

## 동물세포 배양액으로부터 암모늄 이온의 동시제거를 위한 고정화 흡착제의 개발과 동물세포 배양 시스템에의 응용: I. 고정화 흡착시스템 개발

박 병 곤 · 민 용 원 · 전 계 택<sup>1</sup> · 김 익 환<sup>2</sup> · †정 연 호  
강원대학교 식품생명공학부 · 생명과학부<sup>1</sup>, 고려대학교 생명공학원<sup>2</sup>  
(접수 : 1998. 3. 18., 게재승인 : 1998. 6. 22.)

### Development of an Immobilized Adsorbent for *in situ* Removal of Ammonium Ion from Mammalian Cell Culture Media and its Application to a Mammalian Cell Bioreactor: I. Development of Immobilized Adsorbent System

B. G. Park, Y. W. Min, G. T. Chun<sup>1</sup>, I. H. Kim<sup>2</sup>, and †Y. H. Jeong  
Division of Food & Biotechnology,

<sup>1</sup>Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

<sup>2</sup>Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

(Received : 1998. 3. 18., Accepted : 1998. 6. 22.)

Three types of adsorbents were developed by immobilizing synthetic zeolite, Phillipsite-Gismondine, in alginate, cellulose acetate and dialysis membrane for the *in situ* removal of ammonium ion which inhibits growth and productivity of animal cells such as CHO cells producing tPA. Ammonium ion removal efficiency and cell growth promoting effect with various immobilized adsorbents were evaluated and the membrane type was selected as an optimal immobilized adsorbent. The experiments were then simulated by adding 8mM ammonium chloride and immobilized adsorbent in order to validate the removal effect under high density cell cultures. The results showed increase in maximum cell density by three times, in cell viability, and in tPA productivity by 40 %. And it was found that the promoting effects were more significant in case of high ammonium ion concentration system. It was also found that the optimum addition time for immobilized adsorbents was 48 hr in the absence of ammonium chloride addition and 72 hr in the presence of ammonium chloride addition.

Key Words : Chinese Hamster Ovary(CHO) cells, immobilized adsorbent, ammonium ion removal, Phillipsite-Gismondine synthetic zeolite, tissue-type Plasminogen Activator(tPA)

#### 서 론

동물세포의 대량 배양에 있어서 glucose와 glutamine은 주요 carbon과 energy source로 공급되고 있다(1, 2). 특히 glutamine은 에너지를 공급할 뿐만 아니라 다른 amino acids, lipids, protein, antibodies, nucleotides, purine 또는 pyrimidine을 합성하는데 탄소와 질소의 공급원으로 쓰이는 필수 아미노산이다(3, 4, 5). Glutamine은 보통 glutamate를 거쳐  $\alpha$ -keto glutarate의 형태로 TCA cycle로 들어가서 CO<sub>2</sub>로 완전 연소하거나 lactate로 부분 연소하여 세포가 에너지를 얻게 되는데, 이때  $\alpha$ -keto glutarate로 전환될 때까지 2mol의 암모늄 이온이 발생하게 된다. 또한 glutamate가 aspartate나 alanine로 부분

연소하게 되면 1mol의 ammonium ion이 발생하게 된다(6). 세포가 어떤 경로를 택할지는 세포의 에너지 요구도에 따라 달라지나(7), 그 어떤 경우에도 glutamine으로 에너지를 생산하고 다른 세포 구성 물질을 합성하기 위해서는 1mol에서 2mol의 암모늄 이온의 발생이 필수적이다.

동물세포의 대사중 by-product인 암모늄 이온은 세포 성장과 세포 생성물의 생산에 저해효과를 나타내는 것으로 보고되었다. Mouse L cell(8)은 0.5mM, 3T3 cell(9)과 BHK cell(10)은 1mM, mouse hybridoma(11, 12)는 2~3mM, MDCK cell(13, 14)은 4mM 이상의 암모늄 이온 농도에서 저해 현상을 일으키는 것으로 보고되었다. 암모늄 이온은 또한 세포 대사나 생성물의 생산도 저해한다(15, 16) Human fibroblast cell에 의해 생성되는 INF는 2mM의 암모늄 이온 농도에서 50%나 억제되고(17), mouse L cell에서는 20mM에서 50%가 억제되는 것으로 보고되었다(18). Influenza virus(19), New Castle disease virus(20), Columbia SK virus(21)등도 암모늄 이온에 의해 증식이 억제되어 결국 vaccine 생산을 저해한다고 보고되었다.

† Corresponding Author · Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, 200-701, Korea  
Tel : (0361) 250-6484, Fax : (0361) 54-3835  
e-mail : jeongyh@cc.kangwon.ac.kr

이렇게 동물세포의 대량 배양에서 문제가 되는 암모늄 이온을 제거하기 위해 현재까지 두가지 방향으로 접근이 시도되었다. 첫 번째 방향은 세포의 대사 조절(metabolism regulation)을 통해 과다한 암모늄 이온을 생성하지 못하게 하는 방법이고, 두 번째 방향은 암모늄 이온이 생성되는 즉시 system으로부터 제거하여 암모늄 이온의 축적을 방지하는 방법이다. 첫 번째 암모늄 이온의 생성 속도를 낮추는 방법으로는 배양액 내의 glutamine 농도를 낮은 상태로 유지하면서 배양하여 glutamine의 소비속도를 감소시키거나 대사과정의 한 단계를 생략시켜 암모늄 이온의 생성 속도를 감소시키는 방법이다(22, 23, 24). 그러나 이 방법은 암모늄 이온의 생성 속도의 감소에는 성공하였지만 세포 성장에 문제가 있어 사용하기 어렵다. 두 번째 방향은 암모늄 이온의 동시제거이다. Hecht et al.은 항생제 생산을 위한 발효 시스템에서 암모늄 이온의 제거를 위해 hollow fiber supported gas membrane을 사용하여 암모늄 이온이 발생하는 즉시 ammonia gas 형태로 stripping 시키는 방법을 사용했다(25). 그러나 ammonia gas를 발생시키기 위해서는 pH 8.0 이상의 높은 pH가 요구되므로 pH에 민감한 동물세포의 배양에는 적합하지 않다. Wang et al.은 hybridoma culture에서 전기적 방법에 의해 암모늄 이온과 lactate를 제거하는 방법을 사용했다(26). 이 방법은 실제 배양 시스템에 적용할 수 있지만 경제성이 없다.

