creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000234525

2005년 2월

석사학위논문

Agrobacterium sp. ATCC31750을 이용한 β-1,3-glucan 생산 공정에서 UDP-glucose 농도 변화

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

박 양 호

Agrobacterium sp. ATCC31750을 이용한 β-1,3-glucan 생산 공정에서 UDP-glucose 농도 변화

Change of UDP-glucose concentration for β-1,3-glucan production using *Agrobacterium* sp. ATCC 31750

2005년 2 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

박 양 호

Agrobacterium sp. ATCC31750을 이용한 β-1,3-glucan 생산 공정에서 UDP-glucose 농도 변화

지도교수 이 중 헌

이 논문을 공학석사학위신청 논문으로 제출함.

2005 년 2 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

박 양 호

박양호의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 선 일 인

위 원 조선대학교 교수 송 연 호 인

위 원 조선대학교 교수 이 중 헌 인

2005 년 2월

조 선 대 학 교 대 학 원

목　　차

ABSTRACT

I. 서　　론 ····· 1

II. 실험 방법 및 장치 ····· 8

1. 균주 및 배지 ····· 8

가. 균주 및 보관 ····· 8

나. 배　지 ····· 8

2. HPLC를 이용한 UDP-glucose 농도 분석 조건 모색 ····· 10

가. 시약 및 기기 ····· 10

나. 시료 전처리 ····· 10

다. 이동상 조제 ····· 11

라. 분석 방법 ····· 11

3. 배양 공정에 따른 UDP-glucose 농도 변화 측정 ····· 12

가. 반응기 ····· 12

나. 회분식 배양공정에서의 UDP-glucose 농도 측정 ····· 12

다. 2단 연속 배양공정에서의 UDP-glucose 농도 측정 ····· 12

라. Uracil 첨가에 따른 UDP-glucose 농도 변화 측정 ····· 13

마. 분석 방법 ····· 15

III. 실험 결과 및 고찰 ····· 17
1. UDP-glucose 농도 측정 조건 모색 ····· 17
가. Solvent 조성에 따른 retention time 변화 ····· 17
나. 유량의 변화에 따른 UDP-glucose 농도 변화와 검출 속도 ·· 22
다. UDP-glucose 농도를 측정하기 위한 최적 파장 모색 ····· 26
라. 분리 조건의 재현성 ····· 28

2. 회분식 배양 공정에서 UDP-glucose 농도 변화 ····· 31
가. 세포 성장기의 UDP-glucose 농도 변화 ····· 31
나. 질소원 고갈시의 UDP-glucose 농도 변화 ····· 34
다. β-1,3-glucan 생성시의 UDP-glucose 농도 변화 ····· 34
라. pH 변화에 따른 UDP-glucose 농도 변화 ····· 38

3. 2단 연속 배양 공정에서의 UDP-glucose 농도 변화 ····· 40
가. 세포 배양조 에서 UDP-glucose 농도 변화 ····· 41
나. β-1,3-glucan 생산조 에서 UDP-glucose 농도 변화 ····· 44

4. 회분식 배양 공정에서 탄소원 및 uracil 첨가에 의한 영향 ····· 47
가. β-1,3-glucan 생산 공정에서 탄소원에 따른 UDP-glucose 농도 변화 ····· 47
나. Uracil 첨가에 따른 β-1,3-glucan 생산 효율 ····· 48

IV. 결론 ····· 52

참고 문헌 ····· 54

List of Tables

Table 1. Media composition for β-1,3-glucan production ····· 9

Table 2. Effect of type and composition of mobile phase resolution ·· 19

Table 3. HPLC gradient conditions for the analysis of UDP-glucose 20

Table 4. Condition of analysis for UDP-glucose concentration ····· 29

Table 5. β-1,3-glucan productivity in a batch process and efficiency by uracil addition ····· 51

List of Figures

Fig. 1. *β*-1,3-glucan synthesis pathway ····· 6

Fig. 2. The pathway from uracil to UDP-glucose ····· 7

Fig. 3. Schematic picture of two-stage continuous fermentation process ····· 14

Fig. 4. Chromatogram of sample with the gradient elution conditions ····· 20

Fig. 5. Chromatogram of sample with the isocratic elution conditions ····· 21

Fig. 6. Shift of the retention times of UDP-glucose with mobile flow rates ····· 23

Fig. 7. Effect of flow rates on intensity of UDP-glucose ····· 24

Fig. 8. Chromatogram of UDP-glucose with *Agrobacterium* sp. ··· 25

Fig. 9. Chromatogram in effect of wavelength on intensity of UDP-glucose ····· 27

Fig. 10. Standard curve of UDP-glucose concentration ····· 30

Fig. 11. Standard curve for cell mass measurement ····· 32

Fig. 12. The changes UDP-glucose concentration and cell mass in a batch fermentor ····· 33

Fig. 13. Change of *β*-1,3-glucan and UDP-glucose concentration in a batch fermentor (pH 7.0) ····· 36

Fig. 14. Change of *β*-1,3-glucan and UDP-glucose in a batch fermentor (pH 5.5) ····· 37

Fig. 15. Change of UDP-glucose in *β*-1,3-glucan production level ····· 39

Fig. 16. Change of cell mass, β-1,3-glucan production, UDP-glucose concentration in 1st reactor ····· 42

Fig. 17. Chromatogram of UDP-glucose from *Agrobacterium* sp. in 1st reactor ····· 43

Fig. 18. Change of cell mass, β-1,3-glucan production, UDP-glucose concentration in 2nd reactor ····· 45

Fig. 19. Chromatogram of UDP-glucose from *Agrobacterium* sp. in 2nd reactor ····· 46

Fig. 20 Cell mass, β-1,3-glucan and UDP-glucose concentrations profiles in a batch fermentation process. ····· 49

Fig. 21 Cell mass, β-1,3-glucan and UDP-glucose concentrations profiles in a batch fermentation process. ····· 50

ABSTRACT

Change of UDP-glucose concentration for β-1,3-glucan production using *Agrobacterium* sp. ATCC 31750

Park, Yang-Ho

Advisor : Prof. Lee, Jung-Heon, Ph.D.

Department of Chemical Engineering.

Graduate School of Chosun University

Curdlan is one of biopolymer composed of β-1,3-glucan and dissolved in alkali solution but insoluble under neutral condition, and when the temperature of curdlan solution was heated over 80℃ it became gel.

Agrobacterium sp. ATCC31750 grow in the presence of nitrogen source but produce β-1,3-glucan in the absence of the nitrogen source. Althought we tried to optimize system for the maximal production of β-1,3-glucan, the productivity of β-1,3-glucan still low. To increase β-1,3-glucan productivity, key metabolite UDP-glucose a precursor of β-1,3-glucan was selected and its concentration changes was measured.

In this research, analysis of UDP-glucose by high performance liquid chromatography(HPLC) was established using a reversed phase system. The column used in this research was YMC-Pack Pro C18 column and 50 mM phosphate buffer solution was used as mobile phase. The flow rate of mobile phase was 1.0 ml/min, and UV wavelength was fixed at 254 nm.

The change of UDP-glucose concentration was measured during cell growth and β-1,3-glucan production. The UDP-glucose concentration increases in cell growth level, UDP-glucose revelation activity is differed

by a pH value in the *Agrobacterium* sp. fermentation and it was high in the environment of pH 5.5, also the β-1,3-glucan production showed high productivity.

Using two-stage continuous fermentation process, the change of UDP-glucose concentration during β-1,3-glucan production period was measured. The pH of the first stage fermenter was controlled at pH 7.0, optimal for cell growth and that of 2nd stage was at pH 5.5, optimal for β-1,3-glucan production. When β-1,3-glucan production becomes steady state, the change of UDP-glucose concentration becomes steady state.

Uracil was added to increase β-1,3-glucan production. The added uracil was used to activate UDP-glucose production, a precursor of β-1,3-glucan. When uracil was added at 84 hrs of fermentation the β-1,3-glucan productivity was decreased, the UDP-glucose concentration was suddenly increased and the β-1,3-glucan production was improved about 21 % more than that without uracil. Consequently, UDP-glucose played an important role for the synthesis of β-1,3-glucan. β-1,3-glucan production was increased under high concentration of UDP-glucose.

I. 서론

석유화학, 철강, 조선, 자동차 산업 등을 통해 급속한 성장을 하고 있는 한국은 21세기에 접어들어 컴퓨터와 네트워크 망을 이용한 정보통신 산업의 발전으로 산업화의 전 분야에 걸쳐 큰 변화를 맞이하게 되었다. 이러한 IT 기술의 발전으로 산업체 전반에 자동화 시스템을 적용하게 되었으며 생산성의 극대화라는 업적을 이루게 되었다. 그러나 산업화를 통한 유해물질의 배출과 이를 제거하기 위해 많은 예산이 소요됨에 따라 친환경적인 제품에 관심이 집중되고 있다. 이러한 산업화의 구조 변화로 인해 관심이 집중되고 있는 기술로서 바이오기술(Bio-technology), 나노기술(Nano-technology) 및 환경기술(Environmental-technology)등이 대표적이다. 이 중 바이오 기술은 생물공학 기술을 바탕으로 생물체의 기능과 정보를 활용하여 유용물질을 상업적으로 생산하는 산업이며, 나노 기술은 분자나 원자 수준에서 조작·분석하고 이를 제어하는 기술로써 신 물질 개발, 원자·분자 크기의 모터를 이용한 동력 개발, 기본 생명체의 합성 및 의학에의 응용, 전자 소자를 대체하는 원자 크기의 기본소자 개발 및 이를 이용한 컴퓨터 개발, 생물체와 무기물 소자와의 접속 장치의 개발 등 응용분야가 다양한 미래 지향적 산업이다. 또한, 산업화의 발달로 인한 환경 문제를 해결하기 위한 환경 기술이 부각되고 있으며 지속적인 연구와 투자가 이루어 져야 하는 분야 이다.

산업화의 구조 변화로 미생물의 발효를 통한 바이오 기술이 부각되고 있으며, 발효 공정을 통해 미생물로부터 만들어낼 수 있는 생물고분자들로는 dextran, 잔탄검, 풀루란, curdlan 등이 있다. 생물고분자 물질들은 산업적 수요의 증가로 인하여 생산 공정개발에 대한 투자가 활발히 진행되고 있지만 생산 공정을 최적조건으로 운전을 하여도 우리가 원하는 많은 양의 생물고분자들을 얻어낼 수 가 없고 비싼 재료를 사용하기 때문에 생산물질의 고가를 야기한다는 단점이 있다.

이러한 단점을 해결하기 위해 유전자 재조합 기술을 이용하여 세포내 특정 생화학 반응을 변형시키거나 새로운 생화학 반응을 유도하여 세포의 특성이나 대사물질의 생산을 의도적으로 증가시켜 세포의 활성을 증가시키는 대사공학의 개념이 도입 되었다. 이러한 성과로 대장균을 이용하여 에탄올을 생산하는 균주, 의약품을 만드는데 널리 사용되는 원료 화합물 중 하나인 폴리케티드를 생산하는 균주 그리고 썩는 플라스틱을 생산하는 균주를 육종하였다. 최근에는 대사흐름 분석기술을 사용해 더 효율적인 방법으로 대사공학 연구를 진행하고 있다. 대사흐름 분석기술은 생화학반응식과 미생물이 흡수하거나 분비하는 대사산물을 정량화하여 미생물 내부의 대사회로의 흐름을 예측하고 이를 통해 비효율적인 대사회로의 인식과 새로운 대체 대사회로를 찾아냄으로써 생산 효율을 증가 시킬 수 있는 기술이다.

박테리아에 의하여 생산되는 β-Glucan은 1966년 일본 하라다 교수와 그의 동료들에 의하여 석유 화학 물질을 분해할 수 있는 균주를 분리하여 *Alcaligenes faecalis* var. myxogenes 으로 명명하였으며 이 균주가 생산하는 다당류인 β-Glucan은 수용액 상에서 열을 가하면 겔을 형성하는 특징이 있어 “Curdlan"이라 명명하였다[1]. 특히 이 균주의 경우 curdlan 외에도 succinic acid를 10% 포함한 다당을 생합성하므로 이후 β-Glucan만을 생산하는 미생물 균주를 개발하고자 돌연변이를 유도하였으며 *Alcaligenes faecalis* var. myxogenes IFO 13140 ATCC 21680 균주를 개발하였다. 이후 지속적인 균주 개발로 우라실 요구주인 ATCC 31749 균주를 얻었으며 이로부터 β-Glucan만 생합성하는 ATCC 31750 균주가 Philip 과 Lawford(1983)에 의하여 개발되었다. β-1,3-Glucan은 세포조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포 증식과 재발을 억제하고 면역세포 기능을 활발하게 하는 인터루킨(interleukin), 인터페론(interferon)의 생성을 촉진하는 것으로 보고되고 있다[1,2]. 또한, 활성 β-Glucan은 암세포가 있는 체내로 들어가 사이토카인(cytokine)을 생산시킴으로서 면역세포인 T세포, B세포의 활동을 지원하여 세포조직의 면역기능을 활성화시켜줌으로써 생체방어 효과를 높여준다고 알려지고 있다. 특히

Agrobacterium sp.에서 생산되는 β-1,3-Glucan(Curdlan)은 그 특성이 특이하여 식료품, 건축, 의약분야 등에서 많은 관심을 받고 있다.[3]

