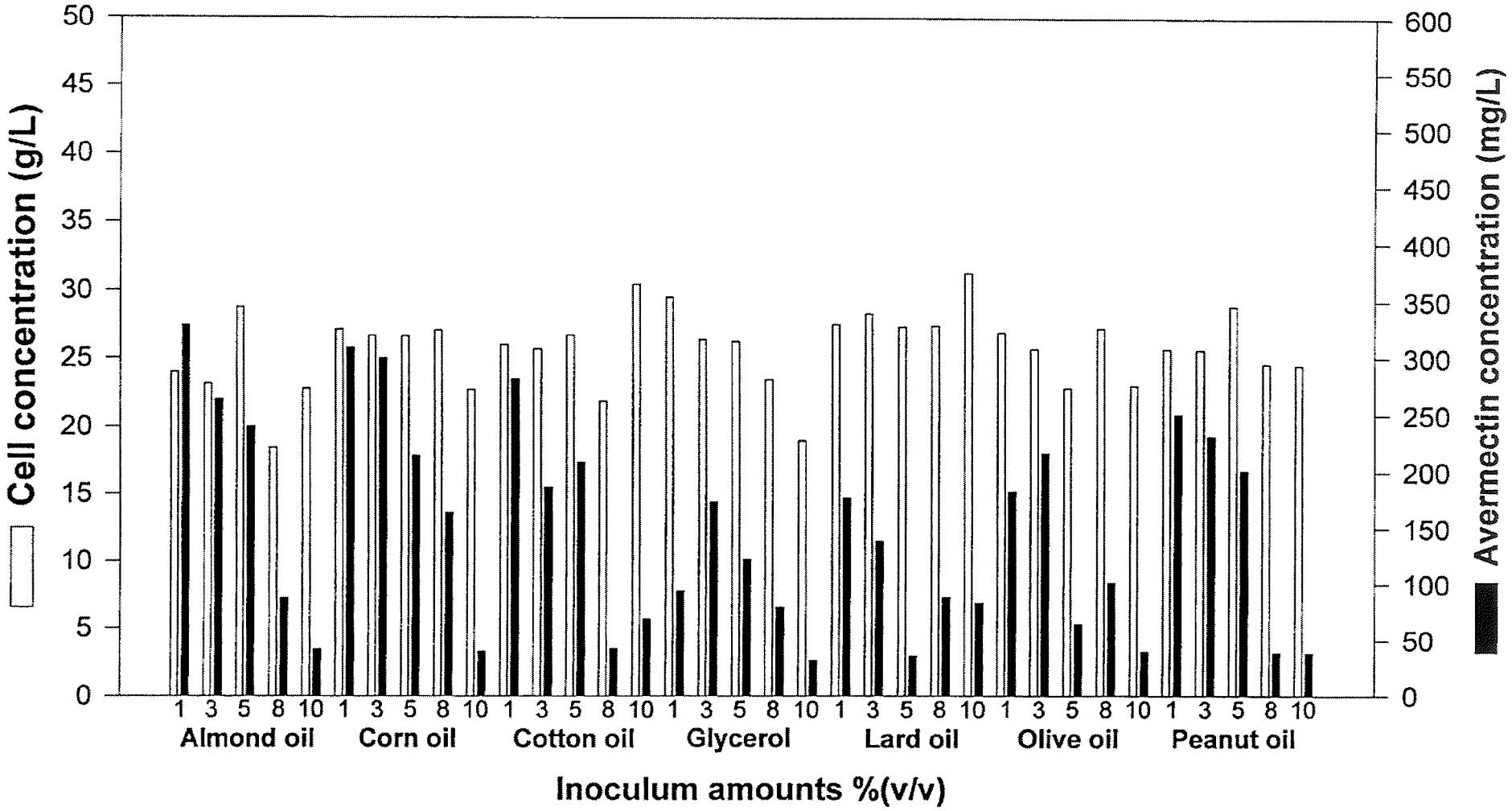


Fig. 2.41. The effect of inoculum amount and different growth media supplemented with various kinds of oils on cell growth and avermectin production
(data II)

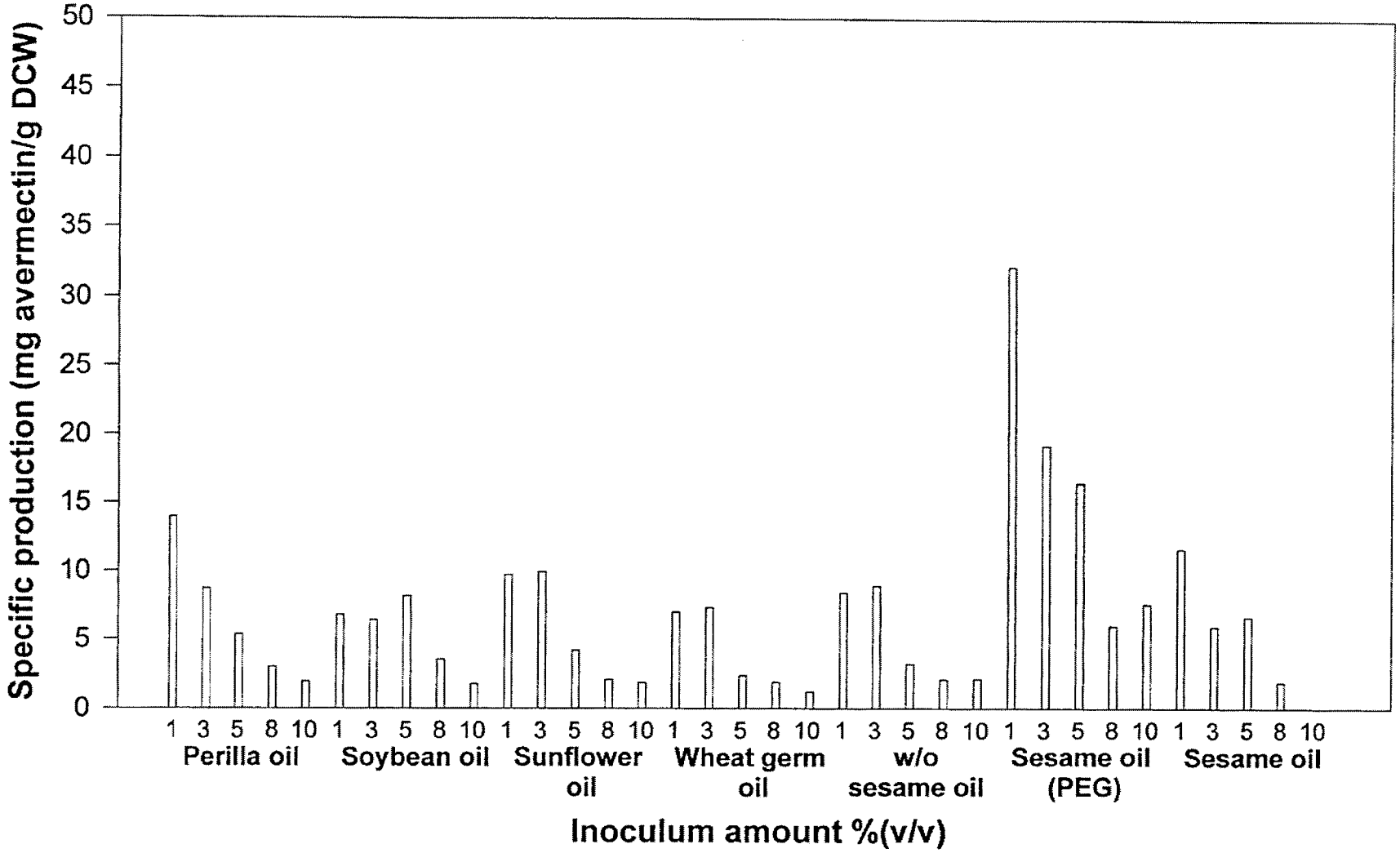


Fig. 2.42. The effect of inoculum amount and different growth media supplemented with various kinds of oils on specific avermectin production (data I)

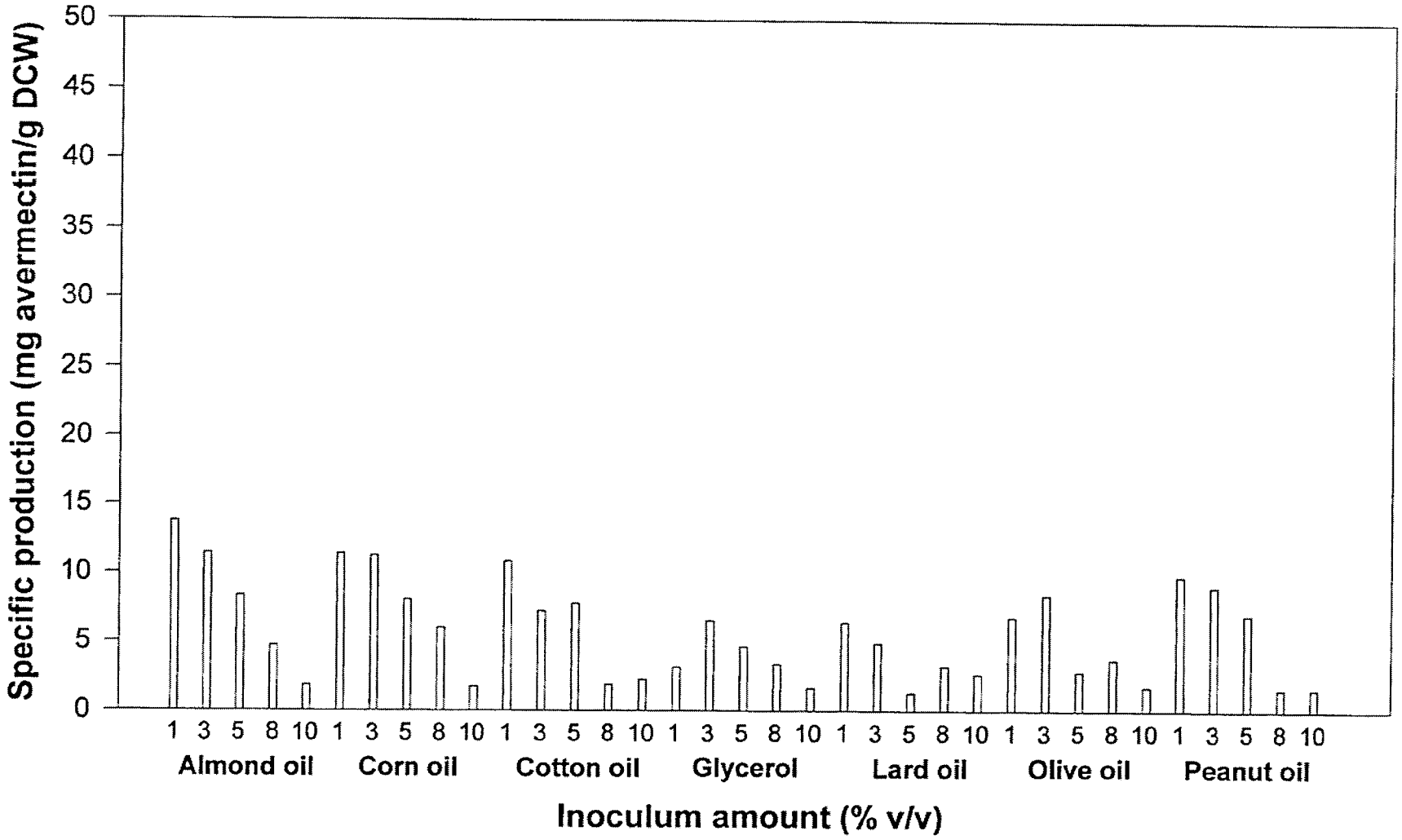


Fig. 2.43. The effect of inoculum amount and different growth media supplemented with various kinds of oils on specific avermectin production (data II)

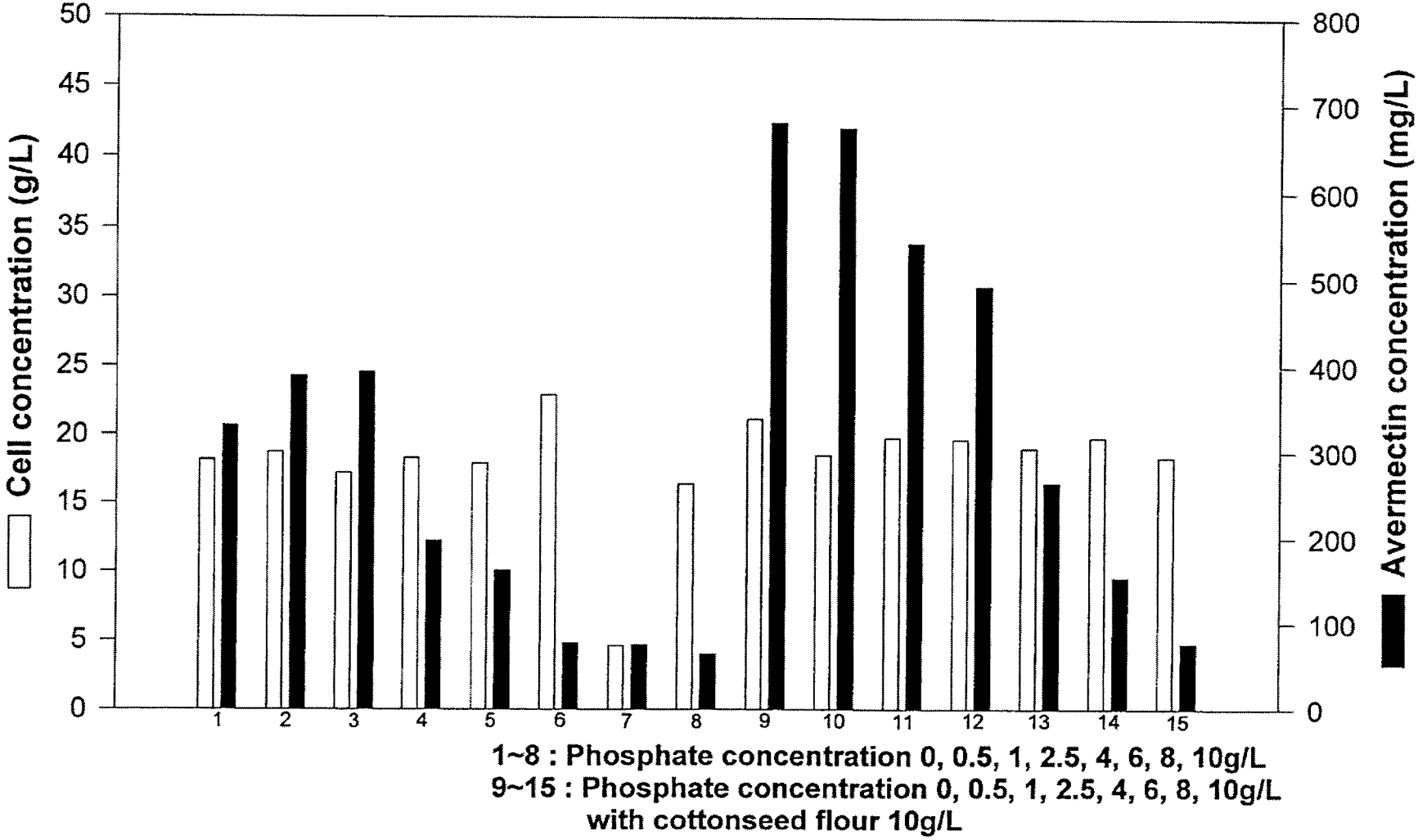


Fig. 2.44. The effect of various concentrations of phosphate and cottonseed flour (10 g/L) supplemented to the production medium on cell growth and avermectin production

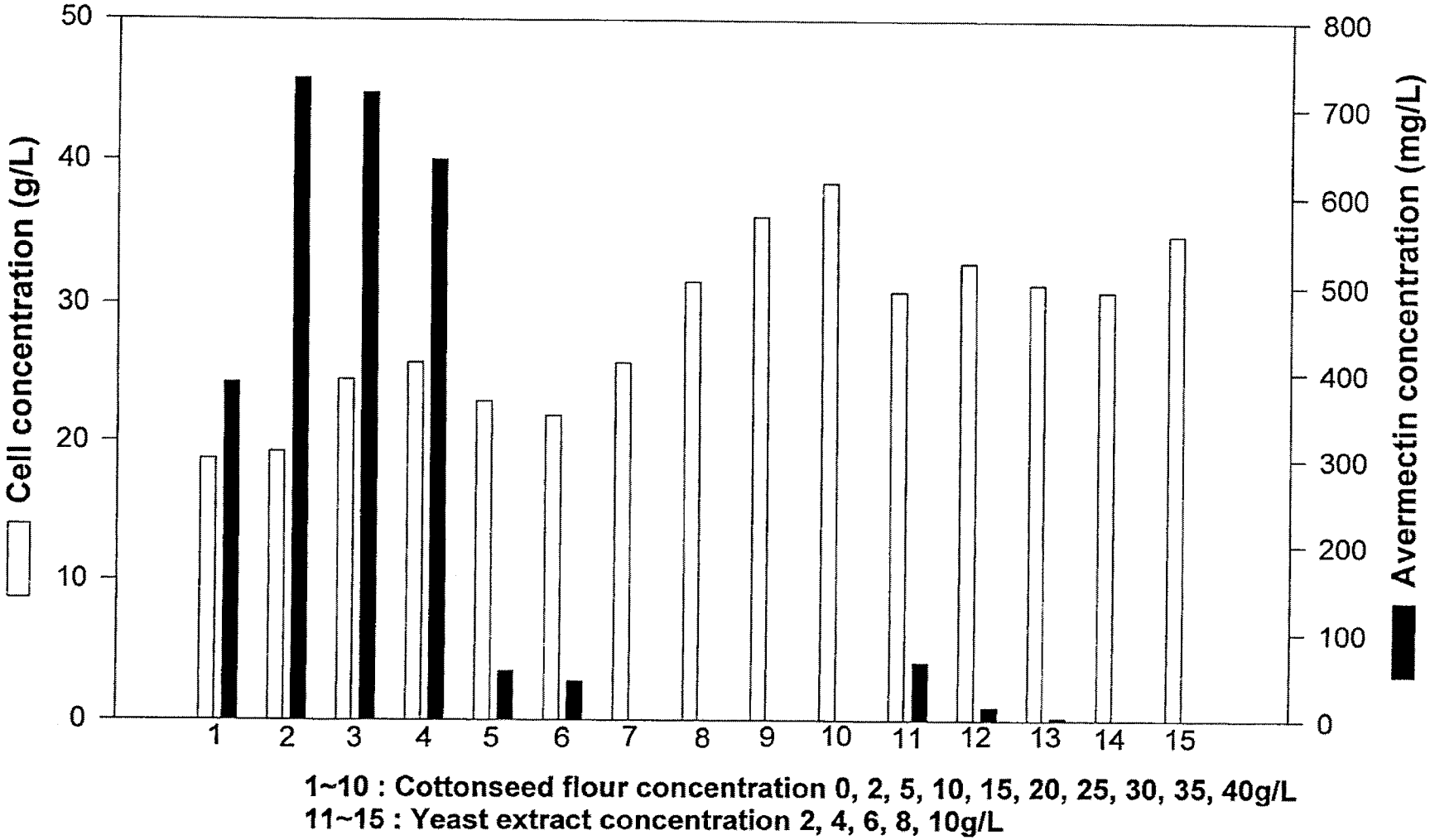


Fig. 2.45. The effect of various concentrations of cottonseed flour and yeast extract supplemented to the production medium on cell growth and avermectin production

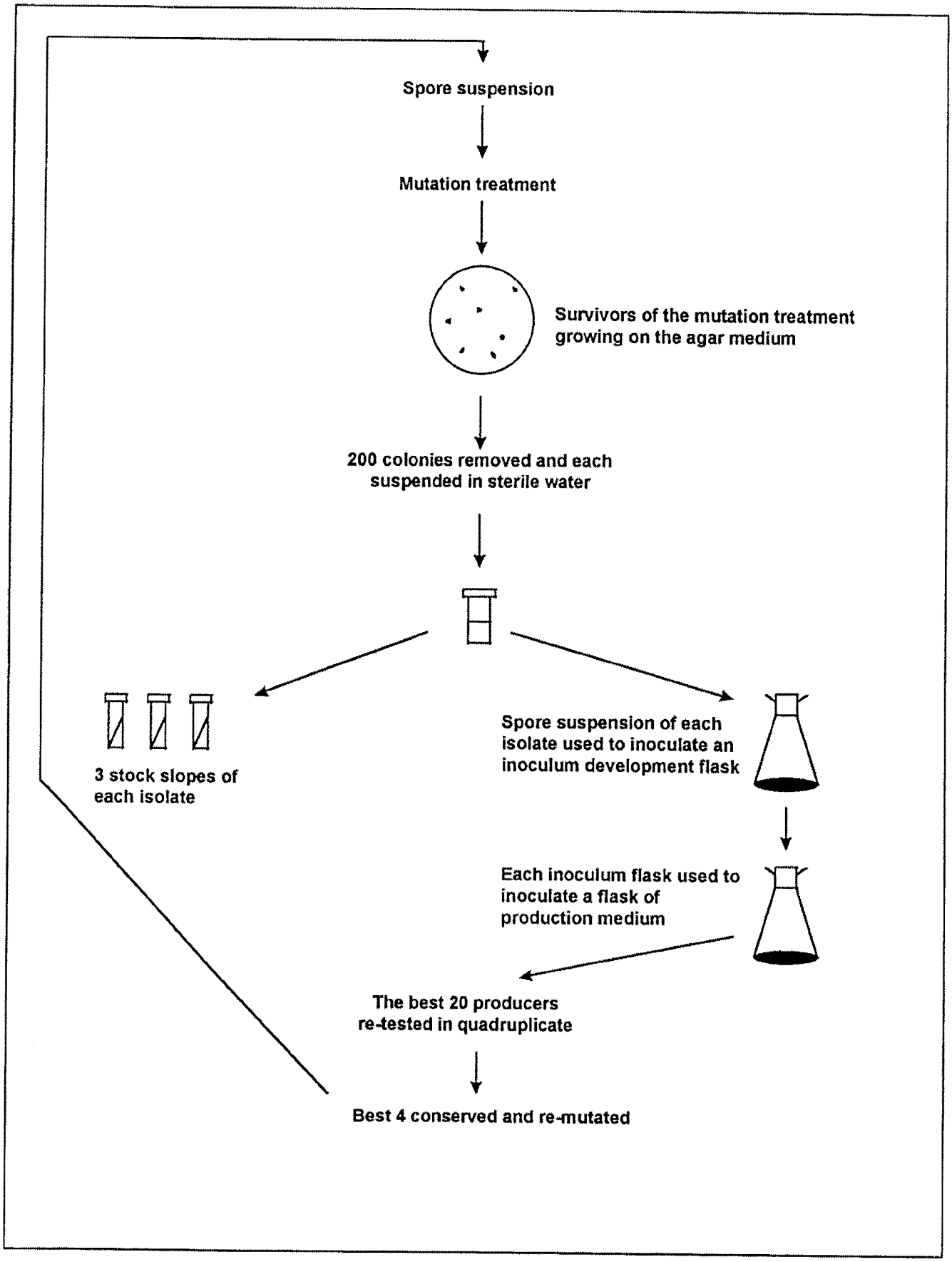


Fig. 2.46. Schematic diagram for the selection of high yielding mutants in shake flask cultures for avermectin production

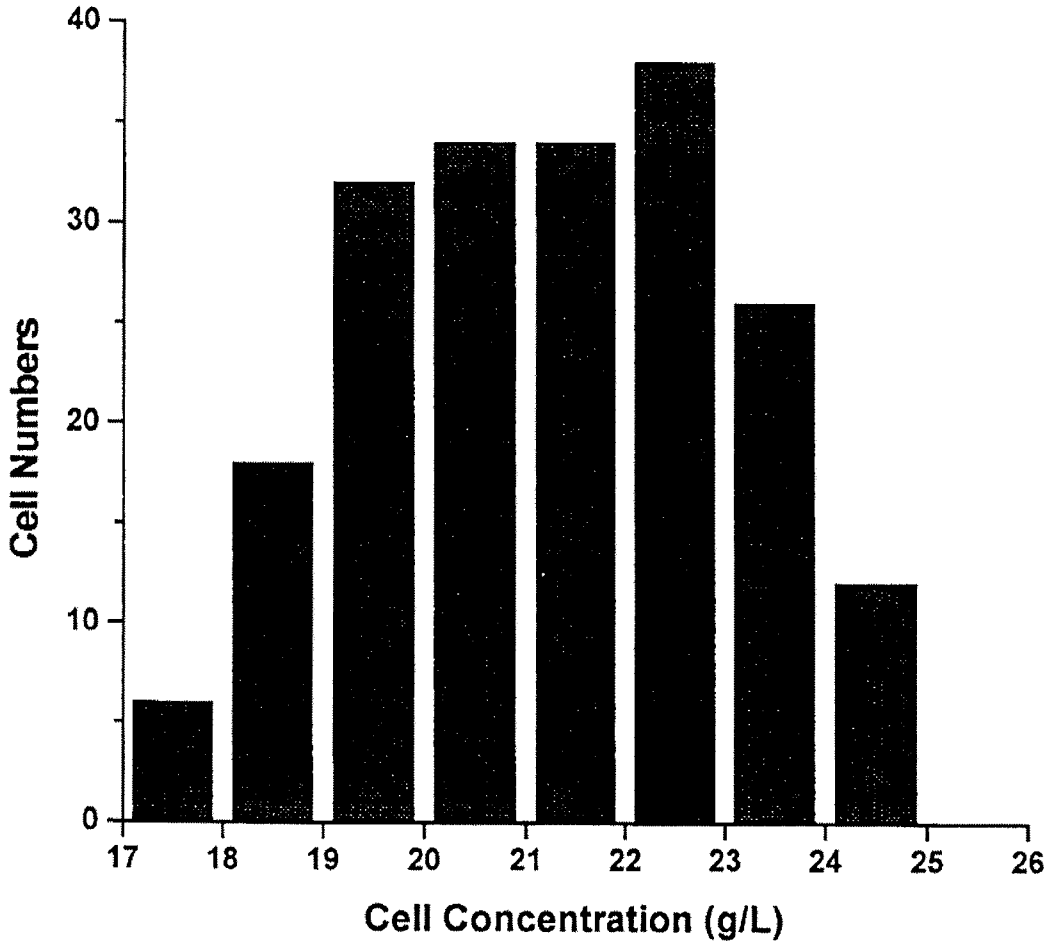


Fig. 2.47. Histogram for cell concentrations of APPL-200 variants cultivated in 250 mL shake flasks containing 50 mL of (FPM-1) production medium

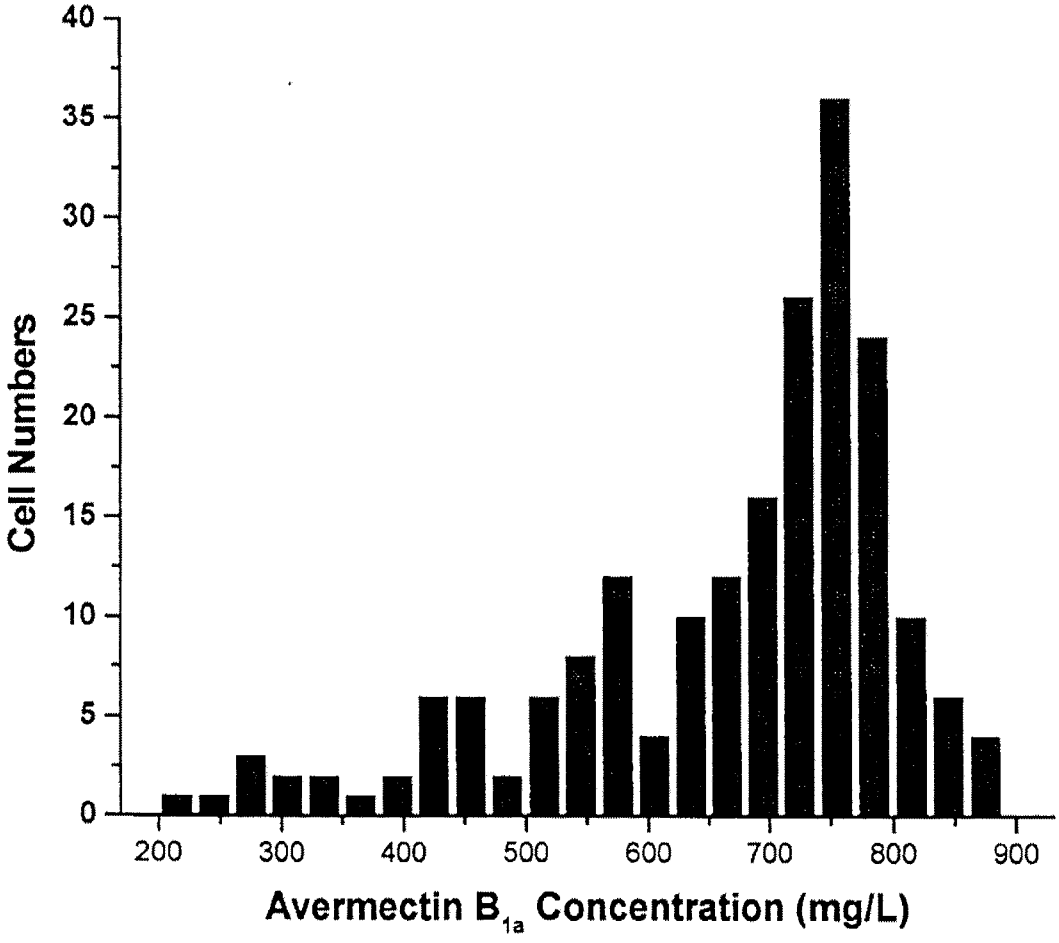


Fig. 2.48. Histogram for avermectin production by APPL-200 variants cultivated in 250 mL shake flasks containing 50 mL of (FPM-1) production medium

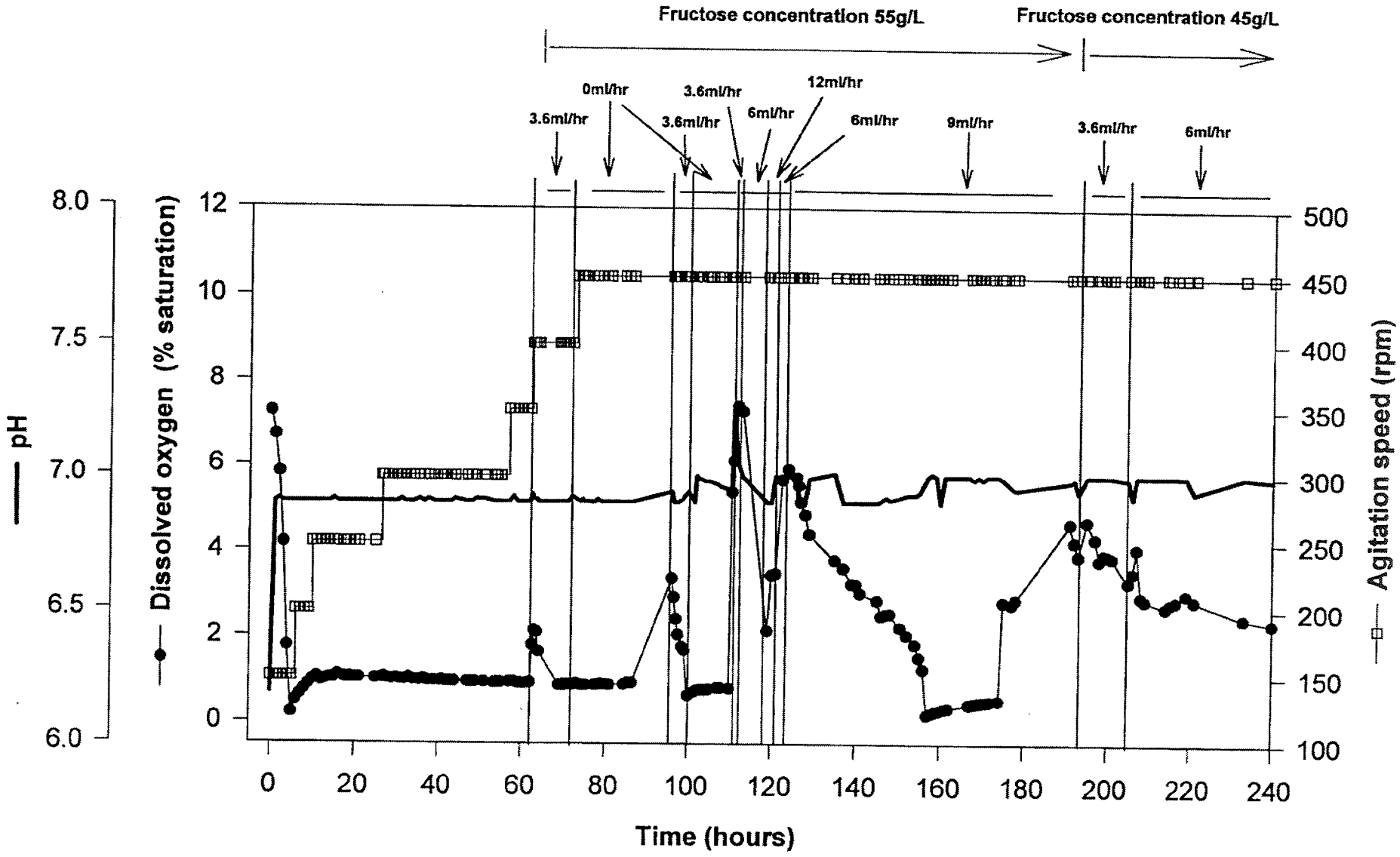


Fig. 2.51. Time-course profile of pH, dissolved oxygen concentration and agitation rate in a fed-batch fermentation #1

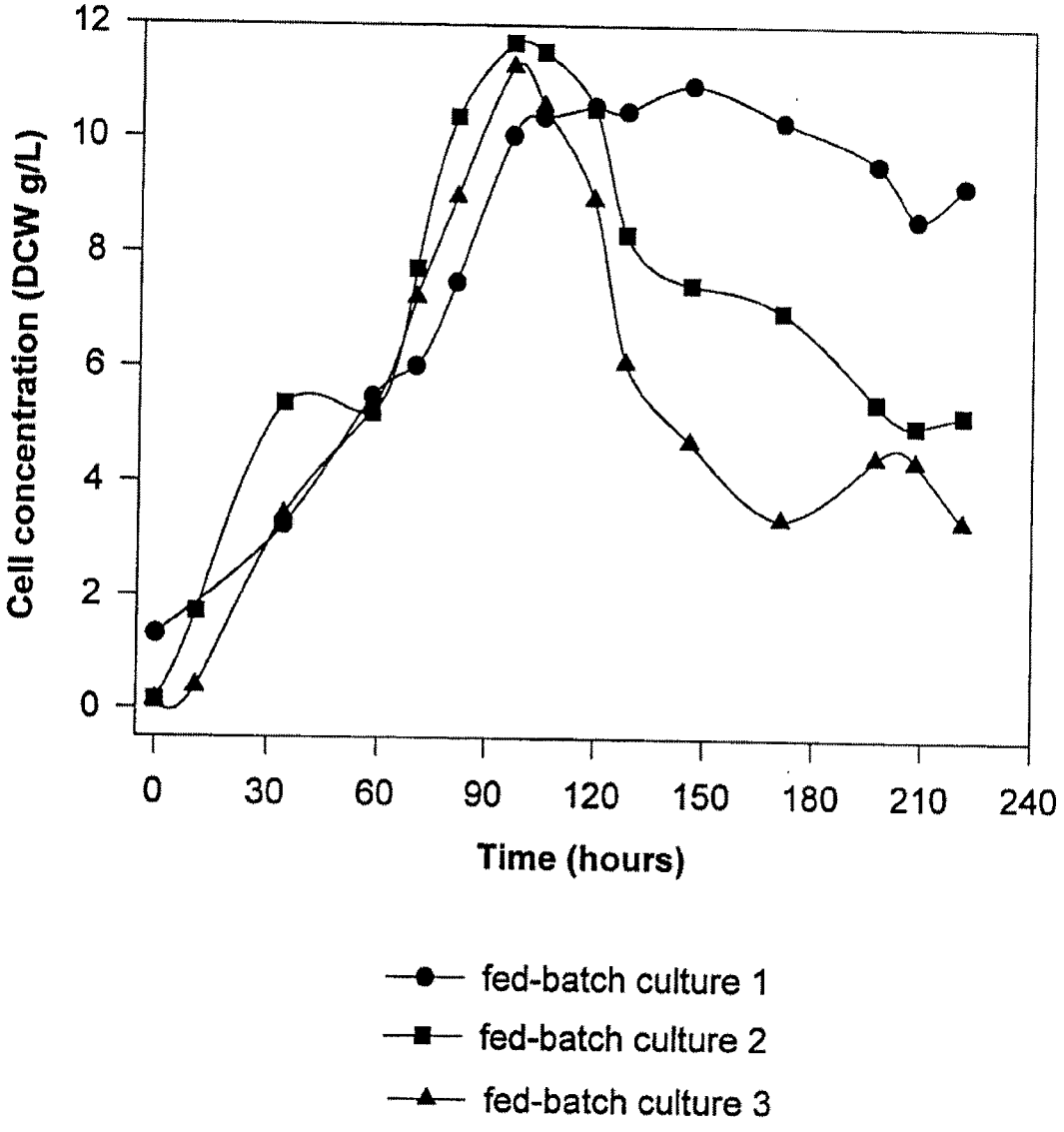


Fig. 2.52. Comparison of cell growth in fed-batch fermentations performed under various substrate feeding rates and various fructose concentrations

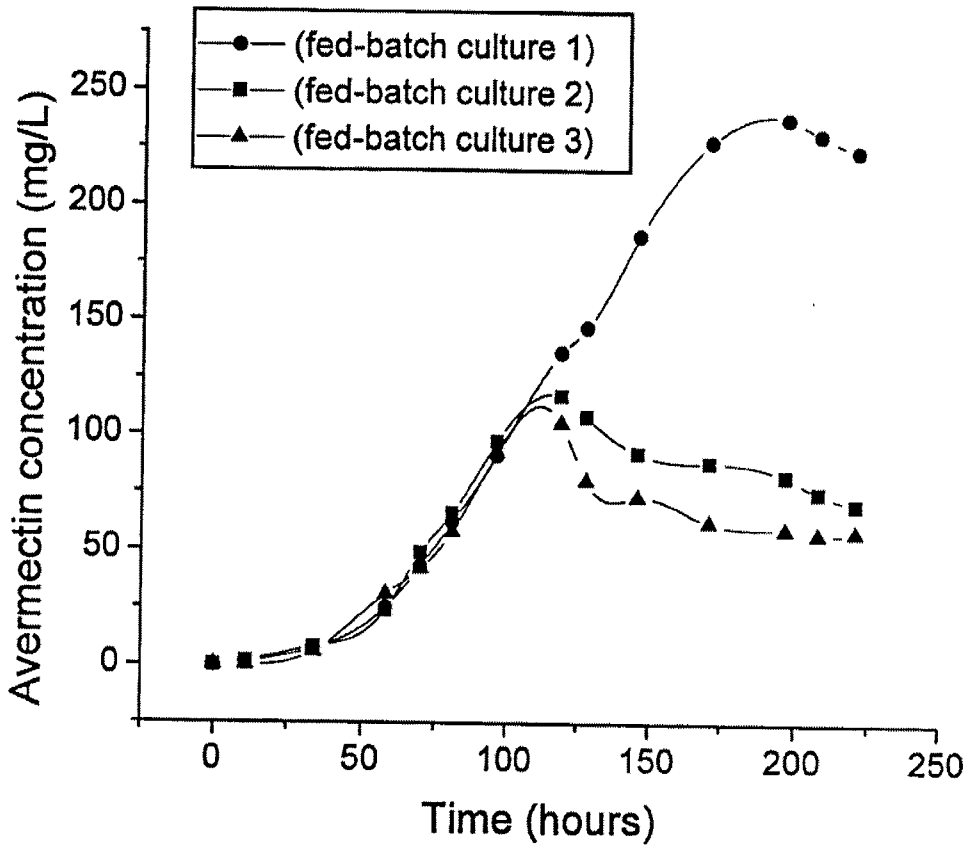


Fig. 2.53. Comparison of avermectin production in fed-batch fermentations performed under various substrate feeding rates and various fructose concentrations

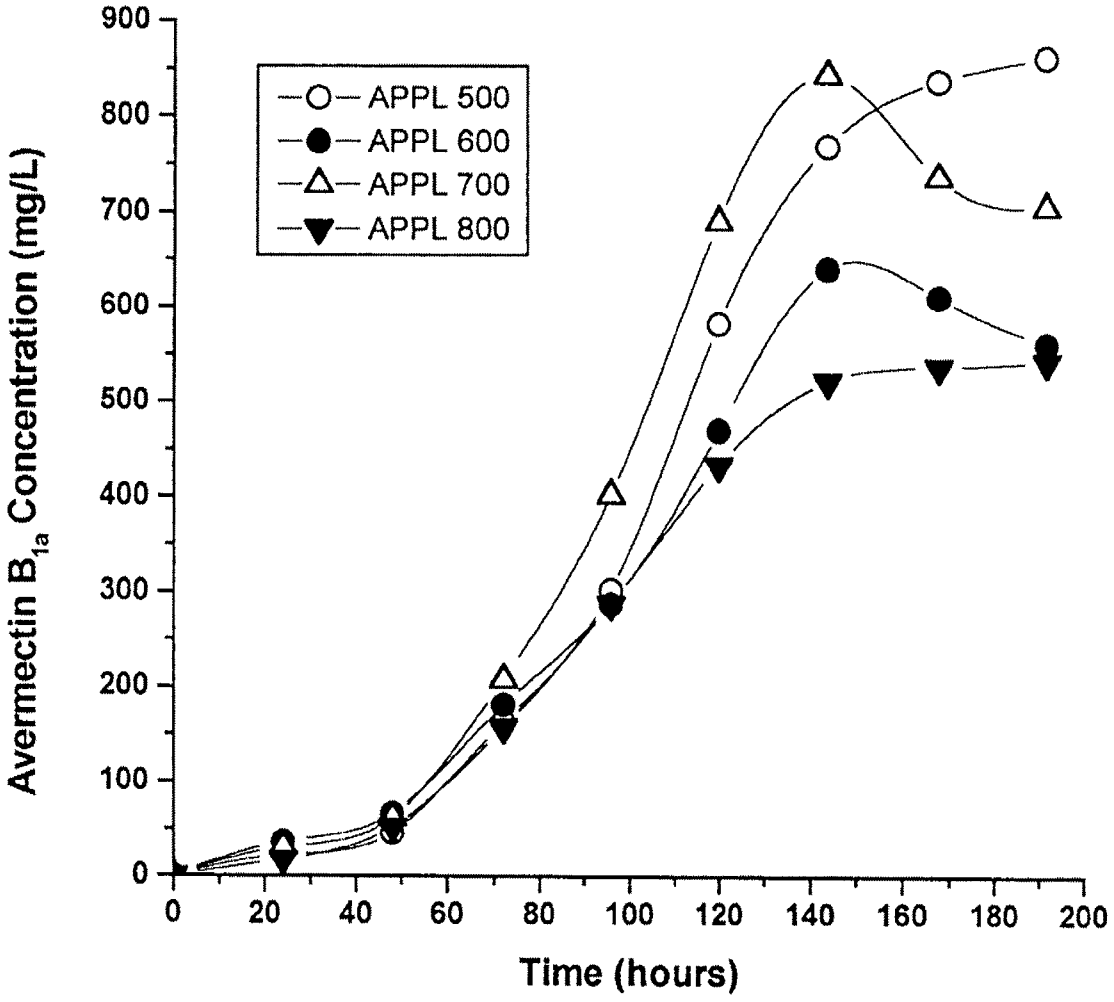


Fig. 2.54. Comparison of avermectin production during batch fermentations of high yielding mutants cultivated in 2.5 liter bioreactor containg 2 liter of finally optimized (FPM-1) production medium

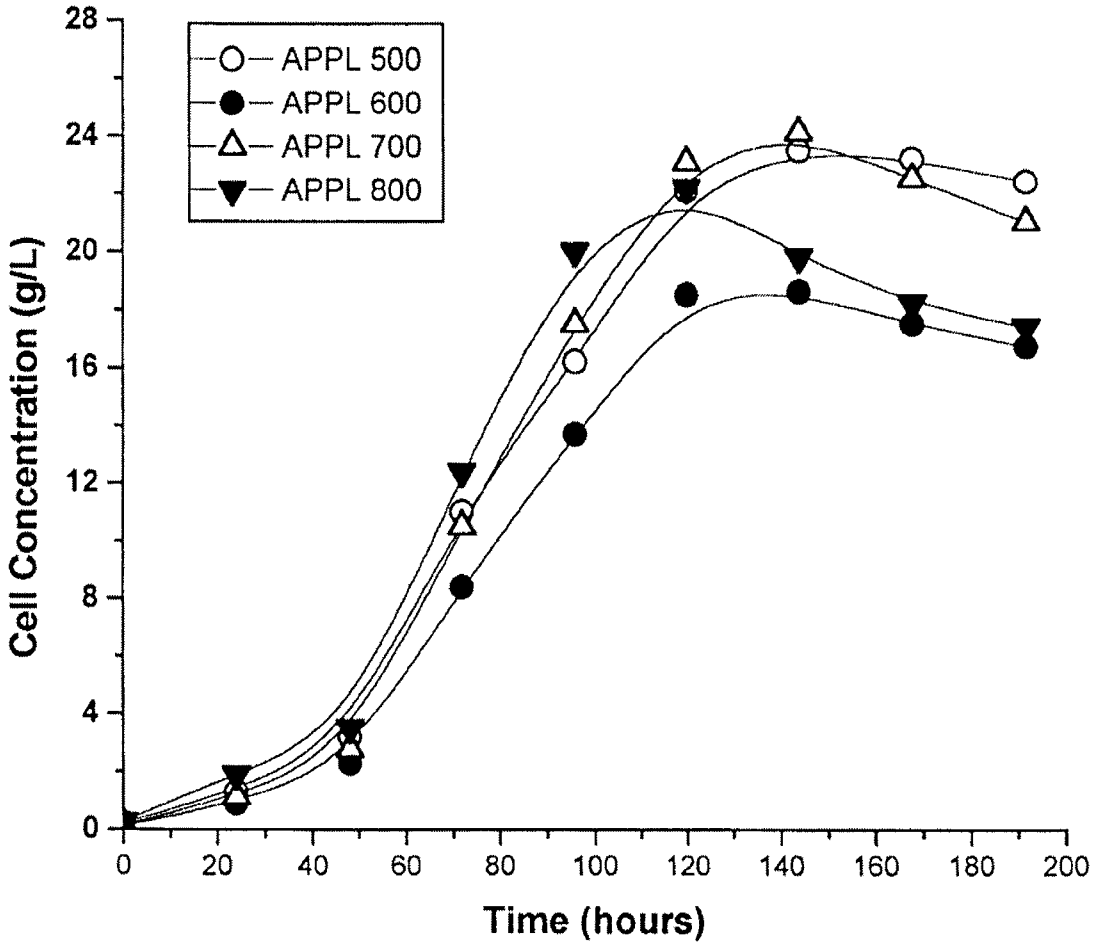


Fig. 2.55. Comparison of cell growth during batch fermentations of high yielding mutants cultivated in 2.5 liter bioreactor containg 2 liter of finally optimized (FPM-1) production medium

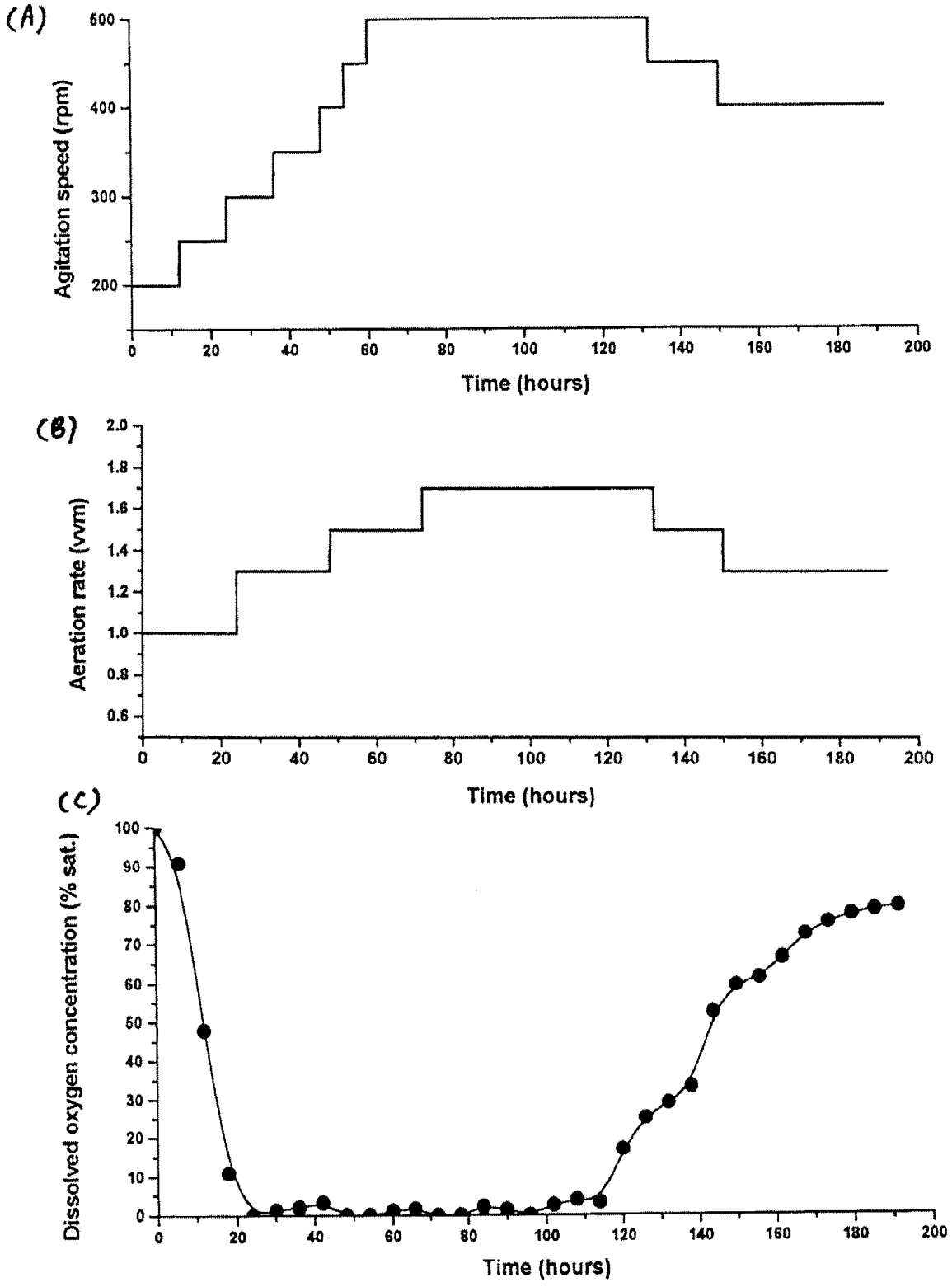


Fig. 2.56. Time-course profiles of (A) agitation speed, (B) aeration rate and (C) dissolved oxygen during batch fermentation of high yielding mutant, APPL-500 in 2.5 liter bioreactor containg 2 liter of finally optimized (FPM-1) production medium

