

배지성분이 고정화 곰팡이 세포를 이용한 Cyclosporin A 생산에 미치는 영향

*이 태 호 · *장 용 근 · †전 계 택

*한국과학기술원 생물공정연구센터 및 화학공학과, 강원대학교 자연과학대학 미생물학과

Effect of Medium Components on the Production of Cyclosporin A by Immobilized Fungal Cell, *Tolypocladium inflatum*

Tae Ho Lee*, Yong Keun Chang*, and Gie-Taek Chun†

*BioProcess Engineering Research Center and Department of Chemical Engineering,
Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea
Department of Microbiology, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea

ABSTRACT

The effects of important medium components such as carbon, nitrogen sources and amino acids on the production of cyclosporin A(CyA) were investigated in an immobilized fungal cell fermentation using *Tolypocladium inflatum*. As carbon sources in the synthetic medium, fructose and maltose stimulated CyA production remarkably compared to glucose when ammonium sulfate was supplemented as a nitrogen source. In the absence of ammonium sulfate in the medium, however, CyA biosynthesis was reduced considerably without regard to C-sources tested. Ammonium sulfate was found to be the best N-source, and also ammonium phosphate and ammonium citrate showed some positive effects on CyA production. Optimum concentration of ammonium sulfate was 10g/L, and supplementation of ammonium sulfate at the start of fermentation was found to be the most efficacious for maximal production of CyA. Among the constituent amino acids of cyclic peptide, CyA, L-valine had the most significant effect on the biosynthesis of CyA, and maximum CyA production was observed when 10 g/L of L-valine was initially added.

서 론

고정상배양은 배양액의 특성이 pellet 형성 배양액의 유변학적 그리고 형태학적 특성과 유사하며, 낮은 점도로 인해 물질전달이 촉진될 수 있는 장점을 가지고 있다(1-3). 또한 고정상배양은 고정상담체

크기의 적정 선택을 통해 담체내의 내부확산저항(intraparticle diffusion resistance)을 인위적으로 줄일 수 있다(4). 반면에 pellet 형태의 현탁배양의 경우 pellet 크기의 인위적인 조절이 매우 까다로와 내부확산저항의 문제점을 쉽게 해결할 수 있는 방법이 제시되지 못하고 있다. 왜냐하면 균사형성 곰팡이의 현탁배양시, pellet의 형성유·무와 크기는 균주의 생리학적 특성 이외에도, 접종농도, 접종된 균

† Corresponding Author

주의 활성도 및 배양배지의 조성 성분에 의해 복합적으로 영향을 받는 것으로 보고되고 있어 매 실험 시 재현가능한(reproducible) 결과를 얻기가 매우 어렵기 때문이다(5). 고정상배양은 특히 고농도 세포배양에서 주로 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. 이밖에도 고정화 균주의 생리학적 특성 변화에 의해서 여러 생산물의 생산성 향상도 보고되었다(6, 7).

고정화의 용이성 및 효율성, 사용된 담체의 경제성, 담체 내의 물질전달, 그리고 안정성 등이 고정화 방법을 결정하는 요인이 될 수 있다. 본 연구에서 사용한 셀라이트(celite) 담체는 diatomaceous bead로서 상기 요인들을 훌륭히 만족시키며, 특히 균사형성 미생물의 고정화시 그 효율성이 매우 클 뿐만 아니라(1, 2), scale-up 또한 용이한 것으로 보고되고 있다(8, 9). Lee(10) 등은 셀라이트 담체를 이용한 최근의 고정상배양 연구에서 오염원으로부터 안전함과 동시에 세포 고정화 절차 또한 매우 간단한 고정화 방법을 제시하였으며, 이를 이용한 고정상 연속배양 결과도 보고하였다.

본 연구의 모델 product인 cyclosporin A(CyA)는 11개 아미노산으로 이루어진 cyclic peptide계 항생제이며 호기성 균사형성 곰팡이인 *Tolypocladium inflatum*에 의해 생산되는 면역억제제이다(11, 12). CyA는 장기이식시 거부반응을 억제하는 중요한 의약품이며 자가면역(autoimmune)과 관련된 당뇨병, 류마티스 등의 치료에도 상당한 효과를 갖는 것으로 알려져 있다(13). 지금까지 CyA의 면역기작 및 생합성 경로에 대해 많은 연구결과가 보고되고 있으며(11-14), 특히 최근에 CyA의 생합성이 다기능성 단일효소인 cyclosporin A synthetase에 의해 진행된다는 사실이 밝혀진 후(15) 부분 또는 완전 정제된 CyA synthetase를 이용하여 CyA 유사물질(derivatives)에 대한 신약탐색 및 약효연구가 활발히 진행되고 있다. 반면에 CyA 생산을 위한 생산균주의 생리학적, 또는 생물공학적 연구는 단지 몇몇 연구팀에 의해 보고되고 있다. Agathos 그룹에서 탄소원, 질소원 그리고 몇몇 아미노산 등의 영향을 알아 보았으며(16-18), 고정상배양을 이용한 CyA 생산공정 연구는 Chun과 Agathos에 의해서 처음으로 시도되었다(6, 7). 또한 Chun 등(19)은 최근의 연구에서 교반식 perfusion 생물반응기에서의 고정화

연속공정을 통해 CyA의 생산성이 크게 향상될 수 있음을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 CyA의 대량생산을 위한 고정상배양공정을 개발하기 위한 기초실험으로 중요한 배지 성분인 탄소원, 질소원, 아미노산 등이 고정상 생산균주의 CyA 생산능력에 미치는 영향을 조사하였다. 특히 CyA 생합성시 매우 중요한 배지성분으로 나타난 ammonium sulfate와 L-valine의 최적 첨가농도 및 첨가시점을 조사하였다.

