

탱크교반형 생물반응기에서 미세배양환경 및 Scale-up이 주목세포 현탁배양에 미치는 영향 연구

장문식* · 송승훈 · 양승환 · 황병구 · 김동일** · 변상요

아주대학교 화학 생물공학부, *(주)바이오랜드, **인하대학교 공과대학 화학 고분자 생물공학부

Microenvironments and Scale-up Effects on Stirred Tank Bioreactor Operations for Suspension Cultures of *Taxus baccata* Pendula

Moon-Sik Chang*, Seung-Hoon Song, Seung-Whan Yang, Byoung-Goo Hwang,
Dong-Il Kim** and Sang-Yo Byun

School of Chemical engineering and Biotechnology, Ajou University

*Bioland Co. Ltd., 39-4 Songjeong-ri, Chonan-Gun, Chungnam-do

**Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University

Abstract

Quantitative analysis of cell growth and taxane production were made in application and scale-up of stirred tank bioreactors for suspension cultures of *Taxus baccata* Pendula. The cell growth rate in 1.5L stirred tank bioreactor was slower than that of shake flask cultures. The maximum cell density was 12.48 g/L which was almost the same as 12.68 g/L of shake flask cultures. The paclitaxel production, however, was decreased to 1.3 mg/L. Baccatin III was not detected. Scale-up from 1.5 L to 6 L resulted cell growth decrease. Measurement of integrated shear factors (ISF), one of the microenvironmental factors, showed the sudden decrease of cell viability could be monitored when the stirred tank bioreactor was operated with ISF 272 sec⁻¹ or higher.

Key words: paclitaxel, stirred tank bioreactor, *Taxus baccata* Pendula

서 론

Paclitaxel에 대한 관심은 미국 암연구소(National Cancer Institute, NCI)가 35,000종의 식물을 대상으로 실시한 항암 활성물질 탐색을 위한 대규모 스크리닝 프로그램의 일환으로 태평양 주목의 껍질로부터 얻은 추출물을 시험한 1960년대 말에 일기 시작하였다. 이 실험에서 주목의 추출물이 백혈병과 폐암을 포함하는 여러가지 종양에 대해 강한 활성을 나타낸다고 보고된 후 1969년에 Wall 등에 의해 활성물질이 분리되었고 1971년에는 항암물질의 본체로서 탁솔의 구조가 밝혀졌다(Wani, et al., 1971). Paclitaxel은 복잡하고 독특한 구조를 갖고 있을 뿐 아니라 매우 새로운 방식의 항암기작때문에 많은 사람들의 관심을 받아 왔다. 세포는 microtubule로 알려져 있는 미세구조를 갖고 있다. 기존의 colchicine과 podophyllotoxin과 같은 항암제들이

microtubule의 합성 과정을 방해하는 반면에, paclitaxel은 tubulin의 합성을 촉진 하고 microtubule의 분해를 억제하여 세포의 기능과 세포분열을 멈추게 하는 것으로 알려져 있다. 그 결과 세포가 thread-like structure bundle로서 팽창하게 되어 암세포의 복제를 억제시키며 *in vitro*와 *in vivo*에서 microtubule를 안정화시킨다(Schiff, et al., 1980; Parness and Horwitz, 1981; Christopher, 1993). 이처럼 다른 항암제와 달리 작용기작이 독특하기 때문에 많은 과학자들에 의해 다른 항암제에 내성을 가지고 성장하는 암을 치료하는데 효과적일 것이라고 관심이 모아지고 있다(Hei and Hall, 1993). Paclitaxel은 1988년 제2차 임상실험에서 기존 항암제에 내성을 가진 말기의 난소암(advanced ovarian cancer) 환자에 대해 30% 치료효과를 보았으며 1990년에는 몸의 일부에서 전체로 퍼져 자라는 성향을 보이는 유방암(metastatic breast cancer)에 대해 암세포의 48% 치유 효과를 보였으며, 1992년에 미국 FDA의 승인을 받아 난소암 치료제로 시판되어 각광을 받고 있다(Woo, et al., 1994; Senilh, et al., 1984;

Corresponding author: Sang-Yo Byun, School of Chemical engineering and Biotechnology, Ajou University, Suwon Kyunggi 442-749, Korea

Wheeler and Hennen, 1993).

