

연속 배양방식에 의한 동물 세포 성장 Model에 관한 연구

이현용·이진하

강원대학교 식품공학과
(1988년 7월 1일 접수, 1988년 10월 10일 채택)

Process Analysis of Perfusion System for Mass Cultivation of Animal Cells

Hyeon Y. Lee and Jin H. Lee

Dept. of Food Eng., Kangweon National Univ., Chuncheon 200-701, Korea
(Received 1 July 1988; accepted 10 October 1988)

요 약

세포 배양기법중 feedback 공법을 변형시킨 연속 배양공정(perfusion chemostat system)에서의 세포 성장 model을 유도했다. 이 model은 기존의 연속 배양방법(continuous culture)과 달리, 세포 성장 속도와 배지 이동속도가 밀접한 관계는 있으나, 같지 않음이 확인됐다. 배양조내의 세포수를 배지의 이동 속도에 근거를 둔 성장 model에 의해 간접 측정이 가능했으며, 간접 계산된 최대 세포 성장속도는 0.019(1/h)이었다. 세포의 세포 분리기예의 유착 정도를 알 수 있는 농축농도, f 와 recycle비, α 가 각각 90.21과 0.01로 측정됐다. 특히 이 측정된 값들은 세포의 대량 배양을 위해 공정의 효율적 조절을 위한 필수적인 수치로 증명됐다.

Abstract—A mathematical model of Perfusion Chemostat (PC) system is developed by using continuous feedback processes, where dilution rate is no longer equal to specific growth rate. It is found that specific growth rate is strongly related with dilution rate. Mammalian cell density in the bioreactor can indirectly be predicted and estimated by employing growth model as a function of dilution rate. The maximum specific growth rate is 0.019(1/h) at 0.020(1/h) of dilution rate. The recycle ratio, α and concentration factor, f are estimated as 0.01 and 90.21, respectively. These values are proved to be important parameters in controlling PC system to effectively cultivate large quantities of mammalian cells and produce pharmaceutically active proteins.

1. 서 론

동물 세포에 의한 의약품의 대량 생산을 위한 배양 기술의 개발이 최근 수년간 급속히 추진되고 있다[1-15]. 동물 세포는 일반 미생물과 그 생체 조직 및 구성이 매우 달라, 대량 배양시 많은 점을 고려해야 한다[1, 2,

5, 15]. 하지만 이 분야에 대한 공업화를 위한 생물 공학적인 기초연구가 많이 되어 있지 못한 실정이다. 지금까지 개발된 배양조(Bioreactor) 및 배양 기술중 연속 배양공법이 대량 생산에 가장 경제성이 있다고 관측된다[1, 6-8, 12-14]. 하지만 이 system에 대한 동력학적 기초 연구가 거의 되어 있지 않으며, 단지 경험에

의한 방법으로 공정 변수를 조절하고 있다[9]. 따라서 본 논문에서 연속 배양공정(perfusion chemostat system, PC system)에 대한 이론 및 model을 정립해 세포 성장의 합리적 조절을 위한 생물 공학적 기초 자료를 제공하고자 한다.

2. 이론 및 방법

유전자 조작에 의해 조직 플라스미노겐 활성인자(tissue Plasminogen Activator, t-PA)를 생산하는 유전자를 이식시킨 recombinant Chinese Hamster Ovary(ATCC CCL-61, Subclone, 이하 CHO로 표기)를 이의 논문에서 기술된 순서에 따라 scale-up시켜 [7] 100L 배양조에 옮겨, 세포 배양배지(media)를 연속적으로 이동시켰다. 배지 이동속도(dilution rate)는 매일 측정되는 전체 세포수 및 산소 소비속도에 따라 변화시켰다. 세포 배양배지로 RPMI-1630(GIBCO, USA)와 5% FBS(Fetal Bovine Serum)를 사용했다. 세포 성장속도(specific growth rate, μ)는 on-line으로 측정되는 산소 소비속도에 의해 구해졌다 [10].

