

과불소탄소화물과 새로운 임펠러를 사용한 생물반응기의 특성

조 무 환 · 김 용 락 · 정 재 학 · 김 정 목
영남대학교 공과대학 화학공학과

Characteristics of a Bioreactor Using Perfluorocarbons and a New Impeller

Moo H. Cho, Yong L. Kim, Jae H. Chung, Jeong M. Kim
Department of Chemical Engineering, Yeungnam University

ABSTRACT

Recently, developments of large scale and high density cell culture methods have been the objects of many researches, because the demand of various pharmaceutical products produced by animal cell culture has been rapidly increasing. The cell culture equipment should have the requirements such as sufficient oxygen transfer and mixing, low shear stress and surface tension, and small foaming. In order to develop a proper bioreactor meeting these requirements simultaneously, a perfluorocarbon having high solubility of oxygen was sprayed into the medium as an oxygen carrier instead of air. Also, a new impeller was developed and combined together with the perfluorocarbon spraying system so as to design a new bioreactor for cell cultivation. The new impeller had better characteristics of mixing and oxygen transfer than the paddle and cell-lift impellers based on the same shear rate. But, it was observed that the volumetric oxygen transfer coefficient of the new bioreactor decreased with increasing cell density during *E. coli* fermentation.

서 론

최근에 대량의 동물 세포배양이 큰 문제로 대두되고 있다. 왜냐하면, 많은 의약품들-백신, 성장호르몬, 혈전용해제, 인터페론, 인터루킨 그리고 모노클로날 항체등의 수요가 급격히 늘고 있기 때문이다. 그리고, 생산수율과 생산성을 높이고 생성물 회수 비용을 줄이기 위해서 고농도의 동물세포배양이 많은 관심을 끌고 있다(1). 고농도 배양의 경우 세포농도가 보통의 10-100배까지 증가함으로 심한 산소 부족현상과 젖산이나 암모니아 이온의 증가현상이 일어나 세포 배양에 장애를 일으키게 된다. 특히, 이러한 현상들은 생물반응기의 크기가 커질수록 더욱 심화되며 그 중에서 충분한 산소 공급이 동물 세포 배양 생물반응기의 scale-up에 가장 심각한 문제로

알려져 있다(2). 동물세포 대량 배양에 적합한 새로운 생물 반응기는 세포막에 충격을 주는 유체의 전단응력이나 기포의 표면장력을 최소화하는 동시에 배지에 산소진달이 충분하여 세포의 생명력을 유지할 수 있어야 하고 영양분을 균일하게 혼합하고 세포의 영감을 방지할 수 있는 충분한 혼합이 이루어져야 한다.

동물세포는 세포벽이 없으므로 유체의 전단응력이나 기포의 표면장력에 아주 민감하다. 따라서, 새로운 생물 반응기에 대한 전단응력 특성조사가 매우 중요하다. 기포의 표면장력이나 전단응력을 제거하기 위하여 간접적인 aeration방법이 여러가지로 개발되었다. 예를들면 cage aeration(3), silicone tubing aeration(4), surface aeration(5), medium circulation(6) 등이다. 그러나, cage aeration은 microcarrier를 사용하지 않는 suspension culture에는

세포가 cage screen을 통하여 들어가서 기포와 접촉하기 때문에 그 효과가 없고 배지의 circulation 방법도 마찬가지이다. 그리고, silicone tubing aeration과 surface aeration 방법들은 작은 크기의 생물 반응기에서는 만족할만 하나 크기가 scale-up 되면 배지의 양이 늘어나서 엄청난 길이의 silicone tubing이 필요하며 surface aeration은 단위 부피당의 표면 넓이가 줄어들어 산소전달 용량이 줄어든다. 또한, air lift 혹은 bubble column 생물반응기는 직접적인 공기 분사로 인하여 세포막에 충격을 주기 쉽다. 특히, 큰 scale에서는 기포의 크기가 더욱 확대됨으로서 그 영향이 더 크다(7).

과불소탄소화합물(perfluorocarbon)은 모든 수소원자가 불소로 치환된 유기 화합물이다. 이 화합물들은 열에 안정하며 화학적으로 비활성적이고 biocompatible한 비극성 물질이다. 또, 산소와 이산화탄소등의 많은 기체가 물에 비해서 이 물질에 높은 용해도를 가진다(8). 이러한 성질들로 인하여 과불소탄소화합물은 인공혈액의 주원료로 연구되어 왔다. 특히, perfluorodecalin과 perfluorotripropylamine 이 분산된 상업적 제품, Fluosol-DA(Green Cross, Japan)는 인체에 인공혈액으로 실험된적 있다(9). 그리고 최근에는 과불소화합물들이 미생물과 동물 세포 배양에도 사용되어 왔다. Adlercreutz와 Mattiasson(10)은 *Gluconobacter oxydans* 고정화 충전층 반응기에서 FC-72라는 과불소탄소화합물이 분산된 배지를 순환시켜 glycerol을 dihydroxyacetone으로 전환시키는데 그 수율을 증가시켰다. Damiano와 Wang(11)은 *Escherichia coli*의 배양을 위하여 Flutec PP9이라는 화합물을 column발효기에 노즐을 통하여 분산시켜 산소전달을 증가시켰다. 이 방법은 그 후 Cho(12)에 의하여 더욱 발전되어 산소전달 속도가 증가되었으며 기존의 교반탱크 발효기와 비교하여 그 성능과 scale-up 그리고 경제성 등이 검토되었다. 또한, Cho와 Wang(13)은 상업적 동물 세포배양기인 Celligen Bioreactor(New Brunswick Sci., New Jersey)를 보완하고 Flutec PP11이라는 화합물을 산소 전달 매체로 하여 산소전달속도를 증가시켰으며, 그 화합물이 hybridoma 배양에 전혀 부해하며 spinner flask에서 여분의 산소를 공급하여 모노클로날 항체 생산을 촉진시키는 것을 밝혔다.

