

Demethylchlortetracycline 발효 생산에서 pH 조절의 최적화와 암모늄이온 농도의 영향

김형수* · 김세진 · 이영무 · 황학연 · 최남희
(주)종근당 반월공장

Optimization of pH Control and Effect of Ammonium Ion Concentration for Overproduction of Demethylchlortetracycline. Hyung-Soo kim*, Sae-Jin Kim, Young-Moo Lee, Hak-Youn Hwang and Nam-Hee Choi. Panwol Sec. Factory, Chong Kun Dang Corporation, Ansan city 425-100, Korea - The effect of ammonium ion concentration on the production of demethylchlortetracycline (DMCT) by a DMCT overproducing mutant, *Streptomyces aureofaciens* 27VR, and the optimal control of pH were studied. The optimum levels of pH control were 6.5-6.6 for 80-120 hr, 6.4-6.5 for 121-150 hr and 6.3-6.4 for 151-190 hr. The optimum level of ammonium ion concentration during the pH control was lower than 20 mg%. Under the optimized culture condition, it was possible to produce DMCT with an 18% increase in productivity compared to that of standard culture condition in 190hrs of the fermentor operation.

Tetracycline류의 항생제인 DMCT(demethylchlortetracycline 또는 demeclocycline)는 그 자체로도 항균력이 있으나 minocycline을 합성하는 원료물질로 사용되며 발효에 의해 대량 생산이 가능하다. Minocycline은 산 및 알칼리에 강하여 경구 투여시 위산에 의한 불활성화가 적고 체내 잔류시간도 길며 tetracycline에 대한 저항성을 갖는 내성균에도 작용하기 때문에 치료약으로서 매우 중요하다. DMCT 발효 과정에서 배양액에는 DMCT뿐만 아니라 유도체인 DMT(demethyltetracycline), epi-DMCT, epi-DMT가 대사산물로 함유되어 있는데 DMT는 치료제로써의 활성이 낮고 epimer들은 신장에 해를 주는 것으로 알려졌다(1).

2차대사의 생합성 효소들은 이용하기 쉬운 특정 탄소원 및 질소원에 의해 저해를 받으며 질소원에 의한 저해 기작은 2차대사 생합성 효소들이 암모늄이나 특정 아미노산에 의해 저해되기 때문으로 알려져 있다(2-3). 이러한 암모늄이온은 streptomycin, cephalosporin, rifamycin, erythromycin 등의 생성에서도 저해 효과를 보이는데 특히 tetracycline 생합성 효소인 anhydrotetracycline oxygenase는 암모늄에 의해 활성이 저해 받는 것으로 알려져 있다(4-9).

발효액의 pH 경향은 발효초기 현상을 진단하는 중요 지표가 되며 배지조성 및 균증식 상태에 따라 배양액의 pH가 변하는데 균이 기질을 이용하여 증식하는 과정에서의 기질의 소비와 대사산물의 분비, 특히 유기산 생성

이 배양액 pH를 결정하게 된다. 배양 pH는 균증식과 2차대사에 적합한 수준이 각각 다르며 따라서 이를 최적화할 필요가 있다. 발효중에 용존산소 결핍과 당 고갈에 의해서도 pH가 상승하며 목적산물이 pH의 변화에 불안정한 경우는 특히 주의해야 한다(10-18).

DMCT 발효에 있어서 균체증식 단계와 대사산물 생산 단계의 pH 경향은 다르며 대사산물 생산단계에서의 pH는 대체적으로 80시간 이후에 하락하는 경향을 나타내고 있고 균의 활성도 즉, 발효 배양 상태에 따라 하락폭이 좌우되고 있다. 이는 균체 형태가 심한 hard pellet으로 변함으로써 발생하는 유기산에 기인하며 pH의 하락과 더불어 급격한 목적산물 생성의 둔화현상이 초래된다(19-20).

따라서 본 연구는 DMCT 발효 중기 이후의 균체생육을 유지하여 목적산물 생산의 극대화를 목적으로 무기태 질소 공급원인 암모니아수를 이용한 pH 조절의 시점과 수준 및 pH 조절에 따른 암모늄 이온 농도가 DMCT 발효에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

종균 배양

-75°C에 보존된 *Streptomyces aureofaciens* 27VR의 FVM(Frozen Vegetative Mycelium)을 종균배양용 배지(Dextrin, 40 g/l; Rice bran oil, 15 g/l; Ammonium sulfate, 4 g/l; Corn steep liquor, 60 g/l; Calcium carbonate, 15 g/l; pH 7.0)가 500 ml 담긴 5L 등근바닥 플라스크에 0.4%(v/v) 접종한 후 28°C 배양실에서 왕복 진탕기로 35시간 배양하여 3 m³ 전배양용 발효조의 접종

*Corresponding author
Tel. 82-345-495-5215, Fax. 82-345-491-5215
E-mail: ckdbio@soback.kornet.nm.kr
Key words: Demethylchlortetracycline, *Streptomyces aureofaciens*, Ammonium ion

액으로 사용하였다.

전배양 및 본배양

전배양으로는 탄소원인 2%(w/v) corn starch와 질소원인 3%(w/v) corn steep liquor를 이용하여 3 m³ 발효조에 2 m³의 가동부피로 온도 28°C, 교반 130 rpm, 통기 0.5 vvm, 압력 0.5 kg/cm², pH 6.8로 36시간 배양하였고, 본배양으로는 탄소원인 9%(w/v) corn starch와 질소원인 5%(w/v) cotton seed meal를 이용하여 50 m³ 발효조에 37 m³을 가동부피로 하여 온도 25°C, 교반 80 rpm, 통기 0.4 vvm, 압력 0.75 kg/cm²로 190시간 배양하였다.

