

## 고정화된 *Streptomyces lincolnensis*의 반복 회분식 배양에 의한 링크마이신 생산

† 김창준 · 전계택 · 장용근 · 김성배

<sup>1</sup>경상대학교 생명화학공학과 및 공학연구원, <sup>2</sup>강원대학교 분자생명과학과, <sup>3</sup>한국과학기술원 생명화학공학과

(접수 : 2006. 7. 19., 게재승인 : 2006. 10. 24.)

## The Production of Lincomycin by Repeated Batch Cultures of Immobilized *Streptomyces lincolnensis*

Chang-Joon Kim<sup>1†</sup>, Gie-Taek Chun<sup>2</sup>, Yong-Keun Chang<sup>3</sup>, and Sung Bae Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical & Biological Engineering and ERI, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Molecular Bioscience, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

<sup>3</sup>Department of Chemical & Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 305-701, Korea

(Received : 2006. 7. 19., Accepted : 2006. 10. 24.)

The production stability of high-yielding mutants of *Streptomyces lincolnensis* immobilized on celite beads was examined in repeated batch cultures. We also explored the feasibility of immobilization of vegetative mycelial cells on pre-wetted celite beads, which is practical method for cell immobilization. Repeated transfer of immobilized cells into fresh medium every 10 days increased productivity of immobilized cells and maximum concentration of lincomycin, 1007 ( $\pm 256$ ) mg/L, was obtained at the end of the ninth cycle. A 1.4-fold higher productivity was obtained in immobilized-cell culture than that obtained by suspended-cell culture. When pre-wetted beads were inoculated with vegetative mycelia and cultured a slightly higher amount of immobilized cells and lincomycin was obtained more than those obtained by culture of spores immobilized on dry beads. This result indicates that immobilization of mycelial cells on pre-wetted beads was readily available. This technique is simple and no additional facilities are required for cell immobilization.

**Key Words** : Celite beads, immobilized *Streptomyces lincolnensis*, lincomycin, repeated-batch cultures, production stability

### 서 론

방선균 이차대사 유래 생리활성 물질들은 의약품 및 식품의 원료로 널리 사용되고 있다(1). 이들 물질들은 산업적으로 현탁세포의 회분식 배양에 의해 생산되고 있으나 생산성이 낮아 이를 대체할 수 있는 고효율 고생산성의 생물공정개발이 필요하다.

특정담체에 방선균을 부착시킨 고정화세포 배양에서는 세포가 펠렛 형태로 성장하므로 균사체 형태로 성장하는 현탁세포배양에 비하여 배양액의 점도가 훨씬 낮아 산소

및 영양분 전달이 우수하여 고농도 세포 배양이 가능하다(2-3). 또한 세포성장을 촉진시키는 배지에서 고농도 세포를 생성한 후, 다시 생합성 촉진 배지로 교체하는 등의 효율적인 기질공급전략을 수립할 수 있어 생산성향상을 도모할 수 있다(3-5). 이러한 장점들로 인해 고정화세포공정은 이차대사산물생산을 위한 경쟁력 있는 생물공정으로서 많은 주목을 받아왔다.

그러나 고정화세포공정은 현탁세포 공정에 비하여 세포 고정화단계가 추가되기 때문에 이로 인한 추가비용이 발생한다. 이러한 단점을 상쇄시키기 위해서는 한번 생성된 세포가 생산성의 감소 없이 장기간 반복적으로 사용될 수 있어야 한다(6). 특히 간단하고 효율적이며 저비용의 세포 고정화방법이 개발된다면 고정화세포공정은 충분히 경쟁력 있는 생물공정이 될 것으로 사료된다.

3.4 L 교반식 발효조를 이용하여 다공성 무기질 담체인 셀라이트 담체에 고정화된 야생형 방선균의 연속 배양을

† Corresponding Author : Department of Chemical & Biological Engineering and ERI, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Tel : +82-55-751-5391, Fax : +82-55-753-1806

E-mail : cj\_kim@gsnu.ac.kr

수행한 기존 연구에서, 본 연구팀은 고정화세포 배양공정이 현탁회분식 배양공정에 비하여 14배 높은 생산성을 나타내었고 생산성의 저하 없이 고정화세포를 장기간 반복적으로 사용할 수 있음을 확인하였다(7).

