

## Airlift 배양기에서 Gas Recycle이 식물세포 성장 및 이차대사산물 생성에 미치는 영향

유 병 삼 · 변 상 요  
아주대학교 공과대학 생물공학과

### Effects of Gas Recycle on Plant Cell Growth and Secondary Metabolites Production in Airlift Fermentor

Byoung Sam Yoo and Sang Yo Byun

Department of Biotechnology, College of Engineering,  
Ajou University, Suwon 441-749, Korea

#### ABSTRACT

The productivity of alkaloid in the airlift fermentor operation was less than that of suspension cultures of *Eschscholtzia californica* cells in the shake flask. To overcome the productivity reduction, a gas recycle airlift fermentor was developed because the gas-stripping in normal airlift fermentor was believed to play a significant role for productivity reduction. The alkaloid content in the gas recycle system with *Eschscholtzia californica* suspension cells was 2.7 times higher than that of normal airlift fermentor. The productivity of alkaloids and CO<sub>2</sub> concentration were affected by the volume of gas reservoir in the gas recycle airlift fermentor.

#### 서 론

대부분의 식물세포 배양에 있어서 생물반응기의 적용은 실험실 규모의 삼각플라스크 배양과 매우 다른 배양 조건을 제공하게 되며 이로 인한 세포의 성장과 유용물질의 생산성 감소 및 생성물의 조성에도 변화를 보이는 경우가 많다(1, 2). 그 원인은 생물반응기와 삼각플라스크 배양조건의 차이를 검토함으로써 찾을 수 있는데, 그 중 대표적인 것으로 산소전달속도, 교반 그리고 유용한 기체 성분의 손실이 큰 차이점으로 관찰되었다. 그런데 생물반응기 중 bench top 규모의 airlift 배양기의 경우는 산소전달속도와 교반 정도가 삼각플라스크 배양과 큰 차이점이 없으므로, 작은 규모의 airlift 배양기에서 유용물

질 생산성 감소는 주로 기체 또는 휘발성물질의 손실이 주된 원인으로 지적되고 있다. 그리고 air sparging에 의해 손실될 수 있는 성분들 중 대표적인 것으로 식물세포 대사과정 중 발생하는 CO<sub>2</sub>와 식물호르몬인 ethylene 등이 꼽히고 있다. 이들 성분들은 식물세포 배양에서 세포성장 및 이차대사산물의 합성 경로에 지대한 영향을 준다고 알려져 왔다(3). 따라서 일부의 식물세포 배양 연구자들은 airlift 배양기에서 식물세포 배양시 발생하는 문제점들을 극복하기 위해 보통 air 대신 CO<sub>2</sub> 및 ethylene을 일정량씩 혼합한 기체를 aeration에 사용하였고 그 결과 세포성장 및 이차대사산물의 생산성 저하 현상을 어느 정도 극복할 수 있었다(4, 5, 6). 그러나 본 연구에서는 좀 더 정밀하고 경제적으로 이러

한 문제점을 극복할 수 있는 airlift 배양기 운전 조건을 개발하게 되었다. 즉, 배양기로부터 방출되는 기체 성분들을 재순환하여 사용하는 gas recycle 식 airlift 배양기를 개발하게 되었다. 일반적인 airlift 배양기와는 다르게 방출된 기체를 모으는 reservoir가 설치되어 있다는 점이 특징이다. 이러한 운전 조건을 개발하게 된 배경은 손실되는 유용성분의 기체를 손실됨없이 재사용하는 것과 식물세포 배양에는 다른 미생물 배양과는 다르게 산소요구량이 비교적 낮다는 점(7)이었다.

