

고정상세포분리기의 개발 및 Cyclosporin A 생산을 위한 고정화 연속배양공정에의 적용

이태호 · 박성관¹ · 장용근 · 전계택^{*}

한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터

¹강원대학교 생명과학부

Development of Immobilized Cell Separator and Its Application to Immobilized Continuous Process for the Production of Cyclosporin A. Tae-Ho Lee, Sung-Kwan Park¹, Yong-Keun Chang, and Gie-Taek Chun^{*}. Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon, 305-701, Korea, ¹Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea – We have developed an efficient immobilized cell separator for continuous operation of immobilized fungal cell cultures, and applied this separator to actual fermentation process for the production of cyclosporin A (CyA), a powerful immunosuppressant. In the experiments employing highly viscous polymer (carboxymethyl cellulose) solution, the decantor showed good separating performances at high solution viscosities and fast dilution rates. Air duct and cylindrical separator installed inside the decantor turned out to play key roles for the efficient separation of the immobilized cells. By installing the decantor in an immobilized perfusion reactor system (IPRS), continuous immobilized culture was stably carried out even at high dilution rate for a long period, leading to high productivities of free cells and CyA. Almost no immobilized biomass existed in effluent stream of the IPRS, demonstrating the effectiveness of the decantor system for a long-term continuous fermentation. It was noteworthy that we could obtain these results despite of the unfavorable fermentation conditions, i.e., reduced density of the biosupports caused by overgrowth of cells inside the bead particles and existence of high density of suspended fungal cells (10 g/l) in the fermentation broth.

고정상세포연속배양 공정은 조업 안정성, 고농도 배양 및 높은 생산성 등의 장점으로 인해 다양하게 연구되어 왔다. 세포고정화를 위해 adsorption, entrapment, encapsulation 등의 여러 방법이 개발되었으나, 고정화의 용이성 및 효율성, 담체 사용의 경제성, 담체 내의 물질전달 등의 요인들에 의해 각기 장·단점을 가진다(1-6). 특히 균사를 형성하는 미생물 배양의 경우 일반 세균이나 효모에 비해 고정화의 효율성이 훨씬 크다. 즉 곰팡이류나 방선균 계통은 배양시 branched filamentous mycelium 등의 형태학적 특성으로 인해 배양액이 비뉴튼 유체화되어 배양액의 점도가 매우 높아지며 이는 결과적으로 물질전달 감소에 기인한 산소 고갈, 혼합의 비균일성 등의 여러 문제점들을 야기하곤 한다. 반면, 균사형성 미생물의 고정화 배양은 위에서 거론한 일반적인 장점 외에도 배양액의 특성이 pellet 형태로 자라는 현탁 배양액의 유변학적, 형태학적 특성과 유사하여 배양액의 점도가 낮게 유지되며, 이로 인해 물질전달이 뚜렷하게 향상될 수 있다는 장점들

가지고 있다(1-3).

한편 생산균주의 성장이 어느 정도 저하된 상태에서 생산성이 크게 증가하는 이차대사 산물의 생합성의 경우 고정화 연속공정은 일반 회분식배양이나 연속현탁 배양에 비해 탁월한 공정 개선 효과를 나타낼 수 있다. 왜냐하면 고정화 연속공정은 희석속도(dilution rate)와 비성장속도(specific growth rate)를 분리시킬 수 있으므로 낮은 비성장속도에서도 높은 희석속도의 운전이 가능해져, 이차대사산물의 생산을 극대화시키는 동시에 희석속도의 증가로 인한 생산성 향상도 함께 도모할 수 있기 때문이다(29).

미세한 입자에 세포를 고정화시켜 사용하는 고정화 연속공정은 그 공정 조작시에 여러 가지 난점이 있다. 즉 산업적으로 이용하기에 고정화 단계가 복잡하고, scale-up이 어려운 점이 그 것들 중 대표적인 것이다. 이러한 문제점을 감안해서 구조토 성분인 셀라이트(celite)를 담체로 이용하는 고정화 방법은 경제적인 뿐만 아니라 scale-up이 매우 용이한 장점으로 인해 다양한 미생물의 고정화 공정에 적용되어 왔다(1-6). 셀라이트와 같은 다공성 담체를 이용한 고정화 연속공정의 경우 고정화된 균주를 생물반응기 내에 유지시키는 것이 공정 조작시의 조업 안정성에 가장 큰 영향을 미친다. 고정화세포의 유출 방지를 위한 세포분리기로서

^{*}Corresponding author.

Key words: Immobilized continuous culture, immobilized cell separator, decantor, carboxymethyl cellulose, fungal cell culture, immunosuppressant drug, cyclosporin A

막이나 filter, 또는 가는 망을 이용할 경우 곰팡이나 방선균과 같은 균사 형성 미생물의 배양시에는 담체로부터 유리되는 세포들이 막이나 filter에 붙어 자라 세포분리의 효율성을 현저히 저하시켜 공정운영이 거의 불가능하다. 따라서 본 연구에서는 셀라이트담체에 고정화된 균사 형성 미생물의 효과적인 분리를 위해 분리기 내에서의 중력과 유체의 흐름에 의해 고정상세포를 침전시켜 반응기 내로 되돌리는 장치인 “고정상세포 분리기”를 개발하고자 하였다. 이를 위해 네 가지 형태의 고정상세포분리기를 고안한 후 유출되는 담체의 양을 측정하여 그 성능을 비교하였다. 먼저 사상균 배양액과 유변학적 특성을 비슷하게 조절할 수 있는 carboxymethyl cellulose(CMC) 용액을 이용하여 여러 가지 CMC 농도의 조건하에서 유출액의 속도가 분리능에 미치는 영향을 알아보았다. 또한 실제 고정상 연속배양을 통해 각각의 고정상세포분리기의 성능을 조사하였다. 최종적으로 개발된 분리기를 cyclosporin A의 생산균주이며 균사형성 곰팡이인 *Tolypocladium inflatum*의 고정상세포 연속배양 공정에 적용하여 공정의 조업안정성을 시험하였다. 본 연구에서 model product로 선정된 cyclosporin A(CyA)는 11개의 아미노산으로 이루어져 있는 peptide antibiotic으로서 균사형성 곰팡이인 *Tolypocladium inflatum*에 의해 생산되는 이차대사산물이다(16,17). CyA는 장기이식시 거부반응 (foreign tissue rejection)을 억제하는 면역억제제로 이용되는 매우 중요한 생물의약품이며, autoimmune에 관련된 질병의 치료에도 상당한 효과를 갖는 것으로 알려져 있다(18).

재료 및 방법

고정상세포분리기

고정상 세포의 침전속도와 분리효율은 담체와 배양액의 밀도차, 배양액의 점도, 고정상세포분리기 내의 유출액 선속도, 담체의 직경 등 여러 요인에 의해 결정된다. 고정화 담체의 분리시 더 큰 문제점은 연속조업중 발생하는 공기가 고정상세포분리기 내로 유입되는 현상이다. 일반적인 연속공정에서 조업부피의 조절의 안전성을 위해 반응기 내로의 배지유입용 펌프속도에 비해 더욱 빠른 속도로 배지유출용 펌프를 작동시키는데, 이때 이 차만큼의 공기의 유입은 불가피하다. 이러한 공기의 유입으로 인해 배양액과 고정화 담체의 분리가 방해받게 되며 결국 반응기 내의 고정화세포 농도의 감소로 고정화 공정의 장점을 반감시키는 결과를 초래한다. 일반적인 고정상세포분리기는 유출시에 동반하는 공기 방울(air bubble)의 영향으로 내부의 배양액과 고정화담체와의 혼합이 가중되어 효과적인 분리가 어려운 반면 Fig. 1(I-1)과 (II-1)에 나타낸 바와 같이 본 연구에서 개발된 고정상세포분리기들은 그 내부에 공기 방