균체량 측정

공업용 배지를 사용함으로써 고형분의 함량이 높아 건조균체량을 측정할 수 없어서 간접적인 방법인 PMV (Packed Mycelium Volume, %)를 지표로 사용하였는데 배양액을 눈금이 새겨진 10 ml 시험관에 담아 2500×g에서 30분간 원심분리하여 형성된 침전물의 부피를 백분율로 표시하였다.

당, 암모늄 이온농도 및 점도 측정

당 농도는 배양액의 상등액 1 ml에 1.5 N 염산용액 5 ml를 첨가한 후 100°C에서 2시간 가수분해시킨 다음 1N NaOH용액을 5 ml첨가한 후 pH 8.0의 인산 완충용액을 첨가하여 50 ml로 만든다음 여과지(Toyo 5B, Japan)로 여과한 후 glucose oxidase를 이용한 당분석기(sugar analyzer, YSI model 27, USA)로 분석하였고, 암모늄 이온 전극을 이용한 이온 분석기(microprocessor ion analyzer P.1, Orion Research, USA)로 암모늄 이온의 농도를 정량하였으며 회전 점도계의 일종인 Brookfield viscometer (model LVT, USA)와 #34 spindle를 이용하여 배양액의 점도를 측정하였다.

DMCT 유도체의 정량

배양액 3 g에 1.5 N 염산용액 50 ml를 첨가한 후 15분간 진탕하고 다시 1.5 N 염산 용액을 첨가하여 100 ml로 만든 다음 여과지(Toyo 5B, Japan)로 여과하고 여과액 2 ml에 반응액(18 g/l EDTA-2Na를 0.25 N NaOH로 녹임) 23 ml를 넣고 상온에서 5분간 정치한 후 385 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

pH 조절의 영향

DMCT 발효 생산은 주로 균주개발과 배지 조성 변경에 의해 생산성향상을 도모해 왔는데 본발효의 특징중의

하나인 80시간 무렵부터 pH하락과 더불어 심한 역가둔화 현상으로 발효공정상의 개선을 필요로 하게 되었다. 오랜기간 동안 여러가지 방안을 모색하였으나 해결점을 찾지 못하다가 결국 근본적으로 역가 하락의 원인이 되는 pH에 초점을 맞추어 무기태 질소원의 공급과 pH 조절에 효과가 있는 암모니아수의 첨가로 문제점을 해결코자 하였다. 물론, pH 조절용 물질의 선정으로는 DMCT 발효 표준 pH6.5~6.6 보다 0.2~0.3 높게하여 NH₄OH와 NaOH로 Jar fermentor에서 실험 하였는데 비록 두 종류 모두 생산성 향상에는 효과가 없을 뿐만 아니라 오히려 초기 발효 역가의 증가율이 둔화되는 사실을 알게 되었지만 이것은 pH 조절시점을 발효 초기에 실시했기 때문으로 판단되었고 균체증식 면에서는 표준보다 높게 유지되는 점으로 보아 균체량 증가에는 도움이 됨을 알았기에 무기태 질소원의 공급 및 사용상의 편리를 고려하여 암모니아수를 선택하였다. DMCT 발효의 특징은 발효 초기 암모늄 이온이 고갈 되면서 세포증식이 둔화되고 DMCT생산이 시작 되는데 이때 약 20시간까지의 pH 변화와 용존산소 농도의 하락에 따른 air량과 rpm의 증가, 이후 PMV 및 점도의 증가와 그에 따른 용존산소 조절을 위한 인위적인 온도의 단계적 하락 및 탱크 내압 증가등 40시간까지의 조절이 매우 중요하다. 그리고 배양시간이 40시간에서 80시간에는 점도와 PMV의 증가가 둔화되는 반면 DMCT 생산역가는 매우 높게 증가하고, 80시간 이후에는 점도와 PMV가 다시 증가하기 시작하면서 발효역가의 구간별 증가율이 조금씩 감소하기 시작한다. 대부분의 DMCT 발효의 pH는 Fig. 1의 pattern I으로 나타나지만 전배양에서의 균체활성도, 본배

