

당근세포의 현탁배양에 의한 세포성장 모델연구

채 보 희 · 허 병 기
인하대학교 공과대학 생물공학과

A Study on the Mathematical Model of Cell Growth by Carrot Cell Suspension Culture

Bo Hee Chai and Byung Ki Hur
Department of Biological Engineering, Inha University

ABSTRACT

In a batch fermentation process using carrot cell suspension culture, the effect of initial concentration of limiting nutrients (glucose and phosphate) on the specific growth rate and cell yield was investigated.

The period of exponential growth is about 2 days and the consumption of glucose and phosphate in culture medium was very small when the initial concentrations of glucose and phosphate are 1.49g/l ~ 3.01g/l and 0.08 ~ 0.32mM respectively.

The specific growth rate of cells ranged from 0.15 day⁻¹ to 0.3 day⁻¹ irregularly. And the ratio of the initial concentration of glucose to phosphate did not affect the specific growth rate and the cell yield. The increase on cells had linear relationship with the consumption of limiting nutrients. Therefore, the increase of cells was found to be more influenced by the concentration of glucose than that of phosphate.

서 론

식물의 세포, 조직 및 기관의 배양기술은 품종 개량을 위한 재래적인 육종기술의 문제점 및 한계성을 극복하는데 유용하게 이용될 뿐만 아니라 식물세포의 1차 및 2차 대사생성물인 의약품, 안료, 향료, 유지, 살충제, 유기약품 등 공업적 생산연구에도 널리 응용되고 있다. 식물 조직배양에 의한 상업적 제품의 생산은 아직 기초 연구 단계에 불과하나 alkaloid 계통의 고가 의약품이나 향료, 염료, 감미료 등에 대한 생산기술은 머지않은 장래에 산업화될 전망이 밝다(1, 2, 3).

식물조직배양에는 그 목적에 따라 다양한 종류의 식물이 이용되고 있다. 당근 뿌리의 조직배양에 대한 연구는 뿌리세포 내에 존재하는 anthocyanin 생산에 목적을 두고 수행되는 경우가 많다. 현재까지의 연구결과에 의하면, 당근조직배양에서 제한요소는 PO_4^{3-} , NH_4^+ , Mg^{2+} 와 글루코오스 등이며 최적 배양온도는 25°C, 최적 배양 pH는 4.5라는 것이 알려져 있다(4~6). 또한 조직배양

은 회분식 또는 반연속식방법으로 수행되어 제한영양소의 농도와 비성장속도, anthocyanin의 생성속도 및 당근 세포의 수율 사이의 함수관계 규명에 관한 연구가 진행되고 있다(4~7).

본 연구에서는 당근세포의 현탁배양에서 제한요소인 글루코오스와 인산염의 농도가 세포의 비성장속도 및 세포수율에 미치는 영향을 저농도범위에서 고찰하여 보았다.

재료 및 방법

세포주 및 배지조성

본 실험에서 사용한 당근세포 현탁액은 다음과 같이 준비하였다. 당근을 흐르는 물에서 깨끗하게 세척한 후 뿌리방향으로부터 1 cm 정도의 길이로 잘라 10% sodium hydrochlorite에서 30분 동안 담근 후 clean bench로 옮겨 70% 에탄올로 sodium hypochlorite를 완전히 제거시킨 뒤 증류수로 3회 이상 세척하여 Fig. 1과 같이 뿌리 단면에서 사관부(phloem), 형성층(cambium

, 목질부(xylem)가 포함되도록 두께 1 mm, 가로×세로가 5 mm×5 mm 가 되도록 잘라서 준비한다. 이렇게 준비된 explant를 직경 90 mm petridish 내의 0.8% agar가 첨가된 배지(8-10)위에 뿌리방향에 밀어서 향하도록 놓고 뚜껑을 닫고 wrap으로 싸 후 25°C incubator에서 28일 정도 배양하였다.

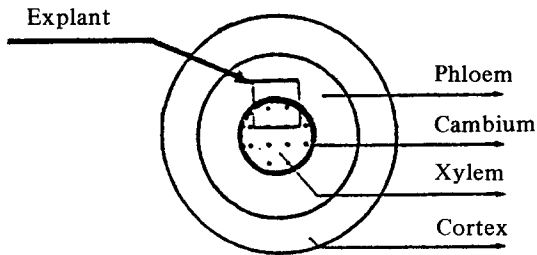


Fig. 1. Isolation of explant.

