

遺伝子 再組合 菌株를 利用한 醱酵

李 啓 準

(서울대학교 自然科学大學 微生物學科 教授)

1. 서 론

학문과 기술이 진보됨에 따라 전문영역도 계속 細分化되고 이른바 전문인만이 그 해당분야를 가장 잘 알게된다. 이와는 정반대로 관련 분야의 학문이 협조하여야만 되는 경우도 있다. 그 대표적인 것이 biotechnology이라 할 수 있다. Biotechnology의 정의는 미생물학, 생화학 및 발효학의 연합된 소위 interscience 또는 multidisciplinary 학문으로 biotechnology를 그대로 번역하면 生物工程 또는 生物技術등으로 표현할 수 있겠으나 biotechnology의 진정한 의미는 生物體를 이용하여 우리에게 유익한 물질을 얻기 위한 다방면의 지식을 종합하는 기초 학문의 하나이다.

Biotechnology에서 사용하는 生命體는 각종 미생물균주를 비롯하여 동·식물의 세포인데 그 중에서도 미생물의 각 균주를 많이 이용하는 편이다. 미생물의 생리 생태 및 유전적 연구를 통해서 미생물내에서 일어나는 잘 균형된 대사조절 기능을 알게됨에 따라 이를 역조절하여 한 특정한 미생물의 산물을 過量蓄積하는 이론과 방법이 많이 축적되었다. 즉 미생물을 유전적 (gene manipulation) 생리적 (physiological manipulation) 및 배양기술적 (technical manipulation)으로 조절하여 미생물내에서 대사되는 물질만을 생산하였다. 그러나 最近에 와서는 미생물균주의 개발을 유전자재조합방법 (recombinant DNA technology)에 의존하게 됨에 따라 기존산물의 생산성을 크게 올릴수도 있고 또한 미생물균체 이외에서 얻었던 물질도 미생물을 통해 생산해 낼 수 있게되어 상당한 결과

를 기대하게 되었다. 종래의 방법이든 Rec. DNA기술을 통한 방법이든 개발된 균주는 반드시 미생물의 생리적 안정성을 유지하여야 산업적 이용이 가능하게 되는데 그 생리적 안정성은 일반적으로 배양조건과 배양기술에 크게 영향을 받는다. 균주의 개발과 발효생리적 연구는 상호 보완적인 관계이며 이 종합된 연구를 통해서 얻어진 균주의 산업적 이용가능성이 판단된다. 따라서 本稿에서는 발효산물을 개발하는 초기단계에서 醱酵學이 관여하여야할 분야를 고찰함에 있어 종래방법에 비해 Rec. DNA기술에 의해 개발균주를 이용할 때 공통점과 아울러 차이점등을 살펴보기로 한다.

2. 醱酵菌株의 開發

산업적으로 사용되는 菌株는 Table 1에 나열한 성질을 지녀야 한다. 이러한 특성들은 산업미생물의 고유특성으로써 인위적으로 부여할 수는 없다. 다시 말해서 위와 같은 특성을 지녀야 산업미생물의 자격을 얻는 셈이다. 이런 미생물을 이용 산업균주로 개발하는데에는 미생물의 유전적 생리적 조절기능을 인위적으로 변형시키므로 대사 최종산물 또는 그 중간물질을 배지내로 대량 축적케 하는 것이다. Table 2에 제시한대로 auxotro-

Table 1. Requisite of Microorganisms for Industrial uses

1) Pure culture	5) Fast production rate
2) Genetic stability	6) Stable from contamination
3) Reproducibility	7) Good maintenance
4) Rapid growth rate	8) Easy separation of products

Table 2. *Methods for the Development of Strain Over-producing Microbial Metabolites*

-
1. Eliminate Undesirable Properties
 - a) Auxotrophic mutant
 - b) Metabolite analog resistant
 2. Induce or Enhance Disirable Properties
 - a) Inducer addition; gratuitous inducer
 - b) Removal of repressor
 - c) Constitutive mutant selection
 3. Increase Membrane Permeability
 - a) Chemical treatment
 - b) Auxotrophic mutant
 4. Amplification of Gene Dosage
-

phic mutant 및 metabolite analog 에 resistant 한 변이주등을 사용하던가, 배지성분에 inducer 를 첨가하든지 기타 미생물 세포막의 투과성을 조절하면 대사산물이 배지내에 축적된다. 이상의 방법은 사용된 균주내에서 일어나는 대사산물에 국한된다. Rec. DNA 방법은 기존의 균주에서부터 얻을 수 있는 산물을 보다더 높은 생산성으로 얻을 수 있는 방법도 되지만 나아가 기존의 미생물에서는 얻을 수 없는 물질을 얻을 수 있다는데 더 큰 의미가 있다. 이때 사용하는 vector 의 개발 및 유전자 공여등은 본고에서 생략하겠으나 단지 사용하는 숙주(host

Table 3. *Criteria in the Selection of Suitable Expression Hosts.*

-
1. Wide range of substrate utilization
 2. Good fermentation characteristics
 - a) High growth rate b) High yield
 - c) High productivity
 3. Easy control of fermentation environment
 - a) pH b) Temp c) O₂ d) Redox potentials
 4. Non-pathogenic and Absence of endotoxins
(Gram \ominus bacteria should be reminded)
 5. Good gene stability and expression efficiency during long period of fermentation
 6. Lack of product degrading enzymes and Resistant to potential product toxicity
-

strain) 는 반드시 산업균주로서 특성을 지녀야 함은 물론 그 생산산물을 보다 저렴하게 안전하게 생산하려면 다음의 Table 3 에서 제시한 기준을 잘 지켜 숙주를 선택하여야 한다.