캘리포니아 양귀비(*Eschscholtzia californica*)는 이차대사산물인 sanguinarine, chelirubine과 macarpine 등 benzophenanthridine 알칼로이드를 생산하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 gas recycle식 airlift 배양기에 캘리포니아 양귀비(*Eschscholtzia californica*) 세포를 배양하여 이차대사산물인 알칼로이드의 생산성을 보통의 airlift fermentor의 배양결과와 비교 조사하였다. 또한 다양한 gas reservoir volume에 대하여 알칼로이드 생산성과 CO<sub>2</sub>의 농도가 어떻게 변하는지 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 세포배양 및 배지

본 연구에서는 1984년 캐나다에서 개발된 캘리포니아 양귀비(*Eschscholtzia californica*) 세포주를 이용하였다. 이 세포주(cell line)는 Prof. Henrik Pedersen (Rutgers University, NJ)로부터 기증 받았다. 이들은 5 μM 2, 4-D와 0.5 μM kinetin 그리고 탄소원으로 20g/l의 sucrose가 첨가된 B<sub>5</sub> 기본배지에 유지 배양하였다. 배지의 pH는 1N KOH를 사용하여 5.8로 조정하였다. 캘러스 유지용 고체배지에는 0.5%(w/v)의 한천을 첨가해 주었다.

### 세포성장 측정

배양된 세포를 약한 진공으로 여과(Whatman No. 1)하고 그 세포를 증류수로 세척 후 더 이상의 물이 떨어지지 않을 때까지 다시 여과하였다. 세척된 세포를 미리 무게를 측정된 알루미늄 용기를 이용해 가능한 빨리 저울로 무게를 측정하여 fresh cell weight(FCW)를 결정한 후, 60°C oven에서 항량에 도달할 때까지 건조시킨 후 dry cell weight(DCW)를 결정하였다.

### 알칼로이드 분석

세포와 배지를 여과(Whatman No. 1)하여 각각을 모아 세포내·외 알칼로이드 분석에 이용하였다. 세포내 알칼로이드의 농도는 fresh cell 1g을 취하여 HPLC용 methanol 10ml에 넣고 상온에서 15분 동안 sonication하여 추출하였다. 그리고 모든 추출물은 분석 전에 0.45 μm membrane filter로 여과 후 20 μl의 용액을 주입하였다. 알칼로이드의 HPLC 분석 조건은 변 등(8)의 조건 중 몇 가지를 변형하여 이용하였다. HPLC는 UV/Vis detector(Waters, 484)와 prefilter가 달려 있는 C-18 reverse phase column(μ-bondapak C-18, 125 Å, 10 μm, 3.9 × 300mm)이 장착되어 있으며, 이동상은 상온에서 acetonitrile과 물을 35 : 65로 유지하여 1.3ml/min로 흘러 주었다. 이때 물에는 1mM TBA와 pH를 2로 조정하기 위하여 인산을 넣어 주었다. 알칼로이드는 280nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 당 분석

자당(sucrose)과 자당의 가수분해 산물인 포도당(glucose)과 과당(fructose)을 동시에 분석하기 위해 HPLC를 이용하였다. HPLC는 refractive index(RI) detector (Showa Denko K. K., Tokyo, Japan)와 carbohydrate analysis column(3.9 × 300mm, Waters, U. S. A.)이 장착되어 있으며, 이동상은 상온에서 acetonitrile과 물을 80 : 20으로 유지하여 2.0ml/min으로 흘러 주었다. 또한 헬륨으로 이동상의 가스를 제거하였으며 모든 시료는 분석 전에 0.45 μm membrane filter로 여과하였다(8).

### CO<sub>2</sub> 분석

Airlift fermentor에서 배양 중 발생하는 CO<sub>2</sub>의 농도는 thermal conductivity detector를 이용한 gas chromatography(Schimadzu model GC-14A, Japan)로 측정하였다. 이때 사용한 column은 Porapak Q(60~80mesh)를 packing한 3m × 3mm stainless column을 이용하였다. Gas chromatography의 분석 조건은 injector와 detector 온도를 각각 40°C와 110°C로 하였고, oven 온도는 35°C에서 100°C까지 프로그램된 온도 변화를 사용하였다.

