

동물세포 배양반응기



제일제당 종합연구소 오 덕 재

서 론

동물세포 배양 기술은 국제적으로 볼 때, 이 분야에 대한 연구가 본래도에 오른 이후 약 20여년에 걸쳐 지금까지 활발한 연구가 진행되고 있으며, 현재 국내외의 대학과 기업체, 연구소에서도 중요한 생물공정기술의 하나로서 인식되어져, 약 10여년간의 집중적인 연구와 더불어 질과 양에 있어서 상당히 발전된 분야이다. 최근에는 조직공학 (tissue engineering)이라고 하여 생체의 특정 조직을 치료, 보완, 대체하는 기술이 개발되고 있어서 그 중요성과 응용성이 확대되면서, 또다른 전기를 마련하고 있다.

동물세포를 생체에서 분리하여 *in vitro* 상태에서 배양하게 된 것은 100여년 전에 Harrison 박사와 Carrel 박사 등에 의해 시도되어 오랜 역사를 지니는데, 초기에는 생체에서 기관 (organ)이나 조직 (tissue)의 단위로 분리하여 식염수나 혈청 등의 용액안에 넣은 다음 생체조직으로서의 활성을 유지, 보존시키고자 하는 연구가 주로 수행되었다. 1950년대에는 효소를 이용한 세포의 개별 분리와 함께 Hela cell과 같은 세포주를 얻게되었고, 이어서 1960년대에 들어서면서 정상세포의 배양도 가능하게 되었다. 10여년 전에 국내에서 세포배양 (cell culture)이 조직배양 (tissue culture)이라는 단어와 혼용되었던 것을 기억하는데, 이는 발전된 세포배양 기술을 조직배양의 한분야로만 간주했기 때문으로 생각되어지며, 현재는 명확하게 구분되어 사용되고 있다. 한편 Eagle에 의한 세포 배양용 기본배

지의 개발은(Eagle, 1959) 인위적인 환경과 영양분의 공급으로 대부분의 세포가 실험실에서 충분히 배양될 수 있다는 것을 실현시켜 준 것으로, 이후로 DMEM, RPMI 1640, IMDM, F-12, McCoy 등 수많은 종류의 배지가 개발되었다. 최근에는 배지중에 혈청을 넣지 않고 세포를 배양할 수 있는 무혈청 배지 (serum-free media)가 개발되고 실용화되어 있고, 배지의 성분 조절을 통해 생산성을 향상시키는 기술도 확립되어 있어서 (Jo et al., 1991), 세포 배양은 그어느때보다도 황금기에 있다고 할 수 있겠다. 동물세포 배양이 생물공학 분야에서 중요한 이유는 여러가지가 있겠으나, 가장 중요한 것은 세포 그자체를 포함한 고부가 가치의 생산물을 얻을 수 있다는 것이다. 이와 같은 동물 세포 유래의 생산물로 현재 산업적인 규모로 생산되거나, 대량생산이 필요한 것으로는, 각종 백신, 단일군 항체, 호르몬 및 여러가지 factor 등이 있는데 (표 1), 1980년대 이후로 이들을 생산하고자 하는 선진 각국의 노력이 활발하게 추진되어 왔다.

한편, 미생물에 대한 유전자 재조합법 등의 개발로 동물세포에서만 합성되던 단백질들을 미생물을 통하여 생산하는 기술이 확립되어 있으나, 동물 세포내에서만 정확하게 실행되어지는 단백질 분자의 folding과 post-translational modification 등이 미생물에서는 불완전하게 이루어져 활성을 잃게되는 단점이 있고, pyrogen과 같이 미생물로 부터 유래한 endotoxin이 생산물에 섞여 있을 수도 있으며, 미생물로부터 생산되는 각종 단백질로부터 원하는

Table 1. Products from animal cells

Viral Vaccines	Human and veterinary
Antibodies	Monoclonal antibodies
Interferons	Fibroblast and lymphoblastoid
Enzymes	E.g. Fibrinolytic
Whole cells	Cells and organelles
Insecticides	Insect viruses
Immunoregulators	e.g. Interleukins
Hormones	e.g. Insulin
Growth factors	e.g. Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), nerve growth factor (NGF)

