

디프테리아 toxin 생산을 위한 발효조건 최적화

조 민 · 유 연 우

아주대학교 공과대학 화학생물공학부
(접수 : 1999. 3. 4., 게재승인 : 1999. 4. 1.)

Optimization of Culture Conditions for the Production of Diphtheria Toxin

Min Cho and Yeon Woo Ryu†

Division of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 442-744, Korea
(Received : 1999. 3. 4., Accepted : 1999. 4. 1.)

Experimental studies were carried out to optimize the culture conditions of *Corynebacterium diphtheriae* for the production of diphtheria toxin. A new media which does not contain any meat digest products was selected. The main ingredient of new medium was enzymatic digests of casein known as NZ-Case. In fermenter experiments, the toxin production was increased with the increase of cell growth. The optimum initial pH of media, air flow rate and agitation speed were 7.0, 0.22 vvm and 400 rpm, respectively. The contents of iron and calcium-phosphate precipitate were important for maximal cell growth and toxin production. The optimum concentration of iron was 0.3 mg/L and calcium-phosphate precipitate could serve in gradual supply of iron to maintain the optimal culture condition which is required for enhanced yield of toxin production. In potency test, the potency of toxoid from fermentor culture was higher than that from static culture. When diphtheria toxin is produced by fermentor culture, it is possible to produce higher levels of toxin and better toxoid quality in terms of safety, yield, productivity and immunity.

Key words : *Corynebacterium diphtheriae*, diphtheria toxin, fermenter culture, iron content, potency test

서 론

디프테리아는 그람양성 간균인 *Corynebacterium diphtheriae*에 의해 발생하는 세균성 호흡기 질병이다(1). 오래 전부터 이 질병에 대한 능동면역의 방법으로 *C. diphtheriae*가 생산하는 exo-toxin을 불활성화 시킨 toxoid 백신을 사용하여 왔으며 디프테리아 toxin을 보다 효율적으로 얻기 위한 배지의 개발과 배양방법에 관한 연구가 많이 진행되어 왔다(2)

일반적으로 디프테리아 toxin을 대량 생산하기 위해 beef muscle을 효소로 가수분해시킨 것이 가장 적합한 배지로 알려져 있다 즉 이 배지를 이용한 48시간 배양에서 200 Lt (Limit of Flocculation) 이상의 toxin 생산이 가능한 것으로 보고되어 있으나 값이 비싸고 beef-sensitizing antigen이 함유되어 있는 치명적인 약점이 있다(3). 반면 casein을 효소로 가수분해시킨 것을 배지로 이용할 경우에는 불순물이 antigen으로 작용하는 위험이 없으며 toxin의 대량 생산에도 적합하므로 배지로서 많은 연구가 되고 있다. Stainer(4)는 casein이 갖고 있지 않은 inorganic phosphate를 첨가해주고 CaCl₂를 투여하여 배지에 calcium-phosphate의 침전을 생성시킬 경우 높은 농도의 toxin

생성이 가능하다고 보고하였다. 또한 디프테리아 toxin은 iron이 배지에서 고갈되었을 때 *C. diphtheriae*에 의해 분비된다(5) Calcium-phosphate 침전이 일어나기 전에 필요한 양의 iron이 충분히 존재하는 것이 중요하며 calcium-phosphate 침전이 일어날 때 침전물 내에 iron이 고정되어 배양기간 동안 서서히 방출됨으로서 배지 내에 iron 이온의 농도가 배양기간 내내 적정하게 유지될 경우 높은 농도의 toxin 생산이 가능하다고 보고되어 있다(4)

*C. diphtheriae*의 배양배지를 위한 탄소원으로는 일반적으로 maltose가 이용되는데, 이는 탄소원에 의한 성장 제한조건이 오랫동안 유지되도록 해주어서 toxin의 생성기간을 연장시키기 때문이다(6). 따라서 maltose가 glucose 보다 toxin 생산에 유리하다(7). 이처럼 탄소원에 의한 성장 제한조건은 높은 수율의 toxin 생산에 중요한 요인이 되며, 실제로 Righelato(8) 등은 glucose 제한조건에서의 성장에서는 toxin 생성량이 0.3 g-toxin/g-bacterial protein으로서 glucose 과다조건에서 보다 toxin 생성량이 5배 증가하였다고 보고하였다. *C. diphtheriae*의 배양기간 중에 pH는 생성되는 대사산물과 통기조건에 의해 결정되는 것으로 알려져 있다(9). 배지 내에 존재하는 maltose는 glucose로 분해되어 대사과정에 의해 propionic acid, formic acid, acetic acid 등의 유기산으로 전환되기 때문에 pH는 배양 초기에 떨어지고 그 후 유기산이 carbonic acid와 물로 전환되는 oxidative metabolism에 의해 pH는 다시 증가한다. 이와 같은 pH의 복귀는 toxin 생성에 요구되는 대사과정이다. 또한 배양 중에 pH 값은 배지 내 산소전달속도의 변화에 민감히 반응하며

† Corresponding Author : Division of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 442-744, Korea
Tel : 0331-219-2449, Fax : 0331-216-8777
e-mail : ywryu@madang.ajou.ac.kr

산소공급이 과잉일 경우 pH도 같이 증가하여 toxin의 생성 수율이 낮아진다.

