

## 회전식 여과기를 이용한 고농도 동물세포배양의 수학적 해석

박 홍 우  
한양대학교 화학공학과

### Mathematical Analysis of a High Density Animal Cell Culture with a Spin-Filter

Hong-Woo Park

Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

#### ABSTRACT

Spin-filters are used as cell separation devices for achieving high cell density and high productivity in animal cell culture. We have proposed a model for the cell growth in a spin-filter perfusion culture and examined the effects on cell growth by several parameters including ammonia inhibition, specific growth rate, specific feeding rate, and cell retention. Results from computer simulation and sensitivity analysis indicate that the cell retention affects the cell growth mostly while there is a significant inhibition on cell growth by the ammonia accumulated during the culture. The specific feeding rate has minimal effects on cell growth, which is consistent with the fact that the cell growth with a step feeding is quite similar to that with a continuous feeding.

#### 서 론

동물세포배양은 유전자 조작방법을 이용한 여러 종류의 기능성단백질의 생산에 이용되어왔는데 그 예들은 성장호르몬, 인터페론, 혈전용해제, 백신 및 단세포항체 등이다. 동물세포는 박테리아나 효모에 비하여 성장속도가 느리고 배양하는데 비용이 많이 드나 박테리아나 효모에서 잘 이루어지지 않는 post-translational modification, 즉 proteolytic cleavage, glycosylation, methylation, phosphorylation 과 acylation이 가능하다. 동물세포로부터 유도되는 많은 단백질들은 이러한 반응 후에만 올바른 활성을 가지므로 동물세포배양은 고가의 기능성 단백질의 제조에 계속 이용될 전망이다.

동물세포배양이 산업적으로 더욱 이용되기 위하여는 값싸고 생산성이 높은 배양기법이 필요하다. 동

물세포는 성장속도가 느리고 멸균상태를 유지하는데 어려움이 있으며 세포벽이 없어 주위의 전단변형에 크게 영향받아 배양시 교반 및 aeration에 주의가 필요하다[1]. 또, 동물세포배양은 일반적으로 혈청 사용을 요구하는데, 혈청비용은 전체 배양비용에 큰 비중을 차지하며 따라서 배지의 효율적 사용이 필요하다.

동물세포의 perfusion 배양은 성장저해물질인 암모니아, 젖산과 같은 노폐물의 농도를 낮게 유지시켜 세포가 높은 농도로 자랄 수 있게 한다[2, 3]. Perfusion 배양시 회전막(spinner)을 이용하면 세포를 효과적으로 유지시킬 수 있는데 회전막은 배양기 내에 설치가 용이하고 또 scale-up이 가능하다[4, 5]. 회전막의 회전으로 높은 세포농도와 배지 교환속도에서도 막의 막힘을 최소화하며 따라서 배양기의 생산성을 높일 수 있다[6]. Thayer 등은 동물

세포의 현탁배양에 회전막의 이용을 처음 제안하였고 그 후 여러 연구자들은 이 배양기법을 계속 발전시켜 연속배양시  $10^7$  cells/ml의 세포농도를 얻을 수 있음이 보고되었다[4, 7, 8]. 또 micro-carrier를 이용한 Chinese hamster overy(CHO)세포의 배양에서도 회전막의 이용으로  $6 \times 10^7$  cells/ml의 세포농도를 얻었음이 보고되었다[9].

회전막을 이용한 perfusion 배양의 scale-up과 배양조건의 최적화를 위하여 배지공급속도, 세포유치율과 같은 인자들이 배양기 내의 세포 성장에 미치는 영향을 조사하는 것이 필요하다. 이때 세포유치율이라 함은 배양기 내의 세포농도와 여과기 내의 세포농도차를 배양기 내의 세포농도로 나눈 값을 칭한다. Perfusion 배양에 대한 수학적 해석은 Wilke 등의 rotor fermentor에 대해 이론적인 해석[10]과 Lee 등의 동물세포의 perfusion배양에 대한 modeling 등이 있으나[11, 12] 이들의 논문의 해석은 회전막을 이용한 perfusion 배양에 직접 적용할 수는 없다.

본 논문에서는 hybridoma의 현탁배양에서 노폐물인 암모니아가 세포 성장에 미치는 영향을 고려하여 배지공급속도, 세포유치율과 같은 운전변수와 배양기 내의 세포농도의 증가와의 관계를 modeling하였고 이를 전산모사(computer simulation) 하였다. 또, 배지를 세포농도의 변화에 따라 연속적으로 변화시키는 연속공급방식과 일정시간 같은 속도를 유지하며 단계별로 공급하는 계단식 공급방식이 세포 성장에 끼치는 영향을 조사하였다. 그리고, 배지공급속도, 세포유치율과 같은 운전변수들이 세포농도의 변화에 얼마만큼 영향을 미치는가를 알아보기 위해 sensitivity analysis를 하여 주요 인자들의 영향의 정도를 조사하였다.

