

## 하이브리도마의 회분식배양에서 아미노산과 비타민의 첨가에 따른 세포성장과 대사의 변화

이 동 섭 · † 박 홍 우

한양대학교 화학공학과

(접수 : 1998. 2. 2., 게재승인 : 1998. 3. 15.)

## Influence of Amino Acid and Vitamin Addition on the Growth and Metabolism of a Hybridoma in Batch Culture

Dongsup Lee and Hongwoo Park†

Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

(Received : 1998. 2. 2., Accepted : 1998. 3. 15.)

The effects of various step-fortifications of the initial medium with amino acids, glucose, and vitamins on the growth and metabolism of a hybridoma cell line in batch cultures were quantified. Comparisons between the metabolic rates of the various cultivations were made for the exponential growth phase. Fortification of the basal medium resulted in higher cell densities through a prolonged growth phase, but the maximum specific growth rate was not affected. The uptake rate of glutamine increased with the addition of amino acids but did not change upon the addition of glucose or vitamins. The specific glucose consumption decreased slightly with the addition of amino acids but increased notably when the medium was supplemented with vitamins. The enhanced consumption of glucose and glutamine resulted in an increased production of lactate and  $\text{NH}_4^+$ . A reciprocal relationship between the yields of  $\text{NH}_4^+$  and lactate indicated a joint regulation of glycolysis and glutaminolysis.

KeyWords : Hybridoma, Amino Acid, Glucose, Vitamin, Batch, Fortification

### 서 론

하이브리도마 세포의 배양은 단세포군항체(monoclonal antibody) 생산의 주된 방법으로, 그 산업적 중요성은 단세포군항체의 이용범위의 확대에 따라 점점 증가하고 있다. 단세포군 항체는 진단, 다운스트림 처리, 바이오센서, 면역이상 또는 바이러스성 질병의 치료, downstream processing, in vivo imaging 등의 분야에 현재 이용되고 있거나 또는 응용 잠재성이 있다(1).

하이브리도마 배양에서 단세포군항체의 생산성을 높이기 위한 근본적인 방법은 배양기간을 연장하고 세포농도를 높이는 것인데 이를 위하여 영양원을 충분히 공급하고 노폐물의 생성을 억제하여야 한다. 세포의 성장은 필요한 성장인자나 아미노산 등 영양원의 고갈,  $\text{NH}_4^+$ , lactate 등 세포의 성장을 저해하는 노폐물의 축적, pH의 저하 등에 의해 크게 영향을 받는다. 영양원으로서 포도당은 핵산, 지질, 탄수화물 등의 합성을 위한 주요 탄

소원 및 에너지원이고, glutamine은 비필수 아미노산과 핵산의 합성을 위한 주요 질소원 및 단백질 합성의 전구체인 동시에 에너지원으로 이용되기도 한다. 동물세포에서 포도당과 glutamine은 이러한 중점적인 대사로서 인하여 소비속도가 다른 영양원의 소비속도에 비해 높다(2). Glycolysis와 glutaminolysis의 결과로 lactate와  $\text{NH}_4^+$ 와 같이 세포성장을 저해하는 노폐물이 생성된다. 이런 노폐물의 생성은 배양환경 및 영양원의 농도에 의해 크게 좌우되며 또한 세포주에 따라 노폐물이 성장을 저해하는 정도가 크게 차이난다(3, 4). 포도당과 glutamine외에 아미노산, 비타민, 무기염류, 혈청성분 등 다수의 필수영양소가 세포의 성장에 크게 영향을 끼치며 이들의 고갈은 세포의 사멸을 초래한다(5-7).

영양원의 고갈과 노폐물의 축적 등은 회분식배양의 배지강화(6, 7, 11), 배지유가식 배양(1, 8, 9), 배지교환식 배양(10) 등에 의해 부분적으로 해결될 수 있으나, 각각의 배양방법에는 문제점이 따른다. 배지첨가식 배양과 배지교환식 배양은 공정 개발과 허가과정의 어려움, 추가적인 배양설비의 필요성, 운전 및 제어의 어려움, 신뢰성 있는 공학 자료의 부재 등의 제약이 있다. 산업현장에서는 여전히 회분식 배양이 큰 비중을 차지하고 있는데 이는 공정의 개발과 검정, 운전 등의 용이함 때문이다. 회분

† Corresponding author : Dept. of Chemical Engineering,  
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea  
Tel : (02)290-0487 Fax : (02)298-1615  
e-mail : hhwpp@chollian.net

