

유전자 재조합 미생물의 발효공정



포항공대 화학공학과 이 선 복

I. 서 론

유전공학 제품의 산업화가 초기에 기대했던 것보다 오랜 시간이 걸리며 제품화, scale-up, 일상실험, 의약품 허가 등 넘어야 할 장애가 많아 한 동안 주춤해지는데 하였으나 최근 다시 활기를 찾아가고 있는 느낌이다, 현재까지 미국에서 상품화된 유전공학제품은 그림 1에 나타난 바와 같이 모두 7가지로서, 1983년 최초의 유전공학제품이었던 human insulin을 비롯하여 human growth hormone, α -interferon, OKT-3(신장 이식거부를 방지하는 단일항체의 일종), 간염백신, tissue plasminogen activator 그리고 erythropoietin 등이며 이들 제품의 1989년도 미국내 매출액 규모는 약 6억4천불로 추정되고 있다 (1). 유전공학적 방법에 의해 생산된 것은 아니나 단일항체를 이용하여 혈청으로부터 분리한 천연 factor VII인 Monoclate가 최근 상품화된 바 있다. 다음 상품화제품으로는 interleukin-2가 될 것으로 예상되는데 미국의 Cetus사에 의해 1988년 11월 FDA 허가신청이 된 바 있으며 이 뒤를 이어 본격적으로 수많은 유전공학제품이 상품화될 전망으로 있는 바 현재 임상실험중인 품목은 모두 80여종으로 추정되고 있으며 2~3년내 10여종 이상이 선보이게 될 것으로 기대되고 있다(그림 1 참조).

이러한 유전공학 제품을 생산하기 까지에는 여러 공정개발 단계를 거쳐야 하는데 크게 나누어 유전자 재조합기술 개발단계와 생물공정기술 개발단계로 나눌 수 있다. 유전자 재조합기술에 의해 얻어진 생산균주로부터 발효 및 분리&정제공정을 거쳐 대량생산에 이르기까지 필요한 기술을 생물공정기술이라 일컫고 있는데 본 고에서는 유전자재조합 미생물의 발효공정에 초점을 맞추어 재조합 미생물의

Pre	Clinical Trials			PLA/ NDA	On Market	Year of Entry
	I	II	III			
					h Insulin	83
					h GH	85, 87
					A-INF	86
					OKT3	86
					HEP-B VAC	86
					IPA	87
					EPO	89
				IL-2		90
				B-INF		90
				G-INF		91
				F-VIII		91
				EGF		91
				GCR		91
				G-CSF		91
				SOD		92
				Septic Shock MAb		92
				GM-CSF		93
				ANF		93
				TNF		94
	CD4					94
	MSF					94
	IL-4					94
	AIDS Vac					95+
	IL-1					95+
	IL-3					95+
	IL-6					95+
	IL-7					95+
	BCDF					95+
	Lung Surf					95+
	FGF					95+
	PF-4					95+
	IGF-I,II					95+
	hFSH					95+
	PROT-C					95+
	MIS					95+
	TGF-B					95+
	Agrotroban					95+
	Relaxin					95+
	PDGF					95+
	Adipsin					95+

Source: Consulting Resources Corp.

그림 1. 유전공학제품의 상업화 추이

발효에 영향을 미치는 여러 공정변수들을 분석하고

재조합 단백질의 분비기술, 고정화재조합 미생물을 이용한 생산기술 및 고농도 배양기술 등 재조합 미생물 발효공정기술의 최근 연구동향에 대해서도 고찰해 보고자 한다.

II. 재조합 미생물의 발효공정 설계변수

재조합 균주를 이용한 발효의 경우에는 기본적으로 지금까지의 미생물 발효에 일반적으로 적용되어 왔던 여러 발효공정 설계변수 모두를 고려하여야 한다. 일반적인 발효공정 설계변수로는 배지설계, 생물반응기설계, 기타 배양조건에 관련된 변수들로 크게 구분할 수 있다. 또한 생산규모의 발효공정을 설계하는 경우에는 발효조의 크기, 발효조 형태(교반형, 기거형, 관형, 유동층형 등) 및 운전방식(회분식, 유가식, 연속식)을 선정해야 하며, 최적조업을 위한 발효공정 제어장치의 설비가 필요하다.

