

Hybridoma 배양을 위한 무혈청 배지의 개발 제 2 부 : 무혈청 배지를 사용한 Hybridoma 배양

제 훈 성 · 최 차 용*
(주) 럭키 중앙연구소
*서울대학교 공과대학 공업화학과

Development of Serum-Free Medium for Mouse-mouse Hybridoma Part II. Hybridoma Culture using Developed Serum-Free Media

Hoon Sung Jeh and Cha Yong Choi*

Central Research Laboratory, Lucky Biotech Inc.

*Department of Chemical Technology, College of Engineering, Seoul National University

ABSTRACT

The serum free medium was developed and used for the suspension culture of mammalian cells.

Although there were the problems of the longer lag time and the smaller maximum cell concentration achievable, the higher specific productivity as well as other advantages of the serum free medium can make it a more realistic alternative.

The existence of a staggering period in glucose concentration vs. time profile in the batch culture can be a practical indicating signal for performing fed batch culture.

The concentration dependence of the effects of the additives in the serum free medium as well as its economic feasibility was also tested.

서 론

동물세포 배양에 있어서 가장 중요한 문제점에는 고농도 배양(4), 저혈청 배지 개발(1, 2), 배양기 개발, 무혈청 배지 개발(4, 5) 등이 있다.

무혈청 배지 개발은 배지비용 절감, 분리 정제 과정의 단순화 및 비용 절감, 세포의 물리화학적 성질(예: 표면 부착성 등)의 조절, 비생산속도의 조절 등 다양한 면에서 중요성을 띠고 있다.

많은 연구자들에 의해 혈청을 대체할 수 있는 물질을 발견하여 무혈청 배지를 제조하려는 노력이 행하여졌다. 기초 과학적인 측면에서 밝혀진 결과를 토대로 여러 물질에 대한 연구가 계속되고 많은 cell

line들에 대하여 시험되었다. 혈청의 주된 성분들에 대한 시험에서 insulin을 비롯한 여러 물질이 세포성장에 필수적인 것으로 나타났으며 cell line에 따라 필요한 인자에 차이가 나는 것도 밝혀졌다. 어떤 경우에는 같은 종류의 cell line임에도 유래가 다를 경우 다른 인자를 필요로 하였다. 전형적인 무혈청 배지들은 주로 실험으로 결정되었다. 그러나 결과적으로 만들어진 배지가 특정 cell line에만 효과가 있는 균주 특이성을 가지거나 혈청을 대신하여 투입하는 성장인자의 가격이 혈청의 가격과 비슷한 경우 등이 있어 거의 모든 cell line에 사용될 수 있는 무혈청 배지는 개발되지 못하였다. 또한 개발 방법도 여러 인자들 중에서 선택하는 단순한 방법들에 의한 것이

어서 인자들이 세포에 미치는 정량적인 영향들도 고려된 바가 없었다. 무혈청 배지는 사용되는 cell line에 따라 조성이 달라야 하며 그 정량적인 조성도 사용되는 cell line에 맞게 최적화되어야 한다는 점과 개발방법상에서도 보다 정량적인 해석이 가능하고 동시에 경제적이어야 한다는 점에서 본 연구의 제1부의 방향이 결정되었었다.

본 논문에서는 이와 같은 관점에서 자체 개발한 무혈청 배지(6)를 사용한 부유배양의 결과와 경제적인 고찰에 관하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 세포주

안질환과 비 임질성 성병을 유발하는 그람양성 병원균인 *Chlamydia trachomatis* L2 type에 대한 항체를 분비하는 hybridoma KA-112가 사용되었다. KA-112는 *Chlamydia trachomatis*를 생쥐에 면역하여 얻은 지라(spleen)의 임파세포와 mouse myeloma P3U1(다니구찌 박사, 일본 쯔바대학)을 본 연구실에서 세포 융합하여 자체 제작하였다(3).

KA-112는 무한 희석법에 의해 클로닝된 5가지 클론 중 성장과 항체생산이 가장 뛰어난 것으로 선택사용되었다.

사용 배지

Hybridoma의 대량 배양 및 배지 개발시에 사용된 기저배지는 RPMI-1640 medium과 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM No. 240-6309: GIBCO, NY, U. S. A.) 이었으며 sodium bicarbonate(2.0g/l)와 수용성 황산 가나마이신(0.3g/l : kanamycin, 동아제약, 서울)을 첨가한 후 0.22 μ m 47mm 필터로 2회 멸균 여과하여 사용하였다.

