Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 35, No. 3, 226–230(2007)

유가식 배양에서 재조합 대장균으로부터 Interferon α-1 생산에 산소 공급이 미치는 영향

이종길 · 문석영 · 김영준 · 신철수[1] · 구윤모 *
인하대학교 생물공학과 및 초정밀생물분리기술연구센터, [1]에이피바이오텍

Effect of Oxygen Supply on the Production of Interferon α-1 by Recombinant *Escherichia coli* in Fed-batch Fermentation. Yi, Jong-Ghil, Seok-Young Moon, Young-Jun Kim, Chul-Soo Shin[1], and Yoon-Mo Koo*. *Department of Biological Engineering and Center for Advanced Bioseparation Technology, Inha University, Incheon 402-751, Korea, [1]Advanced Protein Technologies Corporation, Yeongtong-Dong. Suwon* - In order to achieve high-level expression of interferon-α1 (IFN-α1) during fed-batch fermentation of recombinant *E. coli*, effects of oxygen supply and induction temperature on the expression of recombinant proteins were evaluated. Supplementation of oxygen and its transfer into cells is one of the most important parameters involved in the design and operation of mixing-sparging equipment for bioreactors. Generally, higher oxygen supply stimulates cell growth of aerobic microorganism and consequently the amount of products is increased. In this study, the optimum aeration strategy for the higher production of IFN-α1 during fed-batch fermentation of recombinant *E. coli* was surveyed. The growth of the cells was also monitored with four different concentrations of dissolved oxygen (DO; limiting, 20%, 35%, 50%) conditions. The DO was controlled by varying aeration rates of air and pure oxygen. Oxygen uptake rate (OUR) and specific oxygen uptake rate (SOUR) were evaluated and compared for the enhanced growth and induction of the cells and IFN-α1, respectively. We confirmed that increased DO by additional oxygen supply, up to 35%, can improve the production of IFN-α1 during the fermentation.

Key words: Fed-batch fermentation, oxygen uptake rate, specific oxygen uptake rates, interferon-α1

서 론

유가식 공정은 고농도 세포배양에 매우 자주 이용되어 왔다. 유가식 배양은 발효기의 초기배지에 포함된 영양분을 이용해 유지될 수 있는 최대 비성장속도에서 성장하는 접종액을 사용하며, 발효가 완전히 끝날 때까지 영양공급이 다양한 방법으로 이루어진다. 대장균에 대한 High Cell Density Culture(HCDC) 기술의 발달은 여러 단백질과 아미노산 및 poly(3-hydroxy butyrate)등의 효율적이고 높은 수준의 생산성을 이끌어냈다[10].

재조합 균주를 배양하여 높은 농도의 재조합 산물을 생산하는데 가장 중요한 인자로는 고농도 배양기법이다. 고농도 배양의 장점이라면 반응기의 용량을 극소화시킬 수 있고 배양에 이은 발효 후 분리 과정의 처리 용량 감소로 인한 용량 당 수율이 증가하여 분리 및 회수공정이 용이하고 발생하는 폐수의 양이 감소하는 등 많은 장점을 가지고 있다[2, 4, 5, 7, 11].

*Corresponding author
Tel: 82-32-860-7531, Fax: 82-32-875-8655
E-mail: ymkoo@inha.ac.kr

pH를 이용한 자동화된 피드백 조절에 의한 영양분의 공급으로 재조합 대장균으로부터 interferon-α1의 생산을 위한 발효 공정이 개발되었다. 주요한 탄소원이 고갈되었을 때 pH가 변화한다는 관찰에 기초를 두고 있으며 탄소기질이 고갈되었을 때 세포로부터 배출된 ammonium ion 농도의 증가에 의해 pH도 증가하기 시작함으로써 기질이 추가 공급된다[6]. IFN-α1은 interferon 타입 I으로 B-cell interferon, leukocyte interferon, lymphoblast interferon, and pH2-stable interferon 으로 알려져 있으며 바이러스 감염이나 암과 같은 병을 위한 치료용단백질로 개발되었다[1]. 고농도의 세포 배양 시 제한된 산소용해도로 인한 용존산소의 부족 및 초기 고농도의 기질첨가로 인한 성장저해 현상, 저해서 부산물의 축적 등은 유가식 배양에서 흔히 발생하는 공정상의 문제점으로 지적되고 있다[9, 13].