3. 醱酵條件의 最適化

발효환경의 조건이란 미생물이 성장하는데 필요한 에너지와 영양물질을 제공하는 배지 성분의 조성과 미생물의 성장과 대사를 진행시키기에 충분한 화학적 물리적 제 여건을 말한다. 즉 미생물 자체의 유전·생리적 특성에 의하여 결정되는 내적요인을 잘 이해하고 이를 외적요인으로 잘 조절함으로써 미생물의 산물을 다량으로 축적케 할 수 있다. 미생물의 내적요인은 metabolic pathway, gene dosage 및 membrane permeability 등을 말하는 것으로 아주 정상적인 상태에서의 미생물은 산물을 불필요하게 대량으로 생합성하지 않는다. 그러나 환경적인 제한을 미생물에 부여하면 미생물은 새로 당면한 난관(bottle neck) 을 해결하기 위하여 새로운 대사조절이 야기된다."그 결과 이제까지 대량으로 생산하지 않았던 물질이 생산되게 되는 것이다. 예를들면 효모균을 rich medium에 glucose 을 넣고 충분한 공기를(산소) 공급하면 기질인 glucose 는 대사되어 균체가 생성되고 산물은 주로 CO₂와 물이 된다. 그러나 공기의 공급을 차단하면 glucose 의 분해의 중간산물인 pyruvate가 TCA cycle로 해서 완전산화되는 것이 차단되어 pyruvate가 축적하게 되고 또한 NADH+H⁺가 축적이 되어 균내의 redox potential 에 balance가 깨지는 결과가 초래된다. 즉 O₂의 부족으로 인해 미생물이 봉착한 난관은 redox potential 의 불균형인데 이 불균형을 자체적으로 해결하기 위하여 대사중간산물인 pyruvate (또는 yeast의 경우는 acetaldehyde)가 직접 electron acceptor로 작용하여 lactic acid 또는 yeast의 경우 ethanol이 대량 생산되어 균체외로 분비된다. 사람의 측면에서 보면 ethanol 또는 lactic acid가 목적산물이겠으나 미생물 균체로 보면 이는 봉착한 난관을 해결하기 위하여 어쩔수 없이 배설한 폐기물에 해당하는 것이다.

Table 4. Criteria in the Formulation of Fermentation Media

1. Fermentation products objectives; (Low and high value of products)
 - a) cell mass b) primary metabolites
 - c) secondary metabolites d) protein/enzymes
2. Nutrients satiety and limitation
 - a) C/E, N.S.O., growth factors
 - b) optimized concentration avoiding repression
 - c) specific characters leading to overproduction
3. Techno-economical constraints
 - a) cost and availability
 - b) sterilization and maintaining stability
 - c) type of culture i.e. batch, continuous, fed-batch
 - d) product recovery and waste treatment

미생물의 대사에 bottle neck을 주어 대사 물질을 축적하게 하는 환경적 요인은 (1) nutrients limitation (2) physico-chemical limitation 으로 구분할 수 있는데 이를 잘 조절하는 것이 곧 발효조건을 조절하는 것이다. 이는 미생물에 제한을 부여하는 것 이외에 다른 필요한 여건은 잘 보살펴 주어야 하기 때문이다. 발효조건을 검토하는데 있어서는 우선 배지성분 조성을 최적화하여야 한다.

발효배지의 선택은 연구의 초기단계에서부터 충분히 고려하여 선정하는 것이 바람직하다. 발효배지 성분의 선택은 사용하는 균주와 얻고자 하는 산물의 성질에 크게 좌우된다. Table 4에서 정리한 것 같이 미생물의 발효생리적 측면에서 부터 기술적·경제적 측면에까지 세밀히 검토하여 목적하는 산물이 최대한으로 생산케 함은 물론 생산비에 미치는 영향까지 면밀히 분석하여야 한다. 배지조성중에도 특히 많은 비중을 차지하는 것은 탄소 및 에너지원으로 쓰이는(이것을 통상 基質이라함) 기질의 선택이 중요하다. 발효산물의 종류에 따라 그 선택의 기준이 변하게 되는데 예를 들면 산물자체의 부가가치가 높지 않은 알코올 같은 경우는 우선적으로 값싼 기질을 선택하여야 되나 부가가치가 높은 항생물질의 경우는 기질의 값이 다소 높더라도 산물

의 수율, 최종농도 및 정제수율등을 고려 선택의 폭이 넓다.

