

최 종
연구보고서

고기능성 동물성장 촉진 및 사료효율 개선제 개발과 음식물 쓰레기에의 적용

Development of Mass Production of a Dietary Supplemental Agent and its Application to Food Waste as a Feed

고기능성 동물성장촉진 · 사료효율개선제인 린코마이신 고생산 균주개발

Development and selection of high yielding mutants of lincomycin

고기능성 동물성장촉진 · 사료효율개선제인 린코마이신 발효공정 최적화

Optimized process development for fermentation of lincomycin in bench scale
and basic studies on fermentation process scale-up

고기능성 동물성장촉진 · 사료효율개선제인 린코마이신 분리정제 공정개발

Development of separation and purification process of lincomycin in both lab
and bench scale

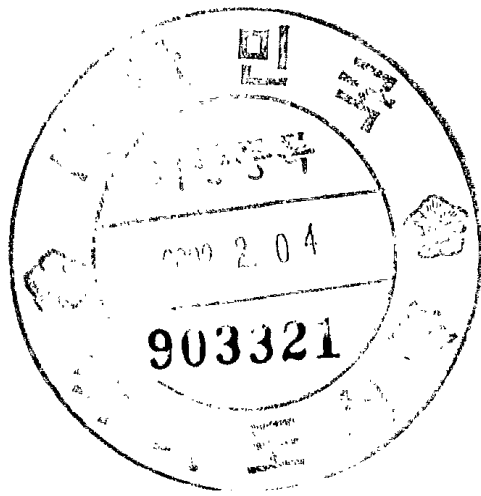
고기능성 동물성장촉진 · 사료효율개선제의 음식물 쓰레기에의 활용을 통한
가축의 생산성 증진

Studies on effects of dietary supplemental lincomycin and food waste on
performance of broiler chicks and pig.

전 북 대 학 교

강 원 대 학 교

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고기능성 동물성장 촉진 및 사료효율 개선제 개발과 음식물 쓰레기에의 적용” 과제 (제1세부과제 “고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제의 음식물 쓰레기에의 활용을 통한 가축의 생산성 증진, 제2세부과제 “고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 링크마이신 발효공정 최적화”, 제1협동과제 “고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 링크마이신 고생산 균주 개발” 제2협동과제 “고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 링크마이신 분리정제 공정 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 12 월 10 일

주관연구기관명 : 전북대학교

총괄연구책임자 : 정 용 섭

세부연구책임자 : 류 경 선

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 전 계 택

협동연구책임자 : 정 언 호

요 약 문

I. 제 목

고기능성 동물성장 촉진 및 사료효율 개선제 개발과 음식물 쓰레기への 적용

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 링크마이신 고생산 균주개발(제1 협동과제)

- 고생산 균주개발에 있어서 가장 중요한 단계 중 하나는 가능한 한 대량의 균주를 테스트하여 그 가운데서 고생산성을 지닌 균주를 신속히 선별하는 데에 있음. 이를 위해서 mother 균주로부터 각각의 분리주를 얻어 성장 단계와 발효 단계의 배양 후, 배양액의 bioassay를 통해 상위 10~20%의 분리주를 선별하고, 이를 플라스크 배양과 좀 더 scale-up된 발효조 배양으로 단계를 점차 증가시켜 가며 생산성을 향상시키는 연구 수행.
- 균주개발의 성공 여부는 가능한 한 많은 변이주를 얻어 이로부터 고생산균주를 선별하는 데에 달려있으므로, lincomycin 고생산균주를 대량으로 선별하기 위한 scale-down 또는 miniature 실험방법 개발.
- 또한 획득된 고생산성 변이주(원형질융합체 포함)를 대규모로 신속하게 배양함으로써 그 생산성을 확인하는 방법인 miniature 실험 방법 개발.
- 높은 생산성을 지닌 균주를 효율적으로 선별하기 위해, 각각의 생산성 수준에 맞는 감수성균주를 이용한 agar piece 방법 및 disc assay 방법을 개발, 적용함으로써 균주선별의 효율성을 극대화시키는 연구 수행.
- Lincomycin을 생합성하는 *Streptomyces lincolnensis*를 대상으로 UV 및 NTG 처리

에 의해 다양한 특성의 고생산성 변이주들을 선별한 후, lincomycin 생산성이 일정 수준에 도달하면 그 때마다 배지성분 최적화에 대한 연구를 반복 수행함으로써 경제적인 산업용 복합배지 개발.

- Lincomycin 생합성 경로를 최대한 이용하는 체계적인 균주개발 전략에 의해 다양한 고생산성의 돌연변이주의 선별 및 lincomycin 생산성 조사.

- 전통적인 돌연변이법인 NTG와 UV를 이용하는 경우, 논리적인 방법(rational screening)에 의해 고생산성 변이주를 유도했을지라도, 생산성이 어느 정도 이상이 되면 그 증가하는 폭이 점차 감소하는 경향이 있음. 따라서 전통적인 돌연변이 방법과 병행해서 효율적으로 고생산성의 원형질 융합체를 얻는 방법 조사 및 다양한 보존제를 이용한 원형질체의 최적 보관조건 조사, 그리고 최적의 융합조건을 이용하여 제조된 융합균주의 lincomycin 생산성과 유전적 안정성 비교 조사.

2. 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 린코마이신 발효공정 최적화(제2세부과제)

- 린코마이신과 같은 이차대사산물의 대량생산을 위한 발효공정 기술은 농산물산업의 know-how 및 경제성을 결정하는 가장 중요한 기술로 인식되어져 선진국에서 기술개발 노력이 매우 치열한 분야임.

- 생산방법이 생산균주의 생리학적 특성에 크게 의존하고 있는 이차대사산물 생산공정 개발의 경우, 기존의 회분식공정이나 scale-up시 많은 문제점을 안고 있는 steady-state 연속배양공정(chemostat) 이외에도, 미생물의 이차대사산물의 생합성 특성과 밀접하게 연계되어 조업되는 유가식 배양공정이 있으며, 다양한 배양공정의 개발은 발효산업의 국제 경쟁력 향상에 도움이 되는 분야임.

- 린코마이신의 대량생산을 통한 산업화 기술의 개발은 다른 미생물이나 다른 유용물질의 생산을 통한 미생물의 자원화에도 기초가 되는 기술로 이의 확대 적용으로

농업에 의해서 생산되는 많은 생물자원을 저가의 식량자원으로만 이용하는 것이 아니라 이로부터 여러 가지 고부가가치 유용물질을 생산함으로써 전반적인 농업의 고부가가치화 및 첨단산업화를 기대할 수 있음.

3. 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 린코마이신 분리정제 공정개발 (제2협동과제)

- 발효공정에서 생산되는 산물은 여러가지 미반응 substrate, byproduct, insoluble등이 포함되어 있어 일정한 함량 및 순도를 지닌 정제품으로의 분리정제가 필수적임.
- 또한 린코마이신은 UV 나 가시광선 범위의 파장에서 흡광하지 않으므로 종래의 HPLC를 사용하기 어려우므로 사용하기 간편한 새로운 분석방법의 개발이 모든 연구개발에 앞서 선행되어야 함.
- 특히 린코마이신의 분리정제를 위해서는 순수도를 높이기 위해 여러 단계의 용매추출 및 column조작이 필요하고 마지막 단계로 소비자가 원하는 형태로 가공하기 위해 결정화(crystallization) 공정이 필요함.
- 실용화 분리정제 공정 개발을 위해서는 lab-scale의 기초연구를 바탕으로 pilot plant-scale의 공정을 개발하고 실제 배양된 배양액을 적용하여 운전 자료를 축적한 후, 기초 연구 자료, pilot plant 설계자료 및 운전자료를 비교 분석하여 scale-up 전략 수립 및 설계인자 도출 등의 일련의 단계적 실용화 연구가 필요함.

4. 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제의 음식물 쓰레기에의 활용을 통한 가축의 생산성 증진(제1세부과제)

- 음식물 찌꺼기 기원의 사료의 개발을 위해서는 성장촉진·사료효율개선제의 효율적 첨가가 필수적이며 이를 위해서는 성장촉진·사료효율개선제의 생산 기술 개발

과 함께 이들의 최적 배합을 통한 사료의 고기능화가 절대적으로 필요함.

- 특히 우리나라에서는 고기능 사료를 위한 성장촉진·사료효율개선제의 배합 기술이 전무한 상태에 있기 때문에 이러한 기술을 이용하여 고기능 사료를 개발함으로써 육계와 비육돈의 생산성을 개선하고 사료를 절감하며 가축 폐사율을 감소시키는 등 축산에 있어서 국제경쟁력을 신장시킬 필요가 있음.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 린코마이신 고생산 균주개발(제1협동과제)

- 고생산 균주개발에 있어서 가장 중요한 단계 중 하나는 가능한 한 대량의 균주를 테스트하여 그 가운데서 고생산성을 지닌 균주를 신속히 선별하는 데에 있음. 이를 위해서 mother 균주로부터 각각의 분리주를 얻어 성장 단계와 발효 단계의 배양 후, 배양액의 bioassay를 통해 상위 10~20%의 분리주를 선별하고, 이를 플라스크 배양과 좀 더 scale-up된 발효조 배양으로 단계를 점차 증가시켜 가며 생산성을 향상시키는 연구 수행.
- 균주개발의 성공 여부는 가능한 한 많은 변이주를 얻어 이로부터 고생산균주를 선별하는 데에 달려있으므로, lincomycin 고생산균주를 대량으로 선별하기 위한 scale-down 또는 miniature 실험방법 개발.
- 또한 획득된 고생산성 변이주(원형질융합체 포함)를 대규모로 신속하게 배양함으로써 그 생산성을 확인하는 방법인 miniature 실험 방법 개발.
- 높은 생산성을 지닌 균주를 효율적으로 선별하기 위해, 각각의 생산성 수준에 맞는 감수성균주를 이용한 agar piece 방법 및 disc assay 방법을 개발, 적용함으로써 균주선별의 효율성을 극대화시키는 연구 수행.
- Lincomycin을 생합성하는 *Streptomyces lincolnensis*를 대상으로 UV 및 NTG 처리

에 의해 다양한 특성의 고생산성 변이주들을 선별한 후, lincomycin 생산성이 일정 수준에 도달하면 그 때마다 배지성분 최적화에 대한 연구를 반복 수행함으로써 경제적인 산업용 복합배지 개발.

- Lincomycin 생합성 경로를 최대한 이용하는 체계적인 균주개발 전략에 의해 다양한 고생산성의 돌연변이주의 선별 및 lincomycin 생산성 조사.
- 전통적인 돌연변이법인 NTG와 UV를 이용하는 경우, 논리적인 방법(rational screening)에 의해 고생산성 변이주를 유도했을까라도, 생산성이 어느 정도 이상이 되면 그 증가하는 폭이 점차 감소하는 경향이 있음. 따라서 전통적인 돌연변이 방법과 병행해서 효율적으로 고생산성의 원형질 융합체를 얻는 방법 조사 및 다양한 보존제를 이용한 원형질체의 최적 보관조건 조사, 그리고 최적의 융합조건을 이용하여 제조된 융합균주의 lincomycin 생산성과 유전적 안정성 비교 조사.

2. 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 링크마이신 발효공정 최적화(제2세부과제)

가. 플라스크 배양에서의 생산 균주 발효 특성 연구 및 회분식 생물반응기 운전공정

- 탄소원 및 질소원(특히 아미노산)이 링크마이신 생합성에 미치는 영향 조사를 통한 catabolite regulation 현상 유무 규명
- 배지 중의 인 성분 농도가 링크마이신 생합성에 미치는 영향 분석
- 배지 성분 조사에 의한 링크마이신 생산용 복합배지 및 세포성장용 배지 개발
- bench-scale 생물반응기 설계 및 scale-up 기초 자료 조사
- 배양에서 용존산소가 링크마이신 생산에 미치는 영향 조사

나. 생물반응기에서의 회분식 배양공정 연구 및 유가식 배양 기술 연구

- 생물반응기에서 고점도 배양액으로의 산소전달 특성 규명
- 효율적 산소공급 장치 설계 및 생물반응기에의 적용
- 교반기에 의한 전단응력이 링크마이신 생합성에 미치는 영향 조사
- 회분식 생물공정에 대한 computer-controlled 생물반응기 최적 제어 기술 확립

- 유가식배양 공정 테스트 및 문제점 분석

다. 유가식배양 공정 확립 및 생산공정 scale-up 방안 제시

- 제한 기질의 유가식배지 공급을 통해 생산균주의 링크마이신 생합성 기작 조절 방안 확립
- 유가식 생물공정에 대한 computer-controlled 생물반응기 최적 제어 기술 확립
- 링크마이신 생산공정의 수치화를 통한 공정 개선안 확립

3. 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 링크마이신 분리정제 공정개발 (제2협동과제)

가. 링크마이신 분석 시스템 연구

1). 최적 column선정 및 분석조건 확립

나. 배양액으로부터 생산균주의 분리공정 연구

1). 최적 세포파쇄공정 선정

2). 여과공정

- filtrate 점성 연구
- scale-up에 필요한 Ruth equation 상수 결정
- cake의 specific resistance 결정
- cake의 compressibility 결정

3). 원심분리공정

- Σ value 추정을 위한 *S. lincolnensis*의 V_g 값 settling velocity 추정

다. 배양액으로부터 링크마이신 추출공정 개발

1). 추출공정 개발을 위한 기초 연구

- two phase형성조사
- 추출용매선정

- pH에 따른 추출율의 변화
- 수용액상 : 용매상의 부피비율에 따른 추출율의 변화

2). 회분식 추출공정

- Dissociative extraction
- 회분식 다단 추출

3). 연속식 추출공정 개발 및 운전

라. 결정화공정 개발

- 1). 냉각법에 의한 결정화 공정
- 2). 침전법에 의한 결정화 공정

마. 추출 전처리 chromatography 공정 개발

- 바. 실제 린코마이신 배양액으로부터 Lab scale의 분리정제 및 결정화
- 사. 실제 린코마이신 배양액으로부터 Pilot scale의 분리정제 및 결정화

4. 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제의 음식물 쓰레기예의 활용을 통한 가축의 생산성 증진(제1세부과제)

가. 남은 음식물 및 본 연구에서 개발된 린코마이신을 성장촉진제로서 육계, 어린 돼지, 비육돈 사료에 급여로 첨가수준 설정

나. 조사항목 :

- 육계 : 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율을 주간별로 측정
실험종료시에 혈중 총콜레스테롤, 혈청 단백질, 알부민, GOT 등과 체중대 간, 복강지방의 비율.
- 비육돈: 증체량, 사료요구율, 혈액의 성상 및 근육의 품질 조사
- 육계와 비육돈에서 남은 음식물의 대사에너지가 구명
- 린코마이신과 남은 음식물의 혼합급여시 육계의 생산성 및 상호작용에 미치는 영향 구명

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

연구개발 결과

1. 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 린코마이신 고생산 균주개발(제1협동과제)

- Lincomycin 생합성 단계별 조절기능의 결손 변이주의 선별을 통해 목적 이차대사산물인 lincomycin의 생산성을 큰 폭으로 증가시켰음. 즉 논리적인 방법으로 고생산균주 선별을 시도하고자 다음의 특성을 갖는 변이주를 개발하였음: 자신의 생합성 물질인 lincomycin에 대한 저항성균주; tyrosine hydroxamate (lincomycin의 precursor로 작용하는 tyrosine의 antimetabolite) 저항성균주; ethionine (lincomycin의 methyl donor인 methionine의 antimetabolite) 저항성균주; 항생제 및 antimetabolite에 대한 동시 저항성균주; 다양한 특성의 원형질융합균주 개발.
- 균주개발의 성공 여부는 가능한 한 많은 변이주를 얻어 이로부터 고생산균주를 신속하게 선별하는 데에 달려 있음. 따라서 lincomycin 고생산 균주를 대량으로 선별하기 위해 scale-down 실험방법을 개발하였으며, 이 방법의 적용으로 사용되는 배지와 실험 기자재의 비용을 줄일 수 있었으며, 유기용매등의 사용과 발효 찌꺼기등을 획기적으로 감소시키는 효과를 얻었음.
- 다양한 조건에서 선별된 고생산성 균주들의 lincomycin 생산성이 일정 수준에 도달하면, 그 때마다 탄소원 및 질소원 조사 등과 같은 배지성분 최적화에 대한 연구를 반복 수행한 결과, 경제적인 산업용 복합 생산배지를 개발할 수 있었음.
- 전통적인 돌연변이 방법과 병행해서 유전자의 재조합 빈도가 높은 원형질융합법을 이용하여 고생산성의 균주를 개발하였음. 상기에서 이미 언급한 바대로, 획득된 원형질융합체를 대규모로 배양하고 생산성을 신속하게 확인하는 방법인 miniature 실험방법을 적용한 결과, 비교적 단기간에 lincomycin의 생산성이 큰 폭으로 증가

했을 뿐만 아니라 유전적 안정성도 우수한 우량 융합주를 개발할 수 있었음. Miniature 실험방법의 핵심 요소는 다음과 같음: 선별된 원형질 융합체의 생산성을 신속하게 확인하기 위해 고체배양 시스템인 agar piece assay를 적용하는 것과, 이로부터 고생산성으로 균주가 확인되는 경우 10 ml 용량의 miniature tube를 이용해서 quadruplicate의 액상배양에 의해 그 생산성과 안정성을 다시 확인함.

- 높은 생산성을 지닌 균주를 효율적으로 선별하기 위해, 각각의 생산성 단계에 맞는 감수성균주를 이용한 agar piece 방법 및 disc assay 방법을 개발, 적용함으로써 균주 선별의 효율성을 극대화시켰음.

- 다음의 특성을 갖는 고생산성 변이주들을 fusion partner로 사용하여 원형질융합체를 얻은 결과, lincomycin 생산성과 유전적 안정성이 큰 폭으로 증가한 우량 산업용 생산균주를 선별할 수 있었음: lincomycin에 대해 저항성을 보이며 동시에 lincomycin 생합성 능력이 우수한 균주 (APPL2020 균주); APPL2020 균주는 약 1,000종의 APPL2000균주로부터 더 이상의 돌연변이 없이 agar piece 방법을 적용한 screening 방법에 의해 새로이 선별된 고생산성, 고안정성의 균주임 (lincomycin 생산성: 약 130,000 units). 또한 lincomycin 생합성의 전구물질로 알려진 tyrosine의 analog인 tyrosine hydroxamate에 대한 저항성 변이주 (BTH25: 127,000 units)와, methionine의 analog인 ethionine에 대한 저항성균주 (CET42: 115,000 units)를 선별하여 fusion partner로 사용하였음.

2. 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 린코마이신 발효공정 최적화(제2세부과제)

- 동물성장촉진·사료효율 개선제로 알려져 있는 lincomycin의 생산수율을 향상시키기 위해 라틴방격법을 이용하여 배지 최적화: 선정된 각각의 3가지 복합탄소원, 복합질소원, 아미노산을 라틴방격법에 따라 배지 최적화를 한 결과 starch와 sugar cane molasses비가 3:1, peptone water와 NaNO₃가 2:1, 아미노산 무처리구인 경우

가 lincomycin 생산이 가장 높았으며, 최적배지의 구성성분은 starch 45 g/L, sugar cane molasses 15 g/L, peptone water 13.33 g/L, NaNO_3 6.67 g/L와 CaCO_3 4 g/L이다.

- 회분식 배양에서 교반속도, pH, 임펠러의 종류 및 소포제에 대한 연구를 수행하여 발효조 배양 운전조건을 확립: 교반속도 300 rpm의 경우 lincomycin 농도는 150 mg/L로 400 rpm보다 2배 높았다. 소포제는 PPG(polypropyl ethylene 2000) 0.5 g/L 첨가한 경우 lincomycin 생산농도는 325 mg/L로 가장 높았다. Rushton turbine 임펠러의 경우, lincomycin 생산농도는 325 mg/L로 가장 높았고, pH를 조절하지 않은 경우 lincomycin 생산 최고농도가 350 mg/L였으며 비 생산성은 1.46 mg/L/hr이였다. Lincomycin 생산을 위한 최적 발효운전 조건으로 300 rpm, PPG 0.5 g/L, rushton turbine, pH를 조절하지 않은 경우가 확립되었다.

- 동적인 방법을 통해 산소전달계수(k_{La})를 측정하였고 단일임펠러와 이중임펠러간의 k_{La} 와 산소섭취속도(O.U.R)를 비교실험하여 lincomycin 대량생산을 위한 운전조건을 제시: 산소전달계수(k_{La})는 rushton 임펠러의 경우 실험한 교반속도와 통기량 전체범위에서 가장 높은 값을 나타내었으며, 이중임펠러의 k_{La} 는 아래쪽에 radial flow인 rushton을 위쪽은 axial flow인 intermig나 pitched blade를 조합한 경우가 비교적 높은 값을 나타내었다. 이중임펠러를 발효에 적용한 결과 lincomycin 생산 농도는 96시간이후 서서히 증가하여 288시간에 약 340 mg/L로 최대값에 도달하였으며, 이중임펠러를 이용하여 250 rpm으로 교반한 결과 단일임펠러 300 rpm의 경우에 비해 큰 효과를 얻지 못하였으나, 발효조 크기가 증가하는 대규모 생산에서는 임펠러를 큰 속도로 유지하기 위한 동력소비를 고려할 경우 낮은 교반속도에서 운전하는 것이 에너지소비를 줄일 수 있는 결과로 생각된다.

-유가식 배양 결과: 유가식 배양을 위해서 질소원인 NaNO_3 의 공급이 최적으로 구명되었고, 초기농도와 공급농도가 증가함에 따라 lincomycin 농도가 증가하는 경향을 나타내었고, 생물반응기에서는 질소원은 연속적으로 투입하는 것보다 하루에 한번씩 일정량을 투입한 경우, lincomycin 생산이 약 39% 증가하는 것을 알 수 있었다.

- on-line computer-controlled fermentation system을 이용한 결과: Lincomycin 고생산 변이주의 선별과 용존산소 농도의 조절이 가능한 on-line

computer-controlled fermentation system을 이용하여 lincomycin의 생산성을 향상시킬 수 있었으며, 개발된 system은 용존산소 농도 조절이 필요한 호기성 미생물의 발효에 적용할 수 있을 것으로 판단되었다.

3. 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 린코마이신 분리정제 공정개발 (제2협동과제)

가. 린코마이신의 분석조건 확립

-최적 column은 C₈ column이었음

-이를 중심으로 한 HPLC를 이용한 분석 조건을 확립.

나. 생산균주의 분리공정

1) 세포파쇄공정

- 린코마이신이 extracellular product임이 확인되어 근본적으로는 세포 파쇄공정이 필요없음.

2) 여과공정

- 린코마이신 생산균주 cake의 여러 진공도에서의 specific cake resistance 값을 도출

- cake의 compressibility S 값은 0.07

3) 원심분리공정

*S. lincolnensis*의 settling velocity V_g 값은 1.88×10^{-3} cm/sec이었음.

다. 배양액으로 부터 린코마이신 추출공정 개발

1) 추출공정 개발을 위한 기초 연구

- 최적 용매로 butanol이 선정.

- 린코마이신의 추출은 전형적인 dissociation extraction의 형태임. 수용액상에서

의 pH가 낮을 경우에는 추출이 거의 일어나지 않았으며 pH가 높아질수록 추출율이 증가함.

- Butanol을 용매로 쓸 경우 최적 수용액의 pH는 10에서 12 이었음.
- Butanol에 의한 추출의 경우 최적의 수용액상:용매상의 부피비율은 1:1이었음.

2) 회분식 추출공정

가) Dissociative extraction

- 6회에 걸친 dissociative extraction에서 추출 횟수가 증가할수록 추출의 수율이 감소되었으나 정제도는 증가하였음.

나) 회분식 다단 추출

- 수율을 높이기 위해 4회에 걸친 회분식 다단 추출 결과 추출 수율이 96.9 %이었음.

3) 연속식 추출공정 개발 및 운전

- Vertical type의 settler의 문제점을 보완한 horizontal type의 settler연속식 3단 향류 추출장치를 개발.
- 연속식 추출장치를 운전한 결과, 마지막 수용액상에 링크마이신이 거의 남아 있지 않았고, 마지막 단으로 갈수록 용매상의 링크마이신의 농도가 증가하였으며, 용매의 상대적 유량이 클수록 진동이 없이 빠르게 정상상태에 도달하였음.
- 개발한 향류 다단식 연속 추출공정은 연속식으로 링크마이신을 90 %이상의 회수율로 추출할 수 있어서 scale-up 공정에 효율적으로 이용될 수 있음.

라. 결정화공정 개발

1) 냉각법에 의한 결정화 공정

- 온도-용해도 곡선으로부터 결정화를 위한 최적의 용매로 methanol이 선정.
- 교반하면서 4° C로 냉각시킴으로써 crystal을 형성시킬 때 가장 균일한 결정이 생성.

2) 침전법에 의한 결정화 공정

- 최적 용매인 acetone의 상대적 부피비가 증가할수록 결정이 빨리 형성되며, water:acetone의 비율이 1:15일 경우 2시간만에 거의 100 % 결정을 회수.
- 결정의 성장속도는 온도나 seeding에 크게 영향을 받지 않았으나 교반에 의해 결정 성장속도가 촉진.

마. 실제 린코마이신 배양액으로부터 Lab scale의 분리정제 및 결정화

- *S. lincolensis* 발효액으로부터 Lab scale의 분리정제 및 결정화를 수행한 결과 순도가 98%정도의 린코마이신 결정을 얻었고 수율은 약 72%이었음.

바. 실제 린코마이신 배양액으로부터 Pilot scale의 분리정제 및 결정화

- 50 liter 발효조에서 수확한 배양액 10 liter의 배양액으로 pilot scale의 분리정제 및 결정화를 수행하였음. Lab scale와 비슷한 순도를 얻기 위해 제 결정화 과정이 추가됨으로 인해 추출수율이 낮아졌음.
- Pilot scale의 분리정제 공정으로부터 얻은 결정은 제2세부과제에 제공하여 동물시험에 사용하도록 하였음.

4. 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제의 음식물 쓰레기에의 활용을 통한 가축의 생산성 증진(제1세부과제)

- 육계용 사료에 본 연구에서 제조된 린코마이신을 2.2mg/kg과 4.4mg/kg 수준으로 급여시에 생산성 개선
- 본 연구에서 제조된 린코마이신 급여구는 혈액의 정상 및 체중대 간의 비율을 조사하였을 때 대조구와 차이가 없었으므로 독성이 없음
- 남은 음식물은 육계용 사료원료로서 15%까지 급여하여도 대조구와 생산성에 차이

가 없었으므로 이 수준까지 사용 가능

- 어린 돼지에서 린코마이신 55, 110mg/kg 수준으로 급여 시 생산성 개선
- 비육돈에서 린코마이신 및 남은 음식물의 급여는 성장을 촉진하였고, 혈액의 성상에서 차이가 없었음
- 남은 음식물의 급여구는 돈육의 품질에서 대조구와 차이가 없었으므로 남은 음식물의 급여가 돈육의 품질을 저하시키는 인자로 생각하는 일반적인 사고와는 차이가 있음.

활용에 대한 건의

- 본 연구를 통해 얻어진 하기의 다양한 전문 기술들은 차원 높은 고생산성 산업용 변이주의 유도를 위해 활용될 수 있을 것이다: 즉 생합성 단계별 조절기능의 결손 변이주의 선별을 통한 이차대사산물 생산성 증가 기술, miniature 실험방법을 이용한 고생산성 변이주의 대량 선별 및 신속 배양 기술, 유전자 재조합 빈도가 높은 다양한 특성의 원형질융합체 개발 기술, 경제적인 산업용 복합 생산배지 개발 기술, 각각의 생산성 수준에 맞는 감수성균주를 이용한 agar piece 방법 및 disc assay 방법을 이용한 효율적 균주 선별 기술, 고생산성 변이주들을 fusion partner 로 사용한 고생산성·고안정성의 산업용 원형질융합체 개발 기술.
- 확립된 린코마이신 분석 시스템은 avermectin의 대량 배양공정 뿐만 아니라 린코마이신의 분리정제 공정 개발에 기본적으로 활용이 되며 고생산성 균주의 개발에도 활용.
- 미생물 배양을 위한 통계적 방법에 의한 배지 최적화 방법 및 배양 조건의 확립으로 인한 know-how는 규모확대 시에도 적용 가능.
- 산소전달계수의 확립은 규모확대 시 대형화기준으로 사용 가능, 즉 발효조의 부피 당 요구되는 동력 및 발효조 크기를 산출하는데 유용하게 이용.
- 다양한 임펠러에 대한 산소전달계수의 확립은 Streptomyces 기원 미생물의 발효

시 요구되는 산소요구량을 만족시킬 수 있는 시스템에 관한 사양 제시

- 발효 시 미생물의 산소요구량을 on-line computer-controlled system에 의하여 제어가 가능하며, 다른 호기성 미생물의 발효에 활용 가능.
- 여과공정에서 도출한 specific cake resistance나 compressibility 등은 링크마이신 배양액의 filter 설계에 활용.
- 본 연구에서 도출한 settling time은 scale up된 원심분리기의 선정에 활용.
- 선정된 최적 용매는 scale-up된 추출장치에 여전히 활용할 수 있음.
- 개발된 dissociative extraction 전략은 링크마이신의 순도를 높이기 위해 scale-up 공정에 활용할 뿐만 아니라 수용액에서 이온화되는 기타 이차대사산물의 분리정제에도 활용될 수 있음.
- 개발된 연속식 향류 다단 추출장치는 생산성이 기존의 회분식(batch) 추출장치보다 월등히 높아서 링크마이신의 scale-up 생산에 활용할 수 있을 뿐만 아니라 다른 항생제의 추출에도 이용될 수 있음.
- 개발된 acetone 침전법에 의한 결정화 방법은 냉각법에 비해 장치가 간단하고 운전이 쉬운 장점이 있고, 재결정에 의해 높은 순도의 링크마이신을 쉽게 얻을 수 있어서 scale-up후에 실제 생산에 활용할 수 있고 마찬가지로 이차 대사산물의 추출에도 이용될 수 있음.
- 축적된 Lab scale의 운전자료와 Pilot-scale up의 운전 자료들은 링크마이신의 상업적 대량 생산을 위한 실용화 분리정제 공정의 scale-up 전략 수립 및 설계인자 도출 등에 활용될 수 있음.
- 남은 음식물의 육계 및 비육돈 사료화를 위한 지속적인 지원과 연구 필요(구제역과는 상관이 없음).

SUMMARY

The goal of this research is to economically produce lincomycin, an antibiotic with mainly gram positive antibacterial activity. Lincomycin is commercially produced as secondary metabolites by using a soil streptomycete called *Streptomyces lincolensis* var. *lincolnensis*. The antibiotic was found to possess excellent activity against penicillin resistant bacteria, *staphylococci*, *streptococci*, *diplococci*, *pneumococci* and *corynebacteria*. It was known that the antibiotic primarily inhibits protein synthesis by binding hydrophobically to ribosomes of sensitive microorganisms. Lincomycin does not show cross-resistance with major therapeutic antibiotics, and is effective in the treatment of superficial sepsis. In this study emphasizing on mass production of lincomycin and its application, four projects were performed separately with the following purposes.

1st project: Development and selection of high yielding mutants of lincomycin.

2nd project: Optimized process development for fermentation of lincomycin in bench scale, and basic studies on fermentation process scale-up.

3rd project: Development of separation and purification process of lincomycin in both lab and bench scale.

4th project: Studies on effects of dietary supplemental lincomycin and food waste on performance of broiler chicks and pig.

1st project:

Strain development of *Streptomyces lincolnensis* mutants showing enhanced capability for biosynthesis of lincomycin was carried out. Both traditional mutation method and genetic protoplast fusion methods were applied for these purposes. Following studies were performed in priority: 1) development of an efficient lincomycin bioassay system for rapid and accurate selection of high lincomycin-producing mutants (including protoplast fusants) using miniature experimental method, 2) strain development of high productive mutants by applying rational screening strategies, such as selection of feed-back insensitive mutants and/or antimetabolite resistant mutants, 3) establishment of protoplast fusion techniques showing high recombination frequency, and application of these high yielding fusants for the production of lincomycin, and 4) development of industrially applicable complex medium.

Miniature experimental method was successfully applied for rapid screening of high producers, through adoption of efficient bioassay systems such as agar piece method and disc assay method. The previous bioassay methods were modified using various kinds of sensitive microorganisms according to the lincomycin production level of the producer mutants. By traditional mutagenesis methods, several kinds of mutants showing significantly high level of lincomycin were isolated through rational screening procedures as follows, and subsequently compared for their lincomycin productivities in shake flask fermentations: selection of lincomycin-resistant mutants, tyrosine hydroxamate-resistant mutants and/or ethionine-resistant mutants. For optimization of production medium composition and components, lots of sets of experiments have been carried out in shake flask cultures, using the original strain as well as various kinds of mutants. Notably, rapid

enhancement in lincomycin productivity was possible due to development of high yielding recombinant fusants obtained by protoplast fusion of the high productive mother cells of the following characteristics: lincomycin-resistant APPL2020 cells, antimetabolite-resistant mutants against tyrosine (BTH25 cells) and/or methionine (CET42 cells). In addition, the high producers from the protoplast fusion were proved to be stable as well as reproducible in their lincomycin productivities after long-term subculture periods.

2nd project:

For the development of optimized process for lincomycin production, several experiments were carried out. For the improvement of the lincomycin production, the effects of various components in the basal medium, like carbon, nitrogen, phosphorus, magnesium salt and amino acid, were examined. In addition, the effects of various operating parameters, agitation speed, impeller types and pH, were also investigated. And, the determination of oxygen transfer coefficient(k_La) and oxygen uptake rate(O.U.R) were studied with direct method. It has been observed that the optimal conditions of agitation and aeration for the growth of *S. lincolenesis* and lincomycin production in a batch fermenter.

Latin-square technique was used to identify the lincomycin production for the optimization of the production medium. By combining this technique with the classical method, the essential medium components were determined and the composition quantified in shake flasks. Thus, the optimum medium composition found consisted of 45 g/L soluble starch, 15 g/L sugar cane molasses, 13.33 g/L peptone water, 6.67 g/L NaNO_3 , and 4 g/L CaCO_3 . The lincomycin production

was 376 mg/L, which was found to be improved almost 3 times in comparison with that in shake flasks using the basic medium.

The effects of agitation speed on the lincomycin production were also observed in a batch fermenter at a bench-top scale. Maximum lincomycin production was 150 mg/L when agitation speed was 300 rpm, and it was improved almost 2 times in comparison with that at 400 rpm.

The effect of various antifoam agents and concentrations on lincomycin production with optimized medium were investigated, and it was found that lincomycin production by adding 0.5 g/L PPG was 325 mg/L, indicating the significant effect on foam depressing.

The rushton turbine, scaba and pitched blade impeller were compared to the lincomycin production in 2.5 L batch fermenter. The rushton turbine showed the best lincomycin production of 325 mg/L, which was 1.4 and 2.5 times higher than those of scaba and pitched blade impeller respectively.

Notably, pH was uncontrolled during the whole fermentation period, the lincomycin production and specific productivity reached around 350 mg/L and 1.46 mg/L · hr respectively.

To optimize the impeller design, k_{La} for various single and dual impellers were measured and compared with that of a Rushton turbine impeller. The Rushton turbine impeller showed the best k_{La} as compared with other single impellers at different aeration rate and agitation speed, and the k_{La} obtained using the Rushton turbine impeller was slightly higher than those using the scaba, intermig-intermig, pitched blade and single intermig impeller. It has been also observed that the impeller combination of upper

and lower impellers, namely an intermig axial flow - a Rushton radial flow turbine gave the highest value of $k_L a$.

Culture in a fermenter by using the dual impeller system was carried out for the lincomycin production at 250 rpm. The maximum concentration of lincomycin obtained was about 340 mg/L after 288 hrs of fermentation, which was almost the same as that by using the single Rushton turbine impeller at 300 rpm. Though the result of the lincomycin production was not enhanced by using the dual impeller system, energy efficiency could be improved for the large scale fermentation with the dual impeller.

NaNO_3 was known the best nitrogen source for lincomycin production in fed-batch flask culture, and the intermittent feeding of NaNO_3 was found to be optimal to increase the lincomycin production in fed-batch culture. The lincomycin production could be improved by fed-batch culture under limited condition of nitrogen source, as compared to the experiment performed in batch culture.

Finally, on-line computer-controlled fermentation system was developed to control the dissolved oxygen during fermentation. Thus, it was possible to maintain a suitable dissolved oxygen concentration at a low agitation speed. It was found that the highest lincomycin production was observed when dissolved oxygen level was controlled at 30%, and the developed system could be applicable to aerobic fermentation process without any limitations.

3rd project:

For the development of optimum separation and purification process for lincomycin, several experiments involving various steps of separation process have been carried out in both lab-scale and pilot-scale. These included

isolation of lincomycin producing cells from media, disruption of cell wall for the excretion of lincomycin into media, solvent extractions for the enriching of lincomycin into solvent phase, and crystallization of lincomycin. A bench-scale continuous extraction process and pilot-scale separation and purification process was developed for the development of further scaled up process from the basal data of lab-scale experiments.

Several design parameters such as settling velocity of *Streptomyces lincolnensis* cells for centrifuge process, and specific cake resistance for filtering process were evaluated for scale-up of cell isolation process from fermentation broth. Parameters such as percentage of extraction were evaluated for extraction process and used as a basis for the selection of optimum solvents.

The optimum solvent for lincomycin extraction was found to be butanol. The optimum pH of aqueous for 1st extraction was founded to be pH 10, and that for 2nd extraction to be pH 2. Lincomycin extraction is a typical dissociation extraction. Therefore lincomycin fermentation broth was adjusted to pH 10 and extracted with butanol in the 1st extraction. The lincomycin in the solvent phase was extracted into aqueous phase at pH 2 in the 2nd extraction, and then back into solvent phase after adjusting pH of aqueous phase to 10. In this way, lincomycin purity could be increased, but lincomycin extraction yield was decreased. The optimal volume ratio of aqueous phase to solvent phase was 1:1(v/v). A four stage batch extraction, which was tried for improving yield, showed an extraction yield of 96.9 %.

A continuous three stage countercurrent extraction process was developed for the efficient scale-up extraction process. It was observed that

lincomycin concentration in the aqueous phase of 1st stage was very low, which shows successful operation of continuous extractor. It was also found that the lincomycin concentration in the solvent phase increased gradually with increasing the number of stages. 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.

A crystallization process using acetone precipitation was developed and it showed the advantage of simple equipment and easy operation. The crystallization kinetics study showed that the crystal formation rate increased as the volume ratio of acetone to water increased. It was found that crystallization kinetics was not affected by temperature and the presence of seed, but agitation significantly improved the rate of crystal formation. It was possible to recover almost 100 % of crystal within two hours with using acetone to water volume ratio of 15:1.

Lab-scale separation and purification from *S. lincolensis* fermentation beer was tried and lincomycin crystals of 98% purity were obtained with yield of 72%. Pilot-scale separation and purification from *S. lincolensis* fermentation beer was also successfully carried out not only to provide bulk lincomycin crystals to other research group of animal test, but also to establish scale-up strategy for lincomycin separation and purification process.

4th project:

Nine experiments were conducted to investigate the effect of dietary supplemental lincomycin and food waste on performance of broiler chicks and

pig. Diets were based corn, soybean meal and contained approximately 3,100, 3,100kcal/kg ME, 21.5, 19% CP for starting and finishing period in broiler diets. Three levels of commercial lincomycin (LM; 0, 2.2, 4.4mg/kg for chicks and 0, 55, 110mg/kg for pig) and food waste(FW: 0, 7.5, 15%) were differently used for all experiments. Metabolizable Energy(ME), Weight gain, feed intake and feed conversion(FC) were periodically measured in both broiler and pig feeding trials. Blood components, liver weight and abdominal fat ratio to body weight, fatty acid composition were examined at the end of experiment. ME of animal fed food waste used in formulating diet prior to feeding trials were measured 2,504(Expt. 3), 2,734(Expt. 4), 2,750(Expt. 5, 6) and 2,583 kcal/kg(Expt 7, 8), respectively. In broiler feeding trials, weight gain of birds fed supplemental lincomycin was significantly higher in Expt 1 to 3 than no LM treatments($P < 0.05$). It also tended to increase in food waste treatments compared to that of control. There were no toxic symptom regardless of dietary LM level. FC of chicks fed LM supplement tended to improve in all experiments as dietary LM level increased, but was no significance. In pig feeding trials(Expt 7 to 9), dietary feeding lincomycin influenced on weight gain of pig for finishing period. It was also improved in feeding the food waste treatments. No difference was found meat quality between food waste groups and control(no food waste). The results of these studies indicated that lincomycin and food waste may have the potential to use the animal feed ingredients.

Section 5	References	260
Chapter 5	Studies on effects of dietary supplemental lincomycin and food waste on performance of broiler chicks and pig.	264
Section 1	Introduction	264
Section 2	Materials and Methods	265
Section 3	Results and Discussions	280
Section 4	References	309

목 차

제출문	1
요약문	2
Summary(영문)	17
Content(영문)	25
목차	27
제 1 장 서 론	29
제 1 절 연구개발의 목적과 범위	29
제 2 절 연구개발의 중요성	40
제 2 장 고기능성 동물성장 촉진·사료효율 개선제인 린코마이신 고생산 균주 개발 (제1협동과제)	45
제 1 절 서 설	45
제 2 절 재료 및 방법	46
제 3 절 결과 및 고찰	57
제 4 절 참고문헌	76
제 3 장 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 린코마이신 발효공정 최적화 (제2세부과제)	114
제 1 절 서 설	114
제 2 절 재료 및 방법	119
제 3 절 결과 및 고찰	132
제 4 절 참고문헌	194
제 4 장 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 린코마이신 분리정제 공정개발 (제2협동과제)	199
제 1 절 서 설	199

제 2 절	재료 및 방법	200
제 3 절	결과 및 고찰	210
제 4 절	결 론	256
제 5 절	참고문헌	260
제 5 장	고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제의 음식물 쓰레기에의 활용을 통한 가축의 생산성 증진(제1세부과제)	264
제 1 절	서 설	264
제 2 절	재료 및 방법	265
제 3 절	결과 및 고찰	280
제 4 절	참고문헌	309

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구 개발의 목적

- 막대한 양의 음식물 찌꺼기가 버려지면서 여러 가지 환경문제가 발생할 뿐만 아니라 아까운 자원이 낭비되고 있음. 이러한 생명공학적인 방법을 이용한 고효율 성장촉진·사료효율개선제의 생산기술과 최적배합 기술이 개발되면 이를 적용하여 우리나라 축산 농가에서 사용할 만한 음식물 기원의 사료가 생산될 수 있기 때문에 자원의 낭비를 막아 국민 경제에 큰 도움을 줄뿐만 아니라 환경문제도 해결할 수 있음.
- 또한 우리 나라에서는 사료뿐만 아니라 성장촉진·사료효율 개선제 자체의 수입에만 연간 1000억원을 소비하고 있어서 이 생산 기술의 개발로 인한 수입대체 효과만 해도 엄청나기 때문에 한국의 국제 수지개선에 꼭 필요한 사업임.
- 사료에 첨가되는 성장촉진·사료효율개선제로서 린코마이신은 단일 품목의 세계 시장 규모가 현재 약 6,000 억원에 달하며 미생물 발효, 이중에서도 특히 본 연구에서 사용하는 *Streptomyces* 계통의 미생물을 사용하고 본 연구와 유사한 생물공정에 의한 방법으로 생산될 수 있는 다양한 동물의약품 (동물구충제, 동물치료제 및 동물성장촉진제로서의 항생물질 등)을 감안하면 그 전체 시장규모는 실로 막대할 것으로 예측됨.
- 효율적 최적 발효공정, 분리정제 공정의 개발은 전체 공정에 걸친 제품의 수율을 향상시킬 뿐만 아니라 초기설치비 및 운전비의 절감을 이룩할 수 있기 때문에 값싼 성장촉진·사료효율개선제의 생산을 통해 저렴하고 효능이 우수한 사료를 축산 농가에 공급할 수 있어 이에 따른 농민의 소득 증대 및 축산업의 활성화가 기대됨.
- 린코마이신의 상업화로 획득한 know-how는 다른 미생물이나 다른 유용물질의 회

수를 통한 미생물의 자원화에도 확대 적용될 수 있음.

- 제1협동과제의 목표는 Lincomycin 고생산 균주 개발.

- 돌연변이 방법에 의한 고생산 균주 개발
- Bioassay 법에 의한 신속한 in situ 고역가 변이주 선별방법 확립
- 링크마이신 고생산균주 선별을 위한 변이처리법 확립
- 분리된 링크마이신 고역가 생산변이주의 shake flask 배양조건 최적화
- 플라스크 배양에서의 링크마이신 생산균주의 특성연구

- 제2세부과제의 목표는 Bench-scale에서의 Lincomycin 발효공정 최적화와 규모확대 연구.

- 생물반응기에서의 링크마이신 생산성 향상 연구
- 유가식 배양을 통해 생산균주의 이차대사 조절: 링크마이신의 생산성 증진을 위한 유가식배양공정 확립
- 생물공정 제어기술에 의한 링크마이신 대량생산 기술 개발

- 제2협동과제의 목표는 Lincomycin 분리 정제 공정 개발.

- 링크마이신 분석 시스템 연구
- 배양액으로부터 생산세균의 분리 연구
- 추출 전처리 chromatography 공정 개발
- 생성 배양액으로부터 링크마이신 추출 공정 연구
- bench-scale 분리 정제 공정 개발

- 제1세부과제의 목표는 Lincomycin의 활용을 통한 남은 음식물의 사료화 방안 연구.

- 남은 음식물과 성장촉진제의 급여수준에 따른 육계와 비육돈의 증체량 개선 및

원인구명

- 남은 음식물과 성장촉진제의 급여에 따른 육계와 비육돈의 사료 섭취량 증가 및 사료효율 개선
- 남은 음식물과 개발된 성장촉진제의 급여수준에 따른 육계와 비육돈의 폐사율에 미치는 영향 구명

2. 연구개발 내용 및 범위

고기능성 동물성장 촉진·사료효율 개선제인 링크마이신 고생산 균주 개발 (제1협동과제)

가. 돌연변이 방법에 의한 고생산 균주 개발

- 링크마이신과 같이 미생물의 이차대사 결과 생합성되는 이차대사산물은 미생물의 생장에 직접 요구되는 대사물질이 아니므로 이의 생합성은 생산균주에 의해 정밀하게 조절되고 있는 바, 산업적인 생산을 위해서는 이 물질의 각 생합성 단계별 조절기능의 결손 변이주를 통해 생산코자 하는 이차대사산물을 과대생산(over-production)하는 변이주의 유도가 가장 중요한 관건이 됨.
- 이차대사산물 과대생산은 이차대사산물의 전구체를 제공해주는 일차대사와 밀접한 연계성이 있으므로, 고생산균주 개발을 위해서는 생산균주의 일차대사산물의 과량 공급에 의해 목적 이차대사산물의 생합성 속도를 증가시키는 논리적인 접근법이 필요함.
- 즉 돌연변이 과정에서 링크마이신의 전구체가 과생산되도록 방향성을 주어 이러한 균주를 일차적으로 선별한 후, 이로부터 링크마이신 생산성이 보다 높은 고생산 균주를 점차적으로 선별하는 전략을 통하여 일차대사산물의 적기 생산이 이차대사

산물의 생합성에 미치는 영향을 규명할 수 있을 것임.

- 유전학적 성질의 변화로 인해 revertant로의 back mutation 현상이 발생되지 않도록 신중한 균주보관방법 개발이 필수적임.

나. Bioassay 법에 의한 신속한 in situ 고역가 변이주 선별방법 확립

- Top agar 법

Top agar 법은 독립된 *S. lincolnensis* 의 colony가 형성된 agar plate 위에 증류수 1L에 NaCl 5 g, agar 6.5 g과 감수성 균주의 포자를 넣어 만든 top agar를 부은 뒤 incubator에서 배양하여 *S. lincolnensis*에 의해 생합성된 린코마이신에 의한 감수성 균주의 성장 저해환의 크기를 측정함.

- Agar plug 법

Agar plug 법은 Ichikawa 등이 개발한 Agar plug 법을 기초로 미리 배양된 *S. lincolnensis* 의 colony로 된 agar cylinder를 감수성균주가 도말된 agar plate 위에 얹어서 배양기에서 배양하여 *S. lincolnensis* 에 의해 생합성된 린코마이신에 의한 감수성균주의 성장저해환의 크기를 측정함.

- Paper filter disk assay 법

Disk assay 법은 액상배양된 *S. lincolnensis* 의 broth filtrate의 용매 추출물을 감수성균주가 도말된 agar plate 위에 얹어서 배양기에서 배양하여, *S. lincolnensis*의 배양액 중에 분비된 린코마이신에 의한 감수성균주의 성장저해환의 크기를 측정함.

다. 린코마이신 고생산균주 선별을 위한 변이처리법 확립

- UV 변이처리 방법

UV 변이처리 방법으로서 배양액을 살균된 Waring blender로 grinding한 뒤 커피

여과지를 이용하여 여과함. 포자와 배지가 혼합된 여과액을 15,000rpm에서 6~7 분간 원심분리하여 0.1M MgSO₄ 용액으로 세번 세척한 뒤 hemocytometer를 이용하여 포자를 계수한 뒤 0.1M MgSO₄ 용액으로 10⁴ spores/ml로 희석함. 살균된 glass petridish에 포자 현탁액 8 ml를 넣고 rocker위에 petridish를 놓은후 온화하게 혼합하면서 UV를 조사함. UV처리는 암소에서 254 nm의 2개의 15W UV lamp(VIBER LOURMAT사, VL-215C)를 20 cm 거리에서 0~60초 동안 5초 간격으로 조사하고 0.5 ml씩 agar plate에 도말하여 각각의 colony를 계수하여 처리하지 않은 control에 대한 백분율을 구하여 생존율이 10%인 UV 처리시간을 구하여 변이조건으로 이용함.

- NTG 변이처리 방법

NTG(1-Methyl-3-nitro-1-nitroso guanidine) 변이처리 방법으로서 포자를 citrate buffer에 희석한 현탁액에 최종농도 50~500 mg/L까지의 NTG (1-Methyl-3-nitro-1-nitroso guanidine)를 넣어 와류 혼합한 뒤 진탕배양기에서 30℃, 40 rpm으로 1시간 동안 섞음. 그 뒤 0.1M KH₂PO₄용액으로 NTG를 세척한 뒤 희석하여 agar plate에 도말함. 역시 각 plate의 colony를 계수하여 처리하지않은 control에 대한 백분율을 구하여 생존율이 10%인 NTG농도를 변이조건으로 이용함.

라. 분리된 링크마이신 고역가 생산변이주의 shake flask 배양조건 최적화

- Top agar 법, agar piece 법, disk assay 법에 의해 고체배양에서 관찰된 각 돌연변이주의 링크마이신 생합성 능력이 shake flask에 의한 액상배양시에도 비슷한 경향을 보이는지 검증.

- 최적 배양조건(온도, pH, rpm, D.O.) 및 배지에 의한 shake flask 배양조건 확립.

- Shake flask 배양을 이용한 유가식 발효 운전조건에서 링크마이신 생산 최적화.

고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 린코마이신 발효공정 최적화(제2세부과제):

가. 플라스크 배양에서의 린코마이신 생산균주의 특성연구

- 배양중의 부산물의 축적, 또는 특정 기질의 과다 공급으로 인한 생산균주의 성장 방해 가능성 및 린코마이신 생산성에 미치는 영향 조사.
- 배지 중에 린코마이신의 전구체(precursor) 또는 유도체(inducer)를 첨가했을 경우, 이들이 생산균주의 린코마이신 생산성에 미치는 영향 조사.
- 생산균주의 형태학적(morphology) 변화에 따른 배양액의 점도 변화 조사.
- 배양액의 점도 변화가 배양액에서의 기질(substrate) (즉 탄소원 또는 산소 등)의 물질전달계수에 미치는 영향 조사.
- 생물반응기에서 교반기의 회전속도와 직경의 변화가 생산균주의 성장 및 사멸에 미치는 효과와 세포의 형태학적인 면(morphology) 및 생산성에 미치는 영향을 정량적으로 분석.

나. 생물반응기에서의 린코마이신 생산성 향상 연구

- 교반속도가 생물반응기 내의 산소공급에 미치는 효과와, 생산균주의 shear stress 에 대한 민감성 및 린코마이신 생산성에 미치는 영향 분석.
- 배양 중에 산소전달율(oxygen transfer rate)과 생산균주의 산소흡수율 (oxygen uptake rate)의 관계 조사 및 각 세포 농도에서의 critical dissolved oxygen level 조사를 통해 배양액 중의 용존산소를 정밀 조절할 수 있는 생물반응기 운전 전략 확립.
- 회분식배양 중 제한기질(limiting substrate)의 농도 변화가 세포의 성장속도와

린코마이신 생산성에 미치는 영향 조사.

- 쉽게 이용되는 탄소원의 농도 변화에 의해 린코마이신 생합성의 catabolite regulation 현상 규명 및 이를 극복하기 위한 유가식 배양공정 및 운전조건 조사.
- 배양액 중의 용존산소 농도의 최적제어(critical 용존산소 농도이상으로 유지)와 연계하여 배양액 내의 탄소원 농도의 최적 수준 유지를 위한 배지공급 전략 확립.

다. 유가식 배양을 통해 생산균주의 이차대사 조절: 린코마이신의 생산성 증진을 위한 유가식 배양공정 확립

- 일차대사에 매우 적응되어 자신의 세포성장이 활발한 생산균주는 이차대사산물을 효과적으로 과도생산(overproduction)하지 않으므로 배양중 생산균주의 성장을 어느 정도 제한하는 생물반응기 운전전략이 필요함. 세포성장의 제한은 일반적으로 필수영양분의 제한공급으로 가능함. 본 연구에서는 용존산소 또는 탄소원을 제한기질(limiting substrate)로 이용하여 세포성장을 제한함으로써 전체대사의 균형을 깨고 대사흐름(metabolic flux)을 이차대사산물인 린코마이신의 생합성 방향으로 전환하기 위해서 유가식배양에 의해 탄소원의 농도와 용존산소 농도를 다양하게 조절함.

- 즉 유가식 배양시 지수기 단계에서 생산균주의 성장이 매우 활발함에도 불구하고 배양액내에 과량의 탄소원을 유지하기 위한 방법으로 생산균주가 용존산소 제한조건에 먼저 노출되어 (즉 OTR의 k_La 을 줄이기 위해 낮은 교반속도 유지) 성장속도가 주로 용존산소에 의해 영향을 받도록 배양조건을 조절하는 실험을 수행함.

- 또한 유가식배양중 공급되는 배지의 공급속도 및 농도 조절을 통해 생산균주의 성장속도가 배양기 내의 잔류 탄소원의 농도에 의해 조절될 수 있는 실험도 수행함. 또한 세포성장속도에 영향을 미치지 않으며 생산균주 또한 교반에 의한 shear damage에 노출되지 않도록 하기 위해, 유가식배양법에 의해 배양액중 용존산소 농

도를 적정 농도로 유지하게 하는 운전전략을 확립함.

- 다양한 조건의 유가식배양을 통해 세포성장에 저해효과가 없는 것으로 판명된 포화용존산소 농도를 유지함과 동시에 탄소원농도가 catabolite regulation 현상을 극복할 수 있도록 낮은 농도로 유지시키는 실험 전략을 개발함. 즉 공급된 높은 비율의 탄소원이 이차대사로 효율적으로 이용될 수 있도록 세포성장을 어느 정도 저해시킴으로써 세포의 이차대사를 활발하게 유도시키는 유가식 배양 전략을 개발함.

라. 생물공정 제어기술에 의한 링크마이신 대량생산 기술 개발:

- 회분식배양과 유가식배양 공정의 실험결과 비교
- 최적의 공정운영을 위한 실험 결과를 이용하여 생물반응기의 운전 공정변수들을 섬세하게 조절하며, 이 결과를 링크마이신 발효공정을 scale-up하기 위한 기초 자료로 이용.
- On-line computer-controlled fermentation system에 의한 lincomycin 발효 및 공정 최적화
- 생물반응기의 운전전략 수립 및 문제점 분석: 최상의 결과를 기초로 해서 링크마이신 생산 최적공정을 개발.

고기능성 동물성장촉진· 사료효율개선제인 링크마이신 분리정제 공정개발 (제2협동과제):

가. 링크마이신 분석 시스템 연구

- FTIR 법
- NMR 법

- TLC 또는 paper chromatography법
- modified HPLC법
- Bioassay 법

나. 배양액으로부터 생산세균의 분리 연구

- 여과법:
 - filtrate 점성 연구
 - cake의 specific resistance 연구
 - 최적 여과 공정 선택
 - 최적 여과막 선택
 - scale-up에 필요한 Ruth equation 상수 결정
 - cake의 compressibility 연구

- 원심분리법:
 - Gyro tester test
 - Σ value 추정

다. 추출 전처리 chromatography 공정 개발

- chromatography 최적 용매 선정
- chromatography 최적 담체 (adsorbent) 선정
- 최적 pH 조건 선정

라. 생성 배양액으로부터 린코마이신 추출 공정 연구

- 최적 추출 용매 선택
- 분배계수 극대화를 위한 추출 시스템의 pH 조절 연구
- 용매 추출 시스템에서 린코마이신의 상평형 연구
- 다단 추출 공정 개발
- 추출공정의 최적화

마. bench-scale 분리 정제 공정 개발

- 분리 정제 공정 합성:
 - 분리 정제 공정의 최적화 및 공정 합성
 - 전체 분리 정제 공정의 PFD (process flow diagram) 개발
- 분리 정제 공정 설계 및 개발:
 - 물질수지식 확립
 - P&ID 개발 및 장치 설계
 - 장치 제작 및 설치
- bench-scale 분리정제 공정 운전:
 - 개발된 연속식 분리정제공정의 운전 및 운전자료 축적
- 운전자료 검토 및 scale-up 전략 연구:
 - 운전자료 분석
 - 설계식의 개발 및 설계인자 추정
 - scale-up 기준과 scale-up 인자 결정

- 링크마이신 결정화 공정 개발:

- 최적 용매 선정 및 온도 pH에 따른 용해도 연구
- 선택된 결정화 공정의 최적 운전 조건 연구
- 재결정화 연구
- 생성 crystal 의 분석 및 성상 연구

고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제의 음식물 쓰레기에의 활용을 통한 가축의 생산성 증진(제1세부과제):

가. 남은 음식물과 성장촉진제의 급여수준에 따른 육계와 비육돈의 증체량 개선 및 원인구명

- 육계 : 1일령 육계 460수에 남은 음식물을 5%와 10%수준으로 첨가하며 현재 시판용 성장 촉진제를 0, 0.1, 0.2%수준으로 첨가한 6개 처리구로 5주간 사양시험을 실시하여 생산성에 미치는 증체량, 및 혈액의 성상을 조사하여, 남은 음식물과 시판용 성장촉진제를 0.1, 0.2, 0.3% 수준으로 첨가·급여하여 생산성이 극대화되는 최적 수준의 배합비를 구명한다

- 비육용 자돈 : 비육돈용 사료에 5, 10, 20% 수준의 남은 음식물과 두 수준의 시판용 성장촉진제를 수준별로 다른 배합비를 이유자돈 60두에 적용하여 6개 처리구를 두어 4주 단위로 약 16주간 사양시험한 후 처리구별 증체량을 측정

나. 남은 음식물과 성장촉진제의 급여에 따른 육계와 비육돈의 사료 섭취량 증가 및 사료효율 개선

- 육계 : 시판용 성장촉진제를 0.1, 0.2, 0.3% 수준으로 첨가·급여하고 남은 음식물 첨가 수준에 따라서 수준별로 6개 처리구로 다르게 급여후 사료섭취량 및 사료효율을 5주간 조사

- 비육용자돈 : 시험방법은 육계와 동일하게 시행하며, 남은 음식물 첨가·급여수준에 따른 고기농성, 단일, 혹은 혼합성장촉진제의 처리구별 사료섭취량, 사료효율을 4주단위로 16주간 조사

다. 남은 음식물과 개발된 성장촉진제의 급여수준에 따른 육계와 비육돈의 폐사율에 미치는 영향 구명

- 육계 : 1년과 2년차에서는 시판용 성장촉진제를 단일 혹은 혼합으로 수준별로 첨가·급여한 후 3년차에는 본 연구에서 제조된 성장촉진제 와 최적수준의 시판용 단일 혹은 혼합 성장 촉진제를 남은 음식물 첨가 수준에 따라서 수준별로 6개 처리구로 나누어 급여후 폐사율을 5주간 조사

- 비육용자돈 : 시험방법은 육계와 동일하며 남은 음식물 첨가·급여수준에 따른 고기농성 성장촉진제 와 시판용 단일 혹은 혼합 성장촉진제의 처리구별 급여로 폐사율을 4주단위로 16주간 조사

제2절 연구개발의 중요성

- 현재 IMF 시대를 맞이하여 그 동안 대부분 수입에 의존하던 사료 수입가의 상승

으로 많은 농민들이 고통을 받고 있고 축산업 전반에 걸친 경쟁력이 급속히 하락하고 있는 실정임. 이러한 문제점을 타개하기 위하여 최근에는 음식물 쓰레기를 수거하여 사료화하는 방안이 실용화되어 왔고 현재 이러한 음식물 찌꺼기 기원의 사료를 사용하고 있는 농가의 수가 나날이 증가하고 있음.

- 하지만 이러한 음식물 쓰레기 기원의 사료는 축산 농가에서 사용하는데 몇가지 문제를 가지고 있어서 이의 보완이 시급한 실정임. 첫 번째 문제는 영양물질의 불균형 문제임. 두 번째 문제는 기존의 수입 사료에 포함되어 있던 성장촉진·사료효율개선제가 음식물 찌꺼기 기원의 사료에는 포함되어 있지 않기 때문에 가축의 사망률이 증가되고 성장이 둔화되는 큰 문제점을 가지고 있음. 특히 어린 돼지나 닭의 경우 사망률 증가 문제로 성장촉진·사료효율개선제의 첨가가 필수적임.

- 한편 시중의 수입 사료에는 이러한 성장촉진·사료효율개선제가 최적 배합되어 첨가되어 있음. 그 한예로 린스마이신은 린코마이신과 스펙티노마이신이 최적 배합되어 상승효과를 극대화한 경우임. 그러므로 성장촉진·사료효율개선제 배합 비율은 회사의 know-how로 완전 비밀에 부쳐지고 있어서 이러한 성장촉진·사료효율개선제의 첨가기술의 확보가 음식물 찌꺼기 기원의 사료화에 필수적임.

- 첫 번째 문제를 해결하기 위한 영양물질의 보강에 대한 대처방안으로 유산균, 효모, 효소복합체의 개발등 여러 가지 다양한 연구가 수행되고 있으나 성장촉진·사료효율개선제의 첨가 방안에 대한 연구는 전무한 상태에 있으므로 음식물 쓰레기 기원의 사료에 필요한 성장촉진·사료효율 개선제의 생산기술 개발과 아울러 이러한 첨가제의 최적 배합에 관한 기술 개발이 특히 IMF를 맞고있는 시점에서 국가적으로 절실한 실정임.

- 이러한 성장촉진·사료효율개선제의 생산 기술 및 첨가제의 최적 배합기술 개발에 따른 고기능성 사료의 개발로 인한 육계와 비육돈의 생산성 개선, 사료 저감 효과, 가축 폐사율 저감효과 등 생산성 제고로 국제경쟁력 신장의 효과를 기대할 수 있음.

- 이러한 고기능사료의 개발을 위해서는 먼저 고기능 성장촉진·사료효율개선제의 생산기술을 확립하여야 함. 따라서 성장촉진제 중 시장성이 비교적 크고 *Streptomyces* 기원이며 스펙티노마이신과 배합되어 린스마이신으로 사용되고 있는 린코마이신을 모델로 삼아 연구를 진행하는 것이 바람직함.

- 특히 이러한 성장 촉진제인 린코마이신은 대표적인 소규모 시장의 첨단 생물공학 제품, 수입의존 소량다품종 제품, 중간기술 차별화 제품임. 따라서 기술개발 시 시장 진입이 용이하나 시장규모가 작기 때문에 대기업의 사업영역으로 기대하기 어려운 생물산업의 틈새시장을 형성하므로 안정적인 시장을 확보할 수 있고 소규모 투자로 용이하게 출발할 수 있음.

- 이러한 성장촉진제의 모델로 린코마이신을 생산하는 기술의 개발을 위해서는 먼저 린코마이신을 효율적으로 생산하는 균주의 개발이 시급하고 이와 아울러 개량된 균주를 대량 배양하고 이로부터 린코마이신을 분리정제하는 일련의 기술들이 개발되어야 함. 또한 이렇게 해서 생성된 성장촉진제의 최적 급여수준을 규명하고 이를 바탕으로 여러 가지 다른 성장촉진제의 최적배합에 관한 연구 및 실제 검정을 통한 고기능 사료의 개발과정에 필요한 다방면의 유기적인 연구가 필요함.

고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 린코마이신 고생산 균주개발(제1협동과제)

- 발효관련 산물의 생산을 위해서는 고생산성 균주의 확보가 가장 핵심적인 관건임. 왜냐하면 새로운 균주는 신규 물질특허로 이어지며 독점적인 물질생산을 법적으로 보장 받게되기 때문임.

- Upjohn사에서 특허 등록된 균주를 ATCC를 통해 구매할 수는 있으나 이들 균주의 생산성은 두회사에서 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 파악함으로써 방선균을 이용한 각종 항생물질 등의 생산 전반에 도움을 줄 수 있을 것임.

고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 링크마이신 발효공정 최적화(제2세 부과제)

- 링크마이신과 같은 이차대사산물의 대량생산을 위한 발효공정 기술은 농생물산업의 know-how 및 경제성을 결정하는 가장 중요한 기술로 인식되어져 선진국에서 기술개발 노력이 매우 치열한 분야임.
- 생산방법이 생산균주의 생리학적 특성에 크게 의존하고 있는 이차대사산물 생산 공정 개발의 경우, 기존의 회분식 공정이나 scale-up시 많은 문제점을 안고 있는 steady-state 연속배양공정 (chemostat) 이외에도, 미생물의 이차대사산물의 생합성특성과 밀접하게 연계되어 조업되는 유가식 배양공정이 있음.
- 링크마이신의 대량생산을 통한 산업화 기술의 개발은 다른 미생물이나 다른 유용물질의 생산을 통한 미생물의 자원화에도 기초가 되는 기술로 이의 확대 적용으로 농업에 의해서 생산되는 많은 생물자원을 저가의 식량자원으로만 이용하는 것이 아니라 이로부터 여러 가지 고부가가치 유용물질을 생산함으로써 전반적인 농업의 고부가가치화 및 첨단산업화를 기대할 수 있음.

고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 링크마이신 분리정제 공정개발(제2협동과제)

- 발효공정에서 생산되는 산물은 여러가지 미반응 substrate, byproduct, insoluble등이 포함되어 있어 일정한 함량 및 순도를 지닌 정제품으로의 분리정제

가 필수적임.

- 또한 린코마이신은 UV 나 가시광선 범위의 파장에서 흡광하지 않으므로 종래의 HPLC를 사용하기 어려우므로 사용하기 간편한 새로운 분석방법의 개발이 모든 연구 개발에 앞서 선행되어야 함.

- 특히 린코마이신의 분리정제를 위해서는 순수도를 높이기 위해 여러 단계의 용매 추출 및 column조작이 필요하고 마지막 단계로 소비자가 원하는 형태로 가공하기 위해 결정화(crystallization) 공정이 필요함.

- 실용화 분리정제 공정 개발을 위해서는 lab-scale의 기초연구를 바탕으로 pilot plant-scale의 공정을 개발하고 실제 배양된 배양액을 적용하여 운전 자료를 축적한 후, 기초 연구 자료, pilot plant 설계자료 및 운전자료를 비교 분석하여 scale-up 전략 수립 및 설계인자 도출등의 일련의 단계적 실용화 연구가 필요함.

고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제의 음식물 쓰레기에의 활용을 통한 가축의 생산성 증진(제1세부과제)

- 앞서 언급한대로 음식물 찌꺼기 기원의 사료의 개발을 위해서는 성장촉진·사료효율개선제의 효율적 첨가가 필수적이며 이를 위해서는 성장촉진·사료효율개선제의 생산 기술 개발과 함께 이들의 최적 배합을 통한 사료의 고기능화가 절대적으로 필요함.

- 특히 우리나라에서는 고기능 사료를 위한 성장촉진·사료효율개선제의 배합 기술이 전무한 상태에 있기 때문에 이러한 기술을 이용하여 고기능 사료를 개발함으로써 육계와 비육돈의 생산성을 개선하고 사료를 절감하며 가축 폐사율을 감소시키는 등 축산에 있어서 국제경쟁력을 신장시킬 필요가 있음.

제 2장. 고기능성 동물성장 촉진·사료효율

개선제인 링크마이신 고생산균주 개발

(제1 협동과제)

제 1절. 서 설

Lincomycin과 같이 미생물의 이차대사 결과 생합성되는 이차대사산물은 미생물의 성장에 직접 요구되는 대사물질이 아니므로 이들의 생합성은 생산균주에 의해 정밀히 조절되고 있다. 따라서 산업적인 생산을 위해서는 이 물질의 각 생합성 단계별 조절기능의 결손 변이주를 통해, 생산하고자 하는 이차대사산물을 과량생산(overproduction)하는 변이주의 유도가 가장 중요한 관건이 된다. 이차대사산물의 과대생산은 이차대사산물의 전구체를 제공해 주는 일차대사와 밀접한 연계성이 있으므로, 고생산균주 개발을 위해서는 일차대사산물의 과량 공급에 의해 목적 이차대사산물의 생합성 속도를 증가시키는 논리적인 접근법이 필요하다. 한편 이차대사산물 생합성 균주는 일반적으로 자신이 합성하는 산물에 의해 성장이 심하게 저해 받거나, feedback inhibition 또는 repression 현상으로 인해 세포성장 기간 동안에 이차대사산물의 생합성이 심각하게 감소하는 경향이 있다. Lincomycin 생산균주의 경우, lincomycin 생합성에 관련된 유전자 내부에 자신이 합성하는 항생물질에 대한 저항성 유전자가 삽입되어 있다고 보고된 바 있다. 따라서 고농도의 lincomycin에 대한 저항성을 갖는 변이주를 얻는다면, 이 균주는 자신의 항생물질에 대한 저항성을 나타내기 위해 저항성 유전자가 증폭되고, 이와 더불어 근접해 있는 생합성 유전자가 동시에 증폭되어 고생산성 변이주일 가능성이 클 것으로 판단된다. 또한 돌연변이 과정에서 lincomycin의 전구체가 과생산되도록 방향성을 주

어 이러한 균주를 일차적으로 선별한 후, 이로부터 lincomycin 생산성이 보다 높은 고생산균주를 점차적으로 선별하는 전략도 논리적인 접근방식으로 판단된다.

본 연구에서는 lincomycin을 생합성하는 *Streptomyces lincolnensis*를 대상으로 UV 및 NTG 처리에 의해 다양한 특성의 고생산성 변이주들을 선별한 후, lincomycin 생산성이 일정 수준에 도달하면 그 때마다 탄소원 및 질소원 조사 등과 같은 배지성분 최적화에 대한 연구를 반복 수행하였다. 한편 전통적인 돌연변이법인 NTG와 UV를 이용하는 경우 논리적인 방법(rational screening)에 의해 고생산성 변이주를 유도했을지라도, 생산성이 일정 수준 이상이 되면 그 증가하는 폭이 점차 감소하는 경향이 있다. 따라서 전통적인 돌연변이 방법과 병행해서 효율적으로 고생산성의 원형질융합체를 얻는 방법을 개발하고자 하였으며, 또한 획득된 고생산성 변이주(원형질융합체 포함)를 대규모로 신속하게 배양함으로써 그 생산성을 확인하는 방법인 miniature 실험 방법을 개발하고자 하였다. 또한 높은 생산성을 지닌 균주를 효율적으로 선별하기 위해, 각각의 생산성 수준에 맞는 감수성균주를 이용한 agar piece 방법 및 disc assay 방법을 개발, 적용함으로써 균주 선별의 효율성을 극대화시키고자 하였다.

제 2절. 재료 및 방법

1. 균주, 배지 및 배양조건

사용된 균주는 *Streptomyces lincolnensis* IMSNU20232에서 유래된 돌연변이주로서 각각의 단일 콜로니를 성장배지 (Table 1-1, A)에서 5일간 배양한 후, 다양한 생산배지 (Table 1-1, B에 균주 선별 초기 단계의 생산배지 성분을 나타냈음)를 사

용하여 플라스크 및 튜브배양을 실시하였다. 다양한 실험조건은 제 3절의 결과 및 고찰에서 상세히 설명하였다. 생산배지에서 약 10일간 배양한 후 5 ml의 sample을 취하여 15000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤, disc assay 및 HPLC 분석을 위해 상등액 2 ml의 sample을 취했다. 본 연구에서 사용된 대표적인 돌연변이주의 종류는 다음과 같다: 자신의 생합성 물질인 lincomycin에 대한 저항성균주; tyrosine hydroxamate (lincomycin의 precursor로 작용하는 tyrosine의 antimetabolite) 저항성균주; ethionine (lincomycin의 methyl donor인 methionine의 antimetabolite) 저항성균주; 항생제 및 antimetabolite에 대한 동시 저항성균주; 다양한 특성의 원형질융합균주.

2. 다양한 돌연변이 유발원

가. UV 변이 처리 방법

초기에 사용한 돌연변이 유발원으로 비교적 온화한 조건의 돌연변이 유발원을 사용하였다. UV 변이처리 방법으로서 sporulation 배지인 SPM plate에 자란 spore를 증류수로 수거한 뒤 주사기 filtration을 거쳐서 순수한 포자를 얻었다. 그리고 hemocytometer를 이용하여 포자를 계수한 뒤, 살균된 glass petridish에 포자 현탁액 8 ml를 넣고 rocker 위에 petridish를 놓은 후 온화하게 혼합하면서 UV를 조사하였다 (Figure 1-1). UV 처리 조건에 대한 한 예는 다음과 같다:

Length : 254 nm

Exposure time : 90 sec

나. NTG 변이처리 방법

두 번째 변이원으로 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine을 이용한 NTG mutation을 실시하였다. 이는 UV 변이처리 방법보다 돌연변이 빈도가 높아 좀더 다양한 변

이주를 얻기 위한 것이었다. 또한 UV 실험에서 생산성 증가에 어느 정도 한계가 있음을 확인한 후 다른 돌연변이원인 NTG를 사용하였다 (Figure 1-2). Sporulation 배지인 SPM plate에 자란 spore를 glycerol 20%로 수거한 뒤 주사기 filtration을 거쳐 순수한 포자를 얻었다. Hemocytometer를 이용하여 포자를 계수한 뒤 살균된 tube에 포자 현탁액을 0.1M citrate buffer (pH 5.5)로 희석시키고 NTG 농도를 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 40분 동안 반응시켰다. 그후 세척용 buffer인 0.1M phosphate buffer (pH 7.0)를 이용하여 3번 세척한 후 도말하였다. NTG 처리 조건에 대한 한 예는 다음과 같다:

NTG concentration : 30 $\mu\text{g/ml}$

Exposure time : 40 min

3. Disc assay 방법

Disc assay를 위해 감수성 균주인 *Staphylococcus aureus* (KCCM 12255), *Sarcina lutea* (IMSNU 11084) 그리고 *Micrococcus luteus* (KCCM 11236)를 12~24시간 Antibiotic medium 3 배지 (Table 1-2, B)에서 배양한 뒤 일정한 농도가 되도록 희석하여 Antibiotic medium 1 배지 (Table 1-2, A)위에 pore plating했다. 미리 준비한 멸균된 disc (Whatman Antibiotic Assay Disc, 6.0 mm)를 ELISA용 well에 놓고 배양액의 추출 시료를 적정량 접종한 후 agar 배지 위에 올려 놓고, 각각의 감수성균주의 성장 속도를 고려하여 배양 온도는 28°C로 배양하였다. 결과 관찰을 위해 disc 주변에 생성된 감수성균주의 성장저해환의 크기를 vernier caliper로 측정하였고, disc assay 방법을 확립하기 위해 감수성 균주의 세포 농도, 배양 시간, 추출시료의 접종량 등을 조절하여 실험을 수행하였다. 한 예로서 Figure 1-3과 1-4에 *S. aureus*를 이용한 다양한 조건의 disc assay 결과를 나타내었다. 또한 Figure 1-5와 1-6에 disc assay를 적용해서 얻은 표준적량곡선 (standard curve)을

제시하였다.

4. Agar piece(plug) method

고생산성 균주 선별을 위한 agar piece 배양은 humidified chamber에서 1.5%의 agar가 포함된 P-1 배지와 SPM 배지에서 1-3일 정도 미리 배양된 *S. lincolnensis* 가 놓여진 agar cylinder (6 mm)를 다양한 농도의 감수성 균주 (*S. aureus* 등)가 pore plating된 antibiotic medium 1 배지 위에 올려 놓고 수행하였다. 한 예로서 감수성 균주로 *S. aureus*를 사용한 실험방법은 다음과 같다: *S. aureus*의 cell 수를 1×10^5 , 1×10^6 cells/ml로 변화시키고 humidified chamber에서 1, 2, 3일간 배양한 agar piece를 실험하였다. 비교적 적절한 성장저해환을 보이는 조건으로서 감수성 균주의 농도를 1×10^6 cells/ml로 결정하였고 humidified chamber에서 2일간 배양하기로 결정하였다. Figure 1-7에 *S. aureus*를 이용한 다양한 조건에서의 agar piece assay 결과를 제시하였다.

5. HPLC 운전조건

추출시료중의 lincomycin의 분리능 증가와 HPLC column의 보호를 위해 기존의 HPLC 분석조건을 다음과 같이 수정하였다 (Figure 1-8).

- Column : Spherisorb ODS-2 C₁₈ (250 mm×4.6 mm)

Cat. No : z22,606-8 (Sigma)

- Mobile phase :

Acetonitrile (CH₃CN):Phosphate buffer:distilled water = 30:40:30

Phosphate buffer : phosphoric acid (1.35% V/V) → PH 6.0 (NaOH)

- Column temperature : 45°C
- UV detection : 210 nm
- Flow rate : 1 ml/min

6. Lincomycin 분석을 위한 HPLC와 disc assay 로 측정된 양의 상관관계

Lincomycin 정량분석을 위한 disc assay의 정확도를 알아보기 위해 HPLC에서 분석한 결과와 비교한 실험예를 한가지 소개하면 다음과 같다: Disc assay를 위해 감수성 균주인 *Sarcina lutea* (IMSNU 11084)를 12~24시간 Antibiotic medium 3 배지에서 배양한 뒤 일정한 농도가 되도록 희석하여 Antibiotic medium 1 배지 위에 pore plating 했다. 미리 준비한 멸균된 disc (Whatman Antibiotic Assay Disc (Cat No 2017 006), 6.0 mm)를 ELISA용 well에 넣고 배양액의 추출 시료를 적당량 접종한 후 agar 배지 위에 올려놓고 감수성균주의 성장 속도를 고려하여 28°C로 배양하였다. 결과 관찰을 위해 disc 주변에 생성된 감수성 균주의 성장저해환의 크기를 vernier caliper (Mitutoyo Company)로 측정하였다. 또한 HPLC에 의한 정량측정은 수정된 조건으로 진행되었다. Figure 1-9에 나타난 바와 같이 lincomycin의 농도가 낮을 경우에는 HPLC와 bioassay의 error %가 높지만, 농도가 높아 질수록 error %가 낮아지는 것을 알 수 있다. 따라서 고생산성 균주 선별시 bioassay로 1차 선별을 한 후 HPLC로 확인 작업을 함으로써 균주 선별이 좀 더 효율적으로 진행될 수 있게 하였다.

7. 항생물질과 아미노산 유사물질에 대한 저항성균주 분리 방법

Lincomycin 생합성에 관련된 유전자의 내부에 자신이 합성하는 항생물질에 대한 저항성 유전자가 삽입되어 있다고 보고된 바 있다. 따라서 고농도의 lincomycin에

대한 저항성을 갖는 변이주를 얻는다면 이 균주는 항생물질에 대한 저항성을 나타내기 위해 저항성 유전자가 증폭되고, 이와 더불어 근접하고 있는 생합성 유전자가 동시에 증폭되어 고생산성 변이주일 가능성이 클 것으로 판단하였다. 또한 lincomycin 생합성의 전구물질로 알려진 tyrosine을 과량 생합성하는 변이주를 얻기 위해 tyrosine analog인 tyrosine hydroxamate에 대한 저항성 변이주를 얻고자 하였다. 한편 lincomycin 생합성 단계에서 methyl기의 donor로 작용하는 methionine의 세포내 농도를 증가시키기 위해 methionine의 analog인 ethionine에 대한 저항성 변이주의 선별을 시도하였다.

항생물질 저항성 균주의 분리는 먼저 SPM plate (Table 1-1, C)에서 자란 spore를 증류수로 수거한 뒤 주사기 filtration을 거쳐서 순수한 포자를 준비하였다. 고생산 균주를 얻기 위해 생산균주 자신이 합성하는 생산물인 lincomycin에 대한 저항성을 띄는 변이주를 얻고자, 초반에는 UV를 처리하여 실험하였으며 점차적으로 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine을 이용한 NTG mutation을 실시하였다. NTG mutation은 UV 변이처리 방법보다 돌연변이 빈도가 높아 더욱 다양한 변이주를 얻기 위해 시도되었다. 첨가되는 lincomycin의 농도를 점차로 증가시켜 가며 저항성 균주를 선별하였고, 매 실험마다 균주의 보관용으로 단일 colony를 agar slant에 접종하였다. 한편 tyrosine hydroxamate 또는 ethionine에 대한 저항성 돌연변이주를 얻기 위해 각각의 antimetabolite를 0.2 μ m pore 크기를 갖는 필터로 거른 뒤 다양한 농도로 최소배지에 첨가하여 사용하였다. 각각의 시약이 첨가된 agar plate에 희석된 포자 현탁액을 도말하고 28°C에서 5~6일간 배양한 뒤 자라난 colony를 분리하였다. 저항성 균주의 선별을 위한 배지로는 초기에는 최소배지 (MM) (Table 1-3)를 사용하였으나 나중에는 SPM배지를 사용하였다. 선별된 colony를 성장배지 (GM)에 접종하여 28°C에서 5일간 배양한 후 생산배지에 접종하여 10일 동안 배양하여 disc assay를 통해 lincomycin 고생산성 변이주를 선별하였다.

8. 생물반응기에서 용존산소 조절을 통한 발효실험

*S. lincolnensis*의 단일 콜로니에서 얻은 고생산 균주를 50 ml의 GM 배지가 포함된 250 ml 플라스크를 이용하여 seed culture했다. 배양 조건은 28°C, 200 rpm으로 하여 5일간 배양하였으며 생산배지 (P-1)가 첨가된 발효조로의 접종량은 10% (v/v)로 하였다. 발효조는 2 L (1.5 L 조업부피)의 한국발효기(주) 제품을 사용하였다. 용존산소 조절을 위한 컴퓨터 소프트웨어는 (주) LOKAS AuotoLab LK-930을 사용하여 제어하고자 하는 수준 이하로 용존산소가 도달하면 자동적으로 교반속도와 통기량이 증가하여 산소공급을 원활하게 하였다. 통기량을 증가시키기 위해 AALBORG[®] INSTRUMENTS & CONTROLS, INC.의 mass flow controller (GFC17)을 이용하였다. 또한 발효조내에서 빠져나가는 산소와 이산화탄소의 분압을 측정하기 위해 exhaust gas analyzer ((주) LOKAS GMATE 3000A)를 사용하였다. 교반속도는 150 rpm과 350 rpm으로, 공기의 유입량은 1 l/min에서 3.5 l/min으로 설정하였다.

9. Lincomycin 고생산균주 대량 선별을 위한 scale-down 실험방법 적용

고생산 균주개발에 있어서 가장 중요한 단계중 하나는 가능한 한 대량의 균주를 테스트하여 그 가운데서 고생산성을 지닌 균주를 신속히 선별하는 데에 있다. 즉, 균주개발을 위해서는 일반적으로 mother 균주로부터 각각의 변이주를 얻어 성장 단계와 발효 단계의 배양 후, 배양액의 bioassay를 통해 상위 10~20 %의 분리주를 선별하고, 이를 플라스크 배양과 좀 더 scale-up된 발효조 배양으로 배양단계를 점차 증가시켜 가며 생산성을 향상시키는 연구를 수행해야 한다. 이 때에 균주개발의 성공 여부는 가능한 한 많은 변이주를 얻어 이로부터 고생산균주를 선별하는 데에 달려있다고 할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 lincomycin 고생산균주를 대량으로 선별하기 위해 scale-down 실험방법을 개발하였다. Scale-down 실험은 기존의 실

험방법을 소규모화 시킴으로써, 사용되는 배지와 실험 기자재의 비용을 줄일 수 있으며, 또한 유기용매등의 사용과 발효 찌꺼기 등을 감소시키는 장점이 있다. 대량의 균주를 신속히 테스트하기 위해 본 연구에서 개발된 lincomycin 고생산균주 선별을 위한 scale-down 실험방법을 Figure 1-10에 자세히 나타내었다. *S. lincolnensis*의 포자를 수거한 후 이를 희석하여 접종한 다음 colony를 분리하여 각각의 colony를 agar slant에 접종하거나 agar plug assay를 통해 일차로 상위 10% 정도의 고생산성 균주를 선별한 뒤 50 ml tube로 옮겨 seed 배양을 하였다. 이때 배지는 주로 5~10 ml의 성장 배지를 사용하였으며 이는 250 ml 플라스크 배양에 사용되는 배지양보다 거의 5~10배 이상 감소된 양으로 배지 비용을 절감할 수 있다. 또한 seed 배양으로서 한번에 500개 정도씩 수행할 수 있으므로 효율적인 대량선별이 가능한 것으로 나타났다.

Figure 1-11에 10 ml의 배지량을 이용하는 tube 배양과 50 ml 배지량을 이용한 플라스크 배양에서의 다양한 저항성 돌연변이주들에 대한 lincomycin 생산성을 비교하였다. 플라스크 배양에 비해 tube 배양의 생산성이 대체로 큰 것을 알 수 있다. 또한 플라스크 배양의 오차의 폭이 대부분 큰 편인데 비해 tube 배양에서는 오차의 폭이 비교적 작게 나타났다. 주목할 점은 tube에서 고생산성 균주 (no12, 12-25, 41-56, 61)가 플라스크에서도 고생산성 균주라는 점이다. 이는 균주 선별시 10 ml 부피의 tube를 사용(miniature 실험의 정의)해도 커다란 문제점이 없으며, 대량의 돌연변이주 (원형질융합균주 포함)를 신속하게 조사할 수 있음을 제시해 준다. 한편 단기간에 다량의 변이주의 생산성을 조사할 수 있는 agar piece 분석법도 긍정적인 결과를 보여 주었다. Agar piece 분석을 위한 가장 좋은 실험방법은 생산 배지에 colony를 3일 동안 배양한 후, agar piece로 만들어 humid chamber에서 4일 동안 배양한 경우로 이 때 환원이 가장 구분하기 쉽게 나타났다 (Figure 1-12). 또한 solid culture인 agar piece 분석에서 고생산성을 보인 균주 (Figure 1-13의 #1 균주)가 액상배양에서도 고생산성을 나타냈음은 agar piece 분석법이 고생산성 균

주를 선별하는데 효율적으로 사용될 수 있음을 제시해 준다.

10. 원형질융합 방법을 이용한 고생산성 균주의 신속 선별

가. 사용균주

원형질융합에 의해 lincomycin 고생산성 균주를 선별하기 위해 다음의 특성을 갖는 균주들을 fusion partner로 사용하였다: lincomycin에 대해 저항성을 보이며 동시에 lincomycin 생합성 능력이 우수한 균주 (APPL2020 균주)를 사용하였다. APPL2020 균주는 약 1,000종의 APPL2000 균주로부터 더 이상의 돌연변이 없이 agar piece 방법을 적용한 screening 방법에 의해 새로이 선별된 고생산성, 고안정성의 균주이다 (lincomycin 생산성: 약 130,000 units). 또한 lincomycin 생합성의 전구 물질로 알려진 tyrosine의 analog인 tyrosine hydroxamate에 대한 저항성 변이주 (BTH25: 127,000 units)와, methionine의 analog인 ethionine에 대한 저항성균주 (CET42: 115,000 units)를 선별하여 fusion partner로 사용하였다.

나. 사용배지 및 완충용액

균주의 원형질체 제조를 위한 배지로는 glucose 10 g/l, yeast extract 10 g/l, sucrose 205 g/l, calcium dichloride 3 g/l, magnesium dichloride 6 g/l, glycine 40-60 g/l 가 조성인 배지를 사용하였다. 또한 원형질체 재생용 기본배지와 원형질체의 형성 및 세척에 사용된 M solution 의 조성은 Table 1-4와 같다.

다. 표지인자 (selective marker) 형성을 위한 저항성 돌연변이주 선별

원형질융합체를 분리하기 위해서는 표지유전인자가 필수적이다. 원형질융합을 수행할 균주가 서로 다른 저항성 변이주라고 한다면, 융합체는 보상작용에 의해 동시 저항성을 보이게 되고, 따라서 원형질융합체를 비교적 쉽게 선별할 수 있다. 저

항성 변이주를 얻기 위한 방법으로는 UV, NTG 변이처리 방법을 사용하였다.

