

형질전환 식물세포배양을 이용한 바이오의약품 생산

권준영 · 전수환 · 이해란 · 한지연 · 김동일

Production of biopharmaceuticals in transgenic plant cell suspension cultures

Jun-Young Kwon · Su-Hwan Cheon · Hye-Ran Lee · Ji-Yeon Han · Dong-Il Kim

Received: 24 November 2009 / Accepted: 1 December 2009
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Transgenic plant cell cultures for the production of biopharmaceuticals including monoclonal antibodies, recombinant proteins have been regarded as an alternative platform in addition to traditional microbial fermentation and mammalian cell cultures. Plant-made pharmaceuticals (PMPs) have several advantages such as safety, cost-effectiveness, scalability and possibility of complex post-translational modifications. Increasing demand for the quantity and diversity of pharmaceutical proteins may accelerate the industrialization of PMP technology. Up to date, there is no plant-made recombinant protein approved by USFDA (Food and Drug Administration) for human therapeutic uses due to the technological bottlenecks of low expression level and slight differences in glycosylation. Regarding expression levels, it is possible to improve the productivity by using stronger promoter and optimizing culture processes. In terms of glycosylation, humanization has been attempted in many ways to reduce immune responses and to enhance the efficacy as well as stability. In this review article, all these respects of transgenic plant cell cultures were summarized. In addition, we also discuss the general characteristics of plant cell suspension cultures related with bioreactor design and operation to achieve high productivity in large scale which could be a key to successful commercialization of PMPs.

서론

바이오의약품 (biopharmaceutical)이란 생체 내에 존재하는 물질을 의약품으로 사용하는 것을 말하며, 보다 넓은 의미로는 첨단 바이오 기술인 유전자재조합, 세포융합, 세포배양 등 생물공학기술을 기반으로 하여 생산된 의약품으로 정의할 수 있다. 이러한 바이오의약품은 단백질의약품, 치료용항체, 백신, 유전자치료제 및 세포치료제로 분류된다. 2010년 바이오의약품 시장은 70조원 이상으로 예상되며 이는 전체 바이오산업의 38%를 차지하는 것이다. 현재 바이오의약품 개발은 암 치료제에 집중되어 있으며, 면역질환이나 적혈구생성촉진인자 (erythropoietin) 나 호르몬 같은 세포조절 단백질에 대한 개발비중도 높은 상황이다. 2008년 전세계 바이오의약품시장에서 상위 10가지 바이오의약품은 모두 재조합 단백질이며 단백질의약품과 치료용항체로 분류되고 그 매출액 총액은 50조원에 달하고 있다 (Table 1).

현재 대부분의 재조합 단백질은 동물세포와 곤충세포 등의 고등세포를 숙주로 이용하거나 효모나 박테리아와 같은 미생물을 통해 생산되어 왔다. 특히 고분자량의 복잡한 단백질의약품이나 치료용항체의 경우, 당쇄화 (glycosylation) 와 같은 post-translational modification (PTM)이 단백질의 활성 및 생체내 안정성에 큰 영향을 미치기 때문에, 인체와 유사한 단백질을 생산하는 동물세포주인 Chinese hamster ovary (CHO) 세포가 주로 이용되고 있다. 최근에는 재조합 단백질 생산 시스템으로 PER.C6와 같은 인간 유래 세포를 이용하여 단백질의 완전한 인간화를 구현하는 방향으로 연구가 진행되고 있다 (Barnes et al. 2006; Yin et al. 2007). 그러나 이러한 동물세포배양은 배지가격이 비싸며, 인간에게 감염될 수 있는 바이러스의 오염

J.-Y. Kwon · S.-H. Cheon · H.-R. Lee · J.-Y. Han · D.-I. Kim (✉)
인하대학교 생물공학과
(Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea)
e-mail: kimdi@inha.ac.kr

Table 1 Top 10 biologics in 2008 (by generic name)

No.	Product Name	Target	Company	2008 sales (billion dollars)
1	Enbrel; etanercept	TNF antagonist	Amgen & Wyeth & Takeda	6.5
2	Remicade; infliximab	TNF antagonist	Centocor (J&J) & ScheringPlough & Mitsubishi Tanabe	5.3
3	Epogen/Procrit/ Eprex/ESPO; epoetin alfa	Erythropoietin receptor (EPO-R)	Amgen & Ortho Biotech/ JanssenCilag (J&J) & Kyowa Hakko Kirin	5.1
4	Rituxan; rituximab	CD20	Genentech; Biogen-IDEC, Roche	5.1
5	Humira; adalimumab	TNF alpha antagonist	Abbott & Eisai	4.5
6	Avastin; bevacizumab	VEGF	Genentech & Roche & Chugai	4.5
7	Herceptin; trastuzumab	HER2	Genentech; Roche, Chugai	4.4
8	Aranesp/NESP; darbepoetin alfa	Erythropoietin receptor (EPO-R)	Amgen & Kyowa Hakko Kirin	3.3
9	Neulasta; pegfilgrastim	G-CSF receptor	Amgen	3.3
10	Lantus; insulin glargine	Insulin receptor	Sanofi-Aventis	3.1

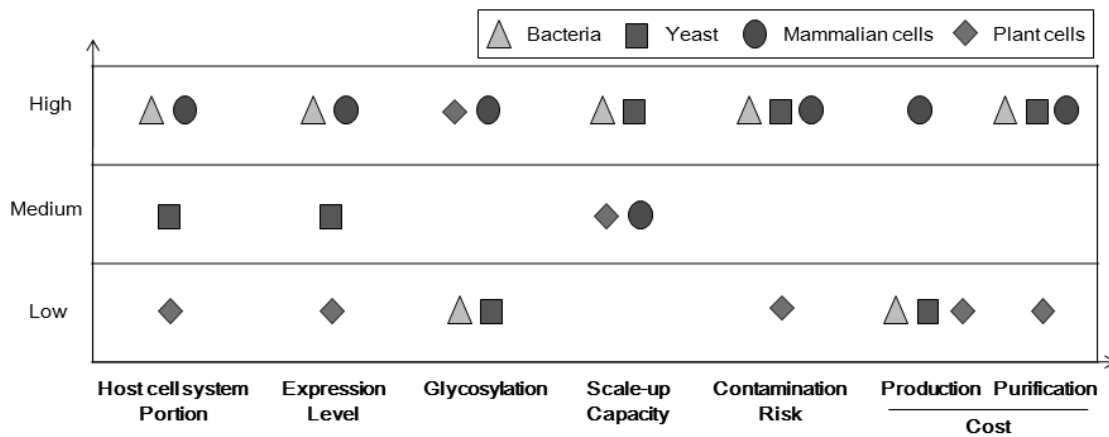


Fig. 1 Comparison of host expression systems for the production of recombinant protein

가능성이 높고, 소 혈청유래 단백질의 유입 가능성으로 인해 이들을 제거하기 위한 별도의 정제공정이 필요한 단점이 있다 (Huang and McDonald 2009).