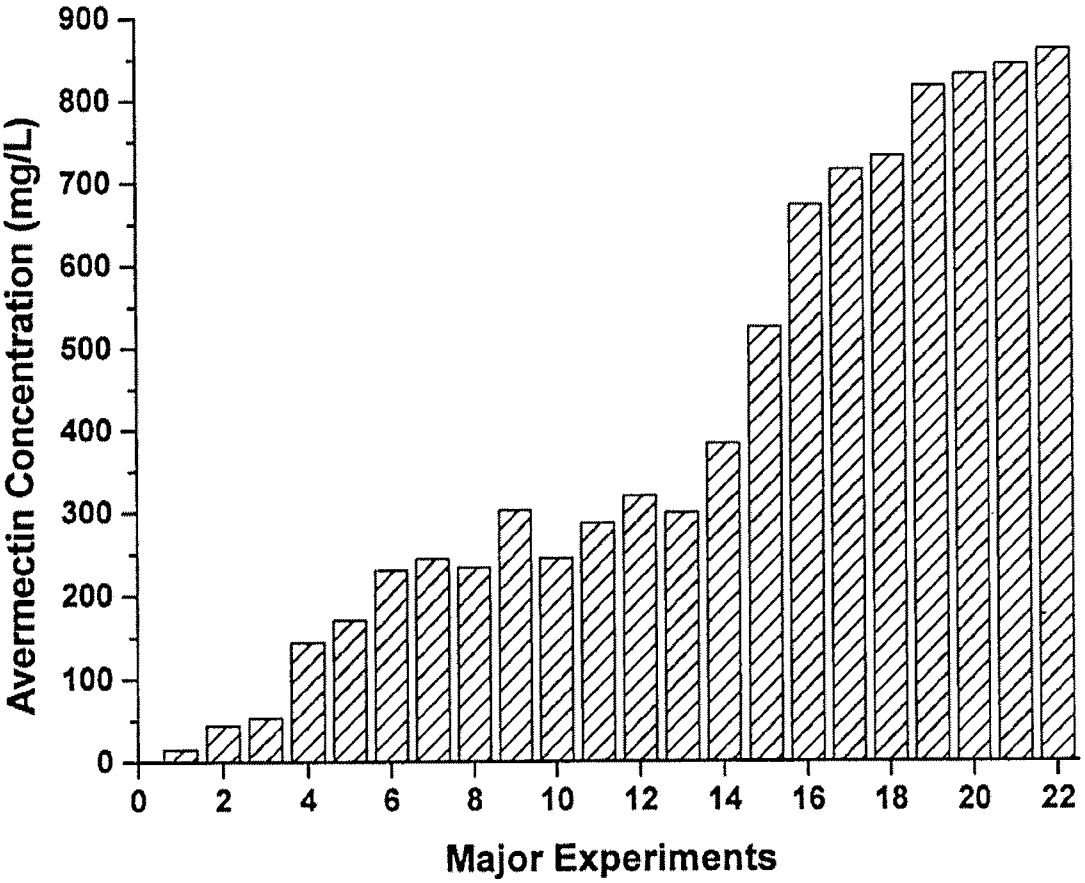


Fig. 2.57. Results of strain improvement and process development leading to enhanced production of avermectin by various kinds of variants of *S. avermitilis*

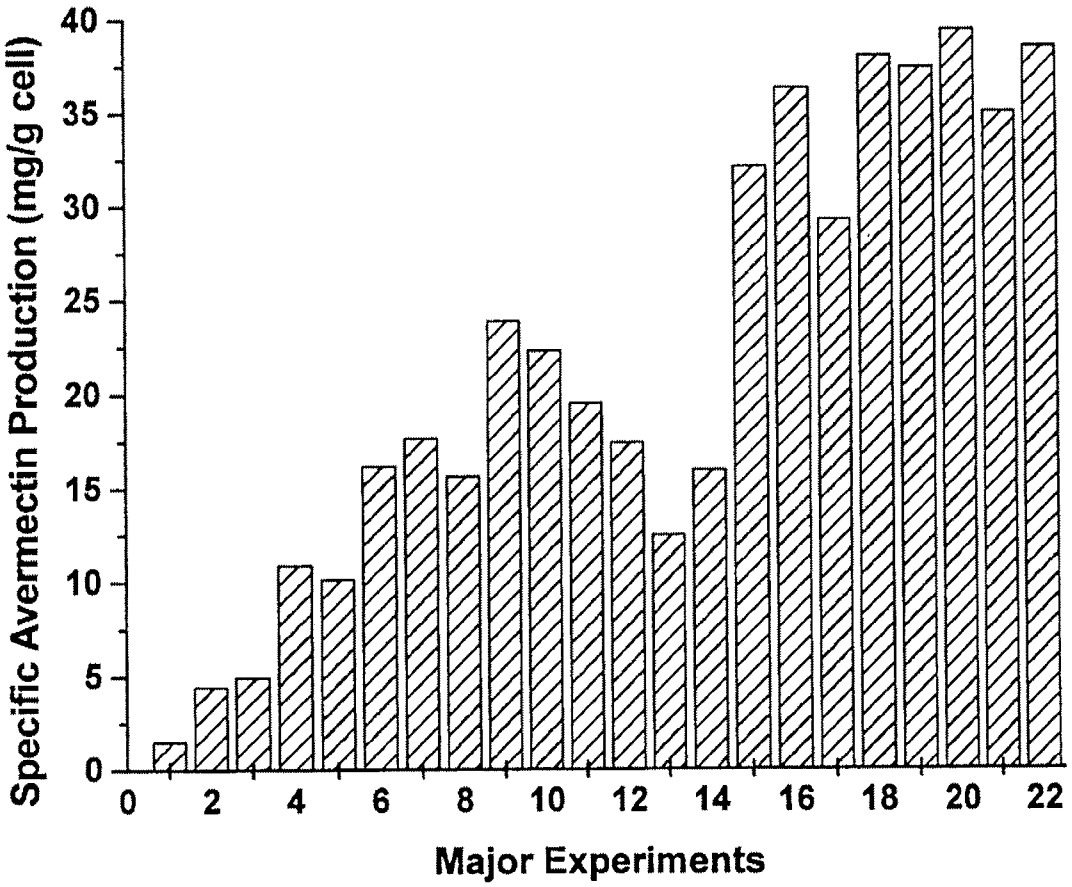


Fig. 2.58. Results of strain improvement and process development leading to enhancement of specific production of avermectin by various kinds of variants of *S. avermitilis*

Table 2.7. Results of strain improvement and process development leading to enhanced production of avermectin by various kinds of variants of *S. avermitilis*

Exp.	cell conc. (g/L)	avermectin concentration (mg/L)	specific production (mg/g cell)	비 고
1	10.49	16.16	1.54	4가지 균주조사, APPL-200 변이주 선별
2	10.04	44.92	4.47	탄소원조사(malt extract)
	10.82	53.80	4.97	탄소원조사(galactose)
3	13.23	144.76	10.94	질소원조사(skim milk),탄소원으로 galactose(#1)
	16.84	171.35	10.18	질소원조사(skim milk powder),탄소원으로 galactose (#2)
4	14.23	230.82	16.22	질소원조사(peptonized milk), 탄소원으로 malt extract (#1)
	13.8	244.35	17.70	질소원조사(skim milk), 탄소원으로 malt extract (#2)
5	11.05	245.20	22.29	생물반응기에 의한 유가식배양, fructose와 skim milk 사용
5	14.94	234.24	15.68	질소원 확정후 탄소원재조사(malt extract), peptonized milk (#1)
	12.65	302.39	23.90	질소원 확정후 탄소원재조사(fructose), peptonized milk (#2)
6	14.73	287.45	19.51	질소원 확정후 탄소원재조사(malt extract), skim milk (#1)
	18.37	320.42	17.44	질소원 확정후 탄소원재조사(fructose), skim milk (#2)
7	23.95	299.60	12.51	탄소원과 질소원의 농도변화 (fructose+malt extract) (#1)
	24.04	383.91	15.98	탄소원과 질소원의 농도변화(malt extract+skim milk) (#2)
8	16.37	525.56	32.10	성장배지조사(sesame oil+PEG)
9	18.54	673.38	36.31	cottonseed flour 농도에 따른 영향 (#1)
	24.48	716.26	29.25	cottonseed flour 농도에 따른 영향 (#2)
	19.26	732.52	38.03	cottonseed flour 농도에 따른 영향 (#3)
10	21.80	817.10	37.40	고생산균주 선별, APPL-700, 최적 성장배지 및 생산배지 사용, 플라스크배양
	21.11	832.05	39.40	고생산균주 선별, APPL-500, 최적 성장배지 및 생산배지 사용, 플라스크배양
11	24.10	844.10	35.02	고생산균주 선별, APPL-700, 최적 성장배지 및 생산배지 사용, 발효조배양
	22.40	862.23	38.50	고생산균주 선별, APPL-500, 최적 성장배지 및 생산배지 사용, 발효조배양

나. avermectin 발효시 산소전달계수 (*kLa*) 측정에 근거한 발효조에서의 scale-up 연구

*Streptomycete*와 같은 방선균을 이용하여 이차 대사산물을 생산하기 위한 호기성 액상발효에서 중요한 요인중의 하나는 산소의 전달이다. 또한 pilot 규모의 발효기 설계나 생산 발효기로 규모를 확대하는 경우, 임계점 이상으로 용존산소농도를 유지하는 것은 매우 중요한 문제중의 하나이다. 이러한 관점에서 발효조의 효율적인 규모 확대를 위해서는 통기와 교반의 변화에 대한 산소전달계수의 측정이 필요하다. *Streptomyces avermitilis*를 대상으로 dynamic method에 의하여 균체량, 교반속도, 통기량에 따른 부피산소전달계수(*kLa*)를 측정하고자 하였다. Dynamic method는 기체산소에서 용존산소로의 산소전달률(*OTR*) 및 부피산소전달계수(*kLa*)와 미생물의 산소흡수율(*OUR*)을 계산하는 방법이다. 회분식 배양조건에서는 균체의 급격한 성장으로 인하여 *kLa*를 측정할 만한 충분한 시간과 용존산소가 유지되지 않아서, 균의 성장에 따른 *kLa*를 측정하기가 어려웠다. 성공적인 *kLa* 측정방법을 확립하기 위하여 균체의 성장속도를 조절할 수 있는 방법을 확립하고자 하였으며, 확립된 방법에 의하여 *kLa*를 측정하고자 하였다. 계산된 *kLa* 값은 궁극적으로 발효조의 scale-up을 위한 기반자료로 이용될 것이다.

1) 이론적 배경

Dynamic Method

Dynamic method는 기체산소에서 용존산소로의 산소전달율(*OTR*)을 나타내는 부피산소전달계수(*kLa*)와 미생물의 산소흡수율(*OUR*)을 계산하는 방법이다. 이 계산된 *kLa* 값이 궁극적으로 발효조의 scale-up을 위한 기반자료로 이용되며, *kLa* 값의 측정을 위한 이론적 근거는 다음과 같다.

Dynamic method는 통기성 발효조에서 세포 배양액과 미생물이 존재하는 실제 발효 진행 시 *kLa*를 측정할 수 있는 간편하고 정확한 방법으로서 용존산소에 대한 다음의 물질수지식에 기초한 것이다.

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_L a(\overline{C}_{AL} - C_{AL}) - q_{O_2} X \qquad (1)$$

여기서 C_{AL}는 발효배양액 내의 용존산소농도(g O2/L)이고, $\overline{C}_{AL}$는 포화용존산소농도(g O2/L)이다. q_{O_2}는 세포당의 산소흡수율(specific oxygen uptake rate, g O_2/L cell · h)이며, X는 배양액 내의 세포농도(g cell/L)이다. 배양도중 어느 한 시점에서 공기의 공급을 멈추면 상기 식의 *kLa*는 0이므로 배양액의 용존 산소농도는 다음 식을 만족하면서 감소하게 된다.

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = q_{O_2} X \qquad (2)$$

그러므로 t에 대한 C_{AL}선의 기울기를 측정함으로서 세포의 산소흡수율(*OUR*)인 q_{O_2}X을 측정할 수 있다. 일정 시점이 지난 후 공기를 다시 발효조로 공급하면, 배양액 내의 용존산소는 (1)식의 물질수지식을 만족하면서 증가할 것이다. 이때 (1)식을 다시 정리하여 직선관계식으로 재배열하면 다음과 같다:

$$C_{AL} = \overline{C}_{AL} - \frac{1}{k_L a}\left(\frac{dC_{AL}}{dt} + q_{O_2} X\right) \qquad (3)$$

(3)식으로부터 $\left(\frac{dC_{AL}}{dt} + q_{O_2} X\right)$에 대한 C_{AL}의 플롯은 기울기가 $-1/(kLa)$이며 y축의 절편이

$\overline{C}_{AL}$인 직선이므로 이로부터 기울기를 계산함으로써 산소전달계수인 kLa가 측정된다. 여기서 $CAL = C^*AL$(final steady dissolved-oxygen concentration)일 때,

$$q_{O_2}X = k_L a(\overline{C}_{AL} - C^*_{AL})$$ 이므로

(1)식은,

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_L a(C^*_{AL} - C_{AL}) \qquad (4)$$

이 된다. (4)식을 t2 와 t1 사이에서 적분하여 정리하면

$$ln\left(\frac{C^*AL - CAL1}{C^*AL - CAL2}\right) = kLa\ (t2 - t1) \qquad (5)$$

가 되므로 좌변을 Y 좌표로 우변의 $(t2 - t1)$을 X 좌표로 rpm의 변화에 따른 CAL을 도시하여 그 기울기로부터 kLa를 구할 수 있게 된다.

Direct Method

산소전달능력을 측정하는 방법 중 가장 믿을 만한 방법은 산소흡수율을 직접 측정하는 것이다. 이 방법은 공기가 산소의 공급원으로 쓰이는 모든 발효에서 수행될 수 있다. 필요한 기구는 기체 산소 분석기, 유량계, 압력 게이지와 온도 측정 기구이다. 공급되는 공기의 산소에 대한 물질수지는 다음과 같다.

$$N_A = 7.32 \cdot \frac{10^5}{V_L}(Q_I P_I y_I / T_I - Q_O P_O y_O / T_O) \qquad (6)$$

여기서 NA는 산소전달 속도(m moles of O2/L-hr);
VL은 발효기 안의 broth volume(liter);
QI, QO : 발효기의 inlet과 outlet에서 측정된 volumetric air flow rate(L/min);
PI, PO : 발효기의 inlet과 outlet에서 측정된 total pressure (atm absolute);
TI, TO : 발효기의 inlet과 outlet에서 각각 측정된 gas의 온도 (K);
yI, yO : 발효기의 inlet과 outlet에서 각각 측정된 산소의 mole fraction;
7.32×105 : conversion factor (60 min/hr) (103 m mole/mole) (mole。K/0.082 L atm).

물질전달계수(kLa)를 측정하기 위해서는 실험적으로 발효기의 배양액의 용존산소농도 CL을 측정하여야 한다. 잘 교반되고 있는 발효기에서 농도는 발효기 안의 위치와 상관없이 일정해야 한다. 이러한 경우 한 지점에서만 용존산소를 측정해도 된다. 그러나 이와 반대로 큰 규모의 발효기에서 특별히 non-Newtonian broth의 특성을 가진 발효기에서는 교반이 잘 이루어 진다고 가정할 수 없다. 이러한 조건에서는 많은 용존산소 농도가 측정되어 평균값이 사용되어야 한다.

평형용존산소량(equilibrium dissolved oxygen concentration, C^*)는 kLa를 계산하기 위해서 반드시 측정되어야 한다. 그러나 기체상과 평형상태에서의 용존산소는 sparger inlet에서와 fermemtor outlet에서 측정되는 것에 따라 차이가 난다. 작은 규모의 발효기에서는 sparged gas는 잘 교반되는 용기에서의 액체와 같은 성향을 가진다. 이러한 예로써 평형용존산소농도 C^*는 gas stream의 exit oxygen과 평행인 값으로 정할 수 있다. 그러나 큰 규모의 발효에서는 gas

stream에서의 완전한 교반 개념이 적용될 수 없다. 이러한 발효기에서 통과되는 기체의 성질은 plug flow situation에 보다 더 가깝게 접근한다고 할 수 있고, 용존산소에 대한 logarithmic mean value가 보다 더 적절하다. 즉 작은 규모에서의 발효에서 물질전달계수는 다음 식으로 계산될 수 있다:

$$k_L a = \frac{N_A}{C^*_{out} - C_L} \quad (7)$$

한편 큰 규모의 발효기에서는

$$k_L a = \frac{N_A}{(C^* - C_L)_{\log mean}} \quad (8)$$

혹은

$$k_L a = \frac{N_A}{\dfrac{(C^*_{in} - C_L) - (C^*_{out} - C_L)}{\ln \dfrac{(C^*_{in} - C_L)}{(C^*_{out} - C_L)}}} \quad (9)$$

여기서 C^*_{in}, C^*_{out}은 각각 발효기 inlet과 outlet에서의 기체산소와 평행을 이룬 용존산소농도이다 (mM O2/L).

2) 교반과 통기조건에 의한 부피산소전달계수(kLa)의 변화

교반속도는 100 rpm에서 500 rpm까지 증가시키고, air는 1 vvm과 2 vvm을 공급하면서, 회분식 생물반응기에서 부피물질전달계수(kLa)를 측정하였다. 생물반응기 가동중 kLa를 구하기 위하여 dynamic method를 사용하였고, 그에 따른 용존산소(DO) 변화를 측정한 결과 중 하나를 도시하면 Fig. 2.59와 같다. 이 방법에 의하여 1 vvm에서 각 교반속도 및 건조균체질량에 따른 DO의 변화를 식(5)에 의하여 그림으로 도시한 결과는 Fig. 2.60과 2.61과 같다. 교반속도의 증가에 따라 산소전달효과가 증가하여 kLa인 기울기 값은 예상과 같이 증가하는 경향을 보였다. 이때의 건조균체질량은 각각 3.0 g/L와 4.02 g/L였다. 상기 실험에서 구해진 kLa의 값은 Table 2.8에 나타냈다.

교반 조건이 100 rpm에서 500 rpm으로 증가함에 따라 kLa 값이 증가함을 알 수 있었으며, 교반속도의 일정한 증가에 따라 kLa 값의 증가폭은 일정하지 않았다. 건조균체질량이 3.0 g/L인 경우 300 rpm에서 400 rpm으로 교반속도의 증가 시 kLa의 증가가 가장 크게 나타났다. 또한 건조균체질량이 4.02 g/L인 경우는 300 rpm에서 500 rpm으로 증가 시 kLa 값이 2배 정도 증가함을 알 수 있었다. 건조균체질량이 3.0 g/L인 경우 교반조건이 300 rpm에서 500 rpm으로 증가했을 시 kLa의 변화가 3배 정도 증가하는 큰 변화를 보여주었다. 달리 표현하면, 균체농도가 적을 경우 같은 조건에서 kLa의 변화가 큰 것을 알 수 있었다.

Fig. 2.62와 2.63은 각각 건조 균체량이 3.24 g/L와 9.24 g/L일 때 2 vvm의 통기 조건에서 kLa를 다양한 교반속도에 따라 구한 것이다. 균체의 양이 증가함에 따라 배지의 점도가 증가하므로 kLa 값은 예상대로 감소하는 경향을 보였다. 건조균체질량이 적은 경우 2 vvm에서 교반속도에 의한 kLa에 대한 효과는 400 rpm 이상에서는 큰 차이가 없는 것으로 측정되었다. 이 경우는 균체량이 상대적으로 적어 400 rpm 이상에서는 교반에 의해 충분한 용존산소가 공급됨으로서 kLa에는 큰 변화가 없는 것으로 측정되었다. 그리고 균체량이 9.24 g/L로 증가한 경우는 Fig. 2.63에 나타난 바와 같이 교반속도의 증가에 따라 kLa가 계속 증가하는 경향을 보여 주었다. 이 경우에서는 상대적으로 점도가 상당히 높아 산소전달이 용이하지 않으므로 교반에 의한 산소전달 효과가 큰 것을 알 수 있다.

Table 2.8. Real example of *kLa* in terms of agitation speed at a aeration of 1 vvm.

rpm	*kLa* (sec-1)	
	D.C.W. (3.0 g/L)	D.C.W. (4.02 g/L)
100	0.0061	0.01304
200	0.0103	n.a
300	0.0211	0.01982
400	0.0496	n.a
500	0.0601	0.04224

Table 2.9**에 건조균체질량과 교반속도의 변화에 따른** *kLa* **값을 나타냈다. 건조균체질량이** 9.24 g/L**의 경우** 400 rpm**까지는** *kLa* **값이 건조균체질량이** 3.24 g/L**인** *kLa* **값의** 44.8 % - 54.1 % **에 해당하는 것을 알 수 있었다. 즉 건조균체질량이 증가하면** *kLa* **값은 감소해서, 건조균체질량이** 3**배 증가했을 때** *kLa* **값은 약** 1/2 **정도로 측정되었다. 또한 건조균체질량이** 9.24 g/L**인 경우는 건조균체질량이** 3.24 g/L**와 달리** *kLa* **값이 교반속도의 증가에 따라 계속 증가하였다. 이것은 점도가 상대적으로 높아 교반속도의 증가가 산소전달에 유효하게 작용하기 때문으로 판단된다. 공기의 공급을** 1 vvm**에서** 2 vvm**으로** 2**배 증가시킨 경우(건조균체질량** 4.02 g/L), **모든 교반속도에 대해** 2 vvm **경우의** *kLa* **값이 약간 큰 값을 보여주었으나,** 2 vvm**으로** air**의 공급량이** 2 **배 증가한 것에 비해** *kLa* **값의 증가는 실제로 미비하였다. 상기 실험을 토대로 발효 초기 즉 건조균체질량이 적은 경우는** 400 rpm **정도의 교반속도가 최적이며, 건조균체질량 많은 경우는** 500 rpm **이상의 교반속도가 미생물에 산소공급을 위하여 좋을 것으로 판단되었다.**

Table 2.9. Real example of *kLa* in terms of agitation speed at a aeration rate of 2 vvm.

rpm	*kLa* (sec-1)		
	D.C.W.(3.24 g/L)	D.C.W.(4.02 g/L)	D.C.W.(9.24 g/L)
100	0.0119	0.01565	0.0055
200	0.0183	n.a	0.0082
300	0.0296	0.02504	0.0160
400	0.0489	n.a	0.0230
500	0.0491	0.04525	0.471

결과적으로 생물반응기 운전 시 산소공급을 원활하게 하기 위한 방법은 산소공급량(vvm)을 증가시키는 것보다는 교반조건(rpm)을 증가시키는 것이 더욱 효과적이라고 판단된다. 또한 교반을 효과적으로 수행하여 *kLa***를 증가시킬 수 있는 임펠러의 사용이 고려되어야 할 것으로 판단된다.**

3) 균체량의 변화에 따른 *kLa*의 측정 및 측정방법 모색

용존산소의 조절이 호기적 조건의 미생물 배양 시 미생물 성장과 생성물의 생산성을 높이기 위해 매우 중요한 요인으로 알려져 있다. 그러므로 용존산소의 조절을 위한 운전조건을 확립하기 위하여 기초 실험을 다음과 같이 실시하였다: 용존산소 값이 10%를 유지할 수 있도록 교반속도를 200 rpm에서 500 rpm의 범위에서 수동으로 조절하였고 그 결과를 Fig. 2.64에 나타냈다. 지수성장기 초기에서는 교반속도를 300 rpm에서 450 rpm으로 조절함으로 용존산소를 평균 25 70%로 유지할 수 있었으나, 지수성장기 후반부에서는 교반속도를 500 rpm으로 조절하고 통기량을 2 vvm으로 증가시켰음에도 불구하고 용존산소는 바닥상태를 나타냈다. 지수성장기 이후에는 교반속도 범위는 400 rpm에서 200 rpm이었으며, 용존산소는 25 %에서 130%를 유지하였다.

지수성장기 후반부에 용존산소가 바닥상태이었으므로 이를 극복하기 위한 방법을 제시하기 위하여, 지수성장기에는 교반속도 및 통기량을 500 rpm 과 2 vvm으로 유지하다가 지수성장기가 지난 후에는 교반속도를 200 rpm으로 통기량을 1 vvm으로 낮추었다. 이에 대한 배양 결과를 Fig. 2.65에 나타냈다. 그림에서와 같이 배양 초기부터 배양액의 용존산소는 바닥상태이었으며 지수성장기에 도달한 후에야 용존산소가 포화수준으로 복귀하였다. 결론적으로 지수성장기에서 용존산소의 농도가 바닥 상태인 것을 상기 방법들에 의해 해결할 수 없었으며, 탄소원을 제한적으로 공급하는 유가식배양으로 지수성장기에서 미생물의 성장을 완화시키는 방법으로 용존산소를 조절하여야 할 것으로 판단되었다. 또한 Fig. 2.64와 Fig. 2.65에 나타난 바와 같이 미생물의 대수기적 성장이 48시간 이내에 종결되고, 이 기간 후에는 영양분의 고갈로 인해 미생물의 자기분해가 이루어졌다. 이러한 자기분해를 피하고 미생물의 성장속도를 조절하기 위하여 농축배지를 사용한 유가식 배양을 통하여 다양한 조건에서의 *kLa* 측정을 위한 미생물 배양 조건을 확립할 수 있었으며, 그 결과를 Fig. 2.66에 나타냈다. 탄소 제한을 통해 미생물의 성장속도를 조절함으로써 낮은 교반속도에서도 용존산소를 높은 범위로 유지하여 다양한 조건에서의 *kLa* 측정이 가능하였다. 또한 계속해서 영양분을 공급함으로써 미생물의 자기분해를 효과적으로 방지할 수 있었다.

이와 같은 환경에서 측정한 교반과 통기에 대한 *kLa*의 결과를 Fig. 2.67과 Fig. 2.68에 나타냈다. 균체량 7 g/L이하의 범위에서 교반속도의 변화에 의한 *kLa*의 변화를 살펴보면 150-350 rpm의 범위에서 *kLa*가 급격하게 상승하였으나, 350 rpm이상에서는 *kLa* 상승폭이 둔화되는 것으로 관찰되었다. 이것으로 이 범위의 균체량에서는 350 rpm에서 산소전달속도가 최대치에 이른다는 것을 알 수 있다. 그러므로 균체량 7 g/L이하의 범위에서는 미생물의 성장과 관련이 있는 전단력을 고려할 때 350 rpm 정도의 교반속도가 산소전달을 위한 최적 조건으로 판단되었다. 통기량의 변화에 따른 *kLa*의 변화는 균체량이 7 g/L보다 적은 초기에는 그 값의 차이가 통기량이 증가함에 따라 비례적으로 증가하였으며, 균체량이 7 g/L 이상에서부터 균체량이 증가할수록 *kLa*의 값이 감소하는 것으로 나타났다.

계속된 균체량의 증가에 따른 *kLa*의 변화를 조사하기 위하여 회분식 배양에서 대수적 성장이 끝난 후 정체기에 이르렀을 때 계속해서 농축배지를 공급해주는 방식을 사용하여 Fig. 2.69와 같이 고농도의 균체량을 얻을 수 있었다. 산소전달계수의 측정은 배지공급이 끝나고 당이 고갈됨에 따라 용존산소가 올라가는 시기를 이용하여 균이 자기분해(lysis)되기 전에 실시하였다. 예상한 바대로 균체량이 증가함에 따라 *kLa*는 급격히 감소하였고, 250 rpm 이하에서는 배양액의 높은 점도로 인한 교반 효율의 저하로 인해 *kLa* 측정이 불가능하였다. 그 결과를 Fig. 2.70과 Fig. 2.71에 나타내었다. 교반속도의 경우 균체량의 증가에 따라 감소하던 *kLa*의 값이 균체량 15 g/L이상에서는 감소되는 폭이 작아지는 것으로 나타났다. 통기량의 변화에 따른 *kLa*의 변화도 교반속도에서의 결과와 유사했으나, 균체량 15 g/L이상에서는 통기변화에 대한 *kLa*의 변화가 크게 감소되었다. 균체량의 농도변화에 따른 교반과 통기에 대한 *kLa* 값을 비교할 때, 고농도의 균체량에 도달할수

록 통기에 의한 *kLa*의 증대 효과가 크게 감소하므로, 고농도 균체량일수록 교반속도를 통해 용존 산소를 조절하는 것이 적절한 것으로 판명되었다. 그 이유는 균체량이 증가함에 따라 산소전달에 영향을 끼치는 배양액 중의 공기방울의 표면적 증가가 임펠러의 전단력에 의한 공기 방울의 분산 효과에 크게 의존하기 때문인 것으로 생각된다.

Fig. 2.66의 발효과정 중 균체의 증가에 대한 산소흡수율(*OUR*)을 Fig. 2.72에 나타내었다. 산소흡수율은 식(2)에 기초하여 계산하였으며, 여기서 균체에 대한 산소흡수율의 기울기는 qO_2 (specific oxygen uptake rate)가 된다. 본 실험에서는 qO_2의 값은 0.2154 mgO_2/g cell·min(0.8 mmole O_2/g cell·hr)으로 측정되었다. 이 때의 상관계수(R)는 0.96871이었다. 이상의 결과로부터 미생물로부터 2차대사산물 생산의 경우 문제되는 것은 고농도 균체량에서 적절한 산소공급을 위한 교반에 의한 산소전달효율에 관한 것임을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 미생물의 이차대사산물 생산을 위한 발효의 경우 문제되는 것은 고농도 균체량에서 적절한 산소공급임을 알 수 있다. 그러므로 산소전달효율을 높이기 위해서는 교반과 통기속도를 증가시키거나 효율 높은 임펠러를 선택하는 방법과, 산소전달을 위한 oxygen vector로 유기용매나 butyric acid 등을 이용하는 방법을 생각할 수 있다. 점도를 높이기 위해 자당으로 포화시킨 용액을 매체로 한 발효기에 butyric acid를 첨가하였을 때 *kLa*를 약 3배정도 증가시켰다는 보고가 있으나, 우선 butyric acid가 균의 성장에 미치는 영향을 규명해 보았다. 농도별로 butyric acid를 첨가하여 flask 배양을 했을 때 균의 성장과의 관계를 Table 2.10에 나타내었다. Butyric acid가 약간만 첨가되어도 균체의 성장이 심각하게 저해를 받아서 산소전달을 위한 용매의 첨가는 고려의 대상이 되지 못하였다. 결국 본 실험에서는 네 가지 임펠러를 사용한 발효를 실시하여 산소전달효율을 비교하였다.

Table 2.10. Effect of butyric acid on growth of *Streptomyces avermitilis*

butyric acid 첨가량(v/v%)	균체량(D.C.W.) (g/L)
0.0	4.7017
0.5	1.1783
1.0	1.0833
1.5	1.025
2.0	0.9033

4) Dynamic method의 검증

앞에서 사용한 dynamic method는 간단하고 특별한 장치가 필요 없어 간편하지만 큰 규모의 발효기에서는 갑작스런 교반의 증가가 어렵기 때문에 적용이 곤란하고, 점도가 높은 경우 발효배지 안에 공기 방울이 계속 남아 산소를 공급해 줌으로써 실제보다 낮은 *OUR*.과 *OTR* 값을 나타낼 수 있게 된다. 따라서 가장 널리 쓰이고 믿을 수 있는 방법인 direct method를 사용하여 dynamic method와 비교해 보았다. Table 2.11과 2.12에서 볼 수 있듯이, 예상대로 dynamic method에 의해 측정된 *OUR*과 *OTR*이 direct method에 의한 것보다 더 작은 값을 나타내었다. 두 방법에 의해 측정된 *OUR*과 *OTR*은 전 세대에 걸쳐서 불일치를 나타내었고, 두 가지 값들에

대한 일정한 상관관계는 찾기 힘들었다. 이 현상은 Tuffile 등이 *Streptomycete* 발효에서 연구 결과와 비슷한 유형을 나타낸다. 그러므로 dynamic method는 동일한 조건과 방법에서 손쉬운 *kLa* 측정과 비교 방법은 될 수 있으나, 다른 조건에서 그 값에 절대적인 의미를 두어서는 중대한 오류를 범할 수 있게 될 것이다.

Table 2.11. Comparison of *OUR* and *kLa* between dynamic and direct methods during batch cultures of *Streptomyces avermitilis* at 300-500 rpm, 1 vvm, pH 7 and 1 % inoculum amount using a Scaba type imepller.

	OUR (mM O2 /L/hr)		*kLa* (hr-1)	
DCW (g/L)	dynamic	direct	dynamic	direct
6.82	1.61	5.31	42.52	78.60
7.15	2.40	8.64	55.44	54.09
7.82	5.14*	11.41*	73.15*	127.15*
10.2	5.37*	13.49*	61.45*	146.33*
9.44	6.22*	15.14*	54.65*	189.48*
10.11	5.25*	14.27*	64.01*	203.77*
9.99	2.59	6.62	16.70	38.99
10.41	2.58	6.89	22.18	41.52
12.57	5.77*	18.15*	51.23*	278.58*
12.69	5.44*	18.82*	58.18*	294.54*
15.5	5.43*	15.73*	71.35*	320.01*
19.08	3.38	6.29	30.35	53.85

* Experiments were done at 500 rpm.

Table 2.12. Comparison of *OUR* and *kLa* between dynamic and direct methods during batch cultures of *Streptomyces avermitilis* at 300 rpm,, 1 vvm, pH 7 and 10 % inoculum amount using a Ruston turbine type impeller.

	OUR (mM O2 /L hr)		*kLa* (hr-1)	
DCW(g/L)	dynamic	direct	dynamic	direct
5.91	1.99	0.92	91.9	378.5
8	5.91	11.33	86.8	164.7
9.41	6.06	11.56	51.4	110.6
10.45	6.13	11.79	48.5	109.0
13.28	5.26	8.35	70.5	117.2

이렇게 dynamic method에 영향을 미치는 점도에 대하여 알아보기 위하여 고농도 균체 배양을 위한 유가식 배양(Fig. 2.69)에서 Brookfield Viscometer를 이용하여 겉보기 점도를 측정하여 Fig. 2.73과 같은 결과를 얻었다. 발효시간이 지남에 따라 겉보기 점도가 증가해서 218.5 시간이 경과했을 때 26600 cP의 최고 점도를 나타내었고, 그 이후로 감소하기 시작하였다. 이 시점 이후로 균사와 pellet으로 고밀도, 고점도를 이루는 배양배지는 균사의 분해로 인해 점차 분리되고, 점도와 산소요구량도 감소하는 것으로 관찰되었다. 한편 배양액의 성질은 Fig. 2.74와 같이 점도계의 스핀들 회전속도(shear rate)가 증가함에 따라 점도가 감소하는 전형적인 non-Newtoian 유체의 특성을 보였다. 상기의 결과들을 종합해 보면 높은 점도에서의 발효나 규모확대를 위한 실험에서는 dynamic method보다 direct method가 유리한 것으로 밝혀졌다. 그래서 임펠러 평가를 위한 실험에서는 direct method를 *kLa* 측정방법으로 선택하였다.

5) 발효기에서 임펠러의 산소전달 효율 비교

여러 종류의 임펠러에 대한 물질전달의 효율을 알아보기 위하여 각 임펠러에 대한 부피물질전달계수를 측정하여 각 임펠러의 효율을 비교하였다. 사용한 임펠러는 Rushton turbine, Scaba, Pitched blade 및 Intermig impeller이다. Rushton blade를 사용하여 회분식 배양의 한 결과를 Fig. 2.75에 나타냈다. 초기 378 hr-1이었던 *kLa* 값은 지수성장기 동안 균체량이 증가하여도 약 110 hr-1 정도의 *kLa* 값을 유지하였다. 그러나 정상기 이후 세포의 자기분해에 의해 균체량이 감소함에 따라 *kLa* 값이 불규칙하게 변하는 등, 결과의 신뢰성이 떨어져서 이 값들을 비교하는 것은 의미가 없는 것으로 판단되었다. Fig. 2.76은 Scaba를 사용한 회분식 배양에 대한 결과이다. 초기 419 hr-1이었던 *kLa*값은 지수성장기 동안 균체량이 증가함에 따라 약 40에서 110 hr-1 정도 *kLa*값의 변화를 보여주었다. *OUR*.은 최소 1.2 mM O2/L hr, 최소 14.0 mM O2/L hr 이었으며, DO는 지수성장기에서는 10-20% 수준이었으나 정상기 이후로는 약 80% 정도를 유지하였다. 여기서 비교되는 *kLa* 값은 균체량이나 그 당시의 배지의 유동학적 특성에 의해 좌우되므로 다른 임펠러와 비교를 위한 절대적 기준으로 보아서는 안될 것으로 보인다.

Pitched blade를 사용한 회분식 배양에 대한 결과를 Fig. 2.77에 나타냈다. 이 실험에서는 앞의 두 실험이 초기에 너무 빠른 성장으로 인하여 *kLa*의 측정과 비교에 어려움이 있었으므로 지수기 단계의 성장속도를 조절하기 위해 접종량을 기존의 10%에서 5%로 낮추어 접종하였다. 예상대로 성장속도가 낮아졌으나, Pitched blade의 특성으로 인해 균체가 증가함에 따른 교반 효율이 급격히 낮아져 용존산소는 계속하여 바닥상태를 나타내었고, *kLa*값도 약 50 hr-1 정도인 것으로 관찰되었다. 그러므로 Pitched blade는 산소공급을 위한 배양에 적합하지 않은 것으로 판단되며, 한 개의 Intermig를 사용한 실험에서도 교반 효율이 너무 적어서 호기성 미생물 발효에 적당하지 않은 것으로 보인다. 한편 Intermig impeller의 경우 counterflow의 성향을 이용하여 사용하기 때문에 두 개를 한 조로 사용하여 물질전달계수를 측정하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

앞의 Pitched blade를 이용한 배양에서 접종량을 사용하여 지수기의 성장속도를 변화시킬 수 있는 점에 착안하여, Scaba를 이용한 회분식 배양의 접종량을 1%로 하여 그 결과를 Fig. 2.78에 나타내었다. 접종량을 줄임으로써 지수기의 성장속도를 조절할 수 있었고, 발효초기에 형성된 미생물의 pellet이 끝까지 분해되지 않고 유지되기 때문에 균체량도 다른 접종량의 배양과 비교해서 증가한 것으로 나타났다. 또한 pellet이 계속해서 유지되므로 인해 교반 효율이 증가하여, 그 결과 *kLa*값이 약 100 hr-1정도로 유지되었다. 이상의 결과로부터 접종량을 줄여서 배양하는 방법이 교반 효율의 비교나 균체량의 유지를 위해 유익한 것으로 판단되며, Rushton turbine과 Scaba가 용존산소의 공급을 위한 효율적인 임펠러로 나타났다.

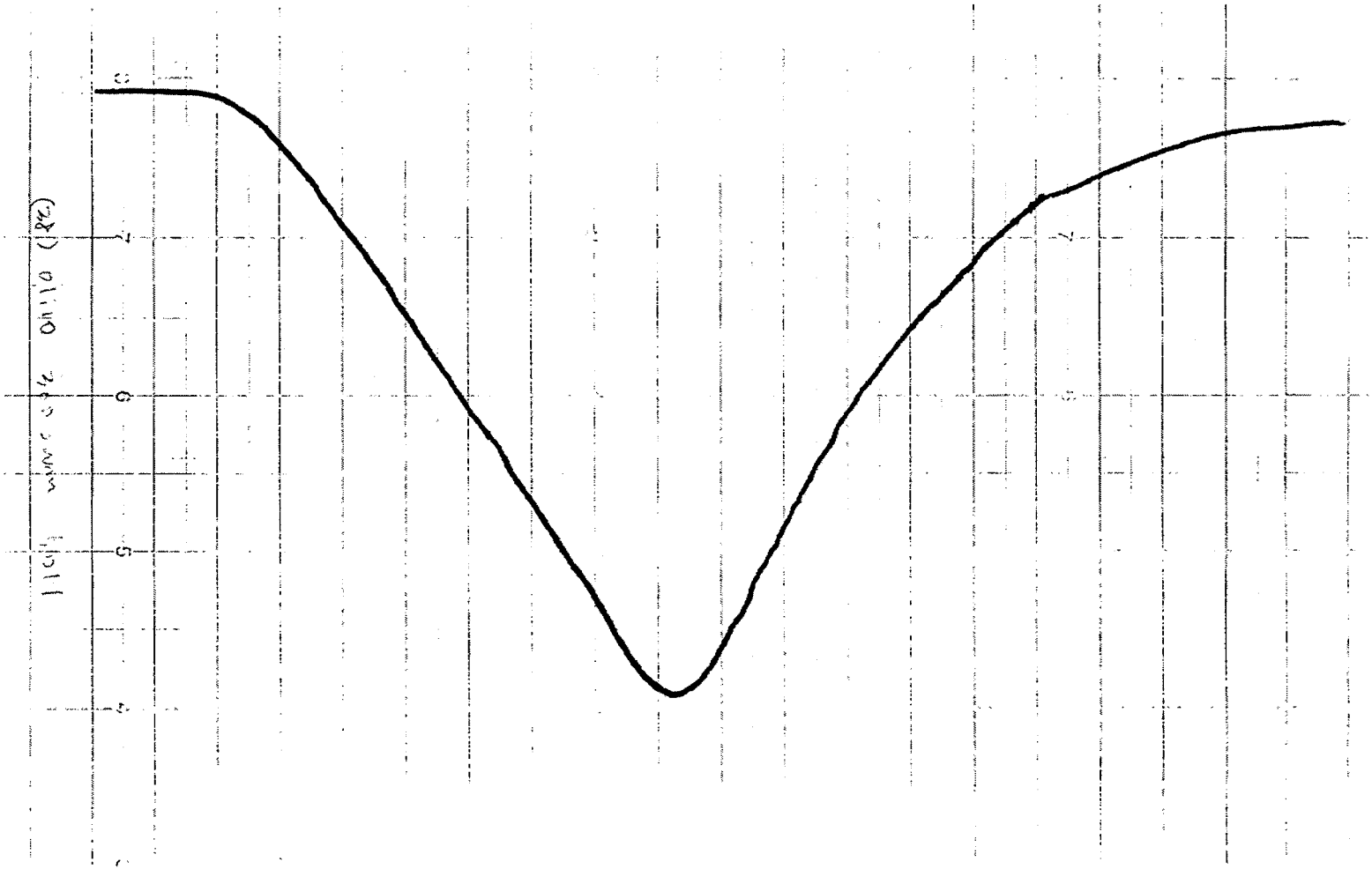


Fig. 2.59. Change in dissolved oxygen concentration according to time for determination of k_La employing dynamic method

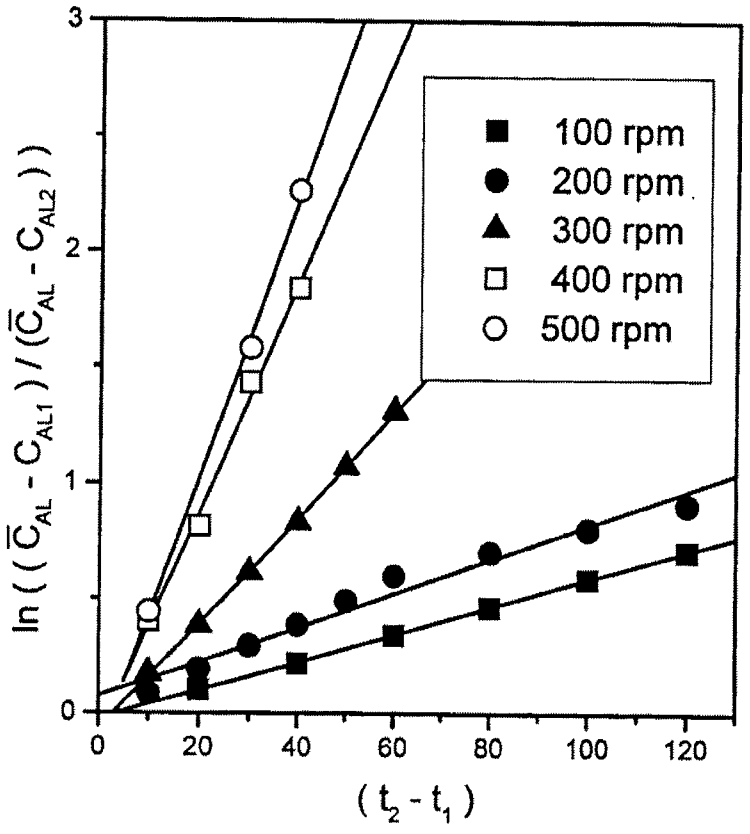


Fig. 2.60. Real example for the plot of $\ln\left(\frac{(\bar{C}_{AL} - C_{AL1})}{(\bar{C}_{AL} - C_{AL2})}\right)$ versus (t_2-t_1) for k_La determination by the dynamic method (suspended cell fermentation at a DCW of 3.0 g/L, aeration 1 vvm).

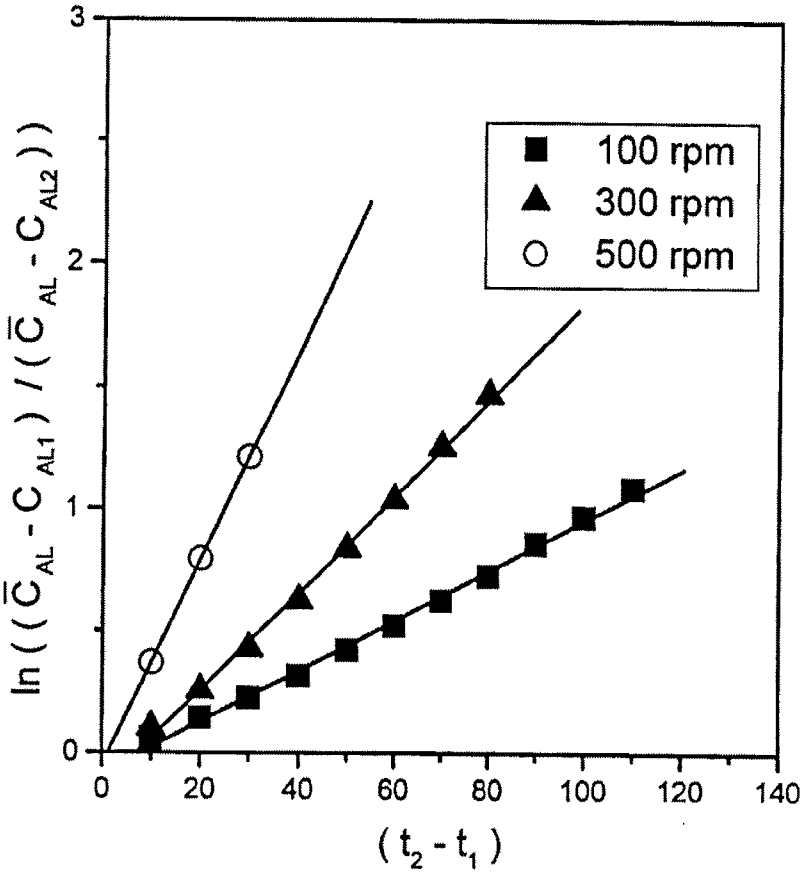


Fig. 2.61. Real example for the plot of $\ln(\frac{(\bar{C}_{AL} - C_{AL1})}{(\bar{C}_{AL} - C_{AL2})})$ versus (t_2-t_1) for k_La determination by the dynamic method(suspended cell fermentation at a DCW of 4.02 g/L, aeration 1 vvm).

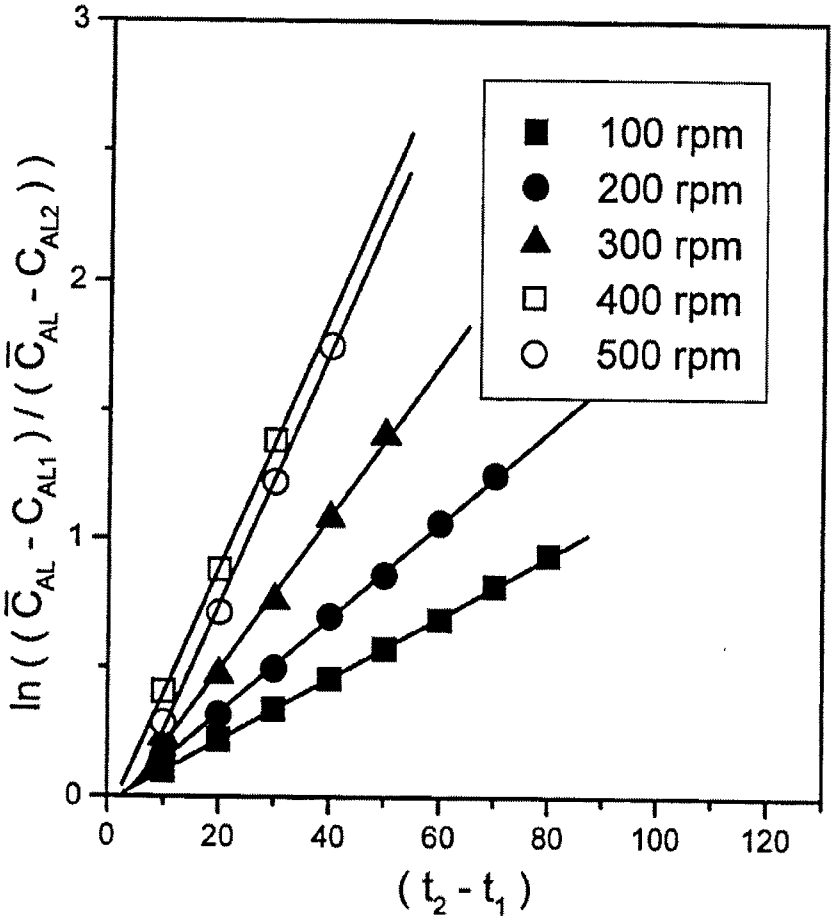


Fig. 2.62. Real example for the plot of $\ln\left(\frac{(\bar{C}_{AL} - C_{AL1})}{(\bar{C}_{AL} - C_{AL2})}\right)$ versus (t_2-t_1) for k_La determination by the dynamic method (suspended cell fermentation at a cell density of 3.24 g/L, aeration 2 vvm).