라. 원형질체 형성, 재생 및 융합

포자 현탁액을 glycine 40-60 g/l 가 첨가된 배지에 접종하여 37 °C에서 48시간 동안 진탕 배양한 후 균체를 회수하였다. 그 후 완충용액인 M solution으로 2회 세척하고 0.5% lysozyme이 함유된 완충액에 현탁시켜 28 °C 배양기에서 190 rpm 으로 80-120분 동안 처리하였다. 원형질체가 형성되는 동안 매 10 분마다 sample을 채취하여 현미경으로 관찰하여 원형질체 형성 정도를 확인하였다. 이렇게 형성된 원형질체를 cotton wool filter로 여과하여 균사를 제거하고 완충용액으로 2회 세척하였다. 이를 다시 완충용액에 현탁시키고 haemocytometer를 사용하여 원형질체 수를 측정하였다. Figure 1-14에 획득한 원형질체에 대한 현미경 사진을 제시하였으며, Figure 1-15에 원형질융합체를 얻기 위한 실험방법을 체계적으로 도식화하였다. 재생된 colony 수를 확인하기 위해 제조된 원형질체 현탁액을 M solution으로 적정배수 희석하고 미리 건조된 재생배지에 도달한 후 6-7일간 배양하였다. 이때, 재생빈도 측정의 정확성을 위해 삼투압 안정제 역할을 하는 sucrose가 첨가되지 않은 배지에도 원형질체를 도달하였다. 또한 재생빈도를 높이기 위하여 1% soft agar overlay 방법을 사용하였으며 재생빈도는 다음의 방법에 의해 계산하였다: 적절한 조건하에서 원형질체가 100% 형성된다고 가정할 때, 7일간 배양하여 나타난 colony (regenerans)의 수(B)와 도달하기 전의 총원형질체의 수(A)의 비. 즉

$$\text{Regeneration frequency (\%)} = B/A * 100$$

원형질융합을 위해 *Streptomyces lincolnensis* 각각의 변이주들을 원형질체로 만든 후, 최종 농도가 각각 1×10^8 /ml에서 1:1이 되도록 혼합한 후 2000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 여기에 1 ml의 PEG-용액을 가하고 일정 시간 방치한 후 4 ml의 완충용액을 가하여 융합을 중지시킨 다음 선택재생배지에 도달하였다.

마. 돌연변이를 이용한 원형질융합

원형질융합 과정에서 가장 문제가 되는 점이 재생이고 빈도도 낮다. 융합빈도와 재생빈도는 같은 종 사이에서도 사용하는 균주에 따라 다르다. 방선균의 경우 일반적으로 10^{-5} - 10^{-7} 의 낮은 융합빈도를 가진다. 한편 UV를 99%의 치사율이 되도록 쬐어준 후 융합을 시도했을 때 10^{-2} - 10^{-1} 의 높은 융합빈도를 보인다고 보고된 바 있다. 이러한 결과에 근거하여 fusion partner인 C group의 경우 (연구결과의 Table 1-7 참고), 원형질체를 만든 후 254 nm에서 80초 동안 UV를 쬐고, PEG로 융합한 후 재생배지에 도말하여 융합체를 얻고자 하였다.

제 3 절. 결과 및 고찰

1. Lincomycin 고생산성 균주의 신속 선별을 위한 bioassay 방법 확립

감수성균주로 *Staphylococcus aureus* (KCCM 12255)를 사용할 경우, 이 균주는 lincomycin 뿐만 아니라 lincomycin 생합성의 중간대사산물인 LAPS에 대해서도 대단히 민감한 것으로 확인되었다. 이러한 경우 순수한 lincomycin을 고생산하는 균주를 선별하는 데는 많은 어려움이 있다. 이를 극복하기 위해 사용한 감수성균주인 *Sarcina lutea* (IMSNU 11084)는 lincomycin에 대해서만 민감성을 지니는 것으로 확인되었다. 그러나 6 mm disc로의 접종량이 20~40 μ l로 비교적 많아 여러 번에 걸쳐 접종해야 하는 문제점이 제기되었으며, 이로 인해 생산성의 비교에 있어 오차가 발생하는 것으로 판명되었다. 또한 순수한 lincomycin에 대한 MIC (minimum inhibitory concentration)가 높아 100,000 units 정도에서 성장저해환이 나타나는 것으로 확인되었다. 따라서 고생산균주의 선별을 위한 감수성균주로 *Sarcina lutea*가 적절하지만 초기에 비교적 낮은 생산성을 보이는 균주를 선별하기 위해서는 다른 감수성균주를 사용해야 하며, 이를 위해 선택된 균주가 *Micrococcus luteus* (KCCM 11236)이다.

*M. luteus*의 농도를 1×10^7 cells/ml로 사용하였고 이때의 배지의 두께는 다른 실험방법과 동일하게 5.95 mm가 되도록 하였다. 기초 실험에서 감수성균주인 *M. luteus*는 lincomycin에 대해 높은 민감성을 나타내기 때문에 disc로의 접종량을 5 μ l로 결정하였다. 그러나 이 경우 감수성 균주의 민감성으로 인해 성장저해환이 크게 관찰되어 균주들간의 lincomycin의 생산성 차이를 구별할 수가 없었다. 따라서 disc로의 접종량은 그대로 유지하고 감수성 균주의 농도를 증가시켜 성장저해환의 크기를 조절하는 실험을 다시 수행하였다.

감수성균주의 농도가 5×10^7 cells/ml (배지두께 5.95 mm)일 때 성장저해환의 크기가 비교적 작게 관찰되었다. 그러나 지속적인 균주의 개발로 생산성이 계속 증가하는 경우 점차 성장저해환의 크기가 증가하여 생산성의 차이를 관찰할 수 없게 된다. 따라서 항생물질의 확산정도를 저해하여 환원의 크기가 작게 나타나도록 감수성균주가 자라는 배지의 양을 증가시켜 실험을 수행하였다. 세포농도는 5×10^7 cells/ml로 일정한 상태에서 배지의 두께를 5.95 mm, 7.15 mm 및 7.7 mm로 증가시켜 이때의 성장저해환을 관찰하였다 (Figure 1-16과 1-17). 기존의 5.95 mm와 실험군인 7.17 mm의 경우 환원의 크기가 여전히 크게 나왔으며, 배지의 두께가 7.7 mm인 경우는 환원이 상당히 저하된 것을 알 수 있었다. 배지의 두께가 5.95 mm인 경우에 감수성균주의 농도가 낮아 성장저해환의 크기가 너무 커져서 항생물질을 대량 합성하는 경우 환원의 차이가 구별되지 않았다. 따라서 고생산 균주의 선별을 위한 bioassay 방법에서 비교적 생산성이 낮은 초기의 변이주의 경우, 감수성균주로서 *M. luteus*를 이용하여 세포의 농도를 5×10^7 cells/ml, 배지의 두께를 7.7 mm로 확립하였다.

위와 같은 조건으로 disc assay를 수행한 방법의 정확도를 확인하기 위해 HPLC 방법에 의한 분석을 병행하여 서로 비교하여 살펴보았다 (Figure 1-18). Disc assay 분석에 의한 lincomycin의 생합성량과 HPLC 방법에 의한 양이 비교적 비슷한 경향성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 *M. luteus*를 이용하더라도 30,000 units 이하의 생산성을 보이는 시료의 경우 disc assay 방법으로도 분석이 되지 않음을 확인할 수 있었다. 이러한 경우에는 감수성균주의 농도와 배지의 두께를 다시 적절히 조절하여 disc assay를 수행해야 할 것으로 판단되었다.

지속적으로 변이주를 선별한 결과, 고생산성을 나타내는 변이주들의 경우에는 감수성균주를 *S. lutea*로 바꾸어 실험을 수행하였다. X축에 감수성 균주 *S. lutea*에 의해 disc assay로 분석한 lincomycin의 생산성을, Y축에 *M. luteus*에 의해 disc assay로 분석한 lincomycin의 생산성을 plotting 하였을 때, 비교적 일직선상

에 놓이는 결과 (Figure 1-19)로부터 이 방법의 정확도를 확인할 수 있었다. 그러나 *S. lutea*에 의한 disc assay의 경우 disc로의 접종량이 40 μ l로서 두번 혹은 세번에 걸쳐 시료를 접종해야 하므로 오차가 비교적 큰 경우도 발생하곤 하였다 (*M. luteus*에 비해 *S. lutea*에 의한 lincomycin의 생산량이 많게는 20,000 units까지 차이가 나는 경우가 관찰되었음) (Figure 1-20). 이러한 결과로부터 오차를 줄이기 위해서는 고생산균주를 선별하였을 경우 disc assay 할 시료를 적절히 희석해서 사용하거나 disc assay 조건을 조금씩 변경하여 분석을 수행해야 함을 알 수 있었다.

한편 또 다른 감수성균주인 *Staphylococcus aureus*의 경우 5 μ l와 10 μ l를 사용하여 그 결과를 *Micrococcus luteus*의 경우 (10 μ l를 disc에 접종) 및 HPLC에 의한 분석방법과 비교하였다 (Figure 1-21). 거의 비슷한 경향성을 보이지만 HPLC보다 bioassay에 의한 lincomycin 생합성량이 더 높게 측정된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 고생산균주 시료의 경우 disc assay와 HPLC 분석 모두에서 높은 생산성이 확인되었으므로 고생산 변이주를 선별하고자 할 때, 대량의 시료를 신속하게 분석하기 위해 bioassay 방법을 사용해도 무관함을 알 수 있었다.

2. 항생물질과 아미노산 유사물질 저항성 균주 분리 및 이들의 생산성 조사

항생물질 저항성 균주를 얻기 위해 lincomycin을 사용하였다. 일반적으로 대부분의 방선균들은 항생물질의 생합성 유전자가 gene clustering 상태로 존재하기 때문에 저항성 유전자와 조절유전자도 함께 포함되어 있다. *S. lincolnensis* 역시 저항성 유전자를 포함하고 있으므로 자신이 생성하는 산물인 lincomycin에 저항성을 나타내기 위해 생합성 유전자 내에 존재하는 저항성 유전자가 발현되는 것으로 보고되어 있다. 따라서 점차적으로 lincomycin의 농도를 증가시키면서, 이에 대한 저항성 변이주를 얻는다면, 이 변이주들은 저항성 유전자의 발현 수준이 높거나 저

항성 유전자가 자체 증폭이 될 것으로 판단되며, 이 때 저항성 유전자와 근접한 생합성 유전자가 동시에 증폭되거나 발현 수준이 증가될 것으로 기대되었다. 또한 feed back inhibition에 의한 생산성의 저하 현상 역시 극복될 수 있을 것으로 판단되었다. 한편 lincomycin은 생합성경로가 1차 대사산물인 tyrosine에서 유래되므로 lincomycin을 고생산하기 위해서는 전구물질인 tyrosine의 생합성이 활발히 진행되어야 한다. 이를 위해서 tyrosine의 유사물질인 tyrosine hydroxamate에 대한 저항성 돌연변이주를 얻고자 하였다. Tyrosine hydroxamate에 저항성을 나타내는 균주들은 일정량의 tyrosine을 합성한 후 더 이상 tyrosine의 합성이 중지되는 것이 아니라 지속적으로 tyrosine 생합성이 진행되어, 그 결과 tyrosine에서 lincomycin으로 진행되는 2차대사 경로가 활발하게 진행될 수 있을 것으로 판단되었다.

가. UV를 이용한 1차 저항성 변이주 선별

UV를 조사한 변이주와 wild type의 균주에서 lincomycin에 대한 저항성을 띄는 균주를 선별하기 위해 최소배지에 다양한 농도의 lincomycin을 첨가하여 실험하였다. 생산성의 확인은 *S. aureus*를 감수성 균주로 세포농도 1×10^7 cells/ml로 disc assay를 수행하였고, 또한 8일간 배양을 했기 때문에 대부분의 생산물이 lincomycin의 전구물질 또는 유사물질 집합체인 LAPS (lincomycin associated product substances)로 확인되었다. 따라서 HPLC를 이용하여 순수한 lincomycin만을 확인한 결과는 LAPS 보다 3배 내지 4배 정도 그 농도가 낮은 것으로 나타났다 (Figure 1-22). 본 실험의 결과 wild-type 균주로부터 lincomycin 생합성 능력이 우수한 4개의 균주를 분리하였다. 이들은 각각 lincomycin 200, 250, 350 $\mu\text{g/ml}$ 에 저항성을 나타내는 균주로서 WLR14, WLR17, WLR33, 그리고 MLR 56으로 각각 명명하였다. 이후 배양기간을 12일로 연장하여 lincomycin으로의 합성 진행을 유도하였고 (배양이 진행됨에 따라 생합성된 LAPS가 lincomycin으로 전환됨을 확인했음), disc

assay의 감수성균주를 *M. luteus*를 이용하여 lincomycin에 대해서만 민감성을 지니도록 하였다. 2차 저항성 변이주를 선별하기 위해 이전보다 고농도의 lincomycin에 저항성을 띄도록 재차 균주개발을 수행하였다.

나. UV를 이용한 2차 저항성 변이주 선별

전 실험에서 분리된 균주 WLR14, WLR17, WLR33, 그리고 MLR 56로부터 lincomycin 300~450 $\mu\text{g/ml}$ 와 tyrosine hydroxamate 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에 저항성을 나타내는 균주를 선별하여 lincomycin의 생합성을 관찰하였다 (Figure 1-23). Lincomycin의 생합성은 균주마다 차이가 심해 약 90,000 units 정도의 생산성을 나타내는 균주가 선별되었는가 하면, 전혀 생합성을 하지 못하는 균주가 선별되기도 했다. 그러나 비교적 높은 생산성을 보인 균주인 WLR33, 그리고 MLR 56으로부터 lincomycin 450 $\mu\text{g/ml}$ 에서 저항성을 띄는 균주 #61과 lincomycin 300 $\mu\text{g/ml}$ 에서 저항성을 띄는 균주 #70을 각각 선별하여 3차 저항성 변이주를 얻기 위한 모세포로 사용하였다.

다. UV를 이용한 3차 저항성 변이주 선별

기존의 실험은 저항성 변이주를 얻은 후 단일 colony를 하루에 모두 선별하여 tube에서 성장단계와 생산단계를 거치도록 하였다. 그러나 이번 실험에서는 5일 동안에 걸쳐 400개 정도의 단일 colony를 획득하여 tube를 통해 실험하였다. 이와 같은 실험은 본 실험실에서 확립한 소규모 배양을 통해서 좀더 편리하고 경제적으로 수행될 수 있었으며, 그 결과 보다 많은 균주를 선별하여 고생산균주의 선별 확률을 높일 수 있었다. 모세포가 #61 균주의 경우 lincomycin 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 저항성을 띄는 균주들이 대부분 생산성이 높게 나타났지만 기존의 모세포와 크게 차이가 없었으며, 다른 조건들의 균주는 오히려 lincomycin의 생산량이 낮게 관찰되었다 (Figure 1-24). 이러한 결과는 저항성 변이주를 얻기 위해 돌연변이를 지속적으로 유도한 결과, 균주의 안정성이 모세포와 비교하여 비슷한 상태이거나 오히려 더 낮

아진 것으로 판단된다. #70 균주 역시 모세포의 생합성량과 크게 차이가 없는 것으로 확인되었다 (Figure 1-25). 그러나 모세포인 #61 균주와 #70 균주에서 각각 선별된 균주들의 lincomycin 생합성량을 비교하였을 때 #61 균주에서 유래된 세포가 비교적 높은 생산성을 나타내었다. 한가지 특이할 만한 점은 항생물질인 lincomycin과 아미노산 유사체가 포함된 최소배지에서 5일 동안에 걸쳐 단일 colony를 선별한 경우, 초반의 1, 2, 3일째 선별한 균주들이 비교적 높은 lincomycin을 생합성하는 것으로 관찰되어, 이 조건을 이 후의 균주 선별 조건으로 이용하였다 (Figure 1-26과 1-27) (Figure 1-26과 1-27은 Figure 1-24와 1-25를 agar slant로부터 colony를 선별한 날짜를 기준으로 재작성한 것임). 상기 실험 결과를 종합 분석한 후 #61 균주에서 유래되어 lincomycin 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 저항성을 보인 LR2 균주를 현 단계까지의 균주선별 과정에서 가장 우수한 균주로 판단하고 liquid stock으로 보관하였다.

라. NTG mutation을 이용한 변이주 선별 (1차)

위의 3차 UV mutation에서 제시된 바와 같이 UV에 의해 고생산성 돌연 변이주를 지속적으로 얻는 것은 어느 정도 한계가 있는 것으로 나타났다. 따라서 UV mutation 보다 좀더 돌연변이 빈도가 높은 NTG mutation을 시행하였다. Figure 1-28에 UV mutation과 NTG mutation에 의한 생산성을 비교하여 제시하였다. Wild-type 균주로부터 NTG와 UV를 이용하여 최소배지에서 lincomycin 농도를 400~600 $\mu\text{g/ml}$ 를 사용하여 MN#15, MN#41, MN#61, MU#12 균주를 얻을 수 있었으며 NTG에 의한 변이주들이 대부분 생산성이 높은 것으로 나타났다. NTG mutation에 의한 보다 수월한 생산성 증가현상은 NTG 처리시 UV 처럼 균주에 치명적으로 작용하기보다는 변이 빈도가 높아지기 때문으로 판단된다.

마. NTG mutation을 이용한 변이주 선별 (2차), 최소배지와 SPM배지 비교, NTG 노

출시간 및 NTG 농도에 따른 생산성 비교

위에서 얻은 MN#41균주를 이용하여 2차 NTG mutation을 실시하였다. 이때 사용한 고체배지는 최소배지와 SPM배지로 사용하였다. 이때 최소배지와 SPM배지에 lincomycin을 넣지 않은 것과 lincomycin 농도를 800~900 $\mu\text{g/ml}$ 를 넣은 것을 각각 비교 조사하였다 (Figure 1-29). 또한 NTG 노출시간을 기존의 40분에서 10~50분으로 다양하게 조사하였으며 (Figure 1-30), NTG 농도에 따른 생산성 (Figure 1-31)을 비교 조사하였다.

Figure 1-29에 나타난 바와 같이 최소배지를 사용하는 것보다 SPM배지를 사용하는 것이 생산성이 더 높았으며, 또한 ML배지 (최소배지에 lincomycin 첨가) 보다 SPL배지 (SPM배지에 lincomycin 첨가)가 생산성이 더 증가하는 것으로 나타났다. Figure 1-30은 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 NTG 농도에서 노출시간의 변화에 따른 lincomycin 생산성이 다 (고체배지로 SPL 배지 사용). 약 50분 정도 노출시키는 조건이 가장 생산성이 높게 나타났다. 또한 NTG에 40분간 노출시켰을 때, 기존에 사용하던 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도보다 더 강화된 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 100,000 unit 이상의 생산성을 보이는 균주가 선별되는 것으로 나타났다 (Figure 1-31). 본 실험 결과는 일정한 한 균주 (MN#41)에 대한 결과로서 상기의 조건을 돌연변이 기준으로 확정하기 보다는 얻은 돌연변이주의 특성에 따라 다양한 NTG 농도와 노출시간을 적용시켜 유전적으로 안정한 고생산성 변이주를 얻는 것이 더 좋은 균주개발 전략으로 판단된다.

3. 생물반응기에서 용존산소 조절을 통한 발효실험

미생물의 배양시 다양한 변수를 측정하고 이를 분석함으로써 적절한 배양조건으로의 신속한 전환이 이루어질 수 있다. 예를 들어 원하는 생산물의 생합성 양이 특정조건이 유지될 때 증가한다면 이러한 조건으로 배양조건을 변화시켜야 할 것이다. 이러한 것에 가장 크게 영향을 주는 변수가 배양액 내의 산소농도 (dissolved oxygen)이다. 배양액 내의 용존산소가 lincomycin 생산성에 미치는 영향을 정밀하

게 조사하기 위해 본 실험에서는 균주개발 초기 단계에서 선별한 변이주인 SR22 균주를 이용하여 발효조 배양을 수행하였다.

용존산소를 정밀하게 조절하기 위한 실험 수행의 원리는 앞서 설명한 바가 있고, 그 모식도를 Figure 1-32에 나타내었다. 배양액내의 용존산소를 적정량으로 유지하기 위해 교반기의 속도와 공기의 유입량을 동시에 조절하는 실험을 수행하였다. 일반적으로 원하는 수준의 용존산소를 유지하기 위해 높은 교반속도가 요구되고, 그 결과 shear stress에 심하게 영향받는 미생물의 경우에는 생산성에 대단한 악영향을 끼치게 된다. 특히 산업용 발효기의 경우 무한정 교반기의 속도를 증가시킬 수 없는 문제점이 있기 때문에 좀더 낮은 교반속도로 운전하기 위해서 적절한 공기의 유입량도 동시에 조절되는 운전조건을 확립하고자 하였다. 교반기 속도의 최대값과 최소값은 각각 150 rpm과 350 rpm으로, 공기의 유입량은 1 l/min에서 3.5 l/min으로 설정하였다. 이와 대비해서 용존산소를 조절하지 않고 제한되는 조건으로 배양한 실험을 대조군으로 하였다.

초반에 용존산소의 급격한 감소로 인해, 원하는 수준의 용존산소인 30%를 유지하기 위해 교반기의 속도와 공기의 유입량이 급격히 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 1-33). 배양의 후반부에 특정 영양분의 고갈로 용존산소가 증가하며, 따라서 교반기의 속도와 공기의 유입량이 점차 감소하였다. 또한 용존산소가 점차 포화 상태로 진행하면서 교반기의 속도와 공기의 유입량이 최소 설정값으로 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 배양 전반에 걸쳐 원하는 수준의 용존산소를 유지할 수 있었으며, 교반속도가 별로 높지 않았으므로 shear stress에 민감한 미생물의 배양일지라도 별로 큰 영향을 받지 않았을 것으로 판단된다.

Lincomycin의 생산성을 살펴본 결과, 용존산소를 30%로 조절한 경우, 배양 4일째부터 6일까지 급격히 증가하고 그 이후에는 거의 생산성의 증가가 이루어지지 않는 것을 확인하였다. 반면에 용존산소를 제한한 경우(exponential phase 동안에 용존산소 농도가 거의 0%로 유지됨)는 lincomycin의 생합성이 거의 이루어지지 않았

음을 관찰할 수 있었다 (Figure 1-34). 이러한 결과로 미루어 볼 때, *Streptomyces lincolnensis*가 생합성하는 lincomycin 역시 다른 이차대사산물과 유사하게 충분한 용존산소의 공급이 매우 중요함을 알 수 있었다.

본 연구에서 개발한 on-line computer-controlled fermentation system을 이용하여 scale-up fermenter에 적용한다면 충분한 산소의 공급이 가능하여 용존산소의 제한조건을 해결할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 직접 시료를 채취하지 않더라도 배양액내 세포의 생리학적 상태를 즉시 확인하고 적절하게 배양조건을 변화시켜 세포의 성장과 생산성을 높일 수 있을 것으로 판단되어, 제2세부과제 연구팀에서 배양공정 자동화 및 제어에 관한 연구를 본격적으로 수행하고 있다.

4. SUN series 고생산균주의 배지 성분 최적화 (탄소원 및 질소원 재조사)

지금까지 개발된 다양한 종류의 고생산성 변이주 중 lincomycin 생합성 능력이 우수하며 안정적으로 나타난 SUN series 균주들 (licomycin 및 tyrosine hydroxamate 동시 저항성 균주)에 대해, wild type 생산균주의 배지 최적화시 lincomycin 생산성이 높게 나타난 탄소원과 질소원을 동시에 첨가하여 이들 각각의 생산성을 250 ml 플라스크배양 (50 ml 배지량, 28°C, 250 rpm, 10일간 배양)에 의해 비교하여 보았다. 다양한 조건에서 선별된 고생산성 균주를 이용해서 산업용 복합 생산배지를 개발하고자 지속적으로 배지성분을 개량시켜 나갔다. 지금까지 최적화 되었다고 판단되는 다음 성분의 생산배지 (SLOM)에 질소원과 탄소원을 하기와 같이 각각 첨가하여 새로이 조성된 배지의 종류를 SLPM1부터 SLPM3로 명명하였다 (C, H, N, O, P, S, Mg 등을 함유한 다양한 복합배지 성분이 licomycin 생합성에 미치는 영향을 지속적으로 조사했으나, 지면 여백 상 배지개발 중간 단계의 결과는 모두 생략했음). :

Original medium (SLOM):

Soluble starch 45 g/l, Sugar cane molasses 15 g/l,

Peptone water 13.33 g/l, NaNO₃ 6.67 g/l, CaCO₃ 4 g/l

SLPM1: SLOM + Glucose 20 (g/l)+ NaNO₃ 5 (g/l)

SLPM2: SLOM + Malt extract 20 (g/l)+ NaNO₃ 5 (g/l)

SLPM3: SLOM + Glycerol 20 (g/l)+ Tomato powder 5 (g/l)

Figure 1-35과 1-36의 상반부에 표시된 바대로 여러 종류의 고생산성 변이주에 대해 triplicate로 실험한 결과, 각각의 고생산성 변이주가 안정적으로 lincomycin을 생산하는 것을 확인하였으며, 또한 다른 변이주보다 SUN9의 생산성이 가장 높게 (약 120,000 units) 나타났다. 그리고 2번째 배지성분인 malt extract (20 g/l)와 NaNO₃ (5 g/l)를 각각 탄소원과 질소원으로 더욱 첨가한 경우 (SLPM2)에, 모든 균주에서 lincomycin의 생산성이 높은 것으로 관찰되었다. 이전의 실험 결과, original medium인 SLOM에서 대부분의 고생산균주의 lincomycin 생산성이 약 70,000-80,000 units인 점을 감안하면 SUN9, SUN10, MN61에 대한 malt extract와 NaNO₃의 lincomycin 생산성 증가 효과는 주목할 만하다고 판단된다.

5. APPL series 고생산성 균주에 대해 무기염이 lincomycin 생산성에 미치는 영향

이번 실험에서는 고생산성 변이주 중의 한 종류인 APPL series 균주들 (lincomycin 저항성 균주) 중에서 안정적인 생산성을 보이는 APPL2000 균주에 대해 새로이 조성된 SLPM1, SLPM2 및 SLPM3를 이용하여 무기염이 lincomycin 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 즉 SLPM series 배지 성분에 K₂HPO₄, MgSO₄ 또는 MgHPO₄를 첨가하여 phosphate와 sulfate 농도에 따른 lincomycin의 생산성을 비교하였다.

100 ml의 성장배지(500 ml 플라스크 사용)에서 5일간 28℃에서 배양한 후, 2% (v/v)로 각각의 상기 생산배지에 접종하였다. Lincomycin 생산성은 50 ml 플라스크 배양 (250 ml 플라스크 사용, 28℃, 250 rpm, 10일간 배양)에 의해 수행되었다.

Figure 1-37에서 1-39에 나타난 바대로, 세가지 배지의 경우 모두에서 K_2HPO_4 를 통해 phosphate가 조금이라도 추가적으로 공급되면 lincomycin이 전혀 생산되지 않는 것으로 나타났다. 또한 magnesium phosphate를 통해 phosphate가 첨가된 경우는, 비교적 낮은 phosphate 농도에서만 lincomycin의 생합성이 이루어지는 것으로 확인되었다. 이는 APPL2000 균주의 경우 lincomycin 생합성이 phosphate에 의한 catabolite repression 또는 inhibition 현상에 의해 매우 심각하게 저해받고 있음을 제시해 준다. 반면에 $MgSO_4$ 는 어느 정도 추가적으로 공급된 경우에 lincomycin의 생산성이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 SUN series 균주에서 좋은 생산성을 보여주었던 SLPM2 배지의 경우, $MgSO_4$ 를 첨가했을 때 lincomycin 생산성이 약 50% 이상 증가하는 주목할 만한 현상이 관찰되었다 ($MgSO_4$ 0.6 g/L의 농도에서 가장 높은 생산성을 보임). 일반적으로 아미노산이 탄소원 및 질소원으로 이용될 때 발생하는 암모니아는 대부분의 이차대사산물 생합성에 심각한 악영향을 주는 것으로 알려져 있다. 이를 해결하기 위해 배지 중에 zeolite 또는 magnesium phosphate를 사용하여 암모니아를 흡착 또는 침전시키는 방법이 사용되곤 한다. 본 실험에서도 첨가된 magnesium phosphate가 발생된 암모니아를 마그네슘염으로 침전시킴으로써 암모니아에 의한 nitrogen catabolite inhibition 또는 repression 현상이 방지되어 lincomycin 생산성 증가에 긍정적인 역할을 한 것으로 추측된다.

SUN series 균주와 APPL2000 균주에 대한 배지 최적화 실험 결과, 기존의 최적 배지인 SLOM을 변형시킨 다음 조성의 최적 생산배지를 궁극적으로 얻을 수 있었으며, 이 새로운 배지를 SLPM4로 명명한 후 이후의 실험에서부터 최적 생산배지로 사용하였다:

SLPM4 생산배지의 성분: Soluble starch 45g/L, Malt extract 20g/L, Sugar cane

molasses 15g/L, Peptone water 13.33g/L, NaNO₃ 11.67g/L, CaCO₃ 4g/L, MgSO₄ 0.6g/L.

6. 9종의 고생산성 변이주 (SUN series)와 4종의 모세포의 lincomycin 생산 kinetics 비교

상기 실험에서 최적배지로 결정된 SLP4배지를 이용하여 13종의 SUN series 균주와 1종의 모균주에 대해 삼각 플라스크에서 lincomycin의 생산 kinetics를 비교하여 보았다. 100 ml의 성장배지 (500 ml 플라스크 사용)에서 5일간 28℃에서 배양한 후, 2% (v/v) 로 SLP4 생산배지에 접종하였다. Lincomycin 생산성은 50 ml 플라스크배양 (250 ml 플라스크 사용, 28℃, 250 rpm, 10일간 배양)에 의해 triplicate로 수행되었다. 매일 각 플라스크에서 1 ml의 시료를 채취하여 lincomycin에 대한 생산 kinetics를 조사하였다 (Figure 1-40 에서 Figure 1-43) (SUN6와 SUN9 에서 두 종류만의 data가 제시된 것은 triplicate중에서 한 개가 오염된 것임). 고생산성 변이주인 SUN1-SUN5의 경우 대략 80,000 units 미만의 생산성을 나타내었고, SUN6에서 160,000 units 의 lincomycin을 생산하는 경우도 확인되었다. 주목할 점은 대부분의 경우 세포가 성장하는 배양 초반에는 원하는 생산물인 lincomycin을 거의 합성하지 않다가 특정 영양분이 고갈된 시점에서 lincomycin을 생합성하는 것으로 보아, 개발된 고생산 균주는 전형적인 이차대사산물 생합성 특징을 갖고 있음을 알 수 있다. 후반부에 선별된 고생산성 변이주인 SUN7-SUN9은 이전의 변이주보다 생산성이 대략 2배 정도 증가한 것으로 나타났으며, 이들 또한 마찬가지로 배양 중반부터 lincomycin을 생합성하는 것으로 관찰되었다. 또한 이들 고생산균주의 lincomycin 생산성이 이들 변이주의 모세포들 (MN12-1, MN12-26, MN61 그리고 mother strain)에 비해 2-4배 정도 증가한 것은 주목할 만 하다. 이상의 실험에서 SUN9 균주가 가장 생산성이 높을 뿐만 아니라

triplicate 실험 결과 안정성도 어느 정도 높은 것으로 확인되었으므로, 이 균주를 5 liter 생물반응기에서 computer-controlled fermentation을 통한 배양공정의 최적화를 위한 고생산균주로 결정하였다 (배양공정 연구팀인 제2세부과제 연구팀에게 SUN9 균주를 분양하였으며, 동시에 어느 정도 생산성이 높은 SUN8과 SUN10 균주도 비교 연구를 위해 분양하였다).

7. 원형질융합체를 이용한 고생산성 균주 개발

가. miniature 실험에 의한 원형질융합체의 lincomycin 생산성에 대한 대규모 신속 분석 방법 적용

전통적인 돌연변이법인 NTG와 UV를 이용하는 경우 논리적인 방법에 의해 고생산성 변이주를 유도했을 지라도, 생산성이 어느 수준 이상이 되면 (약 120,000 units) 그 증가하는 폭이 점차 작아지는 경향을 확인했다. 따라서 전통적인 돌연변이 방법과 병행해서 유전자의 제조합 빈도가 높은 원형질융합법을 이용하여 고생산성의 균주를 얻고자, 효율적으로 원형질융합체를 얻는 방법을 연구하였다. 이를 위해 실험방법에서 이미 언급한 바대로, 획득된 원형질융합체를 대규모로 신속하게 배양함으로써 그 생산성을 확인하는 방법인 miniature 실험방법을 적용하였다 (Figure 1-10). 즉 선별된 원형질 융합체의 생산성을 신속하게 확인하기 위해 고체 배양 시스템인 agar piece assay를 적용하는 것과, 이로부터 고생산성으로 균주가 확인되는 경우 10 ml 용량의 miniature tube를 이용해서 quadruplicate의 액상배양에 의해 그 생산성을 다시 확인하였다.

원형질융합법은 세포벽이 제거된 원형질체를 융합 유도물질인 polyethylene glycol (PEG)를 사용하여 서로 다른 균주 사이에서 인위적으로 유전자의 교환이 일어나도록 하는 방법으로서 각자의 균주가 갖는 우수한 형질을 하나의 균주 내에서 발현시킬 수 있다고 보고되고 있다. 본 연구에서는 lincomycin을 생산하는

Streptomyces lincolnensis 균주에 대한 원형질융합 방법을 균주개량에 이용할 목적으로 원형질체의 형성, 재생, 융합을 통해 융합균주를 선별한 후, 이들의 생산성을 모균주와 비교하였다. 또한 융합체 선별을 위한 marker를 구하기 위해 antimetabolite 저항성균주 선별 및 mutation을 이용하여 융합체의 재조합빈도 (recombination frequency)를 높이고자 하였다.

나. 원형질체의 저장방법 조사

원형질체는 세포벽이 제거된 상태의 세포로서 세포내외의 동일한 삼투압 상태에서만 그 형태를 유지한다. 일반적으로 원형질체를 제조하기 위해서는 많은 효소와 시간이 요구되며, 또한 상당량의 원형질체 (1×10^7 cells/ml 이상)가 요구되므로, 일단 생성된 원형질체가 활성이 사라지지 않는 상태로 장기간 보관되어야 다양한 실험을 쉽게 수행할 수 있다. 따라서 원형질체 보관을 위한 최적 조건을 조사하기 위해 다양한 조성의 보존제를 사용하여 원형질체를 -80°C , 또는 -196°C 에 보관한 후 (Table 1-5), 7일, 16일, 30일, 60일, 그리고 90일 간격으로 각각 꺼내어 활성 조사를 위해 재생빈도를 비교하였다. DMSO 10%, serum 20% 및 삼투압안정제 70%(in protoplast)가 첨가된 보존제가 가장 높은 재생빈도를 나타내는 최적의 원형질체 보관조건으로 나타났다. 한편 이 보존제를 사용했는지라도 -80°C 에 원형질체를 보관한 경우는 재생빈도가 10일째부터 급격하게 감소하는 반면, 액체 질소 (-196°C)에 보관한 경우에는 90일까지도 재생빈도의 값이 변화없이 원형질체가 안정적으로 보존됨을 알 수 있었다 (Figure 1-44 와 Figure 1-45).

다. 표지 유전인자 (selectable marker) 선별

원형질체 융합을 수행한 뒤 효과적으로 융합체를 선별하기 위한 방법으로 표지 유전인자 (selectable marker) 선별이 필수적이다. 생산균주의 돌연변이를 위해 NTG와 UV를 사용하였다. Lincomycin은 두개의 subunits인 아미노산 계열의 PHA와

당 계열의 MTL로 구성되어 있다. PHA의 precursor는 L-tyrosine이며, 또한 lincomycin의 side chain인 methyl group은 methionine으로부터 유래된다. 이에 근거하여 생산균주 자체의 생합성물인 lincomycin에 대한 저항성 균주(APPL2020)와, methyl donor의 과량 생산을 위하여 antimetabolite인 ethionine에 대한 저항성 균주(CET41)를 개발했다. 또한 L-tyrosine의 과량생산을 위하여 tyrosine hydroxamate에 대한 저항성을 가진 균주(BTH25)를 선별하여 이들을 각각 fusion partner로 사용하였다 (각각의 균주 특성 및 생산성에 대해 하기의 Table 1-7 참고할 것). 유전자가 재조합된 융합체는 보상작용에 의해 동시 저항성을 보이게 되므로 selectable marker로 사용된 antimetabolite들, 또는 lincomycin이 첨가된 재생배지에서 자라나게 되고, 그 결과 쉽게 원형질융합체를 선별할 수 있었다 (Figure 1-46).

라. 원형질체의 형성조건 조사 (Glycine, Lysozyme, 균체 생육시기, pH 및 배지 조성의 영향)

방선균을 glycine이 첨가된 배지에서 배양시켜 lysozyme을 처리하면 원형질체를 쉽게 유도할 수 있다고 보고된 바 있다. 본 실험에서도 glycine을 농도별로 배지중에 첨가시, 균체생육 저해현상과 원형질체의 형성이 변화됨을 관찰할 수 있었다. 즉 0.6 % 이상 glycine을 첨가한 경우 균체의 생육이 저해되는 것으로 나타났다 (Figure 1-47) (600 nm에서 OD (Optical density) 측정). 한편 원형질체의 형성은 0.4%의 glycine이 첨가되었을 때 가장 높았으며, 그 이하나 그 이상 첨가시에는 오히려 감소하는 경향을 보여주었다.

생산균주의 세포벽을 제거하기 위한 효소인 lysozyme의 최적 농도를 결정하기 위하여 0.4%의 glycine이 첨가된 배지에 lysozyme의 농도를 달리하여 28° C에서 60분간 처리한 후 원형질체의 형성 정도를 비교하였다. 5 mg/ml일 때 원형질체의 형성 빈도가 가장 높았으며 그 이상의 농도에서는 감소하는 것으로 나타났다 (Figure 1-48).

또한 최대의 원형질체 형성율과 재생율을 얻기 위해서 균체의 생육시기가 원형질체의 형성 및 재생빈도에 미치는 영향을 조사하였다. 약 35-42시간 배양한 균체의 경우 원형질체의 형성 및 재생 빈도가 높았으며, 그 이상 배양시 급격하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 1-49). 한편 Figure 1-50에 제시한 바와 같이 배양시의 pH가 균체 생육과 원형질체 형성에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. pH 7.2에서 세포농도 뿐만 아니라 원형질체의 수도 큰 폭으로 증가하였다.

원형질체 재생빈도는 상기에서 언급한 바대로 세포성장 상태도 큰 영향을 미치지만, 배지 조성도 심각하게 영향을 줄 것으로 판단되었다. 이를 위해 다양한 재생배지들 (Table 1-6)에서의 재생빈도를 비교 조사하였다. 원형질체를 각각의 재생배지에 도달하여 30° C에서 7일간 배양한 후, 재생세포수를 비교해 본 결과 RMM2, RMM3에서는 매우 낮은 빈도를 나타낸 반면, RMM1에서는 1.2×10^{-3} 의 빈도를 보여 약 100배 정도 증가하는 것으로 관찰되었다 (Figure 1-51).

다. 원형질체의 융합 조건 조사 (PEG의 분자량 및 농도의 영향)

PEG는 원형질체의 융합에 이용되는 융합 유도체로서 분자량, 농도 및 처리 시간 등에 따라 재조합 빈도에 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다. 또한 융합을 촉진시키기 위해 Ca^{2+} , PO_4^{3-} 가 유효하다는 보고도 있지만 주로 PEG와 CaCl_2 또는 MgCl_2 가 사용되고 있다. 먼저 PEG의 분자량이 원형질체의 융합에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 APPL2020 균주와 BTH25 균주를 각각 원형질체로 만든 후 50%의 PEG 1000, 2000, 4000, 6000으로 융합을 유도하였다. Figure 1-52에 나타난 바와 같이 분자량 2000의 PEG를 사용했을 때 가장 높은 융합빈도를 보였으며 PEG1000과 PEG6000에서는 가장 낮은 빈도를 나타내었다. 또한 PEG 분자량이 커짐에 따라 융합빈도는 감소하는 경향을 보여주었다. 한편 PEG 농도에 따른 융합빈도를 조사하기 위하여 앞 실험에서 결정된 PEG2000을 농도 별로 처리하여 융합을 유도하였다. Figure 1-53에 제시한 바와 같

이 50%까지는 융합빈도가 증가하였고 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보였다.

8. 원형질융합에 의한 고생산성 균주의 선별 및 lincomycin 생산성 조사

이상의 실험에서 얻어진 최적의 융합조건을 이용하여 원형질융합을 시도한 후 융합균주의 lincomycin 생산성을 비교 조사하였다. 본 실험에서 사용된 각각의 fusion partner를 하기의 Table 1-7에 나타내었다. 각각의 fusion partner는 selectable marker로서 생산균주 자체의 생합성물인 lincomycin에 대한 저항성 균주, lincomycin의 methyl기의 donor인 methionine의 과량생산을 위한 ethionine (methionine antimetabolite 임)에 대한 저항성 균주, 그리고 lincomycin의 precursor의 과량 생산을 위한 tyrosine hydroxamate (tyrosine antimetabolite 임)에 대한 저항성 균주로 구성되어 있으므로, 각 partner의 이와 같은 특성을 융합균주의 선별을 위한 selectable marker로 사용할 수 있었다. Table 1-7에 제시한 고생산성 균주인 BTH25와 CET42의 균주 개발을 위해 상기에서 이미 설명한 바대로 APPL2020 균주개발 전략과 거의 동일한 실험절차를 거쳤다. 즉 두 균주 모두 wild type의 균주로부터 시작하여 UV 또는 NTG등의 돌연변이 유도법을 통해, 최적의 생산배지에서 각각의 antimetabolite에 대한 저항성을 점차로 증가시켜 가며 lincomycin 생산성이 높은 고생산균주를 선별해 나갔다. 각 균주의 생산성에 대한 단계별 실험결과가 준비되어 있으나, 본 보고서에서는 균주개발 중간 단계에서의 결과는 생략한 채 최종 고생산성 변이주인 BTH25와 CET42의 lincomycin 생합성 능력과 선별특성만을 기록하였다.

A group의 융합에서 사용된 APPL2020 균주는 lincomycin (3 mg/ml)의 저항성 균주로서 현재까지의 lincomycin 최대 생산성이 130,000 units이며, 융합 partner인 BTH25 균주는 tyrosine hydroxamate (250 μ g/ml)에 대한 저항성 균주로서 융합 이전까지의 최대 생산성이 127,000 units인 균주이다. 각각의 partner에 대해 원형질

체를 제조한 후, 일부는 융합체형성에 의한 재조합 균주를 선별하였으며, 또 다른 일부는 실험의 대조군으로 사용하기 위해, 형성된 원형질체를 융합시키지 않은채 그대로 재생시켜 각각의 lincomycin 생산성을 융합체와 비교하였다. Figure 1-54와 Figure 1-55에 제시한 바와 같이 대부분의 융합균주는 lincomycin 생산성이 모균주와 거의 비슷한 수준을 유지하였으나, 몇몇 융합균주의 경우 모균주에 비해 lincomycin 생산성이 큰 폭으로 증가하는 것으로 관찰되었다. 특히 최대 생산성을 보인 #63 균주는 lincomycin 생산성이 약 212,000 units로서 그대로 재생된 모균주에 비해 평균 1.6배나 높게 나타났음은 주목할 만 하다. 동일한 실험을 융합 partner를 달리한 B group을 이용하여 수행한 결과를 Figure 1-56 과 Figure 1-57에 나타내었다. 여기서 사용된 CET42 균주는 ethinine 40 $\mu\text{g/ml}$ 에 대한 저항성 균주로서 융합 이전까지의 lincomycin 최대 생산성이 115,000 units인 고생산성 균주이다. A group에서의 실험과 마찬가지로 융합균주에 대한 대조군으로 각각의 partner를 원형질체로 제조한 후 융합시키지 않은채 재생시킨 각각의 모균주에 대한 lincomycin 생산성을 조사한 후, 유전자가 재조합된 융합균주의 생산성과 비교하였다. B group에서 선별된 융합균주의 경우에도 A group의 결과와 비슷한 경향을 보여주었다. 즉 융합균주 대부분의 생산성이 모균주에 비해 낮거나 비슷한 수준이었으나, 약 5개 정도의 융합균주는 lincomycin 생산성이 각각의 모균주의 평균값에 비해 약 2배 정도 증가하는 것으로 나타났다. 한편 B group의 경우는 A group에서 얻은 융합균주에 비해 lincomycin 생산성이 대체적으로 비교적 낮게 나타났다.

한편 C group의 경우에는 재조합 융합균주의 선별을 위해서 selectable marker의 특징을 이용하지 않았다. 즉 형성된 원형질체의 치사율이 약 99% 되도록 UV를 조사한 후 융합을 시도하여 재생된 균주를 선별할 경우, 융합빈도가 10^{-2} - 10^{-1} 까지 높아질 수 있다는 이전의 보고에 따라 selectable marker의 이용없이 융합체를 선별하고자 하였다. 즉 C group (CET42 x BTH25)에 속한 각각의 partner를 원형질체로 만든 후 254 nm에서 80초 동안 UV를 쬐고 PEG 융합을 시도한 다음, 재생배지에

서 살아난 colony는 융합균주일 가능성이 높다는 판단 아래 임의로 각각의 colony를 선별하였다. 그리고 이들 균주들을 이전과 같이 miniature 실험방법에 따라 신속히 선별 배양한 후 이들의 lincomycin 생산성을 융합시키지 않고 그대로 재생시킨 각각의 모균주의 생산성과 비교하였다. Figure 1-58과 1-59에 나타난 바와 같이 C group의 경우에는 대다수 융합균주의 생산성이 낮게 나타났다. 높은 치사율의 돌연변이원의 처리로 인해 재생된 융합균주의 lincomycin에 대한 생합성 경로가 오히려 심하게 손상된 것으로 추측된다. 그러나 C group의 융합 partner를 이용한 경우에도 A group 또는 B group의 경우에서 나타난 바와 같이, 몇몇 융합균주에서 lincomycin 생산성이 큰폭으로 증가한 균주를 관찰할 수 있었음은 주목할 만 하다.

A group, B group 또는 C group의 융합 partner를 이용해서 얻은 상기의 결과는 lincomycin 고생산성 균주를 단기간에 선별하기 위해 원형질융합법이 매우 효율적임을 제시해 준다. 참고삼아 본 연구팀이 원형질융합법을 적용하지 않고 단지 전통적인 돌연변이법인 NTG와 UV를 이용하여 고생산변이주를 선별했을 경우, 논리적이며 체계적으로 변이주의 생산성을 꾸준히 증가시켰을지라도 각 돌연변이주의 생산성이 일정 수준 이상이 되면 (본 연구의 경우 약 120,000 units), 그 증가하는 폭이 현저하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 점에 비추어 볼 때 산업용의 고생산성 균주를 선별하기 위해서는 전통적인 돌연변이 방법과 병행해서 고생산성의 partner를 이용한 원형질융합 방법이 시도되어야 함을 알 수 있다. 현재 본 세부과제 연구팀은 튜브 배양, 플라스크 배양 및 생물반응기 배양을 통해 선별된 고생산성 융합균주의 안정성을 테스트하고 있으며, 또한 다양한 partner 균주를 이용한 고생산성 융합균주의 선별을 지속적으로 수행하고 있다. 특히 현재까지 얻은 몇몇 균주의 생산성이 매우 높은 수준이라는 결론에 따라, 현재는 융합균주의 유전적 안정성에 연구의 초점을 맞춰 재현성이 높은 융합균주를 선별하고 있는 중이며, 이들 고생산성·고안정성 균주에 대한 scale-up 가능성을 공정분야에 대한 연구를 수행하고 있는 제2세부과제 팀과 긴밀한 협조 아래 조사하고 있다.

제 4절. 참고문헌

1. Argoudelis A. D., J. A. Fox, and T. E. Eble. (1965) U-21669 : A new lincomycin-related antibiotic. *Biochemistry*. 4, 698-703.
2. Argoudelis, A. D., Eble, T. E., Fox, J. A., and Mason, D. J. (1969) Studies on the biosynthesis of lincomycin. IV. The origin of methyl groups. *Biochemistry*. 8, 3408-3411.
3. Argoudelis. A. D., Coats J. H. and Pyke T. R. (1972) Lincomycin production. *US Pat.* 3,697,380.
4. Argoudelis. A. D. and Coats J. H. (1973) Process for producing lincomycin. *US Pat.* 3,726,766.
5. Argoudelis. A. D. and Coats J. H. (1974) Process for preparing lincomycin. *US Pat.* 3,812,014.
6. Asmus, P. A., Landis, J. B., and Vila, C. L. (1983) Liquid chromatographic determination of lincomycin in fermentation beer. *J. Chromatogr.* 264, 241-248
7. Bergy M. E., Herr R. R. and Mason D. J. (1963) Antibiotic lincolnensin and method of production. *US Pat.* 3,086,912.
8. Bergy M. E., Coats J. H. and Malik V. S. (1981) Process for producing lincomycin. *US Pat.* 4,271,266.
9. Brahme, N. M., Gonzalez, J. E., Rolls, J. P., Hessler, E. J., Mizak, S., and Hurley, L. H. (1984 a) Biosynthesis of the lincomycin. 2. Studies using stable isotope on the biosynthesis of methylthiolincosaminide moiety of lincomycin A. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 7878-7883.
10. Brahme, N. M., Gonzalez, J. E., Rolls, J. P., Hessler, E. J., Mizak, S., and Hurley, L. H. (1984 b) Biosynthesis of the lincomycin. 1. Studies using stable isotope on the biosynthesis of the propyl- and ethyl-L-hygric acid moieties of lincomycin A and B. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 7873-7878.
11. Campbell, J. M., Reusser, F., and Caskey, C. T. (1979) Specificity of lincomycin action on peptidyl transferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 1032-1038.
12. Chang, F. N., Sih, C. J. and Weisblum, B. (1966) Lincomycin, an inhibitor of aminoacyl sRNA binding to ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 55, 431-438.
13. Chen H. C. and F. Wilide. (1991) The effect of dissolved oxygen and aeration rate on antibiotic production of *Streptomyces fradiiae*. *Biotechnol.*

Bioeng. 37, 591-595.

14. Clark T. A., Hesketh T. and Seddon T. (1985) Automatic control of dissolved oxygen tension via fermenter agitation speed. *Biotechnol. Bioeng.* 27. 1507-1511.

15. Davies, O. L., *In* Screening for Improved Mutants in Antibiotic Research, 576-591.

16. Fuchs, P. C., and Barry, A. L. (1990) Lincomycin disc susceptibility testing criteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 25, 1024-1025.

17. Grady. J. E. (1968) Recent developments in lincomycin research. *Int J Clin Pharmacol.* 16. 533-538

18. Hanka, L. J., Mason, D. J., Burch, M. R., and Treick, R. W. (1963) Lincomycin, a new antibiotic III. Microbiological assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 565-569

19. Herr, R. R. and Bergy, M. E. (1963) Lincomycin, a new antibiotic II. Isolation and characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 560-564

20. Hoeksema H., B. Bannister, R. D. Birkenmeyer, F. Kagan, B. J. Magerlein, F. A. MacKellar, W. Schroeder, G. Slomp and R. R. Herr. (1964) Chemical studies on lincomycin. I. The structure of lincomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 86. 4223-4224.

21. Ichikawa, T., Date, M. I. and Ozaki, A. (1971) Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method, *Folia Microbiol.* 16, 218-224.

22. Josten, J. J., and P. Allen. (1964) The mode of action of lincomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14. 241-244.

23. Kuo, M. S., Yurek, D. A., Coast, J. H., Chung, S. T., and Li, G. P. (1992) Isolation and identification of 3-propylidene-delta 1-pyrroline-5-carboxylic acid, a biosynthetic precursor of lincomycin. *J. Antibiot.* 45, 1773-1777.

24. Kuznetsov V. D., Bushueva O. A. and Bryzgalova L. S. (1974) Variation of *Actinomyces reesei*. A lincomycin-producing organism. *Antibiotiki.* 19. 690-693.

25. Lewis, C., Clapp, H. W., and Grady, J. E. (1963) In vitro and in vivo evaluation of lincomycin, a new antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 570-582

26. Magerlein, B. J., Birkenmeyer, R. D., Herr, R. R. and Kagan, F. (1967)

- Lincomycin. V. Amino acid fragment. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 2459-2464.
27. Mason, D. J., Dietz, A., and DeBore C. (1963) Lincomycin, a new antibiotic I. Discovery and biological properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 554-559
28. Neusser, D., Schmidt, H., Spizèk, J., Novotná, J., Peschke, U., Kaschabeck, S., Tichy, P., and Piepersberg, W. (1998) The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. *Arch. Microbiol.* 169, 322-332.
29. Peschke, U. Schmidt, H. Zhang, H. Z., and Piepersberg, W. (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.* 16, 1137-1156.
30. Reusser F. and Argoudelis. A. D. (1974) Process for preparing lincomycin. *US Pat.* 3,833,475.
31. Schroeder, W., Bannister, B., and Hoeksema, H. (1967) Lincomycin. III. The structure and stereochemistry of the carbohydrate moiety. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 2448-2453.
32. Sikyta, B., Slezak, J., and Herold, H. Growth of *Streptomyces aureofaciens* in continuous culture. *Appl. Microbiol.*, 9, 233, 1961.
33. Slomp, G., and MacKellar, F. A. (1967) Lincomycin. IV. Nuclear magnetic resonance studies on the structure of lincomycin, its degradation products, and some analogs. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 2454-2459.
34. Witz, D. F., Hessler, E. J., and Miller, T. L. (1971) Bioconversion of tyrosine into the propylhygric acid moiety of lincomycin. *Biochemistry.* 10, 1128-1133.
35. Young, M. D., Kempe, L. L., and Bader, F. G. (1985) Effects of phosphate, glucose, and ammonium on cell growth and lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis* in chemically defined media. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 327-333.
36. Yegneswaran P. K., M. R. Gray and B. G. Thompson. (1991) Effect of dissolved oxygen control on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus* fermentations. *Biotechnol. Prog.* 7, 246-250.

Table 1-1. Component and composition of GM, SPM and P-1.

A : Growth Medium : GM

Glucose	10g/L	Peptone	5g/L
Yeast extract	10g/L		

B : Production Medium : P-1

Malt extract	50g/L	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1g/L
Skim milk	10g/L	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.05g/L
CaCO ₃	5g/L	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.05g/L
NaCl	2g/L	MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.05g/L
K ₂ HPO ₄	0.5g/L	Cottonseed flour	2g/L
MgHPO ₄	0.5g/L		

C : Sporulation Medium : SPM

Maltose	12g/L	K ₂ HPO ₄	0.3g/L
Soybean meal	6g/L	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1g/L
Soybean oil	0.3g/L	Bacto-peptone	3g/L
NaCl	1g/L	Agar	20g/L

Table 1-2. Component and composition of Antibiotic medium 1 and Antibiotic medium 3.

A : Antibiotic medium 1

Peptone	6g/L	Beef exrract	1.5g/L
Casitone	4g/L	Dextrose	1g/L
Yeast extract	3g/L	Agar	15g/L

B : Antibiotic medium 3

Beef extract	1.5g/L	NaCl	3.5g/L
Yeast extract	1.5g/L	K ₂ HPO ₄	3.68g/L
peptone	5g/L	KH ₂ PO ₄	1.32g/L
Dextrose	1g/L		

Table 1-3. Component and composition of minimal medium.

Glucose	30g/L	NH ₄ NO ₃	2.0g/L
Sodium citrate dihydrate	3.4g/L	Agar	1.5%
K ₂ HPO ₄	2.5g/L		

Table 1-4. Composition of regeneration medium and buffer solution for the formation and regeneration of protoplasts (pH was adjusted with 2N HCl and 2N NaOH)

Components	Regeneration medium	M solution
Glucose	10 g	-----
Yeast extract	10 g	-----
Sucrose	205 g	205 g
Calcium dichloride dihydrate	3 g	3 g
Magnesium dichloride hexahydrate	6 g	6 g
Potassium chloride	-----	0.075 g
Agar	20 g	-----
Distilled water	1 L	1 L
pH	7.0 ~ 7.2	7.2

Table 1-5. Various conditions for examination of activity and stability of the protoplasts formed

조성 1	DMSO 10%	Serum 20%	--	삼투압안정제 70%
조성 2	DMSO 10%	Serum 20%	Glycerol 10%	삼투압안정제 60%
조성 3	DMSO 10%	--	Glycerol 20%	삼투압안정제 70%
조성 4	--	Serum 20%	Glycerol 10%	삼투압안정제 70%

Table 1-6. Various kinds of regeneration media

1) RMM1

성분	Medium RMM ₁ (g/L)
Glycerol	5 g
Sucrose *	205 g
NaCl	2 g
KNO ₃	1 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0.0534 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.272 g
Trace elements solution	1 ml
Agar	20 g

* : 따로 멸균함

- Trace element solution (100ml)
ZnSO₄ · 7H₂O 0.1g, MnCl₂ · 4H₂O 0.1g,
FeSO₄ · 7H₂O 0.1g
- Overlay agar (2%)

2) RMM2

성분	Medium RMM ₂ (g/L)
1. Group A	
Glucose *	30 g
KH ₂ PO ₄ *	1.5 g
MgCl ₂ · 7H ₂ O	0.6 g
CaCl ₂	0.05 g
Agar	30 g
Sucrose *	205 g
Trace element solution	0.1 ml
2. Group B *	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	6 g
(NH ₄)H ₂ PO ₄	5 g
3. Group C *	
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O	4 g
4. Group D *	
Mops	21 g

* : 따로 멸균함

- Trace element solution (100ml)
ZnSO₄ 0.06g, Fe₂SO₄ 0.06g, CuSO₄ 0.06g
Fe₂(SO₄)₃ 0.15g

3) RMM3

성분	Medium RMM ₃ (g/L)
Sucrose	205 g
Glucose *	10 g
Yeast extract	0.25 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	6 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O *	3 g
Agar	30 g

* : 따로 멸균함

- Overlay agar (1%)

Table 1-7. Characteristics and lincomycin production of respective fusion partner used for obtaining various protoplast fusants.

구 분		Partner 1	Partner 2
A group	Strain	APPL2020	BTH25
	Selectable marker	Lin 3mg/ml	TyHx 250 μ g/ml
	Maximum lincomycin production	130,000 units	127,000 units
B group	Strain	APPL2020	CET42
	Selectable marker	Lin 3mg/ml	L-Ethionine 40 μ g/ml
	Maximum lincomycin production	130,000 units	115,000 units
C group	Strain	BTH25	CET42
	Selectable marker	TyHx 250 μ g/ml	L-Ethionine 40 μ g/ml
	Maximum lincomycin production	127,000 units	115,000 units

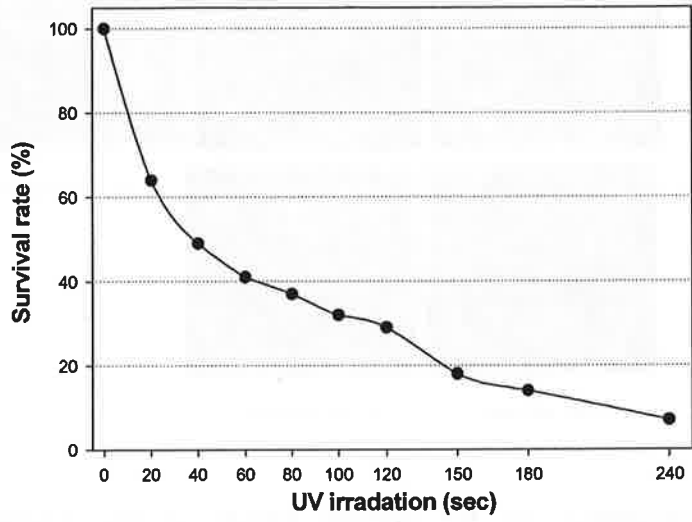


Figure 1-1. Survival rate after UV treatment at 254nm.

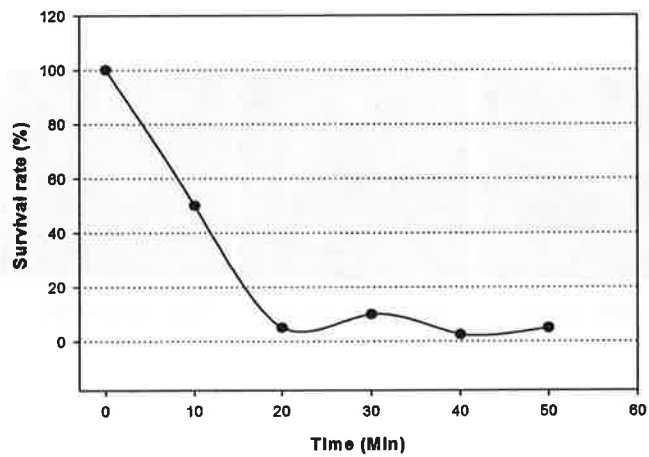


Figure 1-2. Survival rate according to NTG exposure time (NTG concentration : 30 µg/ml).

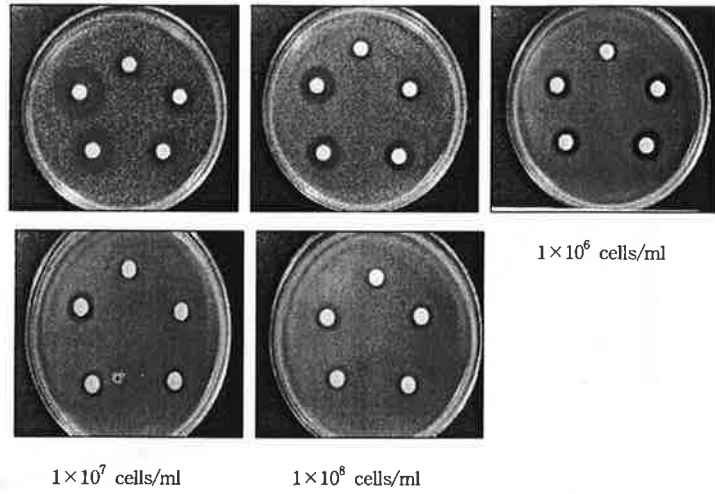


Figure 1-3. Photographs for the various effects of the inhibition zone diameter with lincomycin standard solution according to sensitive microorganisms (*S. aureus*) concentration.

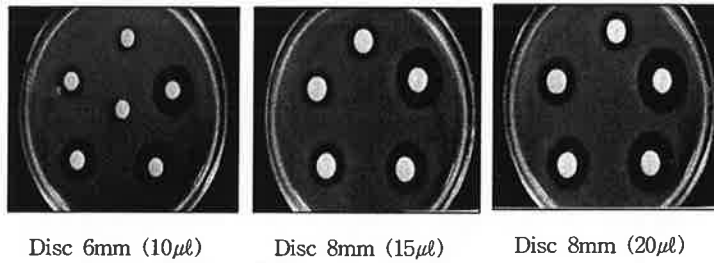


Figure 1-4. Photographs for inhibition zone diameter with lincomycin standard solution according to inoculum volume and disc size.

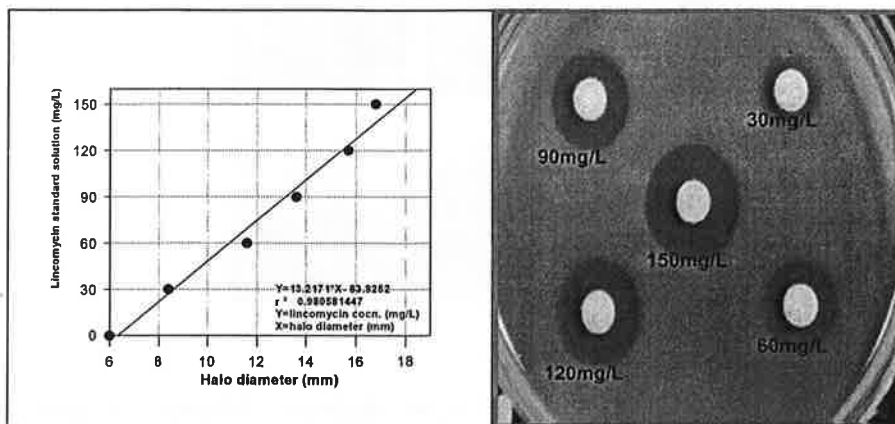


Figure 1-5. Standard curve and inhibition zone photograph for low concentrations of lincomycin standard solution.

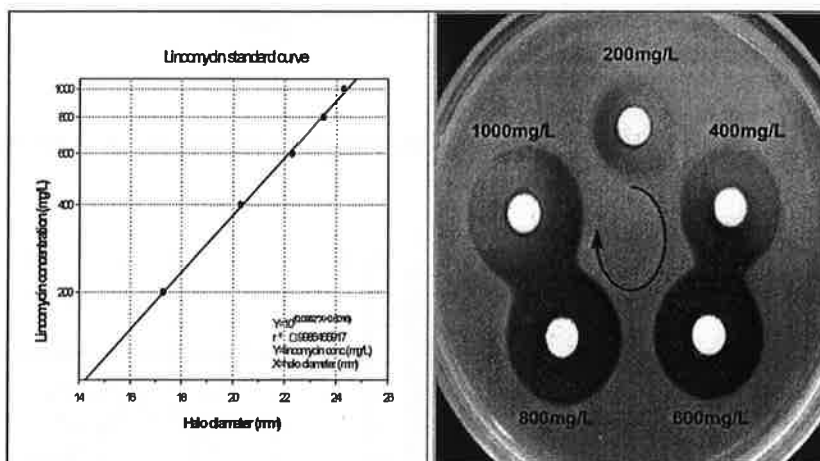


Figure 1-6. Standard curve and inhibition zone photograph for high concentrations of lincomycin standard solution.

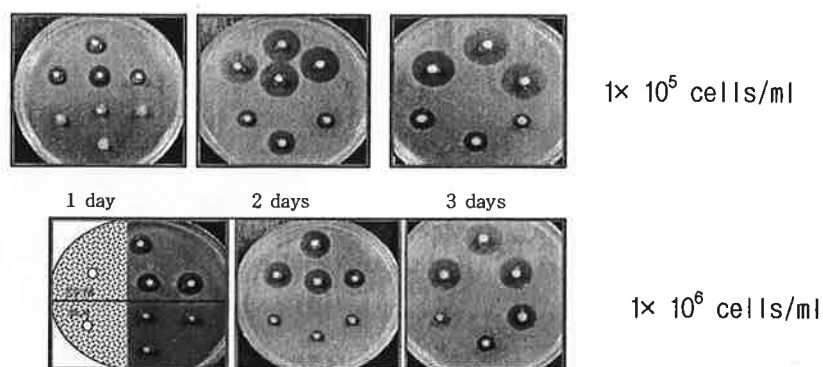


Figure 1-7. Photographs for inhibition zone diameter obtained by agar piece method according to sensitive microorganisms concentration and culture periods in humidified chamber (Two kinds of production media, SPM and P-1 were used).

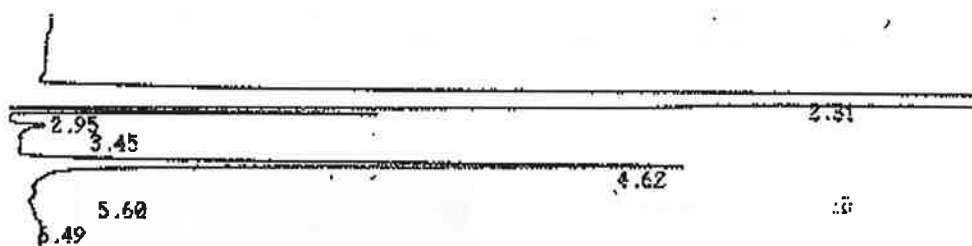


Figure 1-8. Chromatogram for lincomycin standard ($120 \mu\text{g/ml}$ at 4.82 minutes)

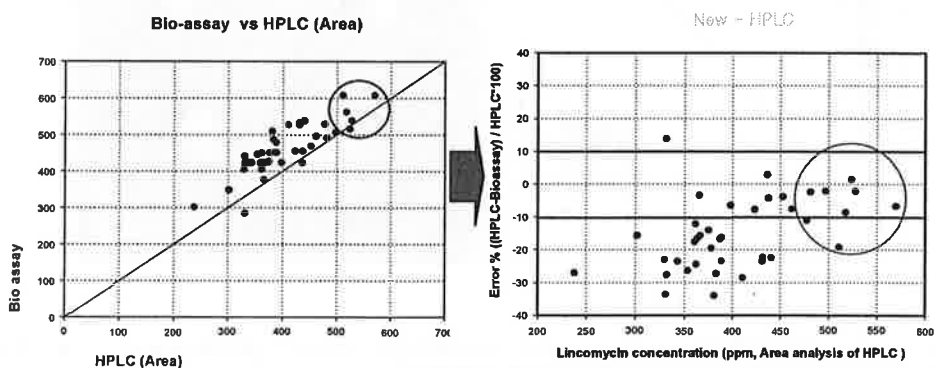


Figure 1-9. Comparison of Lincomycin concentration between HPLC analysis and bioassay method demonstrated as error percentage.

Streptomyces lincolnensis strain 개발 전략

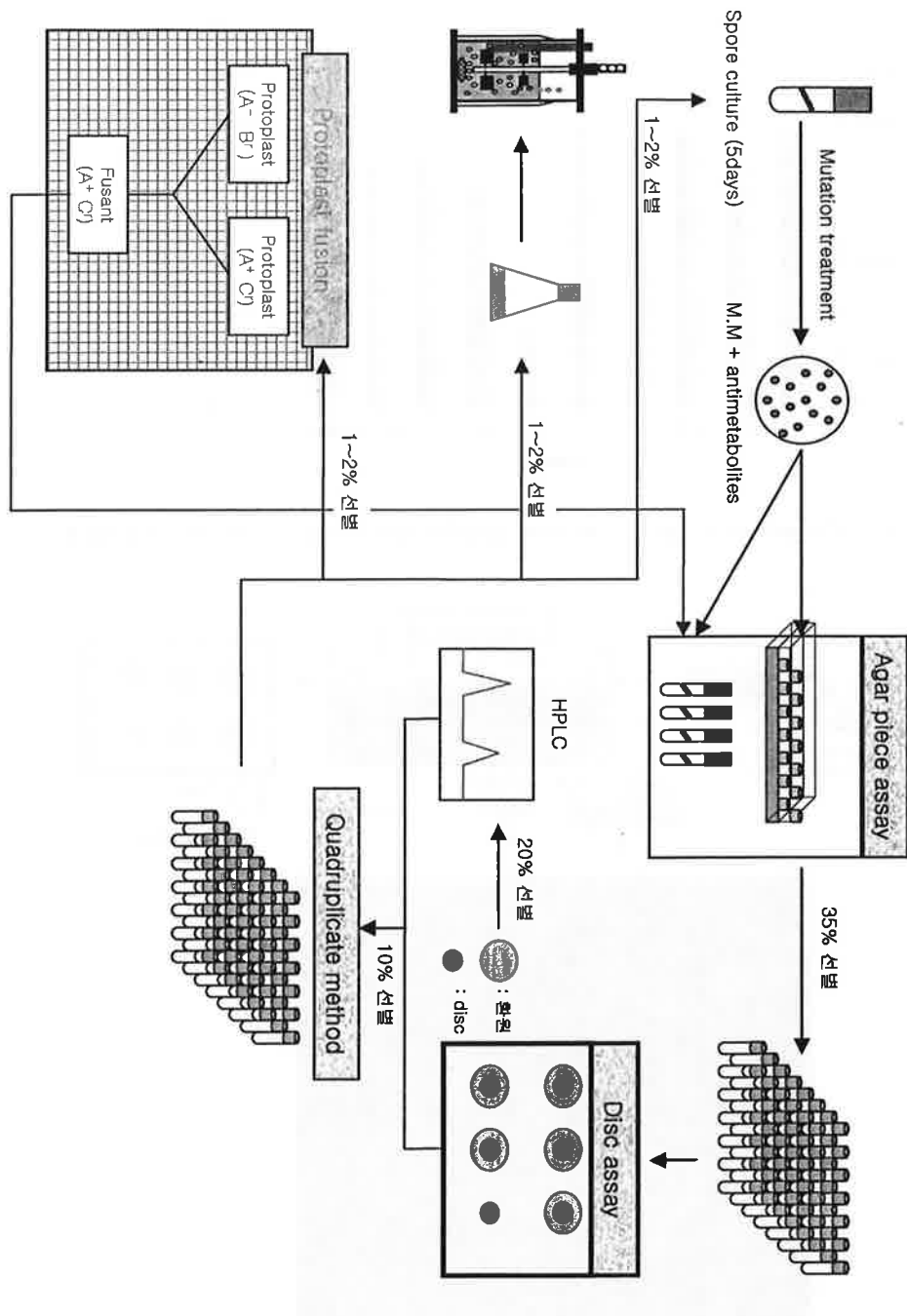


Figure 1-10. Rapid screening procedure for selection of high yielding mutants including protoplast fusants by use of miniature experiment.

Fig. Comparison lincomycin production between flask and tube cultures

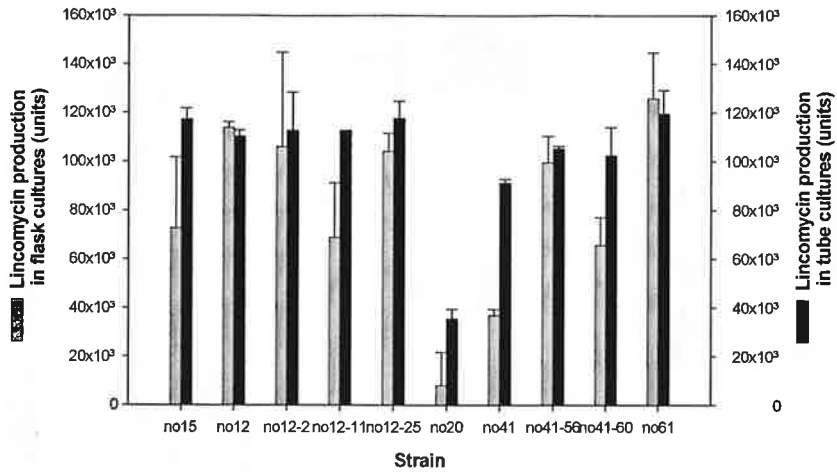


Figure 1-11. Comparison of lincomycin production between flask and tube cultures.

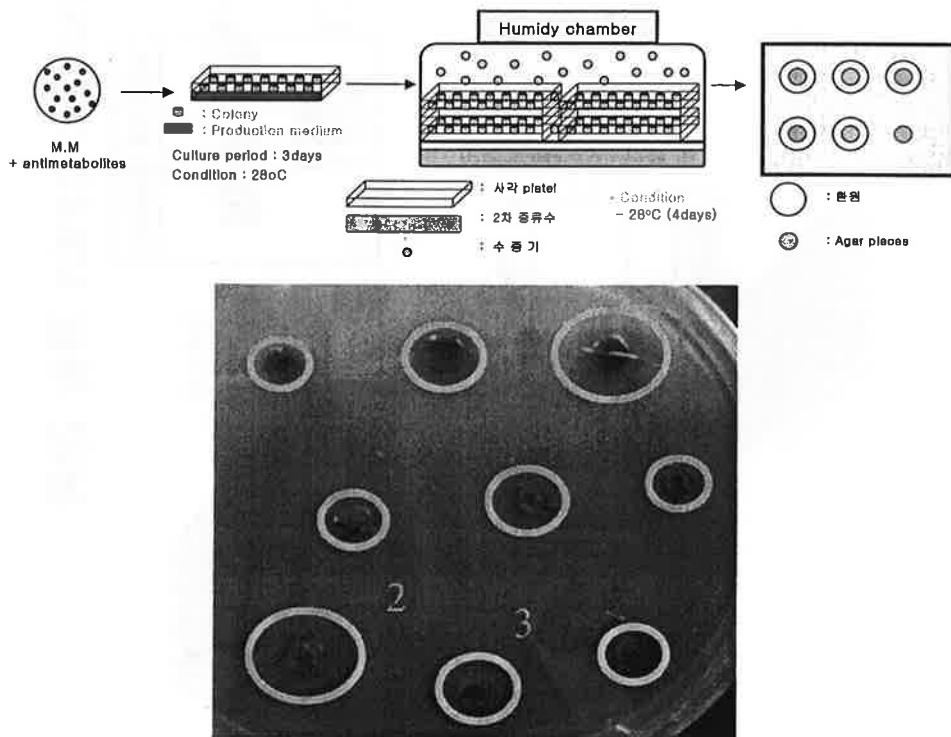


Figure 1-12. Development of agar piece assay (above) and photograph of agar piece (below) for various high yielding mutants.

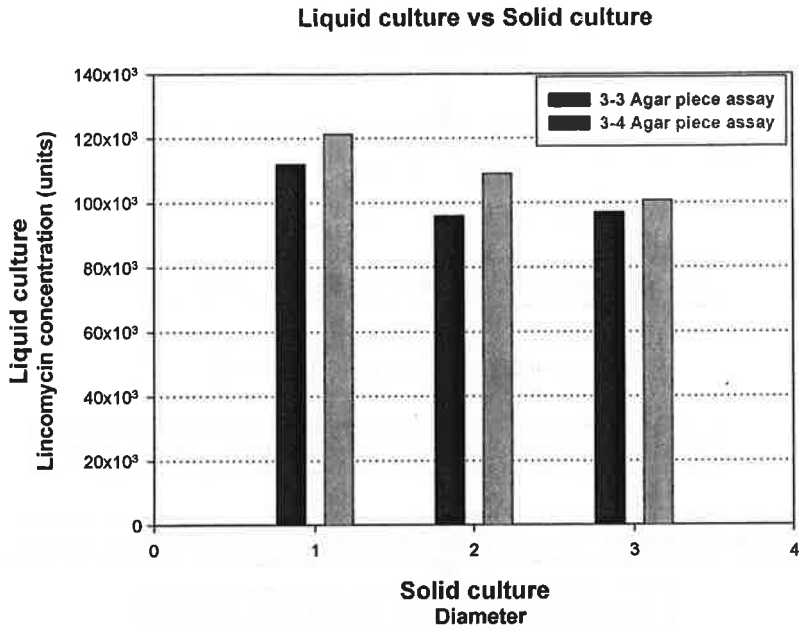


Figure 1-13. Comparison of lincomycin production between solid cultures by agar piece and liquid cultures .

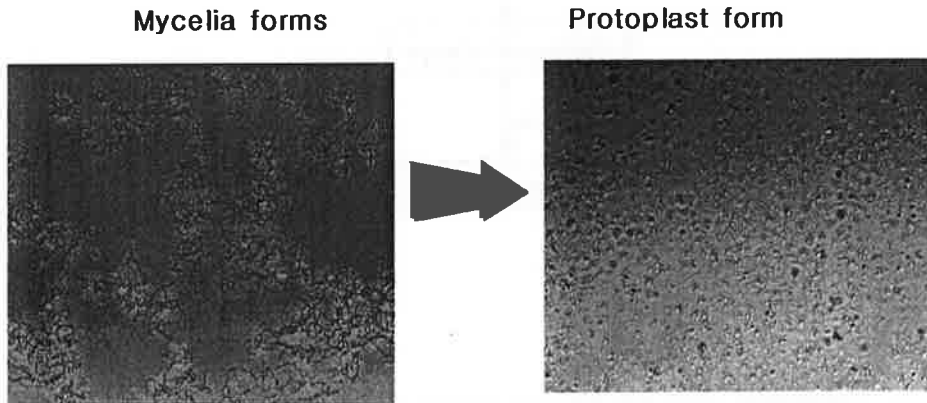


Figure 1-14. Microphotograph for lysozyme-untreated mycelial forms and lysozyme-treated protoplasts of *S. lincolnensis*.

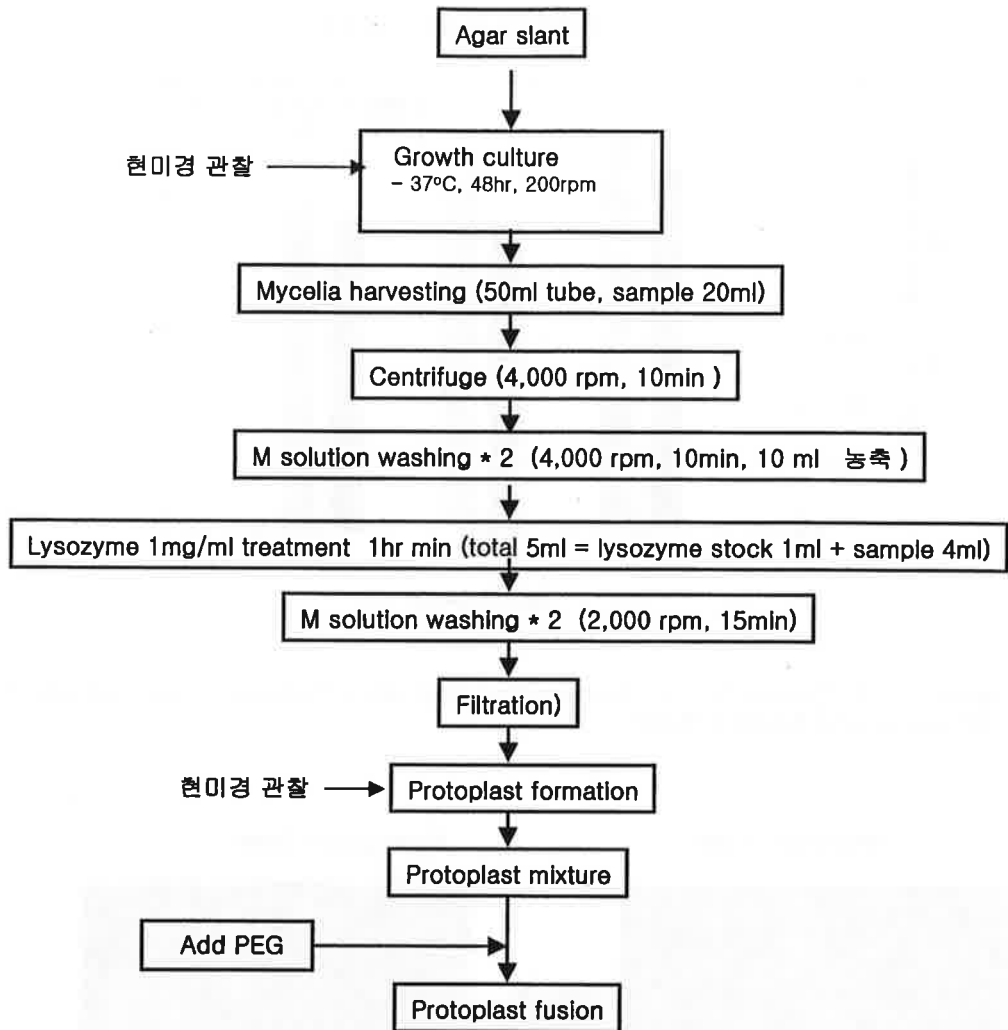


Figure 1-15. Schematic diagram for preparation of protoplast fusants

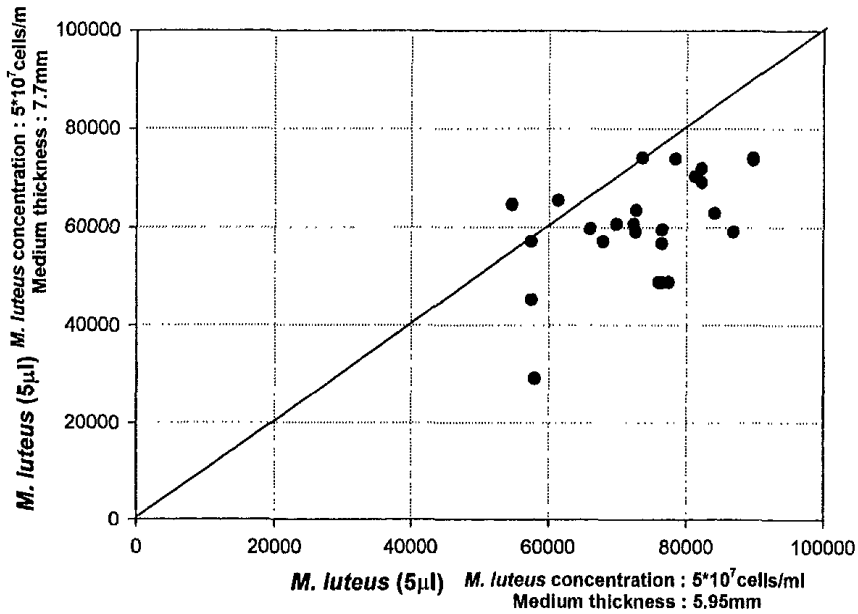


Figure 1-16. Comparison of lincomycin concentration measured by disc assay according to media thickness (5.95 mm and 7.7 mm) with sensitive microorganism of *M. luteus* (5×10^7 cells/ml).

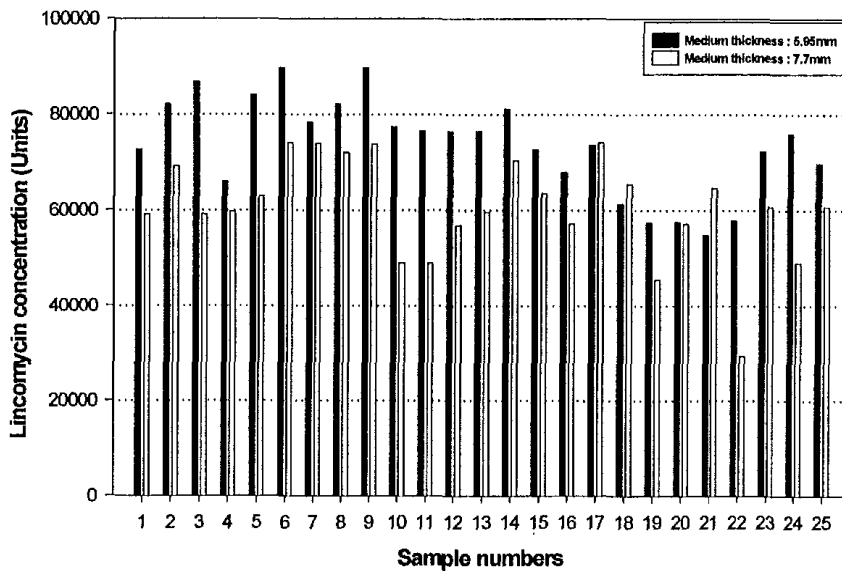


Figure 1-17. Comparison of lincomycin concentration measured by disc assay according to media thickness (5.95 mm and 7.7 mm) with sensitive microorganism of *M. luteus* (5×10^7 cells/ml).

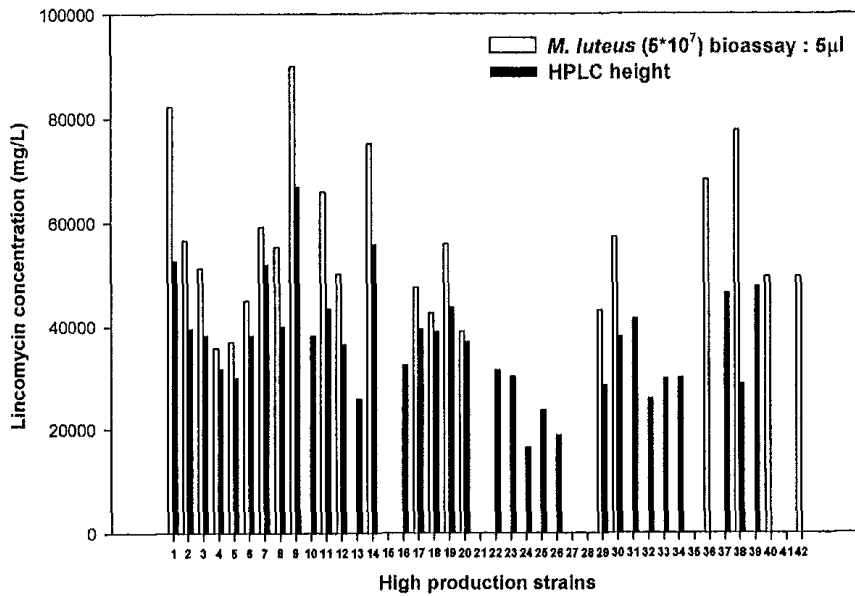


Figure 1-18. Comparison of lincomycin concentration measured by disc assay with sensitive microorganism of *M. luteus* (5×10^7 cells/ml) and HPLC analysis.

