

# 형질전환 벼 현탁세포 배양에서 혼합효율과 조정배지가 hCTLA4Ig 생산에 미치는 영향

최홍열<sup>a</sup>, 박준용<sup>a</sup>, 남형진, 공미경, 유예리, 김동일\*

## Effects of Mixing Performance and Conditioned Medium on hCTLA4Ig Production in Transgenic Rice Cell Suspension Cultures

Hong-Yeol Choi<sup>a</sup>, Jun-Yong Park<sup>a</sup>, Hyung-Jin Nam, Mi-Kyung Gong, Ye-Ri Yoo, and Dong-II Kim\*

Received: 1 September 2015 / Revised: 3 December 2015 / Accepted: 13 December 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Transgenic rice cells using RAmy3D promoter can provide high productivity, and the production of recombinant protein is induced by sugar starvation. In this system, productivity was reduced during the scale-up processes. To ensure the influences of shear stress and oxygen transfer rate, working volume and mixing performances were investigated under various agitation speeds and working volumes. In addition, inoculation methods including suspended cells and filtered cells were compared. Working volumes and shaking speeds were 300, 450 mL and 80, 120 rpm, respectively. Hydrodynamic environment of each condition was measured numerically like mixing time and  $k_{La}$ . Good mixing performance and high shear stress were measured at high agitation speed and low volume. The highest level of hCTLA4Ig was 30.7 mg/L at 120 rpm, 300 mL. When conditioned medium was used for inoculation, increased cell growth was noticed during the day 0~4 and decreased slower than filtered cells. Compared with filtered cells, the maximum hCTLA4Ig level reached 37.8 mg/L at 120 rpm, 300 mL and lower protease activity level was observed. In conclusion mixing performance is critical factor for productivity and conditioned medium

can have a positive effect on damaged cells caused by hydrodynamic shear stress.

**Keywords:** Bioreactor, Conditioned medium, hCTLA4Ig, Mixing performance, Plant cell culture

### 1. INTRODUCTION

형질전환 식물세포의 현탁배양을 통한 의약품 단백질의 생산은 식물체를 이용할 경우에 비해 많은 장점을 가진다. 식물체보다 생산기간이 짧고, 외래 유전자의 유출 위험이 없으며, 제어된 환경에서 생산하기 때문에 의약품 단백질의 균일한 품질을 유지하는 것이 가능하다 [1,2]. 하지만 낮은 단백질 수율과 배양 중의 유전자 침묵화 등으로 인해 발현수준이 낮은 문제점이 있다 [3]. 본 연구에서는 낮은 생산성을 극복하기 위해 배지 내의 당이 고갈되었을 때 발현되는 RAmy3D 프로모터를 이용하여 형질전환 벼 현탁세포에서 hCTLA4Ig을 고 발현하는 유전자시스템을 이용하였다.

hCTLA4Ig (human cytotoxic T lymphocyte antigen4-immunoglobulin)는 T 세포를 활성화하는 공조 자극 신호에 관여하는 hCTLA4와 면역글로불린의 Fc 부분을 융합한 단백질이다. hCTLA4Ig는 동질이량체 (homodimer) 구조로 분자량은 약 92 kDa이며, 한 개의 N-결합형 당쇄를 가진다 [4,5].

배양기 내의 교반효율은 목적단백질의 생산성에서 중요한 지표 중 하나이다. 교반은 통기와 함께 배양액 내의 물질혼합과 전달능력을 효율적으로 관리해준다. 하지만 교반속도를

\*These authors contributed equally to this work as the first author.

인하대학교 생명공학과  
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

과도하게 증가시키는 경우 배양 중 유체역학적 스트레스를 유발하게 되어 세포의 성장억제, 생존도 감소, 자가분해 등의 부정적인 영향을 미칠 수도 있다. 따라서 성공적인 배양을 위해서는 배양기 내의 원활한 산소전달과 물질전달이 가능하도록 환경을 제공하고 과도한 스트레스를 유발하지 않아야 한다. 이러한 환경은 배양기의 형태, 통기형태, 교반속도, 그리고 작업량 (working volume)에 의해 결정된다 [6].

