

동물 세포 반응기에서의 초미세 통기법이 산소 전달 속도와 세포 생존율에 미치는 영향

김정모 · 장건희¹ · 최춘순² · 김정희*

한국과학기술원 생물과학과, ¹삼성정밀화학연구소, ²광주보건전문대학 식품공학과

Effect of Microsparged Aeration on Oxygen Transfer Rate and Cell Viability in Mammalian Cell Culture Bioreactor. Kim, Jung Mo, Kern Hee Chang¹, Choon Soon Choi², and Jung Hoe Kim*. Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology ¹Samsung Fine Chemicals Co. R & D Center, ²Department of Food Technology, Kwangju Health College - The effect of microsparged aeration in mammalian cell bioreactor on the oxygen transfer rate and cell viability was studied. The microspargers with different micron-sized pores were used to supply oxygen to the medium. The oxygen transfer coefficients (k_{La}) measured in the bioreactor were markedly increased, which is due to the increase of the contacting area between air bubbles and liquid medium when the pore size of microsparger decreases. When the impellers of two different types (square-pitch marine impeller and 45° pitched flat blade impeller) were used for agitation, the k_{La} values were slightly higher with the marine impeller than with the blade impeller. The detrimental effect of direct gas sparging with microsparger on mammalian cells was investigated in bubble columns with various air flow rates and different pore sized microspargers. The first-order cell death rate constant (k_d) was shown to be directly proportional to the air flow rate and inversely proportional to the pore size. During the cultivation of hybridoma cells using microsparger with the pore size of 0.5 μm in the mammalian cell culture bioreactor, the continuous sparging caused the cell death and suppressed the cell growth. However, cells grew normally and cell viability was maintained above 90% in the logarithmic phase when the air was intermittently sparged in order to maintain the dissolved oxygen level above 20%.

Key words: Microsparger, oxygen transfer rate, cell death rate

동물 세포의 대량 배양은 1960년대에 baby hamster kidney(BHK) cell의 연속 배양을 시작으로 1980년대 중반부터 연구와 산업화에 대한 노력이 활발히 진행되어, 현재까지 단일 클론 항체, 혈압강화제, 조혈제, 혈액응고제, 인터페론, 백신 등과 같은 의약품 단백질을 생산하는 데에 이용되고 있다[1,2,6,14,17].

배양 공학적인 측면에서 볼 때 동물세포는 미생물 세포와는 달리 세포를 외부의 기계적인 힘으로부터 보호할 수 있는 튼튼한 세포벽이 없다는 것이 주요 특징이다. 즉, 약한 원형질막이 직접 배양 환경조건에 노출되므로, 유체의 유동에 의해 발생하는 기계적인 힘에 매우 민감하다[9]. 그러므로, 산소전달을 증가시키기 위하여 격렬한 교반을 할 수가 없기 때문에 세포 배양 장치 설계시, 교반시 발생하는 전단 응력을 최대한으로 낮추면서 세포가 필요로 하는 산소를 충분히 공급해야 된다는 서로 상충되는 문제가 발생한다. 주요 문제점들로는, 세포반응기 내에서 교반시 발생하는 전

단 응력 때문에 세포가 죽어 가는 문제점, 배지 내에 있는 혈청 단백질 때문에 심한 거품과 거품이 깨질 때 발생하는 hydrodynamic force에 의해 세포가 손상을 받는 문제 때문에 세포가 필요로 하는 산소를 공급할 때 특수한 통기법을 고안해야 한다는 점, 배양 시간이 길기 때문에 미생물 오염의 우려가 높은 점 등을 들 수 있다[1,4,5,7,12]. 따라서, 대량 배양을 위해선 이상과 같은 문제점을 해결 또는 극소화 시켜야한다. 동물 세포 반응기의 설계시 작은 전단응력, 높은 혼합 능력, 최적의 산소 전달 시스템, scale-up의 가능성 등이 고려해야 할 중요한 조건들로 여겨지고 있다[3].

본 연구에서는 산업적으로 많이 쓰이는 교반식 탱크 반응기내에서 microsparger를 사용한 직접 통기법이 산소 전달 속도와 세포의 생존율에 미치는 영향에 관한 기초연구를 수행하였다. 이를 위해 microsparger의 통기 구멍 크기와 임펠러 형태를 달리 하여 산소 전달 속도를 측정하였고, 100 μm 이하의 통기 구멍 크기를 가진 microsparger를 이용하여 통기 구멍의 크기에 따른 세포의 손상 정도를 측정, 비교하였다. 또한 실제로 소형 교반식 반응기 내에서 microsparger를 이용한 통기법을 사용하여 세포를 배양하여, 세포 생존율과 세포 성장을 관찰하였다.

*Corresponding author
Tel. 042-869-2614, Fax. 042-869-5614
E-mail: kimjh@mail.kaist.ac.kr

재료 및 방법

모형 세포 반응기 제작 및 DO, pH 측정을 위한 시스템 구축

외경이 28 cm, 내경이 26 cm, 두께가 1 cm, 높이가 50 cm인, 아크릴로 된 원통형 모형 세포 반응기를 제작한 뒤 여기에 교반 장치를 설치하였다. 내부에 장치할 임펠러들은 3개의 날개가 있는 프로펠러형 (Square-pitch marine impeller)과 45°로 경사진 4개의 평판형 날개가 있는 임펠러(45° pitched flat blade impeller)를 이용하였다. 같은 형태의 임펠러를 두 개 부착하여 사용하였으며, 프로펠러형 임펠러의 경우 지름이 12 cm이고 높이가 3 cm 이었으며, 하층 임펠러와 바닥 사이의 거리는 5.8 cm, 임펠러 사이의 간격은 12 cm로 하였다. pitched flat blade 임펠러의 경우 지름이 13 cm이고 높이가 2 cm 이었으며, 하층 임펠러와 바닥사이의 거리, 임펠러 사이의 간격은 각각 6.2 cm, 13 cm로 하였다[20].

