

형질전환된 식물세포에서 hGM-CSF 생산과 안정성에 대한 다양한 탄소원의 효과

이재화^{1*}

¹신라대학교 생명공학과

Effect of Various Carbon Sources on the Production and Stabilization of hGM-CSF in Transgenic Plant Suspension Culture

Jae-Hwa Lee^{1*}

¹Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan 617-736, Korea

ABSTRACT The effects of various carbon sources on the secretion of hGM-CSF, total protein and protease into the medium were investigated in transgenic tobacco cells. The dry cell weight (11.2 g/L) and wet cell weight (310.8 g/L) were highest at 30 g/L glucose after 5-day culture but, the dry cell weight (13.4 g/L) and wet cell weight (480 g/L) were highest at 30 g/L sucrose after 10-day culture. The total protein (110.3 mg/L), protease activity (3950 U/L) and total secreted hGM-CSF (56 mg/L) were highest at 30 g/L sucrose after 10-day culture. Stabilization of the total secreted protein and hGM-CSF in various carbon source concentrations was determined. Total secreted protein was most stabilized in the medium containing sucrose. However, the loss of the total protein was increased with the concentrations of high level in medium containing sorbitol, mannitol, fructose, and glucose. hGM-CSF was more stabilized in the medium containing sucrose than in the medium containing sorbitol, mannitol, fructose, glucose.

Key words: hGM-CSF, recombinant protein, transgenic plant, transgenic suspension culture

서 론

재조합 단백질 생산이 가능한 방법으로는 형질전환된 미생물, 곤충세포, 동물세포, 식물세포를 이용하는 방법이 있다. 이전 20여 년간은 주로 미생물이나 동물세포를 이용하여 재조합 단백질을 생산하였지만, 최근에는 식물세포를 이용한 배양 시스템 개발이나 대량생산 가능성에 대한 연구가 수행되고 있다. 식물세포를 이용한 재조합 단백질의 생산은 생산비용이 낮아 경제적이며 대량생산을 위한 scale-up이 상대적으로 쉽고, 전사 후 수식 과정이 동물세포와 유사하며 인체에 유해한 2차 감염의 우려가 적은 등 여러 가지 장점이 보고되어 있다 (Miele 1997; Doran 2000). 식물세포배양을 통해 생산되는 재조합 단백질로는

risin (Senki PC et al. 1999), interleukin (Magnuson et al. 1998), mGM-CSF (Lee et al. 1997), hGM-CSF (James et al. 2000), G-CSF (Hong et al. 2001), 항체 (Lacount et al. 1997), β -glucuronidase (Kurata et al. 1998) 등이 보고되어 있다.

하지만, 식물세포배양을 이용하여 재조합 단백질을 생산할 경우에는 공통적으로 생산수율이 낮은 것으로 알려져 있으며 이를 개선하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다. 삼투압을 이용하여 생산물을 세포 밖으로 유도 시키거나 (Lee et al. 2002a), 단백질 안정제인 gelatin, PVP, PEG를 첨가하였을 때 gelatin에 의해서 높은 단백질 안정화가 이루어졌던 보고도 있다. 한편, 세포 밖으로 분비된 단백질은 문헌에 보고된 바에 의하면 protease의 공격을 쉽게 받는다는 단점도 있었다 (Wright et al. 1997). 이에 재조합 단백질 생산에 있어 protease를 억제 시키기 위해 억제제의 일종인 bacitracin을 이용하여 생산수율을 향상시킨 사례 또

*Corresponding author Tel 051-999-5748 Fax 051-999-5636
E-mail: jhalee@silla.ac.kr

한 있다 (Ceriotti et al. 1998; Lee et al. 2002b, 2003a). 이외에도 재조합 단백질의 생산성은 세포 생존율과 직접적으로 비례한다는 연구결과도 있어 (Lee et al. 2004), 식물세포의 생존율을 높이기 위한 방안과 세포 사멸 방지기술에 대한 개발 역시 많은 연구가 진행되고 있다. 하지만 많은 연구에도 불구하고 여러 가지 외부요인에 대한 재조합 단백질 생산수율 향상에 관련된 연구결과가 부족한 실정이다.

GM-CSF는 조혈모세포에 작용하여 백혈구의 생성을 촉진하는 당단백질로서, 항암 화학요법에 따른 호중구 감소증, 재생불량성 빈혈, 골수이형성증후군, 자가골수이식, 후천성 면역결핍증에 대한 임상 보고가 있으며, 특히 호중구 감소증과 골수 이식의 환자에 매우 효과적임이 보고되어 있는 유용 단백질이다 (Champlim et al. 1989; Antman et al. 1998).

