

## 인간 신장세포로부터 새로운 배양공법에 의한 scu-PA의 생산성 향상

최 석 규 · 강 재 구 · 이 진 하 · 이 현 용  
강원대학교 식품공학과

### Enhancement of scu-PA Production from Human Kidney Cells by a Novel Bioreactor

Suk Kyu Choi, Jae Koo Kang, Jin Ha Lee and Hyeon Yong Lee  
*Department of Food Engineering,  
Kangweon National University  
Chuncheon 200-701, Korea*

#### ABSTRACT

$4.0 \times 10^{-3}$  (IU/cells/day) of maximum specific scu-PA production, which was higher than those by a 75cm<sup>2</sup> T-flask and conventional perfusion systems, was maintained by tube-type bioreactor at 0.35 (1/h) of perfusion rate corresponding to 0.15 (dynes/cm<sup>2</sup>) of shear stress. The production of scu-PA is also increased as shear stress was slowly increased, which is similar to natural human blood circulation. The tube reactor proves that there may be no limitation of oxygen supply by showing 1.0 (1/h) of oxygen transfer coefficient at steady state and this system yields much lower shear stress of 0.3(dynes/cm<sup>2</sup>) than that of 5-8(dynes/cm<sup>2</sup>) by conventional agitation systems.

#### 서 론

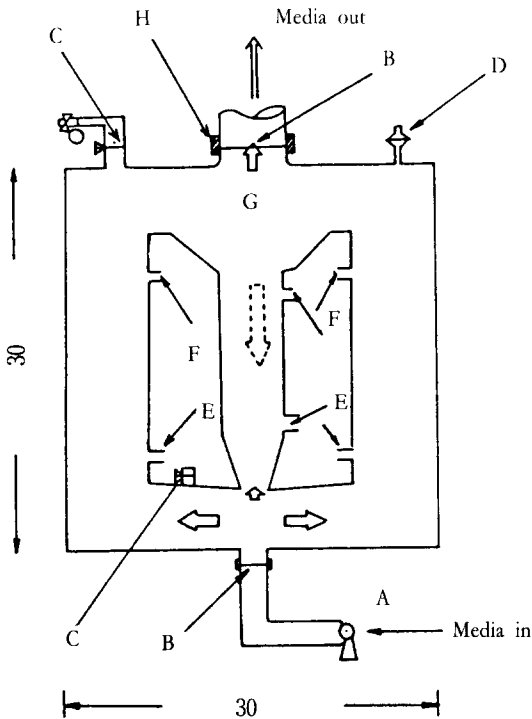
Bioreactor에 의한 대부분의 동물 세포의 체외(in vitro) 배양시 교반에 의한 전단 응력이 세포의 생육 및 물질 생산에 큰 지해 요소로 작용되므로(1-5), 세포 배양 공정의 scale-up시 가장 중요한 변수중의 하나로 이의 해결에 많은 연구가 집중되고 있다(6-7). 특히 hybridoma나 미립 담체(microcarriers)에서만 성장하는 접착성 세포(anchorage dependent cells)들은 전단 응력에 극히 약해 이들의 배양을 위한 여러 형태의 배양조 및 첨가 물질들이 개발되고 있다(8-10).

하지만 인체내에서 혈액 세포나 혈관 벽을 구성하고 있는 세포들(주로 endothelial cells)은 혈액의 순환에 의해 연속적으로 전단 응력을 받으며 성장하고 있으며(11-13), 특히 이들 세포들에서 다종의 의약적 특성들

지닌 단백질들의 생산이 보고되고 있다(14-15). 따라서 특정 세포들이나 접착성 세포의 배양시 극히 낮은 전단 응력에서는 (<1 dynes/cm<sup>2</sup> (16)) 기존의 배양조에서의 생산성보다 향상될 수 있는 것을 전단 응력이 거의 존재하지 않는 정체(static) 상태에서와 일반적인 교반에 의한 연속 배양에서의 생산성과 비교하자고 한다. 이를 위해 접착성 세포를 배지의 이동에 의해 야기되는 전단 응력만이 존재하는 관 형태(tube type)의 연속 배양조를 이용해 단지 배지의 이동과 세포 및 담체의 자연 낙하에 의한 산소 전달 및 교반이 가능한 새로운 형태의 배양 공법을 개발했다.

