*Sorangium cellulosum*의 생물반응기 배양에서 용존산소가 epothilone의 생산에 미치는 영향

박수정 · 한세종 · 김병우 · 심상준*
성균관대학교 화학공학과

Effect of Dissolved Oxygen on the Production of Epothilone in Bioreactor Cultures of *Sorangium cellulosum*

Su Jeong Park, Se Jong Han, Byung Woo Kim, and Sang Jun Sim*
Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea.

Abstract The biological production of a potent anticancer agent, epothilone, by *Sorangium cellulosum* was carried out using flask and fermentor cultures. Soluble starch was selected as the main carbon source and the concentrations of lactose and yeast extract were optimized at 4 and 0 g/L, respectively, when using the flask cultures. In the fermentor cultures, the cells were cultivated at a high DO level of more than 80% of air saturation in the growth stage and then the DO level was controlled at about 50, 20 or 1-2% when the carbon source was exhausted. The epothilone production increased with decreasing DO level after the exhaustion of the carbon source, and the maximum concentration of epothilone was 5.4 mg/L. It was found that the DO level had significant regulation effects on the epothilone production.

Keywords: Dissolved Oxygen (DO), Epothilone, Secondary metabolite, *Sorangium cellulosum*

서 론

그람 음성 myxobacteria인 *Sorangium cellulosum* So ce90은 2차 대사산물로 유망한 항암제 중의 하나인 epothilone을 생산한다(1-3). Epothilone의 작용기작은 탁솔 (Taxol)과 매우 유사하여 이들은 microtuble에 결합하고 안정화되는 과정을 거쳐 암세포를 괴사시킨다(4). Epothilone은 탁솔에 비해 몇 가지 장점을 갖고 있는데, 첫째, 물에 대해 높은 용해성을 가지므로 별도의 안정제 없이 사용할 수 있다. 둘째, Epothilone은 탁솔에 저항성이 있는 암세포에 효과가 있음이 밝혀졌다(4, 5). 이러한 이점들 때문에 탁솔을 능가하는 관심을 받고 있으며 차세대 항암제로 많은 연구가 진행되고 있다. 자연 상태의 *S. cellulosum*은 최종 발효산물로 epothilone A와 epothilone B를 주로 생산한다(5). Epothilone A와 epothilone B는 각각 acetate와 propionate를 기본 출발물질로 하고 있으며 epothilone B는 12번 탄소에 methyl기가 있는 것이 epothilone A와 다른 점이다(6). Epothilone C와 epothilone D는 각각 생합성 경로에서 epothilone A와 epothilone B의 전구체가 된다(7, 8). 본 연구팀은 이전 연구에서, 탄소원의 조절, 양이온 교환수지의 이용, 전세포 고정화 등을 통해 epothilone의 생산성을 높이는 다양한 시도를 flask 배양을 통하여 수행하였다(9-11). 본 연구에서는 lactose 및 yeast extract의 영향에 대해서 알아보고, 주로 생물반응기 배양을 통해 용존산소 (dissolved oxygen)가 epothilone의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

***Corresponding author**
Tel: +82-31-290-7341, Fax: +82-31-290-7272
e-mail: simsj@skku.edu

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 사용한 균주는 *Sorangium cellulosum* So ce90으로 독일의 DSMZ (German collection of microorganisms and cell cultures, Germany)에서 PM 배지 (pH 7.3)에 도말된 상태로 분양 받았다. PM배지는 단위 부피 (1 L) 당 peptone 0.4 g, $MgSO_4$ 1.5 g, Tris-HCl 2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 g, Na-Fe(III)-EDTA 80 mg, KNO_3 0.2 g, K_2HPO_4 6.25 mg, glucose 0.35 g, dithionite 0.06 mmol 및 agar 15 g으로 구성되어 있다. 종배양 (seed culture)을 위해 균체가 도말된 agar 조각을 20 mL의 멸균된 E 배지가 있는 250 mL의 삼각 flask에 접종한 후 32℃, 200 rpm에서 약 10일 동안 배양하였다. 종배양 배지로 E배지 (pH 7.6)를 사용하였으며 단위 부피 (1 L) 당 구성 성분은 skim milk 4 g, soy grits 4 g, potato starch 10 g, yeast extract 2 g, glycerol 4.3 ml, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, HEPES buffer 50 mmol 및 $FeCl_3$ 21 μmol 이었다(12, 13). E 배지에서 탄소원 및 질소원을 변형시키는 선행연구를 통해 최적화한 후 이를 생물반응기 생산배지로 사용하였다.