한편 고정화세포공정의 실용화를 고려한다면, 산업현장에서 사용되는 고생산성 산업균주를 고정화한 세포의 생산안정성 테스트가 필요하다. 또한 본 연구팀이 개발한 포자상태의 방선균 고정화방법은 Wang 등(8)이 셀라이트에 곰팡이 포자를 고정화하는 데 사용한 방법을 수정한 것으로서 고체 배지에서 방선균 포자를 회수하고 이를 건조한 담체에 고정화하는 방식이다. 그러나 생산현장에서는 스팀 멸균을 하기 때문에 건조한 비드상태를 유지하기 힘들뿐만 아니라 담체자체만 멸균 시 멸균 효과가 떨어질 수 있다(9). 다량의 방선균 포자는 액체배양을 통하여 얻기 힘들고 주로 고체배양을 통해서 얻을 수 있다(10). 따라서 포자를 대량으로 얻기 위한 고체배양 및 포자회수 공정을 포함한 세포 고정화 공정은 고정화세포공정의 전체 투자비에서 차지하는 비중이 높아 고정화세포를 이용하는 공정은 현탁 세포공정에 비하여 경제성이 떨어질 수 있다. 그러나 세포고정화단계에서 축축한 (pre-wetted) 상태의 담체에 균사상태의 균주가 고정화될 수 있다면 상기에서 지적된 세포 고정화 단계에 발생될 수 있는 문제점들이 해결될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 산업균주의 모델로써 링크마이신을 생산하는 *Streptomyces lincolnensis*를 UV 변이처리하여 얻은 고생산성 돌연변이 균주를 선정하였다. 링크마이신은 인간의 감염증 치료제 및 동물성장촉진용 사료첨가제로도 사용된다(11). 반복회분식 배양에서 고생산성 돌연변이 균주를 셀라이트 담체에 고정화하고 이의 생산능력이 장기간 유지되는가에 대해 조사하였다. 또한 균사체 형태 (vegetative mycelia)로 성장하는 생산균주가 축축한 셀라이트 담체에 고정화 가능성 여부에 대해 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 균주, 배지, 및 고정화 담체

모균주인 *Streptomyces lincolnensis* IMSNU20232를 서울대학교 미생물연구소에서 분양받았다. 이를 UV 변이처리하고 링크마이신에 저항성을 갖는 돌연변이주를 스크리닝한 결과 링크마이신 고생산성 돌연변이주 (SUN1)를 얻었으며 이를 생산균주로 사용하였다(12). 균주의 활성을 유지하기 위하여 20% glycerol stock으로 -80°C에 보관하고 석 달에 한번씩 계대배양하였다. 현탁세포 배양에서 접종용 균주 배양을 위한 성장배지의 조성 (g/L)은 glucose 10, peptone 5, yeast extract 3, malt extract 3이었다. 현탁세포 및 고정화세포 배양을 위한 생산배지 (PM1)의 조성은 다음과 같다 (g/L): soluble starch 45, malt extract 20, sugarcane molasses 15, peptone water 13.3, NaNO<sub>3</sub> 11.7, MgSO<sub>4</sub> 0.6, CaCO<sub>3</sub> 4. 한편 세포고정화 방법에 따른 고정화효율을 비교하기 위한 실험에서 사용한 배지 (PM2)의 조성 (g/L)은 glucose 30, sugar cane molasses 15, peptone water 13.3, NaNO<sub>3</sub> 6.67,

CaCO<sub>3</sub> 4이었다. 포자 상태의 생산균주를 다량으로 얻기 위한 고체배지의 조성은 다음과 같다 (g/L): maltose 12, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3, soybean meal 6, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1, soybean oil 0.3, NaCl 1, peptone 3, agar 20(7).

