

## 용존산소 제한 또는 탄소원 제한 조건의 유가식배양에서의 Cyclosporin A 생합성 연구

† 전 계 택 · 박 성 관 · 권 호 균 · 정 연 호 · 정 용 섭 · 장 용 근 · 이 영 행  
강원대학교 생명과학부, <sup>1</sup>식품생명공학부, <sup>2</sup>전북대학교 응용생물공학부  
<sup>3</sup>한국과학기술원 화학공학과, <sup>4</sup>원광대학교 화학과  
(접수 : 1997. 12. 12., 게재승인 : 1998. 3. 5.)

### Studies of Cyclosporin A Biosynthesis under the Conditions of Limited Dissolved Oxygen or Carbon Source in Fed-batch Culture

G.-T. Chun<sup>†</sup>, S. K. Park, H. K. Kwon, Y.-H. Jeong<sup>1</sup>, Y.-S. Jeong<sup>2</sup>, Y. K. Chang<sup>3</sup>, and Y.-H. Lee<sup>4</sup>  
Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701  
<sup>1</sup>Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701  
<sup>2</sup>Faculty of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju 561-756  
<sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, KAIST, Taejeon 305-701  
<sup>4</sup>Department of Chemistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea  
(Received : 1997. 12. 12., Accepted : 1998. 3. 5.)

We investigated the effects of dissolved oxygen (D.O.) and fructose (C-source) on cell growth and biosynthesis of cyclosporin A (CyA) produced as a secondary metabolite by a wild-type filamentous fungus, *Tolypocladium inflatum*. This was performed by controlling the level of D.O. and the residual C-source, as required, through adjustment of medium flow rate, medium concentration and agitation rate in fed-batch cultures. CyA production was turned out to be maximal, when D.O. level was controlled around 10% saturated D.O. and concentration of the C-source was maintained sufficiently low (below 2 g/L) not to cause carbon catabolite repression. Under this culture condition, we obtained the highest values of CyA concentration (507.14 mg/L),  $Q_p$  (2.11 mg CyA/L/hr),  $Y_{x/s}$  (0.49 g DCW/g fructose),  $Y_{p/s}$  (22.56 mg CyA/g fructose), and  $Y_{p/x}$  (48.31 mg CyA/g DCW), but relatively lower values of cell concentration (11.98 g DCW/L) and cell productivity (0.043 g DCW/L/hr), in comparison with other parallel fed-batch fermentation conditions. These results implied that, in the carbon-limited culture with 10% saturated D.O. level, the producer microorganism utilized the C-source more efficiently for secondary metabolism.

Key Words : cyclosporin A, filamentous fungus, secondary metabolism, fed-batch culture

### 서 론

균류(곰팡이)와 같이 균사를 형성하는 미생물이 생산하는 이차대사산물 또는 효소 등은 산업적 중요성이 매우 높으나, 이들 균사모양의 세포가 갖는 독특한 morphology로 인해 대량생산이 매우 까다롭다(1). 즉 박테리아나 효모의 성장과는 달리, 균류의 현탁배양시 독특한 3차원적인 highly branched filamentous mycelial structure로 인해 배양액의 점도가 증가함으로써 생물

반응기내에서의 물질전달, 특히 산소전달 능력이 급속히 감소하는 특성을 갖는다(2, 3). 따라서 배양중 산소가 제한되는 상태를 피하기 위해서, 즉, 용존산소량을 critical dissolved oxygen concentration 이상으로 유지하기 위해서는 배양액 내로의 산소 전달율을 증가시켜야 한다. 산소전달속도(oxygen transfer rate, OTR)를 증가시키기 위한 한 방법으로 배양기의 교반속도(rpm)를 증가시킬 수 있으나, 교반속도를 과도하게 증가시킬 경우 shear stress로 인해 세포의 성장과 이차대사산물의 생합성이 영향을 받는다고 알려져 있다(4).