본 연구에서는 사람유래의 hGM-CSF가 형질전환된 식물세포의 현탁배양 시 다양한 탄소원이 세포성장과 hGM-CSF 생산 및 안정화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 사용된 형질전환 식물세포의 개발과 생리적 활성에 대한 검정은 Kwon 등 (Kwon et al. 2003)에 의해 보고되었으며, 이에 각 탄소원에 따른 세포의 성장양상, hGM-CSF 안정성에 영향을 미치는 protease양, 분리정제 효율에 영향을 미칠 수 있는 total secreted protein 및 최종적으로 생산된 hGM-CSF를 정량적으로 조사하였다. 또한, 생산된 total secreted protein과 hGM-CSF가 여러 가지 탄소원 (sorbitol, mannitol, fructose, glucose)에 대한 안정성 역시 확인해 보았다.

재료 및 방법

형질전환된 세포의 현탁배양

본 연구에서는 hGM-CSF 유전자가 도입된 *A. tumefaciens* LBA4404를 *Nicotiana tabacum* 세포에 형질전환 시켜 사용하였다 (Kwon et al. 2003). 기본 성장배지는 pH 5.8, 2.4-D 1 mg/L, Kinetin 0.02 mg/L, kanamycin 100 mg/L 가 포함된 변형된 Murashige & Skoog 액체배지 (Murashige 1962)에 배양하였고, 50 ml의 액체배지에 초기 세포는 생체중량으로 2.5 g을 접종하였다. 배양 조건은 25°C, 100 rpm에서 암배양 조건으로 300 mL Erlenmeyer flask를 이용하여 배양하였다. 계대배양은 배양된 현탁세포를 7일 간격으로 20%의 비율로 배양하면서 유지하였다.

또한, 탄소원에 대한 영향을 알아보기 위해 MS 배지의 기본 탄소원인 sucrose를 sorbitol, mannitol, fructose, glucose로 대체하여 제조하였다. 이때 각 탄소원의 농도를 맞추기 위해 각각 0.0876 M로 제조하였다. 제조된 각각 50 ml의 변형된 MS 배지에 역시 세포를 생체중량으로 2.5 g을 접종하고 배양 조건은 25°C, 100 rpm에서 암배양 조건으로 300 ml Erlenmeyer flask를 이용하여 배양하였다.

다양한 탄소원을 이용한 생산된 재조합단백질의 안정성 측정

기본 탄소원으로 사용한 3% sucrose를 이용한 50 ml의 MS배지에 생체중량으로 2.5 g을 접종하여, 배양 5일째 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액에 각각의 사용된 탄소원의 농도를 10, 30, 60, 90 g/L가 되게 하여 시간에 따른 protein, hGM-CSF에 미치는 영향을 관찰 하였다.

세포성장 측정

배양된 현탁세포는 각 시간별로 생체중량 (Wet cell weight)과 건조중량 (Dry cell weight)을 측정하였다. 세포 생체중량은 배양액을 Whatman No.1 여과지로 여과하여 얻은 세포의 무게를 측정하였다. 건조중량은 생체중량을 확인한 세포를 60°C dry oven에 넣어 건조하여 시간에 따른 무게 변화를 관찰하였다. 세포성장 측정은 각각의 배양 세포를 3개씩 배양하여 측정하였고, 측정된 결과는 평균치를 계산하여 나타내었다.

총 단백질과 단백질 분해효소 활성 측정

총 단백질을 분석하기 위해 Bradford assay (Bio-rad, USA)법을 이용하여 정량하였고, protease activity assay은 1% casein을 포함한 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 5.8)와 0.4 M trichloroacetic acid (TCA)를 사용하였다. 측정을 위해 1% casein을 포함한 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 5.8) 200 μ l와 현탁세포를 여과하여 얻은 여과액 200 μ l를 섞어 25°C incubator에서 2시간 반응시켰다. 이후 0.4 M trichloroacetic acid (TCA) 600 μ l 넣어 섞은 후 상온에서 5분 반응시켜 원심분리 (6000 rpm, 5 min)한 후 상층액을 회수하여 280 nm에서 O.D를 측정하였다. Protease activity의 unit (U)는 최종 반응액 1 ml을 280 nm에서 측정했을 때 해당하는 absorbance 값을 U/L로 환산한 값이다. 총 단백질과 단백질 분해효소 활성 측정은 각각의 배양 세포를 3개씩 배양하여 측정하였고, 측정된 결과는 평균치를 계산하여 나타내었다.

