

동물세포 배양액으로부터 암모늄 이온의 동시제거를 위한 고정화 흡착제의 개발과 동물세포 배양 시스템에의 응용: II. 세포배양 시스템에의 이용

박 병 곤 · 이 해 익 · 전 계 택¹ · 김 익 환² · †정 언 호
강원대학교 식품생명공학부, 생명과학부¹, 고려대학교 생명공학원²
(접수 : 1998. 3. 18., 게재승인 : 1998. 6. 22.)

Development of an Immobilized Adsorbent for *In Situ* Removal of Ammonium Ion from Animal Cell Culture Media and Its Application to Animal Cell Culture System: II. Application to Cell Culture System

B. G. Park, H. I. Rhee, G. T. Chun¹, I. H. Kim², and † Y. H. Jeong
Division of Food & Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
¹Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
²Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea
(Received : 1998. 3. 18., Accepted : 1998. 6. 22.)

The possibility of application of membrane type immobilized adsorbent to the fed-batch or perfusion culture system with anchorage-independent cells as well as batch system was investigated. The improvement in cell density and cell viability due to the combination of immobilized adsorbent with each culture system was evaluated for the investigation, and the optimum culture system employing immobilized adsorbent system was suggested based on the results. It was observed that the system with immobilized adsorbent showed better cell growth and cell viability than that without immobilized adsorbent in every operation system of batch, fed-batch, and perfusion. In case of batch system, 200% improvement of maximum cell density was observed in the system where ammonium chloride was added on purpose. And 50% improvement of maximum cell density was observed in the fed-batch system where ammonium ion accumulates significantly, while small increase in maximum cell density was observed in the perfusion system where dilution of waste byproducts exists. Especially, the fed-batch system showed the most significant improvement on cell growth because both compensation of nutrient and removal of ammonium ion occurred simultaneously in the system. Therefore a combined system of immobilized adsorbent and fed-batch operation could be suggested as an optimum system with in situ removal of ammonium ion.

Key Words : Chinese hamster ovary(CHO) cells, anchorage-independent cell, immobilized adsorbents, ammonium ion removal, batch, fed-batch, semi-perfusion

서 론

동물세포를 배양함으로써 여러 가지 고부가가치 진단제 및 치료제 등의 의약품을 생산할 수 있다. 그런데 동물세포 배양액에서의 암모늄 이온의 축적은 불가피하다. 그 이유는 세포에 에너지를 공급하고 여러 필요한 물질들의 전구체(precursor)들을 생성하는 glutamine 대사과정에서 암모늄 이온이 부산물로 배출되기 때문이다(1, 2, 3). 동물세포 배양액내의 암모늄 이온의 축

적은 세포 성장 및 세포 생성물의 생산성을 저해한다(4, 5, 6, 7, 8). 따라서 동물세포 배양액에서 암모늄 이온의 축적을 감소시키는 것은 세포 성장과 세포 생성물의 생산성 향상을 위해 매우 중요하다.

동물세포 배양중 암모늄 이온 축적 문제를 해결하기 위한 많은 연구 보고가 있었지만, Phillipsite-Gismondine 같은 zeolite를 이용한 흡착법이 현재까지 가장 효과적인 것으로 보고되었다(8, 9, 10). 그렇지만 zeolite 분말을 직접 생물반응기에 응용하는 것은 세포 및 배양액과의 분리가 용이하지 않고, 생성물의 손실등의 문제점이 발생하기 때문에 zeolite 분말을 여러 가지 matrix에 고정화시킨 고정화 흡착제의 개발이 요구된다. 이를 위해 저자는 최근 cellulose acetate를 matrix로 사용한 film 형태, calcium alginate를 matrix로 이용한 bead 형태, dialysis

† 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

membrane을 이용한 고정화 흡착제 등 다양한 형태의 고정화 흡착제를 개발하여 세포 배양액으로부터 암모늄 이온의 흡착 실험을 통해 그 흡착 성능을 조사하였다(11).

그러나 이 연구 결과는 anchorage dependent cell의 회분식 배양의 경우이었기 때문에 개발된 고정화 흡착제가 다른 세포의 현탁 배양에도 유용하게 사용될 수 있는지, 또한 회분식 뿐만 아니라 유가식이나 perfusion 같은 다른 배양 시스템에도 적용 가능할지 조사되어야 한다(12, 13, 14). 따라서 본 연구에서는 TGF- β 1을 생산하는 anchorage independent CHO 세포를 이용하여 선정된 고정화 흡착시스템을 fed-batch, 또는 perfusion 등의 배양 공정에 적용하여 세포밀도 및 세포 생존율의 향상 여부를 검토하였고, 이를 바탕으로 고정화 흡착제를 응용한 최적의 동물세포 배양공정을 제시하였다. 본 연구를 통해 개발된 고정화 흡착제가 결합된 고농도 동물세포 배양 시스템은 최대 세포농도 및 세포 생성물의 생산성 향상에 크게 기여할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

모델 세포주

TGF- β 1을 생산하는 CHO 세포는 강원대학교에서 자체 개발한 세포를 사용하였다. 이 세포는 TGF- β 1과 dihydrofolate reductase gene을 CHO DHFR⁻ 세포에서 cotransfection과 coamplification시켜 확립한 세포주이다. 조직배양 플라스크에서 배양한 anchorage-dependent 세포를 100mL spinner flask (Bellco)에 5×10^4 cells/mL로 접종한 후 교반속도 80rpm으로 배양하였다. 약 6주 가량 지속적인 계대배양으로 현탁배양 적용(anchorage-independent) CHO 세포를 개발하였다. 본 실험에서는 현탁배양 적용 CHO 세포를 기본 세포주로 하였다.