최근에 식물세포배양이 재조합 단백질의 대체생산 시스템으로 부각되고 있다 (Fig. 1). 식물세포의 경우 동물 유래 바이러스나 병원균에 감염되지 않을 뿐만 아니라 동물유래 물질 혼입의 우려가 없어 안전한 생산 시스템으로 여겨지고 있다. 한편 식물세포배양 대신에 형질전

환 식물체를 사용할 경우 유전자의 외부 유출이 쉽고, 재배환경의 제어가 어려우며, 생산된 단백질 품질의 일관성이 낮고, 생산 및 정제수율도 낮은 단점이 있다. 따라서 형질전환 식물체보다는 식물세포배양이 선호되고 있으며, 생산 수율과 단백질 품질을 개선하기 위한 연구가 활발히 진행 중이다 (Twyman et al. 2003).

형질전환 식물세포배양은 생물공정 측면에서 고려할 때 배지 가격이 저렴하며, 상대적으로 간단한 배지조성

으로 성분이 규명되어 있으며, 첨가되는 단백질 성분이 없기 때문에 동물세포배양에 비해 생산, 정제 비용을 낮출 수 있다는 점에서 경제적이다 (Doran 2006). 식물세포를 재조합 단백질을 생산하는 숙주로 사용할 경우 PTM이 가능하여 고분자량의 당단백질 (glycoprotein)이나 구조적으로 복잡한 단백질도 생산이 가능하다. 또한 signal sequence를 이용하여 목적 단백질을 배양액으로 분비시킬 수 있으므로 단백질 회수와 정제가 용이한 장점이 있다. 식물세포배양을 이용한 이차대사산물 생산사례에서 이미 scale-up에 대한 많은 노하우가 축적되어 있으며, 이로 인해 형질전환 식물세포배양을 통해 생산된 재조합 단백질을 상업화하는데 있어 유리하다.

Plant-made pharmaceuticals (PMPs)는 형질전환 식물을 이용하여 생산되는 치료용 재조합 단백질을 의미하며, 1990년 최초로 형질전환 식물세포 현탁배양을 이용하여 인혈청 알부민과 chloramphenicol acetyltransferase를 생산하였으며, 현재는 항체, single chain variable fragment (scFv), 항원, 백신, 호르몬, 성장인자, 인혈장유래 단백질, 효소 대체치료제를 포함한 식물 기반 치료용 단백질 생산 등 300가지 이상이 연구 개발되고 있는 것으로 보고되어 있다 (Fox 2006; Aviezer et al. 2009). 이들은 다양한 재조합 단백질 발현 숙주로서 담배, 벼, 콩, 토마토 등을 이용한 식물세포배양 bioreactor 시스템이 성공적으로 개발되었으며, 최근 Newcastle disease virus (NDV)에 대한 재조합 수의용 백신이 담배 세포배양을 통해 생산되었다. Dow Agrosciences에서 개발한 식물유래 수의용 NDV 백신은 2006년 2월 미국 농무성 (United States Department of Agriculture, USDA)에서 처음으로 승인을 받았으며, 이는 비록 수익이긴 하지만 식물세포배양을 이용한 의약품 단백질을 생산하는 최초의 성공사례로 대표된다 (Pervin and Emilio 2008).

하지만 아직까지는 미국 식약청 (Food and Drug Administration, FDA)으로부터 사람의 치료를 목적으로 하는 PMPs 허가 사례는 없는 실정이다. 그 이유는 크게 두 가지로 생각할 수 있다. 첫째로는 단백질 자체의 품질 측면에서의 문제점을 고려해야 한다. 식물세포에서 생산된 재조합 단백질의 경우 식물 특이적인 당쇄 (glycan)들로 인해 면역반응을 일으킬 수 있고, 당쇄 말단이 sialylation 되어있지 않기 때문에 혈중 반감기가 매우 짧은 단점이 있다. 인간유래 단백질과 동일한 당쇄화 유형을 만드는 것은 PMPs의 상업화 여부를 결정짓는 가장 중요한 부분이라고 할 수 있다 (Miele 1997; Gomord and Faye 2004).

두 번째는 동물세포를 포함한 다른 숙주들에 비해 상대적으로 낮은 단백질 발현 수준과 느린 성장속도를 들 수 있다. 단백질 생산 수준은 세포배양 이전에는 강력한 프로모터의 개발과 우수 세포주 선별에 따라 좌우된다.

일단 세포주가 확보된 후에는, bioreactor 배양공정의 확립에 의해 생산 수준이 결정된다. 또한 식물세포의 느린 성장속도로 인해 배양 및 생산기간이 길어져 단위시간당 생산성이나 연간 생산 배치 수에 영향을 미치게 된다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서는 성장 및 단백질 생산에 미치는 공정변수에 대한 최적화와 함께 bioreactor 종류 및 운전 전략의 최적화를 통하여, 재조합 단백질의 생산량을 높이는 연구가 수반되어야 하며, 식물유래 바이오의약품의 상업화를 위해서는 식물세포 특이적인 bioreactor의 개발과 공정의 확립이 중요하다.

본 총설에서는 먼저 형질전환 식물세포배양을 이용한 바이오의약품 단백질의 상업화를 위해 필요한 식물유래 당쇄화의 최근 연구방향과, 생산성 증대를 위해 세포주 수준에서 고려할 측면에 대해서 정리하였다. 고생산 세포주가 선별된 후의 단백질 생산성은 bioreactor 공정상에서 좌우된다. 바이오의약품 단백질의 상업화를 위해서는 bioreactor에서의 대량배양이 필수적이므로, 형질전환 식물세포에 적합한 bioreactor 배양공정이 확립되어야 한다. 따라서 성공적인 식물세포 bioreactor 배양을 위한 고려사항, 식물세포용 bioreactor의 종류, 바이오의약품 단백질의 허가와 생산성 증대를 위한 bioreactor 배양공정 최적화 전략에 대해서도 최근의 동향을 알아보려고 하였다.

식물유래 재조합단백질의 당쇄화에 대한 연구

당쇄화 (glycosylation)

당쇄화란 단백질의 잔기나 지질에 당이 공유결합적으로 첨가되는 과정을 의미하며 대부분 인간 유래 단백질인 치료용 단백질들은 당쇄화 과정을 거치는 것으로 알려져 있다. 당쇄화 과정에서 당이 붙는 자리는 소포체 (endoplasmic reticulum)와 골지체 (Golgi apparatus)에 존재하는 효소들에 의해 특이적으로 정해져 있으며 당이 붙는 위치에 따라 크게 두 종류로 분류된다. 주로 proteoglycan에서 볼 수 있는 O-linked 당쇄화는 당이 serine이나 threonine 잔기의 side chain에 결합한다. 반면, N-linked 당쇄화는 당이 asparagine의 side chain에 있는 Asn-X-Ser/Thr 자리에 결합하며 치료용 단백질을 생산할 때 주로 고려되는 부분은 바로 이 N-linked 당쇄화와 관련된 부분이다 (Warzecha et al. 2008). Fig. 2A에는 식물에서의 일반적인 N-linked 당쇄화의 생합성 경로를 나타내었다. 골지체 초반부까지는 식물과 동물에서의 당쇄화 유형이 유사한 것을 볼 수 있다. 그러나 식물의 경우, β 1,2-xylosyltransferase (β 1,2-XylT), α 1,3-fucosyltransferase (α 1,3-FucT), β 1,3-galactosyltransferase (β 1,3-GalT) 효소들의 영향으로 인해 식물 특이적인 당쇄 구조가 나타난다 (Lerouge et al. 2000).

