한국생물공학회지 제 13권 제 1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 13, No. 1, 108-113(1998)

하이브리도마 배양에서 아미노산과 노폐물의 조성 분석에 기초한 배지의 선택적 강화

현 병 용 · 이 동 섭 · † 박 홍 우
한양대학교 화학공학과
(접수 : 1997. 11. 3., 게재승인 : 1997. 12. 5.)

Medium Fortification based on the Analysis of Amino Acids and Wastes in Hybridoma Culture

Byungyong Hyun, Dongsup Lee, and Hongwoo Park†
Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea
(Received : 1997. 11. 3., Accepted : 1997. 12. 5.)

The cell growth and amino acid metabolism of a hybridoma cell line in T-flasks, spinner flasks, and a 2L bioreactor were compared. Similar growth and metabolic behaviour were observed for spinner flask and bioreactor cultivations, while those in T-flasks differed significantly. Through a detailed analysis of nutrients and wastes, 7 amino acids were found to be consumed to a much higher extent than the rest of the amino acids. Supplementing the basal medium with selected amino acids, glucose, and vitamines increased the cell density by 70%. The addition of vitamines was found to increase the metabolic rates of glucose and lactate.

Key Words : hybridoma, amino acid, glucose, vitamin, batch

서 론

하이브리도마 세포의 배양은 단세포군항체(Monoclonal antibody) 등의 생산에 이용되는 기술이다. 일반적인 하이브리도마 세포의 회분식 배양에서 세포는 $1\sim2\times10^6$ cells/mL 밖에 성장하지 않는데 이는 세포의 성장에 필요한 성장인자나 아미노산 등 영양원의 고갈, NH_4^+, lactate 등 세포의 성장을 저해하는 노폐물의 축적, pH의 저하, 산소공급의 한계 등에 의한 것으로 알려져 있다(1). 동물세포배양의 경우에는 미생물 배양에서와는 달리 포도당, 아미노산, 비타민, 무기염류, 혈청성분 등 다수의 필수영양소가 요구되며 특히 포도당, 아미노산, 비타민 등은 세포의 성장속도에 영향을 미칠 뿐 아니라 회분식 배양에서 얻을 수 있는 최대세포농도의 제한요인이 된다(2). 포도당과 glutamine은 에너지원으로 사용되면서 세포의 성장에 필요한 핵산, 비필수 아미노산 등의 합성에 관여하는 필수 영양원인 동시에 세포의 성장을 저해하는 것으로 알려진 lactate와 NH_4^+의 주생성원인이다(3).

회분식 배양의 문제점을 극복하기 위한 연구의 예로는 포도당과 glutamine의 농도를 각각 0.2 g/L, 0.1 g/L 이하로 낮게 유지시켜 주어 노폐물의 생성을 억제하는 배지첨가식 배양(4), 세포성장과 생성물 합성에서 각 영양원의 역할의 분석을 바탕으로 한 양론적인 모델식을 이용한 배지 설계(5, 6), 배지 교환식 배양(7) 등이 있다. 그러나 이러한 다양한 배양 방법들은 공정 개발과 허가과정의 어려움, 추가의 장치 설치의 필요, 운전 및 제어의 어려움, 신뢰성 있는 공학 자료의 부재 등의 문제점이 있어 여전히 회분식 배양이 산업현장에서 큰 비중을 차지하고 있다.

회분식 배양의 단점인 낮은 세포농도와 짧은 배양기간을 개선하기 위해 사용 배지조성을 변화시키는 연구가 시도되었으나 부분적 성공만을 거두었다. 배양시 고포도당 DMEM 등 단일 제한 성분을 강화한 배지를 사용하는 경우가 있으나 이에 의해 생산성이 크게 향상되지 않는다(8). 반면에 다수의 배지 성분을 무작위로 강화하는 경우 배지이용의 효율성이 떨어질 뿐만 아니라 일부 성분의 과잉이 세포성장을 억제할 가능성이 있는 등의 한계가 있다(9).

