

Gas 자동제어시스템을 이용하여 다양한 gas 조성이 *Aloe Saponaria* 세포배양계에 미치는 영향 연구

박태영, 허원*, 김동일**, 조규현

강원대학교 화학공학과, 환경생물공학부* 인하대학교 화공고분자생물공학부**

전화 (033) 250-6335, FAX (033) 251-6335, E-mail : ghcho@cc.kangwon.ac.kr

Abstract

The effect of volatile components on cell growth and polysaccharide production in suspension cultures of *Aloe saponaria* was investigated using an intelligent on-line gas control system which enabled to control the concentrations of oxygen, carbon dioxide and ethylene simultaneously. Aloe production was enhanced in the presence of exogenous ethylene in the concentration range of 5ppm and 15ppm. Maintaining high tension of carbon dioxide (5% v/v) was found to enhance polysaccharide production significantly.

서론

식물세포를 bioreactor에서 대량배양하기 위해서는 적절한 gas 공급이 매우 중요하며 배양환경에 따라 원식물체의 주요성분과는 다른 화학성분 profile을 보일수 있어 적절한 조성의 gas 공급은 식물세포 대량배양에 있어 중요한 기술이라고 할수 있다. 지금까지 식물세포 대량배양에서 O₂, CO₂, C₂H₄등의 각 gas component가 2차 대사산물에 미치는 영향이나 중요성에 대한 많은 연구가 있어왔고, 이런 gas 성분은 미생물이나 동물세포에서와는 다른 중요성을 갖는다. 이번 연구는 이전의 연구 결과를 토대로 대량배양에 있어서의 전단계인 flask 수준에서 gas 자동제어 시스템을 개발함과 동시에 gas mixture의 복합적인 영향을 연구하였다.

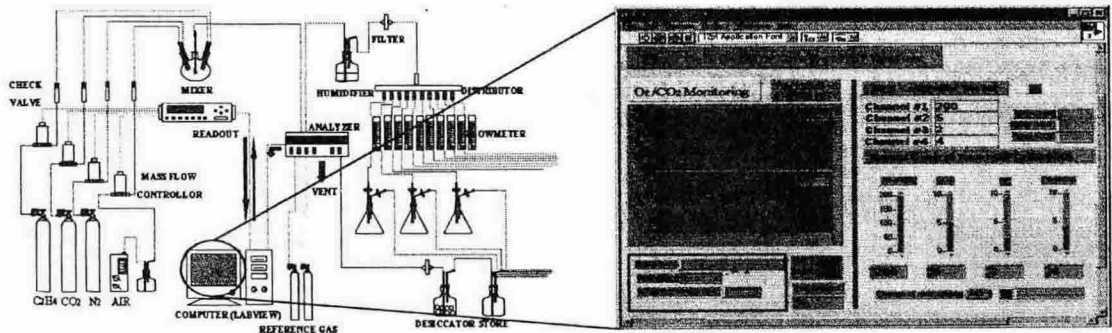


Figure 1. Schematic diagram of the gas control system

일반적으로 산소의 경우는 탄소화합물의 호기적 대사에서 최종 전자 수용체로서 작용하고 생명체 호흡의 기본성분이므로 산소부족현상이 일어나지 않도록 적절한 산소농도를 유지하는 것이 중요하고, 산소농도는 세포분화에 매우 큰영향을 끼치는 것으로 알려져 있다[1]. 식물세포배양에서 임계산소농도이하에서는 산소공급의 증가는 성장속도를 증가시키지만 임계산소농도이상에서는 성장속도가 줄어든다고 보고되었다[2]. 이산화탄소는 식물세포의 배양에서 필수적인 요소로서 식물세포나 조직의 대사산물에서의 이산화탄소의 역할은 다소 논쟁의 소지가 남아있다. Nesius와 Fletcher는 1973년 이산화탄소가 부족한 환경에서 rose' cell suspension의 생장이 저해된다고 보고하였다. 배양기안의 이산화탄소 농도를 높여주면 세포생장을 높여주었다[3]. 또한 *Taxus cuspidata* 배양에서 head space의 이산화탄소 농도증가는 lag phase을 짧게 해주지만 성장속도를 저해시킨다고 보고되었다[4]. Ethylene은 식물세포가 매우 소량으로 생산하는 휘발성 성분의 하나로 과일숙성에 관여하는 유용물질의 생산 촉진을 하며 예로써 coffee 세포의 caffeine 생산성 증대에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[5]