디프테리아 toxin은 일반적으로 배양병을 이용한 정치배양과 발효조를 이용한 생산이 모두 가능하다. 정치배양의 장점은 간단하고 장비구입이 저렴하다는 것이며 Roux bottle에서 약 7일간 배양하면 50~100 Lf/mL의 toxin을 얻을 수 있다. 그러나 농도와 순도가 높은 toxin을 생산하기 위해서는 발효조에 의한 생산이 필수적이며, 이 경우 150~300 Lf/mL의 toxin을 48시간 내에 생산할 수 있다(10). 현재까지 국내에서는 아직도 정치배양을 통해 디프테리아 toxin을 생산하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 높은 농도의 디프테리아 toxin을 효율적으로 생산하여 품질이 우수한 디프테리아 백신을 제조하기 위하여 생산성이 우수한 배지를 탐색하고 발효조에서 *C. diphtheriae*의 배양조건을 최적화하기 위한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지 조성

본 실험에서는 디프테리아에 대한 능동면역에 필요한 toxoid를 생산하는데 일반적으로 사용되어온 *Corynebacterium diphtheriae* Park-William No.8 strain을 식품의약품 안전청(KFDA)에서 분양받아 사용하였다. 배양배지의 제조를 위한 10% NZ-Case stock solution은 다음과 같이 준비하였다. NZ-Case (Sheffield, USA) 500.0 g, Na₂HPO₄ 195 g, KH₂PO₄ 65 g을 4.2 L의 증류수에 녹인 후 10N NaOH를 이용하여 pH를 9.3으로 맞추고 79°C로 가열한 후 CaCl₂ 20.46 g을 첨가하여 침전을 형성시켰다. 침전을 원심분리로 제거시킨 상등액을 stock solution으로 사용하였다. 발효조를 이용한 배양배지의 조성은 Table 1에 나타내었으며, 접종 전에 phosphate 용액과 40% CaCl₂ 용액을 첨가하여 침전을 생성시킨 후에 배양을 시작하였다.

Table 1. Nutrient composition of NZ-Case medium.

Component	Concentration
10% NZ-Case stock solution	33.3 % (v/v)
Maltose	25.0 g/L
60% sodium lactate solution	0.17 % (v/v)
Mueller growth factor solution	0.8 % (v/v)
10% L-Cystine HCl solution	0.2 % (v/v)
0.1 mg/mL Fe ²⁺ solution	0.2~0.5 mg/L

배양 방법

정치배양의 배지는 질소원으로서 casamino acid를 사용한 Muller & Miller modified 배지(11)를 2 L의 Roux bottle에 250 mL를 첨가하여 36°C에서 7일간 배양하였다. 접종용 균주의 배양은 Loeffler slant에서 2일 배양한 균주를 200 mL의 배양배지가 들어 있는 1 L baffled flask에 0.4%(v/v)가 되도록 접종하여 35°C에서 2일간 배양하였다. 발효조를 이용한 배양은 7 L jar fermentor (KFC, Korea)를 멸균한 후 filtration으로 멸균한 4.5 L의 배지를 넣고 0.4 % (v/v)의 균주를 접종하여 35°C

서 배양하였으며, 배지의 초기 pH는 7.0~7.4로 조정하였다. 용존산소의 영향은 0.22 vvm의 통기조건에서 200~500 rpm의 범위로 교환하면서 실험을 수행하였다

분석 방법

세포의 농도는 650 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 optical density로 측정하였다. Toxin의 농도는 Ramon(12)의 flocculation method를 이용하였으며, 측정값은 Lf/mL로 나타내었다. 즉 100 IU/mL antitoxin(WHO Diphtheria antitoxin)을 5 IU 간격으로 30 IU에서 70 IU까지 단단계로 희석하여 준비하였고, 시료는 50 Lf/mL이 되도록 saline으로 희석하여 준비하였다. 5 mL tube에 준비된 antitoxin 1 mL와 시료 1 mL 넣고 50°C 항온조에서 반응시켜 가장 먼저 반응이 일어나는 tube의 IU를 확인한 후 희석배수를 곱하여 Lf를 계산하였다. 단백질 함량은 bradford method(13)로 측정하였으며 standard는 bovine serum albumin을 사용하였다. 매지내 maltose와 glucose의 정량은 당 분석용 column(Bionex PA1, USA)을 사용한 HPLC(Bionex, USA)를 통해 측정하였으며 detector는 Pulsed Amperometric Detector를 사용하였다. Iron 이온은 ICP-AES를 통한 기기분석으로 측정하였다.