유전자조작기술에 의한 균주의 산물은 매우 다양할 수 있겠으나 우선 본 symposium에서 목적하는 산물은 사람에게 투여할 약품이라고 볼 때 그 부가가치는 높다하겠다. 따라서 基質의 선택이 비교적 용이하겠고 발효배지의 조성도 天然復合培地보다는 合成培地 (chemically defined medium)의 사용도 가능하다고 판단된다. 合成培地의 사용은 발효의 진행을 보다 명백히 판단할 수 있을뿐더러 발효가 완료되었을때 산물을 정제할 때 매우 유리하다. 즉 合成培地를 쓸 경우 발효결과가 각 回分(batch)마다 완벽할 정도의 재현성을 기대할 수 있고 또한 실험실적 연구결과를 곧바로 산업화로 (scale-up) 연결할 수 있을 뿐더러 경제적규모의 발효조를 설계 설치하는데의 비용을 경감할 수 있다. 분리정제의 과정에서만 해도 천연배지를 쓸 경우에서 발생하는 조작의 복잡성, 정제순도에서의 문제점 및 정제수율등을 고려할 때 합성배지를 쓰는데에 얻는 경제적 이점은 실로 크다. 또한 부차적으로 발생하는 폐수의 처리등에서도 상당한 이점이 있다. 유전자재조합한 균주의 경우 cloning vector를 plasmid를 사용하였을때 plasmid stability를 유지해주기 위하여 selective marker인 항생물질을 첨가한다든가 auxotrophic mutants 및 analog mutants 등을 사용할 경우에는 要求되는 물질을 배지에 첨가해 주어야 하는데 이럴 경우 이러한 물질이 차지하는 비용을 균주개발에서 부터 충분히 고려하여야 한다. 뿐만아니라 효소생산의 경우 효소생합성을 유도하기 위한 inducer의 사용과 항생물질의 생산에서 특정한 전구물질을 첨가할 때가 있다. 이러한 경우 전구물질의 첨가에 따른 비용의 증가요인과 생산성의 증가량을 종합적으로 판단하여야 한다. 배지성분의 조성은 곧바로 미생물의 생리현상에 직접적으로 영향을 주므로 반드시 미생물의 생리에 대하여 해박한 지식이 필요하다. 가령 *Bacillus licheniformis* β -amylase을 생산하려 할때 균을 질소원이 부족한 상태에서 배양하게 되면 体外 단백질분해

효소(extracellular protease)의 생성이 촉진되어 다른 즉 목적하는 효소를 분해하므로 생산성이 크게 떨어진다.⁽²⁾ 따라서 배지성분·생산물의 축적·및 Host/vector의 생리적 특성을 복합적으로 분석 판단하여야 한다.

이상 매우 간단하게 유전자 조작에 있어서 발효학적 개념으로 접근하여야 분야를 서술하였지만 산업적으로 우수한 균주는 미생물 자체적 생리현상으로 판단하면 이는 분명히 비정상적인 상태이다. 즉 foreign gene이 cloning된 균은 상당한 짐을(burden) 지고 있으므로 이 짐을 벗어버리기 위한 자체의 노력이 있게 마련이다. 이 결과를 발효 측면에서 보면 균주의 역가저하(strain degeneration)는 미생물 측면에서 보면 생존(survival)하기 위한 피치 못할 노력의 결과이다. 미생물과 환경과의 관계(interaction between microorganism and environment)를 무시하고서는 발효의 좋은 결과를 기대할 수 없다. 따라서 미생물의 환경을 조절하는 방법이 곧 발효학의 일부분이므로 유전자 조작을 통해 균주의 개발과 아울러 아니 오히려 더 큰 비중을 가지고 발효에 집중하여야만 소기의 목적을 성취할 수 있다 하겠다.

4. 産物의 生成과 醱酵工程의 開發

발효공정의 개발은 Table 5에서 정리한대로 산물의 종류와 성질, 생성·축적된 부위, 사용하는 균주의 성질, 산물의 경제적 부가가치 및 발효기지의 이용성과 기술의 축적도 등에 의하여 결정된다. 이러한 종합적인 판단으로 해서

Table 5. Criteria in the Development of Fermentation process

- | |
|---|
| 1. Location or site of the product accumulated |
| 2. Physico-chemical properties of the product |
| 3. Availability of substrate, equipments and techniques |
| 4. Economic value of the product and market size |
| 5. Characteristics of the used organisms |
| a) genetic stability |
| b) physiological stability |

Table 6. Typical type of Microbial Processes

- | |
|--|
| 1. Aerobic vs Anaerobic |
| 2. Batch vs Continuous
(Fed-batch, plug-flow, cell recycle) |
| 3. Single-stage vs Multi-stage |
| 4. Submerged vs Semi-solid |
| 5. CSTR vs Immobilized |

Table 6에서 비교한대로 여러형태의 발효 방법이 고안되었고 이에 맞추어 발효조의 모양도 Fig. 1에 정리한대로 다양하다. 발효조의 설계와 그 조절방법은 모두 미생물의 유전적 생리적 특성에 따라 다르다.

개발된 균주를 발효배지에 배양했을때 목적하는 산물이 축적되는 위치는 Table 7에서 구별한 것같이 4종류로 볼 수 있다. (1)(2)(3)의 경우는 생성된 균체량에 따라 목적하는 산물이 생성되는데 비해 (4)의 경우는 균체내에서 생성된 물질이 쉽게 분비 배설되어 배지내에 축적된다. 즉 (1)(2) 및 (3)의 경우는 균의 성장속도 및 성장 정도에 크게 의존하나(growth associated product)(4)의 경우는 부분적으로 균의 성장과 연결된다(partially growth associated product).

Table 7. Modes of Accumulation of Microbial Products

- | |
|--|
| 1. Intra-cellular, cytoplasmic (soluble) |
| 2. Intra-cellular, membrane associated |
| 3. Extra-cellular, cell bound |
| 4. Extra-cellular, cell free |

현재까지 Rec. DNA 방법에 Host strain 으로 많이 쓰여진 *E. coli*의 경우는 Gram \ominus 의 bacteria로서 생합성된 물질 특히 단백질을 균체외로 분비하지 못한다. 이런 경우에는 산물의 생산성은 산물이 축적될 수 있는 세포내용적(intracellular volume)에 의존하게 된다. 이런 경우는 균체파쇄를 비롯한 분리정제(down stream processing)의 효율등 발효외적 요인에 의하여 크게 좌우된다. 만약 inner membrane과 outer membrane사이인 periplasmic space에 축적이