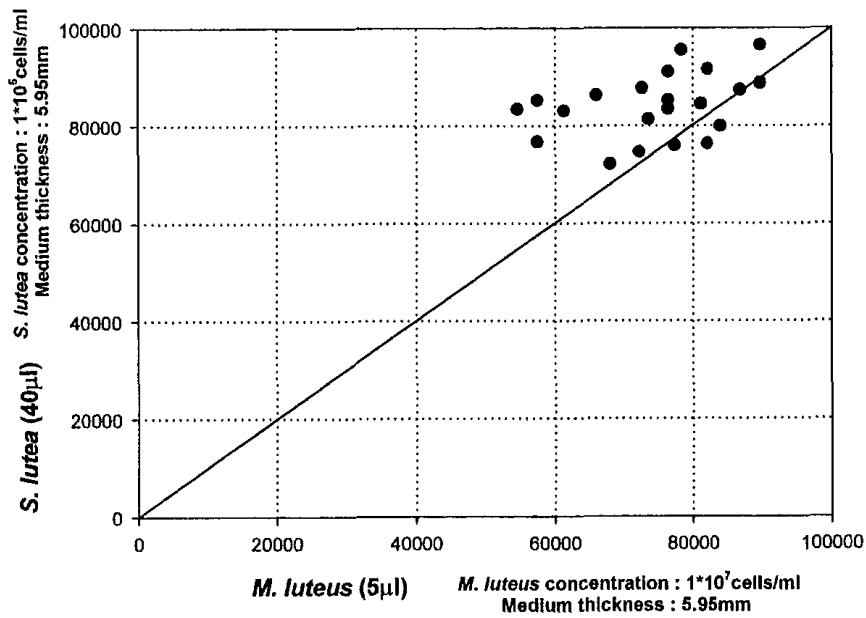


Figure 1-19. Comparison of lincomycin concentration measured by disc assay according to sensitive microorganisms of *S. lutea* (1×10^5 cells/ml) and *M. luteus* (1×10^7 cells/ml).

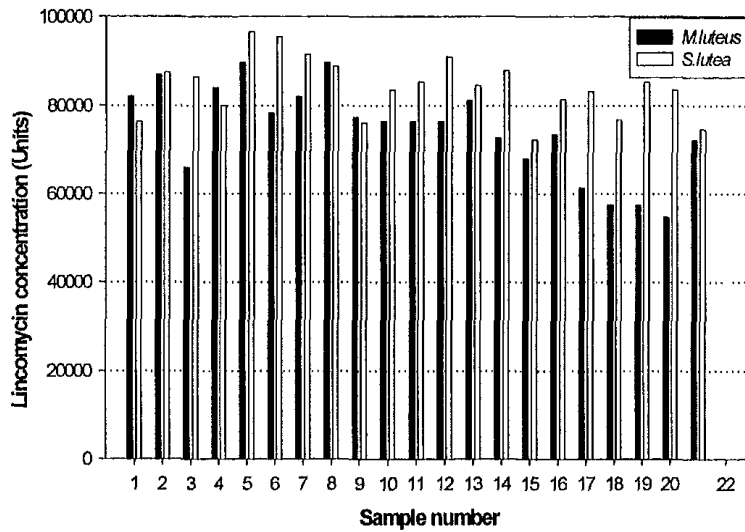


Figure 1-20. Comparison of lincomycin concentration measured by disc assay according to sensitive microorganisms of *S. lutea* (1×10^5 cells/ml) and *M. luteus* (1×10^7 cells/ml).

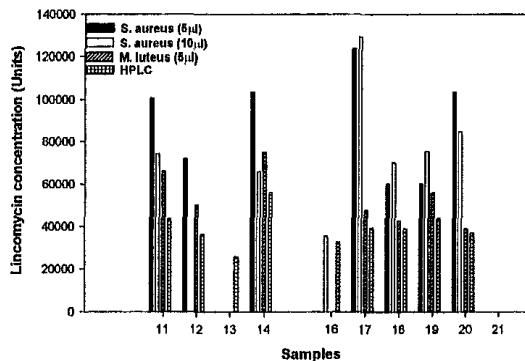
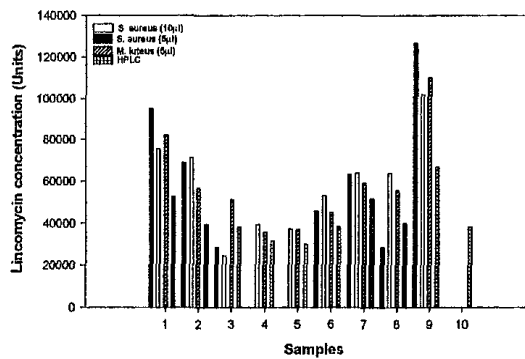


Figure 1-21. Comparison of lincomycin concentration measured by disc assay according to sensitive microorganisms of *S. aureus* (1×10^7 cells/ml), *M. luteus* (5×10^7 cells/ml) and HPLC analysis.

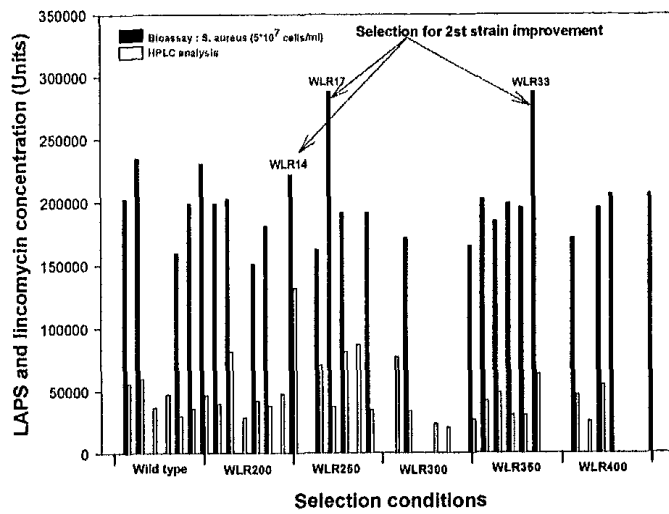


Figure 1-22. Concentration of LAPS and lincomycin produced by the first lincomycin resistant mutants (various concentrations of lincomycin were used).

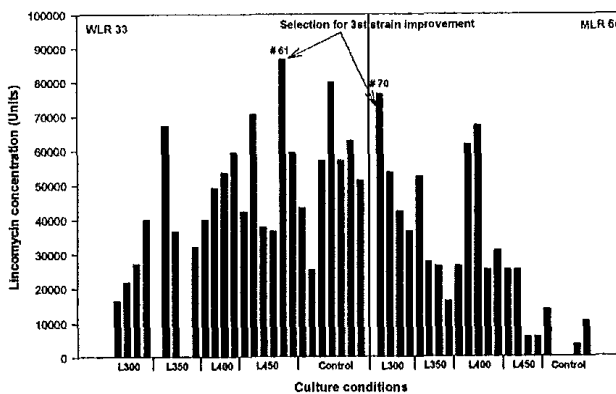
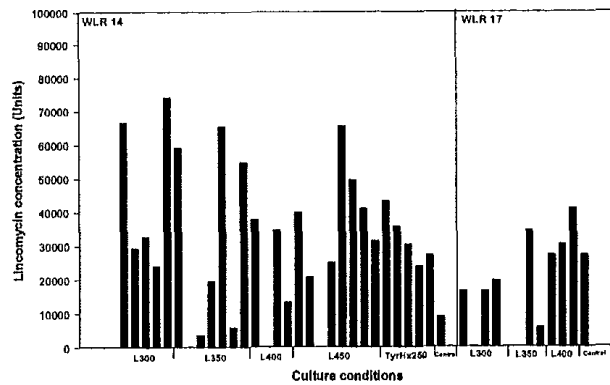


Figure 1-23. Concentration of lincomycin produced by the second lincomycin resistant mutants and tyrosine hydroxamate resistant mutants (various concentrations of lincomycin and tyrosine hydroxamate were used).

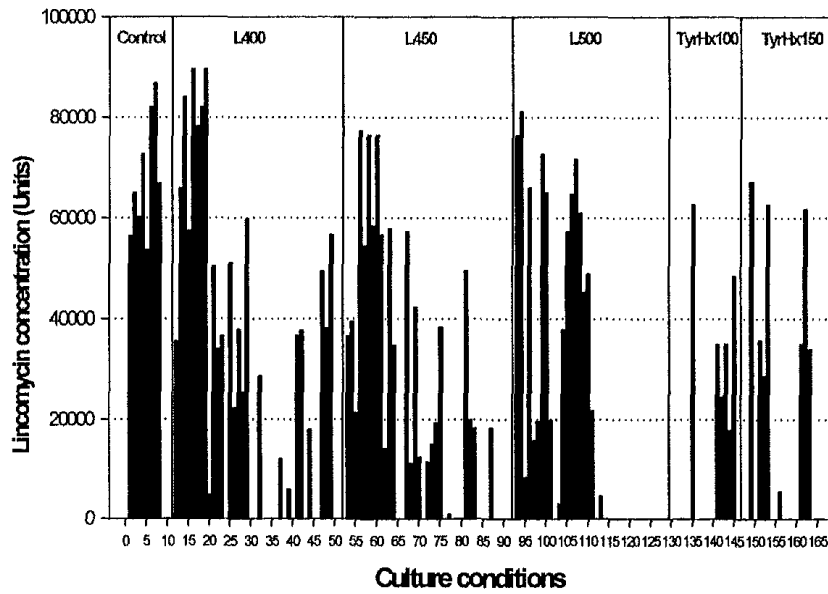


Figure 1-24. Concentration of lincomycin produced by the third lincomycin resistant mutants and tyrosine hydroxamate resistant mutants originated from #61 (various concentrations of lincomycin and tyrosine hydroxamate were used).

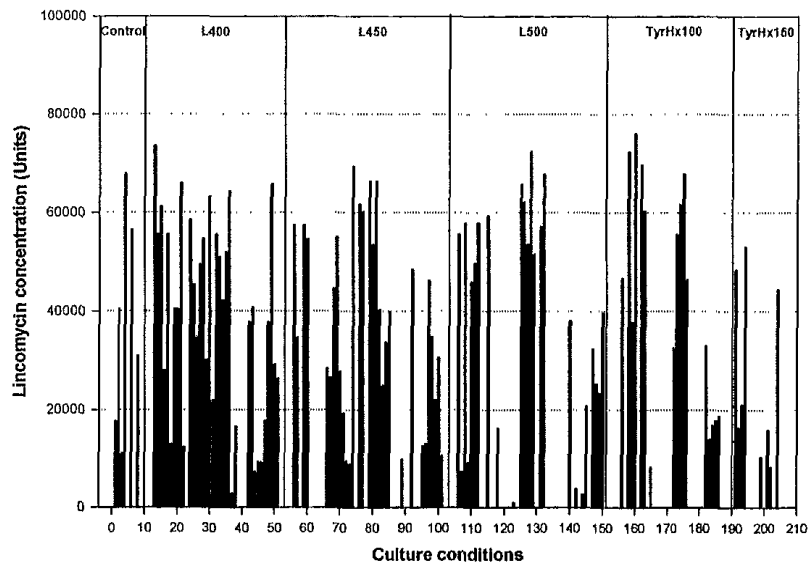


Figure 1-25. Concentration of lincomycin produced by the third lincomycin resistant mutants and tyrosine hydroxamate resistant mutants originated from #70 (various concentrations of lincomycin and tyrosine hydroxamate were used).

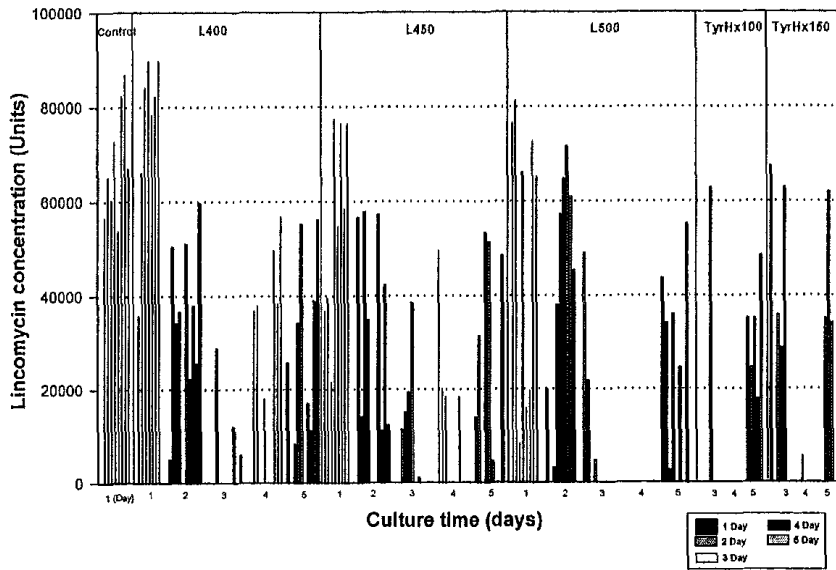


Figure 1-26. Lincomycin production according to inoculation time into growth medium from agar slant (originated from #61) grown in minimal media with various concentrations of lincomycin and tyrosine hydroxamate.

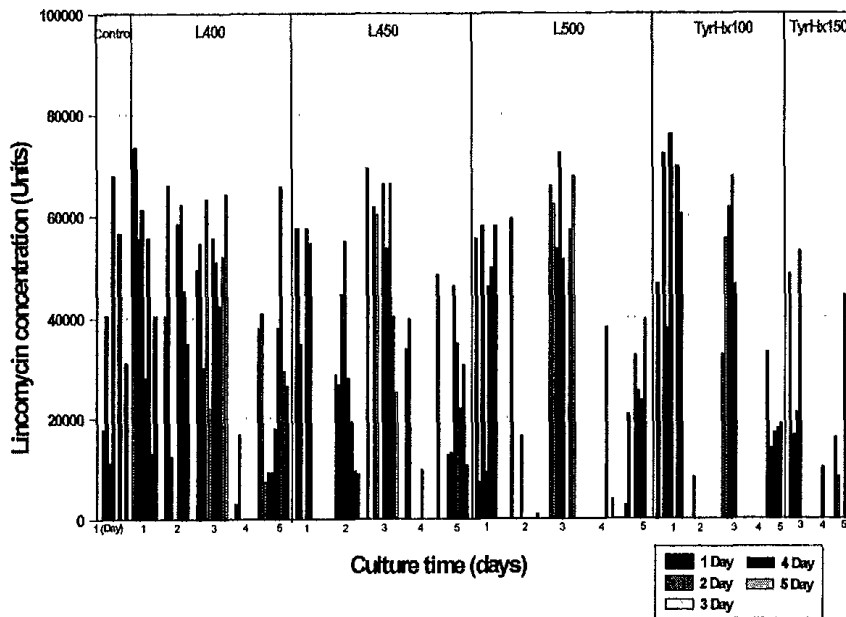


Figure 1-27. Lincomycin production according to inoculation time into growth medium from agar slant (originated from #70) grown in minimal media with various concentrations of lincomycin and tyrosine hydroxamate.

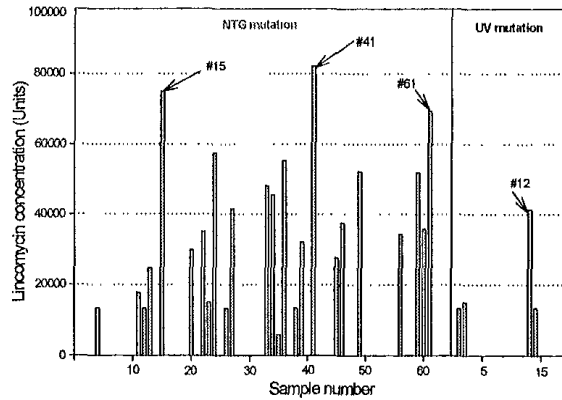


Figure 1-28. Comparison of lincomycin concentration produced by mutants obtained by applying NTG treatment and UV exposure.

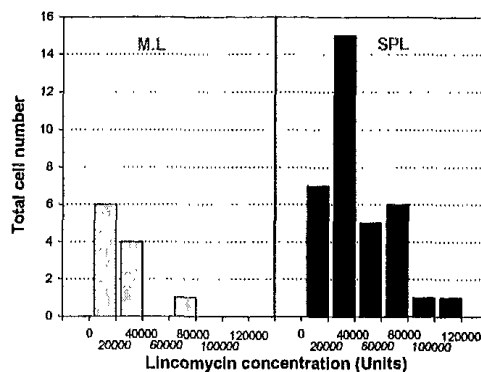
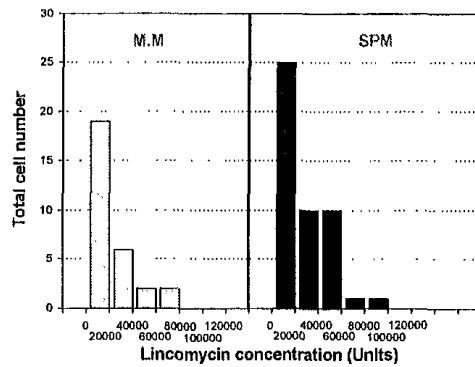


Figure 1-29. Comparative histogram for lincomycin productivity according to solid medium for spore regeneration after NTG treatment (M.M: minimal medium; SPM: sporulation medium; M.L: M.M with lincomycin; SPL: SPM with lincomycin).

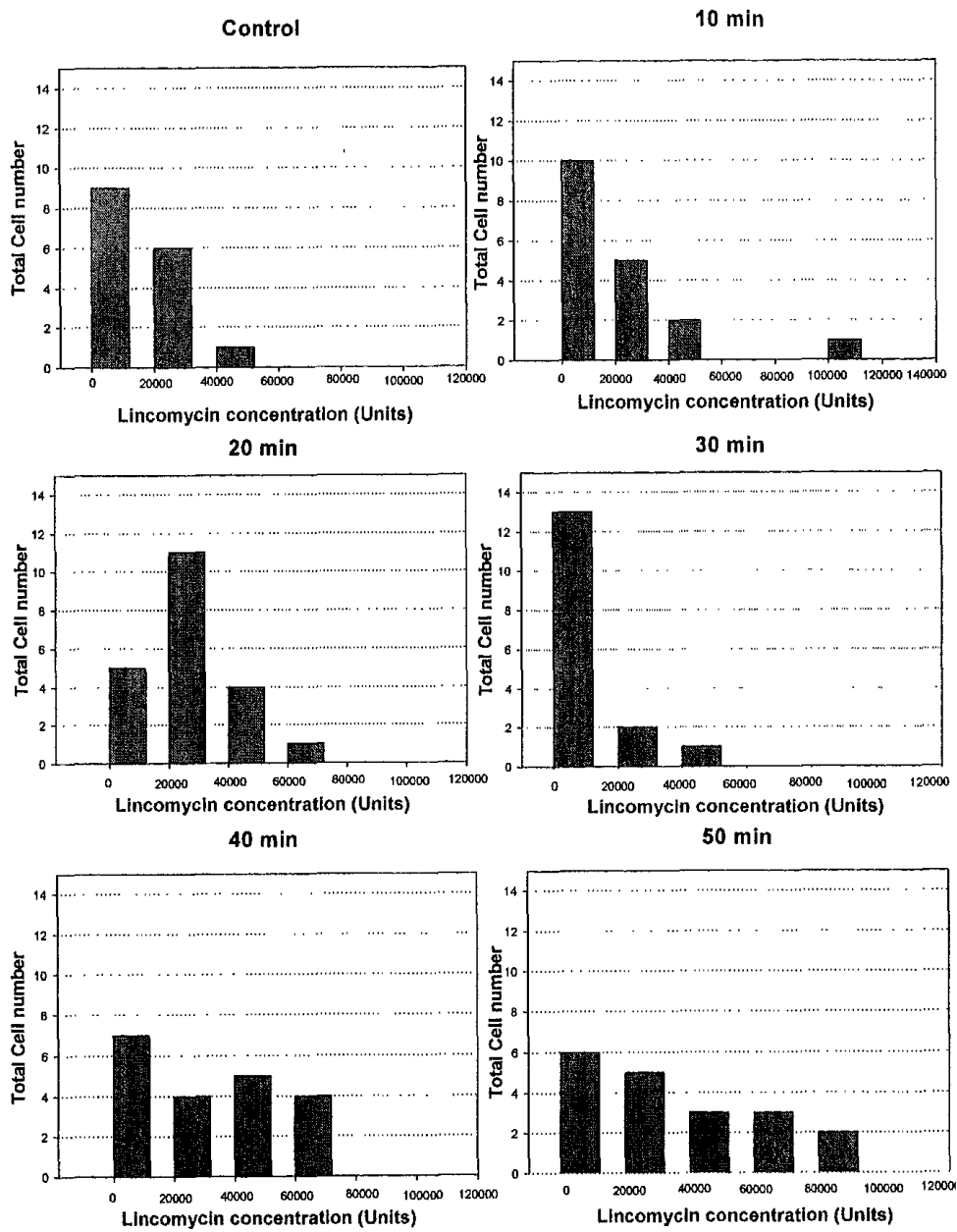


Figure 1-30. Comparison of lincomycin production according to NTG exposure time (NTG concentration: 30 μ g/ml; Colony selection from SPL medium).

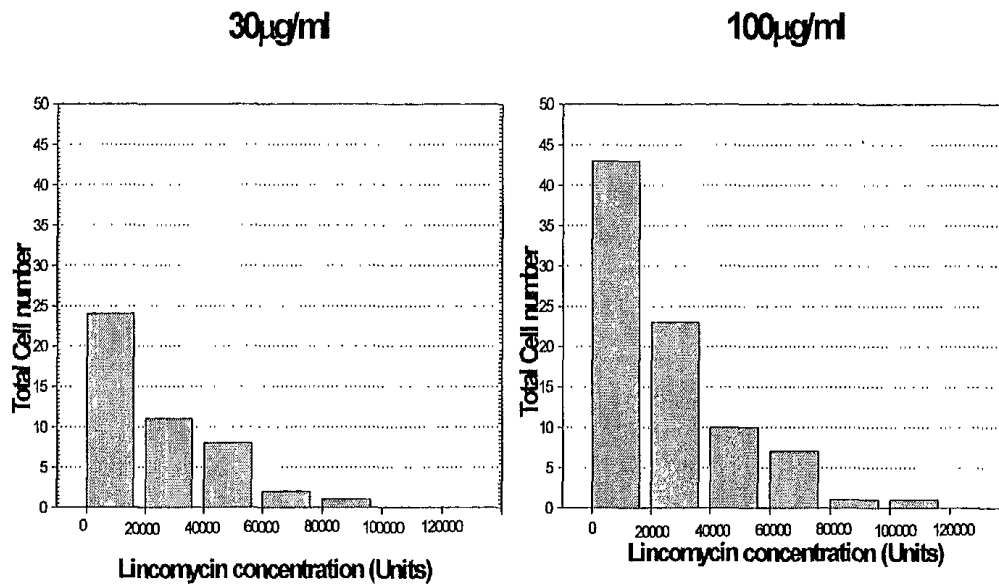


Figure 1-31. Comparison of lincomycin concentration obtained after treatment of 30 µg/ml and 100 µg/ml of NTG (Exposure time: 40 min; Strain: MN#41; Colony selection from SPL medium).

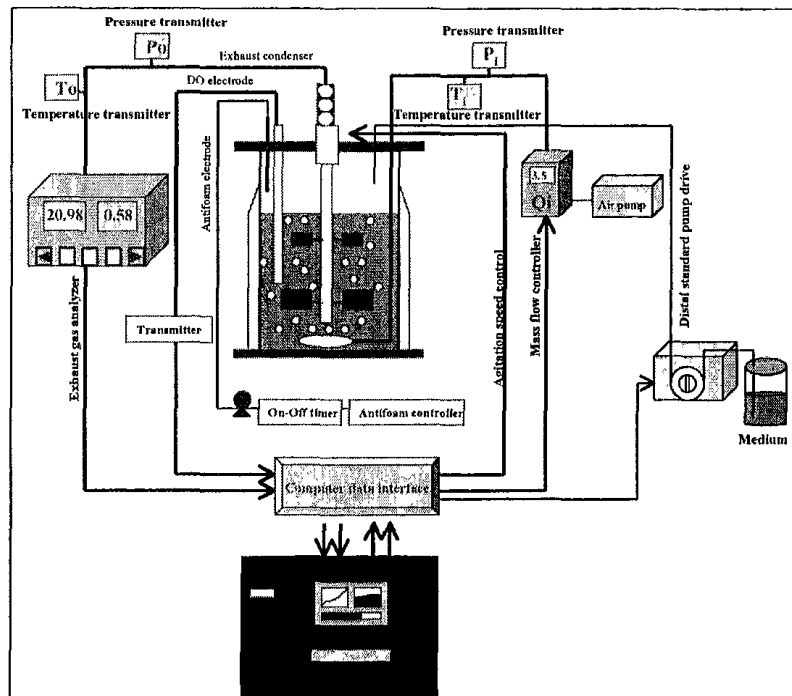


Figure 1-32. Configuration of a on-line computer-controlled fermentation system.

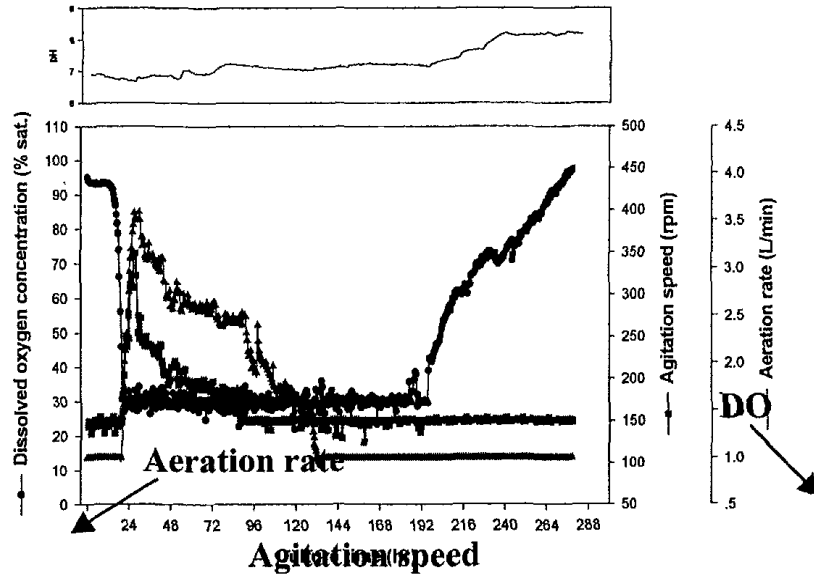


Figure 1-33. Time course profiles of dissolved oxygen concentration, agitation speed, aeration rate and pH variation in dissolved oxygen controlled fermentation (controlled at 30% of saturated DO concentration).

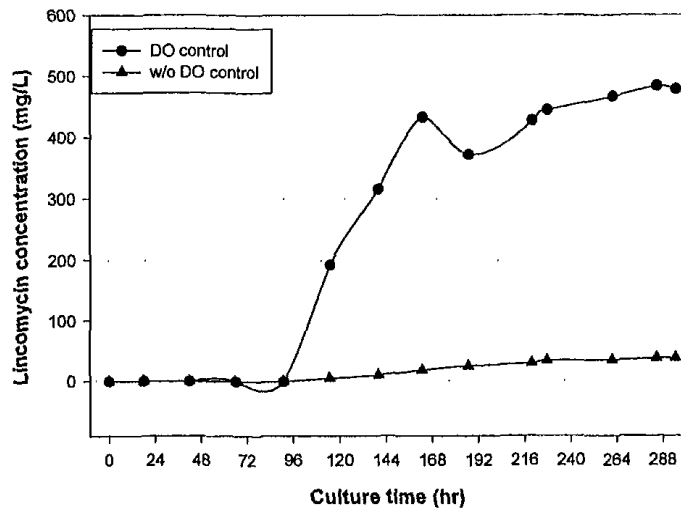


Figure 1-34. Comparison of lincomycin production as a function of fermentation time between DO-controlled fermentation (controlled at 30% of saturated DO concentration) and no DO-controlled fermentation.

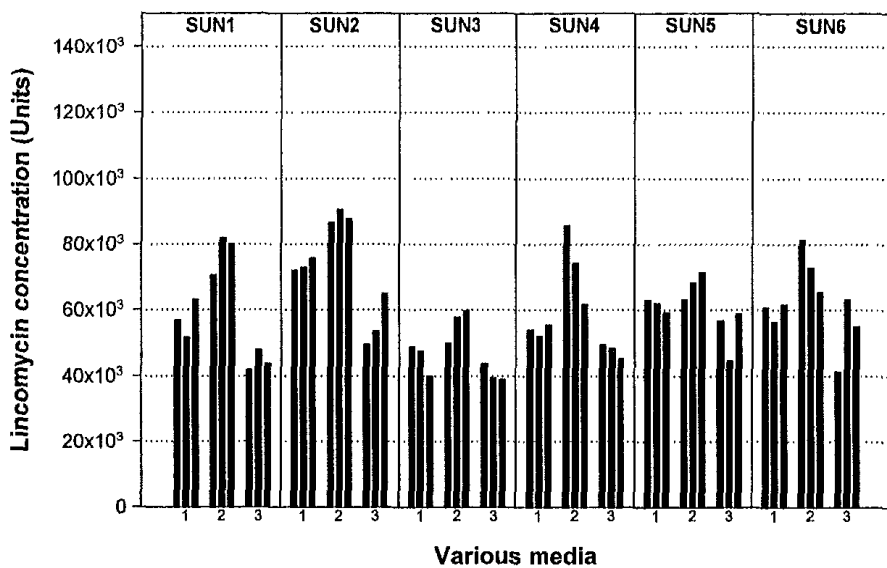


Figure 1-35. Effect of various media on lincomycin production in shake flask fermentations of high-yielding mutants.

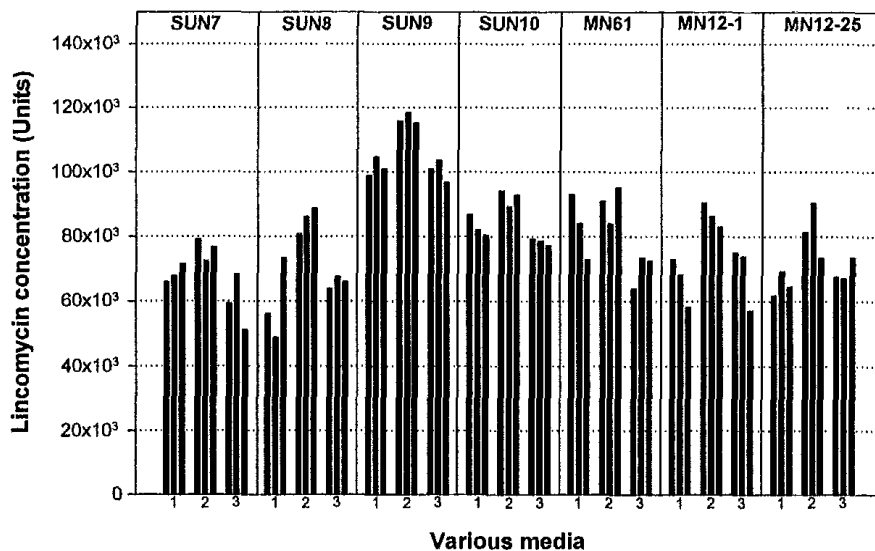


Figure 1-36. Effect of various media on lincomycin production in shake flask fermentations of high-yielding mutants.

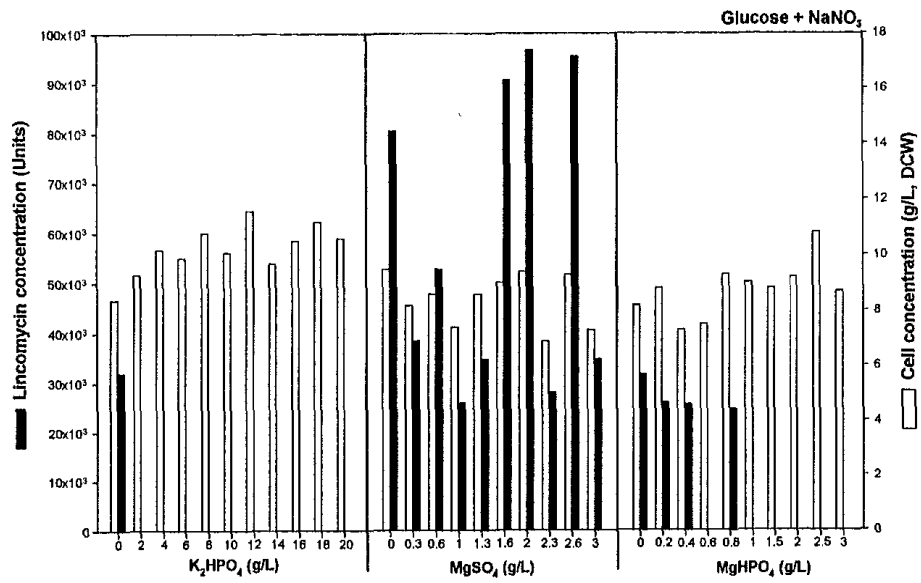


Figure 1-37. Effect of phosphate and magnesium on lincomycin production in fermentations of APPL 2000 mutants (SLPM1 medium used).

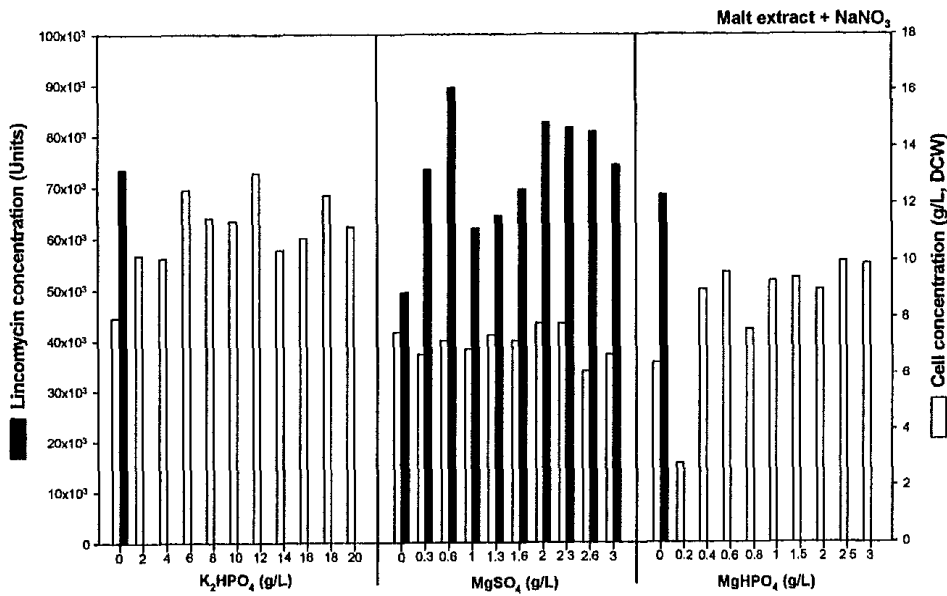


Figure 1-38. Effect of phosphate and magnesium on lincomycin production in fermentations of APPL 2000 mutants (SLPM2 medium used).

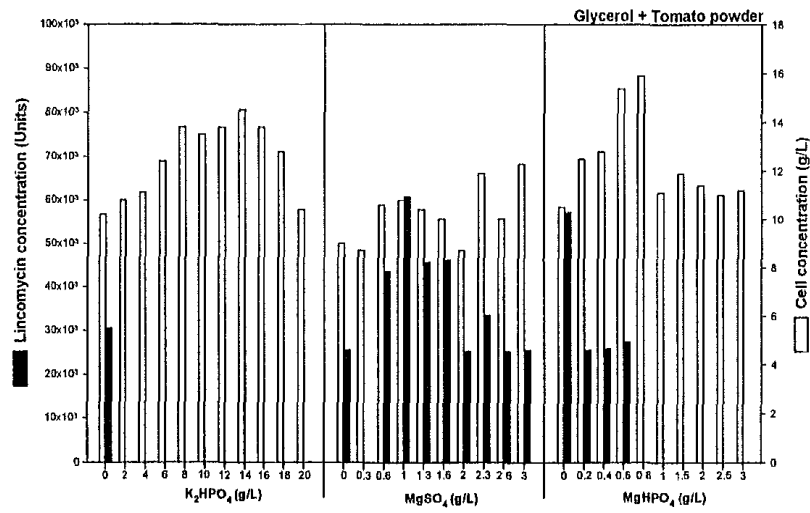


Figure 1-39. Effect of phosphate and magnesium on lincomycin production in fermentations of APPL 2000 mutants (SLPM3 medium used).

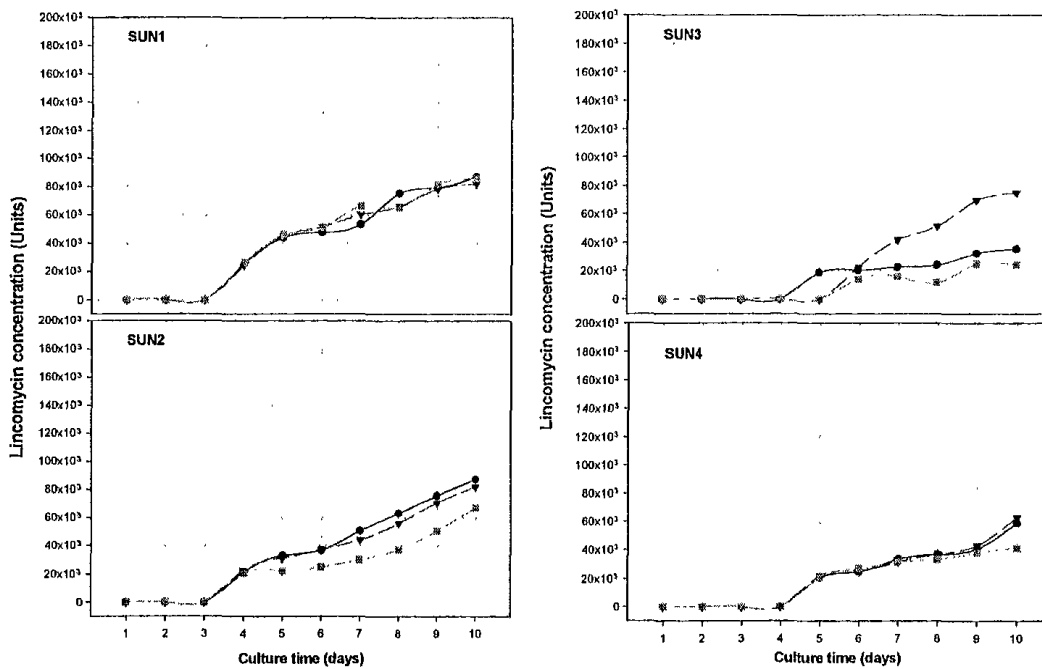


Figure 1-40. Lincomycin production kinetics in fermentations of various mutants (SUN1-SUN4) (SLPM4 medium used).

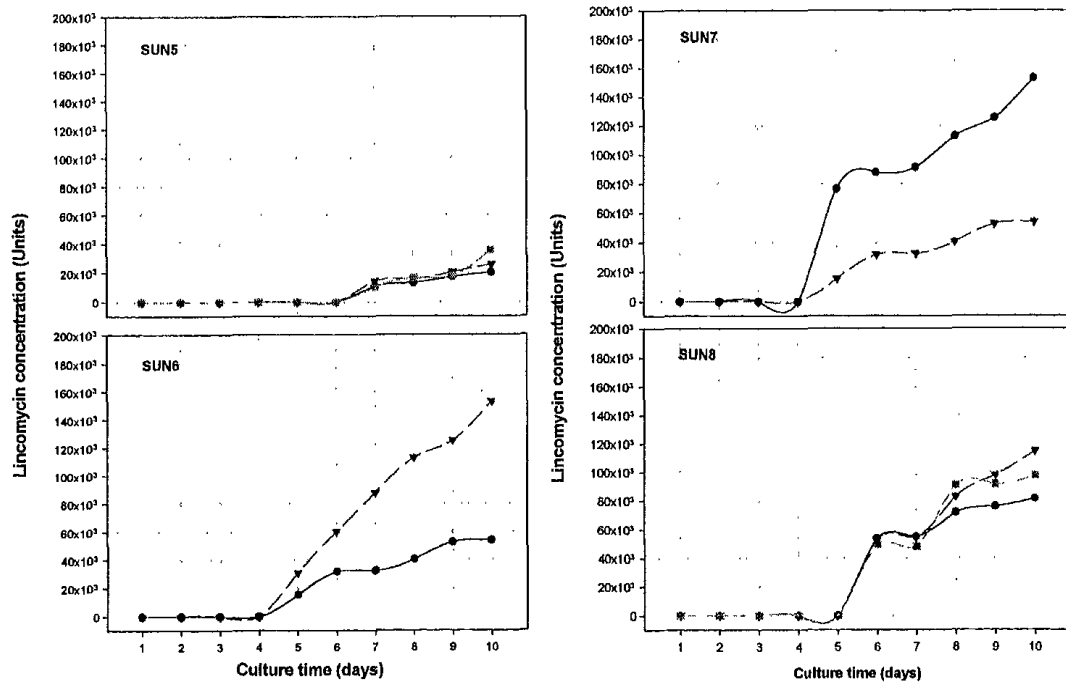


Figure 1-41. Lincomycin production kinetics in fermentations of various mutants (SUN5-SUN8) (SLPM4 medium used).

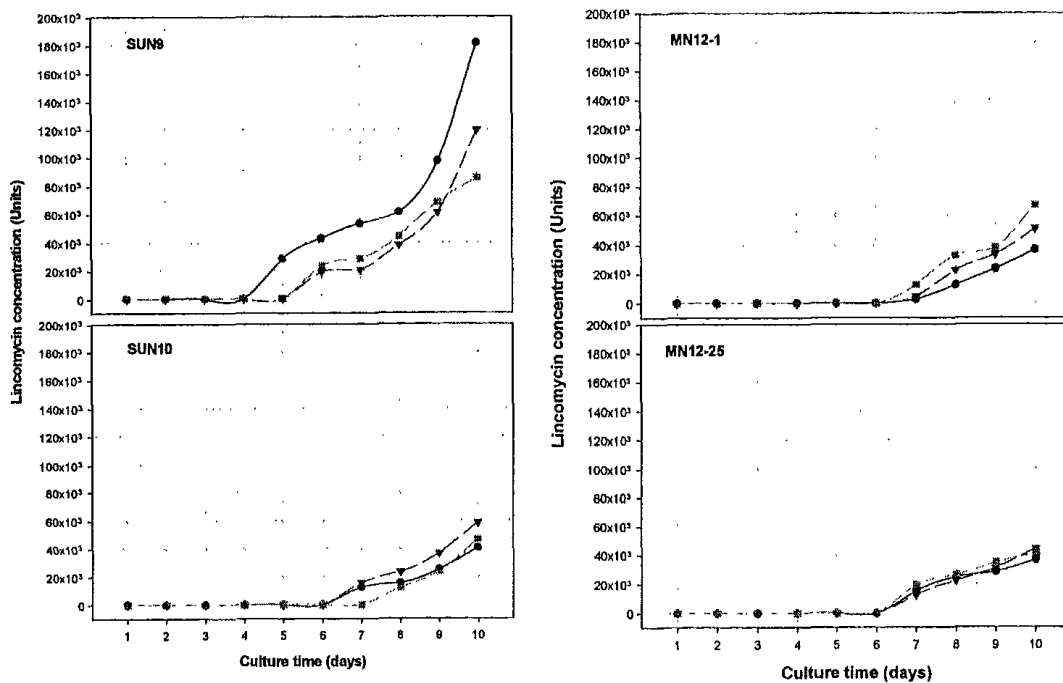


Figure 1-42. Lincomycin production kinetics in fermentations of various mutants (SUN9, 10, MN12-1, MN12-25) (SLPM4 medium used).

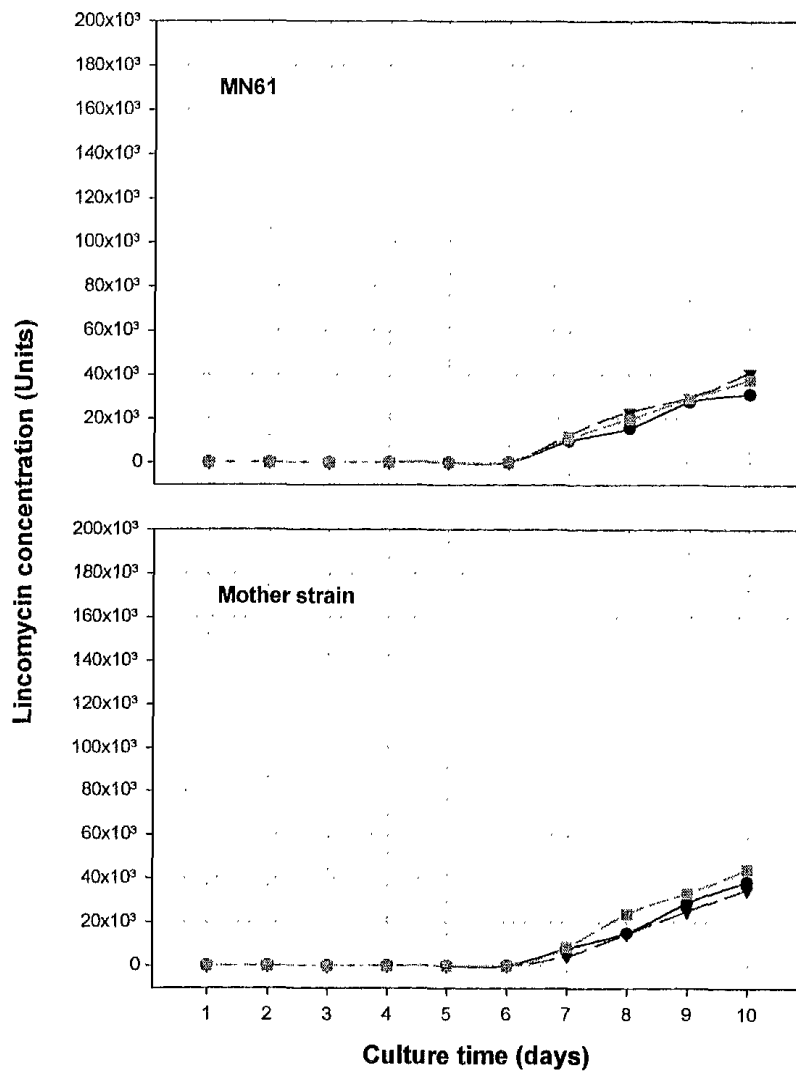


Figure 1-43. Lincomycin production kinetics in fermentations of various mutants (MN61, Mother strain) (SLPM4 medium used).

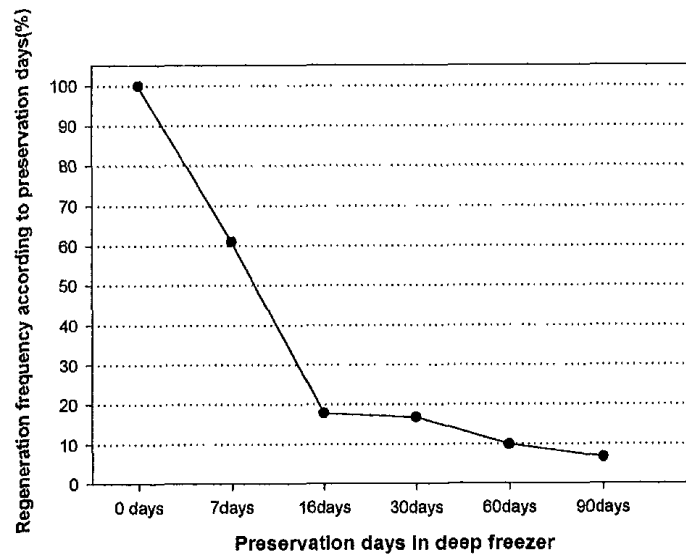


Figure 1-44. Protoplast maintenance and preservation in deep freezer (-80 C).

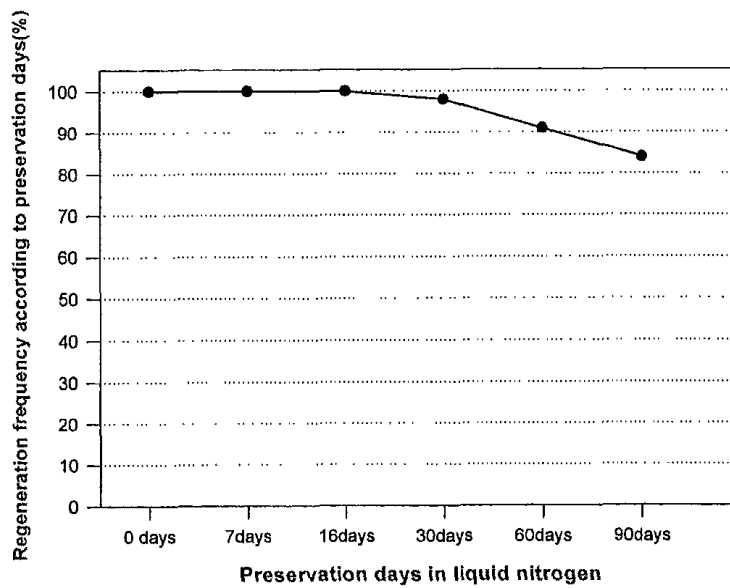


Figure 1-45. Protoplast maintenance and preservation in liquid nitrogen (-196 C).

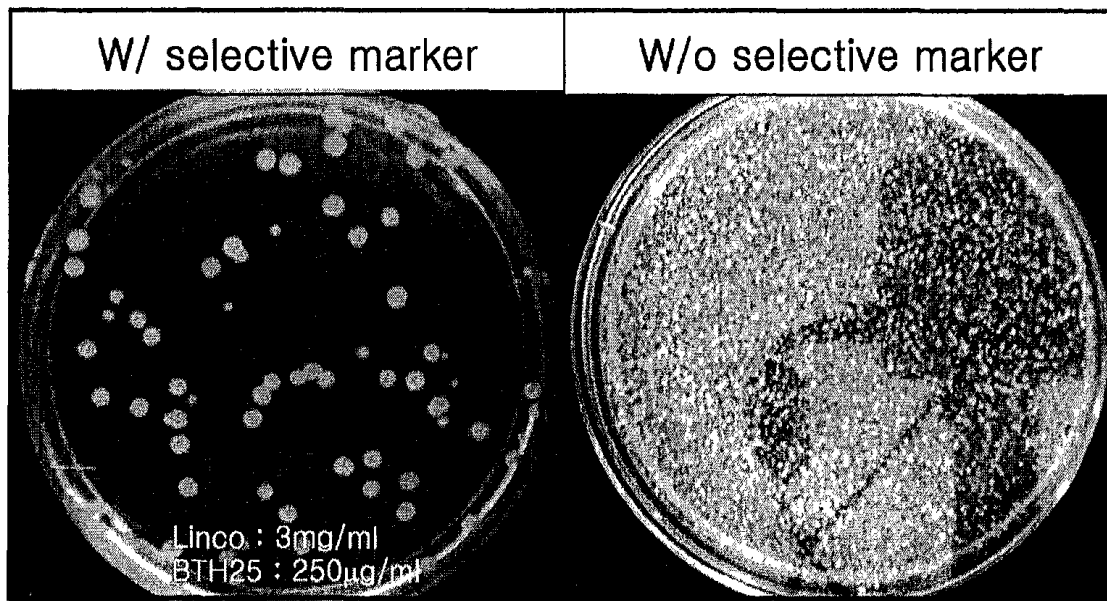


Figure 1-46. Effect of selective markers on the regeneration of protoplast fusants.

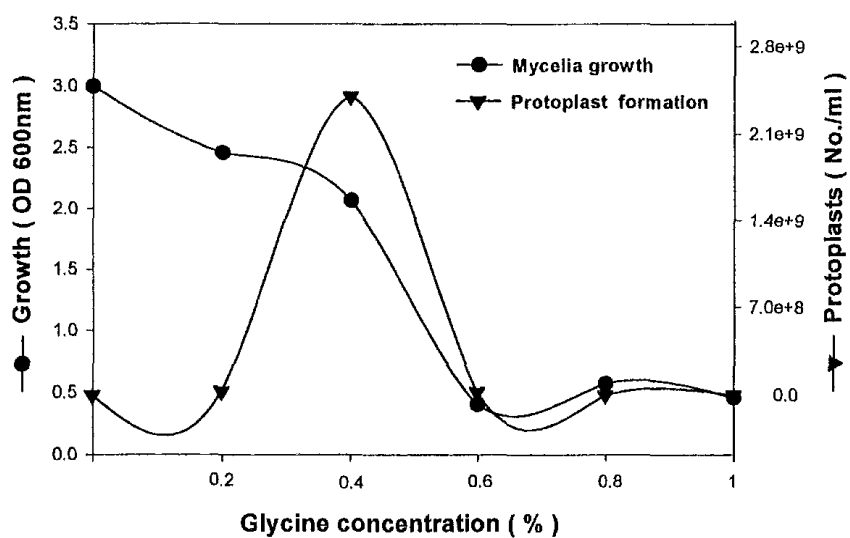


Figure 1-47. Effect of glycine concentration on cell growth and protoplast formation.

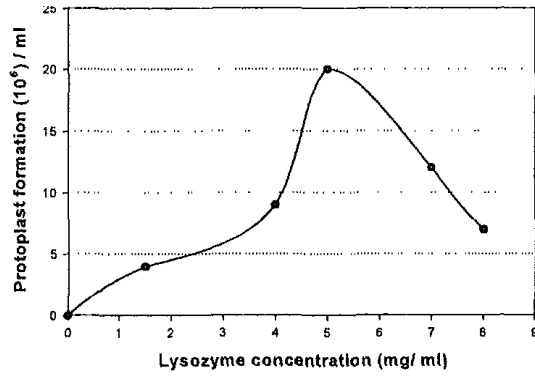


Figure 1-48. Effect of lysozyme concentration on protoplast formation.

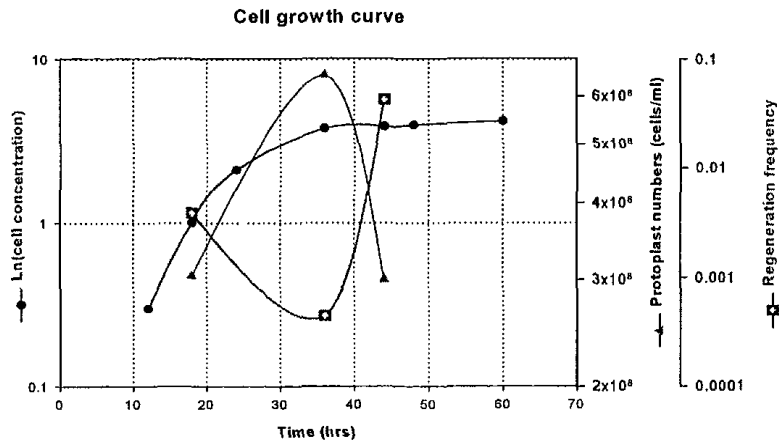


Figure 1-49. Effect of culture time on protoplast formation and regeneration frequency.

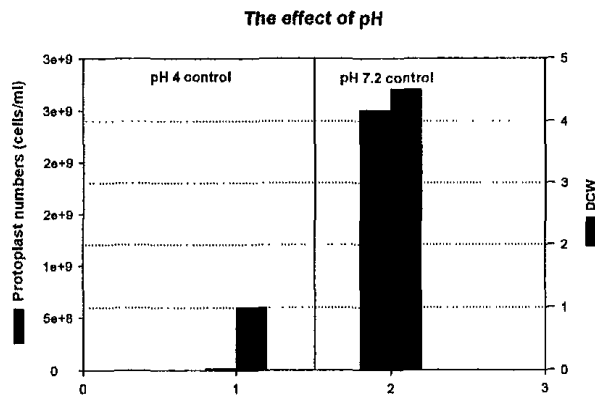
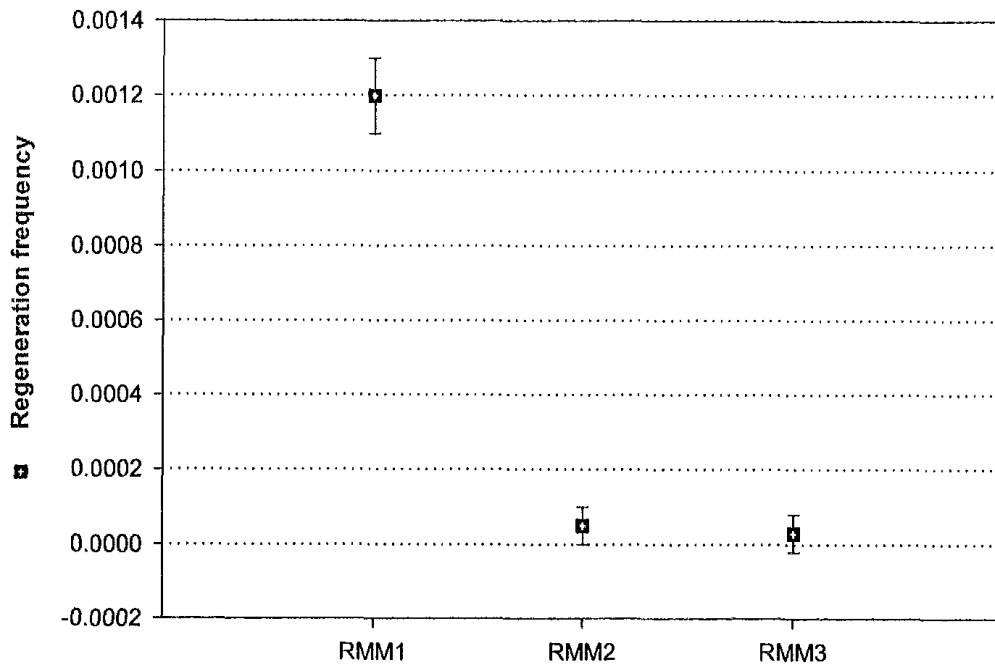


Figure 1-50. Effect of pH on cell growth and protoplast formation.



구 분	Protoplast 수		삼투압 안정제 첨가시 살아남은 세포수	삼투압 안정제 비첨가시 살아남은 세포수	Protoplast (%)	재생 빈도
	Total (cells/ml)	희석해서 도말한 세포수 (cells/ml)				
RMM1	2.5x10 ⁹	1x10 ⁷	12,000	343	97	1.2x10 ^{-d}
RMM2		1x10 ⁷	612	126	80	4.9x10 ^{-b}
RMM3		1x10 ⁷	321	36	88	2.9x10 ^{-b}

Figure 1-51. Effect of various regeneration media on regeneration frequency of protoplasts.

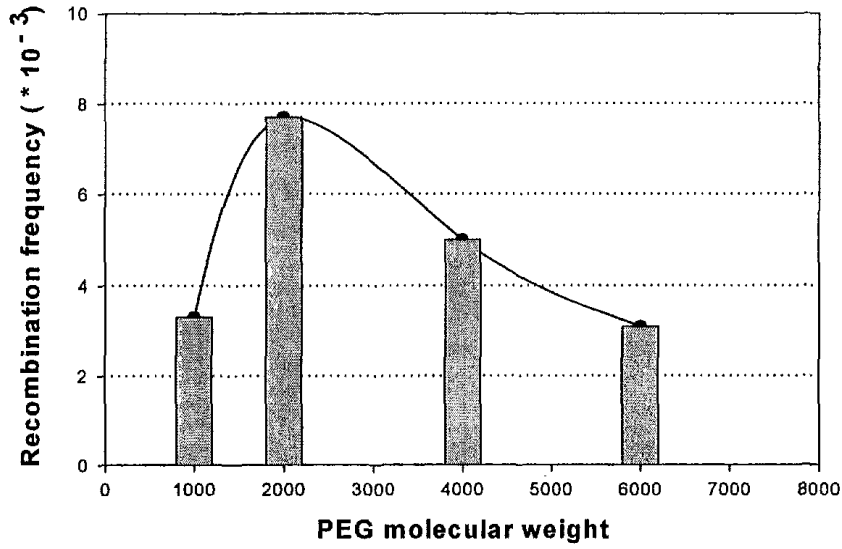


Figure 1-52. Effect of molecular weight of PEG on recombination frequency

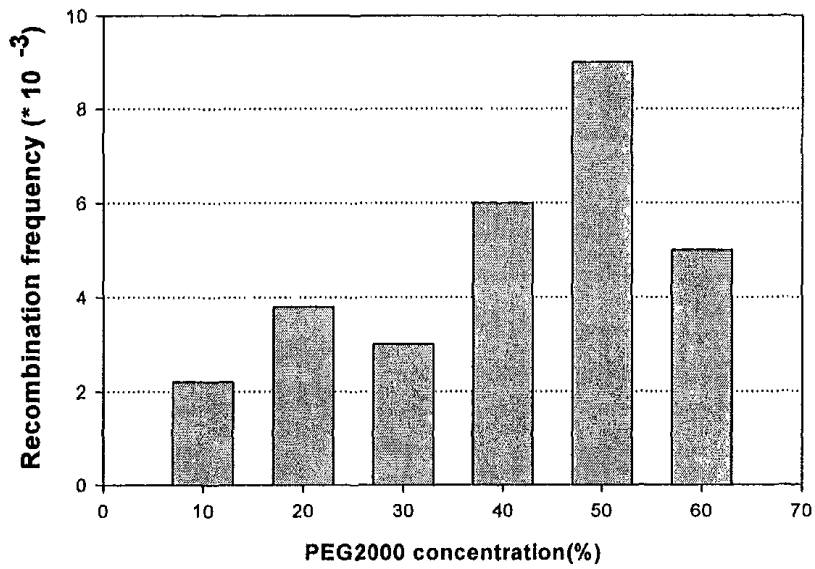


Figure 1-53. Effect of PEG2000 concentration on recombination frequency.

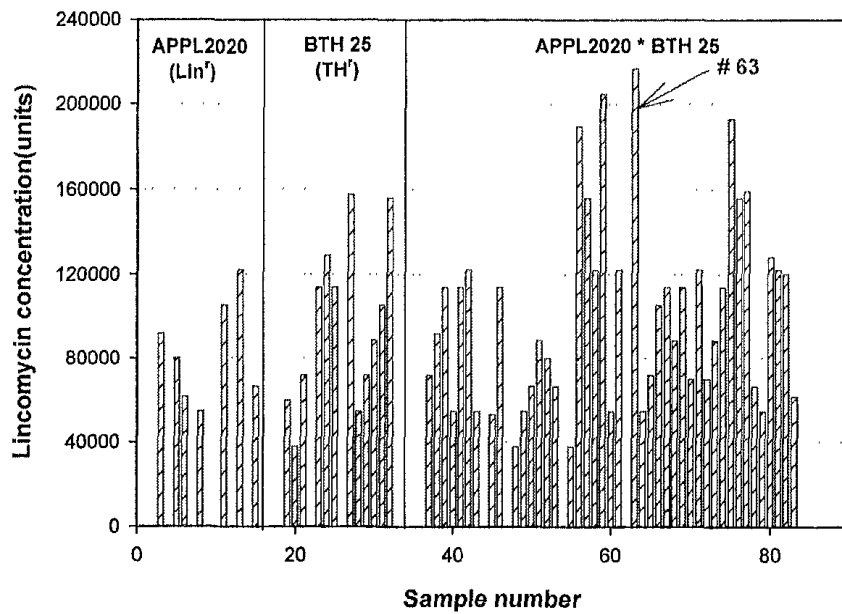


Figure 1-54. Lincomycin production profiles of A group fusants.

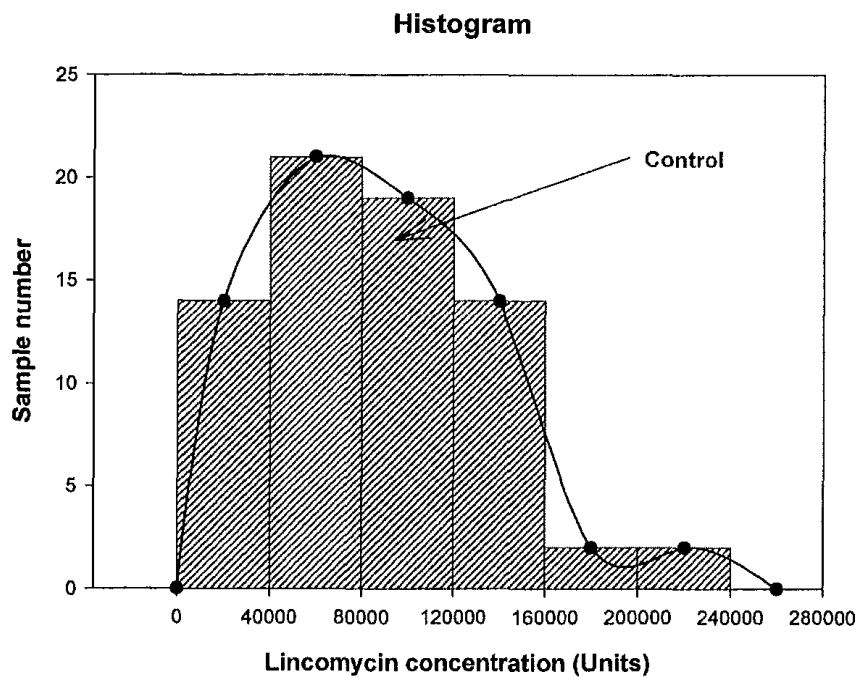


Figure 1-55. Histogram of lincomycin production of A group fusants

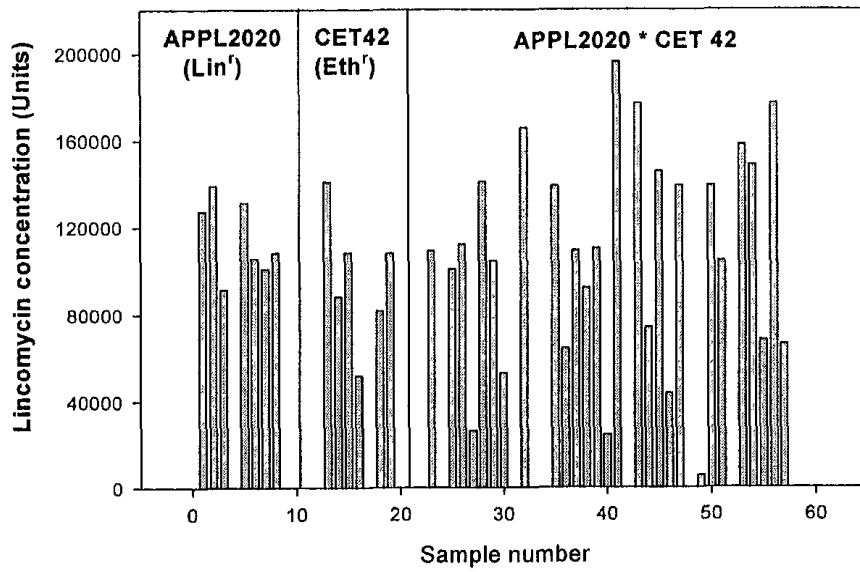


Figure 1-56. Lincomycin production profiles of B group fusants.

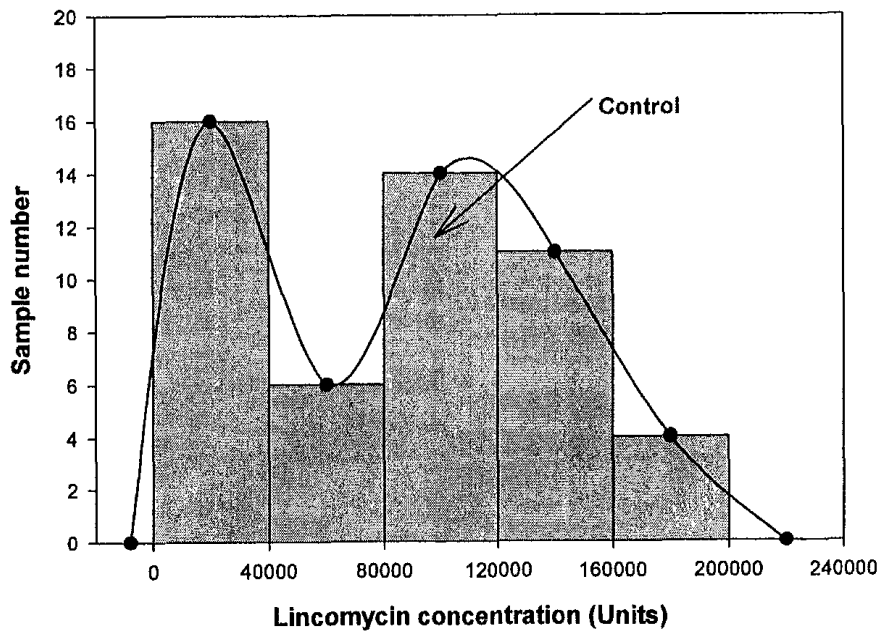


Figure 1-57. Histogram of lincomycin production of B group fusants

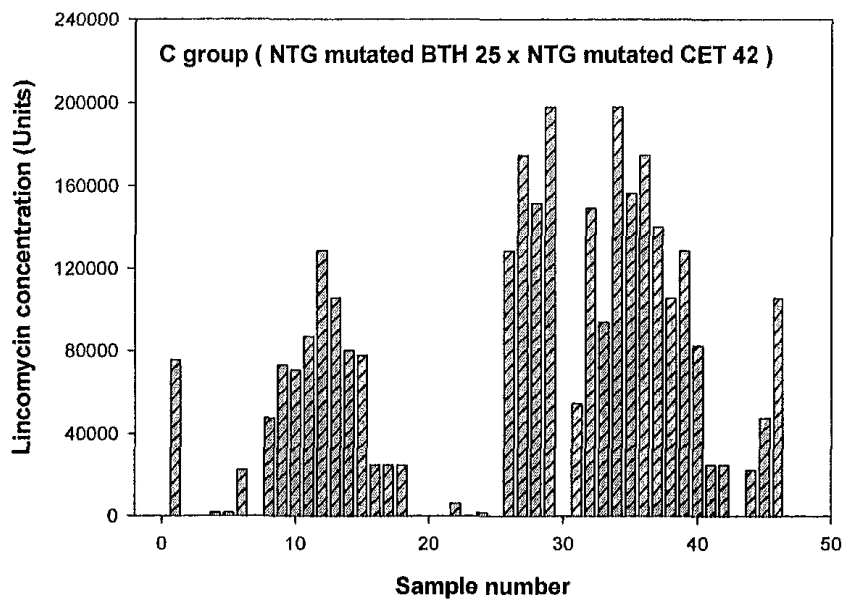


Figure 1-58. Lincomycin production profiles of C group fusants.

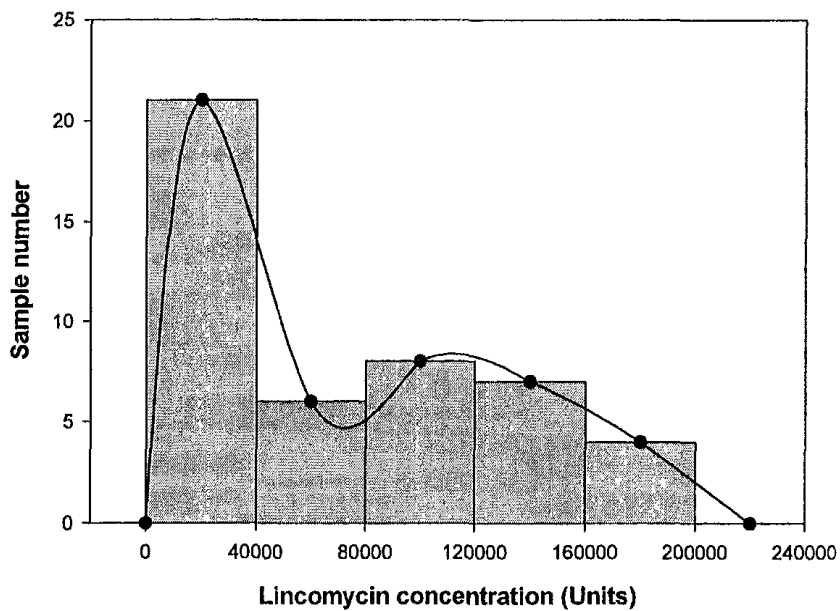


Figure 1-59. Histogram of lincomycin production of C group fusants

제 3 장 고기능성 동물성장촉진·사료효율개선제인 린코마이신 발효공정 최적화(제2세부과제)

제1절 서 설

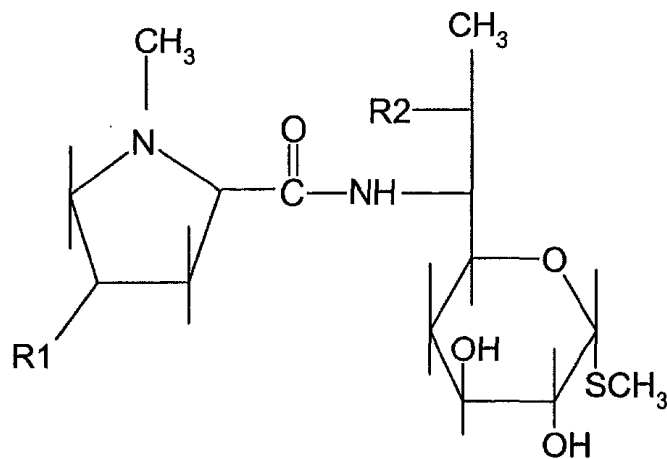
선진외국에서는 1970년대부터 성장촉진제를 개발하여 가축의 생산성을 개선하여 왔으나, 현재 국내의 가축용 성장 촉진 및 사료효율개선제 시장은 약 1,000억원 규모로 전량 수입에 의존하고 있는 실정이다. 동물성장촉진과 사료효율개선제로서의 항생제의 기작은 완전하게 규명되지는 않았으나, 장내 병원성 세균의 제거 및 장내 세균의 재분포로 인해 동물의 성장이 촉진되는 것으로 알려져 있다⁽¹⁾.

Lincomycin은 방선균인 *Streptomyces lincolnensis*에 의해 이차대사산물로 생합성되며 그람양성균주에 대해 효과를 가지고 있다고 알려져 있다. 또한 여러 가지 병리학적 상태의 인간과 동물의 치료제로 알려져 있으며 편도선염, 폐렴, 부종, 결막염, 종기와 등창의 질병 치료제로 사용되고있다⁽²⁻⁶⁾. 그리고, *Streptococci*, *Staphylococci*와 *Pneumococci*의 균주에 의해 감염되기 쉬운 대부분의 호기성 그람 양성 병원균에 대해 활성을 가지 있으며, 그람 양성균(포도상구균, 연쇄상구균, 폐렴구균 등)에 우수한 항균작용을 하고, 호흡기 감염증, 소화기 감염증, 농양, 외이염, 수술후 2차 세균 감염 방지의 효과가 있다^(7, 8).

Lincomycin은 sulfur를 포함하는 독특한 구조를 가지며 특정 family의 항생제에 속하지 않는다. 주로 lincomycin A, B와 cilindamycin으로 나눌 수 있고, 기능기의 종류에 따라 여러 가지 구조적으로 유사한 물질이 생성된다^(9,10). Lincomycin 구조는 Fig. 1에 나타낸 것처럼 두 부분으로 나누어지며 trans - N - methyl - 4 - n - propyl - L - proline (propylhygric acid 또는 PHA)인 아미노산의 부분과 6 - amino - 6, 8 - dideoxy - 1 - thio - D - erythro - α - D - galactoocto - pyranoside (methyl thiolincosaminde 또는 MTL)인 당의 일부의 펩타이드 결합으로

구성되어 있다. 9개 탄소원중 7개와 아미노산 부분의 질소는 L-tyrosine으로 유래된 것이고 N-methyl carbon과 side-chain의 3번째 탄소는 전구물질로 L-methionine을 가지고 있다. L - 3 - hydroxytyrosine 또는 L - 3, 4 - dihydroxy phenylalanine (L-DOPA)는 L-tyrosine보다 lincomycin에 더 즉각적인 전구물질로 알려져 있으며 생합성 경로를 Fig. 2-2에 나타냈다^(11,12).

현재 상품명 Albitotic, Cilimicina, Cilimycin, Frademycin, Lincomyx, Mycivin, Waynecomycin 등으로 시판되고 있으며 돼지의 경우 질병 예방과 사료효율 개선용으로 사료 톤당 0.25~1 kg을, 질병치료용으로 사료 톤당 1~3 kg(1~3 주간 투여)을 사용하며, 육계의 경우에도 괴사성 장염예방, 증체율 및 사료 개선용으로 사료 톤당 약 5 kg(5~7일간 투여)을 사용하는 등, lincomycin은 광범위한 질병의 치료와 예방에 넓은 항균력과 빠른 진행으로 탁월한 효과를 나타내고 있다.



Lincomycin A R1=propyl R2=OH

Lincomycin B R1=Ethyl R2=OH

Figure 2-1. Chemical structures of some lincomycins.

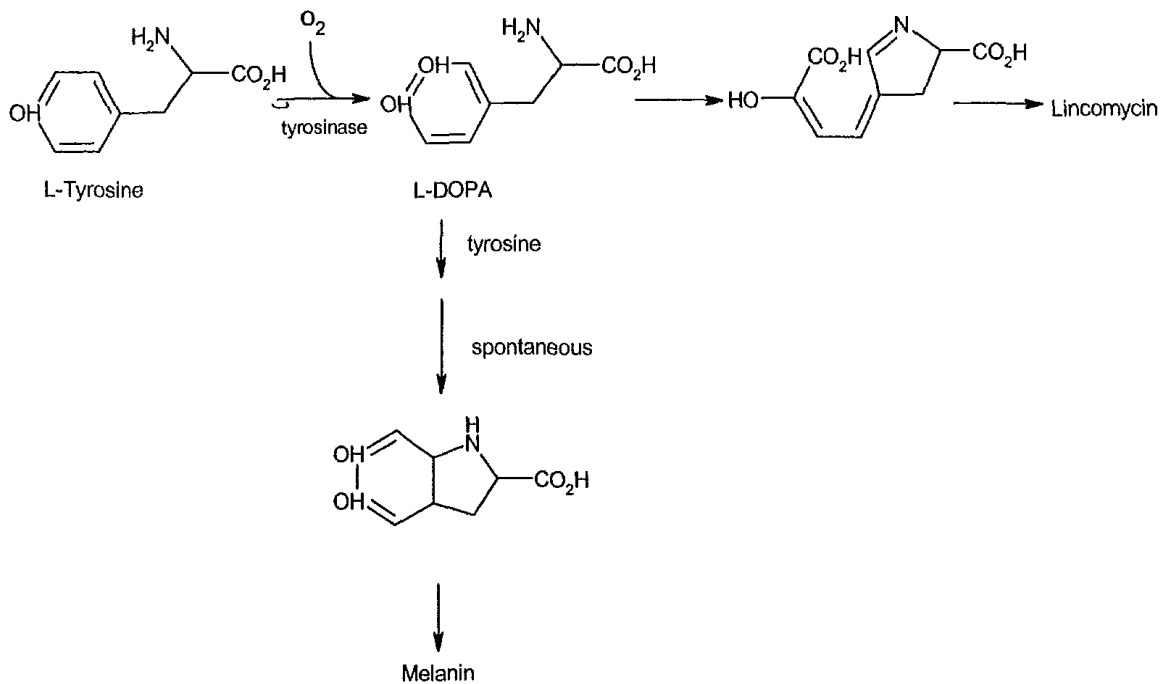


Figure 2-2. Fate of L-3,4-dihydroxyphenylalanine in *S. lincolnensis*.

이와같은 lincomycin은 사료의 효율성, 가축의 건강성과 증체량을 증진시킬 수 있는 경제적인 사료첨가제로 널리 인정 받고 있을 뿐만 아니라, 사람과 동물, 환경에 모두 안전하며, 휴약기간도 1일로 매우 짧고, 25배 용량에도 부작용이 전혀 나타나지 않는 안전한 항생제이다. 사료에 단순히 첨가함으로써 매우 편리하게 사용할 수 있어 대부분의 사료회사에서 다른 경쟁관계에 있는 항생제에 비해 우선적으로 선호하는 동물성장촉진 및 사료효율 개선제이다.

이차대사는 일부 식물과 미생물에서 일어나는 물질대사로서, 세포의 성장과 직접적으로 연관이 되어 있는 일차대사와는 뚜렷이 구별된다. 생명체의 성장과 재생산에 직접적인 관계를 갖는 필수적인 일차대사와 구별되며 당, 아미노산, 유기산 등과 상이한 화학구조를 가진 특별한 화합물로 일부 식물과 미생물에서 일어나는 물

질대사이다. 풍부한 배지로 희분식 배양을 한 경우 높은 항생물질 농도는 세포성장이 이루어진 후에 생성된다. 그래서 미생물은 trophophase에서는 생성물을 합성하지 않고 전혀 대사과정을 행하지 않는 것처럼 보이는 시기인 생육정지기에 어떤 생성물을 합성하기도 한다. 이러한 생성물을 이차대사산물이라고 하고, 이시기를 idiophase라 한다. 방선균과 곰팡이 같은 균사형성 미생물인 경우에는 trophophase와 idiophase의 구분은 뚜렷하지 않는 경우도 많다^(2,3).

미생물은 모두 물을 요구하며, 에너지원으로서 탄소원과 질소원이 필요하고 무기물과 비타민 외에 호기성 균에서는 산소를 필요로 한다. 배지성분은 균체량과 대사산물 생산을 위한 기본조건을 만족시켜야하며 생합성과 세포유지를 위한 충분한 에너지를 공급할 수 있도록 구성되어야 한다. 탄소원의 선정은 이차대사산물 생산을 원활히 수행하기 위한 중요한 요인이 된다. 일반적으로 신속하게 대사되는 glucose와 같은 당은 미생물의 성장에 이용되며, 느리게 소모되는 탄소원이 균체의 성장을 조절함으로써 이차대사산물 생산에 좋은 것으로 알려져 있다⁽¹³⁾. 탄소원의 대사속도는 균체 생성이나 일차 또는 이차대사산물의 생산에 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. 질소원 역시 탄소원의 경우와 같이 NH_4^+ 나 NO_3^- 같이 쉽고, 빠르게 이용되는 질소원은 과량으로 공급될 경우 이차대사를 저해하는 반면 soybean meal이나 corn-steep liquor같이 쉽게 이용되지 않는 질소원은 이차대사산물 생산에 적합하다고 알려지고 있다. 많은 미생물들에 의한 항생물질 생산은 배양배지에서의 질소원의 농도와 그 형태에 따라 영향을 받는 것으로 보고되었다⁽¹⁸⁾. 무기인산염은 모든 미생물의 성장이나 대사에 요구되는 성분이나 무기인산염의 다량첨가는 탄소원과 질소원의 소비와 호흡을 가속화시켜 성장하는데 좋은 영향을 주지만, 이차대사산물의 생산은 감소시킨다⁽¹⁹⁻²²⁾.

뛰어난 분석기기와 유전공학적 방법을 이용한 정량적인 대사기능의 해석이 시도되고 있지만 현재까지도 생물공정의 많은 부분이 경험에 의해 축적된 know-how에 의존하는 경우가 많은데, 그 이유는 체계적인 실험에 의한 분석이 미비한 점도 있지

만 미생물이 갖는 변이성에도 기인하는 바가 크다고 할 수 있다⁽²³⁾. 이와같은 변이성은 배지조성 등의 중요한 배양조건을 결정하는데 크게 영향을 미치고 새로운 균주가 지속적으로 개발됨에 따라 계속 새로운 배지를 최적화 하여야 하는 어려움이 있다. 계속되는 새로운 배지의 최적화를 잘 알려진 통계적 실험 설계에 의해 적은 수의 실험으로 노력을 극소화 할 수 있다.

실험설계의 기본적인 목표는 짧은 시간 안에 신뢰성 있고 유용한 자료의 생산에 있고, 효율적인 실험 계획을 수립하는 것이다. 일반적으로 사용되고 있는 대표적인 실험 설계법은 Plackett-Burman design, Response surface design과 Latin square design등이 있다⁽²⁴⁻²⁶⁾. 이중에서 라틴방격법(latin square design)은 3인자의 실험에 쓰여지며 각 인자의 수준수가 반드시 동일하여야 한다. 수준수를 k 라 하면 총 실험횟수는 k^2 개가 된다. 라틴방격법은 k^3 개의 실험이 이루어지는 3원 배치실험보다 $1/k$ 배로 실험횟수가 적어지게 된다. 라틴방격법은 이처럼 적은 실험횟수로서 실험가능한 반면에 인자간의 상호작용의 효과를 검출할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 따라서 이 실험계획법은 인자간의 상호작용이 무시될 수 있을 때, 적은 실험횟수로서 주효과에 대한 정보를 간편히 얻고자 할 때 많이 사용된다⁽²⁷⁾.

호기성 배양에서 세포는 배지로부터 산소를 섭취한다. 그래서 기체로부터 액체로의 산소 전달의 속도는 매우 중요하며, 특히 세포의 성장이 활발하여 산소가 제한되는 높은 세포 농도에서 더욱 그렇다. 회분식 배양에서 산소 섭취 속도는 시간에 따라 변한다. 세포의 농도는 배양 중에 점점 증가하고 산소 섭취 속도는 세포의 수에 비례한다. 그리고 세포 당 산소의 소비 속도인 비 산소 섭취 속도(specific oxygen uptake rate)도 역시 변화한다. 발효과정동안 용존산소부족으로 인한 산소 제한현상을 피하고 세포의 대사작용이 가장 빠른 속도로 이루어지려면 발효기 안의 모든 지점에서의 용존산소의 농도가 한계용존산소농도(critical dissolved oxygen concentration, C_{crit})보다 높아야한다. 한계용존산소농도는 단위세포당의 산소흡수율이 배지중의 용존산소농도에 의해 더 이상 영향을 받지 않는 용존산소의 농도로

정의된다. 정확한 값은 유기체에 의존하지만 평균적인 작업 조건하에서 대개 공기 포화의 5~10% 범위에 있다. 발효를 위해 기질을 선택하는 것도 산소 수요에 상당한 영향을 줄 수 있다. 다른 당이나 탄소를 포함하는 기질들보다 glucose는 일반적으로 소비가 빠르기 때문에 산소 수요는 glucose가 사용될 때 더 높다. 예를 들어, lactose, sucrose와 glucose를 penicillium 곰팡이 성장에 사용하였을 경우 각각 5.5, 6.1과 12 m mol/h의 최대 산소소비속도를 나타내었다⁽²⁸⁾. 그리고 전형적인 생물반응기 조업 조건하에서 교반속도를 증가시키는 것은 부피전달계수(k_{La})의 값을 향상시킨다. 그리고 일반적으로 k_{La} 는 통기속도의 증가보다는 교반속도의 증가에 의해 큰 영향을 받는다.

본 연구에서는 lincomycin의 생산을 위한 배지중의 여러 가지의 탄소원, 질소원, 인산염, 마그네슘 및 아미노산의 영향을 조사하여 중요한 영양원을 선정하였고, 선정된 영양원을 중심으로 라틴방격법을 이용하여 배지최적화를 시도하였다. 또한 회분식 배양에서 교반속도, pH, 임펠러의 종류 및 소포제에 대한 연구를 수행하여 발효조 배양 운전조건을 확립하였다. 그리고, 동적인 방법(dynamic method)을 통해 부피전달계수(k_{La})를 측정하였고 단일임펠러와 이중임펠러의 k_{La} 와 산소섭취속도(oxygen uptake rate, O.U.R)를 비교실험하여 lincomycin 대량생산을 위한 운전조건을 제시하였다. 또한 생물반응기 운전조건을 확립하기 위해 회분식과 유기식 배양을 실시하였으며, 용존산소 조절에 의한 발효시스템이 lincomycin 생산에 미치는 영향을 구명하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 재료

가. 사용균주

본 연구에서 사용한 균주는 *Streptomyces lincolnensis*: KCTC 1868(ATCC 25466, NRRL 2936), IMSNU 20232(ATCC 25466)이다. PDA(potato dextrose agar)와 GYP(glucose monohydrate, yeast extract, pancreatic digest of casein)를 이용하여 계대배양하였고, 냉장상태에서 보관하였다. 고체 종배양배지에 배양한 균을 액체배지에 접종하여 27℃와 200 rpm에서 5일간 배양하였으며, 성장이 좋은 배양균을 glycerol stock(3 mL glycerol과 7 mL broth)을 만들어 -60~-70℃에서 냉동보관하면서 매 실험마다 접종용으로 사용하였다.

mutant균은 *Streptomyces lincolnensis* mutant Asun1, Asun9, Bsun1과 Bsun2이 사용되었으며, sporulation배지(SPM)를 이용하여 slant argar 상태로 4℃에서 냉장보관하였다. 그리고 3개월 마다 계대배양하여 실험에 사용하였다.

나. 배양배지

wild type 균의 종배양은 Table 2-1과 같은 배지를 사용하였고, mutant균의 종배양에서는 Table 2-2의 배지를 사용하였다. Lincomycin 생산을 위한 배지로서 최적 배지선정을 위해 생산배지^{1,2}, defined 배지³, *Streptomyces*속의 배지를 사용하였으며 그 조성을 Table 2-3, 2-4와 2-5에 나타냈다.

상기 생산배지를 기본으로하여 플라스크를 이용한 lincomycin 생산 최적 배지(OP-1)결과는 Table 2-6에 나타내었다. 그리고 종균보존배지를 Table 2-7에 나타내었다.

다. 소포제

본 연구에서는 PPG, PEG, CA-110의 소포제를 사용했다. PPG(polypropylene glycol 2000)는 분자량이 2000 g/mol이고, 무색으로 점성이 있으며, PEG(polyethylene glycol 2000)는 분자량이 2000 g/mol이고, CA-110은 순수한 silicone oil이 16±1%인 silicone emulsion이다.

2. 분석방법

가. 균체농도측정

균체농도 측정을 위하여 발효액으로부터 일정량의 시료를 취한 후, 2,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 상징액을 버리고 증류수를 넣은 다음 혼합, 다시 원심 분리하였다. 이런 과정을 세 번 반복하여 시료를 세척한 후 항량을 구한 용기에 넣고 105°C에서 항량이 나올 때까지 건조하여 건조균체질량(dry cell weight)을 측정하였다.

