

교반식 perfusion 생물반응기(IPRS)에서 고밀도 고정상
곰팡이 세포를 이용한 세포내 축적 이차대사산물인
Cyclosporin A 대량생산에 관한 연구

†전 계 택 · *이 태 호 · *장 용 근

강원대학교 미생물학과

*한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터

Studies on Mass Production of Intracellularly-Produced
Secondary Metabolite, Cyclosporin A by Use of
Immobilized Fungal Cells in Stirred-Tank Immobilized
Perfusion Reactor System(IPRS)

Gie-Taek Chun[†], Tae Ho Lee^{*}, and Yong Keun Chang^{*}

Department of Microbiology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

^{*}Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center,
Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

ABSTRACT

Immobilized bioprocess was carried out for continuous production of cyclosporin A (CyA) produced intracellularly as a secondary metabolite by a filamentous fungus, *Tolypocladium inflatum*. Immobilization procedure for entrapping conidiospores of the producer was significantly simplified by use of a modified immobilization technique. A newly-designed immobilized perfusion reactor system (IPRS) showed good process benefits as demonstrated by the role of the high density immobilized cells as an efficient biomass generator, continuously supplying highly active CyA-producing free cells (1.0g/ℓ/hr) even at very high dilution rate (0.1hr⁻¹). IPRS bioprocess was possible since efficient decantor system developed in our laboratory separated the sloughed-off free cells from the immobilized biomass effectively, thus overcoming wash-out phenomenon frequently encountered in continuous free cell cultures. Furthermore the released-free cells remaining in the bulk solution did not appear to cause substrate mass transfer limitation which was often experienced in suspended mycelial fungal cell fermentations. The primary reason for this was that the suspension broth of the IPRS mainly consisted of round-shaped short mycelial fragments and conidiospores, still remaining Newtonian even at high cell density. In parallel with IPRS bioprocess development, other key factors to be considered necessarily for significant increase in CyA productivity would be strain improvement and medium optimization for the immobilized cells.

† Corresponding Author

서 론

일반적으로 균사를 형성하는 곰팡이의 발효의 경우, 고정화배양이 현탁배양에 비해 많은 장점이 있다. 균사형성 세포 특유의 branched hyphal filament는 배양액을 비뉴튼 유체화하여 점도를 매우 높이며 결국 물질전달 감소로 인한 산소 고갈, 혼합의 비균일성 등 여러 문제점들을 야기하곤 한다. 특히 교반반응기를 이용하는 경우 높은 교반속도는 그로 인한 전단력에 의해 곰팡이 균주의 생산성을 떨어뜨리는 것으로 보고되고 있어 비교적 낮은 교반속도에서의 조업이 권장되고 있으나 이는 앞에서 거론한 산소전달의 감소와 결합하여 심한 혐기적 환경(anaerobic environment)을 형성하여 열악한 조건에서의 배양이 되기 쉽다(1, 2, 3). 한편, 고정화 배양은 배양액의 특성이 pellet 형성 배양액의 유연학적 그리고 형태학적 특성과 유사하며 낮은 점도로 인한 높은 물질전달을 나타낼 수 있다는 장점을 가지고 있다(4, 5). 고농도 세포배양에서도 많이 이용되고 있으며 연속공정의 경우 세포재순환이나 회수 공정 없이 세포를 재사용 또는 장기간 사용할 수 있다. 또한 shear sensitive cell의 경우 shear damage로부터 보호할 수 있다는 장점이 있다(4, 5). 이 밖에도 고정화 균주의 생리학적 특성변화에 의해서 여러 생산물의 생산성 향상도 보고되고 있다(4, 5).

본 연구에서 model product로 선정된 cyclosporin A (CyA)는 11개 아미노산으로 이루어진 cyclic peptide이며 균사형성 곰팡이(filamentous fungi), *Tolypocladium inflatum*에 의해 생산되는 면역억제제이다(6, 7). CyA는 장기이식시 거부반응을 억제하는 중요한 의약품이며 autoimmune에 관련된 질병의 치료에도 상당한 효과를 갖는 것으로 알려져 있다(8). CyA와 그 유도체들에 대한 수많은 임상실험과 면역학적 연구에도 불구하고 생물공학적 연구는 그리 많지 않다(9). CyA의 생산을 위한 celite를 이용한 세포고정화는 Chun과 Agathos에 의해서 처음으로 시도되었다(10, 11, 12). 최근에 동 그룹은 같은 담체를 이용하여 *T. inflatum*의 고정화에 의한 CyA의 최적생산에 대해 top-driven 생물반응기를 이용하여 현탁배양과 비교하여 보고하였다(13). 또한 이 두 가지 배양에 대한 산소전달 메카니즘을 살펴 보고 고정화에 의한 산소전달계수의 향상을 관찰하였다(14).