배양중에 생성된 callus 조각을 100 ml의 액체배지가 내포된 250 ml 삼각플라스크에 주입한 후 진탕배양기에서 25°C 115 rpm으로 2주동안 subculture 하면서 callus로부터 당근세포를 분리시켰다. 분리된 당근세포를 약 48시간 동안 침전시켜 본 연구의 현탁액 배양 세포주에 이용하였다.

subculture에 사용된 배지성분 중 2,4-D의 농도는 1 mg/l가 되도록 하고 4 N-KOH와 4 N-HCl을 이용하여 배지의 pH를 4.5으로 맞춘 후(4,5) 멸균시켜 subculture에 사용하였다.

Table 1은 당근세포의 subculture에 사용된 배지조성을 나타내고 있다.

현탁액 배양실험

앞에서 얻은 당근세포를 pH 4.5로 맞춘 Table 1의 액체배지(ager 제외)에 5 내지 10×10^7 cells/ml가 되도록 주입한 후 25°C 진탕배양기에서 7일동안 배양하면서 클루코오스 및 인산염의 초기 농도가 세포 성장에 미치는 영향을 규명하여 보았다.

본 실험에서는 클루코오스 농도 1.49 g/l, 2.17 g/l, 2.67 g/l 각각에 인산염 농도변화를 0.08 mM, 0.22 mM, 0.32 mM로 한 경우와 인산염 농도를 1.06 mM로 고정하고 클루코오스의 농도변화를 1.12 g/l, 1.78 g/l, 3.01 g/l로 한 경우로 나누어 실험하였다.

인산염 분석

배지중 phosphate의 농도는 Fiske와 Subbarow의 방법을 수정한 분석법(11)에 의하여 측정하였으며 그 방법은 다음과 같다. 배양 시작 후 일정시간마다 샘플을

Table 1. Composition for culture medium.

COMPONENTS	CONCENTRATION (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	4000
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
Na ₂ EDTA	37.3
NH ₄ Cl	540
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
Agar	8000
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
Sucrose	20
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine	0.1
Thiamine HCl	0.1
Glycine	3.0
2,4-D	1.0
Kinetin	1.0
Malt extract	2000
Ferrous EDTA chelate	21.05

취하고 원심분리하여 상등액을 얻는다. 이 상등액의 인산염농도가 0.04 내지 0.2 mM 범위내에 들도록 희석한다. 6 N-sulfuric acid, ammonium molybdate solution, ascorbic acid 및 증류수의 부피비가 1:1:1:2인 혼합용액 4 ml를 샘플 희석용액 1 ml가 포함되어 있는 시험관에 가하고 vortexing 시킨다. 이 시험관을 37°C의 incubator에서 2시간 동안 발색시킨 후 실온으로 냉각하여 분광광도계(Shimadzu, UV-120-02)를 사용하여 820 nm에서 흡광도를 측정한다. 얻어진 흡광도를 Fig. 2의 표준농도 곡선에 적용하여 배지중의 인산염 농도를 구하였다. 본 실험에서 사용한 인산염의 표준농도곡선은 KH₂PO₄를 사용하여 구하였다.

당농도 분석

샘플내의 glucose 농도가 0.5 g/l~2.0 g/l 범위내에 분포되도록 조정된 희석 시료용액 1 ml에 DNS 시약 1 ml를 가한 후 100°C 항온수조에서 5분간 가열하고 실온으로 냉각한다. 분광광도계를 사용하여 550 nm에서

