

이차대사산물 생산을 위한 고정상세포 배양공정의 적용

전 계 택

강원대학교 자연과학대학 생명과학부

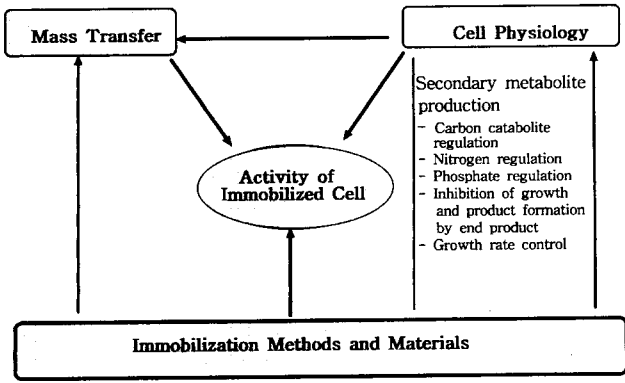
최근까지 고정상효소 또는 세포의 용용에 대한 연구는 유럽과 일본을 중심으로 주로 일차대사산물의 생산에 관한 연구에 초점이 맞추어져 왔으며 그 결과 다양한 고정상공정이 이미 산업화되었거나 연구과정에 있다[1, 2]. 고정상세포 배양공정에 대한 장단점 및 최근 연구 동향에 대해서는 많은 review 논문과 textbook에 잘 다루어져 있다[3-5]. 한편 최근에 항생제 및 관련 이차대사산물의 시장성이 점점 증가함에 따라[6], 다양한 이차대사산물 생산을 위해 고정상세포 배양공정을 적용하기 위한 연구가 시도되어 왔다[7-10].

이차대사산물 발효시 제한기질(carbon, nitrogen, phosphate)의 특성이 매우 중요하다고 알려져 있다[11]. 일반적으로 이차대사산물의 생합성은 쉽게 이용될 수 있는 carbon, nitrogen 또는 phosphate등이 배양액 내에 과도하게 존재하는 배양 초기 또는 지수기성장 단계에 catabolite repression 또는 inhibition 현상 때문에 방해받는다고 알려져 있다. Catabolic repression에 의한 이차대사산물 생합성 저해효과를 적절한 배양방법을 개발함으로써 극복하려는 노력이 시도되어 왔는데, 그 한가지 접근방식이 유가식배양 기술의 이용이다. 이차대사산물 생산에서 쉽게 이용되는 탄소원을 지속적 또는 간헐적으로 공급함으로써 배지중의 탄소원 농도를 이차대사산물 생산에 방해되지 않을 정도로 유지시켜 주는 배양방식이다. Squires[12]는 penicillin 생산에서 용존산소 농도의 측정을 통해 carbon source의 공급을 조절하는 생물공정을 개발하였다. 또한 Mou와 Cooney[13]는 penicillin 생산 발효에서 물질수지식을 통해 세포의 탄소요구량에 맞추어 탄소원을 공급하는 유가식배양 전략을 시도하였다. 또 다른 접근방식은 배양배지에 두가지 carbon source를 동시에 첨가해 주는 방식이다. 즉 세포성장을 좋게 하기 위해 쉽게 이용되는 carbon source를 넣어주고, 동시에 antibiotic 합성을 위해 천천히 이용되는 carbon source를 넣어준다. penicillin 발효에서, Jarvis와 Johnson[14]은 배지에 glucose와 lactose를 동시에 공급한 경우, 세포중식 단계인 trophophase에서는 glucose를 이용함으로써 세포가 빠르게 성장하였고, production phase인 idiophase에 도달하였을 때는 lactose를 이용함으로써 penicillin 생산과 함께 세포는 천천히 성장하였음을 보고하였다. 한편 고정상배양을 적용할 경우 고정상세포와 배지를 효과적으로 분리시킬 수 있으므로 연속배양

또는 "fill and draw" 배양법을 이용하여 세포성장과 이차대사산물 생산단계의 각각의 최적화가 가능하다. 즉 세포성장 단계 중에 고농도의 세포를 반응기 내에 축적시킨 후 공급되는 제한기질 농도의 제어를 통해 생산균주의 생리학적인 면을 이차대사산물 생합성에 바람직한 방향으로 유도시킬 수 있다. 이 경우 고농도 연속배양이므로 잔류 탄소원/질소원/인의 농도를 낮게 유지시킬 수 있어 유가식배양에서와 같이 효과적으로 catabolite repression 또는 inhibition 현상을 극복할 수 있을 뿐만 아니라, 이차대사산물의 생산성 증가에 매우 중요한 역할을 하는 activator, inducer, inhibitor 또는 precursor 등의 적정 공급전략 개발도 수월하게 이루어질 수 있다. 반면 연속현탁 배양공정의 경우 발효조 내에 고농도의 세포를 유지시킬 수 없으며(wash-out 현상), 따라서 배양액에서 수확된 이차대사물질의 농도가 매우 낮아 분리정제공정이 어려워져 경제성의 문제점이 제기될 수 있다.

대다수의 이차대사산물 생산균주인 actinomycetes(이중 특히 streptomycetes) 또는 균류(fungi)와 같은 균사형성 미생물의 경우, 현탁배양시 균사모양의 세포가 갖는 독특한 morphology로 인해 배양액의 점도가 상당히 증가함으로써 발효조 내에서의 물질전달 능력이 급속히 감소하는 특성을 갖는다. 이 경우 고정상배양법은 균사형의 생산균주를 고정화담체에 제한시킴으로써, extended mycelial growth를 compact particulate growth로의 변환을 가능하게 하며, 따라서 균사형성 균주의 morphology 및 배양액의 rheology를 인위적으로 조절할 수 있게 한다. 결과적으로 배양액의 점도를 낮춤으로써 생물반응기 내의 물질전달능력을 훨씬 증가시킬 수 있으며 특히 산소전달 계수의 뚜렷한 증가 현상은 이미 여러 문헌에서 보고된 바 있다[15-17]. 또한 고정상세포의 각 특징에 맞는 특수한 종류의 생물반응기, 예를 들면 bubble column reactor[18, 19], fluidized bed reactor[20], air-lift reactor[9], stirred tank reactor[21, 22]를 쉽사리 적용시킬 수 장점도 무시할 수 없다.

