

## 탱크 교반형 생물반응기의 scale-up이 *Eschscholtzia californica* 세포성장 및 알칼로이드 생성에 미치는 영향

유 병 삼 · † 변 상 요

아주대학교 공과대학 화학·생물공학부  
(접수 : 1998. 9. 23., 게재승인 : 1998. 12. 4.)

### Effects of Stirred Tank Bioreactor Scale-up on Cell Growth and Alkaloids Production in Cell Cultures of *Eschscholtzia californica*

Byoung Sam Yoo and Sang Yo Byun†

School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea  
(Received : 1998. 9. 23., Accepted : 1998. 12. 4.)

Studies were made to investigate effects of the scale-up of stirred tank bioreactors on cell growth and alkaloids production for suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. In the 1.5 L STR, cell lysis was observed at 110 rpm or higher agitation speed. The agitation speed of 30 L STR was 43.7 rpm to maintain the same shear stress developed in 1.5 L STR of 100 rpm. As a result of scale-up from 1.5 L to 30 L STR, the specific growth rate was decreased from 0.12 to 0.07 day<sup>-1</sup>. The alkaloids productivity was also decreased from 0.24 to 0.14 mg/L-day. Changes of mixing performance and oxygen transfer were studied to explain the decreases of cell growth and alkaloids production. Decreased oxygen transfer rate coefficient(K<sub>La</sub>) and increased mixing time by the scale-up was observed at various aeration rates.

Key Words : scale-up, stirred tank bioreactor, K<sub>La</sub>, mixing time, shear, *Eschscholtzia californica*

#### 시 론

대부분의 식물세포 배양에 있어서 생물반응기의 적용은 실험실 규모의 삼각플라스크 배양과 매우 다른 배양 환경을 제공하게 되며 이로 인한 세포의 성장 저하와 유용물질의 생산성 감소 및 생성물의 조성에도 변화를 보이는 경우가 많다(1,2). 그 원인들은 생물반응기와 삼각플라스크 배양조건의 차이를 검토함으로써 찾을 수 있는데, 그 중 대표적인 것으로 산소전달속도(oxygen transfer rate), 교반(mixing), 전단응력(shear) 그리고 유용한 기체 성분의 손실 등을 예로 들 수 있다. 그런데 실험실 규모의 생물반응기의 경우 산소전달속도, 교반 그리고 전단응력에 있어서 삼각 플라스크 배양과 별로 큰 차이를 나타내지 않았으나(3), 산업화를 위한 첫 단계인 중간규모(pilot-scale)의 생물반응기로 scale-up 하는 과정에서 위의 세 가지 인자들은 현격한 차이를 나타내어 결국에는 배양의 성공 여부를 판가름하는 변수가 되기도 한다.

식물세포 배양에 적용되어 왔던 생물반응기에는 그 운전방식

에 따라 공기부양식 생물반응기(airlift bioreactor)와 탱크 교반형 생물반응기(stirred tank bioreactor, STR)로 크게 분류할 수 있다 그리고 식물세포 배양측면에서 볼 때, 그 종류에 따라 서로 장단점이 있으며 우리의 목표에 적합한 생물반응기를 선택하는 것이 바람직하다. 전단응력에 매우 민감한 세포주이며 그 생산물이 고부가가치성일 때, 산업화를 위해서는 낮은 전단응력 환경을 제공하는 공기 부양식 생물반응기를 이용하는 것이 유리할 것이다. 그러나 최근 생물반응기를 이용한 식물세포 배양 연구들은 교밀도 세포 배양방법을 선호하고 있는데, 이는 우리가 인고자하는 유용물질들의 농도를 높은 수준으로 유지하여 이들의 분리정제를 보다 경제적으로 수행하기 위해서이다. 공기부양식 생물반응기에서는 약 30g dry weight/L의 세포 밀도까지는 교반과 공기공급(aeration)이 가능하지만 그 이상의 세포밀도에서는 불충분한 효과가 나타나므로(4) 위의 목적을 위해서는 탱크 교반형 생물반응기의 적용이 불가피 할 것이다. 하지만 식물세포는 미생물과는 생리학적으로 다른 특성들을 지니고 있으므로 기존의 미생물 배양을 위한 탱크 교반형 생물반응기를 그대로 사용하기가 어렵다. 즉 충분한 교반효율을 위해 요구되는 고속의 교반속도(impeller speed)로 말미암아 큰 전단응력 환경이 조성되고 전단응력에 민감한 식물세포는 세포의 이차대사 및 생존능이 저하되게 되는데, 이것은 탱크교반형 생물반응기를 식물세포 배양에 적용할 때 큰 단점으로 작용하고 있다. 또한 전단응력을 줄이기 위해 단순히 교반 속도를 낮출 경우 동력에 비해

