

## 실리콘 튜브를 이용한 동물세포 배양장치의 산소전달

정흥채 · 김정희\*  
한국과학기술원 생물공학과

### Oxygen Transfer in Animal Cell Culture by Using a Silicone Tube as an Oxygenator

Jung, Heung-Chae and Jung-Hoe Kim\*

Department of Biotechnology, KAIST, Kusungdong, Yusongku, Taejeon 305-338, Korea

**Abstract** — An enhancement of the oxygen transfer rate in a 1 l bioreactor for mammalian cell culture by using a silicone rubber tubing as an oxygenator was investigated. When the silicone membrane was used to supply oxygen to the culture broth, the oxygen transfer coefficients ( $k_La$ ) measured in deionized-distilled water were markedly increased. Effect of surface aeration without the tubing aeration was very low under  $1.0 \text{ hr}^{-1}$  of  $k_La$ . The enhancing effects of agitation rates on  $k_La$  were much more effective than those of aeration rates. The increase of  $k_La$  with increasing tube length was observed as a result of the large surface area for oxygen supply. However, 2 m of the tube length was adequate for a 1 l vessel. The larger blade type of impeller was effective to enhance the  $k_La$  values because of its high mixing intensity. In culture medium supplemented with 5% serum,  $k_La$  values were reduced to approximately 40% probably due to the viscosity. We also obtained the normal cell concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml of HepG2 on microcarriers, which could be achieved in a typical bioreactor for animal cell culture.

동물세포는 세포벽이 없기 때문에 기계적 교반시 생성되는 전단응력(shear stress)에 매우 약하다. 또한 영양원이 까다롭고 배지의 설계시 삼투압 및 이온강도를 적절히 조절해야 한다. 따라서 동물세포 배양을 위한 세포 반응기의 설계시 교반속도를 줄여 전단응력을 극소화하고 충분한 산소공급을 할 수 있는 방법을 모색해야 하며 세포 반응기내에 독성 발효산물을 최대한 줄이고 pH 조절이 용이해야 한다(1-6).

산업적으로 대량생산을 위한 배양기 개발에 있어서, 고농도의 세포를 배양기 내에 증식 유지시키기 위해서는 심각한 산소결핍현상으로 세포증식 감소와 생산성의 감소를 초래한다(7-9). 표면통기(surface aeration)는 낮은 산소 전달속도로 적당하지 못하며, 직접통기(direct sparging)는 많은 거품생성과 높은 표면장력으로 세포에 크게 해롭다(10). 이러한 동물

세포 배양의 특성에 맞는 산소 공급원으로 실리콘 튜브(silicone tube)를 사용하는 것이 유리하다(6, 12).

본 논문에서도 거품생성을 줄이고 높은 산소전달을 위해 실리콘 튜브(silicone tube)를 이용한 간접적 통기방법으로 산소전달 향상 효과를 관찰하고 실제 동물세포 배양특성을 살펴보았다.

### 재료 및 방법

#### 세포반응기 및 조업조건

세포반응기는 water jacket이 달려있는 1 l round bottom vessel(Pyrex)을 이용하여 조업부피(working volume)는 500 ml로 고정하였다. 교반은 magnetic stirrer를 이용하여 작동하는 impeller를 사용하였고 배양온도는 thermostat을 이용하여 37°C로 유지하였다.

산소공급은 silicone tube를 반응기 내부에 나선형

**Key words:** Silicone tubing, oxygen transfer coefficient ( $k_La$ ), animal cell culture, HepG2.

\*Corresponding author

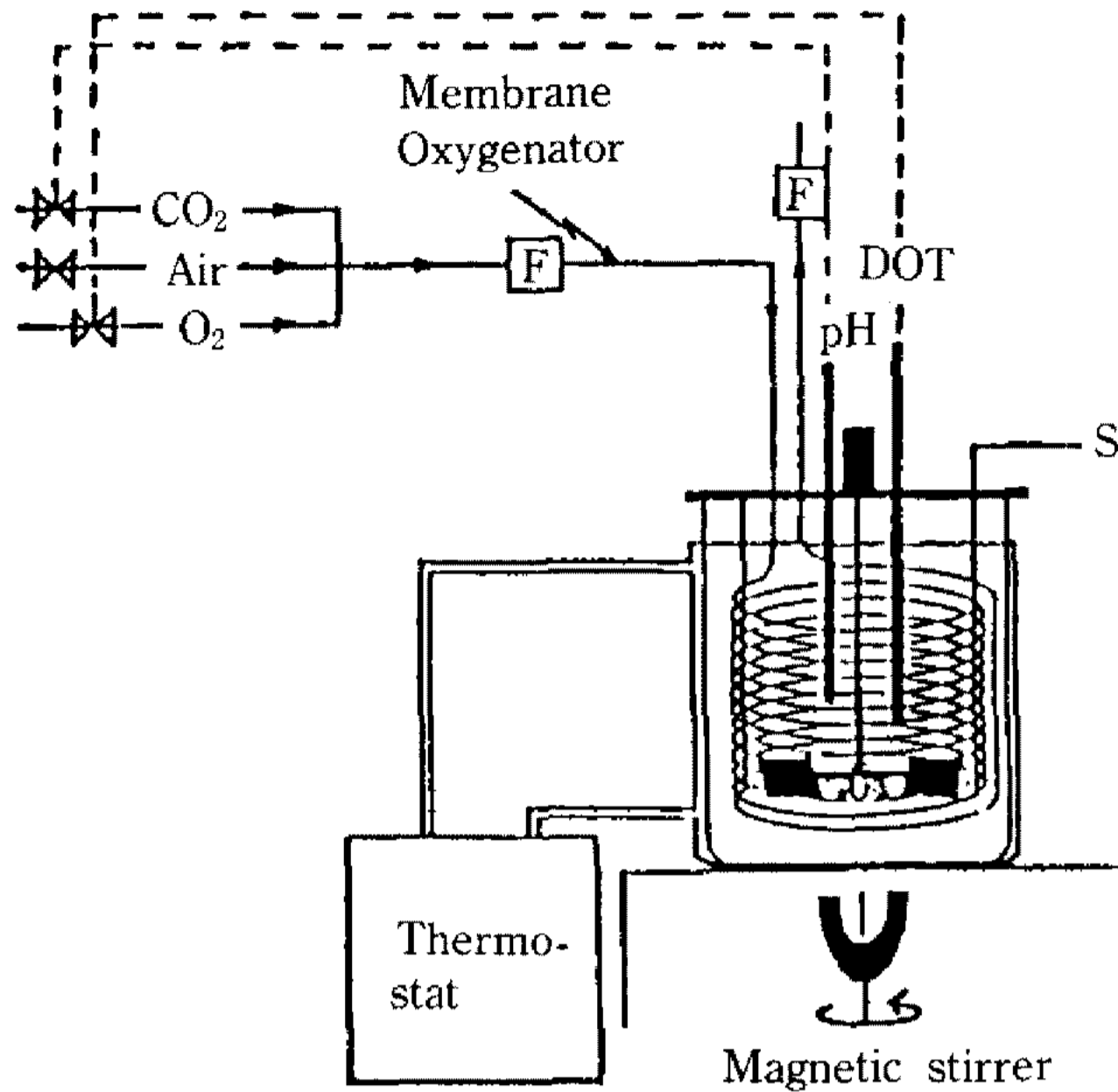


Fig. 1. Schematic diagram of 1 l bioreactor for animal cell culture.

F: 0.2  $\mu\text{m}$  filter, DOT: electrode for dissolved oxygen tension, S: sampling line

으로 설치하여 공급하는 방법과 표면통기를 병용하였다(Fig. 1). 이때 사용한 silicone tube는 내경 0.058 in., 외경 0.077 in.(Dow Corning)인 것을 사용하였다. 산소전극은 galvanic type(New Brunswick Scientific)을 사용하여 배양중 용존산소의 농도변화를 추적하였으며 산소농도를 20% 수준이상으로 유지시키기 위해 필요시 순수 산소를 소량씩 공급하였다.