이에 반해 합성 zeolite인 Phillipsite-Gismondine은 암모늄 이온에 대한 선택성이 높고 흡착 용량이 크며 동물세포에 무해하기 때문에 세포 배양액으로부터 암모늄 이온을 동시 제거함으로써 세포 성장 및 생산성 향상을 도모할 수 있다(27). 그러나 이 흡착제는 분말 형태로 생물 반응기에 그대로 이용하게 될 경우 다음과 같은 문제점이 예상된다. 첫째로 배양이 끝난 후 media와 세포로부터 흡착제 분말을 분리하기가 어렵다. Vaccine 생산을 위해서 동물 세포를 생산하는 경우 일단 생물 반응기에서 동물 세포를 배양한 후 세포를 수확하여 다음 단계에서 virus에 감염시키는데, 이 때 동물 세포 수확 단계에서 흡착제 분말과 세포가 분리되어야 한다. 또 perfusion system에 응용하는 경우 recycle line에서 clogging될 염려가 높다. 또 다른 문제는 직경이 작은 분말이 사용됨으로써, 생성물이 그 표면에 무작위로 흡착되어 생성물의 손실을 가져오게 되는 문제이다.

이와같은 문제점들을 해결하기 위해서 흡착제를 고정화시켜서 cell이나 media로부터 쉽게 분리하고 matrix의 pore size를 조절하여 생성물이 아닌 암모늄 이온만을 선택적으로 흡착하게 하는 것이 중요하다(28, 29). 또한 그러한 고정화 흡착제를 생물 반응기에 적용, 시도하여 실제 개발된 고정화 흡착제의 응용 가능성을 평가할 뿐만 아니라 실제 적용시 부딪히는 여러 문제점들을 해결해 가면서 실용적인 고정화 흡착제를 개발하는 것이 무엇보다도 중요한 것이다. 이에 본 연구에서는 zeolite의 고정화 방법을 모색하였으며 고정화된 zeolite의 암모늄 이온의 흡착 효율성 및 세포 성장 증진에 기인하여 최적 고정화 흡착제를 선정하였다. 또한 선정된 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 제거 효과를 조사하였으며 고정화 흡착제의 최적 투여시기를 조사하였다. 본 연구의 결과는 암모늄 이온의 동시 제거 체계가 응용된 동물세포 대량 배양 시스템의 개발에 기초 자료로 사용될 것이다.

## 재료 및 방법

### 세포주 및 세포배양조건

본 연구에서는 tPA를 생산하는 CHO(Chinese Hamster Ovary) cell(ACTC CRL 9606)을 기본 세포주로 사용하였으며, 이 세포주는 anchorage-dependent 세포이다. 세포배양을 위한 배지로는 CHO 세포의 배양을 위한 기본 배지를 최적화시킨 변형 배지를 사용하였는데 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma)과 Nutrient Mixture F-12 Ham(Sigma)를 1:1로 혼합하고 2.5g/L sodium bicarbonate(Sigma), 10mM HEPES(Sigma), penicillin & streptomycin(Sigma)은 각각 100,000unit과 100mg/L, glucose(Sigma) 6.5g/L, glutamine(Sigma) 4mM, 10% FBS(Fetal Bovine Serum, GibcoBRL)이 첨가되었다. 만들어진 배지는 membrane filtration(pore size : 0.22 $\mu$ m)으로 멸균되었다.

### Anchorage-dependent CHO 세포 배양 및 계대배양

Anchorage-dependent CHO 세포의 계대배양은 tissue culture flask(75cm<sup>2</sup>, Corning)를 이용하였고, 암모늄 이온의 제거 효과 및 immobilized adsorbent에 의한 흡착 실험은 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask를 이용하였다. 본 실험 및 계대배양 모두 5 × 10<sup>5</sup> cells/mL의 농도로 접종하여 humidified CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air)에서 37°C의 조건으로 배양했으며 4일을 주기로 계대배양하였다.

### 고정화 흡착제의 개발

본 연구에서는 분말 형태인 Phillipsite-Gismondine synthetic zeolite(UOP)를 membrane type, chip type, bead type의 세가지 형태로 응용하여 배양에 이용하였다. Membrane type의 경우 dialysis tube(retain M.W. 12000, Sigma)를 흐르는 물에 3~4 시간동안 씻어 glycerin을 제거하고, 80°C에서 1분 동안 0.3% sodium sulfide로 처리하여 황 성분을 제거한 다음 0.5g Phillipsite-Gismondine synthetic zeolite를 충전시켜서 사용하였다. 충전된 membrane type immobilized adsorbent는 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask에 2개를 넣고 배양하였다.