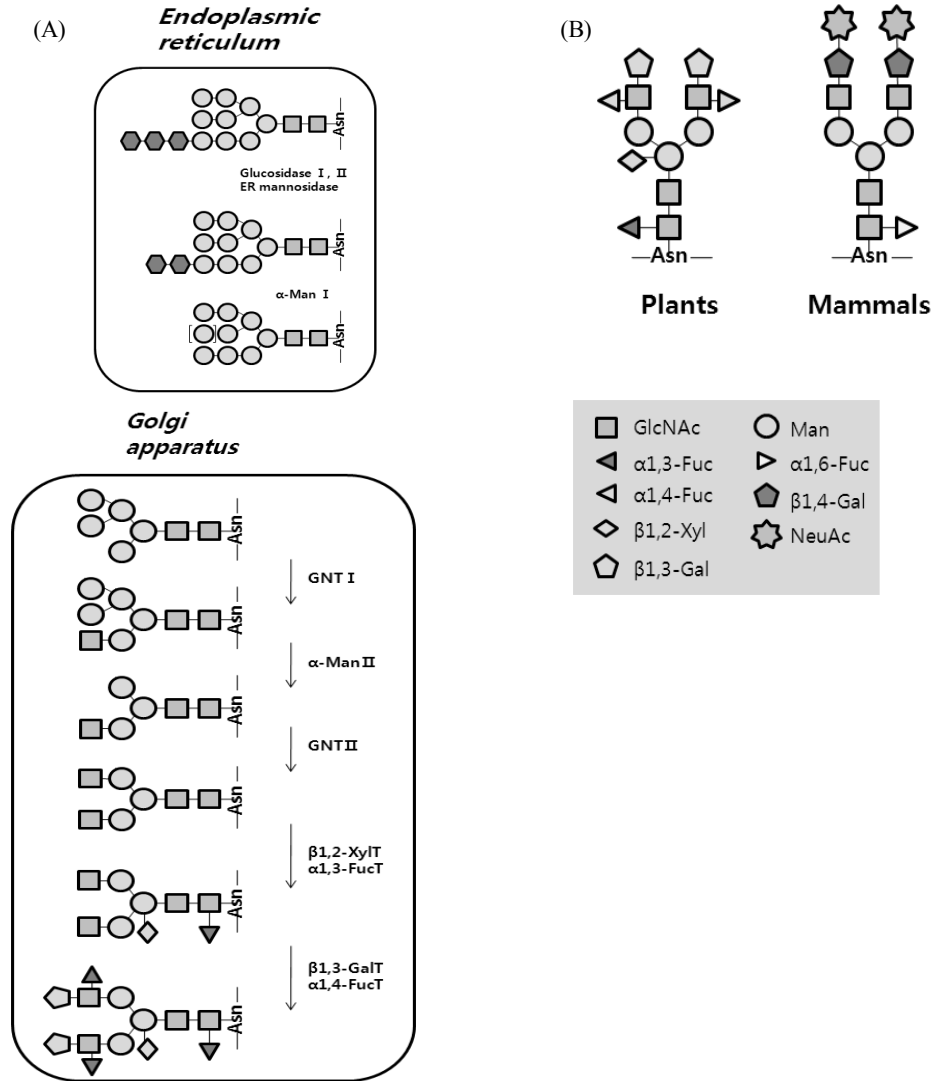


Fig. 2 Glycosylation in plants, (A) Plant *N*-glycosylation pathway from ER to Golgi. and (B) Comparison of the glycosylation pattern between mammalian and plant glycoproteins

세포주에 따른 *N*-linked 당쇄화의 차이점

N-linked 당쇄화는 당단백질을 생산하는 시스템에 따라 다소 차이를 보인다. 일반적으로 박테리아와 같은 원핵세포에서는 소포체나 골지체와 같은 세포내 소기관이 존재하지 않아 당쇄화가 일어나지 않는 것으로 알려져 있다. 단세포이면서도 진핵생물인 효모의 경우 당쇄화가 일어나지만 high-mannose 형태의 당쇄를 갖는 특징을 보인다. 반면 다세포 진핵생물인 식물과 동물에서는 유사한 complex-type의 *N*-linked 당쇄를 형성하지만 몇 가지 서로 다른 특징을 보이는 것이 알려져 있다 (Bakker et al. 2001).

식물 특이적인 당쇄화 유형은 core structure에서 가지처럼 뻗어나간 2개의 mannose 잔기 위에 각각 하나의 *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)이 결합하여 β 1,3-linked galactose

잔기로 종결되는 것이 일반적이며 골지체 후반부에서 α 1,3-linked fucose나 β 1,2-linked xylose와 같은 식물 특이적인 당들이 관찰되기도 한다 (Fig. 2B). 반면 동물유래의 당단백질의 경우 α 1,6-fucose가 관찰되며 말단부분은 β 1,4 -linked galactose 위에 sialic acid로 종결되는 양상을 보인다 (Misaki et al. 2003). Sialic acid는 동물유래 당단백질에서만 발견되는 당으로 β 1,4-linked galactose를 특이적으로 인지하여 결합하는 특징을 갖는다.

식물에서 인간유래 치료용 단백질을 생산할 경우 말단 galactose 잔기의 결합구조 차이와 그로 기인한 sialic acid의 부재로 인해 혈중 반감기나 체내 단백질의 안정성이 감소하며 기능적 활성에 영향을 미친다는 문제가 제기되고 있다. 또한 식물 특이적인 β 1,2-xylose와 α 1,3-fucose의 경우 IgE와 반응하여 알레르기 반응을 유발할 가능성이 있다. 식물 특이적인 당 구조를 갖는 치료용

단백질을 인체 내에 투여하였을 때 간이나 기타 장기에서 mannose receptor나 asialoglycoprotein receptor에 노출될 확률이 높아지기 때문에 체내 반감기가 현저히 줄어들게 된다. 이와 같은 체내에서의 단백질 안정성이나 활성 등의 특성은 제품으로서 치료용 단백질의 품질과 직결될 뿐만 아니라 환자에 대한 의약품의 투여 횟수와도 밀접한 관련이 있어 최근에는 이를 개선하기 위한 당쇄화 변형에 관한 연구들이 진행되고 있다 (Bakker et al. 2001; Jefferis 2009).

