

형질전환 벼 현탁세포 배양에서 hGM-CSF의 *in situ* Recovery 연구

명현종^a, 최홍열^a, 남형진, 김동일*

In situ Recovery of hGM-CSF in Transgenic Rice Cell Suspension Cultures

Hyun-Jong Myoung^a, Hong-Yeol Choi^a, Hyung-Jin Nam, and Dong-Il Kim*

Received: 6 February 2015 / Revised: 25 April 2015 / Accepted: 26 May 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Production of foreign proteins by transgenic plant cell cultures has several advantages such as post-translational modification, low risk of product contamination and low-cost production and purification. However, target proteins are degraded by extracellular proteases existing in the media. A solution to this problem is the use of perfusion culture and ion exchange chromatography for the application of integrated bioprocess using *in situ* recovery. With this method, production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) was investigated in this study. First, optimization of cell concentration during the induction phase for the production of hGM-CSF was examined. As cell concentration increased, the level of hGM-CSF was decreased due to the presence of extracellular proteases. Induction using sugar-free media produced 33% more hGM-CSF. The effects of pH on the binding of hGM-CSF to cationic and anionic exchange resins were also investigated. In terms of stability, optimal pH was found to be 5~7. In the case of using buffer exchange when CM-Sepharose was used as a cationic exchange resin, optimal pH for binding was 4.8 and adsorption yield was 77%. When DEAE-Sepharose was used as an anionic exchange resin, it was 5.5 (74%). Without buffer exchange, optimal pH was 4.6 (84%). From these results, an integrated bioprocess using *in situ* recovery with simultaneous production and separation of

foreign protein in transgenic plant cell suspension cultures was found to be feasible.

Keywords: Plant cell culture, *In situ* recovery, Perfusion culture, Purification

1. INTRODUCTION

hGM-CSF (human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)는 최초로 대량생산 및 정제된 사이토카인 중의 하나로서 T-세포, B-세포, 대식세포, 상피세포, 섬유아세포와 같은 여러 종류의 세포들에 의해 생산되며 다양한 조혈 모세포의 증식, 성숙 기능 등을 자극한다. hGM-CSF는 127개의 아미노산으로 이루어져 있고 분자량이 14 kDa이며 2개의 N-당화 부위와 5개의 O-당화 부위를 보유하고 있는 당단백질이다. 이 다양한 당화 부위들이 완전히 당화되었을 경우 분자량이 30 kDa까지 증가하게 되며, 이합체로도 존재가 가능하다고 알려져 있다 [1-3].

식물세포 배양은 계절이나 기후 등과 같은 자연적인 환경 조건에 의한 영향을 받지 않아 일정수준의 수율과 품질을 유지하는 산물의 생산이 가능하며 일반 재배식물에 비해 빠른 증식속도를 나타내므로 산물의 신속한 생산이 가능하고 생장조건의 조정, 유전자 조작 등으로 여러 가지 변화를 줄 수 있다는 장점을 지니고 있다 [4-6]. 바이오 의약품 생산에서도 형질전환된 식물세포를 이용한 생산시스템은 새롭게 주목을 받는 추세이다. 가장 대표적인 예로는 2012년 5월에 미국 FDA로부터 판매 승인된 Protalix사의 Elelyso™를 들 수 있다. 이는 리소좀 축적 질환인 고셔병 (Gaucher's disease) 치료를

인하대학교 생명공학과
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel: +82-32-860-7515, Fax: +82-32-872-4046
e-mail: kimdi@inha.ac.kr

*These authors contributed equally to this work as the first author.

위한 재조합 단백질로서 인간 베타-글루코세레브로시다제 (human β -glucocerebrosidase)라는 효소를 말한다. Elelyso™는 FDA로부터 승인된 최초의 식물유래 단백질 의약품으로서 그 의미가 크며 식물세포 배양을 이용한 의약품 단백질 생산의 가능성을 제시해준다 [7]. 이처럼 식물세포 배양이 주목받는 이유는 다음과 같다. 첫째, 배양에 사용되는 배지 성분이 당과 염으로 구성되어 있어 다양한 단백질이 포함된 동물세포 배양의 배지보다 정제가 상대적으로 용이하며 경제적인 면에서도 훨씬 저렴하다. 둘째, 동물성 바이러스 오염의 위험이 없어 바이오 의약품 생산에 있어 안전하다. 셋째, 전사 후 변형이 가능하기 때문에 당화 등이 중요한 역할을 하는 당단백질의 적절한 생산이 가능하다. 하지만 낮은 발현율과 단백질의 불안정성 등 여러 문제점을 가지고 있기 때문에 경제적인 생산성에 도달하지 못하고 있다. 또한 형질전환된 식물세포 배양에서는 생산된 외래 단백질과 프로테아제가 배지 내에 같이 존재하기 때문에 외래 단백질이 프로테아제에 의해 분해된다는 점이 가장 큰 문제점이라고 할 수 있다.

