

Bioreactor를 이용한 담배세포 현탁배양에서 교반형태와 통기량이 미치는 영향

이 상 윤 · *김 동 일
인하대학교 생물공학과

(접수 : 1999. 7. 2., 게재승인 : 1999. 10. 2.)

Effect of Agitation and Aeration Rate on *Nicotiana tabacum* Suspension Cell Culture in Bioreactors

Sang-Yoon Lee and Dong-Il Kim*

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

(Received : 1999. 7. 2., Accepted : 1999. 10. 2.)

For the optimization of operating conditions for plant cell suspension cultures in bioreactors, effects of bioreactor types, various kinds of impellers, and aeration rates were examined using *Nicotiana tabacum* cells as a model system. Stirred tank bioreactor and airlift bioreactor were used for the comparison of bioreactor type. Growth rates in both bioreactors were lower than that in shake flasks. In terms of final cell concentration, stirred tank bioreactor supported a little bit better growth compared to airlift bioreactor. Impeller type did not affect cell growth significantly, but it was apparent that cell size index decreased in the case of using hollowed paddle impeller. When the aeration rate was maintained at 0.3 vvm, cell growth was the best. At above 1.0 vvm, growth inhibition as well as browning was noticed. In addition, it was found that cell size index was reduced proportionally to the increase of aeration rate.

Key Words : bioreactor, *Nicotiana tabacum*, plant cell culture, agitation

서 론

식물의 대사과정에서 생산되는 여러 이차대사산물은 생리적 특성을 지니고 있어 식물에 대한 중요성이 부각되었으며 그 대표적인 예로 주목 유래의 이차대사산물인 paclitaxel을 들 수 있다(1). 그러나 식물세포배양에 의한 이차대사산물의 생산은 식물체로부터의 직접추출법이나 화학적 전합성법 또는 반합성법에 비해 여러 가지 장점을 지니고 있음에도 불구하고 상업화에 성공한 예는 shikonine, berberine 등으로 극히 드물며 그 이유로는 식물세포의 느린 성장속도와 낮은 생산성을 들 수 있다(2-4). 근래에 들어서는 유전자 재조합된 식물세포배양을 통한 재조합 단백질의 생산도 활발히 연구되고 있으며 식물세포를 이용하는 경우는 생물학적인 활성을 지닌 재조합 단백질을 낮은 비용으로 생산할 수 있다는 장점을 지니고 있다(5). 따라서 bioreactor에서의 식물세포배양의 최적화와 scale-up에 관한 연구가 필수적이다.

일반적으로 bioreactor 내에서의 식물세포배양에서 세포의 성장형태와 이차대사산물의 생산을 flask에서와 비교하면 그 결과가 항상 일치하는 것은 아니며 flask에서의 실험결과를 상업적인 규모로 scale-up하는 경우 재현성이 낮은 편이다(6). 따라서 식물세포배양을 통한 이차대사산물의 대량생산과 상업화를 위해서는 세포배양기의 운전조건에 대한 연구가 선행되어야 하며 적절한 식물세포용 bioreactor의 개발이 필요하다. 현재까지 보고된 식물세포용 배양기의 종류를 보면 교반기의 유무에 따라 물리적인 교반이 수반되는 stirred tank bioreactor와 유입되는 공기의 흐름에 의해 혼합되는 bubble column bioreactor, airlift bioreactor, 그리고 rotary drum bioreactor 등이 있다(7).

Bioreactor 내에서의 식물세포배양이 flask에서의 배양과 크게 다른 점 중의 하나는 교반과 통기에 의해 발생하는 hydrodynamic stress라고 할 수 있다. 식물세포는 미생물이나 동물세포에 비해 그 크기가 큰 편이다. 또한 동물세포와는 달리 세포벽을 지니고 있어 shear에 비교적 잘 견딜 것으로 생각할 수 있으나 실제로는 shear에 의해 성장과 생존력이 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다(8, 9). Bioreactor 내에서 발생하는 shear는 교반기에 의한 shear와 통기에 의한 shear가 있으며, 동물세포는 통기에 의한 bubble에 대해서 민감한 것에 비해 식물세포는 상대적으로 영향을 덜 받는다고 한다(10). Bioreactor 내에서의 shear

* Corresponding Author : Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : 032-860-7515, Fax : 032-875-0827
E-mail : kimdi@dragon.inha.ac.kr

에 의한 부정적인 영향을 줄이기 위해서는 교반속도를 낮추거나 shear를 적게 유발하는 교반기를 사용하는 것을 고려할 수 있으며 이러한 형태의 교반기로는 동물세포배양에서 흔히 사용되는 centrifugal impeller(11, 12)와 Hooker와 Lee(13)가 제시한 sail impeller 등을 들 수 있다. 한편 식물세포와 같은 shear에 민감한 세포의 배양에 적합한 bubble-free loop fluidized bed bioreactor나 external loop airlift bioreactor 등도 보고된 바 있다(14).