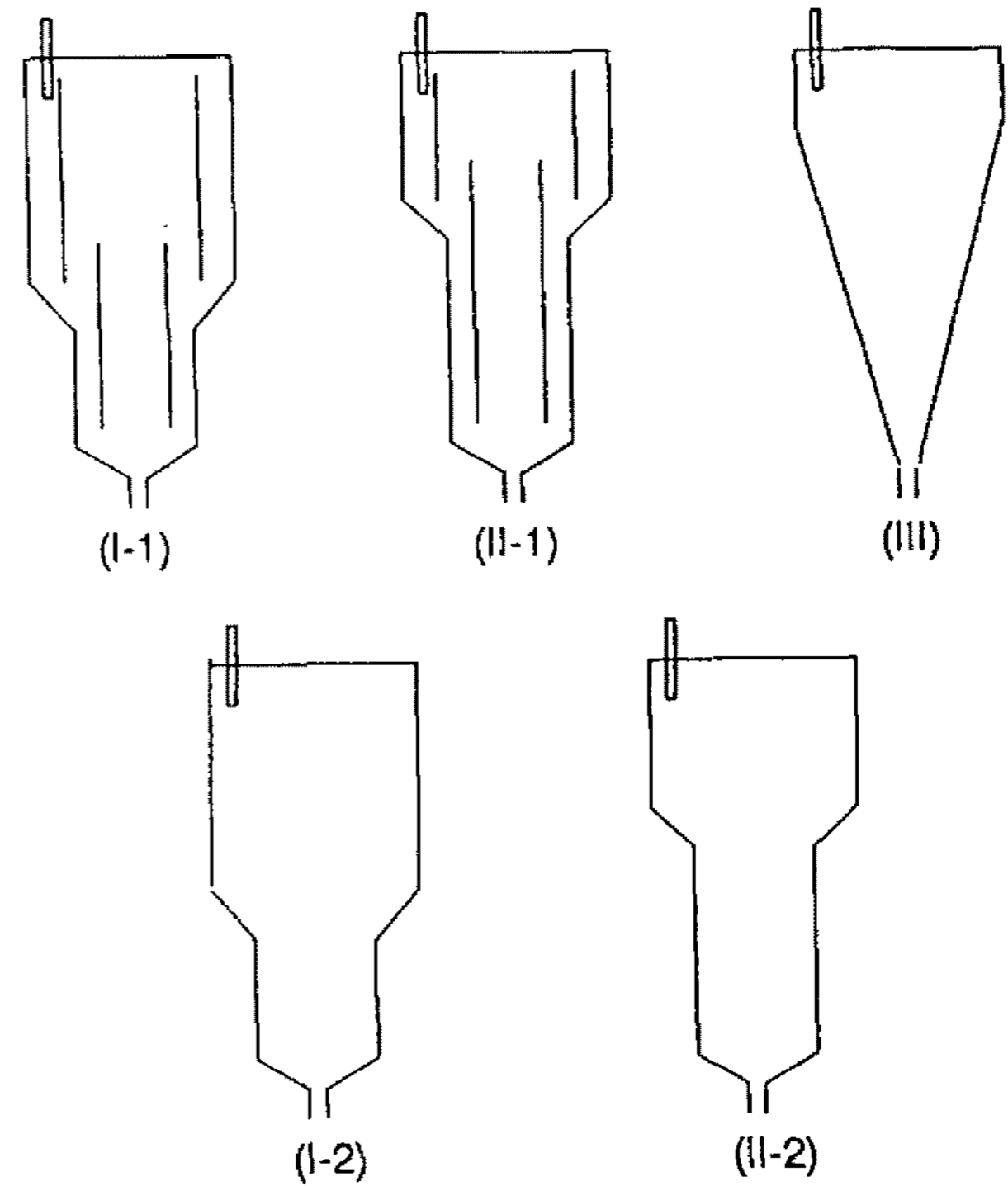


Fig. 1. Structures of immobilized cell separator.

울과 유출되는 배양액의 흐름을 효과적으로 분리시켜 고정화세포를 반응기로 회수할 수 있도록 고안되었다. 고정상세포분리기는 연속적으로 배양액이 유출되는 관에 부착되며 고정상세포분리기를 거치는 동안 고정화세포가 부착된 담체는 배양액과의 밀도 차에 의해 침강하여 반응기 내로 되돌려진다. 대조군으로서 사용되는 고정상세포분리기의 형태 세 가지를 Fig. 1(I-2), (II-2), (III)에 나타내었다.

Carboxymethyl cellulose 용액을 이용한 고정상세포분리기의 성능 실험

일반적으로 사상균 배양액과 같이 점성이 큰 비뉴턴 유체의 거동을 모사할 경우 많은 문헌에서 carboxymethyl cellulose(CMC)(7-11), polyacrylamide(12), sodium sulphite(13) 등의 고분자 용액을 사용하였다. 이 실험에서는 CMC 용액을 사용하여 셀라이트 담체의 분리 정도를 알아봄으로써 점성이 큰 용액에서의 고정상세포분리기의 분리 성능을 시험하였다. 배양액 중 세포 농도의 영향을 모사하기 위해 CMC(medium viscosity, Sigma Co. Ltd., U.S.A.)를 각각 0, 3, 5 g/l의 농도로 증류수에 녹인 후 이 용액들을 배양액 대신 이용하여 연속적으로 반응기 내로 공급하였다. 조업부피는 2 L이며 고정상세포분리기의 부피는 반응기부피의 1/10인 약 200 ml이었다. 담체인 셀라이트 입자를 170 g/l(50% v/v)로 첨가하였으며 각각의 용액의 유입 및 유출 속도는 100~4,000 ml로 하였다. 이는 반응기에 대한 고정상세포분리기의 안전한 조업가능 부피비를 조사함으로써 가능한한 작은 고정상세포분리기로 고정화세포의

Table 1. Media composition.

| Component | Medium(g/l) |
|---|-------------|
| Fructose | 30.0 |
| L-valine | 6.0 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 10.0 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.75 |
| MgSO ₄ | 0.5 |
| CaCl ₂ | 0.1 |
| Trace element solution | 1 ml/L |

Trace element solution: ZnSO₄·7H₂O (4400 mg), MnCl₂·4H₂O (180 mg/l), Na₂MoO₄ (25 mg), CuSO₄·H₂O (80 mg), FeSO₄·7H₂O (5000 mg) and H₂SO₄ (2 ml) per liter of distilled water.

분리 효율을 극대화하기 위함이다.

곰팡이 세포의 실제 고정화 연속배양 고정상세포분리기의 성능 실험

사용 균주는 균사 형성 곰팡이인 *Tolypocladium inflatum* (ATCC 34921)이었으며 사용된 배지는 Table 1과 같다. 고정화 담체로서 celite grade 560 (Manville corporation, U.S.A.)을 사용하였으며, 물질전달저항을 고려하여(14) 직경 100~500 μm 크기의 셀라이트 입자를 sieve를 이용하여 고른 후 증류수로 여러 번 세척하고 600°C에서 소각하여 휘발성 물질을 제거하였다. 이렇게 준비된 셀라이트 담체를 121°C에서 증기멸균하고 다시 건조하였다. 세포고정화는 *T. inflatum*의 포자 현탁액 (spore suspension solution)을 준비된 셀라이트 담체에 흡수시킨 후 배양하는 방법을 이용했으며 자세한 실험 절차는 이미 보고된 바와 같다(5,6). 연속조업시의 희석 속도(dilution rate)는 0.1 hr⁻¹이었으며 배양 온도와 pH는 각각 27°C와 5.7에서 조절되었다. 고정상세포분리기에 유입되는 발효액의 속도는 200 ml/hr이었다. 이는 CMC 용액에 의한 실험에서 사용한 유속에 비하면 작은 값이지만 위에서 설명한 바와 같이 분리 성능이 고정화 담체에 붙어 자라는 곰팡이 세포에 기인한 담체 전체의 밀도 저하에 영향을 받음을 고려할 때 적절한 값으로 사료되며, 보고된 *T. inflatum*의 최대 비성장속도(maximum specific growth rate)가 synthetic medium에서 0.03~0.05 hr⁻¹임을 감안할 때(15), 매우 높은 희석속도에서의 조업이라 할 수 있다. 고정상세포분리기를 이용한 고정화 반응기 시스템을 도식화하여 Fig. 2에 나타내었다.