이를 해결할 수 있는 방법으로 PVP (polyvinylpyrrolidone)이나 젤라틴과 같은 단백질 안정제를 쓰는 방법이 있다 [8]. 그러나 이러한 단백질 안정제는 가격이 비싸므로 대량 생산시 경제성이 떨어진다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 단백질의 생산과 동시에 분리하는 *in situ* 회수의 필요성이 대두되고 있다. 단백질을 생산과 동시에 연속적으로 분리하게 되면 단백질의 불안정성을 완화시킬 수 있으며 생성물 손실도 피할 수 있게 된다. 이러한 이점 때문에 수성이상계에서의 목적 단백질의 분배 [9-10] 및 친화성 크로마토그래피 컬럼을 이용한 흡착 [11]을 통한 다양한 복합생물공정에 관한 연구가 진행되었다.

본 연구에서는 단백질 분리에 가장 널리 이용되는 이온 교환 크로마토그래피의 원리를 이용하고, 관류배양과 연계하여 배양과 동시에 목적 단백질을 분리하는 *in situ* 회수를 이용한 복합 생물공정을 통하여 형질전환된 벼 현탁세포에서 hGM-CSF의 생산성을 증가시키고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 세포배양 및 배지

본 연구에 사용된 세포주는 hGM-CSF를 생산하는 형질전환된 *Oryza sativa* L. cv Dongjin이며 벼의 α -아밀레이즈 유전자계인 RAmY3D 프로모터가 삽입되어 있어 당이 고갈된 상태에서만 목적 단백질을 생산한다. 성장배지로는 비타민이 첨가된 N6 (Duchefa Biochemie, Netherlands) 기본배지에 0.2 mg/L 카이테틴, 2 mg/L 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-D), 30 g/L 수크로오스를 첨가하였다. pH를 5.8로 맞춘 뒤 가압증기 멸균을 하고 0.2 mm의 막 필터로 여과한 하이그로마 이신을 50 mg/L의 농도로 첨가하여 사용하였다. 계대배양은 28°C, 120 rpm의 회전식 진탕 배양기에서 7일 간격으로 암 조건에서 수행하였다. 생산유도 배지는 성장배지로 사용하

는 N6 배지에서 수크로오스를 첨가하지 않은 상태로 사용하였다.

2.2. 세포량 측정

세포의 증식을 측정하기 위해서 세포 생체량 (fresh cell weight, FCW)과 세포 건조량 (dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 100-mL 엘렌마이어 플라스크에서 배양한 현탁세포를 뷰흐너 깔때기를 이용하여 Whatman No. 1 여과지로 시료의 배양액을 걸러내었다. 배지와 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 미리 무게를 측정할 질량 접시에 세포를 옮겨 담아 화학저울로 FCW를 측정하였다. FCW 측정 후 60°C의 건조 오븐에서 24시간 동안 향량이 될 때까지 건조하여 DCW를 측정하였다.

2.3. hGM-CSF 및 총 단백질 분석

생산된 hGM-CSF의 양은 ELISA 분석 kit (BD Pharmingen Inc., San Jose, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였으며 분석방법은 ELISA kit 제작회사의 표준방법을 사용하였다. 총 단백질 정량분석을 위해서는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)사의 Bradford assay kit를 사용하였으며, 표준물질로는 소혈청 알부민을 사용하여 595 nm에서 측정하였다. 생산된 hGM-CSF의 정성분석을 위해서는 12% 젤을 사용하여 SDS-PAGE를 수행한 후 웨스턴 블로팅으로 확인하였다.