#### Impeller와 medium

Impeller는 크기가 다른 두 개의 45° pitched blade type과 magnetic bar를 사용하였고 그 모양과 크기는 Fig. 2에 도식하였다.

산소전달 측정매질로서는 2차 증류수(deionized and distilled water)를 사용하였고 실제 세포 배양시 산소전달속도와 비교하기 위해 5% bovine serum (Hyclone Lab.)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco Co.)를 사용하였다.

#### Cell line

HepG2 cell line은 미네소타 대학의 W.-S. Hu 교수로부터 분양받아 사용하였다. 세포의 보존 및 사용한 미립담체의 종류 및 농도, 세포농도 측정, 그리고 기타 상세한 배양방법은 이미 발표된 문헌을 따라서 수행하였다(3, 4).

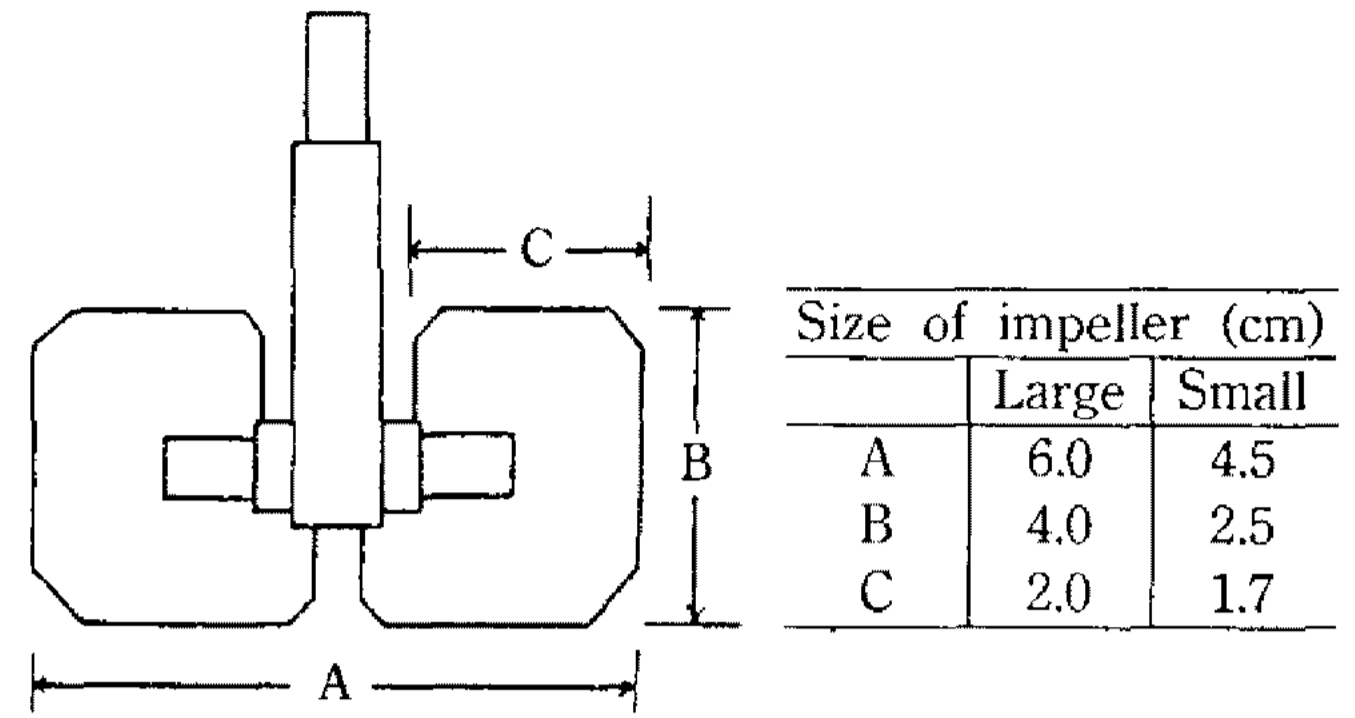


Fig. 2. Type and size of impeller used for the cultivation of mammalian cells.

#### $k_La$ 측정방법

물질전달상수  $k_La$ 는 dynamic method로 결정하였다(6). 먼저 질소가스를 불어 넣고 용존산소를 제거한 다음 일정한 속도로 통기하면서 용존산소를 시간에 따라 dissolved oxygen probe(polarographic type, Ingold electrodes)로 측정하였다. 산소전극의 응답시간 지연은  $k_La$ 의 계산에 크게 영향을 미치지 않으므로 무시하였다. 용존산소의 측정은 IBM-PC를 이용하여 on-line monitoring하였고 용존산소( $C_L$ )의 변화는 다음식으로 주어지므로  $k_La$ 값을 선형회귀법(linear regression method)으로 결정하였다.

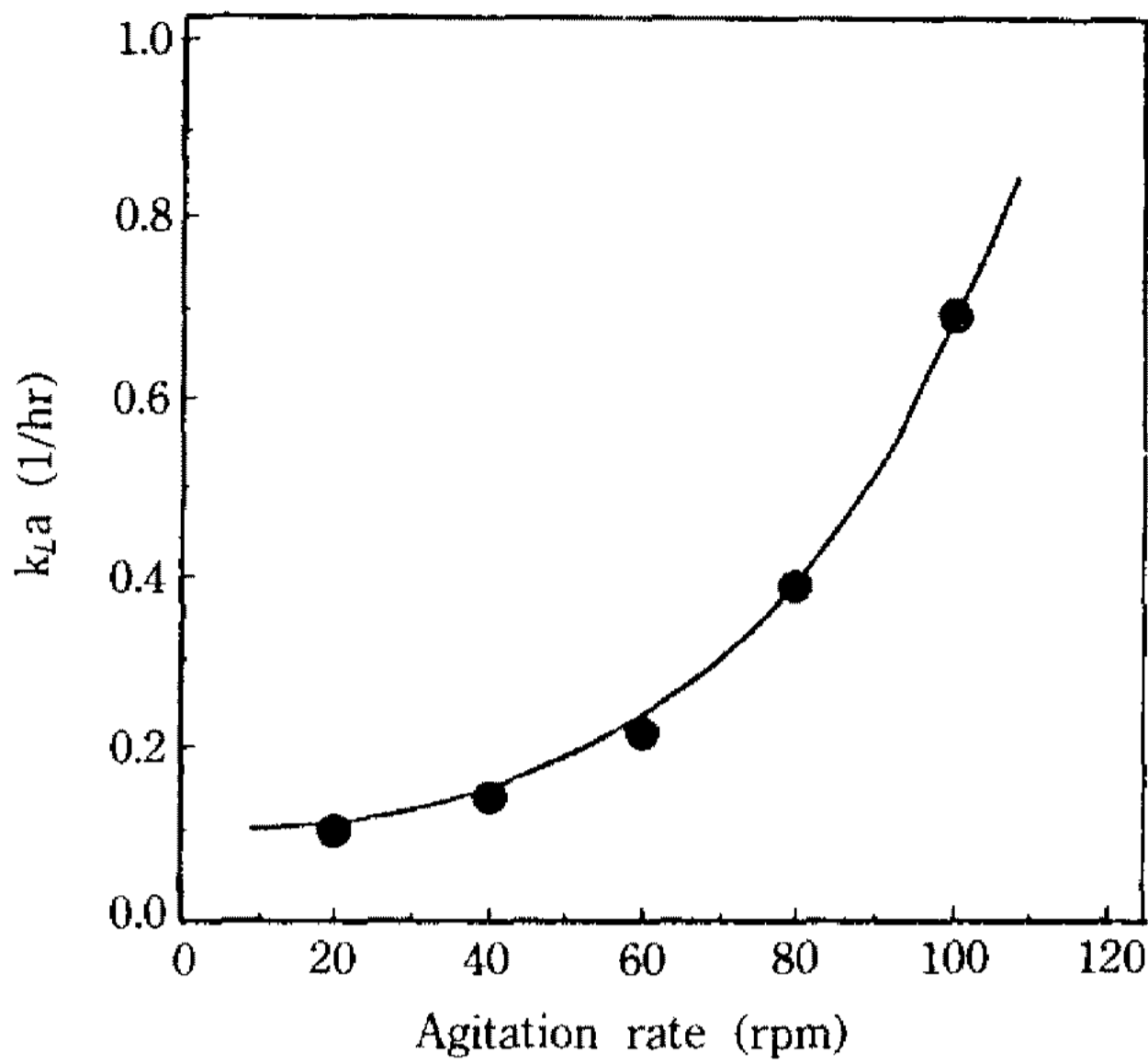
$$\frac{dC_L}{dt} = k_La(C^* - C_L) \quad (1)$$

여기서  $C^*$ 는 포화상태의 산소농도이다.