실제 연속배양액과 세포가 부하된 담체에 의한 고정상세포분리기의 성능 실험

연속배양에서 얻은 실제 배양액과 세포 부하가 0.5 g-cell/g-celite인 고정화 담체를 이용하여 각각의 유속에 따른 고정상세포분리기의 분리 능력을 실험하였다. 실제

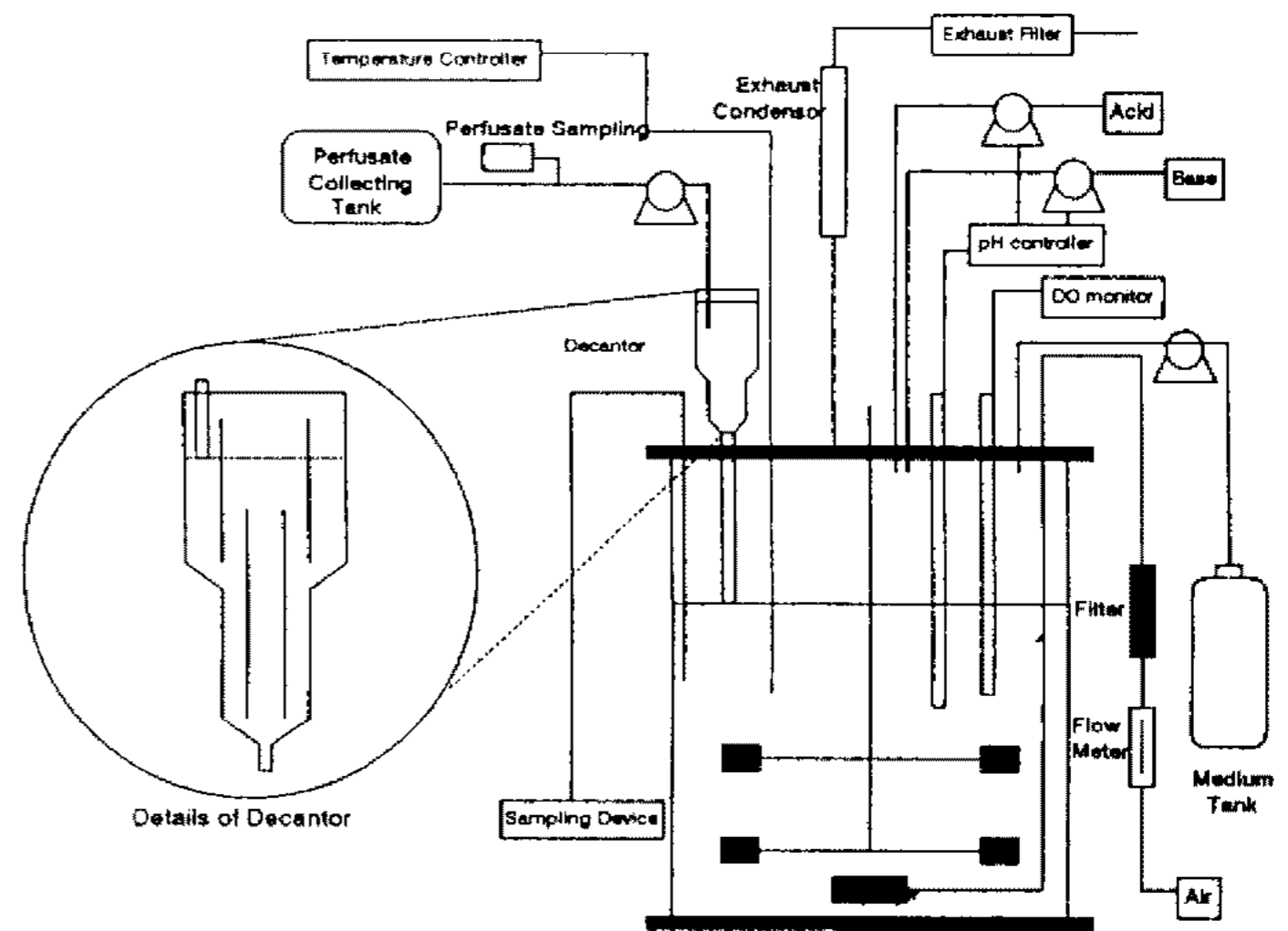


Fig. 2. Immobilized continuous reactor system using immobilized cell separator.

배양액의 균체 농도는 약 8 g/l였으며, 유속은 100~5,000 ml/hr로 하였다.

Perfusion 연속배양을 통한 고정상 곰팡이 배양 공정 (Immobilized Perfusion Reactor System 공정 = IPRS)

세포외 대사산물(extracellular product) 생산의 경우, 고정상균체의 과도성장에 의해 고정상담체로부터 이탈, 분리되는 유리세포(released-free cell)는 연속공정 운영 중 발생하는 반응기의 막힘, 손상 등의 많은 문제점으로 인해 방해요소로 간주되어 왔다(23-25). 그러므로 이러한 시스템에서는 담체 내에서의 균체의 과도성장을 억제시킴으로써 유리세포가 연속적으로 이탈되는 현상을 방지하기 위한 다양한 공정운영전략을 시도해 왔다(26,27). 반면에 본 연구에서는 고밀도 고정상균체에서 이탈, 분리되어 출류(outlet stream)상에서 연속적으로 수확되는 유리세포를 intracellular product인 CyA의 연속생산을 위해 효과적으로 이용함으로써, CyA가 세포 내에 축적됨으로 인해 발생하는 공정개발상의 어려움을 극복하고자 하였다. 사용된 고정상세포분리기는 I-1형이었다.

세포내 이차대사산물인 CyA를 연속적으로 생산하기 위한 연속 고정상배양공정은 고정상균체와 고정상균체로 포화된 셀라이트담체로부터 이탈되는 유리세포를 함께 이용하는 semi-perfusion 시스템이다. 즉 고밀도의 고정상균주는 생물반응기내에 제한 유지되어 계속적으로 유리세포(released-free cell)를 생산해 내는 세포생성기(biomass generator)로 이용되며, IPRS의 배출구를 통해 연속적으로 생산되어, 부서진 mycelia 또는 conidiospore 상태로 존재하는 유리세포는(이차대사 결과 세포 내에 축적되는) CyA를 연속적으로 생산하는데 이용된다. 연속배양의 희석속도는 0.1 hr⁻¹으로서 이미 보고된 포도당을 기질로 하는 *T. inflatum*의 연속현탁

배양(15)과 비교할 때, 3배정도 높은 값이다. 높은 회석속도로 조업한 이유는 생산성을 증대시킴과 동시에 액체배지에서 자랄 수 있는 액상세포(suspended cell)의 농도를 조정함으로써 배양액의 유변학적 성질을 조절할 수 있기 때문이다.

배지 및 배양조건

발효조로의 접종을 위한 균체의 seed culture용 배지의 조성은 다음과 같다. Glucose 80 g/l; urea 2.0 g/l; NaNO_3 3.0 g/l; KH_2PO_4 2.0 g/l; KCl 0.5 g/l; MgSO_4 0.5 g/l; yeast extract 30 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/l. 이 배지는 대량의 포자를 형성하는 배지이므로 고정화를 위한 포자 현탁액의 준비를 위해 매우 중요한 배지이다. CyA생산을 위한 생산배지(production medium)로는 synthetic medium(SM)을 이용하였으며 그 조성은 Table 1에 나타난 바와 같다.

고정상 연속배양은 2.5 L 부피의 top-driven 방식의 교반식 발효조((주)한국발효기)를 이용하였으며 조업부피는 2 L였다. 배양온도는 27°C로 일정하게 유지하였으며, pH는 H_2SO_4 (2N)와 KOH(2N) 용액을 이용하여 5.7로 조절하였다. 통기속도와 교반속도는 초기 1 vvm과 250 rpm이었으며, 연속 perfusion 배양시 반응기내의 고정화 균체의 농도가 증가함에 따라 산소제한의 조건이 되지 않도록 교반속도(200~550 rpm)와 통기속도(1~2 vvm)의 동시 조절을 통해 용존산소농도가 산소포화농도의 약 10% 이상을 유지하도록 조절하였다.

분석방법

CyA의 분석은 HPLC를 이용했으며 자세한 사항은 Chun과 Agathos에 의해 제시된 이전의 보고와 같다(3,4). Glucose의 농도는 Beckman Glucose Analyzer 2 (Beckman Instruments, Inc, Fullerton, CA, USA)에 의해 결정되었다. 고정상배양과 현탁배양의 건조균체중량(dry cell weight)의 측정은 10 ml의 sample을 15,000 rpm에서 원심분리한 후 증류수로 남아 있는 당 및 염들을 씻어 내고 원심분리를 3번 반복한 후 aluminum weighing dish에 담아 dry oven(80°C)에서 12시간 건조하였다. 현탁배양의 경우는 이로써 균체중량을 재는 것이 끝나지만 고정화 배양의 경우는 한 단계의 처리 과정을 더 거친다. 즉 80°C에서 건조된 무게를 재어 담체와 균체의 중량 합을 결정한 뒤 600°C의 furnace에서 6시간 소각한 후 다시 무게를 재어 위의 값과의 차에 의해 균체농도를 결정하였다. 유출되는 담체의 농도는 85°C에서 건조한 후 이 시료를 600°C의 소각로(furnace)에서 6시간 동안 태워 측정하였다.