유용 단백질을 분리하기 어려운 것 등, 현실적으로 많은 어려움을 가지고 있기 때문에 미생물을 이용하기보다 동물 세포 배양을 통하여 위와 같은 제제들을 생산하려 하고 있다. 유전자 재조합 기술은, 현재 미생물뿐만 아니라 동, 식물 세포에 대하여도 적용되어 있어서 각종 유용생산물들 동, 식물세포의 유전자 조작을 통해 얻을 수 있는 단계에 와 있으며, 이는 유전자 치료 (gene therapy)와 같은 의료분야에 까지 확장될 수 있게 되었다. 표 2에서는 동물 세포를 배양할 때와 미생물을 이용할 때의 각각의 특징을 보여주고 있다.

동물 세포 배양기

동물 세포 배양기는 배양하고자 하는 세포주의 특성과 생산물의 종류에 따라 적절하게 선택되거나 개발되어야 한다 (Cartwright, 1987; Mizrahi, 1986; Ratafia, 1987; Rhodes and Birch, 1988; Spire, 1988a,b). 그중에서도 세포주의 특성은 반응기를 결정하는 데 있어서 가장 기본적인 기준이 되는데, 세포가 증식할 때 붙어서 자랄 수 있는 표면을 필요로 하는가의 여부가 1차적으로 중요한 선택 기준이 된다. 세포가 증식하기 위해서는 붙어서 자랄 수 있는 표면을 반드시 필요로 하는 세포를 '부착성 세포 (anchorage dependent cell)'라 하고, 표면을 필요로 하지 않는 세포를 '부유성 세포 (anchorage independent cell)'라고 한다. 부착성 세포의 대표적인 예로는 mouse 3T3 cell과 같은 섬유아세포 (fibroblast)가 있으며, 부유성 세포의 예로는 혈액

Table 2. Comparison between animal cell and bacterial cell

	Animal cells	Microbial cells
Post-translational modification	yes	limited
Structural conformation	active	often inactive
Product form	extracellular	intracellular
Down stream purification	moderate/easy	complex
Clinical trial	moderate	severe

에서 분리할 수 있는 각종 임파구(lymphocytes) 및 이들의 하이브리드화 된 hybridoma cell 등이 있다.

일반적으로 세포의 계대 배양을 위해서는 세포의 종류에 관계없이 세포 배양용 flask (T-flask)나 petri dish를 사용하지만 미생물의 경우와는 달리 표면 처리가 되어 있어 세포의 부착이 용이하게 되어 있다. 한편, 배양 규모가 커지게 되면 세포의 종류에 따라 배양 방법이 다른 배양기 (생물 반응기)를 사용하게 되는데 세포가 생산해 내는 생산물의 양이 배양 배지중에 수 ppm 단위로 녹아 있고 그 생산 속도도 느리기 때문에 대부분의 세포배양기의 경우에 고농도 세포 배양법을 채택하여 생산성을 높이려 하고 있다 (Chang, 1987; Murakami, 1990).

현재까지 개발된 동물 세포 배양용 생물 반응기는 부착성 세포의 경우에 roller bottle (Nardelli and Panina, 1976), microcarrier (van Wezel, 1967), packed bed (Kadouri et al., 1988; Perry and Wang, 1989), hollow fiber (Knazek et al., 1972; Quarles et al., 1980) 등이 있고, 부유성 세포의 경우에 macroporous microcarrier (Dean et al., 1987; Nilsson et al., 1986), air-lift fermenter (Wood and Thompson, 1987), spin filter (Himmelfarb et al., 1969; Tolbert et al., 1981), microencapsulation (Lim and Sun, 1980), ceramic matrix (Lyndersen, 1987; Putnam, 1987), packed bed (Lazar et al., 1988; Ramirez and Mutharasan, 1989), hollow fiber (Altshuler et al., 1986) 등이 있다. 이렇게 여러가지로 개발된 반응기들은 나름대로의 특징들이 있어서 절대적인 비교는 어렵지만, 배양하고자 하는

