

통계실험계획법을 통한 중요인자 선정에 의한 형질전환 담배세포에서 hGM-CSF 생산 증대 연구

이기용, 최성훈, 홍석미, 김동일

인하대학교 생명화학공학과

전화 (032) 863-5946, Fax (032) 872-4046

Abstract

Plackette-Burman method, one of the statistical experimental methods, was used for the screening of main factor for the enhanced production of hGM-CSF. A nine-runs Plackette-Burman design including one center point was the screening design selected for the initial set of experiments. The analysis of the data from the Plackette-Burman experiments showed main effect. Sucrose, nitrogen and temperature were determined to be main factors to enhance the production of hGM-CSF because the absolute values of main effect of sucrose, nitrogen and temperature were higher than the other factors. The production of hGM-CSF was improved when initial sucrose concentration was 50 g/L, initial nitrogen concentration was 90 mM and initial temperature was 20°C.

서론

통계실험계획법은 지금까지 주로 미생물에서 세포생장의 증대와 생산물의 증대를 위한 배지성분의 최적화를 위해 많이 사용되어 왔다.¹⁾ 이러한 방법은 실험 공정상의 요인들을 효과적으로 제어함으로써 효율적인 실험을 계획하고, 단시간에 가장 생산성이 증가되는 실험조건을 결정할 수 있으며, 실험적인 오차를 최대한 줄여서 믿을 수 있는 결과를 얻기 위해 대단히 유용한 방법이다.

위와 같은 통계실험계획법을 사용하여 실험조건을 최적화하여 생산성을 증대시키기 위해서는 생산성에 영향을 미치는 인자의 수 즉 method 상의 변수를 줄이는 screening design 단계가 필요하다. Screening design 단계에서는 생산성에 가장 큰 영향을 미치는 인자를 선택하고, 나머지 인자는 실험조건에 영향을 미치지 않게 된다.

Plackette-Burman법은 screening design중의 하나로써 인자들의 주효과를 검출하는 2 수준 일부실시 실험계획이다.²⁾ 본 연구에서는 형질전환된 식물세포인 *Nicotiana*

tabacum 세포에서 의료용 재조합단백질인 hGM-CSF의 생산을 극대화하기 위한 실험 조건 최적화실험인(Response Surface Method)을 수행하기 위해 선행되는 연구로써 carbon, nitrogen, phosphorus, kinetin, 2,4-D와 같은 배지 성분인자와 실험운전조건 인자인 온도를 screening design중의 하나인 Plackette-Burman법을 사용하여 가장 큰 영향을 미치는 인자 3개를 선정하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배양

본 연구에 사용된 세포주는 전북대학교로부터 분양받은 hGM-CSF를 생산할 수 있는 *Nicotiana tabacum*이며 성장배지로는 MS 기본배지를 사용하였다. 탄소원으로는 30 g/L의 sucrose를 사용하였고, 성장조절제로는 2,4-D(0.2 mg/L)와 kinetin(0.02 mg/L)을 사용하였다. pH는 1 N NaOH를 사용하여 5.9로 조절하였으며 가압증기멸균하여 사용하였다. 현탁배양은 회전식 진탕배양기에서 25°C, 120 rpm, 암조건에서 수행하였다.

세포량측정

세포의 성장을 알아보기 위하여 세포의 생체중량과 건조중량을 측정하였는데 생체중량은 현탁배양된 세포를 진공펌프와 Whatman No.1 여과지로 여과하여 세포와 배지를 분리한 다음 세포로부터 수분을 제거하고 무게를 알고있는 weighing dish에 옮겨서 저울로 측정하였다.

건조중량은 생체중량을 측정한 세포를 60°C로 유지한 dry oven에서 항량이 될 때까지 건조하여 측정하였다.

hGM-CSF 정량분석

hGM-CSF의 정량방법으로는 ELISA 법을 사용하였으며 450 nm에서 측정하였다.

Selection of main factor

hGM-CSF의 생산에 가장 큰 영향을 미치는 3개의 주요인자를 선정하기 위해 Table 1과 같이 실험계획을 세운 후 Minitab software를 사용하여 Plackette-Burman법을 실행하였다.