결과 및 고찰

Carboxymethyl cellulose 용액을 이용할 때의 고정

상세포분리기의 특성

Fig. 3(a)~3(e)에 CMC의 농도와 용액의 유입량에 따른 유출되는 고정화 담체의 농도를 나타내었다. 기존 형태의 고정상세포분리기는 CMC 0 g/l(순수 물)의 경우를 제외하고 열악한 분리 성능을 보였으며 이러한 현상은 CMC의 농도가 증가할수록 심화되었다(Fig. 3(c)~3(e)). 점도(또는 CMC 농도)의 증가에 따른 세포분리능의 저하는 입자의 침강속도가 주위 액체의 점도에 반비례하는 현상에서 비롯되는 것으로 사료된다. 특히 이들 고정상세포분리기들은 위에서 언급한 공기방울의 혼합 영향에 의해 입자와 용액간의 비중 차에 의한 입자의 침강이 방해받으므로 더욱 분리 효율이 저하되는 것으로 볼 수 있다. 육안으로 관찰된 사항에 의하면 이러한 현상은 뚜렷이 나타나는데, 아래로 침강하던 담체들이 기포에 의해 다시 상승하여 혼합되어 고정상세포분리기 윗부분까지 상당량의 담체가 존재함으로써 담체의 유출이 불가피하였다. 이러한 고정상세포분리기는 고정화세포의 지속적인 유실로 인해 실제 고정화 연속 발효 공정에는 적용하기 어렵다고 할 수 있다. 반면 Fig. 3(a)에서 알 수 있듯이 본 연구에서 개발된 고정상세포분리기는 기존의 분리기에 비해 높은 유속과 CMC의 농도에서도 효과적으로 담체의 유출이 억제되었다. 유출되는 담체의 농도에 대한 결과 이외에도 육안으로 관찰된 사항에 의하면 고정상세포분리기 내의 담체의 움직임이 매우 원활하게 고정상세포분리기 아래쪽으로 빠르게 이동함을 볼 수 있는데, 이는 입자 자체의 침강속도에 분리관(Separating Cylinder)에 의한 공기유출관(Air Draft) 바깥쪽 유체의 아래방향 흐름이 가세했기 때문으로 추정된다. 또한 침강하는 부분의 담체나 유체가 공기 방울의 영향을 받지 않으므로 담체의 분리가 방해받지 않는 현상 역시 높은 분리 효율을 나타내는 중요한 요건이라 볼 수 있다.

여기서 주목할 것은 고정상세포분리기의 넓은 부분(Broad Zone)과 좁은 부분(Narrow Zone)의 비이다. 고정상세포분리기를 나타낸 그림에서 알 수 있듯이 상승하는 담체의 속도를 줄이고 침강하는 담체의 속도를 늘이고자 이 두 부분을 고안했는데, 이들의 비가 분리 효율에 영향을 미친다는 것을 Fig. 3(a)과 (b)의 비교에서 알 수 있다. 넓은 부분과 좁은 부분의 비가(I-1)과(II-1)형 고정상세포분리기의 경우 각각 2.13 : 1과 0.67 : 1이었다. 이 결과에서 낮은 농도의 CMC에서는 분리 효율이 크게 다르지 않으나 CMC 10 g/l에서는 (I-1)형이 다소 우수함을 알 수 있다. 이는 넓은 부분의 유체의 상승 속도(유체의 부피 속도를 면적으로 나눈 값)가 좁은 부분의 1/3 수준이므로 이 부분의 비가 크면 클수록 분리 효율이 증가하는 것으로 사료된다. 이런 현상은 다음과 같은 이유에서 비롯된다고 추측된다. 주어진 유체의 밀도 및 점도, 담체의 밀도 및 지름 등의 조건에서 담체의 침강속도가 일정하다고 했을 때 유체

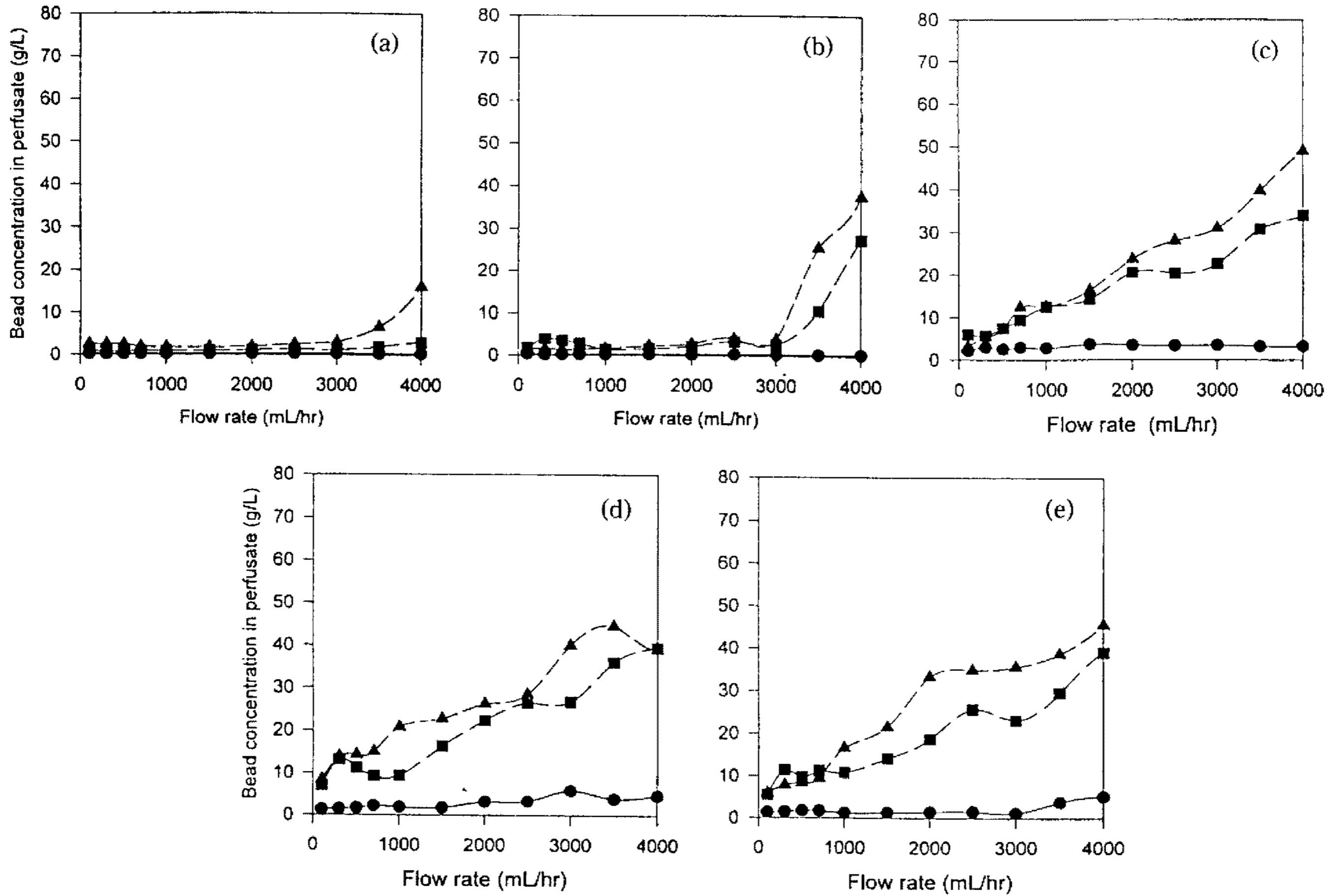


Fig. 3. (a) Effluent bead concentration in the case of type (I-1), (b) Effluent bead concentration in the case of type (II-1), (c) Effluent bead concentration in the case of type (I-2), (d) Effluent bead concentration in the case of type (II-2), (E) Effluent bead concentration in the case of type (III)
 ●: CMC 0 g/l; ■: CMC 3 g/l; ▲: CMC 5 g/l

의 위쪽으로의 선속도(유량을 고정상세포분리기의 단면적으로 나눈 값)가 침강속도보다 크면 고정화담체의 분리는 쉽지 않을 것이다. 이에 따라 점도 및 유체 유량의 증가로 인한 담체 유실이 나타나며, 결과적으로 넓은 부분의 비가 큰 경우가 분리 효율이 우수한 것으로 사료된다.

