

## 고농도 재조합 대장균의 Fed-batch 배양 시스템을 이용한 Pyruvate Dehydrogenase Complex-E2 특이성 인간 모노클론 항체의 생산

이 미 숙·진 주 미·차 상 훈·†정 연 호  
강원대학교 식품생명공학부  
(접수 : 2000. 8. 23., 게재승인 : 2000. 10. 23.)

## Production of Pyruvate Dehydrogenase Complex-E2 Specific Human Monoclonal Antibody in Fed-batch Culture Systems with High Cell Density Recombinant *Escherichia coli*

Mi-Sook Lee, Joo-Mi Chun, Sang-Hoon Cha, and Yeon-Ho Jeong†  
Division of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea  
(Received : 2000. 8. 23., Accepted : 2000. 10. 23.)

Several culture systems including batch, two-stage CSTR, semi-fed batch, and two-stage cyclic fed-batch were investigated for the efficient production of the Fab fraction of PDC-E2 specific human monoclonal antibody using high cell density recombinant *E. coli*. A two-phase batch system and a two-stage continuous system were examined to overcome plasmid instability problems, by separating the growth and the production stages. The cell density and productivity of the two-stage continuous culture was better than that of the two-phase batch fermentation. In the two-stage continuous culture system with DO-stat, the cell growth and the productivity were superior to those of the system without the DO control. Also, almost total plasmid stability was maintained in the two-stage continuous culture system. Modified M9 medium was selected as an optimum feeding medium for the fed-batch process, and the optimum C/N ratio determined to be 2:3. The optimum feeding rate was 0.6 g/l/hr for a constant feeding strategy in semi-fed batch system. When the feeding medium was fed by pulsing, it was observed that more frequent pulsing resulted in improved cell growth. The linear feeding method was the most efficient of the various feeding methods tested. Finally, high cell density culture using a two-stage cyclic fed batch system with pH-stat was tried because the linear feeding method showed limitations in terms of obtaining high cell densities, and a cell density of 54 g/l was achieved. It was concluded that the two-stage cyclic fed batch system was the most efficient system for high cell density culture of the systems tested. However, productivity improvements were lower than expected due to the extremely high accumulations of acetate, although the low levels of residual glucose were maintained.

**Key Words** : human monoclonal antibody, recombinant *E. coli*, two-phase batch, two-stage continuous, fed-batch, two-stage cyclic fed-batch system

### 서 론

설치류 기원의 모노클론 항체는 저 기능성, 혈액 순환계에 서의 불안정성 및 부작용으로 인체에 직접 사용하기에는 많은 문제점이 있기 때문에 인간 모노클론 항체(human mono-

clonal antibody)에 대한 수요가 급증하고 있다. 이러한 경향에 따라 최근에는 antibody repertoire cloning이라는 분자 생물학적 기술이 개발되어 여러 재조합 인간 모노클론 항체를 발현하기에 이르렀다. 이 기술은 인간 항체 유전자의 heavy chain 일부 (VH와 CH1) 그리고 light chain (VL과 CL)을 인체내의 B 세포로부터 분리하여 대장균 내에 발현함으로써 원하는 항원 반응 특이성을 지닌 모노클론 항체 (Fab 분자)를 제작하는 방법이다. Antibody repertoire cloning 기술에 의해 tetanus toxoid (1), human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)의 항원인 gp120 (2), 일차 담관성 간경화 (primary biliary cirrhosis)의 자가 항원인 PDC-E2 (3) 등에 특이적으로 반응

†Corresponding Author : Division of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

Tel : +82-33-250-6484, Fax : +82-33-254-3835

E-mail : jeongyhb@cc.kangwon.ac.kr

하는 유전자 재조합 인간 모노클론 항체가 개발된 바 있다.

Antibody repertoire cloning 기술은 기존의 방법으로는 생산할 수 없었던 인간 모노클론 항체 생산을 가능하게 하는 장점 외에도 치료 또는 진단을 위한 많은 응용 가능성이 있기 때문에 매우 유망한 기술이지만 이 기술에 의해 분리된 인간 모노클론 항체 유전자를 대장균 내에서 발현, 생산할 경우 그 생산량이 미약하고, 대량 배양시스템에 적용된 경험이 없기 때문에 이 기술을 실용화하기에는 어려운 실정이다. 그러므로 대장균 내에서 재조합 인간 모노클론 항체 유전자를 포함하고 있는 플라스미드의 안정성 증대와 인간 모노클론 항체의 효율적 대량 생산을 위한 bioreactor system의 구축 및 최적 운전 전략 수립을 통한 항체의 생산성 향상 및 대량생산 시스템에의 적용은 이 기술의 scale-up 및 실용화를 위해 반드시 필요하다.

이를 위해 본 연구에서는 미토콘드리아의 내막에 존재하면서 해당작용의 결과물인 pyruvate를 acetyl CoA로 변환시키는데 촉매 역할을 하는 것으로 알려진 pyruvate dehydrogenase complex-E2 (PDC-E2)에 특이적으로 반응하는 재조합 인간 모노클론 항체 (항체의 Fab 부분)를 모델로 하여 (4) 인간 항체의 효율적 대량 생산에 관한 연구를 수행하였다. 유전자 재조합 인간 모노클론 항체의 발현을 위하여 항 pyruvate dehydrogenase complex-E2 인간 모노클론 항체를 램다 바이러스 벡터를 이용해 제작하였으며, plasmid에 삽입되어진 항체 유전자를 대장균(Topp2)에서 발현, 생산하였고, 이를 모델로 하여 antibody repertoire cloning 기술을 통한 효율적인 인간 모노클론 항체의 대량 생산 기술의 실용화에 따르는 여러 가지 기반기술을 구축하고자 하였다.

유용 단백질의 생산을 위한 재조합 대장균 발효에서는 최종 세포농도와 specific productivity에 비례하는 목적 생성물의 생산성을 높이는 것이 중요하며 고농도 세포배양 기술이 생산성을 증가시키는 방향으로 발전되어 왔다. 재조합 대장균 발효과정 중에서 유가식배양(fed-batch)은 생산성을 향상시킬 뿐만 아니라 기질 혹은 영양분 저해, 산소 전달 저해, 부산물에 의한 저해와 같은 문제점들을 최소화하여 고농도 세포를 얻을 수 있는 공정으로 가장 많이 사용되고 있는 실정이다(5,6).