본 연구에서는 배양액 중의 영양원과 노폐물의 분석을 토대로 배지를 강화하여 회분식 배양에서 세포의 성장을 효율적으로 제고하고자 하였다. 이를 위해 기초실험으로 하이브리도마 세포를 T-flask, spinner flask, 그리고 bioreactor에서 회분식 배양하여 각각에서의 세포성장과 대사를 비교하였고, 영양원과 노폐물의 조성 변화의 분석을 바탕으로 아미노산,

† Corresponding Author : Dept. of Chemical Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea
Tel : (02) 290-0487, FAX : (02) 298-1615
E-mail : hhwwpp@chollian.net

Table 1. Supplements added to basal medium.

Experiments	Components	Added amounts
A. Cultivations with basal medium	-	-
B. Amino acid fortification	ASP, MET	60mg/L
	VAL	188mg/L
	ARG	168mg/L
	ILE, LEU	210mg/L
	GLN	1168mg/L
C. Amino acid and glucose fortification	Amino acids	Same as in B
	Glucose	4.5g/L
D. Amino acid, glucose, and vitamine fortification	Amino acids	Same as in B
	Glucose	Same as in C
	Biotin, Vitamin B_{12}	0.026mg/L
	D-Ca-Pantothenate, Choline chloride, Folic acid, Niacinamide, Pyridoxal HCl, Thiamine HCl	8.00mg/L
	i-Inositol	14.4mg/L
	Riboflavin	0.80mg/L

포도당, 그리고 비타민으로 배지를 강화한 배양을 행하여 70%의 세포농도의 증가를 얻었다.

재료 및 실험 방법

세포주 및 배지

배양에 사용된 세포는 EPO와 결합하는 IgG_1을 분비하는 5F12 AD3 하이브리도마(ATCC HB 8209)이다. 기초배양에서는 5%의 FBS와 50 μg/L의 gentamycin를 포함하는 IMDM (GibcoBRL)을 배지로 이용하였으며, 배지강화실험에서는 큰 감소를 보인 7종의 아미노산을 첨가한 IMDM, 7종의 아미노산과 포도당을 첨가한 IMDM, 그리고 7종의 아미노산, 포도당, 비타민을 첨가한 IMDM 등 3종류의 배지를 이용하였다. 각 배양에서 IMDM에 보강된 영양원의 첨가량을 Table 1에 나타내었다.

배양 방법 및 배양 조건

기초배양은 75 cm^2 T-flask, 500 mL spinner flask, 그리고 자체제작한 2 L bioreactor(Fig. 1)에서 행해졌다. T-flask 배양과 spinner flask 배양은 37℃, 5% CO_2의 조건으로 CO_2 배양기에서 이루어졌으며 spinner flask 배양의 경우에는 40 rpm으로 교반하여 주었다. 2 L bioreactor(배양부피 1.5 L)를 이용한 회분식 배양에서는 온도를 37℃, 교반 속도를 75 rpm으로 하였다. DO는 O_2를 microsparger로 공급함으로써 40% air saturation으로 유지하였으며, 이때 foam control을 하지 않았다. 기초실험에서는 pH를 제어하지 않았다. 배지강화실험은 bioreactor에서 이루어졌으며 이 경우에는 기초실험에서와 달리 0.5 N의 sodium bicarbonate를 배양 중에 첨가함으로써 pH를 7.0~7.2로 조절하였다. 다른 조건은 기초실험에서와 동일하게 행해졌다.

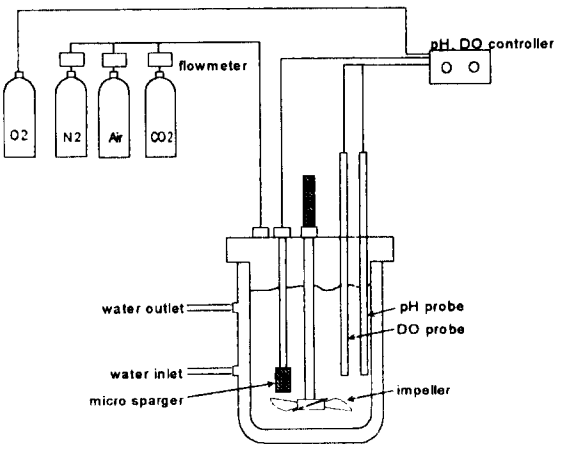

Figure 1. Schematic diagram of bioreactor.

분 석

각 배양에서 8시간마다 sample을 취하여 세포농도와 pH를 측정하였고, 16시간 간격으로 당, 아미노산, 이온 분석을 행하였다. 세포농도는 hemocytometer를 이용하여 측정하였으며 세포활성은 trypan blue exclusion 방법을 이용하여 측정하였다.