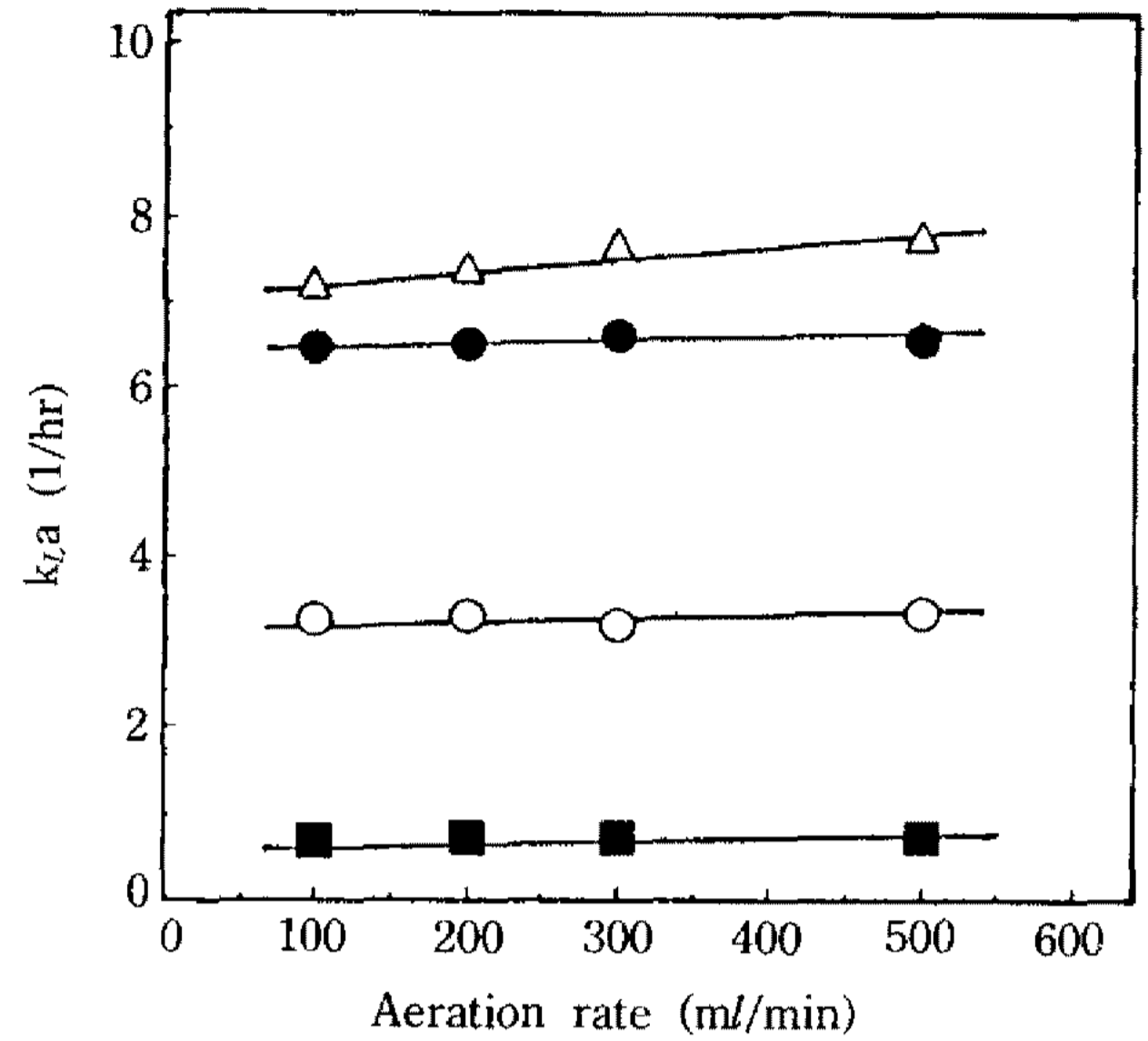
## 결과 및 고찰

#### 교반속도 및 통기속도 효과

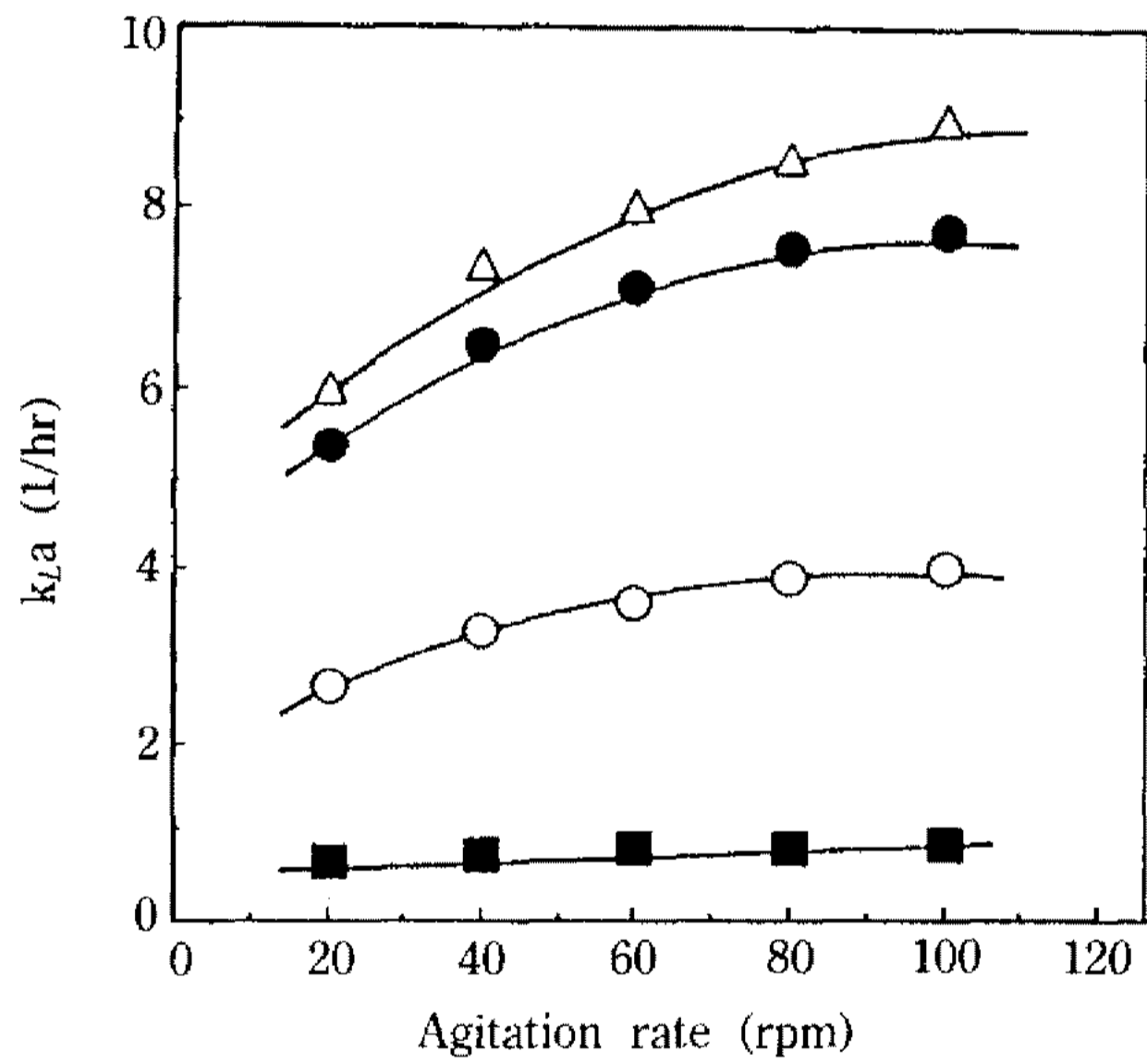
세포 배양기에서 impeller는 가장 효과가 좋을 것으로 예상되는 45° pitched blade를 이용하여 표면통기(surface aeration) 정도를 측정하였다(Fig. 3). 교반속도가 증가할수록  $k_La$ 는 증가하나 최대 교반속도 100 rpm에서도  $k_La$ 값이 0.7 hr<sup>-1</sup> 이하임을 알 수 있었다. 따라서 표면통기만으로는 실제 세포배양시 심각한 산소결핍현상을 예측할 수 있었다. 길이 2 m silicone tube를 이용하여 튜브통기(tubing aeration) 하였을 때 20~100 rpm 사이의 교반속도와 200 ml/min의 통기속도에 따른  $k_La$  변화를 관찰하였다(Fig. 4). 교반속도가 증가하면  $k_La$ 값도 증가하나 교반속도 80 rpm 이상에서는 증가폭이 둔화되었다. 가장 많이 이용되고 있는 60 rpm에서는 silicone tubing 효과로



