

특 집

“Bioreactor”

생물반응기

전기투석생물반응기

Airlift 생물 반응기의 설계

폐수처리용 생물반응기

동물세포 배양반응기

실관막 생물 반응기

장 호 남

김 인 호

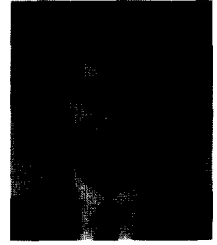
류희욱 · 장용근

박 용 석

오 덕 재

정봉현 · 심상준

생물반응기



한국과학기술원 생물공정 연구센터 장 호 남

1. 생물반응기의 전망

생물반응기란 bioreactor라고 하여 아미노산, 핵산, 항생제 등 여러 가지 대사물질의 생산에 사용되는 발효조, 고정화 효소를 충전한 충전탑 등을 쉽게 생각해 볼 수 있다. 이것이 이제까지 생물반응기에 가져왔던 고정관념이었고 지금도 이것이 중요한 부분을 차지하고 있음은 말할 나위가 없다. 학문이나 산업이 발전되고 세분화되면 새로운 학문분야가 태어나 첨단분야란 이름으로 각광을 받게 된다. 도약기, 성장기, 성숙기를 거쳐, 정지기, 쇠퇴기를 맞아 사라지기도 한다. 1973년의 생명공학은 성숙기에 있었고 현재의 세계 화학공업도 성숙기에 있다. 산업의 성숙기는 전체물량은 많아 GNP에 차지하는 비율은 크지만 성장율이 년 5% 이내로 완만한 상승세에 있다.

성숙기에 있던 산업도 생명공학처럼 어떤 계기를 맞아 새로운 산업으로 태어나면 첨단분야가 된다. 생명공학 중에 유전공학이 주도하는 신생물공학 분야는 첨단이지만 그외의 분야는 완만한 상승세의 성숙기에 있다고 하겠다. 이러한 기준에서 볼때 생물반응기 분야도 신생물공학처럼 첨단분야에 속하지는 않고 생명공학의 다른 분야처럼 신생물공학의 영향을 받아 발전을 하고 있는 분야라고 이야기 할 수 있겠다. 어떠한 학문분야라도 타분야의 도움없이 스스로 발전할 수도 있겠지만, 그렇게 되면 발전 자체가 느릴 뿐만 아니라, 경우에 따라 쇠퇴의 길을 걸어 없어지기도 한다. 전자산업의 진공관은 트랜

지스터의 발명과 함께 이 세상에 자취를 감춘 학문분야의 대표적인 예라고 할 수 있겠다.

2. 생물반응기의 역사 및 범위

생물반응기는 기원전 수 천년 전부터 생긴 맥주, 포도주 생물공학(biotechnology)과 역사를 같이 한다고 할 수 있다. 이러한 주류나 혹은 발효식품은 어떤 형태의 생물반응기를 사용해서 만들었을 것이기 때문이다. 그러나, 현재의 발효산업에 쓰이고 있는 생물반응기는 생물화학공학(Biochemical engineering)이란 학문분야의 탄생과 그 역사를 같이 한다고 하겠다. 즉 이차대전 당시에 열을 이용한 멸균과 통기(aeration)를 이용한 산소공급으로 근대식 생물반응기에서 페니실린을 생산하였기 때문이다.

1960년대 중반부터 1970년대 초에 걸쳐 새로운 기능을 가진 효소를 산업화하기 위하여 고정화효소법이 개발되어 충전탑형태의 생물반응기가 사용되었다. 1973년 신생물공학 시대 이후의 새로운 반응기의 필요성은 동물세포를 고농도로 키울 수 있는 것이었다. 생물반응기는 그의 주변학문인 생물학의 발전에 크게 의존하고 다음이 화학공학 및 기타 응용과학의 발전에 의한다고 할 수 있다. 1950년대의 Watson과 Crick에 의한 DNA의 발견에 따른 직접적인 영향을 받은 바 없다고 할 정도로 생물반응기의 hardware적인 발전은 없었다고 할 수 있다. 1960년대 말부터 single cell protein의 대량생산은

을 위한 생물반응기 중에는 에너지 소모가 적고 경제적인 혹은 기술적인 측면에서 유리한 air-lift형 발효기의 출현이 있었고, 1980년대에 들어서 동물 세포의 배양이 본격화하면서 shear가 적게 걸리고 고농도로 세포를 키울 수 있는 반응기의 필요성이 제기되었다.