### 이론 및 방법

#### 세포 성장 모델

회전막을 이용한 perfusion배양기의 도식은 Fig. 1에 보인다. 배지통으로부터 배지는 F의 속도로 배양기에 공급되고, 사용된 배지는 여과기 안으로부터 같은 속도로 수확통으로 보내진다. 배지교환시 세포는 여과기에 의해 대부분 배양기 안에 유치되고 일부는 밖으로 유출된다. 배양시 세포농도를 결정하는 인자들에 대한 영향을 조사하기 위해 먼저 세포농도에 대한 물질수지식을 세웠다.

배양기 내의 세포농도에 대한 수지식은

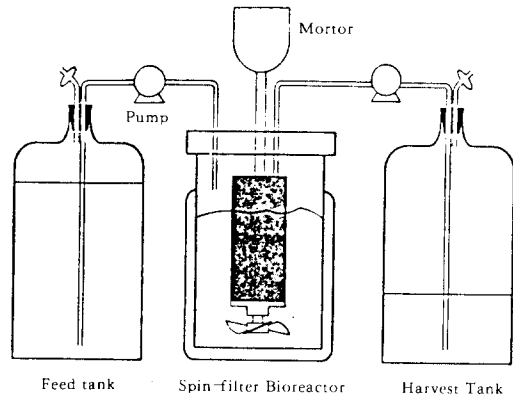


Fig 1. Schematic of continuous perfusion culture with a spin-filter.

$$V \frac{dX_i}{dt} = FX_i - FX_s + \mu X_i V \tag{1}$$

과 같이 표현되고, 여기서 V는 여과기가 차지하는 부피를 제외한 배양기의 부피,  $X_i$ 는 배양기 내의 세포농도, F는 배지공급속도,  $X_s$ 는 공급되는 배지 속의 세포농도,  $X_s$ 는 회전막 안의 세포농도,  $\mu$ 는 비증식속도이다. 멸균배지의 공급시  $X_s$ 는 0이 되고 식(1)의 양변을 V로 나누면 아래와 같이 된다.

$$\begin{aligned} \frac{dX_i}{dt} &= \frac{F}{V} X_s + \mu X_i \\ &= -DX_s + \mu X_i \end{aligned} \tag{2}$$

여기서 D는 dilution rate이고 F/V로 정의된다.

식(1)에서 우리의 관심사인 시간에 따른 배양기 내의 세포농도( $X_i$ )를 계산하기 위하여는 배지공급속도(F), 회전막 안의 세포농도( $X_s$ ), 비증식속도( $\mu$ )에 대한 독립적인 표현식이 필요하다. 배지공급속도의 경우 세포가 계속 성장할 수 있도록 세포농도에 비례하여 증가시켜야 하는데 그 표현식은 다음과 같이 된다.

$$F = \delta X_i V \tag{3}$$

여기서  $\delta$ 는 단위세포당 배지공급속도이며 비배지공급속도(specific feed rate)라 정의한다. 위 식의 양변을 V로 나누어 정리하면

$$\frac{F}{V} = D = \delta X_i \tag{4}$$

이 되며 즉, 배양기의 dilution rate는 세포농도와 비

배지공급속도의 곱에 비례함을 보인다.

회전막 안의 세포농도( $X_s$ )의 경우는 여과막 주위의 유체유동이 일정할 경우 배양기 안의 세포농도( $X_r$ )에 비례하게 되는데, 회전막 안의 세포농도의 표현식은 아래와 같다.

$$X_s = aX_r \quad (5)$$

여기서  $a$ 는 세포유출률로 그 값은 '1-세포유출율'과 같으며 그 값은 막 구멍크기(pore size) 및 주위의 유체 움직임에 의해 결정된다.

식 (5)를 식 (2)에 대입하면, 배양기 내의 세포농도의 변화에 대한 표현식은

$$\frac{dX_r}{dt} = (\mu - aD)X_r \quad (6)$$

이고 세포농도를 결정하는 인자는 비증식속도, dilution rate, 그리고 세포유출율 혹은 세포유출률임을 안다.

비증식속도( $\mu$ )의 표현식은 hybridoma가 혈청이 포함된 배지에서 성장할 때에 암모니아의 성장 억제를 고려한 것을 이용하였다. 동물세포배양에서 노폐물인 암모니아, 젖산 등에 의해 세포 성장이 저해됨이 알려졌는데[13-16] 특히 hybridoma의 배양에 있어서는 암모니아가 주된 세포 성장의 억제요소임이 알려졌다[13]. 성장 억제 인자로서의 암모니아를 고려한 실험식은[13] 아래와 같다.

$$\mu = \frac{\mu_m Se}{(K_{Se} + Se)\left(1 + \frac{A}{K_i}\right)} = \frac{\mu_m Se}{(K_{Se} + Se)\left(1 + \frac{A^2}{K_A}\right)} \quad (7)$$

여기서  $\mu_m$ 는 최대비증식속도,  $Se$ 는 혈청의 농도,  $K_{Se}$ 는 혈청의 Monod 상수,  $A$ 는 암모니아의 농도,  $K_i$ 는 암모니아의 억제상수이다. Glacken 등은 실험을 통해  $K_i$ 가 암모니아의 농도에 반비례함을 알아내고  $K_i = K_A/A$ 로 치환하였는데, 이때  $K_A$ 는 새로운 암모니아의 억제상수이다[13].