통기장치로는 통기 구멍 크기가 각각 40 μm, 20 μm, 0.5 μm인 세 종류의 microsparger(직경 15 cm)를 사용하였다. 제작된 모형 세포 반응기에 pH electrode (Metter-Toledo GmbH., Switzerland), DO probe(Ingold Electrodes, Swiss)를 부착하고 이들 probe들로부터 출력되는 신호를 PC에 입력되게 하는 on-line 시스템을 구축하였다(Fig. 1).

배지 내에 용존 산소 농도는 DO probe를 가지고 측정하였다. DO probe로 측정된 용존 산소 농도는 전압 신호로서, 아날로그 신호로 출력되었고, 이 신호는 interface card(DT2805, DATA TRANSLATION)를 거쳐 증폭되어, 디지털 신호로 전환되어 5초 간격으로 컴퓨터(IBM-PC/AT-386)로 전달되었다. 컴퓨터에 전달된 전압값은 계산식에 의해 용존 산소 농도(%)로 환산되어 화면상에 표시되었고, 컴퓨터의 하드디스크에 저장되었다.

산소 전달 계수(k_La)의 계산

산소 전달 계수(k_La)를 구하기 위해, 일반적으로 많이 쓰이고 있는 dynamic method를 이용하였다[8].

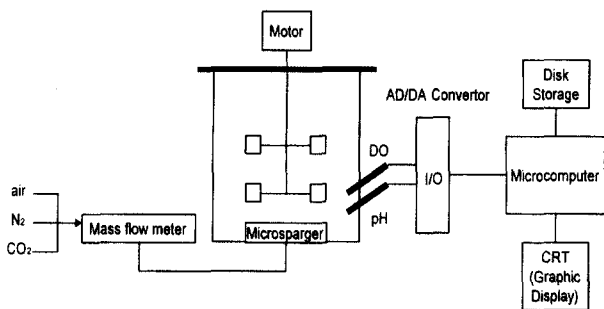


Fig. 1. Schematic diagram of system for measurement of k_La.

세포주 및 배지

배양에 사용된 세포는 carcinogen-induced B cell tumor (38C13)에 대한 anti-idiotypic antibody를 분비하는 S3H5/γ2bA2 hybridoma 세포로 한국과학기술원 이균민 교수님으로부터 분양받아 사용하였다[19]. 계대 배양시, 세포는 5.0% CO₂ incubator(Forma Scientific, Marietta, OH)에서, T-75 flask(Nunc, Denmark)내에서 배양되었다. 배지는 IMDM을 사용하였으며, 5%의 Fetal bovine serum(FBS, Gibco Laboratories, NY, USA)과 100U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin을 첨가하였다.

Bubble column내에서 통기시 공기 방울 크기에 따른 세포의 손상 정도 비교

사용된 bubble column은 내경 2.5 cm, 높이 25 cm인 유리 관이었으며, 세 개의 유리관에 통기 구멍의 크기가 각각 1 mm, 40 μm, 0.5 μm인 sparger들(직경 2.5 cm)을 부착하였다. 우선, 시험에 사용할 세포들은 T-185 flask((Nunc, Denmark)에 약 2×10⁵ cells/ml로 접종한 후, 대수기 중에 있는 세포들을 얻기 위해 50시간동안 배양하였다. 이때 배지는 IMDM을 이용하였으며, bubble column에서 통기시 과다한 거품 생성을 방지하기 위해 혈청을 2%로 낮추어 첨가하였다.

T-185 flask상에서 배양을 한 배양액을 모아 100 ml씩 bubble column에 옮겨 통기를 시작하였다. 이 때의 세포 농도는 0.8-1×10⁶ cells/ml 정도로 배양시마다 거의 일정하였다. 배양액의 pH 조절을 위해 5% CO₂가 들어있는 공기를 bubble column 바닥에 부착되어 있는 sparger를 통해 주입하였다. 통기시 bubble column내에서 과다한 거품 생성을 방지하기 위해 antifoam B emulsion(Sigma Chemical Co., USA)을 통기 조건에 따라 0.005%에서 0.01%까지 첨가하였다. 모든 실험은 clean bench 내에서, 상온(20-25°C)에서 행해졌으며, 같은 조건하에서 3회 반복하여 행해졌다.

세포의 비사멸 속도 상수(k_d) 계산

세포의 사멸 속도(cell death rate)는 세포 성장 속도(cell growth rate)와 비슷하게 first-order kinetics로 나타낼 수 있다.[10,16]

$$\frac{dN}{dt} = -k_d N$$

위 식을 적분하면,

$$\ln \frac{N}{N_0} = -k_d t$$

단, k_d: specific death rate constant (h⁻¹)

N: viable cell number (cells/ml)

N₀: initial viable cell number (cells/ml)

t: time (h)

그러므로, 세포 생존율의 로그 함수($\ln \frac{N}{N_0}$)를 시간(t)의 함수로 plotting하여 기울기로부터 k_d 를 구하였다.

