

GE Healthcare

Life Sciences

# $K_{La}$ - 정의 및 실험적 방법



GE Healthcare Life Sciences Korea

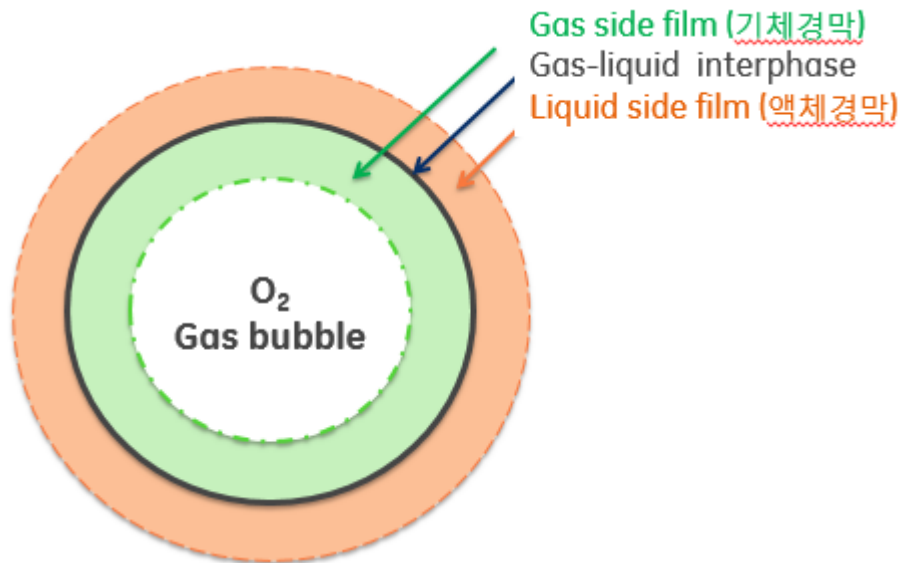
Ver 1.0 @2017

# 내용

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| 1. $K_{La}$ 의 정의.....           | 3 |
| 2. $K_{La}$ 의 측정 및 계산 .....     | 4 |
| 3. $K_{La}$ 값에 영향을 끼치는 요인 ..... | 4 |
| 4. $K_{La}$ 의 예시 .....          | 4 |
| 5. OTR의 개념 및 예시 .....           | 6 |
| 6. 요약 .....                     | 7 |

## 1. $K_L a$ 의 정의

산소는 물이나 배지에서 용해성이 매우 낮은 기체로서 기포가 배지 속으로 확산이 될 때 “물질전달” 과정에서 연속된 “전달저항”을 받습니다. 따라서, 산소의 물질전달은 이들의 저항과 기포의 수력학적 특성, 온도, 용액의 조성 및 성질, 계면현상 등 여러 인자들에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있습니다. 산소가 배지에 전달이 될 때 산소 자체가 갖고 있는 기체 경막에서의 저항은 무시할 정도로 작으므로 모든 저항은 액체 경막에서 일어납니다 (그림1).



(그림 1) 산소 기체가 액체로 전달 될 때 기체와 액체 경막 사이에 전달 저항을 받게 됩니다.

$K_L a$  (산소전달계수)란 시간당 얼마만큼의 산소를 공급할 수 있는지를 의미하는 상수입니다.  $K_L a$ 는 사용하는 bioreactor의 사양 즉, vessel의 직경 및 높이, impeller타입, rpm 등 다양한 parameter에 의해 영향을 받으며, scale-up을 할 때 유지해야 하는 중요한 factor입니다.  $K_L a$  수식은 다음과 같습니다.

$$K_L a = c (P/V) \alpha \beta (U_g)$$

$K_L$  : Mass Transfer coefficient  
 $a$  : interfacial area for mass transfer  
 $c$  : DO concentration  
 $P/V$  : power input per unit volume ( $W/m^3$ )  
 $\alpha, \beta$  : constant  
 $U_g$  : superficial velocity (m/s)

$K_L a$  는 impeller power 인  $P/V$  와 gas 공급량인  $U_g$  값의 곱으로 이루어져 있으며, 세 개의 상수인  $c, \alpha, \beta$  로 구성이 되어있습니다.  $c, \alpha, \beta$  는 유동적으로 움직이는 상수로 값이 정해져 있지 않아서  $K_L a$  값을 위의 수식을 이용해서 구하기 보다는 실험적으로 구하는 것이 일반적입니다.