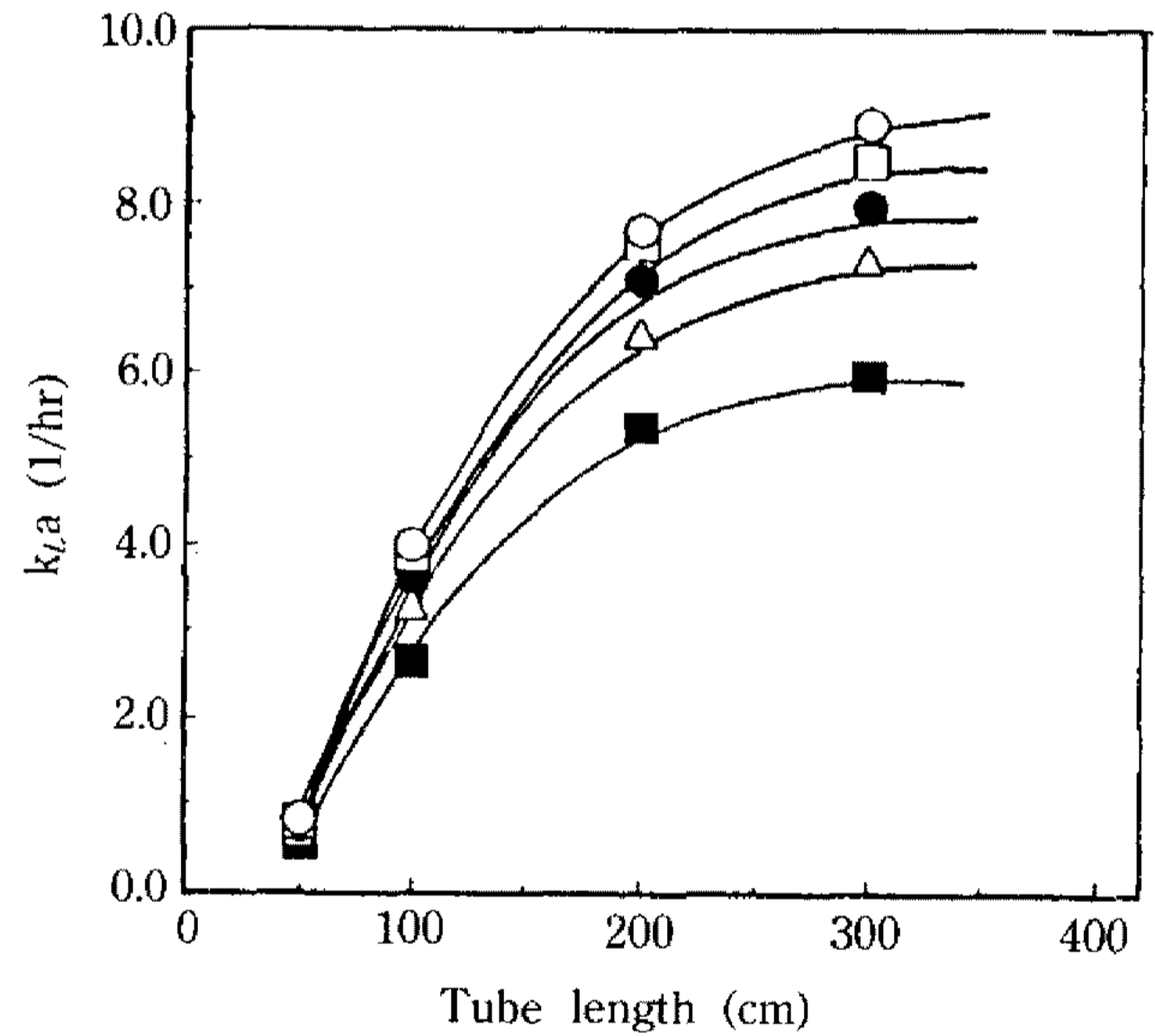
**Fig. 3. Effect of surface aeration on  $k_L a$ .** This was carried out without the tubing aeration.



**Fig. 5. Effect of aeration rate on  $k_L a$  at 40 rpm.** Silicone membranes used were 0.5 m (■), 1.0 m (○), 2.0 m (●), and 3.0 m (△), respectively.



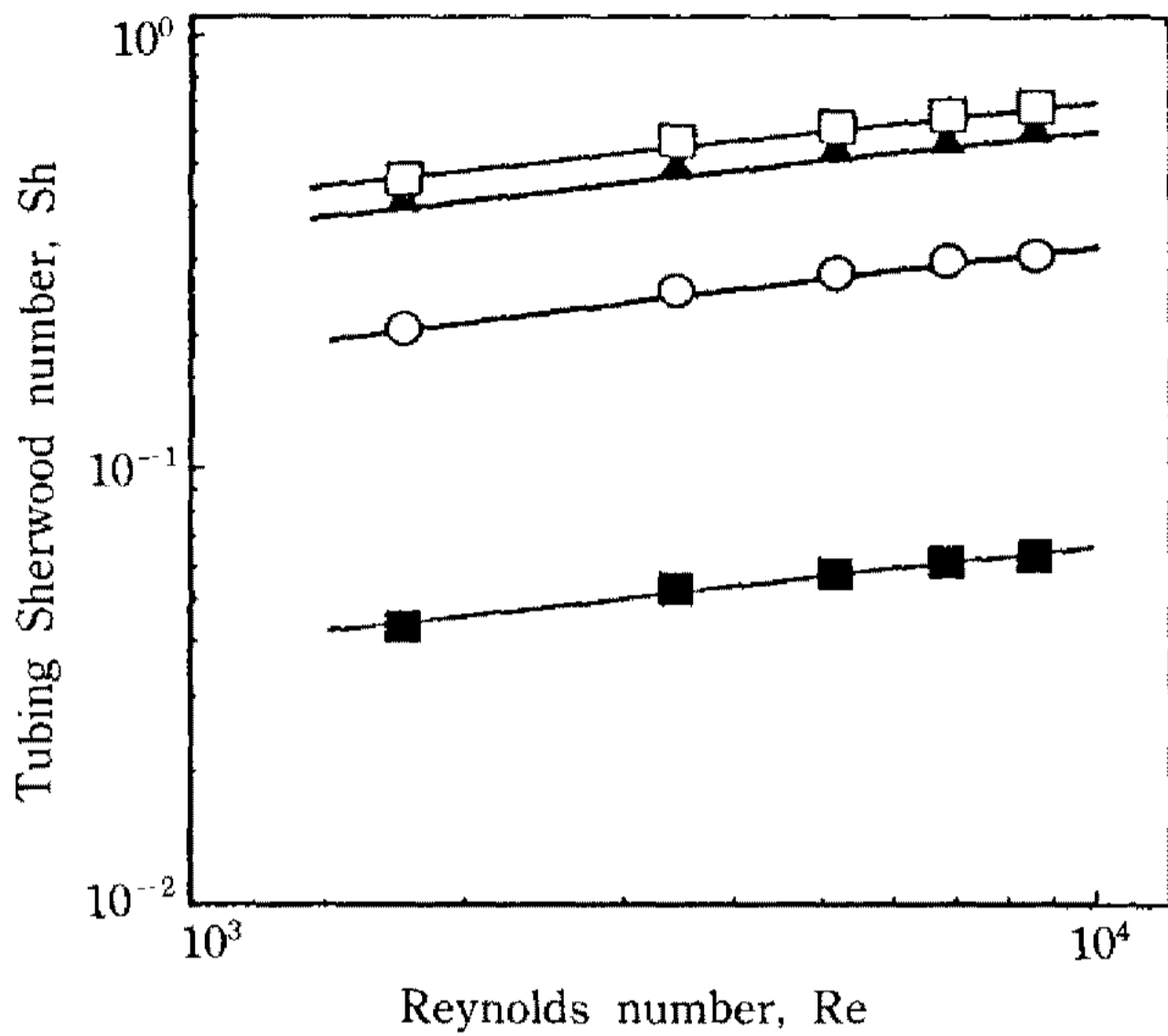
**Fig. 4. Effect of agitation rate on  $k_L a$  at 200 ml/min.** Silicone membranes used were 0.5 m (■), 1.0 m (○), 2.0 m (●), and 3.0 m (△), respectively.