Table 3. Comparison of s/v values in culture systems for anchorage dependent cells

	Surface Area (cm ²) total	/mL medium	/mL culture volume
Roux	175-200	2	0.2
Roller	750-1500	4	0.3
- Spiral film	8,500	5	5
- Glass tubes	5,000-340,000	2	4 ^b
- Plates	6,300-17,000	6-10	3-5
Multitray	6,000-24,000	2.5	0.5
Hollow fibers	1,000-5,000	(30)	(25) ^b
Ceramic matrix	42,500-180,000	40	35 ^b
Plastic bags	300 ^a	5	5
Plastic roll	25,000	25	20
Glass bead propagator	2×10 ^{6a}	20	19 ^b
Multisurface propagator	2.5×10 ⁷	1.1	1.0
Stack plate fermenter	3.5×10 ^{5a}	1.7	1.3
Plate exchanger	2×10 ⁴ -1.5×10 ⁷	6.7	3 ^b
Microcarrier 5 g/L	30×10 ^{6a}	30	24 ^b
15 g/L	2×10 ^{6a}	90	75 ^b

^aAt known maximum culture systems, not the maximum potential

^bPlus reservoir and control equipment.

세포의 특성과 생산물의 종류, 생산 scale 등에 따라 적절한 것을 선정하여야 할 것이다.

부착성 세포 배양기의 경우에는 반응기의 전체 부피중에서 세포가 자랄 수 있는 표면적의 비율인 s/v 값이 중요한 비교 지침이 된다. 우선 s/v 값이 큰 배양기는 그 값이 작은 배양기보다 더 높은 농도로 세포를 배양할 수 있고, 따라서 높은 반응기 생산성을 가진 배양기가 된다. 이와 같이 s/v 값이 우선적으로 고려되고 난 뒤에, 표면에 세포가 잘 부착되는 정도 및 세포의 탈착, 회수의 용이함, 조업 방법의 편리성 등이 비교되어야 할 것이며 배양 시스템의 가격도 고려되어야 할 것이다. 배양기의 종류 및 그 표면적의 비교는 표 3에 나타나 있다 (Griffiths, 1988). 이에 의하면 s/v 값은 hollow fiber와 ceramic matrix, microcarrier가 다른 배양 장치에 비하여 높게 나타나 생산성이 뛰어난 것으로

생각된다. 그러나 hollow fiber의 경우에는 membrane이 세포에 의해 막히는 현상이 쉽게 관찰될 수 있으며, microcarrier의 경우에는 carrier의 내부에 있는 micropore의 표면적은 세포가 이용할 수 없는 면적이 되어 실제의 표면적은 계산된 값의 약 1/20 정도로 줄어들게 된다. hollow fiber의 경우에는 s/v 값을 더욱 높이기 위해 반응기의 ECS (extracapillary space)에 microcarrier를 넣어서 배양하는 연구가 수행된 적도 있으며 (Strand et al., 1984a,b), microcarrier에서는 macroporous microcarrier가 개발됨으로 세포 부착이 유효한 표면적을 10배 정도 증가시킬 수 있었다 (Technical report: Verax Corp.). 한편, s/v값과는 별도로 세포의 부착과 증식이 용이하도록 부착표면의 생물학적, 화학적 처리도 매우 중요하다고 하겠다.

부유성 세포용 반응기는 미생물의 경우와 마찬가지로

가지로 배지 중에 단위세포로 분리하여 현탁 배양 (부착성 세포의 경우에는 담체에 부착시킨 뒤 현탁 배양)할 수 있으나 (Leist, 1990; Tovey, 1980; Zwerner et al., 1981), 단위 세포당의 비생산성이 매우 낮기 때문에, membrane이나 세포 침강조를 사용해 세포를 배양조에 머무르게 하거나 (Brennan et al., 1987; Himmelfarb et al., 1969; Kitano et al., 1986; Kybal and Sikyta, 1985; Martin et al., 1987; Takazawa et al., 1988; Tolbert et al., 1981), 세포를 고정화시켜 고농도로 배양하는 perfusion culture system이 효과적인 배양 기술로 인식되고 있다. 부유성 세포 중에서는 하이브리도마가 많은 연구에서 그대상이 되어 왔는데 이러한 하이브리도마의 배양을 위해 다양한 배양 시스템이 시도되어 왔다. (Brennan et al., 1987; Corrigan, 1988; Fazekas, 1983; Kurosawa et al., 1991).