곰팡이 세포의 실제 고정화 연속배양에서의 고정상 세포분리기의 특성

Fig. 4에 I-1, II-1, 그리고 II-2의 세 가지 고정상 세포분리기를 이용한 연속배양시 유출되는 고정화 담체의 농도를 나타내었다. II-2의 경우 초기부터 약 3~5 g/l의 담체가 유출액에서 나타났으며 연속배양이 진행된 후 약 50 시간이 지난 뒤부터 균체에 의해 담체의 밀도가 낮아짐에 따라 그 농도가 급격히 증가하여 8~10 g/l의 담체가 유출되었다. 반응기 내의 담체 농도도 이에 따라 급격하게 감소하였다(data not shown). 이 결과로부터 실험 조건이 비교적 낮은 유속임을 감안할 때 이 유속 이상에서는 더욱 심각한 담체의 손실을 가져올 것으로 예상되며 CMC 용액에 의한 실험에서와 마찬가지로 실제 배양에 이용하기에 부적절하다는 결론을 얻을 수

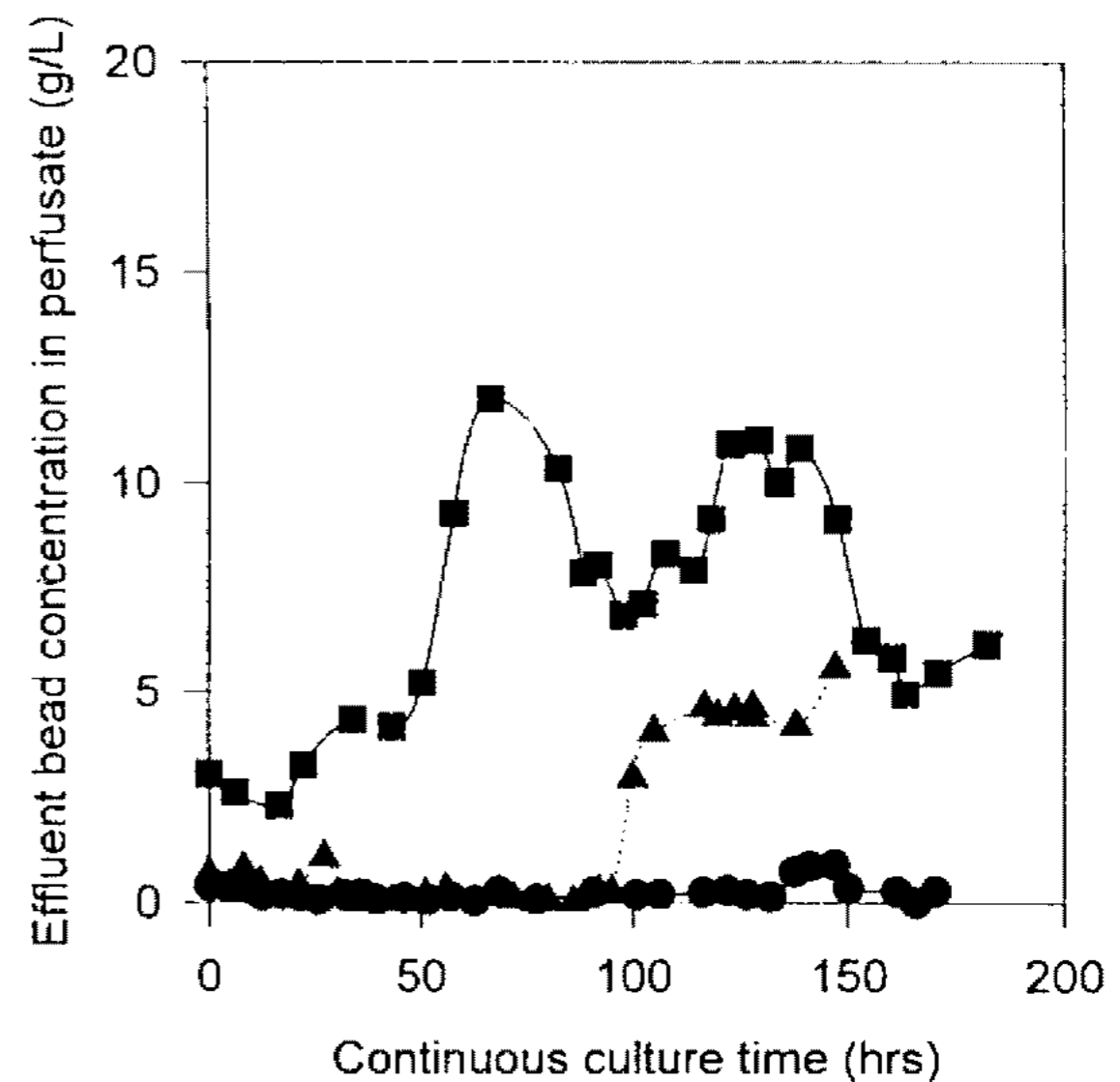


Fig. 4. Effluent bead concentration in the case of continuous culture of *Tolypocladium inflatum*.

○: (I-1) type △: (II-2) type ●: (II-1) type

있었다. 유출되는 담체농도가 다소 변동되는 경향을 보이는데, 이는 실험오차라기 보다는 담체의 크기분포에

다른 밀도분포에 의한 것으로 보인다. 즉 담체의 침강이 부력 및 중력 그리고 분리기내 유체속도의 상호역학관계에 의해 일어난다는 점을 감안하면 원활한 침강을 위한 각 담체지름에 해당하는 문턱(threshold)밀도값 또는 균체부하가 다르므로 인해 생기는 현상으로 사료된다. 한편, I-1과 II-2의 경우 약 100여 시간까지는 거의 담체가 유출되지 않았으며, 이 결과로부터 분리관과 공기유출관의 설치로 인해 분리 효율이 월등하게 개선되었음을 알 수 있다. 연속배양중 담체에 고정화되는 균체의 농도(loaded biomass)가 증가함에 따라 II-1의 경우 담체 밀도의 감소에 의해 100여 시간 후부터는 3~5 g/l의 담체가 유출되었으나, I-1의 경우에는 같은 조건하에서도 거의 완벽한 분리능을 보였다. 이는 CMC 용액에서의 실험결과와 마찬가지로 이유, 즉 넓은 부분과 좁은 부분의 비에 기인하는 것으로 사료된다.

실제 연속배양에서 얻어진 발효액과 세포가 부하된 담체에 의한 고정상세포분리기의 특성

이 실험에 사용한 고정상세포분리기들은 이상의 결과에서 우수한 것으로 판명된 I-1과 II-1이었다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 약 1,000 ml/hr까지는 유출되는 담체가 두 경우 모두 적었으나 그 이상부터는 담체의 농도가 유속에 따라 증가하였다. 이전의 CMC 용액에서의 결과에 비해 낮은 유속에서 담체가 유출되기 시작했는데, 이는 담체 내 고정화세포의 성장에 의해 담체 밀도가 낮아졌음에 기인한다. 주목할 것은 유속이 약 2,500 ml/hr일 때는 본 연구에서 제안하는 I-1의 경우 II-1의 유출 담체 농도의 1/3 수준이었으며 이는 담체의 밀도가 낮은 것을 감안할 때 매우 큰 성능 차로 볼 수 있다.