배양액으로 분비된 epothilone을 결합 및 획득하기 위하여 배지에 XAD-16 resin (Rohm and Haas electronic materials, Korea, Ltd.)을 20 g/L 농도로 첨가하였다.

Shake Flask 배양

멸균과정 동안 XAD-16 resin이 균체 성장에 필요한 배지 중의 영양 성분과 결합하는 것을 방지하기 위하여 resin과 배지는 각각 별도로 멸균 후 무균적으로 혼합되었다. 250 mL flask에 XAD-16 resin 1 g과 증류수 3 mL를 넣고 121℃에서 30분간 멸균한 후, 동일조건에서 별도로 멸균된 50 mL의 E배지를 첨가하였다. 이와 같이 준비된 flask는 접종 (10% (v/v)) 과정을 거친 후 32℃, 200 rpm에서 약 10일 동안 배양에 사용되었다.

발효기 배양

5 L 발효기 (KoBiotech, Korea)에 배양액 2 L를 넣고 회분식 배양을 수행하였다. HEPES buffer를 제외한 E 배지와 20 g/L의 XAD-16 resin을 별도로 121℃ 에서 30분간 멸균한 후 혼합하였다. 접종은 E 배지에서 배양한 200 mL의 종배양액을 발효기에 투입하여 수행하였고 초기 조건은 온도 32℃, 공기 공급속도 0.5-1.0 v/v/m, 교반속도 200 rpm 이었다. 배양액의 pH는 1 N KOH와 1 N H_2SO_4을 이용하여 7.6으로 유지시켰다.

Epothilone 분석

우선 배양액으로부터 1 g의 XAD-16 resin을 취한 후 50 mL의 증류수로 3회 세척한 한 다음 여과하여 resin을 수거하였다. Methanol 25 mL를 이용하여 30분간 epothilone을 추출한 후 HPLC (Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다. 50 μL의 methanol 추출물을 4.6 x 10 mm guard column (Inertsil, ODS-3, 5 μm) 및 4.6 x 150 mm column (Inertsil, ODS-3, 5 μm) 이 장착된 HPLC에 주입하였다. 이동상으로 60% acetonitrile과 40% 증류수를 사용하였고 유속 1 mL/min, 파장 250 nm에서 UV 검출기를 이용하여 epothilone을 검출하였다.

탄소원 분석

배양액을 12,000 × g, 실온에서 20분간 원심분리한 후 상등액에 존재하는 starch 및 glucose의 농도를 요오드법 및 효소법으로 측정하였다. Starch의 농도는 1 mL의 요오드 반응액 (0.02% iodine, 0.03 M potassium iodine, 1 drop of conc. H_2SO_4 per liter)을 9 mL의 상등액과 혼합한 후 550 nm에서 iodo-starch의 흡광도를 측정하여 구했다. Glucose의 농도는 3 mL의 효소액 (Peroxidase-glucose oxidase enzyme and Buffer diluents)에 0.02 mL의 상등액을 혼합한 후 37℃에서 5분간 반응 후 505 nm에서 흡광도를 측정하여 구했다.

균체 농도 분석

배양액 내의 균체 농도는 spectrophotometer (Hitachi, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도 (OD_{600})를 측정하여 얻었다. 1 mL의 시료를 배양액에서 무균적으로 취한 후 흡광도가 일정한 범위에 들어오도록 적절히 희석한 후 OD_{600}을 측정하였다.

결과 및 고찰

탄소원 최적화

생물반응기를 이용한 epothilone 생산에 있어 최적의 탄소원을 찾기 위하여, glucose, potato starch, soluble starch를 각각 탄소원으로 하여 균체 성장 및 epothilone의 생산성을 비교하였다. 선행연구 결과, glucose, potato starch, soluble starch의 최적 농도는 각각 10, 15, 15 g/L 였고 이 때 최대 균체 농도는 각각 OD_{600} = 7.5, 12, 10이었다.