2.4. hGM-CSF의 흡착

흡착에 사용된 이온 교환 수지는 양이온 교환 수지인 CM-Sephacrose와 음이온 교환 수지인 DEAE-Sephacrose이었다. CM-Sephacrose를 이용한 흡착에는 100 mM 아세트산나트륨 버퍼를 사용하였으며 DEAE-Sephacrose 흡착에는 100 mM 인산나트륨 버퍼를 사용하였다. 흡착시 사용한 hGM-CSF의 시료는 벼 세포배양에서 생산된 배지 시료를 각 pH에 맞추어 사용하거나 버퍼 교환시켜 사용하였다. 시료의 흡착 전에 수지 부피의 10배 이상의 버퍼를 흘려주어 pH가 충분히 평형이 되도록 하였다. 흡착을 위해서는 15-mL 주사기에 각각의 수지를 1 mL씩 충전시켜 25°C에서 0.5 mL/min의 유속으로 수행하였다.

2.5. 생물반응기(bioreactor) 운전

생물반응기 배양을 위해서는 식물세포 배양용 5-L jar 생물반응기 (Kobitech, Incheon, Korea)를 사용하였다. Working volume은 2 L이었고 배양 조건은 28°C, 80 rpm, 0.2 vvm이었다. 또한 거품의 억제를 위해 실리콘 계열의 소포제인 Sigma Aldrich (St. Louis, USA) 사의 Antifoam A emulsion을 1 g/L로 사용하였으며 배양 중에도 필요에 따라 추가로 첨가하였다.

2.6. *In situ* 회수

In situ 회수 실험을 위해 pH 조절이 가능한 식물세포 배양용 5-L jar 생물반응기에서 hGM-CSF를 생산하는 벼 세포를 성장배지에서 8일간 배양한 후에 생산유도시켰으며 4일 후에

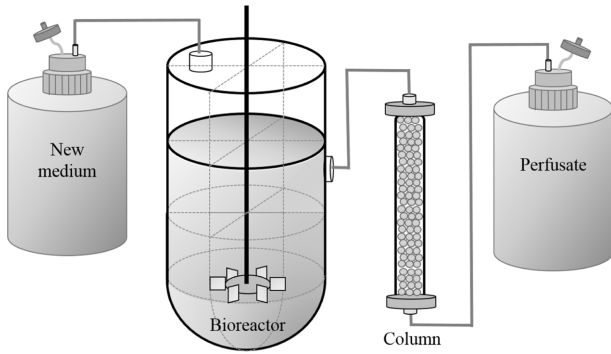


Fig. 1. Schematic diagram of *in situ* recovery.

pH를 조절하였다. 이후 준비된 수지 컬럼을 연결한 후 1.5 mL/min으로 흘려주었다. 이때 컬럼을 통해 빠져나오는 배지의 양만큼의 생산유도 배지를 같은 유속으로 넣어주어 생물 반응기의 working volume이 2 L로 일정하게 유지되도록 배지를 교환해주었다 (Fig. 1). 사용된 배지 (perfusate)는 가압 증기 멸균된 빈 저수조에 저장하였으며, 새로 들어가는 배지는 세포 유지에 사용되었던 비타민이 포함된 기본적인 N6 배지에 성장조절제인 0.2 mg/L 카이네틴과 2 mg/L 2,4-디클

로로페녹시아세트산 (2,4-D)가 첨가된 배지였으며 생산유도를 위해 수크로오스는 첨가하지 않았다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 비연속 배양에서의 hGM-CSF의 생산

본 연구에서 사용한 벼 세포주는 당이 고갈된 상태에서만 단백질 생산이 유도되며 배지 내로 hGM-CSF를 분비한다. 따라서 세포가 증식되는 시기와 목적 단백질을 생산하는 시기 두 가지 관점에서 나누어 생각해야 한다. hGM-CSF의 생산을 비연속 배양과 생산유도 조건에서 비교하여 실험하였다. 우선 5-L jar 생물반응기에서 자연적인 당의 고갈로 인한 벼 세포의 증식 및 당 소비 경향과 pH의 변화 및 hGM-CSF의 생산에 대하여 알아보았다. 세포의 증식은 지수 증식을 하다가 8일째에 최대인 14.2 g/L를 보였고 그 이후 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 2(a)). 당 소비 경향을 보면 성장 배지의 초기 농도인 30 g/L에서 점점 감소하며 접종 후 8일 이후에는 당이 완전히 고갈된 상태가 되었다 (Fig. 2(b)). 따라서 배양 8일째인 당이 고갈되는 시점에서 벼 세포는 생산유도 프로모터가 작동하여 단백질을 생산하기 시작하였고 배양 16