Paclitaxel의 공급 방법은 다양하지만 주목으로부터 직접 추출 하지 않고 paclitaxel을 대량으로 공급할 수 있는 대체방안으로 크게 유기합성과 식물세포 배양에 의한 paclitaxel의 생산으로 나눌 수 있다. 유기합성의 경우 paclitaxel의 구조가 복잡하고 분자량이 크기 때문에 전 합성(total synthesis)은 가능하지만(Nicolaou, 1994) 많은 어려움이 따르고 있으며 현재 실용화되고 있는 합성 방법에는 주목 잎에 존재하는 paclitaxel의 전구체인 10-deacetylbaaccatin III에 paclitaxel side chain을 화학결합 시켜 paclitaxel을 반합성(semisynthesis)하는 공정이 있다. Paclitaxel의 side chain을 합성하는 방법과 baaccatin III와 paclitaxel side chain을 결합하는 방법에 대해 많은 보고가 있다. 그러나, 주목의 잎으로부터 baaccatin III을 공급받는 과정에 어려움이 따르며 최근의 보고에 의하면 baaccatin III의 함량이 이전에 보고된 함량보다 적다고 재평가되고 있다. 최근에는 보다 활발한 연구로 전 합성에 의한 성공사례가 발표되고 있으나, 약 30개의 반응과정을 거쳐야 하는 등 경제성에는 아직 한계가 있는 것으로 알려져 있다(Bringe, 1995).

이와같은 상황에서 볼때, 식물세포 배양의 경우 경제성 측면에서 paclitaxel을 대량 공급할 수 있는 방법으로 유력시 되고 있다(Fowler, 1987). 식물세포 배양에 의한 대량생산을 위해선 생물반응기를 이용한 대량배양이 필수적이며 이를 위한 주목세포배양 생물반응기의 운전 및 설계에 대한 연구를 필요로 한다. 초기의 식물세포 대량배양에는 미생물 배양에 사용되어 왔던 전통적인 stirred tank 배양기가 사용되었다. 그러나 이러한 type의 배양기는 식물세포의 생리화학적 특성과 구조적인 특성에 잘 맞지 않았다. 특징적으로 식물세포는 미생물 세포보다 세포 크기가 더 크고, 대사속도가 느리며, 또한 세포벽이 cellulose로 구성되어 있다. 특히 세포의 크기와 현탁배양시 뭉치려는 식물세포의 특성은 식물세포가 shear에 대단히 민감한 원인이 된다. 따라서 새로운 type 즉, low shear를 제공하는 배양기를 고안하게 되었다. 대표적으로 세가지 type이 있는데, bubble column, draught tubes 그리고 airlift bioreactor이다. 모두 공통적으로 air sparger에 의해 공기를 작은 크기의 bubble 형태로 배양기내의 배지상으로 공급하며, 이러한 공기 bubble의 이동 방향에 의해 배양기내의 유체의 흐름이 유도되는 것이다. 특히 airlift type의 배양기는 다른 두가지 type 보다 훨씬 더 좋은 mixing 효과를 줄 수 있어서 식물세포의 배양에 선호되고 있다. 경제적인 측면에서 이러한

type의 배양기를 stirred tank type의 배양기와 비교하여 본다면, 첫째 제작비가 저렴하고, 둘째 단순하여 운전이 쉽고 운전 비용이 저렴하며, 셋째 오염의 위험성이 적다는 장점들이 있다. 하지만, airlift 배양기의 단점은 세포량 증가 측면에서 불태 효율적이지 못하다는 것이다. 즉, airlift 배양기의 mixing 효율은 세포 밀도에 의해 어느 정도까지의 한계성이 있다는 것이다. 따라서 고밀도 대량 배양이 필요한 세포배양시에는 mixing과 aeration 등의 문제를 극복하기 위하여 impeller를 장착한 stirred tank bioreactor를 선호한다. 식물세포는 shear에 약하기 때문에 shear 발생을 줄이기 위해 impeller에 변형을 주어 세포배양을 하는 것이 바람직하다(Yokoi, et al., 1993).