따라서, 본 실험에서는 유가식 배양을 통해 재조합 대장균으로부터 높은 수준의 IFN-α1 의 발현율을 얻기 위해, 첫 번째로 4가지 다른 용존산소 농도(DO; limiting, 20%, 35%, 50%) 조건에서 총 IFN-α1 발현과 용해성IFN-α1의 발현양을 세포증식온도와 목적 단백질 Induction 시 온도의 영향을 알아보았다. 용존산소는 다양한 범위의 공기와 순수 산소의 공급으로 조절되었다. 산소소비속도(OUR)와 특이적산소소

비소도(SOUR)은 각각 IFN-α1과 세포들은 향상된 세포증식과 Induction시에 비교 평가되었다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

사용된 균주는 에이피바이오텍에서 분양받은 *E.coli* Rosetta BL21a이며 플라스미드 pET21a 6.1kb로, fusion partner로 K6ub protein lysine 6개가 N-terminal에 붙어있고 ubiquitin 243 bp로 구성되어 발현량을 증가시킬 뿐 아니라 soluble form으로 발현을 증가 시켜며, 정제를 용이하게 해준다. k6ub/IFN-α1는 Nde*I*과 BamH*I* restriction enzyme 사이에 cloning 되었으며 upstream에 tac promoter에 의해 전사가 조절된다. 발효 배지조성은 Yeast extract 20 g/L, Glucose 20 g/L, KH_2PO_4 5 g/L, K_2HPO_4 3 g/L, Mg_2SO_4 1.2 g/L이었으며, 추가 기질공급 배지는 Yeast extract 211 g/L, glucose 274 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1.5 g/L, Mg_2SO_4 1.2 g/L로 pH가 상승되는 시점부터 추가 공급되었다.

발효조 배양

본 실험에 사용된 발효조는 5.0 L 용량(조업부피 2 L)의 발효조(코바이오텍, Korea)로서 자동온도 조절기, 교반속도 조절기, 용존산소센서, pH센서와 소포제센서를 부착하고 있으며 자동으로 제어된다. 교반속도(200-600 rpm)와 통기량 공기(1 vvm)와 순수산소를 조절함으로써 배양액 내의 용존산소량을 배양조건에 따라 맞춰주었다. pH는 27% 암모니아수를 이용하여 6.8로 조절하였다. 그리고 발효 중 생성되는 기포 제거를 위해 비실리콘 소포제 PPG2000(sigma, USA)을 사용하였다.

유가식 배양의 경우는 균체 성장을 조절하기 위하여 feeding 배지를 pH-stat 방법으로써, 탄소기질이 고갈되었을 때 세포로부터 배출된 ammonium ion 농도의 증가에 의해 pH도 증가하기 시작함으로써 pH signal을 받아 feeding pump가 작동되었다.

균체농도 측정 및 잔류당 분석

건조균체량(dry cell weight, DCW)은 균질혼합기에서 균질화 과정을 건친 배양액 시료를 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 버린 후 증류수를 넣어 와류 혼합을 하고 다시 원심분리 하는 세척과정을 거친 후 105°C에서 항량을 구하여 측정하였다. 발효 배양액의 잔류당은 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 취하여 Dinitrosalicyclic acid(DNS)를 이용한 환원당 측정 방법에 의해 측정하였다.

총단백질 정량

총 단백질의 양은 Sigma (USA)사의 Bradford assay kit을 사용하여 정량하였다. 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하고 표준농도식을 구하여 이후 정량분석에 사용하였다.

k6ub/Interferon-α1 양 측정

각 시료들은 Interferon-α1 측정을 위해서 sampling 후 10,000 rpm에서 5분 원심분리후 -20°C에 보관하였다가 발효가 끝나고 시간별로 취한 sample을 PBS로 세척후에 lysis buffer(30 mM NaPi + 100 mM NaCl + 5 mM EDTA + 0.5% triton X-100)에 resuspension 후 초음파 세포파쇄기를 이용하여 세포 파쇄후 SDS PAGE로 분리 후, Staining 과정을 거쳐 알고 있는 농도의 standard marker와 비교해 densitometric scanning(FUJIFILM, FLA-5000)을 함으로써 Interferon-α1의 양을 측정하였다.