실제 실험은 bubble column에 배양액을 옮긴 뒤, 통기 시작부터 한 시간마다 각각의 column으로부터 배양액을 0.5 ml씩 두 번을 취하여 생존 세포수들을 측정한다 뒤 평균 값을 취하였다. 생존 세포수는 hemacytometer(Hauser Scientific, PA, USA)를 이용해 Trypan blue exclusion법으로 측정하였다.

반응기 내에서의 세포 배양

제작된 모형반응기의 부피가 너무 커서 실제 micro-sparger를 이용한 반응기 내에서의 세포배양특성 조사실험은 (주)KoBiotech에서 생산된 직경 13 cm의 2.5 L round bottom vessel로 된 배양기를 이용하였으며, 배양액의 부피는 1.8 L로 하였다. 세포는 2×10^5 cells/ml의 농도로 접종하였으며, 배양 온도는 항상 37°C로 유지하였다. pH는 5% CO₂가 들어있는 공기를 사용하여 7.0-7.5로 유지하였다.

우선, 대조 실험으로 통기에 의한 세포 손상이 없는 통기 장치인 silicon rubber tube(외경 4 mm, 내경 3 mm, 길이 9 m, Silastic tubing, Dow Corning)를 반응기에 설치하여 세포를 배양하였다. 그 후 silicon tube를 제거하고, 통기 구멍 크기가 0.5 μm인 microsparger(직경 4 cm)를 vessel 바닥에 설치하여 세포를 배양하였다. 이때 거품을 제거하기 위해 antifoam B emulsion을 증류수를 이용하여 1/5로 희석한 액을 배양액 내에 첨가하였다. 교반 속도는 30 rpm으로 하였으며, 통기 속도를 조절하여 20%이상의 용존 산소 농도를 유지하였다.

결과 및 고찰

통기 구멍 크기와 임펠러 형태가 산소 전달 속도에 미치는 영향

통기시 산소 전달 속도는 주로 교반 속도, 통기 속도, 기체가 단위 부피당 액체와 맞닿아 있는 표면적에 비례한다. 제작된 모형반응기에서 물을 매질로 사용하여 통기하였을 때 산소 전달 계수(k_{La}) 값은 5-20 h⁻¹ 정도였고(Fig. 2), 배지를 매질로 사용하여 통기하였을 때는 5-50 h⁻¹ 정도로(Fig. 3-4) 배지를 매질로 사용하였을 때가 훨씬 높았다. 통기시에 공기 방울이 sparger에서 나와서 액의 표면까지 이동할 때 방울끼리 서로 응집되는 현상이 나타났다. 응집이 일어나면 공기 방울의 크기가 커져 산소 전달속도는 감소하게 된다. 매질로 배지를 이용했을 때는 배지내의 성분들로 인해 공기방울의 표면이 포화되어, 공기 방울이 서로 뭉치는 현상이 적어지므로 산소 전달이 증가했을 것으로 추정된다[21].

통기 구멍의 크기가 다른 microsparger를 사용하여 k_{La}

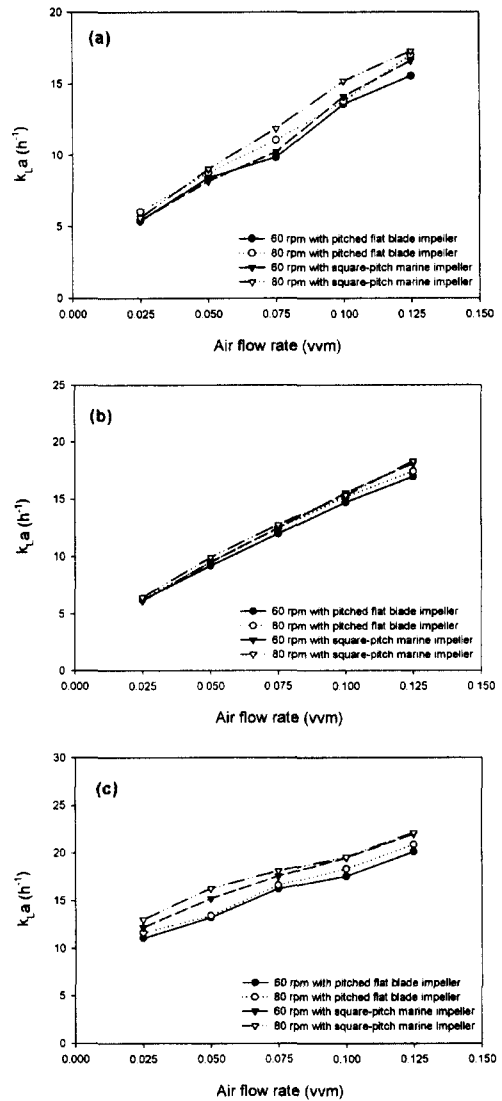


Fig. 2. Effects of agitation and aeration rates on k_{La} in distilled deionized water. Pore size of sparger : 40 μm (a), 20 μm (b), 0.5 μm (c).