아미노산 분석은 HPLC(Waters Co.)를 이용한 Pico-tag 방법으로 행하였다. 이 방법에서 유리아미노산은 phenylisothiocyanate에 의해 유도체화되어 phenylthiocarbamyl 아미노산으로 전환되며, 유도체화된 아미노산은 역상 크로마토그래피에 의해 분석된다. 감지는 254 nm의 UV로 이루어지며 1 picomole 수준의 농도의 분석이 가능하다. 포도당과 lactate는 Aminex HPX-87H column(Bio-Rad Co.)을 장착한 HPLC를 이용하여 분석하였다. 이 칼럼은 sulfonated divinyl benzene-styrene copolymer를 support로 한 hydrogen resin을 이용하여 ion exclusion과 reversed phase partition의 원리를 결부시킨 것으로, 탄수화물과 유기산의 동시적 분리가 가능하다. 이동상은 0.01 N의 황산수용액으로 유속은 0.6 mL/min로 하며, 분석은 RI 검출기에 의해 이루어진다. NH_4^+는 IonPac CS12A analytical column이 장착된 Ion Chromatography system(Dionex Co.)을 이용하여 분석하였다. IonPac CS12A analytical column은 알칼리금속, 알칼리토금속, 그리고 암모니움의 분석을 위해 디자인된 것으로, 고정상은 hydronium 이온에 대하여 선택성이 높은 carboxylic/phosphonic acid를 functional group로 가진다. 분석시 일어나는 sodium peak에 의한 간섭은 시료를 50배 희석시킴으로써 제거하였다.

아미노산의 비소비속도 계산

아미노산의 비소비속도를 오차의 영향을 최소화하면서 계산하기 위해 적분방법을 이용하였다. 기질소비에 대하여 다음과 같이 쓸 수 있다:

$$-\frac{dS}{dt} = q_S X_v$$

여기서 S는 시간 t에서의 기질농도, q_S는 비소비속도, Xv는 산세포농도이다. q_S가 일정할 때 이를 적분하면 다음과 같은

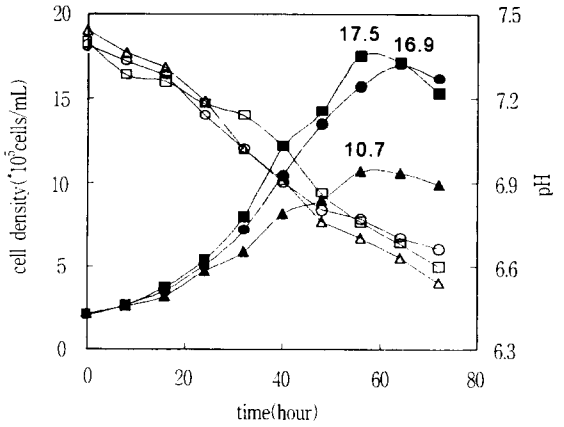

Figure 2. Viable cell densities and pH in various cultivations. (▲), cell density in T-flask; (◆), cell density in spinner flask; (■), cell density in bioreactor; (△), pH in flask; (◇), pH in spinner flask; (□), pH in bioreactor; Labels indicate the maximum viable cell densities in each culture.

식을 얻는다:

$$S_0 - S_t = q_S \int_0^t X_v \, dt$$

여기서 S_0는 기질의 초기농도이다. 따라서 q_S가 일정한 구간에서 기질의 누적 소비량 $S_0 - S_t$를 산세포농도의 시간적분 $\int_0^t X_v \, dt$에 대하여 그린 직선을 linear regression으로 구하면, 직선의 기울기로부터 비소비속도를 알 수 있다.

한편, 비소비속도에 대하여

$$q_S = -\frac{1}{X_v}\frac{dS}{dt} = \frac{d(S_0 - S)}{d(\int_0^t X_v \, dt)}$$

의 관계가 성립하므로 기질의 누적 소비량 $S_0 - S_t$를 산세포농도의 시간적분 $\int_0^t X_v \, dt$에 대하여 그린 곡선의 임의의 점에서의 기울기가 그 점에서의 비소비속도이다. 따라서 $S_0 - S_t$ vs. $\int_0^t X_v \, dt$의 곡선에서 비소비속도의 변화경향을 알 수 있다.

