

Optimization of main factors using response surface method for the enhanced production of hGM-CSF from transgenic *Nicotiana tabacum* cell suspension cultures

Ki-Yong Lee, Sang-Yoon Lee and Dong-Il Kim*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon, Korea

Tel: +82-32-863-5946, Fax: +82-32-872-4046

Abstract

Response surface methodology was employed to study the interactive effect of sucrose, nitrogen, temperature and to optimize their levels to enhance the production of human granulocyte-macrophage colony-stimulation factor from *Nicotiana tabacum* cell suspension cultures. A 15-runs Box-Behnken design including three center points was the response surface method selected for the initial set of experiments. The analysis of the data from the Box-Behnken experiments showed interactive effects of sucrose:nitrogen, sucrose:temperature and nitrogen:temperature. The optimal combinations of sucrose, nitrogen and temperature for hGM-CSF production from surface plot were sucrose 90 g/L, nitrogen 41 mM and 22°C, respectively. The optimization of these factors enhanced the hGM-CSF production by 2 times because high sucrose concentration stimulated the secretion of hGM-CSF and low temperature prevented hGM-CSF degradation in media by proteases.

서론

통계실험계획법은 지금까지 주로 미생물에서 세포증식 및 생산물의 생산성증대를 위한 배지성분의 최적화를 위해 많이 사용되어 왔다.¹⁾ 이러한 방법은 실험 공정상의 요인들을 효과적으로 제어함으로써 효율적인 실험을 계획하고, 단시간에 가장 생산성이 증가되는 실험조건을 결정할 수 있으며, 실험적인 오차를 최대한 줄여서 믿을 수 있는 결과를 얻기 위해 대단히 유용한 방법이다.

위와 같은 통계실험계획법을 사용하여 실험조건을 최적화하여 생산성을 증대시키기 위해서는 생산성에 영향을 미치는 인자의 수 즉 method 상의 변수를 줄이는 screening design 단계가 필요하고 이후 선정된 중요인자들의 농도를 표면반응실험

법을 통하여 최적화하는 단계가 필요하다. 표면반응실험법은 실험조건 최적화의 최종단계로 각 인자들 간의 상관관계를 분석하며 이를 근거하여 각 인자들의 최적농도를 결정하는 단계이다.²⁾ 표면반응실험법으로는 Box-Behnken design과 Central composite design이 자주 사용된다. 본 연구에서는 형질전환된 식물세포인 *Nicotiana tabacum* 세포에서 의료용 재조합단백질인 hGM-CSF의 생산을 극대화하기 위하여 표면반응실험법 중 하나인 Box-Behnken design을 사용하여 선행된 연구에서 중요인자로 결정된 carbon, nitrogen과 같은 배지 성분인자의 최적농도와 실험온도인 인자인 온도의 최적온도를 결정하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배양

본 연구에 사용된 형질전환 세포주는 전북대학교로부터 분양받은 hGM-CSF를 생산할 수 있는 *Nicotiana tabacum*이며 성장배지로는 MS 기본배지를 사용하였다. 탄소원으로는 30 g/L의 sucrose를 사용하였고, 성장조절제로는 2,4-D(0.2 mg/L)와 kinetin(0.02 mg/L)을 사용하였다. pH는 1 N NaOH를 사용하여 5.9로 조절하였으며 가압증기멸균하여 사용하였다. 현탁배양은 회전식 진탕배양기에서 25°C, 120 rpm, 암조건에서 수행하였다.

세포량 측정

세포의 성장을 알아보기 위하여 세포의 생체중량과 건조중량을 측정하였는데 생체중량은 현탁배양된 세포를 진공펌프와 Whatman No.1 여과지로 여과하여 세포와 배지를 분리한 다음 세포로부터 수분을 제거하고 무게를 알고 있는 weighing dish에 옮겨서 저울로 측정하였다. 건조중량은 생체중량을 측정한 세포를 60°C로 유지한 dry oven에서 항량이 될 때까지 건조하여 측정하였다.

hGM-CSF 정량분석

hGM-CSF의 정량을 위해서는 ELISA 법을 사용하였으며 450 nm에서 측정하였다.

요인의 최적수준 결정

선정된 sucrose, nitrogen, temperature level을 결정하기 위해 Table 1과 같이 실험계획을 세운 후 Minitab software를 사용하여 Box-Behnken design을 실행하였다.