식 배양에서 배지를 아미노산과 비타민 등의 영양원으로 강화함으로써 세포농도를 높이고 배양기간을 연장할 수 있는 것으로 밝혀져 있는데, 이와 같은 배지강화는 배지의 이용효율과 노폐물의 생성 억제면에서 최적일 아닐 가능성이 높다. 동물세포의 대사는 배양환경에 대하여 매우 민감하여 영양원의 잔류농도에 크게 의존한다. 따라서 균형된 배지강화도 낮은 배지 이용 효율과 높은 노폐물 생성을 초래할 수 있다(2). 배지강화를 다룬 대부분의 연구는 포도당과 glutamine 이외의 영양원에 대해서는 고갈의 방지에만 초점을 두며, 여러 영양원의 강화가 세포의 대사에 미치는 영향에 대한 정량적 자료는 많지 않다.

본 논문에서는 하이브리도마의 회분식 배양에서 아미노산, 포도당, 비타민 등의 영양원에 의한 배지의 강화가 세포의 성장, 아미노산과 포도당의 소비, 그리고 lactate와  $\text{NH}_4^-$  등의 생성에 미치는 영향을 정량적으로 분석하고자 한다. 배지에 첨가된 영양원 이외의 인자의 영향을 배제하기 위하여 각 영양원의 소비와 노폐물의 생성을 배양환경이 비교적 동일한 지수성장기에서 관찰하였다. 본 연구의 결과 아미노산, 포도당, 그리고 비타민의 첨가는 영양원의 소비속도와 노폐물의 생성속도에 지대한 영향을 끼치는 것으로 나타났다. 본 논문에서 사용된 실험자료는 2L bioreactor를 이용한 회분식 배양의 결과이다(12). 배양실험들은 IMDM을 배지로 사용한 배양, IMDM에 아미노산을 강화한 배양(AAs), 아미노산과 포도당을 강화한 배양(AAsGlc), 그리고 아미노산, 포도당, 비타민을 강화하는 배양(AAsGlcVit)이다. IMDM 배양의 결과로부터 크게 소비된 7가지의 아미노산을 선정하고 이를 강화하였다. Table 1은 각 배양에 첨가된 영양원을 나타낸 것이고 Table 2는 각 배양에서의 세포성장, 영양원 소비, 그리고 노폐물의 생성을 요약한 것이다.

## 재료 및 실험 방법

### 실험방법

배양에 사용된 세포는 EPO와 결합하는 IgG<sub>1</sub>을 분비하는 5F12 AD3 하이브리도마(ATCC HB 8209)이다. 기초배지는 5%의 FBS와 50  $\mu\text{g/L}$ 의 gentamycin를 포함하는 IMDM(GibcoBRL)을 사용하였으며, 여기에 큰 감소를 보인 7종의 아미노산, 포도당, 그리고 비타민을 첨가하였다. 각 배양에서 IMDM에 보강된 영양원의 첨가량을 Table 1에 나타내었다.

배양은 2L bioreactor(배양부피 1.5L)에서 행해졌다. 배양조건은 온도를 37°C, 교반 속도를 75rpm으로 하였으며, microsparger를 이용하여 DO를 40% air saturation으로 유지하였다. pH는 0.5M의 sodium bicarbonate(SIGMA)를 이용하여 7.0~7.2로 조절하였다. 각 배양에서 세포를  $2 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 접종하였다(12).

세포농도는 8시간 간격으로 hemocytometer를 이용하여 측정하였으며 세포활성은 trypan blue exclusion 방법을 이용하여 측정하였다. 아미노산 분석은 HPLC(Waters Co.)를 이용한 Pico-tag 방법으로 행하였다. 포도당과 lactate는 Aminex HPX-87H column(Bio-Rad Co.)을 장착한 HPLC를 이용하여 굴절을 검출기로 분석하였다.  $\text{NH}_4^-$ 는 IonPac CS12A analytical column이 장착된 Ion Chromatography system(Dionex Co.)을 이용하여 분석하였다. 자세한 분석방법은 이전의 논문에서 설명되어 있다(12).

Table 1. Supplements added to basal IMDM medium. (AAs) Batch culture with addition of amino acids; (AAsGlc) Batch culture with addition of amino acids and glucose; (AAsGlcVit) Batch culture with addition of amino acids, glucose, and vitamins.