일반적으로 일차대사에 매우 적응되어 세포성장이 활발한 생산균주는 이차대사산물을 효과적으로 과도 생산하지 않으므로, 배양중 생산균주의 성장을 어느 정도 제한시키는 생물반응기 운전전략이 필요하다(5, 6). 즉 특정 제한기질로 세포의 성장을 제한시킴으로써 전체 대사의 균형을 깨고 대사 흐름을 원하는 이

† Corresponding Author : Division of Life Sciences, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea  
Tel : 0361-250-8547, Fax : 0361-241-4627  
e-mail : gtchun@cc.kangwon.ac.kr

차대사방향으로 유도하는 것이다. 한 예로서, 이차대사산물의 생합성시 탄소원이 배지 내에 일정 농도 이상으로 유지되면, 이차대사 관련 효소의 생합성이 억제되는 carbon catabolite repression 현상이 종종 나타나곤 한다(7). 반면에 주목할 점은 탄소원이 배지 내에 너무 낮은 농도로 유지되는 경우, 세포성장이 저해를 받아 이차대사산물의 volumetric productivity ( $Q_p$ ,  $Q_p=q_pX$ :  $q_p$ =specific production rate (g product/g cell/hr),  $X$ =cell concentration(g/L))가 감소하게 된다는 점이다(7). Catabolite repression에 의한 이차대사산물 생산성 저해 효과를 적절히 완화시키기 위한 유가식배양(fed-batch culture)법은 탄소원을 지속적, 또는 간헐적으로 공급함으로써 배지 중의 탄소원농도를 이차대사산물 생산에 방해되지 않을 정도로 유지시킬 수 있으며, 동시에 지속적인 세포성장도 이룰 수 있는 배양 방법으로 제시되어 왔다(6).

본 연구에서는 균사형성 균류인 wild-type의 *Tolypocladium inflatum*의 유가식배양을 통해 탄소원 또는 용존산소 제한 조건이 Cyclosporin A(CyA)의 생합성에 미치는 영향을 조사하였다. 즉 유가식배양에서 탄소원과 용존산소 농도의 다양한 조절을 통해, 생산균주의 성장을 제한시킴으로써 전체대사를 불균형화시켜 대사흐름을 이차대사산물인 CyA의 생합성방향으로 유도하고자 하였다. 본 연구의 모델 product인 CyA는 11개 아미노산으로 이루어진 cyclic peptide계 이차대사산물로서, 장기이식시 거부반응을 억제하는 중요한 의약품이며, 자가면역(auto-immune)과 관련된 당뇨병, 류마티스 등의 치료에도 상당한 효과를 갖는 것으로 알려져 있다(8). 지금까지 CyA의 면역기작 및 생합성 경로에 대해 많은 연구결과가 보고되고 있으며(8, 9), 특히 최근에 CyA의 생합성이 다기능성 단일효소인 CyA synthetase에 의해 진행된다는 사실이 밝혀진 후(10, 11), 부분 또는 완전 정제된 CyA synthetase를 이용하여 CyA 유사물질(derivatives)에 대한 신약 탐색 및 약효 연구가 활발히 진행되고 있다(12, 13).

## 재료 및 방법

### 균주

사용된 균주는 ATCC에서 구입한 wild-type 균주인 *Tolypocladium inflatum* (ATCC 34921)이다. 균주는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 glycerol stock으로 보관하여 seed culture시 마다 새로운 stock을 꺼내 사용했고 2개월 마다 계대배양하였다.

### 배지 및 배양조건

균체의 발효조로의 접종을 위한 seed culture를 위해 사용된 배지(SSM)의 조성은 다음과 같다. glucose 80 g/L; urea 2.0 g/L;  $\text{NaNO}_3$  3.0 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L; KCl 0.5 g/L;  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L; yeast extract 30 g/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L. CyA 생산을 위한 생산배지로는 synthetic medium (SM)을 이용하였으며 그 기본조성은 fructose 30 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10.0 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75 g/L;  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L;  $\text{CaCl}_2$  0.1 g/L; valine 6 g/L; trace element solution 1 mL/L 이다(14). 배지의 열멸균시 침전과 갈변현상의 방지를 위해, sugar와 무기염류를 농축용액으로 만들어 각각 따로 멸균한 후, 무균 상태에서 나머지 배지용액과 혼합하여 사용하였다. 발효를 위한 seed culture는 성

장배지인 100 mL의 SSM배지(초기 pH 5.7, 500 mL Erlenmeyer flask에 glycerol stock을 10 mL 취하여 접종)에서 수행하였다. 200 rpm,  $27^{\circ}\text{C}$ 에서 5일간 배양하여 지수기 성장 단계에 있는 활성 높은 seed를 5% v/v의 부피로 생산배지가 들어있는 발효조에 접종하였다. 각 단계마다 오염 여부의 확인을 위하여 현미경을 통한 관찰을 병행하였다.