β-1,3-glucan의 일반적인 화학적 물리적 특성으로는 물에 불용이고 알칼리 용액에 녹아 고점도를 갖게 되며 산성용액에 의한 중화 반응으로 약간의 겔을 형성하는 특성이 있으며, 80℃ 이상 가열하면 탄력 있는 비가역적인 겔을 형성한다. 또한, 중화 반응 시 산성 용액의 첨가로 기포가 발생하는데 이로 인해 표면적이 넓은 다공성 겔이 된다. 최근에는 콘크리트 혼화제로 사용되어 강도를 증가 시켜주는 역할을 하며 그 수요가 지속적으로 증가하고 있고 서방성 농약제의 매트릭스 및 사료용 면역증강제 등으로 사용됨으로써 산업적 응용분야가 지속적으로 증가하고 있다.[2-10] 이러한 산업적 활용도가 높기 때문에 물리•화학적 특성연구와 대량생산 공정의 연구에 지속적으로 관심과 연구가 이루어지고 있다. 그러나 미생물을 이용한 소규모 생산 공정의 최적화가 이미 진행된 상태에서도 여전히 생산량이 낮은 문제점이 있다. 이러한 문제점을 보완하고 높은 생산성을 얻기 위한 방안으로 미생물의 대사 과정을 예측 하고 주요 대사물질을 측정하여 대사 과정의 제어를 통해 생산성을 높이는 방법이 도입되었으며 많은 연구가 진행 중에 있다. 이러한 미생물의 대사 과정을 분석하는데 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 대사산물의 농도를 정량화 하고 있다.[12,13,21] 역상 액체 크로마토그래피 (reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)는 액상 혼합물의 분리 및 분석에 있어서 대표적인 분석 기기이다. 거의 모든 액상시료의 분리 및 분석이 가능하며, 짧은 분석 시간과 분리능이 우수하다는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서도 RP-HPLC를 이용하여 대사물질을 분석하였다. β-1,3-Glucan을 생산 하는 균주인 *Agrobacterium* sp.의 대사 과정을 추정 하고 주요 대사물질을 선별하였다.(Figure. 1.) 초기 탄소원으로 이용하는 sugar를 분해하여 세포 성장 단계의 필수 에너지원으로 사용을 하고 여분은 glucose로 전환하여 β-1,3-Glucan을 생산해 낸다.[14] *Agrobacterium* sp. ATCC31750의 증식과정에서 가장 큰 특징은 질소원이 존재하는 환경에서는

세포 배양을 촉진하고, 질소원이 고갈되면 대사 경로의 변화로 β-1,3-Glucan을 합성하게 된다. 이 과정에서 UDP-glucose 라는 대사 물질이 발현되고 이는 β-1,3-Glucan을 합성하는데 유일한 전구체 이며 중요한 다리 역할을 한다. 이에 UDP-glucose 농도를 측정함으로써 대사 경로의 효율성을 알아낼 수 있다는 가정을 내리게 되었다. 따라서 본 연구에서는 Key metabolite로 선정한 UDP-glucose 농도를 측정하기 위하여 HPLC system을 이용하여 적정 컬럼을 선정하고 이동상의 조성 및 용리 방법, 이동상의 주입 속도와 측정 파장의 최적화를 통해 분석 시스템의 최적화를 이루고자 하였다.

현재 *Agrobacterium* sp. ATCC31750을 이용한 β-1,3-glucan 생산 공정에 관하여 많은 연구가 진행되고 있는데 회분식 배양에서 세포 최적 pH인 7.0에서 세포 농도를 증가시킨 후 질소원이 고갈되어 더 이상 세포가 성장하지 못하고 β-1,3-glucan을 생산하는 시점부터 pH를 5.5로 조절하여 β-1,3-glucan 생산을 유도하여 공정을 운전하였다. 그러나 생산되어지는 수득률이 낮기에 회분식 배양을 통한 β-1,3-glucan 생산 공정에서는 배양기간의 단축이 생산성을 높이는데 중요한 관건이 되고 있다. 이러한 이유로 β-1,3-glucan 배양 과정에 UDP-glucose의 전구물질인 우라실을 첨가하여 β-1,3-glucan 생산이 향상되는 결과가 보고되기도 하였으며[15], 인산염을 제어하여 생산성을 향상시킨 연구 결과도 보고되었다.[16]

본 연구에서 회분식 배양 공정에서 세포가 성장하는 과정과 질소원이 고갈되는 시점 그리고 β-1,3-glucan을 합성하는 과정에서의 UDP-glucose 농도를 측정하여 β-1,3-glucan을 생성하는 과정에서 UDP-glucose 의 농도변화가 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다.

세포 성장 조건과 β-1,3-glucan 생산 조건의 차이를 이용하여 세포 성장 단계와 β-1,3-glucan 생산 단계를 분리하여 2단 연속 배양 공정을 도입하였다. 1st reactor는 세포 배양 공정으로써 세포 성장 최적 pH인 7.0으로 운전을 하며 기질을 주입하여 주고, 2nd reactor는 활성을 가지고 있는 세포를 넘겨받음으로써 β-1,3-glucan을 생산하는 공정으로 생산 최적 조건인 pH 5.5로

유지하여 연속 배양 공정으로 운전 하면서 이때의 UDP-glucose 농도 변화를 살펴보고 β-1,3-glucan 생산 활성과의 관계를 살펴보도록 하겠다. 또한, UDP-glucose의 전구물질로 알려진 uracil을 첨가함으로 인해 UDP-glucose 농도 변화와 이에 따른 β-1,3-glucan의 생산성에 관해 살펴보았다.[19,20]

결과적으로 본 연구에서는 β-1,3-glucan의 생산성을 높이기 위해 세포내에서 β-1,3-glucan 합성에 관여하는 key metabolite들을 검출하고 정량화하여 세포내 metabolite 변화를 관찰하고 대사흐름을 최적화함으로써 β-1,3-glucan 생산에 중요한 작용을 하는 단백질들의 합성을 촉진하고 생산을 방해하는 부가반응들을 차단시킴으로써 β-1,3-glucan의 생산효율을 높이는데 목적이 있다.

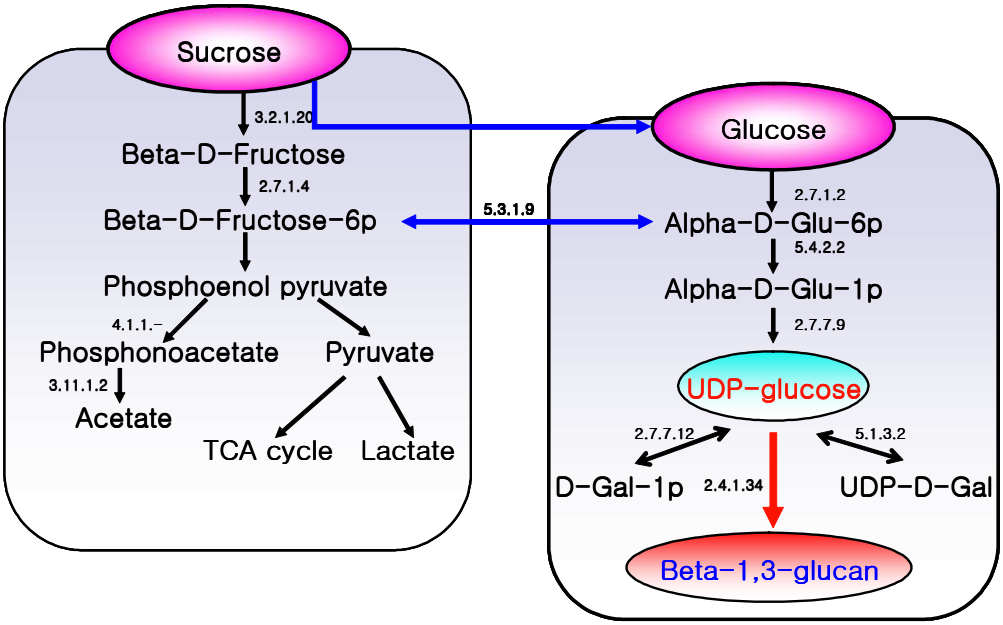

Figure. 1. β-1,3-Glucan synthesis pathway

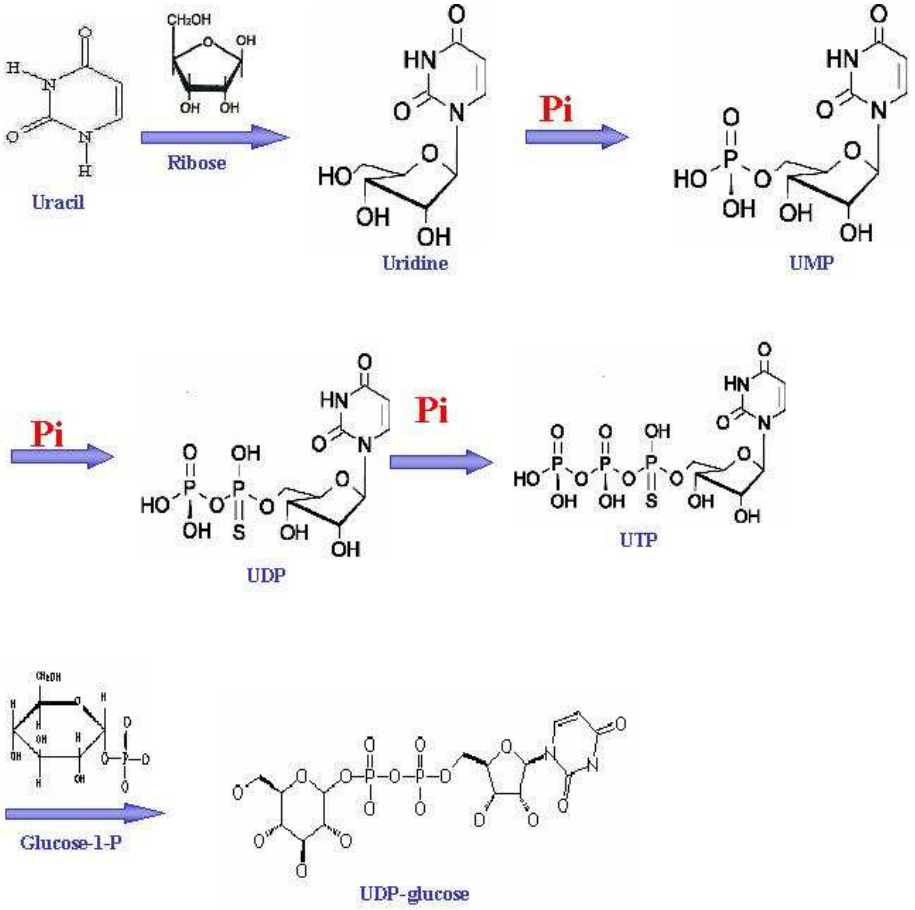

Figure. 2. The pathway from uracil to UDP-glucose

II. 실험 방법 및 장치

1. 균주 및 배지

가. 균주 및 보관

본 연구에서 사용한 균주는 *Agrobacterium* sp. ATCC31750을 사용하였으며, 영양고체배지에서 30 ℃로 2 day 배양 한 후 삼각플라스크(300 ml 삼각플라스크에 100 ml 의 배지를 넣고 30 ℃ 150 rpm에서 20 hr 종 배양)에 종 배양하여 long-term stock solution(배양액 1 ml를 취하여 12,000 rpm에서 10 min 간 원심분리를 거친 후 상등액을 버리고 0.9 % NaCl 용액 1 ml를 넣고 잘 섞어준다. 세척과정을 2회 거쳐 순수한 세포만 취한 후 0.2 ml의 LB medium을 첨가하고, 50 % glycerol 0.8 ml를 넣고 잘 교반해 준다)으로 제작하여 -70 ℃에 보관하며 종 배양에 사용하였다.

나. 배지

본 연구에 사용한 종 배양 배지 조성으로 설탕 20 g/L, yeast extract 5 g/L, peptone 5 g/L로 제조 후 121 ℃에서 15 min 멸균 후 접종하였다. 30 ℃ 150 rpm에서 20 hr 배양 후 본 배양 접종 균주로 사용하였다. 본 배양 배지의 조성으로는 sugar 100 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NH_4Cl 4 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, 그리고 10 ml/L의 미량원소용액(0.1 N HCl 1 L에 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2 g, $CaCl_2$ 0.5 g, $ZnCl_2$ 1 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 g을 혼합하여 제조)으로 배양액을 제조하였다. 본 배양 배지는 autoclave에서 121 ℃, 15 min 멸균 후 사용하였으며, pH 조절은 2 N HCl과 2 N NaOH을 사용하여 조절하였다.

Table 1. Media composition for β-1,3-glucan production

Component	*Concentration (g/L)*
Sucrose	100
NH_4Cl	4
KH_2PO_4	1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
Trace element	10 ml/L
Initial pH 7.0	

2. *HPLC*를 이용한 *UDP-glucose* 농도 분석 조건 모색

가. 시약 및 기기

UDP-glucose 농도를 측정하기 위해 HPLC system을 사용하였다. 기울기 용리 장치로 Young-Lin SDV30 plus(Solvent degassor & Valve module)를 사용하였고, 펌프는 Young-Lin M930 Solvent delivery pump를 사용하였다. Young-In M720 UV detector를 사용하여 UDP-glucose 농도를 측정 하였다. Column은 YMC-Pack Pro C18(S-5μm, 12 nm, 250×4.6 mm I.D)을 이용하였다. 또한, 세포 파괴 장비로는 Sonic Dismemberator(Fisher 100 model)를 사용하였고, 이물질을 제거하기 위해 High speed centrifuge(한국 한일 과학)를 사용하였다.

이동상의 조제를 위하여 HPLC 급 Methanol(Fisher), Acetonitrile(Fisher), Phosphate buffer solution을 사용하였고, UDP-glucose 농도를 측정하기 위한 standard 시약으로는 Uridine-5′-diphosphoglucose Disodium salt (Fluka, -18 ℃ 냉동 보관)를 사용하였다.

나. 시료 전 처리

공정에서 취한 sample을 세포 농도 2 g/L로 취하여 고속 원심분리기로 4 ℃, 12000 rpm에서 10 min 동안 원심분리를 하고 침전물을 증류수로 2회 세척한 후 다시 원심 분리하여 세포를 채취하였다. 침전된 세포에 이동상으로 사용한 50 mM phosphate buffer solution 1 ml를 첨가 후 얼음물에 10 min 보관하였다. 세포내 단백질 변성 억제를 위해 얼음물에 보관한 상태에서 sonicator를 이용하여 세포를 파괴하여 세포내 대사 물질을 취하였다. 세포 파괴 후 얼음물에 넣고 4 ℃에서 30 min 냉장 보관하였다. 이를 고속 원심분리기로 4 ℃, 12,000 rpm에서 15 min 원심분리를 하여 대사물질이 녹아있는 상등액을 취했다. 주입 시료로 사용하기 전에 0.2 μm filter를 거쳐 이물질을 제거한 후 주입 시료로 사용하였다.

다. 이동상 조제

50 mM Phosphate buffer solution (pH 6.0)을 만든 후 Phosphoric acid를 이용하여 pH를 5.3으로 조절하였다. 0.45 μm membrane filter를 이용하여 이물질을 제거한 후 Helium gas를 이용해 10 min 탈기 시켜 이동상으로 사용하였다.