Bead type(calcium alginate)의 경우 zeolite powder 30g을 100mL의 1.4% alginate solution(Sigma)에 넣고 잘 혼합한 후 이 혼합 용액을 펌프로 0.4mm nozzle을 통하여 50mM calcium chloride solution(Sigma)에 떨어뜨려서 zeolite가 calcium alginate matrix에 포획된 형태로 제조한다. Bead type은 10mL 배양액에 3g을 첨가하여 배양하였다.

Chip type(cellulose acetate)의 경우 zeolite 10g을 cellulose acetate(Sigma) polymer 용액에 넣어 균일하게 혼합한 후 slurry를 특수 제작된 유리판에 옮겨 부어 유리판 표면에서 film을 형성하게 한다. Film이 형성된 후 유리판 전체를 0°C chamber에서 1시간 동안 curing한다. Chip type은 10mL 배양액에 1g을 첨가하여 배양하였다.

### 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 동시제거

세 가지 type의 고정화 흡착제를 세포 배양에 응용하여 각 type의 고정화 흡착제의 성능을 비교하였다. 또한 고농도의 세포 배양을 가정하여 인위적으로 8mM의 ammonium chloride를

침가한 시스템에서도 세 가지 type의 고정화 흡착제의 성능을 비교하였다.

**고정화 흡착제의 최적 투여시기 선정**

선별된 membrane type의 고정화 흡착제를 배양 시작 후 24, 48, 72, 96, 120시간 경과 후 각각 1g씩 투여하여 세포 성장, 세포 생존율, 암모늄 이온의 농도를 6일 배양 후 측정하였다. Ammonium chloride를 첨가하지 않은 시스템과 첨가한 시스템의 성능을 비교하여 세포 성장과 세포 생존율이 가장 높고, 암모늄 이온 농도가 가장 낮게 유지된 시스템의 투여시기를 최적 고정화 흡착제 투여시기로 선정하였다.

**세포농도 및 암모늄 이온 농도 분석**

세포 농도는 tissue culture flask에서 spent medium을 제거한 후 5mL trypsin (200unit/mL, 1mM EDTA, Sigma)을 처리하여 세포를 표면에서 떼어낸 후 centrifuge(1500rpm, 5min)하여 세포를 농축시킨 후 5mL 베지로 현탁시킨 다음 trypan blue(Sigma)와 1:1로 혼합시켜 hemocytometer로 측정하였다. 암모늄 이온 농도는 ammonium ion electrode(Orion)를 이용하여 측정하였다. 먼저 시료 5mL에 ammonia pH-adjusting ISA(Orion) 200  $\mu$ L를 넣고 stirrer로 잘 혼합하면서 mV 단위의 기전력을 측정하였다. Ammonium chloride 0, 2, 4, 3, 8, 10mM 용액으로 먼저 calibration curve를 작성하고 시료의 mV를 측정하여 mM 단위로 환산하였다.

**tPA 농도 분석**

tPA의 분석은 spectrophotometric assay를 이용하였다(30). tPA에 의해 plasminogen을 활성화시켜 반응 substrate인 S-2251 (D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilide)을 D-Val-Leu-Lys과 p-nitroanilide로 분해하고 이때 발생하는 발색 정도를 405nm에서 측정하는 방법이다. 96 well plate(Corning)에 TT-buffer solution (50mM Tris-HCl, 12mM NaCl, 0.02% v/v Triton X-100, pH 7.4)으로 희석한 sample이나 urokinase(Sigma) 140  $\mu$ L를 5  $\mu$ L substrate solution(1.67mg/mL S-2251 in TT-buffer)과 5  $\mu$ L plasminogen solution(0.2unit/mL in TT- buffer)을 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 incubation시킨 다음 ELISA Reader(Bio-RAD)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**고정화 흡착제의 개발**

Figure 1은 개발된 bead 형태의 고정화 흡착제를 나타내고 있다. 개발된 고정화 흡착제의 암모늄 이온 흡착성능을 조사하기 위하여 bead 형태의 흡착제 20g을 50mL의 배양액에 넣고 37 $^{\circ}$ C shaker에서 300rpm으로 흔들어 주면서 흡착실험을 수행하였고, 그 결과를 Figure 2에 나타내고 있다 Figure 2에 의하면 불과 10 여분만에 평형에 다다르고 있으며 제거율도 85% 정도를 나타내고 있어서 개발된 흡착제가 세포배양액으로부터 암모늄 이온의 제거에 효과적으로 이용될 수 있음을 보여주고 있다. 이러한 bead type의 immobilized bead는 reactor안에서 microcarrier 형식 또는 cage 형식으로 사용되거나 reactor 밖에서 column 형식으로 packing하여 external closed loop 형태

로 사용될 수 있다.

Figure 3은 성형된 film 형태의 고정화 흡착제를 나타내고 있고 이것을 chip 형태로 나누어 사용한다. Figure 4는 이렇게 성

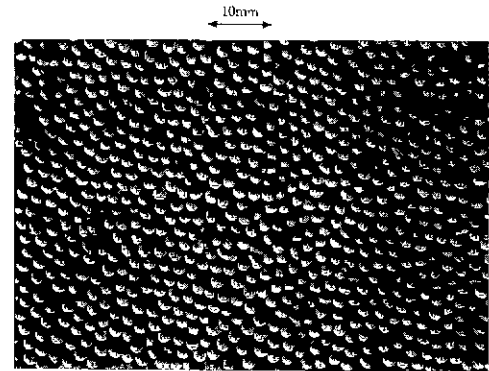


Figure 1. Immobilized adsorbent of bead type.

