Korean Chem. Eng. Res., Vol. 49, No. 5, October, 2011, pp. 588-593

Carberry Type 생물반응기에서 암모늄 이온 제거에 의한 돼지유행성설사병 바이러스 백신 생산성 증대

이창진 · 정연호†

강원대학교 의생명과학대학 의생명공학과
200-701 강원도 춘천시 효자동 192-1
(2011년 1월 13일 접수, 2011년 2월 5일 채택)

Improvement of Porcine Epidemic Diarrhea Disease Vaccine Productivity by Ammonium Ion Removal in a Carberry Type Bioreactor

Chang-Jin Lee and Yeon-Ho Jeong†

Department of Medical Biotechnology, College of Biomedical Science, Kangwon National University, 192-1 Hyoja-dong, Chuncheon-si, Gangwon 200-701, Korea
(Received 13 January 2011; accepted 5 February 2011)

요 약

미립담체에 고정된 Vero 세포를 이용한 돼지유행성설사병 바이러스 백신의 생산성을 향상시키기 위하여 Phillipsite-Gismondine synthetic zeolite가 투석막에 충진된 Carberry type 생물반응기를 사용하여 암모늄 이온을 선택적으로 흡착하였다. Impeller shaft 및 흡착제 사이에 응집된 미립담체 때문에 세포 성장이 감소하는 것으로 보이나, 포도당 소모량과 젖산 생성량의 비교를 통해 판단 할 때 zeolite는 세포에 독성을 나타내지 않았다. 배양배지로부터 암모늄 이온을 제거함으로써 세포성장 및 바이러스 생산 두 단계 모두가 크게 개선되었다. 바이러스 생산에 있어서는 암모늄 이온 제거에 의해 대조군과 비교하여 바이러스 역가가 2배 이상 향상되었다. 연구결과 zeolite는 암모늄 이온을 효과적으로 흡착제거하여 바이러스 백신의 생산성을 높일 수 있는 이상적인 흡착제임을 확인하였다.

Abstract – The porcine epidemic diarrhea virus(PEDV) production yield in spinner flask cultures using Vero cells immobilized on microcarriers was improved by the selective adsorption of ammonium ions in a Carberry type bioreactor which was equipped with Phillipsite-Gismondine synthetic zeolite. Though the apparent cell growth seemed to be lower than that of control due to the aggregation of microcarriers between impeller shaft and the adsorbent, zeolite was found to not to be toxic to Vero cell, considering estimated glucose and lactate changes. Zeolite was observed to remove ammonium ions effectively in both steps of cell growth and virus production. In virus production, the virus titer with zeolite was two times higher than that without zeolite. Consequently, zeolite was found to be an ideal adsorbent for higher production of virus vaccine with the effective removal of ammonium ions.

Key words: Vero Cell, Porcine Epidemic Diarrhea Virus, Vaccine, Ammonium Ion, Zeolite, Carberry Type Bioreactor

1. 서 론

동물세포의 배양에 있어서 포도당과 글루타민은 주요 탄소원과 에너지원으로 공급되고 있다[1]. 특히 글루타민은 세포대사에 에너지를 공급할 뿐만 아니라 다른 아미노산, 지질, 단백질, 핵산, 퓨린 또는 피리미딘을 합성하는데 탄소와 질소의 공급원으로 쓰이는 필수 아미노산이다[2,3]. 글루타민은 대사과정에서 암모늄 이온이 부산물로 배출된다[4,5]. 동물세포 배양액내 의 암모늄 이온의 축적은 세포 성장에 저해효과를 나타낸다. Mouse L 세포[6]는 0.5 mM, 3T3 세포[7]와 BHK 세포[8]는 1 mM, mouse hybridoma[9,10]는 2~3 mM, MDCK 세포[11]는 4 mM 이상의 암모늄 이온 농도에서 저해 현상을 일으키는 것으로 보고되었다. 암모늄 이온은 또한 세포 대사나 생성물의 생산도 저해한다. Human fibroblast 세포에 의해 생성되는 인터페론은 2 mM의 암모늄 이온 농도에서 50%나 억제되고[12], mouse L 세포에서는 20 mM에서 50%가 억제되는 것으로 보고되었다[13]. New Castle disease 바이러스[14], Influenza 바이러스[15], Columbia SK 바이러스[16] 등도 암모늄 이온에 의해 증식이 억제되어 결국 백신 생산을 저해한다고 보고되었다. 따라서 동물세포 배양액에서 암모늄 이온의 축적을 감소시키는 것은 세포 성장과 세포 생성물의 생산성 향상을 위해 매우 중요하다.