세포 배양

배지 개발시에는 소규모로 24well tissue culture plate(NUNC, Denmark)를 사용하였으며 균주 유지와 장기 적응 시험을 위하여 Φ 60 및 Φ 100 tissue culture dish(녹십자 의료공업, 서울)가 사용되었다. 부유배양에의 적합성 검토를 위해서는 250ml와 1L spinner flask(Bellco, U. S. A.), 2 L Celligen Bioreactor(New Brunswick Scientific Co., U. S. A.)가 사용되었다. 배양기의 온도는 36.5°C에서 제어되었으며 spinner flask의 경우에는 교반기의 회전수를 40 rpm에 놓고 사용하였다.

항체 역가의 분석

분비된 항체의 역가는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 법으로 측정되었다. Peroxidase-labelled goat anti-mouse Ig M(Kirkegaard and Perry Laboratories, U. S. A.)이 사용되었으며 항원은 *Chlamydia trachomatis*를 McCoy 세포를 숙주로 하여 배양한 다음 초원심 분리하여 사용하였다. 항원의 초원심 분리 농축액은 희석하여 micro-well plate에 분주, 건조하여 ELISA에 사용하였다.

첨가물의 검색

모든 인자가 포함된 배지(control medium)로 2~3일간 적응시킨 세포를 원심분리하여 적정농도로 재현탁, 동일분량으로 24well plate에 분주한 다음 1일 후에 폐 배지(spent medium)를 각 well로부터 제거하고 한가지씩의 인자가 제거된 각각의 배지를 동일한 양(1~2ml) 투입하였다. 매 24시간마다 농도와 생존도를 측정하여 성장곡선을 얻었다.

결과 및 고찰

부유배양에서의 성장특성 검토

7% 혈청첨가배지, 1% 혈청첨가 저혈청 배지, 무혈청 배지의 부유배양(suspension culture) 특성을 비교 검토하였다. 300ml spinner flask를 이용하여 250ml volume으로 배양하였을 때의 결과를 Fig. 1에 도시하였다. 세포성장상에 있어서 혈청 배지(1.3×10^6 cells/ml)와 저혈청 배지(1.2×10^6 cells/ml)에 비하여 무혈청 배지가 다소 낮은 최고 세포 농도(1.0×10^6 cells/ml)를 보였다. 또 한가지 특기할 것은 무혈청 배지의 사용시 lag time이 다른 배지에 비해 매우 길다는 것이다. 세포성장상에 가장 큰 영향을 주는 인자들로만 구성되어 있는 무혈청 배지에서는 자신이 분비하는 자기분비 성장인자(autocrine growth factor)들의 농도가 배양초기에 거의 0이므로 lag time이 길게 된다고 사료된다. 무혈청 배지에서 배양에서 최고 세포 농도가 가장 낮은 것은 여러 가지로 해석할 수 있겠으나 오랜 lag time 동안에 maintenance energy용으로 energy substrate가 소비되기 때문으로 생각될 수 있는데 Fig. 2의 실험 결과를 보면 glucose 농도가 lag time 동안에 거의 변하지 않고 다른 배지에 비해서도 그 소비속도가 가장 낮은 것으로 보아 lag time 동안에는 glucose 이외의 성분이 energy substrate로 쓰이고 있음을 알 수 있다. 또 다른 해석을 하자면 lag time 중에는

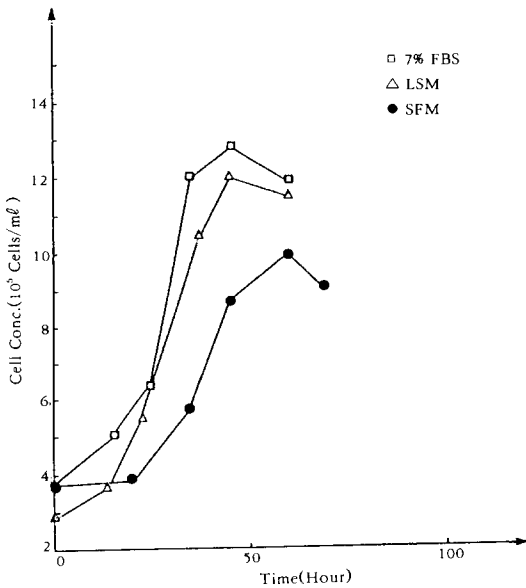


Fig. 1. Cell growth kinetics in low-serum medium and serum-free medium. (Supplements for serum-free medium are transferrin(10mg/L), bovine serum albumin(0.5g/L), linoleic acid(5mg/L), ethanolamine(1.2 μg/L), and sodium selenite(1.7 μg/L) Culture was carried out in 300ml spinner flask).