결과 및 고찰

선행된 연구에서 중요인자의 screening 단계를 통하여 선정된 sucrose, nitrogen,

배양온도로 Box-Behnken design을 사용하여 Table 1과 같이 3번의 center point를 포함하여 총 15회의 실험을 수행하였다.

Table 1. Box-Behnken design plan

Factor	Run number														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sucrose (g/L)	10	10	10	10	50	50	50	50	50	50	50	90	90	90	90
Nitrogen (mM)	30	60	60	90	30	30	60	60	60	90	90	30	60	60	90
Temperature (°C)	25	20	30	25	20	30	25	25	25	20	30	25	20	30	25
Maximum cell density (g/L)	6.0	6.5	5.8	6.5	18.7	16.4	18.7	17.3	18.3	7.7	6.4	30.0	6.8	22.2	11.8
Maximum hGM-CSF production (mg/L)	3.0	6.4	4.9	4.3	11.7	5.5	8.5	8.7	9.5	12.2	2.9	14.2	13.4	7.0	6.7

최대 세포생장은 No. 12에서 30 g/L로 관찰되었으며, 최대 hGM-CSF의 생산은 No. 12와 No. 13에서 14.2 mg/L, 13.4 mg/L로 관찰되었다. 각 인자들의 최적조건을 알기위해서는 각 인자들의 개별적인 영향도 중요하지만 다른 인자들과의 상관관계가 중요하다. Figure 1은 hGM-CSF의 생산에 관하여 각인자들간의 상관관계를 surface plot으로 나타낸 것이다.

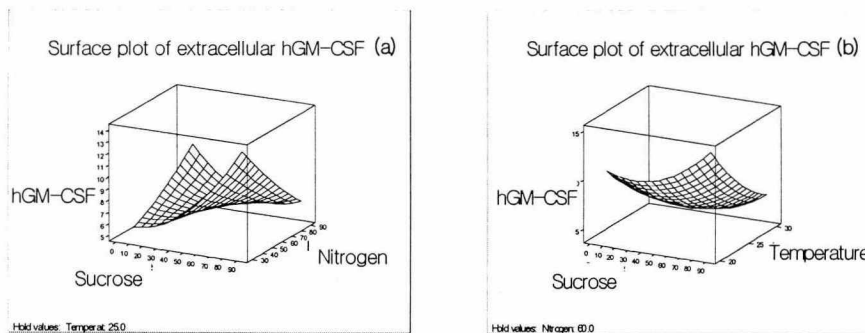


Figure 1. Surface plot; interactive effect of sucrose and nitrogen (a), sucrose and temperature (b) on the production of extracellular hGM-CSF.

Figure 1(a)에서는 sucrose농도가 높고, nitrogen 농도가 낮을 때 hGM-CSF의 생산량이 높아짐을 알 수가 있다. 또한 (b)에서는 sucrose 농도가 높고, 온도가 낮을 때 hGM-CSF의 생산량이 높음을 알 수가 있다. 온도와 nitrogen의 관계에 있어서는 온도는 낮고, nitrogen 농도가 낮을 때 생산량이 높음을 관찰할 수 있었다. 이러한 상관관계를 바탕으로 Minitab software을 사용하여 세 가지 인자들 간의 level을 조

절하여 가장 hGM-CSF의 생산량이 많을 때의 인자들의 level을 결정할 수 있었는데 sucrose는 90 g/L, nitrogen은 42 mM이었으며 온도는 22°C였다.

Figure 2는 결정된 인자들의 수준으로 실험한 결과로서 (a)에서 볼 수 있듯이 세포 최대생장은 대조구의 14.4 g/L에서 16.5 g/L로 증가하였으며, 최대 hGM-CSF의 생산량은 대조구의 20.1 µg/L에 비해 약 2배인 39.0 µg/L로 증가하였다. 위의 결과를 바탕으로 세포생장과 hGM-CSF의 생산의 증가에 각 인자들이 미치는 영향을 알아

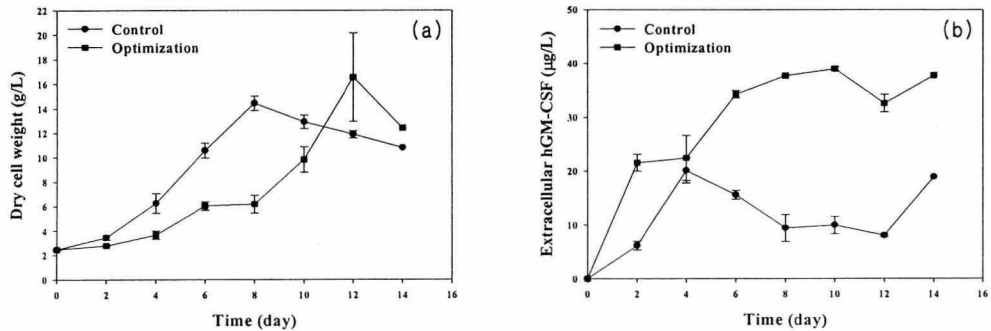


Figure 2. Effect of optimized nutrient factors and temperature on growth (a) and production of extracellular hGM-CSF (b).