이렇게 동물세포의 배양에서 문제가 되는 암모늄 이온을 제거하

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jeongyhb@kangwon.ac.kr
‡이 논문은 KAIST 임선기 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

기 위한 방법으로 크게 두 가지 방법이 시도되었다. 첫 번째는 배양액 내의 글루타민을 저농도로 유지하면서 배양하거나, 글루타민을 glutamate나 다른 아미노산, 또는 pyruvate와 같은 다른 물질로 대체하여 세포대사에 변화를 주어 암모늄 이온의 생성을 줄이는 방법이다[17-20]. 두 번째는 암모늄 이온이 생성되는 즉시 시스템으로부터 동시 제거하여 암모늄 이온의 축적을 방지하는 방법이다[9,21,22]. 이 두 가지 방법 모두 암모늄 이온의 생성 저해 및 축적 방지의 장점을 보였으나 세포의 성장이나 여러 동물세포에 각각 적용하는데 문제가 있거나 경제성이 떨어지는 등의 단점을 보였다. 이들 여러 방법 중 Jeong과 Wang[9]에 의해 소개된 합성 zeolite인 Phillipsite-Gismondine은 암모늄 이온에 대한 선택성과 흡착 용량이 높고 동물세포에 무해하며 세포 배양액으로부터 암모늄 이온을 동시 제거함으로써 세포 성장 및 생산성 향상을 도모할 수 있다는 점과 배양 중간에 손쉽게 적용할 수 있다는 점에서 다른 방법들보다 장점이 있었다.

바이러스 백신 생산에 있어서 zeolite에 의한 암모늄 이온 제거 효과를 알아보기 위해 본 연구에서 사용한 바이러스는 돼지유행성설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)로 coronavirus에 속한다. PEDV 감염에 의해 발병하는 돼지유행성설사병(porcine epidemic diarrhea; PED)은 어린 자돈뿐만 아니라 육성돈, 비육돈에서도 심한 수양성 설사를 일으키는 급성 바이러스성 장염이다[23]. PEDV에 의한 증상은 돼지전염성위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV) 감염에 의한 임상증상과 유사한 것으로 알려져 있다[24]. PEDV는 single stranded positive RNA genome으로 구성된 coronavirus로 직경이 95~190 nm이며 표면에는 방사상으로 배열된 18~23 nm의 곤봉모양의 spike를 가지고 있고 다형태이나 주로 구형이다[25]. PEDV는 Vero 세포에 trypsin이 첨가된 배지를 이용하여 연속 계대하여 Hoffman과 Wyler[26]에 의해 분리되었다. 국내에서는 1992년 처음으로 간접형광항체검사에서 PEDV에 대한 양성반응을 보인 가검재료를 Vero 세포에 연속으로 계대하여 분리하였다[27].

따라서 본 연구에서는 투석막에 zeolite를 고정화한 흡착제를 적용한 Carberry type의 생물반응기를 이용하여 세포배양과 바이러스 생산 과정에서 암모늄 이온을 제거해 줌으로써 바이러스 백신의 역가 향상을 시도하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 세포주 및 세포배양

본 실험에 사용한 세포주로 백신생산에 널리 사용되는 Vero 세포(African Green Monkey Kidney cell, ATCC CCL-81)를 사용하였다.

세포배양을 위하여 10% Fetal Bovine Serum(FBS, JRS), 30 mM $NaHCO_3$(Sigma), Streptomycin sulfate(100 μg/mL, Sigma), Penicillin G (100 units/mL, Sigma)가 첨가된 DMEM:F-12(Sigma)를 사용하여, 37 ºC, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 세포의 계대배양을 위하여 ϕ100 mm tissue culture dish에 1×10^5 cells/mL의 농도로 10 mL씩 배양하며, 3일 간격으로 계대하였다. Heamocytometer를 이용한 trypan blue exclusion method를 이용하여 세포농도를 측정하였다.

2-2. 바이러스주 및 바이러스배양

본 실험에 사용한 바이러스주는 돼지유행성설사병을 일으키는 약독화된 돼지유행성설사병 바이러스주(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, KPED-9)로써, (주)대성미생물연구소의 생독백신을 구입하여 사용하였으며, −80 ºC deep freezer에 보관하였다.

Seed 바이러스를 생산하기 위하여 ϕ100 mm tissue culture dish에 1×10^5 cells/mL의 농도로 10 mL씩 Vero 세포를 접종하여 3일간 배양한 후, 배지를 제거하고, 0.1 MOI (Multiplicity of Infection)로 감염시켜 37 ºC, 5% CO_2 incubator에서 간헐적으로 흔들어주며 1시간 동안 흡착시켰다. 흡착 1시간 후 바이러스가 포함된 배지를 제거하고, 바이러스 생산배지를 세포배양 부피와 동일하게 넣어주었다. 24시간 동안 바이러스를 생산 후 바이러스 생산 culture vessel을 deep freezer에 넣고 3회 동결해동법으로 세포파쇄를 한 후 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 seed 바이러스로 사용하였다.