값을 측정하여 본 결과, 통기 구멍의 크기가 작아질수록 k_{La} 값은 더 커졌다. 이는 물을 사용했을 때와 배지를 사용했을 때 모두 같은 경향을 보였다. 통기 구멍이 작을수록 상대적으로 더 작은 공기 방울이 생성되어 표면적이 커졌기 때문인 것으로 추정된다. 물을 사용하였을 때의 sparger의 통기 구멍 크기에 따른 k_{La} 값의 변화와 배지를 사용했을 때의 k_{La} 값의 변화를 살펴보면, 배지를 사용했을 때, 통기 구멍 크기의 감소에 따른 k_{La} 값의 증가가 훨씬 크다. 배지를 매질로 하여 통기시, 매질이 물이었을 때보다 공기 방울의 응집현상이 적으므로, 통기구멍의 크기가 다른 sparger들에서 생성된 공기 방울들의 크기들이 물을 사용했을 때보다, 더 차이가 많이 나서 이와 같은 결과가 나온 것으로 보인다.

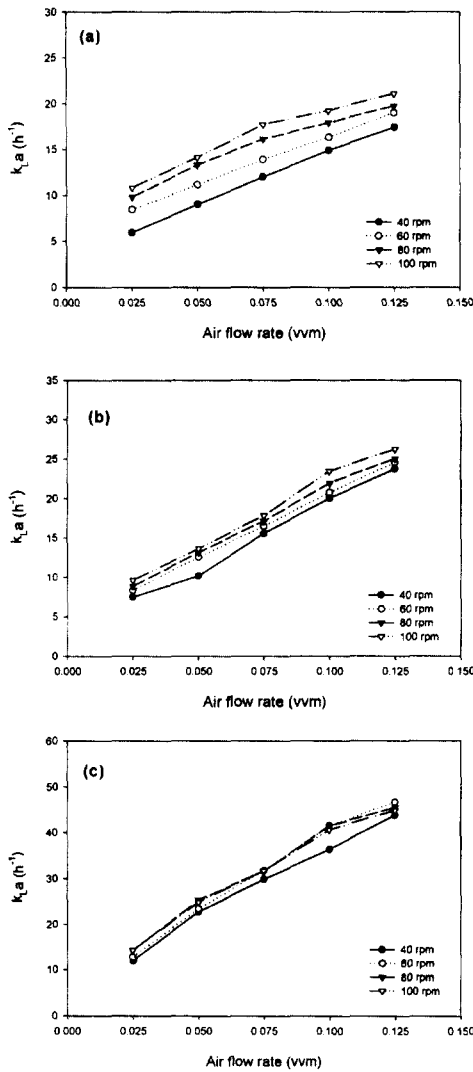


Fig. 3. Effects of agitation and aeration rates on $k_L a$ in bioreactor with pitched flat blade impeller. Pore size of sparger: 40 μm (a), 20 μm (b), 0.5 μm (c). Medium: DMEM.

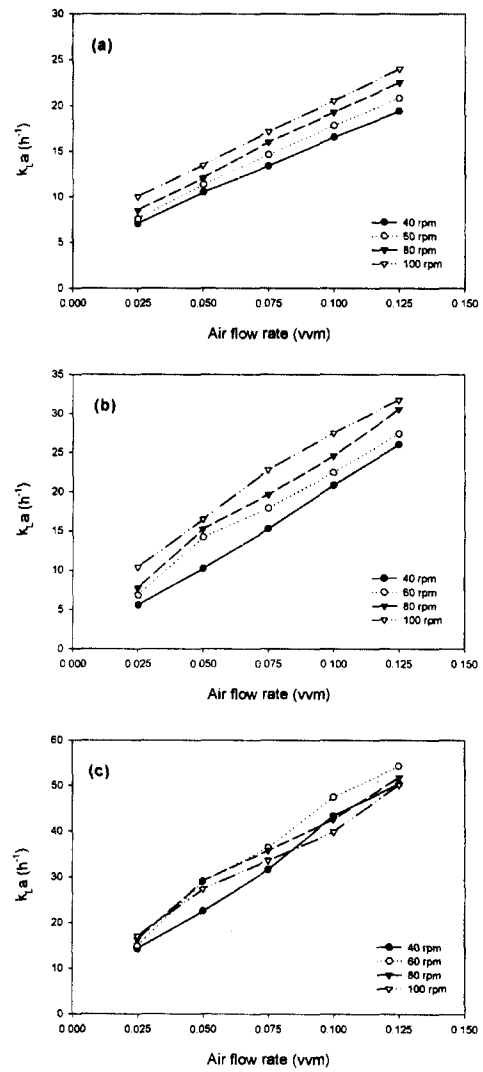


Fig. 4. Effects of agitation and aeration rates on $k_L a$ in bioreactor with square-pitch marine impeller. Pore size of sparger: 40 μm (a), 20 μm (b), 0.5 μm (c). Medium: DMEM.

