

Bubble column bioreactor에서 형질전환된 담배세포의 성장양상 및 β -Glucuronidase의 생산

김석우 · 이동근¹ · 현진원² · 이상현 · 하종명 · 하배진 · 이재화*

신라대학교 공과대학 생명공학과

¹신라대학교 생명공학연구소

²제주대학교 의과대학 생화학과

The Growth of Transgenic Tobacco's Suspension Culture and the Production of β -Glucuronidase in Bubble Column Bioreactor

Seok-Wo Kim, Dong-Geun Lee¹, Jin-Won Hyun², Sang-Hyeon Lee, Jong-Myung Ha, Bae-Jin Ha and Jae-Hwa Lee*

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering,

¹Biotechnology Research Institute, Silla University, kwaebop-dong 1-1, Busan 617-736, Korea,

²Department of Biochemistry, Medical School, Cheju National University

Abstract

The growth kinetics and the production of β -glucuronidase from transgenic tobacco's suspension culture was investigated in the flask culture and a 2.5 L bubble column reactor. The growth of bubble column reactor was similar to that of flask culture. However, in the bubble column reactor, the production of β -glucuronidase reached 2850 U/mg (85-fold higher than that of flask culture). In both case, the production level of β -glucuronidase was fluctuated, which was resulted from periodical degradation of the protein. Sucrose is important component in plant culture medium. Twice addition of sucrose in bubble column reactor could not improve cell growth, since other components in a medium were already depleted. However, the addition of sugar decreased cell size, which facilitated the operation of bioreactor. The production of β -glucuronidase was continuously increased, however final concentration of β -glucuronidase was similar to that without sucrose addition.

Key words – plant suspension culture, β -glucuronidase, bubble column bioreactor, transgenic plant,

서 론

1970년대 중반 이후 급속도로 발전된 유전공학의 발달

로 생명현상을 지배하는 유전자의 인위적인 조작 및 다른 생물체로의 전환이 가능하게 되면서 생명체를 대상으로 한 새로운 공학분야의 시작이 이루어졌다. 이와 같은 유전공학 기술들은 이미 미생물 수준에 적용되는 단계를 지나 고등생물인 동·식물에까지 확대되었고, 외래의 유용유전자를 분리하여 사용하고자 하는 특정 식물체에 형질전환시키

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 82-51-999-5748, Fax : 82-51-999-5636

E-mail : jhalee@silla.ac.kr

는 수준에 와 있다 [10].

식물세포의 이용은 주로 생리활성물질의 생산에 집중되었지만 [3,4] *Agrobacterium*의 Ti-plasmid 내 T-DNA가 식물체의 염색체 내로 삽입되어 발현되어 진다는 것이 밝혀진 후 [2], 많은 연구와 발전이 있었다 [1,5,13].

최근에는 DNA 재조합기술이 생물공학에 소개되면서 재조합 단백질의 생산분야가 급격한 발전을 이루게 되었으나 아직까지는 생물공학을 이용해 생산되는 대부분의 의약품의 발현속주로서 대장균, 효모 등이 보다 더 일반적이다. 그러나 인류가 필요로 하는 대부분의 단백질들은 주로 고등동물에 존재하는 바 이들 단백질의 생산을 위해서는 미생물 외의 고등동물 발현계가 요구된다. *Agrobacterium*에 의한 식물 세포로의 외래 유전자 도입기술에 의해 식물세포에서의 단백질의 생산은 미생물의 경우에는 post-translational modification이 수행되지 않기 때문에 의약품으로써의 가치가 미생물에 의해 생산될 경우에 비해 그 효능이 더 높을 수 있다. 이러한 문제의 해결책 중 한가지가 동·식물세포를 이용한 재조합 단백질의 생산이다 [9]. 동물세포를 이용하는 것에 비해 식물세포를 이용하는 경우에는 인체에 유해할 수 있는 동물 바이러스의 감염 오염이 없고 배양 비용이 저렴한 장점이 있다 [1].