2-3. 미립담체 배양

세포배양을 위한 미립담체로 Cultispher-G 0.17 g을 Ca^{2+}, Mg^{2+}-free PBS로 overnight 팽윤시켰다. 팽윤된 Cultispher-G를 121 ºC, 20분간 가압멸균하였다. 멸균된 Cultispher-G를 10% FBS-DMEM: F12 배지로 3회 세척 후 37 ºC, 5% CO_2 incubator에서 1시간동안 배양하였다. 1시간 후 미립담체와 Vero 세포를 100 mL spinner flask에 50 mL 넣고, on/off timer를 이용(3분 on/ 30분 off)하여 24시간 동안 40 rpm으로 간헐적으로 교반하면서 미립담체에 세포가 부착되도록 하였다. 24시간 후 배지 50 mL을 첨가하여 전체 부피를 100 mL로 맞춘 후 60 rpm으로 연속적으로 교반하면서 배양하였다.

2-4. Zeolite 고정화흡착제 제작 및 처리

본 연구에서는 Table 1과 같은 물리적 성질을 갖는 분말 형태인 Phillipsite-Gismondine synthetic zeolite(IW-85, UOP)를 Park 등[28,29]이 사용한 방법 중 막 형태로 고정화하여 이용하였다. 막 형태의 고정화흡착제는 투석막(retain M.W. 12,000, Sigma)을 흐르는 물에 3~4시간 동안 씻어 glycerin을 제거하고, 100 ºC에서 10분간 끓인 다음 투석막 하나에 0.5 g Phillipsite-Gismondine synthetic zeolite를 충전시켜서 사용하였다. 충전된 막 형태의 고정화흡착제는 100 mL spinner flask의 impeller shaft 양쪽에 1개씩 모두 2개를 부착하여 따로 가압멸균하였다. Zeolite의 적용을 위하여 100 mL spinner flask에서 Vero 세포의 배양 48시간에 Fig. 1에서와 같이 막 형태의 고정화흡착제가 부착된 impeller shaft로 교환하여 주었다.

Table 1. The physical properties of Phillipsite-Gismondine

Typical Oxide formula :	$K_2OAl_2O_3 3.6SiO_2 5H_2O$
Typical Unit Cell Contents	$K_{42}[(AlO_2)_{42}(SiO_2)_{76}]107H_2O$
Symmetry	Cubic
Density	2.18 g/mL
Unit Cell Constants	a = 20.1 Å
Unit Cell Volume	8072 $Å^3$
Framework	Phillipsite-related
Void Volume	0.22 mL/mL
Framework density	1.45 g/mL
Large Molecule Adsorbed	SO_2 not O_2
Kinetic Diameter	3.6 Å

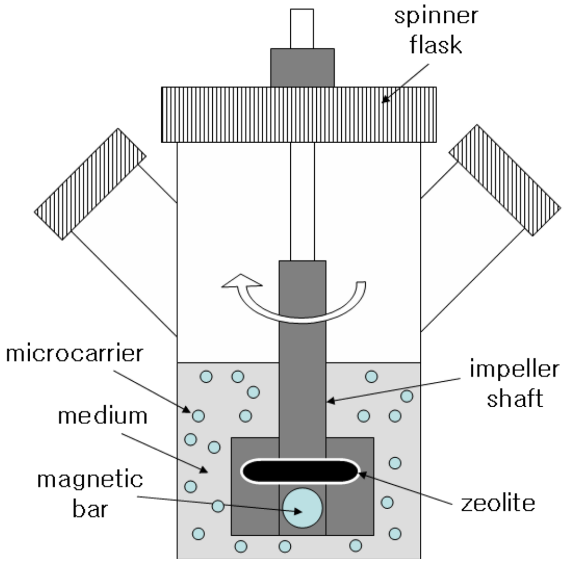

Fig. 1. The schematic diagram of Carberry type bioreactor equipped with zeolite adsorbent at the impeller shaft of spinner flask.

2-5. 미립담체 배양에서의 바이러스 감염

100 mL spinner flask(Bellco, USA)에 Vero 세포를 배양하다가 72시간에 배지를 80% 제거하고, PEDV를 0.01 MOI로 1시간 동안 교반을 멈추고 간헐적으로 흔들어 주면서 감염시켰다. 1시간 후 배지제거 전의 부피만큼 새 배지를 넣어주고, 60 rpm으로 연속해서 교반하며 바이러스를 생산하였다. 바이러스 감염 후 24시간 간격으로 1 mL씩 sampling하여 1.5 mL microtube에 넣고, 바이러스 역가 측정 전까지 −80 °C deep freezer에 보관하였다.

