

항생제 생산을 위한 생물 공정상의 문제점



유한화학(주) 노 용 택

1. 서 론

항생제 생합성은 이차대사(Secondary Metabolism)라는 용어로 그 특성을 함축시킬 수 있으면서, 그 속에 담겨진 복잡한 유전자 발현 기작, 여러단계 생합성 과정에서 여러가지 효소에 의한 생화학적 반응, 그리고 유전자 및 생합성 수준에서의 복잡한 조절 기작때문에, 항생제 생산을 위한 생물공정은 손쉽게 해결되기 어려운 많은 문제점을 안고 있으며, 산업적 생산에 크게 도움이 될만한 기초 연구 실적도 미진한 상태이다. 항생제의 90% 이상은 방선균에 의해 생합성되고 있는데, 세균 가운데 가장 진핵세포 특히 균류에 가까운 균사 형태로 성장하면서 호기성 균사 및 호기성 세포 외 포자를 형성하는 분화과정을 지닌 특이한 그람 양성 세균이다. 이처럼 형태학적 분화기작(Morphological Differentiation)과 함께 항생제, 색소, 특이 효소들을 생합성하는 생리적 분화기작(Physiological Differentiation)을 갖고 있는 방선균에 대한 연구 역사는 항생제 생산 산업화 역사보다 길지만, 생합성 과정에 대한 생리학적 연구, 발효조건 및 배지조성과 관련된 발효학적 연구가 근간을 이루고, 이미 다른 세균이나 분야에서 발전한 유전학, 유전공학, 분자생물학적 연구는 아직도 미숙한 상태이다. 이는 방선균의 분화과정이 단순한 몇몇 구조유전자 또는 조절유전자에 의해 발현되는 것이 아니라 일차대사와 관련된 모든 유전자 발현의 상호연관성과 배양조건에 의존하여 이차대사와 관련된 조절유전자 및 구조유전자들이 복잡한 연관성 및 시차성을 두고 발현될 때 이차대사와 분화가 진행되는 것이기 때문이다. 이러한 이유때문에 단일 유전자 조작에 의한 유전공학기법으로 개발된 산업

용 항생제 생산균주는 아직 전무한 실정이다.

방선균의 또하나의 특징은 비성장속도가 느리며, Idiophase로의 전환도 긴 시간을 요한다. 여러가지 효소 생산에 이용되는 단세포 세균들의 doubling time이 30-60분 정도이고 발효시간이 1-2일 정도인데 비하여 항생제 발효공정은 1주일 이상인 경우가 산업현장의 실정이다. 따라서 많은 연구가 진행된 Chemostat Culture 또는 Immobilized-Cell Bioreactor의 산업현장 적용도 현실적으로는 거의 불가능한 상태이다. 진전된 발효공정 형태로는 Fed-Batch Culture, Semicontinuous Culture가 산업적으로 이용되고 있다.

항생제 생산을 위한 생물공정은 크게 3단계로 나눌 수 있다. 우주균주 선발, 현장균주 보존 및 현장 종균 공급을 위한 일련의 종균배양 과정을 Upstream이라 할 수 있고, 종모실로부터 공급받은 종균을 현장에서 증식시키는 현장 종균배양 공정과 본 발효조에서의 항생제 생합성공정을 Mid-Stream, 발효가 끝난 상태의 배양액으로부터 균체, 세포내 및 세포외 불필요한 물질을 제거하고 항생제만을 회수, 정제하는 Down Stream으로 나눌 수 있다. 따라서 항생제 발효는 좁은 의미에서는 본 발효조에서의 항생제 생합성공정을 가리키지만 넓은 의미에서는 위 전체 공정을 가리키는 말이기도 하다. 따라서 본 소고에서는 항생제 생산을 위한 생물 공정상의 문제점을 3분야로 나누어 제시하고자 한다. 실제로 항생제 공장을 건립하여 항생제 발효를 실시해 왔으며 그것을 좀더 나은 수준으로 개선하고자 꾸준히 노력해 온 당사에서의 경우를 그 예로 보아 문제점을 제시하고자 한다.