식물세포 배양에서 생물반응기의 적용 및 scale-up은 주로 성공적으로 실험실 규모의 우수한 연구결과가 있는 다음으로 볼 수 있다. 이때 반응기를 적용하여 scale-up을 하게 되면 실험실 규모의 flask 배양과 매우 다른 배양 환경이 제공되어 이로 인한 세포의 성장과 유용물질의 생산성에 변화가 생기기 마련이다. 일반적으로 생장이 느려지고 생산성이 감소하며 생성물의 조성에도 변화를 보이는 경우가 대부분이다. Scale-up을 할 때 나타나는 이러한 부정적인 결과는 scale-up 함으로써 식물 세포의 성장환경이 shaker 배양때와 달라졌기 때문이다. 즉 세포에 대한 microenvironment의 차이를 극복하지 못했기 때문에 발생한 결과이다. 본 연구에서는 주목세포 배양을 위한 stirred tank reactor를 scale-up 할 때 나타나는 세포 성장 및 유용물질 생산성 변화에 관한 연구를 하였다. 특히 scale-up시 영향을 미치는 microenvironment들의 영향을 연구하였다. 이들 factor들은 실험을 통해 측정하거나 이론식을 이용하여 규명하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 연구에 이용된 세포주는 미국 Rutgers 대학 부설 농업시험장으로부터 분양받은 유럽 주목(*Taxus baccata* Pendula)의 줄기와 잎으로부터 callus를 유도하여 25°C, 암조건에서 계대배양 중이다. 유도된 callus는 수년간의 계대 및 유지를 통하여 paclitaxel 생성 능력을 함유하고 세포생장이 우수한 세포주를 선별할 수 있는 가능성을 제시하였다.

성장조절제로는 α -naphthalene acetic acid(NAA)와 6-benzyl aminopurine(BAP)를 이용하였고 탄소원으로 2% sucrose가 첨가된 기본 Schenk & Hilde-brandt(SH)

배지를 이용하였다. 배지의 pH는 1 N KOH와 1 N HCl을 이용하여 5.8로 적정하였다. Callus 배양의 경우 위의 액체배지에 0.5%(w/v)의 한천을 첨가해 이용하였다. 현탁배양은 100 ml 배양배지가 든 250 ml 삼각플라스크와 200 ml 배양배지가 든 500 ml 삼각플라스크에서 7~10일 간격으로 세포와 배양배지의 비율을 1:3 정도로 하여 계대배양하였다. 또한 callus 배양은 약 20~30일 주기로 계대배양하였다.

시약

Paclitaxel 및 taxane 표준물질은 미국 NCI의 Ken Snader 박사로부터 공급받았으며 주목세포 배양배지 제조에 사용한 시약 및 생장 조절제, casein enzymatic hydrolysate, polyvinylpyrrolidone은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하였다. Paclitaxel 및 taxane 분석에 사용한 전계용매인 water, acetonitrile 및 methanol은 Fisher Scientific Co.(Rochester, NY, U.S.A.)의 HPLC grade 제품을 이용하였으며, 기타 모든 시약도 특급 시약을 사용하였다.

Paclitaxel 및 Taxane 분석

Paclitaxel 함량은 세포내 함량과 배지에 존재하는 세포외 함량으로 구분하였다. 세포내 함량은 fresh cell에 methanol을 가하고 초음파 파쇄하여 추출한 뒤 주목 시료 추출과 동일한 방법인 MC와 물을(1:1, v/v) 이용해 partitioning하여 수용액 층을 제거한 후 MC를 진공 감압하여 제거하였다. 다시 methanol 추출하여 0.45 μm, 13 mm membrane filter(Baxter Scientific Products, U.S.A.)로 여과하여 HPLC 분석하였다. 배지에 존재하는 paclitaxel은 일정량의 배지를 진공 건조한 후 methanol로 추출하여 분석하였다.