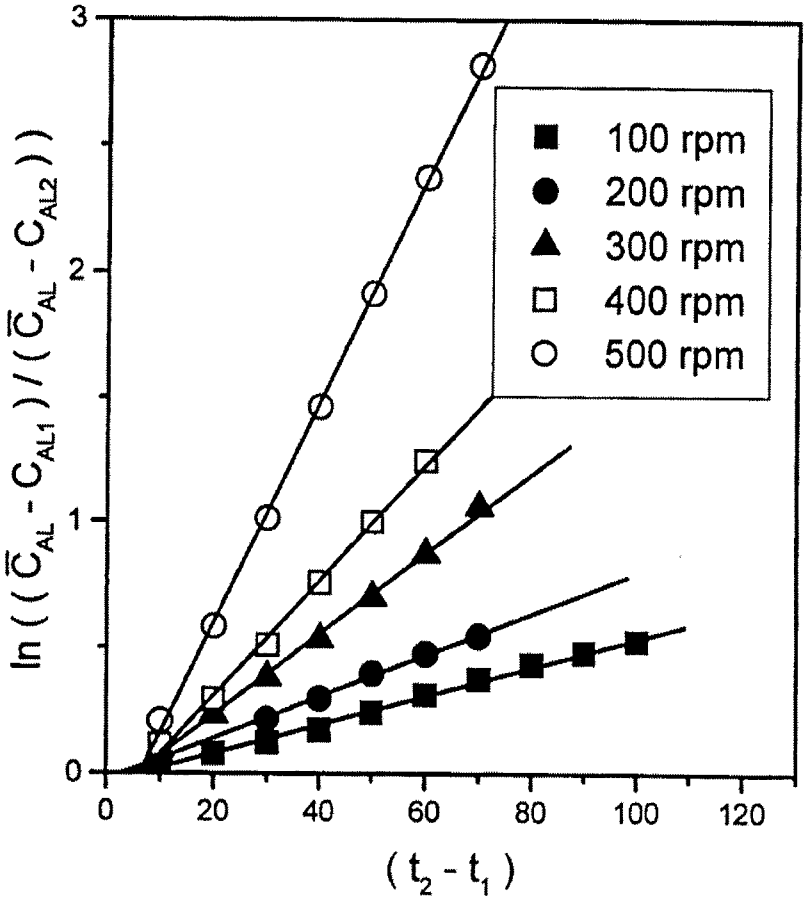


Fig. 2.63. Real example for the plot of $\ln\left(\frac{(\bar{C}_{AL} - C_{AL1})}{(\bar{C}_{AL} - C_{AL2})}\right)$ versus (t_2-t_1) for k_La determination by the dynamic method (suspended cell fermentation at a cell density of 9.24 g/L, aeration 2 vvm).

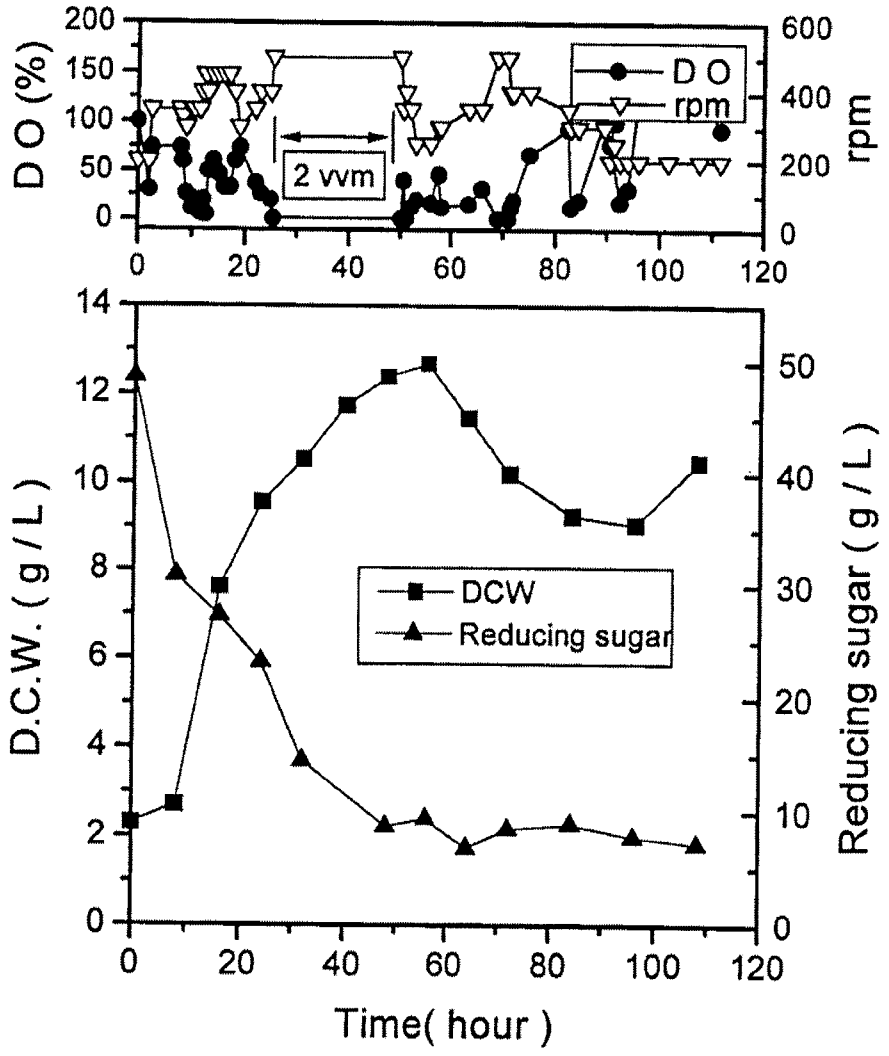


Fig. 2.64. Time course changes of cell growth in batch culture of *Streptomyces avermitilis* at variable agitation speeds, 27℃, 1.5 liter working volume, and 1-2 vvm.

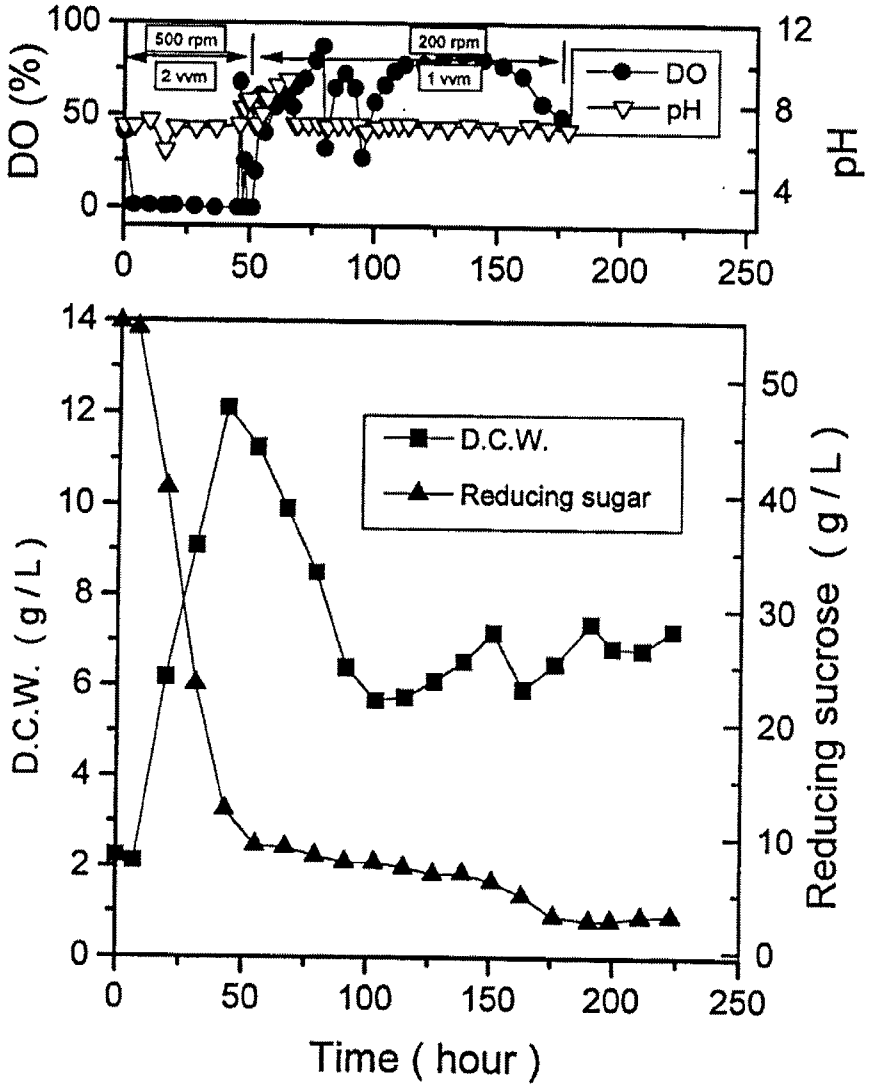


Fig. 2.65. Time course changes of cell growth in batch culture of *Streptomyces avermitilis* at fixed two agitation speeds, 27℃, 1.5 liter working volume, and 1–2 vvm.

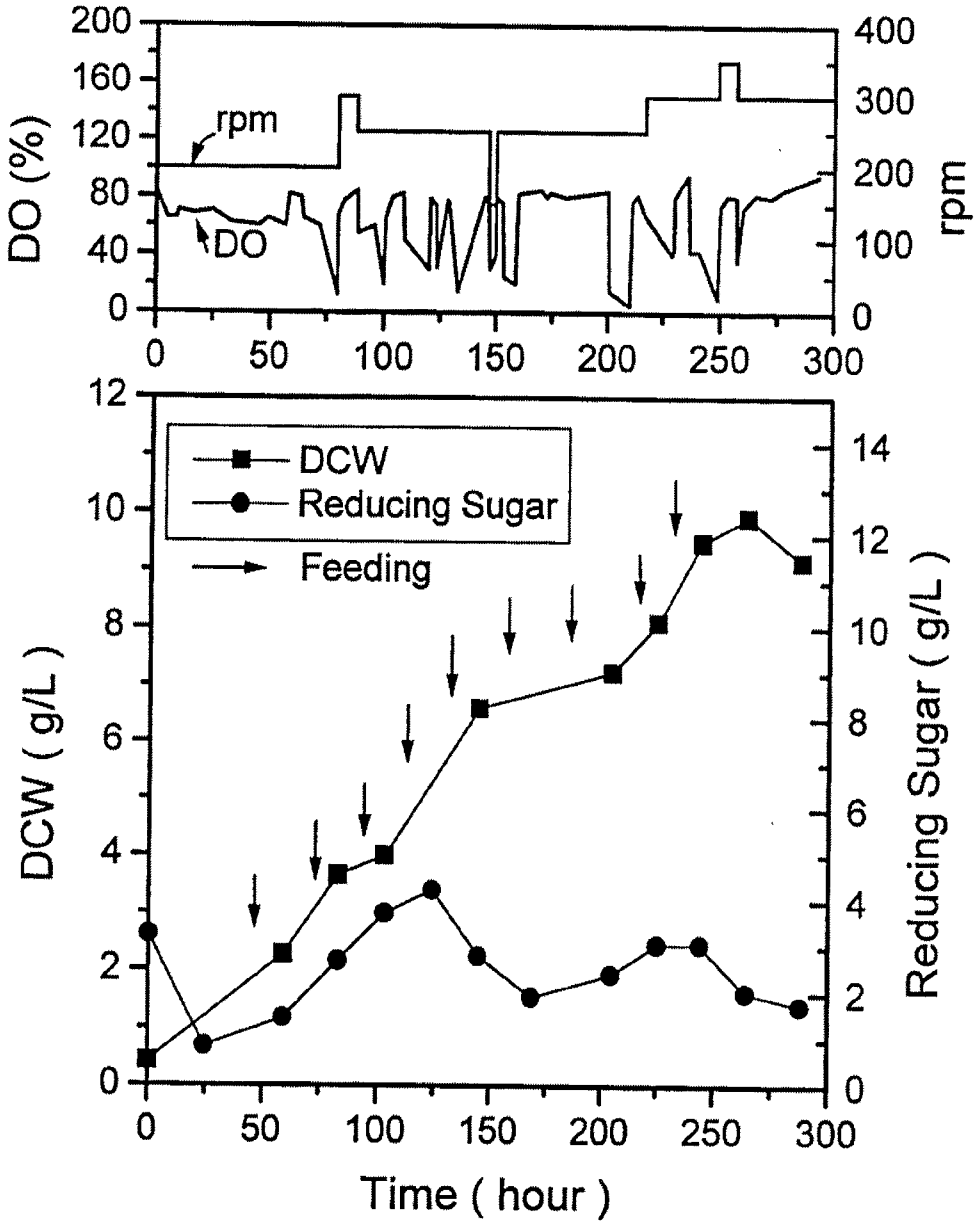


Fig. 2.66. Time course changes of cell growth in Fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis* at variable agitation speeds, 27℃, 1.5 liter working volume, and 1 vvm.

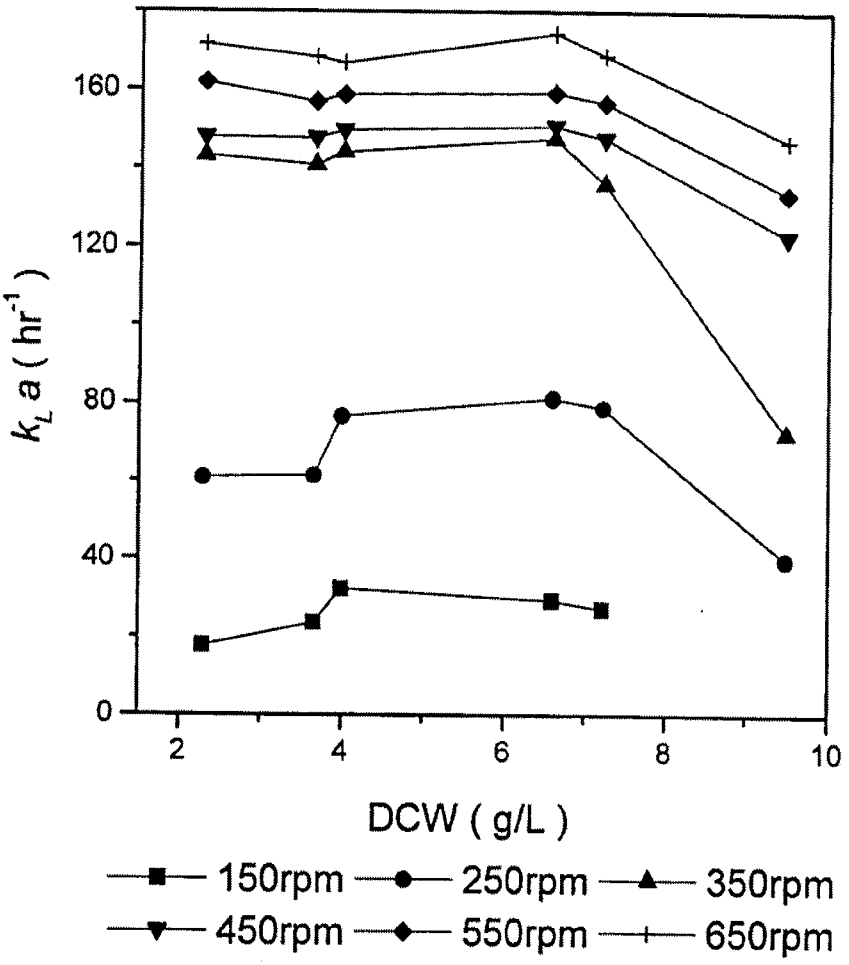


Fig. 2.67. Comparison of k_La with DCW during fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis* at various agitation speeds(1 vvm)

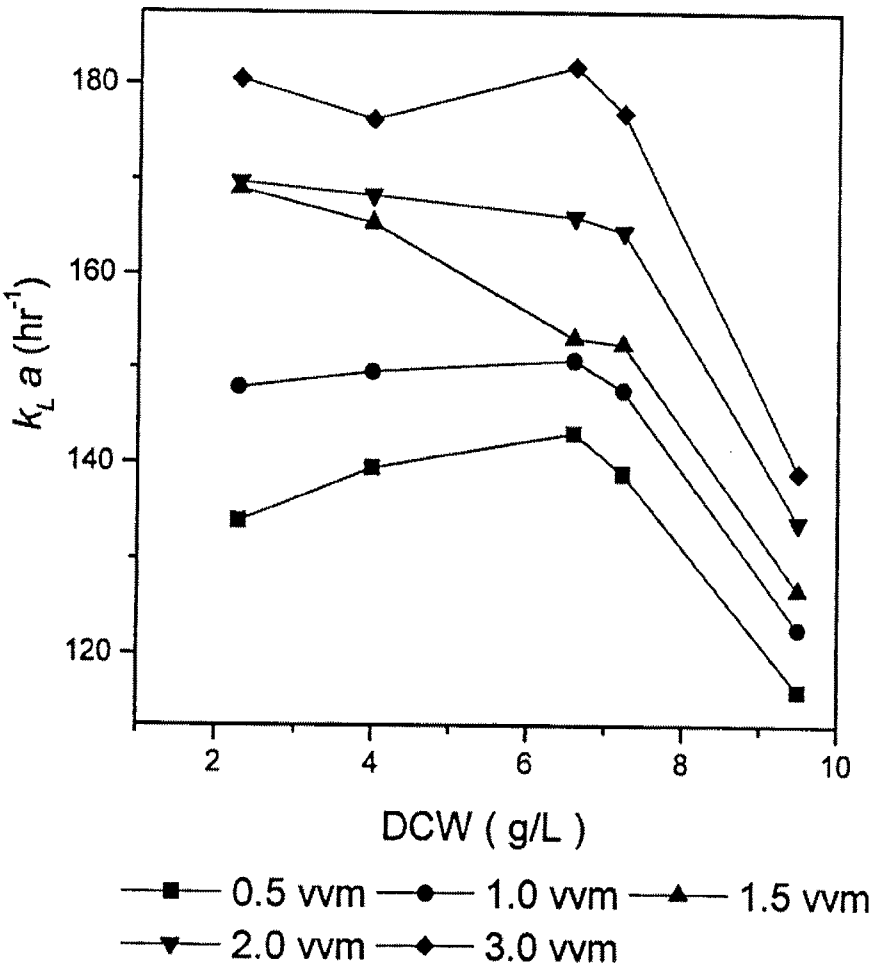


Fig. 2.68. Comparison of k_La with DCW during fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis* at various conditions of aeration(450 rpm).

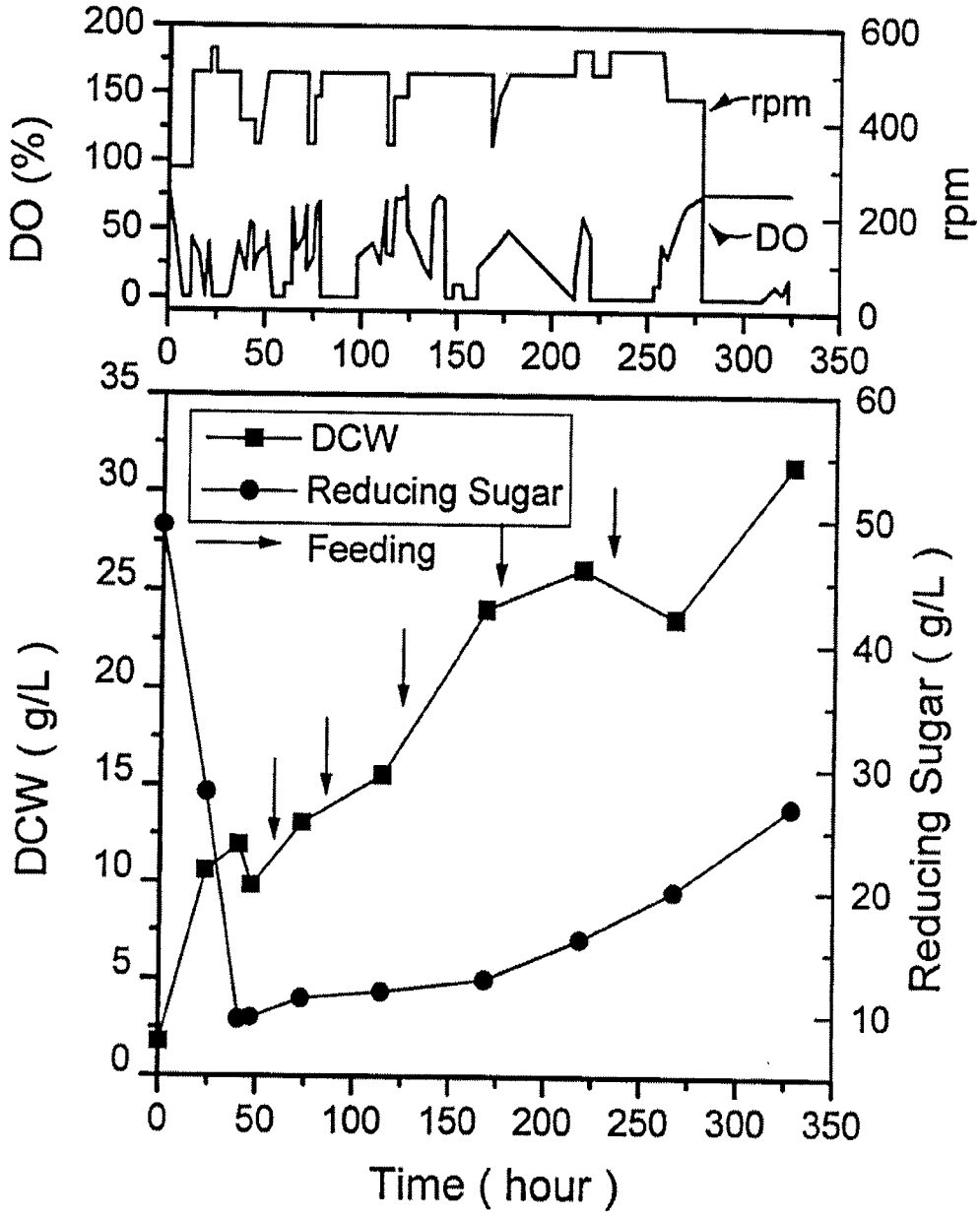


Fig. 2.69. Time course changes of cell growth in Fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis* at variable agitation speeds, 27℃, 1.5 liter working volume, and 1 vvm.

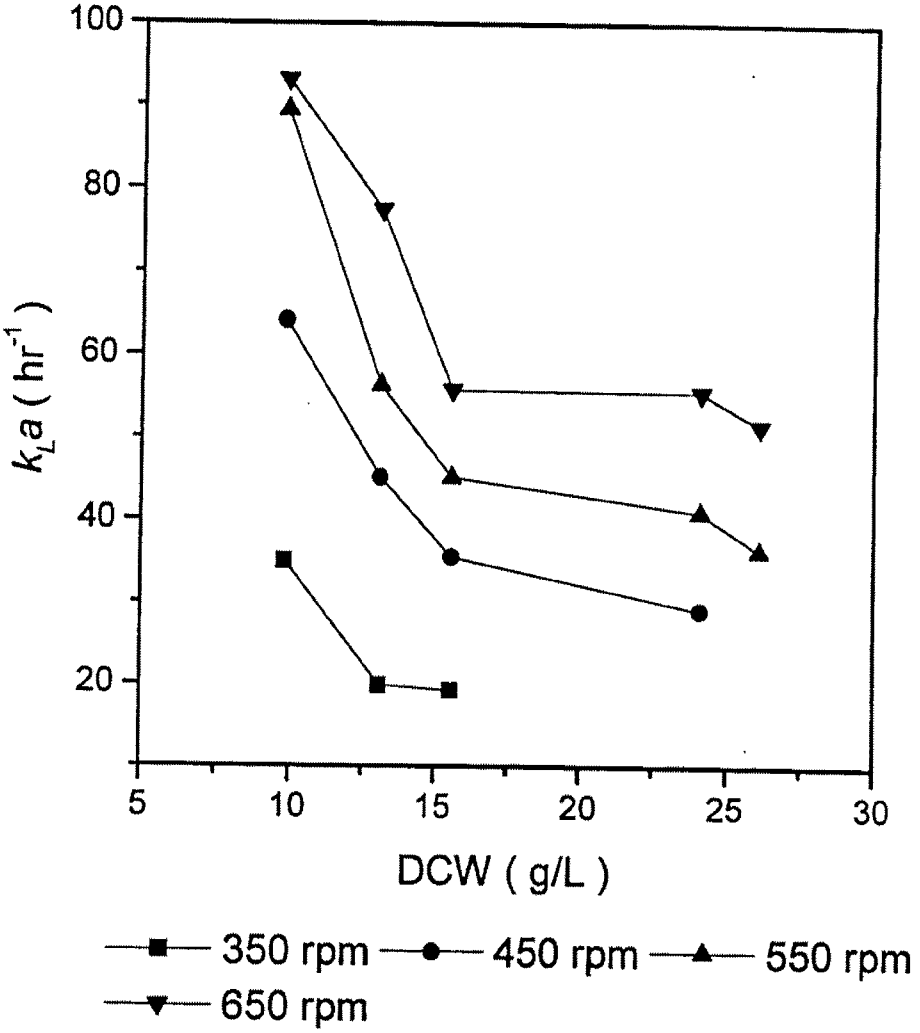


Fig. 2.70. The comparison of k_La with DCW during fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis* at various agitation speeds(1 vvm)

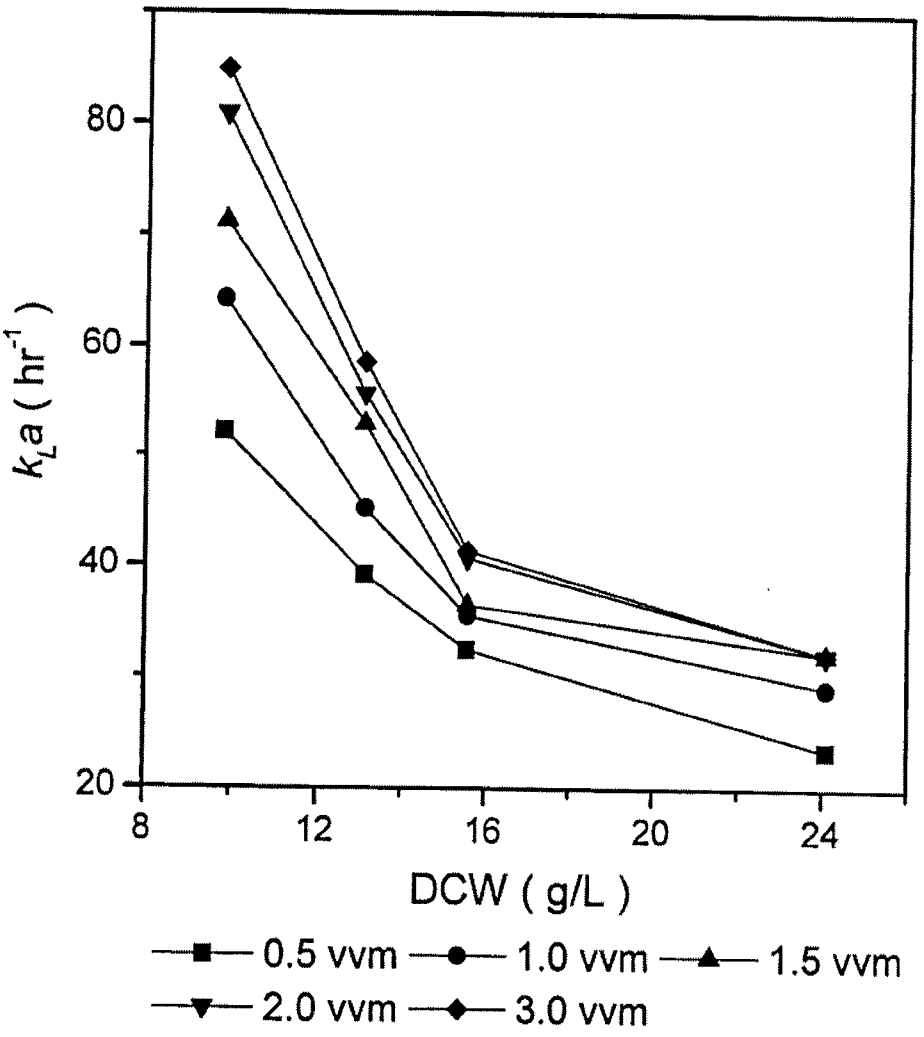


Fig. 2.71. Comparison of k_La with DCW during fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis* at various conditions of aeration(450 rpm).

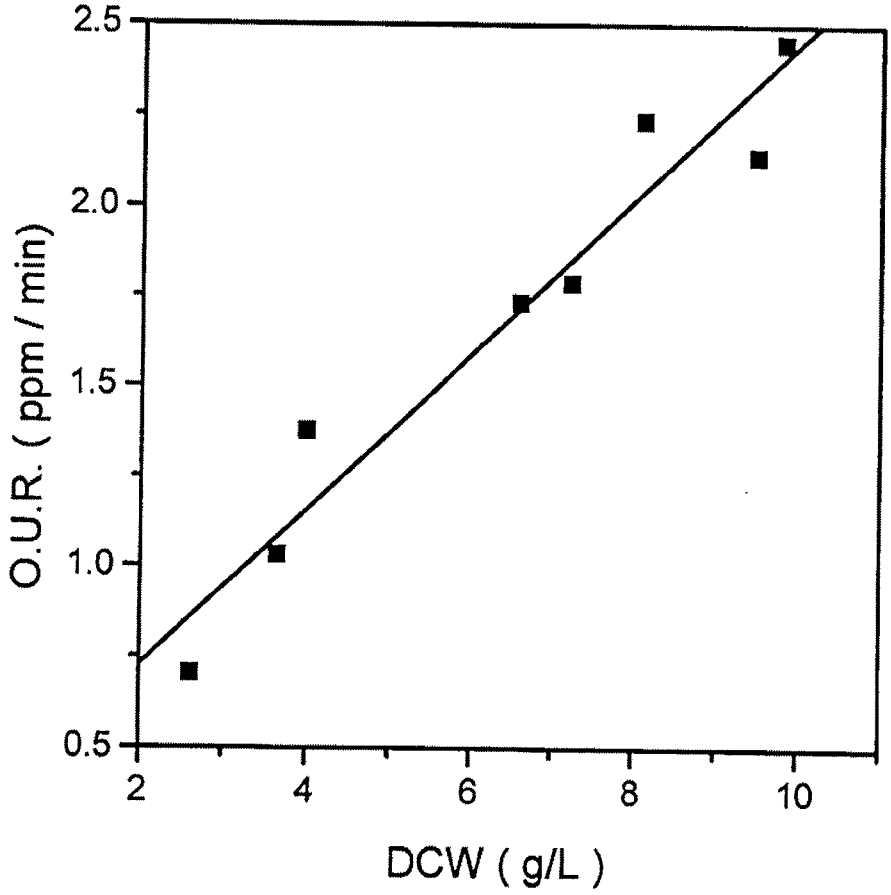


Fig. 2.72. The comparison of *OUR* with DCW during fed-batch culture of *Streptomyces avermitilis*

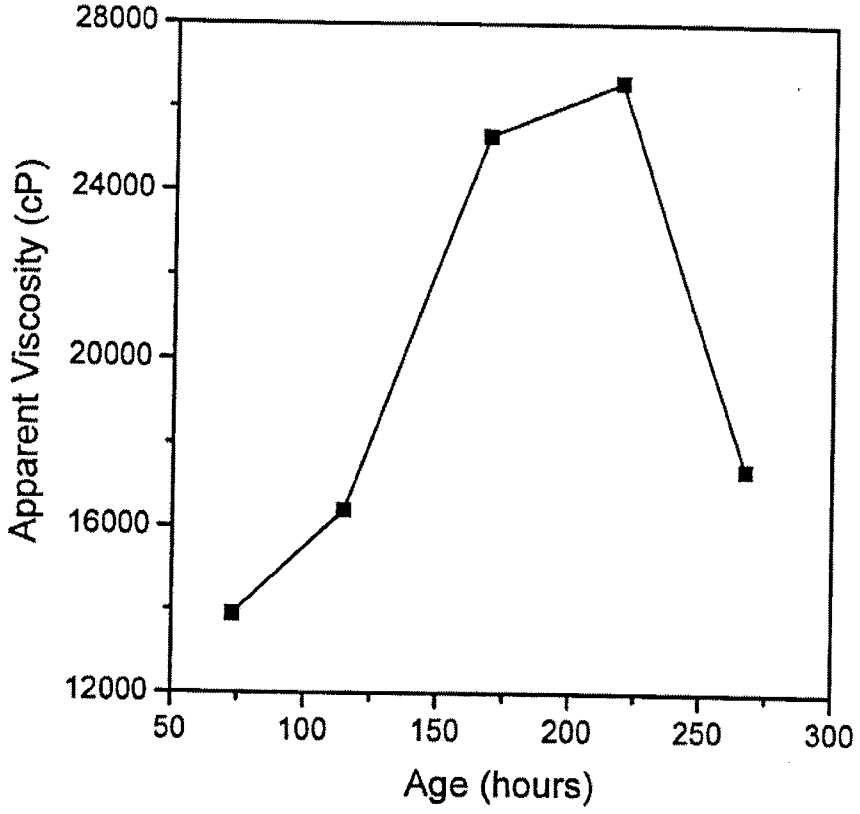


Fig. 2.73. Viscosity profiles in Avermectin fed-batch fermentation. Apparent viscosity of samples determined on the Brookfield Viscometer using spindle LVT #2 at identical rotation speed of 0.6 rpm.

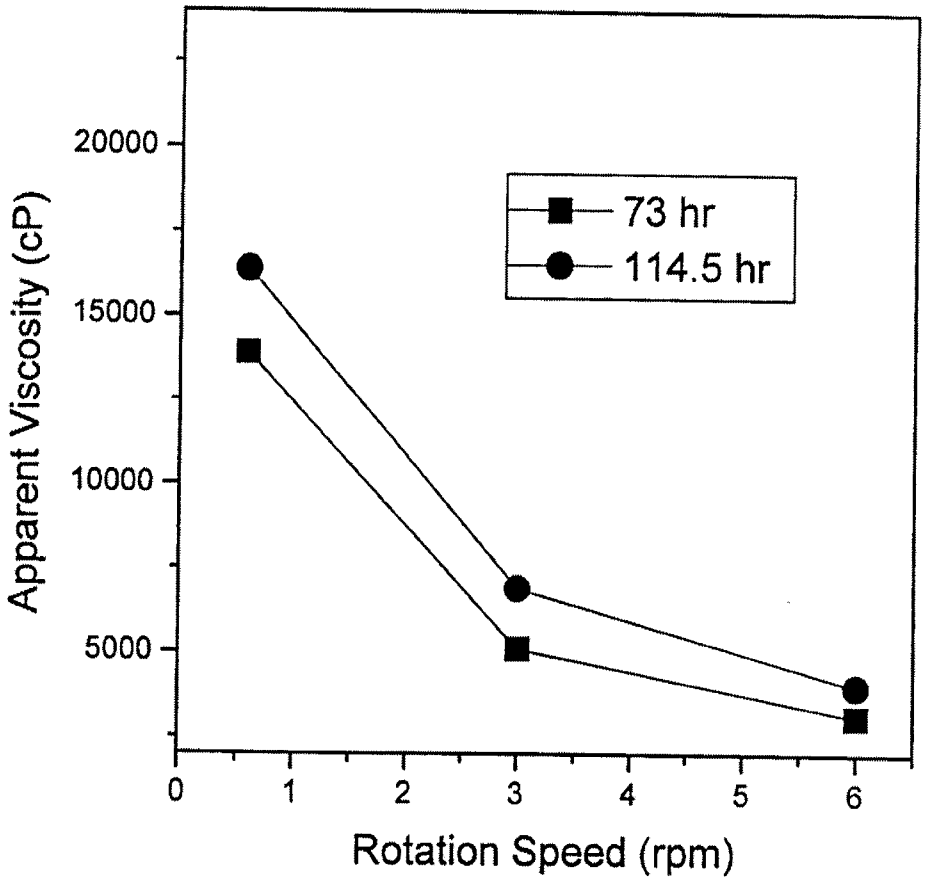


Fig. 2.74. Viscosity profiles in Avermectin fermentation. 100 ml samples of broth taken at two different fermentation ages, were measured on Brookfield Viscometer. The rotation speed of the spindle LVT #2 was varied from 0.6, 3 and 6 rpm to determine torque deflection. The % torque deflection was converted to apparent viscosity(cP) units using calibration charts provided by Brookfield instruments.

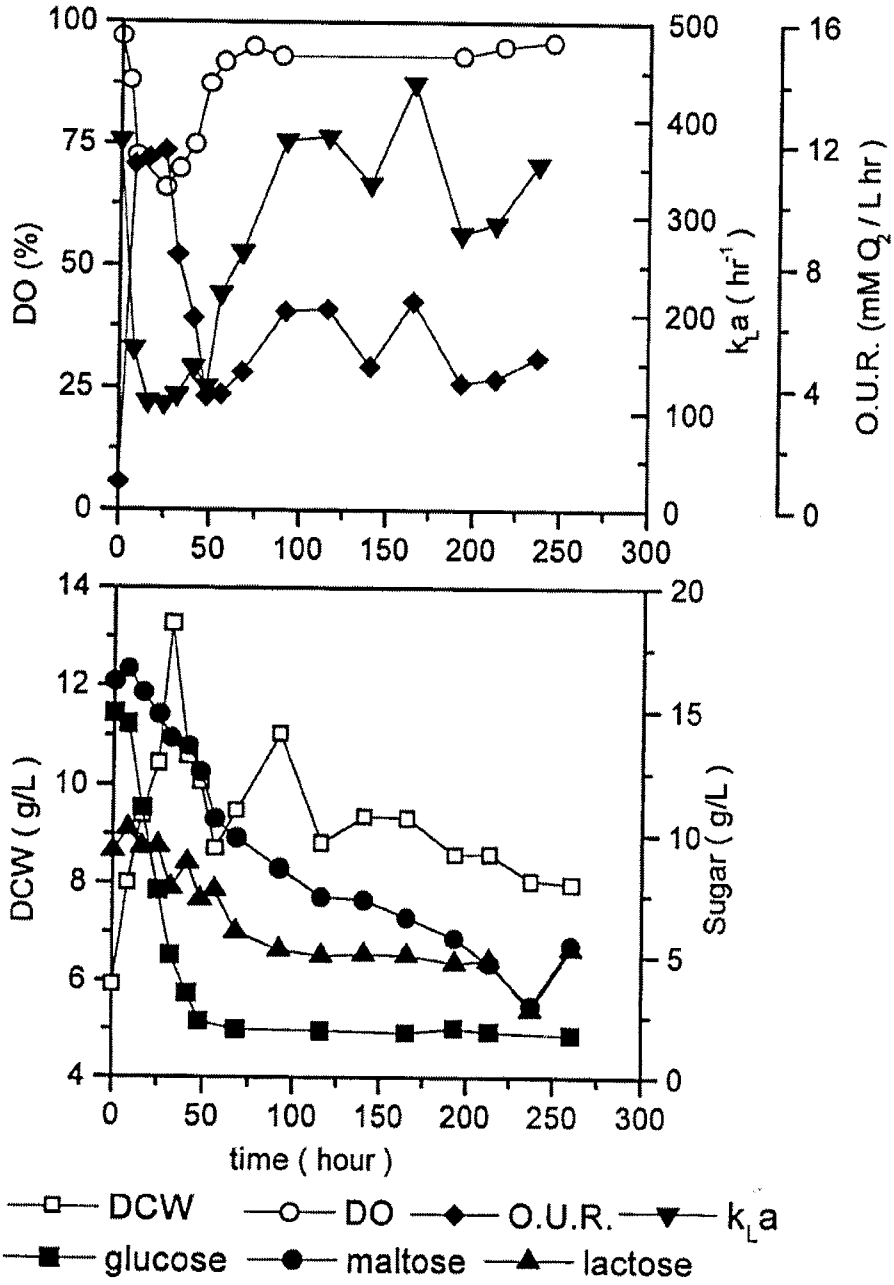


Fig. 2.75 The time profiles of dry cell weight and k_La in batch culture of *Streptomyces avermitilis* at 300 rpm, 1 vvm, pH 7 and 10 % inoculum using a Rushton turbine impeller.

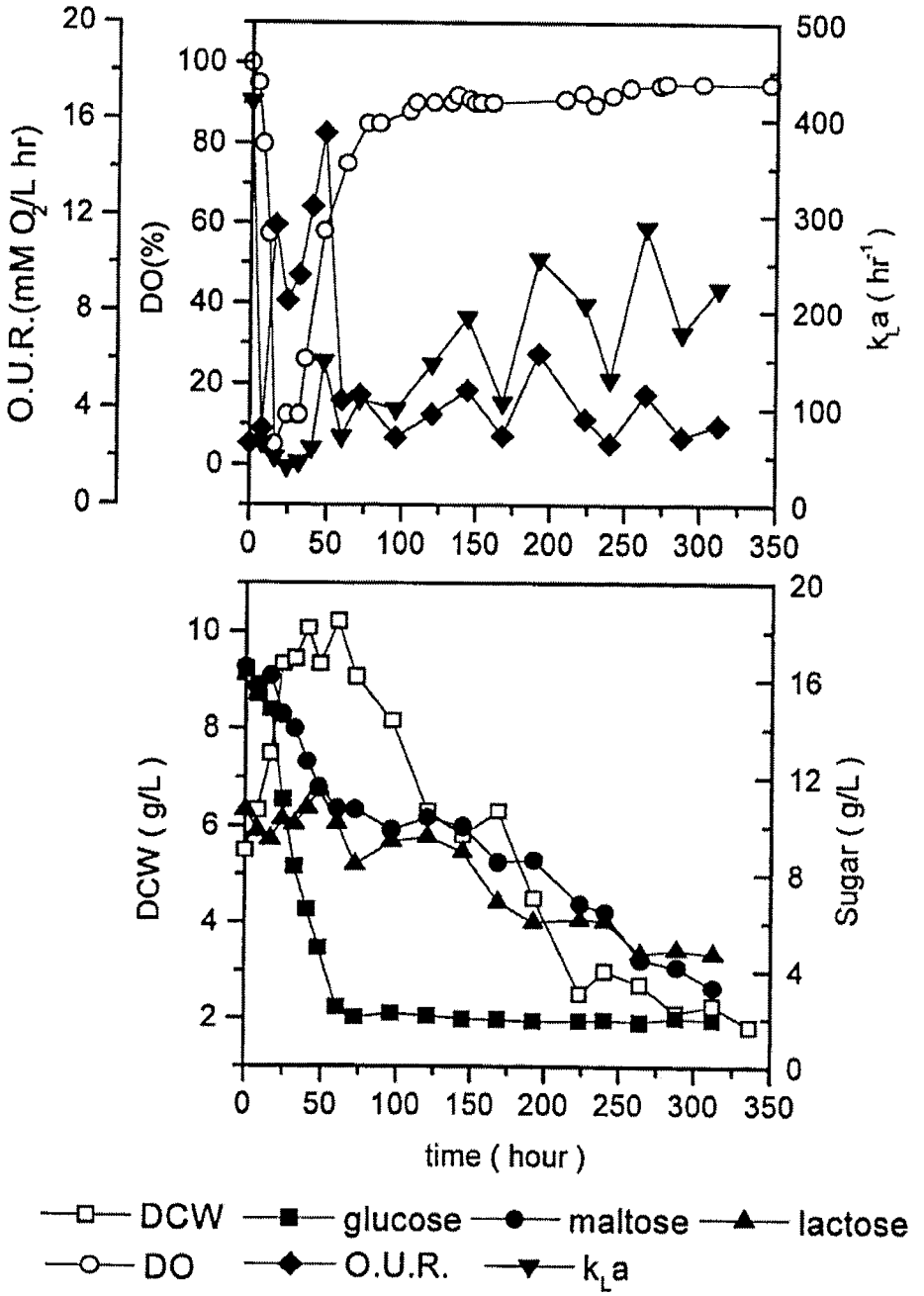


Fig. 2.76. The time profiles of dry cell weight and k_La in batch culture of *Streptomyces avermitilis* at 300 rpm, 1 vvm, pH 7 and 10 % inoculum using a Scaba impeller.

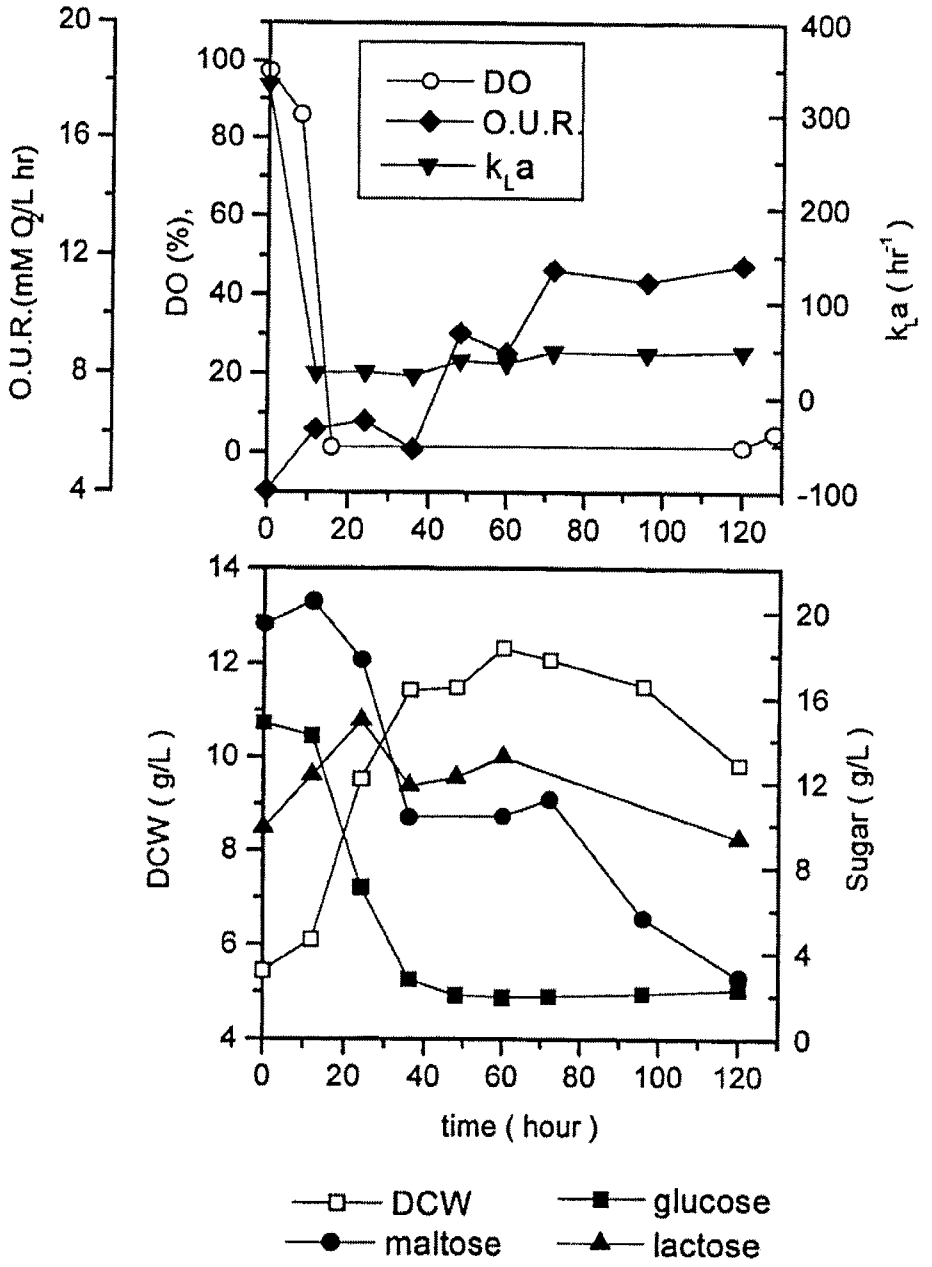


Fig. 2.77. The time profiles of dry cell weight and k_La in batch culture of *Streptomyces avermitilis* at 500 rpm, 1 vvm, pH 7 and 5 % inoculum using a Pitched blade impeller.

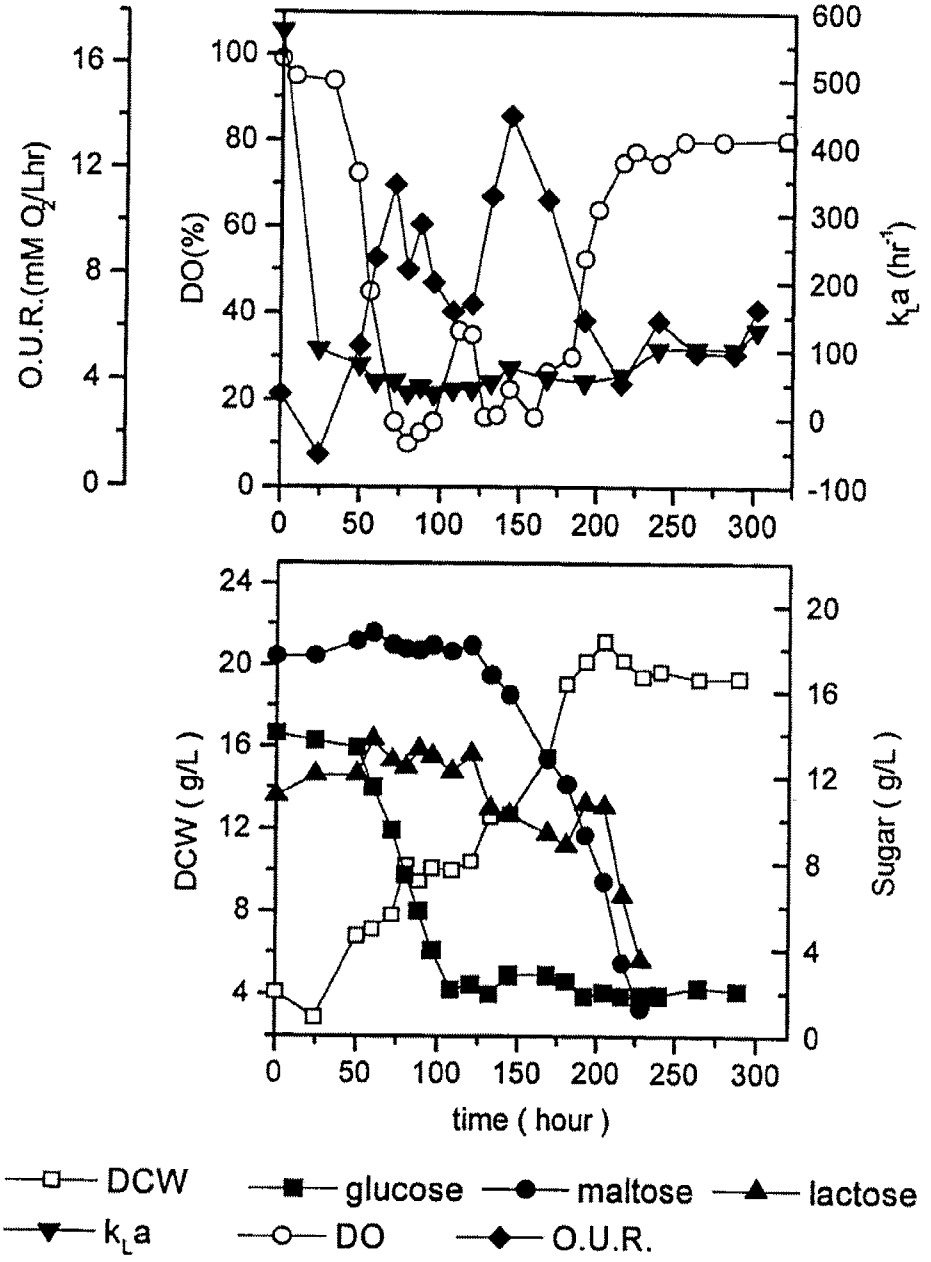


Fig. 2.78. The time profiles of dry cell weight and k_La in batch culture of *Streptomyces avermitilis* at 300 rpm, 1 vvm, pH 7 and 1 % inoculum using a Scaba impeller.

