

Improved mevinolic acid (MA) production by the immobilized cells, and the establishment of on-line measurement system for fermentation parameters using vent gas analyzer

송성기, 김경희, 김명진, 이상중¹, 장용근², 정연호³, 정용섭⁴, 전계택
강원대학교 생명과학부, ¹(주)에스티알바이오텍, ²KAIST 생명화학공학과, ³강원대학교
생명공학부, ⁴전북대학교 응용생물공학부
전화 (033)250-8547, FAX (033)241-4627

Abstract

Mevinolic acid (MA), a secondary metabolite produced by a filamentous fungus *Aspergillus terreus*, is acidic form of lovastatin which has been identified as a powerful cholesterol-lowering agent in humans. When immobilized cell culture was performed, MA production was about 5.3-fold higher than the parallel suspended cell culture. Although the immobilized cells proliferated slowly during exponential in comparison with the suspended cells, oxygen uptake rate and oxygen mass transfer coefficient of the immobilized cell culture were about 1.3- and 2.5- fold higher respectively than those of the parallel suspended cell culture. From these results, it was concluded that MA biosynthesis was closely dependent on the cell growth rate, morphology and oxygen availability.

서론

Mevinolic acid (MA)는 균사형성 곰팡이인 *Aspergillus terreus*에서 생합성되는 이차대사산물로서, 고지혈증 치료제로 이용되고 있다.⁽¹⁾ 세포를 담체에 고정화하여 배양할 경우, 생산균주의 반복사용 및 cycling time의 단축으로 인한 공정비용의 감소, 진단응력으로부터 생산균주의 보호 및 인위적인 pellet 형성으로 인한 배양액 점도 감소 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.⁽²⁾ 막투과성인 MA 고생산성 변이주를 이용하여 고정상배양을 시도한 결과, 액상배양에 비해 MA 생산성이 약 5.3배 증가하였다. 본 연구에서는 액상세포와 고정상세포의 배양 생리적 차이를 명확히 규명하고자, 가스분석시스템을 확립하였고 온라인 상에서 연산되는 각종 배양 변수를 비교 분석하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양방법 mevinolic acid 생산을 위해 rational screening 방법을 통해 자체 개발한 고생산성의 *Aspergillus terreus* 막투과성 변이주 (APPL-100)를 사용하였다. 액상배양의 경우, 500 ml flask에 100 ml의 성장배지를 첨가하고 포자형성배지에서 회수한 포자 및 균사체를 접종하였다. 그리고 진탕배양기에서 250 rpm, 28°C, 48 시간동안 배양한 후, MA 생산배지로 접종하여 8일간 배양하였다. 고정상배양의 경우, 멸균된 20 % glycerol 용액을 이용하여 생산균주의 포자 및 균사체를 회수한 후, coffee filter를 이용하여 균사체를 제거하여 순수한 포자 용액을 획득하였다. 그리고 포자 농도를 계수하여 포자용액을 적절하게 희석하였다. 이렇게 준비된 포자용액을 전처리를 거친 celite bead에 첨가하여 고정화를 유도하였다.

생물반응기배양 고정상배양 및 액상배양에서의 배양생리적 특성을 비교하기 위해 5L의 top-driven fermentor를 이용하여 발효기 배양을 수행하였다. 온도는 28°C를 유지하였고 교반기와 통기장치로서 산소전달계수에 관한 연구를 통해 용존산소전달율이 우수한 것으로 판명된 paddle impeller와 sintered steel sparger를 각각 사용하였으며, 교반속도는 200-250 rpm, 통기량은 0.8-1.0 vvm으로 조정하였다. 또한 본 연구팀에서 확립한 온라인 가스분석시스템 이용하여 배양의 중요 변수, 즉 pH, 용존산소, 산소흡수율, 이산화탄소발생율, 세포비성장속도, 산소전달계수, 세포생산량, MA 생산성 등을 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

고정상배양 및 액상배양의 MA 생산성과 배양생리적 특성 비교 고정상배양 및 액상배양에서의 용존산소 농도의 변화를 Figure 1에 나타내었다. 액상배양의 경우, 배양 48시간 이내에 배양액의 용존산소가 모두 고갈되었으며, 배양 말기까지 이러한 현상이 지속되는 것으로 나타났다. 반면에 고정상배양의 경우, 용존산소 농도가 72시간까지 천천히 감소하다가 다시 증가였으며, 배양 전반에 걸쳐 포화용존산소 농도의 50% 이상으로 유지되는 것으로 관찰되었다. Figure 2에 배양 시간에 따른 MA의 생산성 및 glucose 소모 경향, 그리고 세포 성장 패턴을 비교해서 제시하였다. 액상배양의 경우, 배양 초기에 접종한 균사체가 활발히 대사하여 glucose를 약 96시간에 대부분 소모하는 반면, 고정상배양은 celite bead에 고정된 포자가 발아하는데 시간이 걸림에 따라 glucose가 천천히 이용되어 약 140시간까지 배양액 내에 존재하는 것으로 관찰되었다. 두 배양 조건에서의 건조균체량을 비교해 보면 상기의 glucose 소모 경향을 더욱 명확히 설명할 수 있다. 액상배양의 경우 생산균주가 48시간까지 급격히 성장하고