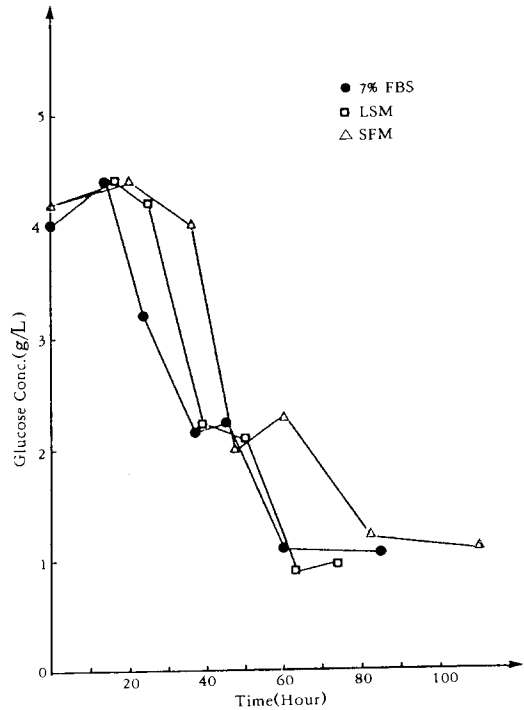


Fig. 2. Concentration profile of glucose in 3 different kinds of media for the culture of the hybridoma, KA-112.

autocrine factor들을 생산하는 과정에서 여타의 metabolic activity는 극히 낮은 상태에서 glucose도 소비되지 않고 세포성장도 일어나지 않다가 나중에 막상 세포성장이 활발히 일어날 즈음에는 배지 내에 inhibitory 성분들이 축적되어 세포성장이 효율적으로 되지 못하는 경우도 생각해 볼 수 있다. 성장속도에 있어서도 무혈청 배지의 경우가 다소 작은 값을 보였으나 그리 큰 차이를 보이지는 않았다. 세가지 배지조건에서의 glucose 소비 양상을 보면 Fig. 2와 같다. 이 결과에서도 lag time의 존재가 확인되었는데 특이한 점으로는 lag time동안 사용되는 maintenance용의 substrate는 glucose가 아님을 알 수 있었다. 즉, glucose는 lag time이 끝나고 약 10~20 시간 후에 소비되기 시작하였으며 lag time이 가장 긴 무혈청 배지의 경우에 glucose 소비의 시작도가 가장 늦게 나타났다. 또한 세포성장이 정지되고 세포의 사멸이 시작되기 직전 세포성장이 둔화되는 시간에서 glucose의 소비가 잠시 정지하는 현상을 보였는데 이는 동물세포의 특성 중의 하나인 cell

cycle에 기인하는 것으로 보였다. 즉, 어떤 물질의 고갈로 세포가 성장의 phase에서 다른 phase로 옮겨감에 따라 기질소비 pattern이 달라지고 이에 따라 나타나는 현상으로 생각된다. 이 현상은 여러 가지 배양방식에서의 배지공급 제어(7)에 이용할 수 있을 것으로 보였다. 즉, glucose 농도를 on-line으로 측정할 수 있다면(8) 배지공급의 기준으로 삼을 수가 있을 것이며 이에 대한 방법은 앞으로 연구 검토되어야 할 것이다.

