

단 신

## 인 과립구 거식세포 콜로니 자극인자(hGM-CSF) 생산을 위한 효모의 유가배양 연구

김 인 호<sup>†</sup>

충남대학교 화학공학과  
(1998년 6월 15일 접수, 1998년 9월 4일 채택)

### Fed-Batch Culture of Yeast for Producing Human Granulocyte Macrophage Colony Stimulation Factor(hGM-CSF)

In Ho Kim<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea  
(Received 15 June 1998; accepted 4 September 1998)

#### 요 약

사람의 혈구 조혈 인자의 일종인 인과립구-거식세포 콜로니 자극인자(hGM-CSF)를 분비하는 재조합 효모를 유가배양하였다. 재조합 효모는 알코올 탈수소 효소 프로모터에 의하여 hGM-CSF를 발현하므로 배지 중의 알코올 농도에 따라 hGM-CSF의 발현율이 큰 영향을 받았다. 포도당 공급의 방법에 따라 회분배양, 일정유속의 유가배양, 유속증가의 유가배양을 비교하였다. 이 중 배지 중의 에탄올 농도 변화가 작은 유속증가의 유가배양에서 가장 hGM-CSF 발현이 잘 되었고 회분 배양에 비해 단위 OD당 12배의 발현율의 증가가 있었다.

**Abstract**—Recombinant yeast strain harboring genes for human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (hGM-CSF), a hematopoietic factor, was cultured in a fed batch mode. Since hGM-CSF is able to be expressed with an aid of alcohol dehydrogenase II(ADH II) promoter of the yeast strain, ethanol concentration in medium was controlled to obtain a high yield of hGM-CSF. Three culture methods(batch, fed-batch with constant glucose feed, and fed-batch with increasing rate of glucose feed) were compared for the high yield of hGM-CSF. Ethanol concentration was well maintained in the fed batch culture with increasing glucose feed, and consequently yielded a high expression level of hGM-CSF, which was 12 times larger than that of batch culture per unit OD.

Key words : hGM-CSF, Fed Batch, Yeast, ADH II

#### 1. 서 론

인체의 조혈작용은 골수에서 이루어지고 다양한 경로를 거쳐 여러 종류의 혈구가 만들어진다. 혈구 형성에 관여하는 당단백질의 생리활성의 측정은 콜로니 형성에 의해 측정되었고 이에 따라 조혈인자를 콜로니 자극인자로 부르게 되었다[1]. 이 중 인간과립구 거식세포 콜로니 자극인자(Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, hGM-CSF)는 조혈작용의 조절인자로 작용하여 백혈구 감소증, 재생 불량성 빈혈, 백혈병 등의 혈구와 관련된 병의 치료제로 사용할 수 있게 되었다[2]. 유전자재조합 기술에 의해 hGM-CSF를 다량 생산하고자 하는 연구들[3,4]이 보고되었고 숙주를 효모로 하여 hGM-CSF를 발현시키고 이를 정제하는 연구가 보고되고 있다[5]. 효모에서 hGM-CSF가 발현될 때, 알코올 탈수소 효소 II(Alcohol Dehydrogenase II, ADH II) 프로모터를 사용하기 때문에 효모가 에

탄올 농도에 따라 hGM-CSF의 합성하는 수준이 변하여 알코올 농도는 효모배양기에 포도당을 어떤 방법으로 주입하는가에 따라 달라진다.

본 연구에서는 hGM-CSF를 효모가 생산할 때 효모의 농도를 높이기 위해 포도당을 배양조에 어떻게 주입하며 한편 포도당 주입속도의 차이에 따라 생성된 알코올 농도변화가 hGM-CSF의 생성에 어떠한 영향을 미치는가를 고찰하고자 한다.

#### 2. 실 험

##### 2-1. 균주 및 배지

본 연구에서 사용한 균주는 ADH II에 의해 hGM-CSF발현을 조정하는 *Saccharomyces cerevisiae* 균주(KFCC 10771)이며 배지는 효모 엑기스 4%, 펩톤 1%, 포도당이 적당량 포함된 복합배지이다.