생산된 epothilone의 농도는 glucose, potato starch, soluble starch의 경우 각각 3.2, 4.8, 4.4 mg/L이었다 (Fig. 1). Potato starch를 탄소원으로 사용했을 경우 최대의 균체 농도를 얻었으나 epothilone의 생산성은 soluble starch의 경우와 거의 유사하였다. 또한, potato starch의 경우 용해도가 5 g/L에 불과하여 15 g/L의 soluble starch보다 상당히 낮아 발효기의 공기주입구를 막아 산소전달

의 어려움이 있어 생물반응기 배양에서 soluble starch를 E배지의 탄소원으로 사용하였다.

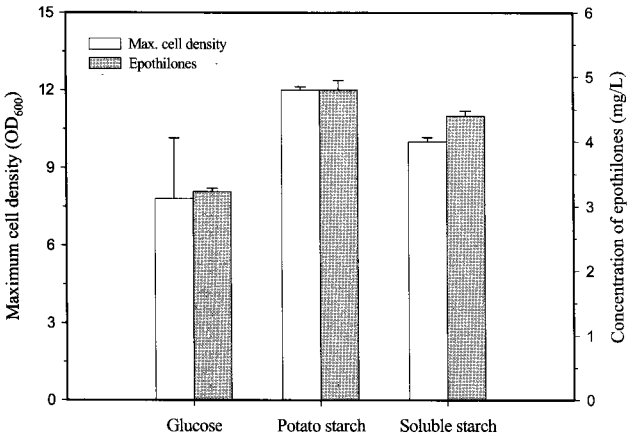

Fig. 1. Effect of carbon source on maximum cell density and epothilone production. Cells were cultivated in 250 mL flask supplemented with different carbon sources, glucose, potato starch and soluble starch, and the maximum cell density and final epothilone concentration were determined.

균체에 의한 soluble starch의 소모와 epothilone 생산과의 관계를 조사하기 위하여 시간에 따른 epothilone 및 soluble starch의 농도를 측정하였다. 그 결과, soluble starch의 농도가 0 g/L에 도달한 후에 epothilone의 생산을 확인하였으며 이는 약 6-7일간 지속됨을 알 수 있었다(Fig. 2.).

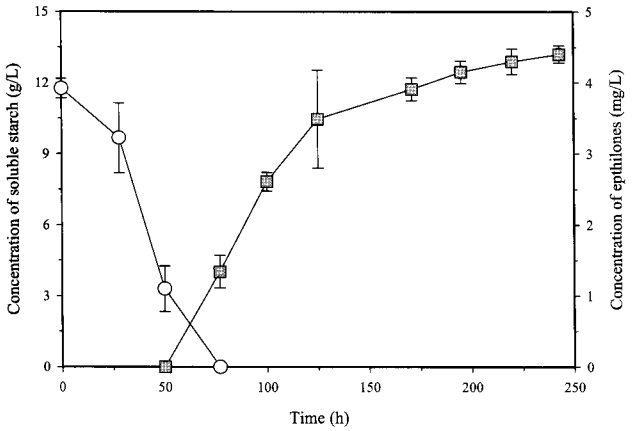

Fig. 2. Time course of consumption of soluble starch and production of epothilone by *Sorangium cellulosum*. Cells were cultivated using soluble starch as the carbon source and the concentrations of soluble starch (○) and epothilones (■) were measured.

Epothilone 생산에 대한 lactose 및 yeast extract의 영향

새로운 탄소원 및 질소원으로 lactose와 yeast extract가 각각 epothilone의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Lactose의 경우 농도를 0 에서 4 g/L까지 올렸을 경우 epothilone의 생산이 증가하다가 이 후 감소하여 최적 농도가 4 g/L로 밝혀졌다(Fig. 3A).

질소원으로 사용된 yeast extract의 경우, 흥미롭게도 농도가 증가하면서 균체 농도도 함께 증가하였으나 epothilone의 농도는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3B).