### Airlift 배양기에서 회분배양과 Gas Recycle 배양

본 연구에 사용된 배양기는 external loop airlift type이다(Fig. 1(a), (b)). 높이와 지름의 비율(H/D)은 10, riser와 downcomer의 단면적 비율(Ar/

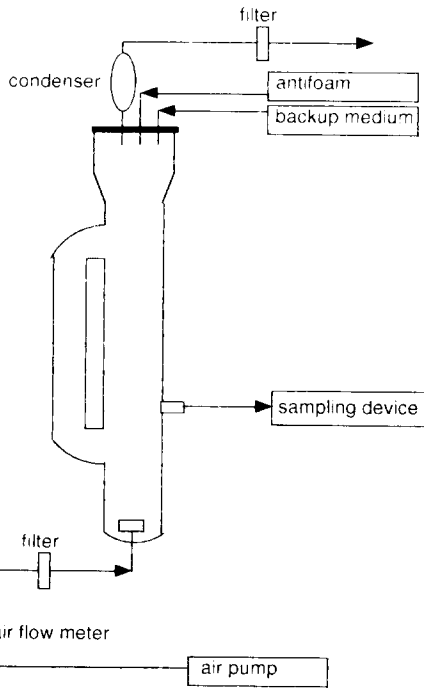


Fig 1(a). The configuration of external loop airlift fermentor system.

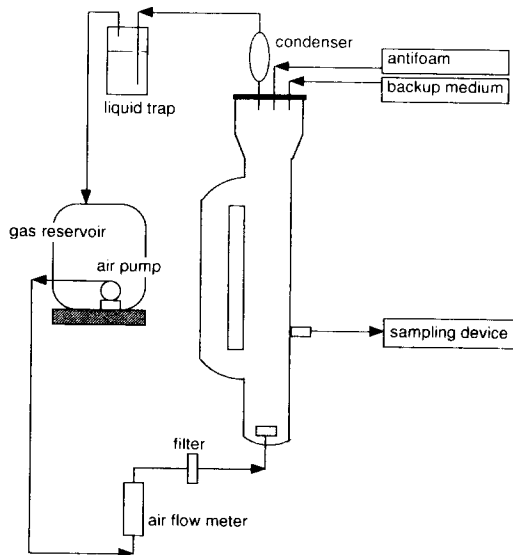


Fig 1(b). The configuration of external loop airlift fermentor with gas recycle system.

Ad)은 1.2, 그리고 재질은 3mm 두께의 Pyrex<sup>®</sup> 유리로 되어 있다. 운전부피(working volume)는 0.9ℓ 이고 운전동안 25℃ 항온 조건(25℃ 항온실에 설치)을 유지시켰다. 60ml/min으로 일정하게 aeration 하였고, 배양 중 발생하는 거품은 antifoam agent를 첨가하여 제거하였다. 총 배양기간은 21일로 하였다.

접종은 clean bench에서 하였으며 초기 접종량은 삼각플라스크 회분배양 실험과 같은 비율인 8.75% (w/v)로 결정하였다. Sampling은 배양기 아래쪽의 riser와 downcomer가 만나는 곳에 위치한 sampling device에 의해 약 20ml씩 취하였다. 이때 세포의 성장은 PCV 장치를 고안하여 측정하였다. PCV 측정 방법은 약 20ml의 배양 배지를 PCV device로 끌어 올린 후 clamp로 막고 30분 동안 세포를 중력에 의해 가라앉힌 후 전체 부피에 대한 가라앉은 세포의 부피비를 백분율(%)로 나타내었다.

한편 gas recycle 실험을 위한 airlift 배양기 시스템을 고안하였다. 이것은 Fig. 1(b)에서 나타난 것처럼 배양기 내에서 방출되는 gas를 손실됨이 없이 보관할 수 있는 reservoir가 하나 더 설치되어 있는 것이 특징이다. 완전히 밀폐 상태의 reservoir 안에 설치된 pump는 배양기에서 방출되어 들어온 기체를 다시 배양기 내로 순환시키는 작용을 한다. 또한 reservoir 상층부에 gas sampling 장치를 설치하여 배양 동안의 CO<sub>2</sub> 농도를 측정할 수 있게 하였다. 그리고 gas recycle 최적조건 실험을 위해서 reservoir는 용량을 3ℓ에서 30ℓ까지 1ℓ 단위로 가변화할 수 있도록 제작하였다.