세포 고정화 담체로는 다공성 무기질의 Celite R 633 (Celite Korea, Seoul, Korea)을 사용하였다. 체 (sieve)를 이용하여 100~500 μm 크기의 입자를 골라낸 후 이를 증류수로 세척하고 건조시킨 후 600°C에서 소각하여 사용하였다. (7).

### 현탁세포 및 고정화세포 배양

250 mL 플라스크에 20 mL의 배양액 부피로 진탕배양기 (Vision Co., Ltd., Korea)에서 28°C, 230 rpm으로 10일간 현탁세포 및 고정화세포 배양을 수행하였다. 현탁세포 배양을 위하여 glycerol stock 100 μl를 성장배지에 접종하고 이를 동안 배양한 후 배양액 1 mL를 생산배지를 함유한 플라스크에 접종하였다.

고정화세포 배양을 위하여 고체배지 상에서 8일간 배양한 포자 상태의 생산균주를 담체에 고정화하였다. 생산균주의 포자로 덮여있는 고체배지가 들어있는 페트리 디쉬 (지름 80 mm) 5개를 취하였다. 각각에 5 mL의 멸균수를 붓고 삼각봉으로 포자를 긁어낸 후 이를 플라스크로 옮겨 15분간 격렬히 교반하였다. 이를 커피필터에 통과시켜 균사체를 분리한 후 필터여액을 멸균수로 희석하여 10<sup>6</sup> spores/mL의 포자 현탁액을 제조하였다(7). 포자현탁액 20 mL를 3 g의 멸균 및 건조된 담체가 들어있는 각각의 플라스크에 접종하고 진탕 배양기에서 28°C, 230 rpm으로 1시간 동안 교반하였다. 교반을 멈추면 생산균주의 포자가 고정화된 비드는 가라앉게 되는데, 이때 상등액을 제거한 후, 멸균 증류수 20 mL를 넣고 흔들어서 세척하기를 여러 번 반복하였다. 여기에 농축된 생산배지 (PM1)를 넣고 증류수로 현탁세포 배양에서와 동일한 배지 농도로 맞추었다.

고정화세포의 반복회분식 배양을 수행하였다. 매 회분이 종료된 후 상등액을 조심스럽게 제거하고 세포가 고정화된 비드를 증류수로 여러 번 세척하여 담체 세공 또는 담체들 사이에 스며있는 잔 단계 회분에서 사용한 배지의 잔류 성분 및 생합성물 등을 완전히 제거하였다. 여기에 신선한 생산 배지를 첨가한 후 배양을 재개하였다. 상등액은 링크마이신 분석에 사용되었다.

### 세포고정화 방법의 비교평가

세 종류의 세포고정화 방법이 비교 되었다. 건조한 담체 (control) 및 축축한 담체(I)에 포자상태의 생산균주 고정화, 축축한 담체에 균사체 형태로 성장하는 생산균주 고정화 (II) 등이다.

건조한 담체에 포자상태의 생산균주를 고정화하는 방법 (control)에 대해서는 이미 상기에서 언급하였다. 한편, 축축한 담체를 제조하기 위하여 담체를 포함한 플라스크에 20 mL의 증류수를 넣고 멸균 후 증류수를 제거하면, 축축한 담체만 남는다(9). 여기에 포자현탁액을 넣고 고정화하는 단계는 control방법에서와 같다(I). 균사체 고정화(II)는

성장배지에서 2일간 배양한 접종균 1 mL를 담체와 생산배지 (PM2)를 포함한 플라스크에 접종한 후 배양하는 방법이다. 포자상태의 생산균주를 고정화하는 상기의 방법 (control 또는 방법 I)과 비교하면 방법II에서는 1시간동안 교환하는 세포고정화 과정이 생략된다.