본 연구에서는 낮은 전달능력에서 높은 혼합효과를 보이는 새로운 교반앰퍼리를 개발하여 공기 대신에 과불소탄소화합물을 산소전달매체로 사용하는 생물반응기에 적용함으로써 새로운 동물세포 대량배양장치를 설계하였으며, 기초실험으로서 그것의 산소전달속도, 혼합시간, 전달율 등을 측정하고, 이를 *Escherichia coli* 배양에 사용하여 특성과 성능을 교반탱크반응기와 비교 검토하였

다.

재료 및 방법

실험장치

Fig. 1은 과불소탄소화합물(이하 PFC)을 산소 전달 매체로 사용할때 산소 전달 계수를 측정하기 위한 장치로서 높이가 16cm, 직경이 12cm이다. 하부에 PFC 280ml를 채우고 PFC속에 실리콘 튜브(내경 2mm, 두께 0.5mm) 1m를 넣어서 공기 또는 순수한 산소로 포화시키고 펌프로 순환시켜 노즐을 통하여 증류수 속에 분산시켰다. 노즐은 실리콘 튜브(내경 5mm, 두께 1.5mm)를 직경 9cm의 원형으로 만들어 고정시키고, 직경이 0.7mm인 구멍 10개를 하부에 뚫어 사용하였다. impeller는 pyrex로 제작한 3종류를 사용하였는데 자세한 모양은 Fig. 2와 같다. 여기서, Cell-lift impeller는 미국의 발효기 제작 회사인 New Brunswick Sci. 회사에서 판매하고 있는 동물 세포 배양기(Cellgen)의 impeller 형태이다. 동물 세포 배양에는 전달 용력을 최소화 하며 혼합과 산소 전달을 충분히 할 수 있는 impeller가 필요하다. PFC는 물보다 비중이 약 2배이므로 그것이 물속에서 분산되어 낙하할때 상당한 혼합이 이루어진다. 그러나, 대규모의 배양기에서는

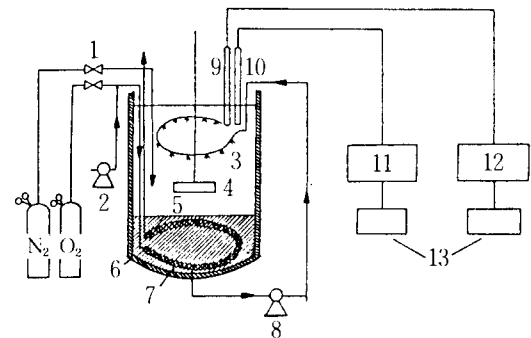


Fig. 1. Schematic diagram of the PFC-Bioreactor system for preliminary experiments.

- | | |
|------------------|-----------------|
| 1. Gate valve | 8. Feed pump |
| 2. Air pump | 9. pH probe |
| 3. Sprayer | 10. DO probe |
| 4. Impeller | 11. pH meter |
| 5. Flutec PP11 | 12. DO analyzer |
| 6. Water jacket | 13. Recorder |
| 7. Silicone tube | |

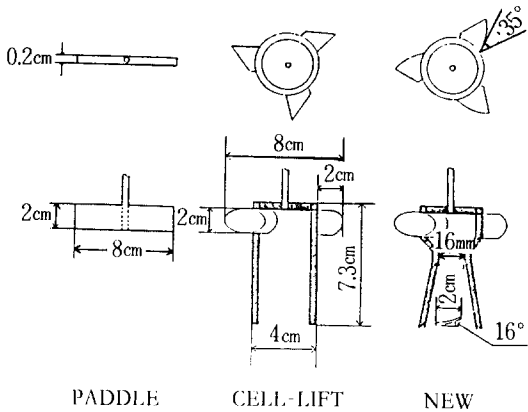


Fig. 2. Schematic diagrams of three different impellers.

그것만으로 충분치 못하며 특히 축 방향의 혼합이 많이 필요하다. 따라서, 전달 능력이 작으면서 축 방향의 혼합을 원활히 해줄수 있는 impeller의 개발이 수행되었다. 새로운 impeller는 Cell-lift형을 수정·보완한 것으로서 사용한 날개의 직경은 8cm, 높이 2cm, 하부 직경 4cm, 전체높이 7.3cm이다. Cell-lift와 다른점은 같은 교반 속도에서 원통 내부로 유체의 흡입 능력을 증대시키기 위하여 하부 원통을 벤츄리 형태로 만들었다. 벤츄리 목의 직경은 1.6cm이다. 또한, 흡입 능력을 더욱 증대시키기 위하여 원통 하부의 안쪽에 16°정도로 기울인 2cm 길이의 나선 모양을 붙였다. 그리고, 유체와의 마찰을 최소화하기 위하여 날개의 모양을 35° 정도로 곡면화시켜 유선형으로 만들었다. 3종류의 impeller를 바꾸어 가면서 1.2l의 증류수를 사용하여 교반속도에 따라 혼합 시간, 포화 용존 산소 농도(이로부터 전달을 계산 가능), 표면 통기의 부피 산소 전달 계수(이하 k_La)등을 측정하였다.