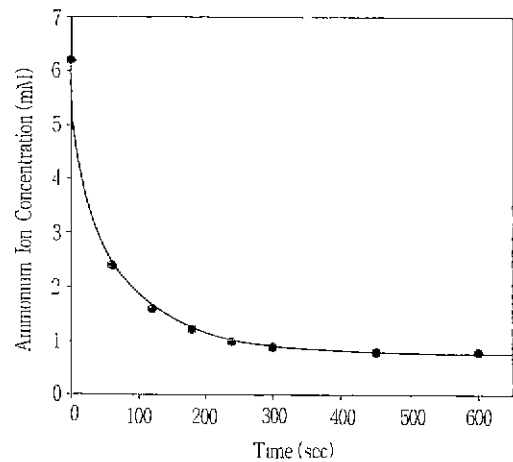


Figure 2. Ammonium ion adsorption kinetics with bead type immobilized adsorbent.

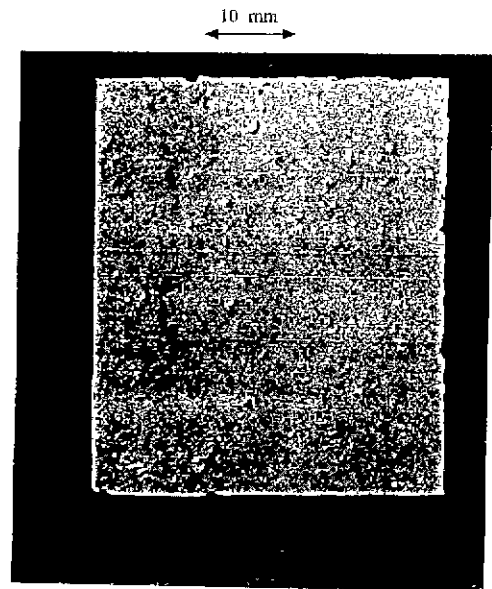
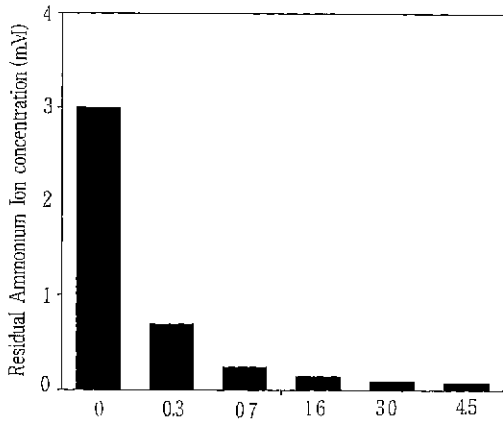


Figure 3. Immobilized adsorbent of chip type.



X Axis : Amount of Adsorbent(g) in 40mL of 3mM Ammonium Chloride

Figure 4. Residual ammonium ion concentrations after adsorption with various amounts of chip type immobilized adsorbents.

형된 고정화 흡착제의 성능 실험을 위해 3mm × 3mm로 자른 chip 형태의 흡착제를 3mM ammonium chloride solution 40mL에 무게를(0.3, 0.7, 1.6, 3.0, 4.5g) 달리하여 첨가하여 37℃ shaker에서 24 시간 접촉한 후, 잔류 암모늄 이온의 농도를 측정된 결과를 나타낸 것이다. Chip 형태의 흡착제를 많이 첨가할수록 잔류 암모늄 이온의 농도가 낮아짐을 알 수 있어 암모늄 이온 흡착이 잘 이루어짐을 확인할 수 있었다. 이 형태의 흡착제는 잘게 나누어 chip 형태로 반응기에 적용하거나 반응기 벽면에 장착시키는 형태로 암모늄 이온의 동시제거를 수행할 수 있다. Membrane type의 고정화 흡착제는 간단하게 packing된 형태로 그림을 생략하였다.

**암모늄 이온 제거를 위한 최적 고정화 흡착제 선정**

Anchorage-dependent CHO 세포의 배양시 암모늄 이온의 동시 제거를 위한 최적의 고정화 흡착제를 선정하기 위해 membrane, chip, bead type의 흡착제를 T-flask에 첨가하여 배양한 후 세포 성장과 세포생존율의 관점에서 최적 고정화 흡착제를 선정하였다. 세가지 형태의 고정화 흡착제를 첨가한 것과 첨가하지 않은 CHO 세포의 배양에서 4일 경과 후 세포 밀도와 생존율, 잔류 암모늄 이온의 농도를 Figure 5에 나타내었다. 세포 농도 측면에서 비교해 보았을 때 membrane type 고정화 흡착제를 첨가한 배양에서  $3.0 \times 10^5$  cells/mL로 가장 높게 나타났고, 고정화 흡착제를 첨가하지 않은 배양이  $2.1 \times 10^5$  cells/mL로 나타났다. Chip과 bead type의 경우  $1.9 \times 10^5$  cells/mL과  $8.0 \times 10^4$  cells/mL로 고정화 흡착제를 첨가하지 않은 배양보다 더 낮게 나타났다. 이런 결과는 chip이나 bead type의 경우 matrix가 견고하지 못하여 일부의 작은 zeolite particle들이 빠져나와 tissue culture flask 바닥에 존재함으로써 anchorage-dependent CHO 세포가 flask 표면에 붙는 것을 방해하기 때문으로 추정된다. 생존율을 보면 고정화 흡착제를 첨가하지 않은 경우와 membrane type, chip type의 고정화 흡착제를 첨가한 경우에 85~90% 정도로 유사하게 유지되었고, bead type의 고정화 흡착제를 첨가한 경우에는 55% 정도로 낮게 유지되었다. 이러한 결과는 bead type이 suspension cell의 경우 성공적이었던 결과(11)와는 다

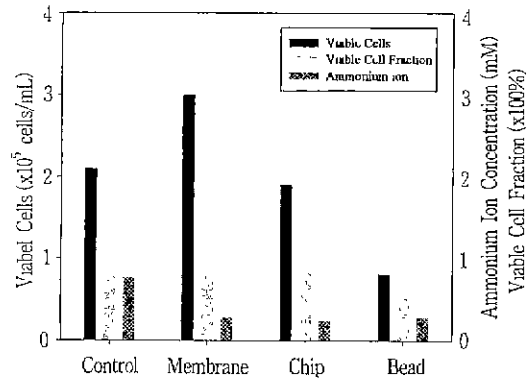


Figure 5. Performance comparison of various forms of immobilized adsorbents in terms of final cell density, viability and ammonium ion concentration. Data were obtained after 4 days culture of CHO cells.