재조합 미생물을 이용하여 대량생산을 하는 경우 가장 문제가 되는 것은 재조합 균주의 안정성인데, 안정성 유지를 위해 종균배양, 배지설계 등에 세심한 주의가 필요하다. 또한 재조합 미생물의 경우 일반적으로 환경인자의 변화에 매우 민감하여 환경인자들 특히 온도, pH, 용존산소 농도 등의 정밀제어가 요구되어지고 있으며 유전자 발현이 배양온도나 유도물질에 의해 조절되는 경우는 이러한 유전자 발현시기의 최적화가 필요하다. 재조합 미생물의 발효공정 설계를 위해 고려되어야 할 사항들에 대하여는 이미 발표한 바 있는데(2-4), 다음에 각 공정 변수들의 영향에 대해 간략히 살펴보기로 한다.

1. 재조합 균주의 안정성

이미 언급한 바와 같이 재조합 균주의 안정성은 유전공학기술을 이용한 제품생산에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 재조합 DNA의 불안정성은 두 가지로 구분되는데 클론된 유전자와 변형에서 비롯되는 불안정성을 구조적 불안정성(structural instability)이라 하고 벡터로 사용되는 플라즈미드가 세포분열시 불균등 분배에 의해 소실되는 현상을 분배적 불안정성(segregational instability)이라 하며 어느 경우나 재조합 균주의 생성능이 없어지게 된다(5).

재조합 미생물의 안정성에 영향을 미치는 유전인자로서는 (1) 플라즈미드 벡터의 성질 및 구성, (2)

숙주세포의 유전적 형질, (3) 유전자 발현정도 및 copy수 등이 있으며, 이외에 (4) 배양온도, (5) 제한영양소의 종류, (6) 희석률, (7) 반응기 조업방식 등과 같은 환경인자들에 의해서도 영향을 받는다(6-9). 일반적으로 재조합 균주는 클론된 유전자의 발현으로 인해 세포정장의 저해를 받기 때문에 일단 재조합 DNA를 함유하지 않은 세포가 생기게 되면 이 세포의 빠른 증식으로 인해 재조합 균주의 비율이 감소 생산성이 크게 떨어지게 된다.

한편, 재조합 미생물의 안정화를 위하여는 환경조건을 플라즈미드가 소실된 미생물이 증식할 수 없도록 selection pressure를 가하거나 유전학적 변이를 의해 재조합 균주의 안정성을 유지시킬 수 있도록 하여야 한다. 가장 널리 쓰이는 방법 중의 하나인 항생제 첨가법은 대규모 산업적 발효의 경우 다량의 항생제가 필요하여 생산비의 추가부담이 되며 의약품 생산시는 첨가된 항생제를 제거해 주어야 하는 단점이 있다. 최근에는 숙주세포에 영양요구성을 도입하여 영양물질의 생성에 필요한 유전자를 플라즈미드에 함유시켜 플라즈미드가 유실되면 미생물이 증식하지 못하도록 하는 방법이 널리 쓰이고 있으나(10), 이 경우 배지설계시 defined media를 사용해야 하므로 배지선택에 어려운 점이 있다.

한편 자연계에 존재하는 플라즈미드의 안정유지 메카니즘의 연구로 플라즈미드의 안정화에 관여하는 유전자를 밝혀내었는데 현재 알려진 것으로는 pSC 101 플라즈미드의 *par* 유전자와 CoIE1 플라즈미드의 *cer* 유전자를 들 수 있으며(11,12), *par* 부위를 재조합 DNA에 함유시켜 안정성을 향상시킨 보고도 있으나(13) 모든 경우에 안정화현상을 나타내지는 않아 이 방법도 완전히 해결책은 되지 못하고 있다(14). 그밖의 유전학적 안정화 방법은 Lilly사와 Ajinomoto사에서 개발한 internal selection pressure를 사용하여 플라즈미드 함유미생물 균주를 선택적으로 남게하는 방법이 있으며(15,16), 그 이외에 *rec* 형질을 갖는 숙주를 사용하여 안정성을 향상시킬 수 있다.