## 2. $K_L a$ 의 측정 및 계산

$K_L a$  를 실험을 통해서 구하는 방법에는 크게, Dynamic method 와 Chemical sorption method 가 있으며, 일반적으로 Dynamic method 를 사용합니다.

Dynamic method 는 DO 가 100% 된 상태에서, 질소가스를 이용해서 용존 산소를 없애고, 다시 일정양의 gas 을 주입해서 시간 별로 DO 가 100% 될 때까지의 linear slope 을 의미하는데, 아래의 수식에서 보듯이 시간에 따른 특정 시간의 DO 농도의 변화를 의미합니다.

$$\frac{dc(t)}{dt} = k_L a (c^* - c_t) \quad k_L a = \frac{\ln\left(\frac{c^* - c_1}{c^* - c_2}\right)}{t_2 - t_1}$$

$$dc(t)/dt = K_L a (c^* - c_t)$$

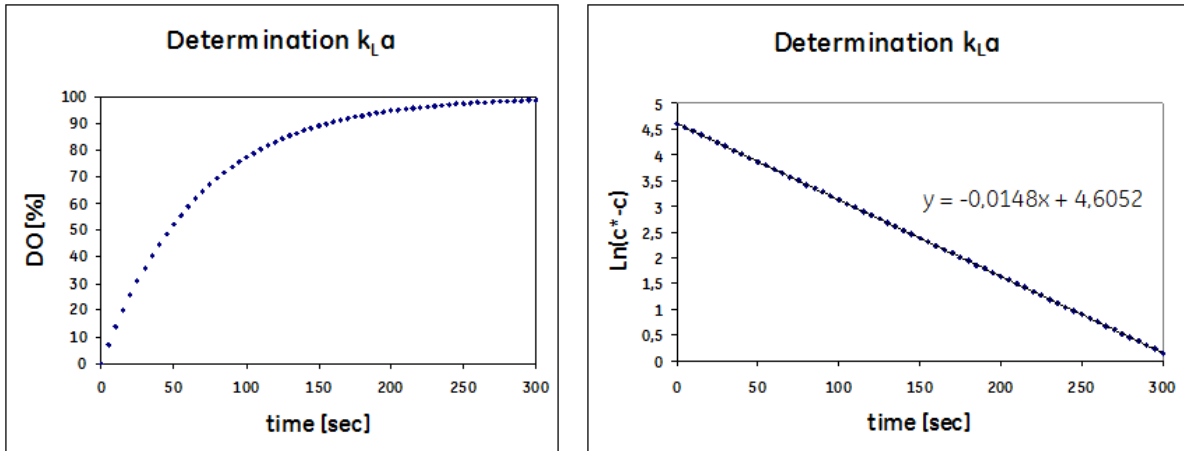
$c^*$  : mx. DO concentration

$c_t$  : DO concentration at specific time

Dynamic method 를 사용해서  $K_L a$  를 구하는 방법에 대해 자세히 살펴 보도록 하겠습니다. 먼저 bag 안에 100 % DO 를, 질소 가스를 이용하여 deoxy 시켜, DO 를 0%로 만듭니다. 그 뒤 원하는 air flow rate, rpm 을 셋팅 한 뒤 DO 가 0 에서 100 % 로 포화 될 때까지 기다립니다. 현재  $K_L a$  를 구하는 실험은 끝났고, 약간의 계산 과정이 필요합니다. 즉,  $K_L a$  는 특정 시간의 DO 의 농도 변화를 의미합니다.