식물세포는 미생물에 비해 산소 요구도가 낮은 편이기는 하지만 적절한 산소의 공급은 필수적이며 특히 고농도로 세포배양하는 경우 용존산소량이 급격히 감소하게 되므로 통기량을 적절히 조절하여야 한다(15). 그러나 산소의 충분한 공급만을 목적으로 통기량을 증가시키면 과도한 통기에 의해 에틸렌이나 이산화탄소 등과 같은 휘발성 기체 성분이 유실되어 식물세포의 성장과 이차대사산물의 생산이 저해될 수 있다(16, 17). 따라서 통기량의 최적화가 필요하다.

본 연구에서는 *Nicotiana tabacum* 현탁세포를 model system으로 flask와 서로 다른 형태의 bioreactor에서의 성장을 비교하고자 하였으며 식물세포 현탁배양을 위한 bioreactor의 운전에서 교반기의 종류에 따른 영향과 통기량의 변화에 따른 세포생장 및 세포크기지수의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

식물세포배양 및 배지조성

본 연구에서는 산림청 임업연구원으로부터 제공받은 *Nicotiana tabacum* 캘러스로부터 유도한 현탁세포를 사용하였다. 생장배지로는 MS 기본배지에 30 g/L sucrose, 0.1 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP), 0.5 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 100 mg/L myo-inositol을 첨가하여 사용하였으며 pH를 5.8로 맞춘 뒤 121°C, 1.2기압에서 가압증기멸균하였다.

계대배양은 7일 간격으로 수행하였으며 500-mL Erlenmeyer flask에 180 mL의 배지를 넣은 뒤 10%(v/v)로 접종하여 회전식 진탕배양기에서 25°C, 120 rpm, 명조건을 유지하며 배양하였다. Flask에서의 실험을 위해서는 시료당 복수의 100-mL Erlenmeyer flask에 30 mL의 배지를 첨가하여 사용하여 세포를 배양한 후 flask째로 분석하였다.

Bioreactor 운전

Bioreactor 내에서의 모든 실험은 (주)한국발효기에서 제작한 식물세포배양용 5-L jar bioreactor를 사용하였으며 working volume은 2 L로 수행하였다. 운전조건은 25°C, 80 rpm, 0.2 vvm으로 하여 배양하였다. Bioreactor 유형별 실험을 위한 airlift bioreactor의 운전을 위해서는 (주)한국발효기에서 제작한 3-L bioreactor를 이용하였으며 2.5 L의 working volume으로 유지하였다.

통기량의 영향을 비교하기 위한 실험은 Dow Corning사의 1.5-L spinner flask에서 0.7 L의 working volume으로 수행하였으며 교반을 위해 Cellgro™ slow speed stirrer(Thermolyne)를 사용하였다.

모든 종류의 세포배양기에서의 실험에서 foam의 억제를 위해 silicon 계열의 소포제인 Sigma사의 Antifoam A emulsion을 배지에 1 g/L 첨가하였으며 배양중에도 필요에 따라 첨가하였다.

세포중량 측정

생체세포중량(fresh cell weight, FCW)을 측정하기 위해서 배양액을 Buchner 깔대기를 사용하여 Whatman No. 1 여과지로 걸르고 동량의 증류수로 2회이상 세척한 후 진공펌프로 수분을 제거하여 계량접시에 세포를 옮겨 FCW를 측정하였다. FCW를 측정한 세포는 60°C로 고정된 dry oven에서 항량이 되도록 건조하여 건조세포중량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 충전세포부피(packed cell volume, PCV)의 측정은 시료를 30분간 정치한 후 총 시료부피에 대한 침전된 세포 부피의 비로 나타내었다.

점도 측정

시료의 점도를 측정하기 위해 Viscometer R:1:1:L(Rheology Int.)을 사용하였으며 40 mL의 배양액을 측정용 용기에 담아 시료에 적합한 spindle과 회전수를 선택하여 측정하였다.