재료 및 방법

균주

사용된 균주는 ATCC에서 구입한 wild-type 균주인 *Tolypocladium inflatum* (ATCC 34921)이다. 균주는 -20°C 에서 glycerol stock으로 보관하여 seed culture시마다 새로운 stock을 꺼내 사용했고 2개월마다 계대배양하였다.

배지 및 배양조건

균체의 발효조로의 접종을 위한 seed culture를 위해 사용된 배지(SSM)의 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. CyA 생산을 위한 생산배지로는 synthetic medium(SM)을 이용하였으며 그 기본조성은 fructose 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; valine 6g/L; trace element solution 1mL/L이다(3, 4). 이 배지조성을 기본으로 하여 다양한 탄소원과 질소원이 CyA 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 고정상세포 배양용 담체인 셀라이트의 농도는 135g/L로서 이는 생산배지 기준 50% v/v에 해당되는 양이다. 셀라이트 담체의 지름은 담체 내의 물질전달을 고려하여 100~500 μm 의 크기를 체를 이용하여 선별한 후 사용하였다(4). SSM 배지를 사용하여 250mL 플라스크에서 100mL의 부피로 10일간 배양한 seed culture를 필터를 통과시켜 포자 현탁액만을 얻은 후 약 $10^7 \sim 10^8$ spores/mL의 포자현탁액을 멸균된 셀라이트가 들어 있는 250mL 플라스크에 20mL씩 접종하였으며 셀라이트로의 고정화 방법은 이전에 보고한 바와 같이 포자현탁액을 이용한 모세관 흡입식 방법에 의해 수행되었다(19). 고정상배양은 250mL flask에서 100mL 부피로 배양했으며, 초기 pH, 5.7; 온도,

27°C 및 200rpm의 배양조건에서 10일간 고정상배양을 수행하였다.

분석방법

CyA의 분석은 HPLC를 이용했으며 분석조건에 대한 자세한 사항은 Chun과 Agathos에 의해 제시된 이전의 보고와 같다(6, 7). 고정상배양과 현탁배양의 건조균체중량(dry cell weight)의 측정은 10mL의 sample을 15,000rpm에서 원심분리한 후 증류수로 남아 있는 당 및 염들을 씻어 낸 후(3번 반복) aluminum weighing dish에 담아 80°C 건조기에서 12시간 건조하였다. 현탁배양의 경우 이로써 균체중량이 측정될 수 있으나 고정화 배양의 경우는 한 단계의 처리과정이 더 필요하다. 즉 80°C에서 건조된 무게를 측정하여 담체와 균체의 중량합을 결정한 뒤 600°C의 furnace에서 6시간 소각한 후 다시 무게를 측정하여 이 두 값의 차이에 의해 균체농도가 결정되었다.

결과 및 고찰

탄소원의 영향

고정상 배양에서 CyA 생산에 미치는 탄소원의 영향을 Fig. 1에 나타냈다. 이 탄소원 실험과 동시에 질소원인 ammonium sulfate의 첨가 유·무가 CyA 생산성에 미치는 효과도 함께 조사하였다. 탄소원을 제외한 나머지 생산배지의 조성은 “배지 및 배양조건”에 기술한 바와 같으며 각 탄소원의 농도는 30g/L였다. 모두 6 가지 종류의 단일 탄소원의 역할을 각각 조사하였으며, sucrose, fructose, glucose의 경우는 두가지 당을 동시에 탄소원으로 사용했을 때의 영향에 대해서도 알아보았다(Table 1). Ammonium sulfate가 배지에 첨가되지 않은 경우 10일간 배양 후의 최종 균체농도는 glucose와 sucrose에서 최대(21g/L)로 나타났으며, lactose를 제외한 나머지 탄소원의 경우에도 18g/L 이상의 농도를 얻을 수 있었다(Fig. 1(A)). Ammonium sulfate가 첨가되었을 시는 lactose를 첨가한 경우에만 균체농도가 증가하였으며(약 60%), 나머지 탄소원의 경우 균체농도가 약 2~5g/L 정도씩 감소하는 경향을 보여주었다. CyA의 생산성은 ammonium sulfate가 첨가되지 않은 경우 maltose와 fructose를 제외한 대부분의 경우에서 100mg/L 이하로 낮게 나타났으며, 특히 lactose의 경우에는 20mg/L로 매우 적게 나타났다. 젖산, 아미노산 등과 같은 일차대사산물의