식물세포의 형질전환시 model system으로 가장 널리 사용되는 β -glucuronidase (GUS)는 척추동물의 장내에 가장 풍부하게 존재하는 *Escherichia coli*에 의해 생산되어지는 효소로서 분자량이 68000인 subunit로 이루어진 안전한 homotetramer이다 [6]. GUS는 고등식물의 경우 endogenous GUS activity가 없기 때문에 reporter gene으로써 매우 유용하며 assay가 매우 용이하고 기질도 매우 다양하다. 무엇보다도 식물체에 무해하다는 것이 식물체 내에서 reporter gene으로 사용하는데 있어서 가장 큰 장점이라 하겠다. 또한 GUS gene fusion system을 사용하여 특정 단백질이 식물체 어느 부위에 많이 축적되는지를 알아내는데 사용되기도 한다[7]

본 연구에서는 의약품과 같은 유용 단백질을 생산하는 벡터를 식물세포 내 삽입하여 형질 전환된 식물세포의 배양을 통해 이러한 물질들을 대량생산하기 위한 기초자료를 얻고자 reporter gene으로 널리 알려진 β -glucuronidase (GUS) 유전자로 형질 전환된 담배세포를 유도하여 bioreactor 내에서 현탁배양시 회분식배양과 유가식배양을 하여 세포생장 및 당, 이온들의 변화추이, GUS activity 등을 측정하였다.

재료 및 방법

담배세포의 형질전환 및 세포배양

식물에서 β -glucuronidase가 발현되도록 조작된 식물 형질전환용 vector pBI 121을 *A. tumefaciens* LBA 4404에 삽입한 후 담배식물체 절편과 공조배양 후 50 mg/L kanamycin과 30 g/L의 sucrose가 첨가된 MS 배지 (1.65g/L NH_4NO_3 , 1.0g/L KNO_3 , 0.37g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16.9mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 8.6mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.025mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.44g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.083mg/L KI, 0.025mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.17g/L KH_2PO_4 , 6.2mg/L H_3BO_3 , 0.25mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 27.85mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 37.25mg/L Na-EDTA, 0.1g/L myo-inositol, 20mg/L glycine, 0.5mg/L pyridoxin-HCl, 0.1mg/L thiamine-HCl) 에서 callus를 유도하고 이를 다시 50 mg/L의 benzylaminopurine (BAP)가 첨가된 MS 배지에서 식물체로 재분화를 유도하였다. 이렇게 유도된 식물체를 부위별로 나누어 GUS activity를 측정 한 후 가장 높은 부위에서 다시 0.5 mg/L 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)가 첨가된 MS 배지에서 callus 유도 후 동일 배지하에서 현탁세포를 유도하였고 25°C, 120 rpm, 명조건으로 유지하면서 7일 간격으로 계대배양 하면서 유지하고 실험 재료로 사용하였다.

세포농도측정

세포의 증식은 세포 생체중량(fresh cell weight, FCW), 세포 건조중량(dry cell weight, DCW)과 SCV (sedimented cell volume)의 측정을 통해 관찰하였다. 세포 생체중량은 Büchner funnel을 이용하여 배양액을 Whatman No.1 여과지로 거른 후 증류수로 수회 세척후 다시 여과하여 얻은 세포를 측정된 중량을 사용하였으며 이러한 생체중량 측정 과정을 거친 세포를 60°C로 유지된 dry oven에 넣어 시간에 따른 무게변화가 없을 때까지 건조시켜 측정된 중량은 세포 건조중량으로 사용하였다. SCV는 시료를 1시간 동안 매스실린더에서 세포를 가라앉힌 후 세포부피 : 총시료 부피로 나타내었다.

이온 및 당농도 분석

총당분석은 Waters사의 refractometry index detector와 carbohydrate column (4.6×250 mm)로 이루어진 HPLC를

사용하였고 이때 유속은 1.3 ml/min 이었다.

이온분석은 ion chromatography를 이용하였는데 이때 음이온(PO_4^- , SO_4^- , NO_3^- , Cl^-) 분석으로는 Ion Pac SDA4 column (Dionex, USA), 양이온(Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+) 분석으로는 Ion Pac CS124 column (Dionex, USA)을 사용하였고 이때 유속은 1.0 ml/min 이었다.

β -glucuronidase (GUS) assay

식물체의 경우 식물체 절편을 액체질소로 얼린 후 유봉으로 파쇄 후 extraction buffer (0.1 M NaHPO_4 pH7.0, 10mM β -mercaptoethanol, 0.5 M EDTA, 30% sarcosyl, 10% triton, H_2O)로 추출하였고 현탁세포의 경우는 extraction buffer를 첨가한 후 1시간 동안 sonication하였다.