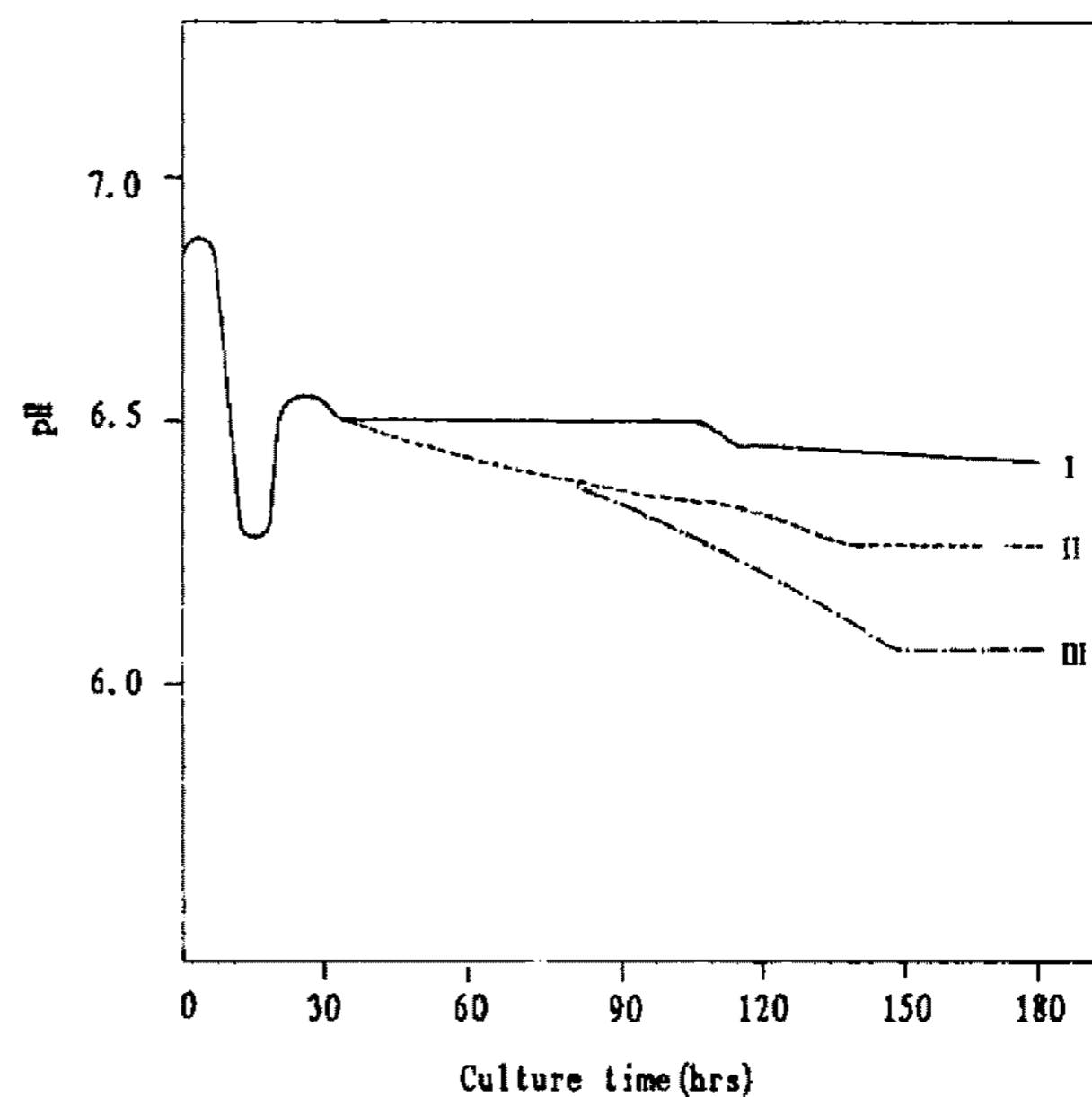


Fig. 1. Classified patterns of the pH change in DMCT fermentation.

Symbols: —, Pattern I; ----, Pattern II; - · -, Pattern III.

양으로의 접종시기, 본배양 배지의 살균 강도 및 본배양 초기의 거품형성에 의한 air량 감소등의 다양한 추정원 인들에 의해 pattern II와 III로도 나타나고 있으며 20시간 까지의 초기 발효 pH 경향은 유사하고 80시간 전후로 pH의 하락 폭이 달라지게 된다. 그리고 본배양 40시간에서 80시간까지의 pH는 6.5또는 6.6이 되는데 이것은 발효초기의 air주입량에 의해 차이가 나는 것으로 추정하고 있다. 즉, air가 설정된 표준조건으로 주입되면 pH 6.6으로 진행되지만, 초기 발효배지에서 거품이 발생되거나 본배양 배지의 조제시 corn starch의 분해 정도와 연속 살균 공정의 유속등에 의해 발효초기의 점도 상승이 일어날 경우에 air 주입량이 표준설정값보다 낮게 주입되거나 균체중식이 표준보다 높게 유지될 경우 설정된 용존 산소농도를 유지하기 위해 탱크 내압까지 상승시키게 되는데 그럴 경우에 air가 설정된 표준값보다 낮게 주입되어 pH가 6.5로 진행되는 것으로 추정된다. 또한, 발효 후기에서의 pH하락은 발효역가 하락뿐만 아니라 DMCT의 품질에도 영향을 주는것으로 추정하고 있는데 최(21)와 신(22)은 수소이온 농도에 의해 DMCT와 DMT의 epimer발생이 높아진다고 보고하였고 실제로 DMCT 발효에서도 pH가 6.1 이하가 될 경우에 DMCT 함량이 감소하는 현상이 관찰된 바가 있다.

따라서 암모니아수를 이용하여 pH를 인위적으로 조절하여 본 결과(Fig. 2-4), pH가 이미 하락한 100시간 이후에 pH를 6.3으로 조절하였을 경우에는 세포중식에 따른 PMV 증가와 점도증가 그리고 용존산소 농도의 하락