2-6. 바이러스역가 측정

PEDV의 역가를 확인하기 위해 plaque assay를 사용하였다. 먼저 6 well culture plate에 Vero 세포를 1×10^5 cells/mL의 농도로 각 well에 2 mL씩 접종하고, 37 °C, 5% CO_2 incubator에서 3일간 배양하여 세포가 culture vessel 표면을 80~90% 이상 덮으면 배지를 제거하고, 10배씩 serial dilution한 바이러스 희석액을 접종하고, 1시간 동안 간헐적으로 흔들어서 바이러스가 세포에 흡착되도록 하였다. 1시간 후 바이러스 희석액을 제거하고, 3% low melting agarose와 배지를 1:2로 혼합한 overlay 배지를 각 well에 2 mL씩 도포하고, 실온에서 굳혔다. Agarose overlay 배지가 굳은 후 parafilm으로 plate를 봉하고, 37 °C, 5% CO_2 incubator에서 2일간 배양하였다. 2일간 배양 후 육안으로 plaque가 형성된 것이 보이면, 3% agarose solution : 배지 : neutral red solution=1 : 2 : 0.3의 agarose 염색배지를 만들어 각 well에 1 mL씩 도포하여 실온에서 굳혔다. Agarose 염색배지가 굳은 후 37 °C, 5% CO_2 incubator에서 overnight하여 neutral red dye가 세포에 염색되도록 하였다. 다음날 계수하기에 적합한 희석배수에서의 plaque를 계산하여 역가를 측정하였다.

2-7. 포도당, 젖산, 암모늄 이온 분석

포도당은 YSI 2700(YSI, USA)을 이용하여 분석하였고, 젖산과 암모늄 이온은 lactate assay kit(sigma, 735)와 ammonia assay kit(sigma, 171-B)를 이용하여 microplate reader에서 각각 540 nm와 340 nm로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. Zeolite의 Vero 세포 성장에 대한 효과

CHO 세포와 hybridoma 세포 배양에서 zeolite가 암모늄 이온을 제거함에 따라 세포성장 및 생성물의 생산을 촉진한다는 사실은 이미 보고되었다[9,28,29]. 따라서 zeolite에 의한 암모늄 이온의 제거가 돼지유행성설사병 바이러스의 숙주세포인 Vero 세포성장에 어떠한 영향을 미치는지 먼저 조사하였다. Cultispher-G 미립담체에 고정된 Vero 세포를 100 mL spinner flask에서 배양하면서, 배양 48시간에 spinner flask의 impeller shaft를 zeolite가 부착된 impeller shaft로 교환하여 zeolite가 부착되지 않은 대조군과 세포성장을 비교하였다. 그 결과 Fig. 2(a)에서처럼, zeolite 처리군에서의 세포성장이 감소하는 것을 보였다. 그러나 Fig. 2(b)에서는 zeolite 처리군에서 포도당 소모가 더 빨리 일어났고, 또한 Fig. 2(c)에서와 같이 젖산 생성도 증가함을 보이고 있어서 실제 세포성장이 저해되었다기 보다는 다른 이유로 겉보기 세포성장이 낮게 관찰되었을 것이라 추측할 수 있으며, zeolite가 Vero 세포의 성장을 저해하지 않는 것으로 보인다. 실제 zeolite 처리군에서 세포농도가 적게 측정된 원인은 흡착제가 impeller shaft에 고정되면서 그 틈 사이에 미립담체가 부착되어져 응집이 형성되었기 때문이다. Park 등[29]의 결과에서는 미립담체를 사용하지 않고 부유배양에 적응된 CHO 세포를 배양하였기 때문에 응집이 형성되어지지 않아 세포농도의 증가 현상을 보였으나, 본 실험에서 사용한 Vero 세포가 고정된 미립담체는 단일 세포에 비해 크기가 커서 응집이 쉽게 형성되었기 때문에 sampling에 의해 세포농도를 측정했을 때 낮은 세포농도를 보였다. Fig. 2(d)에서 zeolite 처리군의 암모늄 이온 농도는 흡착으로 인해 세포배양 96시간을 기준으로 대조군 대비 57%의 암모늄 이온 농도를 보였다. 이 결과로 zeolite가 CHO, hybridoma 세포배양 외에 Vero 세포배양에서도 뛰어난 암모늄 이온 흡착능을 보여준다고 할 수 있다.

3-2. Zeolite의 PEDV 생산에 대한 효과

Spinner flask 배양에서 Vero 세포를 이용한 PEDV 생산 과정 중 바이러스 감염 전까지의 세포배양 과정은 위와 동일하였다. Zeolite 처리군과 대조군에서의 바이러스의 감염은 세포배양 72시간에 spinner flask의 교반을 멈추어 미립담체를 침강시킨 후 배지의 80%를 제거하고, PEDV를 0.01 MOI로 감염시켜 1시간 동안 세포와 바이러스를 접촉시켜 바이러스를 감염한 후 PEDV를 생산하여 바이러스 역가를 측정하였다. Fig. 3(a)에서는 세포배양 72시간까지는 Fig. 2(a)와 마찬가지로 비슷한 양상을 보였으나, 24 hpi(hours post-infection)부터는 zeolite 처리군과 대조군 모두 바이러스의 증식으로 세포농도가 급격하게 감소함을 보여주고 있다. 바이러스 생산시간에 따른 PEDV의 역가변화를 보여주고 있는 Fig. 3(b)에서, zeolite 처리군의 역가는 24 hpi부터 증가하기 시작하여 48 hpi에 최대 11.3×10^6 pfu/mL의 역가를 보인 후에 감소하기 시작한 반면에 대조군은 24 hpi에 4.8×10^6 pfu/mL의 역가를 보인 후에 계속 감소함을 보였다. 바이러스 생산에 있어서는 zeolite 처리군의 경우 zeolite의 암모늄 이온 제거에 의해 대조군과 비교하여 2배 이상의 바이러스 역가가 향상됨을 보였다. 따라서 본 연구에서 적용한 막 형태의 고정화흡착제가 부착된 Carberry type 생물반응기는 CHO 세포나 hybridoma 세포배양뿐만 아니라 돼지유행성설사병 바이러