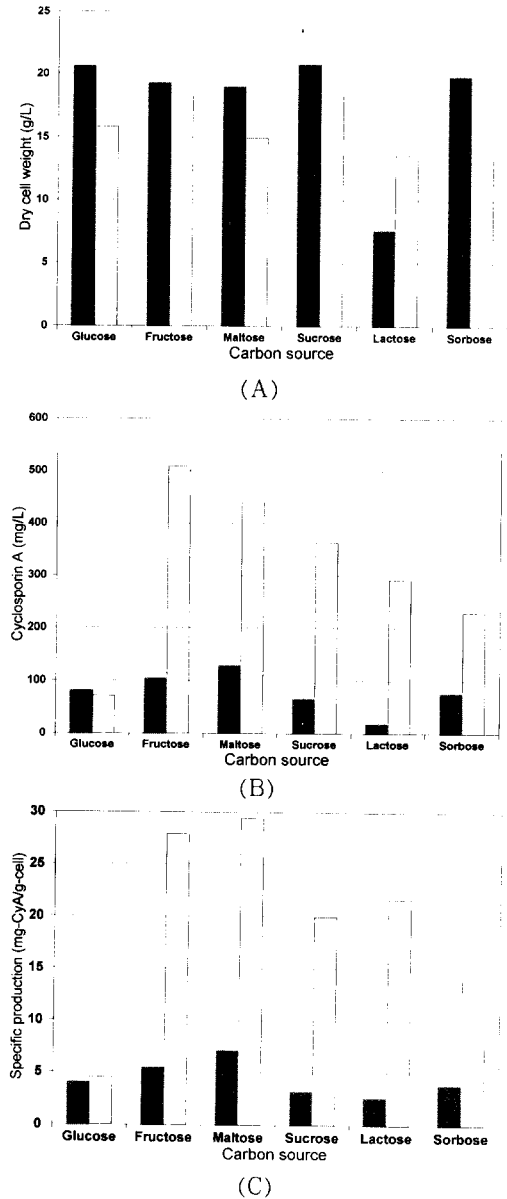


Fig. 1. Effects of carbon sources in the immobilized cell cultures (■ : No ammonium sulfate addition, □ : ammonium sulfate addition).

- (A) dry cell weight (g/L)
- (B) cyclosporin A concentration (mg/L)
- (C) specific production (g-CyA/g-cell)

발효에서 ammonium 이온의 존재는 대사산물의 생산성에 긍정적인 영향을 주는 것으로 보고된 바 있

Table 1. Effects of simultaneous addition of two carbon sources.

Carbon source		DCW (g/L)	CyA (mg/L)	Specific production (mg/g-cell)
No Ammonium sulfate	glu 20+fru 10	21.2	95.5	4.49
	glu 15+fru 15	21.0	111.7	5.30
	glu 10+fru 20	20.8	106.6	5.11
	suc 20+fru 10	21.0	67.7	3.22
	suc 15+fru 15	20.5	81.1	3.95
	suc 10+fru 20	20.4	78.4	3.83
	suc 20+glu 10	21.6	86.5	4.01
	suc 15+glu 15	21.8	105.1	4.85
suc 10+glu 20	21.4	99.9	4.63	
Ammonium sulfate 10g/L	glu 20+fru 10	17.4	106.4	6.13
	glu 15+fru 15	17.3	78.3	4.52
	glu 10+fru 20	17.4	272.7	16.37
	suc 20+fru 10	18.2	284.5	15.64
	suc 15+fru 15	18.1	432.5	23.90
	suc 10+fru 20	18.3	248.7	13.58
	suc 20+glu 10	17.8	135.1	7.58
	suc 15+glu 15	17.6	90.2	5.11
suc 10+glu 20	17.1	75.2	4.40	

다(20). 본 연구의 경우, CyA가 비록 이차대사산물 이기는 하나 ammonium sulfate가 추가 질소원으로 배지에 첨가된 경우, CyA 생산성이 3~5배 이상 증가했으며(glucose가 탄소원인 경우 제외), 특히 fructose의 경우 10일 배양후의 CyA 농도는 505mg/L로서 그 효과가 가장 뚜렷이 나타났다(Fig. 1(B)). Maltose와 sucrose의 경우에도 CyA 농도는 각기 435, 370mg/L로서 ammonium ion이 첨가되지 않은 경우에 비해 각각 3.4배와 5.0배 생산성이 증가하였다. 주목할 점은 glucose의 경우 CyA 생산성이 매우 낮게 나타난 점으로서, 균체 성장에 매우 유리한 탄소원의 경우, 일반적으로 이차대사산물(secondary metabolite) 형성에 필요한 최적의 생리학적 상태를 제공하지 않는다는 기존의 현탁배양 연구결과들이(21-23) 고정상 배양에서도 관찰되었다는 점이다. 즉, 균체 성장이 원활한 상태에서는 대사상태가 일차대사에 매우 적응되어 있기 때문에 이차대사산물의 생산에 필요한 이차대사로의 전환이 어려운 생리학적인 특성에 기인하는 것으로 보인다. Agathos 등(16)이 행한 현탁배양의 연구에서도, 본 고정상배양 결과와 마찬가지로 glucose는 CyA 생산에 적합하지 않은 탄소원으로 나타났다.