hGM-CSF 측정

배양액 5 ml의 상등액을 분리한 후에 투석과정을 통하여 염분을 제거하였다. 투석을 통하여 탈염된 배양액을 ELISA 분석 kit (Pharmingen Inc, San Diego, CA, U.S.A)를 사용하여 생산된 hGM-CSF를 정량 하였다. 분석 방법은 제약회사의 표준방법을 사용하였으며, 정량을 위한 표준 GM-CSF로서는 곤충세포 유래의 GM-CSF (Pharmingen Inc)를 사용하였다. 배양액 내의 hGM-CSF의 측정은 각각의 배양 세포를 3개씩 배양하여 측정하였고, 측정된 결과는 평균치를 계산하여 나타내었다.

결과 및 고찰

다양한 탄소원에 따른 세포성장 양상

MS 배지에 기본 탄소원으로 sorbitol, mannitol, sucrose, fructose, glucose를 0.0876 M의 농도가 되게 하여 제조한 후 형질전환된 식물세포를 접종하여 배양하였다. 시료채취는 hGM-CSF를 가장 많이 생산하는 5일 (대수기)과 식물세포의 성장이 최고로 달하는 10일 (지체기)을 선택하였고, 세포 성장양상을 보기위해 dry cell weight와 wet cell weight를 측정해 보았다. 또한 이 측정된 결과를 바탕으로 cell size index 역시 알아보았다 (Figure 1).

측정결과 배양 5일째 세포생산량은 탄소원으로 glucose를 사용한 배양세포에서 dry cell weight가 11.2 g/L로 가장 높았고 wet cell weight 역시 310.8 g/L로 가장 높았다. 그러나 cell size index는 mannitol이 37.4로 가장 높은 결과가 나왔다. 이후 5일간 더 배양하여 배양 10일차에는 오히려 sucrose를 탄소원으로 사용한 배양세포에서 dry cell weight가 13.4 g/L, wet cell weight가 480 g/L로 가장 높이 성장한 것을 확인할 수 있었다. 이 결과 다양한 탄소원을 영양원으로 이용하여 배양하였을 때, 배양 초기에는 fructose, glucose, sucrose를 이용한 배양세포의 성장이 비슷하였으나, 배양 후기에 최대성장을 보이는 배양 10일차에는 tobacco cell이 sucrose를 가장 잘 이용하여 가장 많은 성장을 하는 것을 확인할 수 있었다.

탄소원 종류에 따른 total secreted protein 과 total secreted protease 생산

배양세포 외로 분비된 총 단백질의 생산량을 측정하기 위해 Bio-rad사의 Bradford assay 법을 이용하여 배양시간에 따른 단백질양의 변화를 분석하였다. protease activity assay은 1% casein을 포함한 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 5.8)와 0.4 M trichloroacetic acid (TCA)를 사용하여 반응시킨 후 상층액을 회수하여 280 nm에서 O.D를 측정하였다 (Figure 2).

Total secreted protein의 생산양상은 세포성장과 비슷한 양상을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 세포성장 역시 sucrose, fructose, glucose 세 종류의 탄소원에서 5 일간 배양한 세포양은 약 55 mg/L로 비슷하게 생산하였고 이후, sucrose에서 10 일간 배양한 배양배지의 세포가 110.3 mg/L로 가장 많이 성장한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 형질전환된 tobacco cell이 생산하는 재조합 단백질은 세포성장에 따라 비례적으로 단백질을 생산하는 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다. Total secreted protease 역시 배양 5 일차에는 fructose, glucose를 탄소원으로 사용한 배지에서 2600 U/L로 가장 높게 나왔지만, 배양 10 일차에는 sucrose를 기본배지로 한 배양액에서 3950 U/L로 가장 많은 양이 측정되었고 이 역