**Fig. 6. Effect of tube length on  $k_L a$ .** The agitation rates examined were 20 rpm (■), 40 rpm (△), 60 rpm (●), 80 rpm (□), and 100 rpm (○), respectively.

서 표면통기 조건에 비해 약 30배 이상 향상되었다. 통기효과는 통기속도가 높을수록 산소전달속도가 증가하나 증가 정도는 상대적으로 매우 낮았다(Fig. 5). 따라서 통기속도에 비해 교반속도가  $k_L a$ 에 미치는 영향이 훨씬 효과적이었다. 이것은 배양기 내의 교반상태가 산소전달에 중요함을 나타낸다. Tube 길이는 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 m을 각각 이용하여 각 교반속도와 통기속도에 의한  $k_L a$  상승 정도를 비교하였다(Fig. 6). Silicone tube가 길어짐에 따라 산소를 전달할 수 있는 tube 표면적이 증가하므로  $k_L a$ 는 거의 비례적으로

증가하였다. 그러나 silicone tube의 길이가 2 m 이상일 때는 큰 영향이 없었다. 따라서 세포배양기 내의 silicone tube 길이는 2 m로 고정하였다. 물질전달상수  $k_L a$ 는 세포 배양기의 geometry와 유체의 물리화학적 성질에 따라 달라진다(6). Tubing aeration에서는 물질전달에 관한 무차원 상수 tubing Sherwood number(Sh)와 유체의 흐름에 관한 무차원 상수 impeller Reynolds number(Re)가 다음과 같은 상호관계가 있다.



**Fig. 7. Plot of tubing Sherwood number (Sh) vs. impeller Reynolds number (Re).**  
The symbols show as followings: 0.5 m (■), 1.0 m (○), 2.0 m (▲), and 3.0 m (□), respectively.

$$Sh = a Re^b \quad (2)$$

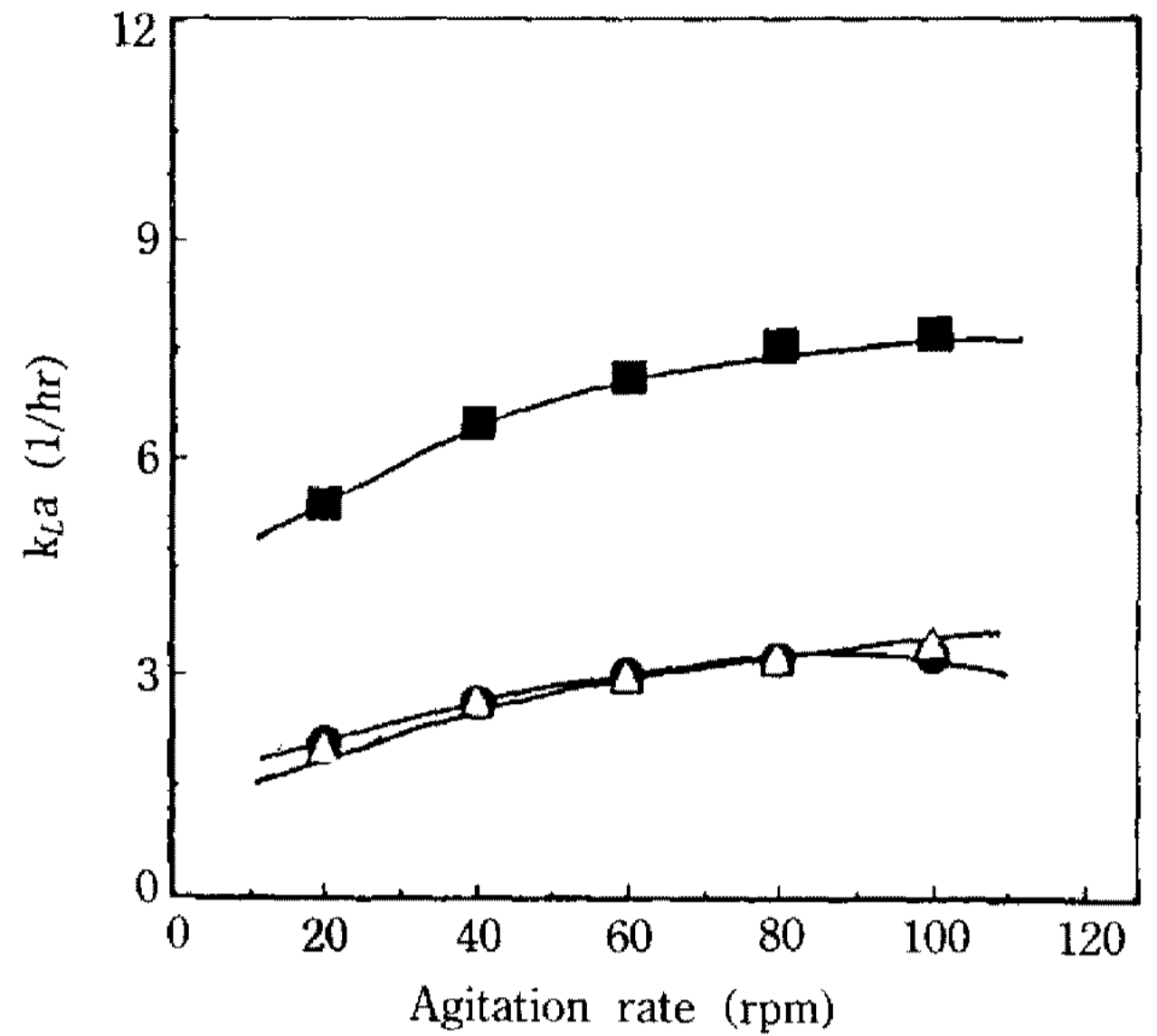
이 때 a와 b는 상수이다. 식 (2)는 두 무차원 상수가 log-log 좌표상에서 직선관계가 있음을 나타낸 것으로 impeller Reynolds number의 지수 b는 길이에 관계 없이 0.26으로 일정하였다(Fig. 7).