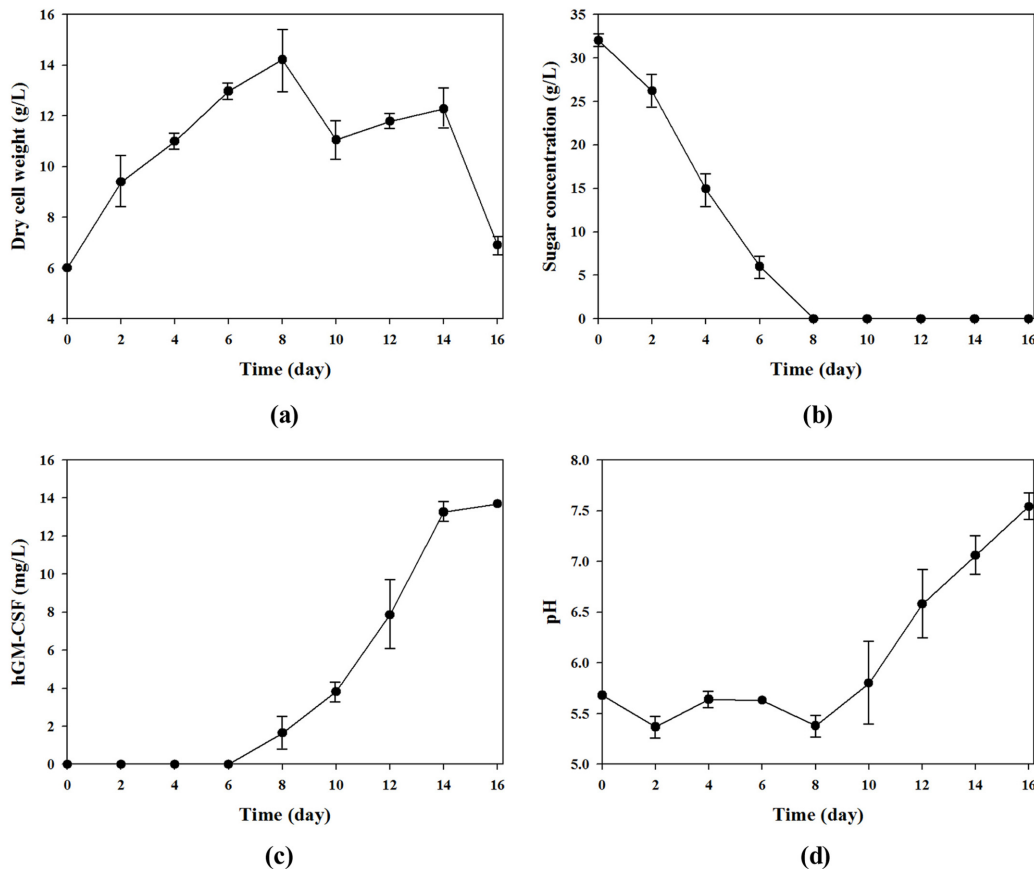


Fig. 2. Time course changes of dry cell weight (a), sugar consumption (b), production of hGM-CSF (c) and media pH (d) during batch culture in 5-L jar bioreactor.

일째에 hGM-CSF의 생산량은 13.7 mg/L로 최대 농도를 보였다 (Fig. 2(c)). 비연속 배양에서의 pH의 변화를 살펴보면 배양 초기에는 5.4에서 5.8 사이로 약산성을 보인 반면 당이 고갈되어 생산유도되는 시점부터는 점점 올라가 배양 16일째에 pH 7.5로 중성을 나타내었다 (Fig. 2(d)). 이는 식물세포가 당 고갈 시에 암모니아를 생성하기 때문인 것으로 사료된다 [12-13].