대부분의 결과에서 교반 속도와 통기 속도가 증가함에 따라 $k_L a$ 값이 거의 일정하게 증가하는 것이 관찰되었다. 통기 속도 증가 시에 $k_L a$ 값의 증가폭이 교반 속도 증가 때보다 큰데 이는 교반 속도의 증가폭이 낮기 때문인 것으로 여겨진다. 그러나, 배지를 매질로 하여, 통기 구멍 크기가 0.5 μm 인 sparger를 사용했을 때에는, 교반 속도가 증가함에 따라 $k_L a$ 값이 일정하게 증가하는 경향이 보이지 않았으며, 높은 통기 속도로 통기하였을 때, 60 rpm 이상의 교반속도에서는 교반속도가 낮을 때가 높을 때보다 $k_L a$ 값이 더 높았다(Fig. 3(c), 4(c)). 이런 현상은 다음과 같은 원인 때문인 것으로 보여진다. 교반시의 와류 발생으로 인해 공기 방울이 임펠러의 회전축으로 모이는 것이 관찰되었다. 이로 인해 공기 방울의 응집현상이 일어난다. 이는 교반 속도를 높일수록 더 심하였다. 매우 작은 공기 방울이 생성될

때 이런 응집현상은 $k_L a$ 값의 심한 감소를 초래한다. 통기 구멍의 크기가 매우 작은 sparger의 경우, 매우 작은 공기 방울이 생성되므로 교반 속도를 높일 때 교반에 의한 산소 전달의 증가보다 위의 응집현상에 의한 산소 전달의 감소가 더 크게 영향을 미치는 것으로 보인다. 물을 매질로 사용할 경우에는 배지를 이용할 때보다 응집이 많이 일어나므로 공기 방울이 커진다. 따라서, 위와 같은 현상은 보이지 않는 것 같다.

프로펠러형 임펠러를 사용했을 때와 평판형 날개를 가진 임펠러를 사용했을 때의 $k_L a$ 값을 비교해 보면, 프로펠러형 임펠러를 사용했을 때가 $k_L a$ 값이 다소 높았다. 교반시 공기 방울이 회전축으로 모이는 정도가, 프로펠러형 임펠러를 사용할 때가 평판형 날개를 가진 임펠러를 사용할 때보다 덜 하였다(Fig. 5). 이로 미루어, 프로펠러형 임펠러를 사용하는 것이 산소 전달에는 더 유리할 것으로 생각된다.

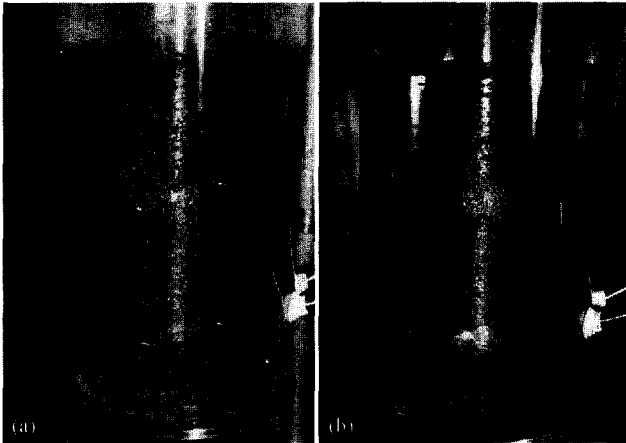


Fig. 5. Comparison of bubble coalescence between square-pitch marine impeller (a) and pitched flat blade impeller (b). Operation condition: 80 rpm, 0.075 vvm.

공기 방울 크기에 따른 세포의 손상 정도
 bubble column 내에서 통기시 생존세포수는 일정한 속도로 감소하였다.(Fig. 6) 세포 생존율의 로그 함수($\ln \frac{N}{N_0}$)를 시간(t)에 대한 함수로 plotting 한 결과 거의 직선에 가까웠으며, 그것의 기울기, 즉 비사멸 속도 상수는 통기 속도가 증가함에 따라 커졌다. 통기를 하지 않았을 때 세포 농도는 거의 일정하였으므로, 생존 세포수의 자연적인 감소는 무시될 수 있었다. 생존 세포수의 감소는 오로지 통기에 의한 세포의 손상의 결과였다. 100 μm 이하의 통기 구멍의 크기를 가진 microsparger들을 이용하여 통기하여, 시간에 따른 생존 세포수의 감소를 측정하고 비사멸 속도 상수를 구해 본 결과, 이전에 보고되었던 것[5,16]과 동일하게 통기 구멍의 크기가 작아질수록 비사멸 속도 상수는 커졌다

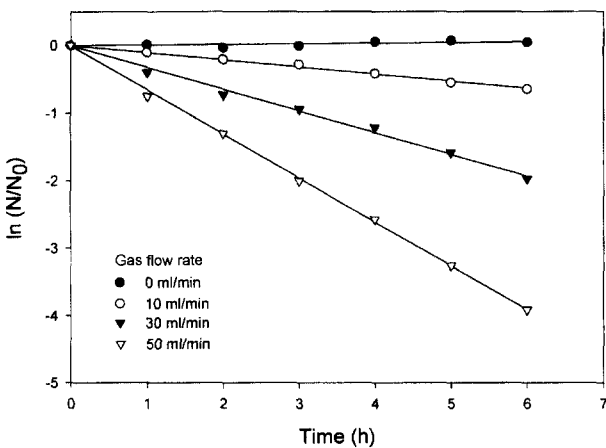


Fig. 6. Estimation of specific death rate constant, k_d in bubble column with microsparger of 0.5 μm pore size at various air flow rates.