본 연구에서는 celite 담체를 이용한 고정화배양에서 기존에 제시된 여러 고정화 방법(4, 5, 10, 11)

들을 획기적으로 단순화시킨 새로운 고정화 방법을 제시하였다. 공극률(porosity)이 매우 높은 celite로 고정화 방식은 부착방식이기는 하지만 곰팡이류의 고정화 경우는 celite의 internal matrix내에 고정된 포자가 발아한 후 형성된 filamentous mycelial type의 균체가 작은 기공을 빠져나가지 못하고 갇히는 방식을 취하는 것이므로 흡착(adsorption)과 포괄(entrapment)의 혼합방식이라고 할 수 있다(4, 5, 15, 16). 또한 상기에 언급한 고농도 곰팡이현탁 배양의 근본적인 단점을 극복함과 동시에 생산균주 내에 축적되는 이차대사산물(intracellularly-produced secondary metabolite, 이후 '세포내이차대사산물'로 표기)인 CyA를 연속적으로 생산하기 위한 시스템으로 고정상세포를 이용하는 perfusion 연속배양시스템(Immobilized Perfusion Reactor System, IPRS)을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

균주

사용된 균주는 *Tolypocladium inflatum* ATCC 34921으로 ATCC에서 초기에 구입하여 순차적으로 포도당에 적응시킨 균주이다(13). 균주는 -20°C 에서 glycerol stock으로 보관하며 seed culture시에 꺼내 사용했고 2개월마다 계대배양하였다.

배지 및 배양조건

균체의 발효조로의 접종을 위한 seed culture에서 쓰이는 배지의 조성은 다음과 같다. glucose 80g/l; urea 2.0g/l; NaNO_3 3.0g/l; KH_2PO_4 2.0g/l; KCl 0.5g/l; MgSO_4 0.5g/l; yeast extract 30g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/l. 이 배지는 대량의 포자를 형성하는 배지이므로 고정화를 위한 포자 현탁액의 준비를 위해 매우 중요한 배지이다. CyA 생산을 위한 생산배지(production medium)로는 synthetic medium(SM)을 이용하였으며 그 조성은 glucose 30g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10.0g/l; KH_2PO_4 0.75g/l; MgSO_4 0.5g/l; CaCl_2 0.1g/l; trace element solution 1ml/l이다. Trace element solution의 조성은 이미 보고되어 있는 바와 같다(13, 14).

Perfusion 고정상연속배양은 2.5l 부피의 top-driven 방식의 교반식 발효조((주)한국발효기)를 이용하였으며 조업부피는 2l 였다. 배양온도는 27°C 로 일정 유지하였으며, pH는 H_2SO_4 (2N)와 KOH(2N) 용액에 의해 5.7에서 조절되었다. 통기속도와

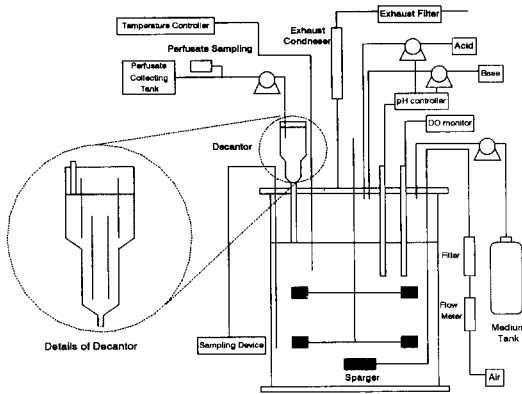


Fig. 1. Schematic diagram for immobilized perfusion reactor system (IPRS) and decanting column.

교반속도는 초기 1vvm과 250rpm이었으며, 연속 perfusion 배양시 반응기내의 고정화 균체농도가 증가함에 따라 산소제한의 조건이 되지 않도록 교반속도(200~550rpm)와 통기속도(1~2vvm)의 동시 조절을 통해 용존산소농도가 산소포화농도의 약 10%를 유지하도록 조절하였다.

Perfusion 배양을 통한 고정상 곰팡이 배양 방법 (Immobilized Perfusion Reactor System 공정=IPRS)

이용된 perfusion 반응기의 구조와 본 실험실에서 설계·제작된 decanting column의 구조를 Fig. 1에 나타냈다. 세포내이차대사산물인 CyA를 연속적으로 생산하기 위한 perfusion 고정상배양공정은 고정상균체와 고정상균체로 포화된 celite 담체로부터 이탈되는 유리세포를 함께 이용하는 semi-perfusion 시스템이다. 즉 고밀도의 고정상균주는 생물반응기 내에 제한 유지되어 계속적으로 유리세포(released-free cell)를 생산해내는 세포생성기(biomass generator)로 이용되며, IPRS의 배출구를 통해 연속적으로 생산되어, 부서진 mycelia 또는 conidiospore 상태로 존재하는 유리세포는 (이차대사 결과 세포내에 축적되는) CyA를 연속적으로 생산하는 데 이용된다. 이러한 semi-perfusion 배양의 경우, 곰팡이 세포는 뭉치거나 부착하는 경향이 있으므로 효모나 박테리아 등과는 달리 유출되는 배양액에서 담체에 고정화된 균체를 분리하여 반응기내에 유지하기 위해 막을 이용할 수 없다. 그러므로 고정화 균체를 효율적으로 분리하기 위한 decanting column의 설치