**Impeller type에 대한 효과**

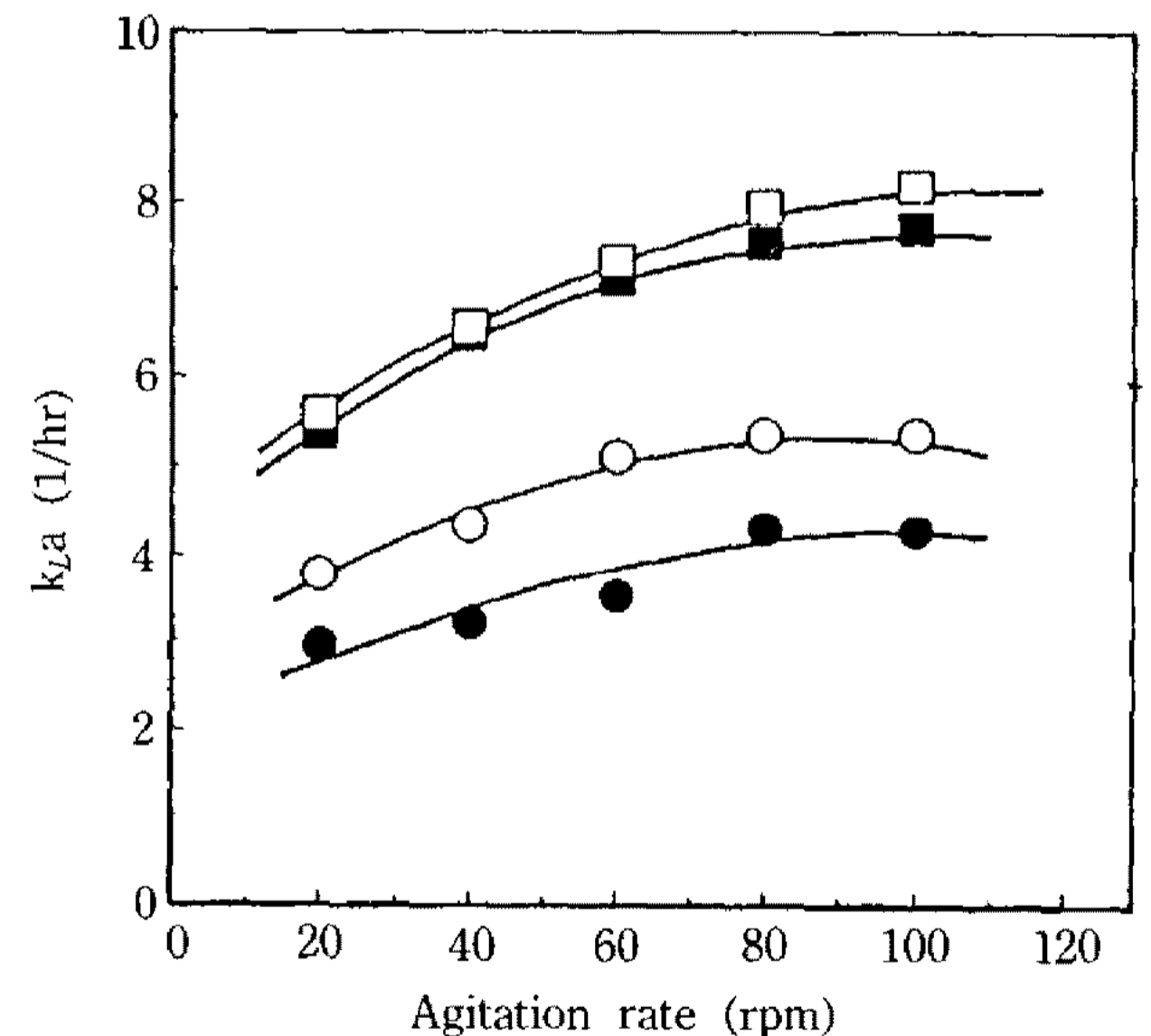
세포 배양기 내에서 impeller에 의한 혼합(mixing)은 세포를 부유한 상태(suspension)로 유지하고 배양액을 균일하게(homogeneous) 한다는 점에 매우 중요하다(11). 또한 impeller 종류에 따라 배양기 내의 유체의 흐름이 결정되고 산소전달에도 큰 영향을 받으므로 impeller 종류에 따른 산소전달효과를 살펴 보았다(Fig. 8). 6 cm 길이의 45° pitched blade는 6 cm 길이의 magnetic bar와 4.5 cm, 45° pitched blade에 비해 3~4배 큰  $k_La$ 값을 보였다. 따라서 impeller는 magnetic bar보다는 pitched blade가 더 좋은 산소전달 효과를 보였으며 blade의 경우에도 impeller의 지름이 클수록 산소전달 효과가 증가하였다. 이것은 mixing 효과가 큰 impeller가 산소전달에도 효과가 크다는 것을 보여준다.

**다른 산소공급 방법과의 산소전달속도 비교**

Silicone tube에 의한 산소전달 향상 정도를 cell-lift impeller가 장치된 CelliGen 세포 배양기(New Brunswick Scientific)와 비교하였다(Fig. 9). 2.5l Celli-



**Fig. 8. Effect of impeller types on  $k_La$ .**  
The impeller types used were 6 cm magnetic bar (●), 4.5 cm blade (△), and 6 cm blade (■), respectively.



**Fig. 9. Effect of cell-lift impeller on  $k_La$ .**  
The symbols show as following: 200 ml/min (■) and 500 ml/min (□) by tubing aeration (2 m tubing), and 200 ml/min (●) and 500 ml/min (○) by aeration with cell-lift impeller.

Gen 세포 배양기의 조업부피는 1.2l로 하였고 교반 및 통기속도는 앞선 경우와 동일하였다. 2 m silicone tube을 이용했을 때 같은 교반 및 통기속도에서 50% 이상 산소전달 향상 효과를 보였다. 본 연구에 사용된 배양기 내에서 tubing aeration과 air sparging과의 산소전달을 비교하였다(Fig. 10). 동물 세포 배양에서는 낮은 교반속도 때문에 mixing이 잘 되지 않아  $k_La$  값이 낮았다.