### 분석방법

배양 종료 후 각 플라스크의 전체 sample (20 mL)을 취하여 고정화세포의 건조균체중량을 측정하였다. 플라스크를 정치하면 세포가 고정화된 담체는 가라앉는 데 피펫을 이용하여 상등액을 제거하고 증류수를 넣고 흔들어주면서 담체들 간극에 있는 유리세포들을 씻어내었다. 세척된 담체를 원심분리튜브로 옮겨 10,000 rpm에서 원심분리한 후 증류수로 세척하고 원심분리하기를 3번 반복한 후 aluminum weighing dish에 담아 dry oven (80°C)에서 12시간 건조하였다. 건조된 무게를 측정하여 담체와 균체의 중량합을 결정한 뒤 600°C의 furnace에서 6시간 소각한 후 다시 무게를 재면 담체만의 중량이 결정된다. 따라서 위의 값과의 차에 의해 고정화된 균체의 농도를 결정하였다. 제거된 상등액 10 mL를 취하여 유리세포 (released free cells)의 건조균체중량을 측정하였다. 현탁세포 배양에서는 각 플라스크의 전체 sample을 취하여 건조중량균체중량을 측정하였다. HPLC를 이용하여 링크마이신 분석을 수행하였다. 역상칼럼인 mighty sil C18 칼럼 (4.6 mm × 150 mm) (Kanto Co., Ltd, Japan)을 사용하였다. Acetonitrile (83%)과 0.8% phosphoric acid (17%)가 섞인 혼합용액을 이동상으로 사용하였으며 NH<sub>4</sub>OH를 사용하여 이동상의 pH를 6.0으로 맞추었다. 유속은 1 mL/min이었고 칼럼의 온도는 45°C로 유지하였다. UV 검출기 (LC-10ADvp, Shimadzu, Japan)를 이용하여 214 nm 파장에서 링크마이신을 검출하였다.

### 결과 및 고찰

#### 고정화세포의 반복회분식 배양에 의한 링크마이신 생산

고정화세포 배양과의 비교 실험으로서 현탁세포 배양을 수행하였다. Table 1에 나타내었듯이, 10일간의 본 배양 후 측정된 최종 세포 농도 (DCW)와 링크마이신 농도는 각각 12.9 (±1.0) g/L와 345 (±55) mg/L였다.

고정화세포의 반복회분식 배양을 수행하였다. 고정화세포의 반복회분식 배양이란 매 회분이 종료된 후 새로운 배지로 교체하여 배양을 계속하는 방식으로서 고정화세포를 반복적으로 사용하는 조업방식이다. 첫 번째 회분 후 세포 농도와 링크마이신 농도는 각각 6.8 (±0.2) g/L와 146 (±22) mg/L였다. 회분수가 증가함에 따라 고정화세포에 의해 생산된 링크마이신 농도는 점차 증가하여 아홉 번째 회분에서 1007 (±256) mg/L가 된 반면 열 번째 회분에서는 다소 감소된 양인 634 (±134) mg/L가 되었다(Table 1). 회분수 증가에 따라 생산성이 증가하는 것은 고정화세포를 반복배양함에 따라 담체에 고정화된 세포량이 증가하기 때문인 것으로 판단된다 (13).

위의 결과를 이용하여 현탁세포와 고정화세포의 생산성

을 비교하였다. 현탁세포는 10일 동안 6.9 mg의 링크마이신을 생산한 반면, 고정화세포는 열 번의 반복회분기간 (100일) 동안 총 99 mg의 링크마이신을 생산하였다. 이는 고정화세포 배양이 현탁세포 배양에 비하여 단위시간당 1.4배 높은 생산성을 나타낸다.

**Table 1.** Lincomycin production in suspended-cell culture and in repeated-batch cultures of immobilized cells

|                                | Batch            | LCM conc. (mg/L) |
|--------------------------------|------------------|------------------|
| <sup>a</sup> Suspended Cells   |                  | 345 (±55)        |
| <sup>b</sup> Immobilized Cells | 1 <sup>st</sup>  | 146 (±22)        |
|                                | 2 <sup>nd</sup>  | 286 (±5)         |
|                                | 3 <sup>rd</sup>  | 256 (±32)        |
|                                | 4 <sup>th</sup>  | 372 (±32)        |
|                                | 5 <sup>th</sup>  | 446 (±40)        |
|                                | 6 <sup>th</sup>  | 554 (±49)        |
|                                | 7 <sup>th</sup>  | 443 (±106)       |
|                                | 8 <sup>th</sup>  | 813 (±90)        |
|                                | 9 <sup>th</sup>  | 1007 (±256)      |
|                                | 10 <sup>th</sup> | 634 (±134)       |

\* Note: Data are the means of three replicates and ± in parenthesis are the standard deviations.