결과 및 고찰

배양기 형태에 따른 현탁세포 성장비교

100-mL flask에서의 결과를 대조구로 하여 기본적인 세포배양기 형태인 stirred tank bioreactor와 airlift bioreactor에서의 결과를 Figure 1에 도시하였다. 우선 flask에서의 생장은 거의 lag phase가 없이 빠르게 진행되었고 최고세포농도는 6일째에 16.3 g/L이었다. 특히 6일 이후는 PCV가 90% 이상이 되어 원활한 교반이 이루어지지 않고 더 이상 세포의 성장도 없었다. Marine impeller를 사용한 stirred tank bioreactor에서는 4일까지 lag phase를 보이며 최고세포농도도 10일째의 9.7 g/L로 낮았다. Airlift bioreactor의 경우는 8일째의 11.5 g/L가 최고세포농도였으며 lag phase는 STR과 마찬가지로 약 4일이었고 4일 이후에는 stirred tank bioreactor에 비하여 비교적 빠른 성장 속도를 보였다. 두가지 형태의 세포배양기에서의 생장은 flask와 비교했을 때 성장속도가 느리며 도달가능한 세포농도 역시 크게 감소하였다. 특히 stirred tank bioreactor에서는 10일 이후에 세포의 갈색화 현상이 관찰되었다.

세포의 크기를 간접적으로 나타낼 수 있는 세포크기지수(FCW/DCW ratio)를 비교하면 flask에서는 4일 이후로 약 23~24의 높은 수치를 보이며 stirred tank bioreactor와 airlift bioreactor에서는 모두 이보다 낮은 수치를 나타내었다(Figure 2). 이는 배양조건에 따라 세포의 생리적 상태가 변화하여 세포의 크기를 작게 유지하거나 shear에 의한 lysis로 세포내부의 성분을 유실했기 때문으로 생각되며 8일 이후의 세포크기지수는 airlift reactor보다 stirred tank bioreactor에서 더 작게 유지되었다.

기본적으로 bioreactor 내에서의 환경이 flask와 다른점은 물리적인 교반이나 유입되는 공기에 의해 발생하는 shear stress라고 할 수 있으며 배양기에서의 세포생장이 flask보다 낮은 이유도 shear stress에 의한 것으로 설명될 수 있다. Airlift bioreactor를 사용하였을 때 stirred tank bioreactor보다 빠른 세포생장을 보이는 이유는 교반기에 의한 물리적 교반이 없기 때문으로 생각되며 따라서 식물세포와 같은 shear에 민감한 세포배양용 배양기로 적합하다 할 수 있다. 그러나 20 g/L 이상의 고농도에서는 교반기를 사용하는 경우에 비하여 물질전달이 원활하지 못하며 한번 정지된 이후에는 다시 운전하기가 곤란한 문제점을 가지고 있다.

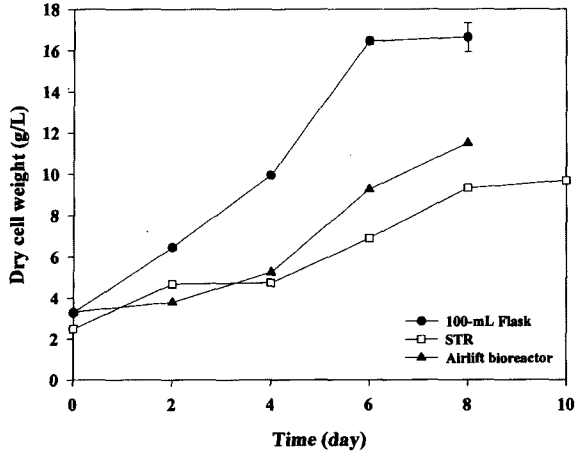


Figure 1. Comparisons of *Nicotiana tabacum* cell growth in shake flasks and bioreactors.

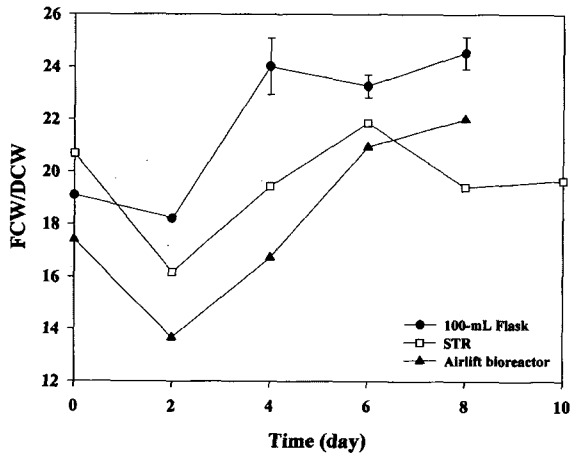


Figure 2. Time course changes of cell size index in shake flasks and bioreactors.