## 결과 및 고찰

### Airlift 배양기에서의 Basic Kinetics

Airlift 배양기의 회분배양 결과 세포성장 및 당의 이용 그리고 알칼로이드 생성유형을 Fig. 2에 나타내었다. 세포성장 정도는 PCV device에 의해서 측정하였는데, 측정된 PCV 값을 일정 간격의 sampling에 의해 측정된 DCW 값과 correlation 한 결과 일정한 상수값인 0.125의 상관계수(DCW=상관계수×PCV)를 얻을 수 있어 비교적 정확한 DCW를 측정할 수 있었다. 그러나 이 장치로는 세포접종부터 성장 후 정지기까지는 PCV값에 의한 DCW값을 비교적 정확하게 측정할 수 있었지만 감소기에서는 정확하지 않았다. 측정된 결과, 배양 초기에 약간의 유도기가 존재하고, 배양 9일째까지 급격한 세포

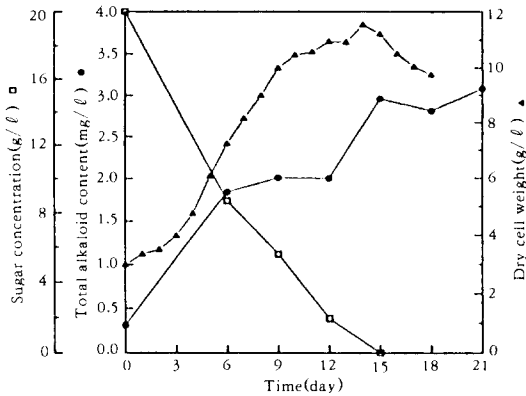


Fig 2. Time course behavior of cell growth, sugar consumption and alkaloid production in airlift fermentor operation.

성장이 진행되었으며, 그 이후는 정지기로 접어들었다. 이러한 결과는 삼각플라스크 배양에 비교하여 약 3일 정도 낮은 성장 유형이었으며 당은 배양 15일째에 모두 소모되었다. 그리고 알칼로이드 생성 유형은 삼각플라스크 배양의 경우와 마찬가지로 정지기로 접어들면서 생성량이 증가하기 시작하였다. 그런데 알칼로이드 함량은 삼각플라스크 배양 결과에 비교하여 약 1/5로 감소되었다(Fig. 3). 이러한 주된 원인은 배양 동안의 gas stripping에 의해 이산화탄소 및 휘발성의 유용 성분의 gas들이 손실되었기 때문으로 생각된다(3).

**Gas Recycle이 알칼로이드 생성에 미치는 영향 연구**

앞서 수행한 실험에서 air sparging에 의한 이산화탄소 및 휘발성 유용 성분의 손실이 알칼로이드의 생산성 감소에 주된 원인으로 판단되었다. 따라서 이러한 원인을 제거하여 생산성 감소를 막기 위한 방법으로 배양기로부터 방출되는 gas 및 유용성분을 재사용하는 방법을 고안하였다. 먼저 식물세포 배양 시 산소의 요구도가 그다지 크지않다는 점에 착안하여 gas reservoir를 설치하게 되었으며, reservoir의 용량을 최소한 4ℓ 이상으로 결정하였다.

Airlift 배양기 운전시 gas recycle이 알칼로이드 생성에 얼마나 영향을 미치는지 연구하기 위하여 8ℓ gas reservoir를 갖는 배양기 시스템에서 배양을 실시하였다. 그 결과 일반 airlift 배양기에서의 배양 결과보다 약 두 배의 알칼로이드 생산성 증가를 나타내었다(Fig. 4). Gas reservoir에서 이산화탄소의

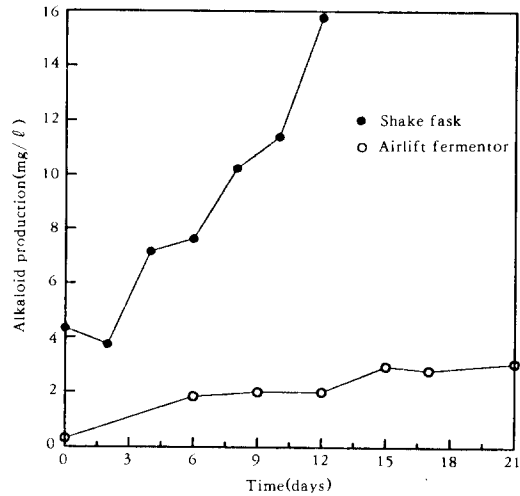


Fig 3. Time course behavior of alkaloid production in shake flask and airlift fermentor culture.