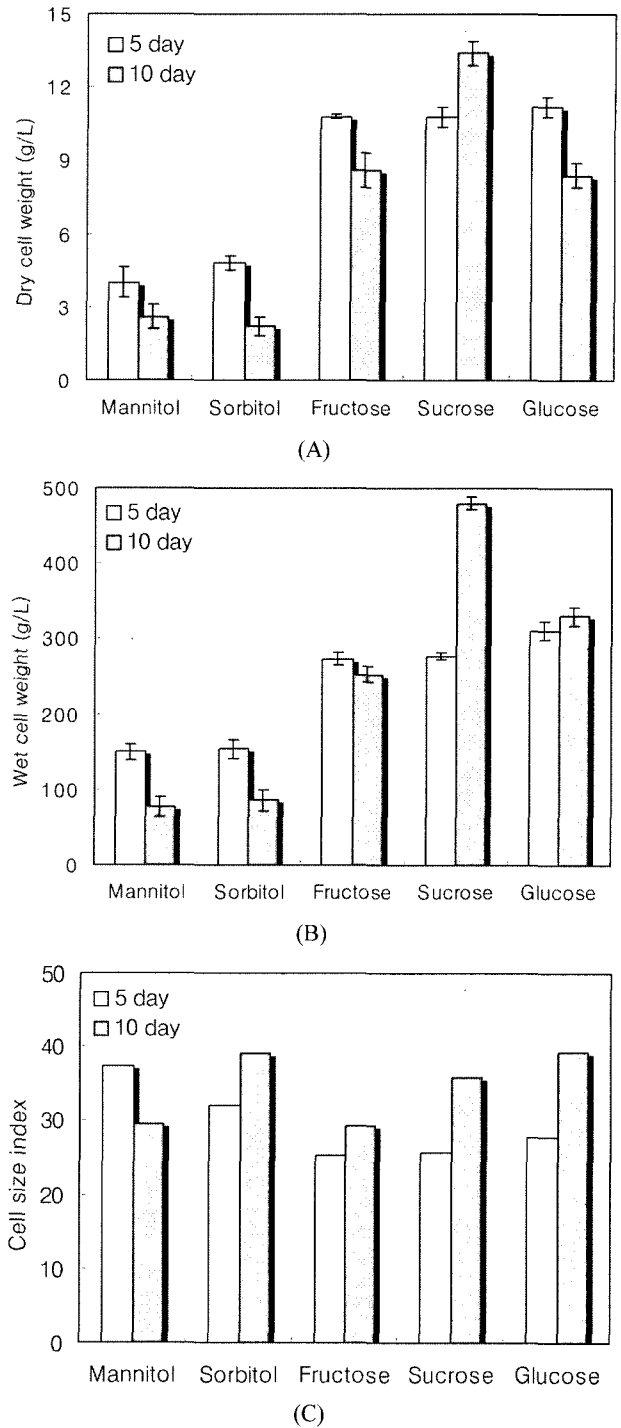


Figure 1. Effects of various carbon sources on plant cell growth during suspension batch culture. Cell size index was calculated by dividing wet cell weight (WCW), by dry cell weight. The error bars represent the standard error among the three separate experiments (DCW) [dry cell weight-A, wet cell weight-B, cell size index-C (WCW / DCW)].

시도 세포성장에 따라 비례적으로 protease를 생산함을 알 수 있었다.

측정된 결과를 바탕으로, 형질전환된 tobacco cell에서 생산된 total secreted protein 1 mg에 대해 작용하는 protease 양을 계산해 보았다. 10 일간 sucrose를 이용하여 배양한 세

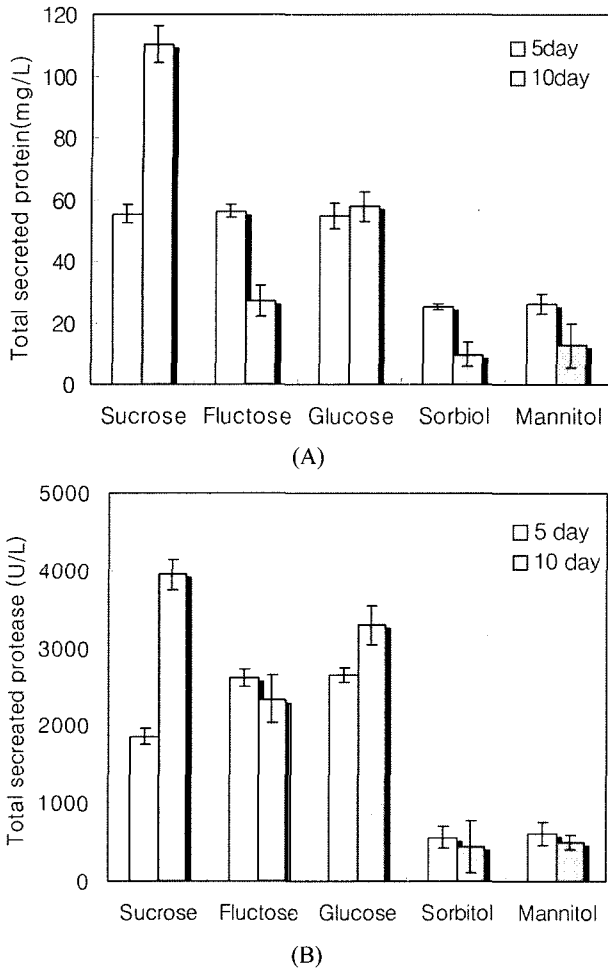


Figure 2. Effects of various carbon sources on the secretion of total protein and protease during suspension batch culture. The error bars represent the standard error among the three separate experiments [total secreted protein-A, total secreted protease-B].