이러한 유가식 배양에서 고농도 세포배양을 얻기 위한 가장 중요한 전략은 feedforward control의 일종인 nutrient feeding 방법이며, 영양분의 constant, stepwise, exponential feeding 등이 사용되고 있다. Constant-rate feeding 방법(7-9)은 농축된 영양분이 미리 계산된 속도로 공급되는 방법으로 비성장속도 및 세포농도의 증가속도가 계속해서 감소하는 문제가 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 공급속도의 점진적인 증가방법(stepwise feeding)이 개발되었는데 이 방법은 세포농도의 증가에 따라 영양분의 공급속도를 증가시키는 방법이다(10). 이러한 방법 중에 exponential feeding 방법(11)이 개발됨으로써 세포가 전체 배양 기간 동안 일정한 비성장속도로 성장하는 것이 가능하게 되었다.

한편 이러한 공급속도 조절을 통한 feedforward control 방법 이외에 DO(12), pH(13), microbial heat 그리고 CO<sub>2</sub> evolution rate (14) 같은 다양한 물리적인 변수들의 측정과 feeding을 연결한 간접적 feedback control 방법이 개발되었고,

이러한 feedback control을 이용하여 좀더 정교해진 기질 공급 방법이 또한 개발되었다. DO-stat 방법(12)은 기질이 고갈되었을 때 용존산소(DO)가 급증한다는 사실에 기초를 두고 있고, pH-stat 방법(13)은 탄소 기질이 고갈되었을 때 세포로부터 배출된 암모늄 이온의 증가에 의해 pH가 올라간다는 사실에 기초를 두고 있으며, 용존산소나 pH가 미리 정해진 값 이상으로 증가될 때 미리 정해진 속도로 영양분을 공급함으로써 일정한 범위 내로 기질 농도를 유지하는 방법들이다.

본 연구에서는 인간 모노클론 항체의 대량 생산 기술의 실용화를 최종목표로, 대장균을 이용한 인간 항체 생산 기술의 실용화 과정에서 가장 큰 걸림돌인 낮은 생산성을 보완하기 위한 방안을 모색하기 위하여 two-stage bioreactor를 이용한 연속식 생산과 two-stage cyclic operation을 포함한 유가식 배양을 통한 생산에 관한 실험을 수행하였고, 그 결과들을 비교분석함으로써 대장균을 이용한 재조합 인간 모노클론 항체의 bioreactor에서의 효율적 대량생산을 위한 최적의 배양방법을 제시하였다.

항체의 Fab와 single chain variable region (ScFv)는 보통의 항체보다 작은 분자 구조로 인하여 정상적인 항체보다 훨씬 효과적으로 혈액 순환계로부터 체내의 조직 안에 침투할 수 있기 때문에 치료제 전달용 (drug delivery system) 또는 진단을 위한 imaging tool로서 매우 적합하다는 것이 이미 인정되었다 (16). 본 연구에서 사용한 antibody repertoire cloning 기술은 기존의 방법으로 얻기 힘든 인간 모노클론 항체의 유전자를 재조합 유전자 기술에 의해 쉽게 조작할 수 있기 때문에 magic bullet과 같은 새로운 기능을 지닌 항체의 제작이 쉽고, 항체의 각기 다른 생물학적 기능을 지니고 있는 Fc 부분을 원하는 항체형으로 교체하기가 용이하다는 매우 유리한 장점을 지니고 있다. 그러므로 이 기술은 앞으로 인체의 in vivo 상태에서 사용되어질 인간 항체 생산을 위한 도구로서 그 잠재성이 매우 크다. 따라서 이 논문의 결과는 앞으로 제작되어질 인간 질병에 대한 면역 진단 또는 면역 치료제로서 사용될 면역독소(immunotoxin)와 같은 특수 인간 모노클론 항체의 대량 생산 뿐만 아니라 앞으로 생산되어질 여러 일반적인 기능성 항체들의 실용화 대량생산을 위한 기초자료로서 매우 유용하게 사용되어질 것이다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

Pyruvate dehydrogenase complex-E2 (PDC-E2)에 특이적으로 반응하는 인간 모노클론 항체의 Fab부분을 생산하는 균주인 Topp2 세포를 강원대학교 식품생명공학부의 차상훈 교수로부터 제공받았다. Fab를 발현하는 플라스미드 DNA에는 inducer로 IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)를 사용하는 lac promoter가 쓰였으며 ampicillin에 저항성을 갖는다. 한 개의 플라스미드에 함께 삽입되어진 각각의 heavy와 light chain은 대장균의 세포질에서 생산된 후 pelB leader sequence에 의해 periplasmic space로 이동하게 되며, 이 periplasm에서 heavy와 light chain 사이에 disulfide 결합이 형성되어 항원 결합 능력이 있는 Fab 분자가 생성되도록 하였다.

**기본 배양조건**

Seed culture는 -80℃에 저장된 재조합 대장균을 25 mg/ℓ의 ampicillin이 포함된 Luria Broth (LB) 배지 10 mℓ에서 24시간 배양하였다. 배양은 37℃, pH 7.0, 200 rpm의 조건에서 rotary shaker에서 하였으며, 발현 유도는 1 mM의 IPTG를 첨가하여 26℃, 200 rpm의 rotary shaker에서 10시간 배양함으로써 이루어졌다. 고체배양은 ampicillin이 포함된 LB 고체 배지에 seed culture로부터의 세포를 적절히 도말하여 37℃에서 배양하였다.

