

## 배지교환식 고농도 배양에 의한 참당귀 현탁세포 유래 ECP 생산

<sup>1</sup>김영화 · <sup>2</sup>김익환 · †<sup>1</sup>김동일  
<sup>1</sup>인하대학교 공과대학 생물공학과, <sup>2</sup>고려대학교 생명공학원  
(접수 : 2006. 4. 26., 게재승인 : 2006. 10. 19.)

## Production of Extracellular Polysaccharide by Perfusion Culture of *Angelica gigas* Nakai Suspension Cells

Young-Hwa Kim<sup>1</sup>, Ik-Hwan Kim<sup>2</sup>, and Dong-Il Kim<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

<sup>2</sup>School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

(Received : 2006. 4. 26., Accepted : 2006. 10. 19.)

High-density perfusion cultivation was performed to produce extracellular polysaccharide (ECP) as immunostimulating agents in suspension cell cultures of *Angelica gigas* Nakai. In batch culture, the maximum cell density was 16.8 gDCW/L at day 6 and 0.9 g/L of ECP was obtained at day 8. When the medium exchange was started at the fifth day after inoculation for the perfusion culture, high concentration of the cells at 23.8 gDCW/L could be achieved with continuous production of ECP. Treatments of ultrasound and Pluronic F-68 were found to be helpful for the secretion of intracellular ECP into the culture medium.

**Key Words** : *Angelica gigas*, extracellular polysaccharide, perfusion culture, ultrasound, Pluronic F-68

### 서 론

한약재로 사용되는 당귀는 약용식물인 참당귀 (*Angelica gigas* Nakai)의 뿌리를 건조시킨 것이다. 조선당귀라고도 불리는 숙근성 다년초인 참당귀 뿌리의 다당 성분은 여러 면역조절활성을 갖는다고 알려져 있다(1). 참당귀에서 얻어진 면역활성이 있는 다당을 특별히 angelan이라 하며 여타 다당류들과는 다른 고유의 면역증강 기작을 보인다고 한다(2). 인삼의 면역증강 효과의 일부도 이와 같은 다당류의 영향으로 생각할 수 있다.

식물의 세포벽은 펙틴, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 같은 다당류로 구성되어 있다. 펙틴 계열의 복잡한 구조의 다당류들은 세포벽 내의 구조적 재배열이 일어나며 배출되는데, 이것을 세포외 다당 (extracellular polysaccharide, ECP)이라고 한다(3). 최근에는 식물에 공생하는 *Rhizobium*의 경우에도 다량의 ECP를 생산하는 것으로 보고되었다(4). 식물세포배양을 이용하여 이러한 다당을 대량생산하는 것도 가능하다(5).

식물세포배양을 통한 유용물질의 대량생산을 위해서는 고농도 배양 기술이 필요하다. 식물세포는 생장을 위한 최소점중 농도를 필요로 하는데 고농도 배양을 적용하면 이러한 요구도를 최소화할 수 있으며 상업적인 규모의 배양에서는 다수의 세포배양기가 필요하게 되는 단점을 보완할 수 있다. 따라서 배양을 위한 준비기간의 단축과 고농도의 최종세포농도로 인한 생산성의 향상을 도모할 수 있다(6).

고농도 배양 방법으로는 유가식 배양과 배지교환식(perfusion) 배양이 있다. 유가식 배양은 가장 전통적인 방법이며, 배지교환식 배양은 이미 동물세포배양을 이용한 단일균향체의 생산시에 그 유용성이 확인된 방법으로 연속적인 물질의 회수가 가능하여 시간, 장비, 비용의 절감 효과가 높다(7, 8). 회분식 배양은 오염가능성이 낮지만 양분의 고갈, 성장저해물질의 축적 등에 의한 세포생장의 제한 등의 단점을 지니고 있으며, 유가식 배양의 경우 배양 부피의 제한, 축적된 성장저해물질의 제거 어려움 등을 단점으로 들 수 있다. 배지교환식 배양은 이러한 단점을 극복할 수 있는 배양법으로서 새로운 배지의 지속적인 공급에 의한 배양기간의 연장, 성장저해물질을 함유한 사용 배지의 제거 등이 가능하다(9). 그러나 운전상의 어려움, scale-up시 공정의 복잡성, 다량의 배지 소비 등을 해결해야 한다. 현탁배양 식물세포가 포함된 배지교환식 배양기