결과 및 고찰

기초배양에서의 세포성장과 대사 비교

배양기에 따른 세포성장과 대사를 비교하기 위해 하이브리도마 세포를 IMDM 배지를 이용하여 각각 T-flask, spinner flask, 그리고 2 L bioreactor에서 배양하였다. 이들 배양중 spinner flask와 bioreactor에서는 비슷한 세포성장을 관찰할 수 있었으나 T-flask 배양에서의 성장속도는 상대적으로 낮았다 (Figure 2). 세 가지 배양에서 최대 산세포농도는 T-flask 배양에서 1.07×10^6 cells/mL, spinner flask 배양에서 1.69×10^6 cells/mL, bioreactor에서 1.75×10^6 cells/mL이었다. pH는 각 배양에서 비슷한 수준인 6.6 정도로 떨어졌다.

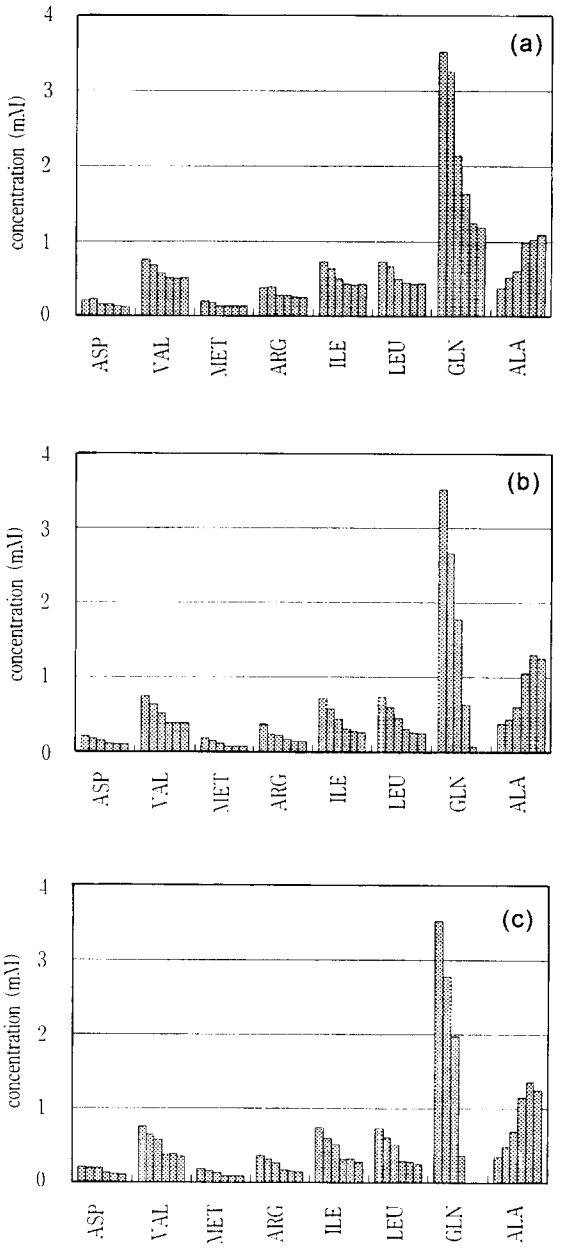

Figure 3. Consumption of amino acids in (a) T-flask, (b) spinner flask, (c) bioreactor. Bars indicate concentrations of amino acids at intervals of 16 h.

각 배양의 아미노산 분석을 한 결과 공통적으로 glutamine, aspartate, valine, methionine, isoleucine, leucine, arginine 등 7종의 아미노산이 뚜렷한 감소를 보였으며, 특히 glutamine은 spinner flask와 bioreactor 배양에서 배양 64시간 후에 완전히 고갈되었다(Figure 3). Alanine은 세 가지 배양에서 모두 두드러지게 증가하였으며, 그 외의 아미노산들은 비교적 일정한 수준으로 유지되거나 증감을 반복하는 등 뚜렷한 소비 또는 생성의 추세를 보이지 않았다.