**분석**

세포농도는 UV spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 측정된 값을 dry cell mass로 환산하였다. 포도당의 농도는 hexokinase법을 이용한 enzyme kit (Sigma, No. 115)를 사용하여 520 nm에서 spectrophotometer로 측정하였다. 한편 초산의 농도는 HPLC(Aminex HPLC-87H Column; Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 분석하였으며, 65℃에서 용리용매로 0.005M의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 0.6 mℓ/min의 속도로 컬럼에 공급하면서 210nm에서 측정하였다. Fab의 농도는 enzyme-linked immunocassay (ELISA) 방법을 이용하여 405 nm에서 측정하였다. Fab 발현 유도가 끝난 후 그 배양액을 20분 동안 14,000 rpm으로 원심 분리하여 얻은 상등액을 분석하였다. 이 방법에 사용된 항원은 Fab에 특이적으로 반응하는 PDC-E2 (Sigma, No. p-7032)로서 carbonate-coating buffer와 함께 최종농도가 10 µg/mℓ이 되도록 하여 4℃에서 하룻밤동안 coating하였다. 여기에 분리한 상등액을 적절히 희석하여 37℃에서 1시간동안 반응시킨 후 이차 항체인 alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgG (Fab specific)를 반응시켰다. 그후 p-nitrophenyl phosphatase (Sigma, No. N9389)를 기질로 사용하는 alkaline phosphatase-nitrophenyl phosphatase 방법을 이용하여 밝은 노란색으로 발색시켜 ELISA reader로 분석하였다.

**Plasmid 안정성 분석**

배양 시간에 따른 시료로부터 replica plating법으로 plasmid 안정성을 조사하였다. 또한 각각의 배양액으로부터 얻은 pellet을 Qiagen kit (LRS Lab. No. 27104)를 이용하여 plasmid DNA를 분리한 후, 이것을 제한효소인 Xho I으로 잘라 4.4 kb의 linear DNA를 얻어 1%의 agarose gel로 전기영동함으로써 plasmid 안정성을 조사하였다.

**Two-phase 회분식 배양과 two-stage 연속식 배양**

Two-phase 회분식 배양은 2.5L의 jar fermenter에 1L의 LB/amp 배지를 사용하여 초기 3시간 동안은 37℃, 200 rpm에서 배양하였으며 이후부터는 26℃에서 1 mM의 IPTG를 첨가하여 Fab 생성을 유도하였다.

플라스미드의 불안정성을 극복하기 위하여 연속식 two-stage 배양이 시도되었다. 이를 위해 0.3 ℓ/hr의 유속으로 계속해서 새 LB/amp 배지가 첫 단으로 유입되었으며, 같은 유속으로 두 번째 단으로 세포를 포함한 배양액이 이동되었다. 첫 단은 2.5L의 jar fermenter에서 37℃, 200 rpm의 조건으로 배양하였으며, 1N NaOH와 1N HCl을 이용하여 pH 7.0으로 유지하였다. 두 번째 단은 2L의 top-driven fermenter에서

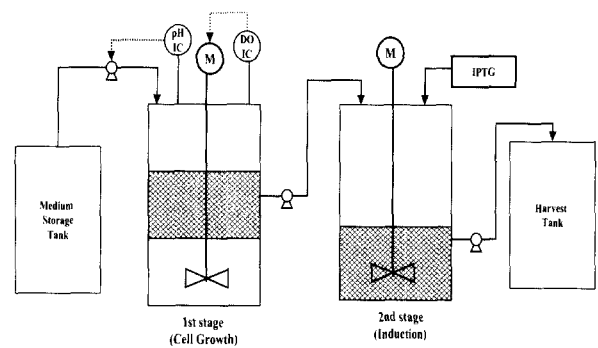


Figure 1. Schematic diagram of two-stage cyclic fed-batch system

26℃, 200 rpm의 조건으로 배양하였으며 Fab 생성을 유도하기 위해 1 mM의 IPTG가 계속해서 두 번째 단으로 유입되었다. 연속식 배양에서는 회분식 배양에서 발생하는 산소 전달의 제한현상을 극복할 수 있는 전략을 세우기 위해 용존산소가 제어되지 않은 경우와 rpm을 증가시키는 방법으로 용존산소를 20%로 유지시켜준 경우의 세포 성장속도 및 Fab 생성속도를 비교 조사하였다.

**여러 가지 nutrient feeding 방법을 적용한 semi-fed batch 배양**

Semi-fed batch 배양을 위해 사용한 semi-complex 배지의 조성은 modified M9 배지 (NH<sub>4</sub>Cl 0.5 g/ℓ, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/ℓ, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g/ℓ, CaCl<sub>2</sub> 0.011 g/ℓ), MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5 g/ℓ, thiamine-HCl 5 g/ℓ, methionine 0.1 g/ℓ, glucose 3 g/ℓ, yeast extract 4.5 g/ℓ와 ampicillin 25 mg/ℓ이었다. 또한 feeding medium으로는 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5 g/l, methionine 1 g/ℓ 그리고 여러 농도의 포도당과 yeast extract가 포함된 배지를 사용하였다. 초기 배양은 semi-complex 배지를 사용하여 37℃, 200 rpm에서 7시간 동안 배양한 후 feeding을 시작하였다. 이때 constant, linear feeding 및 modified linear feeding 방법들을 semi-fed batch 배양에 적용하여 feeding 방법에 따른 세포 성장을 비교하였다.

**Two-stage cyclic fed-batch 배양**

Figure 1은 two-stage cyclic fed-batch 배양 시스템을 보여 주고 있으며, pH-stat 방법을 이용한 two-stage cyclic fed-batch 배양을 통해 항체의 생산성 향상을 시도하였다. 먼저 첫 단에서는 1L의 semi-complex 배지에서 회분식으로 7시간 동안 배양되었으며, 37℃, 200 rpm, 20% DO의 조건을 유지하였다. 이때 발생하는 과도한 거품은 antifoam으로 제어하였다. 그후 영양분을 공급함으로써 유가식 배양을 시작하였다. 이때 세포가 성장함에 따라 생기는 pH의 변화를 신호로 하여 공급용 배지가 첫 단으로 간헐적으로 투입되었으며, 이에 따라 부피가 늘어나서 미리 정한 한계치에 도달하면 일부만 남기고 Fab 생성을 유도하기 위해 두 번째 단으로 세포를 포함한 배양액이 한꺼번에 넘어가게 했다. 두 번째 단은 26℃, 200 rpm의 조건을 유지하면서 cycle 당 약 4시간동안 1 mM IPTG를 첨가함으로써 Fab의 발현을 유도하였다. 이러한 cycle을 3번 반복하면서 세포 성장, Fab 생성, 포도당 및 초산의 변화를 조사하였다.