† Corresponding Author : School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea  
Tel : 0331-219-2451, Fax : 0331-214-8918  
e-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

산소전달을 제대로 못할 뿐 아니라 미생물에 비해 식물세포는 훨씬 더 크고 무거우며 응집(agggregation)하여 자라기 때문에 침전현상이 발생된다 이와 같은 생물반응기 내부의 불충분한 교반효율로 정체지역(dead zone)이 발생할 경우 배양이 다상화(heterogeneous)되어 제어 불가능하게 된다. 이러한 단점을 극복하기 위해서는 전단응력을 최소화하면서 산소전달속도와 교반 효율에 유리한 새로운 교반기 형태 및 반응기 시스템의 개발이 요구되며 이와 아울러 산소전달속도, 교반 그리고 전단응력의 상관관계에 대한 최적화 연구도 필요할 것이다.

본 연구에서는 탱크 교반형 생물반응기(STR)에서 *Eschscholtzia californica* 현탁세포를 대상으로 하여 1.5리터에서 30리터로의 scale-up을 수행하고, 이때 발생하는 세포성장 및 알칼로이드의 생산성 변화 그리고 그 원인들을 조사함과 동시에 부정적인 결과가 발생할 경우 이를 극복하는 것을 그 목적으로 하였다 대부분의 문헌에서 식물세포는 현탁배양시 전단응력에 상당히 민감하다고 보고되어 왔으나, 어떤 문헌에서는 세포주에 따라 전단응력에 저항성이 있는 경우도 있다고 보고하고 있다. 예를 들어 *Catharanthus roseus* 세포주는 250에서부터 1000 rpm 까지의 교반 속도에서도 전단응력에 저항성을 나타낸다는 실험결과가 보고되었다(5). 하지만 전단응력에 저항성이 있는 세포주라 하더라도 산업화 과정에서 요구되는 수습에서 수백톤 용량의 생물반응기를 운전할 경우 이러한 실험 결과가 그대로 적용이 될지는 아직 의문이다. 본 연구에서는 산업적 규모의 scale-up 과정을 모델로 하며, 이때 수반될 수 있는 문제점들을 조사하고 그 해결책을 찾는 것을 목적으로 하였다. 그래서 전단응력에 민감한 *E. californica* 현탁세포를 실험에 사용하였으며, 전단응력을 기준으로 한 scale-up 과정에서 산소전달속도 및 교반 효율의 변화를 각각 산소전달계수(oxygen transfer rate coefficient,  $K_La$ )와 혼합시간(mixing time,  $t_m$ )을 측정함으로써 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 세포배양 및 배지

본 연구에서는 1984년 캐나다에서 개발된 *Eschscholtzia californica* 세포를 이용하였다. 이 세포는 Henrik Pedersen(Rutgers University, NJ) 교수로부터 기증 받았다. 이들은 5  $\mu$ M 2,4-D와 0.5  $\mu$ M kinetin 그리고 탄소원으로 0.2%(w/v)의 자당(sucrose)이 첨가된 B<sub>3</sub> 기본배지에 유지 배양하였다. 배지의 pH는 1 N KOH를 사용하여 5.8로 조정하였다. 켈러스 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 세포

내·외 알칼로이드 분석에 이용하였다. 세포내 알칼로이드의 농도는 fresh cell 1 g을 취하여 HPLC용 methanol 10 mL에 넣고 상온에서 15분 동안 초음파 분쇄하여 추출하였다. 그리고 모든 추출물은 분석 전에 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과 후 20  $\mu$ L의 용액을 주입하였다. 알칼로이드의 HPLC 분석 조건은 변등(6)의 조건 중 몇 가지를 변형하여 이용하였다. HPLC는 UV/Vis detector(Waters, 484)와 pre-filter가 달려 있는 C-18 reverse phase column( $\mu$ -bondapak C-18, 125Å, 10  $\mu$ m, 3.9  $\times$  300 mm)이 장착되어 있으며, 이동상은 상온에서 acetonitrile과 물을 35:65로 유지하여 13 mL/min로 흘려주었다. 이때 물에는 1 mM TBA와 pH를 2로 조정하기 위하여 인산을 넣어 주었다. 알칼로이드는 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 당 분석

자당(sucrose)과 자당의 가수분해 산물인 과당(fructose)과 포도당(glucose)을 동시에 분석하기 위해 HPLC를 이용하였다. HPLC는 refractive index(RI) detector (Showa Denko K. K., Tokyo, Japan)와 carbohydrate analysis column(3.9  $\times$  300 mm, Waters, U.S.A.)이 장착되어 있으며, 이동상은 상온에서 acetonitrile과 물을 80:20으로 유지하여 2.0 mL/min으로 흘려주었다. 또한 모든 시료는 분석 전에 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하였다(6).