대신에 myo-inositol, cellobiose, galactose, fructose, maltose, 그리고 sorbitol 등이 매우 효율적인 탄소원으로 나타났으며, 가장 높은 부피생산성(volumetric productivity)을 보인 경우는 cellobiose와 galactose였다. 한편, Margaritis와 Chahal(17)은 maltose와 fructose를 탄소원으로 하는 현탁배양에서, fructose 첨가시 maltose보다 약 2배 이상 CyA 생산성이 증가하였다고 보고하였다. Fig. 1(C)에 각 탄소원을 첨가한 경우의 CyA 비생산성(specific production)을 나타내었다. 고정상배양의 결과 fructose와 maltose 모두 CyA 생산에 훌륭한 탄소원으로 판명되었으며 각각의 비생산성은 27.5와 29.1(mg-CyA/g-cell)이었다.

Sucrose, fructose, 그리고 glucose 중 두 가지 탄소원을 동시에 공급하여 그 배양 특성을 알아본 결과를 Table 1에 요약하였다. Ammonium sulfate를 첨가하지 않았을 때의 균체농도는 각 경우 20~21g/L로 거의 비슷하였고 CyA 생산량도 약 100mg/L 안팎으로 비슷한 수준을 보였다. 이는 단일 탄소원만을 사용해서 얻은 실험결과와 매우 흡사하다. 그러나 10g/L의 ammonium sulfate가 첨가되었을 때, 각각의 탄소원 조합에 따른 CyA의 생산량은 매우 크게 차이남을 알 수 있다. Sucrose와 fructose가 각각 15g/L씩 동시에 첨가되었을 때 CyA 생산량은 433mg/L로서 가장 높게 나타났다. Sucrose가 glucose 1 분자와 fructose 1 분자의 결합으로 이루어진 이당류임을 감안할 때 상대적으로 glucose 성분이 적을수록 CyA 생산성이 증가한다고 추측할 수 있다. 다른 탄소원 조합, 즉 glucose+fructose나 glucose+sucrose의 경우에도 glucose의 농도가 증가할수록 CyA의 농도가 감소하는 것으로 나타났다.

이차대사산물 생산을 위한 회분식 현탁배양의 경우 균체의 지수기 성장단계에서는 이차대사가 저해(inhibition) 또는 억제(repression)되는 trophophase와, 배지조성의 비균형으로 인해 균체 성장속도가 저하 또는 정지된 상태에서 이차대사가 활발히 진행되는 idiophase의 두가지 phase가 종종 존재하곤 한다(22-24). 반면, defined medium에서는 이런 구분이 명백히 나타나지 않곤 하는데, 이는 defined medium 자체가 성장을 어느 정도 조절하는 기능을 가지기 때문으로 사료된다(22). 각각의 탄소원들은 그 자체 구조나 분자크기에 따라 균체가 이용할 수 있는 정도나 속도가 다르며 이에 따라 균체의 성장속도 역시 영향을 받는다. 이는 성장속도와

생산속도와 상호관계가 일차대사산물의 경우와 매우 다른 이차대사산물의 대량 생산시 반드시 고려해야 할 중요한 사항이다. Defined medium을 생산배지로 사용한 본 실험의 결과로 보아 탄소원 이용의 용이성 여부가 이차대사산물, 즉 CyA의 생산특성에 크게 영향을 미치는 것으로 보이며, 또한 ammonium sulfate의 첨가에 의한 CyA의 생산증가 효과는 defined medium에서의 균체의 성장속도 조절 효과가 그 한 원인이 될 수 있을 것이다. 이는 최종 건조균체중량과 배양액의 pH에 의해서도 추측할 수 있는데, ammonium sulfate 첨가시 pH가 초기 5.7에서 약 2.0까지 떨어진 반면, ammonium sulfate의 부재시에는 약 4.5에서 5.0사이의 비교적 균일한 pH 분포를 보였다(data not shown). Ammonium sulfate의 첨가시 pH가 이와 같이 낮아진 이유는 ammonium 이온에서 떨어져 나오는 H⁺이온에 의한 것으로 추정되며, 이런 낮은 pH의 영향으로 인해 균체의 성장속도가 어느 정도 저해를 받아 상대적으로 이차대사가 비교적 활발히 진행되었다고 추측할 수 있다. 탄소원에 대한 본 실험의 결과로부터 고정상배양을 통해 CyA를 생산할 때에도 균체의 성장과 생산에 관한 최적의 발효 경로를 따라갈 수 있는 적절한 탄소원 및 질소원의 선택이 필요하다는 것을 알 수 있으며 이 경우 fructose나 maltose가 이런 요구에 가장 접근하는 것으로 보인다.

질소원의 영향

본 실험에서는 여러 가지 이용 가능한 질소원(무기 질소원 6가지와 유기 질소원 2가지)의 균체성장과 CyA 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 질소원을 제외한 나머지 생산배지의 조성은 “배지 및 배양 조건”에 기술한 바와 같고 각 질소원의 농도는 10g/L였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 ammonium acetate와 ammonium carbonate의 경우를 제외하고는 대부분 16~19g/L의 균체농도를 얻을 수 있었다. Ammonium sulfate가 CyA 생산에 가장 우수한 질소원으로 나타났다(305 mg/L). Ammonium acetate와 ammonium carbonate의 경우는 CyA가 거의 생산되지 않은 것으로 보아 이 질소원들은 균체의 성장뿐 아니라 CyA의 생산에도 강한 저해 효과를 가지는 것으로 보인다. Ammonium phosphate와 ammonium citrate를 첨가한 경우의 CyA 생산성은 ammonium sulfate의 약 70% 수준이었으며 ammonium nitrate의 경우는 약 50%의 CyA 생산성을 보였다. Margaritis와 Chahal(17)은 현탁