라. 분석방법

HPLC를 이용하여 UDP-glucose 농도를 측정하기 위하여 standard 시약을 사용해 컬럼의 감도를 살펴본 다음에 배양 과정에서 취한 sample을 2 g/L의 농도로 취하여 시료 전 처리를 통해 20 μl를 주입 하여 분리능을 살펴보았다. 최적 분리 조건을 선정하기 위하여 초기 이동상의 유속을 0.5 ml/min, UV wavelength를 254 nm로 고정하여 UDP-glucose 농도를 분석하였다. 분석 최적 조건을 얻기 위하여 유속을 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5 ml/min 으로 변화시켜 최적 유속을 선정하고, 파장을 200, 210, 230, 254, 270 nm로 변화하여 최적 파장을 선정하였다. 이러한 조건들을 적용함으로써 UDP-glucose 농도를 측정 할 수 있는 조건을 확립하였다.

3. 배양 공정에 따른 *UDP-glucose* 농도 변화 측정

가. 반응기

본 연구에 사용한 반응기는 온도 조절과 pH 조절, 용존산소 농도 측정 장치를 장착한 한국발효기(Inchon Korea, KF-5L)를 사용하였다. 반응기 volume은 5 L, 7 L로 working volume을 조절 하며 실험하였다.

나. 회분식 배양 공정에서의 *UDP-glucose* 농도 측정

본 연구의 회분식 발효 공정에서는 working volume 3 L의 10 %에 해당하는 종 배양 300 ml를 진탕배양기 30 ℃ 150 rpm에서 20 hr 배양 후 본 배양 공정에 접종하였다.

pH에 의한 영향을 살펴보기 위해 하나는 초기 세포 배양 시부터 pH를 7.0으로 고정하여 질소원이 고갈되어 β-1,3-glucan이 생성되는 시점까지 유지하였으며, 다른 하나는 초기 pH를 7.0으로 유지하여 세포 배양을 유도하였으며 질소원이 고갈되는 시점에서 pH를 5.5로 조절하여 β-1,3-glucan 생산을 유도하였다. 통기량은 0.5 vvm으로 유지하였고, 교반 속도는 300~600 rpm까지 용존 산소량이 10 %이상으로 유지 되게 높여주면서 배양하였다.

다. *2*단 연속 배양 공정에서의 *UDP-glucose* 농도 측정

2단 연속 배양 공정에서는 1st reactor는 세포 배양 공정, 2nd reactor는 β-1,3-glucan 생산 공정으로 운전하였으며, 세포배양 공정은 working volume 2 L, pH는 7.0, β-1,3-glucan 생산 공정은 4 L, pH 5.5를 유지 하며 액위 컨트롤을 하여 공정을 운전 하였다. 그리고 정량 펌프(Watson Marlow, 101U)를 이용하여 주입되는 기질의 양을 조절하였다.

라. *Uracil* 첨가에 따른 *UDP-glucose* 농도 변화 측정

추정한 대사 경로에서 sugar를 glucose로 분해하여 β-1,3-glucan을 생산하는데, 탄소원으로 sugar를 이용한 공정과 glucose를 이용한 공정으로 나누어 비교 실험을 행하였다. 또한, β-1,3-glucan 생산 공정에서 세포의 대사 물질인 UDP-glucose의 전구물질로 알려진 uracil을 첨가함으로써 생산되어지는 효율을 살펴보았다. 회분식 배양 공정에서 β-1,3-glucan이 생산되어지고 생산 활성이 줄어드는 시점에 uracil 0.5 g/L 농도로 멸균 후 첨가해 주었다. 첨가된 uracil이 UDP-glucose 농도와 β-1,3-glucan 생산성에 미치는 영향을 살펴보았다.

Figure. 3. Schematic picture of two-stage continuous fermentation process

마. 분석 방법

균체량 측정

세포의 균체량을 측정하기 위하여 각 반응기에서 sample 1 ml를 1.5 ml micro-tube에 담아 12,000 rpm에서 10 min 원심분리를 한 후 상등액은 버리고 침전된 세포와 β-1,3-glucan에 3 N NaOH 1 ml를 넣고 충분히 섞어 준 후 β-1,3-glucan이 모두 녹아나도록 30 min 방치하였다. 충분히 β-1,3-glucan을 녹여낸 후 12,000 rpm에서 10 min 원심 분리하여 침전된 세포와 NaOH에 녹아있는 β-1,3-glucan을 분리하였다. 분리된 세포를 증류수로 3회 세척 하여 염을 제거한 후 60 ℃건조기에서 24 hr 건조시켜 건조 중량을 측정하였다.

β-1,3-glucan 측정

β-1,3-glucan의 생산량을 측정하기 위해 세포 분리 시 취한 β-1,3-glucan을 50 ml tube에 담고 3 N HCl 1.5 ml를 넣어 잘 섞어 준다. 염을 제거하기 위하여 40 ml의 증류수를 넣고 3,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리를 하였다. 동일하게 증류수로 3회 세척한 후 60 ℃ 건조기에서 48 hr 건조시킨 후 건조 중량을 측정하였다.

암모늄이온 및 탄소원 측정

암모늄이온 분석은 indophenol 방법으로 분석하였으며[17], 탄소원 측정은 3 N HCl을 이용하여 95 ℃에서 15 min 가수분해 시킨 후 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법을 이용하여 측정하였다[18].

UDP-glucose 농도 측정

UDP-glucose 농도 측정은 YMC-Pack pro C18 column을 이용한 RP-HPLC를 이용하여 UV 파장 254 nm, 이동상의 유속 1.0 ml/min로 흘려주며 등용매 용리 법을 이용하여 분석하였다. 시료의 전 처리는 세포 농도 2 g/L로 취하여 증류수 0.5 ml를 첨가한 후 4 ℃ 12,000 rpm에서 10 min 원심

분리 한 후 상등액을 버리고 50 mM phosphate buffer solution을 이용하여 2회 세척하였다. 이를 얼음물에 넣고 sonication을 한 후 4 ℃ 얼음물에 30 min 보관하였다. 4 ℃ 12,000 rpm에서 10 min 원심 분리하여 파괴된 세포벽과 이물질을 모두 제거한 후 상등액을 0.2 μm filter를 이용해 다시 한번 이물질을 제거하고 주입 시료로 사용하였다.

III. 실험 결과 및 고찰

1. UDP-glucose 농도 측정 조건

UDP-glucose 농도를 측정하기 위하여 RP-HPLC system을 이용하였다. 분리 효율이 좋은 solvent를 찾기 위해 극성이 큰 용매인 methanol, acetonitrile 그리고 phosphate buffer를 이용하여 혼합비를 조절 하고 검출 시간과 크로마토그램을 확인 했으며, 등용매 용리(Isocratic elution)와 기울기 용리(Gradient elution)에서의 분리능을 비교해 최적 solvent를 선정하였다. 또한, 이동상의 이동 속도에 따른 UDP-glucose 농도 변화와 검출속도를 알아봄으로써 최적 유속을 측정하였다. UV detector의 파장 변화에 따른 크로마토그램을 확인하여 최적 파장을 선정함으로써 UDP-glucose농도를 측정하기 위한 조건을 검색하였다.

가. *Solvent* 조성에 따른 *Retention Time* 변화

역상 컬럼인 YMC-Pack Pro C18 Column을 이용하여 UDP-glucose농도를 측정하기 위해 다양한 조성의 solvent를 이용하여 검출 감도를 살펴보고 이에 따른 retention time의 변화를 살펴보았다. 또한, UDP-glucose 순수 시약과 발효조에서 취한 sample을 전처리 하여 검출되어지는 피크를 통해 적정 solvent를 선정하고 등용매 용리와 기울기 용리를 비교함으로써 분석 system을 모색하였다. 역상 컬럼을 사용하기 때문에 극성이 큰 methanol, acetonitrile 그리고 50 mM phosphate buffer solution을 이용하였고 각기 조성을 달리하여 분리능을 살펴보았다. Table. 2에서 보는 바와 같이 %비로 조성을 변화 시켜주었으며, 초기 이동상의 유속은 0.5 ml/min, UV 파장은 254 nm에서 측정하였으며, 주입 시료의 양은 20 µl를 사용하였다.

Table 2.는 UDP-glucose 표준 시약을 사용하여 측정한 검출 시간을 나타내고 있는데 실제 sample을 주입하였을 때 크로마토그램의 검출 감도를 알아보기 위해 발효 과정에서 취한 sample을 시료 전처리 하여 주입 하였다. 그

러나 피크의 감도가 낮고 겹치는 현상과 정확한 분리 감도를 얻지 못하였다. 이에 이동상 용매의 조성을 변화 시켜주는 기울기 용리 방법을 이용하여 분리능을 살펴보았다. 이때 사용한 이동상의 농도 변화를 주기 위해 Sol A : 50 mM phosphate buffer solution을 사용하고 Sol B는 sol A 90 %와 MeOH 10 %를 혼합하여 제조하였다. Figure. 4.에서 보는 바와 같이 분리능이 떨어지고, 검출 감도의 감소와 후반부의 끌림 현상이 일어난다. 이는 컬럼 내부 압력의 상승과 분리 시간의 장기화 그리고 solvent의 소모를 야기하게 된다. 이에 50 mM phosphate buffer solution을 단일 이동상으로 이용한 등용매 용리 상태로 분리능을 살펴본 크로마토그램을 Figure. 5.에 나타내었다. 기울기 용리를 사용한 방법보다 등용매 용리를 사용한 방법이 분리능이 좋고 끌림 현상이 없어 등용매 용리를 이용한 분리 방법으로 UDP-glucose 농도를 측정하였다.

Table. 2. Effect of type and composition of mobile phase on resolution (BS : Phosphate buffer solution, MeOH : Methanol, AN : Acetonitrile)

Solvent	%농도	평균	
		Retention Time	Area (mV x sec)
BS	100	11.25713	1734.821
BS : MeOH	90 : 10	10.56135	1827.18
	80 : 20	8.94137	1905.874
	70 : 30	5.14138	1961.506
BS : AN	90 : 10	12.49916	1818.002
	80 : 20	6.367233	1947.951
	70 : 30	5.128333	2021.412
BS : MeOH : AN	90 : 5 : 5	6.043867	1874.315
	80 : 15 : 5	6.164433	1828.498
	80 : 5 : 15	5.571133	1923.466
	70 : 25 : 5	5.7422	1818.134
	70 : 5 : 25	5.369467	1888.494

Table. 3. HPLC gradient conditions for the analysis of UDP-glucose

Min	Sol A (%)	Sol B (%)
0	100	0
5	95	5
10	90	10
20	70	30
30	70	30
40	100	0

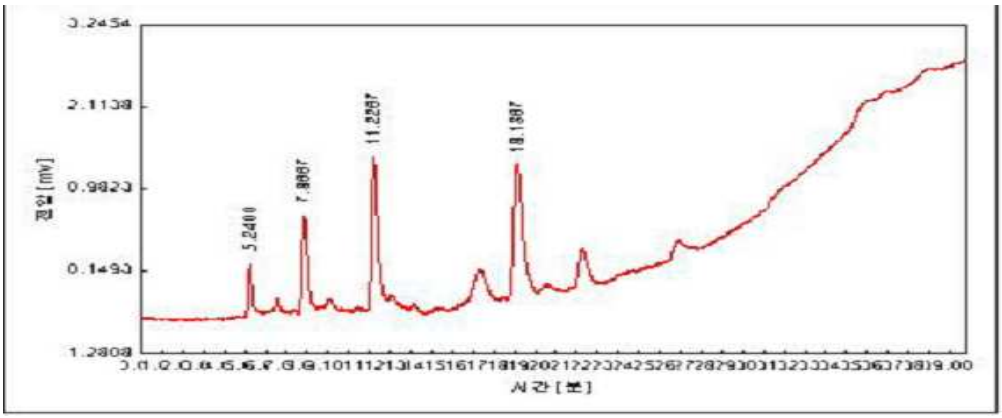

Figure. 4. Chromatogram of sample with the gradient elution conditions
Sol A : 50 mM Phosphate buffer solution
Sol B : Sol A : MeOH = 9 : 1

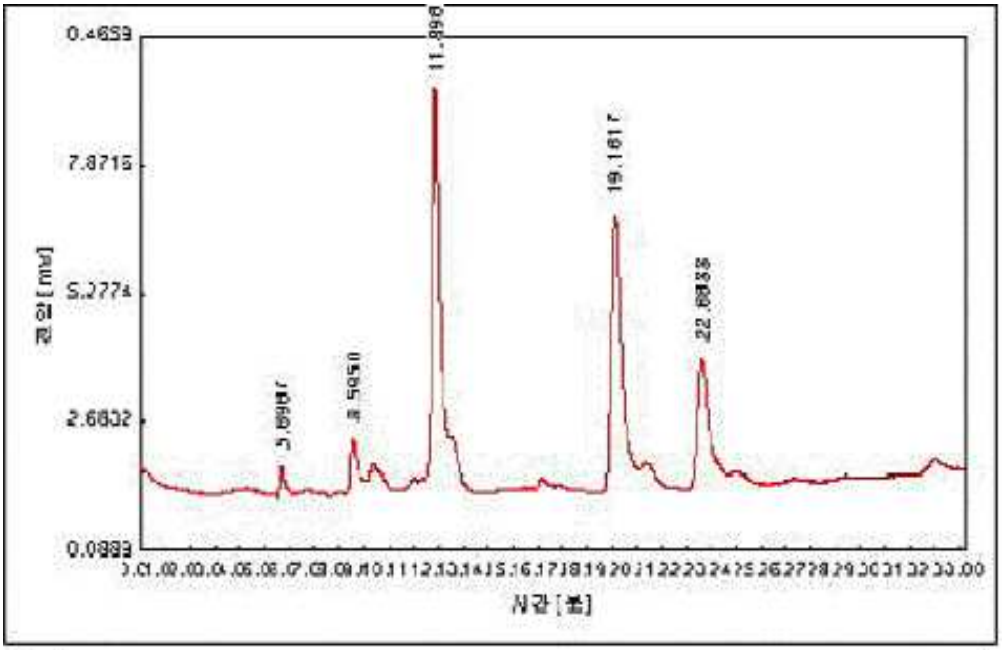

Figure. 5. Chromatogram of sample with the Isocratic elution conditions
Solvent : 50 mM Phosphate buffer solution (pH 5.3)

나. 유량의 변화에 따른 *UDP-glucose* 농도변화와 검출 속도

HPLC를 이용하여 목적 물질을 분리하는데 있어 최적 유량속도를 측정하는 일은 중요한 일이다. 이는 시료의 분리능에 많은 영향을 미치며, 사용하는 분리 column의 내압 상승을 유발한다. 그리고 분석 시간의 장기화와 이동상의 소모를 야기 하게 된다. 이에 이동상의 속도 변화를 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5 ml/min으로 적용하여 검출 시간과 검출 면적을 알아보았다.