Fig. 1이 실험에 사용된 연속 배양방식을 도식화한 것이다. 이 공정의 자세한 설명은 다른 논문에 되어 있다[7]. 배지는 연속적으로 들어오고 나가지만, 배양조 밖으로 나가는 배지중 세포는 여과기에 걸려져 다시 배양조로 되돌아가 배양조내의 세포수가 계속 증가된다. 이것이 일반 연속 배양방식과의 가장 큰 차이점이라 볼 수 있다[11]. 따라서 세포수가 일반 배양공법으로 도달할 수 있는 최대치인 10^6 cells/mL보다 10배 정도 더 증가될 수 있으며, 생성물질이 연속적으로 나오므로 생산성(productivity) 또한 매우 높다.

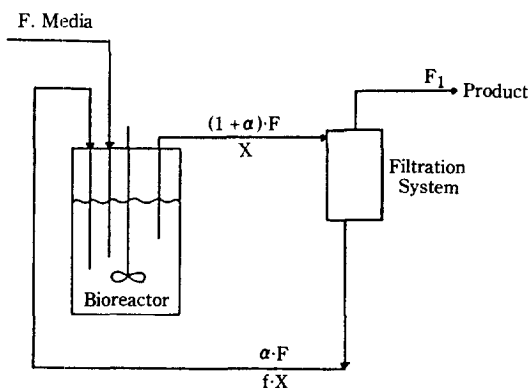


Fig. 1. Diagram of perfusion chemostat system.

이 배양공법 이론을 유도하기 위해 Fig. 1과 같은 feedback 공정을 채택했다. 여기서 X 는 세포수(cells/mL)이며, 배지의 양은 100L이다. F 는 배지의 이동속도(mL/min)이고 F_1 은 배양조밖으로 나가는 배지의 속도이다. 여과장치에서 세포가 배양조로 되돌아가지 않고 여과막에 축적이 되어 배지 이동속도에 저항이 생기는 경우를 제외하고는 F 와 F_1 은 거의 같은 속도이다. 특히 여과막에의 세포 축적은 배지 이동속도 및 recycle 수율에 중요한 요소가 되므로, recycle ratio, α 가 중요 측정변수가 된다. 따라서 현재까지는 이 여과장치 안을 교반 또는 그외 방법으로 세포가 막내에 축적되는 것을 방지하는 방법들이 개발중이며, 이것이 연속 배양공법에서 가장 중요한 요소의 하나가 된다. 이 논문에서 recycle ratio, α 와 세포 농축도(concentration factor), f 와의 관계를 검토할 것이다.

세포의 mass balance를 보면,

$$\text{cell accumulation} = \text{cell growth} - \text{cell out} + \text{cell in feedback stream}$$

즉,

$$V \cdot (dX/dt) = V \cdot \mu \cdot X - (1 + \alpha) \cdot F \cdot X + \alpha \cdot F \cdot f \cdot X \quad (1)$$

이며, 배지 이동속도, D 는 F/V 로 정의된다[11]. 여기서 V 는 배양조의 부피, 100L이다. 따라서 식 (1)을 다시 정리하면

$$dX/dt = \mu \cdot X - D \cdot (1 + \alpha) \cdot X + D \cdot \alpha \cdot f \cdot X \quad (2)$$

가 된다. 또한 이 연속공정이 steady state가 된다는 가정하에서는 $dX/dt=0$ 이 되므로 식 (2)는

$$\mu = (1 + \alpha - \alpha \cdot f) \cdot D \quad (3)$$

의 관계가 성립된다. 즉, 기존의 연속 배양이론인 배지 이동속도가 세포 증식과 같다는 것이 이 공법에서는 적용이 안되는 것을 알 수 있다. 식 (3)에서 $(1 + \alpha - \alpha \cdot f)$ 는 항상 1보다 작으므로, 언제나 D 가 μ 보다 크다. 그 이유는 항상 농축 변수, f 가 1보다 크기 때문이다. 따라서 이 연속 배양공법에서는 D 에 따른 단순한 세포 성장 조절이 불가능하다.