##### 2-2. 배양방법

<sup>†</sup>E-mail : ihkim@hanbat.chungnam.ac.kr

Table 1. Leu deficient medium composition

Component	Weight(g) per L
Amino acid deficient yeast nitrogen base	6.7
Adenine	0.04
Uridine	0.03
Tryptophane	0.02
Histidine	0.02
Arginine	0.02
Methionine	0.02
Tyrosine	0.03
Lysine	0.02
Phenylalanine	0.05
Threonine	0.4
Glucose	80

종배양으로 20 mL leu<sup>-</sup>배지(Table 1)에서 24시간 진탕배양하고 앞의 복합배지에 2% 포도당이 포함된 배지 100 mL에서 12시간 진탕배양 후, 5 L 배양기(한국발효기)에 1.5 L 복합배지를 채운 후 회분배양과 유가배양을 수행하였다. 진탕배양의 조건은 30 °C, 200 rpm이었으며 배양기에서의 배양조건은 30 °C, pH=5.5, rpm=400, 0.5 vvm의 공기 공급속도이었다. pH는 NH<sub>4</sub>OH를 주입하여 조절하였다. 유가배양을 위하여 연동펌프(Pharmacia, P1)로 포도당 45%액을 배양기에 주입하였다.

### 2-3. 분석방법

세포농도는 분광광도계(Smart 190 DUV)를 이용하여 650 nm의 파장에서 흡광도(OD)로 측정하였고 포도당 농도는 Glucostat(영동제약)로 배양액을 발색시켜 분광광도계로 505 nm에서 측정하였다. 에탄올의 농도는 가스크로마토그래피(SRI8610)에 chromosorb101칼럼을 장착하여 FID검출기로 측정하였다. hGM-GSF의 농도는 발효액을 원심분리한 후 상등액을 전기영동하고 농도를 알고 있는 hGM-CSF의 전기영동밴드와 비교하여 Densitometer(Biorad Model 620)를 이용하여 정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. 회분배양

유가배양에서 hGM-CSF의 생산효율과 비교하기 위해 기준실험으로 회분배양을 수행하였다. 초기 포도당 농도는 효모배양 중 에탄올 생성과 최종 세포농도에 영향을 미친다. 시간에 따른 에탄올 농도변화는 ADH II프로모터 작동시점을 변화시키며 최종 hGM-CSF의 농도를 좌우한다. Fig. 1에 초기 포도당 농도를 1-6%로 변화시켰을 때 최종 세포농도와 hGM-CSF의 농도를 보여주고 있다. 포도당 1% 농도에서는 생성된 에탄올 양이 작아서 hGM-CSF가 적게 생성되었다. 포도당 농도가 2에서 4%로 증가하면서 세포농도는 증가되며(OD=16에서 19) hGM-CSF의 최종 농도는 5 mg/L로 변함이 없었다. 세포의 단위 OD를 기준으로 하면 포도당 2%에서 단위 OD당 hGM-CSF의 생성량이 많았다. 포도당 5%의 경우는 전기영동상 효모 유래 불순물이 많이 나타났고 포도당 6%의 경우는 hGM-CSF의 생성량이 미미하였다. 포도당 2%가 포함된 복합배지(효모엑기스 4%, 펩톤 1%)에서의 효모성장이 Fig. 2에 나타나 있다. 배양개시 후 3시간 후 포도당 소모가 빨리지며 에탄올 농도가 세포성장과 비례하여 증가하였다. 그리고 포도당이 고갈된 시점에서(9시간) 에탄올 농도가 감소하기 시작하였다. 이는 효모가 에탄올을 기질로 사용하여 계속 성장하기 때문이다. 배양종말점에서 hGM-CSF의 농도는 5 mg/L

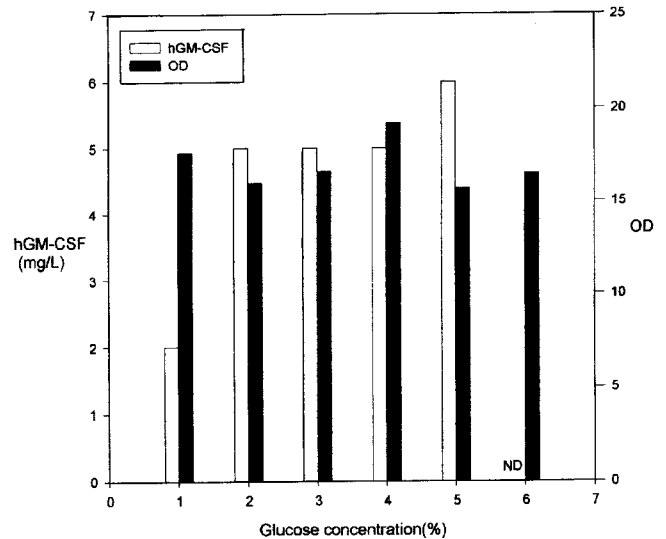


Fig. 1. Effect of initial glucose concentration on the final cell OD and on the final concentration of hGM-CSF.

