

데칸터를 이용한 텍서스속 식물세포 회수

†김진현·임창배·강인선·홍승서·이현수
(주)삼양제넥스 생명공학연구소
(접수 : 2000. 6. 23., 게재승인 : 2000. 8. 17.)

The Use of a Decanter for Harvesting Biomass from Plant Cell Cultures

Jin-Hyun Kim[†], Chang-Bae Lim, In-Seon Kang, Seung-Suh Hong, and Hyun-Soo Lee
Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea
(Received : 2000. 6. 23., Accepted : 2000. 8. 17.)

The decanter is very useful to harvest biomass from plant cell cultures in large-scale process. It is very important to obtain high yield and low moisture content in recovered biomass so as to minimize solvent usage in subsequent extraction steps. Effluent clarity was affected largely by flow rate and only slightly by the diameter of the ring dam. Effluent clarity was also affected by the differential speed, although this affect was more dramatic at higher flow rates than at lower flow rates. Moisture content was largely unaffected by flow rate. A decrease in moisture content was evident as differential speed decreased.

Key Words : paclitaxel, plant cell culture, decanter, biomass, harvest

서론

최근 식물세포 배양에 의한 효율적이고 경제적인 방법으로 복잡하고 독특한 구조를 갖고 있을 뿐 아니라 매우 새로운 방식의 항암기작을 가진 항암제 paclitaxel (taxol) 생산에 많은 관심을 가지게 되었다(1,2,3). 식물세포 배양에 의한 paclitaxel은 식물세포(cell)와 세포분해에 의하여 생성된 식물세포 조각(debris)에 대부분 분포되어 있으며 배지 내에도 미량 존재하게 된다. 이러한 paclitaxel의 회수/추출/정제 공정에서의 첫번째 단계는 배양액으로부터 세포와 세포조각을 분리/회수하는 것이다. 이러한 분리/회수 공정에서는 식물세포 회수율의 최대화와 동시에 추출공정에서의 용매 사용량을 최소화하기 위해서 회수할 세포내의 수분함량을 최대한으로 줄여야 한다(4,5,6). 실험실 규모(<15 L 배양)에서는 주로 coarse paper (filterpaper)를 이용하여 여과하는 방법으로 회수가 가능하다. 그러나 여과에 의한 세포 회수 방법은 미세한 세포조각 등에 의한 막힘 현상 때문에 scale-up에 많은 어려움이 따른다(7).

고/액 분리를 위하여 통상 원심분리기가 많이 이용되어

져 왔으며, 이러한 원심분리기는 원심여과형과 원심침강형으로 크게 나눌 수 있다(8,9). 원심여과형의 기본적인 원리는 여과체를 회전하여 발생하는 원심력에 의하여 고/액을 분리하는 것이다. 원심침강형은 침강분리를 지구의 중력에 의존하지 않고 분리용기의 회전에 따라 원심력을 발생시켜 비중차를 이용해 분리하는 것이다. 또한 분리방법에는 회분식과 연속식이 있으며 대량처리에는 연속식이 이용되는 경우가 많다. 이 원심침강형의 경우 분리 고형물의 비중이 액의 비중보다 커야 하고 비중관계가 역의 경우는 분리가 되지 않는 것이 보통이다. 이러한 원심침강형에는 분리판형(디스크형), 원통형, 데칸터형으로 나눌 수 있다. 고/액 분리에 있어서 기준선정의 기준은 분리입자의 지름, 고/액의 비중차, 분리입자의 지름분포, 처리물의 물성, 처리능력 등에 영향을 받는다. 데칸터(decanter)의 경우 분리입자의 지름분포가 넓고 유입 샘플 내 고형물의 비가 많으며 고/액의 비중차가 적은 난분리액용으로 적절하다. 특히 식물세포의 경우 미생물에 비하여 세포의 크기분포가 다양하며(20-150 μm), 발효 배양액 내에 고형물인 세포의 비율이 높으며(>40%), 식물세포의 비중(<1.05)이 작기 때문에 데칸터에 의하여 연속적으로 대용량 처리에 적합하다(10,11).