이러한 배양에 필요한 다양한 gas 조성을 자동으로 제어할수 있는 프로그램을 제작하여 분석 및 제어를 ON-Line으로 자동화하여 연구하였다.

재료 및 방법

세포주는 *Aloe saponaria*을 사용하였고 25°C, dark room에서 110rpm으로 배양하였다. 배지는 Sigma사 제품의 특급시약으로 만든 M&S 배지를 사용하였고 배지 20ml 당 FCW 2.5g을 접종하였다. 실험시 gas 조성당 10개씩의 플라스크를 접종하였으며 2일마다 한번씩 sampling을 하여 20일동안 배양하였다. Sampling은 100ml 플라스크 전체를 사용하였고 성장속도, glucose 소비속도, 2차대사물질 생산량, polysaccharide 생산량등을 분석하였다. Gas 공급조절은 Kofloc사의 MFC를 사용하였고 산소와 이산화탄소 분석은 GC와 Lokas사의 gas 분석기를 사용하였으며 ethylene은 GC을 이용하여 분석하였다. 2차대사물질은 HPLC을 사용하여 정량분석을 하였고 polysaccharide의 생산량은 에탄올 침전법을 사용하였다. Gas 자동제어는 MFC와 gas 분석기를 컴퓨터에 연결시켜 Labview을 이용하여 프로그래밍하여 플라스크내 head space의 gas 조성을 조절하도록 하였다.

결과 및 토론

Figure 2.에서 보면 생장은 exponential phase까지 거의 비슷하였고 stationary phase에서 약간의 차이를 보였다. 성장초기에는 이산화탄소가 생장에 좋은 영향을

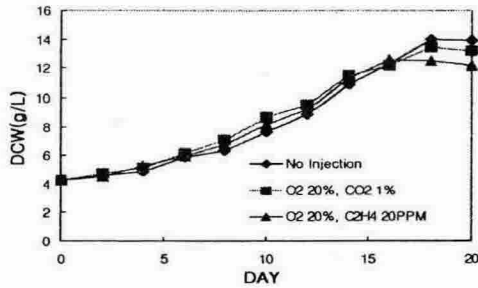


Figure 2. Growth rates when cultures were equilibrated with various head space gas compositions.

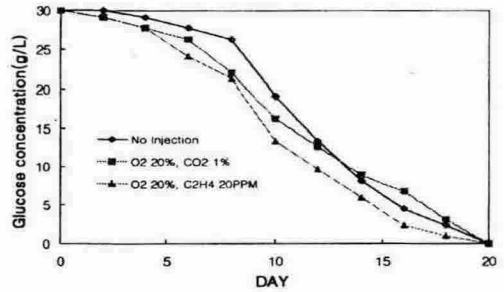


Figure 3. Glucose consumptions when cultures were equilibrated with various head space gas compositions.

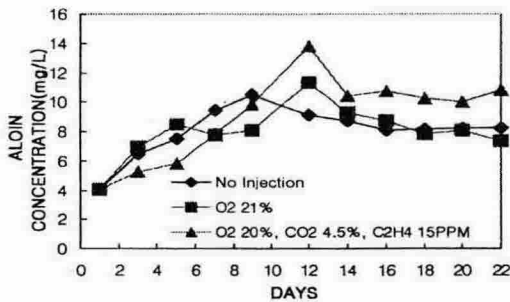


Figure 4. Effect of O₂, CO₂ and C₂H₄ in head space of the cultures equilibrated with gases on alonin production.