세포의 종류에 관계없이 세포의 고정화는 일반적인 현탁 배양에서 항상 문제가 되고 있는 shear stress를 효과적으로 막아줄 수 있고, 세포간의 접촉에 의해 균형된 세포 성장을 실현시킬 수 있으며, autocrine 등에 의한 자기 증식 및 주변 세포의 성장을 효과적으로 증진시킬 수 있는 장점이 있다. 또한 많은 경우에 있어서 세포의 비생산성이 향상되고 있으며 조업안정성도 증가되고 있다 (Lee et al., 1993). 따라서 현재 상업적으로 상품화되어 있는 세포 배양 장치들은 대부분 세포의 고정화를 장치의 기본 공정으로 하고 있다 (Brunt, 1986; Familletti and Fredericks, 1988; Nilsson and Mosbach, 1980; Nilsson, 1987; Scheirer, 1988). 그러나 세포의 고정화에 의해 세포가 고농도로 성장하게 되면 고정화된 세포층으로의 기질 공급이 제한되고, 세포로부터 생성되는 여러가지 toxic waste를 신속히 제거해 주기 어려워지며, 고정화 방법에 따라서는 배양 공정이 복잡해 지거나, 연속 배양이 어렵고, scale-up에 제한을 받을 수 있다. 따라서 이와 같은 문제점들을 해결하면서 효과적으로 동물 세포를 배양할 수 있는 고정화 배양장치의 개발이 필요한 상태이다.

세포의 고정화는 크게 hollow fiber류, microencapsulation 및 adsorption, entrapment 등으로 나눌 수 있다. 일반적으로 부유성 세포의 경우에 위의

고정화 방법 등을 이용하여 고농도로 세포를 배양하고 있으며, 부착성 세포에도 이용될 수 있도록 고안된 배양 장치도 있는데 중요한 몇가지 배양기의 특징과 문제점을 지적하고자 한다.

고농도 세포배양 반응기

실관 반응기

실관 반응기는 현재까지 개발된 동물 세포 배양기 중에서 하이브리도마 세포를 고농도로 연속 배양하는 데에 매우 널리 이용되고 있는 반응기 형태이다. 실관 반응기는 1972년 Knazek에 의해 처음 개발되었는데, 생체 조직에 혈관이 분포하여 각종 영양분과 대사물을 제공, 수송하는 생체 system을 모사한 생물 반응기 형태로서, 여러가닥의 실관 다발과 바깥벽 사이의 공간(ECS, extracapillary space)에서 세포가 성장, 증식한다. 이때 배지는 생체내의 혈관처럼 실관막을 통해 공급되는데, 막을 통한 반지름 방향의 기질 확산과, 배지가 실관을 지날 때 생기는 압력 강하로 기인된 ECS내의 배지의 약한 흐름이 ECS 내의 세포에게 새로운 배지를 공급하고 대사 산물을 제거하는데 중요한 역할을 한다. 실관 반응기가 처음 개발된 이후 생물학적 활성이 있는 효소나 미생물을 실관 반응기에 고정화하여 생물반응기로 사용하려는 시도도 있었지만 (Park and Kim, 1985; Robertson and Kim, 1985), 생체 시스템의 모사 형태인 실관 반응기는 동물 세포의 고정화 배양에 더욱 많이 이용되었다 (Chick et al., 1975; Chick et al., 1977; Ehrlich et al., 1978; Gallagher et al., 1987; Hopkinson, 1985; Knazek et al., 1974; Piret and Cooney, 1990). 특히 하이브리도마 세포의 배양에서는 실관막의 MWCO (molecular weight cut off) 값을 적절히 조절함으로써 고농도의 항체를 얻는 효과도 얻을 수 있었다 (Evans and Miller, 1988; Altshuler et al., 1986). 그러나, 실관 반응기에서는 세포가 ECS에서 고농도로 배양될 때, 살아 있는 세포의 층으로 배지중의 영양분 전달이 원활하게 이루어지지 않는 확산 제약 (diffusion limitation)을 비교적 쉽게 받을 수 있다. 기질의 성분중에서 산소의 경우에는 이와같은 현상이 매우 심각하게 나타나는데 (37°C 배지에 공기