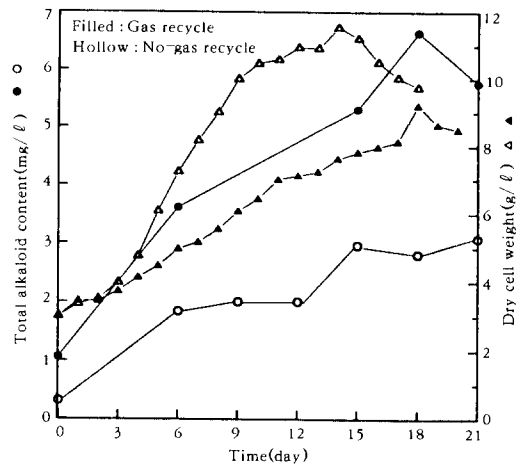


Fig 4. Effect of gas recycle on alkaloid production and cell growth in airlift fermentor operation.

농도 측정 결과 배양 초기인 2~3일째에 최대값인 6.16%(v/v)를 나타냈고 그 이후에는 계속 감소하는 경향을 보였다(Fig. 7). 여기에서 나타낸 이산화탄소 농도는 배양기 내로 aeration을 위해 사용되는 gas의 조성 중에 포함되어 있는 이산화탄소 농도이다. 삼각플라스크에서 식물세포 배양 동안 이산화탄소의 농도는 점차 증가하는 경향을 보이지만(9)

gas recycle을 갖는 배양기 시스템에서는 상반되는 경향을 나타내므로 이러한 차이점은 추후 좀더 연구할 필요성이 있었다. 한편, 세포성장물은 일반 airlift 배양기의 경우와 비교하여 볼 때 완만하게 나타났다(Fig. 4). 그리고 배양 동안 세포의 생육상태를 관찰한 결과, 일반 airlift 배양기 조건에서는 세포의 갈변화가 심했으나 gas recycle 조건의 경우에는 세포의 갈변화가 거의 없었고 아이보리 색조를 나타내는 좋은 상태가 배양 말기까지 유지되었다. 위와 같은 결과는 식물세포 배양에 있어서 CO<sub>2</sub>가 endogenous ethylene의 작용을 억제시킨다는 사실로 설명된다고 생각한다. 즉, 배양동안 발생하는 ethylene은 세포를 갈변화시키며 세포성장을 빠르게 진행시키는데(3) gas recycle 배양조건에서는 CO<sub>2</sub> 농도가 높은 수준으로 존재하므로 이와 같은 ethylene의 작용이 억제되기 때문이라 여겨진다.

**알칼로이드 생산성에 Gas Reservoir Volume이 미치는 영향**

Airlift 배양기 운전시 gas recycle 효과는 알칼로이드 생성뿐만 아니라 세포의 생육상태에도 좋은 결과를 미치는 것으로 나타났다. 따라서 위와 같은 결과를 바탕으로 gas reservoir의 용량을 변화시킬 때 알칼로이드 생산성에 어떠한 영향을 주는지 조사하였다. 앞선 연구에서 8ℓ 용량의 gas reservoir에 대한 효과를 조사했으므로 이번에는 그 전후의 크기로 4ℓ와 12ℓ 용량을 갖는 gas reservoir에 대한 영향을 각각 조사하게 되었다.

