

회전하는 산소전달장치가 부착된 동물세포 배양기의 조업 성능에 관한 고찰

김영남 · 전병철¹ · 이진하 · 이현용*
강원대학교 식품공학과, ¹삼일제약 중앙연구소

Performance of a Novel Bioreactor Equipped with Moving Membrane Tube-Aeration System

Kim, Young-Nam, Byung-Cheol Jeon¹, Jin-Ha Lee and Hyeon-Yong Lee*

Department of Food Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Central Research Institute, Samil Pharmaceutical Co., Ansan 425-090, Korea

Abstract— The optimal conditions for operating a moving-aeration bioreactor were determined as 30 rpm and 150 (ml/min) of air flow rate, which can yield ca. 7.3 (l/h) of maximum mass transfer coefficient. It was also found that the agitation speed played much important role than air input rate in oxygen transfer into the medium. 2.6×10^6 (cells/ml) and 0.6 (mg/l) of maximum cell density and IL-2 production were observed in batch cultivation of IL-2 producing BHK cell line. 0.53 (mM/l/h) of oxygen uptake rate was also estimated. The performance of a moving-aeration bioreactor (specific growth rate and oxygen uptake rate, etc.) was superior to other culture systems, such as cell-lift and static membrane aeration bioreactors. It must be useful to apply this reactor to many culture processes by improving structural limitations in scaling-up the system.

동물세포로부터 목적하는 생물 의약품(Bio-pharmaceuticals)의 경제적 생산 및 임상적 응용을 위해 다각적인 연구들이 진행되고 있다. 그 중 목적 단백질의 의약적 특성 및 생산성 향상과 무혈청 배지의 개발 등과 같은 세포 생물학적 접근 뿐만 아니라(1, 2) 효율적인 배양조의 설계 및 새로운 배양 공정들(perfusion system, 산소전달방식 등)의 개발 등과 같은 공학적인 면에서도 상당한 진척이 이루어지고 있다(3, 4). 특히 목적 단백질의 생산성 향상을 위해 고농도 체외 배양이 가능한 다양한 형태의 배양조들이 개발되었으며(5, 6) 이들은 주로 관류 배양(perfusion cultivation)에 의한 배양 장치로서 이같은 배양장치에서 가장 문제가 되는 배지와 세포의 효율적인 분리 및 재순환을 위한 여과장치 부분에 많은 연구가 추진되고 있다(7). 이와 함께 동물세포의 배양장치 개발에 있어 배양조 내에 적은 거품 및 낮은 전단 응력으로서 보다 효율적인 산소전달이 가능한 공정을 개발하고자 하는

노력이 집중되고 있다. 이같은 연구의 결과로 silicone tube, hollow fiber 등을 이용한 membrane aeration 방식이 가장 효과적인 것으로 평가받고 있다(8, 9). 하지만 배양조 내에 silicone tube 등이 부착된 경우는 산소전달 장치가 고정된 frame에 붙어 있어 배양조 내의 균일한 산소전달을 위해 어떤 형태로든지 교반기를 이용해 일정속도 이상으로 교반해야 되며 특히 세포농도가 높을 경우 이에 따른 전단응력의 상승을 야기하는 경우가 많다. 따라서 본 연구에서는 membrane tube가 부착된 frame 자체가 교반하도록 고안해 극히 낮은 전단응력으로도 소기의 산소전달을 이룰 수 있는 배양 장치를 사용해 세포 생육 및 물질 생산 등의 관계를 기존의 배양조에서 배양된 결과들과 비교해 본 배양조의 우수한 성능을 입증하고자 한다.