이동상의 속도 변화에 따른 검출 속도를 Figure. 6.에 나타내었다. 유속이 빨라질수록 검출되어지는 시간 역시 빨라지지만, Figure. 7.을 보면 검출 되어지는 농도의 면적이 감소하며 이는 분리 column에 높은 압력을 주게 된다. 또한, 저 농도의 UDP-glucose 농도를 측정하면 검출 감도가 감소하여 측정이 불가능하게 된다. 검출 되어지는 시간과 면적을 고려하여 최적 유속은 1.0 ml/min으로 선정하였으며, 분석에 적용하였다. 이동상의 유속을 1.0 ml/min으로 흘려주며 검출한 UDP-glucose의 크로마토그램을 Figure. 8.에 나타내었다. 끌림 현상이 없는 높은 분리능을 나타내고 있으며 6 min 경과 후 목적물질인 UDP-glucose를 검출해 냈다.

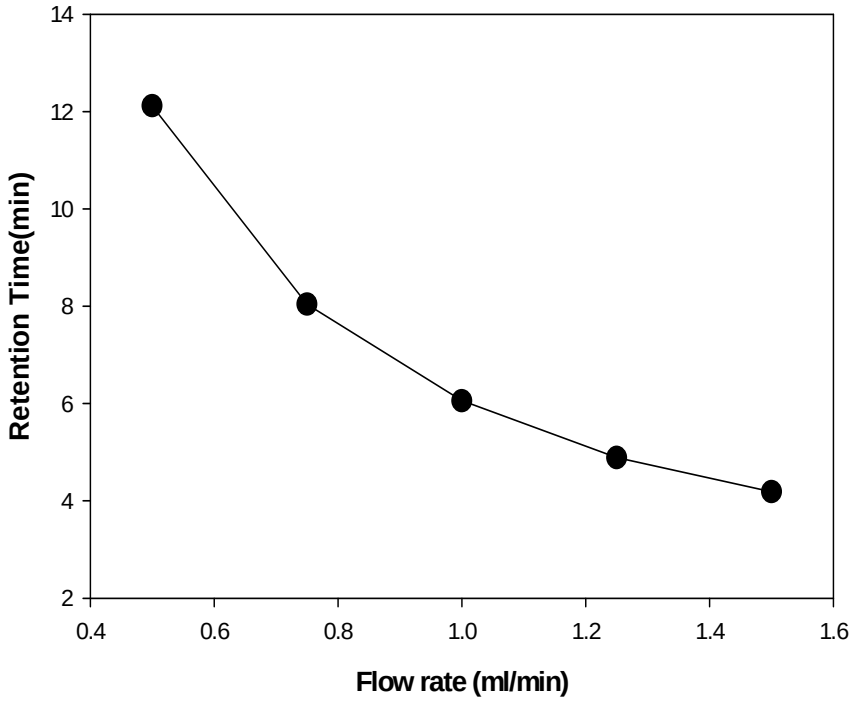

Figure. 6. Shift of the retention times of UDP-glucose with mobile flow rates.

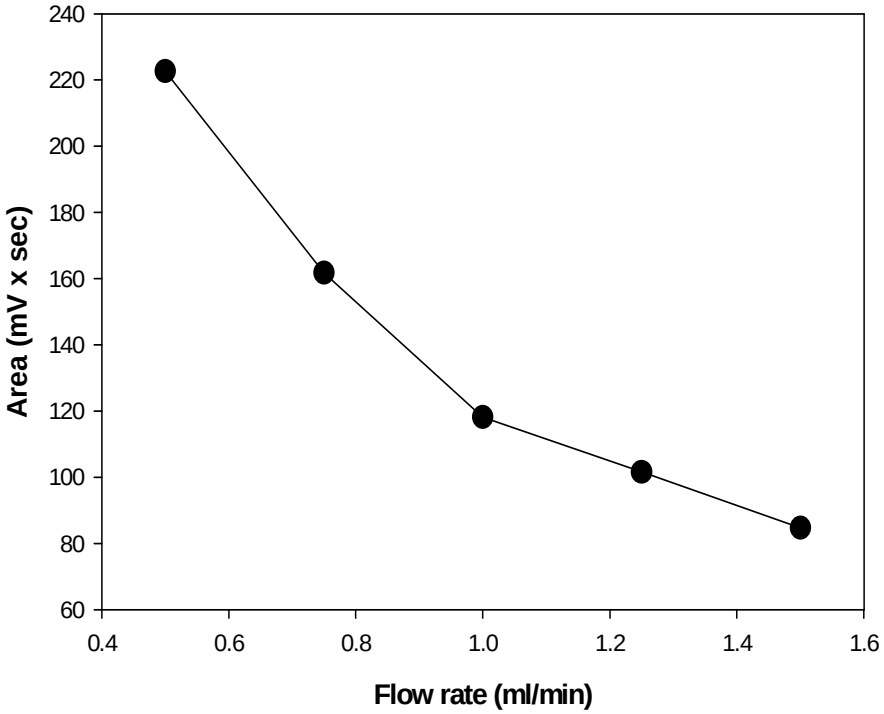

Figure. 7. Effect of flow rates on intensity of UDP-glucose

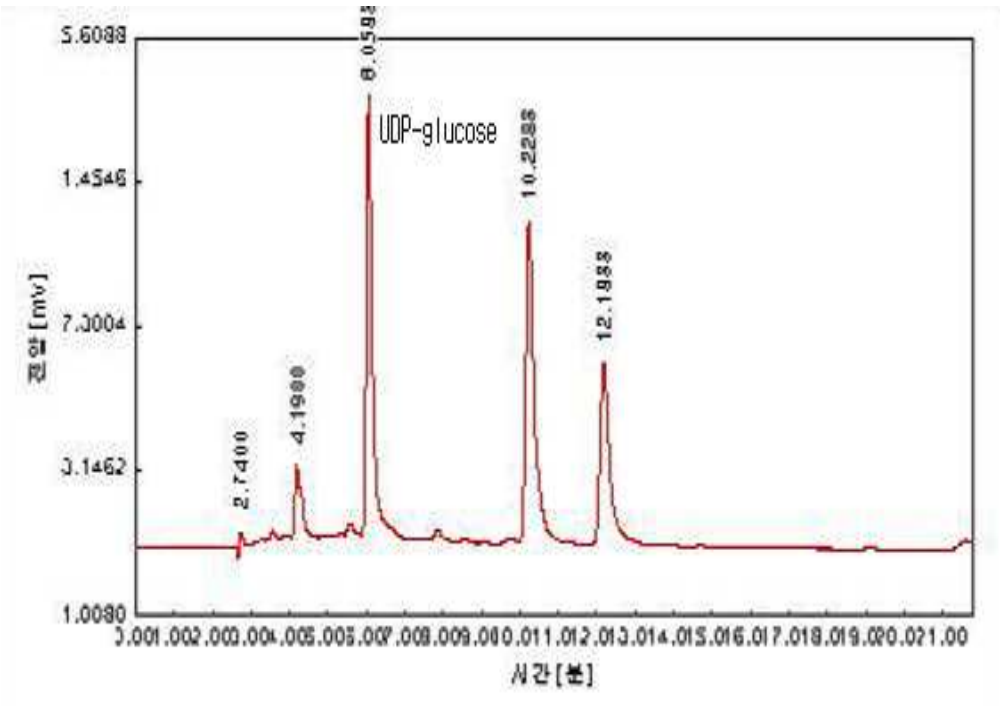

Figure. 8. Chromatogram of UDP-glucose with *Agrobacterium* sp.

다. *UDP-glucose*농도를 측정하기 위한 최적 파장 모색

β-1,3-glucan을 생산해 내는 과정에서의 UDP-glucose 농도를 측정하기 위한 중요 인자 중 하나로 검출되어지는 최적 파장을 선별하기 위한 실험을 행하였다. UV wavelength 변화는 200, 210, 230, 254, 270 nm로 조절하여 측정을 하였다. 이동상으로 50 mM phosphate buffer solution을 등용매 용리법으로 흘려주었으며, 이동상의 유속은 1.0 ml/min으로 유지 하였다. 시료 전처리를 통해 20 µl의 시료를 주입하였다.

UV wavelength를 조절하여 UDP-glucose 농도를 측정한 크로마토그램을 Figure. 9.에 나타내었다. 200, 210, 230 nm의 파장에서 측정한 크로마토그램은 모두 분리능이 떨어지고 끌리는 현상이 일어났다. 그리고 254, 270 nm의 파장에서는 모두 분리능이 좋고 끌림 현상이 일어나지 않았다. 그러나 270 nm보다 254 nm에서 측정한 UDP-glucose 농도가 더 높게 나타남으로 인해 최적 파장을 254 nm로 고정하였다.

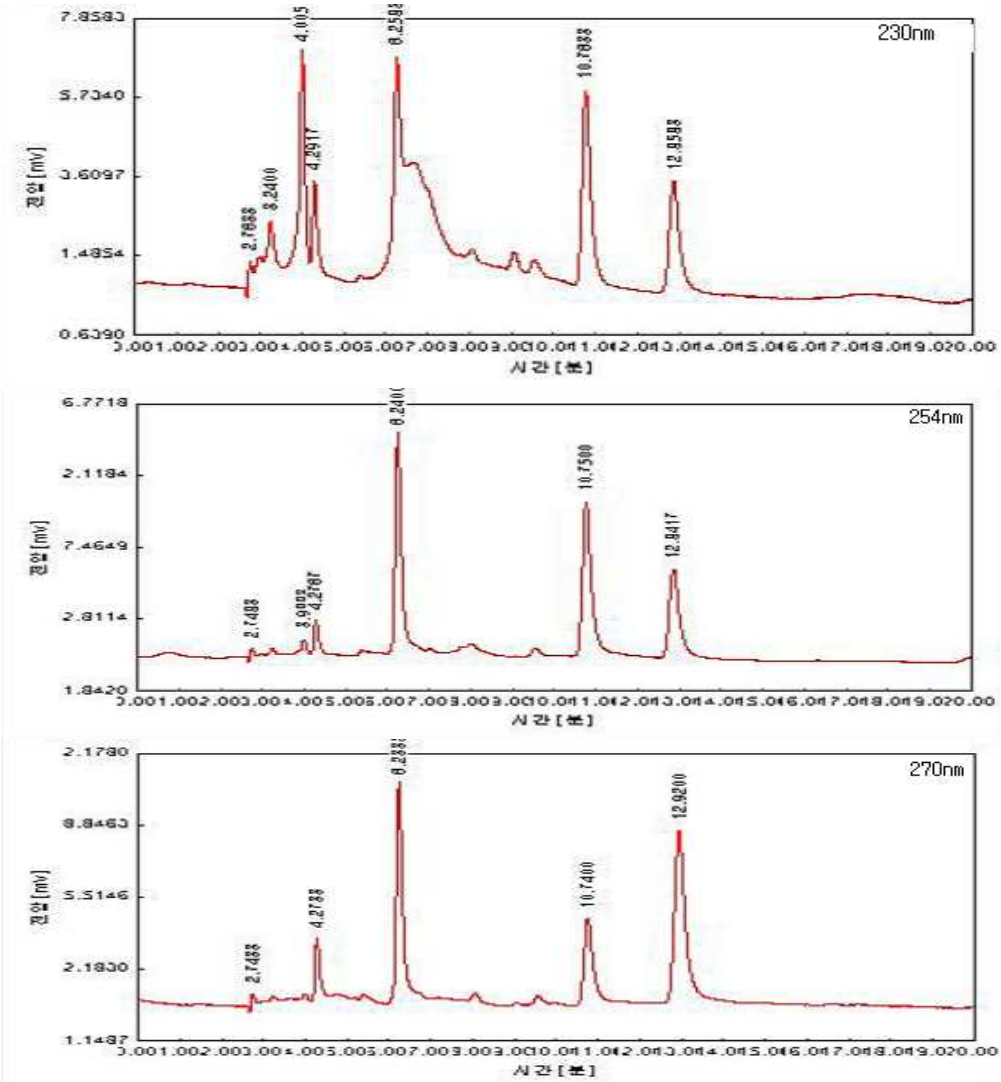

Figure. 9. Chromatogram in effect of wavelengths on intensity of UDP-glucose

라. 분리 조건의 재현성

HPLC를 이용한 UDP-glucose 농도 측정을 위한 조건 모색을 통해 Table 4.와 같은 조건을 확립하였다. 분리능 실험에 있어서 재현성은 중요한 의미를 갖기 때문에 최적 조건을 이용해 분리능의 재현성을 살펴보았다. 시료 전 처리를 통해 동일한 시료를 3회에 거쳐 주입하였으며, 이러한 데이터를 통해서 분리능의 재현성을 살펴 볼 수 있었고 발효 공정에서의 시료 농도 분석을 위하여 standard curve를 작성하였다.(Figure. 10.) UDP-glucose 측정을 위한 최적 조건과 농도에 따른 standard curve를 이용하여 배양 공정에 따른 UDP-glucose 농도 변화를 살펴보았다.