역가 시험

생산된 toxin을 정제하여 제조한 원액의 immunity를 측정하기 위한 역가시험은 먼저 정제된 toxoid의 최종 원액을 aluminium hydroxide gel adjuvant(Superfos Biosector a/s)에 흡착시켜 300~400 g의 guinea-pigs에 0.75 mL 씩 피하 주사한 후 4주간 면역 시켰다. 면역 후 혈청을 채취해 표준독소 1 L+(녹십자)와 중화시켜 이를 230~280 g의 guinea-pigs에 2 mL씩 피하 주사한 후에 12시간 단위로 120시간 동안 생존여부를 관찰하고 역가를 판단하였다(14).

결과 및 고찰

세포성장과 toxin 생성

세포성장과 toxin 생성과의 관계를 검토하기 위하여 발효조를 이용한 NZ-Case 배지에서의 배양결과를 Figure 1에 나타내었다. Toxin은 12시간 이후로 생성되기 시작하였으며 지수성장기에서 toxin 생성도 활발하게 일어나 toxin의 농도가 급격히 증가하였다. 지수성장기의 말기인 30시간 이후에도 toxin의 농도는 계속 증가하였으나 전체적으로 세포성장이 멈추면서 toxin의 생성도 같이 중단되는 경향을 관찰할 수 있다. 이는 세포성장과 toxin 생성이 함께 진행된다는 Nishida(15)와 Mitsuhashi(16) 등의 연구결과와 동일하였다. 배양시간이 42시간이 지나면서 toxin의 농도는 조금씩 감소하기 시작하였는데, 이는 생성된 toxin이 세포가 사멸하면서 방출되는 protease 등에 의해 변성되어 항원-항체 반응을 통한 toxin의 정량에서 측정되지 않기 때문으로 사료된다. 균체의 농도는 배양 초기 24시간까지는 균체의 최대 농도 대비 31~38%에 해당하지만 toxin 생성량은 24~28%에 불과하므로 균체의 단위중량 당 생산된 toxin의 양은 점점 증가하는 것을 알 수 있다. 따라서 세포성장과 toxin 생성은 단순한 일차 비례 함수로 설명될 수 없으며, 여러 가지 배양조건인 자들에 따라 그 경향은 달라질 수 있음을 나타내었다(17).

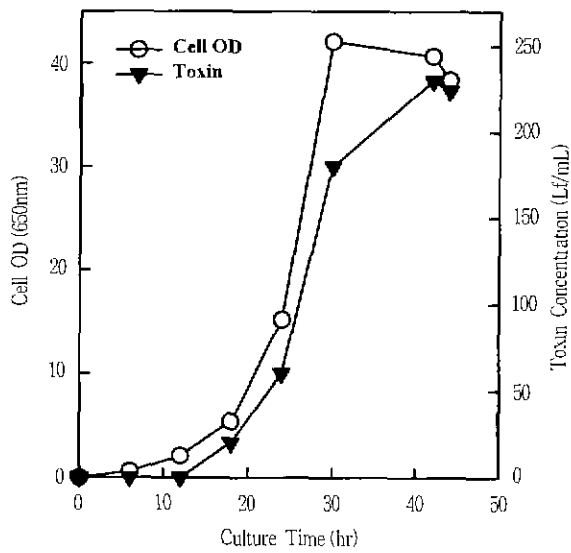


Figure 1. Profiles of cell growth and toxin production during the fermenter culture of *C. diphtheriae*

질소원의 영향

배지의 질소원 종류에 따라 세포성장파 toxin 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 질소원으로서 Casamino acid, NZ-Case, NZ-Amine, Toxiprotone을 선택하여 발효조를 이용한 실험을 수행하였다. NZ-Case와 NZ-Amine은 casein의 enzymatic digest인 배지이며 Toxiprotone은 가금류의 육질을 가공하여 만든 디프테리아 배양용 배지이다. 실험결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 NZ-Case와 Toxiprotone이 균의 생육과 toxin 생성 능력에서 다른 배지 보다 우수하였으며 발효시간도 짧았다. 그러나 Toxiprotone의 경우 meat 유래의 단백질 성분이 항원으로 작용하는 영향에 대한 검증이 추가로 요구되는 부담이 있는 반면, NZ-Case는 기존 정치배양 배지와 같은 Casein 유래의 배지로서 부작용에 대한 위험이 적고 toxin 생성 능력이 우수하므로 NZ-Case를 디프테리아 발효용 배지로 결정하였다

Table 2. Comparison of various nitrogen sources for the production of toxin.