재료 및 방법

Interleukin-2(IL-2)를 생산할 수 있는 유전자가 재조합된 Baby Hamster Kidney(BHK) 세포주(10)를

Key words: Moving aeration system, novel bioreactor, animal cell culture, oxygen transfer

*Corresponding author

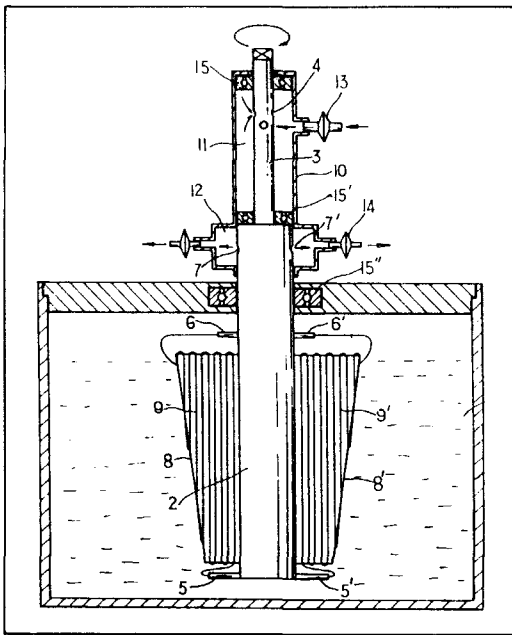


Fig. 1. Diagram of top driven moving-membrane bioreactor.

1. reactor vessel
2. shaft
3. center-empty shaft
4. hole for input air
5. connector to membrane tubing
6. exhaust gas-out connector
7. hole for exhaust gas
8. frame for membrane tubing
9. membrane tubing
10. housing for shaft
11. empty space for gas-in
12. empty space for gas-out
13. 0.2 μ m filter
14. 0.2 μ m filter
15. compact bearing set

DMEM/F12 mixture(1 : 1)에 5% 혈청(FCS, GIBCO)이 보강된 배지(pH 7.1)로 75 cm² T-flask에서 배양후 움직이는 산소전달 장치가 부착된 배양조(Fig. 1, 조업부피 1.5 l)와 cell-lift 방식의 배양조(NBS, USA, 조업부피 1.2 l)에 각각 접종해 배양조의 조업 성능 비교 실험을 수행했다. 이때 3.5(g/l)의 미립담체(microcarrier, Cytodex III)를 넣어 세포를 부착시켰다. Fig. 1에서 공기가 유입되는 회전축은 top drive motor로 교반시키며 축과 housing의 연결 부위는 compact bearing 등을 사용해 공기의 출입을 완전히 차단했다. 배양조의 온도는 water jacket을 사용해 항상

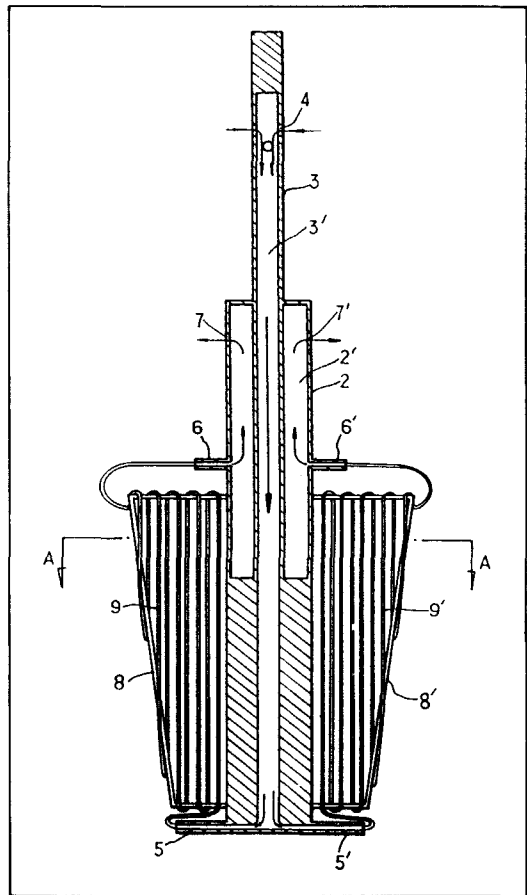


Fig. 2. Detail diagram of moving-membrane shaft in Fig. 1.