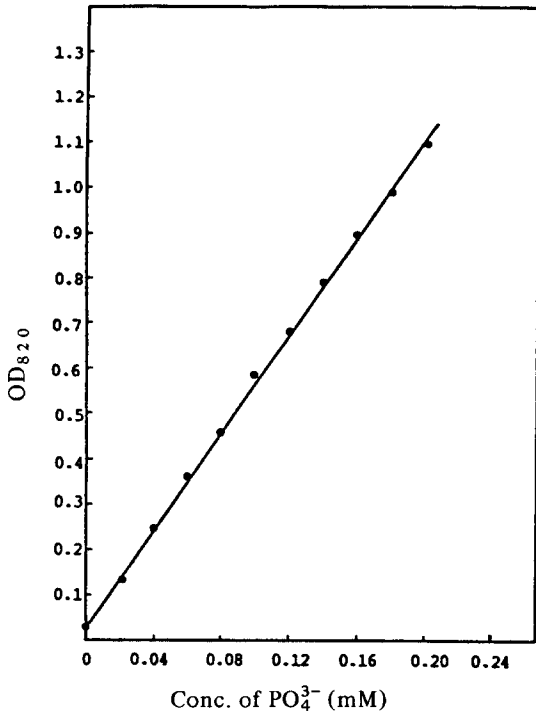


Fig. 2. Calibration curve for determining phosphate in medium.

흡광도를 측정 한 후 Fig. 3의 표준농도곡선에 적용하여 배지중의 포도당 농도를 구하였다.

세포증가량 측정

배양중의 세포의 증가량 측정은 Hemocytometer slide (13)를 이용하여 세포수를 측정하여 구하였다. 이때 사용한 현미경은 Nikon optipot HFX-II이며, sample은 10 내지 20배 희석하여 배율×40으로 측정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 고려한 당근세포 성장특성은 비성장속도와 글루코우즈 및 인산염 소모량에 대한 당근세포의 성장비로서, 다음 식들에 의하여 구하였다.

식 (1)은 당근세포의 비성장속도를 나타내는 식이다. 본 연구에서는 배양 시간과 세포 변화량 사이의 실험 결과로부터 대수기때의 결과를 식(1)에 적용하여 당근세포의 비성장속도를 구하였다.

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \dots\dots\dots (1)$$

윗 식에서,

μ = specific growth rate (day⁻¹)

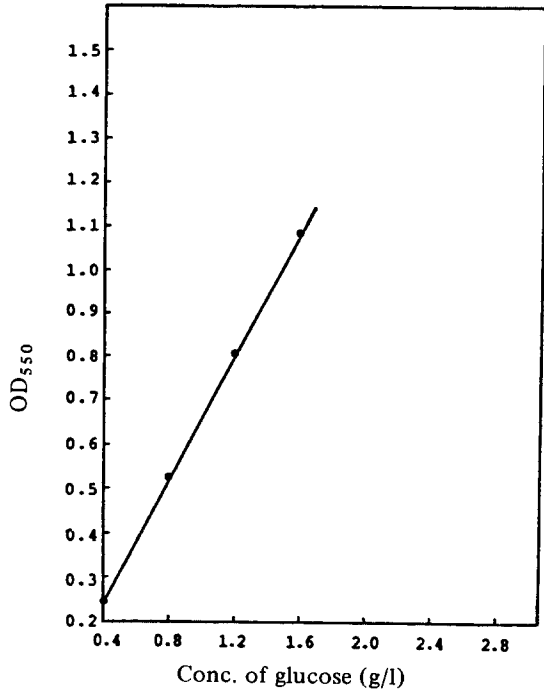


Fig. 3. Calibration curve for determining residual glucose in medium.

x = cell number (10⁷ cells / ml)

글루코우즈와 인산염에 대한 세포수율은 배양기간 중 세포 수가 최대가 될때 소모된 글루코우즈의 농도와 인산염 농도에 대한 증가세포수의 비로 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$Y_{x/sG} = - \frac{\Delta x}{\Delta s_G} \dots\dots\dots (2)$$

$$Y_{x/sp} = - \frac{\Delta x}{\Delta s_p} \dots\dots\dots (3)$$

여기서,

$Y_{x/sG}$ = 글루코우즈에 대한 세포수율(10¹⁰ cells / g)

$Y_{x/sp}$ = 인산염에 대한 세포수율(10¹⁰ cells / g)

Δx = 세포수 증가량

Δs_G = 글루코우즈 감소량

Δs_p = 인산염 감소량

제한영양소의 전환율과 정제기에 도달하는 시간

배지중의 글루코우즈 및 인산염의 초기농도가 당근세포의 성장특성에 미치는 영향을 구명하기 위하여 Table 2와 같이 글루코우즈 및 인산염의 초기농도를 변화시켜가면서 이들 변화가 세포성장특성에 미치는 영향을 비교 분석하였다.