Table. 4. Condition of analysis for UDP-glucose concentration

Reversed-phase HPLC system
Column : YMC-Pack Pro C18 (S-5 μm, 12 nm, 250 X 4.6 mm I.D)
UV wavelength : 254 nm
Flow rate of mobile phase : 1.0 ml/min
Injection volume : 20 μl
Solvent : 50 mM Phosphate buffer solution (pH 5.3)

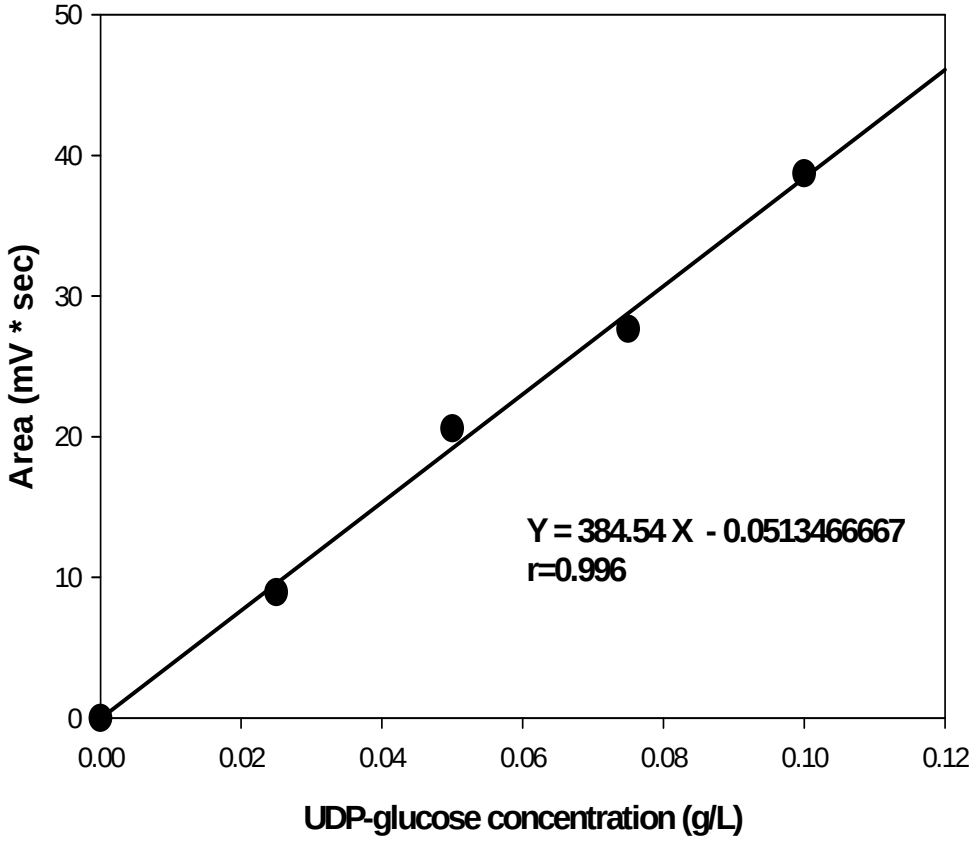

Figure. 10. Standard curve of UDP-glucose concentration

2. 회분식 배양 공정에서 *UDP-glucose* 농도 변화

Agrobacterium sp. ATCC31750 균주를 이용하여 β-1,3-glucan을 생산하는 공정에 Table 1.의 조성으로 배지를 준비하였다. 초기 접종 후 세포 대량 배양을 위해서 발효 조건을 세포 배양 공정으로 유도하여 운전하였다. 24 hr 배양을 하면 세포 농도가 7 g/L정도 성장을 하고 이후 질소원의 고갈로 더 이상 성장을 하지 못하게 된다. 이 과정에서 많은 산소소모량을 필요로 한다. 질소원 고갈 후 세포성장이 멈추고 β-1,3-glucan 생산으로 대사과정이 진행됨으로써 산소소모량이 급격히 감소한다.

질소원 고갈 후 pH에 의한 UDP-glucose 농도 변화를 측정하기 위해 첫 반응조는 pH를 7.0으로 유지하고 다른 반응조는 β-1,3-glucan 생산 최적 조건인 pH 5.5로 조절함으로써 β-1,3-glucan 생산을 유도하였다. 이때의 세포 성장 과정에서의 UDP-glucose 농도 변화와 질소원이 고갈되는 시점에서의 농도 변화 그리고 β-1,3-glucan을 생성하는 과정에서의 UDP-glucose 농도 변화를 측정함으로써 β-1,3-glucan 생산성과의 관계를 살펴보도록 하겠다.

가. 세포 성장기의 *UDP-glucose* 농도 변화

초기 세포 배양 공정에서의 UDP-glucose 농도 변화를 살펴보았다.(Figure. 12.) 세포 농도가 증가하는 과정에서 측정된 UDP-glucose농도를 보면 세포의 농도가 증가할수록 UDP-glucose 농도 역시 증가함을 볼 수가 있다. 이는 질소원이 존재하기 때문에 β-1,3-glucan은 생성이 되지 않지만, 세포 배양 과정에서 세포내 대사 물질인 UDP-glucose가 세포 배양에 의해 같이 증가됨을 볼 수 있었다.

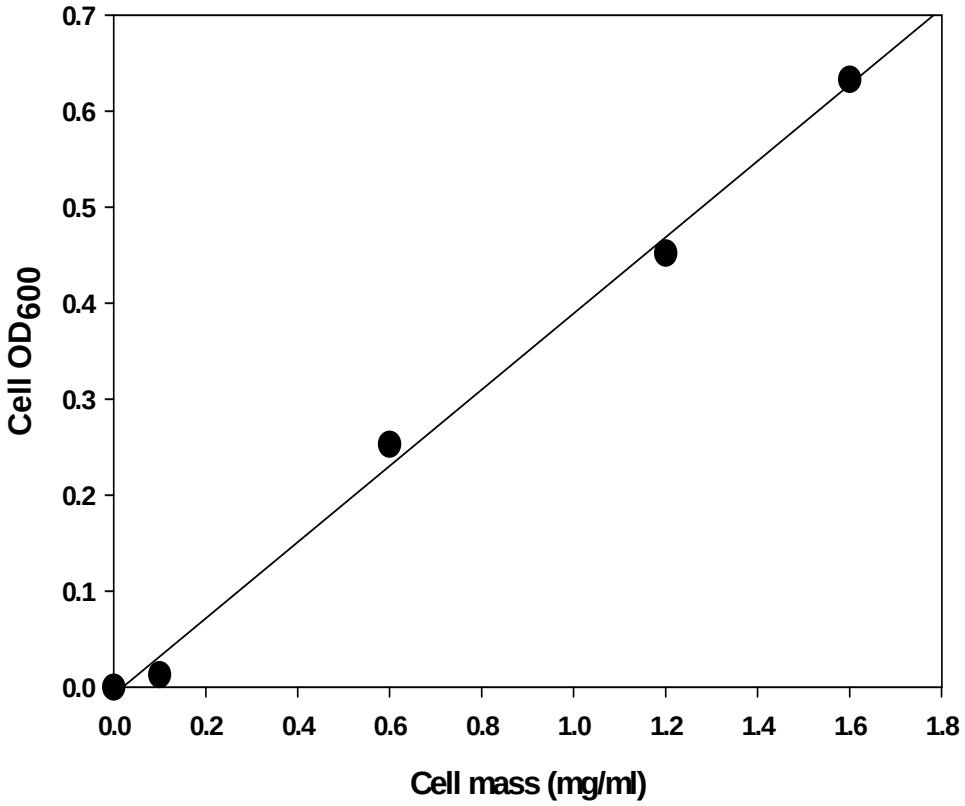

Figure. 11. Standard curve for Cell mass measurement

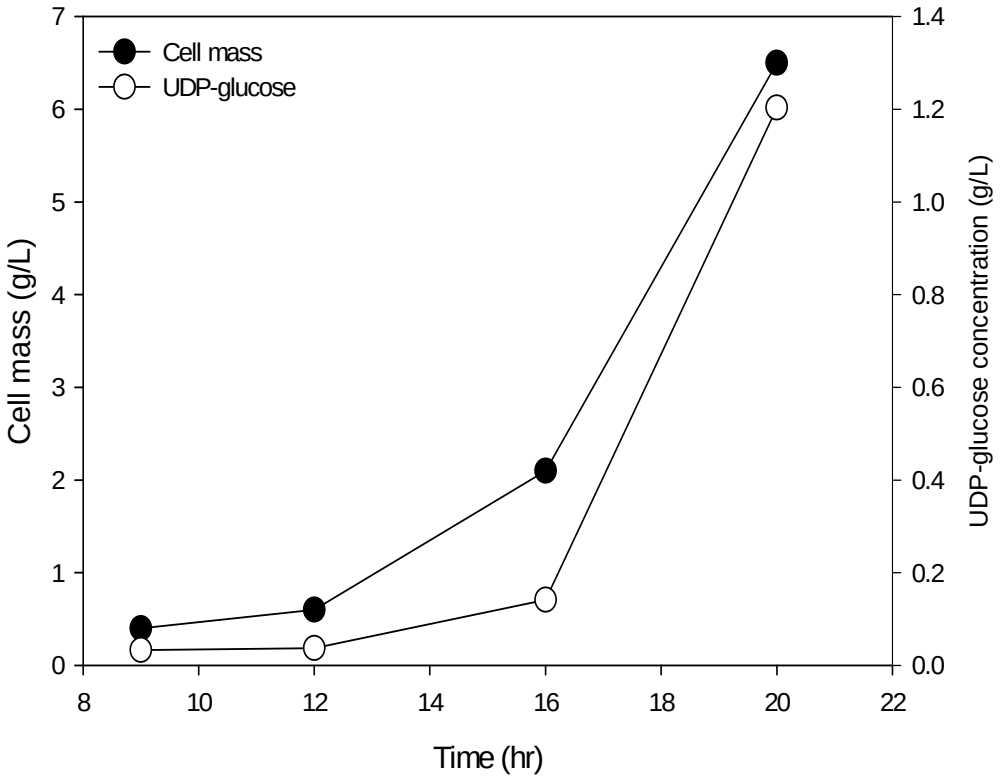

Figure. 12. The changes of UDP-glucose concentration and cell mass in a batch fermenter

나. 질소원 고갈시의 *UDP-glucose* 농도 변화

Agrobacterium sp. ATCC31750 균주는 질소원의 유무에 의해 대사 경로가 변하는 것을 실험을 통해 알 수 있었다. 질소원이 존재하는 시점에서는 세포가 증식을 하고 질소원이 고갈되는 시점에서는 β-1,3-glucan 이라는 생체 고분자 물질을 생합성하게 된다. 본 연구에서는 본 배양 접종 후 1 day 지나면 질소원이 고갈되는데 이 시점까지 세포는 7 g/L 정도 증식을 하게 된다. 질소원이 고갈되는 시점부터 β-1,3-glucan을 합성하게 되는데 이때의 pH에 의한 영향을 살펴보기 위해 세포 배양 최적 pH인 7.0으로 유지한 발효조와 β-1,3-glucan 생산 최적 조건인 pH 5.5로 조절한 발효조로 구분하여 운전하였다. 질소원이 고갈되는 시점에서는 양쪽 모두 UDP-glucose 농도가 감소하는 경향을 보였다. 이는 세포 성장 과정에서 생성된 UDP-glucose가 β-1,3-glucan으로 전환됨으로써 소모되는 것으로 사료된다. Figure. 15.에서 보는 바와 같이 pH에 의한 β-1,3-glucan 생산 활성의 차이를 볼 수가 있다. pH 7.0을 유지한 공정에서는 UDP-glucose 농도가 감소한 후 β-1,3-glucan이 생산 되는데 까지 10 hr 정도 일정한 농도를 보이다 조금씩 증가하게 되는데, pH를 β-1,3-glucan 생산 조건인 pH 5.5로 조절한 공정에서는 질소원이 고갈되는 시점부터 β-1,3-glucan 활성이 증가하고 있음을 UDP-glucose 농도를 측정함으로써 알 수가 있다. 이를 통해 β-1,3-glucan 생산 공정에서 질소원의 유무와 pH에 의한 영향이 매우 큼을 알 수 있었으며, 이러한 조건들이 세포의 대사 과정에 중요한 인자로 작용함을 알 수 있었다.

다. *β-1,3-glucan* 생성시의 *UDP-glucose* 농도 변화

회분식 배양 공정에서 세포 성장 조건에 맞추어 배양 공정을 운전하였을 때의 UDP-glucose 농도와 β-1,3-glucan 농도를 Figure. 13.에 나타내었다. 초기 세포 성장 환경에서는 UDP-glucose 농도가 증가하다가 질소원이 고갈되는 시점에서 급격히 농도가 감소함을 볼 수 있다. 이 후 10 hr 정도 큰 변화 없이 유지되다 β-1,3-glucan이 합성되는 시점에서 조금씩 증가하고, β

-1,3-glucan 생산량이 증가하는 시점에서 UDP-glucose 농도 역시 증가 하였다. 그러나 β-1,3-glucan 생산 활성이 감소하는 시점부터는 UDP-glucose농도 역시 큰 변화 없이 일정하게 유지됨을 볼 수 있다. pH를 세포 성장 조건인 7.0으로 유지 하여 주었기 때문에 β-1,3-glucan의 생산성은 그리 높지 않았고 UDP-glucose 농도도 낮은 측정값을 나타내고 있다.

반면에 세포 배양 조건인 pH 7.0으로 세포를 충분히 성장 시킨 후 질소원이 고갈되는 시점(22 hr)에서 pH를 β-1,3-glucan 생산 최적 조건인 5.5로 조절하여 실험을 하였다.(Figure. 13.) 질소원이 고갈되는 시점까지 세포가 성장하였고 세포가 성장함에 따라 UDP-glucose 농도도 증가함을 나타내었으며, 질소원이 고갈되는 시점에서 역시 농도가 감소함을 보였다. 그러나 pH를 5.5로 조절한 후 바로 UDP-glucose 농도가 증가하는 경향을 볼 수 있었으며, 얼마 지나지 않아 β-1,3-glucan이 생성되는 것을 알 수 있었다. 70 hr 운전하여 60 g/L의 β-1,3-glucan을 얻을 수 있었으며, UDP-glucose 농도가 증가하는 부분에서는 β-1,3-glucan의 생산량이 증가하는 경향을 보였다. 그리고 70 hr 이후부터 생산량이 일정하게 유지되는 부분에서는 UDP-glucose 농도도 감소하였다. 이를 통해 UDP-glucose 농도가 β-1,3-glucan 생산 활성에 중요한 매개체가 됨을 알 수 있었다.