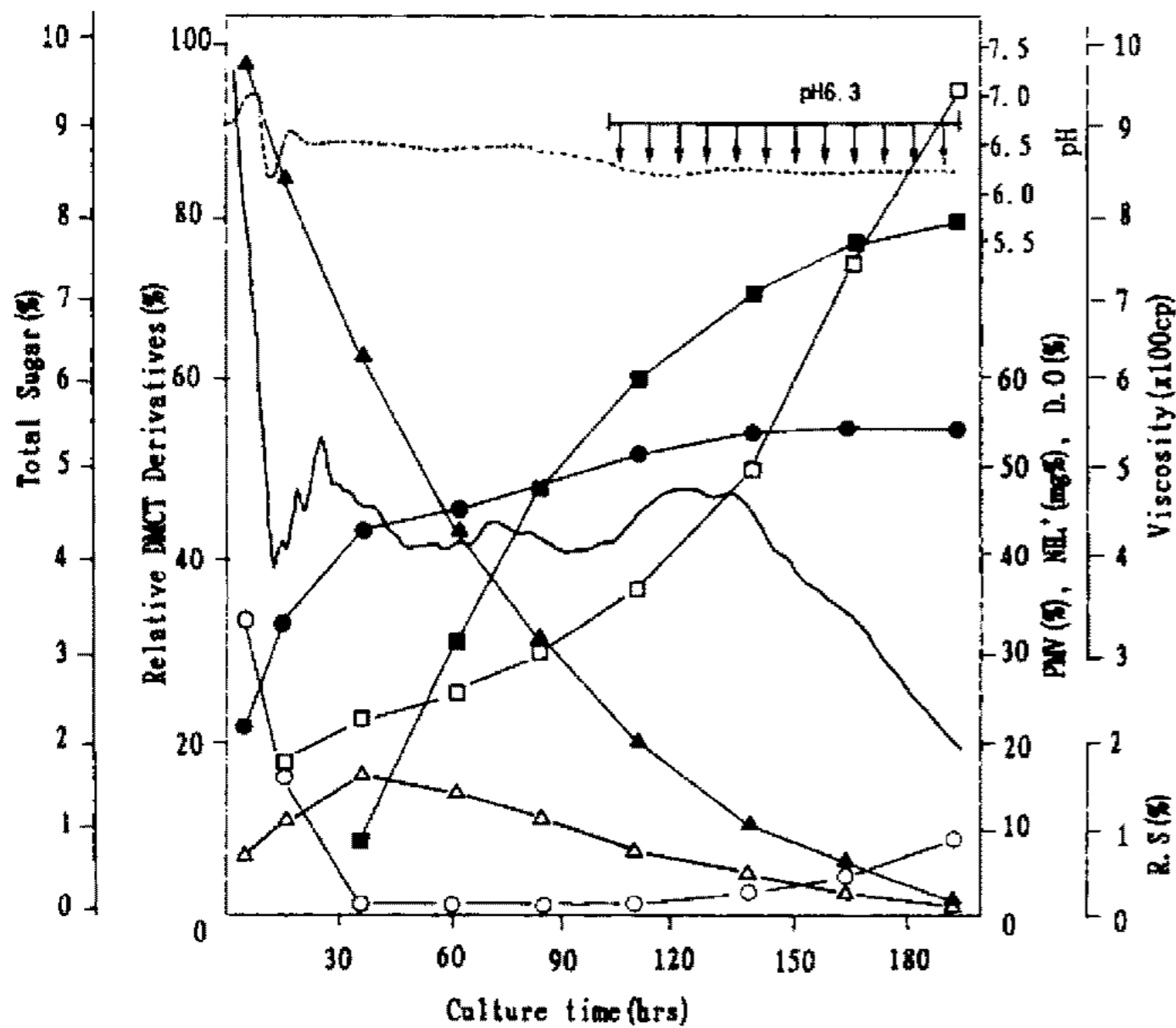


Fig. 2. Effect of pH 6.3 control at 100-190hr on DMCT fermentation.
 Symbols: ■—■, Relative DMCT derivatives (%); □—□, Viscosity(×100cp); ▲—▲, Total sugar (%); △—△, Reducing sugar (R.S,%); ●—●, Packed mycelium volume (PMV,%); ○—○, NH₄⁺ (mg%); -----, pH and —, Dissolved oxygen (%).

및 DMCT 생성이 다소 상승하는 현상을 보였으며, pH가 하락하기 이전 단계인 60시간에 정상적으로 진행되는 pH 6.6수준으로 130시간까지 유지한 경우와 이미 pH가 하락한 100시간부터 150시간까지 pH6.6으로 유지한 경우에는 용존산소 농도가 다소 높게 유지되고 암모니아