중의 산소로 포화시킬 수 있는 산소의 양은 7.6 ppm 정도이다.), 실관반응기에서 고농도로 자란 세포가 산소 결핍상태에 놓이게 되는 것은 이미 여러 연구에서 확인되어 발표되었다 (Belfort, 1989; Chang and Moo-Young, 1988). 이러한 확산 제약은 실관속을 흘러가는 배지의 방향을 수시로 바꾸어 준다거나 (Piret and Cooney, 1990), ECS 내의 배지를 강제적으로 뽑아내 세포층에서의 배지 공급이 원활하게 하는 등 조업상의 변화로 (Tharakan and Chau, 1986a,b) 실관 반응기의 구조적 문제점이라 할 수 있는 확산 문제를 근본적으로 해결하려고 하였으며, silicone hollow fiber를 사용, 배양기의 구조를 바꾸어 산소전달 등이 용이하도록 한 경우도 있었다.(Oh et al., 1992)

Microencapsulation을 이용한 배양장치

고정화 방법의 하나인 microencapsulation 방법은 초기에 효소나 약물 등의 체내 투여와 관련되어 연구되었다가 (Chang, 1972), F. Lim에 의해 살아 있는 동물 세포를 완화된 조건에서 캡슐화하는 방법이 개발되어 (Lim and Sun, 1980; Lim, 1983a,b; Lim, 1984) 많은 종류의 동물 세포가 encapsulation 된 후 배양되었다. 이러한 동물 세포의 encapsulation은 체외에서 만든 인공적인 기관 (artificial organ)으로서의 기능을 가져, 체내에 주입할 때 체내의 면역체계에 의해 캡슐내의 세포가 직접적인 영향을 받지 않게 되므로 체내에서 그 생리적인 활성을 유지시킬 수 있을 뿐만 아니라 (Goosen et al., 1985; Sun et al., 1984), 배양조에서는 단일클론항체와 같은 유용 단백질을 고농도로 생산하는 데에 이용될 수 있다 (Duff, 1985; Posillico, 1986). 이때 세포를 둘러 싸는 membrane은 alginate-L polylysine (King et al., 1987) 및 polyacrylate (Gharapetian et al., 1986; Lamberti et al., 1984) 또는 여러가지 종류의 gel이 이용될 수 있다 (Nigam et al., 1988; Oh et al., 1993; Spiekermann et al., 1987). 이와 같이 동물 세포를 캡슐화시킨 후에 현탁 배양을 하면 일반적인 현탁 배양에서 문제가 되어온 shear stress와 같은 물리적 힘이 세포에 직접 전달되지 않으므로 고농도 배양을 성공적으로 실행할 수 있는 장점도 있다. F. Lim의 캡슐화 공정에 의하면 우선 encapsulation 하려는 세포를 미생물의