가 필수적이다. Decanting column은 반응기의 outlet 상에 위치하여 연속배양시 배양액과 고정화 균체와의 비중차에 의해 고정화 균체를 유출되는 배양액으로부터 분리하는 역할을 한다. 연속배양의 회석속도는 0.1hr^{-1} 으로서 이미 보고된 포도당을 기질로 하는 *T. inflatum*의 연속현탁배양(17)과 비교할 때, 3배정도 높은 값이다. 높은 회석속도로 조업한 이유는 생산성을 증대시키고 동시에 액체배지에서 자랄 수 있는 액상세포(suspended cell)의 농도를 조정함으로써 배양액의 유변학적 성질을 조절할 수 있기 때문이다.

분석방법

CyA의 분석은 HPLC를 이용했으며 자세한 사항은 Chun과 Agathos에 의해 제시된 이전의 보고와 같다(13, 14). Glucose의 농도는 Beckman Glucose Analyzer 2 (Beckman Instruments, Inc, Fullerton, CA, U.S.A.)에 의해 결정되었다. 고정상배양과 현탁배양의 건조균체중량(dry cell weight)의 측정은 10ml의 sample을 15,000rpm에서 원심분리한 후 증류수로 남아있는 당 및 염들을 씻어내고 원심분리를 3번 반복한 후 aluminum weighing dish에 담아 dry oven (80°C)에서 12시간 건조하였다. 현탁배양의 경우는 이로써 균체중량을 재는 것이 끝나지만 고정화 배양의 경우는 한 단계의 처리과정을 더 거친다. 즉 80°C에서 건조된 무게를 재어 담체와 균체의 중량합을 결정한 뒤 600°C의 furnace에서 6시간 소각한 후 다시 무게를 재어 위의 값과의 차에 의해 균체농도를 결정하였다.

결과 및 고찰

곰팡이 세포 고정화 배양방법의 획기적 개선

CyA를 생산하는 *T. inflatum*을 고정화하는 담체로서 celite를 선정하였다. Gbewonyo와 Wang에 의해 개발된 방법(4)과 Chun과 Agathos에 의한 방법(10, 11)을 여러 단계 수정하여 이용하였다. *T. inflatum*의 conidiospore를 고정화하기 위한 담체로서 celite grade 560 (Manville corporation)을 이용하였으며 입자크기는 기질의 확산저항을 고려해서 sieve를 이용하여 100~500 μm 범위를 선택하였다(18). 이렇게 준비된 celite 입자를 증류수로 여러번 세척하고 600°C에서 소각하여 휘발성 물질을 제거한 후 121°C에서 멸균하고 다시 건조하여 사용하였다.

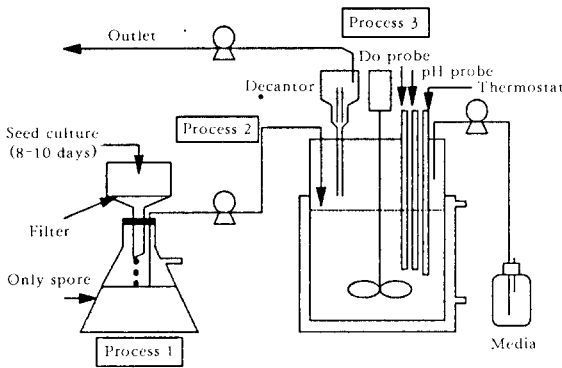


Fig. 2. Schematic diagram for aseptic immobilization procedure (Process 1: preparation of spore suspension; Process 2: enprapment of spores into celite beads; Process 3: immobilized fungal cell fermentation).