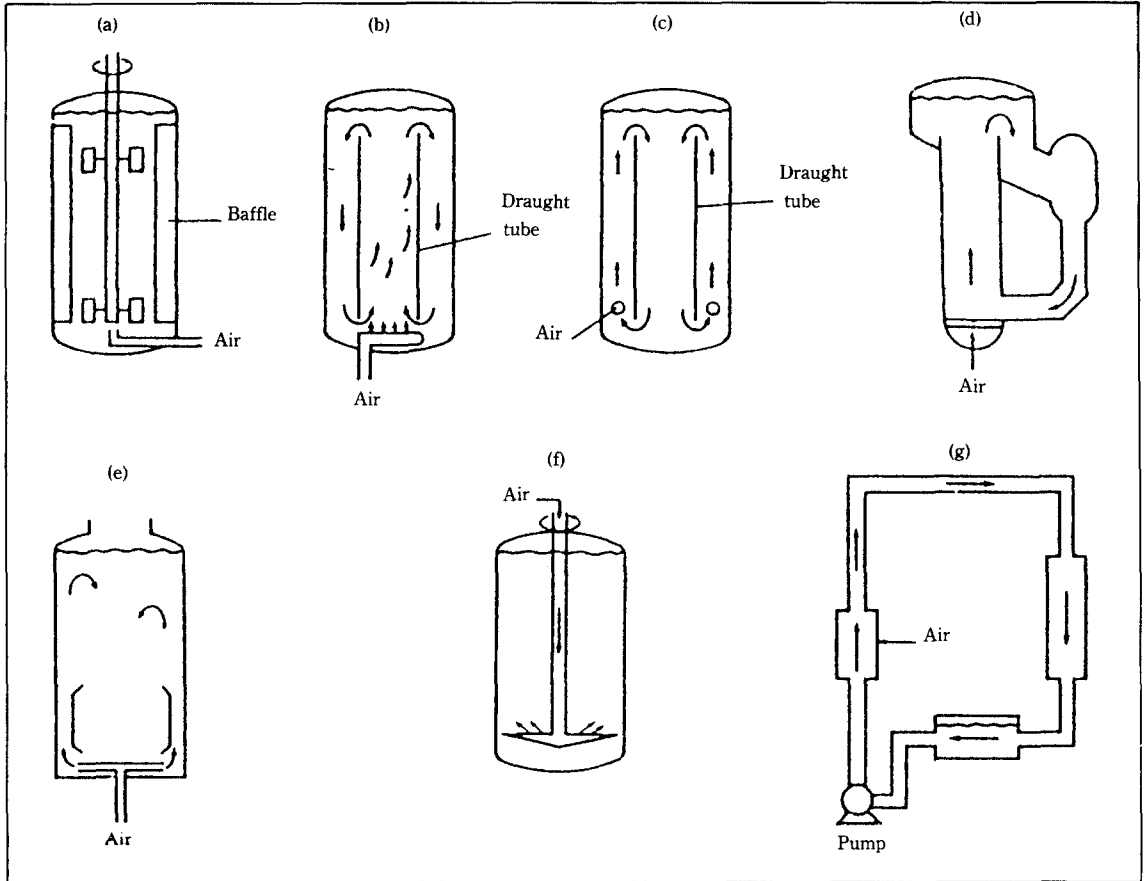


Fig. 1. Selection of aerobic fermenter configurations proposed for single-cell protein production (a) stir red, baffled 'Porton' pot, (b) air-lift fermenter, (c) Wasco air-lift, (d) Kanegafuchi air-lift, (e) Lafrancois air-lift, (f) Vogel busch fermenter, (g) tubular loop fermenter [Rose (1979)].

된다면 정제는 다소 수월하게 된다. 또한 extracellular cell-bound 된 경우는 가능한 cell 농도는 물론 cell surface를 최대화하여야 하며 가능한 한 외부의 물리적 힘에 의하여 cell surface가 손상하지 않도록 주의하여야 한다.

이상 산물이 생합성된 뒤에 축적되는 부위로 보아 발효방법이 결정하여야 한다. 발효산물이 균체내에 축적될 경우는 정제 즉 downstream processing의 어려움 때문에 산물을 균체외로 분비해낼 수 있는 균주를 숙주로 사용하려는 추세이다. 즉 *E. coli*를 주로 쓰던 경향에서 gram \oplus 인 *Bacillus*속 세균, 또는 *streptomyces*속 세균을 쓰고져 노력이 시작되었고 나아가 동물세포를 host strain으로 쓰이고 있는 것도

이러한 맥락에 연유된다. 목적하는 산물을 최대한으로 生合成하려면 먼저 菌體를 적당한 수준까지 (critical biomass level) 성장시키는 것이 선결조건이며 그 다음에는 생성된 균체가 목적하는 생산해내는 능력 즉 比生産速度 (specific productivity)를 最大化하여야 한다. 比生産速度는 미생물 균체 단위 중량당 단위시간 내에 목적하는 산물이 생성되는 양으로서 이는 곧 미생물의 생리, 유전활성을 총괄적으로 나타내는 지표가 된다.

