

## 실관 막 생물 반응기

김 인 호

충남대학교 공과대학 화학공학과  
(1994년 3월 25일 접수)

## Hollow Fiber Membrane Bioreactor

In Ho Kim

Dept. of Chem. Eng., Chungnam Nat'l Univ., Taejon 305-764, Korea

(Received March 25)

**요 약 :** 실관 막은 1970년대에 개발된 이래 인공신장기에 응용되어 막 장치개발의 대표적인 성공 예로 인용되고 있다. 실관 막을 생물 반응기로 사용하여 동물세포의 배양에 성공한 이래로 효소 고정화, 미생물 세포 배양, 그리고 식물 세포 배양에 이르기까지 실관막은 고농도, 고생산성 생물 반응기로 활발히 연구되고 있다. 본 총설에서는 실관 막을 이용한 생물 반응기의 연구 현황과 장래 전망에 대해 살펴보고자 한다.

**Abstract:** Hollow fiber membrane has been successfully developed as an artificial kidney device in the 1970's. In the early 1970's animal cells were introduced into a hollow fiber membrane cartridge and well propagated in the cartridge. Since then, hollow fiber membrane was utilized as a bioreactor in order to immobilize enzymes as well as to culture microbial cells and plant cells. In this review, the present status and the prospect of hollow fiber membrane bioreactor are investigated in view of cell density and product productivity.

### 1. 서 론

생물공학 제품의 생산과정에서 반응기와 분리장치는 중요한 자리를 차지하고 있다. 반응기로 지칭되는 발효조(Fermenter)는 보통 고반 액체 배양조이며 1940년대에 페니실린을 대량 생산하기 위해 미국 제약 기업과 정부의 공동 연구의 결과로써 탄생하게 되었다[1]. 다음으로 생물반응장치로서 중요한 것으로는 효소 고정화(Enzyme Immobilization) 반응기인데 1960년대의 많은 효소를 고정화하는 연구 결과로서 그 중 몇 가지가 산업화되었다. 즉 이성화당 반응기와 아미노산 라세미화 반응기가 그것이다[2]. 막

생물 반응기의 효시는 1963년 Gerhardt와 Gallup [3]에 의한 투석 배양기로서 배양조에서 세포 증식에 의한 저해물을 제거하고 영양분을 공급함으로써 회분 배양(Batch culture)에 비해 매우 높은 세포 농도를 얻을 수 있었다. 효소 고정화의 한 방법으로 한의여과막을 경계로 효소와 기질을 분리하여 효소 반응을 수행한 최초의 연구는 1970년에 발표되었다 [4]. 그 후 막을 이용하여 세포와 효소를 고정화하는 많은 연구가 발표되었으며 이에 대한 Review[5]가 최근 발표된 바 있다. 본 Review에서는 막 생물 반응기의 일종인 실관 막 생물반응기의 최근의 동향과 공학적인 문제에 대해 논의하려고 한다.

## 2. 동물세포 막 생물 반응기

동물세포를 막 표면에 고정화하는 연구는 1972년의 Knazek[6]의 연구로 거슬러 올라갈 수 있다. 그는 가는 tube상의 hollow fiber의 외벽에 쥐의 상피세포를 고정화하여 증식시켰다. hollow fiber는 Fig. 1과 같이 속이 빈 직경 1mm 미만의 가는 고분자 관으로 배양액이 내공(Lumen)을 통하여 흐르며 배양액 속의 영양성분이 확산되거나 한외여과(Ultrafiltration)된다. 관 밖에 있는 동물 세포는 관의 외벽에 붙어 자라거나 관과 관 사이의 공간에 고정화된다. 동물세포 고정화 장치로서 hollow fiber membrane bioreactor는 1980년대에 상업화되어 단일클론항체 생산에 큰 역할을 담당하고 있다[7-10]. Amicon사에서 개발한 이 시스템은 Fig. 2와 같이 펌프, 배양액 속이 빈 직경 1mm 미만의 가는 고분자 관으로 배양액 속의 영양성분이 확산되거나 한외여과(Ultrafiltration)된다. 관 밖에 있는 동물 세포는 관의 외벽에 붙어 자라거나 관과 관 사이의 공간에 고정화된다. 동물세포 고정화 장치로서 hollow fiber membrane bioreactor는 1980년대에 상업화되어 단일클론항체 생산에 큰 역할을 담당하고 있다[7-10]. Amicon사에서 개발한 이 시스템은 Fig. 2와 같이 펌프, 배양액 속이 빈 직경 1mm 미만의 가는 고분자 관으로 배양액 속의 영양성분이 확산되거나 한외여과(Ultrafiltration)된다. 관 밖에 있는 동물 세포는 관의 외벽에 붙어 자라거나 관과 관 사이의 공간에 고정화된다.