2. 균주개발 및 생산균주 공급

항생제를 생산하는 현장에는 단순반복 작업화된 우수균주 선발, 선발된 균주 특성 파악 및 Scale-Up 실험, 현장생산에 필요한 종균 보존, 배양 및 공급을 주임무로 하는 종모실 및 Pilot 실이 반드시 있다. 여기서 진행되는 작업들은 항생제생산이 산업화된 이후로 해당업체에서 밤낮없이 수년간씩 반복 진행되어 오고 있으며, 균주 생산성의 향상, 균주 특성의 최적화, 생산공정의 안정화에 크게 기여하여 왔다. 이 공정은 각 기업체 또는 연구소의 Knowhow로 항생제 종류나 균주 특성에 맞게 개발된 고유한 기술영역이며 좁게는 외부에 알려지지 않고 있다. 그러나 일반적인 방법론상으로는 아직도 고전적인 Mutation 방법에 의해 이루어지고 있으며 좀더 진전된 방법으로는 Protoplast Fusion 같은 방법이 사용되고 있기는 하다. 앞에서 언급된 바와 같이 유전공학기법이 일반화되지 못하는 것은 방선균의 Genome 크기가 대장균의 Genome 크기의 4배가 되어 유전자조작 및 유전자 안정성 유지가 어렵고 항생제 생합성과 관련된 목적 유전자가 단일 유전자로 국한되어 있지 않기 때문이다. 이러한 한계성 때문에 효율적인 균주개발이 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 배양 시간이 길고, 오염에 약하며, 배양액의 높은 점도때문에 배양이 까다롭고, 하나의 균주 선발에 장시간이 요구되는 것도 하나의 한계성이다.

주로 현장에서의 균주개발 목표 및 생산균주 공급의 원칙은 다음과 같다.

첫째, 생산성이 높은 균주일 것

둘째, 본 발효조까지 도달하기 위하여 여러 종균 배양 단계를 거치는 동안 빨리 생장하면서도 역가나 특성변화가 적을 것

셋째, 본 발효조는 대체로 대형 용량으로 배양조건 조절이 사실상 정밀, 정확하지 못하므로 최적 조건 범위가 넓은 내성균주일 것

넷째, 값비싼 전구물질, 배지원료를 요구하지 않고 값싼 Raw material을 배지로 사용할 수 있는 균주일 것

다섯째, 장기보존시에도 역가 변화가 적은 안정한 균주일 것

이상의 목적을 달성하기 위해서는 효율적인 균주

Screening, Assay 방법, 손쉽고 경비가 적게 들면서 선발된 우수 균주를 장기간 안정되게 공급할 수 있는 균주보존 방법, 방선균의 항생제 생합성과 관련된 Key Enzyme 및 Key Gene에 대한 연구들이 유전학, 분자생물학, 생화학, 생리학 등 여러 분야에서 이루어지고, 산업현장에 응용이 가능해야 할 것이다.

3. 항생제 생합성 공정 및 회수 공정

산업 현장에서의 항생제 생합성 공정은 먼저 경제성이 고려되어야 한다. 대부분의 기존 항생제는 생산성에 반비례하여 단위 경제성이 낮으므로 대량 생산이 필요하고, 신규 항생제는 생산성이 낮은 만큼 회수율이 낮아 대량 배양이 필요하다. 따라서 항생제 발효조는 대형화하는 추세이고, 발효조에 부가되는 설비가 많아 설비투자가 많은 장치 산업이므로 초기 자본과 높은 가동율을 유지하기 위한 시장 확보가 전제 되어야 한다. 점도가 높은 발효조의 교반 동력 및 호기성 발효를 위한 압축 공기 생산 동력, 발효 공장 설비와 배지 살균을 위한 연료 등 에너지 비용이 직접제조비에 차지하는 비중이 매우 크다. 산업적 항생제 생산에서 생산성을 높이고, 생산 비용을 절감하는 방법으로 다음 5가지가 본 발효조에 응용되며 꾸준히 해결해 가야 할 문제이기도 한다.

첫째, 배지 조성의 최적화가 매우 효과적이다. 방선균의 기초 연구에서 얻어진 Carbon Catabolite Repression/Inhibition, Nitrogen Repression/Inhibition, Phosphate Regulation 등을 염두에 두고 탄소원, 질소원, 무기인의 농도 및 종류에 관한 실험으로 좋은 결과를 많이 얻는다. 그러나 많은 시행 결과를 토대로 얻어지는 경험적인 것이 많고, 체계적인 생리학적 접근은 어려운 실정이다. 이러한 regulation 기작과 관련된 유전자나 Regulator의 분리도 된 예가 별로 없다. 값싼 Raw Material을 이용하여 고가의 항생제를 생산할 수 있는 방법은 항생제 생합성 경로, 생합성 조절기작 등의 연구를 통하여서만 가능하다.