3.2. 생산유도에 의한 hGM-CSF의 생산

단백질 생산을 유도하기 위하여 당이 완전히 고갈된 상태인 배양 10일째에 수크로오스만을 제거한 배지를 사용하여 배지 교환을 하였다. 세포 증식은 지수증식을 하다가 배지 교환 시점에서 12 mg/L로 최대를 보였고 이후 세포의 증식은 감소하였다 (Fig. 3(a)). hGM-CSF의 최대 생산량은 20.2 mg/L로 자연적인 당의 고갈로 인한 hGM-CSF의 생산량보다 33% 증가하였다 (Fig. 3(b)). 또한 생산시기의 경우 자연적으로 생산유도 시켰을 경우는 6일부터 생산이 되었지만 인위적으로 당이 없는 배지를 사용하였을 때는 배지교환 시점부터 생산이 되었다. 이는 자연적인 비연속 배양보다 인위적으로 생산유도시켰을 경우 프로테아제와의 접촉 기회가 줄어들 수 있

어 hGM-CSF의 분해를 줄일 수 있을 것으로 판단된다 [14]. 배지 교환시 pH의 변화를 살펴보면 배양 4일부터 12일까지 5.5 수준을 유지하다가 12일 이후 점점 높아져 16일째는 7.9를 나타내었다 (Fig. 3(c)). 이러한 결과를 근거로 인위적인 생산유도 배지로 교환한 후 생산유도 4일 전후에 배지의 pH를 이온 교환 수지에 흡착이 잘 되는 조건으로 제어하여 생산과 동시에 목적 단백질을 회수할 수 있도록 실험을 진행하였다.

3.3. 생산유도시 세포의 농도에 따른 hGM-CSF의 생산량

세포 농도가 hGM-CSF 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여 5.8, 11.6, 23.3 g/L의 세포를 N6 배지에 접종하였다. 이때 수크로오스는 제거하고 2 mg/L의 2,4-D와 0.2 mg/L 카이네틴을 첨가하였다. 가장 높은 세포 농도인 23.3 g/L에서는 생산유도시킨 지 5일째에 12.4 mg/L의 hGM-CSF가 생산되었으며 7일 이후 1.4 mg/L로 급격하게 감소되었다. 이것은 높은 세포 농도에서는 목적 단백질의 생산도 많이 되지만 이와 함께 발생하는 프로테아제의 양도 같이 늘어나기 때문이라 사료된다 [15-16]. 반면에 낮은 세포 농도에서는 급격한 hGM-CSF의 감소는 일어나지 않았다 (Fig. 4).