### 세포 생존율(cell viability) 측정

TTC(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) 환원에 의한 세포 생존을 측정방법(7)을 이용하였다. fresh cell weight 30 mg에 TTC 용액 1 mL을 첨가하여 혼합 후, 28°C 암 조건에서 6시간 동안 반응시킨다. 혼합액은 원심분리 후 상등액은 제거되고, 침전물(pellet)에는 95% ethanol 0.5 mL 첨가하여 세포안에 형성된 TTC의 환원 물질이 완전히 추출되도록 초음파 분쇄한다. 혼합액은 원심분리 후 상등액을 취하여 485 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생존율은 세포가 가장 왕성할 때의 흡광도에 대한 각각의 교반속도에서 샘플링한 세포의 흡광도 비 값으로 나타내었다.

### 산소전달계수(oxygen transfer rate coefficient, $K_La$ ) 및 혼합시간(mixing time, $t_m$ ) 측정

STR에서 규모의 증가에 따른 산소 전달능력을 조사하기 위해 dynamic method(8)를 이용하여 산소 전달계수를 측정하였고, 교반의 정도를 조사하기 위해서는 pH response method(8)를 이용하여 혼합시간을 측정하였다. 혼합시간 측정 시 신뢰도는 95%로 하였다.

### 탱크 교반형 생물반응기의 운전

교필도 식물세포 현탁배양의 scale-up 연구를 위해 1.5리터와 30리터 규모의 STR 생물반응기를 사용하였다(Figure 1). 또한 30리터 규모의 생물반응기를 운전하기 위한 접종(inoculation)용 생물반응기로는 3.6리터 공기부양식 생물반응기를 사용하였다. 1.5리터 STR은 EYELA사(MBF250, Japan)에서 식물세포 배양용으로 제작한 것을 구입하여 실험에 사용하였다. 초기 접종량은 20%(Packed cell volume)로 접종하였고, 교반기 종류는 식물세포 배양에 적합한 변형된 flat blade 교반기를 사용하였으

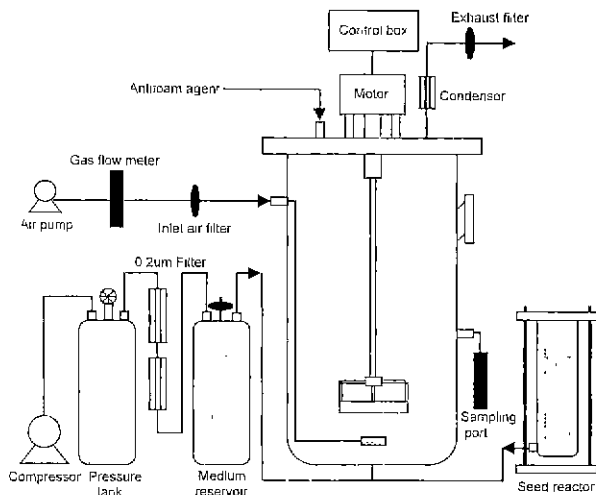


Figure 1 The configuration of stirred tank bioreactor system.

며, 교반 속도는 전단응력의 영향에 따른 세포 생존율 실험결과 결정된 100 rpm으로 하였다. 접종용 생물반응기로는 자체 제작한 3.6리터 규모의 공기부양식 생물반응기(Internal type)를 사용하였다 초기 접종량은 30%(Packed cell volume)로 접종하였다 30리터 STR은 정확한 scale-up 연구를 위해 1.5리터 STR과 같은 형식으로 자체 제작하여 사용하였다. 초기 접종량은 18%(Packed cell volume)로 접종하였다. 교반 속도는 전단응력을 기준으로 한 scale-up 과정에서 사용되는 Kolmogoroff's length scale 계산식에 1.5리터 STR 운전 조건의 교반 속도를 적용하여 계산된 43.74 rpm으로 결정하였다. 사용된 배지는 cold filtration(0.2 μm) 방법으로 준비하였다 위의 모든 생물반응기 운전에서 공통적으로 온도는 26℃, 암조건, 그리고 0.06 vvm의 공기공급 속도를 유지하였고, 거품(foam)의 제거를 위해 소포제(silicone, 30% emulsion)를 사용하였다.