다. Avermectin 분리 정제 공정 개발

본 연구의 최종 목표를 달성하기 위해 본 연구의 1차년도에는 배지로부터 생산균주를 분리하는 공정, 세포파쇄공정, 생산물 추출공정에 대한 연구를 순차적으로 진행하였다. 이를 위해 avermectin 분석 시스템 및 조건을 확립하였으며 배지로부터 생산균주를 분리하는 공정으로 원심분리공정과 여과공정 설계에 필요한 parameter 들을 도출하였고 세포파쇄공정은 기계적 방법을 중심으로 연구한 결과 methanol 추출만 사용한 것과 별 차이가 없어 분리공정에서 생략하기로 결론 내렸다. 추출공정에서 1차 추출은 methanol 보다 acetone이 우수하나 acetone은 다른 용매와의 2차 추출 시 organic phase 의 부피가 늘어나 희석되는 단점이 있어 경제성 검토가 필요하다. 2차 추출은 aceton-water aqueous phase의 경우 chloroform, methanol-water aqueous phase의 경우는 dichloromethane을 사용하는 것이 바람직하였다.

2차년도에는 1차년도의 추출공정 연구 결과 실제 배양한 세포를 사용하였을 경우 2차 추출까지 수행하였는데에도 아직 많은 불순물이 존재하여 농축공정 대신에 3차 추출 등을 계속 연구했다. 이러한 3차 추출을 위한 partition coefficient, percentage of extraction과 selectivity의 관점에서 본 최적의 aqueous phase와 용매(solvent)의 조합을 선정하고 3차 추출공정 설계에 필요한 parameter들을 도출하였다. 그 결과 aqueous phase로는 methanol-water 5:3 phase, solvent phase로는 methylene chloride를 사용하는 것이 가장 바람직하다는 결론을 얻었고 이에 따른 partition coefficient 등 설계자료를 얻었다. 또한 청정공정인 Preparative HPLC를 이용한 avermectin의 분리정제를 시도하였다. 이를 위하여 Water 사의 LC 4000 model HPLC와 10 ㎛ Bondapak C18 reverse-phase preparative column (2.5 Ø X 30 cm)을 사용하여 분리하였으며 그 결과 초기의 acetone extract에 보이던 많은 불순물 peak가 제거되어 하나의 single peak 만을 보여줌으로써 거의 100 %에 가까운 순도를 얻을 수 있었다. 한편 Sephadex LH-20를 이용하여 avermectin B1a와 B1b를 분리하려 하였으나 여러 번의 시도에서도 분리하기 어려워 avermectin B1a와 B1b를 분리하기에는 여러 step의 분리정제 과정이 필요하며 이에 따라 장치비가 증가될 것으로 예상되어 이를 분리하지 않는 제품을 생산하는 것이 더욱 경제적인 측면에서 바람직하다는 결론을 내렸다.

본 과제의 최종 목표는 avermectin을 경제적으로 생산할 수 있는 실용화 생산공정의 개발이다. 이를 위해서는 실험실 규모의 실험에서 얻은 자료에 기초하여 scale-up된 규모의 공정을 개발해 봄으로써 scale-up 전략을 확립하고 여러 가지 설계자료를 도출할 필요가 있다. 따라서 3차 연도에는 분리공정의 대부분을 차지하게될 추출공정을 중심으로 연속식 향류 추출공정을 개발하여 실용화 분리공정의 simulation 실험을 실시함으로써 최적 분리정제 공정 개발을 위한 기반을 확립하였다. 한편 분리정제된 avermectin을 소비자가 원하는 형태로 가공하기 위해서는 crystallization이 반드시 필요하여 기초실험을 바탕으로 air-lift 형태로 과포화 용액을 현탁상태로 유지할 수 있는 연속식 crystallization 장치를 성공적으로 개발하였고 이로부터 균일한 avermectin의 결정을 얻는데 성공하였다.

1) 배지로 부터의 생산균주 분리공정 개발

배지로부터 생산균주를 분리하는 공정은 발효공정에서 분리정제 공정으로 넘어가는 첫 번째 공정으로 avermectin 생산공정의 경우 intracellular product이므로 세포만을 취하고 나머지 배양액은 버림으로써 downstream 공정의 load를 줄이는데 목적이 있다. 생산균주는 고형물이고 배지는 액상이기 때문에 대표적인 고/액 분리공정인 원심분리와 여과 중 하나를 선택해야 하며 보통 생물공정에서는 원심분리나 여과 공정을 이러한 목적으로 사용한다. 이의 최종적 선택은 적어도 bench scale의 test를 통하여 이루어져야 하며 운전비, 설치비등 경제적인 면과 기술적인 면, 그리

고 안전성 등 여러 가지 인자들을 종합 검토하여 최종 공정을 선택해야 한다. 따라서 이러한 두 공정 중 최적 공정의 선택을 위한 경제성 검토를 위해 scale-up에 필요한 기본 설계 자료를 도출하는 것이 lab scale의 공정실험의 기본목표이다. 본 연구에서는 일단 원심분리공정과 여과공정의 scale-up 을 위한 기본 test 잎 설계 parameter를 얻는 목적으로 다음과 같은 실험을 수행하였다.

가) 원심분리공정

본 연구의 원심분리 공정에서는 원심분리기의 용량과 운전조건의 기본이 되는 settling velocity를 lab-scale의 bottle centrifuge test를 통해 추정하였으며 이는 추후 실용화 공정 개발 시 연속식 centifuge의 용량인 Σ 값을 결정하는데 중요한 역할을 한다.

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

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

여기서 l 은 tube bowl의 높이, R은 tube bowl의 축으로부터 벽면까지의 거리 (반지름), ω는 각속도로 나타낸 회전 속도이다.

또한 disc type 원심분리기의 경우 Σ 값은 다음과 같이 계산된다.

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

여기서 n은 disc의 개수, ω는 각속도로 나타낸 회전 속도, Ro는 원심분리기의 반경, R1은 중심축으로부터 disc까지의 거리, θ는 disc의 기울어진 각도이다. 따라서 보통 원심분리기 제조업자들은 각각 제품의 모델마다 Σ 값의 정보를 제공한다.

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

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

여기서 d는 cell particle의 직경, ρ_s는 cell particle 의 밀도, ρ는 배양액의 밀도, g는 중력가속도, μ는 배양액의 점도이다.

만일 위에 기술한 모든 정보를 얻을 수 있다면 vg를 계산할 수 있게 되고 공정의 처리 용량에서 결정될 원심분리기의 처리유량을 Q라고 하면 다음의 식이 성립된다.

$$Q = vg\ \Sigma \qquad (4)$$

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

하지만 (3) 식에서의 모든 parameter들을 다 추정하지 못하기 때문에 적은 scale의 원심분리기로부터 이 값을 estimation하여 scale-up에 이용하는 것이 중요하다. 실험실 규모의 tubular bowl centrifuge를 사용하여 flask에서 배양한 배양산물을 5000rpm으로 원심분리하면서 시간에 따른 supernatant의 변화를 spectrophotometer 600 nm 에서 측정하였고 그 결과를 Fig. 2.79에 나타내었다. 이 그림에 따르면 약 10분이면 더 이상 원심분리가 진행되지 않고 실제에도 맑은 supernatant를 얻을 수 있었다.

한편 사용한 tubular bowl 원심분리기의 geometry, rpm, 실험에서 얻은 settling time사이에

는 다음의 관계식이 성립한다.

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

여기서 g는 중력가속도, R0는 회전축으로부터 tubular bowl 밑까지의 거리, R1은 회전축으로부터 수면까지의 거리, w는 각속도, t는 Fig. 2.79에서 구한 settling time 이다. 이 값을 모두 (5)식에 대입한 결과 주어진 배양액에서의 *Streptomyces avermitilis*의 vg값은 1.13 x 10-3 cm/sec로 bacteria의 10-7 order에 비하면 크다. 그 주요 원인은 mycelia를 형성하기 때문에 bacteria 보다는 particle의 평균 직경이 크기 때문이라고 사료된다. 이렇게 구한 vg값은 식 (4)를 이용하여 주어진 처리용량 Q로부터 원심분리기의 용량인 Σ 값을 계산하는데 사용됨으로써 적절한 크기의 원심분리기를 선정하는데 중요한 역할을 한다.

나) 여과공정

여과공정의 개발을 위해서는 lab scale의 filter test를 통하여 scale up에 필요한 여러 가지 parameter들을 추정하였다. Ruth 방정식을 이용하여 filter의 저항, avermectin 생산균주 cake의 specific cake resistance 값 등을 추정하여 향후 rotary drum filter 등의 scale-up 된 filter의 설계에 대비하였다.

Darcy의 법칙으로부터 유도된 정압여과에 관한 유속과 압력차와의 관계식은 다음과 같다.

$$\frac{1}{A}\frac{dV}{dt} = \frac{\Delta P}{\mu[\alpha c_0 (V/A) + R_M]} \qquad (6)$$

여기서 A는 filter area, V는 filtrate volume, ΔP는 압력차, μ는 점도, α는 specific cake resistance, c_0는 mass of cake solid per volume of filtrate, RM은 filter medium의 저항이다. 이 식을 zero 시간에서 filtrate volume(V)을 zero로 하고 변수분리하여 적분하면 다음과 같은 Ruth 방정식을 얻게 된다.

$$(\frac{At}{V}) = K(\frac{V}{A}) + B \qquad (7)$$

여기서 K는 $\frac{\mu\alpha c_0}{2\Delta P}$, B는 $\frac{\mu R_M}{\Delta P}$ 으로 (At/V)와 (V/A)를 plot하면 직선관계를 얻게 되고 이의 slop에서 specific cake resistance α값을 얻게 된다.

Fig. 2.80은 lab scale 의 filter (Area = 2.2685 cm2)를 이용하여 30 mmHg의 진공으로 여과실험한 결과를 Ruth plot한 것으로 직선을 나타내고 있고 이 직선의 기울기와 점도 (1.17 c.p ; Osteald 점도계로 측정), c_0 (0.003 g/cm3) 등을 대입하여 specific cake resistance α값을 구하면 1.35 x 1013 cm/g가 된다. 또한 Fig. 2.81, Fig. 2.82, Fig. 2.83은 각각 진공도 40 mmHg, 50 mmHg, 60 mmHg에서의 여과실험 결과를 Ruth plot한 것으로 30 mmHg의 경우와 동일하게 각 경우에서의 specific cake resistance α값을 구할 수 있고 그 값은 각각 1.33 x 1013 cm/g, 1.07 x 1013 cm/g, 1.90 x 1013 cm/g이었다.

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

$$\alpha = \alpha'(\Delta P)^s \qquad (8)$$

이때 α'는 cake particle 의 크기와 모양에 관계된 상수이고 S는 압축성의 종류를 나타내는 compressibility이며 보통 0.1-0.8 사이의 값을 갖게되고 이 값이 zero 이면 완전 비 압축성을 나

타내고 1에 가까이 커질수록 압축성이 큰 것을 나타낸다. 이 compressibility를 구하기 위해 여러 압력차에 따르는 specific cake resistance α값의 변화를 log-log 그래프에 plot하면 Fig. 2.84와 같이 되는데 그 기울기로부터 S 값을 구한 결과 0.2586로서 avermectin을 생산하는 *Streptomyces avermitilis* 의 경우 거의 rigid 하다 할 수 있다.

이상에서 lab scale의 filter test를 통하여 여과공정의 scale up시 주어진 처리량에 따른 여과면적의 계산에 필요한 filter의 저항, avermectin 생산균주 cake의 specific cake resistance 값 등 여러 가지 parameter들을 추정하여 scale-up 된 filter의 설계에 대비하였다.

2) avermectin 분석 시스템 및 조건 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 (Waters사 Model 510, detector:Lambda-max 481)를 이용하였으며 column으로는 Waters 사의 10 ㎛ Bondapak C18 reverse-phase column (0.38 X 30 cm)을 사용하였고 40o C에서 column 온도를 유지시켰다. 또한 solvent로는 85:15 (vol/vol)의 methanol-water를 사용하였고 유량은 1.2 ml/min.을 사용하였다. sample은 10 ㎕ 를 주입하였으며 avermectin 농도 0-250 mg/l 의 범위에서 직선적인 관계를 확인하여 이 범위에서 calibration curve를 작성하여 사용하고 있다. Fig. 2.85은 각각 다른 농도의 standard solution의 peak 모양을 나타내고 있고 Fig. 2.86는 avermectin B1a, Fig. 2.87는 avermectin B1b의 standard curve를 나타내고 있다. 이 standard curve를 이용하여 차후의 세포파쇄 공정과 추출공정 및 chromatography 공정에 대한 연구를 계속하였다.

3) 세포 파쇄공정 (1차 추출)

Avermectin은 intracellular product이므로 일단은 세포 파쇄공정을 통하여 세포내의 avermectin을 세포 밖으로 유출 시켜야 한다. 이때 파쇄공정이 완전하지 못하면 수율이 떨어지기 때문에 가장 효율적인 파쇄공정의 개발이 필요하다. 파쇄공정으로 사용할 수 있는 방법은 보통 기계적 방법과 물리화학적 방법을 사용하는데 기계적 방법으로는 여러 가지 형식의 homogenizer를 사용하고 실제 산업체에서 많이 이용된다. 물리화학적인 방법은 주로 실험실 규모에서 많이 이용되는데 삼투압을 이용하거나 ice crystal 을 만들어 파쇄하는 물리적 방법과 lysozyme등의 효소를 이용하거나 solvent 처리, detergent 처리, alkali 처리 등의 화학적 처리방법 등을 이용한다. 본 연구에서는 일반적으로 효율성이 높고 경제성이 높아 산업체에서 주로 이용하는 기계적 방법과 solvent 처리를 중심으로 세포 파쇄공정을 검토하였다. 즉 Waring blender, homogenizer, 초음파 파쇄기 등의 기계적 방법에 대한 공정과 solvent 처리에 의한 화학적 공정을 시험하였고 그 결과를 바탕으로 최적 공정을 선정하였다.

Fig. 2.88은 여러 가지 기계적 방법을 사용하였을 경우, 기계별 혹은 처리시간별 파쇄효율을 나타낸 것으로 같은 source의 cell을 처리하였을 때 ultrasonicator를 사용하는 것이 가장 효율이 좋았고 Waring blender나 homogenizer는 3분 정도의 처리에서는 성능이 비슷하였으나 Waring blender의 경우 30초만 처리하여도 homogenizer의 3분 처리한 경우와 비슷하여서 파쇄속도 면에서 볼 때 Waring blender가 유리함을 알 수 있었다. 비록 ultrasonicator를 사용하는 것이 가장

효율이 좋았으나 ultrasonicator은 scale-up에 문제가 있으므로 기계적 방법을 사용한다면 Waring blender가 가장 좋을 것이다. 한편 control은 기계적인 방법을 가하지 않고 solvent(methanol)만을 처리한 것으로 Waring blender를 사용한 경우의 70 % 정도의 효율을 가지고 있다. 하지만 mechanical disruptor를 사용할 경우에 투자비가 추가되기 때문에 그 도입 여부는 경제성 검토에 의해 결정해야한다. 이러한 결정은 나중 scale-up 된 시험 후 data가 더 축적된 다음에 결정해야 하지만 지금 단계에서는 기계적 방법의 복잡성 때문에 일단 solvent에 의한 세포 파쇄공정을 최적공정으로 선정하였다.

Solvent에 의한 세포파쇄에 적절한 solvent는 세포막을 잘 파쇄할 수 있을 뿐 아니라 avermectin에 대해 용해도가 높아야 하고 또한 물과 섞여 aqueous phase (solvent와 two phase를 형성)를 형성할 수 있어야 한다. 이를 위해 적절한 solvent로 methanol과 acetone을 들 수 있다. Fig. 2.89은 methanol이나 acetone만으로 파쇄하여 chloroform으로 추출한 후 HPLC로 분석한 peak를 보여주고 있고 Fig. 2.90는 methanol이나 acetone으로 추출한 추출물에서의 avermectin의 농도를 분석한 것으로서 세포 파쇄 및 추출 면에서 acetone이 세포파쇄용 solvent로 우수하다고 할 수 있다.

4) 2차 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 avermectin 추출을 위해 적절한 용매를 선정하고 추출공정 설계에 필요한 parameter 들을 도출하였다. 또한 앞의 세포 파쇄 공정에서 세포파쇄 면에서 acetone이 우수하였지만 쉽게 사용 가능한 여러 solvent에 의한 추출 능력 면에서도 평가해야 하기 때문에 여러 solvent에 의한 acetone-water phase와 methanol-water phase의 추출효능도 비교하였다. 이를 위해 먼저 methanol과 acetone에 avermectin을 녹이고 solvent와 two phase를 형성할 수 있게 물을 5:3 비율로 첨가하여 acetone-water, methanol-water aqueous phase를 만들고 여러 solvent로 추출시험(aqueous:solvent=2:1)을 한 후 효능을 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 이른 후 aqueous phase에서의 용질의 농도를 y, solvent phase에서의 용질의 농도를 x 라고 하면 partition coefficient K는 다음과 같이 주어진다.

$$K = \frac{x}{y} \qquad (9)$$

초기 용질농도 yF인 F liter의 aqueous phase가 추출을 위해 공급되었다면 percentage of extraction p는 다음과 같이 주어진다.

$$p = \frac{L x}{F y_F} \qquad (10)$$

두 용질 A 와 B가 동시에 추출되고 A가 원하는 물질일 때 B에 대한 A의 selectivity β_{AB}는 다음과 같이 주어진다.

$$\beta_{AB} = \frac{K(A)}{K(B)} \qquad (11)$$

이러한 partition coefficient, percentage of extraction과 selectivity의 값이 클수록 분리정제의 성능 면에서 우수한 solvent와 aqueous phase의 조합(combination)을 나타내고 있다.

Fig. 2.91은 methanol-water aqueous phase를 여러 용매로 추출한 후 solvent phase에서의 avermectin B1a의 농도를 Fig. 2.92는 avermectin B1b의 농도를 나타내고 있다. methanol-water phase는 추출 후 phase의 volume이 바뀌지 않으므로 dichloromethane이 가장 우수한 성능을 나타내고 있음을 알 수 있다. 또한 Fig. 2.93는 acetone-water aqueous phase를 여러 용매로 추출한 후 solvent phase에서의 avermectin B1a의 농도를, Fig. 2.94는 avermectin B1b의 농도를 나타내고 있다. 겉보기로 농도로만 판별하여 보면 toluene이 가장 좋은 solvent 인 것 같이 보이나 methanol-water phase는 추출 후 phase의 volume이 바뀌므로 이점을 고려하여 % extraction을 비교함으로써 추출효능을 비교할 수 있다. % extraction은 처음 feed에 들어 있던 양 중 solvent phase로 추출된 양과의 비율로 진정한 추출 효능을 나타내고 있다. Fig. 2.95은 methanol-water phase와 acetone-water phase의 여러 solvent에 의한 avermectin B1a의 % extraction과 Fig. 2.96는 avermectin B1b의 % extraction을 나타낸 것으로 methanol-water의 경우 예상대로 dichloromethane이 가장 우수한 성능을 보이고 chloroform이 오히려 toluene보다 우수함을 보여주고 있다. 이는 Fig. 2.97에서 보여주는 것 같이 acetone-water의 경우 추출과정에서 phase의 volume이 바뀌어 지기 때문이며 따라서 toluene의 경우 농도는 높지만 phase의 volume이 chloroform 보다 적기 때문에 적은 양의 avermectin이 solvent phase 에 존재하게 된다. 또한 dichloromethane의 경우를 제외하면 전반적으로 acetone-water의 경우가 methanol-water 의 경우보다 solvent에 의한 추출율이 높음을 알 수 있어 세포를 파쇄하는 solvent로 acetone을 사용하는 것이 바람직함을 알 수 있다.

한편 추출공정의 설계를 위해 partition coefficient를 추정하는 것이 중요한데 Fig. 2.98은 methanol-water phase와 acetone-water phase의 여러 solvent에 의한 추출에서의 avermectin B1a의 partition coefficient, Fig. 2.99은 avermectin B1b의 partition coefficient을 나타낸 것으로 methanol-water의 경우 avermectin B1a, B1b 모두 dichloromethane에 의한 추출에서의 partition coefficient가 특별히 높은 것이 눈에 띈다. 이러한 이유로 Fig. 2.95, Fig. 2.96에서 알 수 있듯이 dichloromethane의 경우는 methanol-water의 경우가 acetonl-water의 경우보다 solvent에 의한 추출율이 높게 된다.

앞서 언급한대로 이상적인 용매는 원하는 물질만을 선택적으로 solvent phase로 이동 시켜야 하기 때문에 여러 solvent의 avermectin B1b에 대한 B1a의 선택성을 조사하는 것이 중요하다. Fig. 2.100은 methanol-water phase와 acetone-water phase의 여러 solvent에 의한 추출에서의 avermectin B1b 에 대한 avermectin B1a 의 selectivity 를 나타낸 것으로 대부분의 solvent 에서 1 이하를 보여줌으로써 대부분 avermectin B1a 보다 avermectin B1b를 선호함을 알수 있다. 하지만 methanol-water의 경우 avermectin B1a에 대한 선택성이 적은 dichloromethane은 partition coefficient가 크고, 선택성이 큰 toluene이나 hexane의 경우는 partition coefficient가 커서 이러한 효과가 상쇄되어 Fig. 2.101에서 보여주듯이 solvent phase에서의 purity 는 거의 일정하다. 이러한 현상은 acetone-water의 경우에도 일어나 거의 일정한 purity를 보여주고 있다. 따라서 purity는 그렇게 문제되지 않고 % extraction 만이 중요한 인자가 된다.

이상을 종합하면 1차 추출의 용매로 acetone-water aqueous phase와 chloroform을 사용하거나 methanol-water dichloromethane을 사용하는 것이 바람직하다.

5) 3차 추출공정 개발

1차 연도의 2차 추출은 최적 용매를 선정하기 위해 편의상 배양액이 아닌 실험실에서 조제한 시료를 사용하여 실시하여 2차 추출을 위한 최적 용매는 acetone-water aqueous phase의 경우

chloroform, methanol-water aqueous phase의 경우는 dichloromethane임을 밝힌바 있다. 하지만 실제 배양액을 적용해 본 결과, chloroform 또는 dichloromethane으로 2차 추출을 하여도 많은 불순물의 peak가 계속 잔존함이 발견되어 3차 추출이 필요함을 알게되었다. 2차 추출후 잔 peak가 계속 잔존하는 이유는 아직도 소수성 lipid 계통의 화합물이 선택한 용매에 용해도가 높기 때문이라 생각되어 순도를 높이기 위해서는 제 3의 용매가 필요하다고 생각되어 3차 추출을 시도하였다.

앞서 언급하였듯이 추출공정에서 가장 중요한 것은 효율적인 용매의 선정이다. 본 연구에서는 이러한 3차 추출을 위한 partition coefficient, percentage of extraction과 selectivity의 관점에서 본 최적의 aqueous phase와 용매(solvent)의 조합을 선정하고 3차 추출공정 설계에 필요한 parameter들을 도출하였다.

가) methanol-glycol 5:1 aqueous phase

Fig. 2.102은 methanol-glycol 5:1 aqueous phase를 여러 용매로 추출한 후 solvent phase에서의 avermectin B1a의 농도를 Fig. 2.103은 avermectin B1b의 농도를 나타내고 있다. n-buthyl acetate, methylene chloride, toluene 등은 aqueous phase와 two phase를 형성하지 못하여 추출이 불가능하여 사용하지 않았고 two phase를 형성하는 두 용매만 사용하였다. 이 methanol-glycol 5:1 phase는 추출 후 solvent phase의 volume이 30 %정도 감소하나 두 용매 모두 같이 감소하므로 solvent phase에서의 농도만 비교해보아도 추출성능을 알 수 있다. Avermectin B1a, B1b 모두 hexane이 heptane 보다 우수한 성능을 나타내고 있음을 알 수 있다. 이는 Merck 사에서 얻은 결론과 일치한다.

보통 methanol-glycol 5:1 phase는 추출 후 phase의 volume이 바뀌므로 이점을 고려하여 % extraction을 비교함으로써 추출효능을 확실하게 비교할 수 있다. 이 % extraction은 처음 feed에 들어 있던 양 중 solvent phase로 추출된 양과의 비율로 진정한 추출 효능을 나타내고 있다. Fig. 2.104는 methanol-glycol 5:1 phase의 여러 solvent에 의한 avermectin B1a의 % extraction과 Fig. 2.105는 avermectin B1b의 % extraction을 나타낸 것으로 예상대로 hexane이 heptane보다 우수함을 보여주고 있다. 하지만 % extraction이 1%를 조금 넘기 때문에 hexane도 사용하기 힘들다는 결론이 나와 다른 solvent와 two phase를 형성할 수 있도록 aqueous phase의 조성을 조절하여야 한다는 결론을 얻었다.

한편 추출공정의 설계를 위해 partition coefficient 를 추정하는 것이 중요한데 Fig. 2.106은 methanol-glycol 5:1 phase의 여러 solvent에 의한 추출에서의 avermectin B1a의 partition coefficient, Fig. 2.107은 avermectin B1b의 partition coefficient를 나타낸 것으로 avermectin B1a, B1b 모두 hexane에 의한 추출에서의 partition coefficient가 특별히 높은 것이 눈에 띈다. 이러한 이유로 Fig. 2.104, 2.105에서 알 수 있듯이 hexane의 경우는 heptane의 경우보다 solvent에 의한 % extraction(추출율)이 높게 된다. 하지만 hexane의 경우도 절대적으로 낮은 partition coefficient 때문에 낮은 % extraction을 초래하고 있다.

앞서 언급한대로 이상적인 용매는 원하는 물질만을 선택적으로 solvent phase로 이동 시켜야 하기 때문에 여러 solvent의 avermectin B1b에 대한 B1a의 선택성을 조사하는 것이 중요하다. Fig. 2.108은 methanol-glycol 5:1 phase의 여러 solvent에 의한 추출에서의 avermectin B1b 에 대한 avermectin B1a 의 selectivity를 나타내고 있다. 그림에서 대부분의 solvent 에서 1 이상을 보

여줌으로써 대부분 avermectin B1a을 avermectin B1b 보다 선호함을 알 수 있다. 또한 Fig. 2.109에 의하면 solvent phase에서의 purity는 거의 일정함을 알 수 있었다. 이 정도의 purity는 2차 추출에서도 보여주고 있다. 따라서 purity는 그렇게 문제되지 않고 % extraction 만이 최적 용매 선정의 중요한 인자가 됨을 알 수 있었다. 위에서 methanol-glycol 5:1 phase의 가장 좋은 용매인 hexane에 의한 추출도 추출율이 1 % 정도이어서 사용하기 힘들다는 결론을 내렸다. 따라서 다른 용매에 의한 추출을 시도하기 위해 aqueous phase의 조성을 조절하여 다른 solvent와 two phase를 형성하도록 하고 이에 대한 최적 용매를 선정하는 실험을 계속하였다.

나) methanol-glycol 2:5 aqueous phase

Hexane과 heptane외에 다른 solvent와 two phase를 형성할 수 있도록 aqueous phase의 조성을 methanol-glycol 2:5로 조절하였다. 이때 two phase를 형성할 수 있는 solvent로 n-butyl acetate와 toluene이 추가되었다. Fig. 2.110는 methanol-glycol 2:5 aqueous phase를 여러 용매로 추출한 후 solvent phase 에서의 avermectin B1a의 농도를 Fig. 2.111는 avermectin B1b의 농도를 나타내고 있다. 이 methanol-glycol 5:1 phase는 추출 후 phase의 volume이 변하지 않으므로 solvent phase에서의 농도만 비교해보아도 추출성능을 알 수 있다. Avermectin B1a, B1b 모두 n-butyl acetate가 가장 우수한 성능을 나타내고 있음을 알 수 있고 hexane과 heptane의 경우는 여전히 아주 적은 농도를 나타내어 aqueous phase의 조성을 바꾸어 추가적으로 n-butyl acetate와 toluene의 two phase를 형성하게 하여 이들을 용매로 사용한 전략이 성공했음을 보여준다.

이번 경우에도 % extraction을 비교함으로써 추출효능을 확실하게 비교할 수 있다. Fig. 2.112는 methanol-glycol 2:5 phase의 여러 solvent에 의한 avermectin B1a의 % extraction과 Fig. 2.113은 avermectin B1b의 % extraction을 나타낸 것으로 예상대로 n-butyl acetate가 가장 우수함을 보여주고 있다. 하지만 % extraction이 methanol-glycol 5:1 phase의 경우보다는 상당히 향상되었지만 아직도 % extraction이 50%를 조금 넘기 때문에 제 3의 solvent를 사용해야 한다는 결론이 나와 다른 solvent와 two phase를 형성할 수 있도록 aqueous phase의 조성을 또 조절하기로 하였다.

마찬가지로 추출공정의 설계를 위해 partition coefficient 를 추정하는 것이 중요해서 추정하였는데, Fig. 2.114는 methanol-glycol 2:5 phase의 여러 solvent에 의한 추출에서의 avermectin B1a의 partition coefficient, Fig. 2.115는 avermectin B1b의 partition coefficient를 나타낸 것으로 avermectin B1a, B1b 모두 n-butyl acetate나 toluene에 의한 추출에서의 partition coefficient가 hexane이나 heptane의 경우보다 특별히 높은 것이 눈에 띈다. 이러한 이유로 Fig. 2.112, Fig. 2.113에서 알 수 있듯이 n-butyl acetate나 toluene의 경우는 hexane이나 heptane의 경우보다 solvent에 의한 % extraction(추출율)이 높게 된다. 하지만 이 경우도 1을 조금 넘는 partition coefficient 때문에 50 % 정도의 낮은 추출율을 초래하는 것으로 관찰되었다.

Fig. 2.116은 methanol-glycol 2:5 phase의 여러 solvent에 의한 추출에서의 avermectin B1b 에 대한 avermectin B1a 의 selectivity 를 나타낸 것으로 대부분의 solvent 에서 1 이상을 보여줌으로써 대부분 avermectin B1a을 avermectin B1b 보다 선호함을 알 수 있고 가장 추출율이 좋았던 n-butyl acetate는 1보다 약간 작아 선호도가 뒤바뀐 것을 알 수 있었다. 따라서 Fig. 2.117에서 보여주듯이 solvent phase에서의 purity는 n-butyl acetate가 가장 낮음을 알 수 있었다. 하지만 heptane의 경우를 제외하면 거의 일정함을 알 수 있어서 purity는 그렇게 문제되지 않고 %

extraction 만이 최적 용매 선정의 중요한 인자가 되어 methanol-glycol 2:5 phase의 경우 최적 용매는 n-butyl acetate라는 결론을 내렸다.

다) methanol-water 5:3 aqueous phase

위에서 언급하였듯이 methanol-glycol 2:5 phase의 가장 좋은 용매인 n-butyl acetate에 의한 추출성능은 methanol-glycol 5:1 phase의 경우보다는 상당히 향상되었지만 아직도 % extraction이 50%를 조금 넘기 때문에 제 3의 solvent를 사용해야 한다는 결론이 나와 제 3의 solvent와 two phase를 형성할 수 있도록 aqueous phase의 조성을 또 조절하기로 하였다. 이를 위해 aqueous phase의 조성 중에 glycol을 생략하고 water를 추가하여 methanol-water 5:3으로 조절하였다. 이때 two phase를 형성할 수 있는 solvent로 methylene chloride가 추가되었다. Fig. 2.118은 methanol-water 5:3 aqueous phase를 여러 용매로 추출한 후 solvent phase에서의 avermectin B1a의 농도를 Fig. 2.119는 avermectin B1b의 농도를 나타내고 있다. Avermectin B1a, B1b 모두 methylene chloride가 가장 우수한 성능을 나타내고 있음을 알 수 있고 hexane과 heptane의 경우는 여전히 아주 적은 농도를 나타내고 methanol-glycol 2:5 phase의 가장 좋은 용매인 n-butyl acetate보다 우수함을 알 수 있어서 aqueous phase의 조성을 바꾸어 추가적으로 methylene chloride와 two phase를 형성하게 하여 용매로 사용한 전략이 성공했음을 보여주고 있다.

이 methanol-water 5:3 phase는 추출 후 solvent phase의 volume이 감소한다. Hexane과 heptane의 경우는 그대로이나 toluene은 12.5 % 증가하고 methylene chloride는 33% 감소, n-buthyl acetate의 경우는 43% 감소한다. 따라서 이점을 고려하여 % extraction을 비교함으로써 추출효능을 확실하게 비교할 수 있다. Fig. 2.120은 methanol-water 5:3 phase의 여러 solvent에 의한 avermectin B1a의 % extraction과 Fig. 2.121은 avermectin B1b의 % extraction을 나타낸 것으로 예상대로 methylene chloride이 가장 우수함을 보여주고 있다. 또한 % extraction이 methanol-glycol 2:5 phase의 경우보다는 상당히 향상되어서 aqueous phase를 methanol-water 5:3 phase로 바꾸어 준 것이 성공적이었음을 알 수 있었고 98%에 가까운 추출율을 보여줌으로써 더 이상의 다른 system은 시도하지 않았다.

마찬가지로 추출공정의 설계를 위해 partition coefficient 를 추정하는 것이 중요해서 이를 추정하였다. Fig. 2.122은 methanol-water 5:3 phase의 여러 solvent에 의한 추출에서의 avermectin B1a의 partition coefficient, Fig. 2.123은 avermectin B1b의 partition coefficient을 나타낸 것으로 avermectin B1a, B1b 모두 methylene chloride에 의한 추출에서의 partition coefficient가 월등히 높은 것이 눈에 띈다. 이러한 이유로 Fig. 2.122, Fig. 2.123에서 알 수 있듯이 methylene chloride에 의한 추출의 경우가 가장 % extraction(추출율)이 높게 된다.

Fig. 2.124는 methanol-water 5:3 phase의 여러 solvent에 의한 추출에서의 avermectin B1b 에 대한 avermectin B1a 의 selectivity 를 나타낸 것으로 heptane이나 n-butyl acetate에서 1 이상을 보여줌으로써 avermectin B1a을 avermectin B1b 보다 선호함을 알 수 있고 다른 용매에서는 1보다 약간 작아 선호도가 뒤바뀐 것을 알 수 있었다. 한편 가장 추출율이 좋았던 methylene chloride의 경우 가장 낮은 selectivity를 보여주고 있는 것이 눈에 띈다. 한편 Fig. 2.125에서 보여주듯이 solvent phase에서의 purity는 heptane의 경우를 제외하면 거의 일정함을 알 수 있었는데 그 이유는 methylene chloride의 경우 avermectin B1a에 대한 선택성이 적지만 partition

coefficient가 크기 때문에 이러한 효과가 상쇄되어 거의 일정한 purity를 나타내고 있다. 따라서 purity는 그렇게 문제되지 않고 % extraction 만이 최적 용매 선정의 중요한 인자가 되어 methanol-water 5:3 phase의 경우 최적 용매는 methylene chloride라는 결론을 내릴 수 있다.

Fig. 2.126은 처음 세포로부터 acetone으로 추출한 경우(A), methanol-water 5:3 phase를 methylene chloride으로 3차 추출한 경우 (B), methanol-water 5:3 phase를 toluene으로 3차 추출한 경우(C)의 추출물을 HPLC로 분석한 결과를 나타내고 있다. Acetone 추출물에 보이던 초기의 불순물 peak가 많이 없어져 있음을 알 수 있다. 여기에서 avermectin B1a는 9분 근처에 avermectin B1b는 8분 근처에서 나오고 있다. Toluene의 경우 불순물을 거의 제거한 peak를 보여주고 있으나 앞서 보여준 것같이 추출율이 50 %정도로 낮아 사용하기 곤란하다.

이상을 종합하면 aqueous phase로는 methanol-water 5:3 phase, solvent phase로는 methylene chloride를 사용하는 것이 가장 바람직하다는 결론을 얻을 수 있다.

6) Preparative HPLC 를 이용한 avermectin 분리정제

Fig. 2.127은 sample volume 5 ml, Fig. 2.128의 경우는 sample volume 10ml을 주입하였을 때의 chromatogram을 나타내고 있다. 이 chromatogram의 앞부분은 불순물 peak인데 그림에서 뒤의 avermectin peak가 잘 분리됨을 보여주고 있다. 이러한 avermectin peak가 나오는 fraction을 fraction collector로 받으면 순수한 avermectin을 얻을 수 있다. Fig. 2.129는 이러한 avermectin peak 부분의 fraction을 분석용 HPLC로 분석한 경우의 chromatogram을 보여주고 있는데 초기의 acetone extract에 보이던 많은 불순물 peak가 제거되어 하나의 single peak 만을 보여줌으로써 거의 100 %에 가까운 순도를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

하지만 위에서 사용한 sample은 아직 고생산 균주 및 배양방법이 개발되기 전이라 세포 추출물에 avermectin standard를 첨가한 것이어서 후에 고농도의 생성물을 얻으면 다시 이 방법에 의한 정제방법을 검증할 필요가 있다. 이러한 실제 고생산 균주를 이용한 세포 추출물로부터의 분리정제는 나중 3차 연도에 이르러서야 가능하게 되었다. Fig. 2.130은 실제 고농도 세포로부터 methanol을 이용하여 avermectin을 1차 추출한 후 methanol 추출물로부터의 sample volume 10 ml을 Preparative HPLC에 주입하였을 때의 chromatogram을 나타내고 있다. 이 chromatogram의 앞부분은 불순물 peak이고 그림에서 avermectin peak가 12분대에서 나타남을 standard의 injection으로 확인할 수 있었다. 이러한 avermectin peak가 나오는 fraction을 fraction collector로 받으면 순수한 avermectin을 얻을 수 있다. Fig. 2.131은 이러한 avermectin peak 부분의 fraction을 받아 분석용 HPLC로 분석한 경우의 chromatogram을 보여주고 있는데 초기의 methanol extract에 보이던 많은 불순물 peak가 제거되어 하나의 single peak 만을 보여줌으로써 거의 100 %에 가까운 순도를 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 이제는 sample을 대량 분리정제할 수 있는 단계에 이르렀다. 더욱이 2차, 3차 추출 등 여러 용매를 사용하지 않고도 높은 순도로 정제할 수 있어서 용매배출을 최소화할 수 있는 청정공정으로서의 가치가 더 높은 공정이 될 수 있음을 알 수 있었다.

7) Sephadex LH-20을 이용한 chromatography

Sephadex LH-20을 이용하면 분자의 크기에 따라 혼합물을 분리할 수 있기 때문에 avermectin B1a와 B1b를 분리할 목적으로 시도되었다. Fig. 2.132는 effluent를 fraction collector

로 받아 분석용 HPLC로 분석한 경우의 chromatogram을 보여주고 있다. 74번 fraction에 없던 avermectin B1a (7.96분)와 B1b(9.32 분)의 peak가 75번 fraction에는 존재함을 알 수 있었고 76번 fraction에는 다시 없어짐을 알 수 있었다. 따라서 지금의 분리정제 조건에서는 분리가 되지 않았음을 알 수 있었고 더욱 더 긴 column을 사용하거나 fraction을 더욱 더 잘게 나누어야 가능하다는 결론을 내릴 수 있다. 하지만 여러 번의 시도에서도 분리하기 어려워 avermectin B1a와 B1b를 분리하기에는 여러 step의 분리정제 과정이 필요하며 이에 따라 장치비가 증가될 것으로 예상되어 이를 분리하지 않는 제품을 생산하는 것이 더욱 경제적인 측면에서 바람직하다는 결론을 내릴 수 있었다.

8) 향류 3단 연속식 추출공정 개발

가) 연속식 추출공정 개발

분리정제공정을 효율적으로 수행하기 위해서는 연속식 공정이 필요하다. 더욱이 3차 추출까지 수행해야하고 여러 step의 chromatography 공정이 필요할 것으로 예상되는데 이때 회분식으로 운전하면 시간과 노력이 많이 들므로 연속식 공정의 개발이 필요하다. 분리정제 공정의 전반부는 계속되는 추출공정이 될 것이므로 1차 추출공정의 고-액 접촉과 나머지 2, 3 차 추출공정의 액-액 접촉이 효율적이면서 연속적으로 이루어 질 수 있도록 연속식 추출장치의 개발이 필수 불가결하다. 또한 연속식 공정일지라도 경우에 따라서는 반복된 추출을 수행하여 원하는 만큼 충분히 추출할 필요가 있다. 이러한 반복 추출은 다단식 추출공정을 통하여 이루어 질 수 있는데, 보통 단수가 증가할수록 추출율이 증가하게 된다. 이때 aqueous phase 와 solvent phase가 서로 다른 방향으로 흐르는 향류식(counter-current) 접촉 방법이 같은 방향으로 흐르는 병류식(cocurrent) 접촉 방법 보다 효율적이므로 본 연구에서는 향류 다단식 연속 추출장치를 개발하였다. 실제공정에서는 요구되는 추출율에 따라 더 많은 단수가 사용될 수 있으나 본 연구에서는 실제공정의 한 모델로 3단을 정하여 개발하였다. Fig. 2.133은 이렇게 개발된 3단 향류 연속식 추출 공정의 공정도와 Fig. 2.134는 실제 개발된 공정의 사진을 보여주고 있다.

나) acetone-water aqueous phase:chloroform system 적용

개발된 연속식 추출장치를 이용한 avermectin의 추출이 실제로 가능한지 검증하면서 실제 회분식 1단 추출보다 얼마나 성능이 향상되었는지를 조사하기 위해 추출실험을 시도하였다. 세포로부터 acetone으로 1차 추출한 후 물을 가하여 acetone-water(5:3) aqueous phase를 만들고 avermectin을 300 mg/ L로 조절하였다. 이러한 aqueous phase를 50 mL/min의 속도로, solvent phase로는 chloroform을 25 mL/min의 속도로 향류 접촉시켰다. 다음의 Fig. 2.135는 각단 출구 solvent phase에서의 시간에 따른 avermectin의 농도를 조사한 것으로써 1단, 2단, 3단 모두 약 두 시간 후부터는 정상상태에 도달함을 알 수 있었고 단수가 증가할수록 avermectin의 농도가 증가하며 마지막 단에서는 회분식 추출(72 %)보다 우수한 82 %의 추출율을 보여주었다. 한편 이 그림에 의하면 처음에는 transient state로 fluctuation이 심하다가 차츰 안정되면서 정상상태의 값을 보여주고 있다. 이러한 fluctuation현상은 start-up 시에 mixer에만 용액을 채웠기 때문임을 나중에 알게 되었다.

다) methanol-water aqueous phase:methylene chloride system 적용

1차 연도의 기초실험결과 acetone-water system뿐만 아니라 methanol-water system도 aqueous system으로 사용할 수 있음을 알 수 있었고, 더욱이 3차 추출에는 methanol-water

system이 좋다는 결과가 있기 때문에 이번에는 methanol-water system을 연속식 향류추출에 적용을 하였다.

Fig. 2.136은 methanol-water aqueous phase와 solvent phase(methylene chloride)의 유량 비율을 1:1(H=20ml/min. L=20ml/min.)로 유지하여 운전한 결과이다. 3시간 이후에 avermectin의 농도가 정상상태를 유지함을 알 수 있고 raffinate를 살펴보면 avermectin이 모든 단에서 거의 없는 것을 알 수 있다. 또한 단수가 증가할수록 avermectin의 농도가 증가하였다. 하지만 여기서도 acetone-water system과 같이 start-up시 mixer에만 용액을 채워 운전하였기 때문에 fluctuation이 나타남을 알 수 있다.

Fig. 2.137에서는 methanol-water aqueous phase와 solvent phase(methylene chloride)를 2:1로 하여 연속식 추출 장치에 운전한 결과이다(H=25ml/min. L=50ml/min.). 마찬가지로 단수가 증가할수록 avermectin의 농도가 증가하였다. 추출율은 이론적으로 예상되는 것과 같이 1:1 system보다는 낮다. 하지만 1:1 system은 solvent가 상대적으로 많이 소요되고 최종 농도가 낮은 단점이 있어 경제적인 선택이 필요하다. 또한 그림에서 보듯이 여태까지 다른 경우보다는 빨리 50분 후에 정상상태로 system이 안정되는 것을 알 수 있고 fluctuation도 나타나지 않음을 알 수 있다. 이러한 이유는 continuous countercurrent multistage extraction 장치에 separator와 mixter 둘 다 채우고 시운전하는 것이 mixer에만 solvent와 methanol-water를 채우고 시운전하는 것 보다 정상상태에 빨리 도달하였기 때문이다.

이상의 결과 및 토의로부터 다음과 같은 결론을 도출할 수 있다:

- 개발된 3단 향류 연속식 추출장치는 연속식 생산에 따른 생산성 향상뿐만 아니라 추출율의 향상 면에서도 성공적이었다. 단이 증가할수록 solvent phase에서의 avermectin 의 농도가 증가하였다. 이러한 연속식 추출장치는 세포와의 1차 추출뿐만 아니라 2,3 차 추출에도 동일하게 적용될 수 있다.
- Countercurrent의 시운전시 mixer에만 채우고 운전하는 경우보다 settler까지 채우고 시운전하면 훨씬 빨리 정상상태에 도달하고 안정된 조업을 할 수 있다.
- 같은 조건에서 methanol-water:dichloromethane system이 acetone-water:chloroform system보다 추출율 면에서 약간 우수한 성능을 보여주었으며 이는 1차 연도의 batch 실험 결과와 일치한다.
- solvent와 aqueous phase와의 비율이 1:1인 시스템이 1:2인 시스템보다 훨씬 우수한 추출율을 보여주고 있다. 하지만 1:1 system은 solvent가 상대적으로 많이 소요되고 최종 농도가 낮은 단점이 있어 경제적인 선택이 필요하다.

9) Crystallization 연구

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. 본 연구에서는 목적물인 avermectin의 결정화를 위한 최적의 용매를 선정하기 위해 여러 가지 용매에 따른 avermectin의 온도-용해도 곡선을 구하였고 이에 따라 최적의 용매를 선정하였다. 또한 여러 가지 기초실험을 바탕으로 균일한 crystal을 얻을 수 있는 전략을 모색하였으며 이를 바탕으로 생산성을 높이기 위한 연속식 crystallizer를 개발하였다.

가) 상평형 연구

결정화를 위해서는 saturation, nucleation, single crystal growth 등에 관한 연구가 필요하며 이중 saturation에 관한 연구가 가장 기본이 된다. 포화(saturation)란 용액에서 열역학적으로 안정

하게 녹을 수 있는 최대 농도를 말하며 상평형의 결과이다. 이러한 상평형은 crystal phase와 주위의 용액간의 chemical potential이 동일하기 때문에 일어난 결과로 같은 용질이라도 용매에 따라 상평형이 다르다. 본 연구에서는 avermectin의 결정화를 위한 최적의 용매를 선정하기 위해 여러 가지 용매에 따른 avermectin의 온도-용해도 곡선을 조사하였고 이를 바탕으로 최적의 용매를 선정하였다.

다음의 Fig. 2.138은 여러 가지 용매에서의 avermectin의 온도-용해도 곡선이다. 이러한 온도-용해도 곡선 중 기울기가 가장 큰 acetone이 결정화를 위한 최적의 용매로 선정되었다. 왜냐하면 대부분의 용매들이 비점이 낮아 냉각의 범위가 한정되어 있고 이때 온도-용해도 곡선의 기울기가 클수록 같은 냉각온도 차이에 의해 석출되는 양이 많기 때문이다.

나) 연속식 crystallizer 개발

결정화(crystallization)는 흔히 거의 용해도 한도까지 녹아있는 더운 용액을 먼지가 없는 상태에서 결정(crystal)이 나타날 때까지 냉각하면서 이루어진다. 이러한 결정은 seed를 넣어주면 잘 유도된다. 이것을 더욱더 냉각시키게 되면 결정이 자라게 된다. Crystallizer의 design과 운전조건에 따라 수율, 결정의 크기, size distribution등이 달라지므로 각별한 노력이 요구된다. 또한 생성된 결정이 crystallizer의 벽면에 attach되는 것을 방지하는 것이 매우 중요하다.

연속식 crystallizer를 개발하기 위한 기초실험으로 batch crystallization을 수행하면서 전략을 모색하였다. Fig. 2.139의 모식도에서 보는 바와 같이 끓는점까지 온도를 높이면서 evaporation(모식도 1)시키다가 용액이 과포화가 되면 각각 4o C로 고정된 water bath에 용액을 옮긴 후 한쪽은 교반을 하지않고(모식도 1.1) 생성된 crystal을 관찰하였고 다른 쪽은 계속 교반을 하면서 seed를 넣어 crystal을 만들었다(모식도 1.2). 한편 모식도 2에서는 교반을 하지 않으며 evaporation만으로 crystal을 만들었다.