포에서 생산된 total secreted protein에 대한 total secreted protease 비는 1 mg : 35.81 U 이지만, fructose를 이용한 배양세포에서는 1 mg : 86.36 U, glucose를 이용한 배양세포에서는 1 mg : 57.18 U로 생산되어 작용하는 것을 확인할 수 있었다. 이 계산된 결과에 따르면, 생산된 재조합 단백질 1mg에 대해 작용하는 protease의 양이 fructose를 탄소원으로 사용하여 배양한 배지에서 86.36 U로 가장 많이 작용한다고 볼 수 있기 때문에 재조합 단백질 생산 수율에 가장 큰 악영향을 미칠 것이라고 생각된다. 같은 방법으로 sucrose를 이용한 재조합 단백질 생산에서는 단백질 1 mg에 대해 protease가 35.81 U로 작용하기 때문에 상대적으로 생산된 재조합 단백질에 대하여 안정할 것이라고 판단된다.

탄소원 종류에 따른 hGM-CSF 생산

배양액 5 mL의 상등액을 분리한 후 투석과정을 통하여 염분을 제거하였다. 투석을 통하여 탈염된 배양액을 Pharmingen Inc. (San Diego, CA, U.S.A)의 ELISA 분석 kit를

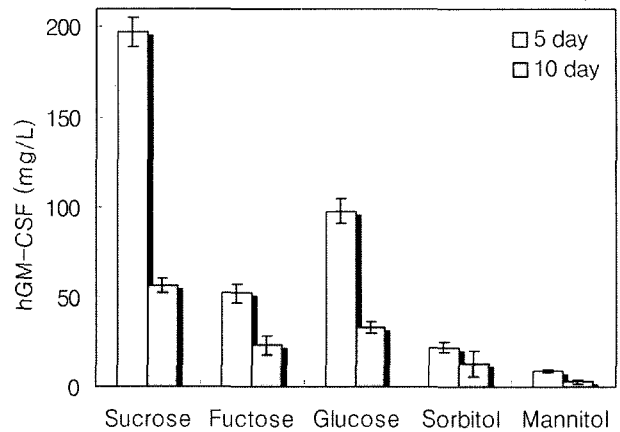


Figure 3. Effects of various carbon sources on the secretion of hGM-CSF during suspension batch culture. The error bars represent the standard error among the three separate experiments.

사용하여 생산된 hGM-CSF를 정량하였다 (Figure 3).

그 측정결과, 배양 5일차에는 sucrose를 기본배지로 사용한 배지에서 195 mg/L로 가장 높게 측정되었고, 배양 10일차에도 역시 sucrose를 기본배지로 사용한 배지에서 56 mg/L로 가장 높게 측정되었다. 이 결과를 보면 형질전환된 tobacco cell의 경우는 세포성장에 따라 비례적으로 단백질은 생산하였지만, 우리가 목적으로 하는 hGM-CSF의 경우에는 오히려 배양 초기에 195 mg/L로 거의 대부분의 hGM-CSF를 생산하여 세포외로 분비하였다. 이후 분비된 hGM-CSF가 protease나 다른 물리, 화학적인 요인에 의해 변성하거나 파괴되어 그 생산량이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 sorbitol, mannitol, fructose, glucose를 탄소원으로 이용한 hGM-CSF 생산 역시 배양 초기에 hGM-CSF의 생산량이 큰 것을 확인할 수 있었고 특히, glucose를 이용한 배양 세포의 경우 sorbitol, mannitol, fructose에 비해 상대적으로 hGM-CSF의 생산량이 많은 것을 나타내었다. 이러한 결과를 볼 때, 형질전환된 식물세포를 이용한 hGM-CSF의 생산은 glucose, sorbitol, mannitol, fructose를 이용하는 것보다 sucrose를 이용하여 5일간 배양하는 것이 가장 최적임을 알 수 있었다. 이는 형질전환된 tobacco cell이 세포성장과 외래 단백질 생산에 있어, 탄소원의 종류에 크게 영향을 받는 것을 확인할 수 있고, 생산된 재조합 단백질의 분리, 회수 시기가 세포성장 양상에 따르지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