### 분석방법

CyA와 탄소원인 fructose의 분석은 HPLC를 이용했으며 분석 조건에 대한 자세한 사항은 Chun과 Agathos에 의해 제시된 이전의 보고와 같다(15). 균체농도는 건조중량(Dry Cell Weight, DCW)을 이용하여 측정하였다. 균일한 시료를 얻기 위하여 homogenizer에서 균일화 과정을 거친 10 mL의 발효액을 15,000 rpm에서 원심분리 후, 남아있는 당 및 염들을 증류수로 씻어 내는 과정을 3번 거친 후 weighting dish에 담아 dry oven( $90^{\circ}\text{C}$ )에서 24시간 동안 건조한 후 건조중량을 측정하였다.

### 유가식 배양을 위한 발효조 실험

발효조로는 2.5 liter부피의 한국발효기(주)제품을 사용하였고 조업부피는 2.0 liter로 하였다. 온도는  $27^{\circ}\text{C}$ , 공기유량은 1.0 vvm, 교반속도는 150~300 rpm의 범위에서 변화시켜 주었다. 유가식배양은 배양시작 후 약 150시간 경에 다양한 농도로 농축된 생산배지를 3.6 mL/hr의 속도로 공급함으로써 수행되었다. 배양기 내의 잔류 탄소원 농도의 조절을 위해, 배지의 공급속도는 거의 일정하게 유지시킨 채, 공급되는 생산배지의 탄소원 농도(20, 30, 40, 50, 60, 90 g/L)를 다양하게 변화시켜 가며 수행하였다. 배지 공급속도가 너무 높을 경우 발효조내의 전체 배지 부피를 과도하게 증가시켜 세포농도를 희석시킬 우려가 있으므로, 상기와 같이 탄소원 농도를 변화시켜 가며 실험을 진행하였다. 또한 배지내의 탄소원의 농도를 원하는 농도로 유지시키기 위해 간헐적 공급 또는 연속 공급의 방법을 병행하였다. pH는 조절하지 않았으며, 이때 배양액의 pH는 발효 초기 약 5.4에서 발효 말기에는 약 2.5까지 변화하였다. pH를 조절하지 않은 이유는 이 경우가 pH를 조절한 경우 보다 세포성장은 별로 저해를 받지 않는 반면, CyA 생산성은 훨씬 높게 나타났기 때문이다 (논문 곧 발표 예정).

### 배양액의 용존산소 농도 측정 및 자동 조절

용존산소 농도의 calibration을 위해, 생산균주를 접종하기 전에 질소가스를 배양액에 공급함으로써 용존산소가 더 이상 존재하지 않는 점을 0% 용존산소 농도로 정하였고, 배양액내로 공기를 계속적으로 공급하여 용존산소가 포화상태에 도달한 점을 100% 용존산소 농도로 정하였다. 배양중 용존산소 농도는 교반속도를 이용해서 용존산소조절기 (PID dissolved oxygen controller)에 의해 원하는 농도로 자동 조절되었다. 주목할 점은 균사형성 균류의 경우 부착성이 매우 높아 발효 기간 동안 산소 전극에 균류가 달라 붙어 용존산소 측정이 불가능해지는 현상이 자주 발생하곤 한다는 점이다. 본 실험에서는 전극 바로 밑에 6 blade turbine impeller를 설치함으로써, 효과적인 turbulent mixing을 통해 균사형성 균류의 부착에 의한 산소 전극의 fouling 현상을 방지할 수 있었으며, polarographic 산소 전극 (Mettler Toledo)의 sensitivity도 배양기간 내내 감소하지 않는

것으로 관찰되었다.