다음에 미생물 배양 특성을 비교하기 위하여 2개의 발효기 형태를 사용하였다. 먼저, baffle이 없는 교반 탱크 발효기(이하 STF)로서 직경 12cm, 높이 16cm이며 하부에 통기석을 사용하여 공기를 직접 주입시켰으며 paddle impeller를 사용하였다. 다른 형태는 새로운 PFC 사용 생물 반응기로서(이하 PFC-Bioreactor) 크기와 모양이 STF와 같으나 새로운 impeller를 사용하였으며, Fig. 3과 같이 하부에 PFC를 300ml가량 채우고, 일부는 recycle 펌프에 의해 aerator에 순환되어 공기로 재포화시켰으며, 일부는 spray 펌프로 순환되어 앞에서 설명한 링

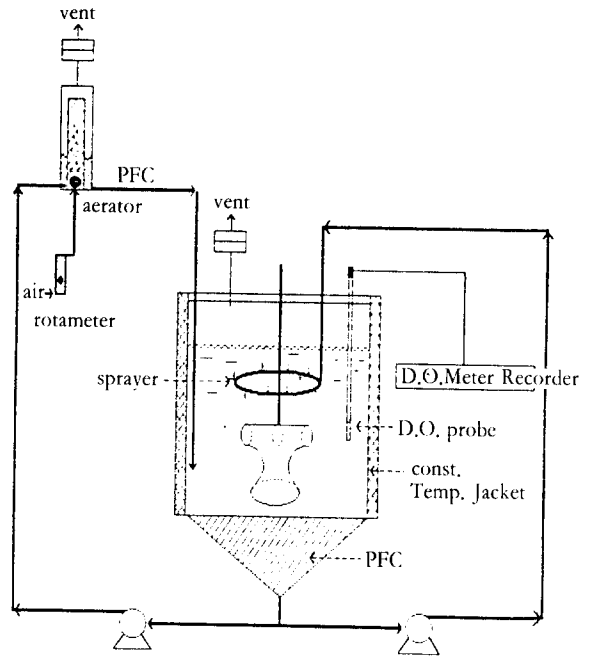


Fig. 3. Schematic diagram of the PFC-Bioreactor system for fermentation.

노즐에 의해 작은 액적으로 발효액 속에 분사되었다. 발효액의 부피는 전체 1.2l로 하였으며 미생물 접종량은 5%로 진탕 플라스크에서 12시간 배양한 뒤 주입하였다. 37°C, pH 7에서 교반속도, 통기속도, PFC 분사 속도 등을 변화시키면서 k_La 등을 측정하고, 미생물 접종후 매시간마다 용존 산소 농도(이하 DO), 세포의 농도등을 측정하였다.

과불소탄소화물(Perfluorocarbons)

먼저, Fig. 1에서 사용한 PFC는 Perfluoromethyldecalin 으로서 영국 ISC 화학 회사에서 제조한 Flutec PP11이다. 그리고, Fig. 3의 발효 실험시에는 PP11이 불충분하고 구입하기가 힘들어서, 새로이 미국 3M회사의 FC-40을 구입하여 사용하였다. Flutec PP11과 FC-40의 여러 가지 성질들을 Table 1에서 서로 비교하였다.

균주 및 배지

Escherichia coli HB-101을 사용하였고 1.B agar 배지에서 계대배양하여 4°C에서 보관하였다. 발효 배지의 조성은 Table 2와 같으며 발효 배지의 pH는 멸균전에 인산으로 7.0으로 조정하였고, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 glucose

Table 1. Properties of distilled water, Flutec^R PP11 and FC-40 at 25°C and 1 atm

Properties	Water	PP11	FC-40
Molecular weight	18	512	650
Density (g / cm ³)	0.997	1.966	1.87
Boiling point (°C)	100	215	155
Viscosity(dynamic) (cp)	0.95	6.41	4.12
Surface tension (dyn / cm)	71.97	18.5	16
Vapor pressure (mbar)	23.4	29	4
Heat of vaporization ^a (J / g)	2257	75.5	71.4
Specific heat (J / g °C)	1.85	1.09	1.05
Oxygen solubility ^b (mg / kg)	8.06	47.84	163.96
Diffusivity of O ₂ (cm ² / s)	2.1 × 10 ⁻⁵	1.1 × 10 ⁻⁵	-

^a: at boiling point
^b: at 28°C with 1 atm air

Table 2. Composition of fermentation medium in distilled water

Component	Concentration(g / L.)
glucose	16
K ₂ HPO ₄	15.75
KH ₂ PO ₄	6.75
sodium citrate	0.6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.15
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.5

는 나머지 성분들과 반응을 피하기 위하여 분리 멸균한 뒤 혼합하였다. 집중 배지의 부피는 전체 발효배지의 5%가 되도록 하였으며 37°C, 200rpm으로 12시간 진탕 배양시킨 뒤 사용하였다.

혼합시간의 측정

혼합시간은 pH-response 방법(14)으로 측정하였다. 먼저, 반응기에 증류수 1.2l를 채우고 35% HCl과 물을 3:7로 혼합한 용액 0.2ml를 반응기에 주입하여 pH를 5.5로 조정하여 완충영역을 피한다. 그 후, 반응기를 원하는 조건에 맞춘다음 앞의 HCl 용액을 0.18ml 주입하여 pH가 3.3에 도달하는 시간을 측정한다.

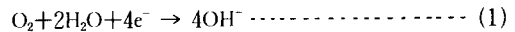
포화 DO 측정

DO 전극막의 바로 밑을 흐르는 유체의 전단응력이 클수록 형성되는 물질 전달 저항층의 두께가 작아져서

전극의 응답이 높게 나타난다(15). 따라서, 공기로 포화된 액체의 DO는 각 임펠러가 나타내는 전단응력에 따라 달라질 수 있다. 그리고, 임펠러가 회전할 때 가장 많은 전단응력이 걸리는 부분이 날개 끝부분이므로 거기에서 포화 DO를 측정하면, 간접적으로 최대 전단응력을 비교할 수 있다. 포화 DO를 측정하는 방법은 먼저, DO 전극(galvanic type)을 물 1.2l로 채워진 반응기의 교반기 날개 끝부분에 설치한다. 공기로 물을 포화시키고 더 이상 DO변화가 없을 때까지 회전속도를 증가시켜 그 DO를 100%로 기준을 정한다. 각 임펠러의 회전속도에 따라서 포화 DO를 측정하여 전달을 계산에 이용한다.

