

Immobilization of transgenic *Nicotiana tabacum* cell suspensions for the continuous production of hGM-CSF

Yun-Sook Roh, Sang-Yoon Lee, Dong-Il Kim*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel +82-32-863-5946, FAX +82-32-872-4046

Abstract

Effect of immobilization on the production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) by *Nicotiana tabacum* cells was investigated using polyurethane foam as immobilization matrices. The cell activity and the hGM-CSF production were maintained for 16 days in spite of 3 times of media exchange. Under the same conditions of temperature and agitation rate, maximum concentrations of hGM-CSF in a 500-mL spinner flask and 100-mL Erlenmeyer flasks were 17.3 $\mu\text{g/L}$ and 9.8 $\mu\text{g/L}$, respectively. Consequently high hGM-CSF production could be possible in spinner flask when the rate and amount of media exchange were optimized.

서 론

식물세포배양은 지난 20년 동안 여러 가지 천연물을 생산하는데 이용되어 왔으며 최근에는 식물세포를 이용한 외래 단백질 생산도 시도되고 있다. 식물세포는 배지 조성이 간단하고 가격이 저렴하여 생산비용을 크게 낮출 수 있는 장점을 지니고 있음에도 불구하고 느린 성장속도와 낮은 단백질 발현으로 인해 산업화에 어려움을 가지고 있다.¹⁾ 그러나 식물세포를 고정화할 경우 전단응력에 의한 손상의 보호, 유전적 안정성의 증대, 연속배양과 세포 재사용등의 장점으로 성장 속도의 제한성을 극복할 수 있다.²⁾ 또한 낮은 생산량을 극복하기 위해서는 치료용 단백질 등 고부가 가치의 물질을 목적 산물로 선정하는 것이 중요하다.

항암 보조제인 human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF)는 화학 항암 요법의 부작용인 골수 기능 약화로 인한 면역력 저하를 예방하여 다량의 화학 요법 치료제의 투여를 가능하게 하는 의료용 단백질이다. 본 연구에서는 spinner flask에서 polyurethane foam 내 고정화된 담배세포를 배양하여 세포 증식과 목적 단백질 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 배지

hGM-CSF를 생산하는 형질전환된 *Nicotiana tabacum* 세포주는 전북대학교로부터 제공받았다. MS 기본배지에 30 g/L sucrose, 0.1 g/L myo-inositol, 0.2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.02 mg/L kinetin, 100 mg/L kanamycin을 첨가하였다. 배양은 25°C, 120 rpm, 암조건에서 수행하였으며 7일마다 계대하였다. 생산배지는 상기 조건에서 sucrose의 농도를 60 g/L로 높여 사용하였다. Spinner flask(New Brunswick Scientific Co. Inc.)에서의 배양을 위해서는 같은 조건에서 균된 공기를 0.2 vvm으로 주입하였다.

식물세포 고정화

N. tabacum 세포는 이진케미칼로부터 구입한 polyurethane foam을 이용하여 고정화하였다. 사용전에 polyurethane foam 내에 있는 monomer를 제거하기 위해 70% ethanol과 증류수로 세척하였다. 그 후 배양배지에 0.6×0.6×0.6 cm foam을 0.2 g씩 넣어 멸균한 후 현탁세포와 동일하게 접종하였다. 고정화 전처리 과정으로 6일간 배양하여 foam에 세포를 포집시킨 후 실험에 이용하였다.

세포량 측정

현탁세포는 배양액을 Whatman No. 1 여과지로 통과시켜 세포와 배지를 분리하여 세포생체량을 측정하였으며 60°C의 dry oven에서 항량이 될 때까지 건조시켜 세포건체량을 측정하였다. Polyurethane foam 내 고정화된 세포의 건체량은 여과지를 통과시켜 분리한 세포를 50°C의 증류수로 2분간 세척하고 건조한 후 넣어준 foam의 무게인 0.2 g을 제하여 측정하였다.

hGM-CSF의 정량분석

hGM-CSF의 양은 배지 상등액을 ELISA 분석 kit (PharMingen Inc., USA)를 이용하여 450 nm에서 정량분석 하였다.

결과 및 고찰

형질전환 된 식물세포를 고정화 하여 외래 단백질을 생산하는 연구는 아직 많이 수행되지 않았다. 본 연구에서는 polyurethane foam 내 고정화법을 이용하여 연속배양의 가능성 확인과 spinner flask 배양의 영향을 알아보았다.

고정화된 세포를 이용하면 연속배양이 용이하므로 전처리 과정을 거친 foam을 새배지로 옮겨준 후 이 과정을 여러번 반복하였다. 6일마다 전체 배지를 모두 교

환하여 주었는데 배지 교환 후 2일까지는 생장이 감소하였지만 그 후 다시 증가하였다. 이는 배지교환으로 인해 conditioning factor가 유실되어 이에 적응하는 과정에서 나타난 현상으로 사료된다. 성장속도가 감소되는 것을 극복하기 위하여 성장배지로 옮겨주는 회복기를 도입하였지만 성장배지로 옮긴 초기에만 대조구보다 높은 성장(Figure 1a)을 보였고 이내 감소하였다. 회복기 후 생산배지로 다시 교환해 주었을 때 대조구와 유사한 성장속도와 hGM-CSF 생산량(Figure 1b)을 보였다. 세포를 재사용하여 16일 동안 3번의 배지교환으로 연속배양을 실시한 결과 세포 활성이 유지되어 hGM-CSF의 생산량이 새배지 교환 후에도 감소하지 않았다.