배지 및 세포배양 조건

CHO cell을 위한 배양액은 medium optimization을 통하여 최적 배지를 확립하여 사용하였다. DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma)과 Nutrient Mixture F-12 HAM (Sigma)를 1:1로 배합한 기본 배양액에 6.5g/L glucose (Sigma), 4mM glutamine(Sigma), 10mM HEPES(Sigma), 2g/L sodium bicarbonate, penicillin(100U/mL)과 streptomycin(100 μ g/L), 그리고 10% fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL)을 첨가하여 사용하였다. 배양액은 0.22 μ m membrane을 이용한 membrane filtration 방법을 사용하였다.

현탁배양 적용 CHO 세포주는 spinner flask(Bellco)를 이용하여 humidifier CO₂ incubator(5% CO₂)내에 설치된 저속 교반기(EYELA) 상에서 70rpm으로 배양하였다. 세포는 1×10^5 cells/mL의 농도로 접종하였고 120시간 마다 계대배양을 하였다.

Membrane type 고정화 흡착제

이전의 보고에서는 membrane type의 고정화 흡착제가 암모늄 이온에 대한 선택성이 높고 세포 성장의 향상에도 유리하며 최적의 고정화 흡착제로 선정된 바 있다 (11). Membrane type의 고정화 흡착제는 dialysis membrane(Sigma)에 Phillipsite-Gismondine zeolite powder를 packing함으로써 비교적 쉽게 만들 수 있다. 먼저 dialysis membrane을 흐르는 물에 3-4 시

간 세척한 후에 0.3% (w/v) sodium sulfide 용액에 1 분 동안 80°C에서 처리하고 황산(0.2%)으로 산성화시킨 후 산을 세척함으로써 황 성분을 제거하여 사용하였다. 본 실험에서는 powder를 채웠을 때의 직경 6mm의 membrane을 사용하였다. 이러한 membrane type의 고정화 흡착제는 spinner reactor의 agitator에 장착시켜 Carberry type의 reactor로 변형시켜 사용하였다. 이러한 membrane type의 고정화 흡착제는 물질전달이 방해받지 않는다면 생물반응기 어디에 설치하여도 관계없으며, 다만 membrane이 조금만 파괴되어도 막 안의 powder가 모두 유출되어 나올 염려가 있으므로 각별히 주의해야 한다.

고정화 흡착제의 여러 배양 시스템에의 응용

본 실험에서는 회분식(batch), 유가식(fed-batch), semi-perfusion의 세 가지 배양 시스템에 고정화 흡착제를 응용하여, 각각의 조합 시스템간의 효율성을 비교하였다. 현탁배양 CHO 세포를 이용한 세 가지 배양 시스템에 고정화 흡착제를 사용하기 위해 2g의 zeolite powder를 dialysis membrane에 packing하여 spinner reactor의 agitator에 장착하였다. 유가식 배양의 경우 고정화 흡착제와 더불어 주요한 영양원인 glucose와 glutamine만을 공급하는 경제적인 방법을 이용하였다. Glucose와 glutamine의 공급 속도는 각각 1.5g/L/day와 300 μ g/10⁶ cells/day로 하였다. semi-perfusion의 경우 고정화 흡착제와 더불어 세포 배양액을 원심 분리한 후 세포만을 회수하여 세렉지로 교환하는 방식으로 수행하였다.

세포농도 및 생존율, 암모늄 이온 농도 분석

세포 성장은 hemocytometer를 이용하여 직접 세포 수를 측정하였고, 세포 생존율은 trypan blue exclusion method에 의해 결정하였다. 암모늄 이온의 농도는 Orion 9512 ammonium ion electrode를 사용하여 측정하였다(15). 0.3, 0.6, 1.3, 2.5, 5.0, 10.0 mM의 ammonium chloride 용액이 standard solution으로 사용되고, 200 μ L의 ammonia pH adjusting solution(5M NaOH/ 0.05M disodium EDTA/ 10% methanol with color indicator, ORION), 그리고 5mL의 standard solution과 sample을 혼합한 후 test-tube 내에서 stirrer bar로 교반되는 상태에서 ammonium ion electrode에 의해 발생하는 기전력을 측정하였다.

결과 및 고찰

고정화 흡착제의 회분식 CHO 세포 배양에의 응용

최근 anchorage dependent 세포의 경우 생물반응기에 가장 효과적으로 응용될 수 있는 고정화 흡착제는 membrane 형태로 보고되었다(11). 이 membrane 형태의 고정화 흡착제가 anchorage-independent 세포 배양에도 유용하게 사용될 수 있는지를 검증하기 위하여 anchorage independent cell line으로 개발된 TGF- β 1을 생산하는 CHO 세포를 모델로 사용하여 현탁 세포 배양 시스템에 적용해 보았다.