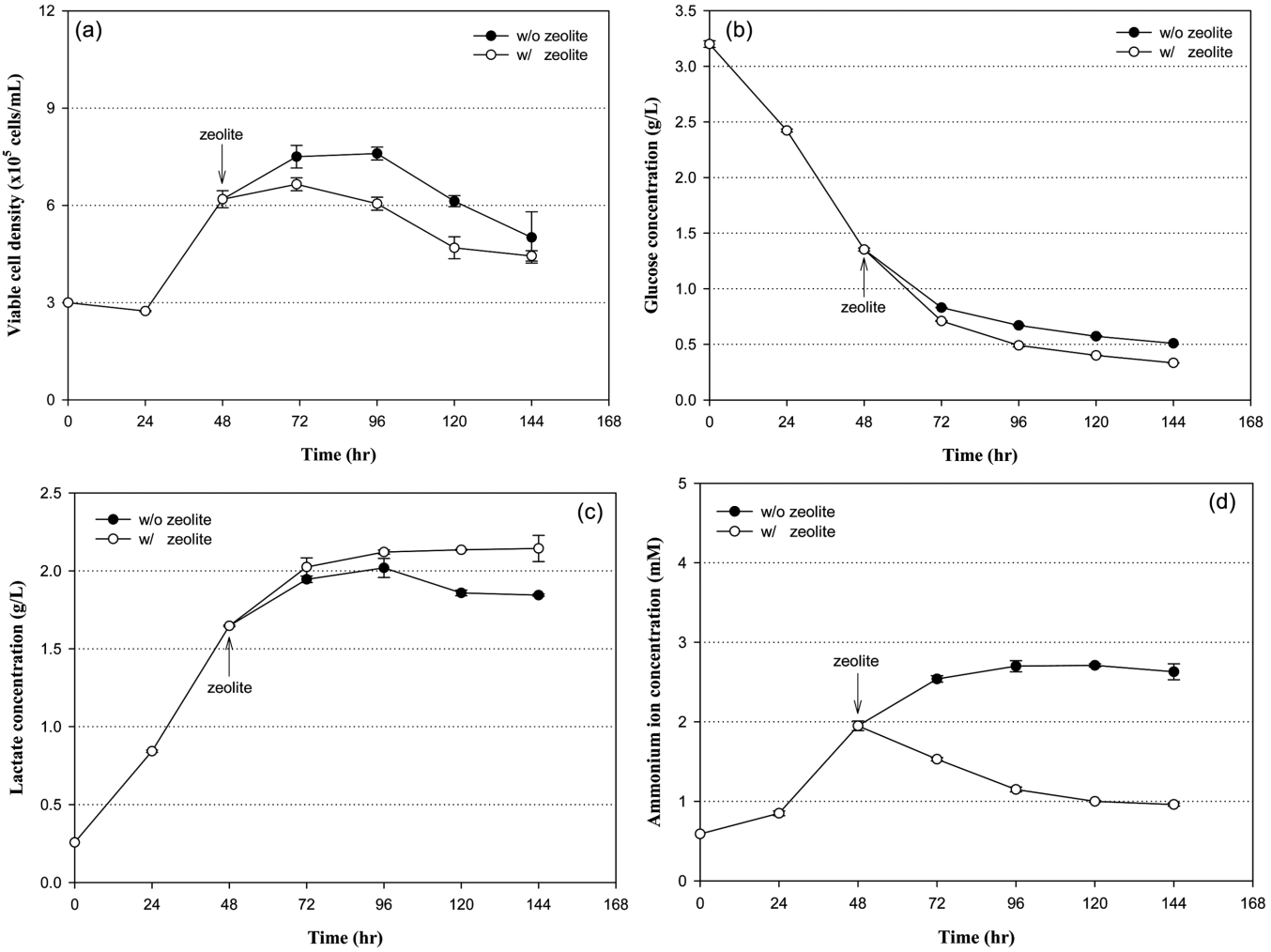

Fig. 2. The effect of zeolite on Vero cells growth without infection in spinner flask cultures. (a) Viable cell, (b) glucose, (c) lactate, and (d) ammonium ion concentration profiles. The arrow means zeolite adsorbent treatment. The data, from 24 hr to 48 hr, represents the mean and standard deviations calculated from the results of two spinner flasks. The data, from 72 hr to 144 hr, represents the mean and standard deviations calculated from the results of duplicate assay in each spinner flask.