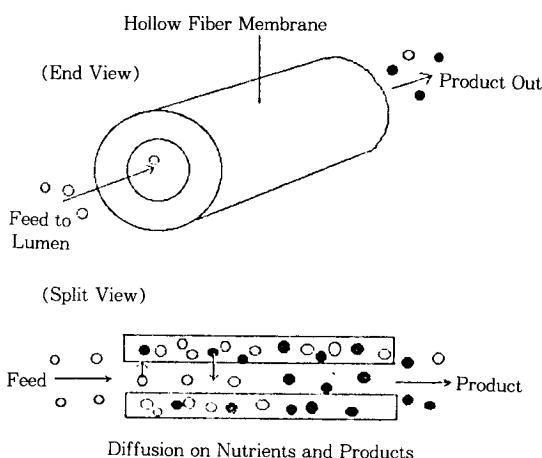


Fig. 1. Schematic diagram of hollow fiber bio-reactor.

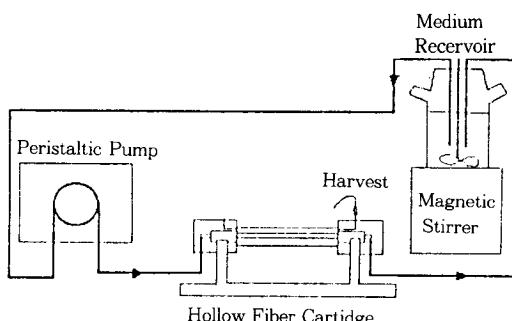


Fig. 2. Hollow fiber membrane animal cell culture device.

액, 저장조, hollow fiber cartridge로 구성이 되어 있다. 이 시스템은 쥐의 복강 배양이나 microcarrier를 이용한 혼탁 배양에 비해 많은 장점을 갖고 있다. 높은 세포농도, 장기간의 오염없는 연속배양, 조업의 간편성 등이 장점으로 제시되고 있다. 그리고 많은 종류의 동물세포가 hollow fiber에 고정되어 실험실에서 연구되었다(Table 1). Hollow fiber에서 일어나는 공학적 문제는 Fig. 3과 같은 Starling flow이다. 관의 상류에서는 한외여과가 관의 안에서 바깥으로 관의 하류에서는 한외여과가 관의 바깥에서 안으로 일어나며 세포증식도 이에 따라서 관의 하류의 표면으로 집중된다. 따라서 막 생물 반응기의 효율이 저하되며 이의 해석[16]과 새로운 형태의 hollow fiber bioreactor가 제시[17, 18]되었다. 한편 배양액을 lumen으로 넣지 않고 관 바깥에서 관안으로 한외여과시키며 세포가 관 외벽에 붙어 자라게 하여 starling flow효과를 제거시킨 방법도 제시되었다[19, 20]. 동물세포의 성장속도는 느리기 때문에 산소 공급의 문제는 액체 영양분의 공급 문제보다는 덜 심각하다. Silicone 재질로 된 관의 내벽에서 세포를 배양할 때 액체 영양분은 lumen으로 흐르고 산소는 관의 벽을 통해 바깥에서 확산되어 들어오는 시스템을 보고한 연구도 있다[21].