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-860-7515, Fax : +82-32-872-4046

E-mail : kimdi@inha.ac.kr

에서 가장 중요한 것은 세포와 배지의 분리이다. 특히 원하는 생성물이 배지로 분리되는 경우 이는 꼭 필요하다. 배지교환식 배양기에서 세포와 배지를 분리하는데 필요한 기술은 침전, 원심분리 및 tangential filtration을 들 수 있다. Su 등(10)은 *Anchusa officinalis* 식물세포에 대한 perfusion 배양을 이용하여 35 g/L라는 높은 농도의 세포를 얻었다고 한다.

한편 초음파를 식물세포에 처리하는 경우 세포막의 투과성을 증진시키므로 외부에서 DNA와 같은 큰 분자를 투입하거나, 세포 내에 간혀있는 물질을 배출하게 만드는 것이 가능한 것으로 알려져 있다(11). 이러한 초음파에 의한 세포구조의 변화와 투과성 증진은 세포의 성장을 증진시키기도 한다(12). 계면활성제인 Pluronic F-68 또한 세포막과 작용하여 투과성을 높이며 세포의 성장을 자극하거나 물질 생산을 증진시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다(13, 14).

본 연구에서는 참당귀의 세포배양에서의 ECP의 생산성을 높이고자 고농도배양을 목표로 배지교환식 배양을 수행하였다. 또한 효율적인 배지교환식 배양을 돕기 위해 ECP의 배지로의 분비를 증진시킬 것으로 예상되는 초음파 처리와 Pluronic F-68 첨가 영향을 확인하고자 하였다.

**재료 및 방법**

**세포주 및 배양**

참당귀 현탁세포배양을 위한 배지로는 Schenk와 Hildebrandt (SH) 기본배지에 30 g/L의 sucrose, 1 mg/L 2,4-D를 첨가하여 사용하였으며, pH를 5.8로 조절한 후 121℃에서 가압증기 멸균하여 사용하였다. 계대배양은 6일간격으로 수행하였으며, 암조건 회전식 진탕배양기에서 110 rpm, 25℃를 유지하였다.

**세포량 측정**

세포의 양을 확인하기 위해서는 세포건조량 (dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 세포를 감압 깔대기와 Toyo

No. 1 거름종이를 이용하여 배지와 분리하고, 동량의 증류수로 2회 세척한 후 무게를 사전에 측정된 접시에 담아 세포생체량 (fresh cell weight, FCW)을 측정하고, 60℃로 유지되는 건조기에서 항량이 될 때까지 수분을 제거하여 DCW를 측정하였다.

**Perfusion 배양을 위한 배지교환**

100-mL 삼각플라스크에 배지 22 mL을 넣고 멸균한 다음, 6일된 배양액 8 mL을 접종하고, 앞부분에 miracloth (Calbiochem, USA)를 부착하여 멸균한 배지교환용 pipet을 이용하여 배지만을 일정량 뽑아내고, sucrose를 농축한 새 배지를 주입하였다.

**ECP의 정량**

세포 내에 존재하는 다당을 정량분석 하기 위해서는 건조된 세포를 막자사발을 이용하여 곱게 빻은 후 0.1 g을 취하여 5 mL의 물을 첨가하고 100℃에서 1시간동안 중탕하였다. 이를 8,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 분석하였다. ECP의 정량을 위해서는 분자량 1,000이하의 물질을 제거할 수 있는 투석막 (Spectrum Medical Industries, USA)을 사용하여 탄소원을 제거한 뒤 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 방법을 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**참당귀 현탁세포배양을 통한 다당의 생산**