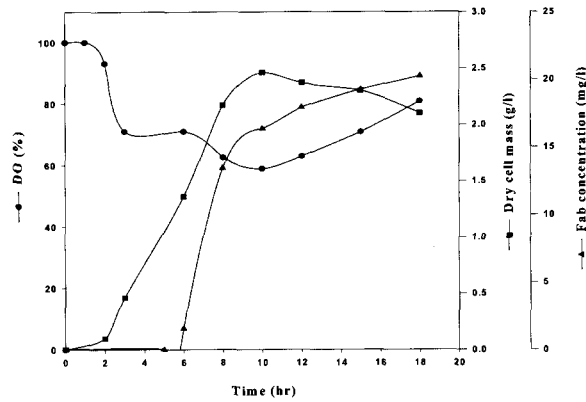


Figure 2. Two-phase batch fermentation of recombinant Topp2. 1st phase : cell growth at 37°C for 3hours 2nd phase : induction at 26°C for 3hours

결과 및 고찰

Two-phase 회분식 배양

Two-phase 회분식 배양은 세포 성장 phase와 생성물 생산 phase가 구분되는 경우에 많이 사용되는데 특히 본 연구처럼 두 phase의 최적 온도가 다른 경우에 더욱 효율적이다. 이 방법은 하나의 생물반응기에서 세포 성장과 항체 생산을 유도하는 방법으로써 첫 번째 phase에서는 37°C에서 3시간 동안 세포성장을 유도하였고, 두 번째 phase에서는 1mM IPTG를 첨가하여 26°C에서 항체 생산을 유도하였으며, 그 결과가 Figure 2에 보여지고 있다. 용존산소의 농도는 세포가 자라는 동안 계속해서 감소하다 세포의 성장이 거의 멈추는 stationary phase에서는 다시 증가하였다. 이와 같이 영양소 제한으로 용존산소의 농도가 올라가는 현상을 이용하여 유가식 배양에서 용존산소를 일정하게 하는 feeding 전략을 개발할 수 있다 (DO-stat). Figure 2의 결과는 작은 시험관에서의 실험 결과보다 항체 생산성 면에서 미약함을 보이는데 이러한 점은 앞으로 scale-up 과정에서 해결해야 할 문제이다.

Two-stage 연속식 배양

연속식 배양에서는 긴 generation time 때문에 plasmid instability가 문제시된다. 이러한 문제점을 극복하기 위한 한 가지 방법이 growth stage와 production stage를 분리하는 two-stage continuous-flow stirred reactor (CSTR) 시스템을 이용하는 것이다. 이 방법은 첫 번째 growth stage에서는 발현 유도 없이 세포 성장만 하게 하여 plasmid 안정이 극대화된 가운데 세포농도를 높인 후 세포배양액을 두 번째 단으로 운송시키고, 두 번째 production stage에서는 IPTG로 발현유도 함으로써 항체의 생산성을 극대화시키는 방법이다. 이와 더불어 용존산소 (DO)를 조절함으로써 세포를 배양하는 동안 산소농도를 일정하게 유지시켜 용존산소를 제어하지 않은 경우에 발생하는 산소 제한(oxygen limiting) 현상의 문제점을 극복할 수 있다. 또한 본 연구의 경우와 같이 최적 세포성장 온도와 최적 항체 생산 온도가 다른 경우에는 two-stage CSTR 공정을 이용하는 것이 더욱 더 바람직하다.

본 실험의 growth stage에서는 37°C에서 세포를 배양하고 production stage에서는 26°C에서 항체 생산을 유도하였다. 과

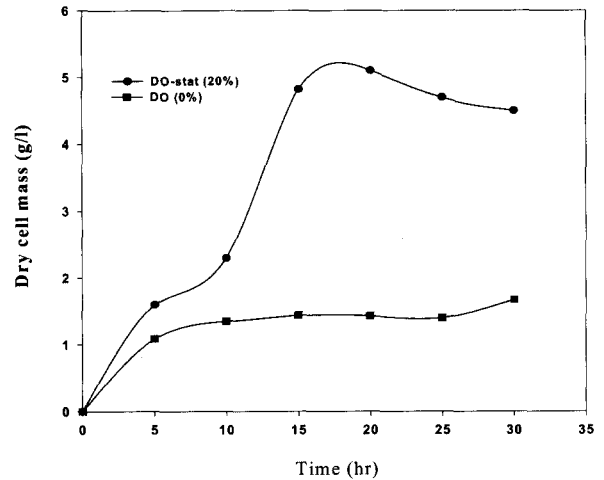


Figure 3. Comparison of cell growth (1st stage) in two-stage continuous fermentation of Topp2.

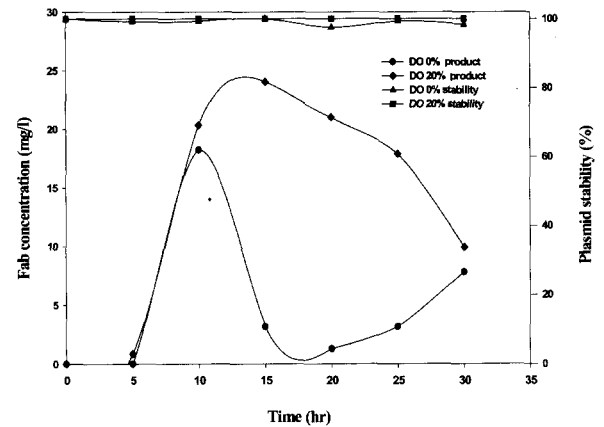


Figure 4. Comparison of antibody productivity and plasmid stability (2nd stage) in two-stage continuous fermentation of recombinant Topp2.

도한 거품이 발생할 경우 antifoam이 사용되었으며, 용존산소를 20%로 유지하기 위해 초기 200 rpm의 교반속도가 약 800 rpm까지 증가되면서 배양되었다. 초기 배양은 1 L의 LB/amp 배지에서 3시간 배양되었으며 0.3 l/hr의 속도로 계속해서 배지가 유입되어 총 배양액이 2 L에 도달했을 때 배지 유입속도와 동일하게 두 번째 단으로 세포배양액을 이동시켰다. 이때 두 번째 단에서의 배양조건은 26°C이었으며 6 mM의 IPTG가 50 m l/hr의 속도로 유입되어 항체 생산을 유도하였다. 7시간이 경과한 후부터 두 번째 단으로부터 4°C의 온도로 유지되는 harvest vessel로 연속적으로 이동되어 Fab를 연속적으로 생산하였다. 배양하는 동안 5시간마다 sampling하여 첫 단에서는 세포성장상과 plasmid 안정성이 조사되었으며 두 번째 단에서는 생성된 Fab의 농도가 측정되었다.