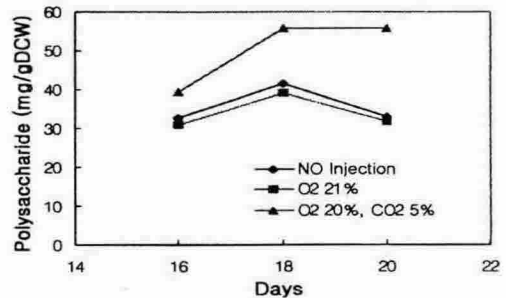


Figure 5. Polysaccharide productions when cultures were equilibrated with various head space gas compositions.

였으며 성장말기에는 나쁜 영향을 보였다. 이산화탄소를 주입한 샘플을 살펴보면 glucose 소비속도가 성장곡선과 밀접한 관계를 보여줌을 관찰할 수 있다. 성장초기 glucose 소비량이 gas를 주입하지 않은 샘플보다 높았으나 성장말기에서는 감소함을 볼 수 있다(Figure 3). Ethylene 20ppm을 주입하였을 경우 glucose 소비속도는 다른 샘플과 비교하여 매우 빨랐으나 세포성장 및 alonin, 다당생산에는 큰 영향을 미치지 않음을 관찰하였다. 2차 대사물질생산은 O₂ 20%, CO₂ 4.5%, C₂H₄ 20ppm를 주입한 샘플에서 가장 가파른 생산증가를 보였다(Figure 4). Polysaccharide 생산의 측면에서 볼 때 CO₂의 주입에 따라 매우 큰 polysaccharide 생산량의 차이를 보였다(Figure 4).

위의 결과를 종합해보면 산소는 성장에 좋은 영향을 보이며 2차대사물질에는 큰 영향을 미치지 않음을 볼 수 있다. 이산화탄소는 성장말기에 나쁜 영향을 나타냈으며 이산화탄소의 농도(0~5v/v)가 증가할수록 2차대사물질을 증가함을 보였으며 이산화탄소의 주입이 polysaccharide 생산에 큰 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. Ethylene의 경우 역시 성장말기에 negative한 영향을 보였으며 2차대사물질생산에

는 positive한 영향을 나타내었고 높은 glucose 소비속도를 보였다.

본연구는 위의 결과를 바탕으로 scale-up시 bioreactor 운전전략 수립을 위한 연구 임과 동시에 이러한 운전전략을 효과적으로 활용하기 위한 gas 자동제어 시스템을 개발하고자 연구하였다.

요약

Bioreactor를 좀더 효율적으로 운전하기 위하여 여러 가지 gas 성분의 조성을 on-line으로 자동제어 및 분석할 수 있는 시스템을 연구하였으며, 이 시스템을 이용하여 각 gas 성분이 식물세포에 미치는 영향을 여러 관점에서 비교·분석하였다. 실험결과, 산소는 exponential phase을 증가시켰으며, 이산화탄소와 ethylene은 lag phase을 줄여주는 결과를 보였다. 이산화탄소는 2차대사물질인 aloin의 생산량을 증대시켰으며, 다당의 경우를 보면 현저한 생산량의 차이(약 1.8배)를 나타내었다. Ethylene을 주입한 샘플에서는 glucose 소비속도가 매우 빨랐으며, aloin의 생산량을 높여주는 결과를 보였다.

감사

본연구는 한국산업기술평가원 산업기반기술개발사업(0399004-1-1)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Payne, G.F., Bringi, V., Prince, C. and Shuler, M.L.,: *Oxford university press*, New york(1991).
2. Tate, J.L. and Payne, G.F.,: *Plant Cell Rep*, **10**, 22(1991).
3. Maurel, B. and Pareilleux, A.,: *Biotechnology Letters*, **7**, 313(1987)
4. Noushin, M. and James, C.L.,: *Biotechnology and Bioengineering*, **48**, 126,131(1995)
5. Chi, G.L. and Pua, E.C.,: *In vitro plant sci*, **64**, 243(1989)