본 논문에서는 비증식속도가 혈청에 영향받지 않도록 혈청을 많이 공급한다고 가정을 하고 식 (7)을 다음과 같이 변화하였다.

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{\left(1 + \frac{A^2}{K_A}\right)} \quad (8)$$

식 (8)을 사용하기 위하여는 배양 중의 암모니아의

농도를 알아야 하므로 배지 내의 암모니아에 대한 수지식을 세웠다.

$$V \frac{dA}{dt} = -FA + kGV + q_A X_r V \quad (9)$$

여기서  $A$ 는 암모니아의 농도이고  $k$ 는 글루타민이 37°C에서 자발적으로 분해되는 분해속도상수[17],  $G$ 는 배양기 내의 글루타민의 농도,  $q_A$ 는 세포 성장 시 대사물질로 생성되는 암모니아의 비생산속도이다. 양변을  $V$ 로 나누고  $V/F$ 를  $D$ 로 바꾸어 주면,

$$\frac{dA}{dt} = -DA + kG + q_A X_r \quad (10)$$

가 된다.

위 식 (10)을 풀기 위해서는 글루타민의 농도를 알아야 하므로 글루타민에 대한 물질수지식은

$$V \frac{dG}{dt} = FG_i - FG - kGV - q_G X_r V \quad (11)$$

이 되는데, 여기서  $G_i$ 는 공급하는 배지의 글루타민 농도이고  $q_G$ 는 비글루타민 소비속도이다. 위의 식 (11)을  $V$ 로 나누고 정리하면,

$$\frac{dG}{dt} = DG_i - DG - kG - q_G X_r \quad (12)$$

가 된다.

시간에 따른 세포농도의 값은 식 (4), (6), (8), (10), (12)의 연립 미분방정식을 Runge-Kutta 4차 방법으로 적분하여 구하였다. 또 세포 성장속도가 암모니아의 영향을 받지 않아 일정하다고 가정할 경우와 비교해 보았는데 이 경우 비증식속도가 일정하다고 가정하고 식 (4), (6)를 Runge-Kutta 4차 방법으로 적분하였다. 본 논문에서 사용한 상수들의 값은 Table 1에 나타내었는데, 이 값들은 실제배양 공정에서 얻은 실험값들이다.

세포농도의 계산시 세포유출율이 세포농도변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포유출율을 90%, 80%, 70%, 60%, 50%로 바꾸어 가며 전산모사하였고, 또 배지공급속도가 세포농도변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 비배지공급속도를  $0.3 \times 10^{-6}$ ,  $0.25 \times 10^{-6}$ ,  $0.2 \times 10^{-6}$ ,  $0.15 \times 10^{-6}$ ,  $0.125 \times 10^{-6}$  ml/cell · day로 바꾸어 가며 전산모사하였다.

지금까지는 배지공급속도를 세포농도에 비례하게 연속적으로 공급할 경우를 살펴 보았는데 실제공정에서 배지공급속도를 연속적으로 변화시키는 것은

Table 1. Values of the cell growth kinetic parameters.

Parameter	Range	Used Value	Reference
Maximum specific growth rate, $\mu_m(\text{day}^{-1})$	0.72~1.4328	1.0	13,20
Specific ammonium production rate, $q_A(\text{mmol}/\text{cell} \cdot \text{day})$	$0.768 \times 10^{-9} \sim 1.752 \times 10^{-9}$	$1.20 \times 10^{-9}$	13, 16
Specific glutamine uptake rate, $q_G(\text{mmol}/\text{cell} \cdot \text{day})$	$0.97 \times 10^{-9} \sim 2.184 \times 10^{-9}$	$1.68 \times 10^{-9}$	13, 16
Inhibition constant for ammonium, $K_A(\text{mM}^2)$	$26 \pm 2.3$	26	13
Glutamine concentration in feed, $G(\text{mM})$	1~5	5	13
First-order spontaneous decomposition rate of glutamine, $k(\text{day}^{-1})$	0.1152	0.1152	17

세포농도의 연속적인 측정을 요구하므로 매우 어렵다. 따라서 배지공급속도를 현재 측정된 세포농도를 기준으로 앞으로 일정시간 동안 성장할 세포농도를 예측하여 그 기간 동안 정속공급하는 것은 유용한 대안이다. 본 논문에서는 매 12시간마다 배지공급속도를 변화시켰을 경우에 대하여 조사하였는데, 12시간 동안 세포농도변화를 예측한 후 12시간 동안의 평균세포농도( $X_{r, \text{ave}}$ )를 구하여 식 (3)에서와 같이 배지공급속도를 아래의 표현식으로 구하였다. 이의 자세한 과정은 부록에 있으며 배지공급속도는 아래와 같이 결정되는데,

$$F = \delta X_{r, \text{ave}} V \quad (13)$$

$$D = \delta X_{r, \text{ave}} \quad (14)$$

즉 배지공급속도는 평균세포농도에 비례하여 12시간 동안 일정하게 공급한다.