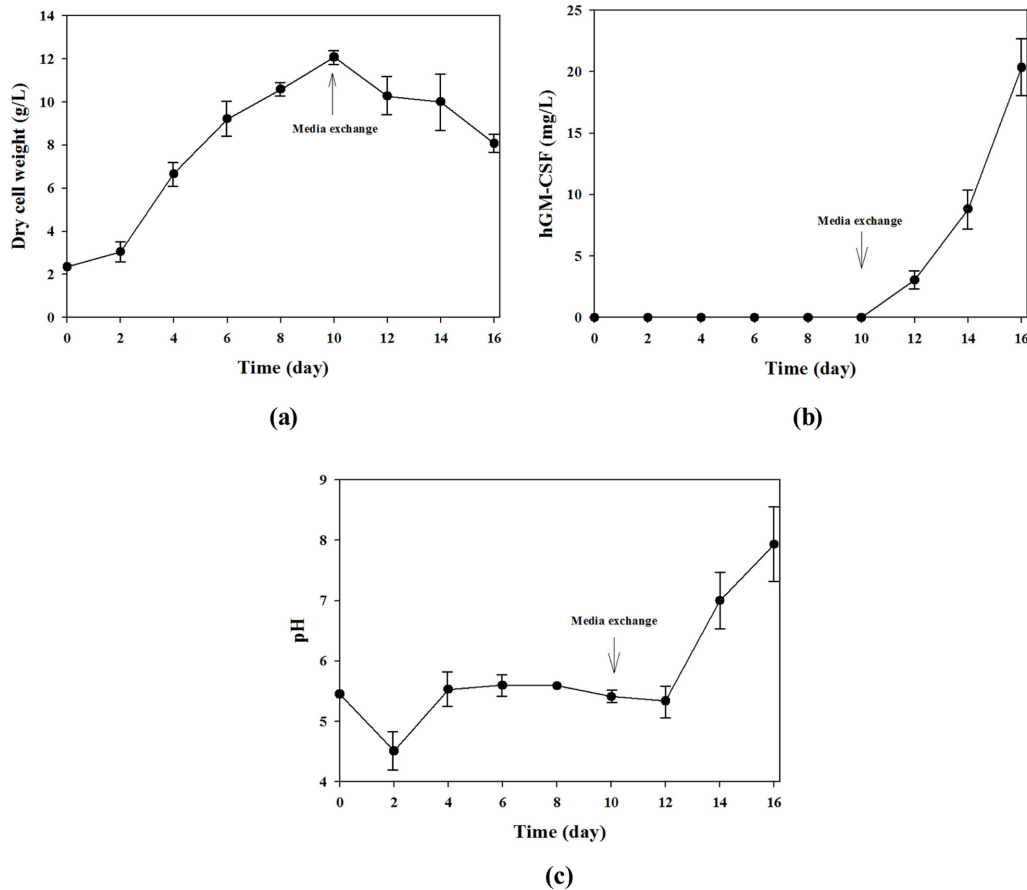


Fig. 3. Time course changes of dry cell weight (a), production of hGM-CSF (b) and media pH (c) during induction by media exchange in 5-L jar bioreactor.

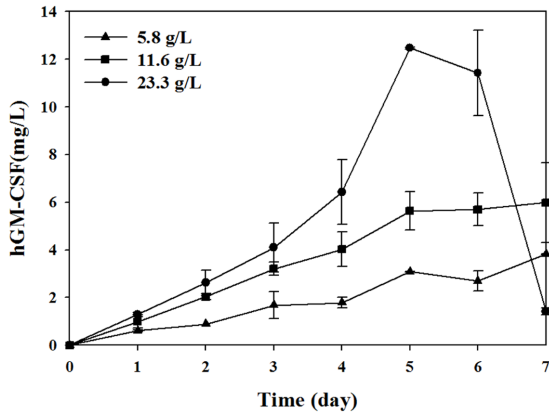


Fig. 4. Effect of cell concentrations on hGM-CSF production after induction.

3.4 hGM-CSF의 흡착

pH의 변화에 따른 hGM-CSF의 안정성을 알아보았다. pH 5.0~7.0에서는 95% 이상의 높은 수준의 안정성을 보였으나 4.0 이하인 산성 조건일 경우 66% 이하로 떨어지는 것을 확

인할 수 있었다 (Fig. 5(a)). 이 결과를 근거로 하여 대부분의 hGM-CSF가 안정한 범위인 4.5~7.0을 수지 흡착 pH 범위로 결정하였다.

흡착을 위해서 hGM-CSF를 생산하는 벼 세포 현탁배양액을 사용하여 베퍼 교환과 pH 조정 후 양이온 교환수지인 CM Sepharose를 충전한 컬럼으로 통과시켰다. pH의 범위는 높은 안정성을 보였던 5.0~6.5으로 잡았다. pH가 높아질수록 점점 흡착률이 낮아짐을 확인할 수 있었으며 5.0일 때 최대의 흡착률인 67%를 나타내었다 (Fig. 5(b)). 음이온 교환수지를 이용한 흡착 역시 벼 세포 현탁배양을 통해 얻은 배지를 사용하여 베퍼교환과 pH 조정 후 음이온 교환수지인 DEAE-Sepharose를 충전한 컬럼으로 통과시켰다. pH의 범위는 5.5~7.0이었으며 pH가 5.5일 때 최대값인 73.8%를 보였다 (Fig. 5(c)). 그리고 공정상 번거로운 과정이 될 수 있는 베퍼 교환의 과정을 생략하고 생산된 배지 상등액의 pH만을 맞추어 주었을 때의 흡착 가능성을 확인하여 보았다. 앞서 확인했던 양이온 교환수지와 음이온 교환수지에서 최대로 흡착되는 조건의 pH 범위에서 CM-Sepharose의 경우 pH 4.6에서 최대 84%의 흡착률을 보였다 (Fig. 5(d)).

