

주목 세포 현탁배양 중, FCW/DCW ratio, 단백질 생산 및 peroxidase 활성 조사

최형균·윤정환·김상익·송재영·김진현·최호준·*홍승서
삼양제넥스 생명공학연구소
(접수 : 2000. 9. 8., 게재승인 : 2000. 10. 10.)

Monitoring of FCW/DCW ratio, Production of Protein and Peroxidase Activity During Suspension Culture of *Taxus chinensis*

Hyung-Kyoon Choi, Jeong-Hwan Yun, Sang-Ic Kim, Jai-Young Song, Jin-Hyun Kim, Ho-Joon Choi, and Seung-Suh Hong*

Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejon 305-348, Korea
(Received : 2000. 9. 8., Accepted : 2000. 10. 10.)

Time course monitoring of FCW/DCW ratio, production of intra and extracellular protein, and peroxidase activity were performed during suspension culture of *Taxus chinensis* cells. The observed FCW/DCW ratio was 12 at day 14, which was the lowest value during cultivation, and the specific protein production, based on dry cell weight, was also the lowest at day 14, which showed 4.3 mg/g DCW. The pattern of POD activity was similar to that of protein production. The results in this report were obtained using actively growing cells in flasks, therefore it is possible to use those results to control the process and indicate the stresses imposed on cells during large-scale cultivation.

Key Words : monitoring, FCW/DCW ratio, protein, peroxidase, *Taxus chinensis*

서론

식물세포배양에 의한 유용물질 생산방법은 천연자원의 고갈 문제 없이 유용물질을 확보할 수 있다는 측면에서 그 가치를 인정받고 있으며, 식물세포배양에 의하여 생산된 이차대사산물은 화장품, 향료, 의약품 등이 있다(1). Paclitaxel은 주목에서 유래된 항암 물질로, 현재 미국의 Bristol-Myers Squibb에서 반합성법에 의하여 생산하고 있다(2,3). 천연 상태의 주목을 벌목하여 paclitaxel을 추출하는 방법에 비하여 자연환경 파괴 정도가 적은 장점을 가지고 있으나 이 방법 역시 화학합성에 필요한 원료물질을 주목의 잎에서 추출한다는 면에서 일정한 한계를 가지고 있다. 식물세포배양에 의해서 paclitaxel을 생산하려는 연구는 많은 연구자들에 의해 시도되어 왔고(4-6) 곧 대량생산에 의한 상업화가 이루어질 전망이다. 대량생산을 하기 위해서는 반드시 scale-up 과정이 필요하게 되며 flask 배양과는 다른 환경에 식물세포가 놓이게 됨으로써 세포증식 및 이차대사산물생산에 차이를 보일 가능성이 있다(1). 그러므로 flask 단계에서의 여러 배양

parameter 들을 조사한 후, 그 자료들을 기초로 하여 생산공정을 제어할 필요가 있다. Kim 등은 *Thalitrum rugosum*과 *Lithospermum erythrorhizon*의 현탁배양세포의 FCW/DCW ratio가 배양조건에 따라 변화함을 보고하였고(7), Meijer 등은 세포외로 분비되는 단백질량이 배양 중의 hydrodynamic stress 정도를 나타내는 지표로 이용될 수 있다고 보고하였다(8). 또한 식물체들에서는 생물학적, 비생물학적 스트레스에 의하여 유발되는 활성산소로부터 자신을 보호하기 위해서 peroxidase 등의 역할이 필요한 것으로 알려져 있다(9).