참당귀의 세포배양에서 세포의 시간에 따른 세포생장과 ECP 생산을 알아보기 위해 100-mL 삼각플라스크에 1 mg/L의 2,4-D와 탄소원으로 sucrose 3%가 첨가된 배지 22 mL을 넣고, 대수 증식기에 있는 현탁세포 8 mL을 접종하여 25℃, 암조건에서 110 rpm으로 배양하였다. Fig. 1과 같이 세포는 지연기를 거의 보이지 않으며 6일까지 급격히 증식하여 16.8 gDCW/L의 최고값을 얻을 수 있었다. 배양 기간에 따른 ECP의 생산은 세포생장과 함께 증가하다가 8

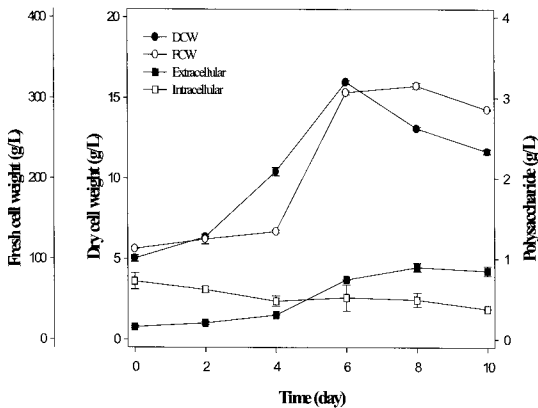


Figure 1. Cell growth and ECP production in batch cultures of *A. gigas* cell suspensions.

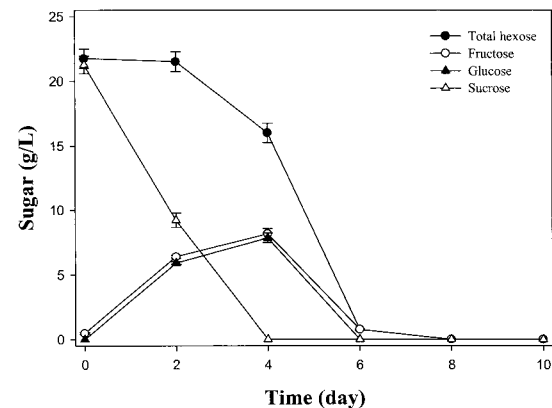


Figure 2. Consumption of carbon sources in *A. gigas* suspension culture.

일째에 최고 0.9 g/L가 생산되었다. 세포 내에 존재하는 다당은 세포 성장과 함께 감소하였다.

배지 내 탄소원인 sucrose는 invertase에 의해서 glucose와 fructose로 가수분해되어 배양초기부터 급격히 감소하였다 (Fig. 2). 또한 전환된 glucose와 fructose의 소모는 대수증식기에 급속히 진행되어, 배양 6일째에 완전히 고갈되었고, 이로 인해 그 이후에는 세포생장이 이루어지지 않았다.

**Perfusion 배양**

참당귀의 대부분 다당류는 세포내 축적되지 않고 세포밖, 즉 배지 내로 분비된다. 따라서 배지교환식 배양을 적용해 ECP가 생산된 배지는 제거하여 ECP를 추출하고 새로운 배지의 주입을 반복하면 ECP를 대량으로 얻을 수 있을 것이다. Su 등(9)은 *Anchusa officinalis*의 bioreactor에서의 배지교환식 배양을 이용하여 회분식 배양보다 3배의 생산성 향상을 나타냈다고 보고하였다.