결과 및 고찰

발효조의 임펠러 높이에 따른 산소전달능력 비교

호기성 균주의 발효 시 미생물의 산소요구량을 충족시킬 수 있는 배지내의 용존산소가 중요한 인자로 작용한다. 발효 중 미생물의 산소요구도는 발효조의 교반과 통기에 의한 산소공급과 균형을 이루어야한다. 만일 이 요구를 충족시키지 못하면 배양액의 용존산소농도는 임계농도 이하가 되어 미생물대사에 치명적인 저해를 가져올 수 있다[3]. 그러므로 용존산소의 조절을 위한 운전조건을 확립하기 위하여 다음과 같이 기초실험을 실시하였다.

발효조 안의 최대 산소전달 능력을 알아보기 위하여 임펠러 높이를 바꿔가면서 0.5 vvm과 1 vvm으로 공기공급을 하고, 교반속도는 200 rpm-1,000 rpm 올려가며 산소전달 능력이 가장 좋은 조건을 찾아 본 결과 임펠러 높이 3 cm에

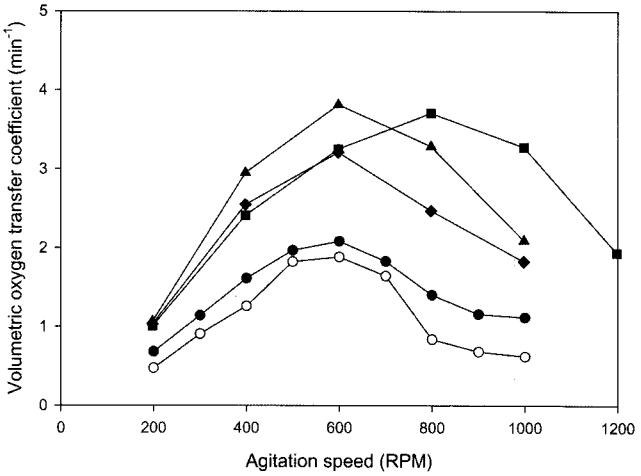

Fig. 1. Determination of K_La under different operating condition with water in 5 L-fermenter -□-; 0.5 vvm (impeller clearance 5 cm), -●-; 1 vvm (impeller clearance 5 cm), -◆-; 1 vvm (impeller clearance 4 cm), -▲-; 1 vvm (impeller clearance 3 cm), -■-; 1vvm(impeller clearance 5cm)

공기공급 1 vvm, 교반속도 600 rpm에서 2.67(min^{-1})으로 가장 높았다(Fig. 1). 교반속도를 600 rpm 이상으로 올렸을 때는 오히려 산소전달 능력이 떨어지는 것을 확인할 수 있었는데 이는 와류 현상으로 교반이 너무 빨라 sparger에서 나온 공기방울들이 깨지는 것이 아니라 임펠러와 같이 통째로 돌아가기 때문이었다.

본 실험을 토대로 유가식 배양 시 최대 Agitation speed는 600 rpm, Aeration rate는 1 vvm, 임펠러 높이는 3 cm로 유지하여 발효조 안의 일정용존산소를 유지하였으며 미생물의 산소 섭취속도가 산소공급 속도보다 높을 경우는 산소와 공기를 적절히 혼합하여 일정 용존산소량을 맞춰주었다.