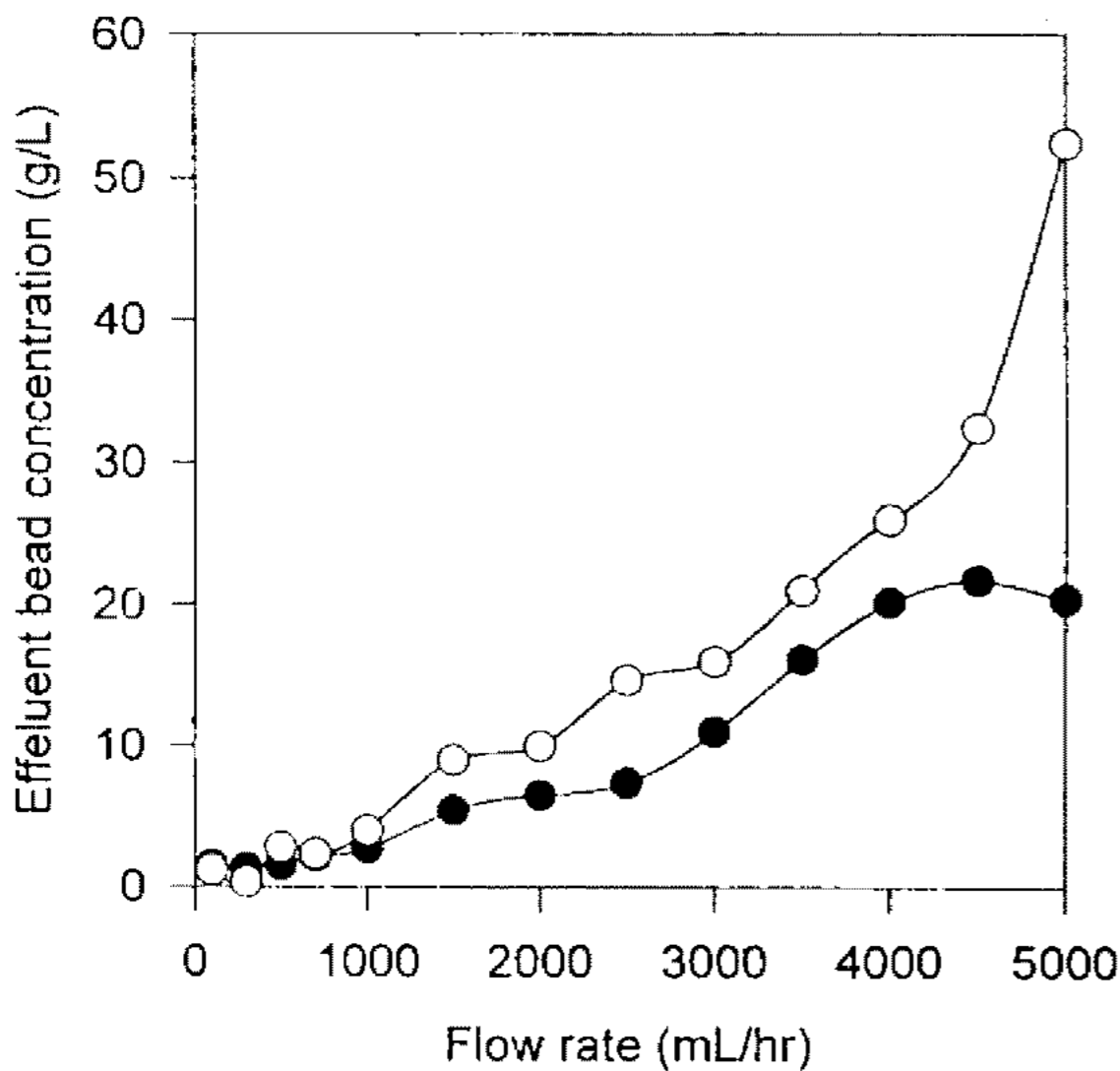


Fig. 5. Effluent bead concentration when fermentation broth including cells of 10 g/l and beads of loaded biomass of 0.5 g-cell/g-celite were used. ●: (I-1) type ○: (II-1) type

세포분리기와 고정상 배양공정(IPRS)을 이용한 CyA 연속생산

성능이 가장 우수한 것으로 판명된 I-1형의 고정상 세포분리기를 CyA생산을 위한 고정상 연속배양공정(IPRS)에 실제로 적용하였다. 150시간의 회분배양 후에 연속배양을 시작하였으며 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6(A)는 Perfusion 배양에 의해 유출되는 배양액(perfusate)에 대한 결과이다. 전 연속배양기간동안 유출되는 담체가 거의 나타나지 않는 점으로 보아 본 실험실에서 개발한 고정상세포분리기가 매우 효율적으로 운전되고 있음을 알 수 있다. CyA가 세포내에 축적되는 이차대사산물(intracellular secondary metabolite)임을 감안할 때 유리세포로 구성된 perfusate의 균체농도가 CyA 생산에 미치는 영향이 매우 중요함을 알 수 있다. 연속배양 초기의 perfusate 균체농도는 1~3 g/l의 낮은 값을 보였으나 담체가 포화되는 시점인 약 320 시간부터 고정상담체로부터 유리되는 균체의

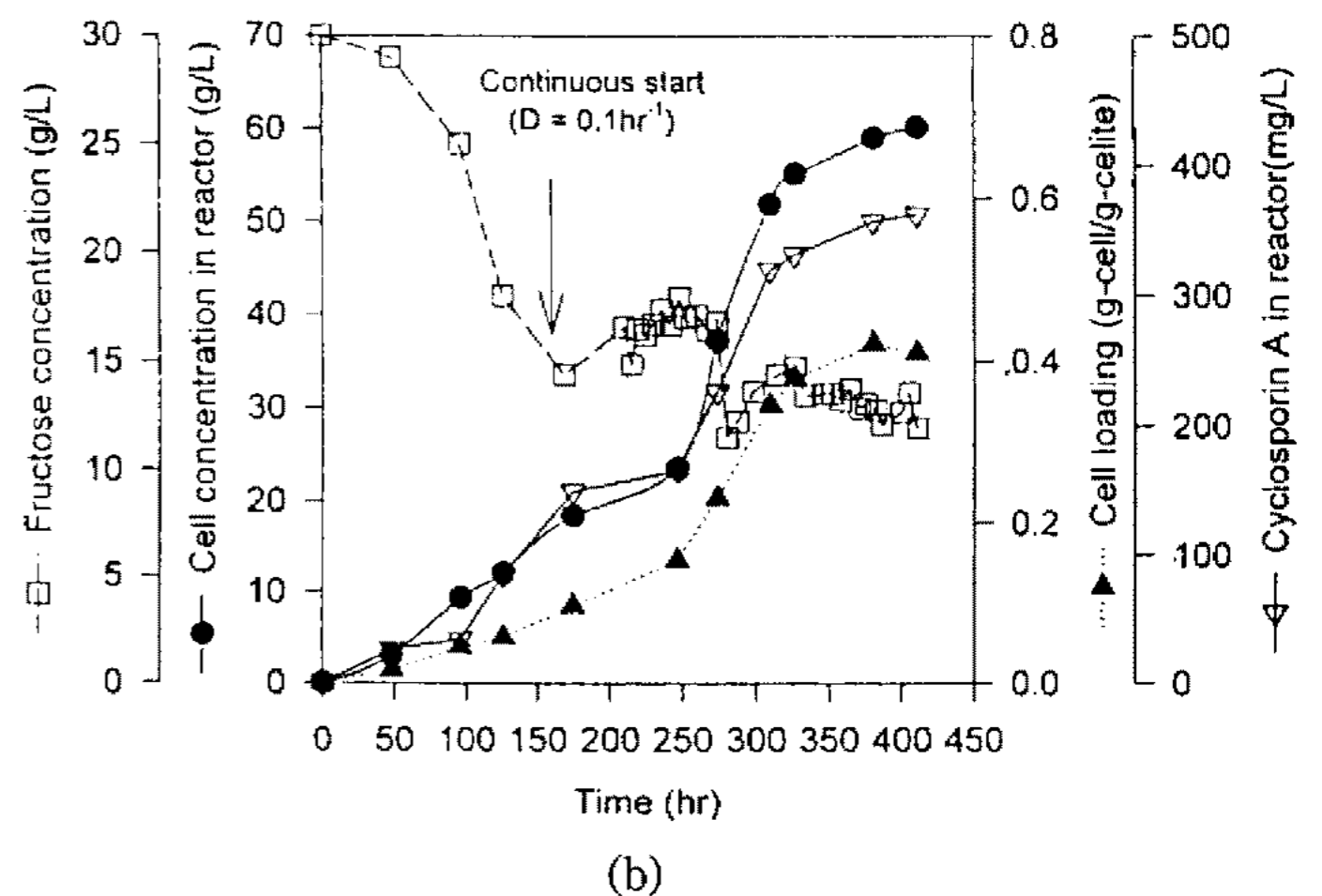
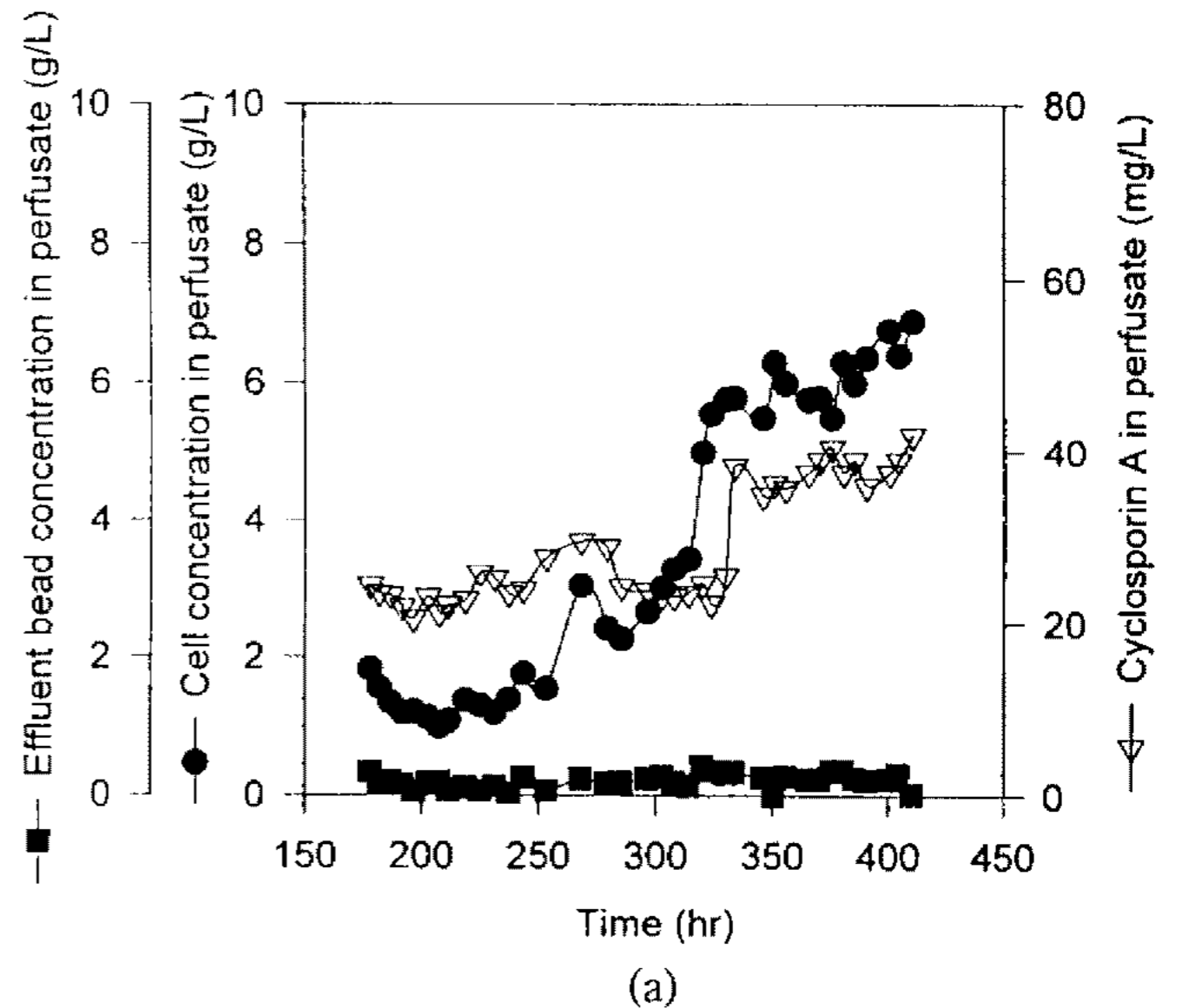