계단변화시키며 배지공급한 경우 세포농도변화를 구하기 위하여 먼저 부록의 방법을 사용하여 평균세포농도를 구한 후 식 (14)를 이용하여 D를 구하고, 다음에 식 (6), (8), (10), (12)를 Runge-Kutta 4차 방법을 이용하여 12시간의 세포 성장에 대해 전산모사하였다. 이러한 조작을 최대세포농도에 도달하는 25일까지 반복하였다. 이때 얻어진 계단식 배지공급의 시간에 따른 세포농도를 연속으로 공급한 경우와 비교하였다.

### Sensitivity Analysis

세포농도의 변화에 세포유출률, 배지공급속도, 비증식속도, 비암모니아 소비속도, 글루타민의 자발적인 분해속도상수와 같은 인자들이 세포농도가 변하는데 미치는 영향을 알아보기 위해 sensitivity analysis를 하였는데, sensitivity는 다음과 같이 정의된다[18, 19].

$$S^x = \frac{dlnf}{dlnx} = \frac{x}{f} \frac{df}{dx} \quad (15)$$

여기서  $S^x$ 는 인자  $x$ 에 대한 sensitivity이고,  $x$ 는 인자,  $f$ 는 함수이다.

특정인자의 sensitivity를 먼저 특정 인자( $x$ )에 대해 특정시각의 세포농도( $f$ )는 앞에서 서술한 방법으로 전산모사하여 구한 후 인자  $x$ 의 값을  $\Delta x$ 만큼 증가시켜 다시 전산모사하여 그 시각에서의 세포농도( $f + \Delta f$ )를 구하였다. 이 계산값은 아래의 식을 사용하여 각 인자에 대한 sensitivity를 구하였다.

$$S^x = \frac{x}{f} \frac{\Delta f}{\Delta x} \quad (16)$$

세포농도변화에 대해 인자들의 영향을 알아보기 위해 두 부분에서의 sensitivity를 구했다. 첫째는 세포가 지수적으로 자라는 기간인 배양시작 후 5일에서 인자들의 sensitivity를 구했고, 둘째는 최대세포농도에 이르렀을 때인 배양시작 후 25일에서 sensitivity를 구했다.

### 결과 및 고찰

배양기 내의 세포농도는 시간에 따라서 S자 형태로 증가하며 암모니아의 축적은 세포 성장을 크게 둔화시킨다. Fig. 2에 보는 바와 같이 세포 성장속도는 초기 세포농도가 낮을 경우 암모니아의 성장 저해가 있을 경우와 없을 경우 비슷하나 시간이 지남에 따라서 결국 암모니아 성장 저해는 고려한 경우 심히 둔화됨을 알 수 있다. 결국 얻을 수 있는 최대 세포농도에서 약 2배의 차이를 보이는데, 암모니아의 성장 저해를 고려한 경우의 세포농도는  $2.1 \times 10^7$  cell/ml이고, 고려하지 않은 세포농도는  $4.0 \times 10^7$  cell/ml이다. 위의 결과로부터 고농도 배양시 암모니아의 세포 성장 저하는 배양기 내에 암모니아가 노폐물로서 축적되었기 때문이며 실제 공정에도 이를 완화할 수 있는 배양조건에서 운전하는 것이 필요하다.

세포유출율에 따른 세포농도변화는 배양 후 4일까지 모든 세포유출율에서 세포농도의 차이가 거의 없

었으나, 그 이후 최대세포농도의 90%에 이르는 10 일경까지 세포농도는 큰 차이를 보인다(Fig. 3). 또 사용한 세포유치율 90%, 80%, 70%, 60%, 50%에서 얻은 최대세포농도는  $2.1 \times 10^7$ ,  $1.0 \times 10^7$ ,  $6.8 \times 10^6$ ,  $5.0 \times 10^6$ ,  $4.0 \times 10^6$  cell/ml이다. 특히 세포유치율이 80% 이상일 때 최대세포농도가 급격히 증가하는데 이는 최대세포농도가 세포유출률(=1-세포유치율)에 반비례하기 때문이다. 즉 최대세포농도는 세포유치율에 매우 영향을 받음을 알 수 있고  $10^7$  cell/ml의 세포농도를 얻기 위해서는 세포유치율이 80% 이상이어야 함을 보인다.