**결과 및 고찰**

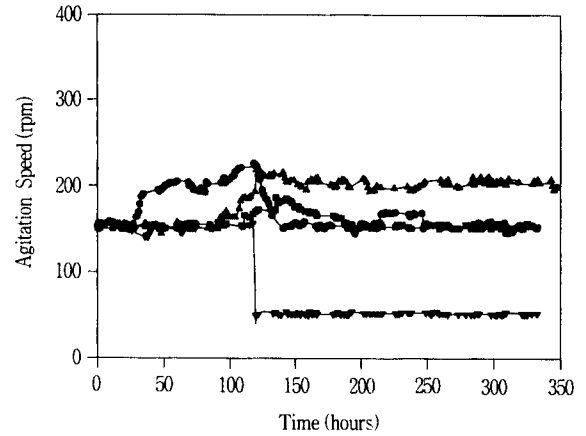
**탄소원 또는 용존산소의 정밀 조절을 위한 유가식배양법 확립**

균류 배양의 경우 균사모양으로 인한 shear sensitivity 현상으로 인해, 배양액 내에 mixing 효과 및 산소전달 속도를 증가시키기 위한 목적으로 교반속도를 증가시키는 경우, 일반적으로 세포 성장속도와 이차대사산물의 생산성이 심각하게 영향을 받는 것으로 알려져 있다(16). 한편 성장(일차대사)이 왕성한 미생물은 이차대사산물을 효과적으로 과도 생산하지 않는 경향이 있으므로, 필수 영양원의 제한적 공급을 통해 전체 대사흐름을 원하는 이차대사방향으로 유도하는 생물반응기의 운전 전략이 제시되고 있다(6). 이를 위해 본 연구에서는 유가식배양시 배양액 내에 과량의 탄소원을 유지시키기 위해, 생산균주가 용존산소 제한 조건에 먼저 노출되어 성장속도가 주로 용존산소에 의해 영향을 받도록 하는 운전전략을 수행하였다. 또한 유가식배양중 공급되는 배지의 공급 속도 및 농도 조절을 통해 생산균주의 성장속도가 배양기내의 잔류 탄소원의 농도에 의해 조절되는 배양 전략도 테스트하였다. 즉 하기의 4가지 조건의 유가식 배양을 통해, 탄소원과 용존산소가 cyclosporin A 생합성 균류인 *T. inflatum*의 일차대사와 이차대사에 미치는 영향을 조사하였다: (i) 충분한 농도의 탄소원과 10% 포화용존산소 농도의 조건, (ii) 충분한 농도의 탄소원과 용존산소 제한 조건(약 1% 포화농도 유지), (iii) 탄소원 농도의 제한(약 2 g/L 이하 유지)과 10% 포화용존산소 조건, (iv) 탄소원 제한(약 5 g/L 이하)과 용존산소 제한 조건(10% 포화농도 이하)의 유지. 본 실험에서 용존산소를 10% 포화농도로 조절한 이유는 이 농도가 세포의 성장과 CyA 생산성에 저해를 미치지 않는 적정 농도로 이전의 실험 결과 판명되었기 때문이다(17).

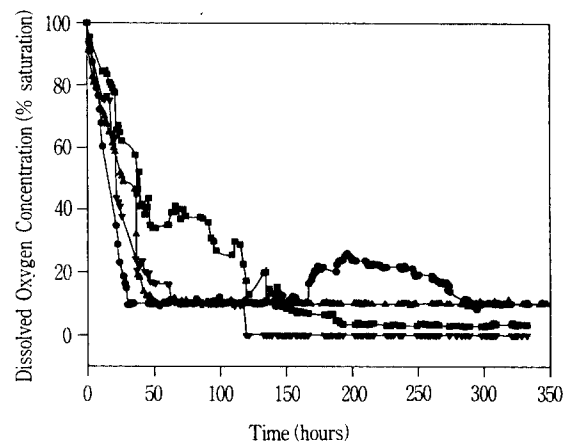
상기와 같은 발효 조건을 맞추기 위해 수행된 실험결과를 Figure 1과 Figure 2에 제시하였다. 시간에 따른 배양액 중의 교반속도(Figure 1(A)), 용존산소(Figure 1(B)) 및 fructose 농도(Figure 2)의 변화로부터, 교반속도와 다양한 농도의 탄소원의 유가식 공급을 통해, 용존산소와 잔류 탄소원 농도의 조절이 정밀하게 이루어졌음을 알 수 있다. 주목할 점은 10% 포화용존산소 농도로 유지하기 위해, 세포성장이 왕성할 때 교반속도를 너무 높은 속도로 증가시키지 않고(실제로 300 rpm 이내로 상한선 제한) 탄소원의 공급속도를 줄임으로써, 또는 간헐적으로 공급을 중단함으로써 본 실험을 수행했다는 점이다. 이는 배양액내로의 산소전달계수( $k_L a$ )를 증가시키기 위해 교반속도를 과도하게 증가시키는 경우(350 rpm 이상), 교반으로 야기된 shear stress에 대해 본 생산균주가 민감한 것으로 판명되었기 때문이다(17).

**용존산소와 탄소원 제한 조건이 CyA 생합성에 미치는 영향**

Figure 3과 Figure 4는 상기 4가지 조건의 유가식배양에 대한 배양시간에 따른 세포농도와 CyA의 생산 경향이다. 용존산소 농도의 수준에 관계없이, 세포농도는 탄소원의 잔류 농도가 15 g/L 또는 그 이상으로 높게 조절된 두 경우가 탄소원의 농도가 제한된 두 경우(5 g/L 이하)에 비해 높게 나타났다(Figure 3).