전단율의 계산

DO probe는 크게 galvanic 및 polarographic 형으로 나눌 수 있고 어느 것이나 다음 전기화학반응에 의하여 음극에서 산소가 소모된다.



이 반응은 매우 빨라서 음극과 배지 사이에 DO 농도차를 나타낸다. 따라서, 산소분자가 배지에서 전극막 바깥의 액체 경막 및 막 자체 그리고 전해질 층을 통과하여 음극까지 전달된다. 만약에, 전극막과 전해질층이 일정하다면 DO전극의 응답은 막바깥 액체 경막의 두께에 의하여 결정되고 DO전극의 포화응답과 응답시간에 영향을 미친다. 여기서는 DO probe의 포화응답이 유체전단응력이 커짐에 따라 증가되는 현상을 이용하여 간접적으로 전단응력 측정에 DO전극을 사용하고저 한다(16).

먼저, DO전극의 출력(*i_s*)과 유체전단율(γ)사이의 상관관계를 얻기 위하여 Kim(15)이 유도한 식에 의하면 각 층의 저항과 *i_s*사이의 관계식은 다음과 같다.

$$i_{s,0} = \frac{nFA P_B}{\frac{\delta_E}{\Phi_E} + \frac{\delta_M}{\Phi_M} + \frac{\delta_L}{\Phi_L}} \text{ ----- (2)}$$

여기서 *i_{s,0}*는 액체경막저항이 있을 경우 전극출력을 나타내고 n은 산소 1몰이 환원될때 필요한 전자수로서 여기서는 4이고, F는 Faraday상수, A는 음극의 표면적, Φ 는 산소 투과도 (cm / s)이고, δ_i 는 각 층의 두께, 하첨자 E, M, L은 각각 전해질층, 막층, 액체 경막을 나타낸다. 그리고 P_B는 bulk medium의 산소분압을 나타낸다 (Fig. 4).

만약, 액체경막이 없다면 최대 출력은 아래와 같다.

$$i_{s,B} = \frac{nFA P_B}{\frac{\delta_E}{\Phi_E} + \frac{\delta_M}{\Phi_M}} \text{ ----- (3)}$$

(2), (3)식에서

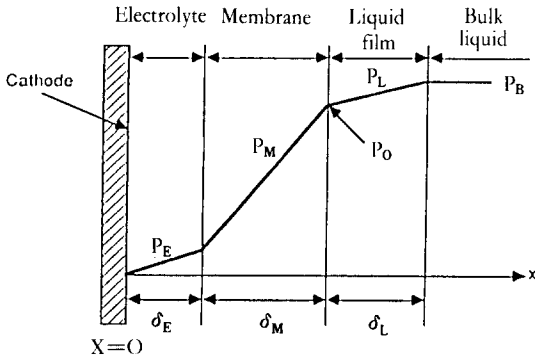


Fig. 4. Three layer model of DO probe(16).

$$\alpha = \frac{i_{s.o}}{i_{s.B}} = \frac{1}{1 + L} \quad \text{----- (4)}$$

여기서

$$L = \frac{\delta_L / \Phi_L}{(\delta_E / \Phi_E + \delta_M / \Phi_M)} \quad \text{----- (5)}$$

α 는 무차원 전극출력 즉, 최대 출력(포화 DO)에 대한 실제 출력(포화 DO)의 비를 나타내고, L은 막과 전해질층의 저항에 대한 액체 경막의 저항의 비를 나타내었다. 그리고, L은 DO 전극에 미치는 유체전달율(γ)의 함수이며 다음과 같이 가정할 수 있다.

$$L=L(\gamma) = \frac{L_o}{1+(\gamma/K)^n} \quad \text{----- (6)}$$

여기서, L_o 는 γ 가 0 일때의 값이며 γ 가 ∞ 일때 1.0이 된다. 그리고, K와 n은 실험상수이다.

(6)식을 (4)식에 대입하여 정리하면

$$\alpha = \frac{K^n + \gamma^n}{K^n(1+L_o) + \gamma^n} \quad \text{----- (7)}$$

$$(7)식에서 \gamma=0 : \alpha = \alpha_o = \frac{1}{1+L_o} \quad \text{----- (8)}$$

$$\gamma=\infty : \alpha = 1 \quad \text{----- (9)}$$

(7), (8)식에서

$$\gamma = K\beta^{1/n} \quad \text{----- (10)}$$

여기서

$$\beta = \frac{\alpha - \alpha_o}{\alpha_o(1-\alpha)} \quad \text{----- (11)}$$

(10)식은 무차원 전극출력(α)와 유체 전달율(γ) 사이의 관계식으로서 실험에 의하여 K와 n을 구할 수 있다.

K와 n을 구하기 위하여 기하학적 길이를 알고 있는 paddle impeller를 사용하였다. Croughan 등(17)에 의하면 평균 전달율은 교반기의 Reynold수(Re)와 회전수(N)의 함수이며 본 실험의 경우 다음과 같이 계산되었다.

$$\gamma = 7.623 \left[\frac{1.004 Re}{1000+1.430 Re} \right]^{1.8} \cdot N \quad \text{----- (12)}$$

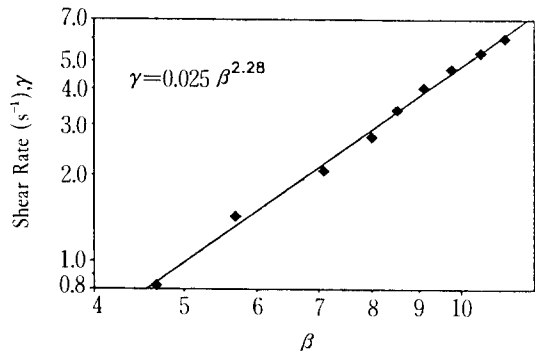


Fig. 5. Plot of $\log \gamma$ vs. $\log \beta$.