많은 문헌에서 고정화하는 데 가장 유리한 미생물의 형태는 microbial endospore나 곰팡이의 포자형태라고 보고되어 있다. 기존의 방법들에서는 담체, 포자현탁액 등의 준비과정의 매우 복잡하고 까다로웠으나 본 연구에서 이를 여러 단계에서 단순화하였다. 즉, 포자 현탁액의 준비시에 기존의 공정은 고정화를 위한 포자현탁액을 agar 포함배지에서 고체배양(solid culture)을 통해 얻어 왔다(4, 5, 10, 11). 이 방법은 solid culture 자체의 시간과 solid culture를 위한 seed culture 등 많은 시간과 노동력을 필요로 하는 번거로운 과정을 포함하고 있었다. 본 연구에서는 고정화를 위한 접종으로서의 포자 현탁액의 준비시에, 보다 간단하면서도 대량의 포자를 얻을 수 있는 복합배지를 개발하여 이용하였다(배지 및 배양조건 참조). 이 배지에서 8~10일간 배양하면 약 $10^9 \sim 10^{10}$ spores/ml의 포자현탁액을 얻을 수 있다. 이때 균사와 포자의 분리는 coarse coffee filter (Rock Line Co., U. S. A.)를 이용했는데 매우 효과적으로 이루어졌다. 이렇게 분비된 포자현탁액을 연동펌프를 이용하여 반응기에 담겨있는 멸균된 celite 담체에 첨가하였다. 모든 공정의 매 단계는 aseptic technique을 이용하여 멸균된 상태에서 수월하게 이루어졌으며 전체공정은 Fig. 2에 도식화하여 제시하였다. 포자현탁액을 담체가 젖기만 할 정도로 첨가하면 모세관현상으로 각 담체내의 내부기공에 효과적으로 스며들게 되는데 이런 과정 후에 27°C로 온도를 맞추어 주고 1vvm의 공기를 공급하면서 2시간 동안 배양하여 포자가 완전히 담체내에

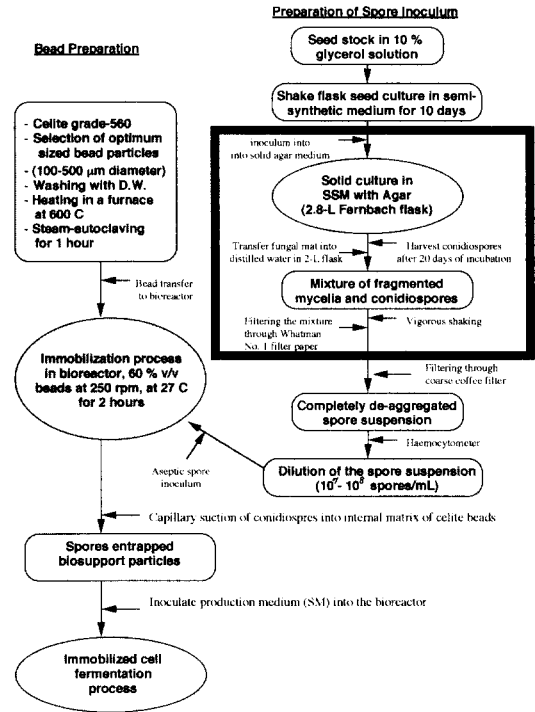
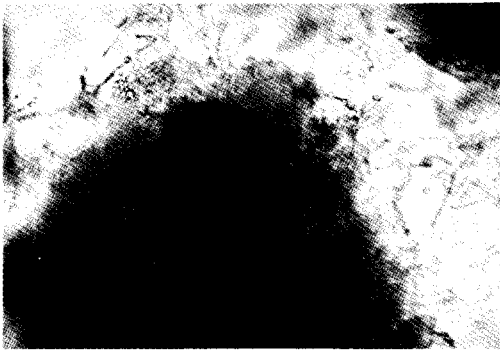


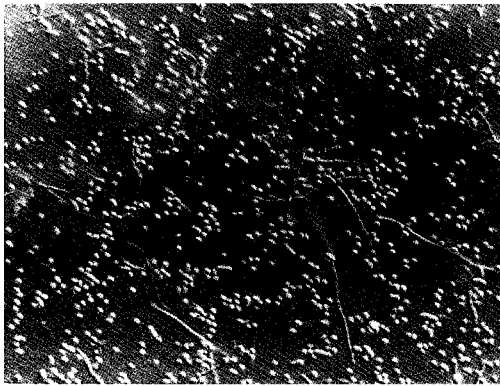
Fig. 3. Flowchart for fungal cell immobilization methodology.

정착할 수 있게 해주었다. 2시간 후 농축된 생산배지와 증류수로 부피를 맞추어 주었다(최종 celite 농도, 60% v/v). 전체 고정화 과정을 Fig. 3에 요약하여 나타내었다. 사각 Box로 강조한 부분이 기존의 다른 공정에서는 이용되고 있으나 본 고정화방법에서는 액체포자형성배지를 이용한 공정의 간소화로 인해 생략된 실험절차를 나타낸다.