Components	Culture		
	AAs	AAsGlc	AAsGlcVit
<i>Amino acids</i>			
Glutamine	1168mg/L	1168mg/L	1168mg/L
Aspartate	60mg/L	60mg/L	60mg/L
Methionine	60mg/L	60mg/L	60mg/L
Valine	188mg/L	188mg/L	188mg/L
Arginine	168mg/L	168mg/L	168mg/L
Isoleucine	210mg/L	210mg/L	210mg/L
Leucine	210mg/L	210mg/L	210mg/L
<i>Glucose</i>	-	4.5g/L	4.5g/L
<i>Vitamins</i>			
Biotin	-	-	0.026mg/L
Vitamin B <sub>12</sub>	-	-	0.026mg/L
D-Ca-Pantothenate	-	-	8.00mg/L
Choline chloride	-	-	8.00mg/L
Folic acid	-	-	8.00mg/L
Niacinamide	-	-	8.00mg/L
Pyridoxal HCl	-	-	8.00mg/L
Thiamine HCl	-	-	8.00mg/L
i-Inositol	-	-	14.4mg/L
Riboflavin	-	-	0.80mg/L

### 세포의 비성장속도, 기질의 비소비속도, 노폐물의 비생성속도의 계산

지수성장기에서의 비성장속도를 실험 오차의 영향을 최소화하면서 계산하기 위하여 다음과 같이 적분방법을 이용하였다. 세포의 비성장속도는 다음과 같이 정의된다:

$$\mu = \frac{1}{X_v} \frac{dX_T}{dt} \quad (1)$$

여기서  $\mu$ 는 비소비속도,  $X_T$ 는 시간  $t$ 에서의 total cell density,  $X_v$ 는 viable cell density이다. 지수성장기에서 비성장속도  $\mu$ 는 일정하다고 보고 식(1)을 적분하면 다음과 같은 식을 얻는다:

$$X_{T2} - X_{T1} = \mu \int_{t1}^{t2} X_v dt \quad (2)$$

여기서  $X_{T1}$ 과  $X_{T2}$ 는 각각 시간  $t1$ 과  $t2$ 에서의 total cell density이다. 따라서 total cell density의 변화  $X_{T2} - X_{T1}$ 를 viable cell density의 시간적분  $\int_{t1}^{t2} X_v dt$ 에 대하여 linear regression을 이용하여 구한 직선의 기울기가 비성장속도가 된다. 본 연구에서는 각 배양에서 초기 48시간 동안에 지수성장이 관찰되었으므로(12) 비성장속도는 배양 0시간부터 48시간까지의 실험결과를 이용하여 구하였다.

Table 2. Summary of the results from various batch cultures. For further details, see reference 12. (Abbreviations for the different batch cultures are the same as in Table 1.)

Culture	Max. viable cell density ( $\times 10^5$ cells/mL)	Glucose consumed <sup>a</sup> (mM)	Glutamine consumed <sup>a</sup> (mM)	Lactate produced <sup>a</sup> (mM)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> produced <sup>a</sup> (mM)	Nutrient limitation	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) <sup>b,c</sup>
IMDM	17.5	14.7	3.6	17.8	2.7	glutamine	0.042
AAs	19.3	17.3	6.9	15.2	5.2	glucose	0.039
AAsGlc	20.2	18.4	8.1	12.3	7.2	vitamines	0.040
AAsGlcVit	30.2	39.4	11.2	48.6	6.8	glutamine	0.041

<sup>a</sup> Values represent total consumption or production until peak cell density is reached.

<sup>b</sup> During exponential growth phase(0-48h)

<sup>c</sup> The observed average viability during the exponential growth phase was 93%.

지수성장기동안의 기질의 비소비속도  $q_s$ 와 노폐물의 비생성속도  $q_p$ 를 일정하다고 보고 위와 유사한 방법을 이용하였는데 식(3)과 식(4)의 관계식으로부터 0시간부터 48시간까지의 실험결과를 대입하고 linear regression을 이용하여 계산하였다.

$$S_{t1} - S_{t2} = q_s \int_{t1}^{t2} X_t dt \tag{3}$$

$$P_{t2} - P_{t1} = q_p \int_{t1}^{t2} X_t dt \tag{4}$$

여기서  $S_{t1}$ 과  $S_{t2}$ 는 시간  $t1$ 과  $t2$ 에서의 기질농도,  $P_{t1}$ 과  $P_{t2}$ 는 시간  $t1$ 과  $t2$ 에서의 생성물 농도이다.

식(3)으로부터 glutamine의 비소비속도를 계산할 때 glutamine의 자연분해를 계산에 포함시키지 않았는데, 이는 유사한 조건하에서 행해진 glutamine의 자연분해에 대한 이전의 연구(13)를 근거로 관찰기간인 초기 48시간 동안에 glutamine의 10% 미만 이 분해되어 계산에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 판단되기 때문이다.