본 연구는 scale-up 전단계에 flask 단계에서 여러 종류의 parameter들을 분석함으로써 flask에서 증식하고 있는 건강할 세포의 생리적인 특성을 파악하는데 있다. 이를 위하여 *Taxus chinensis* 현탁배양세포 배양액중의 식물세포의 크기지수로 보고되어온 FCW/DCW ratio, 세포증식 및 이차대사산물 생산에 관여하고 있는 전체 protein 생산량, stress에 의하여 유도된 활성산소제거 시스템에 관여하는 효소중의 하나인 peroxidase의 활성을 배양시기 별로 조사하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배지

암소에서 150 rpm 의 진탕 속도로 배양중인 *Taxus chinensis* 세포주를 실험에 이용하였다. 배지는 30 g/L sucrose, 10 μ M

*Corresponding Author : Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejon 305-348, Korea
Tel : +82-42-865-8341, Fax : +82-42-865-8398
E-mail : sshong@genex.co.kr

NAA (naphthalene acetic acid), 0.2 μ M BA (6-benzylamino purine), 1 g/L casein hydrolysate, 1 g/L 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid (MES)를 포함한 B5 배지(10)를 사용하였고 2주 간격으로 50 ml의 seed를 150 ml의 신선한 배지에 옮겨주는 방식으로 계대를 실시하면서 실험하였다. 모든 시약은 Sigma 제품을 사용하였고 실험 결과는 3회 반복 실험의 평균값이다.

당농도의 측정

배지내의 잔류 당농도는 refractometer (ATAGO RX 5000)를 이용하여 측정하였다.

세포량의 측정

세포량과 FCW/DCW ratio를 결정하기 위하여 세포생체중량 (fresh cell weight, FCW)과 세포건조중량 (dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 먼저 배양액을 Buchner 깔대기를 이용하여 Whatman No. 541 여과지로 걸러내고 다량의 물로 세척한 후 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고, 세포를 계량 접시에 옮겨 FCW를 측정한다 다음, 70°C 로 조정된 dry oven에서 24 시간 이상 건조시켜 DCW를 측정하였다.

Viability 의 측정

Fluorescein diacetate를 이용하는 Widholm의 방법(11)을 이용하였다.

세포내 단백질 생산량 및 POD 활성 측정을 위한 조효소액의 추출

세포생체중량 0.3 g을 0.1 M 인산완충용액 (pH 7.0) 1 ml과 함께 얼음 위의 막자사발에서 마쇄한 후 14,000 rpm 으로 10 분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

세포외 단백질 생산량 및 POD 활성 측정을 위한 조효소액의 추출

세포배양액을 0.45 μ m filter를 이용하여 filtering한 후, 조효소액으로 사용하였다.

단백질 측정

세포내, 외의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용한 Bradford 방법에 따라 측정하였다(12).

Peroxidase (POD) 활성 측정

POD 활성은 pyrogallol을 기질로 사용한 Sigma 사의 방법에 따라 측정하였다. 배양세포 조효소액 100 μ l를 3 ml cuvette에 넣고 0.1 M 인산완충용액 0.32 ml 0.147 M H₂O₂ 0.16 ml, 5% Pyrogallol 수용액 0.32ml와 증류수 2.1 ml을 함께 섞은 후, 420 nm에서 20초간 상온에서 흡광도 변화를 측정하여 구하였다. UV 측정시 반응액의 흡광도가 0.4-0.7이 되도록 조효소액을 희석하여 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