Table 2. Initial concentration of limiting nutrients.

Experiment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Conc. of phosphate (mM/l)	0.08	0.08	0.08	0.22	0.22	0.22	0.32	0.32	0.32	1.06	1.06	1.06
Conc. of glucose (g/l)	1.49	2.17	2.67	1.49	2.17	2.67	1.49	2.17	2.67	1.12	1.78	3.01

Fig. 4는 본 연구의 결과 중 초기농도 2.67 g/l 인산염 초기농도 0.08 mM 일때 배양시간과 세포수의 변화 및 배양시간과 기질 감소량 사이의 관계를 나타내는 실험결과이다.

본 연구의 결과에 의하면 세포성장 대수기는 현탁배양 시작 후 약 2일 정도이며 이 기간동안 글루코오스와 인산염의 양은 초기량의 5 내지 30% 범위내에 분포되어 있었다. Table 3은 본 연구의 실험결과로 얻은 정체기에 도달하는 시간과 제한영양소의 전환율을 나타내고 있다. 글루코오스의 전환율은 글루코오스의 초기농도가 낮을수록, 인산염의 농도가 높을수록 증가하는 경향을 나타내었으나 인산염의 전환율은 본 연구의 실험범위에서는 뚜렷한 경향을 찾을 수 없었다. 인산염의 농도가 일정한

경우 세포의 성장이 멈추어지는 정체기에 도달하는 시간은 글루코오스의 농도가 높을수록 짧아지는 경향을 나타내었으며 글루코오스의 농도가 일정한 경우에는 인산염의 농도가 높을수록 정체기에 도달하는 시간이 줄어들었다. 본 연구의 실험범위에서는 어떤 경향을 정성적으로 서술할 수는 있었으나 이 경향을 정량화하기는 어려웠다.

세포의 비성장속도

본 연구의 실험결과로부터 제한영양소의 각 농도에 대한 대수기에서의 비성장속도를 구하여 인산염 및 글루코오스의 초기농도의 함수로 표시한 것이 Fig. 5와 Fig. 6이다. 이 결과에 의하면 인산염 농도의 범위가 0.08 mM에서 1.06 mM 이고 글루코오스의 초기농도범위가 1.49 g/l와 2.67 g/l 사이에 존재할 때는 이들 제한요소의 농도변화에 따른 세포의 비성장속도의 변화경향을 찾기는 어려웠다. 이들 농도범위에서는 세포의 비성장속도가 0.15 day⁻¹와 0.3 day⁻¹ 사이에 분포되어 있음을 알 수 있었다.

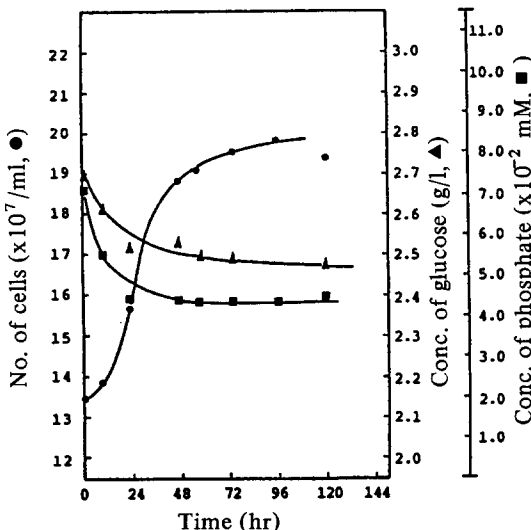


Fig. 4. Functional relationship between no. of cells and conc. of limiting nutrients according to time in carrot cell suspension culture ($S_{G_0} = 2.67$ g/l, $S_{P_0} = 0.08$ mM).