Figure 3과 Figure 4은 용존산소를 제어하지 않은 경우와 용존산소 제어를 통해 20%로 일정하게 유지시킨 경우에 있어서의 세포 농도, 항체 생산성 및 plasmid 안정성을 조사한 결과이다. 세포성장은 용존산소를 제어한 경우가 월등하게 높았으며 용존산소를 제어하지 않은 경우에 있어서는 two-phase batch 배양 실험에서의 결과와 비슷한 정도를 나타냈다. 항체의 생산성도 세포성장상과 마찬가지로 용존산소를

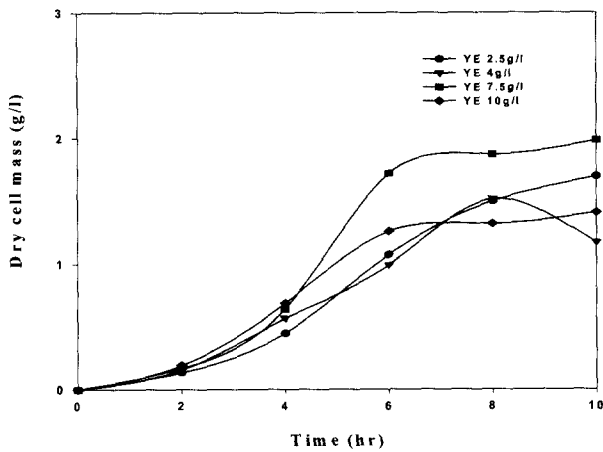


Figure 5. Effect of C/N ratio on cell growth. (initial glucose concentration : 5g/l)

제어한 경우가 월등하게 높았다. Plasmid의 안정성에 있어서는 다소 짧은 generation time으로 인하여 거의 100%를 유지하였다. 약 15시간 경과 후 용존산소를 제어한 경우에도 Fab 생성이 저하되는 것이 목격되었다. 이때 plasmid는 안정적인 것으로 미루어 보아 plasmid instability 문제가 아니고 연속식이기 때문에 실험한 시간동안에 아직 정상상태 (steady state)에 도달하지 못하였기 때문으로 추측할 수 있다. 이는 Figure 4에서 보여주듯이 용존산소를 제어하지 않은 경우에 두 번째 단에서 Fab 농도가 진동(oscillation)하는 사실로 뒷받침될 수 있다. 따라서 연속식 배양에서는 세포 농도 측면에서는 25시간이면 정상상태에 도달하나 생성물인 항체 농도 측면에서는 훨씬 오래 더 운전해야 정상상태에 도달할 수 있음을 알게 되었다. 세포농도와 최대 Fab농도로 미루어 보아 two-phase 회분식 배양보다는 two-stage 연속식 배양에서의 세포농도와 항체 생산성이 우수함을 알 수 있었다.

**Semi-fed batch system을 위한 공급배지 성분**

재조합 대장균의 배양에서 외래 단백질의 생산성 향상을 위해 먼저 고려되어야 할 것이 고농도의 세포를 얻는 것이다. 지금까지 여러 배양 공정 가운데 고농도 세포 배양을 위해서는 유가식 (fed-batch) 배양 시스템이 가장 적절한 것으로 보고되어져 왔다. 유가식 배양에서 영양분의 공급 속도를 조절하는 방법은 feedforward control 방법과 feed back control 방법이 있다. 여기서는 feedforward control 방법인 배지 공급 방법을 도입한 semi-fed batch 배양 연구를 통해 고농도배양을 모색하였고 아울러 이에 따른 feeding 전략을 조사하였다.

이를 위해 먼저 유가식 배양용 공급배지의 개발이 필요하기 때문에 Regenber. *et. al.*(17)의 방법을 바탕으로 하여 Topp2 세포에 맞는 배지의 개발이 이루어졌다. 여러 가지의 배지를 변형 및 조합시킨 결과 최종적으로 modified M9 배지를 기초 배지로 선정하였으며, 탄소원 포도당의 최적 농도를 결정하였고 이로부터 질소원 yeast extract와의 비율인 최적 C/N ratio를 조사하였다. 먼저 포도당의 농도를 확정하기 위해 선정된 최소배지에 여러 농도의 포도당을 첨가하여 세포농도를 비교하였다(data not shown). 그 결과 포도당이 5 g/l 일 때 세포농도가 가장 높았으며, 그 이상의 농도에서는 기질저해 효과를 보였다. 다음은 포도당을 5 g/l 으로 고정하

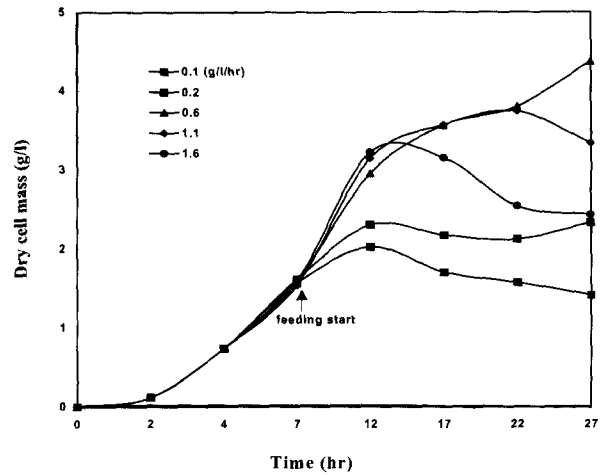


Figure 6. Cell growth of semi-fed system with various feeding rate.