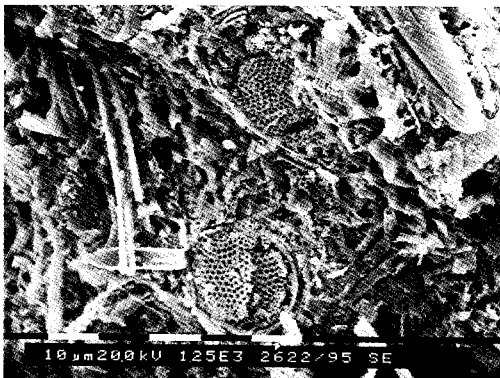
균체가 붙어 있는 celite 입자의 광학현미경 및 전자현미경 사진을 Fig. 4에 나타내었다. 이 사진은 상기 고정화 방법을 이용하여 실제 연속 perfusion 배양공정에 의해 얻은 고정화 균체를 나타낸다. 현미경 사진에서 볼 수 있듯이 담체밖으로 많은 균사가 뻗어나와 있고(Fig. 4(A)) 배양액에는 포자와 잘게 잘려진 균사들이 관찰되었다(Fig. 4(B)). 이는 배양액의 유변학적 특성에 기인한 기질전달속도 증가라는 측면에서, 균사가 그물처럼 엉겨있어 배양액의 점도가 매우 높은 현탁배양과 비교할 때 바람직한 현상으로 해석할 수 있다(하기 고찰 참조). 전자현미경 사진에서는 담체내에 붙어있는 균사를 쉽게 관찰할 수 있다(Fig. 4(C)).



(A)

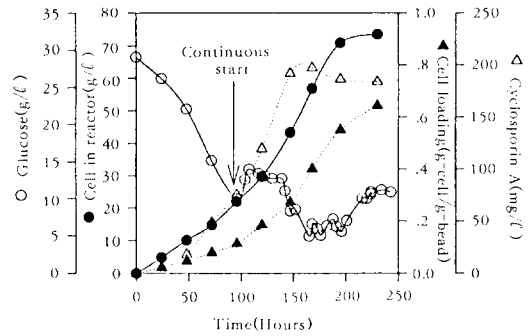


(B)

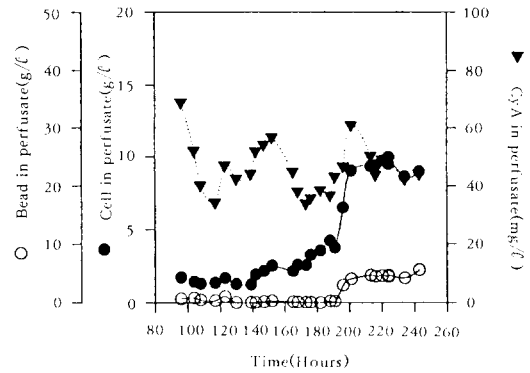


(C)

Fig. 4. Photomicrograph of immobilized celite bead and perfusate (A) Mycelial cells entrapped into celite beads ($\times 400$) (B) Spores and fragmented mycelia in perfusate ($\times 400$) (C) SEM for entrapped cells into celite bead ($\times 100,000$).



(A)



(B)

Fig. 5. Cyclosporin A fermentation results in immobilized perfusion reactor system (IPRS) (A) Kinetic data inside bioreactor (B) Kinetic data in outlet stream (perfusate).

Perfusion 고정상 배양공정 (IPRS)을 이용한 CyA 연속생산

세포내이차대사산물인 CyA 연속생산을 위한 본 IPRS 공정은 현재까지의 고정상 세포를 이용한 세포의 분비 이차대사산물 (extracellular-produced secondary metabolite) 연속생산을 위한 공정의 개념과는 매우 상이하다. 후자의 경우, 고정상균체의 과도성장 (overgrowth) 및 이로 인해 고정상담체로부터 이탈, 분리되는 유리세포 (released-free cell)은 연속공정 운영중 발생하는 많은 문제점으로 인해 방해요소로 간주되곤 했다 (16, 19, 20). 결과적으로 이러한 시스템에서는 담체내에서의 균체의 과도성장을 억제시킴으로써, 포화된 고정상담체로부터 유리세포가 이탈되는 현상을 방지하기 위한 다양한 공정

운영전략을 시도해 왔다(21, 22). 반면에 본 연구에서는 CyA가 세포내에 축적됨으로써 발생하는 공정 개발상의 어려움을 극복하기 위해, 고밀도 고정상균체에서 이탈, 분리되어 IPRS의 출류(outlet stream)상에서 연속적으로 수확되는 유리세포를 CyA의 연속생산을 위해 효과적으로 이용하고자 하였다.