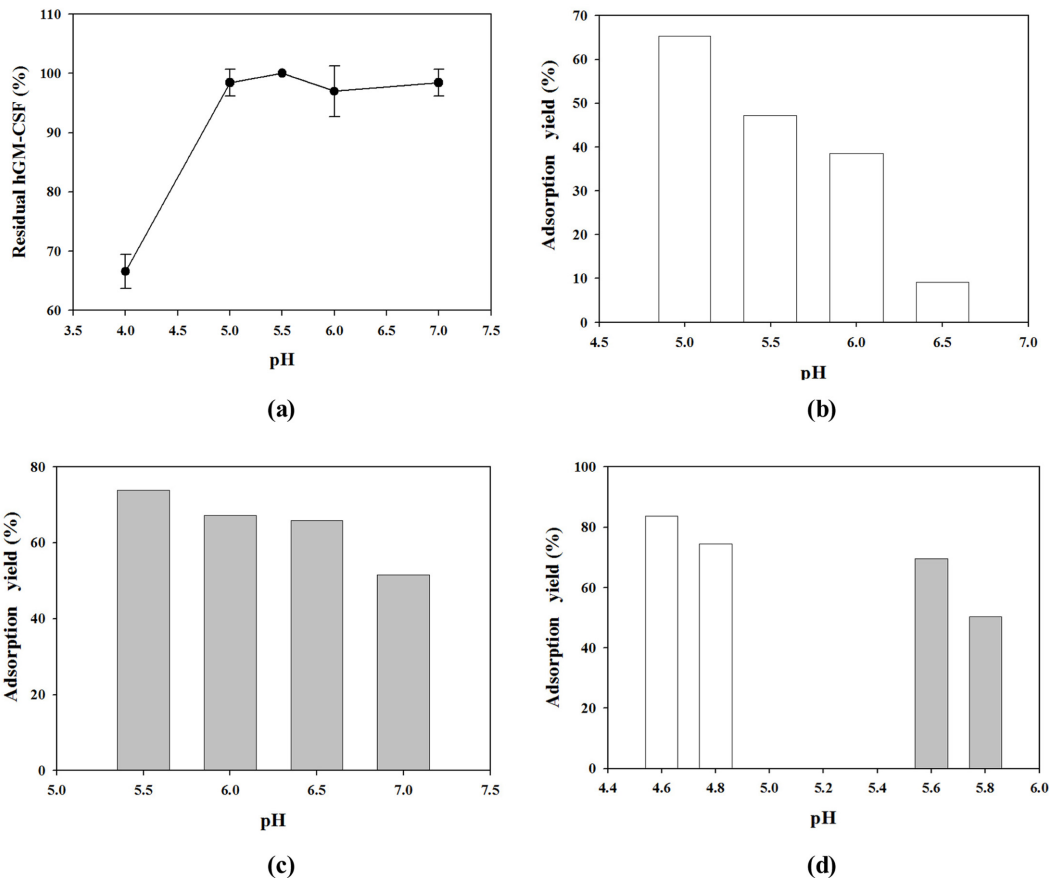


Fig. 5. Effect of pH on (a) stability of hGM-CSF, (b) binding of hGM-CSF to cationic exchange resin (CM-Sepharose in sodium acetate buffer), (c) binding of hGM-CSF to anionic exchange resin (DEAE-Sepharose in sodium phosphate buffer) and (d) binding of hGM-CSF to ionic exchange resins without buffer exchange (CM-Sepharose, open bar; DEAE-Sepharose, closed bar).

4. CONCLUSION

본 연구에서는 형질전환된 식물세포 배양을 통해 생산된 외래 단백질이 배지 내에서 프로테아제에 의해 분해되는 문제점을 극복하기 위해 단백질 분리에 가장 널리 이용되는 이온교환 크로마토그래피를 관류배양과 연계하여 그 조건을 탐색하였다.

비연속 배양에서 자연적으로 당이 고갈되어 목적 단백질을 생산하는 것보다 배양 10일째 당이 없는 배지로 교환하여 단백질을 생산했을 경우 생산량이 33% 증가하였다. 또한 세포의 농도가 높으면 목적 단백질을 많이 생산하지만, 프로테아제에 의한 손실도 그만큼 컸다. 이온 교환 수지를 이용한 흡착에 가장 중요한 인자가 되는 pH에 따른 hGM-CSF의 안정성을 확인한 결과 pH 5~7 범위에서 가장 안정함을 보였으며 이 결과를 바탕으로 버퍼 교환시에 양이온 교환 수지인 CM-Sepharose와 음이온 교환 수지인 DEAE-Sepharose를 사용하였다. CM-Sepharose의 경우에 가장 높은 흡착률을 보였다. 이온 교환 수지를 이용하여 배지 상등액을 흡착시킬 경우 버퍼 교환의 과정이 없이 배지 상등액의 pH를 바로 맞출 경우에도 hGM-CSF의 흡착이 가능하였다. 그리고 흡착률을 확인해 본 결과 DEAE-Sepharose보다는 양이온 교환 수지인 CM-Sepharose가 높은 흡착률을 보였다.