Medium	Culture time (hr)	OD (650 nm)	Toxin concentration (Lf/mL)
Casamino acid	48	15.3	20
Toxiprotone	48	45.2	220
NZ-Amine	40	33.7	180
NZ-Case	39	43.0	225

배지의 초기pH 영향

배지의 초기 pH를 6.6~7.8 사이로 조정된 실험 결과(Table 3)에서 최적의 세포성장파 toxin 생성은 pH 7.0에서 나타났는데, 이는 디프테리아 toxin 생산을 위한 배지의 초기 pH가 일반

적으로 7.5~7.8인 것으로 보고된 것과는 다른 결과이다(4, 9) 이러한 결과는 양호한 통기조건에서 pH가 지속적으로 증가하므로 배양 말기의 pH를 상대적으로 낮게 제공할 수 있는 초기 pH 7.0인 배지가 가장 우수한 세포성장파 toxin 생성을 나타낸 것으로 추정된다. Figure 2에 시간에 따른 pH의 변화와 세포성장, toxin 생성의 경향을 나타내었다. pH는 전반적으로 꾸준히 증가하는 것으로 나타났으며 pH 변화는 통기조건 즉 DO(dissolved oxygen)의 변화에 민감히 반응하는 것을 알 수 있다. DO 값이 낮을 경우 pH는 감소하므로 세포 성장기인 24시간 배양이내에서는 pH가 6.9~7.2 수준에서 유지되었으나 배양 후기에는 DO의 증가로 pH는 8.0까지 상승하였다. 배양 중 pH 값의 변화는 배지 내에 통기조건을 나타낸다. 즉 산소공급이 적절한 경우 pH는 7.0~8.0 사이의 값을 보이며 부족할 경우 7.0 이하 값을, 공급 과잉일 경우엔 8.0 이상의 pH 값을 나타내므로 toxin을 최대로 생산하기 위해서는 배양 중에 pH의 monitoring은 유용하다고 생각된다(18). 또한 배양액의 pH 변화는 대사과정 중에 생성되는 대사산물에 의해 결정되기도 한다. Figure 2에서 배양 시작 직후 pH 값이 조금 하락하는 경향을 관찰할 수 있는데, 이는 배지 내에 탄소원이 소모되면서 생성되는 유기산의 증가가 pH를 감소시키기 때문인 것으로 알려져 있다. 배양시간이 24시간이 지나면서 pH가 다시 증가하는 현상은 유기산이 분해되어 carbonic acid와 물로 전환되는 산화과정과 배지 내의 질소원에서 생성되는 ammonia가 원인인 것으로 설명될 수 있다(9).

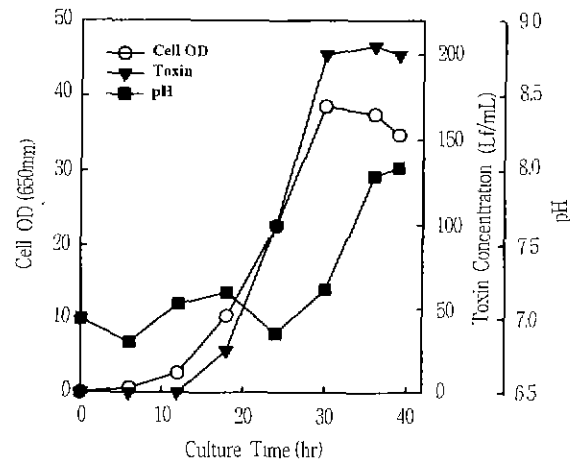


Figure 2. Profiles of cell growth, toxin production and pH change during the fermenter culture of *C. diphtheriae*

Table 3. Effect of initial pH of medium on the cell growth and diphtheria toxin production.

Initial pH of medium	Culture time (hr)	OD (650 nm)	Maximum toxin concentration (Lf/mL)
6.6	42	32.5	205
7.0	42	38.6	228
7.4	44	30.4	197
7.8	41	36.3	160

용존산소량의 영향

용존산소량의 영향을 검토하기 위하여 통기량을 0.22 vvm으로 고정시키고 교반속도를 200, 300, 400, 500 rpm으로 변화시켜 배양한 결과를 Table 4에 나타내었다. 교반속도가 200~300 rpm의 경우 배양기간 동안 DO의 값이 계속 0~5% 수준으로 유지되어 세포성장이 거의 이루어지지 않았다. Toxin은 전혀 생성되지 않았거나 낮은 농도로 생성되었으며 45시간 배양 이후에도 배지 내에 이용되지 못한 maltose가 상당량 잔류해 있었다. 반면 400 rpm 이상의 배양에서는 모든 탄소원이 대사에 이용되었으며 균체의 농도와 toxin 농도는 400 rpm에서 최대값을 나타내었다 그러나 400 rpm 이상에서는 용존산소량이 적정 농도보다 높게 공급될 경우 당이 유기산으로 전환되는 배양초기의 대사과정에 최적의 조건을 제공해 주지 못한다. 따라서 최대의 세포성장과 toxin 수율을 얻기 위해서는 최적의 용존 산소량이 중요한 요인 중의 하나임을 알 수 있었다. Figure 3에서 보듯이 DO는 배양 초기(0~24 hr)에 5% 이하까지 감소하다가 세포성장 속도가 둔화되어 산소 소비량이 감소되면서 배양 후기(24~42 hr)에는 85%까지 상승하는 것을 볼 수 있다. 이러한 통기조건은 배양 초기에 낮은 DO 값에 의하여 유기산이 생성되는 fermentative metabolism이 유도되고, 배양 후기에는 유기산이 carbonic acid와 물로 전환되는 oxidative metabolism이 되도록 충분한 산소가 공급된다. 이는 *C. diphtheriae* 배양에서 fermentation과 respiration의 대사과정이 toxin 생성과 밀접한