Fig. 2.140에서는 acetone으로 과포화된 avermectin을 교반하지 않고 결정화시킨 avermectin 결정의 현미경사진으로 결정이 매우 불규칙하고 결정의 크기가 매우 큰 덩어리 한 개로 형성되었다. 또한 이러한 결정은 test tube 벽에 단단히 붙어 있는 단점이 있다. Fig. 2.141는 교반하는 도중에 sampling한 것으로 교반을 하지 않은 사진에 비해 결정이 균일하게 분포해 있다. Fig. 2.142는 교반하면서 결정을 얻은 사진으로 결정이 매우 규칙적이고 건드리면 쉽게 test tube 벽에서 떨어졌다.

따라서 균일한 결정을 얻고 crystallizer 벽에 붙어 자라서 조업에 지장을 주지 않기 위해서는 crystallization이 일어나는 동안 과포화 용액을 suspension 상태로 유지하는 것이 중요하다. 따라서 교반하거나 air-lift 형태로 과포화 용액을 현탁상태로 유지할 수 있는 design이 필요하며 본 연구에서는 과포화 용액을 냉각시킨 후 draft tube로 보내어 downcomer에서 현탁상태를 유지하는 crystallizer를 개발하였다. Fig. 2.143이 이러한 crystallizer의 모식도를 나타내고 있고 Fig. 2.144와 같은 연속식 공정을 개발하였다. Feeding vessel로부터의 과포화 용액은 downcomer에서 현탁상태로 유지되면서 자란 avermectin결정과 만나 냉동 water bath에서 냉각되면서 과포화도가 증대되어 crystal이 형성된다. 이러한 design은 downcomer에서의 avermectin결정이 seed 역할을 하기 때문에 따로 seed를 공급하지 않아도 되는 장점이 있다. 냉동 water bath를 나온 과포화 용액은 draft tube를 통과하여 injection 되어 downcomer로 내려오면서 속도가 줄어들어 천천히 떨어지면서 crystal이 형성되어 일부는 product로 회수하기 위해 spray drier로 보내지며 일부는 feed와 만나 seed로 recycle된다. Fig. 2.145는 이렇게 개발된 연속식 crystallization process의 사진을 보여주고 있으며 Fig. 2.146은 이로부터 얻은 crystal의 사진을 보여주고 있다.

한편 지금까지 개발한 모든 생산 및 분리정제 방법을 이용하여 avermectin의 fraction을 얻었고 이로부터 개발한 결정화 방법에 의하여 avermectin 결정을 얻었다. 고생산 균주와 최적배지를

이용하여 생산된 fermentation broth 2 liter를 methanol로 추출한 후 Preparative HPLC에 의하여 avermectin fraction만 분리 정제한 후 결정화를 시도하였다. 먼저 토의하였던 Fig. 2.130과 Fig. 2.131이 Preparative HPLC에 의한 결과를 보여주고 있고 Fig.147이 이로부터 얻은 결정의 사진을 보여주고 있다.

결론적으로 온도-용해도 곡선 중 기울기가 가장 큰 acetone이 결정화를 위한 최적의 용매로 선정되었다. Crystallizer에서 현탁상태를 유지하지 않을 경우 벽면에 석출되어 discharge가 어려워지거나 열교환의 문제가 생기고 또한 입자의 크기가 불균일하기 때문에 현탁상태의 유지가 매우 중요하다. 이러한 점을 고려하여 개발한 연속식 결정화 공정이 성공적으로 개발되어 균일한 결정을 얻을 수 있었다.

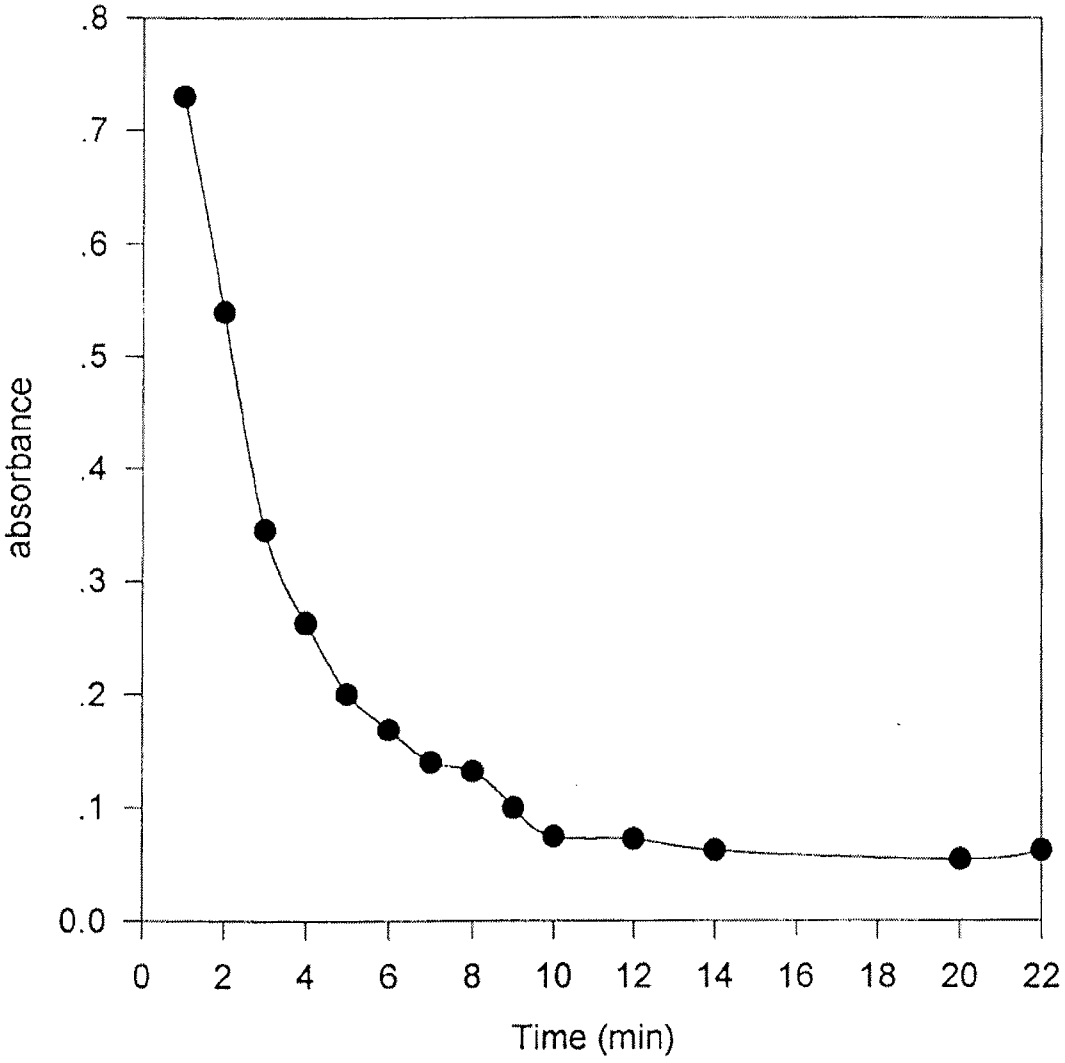


Fig. 2.79. Absorbance change of supernatant during centrifugation at 5000rpm

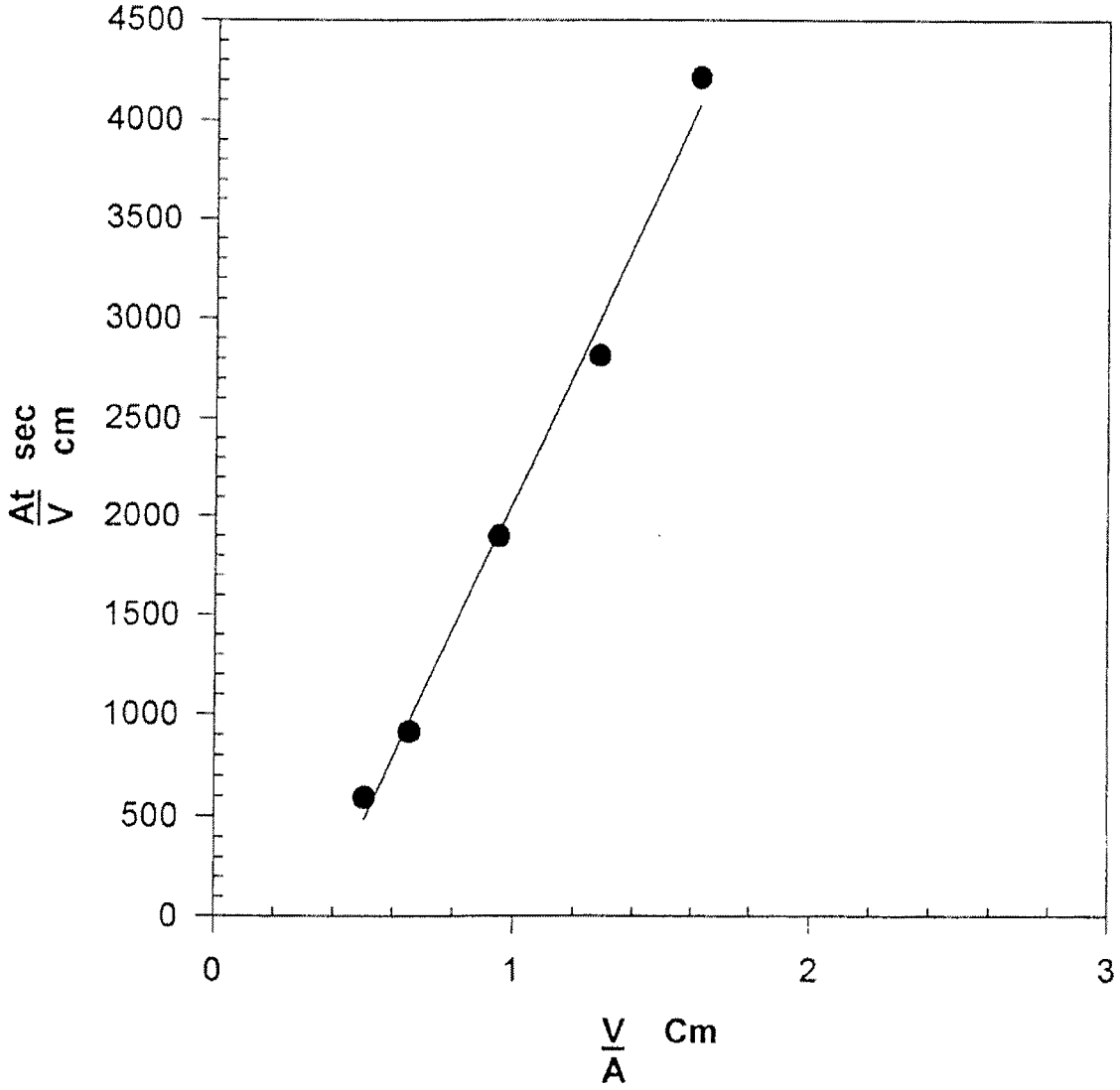


Fig. 2.80. Ruth plot of filtration of *Streptomyces avermitilis* at 30mmHg

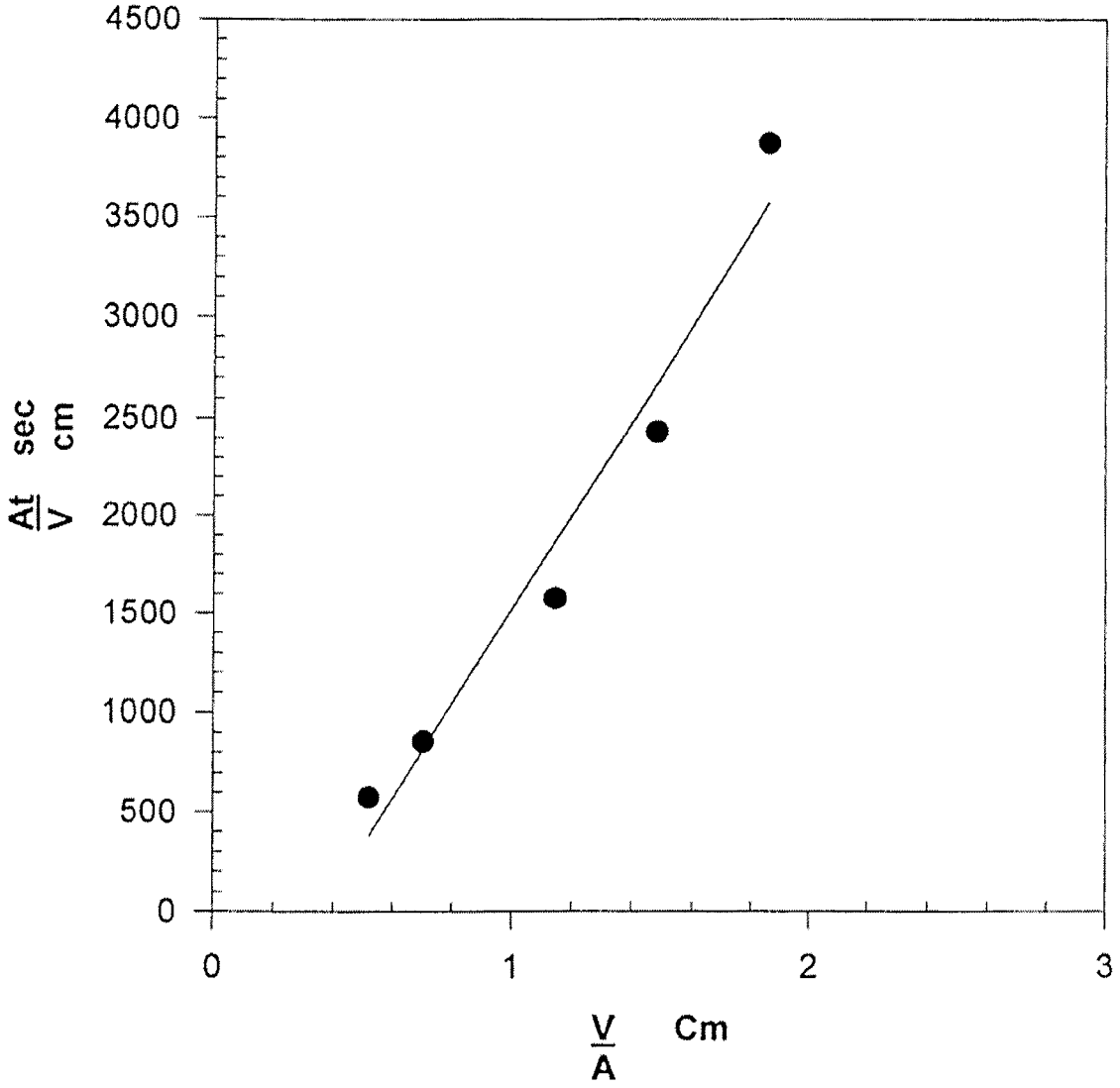


Fig. 2.81. Ruth plot of filtration of *Streptomyces avermitilis* at 40mmHg

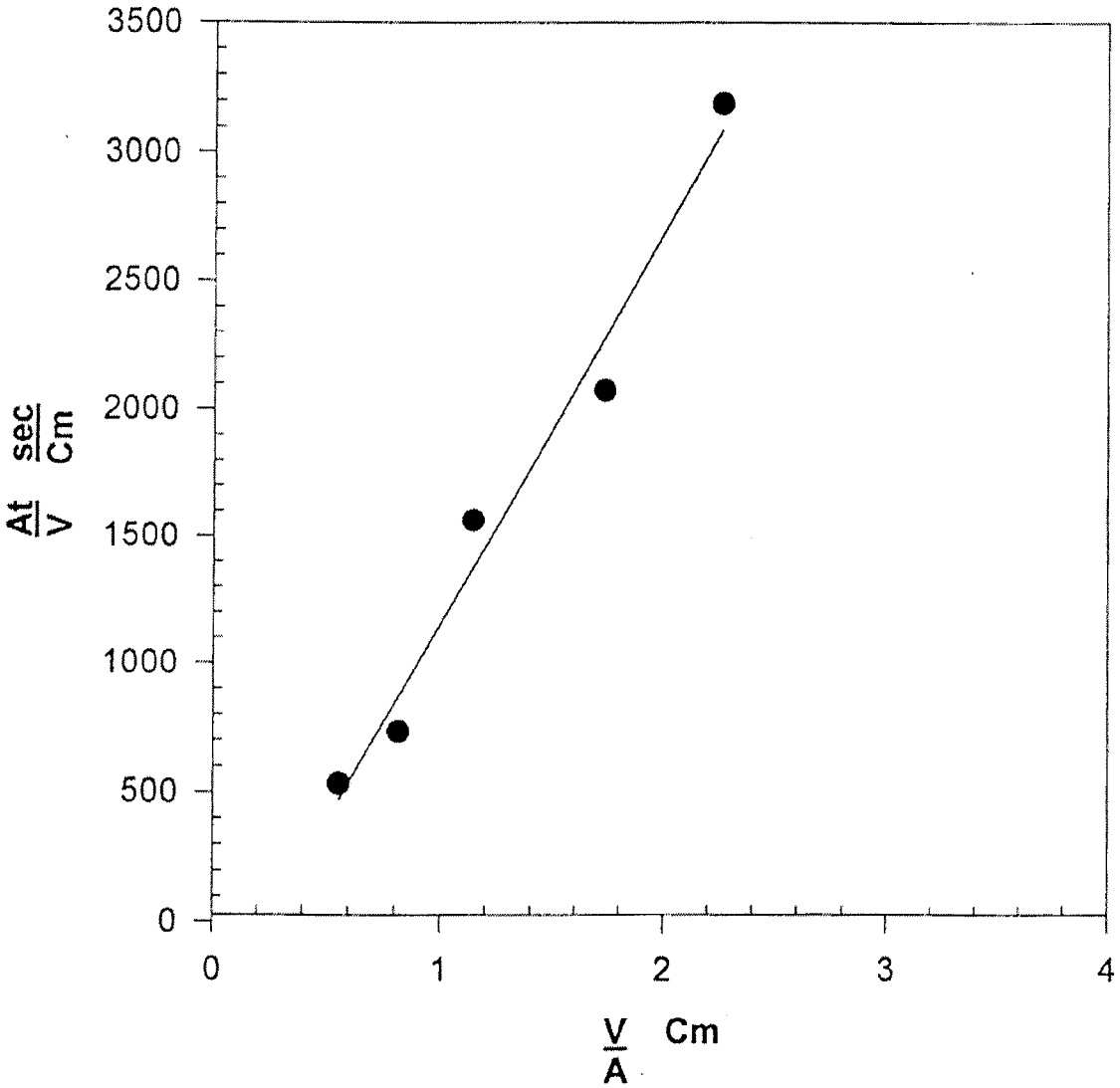


Fig. 2.82. Ruth plot of filtration of *Streptomyces avermitilis* at 50mmHg

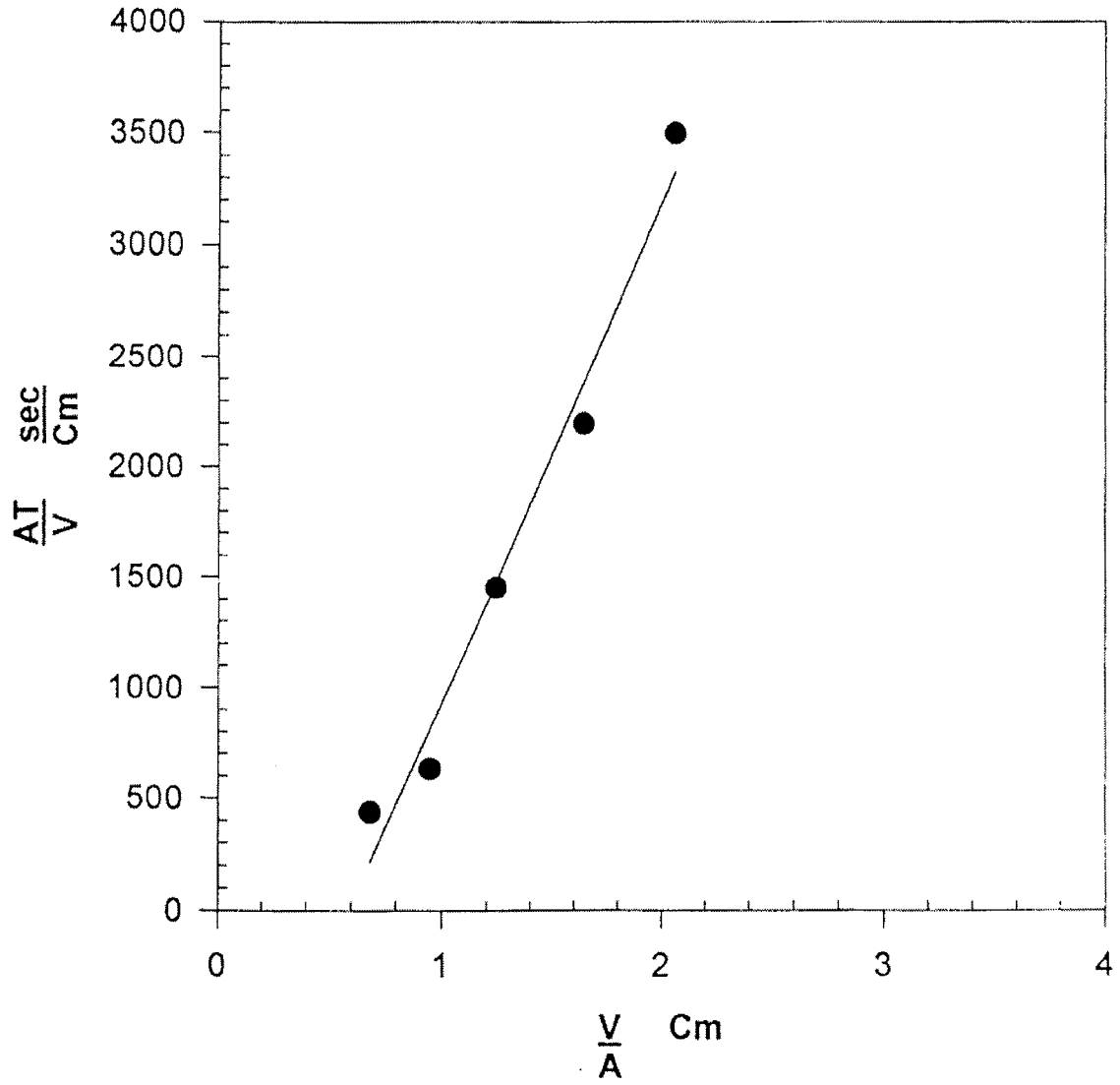


Fig. 2.83. Ruth plot of filtration of *Streptomyces avermitilis* at 60mmHg

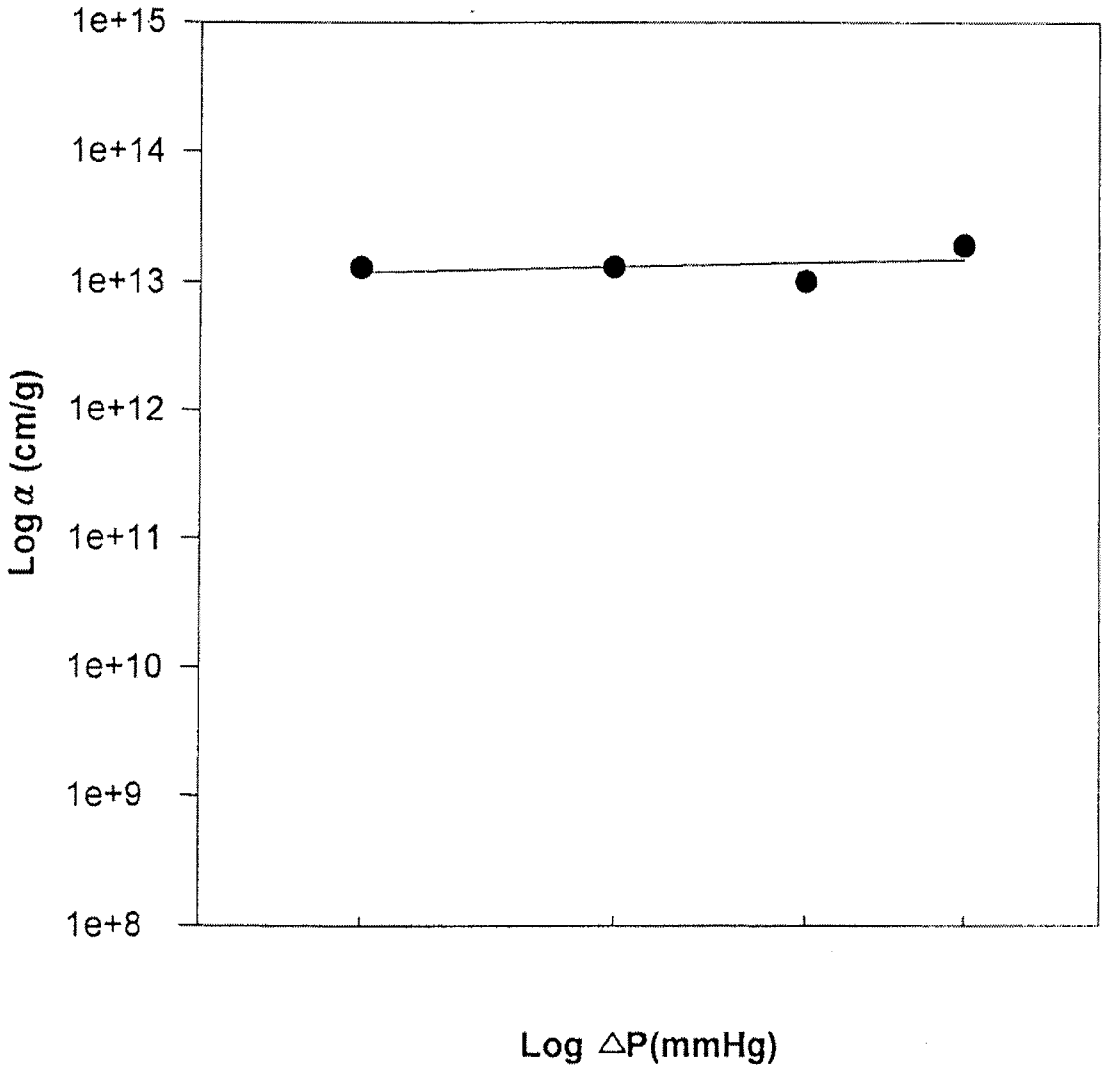


Fig. 2.84. Cake resistance versus pressure drop

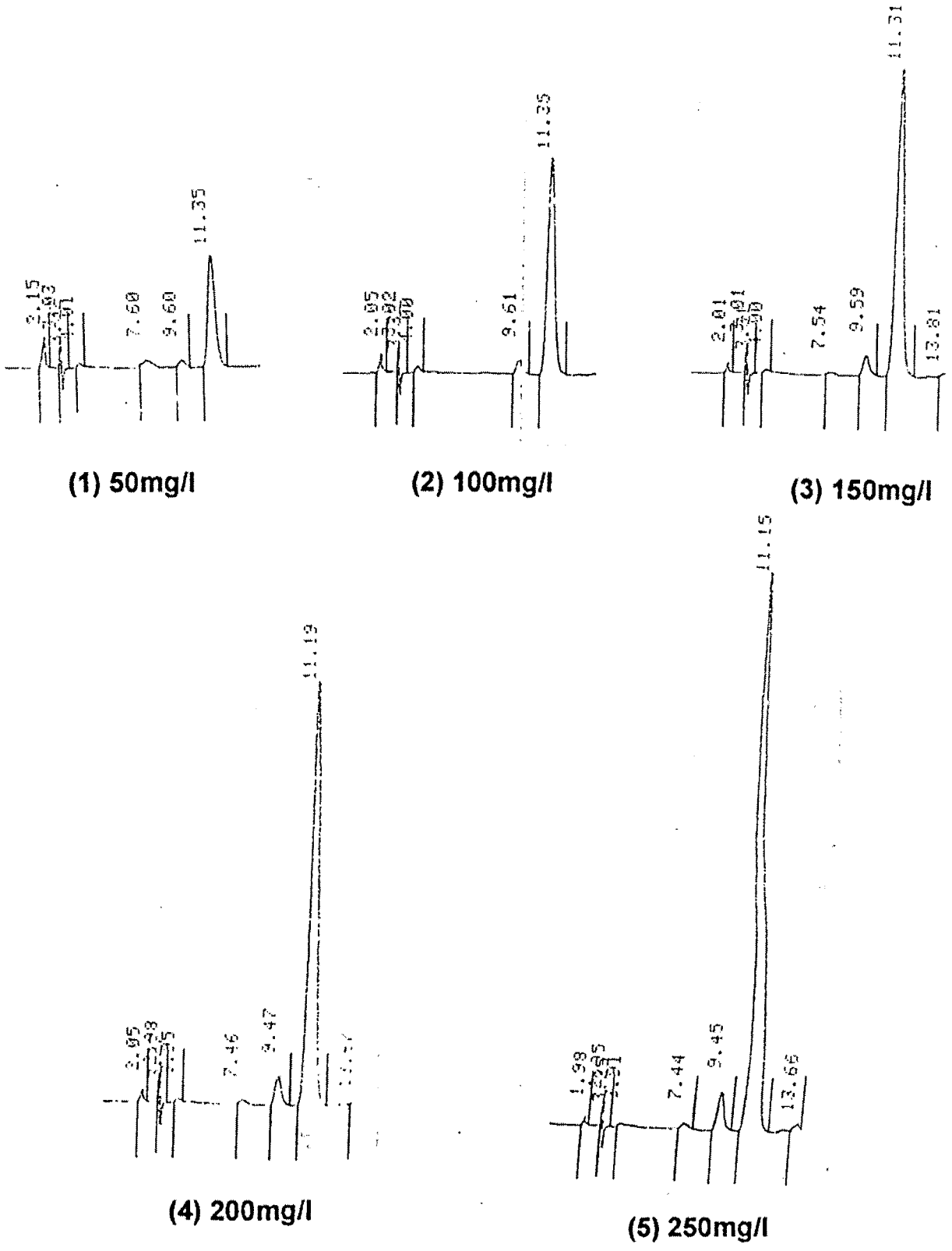


Fig. 2.85. **HPLC peaks of standard solutions**

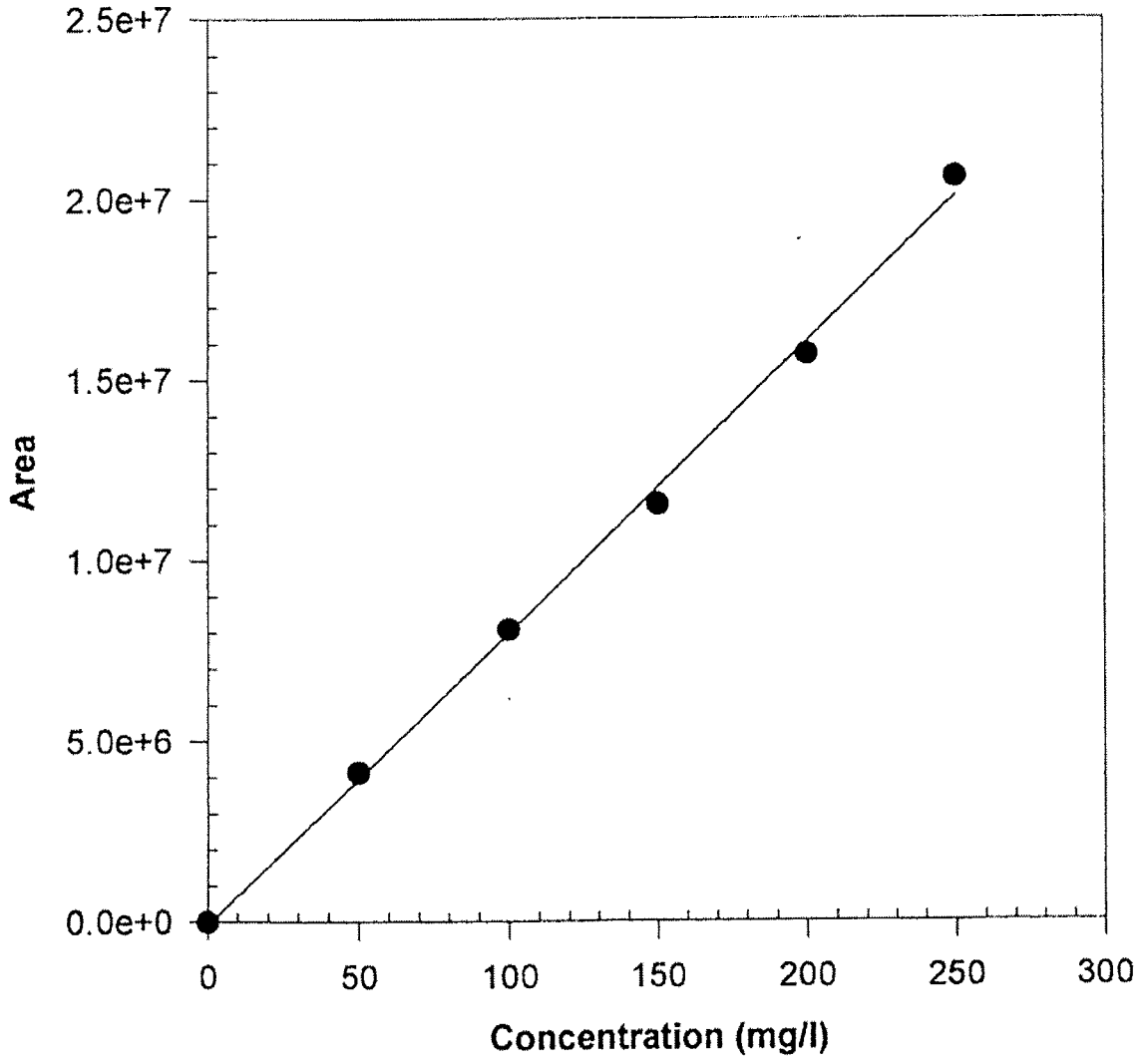


Fig. 2.86. **Standard curve of avermectin B1a**

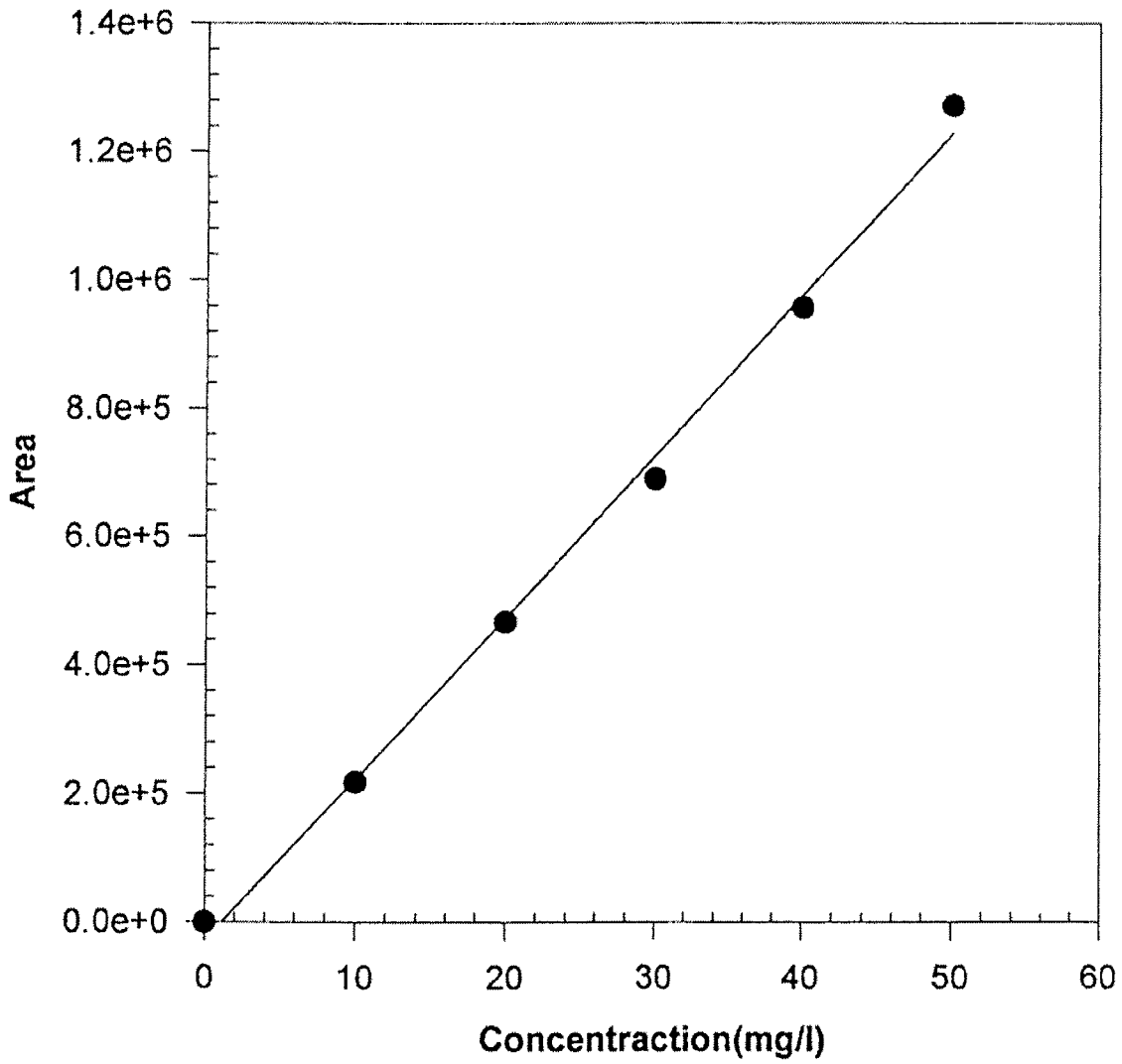


Fig. 2.87. Standard curve of avermectin B1b

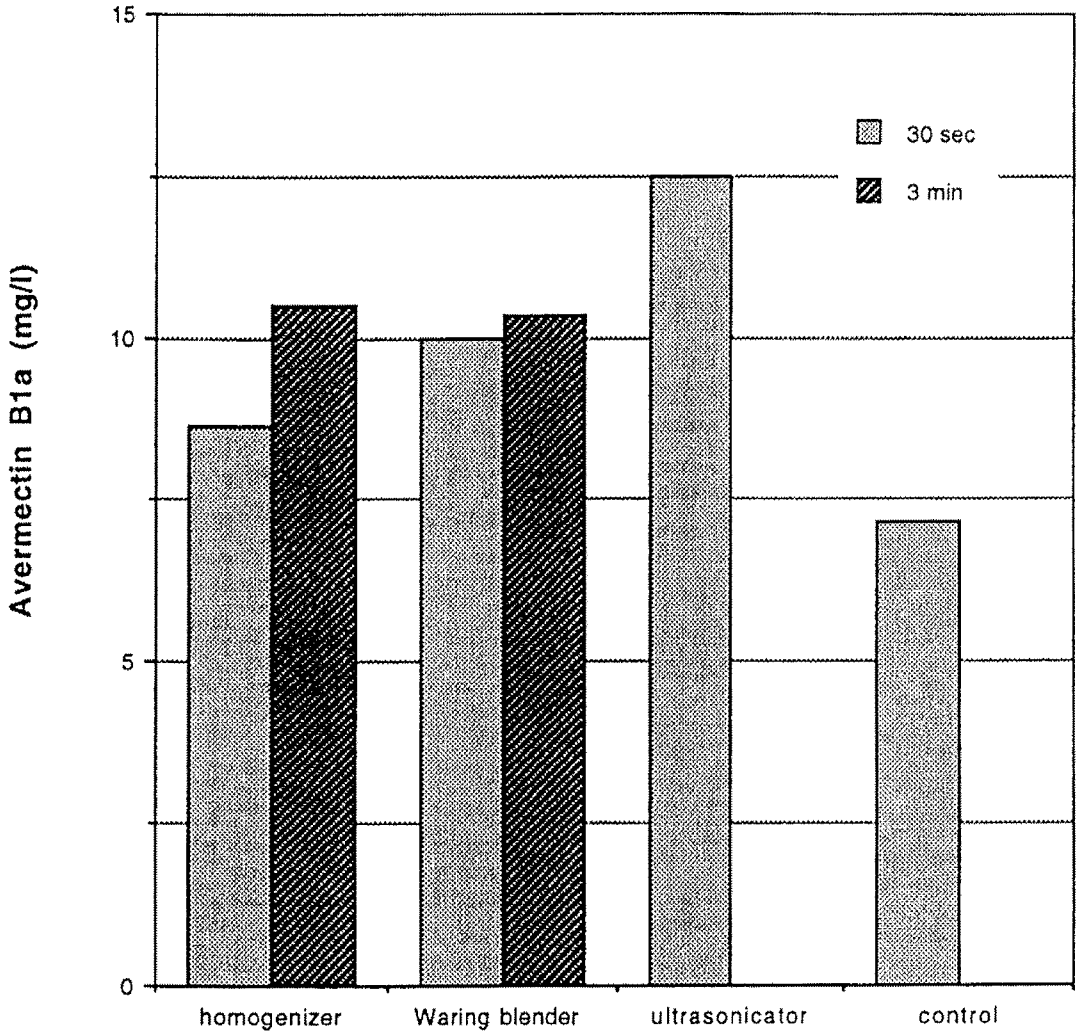
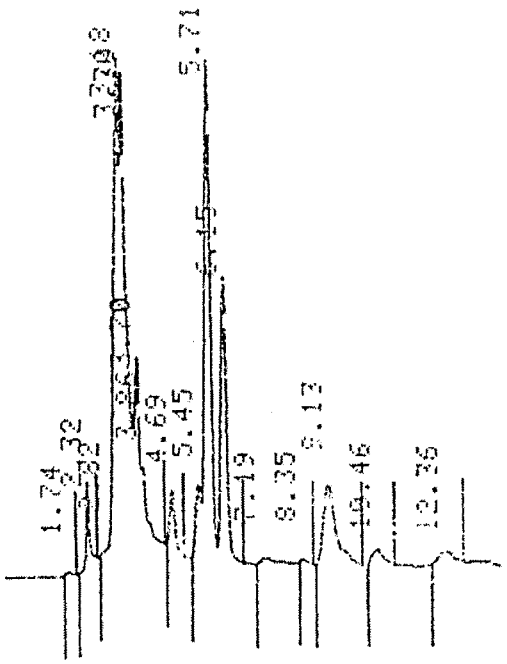
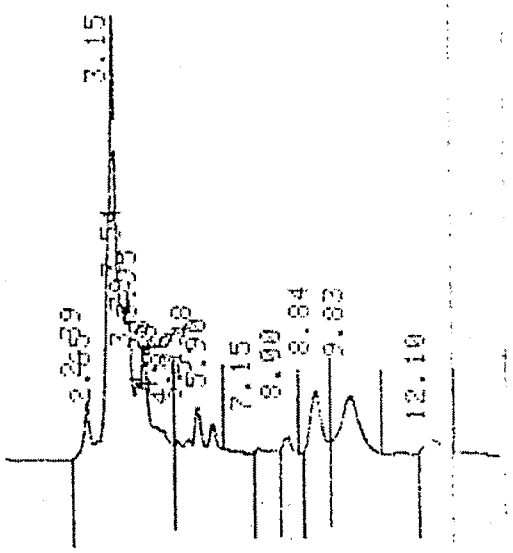


Fig. 2.88. Comparison of various mechanical cell disruptor



(1)methanol extract



(2)aceton extract

Fig. 2.89. HPLC peak of solvent extracts

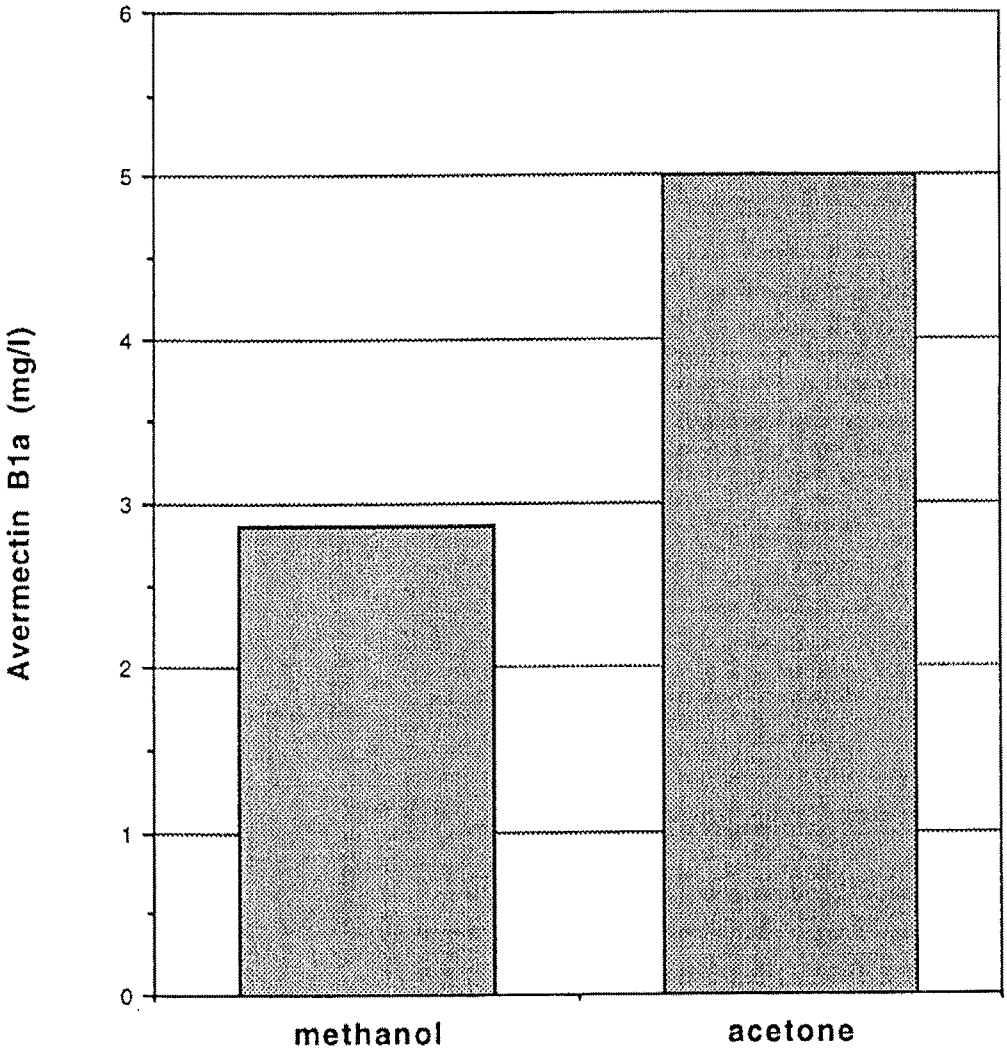


Fig. 2.90. Comparison of avermectin B1a concentration in methanol extract and that of acetone

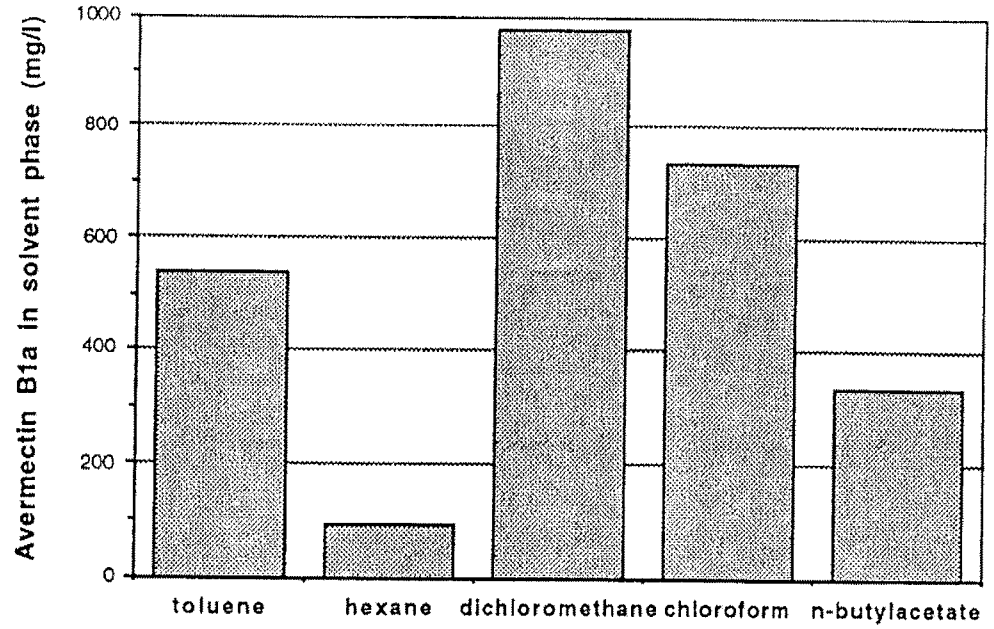


Fig. 2.91. Comparison of avermectin B1a extraction performance among various solvents (feed concentraction: 600mg/l, methanol-water aqueous phase)

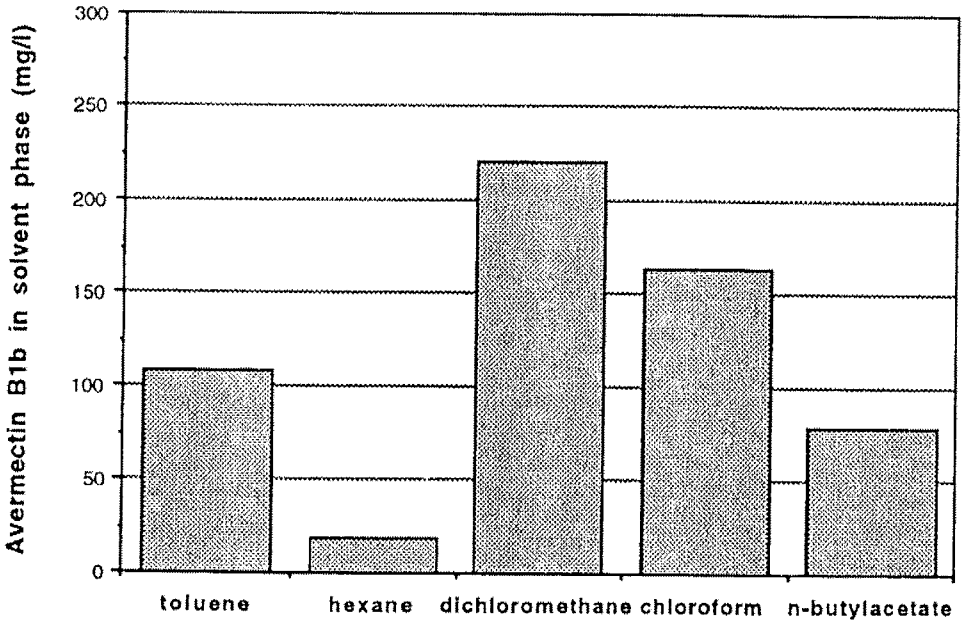


Fig. 2.92. Comparision of avermectin B1b extraction performance among various solvents (feed concentraction:123mg/l), methanol-water aqueous phase)