Fig. 5는 전배양시간에 걸친 perfusion 고정상배양 결과로서, 연속배양은 95시간의 회분식배양 후에 시작되었다. Perfusion 반응기 내부의 고정상세포의 경우(Fig. 5(A), 반응기내의 균체농도는 약 200시간까지는 지속적으로 증가하였으며 이에 따라 celite 담체당 균체부하량(cell loading)도 꾸준히 증가하였다. 95시간 동안의 회분배양기간에 약 19g/l의 반응기내 균체농도를 보인 반면, 그 이후 약 100여 시간 동안의 연속배양기간에는 50g/l 이상의 균체농도의 증가가 있었다. 주목할 점은 균사모양의 생산균주의 morphology를 고정화담체를 이용하여 균일한 크기의 미세한 pellet 형태로 변환을 유도한 결과, 배양액의 점도가 훨씬 감소하여 70g/l 이상의 높은 균체농도에서도 담체내외에서 기질의 물질전달이 원활히 이루어졌다는 점이다. 이와 같은 현상은 본 연구그룹의 회분식교반반응기 실험에서 이미 관찰된 바 있다(14). 즉, 현탁배양과 비교해서 세포농도가 10g/l 이상인 경우, 약 2배이상 높은 산소전달계수($k_L a$)가 유지되었으며 이는 주로 고정상 배양시 나타나는 배양액의 Newtonian 유체성질에 기인하는 것으로 판단되었다(14). 담체내 균체부하량이 0.6(g-cell/g-celite)을 넘어선 200시간 이후부터는 균체성장속도가 현저히 감소하여 반응기내의 균체농도는 거의 일정수준을 유지했다. 이는 이용 가능한 담체내 공간이 고정상균체로 완전히 포화된 후 담체내에서 일어나는 과부하 현상에 기인하는 것으로 추측된다. 즉, 포화된 celite 담체밖으로 과도하게 뺏어나온 균사들에 의해서 담체내로의 기질공급속도가 어느정도 저하되기 때문에 담체내의 기질제한으로 인해 균체성장이 둔화된 것으로 보인다. 반응기내 CyA의 농도는 균체농도에 비례해서 증가하다가 약 180시간 이후에는 약간 감소하는 경향을 보였는데 이미 설명된 균체농도의 경우처럼 시간의 경과에 따른 균체의 활성감소 현상도 한 이유가 될 수 있을 것이다.

포도당 농도의 경우, 반응기내의 균체농도와 관련지어 설명할 수 있는데, 회분배양기간에는 10g/l 까지 감소했다가 연속배양 시작 직후부터 증가하여

15g/l 정도에서 약 50시간 동안 유지되었다. 이는 연속배양 초기에 공급되는 포도당농도($S_0=30g/l$)에 비해 반응기내 고정상균체농도가 상대적으로 낮아 0.1 hr⁻¹의 높은 회석속도에서 완전히 소비되지 못하기 때문으로 사료된다. 145 시간이 경과된 후에는 포도당농도가 급격히 감소하여 약 5g/l 수준에서 유지되었는데, 이는 반응기내의 균체농도와 비교에서 알 수 있듯이 활발한 고정상균체의 성장에 따른 기질소모속도의 증가에 기인한다고 볼 수 있다. 균체부하량의 과도한 증가에 따른 고정상세포의 활성감소로 인해 반응기내의 균체성장속도가 감소하는 영역에서는 잔류 포도당농도가 다시 증가하는 현상이 관찰되었다.

Perfusion 배양에 의해 유출되는 배양액(perfusate)에 대한 결과를 Fig. 5(B)에 나타내었다. 유출되는 담체의 경우 초기 190시간까지는 거의 나타나지 않는 점으로 보아 본 실험실에서 개발한 decanting column이 매우 효율적으로 운전되고 있음을 알 수 있다. 현미경으로 관찰시 포자보다 조금 큰 celite 조각(debris)들만이 발견되었는데, 이는 교반시 기계적 충돌에 의해 부서진 것들로 추정되며, 이들은 반응기내의 담체농도에는 영향을 주지 않는 미미한 수준의 담체유실이라고 볼 수 있다. 배양 후반기에 유실된 담체의 농도가 다소 증가하였는데, 이는 균체부하량의 증가로 인한 배양액과 고정화 담체 사이의 비중차 감소에 기인한다.

CyA가 세포내산물(intracellular product)임을 감안할 때 유리세포로 구성된 perfusate의 균체농도는 매우 중요한데 초기에는 2~4g/l의 낮은 농도를 보였으나 약 190시간부터는 급격하게 증가하여 9~10g/l의 높은 균체농도값을 보였다. 본 IPRS 공정에서 사용한 회석속도가 0.1 hr⁻¹로서, 이는 현탁배양의 washout되는 회석속도(17)의 3배라는 조업조건을 감안할 때 IPRS로부터 유출되는 시간당 균체생산량(cell productivity = $D \cdot X$, D : dilution rate, X : perfusate cell concentration)의 증대효과는 연속현탁배양에 비해 실로 막대한 것으로 나타났다. Perfusate의 현미경사진인 Fig. 4(B)에서 특히 주목할 점은 대부분의 free cell의 morphology가 잘게 부서진 mycelial cell 또는 conidiospore로 구성되어 있어 높은 perfusate의 농도에도 불구하고 배양액이 유변학적으로 Newtonian 유체성질을 가졌다는 점이며, 이로 인해 기존의 균사형성 미생물의 현탁배양시 나타났던 고점도로 인한 배양액에서의 물질전달 감소현상이 뚜렷이 개선될 수 있었다. 이