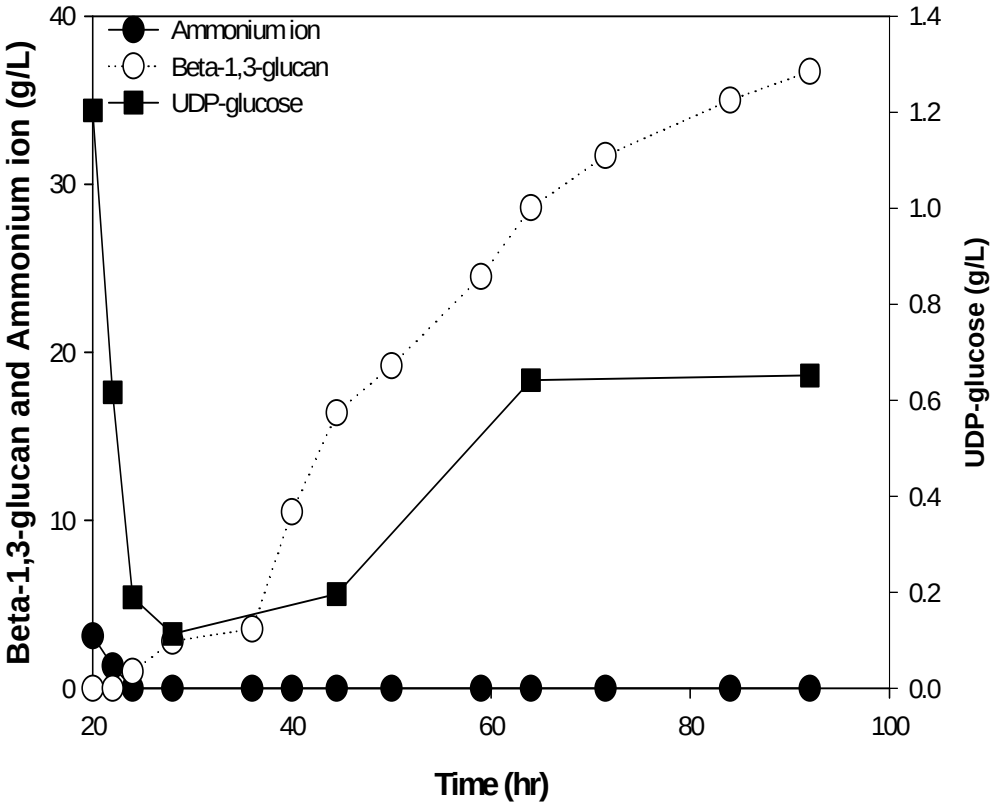

Figure. 13. Change of beta-1,3-glucan and UDP-glucose concentration in a batch fermenter (pH 7.0)

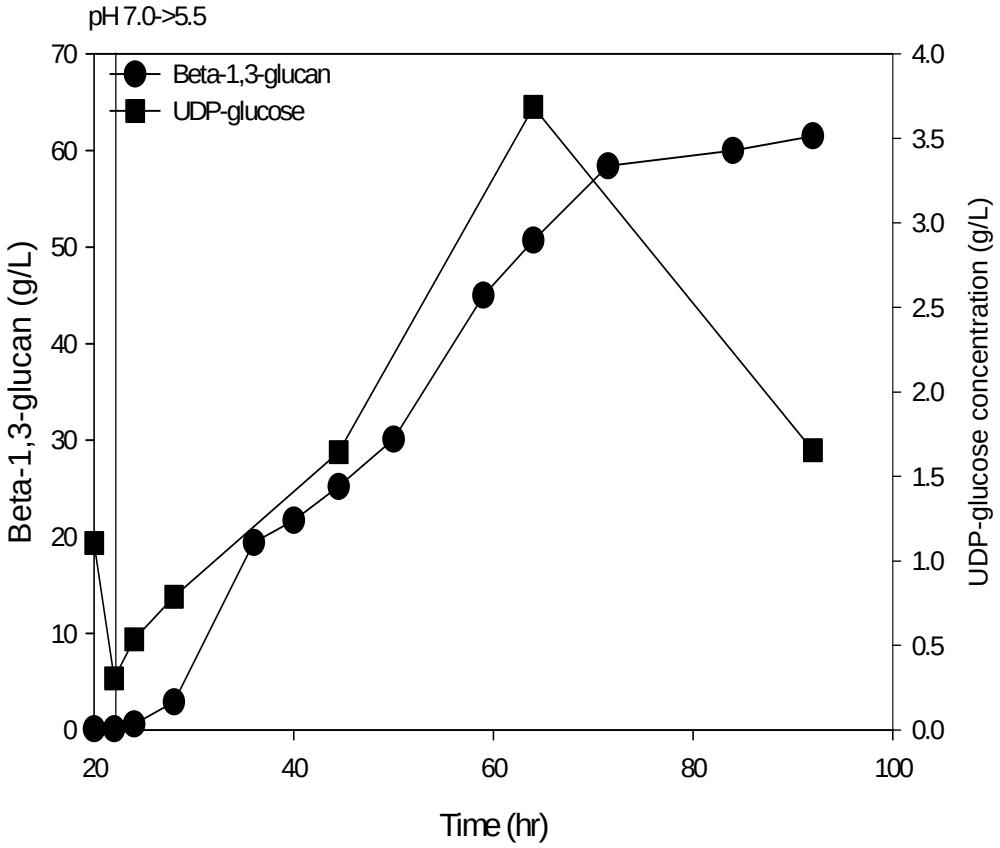

Figure. 14. Change of beta-1,3-glucan and UDP-glucose in a batch fermenter (pH 5.5)

라. *pH* 변화에 따른 *UDP-glucose* 농도 변화

β-1,3-glucan을 생산하는 과정에서 pH에 의한 UDP-glucose 농도 변화를 살펴보기 위해 Figure. 15.에 비교하였다. 질소원이 고갈되어 UDP-glucose 농도가 감소하는 지점부터 공정을 마치는 시간까지 데이터를 분석하였다. pH를 7.0으로 고정하여 운전한 공정에서는 UDP-glucose 농도가 낮게 나타났으며, pH를 β-1,3-glucan 생산 최적 조건인 5.5로 조절하여 β-1,3-glucan 생산을 유도한 공정에서는 UDP-glucose 농도가 높게 나타났다. 또한, pH를 5.5로 조절한 시점부터 UDP-glucose 농도가 증가함으로써 β-1,3-glucan 생산에 높은 활성을 갖게 되었고 pH에 의한 23 g/L의 생산성 차이를 보여주고 있다.

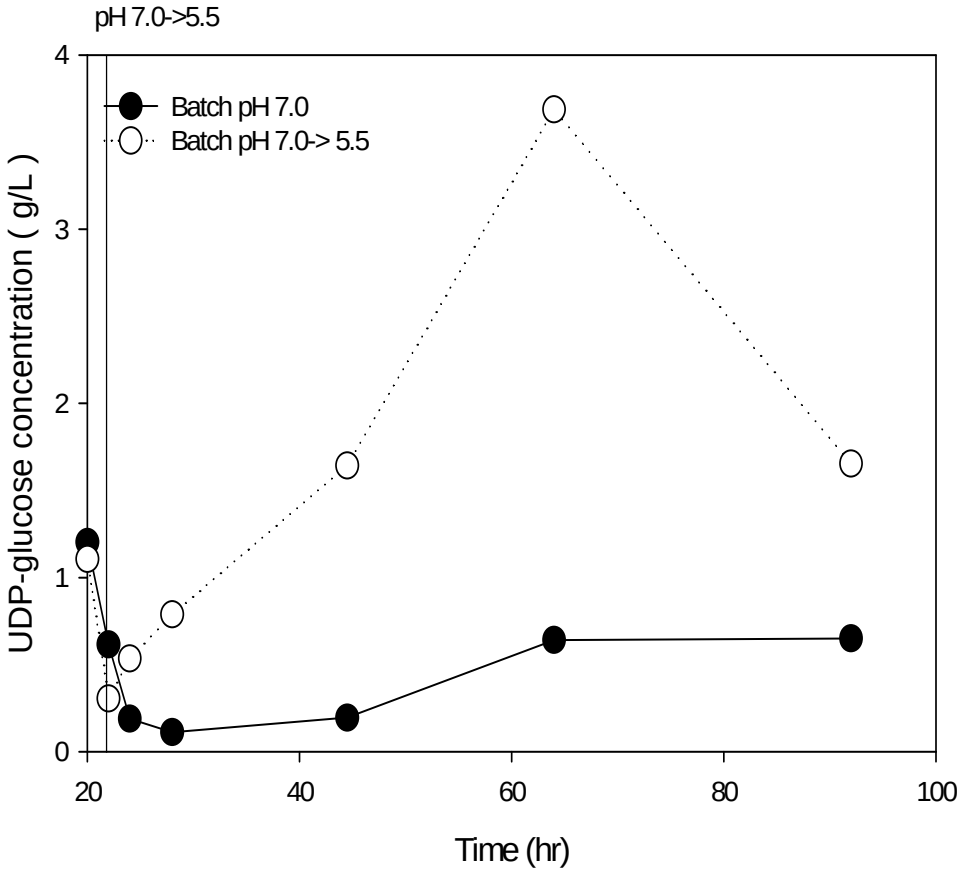

Figure. 15. Change of UDP-glucose in beta-1,3-glucan production level

*3. 2*단 연속배양 공정에서의 *UDP-glucose* 농도 변화

회분식 배양 공정에서는 단일 반응기에서 세포 성장과 β-1,3-glucan 생산 공정을 모두 운전하였다. 그러나 세포 배양 공정과 β-1,3-glucan 생산 공정의 환경이 서로 다른 점을 감안하여 2단 연속 배양 공정을 도입하였다. 첫 번째 반응기에서는 세포성장에 최적인 조건으로 배양하고 두 번째 반응기에서는 질소원이 고갈된 조건에서 β-1,3-glucan 생산에 최적인 조건으로 제어하여 β-1,3-glucan 생산성을 최적화 하고자 하였다. 또한, 2단 연속 배양 공정으로 운전 하였을 때의 UDP-glucose 농도를 측정함으로써 회분식 배양 공정과 연속 배양 공정에서의 농도 차이를 살펴보았다.

β-1,3-glucan을 생산하기 위하여 세포는 *Agrobacterium* sp. ATCC31750을 사용하였고, 배지는 회분식 배양 공정에서와 같은 조성으로 사용하였다. 2단 연속 배양 공정을 위하여 20 L의 유리 기질 주입 탱크를 사용하였으며 정량 펌프를 이용하여 기질 주입 속도를 조절 하였다. 1st reactor는 세포 배양 공정으로 최적 pH 7.0으로 유지하며 2 L working volume으로 운전하였다. 2nd reactor는 β-1,3-glucan 생산 공정으로써 최적 pH를 5.5로 유지하며 4 L working volume으로 유지하며 운전하였다.

UDP-glucose 농도 측정은 YMC-Pack pro C18 column을 이용한 RP-HPLC를 이용하여 UV 파장 254 nm, 이동상의 유속 1.0 ml/min로 흘려주며 등용매 용리 법을 이용하여 분석하였다. 시료의 전 처리는 세포 농도 2 g/L로 취하여 증류수 0.5 ml를 첨가한 후 4 ℃ 12,000 rpm에서 10 hr 원심분리 한 후 상등액을 버리고 50 mM phosphate buffer solution을 이용하여 2회 세척하였다. 이를 얼음물에 넣고 sonication 한 후 4 ℃ 얼음물에 30 min 보관하였다. 4 ℃ 12,000 rpm에서 10 min 원심분리를 함으로써 파괴된 세포벽과 이물질을 모두 제거한 후 상등액을 0.2 μm filter를 이용해 다시 한번 이물질을 제거하고 주입 시료로 사용하였다.

가. 세포 배양조에서 *UDP-glucose* 농도 변화

1st reactor는 세포 배양 공정으로써 cell mass 와 β-1,3-glucan 생산량 그리고 UDP-glucose 농도를 Figure. 16. 에 나타내었다. 세포 접종 후 질소원이 고갈되어 가는 시점인 31 hr부터 연속 배양 공정으로 운전 하였다. 초기 세포 농도가 증가함에 따라 UDP-glucose 농도가 크게 증가하다 질소원이 고갈되는 지점에서 농도가 감소함을 보이고 있으며, 연속배양으로 운전을 전환하고 질소원을 주입함으로써 세포 성장을 유도하여 UDP-glucose 농도가 크게 감소하지 않고 일정한 농도를 유지 하고 있음을 알 수 있다. UDP-glucose 농도가 일정하게 유지 되는 때부터 β-1,3-glucan의 생산량이 일정하게 유지 되는데 이는 생산성에 대한 활성의 유지로 볼 수 있겠다. Figure. 17.은 질소원이 고갈되기 전 연속공정으로 전환한 시점에서의 크로마토그램을 나타내었다.

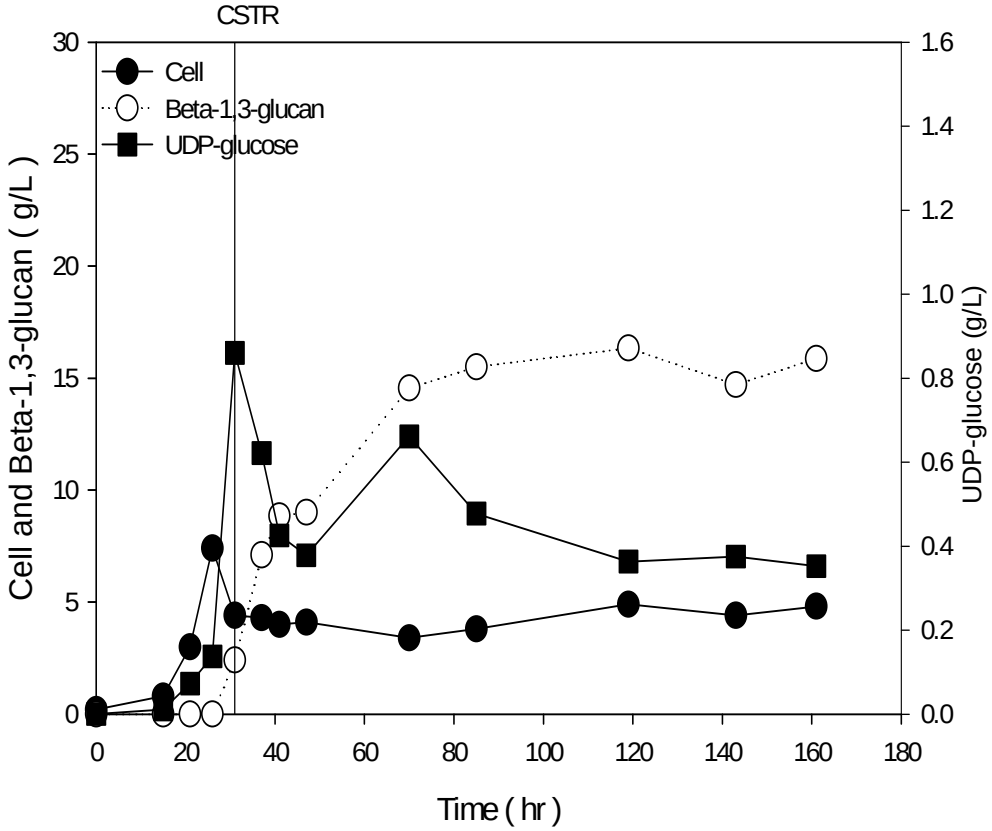

Figure. 16. Change of cell mass, beta-1,3-glucan production, UDP-glucose concentration in 1st reactor.