단백질 추출 후 10분간 3000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 취해 GUS 기질인 4-methylumbelliferyl β -D glucuronide (MUG)를 첨가하여 36°C에서 1시간동안 반응시킨 후 stop buffer (0.2 M Na_2CO_3)를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이때 MUG가 GUS에 의해 4-methylumbelliferone (MU)로 전환시 나타나는 fluorescence를 Höefer사의 TKO100 fluorometer를 이용하여 측정하였다.

Bubble-Column Bioreactor

Fig. 1에 나타난 bioreactor는 높이가 60 cm, glass vessel의 안쪽 지름이 10 cm로 이루어져 있으며 vessel의 아래쪽

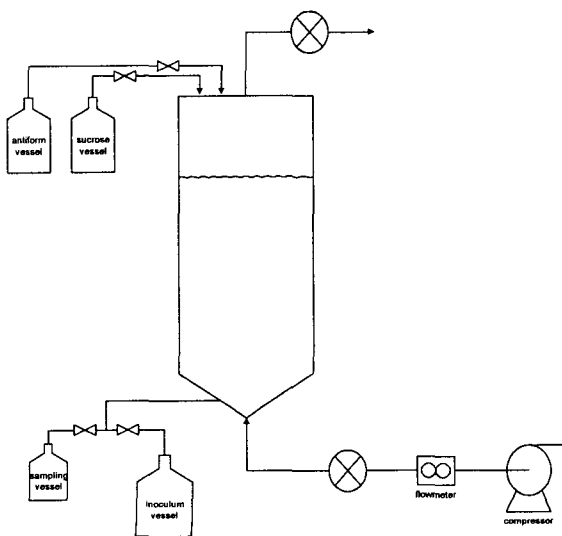


Fig. 1. Diagram of used reactor in this experiment.

에 위치한 1.5 cm의 glass filter를 통해 1.0 vvm의 공기를 불어넣어 세포를 교반시켰고 이때 working volume은 2 L 이었다.

Bioreactor는 회분식 배양과 배양시작후 5, 11일째에 30g/L의 sucrose를 첨가한 유가식 배양을 수행하였고 거품의 형성을 막기 위해 antifoam A emulsion (Sigma)을 희석하여 배양시 간헐적으로 첨가하였다.

RESULTS AND DISCUSSION

식물체 내 GUS activity

식물체 내에 GUS의 발현 유무 및 부위별 발현량을 알아 본 결과 실험에 사용되었던 모든 clone에서 GUS activity가 관찰되었으며 부위별로는 아랫쪽 잎보다는 위쪽 잎, 위쪽 잎보다는 줄기에서 더 높은 activity를 보여 (Fig. 2) 줄기에서 유도된 callus를 현탁세포로 유도하였다.

Shake Flask culture

세포를 2.5 g (DCW)/L의 농도로 세포를 접종하여 실험한 결과, Fig. 3에서 보듯이 GUS 유전자로 형질전환된 식물체와 형질전환되지 않은 식물체의 성장추이가 거의 유사함을 볼 수 있으며 최대 15 g (DCW)/L에 도달하였다. 따라서 식물체 내로 외래 유전자 삼입에 의한 단백질의 생산은 식물세포 성장에 별다른 영향을 주지 않는 것으로 여겨진다.

Transgenic plant의 경우에는 배지내 50 mg/L의 kana-

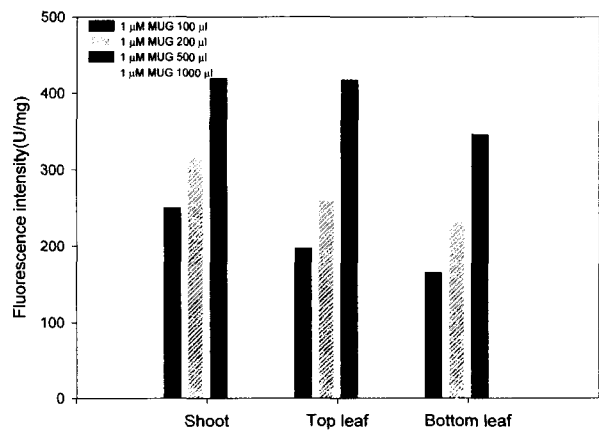


Fig. 2. Fluorescence intensity of each plant part.