고정상세포를 이용한 이차대사산물 생산 발효공정의 경제성을 좌우하는 가장 중요한 요소는 고정상세포의 활성도이다. 이차대사 생합성 균주의 활성도에 영향을 미치는 주된 요소(즉 물질전달, 세포의 생리학적인 면, 고정화방법 및 고정상담체의 재질 등)들의 상관관계 및 각 주된 요소에 영향을 주는



Factors affecting mass transfer limitations

- Effective diffusion coefficient
- Bulk liquid concentrations
- Particle size and shape
- Reaction kinetics

Effect of cell physiology on the activity of immobilized cells

- Cell age and viability prior to and after immobilization
- Growth of immobilized and freely suspended cells
- Maintenance energy requirement
- Death and autolysis
- Switch in metabolism

Immobilization methods and materials on the activity of immobilized cells

- The toxicity of materials
- Permeability of carrier matrix to substrates and products
- Mechanical strength of carrier matrix (particle break-up)
- Compressibility and swelling
- Heat effects, e.g. heat of polymerization
- Strength of immobilization (cell leakage)

Fig. 1. Interrelationships of the major factors affecting the activity of immobilized cell systems.

세부사항을 Fig. 1에 도식적으로 설명하였다. 고정화배양의 다양한 장점에도 불구하고 산업적 적용은 현재 제한적으로 이루어지고 있는 실정인데, 그 이유는 고정화담체 내의 물질수지나 고정화된 균주의 생리학적 또는 형태학적 변화에서 기인된 시스템의 복잡성과 비균일성(heterogeneity) 때문으로 판단된다. 이들 중 반응기 내의 물질전달이나, 담체내의 전달저항 현상, 확산계수 등에 대해서는 화학공학의 불균일축매 분야의 지식을 이용하여 심도있게 연구되었으나[23, 24], 고정화에 의한 균주 특성 변화, 특히 이차대사산물 생합성 능력의 변화는 현재까지도 잘 이해되지 않고 있다. 이러한 요소를 규명하면서 이차대사산물 대량 생산을 위한 고정상공정 개발에 관한 연구가 지난 10년 여에 걸쳐 꾸준히 진행되어 왔는데, 본 고에서는 각각의 주된 요소에 대한 세부사항과 최근의 연구동향에 관해 고찰하고자 한다.

고정상배양시스템에서의 물질전달과 고정화방법

담체내에서 고정화세포가 이용하는 기질의 농도는 기질이 고정화세포에 도달하게 될 때까지 겪게되는 다양한 물질전달 저항 현상으로 인해 bulk 또는 external phase의 기질농도와 매우 다르다. Fig. 2에 고정상배양 시스템에서 물질전달 기작 중 생물산업

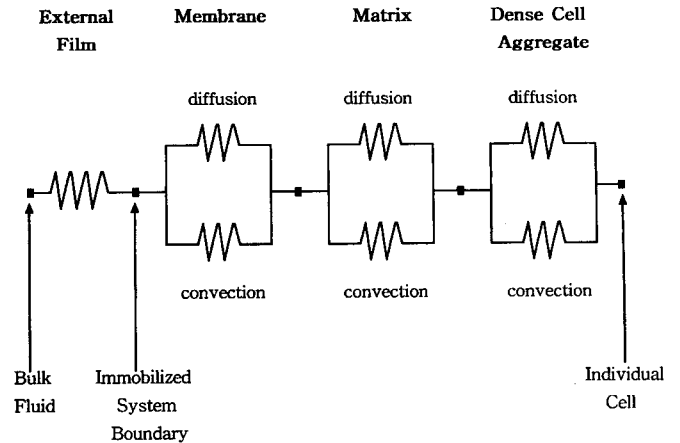


Fig. 2. Mass transfer limitations in immobilised cell systems.

의 직렬적 또는 병렬적으로 가능한 모든 저항을 나타내었다. 일반적으로 반응기 운전조작에 의해 dense cell aggregate에서의 저항현상을 제외한 대부분의 전달저항 현상은 무시될 수 있다(well-mixed bioreactor operation). 또한 대부분의 이차대사산물 생산균주인 균사형성 균체의 경우 convection까지 무시될 수 있으므로 담체내의 cell aggregate에서의 확산저항현상 규명이 가장 중요시 된다. 이를 위해 흔히 이용되는 방법인 다공성담체에 세포를 고정화할 경우, 담체내로의 물질전달에 영향을 줄 수 있는 확산계수, 입자크기, 입자의 균체부하 능력, 배지내의 기질농도, 그리고 고정상균주의 속도론적 매개변수 (μ_{max} , K_m) 등이 고려되어야 한다[24].