주목의 잎과 줄기로부터 유도된 callus의 paclitaxel 생성 능력과 주목 세포배양에서 생성된 paclitaxel 및 관련된 taxane을 알아보기 위한 분석방법으로 HPLC system을 이용하였다(Spectra Physics 8800 pump, Waters 484 UV detector, GBC LC1210 UV/Vis Detector). Paclitaxel 분석에는 ES Industries(Marlton, NJ, U.S.A.)로부터 구입한 reversed phase pentafluorophenyl(PFP) HPLC column(4.6×250 mm, 5 μ, 60Å)과 Phenomenex(Torrance, CA, U.S.A.)로부터 구입한 Curosil B(3.2×250 mm, 5 μ)을 이용하였다. PFP column을 이용한 분석에서의 이동상은 H₂O와 acetonitrile을 62:38(v/v)로 25분간 일정한 비율로 유지하여 35분에서 57:43(v/v)으로 바꾸고 40분에서 55:45(v/v)로 linear gradient를 만들어 주었다. 유속은 1.2

ml/min으로 유지하였고 또한 sample 주입량은 20 μl로 유지하였다. 검색 파장은 228 nm와 280 nm를 이용하였다. Curosil B column을 이용한 분석에서의 이동상은 H₂O와 acetonitrile을 55:45(v/v)으로 isocratic 조건으로 0.7 ml/min로 유지하였다.

Stirred Tank Bioreactor의 운전

현탁 세포 배양 반응기는 공정이 간단하고 운전이 쉬운 장점등이 있으나 가장 큰 장점으로 세포 생장을 들 수 있다. 왕성한 세포생장을 유도하여 높은 세포 밀도를 유지할 수 있게 때문에 전체적으로 단위부피에 대한 세포 질량과 생산성등을 다른 반응기 보다 높게 유지 할 수 있게 된다. 반면에 세포 밀도가 높게 유지 되기 때문에 공급 기체나 영양성분등의 물리적인 분산(dispersion)이 항상 문제가 된다. 일반적으로 식물 세포의 산소 요구량은 박테리아의 그것에 비하여 약 10% 정도로 알려져 있으나 실제 식물세포는 높은 임계 산소 농도(critical oxygen level)을 요구하므로 적정 수준의 aeration과 mixing을 해야 한다. 또한 대부분의 식물 세포는 shear에 어느정도 민감하므로 aeration과 mixing 방법 등을 고려해야한다. 경험적으로 어느 정도 낮은 세포 밀도 (약 20 g/L) 배양에는 비기계적 교반 반응기인 airlift 형식의 반응기를 이보다 높은 세포 밀도 배양에는 기계적 교반 반응기인 stirred-tank 형태의 반응기를 사용하는데 식물 세포의 경우 shear에 상당히 민감하므로 impeller의 type, 교반 속도 등이 반응기 설계시 중요한 인자가 된다(Yokoi, 1993). 일반적으로 paddle-type impeller가 flat blade turbine type impeller 보다 낮은 shear가 나타나므로 식물 세포 배양시 유리한 것으로 알려져 있으나, 본 실험에서는 변형된 형태의 flat blade impeller(EYELA, MBF250)를 장착한 Fig. 1과 같은 생물반응기를 사용하였다. 기계적 교반 반응기인 stirred-tank 형태의 반응기는 일반적으로 넓은 용통성과 적응성을 가지며 높은 점도를 갖는 배지를 다루기가 용이하고 넓은 범위의 혼합 강도를 갖는 장점이 있으나, 전단응력에 의한 세포의 손실을 야기시킬 수 있으며 높은 장치비와 높은 동력 소모를 하는 단점도 있다(Stragg, 1987). 운전조건은 다음과 같다.

- Working Volume : 1500 ml
- Air flow rate : 200 ml/min
- Agitation speed : 300 rpm
- Impeller type : 변형된 형태의 flat blade impeller
- 초기집중량 : 15%(w/v)

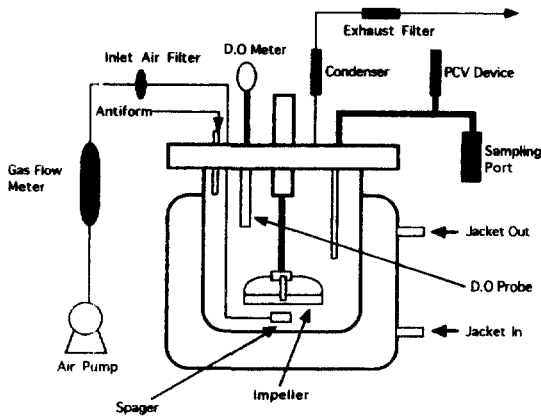


Fig. 1. The configuration of stirred tank bioreactor system.