일반적인 gel 고정화에서 하듯이 Ca-alginate beads 안에 고정화시킨다. 즉 세포를 alginate 용액에 분산시킨 후 Ca^{2+} 등과 같은 2가 이상의 양이온을 포함한 용액에 방울 형태로 떨어 뜨린다. 이와 같이 하면 alginate와 양이온이 결합한 gel beads를 형성할 수 있다. 이렇게 만들어진 gel beads를 polylysine과 같은 coating polymer 용액에 넣은 후 beads의 표면에서 중합반응을 시켜 membrane을 형성시킨다. Polymer membrane으로 coating된 beads 내부의 alginate gel은 EDTA나 citrate 등의 chelating agent를 사용하여 녹여내면 encapsulation이 완성되고 캡슐을 적당한 배지에 넣어서 배양한다. 이때 캡슐은 polymer의 분자량이나 반응 시간 등을 조절함으로써 기계적인 강도를 조절할 수 있고, 특정 범위의 MWCO 값을 얻을 수 있기 때문에, 경우에 따라서는 생산물이 캡슐밖으로 빠져나가지 않게 하여 캡슐내에서 생산물의 농도를 높게 유지시킨 채로 배양할 수 있다. 이와 같이 하면 세포 배양을 통해 고부가 가치의 생산물을 얻는 공정중에서 분리 정제 비용을 상당량 줄일 수 있는 장점도 갖게 된다 (Daly and Knorr, 1988; King et al., 1987). 그러나 이같은 Lim의 encapsulation 공정은 알지네이트 beads에 세포를 고정화시키고, 그 주위에 막을 형성시킨 후, 막 내부의 알지네이트를 녹여내야 하는 등, 많은 단계의 작업을 필요로 하고 있기 때문에 공정이 복잡하여 미생물에 의한 오염 가능성도 커지는 단점이 있다. 각종 gel만을 이용한 encapsulation은 공정이 간단한 반면에 capsule의 물성을 향상시키기 어렵고, 고농도 생산물을 얻는 데에도 부적합하다. 전반적으로 encapsulation은 각종 확산 제약과 폐쇄된 성장가능 공간으로 말미암아 연속적 생산공정에는 적합하지 않다고 하겠다.

Entrapment와 adsorption을 이용한 배양장치

기존의 부유성 세포 배양 장치 중에서 matrix에 고정화시키는 방법으로는 ceramic matrix와 macroporous microcarrier, packed bed system 등이 있는데, ceramic matrix는 matrix의 부피에 비해 세포가 고정화될 수 있는 공간이 부족하고, 고정화 조업이 불편한 면이 있으며, macroporous microcarrier는 주로 부착성 세포용으로 개발된 것이므로 부유성 세포의 배양에 이용하고자 할 때에는 조업시

많은 주의가 필요하다. 또한 두가지 system의 가격이 비싸서 scale-up시에 경제성 문제도 뒤따른다. Packed bed에서는 부유성 세포의 경우 각종 gel에 세포를 우선적으로 entrapment시키고 적절한 형태로 (beads, fiber) 고정층을 만들거나, polyurethane sponge, glass fiber bed, depth filter (Oh, 1992) 등과 같은 macroporous matrix로 고정층을 만든 뒤, 배지의 순환과 같은 물리적 공정을 거쳐 세포를 고정화시키고 (adsorption), 배양에 이용하게 된다. 물론 부착성 세포는 충전물의 표면에 부착되어 배양된다. 이와 같은 packed bed 형태의 배양기에서는 충전층의 길이 방향에 따라 기질의 전달에 제약을 받기도 하고, 충전제 (packing materials) 내에서의 기질 확산이 중요한 문제점이 되고 있다.

결 론

최근의 94 日經 Bio에 의하면, 일본의 동물세포 배양장치 분야에서 가장 큰 화제거리는 hollow fiber를 이용한 배양기에 대한 미국 Cellex Biosciences사 (구 Endotronics사)의 특허권이 없어지면서 이 분야에 대한 본격 사업화가 기대된다는 것이었다. 93년도의 일본내 세포배양 장치관련 시장규모는 20억엔 정도로 그다지 큰규모라고 할 수는 없겠지만 세포배양 기술을 이용한 제품의 시장은 1600억엔을 넘어서고 있어서 배양장치 개발과 관련한 세포배양 기술의 중요성을 알 수 있다. 간단한 형태의 roller bottle이나 stirred tank reactor (STR)에서 세포를 배양해야 각종 생산물에 대한 의약국의 승인을 쉽게 얻을 수 있다는 것이 한가지 이유가 될 수도 있겠지만, 실관반응기의 특허와 관련된 일본 세포배양 장치계의 떠들썩함에 비해 너무도 침잠해 있는 국내의 상황으로 볼 때, 이는 관조가 아닌 무관심으로 해석할 수도 있을 것만 같다. 다른 분야에서도 마찬가지이겠지만 세포배양 장치를 포함한 세포배양 공정기술은 거대 시장에서의 국제 경쟁력을 갖추기 위해 필히 정복되어야 할 것으로 생각된다. 사실이 분야의 기술은 선진국에 비해 그다지 뒤떨어지지 않은 것이기에 더욱 절실하다고 하겠다. 한편, 이러한 세포배양장치 개발분야에서 접근되어야 하는