식 (3)을 간단히 표시하면

$$\mu = A \cdot D \quad (4)$$

가 되는데, 여기서 상수, A 는 $1 + \alpha - \alpha \cdot f$ 이다. μ 를 $(1/X) \cdot (dX/dt)$ 로 나타낼 수 있는데 그 이유는 본 실험공법이 연속 배양이지만, 세포는 외부로 나가지 못하고 배양조내로 돌아가 전체 세포수는 계속 증가되는 plug flow와 유사한 공법으로[16], 이때 세포 증식은

를 최대 성장속도를 나타내기 때문이다. 또한 transient state에서 고려되는 세포의 증식속도가 시간에 따라 변한다는 개념보다는, 배지 이동속도를 변화시킨 후 24시간 후의 전체 세포수의 증가에 역점을 두는 것이 타당하다. 따라서 식 (4)는 다음과 같이 변환시킬 수 있을 것이다.

$$(1/X) \cdot (dX/dt) = A \cdot D \quad (5)$$

이 식을 배양시간에 따른 세포수 증식으로 적분하면

$$\int_{x_1}^{x_2} (1/X) \cdot dX = \int_{t_1}^{t_2} A \cdot D \cdot dt \quad (6)$$

로서 초기 배양시간 t_1 은 0이므로

$$\ln(X_2/X_1) = A \cdot D \cdot t \quad (7)$$

이며, 여기서 t 는 operation time으로 24시간으로 정했다. 그 이유는 본 실험에서 배지의 이동속도를 24시간마다 변화시켰기 때문이다. Feedback 공법인 경우 steady state에 도달되는 시간이 일반 연속 배양시보다 빠르기 때문에 [16] 배양속도를 변화시킨 후 24시간이면 transient state에서 steady state로 전환된다는 가정 하에서 배지 이동속도에 따라 세포수 증식을 예측할 수 있다. 즉, 식 (7)에 의해 세포수 증식과 배지 이동속도, D 와 함수 관계가 성립됨을 알 수 있다. 따라서 식 (4)와 (6)에서 A 의 정확한 수치를 알면, D 에 의해 세포 증식을 조절할 수 있으며, 상수 A 는 배지의 recycle시 세포에 의해 여과 막이 막히는지의 여부를 확인할 수 있는 중요한 수치이다. 식 (4)의 μ 를 측정하기 위해 산소 소비속도를 이용해 간접 측정했다.

$$\mu = OUR / \sum_{i=0}^t OUR \cdot \Delta t \quad (8)$$

이 식에 의해 간접 측정된 μ 의 타당성 및 정확도는 이 외 논문에 기술되어 있다 [10]. 여기서 OUR는 산소 소비속도 ($\text{mL O}_2/\text{min}$)이고 $\sum_{i=0}^t OUR \cdot \Delta t$ 는 산소 소비속도를 전체 시간에 따라 적분한 값이다.

3. 결과 및 고찰

Table 1은 recombinant CHO 세포를 Fig. 1의 100L 규모의 PC 공법으로 배양시킨 결과이다. 전체 생균수와 산소 소비속도를 매일 측정하였다 [10]. 실험 방법에서 언급되었듯이 연속 공법에서 세포의 feedback 장치의 장점인 steady state 도달시간의 단축 및 장시간 유지할 수 있다는 개념을 바탕으로 [16], 매일 측정되는 세포수를 기준으로 24시간마다 배지 이동속도

Table 1. Results of cultivating Chinese Hamster Ovary (ATCC CCL-61) under perfusion chemostat operations[7]

Dilution rate, D (1/h)	Total cells ($\times 10^{-5}$ cell/mL)	Oxygen uptake rate, (mL/min)	Estimated specific growth rate, μ (1/h)
0.0030	3.60	3.24	0.0240
0.0053	5.95	6.42	0.0094
0.0083	7.80	5.38	0.0072
0.0125	8.58	15.66	0.0101
0.0194	10.00	12.75	0.0188
0.0198	8.10	11.66	0.0122
0.0260	9.20	12.79	0.0105
0.0260	8.70	14.28	0.0089
0.0240	10.70	14.68	0.0075
0.0230	11.00	16.99	0.0072
0.0250	10.90	22.78	0.0078
0.0211	11.01	20.04	0.0060
0.0240	12.72	18.45	0.0048
0.0220	9.60	17.69	0.0042
0.0274	6.20	18.85	0.0040
0.0297	12.60	10.34	0.0021
0.0241	8.95	7.92	0.0015
0.0211	8.10	8.36	0.0014
0.0286	8.05	7.60	0.0016
0.0193	6.49	7.66	0.0013
0.0186	8.87	7.34	0.0012
0.0183	6.62	7.96	0.0013
0.0192	6.69	8.28	0.0014
0.0190	7.97	7.99	0.0012
0.0215	6.10	7.68	0.0013