보기 위해 Figure 3과 같이 보완실험을 수행하였다. Figure 3(a)에서 C, D와 같이 성장초기에는 고농도의 sucrose로 인해 세포생장이 느리지만 적응기가 지난 8일 이후에는 당이 고갈되어 생장이 느려지는 A, B와는 다르게 당이 충분하여 생장이 빨라지는 것을 볼수가 있다. 또한 hGM-CSF 생산에 있어서도 (b)와 같이 고농도의 sucrose를 첨가한 C, D가 A, B보다 hGM-CSF의 생산이 증가한 것을 볼 수 있는데 이것은 고농도의 sucrose가 삼투압을 높여 hGM-CSF의 세포외분비를 촉진했기 때문이다. Nitrogen의 경우는 sucrose나 온도처럼 성장이나 생산에 현저한 영향을 주는 것은 아니지만 저농도일 경우가 세포생장과 hGM-CSF 생산에 긍정적인 영향을 보였다.

배양온도의 경우에는 주목할 만한 결과가 관찰되었다. Figure 3(a)에서와 같이 B, D가 저온의 영향으로 A, C보다 세포생장이 저해되는 결과를 보였다. 하지만 hGM-CSF의 생산에 있어서는 (b)에서와 같이 B,D가 A,C보다 생산이 약 2.5배 정도 증가하였는데 이러한 이유로는 저온일 경우 배지내 존재하는 protease의 활성을 감소시킴에 따라 배지내로 분비되는 protease에 의한 hGM-CSF의 분해를 감소

시켰기 때문인 것으로 생각된다.

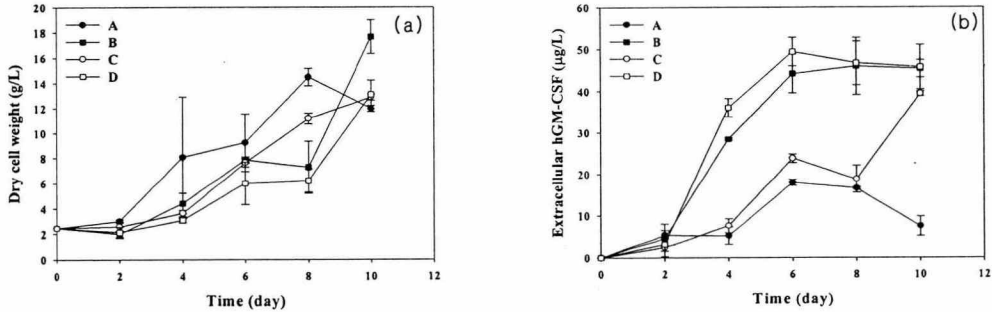


Figure 3. Individual effect of optimized nutrient factors and temperature on growth (a) and production of extracellular hGM-CSF (b).

요 약

Screening 실험을 통하여 결정된 주요인자인 sucrose, nitrogen, 배양온도로 인자의 최적수준을 결정하는 표면반응법중 하나인 Box-Behnken design을 수행하였다. 각 인자의 상관관계를 통하여 sucrose는 90 g/L, nitrogen은 41 mM, 온도는 22°C가 최적수준으로 결정이 되었으며 확인실험을 통하여 대조구보다 세포생장이 증가하였을 뿐만 아니라 hGM-CSF의 생산도 약 2배 정도 증가되었음을 확인하였다. 이것은 고농도의 sucrose로 인해 배지내로의 hGM-CSF의 분비가 촉진되었기 때문이며 또한 저온으로 인해 분비된 hGM-CSF를 분해하는 protease 활성이 감소되었기 때문인 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Cockshott, A. R., Sullivan, G. R., "Improving the fermentation medium for Echinocandin B production. Part I: Sequential statistical experimental design"(2001), *Process Biochem.*, **36**, 647-660.
2. Bull, A. T., Castro, P. M. Hayer, P. M., Ison, A. P., "Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-g production by Chinese hamster ovary cells"(1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 84-90.