담체내 균일한 균체분포와 담체내로의 기질(주로 탄소원 또는 산소)의 공급이 효율적으로 이루어지기 위해서는 적절한 담체크기의 결정이 필수적이며, 이 때 불균일시스템(heterogeneous system)의 특성을 나타내는 효율인자(η) (effectiveness factor)와 담체중심에서의 기질농도 등이 그 척도로 이용될 수 있다[25]. 즉 입자의 크기가 커질수록 또한 부하균체의 농도가 높을수록 확산저항으로 인해 입자내부와 액체배지내의 기질농도가 크게 차이가 나게 되어 전체적인 반응속도나 효율이 떨어지게 되므로 고정상배양시 반드시 이러한 기질확산 저항 현상을 고려해야 한다. Table 1은 고정상배양에 의한 면역억제제 cyclosporin A 생산시 유효확산계수와 celite 고정화담체의 입자크기에 따른 고정화 *T. inflatum* (균사형성 곰팡이) 입자의 Thiele modulus, 효율인자와 담체중심에서의 기질(glucose)농도를 규정화기질농도로 나타낸 것이다[26]. 효율인자 또는 담체중양에서의 기질농도는 담체내부의 균체 lysis의 방비라는 측면에서 매우 중요한데 만일 균체가 활성을 유지하기 위해 필요한 최소의 기질농도 이상으로 담체 중앙의 농도가 유지된다면 전체 담체에서 거의 균일하게 균체가 자란다고 볼 수 있다. 담체크기가 커질수록 그리고 유효확산계수가 감소할수록 담체중앙의 규정화기질농도는 작아짐을 알 수 있다. 이는 열

Table 1. Effects of bead size and diffusion coefficient on the performance on the immobilized *Tolypocladium inflatum* cells. ($X^{sat}=0.5$ g DCW/g celite, $K_m=13.2$ g/l, $\mu_m=0.0757$ hr⁻¹ and $Y_{x/s}=0.35$ g DCW/g glucose)

Radius (cm)	De=6.9 × 10 ⁻⁶ (cm ² /s)			De=4.83 × 10 ⁻⁶ (cm ² /s)			De=3.45 × 10 ⁻⁶ (cm ² /s)			De=2.07 × 10 ⁻⁶ (cm ² /s)			De=0.69 × 10 ⁻⁶ (cm ² /s)		
	φ	η	S ₀ /S ₁	φ	η	S ₀ /S ₁	φ	η	S ₀ /S ₁	φ	η	S ₀ /S ₁	φ	η	S ₀ /S ₁
0.01	0.13	1.00	0.997	0.16	1.00	0.996	0.19	1.00	0.994	0.24	1.00	0.991	0.41	0.99	0.972
0.03	0.39	0.99	0.975	0.47	0.99	0.964	0.56	0.98	0.950	0.72	0.97	0.919	1.24	0.91	0.783
0.05	0.66	0.97	0.932	0.78	0.96	0.905	0.93	0.95	0.870	1.20	0.92	0.796	2.07	0.80	0.531
0.10	1.31	0.90	0.762	1.57	0.87	0.684	1.85	0.83	0.596	2.40	0.75	0.441	4.14	0.55	0.132
0.20	2.62	0.72	0.384	3.13	0.66	0.274	3.70	0.59	0.183	4.78	0.50	0.080	8.28	0.32	0.004
0.30	3.93	0.57	0.154	4.70	0.50	0.086	5.56	0.44	0.043	7.17	0.36	0.011	12.4	0.22	0.000
0.50	6.55	0.39	0.019	7.83	0.33	0.006	9.26	0.29	0.002	12.0	0.23	0.000	20.7	0.14	0.000

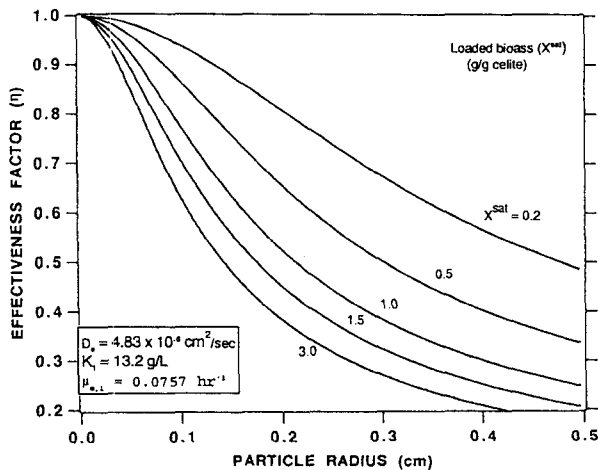


Fig. 3. Relationship between effectiveness factor and particle radius with varying immobilized biomass density for $D_e=4.83 \times 10^{-6}$ cm²/sec $K_s=13.2$ g/L, $\mu_m=0.0757$ hr⁻¹ and $Y_{x/s}=0.35$ g DCW/g glucose.

약한 배양조건의 경우 담체 내부의 균체밀도가 표면에서보다 낮아져서 담체에서 자라는 균체의 비균일한 분포를 야기한다는 것을 의미한다[26].

담체의 크기 뿐만 아니라 부하된 균체밀도 역시 고정화공정에서 전체 효율인자에 영향을 미치는 주요 요소이다. Fig. 3은 삼기 배양시스템에서 균체부하량과 담체크기입자에 따른 효율인자를 나타내 것이다. 균체부하량이 증가할수록 효율인자 값이 급격하게 감소함을 알 수 있다. 이는 균체부하량의 증가로 인한 반응기당 생산성은 증가하지만 효율인자의 감소로 인하여 고정화균체의 활성의 지속적 유지가 어렵게 되므로 최적 균체부하는 이러한 두가지 현상을 동시에 고려해서 결정되어야 함을 제시하는 결과이다[26]. 결론적으로 일단 원하는 담체 크기와 효율인자를 정하면 유지해주어야 하는 균체부하의 농도를 전산모사로 예측하여 고정상세포 배양공정을 운영하여야 함을 알 수 있다.