결과 및 고찰

플라스크 배양에서의 Basic Kinetics

현탁 배양 세포의 시간에 따른 세포 성장과 di-terpenoid alkaloid인 paclitaxel과 baccatin III의 관계를 알아보기 위하여 α -naphthalene acetic acid(NAA) 5 ppm과 6-benzylamino purine(BAP) 2 ppm이 함유된 40 ml의 SH 배지가 담겨 있는 100 ml 삼각 플라스크에 TBA 현탁세포를 fresh cell 6g씩 접종하여 shaking incubator에서 120 rpm으로 진탕배양하였다. 배양실의 온도는 25°C로 유지하였고 습도는 45%를 유지시켰다. 그 결과 Fig. 2같이 시간의 변화에 따른 세포 성장과 taxane 생산 곡선을 얻었다. Lag phase는 거의 나타나지 않았고 exponential phase 말기(접종일로부터 약 6일째)에 DCW는 최고값인 12.68 g/L이었고 그 후 계속해서 감소하였다. 탄소원으로 glucose와 sucrose를 이용하였는데, 당의 소모에 있어 fructose와 비교하여 glucose의 소모가 더 빠르게 이루어지고 배지내에 분비된 invertase에 의해 sucrose가 glucose와 fructose로 빠르게 가수분해된다. Paclitaxel은 stationary phase에 접어들어 후 생성되기 시작하여 배양 20일째 최고치인 9.28 mg/L를 생성하였고, baccatin III는 배양 초기단계인 1일 부터 3일 사이에 생성되고 점차 감소하는 경향을 보였다. Baccatin III는 paclitaxel 생성 대사과정의 중간 생성물집일을 짐작할 수 있는 결과라 생각한다.

Stirred Tank Bioreactor에서의 basic kinetics

Airlift type 생물반응기를 사용하는 경우 mixing과 circulation에 문제가 있기 때문에 생물반응기를 통한 고밀도 배양은 불가능하나 가능케 하기 위해 산소공

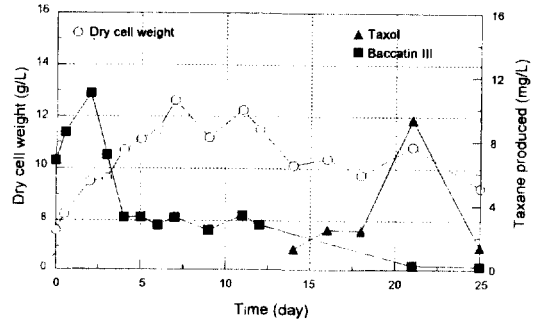


Fig. 2. Cell growth and taxane production in suspension cultures of *Taxus baccata* Pendula.

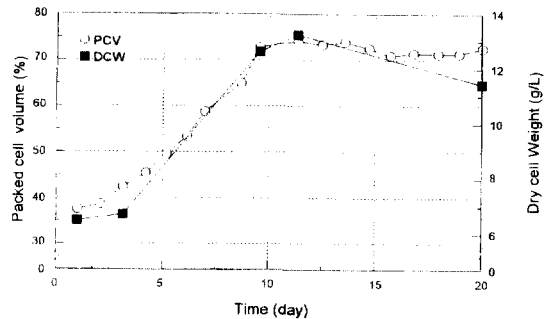


Fig. 3. Time course changes of cell growth in 1.5L stirred tank bioreactor.