## 3. 효소 막 생물 반응기

효소는 고분자이며 한외여과 막을 투과하지 못하므로 효소를 한외여과 막장치에서 기질과 분리시켜 반응을 시키는 연구[4]가 수행된 이래 많은 실험실적 연구가 진행되었다. Rony[22]의 hollow fiber en-

Table 1. Cell Types Cultured in Hollow Fiber Systems

Organism	Tissue	Reference
Chick	Embryo	11
Duck	Embryo	11
Mouse	Connective Tissue	6
	Embryo	12
Hambster	Kidney	11
	Ovary	13
Monkey	Lung	11
	Kidney	12
Human	Foreskin	14
	Liver Hepatoma	15

zyme reactor 연구 아래 많은 종류의 효소가 hollow fiber 막의 sponge matrix(Fig. 4)에 고정되어 효소 반응이 일어났다. 실험적 연구는 Waterland 등[23], Davis[24], Lewis[25], Kohlwey and Cheryan[26] 등에 의해 수행되었고, 기질 전화율을 계산하기 위해 수학적 모델이 제시되었고 모델식의 컴퓨터 모사가 있었다[23, 27-28]. 막 장치에 고정시키는 방법은 hollow fiber 장치의 shell에 효소액을 고정시키고 기질을 recycle 시키거나(Fig. 5), 앞에서 언급한 바와 같이 sponge matrix에 효소를 고정시켜 확산에 의해 기질이 lumen으로부터 matrix에 전달되고 반응생성물이 matrix로부터 lumen에 역확산되는 방법이 있다. 확산속도는 확산계수의 함수이며 이 값은 자유로이 조절할 수 없다. 확산 대신에 한의여과에 의해 기질용액이 효소에 접촉하는 방법을 연구한 보고[27, 29-30]가 있다. 이 때는 기질의 전화율이 여과속도/확산속도에 비례하여 증가하며 반응기의 효율이 개선

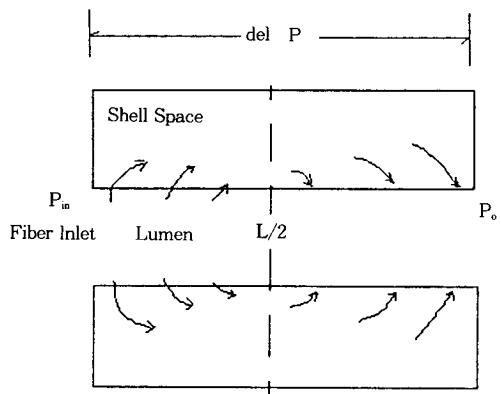


Fig. 3. Starling flow.

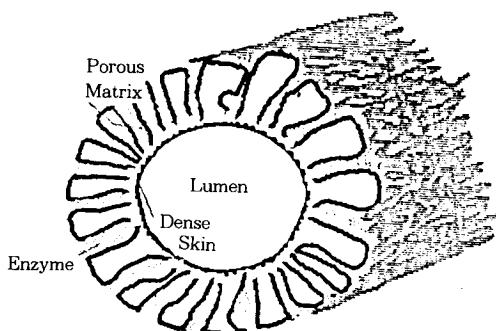


Fig. 4. Asymmetric structure of hollow fiber membrane.

된다. 효소 막반응기로서 상업화는 Degussa 회사에 의해 진전되었다. 광학 활성을 지닌 아미노산을 생산하는 공정이 개발되었고 이는 Wandery and Flaschel의 연구를[31] 상업화 한 것이다. 효소반응에 의해 조효소를 재생시킬 필요가 있을 때 막반응기는 유용하며 근래 연구가 많이 진행되고 있다[32-33]. NAD (P)나 ATP와 같은 조효소는 고가의 시약이며 효소 반응에서 이것들을 재사용하여 경제성을 제고시킬 필요가 있다. Fig. 6과 같이 기질과 고분자화시킨 ATP를 효소와 함께 반응시키고 생성물은 막을 통해 빠져나가고 ATP는 효소와 같이 막에 의해 차단되어 빠져나가지 못하게 된다. 앞에서 살펴 본 효소반응은 수용액 상에서 기질과 효소가 접촉하였으나 Lipase와 같이 oil상에서 반응이 일어나는 효소를 막을 이용하여 고정한 보고가 있다[34]. 소수성을 가진 hollow fiber 막의 lumen으로 olive oil을 훌려 보내면서 oil로 침침된 막의 세공 내에서 lipase가 효소반응을 일으키도록 하였다. 이 때 shell쪽의 glycerol로 안정화시킨 효소 수용액은 막에 침투된 oil로 인하여 lumen으로 전달되지 못한다. 이 때 사용된 막은 소수성의 정밀여과(microfiltration)막으로 구멍크기