또한 지금까지 여러 종류의 고정화 흡착제를 세포배양에 적용한 결과 어느 경우나 암모늄 이온의 제거에는 크게 효과적인 반면 이에 따른 세포의 성장이나 목적물의 생산은 그다지 크게 증진되지 않았다(8, 9, 10). 이 현상은 다음의 두 가지로 설명할

수 있는데 그 첫째 이유는 회분식에서는 심하게 세포 성장을 저해할 정도의 농도까지 암모늄 이온을 축적하지 않기 때문이고, 또 다른 이유는 아무리 암모늄 이온이 제거되어 보다 나은 조건이 형성되었다 하더라도 배양 말기에 영양물질이 고갈되어 더 이상 세포 성장이 불가능하기 때문이다. 따라서 이러한 암모늄 이온의 동시제거의 효과를 보다 확실하게 규명하기 위해서는 암모늄 이온을 의도적으로 첨가함으로써 암모늄 이온의 농도를 저해 농도 이상으로 유지하면서 그 효과를 비교하는 방법과 영양물질의 고갈을 해결해 줄 수 있는 유가식(fed-batch)이나 perfusion 배양과 결합하여 그 효과를 비교하는 방법을 사용할 수 있다. 여기에서는 회분식 배양이므로 외부에서 암모늄 이온을 의도적으로 첨가하여 그 효과를 증진 시켜 관측하는 방법을 사용하였다.

회분식 배양과 고정화 흡착제의 조합 시스템을 위해 2g의 zeolite powder를 packing한 membrane 형태의 고정화 흡착제를 agitator에 장착한 100mL의 spinner reactor 두 조를 준비하여 하나에는 암모늄 이온을 첨가하고(10mM-Adsorbent), 하나에는 암모늄 이온을 첨가하지 않았다(Adsorbent). 또한 고정화 흡착제의 효과를 비교하기 위해 control로서 고정화 흡착제를 첨가하지 않은 두 조의 spinner reactor를 준비하여 하나에는 암모늄 이온을 첨가하고(10mM), 하나에는 암모늄 이온을 첨가하지 않았다(Control). 이렇게 준비된 4조의 spinner reactor를 한꺼번에 CO₂ incubator 안에서 65rpm, 37°C, 7% CO₂의 조건으로 회분식 배양하였다.

Figure 1은 이렇게 준비된 4 조의 spinner reactor에서 배양한 CHO 세포의 성장곡선을 나타내고 있다. 암모늄 이온을 첨가한 경우("10 mM", "10 mM-Adsorbent")의 세포성장이 암모늄 이온을 첨가하지 않은 경우("Control", "Adsorbent") 보다 저조한 것으로 보아 암모늄 이온에 의한 세포 성장 저해를 선명하게 보여주고 있다. 또한 고정화 흡착제를 사용한 경우가("Adsorbent", "10mM-Adsorbent") 고정화 흡착제가 없는 경우("Control", "10mM")보다 세포성장이 향상됨을 보여 주어 membrane 형태의 고정화 흡착제를 사용한 spinner reactor가 CHO 세포의 배양에서 세포의 성장을 증진시키는데 효과적임이

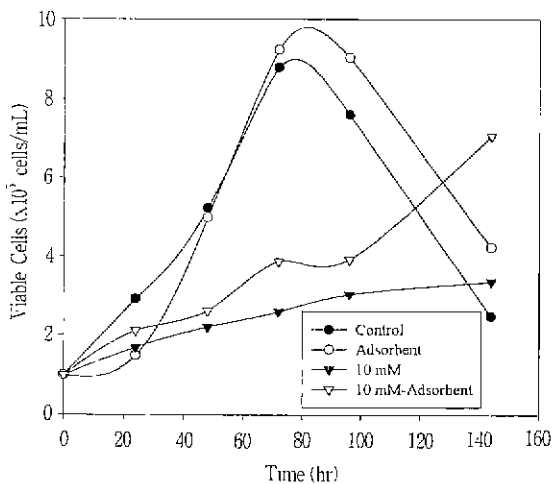


Figure 1. Cell growth kinetics of CHO cells cultured in 100mL spinner reactors attached with 2g of dialysis membrane form immobilized adsorbent. "10mM" represents the run with 10mM initial concentration of ammonium ion.

검증되었다. 또한 흥미로운 사실은 최대 세포농도 기준의 세포 배양의 증진효과가 암모늄 이온을 첨가한 경우("10mM"과 "10mM-Adsorbent"의 비교)에는 200%로서 첨가하지 않은 경우("Control"과 "Adsorbent"의 비교)의 12%보다 더 훨씬 크다는 사실이다. 고정화 흡착제로 인해 암모늄 이온의 농도는 낮게 유지 될 수 있었는데도 불구하고 control의 경우보다 세포성장의 증진 폭이 작았던 이유는 control에서 축적된 암모늄 이온의 농도가 세포 저해 농도에 못 미치기 때문으로 추정된다. 그러나 암모늄 이온의 축적이 심각한 세포의 경우나 유가식 배양(fed-batch)에는 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 동시제거 효과가 훨씬 더 클 것으로 예측된다. 한편 사용한 CHO 세포는 아직 충분히 증폭되지 못하여 생성물의 농도는 측정하지 못하였으나 hybridoma 세포(8, 9, 10)나 tPA 생산 CHO 세포의 경우(11)처럼 암모늄 이온의 제거에 따른 세포성장의 증진이 생산성 향상

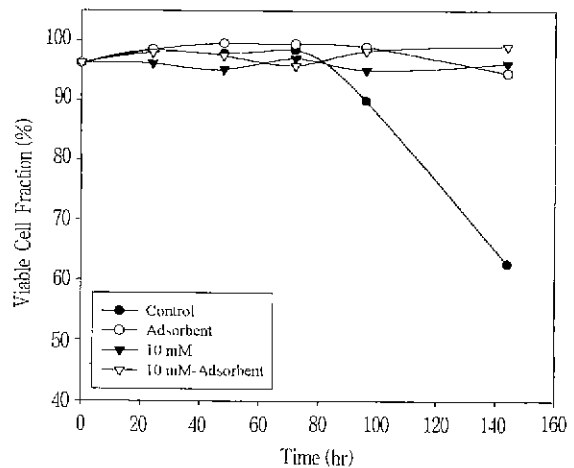


Figure 2. Viable cell fraction change of CHO cells cultured in 100mL spinner reactors attached with 2g of dialysis membrane form immobilized adsorbent. "10mM" represents the run with 10mM initial concentration of ammonium ion.