(a)



(b)

Figure 1. (A) Profiles of agitation rate and (B) dissolved oxygen (D.O.) concentration according to fermentation time in various conditions of fed-batch cultures

(●: carbon-excess and 10% saturated D.O., ■: carbon-excess and D.O.-limited, ▲: carbon-limited and 10% saturated D.O., ▼: carbon-limited and D.O.-limited).

특히 10% 포화용존산소 농도를 유지하며 탄소원의 농도가 충분한 경우(약 15 g/L정도), 배양기 내의 영양 조건이 양호해서 세포성장이 용존산소에 의해 영향을 받지 않고 매우 활발히 이루어졌음을 알 수 있다. 과량의 탄소원이 존재한 또 다른 경우(15 g/L 이상, 이 때 용존산소는 약 3% 포화농도)도 10% 포화용존산소의 경우 보다는 못하나, 꽤 높은 세포성장 속도를 보인 것으로 보아 용존산소 제한 조건이 매우 심각하지는 않은 것처럼 보인다. 반면 이차대사산물인 CyA 생산성 면에서는 세포성장 경향과는 매우 대조적인 결과를 보였다(Figure 4). 배양액 중의 용존산소 수준 (3% 이하 또는 10% 포화용존산소 농도)보다는 탄소원의 농도를 배양기의 후반기에 낮게 유지시킬 경우에 CyA 부피생산성과 비생산성이 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 즉 유가식배양에서 탄소원 제한 조건에 의해 세포성장이 어느 정도 저해를 받는 경우, CyA의 부피 또는 비생산성이 뚜렷이 증가하는 경향을 보여 주었다. 단 이 경우에도 용존산소

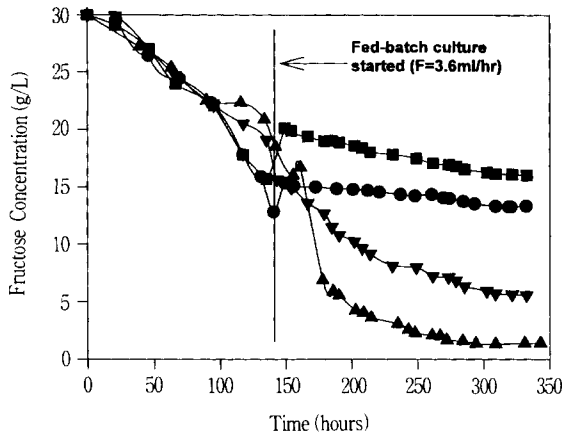


Figure 2. Profiles of fructose concentration according to fermentation time in various conditions of fed-batch cultures (●: carbon-excess and 10% saturated D.O., ■: carbon-excess and D.O.-limited, ▲: carbon-limited and 10% saturated D.O., ▼: carbon-limited and D.O.-limited).

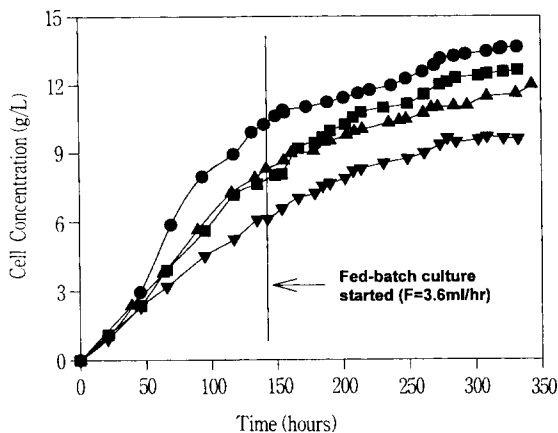


Figure 3. Profiles of cell concentration according to fermentation time in various conditions of fed-batch cultures (●: carbon-excess and 10% saturated D.O., ■: carbon-excess and D.O.-limited, ▲: carbon-limited and 10% saturated D.O., ▼: carbon-limited and D.O.-limited).

농도가 10% 포화농도를 유지할 때가 용존산소가 심각히 제한된 경우에 비해 CyA 생산성이 약 1.8배 더 높게 나타났다. 한편 탄소원 제한과 동시에 용존산소마저 제한된 경우, 심각한 용존산소 제한 현상으로 인해 세포생장이 지나치게 저해된 결과, 배양액중의 탄소원의 농도가 10% 포화농도를 유지한 경우에 비해 오히려 더 높게 유지되었다(약 5. g/L)(Figure 2).