둘째, 배지 원료 품질 관리 및 살균 조건의 최적화를 시도 한다. 항생제 생산에 사용되는 배지원료는 대두분, 어분, 전분, corn steep liquor 등 거의가 농·수산물 또는 폐기물이 재활용 된다. 따라서 배지 Lot간의 품질 내지 성분 조성이 산지, 생산 공정에

따라 달라지고, 그에 따라 발효 양상 또는 생산성이 달라진다. 이 점이 시약급의 배지원료를 사용하는 연구실에서의 결과와 다른 점이다. 따라서 항생제 생합성에 각 배지 성분 중 대표적으로 중요한 성분이 무엇인가도 밝혀져야 한다. 경우에 따라서는 현장에서 배지의 추출 공정 처리를 거쳐 원료를 사용하기도 한다. 또 배지를 살균하는 과정에서 여러 가지 이화학적 변화가 일어나 생산성에 변화를 주기도 한다. 항생제 생산 발효조의 용량이 크므로 연속 살균기를 사용하는 것이 일반적인 살균 방법이지만, 경우에 따라서는 회분식 살균을 하기도 한다. 어떠한 경우든 어떠한 배지 성분을 어떤 순서로 투입, 혼합 살균하느냐, 분리 살균하느냐가 매우 중요하다. 배지 성분들 간의 이화학적 변화가 기대치 생산성보다 항생제 생합성을 증가시키기도 한다. 인산염은 무기인 공급원, pH 완충제 역할 외에 어떤 무기염류와 살균하는에 따라 암모늄염 Trapping Agent로 작용하여, 무기 질소원의 최적 농도를 변화시키기도 하는 예가 있다.

이러한 문제점들은 각 배지 원료가 대표할 수 있는 역할에 대한 연구가 많지 않기 때문이다. 복합 배지 성분내에 존재하는 어떠한 단일 물질이 항생 물질 대사를 크게 촉진하기도 하는데, 그 활성이 살균조건에 따라 변화 될수도 있다. Yeast Extract내 존재하는 B-factor는 Rifamycin B 생합성을 촉진하는 Exogeneous regulator라는 보고는 이러한 문제점 접근의 한 예이다.

셋째, 항생제 발효의 특성이자 많은 문제점을 안고 있는 점은 매우 산소에 민감한 호기성 발효라는 것이다. 항생제 생산균은 대부분 균사체로 성장하는 방선균으로, 발효액의 점도는 매우 높아, 산소를 포함한 Mass Transfer와 Heat Transfer 증진에 어려움이 많다. 발효액의 점도는 Mass Transfer에 영향을 주어 균체의 대사생리를 변화시키고, 이는 다시 균체의 성장 및 분화에 영향을 주어 발효액의 물성과 항생제 합성에 영향을 주는 상호 맞물림 관계의 순환을 이룬다. 교반 속도를 높이면 Mass Transfer 문제가 해결될 것 같지만 균사체의 손상으로 어느 정도 이상에서는 역효과를 갖기도 한다. 근본적으로 항생제 개발과정에서 방선균의 분화 특성이 연구되고, 그것에 맞는 발효조 설계가 이루어져야 하지만, 아직도 항생제 발효조 설계는 경험적 수준이고, 발

효기간 경과에 따른 물성 변화, 성장 및 분화, 대사 변화에 대한 연구도 미약한 실정이다. 따라서 항생제 발효 공정의 On-Line Computer Control은 아직 시험 단계일 뿐이다. 통상 교반속도의 조절, 통기량 조절, 배지나 탄소원의 Feeding, 무균수에 의한 희석, 액체 산소의 이용 등이 항생제 생산성 향상의 한 방법들로 이용되고 있다. 물론 이것들의 적절한 조절 방법 또는 시간들도 많은 실험 결과의 축적이 있을 때만 가능한 것이다. 또 발효조 개선외에 배지조성 최적화, 균주개발을 통하여 산소 이용성을 최대화시켜 낮은 용존산소에서도 항생제 생합성을 촉진시킬 수 있는 연구도 좋은 결과를 얻는 경우가 있다.