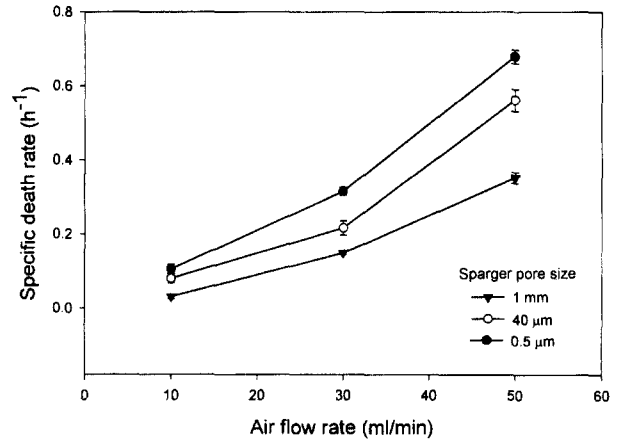


Fig. 7. Effect of sparger pore size on specific death rate constant, k_d in bubble column at various air flow rates. The volume of bubble column was fixed to 100 ml.

(Fig. 7). 통기 구멍의 크기가 작아질수록 생성되는 공기 방울의 수와 거품 발생은 더욱 많아지고, 공기 방울의 크기는 작아졌다(Fig. 8). 이로 인해 세포와 공기 방울이 접촉할 수 있는 면적이 더욱 커져, 공기 방울과 세포의 상호작용이 더욱 커지고, 거품 내에 존재하는 세포가 더 많아져 세포가 더욱 손상을 받았던 것으로 추정된다. 통기 속도의 증가에 따른 비사멸 속도 상수의 증가폭도 통기 구멍 크기가 작은 sparger를 이용할수록 더욱 커졌다. 통기 속도의 증가폭이 같더라도, 통기 구멍이 작을 수록 공기 방울의 생성 빈도 증가가 더욱 크기 때문이다.

위의 사실로 미루어, 낮은 통기 속도와 통기 구멍 사이즈가 큰 sparger를 이용하는 것이, 세포 배양시 세포의 손상을 줄이는 데에 유리하나, 이것은 $k_L a$ 값의 감소를 초래한다[11]. 통기 구멍의 크기가 다른 sparger들을 사용할 때에

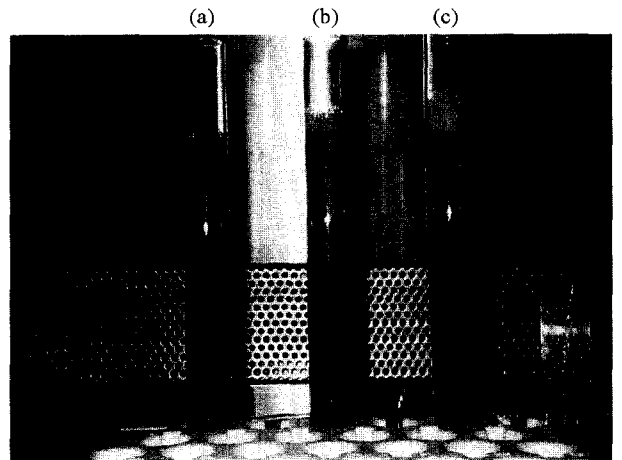


Fig. 8. Behavior of air bubbles in bubble columns with different pore size of microspargers. Pore size of sparger: 1mm (a), 40 μm (b), 0.5 μm (c). Air flow rate: 30ml/min.

비슷한 k_{La} 값을 유지하려면, 통기 구멍의 크기가 큰 sparger를 사용할 때엔 더 큰 통기 속도가 필요하게 되며 그에 따라 사멸 속도도 커지게 된다. 모형 반응기에서 실험한 결과를 토대로, k_{La} 값이 통기 속도가 증가함에 따라 일정하게 증가한다고 가정하고, 통기 구멍 크기가 40 μm 인 microsparger를 사용하여 통기할 때와, 0.5 μm 인 microsparger를 사용하여 통기 할 때에, 비슷한 k_{La} 범위(약 20-40정도)를 유지하기 위해 필요한 통기 속도를 비교하여 보면 Table 1과 같다. 즉 통기속도는 통기 구멍 크기가 40 μm 인 microsparger를 사용할 때가 0.5 μm 의 통기 구멍을 가진 microsparger를 사용할 때보다 약 세배 가량 높다. 이와 같이, 비슷한 k_{La} 값을 유지하기 위해 통기 구멍이 큰 sparger를 사용하여 높은 통기 속도로 통기한다면, 세포의 손상 정도는 통기 구멍이 작은 sparger를 사용하여 낮은 통기 속도로 통기할 때와 비슷하게 될 것이다 (Table 2).

그러므로, 큰 공기 방울 보다 산소 전달 효율이 더 높은 작은 공기 방울로 통기하는 것이 유리할 것으로 생각되며, 이로 인해 발생하는 문제점인, 거품 생성 증가와 공기 방울과 세포와의 접촉 면적 증가로 인한 세포의 손상은, 적당한 배지 조성으로 거품의 과다 생성을 억제하고, 배지 내에 계면활성제 등을 첨가하여 공기 방울 표면을 포화시킴으로써 세포와의 상호작용을 방지하는 등의 방법으로 줄일 수 있다[20,21]. 특히, 고농도로 세포 배양을 할 때에는 산소 요구도가 높으므로, 마이크로 크기의 공기 방울을 사용해야 할 필요가 있다[11,13,18,21].