결과 및 고찰

5가지의 배지성분인자와 실험조건 인자 중에 하나인 온도를 대상으로

Plackette-Burman법을 사용하여 6가지 인자의 수준을 정하고, 총 9번의 실험을 설계하여 수행하였다. 먼저 Figure 1(a)에서 보듯이 세포생장의 경우 1번부터 4번까지는 생장이 현저히 낮고 5번부터 9번까지는 세포생장이 높다는 것을 알 수 있다.

Table 1. Factorial design plan.

Run No.	Sucrose (g/L)	Nitrogen (mM)	Phosphate (mM)	Temperature (°C)	Kinetin (mM)	2,4-D (mM)
1	10	90	1.25	30	0.04	0.4
2	10	90	5	30	0.01	0.4
3	10	30	1.25	20	0.01	0.1
4	10	30	5	20	0.04	0.4
5	50	90	1.25	20	0.04	0.1
6	50	90	5	20	0.01	0.4
7	50	30	1.25	30	0.01	0.4
8	50	30	5	30	0.04	0.1
9	30	60	3.12	25	0.025	0.25

이것은 기초실험을 통하여 당의 농도에 의해서 영향을 받을것이라고 예상을 하였다. 실제로 1번부터 4번까지는 저농도(10 g/L)의 당을 첨가하였고, 5번부터 8번까지는 고농도(50 g/L)의 당을 첨가하였다. 세포최대량은 21 g/L로 5번실험에서 얻을 수 있었다. 9번은 center point로서 30 g/L의 당을 첨가하였다.

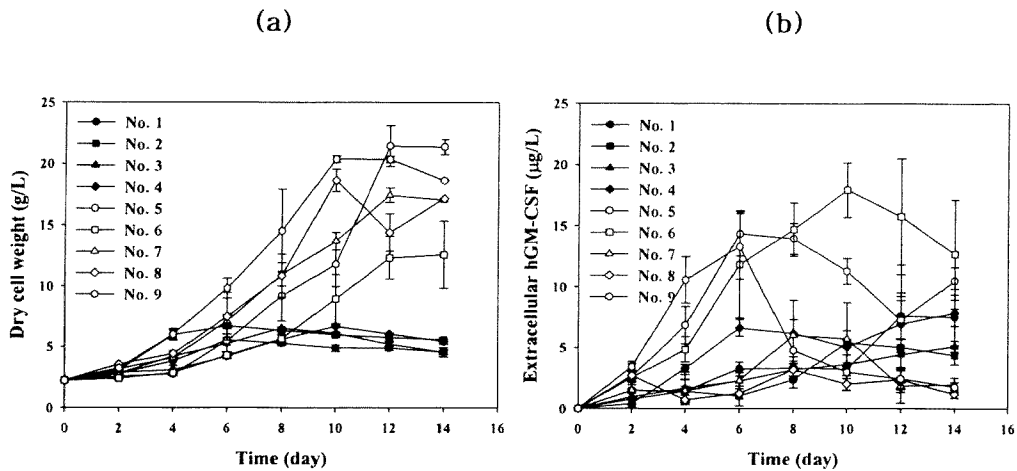


Figure 1. Effect of nutrient factors and temperature on growth (a) and production hGM-CSF (b). Information of simbol was presented in Table 1.

생산물인 hGM-CSF는 배지내로 분비되며 그것을 정량적으로 측정된 결과는 Figure 1(b)에 나타낸 것과 같이 세포생장과는 조금 다른 양상을 보이고 있다. 고농도 당을 첨가하여서 생장이 좋은 5, 6, 7, 8번이 생산량이 많을것으로 예상이 되었으나 5번과 6번은 생산량이 많은것에 비해 7번과 8번은 hGM-CSF의 생산량이 현저히 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 이것은 당외에 다른 인자가 크게 영향을 미친것이라 예상할수 있다. hGM-CSF 최대 생산은 18 mg/L로 6번 실험에서 얻을 수 있었다.

위의 결과와 같은 예상을 바탕으로 실제로 실험에 미치는 영향을 값으로 나타낼 수 있는 main effect를 사용하여 각각의 미치는 영향을 연구하였다. Main effect의 절대값이 클수록 인자가 실험에 미치는 영향이 크다 하겠고, 그 값이 양이면 center point 조건보다 수준을 높이는 것이, 그 값이 음이면 center point 조건보다 수준을 낮추는 것이 실험에 유리하다는 것을 나타낸다.