나. 배양액중의 잔류당측정

1) HPLC에 의한 당 분석

시료를 원심 분리하여 상징액을 취하고, 0.2 μ m 막으로 여과한 후 Table 2-8과 같은 조건으로 분석하였다. HPLC를 이용하여 구한 자당과 포도당의 표준곡선을 각각 Fig. 2-3과 2-4에 나타내었다.

2) Starch 분석

발효액의 starch는 Dubois 방법³을 보완해서 측정하였다. 시료를 원심 분리하여 상징액을 취하고 적당량 희석하여 시료 2 mL에 80% phenol 수용액 0.05 mL를 넣은 후 황산 5 mL를 첨가하였다. 발색시킨 후 상온에서 30분간 방치하고 분광광도계(Shimadzu, UV-1601)를 이용하여 488 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선과 식은 Fig. 2-5에 나타내었다.

3) Reducing sugar 분석

시료를 원심분리하여 상징액을 취하고, 적당량 희석하여 1 mL의 시료에 DNS 시약 3 mL를 첨가한후 끓는 물에서 5분간 방치한다. 실온으로 급냉 시킨후 10 mL의 증류수를 첨가하여 분광 광도계(Shimadzu, UV-1601)를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 표준곡선식에 대입하여 당 농도를 계산하였다.

Table 2-1. The composition of growth medium(GM-1)

components	concentration (g/L)
glucose monohydrate	10
yeast extract	10
pancreatic digest of casein (Casiton)	5

Table 2-2. The composition of growth medium for mutant(GM-2)

components	concentration (g/L)
glucose monohydrate	10
yeast extract	10
bacto peptone	5

Table 2-3. The composition of production medium(UP-1).

components	concentration (g/L)
soluble starch	40
sugar cane molasses	20
corn steep liquor	20
peptone water	10
CaCO ₃	4

Table 2-4. The composition of defined medium(DM).

components	concentration (g/L)	components	concentration (g/L)
glucose	30	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.002
NH ₄ Cl	2.7	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1
K ₂ HPO ₄	1	ZnSO ₄ · H ₂ O	0.001

Table 2-5. The composition of production medium(P-1) for Streptomyces species

components	concentration (g/L)	components	concentration (g/L)
malt extract	50	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
skim milk	10	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
CaCO ₃	5	MnSO ₄	0.05
NaCl	2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1
K ₂ HPO ₄	0.5	cottonseed flour	2
MgHPO ₄	0.5		

Table 2-6. The composition of optimal production medium(OP-1)

components	concentration (g/L)
soluble starch	45
sugar cane molasses	15
peptone water	13.33
NaNO ₃	6.67
CaCO ₃	4

Table 2-7. The composition of sporulation medium(SPM).

components	concentration (g/L)	components	concentration (g/L)
maltose	12	K ₂ HPO ₄	0.3
soybean meal	6	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1
soybean oil	0.3	NaCl	1
bacto-peptone	3		

Table 2-8. HPLC condition for glucose and sucrose analysis

HPLC	Shimmazu (Class-LC 10)
Detector	Refractive index detector (RID-6A)
Temperature	40°C
Column	Shimmazu CLC-NH2 (6.0 × 150 mm)
Mobile phase	90% acetonitrile
Flow rate	0.2 mL/min
Injector volume	20 μ l

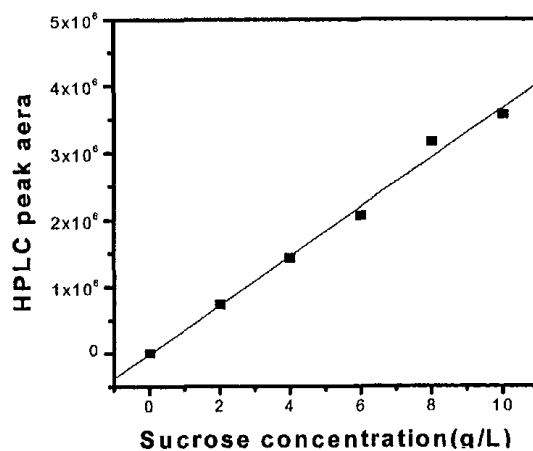


Figure 2-3. Standard curve for sucrose determination.

parameter	value	R
A	-13515.05	0.99576
B	367869.94	
SD	N	P
142235.25	6	<0.0001

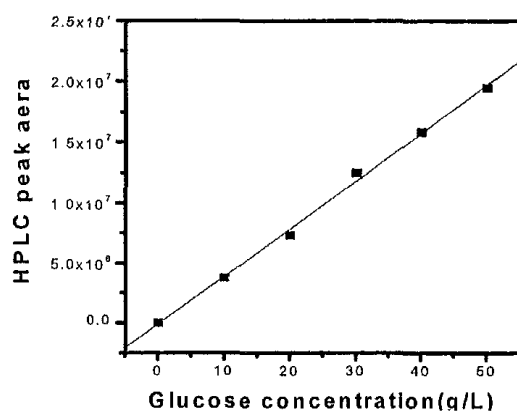


Figure 2-4. Standard curve for glucose determination.

parameter	value	R
A	-76144.90	0.99853
B	395634.92	
SD	N	P
449600.62	6	<0.0001

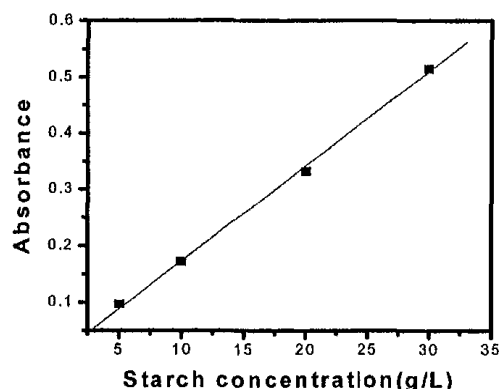


Figure 2-5. Standard curve for starch determination method
(λ : by DNS 488 nm).

parameter	value	R
A	0.00689	0.99913
B	0.01675	
SD	N	P
0.00948	4	8.66938E-4

다 Lincomycin 추출 및 정량분석

1 L 증류수에 phosphoric acid 7 mL를 넣어 용해시킨 뒤 ammonium hydroxide로 pH를 3.0으로 조절하여 phosphate buffer를 제조한다. 발효액을 phosphate buffer와 1:1 비율로 200 rpm에서 10분간 혼합 후, Whatman filter paper No. 4로 여과한다. 이 여과된 액을 다시 0.2 μ m 막으로 여과한 후 HPLC로 분석한다⁽⁴⁾. HPLC 조건은 Table 2-9에 나타내었으며, lincomycin 표준용액의 검량곡선은 배양액을 처리한 방법에 따라 Fig. 2-6과 2-7에 나타내었다. 그리고 Fig. 2-8과 2-9는 lincomycin 표준용액과 발효액의 HPLC 크로마토그램 결과이다.

Table 2-9. HPLC condition for lincomycin analysis

HPLC	Shimadzu(Class-LC 10)
Detector	UV detector(SPD-10A)
Wave length	214 nm
Temperature	45°C
Column	Zorbax C ₈ (25 cm × 4.6 mm) * guard column사용
Mobile phase	sodium dodecyl sulfate 2.9 g과 10 mL phosphoric acid를 660 mL의 증류수에 녹인다. 이 용액에 HPLC grade acetonitrile 330 mL 첨가한 후 ammonium hydroxide로 pH 6.0이 되도록 조절한다.
Flow rate	2 mL/min

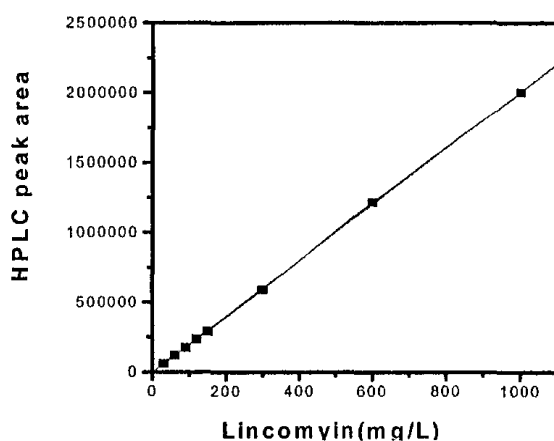


Figure 2-6. Standard curve for lincomycin determination by using buffer.

Parameter	Value	R
A	-2527.70	0.99995
B	2009.75	
SD	N	P
7330.21	8	<0.0001

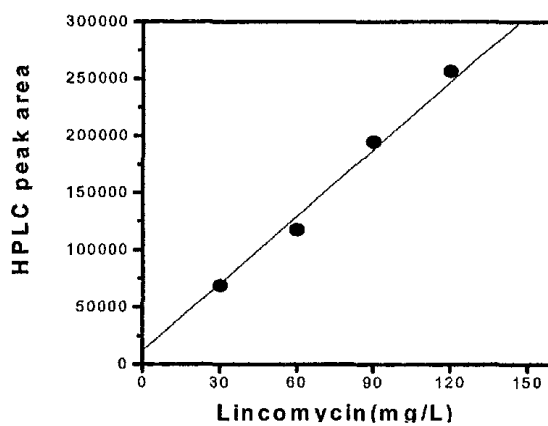


Figure 2-7. Standard curve for lincomycin determination by using methanol

Parameter	Value	R
A	11896.61	0.99995
B	1961.73	
SD	N	P
9566.02	5	<0.0001

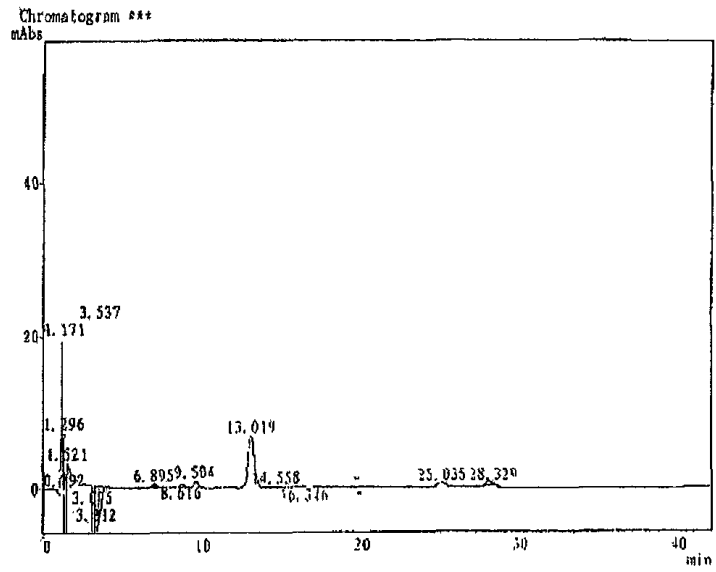
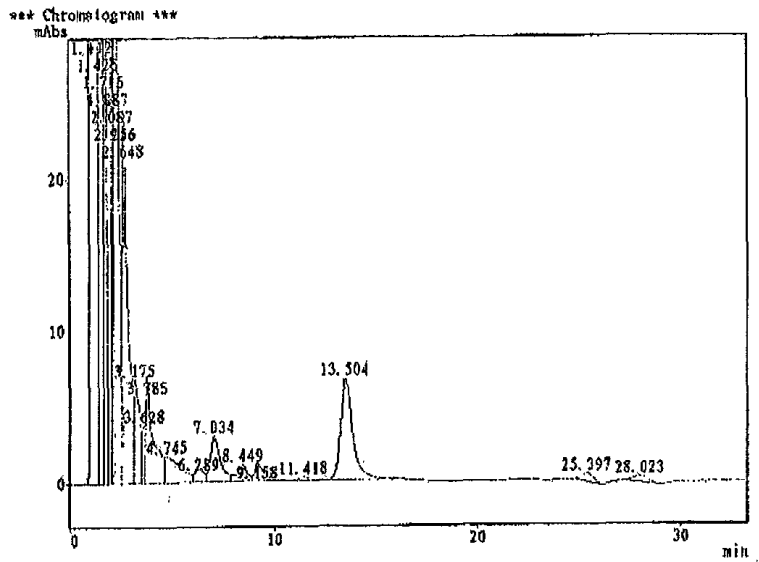


Figure 2-8. HPLC chromatogram of standard lincomycin.



라. 점도

발효액의 점도는 BROOKFIELD MODEL DV- I 를 이용하여 측정했다. spindle(No. 2) 은 시료의 중앙에 위치해야하고 motor를 켜고 3분 후의 값을 읽었다. factor finder에서 점도계 모델 LV에서 설정한 spindle No.와 speed에 해당되는 값을 읽고 발효액의 점도를 계산하였다.

마. pH

발효한 액체 배지의 pH는 ORION 420A 모델의 pH meter를 이용하여 측정하였다.

바. 데이터 분석

실험 자료의 통계처리를 위하여 SAS program을 이용하였다. 플라스크 배양 실험결과에 대하여 ANOVA 분석을 하여 R-square와 F value 값을 통해 유의성의 유무를 확인하였고, SNK grouping에서 A letter를 나타낸 경우를 선택하였다.

3. 실험방법

가. Shaking flask 배양 방법

종배양을 위해 하루 전에 배양온도에서 활성화시킨 stock으로부터 2 mL를 취하여, 250 mL 삼각플라스크의 80 mL 성장배지에 접종하여 27°C, 200 rpm으로 4일간 진탕 배양한다. 그후 성장발효액을 4 mL씩 lincomycin 생산배지 80 mL에 접종하여 27°C와 200 rpm으로 11일간 진탕배양하였다.

mutant 균의 종배양을 위해 하루 전에 배양온도에서 활성화시킨 slant에 증류수 2 mL을 부어 균을 긁은 후 1 mL을 취하여 시험관의 10 mL 성장배지에 접종하여 27°C와 200 rpm으로 2일간 진탕배양한 후 그 배양액을 500 mL 플라스크의 90 mL 성장배지에 접종하여 27°C와 200 rpm으로 4일간 진탕배양한다. 그 후 성장 발효액을 8 mL씩 생산배지 72 mL에 접종한 후 27°C와 200 rpm으로 15일간 진탕배양하였다.

나. Latin square 방법

라틴방격법은 3인자의 실험에 쓰여지며 각 인자의 수준수가 반드시 동일하여야한다. 만약 수준수가 N이라면 총 실험횟수는 N^2 이 된다. 이처럼 라틴방격법은 적은 실험 횟수로서 실험 가능하다는 장점이 있다. 그러나 인자간의 교호작용을 검출할 수 없는 단점이 있다. 적은 실험 횟수로서 주효과에 대한 결과를 상대적으로 간단히 예측할 수 있는 실험계획법이다²⁷. 본 실험에서는 탄소원, 질소원, 아미노산의 3가지 영양원을 조합한 실험에 이 방법을 이용하여 최적배지를 확립하였다.

다. 발효조 배양 방법

1) 회분식 배양

발효조는 2.5 liter 부피의 코바이오텍(주) 제품을 사용하였고, 조업부피는 1.5 liter로 하였다. 배양온도는 28℃, 공기유속은 1 vvm(volume of air/volume of fluid/min)로 유지하였다. pH는 2N-HCl과 2N-NaOH를 이용하여 7.0으로 조절하였다. 발효 중 증발로 인한 broth의 감소를 막기 위해 습윤기(humidifier)를 공기 공급 라인에 설치하여 공기를 발효조에 공급하였다.

2) 유기식 배양

발효조는 2.5 liter 부피의 코바이오텍(주) 제품을 사용하였고 유기식 배양을 위해 공급되는 NaNO_3 를 제외한 최적배지를 1.3 liter의 배양액을 제조하여 실험하였다. 교반속도는 300 rpm, 통기량은 1 vvm으로 조절하였다. 온도는 28 ℃이고, pH는 조절하지 않았다. 발효중 증발로 인한 broth의 감소를 막기위해 습윤기(humidifier)를 공기 공급 라인에 설치하였다.

라. 부피전달계수 측정 방법

발효배지에서 k_{La} 측정은 dynamic 방법을 이용하여 측정하였고, 300 rpm, 1 vvm의

조건에서 시간에 따른 k_{La} 의 변화와 O.U.R의 변화를 조사하였다. 그리고, 교반조건과 통기조건을 변화시켜 k_{La} 값을 비교 실험하였다.

발효기의 용존산소는 O_2 센서를 이용하여 측정하였고 발효기의 레코더와 연결된 Multi-Lab Card(PCL-812PG)를 통해서 컴퓨터와 연결되어 소프트웨어(Genie pro.)에 의해 저장되었다가 origin 프로그램(Microcal Software Inc.)에 의해서 k_{La} 를 계산하였다.

이중임펠러의 기-액 물질전달 특성을 조사하기 위해 산소전달계수의 측정실험은 W. A. Al-Masry와 A. R. Dukkan 등이 사용한 방법과 같은 동적인 방법을 이용하였다⁽³²⁾. 발효기내에 질소를 공급하여 용존산소농도를 20% 이하로 떨어뜨린 후에 air를 공급함으로써 air-water계와 air-medium계에서 수행하였다. 증류수를 사용하여 조업부피 1.5 liter를 기준으로 운전하였고, 교반속도는 300 rpm, 통기량은 1 vvm, 그리고 온도는 28℃로 조절하였다.

k_{La} 와 O.T.R.에 영향을 미치는 통기량 실험은 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 vvm 통기 조건에서 수행하였으며, 교반실험은 200, 250, 300, 350, 400, 450 rpm에서 수행하였다. 배지의 경우에는 생산배지를 사용하였으며 이때 거품을 제거하기 위해 PPG (polypropylene glycol 2000)을 사용하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 생산배지 최적화

가. 성장배지와 생산배지에서 미생물의 성장곡선

생산배지를 최적화하기 전에 성장배지에서 *Streptomyces lincolnensis*의 wild type 균주의 성장곡선, lincomycin의 생산과 pH 변화를 측정하고, 생산배지에서는 lincomycin의 생산과 균체의 성장곡선, pH와 점도의 변화를 구하였다. 각각의 성장곡선은 Fig. 2-10과 2-11에 나타내었다. 성장배지에서 균체량은 배양 후 6일째 제일 높았으며, lincomycin은 측정되지 않았다. 발효기간 동안 pH의 변화는 초기 pH 6.8에서 약 ± 2정도의 변화를 보여 주었다. 성장배지에서 균체를 활성화시킨 후에 생산배지(UP-1)에 접종하여 15일 동안 배양한 결과 균체량은 9일째까지 계속 증가 하였으며 lincomycin 생산은 균체량 증가가 감소하기 시작하는 6일째부터 서서히 시작되었으며, 14일째까지도 증가하였다. 이차대사산물 생산시 볼 수 있는 전형적

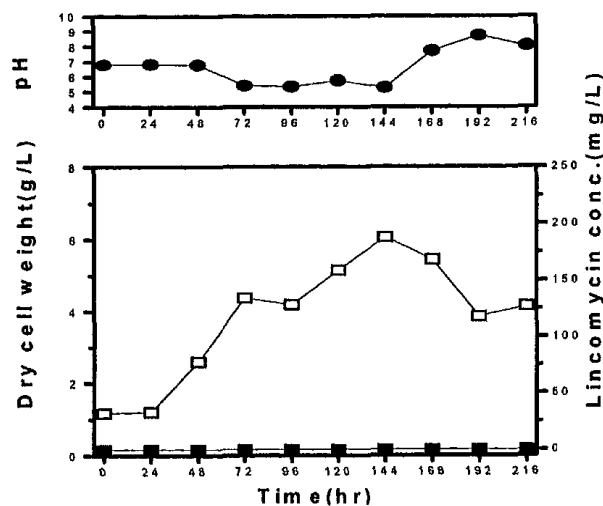


Figure 2-10. The growth curve of *Streptomyces lincolnensis* by GM-1.

—□—, Dry cell weight; —■—, Lincomycin concentration;
—○—, pH

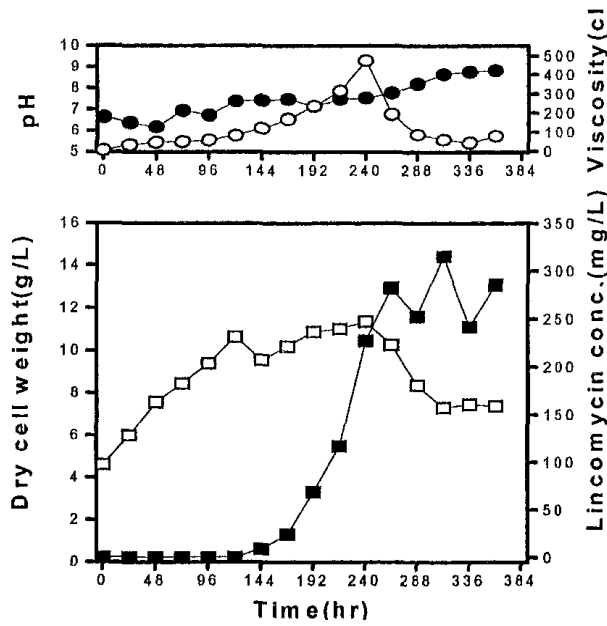


Figure 2-11. The growth curve of *Streptomyces lincolnensis* by UP-1.

—□—, Dry cell weight; —■—, Lincomycin concentration;
 —●—, pH; —○—, Viscosity.

인 성장 및 생산물 생산 형태를 보여주고 있다. 특히 생산배지에서 점도는 240시간에 최고점인 약 473 cP을 나타낸 후 감소하는데 균사체의 절단에 의한 것으로 생각된다⁷.

나. 탄소원의 종류가 lincomycin 생산에 미치는 영향

다양한 탄소원에 따른 lincomycin 생산결과는 Fig. 2-12에 나타내었다. 이때 탄소원을 제외한 나머지 생산배지의 조성은 Table 2-3에 나타낸 바와 같다. 본 연구에 사용된 탄소원 중 미생물에 의해 느리게 소모되는 starch의 경우 lincomycin 생산 농도가 가장 높았다. 콜레스테롤 저하제 생산균주인 *Aspergillus terreus*의 경우 glycerol과 oil이 이차대사산물 생산에 좋은 탄소원이었으나, *S. lincolnensis*의 경우에는 corn oil을 제외한 다른 oil 종류에 대해 특별한 효과가 없었다⁽³³⁾. 건조균체량은 oil중에서 corn oil과 fish oil의 경우 약 12 g/L 이상의 상대적으로 높

은 값을 보여주었다. 나머지 탄소원의 경우는 기본생산배지를 이용한 대조구보다 비슷하거나 낮은 값을 나타냈다. 각 탄소원에 따른 발효액의 최종 pH는 fish oil의 경우 가장 낮은 값인 pH 7.22, sugar cane molasses는 가장 높은 값인 pH 9.06, 그리고 나머지는 pH 8.6 ± 0.3 으로 비슷한 값을 나타내었다.

적절한 균체 성장을 위한 탄소원과 이차대사에 좋은 탄소원을 같이 공급함으로써 lincomycin 생산량을 높이고자 여러 가지 탄소원이 lincomycin 생산에 미치는 영향 실험결과에서 선택된 starch, corn oil, 그리고 sugar cane molasses를 이용하여 복합탄소원의 영향을 실험하였다. 복합탄소원의 농도는 60 g/L를 기준으로 하였으며, starch와 molasses, molasses와 corn oil, 그리고 corn oil과 starch를 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1의 비율로 선정하여 실험한 결과는 Fig. 2-13와 같다. Corn oil을 첨가한 경우 높은 균체량을 나타내었고 이는 oil은 단위질량당 포도당 에너지의 대략 2.4배의 높은 열량을 가지고 있기 때문에 일차대사가 활발하게 일어난 것으로 판단된다. 그러나, corn oil 단독으로 실험한 결과와 달리 복합으로 첨가되었을 때 lincomycin이 생산되지 않았다. Starch와 molasses의 비율이 3:1인 경우 lincomycin 생산농도는 약 225 mg/L로 대조구에 비해 3배 높은 생산량을 나타내었다.

이와같이 starch와 molasses의 비율에서 starch의 농도가 증가함에 따라 lincomycin 생산량이 증가함을 보여주었는데 복합탄소원 중의 starch의 증가에 따른 영향을 조사하기 위해 4:1, 5:1, 단독 starch 실험을 수행하여 그 결과를 Fig. 2-14에 나타내었다. Fig. 2-14과 같이 starch와 sugar cane molasses의 비가 3:1인 경우 lincomycin 농도는 350 mg/L로 가장 좋았고, 2:1인 경우와 큰 차이는 없었다. 그리고 starch와 molasses의 비율이 4:1과 5:1인 경우와 같이 starch양이 증가함에 따라 낮은 lincomycin 생산을 나타내었으며, 이는 catabolite repression 현상때문으로 생각된다. Starch를 단독으로 첨가한 경우 13 g/L로 가장 높은 세포농도를 나타내었고, lincomycin 생산농도가 가장 높았던 처리구(starch와 sugar cane

molasses의 비가 3:1인 경우)는 균체량이 11 g/L이었다. 그리고 발효 후 최종 pH는 8.5 ± 0.4 의 변화를 보였다.

이 실험에서의 lincomycin 농도를 SAS 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 한 결과 R-square가 0.9177로 매우 높았으며, F value는 26.78이었고, $Pr > F$ 는 0.0001로써 유의수준 0.005보다 낮아 높은 유의성이 있음을 나타내었다. 각 처리에 대한 반응간의 유의유무를 나타내는 SNK grouping에서 starch와 sugar cane molasses의 비율이 5:1인 경우와 단독 starch를 제외한 나머지는 동일한 수준을 나타내었다. 따라서, lincomycin 생산이 높은 순으로 grouping된 starch와 sugar cane molasses을 배지 최적화를 위해서 선정하였으며, 두 성분의 비율로서 2:1, 3:1, 4:1의 3종류를 선택하였다.

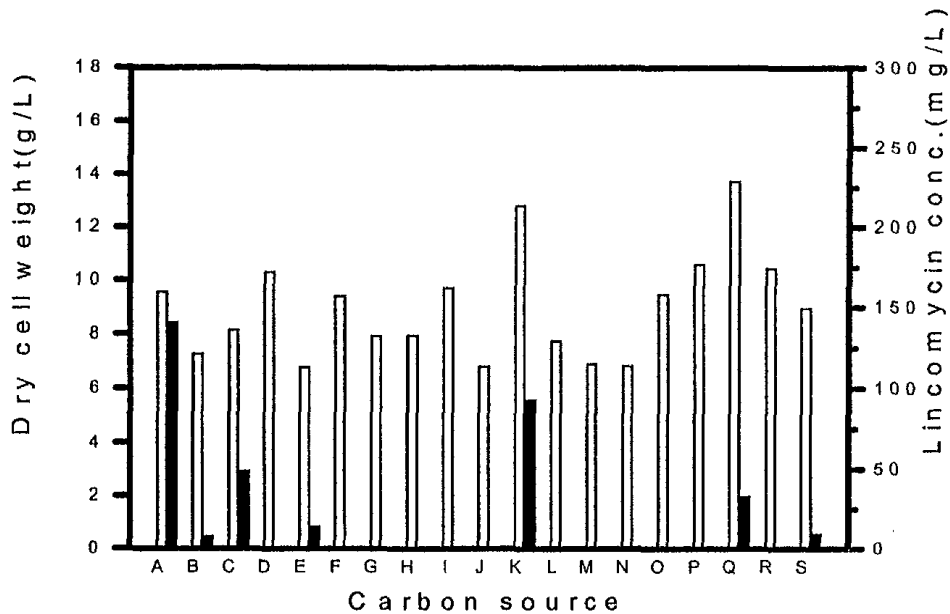


Figure 2-12. Effect of various carbon sources on the production of lincomycin (-□-, Dry cell weight; -■-, lincomycin concentration).
 A, soluble starch; B, sugar cane molasses; C, glucose;
 D, sucrose; E, glycerol; F, fructose; G, maltose; H, lactose;
 I, galactose; J, almond oil; K, corn oil; L, peanut oil;
 M, sesame oil; N, sunflower seed oil; O, soybean oil;
 P, cottonseed oil; Q, fish oil; R, lard oil; S, olive oil.

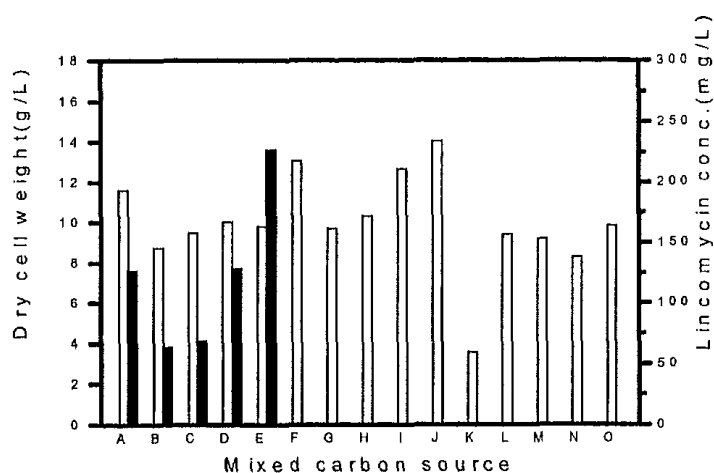


Figure 2-13. Effect of various mixed carbon sources on the production of lincomycin(-□-, Dry cell weight: -■-, lincomycin concentration).
 A, ST:MOL(1:1); B, ST:MOL(1:2); C, ST:MOL(1:3);
 D, ST:MOL(2:1); E, ST:MOL(3:1); F, ST:CO(1:1);
 G, ST:CO(1:2); H, ST:CO(1:3); I, ST:CO(2:1); J, ST:CO(3:1);
 K, MOL:CO(1:1); L, MOL:CO(1:2); M, MOL:CO(1:3);
 N, MOL:CO(2:1); O, MOL:CO(3:1)
 (ST, Starch; MOL, sugar cane molasses; CO, corn oil).

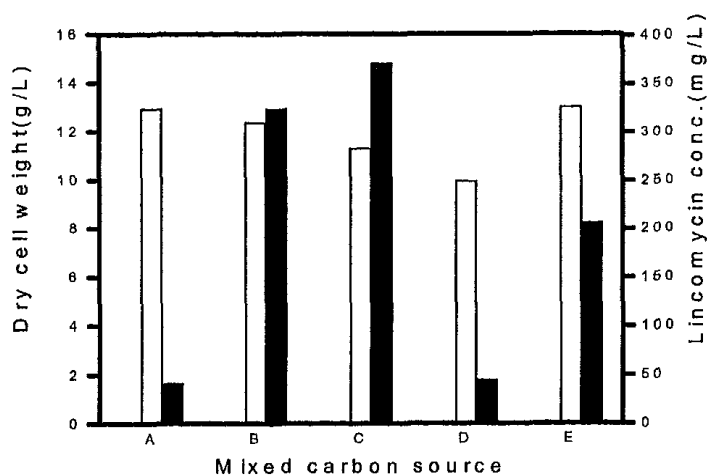


Figure 2-14. Effect of various mixed carbon sources on the production of lincomycin
 (-□-, Dry cell weight: -■-, lincomycin concentration).
 A, ST; B, ST:MOL(2:1); C, ST:MOL(3:1); D, ST:MOL(4:1);
 E, ST:MOL(5:1) (ST, Starch; MOL, sugar cane molasses).

다. 질소원의 종류가 lincomycin의 생산에 미치는 영향

이차대사는 질소원자가 참여하는 일차대사에 의해 유도되기 때문에 이차대사 시에 질소원은 중요한 역할을 한다. 탄소원의 경우와 같이 NH_4^+ 나 NO_3^- 같이 쉽고, 빠르게 이용되는 질소원은 과량으로 공급될 경우 이차대사를 저해한다고 알려져 있으며, soybean meal이나 corn-steep liquor와 같이 쉽게 이용되지 않는 질소원은 이차대사산물 생산에 적합하다고 보고되고 있다⁽¹³⁾. 즉 이차대사산물의 생산은 배지 내에 존재하는 질소원의 종류와 농도에 의해 영향을 받는다.

다양한 종류의 유기질소원과 무기질소원에 대하여 lincomycin 생산결과를 Fig. 2-15에 나타내었다. 즉, 여러 가지 질소원 중에서 malt extract를 첨가한 경우만 균체가 펠릴을 형성하였으며 이때 생산량은 약 17 mg/L, 건조균체량은 4.78 g/L로 둘 다 낮게 나타났다. 질소원으로 사용된 malt extract가 lincomycin 생산을 위한 배지의 질소원으로서 좋지 않다는 것뿐만 아니라 펠릴을 형성하는 것이 균사를 형성하는 것보다 *S. lincolnensis*에 의한 lincomycin 생산에는 좋지 않다는 것을 알 수 있었다. 특히 lincomycin 생산의 경우는 무기질소원인 NaNO_3 가 유기질소원을 이용한 대조구보다 2배 이상의 생산을 보여주었다. 대조구에서 사용된 lincomycin 생산배지에서 복합질소원 중의 corn-steep liquor와 peptone water를 단독 질소원으로 이용한 경우는 대조구와 비교 시 lincomycin 생산이 상당히 낮았다. 이는 질소원도 하나의 종류가 지나치게 많은 것보다는 적절하게 혼합된 것이 질소원에 의한 생성물 생산 억제효과를 줄일 수 있는 방법으로 판단되었다.

또한 무기질소원인 ammonium carbonate가 질소원으로 첨가된 경우는 배지 중에 성분으로 첨가된 CaCO_3 가 적게 소비되는 것을 육안으로 관찰할 수 있었으며, 낮은 lincomycin 생산을 보여주었다. 이는 질소원 선정에 따라 배지의 이용이 변화할 수 있음을 의미한다. 그리고 ammonium ion이 포함된 질소원이 첨가된 처리구는 ammonium phosphate monobasic을 제외하고 거의 lincomycin이 생산되지 않았다. ammonium ion의 농도가 lincomycin 생산에 크게 영향을 미침을 알 수 있었다. 그

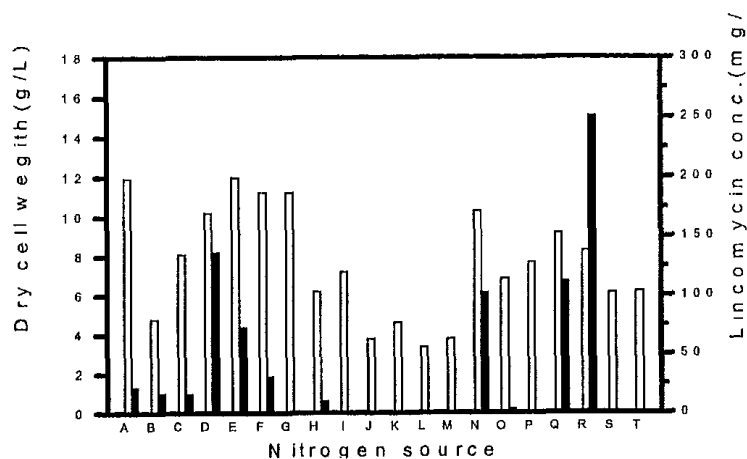


Figure 2-15. Effect of various nitrogen sources on the production of lincomycin (-□-, Dry cell weight; -■-, lincomycin concentration).
 A, corn-steep liquor; B, malt extract; C, peptone;
 D, peptone water; E, peptonized milk; F, skim milk;
 G, soybean meal; H, tryptone; I, autolysis yeast extract;
 J, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$; K, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; L, NH_4Cl ; M, $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$;
 N, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; O, NH_4NO_3 ; P, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Q, KNO_3 ;
 R, NaNO_3 ; S, NaN_3 ; T, urea.

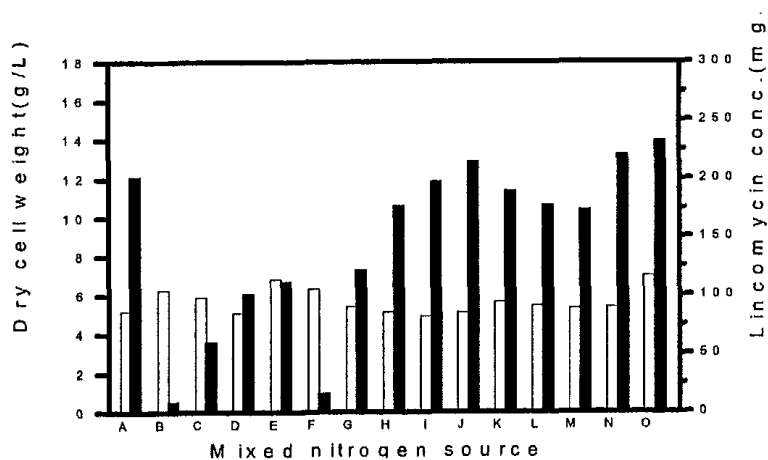


Figure 2-16. Effect of various mixed nitrogen sources on the production of lincomycin (-□-, Dry cell weight; -■-, lincomycin concentration).
 A, NN; B, CL:NN(1:1); C, CL:NN(1:3); D, CL:NN(1:5);
 E, CL:NN(1:7); F, CL:PW(1:1); G, CL:PW(1:3);
 H, CL:PW(1:5); I, CL:PW(1:7); J, CL:PW(1:10);
 K, PW:NN(1:1); L, PW:NN(1:2); M, PW:NN(1:3);
 N, PW:NN(3:1); O, PW:NN(2:1)
 (CL, Corn-steep liquor; NN, NaNO_3 ; PW, Peptone water).

리고 ammonium phosphate monobasic의 경우 발효 후 가장 낮은 최종 발효액 pH 5.29를 나타냈으며, 그 밖의 질소원들의 최종 발효액 pH는 7.03 (corn-steep liquor)에서 9.28 (tryptophan)까지 다양하게 분포되었다. 이때 대조구의 최종 pH는 8.34이었다. 발효 후 최종 pH는 탄소원 보다는 질소원에 의해 영향이 큰 것을 알 수 있었으며, lincomycin 생산시 pH도 중요한 요인으로 생각되었다.

배지최적화를 위해서 무기질소원인 NaNO_3 와 유기질소원중의 corn-steep liquor와 peptone water를 선정하여 복합탄소원 실험과 같은 방법으로 비율만 변화시켜 실험한 결과는 Fig. 2-16과 같다. 무기 질소원인 NaNO_3 는 단독으로 사용시 예상과는 달리 균체량과 lincomycin 생산이 현저하게 낮았고, 약간의 펄질을 형성하였다. Peptone water와 NaNO_3 를 복합으로 사용한 2:1과 3:1의 비율에서 각각 232 mg/L, 220 mg/L의 lincomycin 농도를 보여주었다. 또한 corn-steep liquor와 peptone water가 1:10의 비율인 경우는 214 mg/L로 대조구보다 lincomycin 농도가 높았다.

본 실험의 lincomycin 농도를 SAS 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석을 하였다⁽³⁴⁾. 그 결과 R-square가 0.9560으로 매우 높았으며, F value는 46.37이었고, $\text{Pr}>\text{F}$ 는 0.0001로써 유의수준 0.005보다 낮아 매우 유의성이 있음을 나타내었다. SNK grouping에서 peptone water와 NaNO_3 비율이 3:1인 경우 같은 수준을 나타내었고, 2:1인 경우와 corn steep liquor와 peptone water 비율이 1:10인 경우는 유의적 차이를 나타내었다. 그외의 처리수는 C~G로 서로 다른 grouping을 나타내었다. 따라서, 배지 최적화를 위한 복합질소원으로 lincomycin 생산이 높은 순으로 grouping된 peptone water와 NaNO_3 의 비율이 3:1과 2:1, corn-steep liquor와 peptone water의 비율이 1:10인 세 종류를 선택하였다.

라. 인산염, 마그네슘염과 아미노산의 종류가 lincomycin 생산에 미치는 영향

모든 미생물들의 성장이나 대사에 약간의 무기염 성분이 요구되므로 여러 가지 인산염에 따른 lincomycin 생산성의 영향을 조사해서 Fig. 2-17에 나타내었다.

*Aspergillus terreus*의 경우 K_2HPO_4 를 6 g/L 농도로 첨가한 것이 lovastatin 생산량을 기본배지에 비해 5배 증가시켰다는 보고가 있다⁽³³⁾. 그러나, *S. lincolnensis*의 경우 UP-1배지에 인산염을 2 g/L 첨가하여 11일간 배양한 결과, $MgHPO_4$ 와 NaH_2PO_4 첨가시 약 10 mg/L의 낮은 농도를 나타내었고 나머지 인산염의 경우는 lincomycin 생산량이 검출되지 않았다. 그리고 균체량은 약 12~13 g/L를 나타내었다.

일부의 발효에서는 무기물의 첨가량이 매우 중요하다고 알려져 있다. 어떤 이차대사생산물은 증식기에 비해 무기인산염의 소요량이 매우 작아서, 이 인산염의 양은 영양섭취기(trophophase)가 끝날 때까지 소비되어 없어지는 정도의 소량이어야 한다⁽³⁵⁾. 인산염 2 g/L의 첨가는 lincomycin 생산의 소요량에서 벗어나 오히려 저해하는 현상을 나타낸 것으로 판단된다.

UP-1배지에 1 g/L의 magnesium 염을 첨가하는 것이 lincomycin의 생산농도 및 균체량에 미치는 결과를 Fig. 2-18에 나타내었다⁽³⁶⁾. 균체량은 12 g/L로 거의 비슷하였고 lincomycin 농도는 magnesium carbonate 처리구가 대조구 130 mg/L에 비해 20 mg/L정도 높은 150 mg/L를 나타내었다. magnesium carbonate를 첨가한 경우 약간의 영향이 관찰되었으나 lincomycin 생산량은 뚜렷하게 증가하지는 않았다.

배지성분 중에는 균의 생육을 촉진하기보다는 생산물 생성을 조절하는 물질이 있는데 전구물질(precursor), 저해제(inhibitor), 유도물질(inducer) 등이다. 그중 전구물질로 아미노산이 중요한 역할을 한다. 기본 생산배지(UP-1)에 여러 가지 아미노산을 5 g/L 첨가하여 아미노산의 영향을 실험하여 Fig. 2-19에 나타내었다. Lincomycin 농도는 L-tryptophan과 L-phenylalanine이 각각 180 mg/L와 165 mg/L로 대조구 140 mg/L에 비해 약간 높았다. 균체량 또한 두 가지 아미노산의 경우 12 g/L이상으로 높았으며, 상기 두 아미노산은 방향족 아미노산으로 같은 계열의 아미노산이다.

Fig. 2-2의 생합성 경로에서 나타난 것처럼 전구체로 알려진 tyrosine의 경우 균

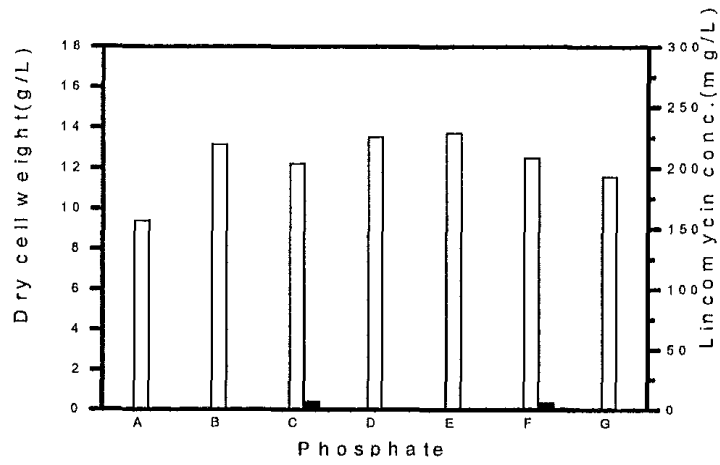


Figure 2-17. Effect of various phosphates on the production of lincomycin (-□-, Dry cell weight; -■-, lincomycin concentration).
 A, K_2HPO_4 ; B, KH_2PO_4 ; C, $MgHPO_4$; D, $NH_4H_2PO_4$;
 E, $(NH_4)_2HPO_4$; F, NaH_2PO_4 ; G, Na_2HPO_4 ;

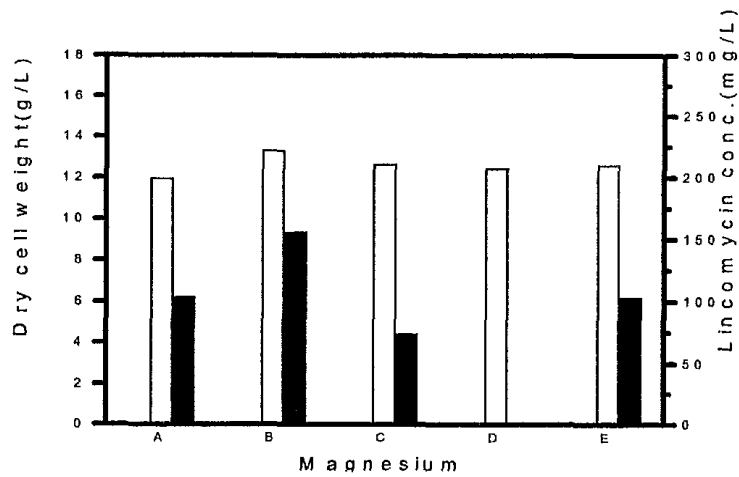


Figure 2-18. Effect of various magnesiums on the production of lincomycin (-□-, Dry cell weight; -■-, lincomycin concentration).
 A, $CH_6O_4Mg_4H_2O$; B, $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$;
 C, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; D, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$; E, $MgHPO_4 \cdot 3H_2O$.

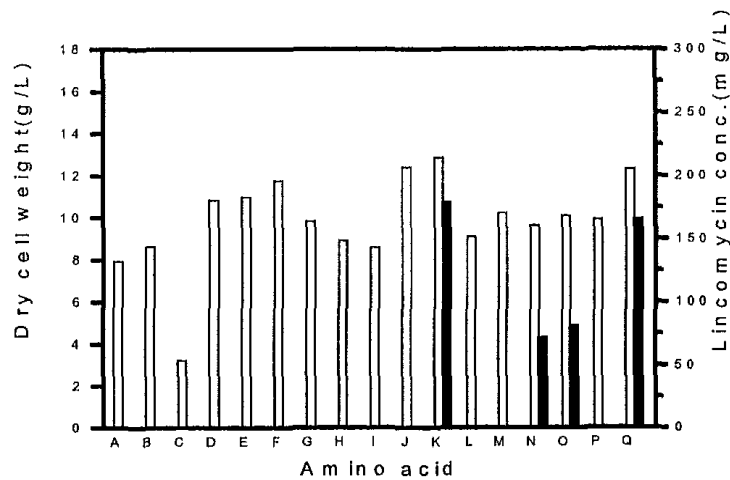


Figure 2-19. Effect of various amino acids on the production of lincomycin (-□-, Dry cell weight; -■-, lincomycin concentration).
 A, glycine; B, alanine; C, leucin; D, isoleucin; E, cystein;
 F, methionine; G, aspartic acid; H, asparagine; I, arginine;
 J, tyrosine; K, L-tryptophan; L, histidine; M, valine;
 N, DL-serine; O, L-threonine; P, glutamic acid;
 Q, L-phenylalanine.

체량은 높았으나, lincomycin은 측정되지 않았다. 이는 L-DOPA 생성 후 melanin과 lincomycin 생산으로 구분되는 경로에서 lincomycin 생산 속도가 상대적으로 느린 결과로 예상된다. 이는 균주개발 시에 고려해야할 점으로 판단되었다.

마. 라틴방격법에 의한 생산배지 최적화

복합탄소원으로 starch와 sugar cane molasses의 비율이 2:1, 3:1, 4:1인 경우 세 종류 복합질소원으로 corn-steep liquor와 peptone water의 비율 1:10과 peptone water와 NaNO₃의 2:1과 3:1 비율인 두종류를 선정하였고, 아미노산 영향 실험에서 L-tryptophan과 L-phenylalanine과 아미노산 무처리구를 선정하여 라틴방격법을 이용

하여 실험한 결과는 Table 2-10과 같다.

Table 2-10에 의하면 배지조합에 대한 ANOVA 통계처리시 R-square는 0.7329, F value는 9.15이었고 Pr>F는 0.0001로 높은 유의성을 보였다. 또한 복합탄소원, 복합질소원과 아미노산에 대한 F value는 각각 7.25, 1.96과 18.23으로 복합탄소원과 복합질소원은 Pr>F가 각각 0.1676, 0.0043으로 유의성이 없는 것으로 판단되었으며 아미노산은 Pr>F가 0.0001로 0.005보다 작으므로 유의성이 있었다. 각 영양원의

Table 2-10. Optimization of mixed carbon and nitrogen source and amino acid *streptomyces lincolnensis* using Latin-square technique.

Ingredient type	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
ST: MOL(2:1)	6%	6%	6%						
ST: MOL(3:1)				6%	6%	6%			
ST: MOL(4:1)							6%	6%	6%
CL: PW(1:10)	2%			2%			2%		
PW: NN(2:1)		2%			2%			2%	
PW: NN(3:1)			2%			2%			2%
L-phenylalanine	0.5%					0.5%		0.5%	
tryptophan		0.5%		0.5%					0.5%
none			0%		0%				
							0%		
Lincomycin(mg/L)	251	178	324	305	376	156	244	144	199
Specific production (mg linco/g DCW)	22	16	31	25	33	12	22	11	16

ST, starch; MOL, sugar cane molasses; CL, corn steep liquor;
NN, NaNO₃; PW, peptone water; M, medium.

SNK grouping 결과 탄소원은 starch와 sugar cane molasses 비율 2:1과 3:1에서 같은 수준을 나타내었으며, 질소원은 모두 동일한 등급을 나타내었다. 아미노산은 grouping한 결과 무처리구의 경우 A letter로 가장 높았다. 동일한 grouping인 경우에 높은 농도를 우선 순위로 정하였다. 균체량은 M6배지가 13.46 g/L로 가장 높았고, 나머지 배지의 균체량도 약 12 g/L로 대체로 높았다(자료 미제시). 발효후 발효액의 최종 pH는 6~8범위를 나타내었고, lincomycin 농도는 M5 배지가 376 mg/L으로 가장 낮은 lincomycin 농도인 M8 배지의 144 mg/L보다 2.5배 높았고 비생산성은 M5 배지와 M8 배지의 경우 33과 22 mg linco/DCW로 3배의 차이를 보여주었다.

M5 배지의 구성성분은 starch 45 g/L, sugar cane molasses 15 g/L, peptone water 13.33 g/L, NaNO₃ 6.67 g/L와 CaCO₃ 4 g/L로 이루어져 있다. 기본생산배지와 비교하면 탄소원인 starch농도가 5 g/L 증가하였고, sugar cane molasse농도가 5 g/L 감소하였으며, 유기질소원인 corn-steep liquor대신 무기질소원 NaNO₃가 이용되었고, peptone water농도가 3.33 g/L만큼 증가하였다. 상기 라에서 언급한 아미노산의 첨가 실험 결과, 대조구보다 tryptophan을 첨가한 경우 약간 높은 결과를 나타내었다. 그러나, 라틴방격법에 의한 결과는 다른 경향을 나타내었으며, lincomycin 생산 최적화하여 구한 M5배지는 외부에서 아미노산 첨가가 필요하지 않았다. 최적배지로 사용한 질소원에 충분한 아미노산이 함유되어있는 결과로 판단된다.

바. 배지성분의 농도최적화

라틴방격법에 의해 실험한 결과 복합탄소원과 복합질소원 각각의 비율은 3:1과 2:1이 최적으로 선정되었다. 복합탄소원농도는 4, 6, 8과 10%로 하였고, 복합질소원농도는 1, 2, 3과 4%로 정하여 실험변수를 배치하여 실험하였다. 그리고, 선정된 복합탄소원과 복합질소원 각각의 농도가 lincomycin의 생산에 미치는 영향을 조사

하여 Fig. 2-20에 나타내었다. Lincomycin 농도는 복합탄소원과 질소원의 농도 6%와 2%를 조합한 경우(F) 312.5 mg/L로 대조구에 비해 19.2% 증가하였다.

복합탄소원과 복합질소원의 농도가 6%와 2%(F), 8%와 2%(J)와 10%와 2%(N)인 경우 균체량과 lincomycin 생산농도는 각각 약 12 g/L과 300 mg/L로 비슷하였다. 즉, 복합 질소원은 2%로 고정되고, 복합탄소원은 6, 8, 10%로 증가하였으나, 균체량과 lincomycin 생산농도는 변화가 없었다.

탄소원 농도가 4%(A, B, C, D), 6%(E, F, G, H), 8%(I, J, K, L)와 10%(M, N, O, P)의 경우에서도 복합질소원농도가 2, 3%인 경우가 높은 lincomycin 농도를 나타내었다. 그러므로, 복합탄소원의 농도보다 복합질소원 농도변화가 lincomycin 생산에 더영향을 미친다고 판단되었다.

2. 유가식 배양

가. 탄소원 종류와 농도가 lincomycin의 생산에 미치는 영향

유가식 배양을 위한 기초자료로서 탄소원의 종류와 농도가 lincomycin 생산에 미치는 영향을 조사하여 Table 2-11에 나타냈다. 단일 탄소원으로 starch, sugar cane molasses, glucose, sucrose와 fructose를 사용하였고, 복합 탄소원으로 starch와 glucose, sugar cane molasse와 glucose 그리고 starch와 sugar cane molasses를 선정하였다. 각각의 단일 탄소원 농도는 40, 60, 그리고 80 g/L로 하였다.

Lincomycin 생산농도는 대조구에서 312.6 mg/L로 가장 높았고, sugar cane molasses를 제외한 다른 탄소원의 경우 lincomycin은 생산되지 않았다. Sugar cane molasses 40, 60 g/L 농도의 경우 lincomycin 생산농도는 각각 113.3, 115.7 mg/L를 나타내었다. 그러나 sugar cane molasses의 농도가 80 g/L인 경우 lincomycin은 생산되지 않았다. 탄소원에 의한 catabolite repression 현상으로 생각된다. 균체량 역시 대조구가 9.41 g/L로 가장 높았으며, 각 탄소원의 경우 농도

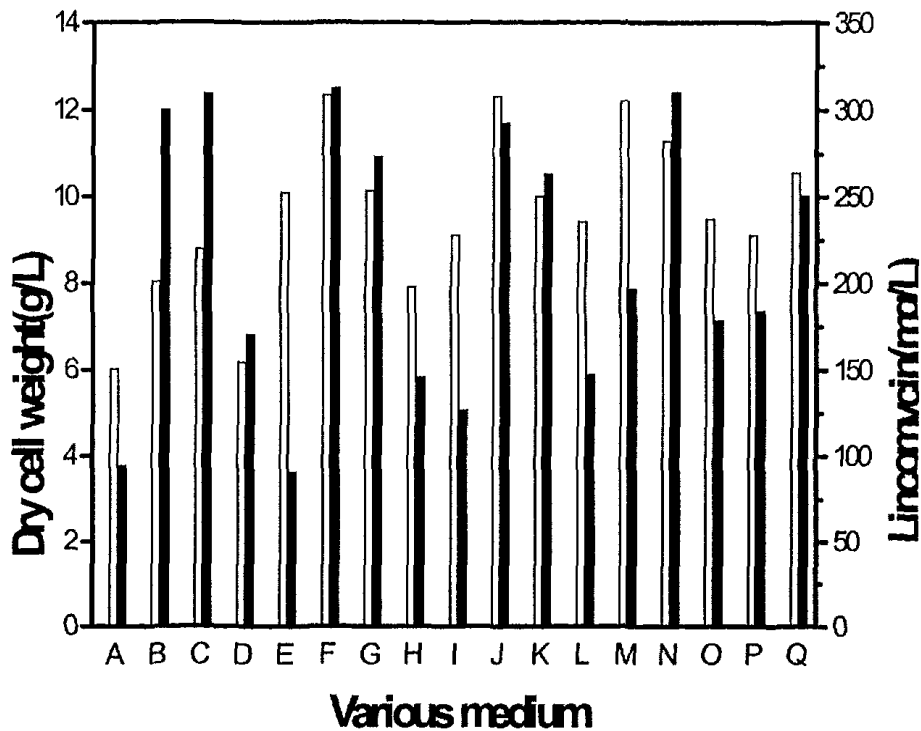


Figure 2-20. Effect of various concentrations of carbon source (starch and sugar cane molasses) and nitrogen source (peptone water and NaNO_3) supplemented to the production medium on the lincomycin production.

(-□-, Dry cell weight; -■-, lincomycin concentration).

A, ST:MOL 4%, PW:NN 1%; B, ST:MOL 4%, PW:NN 2%; C, ST:MOL 4%, PW:NN 3%; D, ST:MOL 4%, PW:NN 4%; E, ST:MOL 6%, PW:NN 1%; F, ST:MOL 6%, PW:NN 2%; G, ST:MOL 6%, PW:NN 3%; H, ST:MOL 6%, PW:NN 4%; I, ST:MOL 8%, PW:NN 1%; J, ST:MOL 8%, PW:NN 2%; K, ST:MOL 8%, PW:NN 3%; L, ST:MOL 8%, PW:NN 4%; M, ST:MOL 10%, PW:NN 1%; N, ST:MOL 10%, PW:NN 2%; O, ST:MOL 10%, PW:NN 3%; P, ST:MOL 10%, PW:NN 4%; Q, control. (ST, Starch; MOL, sugar cane molasses; PW, peptone water; NN, NaNO_3)

Table 2-11 The effect of various carbon sources and concentrations
on the lincomycin production

Carbon source(g/L)	Dry cell weight(g/L)	Final pH	Lincomycin concentration(mg/L)
Starch(40)	9.21	8.58	n.d
Starch(60)	6.49	8.46	n.d
Starch(80)	7.42	8.60	n.d
Glucose(40)	4.21	7.26	n.d
Glucose(60)	3.78	6.86	n.d
Glucose(80)	3.52	6.31	n.d
Sugar cane molasses(40)	8.21	9.09	113.3
Sugar cane molasses(60)	7.23	8.46	115.7
Sugar cane molasses(80)	4.19	5.94	n.d
Sucrose(40)	5.17	7.28	n.d
Sucrose(60)	4.65	6.60	n.d
Sucrose(80)	4.25	6.30	n.d
Fructose(40)	7.61	7.40	n.d
Fructose(60)	6.62	7.66	n.d
Fructose(80)	6.34	7.18	n.d
Starch(45) + Sugar cane molasses(15)	9.41	7.85	312.6
Starch(45) + Glucose(15)	5.97	8.16	n.d
Glucose(45) + Sugar cane molasses(15)	3.55	5.59	n.d

가 40 g/L에서 80 g/L로 증가하면 균체량이 감소하는 경향을 보여주었다. 탄소원의 증가에 따른 균체성장 저해현상을 역시 관찰할 수 있었다. 발효 후 pH는 탄소원의 종류에 따라 약간의 차이가 있었으나 6과 9의 범위이었으며, 일정한 경향을 보여주지는 않았다.

최적배지의 탄소원인 starch와 sugar cane molasses 중 유가식 배양을 위한 공급 탄소원을 결정하기 위하여 실험한 결과, starch의 경우 lincomycin이 검출되지 않았다. 또한 starch는 살균공정에서 가열하면 젤라틴화(호화)되어 점도가 상승하여 발효조 내로 공급하는 것이 쉽지 않았다. 묽은산과 효소에 의해 가수분해하여 시럽(syrup)상태라든지 고형상 등 여러 가지 모양의 glucose로 조제되어 사용되기도 하나, 산의 가수분해에 의해 생성되는 시럽은 독성물질을 포함하고 있을 수 있기 때문에 생물공정에는 적합하지 않다. Sugar cane molasses는 적은 양이지만 lincomycin을 생산하였다. Sugar cane molasses는 항생물질, 특정 효소, 백신 및 정밀화학제품과 같은 고부가가치의 소량생산제품의 제조에 사용되고 있으며, 가격은 순수한 탄수화물과 비교해서 매우 저렴하여 경제적인 장점을 가지고 있다. 그러므로 복합탄소원 중 starch를 미리 생물반응기에 공급하고, sugar cane molasses를 적절하게 공급하는 것이 효과적일 것으로 생각되었다.

나. 탄소원의 조절에 의한 유가식 배양

플라스크에서 11일간 배양을 한 후 lincomycin 생산농도와 당소비경향을 Fig. 2-21에 나타냈다. 균체량은 6~8 g/L의 범위에 있고, 168시간에 약 10 g/L로 최대 균체량을 나타냈다. Licomycin 생산은 120시간부터 검출되기 시작하였고, 서서히 증가하여 288시간에 약 325 mg/L로 최대값에 도달하였다. Sucrose농도는 HPLC로 분석한 결과 24시간에 3.5 g/L의 농도이었으며, 서서히 감소하여 168시간에 고갈되었다.

성장배지(GM)에서 배양한 종균을 sugar cane molasses를 제외한 나머지 생산배지

80 mL가 들어있는 500 mL 플라스크에 접종하고 200 rpm, 27°C로 진탕배양하였다. 그리고 20 mL에 sugar cane molasses를 녹여서 첫날부터 하루에 한번 2 mL씩 공급하여 배양하였고, 이때 공급 농도는 10, 15, 20, 25 g/L로 하였다. 위와 같은 방법으로 배지를 공급하여 배양한 결과를 Fig. 2-22에 나타냈다. 균체량은 4~8 g/L로 낮은 농도를 나타냈고, lincomycin 생산농도는 공급농도가 10 g/L인 경우 410 mg/L로 가장 높은 농도로 대조구에 비해 약 24%가 증가하였다. 생산배지를 첨가한 경우는 370 mg/L의 lincomycin 생산농도를 나타내었고, 균체량은 약 7 g/L의 농도를 나타냈다. 균체량이 낮은 농도를 나타낸 것은 초기에 sugar cane molasses가 전혀 들어가지 않으므로 균체 성장에 영향을 준 것으로 판단되어 초기농도를 고려하였고, 높은 농도의 sugar cane molasses는 오히려 생산을 억제하기 때문에 가장 lincomycin 생산농도가 좋았던 10 g/L를 기준으로 하여 실험을 수행하였다.

Sugar cane molasses의 초기농도와 공급농도 및 공급시기를 결정하기 위해 Fig. 2-21과 Fig. 2-22를 기초하여 플라스크에서 다음과 같이 실험하였다. 초기농도를 5, 10 g/L로 정하고 공급농도는 5, 10, 15 g/L로 하여 3, 5, 7 일간 회분배양한 후 sugar cane molasses를 공급하여 실험한 결과를 Fig. 2-23과 2-24에 나타내었다. 공급시기는 초기농도/공급농도가 5/10, 5/15, 10/10 인 경우 7, 5, 3일 순으로 lincomycin 생산농도가 높았다. 그러나 발효 초기부터 sugar cane molasses를 제외한 나머지 배지에 공급농도 10 g/L를 하루에 2 mL 씩 공급한 경우보다 lincomycin 생산이 낮았다. 또한 초기공급농도가 5 g/L이고 3일 배양 후 공급농도를 5, 10, 15 g/L로 증가시킬수록 균체량은 증가하지만 lincomycin 생산농도는 증가하다가 감소하는 경향을 나타냈다. 이 결과로부터 공급농도 15 g/L에서 carbon catabolite repression이 일어남을 알 수 있다. 탄소원을 이용하여 유가식 배양을 실시하는 경우는 sugar cane molasses를 10 g/L의 농도로 발효 초기부터 공급하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

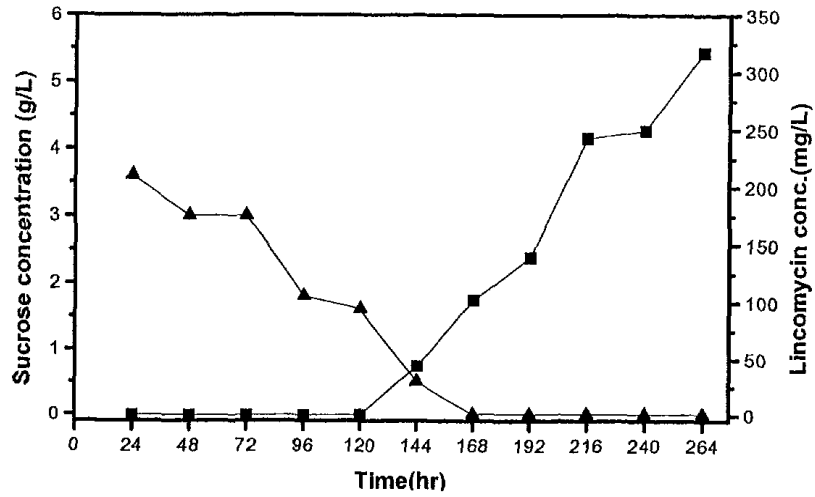


Figure 2-21. Time course of lincomycin and sucrose concentration in shaking flask cultures

-■-, lincomycin conc.; -▲-, sucrose conc.,

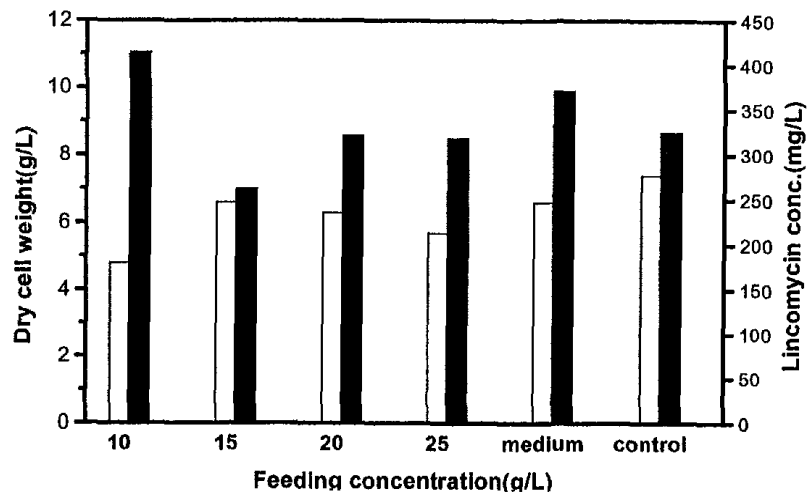


Figure 2-22. Cell mass and lincomycin production by feeding the sugar cane molasses and medium in fed-batch culture.

-□-, Dry cell weight; -■-, Lincomycin concentration.

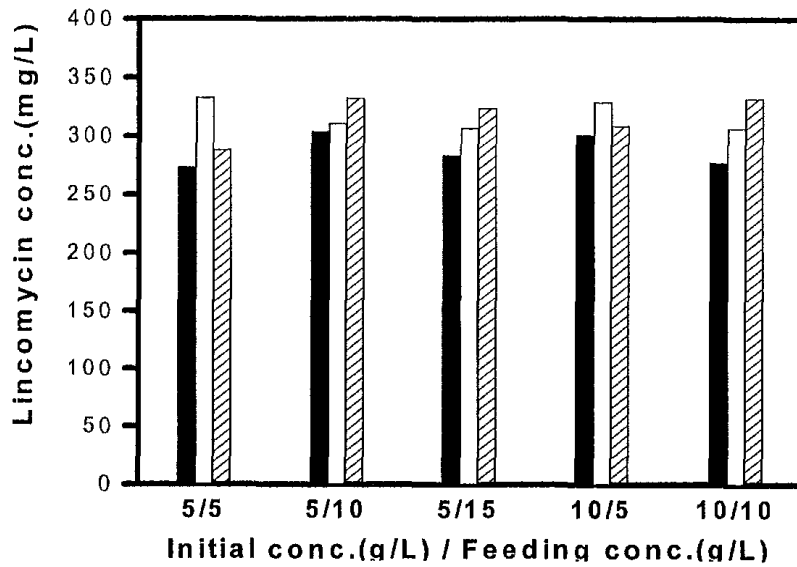


Figure 2-23. Comparison of the effect of initial and feeding conc. of sugar cane molasses on lincomycin production in shaking flask cultures.

-■-, 3 day batch; -□-, 5 day batch; -▨-, 7 day batch.

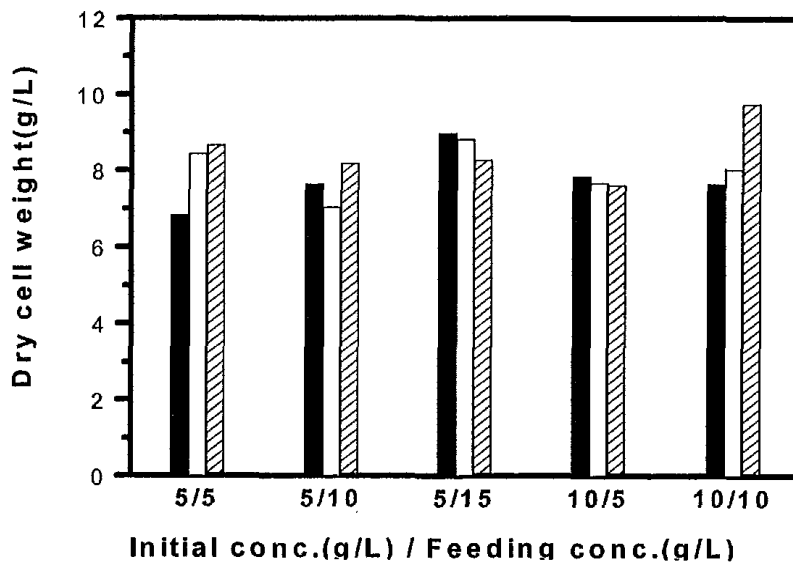


Figure 2-24. Comparison of the effect of initial and feeding conc. of sugar cane molasses on cell mass in shaking flask cultures.

-■-, 3 day batch; -□-, 5 day batch; -▨-, 7 day batch.

다. 질소원의 종류와 농도가 Lincomycin 생산에 미치는 영향

유가식 배양을 위한 기초자료로서 다양한 종류의 유기질소원과 무기질소원에 대하여 lincomycin 생산결과를 실험하여 Fig. 2-25와 2-26에 나타냈다. 여러 가지 질소원 중에서 무기질소원인 NaNO_3 의 경우 유기질소원을 이용한 경우보다 대조구와 비교하여 2배 이상의 생산성을 보여주었다. 이에 따라 질소원 중 NaNO_3 에 대한 유가식 배양을 실험하였다.

질소원 NaNO_3 의 공급시기가 lincomycin 생산에 미치는 영향을 Table 2-12에 나타내었다. NaNO_3 의 초기농도는 3.34 g/L로 고정하였고 공급농도 2~10 g/L의 범위로 정하여 공급시기를 첫날, 3일과 5일로 구분하여 공급하였다. NaNO_3 의 공급농도가 10 g/L이고 첫날부터 공급한 경우의 lincomycin 생산농도는 371.1 mg/L로 대조구에 비해 40 mg/L 증가하였다.

NaNO_3 의 초기농도와 공급농도가 lincomycin 생산에 미치는 영향을 Fig. 2-27에 나타내었다. NaNO_3 의 초기 농도는 3.34, 6.34, 9.34 g/L로 정하고 공급농도는 최종농도가 13.34, 18.34, 23.34 g/L가 되도록 하였다. 플라스크 배양의 공급시기는 발효 첫날부터 매일 2 mL씩 공급하여 최종부피가 100 mL이 되도록 하였다. NaNO_3 의 초기농도와 공급농도가 증가함에 따라 lincomycin 농도가 증가하는 경향을 나타내었다. NaNO_3 의 초기농도 9.34 g/L, 공급농도 14 g/L인 경우, lincomycin 농도는 453.5 mg/L로 가장 높은 값을 나타내었으며, 대조구에 비해 25% 증가한 결과이다. 건조균체량은 6.29 g/L로 상대적으로 낮은 경향을 보여주었다. 모든 처리구의 균체량은 5~10 g/L의 범위에 있었으며, 최종농도가 13.34, 18.34 g/L인 경우 7~8 g/L의 균체농도를 나타내었다. 그리고 초기 농도가 6.34와 9.34 g/L이고 최종농도가 23.34 g/L인 경우는 5~6 g/L로 낮은 균체량을 나타내었으며, 이는 상대적으로 높은 농도의 질소원 때문인 것으로 생각된다. 최종 pH는 8.10~8.29로 거의 비슷한 값을 나타내었다.

초기농도와 공급농도가 증가함에 따라 lincomycin의 농도가 증가하였으므로 초기

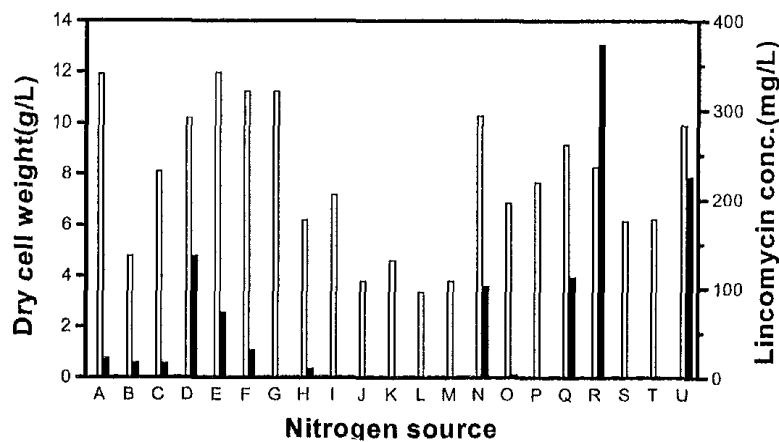


Figure 2-25. Effect of various nitrogen sources on the production of lincomycin (, Dry cell weight; , lincomycin concentration).

A, corn-steep liquor; B, malt extract; C, pepton; D, pepton water; E, peptonized milk; F, skim milk; G, soybean meal; H, tryptone; I, autolysis yeast extract; J, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$; K, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; L, NH_4Cl ; M, $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$; N, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; O, NH_4NO_3 ; P, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Q, KNO_3 ; R, NaNO_3 ; S, NaN_3 ; T, urea; U, control.

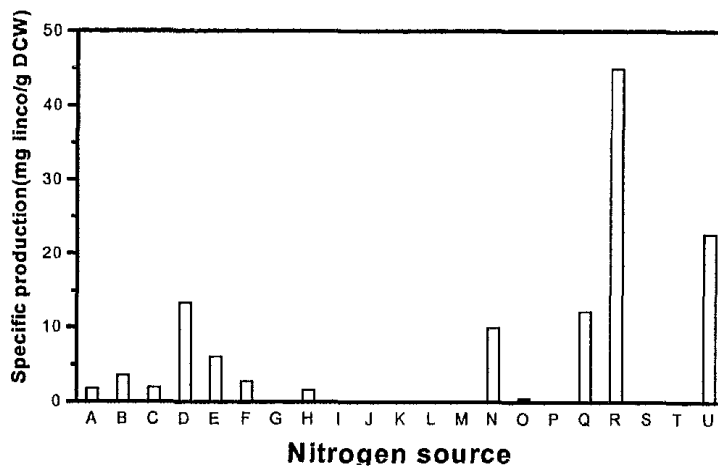


Figure 2-26. Effect of various nitrogen sources on specific lincomycin production.

A, corn-steep liquor; B, malt extract; C, pepton; D, pepton water; E, peptonized milk; F, skim milk; G, soybean meal; H, tryptone; I, autolysis yeast extract; J, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$; K, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; L, NH_4Cl ; M, $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$; N, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; O, NH_4NO_3 ; P, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Q, KNO_3 ; R, NaNO_3 ; S, NaN_3 ; T, urea; U, control.

Table 2-12 The effect of feeding time and feeding conc. of NaNO_3 on lincomycin production in shaking flask culture

Feeding day	Feeding conc. (g/L)	Dry cell weight (g/L)	Lincomycin conc. (mg/L)	Final pH
1st	2	11.35	306.2	8.57
	3.35	7.20	296.3	8.64
	4.7	7.67	286.4	8.65
	8.3	8.83	341.7	8.62
	10	8.43	371.1	8.63
3rd	2	9.30	224.7	8.62
	3.35	8.98	224.6	8.69
	4.7	7.67	307.9	8.72
	8.3	7.69	282.5	8.67
	10	8.22	296.9	8.47
5th	2	7.94	258.2	8.59
	3.35	9.19	236.9	8.56
	4.7	8.66	263.5	8.60
	8.3	8.19	335.0	8.56
	10	6.53	322.8	8.55
control		7.56	331.0	8.59

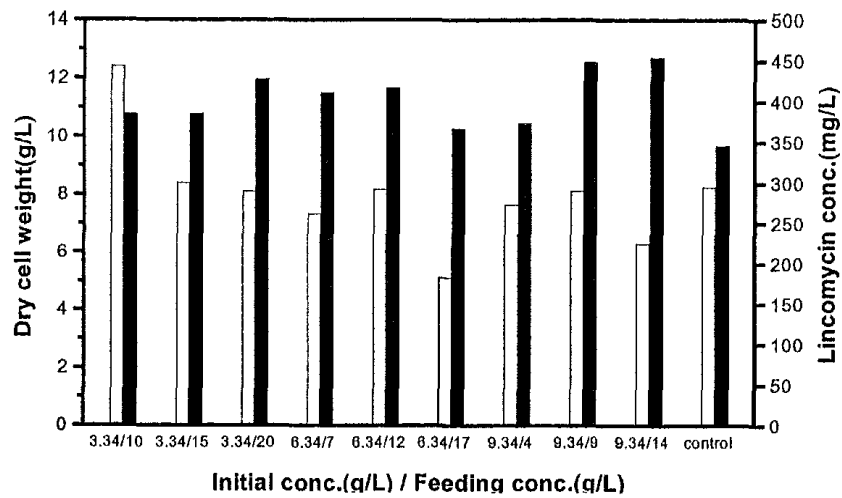


Figure 2-27. Comparison of the effect of initial and feeding conc. of NaNO_3 on lincomycin production in shaking flask culture. (□, Dry cell weight; ■, lincomycin concentration).

농도는 9.34와 12.34 g/L로 정하고, 공급농도는 최종농도가 23.34, 28.34, 33.34 g/L가 되도록 공급하여 그 결과를 Fig. 2-28에 나타냈다. 초기농도가 9.34 g/L인 경우보다 12.34 g/L인 경우 더 높은 lincomycin 농도를 나타내었고, 초기농도가 12.34 g/L이고 공급농도가 16 g/L 일 때 lincomycin의 생산량은 504.2 mg/L로 대조구보다 2배 높은 생산량을 보였다.

3. 발효조의 운전조건이 lincomycin 생산에 미치는 영향

가. 교반속도의 영향

회분식 배양에서 교반속도가 미치는 영향을 조사하기 위해 교반속도를 300과 400 rpm으로 달리하여 실험을 수행하였으며 lincomycin 생산량과 미생물성장의 변화와 당소비경향을 비교한 결과는 Fig. 2-29와 2-30과 같다. 이때 GM-1배지에서 4일간

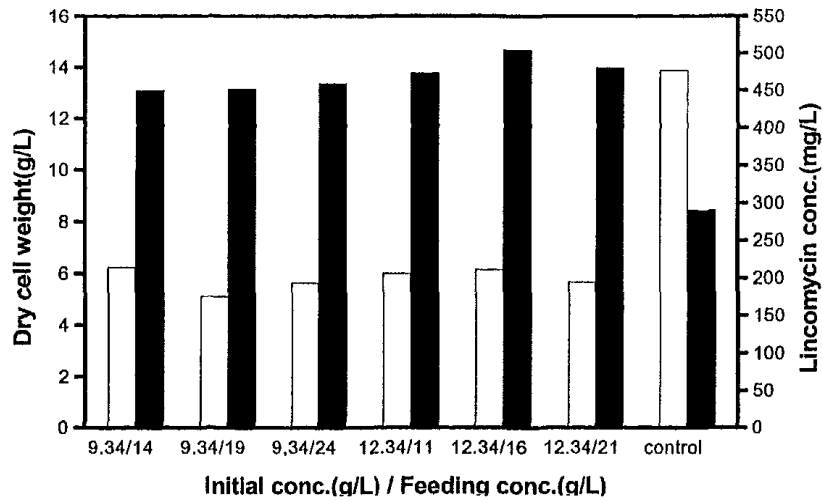


Figure 2-28. Comparison of the effect of initial and feeding conc. of NaNO_3 on lincomycin production in shaking flask culture. (□, Dry cell weight; ■, lincomycin concentration).

배양한 종균을 UP-1배지에 접종하여 배양하였다. 발효조 운전조건으로 통기량과 pH는 각각 1 vvm과 7.0으로 조절하였고, 온도는 28℃로 하였다. 그리고, 생성되는 거품을 제거하기 위해서 소포제 CA-110이 발효기간 중 첨가되었다.

Fig. 2-29는 교반속도를 400 rpm으로 조절하여 발효한 결과이다. 초기 12~72시간에 탄소원이 급격히 감소하였고, 0%의 낮은 용존산소농도를 나타내었다. 이는 미생물의 지수성장기로 세포성장을 위해서 탄소원이 많이 사용되었고, 활발한 성장으로 인해 낮은 용존산소를 유지한 것으로 판단된다. 그리고, 초기에 탄소원이 급격히 감소되어 발효중반부터는 고갈된 탄소원으로 인하여 균체량이 상당히 낮은 것으로 생각된다. 배양액은 초기에 연한 갈색을 나타내었고, 3일 이후 색이 점점 진해지면서 점도도 증가하였다. 최종 발효액은 거의 검은색에 가까웠다. Lincomycin 생산농도는 계속 증가하여 10일째 약 70 mg/L로 최고에 달했고, 다시 감소하여 60 mg/L를 유지하였다.

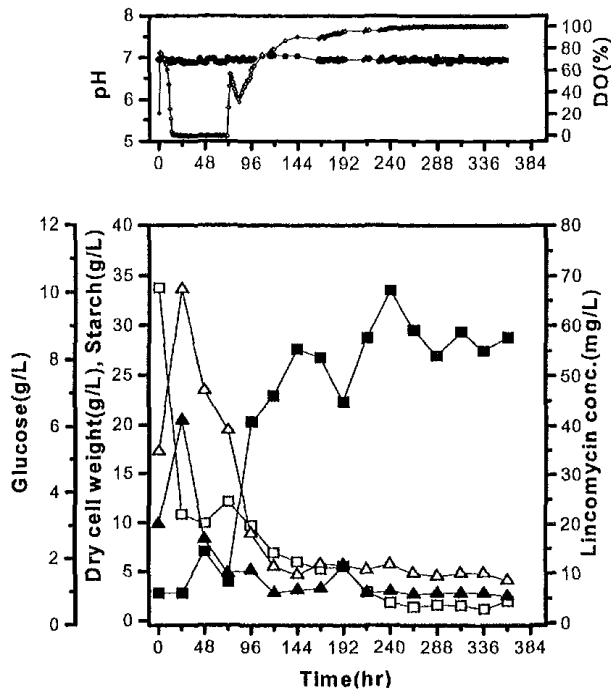


Figure 2-29. Time course of lincomycin fermentation at 400 rpm and pH 7.0 by UP-1.

-□-, Dry cell weight;
 -■-, lincomycin concentration;
 -△-, starch; -▲-, glucose;
 -●-, pH; -◇-, DO.

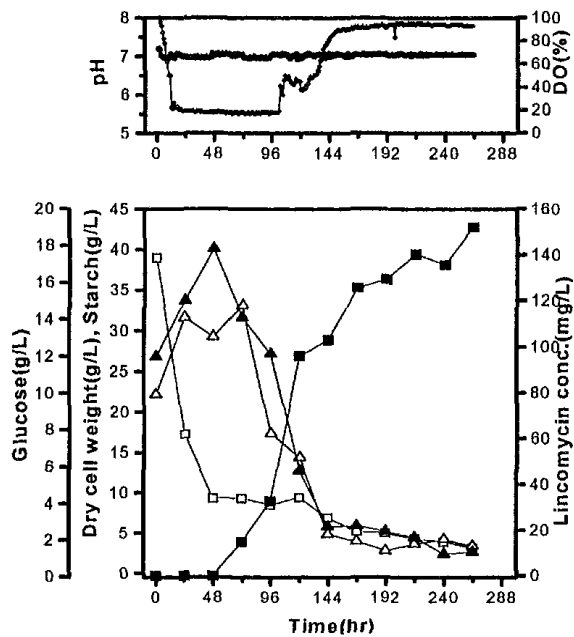


Figure 2-30. Time course of lincomycin fermentation at 300 rpm and pH 7.0 by UP-1.

-□-, Dry cell weight;
 -■-, lincomycin concentration;
 -△-, starch; -▲-, glucose;
 -●-, pH; -◇-, DO.

Fig. 2-30은 교반속도를 300 rpm으로 조절하여 발효한 결과이다. 용존산소는 10~120시간에 미생물의 왕성한 성장으로 낮은 농도를 나타내었으며 400 rpm의 경우보다 낮은 농도의 용존산소가 24 시간 더 유지되었다. 이는 400 rpm에 비해 교반속도 300 rpm의 경우 균체성장기간이 지속적으로 완만하게 증가하였음을 나타내고 있는 것이다. 균체량은 120시간까지 10 g/L이었고, 서서히 감소하여 발효말기에 5 g/L로 측정되었다. Lincomycin 농도는 계속 증가하여 12일에 약 150 mg/L로 최대값을 나타내었으며, 400 rpm의 경우보다 약 2.5배 증가하였다. 교반속도가 증가하면서 lincomycin 생산성과 균체량이 감소하였으며, 이러한 감소는 교반속도를 증가시킴에 따라 전단응력의 증가와 다양한 발효조건외 변화에 기인한 것으로 판단된다.

나. 소포제의 영향

1) 플라스크에서 소포제 종류와 농도의 영향

단백질을 포함한 일·이차대사산물의 생산과 미생물 배양시 생성되는 거품의 영향은 발효에서 대단히 중요하지만, 소포제를 이용하여 배양배지의 거품억제를 다룬 연구는 많지 않다. 거품발생에 영향을 미치는 인자로는 배지의 조성 및 점도, 미생물, 배지내의 단백질이나 지방산과 같이 표면활성이 큰 물질의 농도 등이 있으며, pH 또한 중요한 변수이다^(37,38). 특히 발효시 발생하는 거품은 용기내에 통기속도와 물리적 특성에 관련되어 많은 문제의 원인이 된다⁽³⁹⁾. 거품억제를 위해 여러 가지 소포제를 이용하고 있는데 순수한 소포제를 이용하는 경우도 있지만, Koch와 그의 동료들은 silicone/PPG 혼합용액이 소포제로서 최적이었음을 발표하였다⁽⁴⁰⁾.

최적배지(OP-1)와 교반속도 300 rpm 조건에서 lincomycin 생산을 위한 발효조 실험을 한 결과 거품의 발생으로 lincomycin이 생산되지 않았다. 이는 배지성분중 sugar cane molasses와 peptone water의 특성으로 인하여 거품이 많이 발생하였기 때문이다. 결국 발효기간 중 소포제 CA-110은 다량 투입되었고, 이로 인해 lincomycin 생산저해현상이 나타났다. 그러므로 lincomycin 생산시 생성되는 거품

을 효과적으로 제거할 수 있는 소포제와 농도 실험을 실시하였다.

본 연구에서는 거품을 억제하기 위하여 PPG (polypropylene glycol 2000), PEG (polyethylene glycol 2000)와 CA-110(16% silicone oil)을 소포제로 사용하여 lincomycin 생산에 미치는 영향을 알아보았다. UP-1배지와 OP-1배지에 3가지의 소포제를 첨가하고, 농도를 0.5~5 g/L 달리하여 실험한 결과는 Table 2-13과 같다. UP-1배지의 경우 lincomycin 농도가 크게 증가하지 않았지만, OP-1배지에서는 CA-110을 제외하고 PPG, PEG는 상대적으로 높은 lincomycin 생산농도를 나타내었다. 서로 다른 소포제 농도를 첨가한 결과 PPG 0.5 g/L의 경우 lincomycin 생산농도가 402 mg/L로 무처리구에 비해 30% 높은 생산을 나타내었다. 소포제를 첨가함으로써 lincomycin 생산농도가 증가된 이유는 PPG가 세포막을 완화시키므로 세포안의 생산량이 밖으로 유출되었거나 거품의 제거가 배지의 원활한 이동을 촉진하였기 때문으로 생각되었다.

소포제의 일정량은 발효의 제어에 필요한 요소이긴 하지만, 그 대부분은 산소이동 속도를 50% 정도까지 저하시키기 때문에, 첨가량은 가급적 최소로 하는 것이 바람직하다. 그래서, 낮은 농도범위 0.1~0.5 g/L에서 실험을 수행하여 결과는 Table 2-14에 나타냈다. PPG 0.1 g/L의 경우, lincomycin 농도는 325.9 mg/L로 다른 PPG 농도에 비해 약간 높았다. 그러나, 낮은 농도의 PPG 사용에 따른 lincomycin 생산농도는 25 mg/L이하의 적은 차이를 보였다. 플라스크에서 실험한 결과를 바탕으로 발효조에서 거품을 억제할 수 있으며 lincomycin 생산에 영향을 주지 않는 농도를 찾기 위해 실험을 실시하였다.