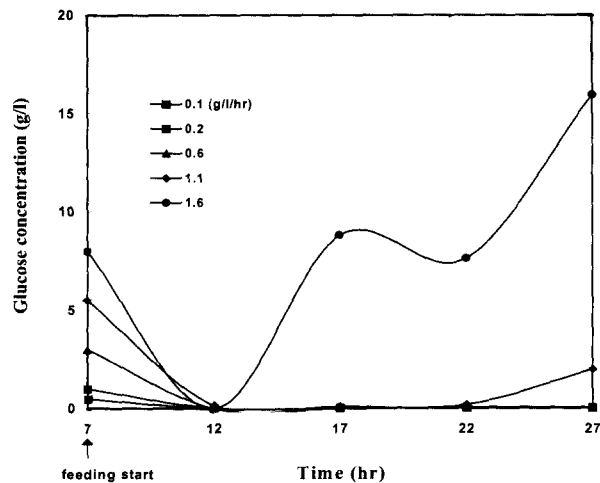


Figure 7. Residual glucose concentration in semi-fed batch system with various feeding rate.

상태에서 여러 농도의 yeast extract를 첨가하여 세포농도를 비교하였다. 그 결과 Figure 5에서 보여주듯이 yeast extract가 7.5 g/l 첨가되었을 때 가장 높은 세포 농도를 얻을 수 있기 때문에 최적 C/N 비율을 2:3으로 결정하였다. 또한 이때 포도당 소모 kinetics를 조사해 본 결과 7시간 batch 배양 후 모두 소비되었다. 따라서 semi-fed batch 배양시 공급 배지는 7시간 후부터 공급하기 시작하였다. 마지막으로 유가식 배양에서 공급 배지의 공급이 시작되기 전 batch 배양을 위한 최적 배지를 선정하기 위하여 변형된 M9 배지를 기본으로 C/N 비율을 2:3으로 유지하면서 포도당의 초기 농도를 달리하여 세포 농도를 비교하였다. 그 결과 포도당 3 g/l, yeast extract 4.5 g/l 일 때 가장 높은 세포농도를 얻었다.

**Constant feeding 방법을 이용한 semi-fed batch fermentation**

Constant feeding 방법을 이용할 경우의 최적 공급배지의 공급속도를 결정하였다. Figure 6은 회분식 배양 7시간 후 5시간 간격으로 여러 가지 공급속도로 공급 배지를 첨가한 결과를 보여주고 있으며, 0.6 g/l/hr의 속도로 배지를 첨가한 경우에 가장 높은 세포 농도를 얻었다. 이때의 포도당 소모 kinetics는 Figure 7에 나타나 있다. 0.6 g/l/hr 이상에서는 포

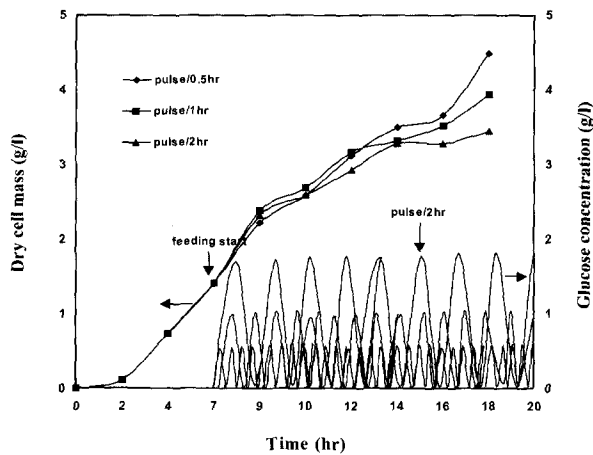


Figure 8. Comparison of cell growth in semi-fed batch with various feeding method ( F=0.92 g/l/hr)

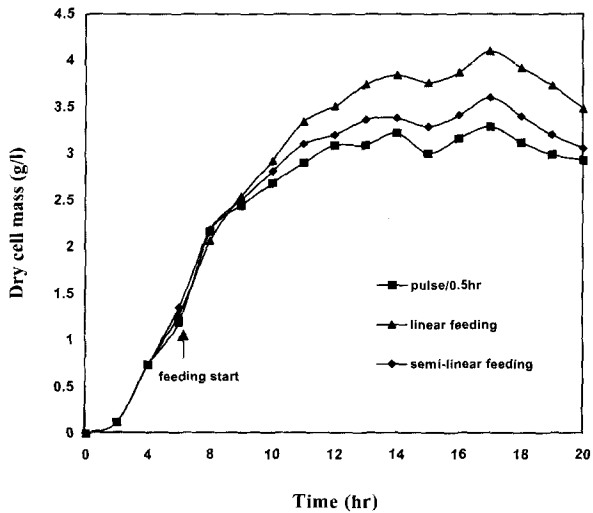


Figure 9. Comparison of growth in semi-fed batch with various feeding method (F=0.92 g/l/hr)

도당이 축적됨을 알 수 있다. 이러한 결과로부터 0.6 g/l/hr 속도 이상의 경우에는 기질 저해효과, 초산의 축적으로 인한 저해, 산소 제한 현상 때문에 세포 성장에 저해를 받는 것으로 생각되어진다. 그러나 5시간 간격으로 공급하기보다 좀더 짧은 간격으로 공급 방법을 변형시킬 경우에는 전체적으로 낮은 포도당 농도를 유지할 수 있기 때문에 세포 성장속도가 더 증가할 수 있을 것으로 예상된다. Figure 8은 0.92 g/l/hr로 0.5시간마다 공급하는 경우에 가장 세포 농도 증진효과가 우수한 것을 보여주고 있다. 이러한 결과로부터 semi-fed batch에서는 될 수 있는 한 pulsing 간격을 짧게 함으로써 전체적으로 포도당 농도를 낮게 유지할수록 세포 성장에 유리함을 알 수 있었다.