Figure 2(a)는 세포생장에 대하여 각각의 요인들이 시간대별로 미치는 영향을 main effect 값을 사용하여 나타낸 것이다. 위에서 예상했듯이 당의 main effect의 절대값이 다른 요인에 비하여 대단히 큼을 알 수 있다. 배양초기에는 음의 값을 가짐으로 당의 농도가 높으면 세포생장에 저해가 됨을 알 수 있고, 배양후반으로 갈수록 값이 양의 값을 가짐으로 농도가 높으면 실험에 더 유리하다는 것을 알 수 있다. Main effect의 절대값이 그 다음으로 큰 요인은 nitrogen이다. Nitrogen은 배양초기부터 음의 값을 가짐으로 고농도일 경우 세포생장에 저해가 됨을 알 수 있다.

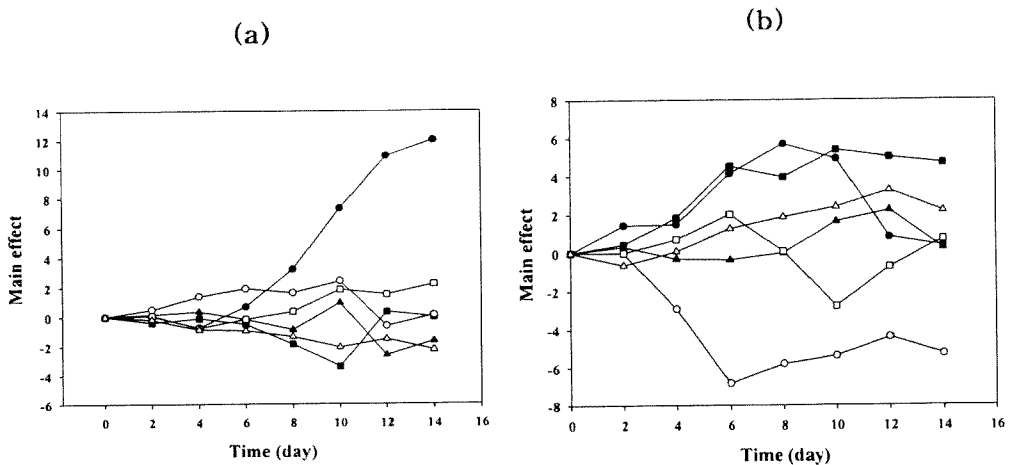


Figure 2. Effect of main factors on cell growth (a), production of hGM-CSF(b): ●, sucrose; ■, nitrogen; ▲, phosphorus; ○, temperature; □, kinetin; △, 2,4-D.

Figure 2(b)에서는 hGM-CSF의 생산에 각각의 요인들이 미치는 영향을 main effect 값으로 나타낸 것으로 당과 nitrogen 그리고 온도의 main effect 절대값이 컸으며, 당과 nitrogen의 농도는 높을 때 hGM-CSF의 생산에 유리하며, 온도는 낮을 때 유리함을 알 수 있다. 위와 같은 main effect 값의 결과를 바탕으로 6가지의 인자 중에서 실험에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로써 당, nitrogen, 온도를 선정할 수 있었다.

요 약

통계실험계획법 중 하나인 Plackette-Burman법을 사용하여 실험을 설계하였으며, 수행된 실험을 통하여 6가지 인자 중 main effect의 절대값이 높은 당, nitrogen, 온도를 최종 선정할 수 있었으며, main effect 값이 양의 값을 가지는 당과 nitrogen은 첨가 농도가 높을수록, 음의 값을 가지는 온도는 낮을수록 실험에 유리하다는 것을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Cockshott, A.R., Sullivan, G.R., "Improving the fermentation medium for Echinocandin B production. Part I: Sequential statistical experimental design"(2001), *Process Biochem.*, **36**, 647-660.
2. Bull, A.T., Castro PM, Hayer P.M., Ison, A.P., "Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-g production by Chinese hamster ovary cells"(1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 84-90.