Figure 3에 나타난 바와 같이 100-mL flask에서 배양시간에 따른 배양액의 점도는 배양시간에 비례하여 증가하였으나 세포를 제거한 배지만의 점도는 크게 변화하지 않았으며 이 결과는 Curtis와 Emery(18)의 보고와 일치하는 것이다. 따라서 물질전달에 영향을 주게되는 배양액의 점도는 세포의 농도에 따라 증가한다고 생각되며 6일에서 8일째에는 세포의 생장이 없었음에도 불구하고 점도가 크게 증가한 것은 세포의 크기가 증가했기 때문으로 보인다. 따라서 Zhang 등(19)이 보고한 바와 같이 osmoticum을 배지에 첨가하여 세포의 크기를 인위적으로 감소시킨다면 배양액의 점도를 감소시켜 산소의 전달을 원활히 할 수 있으며 이는 고농도배양에서 산소의 고갈을 방지할 수 있는 방법으로 이용이 가능할 것이다.

교반기 형태의 영향

Stirred tank bioreactor를 이용한 담배세포배양에서 교반기의 형태에 따른 영향을 조사하기 위해 식물세포배양에서 일반적으로 사용되는 marine impeller와 hollowed-paddle impeller, 그리고 Wang과 Zhong(11, 12)이 보고한 바 있는 centrifugal impeller를 사용하여 비교 실험을 수행하였다. Figure 4에서 나타난 바와 같이 세포의 생장은 제가지 교반기 사용시 모두 큰 차이가 없었으

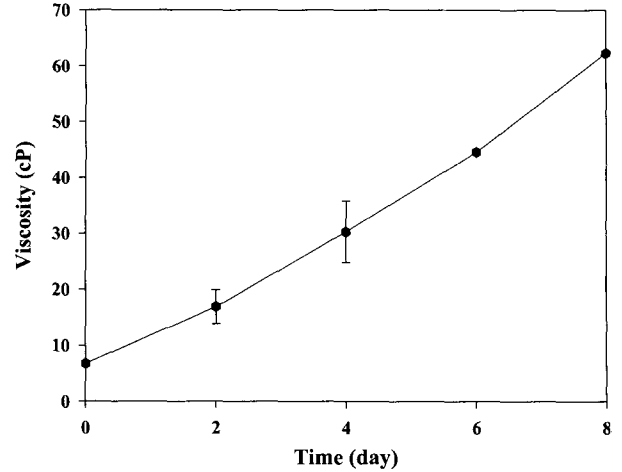


Figure 3. Relationship between *Nicotiana tabacum* cell density and viscosity of culture broth.

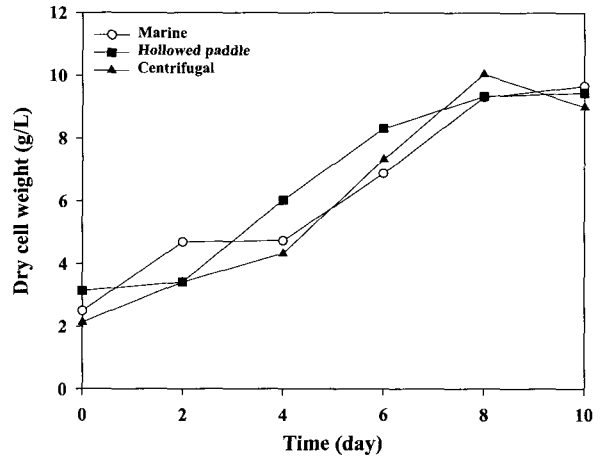


Figure 4. Effect of impeller type on *Nicotiana tabacum* cell growth.