배지의 비공급속도가  $0.30 \times 10^{-6}$ ,  $0.25 \times 10^{-6}$ ,  $0.20 \times 10^{-6}$ ,  $0.15 \times 10^{-6}$ ,  $0.125 \times 10^{-6}$  ml/cell · day 인 경우 세포농도변화를 시간에 따라 Fig. 4에 나타내었다. 각 공급속도의 경우 얻은 최대세포농도는 거의 차이가 없는데, 이것은 배지의 비공급속도가 클 경우 세포유출이 심해지는 반면 암모니아의 농도가 낮아져 비증식속도가 크기 때문이고, 비공급속도가 작을 경우 세포유출이 작은 반면 암모니아의 농도가 높아져 비증식속도가 작아지기 때문이다. 따라서 세포유출과 비증식속도의 증감이 서로 상충되어

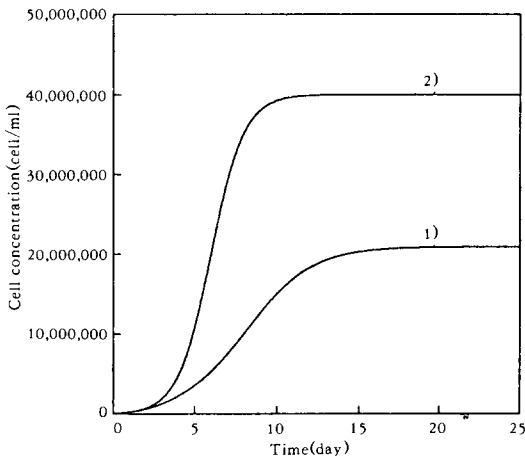


Fig 2. Cell growth with or without ammonia inhibition. The used values for the simulations are: initial cell concentration ( $X_0$ ) =  $10^5$  cell/ml, maximum specific growth rate ( $\mu_m$ ) =  $1.0 \text{ day}^{-1}$  and specific feed rate ( $\delta$ ) =  $0.25 \times 10^{-6}$  ml/cell · day. Line 1 indicates the cell growth with ammonia inhibition and line 2 indicates the cell growth with no ammonia inhibition.

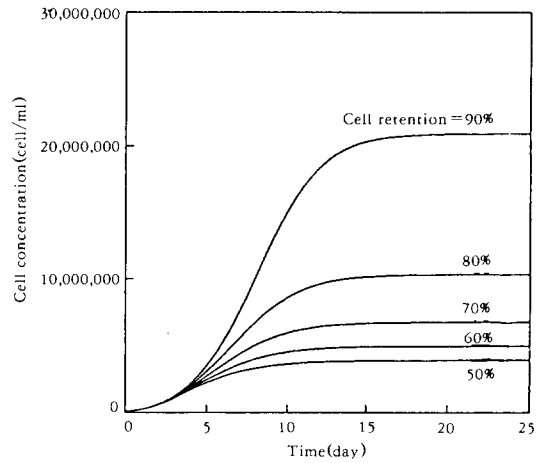


Fig 3. Cell growth at various cell retentions. The values used for the simulations are: initial cell concentration ( $X_0$ ) =  $10^5$  cell/ml, maximum specific growth rate ( $\mu_m$ ) =  $1.0 \text{ day}^{-1}$  and specific feed rate ( $\delta$ ) =  $0.25 \times 10^{-6}$  ml/cell · day.

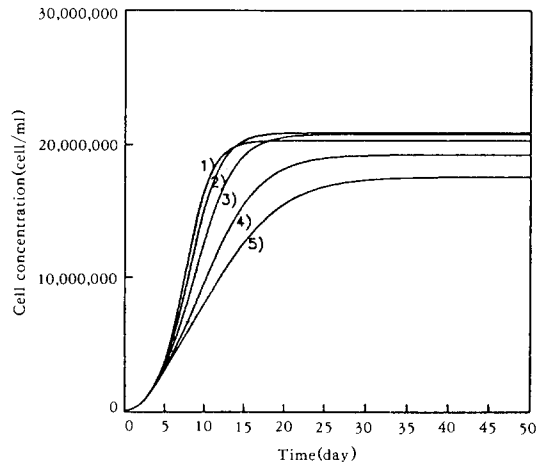
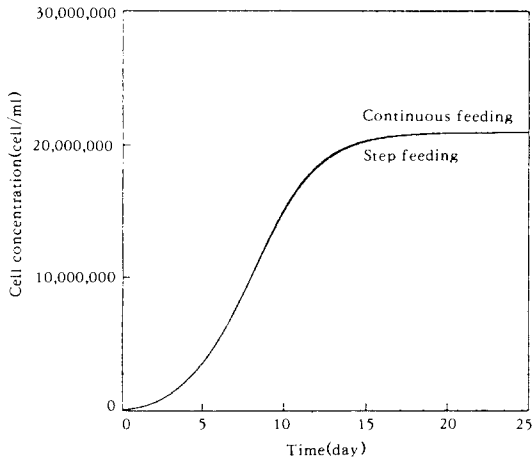