Fig. 6. Cyclosporin A fermentation results in immobilized perfusion reactor system (IPRS). (a) Kinetic data in outlet stream (perfusate). (b) Kinetic data inside bioreactor

농도가 급격하게 증가하여 외부로 유출되는 perfusate 농도는 6~7 g/l에 달했다. 주목할 점은 본 IPRS 공정에서 사용한 희석속도가 0.1 hr^{-1} 로서 매우 높다는 점이다. 이는 현탁배양의 washout되는 희석속도인 0.03 hr^{-1} (15)에 비해 약 3배 이상 높은 조업조건에서도 안정적으로 IPRS 공정이 운전될 수 있음을 뜻한다. 이 경우 유출되는 시간당 균체생산량(cell productivity; Pr)은 $\text{Pr} = D \cdot X$ (D: dilution rate, X: perfusate cell concentration)로 계산될 수 있으므로, IPRS 공정에 의한 균체생산성 증대효과는 연속현탁배양에 비해 매우 뚜렷함을 알 수 있다. 또한 대부분의 유리세포가 잘게 부서진 mycelial cell 또는 conidiospore의 morphology를 띄고 있어 높은 perfusate의 농도에도 불구하고 배양액이 유변학적으로 Newtonian 유체성질을 보였으며, 이로 인해 기존의 균사형성 미생물의 현탁배양시 나타났던 고점도로 인한 배양액에서의 물질전달 감소현상이 훌륭하게 극복되었다. 이러한 morphology를 띄게 된 주된 이유는 균체부하량이 약 $0.4(\text{g-cell/g-celite})$ 에 이르면 담체 밖으로 뿔어나온 균사들이 교반시 impeller와의 충돌 또는 담체와 담체와의 충돌에 의해 부서진 유리세포로 되어 쉽사리 perfusate로 빠져나오기 때문으로 사료된다. Perfusate가 포함하고 있는 CyA 농도는 초기 $20 \sim 30 \text{ mg/l}$ 에서 배양 후반부 균체농도의 증가로 인해 $40 \sim 60 \text{ mg/l}$ 정도로 증가하였다.

생물 반응기 내부의 고정상균체의 경우(Fig. 6(b)), 약 300시간까지 지수적인 증가현상을 보였으며 이에 따라 셀라이트 단위질량당 균체부하량(cell loading)도 증가하였다. 담체 내 균체부하량이 $0.4(\text{g-cell/g-celite})$ 을 넘어선 약 300시간 이후부터는 균체성장속도가 현격히 감소하여 반응기내의 균체농도는 거의 일정수준을 유지했다. 이는 이용 가능한 담체내 공간이 고정상균체로 포화되어 새롭게 생성되는 균체가 앞서 언급한 기작에 의해 유리세포로 떨어져 나온 후 반응기 밖으로 유출되어, 반응기 내의 균체농도가 가-정상상태(pseudo-steady state)에 도달했기 때문으로 추측된다. 300시간 이후 perfusate의 균체농도(Fig. 6(a))와 배양기 내의 탄소원인 과당의 농도(Fig. 6(b))가 일정하게 유지되는 현상도 이러한 가-정상상태를 뒷바침하는 실험결과로 해석될 수 있다.

고정상 배양을 통해 균사모양의 생산균주의 morphology를 담체에 부착된 균일한 크기의 미세한 pellet형태로 변환을 유도한 결과, 배양액의 점도가 훨씬 감소하여 60 g/l 이상의 높은 균체농도에서도 담체내외에서 기질의 물질전달이 원활히 이루어진 점은 매우 주목할 만하다. 이와같은 현상은 본 연구그룹의 회분식 교반 반응기 실험에서 이미 관찰된 바 있으며 이는 주로 고정상 배양시 나타나는 배양액의 Newtonian 유체성질에 기인하는 것으로 판단된다(1,2,28). CyA 생산경향

은 균체 생산경향과 비슷하게 나타났는데, 이는 세포내축적 이차대사산물의 균체농도에 대한 growth-associated mode의 의존성을 보여주는 결과이다. 탄소원인 과당(fructose) 농도는 회분배양 말기에 15 g/l 까지 감소했다가 연속배양 시작 직후부터 증가하여 17 g/l 정도에서 약 100시간 동안 유지되었다. 이는 연속배양 초기에 공급되는 과당농도($S_0 = 30 \text{ g/l}$)에 비해 반응기내 고정상균체의 농도가 상대적으로 낮아 0.1 hr^{-1} 의 높은 희석속도에서 완전히 소비되지 못한 결과이다. 250시간이 경과된 후에는 균체농도의 증가에 따라 탄소원의 소모속도도 증가하여 반응기내의 잔류 과당농도가 약 12 g/l 수준에서 유지되었다.