2) 발효조에서 소포제의 영향

소포제 CA-110(16% silicone oil)과 PPG(polypropylene glycol 2000)를 발효조에 5 g/L첨가하여 실험한 결과는 각각 Fig. 2-31과 2-32에 나타내었다. 발효조 운전조건은 교반속도를 300 rpm으로 고정하였고, 통기량과 pH는 각각 1 vvm, pH

Table 2-13. The effect of various antifoams and concentrations on the production of lincomycin

Name	Content (g/L)	Dry cell weight (g/L)	Final pH	Lincomycin conc.(mg/L)		
Basic medium (UP-1)	PPG	0.5	10.53	8.54	312.9	
		1	11.93	8.42	316.8	
		2.5	11.84	8.60	309.4	
		5	11.32	8.59	223.1	
Basic medium (UP-1)	PEG	0.5	11.39	7.51	264.4	
		1	11.54	7.61	229.0	
		2.5	11.39	8.28	370.4	
		5	9.89	8.58	331.5	
Basic medium (UP-1)	CA-110	0.5	11.13	7.80	311.4	
		1	11.86	7.86	189.0	
		2.5	11.80	8.08	369.3	
		5	10.98	8.16	291.7	
Optimal medium (OP-1)	PPG	0.5	10.58	8.16	402.2	
		1	11.20	8.24	371.1	
		2.5	12.53	8.07	351.4	
		5	12.51	8.09	387.5	
	Optimal medium (OP-1)	PEG	0.5	10.87	7.75	347.5
			1	11.36	7.76	394.6
			2.5	10.76	7.85	344.4
			5	10.83	7.71	395.3
	Optimal medium (OP-1)	CA-110	0.5	9.73	7.82	270.1
			1	11.23	7.64	311.9
			2.5	11.48	7.64	283.3
			5	10.71	7.82	246.4
control		9.72	8.34	305.0		

Table 2-14. The effect of various PPG concentrations on the production of lincomycin

	Content (g/L)	Dry cell weight(g/L)	Final pH	Lincomycin conc.(mg/L)
	0.1	10.25	8.04	325.9
	0.2	9.36	8.18	290.5
PPG	0.3	9.75	8.13	292.8
	0.4	10.84	8.20	298.3
	0.5	9.44	8.23	300.1

7.0으로 조절하였다. 그리고 플라스크에서 배지를 최적화한 배지(OP-1)에 종배양액 5%를 접종하고 14일간 배양하였다. 소포체는 살균 후 균을 접종하기 전에 배지에 첨가하여 발효를 한 경우가 발효기간 중 소포체를 투입하는 방법보다 거품억제능력이 더 좋았다. Fig. 2-31은 소포제 CA-110을 최적생산배지에 5 g/L 첨가하여 실험한 결과이다. Starch는 24시간이후 급격히 감소하였고, glucose는 배양 초기에 서서히 증가하여 120시간 이후에 감소하였다. 초기 12시간에 glucose가 증가한 이유는 starch가 빠르게 가수분해되었기 때문이고, 그 이후 glucose는 미생물의 이용으로 인해 빠르게 감소하였다. 용존산소는 초기에 70%였고, 96시간이후 감소하여 40~50 %의 농도를 계속 유지하였다. 균체농도는 48시간에 12 g/L로 증가하고 72시간 이후에는 7~8 g/L로 변화가 없었다. Lincomycin 생산농도는 탄소원이 급격히 감소한 120시간에 생산되기 시작하여 264시간에 최고농도 150 mg/L를 나타내었고, 288시간에 다시 감소하였다.

최적생산배지에 소포제 PPG 5 g/L를 첨가하여 발효한 결과는 Fig. 2-32와 같다. 초기에 glucose가 증가하다가 48시간이후 완만하게 감소하고, 발효 말기에는 glucose와 starch가 각각 8 g/L, 2 g/L로 낮은 농도를 나타내었다. 용존산소는 포

화상 상태에서 급격히 감소하여 24시간에 20%의 낮은 농도를 나타내었고, 24시간 이후 70%로 증가하고 72이후에는 용존산소가 서서히 증가하여 발효 말기에 100%를 나타내었다. CA-110의 경우보다 높은 용존산소농도를 유지하여 용존산소 제한현상은 없었을 것으로 생각되었다. Lincomycin 농도는 144시간부터 서서히 증가하여 288시간에 약 200 mg/L로 최고에 달했다. 소포제로서 PPG를 사용한 경우가 CA-110에 비해 약 1.5배 높은 lincomycin 생산농도를 나타내었다.

소포제로서 PPG 농도를 5 g/L보다 낮게 하여 lincomycin 생산에 미치는 영향을 발효조에서 실험하였다. 소포제로 PPG 1 g/L를 최적생산배지에 첨가하여 14일간 배양한 결과는 Fig. 2-33과 같다. Starch는 서서히 감소하였고, glucose는 96시간부터 급격히 감소하였다. 용존산소는 10시간에 낮은 농도를 나타내었고, 48시간에서 약간 증가하다가 다시 감소하며 PPG 5 g/L의 경우와 비슷한 경향을 나타내었다. Lincomycin 생산농도는 144시간에 검출되어 서서히 증가하여 264시간에 약 150 mg/L로 높은 농도를 나타내었다.

소포제로 PPG 0.5 g/L를 최적생산배지에 첨가하여 발효한 결과는 Fig. 2-34에 나타내었다. 탄소원인 starch와 glucose의 소모 경향은 PPG 1 g/L인 경우와 비슷하였고, 균체농도도 7~8 g/L로 비슷하였다. 그러나 lincomycin 생산농도는 서서히 증가하여 336시간에 325 mg/L로 최고에 도달하였고, PPG 1 g/L에 비해 2배 이상의 높은 농도를 나타내었다. PPG 0.5 g/L 첨가한 경우가 325 mg/L로 가장 높은 lincomycin 생산농도를 나타내었고, PPG 1 g/L에 비해 2배, PPG 5 g/L에 비해 1.8배 높은 lincomycin 생산농도를 나타내었다. 예상과 달리, 용존산소는 PPG 농도가 증가할수록 높은 농도를 나타내었으며, PPG 농도가 0.5 g/L인 경우가 다른 농도에 비해 낮은 용존산소를 나타내었다. 일반적으로 소포제는 산소이동속도를 저하시키기 때문에 첨가량은 가급적 최소로 하는 것이 바람직하다.

Lincomycin 생산에 영향을 주는 PPG 농도를 줄이기 위해 PPG 0.1 g/L를 생산배지에 첨가하여 실험한 결과 발효초기에 생성되는 거품을 효과적으로 억제하지 못하였

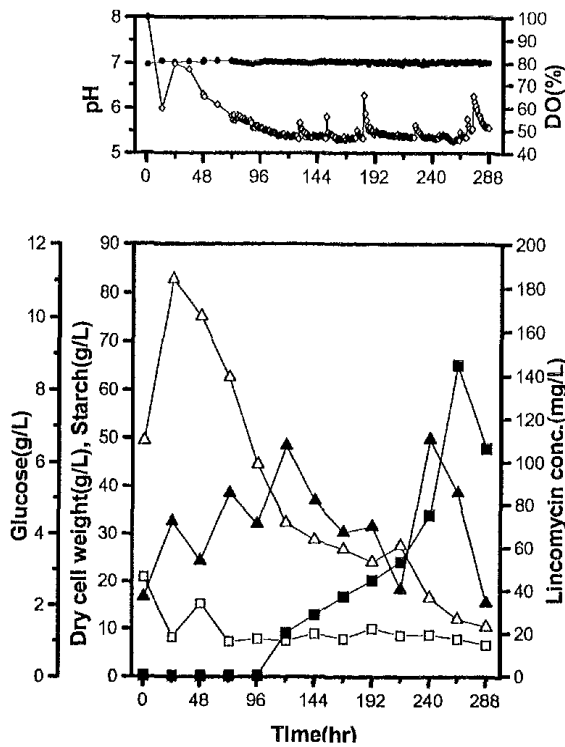


Figure 2-31. Time course of lincomycin fermentation at 300 rpm and pH 7.0 by OP-1 supplemented with 5 g/L of CA-110.

-□-, Dry cell weight;
 -■-, lincomycin concentration;
 -△-, starch; -▲-, glucose;
 -●-, pH; -◇-, DO.

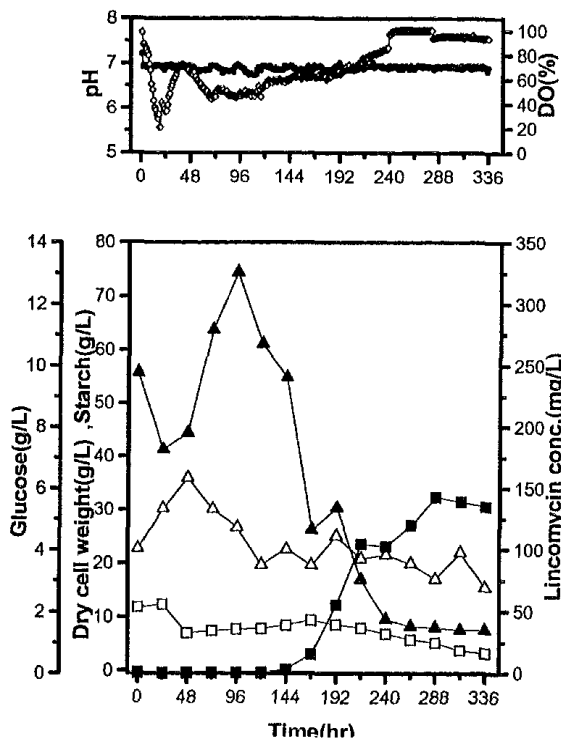


Figure 2-32. Time course of lincomycin fermentation at 300 rpm and pH 7.0 by OP-1 supplemented with 5 g/L of PPG.

-□-, Dry cell weight;
 -■-, lincomycin concentration;
 -△-, starch; -▲-, glucose;
 -●-, pH; -◇-, DO.

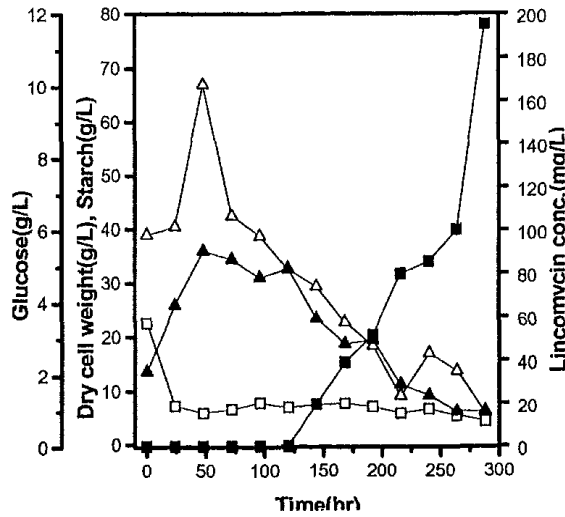
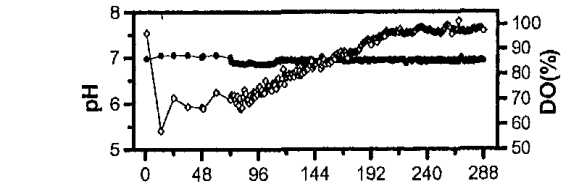


Figure 2-33. Time course of lincomycin fermentation at 300 rpm and pH 7.0 by OP-1 supplemented with 1 g/L of PPG.

- , Dry cell weight;
- , lincomycin concentration;
- △-, starch; -▲-, glucose;
- , pH; -◇-, DO.

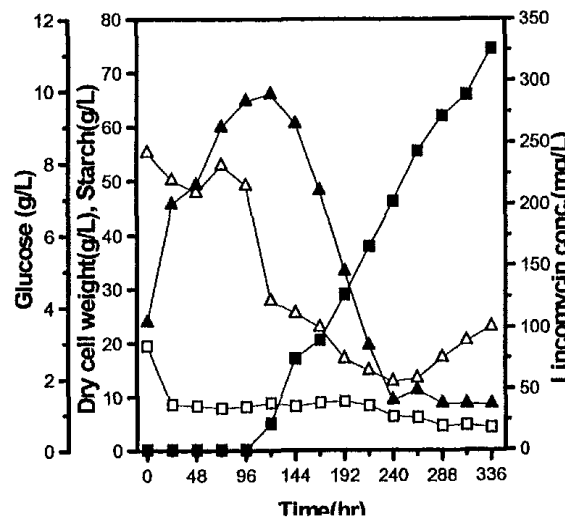
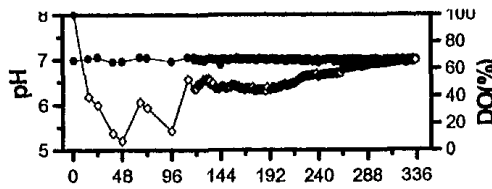


Figure 2-34. Time course of lincomycin fermentation at 300 rpm and pH 7.0 by OP-1 supplemented with 0.5 g/L of PPG.

- , Dry cell weight;
- , lincomycin concentration;
- △-, starch; -▲-, glucose;
- , pH; -◇-, DO.

으며 발효중에 생성되는 거품을 제거하기 위해 계속적으로 PPG가 발효조내로 공급되었다. 따라서 거품억제를 위한 PPG 초기농도는 0.5 g/L 정도가 적당하다고 판단되었다.

다. 임펠러의 영향

교반기는 용기 내에서 액체-기체간의 혼합, 공기분산, 산소전달, 열전달, 고체 입자의 현탁과 용기 내 물질들의 고른 분산을 위해 필요하다⁽⁴¹⁾. 여러 종류의 임펠러가 lincomycin 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 pitched blade, scaba와 rushton turbine 임펠러를 사용하였다. 임펠러의 종류와 크기는 Table 2-15에 나타내었다.

Pitched blade를 사용하여 회분식 배양을 수행한 결과는 Fig. 2-35와 같다. 교반 효율이 낮아 공기가 잘 분산되지 않았고, 산소전달이 잘 이루어지지 못하여 16시간에 교반속도를 300에서 500 rpm으로 변화시켜 발효하였다. 교반속도를 증가시킨 직후에는 용존산소가 증가하였지만, 4시간이후 미생물의 지수성장으로 인하여 다시 낮은 용존산소를 나타내었다. 약 15시간동안 낮은 용존산소를 유지하다가 30시간이후 50%의 용존산소농도로 서서히 증가하기 시작하였고 발효말기 100%의 용존산소농도를 나타내었다. 초기에 starch와 잔류당이 미생물의 성장에 따른 소모로 인하여 감소하였고, 발효 말기에는 5 g/L 이하의 낮은 농도를 유지하였다. Lincomycin 생산농도는 168시간에 60 mg/L, 312시간에 130 mg/L이었다. 예상과 같이, 교반이 잘 이루어지지 않았음을 결과를 통해 알 수 있었다.

Scaba 임펠러는 rushton turbine보다 전체 혼합에 유리하나, 큰 교반기에서는 상단과 하단간의 혼합을 잘 시키지 못하여 교반기로부터 멀리 떨어진 곳은 산소농도가 낮으며, 원료 투입구 부근에 영양분, 산, 알칼리, 소포제의 농도가 높은 경향을 보인다고 알려지고 있다⁽³⁵⁾. Scaba를 사용하여 회분식 배양한 결과는 Fig. 2-36과 같다. 초기 용존산소는 발효시작 후 10시간만에 급속히 감소하여 10%의 낮은 농도

를 나타내었고, 96시간까지 낮은 농도로 유지되다가 110시간이후 서서히 증가하였다. Pitched blade의 경우보다 미생물 성장기간이 더 길었고, starch와 잔류당은 서서히 감소하여 발효말기 각각 8 g/L, 2 g/L의 낮은 농도를 나타내었다. Lincomycin 생산농도는 48시간이후 서서히 증가하여 336시간에 225 mg/L로 가장 높은 농도에 도달하였다. Scaba를 이용한 회분식 배양의 경우, lincomycin 생산시점은 pitched blade의 경우보다 70시간 빠른 시기였고, lincomycin 생산농도는 약 100 mg/L 높은 농도를 보여주었다. 따라서 scaba의 경우가 pitched blade보다 교반이 더 잘 이루어진다는 것을 알 수 있었다.

Rushton turbine 임펠러는 문헌에서 확인된 것처럼 공기가 빠른 속도로 흐를지라도 그대로 유출되지 않고 분산되기 때문에 산소를 필요로 하는 발효조배양에 가장 적절하다고 알려지고 있다⁽³⁶⁾. Rushton turbine 임펠러를 사용하여 배양한 결과는 Fig. 2-35와 같다. 용존산소는 48시간과 96시간에 낮은 농도를 나타내었으며, 96시간이후 서서히 증가하여 60%에 도달하였다. 당소비는 생산이 시작되는 96시간부터 서서히 감소하여 240시간이후 거의 고갈된 상태로 낮은 농도를 나타내었다. Lincomycin 생산은 96시간이후 서서히 증가하여 336시간에 약 325 mg/L를 나타내었다. 균체량은 약 10 g/L로 유지되었고, 발효말기 5 g/L로 감소하였다.

Table 2-15. Impeller characteristics used in 2.5 liter vessel

Impeller	Flow	Impeller diameter/tank diameter ratio (D/T)	No. blades(n)	Angle of blades(α [°])
Rushton turbine	Radial	0.59	6	90
Scaba	Radial	0.61	4	90
Pitched blade	Axial	0.58	3	45
Intermig	Axial	0.59	2	90

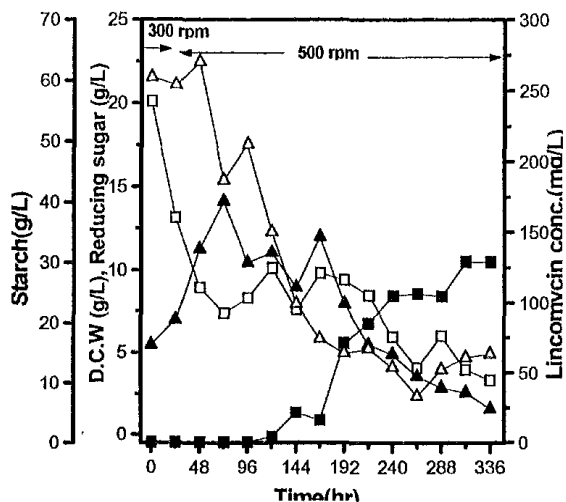
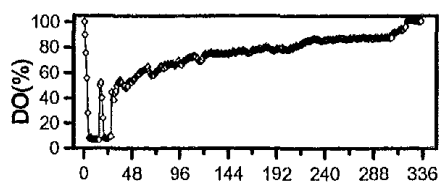


Figure 2-35. Time course of lincomycin fermentation at 300~500 rpm using a pitched blade impeller

- , Dry cell weight;
- , lincomycin concentration;
- △-, starch; -▲-, reducing sugar;
- , pH; -◇-, DO.

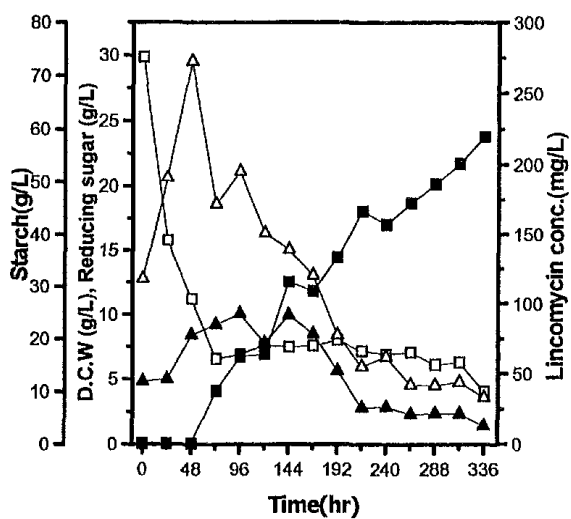
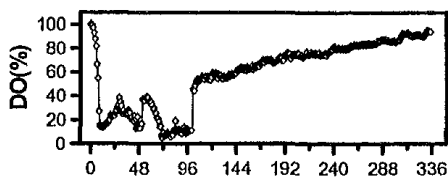


Figure 2-36. Time course of lincomycin fermentation at 300 rpm using a scaba impeller

- , Dry cell weight;
- , lincomycin concentration;
- △-, starch; -▲-, reducing sugar;
- , pH; -◇-, DO.

Rushton turbine 임펠러의 경우, lincomycin 생산농도는 325 mg/L로 가장 높았고, scaba의 경우에 비해 1.4 배, pitched bladed의 경우에 비해 2.5배 높았다. 교반날개의 수와 각도에 따라 미치는 영향이 달랐고, rushton turbine의 경우 교반날개가 6개로 가장 많았고, 날개의 각이 90° 로 상하 좌우 교반이 다른 임펠러에 비해 좋았다. Rushton turbine이 공기분산과 배지, 균체간의 혼합을 좋게하여 lincomycin 생산농도에 긍정적 효과를 미친 것으로 판단된다.

라. 배양액의 pH가 lincomycin 생산에 미치는 영향

1) 배양액의 초기 pH 변화가 lincomycin 생산에 미치는 영향

플라스크배양에서 초기 pH를 변화시켜 lincomycin 생산에 미치는 영향을 실험한 결과는 Table 2-16과 같다. 배양액의 초기 pH 범위는 4~9로 하였고, 1N-NaOH와 1N-HCl를 사용하여 조절하였다. 초기 pH가 6인 경우, lincomycin 생산농도는 349.2 mg/L로 최대값을 나타내었고, 균체농도는 10.9 g/L였다. 초기 pH가 4와 5인 경우, 각각 균체농도가 6.7, 8.5 g/L로 낮은 농도를 나타내었고, lincomycin 생산농도는 296, 243 mg/L로 초기 pH 6인 경우에 비해 각각 16%와 30% 낮은 농도를 나타내었다. 초기 pH 7, 8과 9인 경우, lincomycin 생산농도가 약 300~315 mg/L로 거의 비슷하였고, 균체농도는 약 10 g/L을 나타내었다.

Table 2-16. The effect of initial pH on the cell growth and the lincomycin production in flask cultures

Initial pH	Dry cell weight(g/L)	Final pH	Lincomycin conc.(mg/L)
4	6.79	6.79	296.3
5	8.57	7.07	243.8
6	10.90	7.60	349.2
7	10.49	7.59	314.6
8	10.04	7.68	306.4
9	8.91	7.82	302.1

2) pH 조절여부가 lincomycin 생산에 미치는 영향

pH를 조절과 조절하지 않은 두 경우에 대한 회분식 배양에서 세포성장, lincomycin 생산, 용존산소와 탄소원의 변화를 Fig. 2-37 (A)와 (B)에 나타냈다. pH는 2N-NaOH와 2N-HCl를 이용하여 pH 7.0으로 발효기간동안 조절하였다. pH를 조절하지 않은 경우 발효시작 후 pH는 서서히 증가하여 48시간에 pH 8.5를 나타내었고, 60시간에 pH 7.5로 감소하였다가 72시간이후 다시 pH 8.5로 복귀하였다. pH의 변화는 용존산소 변화와 비슷한 경향을 보여주었다. 이는 초기에 미생물의 성장이 활발하여 starch와 glucose가 많이 소비되므로 pH가 약간 감소하는 경향을 나타낸 것으로 판단된다. 그리고 발효말기까지 pH 9.5로 서서히 증가하여 발효액이 알칼리성을 나타내었다. 이때 pH의 증가는 glucose가 고갈된 후 균체가 단백질을 이용하면서 생기는 ammonia와 같은 대사산물 때문이다(Fig. 2-37 (A)).

pH를 조절하지 않은 경우, 배지의 색은 초기에 연한 갈색이었고, 시간이 흐름에 따라 서서히 진한 갈색을 나타내었다. 그러나, pH를 조절한 경우, 배지의 색은 초기에 연한 갈색에서 15시간 이후에 어두운 고동색으로 변하는 급격한 색의 변화를 나타내었다. 최대 균체량은 pH를 조절한 경우가 약 9 g/L로 조절하지 않은 경우 8 g/L보다 약간 높았다.

Lincomycin 생산농도는 균체량과 다른 경향을 나타내었다. pH를 조절하지 않은 경우 lincomycin 생산은 pH를 조절한 경우보다 24시간 빠른 72시간 이후부터 생산되었다. 그후 lincomycin 생산농도는 급격히 증가하여 240시간에 350 mg/L로 최대값에 도달하였다. 그러나, pH를 조절한 경우에는 96시간 이후부터 서서히 증가하여 336시간에 325 mg/L을 나타내었다. pH를 조절하지 않은 경우가 lincomycin 생산 최고농도가 25 mg/L 증가하였으며 비생산성은 1.46 mg/L/hr로서 65% 증가한 결과를 보여주었다.

pH를 조절하지 않은 경우 배양액중의 용존산소는 10시간 정도에 20%로 급격히 감소하고 약간 증가하였다가 48시간에 10%보다 낮은 농도를 나타내었고, 48시간 이후

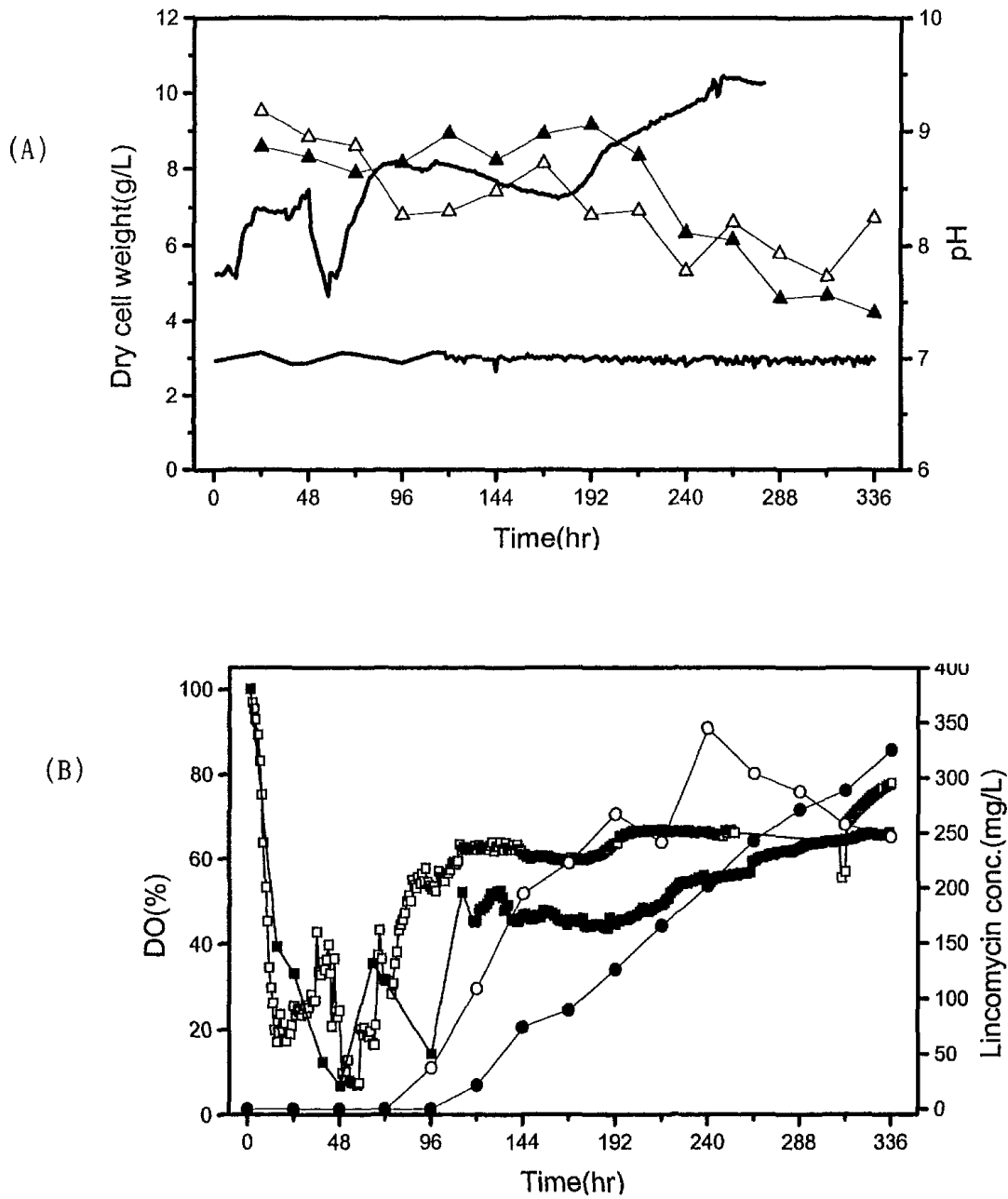


Figure 2-37. Comparison of cell mass, pH(A) and dissolved concentration, lincomycin concentration(B) as a function of fermentation time at pH controlled and pH uncontrolled.

pH controlled : -■-, DO: -●-, lincomycin conc.: -▲-, DCW: -, pH
 pH uncontrolled : -□-, DO: -○-, lincomycin conc.: -△-, DCW: -, pH

에는 서서히 증가하여 96시간이후 발효말기까지 60%의 용존산소농도를 유지하였다. pH를 조절한 경우 용존산소는 급격히 감소하여 48시간에 10% 이하의 낮은 농도를 나타내었고, 증가하였다가 96시간에 다시 감소하여 120시간 이후에는 50%로 유지되었다(Fig. 2-37(B)).

탄소원인 starch와 잔류당의 농도변화는 pH를 조절하지 않은 경우 192시간에 균체 성장으로 인한 탄소원의 소비량의 증가로 배양액중의 탄소원이 거의 고갈되어 발효말기에 각각 10 g/L와 2 g/L이하의 낮은 농도를 나타내었다. pH를 7.0으로 조절한 경우는 서서히 감소하여 240시간 이후에 낮은 탄소원 농도를 나타내었다.

3. 산소전달의 효율성 측정

가. Lincomycin 생산을 위한 *Streptomyces lincolnensis* 발효시 산소전달계수의 측정

발효시간에 따른 산소전달계수(k_{La})와 산소흡수속도(O.U.R.)의 변화는 Fig. 2-38과 같다. k_{La} 는 초기인 5시간에서 97 h^{-1} 로 최대값을 나타내었으며, 30시간에 40 h^{-1} 로 급격한 감소를 나타내었다. 그리고 110 시간이후 60 h^{-1} 를 유지하였다. O.U.R.은 산소전달계수가 최대값을 보인 5시간에서 최소값을 나타내었으며, 산소전달계수가 감소하는 경우에 증가하는 경향을 나타내었다. 동물구충제 Avermectin을 생성하는 *Streptomyces avermitilis* 생산의 경우 300 rpm과 1 vvm 조건하에 측정한 k_{La} 는 건조균체량 4.02 g/L에서 71.35 hr^{-1} 이었다⁽⁴²⁾.

생산규모의 발효기에서 k_{La} 는 보통 $72 \sim 900 \text{ hr}^{-1}$ 의 범위에서 유지된다고 보고되었다. 예를 들면 300 L 규모를 갖는 Streptomyces 발효의 경우 k_{La} 는 초기 30시간에 약 320 hr^{-1} 이었고, 발효가 진행되면서 감소하여 80시간이후 k_{La} 는 40 hr^{-1} 을 유지하였다⁽⁴³⁾.

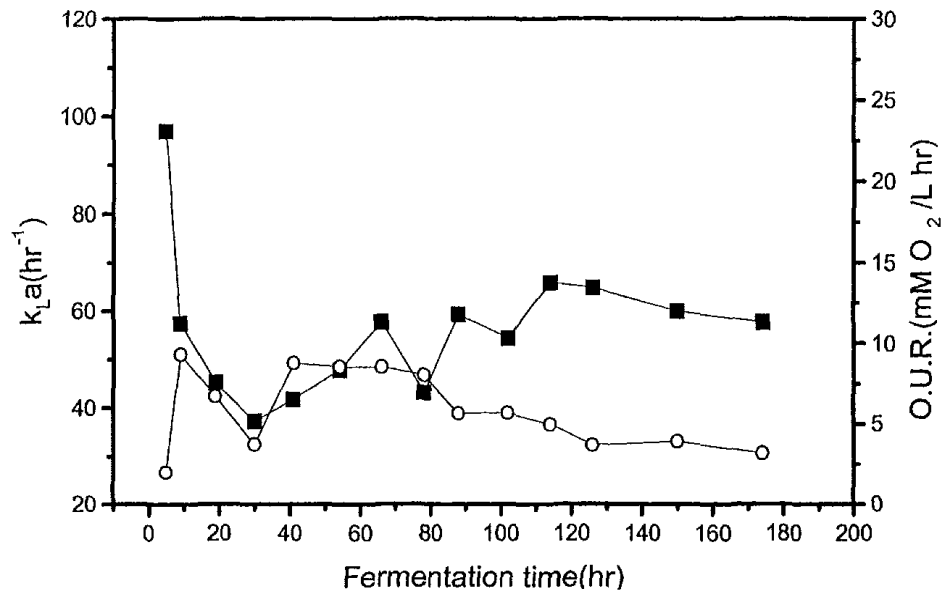


Figure 2-38. Variation of k_{La} and O.U.R. values with the fermentation time by dynamic method at 300 rpm, 1 vvm.
 -■-, k_{La} ; -○-, O.U.R.

Table 2-17. Real example of k_{La} in terms of rpm and vvm at a cell density of 6.91 g/L

rpm	k_{La} (hr^{-1})	vvm	k_{La} (hr^{-1})
250	21.564	0.5	41.832
300	47.916	1.0	47.916
400	75.312	1.5	55.116
500	97.56	2.0	60.948

교반속도와 통기량의 변화가 k_{La} 에 미치는 영향을 실험한 결과는 Table 2-17과 같다. 교반속도를 250 rpm에서 500 rpm으로 증가시킨 경우 k_{La} 값은 21.564 h^{-1} 에서 97.56 h^{-1} 로 약 5배 증가하였다. 반면 통기량을 0.5 vvm에서 2.0 vvm으로 4배 증가함에도 불구하고 k_{La} 는 1.5배정도 증가하였다. 통기량의 증가에 의한 k_{La} 의 증가는 교반속도의 증가에 의한 k_{La} 의 증가처럼 크게 효과가 나타나지 않았으며, 산소 전달을 원활하게 하기 위해서는 통기량(vvm)을 증가시키는 것보다 교반속도(rpm)을 증가시키는 것이 훨씬 효과적이라고 생각되었다.

나. 이중임펠러가 산소전달계수와 산소전달속도에 미치는 영향

Fig. 2-39에 나타낸 여러 가지 임펠러 rushton turbine, scaba, pitched blade와 intermig를 단일과 이중으로 조합하여 산소전달 속도에 미치는 영향을 질소분위기 하에서 실험한 결과는 Fig. 2-40과 같다. k_{La} 와 산소전달속도(O.T.R.)는 교반속도나 통기량이 증가함에 따라 임펠러 종류에 관계없이 증가하는 경향을 나타내었다. k_{La} 와 O.T.R.은 rushton 임펠러(Rush)의 경우 실험한 교반속도와 통기량 전체범위에서 가장 높은 값을 나타내었으며, scaba, intermig-intermig(Int-Int), pitched blade(Pit), intermig(Int) 순으로 감소하였다.

Fig. 2-41은 이중임펠러에 대한 것으로 모든 이중임펠러가 단일임펠러에 비하여 높은 k_{La} 와 O.T.R.을 나타내었다. 이중임펠러의 조합에서는 아래쪽에 radial flow형을, 위쪽은 axial flow형을 조합하여 실험한 경우에 rpm과 vvm 전체범위에서 더 좋은 k_{La} 와 O.T.R.을 나타내었다. 즉, 아래쪽에 rushton을 위쪽은 intermig나 pitched blade를 조합한 경우가 비교적 높은 k_{La} 와 O.T.R.을 나타내었으며 Rush-Pit와 Rush-Int는 비슷한 값을 나타내었다. 이러한 실험 결과로부터 단일임펠러의 경우 높은 교반속도에서 얻을 수 있는 효과를 이중임펠러를 이용한다면 낮은 교반속도에서도 단일임펠러와 같은 좋은 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다^(44, 45). 또한 교반속도를 낮추어줌으로써 높은 교반속도에서의 문제점으로 대두되는

전단력이 균체에 미치는 영향을 줄일 수 있을 것으로 생각된다.

Fig. 2-42는 rushton과 Rush-Int를 이용하여 배지와 물에서의 k_{La} 와 O.T.R의 변화를 나타내었다. Rushton 단독보다는 이중임펠러가 배지와 물에서 더 좋은 k_{La} 와 O.T.R을 나타내었다. 일반적으로 발효 시 배지와 유사한 non-Newtonian 흐름을 형성하기 위하여 사용되는 CMC와 같은 용액의 경우 기포의 엉킴으로 인하여 평균 기포직경이 증가하게 된다. 기포의 크기가 증가될 경우 기포의 체류시간과 표면적이 감소하기 때문에 k_{La} 와 O.T.R는 감소한다. 본 실험에서도 물에서보다는 배지에서 낮은 k_{La} 와 O.T.R을 나타내었다.

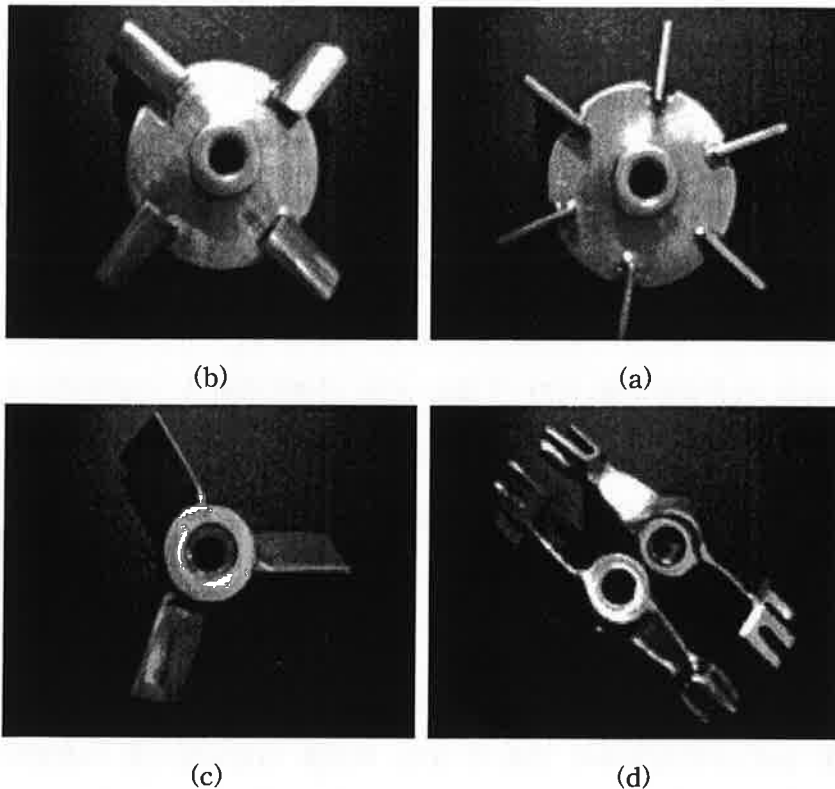


Figure 2-39. Photographs of the used impellers: (a) Rushton turbine, (b) Scaba, (c) Pitched blade, and (d) Intermig-Intermig

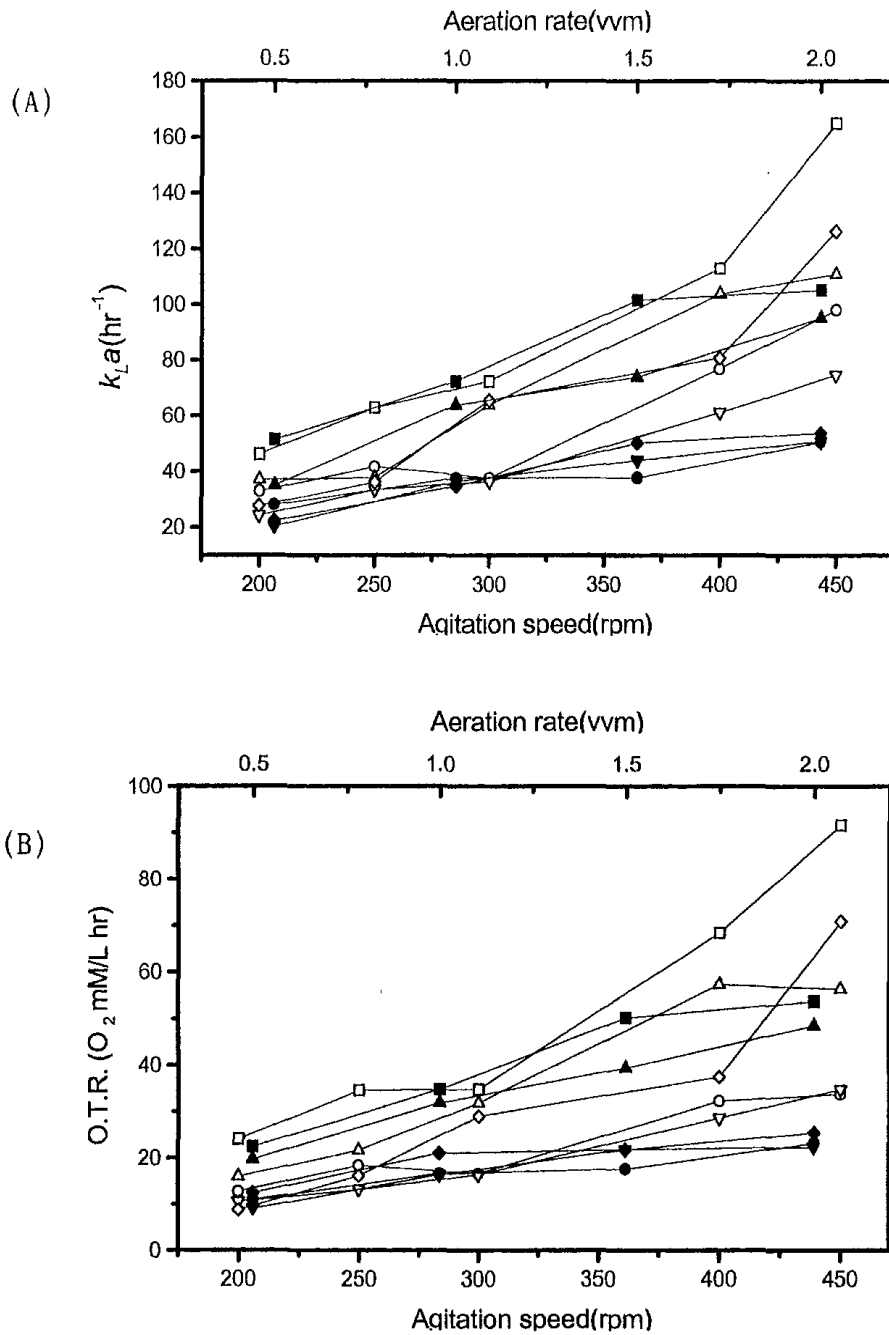


Figure 2-40. Effect of various impellers with rpm and vvm on $k_L a$ (A) and oxygen transfer rate(B) in water by dynamic method at 1 vvm and 300 rpm (open symbol, agitation speed, closed symbol, aeration rate).

-□-, -■-, Rushton; -○-, -●-, Pitched blade; -△-, -▲-, Scaba;
 -▽-, -▼-, Intermig; -◇-, -◆-, Int-Int.

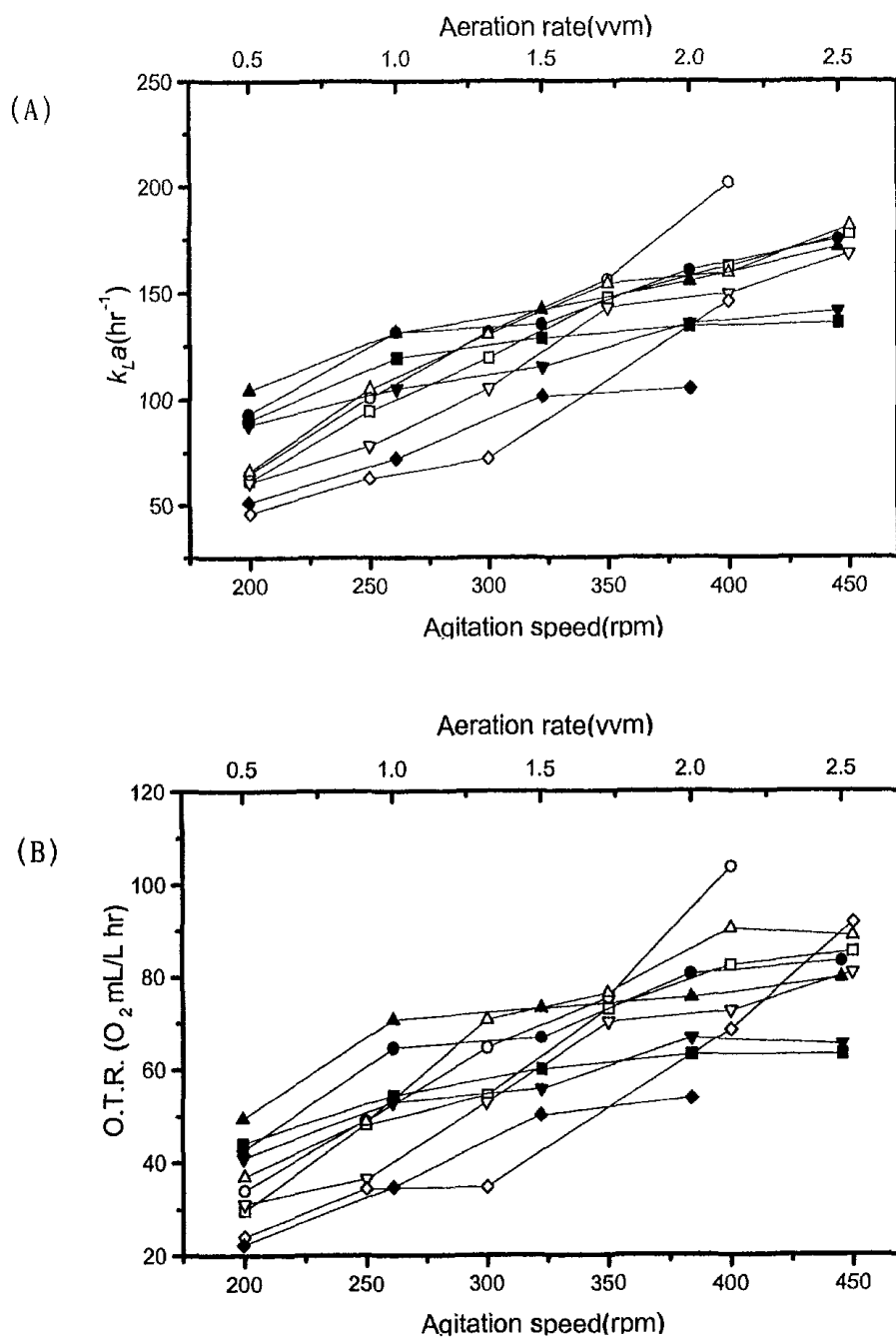


Figure 2-41. Effect of various dual impellers with rpm and vvm on $k_L a$ (A) and oxygen transfer rate(B) in water by dynamic method at 1 vvm and 300 rpm (open symbol, agitation speed, closed symbol, aeration rate).
 -□-, -■-, Int-Rush; -○-, -●-, Rush-Int; -△-, -▲-, Rush-Pit
 -▽-, -▼-, Pit-Rush; -◇-, -◆-, Rush.

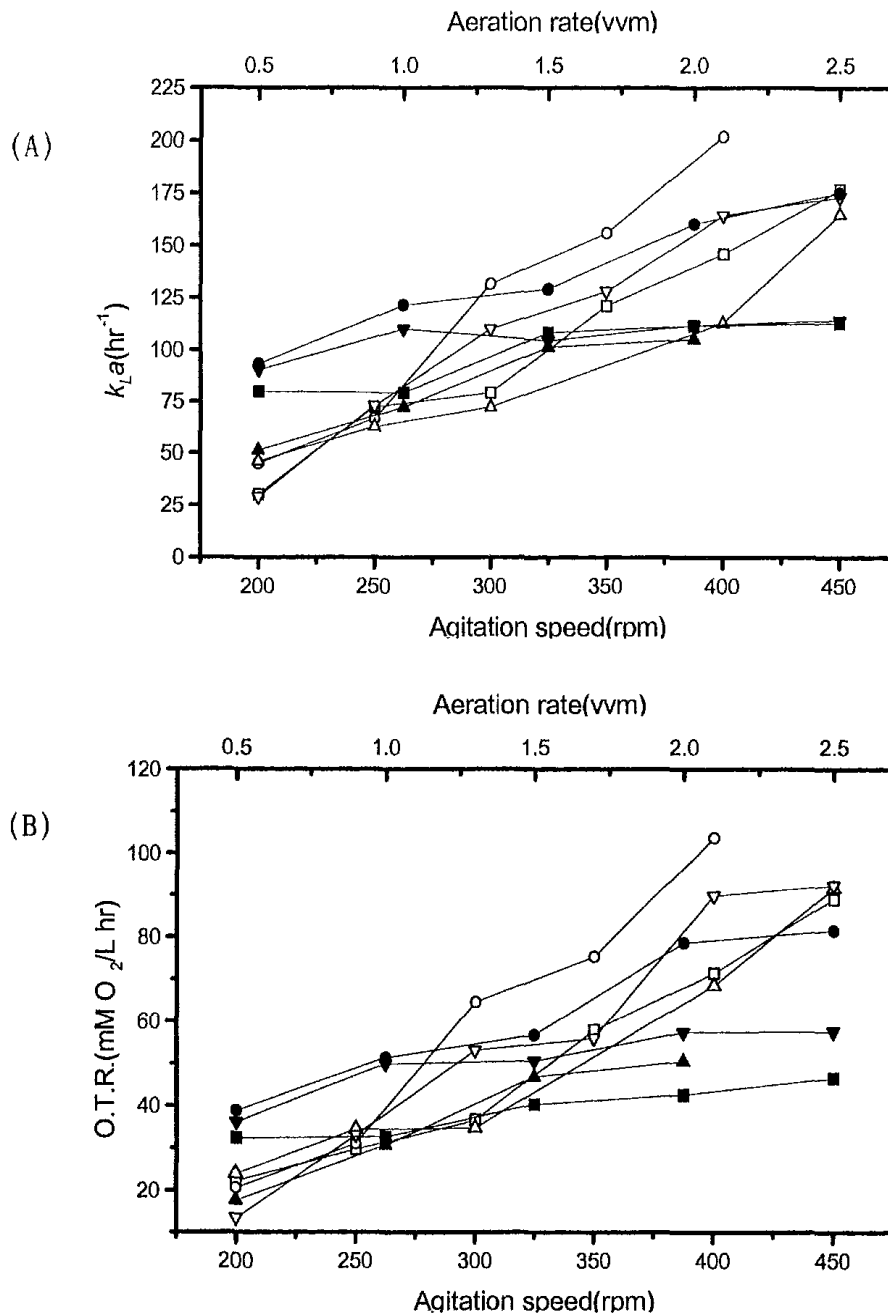


Figure 2-42. Effect of various dual impellers with rpm and vvm on k_{La} (A) and oxygen transfer rate(B) in water and medium by dynamic method at 1 vvm and 300 rpm

(open symbol, agitation speed, closed symbol, aeration rate).

-□-, -■-, Rush, water: -○-, -●-, Rush-Int, water:

-△-, -▲-, Rush, medium: -▽-, -▼-, Rush-Int, medium.

모든 경우 교반속도의 변화가 통기량의 변화보다 더 큰 변화량을 나타내었으므로 통기량 보다는 교반속도의 변화가 산소전달에 더 효과적이라고 생각되었다. 그리고, 낮은 전단에서 효과적인 산소전달을 얻기 위해 Rush-Int가 효과적일 것으로 생각되었다.

다. 발효조에서 이중임펠러가 Lincomycin 생산에 미치는 영향

여러 가지 단일, 이중임펠러들이 산소전달계수와 산소전달속도에 미치는 영향에 대한 실험결과 모든 이중임펠러가 단일임펠러에 비하여 높은 k_{La} 와 O.T.R.를 나타내었다. 그중 Rush-Int 임펠러인 경우 배지와 물에서 더 좋은 k_{La} 와 O.T.R.를 나타내었다. 이중임펠러를 사용함으로써 발효액 혼합과 산소전달에 대한 이점을 얻을 뿐만 아니라 낮은 교반속도에 따른 동력감소와 전단력 감소의 효과를 알아보하고자 하였다. 그래서 교반속도의 변화에 따른 lincomycin 생산에 미치는 영향을 알아보하고자 250 rpm에서 발효한 결과를 Fig. 2-43에 나타내었다. Starch의 농도는 초기 65 g/L에서 서서히 감소하여 발효말기 약 5 g/L이하의 낮은 농도를 나타내었다. 잔류당은 초기 96시간까지 약간 증가하고 이후 감소하여 발효 말기 약 3 g/L이하의 농도를 나타내었다. 초기에 잔류당은 starch가 분해되면서 생성되는 당으로 인해 약간 증가하였다. 용존산소는 초기에 100%의 포화상태였으나 균체량이 최대값에 도달하면서 용존산소는 10%의 낮은 농도로 감소하였다. 이러한 현상으로부터 미생물 지수성장기로 인하여 용존산소농도가 바닥상태를 유지하였음을 알 수 있었다. 발효 72시간이후 용존산소는 증가하기 시작하였고 240시간이후 100%를 유지하였다. 발효 중 pH는 8~10범위에서 큰 차이를 보이지 않았다. Lincomycin 생산농도는 96시간이후 서서히 증가하여 288시간에 약 340 mg/L로 최대값에 도달하였다. 단일임펠러 rushton을 사용하여 300 rpm에서 발효한 결과와 비교 시 lincomycin 농도가 약 10 mg/L 증가하는 이외에는 큰 효과를 얻지 못하였다. 그러나 발효 대상이 대규모인 경우 임펠러의 회전속도를 낮게 유지해도 원하는 용존산소 유지가 가능하다면 동력

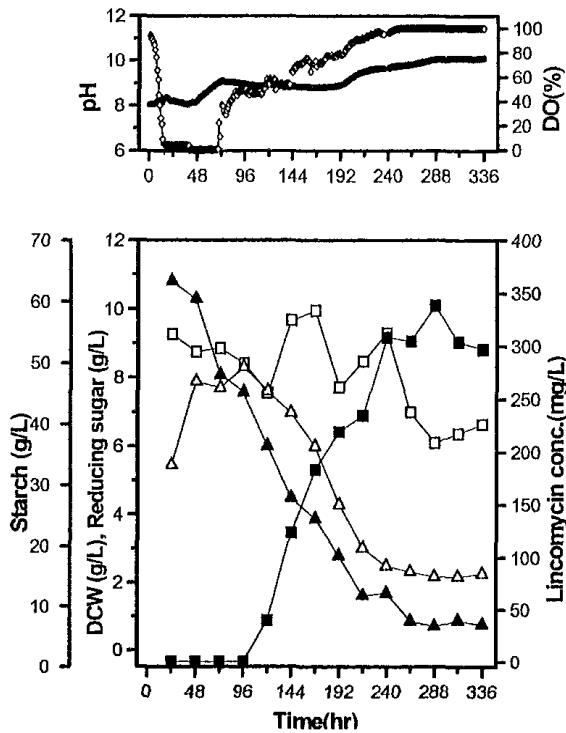


Figure 2-43. Time course of lincomycin production at 250 rpm, 1 vvm and pH uncontrolled using the dual impeller(Rush-Int). First mentioned is the lower impeller.
 -□-, Dry cell weight;
 -■-, Lincomycin conc. ;
 -△-, Starch; -▲-, Reducing sugar;
 -●-, pH; -◇-, DO.

소비 즉 에너지 절약 측면에서 의미 있는 결과로 생각되어진다.

4. 회분식 배양 운전조건에 따른 lincomycin 생산성 비교

회분식배양 운전조건에서 생산된 lincomycin 농도와 생산성을 비교한 결과는 Table 2-18과 같다. 기본생산배지에서 교반속도의 영향에 대한 실험을 수행한 결과 300 rpm이 400 rpm에 비해 2배 이상 높은 lincomycin 농도와 생산성을 나타내었다. 교반속도가 400 rpm으로 상승된 경우 전단력의 영향으로 낮은 lincomycin 생산을 나타낸 것으로 판단되었다.

교반속도 300 rpm 조건하에 라틴방격법에 따라 최적화한 배지를 사용하여 회분식 배양을 실시한 결과, 배지의 특성으로 인하여 거품이 많이 발생하였다. 그리고, 거품을 억제시키기 위해 투입된 다량의 소포제(CA-110)가 lincomycin 생산에도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 소포제의 영향에 대해 실험을 실시하였으며,

그 결과 PPG 0.5 g/L를 첨가한 경우 325 mg/L로 가장 높은 lincomycin 생산농도를 나타내었고, 생산성은 0.97 mg/L · hr였다. 소포제를 CA-110에서 PPG로 변경한 결과 소량으로 거품발생을 억제할 수 있었으며 lincomycin 생산에 미치는 부정적 문제점을 해결할 수 있었다.

임펠러는 액-기체의 혼합, 산소전달, 공기분산 등의 물질전달에 중요한 요인으로 작용한다. 그래서 3가지 유형의 임펠러를 가지고 실험을 수행한 결과 rushton turbine의 경우 scaba와 pitched bladed에 비해 각각 2.3배, 1.5배 높은 생산성을 나타내었다. Rushton turbine은 교반날개수가 6개였고, 날개 각도는 90 °로 상하좌우 교반이 다른 임펠러에 비해 잘 이루어졌다.

pH를 조절한 경우와 조절하지 않은 경우를 비교 실험한 결과 pH를 조절하지 않은 경우가 더 빠른 성장과 높은 lincomycin 생산이 이루어졌다. Lincomycin 최고 농도 차이는 25 mg/L이었지만, 생산성은 1.5배 증가한 1.46 mg/L · hr이었다.

이중임펠러를 사용하여 교반속도 250 rpm에서 실험한 결과 단일임펠러 rushton에 비해 높은 농도의 lincomycin의 생산을 얻지 못하였다. 그러나 이중임펠러의 사용이 작은 규모 발효조에서는 효과적이지 않았지만, 규모가 큰 경우 교반속도를 낮게 할 수 있다는 것은 동력소비측면에서 의미 있는 결과로 판단되어진다.

5. 발효조에서 질소원 조절에 의한 유가식 배양

발효조에서 질소원 NaNO_3 의 유가식 배양을 위해 조업부피는 공급되는 NaNO_3 를 제외한 최적배지(OP-1) 1.3 liter를 기준으로 하여, NaNO_3 16 g/L의 공급방법을 달리 하여 발효한 결과를 Figure 2-44와 2-45에 나타내었다.

Figure 2-44는 배양 중에 NaNO_3 16 g/L를 연속적으로 하루에 20 mL 씩 10일 동안 투입한 결과이다. 배지의 색은 초기에는 연한 갈색이었고, 시간이 흐름에 따라 서서히 진한 갈색을 나타내었다. 균체량은 6~8 g/L로 회분식 배양과 비슷한 값을 나타내었고 lincomycin의 생산농도는 264 hr에서 가장 높은 271 mg/L의 생산을 보였

Table 2-18. Comparison of maximum lincomycin concentration and productivity with fermentation condition

Medium	Agitation speed	Antiform	Impeller type	Max. lincomycin conc.(mg/L)	Productivity (mg/L/hr)
UP-1	300	CA-110	rushton turbine	150	0.52
	400	CA-110	rushton turbine	70	0.29
OP-1	300	CA-110 5 g/L	rushton turbine	150	0.57
	300	PPG 5 g/L	rushton turbine	200	0.69
	300	PPG 1g/L	rushton turbine	150	0.57
	300	PPG 0.5 g/L	rushton turbine	325	0.97
	300	PPG 0.5 g/L	pitched blade	130	0.42
	300	PPG 0.5 g/L	scaba	225	0.67
	250	PPG 0.5 g/L	dual (Rush-Int)*	340	1.22
	300	PPG 0.5 g/L	rushton turbine*	350	1.46

*pH uncontrolled fermentation.

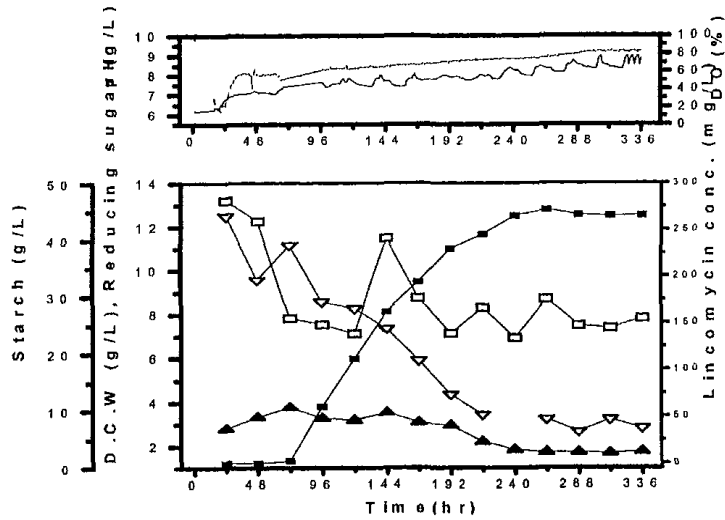


Figure 2-44 Time course of lincomycin fed-batch culture by continuous feeding the NaNO_3 in a fermentation. \square , Dry cell weight; \blacksquare , lincomycin concentration; ∇ , starch; \blacktriangle , reducing sugar; —, pH; \cdots , DO.

다.

Figure 2-45는 NaNO_3 16 g/L을 하루에 한번씩 20 mL를 10일 동안 투입한 결과이다. lincomycin은 48 hr 이후 빠르게 생산되어 216 hr에 376 mg/L가 생산되었다. 상기 결과로부터 질소원은 연속적으로 투입하는 것보다 하루에 한번씩 일정량을 투입한 경우, lincomycin 생산이 약 39% 증가하는 것을 알 수 있었다.

6. Lincomycin 고생산 균주를 이용한 발효 특성 연구

가. 돌연변이 균의 성장곡선

성장배지(GM-2)에서 돌연변이 균를 활성화시킨 후 생산배지(OP-1)에 접종하여 15일 동안 배양한 결과를 Figure 2-46에 나타내었다. 균체량은 서서히 증가하였으며 lincomycin은 96 hr이후 서서히 생산되기 시작하여 360 hr에는 88.07×10^3 unit/L의 생산량을 보였다. 이는 wild type 균이 315 mg/L의 lincomycin을 생산한 것과 비교

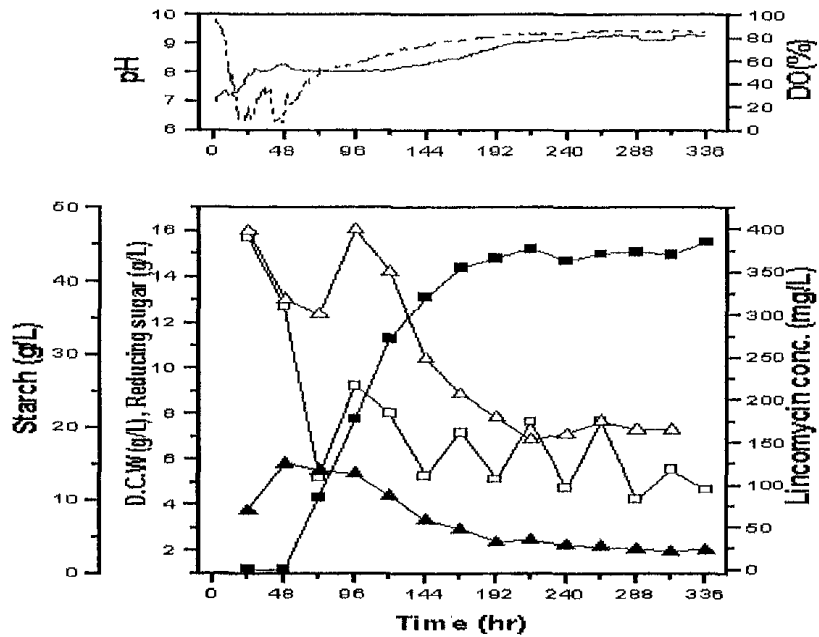


Figure 2-45. Time course of lincomycin fed-batch culture by intermit feeding the NaNO_3 in a fermentation. -□-, Dry cell weight; -■-, lincomycin concentration; -▽-, starch; -▲-, reducing sugar; —, pH; - ···-, DO.

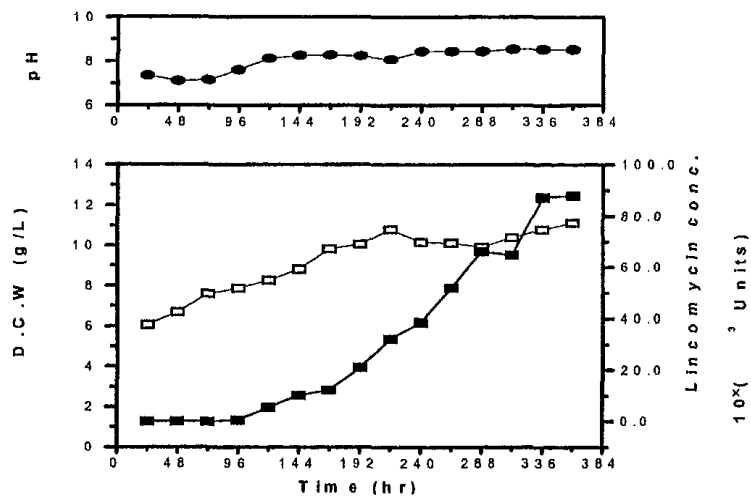


Figure 2-46. The growth curve of *Streptomyces lincolnensis* mutant Asun1 by OP-1. -□-, Dry cell weight; -■-, Lincomycin concentration; -●-, pH.

해볼 때 상당히 증가한 결과이다.

나. 생물반응기에서 ASUN9 고생산성 균주의 lincomycin 생산성 조사: computer-control에 의해 용존산소를 조절한 경우와 조절하지 않은 경우의 배양생리학적 특성 비교

일반적으로 이차대사산물의 생합성에 가장 큰 영향을 주는 요인 중의 하나가 배양액내의 산소농도(dissolved oxygen)이다. 배양액내의 용존산소가 lincomycin 생산성에 미치는 영향을 정밀하게 조사하기 위해 제1협동과제에서 분양 받은 고생산 변이주인 ASUN9 균주를 이용하여 발효조 배양을 수행하였다.

용존산소를 정밀하게 조절하기 위한 실험 장치 모식도를 Figure 2-47에 나타내었다. 배양액내의 용존산소를 적정량으로 유지하기 위해 교반기의 속도와 공기의 유입량을 동시에 조절하였다. 산업용 발효기의 경우 교반기의 속도를 무한정 증가시킬 수 없는 문제점이 있을 뿐만 아니라 일반적으로 방선균의 경우 높은 교반속도에 대해 대단히 민감하므로 좀더 낮은 교반속도로 운전하기 위해서 공기의 유입량도 동시에 조절되도록 운전조건을 확립하였다. 컴퓨터 조절 발효 시스템에 의해 용존산소를 조절한 경우 교반속도의 최대값과 최소값을 각각 150 rpm과 350 rpm으로, 공기의 유입량을 1.5 L/min에서 4.5 L/min으로 설정하였으며, 용존산소를 30%로 조절한 실험의 결과를 Figure 2-48에 나타냈다. 또한 용존산소를 자동으로 조절하지 않은 대조군 실험을 수행하였다. 이 때 인위적으로 실험자가 바꾸어 준 교반속도와 공기량을 Figure 2-49에 나타내었다. 이 외의 발효조 배양 조건으로서 ASUN9 돌연변이 균주, 용존산소 농도 30%, 온도 28℃, 발효조 작업부피 3L, 접종량 10%이었으며, 생산배지의 조성은 soluble starch 45g/L, malt extract 20g/L, sugar cane molasses 15g/L, peptone water 13.33g/L, NaNO₃ 11.67g/L, CaCO₃ 4g/L, MgSO₄ 0.6g/L이었다.

발효 초기에 원하는 수준의 용존산소인 30%를 유지하기 위해 교반기의 속도와 공

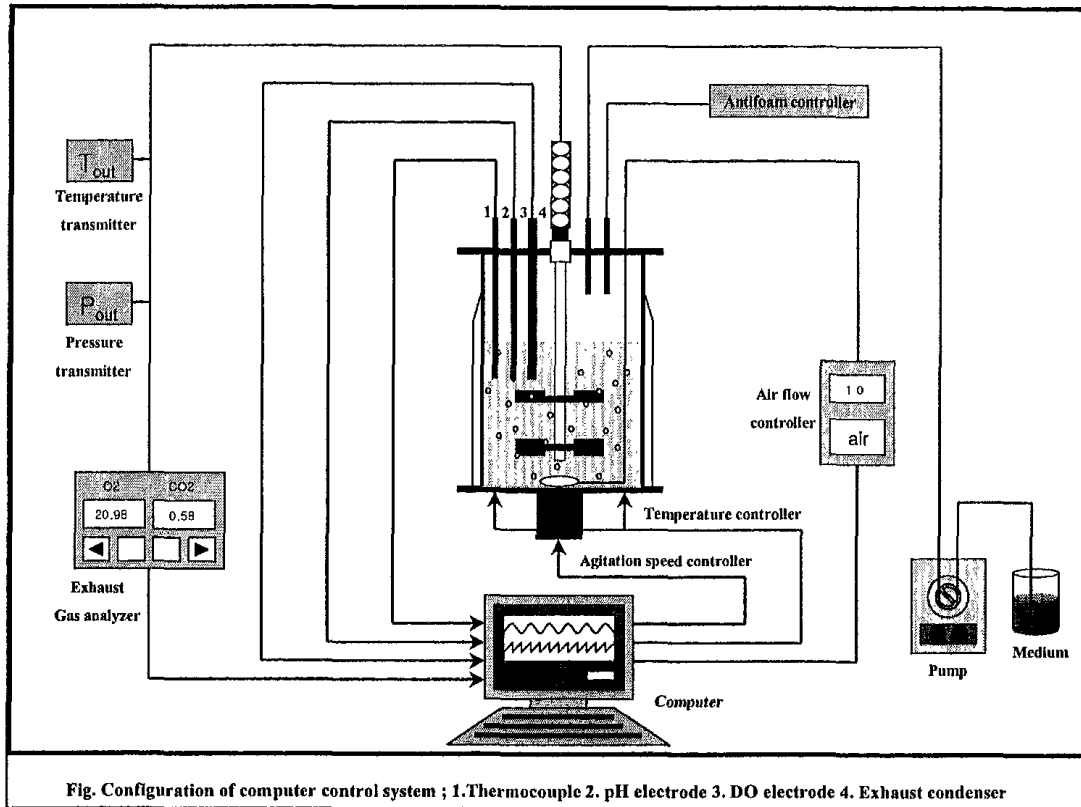


Figure 2-47. Configuration of a on-line computer-controlled fermentation system.

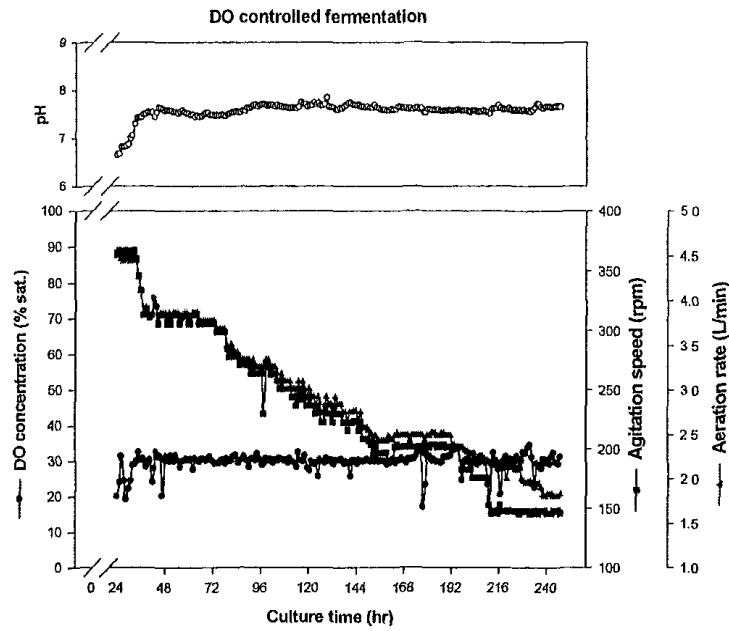


Figure 2-48. Dissolved oxygen controlled fermentation(30% saturated DO by on-line computer-controlled system

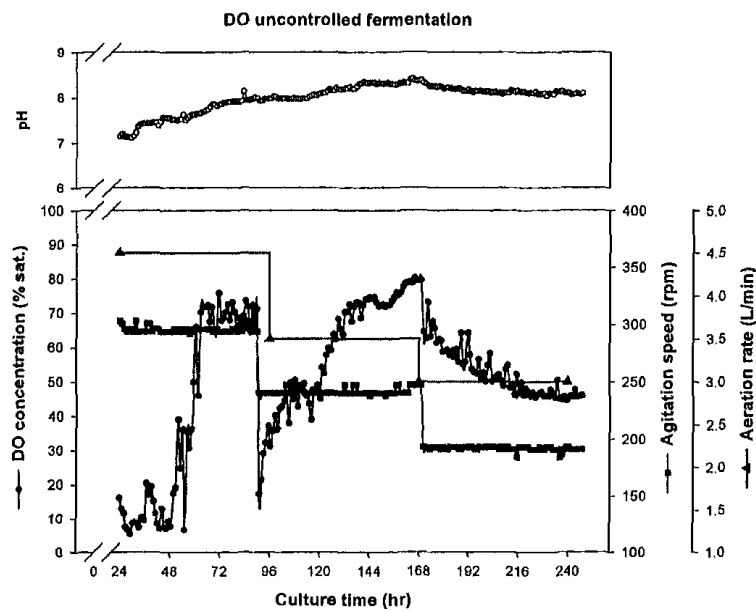


Figure 2-49. Dissolved oxygen uncontrolled fermentation (agitation and aeration rates were adjusted manually)

기의 유입량 모두 높은 수치를 유지하다가, 배양의 후반부로 진행됨에 따라 교반기의 속도와 공기의 유입량이 점차 감소하였다(Time profile에서 초반의 24시간 가량의 데이터가 컴퓨터의 오류로 인해 빠져있음). Fig. 2-48에 나타난 것과 같이 용존 산소를 조절하여 배양한 경우 10일까지 용존산소가 30%로 유지가 되었으며, 이에 따라 교반속도와 공기의 유입량이 컴퓨터에 의해 정밀히 자동 조절되는 것을 확인할 수 있었다. 한편 Fig. 2-49에 나타난 것과 같이 용존산소를 조절하지 않고 배양한 경우, 교반속도와 공기의 유입량이 증가하여 48시간에 용존산소가 다시 증가하는 경향을 보여주었다. Fig. 2-50에 나타난 것에 의하면 세포의 성장곡선에서 확인할 수 있듯이 용존산소를 조절한 경우의 세포농도는 20 g/L로서, 조절하지 않은 경우보다 약 2배 정도 증가함을 확인하였다. 주목할 점은 lincomycin의 생산성에 있어서 용존산소를 조절한 경우가, 조절하지 않은 경우에 비해 약 4배정도 큰 폭으로 증가한다는 점이다. 이는 lincomycin 생합성 시 용존산소가 충분히 배양액 내에 존재해야 함을 제시해 주는 중요한 결과로 판단된다. 본 연구에서 개발한 on-line computer-controlled fermentation system은 용존산소의 제한조건을 해결해 줄 수 있는, 즉 배양액 내로 충분한 산소 공급을 가능하게 해주는 효율적인 배양공정이라고 판단된다.

다. Computer-control에 의해 용존산소를 조절한 생물반응기에서 ASUN9, BSUN1과 BSUN2 고생산성 균주의 lincomycin 생산성 조사

Lincomycin 고생산 변이주 ASUN9, BSUN1과 BSUN2에 대하여 용존산소 농도를 on-line computer-controlled fermentation system에 의해 30%로 유지하면서 발효한 결과를 Figure 2-51, 2-52와 2-53에 나타냈다. 예상한 바와 같이 발효초기에는 미생물의 산소요구량 때문에 교반속도와 통기량이 높게 유지되었으며, 발효액의 용

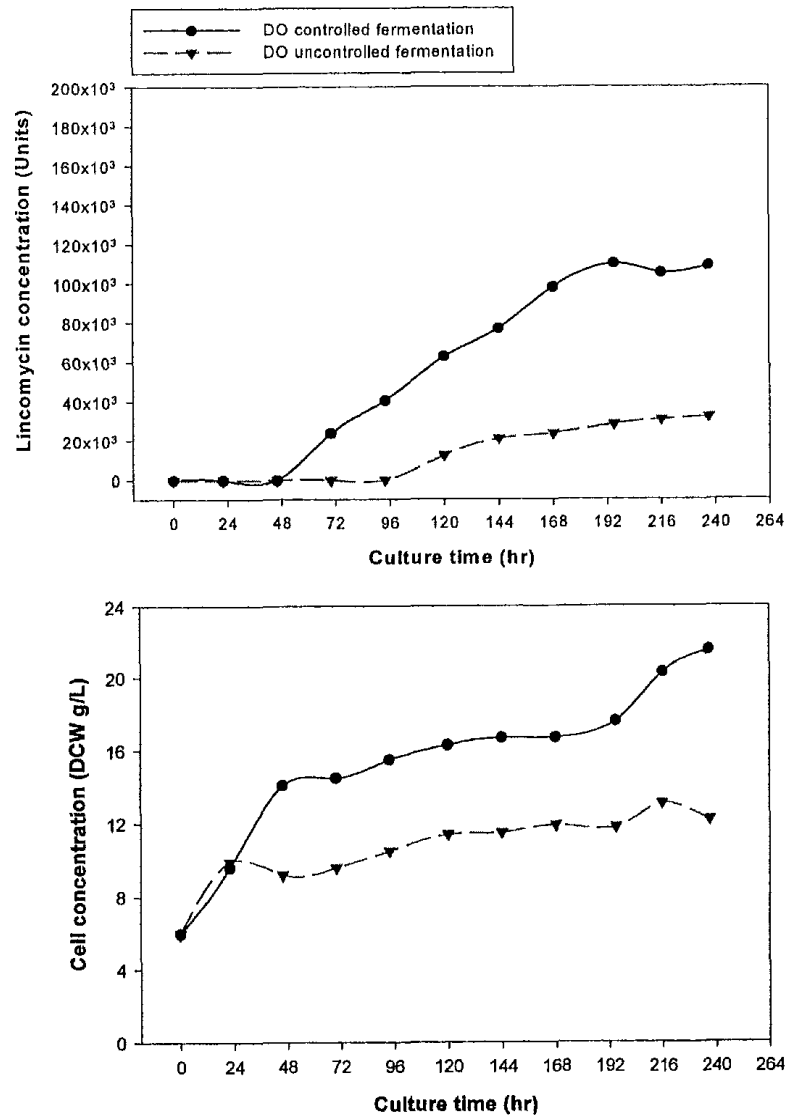


Figure 2-50. Comparison of lincomycin production and cell concentration between dissolved oxygen-controlled and -uncontrolled fermentations

존산소도 일정하게 유지하는 것이 어려웠다. 그리고 ASUN9과 BSUN1의 경우는 108시간이 경과한 후 교반속도와 통기량 모두 변화하는 경향을 나타냈다. ASUN9의 경우 교반속도가 250 rpm으로 높게 유지되는 시기에 통기량은 낮았으며, 교반속도가 최저 값 150 rpm에 이르면 일정한 용존산소 농도를 유지하기 위해 통기량이 증가하는 경향을 보여주었다(Figure 2-51). BSUN1의 경우는 ASUN9가 달리 발효초기부터 용존산소 농도가 30%로 쉽게 유지되었다. 발효초기에는 교반속도와 통기량 모두 상당히 높은 값이었으나 108시간이 경과한 후에는 두 변수 모두 최소값으로도 요구되는 용존산소 농도를 유지할 수 있었다(Figure 2-52). 이러한 현상으로부터 두 균주의 발효특성이 다른 것을 알 수 있었으며, lincomycin 생산에도 영향을 미치리라 생각되었다. 그러나 BSUN2의 경우는 상기 두 균주 보다 더 이른 60시간부터 교반속도가 최소 값인 150 rpm으로 낮아지는 현상을 보였으며, 통기량의 조절만으로도 용존산소 농도를 30%로 유지하는 것이 가능하였다(Figure 2-53). Fig. 2-54에 보여진 것과 같이 lincomycin 생산은 ASUN9과 BSUN2가 유사하였으며, BSUN1의 경우 최종적으로 두 균주에 비해 약 2.6배 이상의 lincomycin 생산을 보여 주었다.

결과적으로 lincomycin 고생산 변이주의 선별과 용존산소 농도의 조절이 가능한 on-line computer-controlled fermentation system을 이용하여 lincomycin의 생산성을 향상시킬 수 있었다. 그리고 개발된 system은 용존산소 농도 조절이 필요한 호기성 미생물의 발효에 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

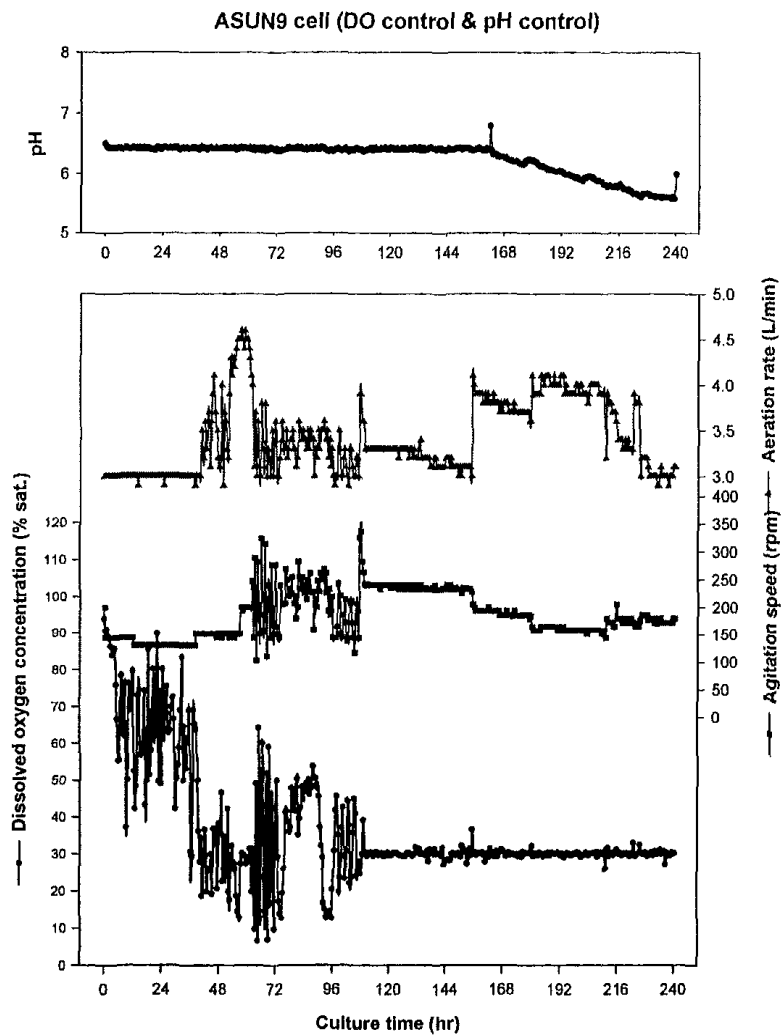


Figure 2-51 Time course profiles of dissolved oxygen concentration, agitation speed, aeration rate, and pH variation in dissolved oxygen controlled fermentation (controlled at 30% of saturated DO concentration) by ASUN9

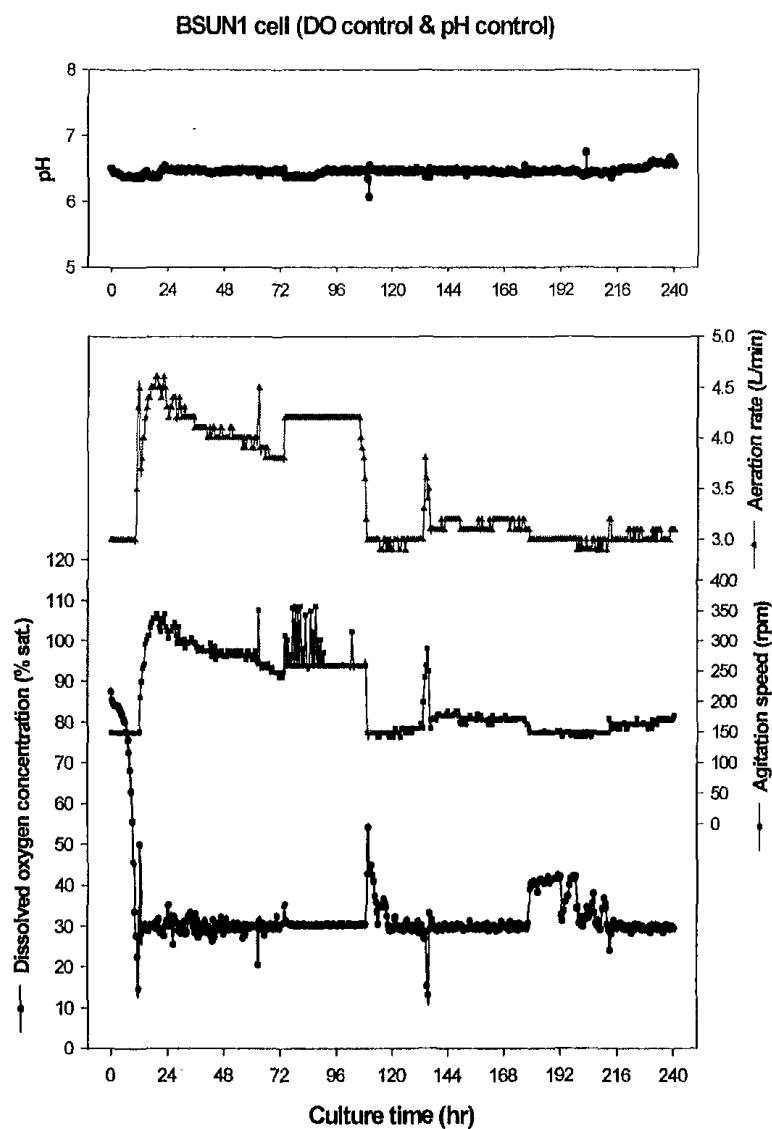


Figure 2-52 Time course profiles of dissolved oxygen concentration, agitation speed, aeration rate, and pH variation in dissolved oxygen controlled fermentation (controlled at 30% of saturated DO concentration) by BSUN1

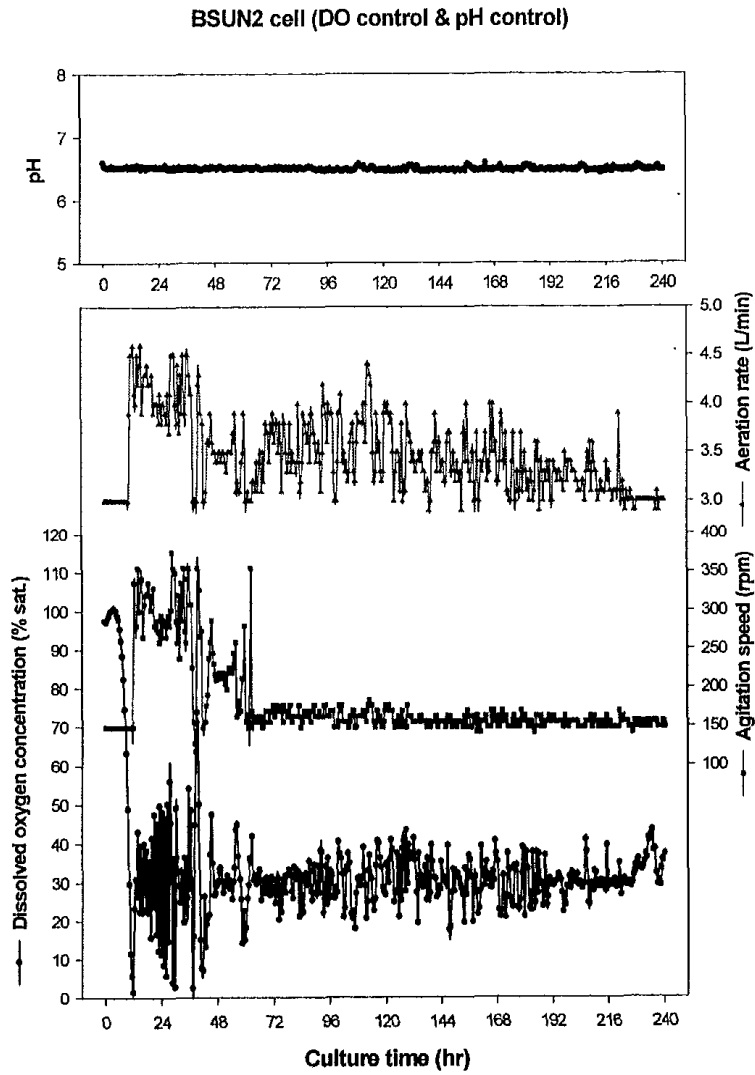


Figure 2-53 Time course profiles of dissolved oxygen concentration, agitation speed, aeration rate, and pH variation in dissolved oxygen controlled fermentation (controlled at 30% of saturated DO concentration) by bSUN2

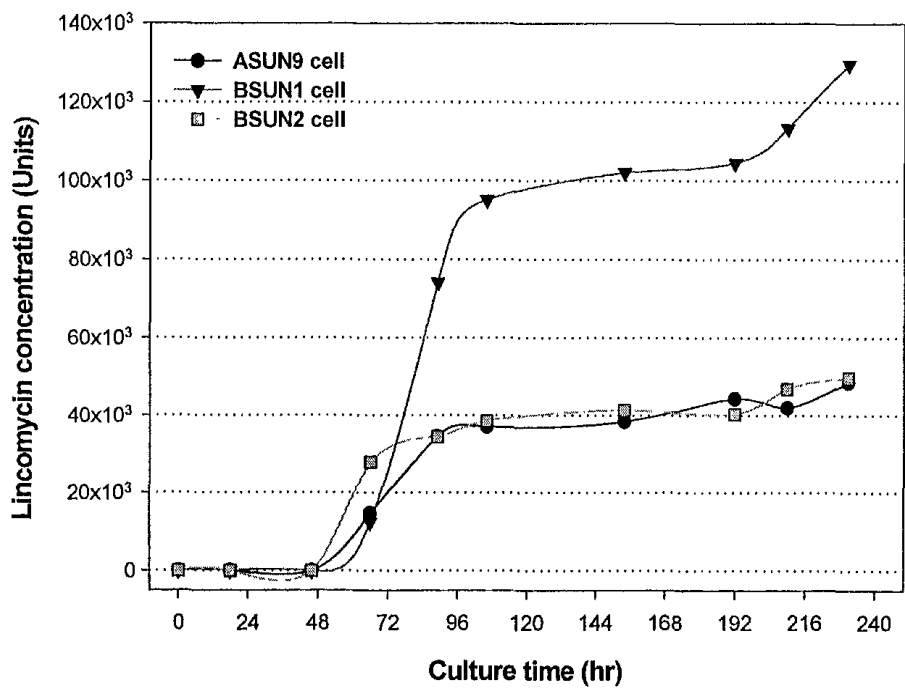


Figure 2-54 Comparison of lincomycin production as a function of fermentation time in dissolved oxygen controlled fermentation (controlled at 30% of saturated DO concentration) by ASUN9, BSUN1 and BSUN2.