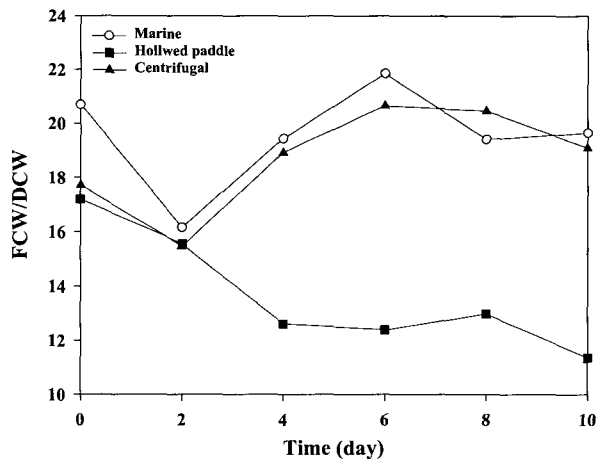


Figure 5. Effect of impeller type on *Nicotiana tabacum* cell size index.

나 초기의 생장은 hollowed-paddle impeller를 사용하였을 때 가장 빨랐다. Shear를 적게 유발하도록 고안된 centrifugal impeller의 경우 8일째에 10 g/L이상의 가장 높은 세포농도를 보였지만 8일 이후로는 충분한 교반이 이루어지지 않아 밑부분에 세포가 가라 앉는 현상을 보였다. 이와 같은 문제점을 보완하기 위해서

는 centrifugal impeller의 형태, 부착되는 위치, 그리고 교반속도에 대한 연구가 진행되어야할 것으로 생각된다.

교반기의 형태에 따른 세포크기지수의 변화를 보면 marine impeller와 centrifugal impeller는 거의 비슷한 수치를 나타내었고 hollowed-paddle impeller를 사용했을 때는 세포의 크기가 배양기간동안 15이하로 상당히 낮게 유지되는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 5). 이는 세포부양식의 marine impeller, centrifugal impeller와는 다른 교반형태로 인한 물리적 환경인자에 기인한 것으로 생각되며 Figure 4에서 세포의 생장은 저해받지 않았음을 감안할 때 고농도배양에 사용하면 세포의 크기를 작게 유지함으로써 물질 전달을 도울 수 있을 것으로 기대된다.

통기량의 영향

식물세포는 미생물에 비해 산소의 요구도가 낮은 편이나 산소의 공급은 필수적이다. 세포량의 증가에 따라 bioreactor 내의 점도도 증가하여 배양후반에는 산소의 공급이 제한될 수 있으며 따라서 교반속도나 통기량의 적절한 조절이 필요하다 할 수 있다(17). 본 실험에서는 1.5-L spinner flask에서 통기량을 각각 0.05, 0.14, 0.30, 1.07, 1.50 vvm으로 달리하여 통기량에 따른 세포생장을 비교하였다. Figure 6에 나타낸 바와 같이 세포의 생장은 0.30 vvm에서 가장 좋았으며 최고세포농도는 10일째의 11.6 g/L였다. Gao와 Lee(20)에 의하면 통기량이 증가할수록 담배세포의 성장과 제조합 단백질의 생산이 증가하였고 1.1 vvm에서 가장 좋은 결과를 보였다. 그러나 통기량을 1.0 vvm이상으로 증가시키는 경우에는 foam의 역제가 어려워지는 등의 현실적인 어려움이 따르며 이는 본 실험의 결과와 일치하는 것이다. 또한 본 연구에서 1.07 vvm이상인 경우 세포의 갈색화 현상이 나타났으며 1.50 vvm에서는 생장의 저해현상이 관찰되었는데 이는 과도한 통기량으로 인해 유발된 CO₂ stripping에 의한 세포생장 저해로 생각된다(16, 17).

Figure 7에는 통기량의 변화가 배양시간에 따른 세포크기지수에 미치는 영향을 정리하였다. 6일까지의 배양초기에 통기량의 증가에 비례하여 세포크기지수가 감소함을 관찰할 수 있었다. 이는 통기량의 증가에 따라 배양기 내의 유체역학적인 환경이 변화하여 세포의 크기에 영향을 주는 것으로 생각되며 전술한 교반기가 미치는 영향과 유사한 결과인 것으로 사료된다. 이와 같이 통기량이 증가함에 따라 세포의 크기가 감소하는 현상을 확인하기 위하여 100-mL의 bubble column 형태의 bioreactor에서 통기량을 달리하여 세포의 생장을 관찰하였고 그 결과는 Figure 8과 같다. 각각의 배양기에 30 mL의 배지를 첨가하여 세포생체증량으로 5 g의 세포를 접종하였으며 배양기 내의 세포가 충분히 혼합되는 최소의 통기량인 0.53 vvm으로부터 1.20, 2.20, 3.50 vvm으로 점차 증가시키면서 그 영향을 확인하였다. 세포량은 접종후 5일째에 측정하였으며 Growth index는 다음과 같이 정의하였다.