또한 고정상배양 시스템의 성공적인 운영은 고정화방법 및 담체의 고정화특성에 의해 좌우된다. 각각의 고정상배양의 종

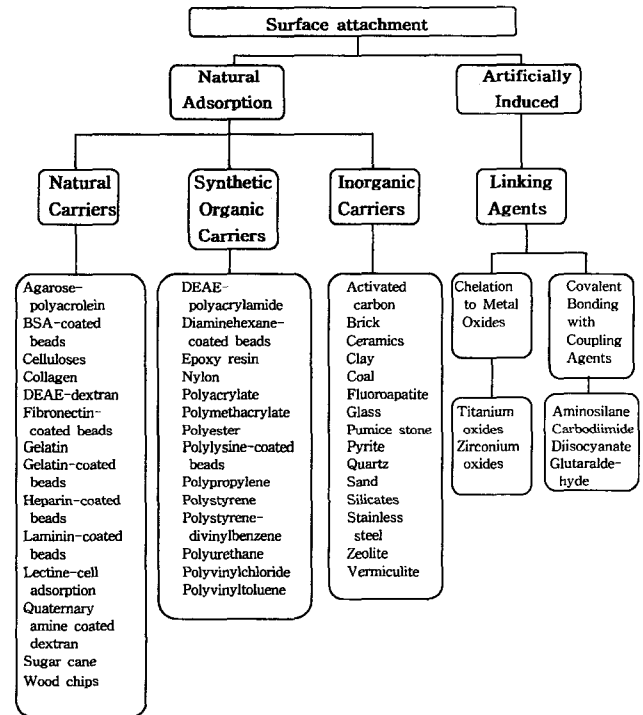


Fig. 4. Immobilization by surface attachment.

류에 따라 사용되는 담체에 대해 요구되는 특성도 달라지나 공통적으로 요구되는 특성을 요약하면 다음과 같다: 높은 균체부하 능력, 배지의 접근성 용이, 간단하며 비독성의 세포 고정화 절차, 높은 부피당 표면적 비율, bulk 배지에서 담체중심까지의 적정한 물질전달 거리, 기계적 강도 유지, 배지로부터 담체와 세포 분리의 용이성, 기존의 발효조에서도 사용 가능, 합리적인 담체 가격 등[27]. 세포고정화 방법은 크게 attachment to a surface, entrapment within a porous matrix, containment behind a barrier, self-aggregation[28]로 분류될 수 있으나, 이차대사산물 생산을 위한 고정화방법은 주로 surface attachment 또는 pore entrapment 방법을 사용해 왔다. Fig. 4와 5에 이 두가지의 고정화방법에 사용되는 담체의 재질 및 종류에 대해 설명하였다[27].

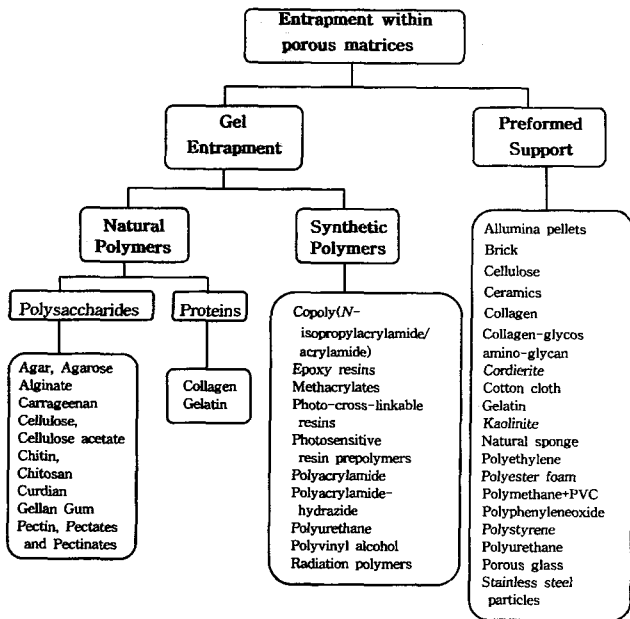


Fig. 5. Immobilization by entrapment in porous matrices.

고정상세포를 이용한 이차대사산물 발효공정 개발 동향

대부분의 이차대사산물 생산 발효에서 이차대사산물의 생합성은 활동적인 세포생장이 끝날 무렵에 시작된다(non-growth associated production mode). 이러한 특성으로 인해 이차대사산물의 생산시 기존의 연속현탁배양 공정을 적용할 경우 늦은 세포증식 속도로 인해 연속배양이 시작되자마자 wash-out 현상이 나타나게 된다[29]. 한편 현탁 유가식배양공정(suspended fed-batch cell culture)을 적용할 경우 생산단계에서 배지공급을 조절할 수 있으나, 균사형성 미생물일 경우 발효배양액의 고점도 현상 및 non-Newtonian 특성으로 인한 물질전달속도의 급격한 감소 현상과 상대적으로 짧은 생산기간 등의 단점이 있을 수 있다. 현탁회분식 또는 연속배양에서 나타나는 이러한 주된 문제점 및 비효율성은 고정상 연속배양공정을 적용시킴으로써 해결될 수 있다. 특히 non-growth associated mode로 생합성되는 항생제의 경우 고정상배양은 생산균주의 specific growth rate와 반응기의 희석속도(dilution rate)를 서로 분리시켜 생각할 수(decouple) 있으므로 고정상 배양공정의 이점이 한층 뚜렷해진다. 즉 반연속 또는 연속배양의 생산단계에서 특정 배지성분을 공급하지 않거나, 제한적으로 공급함으로써 세포생장 단계와 이차대사산물의 생합성 단계를 분리시키기 위한 다양한 고정상배양법이 시도되어 왔다. 이는 고정상배양에 의한 이차대사물 생산시 매우 높은 희석속도에서도 비성장의 또는 저성장의 생산균주를 생물반응기 내에 유지시킬 수 있기 때문에 가능하다. 한 예로 Dalili와