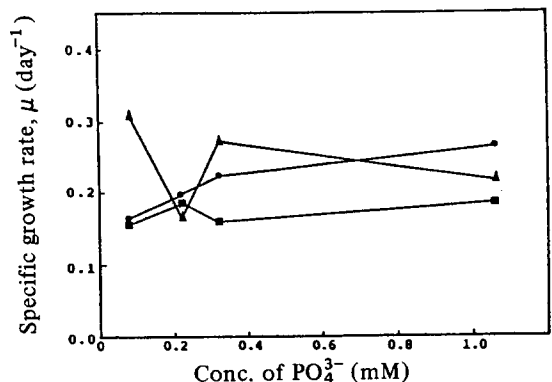


Fig. 5. Specific growth rate vs. concentration of PO_4^{3-} (■ = 1.49 g/l glucose, ▲ = 2.17 g/l glucose, ● = 2.67 g/l glucose).

Table 3. Experimental data for initial conc. of glucose and phosphate.

Conc. of phosphate	0.08 mM			0.22 mM			0.32 mM			1.06 mM		
Conc. of glucose (g/l)	1.49	2.17	2.67	1.49	2.17	2.67	1.49	2.17	2.67	1.12	1.70	3.01
t_s^* (hr)	60.4	30.0	39.2	66.4	31.0	26.0	40.8	20.8	13.2	28.0	55.4	31.0
Conversion %												
Limiting nutrient												
Glucose (%)	11.16	8.00	8.09	11.85	4.95	5.23	8.96	7.80	3.93	27.44	26.82	4.85
Phosphate (%)	15.77	26.51	39.30	9.30	9.38	8.88	8.46	9.48	24.07	9.30	5.93	4.50

* : time to the stationary phase

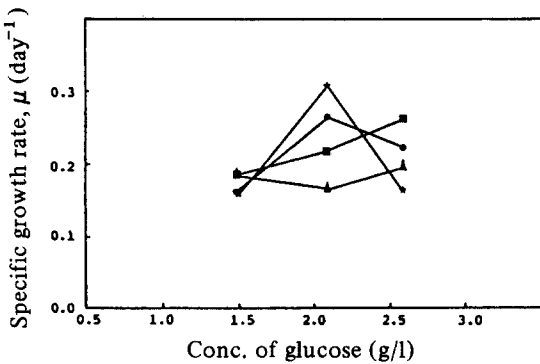


Fig. 6. Specific growth rate vs. concentration of glucose (★ = 0.08 mM PO₄³⁻, ▲ = 0.22 mM PO₄³⁻, ● = 0.32 mM PO₄³⁻, ■ = 1.06 mM PO₄³⁻).

제한 영양소 글루코오스에 대한 세포수율

Fig. 7, 8 및 9는 글루코오스 초기농도를 파라미터로 한 글루코오스 소모량에 대한 세포 수의 증가량을 나타내고 있다. x 축은 회분식 실험에서 배양시간에 따른 기질의 소모량을 나타내며, y 축은 배양시간에 따른 세포 수의 증가량을 나타낸다. 이 결과에 의하면 제한 영양소의 소모량과 세포 증가량 사이에는 선형적인 함수관계가 성립된다. 따라서 배양기간 중 임의의 구간에서 글루코오스의 소모량에 대한 세포 수율이 일정하다는 것을 알 수 있다. 제한 영양소 글루코오스의 소모량에 대한 세포 수의 수율은 다음 식으로 구할 수 있다.

$$Y_{x/sG} = \frac{x - x_0}{s_{G0} - s_G} \dots\dots\dots (4)$$

- 윗 식에서,
- x : 임의의 시간에서의 배양액 내의 세포 수(갯수 / 1)
- x₀ : 배양 초기의 세포 수(갯수 / 1)
- s_G : 배양액 내의 글루코오스의 농도(g/l)
- s_{G0} : 배양액 내의 글루코오스의 농도(g/l)

배양 기간 전 구간에 대한 세포수율의 평균치는 Fig. 7, 8 및 9에 나타나 있는 직선의 기울기이다. 최소자승법에 의하여 글루코오스 및 인산염의 각 초기 농도에 대한 직선의 기울기를 구하면 Table 4와 같다. 이 결과에 의하면 글루코오스 소모량에 대한 세포수의 수율은 제한요소의 초기 농도가 클수록 대체로 높은 값을 나타내는 경향을 보였다.