Microsparger와 silicon tube를 이용한 통기 하에서의 세포 성장의 비교

통기에 의한 손상이 없는 통기법인 silicon tube를 사용

Table 1. Comparison of air flow rates for the maintenance of k_{La} values (20-40 h^{-1}) using microspargers with different pore sizes in a model reactor with square-pitch marine impeller (medium: DMEM)

Agitation rate (rpm)	Range of k_{La} (h^{-1})	Range of air flow rate (vvm)	
		Sparger pore size of 40 μm	Sparger pore size of 0.5 μm
60	20 - 40	0.12 - 0.27	0.03 - 0.08
80	20 - 40	0.11 - 0.25	0.03 - 0.09
100	20 - 40	0.10 - 0.24	0.03 - 0.09

Table 2. Comparison of k_d values according to air flow rates using microspargers with different pore sizes

Range of k_{La} values (h^{-1})	Sparger pore size (μm)	Range of air flow rates (vvm)	Range of k_d values (h^{-1})
20 - 40	40	0.1 - 0.3	0.08 - 0.22
	0.5	0.03 - 0.1	≤ 0.11

하여 세포 배양을 하였다. 교반 속도 30rpm, 통기량 약 0.3vvm으로 하여 배양한 결과 약 92시간 후에 세포농도는 2.0×10^6 cells/ml에 도달하였다.(Fig. 9). 이때 용존 산소 농도는 20%이상으로 유지되었다. 그리고 세포성장기에 세포 생존율은 95% 이상 유지되었다.

Microsparger를 동일 반응기에 장치하여 배양 초기부터 10 ml/min(약0.006vvm)의 일정한 통기 속도로 계속 통기했을 때는, 세포의 생존율이 80% 이하로 떨어지고, 세포가 정상적인 성장을 하지 못하였다(data 생략). 배양 초기는 세포가 불안정하고 세포의 양도 적은 상태이므로, 통기에 의한 세포 손상도 클 것으로 사료된다.

용존 산소 농도가 20% 이하로 떨어질 때만 통기를 하여 세포를 배양한 결과, logarithmic phase에서 세포 생존율이 90% 이상으로 정상적인 성장을 하였다(Fig. 10). 배양 초기, 즉 접종 후 24시간 동안에는 용존 산소 농도가 20% 이하로 떨어지지 않아 통기를 하지 않아도 되었다. 그 후, 20% 이하로 떨어질 때에만 5 ml/min(약 0.003 vvm)의 속도로

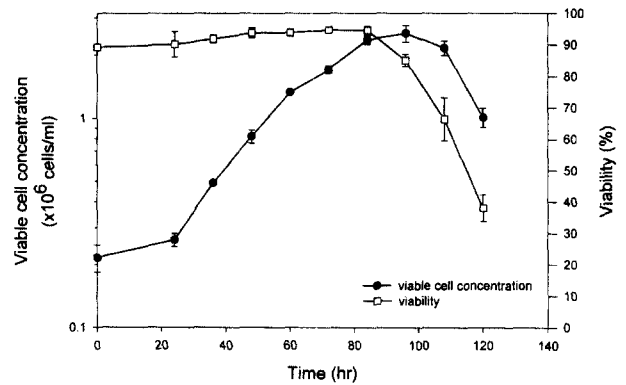


Fig. 9. Cell growth and viability of S3H5/2bA2 hybridoma cells during batch culture in silicon tubing aeration.

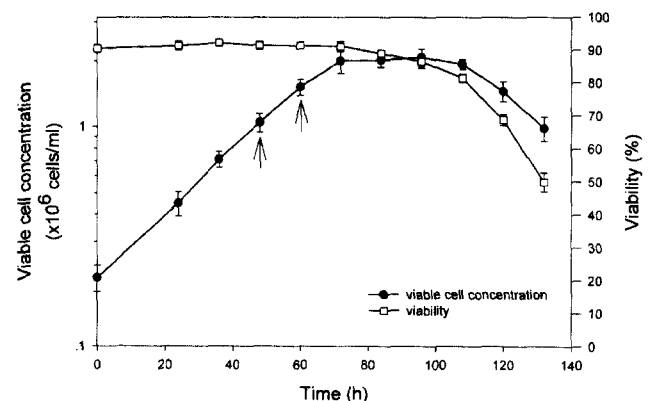


Fig. 10. Cell growth and viability of S3H5/2bA2 hybridoma cells during batch culture in discontinuous sparging. DO level was maintained above 20% air saturation. Arrows indicate the air sparging.

통기를 하였다. 그러나, 48시간 이후로부터 이 통기 속도로는 20% 이상의 용존 산소 농도가 유지되지 않아서 단계적으로 2.5 ml/min씩 통기 속도를 증가시켜(화살표로 표시), 최고 15 ml/min(약 0.008vvm)까지 통기 속도를 높여 배양하였다. 세포 생존율은 90% 이상이었으며, 세포의 최종 농도도 약 2×10^6 cells/ml 로 silicon tube를 이용하여 배양하였을 때와 유사한 결과를 보였다.

위와 같은 사실들로 미루어 볼 때, 대형 반응기에서 micro-sparger를 이용한 직접 통기법을 사용하여 세포를 대량 배양할 경우 계속적인 통기법보다는 용존산소농도가 일정수준 미만으로 떨어질 때만 간헐적으로 공급하는 자동화시스템을 개발할 필요가 있다. 특히 배양초기에는 직접통기에 의한 세포의 손상이 큰 것으로 관찰되었다.