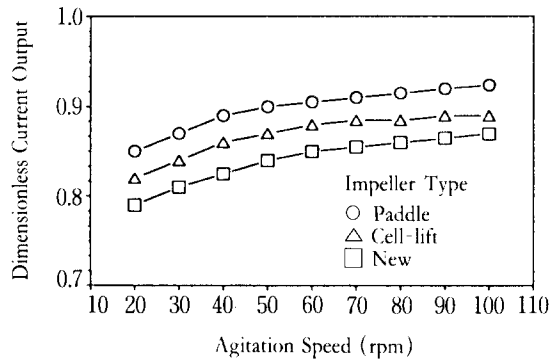


Fig. 6. Dimensionless current output(α)for various impellers.

$$\text{단, } Re = \frac{d_i^2 N \rho}{\mu} \quad \text{----- (13)}$$

여기서 d_i , ρ , μ 는 교반기의 직경 (8cm), 유체의 밀도 및 점도이다.

결국, γ 는 패들 임펠러의 회전수의 함수가 된다. 회전수를 변화시키면서 DO전극 출력(포화 DO)을 측정하여 (10)식의 K와 n을 구할 수 있다. Fig. 5에서 보듯이 그 결과는 다음과 같다.

$$\gamma = 0.025 \beta^{2.28} (s^{-1}) \quad \text{----- (14)}$$

그리고, Fig. 6에서 보는 바와 같이 각종 임펠러의 종류에 따라 회전수의 변화에 대한 무차원 전극출력(α)이 달라짐으로 (14)식을 이용하여 전달율을 계산할 수 있다.

부피 산소전달 계수($k_L a$)

$k_L a$ 는 static gassing-out method(18)에 의하여 주로

측정되었으며, 단, PFC-Bioreactor에서 미생물을 배양할때 최종 k_{La} 는 dynamic method(19)를 사용하여 구하였다.

세포농도

세포농도는 분광광도계(Bausch & Lomb, Spectronic 20)를 사용하여 증류수로 10배 희석한 발효액 시료의 흡광도를 520nm에서 측정하여 미리 구한 표준곡선에 의하여 건조세포농도(dry cell g / l)로 환산하였다.

건조세포농도는 40ml sample을 취하여 원심분리 및 세척을 두 차례 한뒤 90°C에서 24시간 건조시킨 뒤 측정하였다.

결과 및 고찰

새로운 임펠러와 PFC-Bioreactor의 특성

Fig. 7은 교반속도가 전단율에 미치는 영향을 각 임펠러에 대해서 나타낸 그림이다. 패들 임펠러는 낮은 rpm과 높은 rpm에서 큰 차이를 나타내고 있으나 Cell-lift 임펠러 및 새로운 임펠러는 rpm에 따라 큰 변화가 없음을 나타내고 있다. 특히, 새로운 임펠러는 다른 임펠러에 비해서 같은 속도에서 낮은 전단율을 나타내는 것을 볼 수 있다. 이는 유체의 원활한 흐름을 위해 임펠러 밑부분에 나선을 감고 중간을 오목하게 하고, 날개를 유선형으로 설계한 결과로 생각된다. Fig. 8에서는 전단율과 혼합시간의 관계를 나타내었다. 마찬가지로 새로운 임펠러가 다른 임펠러에 비교하여 같은 전단율을 유지할 때 매우 높은 혼합 효과를 나타낸다. Fig. 9는 surface aeration의 k_{La} 와 전단율에 대한 관계를 나타낸 것이다. 새로운 임펠러가 낮은 전단율에서도 가장 높은 k_{La} 를 나타내었다.

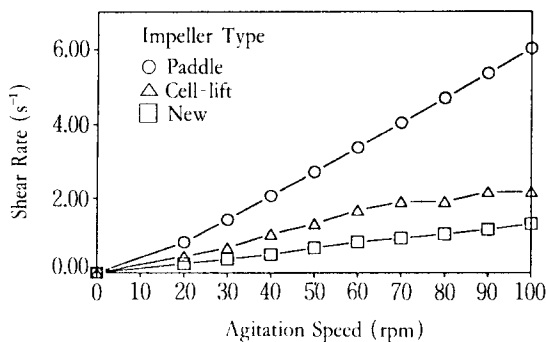


Fig. 7. Effect of agitation speed on shear rate for various impellers.

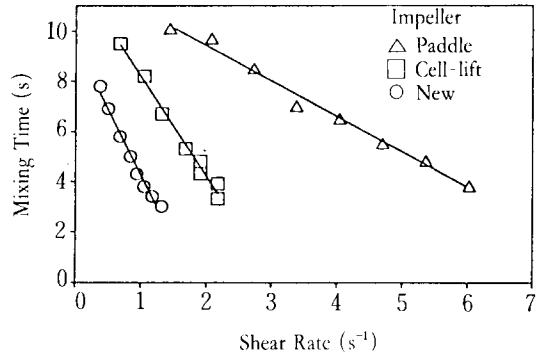


Fig. 8. Plot of mixing time vs. shear rate for various impellers.

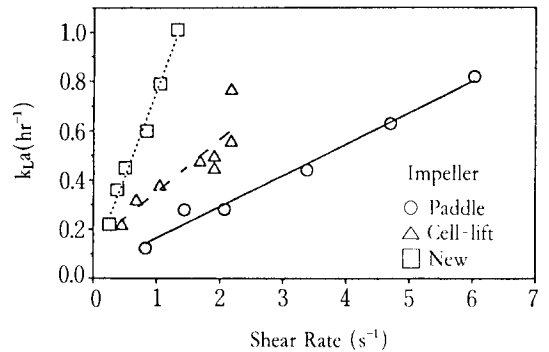


Fig. 9. Plot of k_{La} vs. shear rate for various impellers.