### 결과 및 고찰

#### 배지강화에 따른 세포성장의 변화

세포성장을 아미노산, 아미노산·포도당, 그리고 아미노산·포도당·비타민을 강화한 IMDM배지를 사용한 배양에서 관찰하였는데 초기 48시간 동안 세포성장은 일정한 비성장속도의 지수성장기를 나타내었다. Figure 1에서 볼 수 있듯이, 각 배양에서  $\int X_t dt$ 에 대한 total cell density의 관계는 초기 48시간 동안 선형적 관계를 나타내었다. 이때 기울기로부터 구한 비성장속도는 0.039~0.042 h<sup>-1</sup>로 서로 매우 유사하다. 이와 같은 결과는 영양원의 첨가가 지수성장기에서의 비성장속도를 크게 변화시키지 않았음을 의미한다. 특히 주영양원인 glutamine과 포도당의 경우 지수성장기동안 최저 농도가 각각 0.4mM과 9mM로 낮아졌지만 이보다 높은 기질 농도에서는 세포의 성장속도는 제한받지 않을 것이다.

한편 각 배양에서 최대 세포농도는 지수성장기에서의 성장속도가 아니라 영양원의 잔류농도에 따른 성장의 지속기간의 변화에 따라 좌우되었다. Figure 1에서 볼 수 있듯이 IMDM 배양,

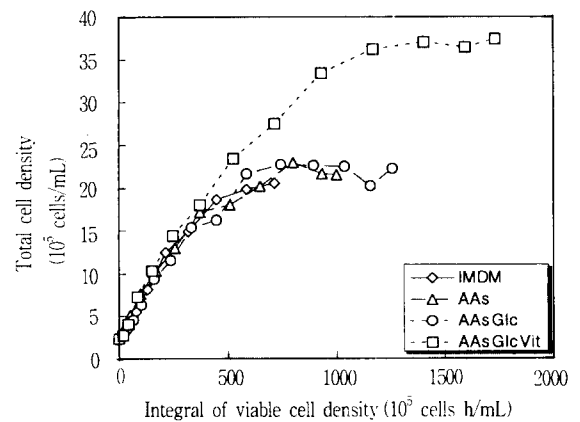


Figure 1. Effects of medium fortifications on the specific growth rates in different batch cultivations: total cell density vs.  $\int X_t dt$ . The slope of the tangent to each curve represents the specific growth rate in the corresponding cultivation. (Abbreviations for the different batch cultures are the same as in Table 1.)

아미노산 첨가 배양, 아미노산·포도당 첨가 배양에서는 48시간 후 성장이 둔화되었으며 최대세포농도는 17.5~20.2  $\times 10^5$  cells/mL 이었다. 아미노산·포도당·비타민 첨가배양에서 성장은 앞의 배양에 비해 약 16시간 더 오래 지속되었으며 이에 따른 세포의 계속적 성장으로 최대세포농도가 30.2  $\times 10^5$  cells/mL로 증가하였다.

#### 배지강화에 따른 영양원 소비의 변화

배지강화에 따른 포도당과 아미노산의 소비속도를 비교하기 위하여 지수성장기인 초기 48시간 동안의 변화를 관찰하였는데, 소비속도들은 각 첨가배양마다 상당한 차이가 있는 것으로 관찰되었다. Figure 2와 Table 3에서 볼 수 있듯이 아미노산 첨가 배양에서 glutamine의 비소비속도는 1.4  $\times 10^{-10}$  mmol/cell·h로 IMDM 배양의 1.0  $\times 10^{-10}$  mmol/cell·h에 비하여 증가한 반면, 포도당의 비소비속도는 4.3  $\times 10^{-10}$  mmol/cell·h에서 3.4  $\times 10^{-10}$  mmol/cell·h로 감소하였다. 첨가한 아미노산 중 valine과 methionine의 소비속도는 약 20% 증가하였으며, aspartate, leucine,

Table 3. Growth yields on glucose and glutamine and specific consumption rates during exponential growth phase in different batch cultures. (Abbreviations for the different batch cultures are the same as in Table 1.)