러한 morphology를 띠게된 '주된 이유는 Fig. 5(A)와의 비교에서도 알 수 있듯이 균체부하량이 약 0.8 (g-cell/g-celite)에 이르면 담체밖으로 뿔어나온 균사들이 교반식 impeller와의 충돌에 의해 부서진 유리세포로 되어 쉽사리 perfusate로 빠져나오기 때문으로 사료된다. Perfusate의 CyA 생산량은 전 연속배양기간에 걸쳐 50~70mg/ℓ의 농도를 얻을 수 있었는데, 후반기 균체농도의 증가에도 불구하고 그에 상응하는 CyA의 농도 증가는 뚜렷이 나타나지 않았다. 이런 현상은 담체내 과도한 균체부하로 인한 기질공급 감소, 이에 의한 균체활성감소로 인한 것으로 추정된다. Regan 등은 그들의 전산모사연구에서 균체부하의 증가로 인한 반응기당 생산성은 증가하지만 효율인자 감소로 인해 고정화 균체의 활성의 지속적 유지가 어렵다는 점을 들어 최적 균체부하는 이런 두 가지 현상을 동시에 고려하여 결정되어야 한다고 주장하였다(23).

이상으로 세포내이차대사산물을 연속적으로 생산하기 위한 IPRS 시스템 운영 결과 얻어진 공정개선 효과는 다음과 같이 요약될 수 있다 :

(1) 기존의 회분식 공정에서 필수적이기는 하나 원하는 유효산물의 생산성에는 기여하지 못하는 상당부분의 매 batch당의 cycle time(발효조 refill에 걸리는 시간, 세척시간, 멸균시간, 냉각시간, re-inoculation 시간 등)이 불필요하게 됨으로써 CyA의 시간당 생산성(productivity, mg CyA/Liter/hour) 면에서 볼 때 매우 경제적인 공정이다.

(2) IPRS는 본 연구에서 개발된 고정상세포분리기인 decanting column을 이용하여 고정상균체를 효과적으로 생물반응기 내에 제한 유지시킬 수 있으므로 매우 높은 희석속도(dilution rate)에서도 연속공정이 가능해져, 기존의 연속 현탁발효공정에서 문제시되었던 wash-out 현상이 훌륭히 극복되었다.

(3) IPRS의 연속운영 중 발생하는 유리세포의 morphology를 주로 원형의 conidiospore나 잘게 부서진 mycelial cell로 구성될 수 있도록(Fig. 4(B)) 교반식 IPRS 생물 반응기 내에 적정의 shear-stress를 가함으로써 (즉 교반식 IPRS 통기속도, 교반속도 및 impeller type의 변화를 통한 전단력 효과), 기존의 균사형성 미생물의 현탁배양시 나타나는 배양액에서의 물질전달 감소현상이 극복될 수 있었다.

한편 본 실험과 관련하여 언급되어야 할 점은 이차대사산물이 세포 내에서 생산 축적되는 시기는 생물반응기 내의 다양한 물리적, 화학적 조건과 생합

성 촉매인 생산균주의 생리학적 상태 및 morphological 상태에 매우 민감하게 영향을 받는다는 점이다(24, 25). 본 실험은 주로 IPRS공정개발의 가능성을 테스트한 실험으로서 고정화배양시 균체의 생리학적 변화를 고려한 생산균주의 개발과 배지 최적화는 아직 고려되지 않았다. 그 결과 현탁배양에 비해 균체생산성(1.0g/ℓ/hr)은 월등히 증가했음에도 불구하고 단위세포당 CyA생산성(specific CyA production rate)의 향상 효과는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 그러나 CyA가 세포내산물임을 감안할 때 균주개발과 production 배지의 최적화가 본 공정개발과 병행되는 경우 기존의 회분식배양 또는 연속현탁배양과 비교할 때 획기적인 CyA의 생산성증대 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다. 한편, 본 연구에서 나타난 IPRS 공정상의 개선해야 할 문제점으로는 균체부하량의 과도한 증가로 인한 담체로의 기질공급 감소, 이로 인한 고정상균체의 활성저하 등이 있으며 이를 해결하기 위한 생물공학적인 연구가 현재 본 연구실에서 수행 중이다. 또한 고밀도의 균체부하량과 매우 높은 희석속도에서도 고정상균체가 배양액으로부터 더욱 완벽하게 분리될 수 있도록 하기 위한 decantor system의 개선도 중요한 개발과제라고 할 수 있다.