른 결과로써 anchorage-dependent cell의 경우에는 alginate bead나 cellulose acetate chip은 적절하지 못함을 알 수 있었다.

암모늄 이온의 농도는 고정화 흡착제를 첨가하지 않은 경우보다 고정화 흡착제를 첨가한 배양에서 모두 낮게 나타남을 볼 수 있어 암모늄 이온 흡착 자체는 문제가 없음을 알 수 있었다. 이 상에서 membrane, chip, bead type 고정화 흡착제 모두 암모늄 이온에 대해 높은 선택성 흡착을 나타내지만, 세포 성장과 생존을 면에서 보았을 때 anchorage-dependent cell을 배양할 경우에는 membrane type의 고정화 흡착제가 최적의 흡착제임을 알 수 있다. 따라서 이 후의 실험에서는 고정화 흡착제로 membrane type을 선정하여 사용하였다.

**암모늄 이온의 제거 효과**

본 실험에서는 배양 시작 후 48시간이 경과한 다음 membrane type의 고정화 흡착제를 투여함으로써 과연 암모늄 이온의 제거가 세포성장 및 생산성 향상에 기여하는지를 조사하였다. 회분식배양에서는 심하게 세포 성장을 저해할 정도의 농도까지 암모늄 이온을 축적하지 않고 배양 말기에 영양물질이 고갈되어 더 이상 세포 성장이 불가능하기 때문에 보통 암모늄 이온의 제거에는 크게 효과적이었는데 비해 이에 따른 세포의 성장이나 생물량의 농도는 그다지 크게 증진되지 않은 것이 목격된다(27, 28). 따라서 이러한 암모늄 이온의 동시제거의 효과를 더욱 더 확실하게 관측하기 위해서는 암모늄 이온의 농도를 저해 농도 이상으로 유지하기 위해 외부에서 암모늄 이온을 의도적으로 첨가하여 그 효과를 관측하는 방법을 사용할 수 있다. Figure 6은 고농도 세포배양의 조건을 모사(simulation)함으로써 고정화 흡착제의 효과를 명확히 관찰하기 위해 임의로 8mM의 ammonium chloride를 배양액에 첨가하여 세포배양 T-flask에서 anchorage-dependent CHO 세포를 배양한 결과이다. Ammonium chloride를 첨가하지 않은 경우 membrane type의 고정화 흡착제를 첨가한 시스템이 control 보다 약 10% 정도의 세포 성장의 증진을 가져왔다. 그러나 8mM의 ammonium chloride를 첨가한 시스템에서는 membrane type의 고정화 흡착제로 암모늄 이온을 제거했을 경우 3배 이상의 세포 성장의 증진을 가져왔다. 이러한 결과로부터 membrane type의 고정화 흡착제를 첨가한 경우에 세포 성장의 증진이 특히 고농도의 암모늄 이온

의 존재 하에서 더욱 효과적일 것이라는 사실을 추론할 수 있다.

Figure 7은 Figure 6의 실험에서 각 배양 시스템의 세포 생존율을 나타낸 것이다. 세포 생존율에서도 ammonium chloride를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 모두 membrane type 고정화 흡착제를 투여했을 때 더 높은 세포 생존율을 나타낼 수 있다. 또한 Figure 8은 Figure 6의 배양 시스템에서의 암모늄 이온의 농도를 나타낸 것으로 ammonium chloride를 첨가하지 않은 경우는 물론 8mM의 ammonium chloride를 첨가한 경우에도 membrane type의 고정화 흡착제를 투여했을 때 암모늄 이온이 1mM의 낮은 농도로 유지됨을 알 수 있다.

또한 Figure 9에서 나타난 바와 같이 tPA의 생산량도 ammonium chloride를 첨가한 경우나 첨가하지 않은 경우 모두 membrane type의 고정화 흡착제를 투여했을 때 증가하고 있음을 알 수 있다. 최종 tPA 농도를 살펴보면, ammonium chloride를 첨가하지 않은 경우 고정화 흡착제를 투여했을 때 30% 정도의 tPA 생산성 향상을 볼 수 있었고, ammonium chloride를 첨가한 배양의 경우 고정화 흡착제를 투여했을 때 40% 정도의 생산성 향상을 가져옴을 알 수 있었다. 즉, perfusion이나 fed-batch 같은 고농도 배양시스템에서 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 동시제거가 더 효과적일 것이라는 결론을 도출할 수 있다 이러한 결과로부터

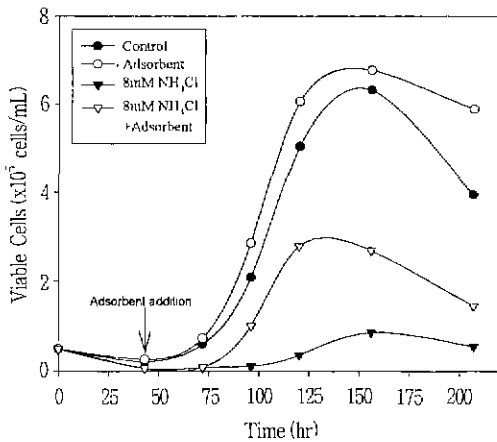


Figure 6. Cell growth kinetics of tPA producing CHO cells cultured with 1g of membrane type immobilized adsorbent.