Rec. DNA 균주를 이용한 발효에서 그 생산성 특히 specific productivity를 증진시키기 위하여서는 Table 8에서 제시한대로 3가지 원칙에 모두 만족하여야 한다. 그렇게 하기 위하여서는

Table 8. Objectives and Approaches to increase Fermentation Productivity using Rec. DNA Technology

Objections	1. Increase gene dosage
	2. Promote expression efficiency
	3. Stabilize gene(s) and its products(s)
Approches	1. Use multi-copy plasmid
	2. Use suitable promoter and specific DNA sequence
	3. Use <i>par</i> gene
	4. Apply selection pressure i.e., antibiotics, temp. shift
	5. Construct stable plasmid i.e., Rec- without Tn
	6. Minimize proteolytic enzyme production i.e. a) mutation in <i>lon</i> gene b) clone <i>pin</i> gene c) utilize proteolytic inhibitor

역시 Table 8에 나타난 여러가지 방법을 시도하였다. 현재까지는 Rec. DNA technology 에 주로 사용된 균주는 *E. coli*로서 upstream processing 정도에 사용되었으므로 발효에 관하여 어떠한 결론을 미리 유도하기는 어렵다. Rec. DNA 균주를 사용한 발효의 특성은 종래 균주를 사용한 발효의 특성범주내에 들 것으로 예상되나 오히려 放線菌 또는 곰팡이를 이용한 발효보다는 용이할 것으로 믿어진다.³⁾ 이는 Rec. DNA 기법이 발효에 아무런 영향을 주지 않을 것이라는 뜻은 아니다. 경우에 따라서는 종래의 발효개념에 크게 벗어날 것같지 않은데 비해 때로는 아주 새로운 일면을 보여준다. 그 중에서 특히 plasmid의 안정성이 가장 큰 관건이다.⁴⁾ Plasmid의 안정성을 유지하기 위하여 항생물질을 첨가하는 일은 실제 발효에 있어서 실용화하기가 어렵다. 특히 그 제품이 치료제로 쓰일 경우 더더욱 불가능하다. 예를 들면 penicillin 계 항생물질을 selection marker로 사용할 경우 allergy 반응에 신경을 써야 할것이다. Cloning vector로서 plasmid를 선택함에 있어서는 아무런 선택적 압력을 (selection pressure) 주지 않아도 30세대이상 지나도록 안정되어 숙주에

남아있는 것을 찾아야 한다. Plasmid의 안정성에 관계하는 replication control과 *par* gene에 관하여 연구하는 것이 이 문제해결의 길이 될 것같다.⁵⁾

산물의 안정성은 또 다른 문제이다. 미생물은 자기 고유의 단백질이 아니면 곧 바로 분해하는 능력이 있다. 이 foreign protein을 분해하는 proteolytic enzyme은 *lon* gene에서 code 되어 생합성된다.⁶⁾ 따라서 *lon* gene을 변이시키는 것이 바람직하고 또는 *proteolysis inhibition* (*pin* gene) 하는 gene을 clone하는 시도도 있었으나⁷⁾모두의 경우 균의 성장속도가 늦어서 실용성이 결여된다 하였다. 또 한가지 매우 흥미롭고도 중요한 문제는 foreign protein이 Rec. DNA에 의하여 세포내에 대량 생합성될 경우 (균체내 총단백의 3% 이상) 그 단백질이 변성 (denaturation) 되어 inclusion body내에 축적되는 상태이다. 이러한 현상이 심할수록 cell의 형태가 비정상적으로 변형하여 길이가 10-20 nm로 장축이 긴 (elongated) 모양이 되며 아울러 균의 생존율이 현격히 감소된다. 이러한 현상은 많이 보고되어 있지 않고 또 연구의 좋은 대상이 된다.³⁾ 산물의 추출정제에 들어가기 위한 harvesting과정에서 있을지도 모를 위험을 사전에 대비하기 위하여 균체를 불활성화시키는 방법을 고려하여야 한다. 적당한 약제나 열처리로서 살균이 가능하겠지만 가령 어떠한 약제를 사용할 경우에는 산물에 유입되는 문제를 고려하여야 되고 열처리 경우는 생산된 산물 특히 단백질의 경우 그 변성에 주의하여야 한다. 최고온 순간처리(High temperature short time; HIST) 방법이 균의 살균을 만족시키고 목적산물의 변성을 최소화하여 소기의 목적을 달성할 수 있는데 그 시설의 설치가 별도로 요구된다. 균을 불활성화시키는 방법의 선택은 산물의 종류와 시설 및 운전비의 양측면에서 고려하여야 한다. 또한 사용한 공기의 배기는 HEPA filter로 여과하여 방출하여야 한다. 특히 aerosol이 휘산될때 이로부터 야기되는 문제점을 아울러 고려할 필요가 있다.

Rec. DNA 균주를 이용하여 대량규모(10 liter

Table 9. Strategies for the Development of Microbial Processes

- | |
|--|
| 1. Increase productivity |
| a) selection and improvement of strain |
| b) optimisation of process control |
| 2. Reduce production cost |
| a) cheaper substrate |
| b) less nutrient dependency |
| c) innovation of purification system |

발효조 이상의) 로 배양한 결과는 그리 많지 않으므로 발효공학적 측면에서 얻은 결론을 입수 못하였다. 다만 미국의 경우 Eli-lilly 회사가 NIH 규정상 제한하였던 10 liter 이상 규모의 발효를 시도하였다. 10 liter 이상 발효를 규제한 이유는 실험실적 규모로 보아 10 liter 가 정상적인 규모이므로 실험실적 이상의 발효를 규제한다는 의미이지 10 liter 발효가 어떠한 위험성을 내포하고 있다는 의미는 아니다. Rec. DNA 균주를 사용하는 발효에 있어서는 종래의 균주를 사용할 때보다 좀더 복잡할 것으로 추측된다. 이는 종균을 증식시킨다든가, 접종하는 절차 및 통기와 배기가스의 처리 등을 고려하여야 하므로 발효조 운전자들에게 특별한 교육을 할 필요가 있다. 왜냐하면 있을지도 모를 위험성 내지는 plasmid⁻(p⁻) 변이주의 오염등에 특별한 관심을 두어야 하기 때문이다.⁽⁸⁾

결론적으로 발효공정의 개발 내지 개선의 목표는 Table 9에서 정리한대로 미생물의 생산성을 증진하고 생산비용을 절감하여 산물을 산업화하는데 있다.