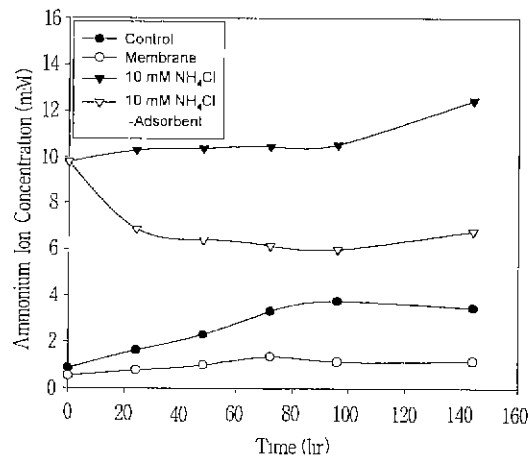


Figure 3. Ammonium ion concentration change of CHO cells cultured in 100mL spinner reactors attached with 2g of dialysis membrane form immobilized adsorbent. "10mM" represents the run with 10mM initial concentration of ammonium ion.

으로 연결될 것으로 예측된다.

Figure 2는 같은 실험에서 CHO 세포의 생존율 변화를 나타내고 있다. 고정화 흡착제를 사용한 경우가("Adsorbent", "10mM-Adsorbent") 고정화 흡착제가 없는 경우("Control", "10mM") 보다 세포성장뿐만 아니라 세포 생존율도 향상됨을 보여 주고 있다. Figure 3은 같은 실험에서 시간에 따른 암모늄 이온의 농도 변화를 나타내고 있다. 이 그림은 암모늄 이온을 첨가한 경우가("10mM", "10mM-Adsorbent") 첨가하지 않은 경우("Control", "Adsorbent")보다 암모늄 이온의 농도가 크게 유지됨을 보여 주어 암모늄 이온의 첨가에 따른 세포 성장의 저해 현상을 설명해 주고 있을 뿐만 아니라, 고정화 흡착제를 사용한 경우가("Adsorbent", "10mM-Adsorbent") 고정화 흡착제가 없는 경우("Control", "10mM") 보다 낮은 암모늄 이온 농도를 유지함을 보여줌으로써 암모늄 이온의 동시제거가 효과적으로 일어나고 있고, 이로 인해 세포성장이 향상되는 이유를 뒷받침하고 있다.

고정화 흡착제의 유가식 배양 공정(Fed-batch culture system)에의 응용

유가식 배양(fed-batch culture)은 영양분이 계속 공급되기 때문에 영양분의 고갈은 해결할 수 있으나 배양기 밖으로의 배출이 없어 암모늄 이온의 축적문제는 해결할 수 없는 한계를 가지고 있다. 더구나 영양분의 계속되는 공급으로 세포의 성장이 왕성하여 암모늄 이온의 축적이 회분식 보다 심각하다. 따라서 개발된 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 동시 제거 방법이 유가식 배양과 병합된다면 이러한 새로운 배양 방식은 영양 고갈 문제와 암모늄 이온의 축적 문제를 해결하는 효율적 배양 공정이 될 것이다.

본 연구에서는 membrane 형태의 고정화 흡착제를 사용하여 현탁 적용 CHO 세포를 유가식으로 배양함으로써 세포 성장 및 세포 생존율의 증진 여부를 조사하였다. 이러한 유가식 배양을 위해 4조의 spinner reactor를 준비하여 2조의 spinner는 접종 후 48 시간 후에 고정화 흡착제가 설치된 agitator로 교환하고, 나머지 2조는 고정화 흡착제 없이 배양을 계속하였다. 또한 접종 후 72 시간부터는 고정화 흡착제가 설치된 spinner reactor와 설치되지 않은 spinner reactor 1조씩을 선택하여 유가식 배양을 시작하였다.

Figure 4는 유가식 배양에서 CHO 세포의 성장곡선을 나타내고 있다. 이 그림에 의하면 glucose, glutamine의 유가식 공급으로 세포 성장이 증진되었고 ("Control"과 "Control-fed"의 비교, "Adsorbent"과 "Adsorbent-fed"의 비교), 또한 membrane 형태의 고정화 흡착제의 사용으로 세포 성장이 증진되었다 ("Control"과 "Adsorbent"의 비교, "Control-fed"와 "Adsorbent-fed"의 비교). 결국 유가식 배양과 고정화 흡착제를 병합한 배양("Adsorbent-fed")에서의 세포성장은 기본 배양("Control") 보다 최대 세포농도 기준으로 50% 향상된 세포 성장을 보여줄 뿐만 아니라 배양말기에서도 상당히 오래 동안 세포성장이 지속됨을 보여 주었다. 따라서 유가식 배양과 고정화 흡착제를 병합한 배양("Adsorbent-fed")은 영양물질 고갈과 암모늄 이온 축적 문제를 동시에 해결할 수 있는 효과적인 배양 방법임을 알 수 있었다.