Fig 4. Cell growth at various specific feed rates. The values used for the simulations are: initial cell concentration ( $X_0$ ) =  $10^5$  cell/ml, maximum specific growth rate ( $\mu_m$ ) =  $1.0 \text{ day}^{-1}$ , cell retention = 90%. The values of specific feed rate ( $\delta$ ) are: ①  $0.3 \times 10^{-6}$  ②  $0.25 \times 10^{-6}$  ③  $0.2 \times 10^{-6}$  ④  $0.15 \times 10^{-6}$  ⑤  $0.125 \times 10^{-6}$  (ml/cell · day).



**Fig 5. Step feeding vs. continuous feeding** The values used for the simulations are: initial cell concentration ( $X_0$ )= $10^5$ cell/ml, maximum specific growth rate ( $\mu_m$ )= $1.0\text{day}^{-1}$ , cell retention= $90\%$  and specific feed rate ( $\delta$ )= $0.25 \times 10^{-6}$ ml/cell · day. In step feeding the feed rate changes at every 12hours.

최대세포농도에 차이가 없어진다. 그러나 최대세포농도의 90%에 도달하는 시간은 배지의 비공급속도가 클수록 짧는데 이는 배지의 공급속도가 클 경우 배지 내의 암모니아 축적이 작아 세포 성장이 활발하기 때문이다.

배지의 공급방법 즉, 연속적으로 배지공급속도를 변화시키며 배양한 경우와 계단변화시키며 배양한 경우의 세포농도의 변화를 나타낸 결과를 Fig. 5에 보인다. 배지를 연속공급할 경우와 계단공급할 경우를 비교해 보면, 배양 후 5일까지는 연속공급방법과 계단공급방법의 세포농도는 차이가 없다. 5일 후부터 계단공급방법의 세포농도변화가 연속공급방법의 세포농도변화보다 조금씩 낮아져 10일경에 이르러  $2 \times 10^5$ cell/ml 정도의 차이를 보이다가 다시 차이가 줄어들어 15일경에는 차이가 없어지고 결국 최대세포농도에는 차이가 없어진다. 전체적으로 보았을 때 배지공급을 연속적으로 한 경우와 계단변화시킨 경우의 세포농도 변화에는 차이가 거의 없다. 이는 동물세포의 경우 세포의 성장속도가 느려서 세포 성장이 12시간 동안 변화하는 배지공급속도의 변화에 크게 영향 받지않기 때문이라 사료된다. 이 결과로부터 동물세포 배양에서 평균세포농도의 예측에 의한

**Table 2. Sensitivity analysis of the effects of various parameters on cell growth.**

Parameter	Sensitivity	
	5days	25days
Maximum specific growth rate, $\mu_m$	2.975	1.004
Specific feed rate, $\delta$	0.296	0.080
Cell retention	1.261	9.113
Inhibition constant for ammonium, $K_A$	0.639	0.479
Specific ammonium production rate, $q_A$	0.696	0.958
First-order spontaneous decomposition	0.605	0.014
Rate of glutamine, $k$		

계단식 배지공급방식은 연속적 세포농도의 측정이 필요치 않아 실제 공정에서 유용하게 쓰일 수 있는 방법이다.

각 인자들에 대한 sensitivity analysis의 결과를 Table 2에 보이는데 이는 세포배양 5일과 25일에서의 세포농도에 대한 것이다. 최대비중식속도와 세포유치율은 다른 인자들에 비하여 세포농도의 변화에 그 영향이 큼을 보이며, 최대비중식속도의 sensitivity는 2.975이고, 세포유치율의 sensitivity는 1.261이다. 이것에 반하여 비배지공급속도의 sensitivity는 0.296으로서 매우 작는데 이는 앞에서의 연속식공급과 계단식공급방식의 경우, 즉 세포농도의 배지공급속도의 변화가 세포 성장에 영향을 끼치지 않음과 일치한다. 또,  $K_A$ ,  $k$ 와  $q_A$ 의 sensitivity는 각각 0.639, 0.605, 0.696인데, 이들 인자들은 세포 성장속도에 관련되어 있어 그 영향이 크지 않다.

세포농도가 최대세포농도에 이르렀을 때 즉 배양 후 25일에도 세포유치율이 세포농도의 결정에 가장 큰 영향을 줌을 보인다. 세포유치율의 sensitivity는 9.113으로써 비중식속도의 1.004에 비하여 9배 큰 값을 보인다. 배양 후 25일에서도 세포유치율과 비중식속도는 5일의 경우와 같이 다른 인자에 비하여 sensitivity가 매우 큰 값을 보인다. 이와 같은 sensitivity analysis의 결과는 전체 공정에서 세포유치율과 비중식속도가 세포농도의 변화에 가장 큰 영향을 줌을 알 수 있고 특히 세포유치율은 세포농도의 증가에 가장 주요한 인자임을 보인다.