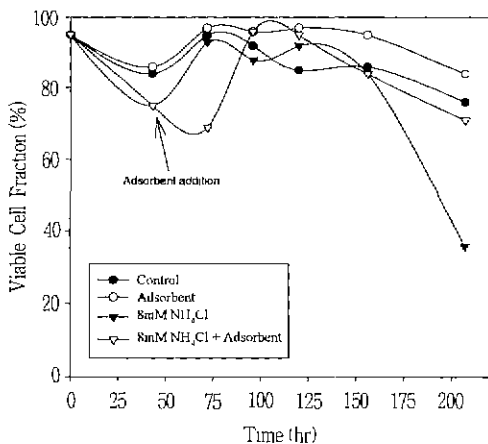


Figure 7. Viable cell fraction change of tPA producing CHO cells cultured with 1g of membrane type immobilized adsorbent.

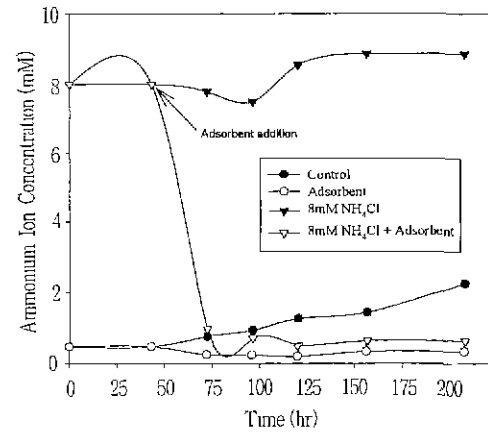


Figure 8. Ammonium ion production kinetics of CHO cells cultured with 1g of membrane type immobilized adsorbent.

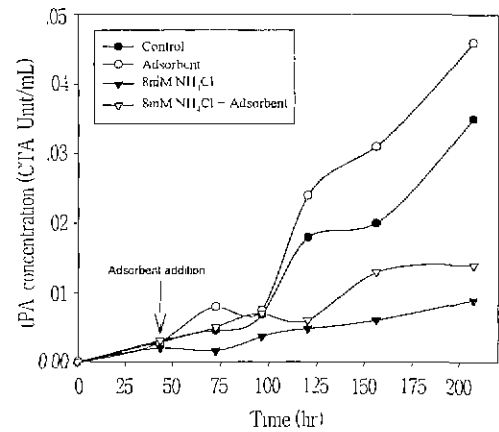


Figure 9. tPA production kinetics of CHO cells cultured with 1g of membrane type immobilized adsorbent.

최적으로 선정된 membrane type의 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 동시제거가 실제 배양 시스템에서 효과적이며, 세포 성장의 증진뿐만 아니라 tPA같은 세포 생산물의 생산성 증진에도 효과적임을 알 수 있다.

#### 고정화 흡착제의 최적 투여 시기

세포배양 시작과 동시에 membrane type 고정화 흡착제를 투여한 결과 오히려 세포 성장에 지해를 가져 왔다. 이는 배양 초기에는 암모늄 이온의 축적이 없어 흡착의 필요성이 없음에도 불구하고 투여된 고정화 흡착제로 인해 세포가 tissue culture flask 바닥에 붙지 못하는 경우가 발생되기 때문으로 판단되며, 이러한 현상은 현미경으로 관찰된 바 있다. 따라서 세포 배양시 고정화 흡착제의 최적 투여 시기를 선정하는 것이 중요하다는 판단 아래 세포 배양 시작 후 매 24시간 주기로 흡착제를 투여하여 세포 성장 및 생존율, 암모늄 이온의 농도를 비교하였다. Figure 10은 membrane type의 고정화 흡착제를 24, 48, 72, 96, 120시간 경과 후 투여했을 때 세포 농도 및 생존율, 암모늄 이온의 농도를 나타낸 것이다. 120시간 경과 후 고정화 흡착제를 투여했을 때는 오히려 고정화 흡착제를 투여하지 않았을 때 보다도 세포 농도가 감소했다. 48시간 경과 후 membrane type의 고정화 흡착제를 투여했을 때 세포 성장 및 생존율이 다른

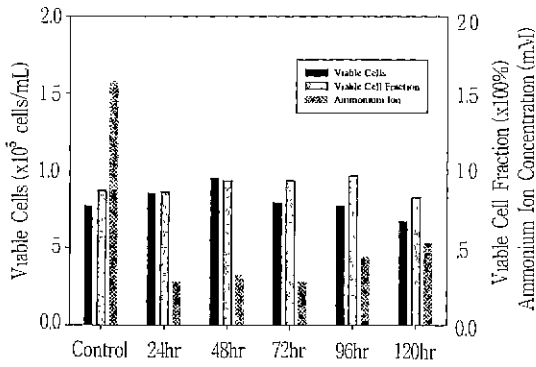


Figure 10. Effect of membrane type adsorbent addition time on the final cell density, cell viability, and ammonium ion concentration. Data were obtained after 6 days culture of tPA producing CHO cells with selected adsorbent.