식물세포 배양의 산소소비속도 (oxygen uptake rate, OUR) 값은 5~10 mmol-O<sub>2</sub>/(L-h)로 미생물보다 매우 낮지만 동물세포보다는 높은 것으로 보고되었다. 그리고 식물세포 바이옱액터 배양에 요구되는 총괄산소전달계수 ( $k_La$ ) 값은 10~50 h<sup>-1</sup>로 미생물의 100~1000 h<sup>-1</sup>와 비교하여 크게 낮고 동물세포배양의 0.25~10 h<sup>-1</sup>보다는 높은 수준이다 [7]. 식물세포는 느린 대사속도 때문에 생장에 필요한 산소요구량은 낮은 편이지만 실제 고농도 배양에서는 배양액의 높은 점도에 의해 충분한 산소전달이 이루어지지 못한다 [8,9].

식물의 캘러스 조직에서 얻어지는 대부분의 현탁화된 세포는 크기는 2 mm 수준까지 세포응집체를 형성하는 특징을 가지고 있다. 세포응집체는 쉽게 가라앉아 배양기 내의 세포농도 구배를 형성하기 때문에 실제 배양에서는 과도한 교반이 요구된다. 그리고 한 세포응집체 내에 세포 간의 영양분 및 산소구배가 형성되며 불균등한 환경이 형성되기 쉽다 [10]. 또한 세포응집체의 표면에 있는 세포는 전단응력에 비교적 큰 손상을 입으므로 세포주에 적합한 효율적인 교반전략과 최적화가 요구된다 [11].

조정배지는 세포를 회수하고 남은 배양액으로 세포로부터 분비된 글루코오스, 아미노산, 핵산과 같은 대사산물, 인터루킨, EGF (epidermal growth factor)와 같은 성장인자 그리고 세포 외 기질 단백질 등을 포함하고 있다 [12,13]. 또한 세포는 배양하는 도중 세포 내에 포함되어 있던 다양한 조정성분들을 배지 내로 방출하며 배지 내 환경을 생장에 적절한 형태로 바꾸어 증식하게 된다 [14,15]. 여기서 조정성분들은 세포 간의 상호작용이 가능하도록 배출되는 일종의 신호물질이다 [16,17]. 이는 성장기의 세포생장을 촉진해 줄 뿐만 아니라, 생산기의 세포사멸을 완화해주는 효과도 있다 [18,19].

본 연구에서는 당이 고갈된 배지를 이용하여 hCTLA4Ig의 생산을 유도하였다. 플라스크 내 교반효율의 변화가 생산 시기의 배지 세포에 어떠한 영향을 주는지 알아보고자 배양 플라스크의 교반속도와 작업량을 달리하여 비교실험을 진행하였다. 또한 식물세포배양에 긍정적인 영향을 줄 것이라고 여겨지는 조정인자들을 포함한 조정배지를 단백질 생산기 세포에 적용함으로써 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. 세포주 및 배양조건

본 연구에 사용된 세포주는 hCTLA4Ig를 생산하는 형질전환 벼 (*Oryza sativa* L. cv Dongjin) 현탁세포이며 RAmY3D 프로

모터가 삽입되어 있어 당이 고갈된 상태에서만 목적단백질을 발현한다. 이 세포주는 전북대로부터 제공을 받았다. 생장배지로는 아미노산 (AA)배지에 30 g/L sucrose를 첨가하였고 pH를 5.8로 맞춘 뒤 121°C, 1.2기압에서 가압증기 멸균을 하였다. 생장조절제로 2.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.2 mg/L kinetin, 0.1 mg/L gibberellin (GA3)을 50 mg/L hygromycin과 함께 0.22 mm의 막 여과지로 여과 후 첨가하여 사용하였다. 계대배양은 500-mL 플라스크에서 진행하였고, 배양은 28°C, 120 rpm의 회전식 진탕 배양기에서 9일 간격으로 암조건에서 수행하였다. 목적단백질의 생산을 위한 배지로는 수크로오스가 첨가되지 않은 AA배지를 사용하였으며 1-L 플라스크를 사용하여 28°C에서 교반속도와 작업량을 달리하여 수행하였다. 교반속도는 80 rpm과 120 rpm으로, 작업량은 300 mL과 450 mL로 각각 결정하였다. 조정배지는 침전된 세포의 부피와 같은 비율로 적용하였다.

### 2.2. 세포량 측정

세포의 증식을 측정하기 위해서 세포 생체량 (fresh cell weight, FCW)과 세포 건조량 (dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 플라스크에서 배양한 현탁세포를 부호너 깔대기를 이용하여 Whatman No. 1 여과지로 시료의 배양액을 걸러내었다. 배지와 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 미리 무게를 측정할 계량접시에 세포를 옮겨 담아 화학저울로 FCW를 측정하였다. FCW 측정 후 60°C의 건조기에서 24시간 동안 향량이 될 때까지 건조하여 DCW를 측정하였다.