Glycoengineering과 최신 연구동향

당쇄 부분이 단백질의 기능적인 특성에 크게 영향을 미치지 않는 경우, 형질전환된 식물로부터 성공적으로 단백질이 생산되었다는 보고가 있었지만, 대부분의 치료용 단백질에서는 당쇄화가 단백질의 안정성, 활성, 혈중 반감기에 큰 영향을 미치고 있으며, 인체 내에서 당쇄화가 미치는 영향이나 작용하는 기작에 대해서는 아직까지도 알려지지 않은 부분이 많기 때문에 glycoengineering을 통해 단백질의 당쇄 구조를 개선하려는 연구들이 활발히 이루어지고 있다. 이러한 glycoengineering의 전략으로 소포체나 액포같은 세포내의 특정 소기관에 단백질이 잔류하도록 조작하여 골지체를 우회하는 방법이 있다. 또한, 원하지 않는 효소를 내재적으로 불활성화 시키는 방법으로 특히, 식물에서 말단의 β 1,3-galactose 잔기를 피하기 위해 β 1,3-galactosyltransferase가 발현되지 못하도록 knock-out 하는 방법도 생각해 볼 수 있지만 식물의 경우 상동재조합 (homologous recombination)이 불가능하다. 따라서 최근에는 RNA interference (RNAi) 기술을 이용하여 β 1,2-XylT나 α 1,3-FucT를 저해하는 시도들이 활발히 이루어지고 있다 (Strasser et al. 2004).

최근에는 식물에 없는 이종의 효소 단백질이 발현되도록 조작하여 원하는 당을 얻을 수 있도록 당쇄 구조를 인간화시키는 연구가 많이 수행되고 있다. 식물에서 당쇄 구조의 인간화를 위해 β 1,4-GalT를 담배 BY-2 (Bright Yellow 2) 세포나 벼 세포에 도입하여 성공한 사례들이 보고된 바 있다 (Misaki et al. 2003; Bakker et al. 2001). 그러나 여전히 sialic acid 잔기가 중요한 역할을 하는 단백질에서는 sialylation을 위한 추가의 단계가 필요하다는 부담이 있을 뿐만 아니라 생합성 경로를 통해 β 1,4-galactose 잔기 위에 sialic acid가 결합할 수 있도록 하기 위해서는 sialyltransferase와 관련된 5개 이상의 추가 유전자가 삽입되어야 하기 때문에 유전자 조작 및 해당 효소 발현에 어려움이 따른다. 그러나 최근 발표된 결과에 따르면 *Arabidopsis thaliana*에서 생합성 경로를 통해 완전한 sialylation이 이루어진 단백질을 생산하는데 성공하였고 (Castilho et al. 2008), 이러한 glycoengineering의 기술 발전에 기초

하여 앞으로 식물에서도 인간화된 당쇄구조를 갖는 치료용 단백질 생산이 가능하리라 기대할 수 있게 되었다.

단백질 생산성 증대연구

BY-2나 NT-1 (*Nicotiana tabacum* 1)과 같은 담배세포는 형질전환이 쉽고, 빠른 세포성장속도를 보여 세포증식에 유리하므로 재조합 단백질 생산시 많이 이용되고 있다. 다른 식물세포주로는 벼, 토마토, 당근, 콩 등이 주로 연구되고 있는데 이러한 세포주들은 담배세포보다 부산물 수준이 낮을 뿐 아니라, 식용으로 쓰일 수 있는 종이어서 최근 연구에 많이 사용되고 있는 추세이다.

형질전환 식물세포주를 이용하여 재조합 단백질을 생산할 때, 가장 중요하게 고려할 인자 중 하나는 단백질 발현수준이다. 어떤 프로모터를 선택하느냐에 따라 전사과정의 속도에 영향을 주고, 이는 단백질 발현수준에 직접적으로 관여된다. 식물세포배양에 가장 많이 쓰이는 프로모터로는 CaMV (cauliflower mosaic virus) 35S 프로모터거나 이를 증진시킨 것들이 있다. 이 프로모터는 상시발현 프로모터이며, 그밖에도 octopine이나 mannopine synthase 등 수많은 상시발현 프로모터들이 사용되고 있다 (Terashima et al. 1999; Kwon et al. 2003; Aviezer et al. 2009).

반면에 상시발현 프로모터와 다른 종류로 inducible 프로모터를 들 수 있다. 이는 상시발현 프로모터에 비해 특정 환경이나 성분 변화로 발현이 유도되기 때문에 발현 수준을 증폭시킬 수 있다. 벼 세포 유래의 α -amylase *RAmy3D* 프로모터는 당 고갈에 의해 induction되며 (Terashima et al. 1999), 이 프로모터는 목적단백질의 생산에 있어서 성장단계와 단백질 생산단계를 분리할 수 있어 성장단계에는 고농도배양을 수행한 뒤, 생산배지로 교환해 줌으로써 목적단백질의 생산성을 증대시킬 수 있는 장점이 있다 (Terashima et al. 2000; Terashima et al. 2002). 그러나 당 고갈에 의해 목적단백질의 생산이 induction되기 때문에, 생산단계에서 세포사멸을 유발하여 거품의 생성을 촉진하거나 protease가 배지로 분비되어 목적 단백질의 분해를 유발하는 단점을 가지고 있다 (Terashima et al. 1999; Terashima et al. 2001). 이와 같이 생산단계에서 세포가 사멸되는 것을 고려하여 생산 후 세포회복을 고려하여 연속배양을 성공시킨 보고도 있다 (Trexler et al. 2005).

식물세포를 이용하여 외래 단백질을 생산하고자 할 때 고려해야 할 또 다른 사항은 leader sequence의 유무이다. 이는 발현된 단백질이 배지로 분비되는 기작과 관련되며 최근에는 유전자에 leader sequence를 삽입함으로써 인간유래의 바이오의약 단백질을 배지로 분비시키는 연

구도 진행되고 있다.

그 외에 고려해야 할 사항으로는 배지로 분비된 단백질이 protease나 전단응력 등에 의해 분해되는 것을 들 수 있다. 멸균된 conditioned MS (Murashige and Skoog) 배지와 Gamborg's B5 배지에서 정제된 면역글로불린이 2시간 이내에 80%까지 분해되거나 (Tsoi and Doran 2002), 분비된 단백질이 bioreactor의 스테인레스 용기 표면이나 플라스틱 유리 표면에 흡착되는 현상도 보고된 바 있다 (Doran 2006).

형질전환 식물세포배양을 위한 bioreactor 공학

형질전환 식물세포배양을 이용한 바이오의약 단백질의 상업화를 위해서는 생산 수준의 증진이 필수적이다. 고생산 세포주의 선별과정 이후에는, 세포에 적합한 bioreactor를 선정하고, 생산 공정의 개발 및 최적화에 의해서 생산성 증대가 가능하다. 이 장에서는 bioreactor 공정 측면에서 bioreactor 종류와 식물세포배양 시 주로 고려해야 하는 사항에 대해 언급하고자 한다.