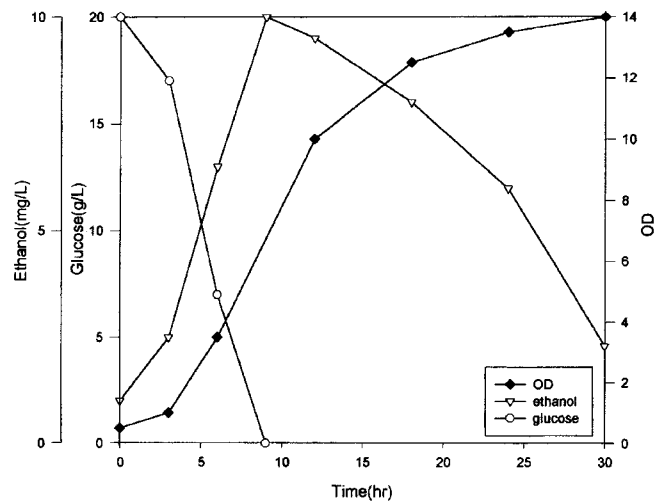


Fig. 2. Time course of cell OD, glucose and ethanol concentrations in a hGM-CSF producing yeast batch culture; initial medium composition: yeast extract=4%, peptone=1%, glucose=2%.

이었다.

### 3-2. 유가배양

유가배양을 포도당 없이 복합배지(효모엑기스 4%, 펩톤 1%)를 멸균하여 배양조에 채운 후 배양개시 직후에 45% 포도당액을 5 mL/hr의 속도로 공급하면서 실시하였다. 이때 배양조내의 포도당, 에탄올, 세포농도를 Fig. 3에 보여주고 있다. 세포농도는 발효개시 후 8시간부터 거의 선형으로 증가하였고 발효개시 후 8시간까지 포도당, 에탄올 농도가 높게 유지되다가 세포성장이 활발하여지며 포도당 소모속도가 높아 포도당 농도가 영으로 유지되고 에탄올 농도도 서서히 감소하였다. 최종 hGM-CSF의 농도는 30 mg/L이었고 회분배양과 비교하여 단위 OD당 약 4배의 증가를 보였다. Fig. 2와 3의 에탄올 농도변화를 비교하면 유가배양의 에탄올 농도가 높고 이 때문에 hGM-CSF의 발현율이 상승한 것으로 사료된다.

에탄올 농도감소를 막아 hGM-CSF의 발현율을 더욱 높이기 위해 포도당 공급속도를 Fig. 4에서의 같이 배양 후반부(배양시작후 26시

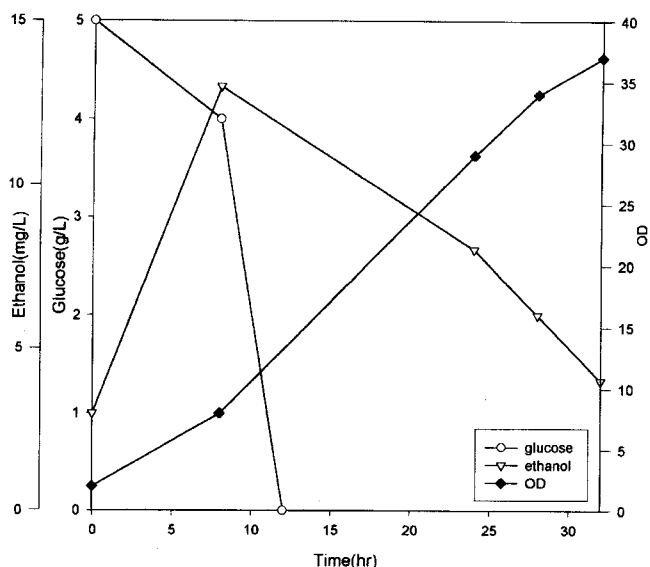


Fig. 3. Fed-batch culture with constant glucose feeding rate; feed rate = 5 mL/hr; medium volume=1.5 L; initial medium composition: yeast extract=4 %, peptone=1 %; T=30 °C; rpm=400; pH=5.5; air flow rate=0.5 vvm.