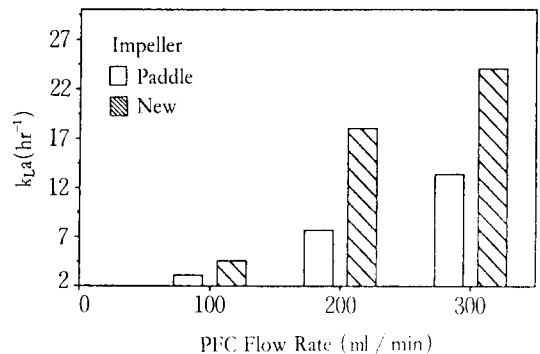


Fig. 10. Effect of PFC spray rate on k_{La} for two different impellers.

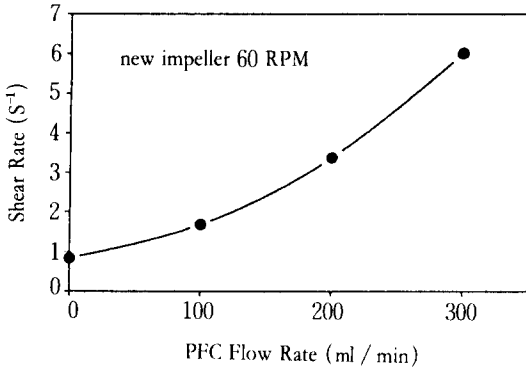


Fig. 11. Effect of PFC spray rate on shear rate using the new impeller.

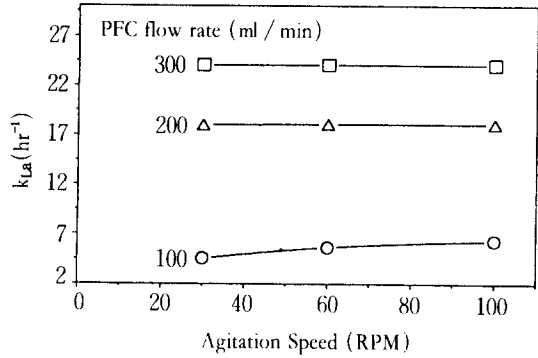


Fig. 12. Effect of agitation speed on k_{La} for various PFC spray rate.

Fig. 10은 PFC-Bioreactor(Fig. 1)에서 PFC 분사유량에 따른 임펠러의 영향을 나타낸 값인데, 공기를 silicon tube 속으로 100ml / min으로 일정하게 불어넣고, 30rpm에서 PFC 유량을 높이면서 측정된 초기 최대 k_{La} 값이다. 이때, PFC유량을 높이면 산소전달계수가 높아지는데, 새로운 임펠러가 패들 임펠러보다 성능이 우수함을 나타낸다. 그러나, Fig. 11에서 보듯이 PFC유량이 커지면 전달율도 따라서 증가하게되어 산소요구도에 맞게 PFC 유량과 교반속도를 조절할 필요가 있다.

Fig. 12는 새로운 임펠러의 교반속도가 k_{La} 에 미치는 영향을 보기 위하여 공기유량을 100ml / min으로하고 rpm과 PFC분사속도를 변화시키면서 k_{La} 를 측정하였다. 여기서 주목할 만한 것은 rpm의 영향은 PFC유량이 낮을 때만 그 효과가 나타나고, PFC유량이 높아지면 rpm의 영향은 거의 없어짐을 알 수 있다. 즉, 높은 PFC유량에서는 PFC가 노즐을 통하여 분사되는 효과가 rpm의 영향으로 나타나는 효과를 무시할 수 있음을 나타내는 결과이다. 이러한 현상은 산소전달이 거의 대부분 PFC의 액적을 통하여서 이루어지고 표면통기의 역할이 거의 없음을 알 수 있다. 따라서, PFC-Bioreactor에서는 배지의 혼합을 위한 최소한의 교반속도가 필요하며 다른 반응기에 비하여 전달율을 줄일 수 있는 잇점이 있다고 할 수 있다.

STF와 PFC-Bioreactor의 미생물 배양 특성

Fig. 13은 STF(Stirred Tank Fermentor)에서 교반속도를 60 rpm으로 일정하게 유지하고 패들 임펠러를 사용했을 때 통기 속도의 변화에 대하여 DO) 및 세포 농도의 시간에 따른 profile을 나타내고 있다. 통기 속도가 증가할수

록 더 높은 DO를 유지할 수 있고 미생물의 성장 속도가 증가되는 것을 알 수 있다. 즉, *E. coli*는 산소전달속도가 증가할수록 비성장속도가 증가되며 같은 발효 시간에서 더 높은 세포 농도를 얻을 수 있다. Fig. 14는 STF에서 통기속도를 600ml / min로 일정하게 유지하고 패들 임펠러를 사용했을 때 교반속도의 변화에 대하여 DO 및 세포 농도의 시간에 따른 profile을 나타낸다. 마찬가지로 교반속도가 증가할수록 산소전달속도가 증가하여 더 높은 DO를 유지하며 성장속도도 증가한다.