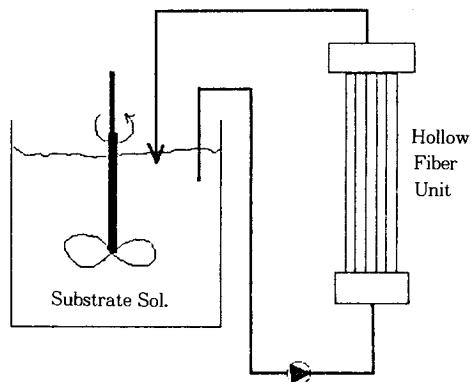


Fig. 5. Membrane recycle reactor.

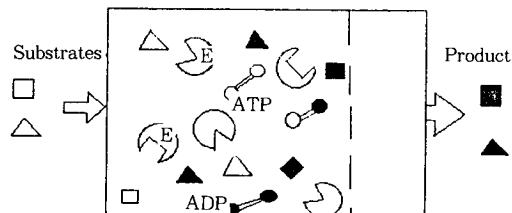


Fig. 6. Membrane bioreactor for the enzymatic reaction with cofactor.

$0.1\mu\text{m}^{\circ}$ 이며 oil이 없다면 효소가 새어나갈 수 있는 크기이다. Lipase를 reversed micelle에 고정시키고 olive oil을 micelle 내에서 분해시킨 후 ceramic막을 이용하여 생성물을 분리하는 분리 겸용 생화학 반응기로서의 막 생물 분리 반응기가 보고되고 있다[35].

#### 4. 식물세포 막 생물 반응기

식물세포 배양을 이용하여 유용 물질을 생산하려는 연구 노력은 1980년대에 활발하였으며, 식물세포 고정화 연구도 동시에 수행되었다[36]. 막에 식물세포를 고정화 한 연구는 효소, 동물 세포, 미생물에 비해 그 리 활발하지 못한 형편이다. 이는 식물세포가 생성물을 분비하지 못하고 생성물의 농도가 낮으며 증식 속도가 매우 느려 실험하기가 매우 어렵기 때문이다. Hollow fiber에 의한 식물세포 고정의 최초 보고는 Shuler에 [37] 의해 서이며 Jose 등[38]의 연구가 그 뒤를 이었다. 그들의 보고에 의하면 식물세포는 부착성이 약하고 막에 잘 붙지 못하기 때문에 shell 밀바닥에 세포가 침전되는 현상을 보였다고 한다.

#### 5. 미생물세포 막 생물 반응기

Hollow fiber를 이용하여 미생물 증식을 시킨 연구는 1980년대에 집중적으로 수행되었다. Kan과 Shuler는[39] 미생물을 키워 죽인 후 미생물을 내의 효소활성을 막 생물 반응기에 12일 동안 유지시켜 Urocanic acid를 생산하였다. Inloes[40]는  $\beta$ -lactamase를 생산하기 위해 대장균을, 그리고 에탄올을 생산하기 위해 효모를 hollow fiber에 고정시켰다. 대장균의 경우 세포는 Fig. 7과 같이 hollow fiber 바깥에 붙어 자랐으며 산소를 공급하기 위해 공기를 shell의 공간에 흘려 보냈다. 대장균 배양의 경우 효소 활성을 비교하면 hollow fiber의 경우 진탕배양 경우의 10% 수준으로 효소활성이 낮았다. 이는 산소전달의 제한 때문이라고 전자 현미경 사진으로 관찰한 세포의 형태로써 설명되었다. Vick Roy 등[41]는 젖산을 혼기 조건에서 생산하기 위해 *Lactobacillus delbreuckii*를 hollow fiber에 고정시켜 400g 건조증량/liter의 높은 세포 농도를 얻었다. Mehaia and Cheryan[42]은 주로 ethanol생산에서 hollow fiber bioreactor의 생산성에 대해 논의하였다. Hollow fiber의 shell공간에 미생물 배양액을 순환시킨 형태의 hollow fiber bioreactor