1. top driven shaft
2. empty hole for exhaust gas
3. empty hole for input gas
4. hole for gas-in
5. connector to tubing (gas-in)
6. connector to tubing (gas-out)
7. hole for gas-out
8. frame for holding membrane
9. poly propylene tubing

37°C로 유지했으며 배양조 내 pH, D.O., rpm 등은 각각 해당 probe를 사용해 일정시간마다 자동 측정해 기록되도록 했다.

Fig. 2는 배양조 내 회전되는 공기 유입 장치의 도식도로서 4번(m/reactor volume)의 poly propylene membrane tube(I.D. 1.8 mm, wall thickness 0.4 mm, Enka, Germany)를 중심의 회전축에 부착된 316 stainless steel frame에 감아 aeration membrane이

중심 축과 같이 회전해 통기 및 교반 효과를 동시에 얻도록 했다. 유입되는 공기(Fig. 2의 4번 부분)는 회전 축의 중심부로 들어와 끝부분에 연결된 silicone tube로 나와(5번) 배양조 내의 배지로 산소가 전달되며 세포 생육시 방출되는 이산화탄소는 중심 축의 상부(6번)로 나와 방출구(7번)를 통해 외부로 나오게 설계됐다.

개발된 배양조의 산소전달 효율성을 측정하기 위해 산소전달계수($K_L a$)를 다음과 같은 방법으로 측정했다. 우선 증류수를 배양조에 넣은 후 1시간 동안 압축 질소를 유입시켜 액체내 용존 산소를 완전히 제거한 후 일정속도로 공기를 유입시키며 용존 산소 측정기(Ingold electrode, USA)를 이용해 한 시간 간격으로 증가되는 용존 산소(C_t)양을 측정했다. 측정된 용존 산소는 다음식을 사용해 산소전달계수를 계산했다 (11).

$$\frac{dC_t}{dt} = K_L a(C^* - C_t) \quad (1)$$

여기서 C^* 는 포화 상태의 산소농도(mg/l)다.

또한 생육에 따른 산소소비속도(oxygen uptake rate, OUR)는 0.22 μm filter로 여과된 공기를 공급하며 배양조 밖으로 나오는 gas에 존재하는 산소의 양을 chemical microsensor가 부착된 mini-Clark type oxygen electrode(732-C Diamond General, MI, USA)로 측정해 다음 물질 수지식을 이용해 계산했다.

$$\text{OUR} = \frac{(P_i - P_o) \times K \times Q}{V} \quad (2)$$

여기서 P_i 와 P_o 는 부착된 산소 전극으로 측정된 배

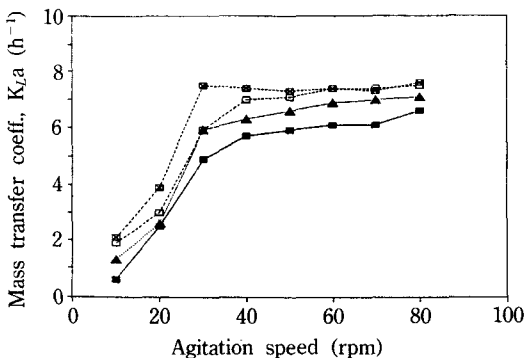


Fig. 3. The effect of agitation speed on mass transfer coefficient according to several different aeration rates. —■— 25 (ml/min), ...▲... 50 (ml/min), --□-- 100 (ml/min), --⊠-- 200 (ml/min)

양조의 유입 및 방출되는 기체내 존재하는 산소의 분압이며 (mmHg), K 는 37°C 전해질 용액에서의 산소의 용해도로서 1.19×10^3 pmole/ml/mmHg(12)이고 V 는 배양조의 부피(l)다. Q 는 배양조로 유입되는 기체의 유속으로(ml/h) 배양조 밖으로 나오는 속도와 일정하다고 가정했다.