#### 재료 및 방법

Single chain Urokinase type Plasminogen Activator(



**Fig. 1. Diagram of tube bioreactor with low shear stress by perfusing fresh media: 30×30cm with I. D. 5cm of pyrexiglass (1.7L of working vol.)**

- A:** Peristaltic pump  
**B:** meshed screen: 0.2–0.5 $\mu$ m nylon screen  
**C:** inoculum and sampling parts  
**D:** vent-gas  
**E:** Entrance of mixture-gas of air, N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by silicone tubings  
**F:** Exit for off-gas out of the reactor  
**G:** Settling bottle of beads  
**H:** clamps

Open arrows are the direction of fresh media in and a dotted arrow is the direction of settling beads.

scu-PA) 를 생산하는 hyman kidney cell line, Caki-1 (Flowlab, Japan)을 5% fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA)이 보강된 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)에 5mM의 glutamine과 40 $\mu$ g/ml의 gentamicin

및 25mM HEPES 완충 용액이 첨가된 배지(pH 6.9)에 접종한 후 매 2–3일 마다 신선한 배지로 갈아주며 배양했다(17). Hemocytometer에 의한 trypan dye염색 방법으로(18) 매일 세포수 및 생존율을 측정해 75cm<sup>2</sup> T-flask내의 세포수가 약 1×10<sup>6</sup> viable cells/ml에 도달했을 때 1.7L 규모의 관형태의 배양조(Fig. 1)에 5g/l의 Cytodex III (Pharmacia, USA)와 함께 접종했다. 배양 후 약 한시간 반동안 정지해 집중된 세포를 미립 담체에 불인후 Fig. 1의 A에 부착된 peristaltic pump (Cole-Parmer, USA)에 의해 매우 느린 속도(1ml/min)로 배지를 정량 이동 시켰다. 매일 배양조 내의 세포수를 측정해 세포수의 급격한 변화가 없는 quasi-steady state에 도달 했을 때, 새로운 배지 이동 속도(perfusion rate)로 바꿨다. 또한 매6시간 마다 배양조에서 나오는 배지의 pH및 용존 산소 양을 측정해 Fig. 1의 E의 입구에 stainless steel로 만들어진 clamp로 고정시킨 silicone tube (Cole-Parmer, USA)로 유입되는 공기 속도와 이산화탄소 양을 조절했다.

거품 및 전단 응력없는 산소 전달을 위해 0.1 $\mu$ m 두께의 silicone tube를 이중으로 꼬아진 상태로 배지가 새지 않도록 배양기의 (Fig. 1의 E,F부분) 산소 투입 부분에 연결했다. 또한 배양조내의 압력을 일정하게 유지하기 위해 Fig. 1의 D부분에 0.25 $\mu$ m filter를 장착해 극히 적은 양이지만 발생하는 gas가 유출되도록 했으며, 배지의 수평적 이동시 낮은 배지 이동 속도로 담체의 무게에 의한 중력으로 G부분의 settling bottle에 침강돼 배지와 세포의 효과적인 분리가 일어나 filter screen을 막는 현상이 현저히 감소했다. Fig. 1의 화살표 방향이 새로 유입되는 배지의 이동 방향이며 세포가 집착된 담체는 점선 화살표 방향으로 침강되도록 고안했다. 배양조는 37 $^{\circ}$ C 항온실에 보관 했으며, 용출된 배지는 4 $^{\circ}$ C 냉장고에 있는 5L spinner vessel에 모아졌다. 배지내 존재하는 scu-PA 양을 측정하기 위해, chromogenic 기질인 S-2 444(Sigma, USA)와 UK standard(United Kongdom)를 3.7 IU/ml의 plasmin을 포함시킨 배지와 반응해 405nm에서 정량적으로 활성을 측정했다(19).