탄소원 농도변화에 따른 생산된 total secreted protein의 영향

Sorbitol, mannitol, fructose, glucose를 여러 농도로 첨가하였을 때 생산된 total secreted protein에 대한 안정성을 확인하였다. 5일간 배양한 배양액의 상층액에 각각의 sorbitol, mannitol, glucose, fructose를 10, 30, 60, 90 g/L의 농도로 첨가하였다. 그리고 탄소원으로 sucrose를 넣은 것을 control로 하였고 시료채취 시간은 0 h, 2 h, 6 h, 1 day, 3 day,

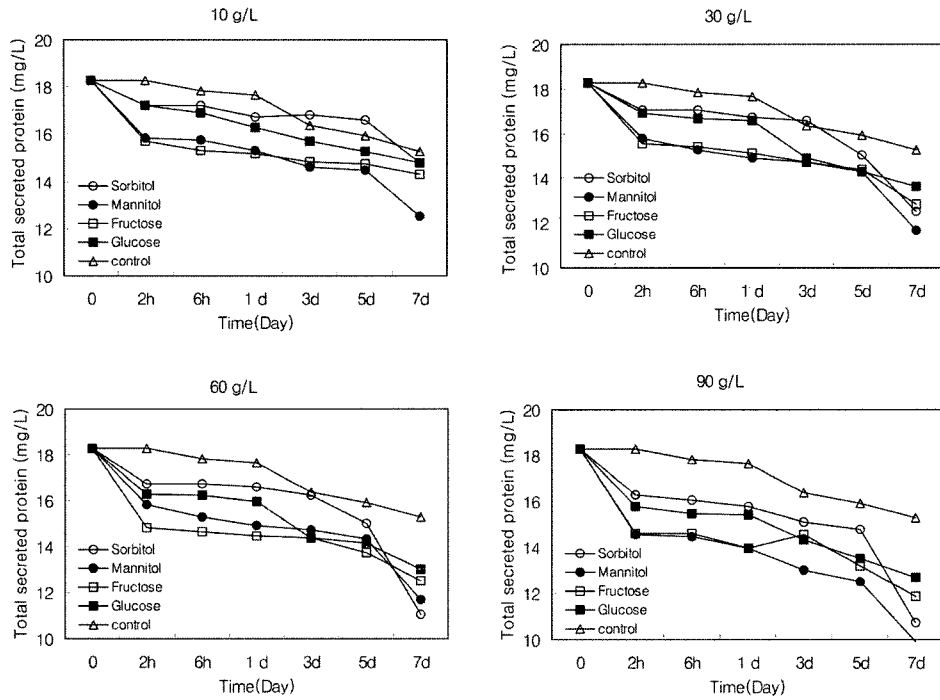


Figure 4. Effect of various carbon sources on total secreted protein in transgenic tobacco cell cultures [Production of protein in sorbitol ○, mannitol ●, glucose □, fructose ■, sucrose △].