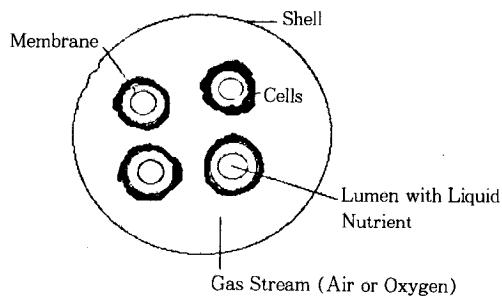


Fig. 7. Aerobic microbial hollow fiber membrane bioreactor.

[43]는 ethanol생산시 발생하는 탄산가스를 제거시키기 위한 방법이었다. 호기성 미생물을 hollow fiber에서 키울 때 부딪히는 가장 큰 문제점은 산소 전달의 제한이며 산소 전달에 대한 연구가 다수 발표되었다[44-46]. 산소 전달을 위해 silicone막과 액체 영양분 공급을 위해 고분자 hollow fiber을 동시에 사용한 dual hollow fiber reactor는 Robertson and Kim[47]에 의해 고안되었고 *Streptomyces aureofaciens*를 두 가지 막 사이에 고정시켰다. Dual hollow fiber는 그 후 *E. coli* [48], Citric acid 연속배양[49]에 사용되었다. 미생물세포 막 반응기로서 hollow fiber는 아직 상업화되지 못하였다. 이는 미생물세포의 증식속도가 동물세포에 비해 빨리 산소 전달을 원활히 할 수 없기 때문이다. 그리고 미생물 배양에서는 아직 발효조의 생산성 향상을 위한 연구가 많이 남아 있고 대규모 미생물 배양에서 막장치의 Scale-up문제가 많이 남아 있기 때문이다. 미생물 배양에서 생산성 향상은 주로 Fed batch방법에 의존하고 있고[50] hollow fiber bioreactor는 새로운 미생물 반응기의 idea를 실증하기 위한 도구로 주로 사용되고 있다. 미생물 반응과 생성물 분리가 동시에 일어나는 반응기로 막 생물 반응기는 여러 각도로 연구되고 있다. 에탄올을 추출할 수 있는 용제를 hollow fiber lumen으로 흘려 보내 shell 공간에서 효모에 의해 생산된 ethanol을 제거함으로써 효모의 ethanol 생산성을 향상시킨 보고[51] 및 추출발효의 수학적 모델 연구는[52] 근래 분리 겸용 막 생물 반응기의 연구 동향을 보여주고 있다. 기타 발효조 외부에 막장치를 연결하여 세포 농도를 높이기 위한 연구는 본 review에서 자세히 언급하지는 않겠지만 간단히 다룰 필요는 있겠다. Fig. 5의 recycle enzyme reactor

에서 enzyme 대신에 미생물을 사용하면 recycle membrane bioreactor가 되겠고, membrane 장치를 다양하게 선택할 수 있다. Membrane 장치로 사용할 수 있는 것은 투석기(dialysis unit), 한의여과기 혹은 정밀여과기(ultrafiltration or microfiltration unit), 그리고 전기투석기(electrodialysis unit) 등이 있다.

## 6. 실관 막의 재질과 제조 방법

실관 막을 제조하기 위해 사용된 재료는 대개 고분자 물질이며 polypropylene, polysulfone, cellulose acetate, polyacrylonitril 등이다. 이들 고분자 물질들을 관 형태로 성형하기 위해서 spinning법 [53]을 사용하고 spinning할 때 고분자 물질을 녹이는 방법에 따라 습식, 건식, 그리고 용융 spinning으로 분류한다. 최근의 보고에 의하면 알루미나, mullite 등의 무기 재료를 이용하여 Dupont 사에서 외경이 1.5~4.5mm인 비교적 직경이 큰 실관을 제조하였다는 보고가[54] 있다.