스 백신 등 바이러스 백신의 생산에도 효율적으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

Fig. 3(c), 3(d)의 결과는 zeolite 처리군이나 대조군 모두에서 포도당 소모나 젖산 생성이 비슷함을 보여주었다. 배양시간에 따른 암모늄 이온의 변화를 보여주고 있는 Fig. 3(e)에서, 바이러스 감염 전까지의 양상은 Fig. 2(d)와 같은 양상을 보였으나 바이러스 감염과 배지교환 후 생산단계에서 24 hpi까지 zeolite 처리군이나 대조군 모두 암모늄 이온이 증가함을 보였다. 이러한 원인은 바이러스 증식 및 세포증식을 위한 글루타민 대사 부산물로써 암모늄 이온이 측적되기 때문이며, 24 hpi 이후부터는 시간이 지날수록 zeolite 처리군에서의 암모늄 이온 농도는 흡착으로 인하여 대조군의 암모늄 이온 농도보다 훨씬 낮게 유지되는 것이 관찰됨으로써 Fig. 3(b)에서 나타난 바이러스 백신 역가의 향상은 zeolite에 의한 암모늄 이온의 제거효과임을 알 수 있었다.

4. 결 론

동물세포배양에서 독성 부산물인 암모늄 이온은 글루타민의 대사에 의해 발생한다. 이 암모늄 이온의 배양액 내 축적은 세포성장을 저해할 뿐만 아니라 생성물의 수율도 감소시킨다. 따라서 배양액 내에 생성 축적된 암모늄 이온을 제거한다면 세포성장 및 생성물의 수율을 촉진할 것으로 예측할 수 있다. 앞선 zeolite를 이용한 연구들에서 tPA나 단일클론항체와 같은 생성물의 수율이 암모늄 이온 제거에 의해 증가함에 따라 zeolite를 바이러스 백신 생산에도 적용해 보았다. Zeolite를 바이러스 백신 생산 시스템에 가장 효율적으로 적용하기 위하여 막 형태 고정화 흡착제가 부착된 Carberry type 생물반응기를 사용하여 돼지유행성설사병 바이러스 백신을 생산하였다. 그 결과 zeolite는 바이러스 생산에 주로 이용되는 Vero 세포 성장에 독성을 나타내지 않았으며, 탁월한 암모늄 이온 제거능을 보여주었다. 또한 바이러스 생산에 있어서도 zeolite를 처리하지 않은 대조군과 비교해 2배 이상의 높은 바이러스 역가를 보여주었다. 이로써 zeolite가 암모늄 이온의 생성 축적에 의해 세포성장 및 생산 수율이 저해되는 다양한 생물학적 공정을 개선할 수 있는 유용한 수단임을 확인하였고, 본 연구에서 사용한 변형된 Carberry type 생물반응기는 미립담체 응집의 축적과 같은 문제가 약간 있었지만 다양한 바이러스 백신 생산에 유용하게 사용될 가능성을 확인