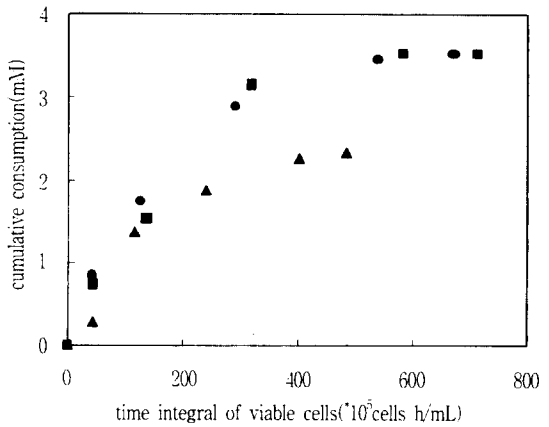

Figure 4. Cumulative consumption of glutamine vs. time intgral of viable cells in T-flask(▲), spinner flask(●), and bioreactor(■).

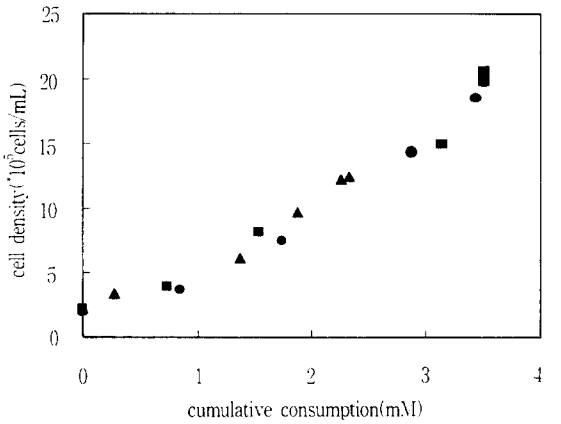

Figure 5. Cell density vs. cumulative consumption of glutamine in T-flask(▲), spinner flask(●), and bioreactor(■).

각 배양에서의 glutamine의 소비를 비교하기 위하여 누적 소비량을 산세포의 시간 적분에 대하여 그린 것을 Figure 4에 나타내었다. 배양이 진행되면서 비소비속도의 감소를 관찰할 수 있는데, 이같은 현상은 배양진행에 따른 기질농도의 감소와 성장속도의 둔화로 설명될 수 있다. 초기 32시간에서의 glutamine의 평균 비소비속도는 T-flask에서 1.22×10^{-10} mmol/cell · h, spinner flask에서 1.34×10^{-10} mmol/cell · h, bioreactor에서 1.11×10^{-10} mmol/cell · h로 비슷하다. 32시간 후 T-flask 배양에서의 glutamine 소비는 나머지 두 배양에서보다 급격하게 둔화된다. 이와 같은 둔화는 세포성장의 상대적 둔화점과 시기적으로 유사하다. 즉 32시간경부터의 산소공급의 제한은 세포성장을 억제시키며 그 결과 glutamine의 대사속도도 함께 저하시킴을 알 수 있다. 따라서 산소공급은 세포성장과 glutamine 등의 아미노산 대사에 직접적인 영향을 끼치는 것으로 사료된다. Glutamine에 대한 세포성장의 수율을 알아보기 위해 세포농도를 glutamine 소비에 대하여 그린 것을 Figure 5에 나타내었는데, 각 배양에서의 성장수율은 매우 유사함을 알 수 있다. 그러나 감소한 다른 아미노산에

Table 2. Cell yields on amino acids in batch cultivations.

Amino acid	Cell yields on amino acids* (0~48h)		
	T-flask	Spinner flask	Bioreactor
ASP	0.87	1.50	1.27
VAL	0.25	0.31	0.29
MET	0.90	0.83	0.84
ARG	0.32	0.28	0.30
ILE	0.17	0.23	0.23
LEU	0.18	0.22	0.22
GLN	0.025	0.029	0.027