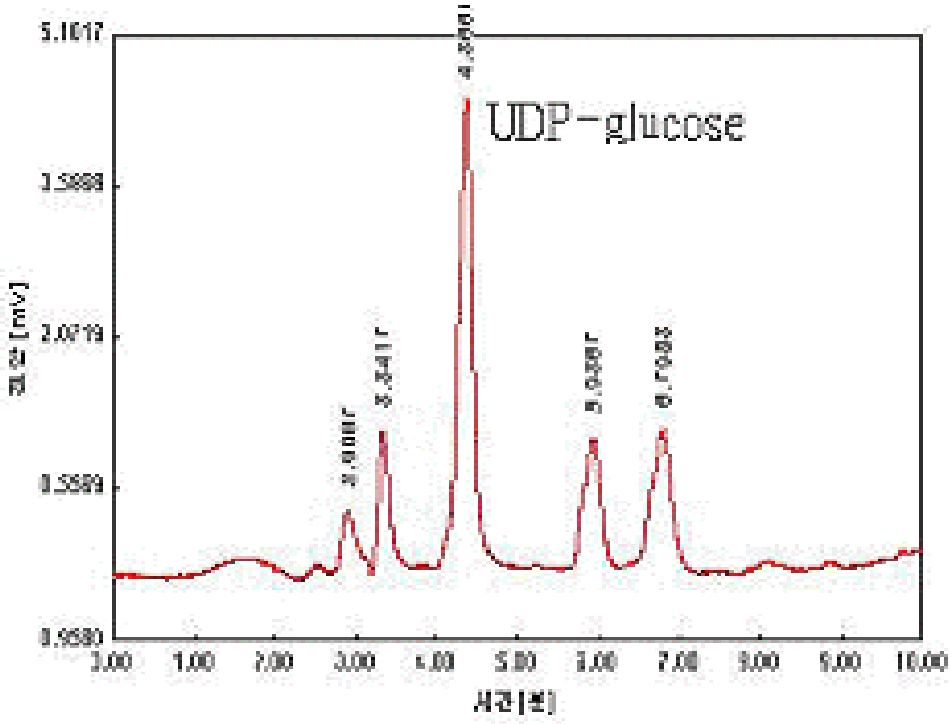

Figure. 17. Chromatogram of UDP-glucose from *Agrobacterium sp.* in 1st reactor

나. *β-1,3-glucan* 생산조에서 *UDP-glucose* 농도 변화

2nd reactor는 β-1,3-glucan 생산을 유도하기 위해 pH 5.5, 4 L working volume으로 운전을 하였으며, Figure. 18.에 나타내었다. 세포가 성장하는 과정에서 UDP-glucose 농도가 증가하였고 1st reactor에서 넘어오는 세포에 의해서 UDP-glucose 농도가 감소하지 않고 증가하는 현상을 보이고 있다. β-1,3-glucan이 생성되는 초기 지점에서 높은 농도를 보이고 있으며, β-1,3-glucan 생산이 일정하게 유지 되는 부분에서는 UDP-glucose 농도가 조금 감소함으로써 β-1,3-glucan 생산 활성이 감소하고 있음을 보여주고 있다. Figure. 19.은 40 hr 때의 크로마토그램을 나타내고 있다. β-1,3-glucan을 생산하면서 잔여 피크가 더 생성됨을 볼 수 있는데, 이는 β-1,3-glucan을 생산하는 과정에서 대사 물질들의 생성을 의미 하며 더 높은 수득율을 얻기 위해서 제거해야 할 부가반응으로 사료된다.

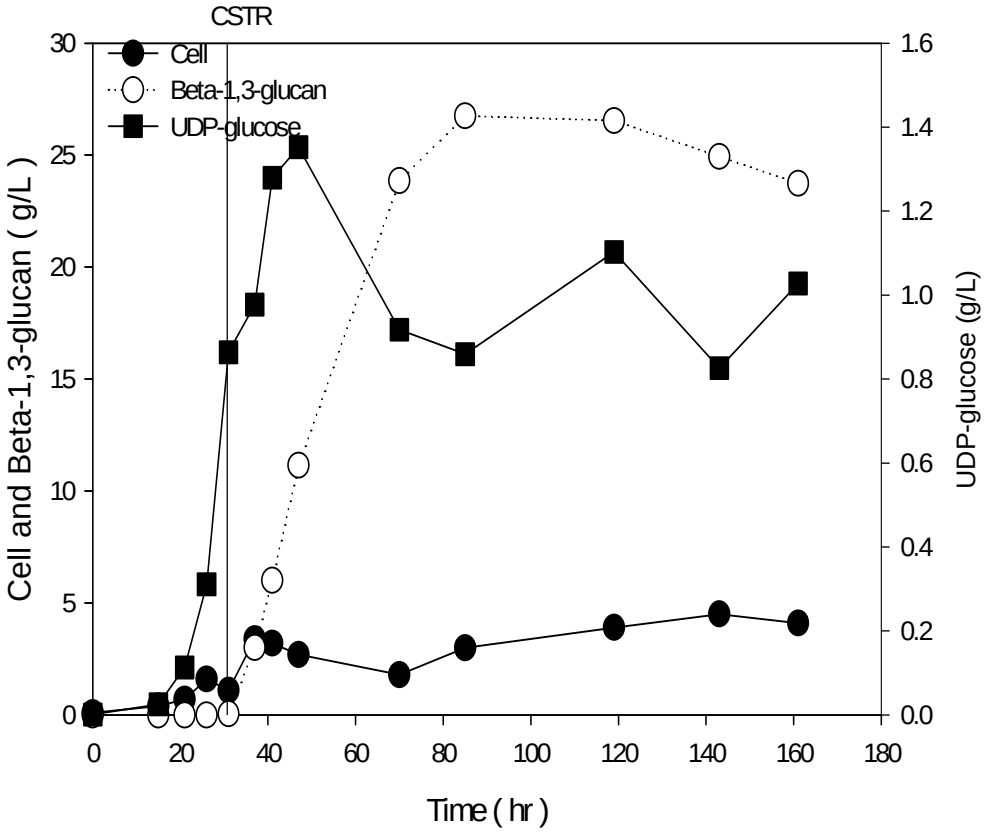

Figure. 18. Change of cell mass, beta-1,3-glucan and UDP-glucose concentration in 2nd reactor.

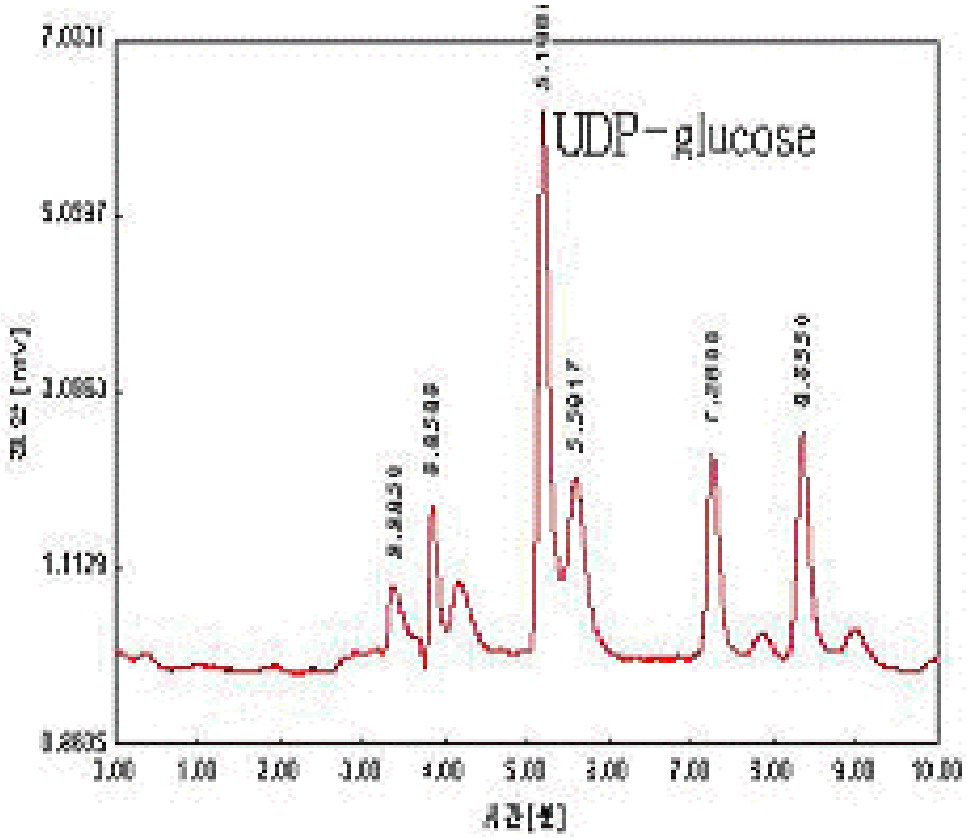

Figure. 19. Chromatogram of UDP-glucose from *Agrobacterium* sp. in 2nd reactor

4. 회분식 배양 공정에서 탄소원 및 *uracil* 첨가에 의한 영향

회분식 배양 공정에서 *Agrobacterium* sp. ATCC31750 균주를 이용하여 β-1,3-glucan 합성 대사 경로를 추정한 Figure. 1.을 보면, sucrose를 glucose로 분해하고 UDP-glucose를 거쳐 β-1,3-glucan을 합성하게 된다. 이에 탄소원으로 sugar와 glucose로 구분하여 세포 성장성과 β-1,3-glucan 생산성, 그리고 uracil을 첨가 하였을 때의 UDP-glucose를 측정함으로써 β-1,3-glucan 생산 효율에 미치는 영향을 살펴보았다.

가. *β-1,3-glucan* 생산 공정에서 탄소원에 따른 *UDP-glucose* 농도 변화

회분식 배양 공정에서 β-1,3-glucan을 생산하기 위하여 탄소원으로 sugar와 glucose를 이용하였다. 각각 100 g/L의 농도로 주입하여 공정을 운전하였으며, 초기 pH는 세포 성장 최적 조건인 7.0으로 운전하고 질소원이 고갈되어 β-1,3-glucan이 합성되는 시점에 pH를 β-1,3-glucan 생산 최적 조건인 pH 5.5로 조절함으로써 β-1,3-glucan 생산을 유도하였다. 두 회분식 배양 공정의 조작은 동일한 방법으로 운전하였다.

Figure. 20.은 탄소원으로 sugar를 이용하였고 회분식 배양 공정을 통해 β-1,3-glucan을 생산한 공정의 데이터이다. Figure. 21.은 glucose를 탄소원으로 이용한 공정이다. 탄소원의 변화에 따라 세포 성장성이 달랐으며, β-1,3-glucan 생산에도 영향을 미침을 알 수 있다. Sugar를 이용한 배양 공정에서는 26 hr에 6 g/L의 세포 농도를 보이고 있으나 glucose를 이용한 배양 공정에서는 세포의 성장 기간이 6 hr이 더 길고, 생산성도 낮음을 알 수 있다. 이는 세포의 대사 경로에서 sugar가 세포의 배양 활성에 glucose 보다 더 높은 에너지원으로 사용됨을 알 수 있다. 또한, β-1,3-glucan의 생성량에도 영향을 미치는데 이는 세포 농도가 높기 때문에 β-1,3-glucan의 생산성이 좋은 것으로 사료 된다.

회분식 배양 공정을 운전하여 β-1,3-glucan을 생산하는 공정에서 β

-1,3-glucan 생산 활성이 좋은 시점에서는 UDP-glucose 농도가 높게 측정이 되었고 활성이 감소하는 지점에서는 농도가 낮게 검출됨을 통해 UDP-glucose 농도가 β-1,3-glucan 생산 활성에 높은 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

나. *Uracil* 첨가에 따른 *β-1,3-glucan* 생산 효율

탄소원을 다르게 하여 배양한 두 공정에 UDP-glucose 전구물질로 알려진 uracil을 첨가함으로 인해 UDP-glucose 농도 변화와 β-1,3-glucan 생산성에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다.

β-1,3-glucan 생산 활성이 감소하는 지점인 84 hr 때에 uracil 농도 0.5 g/L로 제조하여 멸균 후 발효 중인 공정에 첨가 하였다. uracil의 첨가로 인해 UDP-glucose 농도가 큰 폭으로 증가하였음을 Figure. 20, 21.을 통해 알 수 있었다. 또한, β-1,3-glucan의 생산 활성이 감소하는 시점에 uracil에 의해 β-1,3-glucan의 생산성이 sugar를 이용한 발효조는 12.5 g/L 증가 하였고, glucose를 이용한 발효조는 16 g/L 의 증가된 생산성을 나타내고 있다. 전구물질로 사용한 uracil의 영향으로 인해 UDP-glucose 농도가 증가하였고, 이를 통해 β-1,3-glucan의 생산성도 각각 21.6, 34.3 %에 가까운 높은 영향을 받게 됨을 알 수 있었다.