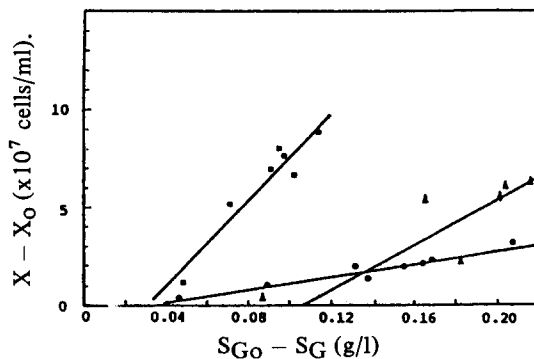


Fig. 7. Consumption of glucose vs. increase of cell number for the initial phosphate conc. of 0.08 mM (● = 1.49 g/l glucose, ■ = 2.17 g/l glucose, ▲ = 2.67 g/l glucose).

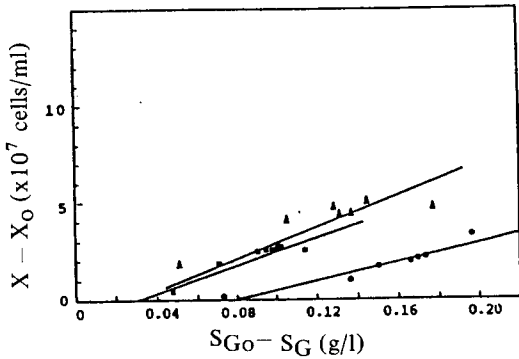


Fig. 8. Consumption of glucose vs. increase of cell number for the initial phosphate conc. of 0.22 mM (● = 1.49 g/l glucose, ■ = 2.17 g/l glucose, ▲ = 2.67 g/l glucos).

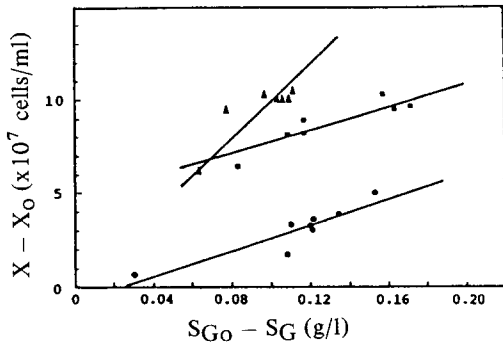


Fig. 9. Consumption of glucose vs. increase of cell number for the initial phosphate conc. of 0.32 mM (● = 1.49 g/l glucose, ■ = 2.17 g/l glucose, ▲ = 2.67 g/l glucose).

Table 4. Cell yield obtained at the initial Conc. of glucose and phosphate ($\times 10^{10}$ cells/g).

Phosphate Glucose	0.08 mM	0.22 mM	0.32 mM
1.49 g/l	16.49	23.45	33.83
2.17 g/l	111.45	35.08	30.89
2.67 g/l	56.40	40.14	98.71

제한 영양소 비 (s_G/s_P)와 비성장속도 및 세포수율 사이의 함수관계

배지중의 초기 글루코오스와 인산염의 두 농도의 비

(s_G/s_P)에 따른 세포의 비성장속도 μ 와 제한영양소인 글루코오스에 대한 세포수율, Y_{X/S_G} 와의 관계를 Fig. 10에 나타내었다. 여기서 배지중 글루코오스와 인산염의 두 농도의 비 (s_G/s_P)가 20 mM / mM - 120 mM / mM 사이에서, 비성장속도와 세포수율은 일관된 경향을 나타내지 않았다. 즉 비성장속도는 0.15 day⁻¹ - 0.3 day⁻¹ 사이의 범위에서 임의적으로 분포하였고, 그 평균값은 약 0.179 day⁻¹ 정도였으며, 세포수율은 15 $\times 10^{10}$ cells / g - 115 $\times 10^{10}$ cells / g 범위에서 넓게 분포하여, 주어진 범위에서 일정한 경향성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

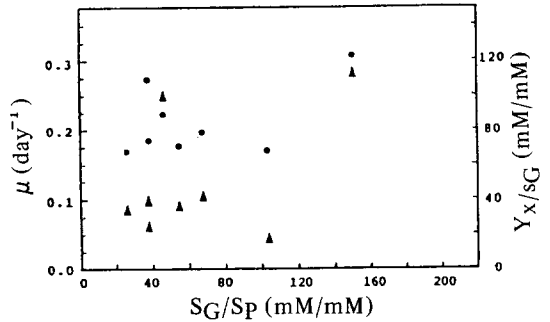


Fig. 10. Relation of ratio of limiting nutrients to specific growth rate (μ , ●) and cell yield (Y_{X/S_G} , ▲).