<sup>a</sup>10-day culture

<sup>b</sup>Medium was replaced with fresh one every 10 days

한편 현탁세포 배양에서는 생산균주가 균사체형태로 성장하기 때문에 배양액의 점도가 매우 높아 불엿처럼 끈적 끈적한 반면, 고정화세포 배양에서는 newtonian 유체와 같은 배양액의 거동이 관찰되었고 생성된 유리세포 (released free cell)의 농도도 0.8 g/L로 매우 낮았다. 따라서 고정화세포 배양이 현탁세포 배양에 비하여 높은 생산성을 보인 것은 산소 및 영양분의 물질 전달이 더욱 용이하여 고농도 세포배양이 가능한 것에 기인하는 것으로 여겨진다. 뿐만 아니라 기존 회분식 공정에서 필수적이기는 하나 원하는 유효산물의 생산성에는 기여하지 못하는 상당부분의 매 회분 당의 cycle time (세척시간, 멸균시간, 냉각시간, reinoculation 시간 등)이 불필요하게 됨으로써 링크마이신 생산성 면에서 볼 때 매우 경제적인 공정이라고 할 수 있다.

본 연구결과는 무기질 담체에 고정화된 고생산성 돌연변이 방선균을 생산성의 감소 없이 높은 생산성으로 반복적으로 사용할 수 있음을 시사한다.

#### 고정화담체 상태와 접종균 형태에 따른 세포고정화 효율 비교

고정화 담체의 상태 (건조한 또는 축축한) 및 생산균주의 형태학적 모양 (포자 또는 균사체)에 따른 세포 고정화 효율을 비교하였다. 정확한 세포 농도 측정을 위하여 soluble starch를 glucose로 대체한 배지 (PM2)를 사용하였다. 상기에서 언급하였듯이, 균사체 고정화의 경우(II) 성장 배지에서 2일간 배양한 균사체를 담체와 배지가 포함된 플라스크에 접종하였다. 이 경우의 첫 번째 배양에서는 현탁세포와 고정화세포가 배양액에 혼재할 수 있기 때문에 링크마이신 생산이 고정화세포에 의한 것인지를 판단하기가 어려울 수 있다. 따라서 첫 번째 배양 후 담체를 분리하고 세척한 후

Table 2. Effects of inoculum type and bead condition on cell immobilization

| <sup>a</sup> Culture | Inoculum type | Bead condition | LCM conc. (mg/L) | Immo. cell conc. (g/L) | Free cell conc. (g/L) | Specific productivity (mg-LCM/g-cells) |
|----------------------|---------------|----------------|------------------|------------------------|-----------------------|--|
| Control              | spores        | dry            | 240 ( $\pm 40$ ) | 8.3 ( $\pm 0.4$ )      | 0.3 ( $\pm 0.1$ )     | 28                                     |
| I                    | spores        | pre-wetted     | 235 ( $\pm 57$ ) | 7.9 ( $\pm 0.6$ )      | 0.4 ( $\pm 0.1$ )     | 28                                     |
| II                   | mycelia       | pre-wetted     | 338 ( $\pm 66$ ) | 10.7 ( $\pm 0.1$ )     | 0.2 ( $\pm 0.0$ )     | 31                                     |

<sup>a</sup>Note: Data are the means of three replicates and  $\pm$  in parenthesis are the standard deviations.

<sup>a</sup>Comparison was made after two successive batches

새로이 교체한 배지로 옮겨서 두 번째 반복배양을 수행하였다. 포자를 접종균으로 사용하는 경우에도 동등비교를 위하여 두 번의 반복 회분식 배양을 수행한 후 고정화세포 농도 및 링크마이신 생산량을 비교하였다.