결과 및 고찰

전단응력의 영향 및 scale-up 기준

1.5리터 STR 생물반응기에서 *E. californica* 세포 배양에 적합한 교반 속도를 결정하기 위한 실험을 하였다 양귀비 세포는 전단응력에 민감하므로 교반 속도의 변화에 따른 세포 생존율을 측정하여 최적 값을 찾고자 하였다. 회분배양 조건에서 초기 50 rpm부터 시작하여 6시간 간격으로 20 rpm 씩 증가시키면서 세포 생존율을 측정하였고, rpm 변경은 2-3회 샘플링 후 세포 생육도가 일정한 가를 확인 후 결정하였다. 세포 생존율이 급격하게 감소하여 더 이상 세포생장이 일어나지 못하는 rpm 값을 마지막 조건으로 하였다 Figure 2에서와 같이 rpm이 50에서 90 까지는 세포 생존율이 서서히 증가하다가 90에서 110 사이에서 최고치를 나타내었고, 110 rpm 이후 급격하게 떨어질음을 알 수 있었는데 이는 전단응력에 의한 세포 파쇄(lysis) 결과로 여겨진다. 50에서 90 rpm 사이에서 세포 생존율이 서서히 증가하는 것은 낮은 교반 속도로 인하여 교반 및 산소전달의 부진 때문으로 추측된다. 이 실험결과 110 rpm 이하의 교반속도가 1.5리터 STR 생물 반응기에서 *E. californica* 세포배양에 적당한 조건임을 알 수 있었고 적정값은 100 rpm으로 설정하여 추후 실험에

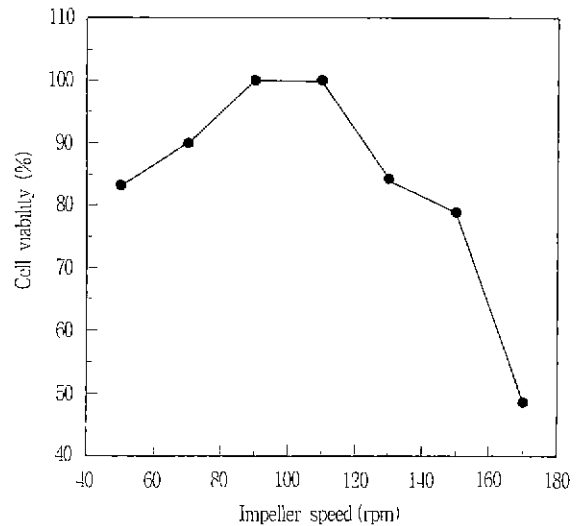


Figure 2. Effects of impeller speed on cell viability in stirred tank bioreactor.

적용하였다.

탱크 교반형 생물 반응기에서 식물 세포에 대한 전단응력은 거의 대부분이 교반기의 기계적인 교반에 의해 발생하는 소용돌이(eddy)에 의해 유발된다. 그리고 하나의 식물세포 크기는 일반적으로 지름이 수십에서 수백 μm인데, 용집되는 현상이 일반적이므로 소용돌이 크기가 이보다 작아질 경우 전단응력을 받게 된다. 따라서 그 정도가 심해지면 식물세포는 파쇄 현상을 일으키고 더 이상 성장할 수 없게 된다. 이러한 현상에 근거하여 본 연구에서는 전단응력에 관계된 Kolmogoroff's length scale(λ, m) 계산식(9)에 1.5리터 STR의 교반 속도를 적용하여 30리터 STR의 교반 속도를 결정하였다. 즉, 1.5리터 STR에서 최적조건인 교반 속도는 100 rpm 이었고, 이때의 λ 값을 아래 (1), (2)식을 이용하여 계산한 결과 193 μm 이었다. 따라서 λ값이 193 μm가 되기 위한 30리터 STR에서의 교반 속도는 43.7 rpm으로 계산되었으며 이는 추후 실험에 적용하였다. 이와 같이 전단응력을 scale-up 기준으로 적용한 이유는 *E. californica*는 현탁배양시 그 크기가 다른 식물세포에 비하여 크고 형태도 구형보다 막대형으로 많이 존재하는 등 세포가 전단응력에 민감하고 따라서 산소전달 속도나 교반과 같은 인자들 보다 전단응력의 영향이 scale-up 과정에서 주요 인자(critical factor)가 되기 때문이다.