배양조 내의 산소 전달 속도의 측정을 위해, 배양조 밖으로 유출되는 기체를 Gas Chromatography (MBM, West German)로 매6시간 마다 분석해 mass balance에 의한 산소 소비 속도(Oxygen uptake rate, OUR)를 계산해(20), 정상상태 (steady state)의 경우 산소 소비 속도 = 산소 용존 속도라는 가정하에(21)

$$X \cdot \mu / Y_{O_2} = K_{La}(C^* - C) \text{ -----(1)}$$

여기서 X는 세포수(viable cell/ml)이며  $\mu$ 는 비 성장 속도(1/h), Y<sub>O<sub>2</sub></sub>는 산소 수율, K<sub>La</sub>는 산소 전달 상수

(1/h)이고  $C^*$ 는 배양 조건 하에서의 평형 용존산소 양으로 일반적인 배양 조건에서는 약30 (ml  $O_2 / l$ ) 로 존재하며(22),  $C$ 는 측정 당시 용존산소 양이다. 배양 system이 평형 상태에 도달하면 유입되는 산소의 용존 속도는 세포의 생육에 의한 산소 소비속도와 같다는 가정이 가능하므로 식(1)로부터 다음과 같이 표시될 수 있다.

$$K_L a = OUR / (C^* - C) \text{ ----- (2)}$$

따라서 식(2)로부터 산소 소비 속도의 측정으로 산소 전달 상수 값을 간접 측정할 수 있다.

세포 배양시 사용되는 배지를 Newtonian 유체로 가정 해 배지의 수직적 이동에 따른 관 형태의 배양조에서의 벽면 전단응력(wall shear stress)에 관한 momentum balance 는 다음과 같이 표시될 수 있다(23).

$$\Delta P \cdot \pi \cdot R = 2 \cdot \pi \cdot \tau \cdot R \cdot L \text{ ----- (3)}$$

여기서  $\Delta P$ 는 배지의 이동에 의한 압력차(dynes /  $cm^2$ )이며,  $R$ 은 배양조 관의 반지름(cm),  $L$ 은 배양조 관의 길이(cm)이고,  $\tau$ 는 벽 전단응력(dynes /  $cm^2$ )이다. 또한 배양조 내에 흐르는 배지의 이동 속도는 일반적으로 극히 느리며 Fig. 1에서 보듯이 end effect를 줄이기 위해 관의 각 귀퉁이 부분을 둥글게해 전체적인 유체의 흐름이 laminer 형태로 흐를수 있으므로 유체 흐름에 의한 압력차는 Hagen-Poiseuille 관계식으로 표시가 가능하므로 (3)과 결합해 전단응력을 계산하면 다음과 같이 표시된다.

$$\tau = \frac{8 \cdot V \cdot \mu}{D} \text{ ----- (4)}$$

여기서  $V$ 는 배지의 이동속도(cm / sec)이고  $D$ 는 배양조의 지름(cm)이며,  $\mu$ 는 배지의 점도로 10(dynes /  $cm^2$ )로 계산했다. 이는 37°C에서 혈청을 포함한 배지 조성 과 세포 체의 물질 생성에 따른 점도의 상승치로 많은 실험에 의해 도출된 결과다(8). 또한 배지의 이동 속도가 극히 느리고 아래서 위로 흐르므로 배지내의 담체 및 내부 구조에 의한 유체의 흐름에 대한 영향이 매우 적어 이같은 관속을 흐르는 배지의 전단 응력은 유체의 이동속도, 점도 및 배양조의 지름의 함수로 표시될 수 있다. 여기서 배지의 점도와 배양조의 내경은 일정하므로, 관 형태 배양조에서 laminar지역에서의 전단응력은 배지의 이동속도로 결정될 수 있다.

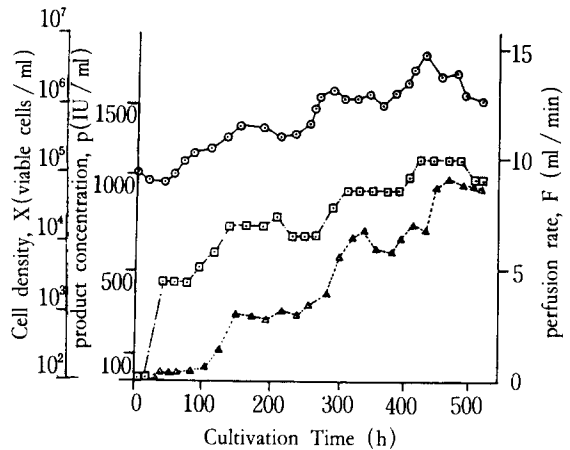
또한 다른 배양 공법에 의해 야기되는 전단응력과 식(4)와 비교하기 위해 교반에 의한 전단응력 생성보다 상대적으로 낮은, 배지의 수평 이동에 의한 parallel 형태의 배양조에서의 발생 전단응력은 다음과 같이 표시가 가능하다(24).

