참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 현탁세포 perfusion 배양 연구

김영화[1], 이용일[1], 김익환[2], 김동일[1*]
인하대학교 화공생명공학부[1], 고려대학교 생명공학원[2]
전화 (032) 863-5946, FAX (032) 872-4046

Abstract

Perfusion culture strategies for high density culture of plant cell suspensions to enhance the productivity of extracellular polysaccharides were investigated. *Angelica gigas* Nakai cell suspensions were used to produce the extracellular polysaccharide and perfusion parameters were optimized to maximize the production. When the medium exchange was started at the fifth day after inoculation, the maximum cell concentration (23.8 g dry cell weight per liter) was achieved.

서론

면역 조절제(immunomodulator)는 bacteria, fungi, 식물, 합성물질, 동물 등으로부터 다양하게 알려지고 있으며, 이들은 면역체계의 여러 point에 작용하는 것으로 알려져 있다. 식물세포 유래 면역 증강제는 담자균류, 진균류, 그리고 고등식물에서 연구 중이며, 우리나라 전통 의약식물인 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)에서도 pectin 질의 다당이 면역증강 활성을 나타낸다고 밝혀져 있다.[1)] 참당귀의 대부분 다당류는 세포내 축적되지 않고 세포밖, 즉 배지 내로 분비된다. Perfusion 배양은 동물세포 배양[2)]이나 식물세포배양[3,4)]에서 고농도의 세포를 얻기 위한 방법으로 연구되어왔으며, 영양분의 계속적인 공급에 의한 세포 생장의 연장 외에도 세포의 생장에 따른 생산물에 의한 세포 생장저해를 방지할 수 있으며 목적산물이 배지로 배출되는 경우 *in situ* recovery가 가능하다는 장점을 가지고 있다. 따라서 perfusion 배양을 적용해 다당류가 생산된 배지는 제거하여 다당을 추출하고 새로운 배지의 주입을 반복하면 다당을 대량으로 얻을 수 있을 것이다.

본 연구에서는 참당귀의 고농도 배양을 위한 perfusion 배양에서 최적조건을 확립하기 위하여 배지교환시기, 초기 당농도의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배양

본 실험에 사용한 참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 현탁세포는 고려대학교 생명공학원으로부터 분양 받은 callus로부터 유도하였다. 현탁세포 배양을 위한 배지로 SH

기본배지에 30 g/L의 sucrose, 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)를 첨가하여 사용하며, 1 N NaOH로 pH를 5.8로 조절한 후 121℃에서 가압증기 멸균하여 사용하였다. 계대배양은 6~7일 간격으로 수행하였으며, 암조건 회전식 진탕배양기에서 110rpm, 25℃를 유지하였다.

세포량 측정

세포의 양을 측정하기 위해 세포건조중량(dry cell weight, DCW)을 측정하였으며, 측정방법은 다음과 같다. 세포를 감압 깔대기와 Toyo No. 1 거름종이를 이용하여 배지와 분리하고, 동량의 증류수로 2회 세척한 후 무게를 사전에 측정한 접시에 담아 세포생체중량(fresh cell weight, FCW)을 측정하고, 60℃로 유지되는 건조기에서 항량이 될 때까지 수분을 제거하여 세포건조중량을 측정하였다.

Perfusion 배양

100 mL Erlenmeyer flask에 배지 22 mL을 넣고 멸균한 다음, 6일된 배양액 8 mL을 접종하고, 앞부분에 miracloth를 부착하여 멸균한 perfusion용 pipet을 이용하여 배지만을 일정량 뽑아내고, sucrose를 농축한 새 배지를 주입하였다.

결과 및 고찰

참당귀(*Angelica gigas* Nakai)의 고농도 배양을 위한 perfusion 배양에서 최적조건을 확립하기 위하여 배지교환시기, 초기 당농도의 영향을 조사하였다.

먼저, 최적 배지교환 시작 시기를 결정하기 위하여 시작 시기를 3일, 5일, 7일로 하여 sucrose를 2배 농축한 배지 5 mL로 한번 배지교환을 하였다. 3일과 5일에 배지교환을 한 경우 비슷하게 증가한 최대 세포농도를 보였지만, 5일에 배지교환을 한 경우가 세포의 배양기간이 더 연장되었다. 이에 비해, 7일에 배지교환을 한 경우에는 생장은 재개되었지만 최대 세포농도의 증가는 관찰되지 않았다. 이는 식물세포의 생장을 위한 conditioning factor의 유실과 새로운 배지의 유입에 따른 높은 당농도로 인한 삼투압의 증가가 원인인 것으로 생각된다(Figure 1).

연속 배지교환의 영향을 알아보기 위해 배양 5일째부터 sucrose를 4배 농축한 배지로 2 mL씩 교환해준 결과, 세포의 생장이 계속 유지되었으며 최대 세포농도도 22일에 23.7 g/L로 대조구에 비하여 1.7 배 증가하였다(Figure 2).

초기 당농도 변화에 따른 연속 배지교환의 영향을 보기 위하여 초기 당농도를 50 g/L로 하여 sucrose를 4배 농축한 배지로 2 mL씩 교환해준 결과, 초기 당농도가 증가됨에 따라 최대 세포농도도 23.8 g/L로, 30 g/L 당농도 대조구에 비하여 1.6 배 증가하였고, 배지교환을 하지 않은 50 g/L 대조구에 비교하면 1.1 배 증가하였다(Figure 3).