### 2.3. Protease 활성 측정

세포가 생산기에 hCTLA4Ig를 생산함과 동시에 단백질 분해 효소인 protease를 분비하기 때문에 배지내로 분비된 hCTLA4Ig의 분해를 유발하여 생산성에 큰 영향을 미친다. 총 protease의 활성을 측정하기 위해서 변형된 Anson's method를 이용하였다 [20]. 배양액 시료 0.5 mL을 1% Na-casein (67 mM phosphate buffer, pH 7.0) 용액 0.5 mL에 첨가하고 50°C에서 20분간 반응시켰다. 그 후 30% TCA (trichloroacetic acid) 용액 0.3 mL을 첨가하여 50°C에서 30분간 반응을 정지시킨 후, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 분광 광도계를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 티로신용액을 0.05~0.4 mg/mL로 농도를 달리하여 사용하였고, 3차 증류수를 이용하여 영점을 조정하였다. 단위 1 U (unit)은 같은 조건에서 분당 tyrosine 1 mg이 생산되는 효소의 양으로 정의하였다.

### 2.4. hCTLA4Ig 정량 분석

hCTLA4Ig의 정량 분석을 위해서는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 수행하였다. 일차 항체는 goat anti-human IgG(Fc) antibody (KPL)로, 이차 항체는 peroxidase-labeled goat anti-human IgG(g) antibody (KPL)를 사용하여 샌드위치 ELISA를 수행하였다. 표준곡선은 human IgG (Pierce)

를 이용하였고 ABTS peroxidase substrate (KPL)를 사용하여 발색시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**2.5. 플라스크 내 혼합시간 및 총괄산소전달계수 ( $k_La$ ) 측정**

플라스크 내 혼합시간은 0.1 N 농도의 HCl과 NaOH 그리고 phenolphthalein (Sigma)을 사용하여 측정하였다. 1-L 플라스크에 0.1 N 농도의 NaOH 200 mL, phenolphthalein 100 mL을 넣어 교반을 실시하여 발색시켰다. 충분히 발색되면 0.1 N 농도의 HCl 200 mL을 첨가한 후 색이 사라지는 반응시간을 측정하였다. 총괄산소전달계수 ( $k_La$ )는 플라스크에 증류수를 작업량에 맞춰 채워주고 질소가스를 불어넣어 용액의 산소를 치환하여 거의 순산소 정도를 포화값 대비 5% 이하로 낮추었다. 산소가 제거된 용액에 교반을 실시하고 순산소 측정 프로브를 이용하여 순산소의 증가를 30초 간격으로 측정하였다 [21].

**3. RESULTS AND DISCUSSION**

**3.1. 교반속도와 작업량이 혼합시간과 총괄산소전달계수 ( $k_La$ )에 미치는 영향**

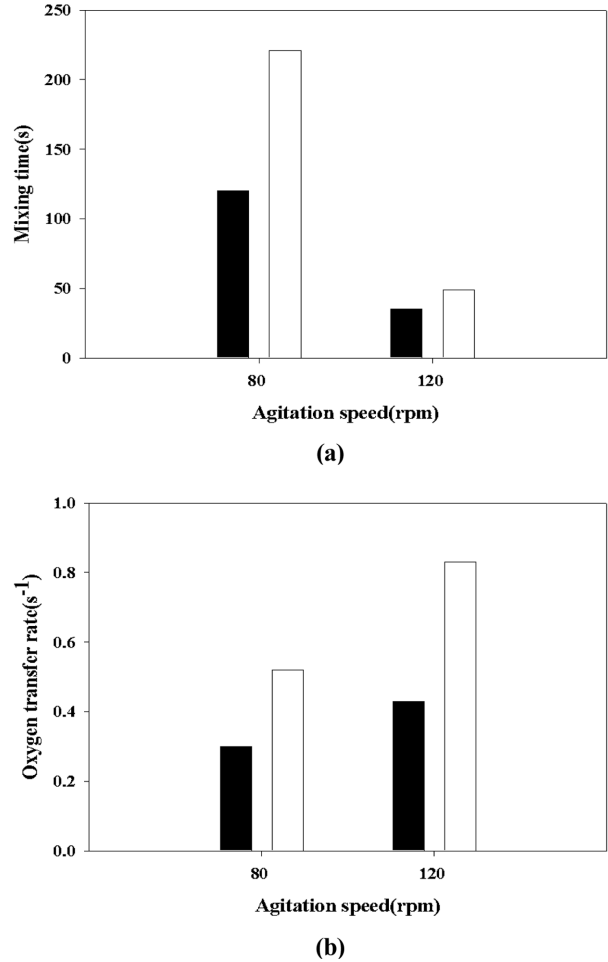
혼합효율이 달라짐에 따라 배양 결과에 어떠한 영향이 있는가를 알아보기 위하여 세포가 없는 1-L 플라스크에서 교반속도와 작업량을 달리하여 비교하였다. 교반속도는 배양액 내에 산소와 영양분이 충분히 잘 교반될 수 있도록 조절해주어야 하며, 적절한 작업량을 선정하여 배양 중의 혼합효율을 높일 수 있다.