Culture	$Y_{Cells/Glucose}$ ( $10^8$ cells/mmol)	$Y_{Cells/Glutamine}$ ( $10^8$ cells/mmol)	$Q_{Glucose}$ ( $10^{-10}$ mmol/cell h)	$Q_{Glutamine}$ ( $10^{-10}$ mmol/cell h)
IMDM	0.97	4.1	4.3	1.0
AAs	1.23	2.4	3.4	1.4
AAsGlc	1.04	2.5	2.9	1.3
AAsGlcVit	0.86	2.4	4.2	1.4

Table 4. Average specific consumption rates of amino acids during exponential growth phase in various batch cultures<sup>a</sup>. (Abbreviations for the different batch cultures are the same as in Table 1.)

Culture	$Q_{Aspartate}$	$Q_{Methionine}$	$Q_{Valine}$	$Q_{Leucine}$	$Q_{Isoleucine}$	$Q_{Arginine}$
IMDM	0.022	0.030	0.11	0.13	0.12	0.059
AAs	0.070	0.017	0.13	0.22	0.17	0.099
AAsGlc	0.032	0.017	0.15	0.13	0.15	0.036
AAsGlcVit	0.039	0.031	0.12	0.16	0.16	0.056

<sup>a</sup> Units are in  $10^{-10}$  mmol/cell · h

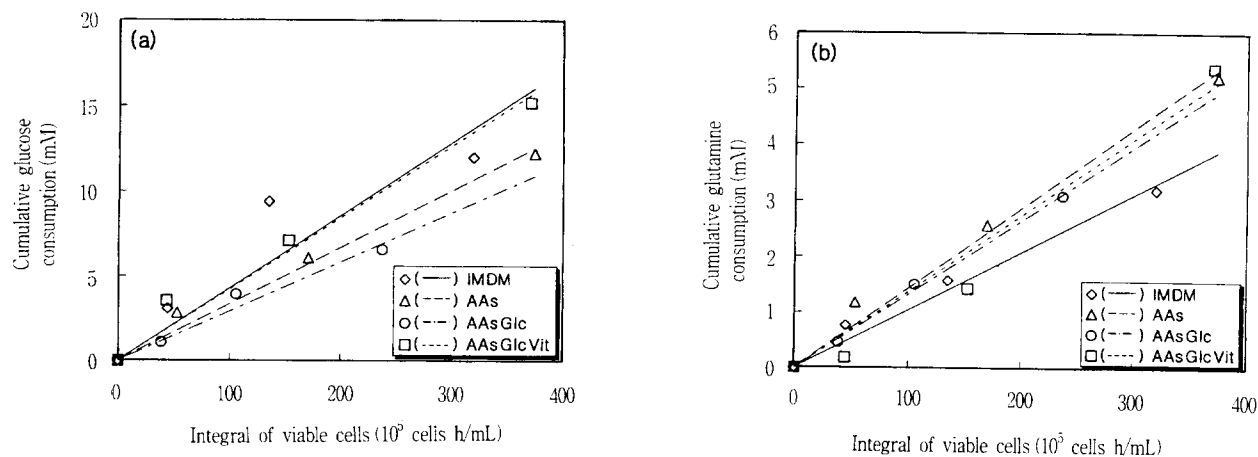


Figure 2. Effects of medium fortification on the specific consumption rates of glucose and glutamine during exponential growth phase in different batch cultivations: (a) Glucose consumption vs.  $\int X_v dt$ , (b) glutamine consumption vs.  $\int X_v dt$ . The slope of each line represents the (average) specific consumption rate of the substrate in the corresponding cultivation. (Abbreviations for the different batch cultures are the same as in Table 1.)

isoleucine, arginine의 소비속도는 40~200%의 두드러진 증가를 보였다(Table 4).

아미노산·포도당 첨가 배양에서 glutamine의 비소비속도는  $1.3 \times 10^{-10}$  mmol/cell · h로 아미노산 첨가 배양에서의 소비속도와 유사하였으며, 포도당의 소비속도는  $2.9 \times 10^{-10}$  mmol/cell · h로 아미노산 첨가배양에 비해 낮았다. Glutamine외의 아미노산 중 valine과 isoleucine의 소비속도는 아미노산 첨가 배양에서의 소비속도에 비해 크게 변하지 않은 반면 aspartate, methionine, leucine, arginine 등의 소비속도는 아미노산 첨가 배양에 비해 40~60% 정도 감소하였다.