를 바꿨으며, 이는 기존의 연속 배양공법에서 일반적으로 steady state는 mean residence time의 3배가 되어야 된다는 통념을 무시한 것이다 [11]. 이에 따라 Table 1에서 나타나듯이, 같은 배지 이동속도에서 μ 값의 차이가 크게 나는 것을 볼 수 있는데, 이는 이 경우 system이 unsteady state이기 때문이었다. 그 예로 $D=0.0194(1/h)$ 인 때 $\mu=0.018(1/h)$ 과 $0.0013(1/h)$ 을 나타내는 경우다. 세포 성장속도, μ 는 식 (8)에 의해 간접 계산된 수치들이다. 식 (3)에 의해 예견되는 바와 같이 배지 이동속도가 세포 증식보다 항상 큰 것을 알 수 있다. 특히 배지 이동속도, D 가 $0.029(1/h)$ 같이 빠른 경우 세포 증식속도와 큰 차이가 있었다. 이는 이런 배지 이동속도가 wash out에 가까움을 의미한다. 또한 D 가 $0.0211(1/h)$ 같이 배지가 빠르게 이동되는 경우 μ 가 0.0060 과 $0.0014(1/h)$ 와 같이 큰 차이를 보이는데 그 이유는 산소 소비속도 측정오차에 의한 전

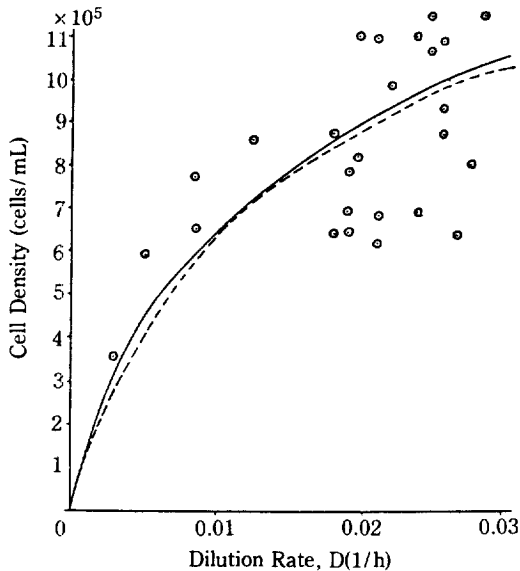


Fig. 2. Results of plotting data of CHO cells producing recombinant t-PA; dilution rate vs cell density.

--- is the result of add (non) linear regression, and — is the prediction line from equation (6).

체 산소 소비량의 누적에 따른 μ 의 계산오차이며, Table 1에서 보듯이 배양 말기로 갈수록 D 가 감소되는데 그 이유는 세포끼리 서로 묻쳐 세포수 측정오차가 커졌기 때문이다. 최대 세포수는 1.2×10^6 cells/mL로서 이는 기존의 batch 공법에서의 1.2×10^7 cells/mL에 상당하는 수치로서, 이 배양공법으로 mL당 백만 세포 이상 증식시킬 수 있음을 입증하고 있다.

Table 1의 자료중 세포수와 배지 이동속도와와의 관계를 나타낸 것이 Fig. 2이다. 식 (6)에서 알 수 있듯이 세포수와 배지 이동속도가 함수관계를 나타내고 있으며, 원으로 표시된 것이 실험치이다. 직선은 식 (6)을 비직선회귀(non linear regression)시킨 결과이며, 점선은 실험치를 data fitting시킨 결과이다. 실험 결과와 식 (6)이 상당함을 보임으로써 설정된 model의 타당성을 입증하고 있다. 특히 배지 이동속도에 따라 세포수가 직선적으로 증가하지 않고 최대치를 나타내는 것은 이 연속공법이 혹은 세포 자체의 증식에 한계가 있음을 함축한다.