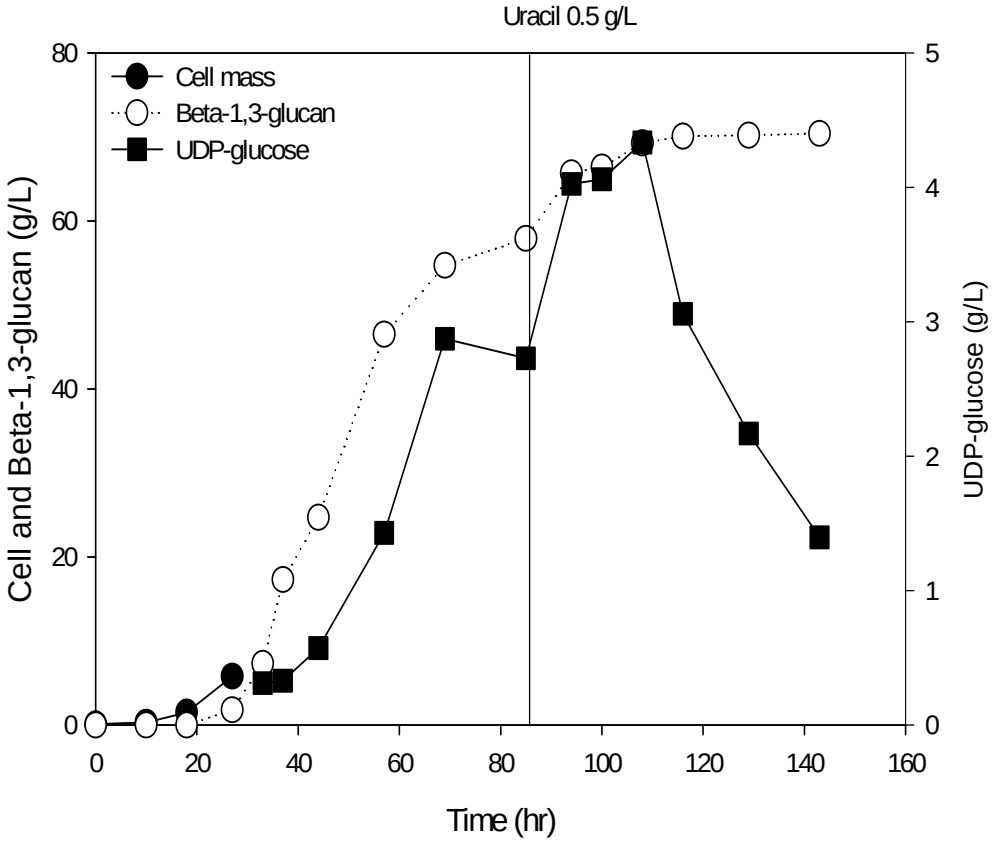

Figure. 20. Cell mass, beta-1,3-glucan and UDP-glucose concentrations profiles in a batch fermentation process.

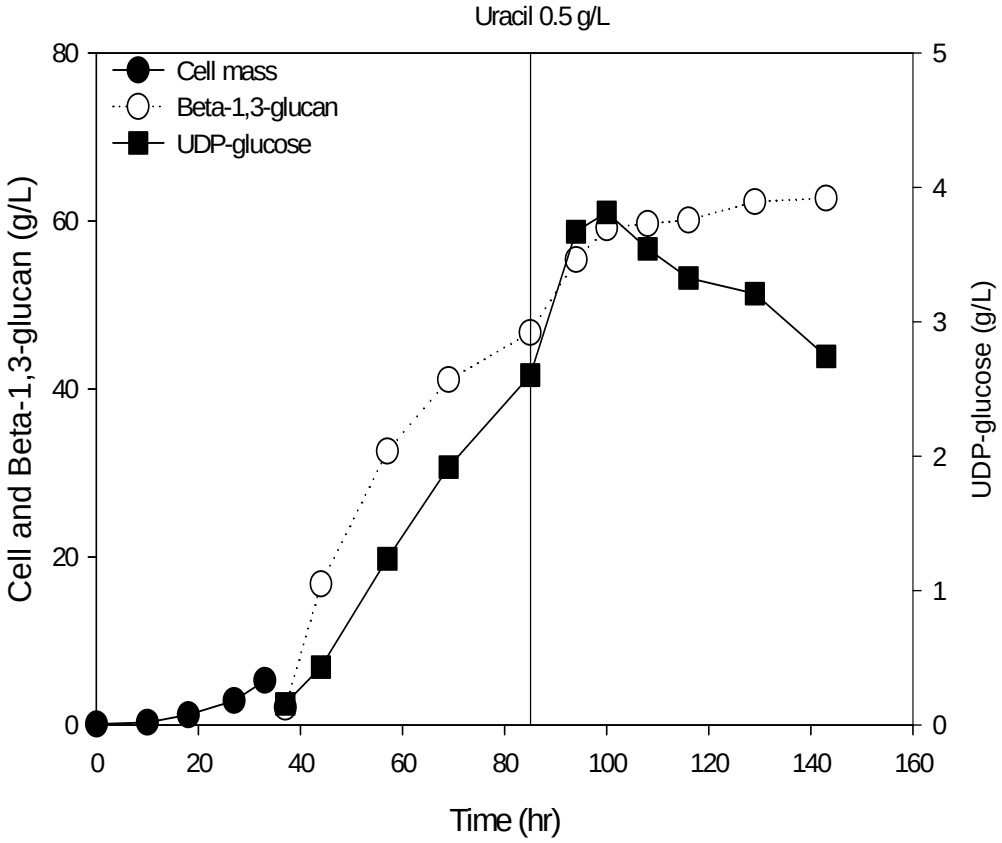

Figure. 21. Cell mass, beta-1,3-glucan and UDP-glucose concentrations profiles in a batch fermentation process.

Table 5. β-1,3-glucan productivity in a batch process and efficiency by uracil addition .

Carbon source	*Batch process*	*Uracil addition (0.5 g/L) in batch process*	*Improvement (%)*
Sugar	57.9 g/L	70.4 g/L	21.6 %
Glucose	46.7 g/L	62.7 g/L	34.3 %

IV. 결론

Agrobacterium sp. ATCC31750을 이용한 생체 고분자 물질인 β-1,3-glucan을 생산하는 공정에서 주요 대사 물질로 추정하는 UDP-glucose 농도를 측정함으로써 β-1,3-glucan의 생산 활성에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 본 연구를 통해 아직은 미미하지만 더 많은 대사 물질을 분석해 내고 농도를 측정함으로써 이론적 대사 경로를 규명하고 균주 개선을 통해 더 높은 수득율을 얻을 수 있는 기반을 마련하였다.

1. HPLC를 이용하여 주요 대사물질인 UDP-glucose 농도를 측정하였다. YMC Pack-pro C18 column을 이용하여 등용매 용리법을 통해 이동상의 조성을 살펴 본 결과 50 mM Phosphate buffer solution (pH 5.3)을 이용하였을 때 분리능이 우수하였다. 분리 시간과 검출되어지는 면적을 살펴보았을 때 1 ml/min의 유속으로 이동상을 흘려주며, 254 nm에서 UV detector를 이용하여 UDP-glucose 농도를 측정하였을 때 가장 좋은 검출 감도를 나타내었다.

2. *Agrobacterium* sp. ATCC31750 균주를 이용하여 β-1,3-glucan을 생산하는 배양 공정에서의 UDP-glucose 농도를 측정함으로써 β-1,3-glucan 생산 활성에 미치는 영향을 살펴보았다. 세포가 증식하는 단계에서 UDP-glucose 농도도 증가함을 알 수 있었으며, 질소원이 고갈되는 시점에서는 UDP-glucose 농도가 감소하였다. 그러나 pH에 따라 다른 경향을 볼 수 있었는데 세포 배양 최적 pH인 7.0으로 유지한 배양 공정에서는 β-1,3-glucan을 생산하기 시작하는 지점 즉, UDP-glucose 농도가 증가하는 시점까지 많은 시간이 소요되었으며 생산성도 0.41 g/L·hr로 낮았다. 그러나 세포 배양 후 β-1,3-glucan 생산 조건인 pH 5.5로 조절해 준 공정에서는 질소원이 고갈되는 시점에서 UDP-glucose 농도가 감소하였지만 pH 조절 후 바로 UDP-glucose 농도가 증가하면서 β-1,3-glucan이 생성되기 시작하였다. 이때의 생산성도

0.67 g/L · hr로 pH 7.0인 배양 공정에서 보다 생산성이 1.4배 차이가 나는 높은 생산성을 보였다. 이는 β-1,3-glucan을 생산하는 과정에서 UDP-glucose라는 대사물질이 생산성에 중요한 요인이 됨을 보여주고 있으며, 부가적인 반응들을 줄임으로써 높은 생산성을 얻을 수 있음을 시사해 주고 있다.

3. β-1,3-glucan을 생산하는 공정에서 세포 배양 조건과 β-1,3-glucan 생산 조건의 차이를 이용하여 서로 다른 환경을 만들어준 2단 연속 배양 공정을 적용하였다. 초기 세포 배양 기간에는 회분식 배양 조건으로 운전하다 질소원이 고갈되는 시점에서 기질을 주입해 주는 연속 배양 공정으로 운전을 하였다. 연속 배양 공정에서의 UDP-glucose 농도를 측정하여 보았으며, 일정한 생산성을 유지 하는 과정에서는 UDP-glucose 농도도 일정하게 유지됨으로써 β-1,3-glucan 생산 활성이 유지 되었다.

4. 세포 성장과 β-1,3-glucan 생산에 중요한 인자인 탄소원을 다르게 하여 회분식 공정을 운전 하였다. 탄소원으로 glucose를 이용한 공정 보다 sugar를 분해한 배양 공정에서 세포 성장성과 β-1,3-glucan 생산성이 좋았다. 양쪽에 동일하게 β-1,3-glucan 생산 활성이 감소하는 지점에서 UDP-glucose의 전구물질인 uracil을 0.5 g/L의 농도로 배양 공정에 주입한 결과, uracil 주입 후 UDP-glucose 농도의 급격한 증가를 볼 수 있었으며 이로 인한 β-1,3-glucan 생산성이 21.6 %와 34.3 % 향상됨 을 볼 수 있었다.

참고 문헌

1. Harada, T, Fujimori, K, Hirose, S. and Masada, M.. Growth and β-1,3-glucan 10C3K production by a Mutant of Alcaligenes faecalis var. myxogenes in Defined edium. Agr. *Biol. Chem.* Vol. *30*:764-769, 1966.

2. Mao, X. I, C. P. Jiang Economic macrofungi of Tibet. *Beijing Science & Tcehnology Press.*, (1993) pages 1-651.

3. Jang, J. K., Optimization of Curdlan Production by Agrobacterium sp. ATCC 31750, M.S. Thesis, Chosun University, (2001).

4. Naohito Ohno, Noriko N. Miura, Mitsuhiro Nakajima, Toshiro Yadomae. Antitumor 1,3-β-Glucan from cultured Fruit Body of *Sparassis crispa. Biol. Pharm. Bull.* Vol. *23*:866-872*,* issue 7 (2000).

5. Kimura,H., Nakagawa, T., Mastukura, A., Suzuki, T. New temo-gellable polysacchride-containing foodstuffs. US patent, Vol. *3:*754-925, *(*1973).

6. Kim, S. W., Ahn, S.G., Se O, W. T., Kwon, K. S., and Park, Y. H. "Rheological properties of a novel high viscosity polysaccharide, A49, produced by Bacillus polymyxa.", *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. *8*:178-181, (1998).

7. Rajaram A. Pai, Michael F. Doherty and Michael F. Malone, Design of Reactive extraction systems for Bioproduct Recovery, *AIChE Journal,*

Vol. *48*:514-526*,* Issue 3, (2002).

8. Crescenzi V., Microbial Polysaccharides of Applied Interest. *Biotechnol Prog* Vol *11*:251-259, *(*1995).

9. Lee, J. H., S. E. Shin, K. H. Rhee, An Experimental Study on the Enhancement Fluidity and Strength of Concrete with Curdlan. *HWAHAK KINGRAK* Vol *40*:400-403, (2002).

10. Rosenberg E, Microbial Diversity as a Source of Useful Biopolymer. *J. Ind* Vol *11*:131-137, *(*1993).

11. Jung, D, Y., Cho, Y, S., Chung, C, H., Jung, D, I., Kim, K., Lee, J, W., Improved production of curdlan with concentrated cells of *Agrobacterium* sp., *Biotechnol. Bioprocess Eng*. Vol. *6*. (2001).

12. Sonia Dorion, Jean Rivoal., Quantification of uridine 5′-diphosphate (UDP)-glucose by high-performance liquid chromatography and its application to a nonradioactive assay for nucleoside diphosphate kinase using UDP-glucose pyrophosphorylase as a coupling enzyme. *Analytical Biochemistry*., pages 188-196, (2003).

13. Kim, M. K., Lee, I, Y., Ko, J, H., Rhee, Y, H., Higher Intracellular Levels of Uridinemonophosphate Under Nitrogen-Limited Conditions Enhance Metabolic Flux of Curdlan Synthesis in *Agrobacterium* species. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. *62*, No. 3, (1999)

14. Lothar Elling, Maria-Regina Kula., Characterization of sucrose synthase from rice grains for the enzymatic synthesis of UDP and TDP glucose. *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. ***17***, (1995)

15. Lee, J. H., I. Y. Lee, Optimization of Uracil addition for curdlan (β-1,3-glucan) production by Agrobacterium sp. *Biotechnology Letters* Vol ***23***:255-259, (1997).

16. Kim, M.K., I. Y. Lee, J. H. Lee., K. T. Kim., Y. H. Rhee, Y. H. Park, Residual phosphate concentration under nitrogen-limiting conditions regulates curdlan in *Agrobacterium* species. *Jounal of industrial Microbiology & Biotechnology* Vol ***25***:180-183, (2000).

17. Srienc, F., B. Arnold, J. E. Bailey, Characterization of intracellular accumulation of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* Vol ***26***:982-987, (1984).

18. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* Vol ***31***:426-428, (1959).

19. Lee, I. Y., W. T. S대, G. J. Kim, M. K. Kim, C. S. Park, Y. H. Park, Production of curdlan of using sucrose and sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of *Agrobacterium* species. *J Ind Microbiol Biotechnol.* Vol ***18***:255-259, (1997).

20. Lee, J. H., I. Y. Lee, Optimization of Uracil addition for curdlan (β

-1,3-glucan) production by *Agrobacterium* sp. *Biotechnology Letters* Vol ***23***:1131-1134, (2001).

21. Sonia, D., Jean, R., Quantification of uridine 5′-diphosphate (UDP)-glucose by high-performance liquid chromatography and its application to a nonradioactive assay for nucleoside diphosphate kinase using UDP-glucose pyrophosphorylase as a coupling enzyme. *Analytical Biochemistry.* Vol ***323***:188-196, (2003).