이상에서 IPRS 공정에 핵심적인 고정상세포분리기의 개발과 이를 이용한 실제고정상 배양을 통해 세포내 이차대사산물인 CyA의 연속생산 가능성에 대해 알아보았다. 본 연구에서 개발된 고정상세포분리기는 CMC 용액을 이용한 실험에서 기존의 세포분리기에 비해 고점도, 고유속에서도 매우 우수한 분리능을 보였다. 또한 고정상곰팡이세포의 연속배양에서 장기간의 조업에도 불구하고 고정상세포분리기의 탁월한 분리능이 입증되었다. 이는 균사형성 미생물의 고정상연속배양시 조업 안정성에 있어서의 문제점이 효과적으로 극복될 수 있음을 제시하며, 그 결과 비교적 고농도의 CyA를 축적하고 있는 활성높은 유리세포(perfusate)를 지속적으로 얻을 수 있었다. 한편 CyA가 세포내 이차대사산물이라는 점을 감안할 때 생산균주의 생리학적인 면을 최대대로 이용하기 위해서는 높은 희석속도에서 고농도의 균체를 생산함과 동시에 활성높은 균체를 효과적으로 숙성시켜 이들이 고농도의 CyA를 함유케하는 공정운전전략이 매우 효과적일 것으로 사료된다. 이를 위해서 고정상배양과 현탁배양을 혼합한 이단연속배양공정, 즉 일단계배양기에서 고정상세포를 세포생성기로 이용하여 고농도의 유리세포를 이단계 배양기로 공급하고, 이단계 배양기에서는 현탁배양에 의해 효과적인 CyA 생산 조건을 제공하는 공정을 본 연구그룹에서 연구중에 있다.

요 약

균사형성 미생물인 고정상곰팡이의 연속배양공정에 필수적인 효율적인 고정상세포분리기를 개발하고 이를 실제로 면역억제제인 cyclosporin A(CyA) 연속생산공정에 적용하였다. 점성이 큰 고분자인 carboxymethyl cellulose 용액을 이용한 실험에서 개발된 고정상 세포분리기는 분리능이 우수하여 고점도·고유속의 경우에도 고정상담체가 거의 유실되지 않았다. 이는 고정상세포분리기에 설치된 공기유출관과 분리관의 역할에 기인하는 것으로 보인다. 또한 실제 곰팡이 세포를 이용한

고정상 연속배양(IPRS)의 경우 고정상세포분리기를 설치함으로써 담체밀도의 감소와 배양액내의 고농도(10 g/l) 현탁 곰팡이 세포의 존재에도 불구하고 안정한 조업가능성을 보였다. 고정상 연속배양의 높은 회석속도에도 불구하고 균체 및 CyA의 생산성이 높게 나타났으며, 담체가 반응기 밖으로 거의 유출되지 않은 점으로 보아 고정상세포분리기의 우수한 성능 및 조업안정성을 확인할 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 1995년도 생물공정연구센터에서 지원한 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Gbewonyo, K. and D.I.C. Wang. 1983a. Confining mycelial growth to porous microbeads: A novel technique to alter the morphology of non-Newtonian mycelial cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 967-983.
- Gbewonyo, K. and D.I.C. Wang. 1983b. Enhancing gas-liquid mass transfer rates in non-Newtonian fermentations by confining mycelial growth to microbeads in a bubble column. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 2873-2887.
- Chun, G.T. and S.N. Agathos. 1989. Immobilization of *Tolypocladium inflatum* spores into porous celite beads for cyclosporine production. *J. Biotechnol.* **9**: 237-254.
- Chun, G.T. and S.N. Agathos. 1991. Comparative studies of physiological and environmental effects on the production of cyclosporin A in suspended and immobilized cells of *Tolypocladium inflatum*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 256-265.
- Chun, G.T., T.H. Lee, and Y.K. Chang. 1996. Studies on mass production of intracellularly-produced secondary metabolite, cyclosporin A by use of immobilized fungal cells in stirred-tank immobilized perfusion reactor system (IPRS). *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **11**: 22-29.
- Lee, T.H., G.T. Chun and Y.K. Chang. 1995. Bioprocess engineering considerations in cyclosporin A fermentation by immobilized fungus *Tolypocladium inflatum*. *Immobilized Cells: Basics and Applications* (R.H. Wijffels, R. M. Buitelaar, C. Bucke, and J. Tramper (Eds.)), Elsevier Science B.V., pp. 402-409.
- Kawase, Y. and M. Moo-Young. 1986. Influence of non-newtonian flow behavior on mass transfer in bubble columns with and without draft tubes. *Chem. Eng. Commun.* **40**: 67-83.
- Popovi, M. and C.W. Robinson. 1988. External-circulation-loop airlift bioreactors: study of the liquid circulating velocity in highly viscous non-Newtonian liquids. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 301-312.
- Popovi, M. and C.W. Robinson. 1987. The specific interfacial area in external-circulation-loop airlifts and a bubble column-II: carboxymethyl cellulose/sulphite solution. *Chem. Eng. Sci.* **42**: 2825-2832.
- Chisti, M.Y. and M. Moo-Young. 1988. Hydrodynamics and oxygen transfer in pneumatic bioreactor devices. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 487-494.
- Ryu, H.W., Y.K. Chang, and S.D. Kim. 1993. Gas holdup and mass transfer characteristics of carboxymethyl cellulose solutions in a bubble column with a radial gas sparger. *Bioprocess Eng.* **8**: 271-277.
- Stejskal, J. and F. Potek. 1985. Oxygen transfer in liquids. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 503-508.
- Popovi, M. and C.W. Robinson. 1987. The specific interfacial area in external-circulation-loop airlifts and a bubble column-I: aqueous sodium sulphite solution. *Chem. Eng. Sci.* **42**: 2811-2824.
- Chun, G.-T., T.H. Lee, and Y.K. Chang. 1996. Determination of optimum bead size by calculating effectiveness factors in cyclosporin A fermentation by immobilized cells. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **11**: 30-36.
- Lee, J. 1989. Physiological factors in cyclosporin A production by *Tolypocladium inflatum*. *Ph.D. Thesis*, Dept. of Chem. & Biochem. Eng., Rutgers University, New Brunswick, U.S.A.
- Dreyfuss, M., E. Harri, H. Hofmann, H. Kobel, W. Pache, and H. Tscheter. 1976. Cyclosporin A and C. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **3**: 125-133.
- Kobel, H. and R. Traber. 1982. Directed biosynthesis of cyclosporins. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **14**: 237-240.
- Borel, J.F. 1986. Cyclosporin and its future. In *Cyclosporin, Progress in Allergy*, (J.F. Borel, ed), **38**: 9-18, Karger, Basel.
- Zocher, R., N. Madry, H. Peeters, and H. Kleinkauf. 1984. Biosynthesis of cyclosporin A. *Phytochem.* **23**: 549-551.
- Billich, A. and R. Zocher. 1987. Enzymatic synthesis of cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **262**: 17258-17259.
- Lawen, A., R. Traber, D. Geyl, R. Zocher, and H. Keinkauf. 1989. Cell free synthesis of new cyclosporins. *J. Antibiotic.* **42**: 1283-1289.
- Traber, R., H. Hofmann, and H. Kobel. 1989. Cyclosporins-new analogues by precursor directed biosynthesis. *J. Antibiotic.* **42**: 591-597.
- Arcuri, E.J., J.R. Nichols, T.S. Brix, V.G. Santamaria, B.C. Buckland, and S.W. Drew. 1983. Thienamycin production by immobilized cells of *Streptomyces cattleya* in a bubble column. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 2399-2411.
- Deo, Y.M. and G.M. Goucher. 1983. Semicontinuous and continuous production of the antibiotic patulin by immobilized cells of *Penicillium urticae*. *Biotechnol. Lett.* **5**: 125-130.
- Ogaki, M., K. Sonomoto, H. Nakajima, and A. Tanaka. 1986. Continuous production of oxytetracycline by immobilized growing *Streptomyces rimosus* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 6-11.
- Deo, Y.M. and G.M. Goucher. 1984. Semicontinuous and continuous production of penicillin G by *Penicillium chrysogenum* cells immobilized in κ -carrageenan beads. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 285-295.
- Keshavarz, T., R. Eglin, E. Walker, C. Bucke, G. Holt,

- A.T. Bull, and M.D. Lilly. 1990. The large scale immobilization of *Penicillium chrysogenum*: Batch and continuous operation in an air-lift reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 763-770.
28. Chun, G.T. 1994. Comparative bioreactor studies in terms of oxygen transfer between suspended and immobilized fungal systems for cyclosporin A fermentation. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **9**: 211-223.
29. Deo, Y.M. and G.M. Gaucher. 1985. Effect of nitrogen supplementation on the longevity of antibiotic production by immobilized cells of *Penicillium urticae*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 220-227.

(Received 30 July 1996)