배양 중 FCW/DCW 의 변화

Figure 1의 a는 세포배양 중 FCW와 DCW의 변화를 나타

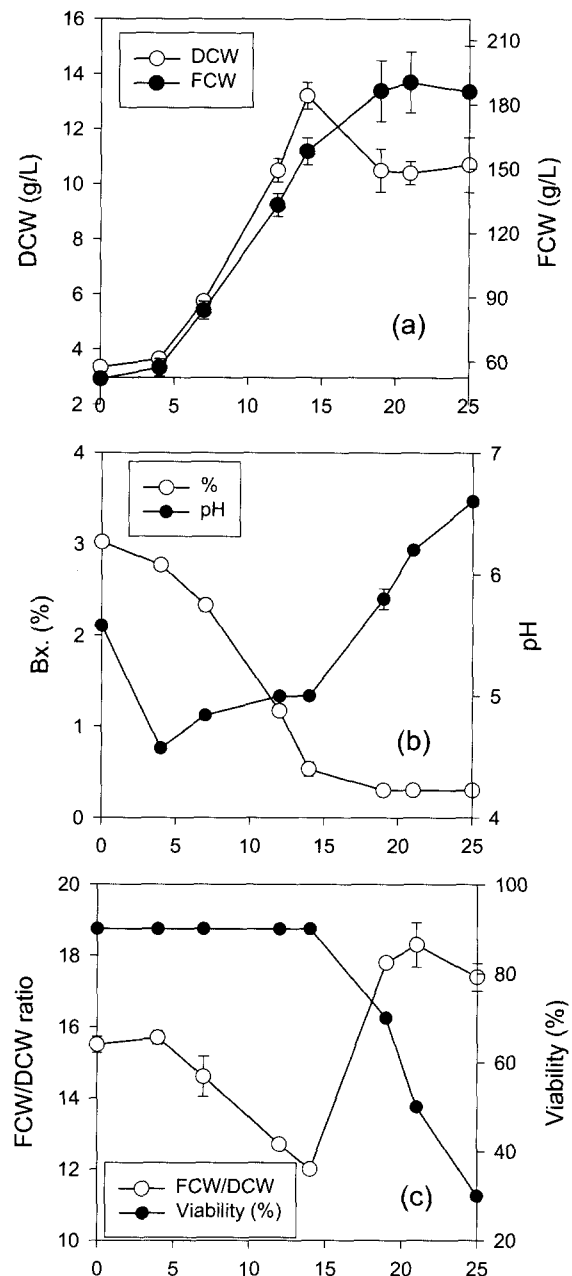


Figure 1. Time course change of cell growth, residual sugar, pH, FCW/DCW ratio and viability in suspension culture of *Taxus chinensis*.

낸 것이다. Figure에서 보는 바와 같이 DCW의 경우 배양 14일까지 지속적으로 증가하여 13.2 g/L에 도달한 다음, 그 이후 감소하여 배양 21일째 10.4 g/L에 도달하였다. FCW의 경우는 21일까지 증가하여 190.4 g/L에 달했다. 배지 내의 잔류당 농도는 14일째에 거의 고갈되었으며, 배지의 pH도 14일째에 pH 5 정도였던 것이 그 이후에 크게 증가하기 시작하여 배양 25일째에는 pH 6.7에 도달하였다 (Figure 1의 b).

Figure 1의 c는 FCW/DCW ratio와 viability의 측정 결과이다. 배양 개시 직후 15.5 이던 FCW/DCW ratio는 14일까지 지속적으로 감소하여 12에 이르렀다가 그 이후에 다시 증가하여 배양 21일에는 18.3까지 증가하였다. 배양개시 이후에

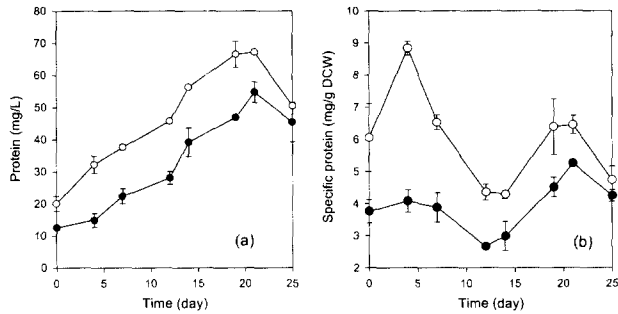


Figure 2. Time course change of intra and extra-cellular protein contents (a), and specific protein contents (b) in suspension culture of *Taxus chinensis*. (○; extracellular, ●; intracellular)

어느 정도 감소하였다가 다시 증가하는 pattern을 보인 이 결과는 *Thalitrum rugosum*과 *Lithospermum erythrorhizon*의 경우와 비슷한 pattern이었다(7). 세포분열이 활발하게 이루어지는 대수기에는 세포 개개의 크기가 작아진다는 것을 의미하며, 정체기에 이르게 되면서 다시 세포크기가 증가하는 것을 알 수 있다. Viability는 14일까지는 90%를 유지하다가 14일 이후에는 급격히 감소하여서 21일째에 50%, 25일째에는 30%를 나타내어 14일 이후의 세포크기 증대가 세포 viability 감소와 관련 있음을 시사하였다.