본 연구에서는 기질이 충분히 공급된다고 가정된 후 계산하였고 또, serum도 충분히 공급될 경우를 계산하였는데, 일반적으로 배지는 충분한 공급이 가능하며 또 serum의 농도도 5% 이상 공급해 주면 세포 성장에 크게 영향을 주지 않는다. 세포에 따라

서 배지와 serum의 공급에 민감한 반응을 보이는 경우에는 사용한 식들을 개선하여 사용할 필요가 있다.

높은 세포유치율을 유지함은 빠른 세포농도의 증가와 높은 최대세포농도를 얻을 수 있어 배양공정의 생산성을 증가시키나 오랜 기간 동안 막의 막힘이 없이 유지함이 중요하다. 일반적으로 막공이 작은 스크린은 높은 세포유치율을 제공하나 배양 중 쉽게 막히고 막공이 큰 스크린은 세포유치율이 낮아 높은 농도에 도달하지 않게 된다. 따라서 막의 막힘을 완화하여 세포유치율을 높게 유지시키는 회전식 여과기의 사용에서 해결하여야 할 중요한 문제 중의 하나이다.

## 결 론

회전식 여과기를 이용한 동물세포의 현탁배양에서 암모니아가 성장 억제제로서 작용할 때 배지공급속도, 세포유치율과 같은 운전변수가 배양기 내의 세포농도를 결정하는 것을 modeling하였고 이를 전산모사하였다. 또 배지를 세포농도의 변화에 따라 연속적으로 변화시키는 연속공급방식과 일정시간 같은 속도를 유지하며 단계별로 공급하는 계단식 공급방식을 세포 성장에 대하여 비교하였다. 세포 성장에 대하여 각 인자들의 영향의 세기를 sensitivity analysis로서 조사하였다.

높은 세포농도에서의 perfusion 배양은 배양기 내에 암모니아의 축적을 일으키고 이는 세포 성장을 저해한다. 암모니아의 성장 저해가 있는 경우 얻을 수 있는 최대세포농도는 암모니아의 저해가 없는 경우의 약 50%에 불과하며 그 성장속도도 심히 둔화됨을 보인다.

전산모사의 결과로부터 perfusion 배양시 세포농도의 증가에 가장 영향을 끼치는 인자는 여과기의 세포유치율이며 이는 세포농도의 증가속도와 최대세포농도의 크기를 결정하는 주된 요인이다. Sensitivity analysis를 통한 결과에서도 세포유치율은 다른 인자들에 비하여 월등히 큰 영향을 끼침을 보인다. 이와 같은 결과는 여과기의 운전시 세포유치율을 적정히 유지함은 높은 세포농도를 얻는데 필수임을 나타낸다.

배지공급방식은 세포농도의 변화에 크게 영향을 끼치지 않음을 보이며 따라서 손쉬운 계단식배지공급방식은 동물세포배양에서 유용하게 쓰일 수 있는 배지공급방식이다. 계단식 배지공급의 장점은 연속

적인 세포농도의 측정을 측정하지 않으면서도 연속식 배지공급의 배양효과를 얻을 수 있다.

## 요 약

회전식 여과기는 일종의 분리기로서 동물세포의 연속배양에 이용되어 높은 세포농도와 그와 비례한 높은 생산성을 가져다 준다. 회전식 여과기를 이용한 세포배양은 여러 인자들에 의해 세포농도의 변화가 결정되는데 이를 수학적으로 modeling하고 수치모사와 sensitivity analysis를 통하여 조사하였다. 고농도 배양시 암모니아의 축적은 세포 성장을 크게 둔화시키고 최대세포농도도 따라서 낮게 된다. 운전인자 중 세포유치율은 세포 성장속도와 최대세포농도의 크기에 가장 큰 영향을 끼침이 밝혀졌다. 비배지공급속도는 세포농도의 변화에 거의 영향을 끼치지 않으며 배지의 연속식공급과 계단식공급은 세포 성장에 큰 차이를 보이지 않는다.

## 부 록

동물세포를 연속적으로 배양하는데 있어서 세포농도에 알맞게 배지공급속도를 결정하는 것은 매우 중요한 일이다. 배지공급속도를 결정할 때 동물세포가 기질의 부족으로 인하여 세포 성장속도가 감소하는 일이 없어야 하고, 또 배지의 불필요한 소비를 줄여야 한다.

본 논문에서는 12시간마다 배지공급속도를 계단변화시켰을 경우를 연속공급의 경우와 비교하였다. 계단식공급의 경우 배지공급속도는 12시간 동안의 세포농도변화를 예측하여 구한 평균세포농도를 이용하여 구했는데, 평균세포농도는 아래의 방법으로 구했다.