Hardware적인 측면에서 반응기를 분류해 본다면

- 교반식 탱크 (stirred tank)
- 막형 반응기 (membrane bioreactor)
- 회전 원반식 (rotating disk bioreactor)
- air-lift 형
- 충전탑 형

생물반응은 그 운용방식에 따라

- 회분식 (batch)
- 연속식 (continuous)
- 유가배양식 (fed-batch)
- 고농도 연속 (continuous with high cell density)
- 추출발효 (extractive fermentation)

생화학 반응단계의 복잡성에 따라

- 효소반응
- organelles
- 미생물
- 동물 · 식물 세포
- 동물 · 식물체

로 분류할 수 있고 반응기의 규모는

- 실험실 용 (flask, roller bottle)
- 실험실용 반응기 (1, 2, 5, 10 L)
- pilot용 반응기 (30, 50, 100, 200, 300, 500, 1000 L)
- 생산시설 (5, 10, 30, 50, 100, 200, 300, 400 KL)
- 폐수처리시설 (활성오니법, deep shaft)
- 대형 생물시스템 (호수, 강, 바다, 지구)

반응물질의 균일성 여부에 따라

- 액체-기체
- 고체-기체

- 액체-액체

가 접촉하는 반응기의 종류로 나눌 수가 있다.

생산물의 종류에 따라

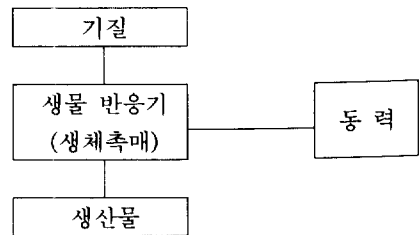
- 주류
- 항생제
- 아미노산
- 단백질
- 단백질
- 생물 고분자

등으로 분류할 수 있다

3. Integrated Approach

위에서 생물반응기의 여러가지 분류를 보았지만 생물반응기의 hardware 측면만 단순히 본다면 지난 50년간의 발전이란 그렇게 크다고 볼 수는 없다. 최근의 생물반응기 연구는 integrated approach를 취하는 경향이 있고 특히 미국을 중심으로 이러한 연구동향은 시작되어 전세계로 확산되어 가는 추세이다.

생물반응기의 궁극적인 목적은 생체촉매(효소 혹은 미생물)를 사용하여 필요로 하는 생산물 혹은 용역을 산업적인 규모에서 가장 경제적으로 생산하는 데 있다. 물론 여기에는 생체촉매, 기질, 생물반응기 그리고 이들을 적절히 운용하는 운영체계가 포함된다.



따라서 생물반응기 연구의 최근 동향은 생물반응 시스템에서 가장 key가 되는 생체촉매의 효율화에 많은 연구가 되고 있다. 이들 노력을 종합해 보면

- 효 소 ----- 단백질 공학
- 미 생 물 ----- 대사공학

동물세포 ----- 대사공학

특히 미생물이 아미노산을 생산하는 경우를 보면 많은 대사경로가 복잡하게 얽혀 있어 어떻게 하는 것이 대사경로를 효율화하는 지를 알기가 힘들다 이런 경우 이론적인 대상수율을 계산하고 이 수율이 실제 대사 생산물의 수율보다 훨씬 높을 경우는 대사경로의 제한 점을 찾아내어 그 부분의 효소를 보강하는 조치를 취한다. 대사경로가 잘 알려져 있는 경우는 이러한 노력으로 기질 비용을 절감한 사실이 동물세포의 경우 보고가 되고 있다. 그러면 각각의 반응장치에 대하여 알아 보고자 한다.

4. 효소 반응기

일본에서 바이오리액터란 주로 고정화 효소반응기를 의미한다. 즉 input→bioreactor→output의 개념으로 화학반응 시스템과 유사한 시스템을 바이오리액터라고 부르고 있다. 여기에 사용되는 촉매로는

- 효소
- 미토콘드리아, 클로로 플라스트 등의 organelles
- 미생물 균체
- 동·식물 세포

등이 있고 용도를 크게 분류해 보면

- 여러가지 유용물질의 생산
- 여러가지 화합물질의 정량
- 인공장기 등 의료에의 응용
- 환경오염물질의 분해제거

등에 활용되고 있다. 효소는 고정화 형태로 주로 산업에 이용되고 있으며, 고정화 방법으로는 다음과 같은 방법이 있다.

- 담체 결합법(공유, 흡착, 이온, 생화학적)
- 가교법
- 포괄법
- Hollow fibers, microcapsules
- 복합법

최근 연구가 많이 되고 있는 효소공학 분야로는

- 유기용매상의 효소반응
- 단백질 공학
- Cell-free 단백질 합성

등이 있다. 이제까지의 효소반응은 효소가 수용성임을 고려할 때 물에 잘 녹는 기질에만 적용이 가능했다. 즉 수용성-수용성 액체반응에만 활용이 되었었다. 그러나 많은 기질이 물에 녹지 않음을 생각할 때 모든 효소가 유기 용매상에서 활성과 안정성을 갖는다면 그 응용범위는 훨씬 넓어질 것이다. 단백질 공학도 마찬가지로 맥락에서 이해할 수 있다. Cell-free 단백질 합성은 생체내에서 일어나는 단백질 대사과정을 *in-vitro*에서 실현해 보자는 노력으로 흥미를 끈다. 효소반응을 산업적으로 잘 이용하기 위해서는 생물반응에 에너지원으로 쓰이는 ATP, NADP 등이 아주 싼 값으로 공급되도록 이에 대한 연구가 많이 이루어져야 할 것이다.