생물산업

Chau[8]는 air-lift fermentor에 의한 *S. parvullus*의 고정상 연속 배양에서 catabolite repression현상을 극복하기 위해 매우 제한된 성분의 배지(starvation medium)를 공급함으로써 actinomycin D의 생산성이 증가하였음을 보고하였다. 또한 Berk[30] 등은 fluidized-bed reactor를 이용한 고정상 *P. urticae*의 반연속 또는 연속배양에서 질소원의 농도를 제한시킴으로써 세포성장 속도를 낮은 수준으로 유지(0.05 g/l의 yeast extract 공급)시키는 것이 생산균체의 patulin 생합성 능력을 연장시키는 주요한 요소라고 밝혔다. 그러나 질소원이 완전히 결핍된 배지를 공급할 때 patulin의 생산성은 점차로 감소되는 것으로 나타났다[31]. Phosphate가 제한된 배지를 공급함으로써 penicillin과 candidin 생산균체의 생합성 능력을 향상시킨 결과도 발표되었다. Fluidized-bed reactor를 이용한 반복식유가배양(repeated fed-batch culture)에서 고정상 *P. chrysogenum*의 세포증식을 조절하기 위해 morphology의 정밀 관찰과 함께 배지중의 phosphate를 제한시킨 결과 penicillin의 생산량이 큰 폭으로 증가하였다[32]. 또한 Constantinides와 Mehta[33]는 특별히 제작된 bubble column reactor에서 고정상 *S. griseus*에 의한 candidin 연속생산시 강제적으로 phosphate 농도를 반복 제한시킨 결과(operation with forced periodic cycling of growth limiting nutrient, phosphate), candidin의 생산량이 증가하였을 뿐만 아니라 고정상생산균주의 생합성 능력이 장기간 지속되었다고 발표하였다. 이들은 고정상세포의 성장과 candidin 생합성에 대한 model식을 세운 뒤 이를 이용하여 다양한 기질의 제한 조건시 생물반응기의 수행 능력에 관한 흥미로운 연구 결과도 제시하였다.

이차대사산물 생산균주(주로 fungi, actinomycetes 중의 streptomycetes, Bacillus)의 고정화는 대부분 성장단계 중에 spore를 형성하는 균주의 독특한 생리학적 특성을 이용해서 이루어진다[3]. 즉 vegetative cell로부터 수확된 생산균주의 spore를 고정상담체의 다공성의 network에 고정화시키면 고정상세포로 발아하여 이차대사산물 생합성에 관여하게 된다. 이러한 접근법의 이점은 성장단계 또는 생산단계의 세포를 고정화시킬 때의 어려운 점을 겪지 않아도 된다는 점이다. Deo와 Gaucher[34]는 이러한 방법으로 *P. chrysogenum*의 conidiospore를 κ-carrageenan 담체에 고정화시킨 결과, fluidized-bed reactor를 이용한 반연속배양(replacement culture)과 연속배양에서 고정상배양이 현탁배양에 비해 penicillin 생합성의 half-life가 9배나 증가하였다고 보고하였다. 이들은 또한 같은 방법으로 *P. urticae*를 고정화시킨 후 질소 결핍 배지에서 semi-continuous shake flask배양시 patulin 생산의 half-life가 3-4일에서 16일로 증가하였음을 관찰하였다[35]. 최근 oxytetracycline(OTC) 생산을 위한 periodic batch culture에서 *S. rimosus*의 spore 또는 1일이 경과한 vegetative cell을 inoculum으로 이용한 고정상배양 결과, 고정상세포는 40일이 경과할 때까지

OTC의 생합성이 계속된 반면 현탁세포는 28일이 경과하자 생합성이 완전히 멈춘 것으로 나타났다[36].

다양한 배지공급 전략으로 연속배양 또는 반연속배양이 쉽게 수행될 수 있는 고정상배양 공정의 이점은 최근 그 derivative의 우수한 광범위 항생 특징으로 인해 시장성이 커진 thienamycin을 생산하는데 특별히 중요하다. 왜냐하면 thienamycin은 배지 중의 성분 또는 발효중에 생산된 대사물과 매우 민감하게 반응하여 분해되는 성질이 있기 때문이다[18]. Baker[37] 등은 celite담체에 고정화된 *S. cattleya*의 thienamycin 발효에서 6달 이상 생산균주의 thienamycin 생합성 능력이 지속되었다고 보고하였다. 또한 Acuri[18] 등은 10 liter bubble column reactor에서 *S. cattleya*의 고정화로 인한 배양액의 적도 감소현상이 thienamycin 생산성 증가에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 그리고 total medium change-over 전략(세포 성장배지에서 합성생산배지로, 그후 복합생산배지로의 배지 교환)을 채택한 결과 담체내에 활성 높은 세포부하량의 증가로 인해 thienamycin의 부피생산성이 증가하였음도 보고하였다[7]. 한편 이차대사산물의 고정상발효에서 pilot-scale에 대한 결과는 그다지 많지 않은 것으로 파악되었다. 한 예로 Wang[38] 등에 의해 200 liter pilot-scale tower fermentor에서 celite 담체에 고정화된 *P. chrysogenum*을 이용하여 유가식배양법에 의한 penicillin의 생산이 시도되었다. 이들은 배지로부터 쉽게 분리되는 고정상세포의 특성을 이용해서, 배양 중간이 수거된 배양액을 새로운 배지로 교체함으로써 penicillin 생산기간을 2주까지 연장시킬 수 있었으며, 또한 현저하게 증가된 산소전달계수로 인해 낮은 통기량에서도 penicillin 생산량이 높았다고 보고하였다. Keshavarz[9] 등도 역시 celite담체를 사용해서 250-320 liter 조업부피의 air-lift fermentor를 이용하여 *P. chrysogenum*에 의한 pilot-scale penicillin 생산공정을 연구하였다. 또한 이들은 매우 최근에 penicillin 생산을 위한 고정상배양용 air-lift fermentor의 scale-up 설계시 고려해야 할 각종 문제점들에 대해서도 고찰한 바 있다[39].