시간  $t = t_p$ 부터 12시간 동안의 세포농도를 시간에 대하여 적분한 함수를 T라고 정의한다.

$$T(t) = \int_{t_p}^{t_p+12} X(t) dt \quad (A-1)$$

양변을 미분하면,

$$\frac{dT}{dt} = X(t) \quad (A-2)$$

가 된다.

식 (4), (6), (8), (12), (A-2)을 Runge-Kutta 4차 방법으로 계산하여 12시간 동안의 세포농도의 시간에 대한 적분함수 T를 구하고 평균세포농도의 값

을 얻기 위해 T를 12시간으로 아래와 같이 나누면,

$$X_{r, ave} = \frac{T}{12} \quad (A-3)$$

평균세포농도( $X_{r, ave}$ )를 얻는다. 이를 식 (14)에 대입하여 배지공급속도를 얻었으며 일정 배지공급속도를 사용하여 다시 식 (6), (8), (10), (12)를 이용하여 세포농도( $X_r$ )를 구하였다.

### 감 사

본 논문은 과학재단의 '94핵심전문연구의 지원과 한양대학교 산업과학연구소 지원으로 수행됨으로 이에 감사드립니다.

본 논문의 작성에 많은 협력을 한 이병강에게 감사드립니다.

### 사용기호

- $\mu_m$  : maximum specific growth rate( $\text{day}^{-1}$ )  
 $\delta$  : specific feed rate( $\text{ml}/\text{cell} \cdot \text{day}$ )  
 $X_0$  : initial cell concentration( $\text{cell}/\text{ml}$ )  
 $X_r$  : cell concentration in reactor( $\text{cell}/\text{ml}$ )  
 $X_s$  : cell concentration in spin filter( $\text{cell}/\text{ml}$ )  
 $A$  : ammonium concentration in reactor( $\text{mM}$ )  
 $G$  : glutamine concentration in reactor( $\text{mM}$ )  
 $K_A$  : inhibition constant for ammonium( $\text{mM}^2$ )  
 $K_i$  : inhibition constant( $\text{mM}$ )  
 $K_{se}$  : Monod constant in serum(%)  
 $Se$  : serum concentration in reactor(%)  
 $q_A$  : specific ammonium production rate( $\text{mmol}/\text{cell} \cdot \text{day}$ )  
 $q_G$  : specific glutamine uptake rate( $\text{mmol}/\text{cell} \cdot \text{day}$ )  
 $k$  : first-order spontaneous decomposition rate of glutamine( $\text{day}^{-1}$ )

### 참고문헌

- I. Abu-Reesh and F. Kargi(1991), *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 913.
- W. S. Hu and D. I. C. Wang(1986), *Mammalian Cell Technology*(W. G. Thilly ed.), 167, Butterworths Publishers.
- J. B. Griffiths(1988), *Animal Cell Biotechnology*(R. E. Spier, J. B. Griffiths, eds.), **3**, 179, Academic Press, New York.
- P. Himmelfarb, P. S. Thayer and H. E. Martin(1969), *Science*, **165**, 555.
- W. R. Tolbert, J. Feder and R. C. Kimes(1981), *In Vitro*, **17**, 885.
- W. S. Hu, M. T. Scholz, E. Favre and T. C. Seamans(1990), *Advances in Animal Cell Biology and Technology for Bioprocess*(R. E. Spier, et. al. eds.), 370, Butterworths, Lodon.
- P. S. Thayer, P. Himmelfarb and D. W. Roberts(1970), *Cancer Res.*, **30**, 1709.
- R. Varecka and W. Scheirer(1987), *Dev. Biol. Stand.*, **66**, 269.
- G. C. Avgerinos, D. Drapeau, J. S. Socolow, J. I. Mao, K. Hsiao and R. J. Broeze(1990), *Bio/Technol.*, **8**, 54.
- A. Margaritis and C. R. Wilke(1978), *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 727.
- H. Y. Lee and J. H. Lee(1988), *Hwahak Konghak*, **26**, 659.
- H. Y. Lee and J. K. Kang(1989), *Hwahak Konghak*, **27**, 286.
- M. W. Glacken, E. Adema and A. J. Sinskey(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 491.
- B. C. Batt and D. S. Kompala(1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 515.
- M. W. Glacken, R. J. Fleischaker and A. J. Sinskey(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1376.
- W. M. Miller, H. W. Blanch and C. R. Wilke(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 947.
- G. L. Tritesch and G. E. Moore(1962), *Exp. Cell Res.*, **28**, 360.
- I. Havlik, J. Votruba, M. Sobotka, B. Volesky(1984), *Biotechnol. Lett.*, **6**, 607.
- J. J. DiStefano III, A. R. Stubberud and I. J. Williams(1990), *Feedback and Control Systems*(Schaum's Outline Series), 2nd ed., 208, McGraw-Hill.
- D. H. Randerson(1985), *J. Biotechnol.*, **12**, 241.