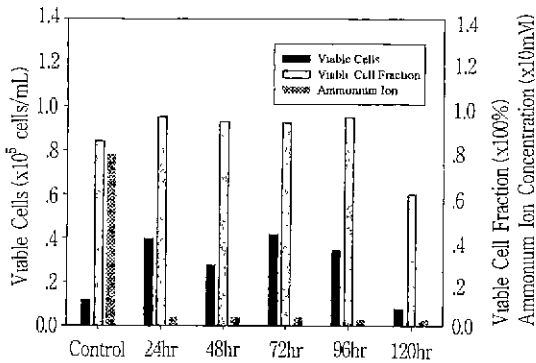


Figure 11. Effect of membrane type adsorbent addition time on the final cell density, cell viability, and ammonium ion concentration. Data were obtained after 6 days culture of CHO cells with selected adsorbent and 8mM initial ammonium ion concentration.

시간에 투여한 것과 고정화 흡착제를 투여하지 않은 시스템보다 더 높게 나타났고, 암모늄 이온 농도 역시 낮게 유지됨을 알 수 있다. 따라서 최적 고정화 흡착제 투여 시기는 배양 시작 후 48시간이었다. Figure 11은 고농도의 세포 배양 조건을 가정하여 8mM의 ammonium chloride를 투여했을 때의 최적 고정화 흡착제 투여 시기를 확인한 결과이다. 이 시스템에서는 72시간 경과 후 고정화 흡착제를 투여했을 때 세포 농도가 가장 높게 나타났고 암모늄 이온 농도도 낮게 유지되었다.

**결 론**

CHO 세포의 성장 및 tPA 생산성을 저해하는 암모늄 이온의 동시 제거를 위해 Phillipsite-Gismondine 합성 zeolite를 alginate, cellulose acetate, dialysis membrane에 고정화하였다. 실제 동물세포 배양 시스템에서 이러한 여러 type의 고정화 흡착제의 암모늄 이온의 제거 효율 및 이에 따른 세포성장의 증진효과를 비교해본 결과 anchorage-dependent CHO 세포를 위한 최적의 고정화 흡착제로 membrane type이 선정되었다. 암모늄 이온의 제거 효과를 더욱더 명확하게 하고 고밀도의 세포

배양을 모사하기 위해 8mM의 ammonium chloride를 첨가하였을 때 membrane type 고정화 흡착제를 투여한 결과 암모늄 이온을 제거하지 않았을 때 보다 최대 세포 농도가 3배 이상 증가하였으며, 생존율 역시 증가하였고 40%정도의 tPA 생산성 향상을 가져왔다. 이러한 결과로부터 최적으로 선정된 membrane type의 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 동시제거가 실제 배양 시스템에서 효과적이며, 세포 성장의 증진뿐만 아니라 tPA 같은 세포 생산물의 생산성 증진에도 효과적임을 알 수 있었고 이러한 증진효과는 고농도 시스템일 때 더욱 크다는 것을 알 수 있었다. 한편 고정화 흡착제의 최적 투여 시기를 조사해본 결과 ammonium chloride를 첨가하지 않았을 때 membrane type 고정화 흡착제의 최적 투여 시기는 배양 시작 후 48시간이었고, 8mM의 ammonium chloride를 첨가한 경우의 최적 투여 시기는 배양 시작 후 72시간이었다.

선정된 고정화 흡착제는 고농도 세포배양 시스템일수록 효과가 더 크게 나타나기 때문에 특히 anchorage-dependent CHO 세포를 microcarrier에 고정화 하여 유가식(fed-batch) 배양 또는 perfusion 배양 등을 수행할 경우에 더욱 더 높은 세포 농도의 증진 효과를 볼 것으로 기대된다. 또한 anchorage-independent CHO 세포의 배양에서도 높은 세포 농도의 증진 효과를 볼 것으로 기대된다. 동물 세포의 배양에 의한 생성물의 생산은 필수적으로 비용의 절감을 위해 고농도 시스템을 요구하게 되는데 이때 문제가 되는 암모늄 이온 제거에 본 연구의 결과가 진요하게 응용될 수 있을 것이다.

**요 약**

CHO 세포의 성장 및 생산성을 저해하는 암모늄 이온의 동시 제거를 위해 Phillipsite-Gismondine 합성 zeolite가 alginate, cellulose acetate, dialysis membrane에 고정화된 흡착제가 개발되었다. 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 제거 효율 및 이에 따른 세포성장의 증진효과를 비교한 결과 최적의 고정화 흡착제로 membrane type이 선정되었다. 암모늄 이온의 제거 효과를 더욱더 명확하게 하고 고밀도의 세포 배양을 모사하기 위하여 8mM의 ammonium chloride를 첨가하고 membrane type 고정화 흡착제를 투여하여 암모늄 이온의 동시제거 효과를 조사한 결과 최대 세포 농도가 3배 이상 증가하였으며 생존율 역시 증가하였고 40%정도의 tPA 생산성 향상을 보여 주었다. 이러한 증진 효과는 암모늄 이온의 고농도 시스템일수록 컸다. 고정화 흡착제의 최적 투여 시기를 조사해본 결과 ammonium chloride를 첨가하지 않았을 때 membrane type 고정화 흡착제의 최적 투여 시기는 배양 시작 후 48시간이었고, 8mM의 ammonium chloride를 첨가한 경우의 최적 투여 시기는 배양 시작 후 72시간이었다.