PEG를 이용한 세포성장 촉진 시도

앞의 실험에서 무혈청 배지를 사용하여 회분배양한 결과 상대적으로 낮은 최고 세포농도를 보였으므로 lag time을 줄이고 최고 세포농도를 높이기 위하여 PEG(polyethyleneglycol)를 첨가하여 세포배양을 하였다. 분자량 1500, 4000, 20000의 PEG를 사용한 결과 분자량 1500에서 가장 좋은 결과를 얻었으나 최고 세포농도를 높이는 데에는 큰 효과를 얻지 못하였다(Fig. 3). 분자량 1500의 PEG에서

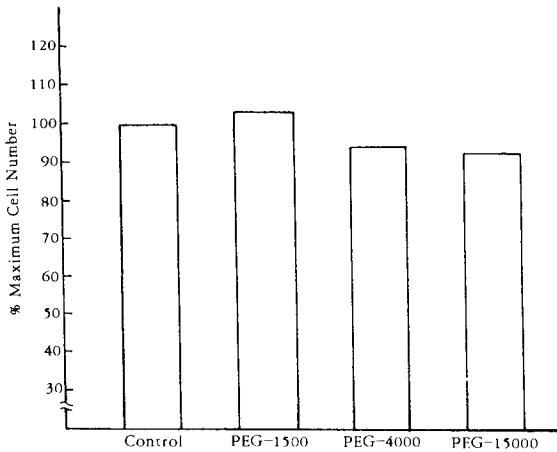


Fig. 3. Effect of various molecular weights of polyethylene glycol(PEG) on maximum cell growth. Each MW was added at 0.1% (w/v) concentration. Cells were inoculated into D-100 dish and were counted everyday to determine maximum cell concentration. The numbers indicate the molecular weights of PEG used.

세포의 상태가 가장 좋았음을 관찰하였다. Human heterohybridoma를 위한 무혈청 배지 개발시에는 PEG가 큰 효과를 보였다는 보고가 있었으나(9, 10) mouse hybridoma인 KA-112에서는 lag time을 줄이지는 못하였다. PEG의 역할은 아직 규명되지 않았으나 세포 융합시 사용농도의 약 1/10을 첨가하면 membrane에서의 물질 수송작용에 도움을 주는 것으로 추측하고 있다. 본 실험에서는 이러한 수송작용을 도와주는 효과가 lag time을 줄여줄 것으로 기대했으나 효과가 없었으므로 세포성장을 일으키는 autocrine성 growth factor 등의 농도가 일정농도 이상에 도달하는 것이 중요한 것으로 판단되었다. 무혈청 배지 사용의 경우, 그러한 일정농도에 도달하는 시간이 이미 growth factor가 함유되어 있는 혈청 첨가 배지들의 경우에 비하여 더 길 것으로 예상할 수 있었다.

무혈청 배지를 이용한 계대배양

회분배양에서 무혈청 배지를 사용시 가장 낮은 최고 세포농도를 보였으나 tissue culture dish에서 매 1~2일 마다 배지를 교환하여 배양한 결과 계속 세포농도가 증가하였으며 이는 저혈청 배지 사용 경우

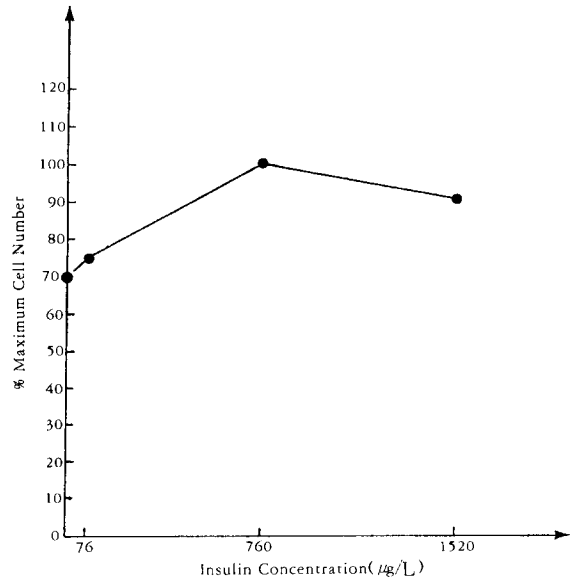


Fig. 4. Effect of insulin concentration on maximum cell growth. Cells were inoculated into D-100 tissue culture dish and were counted everyday. 3 days after inoculation, cell death occurred and maximum cell concentration could be determined. Inoculum size: 5×10^5 cells/ml.

와 비슷한 결과를 보였다. 세포농도 4×10^6 cells/ml 이상에서는 저혈청, 무혈청 배지 양 경우에 더 이상의 세포성장이 일어나지 않고 유지되었다.