급에 필요한 aeration 이상을 수행해야 한다. 따라서 최근의 연구동향은 shear의 문제를 해결한 STR type의 생물반응기에서의 고밀도 세포배양이 활발하게 이루어지고 있다. Yokoi 등의 연구에서는 shear의 문제를 해결하기 위해서는 impeller의 형태에 변형을 주어야 한다고 주장하면서 새로운 생물반응기인 Maxblend fermentor에 의한 세포배양을 보고하였다. 본 연구에서는 식물세포배양에 적합하게 변형된 형태의 flat blade impeller를 장착한 1.5 L의 Volume를 갖는 EYELA사의 MBF250 반응기를 사용하였다. STR에서 시간에 따른 세포생장은 Fig. 3과 같고, 세포 성장정도는 PCV와 세포 건조 중량으로 나타내었다. 배양 초기에 약간의 lag phase가 존재 했지만 이후 급격한 세포생장이 아니라 완만하게 세포생장이 일어났다. 세포 건조 중량은 배양 12일째 12.48 mg/L를 나타내어 예상과 달리 STR에서 세포생장이 우수한 것으로 나타났다. 이것은 일반적인 STR type에서 impeller가 cell에 미치는 damage를 극복하지 못하는 반면 실험에 사용한 식물세포 배양에 알맞게 변형된 impeller는 식물세포에 damage를 입히지 않고 좋은 배양환경을 제공하기 때문으로 생각되어진다. 또 플라스크 배양과 비교하면 약 6일 정도 늦은 성장 유형을 보였고 당은 배

양 16일째 모두 소모 되었고 탄소원의 사용에 있어서 플라스크 배양에서와 같이 glucose를 더 선호하는 경향을 나타내었다. 그리고 paclitaxel은 배양 20일째 1.3 mg/L의 생성 능력을 보였으나, baccatin III는 생성되지 않았다. 이것은 paclitaxel과 baccatin III 모두를 생성한 삼각플라스크 배양과 비교하여 원인을 생각해보면 첫째로 cell line에 따른 생산능력의 차이 일 수도 있고 둘째로 scale이 커지면서 microenvironment의 변화에 따른 생성능력의 저하로 생각 할 수 있다. 또 baccatin III의 경우는 배양초기에 생성되었다 감소하는 경향이 있는데 생물 반응기에서의 sampling 횟수의 제한으로 sampling time의 적절성에 따른 문제 일수도 있다.

Stirred Tank Bioreactor에서 Scale-up연구

본 연구에서는 1.5 L volume을 EYELA사의 MBF 250 STR과 10 L volume을 갖는 biolaffitie사의 STR을 이용하여 scale-up 연구를 하였다. 10 L stirred tank bioreactor의 운전조건은 다음과 같았다.

- working volume : 6000 ml
- Air flow rate : 300 ml/min
- Agitation speed : 100 rpm
- impeller type : helical loop
- aeration : four branched sintered glass
- 초기 접종량 : 15%(w/v)

Shear에 대한 영향은 shear factor에 대한 cell viability 간의 관계로써 나타냈다. Shear factor로써 impeller와 vessel wall간의 shear field의 크기를 나타내는 것으로 계산이 복잡하지 않고 비교적 정확한 integrated shear factor(ISF)를 이용하였다(Klass, 1991).

$$ISF = \frac{2\pi ND}{T_v - D}$$

- N=Stirrer speed
- D=Stirrer diameter
- T_v=Vessel diameter

생물반응기에서 impeller의 speed를 변화시키면서 shear factor에 따른 세포의 활성을 측정하였다. 활성은 세포를 fluorescence diacetate로 염색하여 현미경을 통하여 관찰하였다. 초기의 식물세포 현탁배양은 미생물 배양에 사용된 STR을 사용하였는데 식물세포가 갖는 shear stress에 대한 민감한 성질 때문에 배양에 어려움이 있었다. 식물세포는 그들의 large size, rigid cell wall과 extensive vacuole를 가지고 있어 shear stress에

