

Effect of Pluronic F-68 and Oxygen Vectors on Cell Growth of *Angelica gigas* Nakai in Fed-batch Culture

전수환, 이상윤, 조지숙, 민병혁, 김동일*

인하대학교 생물공학과

전화(032) 863 - 5946

Abstract

It has been commonly known that cell growth is inhibited by the lack of dissolved oxygen and mass transfer inhibition of nutrients at stationary phase in fed-batch culture. In this study, Pluronic F-68 and oxygen vectors were added in *Angelica gigas* Nakai suspension culture in order to enhance cell growth in fed-batch culture. It was observed that the addition of 6%(w/v) Pluronic F-68 promoted cell growth up to 6.1% compared to control and that the use of 4%(v/v) *n*-hexadecane markedly enhanced cell growth up to 11.4%.

서론

식물 세포배양은 여러 가지 유용한 이차대사산물을 생산하기 위한 방법으로서 연구가 진행되고 있다. 이들 물질들은 대부분 의약품, 향신료, 색소 및 살충제 등으로 쓰여지고 있다. 이와 같은 식물 세포배양에 의한 유용물질 생산에 관한 연구는 그동안 생산성 증진의 측면에서 elicitor의 사용, 배지 최적화, 전구물질의 첨가, 성장조절제의 선택 및 결정, 배양 조건의 최적화 등이 조사되었으며, 대량배양을 위한 bioreactor 연구로서 bioreactor의 종류에 따른 세포 성장비교, aeration 및 agitation 방법의 비교, antifoam 연구, shear가 세포생장에 미치는 영향, 고농도 배양 방법 개발 등에 대한 보고들이 알려져 있다. 고농도배양에서는 세포의 고밀도와 배지의 고점도로 인해 nutrient의 물질전달제한과 산소부족이라는 문제점이 발생하며 이는 세포의 생리적 활성을 저하시키거나 cell lysis를 유발시킨다. 한편 동물·곤충세포배양에서 계면활성제와 산소전달물질의 이용은 이러한 문제점을 효율적으로 해결하여 세포생장을 증진시켰다고 널리 알려져 있다^{1,2)}. 식물세포배양의 경우 계면활성제와 산소전달물질에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다. 본 연구에서는 고농도배양에 따른 nutrients의 물질전달의 저해와 산소부족현상이 야기되는 조건에서 계면활성제와 산소전달물질을 사용하여 이러한 문제점들을 해결하고자 하였다. 또한 Pluronic 10R-5와 Plurafac A-38을 이용하여 세포성장증진효과를 Pluronic F-68의 구조적 특징과 연관하여 설명하고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 현탁세포는 *Angelica gigas* Nakai였으며, 성장배지로는 SH 기본 배지에 30 g/L sucrose, 1 g/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)를 첨가하여 25°C, 120 rpm 압 조건에서 배양하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 계면활성제로서 미생물, 동물, 곤충세포배양에서 세포생장을 증진시켰다고 널리 알려진 Pluronic F-68을 이용하였고 계면활성제의 구조가 세포생장에 미치는 영향을 조사하기 위해 Pluronic 10R-5와 Plurafac A-38을 선택하였다. Pluronic F-68은 중심부에 소수성인 polyoxypropylene과 양측에 친수성인 polyoxyethylene이 있는 triblock copolymer(POE-POP-POE)이다. 반면 Pluronic 10R-5는 Pluronic F-68의 소수성부분과 친수성부분이 서로 바뀐 reverse Pluronic F-68의 형태를 가진 triblock copolymer(POP-POE-POP)이다³⁾. Plurafac A-38은 소수성 부분이 hydrocarbon block이며 친수성 부분이 polyoxyethylene block인 diblock copolymer로서 Pluronic F-68의 소수성 부분의 중요성을 확인하기 위해 실험에 사용하였다. 산소전달물질은 일반배지보다 산소용해도가 높아 산소전달을 원활히 공급할 수 있는 hydrocarbon 계열인 *n*-hexadecane, *n*-dodecane과 perfluorochemical인 FC-40을 사용하였다.