재조합 미생물의 불안정화를 감소시키는 방법으로서 비교적 쉽게 행할 수 있으며 앞에서 언급한 바와 같이 영양요구성 도입이나 별도의 유전자 조작 등이 필요하지 않은 산업적으로 가장 실용적인 방법은 유전자 발현의 조절을 이용하는 방법이다. 즉,

유전자 발현의 유도과 억제와 조절 가능한 프로모터를 사용 세포의 성장시기와 생산물 생성시기를 분리하여 세포내의 대사활성이 충분할 때까지는 유전자 발현을 억제시킨 후 비교적 짧은 시간에 유전자 발현을 시킴으로써 재조합 DNA 생성물의 과량생산에 따른 재조합 균주의 불안정성 유발을 감소시키는 방법이다. 2단식 연속배양시스템을 사용하여 재조합 미생물을 장시간 안정하게 유지시키는 방법도 유사한 원리를 응용한 것이다(9).

재조합 미생물의 안정성 문제는 특히 scale up 과정에서 주의해야 하는데 재조합 균주가 high expression인 경우 초기 slant에서는 모두 플라즈미드를 함유하고 있었다 하더라도 생산 발효조까지 transfer되는 과정에서 전체 미생물의 일부만이 재조합 DNA를 가지고 있어 생산성이 크게 저하될 수 있기 때문이다(17,18).

2. 발효배지의 설계

일반적으로 발효배지의 비용이 생산비의 40~70%를 차지, 발효공정의 경제성 결정에 큰 비중을 차지하는 것 중의 하나로서, 재조합 균주의 발효시 특히 배지설계에 세심한 주의가 필요하다(20). 재조합 미생물의 배지선택은 사용되는 숙주 및 생산물질에 따라 결정되어야 하나 적어도 다음과 같은 사항을 고려하여야 한다(21).

- (1) 재조합 균주의 안정성 유지를 위한 영양요구성 또는 selection pressure의 필요성 여부.
- (2) 생산물 합성에 필요한 전구물질 또는 유도물질의 요구성 및 최적농도 결정.
- (3) 분리&정제를 저해하는 물질의 존재 여부.
- (4) 상업적 복합배지로의 대체 가능성 여부.

처음의 재조합 균주의 안정성과 배지설계의 관계에 대해서는 이미 앞에서 설명하였으므로 재조합 균주의 안정성 부분을 참조바라며, 두번째의 경우 유전자 발현의 조절을 위해 유도물질(inducer)을 사용하는 경우에는 최적농도의 결정 또한 매우 중요하다. 예를 들어 *trp* 프로모터를 사용하여 haemagglutinin과 면역 글로블린 단백질을 생산한 경우 유도물질로 indoleacrylic acid(IAA)를 사용한 경우에도 생성된 단백질의 종류에 따라 최적 IAA의 농도가 다르게 나타나고 있다(23).

한편, 분리&정제공정과 배지설계와의 관계는 우선 생성된 단백질의 축적장소에 따라 다른데 세포내에

축적되는 경우에는 crude complex media의 사용이 가능하나 세포외로 분비되어 배지내에 축적되는 경우 complex media 사용에 따른 정제과정에서의 어려움이 따르게 된다. 일반적으로 defined media를 사용하는 경우 재조합 균주의 안정성 유지 및 분리&정제과정을 용이하게 하는 장점이 있으나 비용이 많은데 비해 complex media의 경우 경제적이라는 이점이 있어 산업적인 재조합 균주발효 경우 여러 가지 사항을 종합적으로 분석하여 배지를 설계하여야 한다. 가장 널리 사용되고 있는 재조합 대장균의 경우를 보면 실험실 규모에서는 흔히 L-broth(yeast extract, tryptone, NaCl)를 사용하나 산업용으로는 비경제적이므로 합성배지 또는 복합배지의 개발이 바람직하다.