각각의 실험 결과를 수치적으로 살펴보면, 과량의 탄소원과 10% 포화용존산소의 경우 최대 세포량은 13.63 g/L, 최대 CyA 생산량은 245.35 mg/L이었으며, 잔류 탄소원은 약 15 g/L를 나타내었다. 과량의 탄소원과 용존산소 제한조건의 경우 최대 세포량은 12.63 g/L, 최대 CyA 농도는 258.61 mg/L, 잔류 탄소원의 농도는 15 g/L 이상을 유지하였다. 또한 탄소원 제한과 10% 용존산소의 조건에서 최대 세포량, CyA 농도, 잔류 탄

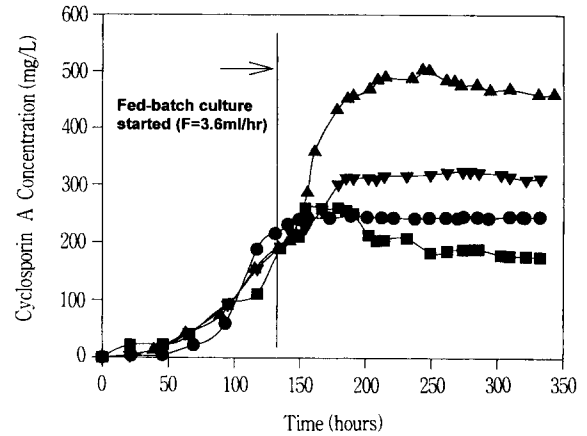


Figure 4. Profiles of cyclosporin A concentration according to fermentation time in various conditions of fed-batch cultures (●: carbon-excess and 10% saturated D.O., ■: carbon-excess and D.O.-limited, ▲: carbon-limited and 10% saturated D.O., ▼: carbon-limited and D.O.-limited).

소원의 농도는 각각 11.98 g/L, 507.14 mg/L, 2 g/L 이하로 관찰되었으며, 탄소원과 용존산소의 동시 제한 조건의 경우에는 각각 9.72 g/L, 324.28 mg/L, 약 5 g/L의 값을 보였다. 또한 배양 약 10일째를 기준으로 하여 각각의 배양 조건에서의 CyA 비생산성 (specific productivity)을 비교하면, 탄소원 제한과 10% 용존산소의 경우 0.19 mg CyA/g DCW/hr로서 역시 최대로 나타났으며, 그 다음이 탄소원과 용존산소 동시 제한의 경우로 0.15 mg CyA/g DCW/hr 수준이었다. 한편 과량의 탄소원 배양 조건하에서는 용존산소 농도에 관계없이 CyA 비생산성이 매우 낮게 나타났다 (용존산소 제한의 경우 0.08 mg CyA/g DCW/hr; 10% 용존산소의 경우 0.07 mg CyA/g DCW/hr). 이와 같이 탄소원의 농도를 제한하여 세포성장 속도를 어느 정도 제한시킬 경우, 생산균주의 전체 일차대사의 균형이 깨어져 대사의 흐름이 이차대사로 비교적 쉽게 진행되는 것처럼 보인다. 일반적으로 이차대사산물 발효시 탄소원이 배지내에 어느 정도 이상의 높은 농도로 존재할 경우, 이차대사 경로의 관련 효소의 생합성이 억제되어 이차대사산물 생산성이 감소하는 catabolite repression 현상이 종종 관찰되곤 하는데(7), 본 실험의 결과 CyA 생합성시에도 비슷한 현상이 나타나는 것처럼 보인다. 한 예로 *Acromonium chrysogenum*에 의한  $\beta$ -lactam계 항생제 발효의 경우, 생합성 경로상의 특정 효소가 glucose에 의해 선택적으로 억제된다고 보고된 바 있다(18). 즉 cephalosporin C의 생합성에서 penicillin N의 ring expansion을 촉진하는 효소가 cycle-forming enzyme인 isopenicillin N synthetase에 비해 catabolic repression현상에 더욱 민감한 것으로 나타났다. 또한 Pogell(19)등은 *Streptomyces alboniger*의 회분식배양에 의한 puromycin 생산시, puromycin 생합성의 최종 단계의 효소인 o-dimethylpuromycin-o-methyl-transferase의 활성이 발효 초기에는 매우 낮다가, 지수기 단계가 거의 끝날 무렵 항생제가 생산되는 단계에서 증가한다고 보고하였다. 그러나 효소의 활성이 증가하기 바로 전에 glucose를 첨가하면, 상기 효소의 생합성이 중단되어 puromycin 생산량이 더 이상 증가하지

Table 1. Comparison of fermentation parameters obtained from various conditions of fed-batch cultures.