Fig. 15는 위의 실험에서 구한 k_{La} 변화에 따른 μ 의 변화를 그림으로 나타내었다. k_{La} 가 0일때는 혐기성 발효

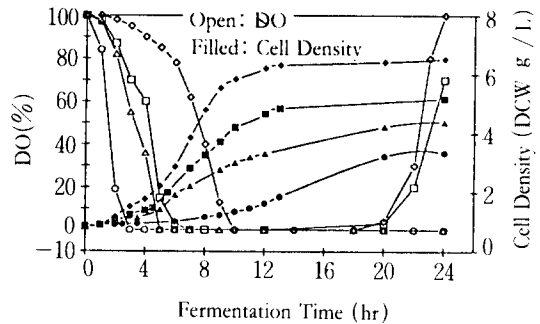


Fig. 13. Effect of air flow rate on DO and cell density profiles in STF at 37°C, pH 7 and 60 rpm.

(○: no aeration, △: 300ml / min
□: 600ml / min, ◇: 1200ml / min)

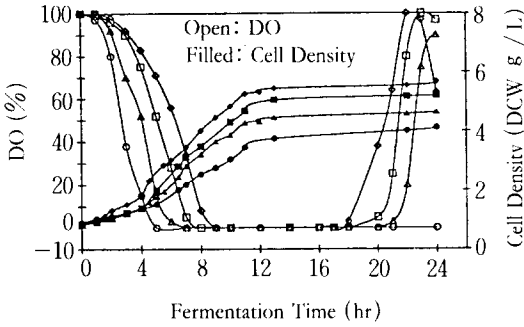


Fig. 14. Effect of agitation speed on DO & cell density profiles in STF at 37°C, pH 7 and 600ml/min aeration.

(○: no agitation, △: 60 rpm, □: 100 rpm, ◇: 200 rpm)

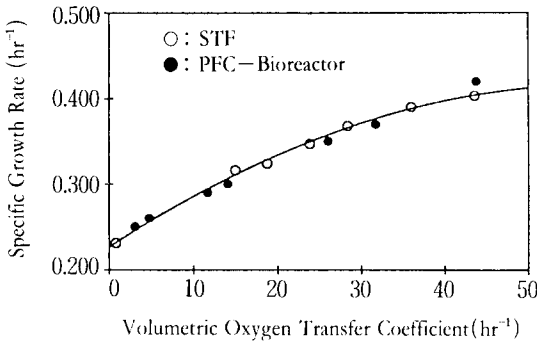


Fig. 15. Effect of k_{La} on μ in STF and PFC-Bioreactor.

를 의미하는데 *E. coli*는 혐의성 미생물이므로 산소가 없더라도 μ 값은 0보다 크게되고 약 0.22 hr^{-1} 이다. 그러나 산소전달이 커지면 커질수록 μ 는 증가함을 보여준다. 본 실험 조건에서는 거의 μ 가 k_{La} 에 비례하여 증가하나 k_{La} 가 어느 정도 이상 커지면 μ 는 본 배양 조건에서 가질 수 있는 최대 비성장속도를 넘어서지 못한다.

Fig. 16은 k_{La} 의 증가에 따라 24시간 뒤의 최종 세포농도의 변화를 나타낸다. μ 와 마찬가지로 최종 세포농도도 k_{La} 의 증가에 따라 비례하여 증가하나 회분식 발효이므로 기질이 완전 소모되면 더 이상 증가하지 않는다.

이상의 결과에서 알 수 있듯이 *E. coli*의 성장은 산소 전달에 민감한 것을 알 수 있고 본 실험 조건 범위에서

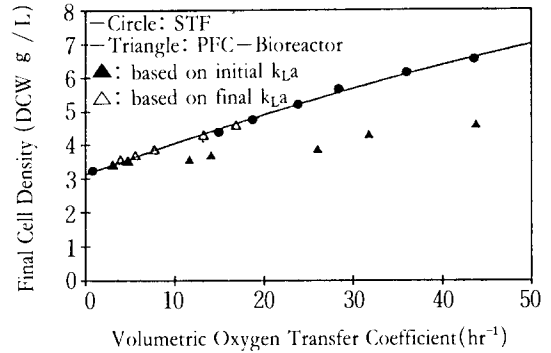


Fig. 16. Effect of k_{La} on the final cell density in STF and PFC-Bioreactor.

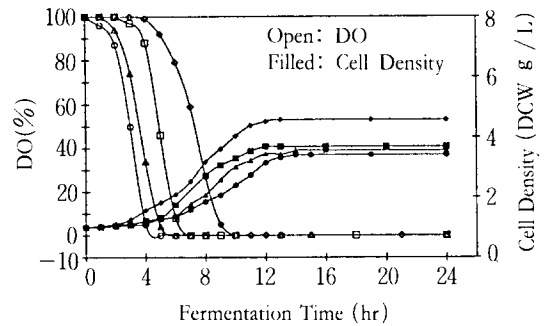


Fig. 17. Effect of PFC spray rate on DO & cell density profiles in PFC-Bioreactor at 60 rpm, 300ml/min aeration, 200ml/min recycle rate.

(○: no spray, △: 100ml/min, □: 200ml/min, ◇: 300ml/min)

는 산소전달속도에 비례하여 비성장속도와 최종 세포농도가 증가하는 것을 보이고 있다. 그리고, 기존의 STF의 교반속도, 통기속도에 따라서 k_{La} , μ , DO 및 세포농도의 변화등을 관찰할 수 있었다.

다음, PFC Bioreactor(Fig. 3)에서 *E. coli* 배양을 한 결과 STF와는 조금 다른 양상을 보였다. Fig. 17과 18은 각각 PFC분사속도와 교반속도가 DO와 세포농도의 profile에 미치는 영향을 보이고 있다. 예전에도 교반속도와 PFC 분사속도가 클수록 DO와 세포농도가 높게 유지되었다. 그러나, 최종세포농도가 STF에 비하여 비교적 낮게 측정되었다. 그 이유를 알기 위하여 PFC Bioreactor의 발효초기와 말기의 k_{La} 를 측정해본 결과 상당히 차이

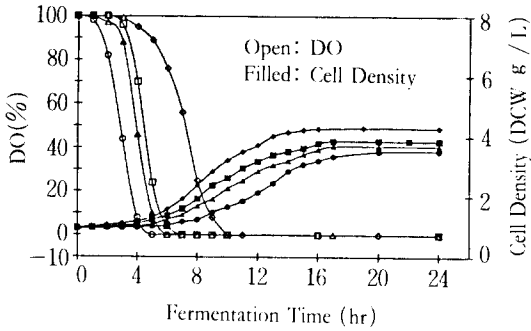


Fig. 18. Effect of agitation speed on DO and cell density profiles in PFC-Bioreactor at 300ml / min aeration, 200ml / min spray rate, and 200ml / min recycle rate.