참당귀의 고농도 배양을 위한 배지교환식 배양에서 최적조건을 확립하기 위하여 배지교환시기, 초기 당농도의 영향을 조사하였다. 먼저, 최적 배지교환 시작 시기를 결

정하기 위하여 시작 시기를 3일, 5일, 7일로 하여 sucrose를 2배 농축한 배지 5 mL로 한번 배지교환을 하였다. 3일과 5일에 배지교환을 한 경우 비슷하게 증가한 최대 세포농도를 보였지만, 5일에 배지교환을 한 경우가 세포의 배양기간이 더 연장되었다. 이에 비해, 7일에 배지교환을 한 경우에는 생장은 재개되었지만 최대 세포농도의 증가는 관찰되지 않았다. 이는 식물세포의 성장을 위한 conditioning factor의 유실과 새로운 배지의 유입에 따른 높은 당농도로 인한 삼투압의 증가가 원인인 것으로 생각된다(Fig. 3). 연속 배지교환의 영향을 알아보기 위해 배양 5일째부터 sucrose를 4배 농축한 배지로 2 mL씩 교환해준 결과, 세포의 생장이 계속 유지되었으며 최대 세포농도도 22일에 23.7 gDCW/L로 대조구에 비하여 1.7배 증가하였다(Fig. 4). 초기 당농도 변화에 따른 연속 배지교환의 영향을 보기 위하여 초기 당농도를 50 g/L로 하여 sucrose를 4배 농축한 배지로 2 mL씩 교환해준 결과, 초기 당농도가 증가됨에 따라 최대 세포농도도 23.8 gDCW/L로, 30 g/L 당농도 대조구에 비하여 1.6배 증가하였고, 배지교환을 하지 않은 50 g/L 대조구에 비교하면 1.1배 증가하였다(Fig. 5). 이 경우에 세포

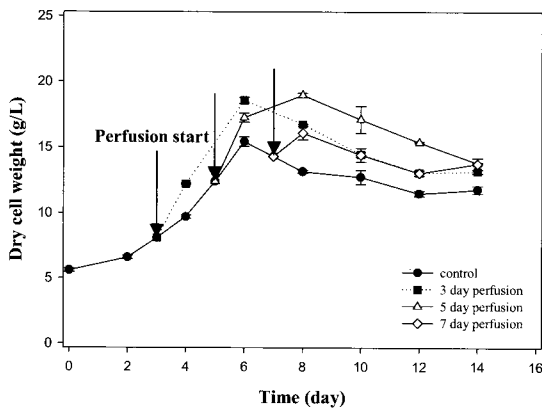


Figure 3. Perfusion cultivation of *A. gigas* suspension cells with different perfusion starting time and 2× sucrose medium.

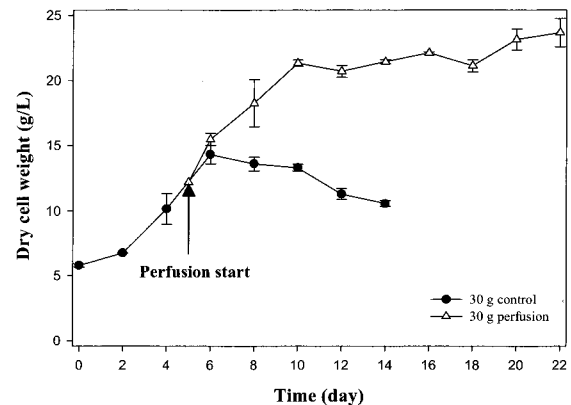


Figure 4. Time course changes of *A. gigas* suspension cell growth during perfusion culture with 4× sucrose medium.

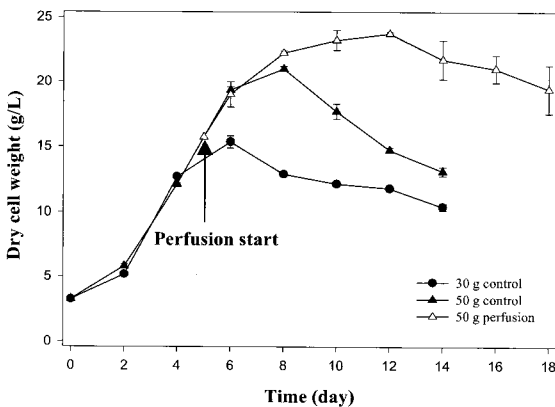


Figure 5. Time course changes of *A. gigas* suspension cell growth during perfusion culture with 4× sucrose medium.