**감 사**

본 연구는 한국과학재단의 연구비 (과제번호: 941-1100-026-2) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

**참 고 문 헌**

1. Eagle, H. (1955), The specific amino acid requirements

- of a mammalian cell in tissue culture, *J. Biol. Chem.*, **114**, 839-853.
2. Telling, R. C. and Radlett, P. J. (1970), Large-scale cultivation of mammalian cells, *Adv. Appl. Microbiol.*, **13**, 91-119.
  3. Batt, B. C. and Kompala, D. S. (1989), A structured kinetic modelling framework for the dynamics of hybridoma growth and monoclonal antibody production in continuous suspension cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 515-531.
  4. Dalili, M., Sayles, G. D. and Ollis, D. F. (1990), Glutamine-limited batch hybridoma growth and antibody production: experiment and model, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 74-82.
  5. Raivio, K. O. and Seegmiller, J. E. (1973), Role of glutamine in purine synthesis and in guanine nucleotide formation in normal fibroblasts and in fibroblasts deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity, *Biochem. Biophys. Acta*, **299**, 283-292.
  6. Glacken, M. W. (1988), Catabolic control of mammalian cell culture, *Bio/Technology*, **6**, 1041-1050.
  7. Mckeehan, W. L. (1986), Glutaminolysis in Animal Cells, Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells (Morgan, M. J., eds.), p. 111-150, Plenum Press, New York.
  8. Ryan, W. L. and Cardin, C. (1966), Amino acids and ammonia of fetal calf serum during storage, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **123**, 27-30.
  9. Visek, W. J., Kolodny, G. M. and Gross, P. R. (1972), Ammonia effects in cultures of normal and transformed 3T3 cells, *J. Cell Physiol.*, **80**, 373-382.
  10. Butler, M. and Spier, R. E. (1984), The effects of glutamine utilization and ammonia production on the growth of BHK cells in microcarrier cultures, *J. Biotechnol.*, **1**, 187-196.
  11. Jeong, Y. H. (1992), Increase of cell density and monoclonal antibody productivity by *in situ* removal of ammonium ion from hybridoma cell culture media, Ph. D. Thesis, Rutgers University, U.S.A.
  12. Reuveny, S., Velez, D., Macmillan, J. D. and Miller, L. (1986), Factors effecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors, *J. Immunol. Methods*, **86**, 53-59.
  13. Glacken, M. W., Fleischaker, R. J. and Sinskey, A. J. (1986), Reduction of waste product excretion via nutrient control: possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1376-1389.
  14. Miller, W. M., Wilke, C. R. and Blanch, H. W. (1988), Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture, *Bioprocess Engineering*, **3**, 113-122.
  15. Doyle, C. and Butler, M. (1990), The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma, *J. Biotechnol.*, **15**, 91-100.
  16. Glacken, M. W., Adema, E. and Sinskey, A. J. (1988), Mathematical descriptions of hybridoma culture kinetics: 1. Initial metabolic rates, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 491-506.
  17. Ito, M. and Mc Linans, W. F. (1981), Ammonia inhibition of interferon synthesis, *Cell Biol. Int. Rep.*, **5**, 661-666.
  18. Comroy Chevalier, M. J., Robert Gailiot, B. and Chany, C. (1978), Effects of ammonium salts on the interferon-induced antiviral state in mouse L cells, *J. Gen. Virol.*, **41**, 541-547.
  19. Jensen, E. M. and Liu, O. C. (1961), Studies of inhibitory effects of ammonium ions in several virus-tissue culture systems, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **107**, 834-838.
  20. Eaton, M. D. and Scala, A. R. (1961), Inhibitory effect of glutamine and ammonia on replication of influenza virus in ascites tumor cells, *Virology.*, **13**, 300-307.
  21. Furusawa, E. and Cutting, W. (1962), Inhibitory effects of ammonia sulfate on Columbian SK virus propagation in mouse ascites tumor cells in vitro, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 71-75.
  22. Griffiths, J. B. (1973), The effects of adapting human diploid cells to grow in glutamic acid media on cell morphology, growth, and metabolism, *J. Cell. Sci.*, **12**, 617-629.
  23. Hosoi, S., Mioh, H., Anzai, C., Sato, S. and Fujiyoshi, N. (1988), Establishment of Namalva cell lines which grow continuously in glutamine-free medium, *Cytotechnology*, **1**, 151-158.
  24. Hassel, T. E., Allen, I. C., Rowley, A. J. and Butler, M. (1987), The use of glutamine-free media for the growth of three cell lines in microcarrier culture. In "Modern Approaches to Animal Cell Technology" (eds. Spier, R. E. and Griffiths, J. B.), p. 245-263, Butterworths, London.
  25. Hecht, V., Bischoff, L. and Gerth, K. (1990), Hollow fiber supported gas membrane for *in situ* removal of ammonium during an antibiotic fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1042-1050.
  26. Chang, Y. H. D., Grodzinsky, A. J. and Wang, D. I. C. (1995), In-situ removal of ammonium and lactate through electrical means for hybridoma cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 308-318.
  27. Jeong Y.H. and Wang S.S.(1992), *In situ* removal of ammonium ions from hybridoma cell culture media: selection of adsorbent, *Biotechnology Techniques.*, **6**(4), 341-346.
  28. 정연호, 이해익, 전계택, 김익환, S.S.Wang (1996), Ammonium ion effects and its *in situ* removal by using immobilized adsorbent in hybridoma cell culture, *한국생물공학 회지*, **11**(3), 329-339.
  29. Kim, I. H., Jeong, Y. H., Chun, G. T. and Wang, S. S. (1997), Increase of hybridoma cell density and monoclonal antibody productivity by *in situ* removal of ammonium ion with immobilized adsorbent beads, *Animal Cell Technol.*, **8**, 237-247.
  30. Zaoui, D., Fevre, B. L., Magdelenat, H. and Bieth, J. G. (1984), A simple spectrophotometric assay of plasminogen activator: comparison with the fibrinolytic method, *Clin. Chim. Acta*, **141**, 101-109.