한편 본 연구실에서는 지난 수년간에 걸쳐 균사형성 곰팡이의 세포내에 축적되는 이차대사산물(intracellularly produced secondary metabolite)을 연속생산하기 위한 시도로서 고정상세포를 이용하는 perfusion 연속배양시스템(Immobilized Perfusion Reactor System, IPRS)을 면역억제제인 cyclosporin A (CyA)생산에 적용해 왔다. 고정상세포에 의한 세포의 분비 이차대사산물(extracellularly produced secondary metabolite) 연속생산 공정의 경우, 고정상균체의 과도성장(overgrowth) 및 이로 인해 담체로부터 이탈되는 유리세포는 연속공정 운영중 발생하는 각종 문제점으로 인해 방해요소로 작용하므로[18, 35, 40], 고정상균체로부터 유리세포가 이탈되는 현상을 방지하기 위한 다양한 공정운영 전략을 시도해 왔다[9, 34]. 반면에 IPRS공정은 이차대사산물이 세포내에 축적됨으로써 발생하는

공정개발상의 어려움을 극복하기 위해 고밀도 고정상균체에서 이탈, 분리되어 IPRS의 출류(outlet stream)상에서 수확되는 고활성의 유리세포를 이차대사물 연속생산을 위해 이용하는 시스템이다. CyA 생산균주인 *T. inflatum*을 celite담체에 고정화하여 IPRS를 수행한 결과, stirred-tank 반응기 내에 유지된 고밀도(약 50 g/l)의 고정상균체는 매우 높은 회석속도에서도 유리세포를 생산해내는 세포생성기의 역할을 훌륭하게 수행했으며, 연속적으로 수확되는 고농도의 CyA 함유 유리세포를 CyA를 연속생산하는데 이용할 수 있었다[21, 41]. 이러한 IPRS공정 운영은 고정상균체를 배양액으로부터 효율적으로 분리시키는 decanting column의 개발로 가능했으며[41], 이로 인해 기존의 연속현탁배양에서 문제시되었던 높은 회석속도에서의 wash-out현상이 극복될 수 있었다. 또한 유출되는 유리세포의 morphology를 원형의 conidiospore나 잘게 부서진 mycelial cell로 구성되어 배양액의 rheology가 뉴튼유체화될 수 있도록 IPRS 공정을 운영함으로써, 기존의 균사형성 미생물의 현탁배양시 나타나는 배양액에서의 물질전달 감소현상이 뚜렷하게 개선됨을 관찰할 수 있었다[21]. Fig. 6은 IPRS의 다양한 담체농도(ρ_B)에서 회석속도에 따른 CyA의 생산성(volumetric productivity, Q_p , mg CyA/liter/hour)를 모사한 결과이다[42]. 기존의 연속현탁배양의 경우 낮은 회석속도인 0.03 hr⁻¹에서 급격히 wash-out 현상이 발생하나, IPRS의 경우 매우 높은 회석속도에서도 이러한 현상이 생겨나지 않기 때문에 이로 인한 CyA 생산성 증가 효과는 실로 막대한 것으로 나타났다. 특히 0.2 hr⁻¹보다 빠른 범위의 회석속도에서 CyA의 생산성이 반응기내의 고정상담체 농도에 의해 보다 영향을 받는 결과는, 실제 이러한 조건으로 반응기의 운전이 용이하게 이

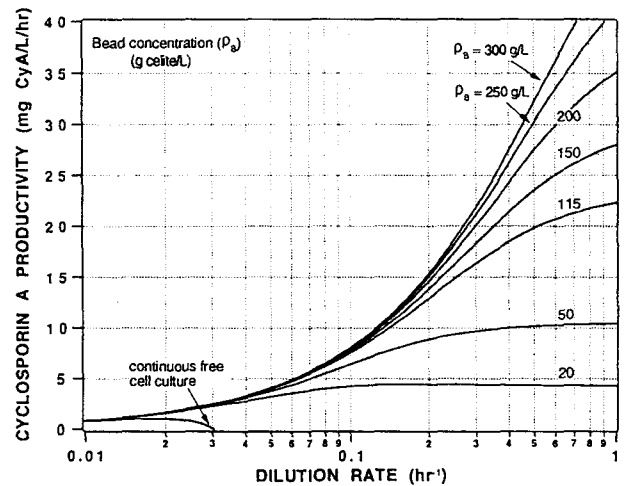


Fig. 6. Perfused CyA productivity as a function of dilution rate with varying bead concentrations in IPRS for $X_{11}^{aq}=0.5$ g DCW/g celite, $S_m=30$ g/L, $\rho_p=0.52$ g/mL, $K_1=13.2$ g/L, $\mu_{m,1}=0.0757$ hr⁻¹, $K_2=27.5$ g/L, $\mu_{m,2}=0.0583$ hr⁻¹, $\alpha_1=8.0$ mg CyA/g cell, $\alpha_2=9.5$ mg CyA/g cell and $Y_{x/s}=0.35$ g DCW/g glucose.