* Units are in 10^8 cells/mg

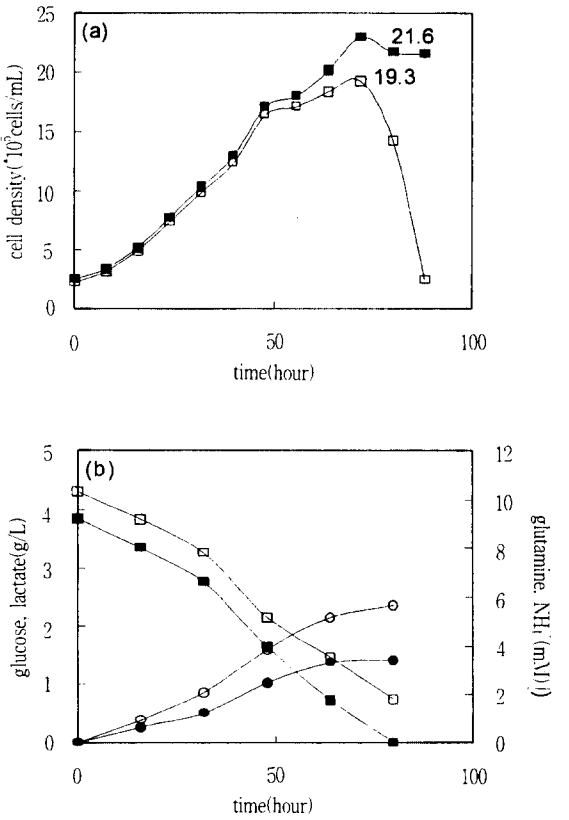

Figure 6. Bioreactor cultivation using IMDM with amino acid supplements. (a) Total cell density(■), viable cell density(□), (b) glucose(■), lactate(●), glutamine(□), NH_4^+(○) concentration.

대한 수율은 spinner flask와 bioreactor에서 비교적 유사한 반면 T-flask에서는 아미노산 종류 및 배양 시간에 따라 나머지 두 배양과 상당한 차이가 있다. Table 2는 각 배양에서 0~48시간까지 아미노산 소비에 대한 세포성장수율을 계산한 것이다.

이상의 결과에서 알 수 있듯이 세포성장과 대사가 spinner flask와 bioreactor에서 비교적 유사한 반면 T-flask에서는 배양시간 및 영양원 종류에 따라 차이가 날 수 있다. T-flask의 경우 세포성장의 제한 원인을 표면 확산만으로 이루어지는

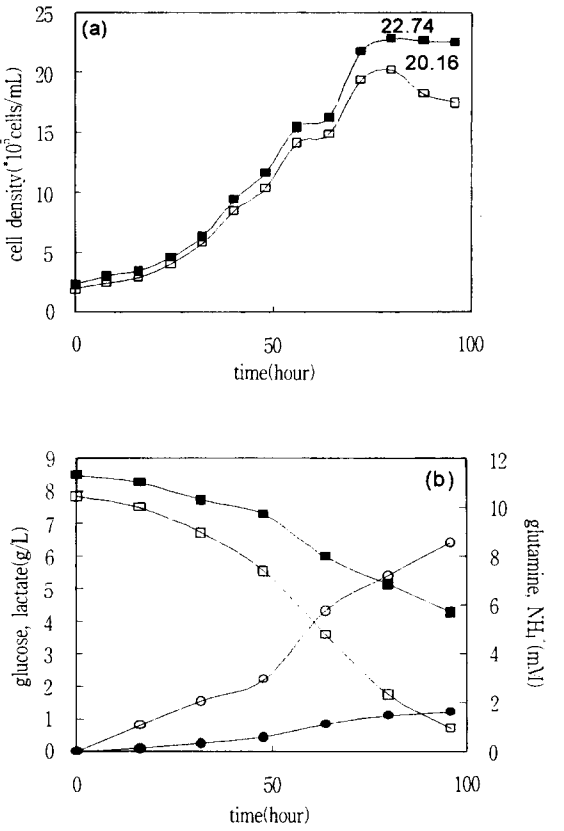

Figure 7. Bioreactor cultivation using IMDM with amino acid and glucose supplements. (a) Total cell density (■), viable cell density(□), (b) glucose(■), lactate(●), glutamine(□), NH_4^+(○) concentration.