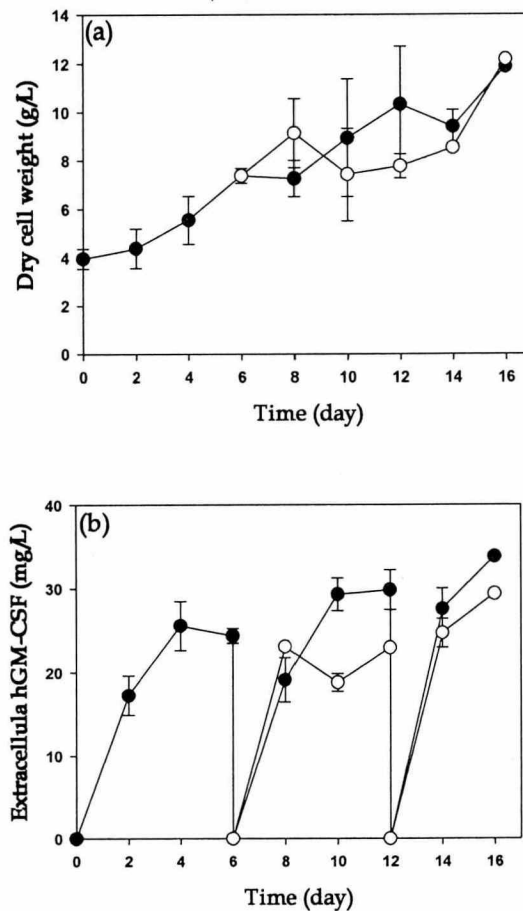


Figure 1. Effect of media change on immobilized cell growth (a) and hGM-CSF production (b). *N. tabacum* was immobilized in polyurethane foam with media exchange every 6 day.

Recovery period was introduced to overcome reduction of growth rate after media exchange. ●, control; ○, recovery.

배양 단위를 100-mL Erlenmeyer flask에서 500-mL spinner flask로 증가시켜 환경 변화에 따른 hGM-CSF 생산량 변화를 알아보았다. 배양온도와 교반속도는 동일하게 유지하고 멸균된 공기를 0.2 vvm으로 주입하였다. 전단응력으로부터 세포를 보호하기 위하여 교반기 상단에 mesh를 장착하여 성장과 생산공간을 분리시켰다. Spinner flask에서 배양시 100-mL Erlenmeyer flask 보다 최대 hGM-CSF 생산량이 9.8 $\mu\text{g/L}$ 에서 17.3 $\mu\text{g/L}$ 로 증가하였다(Figure 2). Spinner flask에서의 생산량은 6일 이후부터 감소하였으므로 spinner flask 내에서 6일마다 새 배지로 교환하며 연속 배양을 할 경우 100-mL flask와 유사한 결과가 도출될 것이라고 예상된다. 이런 세포의 재사용과 배지교환 속도를 최적화하여 연속공정에 응용한다면 높은 hGM-CSF 생산이 기대된다.

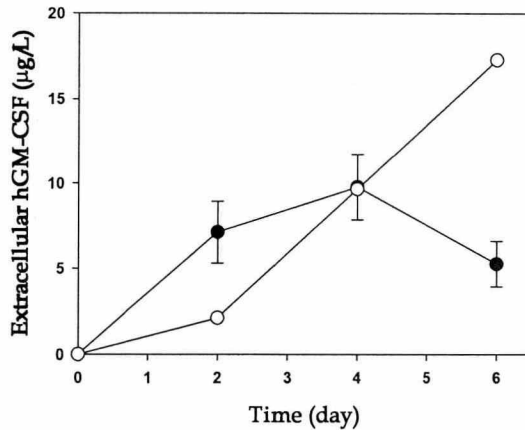


Figure 2. Comparison of hGM-CSF production in 100-mL Erlenmeyer flask (●) and 500-mL spinner flask (○).

요 약

형질전환된 담배세포 배양을 이용한 hGM-CSF 생산에 있어 polyurethane foam 내 고정화법을 이용하여 연속배양의 가능성을 확인하였고 spinner flask에서의 배양에 따른 영향을 알아보았다. 16일 동안 3번의 배지교환에도 세포의 활성이 유지되어 hGM-CSF 생산량은 계속적으로 증가하였다. 온도와 교반속도를 동일하게 하였을 때 spinner flask에서의 hGM-CSF 생산량은 17.3 $\mu\text{g/L}$ 으로 100-mL flask의 9.8 $\mu\text{g/L}$ 보다 증가하였다. 따라서 최적의 배지교환 속도와 양을 결정하여 spinner

flask에서 연속배양을 실시할 경우 세포 재사용이라는 경쟁력과 함께 높은 hGM-CSF 생산량이 얻어질 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 차세대신기술개발사업(A18-06-03)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. James, E. A. and J. M. Lee (2001), The production of foreign protein from genetically modified plant cells, In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology- Plant Cells* (Eds. J. J. Zhong) **72**, 127-156, Springer, Berlin, Germany.
2. Bodeutsch, T., E. A. James, and J. M. Lee (2001), The effect of immobilization on recombinant protein production in plant cell culture, *Plant Cell Rep.* **20**, 562-566.