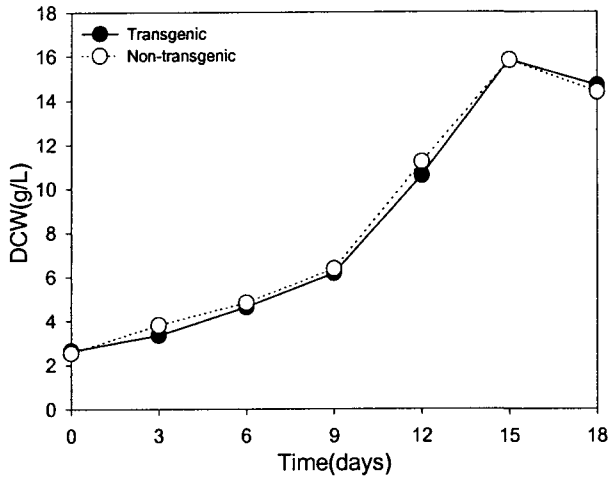


Fig. 3. Batch growth curves for transgenic and non-transgenic tobacco cells in a shake flask culture.

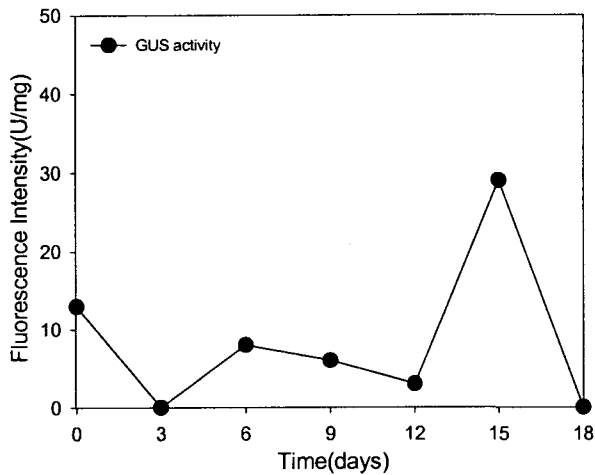


Fig. 4. Time course of GUS activity in a shake flask culture.

mycin이 첨가되었는데도 형질전환되지 않은 식물체에 비해 성장억제가 관찰되지 않음을 알 수 있다. 형질전환된 식물체의 GUS activity는 세포생장에 따라 증가하거나 감소하는 경향이 아니라 fluctuation 되는 경향을 보였다(Fig. 4). 이는 두가지 경우로 생각할 수 있는데 첫째로 Lee등 [13]의 보고와 같이 GUS 단백질이 일정량 생산되면 배지 밖으로 분비되어 activity를 잃어버리는 것과 두 번째는 단백질의 생산과 분해가 식물체내에서 계속적으로 이루어진다고 볼 수 있다. 최대생산은 배양 15일째, 성장이 정지기에 도달할 때 최대값을 나타내었다.

Batch Culture in Bubble-Column Bioreactor

GUS 유전자로 형질전환된 담배세포를 2 L bubble-column bioreactor (Fig. 1)내에서 회분식 배양과 유가식 배양으로 나누어 세포의 성장 (Fig. 5), 당농도 (Fig. 6), GUS activity (Fig. 7), 이온농도의 변화 (Fig. 8) 등을 관찰하였다. 세포성장변화는 flask와 유사하였으나 초기세포생장이 flask에서 보다는 조금 느리고 최대세포농도도 더 작았다. 이것은 bioreactor의 경우 초기 접종량이 flask culture시 보다 적고, 교반상의 차이나 산소전달방법의 차에 의해 유발되어지는 것으로 볼 수 있다.