$$\tau = \frac{6 \cdot \mu \cdot Q}{R \cdot H^2} \text{ ----- (5)}$$

여기서  $Q$ 는 배지의 유속( $cm^3 / sec$ )이며,  $H$ 는 배양조의 높이(cm)로 본 실험에서 사용된 수직형 배양조와 비교하고자 같은 dimension으로의 전환을 위해 식(5)의 높이를 반지름으로 대치했다. 이는 일반적으로 parallel 형태 배양조의 규모가 작아 배지가 흐르는 간격인  $H$ 와 전체 접촉 면적인  $R$ 이 서로 근사한 경우가 많기 때문이다.

**결과 및 고찰**

Fig. 2는 Caki-1 세포를 연속 배양 조건에서 배양 시간에 따른 세포 증식과 scu-PA 생산성과의 관계를 나타낸 것으로, 초기의 세포 농도인  $8.5 \times 10^4$ (viable cells / ml)로 부터 최대 세포 수인  $5 \times 10^6$ (viable cells / ml)에 도달하는데 약 420시간 (18일) 정도 소요되는 약간은 느린 생육을 보이고 있다(25). 이는 배지의 이동 속도의 증가가 느리게 진행됐고, 특히 다른 배지 이동 속도에서 보다 8.5ml / min의 속도에서 system이 안정 상태에 도달되는데 많은 시간이 소요됐기 때문이다. 또한 배지 이동 속도의 증가에 따라 세포수와 scu-PA 생산이 증가되고 있지만, 세포 생육이 보다 밀접하게 배지 이동 속도에 영향을 받고 있음이 확인돼, scu-PA 생산이 낮은 전단응



**Fig. 2. Growth characteristics and scu-PA production according to cultivation time under low-shear-perfusion operation for the growth of human Kidney cell. Caki-1: ○ and ———, cell density (cells/ml); △ and ·····, Product concentration (IU/ml); □ and - · - · -, perfusion rate(ml / min).**

력에서는 growth related process이고 전단응력의 증가에 따라 partially growth related process로 전환됨을 암시하고 있다(25). 본 실험의 최대 배지 이동 속도인 10(ml/min) (=0.35 l/h)에서 약 980(IU/ml)의 scu-PA가 생산돼, 같은 세포주를 일반적인 연속 배양시 약 0.020(l/h)의 희석율에서의 생산된 800(IU/ml)보다(25) 또 75 T-flask로 static상태에서 약  $1 \times 10^6$  (viable cells/ml)로부터 3일동안 생산된 850(IU/ml) (data not shown)보다 높은 것을 알 수 있다.

Fig. 3은 Fig. 2로부터 각 배지 이동 속도에 상응하는 세포 수와 식(4)에 의해 계산된 전단응력과 관계를 보여주는 것으로, 배지 이동속도가 증가할수록 세포수도 증가하며, 전단응력도 거의 직선적으로 증가하는데 식(4)에 의해 계산된 전단응력과 식(5)를 이용해 수평 이동에 의해 야기된 전단응력과 비교해 본 결과, 본 실험에 사용된 수직형 배양조가 낮은 전단응력을 갖고 있음이 입증됐다. 또한 본 실험의 최대 배지 이동속도에서의 전단응력이 0.15 (dynes/cm<sup>2</sup>)로서 이는 세포 생육을 저해할 수 있는 전단 응력인 5-7 (dynes/cm<sup>2</sup>) 보다(2) 극히 낮은 수치로 관 형태의 배양조의 장점이 확인됐다. 특히 이같은 수직 형태의 유체 이동은, Fig. 3에서 나타나듯이 수평 이동의 경우보다 낮은 전단응력을 보이며, 실제 대부분의 인체내의 혈액 이동이 심장 운동

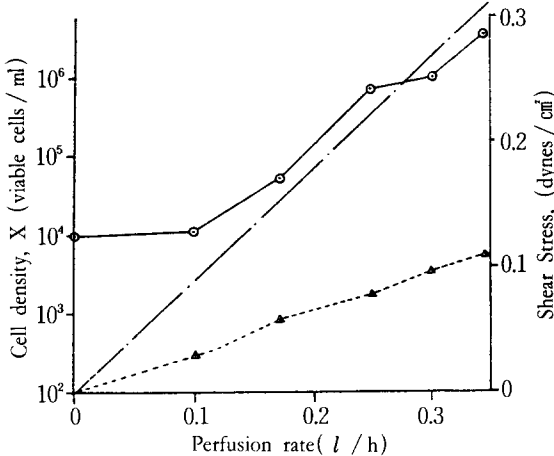


Fig. 3. Cell density and shear stress corressponding to perfusion rate in cultivating Caki-1 cells from Fig. 2: ⊙ and —, cell density(cells/ml); △ and ·····, shear stress from eq. (4) (dynes/cm<sup>2</sup>); - - - - -, estimated shear stress (dynes/cm<sup>2</sup>) from eq. (5) [24].