Parameters	Conditions	Carbon-excess, 10% sat. D.O.	Carbon-excess, D.O.-limited	Carbon-limited, 10% sat. D.O.	Carbon-limited, D.O.-limited
Maximum cell concentration (g DCW/L)		13.63	12.63	11.98	9.72
Maximum CyA concentration (mg CyA/L)		245.35	258.61	507.14	324.28
Cell productivity (g DCW/L/hr)		0.049	0.046	0.043	0.036
Volumetric CyA production rate, $Q_p$ (mg CyA/L/hr)		1.02	1.08	2.11	1.35
Cell yield based on carbon source, $Y_{x/s}$ (g DCW/g fructose)		0.39	0.42	0.49	0.49
Product yield based on carbon source, $Y_{p/s}$ (mg CyA/g fructose)		8.69	10.33	22.56	17.57
Specific CyA production, $Y_{p/x}$ (mg CyA/g DCW)		18.10	25.05	48.31	34.57

않는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 요약하면, 용존산소 제한 조건이 심각한 경우 세포성장 저해로 인한 낮은 탄소원 흡수율(substrate uptake rate)로 인해 배양액 중 탄소원의 농도가 비교적 높게 유지되었으며, 그 결과 CyA 생산량은 용존산소를 10%로 조절된 경우에 비해 낮은 것으로 관찰되었다. 반면에 용존산소가 10% 포화농도로 조절됨과 동시에 탄소원의 농도도 매우 낮은 값으로 유지될 경우, 이차대사로의 가장 효율적인 탄소원 이용 및 catabolite repression 현상이 극복될 수 있었음은 주목할 만하다. 이와 같은 현상은 배양 결과를 다양한 배양변수로 요약한 Table 1에 의해 더욱 확실하게 설명될 수 있다. 즉 탄소원 제한과 10% 포화용존산소 농도의 경우, CyA 생산농도(mg CyA/L),  $Q_p$ (mg CyA/L/hr),  $Y_{x/s}$ (g DCW/g DCW),  $Y_{p/s}$ (mg CyA/g fructose),  $Y_{p/x}$ (mg CyA/g DCW)가 다른 배양조건의 경우에 비해 가장 높은 값을 보인 반면, 최대 세포농도(g DCW/L)와 세포 생산성 (g DCW/L/hr)은 오히려 비교적 낮게 나타난 점이 상기 결론을 뒷받침하고 있다.

상기 연구결과는 비록 배양액의 고점도성때문에 배양이 까다로운 균류 배양일지라도, 유가식배양에 의해 배지의 공급속도, 농도 조절 및 교반속도의 동시 조절을 통해 배양기 내의 용존산소 및 탄소원의 농도를 연구자가 원하는 바대로 조정함으로써, 생산균주의 생리학적 면을 효과적으로 관찰할 수 있음을 제시해 준다. 본 연구에서 고안한 실험방법을 다양하게 응용함으로써, 생산균주의 CyA 이차대사에 관한 생리학적 면을 보다 효율적으로 조사할 때, 경제적인 CyA 생산 공정이 개발될 수 있을 것으로 보인다

## 요 약

유가식배양 기간 동안 배지의 공급 속도, 농도 조절 및 교반 속도의 동시 조절을 통해 배양기 내의 용존산소 및 잔류 탄소원의 농도를 장기간 조절함으로써, 이들이 균사형성 균류인

wild-type *T. inflatum*의 세포 성장 및 cyclosporin A (CyA)의 생합성에 미치는 영향을 조사하였다. 다양한 조건의 유가식 배양 결과 세포 성장에 저해 효과가 없는 것으로 판명된 10% 포화용존산소 농도를 유지함과 동시에, 탄소원 농도가 catabolite repression 현상이 초래되지 않을 정도로 낮은 농도(탄소원 제한 조건)로 유지될 경우(2 g/L 이하), CyA 생합성이 최대로 활발한 것으로 나타났다. 또한 배양 결과를 다양한 배양 변수를 이용하여 분석한 결과, 탄소원 제한과 10% 포화용존산소 농도의 경우에, CyA 생산농도(507.14 mg/L),  $Q_p$  (2.11 mg CyA/L/hr),  $Y_{x/s}$  (0.49 g DCW/g fructose),  $Y_{p/s}$  (22.56 mg CyA/g fructose) 및  $Y_{p/x}$  (48.31 mg CyA/g DCW)가 다른 3가지 배양 조건의 유가식배양에 비해 가장 높은 값을 보인 반면, 세포농도 (11.98 g/L)와 세포생산성 (0.043 g DCW/L/hr)은 오히려 비교적 낮은 값을 보였다. 이로부터 용존산소보다는 탄소원 제한 조건에 의해 세포성장이 어느 정도 저해를 받을 경우, 세포의 이차대사가 활발해져서 공급된 높은 비율의 탄소원이 이차대사로 효율적으로 이용되었음을 알 수 있다.