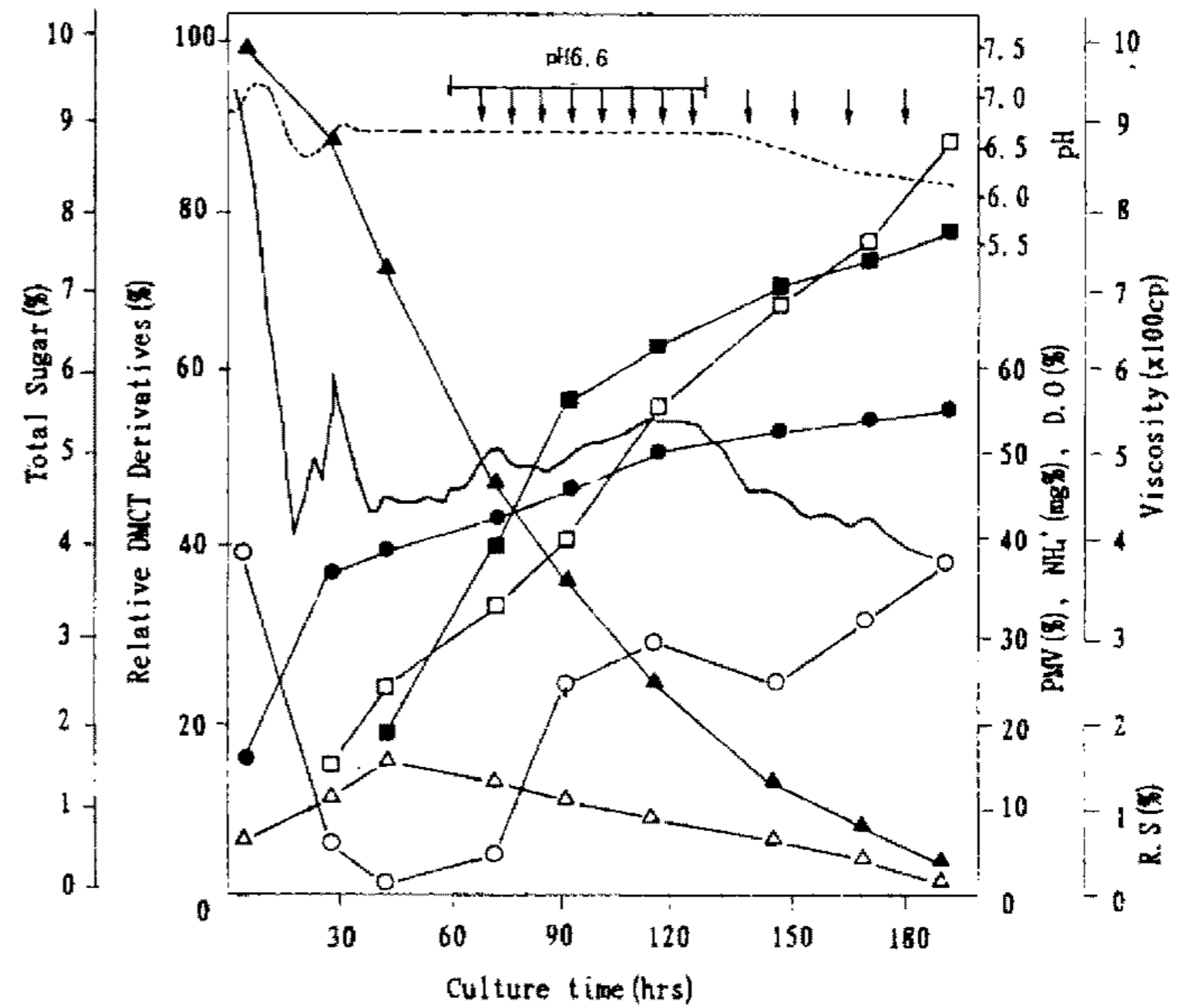


Fig. 3. Effect of pH 6.6 control at 60-130hr on DMCT fermentation.
 Symbols: ■—■, Relative DMCT derivatives (%); □—□, Viscosity(×100cp); ▲—▲, Total sugar (%); △—△, Reducing sugar (R.S,%); ●—●, Packed mycelium volume (PMV,%); ○—○, NH₄⁺ (mg%); -----, pH and —, Dissolved oxygen (%).

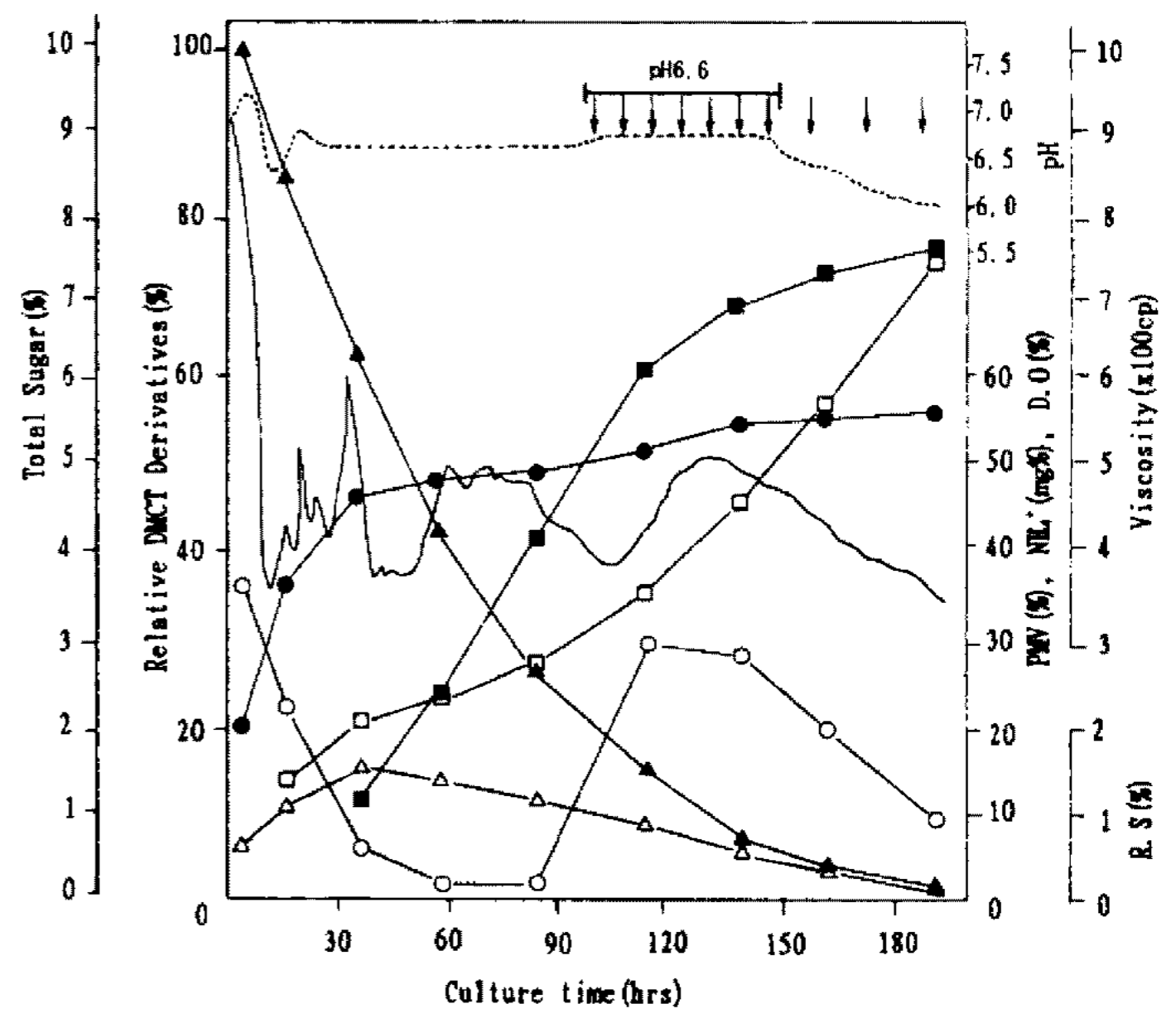


Fig. 4. Effect of pH 6.6 control at 100-150hr on DMCT fermentation.
 Symbols: ■—■, Relative DMCT derivatives (%); □—□, Viscosity(×100cp); ▲—▲, Total sugar (%); △—△, Reducing sugar (R.S,%); ●—●, Packed mycelium volume (PMV,%); ○—○, NH₄⁺ (mg%); -----, pH and —, Dissolved oxygen (%).