데칸터는 고속에서 회전하는 보울(bowl)과 그것과 약간의 회전차(differential speed)로 해서 차동회전하는 내장스크류를 갖는다. 슬러리 원액을 우측단 유입구에서 기내로 유입하면 보울의 고속회전에 따라 발생하는 높은 원심력

†Corresponding Author : Samyang Genex Biotech Research Institute, 63-2 Hwaam-Dong, Yusung-Gu, Taejeon 305-348, Korea
Tel : 82-42-865-8392, Fax : 82-42-865-8399
E-mail : jhkim@genex.co.kr

를 받아서 여액은 보울 내에서 회전축에 대해 중공이 도너츠 상분포를 하면서 보울 좌측으로 흐르고, 보울 좌단의 배출구에 의해 기 외로 유출된다. 그 동안 원심력의 작용에 따라서 무거운 고형물은 스크류 컨베어의 차동 회전에 따라 보울 우단에서 분리고형으로 배출된다. 두개의 모터가 장착되어 보울과 스크류의 회전속도 변화를 조절하며 보울에서의 배양액 체류시간을 조절하기 위하여 ring dam이 부착되어 있다.

본 연구는 데칸터를 이용하여 항암제인 paclitaxel을 생산하는 텍서스속 식물세포 배양액으로부터 식물세포 회수율의 최대화와 회수된 세포내의 수분함량을 최소화하기 위하여 데칸터의 여러 조업변수를 최적화 하는데 그 목적이 있다. 이러한 연구결과는 식물세포 배양액으로부터 식물세포 회수공정의 scale-up 자료로 이용 가능하다.

재료 및 방법

데칸터(Decanter)

본 연구에 사용한 데칸터 (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter)는 보울과 스크류의 회전속도 변화를 조절하기 위한 두개의 모터와 보울내 배양액의 체류시간 조절을 위한 ring dam이 부착되어 있다. 보울의 회전은 6000 rpm이며 실험 도중에는 변화되지 않는다. 발효조에서 데칸터로의 식물세포 배양액 공급은 diaphragm 펌프를 이용하였다. 데칸터 실험중에 배양액의 유입속도, 회전차 (보울과 스크류의 속도차), ring dam 조절 등이 변수가 된다. 이러한 변수들을 고정하여 실험한 후에 데칸터로부터 배출되는 세포와 여액을 샘플링하였다.

고속원심분리기(Centrifuge)

데칸터를 거쳐 나오는 여액 중에 잔존하는 세포 조각을 회수하기 위하여 고속원심분리기를 이용하였다. 원심분리기 (α -Laval, BTPX 205GD-35 CDEFP)의 회전은 9600 rpm이며 실험도중에는 변화되지 않는다. 원심분리기로의 여액 공급은 diaphragm 펌프를 이용하였다.

텍서스속 식물세포 배양

본 연구에 사용된 배양액은 *Taxus chinensis* 의 잎으로부터 얻은 세포주를 이용하여 3000 L 발효조에서 배양한 배양액을 이용하였다(12). 데칸터 실험 24시간 전에 100 g/L NaCl를 배양액에 첨가하여 회수되는 세포내의 수분함량을 줄였다. 배양액에 NaCl 첨가한 후에 교반은 계속하고 통기 (aeration)는 중단하여 거품 생성은 최소화 하였다. 배양액은 실험도중에 계속해 교반하여 데칸터에 균일하게 공급하였다.

세포내의 수분함량 측정

데칸터로부터 회수한 세포내의 수분함량을 측정하기 위하여 회수된 세포 5 g을 채취하고 수분측정기 (Sartorius, MA30)를 이용하여 수분을 측정하였다. 분석조건은 120℃, 20분이며 모든 샘플은 3개씩 취하여 분석 후 평균값을 취하였다.

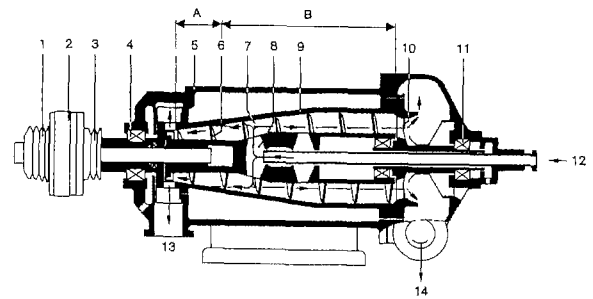


Figure 1. Section of a counter-current decanter (A:drying zone, B:clarification zone, 1:belt pulley-conveyor screw drive, 2:cyclo gear, 3:belt pulley-bowl drive, 4:main bowl bearing, 5:housing, 6:conveyor screw, 7:centrifugation space, 8:distributor, 9:bowl, 10:regulating ring, 11:main bowl bearing, 12:feed tube, 13:solids discharge, 14:gravity discharge of clarified liquid).