3. 발효조건의 최적화

(1) 배양온도

재조합 미생물의 숙주세포로 가장 널리 사용되고 있는 대장균의 경우 최적 배양온도는 37°C로 알려져 있으나 재조합 DNA 단백질 생산의 경우는 이보다 낮은 온도에서 조업하는 경우가 많은데 인터페론과 인슐린의 경우 생산을 극대화하는 최적 배양온도가 30°C인 것으로 보고되고 있다(24,25). 인슐린 생산의 경우 배양온도가 증가함에 따라 인슐린의 단백질 반감속도가 크게 증가, 생성된 인슐린의 분해속도를 줄이기 위해 배양온도를 37°C에서 30°C로 낮춘 결과 인슐린 생성을 약 3배 증가시킬 수 있었다고 발표하였다. 또한 재조합 대장균을 이용한 human epidermal growth factor 생산의 경우도 30°C의 경우가 37°C에서보다 2배 이상 증가하는 것으로 나타나고 있다(26).

배양온도는 재조합 균주의 여러 가지 대사기능에 영향을 미칠 수 있는데 단백질의 분해속도 외에도 재조합 균주의 안정성에도 큰 영향을 미치므로 배양온도 변화에 따른 여러 발효공정변수의 영향을 조사 분석하여 최적 배양온도를 결정하여야 할 것이다.

(2) 성장속도

재조합 미생물을 연속적으로 배양하는 경우 회색율이 재조합 DNA 생산물의 생성에 큰 영향을 미치는데 연속배양에서의 회색율은 바로 미생물의 비증식 속도(specific growth rate)와 같기 때문에 결국은 미생물의 성장속도가 생성물 생산에 주는

영향과 같은 의미를 갖게 된다. 미생물의 성장속도는 앞서 설명한 바와 같이 미생물의 고유한 유전형질과 주어진 환경조건에 의해 결정되어지므로 성장속도에 의하여 결국 배지조성의 설계 등 발효공정 설계변수의 영향을 간접적으로 시사할 수 있다.

일반적으로 성장속도의 증가에 따라 chromosomal DNA의 양은 증가하는데 반해 R1, ColE1, pBR322 등 대부분의 플라스미드 DNA의 경우는 성장속도가 빠를수록 세포당 DNA의 수 즉, copy number가 감소하는 것으로 밝혀져 있다(27,28). 그러나 최근 *Bacillus stearothermophilus*에 함유된 penicillinase 생산 pLPII 플라스미드의 경우는 성장속도의 증가에 따라 플라스미드의 양이 증가하거나 거의 변화하지 않는 것으로 보고되어(29) 플라스미드 또는 숙주의 종류에 따라 성장속도에 따른 플라스미드 copy number의 변화가 다를 수 있음을 보여주고 있다.

재조합 미생물의 성장속도에 따라 플라스미드의 수, 즉 클론된 유전자의 농도가 변하게 되므로 재조합 DNA 생산물의 생성량도 성장속도 또는 회석율에 의한 영향을 받게 된다. 앞서 인용한 pLPII 플라스미드의 경우 생성된 penicillinase의 활성을 최대로 하는 최적 회석율은 배양온도에 따라 다르게 나타나고 있다(29). 이밖에도 재조합 대장균을 이용한 알파-인테페론 생산의 경우에도 최적 회석율이 존재하는 것으로 보고되어 있는데 이 경우 높은 회석율에서는 배지내 acetate의 축적이 증가하며 이로 인한 세포성장 저해에 의해 최적 회석율이 존재하는 것으로 해석되어진다(24).

(3) 유전자 발현의 유도시기

재조합 미생물의 유전자 발현의 조절이 매우 중요하며 다량의 재조합 DNA 생산물을 생성하는 경우 산소요구량이 증가함은 앞에서 이미 언급하였는데 유전자 발현의 유도시기의 결정과 산소의 원활한 공급은 재조합 균주의 발효에 있어 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 최근 연구된 EcoRI 제한효소의 생산 예가 이들의 중요성을 가장 잘 보여주고 있다(30). 사용된 재조합 플라스미드 pEcoR312는 pL 프로모터에 의해 배양온도에 따라 유전자 발현이 조절되는데 pEcoR312를 함유한 재조합 대장균을 20 리터 발효조에 배양시키면서 발효도 중 배양온도를 30°C에서 42°C로 바꾸어 주어 stationary phase에서

유전자 발현을 유도한 경우이다. 유전자 발현의 유도시기에 따라 여러 가지 발효변수의 변화양상이 크게 다름을 알 수 있는데 early induction의 경우 생성된 효소의 양이 총단백질의 22%인데 비해 late induction인 경우는 단지 3~4%에 불과한 바, 유전자 발현이 유도되어 효소생성이 증대되는 시점에서는 산소요구량이 매우 높은 것으로 나타나고 있으며 특히 late induction의 경우에는 용존산소가 급격히 감소되어 용존산소의 부족현상이 일어남을 이 실험 결과는 보여주고 있다.