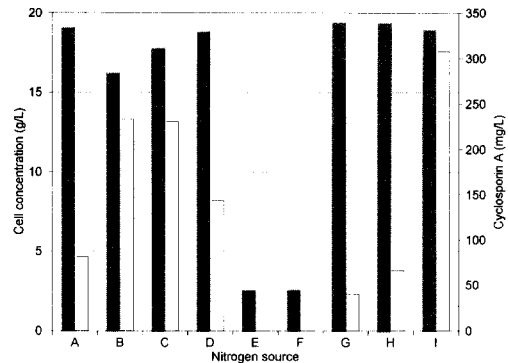


Fig. 2. Effects of nitrogen sources on the cell growth and production of CyA in the immobilized cell cultures (■ : Cell concentration, □ : CyA concentration).

A: control ; B: ammonium phosphate ; C: ammonium citrate ; D: ammonium nitrate ; E: ammonium acetate ; F: ammonium carbonate ; G: yeast extract ; H: peptone ; I: ammonium sulfate

배양에 의한 배지성분 조사에서 ammonium phosphate에 의한 질소원과 phosphate source의 동시 공급이 CyA 생산에 다소 유리하다고 보고하였으나, 본 고정상배양 실험에서는 이와는 매우 대조적인 결과를 얻었다. 유기 질소원인 yeast extract, 또는 peptone을 사용한 경우 탄소원의 제한 현상으로 균체 농도는 거의 비슷하게 나타났으나 CyA 생산성은 질소원을 첨가하지 않은 control에 비해 다소 낮은 결과를 보였다(Fig. 2). 한편 Agathos 등(16)은 현탁배양에서 peptone, soytone, 또는 corn steep liquor 등의 복합 질소원이 무기 질소원에 비해 CyA의 생산에 유리하다고 보고한 바 있다.

아미노산의 영향

CyA는 11개의 아미노산으로 구성되어 있으므로 생산배지내의 아미노산의 존재는 CyA의 생합성에 매우 중요하고 필수적인 것으로 보인다. 아미노산들이 이차대사산물, 특히 peptide계 항생제의 생합성에 있어서 매우 중요한 역할을 한다는 사실은 이미 여러 문헌에 보고된 바 있다(25). 이 실험에서는 고정상배양에서 CyA의 생합성 전구체(precursor)로 이용 가능한 아미노산을 조사하기 위해 CyA 분자를 구성하는 아미노산들이 CyA 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 아미노산을 제외한 나머지 생산배지

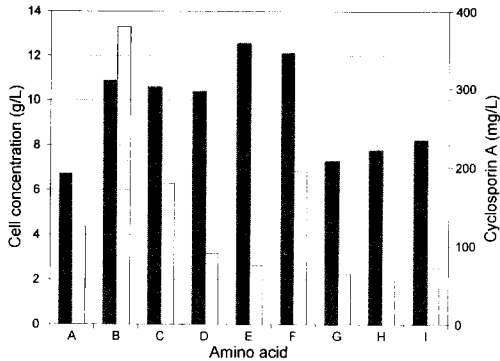


Fig. 3. Effects of amino acids on the cell growth and production of CyA in the immobilized cell cultures (■ : Cell concentration, □ : CyA concentration). A: control ; B: L-valine; C: L-leucine; D: α -aminobutyric acid ; E: L-glycine ; F: L-alanine ; G: L-methionine ; H: DL-methionine ; I: sarcosine

의 조성은 “배지 및 배양조건”에 기술한 바와 같고 각 아미노산의 농도는 6g/L였다.

Fig. 3은 첨가된 아미노산의 종류에 따라 균체농도와 CyA 생산량이 현격하게 차이남을 보여준다. L-valine이 첨가된 경우 CyA 생합성이 가장 뚜렷이 증가하여 376mg/L의 CyA가 생산되었다. 현탁 배양을 이용한 기존의 연구에서도 L-valine이 복합 배지나 defined medium에 첨가되었을 시 CyA의 비생산성 및 부피생산성이 크게 증가되었음이 보고되었으며(26) 같은 연구자들에 의해 CyA 생산성과 L-valine의 intracellular pool 사이의 상관관계가 설명된 바 있다(18). L-alanine 첨가의 경우, 현탁 배양에서는 60mg/L수준으로 CyA 생산성이 미미했으나(data not shown) 고정상배양에서는 약 200 mg/L으로 비교적 생산성이 높게 나타났다. 또한 L-leucine의 경우 현탁배양에서는 320mg/L로 생산성 증가 효과가 비교적 뚜렷이 나타났으나 고정상배양에서는 이와 같은 긍정적인 효과가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 고정상배양과 현탁배양에 관한 기존의 비교 연구들에서 밝혀진 바와 같이 세포고정화에 의한 생산균주의 생리학적 변화가 CyA 발효에서도 나타났음을 제시해준다. L-glycine, L-alanine은 CyA 생산보다는 오히려 균체성장을 매우 촉진시키는 훌륭한 탄소원 및 질소원 역할을 하는 것으로

Table 2. Effects of amino acids on the production of cyclosporin A using immobilized cell cultures