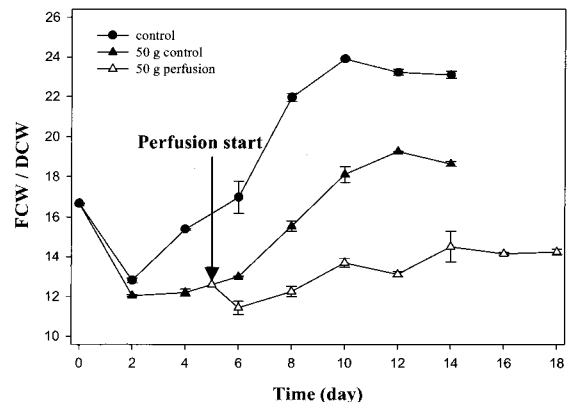


Figure 6. Changes of FCW/DCW during perfusion culture.

의 크기를 간접적으로 나타내는 FCW/DCW를 보면, 배지 교환을 함에 따라 삼투압의 증가로 인해 세포의 크기가 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 이 결과로 초기 당농도를 높이고 연속적으로 배지교환을 해준다면, 세포의 크기를 감소시켜 고농도의 세포를 얻을 수 있으며 결과적으로 참당귀 세포가 생산하는 다당류의 생산량을 증진시킬 수 있을 것이라 사료된다.

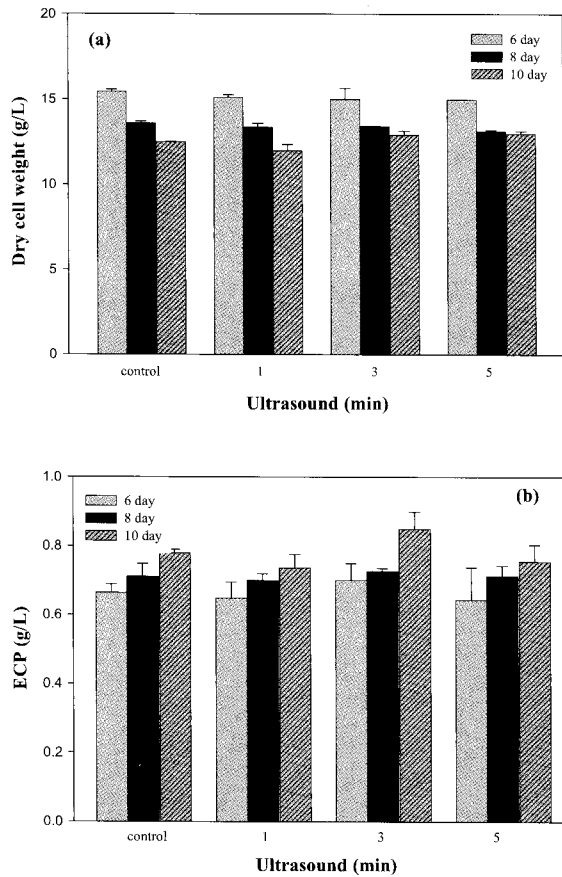


Figure 7. Effects of ultrasound on (a) *A. gigas* cell growth and (b) ECP production. US exposure on day 4 for various periods.

**초음파 (ultrasound)의 영향**

초음파는 식물세포배양에서 쓰이는 물리적 증진제로 강한 초음파는 생물체를 파괴하지만, 그와 반대로 낮은 강도의 초음파는 elicitor와 같은 영향을 주며 생리활성을 증진시켜, 식물세포의 방어 반응을 유도함과 동시에 이차대사산물의 생산을 증진시킨다고 알려져 있다. Lin 등(15, 16)은 *Panax ginseng* 세포배양에서 짧은 시간 동안 낮은 강도의 초음파를 처리하였을 때 ginsenoside saponin의 생산이 증진되었고, *Lithospermum erythrorhizon* 세포배양에서도 shikonin의 생산을 증진시켰다고 보고하였다.