Table 4. Effect of agitation speed on the cell growth and diphtheria toxin production

Agitation (rpm)	Culture time (hr)	OD (650 nm)	Maximum toxin concentration (Lf/mL)	Residual maltose (g/L)
200	42	8.2	0	16.4
300	39	16.8	50	7.95
400	39	43.0	228	0.00
500	38	29.6	130	0.19

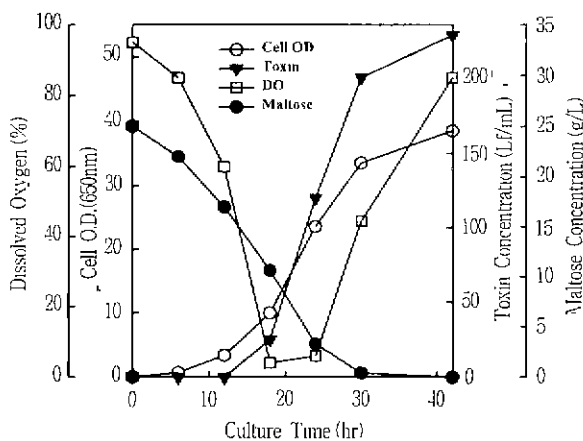


Figure 3. Profiles of cell growth, toxin production, DO and maltose concentration during the fermenter culture of *C. diphtheriae* under 400 rpm agitation and 0.22 vvm aeration.

관련이 있으며, 400 rpm의 교반조건이 두 가지 대사과정을 적절히 연결해 줌으로서 높은 농도의 toxin 생성이 가능한 것으로 추정할 수 있다. 반면 500 rpm의 교반속도에서 세포성장과 toxin 생성이 감소하는 것은 산소가 과량으로 공급되는 조건에서는 당이 유기산으로 전환되는 fermentative metabolism이 억제되기 때문으로 사료된다.

Iron 이온 농도의 영향

디프테리아 toxin 생산에서 배지의 iron 이온농도는 매우 중요한 요인이 된다. Murphy 등(20)은 mutant를 사용한 연구를 통해 toxin을 합성하는 *tox* gene의 조절에 iron 이온이 corepressor로 작용한다고 보고하였다. 즉 세포 내 iron 이온의 농도가 낮아야만 *tox* operon이 derepress 되어 toxin 생산이 가능하게 된다. 따라서 배양기간 동안에 배지내의 iron 이온농도는 제한조건으로 계속 유지되는 것이 높은 수율의 디프테리아 toxin 생산에 반드시 필요하다. Iron 이온농도의 영향을 검토하기 위하여 0.1 mg/mL의 FeSO₄ 용액을 사용하여 iron 이온 농도를 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 mg/L로 첨가한 배지에서 배양 실험을 수행하였다. 실험결과(Table 5)에서 0.2~0.4 mg/L의 범위에서는 모두 200 Lf/mL 이상의 toxin이 생성되었으나 0.6 mg/L 이상에서는 급격히 toxin 생성량이 감소함을 알 수 있었다. 또한 iron 이온의 농도변화가 세포성장에는 큰 영향을 미치지

Table 5. Effect of iron ion concentration on the cell growth and diphtheria toxin production.

Iron ion concentration (mg/L)	Culture time (hr)	OD (650 nm)	Maximum toxin concentration (Lf/mL)
0.2	38	38.1	215
0.3	42	40.7	230
0.4	42	37.9	210
0.6	42	38.5	160
0.8	41	37.2	95

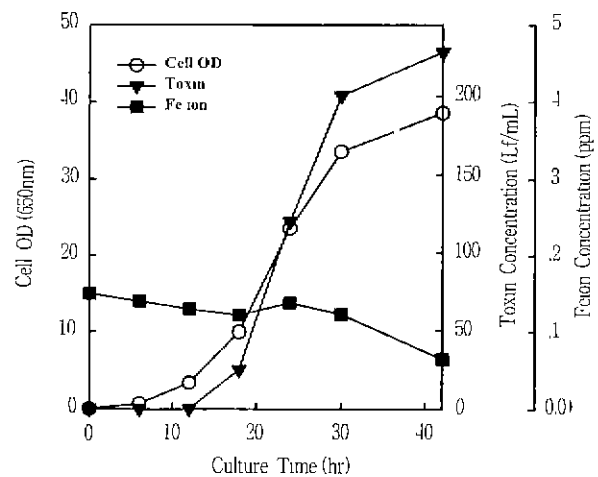


Figure 4. Profiles of cell growth, toxin production and iron concentration during the fermenter culture of *C. diphtheriae*