	DCW (g/L)	CyA (mg/L)	Specific production (mg/g-cell)
L-met + L-val	8.03	97.2	12.10
L-met + L-leu	8.74	146.1	16.72
L-met + DL- α amino butyric acid	8.84	74.0	8.37
L-met + L-gly	10.24	76.2	7.44
L-met + L-ala	9.55	81.9	8.58
L-met + sarcosine	8.15	77.2	9.47
DL-met + L-val	8.85	128.2	14.49
DL-met + L-leu	9.05	159.9	17.67
DL-met + DL- α amino butyric acid	7.81	71.7	9.18
DL-met + L-gly	8.86	163.3	18.43
DL-met + L-ala	9.90	105.3	10.64
DL-met + sarcosine	7.24	89.7	12.39

보인다. 반면, L-methionine, DL-methionine, α -aminobutyric acid, sarcosine 등은 균체성장에는 어느 정도 기여했으나 CyA 생산에는 별로 영향이 없는 것으로 나타났다. 특히 methionine의 경우, 그 자체가 CyA의 생합성에 필수적인 N-methylation 단계에서 methyl기의 donor임에도 불구하고(14) 이와 같은 결과가 나타났음은 주목할 만하다.

Table 2는 고정상배양에서 L- 또는 DL-methionine이 다른 아미노산과 함께 첨가되었을 때 CyA 생산성에 미치는 영향을 요약한 것이다. 균체 및 CyA의 농도가 전반적으로 감소하는 경향을 보였으며 특히 L-valine, L-leucine, 그리고 L-alanine의 경우, CyA의 생산성 증가 효과가 methionine 첨가에 의해 오히려 상쇄되어 CyA 생산이 절반 이하로 감소하였다. 이러한 결과는 Lee 등(26)이 수행한 현탁배양에서도 나타난 바 있다. Lee 등은 CyA 생산성 감소의 이유로 L-methionine에 의한 N-methylation 단계가 feedback mode로서 조절되어, 낮은 생산 상태에서는 N-methylation 단계가 속도 결정 단계가 아니지만 세포내에 대량의 methionine pool을 가진 생리적 상태가 되면 feedback 조절 효과로 인해 이 단계가 병목이 될 수 있다고 제안하였다.

Ammonium sulfate의 영향

위의 질소원 실험에서 ammonium sulfate가 CyA 생산에 최적인 질소원으로 밝혀짐에 따라 ammonium sulfate의 초기농도 및 첨가시기의 최적화를 위

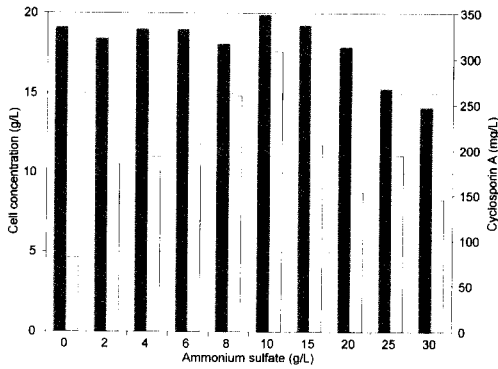


Fig. 4. Effects of ammonium sulfate on the cell growth and production of CyA in the immobilized cell cultures (■ : Cell concentration, □ : CyA concentration).

해 고정상배양을 수행하였다. Ammonium sulfate를 제외한 나머지 생산배지의 조성은 “배지 및 배양 조건”에 기술한 바와 같다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 ammonium sulfate의 초기농도가 20g/L에 이를 때까지 균체의 농도는 거의 같은 수준을 보였으나 그 이상에서는 오히려 균체성장이 저해받는 것으로 나타났다. 반면, CyA의 생산성은 ammonium sulfate의 농도에 비례하여 증가하다가 1g/L에서 305mg/L의 최대 CyA 생산량을 보였으며, 10g/L 이상의 ammonium sulfate가 첨가되면 CyA 생산성이 급격하게 감소함을 알 수 있었다. 이 결과로부터 무기 질소원인 ammonium sulfate는 과다첨가의 경우를 제외하고는 최종 균체농도에 별로 큰 영향을 미치지 않으나, CyA 생산에 있어서는 탄소원의 영향에서 이미 살펴본 바와 같이 매우 중요한 역할을 함을 확인할 수 있었다.

Ammonium sulfate의 최적 첨가시기를 조사하기 위해 최적농도로 밝혀진 10g/L의 ammonium sulfate를 0, 3, 4, 6일의 고정상배양 후에 각각의 배지에 첨가해 주었다(Fig. 5). Ammonium sulfate를 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우보다 항상 CyA 생산성이 증가하는 것으로 보아 ammonium sulfate가 CyA 생합성에 매우 중요한 질소원임을 다시 확인할 수 있었다. 또한 초기에 ammonium sulfate를 첨가한 경우가 배양 중간에 첨가한 경우보다 CyA 생산성 증가에 미치는 영향이 더 큰 것으로 나타났으며, 첨가시기가 늦을수록 CyA의 생산량은 감소하는 경향을 보였다. 상기에서 이미 언급한 바와 같이 ammonium sulfate 첨가에 의한 CyA의 생산성 증