출력이 185 W인 ultrasonic cleaner에 적당량의 물을 채운 다음, 배양 4일째의 참당귀 현탁세포가 담긴 플라스크를 넘어지지 않게 고정시키고 1, 3, 5분 동안 초음파에 노출시키고 배양을 계속하였다. 세포의 생장은 대조구와 비슷한 경향을 보였으며, ECP의 생산은 10일째 대조구의 0.8

g/L에 비해 3분간 노출시킨 경우 10일째 생산량이 0.9 g/L로 증가하였다(Fig. 7). 이 결과는 초음파가 abiotic elicitor로서 작용하여 참당귀의 방어 반응을 유도하여 ECP의 생산을 증진시키고 동시에 세포 내의 ECP의 배출을 유도한 것으로 생각할 수 있다.

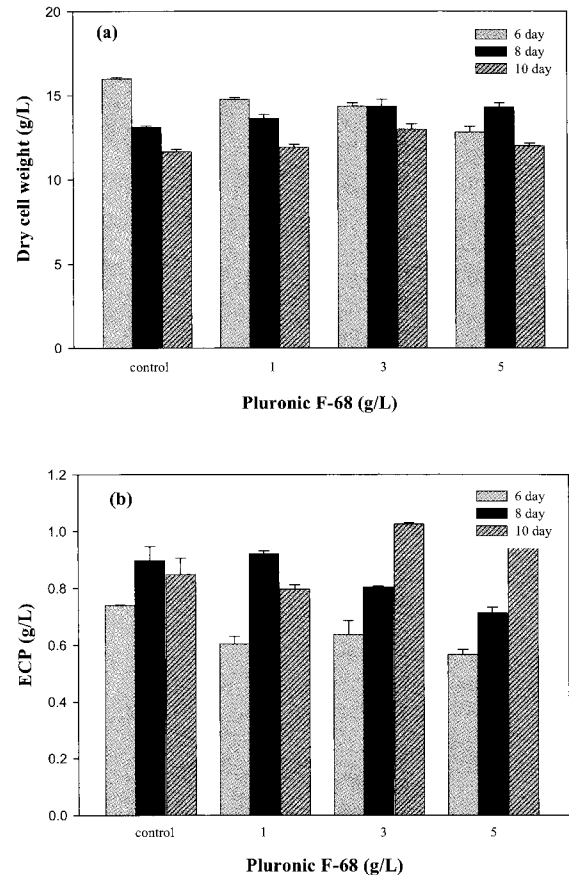


Figure 8. Effects of Pluronic F-68 on (a) *A. gigas* cell growth and (b) ECP production. US exposure on day 4 for various periods.

**Pluronic F-68의 영향**

계면 활성제의 하나인 Pluronic F-68의 첨가는 식물 세포 성장에 다양한 영향을 줄 수 있는데, 세포막과 상호 작용하여 세포 대사를 변화시키거나 영양분의 흡수를 증대하여 세포생장을 증대시킬 수 있다. Bassetti 등(14)은 *Morinda citrifolia* 현탁배양에 의한 anthraquinone의 생산에서 Pluronic F-68의 첨가로 세포의 생존력을 저하시키지 않고 산물의 분비를 증대시켰다고 보고하였다.

참당귀 세포배양 4일째에 Pluronic F-68을 첨가 후 배지 내의 최종 농도가 1, 3, 5 g/L가 되도록 첨가하였다. 세포의 생장은 높은 농도로 처리할수록 많은 저해를 가져왔으나, ECP의 생산은 반대로 8일째 대조구의 0.9 g/L에 비해 3 g/L의 Pluronic F-68을 첨가한 경우 1.0 g/L의 ECP가 생산되었다(Fig. 8). 이것은 Pluronic F-68이 세포막의 투과성을 변화시켜 ECP의 분비를 증대시킨 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 참당귀 현탁세포배양에 의한 면역 증강성 ECP의 생산을 증진시키기 위하여 배지교환식 배양을 수행하였으며, ECP의 분비를 촉진하는 초음파 처리와 Pluronic F-68의 영향을 조사하였다. 참당귀의 현탁세포배양시, 최대 세포생장은 6일째에 16.8 g DCW/L였고, ECP의 생산은 세포생장과 함께 증가하다가 8일째에 최고 0.9 g/L가 생산되었다. 식물세포 고농도배양법인 배지교환식 배양을 적용해, 초기 당 농도를 높이고 접종 후 5일부터 연속적으로 배지교환을 해주어 23.8 gDCW/L의 고농도의 현탁세포를 얻을 수 있었다. 초음파 처리 및 Pluronic F-68의 첨가는 참당귀 세포의 세포막의 투과성을 증진시켜 ECP의 생산성을 높임과 동시에 세포 내의 다당의 배지로의 배출을 유도한 것으로 판단된다.