에 의한 양압(positive pressure)으로 혈관을 따라 수직적으로 움직이므로 관 형태의 배양조가 인체의 혈액 순환 경로와 유사함을 알 수 있다. Fig. 4는 전단응력 증가에 따른 세포 성장과 물질 생산과의 관계를 나타낸 것으로, 전단응력이 증가함에 따라 세포 수도 거의 직선적으로 증가하나 scu-PA의 생산 속도는 약  $4 \times 10^{-3}$  (IU/cells/day)의 최대치를 형성한 후 급격히 감소됐다. 이의 정확한 설명을 위해서는 좀더 좁은 차이의 전단응력 구간에서의 실험이 필요하지만, 이같은 결과는 실험상의 오차를 고려해도 상대적으로 높은 전단응력에서는 세포수의 증가에도 불구하고 물질 생산이 낮아짐을 알 수 있다. 따라서 이같은 세포 배양시 전단 응력 조절을 위한 배지 이동 속도의 최적화가 필요함을 암시한다. 특히 최대 생산속도인  $4 \times 10^{-3}$ (IU/cells/day)는 이와 유사한 세포주에서 생산되는 생산속도인  $7.5 \times 10^{-4}$ (IU/cells/day)와 (19) cytostatic 배양에 의한 연속 배양시의 최대치인  $0.8 \times 10^{-5}$ (IU/cells/day) (17)과 비교해 높은것을 알 수 있다. 따라서 인체내의 혈액 순환에 의해 야기되는 전단응력은 물질 생산을 촉진 시킬 수 있는 정도인 것으로 추측된다. 배양조에 의한 체외 배양시 전단응력이 0인 경우는 사실상 존재하지 않으므로 앞에서 언급

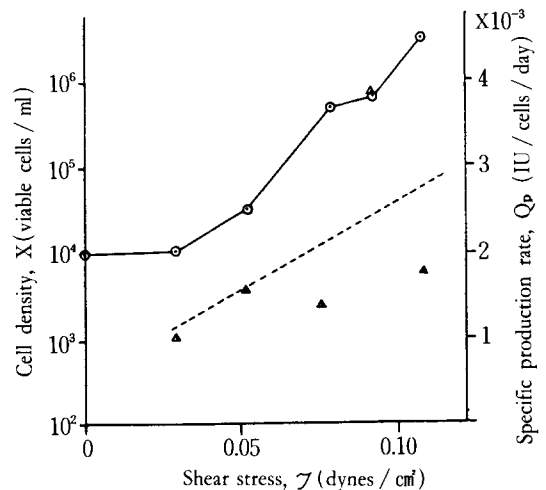


Fig. 4. Relationship between cell growth and scu-PA production rate as a function of shear stress in perfusion cultivation of human kidney cells : ⊙ and —, cell density(viable cells/ml); △ and ·····, specific scu-PA production rate (IU/cells/day).

된 T-flask에서의 결과와 비교해 Fig. 4의 경우가 생산성이 증가했음을 확인할 수 있다.

Fig. 5는 일정한 전단응력하에서 배양 시간에 따른 scu-PA 생산을 검토한 것으로, Fig. 4에서 최대 물질 생산 속도를 보인 0.092(dynes/cm<sup>2</sup>)의 전단응력때의 동력학적 자료다. 배양 초기에는 세포의 성장 및 외부 조건에의 적응때문에 생산 물질 양이 적었으나, 배양시간이 경과함에 따라 생산량이 증가하여 배양후 약 70시간이 지난후에 안정상태에 도달했다. 특히 Fig. 5의 직선에서 전 배양기간 동안 생산된 물질의 평균 생산 속도는 164(IU/ml/h)로 계산됐으며, 이에 근거를 뒤 약 90시간동안 생산된 총 scu-PA의 양은 14760(IU/ml)로 이는 실제 총생산량인 14850(IU/ml)와 근접함을 알 수 있다.