배양액과 여액내의 세포함량 분석

데칸터로 유입되는 발효배양액과 여액 5 mL을 각각 취하여 5.5 cm funnel에 whatman 41 용지를 삽입하여 진공상태에서 여과한다. 여과 후 증류수로 세척하여 여과지를 60℃, 진공오븐에서 overnight 시킨다. 모든 샘플은 3개씩 취하여 분석 후 평균값을 취하였다.

배양액과 여액내의 Paclitaxel 함량 분석

데칸터로 유입되는 발효배양액과 여액 2 mL을 취하여 HPLC (Waters) 분석 방법에 의하여 paclitaxel 함량을 분석하였으며 모든 샘플은 3개씩 취하여 분석 후 평균값을 취하였다(13). 채취한 샘플 2 mL에 내부 표준 (internal standard) 용액 100 μ L (6.25 mg N-propyl paraben/5 mL methanol), CPC 용액 200 μ L (10 g cetyl pyridinium chloride/100 mL distilled water), methyl-t-butyl ether 2.5 mL를 첨가하고 overnight 교반하였다. 교반 후 상등액을 취하여 amino propyl SPE cartridges (Alltech, Cat. #211025)를 통과시킨 후 methyl t-butyl ether/methanol (85/15, v/v) 용액 3 mL로 세척하고 여액을 건조한 후에 0.5 mL 메탄올에 녹여 분석하였다. 분석에 사용한 컬럼은 Capcell Pack C18 UG 120 (250mm X 4.6mm, Shiseido, Japan), 컬럼 온도는 40℃, 이동상은 CH₃CN/Water (20-100% gradient), 유속은 1.0 mL/min, 샘플 주입량은 10 μ L이며, UV (227nm) detector를 사용하였다. Paclitaxel 표준물질은 Sigma 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

여액에서의 세포함량

연속식 수평원동형 데칸터는 Figure 1에서 보는 바와 같이 보울과 스크류가 존재하여 스크류의 회전은 보울의 회전보다 조금 빨라 연속적으로 세포가 외부로 배출된다. 이론적으로 데칸터에서 분리된 세포의 건조 정도는 회전차 (데칸터의 건조구역에서의 세포의 체류시간 지배)와 ring dam의 지름 (건조구역의 길이 결정)에 의하여 지배 받는다. 여액 내의 세포 잔존 정도는 유입속도 (원심분리 구역에서의 배양액 체류시간 결정)와 ring dam의 지름 (데칸터의 액체 구역의 깊이)에 영향을 주어 체류시간에 영향을 주게 됨에

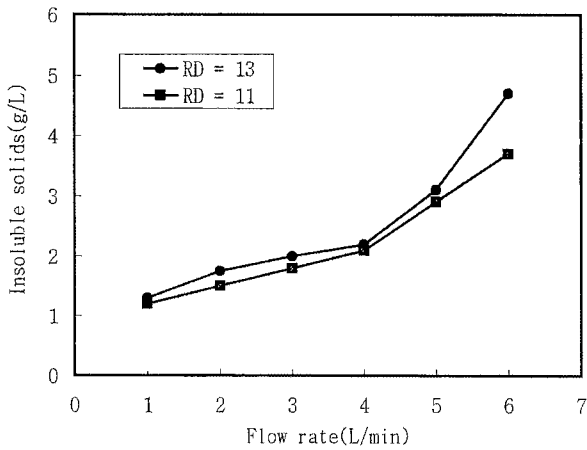


Figure 2. Effect of flow rate on effluent clarity (RD:diameter of ring dam, differential speed : 24).

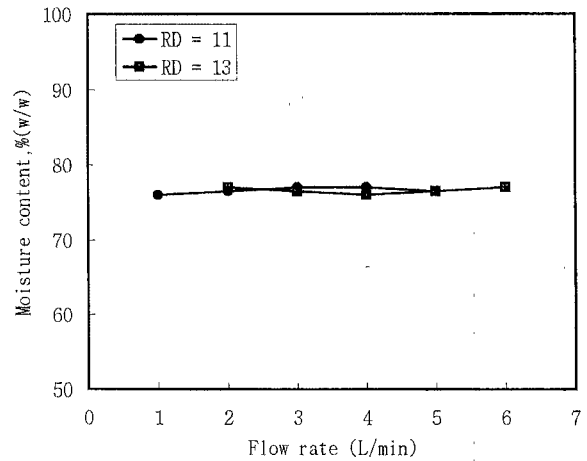


Figure 4. Effect of flow rate on moisture content of cell (RD:diameter of ring dam, differential speed : 24).