Key component 농도의 영향

저혈청 및 무혈청 배지 제조에 있어서 가격결정에 가장 큰 영향을 미치면서 분리정제 측면에도 고려되어야 할 것이 단백질계 첨가물이다. 따라서 이러한 단백질계 첨가물들이 세포성장에 미치는 영향을 보기 위하여 control SFM에 첨가하였던 insulin, transferrin, BSA 농도의 1/2, 1, 10, 20배의 농도로 배지를 제조하여 동일조건에서 배양하였다. 시험되는 물질 외에는 control SFM과 동일한 조성을 취하였다.

i) insulin

저혈청 배지에서와 같이 insulin은 무혈청 배지에서도 필수적이었는데 기존 첨가농도의 양 10배 농도에서 최적을 나타내었다(Fig. 4). 기존 첨가농도가 보고된 다른 배지의 첨가농도에 비해 1/10 이하로

상당히 낮은 편이었으므로 이 결과에 따라 760 $\mu\text{g}/\ell$ 를 첨가하는 것이 타당한 것으로 판단되었다. 이 실험을 통해 insulin을 이용한 세포 성장속도의 조절도 기대해 볼 수 있을 것이다. insulin의 양을 매우 미량으로 조절하여 여러 농도에 따른 세포 성장속도의 관찰이 흥미로울 것으로 보인다.

ii) transferrin

transferrin은 앞의 key component selection 실험에서 본 바와 마찬가지로 short-term culture에서 큰 영향을 주지 않았다(Fig. 5). 시험된 각 농도에서 거의 비슷한 growth를 보였으며 long-term culture에의 영향을 고려하여 계속 첨가하기로 결정된 것이었으나 무혈청 배지 제조 비용에서 전혀 첨가하지 않을 수 있는 방법이 고려되어야 하겠다.

iii) BSA

무혈청 배지에서 가장 중요한 인자로 결정된 BSA는 그 양의 증가에 따라 세포성장을 증가시켰다(Fig. 6). 그러나 control SFM의 BSA 농도에 대해 10배, 20s배의 BSA 농도는 너무 과다하여 10배의

경우 5.0g/l의 농도는 혈청 10% 첨가시의 단백질 농도에 상당하는 것이므로 기존의 농도로 첨가하기로 하였다. 특기할 사실은 BSA 농도가 높아짐에 따라 세포성장에 미치는 영향의 크기는 줄어드는 것이다. 즉, 증가된 BSA 농도에 비해 늘어난 세포성장의 양은 그리 커지지 않으므로 적정선에서 최적화하여야 했다. 또한 이 경우는 insulin의 양이 다소 적으므로(76 $\mu\text{g}/\ell$) insulin이 충분히 첨가된 시점에서 다시 검토해 볼 필요가 있다. 그런데 혈청 1% 첨가시 BSA양에 해당하는 0.5g/l까지는 농도 의존적인 경향이 강한데 비하여 그 이상에서는 현저한 lag-time의 감소현상이 보임과 함께 농도 의존성이 감소한다. 따라서 세포성장에 필수적인 BSA의 양은 0.5g/L였으며 그 이상의 농도는 lag time을 줄임으로써 더 높은 세포농도에 도달하는데 기여한 것으로 보였다.

항체의 생산

세가지 종류의 배지에서 KA-112를 회분배양한 다음 각각의 배양에서 취한 sample들 중 최고농도

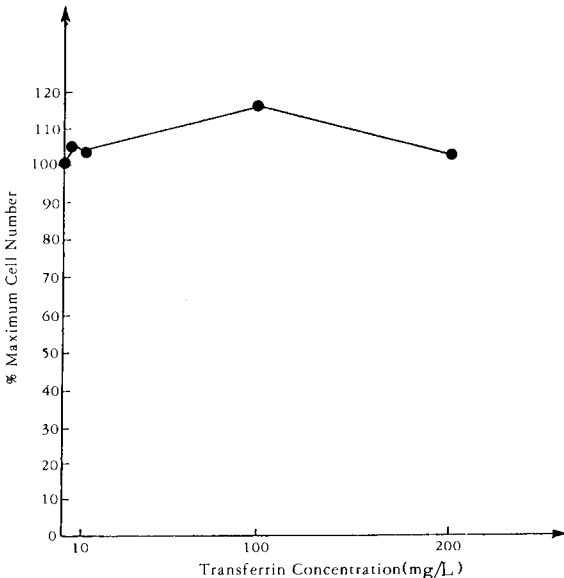


Fig. 5. Effect of transferrin concentration on maximum cell growth. Cells were inoculated into D-100 tissue culture dish and were counted everyday. 3 days after inoculation, cell death occurred and maximum cell concentration could be determined. Inoculum size: 5×10^5 cells/ml.