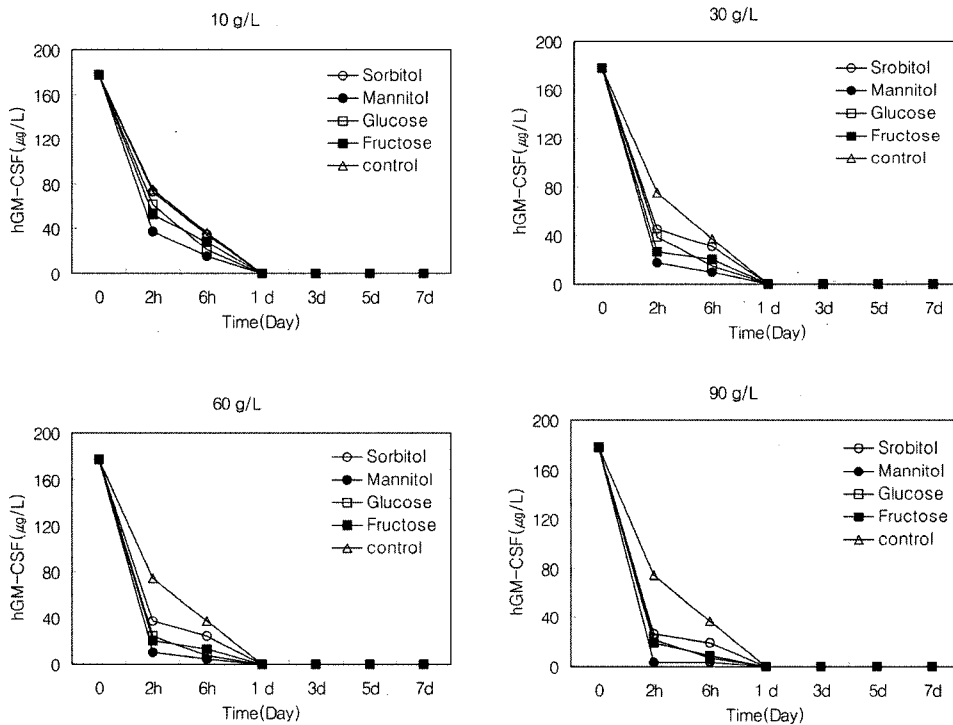


Figure 5. Effect of various carbon sources on survival of hGM-CSF [Production of hGM-CSF in sorbitol ○, mannitol ●, glucose □, fructose ■, sucrose △].

5 day, 7 day로 하였다. 배양액 내의 total secreted protein 을 측정하기 위해 Bio-rad사의 Bradford assay 법을 이용하여 분석하였다 (Figure 4).

Sorbitol, mannitol, fructose, glucose의 농도변화에 따라

나뉘분 결과, 비교대상으로 사용한 sucrose의 경우에는 시간이 지나감에 따라 protein이 자연적으로 변성되거나 분해 되는 양이 적었고, sucrose의 농도가 증가하더라도 양상은 크게 변화가 없었다. 그러나 sorbitol, mannitol, fructose,

glucose의 경우에는 sucrose에 비해 protein이 변성되는 양이 시간이 지남에 따라 큰 것을 확인할 수 있었다. 특히, sorbitol, mannitol, fructose, glucose의 농도가 증가함에 따라 protein이 변성되는 양도 증가하고, 특히 반응 시간이 5일 이후에는 변성양이 더욱 큰 것을 확인할 수 있었다.

탄소원 농도변화에 따른 생산된 hGM-CSF의 영향

형질전환된 식물세포를 배양 5일째 hGM-CSF의 생산량이 최대에 도달하기 때문에 배양 5일째의 샘플을 사용하여 hGM-CSF가 이후에 파괴되는 양상을 관찰하고자 하였으며, 추가로 여러 가지 당이 첨가된 환경에서 안정성의 변화를 관찰하고자 하였다. 이 여과액에 각각의 sorbitol, mannitol, glucose, fructose를 10, 30, 60, 90 g/L의 농도로 한다. 그리고 탄소원으로 sucrose를 넣은 것을 control로 하였고 시료 채취 시간은 0 h, 2 h, 6 h, 1 day, 3 day, 5 day, 7 day로 하였다 (Figure 5).

먼저 비교대상으로 사용한 sucrose의 경우에는 반응 2h부터 hGM-CSF의 변성이 크게 나타나고, 반응 1day 이후로는 검출이 되지 않았다. 그리고 sucrose의 농도가 증가하더라도 hGM-CSF의 변성 양상은 같음을 알 수 있었다. 또한 sorbitol, mannitol, glucose, fructose를 농도별로 반응시켜 본 결과, 각각의 탄소원의 농도가 10 g/L 일 때에는 sucrose와 hGM-CSF의 변성 양상이 비슷하여 반응 2h부터 hGM-CSF의 변성이 크게 나타나고, 반응 1 day 이후로는 검출이 되지 않았으나, sorbitol, mannitol, glucose, fructose의 농도가 증가함에 따라 hGM-CSF의 변성이 더욱 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

만약 tobacco cell 을 이용한 hGM-CSF의 생산 시 생산된 hGM-CSF의 분리, 정제를 위한 안정성 고려한다면 배양배지의 탄소원을 sucrose를 사용할 때 비교적 안정할 것이고, 또한 반응 1 day 이후에는 크게 불안정하므로, 이에 생산된 hGM-CSF의 배양배지에서 안정성 향상 방안을 강구하여야 할 것이다.

적 요

다양한 탄소원을 사용하였을 시, 세포성장애 미치는 영향은 배양 5일째 glucose를 사용한 배양세포에서 dry cell weight가 11.2 g/L, wet cell weight가 310.8 g/L로 가장 높았다. 이후 배양 10일차에는 오히려 sucrose를 탄소원으로 사용한 배양세포에서 dry cell weight가 13.4 g/L, wet cell weight가 480 g/L로 가장 높이 성장한 것을 확인할 수 있었다. Total secreted protein의 경우는 배양 10일차에 sucrose를 기본 탄소원으로 사용하였을 때 110.3 mg/L로 가장 높게 나왔다. Total secreted protease 역시, 배양 10일차에 sucrose를 기

본 탄소원으로 사용한 배양액에서 3950 U/L로 가장 많은 양이 측정되었다. 최종적으로 재조합된 단백질인 hGM-CSF의 생산량에 대한 측정결과, sucrose를 기본 탄소원으로 사용한 배지에서 배양 10일차에 56 mg/L로 가장 높게 측정됨을 확인할 수 있었다.