요 약

고정상공평이를 이용하여 세포내 축적 이차대사산물인 cyclosporin A (CyA)를 연속적으로 생산하기 위해 perfusion 고정상연속배양을 수행하였다. 이를 위해 균사형성 생산균주인 *T. inflaum*을 celite에 고정화하는 데 필요한 공정을 획기적으로 단순화시키는 방법을 제시하였다. 교반식 Perfusion 생물반응기(Immobilized Perfusion Reactor System, 이후 IPRS로 표기) 내에 제한유지된 고밀도 고정상균체는 매우 높은 희석속도(0.1 hr^{-1})에서도 유리세포를 생산해내는 세포생성기의 역할을 훌륭하게 수행하였으며, IPRS의 배출구를 통해 연속적으로 유출되는 고농도의 유리세포($1.0\text{g}/\ell/\text{hr}$)는 이차대사 결과 세포내에 축적되는 CyA를 연속생산하는 데 이용될 수 있었다. 이러한 IPRS공정 운영은 고정상균체를 배양액으로부터 효과적으로 분리시키는 decanting column의 개발로 가능했으며, 이로 인해 기존의 연속현탁배양에서 문제시되었던 높은 희석속도에서의 wash-out현상이 극복될 수 있었다. 또한 유출되는 유리세포(released-free cell)의 mor-

phology를 원형의 conidiospore나 잘게 부서진 mycelial cell로 구성되어 배양액의 rheology가 뉴튼유체화될 수 있도록 IPRS공정을 운영함으로써, 기존의 균사형성 미생물의 현탁배양시 나타나는 배양액에서의 물질전달 감소현상이 뚜렷하게 개선될 수 있었다. 유출되는 높은 균체생산성(1.0g/l/hr)을 감안할 때, 균주개발과 production배지의 최적화가 본 IPRS공정개발과 병행되는 경우 기존의 회분식배양 또는 연속현탁배양에 비해 훨씬 효과적인 생산성 증대를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

감 사

이 논문은 1993년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의해 연구되었습니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. E. Ujcova, Z. Fecl, M. Musilkova and L. Seichert(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 441.
2. W. König, C. Seewald and Schügerl(1981), *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **12**, 205.
3. W. Sittig and H. Heine(1977), *Chem. Ing. Tech.*, **49**, 595.
4. K. Gbewonyo and D. I. C. Wang(1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 967.
5. K. Gbewonyo and D. I. C. Wang(1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2873.
6. M. Dreyfuss, E. Harri, H. Hofmann, H. Kobel, W. Pache and H. Tscheter(1976), *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **3**, 125.
7. H. Kobel and R. Traber(1982), *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **14**, 237.7. D. F. Broad, J. Foulkes and P. Dunnill(1984), *Biotechnol. Letters*, **6**, 357.
8. J. F. Borel(1986), *Cyclosporin, Progress in Allergy*, (J. F. Borel, ed), **38**, 9, Karger, Basel.
9. S. N. Agathos and J. Lee(1993), *Biotechnol. Prog.*, **9**, 54.
10. G. T. Chun and S. N. Agathos(1989), *J. Biotechnol.*, **9**, 237.
11. G. T. Chun and S. N. Agathos(1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 256.
12. G. T. Chun and S. N. Agathos(1993), *J. Biotechnol.*, **27**, 283.
13. G. T. Chun(1994), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 200.
14. G. T. Chun(1994), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 211.
15. D. F. Broad, J. Foulkes, and P. Dunnill (1984), *Biotechnol. Letters*, **6**, 357.
16. E. J. Arcuri, J. R. Nichols, T. S. Brix, V. G. Santamaria, B. C. Buckland, and S. W. Drew (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2399.
17. J. Lee(1989), Ph. D. Thesis, Dept. of Chem. & Biochem. Eng., Rutgers University, New Brunswick.
18. G.-T. Chun, T.H. Lee, and Y.K. Chang (1995), *J. Korean Biotechnol. Bioeng.*, submitted.
19. Y. M. Deo and G. M. Goucher(1983), *Biotechnol. Lett.*, **5**, 125.
20. M. Ogaki, K. Sonomoto, H. Nakajima, and A. Tanaka(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 6.
21. Y. M. Deo and G. M. Goucher(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 285.
22. T. Keshavarz, R. Eglin, E. Walker, C. Bucke, G. Holt, A. T. Bull, and M. D. Lilly(1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 763.
23. D. L. Regan, M. D. Lilly, and P. Dunill (1974), *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1081.
24. H. Z ähner, H. Anke, and T. Anke(1983), *Secondary metabolism and differentiation in Fungi*(J.W. Bennett and A. Ciegler, ed.), *Mycology Series*, Vol. **5**, p. 153-171, Marcel Dekker, New York.
25. J. J. Smith, M. D. Lilly, and R. I. Fox(1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1011.