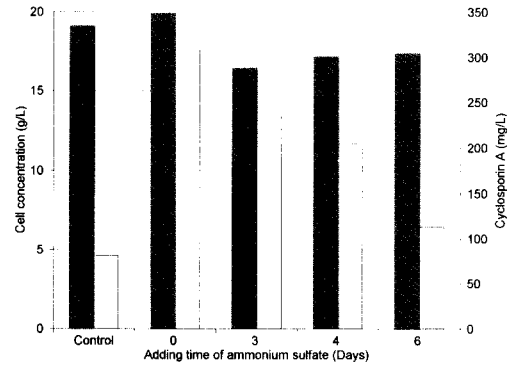


Fig. 5. Effects of addition time of ammonium sulfate on the cell growth and production of CyA in the immobilized cell cultures (■ : Cell concentration, □ : CyA concentration).

가 현상은 pH의 저하로 인해 균체 성장속도가 어느 정도 둔화된 상태에서 일차대사보다 이차대사가 비교적 활발히 진행된 결과에 기인한 것으로 보인다. 특히 이러한 현상이 ammonium sulfate를 초기에 첨가한 경우에 가장 뚜렷이 나타나는 것으로 보아, 초반의 pH 강하가 생산균주의 최적 성장속도 유도에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 실제로 이차 대사산물의 과량생산 유도시 생산균주의 비성장속도 (specific growth rate ; μ)의 조절이 비생산속도 (specific production rate ; q_p)에 매우 중요한 인자임이 여러 연구결과 보고된 바 있다(24).

L-valine의 영향

L-valine이 *T. inflatum*의 현탁배양에서 CyA의 생합성 증가를 촉진시키는 이미 보고된 바 있다(18, 26). 고정상배양의 경우 역시 L-valine이 CyA 생산성 증가에 중요한 역할을 하는 것으로 본 연구결과 입증되었으므로 고정상배양용 배지조성의 최적화를 위해 L-valine의 최적 첨가농도 및 시기를 조사하고자 하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 균체의 성장정도는 L-valine의 초기 첨가농도에 따라 거의 비례적으로 증가하였다. 이는 첨가된 L-valine이 세포 성장에 필요한 훌륭한 탄소원이나 질소원으로 작용되고 있음을 암시한다. 또한 L-valine을 전혀 첨가하지 않은 경우나 소량으로 첨가한 경우 매우 적은 균체생산량이 얻어졌는데, 이로부터 L-valine 등의 아미노산이 ammonium sulfate 등의 무기 질소원보다 균체 성장에 더 많은 기여를 한다고 추측할

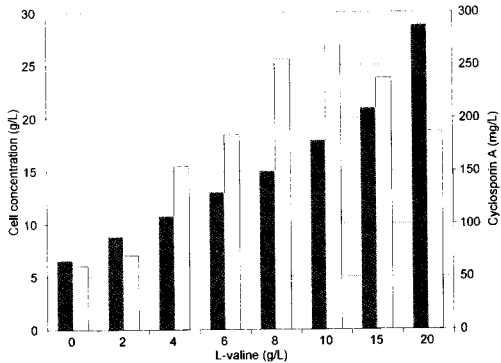


Fig. 6. Effects of L-valine on the cell growth and production of CyA in the immobilized cell cultures (■ : Cell concentration, □ : CyA concentration).

수 있다. 첨가된 L-valine의 농도가 증가할수록 CyA의 생산량은 뚜렷하게 증가했으나, 10g/L를 분수령으로 그 이상 과다하게 첨가한 경우 CyA 농도는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이는 L-valine이 일정농도 범위내에서는 CyA synthetase의 활성을 증가시켜 주는 activator, 또는 inducer로 작용하거나 CyA 분자구조내의 아미노산으로 직접 이용되는 precursor의 역할을 할 수 있으나, 과잉으로 첨가되는 L-valine은 균체 성장속도를 지나치게 촉진시켜 오히려 이차대사물인 CyA의 생합성을 저해하기 때문으로 사료된다.

L-valine의 첨가시기를 조사한 실험에서는 ammonium sulfate와 마찬가지로 배양초기에 첨가하는 경우 CyA 생산 및 균체성장이 가장 높게 나타났다 (Fig. 7). 첨가시점에 관계없이 L-valine(10g/L)을 첨가한 경우가 첨가하지 않은 control 배양에 비해 모든 경우에서 CyA 생산 및 균체농도가 증가했으나 첨가시기가 늦을수록 생산성이 감소하는 경향을 보였다. 이는 탄소원 및 질소원으로 쉽게 이용될 수 있는 L-valine의 부재로 인해 성장이 어느 정도 저해를 받았던 생산균주가 갑자기 첨가된 L-valine을 이차대사에 이용하기보다는 오히려 세포성장 쪽인 일차대사로 더 쉽게 이용하기 때문으로 추측된다.