세포 성장에 있어서 약간의 차이는 있었지만 최대 세포량은 거의 비슷하여 DCW로 약 9g/ℓ를 나타내었다(Fig. 5). 그러나 알칼로이드 생성에 있어서는 8ℓ gas reservoir의 경우가 가장 좋은 결과를 나타내었다(Fig. 6). 이와 같은 결과로 본 연구에서는 8ℓ gas reservoir를 갖는 airlift 배양기 시스템이 알칼로이드 생산성에 가장 좋은 조건으로 나타났다.

또한 이러한 결과를 배양 동안의 CO<sub>2</sub> 농도 변화와 연관하였을 때, Fig. 7에서와 같이 4ℓ gas reservoir, 8ℓ gas reservoir 그리고 12ℓ gas reservoir의 경우 순으로 배양 동안의 CO<sub>2</sub>농도 변화 수준이 증가하였다. 식물세포 배양에서 세포의 대사활성은 gas phase의 조성고 상당히 밀접하게 연관되어 있다. 산화적 인산화반응에서 최종 전자수용체의 역할을 하는 산소의 경우 세포의 에너지 대사를 주도하며 한편으로는 oxygenase의 기질로 이용되어 여러 가지 이차대사 활성에 연관되어 있는 것으로 알려져

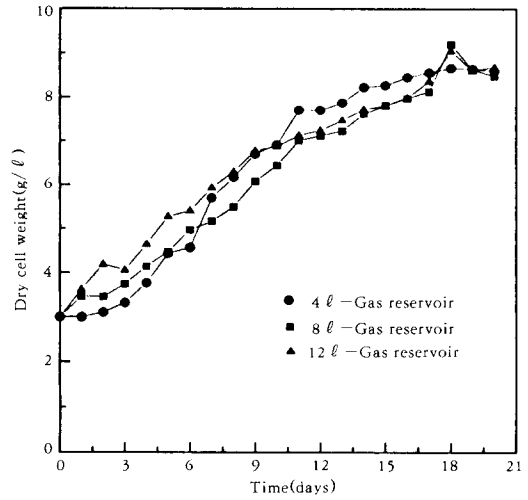


Fig 5. Cell growth of each airlift fermentor with gas recycle operation.

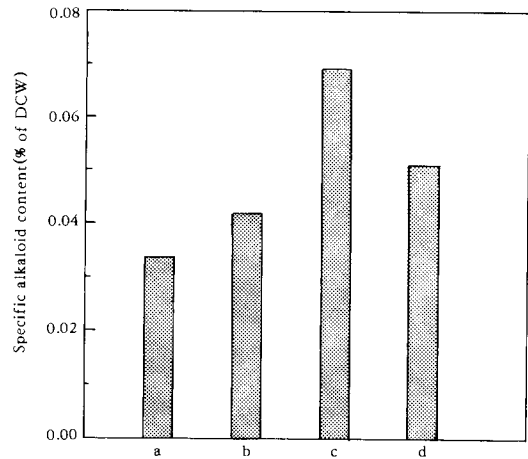


Fig 6. Comparative relation of each operations in terms of specific alkaloid content (a; control, b; 4ℓ-gas reservoir, c;8ℓ-gas reservoir, d; 12ℓ-gas reservoir).

있다(10). 그래서 세포의 생육 및 이차대사 활성에 저해가 없는 범위인 임계값 이상으로 공급해 주어야 한다. CO<sub>2</sub>의 경우 citric acid cycle에서 중간대사산물의 공급을 보충해 줄 수 있는 효소촉매 반응인 anaplerotic reaction에서 중요하게 사용되는데 만약 부족하게 되면 carbon limitation 현상이 발생되어

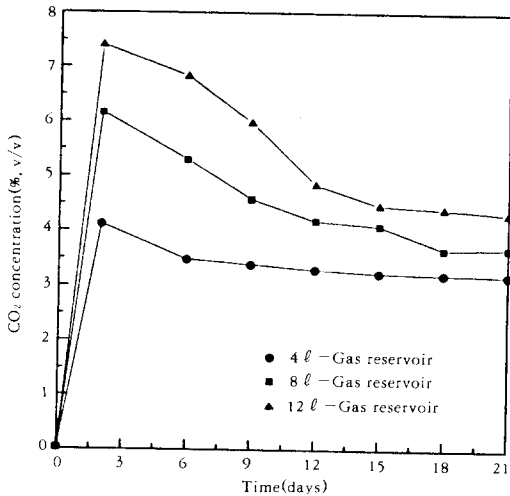


Fig 7. Time course behavior of CO<sub>2</sub> concentration in airlift fermentor with gas recycle each operations.