5. 미생물 반응기

미생물반응기는 생물반응기로 불리기보다는 발효기(fremmentor)로 불리는 교반반응조가 주종을 이룬다. 에너지 절감과 low-shear형으로 air-lift형 반응기가 산업적으로 활용되고 있지만, 아직도 90% 이상의 발효기가 교반형이다. 미생물배양에 생물반응기라고 불리는 것은 현재의 반응기의 운전양식이 대부분 회분식인데 비해 효소 반응기의 경우처럼 연속 고효율화의 개념이 포함되어 있다고 해야 할 것이다. 따라서 효소반응기처럼 균체의 고정화라든가 혹은 막을 이용한 고농도 연속배양방법 같은 것을 생각해 볼 수 있을 것이다.

유전공학시대 이후 미국의 생물화학전공자들은 초기에는 고 생산성 생물반응기 연구에, 최근에 와서는 대사경로의 최적화를 통한 생산물의 최적화에 주력하고 있다. 즉 integrated approach를 취하고 있다.

미생물반응기분야에서 고농도를 얻기 위한 방법으로

- 세포 고정화
- 세포 재순환

의 두 가지 방법이 있으며 세포재순환 방법으로는

- 침전
- 원심분리
- 실관반응기
- 내부 필터

의 가지 방법이 있다. 세포고정화의 경우는 효소의 경우와는 달리 세포가 살아있어 고정화를 하더라도 계속 자라 담체가 부스지는 경우가 있다. 고정화세포에서 더욱 더 큰 문제는 고정화 담체 내까지 산소전달이 용이하지 않다는 점이다. 산소의 용해도가 불과 8 mg/L에 불과해 포도당의 농도가 통상 100 g/L인 것에 비하면 호기설발효는 고정화 담체로는 불가능하다는 결론이 나온다. 세포 재순환의 경우도 마찬가지이다. 즉 충분한 산소의 공급없이는 고농도로 호기성 발효를 하는 것은 불가능하다는 결론이 쉽게 유도된다.

협기성 발효 ----- 고정화 세포재순환
호기성 발효 ----- 세포재순환

호기성 발효를 하는 균체를 고정화 하더라도 산소가 잘 공급되는 부분에만 균체가 자랄 뿐이다 다공성 폴리프로필렌 hollow fiber의 외부에 실리콘막으로 이중실관을 만들고 외부로 터 산소전달을 용이하게 한 이중실관 반응기(dual hollow fiber bioreactor)는 산소전달에 소요되는 동력비가 없어 꿈의 반응기라고 할 수 있겠다. 그러나 현재 이용가능한 폴리머 막은 너무 유연해 대형 반응기로 스케일업 할 수 없는 단점이 있다.

현재의 산업발효공정은 거의 대부분이 유가배양식(fed-batch)으로 이루어지고 있기 때문에 연속 발효의 개념이 잘 적용되지 않고 있다. 그러나 최근 알콜발효에서 6~8개의 반응조를 연결한 연속발효가 산업적으로 시행되고 있고 당밀로 알콜을 만드는 경우는 효모를 원심분리기로 분리해내는 방법이 실용화되어 있다. 효모의 경우는 균체가 커서 원심분리가 용이하지만 대장균 같이 균체가 작은 박테리아의 경우는 원심분리가 잘 적용되지 않는다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 등장한 것이 hollow fiber를 이용한 고농도 세포배양인데 고농도 세포배양은 가능하지만 외부에 정착된 hollow fiber를 통

하여 우리가 원하는 dilution rate를 얻으려면 막 면적을 크게 하던지 아니면 외부순환 속도를 빠르게 하여 flux를 크게 하는 수 밖에 없다. 가장 최근에 개발된 내부필터형 반응기는 이러한 단점을 거의 다 해결하고 있어 그 성과가 기대된다.