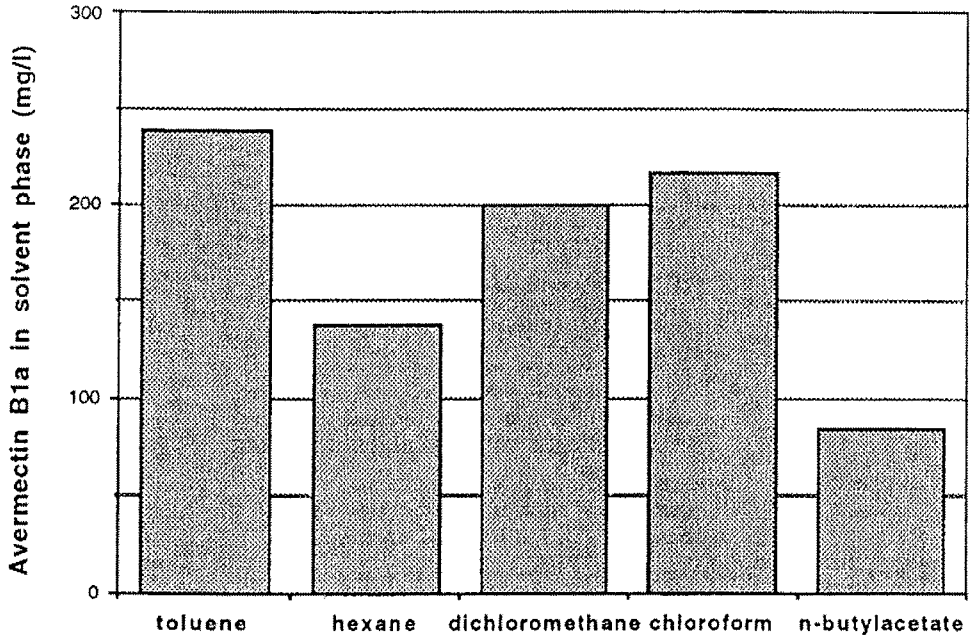


Fig. 2.93. Comparison of avermectin B1a extraction performance among various solvents (feed concentraction:300mg/l, aceton-water aqueous phase)

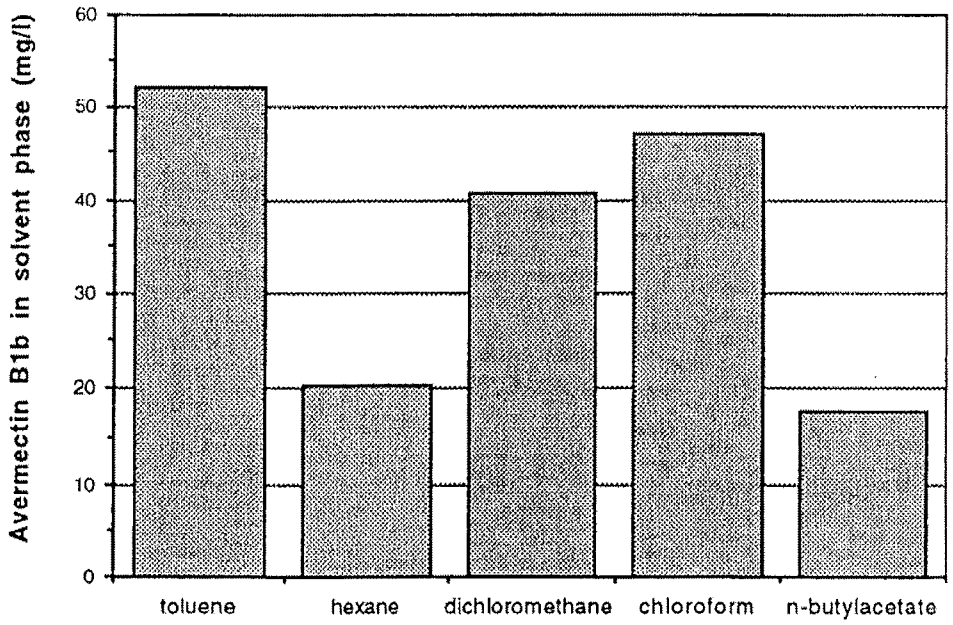


Fig. 2.94. Comparison of Avermectin B1b extraction performance among various solvent (feed concentraction:61.5mg/l, acetone-water aqueous phase)

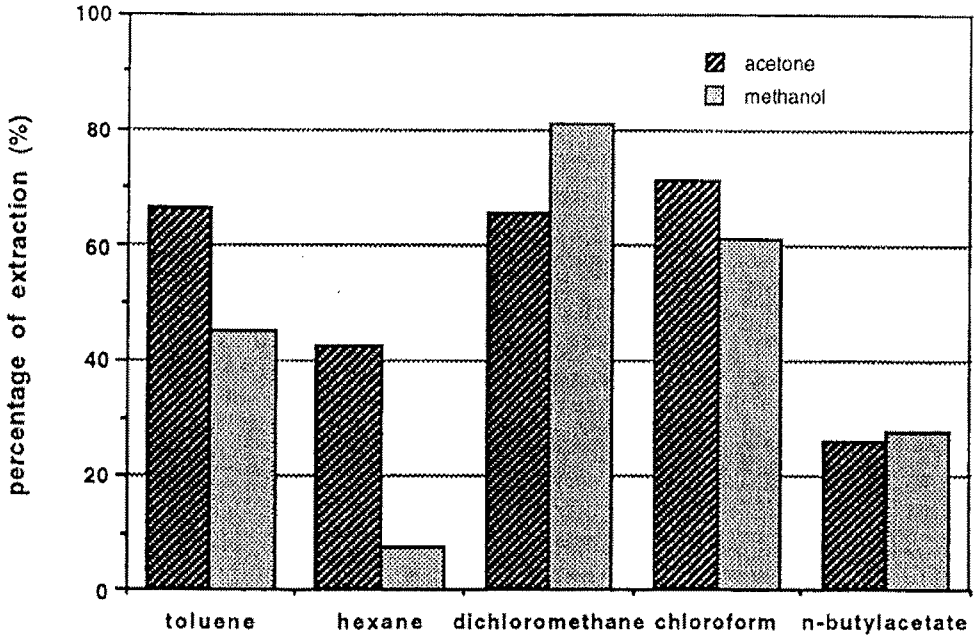


Fig. 2.95. Comparison of percentage of avermectin B1a extraction between acetone-water and methanol-water aqueous phase

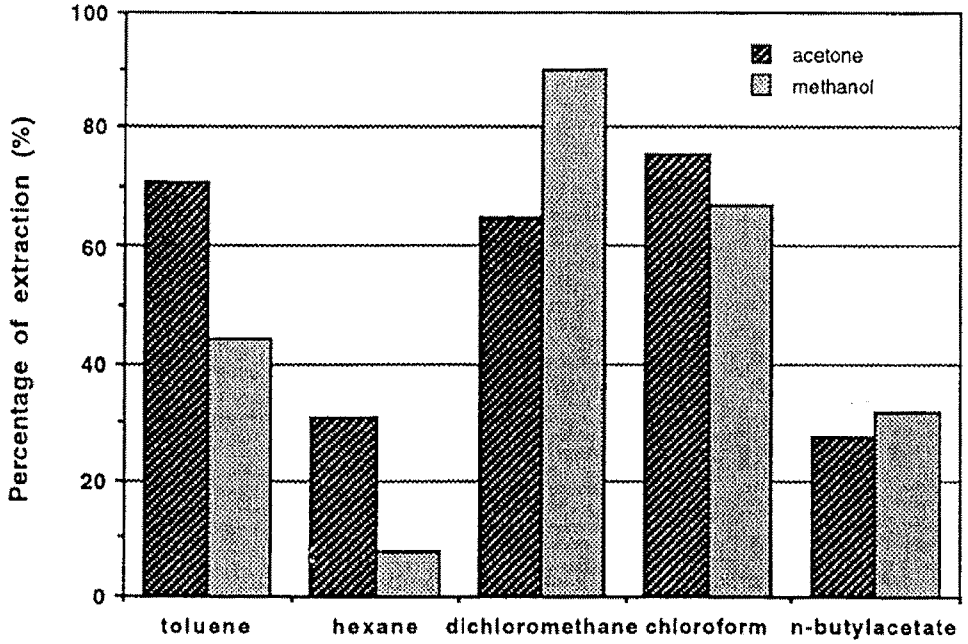


Fig. 2.96. Comparison of percentage of avermectin B1b extraction between acetone-water and methanol-water aqueous phase

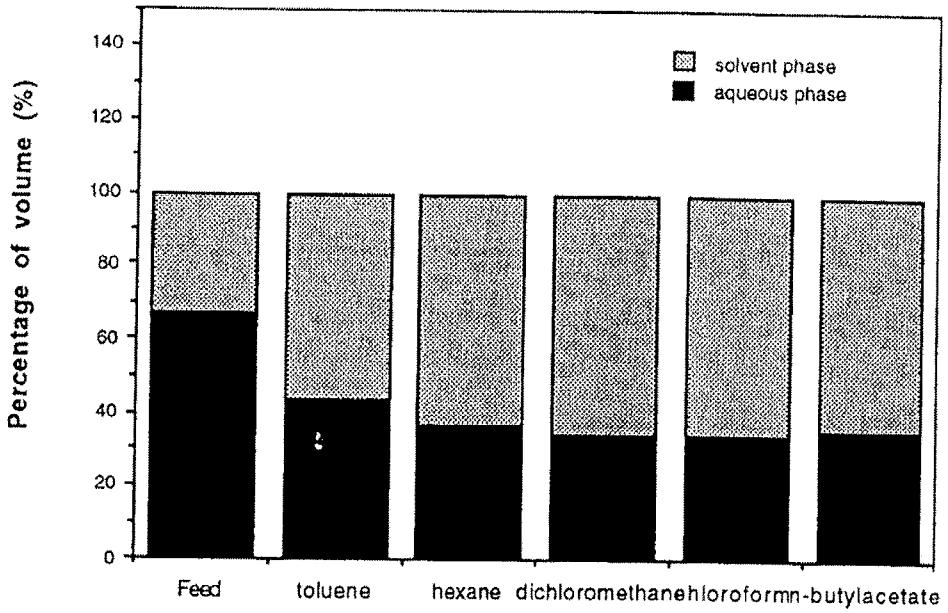


Fig. 2.97. Change of volume ratio of solvent to acetone-water aqueous phase after extraction

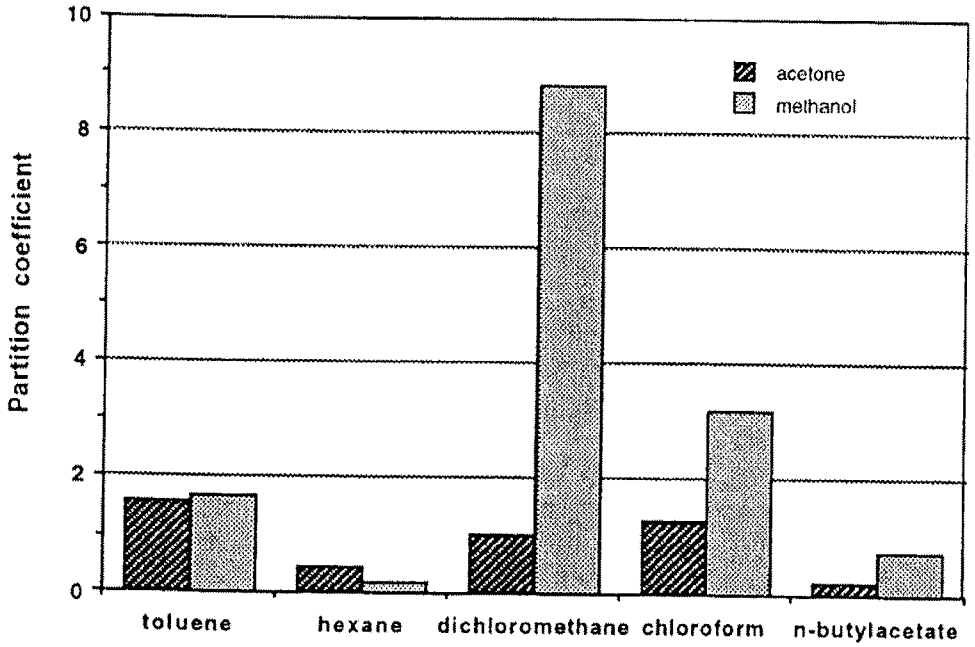


Fig. 2.98. Comparison of partition coefficient of avermectine B1a extraction between acetone-water and methanol-water aqueous phase

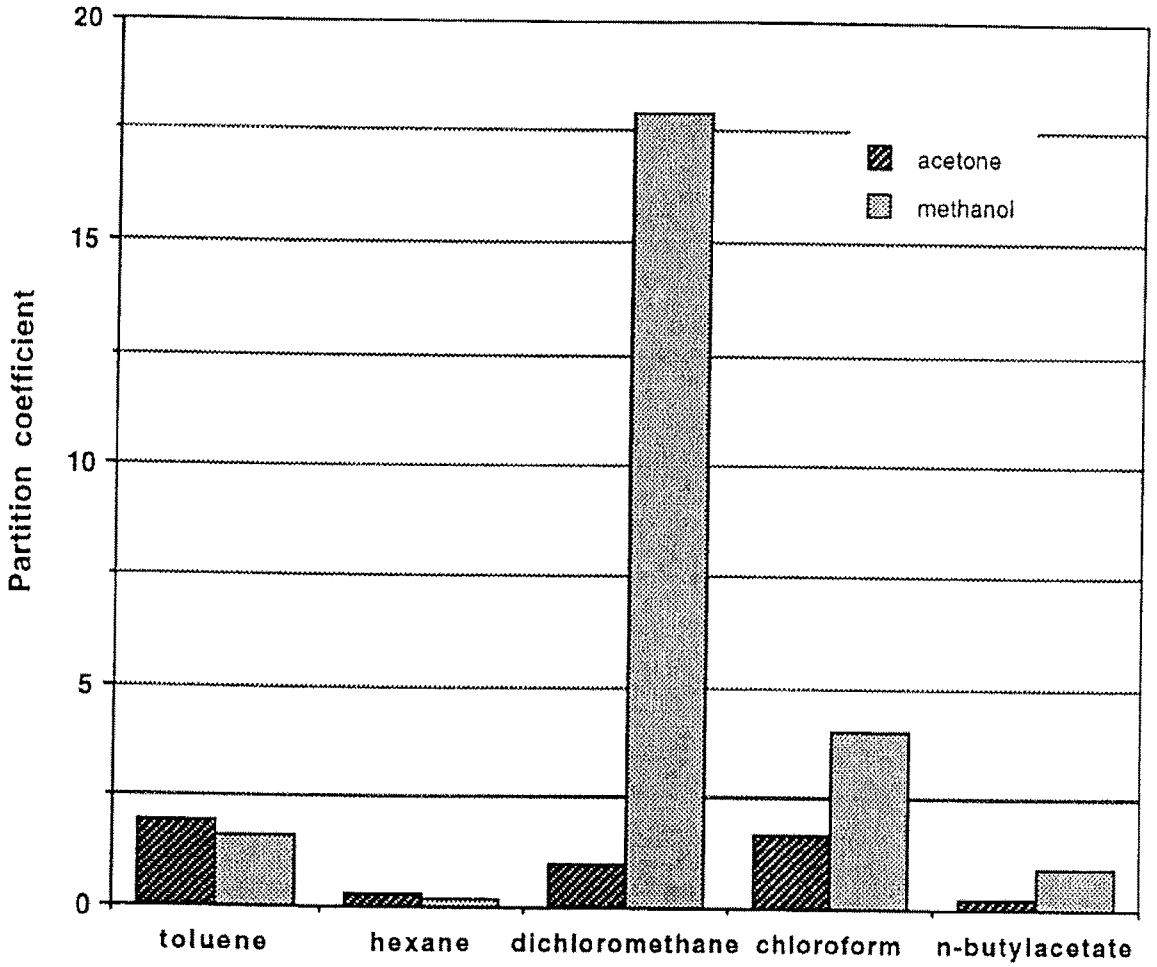


Fig. 2.99. Comparison of partition coefficient of avermectin B1b extraction between acetone-water and methanol-water aqueous phase

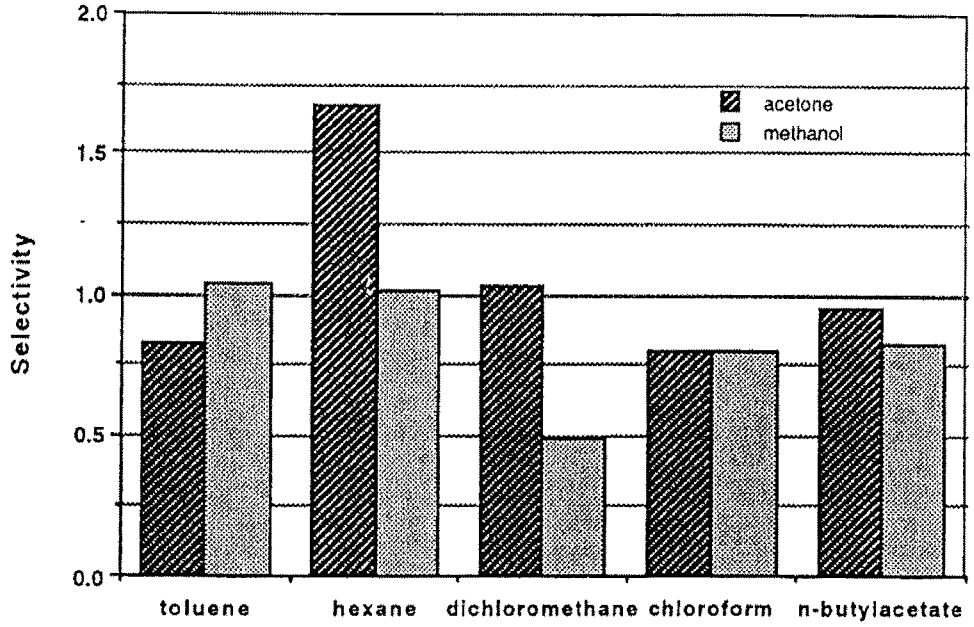


Fig. 2.100. Comparison of selectivity of avermectin B1a to B1b between acetone-water and methanol-water aqueous phase

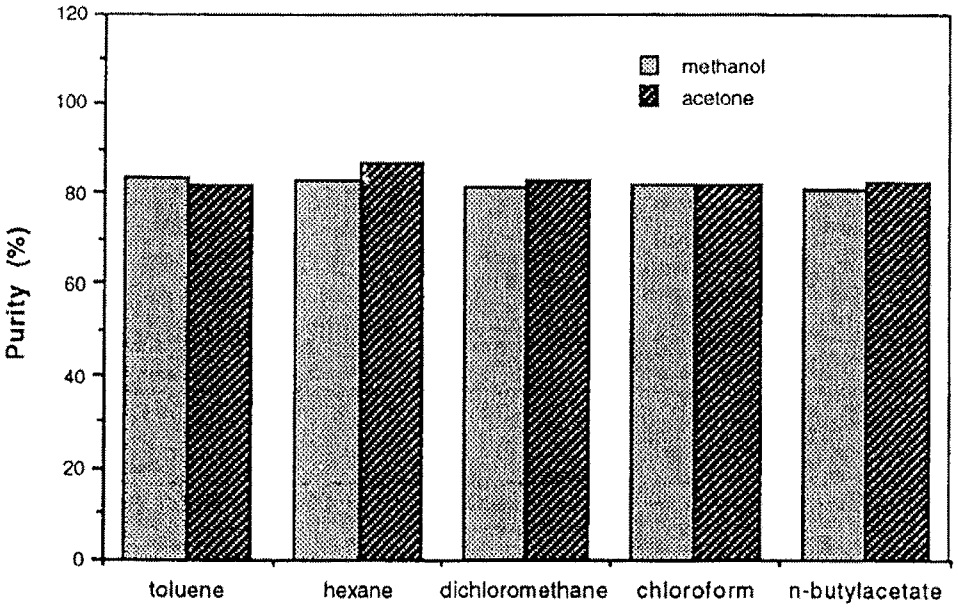


Fig. 2.101. Comparison of purity of avermectin B1a in the solvent phase between methanol-water and acetone-water aqueous phase

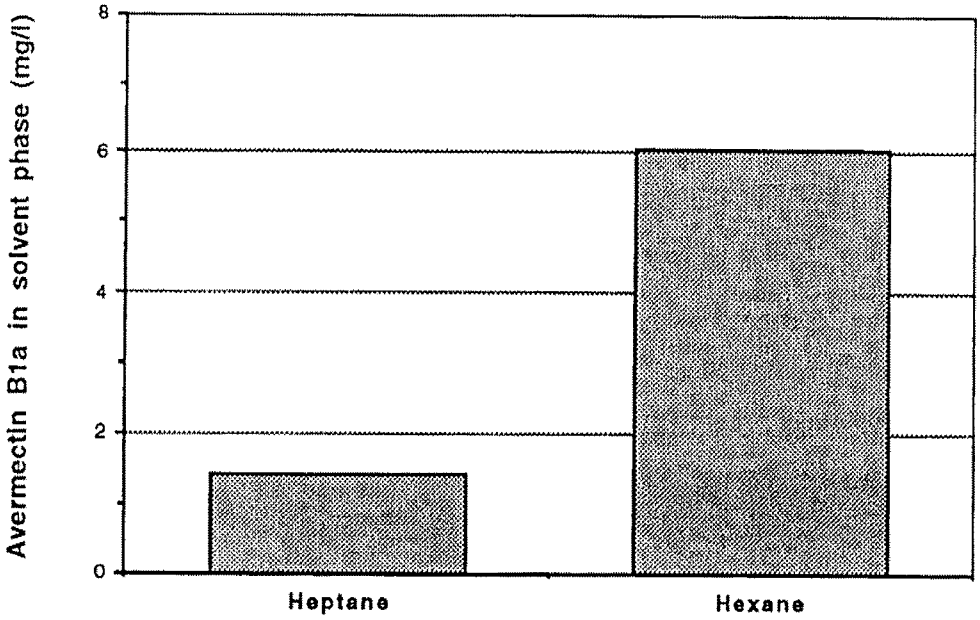


Fig. 2.102. Comparison of avermectin B1a extraction performance among various solvents (feed concentration: 200mg/l, methanol-glycol 5:1 aqueous phase)

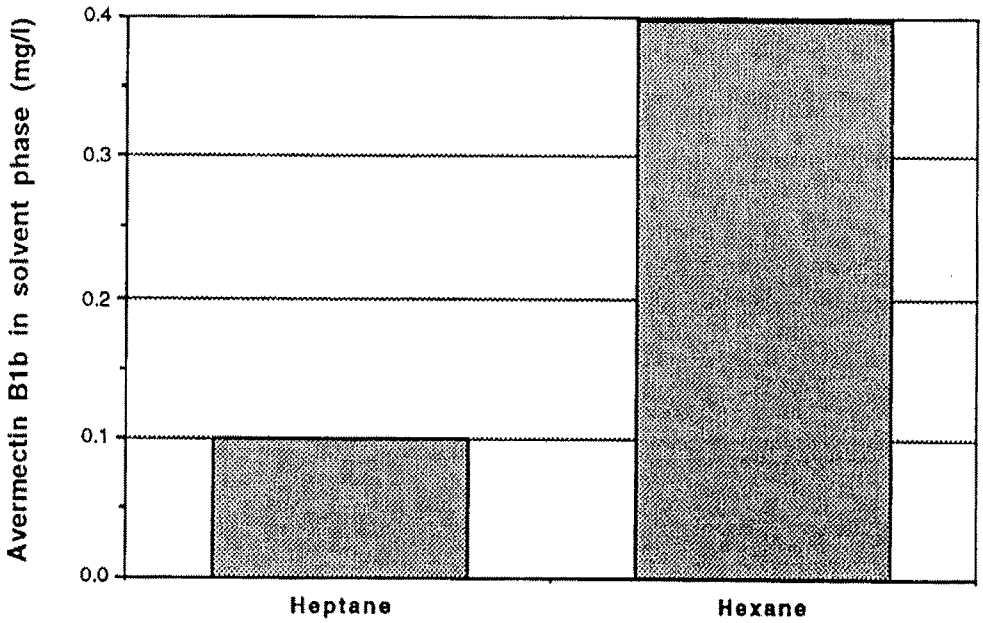


Fig. 2.103. Comparison of avermectin B1b extraction performance among various solvents (feed concentration: 38.4 mg/l, methanol-glycol 5:1 aqueous phase)

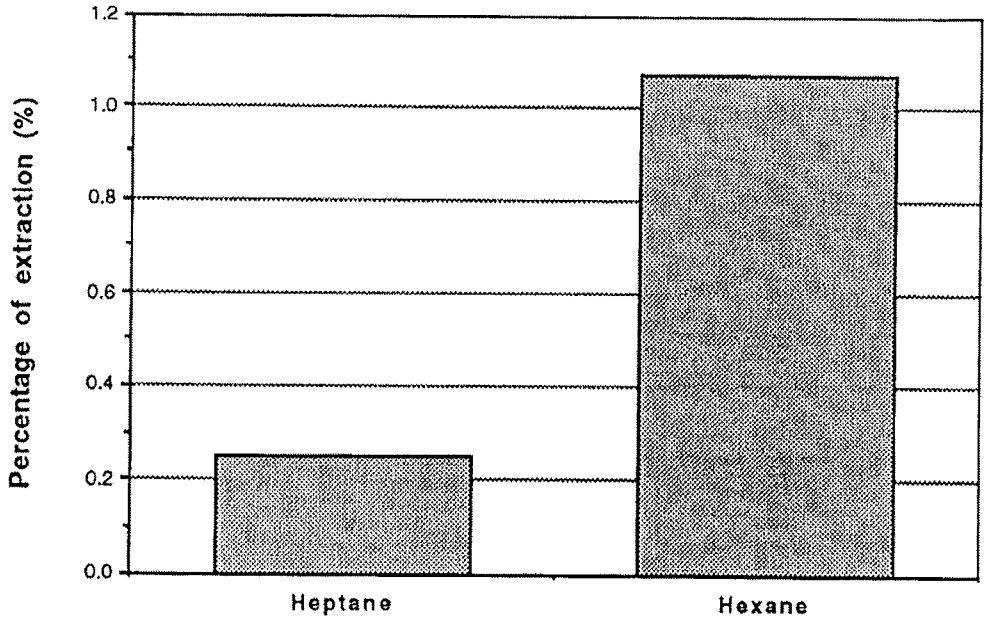


Fig. 2.104. Comparison of percentage of avermectin B1a extraction among various solvents (feed concentration: 200mg/l, methanol-glycol 5:1 aqueous phase)

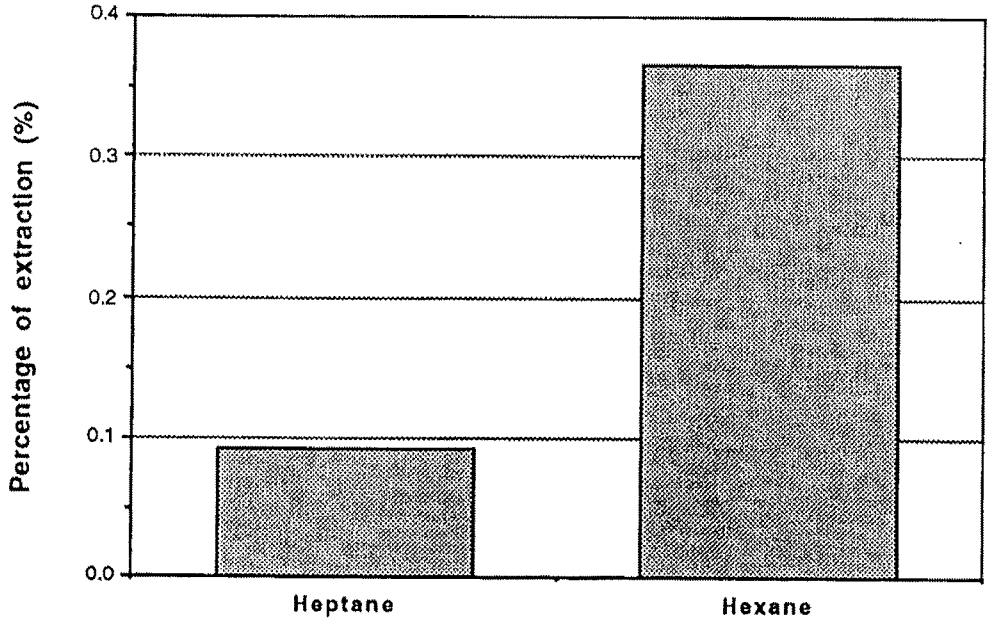


Fig. 2.105. Comparison of percentage of avermectin B1b extraction among various solvents (feed concentration: 38.4 mg/l, methanol-glycol 5:1 aqueous phase)

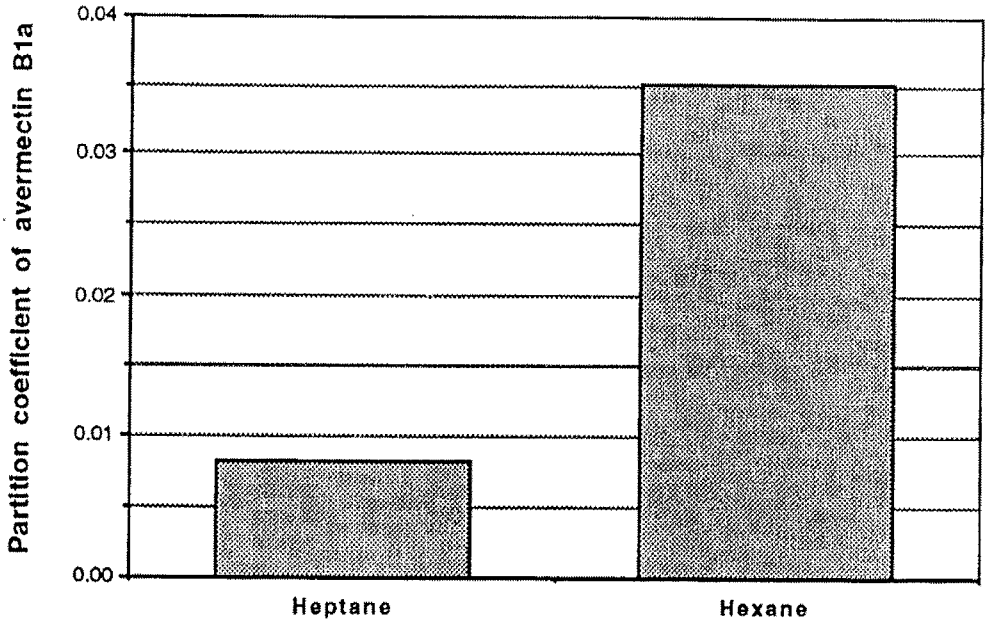


Fig. 2.106. Comparison of partition coefficient of avermectin B1a among various solvents (feed concentration: 200mg/l, methanol-glycol 5:1 aqueous phase)

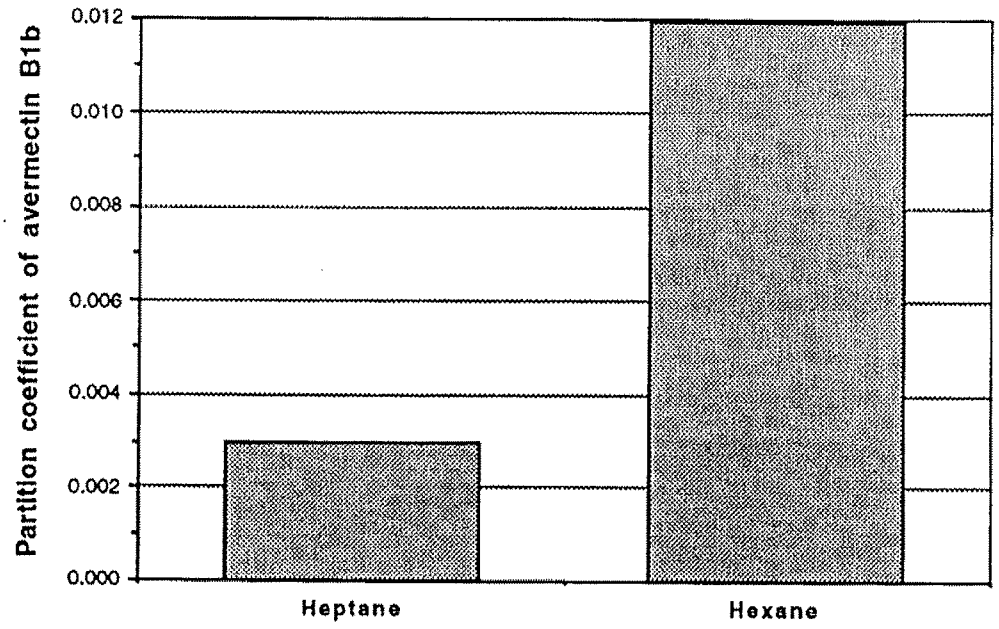


Fig. 2.107. Comparison of partition coefficient of avermectin B1b among various solvents (feed concentration: 38.4 mg/l, methanol-glycol 5:1 aqueous phase)

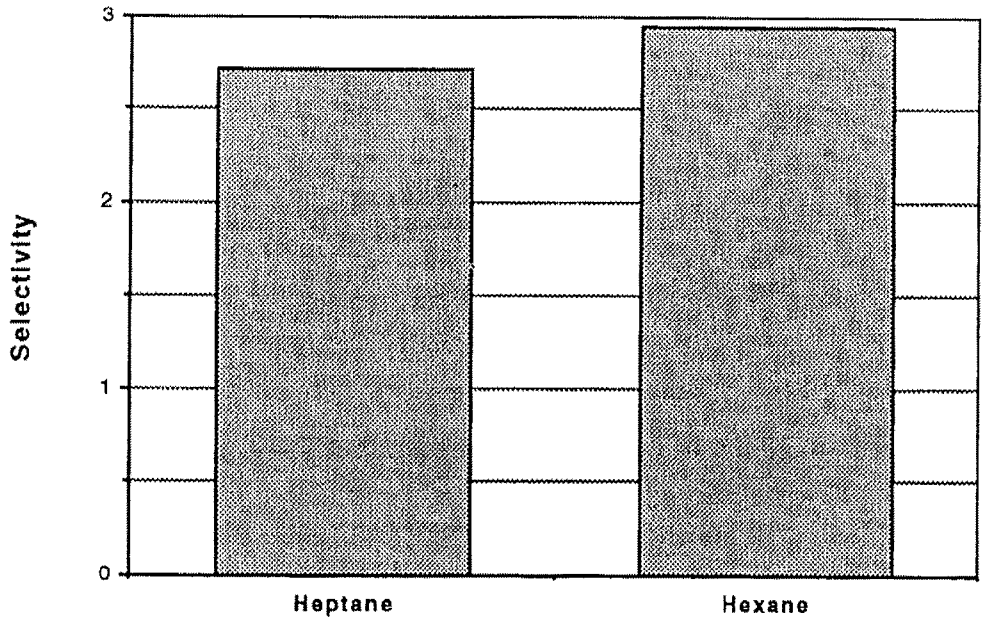


Fig. 2.108. Comparison of selectivity of avermectin B1a to avermectin B1b among various solvents (methanol-glycol 5:1 aqueous phase)

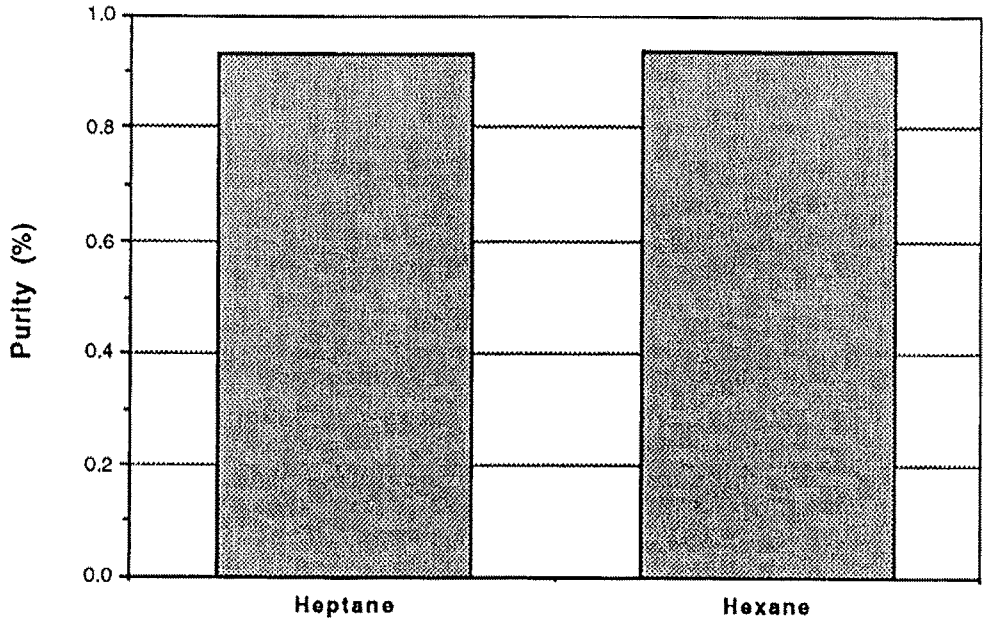


Fig. 2.109. Comparison of purity of avermectin B1a in the solvent phase among various solvents (methanol-glycol 5:1 aqueous phase)

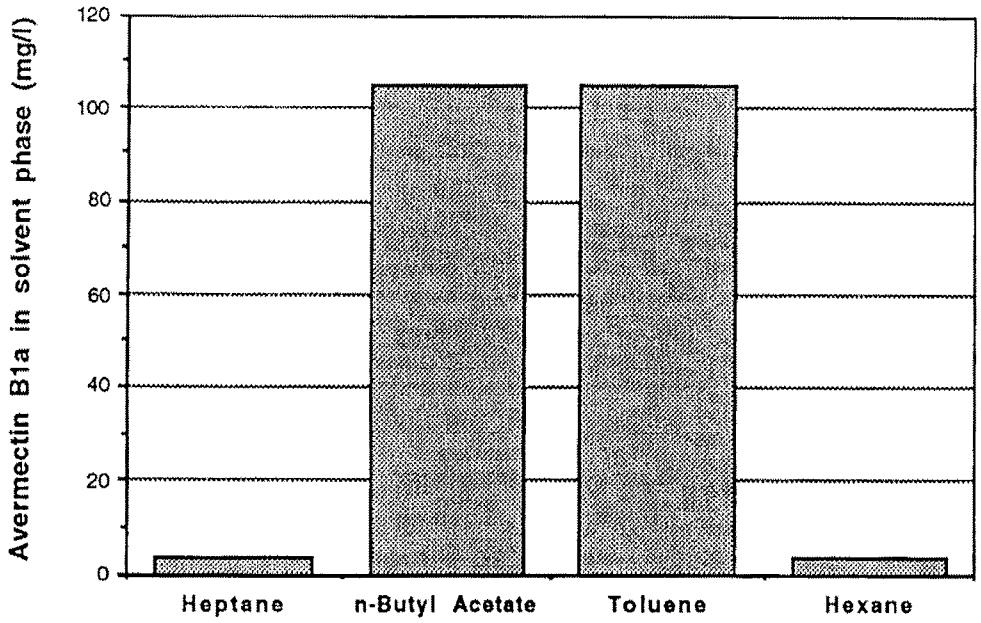


Fig. 2.110. Comparison of avermectin B1a extraction performance among various solvents (feed concentration: 200mg/l, methanol-glycol 2:5 aqueous phase)

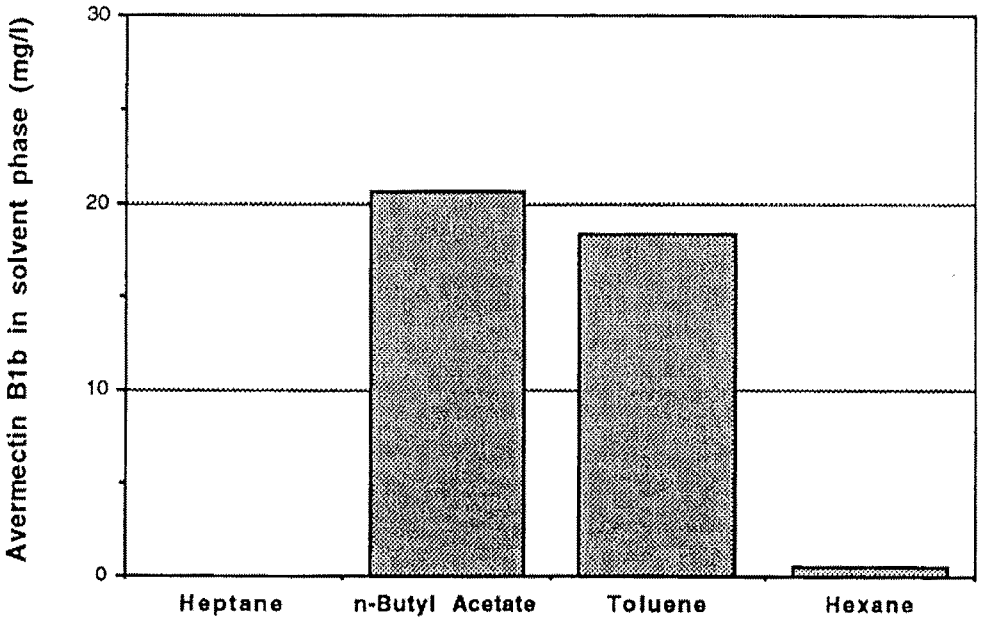


Fig. 2.111. Comparison of avermectin B1b extraction performance among various solvents (feed concentration: 38.4 mg/l, methanol-glycol 2:5 aqueous phase)

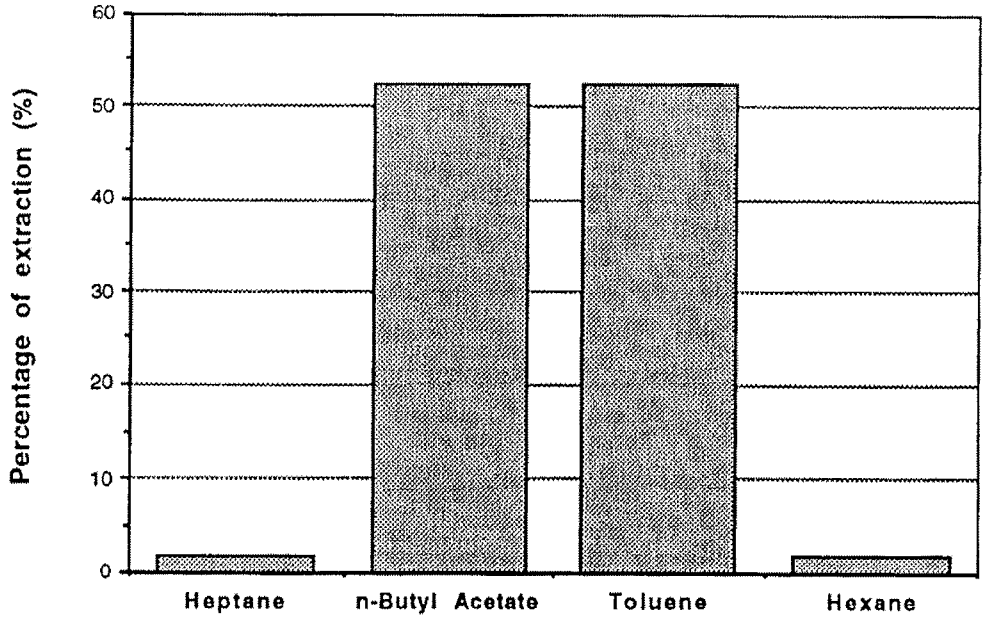


Fig. 2.112. Comparison of percentage of avermectin B1a extraction among various solvents (feed concentration: 200mg/l, methanol-glycol 2:5 aqueous phase)

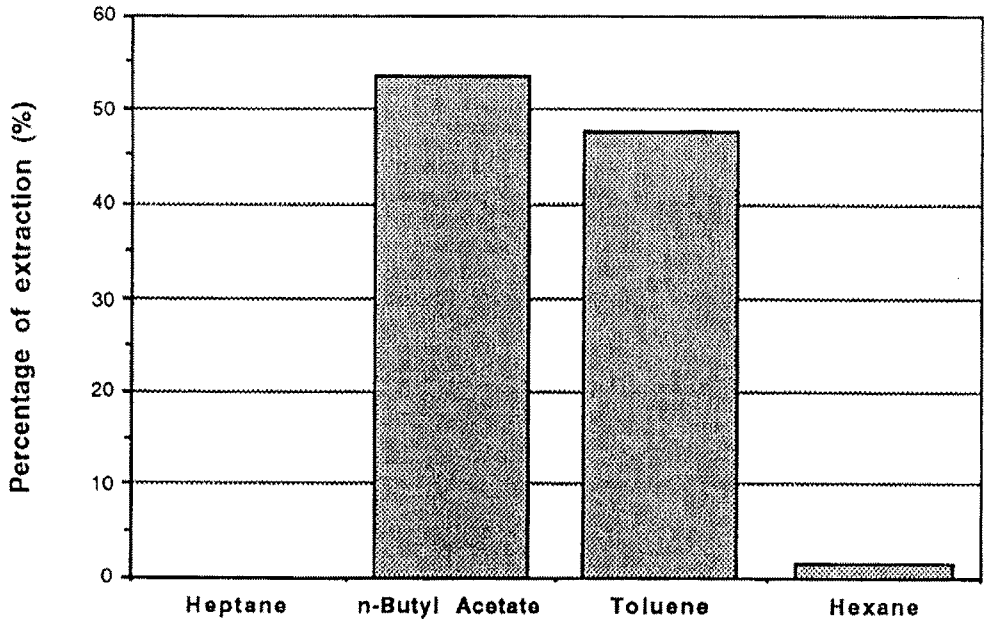


Fig. 2.113. Comparison of percentage of avermectin B1b extraction among various solvents (feed concentration: 38.4 mg/l, methanol-glycol 2:5 aqueous phase)

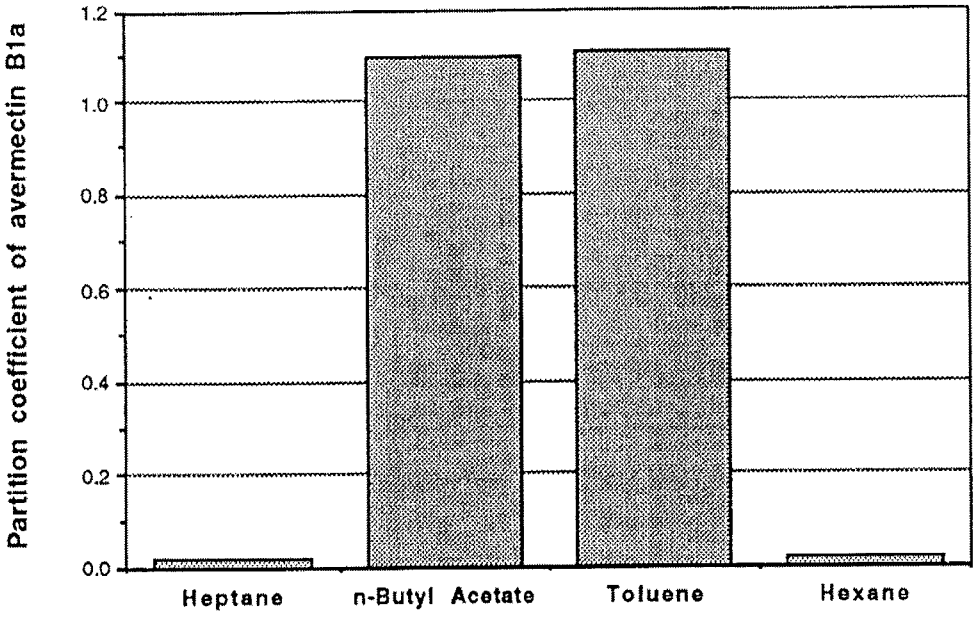


Fig. 2.114. Comparison of partition coefficient of avermectin B1a among various solvents (feed concentration: 200mg/l, methanol-glycol 2:5 aqueous phase)

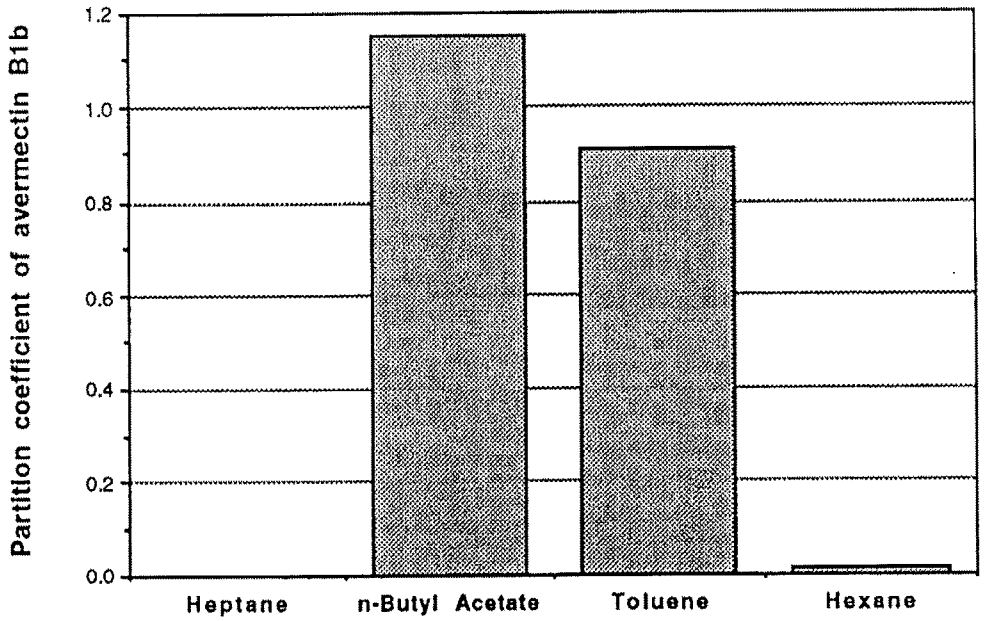


Fig. 2.115. Comparison of partition coefficient of avermectin B1b among various solvents (feed concentration: 38.4 mg/l, methanol-glycol 2:5 aqueous phase)