재조합 균주에 의한 발효의 경우도 일반발효의 경우와 같이 회분식, 유기식, 연속식 그리고 고정화 충전식이 현재 사용되고 있는데 재조합 미생물의 고농도 배양과 고정화 재조합 세포를 이용한 연속식 생산이 주목을 받고 있다. 이에 대해서는 다음 절에서 설명하기로 하겠다.

III. 재조합 미생물 발효공정의 최근 연구동향

재조합 단백질이 세포내에 과잉축적되는 경우 소위 inclusion body를 형성하여 분리정제에 큰 어려움이 있을 뿐 아니라 단백질의 활성도가 크게 감소되어, 최근에는 재조합 단백질의 세포외 분비에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 또한 재조합 단백질의 분비기술이 발전함에 따라 재조합 미생물을 고정화하여 연속적 반응을 사용한 재조합 단백질의 생산 연구가 주목받고 있으며 재조합 미생물의 고농도 배양기술 또한 매우 빠른 속도로 발전하고 있다. 다음에서는 이들 재조합 미생물 발효공정의 최근 연구동향에 대해 좀 더 상세히 설명하기로 한다.

재조합 단백질의 분비기술

재조합 단백질을 세포외로 분비시킬 경우 (1) 분리&정제공정이 용이해져 생산비를 절감시킬 수 있으며, (2) 분비된 단백질의 N-말단 아미노산 잔기가 자연형과 같게되며, (3) 세포내 단백질 축적이 적어지므로 재조합 단백질 축적에 의한 미생물의 성장 저해가 낮아질 수 있고, (4) endotoxin 등 재조합 단백질의 impurity 제거 문제가 적다는 장점이 있다(31). 한편 단점으로는 세포외 분비의 경우 대부분 생성단백질의 농도가 수십 mg/l 수준으로

아직은 만족스러운 수준에 도달하지 못하고 있으며, extracellular protease에 의한 생성단백질의 분해가 남아 있다. 한편, 단백질 분비를 위해 주로 많이 사용되어왔던 host로는 *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Myxococcus*, *Pseudomonas* 등이 있는데(31,32), 최근에 대장균(*E. coli*)을 이용한 새로운 단백질 분비 기술이 개발되어 큰 주목을 끌고 있다.

대장균의 경우 periplasm까지의 단백질 분비는 이루어지나 gram-negative 박테리아의 특성인 outer membrane의 존재로 인해 배양배지로의 단백질 분비는 최근까지 이루어지지 못하였다. 이 문제를 해결한 최초의 예로 일본의 이화학연구소팀에 의해 개발된 pMB9 플라스미드의 *kil* 유전자를 이용하는 방법을 들 수 있다(33). 이 방법은 호알칼리성 *Bacillus*의 secretion signal sequence를 이용하여 periplasm까지 분비시키며 세포의 분비를 위해 *kil* 유전자를 작동시켜 outer membrane을 leaky하게 만드는 것이다. 이와 유사한 방법을 최근 미국의 Lilly사에서 개발하였는데 그림 2에 도시한 바와 같이 *omp A*의 signal sequence를 이용하고 bacteriocin release protein에 의해 outer membrane을 permeable하게 만드는 방법을 택하고 있다(34). 이와는 달리 스웨덴의 KabiGen사에서는 이른바 EcoSec system이라고 하는 새로운 secretion vector를 사용하고 있는데 이 방법은 스웨덴의 Royal Institute of Technology에 의해 protein A(박테리아의 세포벽에 붙는 단백질)를 대장균에서 생산하는 경우 단백질이 세포외로 분비된다는 사실에 착안한 것이다(35). 이 방법을 사용하여 human insulin-like growth factor (IGF-I)를 생산한 결과 1g/l 이상의 단백질 생산이 가능한 것으로 보고되어 있다.