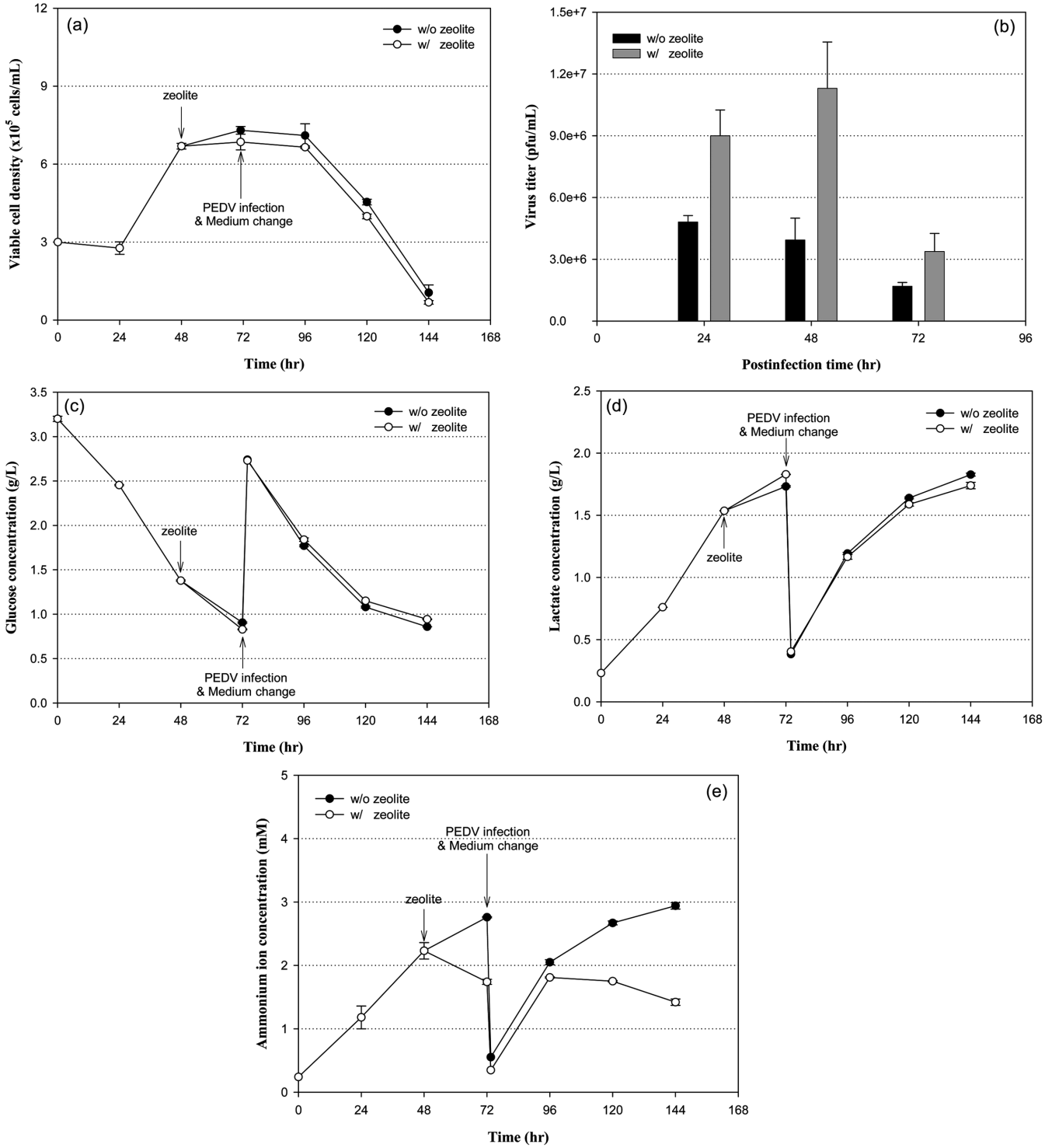

Fig. 3. The effect of zeolite on Vero cells growth with infection in spinner flask cultures. (a) Viable cell, (b) virus titer, (c) glucose, (d) lactate, and (e) ammonium ion concentration profiles. The arrow at 48 hr means zeolite adsorbent treatment. The arrow at 72 hr means PEDV infection and medium exchange. The data, from 24 hr to 48 hr, represents the mean and standard deviations calculated from the results of two spinner flasks. The data, from 72 hr to 144 hr, represents the mean and standard deviations calculated from the results of duplicate assay in each spinner flask.

하였다. 향후 zeolite가 단일 세포나 미립담체에 고정된 세포 모두에 범용적으로 적용될 수 있는 흡착제 시스템의 개발이 암모늄 이온의 축적 문제를 안고 있는 동물세포 배양 시스템의 효율 향상을 위해 절실히 요구된다.

감 사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역혁신인력양성사업 및 2010년도 강원대학교 학술연구조성비로 수행된 연

구결과입니다.