유가식 배양 시 k6ub/IFN-α1 생성에 미치는 온도의 영향

Fig. 2에서는 유가식 배양 시 순수산소를 추가적으로 공급함으로써 용존산소가 20%이상 유지된 환경에서 k6ub/IFN-α1 생성에 미치는 온도의 영향을 알아본 결과, Cell density, total protein, k6ub/IFN-α1은 37°C에서 각각 55 g/L, 16.21 mg/ml, 4.85mg/ml이었으며 30°C에서는 각각 53 g/L, 19.32 mg/ml, 5.61 mg/ml이었고, 30°C 세포증식 25°C Induction 시 Cell density, total protein, k6ub/IFN-α1은 각각 53 g/L, 16.98 mg/ml, 6.43 mg/m로 Cell density는 37°C에서 가장 높았지만 target protein인 k6ub/IFN-α1 생성량은 30°C 세포증식 25°C Induction시 6.43 mg/ml로 total protein의 37%가 발현된 것을 알 수 있었다.

용존산소 농도 조절에 의한 k6ub/IFN-α1 생성의 영향

산소는 물에 대한 용해도가 낮아서 미생물 생장의 주요 제한요인이 될 수 있다. 특히 세포농도가 높을 경우 산소소모가 공급 속도를 초과하기 때문에 산소 부족이 유발된다. 용존산소 농도가 임계 농도 이하일 경우는 용존산소의 농도가 성자의 제한요인으로 작용하지만 임계농도 이상에서는 생장속도가 용존산소와 무관하게 된다[8]. Azoterbacter vinelandii의 경우, 용존산소 농도를 0.05 mg/L로 배양하면 산소가 제한요인으로 작용하기 때문에 생장속도는 포도당이 남아있는데도 불구하고 최대성장 속도의 50%에 불과하며 포도당이 완전히 소모되면 용존산소가 0.05 mg/L이더라도 생장은 정지한다. 따라서 대부분의 배양시간 동안 생장속도가 용존산소에 의존하는 반면 최대생장은 포도당의 양에 의하여 결정된다[6].

Fig. 3은 용존산소 농도 조절을 위하여 초기 seed를 접종하고 통기속도는 2 L/min과 교반속도 200 rpm으로 수행하다가 8시간째 회분배양 기질이 고갈로 인해 pH가 상승하게 되고 pH를 맞추기 위해 feeding 배지가 첨가되기 시작하고 10시간째 교반속도 600 rpm, 통기속도 1 vvm으로 용존산소량을 20% 수준이하로 떨어지기때문에 이때부터 순수 산소(0.3 L/min)가 공기(1 L/min)와 혼합되어 첨가되어 발효조 안의 용존산소량이 20% 이상 유지가 되다가 다시 23시간째