요 약

본 연구에서는 동물세포 배양장치를 개발키 위한 기초연구로서, 초미세 통기법이 산소 전달 속도와 세포의 생존율에 미치는 영향에 대해 알아보았다. 통기 장치로 통기 구멍 크기가 다른 microsparger를 사용하였을 때, 모형 반응기내에서 측정된 산소 전달 계수(k_La)는 microsparger의 통기 구멍 크기가 작아질수록 현저히 증가하였다. 이는 공기 방울들과 매질 사이의 접촉 면적이 증가했기 때문인 것으로 판단된다. 두 가지 다른 형태의 임펠러(square-pitch marine impeller와 45° pitched flat blade impeller)를 사용하여 교반하였을 때, k_La 값은 marine impeller를 사용하였을 때 다소 높았다. 100 μm 이하의 통기 구멍을 가진 microsparger를 사용하여 직접 통기가 세포에 미치는 손상에 대해 알아본 결과, 세포들의 손상 정도는 통기 속도가 증가할수록, 공기 방울 크기가 작아질수록 더 커졌다. 2.5L 용량의 소형 세포 반응기에 0.5 μm 의 통기 구멍 크기를 가진 micro-sparger를 장치하여 세포를 배양한 결과, 지속적인 통기시에는 세포의 생존율이 80% 이하로 떨어지고, 정상적인 성장을 하지 못하였다. 그러나, 용존 산소 농도가 20% 이하로 떨어졌을 때에만 통기하였을 때, 세포는 정상적으로 자랐으며, 세포 생존율도 대수기 전반에 걸쳐 90% 이상을 유지하였다.

감사의 말

본 연구는 중소 기업청과 (주)KoBiotech의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Arathoon, W. R. and J. R. Birch. 1986. Large-scale cell culture in biotechnology. *Science* **232**: 1390-1395.
- Backer, M. P., L. S. Metzger, P. L. Slaber, K. L. Nebitt, and G. B. Boder. 1988. Large-scale production of monoclonal antibodies in suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 993-1000.
- Beyeler, W., T. Thaler, and R. Clements. 1991. Long-term cultivation of mammalian Cells. *Int. Biotech. Lab.* 16.
- Chalmers, J. J. 1994. Cells and bubbles in sparged bioreactors. *Cytotechnol.* **15**: 311-320.
- Cherry, R. S. and C. T. Hulle. 1992. Cell death in the thin films of bursting bubbles. *Biotechnol. Prog.* **8**: 11-18.
- Chisti, Y. 1993. Animal cell culture in stirred bioreactors: observations on scale-up. *Bioprocess Eng.* **9**: 191-196.
- Gardner, A. R., J. L. Gainer, and D. J. Kirwan. 1990. Effects of stirring and sparging on cultured hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 940-947.
- Jonson, M., G. Andre, D. Dhavarie, and J. Archambault. 1990. Oxygen transfer rates in a mammalian cell culture bioreactor equipped with a cell-lift impeller. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 43-49.
- Jordan, M., H. Sucker, A. Einsele, F. Widmer, and H. M. Eppenberger. 1994. Interactions between animal cells and gas Bubbles: the influence of serum and pluronic F68 on the physical properties of the bubble surface. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 446-454.
- Kim, J. H. and W. S. Hu. 1989. Initial culture condition affect the sensitivity of HepG₂ cells to excessive mechanical agitation. *Cytotechnol.* **2**: 135-140.
- Kura, S., H. Nishiumi, and Y. Kawase. 1993. Oxygen Transfer in a stirred loop fermentor with dilute polymer solutions. *Bioprocess Eng.* **8**: 223-228.
- Kunas, K. T. and E. T. Papoutsakis. 1990. Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 476-483.
- Lee, E. K., L. Huang, and Y. H. Lee. 1990. Effect of liquid properties and flow on liquid film mass transfer coefficient in silicone membrane oxygenation. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 530-533.
- Mendonca, R. Z. and C. A. Pereira. 1995. High density VERO cell culture on microcarriers in a cell bioreactor. *Bioprocess Eng.* **12**: 279-282.
- Murry, M. Y. 1985. *Comprehensive biotechnology*, Pergamon Press, New York, **2**: 16-24.
- Papoutsakis, E. T. 1991. Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. *Trens. Biotechnol.* **9**: 427-437.
- Pullen, K. F., M. D. Johnson, A. W. Phillips, G. D. Ball, and N. B. Finter. 1985. Very large scale suspension cultures of mammalian cells. *Develop. Biol. Standard.* **60**: 175-177.
- Reiter, M., G. Bluml, T. Gaida, N. Zach, F. Unterluggauer, O. Doblhoff-Dier, M. Noe, R. Plail, S. Huss, and H. Katinger. 1991. Modular integrated fluidized bed bioreactor technology. *Bio/Technol.* **9**: 1100-1102.
- Ryu, Joon Soo, and G. M. Lee. 1997. Effect of hypoosmotic stress on hybridoma cell growth and antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 565-570.

20. Wang, D. I. C., C. L. Cooney, A. L. Demain, P. Dunnill, A. E. Humphrey, and M. D. Lilly. 1979. Fermentation and enzyme technology. John Wiley & Sons, New York, 157–172.
21. Wu, Jianyong and M. F. A. Goosen. 1995. Evaluation of the

killing volume of gas bubbles in sparged animal cell culture bioreactors, *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 241–247.

(Received Oct. 30, 2001/Accepted Dec. 5, 2001)