투어질 수 있다는 점에 비추어 볼 때 주목할 만하다. 한편 CyA가 세포내 이차대사물이라는 점을 감안할 때 생산균주의 생리학적인 면을 최대한으로 이용하기 위해서는 높은 회색속도에서 고농도의 균체를 생산함과 동시에 활성높은 균체를 효과적으로 숙성시켜 이들이 고농도의 CyA를 함유케하는 공정운전 전략이 효과적일 것이다. 이를 위해서 고정상배양과 현탁배양을 직렬로 혼합한 이단연속배양공정, 즉 일단계배양기에서 고정상균체를 세포생성기로 이용하여 고농도의 유리세포를 이 단계배양기로 공급하고, 이 단계배양기에서는 현탁배양에 의해 효과적인 CyA 생산조건을 제공하는 공정을 본 연구그룹에서 연구중에 있다[43].

결 언

고정상세포를 이용하여 이차대사산물을 생산하기 위한 시도는 기존의 회분식배양과 비교할 때 다양한 장점이 있음에도 불구하고 고정상배양의 산업적 적용은 여전히 연구 단계에 머물러 있다. 이는 고정상배양에서 주로 채택하는 연속배양시장기간의 운전중에 발생할 수 있는 오염에 대한 우려, 또는 고정화담체내의 물질수지나 고정화된 균주의 생리학적 변화에서 기인한 시스템의 복잡성과 비균일성(heterogeneity) 등에 대한 근본적인 이해가 아직 미흡하기 때문인 것으로 판단된다. 또한 산업체에서 이미 현탁배양에 맞춰 설정된 발효조건을 고정화배양 공정으로 전환하는데는 막대한 투자비와 운영비가 소요되는 것도 한 원인이 될 것이다. 최근에 항생제 및 관련 이차대사산물의 시장성이 점점 증가함에 따라 이차대사산물 생산시 공정개발의 중요성이 더욱 강조되고 있으며, 이 경우 경제적인 고정상배양공정의 적용은 매력적이 될 것이다. 특히 고정상연속공정의 적용은 기존의 회분식 현탁배양공정에서 필수적이기는 하나 유효산물의 생산성에는 기여하지 못하는 때 batch당의 cycle time(즉 발효조 refill에 걸리는 시간, 세척 시간, 멸균시간, 냉각시간, re-inoculation공정에 걸리는 시간 등)을 불필요하게 함으로써 공정개선을 통한 뚜렷한 생산성 향상을 이룰 수 있을 것으로 보인다. 또한 고정상배양시 이차대사균주의 활성도에 영향을 미치는 주된 요소(즉 물질전달, 세포의 생리학적인 면, 고정화방법 및 고정상담체의 재질 등)에 대한 면밀한 연구를 통해 고정상세포의 생리학적 특성이 규명될 때 고정상배양공정은 기존의 회분식 또는 유가식 현탁배양공정의 대체공정으로 자리잡을 수 있을 것이다.

SYMBOLS

D	dilution rate (1/hr)
DCW	Dry Cell Weight (g/liter)
De	Effective diffusivity of glucose (cm ² /s)
IPRS	Immobilized Perfusion Reactor System

생물산업

K ₁	Monod equation constant for glucose in immobilized cells (g/liter)
K _m	Same symbol as K ₁
K ₂	Monod equation constant for glucose in free cells (g/liter)
Q _p	Volumetric productivity of CyA by released-free cells (mg CyA/liter/hr)
R	Radius of biosupport particle (cm)
S ₀	Glucose concentration at the center of biosupport (g/liter)
S ₁	Glucose concentration in bulk (g/liter)
S _{in}	Glucose concentration in the inlet liquid phase (g/liter)
X ₁ ^{sat}	Biosupport cell loading capacity (g DCW/g biosupport)
X ^{sat}	Same symbol as X ₁ ^{sat}
Y _{x/s}	Glucose yield for cell mass (g DCW/g glucose)

Greek Letters

α ₁	Growth-associated product constant for immobilized cells (mg CyA/g DCW)
α ₂	Growth-associated product constant for free cells (mg CyA/g DCW)
ψ	Thiele modulus defined as R (v _{max} /D _e K ₁) ^{1/2}
v _{max}	Maximum glucose uptake rate for immobilized cells (g glucos/liter/hr)
η	Effectiveness factor
μ _{m,1}	Maximum specific growth rate of immobilized cells (1/hr)
μ _{m,2}	Maximum specific growth rate of free cells (1/hr)
μ _m	same symbol as μ _{m,1}
ρ _B	Bead concentration (g biosupports/liter of reactor working volume)
ρ _p	Density of biosupport particle (g/cm ³)

참고문헌

1. T. Shibatani. 1996. In *Immobilized Cells: Basics and Applications*, R. H. Wijffels, R. M. Buitelaar, C. Bucke, and J. Tramper, editors, pp. 585–591, Elsevier, Amsterdam.
2. C. M. Mark, V. Loosdrecht, and J. J. Heijnen. 1996. In *Immobilized Living Cell Systems, Modelling and Experimental Methods*, R. G. Willaert, G. V. Baron, and L. D. Backer, editors, pp. 255–271, Johan Wiley & Sons, New York.
3. I. Karube, S. Suzuki, and E. J. Vandamme. 1984. In *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, E. J. Vandamme, editor, pp. 761–789, Marcel Dekker, New York.
4. J. Klein and K. D. Vorlop. 1985. In *Comprehensive Biotechnology. The Principles, Applications & Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*, vol. 2, *The Principles of Biotechnology: Engineering Considerations*, M. Moo-Young and A.E. Humphrey, editors, pp. 203