6. 동물세포 배양기

동물세포 배양기는 배양하고자하는 세포주의 특성과 생산물의 종류에 따라 적절하게 선택되거나 개발되어야 하는데, 그 중에서도 세포주의 특성은 반응기를 결정하는데 있어서 가장 기본적인 기준이 된다. 즉, 세포가 증식할 때 붙어서 자랄 수 있는 표면을 필요로 하는 섬유아 세포 같은 부착성 세포인가 그렇지 않고 하이브리도마 같은 부유성 세포인가에 따라 현재까지 반응기가 연구 개발되어 왔다. 현재까지 알려진 동물세포 배양기에는 부착성 세포의 경우에 roller bottle, 미립담체, 충전층, 막 반응기 등이 있으며, 부유성 세포반응기에는 STR, air-lift, spin filter, 세라믹 matrix에 고정화하는 방법, 그리고 hollow fiber 등이 주로 이용되고 연구 되어 왔다. 산업적으로는 현재 대부분 부착성 세포 배양에는 scale-up이 비교적 쉬운 미립담체를 이용한 STR 조업이나 roller bottle이 주종을 이루고 있으며, 부유성세포 배양에는 대부분 STR에 몇가지 특수한 impeller 설계를 가하여 조업하고 있는 실정이다. 최근에는 이들 세포주의 특성을 모두 살릴 수 있는 반응기의 개발에 주력하고 있으며, 부착성과 부유성 세포를 동시에 배양할 수 있는 반응기 몇 가지가 연구개발 단계에 있다. 예를 들면, 폴리에틸렌 disk 충전층에 세포를 부착하거나 고정화하여 배양하는 방법이나, 기타 폴리 스타이렌, 폴리우레탄 등 여러가지 고분자 재료 또는 유리섬유 등의 섬유재질을 이용하여 충전층 반응기의 형태로 조업을 시도하여 좋은 결과를 많이 얻고 있다. 본 연구실에서도 원통형 폴리프로필렌 필터를 이용하여 부유성 세포인 하이브리도마 세포를 연속배양하여 단일클론항체를 생산해 본 결과 높은 생산성과 안정된 조업을 할 수 있었으며, 또 약간의 표면처리를 거쳐서 부착성 동물세포인 Vero 세포와 혈전용해제를 생하는 재조합 CHO 세포를 성공적으로

배양할 수 있었다. 이 반응기는 저렴한 가격, 균일한 품질, 높은 s/v value (ca. 600 cm³/cm²), 고온멸균이 가능하다는 것 등과 세포주에 따른 반응기의 재설계 등이 필요하지 않아 새로운 생물반응기로서의 높은 가능성을 가지고 있다. 반응기의 조업방식으로는 동물세포배양에서 주로 어렵다고 여겨지던 유가식 배양이 on-line HPLC 등의 기술이 발전함에 따라 가능하게 되었으며, 각광을 받는 조업형태가 될 것으로 생각된다. 앞으로의 동물세포 반응기는 고부가가치의 의약품 생산에 주로 쓰이게 될 것으로 기대되기 때문에 회분식 반응기처럼 생산물에 따른 높은 적응력과 균일한 생산물의 품질, 또 쉬운 조업 등에 초점을 맞추어 많은 연구가 진행되리라 보고 여진다.

7. 기 타

이 외에도 쥐, 염소, 돼지, 소 등의 동물에 유전자를 클로닝하여 우리가 원하는 단백질을 생산할 수가 있다. 동물세포배양이 혈청배지 등 경비가 많이 소요되는 데 비해 동물자체를 이용하는 경우는 생산비가 쌀 수도 있다. 문제는 스케일-업인데 생물반응기를 스케일-업 할 경우는 반응기를 키움으로써 인력이나 경비면에서 많은 절약이 있어 생산비가 싸지지만 많은 동물을 키우는 경우 생산비가 싸지지는 않을 가능성이 있다. 따라서 소 한 두마

리나 돼지 이 삼십마리 정도로 유용물질을 생산하는 경우는 경제성이 있을 수 있으나 많은 동물의 경우는 경제성이 의문시 된다.

식물의 경우는 유전자조작이 제대로 되지만 하면 대량생산자체는 크게 문제가 없다. 그러나 번식하는 경우 유전적 특성이 보존되지 않아 우리가 원하는 물질을 여러 식물개체가 골고루 생산할 지는 의문이다. 현재 생분해성 플라스틱 재료인 PHB(poly-hydroxybutyric acid) 등을 식물에서 대량생산하고자 노력이 진행되고 있다.

참고문헌

1. 福井三郎, 杉野幸夫, (1985), “細胞培養技術”.
2. 福井杉郎, (1985), “バイオリアクター”.
3. Ho Nam Chang, (1987), “Membrane Bioreactors: Engineering Aspects”, *Biotechnol. Adv.*, **5**, 129-145.
4. Ho Nam Chang and Furusaki Sintaro, (1991), “Membrane Bioreactors: Present and Prospects”, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **44**, 27-64.
5. 장호남, 유익근 (1993), “Membrane Bioreactors”, 생물공정 연구의 최근동향, Vol. 3, 128-142.
6. 전영중 (1993), “충진층 생물반응기를 이용한 생물공학제품의 산업화 동향”, 생물공정 연구의 최근동향, Vol. 3. 143-157.