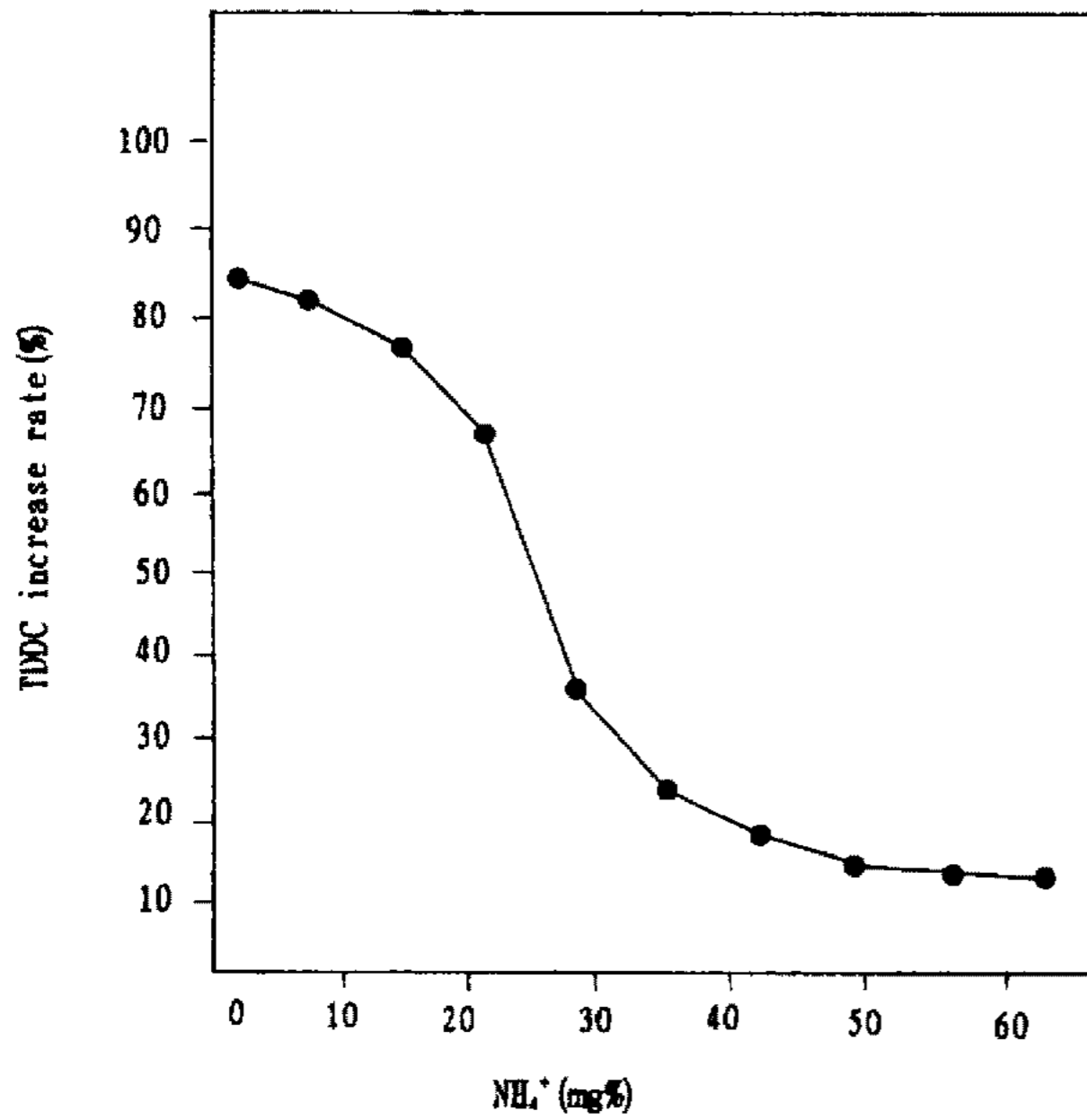


Fig. 5. Effect of total DMCT derivatives concentration (TDDC) increase rate inhibited by ammonium ion concentration.

TDDC increase rate was expressed as the increasing rate of relative activity by residual ammonium ion concentration per 24hrs after cultivation for 80 hrs.

이온이 축적되며 DMCT 생성에 저해현상이 초래되었다. 따라서, pH조절 시점과 수준이 DMCT 생산성에 영향을 주는 것으로 사료되었다.