우선 Pluronic 계열의 계면활성제가 세포생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 2-10%(w/v)의 Pluronic F-68, Pluronic 10R-5, Plurafac A-38을 농도별로 첨가하였다. Pluronic F-68인 경우 6%(w/v)까지 대조구보다 세포생장을 6.1% 증진시키는 효과를 보였지만 그 이상의 농도에서는 점차 감소하는 경향을 보였다. Murhammer 등의 연구에 의하면 첨가되는 계면활성제의 농도가 CMC(critical micelle concentration) 이상이 되면 배지내의 점도를 감소시켜 세포생장에 부정적인 영향을 끼칠 수 있음을 발표하였다³⁾. Pluronic F-68의 경우 SH 배지에서 약 8.0 g/L이다. Pluronic 10R-5는 10%의 농도까지 세포생장을 증진시키는 경향을 보였지만 Plurafac A-38인 경우 2%(w/v)에서도 세포생장을 다소 저해됨을 관찰하였다. Plurafac A-38은 다른 두 계면활성제와는 달리 diblock copolymer이며 소수성부분이 hydrocarbon block을 지니고 있다. 계면활성제가 첨가되면 계면활성제의 소수성부분과 세포표면의 소수성부분이 접촉을 하게된다. 따라서 계면활성제의 구조와 소수성부분이 다르게 되면 세포표면의 hydrophobicity와 세포생장에 다양한 영향을 줄 수 있다.

세포농도가 높은 경우 계면활성제의 영향을 살펴보기 위하여 유가식 배양을 이용하여 당귀세포의 고농도 배양을 수행하였다. 당귀세포의 세포농도의 지속적인 증대를 위해 6일째에 30 g/L의 sucrose를 첨가하였고 이때 4, 8 g/L의 Pluronic F-68을 함께 첨가하였다(Figure 2). 그림에서 볼 수 있는 것과 같이 대조구인 경우 6일째 이후부터 세포생장이 지속됨을 관찰하였고 12일째에 최대 세포농도인 21.5 g/L에 도달하였다. 13일 이후에 생장이 멈추는 것은 세포의 고농도로 인한 공간상의 제약, 영양분의 결핍과 self-product inhibition 등에 의한 것으로 판단되며 세포의 갈색화 현상 및 cell lysis를 관찰할 수 있었다. Pluronic F-68인 경우 첨가량이 증가할수록 최대세포생장이 증가함을 관찰하였다. 8 g/L의 Pluronic F-68을 첨가했을 때 12일째의 최대세포생장은 대조구에 비해 6.0% 증가하였다. 더욱이 사멸기에서 Pluronic F-68의 첨가량이 증가할수록 대조구보다 세포생존도가 증가하여 cell survival

period가 뚜렷이 증대됨을 알 수 있었다.

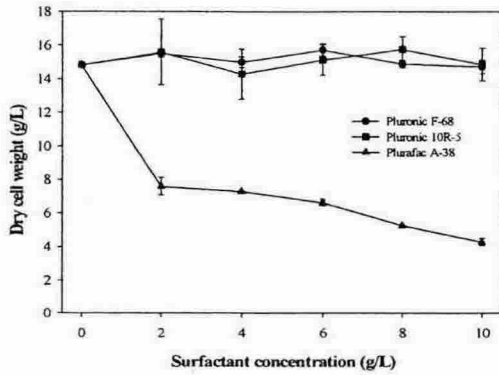


Figure 1. Effect of Pluronic surfactants on cell growth of *Angelica gigas* Nakai.

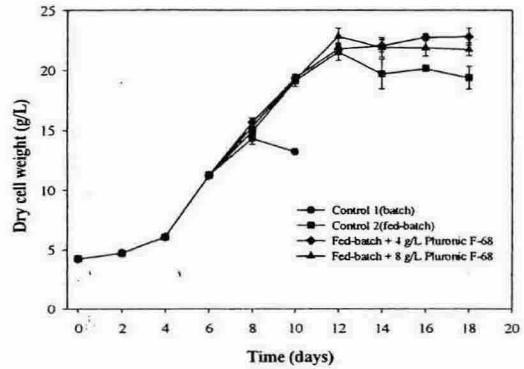


Figure 2. Effect of Pluronic F-68 on cell growth of *Angelica gigas* Nakai in fed-batch culture.

한편 유가식배양에서 산소전달물질의 첨가가 당귀세포의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해 toxicity 실험을 수행하였다. *n*-Hexadecane, *n*-dodecane, FC-40을 각각 2-10%(v/v)으로 하여, 12일째에 세포생장을 비교하였다(Figure 3). *n*-hexadecane, FC-40은 10%(v/v)의 농도까지 세포의 성장을 저해하지 않았다. 산소전달물질을 이용했을 때 세포성장증진에 가장효과가 좋았던 경우는 4%(v/v)의 FC-40을 첨가했을 때이며 대조구보다 12.9% 증가를 보였다. 그러나 *n*-dodecane의 경우는 2%(v/v)농도에서도 세포의 성장을 저해하였다.