제4절 참고문헌

1. Bergy, M. E., R. R. Herr, and D. J. Mason (1964), Antibiotic composition. United states patent office. 3,155,580.
2. Cruger, W. and A. Cruger (1990), *In Biotechnology: A textbook of Industrial Microbiology*. 1-63, Science Tech Publishers.
3. Yuzuru Iwai and Satoshi Omura (1982), Culture conditions for screening of new antibiotics. *The journal of antibiotics* **35**(2), 123-141.
4. Martin, J. F. and A. L. Demain (1980), Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* **44**, 230-251.
5. Aharonowitz, Y. (1980), Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**, 209-233.
6. Savage, G. M. (1972), Bioynthesis of the lincomycins. *Post. Hig. I Med. Dosw.* **26**, 549-562.
7. Chung S. T., J. J. Manis, S. J. Mcwethy, T. E. att, D. F. Witz, H. J. Wolf, and M. G. Wovcha (1997), Fermentation, Biosynthesis, and Molecular Genetics of lincomycin, *Biotechnology of antibiotics*(W. R. Strohl ed.) 2rd ed. 165-186, Marcel dekke, Inc. New York.
8. Mason, D. J., A. Dietz and C. Deboer (1963), Lincomycin, a new antibiotic Discovery and Biological Properties. *Antimicrob. Agents Chemother* 554-559.
9. Jeffrey, L. C. Wright(1983), The Lincomycin-Celesticetin-Qnthramycin Group, *In Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important antibiotics*(L. C. Vining ed.) 311-328, Addison-Wesley Reading, Massachusetts.

10. Argoudelis, A. D., J. A. Fox, and T. E. Eble (1965), A new lincomycin - related antibiotic. *Biochemistry* **4**(4), 698-703.
11. Blanch, H. W., S. Drew, and D. I. C. Wang (1985), The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. *Comprehensive biotechnolog.* Vol. **3**, 211-223, pergamon press, New York.
12. Witz, D. F., E. J. Hessler, and T. L. Miller (1971), Bioconversion of tyrosine into the propylhygric acid moiety of lincomycin. *Biochem.* **10**(7), 1128-1133.
13. Aharonowitz, Y. and A. L. Demain (1978), Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **14**, 159-164.
14. Johnson, M. J. (1952), Recent advances in penicillin fermentations. *Bull. World Health Org.*, **6**, 99-121.
15. Cruz, A. J. G., A. S. Silva, M. L. G. C. Araujo, R. C. Giordano, and C. O. Hokka (1999), Modelling and optimization of the cephalosporin C production bioprocess in a fed-batch bioreactor with invert sugar as substrate. *Chem. Eng. Sci.* **54**, 3137-3142.
16. Yuuichi Y., H. Horitsu, K. Kawai, T. Suzuki, and K. Takamizawa (1996), Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding. *J. Ferment. and Bioeng.* **81**(2), 148-152.
17. Fumihisa K., T. Sawada, Y. Nakamura, M. Ohnaga, M. Godliving, and T. Ushiyama (1997), Saccharification and Alcohol fermentation in starch solution of steam-exploded potato. *Appl. biochem. and biotechnol.* **69**, 177-189.

18. Demain, A. L., Y. Aharonowitz and J.-F. Martin (1983), Metabolic Control of Secondary Biosynthetic Pathways, In Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important antibiotics(Vining, L. C. ed.) 49-72, Addison-Wesley Reading, Massachusetts.
19. Dostkocil, J, S. Hostalek, J. Kasparova, J. Zajick and M. Herold (1959), Development of *Streptomyces aureogaciens* in submerged culture. *J. Biochem. Microbiol. Technol. and Eng.* **1**, 261-271.
20. Aharonowitz, V and A. L. Demain (1977), Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*, *Arch. Microbiol.* **115**, 169-173.
21. Martin, J. F. (1977), Biosynthesis of polyene macrolide antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**, 13-38.
22. Martin, J. F., P. Liras and A. L. Demain (1978), ATP and adenylate energy charge during phosphate-mediated control of antibiotic synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 822-828.
23. 이희찬, 김병기(1997), 통계학적방법을 이용한 배지조성의 최적화, 한국산업미생물학회 소식지, **10(1)**, 10-14.
24. Szakacs, G., G. Morovjan and R. P. Tengerdy (1998), Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotech. Letters*, **20(4)**, 411-415.
25. Gomes, J., I. Gomes, H. Esterbauer, W. Kreiner, and W. Steiner (1989), Production of cellulases by a wild strain of *Gliocladium virens*: optimization of the fermentation medium and partial characterization of the enzymes. *App. Microbio. Biotech* **31**, 601-608.
26. Saval, S., L. Pablos and S. Sanchez (1993), Optimization of a culture

- medium for streptomycin production using respons-surface methodology, *Biores. Tech.* **43**, 19-25.
27. 박성현 (1998), 현대실험계획법. p353-377, 대영사, 서울.
28. Johnson, M. J. (1946), Metabolism of penicillin-producing molds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **48**, 57-66.
29. Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
30. Dubios, M., K. A. Filles, J. K. Hamilton, P. A. Rbers, and F. Smith (1956), *Anal. chemistry*, **28**, 3.
31. Asmus P. A. and J. B. Landis (1983), Liquid chromatographic determination of lincomycin in fermentation beers. *Journal of Chromatography*, **264**,241-248.
32. Jarai, M., E. Gyory, and J. Tombor (1969), Oxygen transfer in *Streptomyces* fermentation broths. *Biotech. Bioeng.* **11**, 605-622
33. Kim B. G., Y. S. Jeong, G. T. Chun and Y. H. Lee(1999), Effect of medium components on the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**(1), 36-44.
34. 김진기, 차장욱, 김연중(1995), 초보자를 위한 알기 쉬운 SAS 활용법, p.159, 혜지원, 서울.
35. Stanbury and Whitaker (1984), In Principles of fermentation technology. 1st ed., Pergmon Press, New York.
36. Young, M. D. and L. L. kempe (1995), Effects of phosphate, glucose, ammonium on cell growth and lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis* in chemically defined media. *Biotech. Bioeng.* **27**, 327-333
37. Kim, Jin-Woo and S. W. Kim, G. W. Lee, S. Y. Lee. S. M. Kim and D. I. Kim (1997), Antifoam Agents for Plant Cell Suspension Cultures. *Korean J.*

- Biotechnol. Bioeng.* **12**(3), 323-327.
38. Volker K., H. M. Ruffer, K. Schugerl, E. Innertsberger, H. Menzel and J. Weis (1995), Effect of antiform agents on the medium and process performance in small and large reactors. *Process Biochemistry*, **30**(5), 435-446.
 39. Fowler, M. W. (1982), The large scale cultivation of plant cells. *Pro. Ind. Microbiol.* **16**, 207-229.
 40. Ghildyal, N. P., B. K. Lonsane, and N. G. Karanth (1988), Foam control in submerged fermentation state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.*, **33**, 173-221.
 41. Finn, R. F. (1954), Agitation-aeration in the laboratory and in industry, *Bacteriol. Rev.* **18**, 254-274.
 42. Oh, J. H. (1999), Establishment of oxygen supply strategies and determination of oxygen transfer coefficient for avermectin production by *Streptomyces avermitilis*, M. S. Thesis, Dept. of Food science and Technology Chonbuk Nat. Univ., Chounju.
 43. Tuffile, C. M. and F. Pinho (1970), Determination of oxygen-transfer coefficients in viscous streptomycete fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **12**, 849-871.
 44. Arjunwadkar, S. J., K. Sarvanan, P. R. Kulkarni and A. B. Pandit (1998), Gas-liquid mass transfer in dual impeller bioreactor. *J. Biochem. Eng.*, **1**, 99~106.
 45. Chen, Z. D. and J. J. J. Chen (1999), Comparison of mass transfer performance for various single and twin impellers. *Inst. of Chem. Eng.*, **77**, A, 104-109.

제 4 장 고기능성 동물성장촉진 · 사료효율개선 제인 링크마이신 분리정제 공정개발 (제 2 협동과제)

제 1 절 서 설

링크마이신과 같이 발효공정에서 생산되는 산물은 여러 가지 미반응 substrate, byproduct, insoluble등이 포함되어 있어 일정한 함량 및 순도를 지닌 정제품으로의 분리정제가 필수적이다. 특히 링크마이신의 분리정제를 위해서는 순도를 높이기 위해 여러 단계의 용매추출 및 column조작이 필요하고 마지막 단계로 소비자가 원하는 형태로 가공하기 위해 결정화(crystallization) 공정의 개발이 필요하다. 또한 링크마이신은 UV나 가시광선에서 흡광하지 않으므로 HPLC 시스템을 사용하기 어려웠으나 1980년대에 이르러 HPLC를 사용한 분석법이 개발되어 분석법의 추가적 확립이 필요하다.

링크마이신의 효능이 알려진 이래 균주개발, 발효공정 연구, 분석방법 및 분리 정제 방법에 대한 많은 연구 보고가 있었으나 이들은 매우 제한적인 lab-scale의 정보만을 제공해 주고 있어 실제 생산 scale의 생물공정 전반에 관한 연구는 거의 알려지지 않고 있다. 현재 외국에서는 1970년대부터 링크마이신의 산업균주 개발, 발효공정의 최적화, 분리 정제공정 등의 개발이 완료되어 제품을 생산하고 있다. 하지만 국내의 실정은 외국에서 생산되어 분리 정제된 원료품을 수입하여 약간의 가공으로 제품을 생산하는 정도로써 링크마이신의 산업적 생산에 관한 연구가 전무한 실정이고 특히 분리정제에 대한 연구는 실험실 규모에서도 거의 이루어지지 않은 실정이다.

이에 본 연구에서는 링크마이신의 실용화 분리정제 공정 개발을 위해서 분석법을

확립하였고 세포분리공정, 추출공정, 결정화 공정에 대한 기본 개발전략을 lab-scale의 기초연구를 바탕으로 확립하였으며, 이를 바탕으로 pilot plant-scale의 분리정제 공정을 개발하였고 이에 실제 배양된 배양액을 적용하여 운전 자료를 축적함으로써 링크마이신의 실용화 분리정제 공정의 scale-up 전략 수립 및 설계인자 도출 등에 필요한 기본 정보를 제공하고자 하였다. 또한 실제공정의 한 모델로 연속식 3단 향류추출 장치를 개발하여 성공적으로 운전함으로써 보다 효율적이고 경제적인 분리정제 공정의 새로운 대안을 제시하고자 하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 실험재료

가. 실험균주

본 연구에서는 링크마이신 생산균주인 *Streptomyces lincolnensis* SUN 9 mutant 균주를 사용하였다.

나. 링크마이신 standard

이 실험에서 기본이 되는 링크마이신 standard는 Merck사에서 시판하고 있는 lincomycin hydrochloride(M.W=406.5)를 사용하였고, 배양액으로 추출 실험을 하기 전에 최적 추출 조건을 찾기 위하여 증류수에 1당 500mg의 링크마이신 standard를 첨가하여 배양액 대신 사용하였다.

다. 유기용매

유기용매 추출 실험을 위한 유기용매로써 덕산약품에서 구입한 butanol, heptane,

butyl acetate, hexane, toluene, methylene chloride, chloroform, ethylene glycol, ethanol, methanol, butanol등을 사용하였다.

2. 실험방법

가. 린코마이신의 HPLC 분석법 확립

린코마이신 STD를 methanol에 각각 100~500 mg/ℓ의 농도로 용해시켜 Waters Bondapak C₁₈ reverse phase column(3.9×300mm)(Millipore, Milord, MA, USA)과 Zorbax 7 μ C₈ column(4.6×250mm)을 사용하여 아래와 같은 조건으로 린코마이신의 분석을 시도하였다.

Pump : Waters 510 (Millipore, Milord, MA, USA)

Injection valve : Waters U6K (Millipore, Milord, MA, USA)

Detector : UV-VIS detector, Waters 486 (Millipore, Milord, MA, USA)

Data analysis : Waters 746 Data module (Millipore, Milord, MA, USA)

Wave length : 214nm

Column temperature : 45℃

Flow rate : 2 ml/min

Mobile phase (/ ℓ) :

2.9g sodium dodecyl sulfate (SDS)

10ml of concentrated (85%) phosphoric acid

660 ml ddH₂O

330ml of HPLC grade acetonitrile

pH with concentrated NH₄OH and then filtered

나. 세포파쇄공정

린코마이신은 세포 외로 생산되나 세포 내에도 린코마이신이 존재할 가능성을 무시할 수 없다. 제1협동과제에서 bioassay의 결과 세포 내에도 린코마이신이 존재할 가능성이 시사되어 이 경우 세포파쇄공정이 필요하므로 효율적인 세포파쇄공정을 조사하였다. 이를 위해 Waring blender를 비롯한 여러 가지 세포 파쇄 방법을 이용하여 효율성을 비교 검토하였다.

1) Waring blender

제1협동과제에서 제공한 Cell broth 25ml을 Waring blender에 넣고 약 1분간 작동시킨 후 3500rpm에서 10분간 centrifuge하고 상등액 1ml을 채취하여 0.2 μ m syringe filter 후 HPLC 분석한다.

2) Ultra sonicator

Cell broth 25ml을 ultra sonicator의 cell에 넣고 cell 주위에 냉각수를 흘려주며 1분 간격으로 운전과 휴식을 병행하며 20분간 처리한 후 3500rpm에서 10분간 centrifuge하고 상등액 1ml을 채취하여 0.2 μ m syringe filter한 후 HPLC 분석한다.

3) Homogenizer

Cell broth 25ml을 homogenizer에 넣어 약5분간 작동시킨 후 3500rpm에서 10분간 centrifuge 하고 상등액 1ml을 채취하여 0.2 μ m syringe filter한 후 HPLC 분석한다.

4) bead beater

우선 glass bead를 용기 내에 채우고 cell broth 25ml을 넣은 다음 phosphate buffer로 가득 채우고 기포가 생기지 않도록 주의하여 밀폐한다. 주위에는 열 발생을 방지하기 위해 얼음물을 채운다. 그 후 10초 간격으로 운전과 휴식을 반복하며

2분간 작동시킨다. Glass bead를 phosphate buffer로 세척한 후 cell broth와 buffer를 함께 모으고 농축하기 위하여 3일간 동결건조 한다. 건조가 끝난 후 cell 을 모아 25ml의 buffer에 녹이고 3500rpm에서 10분간 centrifuge하고 상등액 1ml을 채취하여 0.2 μ m syringe filter 후 HPLC 분석한다.

5) Methanol 추출

Cell broth 25ml에 methanol을 1 : 1로 혼합 후 200rpm에서 24시간 동안 shaking 시켜 추출한 후 3500rpm에서 10분간 centrifuge하여 상등액 1ml을 채취하고 0.2 μ m syringe filter 한 후 HPLC 분석한다.

다. 세포분리공정

1) 세포여과공정

제1 세부에서 배양된 배양액을 lab filter (Area = 2.2685 cm²)를 이용하여 흡입 압력(suction pressure)이 조절되는 pump식 aspirator(EYELA Cool Ace CA-1110)로 진공도를 150, 200, 250, 300mmHg로 변화시키면서 시간에 따른 여과액(filtrate)의 부피를 조사하여 그 결과를 Ruth plot(At/V vs. V/A)하였다. Specific cake resistance α 값을 구하기 위한 파라미터인 점도의 측정을 위해 Ostwald viscometer를 이용하였다.

2) 원심분리 공정

원심분리기의 용량과 운전 조건의 기본이 되는 settling velocity를 lab-scale의 centrifuge test를 통해 추정하였다. 실험실 규모의 centrifuge (Micro 17R, Hanil)를 사용하여 fermentor에서 배양한 배양산물을 5000rpm으로 원심분리하면서 시간에 따라 supernatant를 sampling하여 absorption의 변화를 spectrophotometer (U-3210, Hitachi) 600nm에서 측정하였다. Supernatant의 흡광도가 더 이상 변화하

지 않는 시간을 settling time으로 하여 사용한 centrifuge의 geometry를 이용하여 린코마이신 생산균주의 settling velocity를 구하였다.

라. 추출공정 개발

1) two phase형성조사

유기용매와 수용액간의 two phase를 확인하기 위하여 test tube에 각 유기용매와 dH₂O를 1:1로 혼합한 뒤 수용성 검정 잉크를 0.5ml씩 첨가하여 two phase가 형성되는지 확인한 후 완전한 two phase를 이루는 일곱 종류의 유기용매를 선발하여 실험에 사용하였다.

2) 추출용매선정

선발된 일곱 종류의 유기용매 중 가장 효율이 좋은 용매를 선택하기 위하여 수용액에 l 당 500mg의 린코마이신 standard를 첨가한 후 각 유기용매와 1:1로 접촉 후 유기용매상에서 약1ml의 sample을 취하여 HPLC 분석을 하였다.

3) pH에 따른 추출율의 변화

배양액에서 수용액상으로의 1차 추출과 용매상에서 수용액상으로의 2차 추출에서 수용액의 pH변화에 따른 solvent extraction의 차이를 알아보기 위하여, methylene chloride, chlotoform, 그리고 butanol 용매 각각의 경우 수용액의 pH를 변화시키면서 추출율의 변화를 조사하였다.

4) 수용액상 : 용매상의 부피비율에 따른 추출율의 변화

Methylene chloride, chlotoform, 그리고 butanol 용매 각각의 경우, 수용액상 (aqueous phase)과 용매상(solvent phase)의 부피비의 영향을 조사하고 최적 부피비를 결정하기 위하여 각 pH에서 부피비를 각각 달리 변화시키면서 추출율의 변화

를 조사하였다.

5) 회분식 추출과정

가) Dissociative extraction

① 실제배양액의 추출에 의한 정제

배양한 배양액의 린코마이신 함량을 분석한 후 (100 mg/l), 시약으로 구입한 린코마이신을 첨가하여 500 mg/l의 린코마이신이 포함된 배양액을 시료로 사용하였다. 이렇게 린코마이신의 농도를 높인 이유는 추출 단계가 진행되면서 수율이 줄어들어 분석에 오차가 생기는 것을 최소화하기 위한 것이다. 수용액상의 pH를 변화시키면서 추출을 반복하여 불순물이 제거되는지 조사하였다. 이때 사용한 수용액상:용매상의 부피비는 1:1을 사용하였고 pH는 예비 실험 결과에 따라 pH 10과 pH 2를 번갈아 사용하였다.

② 추출횟수에 따른 추출율 조사

pH의 변화에 따른 분배도의 변화를 이용하여 정제하는 dissociative extraction을 린코마이신의 추출 및 정제의 전략으로 제시하였다. 그러나 이 과정에서 추출 횟수가 증가할수록 정제에 의한 순도는 증가하나 추출의 회수율은 계속하여 떨어지는 경향을 목격하였다. 따라서 dissociative extraction을 계속할 경우 이러한 현상이 계속되는 것을 확인하고 또한 최적 추출 횟수를 결정하기 위한 실험을 수행하였다. 배양액을 대신하여 l 당 500mg의 린코마이신 standard를 첨가하여 만든 시료 (aqueous phase)를 NH₄OH를 사용하여 pH를 10으로 조정한 후 같은 부피의 butanol을 접촉시켜 추출한 후, 이 solvent phase를 다시 pH 2로 맞춘 같은 부피의 aqueous phase와 접촉시켜 추출한다. 이 과정에서 버려지는 aqueous phase를 다시 같은 과정을 반복하여 6회 수행하였다.

나) 회분식 다단 추출

Dissociative extraction에서는 solvent phase와 평형에 있는 aqueous phase에 잔존하는 린코마이신이 버려지기 때문에 추출 회수율이 낮아진다. 따라서 정제도에 문제가 없다면 추출 회수율을 높이기 위해 추출 후 버려지는 aqueous phase를 새로운 solvent로 계속하여 추출하는 회분식 다단 추출이 효율적일 것으로 예상된다. 따라서 회분식 다단 추출에서의 단수에 따른 추출 회수율의 변화와 이 과정에서 aqueous phase와 solvent phase의 부피 변화에 따른 린코마이신의 추출효율을 조사하였다. 이를 위하여 배지를 대신하여 1 당 500mg의 린코마이신 standard를 첨가하여 만든 시료(aqueous phase)를 NH_4OH 를 사용하여 pH를 10으로 조정 한 후, solvent 와 aqueous phase의 부피를 1:1과 1:4로 달리하여 추출하고, aqueous phase에 남아 있는 린코마이신을 다시 같은 부피비의 새로운 solvent로 각각 3회의 재 추출을 시도하였다.

6) 연속식 추출공정 개발 및 운전

개발된 연속식 추출장치를 이용한 린코마이신의 추출이 실제로 가능한지 검증하면서 실제 회분식 1단 추출보다 얼마나 성능이 향상되었는지를 조사하기 위해 추출 실험을 시도하였다. 1 당 500mg의 린코마이신 standard를 첨가하여 만든 aqueous phase에 NH_4OH 를 사용하여 pH를 10으로 조정하여 실제의 배지 대신 사용하였고 이러한 aqueous phase와 solvent phase인 butanol을 각각 10ml/min : 10ml/min, 20ml/min : 10ml/min의 속도로 향류 접촉시키면서 각단에서의 solvent phase의 농도를 시간별로 sampling하여 HPLC로 린코마이신의 농도를 조사하였으며 실제 배양액의 경우에는 10ml/min:10 ml/min의 속도로 향류 접촉시키면서 조사하였다. 기 개발된 연속식 추출장치에서 사용한 수직형 settler는 flow rate의 변동을 자동조절할 수 있는 장점을 가지고 있으나 phase가 완전하게 분리되지 않는 문제점을 가지고 있기 때문에 이번 연구에서는 settler feeding pump로부터의 충격을 완화하고

상 분리가 쉽도록 특수 설계된 horizontal type의 settler로 교환한 연속식 추출장치를 개발하여 사용하였다.

마. 결정화공정

1) 냉각법에 의한 결정화 공정

린코마이신의 결정화를 위한 최적의 용매를 선정하기 위해서 acetone, toluene, butanol, chloroform, methanol 등 5가지의 용매를 사용하여 0°C ~ 40°C까지 온도를 변화시키면서 각각의 solvent-용액에서의 린코마이신의 농도를 HPLC로 분석하였다. 연속식 결정장치의 개발을 위한 기초 실험 중 batch crystallization에서는 비등점까지 온도를 높이면서 린코마이신 standard를 넣으며 증발시키다가 용액이 과포화 상태가 되면 각각 4°C로 고정된 water bath에 용액을 옮긴 후 한쪽은 교반하지 않고 crystal을 생성하였고, 다른 쪽은 계속 교반하면서 seed를 넣어 crystal을 생성시켰으며, 생성된 crystal의 size 및 균일성을 현미경으로 관찰하였다. 이와 같은 기초 실험을 바탕으로 연속식 결정화 장치를 개발하여 그 응용 가능성을 조사하였다.

2) 침전법에 의한 결정화 공정

한편 용매의 성질을 변화시켜 용해도를 감소시켜 침전시키는 방법인 침전법을 이용하여 결정화(crystallization)을 시도하였다. 이를 위해 여러 가지 다른 농도의 acetone-water 용매를 조사하여 최적 용매를 결정하였으며, 최적 acetone-water 용매를 250mg/ml의 린코마이신 standard solution에 첨가하여 4°C로 유지하면서 2시간 정치시킨 후 생성된 crystal을 여과에 의해 회수하여 최적 용매 부피비를 조사하였다. 또한 최적 용매부피비인 acetone-water 15:1에서 온도, seed 첨가 및 교반에 따른 결정화 kinetics를 조사하고, acetone-water 10:1 조건에서 교반에 따른 결정화 kinetics를 조사함으로써 최적 운전 조건을 확립하였다.

바. 추출 전처리 chromatography 공정 개발

활성탄을 흡착제로 선정하여 린코마이신의 흡착 가능성을 조사하였고 이와 함께 elution 조건을 조사하였다. 흡착 chromatography의 사용 가능성을 조사하기 위해 우선 *Streptomyces lincolensis* 발효액 50 ml에 흡착제의 양을 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5g으로 변화시키면서 첨가한 후 magnetic stirrer로 교반하면서 약 5분간 흡착제에 흡착시켰다. 이 후에 흡착제를 여과하여 제거하고 상등액만을 HPLC로 분석함으로써 흡착 정도를 조사하였다. 한편 Elution 조건을 조사하기 위해 린코마이신을 흡착한 흡착제를 분리한 후 흡착제 0.5 gram에 여러 pH의 물과 butanol, chloroform, acetone, methyl ethyl ketone 50 ml을 첨가한 후 magnetic stirrer로 교반하면서 약 5분간 접촉시켜 elution을 시도하였다.

사. 실제 린코마이신 배양액으로부터 Lab scale의 분리정제 및 결정화

먼저 세포를 여과하여 제거한 후 배양액 중의 린코마이신의 농도가 아직은 높지 않기 때문에 HPLC로 농도를 분석한 후 린코마이신의 농도가 1g/L 가 되도록 린코마이신 standard를 첨가시켰다. 이 배양액을 동일 부피의 butanol로 두 번 추출한 후 butanol을 증발시키고 1 ml의 증류수를 가해 재 용해시킨 후 15 ml의 acetone을 첨가하여 4°C로 유지하면서 2시간 동안 정치시켜 crystal을 침전시킨 후 여과에 의해 crystal을 회수하였다. 회수된 crystal의 순도를 검증하기 위해 물에 다시 녹여 HPLC로 분석하였다.

아. 실제 린코마이신 배양액으로부터 Pilot scale의 분리정제 및 결정화

제 1 세부과제에서 운전한 50 liter 발효조에서 수확한 배양액 10 liter의 배양액을 pilot scale의 분리정제를 위한 시료로 사용하였다. 추출용매로는 butanol을 사용하였으며 pilot scale crystallization을 위해 acetone을 이용한 침전법에 의한 결정화 및 재 결정화를 수행하였다. Lab scale의 실험 결과에 따라 pilot scale의

분리정제 및 결정화에 대한 scheme을 정하고 Lab scale의 실험을 통해 scheme의 가능성을 확인한 후 린코마이신의 pilot scale 분리정제 및 결정화를 다음과 같이 수행하였다.

- ① 배양액 10L을 연속원심분리를 하여 배양액과 cell을 분리한다.
- ② 10L의 배양액을 NH_4OH 를 이용하여 PH 10으로 적정한다.
- ③ 적정된 배양액에 1/2 배량의 butanol을 넣고 약 15분간 정치한다.
- ④ butanol을 빼내고 다시 1/2배량의 새로운 butanol과 접촉시키고 약 15분간 정치시킨 후 수거한 후 합친다 (1차 추출 완성).
- ⑤ 10L의 butanol에 PH 2로 적정한 water를 1/2배량으로 접촉시키고 약 15분 후 수거한다.
- ⑥ 다시 1/2배량의 water를 butanol과 약 15분간 접촉 후 수거하여 합친다 (2차 역 추출 완성).
- ⑦ 수거된 10L의 린코마이신 함유 water를 rotary evaporator를 사용하여 50ml로 농축시킨다.
- ⑧ 농축된 50ml의 린코마이신 함유 water에 15배량의 acetone을 첨가하여 약 두시간 4℃에서 정치시킨다.
- ⑨ Whatman여과지를 이용하여 침전물을 여과하여 다시 여과물에 50ml의 물을 혼합하여 다시 15배량의 acetone을 첨가하여 약 2시간 4℃에서 정치시킨다.
- ⑩ 다시 Whatman여과지를 이용하여 침전물 여과하여 vacuum dry하여 린코마이신의 crystal을 수거한다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 린코마이신의 HPLC 분석법 확립

실험방법에서 제시된 HPLC 분석조건을 사용하여 린코마이신의 분석을 위한 column을 선별하였다. Fig.3-1은 C₈ column에서의 린코마이신의 standard curve를 그리고 Fig.3-2는 C₁₈ column에서의 린코마이신의 standard curve를 나타내었다. 이 standard curve는 린코마이신을 methanol에 녹여서 작성한 것으로 C₈ column이 C₁₈ column보다 linearity가 우수하여 C₈ column을 주요 분석을 위한 column으로 선정하였다. 이를 위한 분석조건은 실험 방법 및 재료에서 정리한 바와 같으며 이 결과를 제1세부 및 제1협동과제에 알려주어 각 세부과제에서 린코마이신 분석방법을 확립하였다. 특히 제1협동과제의 Bioassay법과 비교해본 결과 린코마이신 standard에 의한 Bioassay는 HPLC방법과 일치함을 알 수 있었다.

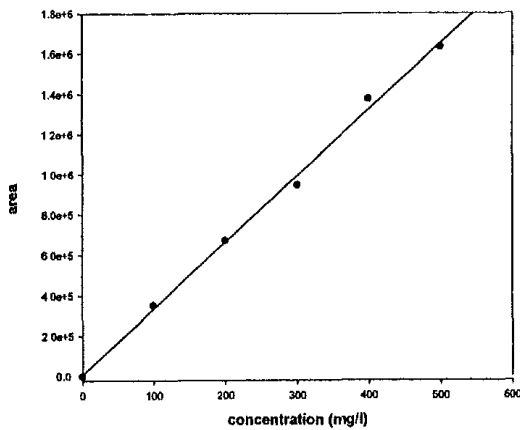


Fig.3-1 Standard curve of Lincomycin.(C₈ column)

$$r=0.9984, y=9319.5x+3287.2$$

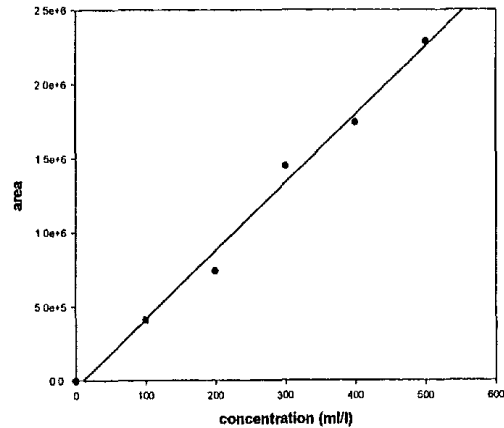


Fig.3-2 Standard curve of Lincomycin. (C₁₈ column)

$$r=0.9950, y=4612.3x-48480.7$$

한편 HPLC에 의하여 분석이 가능하여 린코마이신의 물에 대한 용해도를 조사하였고 그 결과를 Fig.3-3에 나타내었다. 이 결과에 의하면 린코마이신은 500 mg/l까지

는 물에 잘 녹으므로 product의 농도가 500 mg/l까지는 methanol 추출이 필요 없이 배양액을 직접 HPLC로 분석하는 것이 더 정확한 분석 방법임을 알 수 있었다.

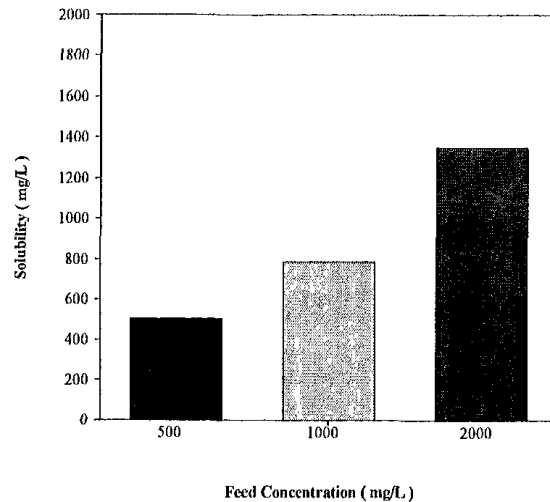


Fig. 3-3 Lincomycin solubility in ddH₂O

2. 세포파쇄공정

Fig.3-4는 여러가지 cell disruption 방법의 효율성을 비교한 것이다. 원래 링크마이신은 extracellular product이므로 cell disruption이 필요 없었으나 균주에서 항균능력이 있는 intracellular product의 존재 가능성이 제시되어 *Streptomyces* 균주에 대한 최적 disruption 방법을 제시하고자 하였다. Fig.3-4에 의하면 여러 가지 방법에 차이가 없음을 알 수 있고 bead beater를 사용하는 것이 가장 바람직하나 소용량의 경우 사용이 불편하므로 methanol로 추출하는 추출 방법도 권장할 만함을 알 수 있었다. 따라서 링크마이신의 일부가 세포 안에 존재함이 의심스러운 경우에는 methanol이나 최적 용매로 선정된 butanol로 확실히 cell wall을 파쇄한 후 분리정제로 들어가는 것이 바람직하다.

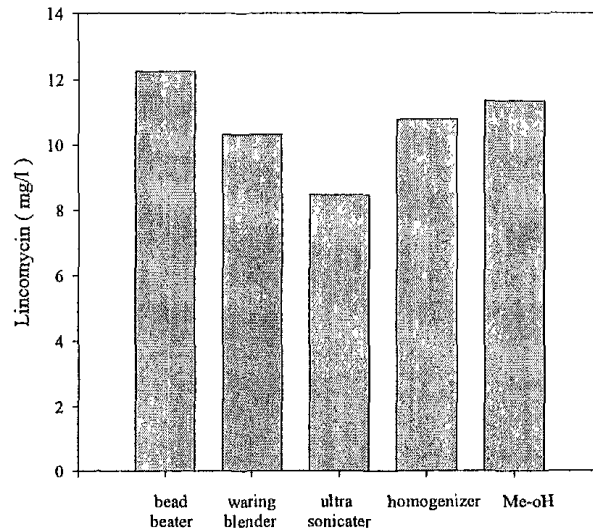


Fig.3-4 Comparison of various cell disrupting method

3. 세포분리공정

가. 세포여과공정

린코마이신은 지금까지의 연구결과 세포 밖으로 생산물을 분비하는 extracellular product임이 밝혀졌고, 이에 따라 린코마이신이 배양액 내에 존재하므로 분리 정제 과정의 첫 번째 공정은 이 배양액과 필요 없는 세포를 분리하는 여과공정이나 원심 분리공정이 될 것이다. 이러한 린코마이신 포함 세포배양액의 여과공정의 개발을 위해서는 lab scale의 filter test를 통하여 여러 가지 parameter들을 추정함으로써 차후 scale-up을 위해서도 기초 설계 자료들을 확보하는 것이 중요하다. 따라서 Ruth 방정식을 이용하여 filter의 저항, 린코마이신 생산균주 cake의 specific cake resistance 값 등을 추정하여 향후 rotary drum filter 등의 scale-up된 filter의 설계에 대비하였다.

Darcy의 법칙으로부터 유도된 정압여과에 관한 유속과 압력차와의 관계식은 다

음과 같다.

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

여기서 A는 filter area, V는 filtrate volume, ΔP 는 압력차, μ 는 점도, α 는 specific cake resistance, ρ_0 는 mass of cake solid per volume of filtrate, R_M 은 filter medium의 저항이다. 이 식을 0시간에서 filtrate volume(V)을 zero로 하고 변수분리하여 적분하면 다음과 같은 Ruth 방정식을 얻게 된다.

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

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

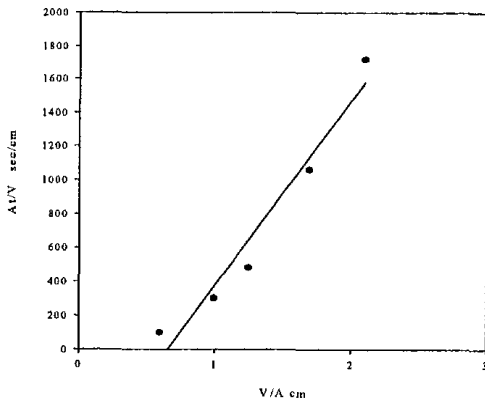


Fig.3-5 Ruth plot of *Streptomyces lincolnensis* at 150mmHg
 $r = 0.9748$ $y = 1099.39x - 721.7$

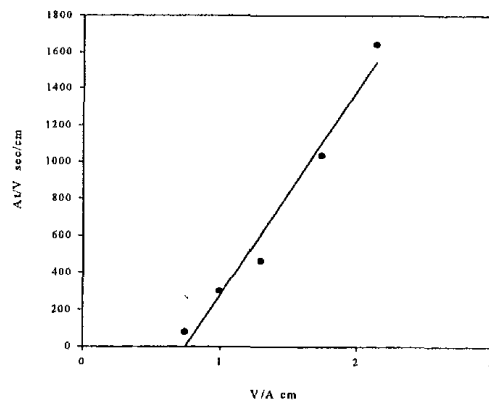


Fig.3-6 Ruth plot of *Streptomyces lincolnensis* at 200mmHg
 $r = 0.9866$ $y = 1109.54x - 830.8$

Fig.3-5는 lab scale 의 filter (Area = 2.2685 cm²)를 이용하여 150 mmHg의 진공으로 여과 실험한 결과를 Ruth plot한 것으로 직선을 나타내고 있고 이 직선의 기울기와 점도 (3.2 c.p ; Ostwald 점도계로 측정), ρ_0 (0.003 g/cm³) 등을 대입하여 specific cake resistance α 값을 구하면 9.48×10^{11} cm/g가 된다. 또한

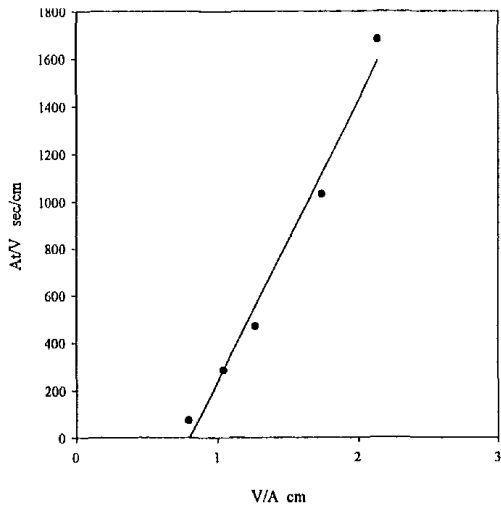


Fig. 3-7 Ruth plot of *Streptomyces lincolnensis* at 250mmHg
 $r = 0.9913$ $y = 1189.28x - 953.3$

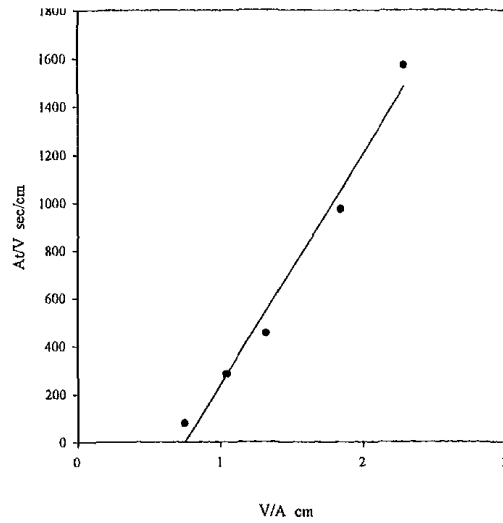


Fig.3-8 Ruth plot of *Streptomyces lincolnensis* at 300mmHg
 $r = 0.9898$ $y = 962.06x - 719.1$

Fig.3-6, Fig.3-7, Fig.3-8은 각각 진공도 200 mmHg, 250 mmHg, 300 mmHg에서의 여과실험 결과를 Ruth plot한 것으로 150 mmHg 의 경우와 동일하게 각 경우에서의 specific cake resistance α 값을 구할 수 있고 그 값은 각각 1.91×10^{12} cm/g, 1.17×10^{12} cm/g, 1.66×10^{12} cm/g이었다.

한편 α 값이 압력차에 따라 조금씩 증가하는 것으로 보아서는 린코마이신 생산용 배지의 cake이 압축성임에 틀림이 없다. 대부분의 생화학적 물질들은 압축성이기 때문에 그 해석이 위의 경우와 같이 간단하지 않다. 압축성일 경우 cake이 압축될 수록 여과속도가 줄어든다. 이러한 cake 의 압축성 정도를 다음의 식으로 나타낸다.

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

이때 α' 는 cake particle의 크기와 모양에 관계된 상수이고 S는 압축성의 종류를 나타내는 compressibility이며 보통 0.1-0.8 사이의 값을 갖게 되고 이 값이 zero 이면 완전 비 압축성을 나타내고 1에 가까이 커질수록 압축성이 큰 것을 나타

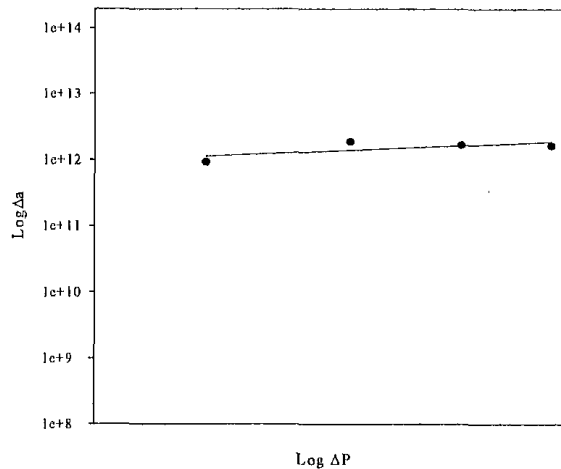


Fig. 3-9 Cake resistance versus pressure drop

낸다. 이 compressibility를 구하기 위해 여러 압력차에 따르는 specific cake resistance α 값의 변화를 log-log 그래프에 plot하면 Fig.3-9와 같이 되는데 그 기울기로부터 S 값을 구한 결과 0.07로서 린코마이신을 생산하는 *Streptomyces lincolnensis* 의 경우 거의 rigid 하다 할 수 있다.

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

나. 원심분리공정

본 연구의 원심분리 공정에서는 원심분리기의 용량과 운전 조건의 기본이 되는 settling velocity를 lab-scale의 bottle centrifuge test를 통해 추정하였다. 이것은 연속식 centrifuge의 용량인 Σ 값을 결정하는데 중요한 역할을 한다.

보통의 연속식 분리공정에 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.

$$\Sigma = \frac{2\pi lR^2\omega^2}{g} \quad (4)$$

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

또한 disc type 원심분리기의 경우 Σ 값은 다음과 같이 계산된다.

$$\Sigma = \frac{2\pi n\omega^2}{3g} \times (R_0^3 - R_1^3) \cot \theta \quad (5)$$

여기서 n 은 disc의 개수, ω 는 각속도로 나타낸 회전 속도, R_0 는 원심분리기의 반경, R_1 은 중심축으로부터 disc까지의 거리, θ 는 disc의 기울어진 각도이다. 따라서 보통 원심분리기 제조업자들은 각각 제품의 모델마다 Σ 값의 정보를 제공한다.

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

$$v_g = \frac{d^2}{18\mu} (\rho_s - \rho)g \quad (6)$$

여기서 d 은 cell particle의 직경, ρ_s 는 cell particle의 밀도, ρ 는 배양액의 밀도, g 는 중력가속도, μ 는 배양액의 점도이다.

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

$$Q = v_g \Sigma \quad (7)$$

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

하지만 (6)식에서의 모든 parameter들을 다 추정하지 못하기 때문에 작은 scale의 원심분리기로부터 이 값을 estimation하여 scale-up에 이용하는 것이 중요하다. 실험실 규모의 centrifuge를 사용하여 fermentor에서 배양한 배양산물을 5000rpm으로 원심분리하면서 시간에 따른 supernatant의 변화를 spectrophotometer 600nm에서 측정하였고 그 결과를 Fig.3-10에 나타내었다. 이 그림에 따르면 약 6분이면 더 이상 원심분리가 진행되지 않고 실제로도 cell이 없는 supernatant를 얻을 수 있었다.

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

$$v_g = \frac{g \ln\left(\frac{R_0}{R_1}\right)}{t \omega^2} \quad (8)$$

여기서 g 는 중력가속도, R_0 는 회전축으로부터 bowl 밑까지의 거리, R_1 은 회전축으로부터 수면까지의 거리, ω 는 각속도, t 는 Fig.3-10에서 구한 settling time이다. 이렇게 구한 *S. lincolnensis*의 v_g 값은 1.88×10^{-3} cm/sec이며, 이 값은 식(7)를 이용하여 주어진 처리용량 Q 로부터 원심분리기의 용량인 Σ 값을 계산하는데 사용됨으로써 적절한 크기의 원심분리기를 선정하는데 중요한 역할을 한다.

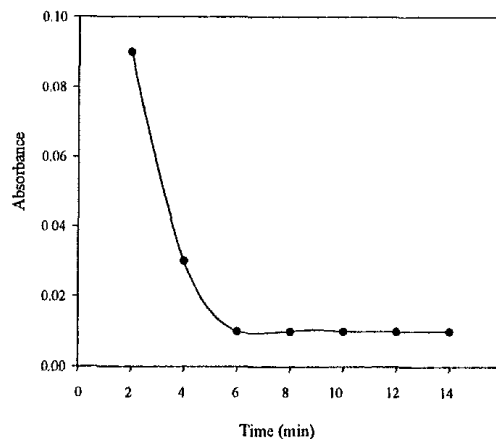


Fig. 3-10 Absorbance change of supernatant during centrifugation at 5000rpm

4. 추출공정 개발

가. two phase형성 조사

추출을 위한 최적 solvent를 선정하기 위해 먼저 배양액과 two phase를 형성하는 solvent를 선발하였다. 왜냐하면 추출에 의하여 린코마이신을 분리정제하기 위해서는 여러 단계의 aqueous phase와 solvent phase의 접촉에 따른 partition을 이용해야 하므로 aqueous phase와 two phase를 형성하지 않는 경우는 추출에 이용하기 곤란하기 때문이다. Table 3-1에 의하면 two phase를 형성하는 solvent로는 n-heptane, n-butyl acetate, n-hexane, toluene, methylene chloride, chloroform, n-butanol 등이며 따라서 이들 solvent중 린코마이신에 대한

Table 3-1 다양한 solvent들의 aqueous phase와의 phase 형성 비교

Solvent	Solvent phase
ethanol	one phase
methanol	one phase
ethylene glycol	one phase
acetone	one phase
n-heptane	up
n-butanol	up
n-butyl acetate	up
n-hexane	up
toluene	up
methylene chloride	down
chloroform	down

partition coefficient가 크고 무독하며 경제적인 solvent를 선정하는 것이 중요하다.

나. 추출용매선정

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. 이 밖에 값이 저렴해야 하고 생산품이나 환경에 무독해야 하는 것도 이상적 용매로서 중요한 성질이다. 본 연구에서는 린코마이신 추출공정 개발을 위한 첫 번째 단계로 최적의 aqueous phase와 용매(solvent)의 조합을 선정하고 추출공정 설계에 필요한 parameter들을 도출하기 위한 기초 자료를 조사하였다.

이때 성능 평가에 사용된 parameter인 percentage of extraction의 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

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

초기 용질 농도 y_F 인 F liter의 aqueous phase가 추출을 위해 공급되었다면 percentage of extraction p는 다음과 같이 주어진다.

$$p = \frac{Lx}{F y_F} \quad (10)$$

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

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

이러한 partition coefficient, percentage of extraction과 selectivity의 값이

클수록 분리정제의 성능 면에서 우수한 solvent와 aqueous phase의 조합 (combination)을 나타내고 있다. 이때 aqueous phase와 solvent phase의 비율이 일정할 경우 partition coefficient의 값이 클수록 percentage of extraction의 값이 커지므로 본 연구에서는 percentage of extraction(추출율)의 관점에서 최적 용매를 선정하였다. 한편 selectivity의 경우 세포 배양액 내의 불순물에 대한 정의 자체가 불가능하므로 HPLC histogram의 pattern에 의한 정성적인 평가만 수행하였다.

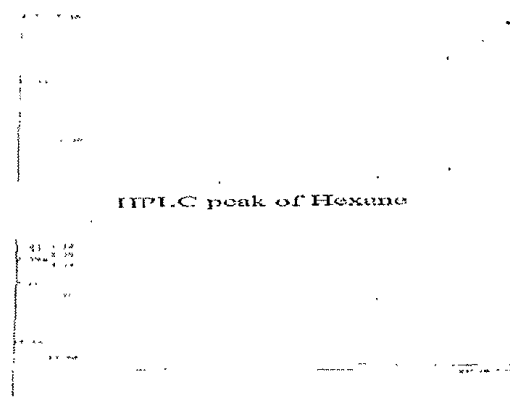
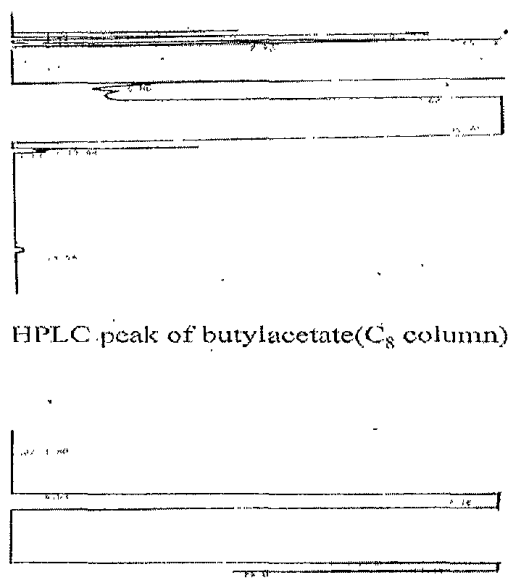


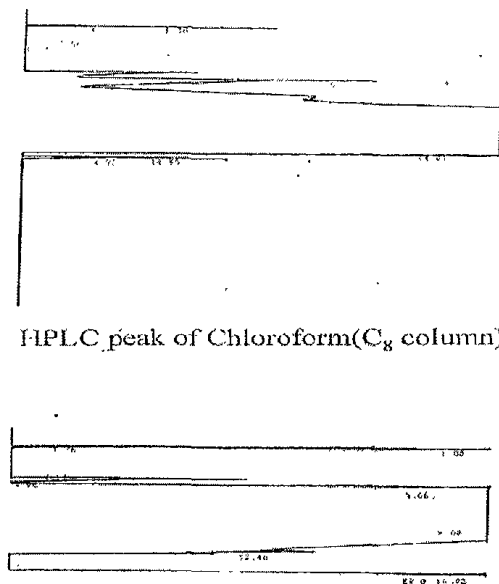
Fig. 3-11 HPLC peak of heptane

바로 위의 절에서 설명하였듯이 추출 용매를 선정하기 위해서 먼저 two phase를 형성하는 solvent를 선정하였고 이렇게 two phase를 형성하는 n-heptane, n-butyl acetate, n-hexane, toluene, methylene chloride, chloroform을 이용하여 링크마이신을 추출하였지만 n-hexane, n-heptane의 경우 Fig.3-11에서 보여 주듯이 거의 추출이 되지 않았으며 나머지 solvent들의 경우 추출은 되지만 solvent내의 잔 peak와 겹쳐서 정확한 분석이 불가능하였다. 그래서 C₈ Column 대신 C₁₈ column을 사용하였는데 역시 마찬가지로 solvent내의 성분과 링크마이신 peak가 겹쳐서 사용이 불가능하였다. 이러한 현상은 butyl acetate와 chloroform의 경우를 대표적으로 Fig.3-12와 Fig.3-13에서 보여주고 있다. 추출공정에서의 최적 용매는 분석도 용이해야 한다는 개념으로 추출율도 높고 peak도 겹치지 않는 용매를 선발하려 했으나 n-heptane, n-hexane의 경우에는 partition coefficient가 너무 낮아 추출이 되지

않았고 n-butyl acetate, toluene, methylene chloride, chloroform의 경우에는 HPLC peak가 겹쳐서 실패하였다(이 때까지 butanol은 test하지 않았음).



HPLC peak of butylacetate(C₈ column)



HPLC peak of Chloroform(C₈ column)

Fig. 3-12 HPLC peak of butylacetate

Fig.3-13 HPLC peak of chloroform

한편 solvent phase에서의 peak가 겹치더라도 이와 평형을 이루는 aqueous phase에서 린코마이신의 양을 분석하고 material balance에 의하여 solvent phase에서의 린코마이신의 양을 추정할 수 있으므로 전략을 수정하여 HPLC의 peak가 겹치더라도 추출율이 높은 용매를 선정하고자 하였다. 린코마이신의 분석은 solvent phase가 아닌 aqueous phase에서 수행하기로 하였고 추출율이 낮은 n-hexane, n-heptane은 조사 대상에서 제외하였다. Fig.3-14은 이러한 결과 중의 일부로서 조사한 용매 중 추출율이 가장 높았던 methylene chloride와 가장 낮았던 toluene의 경우 추출율을 비교하여 보여주고 있으며 methylene chloride의 경우에도 추출율이 그렇게 높지 않다는 것을 알 수 있었다. 이는 Fig.3-15에서 보여주듯이 추정된 분배계수가 methylene chloride의 경우에도 1.0을 조금 상회하는 정도이기 때문이라고 생각되며 이에 따라 회수율을 높이기 위해서는 여러 단으로 구성된 다단 추출장치가 필요함을 알 수 있었다.

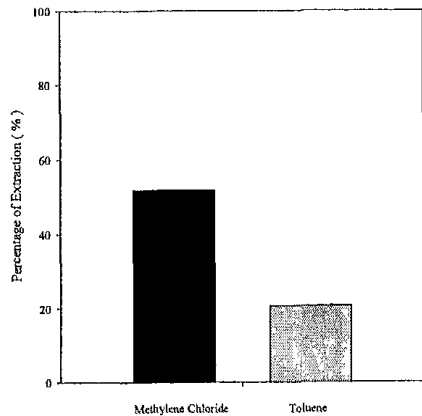


Fig. 3-14 Comparison of percentage of lincomycin concentration among various solvents. (feed concentration : 200mg/L, aqueous phase pH 7, volume ratio 1:1)

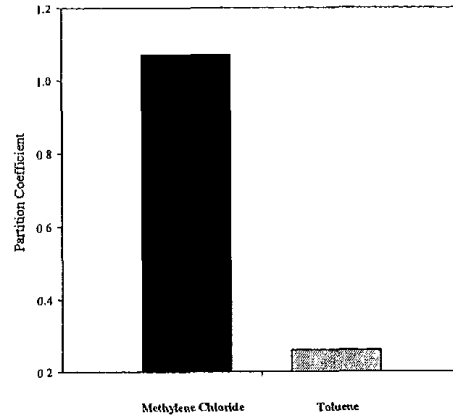


Fig. 3-15 Comparison of partition coefficient of lincomycin among various solvents. (feed concentration : 200mg/L, aqueous phase pH 7, volume ratio 1:1)

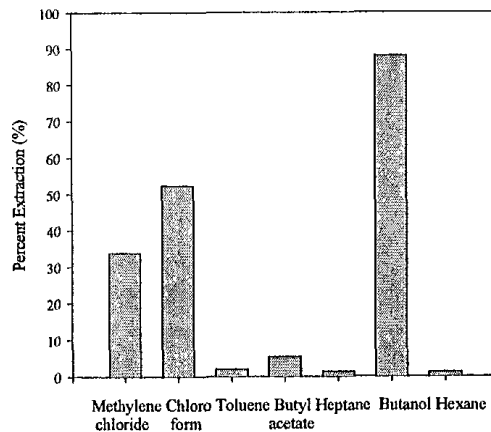


Fig. 3-16 Comparison of percent extraction of lincomycin with various solvent

n-butanol을 용매의 대상으로 조사하기 전까지는 methylene chloride와 chloroform이 비슷한 정도로 가장 우수한 추출율을 나타내어 잠정적인 최적 용매들로 정하고 pH 및 수용액상:용매상의 부피비에 따른 영향을 조사하였다. 하지만 나중에 butanol이 two phase를 형성하는 것을 알아내고 butanol에 의한 추출을 시도한 결과 butanol은 solvent phase에서의 peak도 겹치지 않고 (Fig. 3-23C 참조) Fig.3-16에서 보여주는 것 같이 추출율도 methylene chloride나 chloroform을 비롯

한 기타 용매보다 우수한 것으로 판명되어 결국 린코마이신을 위한 최적의 용매는 추출율도 우수하고 용매상에서 HPLC peak도 겹치지 않아 분석이 용이한 butanol로 결론지었다.

다. pH에 따른 추출율의 변화

린코마이신은 물에 용해되어 이온의 형태로 존재하기 때문에 dissociation extraction을 수행하며 이 경우 aqueous phase에서의 pH에 따라서 추출 효능이 달라질 것으로 예상된다. 따라서 aqueous phase에서의 pH를 달리하고 여러 solvent로 추출하여 최적 pH 조건을 구하고자 하였다.

Butanol이 최적 용매로 선정되기 전의 잠정적인 최적 용매인 methylene chloride와 chloroform을 용매로 사용하였으며 나중에 butanol을 용매로 사용할 경우 pH에 따른 추출율의 변화를 조사하였다. Methylene chloride와 chloroform을 용매로 사용할 경우 solvent phase에서의 HPLC peak가 겹치므로 분석하기 어려워 여러 pH의 aqueous phase를 methylene chloride이나 chloroform에 의해 접촉시키면서 1차 추출한 후 solvent phase를 다시 ddH₂O로 stripping하여 최적 pH 조건을 간접적으로 선정하였다. Fig. 3-17는 여러 가지 pH의 aqueous phase를 methylene chloride로 추출한 후 solvent phase를 다시 ddH₂O의 aqueous phase로 추출하여 HPLC로 분석한 결과이며 Fig. 3-18는 여러 가지 pH의 aqueous phase를 chloroform으로 추출한 후 같은 방법으로 처리한 결과를 나타내고 있다. 두 가지 경우 모두 aqueous phase의 pH에 따라 추출 효율이 차이가 크음을 알 수 있어서 전형적인 dissociation extraction의 형태를 보여주고 있고, 첫 번째 추출에서의 수용액상에서의 pH는 높을수록 추출율이 증가함을 알 수 있었다. 또한 2번째 aqueous phase에서의 린코마이신의 농도가 methylene chloride의 경우가 chloroform보다 약간 높지만 거의 비슷한 수준이어서 잠정적인 최적용매는 methylene chloride와 chloroform으로 하여 계속 실험이 진행되었고 후에 butanol을 최종적인 최적 용매로 선정하여 실험이 진

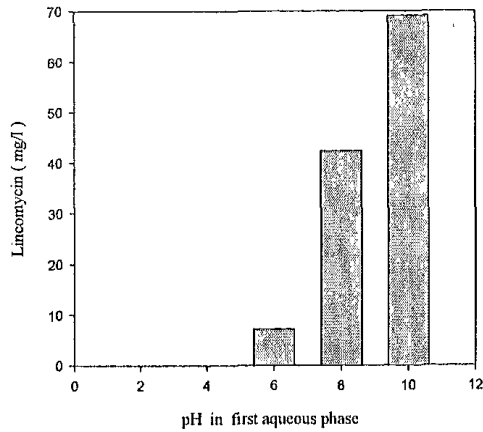


Fig.3-17 Comparison of percent extraction by various aqueous pH (solvent=methylene chloride)

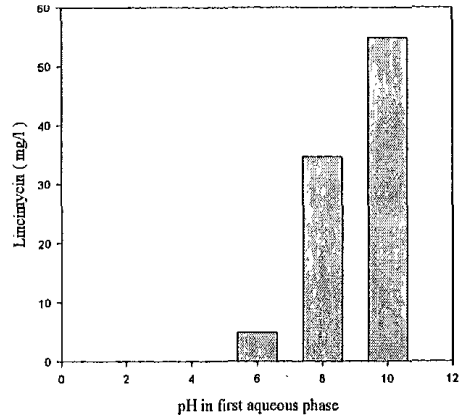


Fig. 3-18 Comparison of percent extraction by various aqueous pH (solvent=chloroform)

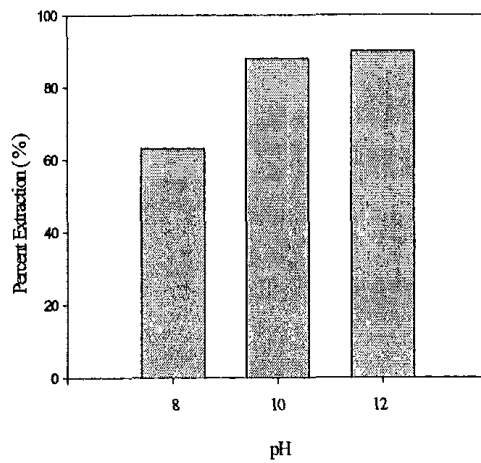
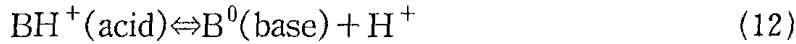


Fig 3-19 Comparison of percent extraction by various aqueous pH (solvent=butanol)

행되었고 그 결과는 Fig.3-19에 나타내었다. 이렇게 Fig.3-17, Fig.3-18과 Fig.3-19에서 보여주듯이 수용액상의 pH가 증가함에 따라 추출율이 증가하는 현상은 다음과 같이 설명될 수 있다. 링크마이신은 pK_a 값이 7.6인 weak base이다. Weak base는 aqueous phase에서 다음과 같이 부분적으로 해리된다.



이때 해리상수는 다음과 같이 정의된다.

$$K_a = \frac{[B^0]_w \cdot [H^+]_w}{[BH^+]_w} \quad (13)$$

만일 해리하지 않고 용매상과 평형에 이르렀을 때의 고유 분배계수 (intrinsic distribution coefficient)는 다음과 같다.

$$K = \frac{[B^0]_o}{[B^0]_w} \quad (14)$$

여기서 $[B^0]_o$ 는 base의 solvent phase에서의 농도를 나타내고 $[B^0]_w$ 는 base의 aqueous phase에서의 농도를 나타낸다. 한편 실제로 base는 aqueous phase에서는 해리하지만 solvent phase에서는 해리하지 않기 때문에 실제의 겉보기 분배계수 (observed distribution coefficients)는 다음과 같이 나타낸다.

$$K' = \frac{[B^0]_o}{[B^0]_w + [BH^+]_w} \quad (15)$$

한편 base의 경우 해리상수는 식 13)과 같이 정의되므로 식 13)으로부터 aqueous phase에서의 acid의 농도를 구하면 식 16)으로 나타낼 수 있다.

$$[BH^+]_w = \frac{[B^0]_w \cdot [H^+]_w}{K_a} \quad (16)$$

따라서 식 16)를 식 15)에 대입하여 정리하면 다음과 같이 겔보기 분배계수와 고유 분배계수와의 관계를 얻을 수 있다.

$$K' = \frac{[B^0]_o}{[B^0]_w(1 + \frac{[H^+]_w}{K_a})} = \frac{K}{(1 + \frac{[H^+]_w}{K_a})} \quad (17)$$

그러므로 식 17)에 의하면 aqueous phase에서의 pH가 증가할 때 즉 H⁺의 농도가 감소할수록 측정되는 겔보기 분배계수가 증가함을 알 수 있다.

라. 수용액상 : 용매상의 부피비율에 따른 추출율의 변화

위에서 pH에 따라 분배계수가 변화하면서 추출율이 변하는 현상을 살펴보았다. 한편 일정한 분배계수 아래에서도 수용액상과 용매상과의 부피비율이 변하면 추출율이 변할 것으로 예상되어 이러한 변화의 pattern에 대하여 조사하여 최적 추출조건을 확립하고 최적 추출공정 개발을 위한 전략을 수립하려 하였다.

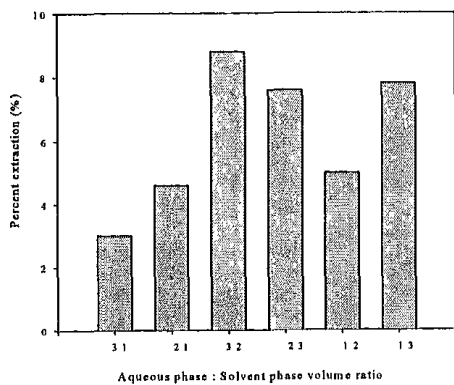


Fig. 3-20 Comparison of percent extraction according to Aqueous / Solvent phase volume ratio change with aqueous phase pH 2 (Solvent : Chloroform)

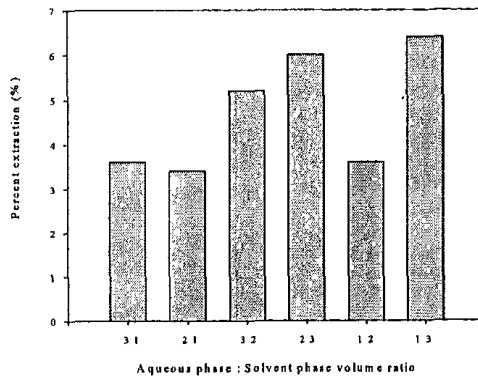


Fig. 3-21 Comparison of percent extraction according to Aqueous / Solvent phase volume ratio change with aqueous phase pH 6 (Solvent : Chloroform)

이를 위하여 우선 잠정적인 최적 용매인 chloroform을 용매로 하여 여러 pH조건에서 수용액상(aqueous phase)과 용매상(solvent phase)의 부피의 비를 변화시키면서 추출율의 변화를 조사하였다. Fig. 3-20에서 Fig. 3-25은 이 경우의 결과를 나타낸 것이다.

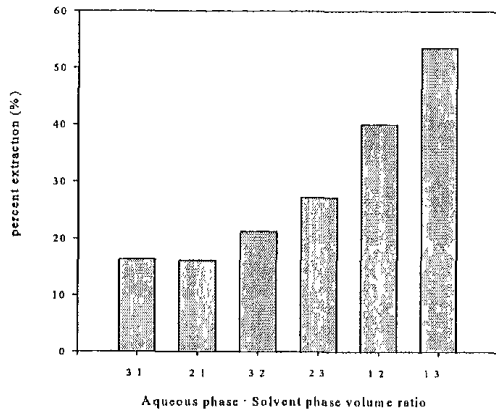


Fig. 3-22 Comparison of percent extraction according to aqueous / Solvent phase volume ratio change with aqueous phase pH 8 (Solvent : Chloroform)

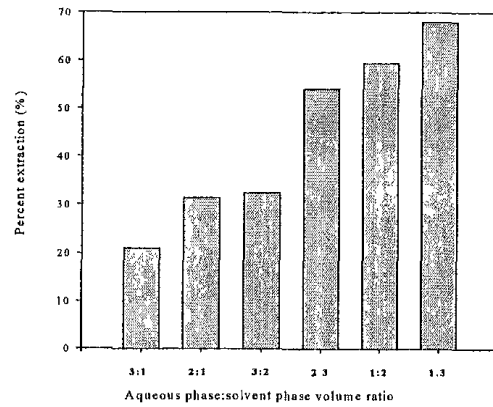


Fig. 3-23 Comparison of percent extraction according to aqueous / Solvent phase volume ratio change with aqueous phase pH 10 (Solvent : Chloroform)

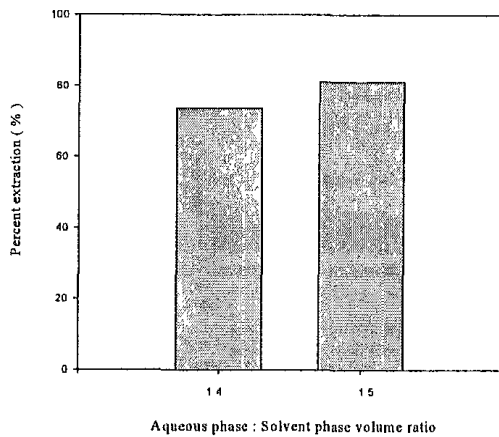


Fig. 3-24 Comparison of percent extraction according to aqueous / solvent phase volume ratio change with aqueous phase pH 10 (Solvent : Chloroform)

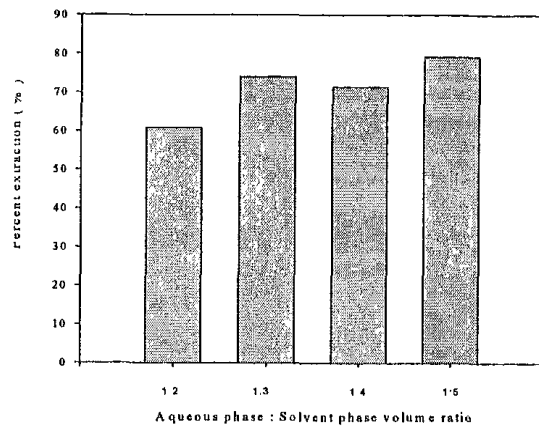


Fig. 3-25 Comparison of percent extraction according to aqueous / solvent phase volume ratio change with aqueous phase pH 12 (Solvent : Chloroform)

Fig. 3-20과 Fig. 3-21은 pH가 각각 2와 6일 경우 수용액상:용매상의 부피비율에 따른 추출율의 변화를 나타내었다. pH가 낮은 경우에는 pH에 따른 추출율의 변화 실험에서 살펴 본 것처럼 추출율이 10 % 미만의 낮은 값을 보여 주고 있고, 두가지 pH 모두의 경우에, 전체적인 경향을 살펴보면 수용액상:용매상의 부피비율이 커지면서(용매상의 상대적 부피가 증가하면서) 추출율이 증가하는 것을 목격할 수 있다. 하지만 data가 다소 흔들리는 것이 목격되는데 주요 원인은 낮은 추출율로 인하여 solvent phase로 넘어간 락탐의 양이 적음으로 인하여 HPLC 분석상의 오차가 material balance에 의한 계산 과정에서 상대적으로 많이 증폭되었기 때문이라고 생각된다. Fig. 3-22, Fig.3-23는 pH가 각각 8와 10의 알칼리 영역일 경우 수용액상:용매상의 부피비율에 따른 추출율의 변화를 나타내고 있는데 pH가 산성 영역과는 달리 pH가 증가함에 따라 추출율도 증가하지만 어떤 pH 조건이든지 data의 흔들림이 거의 없이 수용액상:용매상의 부피비율이 커지면서 추출율이 증가하는 것을 목격할 수 있다. Fig.3-24은 Fig.3-23와 같은 pH 10에서 부피비율을 더욱 더 높여 추출율을 80 % 이상 높이려는 시도를 한 결과를 나타내었는데 역시 수용액상:용매상의 부피비율이 1:4에서 1:5로 증가하면서 추출율이 계속 증가하여 추출율이 80 %를 넘을 수 있다는 것이 목격되었다. 그림 Fig.3-25은 pH를 더욱 더 올린 조건에서의 수용액상:용매상의 부피비율에 따른 추출율의 변화를 나타내고 있는데 앞의 그림의 경우와 마찬가지로 수용액상:용매상의 부피비율이 커지면서 추출율이 증가하는 것을 목격할 수 있으나 pH 증가에 따른 더 이상의 추출율의 증가가 목격되지 않아 chloroform을 용매로 사용할 경우 수용액상의 최적 pH는 10 정도임을 알 수 있었다. 따라서 일정한 수용액상:용매상의 부피비율에서 pH가 증가하면 추출율이 증가하나 어느 정도 pH이상에서는 더 이상 증가하지 않아 최적 수용액상의 pH가 존재함을 알 수 있었고, 또한 어떤 pH 조건이든지 수용액상:용매상의 부피비율이 증가할 경우에 추출율은 계속 증가하나 증가폭이 감소하게 되어 결국 수용액상:용매상의 부피비율이 증가할 때 추가적으로 들어가는 용매의 비용을 고려하면 최적의

수용액상:용매상의 부피비율이 존재함도 알 수 있었다.

Fig.3-26, Fig.3-27, Fig.3-28은 나중에 two phase를 형성한다는 것이 확인되어 시도한 butanol과의 추출율을 비교한 것이다. 앞서 최적 용매의 선정에서 언급하였듯이 butanol은 solvent phase에서의 peak도 겹치지 않아 분석도 용이하고 추출율도 chloroform이나 이와 비슷한 methylene chloride보다 우수한 것으로 판명되어 결국 최적의 용매를 butanol로 결론짓고, butanol에 의한 추출과정에서 aqueous phase에서의 pH의 영향과 수용액상:용매상의 부피비율에 대한 영향을 조사하였다.

Butanol의 경우도 pH가 낮은 산성 영역에서는 추출율이 낮을 것으로 예상하여 생략하고 알칼리 영역인 pH8(Fig.3-26), pH10(Fig.3-27), pH12(Fig.3-28)에서 각각 수용액상:용매상의 부피비율에 대한 영향을 조사하였다. 그 결과 chloroform의 경우와 마찬가지로 pH가 증가할수록 추출율이 증가하였으며 같은 pH에서도 수용액상:용매상의 부피비율이 증가하면서 추출율이 증가됨을 목격할 수 있었으나 그림에서 보는 바와 같이 pH에 따른 증가폭이나 수용액상:용매상의 부피비율이 증가함에 따른 증가폭은 chloroform의 경우와 비교하면 극히 미세한 증가에 불과하여 butanol에 의한 추출의 경우 최적 pH는 10, 최적의 수용액상:용매상의 부피비율은 1:1로 결론지었다.

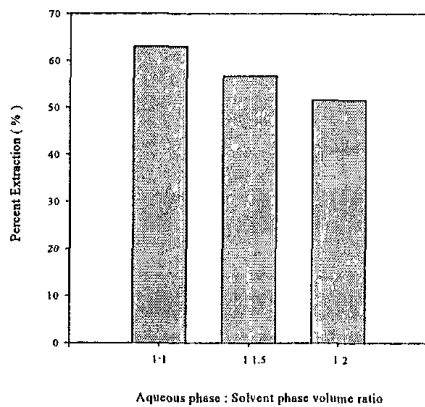


Fig. 3-26 Comparison of percent extraction according to aqueous / solvent phase volume ratio change with aqueous phase pH 8. (Solvent : butanol)

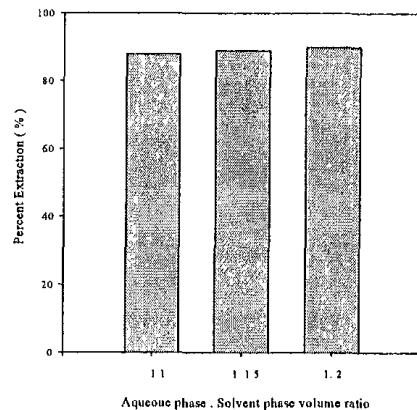


Fig. 3-27 Comparison of percent extraction according to aqueous / solvent phase volume ratio change with aqueous phase pH 10 (Solvent : butanol)

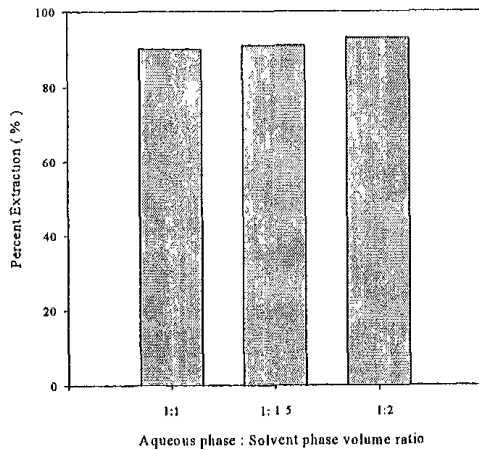


Fig. 3-28 Comparison of percent extraction according to aqueous / solvent phase volume ratio change with aqueous phase pH 12. (Solvent : butanol)

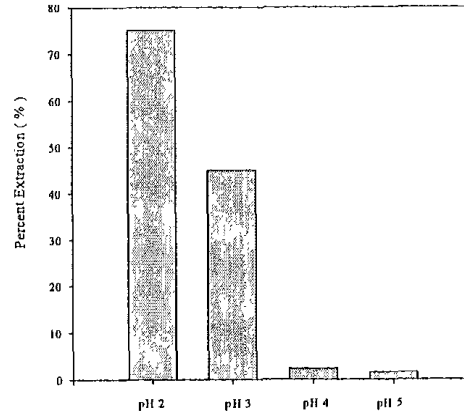


Fig. 3-29 Comparison of percent extraction by various secondary aqueous phase pH

마. 회분식 추출공정

1) Dissociative extraction

가) 실제배양액의 추출에 의한 정제

Fig.3-29는 butanol에 의한 1차 추출 후 수용액에 의해 2차로 추출함으로써 불순물을 줄이려는 전략으로 2차 추출시 수용액의 pH 조건을 결정하기 위하여 pH를 변화시키면서 2차 추출시 추출율의 변화를 조사한 결과이다. 1차 추출시 pH가 높아짐에 따라 solvent phase에 친화적으로 움직인다는 사실(추출율이 높아짐)로부터 2차 추출에서 일단 수용액 층으로 링크마이신을 많이 되들려 보내기 위해서는 분배계수가 낮아지게 하는 pH 조건 즉 pH를 낮추는 것이 좋은 전략임을 유추할 수 있었으며 이것은 Fig.3-29에서 볼 수 있듯이 실제 실험에서도 증명이 되었다. 그림에서 2차 추출을 위한 수용액상에서의 pH가 낮을수록 추출율이 높음을 알 수 있다. 따라서 2차 추출을 위해서는 수용액을 pH 2 정도로 낮추어 1차 추출물과 접촉시켜 대부분의 링크마이신을 다시 수용액상으로 옮긴 후 butanol에 의하여 다시 추출하는 전략이 바람직함을 알 수 있다.

여태까지의 추출에 대한 결과들을 정리하면 최적 용매는 butanol, 최적 수용액상:

용매상의 부피비율은 1:1, 1차 추출 시 수용액상의 최적 pH는 10, 2차 추출 시 수용액상의 최적 pH는 2이다. 2차 추출에 의해 린코마이신의 정제가 진행될 수 있는지 증명하기 위해서 지금까지의 실험에서 얻은 결과들을 종합하여 Fig. 3-30에 나와 있는 것과 같은 scheme으로 2차 추출을 시도하였다. 그림에서 알 수 있듯이 우선 1차 추출을 위해 수용액상(1)의 pH를 10으로 하고 1차 추출을 한 후에 용매상(2)을 pH 2의 새로운 수용액상(3)과 접촉시켜 린코마이신을 수용액상(3)으로 옮긴다. 그리고 2차 추출을 위해 수용액의 pH를 10으로 조절한 후(5) 평형에 있는 용매상(4)을 버리고 새로운 용매상(6)으로 린코마이신을 다시 옮기는 scheme으로 되어 있다.

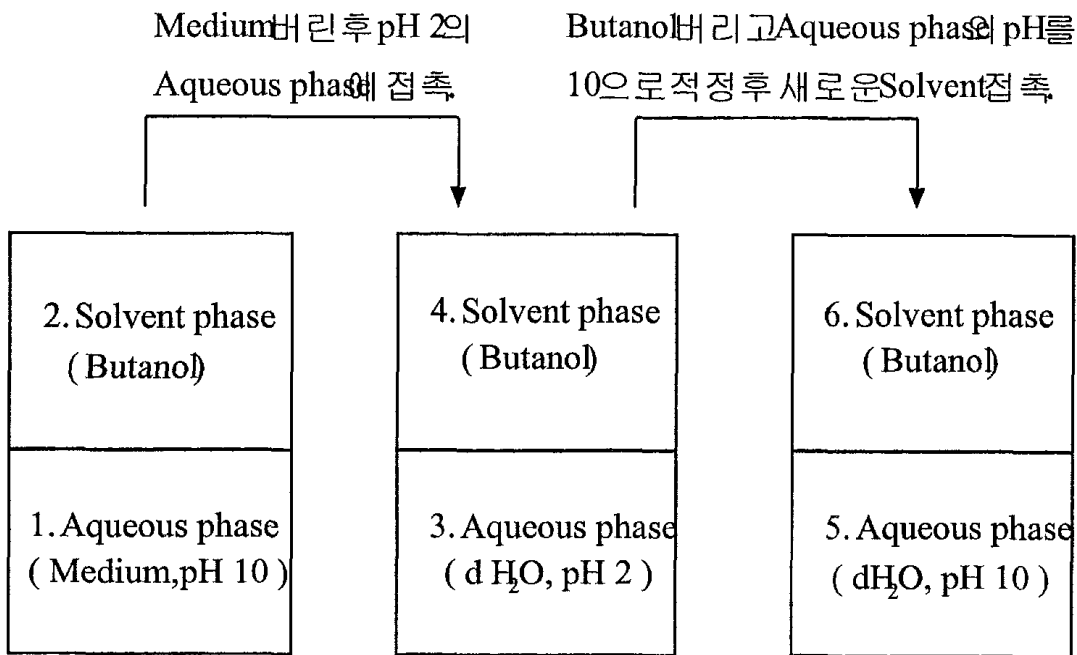


Fig. 3-30 Dissociative extraction strategy

다음의 Fig. 3-31 A, B, C는 실제 배양액으로부터 린코마이신을 1,2차 추출한 결과로, 이러한 1,2차 추출의 각 단계에서의 수용액상과 용매상에서의 HPLC chromatogram을 나타낸 것이다. 1차 추출의 aqueous phase(1)의 첫 부분의 큰 peak

가 배양액 내에 존재하는 여러 불순물을 나타낸다. 추출 단계가 진행되면서 수율이 줄어들어 분석에 오차가 생기는 것을 최소화하기 위해 배양한 배양액의 린코마이신 함량을 분석한 후 (100 mg/1), 시약으로 구입한 린코마이신을 첨가하여 500 mg/1의 린코마이신이 포함된 배양액을 시료로 사용하였다. 1차 추출의 solvent phase(2)의 histogram을 살펴보면 초반의 불순물 peak가 많이 줄어들었지만 여전히 8분대의 린코마이신 peak에 비해 많음을 알 수 있다. 이 solven phase(2)를 pH 2의 aqueous phase(3)와 접촉한 결과의 histogram을 살펴보면 불순물이 많이 줄었지만 린코마이신도 많이 줄었음을 알 수 있다. 그 이유는 불순물 뿐 만 아니라 린코마이신의 일부도 완전히 aqueous phase로 가지 못했기 때문이며 이 사실은 이때 평형에 있는 solvent phase(4)에 나타나고 있는 수용액으로 가지 못한 불순물 peak와 린코마이신 peak로부터 확인할 수 있다. 2차 추출의 결과 solvent phase(6)에서의 histogram을 1차 추출 후 solvent phase(2)에서의 histogram과 비교해 보면 불순물이 크게 줄었고 린코마이신도 다소 줄어들어 린코마이신의 순도는 크게 상승됨을 확실히 증명하여 보였으나 수율은 줄어들었음을 알 수 있다.

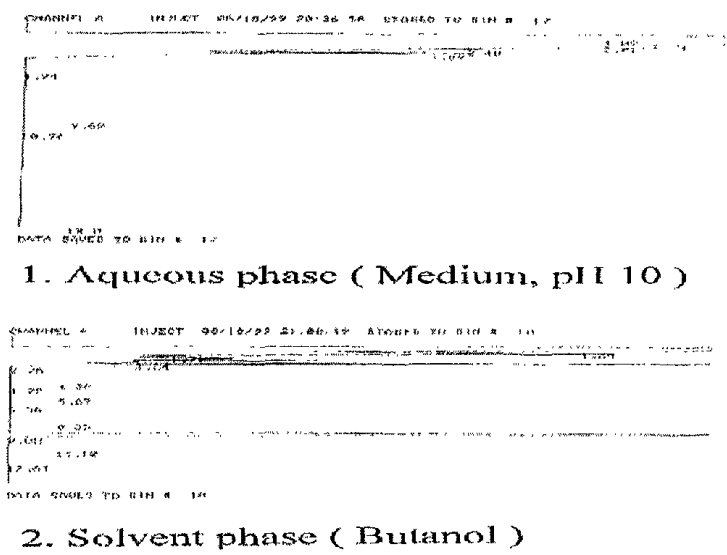


Fig. 3-31 A. HPLC chromatogram at 1st step of dissociative extraction

```

      4.0  5.20
      5.20  5.61
      6.40  5.81
      7.20  6.16
      8.20  6.16
      12.11
    
```

DATA SAVED TO BIN # 19

3. Aqueous phase (dH₂O, pH 2)

```

CHANNEL A      INJECT 08/16/99 21:47:38 STORED TO BIN # 24
-----
      5.20  6.26
      6.40  4.58
      7.20  5.29
      8.20  6.58
      9.00  8.37
      10.00  13.72
      11.15  13.72
      12.60
    
```

DATA SAVED TO BIN # 24

4. Solvent phase (Butanol)

Fig. 3-31 B. HPLC chromatogram at 2nd step of dissociative extraction

```

CHANNEL A      INJECT 08/18/99 22:01:45 STORED TO BIN # 25
-----
      1.00  1.18
      1.24
      1.61  2.42
      1.95
      12.62
    
```

DATA SAVED TO BIN # 25

5. Aqueous phase (dH₂O, pH 10)

```

CHANNEL A      INJECT 08/18/99 22:15:27 STORED TO BIN # 26
-----
      1.22  1.38
      1.40  3.15
      1.55  4.42
      1.65  5.04
      1.18  8.44
      11.18
    
```

DATA SAVED TO BIN # 26

6. Solvent phase (Butanol)

Fig. 3-31 C. HPLC chromatogram at 3rd step of dissociative extraction

이러한 결과는 Fig. 3-32에 잘 정리되어 있으며 그림으로부터 2차에 걸친 추출의 결과 린코마이신의 수율은 60 %에도 못 미침을 알 수 있다. 이렇게 2차 추출 후 린코마이신의 수율이 줄어든 이유는 완전히 한쪽으로 partition되지 못하고 다른 층에 남아 있던 린코마이신이 다른 층을 버릴 때 버려지기 때문이다. 따라서 수율을 올리기 위해서는 버려지는 층에 남아 있는 린코마이신을 다시 추출해야 하며 이를 위해서는 여러 단의 추출 공정이 필요하게 된다.

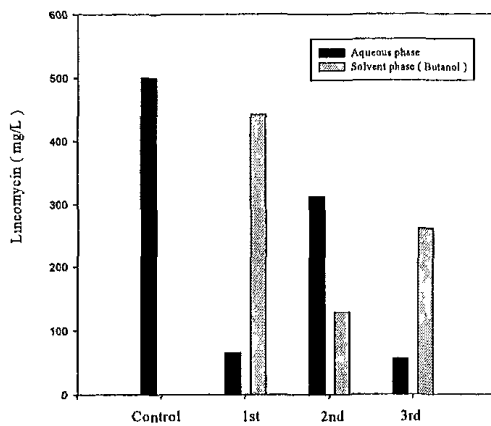


Fig. 3-32 Comparison of lincomycin extraction in dissociative extraction

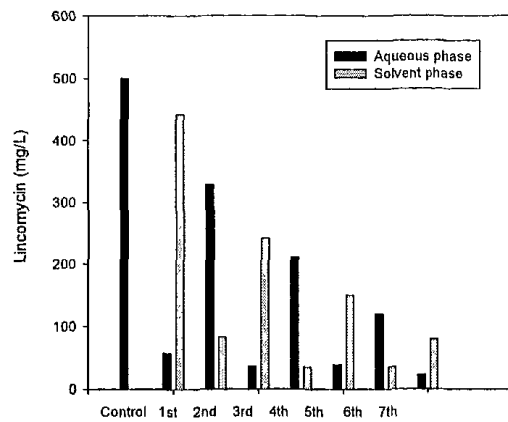


Fig. 3-33 Comparison of lincomycin concentration at various steps of dissociative extraction

나) Dissociative extraction에서 추출 횟수에 따른 추출 회수율 조사

pH의 변화에 따른 분배도의 변화를 이용하여 정제하는 dissociative extraction을 린코마이신의 추출 및 정제의 전략으로 제시하였다. 이 과정에서 추출 횟수가 증가할수록 정제에 의한 순도는 증가하나 추출의 수율은 계속하여 떨어지는 경향이 보고되었다. Dissociative extraction을 반복할 경우 각 solvent phase와 aqueous phase에서의 린코마이신의 농도를 조사한 그림이 Fig. 3-33에 나와 있다. 이 그림에 의해 결과에서 예측되었던 것처럼 6회의 재 추출을 시도한 결과 횟수가 증가할수록 추출의 수율이 감소됨이 판명되었다. 또한 이러한 농도 조사로부터 각 단계별 solvent phase와 aqueous phase의 물질수지를 확인할 수 있었고, 이로부터 추출을

반복함에 따라 추출 수율이 감소하는 이유가 버려지는 solvent phase나 aqueous phase에 평형에 이른 소량의 린코마이신이 존재하기 때문임을 알 수 있었다. 따라서 Dissociative extraction의 구조상 분배계수가 무한대가 되지 않는 한 린코마이신이 버려지는 것은 피할 수 없는 문제이므로 수율의 문제를 위해서는 가급적 단수를 줄이는 것이 바람직함을 알 수 있었다. 따라서 dissociative extraction의 단수가 증가할수록 정제도는 증가하나 수율이 줄어들므로 최종 제품의 요구되는 순도를 만족시키는 범위 하에서 최소한의 단수가 바람직함을 알 수 있었다. 본 연구의 기본 목표인 사료첨가제로서의 린코마이신은 정제도가 크게 문제되지 않으므로 최적 단수는 1-2단 정도로 생각된다.