암모늄 이온 농도의 영향

암모늄이온 농도가 DMCT 생산에 미치는 영향을 검토하기 위해 실험을 행해 본 결과(Fig. 5), 암모늄 이온농도가 높아질수록 DMCT 생산성이 감소하는 경향을 나타냈으며 25 mg% 이상의 농도에서 급격한 생산성 감소현상을 보였고 특히 이런현상은 100~140시간에 예민한 반응이 나타났다. 이는 앞서 언급한 바와 같이 암모늄이온에 의한 대사산물의 생산저해 현상으로 판단되며 이는 Aharonowitz와 Demain(5)이 보고한 암모늄 이온농도가 20 mM 이상일 경우 cephalosporin의 생산이 감소한다는 보고와 유사한 현상으로 사료된다.

pH 조절의 최적화

상기의 결과를 토대로 배양 pH가 서서히 하락하기 시작하는 80시간부터 암모늄 이온농도를 고려하여 단계적으로 pH를 조절해 본 결과, pH조절의 최적값은 80시간에서 120시간까지는 6.5-6.6, 121시간에서 150시간까지는 6.4-6.5 그리고 151시간에서 190시간까지는 6.3-6.4로 나타났다(Fig. 6). 그리고 암모니아수를 주입후 pH가 상승하면 암모늄이온 농도를 분석하여 그 값이 20 mg% 이상일 경우에는 일단 암모니아수 주입을 중단하고 20 mg% 이하로 유지될때 다시 주입량을 조절하여 주입을

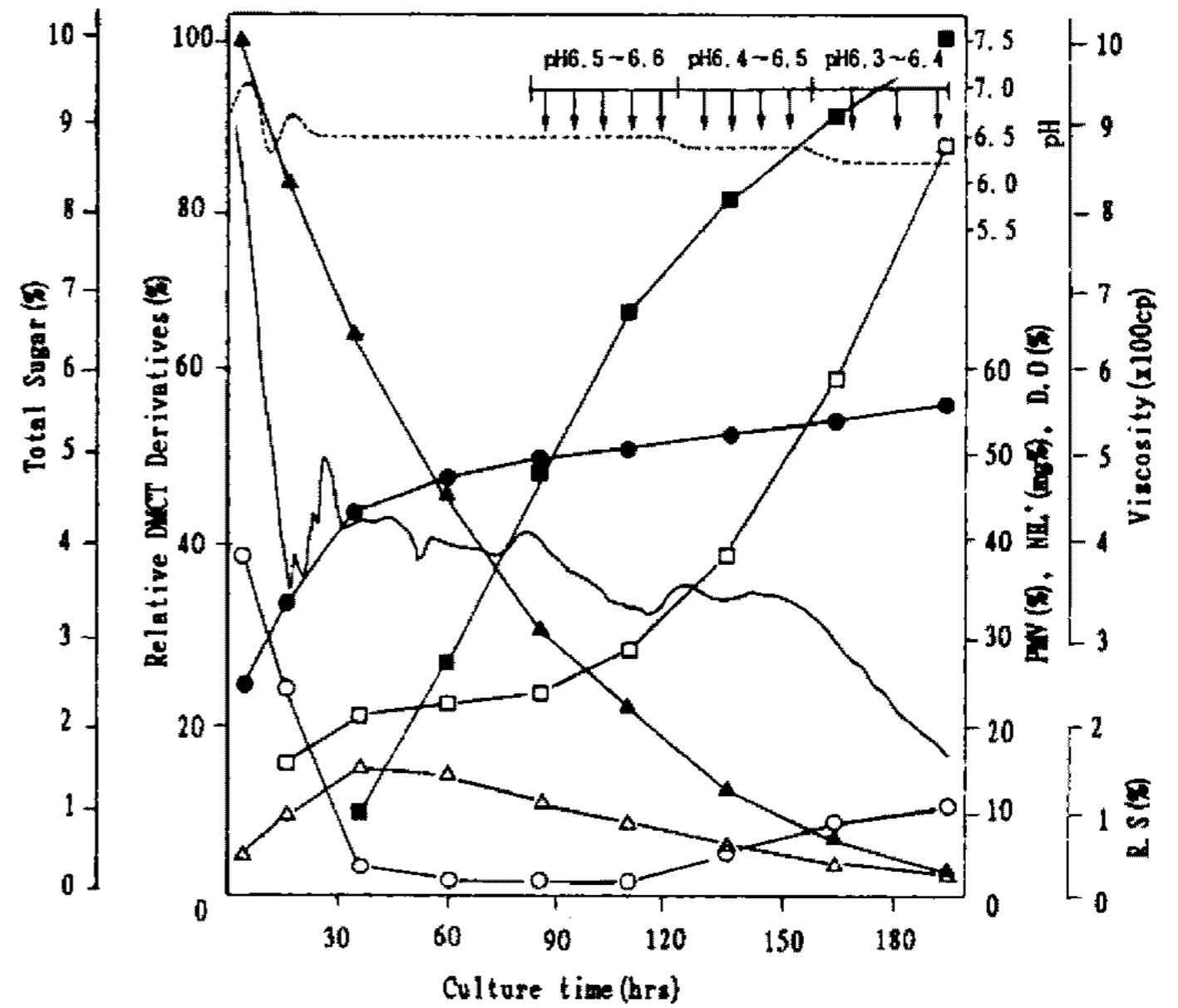


Fig. 6. Response of dissolved oxygen, ammonium ion concentration and relative DMCT derivatives to ammonium pulse and pH control.

Vertical arrows indicate ammonium pulse and the concentration of an ammonium pulse is 3.2 mg%.

Symbols: ■—■, Relative DMCT derivatives (%); □—□, Viscosity(×100cp); ▲—▲, Total sugar (%); △—△, Reducing sugar (R.S,%); ●—●, Packed mycelium volume (PMV,%); ○—○, NH₄⁺ (mg%); -----, pH and —, Dissolved oxygen (%).