Bioreactor 종류

식물세포 배양을 위해서는 이미 다양한 종류의 bioreactor가 개발되었으며, spin filter를 포함하여 공동사막 (hollow fiber) 배양기, 2단계 고정화 배양기, stirred tank bioreactor, 공기부양식 (air-lift) 배양기, rotation drum, 광배양기 등이 식물세포배양에 사용된 보고들이 있다 (Zhong et al. 1999). 일반적으로 동물세포배양이나 식물세포배양에 널리 사용되는 두 종류의 bioreactor는 stirred tank bioreactor와 pneumatic bioreactor이다. 최근에는 공장설립 시간 및 비용절감을 위해 disposable bioreactor를 이용해 목적단백질을 생산하는 연구가 진행되고 있으며, 간편하게 배지 및 공정변수의 최적화를 수행하기 위한 HTS (high-throughput screening)용 bioreactor도 사용되고 있다 (Huang and McDonald 2009).

Stirred tank bioreactor의 경우 산업적 이용에 적합할 뿐만 아니라 bioreactor 운전에 대해 잘 알려져 있으며 다른 bioreactor에 비해 산소 및 물질전달에 용이하며, 재현성 있는 결과를 얻을 수 있다 (Fig. 3A). 게다가 온도, pH, 용존산소량 등 공정변수를 항상 일정하게 유지하기 쉬운 편이기 때문에 이를 바탕으로 조건 변화에 따른 세포의 상태변화의 관찰 및 조절이 용이하다 (Zhong et al. 1995; Roberts and Shuler 1997). 또한 바이오의약품을 생산하기 위해 필수적인 cGMP (current Good Manufacturing Practice) 조건하에서 작업하기 용이하므로, 물리적 교반에 의한 높은 에너지 비용에도 불구하고 현재까지 바이오의약 산

업에서 널리 사용되고 있다. Stirred tank bioreactor에서의 교반과 기포분산은 기계적 교반에 의해 이루어진다. 교반기 종류 및 크기에 따라 bioreactor 내부에서 다양한 흐름형태를 얻을 수 있으며 Rushton turbine, marine, paddle, centrifugal cell-lift 교반기 등이 주로 사용되고 있다. 식물세포는 전단응력에 민감하기 때문에, 낮은 전단응력을 주는 교반기의 적용과 함께, 세포에 손상을 주지 않는 범위에서 교반속도를 최적화해야 한다 (Doran 1999).

Pneumatic bioreactor에는 공기부양식 bioreactor와 bubble column 방식이 있으며, 세포의 혼합, 물질 및 산소전달은 공급된 공기에 의해 이루어진다. 공기부양식 bioreactor의 장점으로는 식물세포 배양에 적합하고, 간단한 구조로 인해 scale-up에 유리하다. 또한 기계적 교반이 없으므로 에너지 및 bioreactor 운영비용이 적게 들고, 전단응력이 낮은 장점이 있다. 전단응력에 민감한 식물세포의 경우, 공기부양식 bioreactor가 많이 적용되고 있다. 공기부양식 bioreactor 내·외부에 loop를 만들 수 있으며, 기포에 의한 세포손상을 줄일 수 있고, 외부 loop내부에 구획을 만들어 세포와 배양액을 분리하여 연속적으로 생산된 재조합 단백질을 분리할 수 있다 (Wang et al. 2002). 반면에 bioreactor 내부에 불균일한 세포분포나 낮은 산소 및 물질전달 능력이 문제가 되고 있다. 과도한 기포가 형성되어 세포에 손상을 미칠 수 있기 때문에 산소를 주입공기에 혼합하는 방법도 사용되고 있다.

상업적으로 세포배양을 통해 목적 단백질 생산을 위해서는 대량배양이 필수적이며 주로 pilot 형태의 stirred tank bioreactor가 사용되지만, 세포에 강한 전단응력을 줄 수 있고 통기에 의한 기포도 세포에 물리적인 충격을 줄 수 있다. 뿐만 아니라 공장설립에 비용이 많이 들고 시간이 오래 걸리는 단점을 극복하기 위해서 disposable bioreactor에 대한 연구가 시작되었다 (Fig. 3B). Disposable bioreactor는 가격이 저렴하고 1,000 L까지 대량배양이 가능하며, 작동 및 유지가 간편하다. 바이오의약품 생산 측면에서는 배양 각 배치사이에 세척과정 및 멸균과정이 없기 때문에 연간 배치수를 늘릴 수 있고, 완벽히 밀폐된 시스템이기 때문에 GMP 시설로 허가받는 데에도 유리하다 (Eibl and Eibl 2008). Disposable bioreactor에는 Wave 방식이 가장 널리 사용되고 있으며, 지금까지 식물세포 배양에 적용한 사례는 주로 이차대사 산물이나 산업용 단백질의 생산이었으며 (Ritala et al. 2008), 바이오의약 단백질 생산에도 형질전환 벼 세포와 담배 세포에 적용한 보고가 있다 (Trexler et al. 2005; Girard et al. 2006). Wave 방식의 경우 보다 큰 scale로의 적용이 어렵고 물질이나 열 및 산소전달능이 낮은 단점을 극복하기 위해서, stirred tank bioreactor 타입의 single-use bioreactor (SUB)를 식물세포 배양에서 연구 중에 있다. 최근에는 이스라엘의 Protalix사에서 bubble column 형태의 disposable bioreactor를 개발




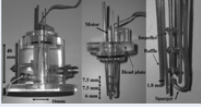








	Lab-scale bioreactor	Pilot-scale bioreactor	Commercial-scale bioreactor
A. Traditional types	a. Multi-STR (1~5 L) 	b. STR (50~500 L) 	c. STR (13,000 L) 
	d. Miniature-STR (10 mL) 	f. Wave (50~200 L) 	g. Wave (200~1,000 L) 
B. New technologies	e. HTS system (10 mL) 	h. S. U. B. (200~500 L) 	i. S. U. B. (2,000 L) 
	j. Disposable B. C. 	k. Disposable B. C. 	l. Disposable B. C. 
C. Industrial application (www.protalix.com)			

Fig. 3 Overview of bioreactor systems for the commercialization in plant cell cultures. Medium and process optimization were performed in lab-scale bioreactor. The established medium and process are applied stepwise from pilot-scale to commercial-scale bioreactor. STR, stirred tank bioreactor; HTS, high-throughput screening; SUB, single-use bioreactor; BC, bubble column bioreactor

하여 당근 세포배양을 통한 재조합 glucocerebrosidase (GCD; 상품명 Cerezyme)를 생산 중이며 (Fig. 3C), 현재 임상 3상이 진행 중에 있다 (Aviezer et al. 2009).