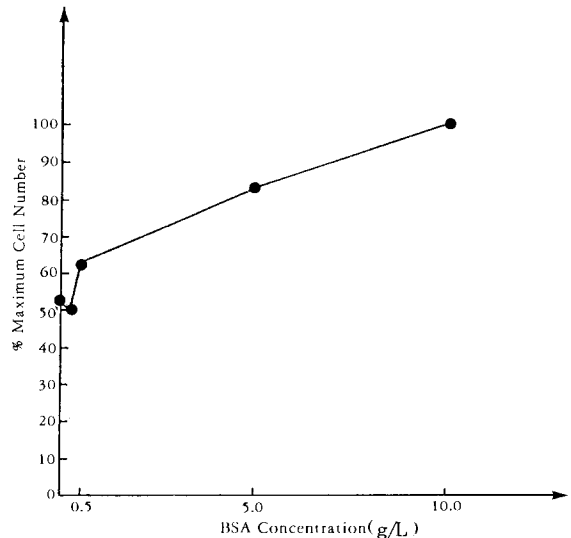


Fig. 6. Effect of BSA concentration on maximum cell growth. Cells were inoculated into D-100 tissue culture dish and were counted everyday. 3 days after inoculation, cell death occurred and maximum cell concentration could be determined. Inoculum size: 5×10^5 cells/ml.

에 달했던 시점의 sample을 ELISA로 분석하였다. 세포배양은 spinner flask에서 이루어졌으며 매일 2회 sampling 한 것 중 택하였다(Table 1). 각각의 sample을 3가지의 농도로 희석하여 역가를 측정하였는데 모든 희석비에서 무혈청 배지 사용의 경우가 항체 생산이 가장 많은 것으로 나타났다. 주의하여야 할 것은 각 sample들의 단백질농도가 매우 다르므로 이러한 단백질들이 ELISA 분석에 간접효과를 줄 가능성이 존재한다는 것이다. 그러나 도달 최고 세포농도를 비교하여 보면 무혈청 배지의 경우가 가장 낮으며 이때 antibody titer는 모든 희석비의 sample에 대하여 무혈청 배지 사용시에 가장 높았으므로 specific productivity가 다른 두 경우에 비해 적어도 같거나 더 높은 값을 가질 것으로 생각되었다. 특히 이때에 소모된 glucose 양을 보면(Fig. 2) 무혈청 배지의 경우 낮은 세포농도와 성장속도에 비해 glucose 소비속도가 다른 두 배지의 경우와 거의 같다. 이는 세포성장이 줄어든 대신 antibody의 생산에 기질이 계속 소비되고 있음을 나타낸다. 동물 세포의 경우 세포성장속도가 낮아도 기질의 소비는 계속 일어나는 것이 통례인데, 이러한 maintenance energy의 일부가 product로 진행되는 것으로 생각된다. 최근에 보고된 바로 hybridoma의 성장속도를 인위적으로 낮출 경우 그 specific productivity가 증가한다는 사실이 있는데 이러한 보고와도 본 결과가 일치한다. 또한 개발된 무혈청 배지에서의 항체생산이 기존의 배지에 비해 높다는 결과도 발표된 경우가 있는데 그 경우에도 성장속도와 생산이 관계가 있는지의 여부는 확실하지 않다.

무혈청 배지의 최종조성

이상과 같은 실험을 통하여 배지 제조가격과 장기 배양 등에 미칠 영향 등을 고려하여 배지의 조성을 결정하였다(Table 2). 조성 중 transferrin의 첨가여부는 장기배양을 통하여 다시 검토되어야 한다. 만약 insulin의 농도로 성장속도를 조절할 수 있을 경우 insulin의 농도는 '성장속도의 조절'이라는 면에는 연구가 계속되어야 하며 insulin의 농도가 배지의 사용 경우(예: 성장단계 또는 생산단계)에 따라 가변적으로 결정될 수도 있을 것으로 예상된다.