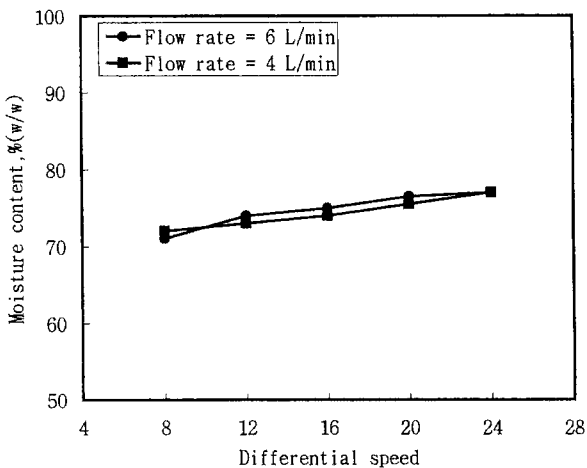


Figure 3. Effect of differential speed on effluent clarity (ring dam : 11).

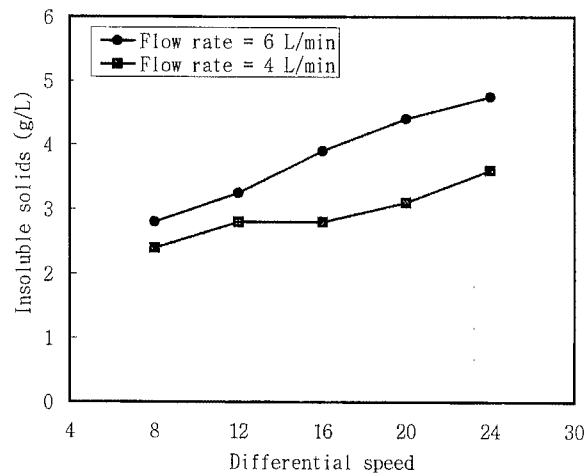


Figure 5. Effect of differential speed on moisture content of cell (ring dam : 11).

의하여 결정된다. 식물세포 배양액으로부터 세포 회수율의 최대화와 회수된 세포내의 수분함량을 최소화 하기 위하여 데칸터의 여러 조업변수 변화에 따른 여액에서의 세포 함량과 회수된 세포 내 수분함량 등을 조사하여 Figure 2, 3, 4, 5에 나타내었다. 실험결과로부터 데칸터 여액에서의 세포함량은 Figure 2에서 보는 바와 같이 배양액의 유입속도가 증가함에 따라 여액에 포함되어 있는 세포함량도 증가하여 여액으로 세포 손실이 많음을 알 수 있었다. 반면 ring dam의 지름 (RD)에는 비교적 적게 영향을 받아 ring dam의 지름이 증가함에 따라 여액으로의 세포 손실이 약간 발생함을 알 수 있었다. 또한 Figure 3에서 보는 바와 같이 회전차가 증가함에 따라 여액에 포함되어 있는 세포 함량도 증가하여 영향을 받으며 낮은 유입속도에서 보다는 높은 유입속도에서 더 많이 영향을 받아 여액으로의 세포 손실이 많이 발생함을 알 수 있었다.

회수 세포내의 수분함량

식물세포 회수공정에서는 추출공정에서의 유기용매 사용량을 최소화하기 위해서 회수한 세포내의 수분함량을 최대한으로 줄여야 한다. 회수한 세포내의 수분 함량은

Figure 4와 Figure 5에서 보는 바와 같이 데칸터로의 유입 속도나 ring dam의 지름 (RD)에는 거의 영향을 받지 않는 반면 회전차가 증가함에 따라 회수된 세포내의 수분함량도 증가하였다. 특히 세포 내 수분 함량의 경우 식물세포 (90-97%)가 미생물 (50-80%)이나 동물세포 (80%)에 비하여 상대적으로 높다(11). 따라서 데칸터를 이용한 식물세포 회수 전에 발효배양액에 NaCl를 첨가하여 세척 (brine washing) 하여 줌으로 회수한 세포내의 수분 함량을 줄일 수 있었다. 실제 동일한 조건 하에서 식물세포를 회수하기 전에 발효배양액에 NaCl 100 g/L를 첨가하여 overnight 시킨 후 회수하였을 경우 첨가하지 않았을 경우에 비하여 회수한 세포내의 수분함량을 7% 정도 줄일 수 있었다.