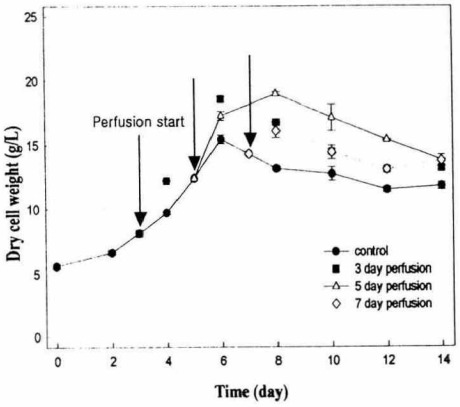

Figure 1. Time course changes of *A. gigas* suspension cell growth at different perfusion starting time with 2 fold sucrose concentrated medium

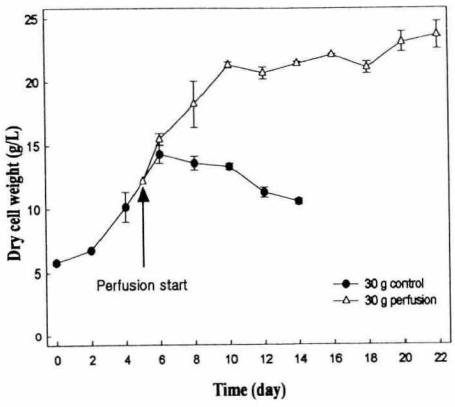

Figure 2. Time course changes of *A. gigas* suspension cell growth according to the perfusion with 4 fold sucrose concentrated medium

이 경우에 세포의 크기를 간접적으로 비교할 수 있는 FCW/DCW를 보면, 배지 교환을 함에 따라 삼투압의 증가로 인해 세포의 크기가 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 4). 이 결과로 초기 당농도를 높이고 연속적으로 배지교환을 해준다면, 세포의 크기를 감소시켜 고농도의 세포를 얻을 수 있으며 결과적으로 참당귀 세포가 생산하는 다당류의 생산량을 증진시킬 수 있을 것이라 사료된다.

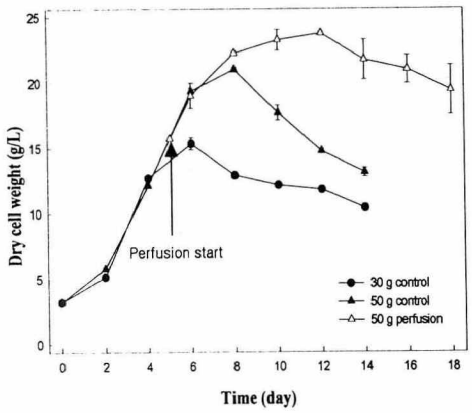

Figure 3. Time course changes of *A. gigas* suspension cell growth according to the perfusion with 4 fold sucrose concentrated medium

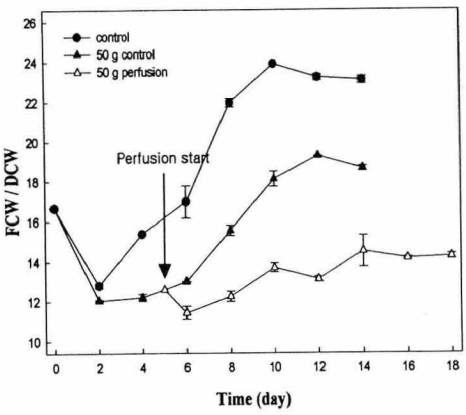

Figure 4. Time course of FCW/DCW according to the perfusion

요약

참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 현탁세포의 고농도 배양을 위하여 perfusion 배양을 한 결과 세포의 생장이 증진됨을 확인하였다. 배양 5일째부터 sucrose를 4배 농축한 배지로 2 mL씩 교환해준 결과, 세포의 생장이 계속 유지되었고 최대 세포농도도 23.7 g/L로 대조구에 비하여 1.7 배 증가하였다. 초기 당농도를 50 g/L로 하여 배지 교환을 한 결과, 최대 세포농도도 23.8 g/L로 30 g/L 당농도 대조구에 비하여 1.6 배 증가하였고, 배지교환을 하지 않은 50 g/L 대조구에 비하여 1.1 배 증가하였다. 따라서 초기 당농도를 높이고 연속적으로 배지교환을 해준다면, 고농도의 세포를 얻을 수 있으며 결과적으로 참당귀 세포가 생산하는 다당류의 생산량을 증진시킬 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Ahn, K. S., "A study on the anticancer and immunostimulating agents from the root of *Angelica gigas* Nakai"(1996), Ph.D. Thesis, Dept. of Biology, Korea University. Seoul.
2. H. Takamatsu, K. Hamamoto, K. Ishimaru, S. Yokoyama, and M. Tokashiki, "Large-scale perfusion culture process for suspended mammalian cells that uses a centrifuge with multiple settling zones"(1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 454-457.
3. Su, W. W. and A. E. Humphrey, "Production of rosmarnic acid from perfusion culture of *Anchusa officialis* in membrane-aerated bioreactor"(1991), *Biotechnol. Lett.*, 13, 889-892.
4. Su. W. W., F. Lei, and N. P. Kao, "High density cultivation of *Anchusa officinalis* in a stirred-tank bioreactor with *in situ* filtration"(1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 293-299.