## 7. 실관 막 생물 반응기에서 생화학 물질의 생산

동물세포 배양기에서 생산할 수 있는 생화학 물질은 다양하며 인터페론과 같은 생화학 물질이 대표적인 예이다. 상업화된 실관장치는 주로 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 배양하며 쥐를 사용한 항체 생산보다 항체 생산성이 높기 때문에 생물 실험실에서 실험기기로 많이 판매되고 있다. 미생물을 배양하여 실관 막 생물 반응기에서 생산 가능한 물질은 미생물 균주에 따라 다양하며 urocanic acid, 에탄올, 젖산, 초산, 항생물질, 페닐알라닌과 같은 것을 열거할 수 있다. 그러나 이들 물질을 상업적으로 생산하기에는 실관 막 생물 반응기가 적합하지 않다. 아직 이 물질을 발효조에서 생산하는 것이 경제적으로 유리하기 때문이다. 효소를 고정화한 실관 막 생물 반응기는 독일 Degussa사에서 상업화되었다. D,L-아미노산의 혼합물에서 L-아미노산을 생산하는 공정을 개발한 것이다.

## 8. 결 론

Hollow fiber를 이용하여 동물세포, 효소를 고정화 시켜 상업적으로 bioproduct를 생산하게 된 단계까지

온 것은 과거 30년간 꾸준한 막장치와 생물공학의 발전에 힘입은 것이다. 미생물 반응기로서 막 생물 반응기는 발효조의 연속조업이 일상화되어 더 높은 생산성을 필요로 하는 생물 반응기가 필요하게 될 때 상업화가 본격화될 것으로 예상된다. 그 동안 실험실에서는 각종 아이디어가 구현된 막 생물 반응기가 보문으로 보고될 것이다.

## 감 사

본 연구는 과학재단 지원으로(92-24-0007) 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. J. E. Bailey and D. F. Ollis, "Biochemical Engineering Fundamentals", 600, McGraw-Hill Book Co., New York(1977).
2. O. Zaborsky, "Immobilized Enzyme", CRC Press, Cleveland(1973).
3. D. M. Gallup and P. Gerhardt, *Appl. Microbiol.*, 11, 506(1963).
4. T. A. Butterworth, D. I. C. Wang, and A. J. Shinskey, *Biotechnology and Bioengineering*, 12, 615(1970).
5. H. N. Chang and S. Furusaki, "Membrane bioreactors: Present and Prospects", *Adv Biochem. Engg.*, 44, 28(1991).
6. R. A. Knazek, *Science*, 178, 63(1972).
7. D. M. Bonfrio, *Amer. Biotech. Lab.*, Spring (1989).
8. A. H. Heifetz, *Bio/Technique*, 7, 192(1989).
9. J. Hopkinson, *Bio/Technol.*, 3, 225(1985).
10. A. Handa-Lorrigan, S. Nikolay, D. Jeffery, B. Hefferman, and A. Young, *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 58(1992).
11. A. D. Johnson, G. A. Eddy, J. D. Gangemi, H. H. Ramsburgand, and J. F. Metzger, *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 431(1978).
12. K. Ku, M. J. Kuo, J. Delente, B. S. Wildi, and J. Feder, *Biotech. Bioeng.*, 23, 79(1981).
13. R. Gonzalez-mendez, D. Wemmer, G. Hahn, N. Ward-Jardetzky, and O. Jardetzky *Biochim.*