Fig. 3은 식 (6)에서 상수 A 를 구하기 위해 도식화한 결과이다. 배지 이동속도를 변하기 전과 후의 세포수의 비를 자연 대수로 전환시킨 값과 배지 이동속도를 비교한 것으로, 직선은 linear regression시킨 결과이다. Regression coefficient, ρ 는 0.891이었다. 본

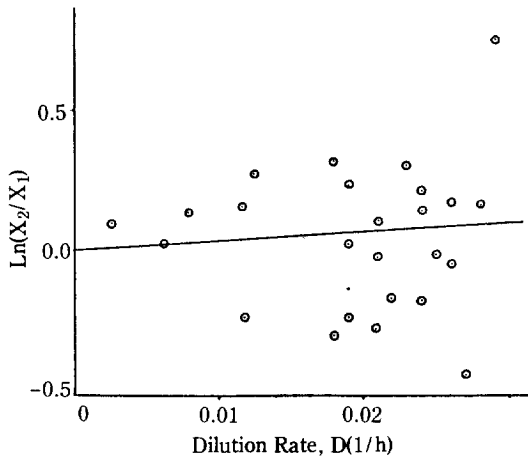


Fig. 3. Relationship between ratio of cell densities and dilution rate; solid line is the result of linear regression.

실험시 배지 이동속도를 변화시킨 후 24시간 이내에 steady state 상태에 도달된다고 가정했다. Fig. 4의 직선은 Table 1의 자료를 이용해 regression시킨 결과로서, regression coefficient, ρ 는 0.908로서 Fig. 3보다 개선된 직선관계를 보이고 있다. 특히 Fig. 4에서 배지 이동속도가 느린 경우 최대 세포 성장속도를 보이고 있는데 이는 식 (9)를 이용해 세포 이동속도, μ 를 계산할 때 초기값이 너무 크기 때문이었다. 이 부분을 outlier로 처리해 regression시 가중치가 없도록 하였다.

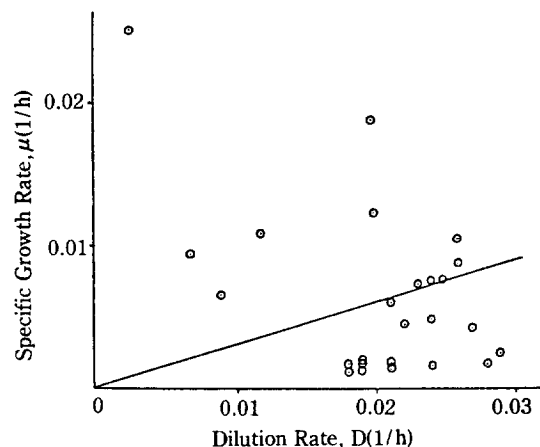


Fig. 4. Correlation between dilution rate and specific growth rate of CHO cells under Perfusion Chemostat operations; solid line is the result of linear regression.

Table 2. Results of estimating recycle ratio and concentration factor in perfusion feedback system

Equation (6)			Equation (4)		
f	point estimate	95% confidence interval	point estimate	95% confidence interval	
$\alpha = 1.0$	1.952	0.463, 2.321	1.731	0.872, 2.165	
$\alpha = 0.01$	96.21	90.18, 111.26	74.69	69.12, 80.83	

*Perfusion chemostat operations which is described in Fig. 1 [7].