2) 회분식 다단 추출

Dissociative extraction에서는 solvent phase와 평형에 있는 aqueous phase에 잔존하는 린코마이신이 버려지기 때문에 추출 회수율이 낮아지기 때문에 추출 회수율을 높이기 위해 추출 후 버려지는 aqueous phase를 새로운 solvent로 계속하여 추출하는 회분식 다단 추출을 시도하였다. Fig. 3-34와 Fig. 3-35는 용매와 액상의 부피비를 달리하면서 회분식 다단 추출을 시도한 결과를 나타내고 있다. 첫 번째 그래프의 용매상에서의 농도가 높은 이유는 접촉된 용매의 부피비가 1/4로 줄어들어 따른 농축 효과 때문이다. 4번에 걸친 추출 결과 추출 효율이 96.9 %임을 알 수 있었고 회분식 다단 추출에 의해 충분한 추출 수율을 보장받을 수 있음을 알 수 있었다. Fig. 3-35의 경우는 Fig. 3-34의 경우보다 추출율이 단수에 따라 급격히 증가함을 알 수 있는데 이는 일부 비선형 평형관계와 부피비의 영향에 기인함으로 생각된다. 따라서 두 경우 모두 추출 단수가 늘어나면서 추출 수율이 높아짐을 알 수 있었다.

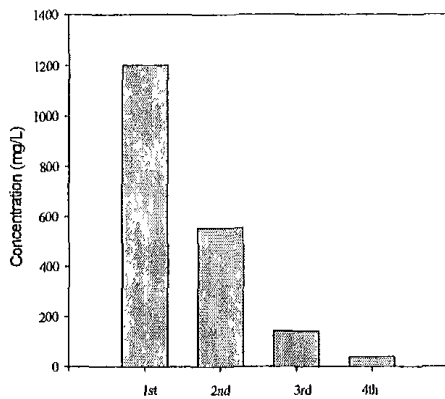


Fig. 3-34 Extraction efficiency by change of solvent volume (feed : 500mg/L, Aqueous : Solvent=1:1/4)

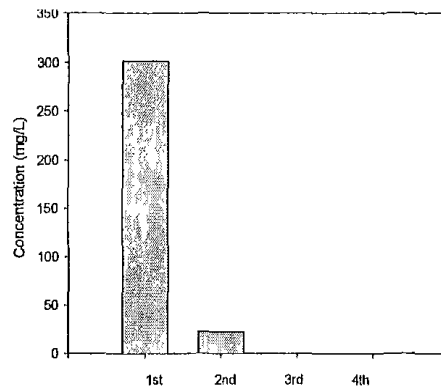


Fig. 3-35 Extraction efficiency by change of solvent volume (feed : 500mg/L, Aqueous : Solvent = 1:1)

바. 연속식 추출공정 개발 및 운전

분리정제공정을 효율적으로 수행하기 위해서는 연속식 공정이 필요하다. 더욱이 3차 추출까지 수행해야 하고 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, 3차 추출공정의 액-액 접촉이 효율적이면서 연속적으로 이루어질 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 이루어질 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)접촉식 보다 효율적이므로 본 연구에서는 향류 다단식 연속 추출장치를 개발하였다. 실제 공정에서는 요구되는 추출율에 따라 더 많은 단수가 사용될 수 있으나 본 연구에서는 실제 공정의 한 모델로 3단을 정하여 개발하였다.

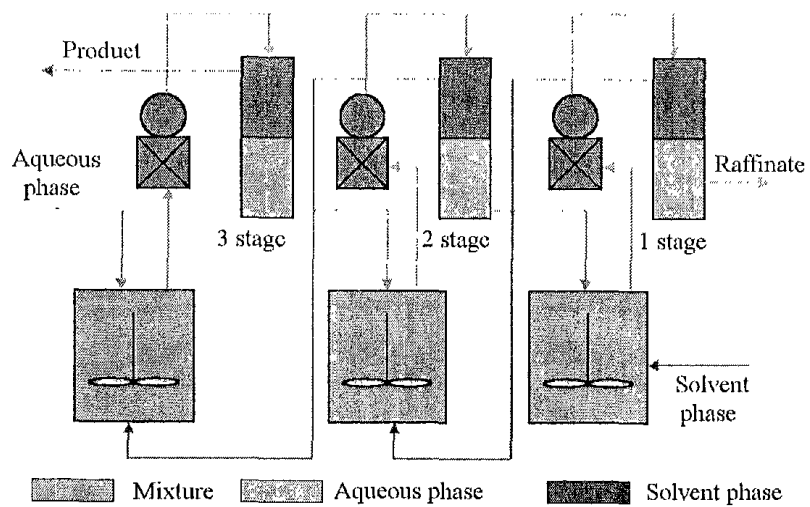


Fig.3-36 Diagram of continuous multistage counter-current extraction system with vertical settler

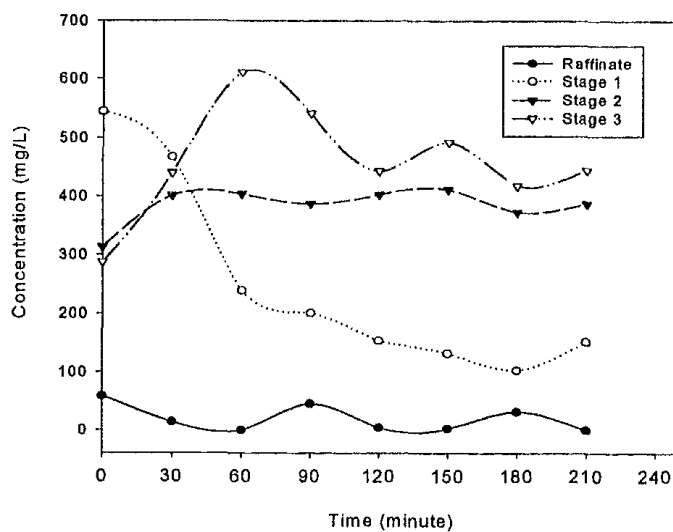


Fig.3-37 Time course change of Incomycin concentration in each stage (A=10ml/min, S=5ml/min)

Fig.3-36은 개발된 3단식 연속 추출장치를 개략적으로 나타낸 모식도를 보여주고 있고 Fig.3-37는 이를 이용하여 린코마이신의 추출을 시도해 본 결과로써 120분 이후에 거의 정상상태를 유지할 수 있었고 단이 증가할수록 린코마이신의 농도가 증가함을 확인하였다. 하지만 위의 공정은 mixer의 level controller에 의하여 settler로의 pump가 작동하는 방식이기 때문에 settler 유입 유량이 크고 간헐적이고 이에 따라 emulsion을 형성하기 쉬워서 vertical type의 settler로는 상분리가 잘 이루어지지 않는 운전상의 문제점이 발견되었다. 따라서 이러한 현상을 극복하기 위해서 settler로의 유체 유입시 surge 현상을 최소화시키는 특수한 구조를 가지는 horizontal type의 settler가 장착된 새로운 연속식 추출장치가 개발되었다.

Fig.3-38은 새로 설계된 settler의 개략적인 모습을 포함한 새로운 연속식 추출장치의 모식도이고 Fig.3-39은 그 사진을 보여주고 있다. 새로운 연속식 추출장치는 예상대로 surge 현상을 잘 흡수하였고 상분리도 완벽하였으나, mixer로 들어가는 유량의 미세한 변동이 축적되어 나중에는 1단에는 solvent만, 3단에는 배양액만 남는 결과를 가져와 mixer로 들어가는 유량조절이 중요함을 발견하였다. 이에 따라 peristaltic pump를 이용하여 유량을 미세하게 조절한 결과 안정된 운전을 성취할 수 있었다. Fig.3-40은 새로운 연속식 추출장치에서 aqueous phase를 10ml/min의 속도로, solvent phase로는 butanol을 10ml/min의 같은 속도로 향류 접촉시키면서 추출한 결과를 나타내고 있으며 단이 증가할수록 린코마이신의 농도가 증가함을 확인하였고, stage 3의 solvent는 여전히 진동하고 있으나 raffinate에서의 린코마이신의 농도는 Fig.3-37보다는 훨씬 빨리 거의 zero에 육박함을 보여주어 전반적으로 새로운 연속식 추출장치의 효율성이 높아짐을 알 수 있었다. Fig.3-41은 새로운 연속식 추출장치에서 aqueous phase를 10ml/min의 속도로, solvent phase로는 butanol을 20ml/min의 같은 속도로 향류 접촉시키면서 추출한 결과를 나타내고 있으며 이 역시 단이 증가할수록 린코마이신의 농도가 증가함을 확인하였고 Fig.3-40의 결과보다는 진동없이 훨씬 빨리 정상상태에 도달하는 것이 관찰되었다. 이에 따

라 수용액상 대비 용매상의 상대적인 유속을 증가시키는 것이 유리함을 알 수 있었다.

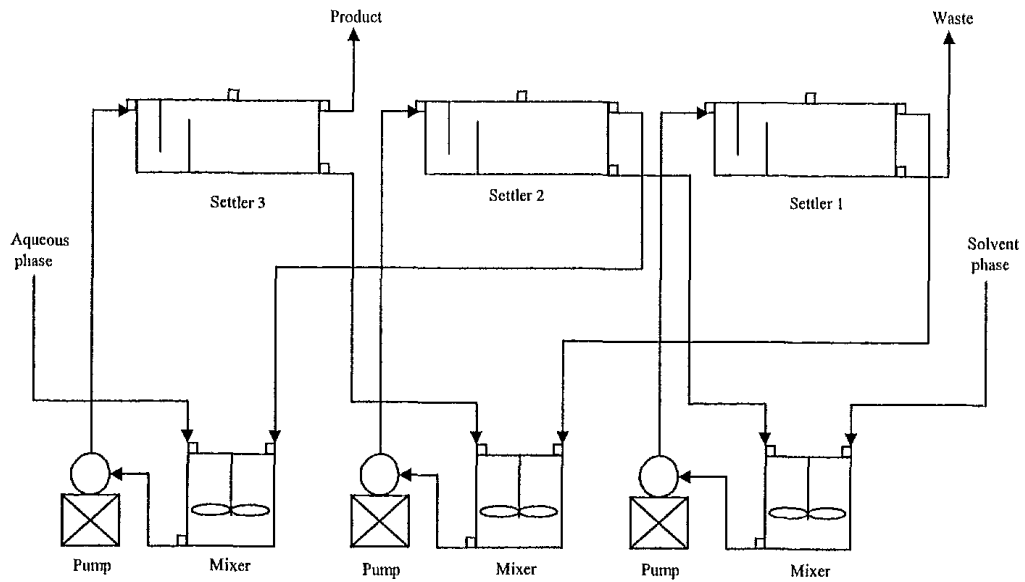


Fig. 3-38 Diagram of continuous multistage current extraction system with horizontal settler

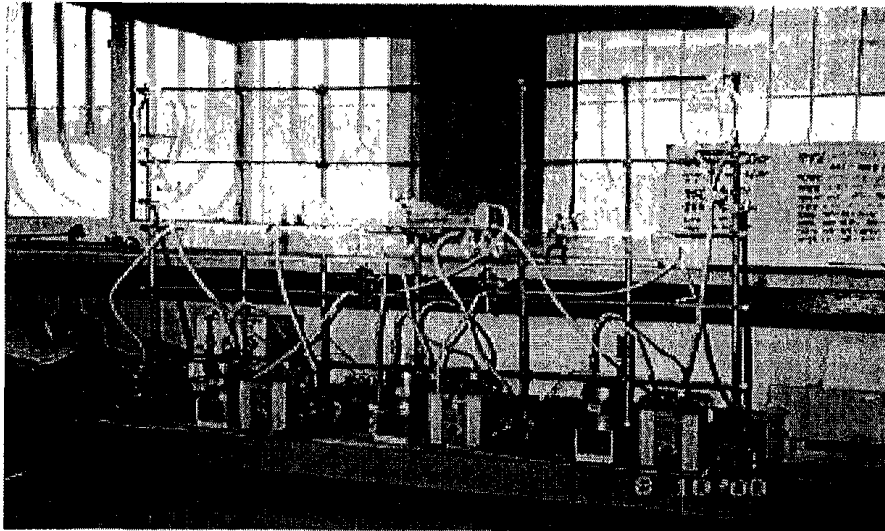


Fig. 3-39 Photography of continuous multistage counter-current extraction system with horizontal settler

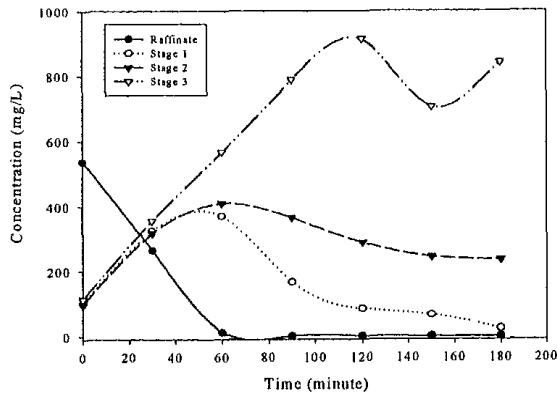


Fig. 3-40 Time course change of lincomycin concentration in each stage.(S=10ml/min, A=10ml/min)

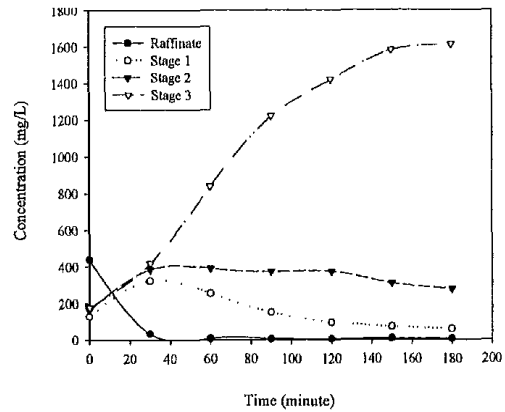


Fig. 3-41 Time course change of lincomycin concentration in each stage. (S=10ml/min, A=20ml/min)

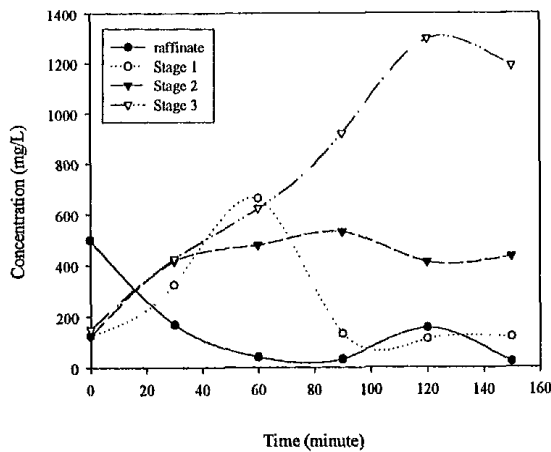


Fig. 3-41 Time course change of lincomycin concentration in each stage. (S=10ml/min, A=10ml/min)

이러한 결과를 이용하여 실제 배양액에서의 린코마이신의 추출율을 확인하기 위하여 용매상과 수용액상의 속도를 10ml/min로 실제배양액을 이용하여 운전한 결과를 Fig. 3-41에 나타내었다. 배양액으로 실험한 결과도 처음에는 fluctuation이 일어나지만 마찬가지로 120분대에 이르러 정상상태에 도달함을 확인 할 수 있었고, 역시 단이 증가할수록 린코마이신의 농도가 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들로부터 향류 다단식 연속 추출장치는 연속식으로 린코마이신을 90 %이상의 회수율

로 추출할 수 있음이 밝혀져 scale-up 공정에 효율적으로 이용될 수 있음이 입증되었으며, 이에 따라 최적 단수, 용매와 배양액의 최적 부피비 등 보다 경제적인 추출을 위한 최적 조건의 확립이 앞으로 집중적으로 연구되어야 한다.

5. 결정화(Crystallization) 공정

가. 냉각법에 의한 결정화 공정

결정화를 위해서는 saturation, nucleation, single crystal growth 등에 관한 연구가 필요하며 이중 saturation에 관한 연구가 가장 기본이 된다. 포화(saturation)란 용액에서 열역학적으로 안정하게 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 린코마이신의 결정화를 위한 최적의 용매를 선정하기 위해 여러 가지 용매에 따른 린코마이신의 온도-용해도 곡선을 조사하였고 이를 바탕으로 최적의 용매를 선정하였다.

Fig. 3-42는 여러 가지 용매에서의 린코마이신의 온도-용해도 곡선이다. 이러한 온도-용해도 곡선 중 기울기가 가장 큰 methanol이 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.

결정화(crystallization)는 흔히 거의 용해도 한도까지 녹아 있는 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 기초 실험으로 batch crystallization을 수행하면서 전략을 모색하였다. Fig. 3-43에서 보는 바와 같이 비등점까지 온도를 높이면서 증발시키다가(모식도 1) 용액이 과포화가 되면 각각 4° C로 고정된 water bath에 용액을 옮긴 후 한쪽은 교반하지 않고(모식도 1.1) 생성된 crystal을 관찰하였고 다른 쪽은 계속 교반하면서 seed를 넣어 crystal을 만들었다(모식도 1.2). 한편 모식도 2에서는 교반하지 않으며 evaporation만으로 crystal을 만들었다. 생성된 crystal을 현미경으로 살펴본 결과 교반하면서 crystal을 만들었을 때가 다른 조건에 비해서 결정이 균일한 것이 확인되었다(Fig. 3-44).

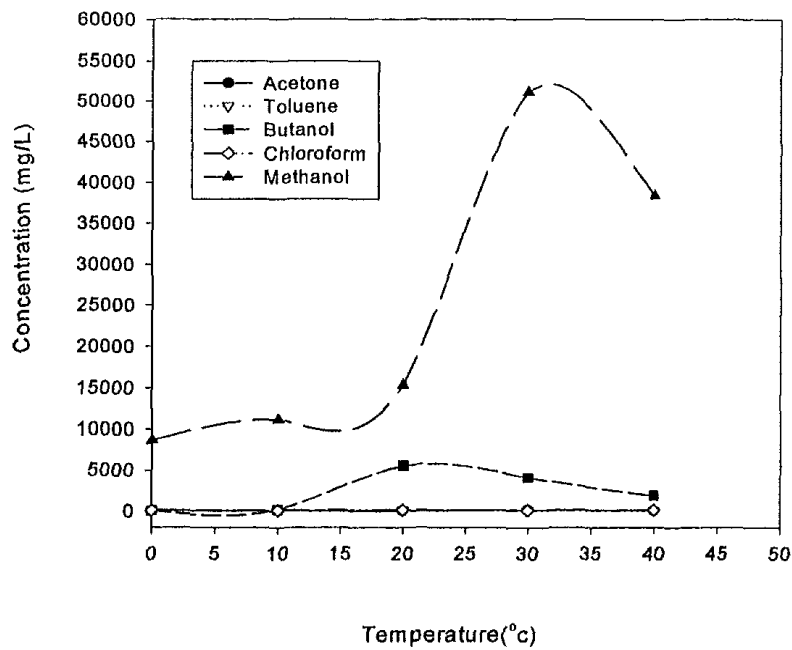


Fig. 3-42 Saturation curve of various solvent

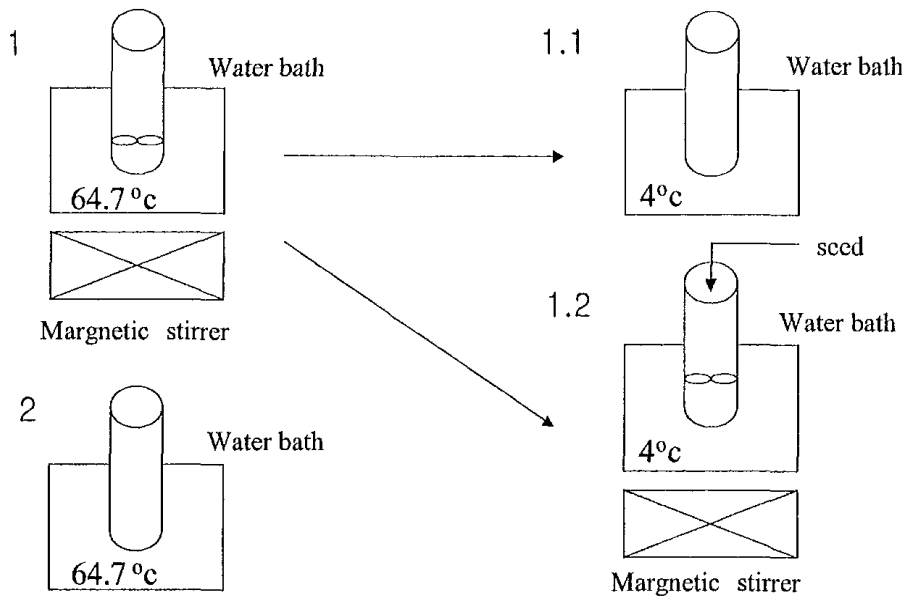


Fig. 3-43 Apparatus for batch crystallization experiment

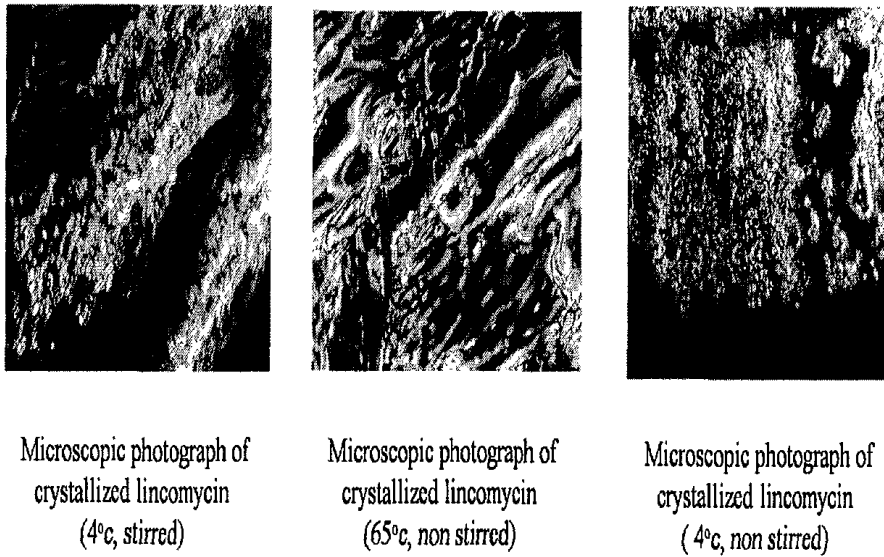


Fig. 3-44 Photography of lincomycin crystal

나. 침전법에 의한 결정화 공정

냉각법을 이용한 연속식 결정화 장치를 개발하였으나 순환 loop의 벽에 자주 결정이 석출되어 막히는 등 운전상에 많은 문제가 발생하여 운전이 쉬운 또 다른 결정화 방법을 찾게 되었다. 냉각법의 대안으로서 용매의 성질을 변화시켜 용해도를 감소시켜 침전시키는 방법인 침전법을 이용하여 crystallization을 시도하였다. 즉 물과 잘 섞이는 methanol, ethanol, acetone등의 용매를 첨가하면 새로 형성된 용매의 성질이 변하게 되어 링크마이신의 용해도가 감소하게 되고 이에 따라 녹아 있던 링크마이신이 crystal을 형성하면서 침전된다.

1) 최적 용매 및 최적 용매 첨가 비율

첨가하는 solvent의 종류 및 양에 따라 다른 용매를 형성하므로 용해도가 변하게 되어 침전되는 링크마이신의 양이 달라지게 된다. 문헌상에 acetone을 사용한 것이 보고되어 있어서 첨가하는 solvent는 acetone으로 정하였고 여러 가지 용매 첨가 비율에 따른 결정화 kinetics를 조사하여 최적 acetone-water 용매를 조사하여 최적 첨가량을 결정하였다.

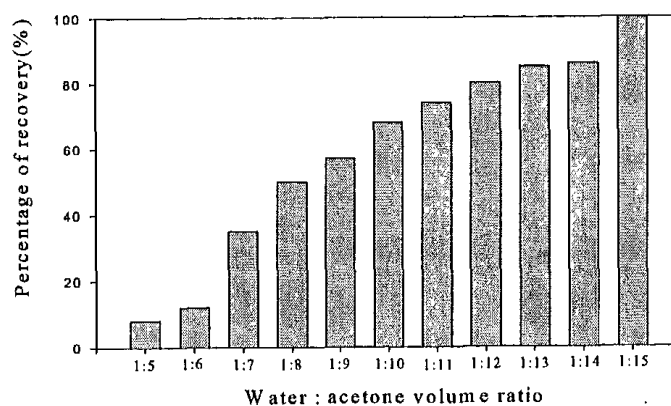


Fig. 3-45 Effect of water :acetone volume ratio on crystal recovery

Fig. 3-45는 우선 250mg/ml의 린코마이신용액에 용매의 부피비를 늘려 가면서 acetone을 첨가시켜 4° C에 2시간 동안 정치시킨 후 생성된 결정을 여과하여 무게를 측정된 결과를 나타낸 그림이다. 이 그림에 의하면 acetone의 부피비가 증가할 수록 결정이 빨리 형성되며, water:acetone의 비율이 1:15일 경우 2시간만에 거의 100 % 결정을 회수할 수 있게 됨을 알 수 있었다. 그림 3-46은 이렇게 하여 회수한 린코마이신 crystal을 보여주고 있다.



Fig. 3-46 lincomycin crystal by acetone precipitation method

2) 온도에 따른 결정화 kinetics의 영향

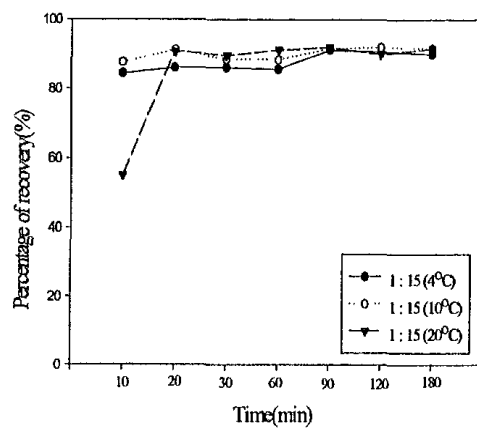


Fig. 3-47 Effect of temperature on crystallization kinetics

Fig.3-47은 250mg/ml의 린코마이신용액에 water:acetone 1:15의 비율로 acetone을 첨가시킨 후 4° C, 10° C, 20° C 세 온도에서 시간에 따른 crystal의 형성을 측정함으로써 온도 변화에 따른 결정화 kinetics를 조사한 결과를 나타내고 있다. 이 그림에 의해 침전법에 의한 결정화는 온도에 크게 영향을 받지 않는다는 사실을 알 수 있었다. 따라서 침전법에 의한 결정화는 온도보다는 water:acetone의 비율이 더 결정화에 중요한 역할을 한다.

3) 교반과 seeding에 따른 결정화 kinetics의 영향

Fig.3-48은 250mg/ml의 린코마이신용액에 water:acetone 1:15의 비율로 acetone을 첨가시킨 후 교반과 seeding을 조합하여 4° C에서 2시간 결정화시켜 생성된 crystal의 양을 비교한 것이다. 이 그림에 의하면 예상과 달리 seeding이 효과가 없었으며 seeding이 없는 경우에는 교반이 crystal의 생성에 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 따라서 acetone 침전법과 같은 결정화에서는 seeding 같은 secondary nucleation은 속도 결정에 관계없고 교반에 영향을 받으므로 전형적인 "diffusion controlled crystallization"이라 할 수 있다.

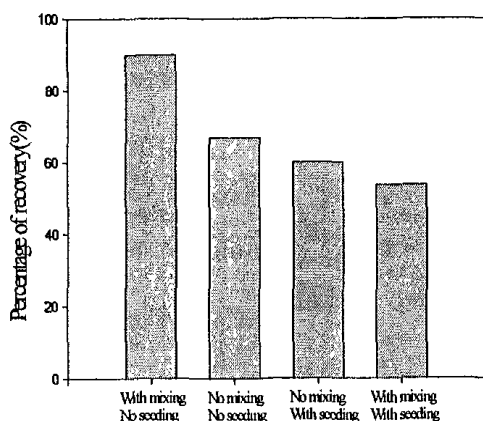


Fig.3-48 Effect of seeding and mixing on crystal recovery

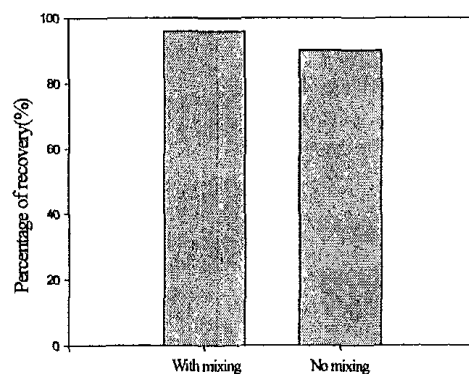


Fig.3-49 Effect of initial mixing on crystal recovery

Fig. 3-49는 Fig. 3-48와 같은 조건에서 초기에만 교반하고 정지한 것과 초기부터 교반없이 정지한 경우의 생성된 crystal의 양을 비교한 것이다. 이 그림에 의하면 정지한 상태로 결정화시키더라도 초기에 잠깐 교반한 것이 결정 성장에 큰 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 교반은 "diffusion controlled crystallization"에서 crystal과 순환 용액 사이의 상대 속도를 증가시킴으로써 물질전달을 증진시켜 결정 성장 속도를 극대화시킬 뿐만 아니라 초기 균일화에 의한 균일 성장 및 결정 성장 촉진 역할을 한다.

실제로 교반이 결정화 kinetics에 미치는 영향을 알아보기 위해 250mg/ml의 린코마이신용액에 water:acetone 1:10의 비율로 acetone을 첨가시킨 후 20° C, 200rpm에서 결정화시킨 경우(Fig. 3-50)와, water:acetone 1:15의 비율로 4° C, 200 rpm에서 결정화시킨 경우(Fig. 3-51)의 crystallization kinetics를 조사하였다. Fig. 3-50과 Fig. 3-51에 의하면 온도나 water:acetone의 비율에 관계없이 교반은 결정 성장 속도를 촉진 시킨다는 사실을 실험으로 확인할 수 있었다. 따라서 결정화 시 교반이 수반될 경우 적은 water:acetone의 비율로도 주어진 시간 내에 결정화가 빨리 이루어지게 함으로써 사용하는 용매의 양을 줄일 수 있는 장점이 있게 된다.

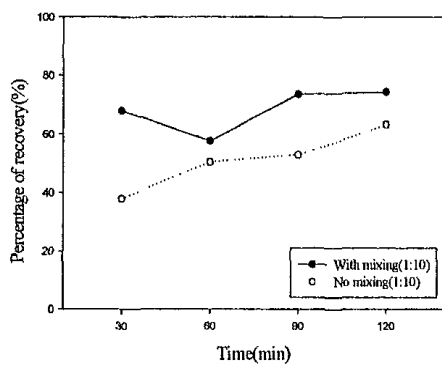


Fig. 3-50 Effect of mixing on crystallization kinetics (Water:Acetone = 1:10)

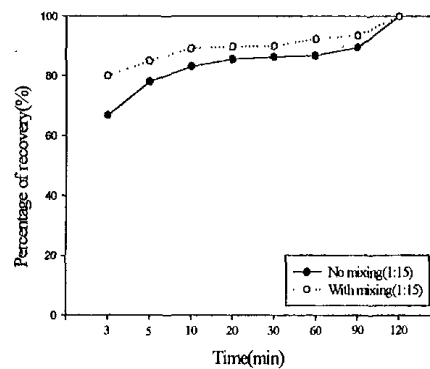


Fig. 3-51 Effect of mixing on crystallization kinetics (Water:Acetone = 1:15)

6. 추출 전처리 chromatography 공정 개발

추출만으로 원하는 순도를 달성하기 어려운 것으로 판단되어 우선 추출 전처리 공정으로서 흡착 크로마토그래피(adsorption chromatography)공정 개발을 위한 기초 실험을 수행하였다. 이를 위해 가장 보편적으로 사용되는 활성탄을 흡착제로 선정하여 린코마이신의 흡착 가능성을 조사하였고 elution 조건을 조사하였다. 흡착 chromatography의 사용 가능성을 조사하기 위해 흡착제의 양을 변화시키면서 흡착제에 흡착시킨 후, 흡착제를 여과하여 제거하고 상등액만을 HPLC로 분석함으로써 흡착 정도를 조사하였다. Fig. 3-52는 *Streptomyces lincolensis* 발효액 50 ml에 여러 양의 활성탄을 흡착 처리한 후 남아 있는 린코마이신의 농도를 나타낸 것이다. 이 그림으로부터 0.5g/50ml의 흡착제만 가지고도 잔존 린코마이신이 거의 zero 이므로 거의 완벽하게 린코마이신을 흡착할 수 있음을 알 수 있었다. Fig. 3-53은 흡착처리 후 흡착제를 여과하여 제거하고 남은 수용액의 HPLC chromatogram을 나타내고 있다. Figure 3-53 a)는 *Streptomyces lincolensis* 발효 원액의 chromatogram으로서 앞쪽에 많은 불순물 peak와 6.68분대의 린코마이신 peak를 보여주고 있다. Fig. 3-53 b)와 c)는 흡착처리 후의 chromatogram으로서 Fig. 3-53 a)에 비해 대부분의 린코마이신 peak는 없어지고 불순물 peak도 약간 줄었지만 대부분의 불순물 peak는 잔존함을 알 수 있었다. 즉 활성탄 흡착 공정에 의해 대부분의 린코마이신은 흡착하고 불순물은 흡착하지 않아서, 배양액을 흡착처리하면 배양액 중의 린코마이신의 대부분과 약간의 불순물만을 일단 흡착탑 안에 붙들어 놓을 수 있음을 알 수 있었다.

일단 흡착공정에 의해 흡착된 린코마이신은 그 다음 적절한 elution solvent를 사용하여 탈착시켜야 회수할 수 있다. 이때 가장 중요한 것은 적절한 elution solvent의 선정이다. 적절한 elution solvent 및 elution 조건을 조사하기 위해 린코마이신을 흡착한 흡착제를 분리한 후 여러 pH의 물과 butanol, chloroform, acetone, methyl ethyl ketone등의 solvent를 elution solvent로 사용하여 elution

을 시도하였으나 적절한 solvent를 발견하지 못하였다. 따라서 린코마이신을 회수할 방법이 없기 때문에 흡착 전처리 공정은 사용할 수 없고 대신에 재결정 등의 방법을 모색해야 한다.

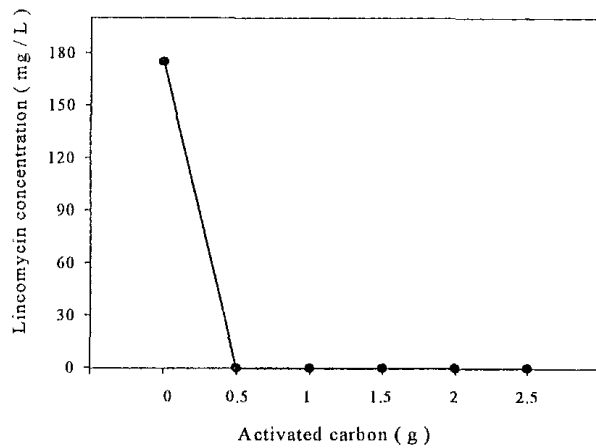
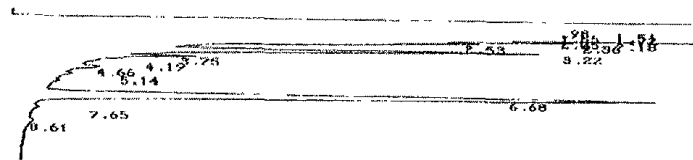
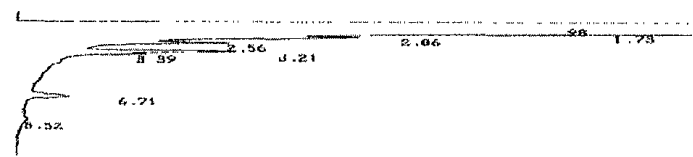


Fig. 3-52 Residual lincomycin concentration after adsorption by various amount of activated carbon.



a) Chromatogram of *S. lincolnensis* medium



b) Chromatogram of activated carbon 0.5g/50ml addition



c) Chromatogram of activated carbon 1g/50ml addition

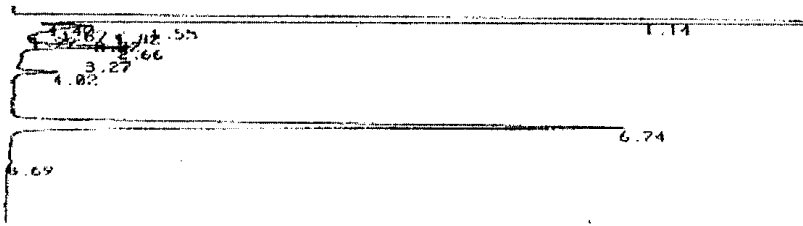
Fig. 3-53 HPLC chromatogram for comparison of activated carbon adsorption

7. 실제 린코마이신 배양액으로부터 린코마이신의 분리정제

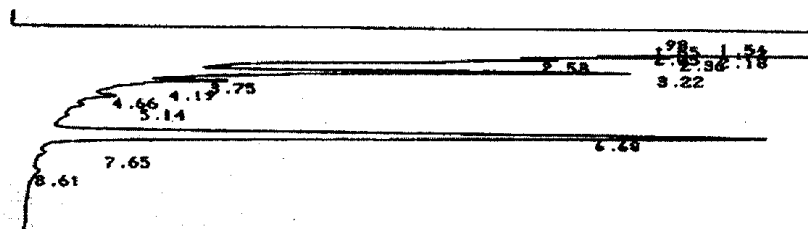
제 2 세부과제에서 배양한 린코마이신 배양액으로부터 현재까지 개발된 분리정제 과정을 통해 순수한 린코마이신 crystal을 얻을 수 있는지 조사하였다. 린코마이신의 농도가 1g/L가 되도록 린코마이신 standard를 첨가한 배양액을 동일 부피의 butanol로 두 번 추출한 후 butanol을 증발시켰다. 남은 잔류물을 증류수로 재 용해한 후 acetone 침전법에 의해 crystal을 형성시켰고 여과에 의해 crystal을 회수하였다. Fig.3-54은 이렇게 *Streptomyces lincolnsis* 발효액으로부터 분리정제하여 회수된 crystal의 현미경 사진을 보여주고 있다. 한편 회수된 crystal의 순도를 검증하기 위해 물에 다시 녹여 HPLC로 분석하였다. 린코마이신 standard(Fig.3-55, a)와 이것이 첨가된 발효배양액(Fig.3-55, b)과 분리정제 과정 후(Fig.3-55, c)의 HPLC chromatogram이 Fig.3-55에 나와 있다. 린코마이신 standard에 비해 발효배양액에는 앞부분에 많은 불순물 peak가 존재함을 알 수 있었다. 하지만 butanol 추출과 아세톤 침전 등에 의한 분리정제를 거친 결과 거의 standard(Fig.3-55, a)와 가까운 peak(Fig.3-55, c)를 얻었음을 알 수 있었다. Standard의 순도가 98%임을 미루어 거의 순도가 98%정도임을 알 수 있었다.



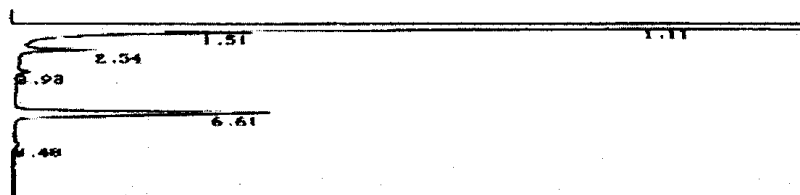
Fig.3-54 Crystal from *S. lincolnsis*
fermentation beer



a) Chromatogram of lincomycin standard



b) Chromatogram of *S. lincolnensis* medium



c) Chromatogram of crystal from *S. lincolnensis* medium

Fig. 3-55 HPLC chromatogram for comparison of crystal purity

8. 실제 링크마이신 배양액으로부터 Pilot scale의 분리정제 및 결정화

다음 그림들은 실험 재료 및 방법에서 설명한 scheme중 pilot plant 규모로 연속식 tubular type 원심분리기에 의한 세포 분리 작업(Fig. 3.56), 회분식 추출 장치에 의한 butanol 추출 작업 (Fig.3.57), 및 rotary evaporator에 의한 농축 작업 (Fig. 3.58)을 하는 내용을 사진으로 보여주고 있다.

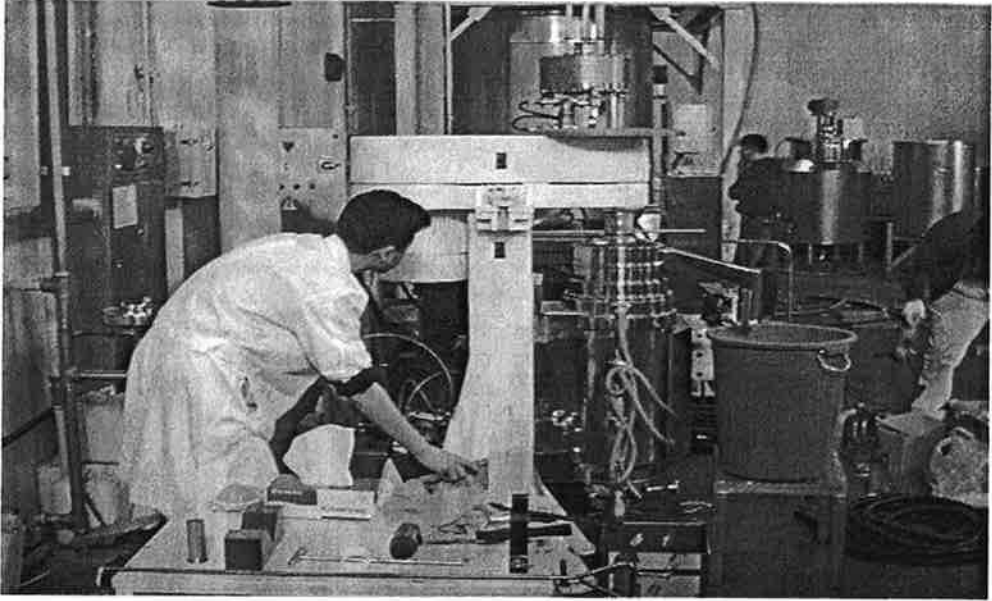


Fig.3-56 Tubular type 연속식 원심분리기에 의한 세포분리제거 작업



Fig.3-57 회분식 추출 장치에 의한 butanol 추출 작업

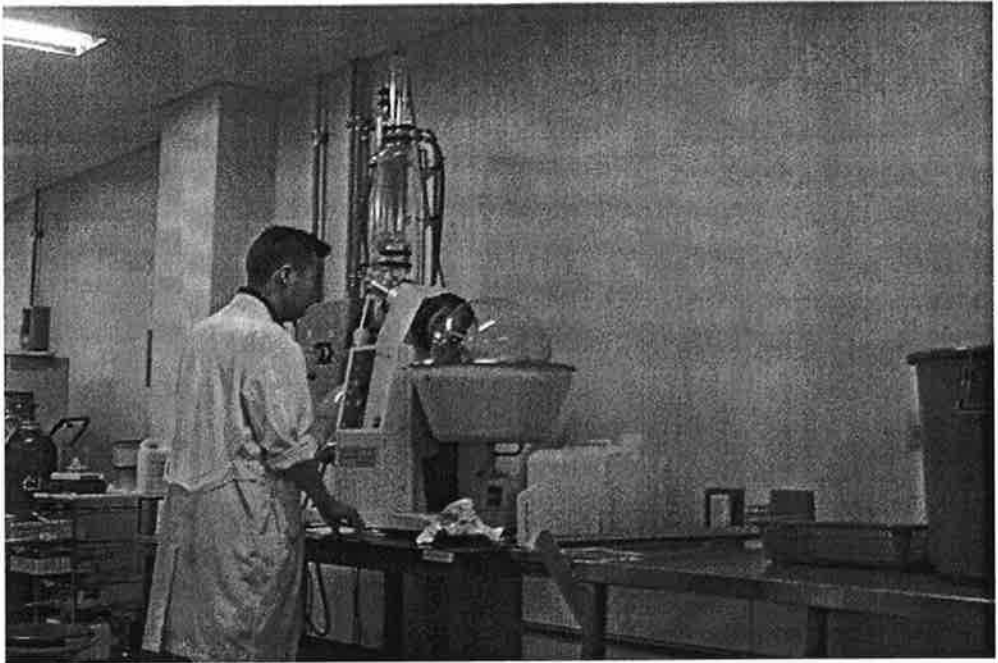


Fig. 3-58 결정화를 위한 Rotary evaporator에 의한 농축작업

주어진 scheme을 따라 lab scale에서 1 liter의 배양액을 분리정제한 결과 원하는 링크마이신 crystal을 얻을 수 있었으며 전체적인 수율은 약 72% 이었다. 이에 따라 설명되어진 scheme으로 pilot scale의 분리정제를 시도하였다. Pilot scale의 분리정제 과정 중 각 step에서의 HPLC histogram이 다음에 나타나 있다.

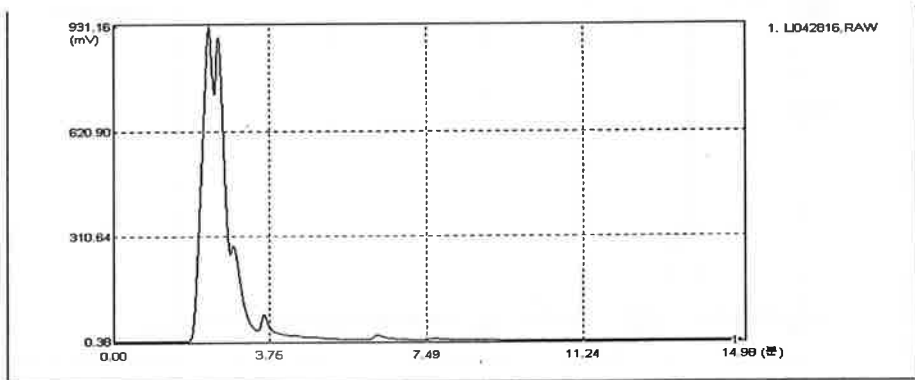


Fig. 3-59 원액의 HPLC chromatogram

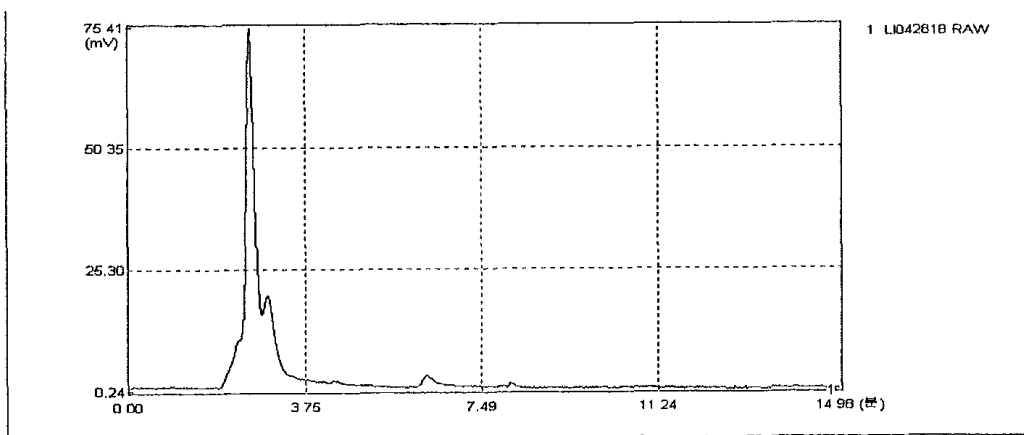


Fig. 3-60 1차추출 후 water phase에서의 HPLC chromatogram

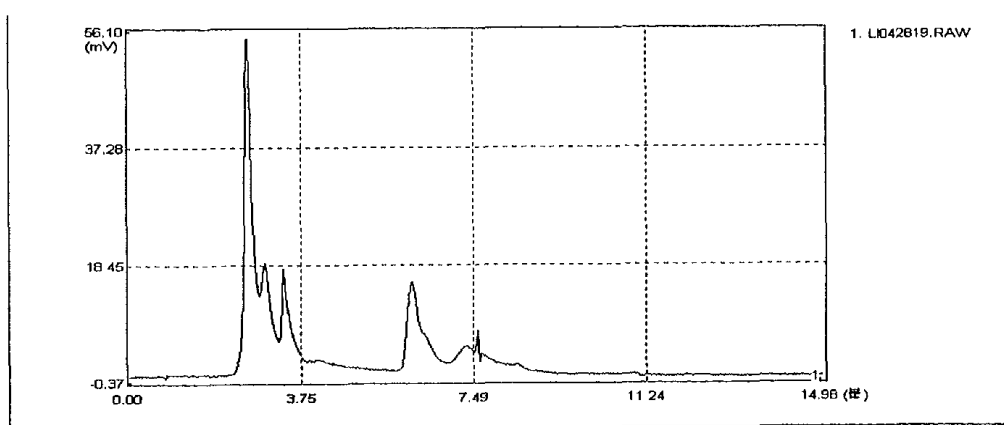


Fig. 3-61 1차추출 후 solvent phase (butanol)에서의 HPLC chromatogram

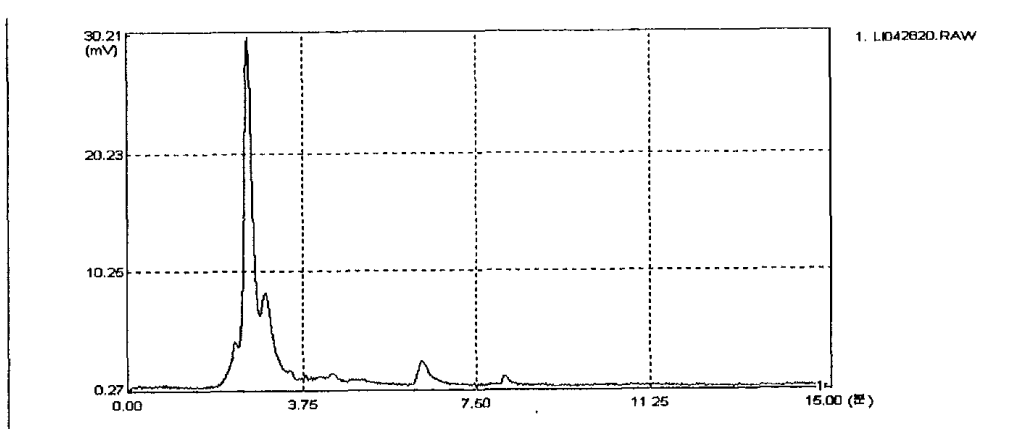


Fig. 3-62 Water phase로의 역추출 (2차 추출)에서의 HPLC chromatogram

Fig. 3-59은 제1세부로부터 제공받은 발효액의 분석 결과를 나타낸 것으로 린코마이신은 약 8분 대에 나타나며 린코마이신의 peak보다 앞쪽의 배지 성분인 불순물의 peak가 훨씬 커서 린코마이신의 peak는 상대적으로 미약하게 보이나 실제로 약 1.5 g/liter를 포함하고 있다. Fig. 3-60는 2회에 걸친 1차 추출 후 남은 water phase의 분석 결과를 보여주고 있으며, 이 그림으로부터 불순물은 여전히 과량으로 존재하며 잔존 린코마이신의 농도도 500 mg/liter정도로 추출율이 낮음을 알 수 있다. 한편 1차 추출 후 solvent phase에서의 분석 결과를 Fig. 3-61에서 보여주고 있는데 butanol에 의해 추출된 린코마이신의 농도가 1g/liter 정도 이어서 추출율은 약 67%이며 불순물 peak는 상당히 줄어들었음을 알 수 있었다. 추출율이 낮은 이유는 lab scale의 최적 운전 조건이 pilot scale의 mixing조건과 달라 추출시간 등이 pilot scale에서 최적화되지 않았기 때문이며 이에 따라 pilot scale의 추출 조건 최적화에 대한 추가적인 실험이 향후 요구되고 있다. 불순물을 추가로 제거하기 위해 solvent phase를 pH 2의 water phase로 2회에 걸쳐 역추출하였고(2차 추출) 그 결과가 Fig. 3-62에 나타나 있다. 이 결과 불순물 peak는 줄어들었지만 린코마이신은 650 mg/liter로 불순물 peak가 줄어드는 것에 비해 재 추출에 따르는 추가적인 수율의 손실이 큼을 알 수 있었다. 이렇게 얻은 추출물을 rotary evaporator에서 50 ml로 농축한 후 acetone을 첨가하여 용매의 용해도를 변화시키는 침전법을 이용하여 린코마이신 crystal을 침전시켜 얻었다. 또한 crystal의 순도를 추가적으로 높이기 위해 얻어진 crystal을 재 용해하여 acetone으로 재 결정화시켜 최종 crystal을 얻었고 최종 결정의 사진을 Fig. 3-63과 Fig. 3-64에 나타내었다. 참고적으로 Fig. 3-65는 린코마이신 standard의 결정 사진을 나타내고 있다. 이렇게 얻은 결정은 제2세부과제에 제공하여 동물시험에 사용하도록 하였다.

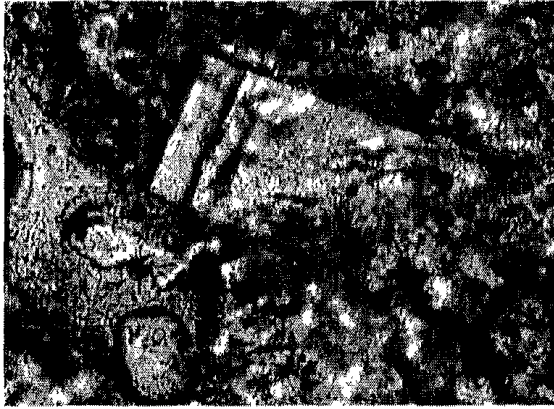


Fig. 3-63 린코마이신 최종 결정

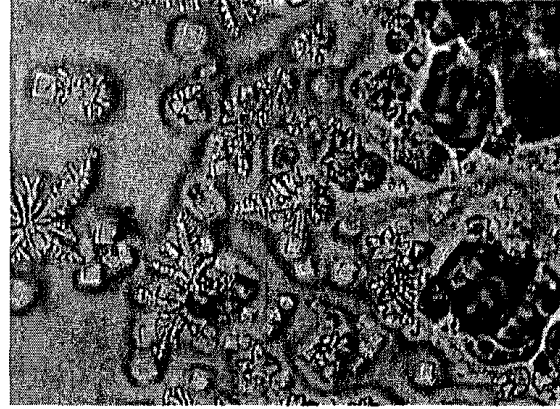


Fig. 3-64 린코마이신 최종결정



Fig. 3-65 린코마이신 standard 결정

제 4 절 결론

Streptomyces lincolnensis 배양액으로부터 린코마이신을 분리정제하기 위한 과정으로부터 다음과 같은 몇 가지 결론을 도출하였다.

1. 린코마이신의 분석조건 확립

최적 column은 C_8 column이었으며 이를 중심으로 한 HPLC를 이용한 분석 조건을 확립하였다.

2. 세포파쇄공정

린코마이신이 extracellular product임이 확인되어 근본적으로는 세포 파쇄공정이 필요없다. 하지만 세포안에 남아있는 항균능력이 있는 린코마이신의 이용가치가 확인될 경우에 세포파쇄공정이 필요하다. 이 경우 bead beater를 사용하거나 소용량의 경우 methanol이나 butanol로 추출하는 방법이 적당하다.

3. 여과공정

린코마이신 포함하는 세포배양액의 여과공정의 개발을 위해서 Ruth 방정식을 이용하여 린코마이신 생산균주 cake의 여러 진공도에서의 specific cake resistance 값을 도출하였고 이를 중심으로 cake의 compressibility S 값 0.07을 얻었다.

4. 원심분리공정

lab scale의 원심분리 실험을 통해 구한 *S. lincolnensis*의 V_g 값(settling velocity)은 1.88×10^{-3} cm/sec이며, 이 값은 주어진 처리용량으로부터 필요한 원심분리기의 용량인 Σ 값을 계산하는데 사용됨으로써 원심분리공정의 scale-up에 이용된다.

5. 추출공정

1)최적 용매로 butanol이 선정되었다.

2)린코마이신의 추출은 수용액상의 pH에 따라서 추출율이 변하는 전형적인 dissociation extraction의 형태를 보여주고 있고, 수용액상에서의 pH가 낮을 경우에는 추출이 거의 일어나지 않았으며 pH가 높아질수록 추출율이 증가함을 알 수 있었다. Butanol을 용매로 쓸 경우 pH의 증가에 따른 추출율의 증가폭이 크지 않아 최적 수용액의 pH는 10에서 12 이었다.

3) Butanol에 의한 추출의 경우 최적의 수용액상:용매상의 부피비율은 1:1이었다.

4) Dissociation extraction의 원리에 기반을 두고 1차 및 2차 추출에 의한 린코마이신 분리 정제 및 추출 전략을 개발하였다. 1차 추출 후 수용액을 pH 2 정도로 낮추어 용매상의 1차 추출물과 접촉시켜 대부분의 린코마이신을 다시 수용액상으로 옮긴 후 butanol에 의하여 다시 추출하는 전략을 사용한 결과 린코마이신의 순도는 크게 상승되었으나 수율은 다소 줄어들었다. 특히 6회에 걸친 dissociative extraction에서 추출 횟수가 증가할수록 추출의 수율이 감소되었으나 정제도는 증가하였다. 사료첨가제로서의 린코마이신을 위한 최적 단수는 1-2단 정도로 생각된다.

5) Dissociation extraction의 문제점인 수율을 증진시키기 위해서는 버려지는 층에 남아 있는 lincomycin을 다시 추출해야 하며 이에 따라 4회에 걸친 회분식 다단 추출 결과 추출 수율이 96.9 %이어서 충분한 추출 수율을 보장받을 수 있었다.

6) 분리정제공정을 연속적으로 수행하기 위해서 연속식 3단 향류 추출장치를 개발하였다. Vertical type의 settler의 문제점을 보완한 horizontal type의 settler는 연속식 추출장치의 성능을 향상시켰다. 배양액을 비롯한 aqueous phase와 solvent phase를 각각 1:1, 1:2로 운전한 결과, 모든 경우에 마지막 수용액상에 린코마이신이 거의 남아 있지 않았고, 마지막 단으로 갈수록 린코마이신의 농도가 증가하였으며, solvent phase의 상대적 유량이 클수록 진동이 없이 빠르게 정상상태에 도달함을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통해 향류 다단식 연속 추출장치는 연속식으로 린코마이신을 90 %이상의 회수율로 추출할 수 있음이 밝혀져 scale-up 공정에 효율적으로 이용될 수 있음이 입증되었다.

6. 결정화 공정

1) 린코마이신의 온도-용해도 곡선으로부터 냉각법에 의한 결정화를 위한 최적의 용매로 methanol이 선정되었다. 교반을 하면서 4° C로 냉각시키면서 crystal을 형성

시켰을 때 가장 균일한 결정을 얻었다.

2) 냉각법에 의한 결정화는 scale-up에 문제가 있어 scale-up이 쉬운 침전법에 의한 결정화 공정을 개발하였다. 최적 용매인 acetone의 상대적 부피비가 증가할수록 결정이 빨리 형성되며, water:acetone의 비율이 1:15일 경우 2시간만에 거의 100 % 결정을 회수할 수 있었다. 침전법에 의한 결정의 성장속도는 온도나 seeding에 크게 영향을 받지 않았으나 교반에 의해 결정 성장속도가 촉진되었다. 따라서 결정화 시 교반이 수반될 경우 적은 water:acetone의 비율로도 주어진 시간 내에 결정화가 이루어져 용매의 사용량을 줄일 수 있다.

7. 실제 링크마이신 배양액으로부터 링크마이신의 lab scale 및 pilot scale 분리정제 및 결정화

1) Lab scale의 분리정제를 위해 *Streptomyces lincolensis* 발효액 1L로부터 동일 부피의 butanol로 두 번 추출한 후 butanol을 증발시키고 남은 잔류물을 증류수로 재 용해한 후 acetone 침전법에 의해 crystal을 형성시킨 결과 순도가 98%정도의 lincomycin 결정을 얻을 수 있었고 전체적인 수율은 약 72%이었다.

2) 50 liter 발효조에서 수확한 배양액 10 liter의 배양액을 pilot scale의 분리정제를 위한 시료로 사용하였다. 추출용매로는 butanol을 사용하여 2회에 걸친 dissociative extraction을 수행하였고, pilot scale crystallization을 위해 acetone을 이용한 침전법에 의한 결정화를 수행한 후 lab scale와 비슷한 순도를 얻기 위해 추가적으로 재 결정화를 수행하였다. 그 결과 lab scale과 비교하여 상당히 낮은 추출 수율을 얻었는데, 그 첫째 이유는 재 결정이라는 과정이 추가되었기 때문이고, 또한 추출시간 등의 운전 조건이 pilot scale에서 최적화되지 않았기 때문이다. 이에 따라 pilot scale의 분리정제 조건 최적화가 향후 추가적으로 요구되고 있다.

제 5 절 참고문헌

Argoudelis A. D., J. A. Fox, and T. E., Eble. (1965) U-21669 : A new lincomycin-related antibiotic. *Biochemistry*. 4. 698-703

Argoudelis. A. D., Coats J. H. (1973) Process for producing lincomycin. *US Pat.* 3,726,766

Argoudelis. A. D. and Coats J. H. (1974) Process for preparing lincomycin. *US Pat.* 3,812,014

Asmus, P. A., Landis, J. B., and Vila, C. L. (1983) Liquid chromatographic determination of lincomycin in fermentation beer. *J. Chromatogr.* 264, 241-248

Bergy M. E., Herr R. R. and mason D. J. (1963) Antibiotic lincolnensin and method of production. *US Pat.* 4,271,266

Campell, J. M., Reusser, F., and Caskey, C. T. (1979) Specificity of lincomycin action on peptidyl transferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 1032-1038

Chang, F. N., Sih, C. J. and Weisblum, B. (1966) Linconcomycin, an inhibitor of aminoacyl sRNA binding to ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 55, 431-438

D. F. Witz, E. J. Hessler, and T. L. Miller (1971) Bioconversion of Tyrosine into the propylhygric acid moiety of lincomycin. *Biochemistry*, Vol 10, No 7, 1128-1131

Donald R. V. O (1963) Lincomycin hydrochloride crystals *US Pat* 3,313,695

George C. prescott (1966) Automated assay for the antibiotic lincomycin *Journal of phamaceutical science* Vol 55, No 4, 423-425

Grady. J E. (1968) Recent developments in lincomycin reserach. *Int J. Clin Pharmacol.* 16. 533-538

Hanka, L. J., Mason, D. J., Burch, M. R., and Trieck, R. W. (1963) Lincomycin, a new antibiotic III. Microbiological assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 565-569

Herr, R. R. and Bergy, M. E (1963) Lincomycin, a new antibiotic II. Isolation and characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 560-564

Hoeksema H., B. Bannister, R. D. Birkenmever, F. Kasan, B. J. Magerlein, F. A. Mackellar, W. Schroeder, G. Slomp and R. R. Herr. (1964) Chemical studies on lincomycin. I. The structure of lincomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 86. 4223-4224

Jariwala: Sharad (1978) Process for recovering lincomycin from fermentation

beer. *US Pat.* 4,091,204

J. A. Orwa, K. Vandenbempt, S. Depuydt, E. Roets, J. Hoogmartens (1999)
Liquid chromatography method for separation of clindamycin from related
substances. *J. Pharmaceutical and Biomedical analysis* 745-752

John R. Hofsetter (1981) Process for the purification of lincomycin. *US P
at.* 4,317,903

Josten. J. J., and P. Allen. (1964) The mode of action of lincomycin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 14. 241-244

Lewis, C., Clapp, H. W., and Grady, J. E. (1963) In vitro and in vivo
evaluation of lincomycin, a new antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.*
570-582

Magerlein, B. J., Birkenmeyer, R. D., Herr, R. R. and Kagan, F. (1967)
Lincomycin. V. Amino acid fragment. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 2459-2464

Mason, D. J., Dietz, A., and DeBore C. (1963) Lincomycin, a new antibiotic
I. Discovery and biological properties. *Antimicrob. Agents Chemother.*
554-559

Reusser F. and Argoudelis. A. D. (1974) Process for preparing lincomycin. *US
Pat.* 3,833,475

R. I. Houtmn, D. G. Kaiser, and A. J. Taraszka (1968) Gas-liquid chromatographic determination of lincomycin. *J. Pharmaceutical science* V 57, No 4, 693-695

Schroeder, W., Bannister, B., and Hoeksema, H. (1967) Lincomycin III. The structure and stereochemistry of the carbohydrate moiety. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 2448-2453

Slomp, G., and MacKellar, F. A. (1967) Lincomycin. IV. Nuclear magnetic resonance studies on the structure of lincomycin, its degradation products, and some analogs. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 2454-2459

W. A. Moats (1991) Determination of lincomycin in milk and tissues by reversed-phase liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1812-1816

Williams D., Yousefpour P. and Wellington E. M. H. (1985) Effects of phosphate, glucose, and ammonium on cell growth and lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis* in chemically defined media *Biotechnol. Bioeng.* 27, 327-333

Zhi chun wu, Xia zhang, Rong fang xu and Jiayong chen (1998) Solvent extraction of lincomycin with neutral donor extractants. *Separation science and technology* 33(2), 259-269

제 5 장 고기능성 동물성장촉진 · 사료효율개선제 의 음식물 쓰레기에의 활용을 통한 가축의 생산성 증진(제1세부과제)

제 1 절 서설

최근, 가정 및 산업체에서 발생하는 폐기물은 환경오염을 가중시키고 있으며, 그 가운데 남은 음식물의 배출량은 종량제 실시 이전의 31% 보다 시행이후 38.3%로 전체 생활쓰레기에서 차지하는 비중이 계속 증가하고 있다(환경부, 1996). 그러나 남은 음식물의 재활용율은 공공 및 민간 자원화시설 확충과 사료가격 급등에 따른 재활용 수요증가에 힘입어 '98년도 21.3%로 크게 증가하였고 2002년도까지 재활용율을 50%로 높이는 것을 목표로 하고 있다(심, 1999). 남은 음식물의 처리방안으로는 혐기성소화(신 등, 1993; 조 등, 1994), 퇴비화(송, 1993; 백과 정, 1994), 소각, 사료화(우와 김, 1993; 신, 1999; 정 등 1999) 등의 방법이 최근에 주로 이용되는데 그 중 남은 음식물의 사료화는 대부분 수입에 의존하는 사료 원료를 대체할 수 있으며 환경오염을 방지할 수 있을 것으로 사료된다. 특히 본 시험에 이용된 남은 음식물은 발효건조 방식으로 제조되었으므로, 미생물 발효에 의해서 남은 음식물 성분 중 비소화성물질이 소화성 물질로 변하고 미생물이 합성한 단백질, 비타민 및 향생물질을 포함하므로 사료적 가치가 크게 향상된다(조, 1998). 또한 여러가지 효소들이 포함되어 유산균제제 및 효소제제를 대체할 수 있는 효과를 얻을 것으로 사료된다.

린코마이신은 *Clostridium perfringens*에 의한 괴사성 장염(Necrotic Enteritis; NE)에 효과적인 항생제이며(Maxey, 1977; Truscott, 1977; Watkins 등, 1997), 육

계사료에 2~4.4mg/kg으로 첨가·급여시 육계의 생산성을 개선할 수 있는 인자로 보고되어 왔다(Miller 등, 1971; Marusich 등, 1974; Church, 1977; Schildknecht 등, 1980; Dafwang 등, 1984; Dafwang 등, 1985; Patel 1985; Buresh 등, 1986; Dafwang 등, 1987). Zavala(1967)와 Marusich 등(1978)은 린코마이신 2.2mg/kg 수준에서, Marusich 등(1973), Marusich 등(1978), Stutz(1984)는 4.4mg/kg 첨가·급여 수준에서 각각 육계의 증체율 및 사료요구율이 개선되었다고 보고하였다. 또한 자돈에 있어서 린코마이신은 마이코플라스마증과 돈적리의 예방 및 치료에 유효하며 생산성을 개선시키는 항생제로 널리 알려져 왔다(Leengoed 등, 1985; Lukert 1982). 그러나 최근에 국내에서 사용되고 있는 린코마이신은 전량 수입되어 왔다.

그러므로 본 연구는 전량 수입에 의존하는 린코마이신을 육계와 육성돈의 성장촉진제로서 개발하기 위해서 기초자료 수집 및 남은 음식물의 사료화에 중점을 두어 시행하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험 1

본 실험은 1999년 1월 26일부터 3월 3일까지 전북대학교 농과대학 부속농장에서 시행하였다. 공시동물은 (주)하림에서 구입한 1일령 하이브로 수컷으로 개시시 체중은 처리구별로 비슷하게 배치하였다. 사료내 남은 음식물 수준은 0과 10%로 하였으며, 린코마이신은 0, 2.2, 4.4mg/kg으로서 2×3 factorial design으로 6개 처리구, 4반복으로 반복당 10수씩 총 240수를 공시하였다. 물과 사료는 무제한 급여하였고 24시간 동안 연속점등 하였다. 실험사료는 사육 전기와 후기에 따라 국내에서 관행적으로 이용되고 있는 옥수수-대두박 위주의 조단백질 21, 19% 수준으로 하였으며 에너지수준은 전기사료 3,078(대조구), 3,089(남은 음식물 10%)kcal/kg과 후기사료 3,116kcal/kg으로 하였다(표 4-1). 본 실험에 이용된 남은 음식물은 진공

건조방식으로 생산하는 (주)신영종합환경으로부터 구입하였으며, 영양소 함량은 대사에너지 2,623 kcal/kg, 조단백질 13.56%, 조지방 4.3%, 조섬유 13.63%, Ca 1.47%, P 0.26%, Na 0.58%가 함유되었다. 남은 음식물 급여수준은 0, 10%로 하였으며, 린코마이신은 린코마이신44[®](염산 린코마이신 4.4%)를 이용하였다.

표 4-1. 육계 사양실험을 위한 사료 배합비

원료사료	육계전기		육계후기	
	대조구	남은 음식물	대조구	남은 음식물
	----- % -----			
옥수수	55.51	49.51	61.48	55.06
대두박	36.54	37.00	31.40	31.74
남은 음식물	-	10.00	-	10.00
소맥피	4.28	0.29	3.47	-
인산칼슘	1.48	1.61	1.57	0.97
석회석	1.23	0.77	1.22	1.50
소금	0.41	0.27	0.41	0.27
비타민프리믹스 ¹	0.20	0.20	0.20	0.20
광물질프리믹스 ²	0.20	0.20	0.20	0.20
메치오닌	0.15	0.15	0.05	0.05
	100.00	100.00	100.00	100.00
영양소 함량				
대사에너지(kcal/kg)	3,078	3,089	3,116	3,116
조단백질(%)	21.00	21.00	19.00	19.00
메치오닌(%)	0.50	0.50	0.38	0.38
라이신(%)	1.21	1.25	1.07	1.11
칼슘(%)	0.90	0.90	0.90	0.90
유효인(%)	0.45	0.45	0.45	0.45

¹비타민은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 비타민 A, 10,000 IU; 비타민 D₃, 2,220 ICU; 비타민 E, 20IU; 라이보플라빈, 5.6; 비타민 B₁, 2.2; 피리독신, 1.6; 비타민 B₁₂, 14; 나이아신, 20; 판토텐산, 12; 엽산, 1.0; 바이오틴, 0.12; 항산화제, 125.

²광물질은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 망간 66; 아연, 50; 철, 44; 구리, 4.0; 요오드, 0.6; 셀레늄, 0.16.

2. 실험 2

본 실험은 1999년 4월 27일부터 6월 1일까지 5주간 시행하였고, (주)하림의 1일령 코브 수컷을 이용하였다. 사료내 조단백질은 전, 후기 각각 21, 19% 수준으로 하였으며, 에너지는 전기 3,058과 후기 3,100 kcal/kg으로 하였다(표 4-2).

처리구는 남은 음식물 0, 5, 10% 수준으로 급여하였고, 린코마이신은 0, 2.2, 4.4mg/kg 수준으로 첨가·급여하여 3×3 factorial design으로 9개 처리구, 4반복 표 4-2. 육계 사양실험을 위한 사료 배합비

원료사료	남은 음식물			육계전기			육계후기		
	0	5	10	0	5	10	0	5	10
	----- % -----								
옥수수	54.75	52.67	50.59	61.43	58.65	55.88			
대두박	36.26	35.96	35.62	29.95	29.38	28.82			
남은 음식물	-	5.00	10.00	-	5.00	10.00			
소맥피	5.32	2.95	0.58	5.71	4.30	2.89			
인산칼슘	1.42	1.51	1.61	0.48	0.51	0.55			
석회석	1.26	1.03	0.80	1.57	1.36	1.14			
소금	0.40	0.33	0.26	0.41	0.34	0.27			
비타민 프리믹스 ¹	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20			
광물질 프리믹스 ²	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20			
메치오닌	0.15	0.15	0.15	0.06	0.06	0.06			
	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00			
영양소 함량									
대사에너지(kcal/kg)	3,058	3,058	3,058	3,100	3,100	3,100			
조단백질(%)	21.00	21.00	21.00	19.00	19.00	19.00			
메치오닌(%)	0.50	0.50	0.50	0.38	0.38	0.38			
라이신(%)	1.22	1.22	1.24	1.03	1.04	1.06			
칼슘(%)	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90			
인(%)	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45			

¹비타민은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 비타민 A, 10,000 IU; 비타민 D₃, 2,220 ICU; 비타민 E, 20IU; 라이보플라빈, 5.6; 비타민 B1, 2.2; 피리독신, 1.6; 비타민 B₁₂, 14; 나이아신, 20; 판토텐산, 12; 엽산, 1.0; 바이오틴, 0.12; 항산화제, 125.

²광물질은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 망간 66; 아연, 50; 철, 44; 구리, 4.0; 요오드, 0.6; 셀레늄, 0.16.

을 두어 반복당 10수씩 총 360수를 공시하였다. 기타 재료 및 실험 방법은 실험 1과 동일하게 시행하였다.

3. 실험 3

본 실험은 2000년 2월 16일부터 3월 22일까지 전북대학교 농과대학 부속농장에서 5주간 시행하였다. 공시동물은 (주)하림에서 구입한 1일령 코브 수컷으로 개시시 체중은 처리구별로 비슷하게 배치하였다. 사료내 남은 음식물 수준은 0, 7.5%, 15%로 하였으며, 린코마이신은 0, 2.2, 4.4mg/kg으로서 3×3 factorial design으로 9개 처리구, 4반복으로 반복당 12수씩 총 432수를 공시하였다. 물과 사료는 무제한 급여하였고 24시간 동안 연속점등 하였다. 실험사료는 사육 전기와 후기에 따라 국내에서 관행적으로 이용되고 있는 옥수수-대두박 위주의 기초사료를 이용하였고 사료내 조단백질 함량은 사육전기과 후기에 각각 21.5, 19% 수준으로 하였으며 에너지수준은 3,100kcal/kg으로 하였다(표 4-3). 본 실험에 이용된 남은 음식물은 발효 건조방식으로 생산된 것으로 (주)삼능건설에서 구입하였으며, 영양소 함량은 조단백질 18.78%, 조지방 9.77%, 조섬유 5.49%, 조회분 11.82%, 칼슘 2.82%, 인 0.49%, 염분 2.48%가 함유되었다. 그리고 린코마이신은 린코마이신44[®](염산 린코마이신 4.4%)를 이용하였다.

4. 실험 4

본 실험은 2000년 4월 13일에 착수하여 5월 18일까지 5주간 시행하였다. 공시동물은 (주)하림에서 구입한 1일령 코브 수컷을 이용하였으며 사료내 남은 음식물 수준은 0, 7.5%, 15%로 하였고, 린코마이신은 0, 2.2, 4.4mg/kg으로서 3×3 factorial design으로 9개 처리구, 3반복으로 반복당 12수씩 총 324수를 공시하였다. 실험사료는 사육 전기와 후기에 따라 국내에서 관행적으로 이용되고 있는 옥수수-대두박 위주의 기초사료를 이용하였고 사료내 조단백질 함량은 사육전기과 후기에 각각 21.5, 19% 수준으로 하였으며 에너지수준은 3,100kcal/kg으로 하였다(표 4-4). 본 실험에 이용된 남은 음식물은 발효 건조방식으로 생산되는 (주)삼능건설

에서 구입하였으며, 영양소 함량은 조단백질 19.61%, 조지방 10.20%, 조섬유 6.98%, 조회분 14.63%, 칼슘 3.56%, 인 0.61%, 염분 2.66%가 함유되었다. 그리고 링크마이신은 링크마이신44[®](염산 링크마이신 4.4%)를 이용하였다.

표 4-3. 육계 사양실험을 위한 사료 배합비

원료사료	남은 음식물			전기			후기		
	0	7.5	15	0	7.5	15	0	7.5	15
	----- % -----								
옥수수	58.53	54.41	51.72	66.33	62.25	58.16			
대두박	29.11	25.74	20.04	25.11	21.69	18.27			
남은 음식물	-	7.50	15.00	-	7.50	15.00			
옥글루텐밀	5.70	6.30	8.30	3.50	4.13	4.76			
대두유	2.97	2.98	2.45	2.00	2.00	2.00			
인산칼슘	1.73	1.73	1.75	1.22	1.22	1.23			
석회석	1.06	0.53	-	1.13	0.60	0.07			
소금	0.46	0.32	0.17	0.34	0.19	0.04			
메치오닌	0.13	0.13	0.12	0.05	0.05	0.05			
라이신	0.11	0.16	0.25	0.12	0.17	0.22			
비타민프리믹스 ¹	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10			
광물질프리믹스 ²	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10			
합 계	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00			
사료내 영양소 함량									
대사에너지(kcal/kg)	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100			
조단백질(%)	21.50	21.50	21.50	19.00	19.00	19.00			
메치오닌(%)	0.50	0.50	0.50	0.38	0.38	0.38			
라이신(%)	1.10	1.10	1.10	1.00	1.00	1.00			
칼슘(%)	1.04	1.04	1.04	0.90	0.90	0.90			
유효인(%)	0.45	0.45	0.45	0.35	0.35	0.35			

¹비타민은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 비타민 A, 10,000 IU; 비타민 D₃, 2,220 ICU; 비타민 E, 20IU; 라이보플라빈, 5.6; 비타민 B1, 2.2; 피리독신, 1.6; 비타민 B₁₂, 14; 나이아신, 20; 판토텐산, 12; 엽산, 1.0; 바이오틴, 0.12; 항산화제, 125.

²광물질은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 망간 66; 아연, 50; 철, 44; 구리, 4.0; 요오드, 0.6; 셀레늄, 0.16.

표 4-4. 육계 사양실험을 위한 사료 배합비

원료사료	남은 음식물			후기		
	0	7.5	15	0	7.5	15
	----- % -----					
옥수수	61.05	56.68	52.32	66.34	61.98	57.62
대두박	24.65	22.80	20.95	25.13	23.25	21.38
남은 음식물	-	7.50	15.00	-	7.50	15.00
옥글루텐밀	8.40	7.88	7.36	3.48	2.98	2.47
대두유	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
인산칼슘	1.76	1.72	1.67	1.17	1.12	1.07
석회석	1.17	0.58	-	1.17	0.59	0.01
소금	0.47	0.29	0.11	0.34	0.17	-
메치오닌	0.11	0.13	0.14	0.05	0.07	0.08
라이신	0.19	0.22	0.25	0.12	0.14	0.17
비타민프리믹스 ¹	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
광물질프리믹스 ²	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
합 계	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
사료내 양양소 함량						
대사에너지(kcal/kg)	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100
조단백질(%)	21.50	21.50	21.50	19.00	19.00	19.00
메치오닌(%)	0.50	0.50	0.50	0.38	0.38	0.38
라이신(%)	1.10	1.10	1.10	1.00	1.00	1.00
칼슘(%)	1.08	1.08	1.08	0.90	0.90	0.90
유효인(%)	0.45	0.45	0.45	0.35	0.35	0.35

¹비타민은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 비타민 A, 10,000 IU; 비타민 D₃, 2,220 ICU; 비타민 E, 20IU; 라이보플라빈, 5.6; 비타민 B₁, 2.2; 피리독신, 1.6; 비타민 B₁₂, 14; 나이아신, 20; 판토텐산, 12; 엽산, 1.0; 바이오틴, 0.12; 항산화제, 125.

²광물질은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 망간 66; 아연, 50; 철, 44; 구리, 4.0; 요오드, 0.6; 셀레늄, 0.16.

5. 실험 5

본 실험은 2001년 4월 27일에 착수하여 6월 1일까지 5주간 시행하였다. 공시동물은 (주)하림에서 구입한 1일령 코브 수컷을 이용하였으며 사료내 남은 음식물 수준

은 0, 7.5%, 15%로 하였고, 링크마이신은 0, 2.2, 4.4mg/kg으로서 3×3 factorial design으로 9개 처리구, 3반복으로 반복당 12수씩 총 324수를 공시하였다. 실험사료는 사육 전기와 후기에 따라 국내에서 관행적으로 이용되고 있는 옥수수-대두박 위주의 기초사료를 이용하였고 사료내 조단백질 함량은 사육전기과 후기에 각각 21.5, 19% 수준으로 하였으며 에너지수준은 3,100kcal/kg으로 하였다(표 4-5). 본 실험에 이용된 남은 음식물은 발효 건조방식으로 생산되는 (주)삼능건설에서 구입하였으며, 영양소 함량은 조단백질 19%, 칼슘 2.88%, 인 0.53%, 염분 2.11%, 메치오닌 0.14%, 라이신 0.34%를 함유하였다. 링크마이신은 링크마이신44[®](염산 링크마이신 4.4%)를 이용하였다.

6. 실험 6

본 실험은 2001년 6월 29일에 착수하여 7월 27일까지 5주간 시행하였다. 공시동물은 (주)하림에서 구입한 1일령 코브 수컷을 이용하였으며 사료내 남은 음식물 수준은 0, 7.5%, 15%로 하였고, 링크마이신은 0, 2.2, 4.4mg/kg으로서 3×3 factorial design으로 9개 처리구, 3반복으로 반복당 12수씩 총 324수를 공시하였다. 실험사료는 사육 전기와 후기에 따라 국내에서 관행적으로 이용되고 있는 옥수수-대두박 위주의 기초사료를 이용하였고 사료내 조단백질 함량은 사육전기과 후기에 각각 21.5, 19% 수준으로 하였으며 에너지수준은 3,100kcal/kg으로 하였다(표 4-5). 본 실험에 이용된 남은 음식물은 발효 건조방식으로 생산되는 (주)삼능건설에서 구입하였으며, 영양소 함량은 조단백질 19%, 칼슘 2.88%, 인 0.53%, 염분 2.11%, 메치오닌 0.14%, 라이신 0.34%를 함유하였다.

그리고 링크마이신은 링크마이신44[®](염산 링크마이신 4.4%)를 이용하였다.

표 4-5. 육계 사양실험을 위한 사료 배합비

원료사료	남은음식물			육계전기			육계후기		
	0	7.5	15	0	7.5	15	0	7.5	15
	----- % -----								
옥수수	61.25	56.71	52.21	66.48	62.00	57.51			
대두박	24.75	22.28	19.99	24.78	22.65	20.53			
남은 음식물	-	7.50	15.00	-	7.50	15.00			
옥글루텐밀	8.30	8.30	8.16	3.70	3.45	3.20			
대두유	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00			
인산칼슘	1.75	1.76	1.77	1.18	1.19	1.20			
석회석	0.98	0.56	0.07	1.14	0.59	0.03			
소금	0.47	0.31	0.16	0.34	0.18	0.03			
메치오닌	0.11	0.13	0.14	0.05	0.07	0.08			
라이신	0.19	0.25	0.30	0.13	0.17	0.22			
비타민프리믹스 ¹	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10			
광물질프리믹스 ²	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10			
합 계	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00			
영양소 함량									
대사에너지(kcal/kg)	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100			
조단백질(%)	21.50	21.50	21.50	19.00	19.00	19.00			
메치오닌(%)	0.50	0.50	0.50	0.38	0.38	0.38			
라이신(%)	1.10	1.10	1.10	1.00	1.00	1.00			
칼슘(%)	1.10	1.10	1.10	0.90	0.90	0.90			
유효인(%)	0.45	0.45	0.45	0.34	0.34	0.34			

¹비타민은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 비타민 A, 10,000 IU; 비타민 D₃, 2,220 ICU; 비타민 E, 20IU; 라이보플라빈, 5.6; 비타민 B1, 2.2; 피리독신, 1.6; 비타민 B₁₂, 14; 나이아신, 20; 판토텐산, 12; 엽산, 1.0; 바이오틴, 0.12; 항산화제, 125.

²광물질은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 망간 66; 아연, 50; 철, 44; 구리, 4.0; 요오드, 0.6; 셀레늄, 0.16.

7. 실험 7

본 실험은 1999년 7월 6일부터 8월 3일까지 8주간 진행하였으며 이유자돈 47일령 삼원교잡종(랜드레이스×대요크셔×듀록, 평균체중;12.52kg)을 사양실험에 공시하

였다. 사료내 조단백질은 실험개시부터 4주까지는 20%, 5주에서 8주까지는 17.5% 수준으로 하였으며, 에너지는 3,200과 3,300kcal/kg로 하였고, 실험사료의 영양소 함량은 표 4-6에 나타냈다. 본 실험에서 남은 음식물은 0, 5, 10% 수준으로 하였고, 린코마이신은 린코마이신44(염산 린코마이신 4.4%)를 이용하여 사료내 0, 55mg/kg, 110mg/kg 수준으로 하여 남은 음식물과 린코마이신의 처리구는 3×3 factorial design으로 9개 처리를 두었고 각 돈방에 5두씩 총 45두를 공시하였다.

실험에 이용된 남은 음식물은 진공 건조방식으로 생산하는 (주)신영종합환경으로부터 구입하였으며, 영양소 함량은 대사에너지 2,623kcal/kg, 조단백질 13.56%, 조지방 4.3%, 조섬유 13.63%, Ca 1.47%, P 0.26%, Na 0.58%를 함유하였다.

8. 사양실험 8

본 실험은 2000년 8월 8일부터 9월 5일까지 4주간 진행하였으며 비육돈 삼원교잡종(랜드레이스×대요크셔×듀록, 평균체중:86.37kg)을 사양실험에 공시하였다.

사료내 조단백질은 18.5%, 에너지는 3,300kcal/kg로 하였고, 실험사료의 영양소 함량은 표 4-7에 나타냈다. 본 실험에서 남은 음식물은 0, 5, 10% 수준으로 하였고, 린코마이신은 린코마이신44(염산 린코마이신 4.4%)를 이용하여 사료내 0, 55mg/kg, 110mg/kg 수준으로 하여 남은 음식물과 린코마이신의 처리구는 3×3 factorial design으로 9개 처리를 두었고 각 돈방에 7두씩 총 63두를 공시하였다.

실험에 이용된 남은 음식물은 발효 건조방식으로 생산되는 (주)삼능건설에서 구입하였으며 남은 음식물의 영양소 함량은 표 4-13와 같다.

9. 사양실험 9

본 실험은 2001년 5월 26일부터 6월 25일까지 4주간 진행하였으며 비육돈 삼원교잡종(랜드레이스×대요크셔×듀록, 평균체중: 77.60kg)을 사양실험에 공시하였다.

사료내 조단백질은 16.5%, 에너지는 3,300kcal/kg로 하였고, 실험사료의 영양소 함량은 표 4-8에 나타냈다.

본 실험에서 남은 음식물은 0, 7.5, 15% 수준으로 하였고, 린코마이신은 린코마

이신44(엽산 린코마이신 4.4%)를 이용하여 사료내 0, 55mg/kg, 110mg/kg 수준으로 하여 남은 음식물과 린코마이신의 처리구는 3×3 factorial design으로 9개 처리를 두었고 각 돈방에 6두씩 총 54두를 공시하였다.