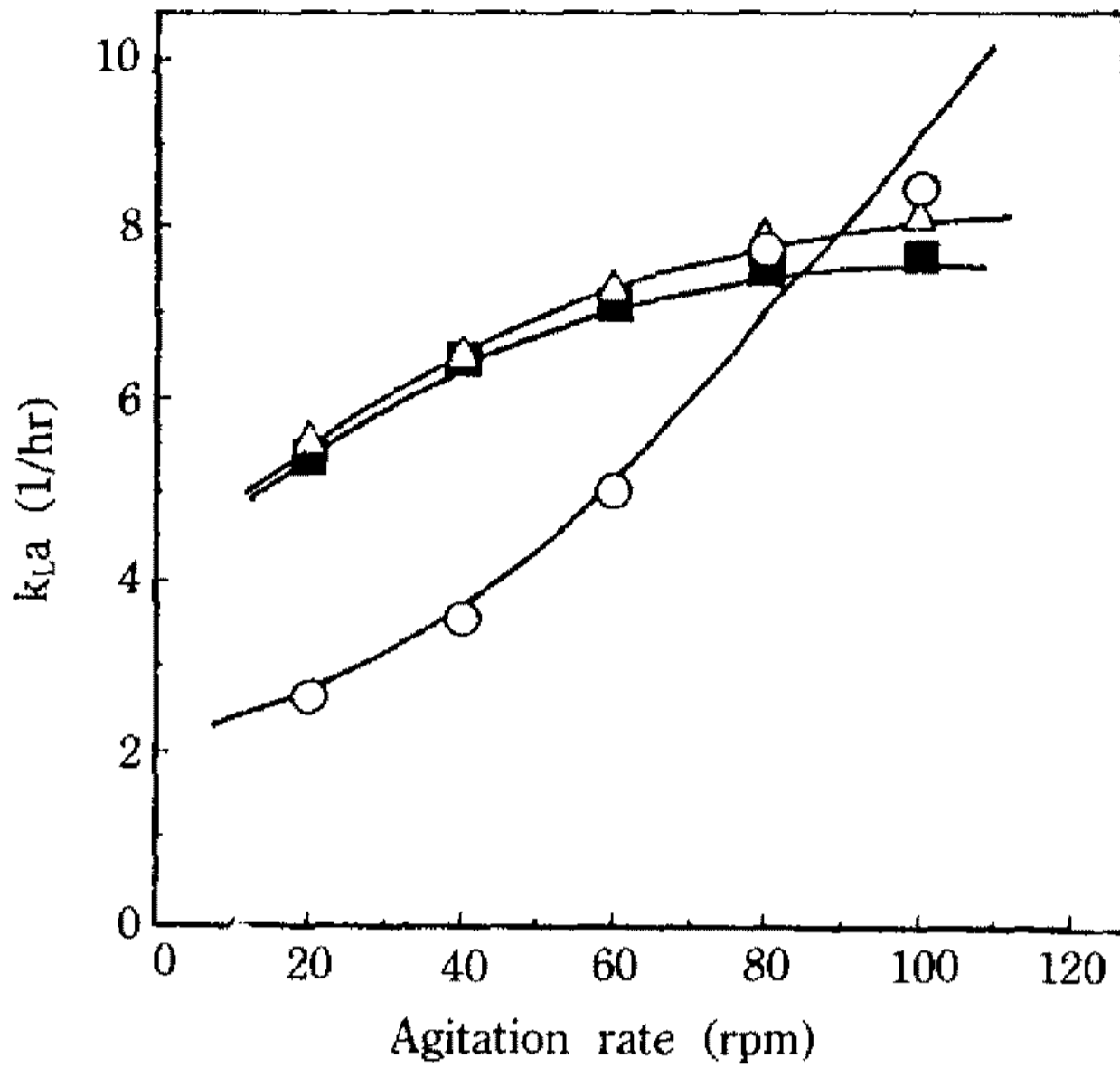


Fig. 10. Comparison of air sparging (○) with tubing aeration (200 ml/min (■) and 500 ml/min (△) of gas flow rate).

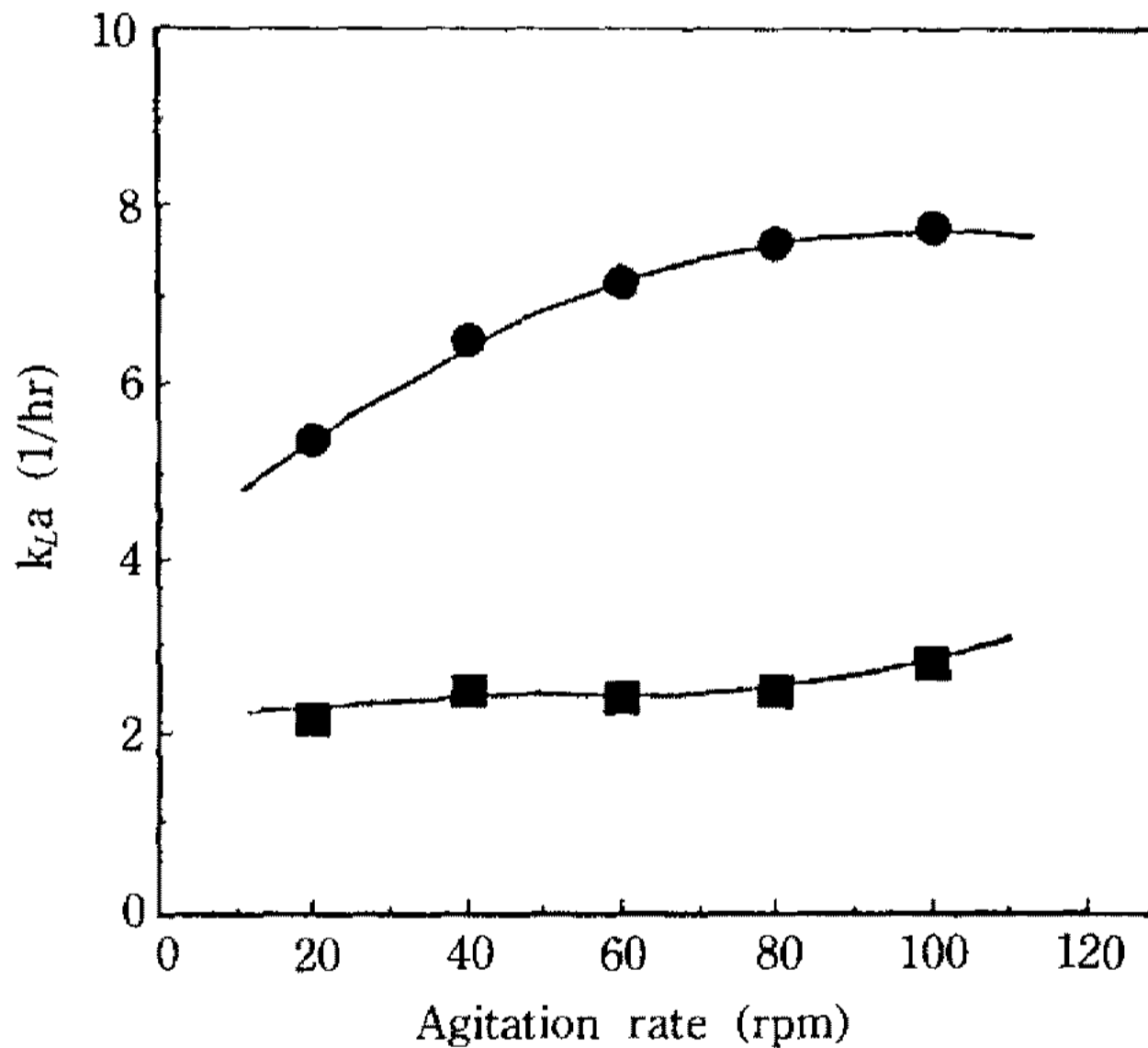


Fig. 11. Effect of serum addition on  $k_{La}$ . The  $k_{La}$  values in medium supplemented with 5% serum (■) were lower than those in distilled water (●).

Medium 효과

실제 동물세포를 배양하기 위한 배지는 복잡한 성분들로 구성되어 있으며 대부분의 동물세포 배양시에는 혈청이 5~10% 첨가된다. 따라서 5% bovine serum이 첨가된 DMEM에서의 silicone tube에 의한 산소전달 효과를 관찰하였다(Fig. 11). 앞에서 매질로 사용한 2차 증류수에 비해 약 3배 정도 낮은  $k_{La}$ 값을 보였다. 이는 혈청을 첨가시 단백질로 인한 배양액의 점도 증가 때문으로 생각된다. 따라서 실제 혈청을