회분 배양시 세포 생육은 0.1% cristal violet을 처리해 hemacytometer를 사용해 nuclei count법으로 배일 전체 세포수를 측정했으며 이때 배지내 생산된 목적 물질인 IL-2는 ELISA kit(Genzyme, USA)를 사용해 정량했다.

결과 및 고찰

Fig. 3과 4는 산소전달에 가장 영향을 미치는 변수들인 공기 유입속도와 aeration membrane의 교반속도의 최적 조건을 결정하기 위해 여러 조건에서 식 (1)을 사용해 측정된 산소전달 상수값을 plot한 결과다. Fig. 3은 각각 다른 공기 유입속도에서 교반속도의 변화에 산소전달계수를 측정된 것으로 Fig. 4와 비교해 교반속도가 공기 유입속도의 변화에 비해 보다 민감하게 산소전달에 영향을 주고 있음을 알 수 있다. 이같은 결과들로서 본 장치를 이용해 배양시 150 (ml/min)의 속도로 공기를 유입시키며 30 rpm을 유지하는 경우가 산소전달효과가 가장 우수한 것으로 평가됐다. 또한 공기 유입속도보다는 membrane의 회전속도가 보다 직접적인 영향이 있음이 확인됐다. 하지만 본 장치의 구조 특성상 기존의 배양조와 같은 빠른 교반속도(100 rpm 이상)에서는 membrane의 저

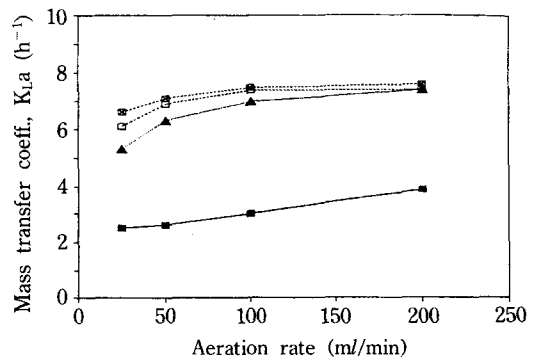


Fig. 4. The effect of aeration rate on mass transfer coefficient according to several different agitation speeds. —■— 20 (rpm), ...▲... 40 (rpm), --□-- 60 (rpm), --⊠-- 80 (rpm)

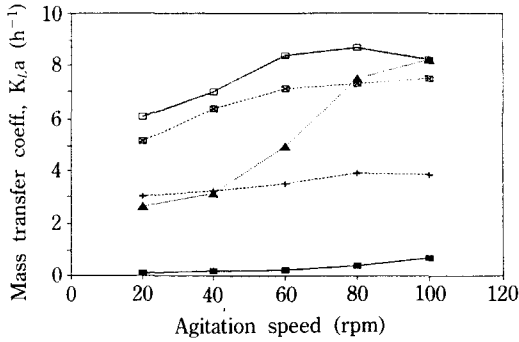


Fig. 5. Comparison of aeration methods in oxygen transfer rate for different agitation speed at 150 (ml/min) of aeration rate.
 —■— Surface, ...▲... Sparging, --×-- Cell-lift, --□-- Static tubing, ...□... Moving aeration

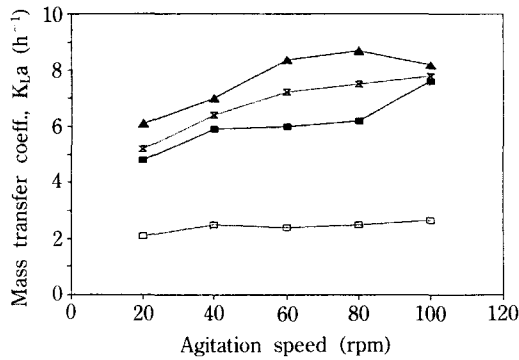


Fig. 6. The effect of 5% (v/v) serum on mass transfer rate in moving and static aeration systems.
 —■— Moving with 5% FBS, ...□... Static with 5% FBS, —▲— Moving with D.W., ...○... Static with D.W.