$$\lambda = \left( \frac{\nu_l^3}{\epsilon_e} \right)^{0.25} \tag{1}$$

$$\epsilon_e = \frac{P_s}{\rho_l V_l} = \frac{N_p N^3 D^5}{V_l} \tag{2}$$

여기서,

ε<sub>e</sub> : local power dissipation per unit mass (W · Kg<sup>-1</sup>)

ν<sub>l</sub> : kinematic viscosity ( m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> )

P<sub>s</sub> : stirred power consumption ( W )

ρ<sub>l</sub> : liquid phase specific density ( Kg m<sup>-3</sup> )

$V_l$  : volume of the liquid phase (  $m^3$  )  
 $N_p$  : stirrer power number  
 $N$  : stirrer speed (  $s^{-1}$  )  
 $D$  : stirrer diameter ( m )

**Scale-up이 세포성장 및 알칼로이드 생산에 미치는 영향**

선정된 1.5리터와 30리터 규모의 탱크 교반형 생물반응기 운전 조건에서 회분배양 실험을 수행하여 세포성장 및 알칼로이드 생성 그리고 당의 소모 유형을 조사하였다. Figure 3에서와 같이 1.5리터 STR 생물반응기에서 *E. californica* 세포 성장을 보면 초기 접종농도인 2.96 g/L (DCW)로 배양을 시작하여 유도기 없이 168시간까지 급격한 세포성장이 진행되었고, 240시간일 때 8.92 g/L 까지 증가하였다. 이후에는 감소기로 접어들었다. 30리터 STR의 경우에는 1.5리터 STR에서와는 달리 초기 접종량 1.81 g/L에서 배양을 시작하여 144시간까지 긴 유도기를 보였으며 대수증식기도 480시간까지 길게 연장되었고, 이때에 7.13 g/L의 최대 세포농도를 나타내었다. 좀더 정확하게 세포성장을 비교하기 위해 비 성장속도(specific growth rate)와 doubling time을 계산해보았다. 그 결과 1.5리터 STR의 경우 비 성장속도는  $0.12 \text{ day}^{-1}$ , 복제시간은 5.78 day 이었고, 30리터 STR의 경우는 각각  $0.07 \text{ day}^{-1}$  와 9.9 day 이었다. 이와 같이 scale-up 결과 세포성장이 매우 감소하는 결과를 얻을 수 있었다. 배양시간에 따른 당 소모 변화에서(Figure 4) 탄소원으로 사용된 자당은 1.5리터와 30리터 STR에서 거의 같은 속도로 배양초기에 포도당과 과당으로 빠르게 가수분해되는 것을 관찰하였다. 또한, 이들 두 경우에서 모두 배양기간동안 과당을 선호하는 것으로 나타났다. 그러나 1.5리터 STR에서 가수분해된 당은 30리터 STR에서보다 더 빨리 소모되었다. 이러한 결과는 세포 성장률의 큰 차이 때문이다.

Scale-up에 따른 알칼로이드 생산 유형을 보면(Figure 3) 1.5리터 STR의 경우 배양말기인 264시간에 2.7 mg/L의 최대값을 나타냈고, 30리터 STR에서는 알칼로이드의 생성이 서서히 증가하다가 배양 후 576시간에 3.4 mg/L의 최대값을 나타내었다 이들 최대값 모두 삼각플라스크 배양 결과(3)인 15.8 mg/L 보다는 매우 낮은 값이다. 이것을 생산성(productivity)으로 비교

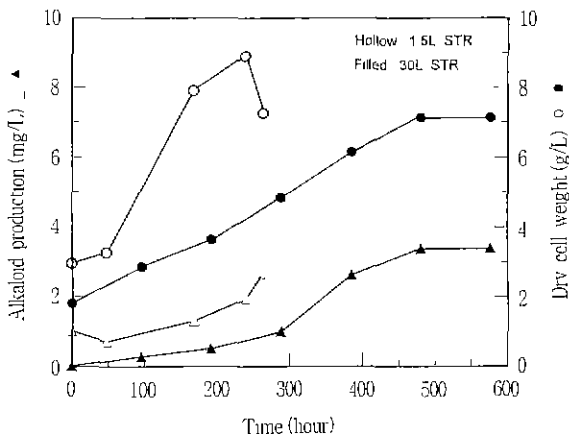


Figure 3. Changes of cell growth and alkaloids production by the scale-up in stirred tank bioreactor. Dry cell weight: (○) 1.5 L STR, (●) 30 L STR ; Alkaloid production: (△) 1.5 L STR, (▲) 30 L STR