저혈청 배지와 무혈청 배지의 비교

배지개발에서 고려되어야 할 것들은 다음과 같다.

- (가) 배지의 가격
- (나) 배양 후의 정제비용

Table 1. Comparison of Antibody Production in Each Medium

(O. D.)			
dilution	7% FBS	1% FBS(LSM)	SFM
1/2	0.196	0.212	0.460
1/4	0.155	0.249	0.227
1/8	0.103	0.111	0.165
max. cell conc.	1.3 × 10 ⁶ cells/ml	1.2 × 10 ⁶ cells/ml	1.0 × 10 ⁶ cells/ml

After taking the supernatants from three kinds of culture broth, ELISA was performed on different degree of dilution. All cultures are performed in 300ml spinner flask (Bellco.)

* The maximum cell concentration of each culture.

Table 2. Composition of Serum Free Medium

Basal Medium	
	DMEM(# 430-1600)
	: with sodium pyruvate(110mg/L)
	and low glucose(1.0g/L)
Supplements Essential to Short-term Cultivation	
BSA	0.5g/L
insulin	760ug/L
Supplements Nonessential to Short-term Cultivation	
transferrin	10mg/L
sodium selenite	1.7ug/L
ethanolamine	1.2ug/L
linoleic acid	5.0mg/L
Others	
glucose	3.5g/L
sodium bicarbonate	2.0g/L
kanamycin	0.3g/L

(다) 세포성장 정도

(라) 생산물 생산 정도

배지 자체의 가격을 낮추려면 첨가물들의 가격이 저렴해야 하며 첨가량이 적절해야 한다. 기존 혈청 배지의 가장 큰 문제의 하나가 혈청가격이었는데 이를 대체하는 첨가물의 가격은 그보다 저렴한 것이 유리하다. 따라서 개발된 두 배지의 제조비용이 기존 배지에 비해 우위를 차지하는지의 여부가 중요하다.

며 두 배지 사이의 장단점을 결정하는 하나의 요인이 될 수 있다.

배지 제조비용보다 더 중요할 수도 있는 것이 배지내의 불순 단백질 함량이라 볼 수 있다. 목적 단백질의 분리정제를 위하여 이는 중요한 사항인데 개발 배지는 단백질의 함량 및 분포면에서도 검토되어야 한다.

위와 같은 비용면을 고려하면서 그 배지의 세포성장이나 생산물 생산 정도도 고려되어 각 배지를 평가하여야 하겠다.

배지의 가격(배지 제조비용)

기존 혈청배지와 개발된 두 가지 배지의 제조가격을 대략 평가하였다(Table 3). 배지 제조비용은 저혈청 배지의 경우가 오히려 무혈청 배지에 비해 저렴하였다.

Table 3. Cost of Media

Serum supplemented Medium	: DME	1.4\$/L
	FBS 10% v/v	40.0\$/L
	Total	41.4\$/L
Low Serum Medium	: DME	1.4\$/L
	Supplements	—
	FBS 1% v/v	4.0\$/L
Total	5.4\$/L	
Serum Free Medium	: DME	1.4\$/L
	BSA (0.5g/l)	1.6\$/L
	Transferrin(10mg/l)	3.5\$/L
	Total	6.5\$/L

이것은 배지개발의 시작단계에서 예상되었던 결과이기도 하다. 다시 말해 분리정제에 악영향을 주지 않으면서(대개 혈청농도 2~3% 이하) 저렴한 첨가물로 혈청을 대체하려는 의도였으므로 배지가격은 저혈청배지의 경우가 최소가 되도록 접근하였던 것이다. 이때 혈청을 FBS 1% 첨가에서 Calf serum 2% 첨가로 대체한다면 배지가격은 더욱 내려서 기존 배지가격의 1/10 이하로 제조가 가능하다. 그러나 이는 혈청의 종류가 바뀔으로써 농도는 2배가 필요하게 되므로 분리정제 비용에 어떤 문제가 생길지도 검토해야 할 것이다. 반면 무혈청 배지의 경우 transferrin을 제외시킬 수 있다면 저혈청 배지의 수준까지 가격절감이 가능하다. 최근 연구되고 있는 lipid의 emulsion화를 통한 BSA-free medium 개

