

제조합 단백질 생산을 위한 식물세포 고농도 배양과 기체조성에 따른 영향

이상윤, 전수환, 민병혁, 허원¹, 조규현², 김동일

인하대학교 생물공학과, 강원대학교 환경생물공학부¹, 강원대학교 화학공학과²

전화 (032) 863-5946, FAX (032) 875-0827

Abstract

To enhance the productivity of recombinant protein, β -glucuronidase(GUS), by transgenic *Nicotiana tabacum* suspensions, perfusion culture was carried out in a 5-L stirred tank bioreactor. Maximum cell density of 20.0 gDCW/L was obtained and GUS activity was noticeably affected by medium composition, such as salt concentration. Effect of headspace purging by CO₂-enriched air was also investigated. Aeration of CO₂(5%)-enriched air with 0.2 vvm significantly promoted the cell growth in lag phase and increased volumetric GUS activity from 0.69 U/mL to 5.76 U/mL. In contrast, aeration of CO₂(5%)-enriched air with 0.1 vvm did not affect the cell growth but enhanced the GUS activity from 3.24 to 5.25 U/mL at the 4th day.

서론

식물세포배양은 식물체로부터 추출할 수 있는 다양한 이차대사산물 등의 유용물질의 생산에서 환경친화적인 생산방법으로 대체가 가능하며 그 가능성에 대한 연구가 진행되어 왔다. 그리고 유전자 재조합 기술의 발달은 식물에서의 외래단백질 생산을 가능하게 하였으며 식물을 이용한 단백질의 생산은 사용되는 배지의 가격이 저렴하고 미생물을 숙주로 사용하는 경우보다 단백질의 적절한 변형이 가능하여 생산되는 단백질의 생리적 활성을 높일 수 있다고 한다.¹⁾ 특히 형질전환된 식물세포의 배양을 통한 외래 단백질의 생산은 식물체를 이용한 방법에 비해 환경에 미치는 영향이 적고 생산되는 산물의 품질이 균일하며 추출정제 공정을 용이하게 조절할 수 있어 그 가능성이 높다 할 수 있다.

그러나 식물세포배양을 이용한 유용물질의 생산은 식물세포의 느린 성장속도와 낮은 생산성으로 인해 상업화에 성공한 예는 극히 제한적이며 상업화를 위해서는 필수적인 식물세포 배양용 세포배양기 운전에 대한 연구도 드문 실정이다. 따라서 본 연구에서는 세포배양기에서의 형질전환된 담배세포의 고농도 배양을 통해 제조합 단백질의 생산성을 증대시키고자 하였으며 세포배양기 운전에서 산소, 이산화탄소 등의 기체 조성에 따른 세포의 성장과 단백질 생산의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 세포배양기 운전

본 연구에 사용된 세포주는 (주)대한제당 중앙연구소로부터 제공받은 *Nicotiana*

*tabacum*이며 MS(Murashige & Skoog) 기본배지에 30 g/L의 sucrose와 0.1 g/L의 myo-inositol, 2 mg/L의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 0.02 mg/L의 kinetin을 첨가하여 사용하였으며 pH를 5.9로 맞춘 뒤 121°C, 1.2 기압에서 가압증기멸균하였다. 그리고 형질전환된 세포의 선별을 위하여 100 mg/L의 kanamycin을 0.2 μ m의 membrane filter로 여과하여 첨가하였다

한국발효기(주)에서 제작한 식물세포배양용 5-L stirred tank bioreactor를 사용하여 세포의 생장을 관찰하였으며 이때 운전부피는 2 L였다. 계대배양 후 7일 된 세포를 20%(v/v)로 접종하였으며 배양온도는 25°C였다. 그리고 세포배양기내의 교반을 위해서 hollowed-paddle impeller를 사용하였으며 교반속도는 80 rpm로 유지하였고 fine-bubble sparger를 통해 0.2 vvm의 속도로 무균여과된 공기를 주입하였다.

제조합 단백질 및 총단백질 정량분석

세포의 중량은 과량의 증류수로 세척한 뒤 Whatman No. 1 여과지를 통해 감압 여과하여 세포생체중량을 측정하였으며 시료를 60°C로 유지되는 dry oven에 항량이 될 때까지 건조시켜 세포건조중량을 측정하였다. 또한 세포생체중량과 세포건조중량의 비는 세포의 크기를 비교하기 위한 간접적인 기준으로 사용되었다.