배양기의 교반속도를 제어하여 작업량에 따른 혼합시간을 측정하였다. 작업량 300 mL, 교반속도 120 rpm 조건에서 혼합시간은 35초로 가장 좋은 혼합효과를 나타냈다. 반면에 450 mL, 80 rpm 조건에서 221초로 가장 낮은 결과를 보였다. 교반속도는 높을수록 작업량은 낮을수록 혼합효율에 좋은 영향이 있었다. 교반속도 120 rpm 이상에서는 작업량이 변해도 혼합시간에는 큰 변화가 없었다 (Fig. 1(a)).

$k_La$ 의 경우 450 mL, 120 rpm 조건에서 0.83 h<sup>-1</sup>로 가장 좋은 산소전달 능력을 보여주었고 300 mL, 80 rpm에서 가장 낮은 산소전달 능력을 보여주었다 (Fig. 1(b)). 교반속도가 증가함에 따라 혼합효율과  $k_La$ 에 긍정적인 영향을 주었지만 플라스크 작업량의 변화는 다른 경향을 나타내었다.

**3.2. 단백질 생산 조건에서 교반속도와 작업량이 미치는 영향**

단백질 생산 조건에서 교반속도와 작업량의 차이가 hCTLA 4Ig 생산에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위해 80, 120 rpm 및 300, 450 mL 조건에서 세포배양을 수행하였다. 본 연구에서는 당이 고갈되었을 때 단백질을 생산하는 시스템이기 때문에 세포 생존에 필요한 탄소원이 공급되지 않아 세포벽 등의 세포 구성 물질들이 생성되기 어렵다. 그리고 유체역학적 환경이 세포에 부정적인 영향을 주어 세포사멸이 유도되기

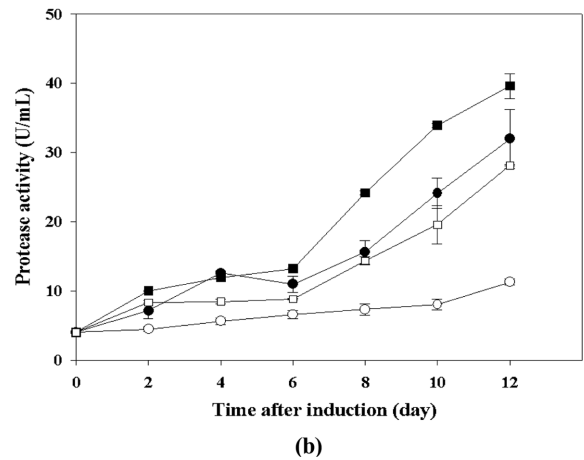
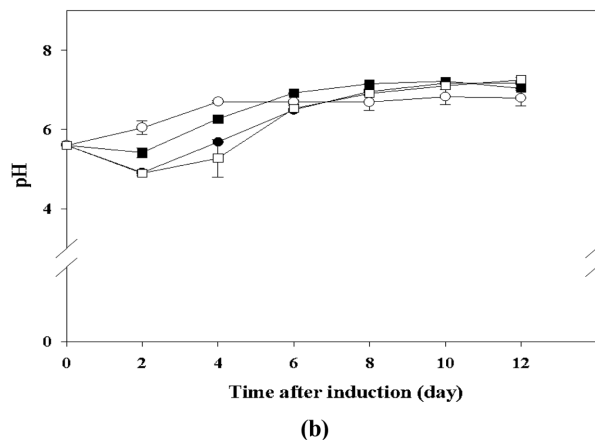
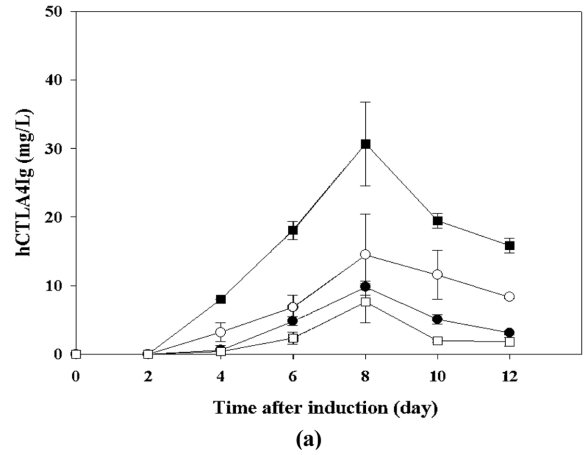
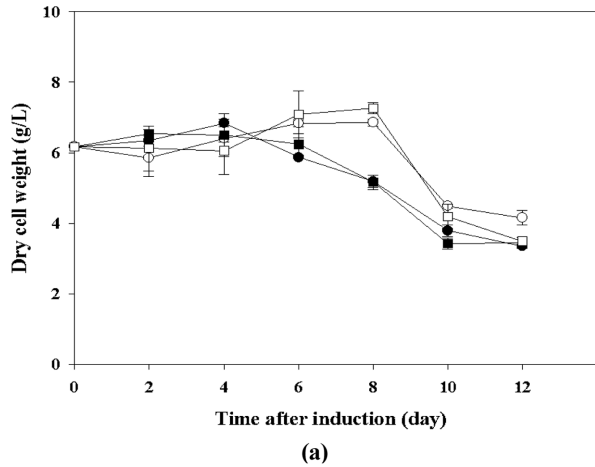