$$\text{Growth index} = \frac{\text{DCW}_{\text{final}} - \text{DCW}_{\text{initial}}}{\text{DCW}_{\text{initial}}}$$

세포의 생장은 통기량이 가장 적었던 0.53 vvm에서 최고세포농도인 약 8.7 g/L를 나타내었으며 이 때의 growth index는 1.174였다. 통기량이 증가함에 따라 세포의 생장이 크게 감소하

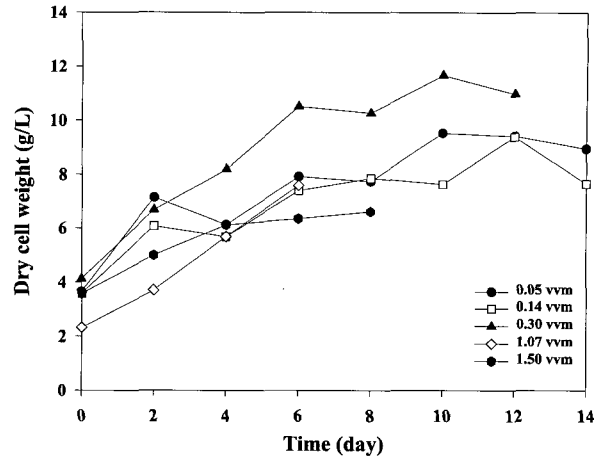


Figure 6. Effect of aeration rate on *Nicotiana tabacum* cell growth in 1.5-L spinner flask.

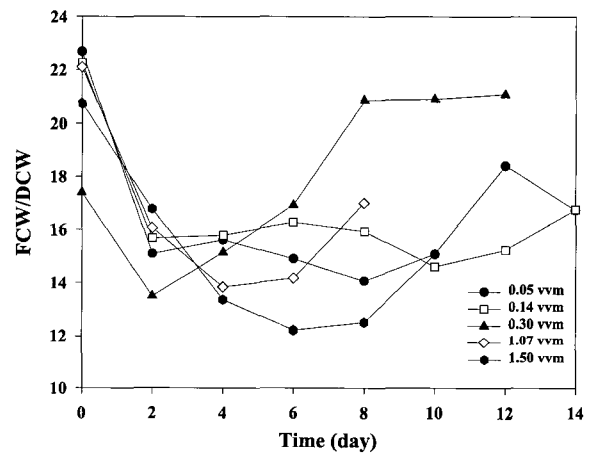


Figure 7. Time course changes of *Nicotiana tabacum* cell size index at different aeration rates in 1.5-L spinner flask.

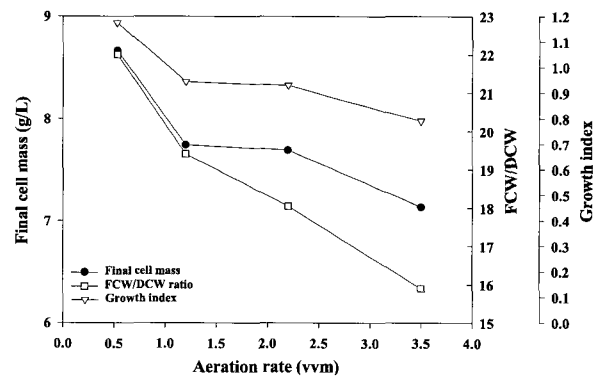


Figure 8. Effect of aeration rate on *Nicotiana tabacum* cell growth and cell size index in 100-mL bubble column bioreactor.

는 것을 관찰할 수 있었다. 세포의 크기지수 역시 통기량의 증가에 따라 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 이는 앞서의 spinner flask에서의 결과와 일치하는 것이었다. 통기량의 증가에 따라 세포의 크기가 감소한다는 것은 지금까지 보고된 바가 없으나 과도한 통기에 의해 유발되는 shear에 의해 세포벽이나 세포내부에 함유하고 있던 수분을 유실하기 때문으로 생각되며 상

당량의 세포가 lysis되기 때문으로 생각된다. 이상의 결과를 적절히 이용한다면 bioreactor 내에서 식물세포배양에 의한 유용물질 생산성 향상에 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