Table 2는 세 가지 고정화방법에 따라 생성된 고정화세포 농도, 링크마이신 생산량을 나타낸다. 모든 경우에 플라스크 내에 존재하는 세포들의 대부분은 고정화세포였으며 유리세포 (released free cells)의 농도는 0.4 g/L 이하였다. 이는 대부분의 링크마이신이 고정화세포로부터 생성되었다는 것을 의미한다. 포자상태의 생산균주가 담체에 고정화될 때, 담체가 건조 (control)하거나 젖어있는 경우(I)에 상관없이 담체 단위 무게 당 생성되는 고정화세포의 양 및 단위세포 당 링크마이신 생산량은 비슷하였다. 이는 담체의 세공 내에 수분이 존재하더라도 방선균 포자의 고정화 효율에는 악영향을 주지 않음을 나타내며 산업현장과 같은 큰 규모에서 기존 장치의 개조 없이 담체를 스팀 멸균할 수 있음을 시사한다. 이는 고정화담체의 전처리에서 고려해야할 중요한 변수중의 하나로서 셀라이트에 곰팡이 고정화 연구에서 많은 연구자들에 의해 연구된 바 있으나 방선균에 대해서는 보고된 바 없다. Wang 등(8)은 곰팡이 포자가 모세관현상에 의해 셀라이트의 세공 안으로 이동하므로 세포가 효과적으로 담체에 고정화되기 위해서는 담체가 건조해야한다고 주장하였다. 반면, Keshavarz 등(14)은 셀라이트가 건조 (dry)하거나 축축한 (pre-wetted)상태에 상관없이 고정화되어 생성되는 고정화세포량에는 차이가 없음을 실험적으로 증명하였다. John 등(9)은 오히려 담체 내에 존재하는 수분이 정전기적 반발력 (static repulsion)을 억제함으로써 곰팡이 포자가 원활하게 고정화될 수 있도록 도와준다고 주장하였다.

한편, 균사상태의 생산균주가 축축한 담체로 접종된 경우(II), 담체 단위무게 당 생성된 고정화세포량 및 단위세포 당 링크마이신 생산량은 다른 방법들 (control, I)에 의해 생성된 것보다 다소 높았다(Table 2). 이는 방선균 균사체가 축축한 담체에 효과적으로 고정화되는 것을 의미한다. Celite R633 계열의 세공들의 평균 직경이 8  $\mu\text{m}$ 이고(9) 성장하는 방선균 균사체의 평균 크기가 곰팡이 균사체보다 훨씬 작은 1  $\mu\text{m}$  근처인 점을 감안할 때, 방선균 균사체가 담체의 세공 안으로 침투하여 고정화되는 데 어려움이 없을 것으로 판단된다.

결론적으로 본 연구팀에 의해 개선된 고정화방법은 배지와 담체가 있는 상태에서 스팀멸균을 수행하고, 균사상태의 균주를 접종하는 방식이다. 이는 포자를 이용하는 기존의 세포고정화방법과 비교시 고체배양 및 포자회수를 위한 추가적인 공정이 필요 없으므로 기존 산업체에서 사

용하는 시설을 개조하지 않고 그대로 사용할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 세포고정화에 고도의 기술과 추가적인 시설을 필요로 하는 기존의 방선균 고정화 방법 (alginate gel, carrageenan에 고정화 등)에 비하여 본 연구에서 제시된 세포고정화 공정은 훨씬 간단하고 가격경쟁력이 있다고 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 고정화 방선균을 이용한 이차대사산물 생산 공정 개발에 있어서 고려해야 할 중요한 사항인, 고정화세포의 반복사용 가능성을 조사하였다. 또한 축축한 담체에 균사체 형태의 생산균주의 고정화가능성에 대하여 알아보았다. 셀라이트 담체에 고정화된 고생산성 *Streptomyces lincolnensis* 돌연변이주를 이용한 반복회분식 배양에서, 회분수가 증가함에 따라 고정화세포의 링크마이신 생산성이 증가하였고 9번째 회분에서는 1007 ( $\pm 256$ ) mg/L의 링크마이신이 얻어졌다. 10번의 반복회분동안 고정화세포에 의해 얻어진 링크마이신 총량을 기준으로 계산된 고정화세포 배양의 생산성은 현탁회분식 배양에 비해 1.4배 높았다. 축축한 담체와 배지가 포함된 플라스크에 균사체 형태의 생산균주를 접종하고 배양 후 생성된 고정화세포 농도와 링크마이신 양은 건조한 담체에 포자상태의 생산균주를 고정화한 후 배양하여 얻어진 것에 비하여 다소 높음이 관찰되었다. 이는 균사체 형태의 생산균주가 축축한 담체에 쉽게 고정화되는 것을 의미한다. 실제 생산규모를 고려할 때, 본 연구팀에서 개발한 방선균 고정화방법은 담체 멸균 및 세포고정화 단계에서 추가적인 설비가 필요 없으며, 이는 고정화단계에서 숙련된 기술과 추가의 설비를 요하는 다른 방법들에 비하여 실용적이며 경쟁력 있는 생물 공정이라고 사료된다.