(○: no agitation, △: 60 rpm, □: 100 rpm ◇: 200 rpm)

가 낮다. 즉, Fig. 15에서 보듯이 최대비성장속도(μ)는 STF와 같이 초기 k_{La} 에 잘 맞으며, 그리고, Fig. 16에서 보듯이 최종세포농도는 최종 k_{La} 에 잘 맞는 것을 볼 수 있다. 그 이유는 PFC-Bioreactor에서는 초기 대수성장기에서 k_{La} 가 크게 변하지 않으나 그 후 세포수와 발효액 점도의 증가로 인하여 PFC액적의 침강 속도가 매우 감소하여 k_{La} 가 감소하는 현상 때문으로 생각할 수 있다. 물론, STF에서도 발효가 진행됨에 따라 k_{La} 가 조금은 영향을 받을 것이나 PFC-Bioreactor에 비하여 그 영향이 크지 않은 것으로 사료된다. 이는 공기와 물의 밀도 차이가 PFC와 물의 밀도차에 비하여 매우 크기 때문이다. 또한, 발효액의 점도가 높아지면 반응기 하부에서 PFC와 발효액 사이에 emulsion현상이 일어남을 관찰할 수 있었다. 이것은 PFC Bioreactor의 단점으로서 고농도의 미생물 배양이나 고점도의 발효액은 기술적, 경제적 면에서 분제가 많은 것으로 생각되나, 앞으로 더욱 연구가 되어야겠지만, 동물세포배양의 경우 세포농도와 산소소모속도가 미생물에 비하여 매우 낮고 대부분의 생산물이 부가가치가 높으므로 이러한 분제가 심각하지 않을 것으로 사료된다.

요 약

새로운 동물 세포 배양기의 개발을 목적으로 새로운 임펠러와 과불소탄소화물(PFC)을 산소전달 매체로 사용한 생물반응기를 설계하여 여러가지 특성들을 살펴본 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

- 1) 새로이 고안한 교반기는 다른 교반기(Cell-lift, paddle 형 등)와 비교하여 낮은 전단율에서도 혼합 효과와 산소전달이 좋은 결과를 얻었다.
- 2) 직접 공기를 주입하는 대신에 과불소탄소화물(PFC)을 노즐을 통하여 배지에 분사함으로써 동물 세포 배양시 분제가 되는 거품 발생을 제거하였으며 또한, 새로운 임펠러의 사용으로 낮은 전단율에서 충분한 혼합과 산소전달을 얻을 수 있었다.
- 3) *E. coli* 배양 실험을 통하여 고안한 반응기(PFC-Bioreactor)가 기존의 교반탱크 발효기(STF)에 비하여 미생물 농도가 높아질 수록 산소전달계수가 감소되는 경향이 있으나 실제 동물세포의 농도는 미생물 보다 낮으므로 큰 분제가 되지는 않을 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 1989년도 과학재단 일반기초 연구비에 의하여 이루어졌으며 이에 대하여 과학재단 당국에 심심한 감사사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. M. Ratafia(1987), *Pharmaceutical Technology*, Nov., 48-56.
2. M. W. Glacken, R. J. Fleischaker and A. J. Sinskey (1983), *Trends in Biotechnology*, 1(4), 102-108.
3. N. Martin, A. Brennan, L. Denome and J. Shaevitz (1987), *Bio/Technology*, 5, 838-840.
4. A. J. Sinskey, R. J. Fleischaker, M. A. Tyo, D. J. Giard, and D. I. C. Wang(1981), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 81, 47-60.
5. W. S. Hu, J. Meier, and D. I. C. Wang(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 122-125.
6. J. B. Griffiths and B. Thornton(1982), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 32, 324.
7. R. E. Spier and B. Griffiths(1984), *Develop. biol. Standard.*, 55, 81-92.
8. B. Mattiasson and P. Adlercreutz(1987), *Trends in Biotechnology*, 5, 250-254.
9. K. C. Lowe and A. D. Bollands(1985), *Med. Lab. Sci.*, 42, 367-375.
10. P. Adlercreutz and B. Mattiasson(1982), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 165-170.
11. D. Damiano and S. S. Wang(1985), *Biotechnol.*

- Letters*, **7**(2), 81.
12. M. H. Cho(1988), *Ph. D. dissertation*, Rutgers University, New Brunswick, N. J., U.S.A.
 13. M. H. Cho and S. S. Wang(1988), *Biotechnol. Letters*, **10**(12), 855–860.
 14. A. Marg and J. D. Sheppard(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2117.
 15. T. J. Kim(1989), *J. Kor. Biotechnol. Bioeng.*, **4**(2), 150–156.
 16. I. H. Kim(1990), *Ph. D. Dissertation*, Rutgers University, New Brunswick, N. J., U.S.A.
 17. M. S. Croughan, J-F Hamel, and D. I. C. Wang(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 130–141.
 18. W. S. Wise(1951), *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 167–177.
 19. H. Taguchi and A. E. Humphrey(1966), *J. Ferment. Technol.*, **44**, 881–889.
- (Received; July 22, 1991, Accepted; September 9, 1991)**