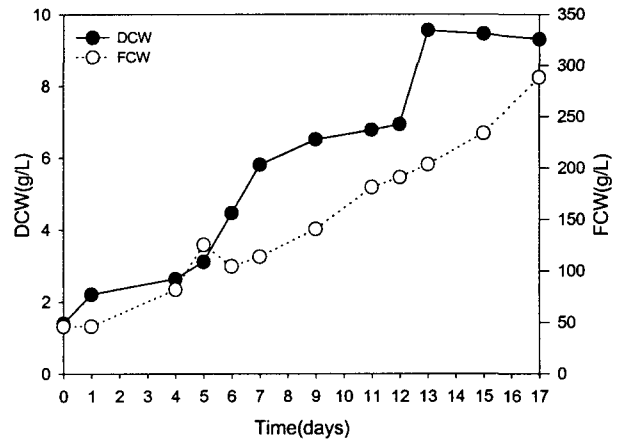


Fig. 5. Batch growth curves for transgenic tobacco cells in a bubble-column bioreactor.

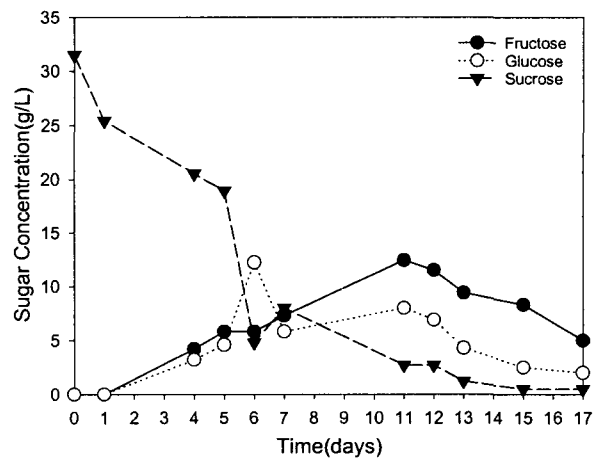


Fig. 6. Sugar consumption curves of batch culture for transgenic tobacco cells in a bubble-column bioreactor.

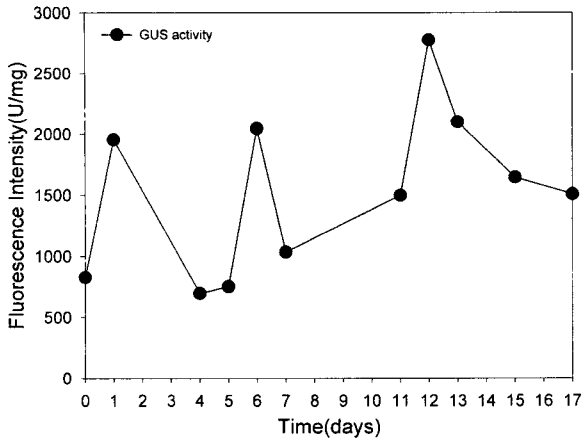


Fig. 7. Time course of GUS activity of batch culture in a bubble-column bioreactor.

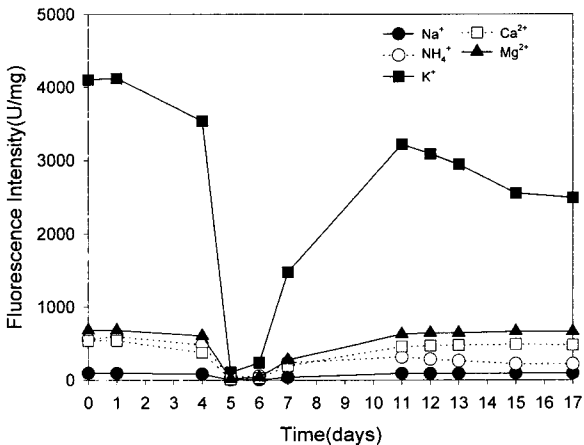


Fig. 8. The change of cations concentration of batch culture in a bubble-column bioreactor

당소비경향도 세포의 성장과 거의 일치하는 것을 볼 수 있는데 sucrose가 fructose와 glucose로 분해되면서 동시에 세포에 의해 소비되어짐을 볼 수 있다. 그러나 glucose와 fructose가 같은 속도로 분해되는 것이 아니라 fructose보다는 glucose가 먼저 소비되는 것을 볼 수 있었다. 세포의 사멸기에는 당의 상당량이 소모되는 것을 알 수 있었기 때문에 세포의 사멸은 당의 고갈이 중요한 이유라고 생각되어진다.