단백질 생산량의 변화

Figure 2의 a는 배양 시기별 단백질 생산을 나타낸 것이다. 전반적으로 세포 외에 존재하는 단백질의 양이 세포 내에 존재하는 단백질의 양보다 많았으며 세포 외에 존재하는 단백질의 양은 계속 증가하여 배양개시 직후 20.1 mg/L에서 21일에는 67 mg/L에 달하였다. 배지 내 잔류당이 고갈된 14일 이후에도 21일까지 세포 내, 외의 단백질 생산량이 지속적으로 증가하였는데, 세포내부로 흡수된 당이 이용되고 있기 때문이라고 생각된다. Figure 2의 b는 DCW를 기준으로 한 단백질 생산을 나타낸 것이다. 세포 외 단백질의 경우, 배양개시 후 6 mg/g DCW 였다가 배양 4일째 8.8 mg/g DCW 까지 증가하였고 그 이후에 감소하여 14일째 4.3 mg/g DCW를 나타내었다. 14일 이후에는 다시 증가해서 21일째에는 6.5 mg/g DCW였다.

Peroxidase 활성의 변화

Figure 3의 a는 배양시기에 따른 POD 활성을 나타낸 것이다. 세포 외에 존재하는 POD활성이 세포 내보다 훨씬 높아서 배양 19일째에 897 unit/L의 활성을 보여 세포 내 활성보다 5.3배의 활성을 나타내었다. 이는 세포 내 POD 활성이 높은 것으로 보고된 고구마의 현탁배양 세포의 경우와는 상반되는 결과이다(13). Figure 3의 b에서 보는 바와 같이 DCW를 기준으로 하였을 때, 세포 외 POD 활성은 14일에 50 unit/g DCW로 최저를 보인 다음, 19일째 80 unit/g DCW 까지 증가한 후에 실패하는 것으로 나타났다. 생산되는 단백질량을 기준으로 한 POD 활성을 보면 세포 외의 경우 10-14 unit/mg protein 정도였고 세포내의 경우는 2-6 unit/mg protein 의 수준이었다 (Figure 3의 c). DCW를 기준으로 했을 때, POD 활성 측정 결과는 protein 의 생산 pattern과 비슷한

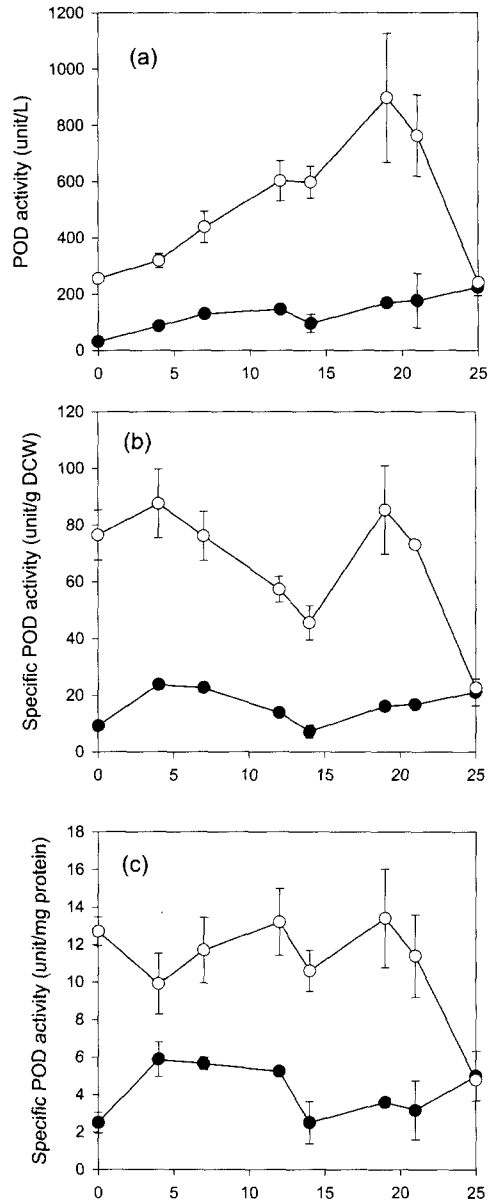


Figure 3. Time course change of intra and extra-cellular POD activity (a), specific POD activity based on DCW (b), and based on protein contents (c) in suspension culture of *Taxus chinensis*. (○; extracellular, ●; intracellular)