**Linear feeding 방법을 이용한 semi-fed batch fermentation**

Constant feeding 방법은 전체 배양액 부피의 증가로 세포의 농도가 희석되어 낮아짐으로써 오히려 비성장 속도가 감소한다는 단점을 갖고 있기 때문에 이를 극복하기 위해 linear feeding 방법을 적용해 보았다. 본 연구에서는 두 가지

pattern의 linear feeding 방식을 적용하여 이에 따른 세포 성장을 조사하였다. 0.5시간마다 0.92 g/l/hr의 속도로 일정하게 공급하는 경우를 control로 하여, 먼저 0.5시간마다 공급하되, 5시간 경과할 동안 linear하게 증가시키면서 공급 속도를 증가시키는 경우(linear feeding)와 linear feeding과 방법은 동일하나 초기 속도를 0.46 g/l/hr로부터 linear하게 증가하면서 배지를 공급하는 방법 (semi-linear feeding)을 적용하였다. 그 결과 Figure 9에서 보이듯이 linear feeding 방법이 더 효과적임을 알 수 있었다. Semi-linear의 경우 초기에 과량의 배지 공급으로 포도당이 축적되는 현상으로 기질저해나 초산의 축적으로 인한 저해 현상이 존재하며, 후반에는 세포 밀도의 증가로 영양 요구량이 증가하는데 비해 공급이 충분히 늘어나지 못하는 현상이 발생되기 때문이다. 결론적으로 feedforward control에 의한 유가식 배양에서는 될 수 있는 대로 연속속식으로 공급하면서 세포의 영양 요구도에 따라 공급 속도를 정밀하게 조절하여 과량의 포도당이 축적되지 않게 하는 것이 무엇보다도 중요하다.

**고농도 세포배양을 위한 two-stage cyclic fed-batch system**

Constant feeding 방법이나 linear feeding 방법으로는 고농도 세포배양에 한계가 있었기 때문에 세포농도를 획기적으로 증진시키기 위해 two-stage cyclic fed-batch공정을 시도하였다. 이 two-stage cyclic fed-batch 공정은 유가식 공정과 연속식 공정의 개념이 동시에 도입되었기 때문에 재조합 단백질의 생산성을 증가시키는데 매우 유용한 방법이다. 본 시스템에서 사용한 유가식 공급 방법은 feedback control 방법의 하나인 pH-stat 방법에 의해 배지의 공급이 이루어졌다. pH-stat 유가식 배양에서는 배지의 공급이 배양액의 pH에 의존한 on-off 모드에 의해 조절되었다.

Two-stage cyclic fed-batch 공정을 모식화한 그림이 Figure 1에 나타나 있다. 초기 1L의 modified M9 배지에서 세포가 7시간 동안 포도당을 완전히 소모할 때까지 성장되었다. 이때 포도당의 소모로 인해 pH의 상승 신호가 pH controller로 전달이 되면 새로운 공급배지가 미리 정한 pH<sub>set</sub>에 도달할 때까지 주입되었다. 이러한 방법으로 유가식 배양이 계속되어 첫 단 (growth tank)의 배양액 부피가 미리 정한 수위 (level)까지 도달되면 일부의 세포 배양액을 남기고 두 번째 단 (induction tank)으로 세포 배양액을 이동시켰으며, 두 번째 단에서 1mM의 IPTG를 syringe filter를 통해 주입함으로써 Fab 항체의 발현 및 생산이 이루어지도록 하였다. 두 번째 단에서 항체가 생산되는 동안 첫 단에서는 새로운 배지가 pH-stat 방법에 의해 다시 채워지며 배양되었다. 이때 두 번째 단으로 이동할 부피만큼 채워지면 Fab 항체를 포함한 배양액을 harvest tank로 이동시켰으며, 이와 동시에 첫 단에서 두 번째 단으로 다시 일정 부피의 배양액을 이동시켰다. 이렇게 3 cycle이 진행되는 동안 세포 성장 속도, Fab 생산 속도, 포도당 소모속도 및 초산의 축적속도를 조사하였다.

배양조건은 연속식 배양 시스템과 동일하며, DO는 20%로 일정하게 유지시켜 주고 semi-complex 배지를 이용하였다. 이러한 two-stage cyclic fed-batch 시스템의 운전결과를 Figure 10와 Figure 11에 나타내었다. 이 방법에 의해 약 54g/l 라는 고농도의 세포를 얻을 수 있었으며, feeding이 시

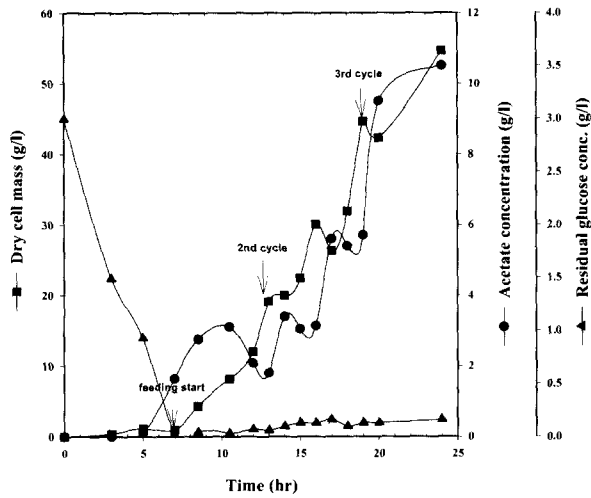


Figure 10. Cell growth, glucose consumption and acetate accumulation kinetics in two-stage fed-batch fermentation using pH-stat (sample from 1st stage).

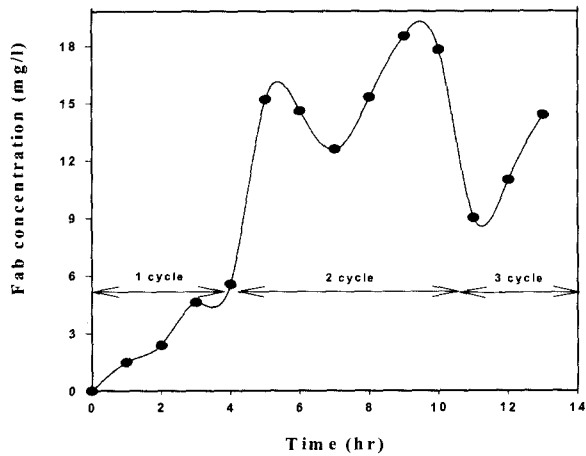


Figure 11. Production kinetics in two-stage cyclic fed-batch fermentation using pH-stat (samples from 2nd stage).