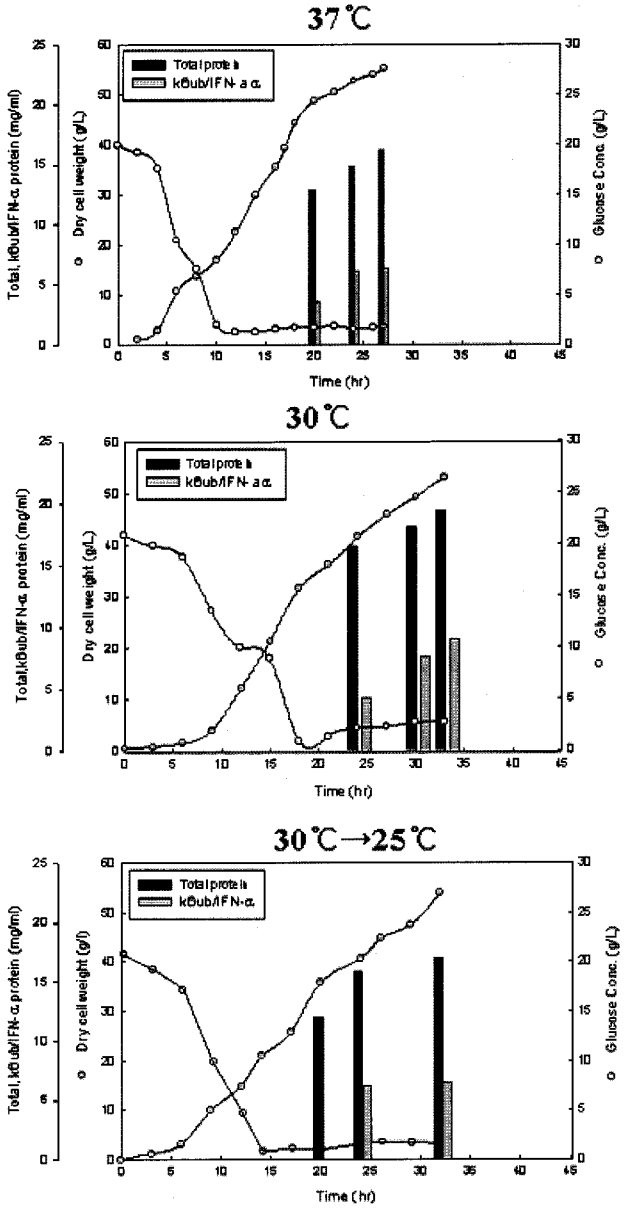

Fig. 2. Comparison of k6ub/IFN-α1 production, dry cell weight and glucose concentration among the 37°C, 30°C and 30°C → 25°C culture temperature at dissolved oxygen concentration of 20% in fed-batch fermentation.

다시 용존산소 농도가 떨어져 순수 산소(0.4 L/min)가 공기(1 L/min)와 혼합되어 첨가되어 용존산소량이 20% 이상 유지되었다. Fig. 4는 통기속도와 교반속도를 이용하여 용존산소 농도를 조절하여 유가식 발효에서 용존산소 조절이 k6ub/IFN-α1 생산에 미치는 영향을 규명하고자 용존산소 농도를 0%, 20%, 35%, 50%로 조절하여 실험을 수행하였고, 최적 발효 시간은 33시간으로 total protein, k6ub/IFN-α1의 발현량은 용존산소량이 0% 일때 각각 10.3 mg/ml, 3.0 mg/ml 이었으며, 20%일때 각각 16.2 mg/ml, 6.3 mg/ml이었고, 35% 일때 각각 21.8 mg/ml, 9.5 mg/ml이었으며, 50% 일때

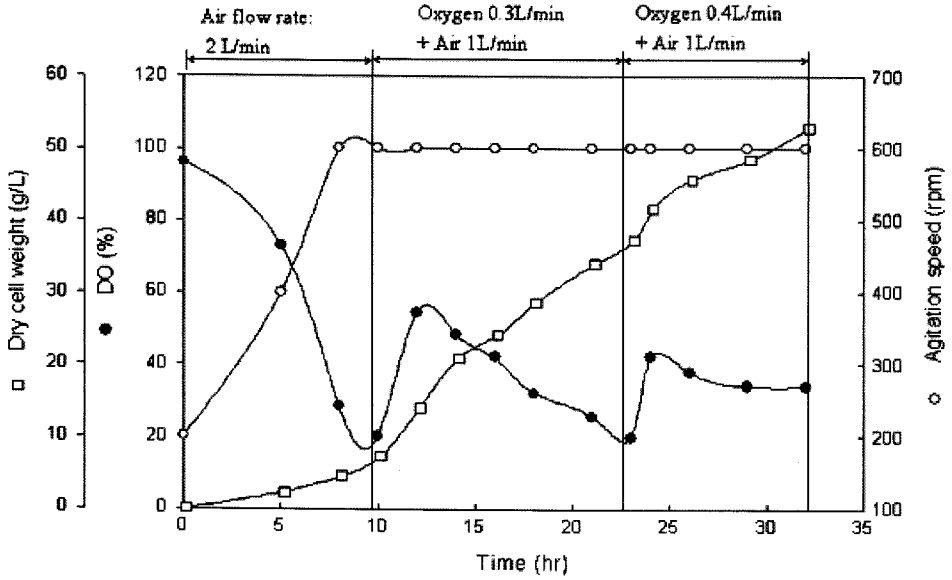

Fig. 3. Time course profiles of dry cell weight by controlling DO, agitation speed, aeration rate in fed-batch fermentation. DO was maintained at about 20%.