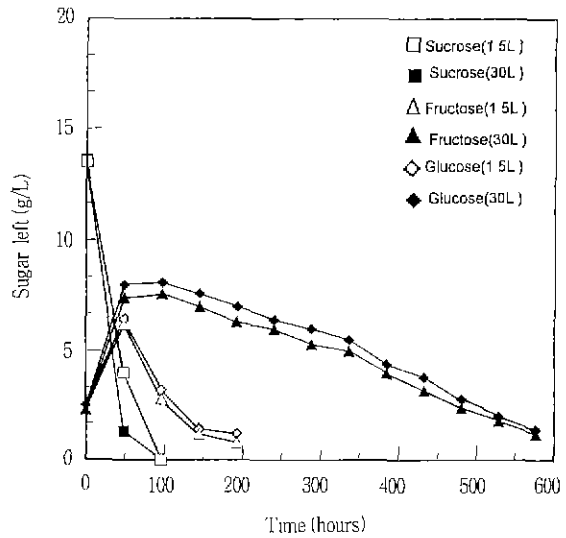


Figure 4. Changes of sugar consumption by the scale-up in stirred tank bioreactor. Sucrose: (□) 1.5 L STR, (■) 30 L STR ; Fructose: (△) 1.5 L STR, (▲) 30 L STR ; Glucose: (◇) 1.5 L STR, (◆) 30 L STR

하면, 1.5 리터 STR의 경우 0.24 mg/L-day, 30리터의 경우 0.14 mg/L-day로서 규모가 증가할수록 감소하는 결과를 보인다. 그런데 삼각플라스크 배양시 생산성이 1.32 mg/L-day임을 비교할 때 생물반응기 적용 및 이의 scale-up 과정에서 알칼로이드 생산 감소폭은 매우 크며 이러한 결과는 식물세포 배양에 의한 유용물질 생산의 산입화 과정에서 극복해야하는 중요한 과제이기도 하다 한편 1.5리터 보다 30리터 STR에서 초기 알칼로이드 농도가 상대적으로 매우 낮았다. 이러한 차이는 1.5리터 STR의 경우 접종구로서 삼각플라스크에서 배양된 세포들을 직접 사용한 반면, 30리터 STR의 경우 접종구는 3.6리터 공기부양식 생물반응기에서 일차 배양되어 알칼로이드 생산 능력이 이미 저하된 세포를 사용했기 때문으로 생각된다. 이와 같은 생산성 감소의 원인은 STR이나 공기부양식 생물반응기에서의 배양 조건이 삼각플라스크의 배양조건과 매우 다른 미세배양환경 (microenvironment)을 제공하기 때문인 것으로 여겨지고 있으며, 주로 교반, 산소전달 및 전단응력의 변화나 차이에 더불어 유용개성분의 손실등이 주된 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(2,3).

**Scale-up에 따른 산소전달속도 및 교반효율의 변화**

전단응력을 주요 인자로 한 scale-up 연구를 위해 첫 번째로 작은 규모인 1.5리터 STR에서 교반 속도에 따른 세포 생존율을 측정하여 최적 교반 속도를 결정하였고, 그 다음으로Kolmogoroff's length scale 계산식을 적용하여 큰 규모인 30리터 STR의 교반 속도를 결정하였다. 생물반응기의 scale-up 결과 세포성장속도와 알칼로이드 생산이 감소하는 결과를 나타내었는데, 이러한 결과에 대한 원인 분석은 산소전달속도 및 교반 효율을 비교함으로써 가능하였다. 따라서 이들 두 인자의 정확한 비교실험을 위해 산소전달계수( $K_{La}$ )와 혼합시간을 측정하였다. Figure 5는 15리터로 부터 30리터 STR로 scale-up 하였을 때  $K_{La}$  값의 변화를 나타내고 있다. 공기공급 속도에 따라 차이는