작되는 7시간 경과 후부터 포도당은 거의 고갈 상태를 유지하는데 성공하였다. 반면에 초산은 거의 세포성장 속도와 비례하여 증가하는 결과를 얻었다. 이러한 초산의 과도한 축적으로 생산성의 향상은 예상에 비해 크지 않았다. 초산의 과도한 축적은 세포의 비성장 속도를 고려하지 않았기 때문에 생각되어지며, 이를 고려하여 이 시스템의 배지공급을 정밀하게 조절한다면 과도한 초산의 축적을 방지할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 산소의 공급에 한계가 세 번째 cycle부터 나타나기 시작하였기 때문에 지속적인 실험의 진행이 어려워졌다. 이러한 산소 공급의 제한은 순수산소를 사용하거나 비성장속도를 다소 낮춤으로써 예방할 수 있다. 따라서 Fab의 생산성은 다소 부정확한 것으로 보여지나 순수 산소의 사용으로 산소 공급 문제를 해결하여 cycle이 계속 진행되어진다면, 두 번째 cycle의 생산성을 유지할 수 있을 것이다.

요약

고농도 유전자 재조합 대장균을 이용하여 pyruvate dehy-

drogenase complex-E2 특이성 인간 모노클론 항체의 Fab 부분을 효율적으로 생산하기 위해 회분식, 이단 연속식, 반유가식, two-stage cyclic fed-batch 등 여러 가지 배양 방법이 조사되었다. 먼저 플라스미드 안정성 문제를 극복하기 위해 growth stage와 production stage를 분리하는 two-phase 회분식 배양과 이단 연속식 시스템을 시도하였다. 그 결과 two-phase 회분식 배양보다는 이단 연속식 배양에서의 세포농도와 항체 생산성이 우수하였다. 또한 이단 연속식 배양에서의 세포 성장과 항체 생산성은 용존산소를 제한한 경우가 그렇지 않은 경우보다 월등하게 높았다. 그리고 plasmid 안정성에 있어서는 실험기간 내에 거의 100%를 유지하여 높은 안정도를 보여주었다. 유가식 공정에 적합한 공급 배지로 변형된 M9 배지가 최적배지로 선정되었고 이 배지 중 최적의 C/N 비율을 조사한 결과 2:3으로 결정되었다. 반유가식 시스템에서 constant feeding 전략을 사용할 경우 최적 공급속도는 0.6 g/l/hr이었다. 또한 pulse에 의해 공급배지를 공급할 경우에는 총 공급량이 같을 경우 소량으로 자주 공급해 주는 것이 공급배지를 한꺼번에 많은 양을 공급해주는 것 보다 바람직하였다. 여러 가지 feeding 전략을 조사해 본 결과 linear feeding 방법이 가장 효과적이었다. 하지만 linear feeding 방법마저도 고농도 세포배양에 한계가 있었기 때문에 pH-stat 방법을 이용한 two-stage cyclic fed-batch 시스템을 시도하여 54 g/l의 세포를 얻을 수 있었다. 따라서 이 방법이 일단 생산성 향상을 위한 세포의 고농도 배양에는 조사한 여러 배양 시스템 중에 가장 효율적인 시스템임을 알 수 있었다. 하지만 이 시스템에서 포도당을 낮은 level로 유지할 수 있었으나, 초산의 과도한 축적으로 항체 생산성의 향상은 예상에 비해 크지 않았다.

감사

본 연구는 한국과학재단의 핵심전문연구비(961-1105-034-2)로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Mullinax, R. L., E. A. Gross, J. R. Amberg, B. N. Hay, H. L. Hogrefe, M. M. Kubitz, and A. Greener (1990), Identification of human antibody fragment clones specific for tetanus toxoid in a bacteriophage lambda immunoexpression library, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 2527-2531.
2. Burton, D. R., C. F. Barbas III, M. A. A. Persson, S. Koenig, R. M. Chanock, and R. A. Lerner (1991), A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries asymptomatic seropositive individuals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 10134-10137.
3. Cha, S., P. S. C. Leung, R. L. Coppel, J. Van de Water, A. A. Ansari, and M. E. Gershwin (1993), Combinatorial autoantibodies to dihydrolipoamide acetyltransferase, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 2527-2531.
4. Cha, S., P. S. C. Leung, R. L. Coppel, J. Van de Water, A. A. Ansari, and M. E. Gershwin (1994), Heterogeneity of combinatorial human autoantibodies against PDC-E2

- and biliary epithelial cells in patients with primary biliary cirrhosis, *Hepatology*, **20**, 574-583.
5. Yee, L. and H. W. Blanch (1992), Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*, *BioTechnology*, **10**, 1550-1556.
  6. Yee, L. and H. W. Blanch (1993), Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 781-790.
  7. Bech Jensen, E. and S. Carlsen (1990), Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*; expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 1-11.
  8. Stranberg, L. and S. -O. Enfors (1991), Batch and fed batch cultivations for the temperature induced production of a recombinant protein in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.*, **13**, 609-614.
  9. Tomson, K., T. Paalme, P. S. Laakso, and R. Vilu (1995), Automatic laboratory-scale fed-batch procedure for production of recombinant proteins using inducible expression systems of *Escherichia coli*, *Biotechnol. Tech.*, **9**, 793-798.
  10. Jung, G. D., P. Deneffe, J. Becquart, and J. -F. Mayaux (1988), High-cell density fermentation studies of recombinant *Escherichia coli* strains expressing human interleukin-1 $\beta$ , *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, **139**, 129-146.
  11. Hellmuth, K., D. J. Korz., E. A. Sanders, and W. -D. Deckwer (1994), Effects of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1, *J. Biotechnol.*, **32**, 289-298.
  12. Seo, D. J., B. H. Chung, Y. B. Hwang, and Y. H. Park (1992), Glucose-limited fed-batch culture of *Escherichia coli* for production of recombinant human interleukin-2 with the DO-stat method, *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 196-198.
  13. Mizutani, S., H. Mori, S. Shimizu, K. Sakaguchi, and T. Kobayashi (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 203-211.
  14. Kim, B. S., S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, and S. I. Woo (1994), Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control, *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 892-898.
  15. McGregor, D. P., P. E. Molloy, C. Cunningham, and W. J. Harris (1994), Spontaneous assembly of bivalent single chain antibody fragments in *Escherichia coli*, *Molecular Immunology*, **31**, 219-226.
  16. Riesenberger, D., K. Menzel, V. Schulz, K. Schumann, G. Veith, G. Zuber, and W. A. Knor (1990), High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 77-82.