아미노산·포도당·비타민 첨가 배양에서 glutamine의 비소비속도는  $1.4 \times 10^{-10}$  mmol/cell · h로 아미노산 첨가 배양과 아미노산·포도당 첨가 배양과 같은 수준이었으나, 포도당의 비소비

속도는  $4.2 \times 10^{-10}$  mmol/cell · h로 아미노산 첨가배양과 아미노산·포도당 첨가배양에 비해 두드러지게 높았으며 IMDM배양과 비슷한 수준이었다. 아미노산 중 aspartate, valine, leucine, isoleucine의 소비속도는 아미노산·포도당 첨가 배양과 크게 다르지 않은 반면 methionine과 arginine의 소비속도는 아미노산·포도당 첨가 배양에 비해 증가하여 IMDM 배양에서의 소비속도와 비슷한 수준이었다.

위의 결과에서 아미노산과 포도당의 소비속도는 영양원군의 첨가에 따라 각기 다르게 영향을 받으며, 특정 기질의 소비는 그 기질뿐만 아니라 다른 영양원의 농도에 의해서도 좌우된다는 것을 알 수 있다. Glutamine의 경우 아미노산, 아미노산·포도당, 그리고 아미노산·포도당·비타민 첨가 배양에서의 비소비속도는 모두  $1.3 \sim 1.4 \times 10^{-10}$  mmol/cell · h로 매우 유사하여,

Table 5. Specific production rates and yields of lactate and NH<sub>4</sub><sup>-</sup> during exponential growth phase in different batch cultures. (Abbreviations for the different batch cultures are the same as in Table 1.)

Culture	Y <sub>Lactate:Glucose</sub> (mol/mol)	Y <sub>NH<sub>4</sub>:Glutamine</sub> (mol/mol)	Q <sub>Lactate</sub> (10 <sup>-8</sup> mmol/cell · h)	Q <sub>NH<sub>4</sub></sub> (10 <sup>-10</sup> mmol/cell · h)
IMDM	1.09	0.50	4.7	0.52
AAs	0.94	0.75	3.2	1.07
AAsGlc	0.79	1.06	2.3	1.39
AAsGlcVit	1.66	0.86	7.0	1.17

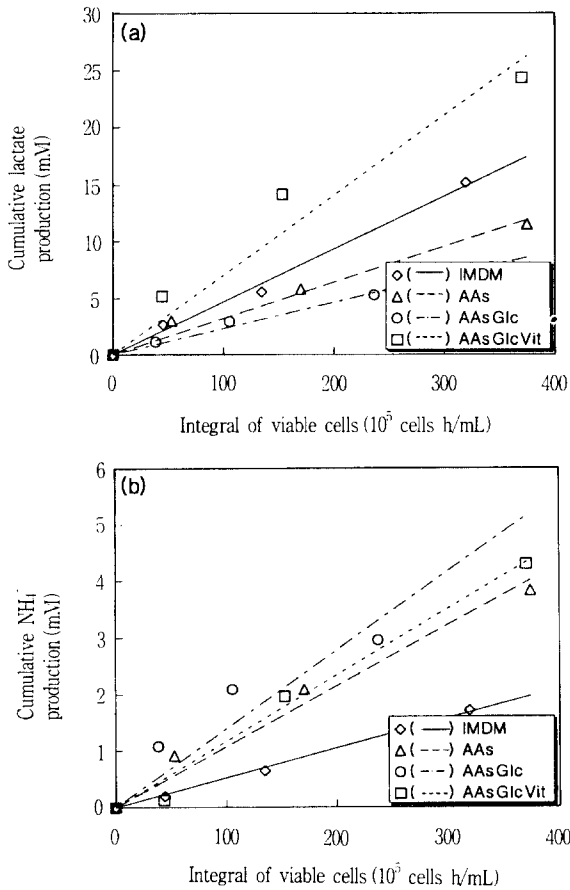


Figure 3. Effect of medium fortification on the specific production rates of lactate and NH<sub>4</sub><sup>-</sup> during exponential growth phase in different batch cultivations: (a) Lactate production vs. ∫ X<sub>v</sub>dt, (b) NH<sub>4</sub><sup>-</sup> production vs. ∫ X<sub>v</sub>dt. The slope of each line represents the (average) specific production rate of the waste in the corresponding cultivation. (Abbreviations for the different batch cultures are the same as in Table 1.)

glutamine의 소비속도는 주로 아미노산의 첨가에 따라 증가하며 포도당과 비타민 첨가에 의해 변하지 않았음을 알 수 있다. 포도당의 비소비속도는 아미노산을 배지에 첨가할 경우 감소하였는데, 이는 이전의 연구(14)에서 보고된 glycolysis와 glutaminolysis의 상호 조절을 반영할 가능성이 있다. 그러나 추가로 포도당을 강화할 경우 포도당의 비소비속도는 예측과 달리 증가하지 않아 지수성장기에서 포도당은 포도당의 소비속도에