세포의 여러 대사과정이 원활하게 이루어질 수 없을 것이다(6). 휘발성 식물호르몬인 ethylene의 경우도 여러 가지 다른 식물호르몬과 상호작용하여 세포의 대사과정에 중요한 영향을 준다. 또한, 폐놀계 화합물의 생합성 과정을 유도하는데 이는 세포의 갈변화 및 그에 따른 노화현상을 유발시키게 된다(3). 그런데 이와 같은 gas phase들은 서로 상호작용하는 것으로 알려져 있다. 앞에서 언급했듯이 CO<sub>2</sub>는 ethylene과 길항작용을 하며 산소는 또한 ethylene의 생합성 과정에 중요한 인자로 작용하므로 산소가 부족하면 ethylene의 생합성 능력이 떨어진다고 알려져 있다(11). 이처럼 식물 세포배양에서 세포의 대사활성이 최적 조건을 유지하기 위해서는 균형있는 gas phase들의 조성이 필수적인 것이다. 즉 gas recycle식 airlift 배양기의 운전조건에서 최대의 알칼로이드 생산성을 나타내기 위한 조건으로 최적의 CO<sub>2</sub> 농도 변화 수준이 밀접하게 관련되어 있는 것으로 생각된다. 이러한 경우에 CO<sub>2</sub>는 세포의 이차대사 활성을 위해 다른 gas phase들과 균형 있는 조성으로 존재하는 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 캘리포니아 양귀비(*Eschscholtzia*

*californica*) 세포를 airlift 배양기에 적용 배양할 때 shake flask 배양보다 benzophenanthridine alkaloid의 생산성이 감소하는 원인을 찾고 이를 극복하기 위한 실험을 수행하였다. Alkaloid 생산성 감소의 주된 원인은 air sparging에 의해 CO<sub>2</sub> 및 ethylene과 같은 유용 성분의 gas가 stripping 되는 것으로 나타났으며 이 stripping 되는 gas를 다시 공급하는 gas recycle식 airlift 배양기를 개발하였다. 이 배양기에 캘리포니아 양귀비 세포를 배양한 결과 alkaloid 함량이 일반 airlift 배양기 운전 결과보다 약 2.7배 증가하였다. 또한 이 배양기의 gas reservoir의 용량 변화에 따라 alkaloid의 생산성 및 이산화탄소의 농도가 영향을 받음을 확인하였다.

## 참고문헌

1. M. Breuling, A. W. Alfermann and E. Reinhard(1985), *Plant Cell Reports*, **4**, 220.
2. 변상요(1991), *생물화공*, **5**(1), 8.
3. Y. Kobayashi, H. Fukui and M. Tabata (1991), *Plant Cell Reports*, **9**, 496.
4. P. Hegarty, N. Smart, A. Scragg and M. Fowler(1986), *J. of Experimental Botany*, **37**, 1911.
5. D. I. Kim, H. Pedersen and C. K. Chin(1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 4.
6. Michael W. Fowler(1987), *Plant Tissue and Cell Culture*(C. E. Green et al., eds), **459**, Alan R. Liss Inc., New York.
7. J. Ducos and A. Pareilleux(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 101.
8. S. Y. Byun, H. Pedersen and C. K. Chin (1990), *Phytochemistry*, **29**(10), 3135.
9. H. J. G. Ten Hoopen, W. M. Van Gulik and J. J. Meijer(1990), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, 673. Kluwer Academic Publishers, London.
10. G. Payne, V. Bringi, C. Prince, M. Shuler eds., *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid System*, **123**, Hanser Publishers, New York.
11. Salisbury & Ross(1985), *Plant Physiology*, **339**, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California.