## 감 사

본 연구는 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터(ERC)의 연구비 지원에 의해서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Han, S. B., Y. H. Kim, C. W. Lee, S. M. Park, H. Y. Lee, K. S. Ahn, I. -H. Kim and H. M. Kim (1998), Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai, *Immunopharmacology* **40**, 39-48.
- Ahn, K. S. (1996), A study on the anticancer and immunostimulation agents from the root of *Angelica gigas* Nakai, Ph.D. Dissertation, Dept. of Biology, Korea University, Seoul.
- Endress, E. (1994), *Plant Cell Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin.
- Ghosh, A. C., S. Ghosh, and P. S. Basu (2005), Production of extracellular polysaccharide by a Rhizobium species from root nodules of the Leguminous tree *Dalbergia lanceolaria*. *Eng. Life Sci.* **5**, 378-382.
- Melchart, D., C. Clemm, B. Weber, T. Draczynski, F. Worku, K. Linde, W. Weidenhammer, H. Wagner, and R. Saller (2002), Polysaccharides isolated from *Echinacea purpurea herba* cell cultures to counteract undesired effects of chemotherapy - a pilot study, *Phytother. Res.* **16**, 138-142.
- Roberts, S. C. and M. L. Shuler (1997), Large scale plant cell culture, *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 154-159.
- Griffiths, J. B., D. Looby, and A. J. Racher (1992), Maximisation of perfusion system and process comparison with batch-type cultures, *Cytotechnol.* **9**, 3-9.
- Velez, D., L. Miller, and J. D. Macmillan (1989), Use of tangential flow filtration in perfusion propagation of hybridoma cells for production of monoclonal antibodies, *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 938-940.
- Su, W. W. and A. E. Humphrey (1991), Production of rosmarinic acid from perfusion culture of *Anchusa officinalis* in membrane-aerated bioreactor, *Biotechnol. Lett.* **13**, 889-892.
- Su, W. W., F. Lei, and N. P. Kao (1995), High density cultivation of *Anchusa officinalis* in a stirred-tank bioreactor with *in situ* filtration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 293-299.
- Deng, C. X., F. Sieling, H. Pan, and J. Cui (2004), Ultrasound-induced cell membrane porosity, *Ultrasound Med. Biol.* **30**, 519-526.
- Liu, Y., A. Yoshikoshi, B. Wang, and A. Sakanishi (2003), Influence of ultrasonic stimulation on the growth and proliferation of *Oryza sativa* Nipponbare callus cells, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **27**, 287-293.
- Mutwakil, M. H. A. Z., T. J. G. Steele, K. C. Lowe, and D. I. de Pomerai (1997), Surfactant stimulation of growth in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 462-470.
- Bassetti, L. and J. Tramper (1995), Increased anthraquinone production by *Morinda citrifolia* in a two-phase system with Pluronic F-68, *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 353-358.
- Lin, L. D., J. Y. Wu, K. P. Ho, and S. Y. Qi (2001), Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures, *Ultrasound Med. Biol.* **27**, 1147-1152.
- Lin, L. D. and J. Y. Wu (2002), Enhancement of shikonin production in single and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound, *Biotechnol. Bioeng.* **78**, 81-88.