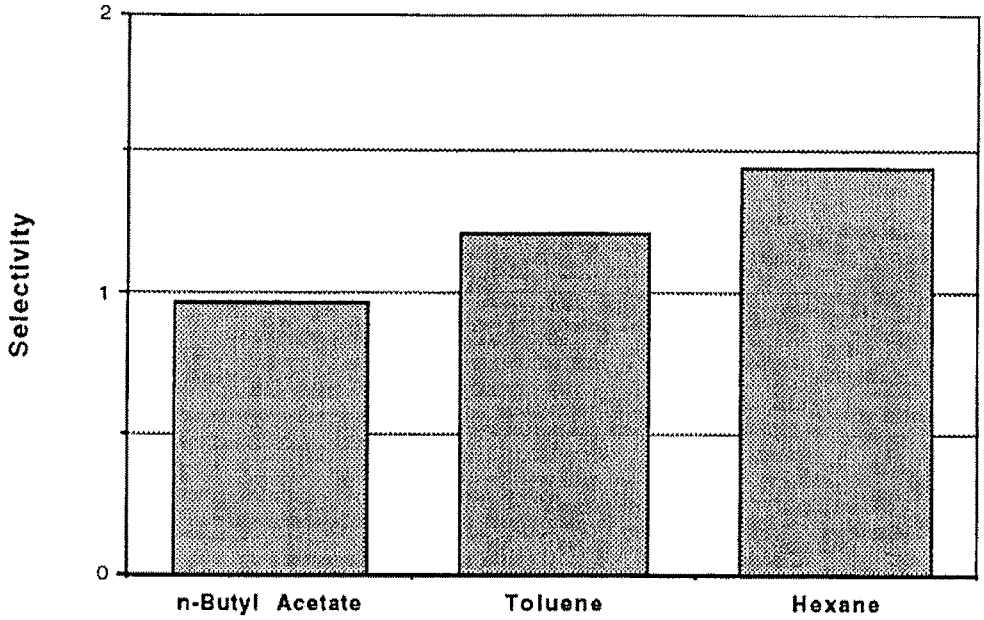


Fig. 2.116. Comparison of selectivity of avermectin B1a to avermectin B1b among various solvents (methanol-glycol 2:5 aqueous phase)

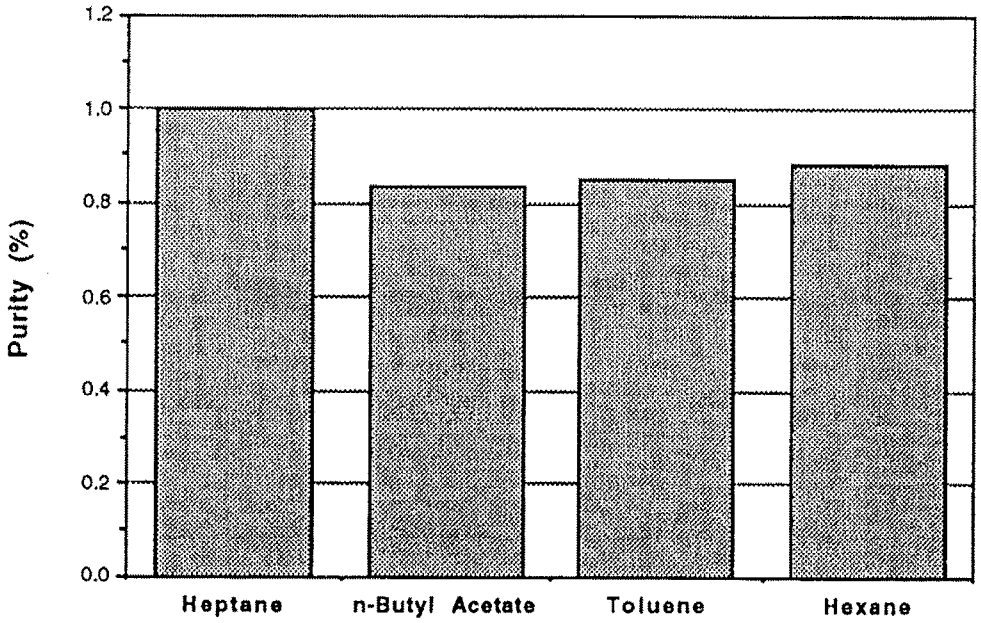


Fig. 2.117. Comparison of purity of avermectin B1a in the solvent phase among various solvents (methanol-glycol 2:5 aqueous phase)

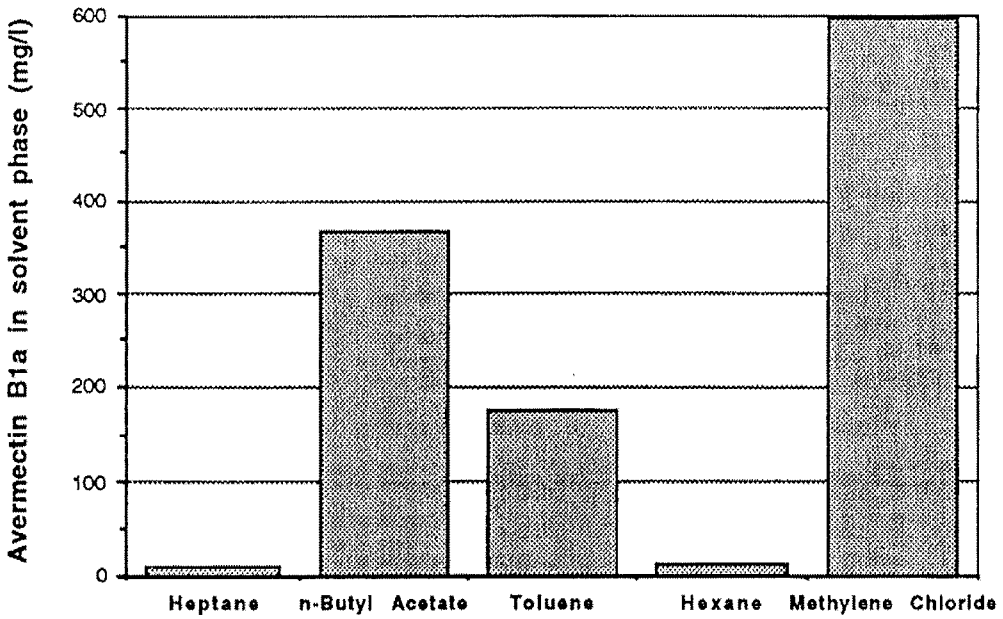


Fig. 2.118. Comparison of avermectin B1a extraction performance among various solvents (feed concentration: 200mg/l, methanol-water 5:3 aqueous phase)

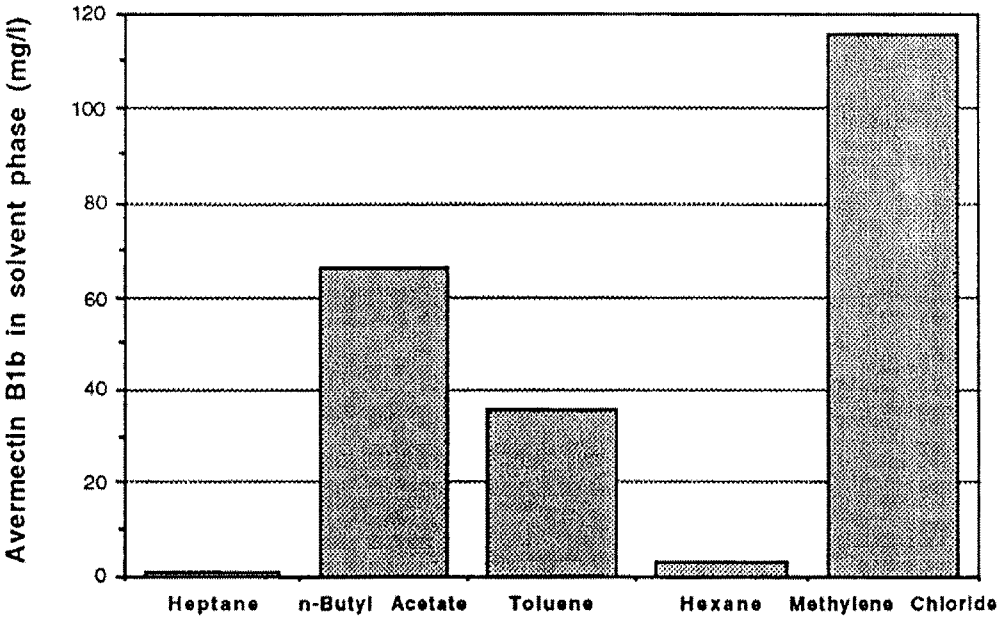


Fig. 2.119. Comparison of avermectin B1b extraction performance among various solvents (feed concentration: 38.4 mg/l, methanol-water 5:3 aqueous phase)

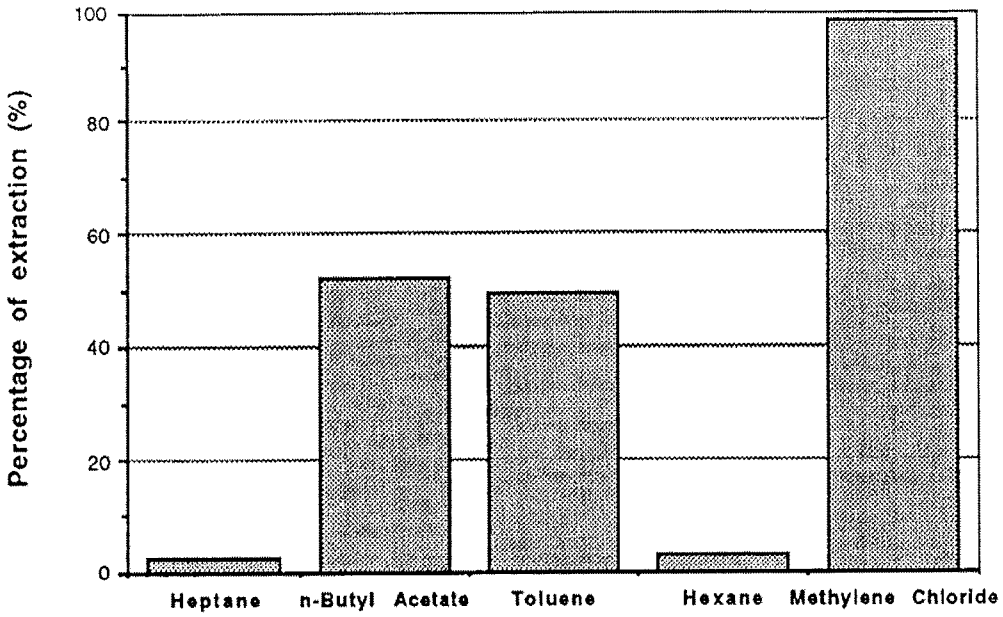


Fig. 2.120. Comparison of percentage of avermectin B1a extraction among various solvents (feed concentration: 200mg/l, methanol-water 5:3 aqueous phase)

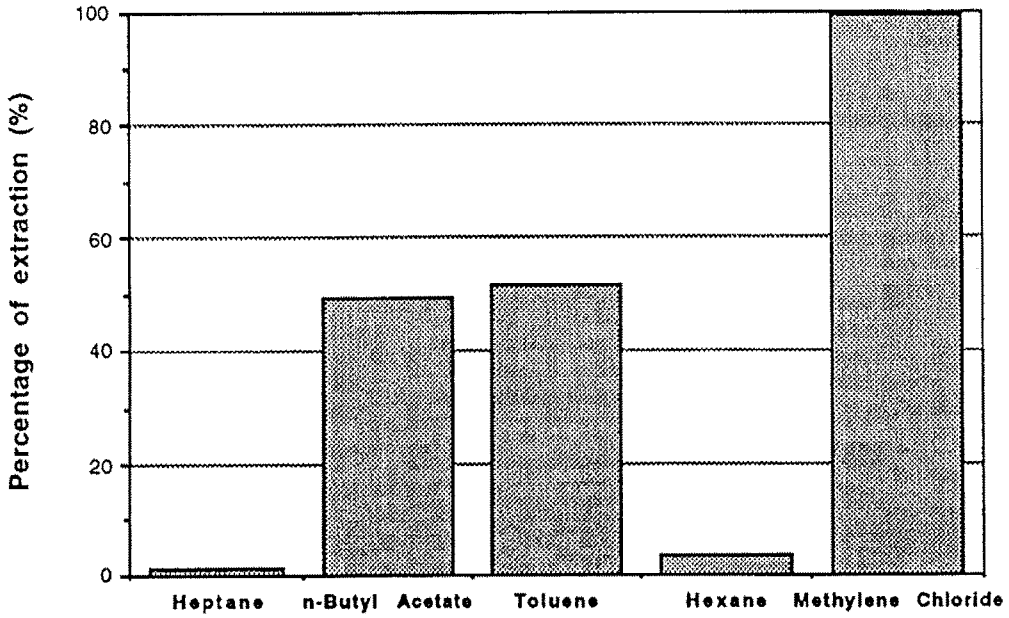


Fig. 2.121. Comparison of percentage of avermectin B1b extraction among various solvents (feed concentration: 38.4 mg/l, methanol-water 5:3 aqueous phase)

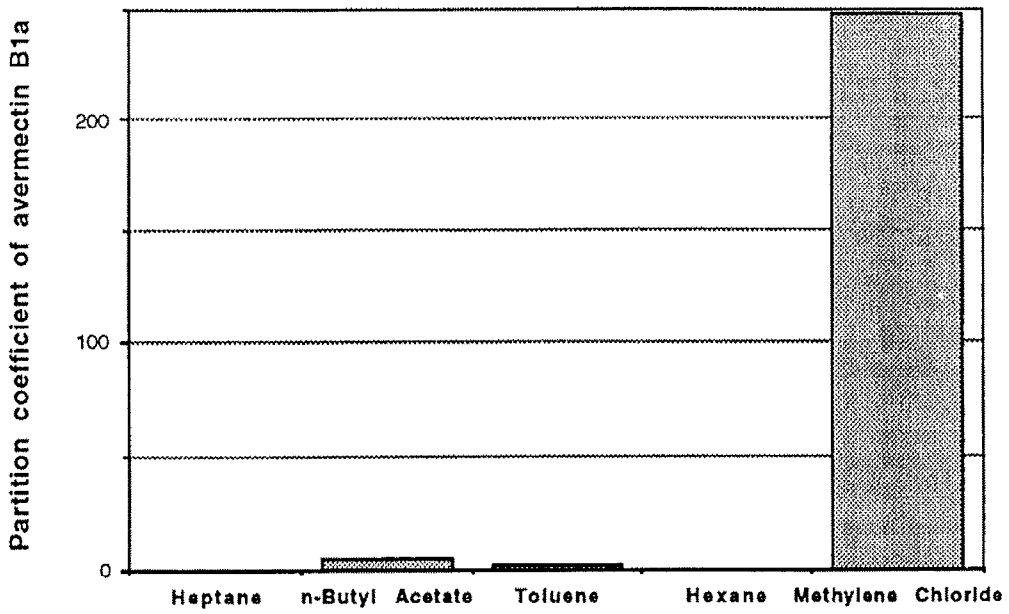


Fig. 2.122. Comparison of partition coefficient of avermectin B1a among various solvents (feed concentration: 200mg/l, methanol-water 5:3 aqueous phase)

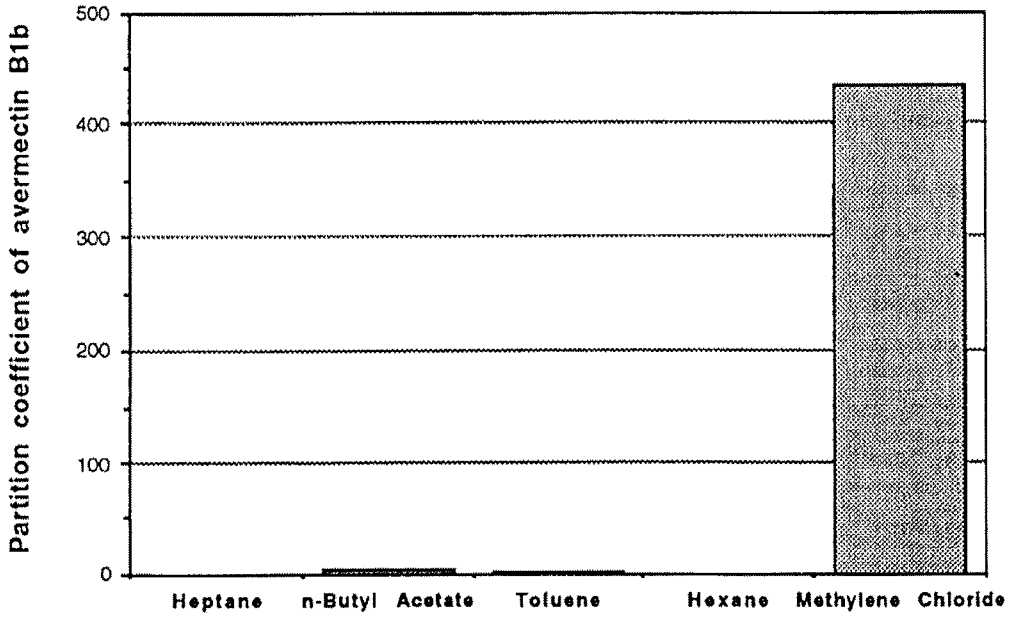


Fig. 2.123. Comparison of partition coefficient of avermectin B1b among various solvents (feed concentration: 38.4 mg/l, methanol-water 5:3 aqueous phase)

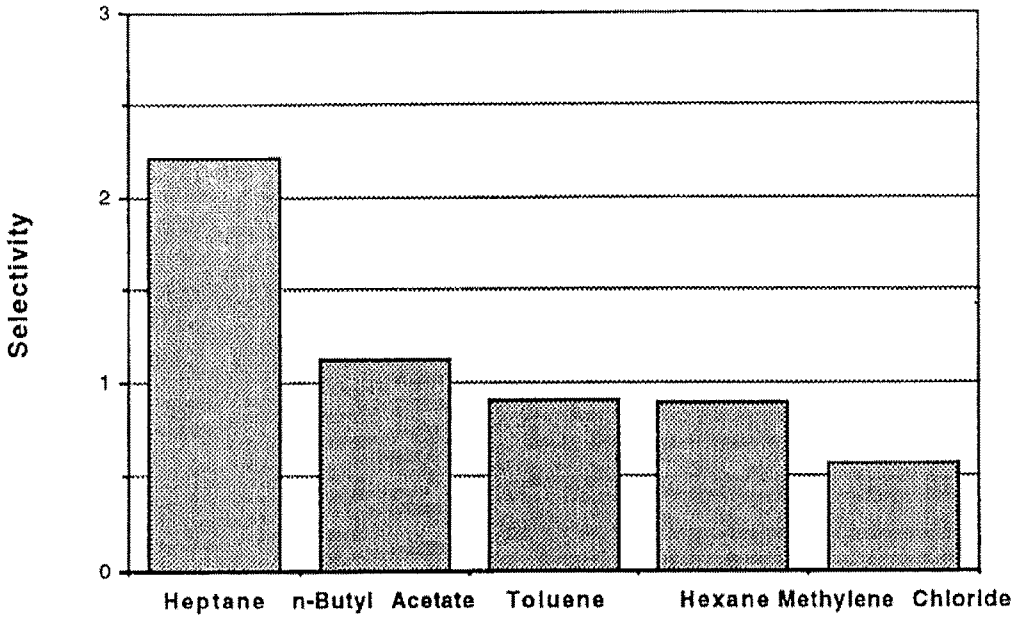


Fig. 2.124. Comparison of selectivity of avermectin B1a to avermectin B1b among various solvents (methanol-water 5:3 aqueous phase)

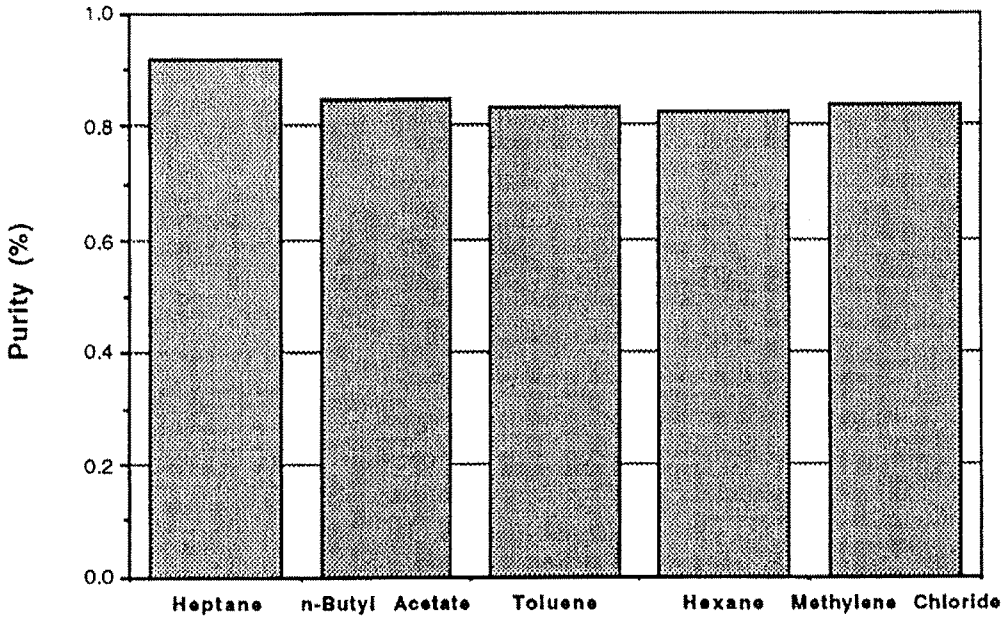


Fig. 2.125. Comparison of purity of avermectin B1a in the solvent phase among various solvents (methanol-water 5:3 aqueous phase)

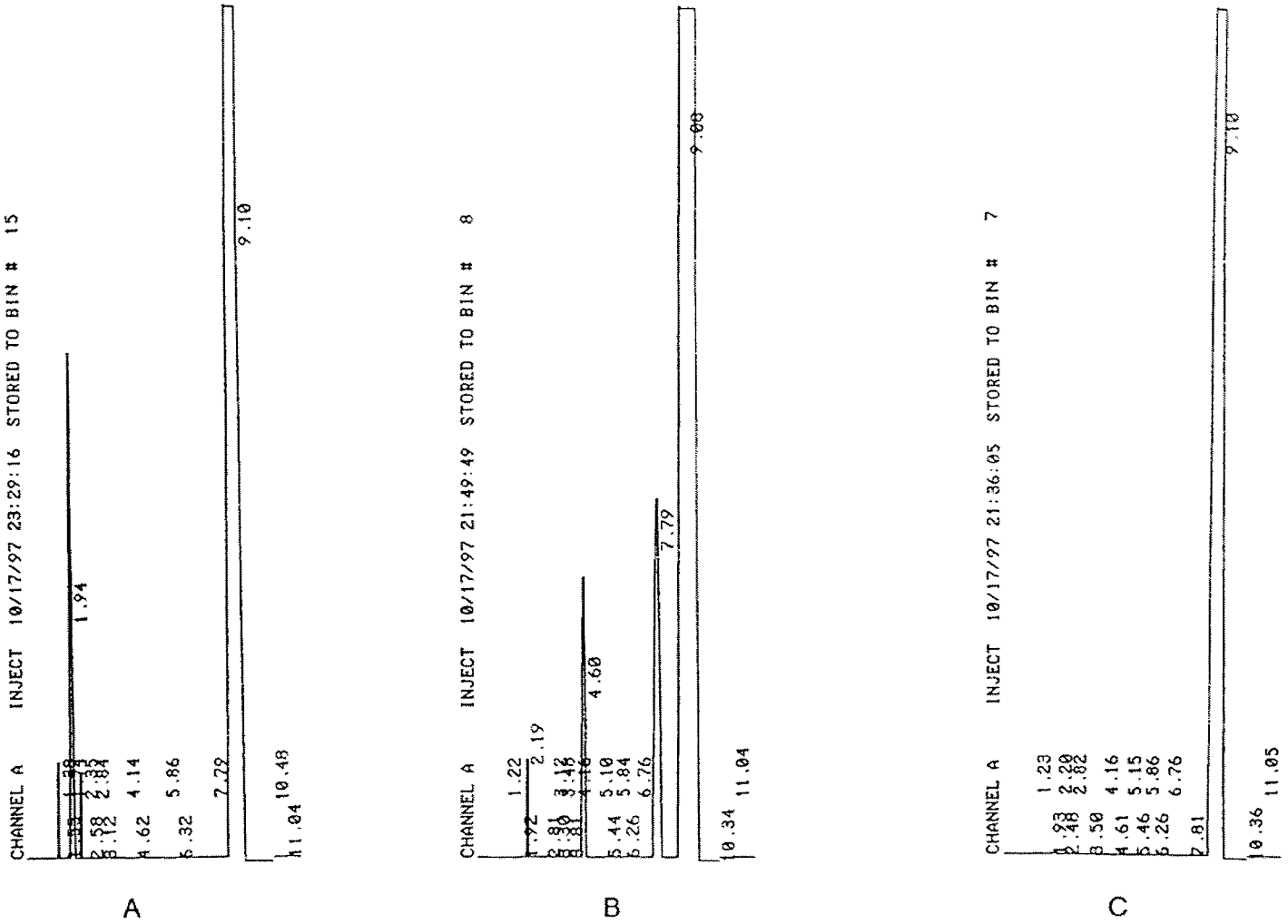


Fig. 2.126. Chromatograms of analytical HPLC of acetone extracts from cells (A) , methylene chroride extracts from 3rd extraction with methanol-water aqueous phase (B), and toluene extracts from 3rd extraction with methanol-water aqueous phase (C).

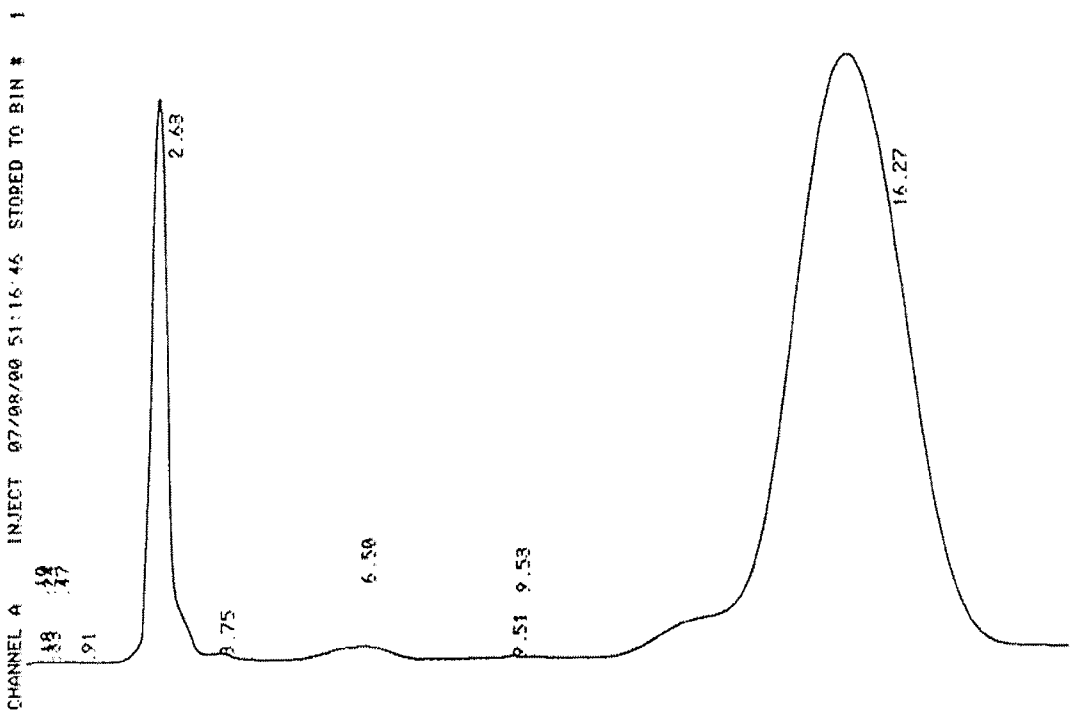


Fig. 2.127. Chromatogram of Preparative HPLC of acetone extracts from cells (Injection volume: 5 ml, Flow rate: 20 ml/min)

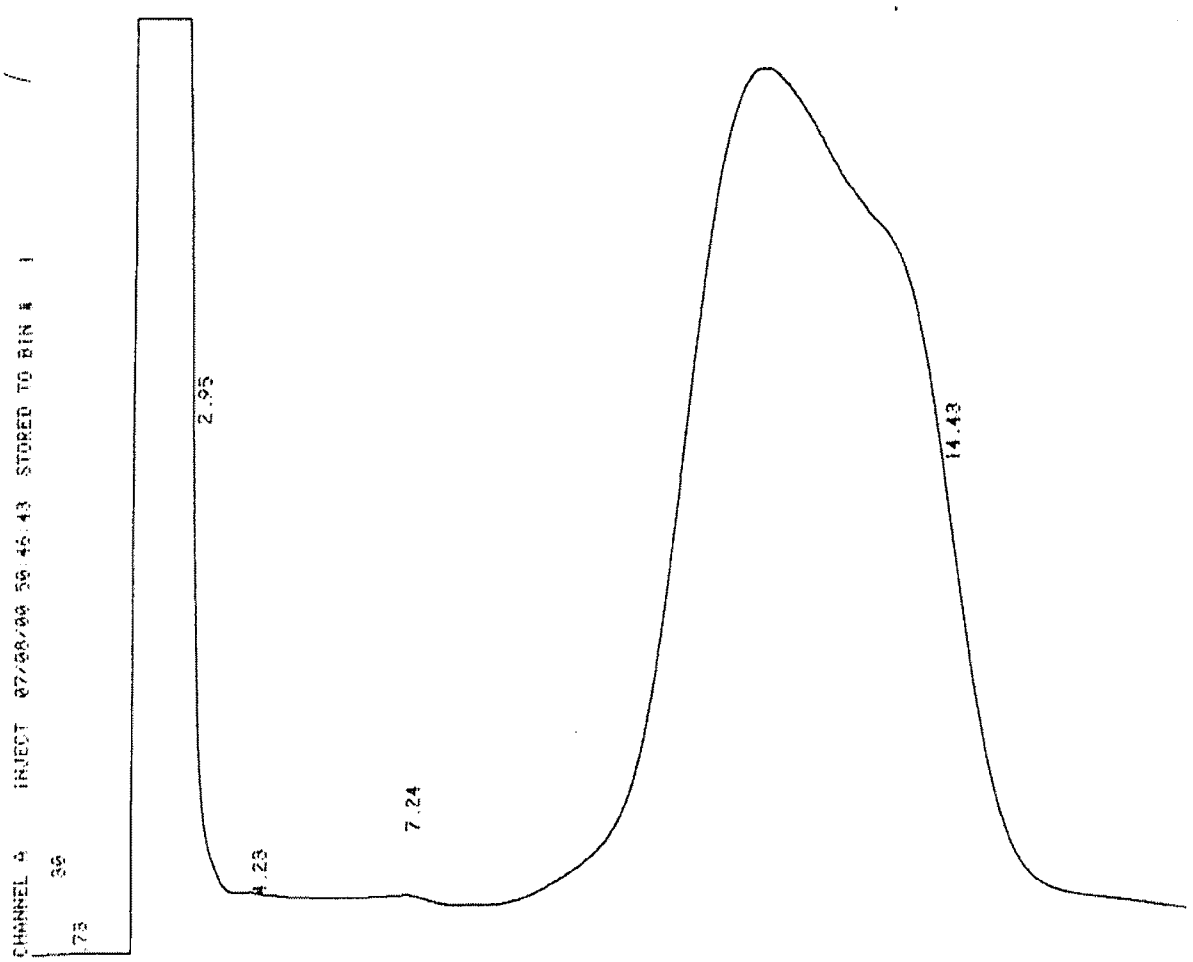


Fig. 2.128. Chromatogram of Preparative HPLC of acetone extracts from cells (Injection volume: 10 ml, Flow rate: 20 ml/min)

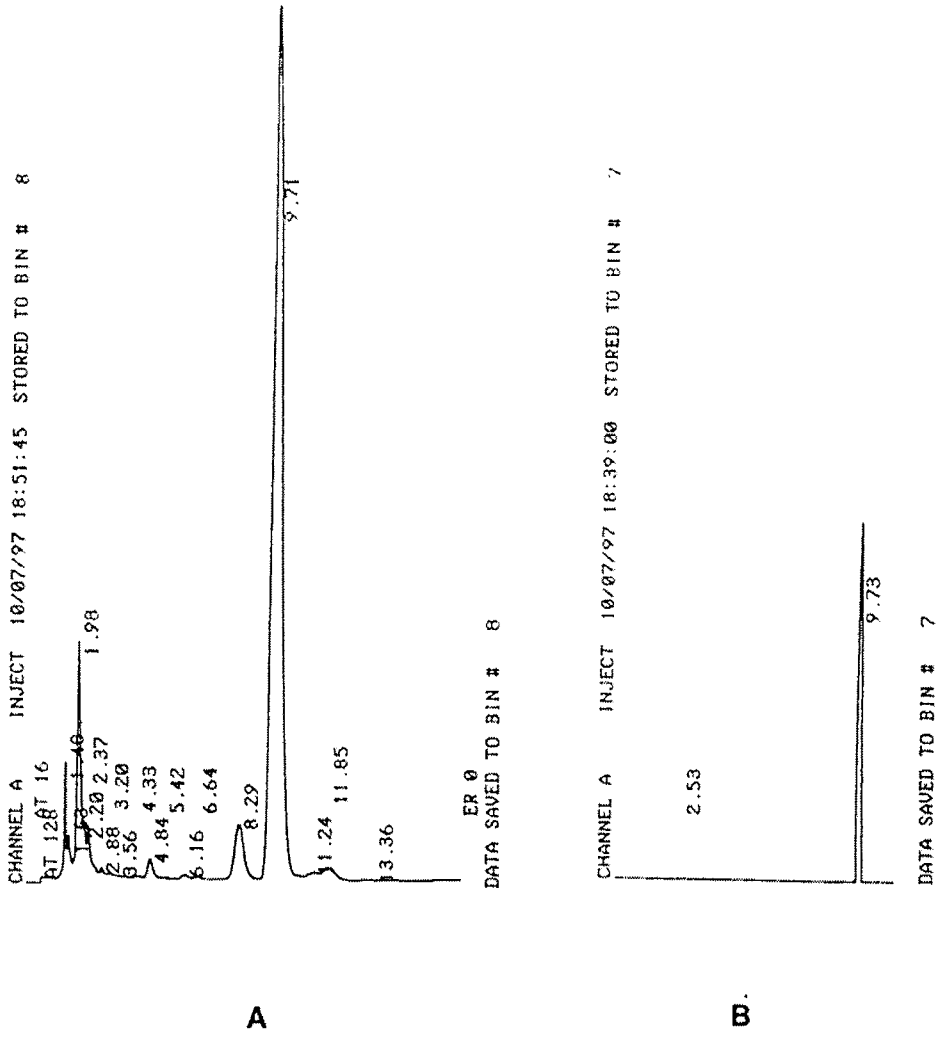


Fig. 2.129. Chromatogram of analytical HPLC of acetone extract from cells (A) and fraction purified by Preparative HPLC(B)

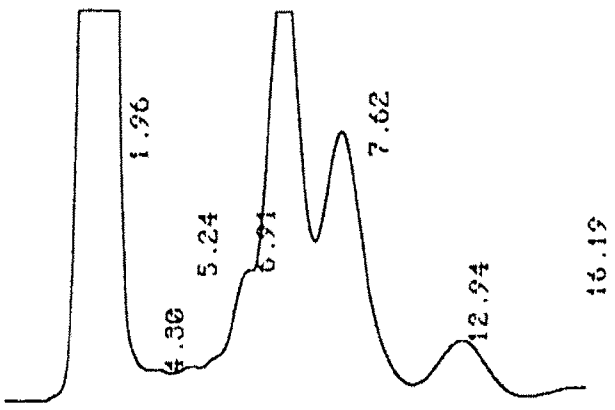


Fig. 2.130. **Preparative HPLC chromatogram of methanol extracts from cells. (Injection volume: 10ml, Flow rate: 20ml/min)**

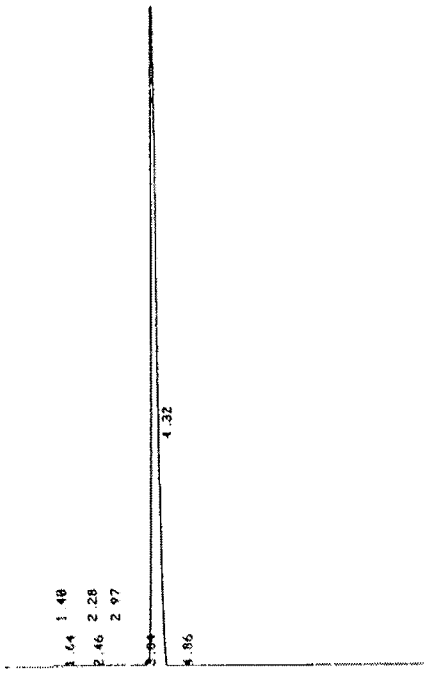


Fig. 2.131. **Chromatogram of analytical HPLC from fraction purified by preparative HPLC**

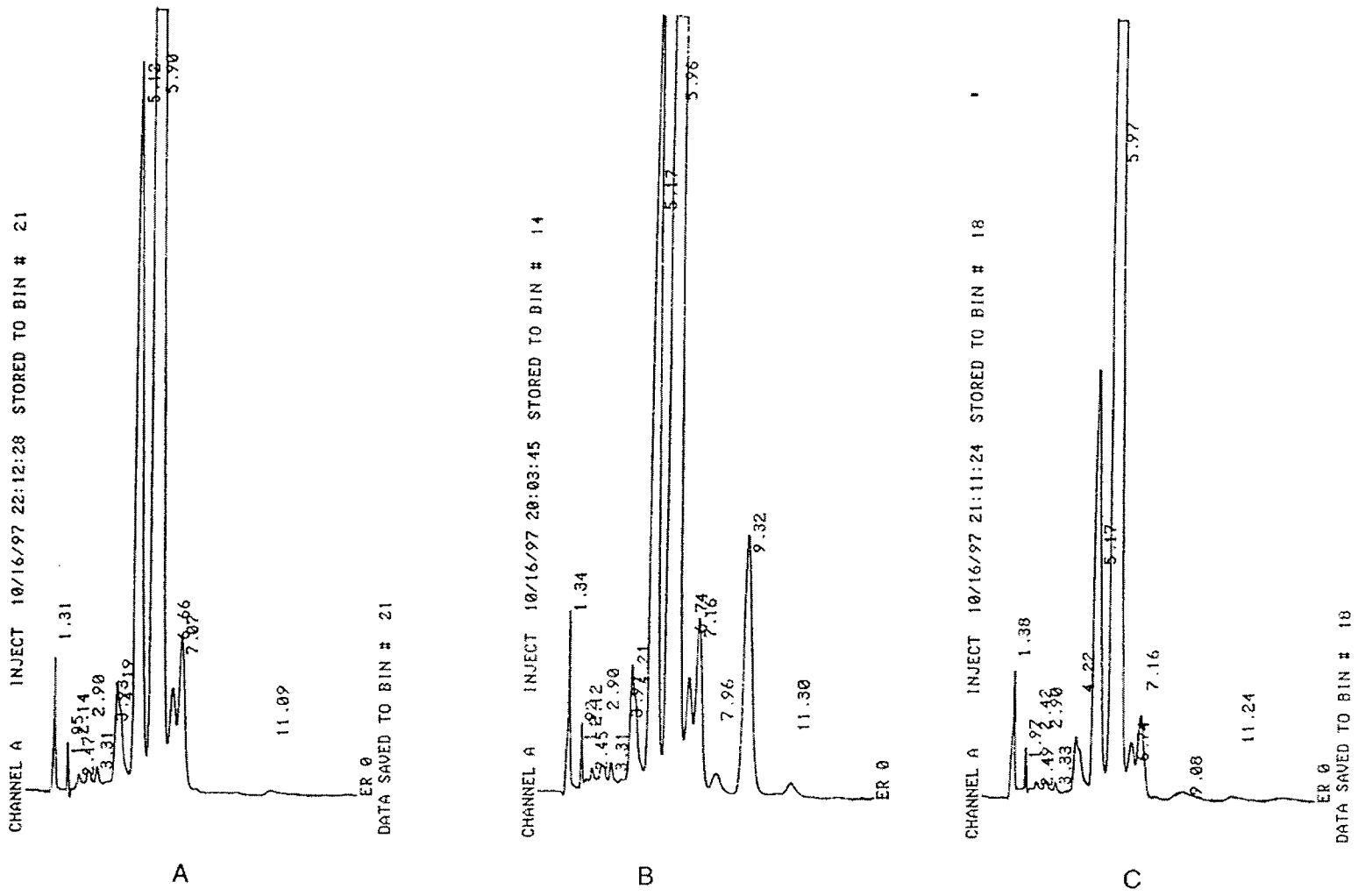


Fig. 2.132. Chromatograms of analytical HPLC of fraction number 74(A), 75(B), 76(C) from Sephadex LH-20 chromatography

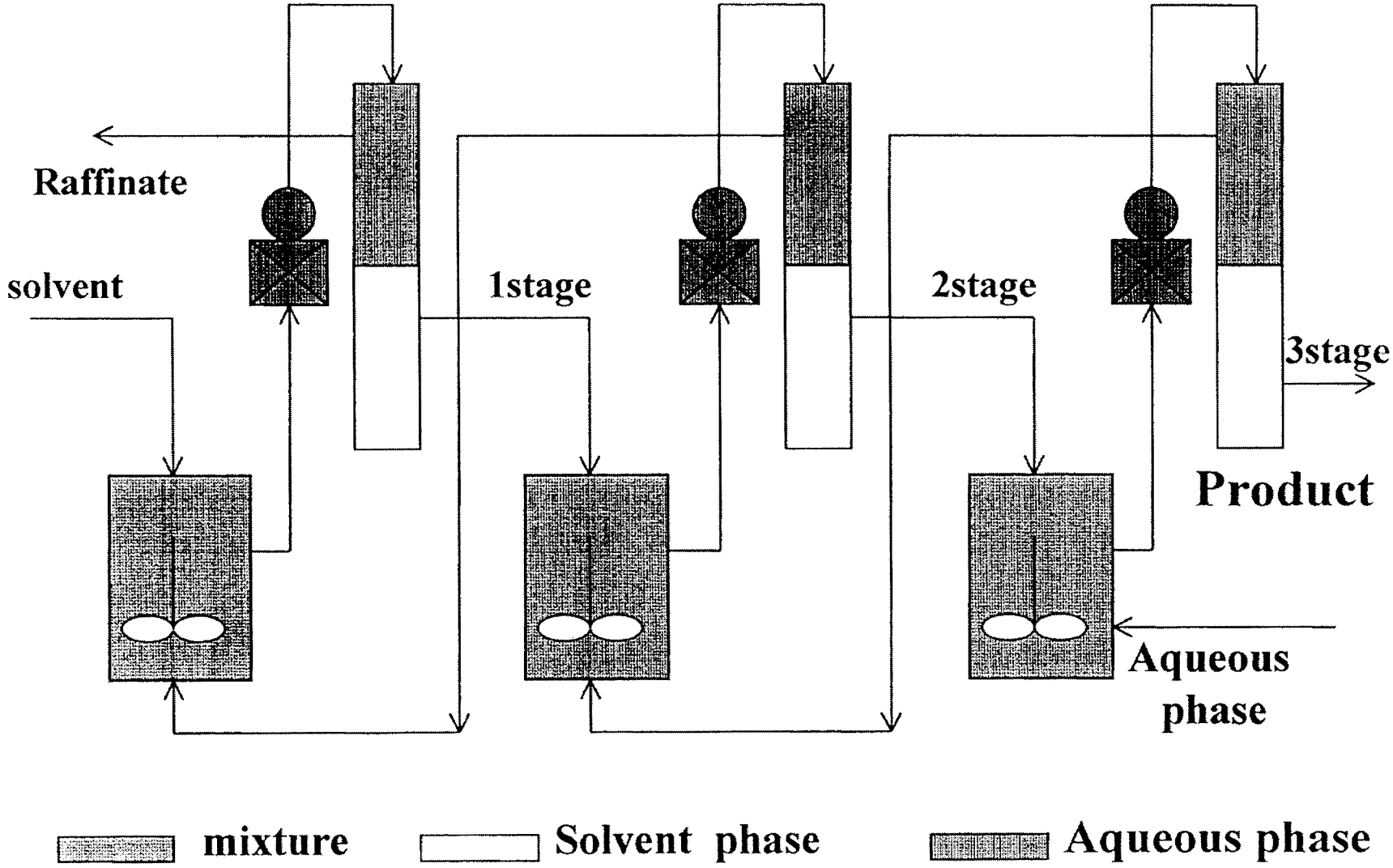


Fig. 2.133. Diagram of multistage countercurrent extraction system

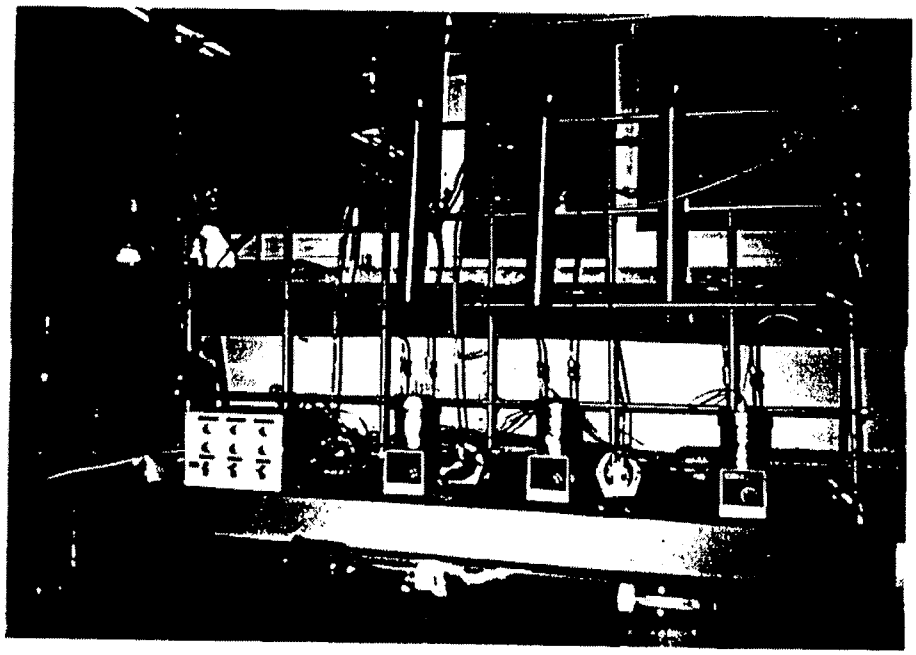


Fig. 2.134. Photography of multistage countercurrent extraction system

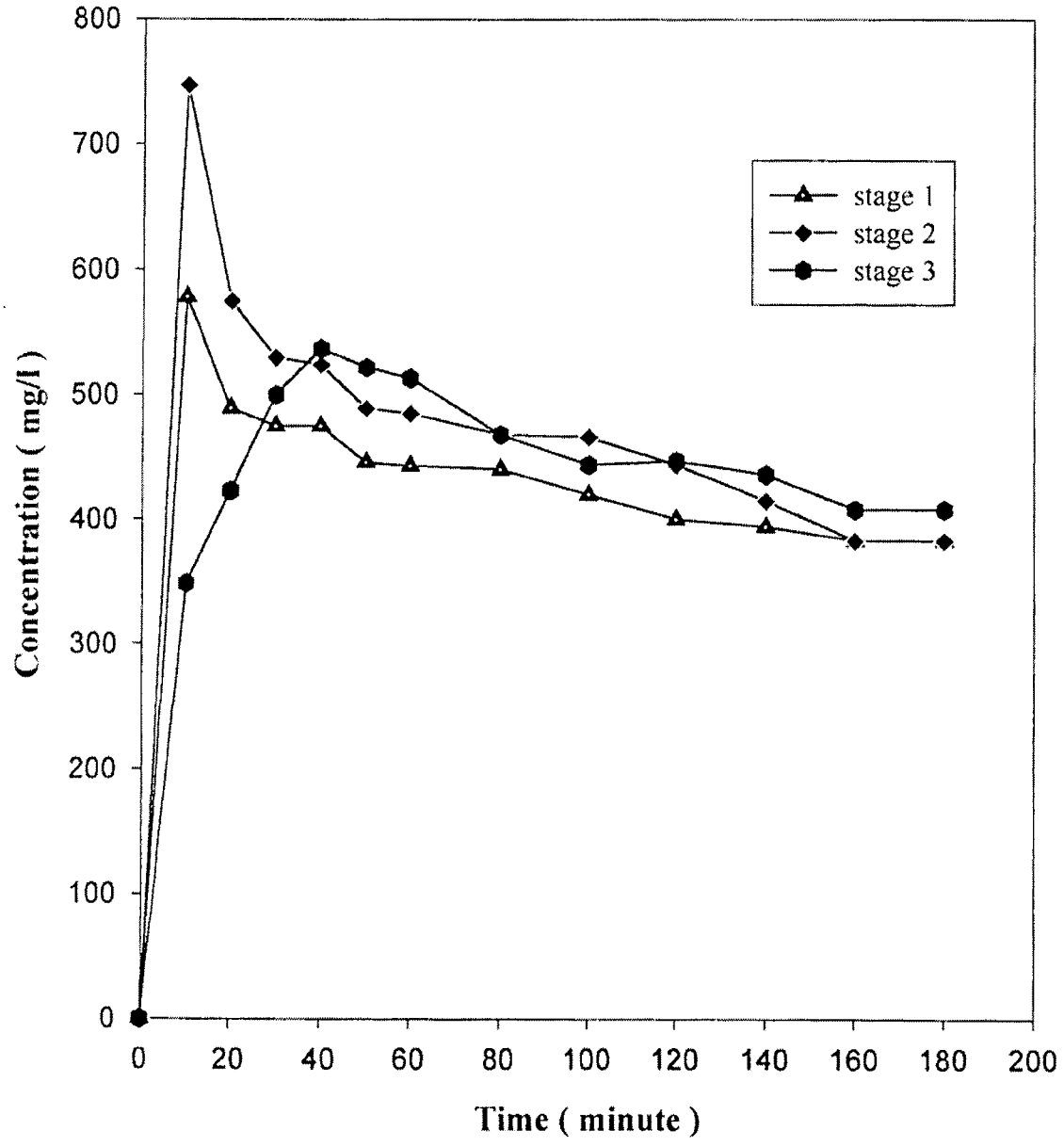


Fig. 2.135. **Time course change of avermectin B1a concentration in each stage. (H=25ml/min, L=50ml/min)**