민감하다. STR에서는 낮은 shear를 발생하는 airlift Bioreactor와는 달리 impeller를 가지고 있어 이것에 의해 shear stress가 발생하여 식물세포 성장을 어렵게 한다. Impeller는 두가지 기능을 가지는데 그중 하나가 산소전달을 증가시키기 위해 유입된 air bubble를 break up하는 것이고 다른 하나는 풀고루 혼합하는 것이다. 식물세포에 있어서 이런 혼합은 낮은 oxygen 요구도를 갖고 있기 때문에 중요하다. 이러한 혼합은 배지의 점도에 영향을 받을 수도 있고 shear에 민감하게 반응할 수도 있다. 또 고밀도배양에서는 좋은 impeller speed나 충분한 oxygen공급을 위해 높은 impeller speed나 높은 aeration rate가 필요하다. 그러나 이러한 높은 impeller speed나 높은 aeration rate는 cell에 damage를 줄일 수 있다. 현재 이런 문제를 줄이기 위해 변형된 impeller에 대한 연구가 한창 진행중에 있고, 본 실험에서는 식물세포배양에 알맞게 변형된 flat blade impeller를 사용하였다. Shear factor로 agitation speed가 400 rpm일때 ISF는 272 sec⁻¹값을 나타냈고 cell viability도 80%에서 40%로 급격히 감소함을 보여주었다 (Fig. 4). 따라서 주목세포의 경우 stirred tank type의 bioreactor에서 cell viability를 유지하기 위해선 ISF

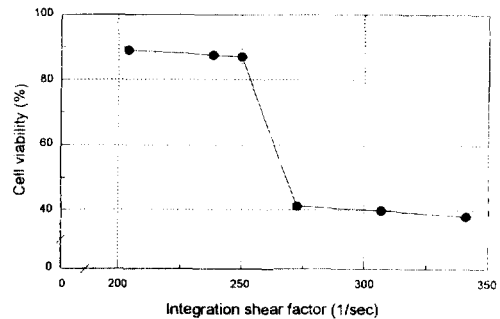


Fig. 4. Integrated shear factor effects on cell viability in 1.5L stirred tank bioreactor.

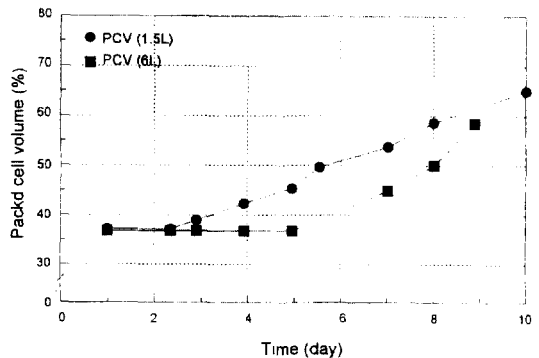


Fig. 5. Cell growth changes with working volume in stirred tank bioreactor.

272 sec⁻¹ 이하로 운전하여야 한다. 이것은 동일한 type의 impeller를 사용하는 bioreactor에서는 scale에 관계없이 적용되는 shear stress의 강도를 나타낸다.

Fig. 5는 stirred tank bioreactor scale 변화에 따른 세포생장의 차이를 나타낸다. 배양 8일에 1.5L 배양기에서는 PCV 57.8%를 나타냈으나 6L 배양기에서는 PCV 50.4%를 나타내어 세포성장 감소를 관찰할 수 있었고, lag time도 6L의 경우 약 5일로 1.5L의 2일 보다 훨씬 긴 것을 알 수 있다. Paclitaxel 및 taxane들은 생성되지 않았다. 이와같이 stirred tank bioreactor에서 비록 작은 scale이고 impeller type에 약간의 차이는 있지만, 1.5L에서 6L로 scale-up하였을 때 growth나 생산성의 감소를 보이는 원인은 일반적으로 mixing의 정도, 산소전달 및 shear의 영향과 gas-phase의 차이 등과 같은 microenvironment 등의 차이로 생각할 수 있다. 실제로 Mixing 정도의 측정에는 pH response법으로 측정하였고 신뢰도는 95%로 하였다(Assa and Bar, 1991). 산소전달 속도는 D.O probe를 이용한 dynamic method법을 이용하였다(Leckie and Scragg, 1991). 1.5L에서 6L로 scale-up했을 때 급격한 혼합의 정도가 감소함을 나타내었고 산소전달속도 역시 scale-up되면서 급격한 감소를 나타내었다(data not shown). 그에 따라서 cell growth 및 taxane 생산 감소라는 결과가 이어졌으리라 여겨진다.