해야 하며 20 mg% 이하일 경우에는 계속 상승된 pH를 그대로 유지하면서 암모니아수를 주입해 주어야 한다. 또한, 암모니아수에 의한 pH조절을 시작하는 80시간 이전에 pH가 6.4이하로 하락하기 시작하면 rpm을 낮추어 주고 air량은 높여주며 온도를 낮추어 pH가 하락하는 속도를 늦춘 후 80시간부터 암모니아수를 주입하면 될것으로 사료된다. 그리고 암모니아 이온농도가 상승할때는 대체로 용존산소의 농도가 상승하는데 이는 과량의 암모니아 이온농도가 균체의 호흡활성에 저해를 주는것으로 추측된다. 결론적으로 암모니아수를 이용한 pH조절은 용존산소 농도, pH의 수준 그리고 암모늄이온 농도를 분석하여 용존산소 농도 및 암모늄 이온농도가 상승하고 pH가 동시에 상승할때는 암모니아수 주입을 멈춘 후 암모늄 이온 농도가 하락하고 pH 상승이 멈추거나 하락할때까지 pH수준을 0.1 낮추어 조절해야 할것으로 판단되며 암모니아수를 주입해도 암모늄이온이 축적되지 않고 pH의 변화가 없는 발효가 최적인 것으로 사료된다.

요 약

암모니아수를 이용하여 pH 조절 및 암모늄 이온 농도의 영향을 관찰한 결과 pH 조절의 최적조건은 80시간에서 120시간까지는 6.5-6.6, 121시간에서 150시간까지는 6.4-6.5 그리고 151시간에서 190시간까지는 6.3-6.4였으

며 발효중의 암모늄 이온농도는 20 mg% 이하가 적정 수준이었다. 이와 같은 최적 조건하에서 DMCT 발효 생산성은 표준조건에 비해 190시간에 약 18%가 증가하였다.

참고문헌

- McCormick, J.R.D., N.O. Sjolander, U. Hirsch, E. R. Jensen and A. P. Doerschuk. 1957. A new family of antibiotics: the demethyltetracyclines. *J. Amer. Chem. Soc.* **79**: 4561-4567.
- Behal, V., V. Prochazkova and Z. Vanek. 1969. Regulation of biosynthesis of secondary metabolites fatty acids and chlortetracycline in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol.* **14**: 112-116.
- Choe, J. H. and Y. J. Yoo. 1991. Effects of ammonium ion concentration and application to fed-batch culture for overproduction of citric acid. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 106-109.
- Lübbe, C., A. L. Demain and K. Bergman. 1985. Use of controlled-release polymer to feed ammonium to *Streptomyces clavuligerus* cephalosporin fermentations in shake flasks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 424-427.
- Aharonowitz, Y. and A. L. Demain. 1979. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.* **25**: 61-67.
- Braña, A. F., S. Wolfe and A. L. Demain. 1985. Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.*
- Kim, K. S., Y. J. Yoo and M. H. Kim. 1995. Control of intracellular ammonium level using specific oxygen uptake rate for overproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 555-559.
- Behal, V., J. Gregrova Prusakova and Z. Hostalek. 1982. Effect of inorganic phosphate and benzylthiocyanate on the activity of anhydrotetracycline oxygenase in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol.* **27**: 102.
- Behal, V., Z. Hostalek and Z. Vanek. 1979. Anhydrotetracycline oxygenase activity and biosynthesis of tetracycline in *Streptomyces aureofaciens*. *Biotechnol. Lett.* **1**: 177.
- Pateman, J. A., J. R. Kinghorn, E. Dunn and E. Forbes. 1973. Ammonium regulation in *Aspergillus nidulance*. *J. Bacteriol.* **114**: 943-950.
- Demain, A. L. 1974. Mutation and the production of secondary metabolites. *Advan. Appl. Microbiol.* **16**: 177-202.
- Blumauerova, M., A. A. Ismail, Z. Hostalek, D. A. Callieri, J. Cudlin and Z. Vanek. 1973. Regulation of biosynthesis of secondary metabolites-Isolation and characterization of auxotrophic mutants in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol.* **18**: 474-491.
- Erpicum, T., B. Granier, M. Delcour, V. M. Lenzini, M. Nguyen-Disteche, J. Dusart and J. M. Frere. 1990. Enzyme production by genetically engineered *Streptomyces* strains: Influence of culture conditions. *Biotech. & Bioeng.* **35**: 719-726.
- Jechova, V., E. Curdova and Z. Hostalek. 1982. Role of phosphatases in the biosynthesis of chlortetracycline in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol.* **27**: 153-158.
- Dercova, K., J. Augustin and D. Krajcova. 1992. Cell growth and α -amylase production characteristics of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.* **37**: 17-23.
- Suzuki, T., H. Mori, T. Yamane and S. Shimizu. 1985. Automatic supplementation of minerals in fed-batch culture to high cell mass concentration. *Biotech. & Bioeng.* **27**: 192-201.
- Aguilera, A. and T. Benitez. 1988. Relationship between growth, fermentation, and respiration rates in *Saccharomyces cerevisiae*-A study based on the analysis of the yield Y_{px}. *Biotech. & Bioeng.* **32**: 240-244.
- Lübbe, C., S. Wolfe and A. L. Demain 1985. Repression and inhibition of cephalosporin synthetases by inorganic phosphate. *Arch. Microbiol.* **140**: 317-320.
- Ajibade, A. R. and A. A. Christine. 1980. Effects of various conditions on the production of citric acid during fermentation of molasses by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* **2**: 61-62.
- Kobayashi, T., G. V. Dedem and M. Moo-Young. 1973. Oxygen transfer into mycelial pellets. *Biotech. & Bioeng.* **15**: 27-45.
- 최남희. 1992. The production of demethyltetracycline by *Streptomyces aureofaciens* FUS 11-4. 고려대학교 박사학위 논문.
- 신상규. 1988. Demeclocycline 유도체 분리에 관한연구. 연세대학교 석사학위 논문.

(Received 14 February 1997)