GUS activity의 변화는 Figure 7에 나타내었는데 flask (30 U/mg)에 비해서는 약 2850 U/mg으로 훨씬 더 높은 activity를 보였으며 변화경향은 flask 내에서의와 같이 일정하게 증가하거나 감소하는 것이 아니라 증가와 감소가 연

속적으로 일어남을 볼 수 있었다.

이온농도의 경우 Figure 8에서 볼 수 있는바와 같이 배양초반에는 급격히 감소하다가 배양중반 이후부터 다시 서서히 증가하여 처음의 농도까지 계속 증가되어짐을 볼 수 있다. 이는 Lee 등 (13)이 보고한 바와 같이 배양중기 이후에 protease 활성이 급격히 높아지는 등 배양환경이 안 좋아지는 결과와도 일치하며, 세포의 생장이 왕성할 경우 배지내 이온을 흡수하여 세포의 증식에 사용되어진다고 여겨지며 배양중반이후 배양액의 삼투압의 감소로 세포밖으로 이온을 배출하거나 세포의 lysis 등에 의해 다시 배지내 이온농도가 증가한다고 여겨진다.

Fed-Batch Culture in Bubble-Column Bioreactor

형질전환된 담배세포를 bubble-column bioreactor 내에서 유가식배양을 통해 세포의 성장, GUS activity, 당농도 및 이온농도의 변화를 살펴보았다. 먼저 세포생장의 경우 당의 고갈을 막아주었는데도 회분식배양에 세포증식과 최대세포농도가 커다란 증가를 보이지 않았다 (Fig. 9). 그러나 삼투압의 증가로 인한 FCW의 감소 [14]로 인하여 세포의 교반이 회분식 배양에 비해 훨씬 원활하였다. 회분식 배양의 경우 배양후반에는 void fraction이 거의 없어 세포의 교반이 불가능한 상태였으나 유가식 배양의 경우에는 이런 현상을 보이지 않았다.

Fig. 10에 나타낸 것과 같이 당농도의 경우에는 회분식 배양과 다르게 당이 추가적으로 공급되었기 때문에 당농도

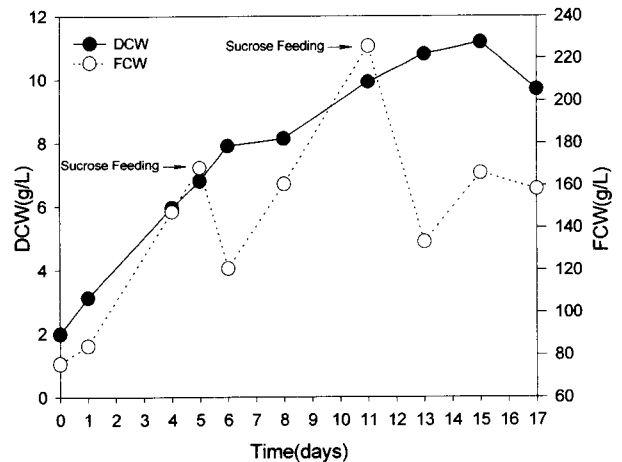


Fig. 9. Fed-batch growth curves for transgenic tobacco cells in a bubble-column bioreactor.

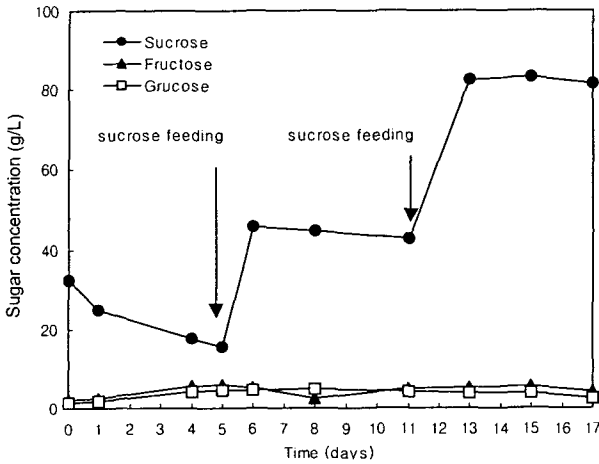


Fig. 10. Sugar consumption curves of fed-batch culture for transgenic tobacco cells in a bubble-column bioreactor.