바이오희약품 개발시 배지 및 공정변수의 최적화를 수행하거나 공정의 검증을 위해 validation에서 scale-down 시험을 수행하는 경우에 miniature bioreactor나 microtiter plate가 사용되고 있다 (Betts and Baganz 2006; Gill et al. 2008). HTS bioreactor는 다수의 bioreactor를 이용하여 짧은 시간에 많은 정보를 얻을 수 있는 장점이 있다. 반면에 보다 큰 규모의 bioreactor 적용시 공정변수의 경우에는 변동사항이 많고 식물세포가 주로 응집되어있기 때문에, 아직 적용에는 어려움이 있을 것으로 사료된다.

시간, 효모의 2~3시간, 동물세포의 24시간보다 상대적으로 느린 편이다. 식물세포의 성장속도는 배양기간을 결정하므로, 성장속도가 빠른 담배 BY-2 세포가 재조합 단백질 생산을 위해 많이 쓰이고 있다 (Shinmyo et al. 1998). 버 세포의 경우에는 doubling time이 1.5~6일로 상대적으로 느림에도 불구하고 식물세포 중 생산성이 가장 높은 시스템으로 많은 연구가 진행되고 있다 (Terashima et al. 1999; Lee et al. 2007). 성장속도는 주로 산소소비속도 (oxygen uptake rate, OUR)에 의해 크게 좌우된다. 배양생장기에 따라 세포당 산소소비속도도 다르기 때문에 세포가 생장에 저해를 받지 않도록 최소임계 용존산소량 (15~20%) 이상을 유지해주는 것이 중요하다.

단백질 분해

Bioreactor에서 식물세포배양 시 고려사항

성장속도

바이오희약 단백질을 상업적으로 생산하는 경우, 식물세포의 느린 성장속도와 생산된 단백질이 배지로 분비된 단백질 분해효소에 의해 분해되는 것은 반드시 해결되어야 할 문제이다. 일반적으로 식물세포의 doubling time은 20~100시간으로 알려져 있으며, 미생물의 30분~1

세포 밖으로 분비된 목적 단백질은 여러 가지 기작에 의해 그 안정성이 낮아져 생산성에 커다란 영향을 끼친다. 이런 단백질의 안정성에 영향을 미치는 요인으로는 발현되어 배지로 분비된 단백질 자체의 구조적 특징에 의한 불안정성이나 단백질의 응집에 의한 불안정성이 있으며, 특히 배지내의 단백질 분해효소에 의한 목적 단백질의 분해는 생산성에 가장 큰 영향을 미치게 된다 (Wang et al. 2002). 식물세포의 경우 단백질 분해효소에

의해 생산된 단백질이 분해되므로 젤라틴과 같은 몇몇 gelling agent나 dimethyl sulphoxide (DMSO), 알부민, polyvinylpyrrolidone (PVP) 등 다양한 첨가제를 이용하여 분해를 억제한 보고가 있다 (Doran 2006). 또한 단백질 분해효소 억제제를 이용하여 단백질 분해효소 활성을 낮춤으로써 목적 단백질의 생산성을 높이는 연구도 보고되었다 (Gotoh et al. 2001). 그러나 젤라틴이나 알부민의 경우 동물유래 물질이고 단백질 분해효소 억제제들은 대부분 고가이므로 산업적 적용이 어렵다. 최근 bioreactor 배양 중 pH 제어를 이용하여 단백질 분해효소의 활성을 낮추거나, 생산과 동시에 분리하는 *in situ* protein recovery와 같은 산업적 적용이 가능한 연구가 진행 중에 있다 (Huang et al. 2009; Doran 2006).

세포응집화 (aggregation) 및 rheological 특성

대부분의 식물세포배양시, 작게는 50 mm에서 크게는 1 cm 수준까지, 다양한 크기의 세포응집체 (aggregate)를 형성하게 된다. 세포응집체는 생장 시 분열된 세포가 분리되지 못하여 형성되며, 이는 세포밖에 존재하는 세포벽의 다당류에 의해 형성된다고 여겨지고 있다 (Taticek et al. 1991). 일단 세포응집체가 만들어질 경우 내부에 영양분 농도구배가 형성되어, 세포의 분화를 촉진하거나 이차대사산물의 생산을 유도한다. 재조합 단백질 생산 측면에서, 세포응집화는 영양분 및 산소구배 형성과 bioreactor 하부의 세포침전은 불균일한 환경을 야기하기 때문에 불리하다. 세포의 분리를 위해 교반속도를 높이거나, pectinase나 cellulase를 첨가한 보고가 있었으나, 각각 세포사멸 유발과 고가로 인해 산업적 적용이 어렵기 때문에, 이에 대한 개선이 필요한 실정이다.

세포응집화를 비롯한 식물세포의 형태학적 특성, 세포농도, 배양액의 삼투압이나 분비된 다당류는 배양액의 유동학적 특성에 영향을 미친다. 이런 특성은 세포배양 공정을 개발하거나 고려해야 하는 중요한 특성이며 bioreactor 배양시 배양액의 점도, 혼합, 물질전달, 전단속도와 생장 속도간의 상관관계를 이해함으로써 최적의 배양 및 생산조건을 확립해야 한다 (Williams et al. 2000; Raposo and Lima-Costa 2006).

거품형성과 wall growth

거품의 생성은 발효 및 배양 공정에서 일반적인 현상이다. 거품유발물질로는 단백질이나 지방, 다당류 등이 있으며 거품생성정도는 통기속도, 배양액 점도, 세포농도, 배지성분 등에 의해 좌우된다. 식물세포의 경우 거품은 배양초기와 후반에 주로 형성되며 배양초기에는 높은 당농도와 세포분열 중에 생성된 다당류로 기인하고, 배

양후반에는 주로 세포가 죽으면서 나오는 단백질, 지질, 다당류에 의한 것으로 알려져 있다 (Williams et al. 2000). 생성된 거품층에 갇힌 세포는 영양분 및 산소결핍으로 인해 단백질 분해효소나 부산물을 분비할 수 있으며 죽은 세포가 두꺼운 층을 형성하여 bioreactor 내부벽면이나 교반기, 거품 분쇄판 (foam breaker), 각종 전극이나 포트 표면에 눌러 붙게 된다. 이는 공정 전반적으로 세포의 생장이나 생산성에 영향을 미치게 되므로, 거품의 형성을 억제하는 것이 중요하다 (Zhang et al. 1992).