그 후에는 증가폭이 감소하였다. 그 결과 배양 초반에 존재하는 glucose 대부분이 세포 성장에 이용되었다고 판단된다. 반면 고정상배양의 경우, 담체에 고정화된 포자로부터 세포 성장이 시작되므로 건조균체량이 천천히 증가하였으며, 그 결과 glucose 등의 영양분이 서서히 소모된 것으로 결론지을 수 있었다. 주목할 점은, Figure 3에 나타난 바대로, MA의 생산성 면에서 볼 때, 액상배양의 경우 약 72시간부터 MA 생합성이 개시되었고 배양 192시간에 약 75 unit/L의 생산성을 보인 반면, 고정상배양의 경우 생합성이 시작되는 시점은 액상배양과 유사하였지만 배양이 지속됨에 따라 증가폭이 증가하여 배양 192시간에 액상배양 생산성의 약 5.3 배에 달하는 400 unit/L의 생산성을 보였다는 점이다. 이와 같은 생합성량의 차이는 상기에 언급하였던 glucose 변화, 건조균체량 및 용존산소 변화 경향과 연계하여 설명될 수 있을 것으로 보인다. 즉 액상배양의 경우 배양 초반 배양액 내의 높은 영양분 농도에 의한 catabolite repression 현상으로 인해 생산균주가 제대로 이차대사를 수행하지 못한 결과, 대부분의 영양분이 세포성장 쪽으로 이용되어 배양이 지속될수록 MA 생합성에 필요한 에너지 및 영양분이 부족하게 된 것으로 보인다. 또 한편으로는 생산균주의 균사모양의 형태적 특성으로 인한 배양액의 점도 증가 현상에 의해 배양액 내로의 용존산소 전달이 부족하게 되어, 고에너지를 요구하는 MA의 생합성이 제한된 것으로 보인다. 그러나 고정상배양에서는 세포의 고정화에 의한 pellet 모양의 형태로 인해 배양액의 점도 증가 현상이 거의 나타나지 않아 배양 전반에 걸쳐 산소전달이 원활하였을 뿐만 아니라 배양액 내에 높은 영양분이 존재함에도 불구하고 배양 초반 생산균주의 낮은 성장속도로 인해 세포성장과 MA 생합성이 동시에 균형적으로 이루어졌기 때문에, MA의 생합성량이 액상배양에 비해 약 5.3 배 증가한 것으로 판단된다.

온라인 가스분석시스템의 분석을 통한 액상배양 공정과 고정상배양 공정 비교 두가지 배양 조건에서의 산소흡수율을 figure 4에 제시하였다. 액상배양에서는 산소흡수율이 배양 12시간만에 급격히 증가하여 최고 수치가 약 14 mmol O₂/L/hr에 이르는 것으로 나타났다. 그러나 그 후 급격히 감소하여 48시간 정도에 약 8 mmol O₂/L/hr의 산소흡수율을 보인 후, 배양 말기까지 천천히 감소하였다. 주목할 점은 산소흡수율이 감소하는 24시간에서 48시간 사이에 배양액의 잔류 glucose 농도는 약 60 g/L로서, 생산균주가 대사하기에 충분한 양이 존재한다는 점이다. 이 결과는 이 기간 동안에 산소흡수율이 급격히 감소한 이유가 탄소원의 고갈에 의한 것이라기 보다는 액상배양 시 균사모양의 morphology로 인한 배양액의 점도 증가로 인해, 배양액 내로의 용존산소전달이 제대로 이루어지지 않은 데서 비롯되었음을 확인시켜 주는 것이다. 고정상배양의 경우 배양 24시간부터 산소흡수율이 천천히 증가하여 배양 48시간에 최고 11

mmol O₂/L/hr에 도달한 후에도, 배양 전반에 걸쳐 큰 감소 없이 유지되는 것으로 관찰되었다. 본 균사형성 균류 배양의 경우 배양 48시간에서 고정상배양의 최고 산소흡수율은 액상배양에 비해 낮았지만, MA의 생산성에 가장 큰 영향을 미치는 지수기 성장단계에서의 산소흡수율은 고정상배양이 액상배양에 비해 매우 높은 것으로 나타났다. 주목할 만 하다. 두 조건의 산소전달계수를 온라인 상에서 측정하였고, 그 결과를 Figure 5에 제시하였다. 주목할 점은 배양 전반에 걸쳐 고정상배양이 액상배양에 비해 약 3배 높은 산소전달계수를 보였다는 점이다. 본 결과는 용존산소의 수준 확인을 통해 예견된 것으로서, 고정상배양 시 celite bead를 이용한 인위적인 pellet 형성으로 인해 배양액의 점도가 균사형성 액상배양에 비해 매우 낮은 수준으로 유지되었기 때문으로 판단되었다. 다음으로 배양 시간에 따른 산소흡수율을 실시간 연산된 세포량으로 나누어 비산소흡수율을 추정하였고 그 결과를 Figure 6에 나타내었다. 액상배양 시 배양액의 점도 증가로 인한 산소전달율의 극심한 감소로 산소흡수율이 감소하여 비산소흡수율이 고정상 배양의 경우보다 매우 낮은 것으로 나타났다. 특히 생산균주의 지수성장기의 비산소흡수율을 측정한 결과, 액상배양에서보다 고정상배양에서 약 2.5 배 높았음은 주목할 만 하다. 그러나 96시간 이후에는 액상배양과 고정상배양 모두 유사한 값을 보이는 것으로 관찰되었는데, 이러한 현상은 배양액 내의 탄소원 또는 주요 영양원의 고갈로 인해 생산균주의 산소흡수가 매우 제한되었기 때문으로 판단되었다.