Figure 5는 이 실험에서의 암모늄 이온의 농도 변화를 나타낸 것이다. 유가식 배양만 하는 경우("Control-fed"), glutamine

의 첨가로 인해 암모늄 이온이 많이 축적되어 있었다. 배양액 내에 glutamine의 농도가 높을 때 glutamine의 소비 속도가 증가하게 되고 암모늄 이온의 생성 속도가 증가하게 되는 것은 잘 알려진 사실이다(3). 따라서 glutamine의 계속되는 공급으로 배양액내의 암모늄 이온 농도가 계속 올라가고 이러한 암모늄 이온을 제거하지 않는 한 세포 성장은 계속 될 수 없다. 따라서 유가식 배양이라도 고정화 흡착제가 첨가되면 "control-fed"의 경우보다 낮은 농도로 암모늄 이온의 농도가 유지될 수 있어서 세포 성장의 증진이 가능해진다. 유가식이 사용되지 않는 경우에도 고정화 흡착제가 첨가되면 "control"의 경우보다 낮은 농도로 암모늄 이온의 농도가 유지되므로 앞서 언급한대로 세포 성장이 증진된다.

Figure 6은 같은 실험에서의 세포 생존율의 변화를 나타내고

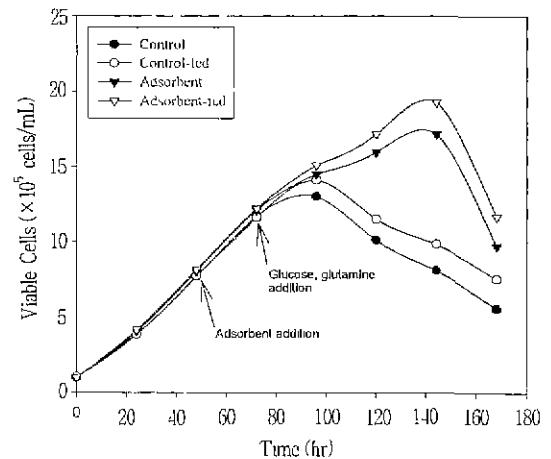


Figure 4. Cell growth kinetics of CHO cells cultured in 100mL spinner reactors. For "adsorbent-" run, agitator attached with 2g of dialysis membrane form immobilized adsorbent was changed after 2 days. For "fed-"run, fed batch adding of glucose and glutamine was started after 3 days

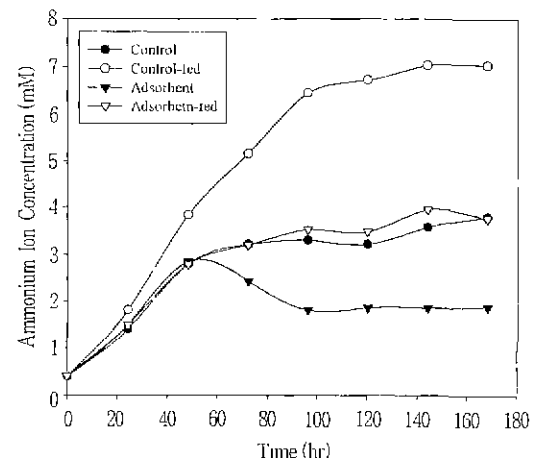


Figure 5. Ammonium ion concentration change of CHO cells cultured in 100mL spinner reactors. For "adsorbent-" run, agitator attached with 2g of dialysis membrane form immobilized adsorbent was changed after 2 days. For "fed-"run, fed batch adding of glucose and glutamine was started after 3 days.

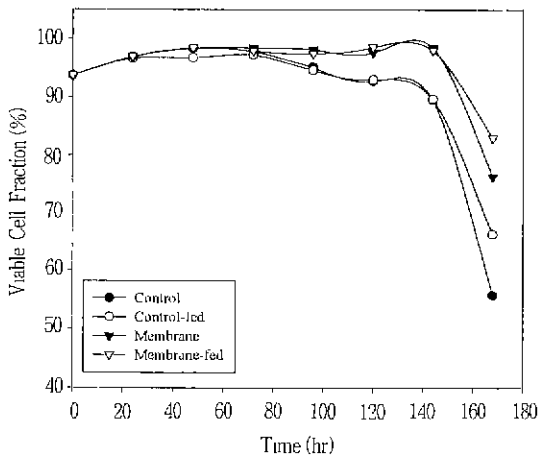


Figure 6. Viable cell fraction change of CHO cells cultured in 100mL spinner reactors. For “adsorbent-” run, agitator attached with 2g of dialysis membrane form immobilized adsorbent was changed after 2 days. For “fed-” run, fed batch adding of glucose and glutamine was started after 3 days.

있다. 유가식 배양을 한 경우(“Control-fed”, “Adsorbent-fed”)가 회분식 배양(“Control”, “Adsorbent”)보다, membrane 형태의 고정화 흡착제를 사용한 경우(“Adsorbent”, “Adsorbent-fed”)가 사용하지 않은 경우(“Control”, “Control-fed”) 보다 세포의 생존율이 향상되었다. 결국 유가식 배양과 고정화 흡착제를 병합한 배양(“Adsorbent-fed”)에서의 세포 생존율은 기본배양(“Control”) 보다 훨씬 더 좋은 세포 생존율을 보여 주고 있다.