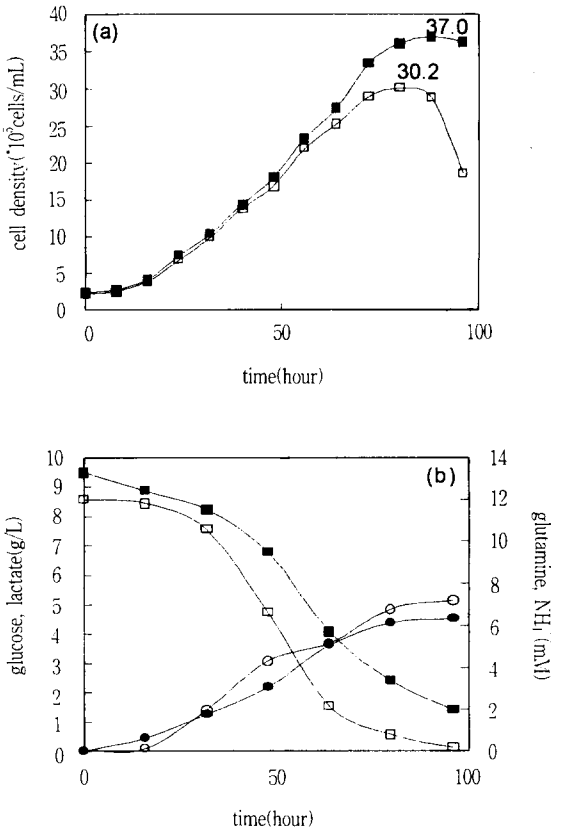

Figure 8. Bioreactor cultivation using IMDM with amino acid, glucose, and vitamine supplements. (a) Total cell density(■), viable cell density(□), (b) glucose(■), lactate(●), glutamine(□), NH_4^+(○) concentration.

산소 공급의 제한과 pH의 저하, spinner flask 배양의 경우 glutamine의 고갈과 pH의 저하로 추측할 수 있다. 세포성장과 대사가 배양방법에 따라 변화하기 때문에 배양자료로서의 활용에는 배양방법의 환경에 대한 고려가 있을 필요가 있다.

부족 영양원을 보강한 배지에서의 배양

위의 기초실험의 결과를 토대로 큰 감소를 보인 7종의 아미노산이 강화된 IMDM 배지로 bioreactor 배양을 한 결과 1.93×10^6 cells/mL의 최대 산세포농도를 얻을 수 있었는데 이는 원래의 IMDM 배지를 이용한 배양에서보다 약 10% 높은 수치이다. 산세포농도는 72시간에서 최대치를 보였으며 이후 세포활성은 급격히 감소하였다(Figure 6 (a)). 당 분석을 한 결과 포도당이 배양 80시간에 완전히 고갈된 것으로 드러났으며, 이는 세포활성의 감소와 시기적으로 일치하므로 세포활성 감소의 직접적인 원인이 포도당의 고갈임을 의미한다(Figure 6 (b)).

세포를 더 높은 농도로 배양하기 위해 7종의 아미노산 외에 포도당을 4.5 g/L 강화한 배지를 이용하여 배양을 실시하였으나 최대 산세포농도가 80시간에 2.02×10^6 cells/mL로 이전에 비하여 크게 증가하지 않았다(Figure 7 (a)). 이 배양에서 포도당과 아미노산의 고갈이 일어나지 않았으며, 노폐물의 생성량은 lactate 1.22 g/L, NH_4^+ 8.55 mmol/L로 비교적 높은 편이었으나 세포성장 둔화의 전적인 원인으로 단정지을 수 있는 수준은 아니었다(Figure 7 (b)).

세포성장 둔화의 주원인이 다른 필수영양원의 고갈이라는 가정을 토대로 포도당과 아미노산 외에 IMDM에 포함된 10종의 비타민으로 배지를 강화하여 배양한 결과 비타민이 첨가되지 않은 강화배지에서의 배양에 비해 약 50%가 높은 3.02×10^6 cells/mL의 산세포농도를 얻었다(Figure 8 (a)). 따라서 아미노산과 포도당이 강화된 배양에서 비타민의 고갈이 세포활성 둔화의 중요한 원인임이 입증되었다. 이 배양에서 배지에 포함된 20종의 아미노산중 고갈이 일어난 아미노산이 없었으며, 강화된 아미노산의 소비량은 glutamine 11.8 mM, aspartate 0.38 mM, valine 1.1 mM, methionine 0.31 mM, isoleucine 1.3 mM, leucine 1.4 mM, arginine 0.58 mM로 모두 기본 IMDM 배지에 함유된 농도보다 많은 양이 소비되어 배지강화가 효율적으로 이루어졌음을 알 수 있다.