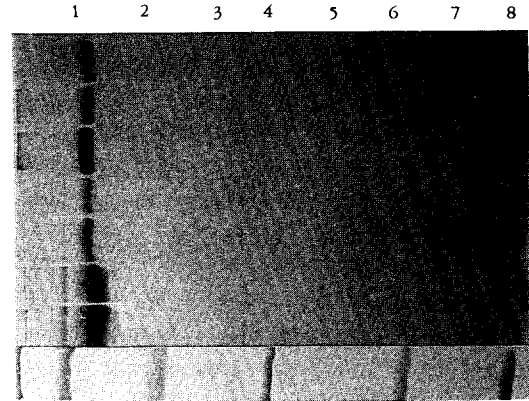


Fig. 7. Gel electrophorogram of supernatants. KA-112 hybridomas were cultured in serum free synthetic medium, low serum medium, and 7% FBS supplemented medium. Samples were precipitated in 50% saturated ammonium sulfate. The precipitates were dissolved in 500 μ l PBS. Initial supernatant volume was 7ml. Two different volumes, 25 μ l and 50 μ l, of the prepared samples were loaded. Lane: 1. reference protein size marker 2. 7% FBS supernatant(50 μ l) 3. 7% FBS supernatant(25 μ l) 4. LSM supernatant(50 μ l) 5. LSM supernatant(25 μ l) 6. SFM supernatant(50 μ l) 7. SFM supernatant(25 μ l) 8. supernatant after precipitation of 7% FBS supernatant

발이나 chelate물의 이용으로 transferrin을 완전히 대체할 수 있다면 KA-112 hybridoma와 같은 경우에 basal medium의 가격으로 배지를 제조할 수 있을 것도 예상할 수 있다.

분리정제 비용

개발된 배지들의 단백질 함량을 보기위하여 배양 상등액을 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 침전하여 농축, SDS (sodium dodecyl sulfate)-PAGE(poly acrylamide gel electrophoresis)로 단백질을 분리하였다. 각 배양상등액을 두 가지 양으로 loading 하였는데 저혈청배지와 무혈청배지의 단백질 함량이 거의 비슷하

였으며 이에 따라 분리정제의 난이도에도 큰 차이는 없을 것으로 보였다(Fig. 7). 1번 lane은 분자량 standard이며 가장 위의 것이 BSA 밴드이다. 즉, 모든 배지내에서 가장 많은 양을 보인 것이 BSA이며 LSM과 SFM에서 각각의 BSA양이 비슷함을 볼 수 있었다. 혈청 함유량 3% 내외가 분리정제에 악영향을 주는 한계농도이므로 단백질 분리 결과에서 보듯이 LSM과 SFM 사용시 배양상등액의 분리정제에 큰 차이는 없을 것으로 보이며 7% FBS 첨가 배지의 배양상등액에 비해 훨씬 쉬운 분리정제가 가능할 것으로 판단되었다.

감 사

본 연구를 위해 연구비를 제공해 주신 한국 학술진흥재단 및 한국 과학재단에게 심심한 감사의 말씀을 드립니다.

참고문헌

1. Jeh, H. S. and Choi, C. Y., *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, accepted for publication(1993).

2. Jeh, H. S. and Choi, C. Y., *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, accepted for publication(1993).
3. Yim, G. B., *M. S. Thesis, Seoul National University, Korea*(1986).
4. Park, S. J., *M. S. Thesis, Seoul National University, Korea*(1990).
5. Jeh, H. S., *M. S. Thesis, Seoul National University, Korea*(1989).
6. Jeh, H. S. and Choi, C. Y., *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, submitted for publication(1993).
7. Glacken, M. W., *Metabolic regulation in cultured mammalian cells: concepts for design and control of commercial process, International Biosymposium, Nagoya 88, Japan*(1988).
8. Jung, K. H., *M. S. Thesis, Seoul National University, Korea*(1987).
9. Shintani, Y., Iwamoto, K., and Kitano, K., *Appl. Microb. Biotechnol.*
10. Teng, N. N. H., Lam, K. S., Riera, F. C., and Kaplan, H. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 7308-7312(1983).