항에 따른 균일한 교반이 어려우며 이에 따른 세포의 damage가 클 것으로 판단되었다.

Fig. 5는 moving aeration에 의한 산소전달효과를 비교하기 위해 유사한 공기 유입속도(150~200 ml/min)에서 기타 다른 통기 방법에 따른 산소전달상수 자료(8)와 비교한 결과다. 여기서 교반 방법이 서로 다른 경우 같은 교반속도에서도 상이한 전달능력을 나타낼 수 있으나 각기 다른 통기 방법에 따른 산소 전달계수의 수치가 현격히 차이가 나 전체적인 경향의 비교에 문제가 없으므로 각 통기 방법시 교반속도의 변화에 따른 산소전달계수를 비교했다. 전반적으로 낮은 교반속도에서는 aeration membrane이 움직이며 통기하는 것이 매우 효과적임을 알 수 있다. 또한 그 상승효과가 큰 반면 세포 생육에 영향을 줄 수 있는 높은 교반속도(80 rpm 이상)(13)에서는 sparging 혹은

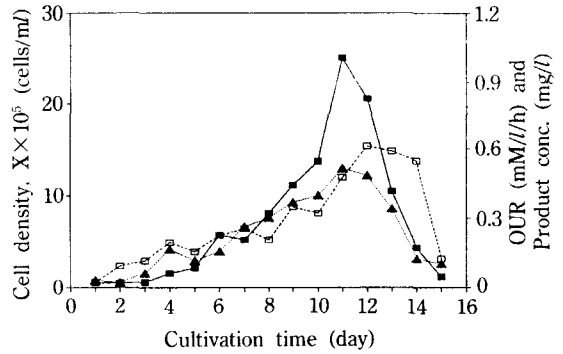


Fig. 7. Kinetics of cell growth, IL-2 production and oxygen uptake according to cultivation time in a moving membrane bioreactor for the batch cultivation of BHK cells (30 rpm of agitation speed and 150 ml/min of aeration rate).
 —■— Cell density, ...▲... OUR, --▲-- IL-2 conc.

aeration membrane이 고정된 경우와 큰 차이가 없었다. 또한 표면 통기 방식에서 가장 낮은 산소전달이 이루어졌으며, static membrane aeration 방식과는 달리 membrane이 움직이는 경우는 sparging에 의한 통기와 마찬가지로 교반속도의 증가에 따라 민감하게 나타났다. 또한 Fig. 6은 같은 membrane aeration시 움직이는 경우와 정지된 상태(8)에서 배지의 종류에 따른 산소전달효과를 비교한 것이다. 고정된 membrane에 의한 통기의 경우 순수 물의 경우와 5% 혈청이 포함됐을 때 산소전달이 현격한 차이를 보인 반면 움직이는 membrane 통기의 경우는 배지의 조성에 그리 크게 영향을 받지 않았으며 약 2배 이상 보다 높은 산소전달상수 값을 나타냈다.

Fig. 7은 Fig. 1의 배양장치를 이용해 회분배양시 세포생육 및 물질생산과 산소소비속도를 배양시간에 따라 나타낸 동력학적 자료다. 1.1×10^4 total cells/ml의 농도로 접종해 약 3일간의 휴지기를 지난후 배양후 11일째 가장 높은 세포수를 유지했으며 13일 후는 급속히 감소했다. 배양조에 유입된 산소도 이와 유사한 형태로 소비됐으나, IL-2는 배양 후반기도 생산이 지속되는 전형적인 생산 곡선을 나타냈다. 이 같은 결과를 근거로 세포 농도에 따른 산소소비속도와 물질 생산과의 관계를 나타낸 것이 Fig. 8로서, 균체 농도와 산소소비속도의 관계를 직선 회귀 분석 결과 (linear regression analysis)(Fig. 8의 직선), correlation factor가 0.71로서 세포 생육과 어느 정도 밀접한 관계를 갖고 있음이 확인됐다. 하지만 IL-2의 생산은 그리 강한 상관관계를 갖고 있는것 같이 보이지는

않았다.