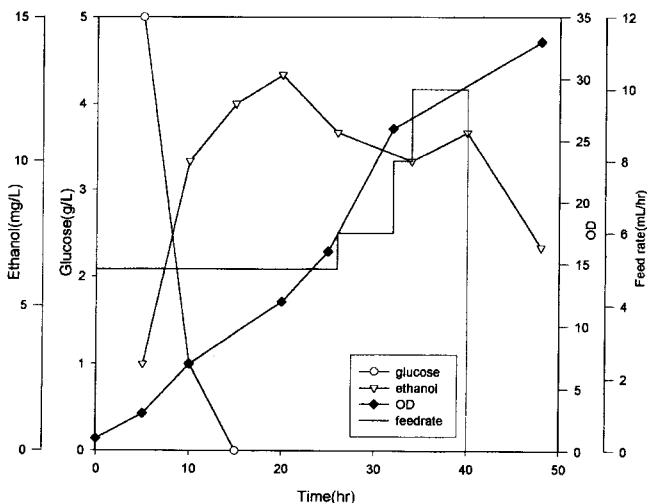


Fig. 4. Fed-batch culture with increasing glucose feeding rate; feed rate=5 → 6 → 8 → 10 mL/hr; other conditions are same as in Fig. 3.

간)에 증가시켰다(5 → 6 → 8 → 10 mL/hr). 공급속도를 정하기 위해 에탄올 농도를 1시간에서 3시간 간격으로 자주 측정하였다. 에탄올 농도는 Fig. 3보다 더 높게 유지되었고 높은 에탄올 농도 때문에 비성장속도는 33시간 후 둔화되었다. hGM-CSF의 최종농도는 100 mg/L이었고 이는 Fig. 3의 유가배양과 비교하여 단위 OD당 약 3배의 증가에 해당한다.

인간 프로인슐린을 ADH II/GAPDH 프로모터를 가진 효모에서 발현시킬 때 사용한 유가배양 방법은 배양 초기에 포도당을 일정한 속도로 공급하고 후기에는 에탄올을 공급한 방법이었다[6]. 에탄올을 첨가하는 것은 배지 중의 에탄올 농도를 바로 올릴 수가 있지만 세포내의 프로모터를 작동시키는데에 지연이 있고 적절한 배지의 에탄올 농도를 정하는 것과 효모 성장 저해의 문제가 있다. 포도당을 이용하여 에탄올을 효모가 생성하게 하여 세포 안의 에탄올 농도를 올리는 것이 보다 자연스럽다고 생각된다. Fig. 4의 결과로 보아 약 10 ppm의 세포 바깥 배지의 에탄올 농도가 유지되는 것이 hGM-CSF의 발현에 적절한데 에탄올 농도를 자동으로 조절하기 위해서는 RQ(생성된 CO<sub>2</sub>/소비된 O<sub>2</sub>, Respiratory Quotient)값을 조절하는 것이 필요하다. 배양조 배기가스 속의 산소와 이산화탄소농도를 측정하여 그 농도비를 일정하게 유지하면 에탄올 농도가 일정하게 유지된다고 알려져 있다[7]. 따라서 RQ를 일정하게 유지하기 위해서는 mass spectrometer와 같은 추가의 장치가 필요하고 추가의 실험이 계획되고 있다.

#### 4. 결 론

인 과립구 거식세포 콜로니 자극인자(hGM-CSF)를 생산하는 효모를 유가배양하여 hGM-CSF발현율을 증가시키는 연구를 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- (1) 회분배양에서 생성된 에탄올이 주로 세포성장에 사용되어 ADH II 프로모터의 작동이 비효율적이었고 hGM-CSF의 발현농도가 낮았다.
- (2) 유가배양에서 일정한 속도로 포도당을 공급하여 에탄올 생성량을 증가시켜 회분배양보다 에탄올 농도를 높여 hGM-CSF의 발현율을 회분배양보다 단위 OD당 4배 증가시켰다.
- (3) 일정한 속도의 포도당 공급방법은 에탄올 농도감소가 여전히 있으므로 에탄올 농도를 유지시키기 위해 포도당 공급속도를 에탄올 농도감소에 맞추어 증가시켰다. 이에 따라 일정 유속의 유가배양보다 hGM-CSF의 발현율을 단위 OD당 3배 증가시킬 수 있었다.

#### 참고문헌

1. Clark, S. H. and Kamen, R.: *Science*, **236**, 1229(1987).
2. Kim, I. H.: *Saengwhahak news*, **11**(4), 280(1991).
3. Gillis, S., Urdal, D. L., Clevengen, W., Klinke, R., Sassenfeld, H., Price, V. and Cosman, D.: *Behring Inst. Mitt.*, **83**, 1(1988).
4. Moonen, P., Mermod, J.-J. and Ernest, J. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 4428(1987).
5. Kim, I. H., Yune, S. W., Lee, S. M. and Song, J. Y.: *Kor. J. Biol. Response. Modif.*, **1**, 105(1991).
6. Tottrup, H. V. and Carlsen, S.: *Biotech. Bioeng.*, **35**, 339(1990).
7. Wang, H. Y., Cooney, C. L. and Wang, D. I. C.: *Biotech. Bioeng.*, **19**, 69(1977).