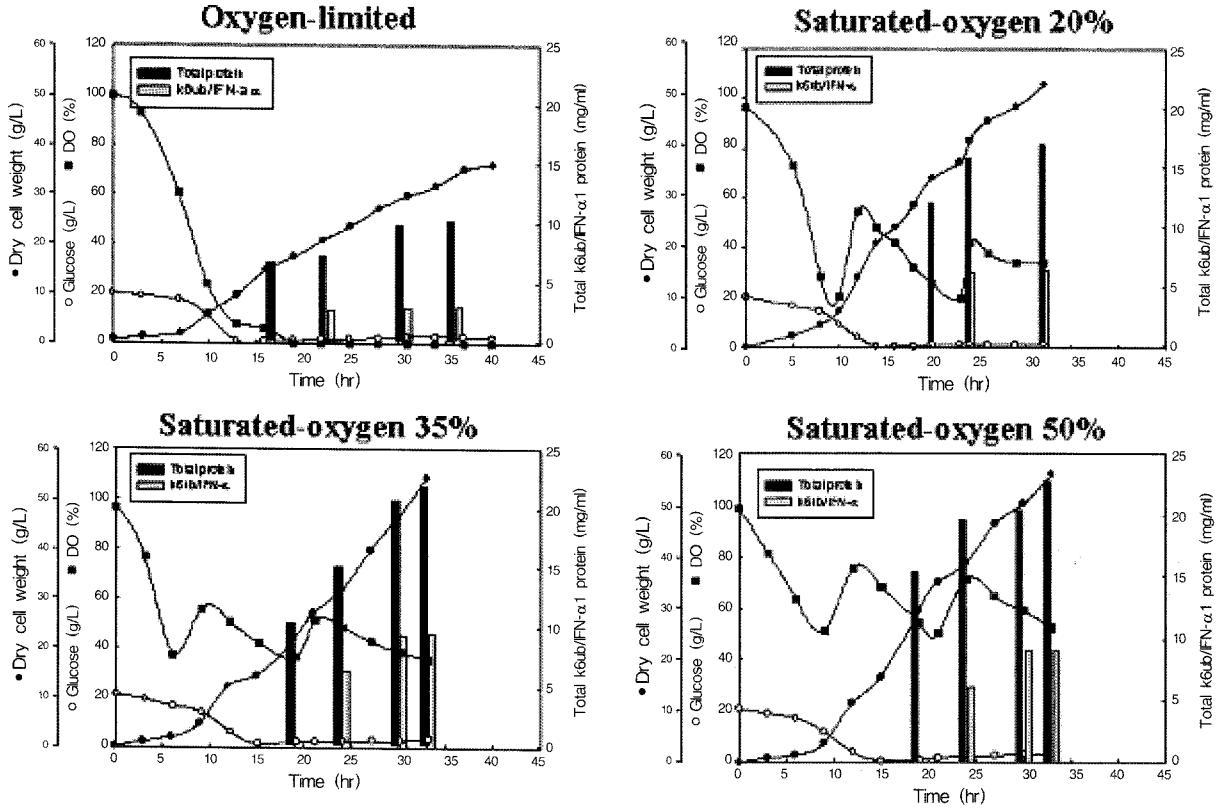

Fig. 4. Comparison of k6ub/IFN-α1 production, dry cell weight and glucose concentration among the 0%, 20%, 35%, 50% dissolved oxygen concentration in fed-batch fermentation.

각각 22.1 mg/ml, 9.14 mg/ml target protein인 k6ub/IFN-α1 발현량이 가장 높은 것을 알 수 있었다. 용존산소량은 산소소비 속도를 측정함으로써 정확한 임계점을 찾을 수 있었는데 추가적인 산소공급이 없는 상태에서는 산소전달 속도보다 산소소비 속도가 더 커서 세포성장 및 단백질의 발현에도 저해를 가져오는 것을 알 수 있었다. 그러나 오히려

Table 1. Fed-batch cultures for production of k6ub/IFN-α1 at different culture condition.