5. 醱酵産物의 經濟性

새로운 물질을 산업화시키려면 먼저 시장의 규모 즉 연간 총수요량을 예측하여야 하고 다음에는 정확한 생산비를 산출하여야 한다. 시장의 규모를 예측하는 것은 그 분야의 전문인이 담당하여야 할 것이지만 생산비의 산출은 생물화학 공학을 전공한 사람이 해결하여야 한다. 생산비는 생산시설 설치비(fixed costs), 실제 운전비

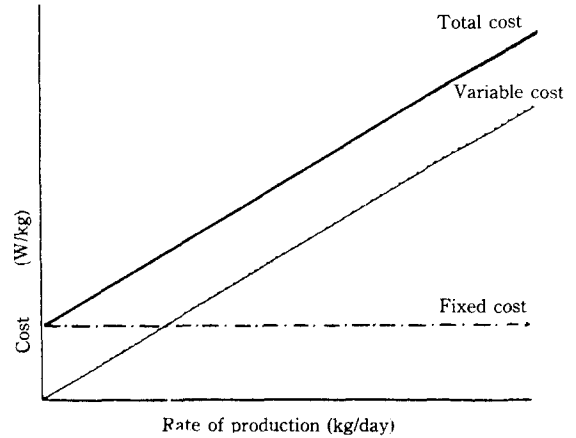


Fig. 2. Analysis of production cost vs production rate

(operating costs) 및 기질 배지값(media costs) 로서 분리 산출한다. 산물에 따라서 그 각각 차지하는 비율이 다르다. 즉 alcohol 같은 組産物은 배지대(45~55%), 운전비(25~35%) 및 시설비(20%) 정도인데 비해 항생물질 같은 복잡한 발효에서의 경우는 시설비(40%) 운전비(40%) 및 배지대(20%) 정도로 그 순위가 다르다. Rec. DNA 균주의 경우 정확한 보고는 없으나 예측해 보면 산물에 따라 역시 다르겠지만 fixed cost가 종래의 균주보다 더 증가할 것 같으며 배지대도 selection pressure를 사용하게 되면 그 비용도 더 증가할 것으로 예상된다. 생산비는 단위 생산속도(rate of production)의 일정한 관계가 있다. 즉 Fig. 2에 도시한대

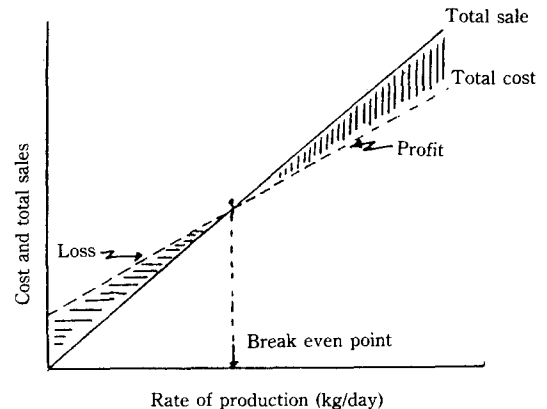


Fig. 3. Break-even chart analysis to determine production scale

로 단위 생산속도를 증가하면 전비용도 증가하는데 시설비가 점유하는 비율은 해당산물에 있어서는 생산속도에 관계없이 일정하고 반면 배지 및 운전비는 상대적으로 증가한다. 발효산물의 경제성은 Fig. 3에서 분석한대로 break-Even Chart로서 분석하여야 한다. Break - Even Point를 넘기지 못할 경우는 산업화가 될 수 없다. 발효산업은 고도의 장치를 필요로하는 관계로 시설비가 많이 든다. 따라서 가장 적정한 시설 규모를 결정하여야 하는데 생산규모의 결정은 연간 총수요량과 그 발효 공정의 생산성 (productivity)로 결정한다. 발효 공정의 생산성은 발효산물이 단위 시간내에 배지중에 축적되는 속도 (g, l^{-1}, hr^{-1})와 downstreaming을 통해서 요구되는 순도까지 정제하는데 필요한 시간과 그 수율로서 결정된다. 즉 목적산물 일년 수요량을 충족시키기 위한 발효조의 크기와 회전정도 (cycle number of batch)가 결정된다. 이 중에서도 특히 발효조의 크기 결정이 핵심이 되고 있는데 왜냐하면 발효조가 산물생산의 산실이 기 때문이다. 따라서 발효조건을 완벽하게 조절하도록 각종 측정 및 제어장치를 하여야 한다. 또한 요구되는 멸균도를 유지하도록 각종 장치를 갖추는데는 가장 큰 비중으로 경비가 지출될 것이다. Rec. DNA 균주를 위한 시설의 보완 및 추가시설은 있을지도 모를 위험을 대비하여 발효로부터의 누출을 완전 차단하는 (proof of leaking) 시설과 배기가스의 포집 및 발효후의 균체 폐기등을 위한 시설이 추가되어야 한다.