요 약

Wild-type 곰팡이인 *Tolyocladium inflatum*의 고정상배양을 통해 탄소원, 질소원, 아미노산 등이 peptide 항생제 계통의 면역억제제인 cyclosporin

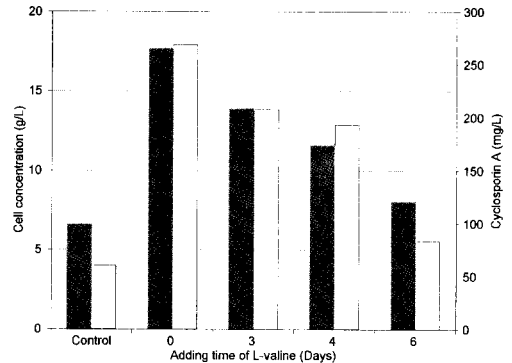


Fig. 7. Effects of addition time of L-valine on the cell growth and production of CyA in the immobilized cell cultures (■ : Cell concentration, □ : CyA concentration).

A(CyA) 생합성에 미치는 영향을 조사하였다. 질소원으로서 ammonium sulfate가 첨가된 경우에, fructose 또는 maltose 등을 탄소원으로 이용하는 배지가 glucose가 첨가된 배지에 비해 월등히 높은 CyA 생산성을 보였으나, ammonium sulfate의 부재시에는 탄소원들의 종류에 관계없이 CyA 생산성이 매우 낮게 나타났다. 질소원의 경우는 무기 질소원인 ammonium sulfate가 CyA 생산에 가장 훌륭한 성분으로 작용했으며, 그밖에 ammonium phosphate, ammonium citrate 역시 CyA 생산을 어느 정도 증가시키는 효과를 보였다. 최적 ammonium sulfate의 농도는 10g/L로 밝혀졌으며 배양초기에 ammonium sulfate를 첨가해 주는 경우가 배양중간에 첨가하는 경우보다 CyA 생산에 더 효율적인 것으로 나타났다. 아미노산의 경우 L-valine에 의한 CyA 생합성 증진 효과가 가장 뚜렷하게 나타났다. 최적 L-valine 농도는 10g/L이었으며 L-valine이 배양 초반부터 배지 중에 존재하는 것이 CyA 생합성에 가장 유리한 것으로 나타났다.

감 사

본 연구는 1996년도 생물공정연구센터에서 지원한 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. K. Gbewonyo and D. I. C. Wang(1983), *Biotechnol, Bioeng.*, **25**, 967.

2. K. Gbewonyo and D. I. C. Wang(1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2873.
3. G. T. Chun(1994), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 211.
4. G. T. Chun, T. H. Lee, and Y. K. Chang (1996), *J. Korean Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 30.
5. P. F Stanbury(1994), *Principles of Fermentation Technology*, pp. 108-119, Pergamon Press, Oxford.
6. G. T. Chun and S. N. Agathos(1989), *J. Biotechnol.*, **9**, 237.
7. G. T. Chun and S. N. Agathos(1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 256.
8. D. I. C. Wang, J. Meier, and K. Yokoyama (1984), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **9**, 105.
9. T. Keshavarz, R. Eglin, E. Walker, C. Bucke, G. Holt, A.T. Bull, and M.D. Lilly (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 763.
10. T. H. Lee, G. T. Chun, and Y. K. Chang (1995), *Progress in Biotechnology, Immobilized Cells: Basics and Applications* (R. H. Wijffels, R. M. Buitelaar, C. Bucke, and J. Tramper eds), Vol. 11, pp. 402-409, Elsevier, Amsterdam.
11. J. F. Borel(1986), *Cyclosporin, Progress in Allergy*, (J.F. Borel, ed), **38**, 9, Karger, Basel.
12. H. Kobel and R. Traber(1982), *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **14**, 237.
13. M. Dreyfuss, E. Harri, H. Hofmann, H. Kobel, W. Pache, and H. Tscheter(1976), *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **3**, 125.
14. R. Zocher, T. Nihira, E. Paul, N. Madry, H. Peeters, H. Kleinkauf, and U. Keller (1986), *Biochemistry*, **25**, 550.
15. J. Dittmann, R. M. Wenger, H. Kleinkauf, and A. Lawen(1994), *J. Biol. Chem.*, **269**, 2841.
16. S. N. Agathos, J. W. Marshall, C. Moraiti, R. Parekh, and C. Madhosingh(1986), *J. Ind. Microbiol.*, **1**, 39.
17. A. Margaritis and P. S. Chahal(1989), *Biotechnol. Lett.*, **11**, 765.
18. J. Lee and S. N. Agathos(1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 513.
19. G. T. Chun, T. H. Lee, and Y. K. Chang (1996), *J. Korean Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 22.
20. D. K. Choi, W. S. Ryu, B. H. Chung, S. W. Nam, and Y. H. Park(1992), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2**, 102.
21. J. D. Bu'lock, D. Hamilton, M. A. Hulme, A. J. Powell, H. M. Smalley, D. Sheperd, and G. N. Smith(1965), *Can. J. Microb.*, **11**, 765.
22. J. D. Bu'lock(1975), *The Filamentous Fungi* (J.E. Smith and D.R. Berry eds), p. 33 Edward Arnold, London.
23. J. B. Walker(1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2397.
24. A. L. Demain(1992), *Secondary Metabolite: Their Function and Evolution*, Ciba Foundation Symposium **171**, pp. 3-23, John Wiley & Sons, NY.
25. W. Cruger and A. Cruger(1990), *Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology*, 2nd. ed., pp. 243-249, Sinauer Associates, MA.
26. J. Lee and S. N. Agathos(1989), *Biotechnol. Lett.*, **11**, 77.