고정화 흡착제의 Perfusion 배양 공정에서의 응용

유가식 배양(Fed-batch culture)은 영양분의 고갈은 해결할 수 있으나 암모늄 이온 등의 축적문제는 해결할 수 없는 한계를 가진 배양 공정이며 고정화 흡착제를 이용하여 성능이 향상될 수 있음을 위에서 알 수 있었다. Perfusion 배양의 경우 세포를 배양기에 그대로 머물게 하면서 계속 새로운 배양액을 공급하고 사용된 배양액은 배출시킨다. 따라서 이 경우에 고갈된 영양물질의 보충과 축적된 노폐물의 배출이 동시에 이루어짐으로써 세포 성장의 증진이 가능하다. 하지만 노폐물의 농도를 낮추기 위해 사용 안된 값비싼 serum 성분이 배출되어야 하는 단점이 있다. 이러한 perfusion 배양에 고정화 흡착제가 사용되면 perfusion rate를 줄임으로써 값비싼 serum 성분뿐만 아니라 배양액의 소모량을 줄일 수 있어 훨씬 경제적인 공정이 될 수 있다.

따라서 본 연구에서는 세포 성장 증진에 효과가 있었던 membrane 형태의 고정화 흡착제를 현탁 적용 CHO 세포의 perfusion 배양공정에 응용함으로써 보다 경제적인 배양공정을 개발하려 하였다. 이를 위해 8조의 spinner를 준비하여 접종 후 48시간에 절반은 membrane type의 고정화 흡착제를 첨가하고 (agitator 교환) 절반은 그대로 배양하였다. 또한 같은 48 시간 후에 membrane이 설치되어 있는 spinner와 그렇지 않은 spinner를 한 조로하여 각각 다른 perfusion rate로 perfusion을 시작하였다. Perfusion rate는 하루에 0mL(no perfusion), 20mL, 40mL, 80mL의 배양액을 세포 원심분리한 후 교환하는

형식으로 수행하였다.

Figure 7은 고정화 흡착제를 CHO 세포의 perfusion 배양공정에 응용한 경우의 세포 성장 곡선을 나타낸다. Perfusion rate가 증가할수록 그리고 같은 perfusion rate에서도 20 mL/day 이상에서는 고정화 흡착제와 함께 배양한 시스템일수록 세포성장률이 증진되어 특히 배양 말기에 고농도로 유지되고 있다. 따라서 고정화 흡착제는 perfusion 배양공정 중 perfusion rate가 커서 세포가 고농도로 자라는 경우의 세포증진에 효과적임을 알 수 있다. 하지만 유가식 배양만큼 세포 증진 효과가 크지는 않았다. Figure 8은 같은 실험에서의 세포의 생존율의 변화를 나타내고 있는데, 대체적으로 perfusion rate가 증가할수록 그리고 같은 perfusion rate에서도 고정화 흡착제와 함께 배양한 시스템일수록 생존율이 향상되었다.

Figure 9는 같은 실험에서의 암모늄 이온 농도의 변화를 나타내고 있는데 perfusion rate가 증가할수록 노폐물의 제거 속도가 커서 암모늄 이온의 농도가 낮아질 것으로 예상된다. 하지만 계속적으로 공급되는 배양액 중에 glutamine이 포함되어 있고 또한 세포 농도의 상승으로 암모늄 이온의 생산 속도가 증가되어, perfusion rate가 증가하더라도 perfusion이 없는 control의 경우보다는 낮으나 암모늄 이온의 농도가 크게 감소되지 않음을 보여주고 있다. 따라서 perfusion rate의 증가에 따른 세포 성장의 향상은 노폐물의 제거 효과보다는 고갈된 영양액의 보충 효과가 더 공헌하였을 가능성이 크다. 하지만 Figure 9에 의하

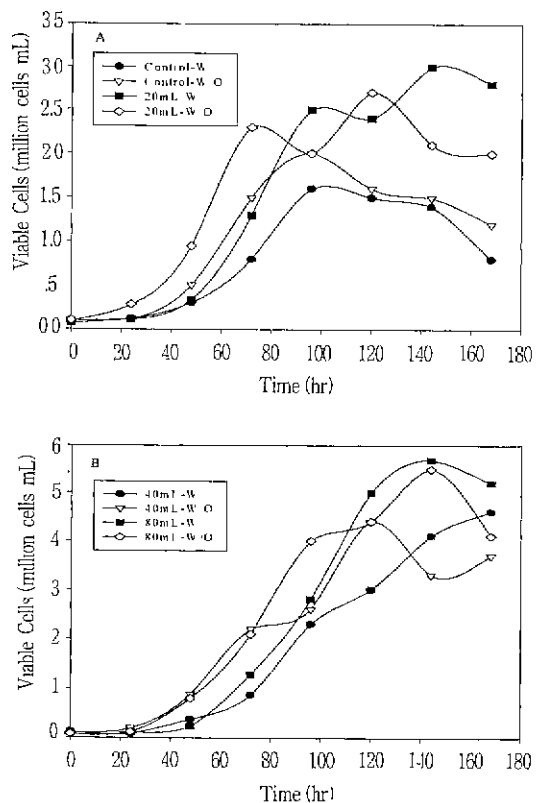


Figure 7. Cell growth kinetics of CHO cells cultured in 100mL spinner reactors with perfusion operation. “20mL” represents the run with medium change of 20mL per a day “W” represents runs with adsorbents and “W/O” without adsorbents.