- 224, Pergamon Press, New York.
5. I. A. Veliky, and R. C. J. Mclean. 1994. *Immobilized Biosystems*. Blackie Academic, London.
 6. B. C. Buckland. 1992. In *Harnessing Biotechnology for the 21st Century*, M. R. Ladisch, and A. Bose, editors, pp. 215–218, American Chemical Society, Washington, DC.
 7. E. J. Arcuri, G. Slaff, and R. Greasham. 1986. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**: 842.
 8. M. Dalili and P. C. Chau. 1988. *Biotechnol. Lett.*, **10**: 331.
 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, Y. K. Chang, J. Lee, and S. N. Agathos. 1996. In *Immobilized Cells: Basics and Applications*, R. H. Wijffels, R. M. Buitelaar, C. Bucke, and J. Tramper, editors, pp. 402–409, Elsevier, Amsterdam.
 11. A. L. Demain. 1992. In *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*, Ciba Foundation Symposium 171, pp. 3–23, John Wiley & Sons, New York.
 12. R. W. Squires. 1972. *Dev. Ind. Microbiol.*, **13**: 128.
 13. D. G. Mou, and C. L. Cooney. 1983. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**: 257.
 14. F. M. Jarvis and M. J. Johnson. 1947. *J. Am. Chem. Soc.*, **69**: 3010.
 15. K. Gbewonyo, D. Dimasi, and B. C. Buckland. 1987. In *Biotechnology Processes. Scale-up and Mixing*, C. S. Ho and J. Y. Oldshue, editors, pp. 128–134, American Institute of Chemical Engineers, New York.
 16. K. Gbewonyo, and D. I. C. Wang. 1983. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**: 2873.
 17. G.-T. Chun. 1994. *Korean J. biotechnol. Bioeng.*, **9**: 211.
 18. E. J. Arcuri, J. R. Nichols, T. S. Brix, V. G. Santamarina, B. C. Buckland, and S. W. Drew. 1983. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**: 2399.
 19. K. Gbewonyo, and D. I. C. Wang. 1983b. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**: 2873.
 20. J. H. Kim, D. K. Oh, Y. K. Park, Y. H. Park, and D. A. Wallis. 1986. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**: 1838.
 21. T. H. Lee, G.-T. Chun, and Y. K. Chang. 1997. *Biotechnol. Progress*, **13**: 546.
 22. G. V. Baron, R. G. Willaert, and L. D. Backer. 1996. In *Immobilized Living Cell Systems, Modelling and Experimental Methods*, R. G. Willaert, G. V. Baron, and L. D. Backer, editors, pp. 67–95, Johan Wiley& Sons, New York.
 23. B. Atkinson, and F. Mavituna. 1983. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. 1st ed., Macmillan Publishers Ltd. The Nature Press, Suffolk-England, Chapter 8.
 24. J. E. Bailey, and D. F. Ollis. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd ed., pp. 457–532, McGraw-Hill, New York.
 25. M. L. Shuler, and F. Kargi. 1992. *Bioprocess Engineering, Basic Concepts*. p. 83, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ
 26. G.-T. Chun, T. H. Lee, and Y. K. Chang. 1996. *Korean J. biotechnol. Bioeng.*, **11**: 30.
 27. R. G. Willaert, and G. V. Baron. 1996. In *Immobilized Living Cell Systems, Modelling and Experimental Methods*, R. G. Willaert, G. V. Baron, and L. D. Backer, editors, pp. 1–17, Johan Wiley& Sons, New York.
 28. S. F. Karel, S. B. Libicki, and C. R. Robertson. 1985. *Chem. Eng. Sci.*, **40**:1321.
 29. P. F. Stanbury, A. Whitaker, and S. J. Hall. 1995. *Principles of Fermentation Technology*, 2nd ed, pp. 13–33, Pergamon, London.
 30. D. Berk, L. A. Behie, A. Jones, B. H. Lesser, and G. M. Gaucher. 1984. *Can. J. Chem. Eng.*, **62**: 112.
 31. A. Jones, D. Berk, B. H. Lesser, L. A. Behie, and G. M. Gaucher. 1983. *Biotechnol. Lett.*, **5**: 785.
 32. D. K. Oh, C. K. Hyun, J. H. Kim, and Y. H. Park. 1983. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**: 569.
 33. A. Constantinides and N. Mehta. 1991. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**: 1010.
 34. Y. M. Deo and G. M. Gaucher. 1984. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**: 285.
 35. Y. M. Deo and G. M. Gaucher. 1983. *Biotechnol. Lett.*, **5**: 125.
 36. H. A. El-Enshasy, M. A. Farid, and A. I. El-Diwany. 1996. In *Immobilized Cells: Basics and Applications*, R. H. Wijffels, R. M. Buitelaar, C. Bucke, and J. Tramper, editors, pp. 437–443, Elsevier, Amsterdam.
 37. E. E. Baker, R. J. Prevoznak, S. W. Drew, and B. C. Buckland. 1982. *Dev. Ind. Microbiol.*, **24**: 467.
 38. D. I. C. Wang, J. Meier, and K. Yokoyama. 1984. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **9**: 105.
 39. T. Keshavarz, C. Bucke, and M. D. Lilly. 1996. In *Immobilized Cells: Basics and Applications*, R. H. Wijffels, R. M. Buitelaar, C. Bucke, and J. Tramper, editors, pp. 505–510, Elsevier, Amsterdam.
 40. M. Ogaki, K. Sonomoto, H. Nakajima, and A. Tanaka. 1986. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**: 6.
 41. T. H. Lee, S. K. Park, Y. K. Chang, and G.-T. Chun. 1996. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**: 717.
 42. G. -T. Chun, and S. N. Agathos. 1998. *Biotechnol. Bioeng.*, submitted.
 43. T. H. Lee, Y. K. Chang, and G.-T. Chun. 1997. Cyclosporin A production using immobilized fungus, *Tolypocladium inflatum*, in two stage continuous process. *Biochemical Engineering X*, Kananaskis, Canada, May 18-23.