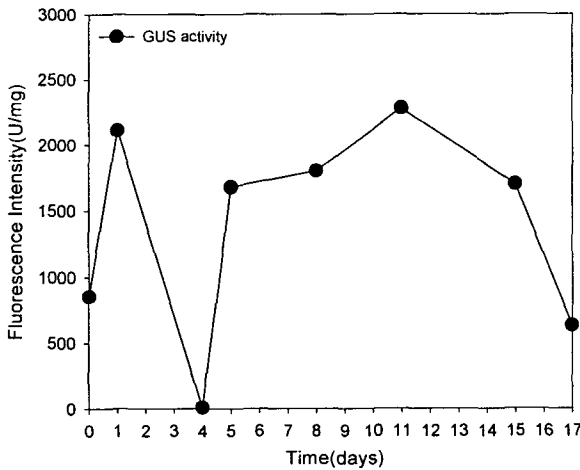


Fig. 11. Time course of GUS activity of fed-batch culture in a bubble-column bioreactor

의 고갈은 없었으나 세포증식면과 함께 고려할 경우 더 이상의 추가증식을 유도할 수 없었다. 이는 당농도의 세포증식에 다른 인자가 관여되어진다고 생각되어진다. 또한 첨가되어진 당이 지나치게 고농도여서 당의 소모가 원활하게 이루어지지 않는 것으로 추정된다. 따라서 변화되는 당농도를 관찰하면서 필요로 하는 가장 적절한 양의 당농도가 얼마인가를 먼저 알아내는 것이 유가식 배양의 선결요건이라 할 수 있겠다.

GUS activity는 다른 배양 때와 마찬가지로 증감을 반복하는 경향을 보였으나 그리 심하지는 않았다. 그 양은 회

분식배양 때와 커다란 차이를 보이지 않았다 (Fig. 11).

Fig. 12에서 볼 수 있듯이 이온농도의 변화는 회분식배양과는 다르게 배양초반부터 계속 감소되어 배양 후반에는 거의 고갈되어졌다. 이것으로 보아 세포의 lysis는 회분식배양에 비해 훨씬 감소되어진다고 생각되어진다. 앞서서도 잠시 언급한바와 같이 당 이외에도 이온의 고갈이 더 이상의 세포생장이 이루어질 수 없도록 한 한가지의 원인으로 추정할 수 있다. 따라서 배양시 당 뿐아니라 Jung 등 [8]의 다른 보고에서와 같이 이온의 첨가도 고려되어야 할 인자라고 여겨진다. 식물세포배양시 당의 첨가는 세포내의 생리에 많은 영향을 주는 것으로 보고되고 있으며 [12]그 외에 빛의 영향 [11]등도 세포의 생리와 재조합 단백질의 생산에 영향을 주므로 최적의 배양을 위해서는 이런 여러 가지 인자를 종합적으로 고려하여야한다.

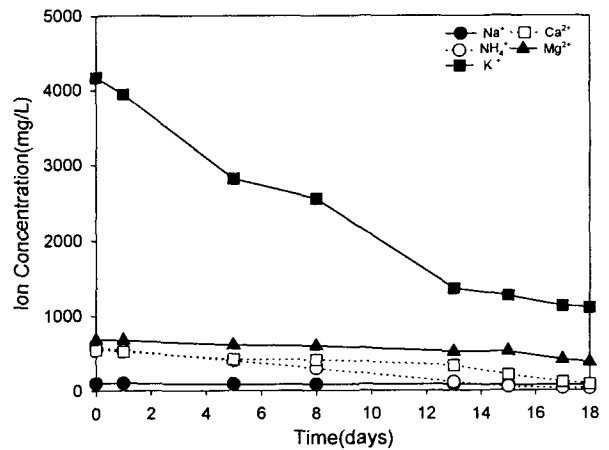


Fig. 12. Change of cations concentration of fed-batch culture in a bubble-column bioreactor

요 약

β -glucuronidase 유전자를 형질전환한 담배에서 여러 조직중에서 가장 activity가 높은 줄기에서 현탁세포를 유도하여 성장 및 발현 양상을 조사하였다. Flask culture와 2.5 L bubble column culture시 세포의 성장에는 큰 차이가 없었지만 β -glucuronidase의 발현은 bubble column culture시 약 2850 U/mg으로 95배 향상되는 결과를 나타내었다. 하지만 두 경우 모두 β -glucuronidase의 생산량이 증가와 감소를 반복하는 양상을 나타내었다. 이것은 외래