Table 2는 Fig. 3과 4의 결과를 정리한 것으로, 식 (4)와 (6)에서 상수 A값을 구해, 원하는 변수 α 와 f와의 관계를 나타내고 있다. 식 (3)에서 나타나듯이 계산된 A는 2개의 변수 α 와 f를 갖고 있으므로, 임의로 α 값을 정해 이때 f값을 구할 수 있었다. 이론적으로 α 는 1보다 작으므로 최대치인 1과, 이상적 값인 0.01에서의 구간을 잡아 f값을 구했으며, 95% 신뢰 구간도 함께 측정할 수 있었다. 실제로 이 PC 공법에서 recycle되는 배지량은 극히 적었다. 배지의 대부분이 여과장치를 통해 나가고 농축된 세포와 소량의 배지만이 되돌아 갈 뿐이다. 따라서 $\alpha=0.01$ 이 타당성이 있는 수치로 고려된다. 이때 농축율, f는 97~75로서 100배 정도 농축됨을 알 수 있다. 즉 여과장치를 통해 나가는 배지의 비는 100:1로서 $\alpha=0.01$ 때와 근사함을 입증하고 있다. 따라서 이 공법으로 연속배양시 recycle비, α 를 측정해 여과막이 막히는지의 여부를 검증할 수 있다. 한편 농축 수율이 배양조내의 전체 세포 증식에 큰 영향을 미치므로, 이 f값을 조절하는 것도 중요한 변수가 된다.

4. 결 론

t-PA를 생산할 수 있는 recombinant CHO 세포를 연속 배양방식으로 배양시켜 배지이동속도와 세포 증식과의 관계를 조사한 결과로 최대 세포 증식속도는 0.0188(1/h)이었으며, 모든 실험 결과에서도 배지이동속도가 세포 증식보다 높았다. 단지 이 CHO 세포경우 최대 세포 증식속도가 다른 CHO 세포보다 느린데, 그 이유는 배양조건 및 배지조성이 다르기 때문이다. 또한 연속 배양이론을 유도해 세포 성장속도와, 공정변수인 배지 이동속도와와의 관계를 규명해 실험치와 비교한 결과 상충함을 알 수 있었다. 그리고 이 연속공법의 중요 변수인 recycle ratio를 측정할 수 있었으며, 이에 따른 여과막의 막힘 및 세포의 손실을 막는 조절이 가능

해졌다. 이로 인해 지금까지 경험에 의해 배지 이동속도를 변화시키는 단계에서, 세포수의 예측 및 최대 세포수의 증가를 보다 효율적으로 조절할 수 있게 되었다.

REFERENCES

1. Lee, H.Y.: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 236 (1988).
2. Boraston, R., Thompson, P.W., Garland, S., and Birch, J.R.: *Develop. Biol. Stand.*, **55**, 103 (1984).
3. Cleveland, W.L., Wood, I., and Erlanger, B.F.: *J. Immunol. Methods*, **56**, 221 (1983).
4. Kohler, G. and Milstein, C.: *Nature*, **256**, 495 (1975).
5. Lynn, J.D. and Acton, R.T.: *Biotech. Bioeng.*, **17**, 659 (1974).
6. Spier, R.E.: *Adv. Biochem. Eng.*, **14**, 119 (1980).
7. Lee, H.Y.: Tenth Symp. Korean Scientists and Engineers in America (Biotechnology Chapter), **10**, 127 (1987).
8. Tolbert, W.R. and Srigley, W.R.: *Biopharm.*, **2**, 149 (1987).
9. Feder, J. and Tolbert, W.R. (eds.): "Large Scale Mammalian Cell Culture", p. 97, Academic Press, New York (1985).
10. Lee, H.Y.: *J. Korean Appl. Microbiol. Bioeng.*, Vol. 16, (In press) (1988).
11. Pirt, S.J. (ed.): "Principles of Microbe and Cell Cultivation", p. 42, John Wiley and Sons Press, New York (1975).
12. Griffiths, J.B.: *Trib-tech*, **4**, 268 (1986).
13. Katinger, H. and Schirer, W.: *Acta Biotechnologica*, **2**, 3 (1982).
14. Griffiths, J.B.: *Devel. Biol. Stand.*, (In Press) (1987).
15. Hu, W.S. and Wang, D.I.C.: *Biotech. Bioeng.*, **30**, 548 (1987).
16. Pirt, S.J. (ed.): "Principles of Microbe and Cell Cultivation", pp. 27, John Wiley and Sons Press, New York (1975).