중요한 방향으로 생각되어지는 것은, 개인적으로 볼 때, 최근의 조직 공학 (tissue engineering)의 급속한 발전과 맥락을 같이 하여, 기존의 세포 배양기 개발에서 경험적으로 받아들여진 장치 재료에 대한 연구가 폭넓게 실행되어져야 한다. 조직 (tissue) 또는 단일 세포의 경우라도 2, 3차원적인 배양조건과 미세환경을 구성하는 특정생화학 물질에 의해 그특성이 매우 달라지기 때문이다. 이같은 재료분야와 밀접하게 접목된 세포배양기술의 개발이 심도있게 진행될 수 있기를 기대한다.

참고문헌

1. Altshuler, G.L., D.M. Dziewulski, J.A. Soweck and G. Belfort. 1986. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 646-658.
2. Belfort, G. 1989. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 1047-1066.
3. Brennan, A.J., J. Shevits and J.D. Macmillan. 1987, *Biotechnol. Techniques.* **1**: 169-174.
4. Brunt, J.V. 1986. *Bio/Technology.* **4**: 506-517.
5. Cartwright, T. 1987. *Trend. Biotechnol.* **5**: 25-30.
6. Chang, H.N. 1987, *Biotech. Adv.* **5**: 129-145.
7. Chang, H.N. and M. Moo-Young. 1988. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 107-112.
8. Chang, T.M.S. 1972. Artificial cells, Charles C. Thomas Pub., Springfield, Illinois.
9. Chick, W.L., A.A. Like and V. Lauris. 1975. *Science*, **187**: 847-849.
10. Chick, W.L., J.J. Perna, V. Lauris, D. Low, P.M. Galletti, G. Panol, A.D. Whittemore, A.A. Like, C.K. Colton and M.J. Lysaght. 1977. *Science.* **197**: 780-782.
11. Corrigan, A.H. 1988. *Bio/Technology.* **6**: 784-786.
12. Daly, M.M. and D. Knorr. 1988. *Biotechnol. Progress.* **4**: 76-81.
13. Dean, R.C., Jr., S.B. Karkare, P.G. Phillips, N.G. Ray and P.W. Runstadler, Jr. 1987. Large scale cell culture technology, Hanser Pub., New York, 145-167.
14. Duff, R.G. 1985. *Trend. Biotechnol.* **3**: 167-170.