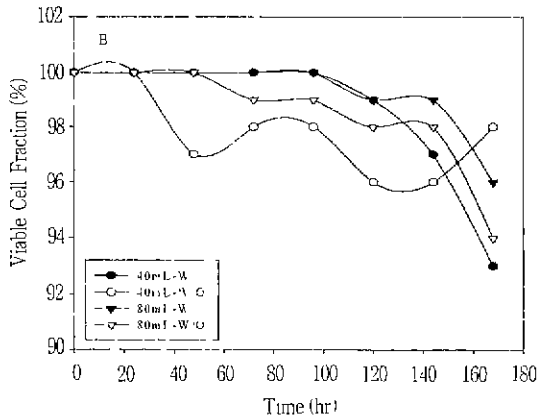
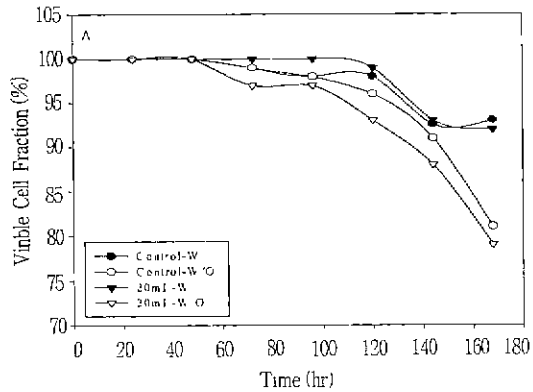


Figure 8. Viable cell fraction change of CHO cells cultured in 100mL spinner reactors with perfusion operation. "20mL" represents the run with medium change of 20mL per a day "W" represents runs with adsorbents and "W/O" without adsorbents.

면 고정화 흡착제가 첨가된 시스템에서는 같은 perfusion rate 라 할 지라도 더 낮은 암모늄 농도를 유지하기 때문에 이로 인한 세포 성장의 상승효과를 뒷받침할 수 있다. 근본적으로 perfusion 배양에서는 노폐물의 제거 효과가 있기 때문에 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 동시제거 효과가 감소되어 Figure 7에서 보여주는 것 같이 세포 증진의 큰 효과는 기대하기 어렵다. 그렇지만 앞서 언급한 대로 이러한 perfusion 배양에 고정화 흡착제가 사용됨으로써 perfusion rate를 줄이고도 같은 정도의 세포 성장을 기대할 수 있다면 훨씬 경제적인 공정이 될 수 있다.

결 론

Anchorage-independent CHO세포를 dialysis membrane 형태의 고정화 흡착제를 설치한 spinner에서 회분식으로 배양한 결과 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 제거는 최대 세포농도를 12%정도 증진시켰을 뿐 아니라 생존율도 증진시켰다 특히 이러한 고정화 흡착제에 의한 세포 농도나 세포 생존율 증대 효과는 암모늄 이온의 축적이 심한 시스템일수록 효과적이어서 외부에서 암모늄 이온을 10mM 첨가한 경우에는 최대 세포농도 기준으로 200% 이상의 세포 성장 증진효과를 보여주었다

CHO 세포의 유가식 배양 공정에 membrane 형태의 고정화

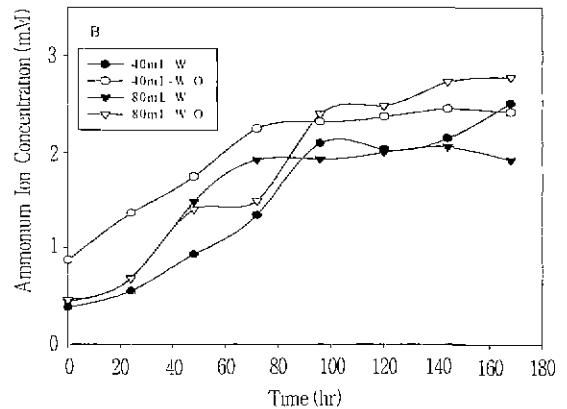
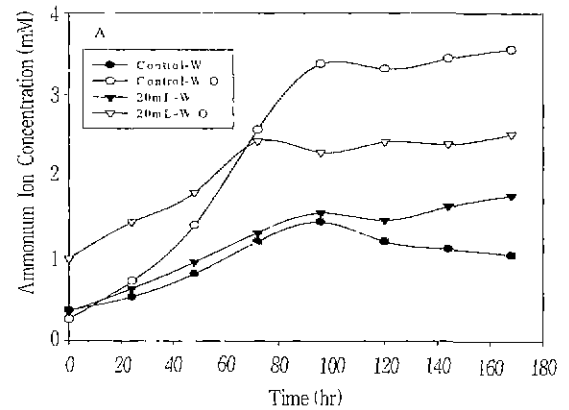


Figure 9. Ammonium ion concentration change of CHO cells cultured in 100mL spinner reactors with perfusion operation. "20mL" represents the run with medium change of 20mL per a day. "W" represents runs with adsorbents and "W/O" with out adsorbents.

흡착제를 적용하여 본 결과 유가식 배양과 고정화 흡착제를 병합한 배양에서의 세포성장 및 세포 생존율이 보통의 회분식 배양에 비해 최대 세포농도 기준으로 50% 향상되었고 배양말기에서도 상당히 오래 동안 세포성장이 지속될 수 있었다. 따라서 유가식 배양과 고정화 흡착제를 병합한 새로운 배양 방식은 영양물질 고갈과 암모늄 이온 축적 문제를 동시에 해결할 수 있는 효과적인 배양 방식임을 알 수 있었다. 더구나 유가식 배양만 하는 경우 glutamine의 침가로 인해 암모늄 이온이 많이 축적되어서 고정화 흡착제에 의한 해결 없이는 더 이상의 세포성장 증진이 불가능함도 알 수 있었다.