이 외에 다양한 탄소원 농도변화에 따른 total secreted protein과 hGM-CSF의 안정성 평가를 확인해본 결과, total secreted protein의 경우, 비교대상으로 사용한 sucrose에서는 농도변화에도 큰 손실률을 보이지는 않았으나, sorbitol, mannitol, fructose, glucose의 경우에는 농도가 높아질수록 배양액내의 protein의 손실률이 증가 하였다. 총 분비된 hGM-CSF 역시 sucrose에 비해 sorbitol, mannitol, fructose, glucose에서는 분비된 hGM-CSF의 양이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 탄소원의 농도가 높아질수록 hGM-CSF의 양이 감소하는 경향이 크게 나타났다.

인용문헌

- Antman KS, Griffin JD, Dlias A, Socinski MA, Ryan L, Cannistra SA, Oette D, Whitley M, 3rd Frei E, Schnipper LE (1998) Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression. *J Med Microbiol* 319: 593-598
- Cerioti A, Duranti M, Bollini (1998) Effects of N-glycosylation on the folding and structure of plant proteins. *J Exp Bot* 49: 1091-1103
- Champlim RE, Nimer SD, Ireland P, Oette DH, Golde DW (1989) Treatment of refractory aplastic anemia with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 73: 694-699
- Hong SY, Kwon TH, Kim OH, Lee JH, Jang YS and Yang MS (2002) Production of biologically active hGM-CSF by transgenic plant cell suspension culture. *Enzyme Microb Tech* 30: 763-767
- James EA, Wang C, Wang Z, Reeves R, Shin JH, Magnuson NS and Lee JM (2000) Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expres Purif* 19: 131-138
- Kwon TH, Shin YS, Kim YS and Yang MS (2003) Secretory production of hGM-CSF with a high specific biological activity by transgenic plant cell suspension culture. *Biotech Bioeng* 8: 135-141
- Kurata H, Takemura T, Furusaki S and Kado CI (1998) Light-controlled expression of a foreign gene using the chalcone synthase promoter in tobacco BY-2 cells. *J Ferment Bioeng* 86: 317-323
- LaCount W, An G and Lee JM (1997) The effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures. *Biot-echnol Lett* 19: 93-96
- Lee JS, Choi SJ, Kang HS, Oh WG, Choi KH, Kwon TH.

- Kim DH and Yang MS (1997) Establishment of a transgenic tobacco cell suspension culture system for producing murine granulocyte - macrophage colony stimulation factor. *Mol Cell* 7: 783-787
- Lee JO, Shim DH, Joo CU, Kim DI, Lee DG, Lee JH (2004) Effects of sucrose concentration on the production of hGM-CSF in transgenic plant cell suspension culture. *J Plant Biotechnol.* 31: 163-167
- Lee SY, Cho JM, Kim DI (2003) Effect of bacitracin on hGM-CSF production in suspension cultures of transgenic *Nicotiana tabacum* cells. *Enzyme Microb Tech* 33: 353-357.
- Lee SY, Cho JM and Kim DI (2003) Stability Enhancement of hGM-CSF in Transgenic *Nicotiana tabacum* Suspension Cell Cultures. *Biotech Biopro Engineer* 8: 187-191
- Lee JW, Kim NS, Kwon TH, Yang MS (2002) Effects of osmotic pressure on production of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in plant cell suspension culture. *Enzyme Microb Tech* 30: 768-773
- Lee JW, Kim NS, Kwon TH, Jang YS, Yang MS (2002) Increased production of human granulocyte - macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. *J Biotechnol* 96: 205-211
- Magnuson NS, Linzmaier PM, Reeves R, An G, HayGlasee K and Lee JM (1998) Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Express Purif* 13: 45-52
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473-479
- Miele L (1997) Plants as bioreactors for biopharmaceuticals : regulatory consideration. *Trans Biotechnol.* 15: 45-50
- Pauline MD (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotech* 11: 199-204
- Sehnki PC, Ferl RJ (1999) Processing of preproinsulin in transgenic tobacco. *Protein Expr purif* 15: 188-195

(접수일자 2005년 11월 21일, 수리일자 2005년 12월 12일)