있지만 scale-up을 함으로써  $K_{La}$  값의 현격한 감소를 알 수 있었다. 한편 공기공급 속도에 따른  $K_{La}$  값의 변화를 보면 두 경우 모두 0.2 vvm 까지는  $K_{La}$  값이 증가하다가 그 이상에서는 조금씩 감소하는 경향을 보이는데 이는 공기공급 속도가 어느 정도의 한계를 넘으면 공기방울(air bubble)의 합체현상에 의해 그 크기가 증가하고, 따라서  $K_{La}$  값의 총괄산소전달 면적을 나타내는 a 항이 감소하여 결국  $K_{La}$  값이 감소된다고 생각된다. 또한 Figure 6은 Figure 5와 같이 scale-up을 하였을 때 교반 효율의 변화 즉, 혼합시간의 변화를 나타낸다. 교반 효율의 감소도 공기공급 속도에 따라 차이는 있지만 scale-up을 함으로써 혼합시간의 현격한 증가를 통하여 알 수 있었다. 15리터 또는 30리터 STR 두 경우 모두 혼합시간은 공기공급 속도의 변화에 심하게 영향을 받지 않는 것으로 나타났는데, 이러한 결과는 탱크 교반형 생물반응기에서의 교반효율이 공기 부양식 생물반응

기 보다 공기공급 속도에 덜 의존된다는 F. Leckie와 A. H. Scragg의 보고와 일치하는 결과이다(10).

이렇게 scale-up 과정에서 산소전달속도와 교반 효율의 감소는 배양의 세포 성장과 알칼로이드 생산성의 감소라는 결과로 이어졌다고 볼 수 있다. 그런데 본 연구에서 산소전달속도와 교반 효율의 저하 현상에 대한 주된 원인은 전단응력을 주요 인자로 한 scale-up을 수행하였기 때문이며, 이것은 scale-up 과정에서 전단응력 인자는 산소전달 및 교반이라는 인자들과 서로 양립되기 어렵다는 이론을 증명하는 것이다. 이와 같은 원인으로 30리터 STR 운전동안 전단응력에 의한 세포의 파쇄 현상은 나타나지 않았지만 미흡한 산소전달 및 교반 효율에 의해서 긴 배양기간과 낮은 세포 성장률의 결과를 초래한 것으로 생각된다. 한편 30리터 STR의 경우 배양 말기에 접어들면서 거품의 발생이 증가하고 수면에 인접한 교반기 축 부분을 중심으로 벽면성장(wall growth)을 시작하였다 또한 그 크기가 증가하면서 일부는 배양액 내로 떨어져 배양의 불 균일성을 초래하였고, 일부는 건조되어 죽은 세포덩이로 전환되었는데, 이것은 scale-up 과정에서 간과해서는 안될 문제의 대상이 되고 있다 앞으로 전개될 식물세포 배양의 산업화를 위한 생물반응기 scale-up 연구에서는 이번 실험결과를 토대로 산소전달, 교반 그리고 전단응력이라는 세 가지 인자들의 상관관계에 대한 보다 효율적인 최적화 방법과 이를 위한 배양기 시스템의 개발이 요구되며, 동시에 이차대사산물 생산성 감소를 해결하기 위한 연구도 필요하리라 생각된다.

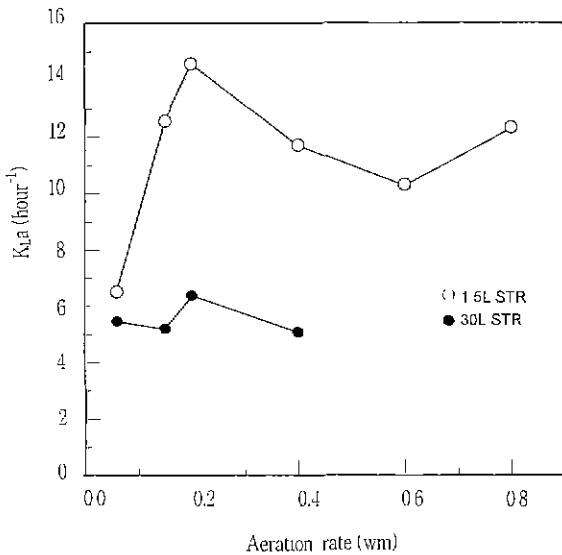


Figure 5. Effects of scale-up on  $K_{La}$  at various aeration rate in stirred tank bioreactor. (○) 1.5 L STR, (●) 30 L STR