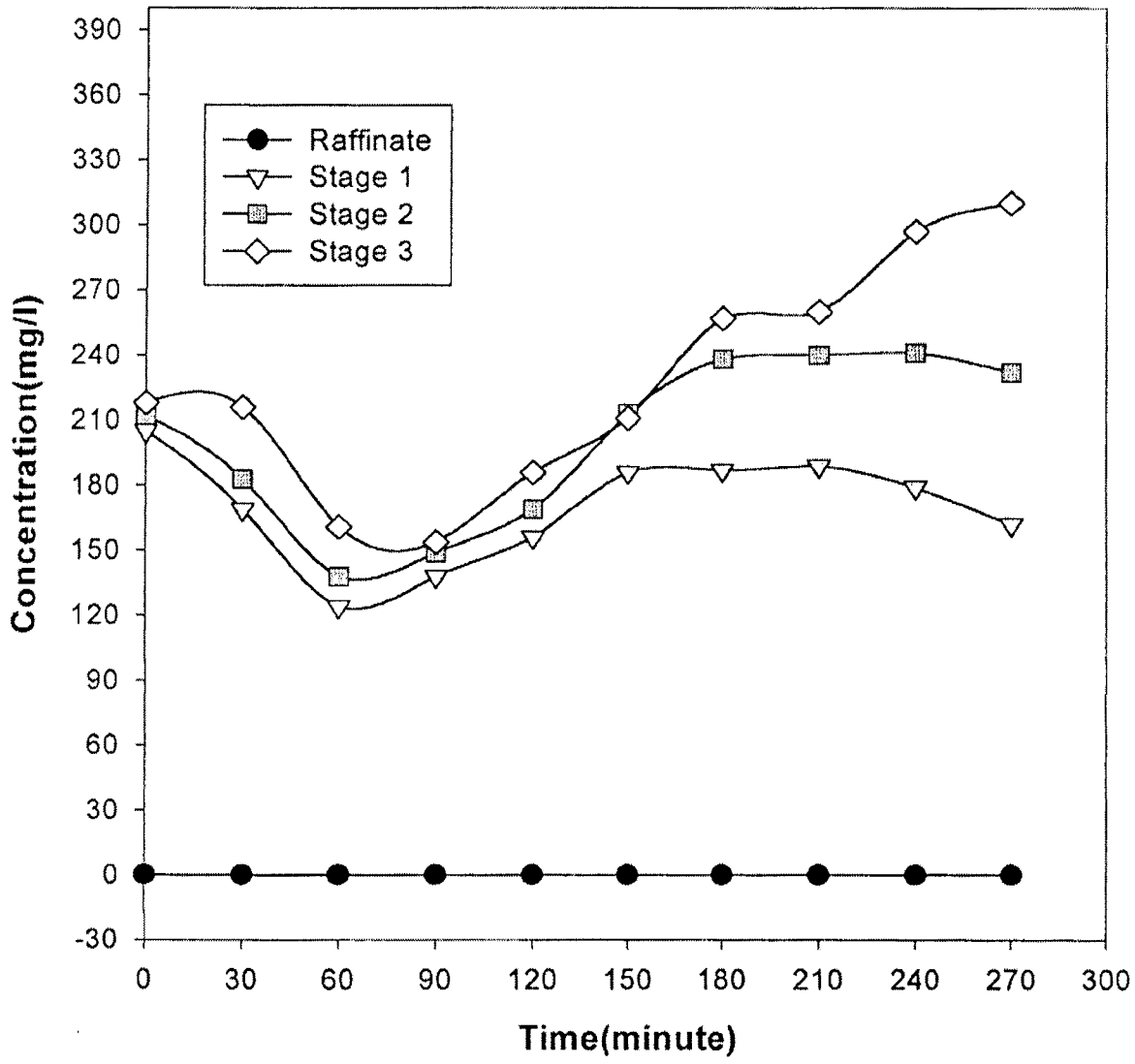


Fig. 2.136. **Time course change of avermectin B1a concentration in each stage. (H=20ml/min, L=20ml/min)**

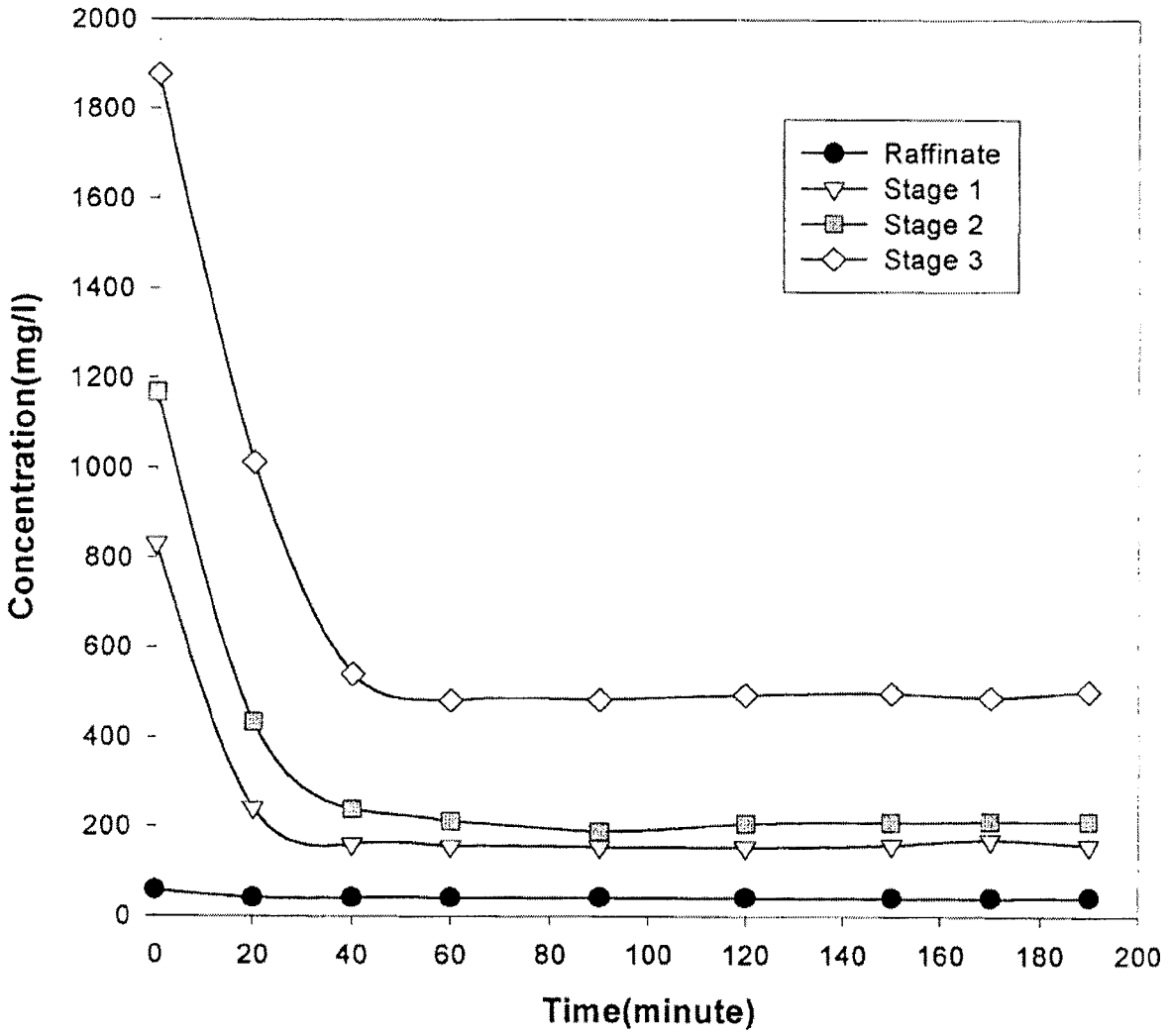


Fig. 2.137. **Time course change of avermectin B1a concentration in each stage. (H=25ml/min, L=50ml/min)**

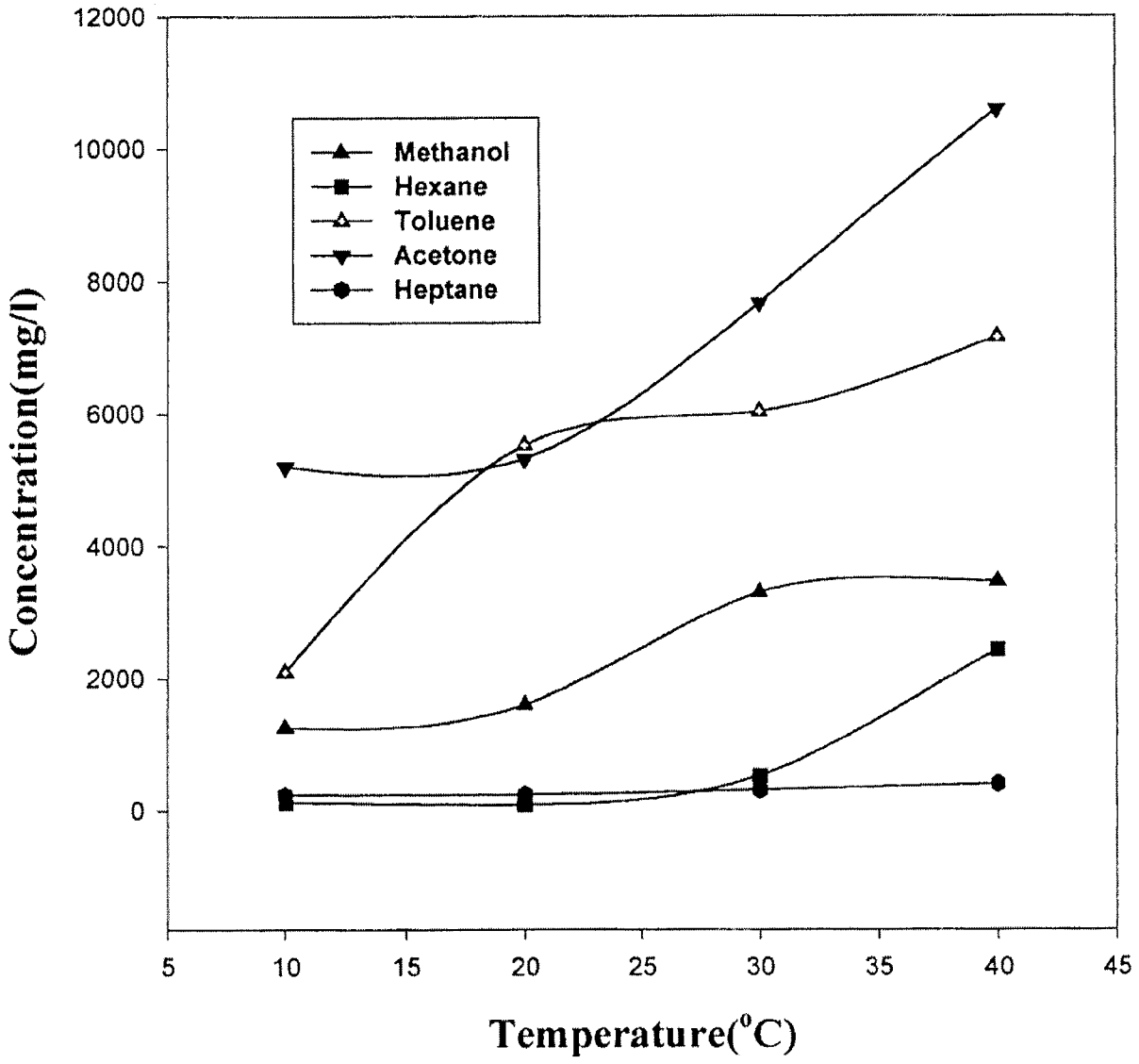


Fig. 2.138. **Saturation curve of various solvents**

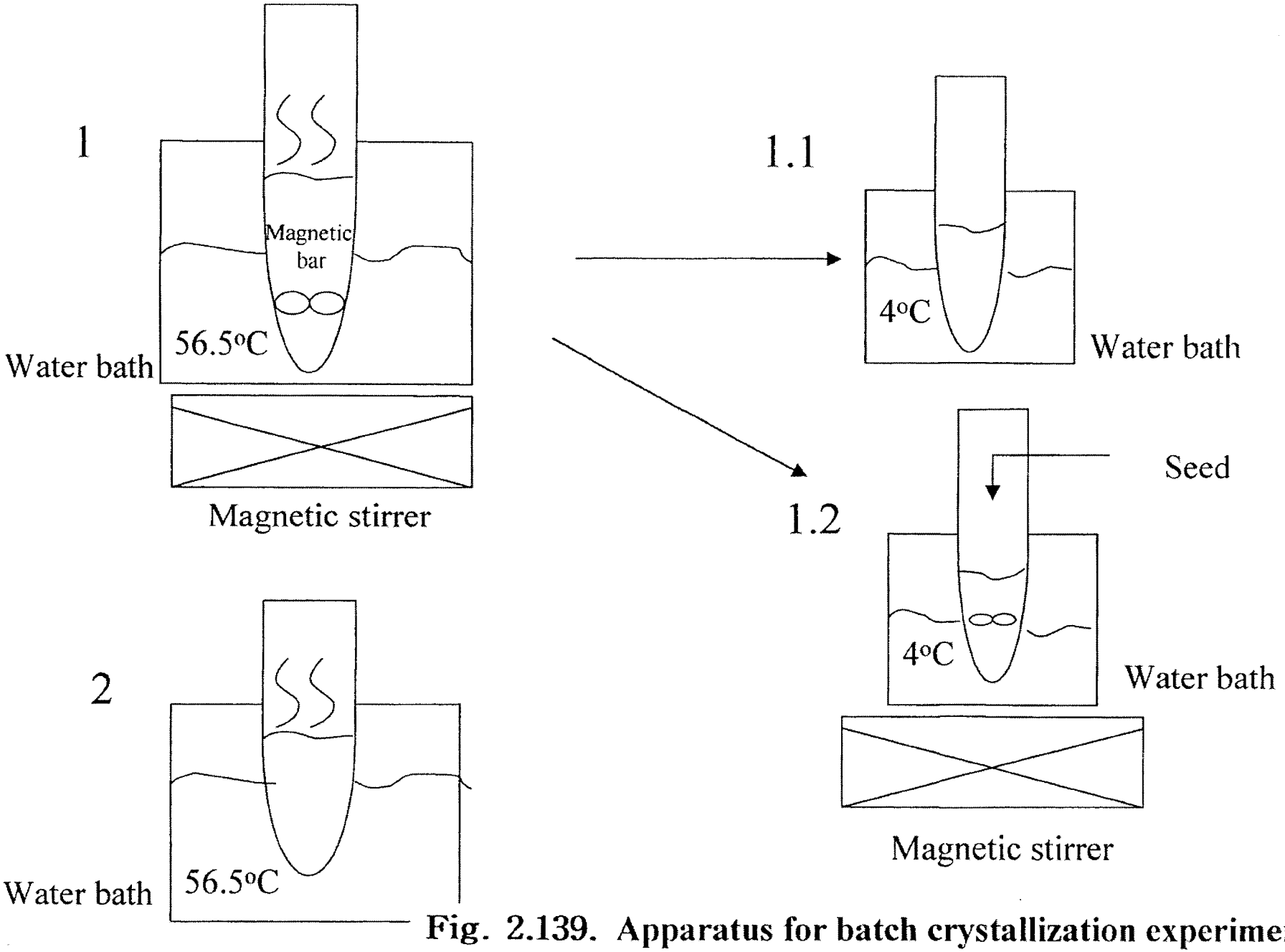


Fig. 2.139. Apparatus for batch crystallization experiment

Fig. 2.140. Microscopic photograph of crystallized avermectin

Fig. 2.141. Microscopic photograph of crystallized avermectin

Fig. 2.142. Microscopic photograph of crystallized avermectin

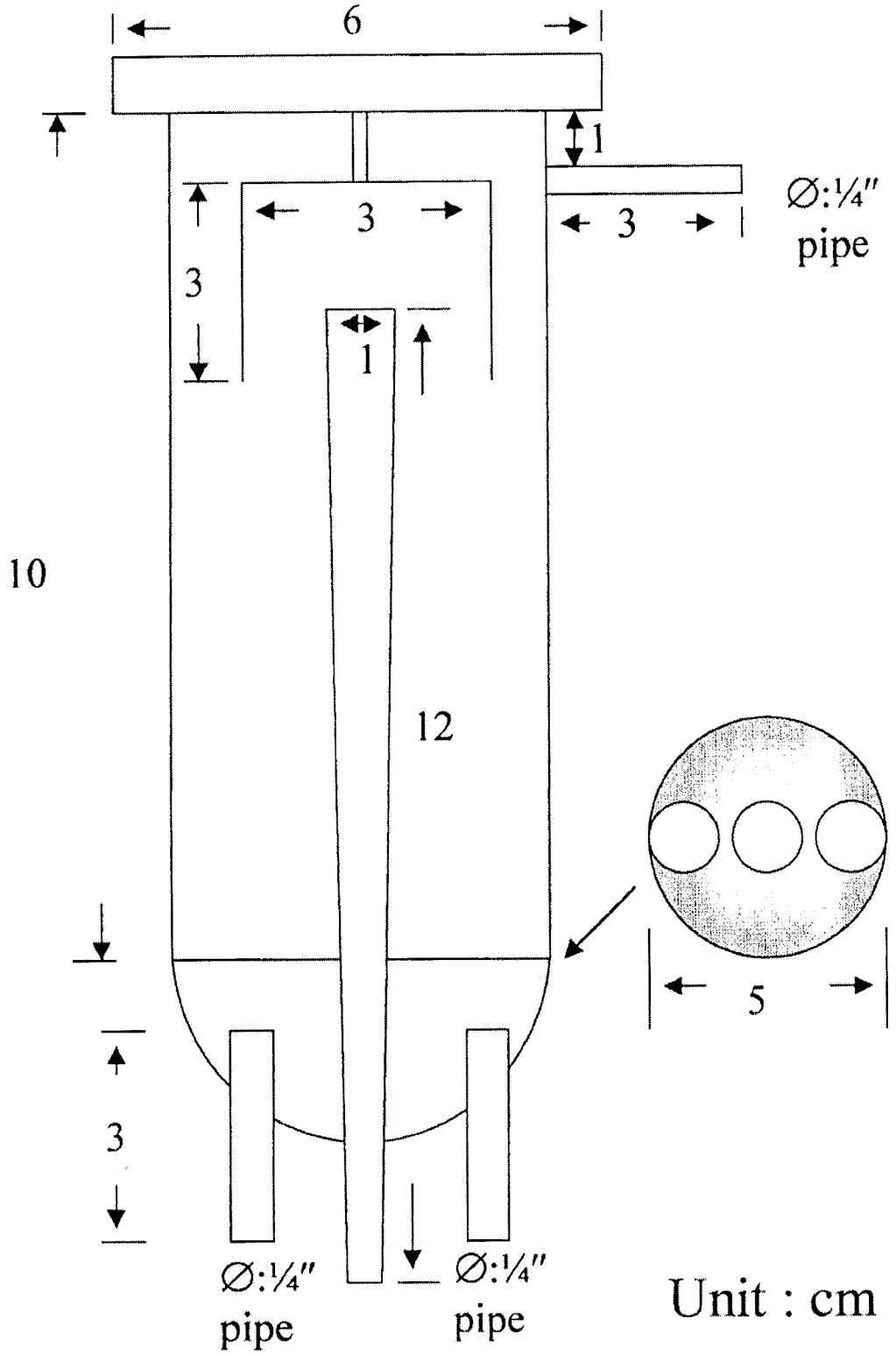


Fig. 2.143. Skeleton diagram of Crystallizer

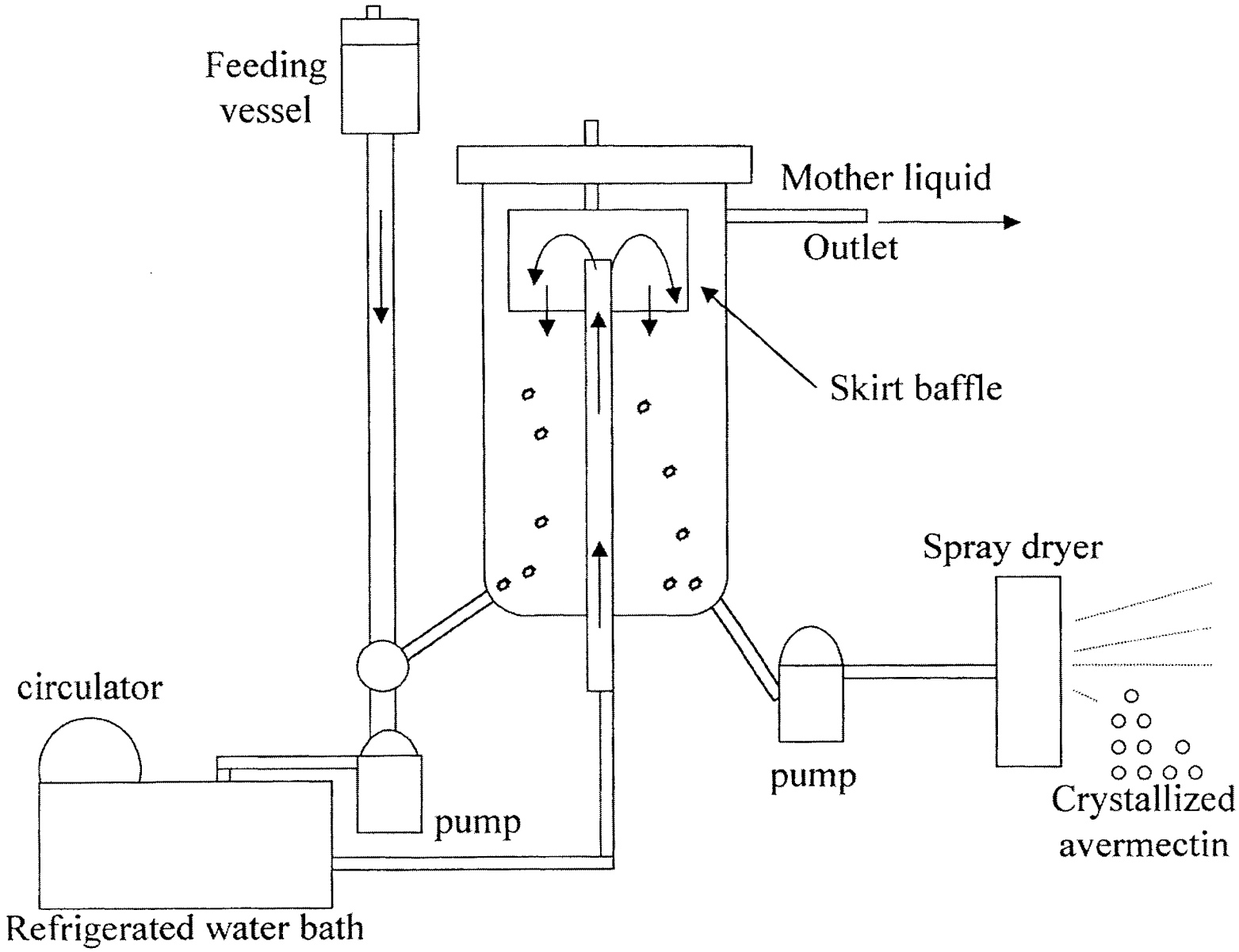


Fig. 2.144. Diagram of continuous crystallization process

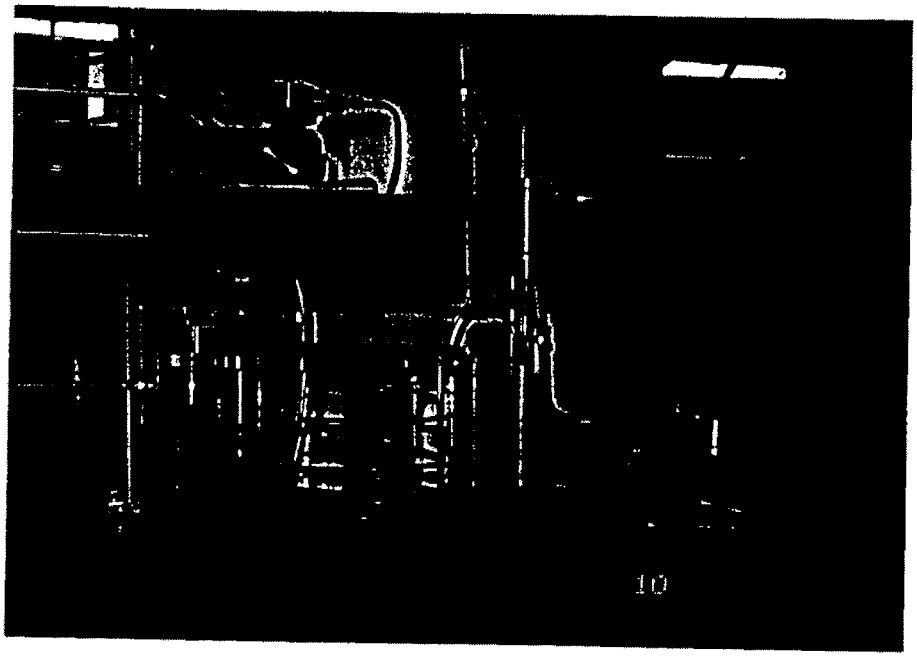


Fig. 2.145. Photograph of continuous crystallization process

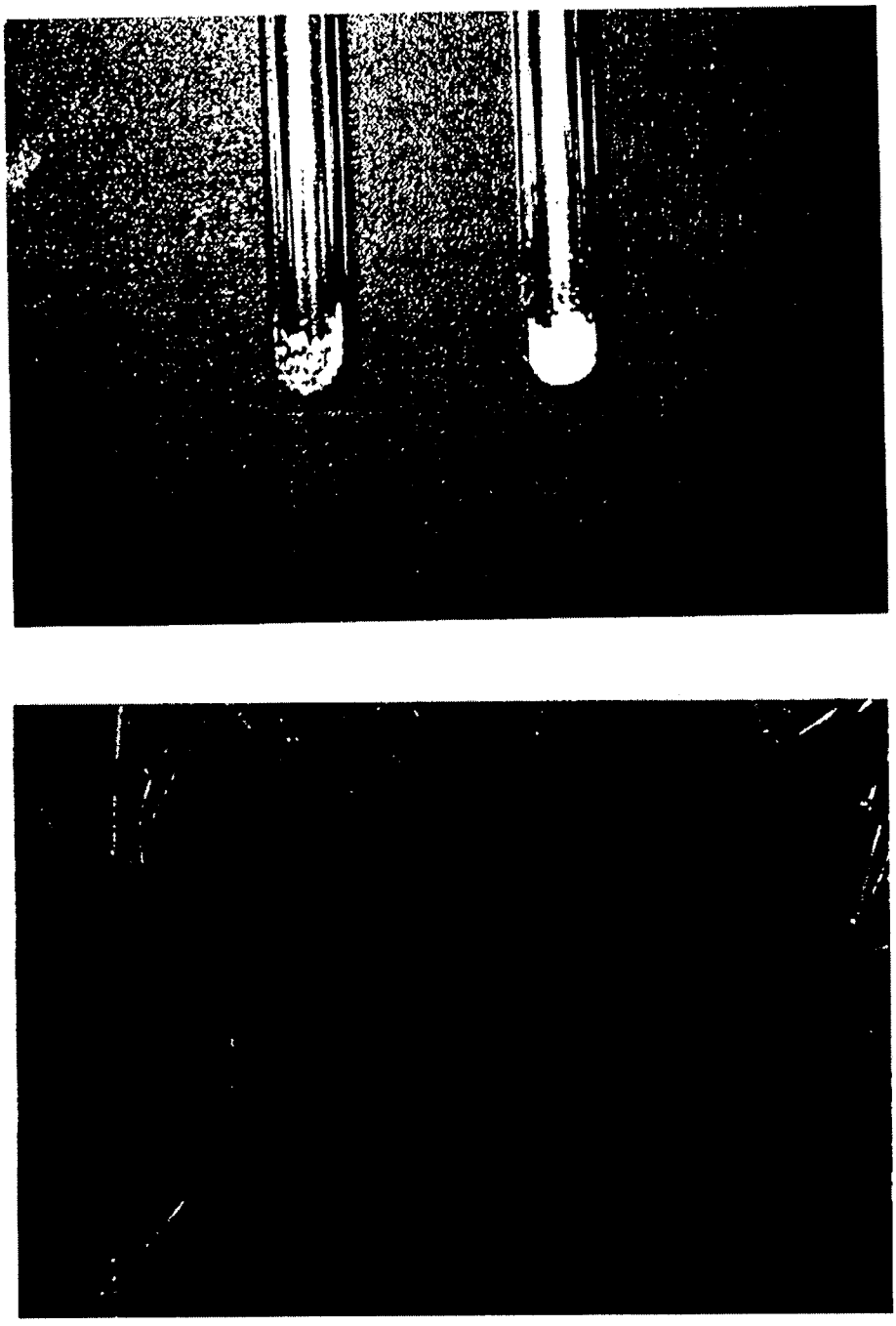


Fig. 2.146. Crystal from continuous crystallization process

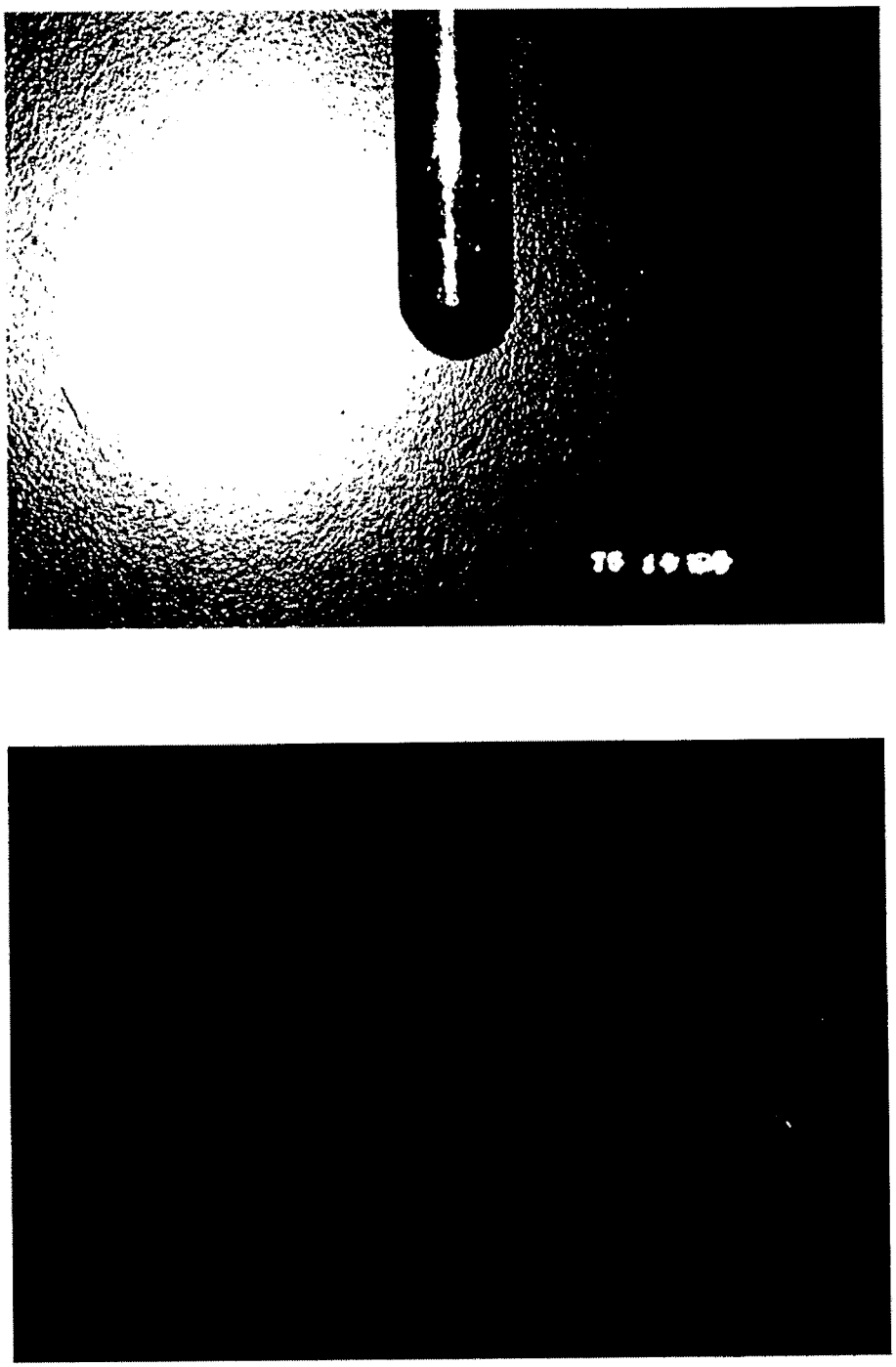


Fig. 2.147. Crystals from cell extracts.

제 3 장. 연구개발 결과의 활용에 대한 건의

제 1 절. 연구원 벤처 창업 또는 기술 양허를 통한 avermectin 생산의 국산화

하기에 첨부된 Table 2.13은 현재까지 발표된 연구논문에서 발췌한 세계 각국의 avermectin 연구그룹의 현황과 그들이 사용한 생산균주 및 avermectin 생산성을 비교한 것이다. 이 Table에 의하면 본 연구그룹에서 균주 개발과 배지 최적화 및 배양조건 최적화를 통하여 얻은 avermectin 생산성은 지금까지 발표된 자료 중에 가장 높다는 것을 알 수 있다. 한편 avermectin의 대량생산을 위한 대량배양공정 기술과 대량 분리정제 공정기술의 중요한 기반 기술이 대부분 완성되어 있기 때문에 앞으로 pilot plant scale의 검증만 거친다면 쉽게 실용화할 수 있는 상태에 있다.

따라서 본 연구과제에서 개발한 균주와 배지 최적화 등 대량 배양 기술, 분리정제 기술을 바탕으로 scale-up 기술에 대한 추가적 연구를 통해 avermectin 생산을 산업화할 경우 세계 시장과도 경쟁할 수 있을 정도로 사업성이 우수할 것으로 판단된다. 이 기술을 바탕으로 벤처기업을 창업하거나 avermectin에 관심이 있는 국내 제약회사에 기술을 양도하여 국내 기술의 힘만으로 avermectin 생산의 국산화를 이룩함으로써 국가경제에 이바지할 수 있을 것이다.

특히 벤처기업을 창업할 경우, 본 연구원들이 깊이 관계하고 있는 춘천시의 생물벤처산업지원센터에 입주하여 공동 생산장비인 pilot plant를 이용한 scale-up 연구 및 생산관련 연구를 완성한 후 사업화함으로써 본 기술을 적극 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

제 2 절. 연구원 벤처 창업 또는 기술 양허를 위한 건의

앞서 언급하였듯이 본 기술개발을 통하여 경쟁력있는 고생산성 균주가 개발되었고 대량생산에 필요한 대부분의 기반 기술이 확립되었으며 scale-up parameter들이 대부분 도출되어 실용화할 수 있는 목전에 와 있는 상태이다.

그러나 이러한 대량생산 기술과 scale-up parameter들도 pilot scale의 검증을 거치지 않으면 실용화하기 어려우므로 pilot scale의 연구가 최종적으로 필요하다. 즉 지금까지 축적된 기술이 사업화로 열매맺기 위해서는 pilot scale의 연구를 반드시 거쳐야 하며 그렇지 않을 경우 어렵게 개발된 기술이 사장될 가능성이 높다.

본 연구는 원래 4년으로 계획되어 있어 pilot scale 연구가 일부 포함되어 있었으나 2차 연도에 총 연구기간이 3년으로 축소 조정되어 pilot scale 연구가 불가능하게 되었다. 하지만 현재까지의 연구 결과 산업화 가능성이 확인되었으므로, 지금까지 축적된 기술을 사업화로 연결할 수 있는 pilot scale 연구를 위한 농림기술개발사업의 추가적 지원에 대한 방안이 마련되기를 희망한다.

Table 2.13. Summary of the data published until now in the world-wide journals for avermectin concentration produced through fermentations of various strains of *Streptomyces avermitilis*

Research Group	Producer Microorganism Type	Avermectin Concentration (mg/L)	Remarks	Published Journal
R.W. Burg *et al.*	selection of high producer, NRRL 8165 (MA 4680)	30	sum of (B1a+B1b)	Antimicrob. Agents Chemother. 15, 361-367, 1979
		125	tAVMS*	
	selection of high producer, ATCC 31271 (MA 4848)	170	sum of (B1a+B1b)	
		485	tAVMS*	
H. Ikeda *et al.*	mutant, K 139	620	tAVMS*	Antimicrob. Agents Chemother. 32, 282-284, 1988
	mutant, K 75	2000	tAVMS*	
E. Cimburkova *et al.*	mutant of ATCC 31267	208	tAVMS*	J. Basic Microbiol. 28, 491-499, 1988
		38	B1a only	
Curdova *et al.*	mutant of ATCC 31267	40	B1a only	J. Basic Microbiol. 29, 341-346, 1989
Novak *et al.*	mutant of ATCC 31267	155	tAVMS*	FEMS Microbiol. Letters 70, 291-294, 1990
		150	tAVMS*	Folia Microbiol. 37, 261-266, 1992
		100	tAVMS*	Folia Microbiol. 38, 367-370, 1993
S. Omura *et al.*	mutant, K 2034	200	sum of "B" component = (B1a+B1b+B2a+B2b)	J. of Antibiotics 44, 560-563, 1991
	mutant, K 2021	1000	sum of "A" component = (A1a+A1b+A2a+A2b)	
	recombinant, K 2038	200	tAVMS*	
Rezanka *et al.*	mutant of ATCC 31267	630	tAVMS*	FEMS Microbiol. Letters 96, 31-36, 1992
농특첨단 연구그룹 (강원대학교 주관)	**고생산 변이주, APPL-500**	**862**	**B1a only**	**고생산균주 선별, 최적 성장배지 및 생산배지 사용, 2.5 리터 생물반응기 운전전략 및 배양조건 확립**
		2730	**tAVMS***	

***tAVMS** = sum of total 8 avermectins = (A1a + A1b + B1a + B1b + A2a + A2b + B2a + B2b)

제 3 절. 개발된 세부 기술 활용 방안

1. 고생산성 균주 개발 기술

본 연구를 통해 얻어진, *C. elegans*를 이용한 avermectin 검출 system은 앞으로 avermectin의 산업적 생산화에서 유용한 균주 screening 수단으로 기여하게 될 것이며 돌연변이 유발 조건 및 *Streptomyces* 유전자 조작 기술은 차원 높은 고생산 변이주의 유도를 위해 활용될 수 있을 것이다.

2. 발효기술 및 대량 배양 기술

본 연구를 통해 배지 및 배양조건 최적화 및 균주 개량에 의해 상기의 Table 2.13에 요약한 바와 같이 높은 avermectin 생산성을 얻을 수 있었다. 이러한 높은 생산성은 avermectin 사업화 추진에 가장 강력한 동기를 부여하고 있다. 또한 생물반응기 운전 전략 및 배양 조건의 최적화 등이 이루어 졌으므로, 축적된 know-how는 scale-up된 avermectin 생산공정에 쉽사리 적용될 수 있다. 한편 발효공정 scale-up 시 대형화 기준으로 사용되나 그 적용이 매우 까다로운 부피물질전달계수 측정에 대한 연구방법이 확립되었으며, 측정된 부피물질전달계수는 발효조의 부피 당 동력 및 발효조 크기를 산출하는데 유용하게 활용될 수 있다. 또한 임펠러의 종류에 따른 부피물질전달계수를 측정함으로써 *Streptomyces* 기원 미생물 발효 시 요구되는 산소요구량을 만족시킬 수 있는 최적의 임펠러에 관한 사양을 제시할 수 있다.

3. 대량 분리정제 기술

본 연구에서 도출한 settling time은 scale up된 원심분리기의 선정에 활용될 수 있다. 여과공정에서 도출한 specific cake resistance나 compressibility등은 avermectin 배양액의 filter 설계에 활용할 수 있다. 확립된 avermectin 분석 시스템은 avermectin의 대량 배양공정 뿐만 아니라 avermectin의 분리정제 공정 개발에 기본적으로 활용이 되며 고생산성 균주의 개발에도 활용이 된다. 선정된 최적 용매는 scale-up된 추출장치에 여전히 활용할 수 있으며 개발된 연속식 향류 다단 추출장치는 생산성이 기존의 회분식(batch) 추출장치보다 월등히 높아서 avermectin의 scale-up 생산에 활용할 수 있을 뿐만 아니라 다른 항생제의 추출에도 이용될 수 있다. 개발된 preparative HPLC공정 역시 처리량은 낮으나 높은 순도의 avermectin을 얻을 수 있어서 scale-up후에 실제 생산에 활용할 수 있고 마찬가지로 다른 항생제의 추출에도 이용될 수 있다. 여러 용매에서의 온도에 따른 avermectin의 상평형을 기반으로 개발한 연속식 crystallizer도 seed가 필요 없고 batch crystallizer보다 생산성이 우수하여 scale-up후에 실제 avermectin의 생산에 활용할 수 있고 연속식 추출장치와 마찬가지로 다른 항생제의 추출에도 이용될 수 있다.

제 4 장. 참 고 문 헌

Avermectin 생산 변이주 유도 및 분리

Ikeda, H. I., C. H. Pang, and H. Endo, 1995. Construction of a single Component Producer from the Wild Type Avermectin Producer *Streptomyces avermitilis*. J. Antibio. 48(6):532 534.

Ikeda, H., and S. Omura, 1995. Control of Avermectin Biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* for the selective Production of a Useful Component. J. Antibio. 48(7): 549 562.

Miller, T. W., L. Chaiet, D. J. Cole, L. J. Cole, 1979. Avermectin, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Isolation and Chromatographic Properties. AAC. 15(3): 638 371.

Pang, C. H., K. Matsuzaki, H. Ikeda, H. Tanaka, and S. Omura, 1995. Production of 6,8a-Seco-6,8a-deoxy Derivative of the Avermectins by a Mutant Strain of *Streptomyces avermitilis*. J. Antibio. 48(1): 59 66.

Bazzicalupo, P., 1983. *Caenorhabditis elegans*: A Model System for the study of Nematode. ed. Academic Press Inc, London.

Burg, R. W., B. M. Miller, E. E. Baker, J. Birnbaum, 1979. Avermectin, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. AAC. 15(3): 361 367.

Denoya, C. D., R. W. Fedechko, E. W. Hafner, H. I. Mcarthur, 1995. A Second Branched-Chain α-Keto Acid Dehydrogenase Gene Cluster(*bkdFGH*) from *Streptomyces avermitilis*: Its Relationship Its Avermectin Biosythesis and the Construction of a *bkdF* Suitable for the Production of Novel Antiparasitic Avermectins. J. Bactriol.177(12): 3504 3511.

Ikeda, H. I., Y. Takada, C. H. Pang, H. Tanaka, and S. Omura, 1993. Transposon Mutagenesis by Tn4560 and Applications with Avermectin-Producing *Streptomyces avermitilis*. J. Bactriol. 175(7): 2077 2082.

Novak, J., and Z. Vanek, 1992. Screening for a New Generation of Anthelminthic Compounds. *In Vitro* Selection of the Nematode *Caenorhabditis elegans* for Ivermectin Resistance. Folia Microbiol. 37(2): 237 238.

Simpkin, K. G., and G. C. Coles, 1981. The use of *Caenorhabditis elegans* for Anthleminic Screening. J. Chem. Tech. Biotechnol. 31: 66 69.

Bench-scale에서의 avermectin 발효 공정 최적화, scale-up 연구 및 avermectin 분리 정제 공정 개발

Amanullah, A., L. Serrano-Carreon, B. Castro, E. Galindo, A. W. Nienow. The Influence of Impeller Type in Pilot Scale Xanthan Fermentations. Biotech. and Bioeng., 57, 95-108 (1998).

Baushop, T. and S. R. Elsden, J. Gen. Microbiol., 23, 457 (1960)

Brix, T., S. W. Drew, and B. C. Buckland, in Computers in Fermantation Tachnology, M. E. Bushell, Ed. Elsevier Science, 1988.

Buckland, B. C., Bio/Technology, 2, 875 (1984)

Buckland, B., T. Brix, H. Fastert, K. Gebewonyo, G. Hunt and D. Jain, Bio/Technology, 3, 982 (1985).

Burg, R. W., B. M. Miller, E. E. Baker, J. Birnbaum, S. A. Currie, R. Hartman, Y-L. Kong, R. L. Monaghan, G. Olson, I. Putter, J. B. Tunac, H. Wallick, E. O. Stapley, R. Öiwa, and S. Ömura. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermantation. Antimicrob. Agents. Chemother., 15, 361-376 (1979)

Campbell, W. C., M. H. Fisher, E. O. Stapley, G. Albers-Schonberg, and T. A. Jacob, Sience, 221, 823 (1983)

Cimburkova, E., J. Zima, J. Novak and Z. Vanek. Nitrogen Regulation of Avermectins Biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* in Chemically Defined Medium. J. Basic. Microbiol., 28, 491-499 (1988).

Cooke, M. and J. C. Middleton. Mixing and Mass Transfer in Filamentous Fermentations, In Proceedings of the 2nd International conference on Bioreactor Fluid Dynamics,(R. King, ed.), pp37-64, Elservier, London, 1988.

Curdova, E., V. Jechova, J. Zima and J. Novak. The Effect of Inorganic phosphate on the Production of Avermectin in *Streptomyces avermitilis*. J. Basic. Microbiol., 29, 341-346 (1989).

Egerton, J. R., D. A. Ostlind, L. S. Blair, C. Campbell. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the B1a component. Antimicrob. Agents Chamother., 15, 372-376 (1979).

Gbewonyo, K., D. DiMasi, and B. C. Buckland, in Bioreactor Fluid Dynamics (BHRA, Cranfield, England), p. 281, 1986.

Gbewonyo, K., D. Jain, G. Hunt, S. W. Drew, and Buckland. Biotechnology and Bioeng., 34, 234-241 (1989).

Ikeda, H. I., Y. Takada, C. H. Pang, H. Tanaka and S. Omura. Transposon Mutagenesis by Tn4560 and Applications with Avermectin-Producing *Streptomyces avermitilis*. J. Bactriol. 175, 2077 2082 (1993).

Ikeda, H., H. Kotaki., H. Tanaka and S. Omura. Involvement of Glucose Catabolism in Avermectin Production by *Streptomyces avermitilis*. Antimicrob. Agents. Chemother., 32, 282-284 (1988).

Jüsten, P., G. C. Paul, A. W. Nienow and C. R. Thomas. Dependence of Mycelial Morphology on Impeller Type and Agitation Intensity. Biotech. and Bioeng., 52, 672-684 (1996).

Jüsten, P., G. C. Paul, A. W. Nienow and C. R. Thomas. Dependence of *Penicillium chrysogenum* Growth, Morphology, Vacuolation and Productivity in Fed-Batch Fermentations on Impeller Type and Agitation Intensity. Biotech. and Bioeng., 59, 762-775 (1998).

Kuenzi, M. T., in Antibiotics and other Secondary Metabolites. Biosysthesis and Production. Fed European Microbiological Society Symposium(FEMS)R. Hitter, T. Leisinger, J. Niresih, and W. Wehrli, Eds. Academic, New York, 1978.

Miller, T. W., Louis chaiet., 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. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties. Antimicrob. Agents Chamother., 638-371 (1979).

Mou, D. G. and C. L. Cooney. Biotechnol. Bioeng., 25, 225 (1983).

Nienow, A. W. Agitators for mycelial fermentations. TIBTECH, 8, 224-233 (1990).

Novak, J., T. Rezanka, T. Koza and Z. Vanek. Biosynthesis of Avermectins and Lipids in *Streptomyces avermitilis*. FEMS Microbiol. letters. 70, 291-294 (1990).

Novak, J., E. Curdova, V. Jechova, E. Cimburkova and Z. Vanek. Enzymes of ammonium assimilation in *Streptomyces avermitilis*. Folia Microbiol. 37, 261-266, (1992).

Novak, J., M. Beran, J. Nemecek, V. Prikrylova, and P. Hajek. Production of Avermectin A2a and Monoglycosides A2a and B2a by a Strain of *Streptomyces avermitilis*. Folia Microbiol. 38, 367-370 (1993).

Omura, S., H. Ikeda, and H. Tanaka. Selective Production of Specific Components of Avermectins. 44, 560-563 (1991).

Raposo, S., Pires, T., Lima-Costak, E. Oxygen Transfer Rates in a Stirred Bioreactor Using Butyric Acid As Oxygen-vector, 8th European Congress on Biotechology on Biotechnology(Organized by the Hungarian Biochemical Society and the Working Party on Bioengineering of the Hungarian Academy of Sciences eds.), pp.267, Budapest 17-21 August 1997.

Rezanka, T., H. Mikova, and M. Jurkova. Influence of Inhibitors of Lipid Biosynthesis on the Production of Avermectins in *Streptomyces avermitilis*. FEMS Microbiol. letters. 96, 31-36 (1992).

Ryu, D. Y. and A. E. Humphrey. A Reassessment of Oxygen-Transfer Rates in Antibiotics Fermentations. J. Ferment. Technol., 50, 424-431 (1972).

Stanbury, P. F. and A. Whitaker. *In* Principles of Fermentation Technology, 2nd ed., pp 167-214, Pergamon Press, 1995.

Stouthamer, A. H. and H. W. Van Versevsld, in Comprehensive Biotechnology, Vol. 1, A. T. Bull, Ed, Pergamon, Elmsford, NY, p.215, 1985.

Tuffile, C. M. and F. Pinho. Determination of oxygen-transfer coefficients in viscous *Streptomycete* fermentations. Biotech. Bioeng., 12, 849-871 (1970).

Wang, D. I. C., Charles L. cooney, Arnold L. Demain, Peter Dunnill, Arthur E. Humphrey, Malcoln D. Lilly. In Fermentation and Enzyme Technology, pp.173-274, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, 1979.

Wang, S.-J. and J. -J. Zhong. Comparison of O2 transfer characteristics between a new centrifugal impeller and a flat-bladed turbine impeller. Biotechnology Techniques, 11, 763-767 (1997).

Yano, T., H. Mori, T. Kobayashi and S. Shimizu. Control systems for dissolved oxygen concentration in aerobic cultivation. J. Ferment. Technol., 57, 91-98 (1979).

Zabriskie, D. W. and A. E. Humphrey, AICHE, 24, 138 (1978).