발효운전의 총비용은 준비비 (batching costs)

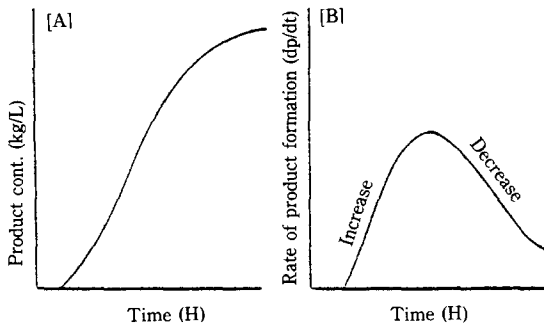


Fig. 4. Product formation profile (A) and changes in the product formation rate (B)

실제 발효진행비 (running costs) 및 정제추출비 (extraction costs)의 합계이다.

$$\text{Total operating costs} = \text{Batching costs} + \text{Running costs} + \text{Extraction costs}$$

(Media costs Sterilization costs etc.) (Power Precursors Nutrients) (Separating media Chemicals power)

$$\text{Unit operating cost (C)} = \frac{B}{W} + \frac{R}{W} + \frac{E}{W}$$

- C ; Cost of producing 1 Kg at time, t
- B ; Batch costs R; Running cost
- E ; Extraction cost
- R ; Running cost at time, t
- C ; Extraction cost
- W ; Mass of product (Kg) at time, t

만약 항생물질을 목적으로 하는 발효생산 공선이 Fig. 4A와 같이 되었을 경우에 산물생산 속도는 Fig. 4B와 같다. 또한 batch 및 running cost는 Fig. 5A와 같다. 즉 발효시작하기 전에 이미 배지의 조제와 멸균 냉각등으로 비용이 지불되었을 뿐만 아니라 발효가 진행되는 데 따른 동력비가 계속 추가될 것이고 만약 전구물질을 넣어 주는 경우 그 비용이 추가되며 기타 여러요소에 의하여 비용이 추가될 것이다. 그 비용이 추가되는데 따라 물론 목적하는 산물이 생산 축적되므로 문제는 어느 시기에 발효를 중단하여야 하는 것이다.

산물의 추출 정제비용은 축적된 산물의 농도 및 그 양에 따라 Fig. 5B에서 보는 바같이 증가한다. 산물이 전혀 생산되지 않은 시간에도

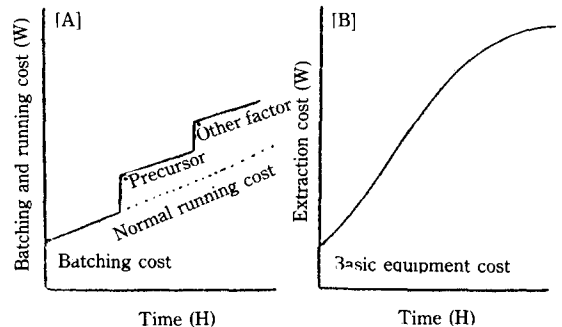


Fig. 5. Profiles of batching, running and extraction cost in a batch fermentation process

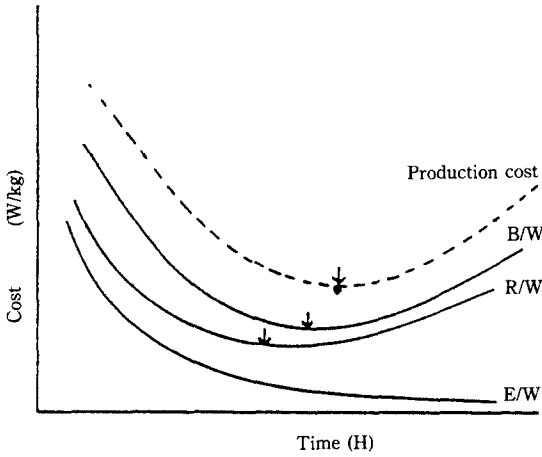


Fig. 6. Analysis of unit production cost in a batch fermentation processes
 B/W; cost for batching
 R/W; cost for operating
 E/W; cost for extraction

기본비용 즉 separation media 을 활성화시키는 등에 따른 비용이 지불되게 된다. Unit operating cost 를 그 batch, running 및 extraction 에 의하여 야기된 요소대로 분석하여 발효시간 진행에 따라 나타내면 Fig. 6 과 같다. Fig. 6 이 나타내는 의미는 항생물질 발효에서 어느 한 시점에 그 발효를 종결하여 그 때 생산된 항생물질을 분리 추출 완전 정제한다면 그 때 1Kg 항생물질을 생산하는 비용을 나타내는 것으로서 종합적으로 볼 때 생산비가 가장 낮은 비용을 나타내는 그 시간에 발효를 완료 하여야 한다는 뜻이다.

Fig. 7 에서 분석한대로 가장 전형적인 회분발효에 있어서 생산곡선 (7A) 을 먼저 작성하고 그 준비시간을 함께 포함한 총 소요시간으로서 생산성을 분석한다(7B). 이때 비록 생산된 물질의 최종 농도에 도달하지 않아도 생산성이 최고에 도달할 경우가 있다. 만약 사용된 기질의 값이 싸고 산물의 값이 낮은 경우는 최대생산성을 내는 시점에서 발효를 종결한다(例. 단세포 단백질, 에탄올). 그러나 기질 및 그 산물의 값이 높을 경우는 비록 생산성은 떨어져도 산물의 최고농도에 도달하기까지 발효를 진행하여야 한다. 그림 7C 에서 표시한대로 maximum producti-