Fig. 6은 본 실험에 사용된 Fig. 1과 같은 tube 형태의 배양조 내의 silicone tube에 의한 산소 전달이 세포 생육의 제한 요인이 되는가를 확인하기 위해 배양조내의 상태가 안정하다고 가정한 식(2)에 의해 산소 전달 상수를 계산해 배양시간에 따라 나타낸 결과로, Fig. 3에서 최대 생산 속도를 보인 8.5ml/min의 배지 이동속도를 유지하며 산소 소비 속도를 측정했다. 배양 시간이 지남에 따라 세포수의 증가에 따른 산소 소비속도의 증가로, 최대 세포농도를 유지했을때인 배양후 약 55

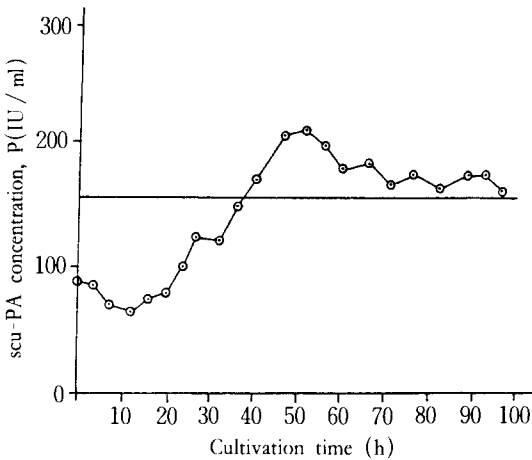


Fig. 5. Kinetics of producing scu-PA from Caki-1 cells as a function of cultivation time at fixed shear stress of 0.092(dynes/cm<sup>2</sup>) and 8.5(ml/min) of perfusion rate. Solid line is the average scu-PA production rate during overall cultivation period.

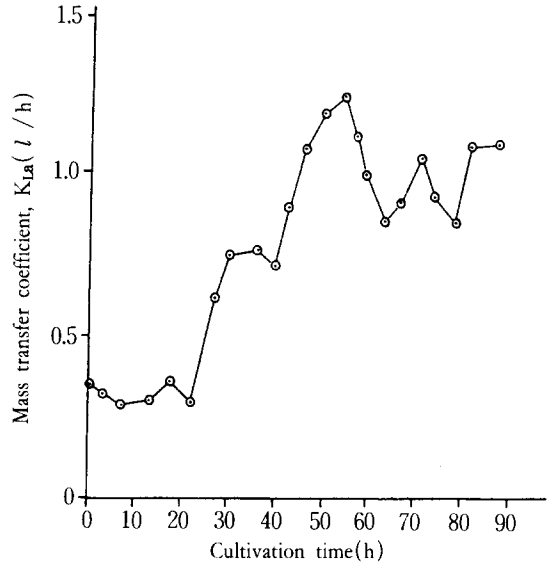


Fig. 6. Change of mass transfer coefficient estimated by oxygen uptake rates according to cultivation time at 8.5(ml/min) of media perfusion rate for 95 hours from the point of starting to perfuse fresh media into the reactor.

시간 경과했을때 산소 전달 상수값이 1.2(1/h)의 최대치를 보인후 평균 약 1.0(1/h)의 일정한 산소전달 상수값을 유지하는 안정상태에 도달했다. 이는 미생물 성장시 요구되는 산소 전달속도 보다는 현격히 낮지만, 일반적인 연속배양에서의 산소 전달상수인 0.8-2.0(1/h) (25)와 비교할때 적지않은 수치로 본 실험에서 사용된 배양조로 동물 세포 배양시 산소전달 제한 현상이 일어나지 않을 것으로 추정된다.