요 약

주목세포의 대량배양을 위한 stirred tank type 생물반응기의 적용 및 scale-up 과정에서 발생하는 부정적인 결과 즉 세포 성장과 taxane 생산성 감소 현상을 정량적으로 진단하였다. 1.5L stirred tank bioreactor에서 주목세포를 배양한 결과 플라스크 배양과 비교하여 세포성장 속도는 약 6일 정도 늦었지만 배양된 세포량은 12.48 g/L로 플라스크 배양의 12.68 g/L와 유사하였다. Paclitaxel은 1.3 mg/L 생성되어 플라스크 배양과 비교하여 현저히 감소하였고 baccatin III는 생성되지 않았다. Scale-up한 결과 세포생장이 감소하였고 taxane은 생성되지 않았다. Stirred tank bioreactor에서의 세포배양 microenvironment 중에서 shear의 영향을 integrated shear factor(ISF)를 이용하여 측정한 결과 ISF 272 sec⁻¹ 이상에서는 shear에 의한 세포손상으로 cell viability가 급격하게 감소함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 연구비지원(과제번호:

95-0502-03-01-3)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Assa, A. and R. Bar, 1991, Biomass axial distribution in air-lift bioreactor with yeast and plant cells, *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, p1325-1330.
- Bringe, Vankataraman; Phyton catalytic Inc., 1994, Enhanced Production of Taxol and Taxans by Cell Cultures Of *Taxus* Species WO 93/17121.
- Christopher, J., 1993, Taxol: search for a cancer drug, *Bioscience*, **43**, 133-136.
- Fower, M.W., 1987, Process system and approaches for large scale plant cell culture, In Plant tissue and cell culture, C.E.Green ed., Alan R. Liss, NY, pp459-471.
- Hei, T.K. and E.J. Hall, 1993, Taxol, radiation, and oncogenic transformation, *Cancer Research*, **53**, 1368-1372.
- Klass Vant's Riet and Johannes Tramper, 1991, Basic Bioreactor Design, Marcel Dekker Inc.
- Leckie, F. and A.H. Scragg, 1991, An Investigation into the Role of Initial KLa on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*, *Biotechnology and Bioengineering*, **37**, 364-370.
- McGuire, W.P., E.K. Rowinsky, N.B. Rosenshein, F.C. Grumbine, D.S. Ettinger, D.K. Armstron and C.R.C. Donehower, 1980, Taxol: A Unique Antineoplastic Agent with Significant Activity in Advanced Ovarian Epithelial neoplasms, *Annals of Internal Medicine*, **77**, 1561-1565.
- Nicholaou, K.C., Z. Yang, J.J. Liu, H. Ueno, P.G. Nantmet, R.K. Guy, C.F. Claiborne, J. Renaud, E.A. Coulaudouros, K. Paulvannan and E.J. Sorensen, 1994, Total synthesis of taxol, *Nature*, **367**, 630-634.
- Parness, J. and S.B. Horwitz, 1981, Taxol binds to polymerized tubulin *in vitro*, *J. Cell Biol.*, **91**, 479-487.
- Schiff, B.P., J. Fant and S.B. Horwitz, 1979, Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol, *Nature*, **227**, 665-667.
- Senilh, V., S. Blechert, M. Colin, D. Guenard, F. Picot, P. Potier and P. Varena, Mise en evidence de nouveaux analogues du taxol extraits de *Taxus baccata*, *J. Nat. Prod.*, **47**, 131-137.
- Stragg, A.H., 1987, Bioreactors in Biotechnology, Ellis Horwood, pp114-116.
- Wani, M.C., H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon and A.T. Mcphail, 1971, Plant Antitumor pAgent. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325-2327.
- Wheeler, N.C., M.T. Hehnen, 1993, Taxol, *J. Forestry*, **15**, 18.
- Woo, D.D.L., S.Y.P. Miao, J.C. Pelayo and A.S. Woolf, 1994, Taxol inhibits progression of congenital polycystic kidney disease, *Nature*, **368**, 750-753.
- Yokoi, H., J. Koga, K. Yamamura and Y. Seike, 1993, High Density Cultivation of Plant Cells in a New Aeration-Agitation Type Fermentor, Maxblend Fermentor, *J. Ferment. Bioeng.*, **75**(1), 48-52.