지 않는 것으로 나타났는데, 이는 과량의 iron 이온농도가 세포 성장 속도에 큰 영향을 주지 않는다는 보고와 일치하였다(20). Figure 4에서 보듯이 0.3 mg/L의 iron 이온농도에서 배양기간 내내 0.14×10^{-3} mg/mL 이하의 iron 이온농도가 유지됨을 알 수 있다. 이처럼 낮은 농도의 iron 이온이 공급되는 배지조건에서 높은 농도의 toxin 생성이 가능하였다. 반면 iron 이온의 농도가 너무 낮은 경우에도 toxin 생성이 저해되므로 적정 농도의 iron 이온이 공급되는 것이 필요하다. 또한 배양기간 중에 iron 이온의 농도가 증가하기도 하는데, 이는 배지에 calcium-phosphate 침전을 형성시키면서 침전물 내에 iron 이온을 붙잡아 두고 배양기간 동안 조금씩 방출하고 있다는 증거가 되며, 이렇게 배지 내에 iron 이온의 농도가 배양기간 내내 적정하게 유지됨으로서 높은 농도의 toxin 생산이 가능하였다(4) 또한 일반적으로 배양 초기에 균체의 농도가 낮을 때 *C. diphtheriae*의 toxin 생산 능력은 높지 않은데, 이것은 디프테리아 toxin 생성을 위하여 세포 내에 최저 한계점의 iron 이온농도가 존재하여 *C. diphtheriae*가 충분한 농도로 성장하면 iron 이온의 농도가 한계점 이하로 낮아지면서 toxin이 생성되기 시작하는 것으로 설명될 수 있다. Pappenheimer(5)는 이 가정을 바탕으로 균체의 농도가 1.6 g-bacterial protcin/L 이상이 되어야만 toxin의 생성이 활발히 이루어지며, 이때 bacterial protem 당 iron 이온의 농도는 2.5~3.0g-atom Fe/g-bacterial protein 이라고 보고하였다.

Cacium-phosphate 침전량의 영향

높은 수율의 toxin을 얻기 위해서 배지 내에 적정 농도의 calcium-phosphate 침전이 형성되어 있는 것이 필수적이다 최적의 calcium-phosphate 침전량을 결정하기 위하여 calcium/phosphate의 비가 5.7~8.8 수준이 되도록 phosphate 용액과 CaCl₂ 용액을 여러 농도로 첨가해주어 배양한 결과를 Table 6에 나타냈다. 실험결과를 통하여 calcium-phosphate의 침전량은 세포 성장에 크게 영향을 주지 않았으나 적정량 이상이거나 이하일 경우 배지 내의 iron 이온의 농도에 영향을 미치 toxin의 생산 수율을 변화시키는 것으로 나타났다. NZ-Case 배지는 casen 유래 배지로서 CaCl₂ 용액을 단독으로 첨가할 경우에 침전은 생성되지 않았는데, 이는 casein이 phosphoprotein이기 때문이며 phosphate가 bound form으로 존재하여 CaCl₂와 침전을 형성하

지 못하였다. 따라서 CaCl₂를 첨가하기 전에 inorganic phosphate를 넣어 침전이 잘 형성되도록 하여야 고농도의 toxin 생산을 기대할 수 있다. Calcium-phosphate 침전은 iron 이온을 loose adsorption complex 안에 붙잡아 두고 세포 성장기에 조금씩 방출하는 것으로 보고되어 있다(4). 배지 내에 calcium-phosphate 침전이 과량으로 존재할 경우 배지의 점도 증가에 의하여 산소 전달속도를 감소시켜 세포성장과 toxin 생성량을 떨어뜨리는 것으로 사료된다. 또한 세포성장기 일어나기 전에 calcium-phosphate 침전을 제거시킬 경우 iron 이온이 동시에 제거되어 낮은 농도의 toxin 생산이 예상되며, 24시간 이후의 배양액에는 침전이 더 이상 남아있지 않는 것으로 미루어 볼 때 침전은 세포 성장과 더불어 용해되면서 toxin 합성의 대사에 필요한 iron 이온을 방출하는 것으로 생각된다.