- Biophys. Acta*, **720**, 274(1982).
14. J. M. Strand, J. M. Quarles, and S. A. McConnell, *Biotech. Bioeng.*, **26**, 503(1984).
  15. W. J. McAleer, H. Z. Markus, F. J. Bailey, A. C. Herman, B. J. Harder, D. E. Wampler, W. J. Miller, P. M. Keller, E. B. Bunvak, and M. R. Hillemann, *J. Virol. Methods*, **7**, 263(1983).
  16. J. P. Tarakan and P. C. Chau, *Biotech. Bioeng.*, **28**, 1064(1986).
  17. J. D. Brotherton and P. C. Chau, *ibid*, **35**, 375 (1990).
  18. J. P. Tharakan and P. C. Chau, *ibid*, **28**, 329 (1986).
  19. D. Patankar and T. Oolman, *ibid*, **36**, 97(1990).
  20. D. Patankar and T. Oolman, *ibid*, **36**, 104 (1990).
  21. T. H. Park and I. H. Kim, *Kor. J. Chem. Eng.*, **4**, 79(1987).
  22. P. R. Rony, *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 23(1972).
  23. L. R. Waterland, A. S. Michaels, and C. R. Robertson, *AICHE J.*, **20**, 50(1974).
  24. J. C. Davis, *Biotech. Bioeng.*, **16**, 1113(1974).
  25. W. Lewis and S. Middleman, *AICHE J.*, **20**, 1012 (1974).
  26. D. E. Kohlwey and M. Cheryan, *Enzyme Microbiol. Technol.*, **3**, 64(1981).
  27. J. E. Prenosil and T. Hediger, *Biotech. Bioeng.*, **31**, 913(1988).
  28. C. Kleinstuer and S. S. Agarwal, *ibid*, **28**, 1233 (1986).
  29. I. H. Kim and H. N. Chang, *AICHE J.*, **29**, 910 (1983).
  30. S. R. Reinken and D. M. Briedis, *Biotech. Bioeng.*, **35**, 260(1990).
  31. C. Wandrey and E. Flaschel, *Adv. in Biochem. Eng.*, **12**, 147(1979).
  32. W. Berke, H. J. Schutz, C. Wandrey, M. Morr, G. Denda, and M-R. Kula, *Biotech. Bioeng.*, **32**, 130(1988).
  33. M. Ikemi, N. Koizumi, and Y. Ishimatsu, *ibid*, **36**, 149(1990).
  34. M. M. Hoq, M. Koike, T. Yamane, and S. Shimizu, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3171(1985).
  35. D. M. F. Prazeres, F. A. P. Garcia, and J. M. S. Cabral, *Biotech. Bioeng.*, **41**, 761(1993).
  36. S. J. Sim, Ph. D. dissertation, KAIST, Taejeon (1994).
  37. M. L. Shuler, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **369**, 65 (1981).
  38. W. Jose, H. Pedersen, and C. Chin, *ibid*, **413**, 409(1983).
  39. J. K. Kan and M. L. Shuler, *Biotech. Bioeng.*, **20**, 217(1978).
  40. D. Inloes, Ph. D. Dissertation, Stanford University(1982).
  41. T. B. Vick Roy, *Biotech. Lett.*, **6**, 425(1984).
  42. M. A. Mehaia and M. Cheryan, "Membrane bioreactors: a new approach to fermentation of agricultural and food processing wastes", in Prospects in Biotech. and Appl. Microbiol., D. I. Alani and M. Moo-Young(eds), Elsevier, London(1986).
  43. T. H. Park and I. H. Kim, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 190(1985).
  44. K. Nishii, K. Sode, and I. Karube, *Biotech. Bioeng.*, **35**, 1155(1990).
  45. S. L. Paterson, A. G. Fane, C. J. D. Fell, and P. L. Rogers, *Biotech. Lett.*, **8**, 561(1986).
  46. J. M. Piret and C. L. Cooney, *Biotech. Bioeng.*, **37**, 80(1991).
  47. C. R. Robertson and I. H. Kim, *ibid*, **27**, 1012 (1985).
  48. B. H. Chung and H. N. Chang, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 209(1985).
  49. B. H. Chung and H. N. Chang, *Biotech. Bioeng.*, **32**, 205(1988).
  50. B. S. Kim, Ph. D. Dissertation, KAIST(1993).
  51. W. Kang, R. Shukla, and K. K. Sirkar, *Biotech. Bioeng.*, **36**, 826(1990).
  52. R. L. Fournier, *ibid*, **31**, 235(1988).
  53. M. Mulder, "Basic Principles of Membrane Technology," 61, Kluver Academic Publishers, Netherlands(1991).
  54. 이종협, 서울공대, 3·4월, 37(1994).