2. 고정화 재조합 세포기술

고정화 재조합 미생물을 이용한 단백질 생산은 스웨덴의 Mosbach 그룹에서 처음으로 발표된 바 있는데(36), 고정화 재조합 세포를 이용하는 방법은 아직은 초기단계라 할 수 있다. Mosbach 그룹에서는 인슐린 유전자를 함유하는 *B. subtilis*를 고정화시켜 proinsulin의 연속생산을 시도하였는데 이 경우 세포의 분비를 위해 *B. subtilis*의 penicillinase signal sequence를 사용하였다. 이외에 이용한 효소생산, yeast를 이용한 α -peptide, somatomedin C의 연속생산 등이 보고된 바 있다(37-40).

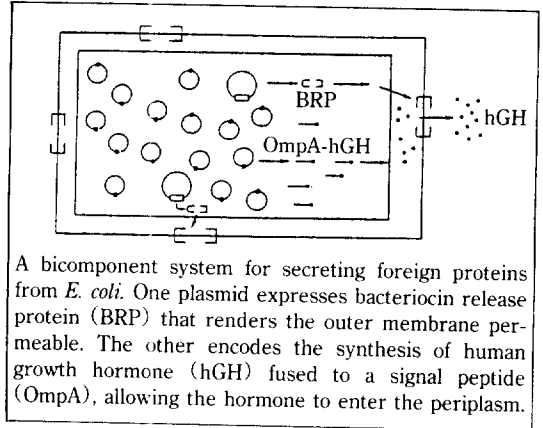


그림 2. 대장균을 이용한 재조합 단백질의 세포외 분비 시스템

한편 재조합 미생물을 고정화시키는 경우 일반적으로 stability가 향상되는 것으로 보고되고 있으며(41), 세포를 고정화시킨 후 novobycin 등 항상제를 첨가하여 DNA 합성을 억제하는 경우 재조합 단백질의 생산이 향상되는 것으로 발표되어 있다. 단백질의 세포외 분비기술이 발전됨에 따라 고정화세포를 이용한 연속생산 공정도 가능해질 것으로 전망되고 있으나 상업적용의 성공여부는 좀 더 시간을 두고 기다려 보아야 할 것으로 예상된다.

3. 재조합 미생물의 고농도 배양기술

80년대 들어 가장 괄목할 만한 발전을 이룩한 분야 중의 하나로 미생물의 고농도 배양기술 분야를 들 수 있는데 최근에는 유전자 재조합 미생물에 대해서도 고농도 배양기법을 적용, 재조합 단백질의 생산성을 크게 향상시키게 되었다. 참고로 표 1에 고농도 배양의 예를 나타내었는 바(42), 일반적으로 재조합 대장균의 경우는 60~80g/l, 재조합 효모의 경우는 100~150g/l까지 가능하다. 한편, 재조합 *Bacillus*는 고농도 배양이 상대적으로 어려워 30~40g/l 수준에 머물고 있다.

재조합 미생물의 고농도 배양에 의한 단백질 생산은 일반적으로 유전자 발현을 억제하며 세포농도를 높인 다음 유전자 발현을 유도하는 2단계 배양법이 쓰이게 되는데 이는 유전자 발현에 의해 재조합 단백질이 생성됨에 따라 재조합 세포의 성장이 크게 저해되기 때문이다. 미생물의 고농도 배양방법으로는 fed-batch culture, dialysis culture, membrane