정치배양과 발효조배양의 비교

발효조에서 배양하여 생산된 *C. diphtheriae*의 toxin과 기존의 정치배양으로 생산된 toxin의 품질을 비교하였다(Table 7). 우선 발효조배양의 경우에는 재현성이 있게 toxin이 200 Lf/mL 이상 생산될 수 있는 배양조건이 확립되었는데, 이는 최대 toxin 농도로 비교할 때 정치배양에 비해 2배 이상 높은 생산량이다. Toxin의 농도가 높아짐에 따라 자연히 순도도 증가하였는데, 일반적으로 정치배양의 순도는 800~1000 Lf/mg PN(Protein Nitrogen) 이고 발효조배양일 경우 1000~2000 Lf/mg PN의 toxin이 생산될 수 있다고 알려져 있다(10). 본 실험에서는 발효조배양에서 최대 순도가 1825 Lf/mg PN인 toxin이 생성되었으며, 이는 기존의 정치배양 방법에 비해 2배 이상 높은 값이다. 높은 순도의 toxin이 생산됨에 따라 toxoid 정제공정을 거쳐 제조되는 최종 원액은 2500 Lf/mg PN 이상의 순도를 가질 것으로 예상되며, 이것은 아직 순도가 낮아 국내에서는 생산하지 못하는 성인용 Td 백신(디프테리아, 파상풍 예방 백신)의 생물학적 제제 기준이 요구하는 순도이므로 새로운 제품의 개발을 기대할 수 있다. 또한 순도가 높은 toxoid는 다른 단백질을 적게 함유하고 있으므로 백신 제조에서 부작용의 가능성을 최소화할 수 있는 장점이 있다. 디프테리아 antitoxin과 반응하는 시간(Kf)도 발효조 배양에서 얻은 toxin이 더 빠르게 나타났으므로 발효조를 통해 생산되는 toxin이 기존 정치배양 toxin 보다 더 우수한 품질을 가질 수 있다는 것을 알게 되었다 또한 두 가지 배양방법으로 생산된 toxin을 정제하여 백신제조를 위한 최종 원액을 만들고 동물시험을 통하여 두 toxoid의 면역원성을 비교

Table 6. Effect of calcium-phosphate precipitate quantity on the cell growth and diphtheria toxin production.

Addition of phosphate and CaCl ₂ solution (mL)		OD (650 nm)	Maximum toxin concentration (Lf/mL)
Phosphate	CaCl ₂		
4.3	13.0	30.3	140
6.5	20.0	34.3	190
13.0	41.0	43.0	228
19.5	61.0	34.2	180

Table 7. Comparison of culture time, diphtheria toxin concentration, purity and potency in static and fermenter cultures.

Culture method	Static culture	Fermenter culture
Culture time (hr)	168	48
Toxin concentration (Lf/mL)	90 - 110	200 - 230
Kf (min)	4 - 5	1 - 2
Purity (Lf/mg PN)	875 - 1020	1720 - 1825
Potency (IU/mL)	2 >	4 >

Table 8. Comparison of toxoid potency in static and fermenter cultures.

Mixing	Dilution rate	Observation time (No. of G. P. dead/No. of G. P. challenged)				
		24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
Standard antitoxin + Standard toxin	1 IU/mL	0/2	2/2	2/2		
Final solution of static culture	X2	0/2	0/2	2/2		
	X4	0/2	1/2	2/2		
Final solution of fermenter culture	X2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	X4	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

* G. P. : Guinea-pigs

하는 역가시험(Potency test)를 수행하였다. 그 결과(Table 8) 발효조 배양에서 얻은 toxoid는 국가검정기준인 2단위에서 모든 guinea-pigs가 생존하였을 뿐만 아니라 4단위에서도 모두 생존하여 정치배양 toxoid에 비해 월등히 우수한 역가를 가지는 것으로 판단되었다. 이상의 실험을 통해 발효조배양으로 toxin을 생산할 경우 수율과 생산성 및 면역원성이 모두 우수한 디프테리아 toxoid를 생산할 수 있음을 확인할 수 있었다. 더구나 발효조 배양의 경우에 높은 역가에 의하여 백신제조시에 toxoid의 함량을 낮출 수 있으므로 부작용을 유발시키는 다른 단백질이 존재할 확률도 낮아지므로 부작용이 적은 백신의 제조가 가능할 것으로 예측된다.