이러한 결과를 통하여 형질전환된 식물세포의 현탁배양에서 이온 교환 크로마토그래피 기술과 관류배양을 연계하여 외래 단백질을 생산과 동시에 분리할 수 있는 *in situ* 회수 및 복합생물공정의 가능성을 확인할 수 있었다. 이는 배양과 동시에 목적 단백질을 분리할 수 있어 형질전환된 벼세포 배양에서 hGM-CSF의 생산성을 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다 [17-19].

Acknowledgements

이 논문은 교육과학기술부 재원 한국연구재단의 기초연구사업 (과제번호 NRF-2013R1A1A2008768), 산업통상자원부의 기술료지원사업 (과제번호 10048311) 및 산업핵심기술개발사업 (과제번호 10051171)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- James, E. A., C. Wang, Z. Wang, R. Reeves, J. H. Shin, N. S. Magnuson, and J. M. Lee (2000) Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expr. Purif.* 19: 131-138.
- Zhang, X. W., T. Sun, X. Liu, D. X. Gu, and Z. Q. Tang (1999) Production of granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) by high cell density fermentation of secretory recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem.* 34: 55-58.
- Shin, Y. J., S. Y. Hong, T. H. Kwon, Y. S. Jang, and M. S. Yang (2003) High level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* 82: 778-783.
- Sharma, A. K. and M. K. Sharma (2009) Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol. Adv.* 27: 811-832.
- Twyman, R. M., E. Stoger, S. Schillberg, P. Christou, and R. Fischer (2003) Molecular farming in plants: Host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.* 21: 570-578.
- Mascia, P. N. and R. B. Flavell (2004) Safe and acceptable strategies for producing foreign molecules in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 189-195.
- Grabowski, G. A., M. Golemba, and Y. Shahtiel (2014) Taliglucerase alfa: An enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Mol. Gen. Metabol.* 112: 1-8.
- Magnuson, N. S., P. M. Linzmaier, J.-W. Gao, R. Reeves, G. An, and J. M. Lee (1996) Enhanced recovery of secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells. *Protein Expr. Purif.* 7: 220-228.
- Hooker, B. S. and J. M. Lee (1990) Cultivation of plant cells in aqueous two-phase polymer systems. *Plant Cell Rep.* 8: 546-549.
- Tjerneld, F., I. Persson, and J. M. Lee (1991) Enzymatic cellulose hydrolysis an attrition bioreactor combined with an aqueous two-phase system. *Biotechnol. Bioeng.* 37: 876-882.
- James, E., D. R. Mills, and J. M. Lee (2002) Increased production and recovery of secreted foreign proteins from plant cell cultures using an affinity chromatography bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 12: 205-213.
- Terashima, M., N. Hashikawa, M. Hattori, and H. Yoshida (2002) Growth characteristics of rice cell genetically modified for recombinant human α 1-antitrypsin production. *Biochem. Eng. J.* 12: 155-160.
- Kwon, J. Y., K. H. Lee, S. H. Cheon, and D. I. Kim (2012) Application of anoxia with glucose addition for the enhanced production of hCTLA4Ig in transgenic rice suspension cell cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 50: 298-303.
- James, E. A. and J. M. Lee (2001) The production of foreign protein from genetically modified plant cells. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 72: 127-156.
- Kusnadi, A. R., Z. L. Nikolov, and J. A. Howard (1997) Production of recombinant protein in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnol. Bioeng.* 56: 473-484.
- Magnuson, N. S., P. M. Linzmaier, R. Reeves, G. An, K. Hay-Glass, and J. M. Lee (1998) Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Express. Purif.* 13: 45-52.
- Velez, D., L. Miller, and J. D. Macmillan (1989) Use of tangential flow filtration in perfusion propagation of hybridoma cells for production of monoclonal antibodies. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 938-940.
- Su, W. W., F. Lei, and N. P. Kao (1995) High density cultivation of *Anchusa officinalis* in a stirred-tank bioreactor with *in situ* filtration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 293-299.
- Choi, J. W., G. H. Cho, S. Y. Byun, and D. I. Kim (2001) Integrated bioprocessing for plant cell cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 72: 63-103.