(그림 2)에서 시간에 따른 DO 의 농도변화를 기록한 데이터로부터 100 % DO saturation 농도에서 현재 DO 농도를 빼고, 자연 로그를 취해서 그 slope 값인  $K_L a$  를 구하는 것을

보실 수 있습니다  $[(\ln(C_L^* - C_L)) = - K_L a (t)]$ . 만약 x 축이 초 단위라면 시간으로 변경하기 위해서 3,600 을 곱하면 됩니다.



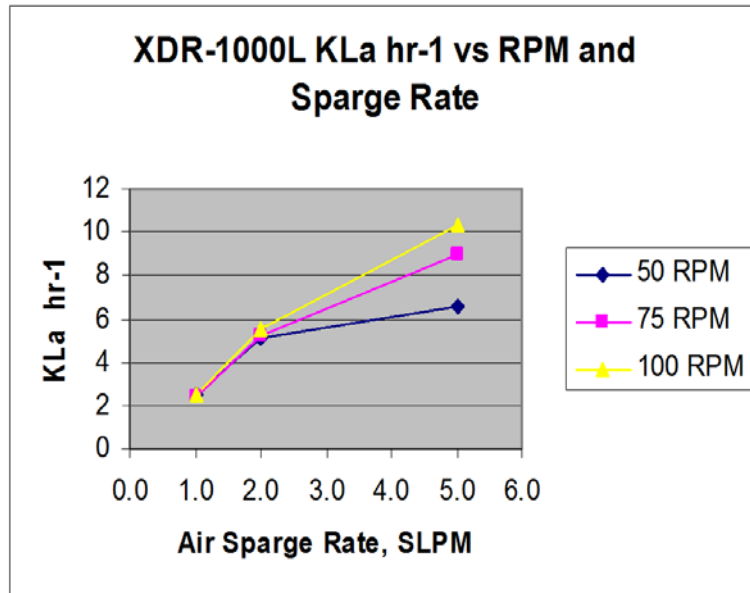
(그림 2) 시간대 별로 DO (%) saturation 되는 그래프 (좌측), 좌측 그래프에 자연 로그를 취한 그래프 (우측).

### 3. K<sub>L</sub>a값에 영향을 끼치는 요인

K<sub>L</sub>a 는 환경적으로 많은 인자에 의해 영향을 받습니다. 즉, 사용하는 sparger 타입, 배지 양, rpm, impeller 타입, 배지 점성의 정도, 압력, 온도 등에 따라 K<sub>L</sub>a 값이 변할 수가 있습니다. K<sub>L</sub>a test 를 할 때에는 최대한 실제 배양을 하는 조건과 비슷하게 셋팅을 하여야 비슷한 최적화된 K<sub>L</sub>a 값을 구할 수가 있습니다. 보통 배지를 이용하여 K<sub>L</sub>a study 를 진행하는 경우는 없으며, 만약 배지의 점성과 비슷하게 구현하고 싶을 때는 비 이온 계면활성제인 PF-68 을 첨가할 수 있습니다.

### 4. K<sub>L</sub>a 예시

(그림 3)은 XDR1000L scale 에서 각각 다른 air flow rate 변화를 주고, agitation 을 50rpm, 75rpm, 100rpm 변화를 주었을 때 K<sub>L</sub>a 값을 기록한 데이터 입니다. Air flowrate 1LPM, 2LPM 에서는 agitation 에 따라 K<sub>L</sub>a 변화가 없지만, 5LPM 에서는 각각의 agitation 변화에 따라 크게 두 배 정도의 차이가 생기는 것을 관찰 할 수 있었으며, 즉 K<sub>L</sub>a 는 gas flow rate 가 높을 때 agitation 에 따른 K<sub>L</sub>a 값에 크게 영향을 받는 것을 알 수 있었습니다.