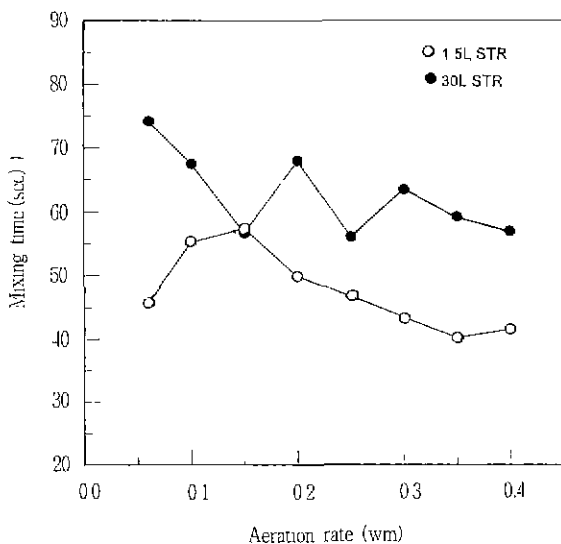


Figure 6. Effects of scale-up on mixing time at various aeration rate in stirred tank bioreactor. (○) 1.5 L STR, (●) 30 L STR

요약

탱크 교반형 생물반응기(STR)에서 *Eschscholtzia californica* 현탁배양의 scale-up 과정에서 발생하는 세포성장 및 알칼로이드 생성 변화를 조사하고, 이러한 변화의 원인에 대한 정량적인 연구를 하였다. 15리터 STR에서 교반기 회전 속도 변화에 따른 세포 생존을 측정실험 결과 110 rpm 이상에서 전단응력에 의한 세포 파쇄 현상이 발생하였다. 같은 전단응력을 기준으로 한 scale-up 과정에서 1.5 리터 STR에서 100 rpm 교반에 해당하는 30리터 STR에서의 교반 속도는 43.7 rpm 이었다. 15리터 STR에서 30리터 STR로 scale-up 한 결과 비성장속도(specific growth rate)는 각각 0.12 와 0.07 day<sup>-1</sup>로서 세포생장의 감소 현상이 나타났다. 알칼로이드 생산성도 1.5 리터 STR의 경우 0.24 mg/L-day, 30 리터의 경우 0.14 mg/L-day로서 규모가 증가할수록 감소하는 결과를 보였다. 세포성장 및 생산성 감소 원인이므로서 교반 효율 및 산소전달속도를 조사하였다. 공기공급 속도에 따라 차이는 있지만 scale-up을 함으로써  $K_{La}$  값의 현격한 감소에 의한 산소전달의 감소와 혼합시간의 증가에 의한 교반 효율의 감소를 측정하였다.

감사

본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원(과제번호 : 95-0502-03-01-3)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Breuling, M., A. W. Alfermann, and E. Reinhard (1985),

- Cultivation of cell cultures of *Berberis wilsonae* in 20-l airlift bioreactors, *Plant Cell Report*, 4, 220-223
2. 변상요 (1991), 식물세포 배양에 의한 유용물질 생산을 위한 생물반응기, *생물화학*, 5(1) 8-14
  3. 유명삼, 변상요 (1994), Airlift 배양기에서 Gas Recycle이 식물세포 성장 및 이차대사산물 생성에 미치는 영향, *한국 생물공학회지*, 9(2), 180-185
  4. Fowler, M. W. (1987), Process system and approaches for large scale plant cell culture (C E Green et al., eds) pp. 459-471. Alan R Liss Inc., New York
  5. Ten Hoopen, H. J. G., W. M. Van Gulik, and J. J. Meijer (1990), Progress in plant cellular and molecular biology, pp. 673-681, Kluwer Academic Publishers, London
  6. Byun, S. Y., H. Pederson, and C. K. Chin (1990), Two-phase culture for the enhanced production of benzophenanthridine alkaloids in cell suspensions of *Eschscholtzia Californica*, *Phytochemistry*, 29(10), 3135-3139.
  7. Pollard, J. W. and J. M. Walker (1990), Plant cell and tissue culture, pp. 29-37, Humana Press, New Jersey.
  8. Klaas van't Riet and Johannes Tramper (1991), Basic Bioreactor Design, Marcel Dekker Inc., New York.
  9. Stanbury, P. F. and A. Whitaker (1984), Principles of Fermentation Technology, pp 169-192, Pergamon Press, New York
  10. Leckie, F. and A. H. Scragg (1990), An Investigation into the role of initial  $K_{La}$  on the growth and alkaloids accumulation by cultures of *Cantharanthus roseus*, *Bio-technol. and Bioeng.*, 37, 364-370