**Fig. 1.** Identification of (a) mixing time and (b)  $k_La$  values in various agitation speeds and working volumes. Closed bar, working volume 300 mL; open bar, working volume 450 mL.

때문에 단백질의 생산이 어려워진다 [22].

작업량 450 mL에서는 교반속도와 상관없이 세포의 성장곡선이 8일간 증가하였으며 300 mL에서는 배양 4일차부터 급격한 감소를 보였다. 이는 300 mL이 450 mL보다 세포생장에 부정적인 영향을 미쳤다는 것을 보여주며 작업량의 변화에 따라 전단응력이 변화하여 세포생장에 미치는 영향이 상이했기 때문으로 사료된다 (Fig. 2(a)). 하지만 배양액의 pH 변화를 살펴보면 80 rpm, 450 mL의 경우 배양 초반부터 pH가 증가하는 것을 확인할 수 있다. 다른 조건의 경우 배지 내 혼합이 정상적으로 이루어지기 때문에 적절한 물질전달을 통해 세포 내로 흡수되면서 pH가 낮아졌다가 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 2(b)). 결과적으로 80 rpm, 450 mL의 조건에서 혼합효율이 상대적으로 낮은 것을 알 수 있다.

혼합효율에 따른 hCTLA4Ig의 생산량을 비교한 결과, 120 rpm, 300 mL에서 37.8 mg/L의 최대 생산량을 나타내었다. 반면에 120 rpm, 450 mL에서는 7.6 mg/L로 가장 낮은 생산량을 보였다 (Fig. 3(a)). Protease의 경우 120 rpm, 450 mL에서 가



**Fig. 2.** Effects of agitation speeds and working volumes on (a) dry cell weight and (b) media pH with filtered cells. ●, 80 rpm / 300 mL; ○, 80 rpm / 450 mL; ■, 120 rpm / 300 mL; □, 120 rpm / 450 mL.

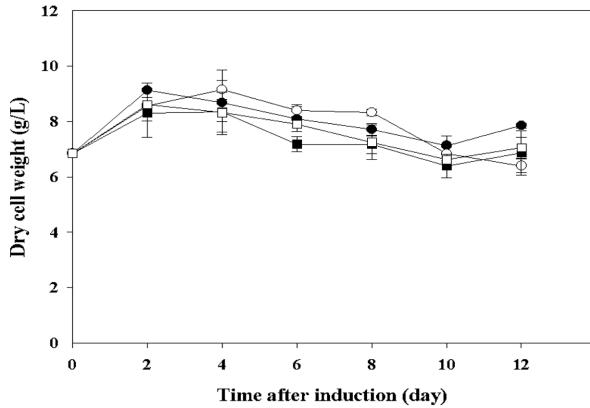
**Fig. 3.** Effects of agitation speeds and working volumes on (a) hCTLA4Ig concentration and (b) protease activity by with filtered cells. ●, 80 rpm / 300 mL; ○, 80 rpm / 450 mL; ■, 120 rpm / 300 mL; □, 120 rpm / 450 mL.