양상을 나타내었다. 그러므로 상대적으로 측정이 간편한 단백질의 양을 측정하는 것이 계대 시기의 결정 및 세포상태 파악에 더 유용하게 쓰일 수 있다. 그러나 일반적으로 paclitaxel과 같은 이차대사산물은 외부 stress에 의해서 생산된다고 알려져 있으므로, POD 등의 항산화 효소 활성과 paclitaxel 생산과의 상관관계 등은 더 연구가 진행되어야 한다고 사료된다.

요 약

Taxus chinensis 세포배양 중의 FCW/DCW ratio, 세포내, 외 단백질 생산 및 peroxidase 활성의 변화를 배양시기별로

조사하였다. 조사 결과, 배지내 잔류당이 고갈되기 직전인 배양 14일째에 FCW/DCW ratio 는 12로 가장 낮은 수치를 나타내었고 DCW를 기준으로 한 세포 외에서의 protein 생산도 14일째 가장 낮은 수치인 4.3 mg/g DCW 였다. 배양시기별 POD 활성도는 단백질 생산 pattern과 유사하였다. 이 결과들은 flask에서 활발하게 증식 중인 세포들을 이용하여 측정된 것으로 대량배양 시, 공정제어를 위한 자료 및 세포가 받는 stress 정도를 나타내는 지표로 활용할 수 있다.

REFERENCES

1. Kieran P. M., P. F. MacLoughlin, and D. M. Malone (1997), Plant cell suspension cultures: some engineering considerations, *J. Biotechnol.*, **59**, 39-62.
2. Suffness M. and M. E. Wall (1995), Discovery and development of taxol, Taxol: science and application (M. Suffness, ed.), p.3-25, CRC Press, Boca Raton.
3. Borman S. (1992), Taxol to be made from renewable materials by organic semisynthesis, *Chem. Eng. News*, **12**, 30-32.
4. Pestchanker L. J., S. C. Roberts, and M. L. Shuler (1996), Kinetics of taxol production and nutrient use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and a Wilson-type bioreactor, *Enzyme Microb. Technol.*, **19**, 256-260.
5. Seki M., M. Takeda, and S. Furusaki (1995) Continuous production of taxol by cell cultures of *Taxus cuspidata*, *J. Chem. Eng. Japan*, **28**, 488-490.
6. Yukimune Y., H. Tabata, Y. Higashi, and Y. Hara (1996), Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures, *Nature Biotechnol.*, **14**, 1129-1132.
7. Kim S. M., I. S. Park, S. Y. Lee, G. W. Lee, and D. I. Kim (1998), Changes of plant cell size index by culture conditions, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 438-443.
8. Meijer J. J., H. J. C. ten Hoopen, Y. M. van Gameraen, K. Ch. A. M. Luyben, and K. R. Libbenga (1994), Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture, *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 467-477.
9. Alscher R. G. and J. L. Hess (1993), Antioxidants in higher plants, p.1-17, CRC Press, Boca Raton.
10. Gamborg O. L., R. A. Miller, and K. Ojima (1968), Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, **50**, 151-158.
11. Widholm J. M. (1972), The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells, *Stain Technol.*, **47**, 189-194.
12. Bradford M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
13. Huh G. H., S. J. Lee, Y. S. Bae, J. R. Liu, and S. S. Kwak (1997), Molecular cloning and characterization of anionic and neutral peroxidase cDNAs from sweet potato suspension- cultured cells and their differential expression in response to stress, *Molecular General and Genetics*, **255**, 382-391.