CHO 세포의 perfusion 배양 공정에 membrane 형태의 고정화 흡착제를 적용하여 본 결과 고정화 흡착제의 사용은 perfusion rate가 커서 세포가 고농도로 자라는 경우의 세포성장 증진에 효과적이었으나 유가식 배양만큼 세포 증진 효과가 크지는 않았다. 세포의 생존율도 대체적으로 perfusion rate가 증가할수록 그리고 같은 perfusion rate에서도 고정화 흡착제와 함께 배양한 시스템일수록 생존율이 향상되었다. Perfusion rate가 증가할수록 노폐물의 제거 효과가 있기 때문에 세포 농도가 높더라도 암모늄 이온의 축적이 심각하지 않았고 따라서 고정화 흡착제에 의한 암모늄 이온의 동시제거 효과가 약화되어 세포성장 증진의 큰 효과는 기대하기 어려웠다. 결론적으로 개발된 고정화 흡착제를 이용한 암모늄 이온의 동시제거가 효

과적으로 수행될 수 있는 시스템은 유가식 배양과 결합된 배양 공정이다.

요 약

Membrane type의 고정화 흡착제가 anchorage-independent 세포에도 유용하게 사용될 수 있는지 또한 회분식 뿐만 아니라 유가식이나 perfusion 같은 다른 배양 시스템에도 적용 가능한지 조사되었다. 이를 위해 고정화 흡착제가 결합된 각각의 배양 공정에서의 세포밀도 및 세포 생존율의 향상 여부를 조사하였고 이를 바탕으로 고정화 흡착제를 응용한 최적의 동물세포 배양공정을 제시하였다. 조사결과, 회분식과 유가식, semi-perfusion 배양 시스템 모두에서 고정화 흡착제를 첨가한 경우가 고정화 흡착제를 첨가하지 않은 경우보다 높은 세포밀도 및 생존율을 나타냈다. 이러한 세포성장 증진 효과는 회분식의 경우 암모늄 이온을 의도적으로 첨가한 시스템에서 최대 세포농도 기준으로 200% 이었다. 또한 노폐물의 회색효과가 있는 perfusion 공정에서는 증진 효과가 미미한데 비해 암모늄 이온의 축적이 심각한 유가식 배양에서는 최대 세포농도 기준으로 50%의 세포증진 효과를 보여주었다. 특히 유가식 배양의 경우 영양물질의 공급과 암모늄 이온의 제거가 동시에 진행되기 때문에 세포성장 효과가 가장 큰 시스템이었다. 따라서 개발된 고정화 흡착제를 이용한 암모늄 이온의 동시제거가 가장 효과적으로 수행될 수 있는 시스템은 유가식 배양과 결합된 배양공정이다.

감 사

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

참 고 문 헌

- Reitzer, L. J., Wice, B. M. and Ozand, P. T. (1984), Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **254**, 2669-2676.
- Zielke, H. R., Zielke C. L., and Ozand P. T. (1984), Glutamine : a major energy source for cultured mammalian cells, *Federation Proc.*, **43**, 121-125.
- Jeong, Y. H. and Wang, S. S. (1995), Role of glutamine in hybridoma cell culture: Effect on cell growth, antibody production and cell metabolism, *Enzyme and Microbial Technol.*, **17**, 47-55.
- Mc Queen, A. and Bailey, J. E. (1991), Growth inhibition of hybridoma cells by ammonium ion : correlation with effects on intracellular pH. *Bioprocess Eng.*, **6**, 49-61.
- Maribel, M., Navarro, A., Lopez, A., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C. and Franco, R. (1997), Ammonium toxicity in different cell lines, *Biotechnol. Bioeng.*, **56**, 530-537.
- Ryll, T., Vally, U. and Wagner, R. (1994), Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 184-193.
- Martinelle, K. and Haggstrom, L. (1993), Mechanism of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes, *J. Biotechnol.*, **30**, 339-350.
- 정연호, 이해익, 전계택, 김익환, S.S.Wang (1996), Ammonium Ion Effects and Its *in situ* removal by Using Immobilized Adsorbent in Hybridoma Cell Culture, *한국생물공학회지*, **11**(3), 329-339.
- Jeong Y.H. and Wang S.S.(1992), *In situ* removal of ammonium ions from hybridoma cell culture media: selection of adsorbent, *Biotechnology Tech.*, **6**(4), 341-346.
- 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.
- 박병곤, 전계택, 김익환, 정연호 (1998), 동물세포 배양액으로부터 암모늄 이온의 동시 제거를 위한 고정화 흡착제의 개발과 동물세포 생물반응기에의 응용: I. 흡착시스템 개발, *한국생물공학회지*, **13**(4), 404-410.
- Hayter, P. M., Curling, E. M. A., Baines, A. J., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P. G. and Bull, A. T. (1991), Chinese hamster ovary cell growth and interferon production kinetics in stirred batch culture, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, **34**, 559-564.
- Theodora, A. B. and David, K. R. (1995), In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production, *Biotechnol. Prog.*, **11**, 1-13.
- Nienke, V., Bastian, R., Karel, C. A. M. L. and Johannes, V. D. (1997), Effects of glutamine supply on growth and metabolism of mammalian cells in chemostat culture, *Biotechnol. Bioeng.*, **54**, 272-285.
- Ozturk, S. S., Meyerhoff, M. E. and Palsson, B. O. (1989), Measurement of ammonia and glutamine in cell culture media by gas sensing electrodes, *Biotechnol. Tech.*, **3**, 217-222.