장 낮은 활성을 보였고 나머지 조건에서는 배양 6일차부터 급격히 증가하였다 (Fig. 3(b)). 모든 조건에서 protease 활성의 증가로 인해 목적단백질의 분해가 진행되어 배양 8일차 이후의 hCTLA4Ig 생산량은 감소하였다. 그리고 세포량의 감소와 함께 protease의 활성이 증가하였다. 결론적으로 120 rpm, 300 mL에서 가장 좋은 혼합속도를 나타냈고 hCTLA4Ig의 생산량도 가장 높았다. 하지만 높은 교반속도는 세포에 강한 전단응력을 가했고 protease의 활성이 가장 급격하게 증가하여 hCTLA4Ig의 분해도 빠르게 진행되었다. 이러한 결과를 통해 빠른 교반속도는 혼합효율을 증대시키지만 높은 전단응력이 발생하고 세포에 부정적인 영향을 주어 세포 용해에 의한 protease의 분비를 야기하는 것을 알 수 있었다. 하지만 플라스크 내의 혼합효율이 좋음에도 불구하고 작업량에 따라 hCTLA4Ig의 생산에 미치는 영향이 다른 것을 확인할 수 있었다.

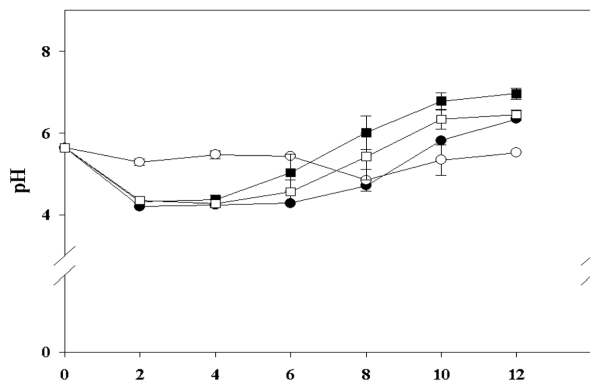
**3.3. 단백질 생산 조건에서 조정배지의 첨가에 따른 영향**  
기존의 세포접종 방식은 종이필터로 여과한 세포량을 정량

하여 접종하는 방식이었다. 조정배지를 적용하기 위하여 침전시킨 세포의 부피와 같은 부피의 조정배지를 포함하여 세포를 접종하였다. 이때 세포량은 작업량 300 mL의 경우 30 g, 450 mL의 경우 45 g으로 적용하였다.

세포의 성장곡선을 살펴보면, 조정배지를 적용하였을 때 모든 조건에서 배양 초반 4일까지 증가하다가 감소하였다. 이는 조정배지에 잔존하는 당과 여러 생장인자들에 의한 효과로 판단된다. 특히 세포만을 정량하여 적용한 경우 세포 생장이 4 g/L까지 떨어졌지만 조정배지가 포함된 세포로 접종한 경우 세포량의 급격한 감소는 없었고 교반속도와 작업량에 의한 성장곡선의 변화도 없었다. 세포사멸에 의해 생장이 저하될 때 배양액의 pH가 증가하는 것을 확인할 수 있었는데, 조정배지를 사용할 경우 더 늦게 증가하는 것을 알 수 있었다. 교반속도 80 rpm, 작업량 450 mL 조건에서는 조정배지를 첨가했을 때와 마찬가지로 배지 내 물질전달이 제대로 이루어지지 않아 pH가 떨어지지 않았다 (Fig. 4). 조정배지가 포함된 세포로 접종할 경우 hCTLA4Ig의 생산량은 120 rpm, 300 mL



(a)



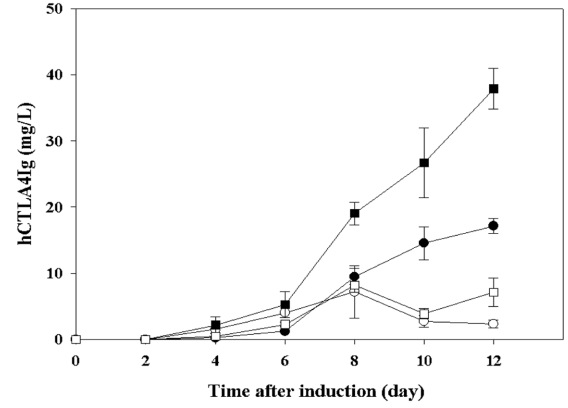
(b)

Fig. 4. Time course changes of (a) dry cell weight and (b) media pH under various agitation speeds and working volumes with settled cell volume containing conditioned media. ●, 80 rpm / 300 mL; ○, 80 rpm / 450 mL; ■, 120 rpm / 300 mL; □, 120 rpm / 450 mL.