삽입된 유전자에 의해 생산되는 β -glucuronidase의 농도는 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide를 기질로 하여 DyNA Quant™ 200 fluorometer(Hoefler Pharmacia Inc.)로 측정하였다. 그리고 세포와 배지 내의 총 단백질은 Bio-Rad사의 Bradford reagent를 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Figure 1에는 각각의 배지교환식 배양에 따른 세포건조중량을 나타내었다. 먼저 첨가시기의 영향에서는 4일째에 배지교환을 시작한 경우(Run #1)와 6일째에 배지교환을 시작한 경우(Run #2)의 비성장속도가 각각 0.37 day^{-1} , 0.26 day^{-1} 였으며 빠른 배지교환의 시작에 따른 세포성장속도의 감소를 관찰할 수 있었다. 이는 배지교환에 따라 기존의 배지에 생성되었던 conditioning factor의 유실과 유입되는 배지의 높은 당농도에 의한 세포생장의 지연으로 생각된다.

배지교환을 위한 배지의 조성에서 당농도와 질소나 인, 그리고 기타 무기염류의 영향을 관찰하기 위하여 성장용 배지의 당농도와 염의 농도보다 각각 4배, 2배 농축된 배지를 사용한 경우(Run #2)와 염을 포함하지 않고 150 g/L의 glucose 농축액을 사용한 경우(Run #3), 2.5배 농축된 당농도와 정상적인 염농도를 사용한 경우(Run #4)의 세포생장을 비교하였다. 염을 포함하지 않고 탄소원으로 glucose를 사용한 경우 8일째에 16.3 gDCW/L의 세포농도에 도달하였지만 8일 이후에는 세포의 생장이 크게 저해되었다. 이러한 결과는 8일까지는 질소원 등의 무기염류가 세포생장에 미치는 영향이 적으며 8일 이후에는 무기염류의 고갈로 인해 세포의 생장이 정지되기 때문으로 생각된다. 그리고 2.5배 농축된 당농도와 성장용 배지와 같은 염농도의 배지를 사용한 경우(Run #4)에 비하여 4배 농축된 당농도를 사용한 경우(Run #2)에 세포의 생장이 지연되는 것을 관찰할 수 있었으며 이는 필요이상의 과도한 당의 유입으로 인해 세포의 생장이 저해되었기 때문으로 생각된다.

그러나 16일째의 세포건조중량은 20.04 gDCW/L로 다른 경우에 비해 가장 높은 수치를 나타내었으며 그 이유는 높은 당농도로 인해 배양초기 세포의 생장이 저해되었지만 세포의 수분함량이 낮게 유지되어 공간적인 여유가 있었기 때문인 것으로 보인다.

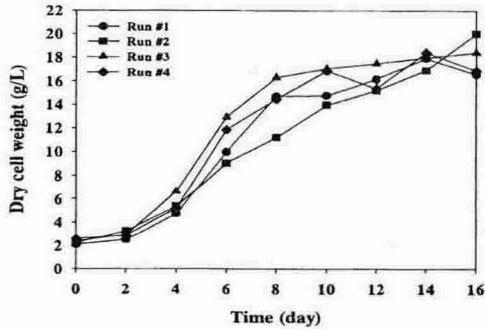


Figure 1. Time course changes of cell growth in perfusion culture.

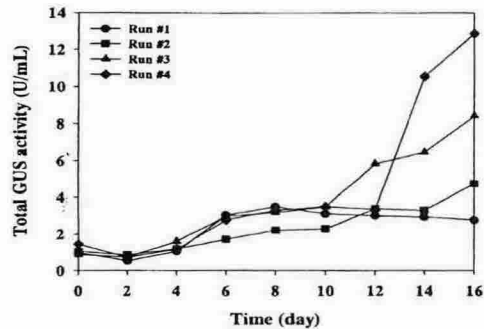


Figure 2. Time course changes of GUS activity in perfusion culture.

배지교환식 배양을 이용한 식물세포배양에서 재조합 단백질의 생산을 비교하기 위하여 배양기간에 따른 GUS의 activity를 Figure 2에 나타내었다. 세포내의 단백질 함량은 세포의 성장속도와 반드시 일치하여 증가하지 않으며 오히려 세포의 성장속도가 지연될 때 단백질 함량이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 재조합 단백질인 GUS의 생산은 배지교환식 배양에서 교환용 배지의 조성이나 배지의 교환속도에 따른 배지조성의 변화에 의해 그 생산량과 생산성이 크게 달라졌으며 최고 생산량은 성장배지보다 2.5배 농축된 당과 성장배지와 같은 염의 농도를 사용한 경우(Run #4)의 12.9 U/mL이었다.

일반적으로 재조합 단백질의 생산은 세포의 성장과 연관된 형태로 이루어지며 세포배양기내의 세포의 상태와 밀접하게 관련되어있다. 그러나 반드시 세포의 성장과 비례하여 생산량이 증가한다고 생각할 수는 없고 본 실험의 결과를 종합해 볼 때 생산성의 증대를 위한 세포성장 조건과 높은 세포농도에서의 세포당 재조합 단백질의 생산성을 증대시키는 조건의 decoupling이 가능할 것으로 사료된다.