Toxicity 실험결과 FC-40이 세포생장에 가장 효과가 좋았지만 가격이 비싸기 때문에 저렴한 *n*-hexadecane을 이후 실험에 사용하였다. *n*-Hexadecane은 FC-40과 같이 산소전달능력이 우수하고 세포에 독성이 없고 재사용할 수 있는 경제적인 장점을 보였으므로 2, 4%(v/v)의 *n*-hexadecane을 첨가하여 실험을 진행하였다(Figure 4). Figure 3에서의 유가식배양과 같이 6일째에 30 g/L의 sucrose를 첨가하였고 이때 2, 4%(v/v)의 *n*-hexadecane을 첨가하였다. 그림에서 보는바와 같이 대조구와 *n*-hexadecane을 첨가한 경우 6일째부터 12일째까지 세포농도가 지속됨을 관찰하였다. 대조구인 경우 13일째부터 nutrients의 물질전달제한과 산소부족으로 인해 세포의 갈색화현상을 보였지만 *n*-hexadecane을 첨가한 경우 14일 후반까지도 이 현상이 나타나지 않았다. 이는 산소전달 물질이 세포가 필요로 하는 산소요구도를 충분히 만족시켰기 때문이라고 판단하였다.

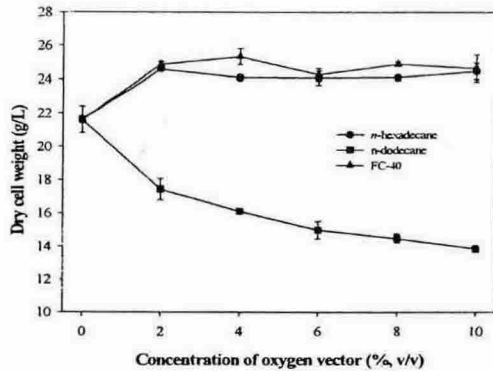


Figure 3. Effect of Oxygen vectors on cell growth of *Angelica gigas* Nakai in fed-batch culture.

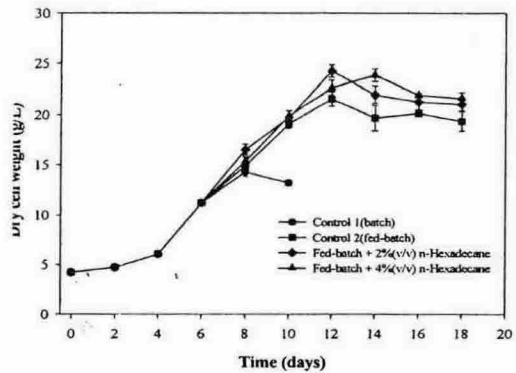


Figure 4. Effect of *n*-hexadecane on cell growth of *Angelica gigas* Nakai in fed-batch culture.

요약

유가식배양을 통한 고농도배양에서 계면활성제와 산소전달물질의 첨가는 세포의 고밀도와 배지의 고점도로 인해 발생하는 nutrient의 물질전달제한과 산소부족현상을 효과적으로 해결하였다. Pluronic 10R-5는 Pluronic F-68과 같은 triblock copolymer 구조이며 세포생장의 저해를 나타내지 않았다. 그러나 diblock copolymer 구조이며 소수성 부분이 hydrocarbon block인 Plurafac A-38은 세포의 성장을 저해함을 관찰할 수 있었다. 따라서 장기간의 유가식배양이나 perfusion 배양을 수행할 경우 세포의 생존도를 증대시켜 유용물질의 생산성을 높일 수 있으며 여러 형태의 bioreactor에서 고농도 배양을 가능케 하여 유용물질 생산성을 높일 수 있을 것이라고 기대된다.

참고문헌

1. Palomares, L. A., M. Gonzalez, O. T. Ramirez, Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells: impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production, (2000), *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 324-331.
2. Ho, C. S., L.-K. Ju, R. F. Baddour, Enhancing penicillin fermentations by increased oxygen solubility through the addition of *n*-hexadecane, (1990), *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 1110-1118.
3. Murhammer, D. W., C. F. Goochee, Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactors, (1990), *Biotechnol. Prog.*, **6**, 142-148.