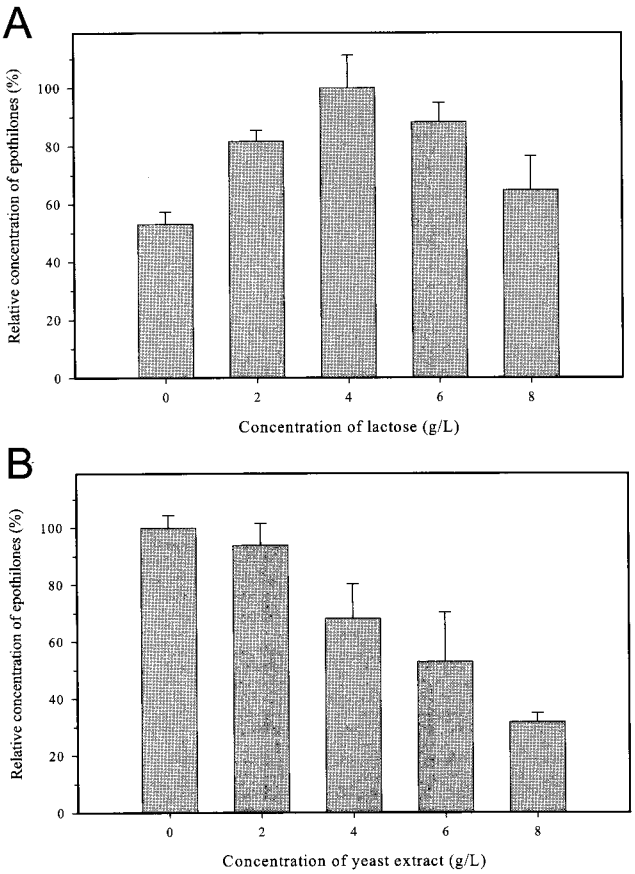

Fig. 3. Effect of (a) lactose and (b) yeast extract on epothilone biosynthesis. Cells were cultivated with 0, 2, 4, 6, or 8 g/L of lactose and yeast extract, respectively, and the final concentrations of epothilone were measured.

산소농도에 따른 epothilone의 생산성

미생물의 배양 중에 산소 공급을 제한하면 최종산물의 중간체의 합성에 필요한 cytochrome P-450 monooxygenase 등의 활성에 영향을 주어 중간체의 축적을 유도할 수 있다. Epothilone 등의 합성에 관여하는 유전자를 발현하도록 고안된 재조합 myxobacteria를 이용하여 배양 중 산소농도의 영향을 조사한 경우는 있으나 자연 상태의 *Sorangium cellulosum*을 이용한 예는 없다(7, 14). 회분식의 대량 배양에 있어 산소 공급 및 용존산소 농도의 영향이 epothilone의 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 균체를 높은 용존산소 수준 (공기 포화농도의 80%이상)에서 배양하다가

탄소원이 고갈되는 시점에서 각각 50, 20, 1-2% 수준으로 조절하여 epothilone의 농도를 측정하였다. 그 결과 용존 산소 수준을 약 1-2%로 가능한 낮게 유지시키는 것이 최대의 epothilone 생산성 (5.4 mg/L)을 보였다(Fig. 4). 일반적으로 2차 대사산물은 균체가 열악한 외부환경에 노출되었을 경우 생산성이 증가하게 되는데, 탄소원이 고갈된 시점에서 산소농도의 감소가 epothilone의 생산성 증대에 영향을 준 것으로 사료된다.

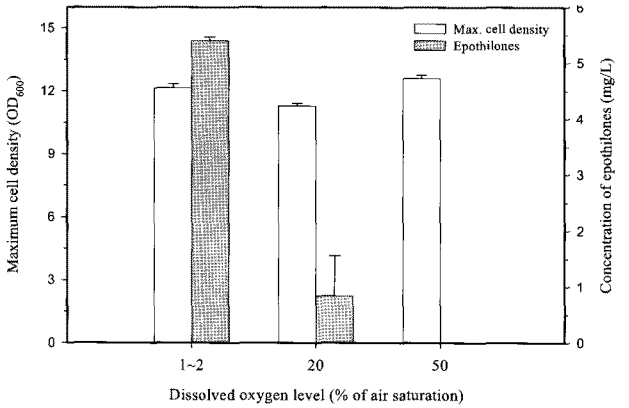

Fig. 4. Effect of dissolved oxygen level on epothilone biosynthesis by *Sorangium cellulosum*. Cells were cultivated using a 5 L jar fermentor with a working volume of 2 L and the DO levels were controlled at 50, 20 or 1-2% of air saturation after the carbon source was depleted.