세포배양기 운전에서 통기속도를 각각 0.1, 0.2 vvm으로 다르게 했을 때와 각각의 통기속도에서 5% CO₂를 포함한 공기를 주입했을 때의 세포의 성장과 재조합 단백질의 생산에 미치는 영향을 Figure 3과 Figure 4에 도시하였다. 통기속도를 0.2 vvm으로 빠르게 한 경우는 대조구(0.1 vvm)에 비하여 세포의 생장이 약간 저해되었으나 그 정도가 크지는 않았다. 그러나 5% CO₂를 포함한 공기로 통기시킨 경우는 보통 공기로 통기시킨 경우에 비하여 세포의 초기생장을 증진시켰으며 그 정도는 통기량에 따라 증가하였다. 특히 0.2 vvm에서는 6일째에 7.5 gDCW/L의 세포농도를 보인 대조구에 비하여 같은 기간에 9.7 gDCW/L로 28% 향상된 세포생장을 관찰할 수 있었다.

재조합단백질의 생산에서는 통기량을 0.1 vvm에서 0.2 vvm으로 증가시킴에 따라 세포내 재조합 단백질의 함량이 크게 낮아졌으며 결과적으로 4일째의 GUS 생산은 3.24 U/mL에서 0.69 U/mL로 크게 낮아지는 결과를 나타내었다. 반면 5% CO₂를 포함한 공기로 통기시킨

경우는 0.2 vvm에서도 4일째에 5.76 U/mL로 오히려 0.1 vvm으로 통기시킨 경우에 비해 높은 생산량을 나타내었다. 또한 5% CO₂를 포함한 공기를 0.1 vvm으로 통기시킨 경우 세포의 성장에 미치는 영향은 미미하였지만 GUS의 생산은 4일째에 68% 높은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 높은 CO₂의 농도가 세포배양기내에 세포의 분열과 대사과정에 영향을 미치기 때문으로 생각된다.²⁾

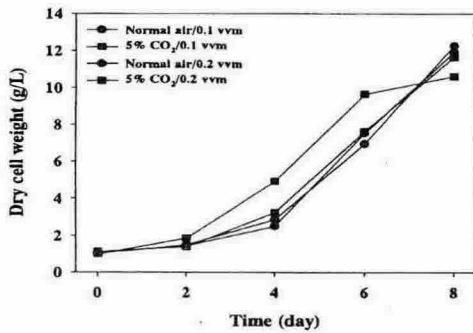


Figure 3. Effect of CO₂ concentration and aeration rate on cell growth.

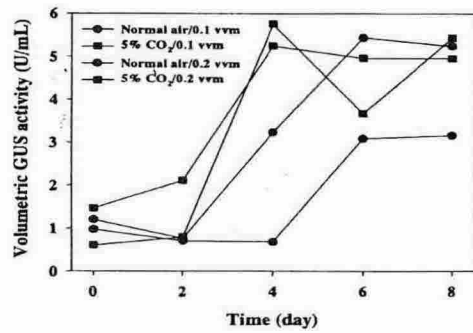


Figure 4. Effect of CO₂ concentration and aeration rate on GUS production.

요약

본 연구에서는 재조합단백질 생산을 위한 식물세포배양용 세포배양기 운전에서 배지교환식 배양과 기체조성에 따른 영향을 관찰하였다. 배지교환식 배양에서는 6일째에 배지교환을 시작하는 것이 세포의 성장을 저해하지 않았으며 교환용 배지의 조성을 120 g/L sucrose와 2배 농축된 염농도를 하였을 때 가장 높은 세포농도인 20.0 gDCW/L를 나타내었으며 GUS 생산량은 60 g/L sucrose와 기본배지와 같은 농도의 염농도로 배지를 교환했을 때 12.9 U/mL로 다른 경우에 비하여 1.5~4.6 배 증가된 결과를 보였다. 그리고 CO₂의 농도를 5%로 높인 공기로 통기했을 때는 세포의 초기생장을 증진시켰으며 0.2 vvm의 통기량에서 5% CO₂로 통기시킨 경우는 일반 공기를 0.1 vvm으로 통기시킨 경우보다도 77% 높은 GUS의 생산량을 나타내었다.

감사

본 연구는 산업기반기술개발사업(0399004-1-1)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Magnuson, N. S., P. M. Linzmaier, R. Reeves, G. An, K. HayGlass, and J. M. Lee, "Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture"(1998), *Protein Expr. Purif.*, **13**, 45-52.
- Mirjalili, N. and J.C. Linden, "Gas phase composition effects on suspension cultures of *Taxus cuspidata*"(1995), *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 123-132.