## 감 사

본 연구의 일부는 한국과학재단 후원 의약자원연구센터(MRRC-96A-16-06-03-2)의 지원에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Finkelstein, D. B. (1992), *Biotechnology of Filamentous Fungi, Technology and Products*, (D. B. Finkelstein and C. Ball, eds), p. 241-415, Butterworth-Heinemann, Boston, MA.
2. Gbewonyo, K. and D. I. C. Wang (1983), *Enhancing Gas Liquid Mass Transfer Rates in Non-Newtonian Ferme-*

- ntations by Confining Mycelial Growth to Microbeads in a Bubble Column, *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 2873-2877.
3. Chun, G.-T. (1994), Comparative Bioreactor Studies in Terms of Oxygen Mass Transfer between Suspended and Immobilized Fungal Systems for Cyclosporin A Fermentation, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **9**, 211-223.
  4. Rios del Prado, J. A. (1989), Effect of Oxygen on the Production of Cyclosporin A by *Tolypocladium inflatum*, M.S. Thesis, Department of Chemical and Biochemical Engineering, Rutgers - the State University of New Jersey, New Brunswick, NJ.
  5. Crueger, W. and A. Crueger (1990), *Biotechnology*, 2nd ed., p. 229-273, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
  6. Stanbury, P. F., A. Whitaker, and S. J. Hall (1995), *Principles of Fermentation Technology*, 2nd ed., p. 13-34, Pergamon, New York.
  7. Ciba Foundation Symposium 171 (1992), Secondary Metabolites: Their Function and Evolution, p. 3-23, John Wiley & Sons, New York.
  8. Borel, J.F. (1984), Cyclosporine in *Textbook of Immunopharmacology*, (M. M. Dale and J. C. Foreman, eds), p. 315-324, Blackwell, Oxford.
  9. Bruserud, O. and G. Pawelec (1993), Cyclosporin A and FK 506 Show Similar Immunosuppressive Effects on Long-term in Vitro T-cell Proliferation, *Int. J. Immunopharmacol.* **15**, 93-97.
  10. Kleinkauf, H. and H. von Dohren (1990), Nonribosomal Biosynthesis of Peptide Antibiotics, *Eur. J. Biochem.* **192**, 1-15.
  11. Dittmann, J., R. M. Wenger, H. Kleinkauf, and A. Lawen (1994), Mechanism of Cyclosporin A Biosynthesis. Evidence for Synthesis via a Single Linear Undecapeptide Precursor, *J. Biol. Chem.* **269**, 2841-2846.
  12. Kleinkauf, H., J. Dittmann, and A. Lawen (1991), Cell-free Biosynthesis of Cyclosporin A and Analogues, *Biomed. Biochim. Acta.* **50**, S219-224.
  13. Lawen, A., J. Dittmann, B. Schmidt, D. Riesner, and H. Kleinkauf (1992), Enzymatic Biosynthesis of Cyclosporin A and Analogues, *Biochimie.* **74**, 511-516.
  14. 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.
  15. Chun, G.-T. and S. N. Agathos (1993), Dynamic Response of Immobilized Cells to Pulse Addition of L-valine in Cyclosporin A Fermentation, *J. Biotechnol.* **27**, 283-294.
  16. Finkelstein, D. B. (1992), *Biotechnology of Filamentous Fungi, Technology and Products*, (D. B. Finkelstein and C. Ball, eds), p. 65-87, Butterworth-Heinemann, Boston, MA.
  17. Yoon, M. J. and G. -T. Chun (1995), Effects of Dissolved Oxygen Levels on the Production of Cyclosporin A in Filamentous Fungal Cell Fermentation, Autumn Meeting of The Korean Society of Applied Microbiology, Myungi University, Yongin, Korea.
  18. Demain, A. L. (1982), Overproduction of Microbial Products, (V. Krumphanzl, B. Sikyta, and Z. Vanek, eds), p. 571-580, Academic Press, London.
  19. Pogel, B. M., L. Sankaran, P. A. Redshaw, and P. A. McCann (1976), *Microbiology*, (D. Schlessinger, ed.), p. 543-547, American Society for Microbiology, Washington, D.C.