영향을 주지 않을 정도의 과잉 농도로 존재하였음을 알 수 있다. 아미노산·포도당·비타민 첨가 배양에서 포도당의 비소비속도는 아미노산·포도당 첨가배양에 비해 뚜렷하게 높아 비타민의 농도가 포도당의 대사를 촉진할 가능성이 관찰되었으나, 이러한 경향이 다른 세포주에서도 재현되는지의 여부에 대한 검사가 필요하다. 한편 glutamine 외의 아미노산의 소비는 일반적으로 아미노산의 첨가에 따라 증가하였으나, 포도당과 비타민의 첨가에 따른 변화의 경향은 각 아미노산마다 차이가 나며, 변화의 크기 또한 각 배양마다 큰 증감폭을 보였다. 즉 배지강화시 아미노산의 대사는 영양원의 잔류농도, glutamine과 포도당의 대사의 변화 등 복합적인 영향으로 인하여 민감하게 변하므로 이들의 효율적인 첨가를 위해서는 더욱 깊은 연구가 필요할 것이다.

**배지강화에 따른 노폐물 생성의 변화**

지수성장기에서 노폐물인 NH<sub>4</sub><sup>-</sup>와 lactate의 생성도 영양원의 첨가에 따라 크게 변하는 것으로 나타났다. Figure 3와 Table 5에서 볼 수 있듯이 아미노산 첨가 배양에서 lactate의 비생성속도는 3.2×10<sup>-10</sup>mmol/cell · h로 IMDM 배양의 4.7×10<sup>-10</sup>mmol/cell · h에 비해 감소한 반면 NH<sub>4</sub><sup>-</sup>의 생성속도는 1.07×10<sup>-10</sup>mmol/cell · h로 IMDM배양의 0.52×10<sup>-10</sup>mmol/cell · h에 비해 두드러진 증가를 보였다. 아미노산·포도당 첨가 배양에서 lactate의 비생성속도는 2.3×10<sup>-10</sup>mmol/cell · h로 아미노산 첨가 배양에 비해 감소하였으며 NH<sub>4</sub><sup>-</sup>의 생성속도는 1.39×10<sup>-10</sup>mmol/cell · h로 아미노산 첨가배양에 비해 증가하였으나 비슷한 수준이었다. 아미노산·포도당·비타민 첨가 배양에서 lactate의 비생성속도는 7.0×10<sup>-10</sup>mmol/cell · h로 본 연구에서 행한 배양중에서 두드러지게 높았으며, 역으로 NH<sub>4</sub><sup>-</sup>의 비생성속도는 1.17×10<sup>-10</sup>mmol/cell · h로 아미노산·포도당 첨가 배양에 비해 낮으나 비슷한 수준이었다.

위와 같은 노폐물의 생성 경향은 이들의 주발생원인 포도당과 glutamine의 소비와 밀접한 관련을 갖는다. Lactate의 비생성속도는 포도당의 비소비속도가 상대적으로 높았던 IMDM 배양과 아미노산·포도당·비타민 첨가 배양에서 더 높았으며, 이들 배양에서는 포도당에 대한 lactate의 생성수율 또한 높았다(Table 5). 각 배양에서 세포의 비성장속도가 서로 비슷한 수준이었으므로, IMDM 배양과 아미노산·포도당·비타민 첨가 배양에서 나타난 lactate의 높은 생성 수율은 같은 성장속도에 대하여 상대적으로 높은 glycolysis 속도에 따른 pyruvate의 과다생성으로 인한 것으로 추측된다. NH<sub>4</sub><sup>-</sup>의 생성속도는 glutamine의 소비속도가 1.03×10<sup>-10</sup>mmol/cell · h로 낮았던 IMDM 배양에서 가장 낮았다. 반면에 glutamine의 소비속도가 1.3~1.4×10<sup>-10</sup>mmol/cell · h인 아미노산, 아미노산·포도당, 아미노산·포도

당·비타민 첨가 배양에서의  $\text{NH}_4^-$  생성속도는 IMDM 배양에 비해 높았는데, 이들 세 배양에서 glutamine의 소비속도가 매우 비슷하였음에도 불구하고  $\text{NH}_4^-$ 의 생성속도는  $1.07 \sim 1.39 \times 10^{-10}$  mmol/cell·h로 비슷한 수준에서 어느 정도 차이가 있어,  $\text{NH}_4^-$ 의 생성속도가 glutamine의 소비속도에 의해서만 좌우되는 것이 아님을 추측할 수 있다.