따라서 실제 배양시 배양조의 조업 성능을 비교하기 위해 현재 범용되고 있는 배양조의 하나인 cell-lift 방식과 통기 막 전체가 움직이는 배양조에 의한 배양시 산소의 비소비속도 및 IL-2의 비생산성을 비교한

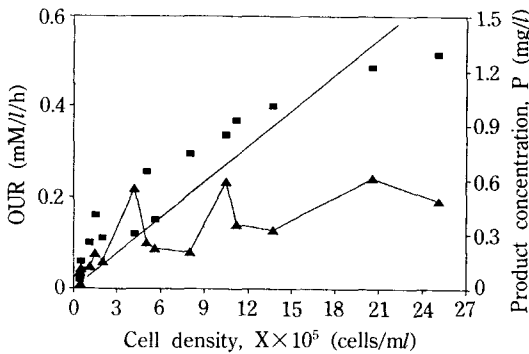


Fig. 8. The correlation among cell growth, oxygen uptake rate and IL-2 production in cultivating BHK cells by a moving membrane bioreactor. Solid line is the result of linear regression analysis. ■ OUR, -▲- IL-2 conc.

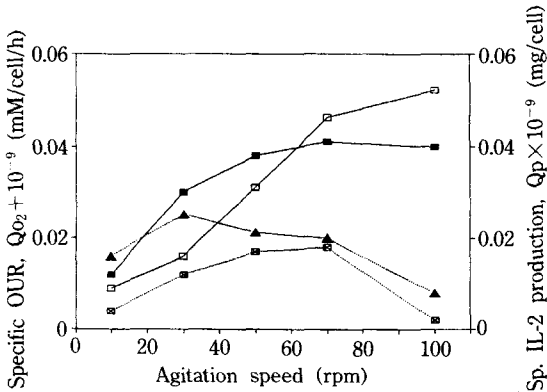


Fig. 9. Comparison of specific oxygen uptake rate and specific IL-2 production for two different aeration systems as a function of agitation speed. -■- Q_{o2}-moving aeration, ...▲... Q_p-moving aeration, -□- Q_{o2}-Cell-lift, ...□... Q_p-Cell-lift

것이 Fig. 9이다. 빠른 교반속도(70 rpm 이상)에서는 cell-lift 방식이 보다 높은 산소소비속도를 보인 반면 낮은 생산성을 유지했다. 전반적으로 느린 교반속도에서는 통기막이 움직이며 교반하는 경우가 높은 산소소비속도 및 물질 생산성을 나타내 세포의 damage가 적으며 산소전달효과가 우수한 것으로 판명됐다. BHK 세포주를 상기 배양조들을 이용해 얻어진 배양 변수들(Fig. 8)과 세포주는 다르지만 상대적 비교를 위해 통기막이 고정된 배양조에서 HepG2 세포주를 배양한 결과와 비교한 것이 Table 1로서 cell-lift 배양조의 경우가 가장 높은 세포수를 유지했으나 산소소비속도 및 생육속도는 통기막이 움직이는 경우가 가장 좋았으며 전반적인 조업성능도 가장 우수한 것으로 평가됐다.