비타민이 강화된 배양에서 포도당의 소비량은 8.08 g/L로 아미노산과 포도당만 강화한 배양에서의 소비량인 4.18 g/L에 비해 약 2배 정도 높고 lactate의 생성량도 4.51 g/L로 3배이상 높아 비타민의 잔여 농도가 포도당의 대사에 상당한 영향을 미칠 수 있음이 관찰되었다(Figure 8 (b)). 비타민 중 포도당의 대사를 촉진하는 것을 선별하여 이를 조절함으로써 lactate의 생성을 최소화하면 배양효율을 증대시킬 수 있을 것이다.

이상의 결과에서 볼 수 있듯이 영양원 분석을 통하여 과다하게 사용되는 배지성분을 찾은 후 이를 선택적으로 보강하는 간단한 배지강화로 세포농도를 원래의 IMDM 배지를 이용한 배양에 비해 약 70% 정도 증가시킬 수 있었다. 이와 같은 배지의 개선은 다른 세포와 배지를 대상으로 재현성 실험을 하여 그 일반성을 증명하여야 한다. 특히 본 실험에서는 5%의 FBS를 사용하였는데 무혈청배지 또는 무단백질배지에서 위의 결과의 재현성을 조사할 필요가 있다.

요 약

본 연구에서는 하이브리도마 세포를 T-flask, spinner flask, 그리고 2L bioreactor에서 batch 배양하여 배양 방법에 따른 세포성장과 대사의 차이점을 살펴보고, 이것의 영양원 분석을 토대로 배지를 강화함으로써 세포성장을 제고하고자 하였다. 배양방법에 따른 세포성장의 차이를 살펴보는 실험에서 spinner flask와 배양기를 이용한 배양에서는 비슷한 세포성장과 아미노산의 대사를 관찰할 수 있었으나 T-flask 배양에서의 세포성장과 대사는 나머지 두 배양과 현격한 차이를 보였다. 아미노산, 포도당, 그리고 비타민이 강화된 배지를 이용함으로써 원래의 IMDM 배지를 이용한 배양에서보다 70% 정도 높은 세포농도를 얻을 수 있었다. 그러나, 비타민 강화에 따른 에너지 대사의 변화가 관찰되어 이에 대한 연구의 필요성이 제시되었다.

감 사

본 연구는 1996년도 교육부 생물화학공학 학술연구조성비(B(3)-6)에 의하여 연구되었음을 깊이 감사드립니다. 또, 실험 및 분석에 많은 도움을 준 최용운 학생에게 심심한 감사의 뜻을 표합니다.

참 고 문 헌

1. Hiller, G. W., D. S. Clark, and H. W. Blanch (1994), Transient Responses of Hybridoma Cells in Continuous Culture to Step Changes in Amino Acid and Vitamin Concentrations, *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 303-321.
2. Duval, D., C. Demangel, K. Munier-Jolain, S. Miossec, and I. Geahel (1991), Factors Controlling Cell proliferation and Antibody Production in Mouse Hybridoma Cells: 1. Influence of the Amino Acid Supply, *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 561-570.
3. Ozturk S. S., M. R. Riley, and B. O. Palsson (1992), Effects of Ammonia and Lactate on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody Production, *Biotechnol. Bioeng.* **39**. 418-431.
4. Kurokawa, H., Y. S. Park, S. Iijima, and T. Kobayashi (1994), Growth Characteristics in Fed-batch Culture of Hybridoma Cells with Control of Glucose and Glutamine Concentrations, *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 95-103.
5. Xie, L. and D. I. C. Wang (1994), Stoichiometric Analysis of Animal Cell Growth and Its Application in Medium Design, *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 1164-1174.
6. Xie, L. and D. I. C. Wang (1994), Fed-batch Cultivation of Animal Cells Using Different Medium Design Concepts and Feeding Strategies, *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 1175-1189.
7. Tolbert, W. R., J. Feder, and R. C. Kimes (1981), Large-scale Rotating Filter Perfusion System for High-density Growth of Mammalian Suspension Cultures, *In Vitro* **17**, 885-890.
8. Bibila, T. A. and D. K. Robinson (1995), In Pursuit of the Optimal Fed-batch Process for Monoclonal Antibody Production, *Biotechnol. Prog.* **11**, 1-13.
9. Stoll, T. S., K. Mühlethaler, U. von Stockar, and I. W. Marison (1996), Systematic Improvement of a Chemically-defined Protein-free Medium for Hybridoma Growth and Monoclonal Antibody Production, *J. Biotechnol.* **45**, 111-123.