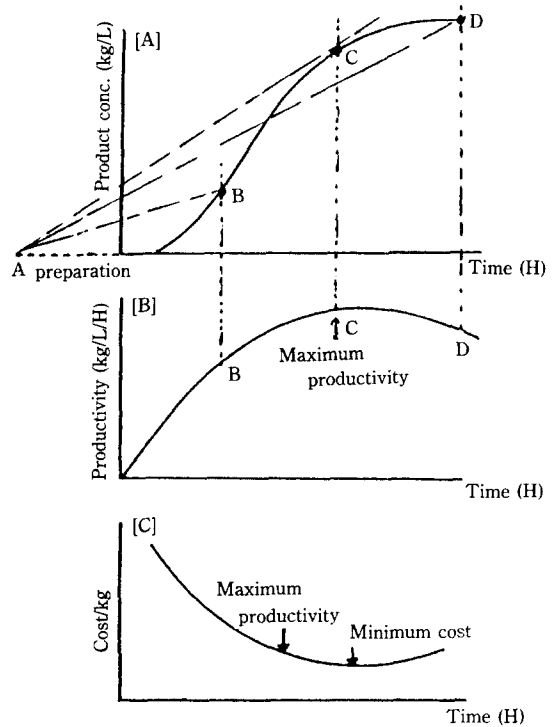


Fig. 7. Analysis of fermentation productivity and unit production cost

vity 를 택할 것인지 minum cost 를 택할 것인지 는 순전히 목적하는 산물에 따라 결정하게 된다.⁹⁾

6. 결 론

유전자 재조합기법은 기존발효 산물을 생산하는 균주의 역가를 증진하는데에 기여할 뿐 아니라, 미생물 본래의 단백질이 아닌 “異蛋白質”(foreign, protein) 을 미생물 균체내에서 생합성한다는데 더 큰 의미가 있다. 이 foreign protein 은 미생물 균체내 또는 미생물 균체외에 상당한 양이 축적하므로 희귀한 물질을 종래에 당면하여온 여러 제한요소에 관계없이 다량 생산하게 되었다. 이러한 일이 가능하게 된 것은 미생물 자체의 유전적 연구가 진보된 위에 희귀한 목적산물을 생합성하는 유전자를 역전사(reverse transcription) 또는 화학적 합성으로 제조하는 기법의 발달에 기인하며 더 나아가 적당한 cloning vector 의 선택과 expression 의

최적화 즉 **promotor**의 선택과 **vector**의 안정성을 연구하여 그 최적조건을 탐구한 노력의 결실이다.

균주를 개발하는 범위의 일을 **upstream processing**이라 할때 이 균주의 산물을 신속하게 요구되는 순도에까지 높은 수율로 정제하는 **down stream processing**에 연결하기 위하여는 그 중간단계인 발효과정의 연구가 성공적으로 마무리되어야 한다. 왜냐하면 산물이 비정상적으로 대량 생합성된다는 것은 숙주의 생리적 제활성이 비정상적으로 진행된다는 뜻이므로 그 결과 미생물은 그 생존을 위해 그 자체의 정상적인 위치로 환원하려는 노력이(그 결과 **foreign protein**의 생합성 능력이 소실됨) 있게 마련이다. 따라서 미생물에 새로이 부여된 임무(**foreign protein biosynthesis**)를 충실히 수행하려면 발효가 진행되는 어느 일정한 기간에 그 성장이 워만히 진행되면서 새로운 물질을 생합성하는 유전자가 안정되이 유지되어야 한다. 그러한 조건을 잡는데에는 **upstream**에 관계하는 제반지식과 일반 발효공학의 지식이 총동원되어야 할 것이다. 일단 생성된 산물도 **downstream**에 넘겨지기까지 안정되게 보존할 수 있는 방법을 또한 강구하여야 한다. 균체내에 축적된 물질을 균체외로 유도해내는 기술의 개발도 중요하며, 일단 생성된 異蛋白質(**foreign protein**)을 분해하는 능력을 제거하는 방법, 즉 **lon gene**에 변이를 유도한다든가 **pin gene**(**proteolysis inhibition gene**)을 삽입하는 방법도 시도되어야 할 것이다.

발효에서 얻은 결과를 **upstream**에 **feed-back**하여 균주개발의 방향을 설정하는 중요한 역할을 발효과정에서 담당하게 되며 그 결과가 성공적이어야 **downstream processing**에 넘겨줄 수

있으므로 발효과정은 생물공학의 “**mid-stream processing**” 명명하여도 무리는 없을 것이다. 아니 “**main stream**”이라 하면 어떨까? !

REFERENCES

1. Neijssel, O.M. and D.W. Tempest (1978): The physiology of metabolite over-production *S.G.M.* **29**, 53-82.
2. Tempest, D.W., O.M. Neijssel (1981): *Trends in the biology of fermentations for fuel and chemicals* (Hollaender, A) 335-356 plenum press New York.
3. Hanish, W. (1984): Practical aspects of Rec. DNA technology proceeding of “Fermentation technology of recombinant organisms” University of Queensland St. Lucia september p. 6-2~6-8.
4. Rogers, P.L., .RH. Heyes and A.T. Strzelecki (1984): Factors to be considered in the design and operation of fermentation systems using Recombinant organisms *ibid.* p. 5-1~13.
5. Goldberg, A.L. and A.C. St. John (1976): *Ann Rev. Biochem* **45**, 747-803.
6. Gottesman, S. and D. Zipser (1978): *J. Bacteriol.* **133**, 844-851.
7. Simon, L.D., B. Randolph, N. irwin and G. Binkowski (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci* **80**, 2059-2062.
8. Johnson, I.S. (1968): Industrial Pecombinaht DNA procedures: *An overview of progress and linitations in Insulins, growth hormone and recombinant DNA Technology*, ed J.L. Gueriguian Raven press N.Y. p. 183-188.
9. Richards, J.W. (1968): Economics of fermenter operation *Proc. Biochem* May 38-31 June 56-58.