거품의 형성을 억제하기 위해서 주로 화학적인 실리콘 계열 거품생성억제제 (antifoam)들이 사용되며 이는 거품의 표면장력을 완화시켜 제거하게 된다. 과도한 거품생성억제제는 기체의 표면적을 증가시켜주지만 액체 상에서의 물질전달을 크게 감소시켜, 전체적으로는 산소전달계수 (k_La)의 감소를 초래하므로 세포생장에 안 좋은 영향을 미칠 수 있다. 거품을 억제하기 위한 다른 접근 방법으로는 물질전달에 문제없는 최소한의 교반과 통기를 하거나, 배양액 상부로 산소를 공급하거나, 순산소의 넣어주는 방법도 적용되고 있다. 또한 배양액 상부에 기계적 거품 분쇄판의 설치하는 방법으로 거품생성을 줄일 수 있지만 과도한 거품생성시에는 거품생성억제제의 사용도 병행되어야 한다 (Bohme et al. 1997; Abdullah 2000).

전단력 민감성

플라스크에서 얻은 생장 및 생산결과를 stirred tank bioreactor에 적용할 경우 재현성 있는 결과를 얻기 어려우며 가장 큰 이유는 bioreactor 배양의 경우에는 hydrodynamic 환경이 세포에 영향을 주기 때문이다. 일반적으로 bioreactor에서는 생산수율이 낮아지고 세포 생장기간이 단축되는 결과를 보여주는데, 특히 식물세포에 경우에는 단단한 세포벽이나 세포응집체의 형성, 대수증식기 후반이나 정체기 초반에 비대한 세포내 액포에 의해 다른 세포주보다 더 민감하다고 알려져 있다. 이는 주로 교반기의 기계적 교반과 공기분사기 (sparger)에 의한 통기에 의한 것이다. 교반속도와 통기속도는 물질전달 및 산소전달이 충분히 이루어지는 범위에서 최소화하는 것이 좋다. 일반적으로 세포배양에서 알려진 전단력에 의한 세포 손상은 bioreactor 내 형성된 난류 (turbulent flow) 맴돌이, 세포와 세포, 교반기, 방해판 (baffle) 등과의 충돌, 배양액 표면의 기포의 파열, 공기분사기로부터 나오는 기포의 흐름 등에 의해서 이루어진다. 식물세포의 경우 세포주마다 세포응집체의 크기 및 형태차이가 있을 뿐 아니라, 같은 세포주이더라도 생장 중에 크기가 바뀌기 때문에 전단력이 식물세포에 미치는 영향에 대한 기작은 아직 정확히 알려지지 않았다. 몇몇 연구에서 전단력에 대한 세포수준에서의 반응 (세포생

존도, 호흡률 측정, 세포 형태변화)을 확인하였으며 (Sowana et al. 2001), 식물세포를 이용하여 바이오의약 단백질을 생산할 경우 성공적인 scale-up을 위해서는 이에 대한 명확한 이해가 필요하다.

Bioreactor 배양 공정최적화

바이오의약 단백질의 재현성 있는 생산을 위해서는 배양 중 각 공정변수 (input variable)에 대한 최적화가 필요하다. 이런 공정변수에는 온도, pH, 용존산소량 (dissolved oxygen, DO), 교반 및 통기속도, 전기전도도, 배지성분, 삼투압, 배지첨가속도, 초기접종농도 등이 있다. 배양이 종료되어 얻을 수 있는 결과변수 (output variable)로는 세포농도, 세포생존도, 목적단백질의 생산성 및 단백질의 품질 등이 있다. 각 공정변수는 결과변수에 단독으로 영향을 미칠 뿐 아니라, 상호작용도 존재하기 때문에 재현성 있는 배양결과를 얻기 위해서는 최적 운전조건을 확립하는 것이 필수적이다. 이를 통해 재현성 있는 배양공정의 확립이 가능하며, 이를 위해서는 통계적인 실험계획법 (design of experiment, DoE)의 적용이 필수적이다. 실험계획법을 사용할 경우 공정의 재현성의 확보가 가능하며 최적화된 공정에 의해 생산성의 증대될 뿐 아니라, 동시에 여러 공정변수에 대한 실험을 수행하므로 전체 실험수를 줄일 수 있어 실험비용의 감소가 가능하다. 상업적으로 바이오의약 단백질 생산에 쓰이는 동물세포배양이나 미생물의 발효공정에서 요인배치법 (full factorial design), 일부실시법 (fractional factorial design) 및 반응표면분석 (response surface model) 등의 실험계획법을 공정변수 및 배지 최적화에 적용한 다수의 보고가 있다 (Mandenius and Brundin 2008).

결론

형질전환 식물세포 배양은 동물유래 바이러스로부터 안전하며 그에 따라 정제비용을 절감할 수 있으며, 값싼 배지가격으로 고가의 바이오의약 단백질의 대체생산 시스템으로 각광받고 있다. 하지만 식물 고유의 당쇄화 유형과 기존 생산시스템에 비해 낮은 생산성으로 인해 아직까지 허가된 사례가 없는 실정이다. 이를 해결하기 위해 중점적으로 수행되어야 할 분야로는 PMP 당쇄의 인산화와 낮은 생산성을 극복하기 위한 강력한 프로모터의 개발을 들 수 있다. 또한 고부가가치의 바이오의약 단백질 시장에서 식물세포 대량배양 및 상업화를 위해서는 bioreactor 배양 및 공장의 설립이 필수적이기 때문에, 식물세포에 적합한 bioreactor의 종류를 선정하여 최

적의 공정을 개발하는 것이 중요하다. 또한 식물세포 bioreactor 배양에서 고려사항들에 대한 총체적인 이해가 필요하며, 공정 및 배지최적화를 통해 생산성 증대와 재현성 있는 생산시스템의 확립이 가능할 것이다. 근 미래에 바이오의약 단백질 시장의 새로운 생산시스템으로서 한 축을 담당할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 인하대학교 및 지식경제부 산업원천기술과제의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Abdullah MA, Ariff AB, Marziah M, Ali AM, Lajis NH (2000) Strategies to overcome foaming and wall-growth during the cultivation of *Morinda elliptica* cell suspension culture in a stirred-tank bioreactor. *Plant Cell Tiss Org Cult* 60:205-212
- Aviezer D, Brill-Almon E, Shaaltiel Y, Hashmueli S, Bartfeld D, Mizrachi S, Liberman Y, Freeman A, Zimran A, Galun E (2009) A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme: A preclinical and phase I investigation. *Plos Med* 4: 1-5
- Bakker H, Bardor M, Molthoff JW, Gomord V, Elvers I, Stevens LH, Jordi W, Lommen A, Faye L, Lerouge P, Bosch D (2001) Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2899-2904
- Barnes LM, Dickson AJ (2006) Mammalian cell factories for efficient and stable protein expression. *Curr Opin Biotechnol* 17:381-386
- Betts JJ, Baganz F (2006) Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microb Cell Fact* 5:21-34
- Bohme C, Schroder MB, JungHeiliger H, Lehmann J (1997) Plant cell suspension culture in a bench-scale fermenter with a newly designed membrane stirrer for bubble-free aeration. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:149-154
- Castilho A, Pabst M, Leonard R, Veit C, Altmann F, Mach L, Glossl J, Strasser R, Steinkellner H (2008) Construction of a functional CMP-sialic acid (CMP-Neu5Ac) biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 147:331-339
- Doran PM (1999) Design of mixing systems for plant cell suspensions in stirred reactors. *Biotechnol Prog* 15:319-335
- Doran PM (2006) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol* 24: 426-432
- Eibl R, Eibl D (2008) Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochem Rev* 7:593-598
- Fox JL (2006) Turning plants into protein factories. *Nat Biotechnol* 24:1191-1193