한편 lactate와  $\text{NH}_4^-$ 의 생성은 상호간에도 관계 있는 것으로 보인다. Table 5에서 볼 수 있듯이 포도당에 대한 lactate의 생성수율이 가장 낮은 아미노산·포도당 첨가배양에서 glutamine에 대한  $\text{NH}_4^-$ 의 생성수율이 가장 높으며, lactate 생성수율이 높은 IMDM배양, 아미노산 첨가배양, 아미노산·포도당·비타민 첨가배양에서  $\text{NH}_4^-$ 의 생성수율 대체로 높다. 위와 같은 lactate와  $\text{NH}_4^-$ 의 생성 추세는 이전의 다른 연구(8)에서도 관찰되었으며 탄소원과 에너지원으로서의 포도당과 glutamine의 대사의 균형된 조절을 반영하는 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 볼 수 있듯이 하이브리도마의 회분식 배양에서 아미노산, 포도당, 그리고 비타민 등의 영양원의 첨가에 따라 기질의 소비 및 노폐물의 생성 경향이 변하므로 세포농도를 높이고 배양기간을 연장하기 위한 배지의 강화가 최적으로 이루어지기 위해서는 이에 대한 고려가 있어야 한다. 따라서 이번 연구의 결과는 이러한 배지강화의 영향의 중요성을 제시하고 회분식 또는 배지첨가식 배양에서 보다 효율적인 영양원첨가 전략의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

본 연구에서는 하이브리도마 세포의 회분식배양에서 아미노산, 포도당, 비타민 등의 영양원의 강화가 세포성장, 포도당과 아미노산의 소비, lactate와  $\text{NH}_4^-$  등의 노폐물 생성에 미치는 영향을 정량적으로 분석하였다. 각 배양간의 대사속도의 비교는 지수성장기에 대하여 행하였다. 아미노산, 아미노산과 포도당, 그리고 아미노산, 포도당, 비타민에 의한 배지강화는 지수성장기에서의 비성장속도에 영향을 끼치지 않았으나, 성장기간을 연장함으로써 최대세포농도를 증가시켰다. Glutamine의 소비속도는 아미노산의 첨가에 따라 증가하는 것으로 관찰되었으나, 포도당과 비타민의 첨가에 의해 영향을 받지 않았다. 반면에 포도당의 소비속도는 아미노산의 첨가에 따라 약간 감소하였으나 비타민 강화된 배양에서 크게 증가하였다. 여러 가지 배지강화에 따른 포도당과 glutamine의 소비속도의 증가는 lactate와  $\text{NH}_4^-$ 의 생성속도와 수율의 증가를 초래하였으며, glutamine에 대한  $\text{NH}_4^-$ 의 생성수율과 포도당에 대한 lactate의 생성수율은 glutaminolysis와 glycolysis의 균형된 조절에 따른 상호관계가 있는 것으로 추측된다.

## 감 사

본 연구는 1996년도 교육부 생물화학공학 학술연구조성비(B(3)-6)에 의하여 연구되었음을 깊이 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- 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.
- 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.
- Glacken, M. W., R. J. Fleischaker, and A. J. Sinskey (1986). 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**, 1376-1389.
- 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.
- Jo. E. C., D. I. Kim, and K. H. Kim (1993). Step-Fortifications of Nutrients in Mammalian Cell Culture, *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 1218-1228.
- 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.
- Luan, Y. T., R. Mutharasan, and W. E. Magee (1987). Strategies to extend Longevity of Hybridomas in Culture and Promote Yield of Monoclonal Antibodies, *Biotechnol. Lett.* **9**, 691-696.
- 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.
- 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.
- 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.
- Jo, E. C., H. J. Park, J. M. Park, K. H. Kim (1990). Balanced Nutrient Fortification enables High-Density Hybridoma Cell Culture in Batch Culture, *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 717-722.
- 현병용, 이동섭, 박홍우 (1998). 하이브리도마 배양에서 아미노산과 노폐물의 조성 분석에 기초한 배지의 선택적 강화, *한국생물공학회지*, **13**(1), 1-6.
- Ozturk, S. S. and B. O. Palsson (1990). Chemical Decomposition of Glutamine in Cell Culture Media: Effect of Media Type, pH, and Serum Concentration, *Biotechnol. Prog.* **6**, 121-128.
- Glacken, M. W. (1988). Catabolic Control of Mammalian Cell Culture, *Bio/Technology* **6**, 1041-1050.