단백질의 생산과 파괴가 반복적으로 일어나는 것으로 추정
이 된다. 또한 bubble column culture의 생산성을 향상시
키기 위해 중요한 영양분인 sucrose을 30 g/L로 두 번 첨
가한 경우, 다른 영양분의 고갈로 인하여 세포의 최종 생
산량은 향상되지 않았고 β -glucuronidase는 안정적으로
생산되었지만 최종 생산량은 향상되지 않았다. 하지만
세포의 크기가 감소하여 배양기 운전이 쉬워지는 장점이
있었고 이것은 세포의 고농도 배양을 통한 재조합 단백질
생산성을 향상시키는 유리하게 작용할 것이다.

감 사

본 연구는 2002년도 신라대학교 교내연구비 지원에 의
하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Brodelius, P. 1985. The potential role of immobi-
lization in plant cell biotechnology. *Trends Biotechnol.*
3, 330-337
2. Chilton, M., M. H. Drummond, D. J. Mero, D. Sciak,
A. L. Montoya, M. P. Gordon and E. W. Nester.
1997. Stable incorporation of DNA into higher plants
cells : the molecular basis of crown gall tumorigenesis.
Cell **11**, 263-271
3. Flores, H. E. 1987. Use of plant cells and organ
culture in the production of biological chemicals. In
Biotechnology in Agricultural Chemistry; ACS Sym-
posium Series 334; American Chemical Society: Wash-
ington, D.C, 66-86
4. Hamill, J. D., A. J. Parr, M. J. C. Rhodes, R. J. Robins
and N. J. Walton. 1987. New routes to plant second-
ary products. *Bio/Technol.* **5**, 800-804
5. Hong, S. Y., T. H. Kwon, J. H. Lee, Y. S. Jang and
M. S. Yang. 2002. Production of Biologically Active
hG-CSF by Transgenic Plant Cell Suspension Culture.
Enzyme and Microbial Technology **30(6)**, 763-767
6. Jefferson, R. A. 1989. The GUS reporter gene system.
Bio/Technol. **42**, 837-838
7. Gijs, J. H., van Rooijen and M. M. Moloney. 1995.
Plant seed oil-body as carriers for foreign proteins.
Bio/Technol. **13**, 72-77
8. Jung, K. H., S. S. Kwak, C. Y. Choi and J. R. Liu.
1994. Development of two stage culture process by
optimization of inorganic salts for improving
catharanthine production in hairy root cultures of
Catharanthus roseus. *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 57-61
9. Larrick, J. W. and D. W. Thomas. 2001. Producing
proteins in transgenic plants and animals. *Curr. Opin.*
Biotech. **12**, 411-418
10. Lee, J. H., E. W. Noh. 1996. Construction of a vector
for the expression of HBTV vaccine gene. *Res. Rep.*
For. Gen. Res. Inst. Korea **32**, 80-87
11. Lee, J. H., N. S. Kim, T. H. Kwon and M. S. Yang.
2001. The effects of light on the production of
hGM-CSF in transgenic plant cell culture. *Kor. J.*
Biotechnol. Bioeng. **16(6)**, 568-72
12. Lee, J. H., N. S. Kim, T. H. Kwon, S. M. Park, Y. S.
Jang and M. S. Yang. 2001. The effects of sucrose
and inoculum size on the production of hGM-CSF
from plant cell culture. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*
16(4), 376-380
13. Lee, J. H., N. S. Kim, T. H. Kwon, Y. S. Jang and M.
S. Yang. 2002. Increased production of the human
granulocyte-macrophage colony stimulating factor by
addition of stabilizing polymer in plant suspension
cultures. *Journal of Biotechnology* **96(3)**, 205-212
14. Lee, J. H., N. S. Kim, T. H. Kwon and M. S. Yang.
2002. Effects of osmotic pressure on production of
recombinant human granulocyte-macrophage colony
stimulating factor in plant cell suspension culture.
Enzyme and Microbial Technology **30(6)**, 768-773

(Received August 5, 2002; Accepted September 27, 2002)