- Gill NK, Appleton M, Baganz F, Lye GJ (2008) Quantification of power consumption and oxygen transfer characteristics of a stirred miniature bioreactor for predictive fermentation scale-up. *Biotechnol Bioeng* 100:1144-1155
- Girard LS, Fabis MJ, Bastin M, Courtois D, Petiard V, Koprowski H (2006) Expression of a human anti-virus monoclonal antibody in tobacco cell culture. *Biochem Biophys Res Comm* 345:602-607
- Gomord V, Faye L (2004) Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol* 7:171-181
- Gotoh T, Miyazaki Y, Sato W, Kikuchi K, Bentley WE (2001) Proteolytic activity and recombinant protein production in virus-infected Sf-9 insect cell cultures supplemented with carboxyl and cysteine protease inhibitors. *J Biosci Bioeng* 92: 248-255
- Huang TK, McDonald KA (2009) Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochem Eng J* 45:168-184
- Huang TK, Plesha MA, Falk BW, Dandekar AM, McDonald KA (2009) Bioreactor strategies for improving production yield and functionality of a recombinant human protein in transgenic tobacco cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 102:508-520
- Jefferis R (2009) Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Drug Discov* 8:226-234
- Kwon TH, Kin YS, Lee JH, Yang MS (2003) Production and secretion of biologically active human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic tomato suspension cultures. *Biotechnol Lett* 25:1571-1574
- Lee SJ, Park CI, Park MY, Jung HS, Ryu WS, Lim SM, Tan HK, Kwon TH, Yang MS, Kim DI (2007) Production and characterization of human CTLA4lg expressed in transgenic rice cell suspension cultures. *Protein Expr Purif* 51:293-302
- Lerouge P, Bardor M, Pagny S, Gomord V, Faye L (2000) *N*-glycosylation of recombinant pharmaceutical glycoproteins produced in transgenic plants: towards a humanisation of plant *N*-glycans. *Curr Pharm Biotechnol* 1:347-354
- Mandenius CF, Brundin A (2008) Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnol Prog* 24: 1191-1203
- Miele L (1997) Plants as bioreactors for biopharmaceutical: regulatory considerations. *Trends Biotechnol* 15:45-50
- Misaki R, Kimura Y, Palacpac NQ, Yoshida S, Fujiyama K, Seki T (2003) Plant cultured cells expressing human b1,4-galactosyltransferase secrete glycoproteins with galactose-extended *N*-linked glycans. *Glycobiology* 13:199-205
- Pervin B, Emilio RC (2008) Plant molecular farming: Opportunities and challenges. *Crit Rev Biotechnol* 28:153-172
- Raposo S, Lima-Costa ME (2006) Rheology and shear stress of *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures grown in bioreactor. *Biotechnol Lett* 28:431-438
- Ritala A, Wahlstro EH, Holkeri MH, Hafren A, Makelainen K, Baez J, Makinen K, Nuutila AM (2008) Production of a recombinant industrial protein using barley cell cultures. *Protein Expr Purif* 59:274-281
- Roberts SG, Shuler ML (1997) Large-scale plant cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 8:154-159
- Shinmyo A, Shoji T, Bando E, Nagaya S, Nakai Y, Kato K, Sekine M, Yoshida K (1998) Metabolic engineering of cultured tobacco cells. *Biotechnol Bioeng* 58:329-332
- Sowana DD, Williams DRG, Dunlop EH, Dally BB, O'Neill BK, Fletcher DF (2001) Turbulent shear stress effects on plant cell suspension cultures. *Trans I Chem E* 79:867-875
- Strasser R, Altmann F, Mach L, Glossl J, Steinkellner H (2004) Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex *N*-glycans lacking b1,2-linked xylose and core a1,3-linked fucose. *FEBS Letters*. 561:132-136
- Taticek RA, Legge RL (1991) The scale-up of plant cell culture: engineering considerations. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 24: 139-159
- Terashima M, Murai Y, Kawamura M, Nakanishi S, Stoltz T, Chen L, Drohan W, Rodriguez RL, Kotoh S (1999) Production of functional human a₁-antitrypsin by plant cell culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:516-523
- Terashima M, Ejiri Y, Hashikawa N, Yoshida H (2000) Effect of sugar concentration of recombinant human a₁-antitrypsin production by genetically engineered rice cell. *Biochem Eng J* 6:201-205
- Terashima M, Ejiri Y, Hashikawa N, Yoshida H (2001) Utilization of an alternative carbon source for efficient production of human a₁-antitrypsin by genetically engineered rice cell culture. *Biotechnol Prog* 17:403-406
- Terashima M, Hashikawa N, Hattori M, Yoshida H (2002) Growth characteristic of rice cell genetically modified for recombinant human a₁-antitrypsin production. *Biochem Eng J* 12: 155-160
- Trexler MM, McDonald KA, Jackman AP (2005) A cyclical semicontinuous process for production of human a₁-antitrypsin using metabolically induced plant cell suspension cultures. *Biotechnol Prog* 21:321-328
- Tsoi, BM, Doran PM (2002) Effect of medium properties and additives on antibody stability and accumulation in suspended plant cell cultures. *Biotechnol Appl Biochem* 35: 171-180
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003) Molecular farming in plants: Host systems and expression technology. *Trends Biotechnol* 21:570-578
- Wang PM, Huang TK, Cheng HP, Chien YH, Wu WT (2002) A modified airlift reactor with high capabilities of liquid mixing and mass transfer. *J Chem Eng Jpn* 35:354-359
- Warzecha H (2008) Biopharmaceuticals from plants: a multitude of options for posttranslational modifications. *Biotechnol Genetic Eng Rev* 25:315-330
- Williams GRC, Doran PM (2000) Hairy root culture in a liquid-dispersed bioreactor: Characterization of spatial heterogeneity. *Biotechnol Prog* 16:391-401
- Yin JC, Li GX, Ren XF, Herrler G (2007) Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol* 127:335-347

Zhang S, Handa-Corrigan A, Spier RE (1992) Foaming and media surfactant effects on the cultivation of animal cells in stirred and sparged bioreactors. *J Biotechnol* 25:289-306

Zhong JJ, Yu JT, Yoshida T (1995) Recent advance in plant cell cultures in bioreactors. *World J Microbiol Biotechnol* 11: 461-467

Zhong JJ, Chen F, Hu WW (1999) High density cultivation of *Panax notoginseng* cells in stirred bioreactor for the production of ginseng biomass and ginseng saponin. *Process Biochem* 35:491-496