요 약

당근세포의 현탁배양에서 배지중 제한영양소인 인산염과 글루코오스 농도에 대한 당근세포 배양특성에 관한 실험으로부터 다음의 결론을 얻었다.

1) 배지중의 글루코오스와 인산염을 제한영양소로 하였을 때, 현탁배양 중의 글루코오스의 농도 1.49 g/l - 3.01 g/l, 인산염의 농도 0.08 mM - 1.06 mM의 범위에서 세포성장 정체기에 도달하는 시간은 13.2 hr - 66.4 hr였고 제한영양소의 전환율은 초기 글루코오스와 인산염의 농도의 5~30% 범위내에 분포되었다.

2) 제한 영양소의 저농도범위에서의 농도변화에 따른 세포의 비성장속도, μ 는 0.15 day⁻¹와 0.3 day⁻¹ 사이의 값으로 일정한 경향을 보이지 않았는데, 이것은 제한요소가 저농도로 존재할 때 세포의 비성장속도에 미치는 영향이 적음을 알 수 있다.

3) 제한 영양소의 소모량과 세포증가량 사이에는 선형적 관계를 나타내며, 제한 영양소 글루코오스에 대한 세포수율 (Y_{X/S_G})은 인산염 0.32 mM, 글루코오스 2.67 g/l에서 98.71 $\times 10^{10}$ 개 / g로 최대값을 나타내었다.

4) 제한 영양소의 비 (s_G/s_P)에 대한 비성장속도, μ 및 세포수율 (Y_{X/S_G})는 두 농도의 비 (s_G/s_P)가 20 mM

/ mM - 120 mM / mM 사이에서 임의적으로 분포하였다.

- S_G : glucose concentration of culture medium (g/l).
 S_P : phosphate concentration of culture medium (g/l).
 t_s : time to the stationary phase (hr).
 Y_{x/S_G} : cell yield for the consumption of glucose (10^{10} cells/g).
 Y_{x/S_P} : cell yield for the consumption of phosphate (10^{10} cells/g).
 μ : specific growth rate (day^{-1}).
 x : cell number (10^7 cells/ml).

참 고 문 헌

1. 공태훈, 박교수, 유재근(1983), 美合衆國議會 特別調査, 遺傳工學의 現在와 展望(完譯版), 新光出版社.
2. Office of Technology Assessment of U. S. Congress(1984), *Commercial Biotechnology*; An In-

troductional Analysis.

3. O. Sahai and M. Knuth(1985), *Biotechnology Progress*, **1**(1), 1-9.
4. Donald K. Daugall and Keith W. Weyrauch(1980), *Biotechnology and Bioengineering*, **22**, 337-352.
5. D. K. Dougall, S. LaBrake, and G. H. Whitten(1983), *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 569-579.
6. D. K. Dougall, S. LaBrake, and G. H. Whitten(1983), *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 581-594.
7. Alical V. Quinlan(1986), *Biotechnology and Bioengineering*, **28**, 1455-1461.
8. J. Reinert and M. M. Yoeman(1982), *Plant cell and tissue culture*, 12-13, Springer-Verlag.
9. W. Halperin and D. H. Wetherell(1964), *Amer. Jour. Bot.*, **51**(3), 274-283.
10. Donald F. Wetherell(1969), *Plant Physiol.*, **44**, 1734-1737.
11. T. G. Cooper(1977), *The tools of biochemistry*, John Wiley & Sons Inc.
12. Miller, G. L.(1959), *Analytical Chem.*, **31**, 426.
13. Iran Freshney(1984), *Culture of animal cells*, a manual of basic technique, Alan R. Liss Inc., New York.

(Received November 21, 1989)