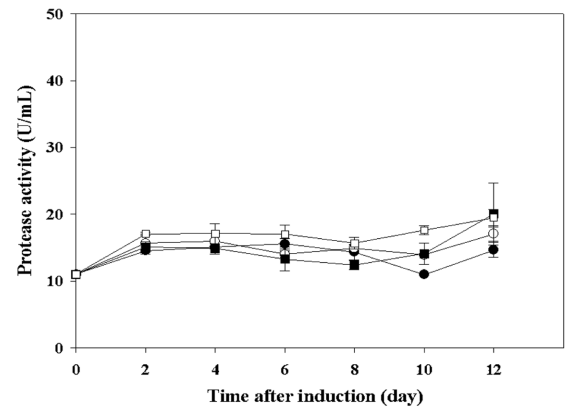
의 조건에서 가장 높은 37.8 mg/L이었으며, 80 rpm, 300 mL에서 17.1 mg/L, 120 rpm, 450 mL에서 7.2 mg/L, 80 rpm, 450 mL에서 2.3 mg/L로 상이한 결과를 보였다. 조정배지를 사용하지 않았을 때와 다르게 배양 12 일차까지 hCTLA4Ig의 생산량이 감소하지 않았다. 조정배지를 사용하였을 때 protease의 활성은 조정배지를 사용하지 않았을 때보다 감소한 결과를 보였다. 세포의 성장곡선과 배양액 내 protease의 활성측정 결과를 통해 접종시 첨가된 조정배지가 세포 용해를 억제하였고 protease의 분비가 감소하여 목적단백질인 hCTLA4Ig의 분해가 감소된 것으로 보인다 [23]. 궁극적으로 조정배지를 사용하지 않은 경우와 비교하여 hCTLA4Ig의 생산량이 증가하였다 (Fig. 5).

#### 4. CONCLUSION

본 연구에서는 당이 고갈된 배지를 이용하여 hCTLA4Ig의 생



(a)



(b)

Fig. 5. Time course changes of (a) hCTLA4Ig concentration and (b) protease activity under various agitation speeds and working volumes with settled cell volume containing conditioned media. ●, 80 rpm / 300 mL; ○, 80 rpm / 450 mL; ■, 120 rpm / 300 mL; □, 120 rpm / 450 mL.

산을 유도하였다. 플라스크 내 교반효율의 변화가 생산 시기의 버 세포에 어떠한 영향을 주는지 알아보고자 배양 플라스크의 교반속도와 작업량을 달리하여 비교실험을 진행하였다. 또한 식물세포배양에 긍정적인 영향을 줄 것이라고 여겨지는 조정인자들을 포함한 조정배지를 단백질 생산기 세포에 적용함으로써 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

교반속도 120 rpm, 작업량 300 mL 조건에서 높은 혼합효율을 나타내었으며 가장 높은 hCTLA4Ig의 생산량을 보였다. 하지만 높은 전단응력으로 인해 배양 4일차 이후 세포 성장곡선이 감소하고 세포용해에 의해 단백질 분해효소인 protease의 활성이 급격하게 증가하였으며, 이로 인해 배양 8일차 이후 hCTLA4Ig 생산량이 감소하였다. 조정배지의 첨가는 세포 성장곡선의 급격한 감소를 억제할 수 있었으며 높은 전단응력에 의한 세포 용해와 protease의 활성증가를 억제할 수 있었다.

식물세포배양에서는 배양기의 교반속도와 작업량이 배지 내 교반효율을 결정하며 세포의 생장에 중요한 역할을 한다.

부적절한 교반효율과 전단응력은 세포로부터 protease를 분비하게 하고 목적단백질의 분해를 야기한다. 접종시 식물세포에 필요한 성장인자와 세포외 기질 단백질 등을 포함하는 조정배지를 적용함으로써 세포 생장에 도움을 주고 protease의 분비를 억제시켜 목적단백질의 생산량을 증대시킬 수 있다.