표 1. 고농도 배양의 양

Strategy	Microorganism	Recombinant	Medium	Spargin gas	Dry cell weight (g l ⁻¹)	Specific growth rate (l h ⁻¹)	Productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹)
(1) Add glucose DOC increase	<i>E. coli</i>	-	C	O ₂	26	0.46	2.3
(2) Control DOC by varying sucrose feeding	<i>E. coli</i>	-	C	O ₂	42	0.36	4.7
(3) Add glucose in proportion to NH ₃ used to control pH	<i>E. coli</i>	-	C	O ₂	35	0.28	3.9
(4) Add glucose in proportion to NH ₃ used to control pH. Lower temperature to maintain DOC>10%	<i>E. coli</i>	-	C	O ₂	47	0.58	3.6
(5) Add C-source to maintain concentration constant. Add salts in proportion to NH ₃ used to control pH	<i>C. brassicae</i>	-	C	O ₂	138	0.55	5.8
(6) Add C-source at a constant rate below the level which causes O ₂ limitation	<i>E. coli</i>	-	S	Air	43	0.38	0.8
(7) Add C-source to limit specific growth to prevent acetate production	<i>E. coli</i>	+	C	Air	65	0.10-0.14	1.3
(8) Add C-source to control specific growth	<i>E. coli</i>	+	C	Air	80	0.2-1.3	6.2

+, Beraing recombinant plasmid ; -, without a recombiant plasmid ; C,complex media ; S, synthetic media

표 2. 재조합 효모를 이용한 감마 인터페론 생산 예

Promoter	Induction method ^a	Maximum cell concentration	Maximum IFN- γ concentration (u/L)	Medium type	Host
PGK	constitutive	15	1.5×10 ⁸	minimal	RH218-D
PGK	constitutive	19	2.2×10 ⁸	cnriched	RH218-D
GPD(G)	1	76	2.0×10 ⁹	cnriched	J17-3A
GPD(G)	2	83	3.3×10 ⁹	cnriched	J17-3A
GPD(G)	3	53	5.6×10 ⁹	cnriched	J17-3A
GPD(G)	1	110	2.2×10 ¹⁰	cnriched	DM-1

recycle culture, 그리고 hollow fiber를 사용하는 방법 등이 있으며 이 중 특별한 장치가 필요하지 않은 fed-batch culture가 가장 널리 쓰이고 있다. 대장균이나 효모의 경우 미생물의 성장저해가 acetate(대장균의 경우), 또는 ethanol(효모의 경우)의 축적에 기인하기 때문에 포도당 등 탄소원의 feed rate을 조절하여 이들 물질의 축적을 최소화하는 방법으로 흔히 controlled fed-batch라 불리우고 있다(43,44). 한편 재조합 미생물의 최대 세포농도 및 재조합 단백질의 생산성은 사용되는 host의 종류, promoter 및 유전자 발현유도 방법, 배지 종류 등에 따라서도 크게 달라질 수 있는데, 표 2에 재조합 효모를 이용한 γ -interferon의 예를 나타내었다(45). 이로부터 재조합 균주의 발효공정 최적화를 위하여는 생산성에 관계되는 여러 변수들의 영향을 종합적으로 분석하여 조업조건 또는 조업방식이 결정되어야 함을 알 수 있으며 이를 위해서는 경험 축적에 따른 knowledge base의 확립과 기본원리의 이해가 중요함을 알 수 있다.

IV. 맺는말

목적하는 물질을 유전공학기술에 의하여 효율적으로 생산하기 위하여 초기 유전자 클로닝 및 발현 단계에서부터 후방공정을 고려한 설계가 요구되어지며 공정분석을 통하여 재조합 세포의 설계로부터 발효 및 정제에 이르기까지 전공정의 최적화가 필요하다.

본 총설에서는 생산공정의 핵심이라 할 수 있는 발효공정에 필요한 공정변수들의 영향을 분석함으로써 재조합 균주의 발효기술에 대하여 고찰하였는바, 특히 재조합 균주설계에 필요한 미생물 공정변수와 발효설계를 위한 발효공정변수와의 상호관계에 역점을 두어 살펴보았다. 이는 재조합 균주의 특성을 잘 이해함으로써 보다 효율적인 발효를 수행할 수 있기 때문이다.