참고문헌

1. Gbewonyo, K., G. Hunt and B. Buckland. Interactions of cell morphology and transport processes in the lovastatin fermentation. *Bioprocess Eng.* **8**: 1-7, 1992
2. Chun, G.-T. and S.N. Agathos. Comparative studies of physiological and environmental effects on the production of cyclosporin A in suspended and immobilized cells of *Tolypocladium inflatum*. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**:256, 1991

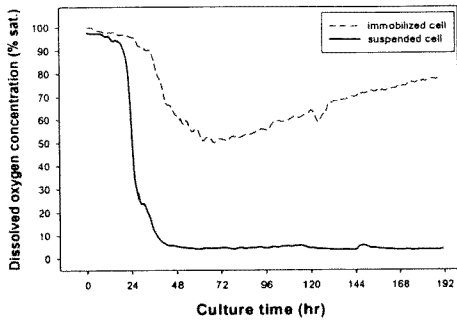


Figure 1. Time-course profiles of DO in the immobilized and suspended cell cultivations.

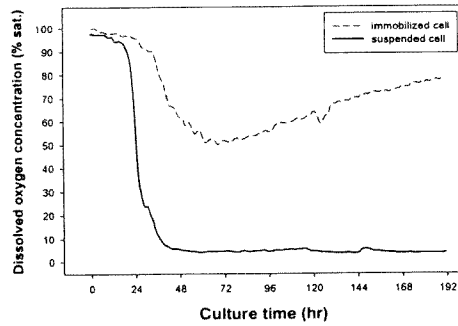


Figure 2. Time-course profiles of DCW (closed symbols) and glucose concentrations (open symbols) in the immobilized and suspended cell cultivations.

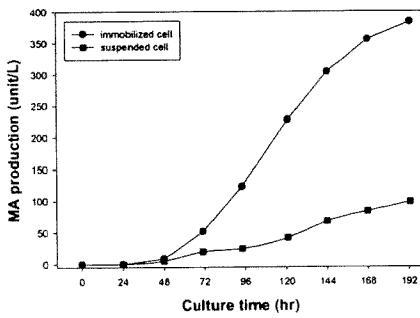


Figure 3. Time-course profiles of MA production in the immobilized and suspended cell cultivations.

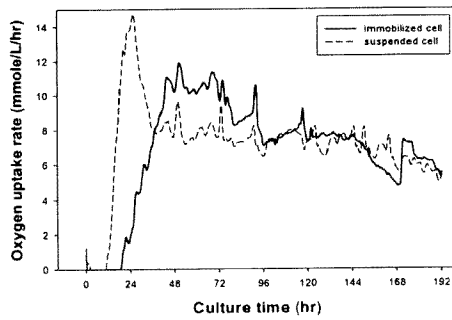


Figure 4. Time-course profiles of OUR in the immobilized and suspended cell cultivations.

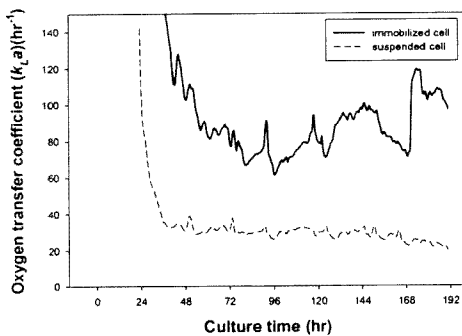


Figure 5. Time-course profiles of k_{La} in the immobilized and suspended cell cultivations.

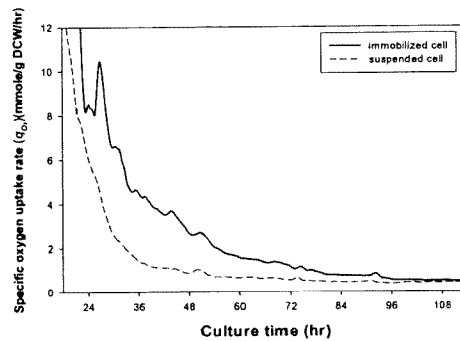


Figure 6. Time-course profiles of specific OUR in the immobilized and suspended cell cultivations.