## 감 사

이 논문은 2004년도 경상대학교 교내 신진교수연구비지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Demain, A. L. (1999), Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 455-463.

2. Park, Y. S., Ohta, N., and M. Okabe (1994), Neomycin production by partial immobilization *Streptomyces fradiae* on cellulose beads in an air-lift bioreactor, *J. Ferm. Bioeng.* **78**, 265-268.
3. Sara, M., Casas, C., and R. Godia (1997), Continuous production of a hybrid antibiotic by *Streptomyces lividans* TK21 pellets in a three-phase fluidized-bed bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* **53**, 601-610.
4. Ozergin-Ulgen, K. and F. Mavituna (1994), Comparison of the activity of immobilised and freely suspended *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 197-202.
5. Arcuri, E. J., Slaff, G., and R. Greasham (1986), Continuous production of thienamycin in immobilized cell systems, *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 842-849.
6. Cruz, A. J. G., Pan, T., Giordano, R. C., Araujo, M. L. G. C., and C. O. Hokka (2004), Cephalosporin C production by immobilized *Cephalosporium acremonium* cells in a repeated batch tower bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* **85**, 96-102.
7. Kim, C. J., Chang, Y. K., Chun, G.-T., Jeong, Y.-H., and S. J. Lee (2001), Continuous culture of immobilized *Streptomyces* cells for kasugamycin production, *Biotechnol. Prog.* **17**, 453-461.
8. Gbewonyo, K. and D. I. C. Wang (1983), Confining mycelial growth to porous microbeads: a novel technique to alter the morphology of non-newtonian mycelial cultures, *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 967-893.
9. Jones, A., Wood, D. N., Razniewska, T., Gaucher, G. M., and L. A. Behie (1986), Continuous production of penicillin-G by *Penicillium chrysogenum* cells immobilized on celite biocatalyst support particles, *Can. J. Chem. Eng.* **64**, 547-552.
10. Baker, E. E., Prevoznak, R. J., Drew, S. W., and B. C. Buckland (1982), Thienamycin production by *Streptomyces cattleya* cells immobilized in celite beads, *Dev. Ind. Microbiol.* **24**, 467-474.
11. Spizek, J. and T. Reznaka (2004), Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 510-519.
12. Lee, B. J. (2000), Establishment of screening procedure for high yielding mutant of lincomycin and dissolved oxygen controlled fermentation, M. S. Thesis, Division of Life Science, Kangwon National University, Chunchon.
13. El-Enshasy, H. A., Farid, M. A., and A. I. El-Diwany (1996), Oxytetracycline production by free and immobilized cells of *Streptomyces rimosus* in batch and repeated batch cultures, In *Immobilized Cells: Basic and Applications*, R. H. Wijffels, R. M. Buitelaar, C. Bucke, and J. Tramper Eds: Proc. International Symposium Organized Under Auspices of The Working Party on Applied Biocatalysis of the European Federation of Biotechnology, Noordwijkerhout, The Netherlands, pp437-443.
14. Keshavarz, T., Walker, E., Eglin, R., Lilley, G., Holt, G., Bull, A. T., and M. D. Lilly (1989), Immobilization of *Penicillium chrysogenum*: spore growth on celite. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 487-491.