실험에 이용된 남은 음식물은 발효 건조방식으로 생산하는 (주)삼능건설에서 구입
표 4-6. 이유자돈 사양실험을 위한 사료 배합비(실험 7)

원료사료	4주			8주		
	0	5	10	0	5	10
	----- % -----					
옥수수	53.80	50.51	47.26	66.01	62.00	58.00
대두박	32.52	32.00	31.47	27.20	26.54	25.89
소맥피	8.33	7.17	6.00	1.58	1.14	0.70
대두유	2.93	3.15	3.37	2.99	3.35	3.70
석회석	1.45	1.26	1.06	1.30	1.12	0.94
소 금	0.33	0.29	0.24	0.21	0.17	0.12
비타민프리믹스 ¹	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
광물질프리믹스 ²	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
인산칼슘	0.18	0.18	0.17	0.27	0.25	0.23
라이신	0.06	0.04	0.03	0.04	0.03	0.02
합 계	100	100	100	100	100	100
사료내 영양소 함량						
대사에너지(kcal/kg)	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200	3,200
조단백질(%)	20.00	20.00	20.00	17.50	17.50	17.50
소금(%)	0.15	0.15	0.15	0.10	0.10	0.10
메티오닌(%)	0.33	0.33	0.33	0.31	0.31	0.31
라이신(%)	1.15	1.15	1.15	1.00	1.00	1.00
칼슘(%)	0.75	0.75	0.75	0.70	0.70	0.70
유효인(%)	0.41	0.41	0.41	0.37	0.37	0.37

¹비타민은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 비타민 A, 10,000 IU; 비타민 D₃, 2,220 IU; 비타민 E, 20IU; 라이보플라빈, 5.6; 비타민 B1, 2.2; 피리독신, 1.6; 비타민 B₁₂, 14; 나이아신, 20; 판토텐산, 12; 엽산, 1.0; 바이오틴, 0.12; 항산화제, 125.

²광물질은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 망간 66; 아연, 50; 철, 44; 구리, 4.0; 요오드, 0.6; 셀레늄, 0.16.

하였으며, 영양소 함량은 A.O.A.C(1990)에 의해 분석한 결과 조단백질 19%, 칼슘 2.88%, 인 0.53%, 염분 2.11%, 메치오닌 0.14%, 라이신 0.34%를 함유하였다.

표 4-7. 비육돈 사양실험을 위한 사료 배합비(실험 8)

원료사료	남은 음식물		
	0	7.5	15
	----- % -----		
옥수수	61.82	58.41	54.98
대두박	30.25	28.12	25.97
소맥피	1.20	1.69	2.18
당밀	2.00	2.00	2.00
우지	1.98	2.69	3.40
인산칼슘	1.18	1.13	1.09
석회석	0.99	0.49	-
소금	0.37	0.22	0.07
메치오닌	0.01	0.01	0.02
라이신	-	0.04	0.09
비타민프리믹스 ¹	0.10	0.10	0.10
광물질프리믹스 ²	0.10	0.10	0.10
합 계	100.00	100.00	100.00
사료내 양양소 함량			
대사에너지(kcal/kg)	3,300	3,300	3,300
조단백질(%)	18.50	18.50	18.50
라이신(%)	1.04	1.04	1.04
메치오닌(%)	0.31	0.31	0.31
칼슘(%)	0.75	0.75	0.75
유효인(%)	0.31	0.31	0.31

¹비타민은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 비타민 A, 10,000 IU; 비타민 D₃, 2,220 IU; 비타민 E, 20IU; 라이보플라빈, 5.6; 비타민 B₁, 2.2; 피리독신, 1.6; 비타민 B₁₂, 14; 나이아신, 20; 판토텐산, 12; 엽산, 1.0; 바이오틴, 0.12; 향산화제, 125.

²광물질은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 망간 66; 아연, 50; 철, 44; 구리, 4.0; 요오드, 0.6; 셀레늄, 0.16.

표 4-8. 비육돈 사양실험을 위한 사료 배합비(실험 9)

원료사료	남은 음식물		
	0	7.5	15
	----- % -----		
옥수수	45.00	40.69	35.26
소맥	15.00	15.00	15.00
소맥피	2.19	3.01	2.42
미강	5.00	5.00	5.00
대두박	23.60	19.80	17.80
당밀	3.00	3.00	3.00
우지	4.00	4.70	5.50
석회석	0.80	0.15	-
인산칼슘	0.70	0.55	0.45
소금	0.30	0.10	-
메치오닌	0.02	0.07	0.10
콜린	0.13	0.17	0.21
황산구리	0.01	0.01	0.01
비타민 프리믹스 ¹	0.15	0.15	0.15
광물질 프리믹스 ²	0.10	0.10	0.10
합 계	100.00	100.00	100.00
사료내 영양소 함량			
대사에너지(kcal/kg)	3,300	3,300	3,300
조단백질(%)	16.50	16.41	16.80
총인(%)	0.55	0.55	0.55
유효인(%)	0.21	0.19	0.18
라이신(%)	0.82	0.94	1.04
메치오닌(%)	0.26	0.27	0.28
나트륨(%)	0.43	0.44	0.56

¹비타민은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 비타민 A, 10,000 IU; 비타민 D₃, 2,220 IU; 비타민 E, 20IU; 라이보플라빈, 5.6; 비타민 B1, 2.2; 피리독신, 1.6; 비타민 B₁₂, 14; 나이아신, 20; 판토텐산, 12; 엽산, 1.0; 바이오틴, 0.12; 황산화제, 125.

²광물질은 사료 kg당 mg으로 계산하였다 : 망간 66; 아연, 50; 철, 44; 구리, 4.0; 요오드, 0.6; 셀레늄, 0.16.

10. 조사항목

1) 육계에 대한 남은 음식물의 대사에너지가 구명

1999년 12월 13일부터 19일까지 1차 실험과 2000년 3월 27일부터 4월 2일까지 2차 실험 그리고 2001년 4월 6일부터 13일(3차 실험)까지 총 3회 시행하였다. 평사에서 사육된 5주령 코브 15수를 체중이 비슷하게 대사실험용 케이지에 배치하였다. 사료와 물은 자유채식 하였고 온도는 18℃로 고정하여 3일 동안 적응기간을 두었다. 이후 소화관내 사료 잔여물을 완전히 제거하기 위해 24시간 동안 절식시켰다. 체중을 측정한 후, 처리구는 사료의 강제급여량이 체중의 1%, 2%인 강제급여구와 자유채식 급여구로 하였으며 1%, 2% 처리구는 각각 5수씩 자유채식구는 4수(1차 실험), 1%, 2%, 자유채식구 각각 5수씩(2차 실험)을 배치하였다. 실험 개시후 분은 매일 일정 시각에 개체별로 채취하였으며, 자유채식구는 사료 잔량을 측정한 후 남은 음식물을 급여하여 5일간 대사실험을 시행하였다. 계분은 드라이 오븐에 건조(60℃에서 24시간)한 후 실온에 방치하여 공기중의 습도와 동일해지면 무게를 측정하여 분쇄하였다. 사료와 분의 GE는 Bomb calorimeter(Parr, Model 155)를 이용해 측정하였고 질소 함량(Nitrogen: N)은 Kjeltac(Foss, 22000 Kjeltac Auto Distillation)을 이용하여 함량을 측정하였다.

실험사료의 대사에너지는 다음과 같이 급여된 사료에너지에서 분뇨로 배설된 에너지함량을 제외한 외관상 대사ener지를 이용하여 질소축적이 제로인 상태에서 에너지값을 보정한 질소보정 대사ener지를 이용하였다.

외관상 대사에너지(AME) = 섭취한 에너지 - 분으로 배설된 에너지

질소보정 대사에너지(AMEn) = AME - (8.22 × 질소축적/사료섭취량)

2) 육성돈에 대한 남은 음식물의 대사에너지가 구명

남은 음식물에 대한 육성돈의 대사ener지를 구명하고자 3반복으로 시행하였다. 체중을 비슷하게 대사실험용 케이지에 배치하였고 사료와 물은 자유채식 하여 21 ± 2℃에서 7일간 적응기간을 두었다. 분과 뇨는 하루에 한번 씩 분리, 수집하였으며

뇨는 1N HCL 또는 28% formaldehyde 10mL에 혼합하여 수집량의 20%를 분석전까지 -18℃에 보관하였다. 분석시 분과 뇨는 forced-draft oven에서 55℃로 72h 동안 건조, 녹인 후 실온에 방치하여 공기중의 습도와 동일해지면 무게를 측정하여 분쇄하였다. 사료와 분의 GE(Gross Energy)는 Bomb calorimeter(Parr, Model 155)를 이용해 측정하였고 질소 함량(Nitrogen: N)은 Kjeltex(Foss, 22000 Kjeltex Auto Distillation)을 이용하여 함량을 측정하였다.

실험사료의 대사에너지는 다음과 같이 급여된 사료에너지에서 분뇨로 배설된 에너지함량을 제외한 외관상 대사ener지를 이용하여 질소축적이 제로인 상태에서 에너지값을 보정한 질소보정 대사ener지를 이용하였다.

외관상 대사에너지(AME) = 섭취한 에너지 - 분과 뇨로 배설된 에너지

질소보정 대사에너지(AMEn) = AME - (6.77 × 질소축적/사료섭취량)

3) 체중, 사료섭취량 및 사료요구율

체중은 일정한 시간(실험 1-6: 매주, 실험 7: 4주 간격으로 2회, 실험 8-9: 실험 종료시 4주)에 측정하였고 사료섭취량은 체중 측정시에 반복별로 사료잔량을 측정하여 구하였다. 또한 사료요구율은 사료섭취량을 증체량으로 나누어 산출하였다.

4) 혈액의 성상

혈액은 실험 종료시 처리구당 5수(두)씩 희생시켜 전혈을 실험관에 채취한 다음 고정된 상태로 4℃에서 3시간 동안 응고시켰다. 응고된 혈액을 3,000rpm에 10분간 원심분리하고 상층액인 혈청을 분리하여 -70℃의 냉동실에 보관한 후 분석시 이용하였다. 남은 음식물과 린코마이신이 혈액의 성상에 미치는 영향을 구명하기 위하여 혈액의 Albumin, AST, BUN, Cholesterol, Ca, Mg, 등을 혈액 자동분석기(Minos BAT, France)로 측정하였고 혈청 단백질 함량은 Lowry(1951)의 방법으로 측정하였다.

5) 간, 복강지방의 체중에 대한 비율

육계 실험 종료시 처리구당 5수씩 간의 무게와 근위 주위와 복강내부에 축적된 지

방을 분리한 후 무게를 측정하여 생체중에 대한 비율로 계산하였다.

6) 돈육의 일반성분 분석

돈육 등심의 수분, 조단백질, 조지방 및 조회분은 A, O, A, C에 의해 분석하였다.

7) 지방산 분석

돈육 등심의 지방산 조성 분석은 시료를 0.5g 취한 후 Park과 Goins(1994)의 방법에 의해서 methylation하였다. 시료에 Methanol : Benzen(4:1, v/v) 2ml과 acetyl chloride 200 μ l를 가한 후 100 $^{\circ}$ C의 heating block에서 1시간 동안 가열하였다. 이를 실온에서 방냉하여 충분히 식힌 다음 hexane 1ml과 6% potassium carbonate 5ml를 가하고 원심분리기를 이용하여 3000rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상등액 0.5 μ l를 취하여 표 4-9의 조건하에서 gas chromatograph(SHIMADZU GA-17A)에 injection하였다.

표 4-9. 돈육 등심내 지방산 조성을 위한 가스크로마토그래피의 조건

조 건	
기기명	SHIMADZU GC-17A
칼럼	Supelcowax 10 Fused silica capillary column, 30m \times 0.32mm I.D., 0.25 μ m film thickness
검출기	FID
칼럼 온도	시작 온도: 180 $^{\circ}$ C (1.5분 유지) 분당 1.5 $^{\circ}$ C 증가 최종 온도: 230 $^{\circ}$ C (2분 유지)
주입기 온도	230 $^{\circ}$ C
검출기 온도	250 $^{\circ}$ C
운반 가스	질소
스프릿 비율	100:1

11. 통계분석

모든 데이터는 주간별로 수집하였고, 처리구간의 통계적인 차이는 SAS program(1996)의 ANOVA를 이용하여 분산분석을 실시하였으며 Duncan's multiple range test에 의하여 처리구간의 통계적인 차이를 구명하였다(Steel과 Torrie, 1980).

제 3 절 결과 및 고찰

1. 육계에 대한 남은음식물의 대사에너지 평가

본 실험은 남은음식물을 육계용 사료원료로 급여시에 적정수준을 구명하고자 사료원료로 사용하기 전에 대사실험을 통하여 매년 1회씩 3년간 3회 실행하였다. 남은음식물을 5일간 급여하였을 때의 에너지 이용 및 질소 축적량은 표 4-10부터 4-12까지 나타냈다. 1차 실험(표 4-10)의 남은 음식물은 4,002kcal/kg의 총에너지를 함유하고 체중의 1% 강제급여구는 질소축적이 -104.88이므로 질소보정 대사에너지값(AMEn)은 2,479kcal(=2432-(-104.88×8.22/18.48))로 제일 낮았으며 2%, 자유채식구는 각각 2,536, 2,695kcal/kg으로 사료섭취량에 비례하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다. 이는 사료섭취량이 증가함에 따라 AMEn도 증가한다는 Sibbald(1977)의 보고와 일치하였다. 그러나 Sibbald(1976)와 Schang과 Hamilton(1982)은 강제급여에 의한 대사에너지 측정방법을 이용하면 사료의 허실로 인한 실험수치상의 오류를 방지할 수 있으며 대략 체중의 1% 급여가 오차가 적고 가장 효과적이라고 하였다. 그러므로 본 실험에서도 강제급여구인 1%의 2,479와 2%의 2,589kcal/kg의 평균값인 2,504kcal/kg(1차 실험, 표 4-10), 2,734kcal/kg(2차 실험, 표 4-11), 2,750kcal/kg(3차 실험, 표 4-12)로 대사 에너지를 결정하였다. 이러한 결과는 이규호(1998)가 9종류의 남은 음식물의 대사에너지가의 평균인 2,560kcal/kg과 비슷한 결과를 보였다. 한편 Farhat 등(1998)은 원료사료의 총에너지가 높고 단백질이 풍부한 경우 질소의 축적이 부의 균형을 보인다고 하였는데 1차 실험은 1% 처리구에서 -104.88, 2차 실험은 1%, 2% 처리구의 경우 각각 -179.03과 -91.74로 부의 균형을 나타냈고 이러한 이유는 내생질소에 기인한 것으로 사료된다. 총 3회에 걸친 실험에서 총에너지에 대한 대사에너지의 비율 즉 대사율은 1% 처리구의 61.94%(1차 실험), 2% 처리구의 61.91%(2차 실험)로 제일 낮았으며 자유채식구가 가장 높은 경향을 나타냈다. 또한 1%와 2% 처리구의 평균 대사율이

62.57%(1차 실험), 62.52%(2차 실험)로 사양실험에 적용된 원료사료인 옥수수외의 대
사율이 82.2%, 대두박 71.5% (고태송, 1980)에 비해서 낮은 경향을 보였다.

4-10. 남은 음식물의 대사에너지와 질소축적(1차 실험)

처리구	GE ¹ (kcal/kg)	사료섭취량 (g)	N 축적 (mg)	AME (kcal/kg)	AMEn (kcal/kg)	AMEn/GE (%)
강제급여 1%		18.48	-104.88	2,432	2,479	61.94
강제급여 2%	4,002	35.34	30.34	2,536	2,529	63.19
자유채식		122.84	1950.80	2,825	2,695	67.34
전체표준오차					47.58	1.19

¹GE: Gross Energy, DE: Digestible Energy, AME: Apparent Metabolizable Energy,
AMEn : Nitrogen Corrected Metabolizable Energy.

표 4-11. 남은 음식물의 대사에너지와 질소축적(2차 실험)

처리구	GE ¹ (kcal/kg)	사료섭취량 (g)	N 축적 (mg)	AME (kcal/kg)	AMEn (kcal/kg)	AMEn/GE (%)
강제급여 1%		17.37	-179.03	2,676	2,761 ^b	63.12 ^b
강제급여 2%	4,371	35.51	-91.74	2,685	2,706 ^b	61.91 ^b
자유채식		111.72	1602.44	3,087	2,969 ^a	67.95 ^a
전체표준오차					37.66	0.86

^{a, b}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹GE: Gross Energy, DE: Digestible Energy, AME: Apparent Metabolizable Energy,
AMEn : Nitrogen Corrected Metabolizable Energy.

표 4-12. 남은 음식물의 대사에너지와 질소축적(3차 실험)

처리구	GE ¹ (kcal/kg)	사료섭취량 (g)	N 축적 (mg)	AME (kcal/kg)	AMEn (kcal/kg)	AMEn/GE (%)
강제급여 1%		20.00	-28.14	2,800	2,812	58.56
강제급여 2%	4,801	38.16	58.50	2,701	2,688	55.98
자유채식		195.94	644.84	2,711	2,684	55.91
전체표준오차					55.82	1.16

¹GE: Gross Energy, DE: Digestible Energy, AME: Apparent Metabolizable Energy,
AMEn : Nitrogen Corrected Metabolizable Energy.

2. 육성돈에 대한 남은 음식물의 영양소 함량 및 대사에너지 평가

실험사료의 원료로 이용된 남은 음식물의 영양소 함량과 단백질 소화율 및 대사에너지는 표 4-13와 4-14에 나타냈다. 실험 8에 적용된 남은 음식물(표 4-13)의 대사에너지는 2,356kcal/kg이며 단백질 소화율은 61.35%로 나타났다. 조단백질과 조지방은 각각 21.63%와 9.95%이었으며 특히 칼슘과 염분이 3.99%와 2.6%로 다른 주요 사료원료에 비하여 높았다. 이러한 결과로 칼슘과 염분함량으로 인하여 남은 음식물의 최대 급여수준은 약 15%로 사료되었다. 필수 아미노산 중 라이신과 메치오닌 함량은 0.47%, 0.29%로 옥수수과 비슷한 수준이었다. 실험 9의 남은 음식물은 가소화에너지가 2,779kcal/kg으로 이규호(1999)가 측정한 11종의 남은 음식물의 평균값인 2,597kcal/kg에 비해서 높은 경향을 보였다(표 4-14). 한편 외관상 대사에너지는 2,651kcal/kg 이고 질소보정 대사에너지는 2,583kcal/kg으로 나타났다.

표 4-13. 남은 음식물의 영양소 함량

남은 음식물	영양소 함량
건물(%)	89.10
총에너지(GE), kcal/kg	4,176
가소화에너지(DE), kcal/kg	2,497
대사에너지(ME), kcal/kg	2,356
단백질 소화율(%)	61.35
조단백질(%)	21.63
조지방(%)	9.95
칼슘(%)	3.99
염분(%)	2.60
필수 아미노산(%)	
아르지닌	0.71
히스티딘	0.69
이소루신	0.55
루신	1.20
라이신	0.47
메치오닌	0.29
페닐알라닌	0.72
트레오닌	0.66
타이로신	0.47
발린	0.73

표 4-14. 육성돈에 대한 남은 음식물의 대사에너지가

처리구	GE ¹ (kcal/kg)	사료섭취량 (g)	N 축적 (g)	DE (kcal/kg)	AME (kcal/kg)	AMEn (kcal/kg)	AMEn /GE (%)
	4,193	2,510	25.51	2,779	2,651	2,583	61.60
표준오차						77.32	1.84

¹GE: Gross Energy, DE: Digestible Energy, AME: Apparent Metabolizable Energy, AMEn : Nitrogen Corrected Metabolizable Energy.

3. 실험 1

린코마이신의 첨가·급여가 육계의 생산성에 미치는 영향은 표 4-15에 나타냈다. 실험 전 기간의 증체량은 남은 음식물을 첨가하지 않은 옥수수 대두박 위주의 사료 급여구가 남은 음식물 10% 급여구에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다. 그러나 린코마이신의 첨가·급여구는 대조구에 비하여 현저하게 높았으며($P < 0.05$) 2.2mg/kg 처리구에서 증체량은 1399.2g으로 린코마이신 처리구중 제일 높았다. 이러한 결과는 린코마이신 2.2~4.4mg/kg 수준의 첨가·급여가 육계의 증체율이나 사료요구율을 현저하게 개선하였다는 보고(Zavala, 1967; Miller 등, 1971; Church, 1977)와 일치하였으며, 4mg/kg의 린코마이신의 첨가·급여구에서 증체율이 10% 개선되었다는 Dafwang 등 (1985)과 사료에 2.2mg/kg의 린코마이신의 첨가·급여가 육계의 생산성을 개선하지 못했다는 Leesson 등(1980), Leeson(1984), Proudfoot 등(1990)의 보고와는 상반되는 결과를 나타냈다. 남은 음식물과 린코마이신 첨가·급여구간에서 증체량에 미치는 상호작용은 없었지만 남은 음식물 10% 급여시 린코마이신 첨가·급여는 대조구에 비하여 증가하는 경향을 보였다. 본 실험의 결과 남은 음식물은 린코마이신의 첨가·급여에 비하여 증체량에 미치는 영향은 적은 것으로 사료된다.

남은 음식물을 적용하지 않은 처리구들의 평균 사료섭취량은 2621.4g으로 남은 음식물 10% 급여구의 2805.0g에 비하여 현저하게 낮았으며($P < 0.05$), 린코마이신 2.2mg/kg 처리구는 2791.5g으로 대조구와 린코마이신 4.4mg/kg 처리구에 비하여 섭

취량이 현저하게 증가하였다($P < 0.05$). 사료섭취량은 전체 처리구중 남은 음식물 10%와 2.2mg/kg 린코마이신 혼합급여구에서 제일 높았지만 남은 음식물과 린코마이신의 첨가·급여가 사료섭취량에 미치는 상호작용은 없었다.

평균 사료요구율은 남은 음식물을 적용하지 않은 옥수수 대두박 위주의 사료를 급여구에서 1.816으로 남은 음식물 10% 급여구의 1.915에 비해 개선되는 경향을 보였지만 처리구간에 통계적인 차이는 없었다. 사료요구율은 사료내 린코마이신의 수준이 증가에 따라서 개선되는 경향을 보였으며 4.4mg/kg 린코마이신 처리구에서 1.837로 가장 우수하였다.

혈액의 성상은 표 4-16에 나타냈는데 혈청 단백질을 제외하고는 처리구간에 통계적인 차이는 없었다. Keyser 등(1968), Panigraphy 등(1969), Lisano(1977)은 사료내 단백질 수준이 높을수록 혈청 단백질이 증가하며 가금에서 혈청 단백질이 증가하면 생산성이 개선되었다고 하였으나 본 실험에서는 대조구에서 3.66g/dL로 다른 처리구에 비하여 높았으므로 상반된 결과를 나타냈다. 육계 5주령의 평균 단백질 함량은 3.33g/dL으로 평균 3.16g/dL인 류 등(1998)의 결과와 비슷한 경향을 보였다. Cholesterol은 남은 음식물 급여구가 급여하지 않은 처리구에 비하여 감소하는 경향을 보였고 Ca, Mg, P은 처리구간에 차이를 보이지 않았다. 또한 AST, GGT, Glucose, Albumin 그리고 A/G도 대조구와 처리구에서 통계적인 차이가 없었다.

체중에 대한 간의 비율은 대조구와 남은 음식물 급여구간에 통계적인 차이는 없었으나(표 4-17), 린코마이신 첨가·급여구 사이에서는 4.4mg/kg 처리구가 대조구에 비하여 현저하게 감소하는 경향을 나타냈다($P < 0.05$). 또한 남은 음식물과 린코마이신이 체중에 대한 간의 비율을 낮추는데 상호작용이 있었다($P < 0.05$). 복강지방 함량은 처리구간에 통계적인 차이가 없었으나 남은 음식물 급여구는 대조구에 비하여 감소하는 경향을 나타냈고 린코마이신 첨가·급여구간에는 차이가 없었다. 이러한 결과는 남은 음식물 사료에서 문제될 수 있는 독성에 의해 체중 대 간의 비율이 대조구보다 높을 것으로 예측한 결과와는 다르게 나타났다. 그리고 남은 음식물의

급여수준이 증가함에 따라서 복강지방의 비율은 감소하는 경향을 나타냈으나 처리구간에 통계적인 차이는 없었다.

표 4-15. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 육계의 증체량, 사료섭취량, 사료요구율에 미치는 영향

LM(mg/kg) ¹	FW(%)			0			10		
	0	10	\bar{x}	0	10	\bar{x}	0	10	\bar{x}
	증체량(g)			사료섭취량(g)			사료요구율		
0	1324.2	1324.0	1324.1 ^b	2604.6	2772.5	2688.6 ^b	1.867	1.940	1.904
2.2	1433.3	1362.6	1399.2 ^a	2698.6	2884.5	2791.5 ^a	1.787	1.925	1.856
4.4	1405.6	1365.9	1385.4 ^a	2561.0	2758.1	2659.5 ^b	1.794	1.880	1.837
\bar{x}	1387.5	1350.6		2621.4 ^b	2805.0 ^a		1.816	1.915	
분산분석	자유도			확률					
FW	1			0.123			0.001		
LM	2			0.026			0.001		
FW×LM	2			0.481			0.806		

^{a, b}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

표 4-16. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 혈액의 성상에 미치는 영향

LM ¹ (mg/kg)	FW (%)	Chol ² mg/dL	Ca mg/dL	P mg/dL	Mg mg/dL	AST U/dL	BUN mg/dL	GGT U/L	Gluc mg/dL	Prot g/dL	Alb g/dL	A/G
0	0	137.44	9.70	7.19	2.39	220.60	2.08	20.80	259.80	3.66 ^a	1.50	0.70
2.2	0	136.78	9.02	7.30	2.34	225.00	2.51	17.20	235.86	3.46 ^{ab}	1.50	0.76
4.4	0	136.42	8.54	7.52	2.42	220.00	1.91	17.60	234.63	3.14 ^c	1.36	0.78
0	10	133.16	9.22	7.48	2.31	209.20	1.59	19.20	252.80	3.32 ^{bc}	1.40	0.74
2.2	10	132.58	9.36	8.18	2.51	201.00	1.89	17.40	273.16	3.18 ^c	1.40	0.76
4.4	10	131.82	9.74	7.66	2.51	222.00	2.41	14.60	219.64	3.22 ^{bc}	1.48	0.80
전체표준오차		3.49	0.14	0.14	0.04	4.24	0.15	0.92	5.71	0.05	0.02	0.01

^{a, b, c}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

²Chol: Cholesterol, Ca: Calcium, P: Phosphorus, Mg: Magnesium, GGT: Gamma glutamyltransferase, BUN: Blood urea nitrogen, AST: Aspartate aminotransferase, Prot: Protein, Alb: Albumin, A/G: Albumin/globulin.

표 4-17. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 간, 복강지방에 미치는 영향

LM(mg/kg) ¹	FW(%)			복강지방(%)		
	0	10	\bar{x}	0	10	\bar{x}
		간(%)				
0	2.48	2.20	2.34 ^a	0.81	0.85	0.83
2.2	2.12	2.12	2.12 ^b	0.83	0.65	0.74
4.4	1.95	2.17	2.06 ^b	1.13	0.70	0.92
\bar{x}	2.18	2.16		0.93	0.74	
분산분석	자유도	----- 확 율 -----				
FW	1		0.747			0.085
LM	2		0.003			0.426
FW×LM	2		0.015			0.214

^{a, b} 는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

4. 실험 2

린코마이신의 첨가·급여가 육계의 생산성에 미치는 영향은 표 4-18에 나타냈다. 실험 전 기간 동안의 평균 증체량은 남은 음식물 급여구가 음식물을 급여하지 않은 옥수수 대두박 위주의 사료를 급여한 대조구보다 증가하는 경향을 보였으며 남은 음식물 5% 급여구에서 제일 높았으나 처리구간에 통계적인 차이는 없었다. 이러한 결과는 사육 전기 3주 동안에 남은 음식물에 대한 기호성이 낮은 원인으로 사료섭취량이 적어져 증체량이 대조구에 비해 감소하였으나 후기에는 음식물 사료에 적응됨에 따라 사료섭취량이 증가하여 증체량이 개선되었음을 시사한다. 린코마이신의 첨가·급여가 증체량에 미치는 영향은 실험 1의 결과와는 다르게 4.4mg/kg 수준에서 1384.4g으로 대조구에 비하여 현저하게 증가하였지만(P<0.05), 2.2mg/kg 처리구와 통계적인 차이는 없었다. 남은 음식물과 린코마이신이 증체량에 미치는 상호작용은 실험 1과 동일하게 영향이 없었고 남은 음식물 10% 급여구중 린코마이신 4.4mg/kg를 급여한 처리구에서 다른 처리구에 비하여 높았다.

사료섭취량은 남은 음식물 10% 급여구에서 2584.2g으로 대조구와 남은 음식물5%

급여구에 비하여 높았으며 사료내 남은 음식물 수준이 증가함에 따라 섭취량이 증가하는 경향을 보여 실험 1과 동일한 경향을 나타냈다. 또한 린코마이신 첨가·급여구간에서도 실험 1과 동일하게 2.2mg/kg의 처리구에서 제일 높았다. 남은 음식물과 린코마이신이 사료섭취량에 미치는 상호작용은 통계적인 차이는 없었으나 전체 처리구 중 남은 음식물을 급여하지 않은 린코마이신 4.4mg/kg 처리구에서 사료섭취량은 2475.7g으로 제일 낮았고 남은 음식물을 10% 급여한 4.4mg/kg 처리구에서 제일 높았다.

사료요구율은 남은 음식물 5% 급여구에서 1.848로 10% 급여구에 비하여 현저하게 개선되었지만($P<0.05$) 이러한 결과는 남은 음식물 처리구의 사료요구율이 대조구보다 높았던 실험 1과는 상반된 결과를 나타냈다. 린코마이신 첨가·급여구간에서는 통계적인 차이는 없었지만 실험 1의 결과와 동일하게 사료내 린코마이신의 수준이 증가할수록 개선되는 경향을 나타냈다.

표 4-19의 혈액의 성상에서 BUN은 남은 음식물 5% 급여구중 린코마이신을 첨가·급여하지 않은 처리구에서 15.49mg/dL으로 현저하게 증가하였다($P<0.05$). 이는 다른 실험의 BUN 수치를 고려할 때 실험상 오차로 사료된다.

남은 음식물과 린코마이신의 첨가·급여가 간, 복강지방에 미치는 영향은 표 4-20에 나타냈다. 체중에 대한 간의 비율은 실험 1과 2에서 동일한 경향을 보였으며 처리구간에 통계적인 차이는 없었지만 남은 음식물 급여 수준이 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 린코마이신 첨가·급여구중 4.4mg/kg 수준에서 간의 비율이 제일 낮은 경향을 보였다. 복강지방의 비율은 남은 음식물 급여구가 0.61%로 남은 음식물을 급여하지 않은 대조구의 0.97% 비하여 현저하게 감소하였으나($P<0.05$) 린코마이신의 첨가·급여로 복강지방함량은 처리구간에 차이가 없었다.

표 4-18. 링크마이신과 남은 음식물의 급여가 육계의 증체량, 사료섭취량, 사료요구율에 미치는 영향

FW(%) LM(mg/kg) ¹	증체량(g)				사료섭취량(g)				사료요구율			
	0	5	10	\bar{x}	0	5	10	\bar{x}	0	5	10	\bar{x}
0	1318.1	1356.0	1295.3	1323.6 ^b	2499.1	2488.1	2501.7	2496.3	1.906	1.837	1.942	1.895
2.2	1373.9	1381.1	1352.9	1369.1 ^a	2545.9	2565.2	2615.3	2575.5	1.855	1.858	1.933	1.882
4.4	1353.1	1393.9	1407.6	1384.4 ^a	2475.7	2580.7	2635.5	2563.9	1.831	1.851	1.872	1.851
\bar{x}	1349.2	1377.2	1351.9		2506.9	2544.6	2584.2		1.864 ^{ab}	1.848 ^b	1.915 ^a	
분산분석 자유도				확률								
FW	2			0.305				0.384				0.040
LM	2			0.008				0.314				0.232
FW×LM	4			0.412				0.814				0.540

^{a, b}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

표 4-19. 링크마이신과 남은 음식물의 급여가 혈액의 성상에 미치는 영향

LM ¹ (mg/kg)	FW (%)	Chol ² mg/dL	Ca mg/dL	P mg/dL	Mg mg/dL	AST U/dL	BUN mg/dL	GGT U/L	Prot g/dL	Alb g/dL	A/G
0	0	99.43	11.50	5.11	3.09	198.00	13.56 ^{ab}	10.33	2.73	1.23	0.80
2.2	0	124.93	11.10	5.08	2.78	216.33	5.66 ^c	13.33	3.07	1.37	0.83
4.4	0	120.43	11.20	4.14	3.31	197.00	10.51 ^{abc}	12.33	2.93	1.30	0.83
0	5	98.83	12.10	4.73	3.10	212.00	15.49 ^a	12.67	2.77	1.20	0.80
2.2	5	124.47	10.60	5.63	2.78	172.33	6.62 ^c	13.00	3.40	1.50	0.80
4.4	5	98.63	11.23	3.79	3.01	204.33	5.34 ^c	12.67	2.70	1.20	0.80
0	10	103.50	10.47	5.31	4.76	185.67	8.26 ^{bc}	12.67	2.80	1.20	0.77
2.2	10	99.83	9.53	5.93	2.56	239.00	4.65 ^c	12.00	2.93	1.40	0.90
4.4	10	102.60	11.40	4.21	2.54	203.33	4.82 ^c	12.33	3.10	1.27	0.70
전체표준오차		3.53	0.24	0.24	0.25	5.89	0.92	0.33	0.06	0.03	0.02

^{a, b, c}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

²Chol: Cholesterol, Ca: Calcium, P: Phosphorus, Mg: Magnesium, GGT: Gamma glutamyltransferase, BUN: Blood urea nitrogen, AST: Aspartate aminotransferase, Prot: Protein, Alb: Albumin, A/G: Albumin/globulin.

표 4-20. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 간, 복강지방에 미치는 영향

LM(mg/kg) ¹	FW(%)				복강지방(%)			
	0	5	10	\bar{x}	0	5	10	\bar{x}
	간(%)				복강지방(%)			
0	3.01	2.27	2.43	2.57	0.90	0.57	0.56	0.67
2.2	2.56	2.85	2.34	2.58	1.04	0.57	0.66	0.75
4.4	2.58	2.45	2.53	2.52	0.98	0.70	0.61	0.76
\bar{x}	2.71	2.52	2.44		0.97 ^a	0.61 ^b	0.61 ^b	
분산분석	자유도	-----		확률	-----			
FW	2			0.140	0.001			
LM	2			0.897	0.449			
FW×LM	4			0.049	0.828			

^{a, b} 는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

5. 실험 3

남은 음식물과 린코마이신의 첨가·급여가 육계의 생산성에 미치는 영향은 표 4-21에 나타냈다. 실험 전 기간의 평균 증체량은 남은 음식물 7.5% 급여구가 1806.2g으로 남은 음식물을 첨가하지 않은 옥수수-대두박 위주의 사료를 급여한 대조구와 남은 음식물 15% 급여구에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 처리구간에 통계적인 차이는 없었다. 이병석 등(1998)은 남은 음식물을 배합사료에 9% 까지 혼합 급여 하였을 때 육성을 및 증체량에 거의 차이가 없다고 보고하였는데 본 실험에서는 남은 음식물 15% 급여구에서도 대조구와 증체량에 차이가 없었다. 린코마이신의 첨가·급여가 증체량에 미치는 영향은 4.4mg/kg 수준에서 1808.9g으로 대조구에 비하여 현저하게 증가하였지만(P<0.05) 2.2mg/kg 처리구와 통계적인 차이는 없었다. 이러한 결과는 린코마이신 4.4mg/kg 수준의 첨가·급여가 육계의 증체량을 현저하게 증가하였다는 보고(Marusich 등, 1973; Marusich 등, 1978)와 일치하였으며, 4mg/kg의 린코마이신의 첨가·급여구에서 증체율이 10% 개선되었다는 Dafwang 등(1985)의 결과와는 상이하였고, 2.2mg/kg의 린코마이신의 첨가·급여가 육계의 생

산성을 개선하지 못했다는 Leesson 등(1980), Leeson(1984), Proudfoot 등(1990)의 보고와는 상반되었다. 본 실험의 결과 남은 음식물과 린코마이신이 증체량에 미치는 상호작용은 없었으나 남은 음식물 7.5% 급여구중 린코마이신 2.2mg/kg 첨가·급여구에서 제일 높은 증체율을 보였고 남은 음식물 급여구에서 린코마이신의 첨가·급여로 증체량이 개선하는 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다.

남은 음식물을 급여하지 않은 대조구의 평균 사료섭취량이 3096.4g인데 비하여 남은 음식물 급여구는 현저하게 증가하여 7.5%, 15% 급여구에서 각각 3214.0g, 3269.1g으로 급여수준이 증가할수록 섭취량이 높았다($P<0.05$). 린코마이신 첨가·급여구중 4.4mg/kg의 처리구에서 사료섭취량은 대조구 보다 현저하게 증가하였으나 ($P<0.05$) 2.2mg/kg 처리구와는 차이가 없었다. 남은 음식물과 린코마이신이 사료섭취량에 미치는 상호작용은 통계적인 차이는 없었으나 전체 처리구 중 남은 음식물 15% 급여구중 린코마이신 4.4mg/kg 첨가·급여구에서 사료섭취량은 3364.7g으로 제일 높았다.

평균 사료요구율은 대조구에 비하여 남은 음식물 급여구에서 현저하게 높았고 남은 음식물 급여 수준이 증가할수록 높은 경향을 보였다($P<0.05$). 린코마이신 첨가·급여구간에서는 2.2mg/kg 처리구가 1.760으로 현저하게 개선되었으나($P<0.05$), 4.4mg/kg 처리구와 대조구는 통계적인 차이가 없었다. 그리고 남은 음식물에 대한 린코마이신의 상호작용은 없었으나 린코마이신의 첨가·급여가 사료요구율을 개선하는 경향을 보였다.

혈액의 성상(표 4-22)에서는 처리구간에 통계적인 차이는 없었으나 총 Cholesterol 농도는 남은 음식물 7.5% 급여구에서 감소하는 경향을 보였다. 그리고 혈청 BUN 농도는 남은 음식물 7.5% 급여구중 린코마이신 2.2mg/kg 첨가·급여구가 1.06mg/dL으로 대조구의 1.83mg/dL과 전 처리구중에서 가장 낮게 분석되었다. Kubena 등(1990)은 aflatoxin에 감염된 병아리의 혈청 총 단백질과 Alb의 함량은 대조구 보다 감소하고 Gamma glutamyl-transferase는 유의적으로 증가한다고 보고

하였다. 따라서 본 시험의 결과, 혈청 단백질, Albumin 함량, GGT 및 AST 농도가 대조구와 차이가 없었으므로 간과 심장 질환으로 인한 장애가 없는 건강한 상태라고 사료된다. 또한 혈청내 Ca, P, Mg도 처리구간에 차이가 없었으며 A:G의 비율도 차이가 없었다.

체중에 대한 간의 비율은 남은 음식물 7.5% 급여구가 대조구와 남은 음식물 15% 급여구에 비하여 현저하게 감소하였고($P < 0.05$) 링크마이신 첨가·급여구간은 통계적인 차이가 없었다(표 4-23). 이러한 결과는 남은 음식물에서 문제될 수 있는 독성에 의해 체중 대 간의 비율이 대조구 보다 높을 것으로 예측한 결과와는 다르게 나타났다. 복강지방의 함량은 대조구에 비하여 남은 음식물 급여구가 증가하는 경향을 보였는데 이는 남은 음식물 처리구와 대조구간에 성장의 차이에 기인한 것으로 사료된다. 또한 링크마이신 첨가·급여구는 복강지방이 감소하는 경향을 나타냈으나 통계적인 차이는 없었다.

표 4-21. 링크마이신과 남은 음식물의 급여가 육계의 증체량, 사료섭취량, 사료요구율에 미치는 영향

FW(%) LM(mg/kg) ¹	0				7.5				15				\bar{x}			
	0	7.5	15	\bar{x}	0	7.5	15	\bar{x}	0	7.5	15	\bar{x}	0	7.5	15	\bar{x}
	증체량(g)								사료섭취량(g)				사료요구율			
0	1760.3	1757.2	1755.7	1757.7 ^a	3067.6	3171.8	3211.2	3144.7 ^b	1.743	1.805	1.855	1.796 ^c				
2.2	1817.9	1827.6	1780.5	1808.7 ^a	3119.0	3212.9	3216.9	3182.9 ^{ab}	1.716	1.758	1.807	1.760 ^b				
4.4	1778.0	1833.9	1814.9	1808.9 ^a	3102.5	3257.4	3364.7	3241.5 ^a	1.745	1.776	1.854	1.792 ^c				
\bar{x}	1785.4	1806.2	1783.7		3096.4 ^b	3214.0 ^a	3269.1 ^a		1.735 ^c	1.780 ^b	1.837 ^a					
분산분석	자유도								확률							
FW	2								0.458							
LM	2								0.021							
FW×LM	4								0.525							
									0.002							
									0.115							
									0.600							
									0.001							
									0.029							
									0.848							

^{a, b, c}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다($P < 0.05$).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

표 4-22. 링크마이신과 남은 음식물의 급여가 혈액의 성상에 미치는 영향

LM ¹ (mg/kg)	FW (%)	Prot ² g/dL	Alb g/dL	BUN mg/dL	Chol mg/dL	GGT U/dL	AST U/dL	Ca mg/dL	P mg/dL	Mg mg/dL	A/G
0	0	2.47	1.40	1.83	131.93	14.00	246.67	6.07	9.65	1.98	1.33
2.2	0	2.33	1.27	1.33	113.17	11.33	213.67	7.93	8.74	2.12	1.23
4.4	0	2.07	1.17	1.14	123.12	11.67	237.00	6.77	8.73	1.83	1.43
0	7.5	2.27	1.27	1.13	105.50	11.67	193.00	6.60	10.08	1.83	1.27
2.2	7.5	2.00	1.13	1.06	91.97	8.33	185.33	6.33	9.47	1.62	1.30
4.4	7.5	2.00	1.13	1.15	97.77	10.67	196.67	5.53	8.70	1.61	1.30
0	15	2.40	1.23	1.52	118.47	9.67	229.67	6.47	10.32	1.82	1.13
2.2	15	2.33	1.20	1.16	106.20	10.33	208.00	6.10	9.63	1.67	1.07
4.4	15	2.20	1.23	1.38	113.30	10.33	195.00	6.60	10.17	1.73	1.27
전체표준오차		0.06	0.03	0.07	4.22	0.43	5.87	0.25	0.18	0.05	0.04

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

²Prot: Protein, Alb: Albumin, BUN: Blood urea nitrogen, Chol: Cholesterol, GGT: Gamma glutamyltransferase, AST: Aspartate aminotransferase, Ca: Calcium, P: Phosphorus, Mg: Magnesium, A/G: Albumin/globulin.

표 4-23. 링크마이신과 남은 음식물의 급여가 간, 복강지방에 미치는 영향

LM(mg/kg) ¹	FW(%)				복강지방(%)			
	0	7.5	15	\bar{x}	0	7.5	15	\bar{x}
	간(%)				복강지방(%)			
0	2.23	2.12	2.34	2.23	1.65	1.82	1.61	1.69
2.2	2.10	2.11	2.20	2.13	1.42	1.62	1.86	1.63
4.4	2.44	2.06	2.25	2.25	1.46	1.79	1.64	1.63
\bar{x}	2.26 ^a	2.10 ^b	2.26 ^a		1.51	1.74	1.70	
분산분석	자유도				확률			
FW	2				0.018			
LM	2				0.157			
FW×LM	4				0.103			
					0.126			
					0.846			
					0.426			

^{a, b} 는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

6. 실험 4

남은 음식물과 린코마이신의 첨가·급여가 육계의 생산성의 결과는 표 4-24에 나타났다. 실험 전 기간의 평균 증체량은 남은 음식물 15% 급여구가 1802.4g으로 남은 음식물을 첨가하지 않은 옥수수-대두박 위주의 사료를 급여한 대조구와 남은 음식물 7.5% 급여구에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 처리구간에 통계적인 차이는 없었다. 이러한 결과는 남은 음식물 급여구가 대조구와 비교하여 육계의 증체량에 차이가 없었던 실험 3의 결과와 동일하다. 린코마이신의 첨가·급여가 증체량에 미치는 영향은 4.4mg/kg 수준에서 1766.4g으로 대조구와 2.2mg/kg 처리구에 비하여 증가하는 경향을 보였지만 통계적인 차이가 없었다. Leesson 등(1980), Leeson(1984), Proudfoot 등(1990)은 린코마이신 2.2mg/kg 첨가·급여가 사육전기에는 증체량이 현저하게 증가하였으나 후기에는 개선 효과가 없었다는 보고했는데 이는 본 실험의 결과와 일치하며 린코마이신 4.4mg/kg 첨가·급여구도 실험 3과는 다르게 대조구와 통계적인 차이가 없었다. 본 실험의 결과 남은 음식물과 린코마이신이 증체량에 미치는 상호작용은 없었으나 남은 음식물 15% 급여구중 린코마이신 2.2mg/kg 첨가·급여구에서 제일 높은 증체율을 보였고 남은 음식물 급여구에서 린코마이신의 첨가·급여로 증체량이 개선하는 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다. 실험 결과 증체량은 남은 음식물 첨가구가 대조구에 비하여 증가하는 경향을 보였는데 이는 남은 음식물이 유효 미생물에 의해서 발효 건조되었다는 점과 여러 가지 동, 식물성 원료로 이루어져 영양소의 공급원이 다양하고 15% 첨가구의 경우 지방의 함량이 대조구에 비해 약 1% 정도 높은 점에 원인이 있다고 생각된다.

사료섭취량은 남은 음식물 15% 급여구의 평균 사료섭취량은 3402.7g으로 대조구와 남은 음식물 7.5% 급여구에 비하여 현저하게 증가하였다($P < 0.05$). 린코마이신 첨가·급여구간에서는 대조구보다 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다. 남은 음식물과 린코마이신이 사료섭취량에 미치는 상호작용은 통계적인 차이는 없었다.

평균 사료요구율은 대조구에 비하여 남은 음식물 급여구에서 현저하게 높았고 남은 음식물 급여 수준이 증가할수록 높은 경향을 보였다($P < 0.05$). 린코마이신 첨가·급여구간에서는 대조구에 비하여 개선되는 경향을 보였으나 통계적인 차이가 없었다. 그리고 남은 음식물에 대한 린코마이신의 상호작용은 없었으나 린코마이신의 첨가·급여가 사료요구율을 개선하는 경향을 보였다.

혈액의 정상(표 4-25)에서는 Ca를 제외하고 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 특히 총콜레스테롤 함량은 실험 3과 동일하게 남은 음식물 급여구가 남은 음식물을 급여하지 않은 처리구에 비해서 감소하는 경향을 보였다. 혈청내 Ca 함량은 대조구가 8.50mg/dL으로 제일 높았으며 남은 음식물을 급여하지 않은 처리구에 비해서 남은 음식물 급여구가 현저하게 감소하였다($P < 0.05$). Savage(1973)와 김성겸(1982)는 혈청내 Ca 수준은 사료의 Ca 수준이 증가할 수록 증가하고 사료의 P 수준이 낮을수록 높다고 보고하였는데 Ca 함량이 높은 남은 음식물이 첨가된 처리구에서는 무기태 Ca 공급원인 Limestone의 사료 첨가량이 대조구에 비해서 현저하게 적은 이유로 Ca의 이용율의 차이에 기인한 것으로 사료된다.

체중에 대한 간의 비율은 남은 음식물 급여구와 린코마이신 첨가·급여구간에서 통계적인 차이가 없었다(표 4-26). 이러한 결과는 남은 음식물에서 문제될 수 있는 독성에 의해 체중 대 간의 비율이 대조구 보다 높을 것으로 예측한 결과와는 다르게 나타났다. 복강지방의 함량은 대조구에 비하여 남은 음식물 급여구가 증가하는 경향을 보였는데 이는 남은 음식물 처리구와 대조구간에 성장의 차이에 기인한 것으로 사료된다. 또한 린코마이신 첨가·급여구에서도 차이는 없었다.

표 4-24. 링크마이신과 남은 음식물의 급여가 육계의 증체량, 사료섭취량, 사료요구율에 미치는 영향

FW(%) LM(mg/kg) ¹	0	7.5	15	\bar{x}	0	7.5	15	\bar{x}	0	7.5	15	\bar{x}	
	증체량(g)				사료섭취량(g)				사료요구율				
0	1736.8	1720.4	1783.8	1747.0	3082.9	3092.4	3444.7	3206.7	1.775	1.798	1.930	1.835	
2.2	1748.3	1726.5	1819.2	1764.7	3075.1	3062.9	3398.6	3178.9	1.760	1.774	1.869	1.801	
4.4	1742.1	1752.6	1804.4	1766.4	3061.3	3170.3	3364.7	3198.8	1.756	1.808	1.866	1.810	
\bar{x}	1742.4	1733.2	1802.4		3073.1 ^b	3108.5 ^b	3402.7 ^a		1.764 ^b	1.794 ^b	1.888 ^a		
분산분석 자유도	-----				확율				-----				
FW	2				0.063				0.001				0.001
LM	2				0.771				0.897				0.362
FW×LM	4				0.976				0.826				0.734

^{a, b, c}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

표 4-25. 링크마이신과 남은 음식물의 급여가 혈액의 성상에 미치는 영향

LM ¹ (mg/kg)	FW (%)	Prot ² g/dL	Alb g/dL	BUN mg/dL	Chol mg/dL	GGT U/dL	AST U/dL	Ca mg/dL	P mg/dL	Mg mg/dL	A/G
0	0	2.97	1.57	1.80	141.87	15.00	251.67	8.50 ^a	10.13	2.60	1.17
2.2	0	3.77	1.93	2.39	176.30	17.00	268.00	8.17 ^{ab}	11.93	2.70	1.03
4.4	0	2.97	1.50	1.74	142.33	10.00	219.33	7.07 ^{abc}	10.77	2.16	1.13
0	7.5	2.03	1.03	1.29	107.03	9.67	210.67	5.43 ^c	9.78	1.74	1.17
2.2	7.5	2.33	1.30	1.10	126.03	10.00	189.33	6.03 ^c	10.00	1.86	1.30
4.4	7.5	2.50	1.43	1.42	132.97	12.67	215.00	5.80 ^c	9.91	1.96	1.30
0	15	2.43	1.37	1.67	131.07	11.00	211.33	6.27 ^c	10.03	2.03	1.30
2.2	15	2.73	1.43	1.76	134.93	10.67	221.00	6.67 ^{bc}	10.33	2.21	1.13
4.4	15	2.67	1.37	1.56	115.03	12.33	222.00	6.20 ^c	9.77	1.88	1.20
전체표준오차		0.14	0.07	0.12	6.07	0.89	7.97	0.25	0.21	0.09	0.03

^{a, b, c}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

²Prot: Protein, Alb: Albumin, BUN: Blood urea nitrogen, Chol: Cholesterol, GGT: Gamma glutamyltransferase, AST: Aspartate aminotransferase, Ca: Calcium, P: Phosphorus, Mg: Magnesium, A/G: Albumin/globulin.

표 4-26. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가, 간, 복강지방(%)에 미치는 영향

LM(mg/kg) ¹	FW(%)								
	0	7.5	15	\bar{x}	0	7.5	15	\bar{x}	
	간 (%)				복강지방 (%)				
0	2.09	2.20	2.01	2.10	1.62	1.56	2.04	1.74	
2.2	2.12	2.12	2.05	2.10	1.66	1.81	1.80	1.76	
4.4	2.19	2.12	2.27	2.19	1.76	1.83	1.67	1.75	
\bar{x}	2.13	2.15	2.11		1.68	1.73	1.84		
분산분석	자유도	-----						확률	-----
FW	2							0.879	0.423
LM	2							0.370	0.992
FW×LM	4							0.444	0.245

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

7. 실험 5

남은 음식물과 린코마이신의 첨가·급여가 육계의 생산성에 미치는 실험 5의 결과는 표 4-27에 나타났다. 실험 전 기간의 평균 증체량은 남은 음식물 7.5% 급여구가 1690.2g으로 남은 음식물을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 처리구간에 통계적인 차이는 없었다. 린코마이신의 첨가·급여가 증체량에 미치는 영향은 4.4mg/kg 수준에서 1691.1g으로 대조구와 2.2mg/kg 처리구에 비하여 증가하는 경향을 보였지만 통계적인 차이가 없었다. 본 실험의 결과 남은 음식물과 린코마이신이 증체량에 미치는 상호작용은 없었고 남은 음식물을 급여하지 않은 린코마이신 4.4mg/kg 첨가·급여구에서 제일 높은 증체율을 보였다.

사료섭취량은 남은 음식물 급여구가 남은 음식물을 급여하지 않은 대조구에 비해서 현저하게 증가하였다($P < 0.05$). 한편 린코마이신 첨가·급여구간에서는 대조구와 통계적인 차이는 없었다. 또한 남은 음식물과 린코마이신이 사료섭취량에 미치는 상호작용은 일관성이 없었다.

평균 사료요구율은 사료섭취량과 비례하여 남은 음식물 급여구에서 현저하게 높았고 남은 음식물 급여 수준이 증가할수록 높은 경향을 보였다($P < 0.05$). 하지만 린

코마이신 첨가·급여구간에서는 통계적인 차이가 없었다. 그리고 남은 음식물과 린코마이신의 상호작용은 없었으나 린코마이신 첨가·급여구가 일반적으로 사료요구율을 개선하는 경향을 보였다.

혈청 단백질은 남은 음식물 7.5% 급여구가 2.54g/dL로 전체 처리구중 가장 높았으나(P<0.05) 대조구와는 차이가 없었다(P<0.05)(표 4-28). Ca은 대조구가 가장 높았고 P은 남은 음식물 7.5% 급여가 증가하였으며 Mg은 린코마이신 2.2mg/kg 처리구에서 유의적으로 증가하였다(P<0.05). 또한 A/G는 린코마이신 첨가·급여구가 린코마이신을 첨가하지 않은 처리구보다 낮은 경향을 보였다.

체중에 대한 복강지방의 비율(표 4-29)은 남은 음식물 급여구와 린코마이신 첨가·급여구간에 차이가 없었다.

표 4-27. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 육계의 증체량, 사료섭취량,

사료요구율에 미치는 영향

FW(%) LM(mg/kg) ¹	0	7.5	15	\bar{x}	0	7.5	15	\bar{x}	0	7.5	15	\bar{x}
	증체량(g)				사료섭취량(g)				사료요구율			
0	1614.6	1674.1	1700.3	1663.0	2689.7	2877.8	3015.2	2860.9	1.666	1.719	1.773	1.719
2.2	1625.9	1690.4	1653.8	1656.7	2712.2	2927.9	2959.4	2866.5	1.668	1.733	1.789	1.730
4.4	1719.5	1706.1	1647.7	1691.1	2790.2	2910.9	2911.2	2870.8	1.622	1.706	1.767	1.699
\bar{x}	1653.3	1690.2	1667.3		2730.6 ^b	2905.5 ^a	2962.0 ^a		1.652 ^c	1.720 ^b	1.777 ^a	
분산분석	자유도				확률							
FW	2				0.291				0.001			
LM	2				0.301				0.975			
FW×LM	4				0.115				0.416			

^{a, b, c}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

표 4-28. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 혈액의 성상에 미치는 영향

LM ¹ (mg/kg)	FW (%)	Prot ² g/dL	Alb g/dL	AST U/dL	BUN mg/dL	Chol mg/dL	Ca mg/dL	P mg/dL	Mg mg/dL	GGT U/L	A/G
0	0	3.12 ^{bc}	1.48 ^c	108.40	3.27	130.44 ^{bc}	9.66 ^{bc}	15.22	3.27	32.0	0.92
2.2	0	3.58 ^a	1.66 ^{ab}	100.40	5.11	137.30 ^{bc}	11.18 ^a	14.92	3.54	10.6	0.88
4.4	0	2.96 ^c	1.46 ^c	116.20	3.00	144.24 ^{abc}	10.10 ^{abc}	14.33	3.24	11.2	0.98
0	7.5	3.54 ^a	1.68 ^a	113.60	4.48	142.20 ^{abc}	10.96 ^a	17.58	3.59	12.4	0.92
2.2	7.5	3.42 ^{ab}	1.58 ^{abc}	103.00	3.36	144.54 ^{abc}	9.22 ^c	14.04	3.30	12.2	0.86
4.4	7.5	3.25 ^{abc}	1.50 ^{bc}	98.40	3.07	148.04 ^{ab}	9.54 ^{bc}	16.36	3.12	12.0	0.86
0	15	3.52 ^a	1.66 ^{ab}	111.00	3.13	156.48 ^a	10.00 ^{abc}	15.41	3.28	12.0	0.90
2.2	15	3.18 ^{abc}	1.46 ^c	98.60	3.25	121.26 ^c	10.66 ^{ab}	13.16	3.40	9.4	0.86
4.4	15	3.22 ^{abc}	1.48 ^c	85.20	2.84	127.24 ^{bc}	9.74 ^{bc}	15.50	3.13	11.2	0.86
전체표준오차		0.05	0.02	2.75	0.22	2.72	0.15	0.36	0.04	2.26	0.01

^{a, b, c}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

²Prot: Protein, Alb: Albumin, BUN: Blood urea nitrogen, Chol: Cholesterol, GGT: Gamma glutamyltransferase, AST: Aspartate aminotransferase, Ca: Calcium, P: Phosphorus, Mg: Magnesium, A/G: Albumin/globulin.

표 4-29. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 복강지방에 미치는 영향

LM(mg/kg) ¹	FW(%)			
	0	7.5	15	\bar{x}
	복강지방(%)			
0	1.58	1.34	1.72	1.55
2.2	1.43	1.54	1.51	1.49
4.4	1.26	1.49	1.41	1.38
\bar{x}	1.42	1.46	1.55	
분산분석	자유도	-----		확률
FW	2			0.312
LM	2			0.143
FW×LM	4			0.121

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

8. 실험 6

표 4-30에서 린코마이신과 남은 음식을 5주간 급여한 육계의 증체량은 남은 음식물 급여구인 7.5%와 15% 급여구가 남은 음식을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 현저하게 증가하였다($P < 0.05$). 그러나 린코마이신의 첨가·급여구간에서는 통계적인 차이가 없었다. 본 실험의 결과 남은 음식물과 린코마이신이 증체량에 미치는 상호작용은 없었고 남은 음식물 7.5% 급여구중 린코마이신 4.4mg/kg 첨가·급여구에서 1622.8g으로 제일 높은 증체율을 보였다.

사료섭취량은 남은 음식물 7.5%와 15% 급여구의 평균 사료섭취량은 2905.5g과 2962.0으로 급여수준이 증가할수록 현저하게 높았다($P < 0.05$). 린코마이신 첨가·급여구간에서는 대조구와 통계적인 차이는 없었다. 또한 남은 음식물과 린코마이신이 사료섭취량에 미치는 상호작용은 차이가 없었다.

평균 사료요구율은 사료섭취량과 비례하여 남은 음식물 급여구에서 현저하게 높았고 남은 음식물 급여 수준이 증가할수록 높은 경향을 보였다($P < 0.05$). 하지만 린코마이신 첨가·급여구간에서는 통계적인 차이가 없었다. 그리고 남은 음식물에 대한 린코마이신의 상호작용은 없었으나 린코마이신 4.4mg/kg 급여구가 사료요구율을 개선하는 경향을 보였다.

혈청 단백질은 린코마이신 2.2mg/kg 처리구와 남은 음식물 7.5%, 15% 급여구가 대조구에 비해서 현저하게 증가하였고 Alb의 함량도 이들 처리구에서 유의적으로 높았다($P < 0.05$)(표 4-31). 혈중 총콜레스테롤은 남은 음식물 15% 급여구가 현저하게 증가하였다($P < 0.05$). 또한 Ca은 린코마이신 2.2mg/kg 처리구에서 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$).

간과 복강지방의 비율(표 4-32)은 남은 음식물 급여구 또는 린코마이신 첨가·급여구에서 차이가 없었으며 처리구 상호간에서도 유의적인 차이가 없었다.

표 4-30. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 육계의 증체량, 사료섭취량, 사료요구율에 미치는 영향

FW(%) LM(mg/kg) ¹	0	7.5	15	\bar{x}	0	7.5	15	\bar{x}	0	7.5	15	\bar{x}	
	증체량(g)				사료섭취량(g)				사료요구율				
0	1498.4	1576.8	1640.8	1572.0	2608.9	2747.3	2937.1	2764.5	1.741	1.742	1.791	1.758	
2.2	1528.4	1636.1	1610.2	1591.6	2625.0	2811.3	2852.6	2763.0	1.719	1.719	1.771	1.736	
4.4	1596.6	1655.6	1608.0	1620.1	2631.3	2856.8	2873.2	2787.1	1.647	1.726	1.788	1.702	
\bar{x}	1541.1 ^b	1622.8 ^a	1619.6 ^a		2621.7 ^b	2805.1 ^a	2887.6 ^a		1.703 ^b	1.729 ^b	1.783 ^a		
분산분석 자유도					확률								
FW	2					0.038					0.001		
LM	2					0.362					0.893		
FW×LM	4					0.506					0.756		

^{a, b}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

표 4-31. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 혈액의 성상에 미치는 영향

LM ¹ (mg/kg)	FW (%)	Prot ² g/dL	Alb g/dL	AST U/L	BUN mg/dL	Chol mg/dL	Ca mg/dL	P mg/dL	Mg mg/dL	GGT U/L	A/G
0	0	3.44 ^a	1.64	188.00	1.46	147.46	13.94 ^a	8.43 ^d	3.23 ^{ab}	11.40	0.88
2.2	0	2.46 ^b	1.46	158.20	1.38	153.02	13.12 ^b	8.64 ^{cd}	3.41 ^a	10.80	1.52
4.4	0	2.68 ^b	1.64	204.80	1.44	137.96	13.04 ^b	8.84 ^{bcd}	3.25 ^{abc}	12.00	1.58
0	7.5	3.54 ^a	1.58	163.80	1.51	146.14	13.44 ^a	10.70 ^a	3.15 ^{abc}	11.40	0.82
2.2	7.5	2.74 ^b	1.68	183.60	1.49	143.96	13.34 ^b	10.60 ^a	3.28 ^{abc}	12.40	1.58
4.4	7.5	2.56 ^b	1.50	183.00	1.48	121.22	13.14 ^b	10.19 ^{ab}	3.13 ^{abc}	11.20	1.66
0	15	2.70 ^b	1.60	140.90	1.29	145.44	11.78 ^b	9.89 ^{abc}	2.97 ^{cd}	10.60	1.48
2.2	15	2.48 ^b	1.58	169.20	1.31	143.84	11.86 ^b	10.25 ^{ab}	2.73 ^d	13.80	1.82
4.4	15	2.60 ^b	1.64	193.80	1.59	145.78	13.22 ^b	10.28 ^{ab}	3.03 ^{bcd}	12.60	1.82
전체표준오차		0.07	0.02	5.44	0.03	2.54	0.13	0.19	0.04	0.39	0.07

^{a, b, c}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

²Prot: Protein, Alb: Albumin, BUN: Blood urea nitrogen, Chol: Cholesterol, GGT: Gamma glutamyltransferase, AST: Aspartate aminotransferase, Ca: Calcium, P: Phosphorus, Mg: Magnesium, A/G: Albumin/globulin.

표 4-32. 링크마이신과 남은 음식물의 급여가 간, 복강지방에 미치는 영향

LM(mg/kg) ¹	FW(%)								
	0	7.5	15	\bar{x}	0	7.5	15	\bar{x}	
	간(%)				복강지방(%)				
0	2.58	2.78	2.42	2.59	1.39	1.55	1.51	1.48	
2.2	2.59	2.54	2.60	2.58	1.54	1.55	1.46	1.52	
4.4	2.78	2.69	2.89	2.79	1.49	1.50	1.29	1.43	
\bar{x}	2.65	2.67	2.64		1.47	1.53	1.42		
분산분석	자유도	-----				확률	-----		
FW	2					0.973	0.726		
LM	2					0.321	0.813		
FW×LM	4					0.650	0.906		

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

9. 실험 7

본 실험에서는 링크마이신과 남은 음식물의 첨가·급여로 이유자돈의 생산성에 미치는 영향을 조사하였으며 그 결과는 표 4-33에 나타냈다. 실험 개시후 4주간에 증체량은 전체 처리구 중 남은 음식물을 급여하지 않은 링크마이신 55mg/kg 처리구에서 15.1kg으로 제일 높았으나 통계적인 차이는 없었다. 5~8주에서 증체량은 남은 음식물을 급여하지 않은 링크마이신 110mg/kg 처리구에서 20.1kg으로 증가하는 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다. 실험 전 기간의 증체량은 남은 음식물을 급여하지 않은 링크마이신 110mg/kg 처리구에서 가장 높았으나 통계적인 차이는 없었고 링크마이신 첨가구가 무첨가구에 비해서 증체량은 개선되는 경향을 보였다. 또한 남은 음식물은 5%, 10% 급여구가 대조구에 비해서 낮은 증체율을 보였다.

사료섭취량은 실험 전기간 동안에 남은 음식물 급여구가 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 차이는 없었다. 링크마이신 처리구에서도 사료섭취량은 차이가 없었다.

사료요구율은 전체 처리구중 남은 음식물을 급여하지 않은 링크마이신 55mg/kg 처리구에서 가장 개선되는 경향을 보였고 남은 음식물 급여구가 대조구에 비해서 높은 경향을 보였다.

이유자돈의 혈액의 성상(표 4-34)은 혈청 총 콜레스테롤이 남은 음식물 5% 처리구에서 70.53mg/dL로 대조구의 99.30mg/dL보다 현저하게 감소하였다(P<0.05). Ca 함량은 남은 음식물 10% 급여구중 린코마이신 110mg/kg 처리구에서 13.37mg/dL로 대조구에 비해서 현저하게 증가하였다(P<0.05). 그리고 혈청 단백질, Albumin, P, Mg은 처리구간 통계적인 차이가 없었고 AST, GGT, BUN, A/G 또한 대조구와 처리구간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

표 4-33. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 이유자돈의 증체량, 사료섭취량, 사료요구율에 미치는 영향

처리구		증체량(kg)			사료섭취량(kg)			사료요구율		
LM(mg/kg) ¹	FW(%)	4주	8주	전체	4주	8주	전체	4주	8주	전체
----- 주 령 -----										
0	0	13.28	18.82	32.10	27.16	44.96	72.12	2.045	2.389	2.247
55	0	15.12	19.24	34.36	27.66	44.02	71.68	1.829	2.288	2.086
110	0	13.72	20.06	33.78	28.82	47.56	76.38	2.101	2.371	2.261
평균		14.04	19.37	33.41	27.88	45.51	73.39	1.992	2.349	2.198
0	5	9.50	15.08	24.58	22.58	38.48	61.06	2.377	2.552	2.484
55	5	11.02	17.18	28.20	24.30	43.86	68.16	2.205	2.553	2.417
110	5	11.98	17.88	29.86	24.80	43.00	67.80	2.070	2.405	2.270
평균		10.83	16.71	27.55	23.89	41.78	65.67	2.217	2.503	2.390
0	10	9.78	17.82	27.60	24.92	42.56	67.48	2.548	2.388	2.445
55	10	10.08	19.88	29.96	22.98	45.79	68.77	2.280	2.304	2.295
110	10	10.38	16.83	27.21	24.98	40.43	65.41	2.408	2.403	2.404
평균		10.08	18.17	28.26	24.29	42.93	67.22	2.410	2.365	2.381
전체표준오차		0.76	1.38	1.21	-	-	-	-	-	-

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

표 4-34. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 이유자돈의 혈액의 성상에 미치는 영향

LM ¹ (mg/kg)	FW (%)	Chol ² mg/dL	Ca mg/dL	P mg/dL	Mg mg/dL	AST U/dL	BUN mg/dL	GGT U/L	Prot g/dL	Alb g/dL	A/G
0	0	99.30 ^a	11.60 ^{bc}	8.34	3.00	50.67	15.22	24.33	6.43	3.63	1.30
55	0	95.60 ^{ab}	10.70 ^c	8.69	2.44	55.00	15.21	21.33	6.20	3.83	1.67
110	0	89.00 ^b	11.07 ^c	8.71	2.40	81.00	14.61	26.33	6.40	3.67	1.40
0	5	70.53 ^c	12.73 ^{ab}	8.20	2.89	79.67	14.69	19.33	7.10	3.43	1.07
55	5	94.37 ^{ab}	11.60 ^{bc}	7.59	2.31	36.00	17.90	22.00	5.90	3.47	1.47
110	5	79.07 ^{bc}	11.93 ^{abc}	6.88	2.38	43.00	12.15	16.67	5.77	3.57	1.60
0	10	83.37 ^{abc}	12.10 ^{abc}	5.99	2.50	41.67	11.75	26.00	5.83	3.60	1.67
55	10	77.43 ^{bc}	10.70 ^c	6.67	2.23	46.00	8.66	17.00	5.97	3.67	1.63
110	10	94.10 ^{ab}	13.37 ^a	6.03	2.55	36.67	10.59	23.00	5.87	3.77	1.83
전체표준오차		2.36	0.21	0.29	0.07	5.30	0.77	1.59	0.15	0.07	0.06

^{a, b, c}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

²Chol: Cholesterol, Ca: Calcium, P: Phosphorus, Mg: Magnesium, GGT: Gamma glutamyltransferase, BUN: Blood urea nitrogen, AST: Aspartate aminotransferase, Prot: Protein, Alb: Albumin, A/G: Albumin/globulin.

10. 실험 8

린코마이신과 남은 음식물의 첨가·급여가 비육돈 후기의 생산성에 미치는 영향은 표 4-35에 나타냈다. 실험기간 4주 동안의 총 증체량은 전체 처리구 중 남은 음식물 5% 급여구 중 린코마이신 55mg/kg 처리구가 22.6kg으로 대조구에 비해서 현저하게 증가하였다(P<0.05). 또한 남은 음식물 10% 급여구 중 린코마이신 55mg/kg 처리구가 21.7kg으로 대조구에 비해서 증체량이 현저하게 높아 Olson-LD(1995)의 결과와 동일하였다(P<0.05). Weiskopf-S 등(1994)은 린코마이신 110mg/kg의 첨가·급여가 육성돈의 일당 증체량과 사료요구율을 개선시킨다고 하였으나 본 실험에서는 차이가 없었다. 남은 음식물 급여 수준에 따른 증체량은 남은 음식물 5%, 10% 급여구가 급여하지 않은 처리구보다 증가하는 경향을 보였다. 사료섭취량은 남은 음식물 10% 급여구가 전체 처리구에서 가장 높았으며 남은 음식물의 급여수준이 증가

함에 따라 증가하였다. 사료요구율은 남은 음식을 급여구중 린코마이신 55mg/kg 처리구에서 3.604로 가장 개선되는 경향을 보였으나 일반적으로 남은 음식물 급여 수준이 증가할수록 높았다. 이러한 결과는 남은 음식물은 비육돈 후기에서 사료원료로 이용이 가능함을 시사한다.

혈액의 정상(표 4-36)에서 혈청의 P 함량은 전체 처리구 중 남은 음식물 7.5% 급여구가 16.73mg/dL로 가장 높았고 남은 음식물 15% 급여구 중 린코마이신 110mg/kg 처리구가 13.57mg/dL로 현저하게 감소하였으나(P<0.05) 대조구와는 차이가 없었다. 혈청 총콜레스테롤과 Ca 및 Mg은 처리구 상호간에 차이가 없었고 GGT, BUN, GOT, A/G도 통계적인 차이가 없었다. 그리고 혈청 단백질 및 알부민의 함량도 차이가 없었다.

표 4-35. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 비육돈후기의 증체량, 사료섭취량, 사료요구율에 미치는 영향

처리구	개시체중	종료시 체중	증체량	사료섭취량	사료요구율	
LM(mg/kg) ¹ FW(%)	(kg)	(kg)	(kg)	(kg)		
0	0	85.44	102.81	17.37 ^c	70.39	4.053
55	0	83.85	102.49	18.64 ^{bc}	70.38	3.776
110	0	87.03	106.95	19.92 ^{abc}	73.13	3.671
평균		85.44	104.08	18.64	71.30	3.833
0	5	83.08	102.38	19.30 ^{abc}	71.23	3.691
55	5	86.00	108.63	22.63 ^a	87.12	3.849
110	5	82.54	101.52	18.98 ^{bc}	78.40	4.131
평균		83.87	104.17	20.30	78.92	3.890
0	10	94.05	113.43	19.38 ^{abc}	90.29	4.659
55	10	89.26	110.92	21.66 ^{ab}	78.08	3.604
110	10	86.09	104.73	18.64 ^{bc}	80.85	4.338
평균		89.80	109.69	19.89	83.07	4.200
전체표준오차				0.38	-	-

^{a, b, c}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

표 4-36. 링크마이신과 남은 음식물의 급여가 비육돈의 혈액의 정상에 미치는 영향
(실험 8)

LM (mg/kg)	FW (%)	Chol ² mg/dL	Ca mg/dL	P mg/dL	Mg mg/dL	GGT U/dL	BUN mg/dL	AST U/dL	Prot g/dL	Alb g/dL	A/G
0	0	96.27	11.73	15.54 ^{abcd}	3.02	40.33	16.57	57.67	6.67	3.80	1.33
55	0	88.50	11.70	15.09 ^{abcd}	2.91	29.67	14.20	87.33	6.63	3.47	1.10
110	0	103.77	10.63	16.46 ^{ab}	3.34	39.00	18.31	89.67	6.97	3.87	1.27
0	7.5	113.83	12.03	16.73 ^a	3.32	27.00	19.37	69.00	6.73	3.93	1.37
55	7.5	111.23	12.83	15.51 ^{abcd}	3.23	25.00	19.61	83.00	6.77	4.07	1.53
110	7.5	104.07	11.50	14.32 ^{abcd}	3.17	35.67	18.03	130.33	7.17	3.87	1.17
0	15	95.70	12.00	15.98 ^{abc}	3.45	28.33	18.07	104.33	7.43	3.93	1.17
55	15	94.87	12.57	13.94 ^d	3.00	21.33	15.18	69.67	7.27	4.10	1.33
110	15	88.97	11.23	13.57 ^d	2.77	25.67	18.01	35.67	6.83	3.73	1.23
전체표준오차		3.05	0.18	0.27	0.07	2.65	0.71	11.63	0.07	0.06	0.05

a, b, c, d는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

²Chol: Cholesterol, Ca: Calcium, P: Phosphorus, Mg: Magnesium, GGT: Gamma glutamyltransferase, BUN: Blood urea nitrogen, AST: Aspartate aminotransferase, Prot: Protein, Alb: Albumin, A/G: Albumin/globulin.

11. 실험 9

링크마이신과 남은 음식물의 첨가·급여가 비육돈의 생산성에 미치는 영향은 표 4-37에 나타냈다. 증체량은 전체 처리구 중 남은 음식물 7.5% 급여구 중 링크마이신 110mg/kg 처리구가 29.3kg으로 제일 높았지만 통계적인 차이는 없었다. 이병석 등(1998)은 비육돈에 남은 음식물을 12% 혼합급여시 일당 증체량이나 사료섭취량이 대조구와 차이가 없었다고 보고하였는데 본 실험에서는 남은 음식물 15% 급여 수준에서도 대조구와 증체량에 차이가 없었다.

사료섭취량은 실험 7, 8와 동일하게 남은 음식물 급여구가 남은 음식물을 급여하지 않은 처리구에 비해서 증가하는 경향을 보였다.

또한 사료요구율도 남은 음식물을 급여구가 남은 음식물을 급여하지 않은 처리구보다 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 증체량에서는 남은 음식물 급여구간

에 차이가 없으나 사료섭취량의 증가에 원인이 있다고 볼 수 있다.

린코마이신과 남은 음식물의 급여가 비육돈의 혈액의 성상에 미치는 영향은 표 4-38에 나타냈다. 혈중 총 콜레스테롤은 전체 처리구사이에 통계적인 차이가 없었고 Ca 함량은 남은 음식물 15% 급여구 중 린코마이신 110mg/kg 처리구가 10.03mg/dL로 대조구에 비해서 현저하게 감소하였다 ($P < 0.05$). 또한 P의 함량도 남은 음식물 15% 처리구에서 17.71로 대조구보다 현저하게 감소하였다($P < 0.05$). BUN은 남은 음식물 7.5% 급여구 중 린코마이신 55mg/kg 처리구가 제일 높았으나 ($P < 0.05$) 대조구와는 차이가 없었다. 기타 GGT, GOT, 혈청 단백질 등은 대조구와 통계적인 차이가 없었다.

돈육 등심의 화학적 조성(표 4-39)은 전체 처리구간에 유의적인 차이는 없었지만 수분에서는 남은 음식물 7.5% 급여구 중 린코마이신 55mg/kg 처리구가 74.94%로 제일 높았다. 조단백질 함량은 남은 음식물 15% 급여구 중 린코마이신 55mg/kg 처리구에서 23.39%로 제일 높았으며 조지방은 남은 음식물 7.5% 급여구 중 린코마이신 55mg/kg 처리구가 증가하는 경향을 보였다. 그러나 본 실험에서는 일반적으로 지방함량이 높으면 단백질 함량이 낮다고 한 Davis 등(1975)의 보고와는 일치하지 않았다. 또한 조회분은 대조구가 1.80%로 전체 처리구 중 가장 높았다.

표 4-40에 나타낸 돈육 등심의 지방산 조성은 처리구간에 유의적인 차이는 없었으나 ω 3계열의 지방산인 linolenic acid(C18:3)는 남은 음식물 15% 처리구가 0.62%로 높게 나타났으며 ω 6계열의 지방산인 linoleic acid(C18:2)는 남은 음식물을 급여하지 않은 처리구 중 린코마이신 110mg/kg 처리구에서 제일 높았다. 또한 ω 9계열의 지방산인 oleic acid(C18:1)는 남은 음식물 15% 급여구 중 린코마이신 55mg/kg 처리구에서 46.55%로 증가하는 경향을 보였다. 또한 포화지방산도 처리구 상호간에 통계적인 차이가 없었다. 이러한 결과는 남은 음식물의 급여가 돈육의 품질에 영향이 없었음을 시사하며, 남은 음식물의 급여가 돈육의 품질을 저하시키는 인자로 생각하는 일반적인 사고와는 차이가 있음을 시사한다.

표 4-37. 링크마이신과 남은 음식물의 급여가 4주간 비육돈후기의 증체량, 사료섭취량, 사료요구율에 미치는 영향

처리구		개시체중	종료시 체중	증체량	사료섭취량	사료요구율
LM(mg/kg) ¹	FW(%)	(kg)	(kg)	(kg)	(kg)	
0	0	81.40	108.11	26.71	87.68	3.282
55	0	73.95	99.38	25.43	76.20	2.997
110	0	78.41	107.69	29.28	83.92	2.866
평균		77.92	105.06	27.14	82.60	3.048
0	7.5	76.50	104.32	27.82	84.52	3.038
55	7.5	75.00	101.98	26.98	80.94	3.000
110	7.5	79.19	108.48	29.29	97.60	3.332
평균		76.90	104.93	28.03	87.69	3.120
0	15	84.47	109.47	25.00	78.66	3.147
55	15	75.69	103.53	27.84	87.46	3.142
110	15	74.52	102.63	28.11	92.13	3.278
평균		78.23	105.21	26.98	86.08	3.189

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

표 4-38. 링크마이신과 남은 음식물의 급여가 비육돈의 혈액의 성상에 미치는 영향

LM (mg/kg)	FW (%)	Chol ² (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Mg (mg/dL)	GGT (U/dL)	BUN (mg/dL)	AST (U/dL)	Prot (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G
0	0	102.78	13.30 ^{ab}	24.23 ^{ab}	4.77	48.33	19.60 ^{ab}	112.25	8.10	4.55	1.33
55	0	111.13	11.78 ^{bc}	24.93 ^a	4.58	37.33	22.05 ^a	57.75	7.83	4.30	1.20
110	0	103.75	12.48 ^{bc}	21.10 ^{abc}	4.58	38.75	18.81 ^{ab}	122.75	7.68	4.18	1.18
0	7.5	108.35	12.10 ^{bc}	20.06 ^{bc}	4.28	58.50	15.78 ^b	47.00	7.35	4.08	1.28
55	7.5	115.05	12.10 ^{bc}	20.47 ^{abc}	4.55	42.50	22.28 ^a	39.75	8.65	4.50	1.13
110	7.5	123.68	14.38 ^a	23.64 ^{ab}	4.91	58.00	18.60 ^{ab}	47.75	7.53	4.13	1.25
0	15	108.95	12.10 ^{bc}	17.71 ^c	3.98	46.50	15.11 ^b	61.25	7.48	4.18	1.28
55	15	120.78	11.15 ^{cd}	19.55 ^{bc}	3.86	66.00	16.01 ^b	104.75	7.30	4.23	1.38
110	15	118.73	10.03 ^d	20.20 ^{abc}	4.38	42.50	17.24 ^{ab}	88.75	7.55	4.68	1.18
전체표준오차		2.54	0.25	0.60	0.09	3.47	0.64	12.59	0.15	0.09	0.03

^{a, b, c}는 처리구간에 통계적인 차이를 나타낸다(P<0.05).

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

²Chol: Cholesterol, Ca: Calcium, P: Phosphorus, Mg: Magnesium, GGT: Gamma glutamyltransferase, BUN: Blood urea nitrogen, AST: Aspartate aminotransferase, Prot: Protein, Alb: Albumin, A/G: Albumin/globulin.

표 4-39. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 돈육중 등심의 화학적 조성에 미치는 영향

LM ¹ (mg/kg)	FW (%)	화학적 조성(%)			
		수분	조단백질	조지방	조회분
0	0	73.64	22.23	2.33	1.80
55	0	74.18	22.30	2.36	1.56
110	0	74.55	22.55	2.40	1.50
0	7.5	73.85	22.53	2.10	1.53
55	7.5	74.94	22.96	2.40	1.27
110	7.5	74.37	22.99	2.17	1.14
0	15	74.22	22.44	1.86	1.49
55	15	72.79	23.39	2.22	1.59
110	15	73.61	23.11	2.11	1.17
전체표준오차		0.13	0.11	0.08	0.08

¹LM: Lincomycin, FW: Food Waste

표 4-40. 린코마이신과 남은 음식물의 급여가 돈육 등심내 지방산 조성에 미치는 영향

지방산 (%)	처리구 ¹									전체 표준오차
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
C8:0	0.21	0.34	0.42	0.30	0.25	0.40	0.26	0.27	0.42	0.03
C10:0	0.18	0.29	1.00	0.20	0.24	0.24	0.27	0.18	0.21	0.09
C12:0	0.10	0.09	0.22	0.08	0.08	0.09	0.96	0.09	0.08	0.10
C14:0	1.35	1.23	1.13	1.28	1.17	1.23	1.26	1.46	1.27	0.03
C16:0	24.79	24.60	24.15	24.88	24.36	20.71	19.55	26.19	24.80	0.96
C16:1	3.37	3.11	3.29	3.48	3.44	6.85	6.85	3.24	3.51	0.62
C18:0	12.43	12.42	12.45	12.35	12.24	12.10	12.12	13.42	12.23	0.15
C18:1	45.21	43.21	41.25	45.53	44.14	44.32	45.05	46.55	44.33	0.55
C18:2	10.92	13.03	14.45	10.57	12.56	12.54	11.87	7.23	11.62	0.65
C18:3	0.35	0.45	0.37	0.23	0.36	0.37	0.62	0.28	0.35	0.03
C20:0	0.73	0.60	0.57	0.69	0.65	0.57	0.74	0.55	0.63	0.03
C22:0	0.09	0.21	0.21	0.12	0.22	0.19	0.06	0.34	0.20	0.03
C22:1	²	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C24:0	0.27	0.42	0.49	0.29	0.29	0.39	0.39	0.20	0.35	0.03
합계	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

¹T1: Control, T2: LM 2.2mg/kg, T3: LM 4.4mg/kg, T4: FW 7.5%, T5: FW 7.5%×LM 2.2mg/kg, T6: FW 7.5%×LM 4.4mg/kg, T7: FW 15%, T8: FW 15%×LM 2.2mg/kg, T9: FW 15%×LM 4.4mg/kg

²Trace(0.001%>)

제 4 절 참고문헌

- A.O.A.C 1990 official methods of analysis (15th ed.). Association of official analytical chemists. Washington, D.C.
- Church, C. D. 1977. Livestock feed and feeding. O & B Books, Oregon.
- Dafwang II, Cook ME, Sunde ML, Bird HR 1985 Bursal, intestinal and spleen weights and antibody response of chicks fed subtherapeutic levels of dietary antibiotics. Poultry Sci. 64: 634-639.
- Davis GW, Smith GC, Carpenter ZL, Cross HR 1975 Relationships of quality indicators to palatability attributes of pork loins. J. Anim. Sci. 41:1305
- Farhat A, Normand L, Chavez ER & Rouchburn 1998 Nutrient digestibility in food waste ingredients for pekin and muscovy ducks. Poultry Sci. 77: 1371-1376
- Keyser, E. G., P. W. Waldroup and G. C. Harris. 1968. The effect of dietary protein levels on serum protein. Poultry Sci. 47: 687.
- Kubena, L. F., Harvey, R. B., Phillips, T. D., D. E. Corrier and W. E. Huff. 1990. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated, sodium calcium aluminosilicate. Poultry Sci. 69:727-735.
- Leeson S, Summers JD, Ferguson AE 1980 Efficacy of avoparcin as a growth promoter for broiler chickens. Can. J. Sci. 60: 275-279.
- Leeson S 1984 Growth and carcass characteristics of chickens and turkey broilers fed diets containing flavomycin. Can. J. Anim. Sci. 64: 971-976.
- Lengoad LAMG, Smit HF, Brand A, Frik JF 1985 Swine dysentery in a sow herd.

- The veternaty Quarterly Vol.7(2):146-150
- Lisano, M. E. and J. E. Kennamer. 1977. Values for several blood parameters in eastern wild turkeys. Poultry Sci. 56: 157-166.
- Lowry, O. H., Rosebrugh, N. H., A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 193:265-275.
- Lukert D 1982 Treatment of Mycoplasmosis in young swine. J. Modern veterinary Practice 1982(2):107-110
- Olson-LD 1995 Comparison of coated and uncoated salinomycin with uncoated lincomycin in feed for prevention of swine dysentery. Pig-journal 35:150-156
- Panigraphy, B. P., P. E. Waibel and B. S. Pomeroy. 1969. Influence of E. cloli septicemia and nutrition on growth and tissue and fluid changes of the chick. Poultry Sci. 48: 1695-1703.
- Park PW, Goins RE 1994 In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. J. Food Sci. 59:1262
- Proudfoot FG, Hulan HW, Jackson ED, Salisbury CDC 1990 Effect of lincomycin as a growth promoter for broiler chicks. British Poultry Sci. 31:181-187.
- Marusich WL, Ogrinz EF, Brown PR, Mitrovic M 1973 Comparative efficacy of intermittent and continuous feeding of four antibiotics at low levels in broilers. Poultry Sci. 52:1774-1779.
- Marusich WL, Ogrinz EF, Brown PR, Mitrovic M 1978 Use of rye-soybean ration to evaluate growth promotants in chicks. Poultry Sci. 57: 1297-1304.
- Miller, C. C., Bloss, R. E., L. E. Marrett and F. R. Frank. 1971. The effect of lincomycin on broiler performance when used with various coccidiostats. Poultry Sci. 50:1607.

- SAS/STAT 1996 SAS user guide. release 6.12 edition, SAS Inst Inc Cary NC.
- Savage, S. I. 1973. The effect of dietary calcium, phosphorus and vitamin D₃ on growing pullet chicks on subsequent laying hen performance. Poultry Sci. 52:2082.
- Sibbald IR 1976 A bioassay for true metabolizable energy in feedingstuffs. Poultry Sci. 55: 303-308
- Sibbald IR 1977 The effect of level of feed input on true metabolizable energy values. Poultry Sci. 56:2070
- Schang MJ & Hamilton RMG 1982 Comparison of two direct bioassays using adult cocks and four indirect methods for estimating the metabolizable energy content of different feedingstuffs. Poultry Sci. 61: 1344-1353
- Steel RGD, Torrie JH 1980 Principles and Procedure of Statistics, McGraw Hill, New York.
- Weiskopf-S, During-F, Dost-G, Luchsinger-JH, Poomvises-P, Ingkaniun-P 1994 Compatibility study with salocin 120 R microgranulate in combination with lincomix R premix and linco-spectin™ premix in swine. Proceedings: The 13th International Pig Veterinary
- Zavala, M. and E. Guerra. 1967. Lincomycin supplementation in growing and laying diets. Poultry Sci. 46:1342.
- 고태송 1980 병아리에서의 대두박, 대두유 및 섬바디 분말의 대사에너지에 관한 연구. 건대 학술지 제 24집 267-274
- 김성겸, 한인규. 1982. 단위동물에 있어서 칼슘 및 인의 영향에 관한 연구 III. 사료 내의 칼슘, 인 및 소금 수준간의 상호작용이 브로일러의 골격과 혈액의 조성에 미치는 영향에 대한 연구. 한국축산학회지. 24(3):239-247.
- 류경선, 강창원, 송근섭, 백승운. 1998. 황기의 첨가·급여가 육계의 생산성 및 혈

액의 성장과 육질에 미치는 영향. 한국가금학회지. 25:185-193.

이규호 1998 낚은 음식물 사료의 영양가치 평가. 낚은 음식물 사료화 심포지엄
113-128

이병석 조성배 정완태 신기준 1998 낚은 음식물 사료 가축급여 효과. 낚은 음식물
사료화 심포지엄 69-79.