요 약

본 연구에서 탄소원이 고갈된 후 용존산소농도로 epothilone의 합성을 조절할 수 있음을 증명하였다. 선행연구로써, soluble starch를 탄소원으로 결정하였고, lactose와 yeast extract의 최적농도가 각각 4 g/L, 0 g/L임을 알 수 있었다. 탄소원이 고갈된 환경에서 산소농도가 낮을 경우 균체가 epothilone을 다량으로 합성하였다. 산소 공급을 조절할 수 없는 flask의 경우 배양이 진행되면서 균체농도가 증가하고 자연적으로 산소 농도도 감소하므로 epothilone이 합성되지만, 생물반응기의 경우 탄소원의 고갈 후 산소농도를 최대한 낮게 유지시키는 것이 epothilone의 생산을 증가시켰다.

접수 : 2008년 7월 7일, 게재승인 : 2008년 12월 22일

감 사

본 연구는 신화학공정기술사업 (과제관리번호 10023883) 및 (주)휴온스의 지원에 의한 결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Gerth, K., N. Bedorf, G. Hfle, H. Irschik, and H. Reichenbach (1996), Epothilones A and B: Antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria) Production, physico-chemical, and biological properties, *J. Antibiot.* **49**, 560-563.
2. Julien, B., S. Shah, R. Ziermann, R. Goldman, and L. Katz, and C. Khosla (2000), Isolation and characterization of the epothilone biosynthetic gene cluster from *Sorangium cellulosum, Gene* **249**, 153-160.
3. Rosenberg, E., K. H. Keller, and M. Dworkin (1977), Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein, *J. Bacteriol.* **129**, 770-777.
4. Bollag, D. M., P. A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, and C. M. Woods (1995), Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action, *Cancer Res.* **55**, 2325-2333.
5. Rowinsky, E. K., E. A. Eisenhauer, V. Chaudhry, S. G. Arbuck, and R. C. Donehower (1993), Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol), *Semin. Oncol.* **20**, 1-15.
6. Han, S. J., S. W. Park, B. W. Kim, and S. J. Sim (2008), Selective production of epothilone B by heterologous expression of propionyl-CoA synthetase in *Sorangium cellulosum, J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 135-137.
7. Molnar, I., T. Schupp, M. Ono, R. Zirkle, M. Milnamow, B. Nowak-Thompson, N. Engel, C. Toupet, A. Stratmann, D. D. Cyr, J. Gorlach, J. M. Mayo, A. Hu, S. Goff, J. Schmid, and J. M. Ligon (2000), The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90, *Chem. Biol.* **7**, 97-109.
8. Su, D.-S., A. Balog, D. Meng, P. Bertinato, S. J. Danishfsky, Y.-H. Zheng, T.-C. Chou. L. He, and S. B. Horwitz (1997), Structure-activity relationships of the epothilones and the first in vivo comparison with paclitaxel, *Angew. Chem. Int. ED. Engl.* **36**, 2093-2096.
9. Park, S. W., S. H. Choi, Y. J. Yoon, D. H. Lee, D. J. Kim, J.-H. Kim, Y. K. Lee, G. J. Choi, I.-T. Yeom, and S. J. Sim (2006), Enhanced production of epothilones by carbon sources in *Sorangium cellulosum, J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 519-523.
10. Park, S. W., S. J. Han, D.-S. Kim, and S. J. Sim (2007), Improvement of epothilone B production by *in situ* removal of ammonium using cation exchange

resin in *Sorangium cellulosum* culture, *Biochem. Eng. J.* **37**, 328-331.
11. Park, S. W., S. J. Park, S. J. Han, J. Lee, D.-S. Kim, J.-H. Kim, B. W. Kim, J. Lee, and S. J. Sim (2007), Repeated batch production of epothilone B by immobilized *Sorangium cellulosum*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1208-1212.
12. Pfeifer, B. A. and C. Khosla (2001), Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 106-118.
13. Reichenbach, H. and M. Dworkin (1992), The myxobacteria, In *The Procaryotes,* A. Balow, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer, Eds., p3416, Springer-Verlag, New York.
14. Tang, L., S. Shah, L. Chung, J. Carney, L. Katz, C. Khosla, and B. Julien (2000), Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster, *Science* **287**, 640-642.