참고문헌

1. Eagle, H., "The Specific Amino Acid Requirements of a Mammalian Cell(strain L) in Tissue Culture," *J. Biol. Chem*., **214**(2), 839-852(1955).
2. Raivio, K. O. and Seegmiller, J. E., "Role of Glutamine in Purine Synthesis and in Guanine Nucleotide Formation in Normal Fibroblasts and in Fibroblasts Deficient in Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase Activity," *Biochim. Biophys. Acta*., **299**(2), 283-292(1973).
3. Dalili, M., Sayles, G. D. and Ollis, D. F., "Glutamine Limited Batch Hybridoma Growth and Antibody Production; Experiment and Model," *Biotechnol. Bioeng*., **36**(1), 74-82(1990).
4. Zielke, H. R., Zielke, C. L. and Ozand, P. T., "Glutamine : a Major Energy Source for Cultured Mammalian Cells," *Fed. Proc*., **43**(1), 121-125(1984).
5. Jeong, Y. H. and Wang, S. S., "Role of Glutamine in Hybridoma Cell Culture: Effect on Cell Growth, Antibody Production and Cell Metabolism," *Enzyme Microb. Technol*., **17**(1), 47-55(1995).
6. Ryan, W. L. and Cardin, C., "Amino Acids and Ammonia of Fetal Calf Serum During Storage," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*., **123**(1), 27-30(1966).
7. Visek, W. J., Kolodny, G. M. and Gross, P. R., "Ammonia Effects in Cultures of Normal and Transformed 3T3 Cells," *J. Cell Physiol*., **80**(3), 373-381(1972).
8. Butler, M. and Spier, R. E., "The Effects of Glutamine Utilization and Ammonia Production on the Growth of BHK Cells in Microcarrier Cultures," *J. Biotechnol*., **1**(3-4), 187-196(1984).
9. Jeong, Y. H. and Wang, S. S., "In situ Removal of Ammonium ions from Hybridoma Cell Culture Media: Selection of Adsorbent," *Biotechnol. Tech*., **6**(4), 341-346(1992).
10. Reuveny, S., Velez, D., Macmillan, J. D. and Miller, L., "Factors Affecting Cell Growth and Monoclonal Antibody Production in Stirred Reactors," *J. Immunol. Methods*, **86**(1), 53-59(1986).
11. Glacken, M. W., Fleischaker, R. J. and Sinskey, A. J., "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**(9), 1376-1389(1986).
12. Ito, M. and Mc Limans, W. F., "Ammonia Inhibition of Interferon Synthesis," *Cell Biol. Int. Rep*., **5**(7), 661-666(1981).
13. Commoy-Chevalier, M. J., Robert-Gailiot, B. and Chany, C., "Effects of Ammonium Salts on the Interferon-induced Antiviral State in Mouse L Cells," *J. Gen. Virol*., **41**(3), 541-547(1978).
14. Jensen, E. M. and Liu, O. C., "Studies of Inhibitory Effect of Ammonium Ions in Several Virus-tissue Culture Systems," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*., **107**, 834-838(1961).
15. Eaton, M. D. and Scala, A. R., "Inhibitory Effect of Glutamine and Ammonia on Replication of Influenza Virus in Ascites Tumor Cells," *Virology*, **13**, 300-307(1961).
16. Furusawa, E. and Cutting, W., "Inhibitory Effects of Ammonium Sulfate on Columbian SK Virus Propagation in Mouse Ascites Tumor Cells In Vitro," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*., **111**, 71-75(1962).
17. Griffiths, J. B., "The Effects of Adapting Human Diploid Cells to Grow in Glutamic Acid Media on Cell Morphology, Growth, and Metabolism," *J. Cell Sci*., **12**(2), 617-629(1973).
18. Hosoi, S., Mioh, H., Anzai, C., Sato, S. and Fujiyoshi, N., "Establishment of Namalva Cell Lines Which Grow Continuously in Glutamine-free Medium," *Cytotechnology*, **1**(2), 151-158(1988).
19. Butler, M. and Christie, A., "Adaptation of Mammalian Cells to Non-ammoniagenic Media," *Cytotechnology*, **15**(1-3), 87-94(1994).
20. Genzel, Y., Ritter, J. B., Konig, S., Alt, R. and Reichl, U., "Substitution of Glutamine by Pyruvate to Reduce Ammonia Formation and Growth Inhibition of Mammalian Cells," *Biotechnol. Prog*., **21**(1), 58-69(2005).
21. Hecht, V., Bischoff, L. and Gerth, K., "Hollow Fiber Supported Gas Membrane for in situ Removal of Ammonium During an Antibiotic Fermentation," *Biotechnol. Bioeng*., **35**(10), 1042-1050 (1990).
22. Chang, Y. H. D., Grodzinsky, A. J. and Wang, D. I. C., "In-situ Removal of Ammonium and Lactate Through Electrical Means for Hybridoma Cultures," *Biotechnol. Bioeng*., **47**(3), 308-318(1995).
23. DeBouck, P. and Pensaert, M., "Experimental Infection of Pigs with a New Porcine Enteric Coronavirus, CV 777," *Am. J. Vet. Res*. **41**(2), 219-223(1980).
24. Dea, S., Vaillancourt, J., Elazhary, Y. and Martineau, G. P., "An Outbreak of Diarrhea in Piglets Caused by a Coronavirus Antigenically Distinct from Transmissible Gastroenteritis Virus," *Can. Vet. J*., **26**(3), 108-111(1985).
25. Egberink, H. F., Ederveen, J., Callebaut, P. and Horzinek, M.C., "Characterization of the Structural Proteins of Porcine Epizootic Diarrhea Virus, Strain CV777," *Am. J. Vet. Res*., **49**(8), 1320-1324 (1988).
26. Hofmann, M. and Wyler, R., "Propagation of the Virus of Porcine Epidemic Diarrhea in Cell Culture," *J. Clin. Microbiol*., **26**(11), 2235-2239(1988).
27. Kweon, C. H., Kwon, B. J., Jung, T. S., Kee, Y. J., Hur, D. H., Hwang, E. K., Rhee, J. C. and An, S. H., "Isolation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) in Korea," *Korean. J. Vet. Res*., **33**(2), 249-254(1993).
28. Park, B. G., Min, Y. W., Chun, G. T., Kim, I. H. and Jeong, Y. H., "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," *Korean J. Biotechnol. Bioeng*., **13**(4), 404-410(1998).
29. Park, B. G., Rhee, H. I., Chun, G. T., Kim, I. H. and Jeong, Y. H., "Development of An Immobilized Adsorbent for in situ Removal of Ammonium ion from Animal Cell Culture Media and its Application to a Animal Cell Culture System: II. Application to Cell Culture System," *Korean J. Biotechnol. Bioeng*., **13**(4), 411-417(1998).