참고문헌

1. R.E., Shamel and J.J., Chow, *Chem. Eng. Progr.* **85**(12), 33(1989).
2. 이선복, *생물화공*, 1(1), 5(1987).

3. D.D.Y. Ryu and S.B. Lee, in *Horizons of Biochemical Engineering*(S. Aiba ed.) p.95, University of Tokyo Press, 1987.
4. D.D.Y. Ryu and S.B. Lee, in *Bioproducts and Bioprocesses*(A. Fiechter, H. Okada, R.D. Tanner eds.) p.347, Springer-Verlag, 1989.
5. M.J. Carrier *et al.*, *Trends in Biotechnol.*, **1**, 109 (1983).
6. D. Noack *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, **181**, 121 (1981)
7. M. Roth, D. Noack, and R. Geuther, *J. Basic Microb.*, **25**, 265(1985).
8. D.D.Y. Ryu, *Proc. Bio Expo* **85**, p.351(1985).
9. S.B. Lee *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 805 (1998).
10. D.M. Anderson, K.M. Herrman, and R.L. Somerville, U.S. Patent 4, 371, 614(1983).
11. P.A. Meacock and S.N. Cohen, *Cell*, **20**, 529 (1980).
12. D.K. Summers and D.J. Sherratt, *Cell*, **36**, 1097 (1984).
13. G. Skogman, J. Nilsson, and P. Gustafsson, *Gene*, **23**, 105(1983).
14. E. Hinchiff, P.L. Kumepel, and M. Masters, *Plasmid*, **9**, 286(1983).
15. P.R. Rosteck, Jr. and C.L. Hershberger, *Gene*, **25**, 29(1983).
16. M. Kiyoshi, S. Nakamori, K. Sano, and H. Mose, *Gene*, **31**, 275(1984) ; U.S. Patent 4, 371, 615(1983).
17. T. Imanaka, and S. Aiba. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **369**, 1(1981).
18. D.F. Ollis, *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.* **B297**, 617(1982).
19. K. Miwa, S. Nakanori, K. Sano, and H. Mose, *Agric Biol. Chem.* **48**, 2233(1984).
20. J. Van Brunt. *Bio/Technol.*, **4**, 395(1986).
21. D.E. Pitt, in "University of Queensland Biotechnology Unit Biotechnology Training Course" Chap. 3, 1984.
22. J.S. Emtage *et al.*, *Nature*, **283**, 171(1980) ; T. Kurokawa *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **11**, 3077 (1983).
23. S.I. Feinstein *et al.*, *Nucleic Acids Res* **11**, 1927 (1983).
24. H.-P. Meyer, H.-J. Kuhn. S.W. Brown, and A.

- Fiechter, *3rd. Eur. Congr. Biotechnol.* Vol.I, p. 499(1984).
25. A.W. Emerik *et al.*, *Bio/Technol.*, **2**, 165(1984).
26. T. Oka *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 7217 (1985).
27. B. Engberg and K. Nordstrom, *J. Bacteriol.*, **123**, 179(1975) ; D. Stueber and H. Bujard, *EMBO J.*, **1**, 1399(1982).
28. R. Siegel and D.D.Y. Ryu, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 28(1985).
29. J.-I. Koizumi, Y. Monden, and S. Aiba, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 271(1985).
30. J.H. Botterman *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 1320(1985).
31. J.-M. Nicaud *et al.*, *J. Biotechnol.* **3**, 255(1986).
32. I.B. Holland, N. Mackman and J.-M. Nicaud, *Bio/Technol.* **4**, 427(1986).
33. T. Kobayashi *et al.*, *J. Bacteriol.* **166**, 728(1986) ; H. Honda *et al.*, *Agric. Biol. Chem.* **49**, 3011(1985).
34. H.M. Hsiung *et al.*, *Bio/Technol.* **7**, 267(1989).
35. L. Abrahmsen *et al.*, *Nucleic Acids Res* **14**, 7487 (1986).
36. K. Mosbach *et al.*, *Nature* **302**, 543(1983).
37. K. Sode *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 215(1988).
38. S. Birnbaum *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 601(1988).
39. G. Younes *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 507(1987).
40. K. Sode *et al.*, *J. Biotechnol.*, **8**, 113(1988).
41. S. Sayadi *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 801 (1989).
42. D.W. Zarbiskie and E.J. Arcuri, *Enzyme Microb. Technol.* **8** 706(1986).
43. J. Fiechko and T. Ritch, *Chem. Eng. Commun.* **45**, 229(1986).
44. J.C. Fieschko *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 1113 (1987).
45. J.-H. Hsieh *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* **32**, 334 (1988).