식물세포배양을 위한 bioreactor의 운전조건 최적화를 위해 *Nicotiana tabacum* 현탁세포를 model system으로 bioreactor의 종류, 교반기의 형태, 그리고 통기량에 따른 세포생장을 관찰하였다. Bioreactor로는 stirred tank bioreactor과 airlift bioreactor를 사용하였으며 두가지 배양기 모두 flask에서의 성장보다 낮은 생장을 보였으며 stirred tank bioreactor보다는 airlift bioreactor에서 높은 세포농도를 얻을 수 있었다. 교반기의 종류에 따른 세포의 생장은 큰 차이가 없었으나 hollowed paddle impeller를 사용하였을 경우에는 배양기간 동안 세포의 크기가 작게 유지되었다. 통기량을 0.30 vvm으로 유지하는 경우에 가장 좋은 세포생장을 관찰할 수 있었으며 1.0 vvm이상의 통기량에서는 과도한 foam의 형성과 세포의 갈색화 현상을 보이며 세포의 성장도 저해되었다. 또한 통기량이 증가할수록 세포크기지수가 감소하는 결과를 보였다.

감 사

본 연구는 1998년도 인하대학교 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Ketchum, R. E. B. and D. M. Gibson (1996), Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **46**, 9-16.
- Gibson, D. M., R. E. B. Ketchum, T. J. Hirasuna, and M. L. Shuler (1995), Potential of plant cell culture for taxane production, In "Taxol: Science and Applications"(Ed. Suffness, M.), CRC press, New York.
- Zhong, J. J., J. T. Yu, and T. Yoshida (1995), Recent advances in plant cell cultures in bioreactor, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 461-467.
- Fujita, Y. (1990), The production of industrial compounds, In "Plant Tissue Culture: Applications and Limitations"(Ed. Bhojwani, S. S.), Elsevier, New York.
- Hogue, R. S., J. M. Lee, and G. An (1989), Production of a foreign protein product with genetically modified plant cells, *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 533-538.
- Van Gulik, W. M., H. J. G. ten Hoopen, and J. J. Heijnen (1992), Kinetics and stoichiometry of growth of plant cell cultures of *Chataranthus roseus* and *Nicotiana tabacum* in batch and continuous fermentors, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 863-874.
- Taticek, R. A., M. Y. Murray, and R. L. Legge (1991), The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **24**, 139-158.
- Zhong, J. J., K. Fujiyama, T. Seki, and T. Yoshida (1994), A quantitative analysis of shear effects on cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens* in bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 649-654.
- Hooker, B. S., J. M. Lee, and G. An (1989), Response of plant tissue culture to a high shear environment, *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 484-490.
- Namdev, P. K. and E. H. Dunlop (1995), Shear sensitivity of plant cells in suspensions: Present and future, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **54**, 109-131.
- Wang, S. J. and J. J. Zhong (1996), A novel centrifugal impeller bioreactor. I. fluid circulation, mixing, and liquid velocity profiles, *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 511-519.
- Wang, S. J. and J. J. Zhong (1996), A novel centrifugal impeller bioreactor. II. oxygen transfer and power consumption, *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 520-527.
- Hooker, B. S. and J. M. Lee (1990), Cultivation of plant cells in a stirred vessel: Effect of impeller design, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 296-304.
- Robert, S. C. and M. L. Shuler (1997), Large-scale plant cell culture, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**, 154-159.
- Tanaka, H. (1987), Large-scale cultivation of plant cells at high density: A review, *Process Biochem.*, **22**, 106-113.
- Ducos, J. P. and A. Pareilleux (1986), Effect of aeration rate and influence of pCO₂ in large-scale cultures of *Catharanthus roseus* cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 101-105.
- Ho, C. H., K. A. Henderson, and G. L. Rorrer (1995), Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor, *Biotechnol. Prog.*, **11**, 140-145.
- Curtis, W. R. and A. H. Emery (1993), Plant cell suspension culture rheology, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 520-526.
- Zhang, Y. H., H. Q. Wang, S. Liu, J. T. Yu, and J. J. Zhong (1997), Regulation of apparent viscosity and O₂ transfer coefficient by osmotic pressure in cell suspensions of *Panax notoginseng*, *Biotechnol. Lett.*, **19**(10), 943-945.
- Gao, J. and J. M. Lee (1992), Effect of oxygen supply on the suspension culture of genetically modified tobacco cells, *Biotechnol. Prog.*, **8**, 285-290.