식물세포 및 Paclitaxel 회수

전체적으로 여러가지 조건 하에서 데칸터를 이용한 식물세포의 회수는 Figure 2와 Figure 3에서 보는 바와 같이 71-94% 정도이다. 데칸터에 유입되는 식물세포 배양액, 여액, 회수된 세포의 상태를 보면 Figure 6에서 보는 바와 같이 데칸터를 이용하여 배양액에 존재하는 대부분의 세포

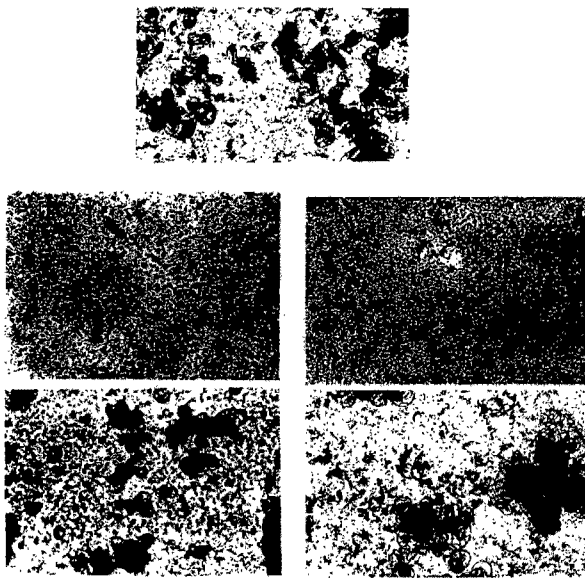


Figure 6. Photomicrographs of decanter feed material(top), effluent sample 6(upper left), effluent sample 16(upper right), solid discharge sample 6(lower left) and solid discharge sample 16(lower right).

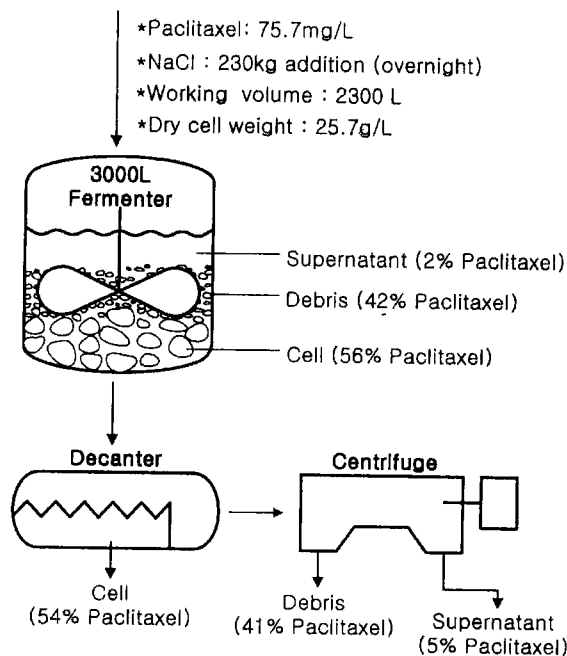


Figure 7. Schematic diagram of cell harvest process from fermentation broth for paclitaxel production in large-scale process.

와 일부 세포조각의 회수가 가능하며, 여액에는 세포조각만이 포함되어 있음을 알 수 있었다. 따라서 세포 조각에 포함되어 있는 paclitaxel 때문에 여액으로 상당한 paclitaxel 손실이 발생함을 알 수 있었다. Paclitaxel 분포를 보면 회수 전 발효 배양액에서의 paclitaxel 생산량에 따라 차이는 있으나 대체로 Figure 7에서 보는 바와 같이 세포에 56%, 세포조각 42%, 여액 2% 정도 분포되어 있다. 또한 3000 L 발효조로부터 데칸터 회수 결과를 보면 여액으로의 paclitaxel 손실은 46% 정도로 상당한 부분을 차지하였으며, 이러한

여액으로의 paclitaxel 손실에는 세포 조각들에 포함되어 있는 paclitaxel 뿐만 아니라 발효 배양액 배지에 녹아 있는 미량의 paclitaxel도 포함되어 있다. 데칸터를 이용한 식물세포의 회수공정은 결국 세포배양액에서의 높은 세포활성, 높은 paclitaxel 생산, 최소의 세포조각 생성 조건 하에서 세포와 paclitaxel 회수율을 향상시킬 수 있다.