(그림 3) Air flow rate 에 따라 agitation 변화를 주었을 때, KLa 값의 변동 그래프

## 5. OTR의 개념 및 예시

OTR이란 산소 공급율을 의미하며, KLa 값과 밀접한 관련이 있습니다. OTR 값은 시간 당 L 당 얼마만큼의 산소 (mg)를 공급했는지를 의미하며, KLa 값에 산소의 농도 변화율을 곱하여 얻을 수 있습니다. OTR 값을 통해서 얼마만큼의 산소를 공급했는지를 알 수 있기 때문에 최대 증식할 수 있는 세포의 양/농도를 계산 할 수 있습니다.

$$OTR = k_{La} \times (C_L^* - C_L)$$

OTR : Oxygen transfer rate (mg/L/h)  
 CL\* : maximum soluble concentration  
 CL : dissolved concentration

OTR은 사용할 시스템을 어떠한 환경에서 saturation 했는 지에 따라 그 값이 달라 집니다. Room air와 50% 산소로 시스템을 saturation 한 경우를 예로 비교한 아래 표를 설명하겠습니다.

|  | Aerated with Room Air   | Aerated with 50% Oxygen   |
|--|---|---|
| $c_L^*$  | <b>7.0 mg L<sup>-1</sup></b> (37°C, 1 atm, 21 %)  | <b>16.7 mg L<sup>-1</sup></b> (37°C, 1 atm, 50 %)   |
| $c_L$  | 1.4 mg L <sup>-1</sup> (Residual DO saturation, 20 %)   |   |
| $K_L a$  | 50 h <sup>-1</sup>  |   |
| <b>OTR</b><br><b>= <math>k_L a \times (c_L^* - c_L)</math></b> | 50 h <sup>-1</sup> x (7.0 - 1.4) mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup><br><b>= 280 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup></b>  | 50 h <sup>-1</sup> x (16.7 - 1.4) mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup><br><b>= 763 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup></b>   |
| <b>Cell consumes</b>   | ~ 8 pg O <sub>2</sub> cell <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> (CHO)  |   |
| <b>Maximum cell concentration</b>                              | (2.8 x 10 <sup>11</sup> pg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )/(8 pg O <sub>2</sub> cell <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) = 3.5 x 10 <sup>10</sup> cells L <sup>-1</sup><br><b>= 3.5 x 10<sup>7</sup> cells ml<sup>-1</sup></b> | (7.6 x 10 <sup>11</sup> pg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )/(8 pg O <sub>2</sub> cell <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) = 9.5 x 10 <sup>10</sup> cells L <sup>-1</sup><br><b>= 9.5 x 10<sup>7</sup> cells ml<sup>-1</sup></b> |

Room air인 1 기압 37 °C, room air에서는 L당 약 7 mg의 산소가 포함되어 있습니다. 현재 시스템에 남아있는 용존 산소량이 20 %라면, 80 % 용존산소량을 사용했음을 알 수 있습니다.  $K_L a$  값 (50 h<sup>-1</sup>)에 최대 산소량에서 남아있는 산소량을 뺀 값을 곱하면 280 mg O<sub>2</sub>/L/h의 OTR을 얻을 수 있습니다. CHO cell은 시간당 하나의 세포가 약 8 pg의 산소를 사용하므로 280 mg O<sub>2</sub>을 사용해서 세포가 증식 할 수 있는 최대 수는 약 3.5 x 10<sup>7</sup>으로 계산할 수 있습니다. 같은 방법으로 50 % 산소 saturation에서의 OTR 값을 계산 하면 763 mg O<sub>2</sub>/L/h 이고, 약 9.5 x 10<sup>7</sup>의 세포를 최대로 배양할 수 있습니다.

## 6. 요약

산소전달계수인  $K_L a$ 는 세포배양을 성공적으로 scale-up하기 위해서 일정하게 유지해야 하는 매우 중요한 상수이며 다양한 물리적인 환경에 의해 영향을 받습니다. 동물세포배양에서  $K_L a$ 값은 일반적으로 5~25 h<sup>-1</sup> 이며, 미생물 배양의  $K_L a$ 값은 보통 1,000 h<sup>-1</sup>을 넘습니다. 최적화한 배양 조건에서의  $K_L a$ 값을 실험적 방법으로 얻어서 적용하고, 산소농도구배에 따라서 배양할 수 있는 최대 세포 농도를 추정한다면 성공적인 scale-up을 진행하는 데 도움이 될 것입니다.