Culture & Induction condition	Final dry cell weight (g/L)	Total Protem (mg/ml)	Volumetric yields (g/L)	Specific yields (mg/g CDW)	IFN-α content per total protein (%)	Maximum OUR (mM · O_2/h)
Limited-oxygen	42.9	12.7	3.0	83	29	6.5
Saturated-Oxygen 20%	53.9	17.0	6.4	119	37	9.2
Saturated-Oxygen 35%	58.4	21.5	9.5	175	43	10.2
Saturated-Oxygen 50%	60.5	22.8	9.1	150	40	11.2

※ Maximum KLa with water: 4.125 ($mmolO_2$/1 h)

target protein의 발현 양을 비교해본 결과로는 용존산소량이 50% 이상 일 때 보다 35%에서 가장 높은 발현 양을 보였다(Table 1).

요 약

산소를 많이 소비하는 발효공정일수록 배양액중의 용존산소의 농도가 목적생산물의 생산성에 많은 영향을 주는 경우가 많다. 때문에 고농도 발효에 앞서, 발효조의 sparging hole 로부터 임펠러 높이에 따른 산소전달 능력을 알아본 결과 공기공급이 1 vvm, 교반속도가 600 rpm에서 산소전달계수(K_La)는 2.67(min^{-1})으로 가장 높았다. 배양 시 용존산소 농도를 20% 이상 유지시켰을 때 온도에 따른 k6ub/IFN-α1 생성은 30°C에서 세포증식을 하고 25°C에서 IPTG로 Induction 하였을 때 발현율이 6.43mg/ml로 total protein의 37%로 가장 많은 양이 발현되는 것을 알 수 있었다. 용존산소 농도에 따른 k6ub/IFN-α1의 발현양은 용존산소 농도가 35%일 때 가장 높은 수율을 나타냈다. 용존산소량은 산소소비 속도를 측정함으로써 정확한 임계점을 찾을 수 있었는데 용존산소량이 35% 유지될 때 산소 전달 속도와 비교하여 가장 적당한 산소공급량임을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 초정밀분리기술센터의 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다. 또한 본연구에 사용된 균주를 제공해주신 APtech에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Babu, R. and S. Swaminathan. 2000. production of interferon-a in high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins, *Microbiol Biotechnol,* **53**: 655-660.
2. Chen, C. G. 1997. Automated fed-batch fermentation with feed-back controls based on dissolved oxygen (DO) and pH for production of DNA vaccines, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,* **18**: 43-48.
3. Emilio Gomez, Victoria E. Santos, and Almudena Alcon. 2006. Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of Pseudomonas putida CECT5279: Influence on Biodesulfurization (BDS) *Capability, Energy & Fuels*, **20**: 1565-1571.
4. Jeong, K. J. and S. Y. Lee. 1999. High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its puri.cation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3027-3032.
5. Kim, B. S. and L. Seung Chu. 2004. High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat, *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, **26**: 147-150.
6. Kim, S. S. 1995. Effects of Specific Growth rate on the High Cell Density Cultivation of Lipase-producing Recombinant *Escherichia coli*, M. S. Thesis, Dept. of Microbiology, Inha University, Incheon.
7. Lee, S. Y. 1996. High-cell-density culture of *Escherichia coli, TIBTECH.,* **14**: 98-105.
8. Motarjemi, M. and G. J. Jameson. 1978. Mass transfer from very small bubbles-the optimum bubble size for aeration, *Chem. Eng. Sci.* **33**: 1415-1423.
9. Rabhi-Essafi, I. and A. Sadok. 2007. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon a as a GST-fusion protein in *E.coli,* Protein Engineering, Design & Selection, pp. 1-9.
10. Risenberg, D., B. Schulz, W.A. Knorre, and H.-D. Pohl 1991. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate, *J. Biotechnol.*, **20**: 17-28.
11. Shin, C. -S., H, Min Seon. 1997. Enhanced Production of Human Mini-Proinsulin in Fed-Batch Cultures at High Cell Density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2], *Biotechnol. Prog,* **13**: 249-257.
12. S. Shams Yazdani, and A. Rushdi Shakri. 2004. A high cell density fermentation strategy to produce recombinant malarial antigen in *E. coli, Biotechnology, Letters* **26**: 1891-1895.
13. Yee, L. and H. W. Banch. 1993. Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*, Biotechnol, and Bioeng., **41**: 781-790.

(Received July 3, 2007/Accepted Sep. 6, 2007)