넷째, 항생제 발효에 있어서 많은 어려움을 겪는 것이 오염 문제이다. 방선균은 매우 생장이 느리므로, 단세포 세균이 일단 오염되면 발효조는 항생제 생합성 완료전에 오염균으로 충전되어 버린다. 다른 세균을 이용한 발효에서는 발효 기간이 짧아 오염균 증식 이전에 발효가 완료되지만, 항생제 발효는 보통 1주일 이상이 요구되므로, 오염은 매우 치명적이다. 보통 오염은 크게 2가지 원인에서 올 수 있다. 불합리한 배관, 부적당한 발효조 설계, 불량한 밸브류 등 기계적인 원인과 중균 관리의 허점, 불완전한 배지 살균 또는 설비 살균 등 공정 관리가 원인일 수 있다. 어느 시간대에 오염되든 빠른 시간내에 오염을 확인할 수 있는 방법이 필요하고, 오염 판정 후에는 그 발효액을 폐기할 것인가, 중단할 것인가, 계속 배양할 것인가의 판단이 이루어져야 하며, 그 오염 원인을 빨리 추적하여 개선, 제거 해야 한다. 오염 판정법은 현미경의 관찰, 발효액의 Plate 배양 등을 통하여 확인되고 있지만 좀더 생화학적으로 빠른 시간내에 저 농도에서도 민감하게 판정할 수 있는 방법이 모색되어야 한다. 오염 판정 후에 발효액 처리는 오염 시간대 또는 발견 시점에 따라 재살균하여 활용 할 수도 있고, 어느 정도 항생제에 의해 생장이 저해를 받는 오염균이라면 계속 배양을 할 수도 있다. 일련의 이러한 과정은 생산 균주, 항생제 종류에 따라 달라질 수 있으므로 오염에 의한 생산비 상승은 case study를 통하여, 어느 정도 막을 수 있지만, 이것은 경험적인 것들로, 동업종간에도 정보 교환은 없는 상태이다. 특히, phage에 의한 오염 발생의 경우에는 대처 능력이 없어서 공장 가동 중지가 최대한의 해결책인 경우도 있다. 이러한 오염

발생 원인 가운데 설비와 관련된 경우에는 설비 개선이 이루어지기 전에는 해결이 안된다. 다른 공장과 달리 설비 부품 및 설비 설치의 규격화나 장치 기준이 마련되어 있지 않고 경험에 의존하는 것도 문제 발생의 한 원인이기도 하다.

다섯째, 항생제 생산을 위한 생물 공정은 항생제 생산성 향상에 역점을 두겠지만, 생산된 항생제를 어떤 방법으로 어떻게 회수, 정제할 것인가도 염두에 두어야 한다. 용매 추출, 원심 분리, 여과, 막 분리 등 여러 가지 방법이 단일 또는 복합적으로 사용되고 있지만 균체, 배지 성분, 세포내외에 축적된 부산물 등을 제거하고, 항생제를 회수하며, 대형 발효조에서 나온 물량을 농축, 정제하여 소량으로 만드는 것은 많은 어려움이 있다. 이 때 부가적으로 생성되는 폐액 및 폐기물은 또다른 처리 문제를 야기시키므로 이전단계에서 이를 염두에 두어야 한다. 생장, 분화 및 항생제생합성에 관한 동력학적 modeling 연구가 적절히 이루어져 균체량을 줄이고, 배지의 이용성을 최대한 높여야 할 것이다. 또한 발효에서와 같이 회수 공정에서도 발효액의 점도가 상당한 장애 요

인이 되는데 연속추출이 가능한 extractor, 고속 연속 원심 분리기, 연속 여과 장치, 역삼투 또는 한외 여과막장치 등이 개발되어 이들을 효과적으로 이용할 수 있는 공정 실험이 적절히 이루어지면 적은 비용으로, 적은 폐기물을 만들면서 항생제를 순도 높게 회수, 정제할 수 있으리라 생각되지만, 이러한 연구도 부족한 실정이다. 항생제 회수 공정은 아직 균체가 존재하고 생합성 물질인 항생제와 기타 다른 유기물을 제거하는 작업이므로 생물 공정으로서의 인식이 필요하다. 무균상태가 아닌 상태에서 발효액을 방치하면, 하절기에 부패가 일어나 회수, 정제, 수율이 저하되고 적업에 어려움이 따르지만 대체로 고가 설비인 회수, 정제 시설을 무한정 크게 할 경우 설치 비용과 운전비용이 높아져 신속한 처리만을 고집할 수는 없다. 따라서 적당한 회수 설비로 최대의 효율로 항생제를 회수, 정제할 수 있는 공정에 관한 연구는 생물 공정을 연구한 사람들의 과제이기도 하다. 이런 점에서 이 부분에 관한 기초연구나 이론, 설비 개발에 있어서 외국에 비하여 상당히 뒤떨어져 있는 부분이기도 하다.