## Acknowledgements

이 논문은 미래창조과학부 재원 한국연구재단의 기초연구사업 (과제번호 NRF-2013R1A1A2008768), 바이오의료기술개발사업 (과제번호 NRF-2013M3A9B6075887), 및 산업통상자원부의 산업기술혁신사업 (과제번호 10051171) 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Fisher, R. and N. Emans (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res.* 9: 279-299.
- Hellwig, S., J. Drossard, R. M. Twyman, and R. Fischer (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnol.* 22: 1415-1422.
- James, E. and J.-M. Lee (2006) Loss and recovery of protein productivity in genetically modified plant cell lines. *Plant Cell Rep.* 25: 723-727.
- Pree, I. and T. Wekerle (2006) New approaches to prevent transplant rejection: Co-stimulation blockers anti-CD40L and CTLA4Ig. *Drug Discov. Today* 3: 41-47.
- Lee, S.-J., C.-I. Park, M.-Y. Park, H.-S. Jung, W.-S. Ryu, S.-M. Lim, H.-K. Tan, T.-H. Kwon, M.-S. Yang, and D.-I. Kim (2007) Production and characterization of human CTLA4Ig expressed in transgenic rice cell suspension cultures. *Protein Exp. Purif.* 51: 293-302.
- Raposo, S. and M. E. Lima-Costa (2012) Effects of the hydrodynamic environment and oxygen mass transfer on plant cell growth and milk-clotting protease production in a stirred-tank reactor. *Eng. Life Sci.* 12: 441-449.
- Huang, T.-K., McDonald, K. A. (2009) Bioreactor engineering for recombinant production in plant cell suspension cultures. *Biochem. Eng. J.* 45: 168-184.
- Doran P. M. (1999) Design of mixing systems for plant cell suspension in stirred reactor. *Biotechnol. Prog.* 15: 319-335.
- Curtis, W. R. and A. L. Tuerk (2006) Oxygen transport in plant tissue culture systems. *Plant Tiss. Cult. Eng.* 6: 173-187.
- Chattopadhyay, S., S. Farkya, A. K. Srivastava, and V. S. Bisaria (2002) Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7: 138-149.
- Tanaka, H., H. Semba, T. Jisufuchi, and H. Harada (1988) The effect of physical stress on plant cells in suspension cultures. *Biotechnol. Lett.* 10: 485-490.
- Lee, C. W. T. and M. L. Shuler (2000) The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 67: 61-71.
- Celles, K., U. Eriksson, and L. Haggstrom (2006) Effect of conditioned medium factors productivity and cell physiology in *Trichoplysia ni* insect cell cultures. *Biotechnol. Prog.* 22: 653-659.
- Mori, T., M. Sakurai, M. Seki, and S. Furusaki (1994) Effects of conditioning on anthocyanin production in strawberry suspension cultures. *J. Sci. Food. Agric.* 66: 381-388.
- Sakano, K., M. Makiko, Y. Yoshiaki, K. Seiichiro, and K. Okihara (1995) Inorganic phosphate as a negative conditioning factor in plant cell culture. *Plant. Sci.* 107: 117-124.
- Kobayashi, T., K. Higashi, H. Saitou, and H. Kamada (2001) Stimulatory and inhibitory conditioning factors that regulate cell proliferation and morphogenesis in plant cell cultures. *Plant Biotechnol. J.* 18: 93-99.
- Zhou, J., B. Wang, and L. Zhu (2005) Conditioned culture for protoplasts isolated from *Chrysanthemum*: An efficient approach. *Colloid Surface. B.* 45: 113-119.
- Woragidbumrung, K., P. Sae-tang, H. Yao, J. Han, S. Chauvatharin, and J. Zhong (2001) Impact of conditioned medium on cell cultures of *Panax notoginseng* in an airlift bioreactor. *Process Biochem.* 37: 209-213.
- Wang, Z. Y. and J. J. Zhong (2002) Combination of conditioned medium and elicitation enhances taxoid production in bioreactor cultures of *Taxus chinensis* cells. *Biochem. Eng. J.* 12: 93-97.
- Bettaglino, R. A., M. Huergo, A. M. Pilosof, and G. B. Bartholomai (1992) Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 292-296.
- Kwon, J.-Y., Yang, Y.-S., Cheon, S.-H., Nam, H.-J., Jin, G.-H. and D.-I. Kim (2013) Bioreactor engineering using disposable technology for enhanced production of hCTLA4Ig in transgenic rice cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 110: 2412-2424.
- Kieran, P. M., Malone, D. M. and MacLoughlin, P. F. (2000) Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 67: 139-177.
- Outchkourov, N. S., Rogelj, B., Struckelj, B. and Jongsma, M. A. (2003) Expression of sea anemone equistatin in potato. Effects of plant proteases on heterologous protein production. *Plant Physiol.* 133: 379-390.