결론적으로, 데칸터는 텍세스속 식물세포 배양액으로부터 세포회수에 효과적이며 회수된 세포는 건조와 같은 전처리 공정이 없이 바로 추출/정제에 사용 가능할 정도로 건조되어 있다. 또한 데칸터에서 회수하지 못한 식물세포 조각과 paclitaxel은 Figure 7에서 보는 바와 같이 고속원심분리기를 이용하여 회수가 가능하며 데칸터와 고속원심분리기를 연속적으로 이용하여 대부분의 식물세포와 paclitaxel 회수 (>95%)가 가능하다. 단지 발효 여액에 녹아 있는 미량의 paclitaxel (<5%)만이 고속원심분리기의 여액으로 배출된다. 이러한 연구결과는 식물세포 배양액으로부터 세포 및 유용성분 회수공정의 scale-up에 자료로 이용 가능할 것으로 판단된다.

요 약

데칸터의 실험조건 변화에 따라 텍세스속 식물세포 배양액으로부터 세포를 회수함에 있어 여액에서의 세포함량, paclitaxel함량, 회수된 세포내의 수분함량 등을 조사하였다. 데칸터를 거친 여액에 포함되어 있는 세포함량은 배양액의 유입속도에 많이 영향을 받는 반면 ring dam의 지름에는 비교적 적게 영향을 받았다. 또한 회전차에 의하여 영향을 받으며 낮은 유입속도에서 보다는 높은 유입속도에서 더 많이 영향을 받았다. 회수된 세포내의 수분함량은 유입속도에는 거의 영향을 받지 않으며 회전차가 감소함에 따라 수분함량도 감소하였다.

REFERENCES

1. Fett-Neto A.G., W.Y. Zhang, and F. DiCosmo (1994), Kinetics of Taxol Production, Growth and Nutrient Uptake in Cell Suspensions of *Taxus cuspidata*, *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 205-210.
2. Strobel G.A., A. Stierle, and F.J.G.M. Van Kuijk (1992), Factors Influencing the in vitro Production of Radiolabelled Taxol by Pacific Yew, *Taxus brevifolia*, *Plant Science*, **84**, 65-69.
3. Kingston D.G.I., G. Samaranyake, and C.A. Ivey (1991), The Chemistry of Taxol, A Clinically Useful Anticancer Agent, *J. Nat. Prod.*, **53**, 1-12.
4. Rao K.V.(1992), Taxol and Related Taxanes. I.Taxanes of *Taxus brevifolia* Bark, *Pharm. Res.*, **10**, 521-524.
5. Witherup E.M., S.A. Look, M.W. Stasko, T.J. Ghorzi, and G.M. Muschik(1990), *Taxus spp.* Needles Contain amounts of Taxol Comparable to the Bark of *Taxus brevifolia* : Analysis and Isolation, *J. Nat. Prod.*, **53**, 1249-1255.
6. Rao K.V., J.B. Hanuman, C. Alvarez, M. Stoy, J. Juchum, R.M. Davies, and R. Baxley (1995), A New Large-Scale Process for Taxol and related taxanes from

- Taxus brevifolia*, Pharm. Res., 12, 1003-1010.
7. McGregor W.C.(1986), Membrane Separations in Biotechnology, 1st ed., p.61, Dekker, New York.
 8. Sharpe P.T.(1988), Methods of Cell Separation, 1st ed., p.18, Elsevier, Amsterdam.
 9. Belter P.A., E.L. Cussler, W.S. Hu(1988), 1st ed., p.47, John Wiley & Sons, New York.
 10. Payne G., V. Bringi, C. Prince, and M. Shuler(1992), Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems, 1st ed., p.13, Hanser Publishers, New York.
 11. Krijgsman I.J.(1992), Product Recovery in Bioprocess Technology, 1st ed., p.14, Butterworth-Heinemann, Oxford.
 12. Choi, H.K., T.L. Adams, R.W. Stahlhut, S.I. Kim, J.H. Yun, B.K. Song, J.H. Kim, S.S. Hong, and H.S. Lee (1999), Method for Mass Production of Taxol by Semi-Continuous Culture with *Taxus chinensis* Cell Culture, U.S.Patent, 5,871,979.
 13. Hong, S.S., B.K. Song, J.H. Kim, C.B. Lim, H.S. Lee, K.W. Kim, I.S. Kang, and H.B. Park (1999), Method for Purifying Taxol from *Taxus* Biomass, U.S. Patent, 5,900,979.