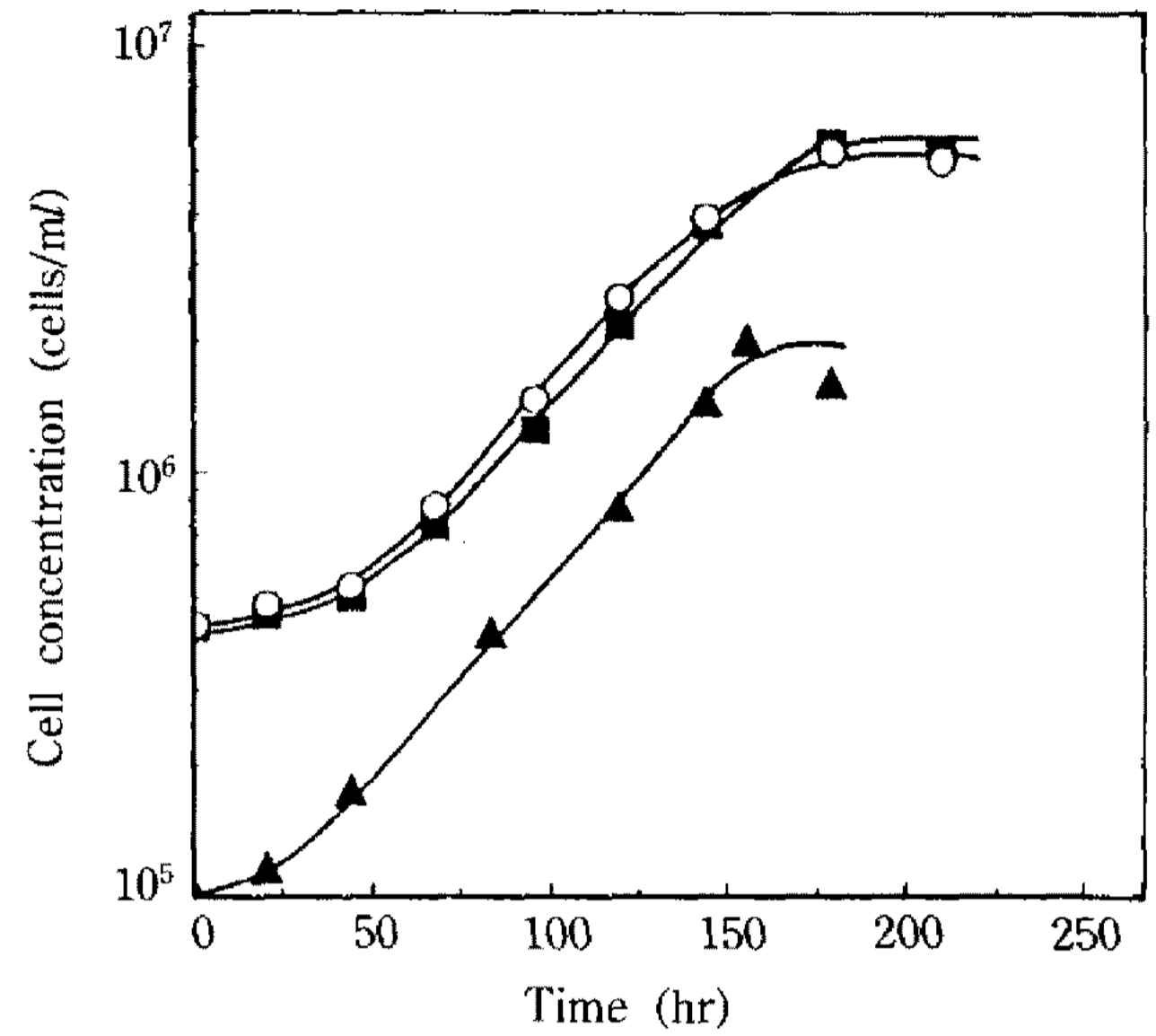


Fig. 12. Growth kinetics of HepG2 on microcarriers at different agitation rates and on petri-dish. The symbols show as followings: 40 rpm (■), 60 rpm (○), and petri dish (▲).

포함한 배양 조건에서  $k_{La}$ 값이 약  $2 \sim 3 \text{ hr}^{-1}$ 이므로 기존의 세포 배양시 요구되는 산소전달속도에 못미치는 것으로 판단된다. 이유는 다음과 같다. 세포 산소 요구도(oxygen uptake rate)는 세포의 종류에 따라 다르지만 보고된 문헌에 의하면 평균적으로  $10^6 \text{ cells/ml}$ 일 때  $0.2 \sim 0.5 \text{ mmol oxygen/l hr}$ 이다(12). 그리고 세포 배양기에서 suspension culture시 얻을 수 있는 세포의 농도는  $2 \sim 4 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 이다. 그러므로 요구되는 총 산소량은  $0.4 \sim 2.0 \text{ mmol oxygen/l hr}$ 가 된다. 산소공급 속도는 식 (1)에 의해 본 연구결과  $k_{La}$ 값이  $2 \sim 3 \text{ hr}^{-1}$ 일 때  $0.4 \sim 0.6 \text{ mmol oxygen/l hr}$ 가 된다. 이 값은 산소 요구도에 비해 충분하지 않으므로 단순히 공기만을 이용한 통기로는 세포가 필요로 하는 산소의 양을 충분히 공급할 수 없다. 이를 해결하기 위해서는 순수 산소로 산소농도가 강화된 혼합공기를 이용해야 한다.

미립담체를 이용한 세포배양의 growth kinetics

미립담체로서 Cytodex-3를 5 g/l을 이용하여 HepG2 세포의 growth kinetics를 40 rpm과 60 rpm에서 조사하였다(Fig. 12). 초기 접종 세포농도는  $3.5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 로 하였다. 최종 세포농도는  $5 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 로 일반적인 미립담체 배양에서 얻을 수 있는 세포 농도를 얻었다. 특히 40 rpm과 60 rpm에서 증식속도와 최종 세포농도의 차이는 관찰할 수 없었다. 이는 교반에 의한 shear damage와 산소결핍에 의한 손상을

받지 않는다는 것을 증명한다. 또한 shear가 전혀 작용하지 않는 petri-dish상에서 정지 배양을 수행하였을 경우 40 rpm 또는 60 rpm으로 교반하면서 배양하였을 때와 세포의 증식속도에서 전혀 차이를 발견할 수 없었다.

## 요 약

동물세포 배양기에서 silicone tube를 oxygenator로 이용하여 산소전달 정도를 조사하였다. Silicone tube를 이용할 때 표면통기에 비해 산소전달 상수  $k_La$ 는 약 30배 이상 증가하였다. 통기속도와 교반속도가 증가할수록  $k_La$ 값도 증가하지만 교반속도가 훨씬 효과적이었고, 물질전달에 관한 무차원 상수 tubing Sherwood number(Sh)와 유체 흐름에 관한 상수 impeller Reynolds number(Re)는 log-log 좌표에서 직선관계가 있었고 기울기는 tube 길이에 관계없이 0.26이었다. Tube 길이는 2 m가 적당하였고 impeller는 pitched blade type이 효과적이었다. 5% serum이 첨가된 medium에서는  $k_La$ 가 40%로 감소하였다. HepG2를 이용한 실제 동물세포 배양에서는 전형적인 세포농도인  $4\sim6\times 10^6$  cells/ml를 얻을 수 있었다.

## 감사의 말

본 연구는 1990년도 과학재단과 1991년도 과학기술처-한국발효기(주)의 중소기업육성 연구지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

## 참고문헌

1. Augenstein, D.C., A.J. Sinskey and D.I.G. Wang. 1971. Effect of shear on the death of two strains

- of mammalian tissue cells. *Biotech. Bioeng.* **13**: 409-418.
2. Stathopoulos, N.A. and J.D. Hellums. 1985. Shear stress effects on human embryonic kidney cells *in vitro*. *Biotech. Bioeng.* **27**: 1021-1026.
3. Kim, J.H. and W.S. Hu. 1989. Initial culture conditions affect the sensitivity of HepG2 cells to excessive mechanical agitation. *Cytotechnology* **2**: 135-140.
4. Kim, J.H., J.H. Choi and W.S. Hu. 1989. Cytodex-3를 이용한 부착성 동물세포의 미립담체 배양. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**(3): 231-235.
5. Freshney, I.R. 1987. *Culture of Animal Cells*. 2nd ed. Alan R. Liss, Inc. New York.
6. Aunins, J.G., M.S. Croughan and D.I.C. Wang. 1986. Engineering developments in homogeneous culture of animal cells: Oxygenation of reactors and scale-up. *Biotech. Bioeng. Symp.* No. 17, 699-723.
7. Aunins, J.G., B.A. Woodson, Jr., T.K. Hale and D.I.C. Wang. 1989. Effects of paddle impeller geometry on power input and mass transfer in small-scale animal cell culture vessels. *Biotech. Bioeng.* **34**: 1127-1132.
8. Glacken, M.W., R.J. Fleischaker and A.J. Sinskey. 1983. Mammalian cell culture: Engineering principles and scale-up. *Trends in Biotechnol.* **1**(4): 102-108.
9. KAIST, 1989. In *Principles of Animal Cell Reactor Engineering and Their Applications*.
10. Chapman, C.M., A.W. Nienow and J.C. Middleton. 1980. Surface aeration in a small agitated and sparged vessel. *Biotech. Bioeng.* **22**: 981-993.
11. Nagata, S. 1975. *Mixing: Principles and Application*. John Wiley & Sons, New York.
12. Fleischaker Jr., R.J. and A.J. Sinskey. 1981. Oxygen demand and supply in cell culture. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 193-197.

(Received April 15, 1992)