요 약

디프테리아는 *Corynebacterium diphtheriae*에 의해 발생하는 호흡기 질환으로 *C. diphtheriae*의 exo-toxin을 불활성화 시킨 toxoid 백신을 사용하여 예방해 왔다. 현재까지 국내에서는 정치배양 방법으로 디프테리아 toxin을 생산해 왔기 때문에 생산성과 품질에 한계가 있었으며, 이를 극복하기 위해 발효조를 이용한 발효조건 최적화에 대한 연구를 수행하였다. 디프테리아 toxin을 보다 효율적으로 얻기 위한 매지로서 beef antigen이 함유되어 있지 않은 casein 유래의 NZ-Case를 선택하였다. 발효조에 의한 toxin 생성은 세포성장과 함께 증가하는 growth-associated form으로 나타났다. 최대의 세포성장과 toxin 생성은 초기 pH가 7.0인 배지에서 0.22 vvm의 통기와 400 rpm의 교반조건에서 얻을 수 있었다. 또한 최대의 toxin 생성을 위한 최적의 iron 이온의 농도는 0.3 mg/L 이었으며, inorganic phosphate의 첨가에 의한 calcium-phosphate 침전이 비지 내에 iron 이온의 농도조절을 위하여 요구되었다. 면역원성을 확인하기 위한 역가시험 결과 발효조 배양에서 얻은 toxoid는 4단위에서 모든 guinea-pigs가 생존하여 2단위인 정치배양 toxoid에 비해 월등히 우수한 것으로 판단되었다. 결국 발효조 배양으로 toxin을 생산할 경우 부작용이 적고 수율과 생산성 및 면역원성이 우수한 toxoid의 생산이 가능하였다.

참 고 문 헌

1. Belsey, M. A., M. Sinclair, M. R. Roder, and D. R. LeBlanc (1969). *Corynebacterium diphtheriae* Skin Infections in

Alabama and Louisiana A Factor in the Epidemiology of Diphtheria, *N Engl J Med* 280, 135-141.
 2. Mueller, J. H. and P. A. Miller (1941). Production of Diphtheria Toxin of High Potency(100 Lf) on a Reproducible Medium, *J Immunol.* 40, 21-32.
 3. Stainer D. W. (1967), Preparation and Properties of Diphtheria Toxoids in Submerged Culture I. Presence of Bovine Antigens, *Can J Microbiol.* 13, 963-968.
 4. Stainer D. W. (1968). Preparation and Properties of Diphtheria Toxoids in Submerged Culture III. Development of a New Semisynthetic Medium, *Can. J. Microbiol.* 14, 1155-1160
 5. Pappenheimer A. M. Jr (1955), The Pathogenesis of Diphtheria, *Symp. Soc. Gen Microbiol.* 5, 40-56.
 6. Linggood, F. V. and E. L. Fenton (1947), The Production of Diphtheria Toxin by Submerged Culture in Shaking Flasks. *Br. J. Exp. Path.* 28, 354-358.
 7. van Hemert, P. A. and A. L. van Wezel (1966), The Course of pH in Diphtheria Toxin Production, *Symp Series Immunobiol. Standard.* 3, 221-225.
 8. Righelato, R. C. and P. A. van Hemert (1969), Growth and Toxin Synthesis in Batch and Chemostat Cultures of *Corynebacterium diphtheriae*, *J. Gen. Microbiol.* 58, 403-410.
 9. Tasman, A. and A. C. Brandwijk (1938), Experiments on Metabolism with Diphtheria *Bacillus*, *J. Infec. Dis.* 63, 1020.
 10. Manual for the Production and Control of Vaccines Diphtheria Toxoid, Unpublished WHO Document BLG/UNDP/77.1 Rev 1
 11. Mueller, J. H. (1939), A Simplified Formula for Diphtheritic Toxin Broth, *J. Immunol* 37, 103-112.
 12. Ramon, G. (1922), Flocculation dans un melange neutre de toxin-antitoxine diphtheriques, *CR. Soc. Biol.* 86, 661-663
 13. Bradford, M. M. (1976), A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-dye Binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
 14. Minimum Requirements: Diphtheria Toxoid. U.S. Depart-

- ment of Health, Education and Welfare. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 5th Revision.
15. Nishida S. (1949). *C. diphtheriae* 2 Specific Characteristics of the Growth Curve of *C. diphtheriae*, *Jap. J. Med. Sci. Biol* **7**, 495-502.
 16. Mitsuhashi, S., M. Kurokawa, and Y Kojima (1949), Study on the Production of the Toxin by *Corynebacterium diphtheriae*, *Jap. J. Exp. Med.* **20**, 261-269.
 17. Edwards, D (1959). The Growth and Toxin Production of *Corynebacterium diphtheriae* in Submerged Culture, *J. Gen Microbiol.* **22**, 698-704
 18. Nikolajewski, H. E., Siglinde Rustenbach, Sonja Mebel, and L. Meineke (1982), Production of *Corynebacterium diphtheriae* Toxin in a Bubble Column Fermentor, *Journal of Biological Standardization*, **10**, 109-114.
 19. Murphy, J. R., J. Skiver, and G McBride (1976), Isolation and Partial Characterization of a Corynebacteriophage beta, *tox* Operon Constitutive-like Mutant Lysogen of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Virol.* **18**, 23-41.
 20. Edwards, D. C. and P. A. Seamer (1960). The Uptake of Iron by *Corynebacterium diphtheriae* Growing in Submerged Culture, *J. Gen. Microbiol.* **22**, 706-802.