### 결론

극히 낮은 전단응력을 유지할 수 있는 관 형태의 배양조에서 배지 이동 속도에 의한 전단응력 조절로 낮은 전단 응력하에서는 정체 상태나 일반적인 연속배양 조건에서보다 scu-PA 생산성이 향상됨이 확인됐다. 또한 이 배양 system은 인체의 혈액순환 기작과 유사해 전단응력의 미세한 증가에 따라 세포 생육 및 물질 생산이 증가될 수 있을 것이다. 특히 이 배양 공법으로 집착성 세포 배양시 고농도의 세포수는 유지할 수는 없었지만 이 공법에 의한 산소전달 제한요소를 찾을수

는 없었다. 본 실험에 사용된 세포주로부터 매 시간마다 약 164 IU/ml의 suc-PA가 생산되는 배양 시간에 따른 물질 생산의 동력학적 자료를 산출했으며, 이는 대사물질 및 배양 공정의 조절에 의해 물질 생산성을 높일 수 있는 대사공학(metabolic engineering)을 위한 기초 자료를 제공하고 있다. 하지만 본 실험에 사용된 배양조는 단지 배지 이동속도 변화에 의해 세포 성장이 조절되는 단일 조절 system으로, 본 배양기는 구조상 쉽게 세포 분리장치인 filter가 막혀진 공정에 치명적인 영향을 미칠 뿐만 아니라, 이의 손쉬운 교체가 힘들고 배양조의 scale-up에 많은 제약이 따른 문제점들을 보완해야 하며, 고농도 배양이 가능하도록 산소 전달 방법의 개선에 관한 연구가 진행중이다.

## 사 사

본 연구는 90년도 산학협동 재단 연구비의 지원으로 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

## 참 고 문 헌

- N. A. Stathopoulos, and J. Hellums (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1021.
- R. F. Viggers, A. R. Wecheak and L. R. Sauvage (1986), *J. Biomed. Eng.*, **108**, 332.
- C. F. Crouch, H. W. Fowler and R. E. Spier (1985), *J. Chem. Tech. Biotech.*, **35**, 273.
- A. R. Ibrahim, and F. Kargi (1989), *J. Biotech.*, **9**, 167.
- T. C. Dodge, and W. Hu (1986), *Biotech. Lett.*, **8**, 683.
- D. C. Augenstein, A. Sinsky and D. I. C. Wang (1971), *Biotech. Bioeng.*, **13**, 409.
- J., Petersen, L. V. McIntire and E. T. Papoutsakis (1988), *J. Biotech.*, **7**, 229.
- M. S. Croughan, E. S. Sayre and D. I. C. Wang (1989), *Biotech. Bioeng.*, **33**, 862.
- J., Trauper, J. B. Williams, D. Jonstra and J. Valk (1986), *Enz. Microb. Tech.*, **8**, 33.
- M. S. Croughan, J. Hamel and D. I. C. Wang (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 975.
- J. T. Flaberty, J. Pierce and V. J. Ferrans (1972), *Cir. Res.*, **30**, 23.
- M. A. Reidy, and B. L. Langille (1980), *Exp. Mol. Path.*, **32**, 276.
- M. A. Reidy, and S. Schwartz (1981), *Lab. Invest.*, **44**, 301.
- U. S. Ryan, (ed.) (1988), *Endothelial Cells*, CRC Press, FL.
- T. H. Griffith, D. H. Edwards, M. Lewis, A. C. Newby and A. H. Henderson (1984), *Nature*, **308**, 645.
- R. N. Vaishnav, D. J. Patel, H. Atabek, M. Deshpande, F. Plowman and J. Vossoughi (1983), *J. Biomed. Eng.*, **105**, 77.
- J., Kang, S. Choi and H. Y. Lee (1990), *Biotech. Lett.*, **12**, 273.
- J. P., Kalenbach, M. H. Kalenbach and W. Lyons (1958), *Exp. Cell Res.*, **15**, 112.
- T. Y. Tao, M. Bohn, G. Y. Ji, A. Einsele and W. Hu (1987), *J. Biotech.*, **6**, 205.
- H. Y. Lee, (1989), *Kor. J. Biochem. Eng.*, **4**, 36.
- J. E. Bailey, and D. F. Ollis (eds.) (1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill co., N. Y.
- C. W. Robert, and M. J. Astle (eds.) (1982), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 63rd ed., pp. B-126, CRC Press, FL.
- W. L. McCabe, J. C. Smith and P. Harriott (1985), *Unit Operations of Chemical Engineering*, 4th ed., McGraw-Hill co., N. Y.
- J. A. Frangos, S. Eskin, L. V. McIntire and C. L. Ives (1985), *Science*, **227**, 1477.
- H. Y. Lee, (1988), *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 282.

(Received; November 29, 1990, Accepted; December 30, 1990)