결론

통기막이 움직이며 산소전달 및 교반이 이루어지는 배양조에서 150(ml/min)의 통기속도와 30 rpm의 교반속도에서 약 7.3(1/h)의 최대 산소전달 계수값을 얻을 수 있었다. 이같은 배양 장치에서의 산소전달은 통기속도 보다는 통기막의 교반속도가 보다 직접적인 영향이 있음이 확인됐다. 5% 혈청을 첨가한 배지에서 기존의 막 통기 방식인 static membrane aeration 과 비교해 약 2.5배 이상 높은 산소전달효과를 나타냈다. 이 배양 장치를 이용해 IL-2의 생산이 가능한 BHK 세포주를 회분 배양한 경우 각각 2.6×10⁶(cells/ml)와 0.6(mg/l)의 최대 세포수 및 IL-2의 최대 농도를 얻었으며 0.53(mM/l/h)의 산소소비속도를 유지했다. 또한 상용되는 배양 형태인 cell-lift 방식과 고정된 통기막에 의한 배양조들과의 조업 성능을 비교한 경우 세포의 생육 및 산소전달속도 등이 가장 우수한 것으로 나타나, scale-up에 따른 구조적인 문제점을 해결하면 aeration membrane이 움직이는 배양조의 적용 가능성이 매우 높을 것이다.

Table 1. Comparison of growth parameters for three different aeration systems in batch cultivation of BHK and HepG2 cells

Aeration	Max. cell density (cells/ml)	Product conc. (mg/l)	Sp. growth rate (1/h)	Cultivation time (h)	Ref.
Cell-lift	4.0×10 ⁶	1.0	0.025	400	This work
Moving aeration	2.6×10 ⁶	0.6	0.026	360	∕
Static aeration	3.8×10 ⁶	-	0.018	250	(8)

사 사

본 연구는 산학 협동 재단과 비전과학(주)의 지원으로 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

참고문헌

1. Asselbergs, F.A.M. 1992. Transformation of Bowes melanoma cells with SV40 T antigen. *J. Biotechnol.* **26**: 301-313.
2. Bader, A., I.H. Rinkes, E. Closs, C.M. Ryan, M. Toner, J.M. Cunnigham, R.G. Tompkins and M.L. Yarmush. 1992. A stable long term hepatocyte culture system for studies of physiologic process. **8**: 219-225.
3. Applegate, M.A. and G. Stephanopoulos. 1992. Development of a single pass ceramic matrix bioreactor for large scale mammalian cell culture. *Biotechnol Bioeng.* **40**: 1056-1068.
4. Schurch, U., S.J. Cryz and A.B. Lang. 1992. Scale-up and optimization of culture conditions of a human heterohybridoma producing serotype-specific antibodies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 446-450.
5. Lehman, J., J. Vorlop and H. Buntmyer. 1988. Bubble free reactors and their development for continuous culture with cell recycle. *Animal cell Biotechnology*. R.E. Spier and J.B. Griffiths (eds.) Pp. 221-237. Academic Press.
6. Tharakan, J.P. and P.C. Chau. 1986. Operation and pressure distribution of immobilized cell hollow fiber reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 1064-1071.
7. Smith, C.G., J.M. Cuillaume, P.F. Greenfield and D.H. Randerson. 1991. Experience in scale-up of homogeneous perfusion culture for hybridoma. **6**: 213-219.
8. Jung, H.C. and J.H. Kim. 1992. Oxygen transfer in animal cell culture by using a silicone tube as an oxygenator. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 445-450.
9. Velez, D., L. Miller and J.D. McMillan. 1988. Use of tangential flow filtration in perfusion propagation of hybridoma cells for production of monoclonal antibodies. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 938-940.
10. Contradt, H.S., M. Nimtz, K.E.J. Dittmar and H. Hauser. 1989. Expression of human interleukin-2 in recombinant baby hamster kidney, Ltk⁻. *J. Biol. Chem.* **264**: 17368-17373.
11. Bailey, J. and D. Ollis. (eds.). 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. Pp. 457-532. McGraw-Hill. N.Y.
12. Schump, A., I. Adler and W.D. Deckwer. 1978. Solubility of oxygen electrolyte solution. *Biotechnol. Bioeng.* **20**: 145-153.
13. Thilly, W.G. (eds.). 1986. *Mammalian Cell Technology*. Pp. 167-198. Butterworths. Boston.

(Received May 21, 1993)