15. Eagle, H. 1959. *Science*. **130**: 432-437.
16. Ehrlich, K.C., E. Stewart and E. Klein. 1978. *In Vitro*. **14**: 443-449.
17. Evans, T.L. and R.A. Miller. 1988. *Bio/Technology*. **6**:762-766.
18. Familletti, P.C. and J.E. Fredericks. 1988. *Bio/Technology*. **6**:41-44.
19. Fazekas, S. 1983. *J. Immunol. Methods*. **57**: 121-136.
20. Gallagher, S.L., J.T. Tharakan and P.C. Chau. 1987. *Biotechnol. Techniques*. **1**: 91-96.
21. Gharapetian, H., N.A. Davies and A.M. Sun. 1986. *Biotechnol. Bioeng*. **28**: 1595-1600.
22. Goosen, M.F.A., G.M. O'Shea, H.M. Gharapetian, S. Chou and A.M. Sun. 1985. *Biotechnol. Bioeng*. **27**: 146-150.
23. Griffiths, J. 1988. *Animal Cell Biotechnology*, Academic press, **3**: 179-220.
24. Himmelfarb, P., P.S. Thayer and H.E. Martin. 1969. *Science*. **164**: 555-557.
25. Hopkinson, J. 1985. *Bio/Technology*. **3**: 225-230.
26. Jo, E.C., H.J. Park, J.M. Park and K.H. Kim. 1991. *Biotechnol. Bioeng*. **36**: 717-722.
27. Kadouri, Al, D. Sher and N.G. Maroudas. 1988. *Cytotechnology*, **1**: 301-307.
28. King, G.A., A.J. Daugulis, P. Faulker and M. F.A. Goosen. 1987. *Biotechnol. Progress*. **3**: 231-240.
29. Kitano, K., Y. Shintani, Y. Ichimori, K. Tsukamoto, S. Sasai and M. Kida. 1986. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **24**: 282-286.
30. Knazek, R.A., P.M. Gullino, P.O. Kohler, and R.L. Dedrick. 1972. *Science*. **178**: 65-67.
31. Knazek, R.A., P.O. Kohler and P.M. Gullino. 1974. *Experimental Cell Research*. **84**: 251-254.
32. Kurosawa, H., H. Marik, C.N. Redder and M. Matsumura. 1991. *J. Ferment. Bioeng*. **72**: 41-45.
33. Kybal, J. and B. Sikyta. 1985. *Biotechnol. Lett.*, **7**: 467-470.
34. Lamberti, F.V., R.A. Evangelista, J. Blyzniuk, M.A. Wheatley and M.V. Sefton. 1984. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **10**: 101-102.
35. Lazar, A., L. Silberstein, A. Mizrahi and S. Reuveny. 1988. *Cytotechnology*. **1**: 331-337.
36. Lee, G.M., A.S. Chuck and B.O. Palsson. 1993. *Biotechnol. Bioeng*. **41**: 330-340.
37. Leist, C., H.P. Meyer and A. Fiechter. 1986. *J. Biotechnol*. **4**: 235-246.
38. Lim, F. and A.M. Sun. 1980. *Science*. **210**: 908-910.
39. Lim, F. 1983. U.S. Patent 4,391,909.
40. Lim, F. 1983. U.S. Patent 4,409,331.
41. Lim, F. 1984. Biomedical applications of microencapsulation, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
42. Lyndersen, B.K. 1987. Large scale cell culture technology, Hanser Publishers, New York, 169-192.
43. Martin, N., A. Brennan, L. Denomi and J. Shaevitz. 1987. *Bio/Technology*. **5**: 838-840.
44. Mizrahi, A. 1986. *Bio/Technology*. **4**: 123-127.
45. Murakami, H. 1990. *Cytotechnology*. **3**: 3-7.
46. Nardelli, L. and C.F. Panina. 1976. *Develop. Biol. Stand*. **37**: 133-138.
47. Nigam, S.C., I.F. Tsao, A.Sakoda and H.Y. Wang. 1988. *Biotechnol. Techniques*. **2**: 271-276.
48. Nilsson, K. and K. Mosbach. 1980. *FEBS Letters*. **118**: 145-150.
49. Nilsson, K., F. Buzsaky and K. Mosbach. 1986. *Bio/Technology*. **4**: 989-990.
50. Nilsson, K. 1987. *Trend. Biotechnol*. **5**: 73-78.
51. Oh, D.J. 1992. Ph.D. Thesis. KAIST. Korea.
52. Oh, D.J. and H.N. Chang. 1992. *Biotechnology Techniques*. **6**: 77-82.
53. Oh, D.J., S.K. Choi, H.N. Chang and T.B. Choe. 1993. *Cytotechnol* **1**-49.
54. Park, T.H. and I.H. Kim. 1985. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **22**: 190-194.
55. Perry, S.V. and D.I.C. Wang. 1989. *Biotechnol. Bioeng*. **34**: 1-9.
56. Piret, J.M. and C.L. Cooney. 1990. *Biotechnol. Bioeng*. **36**: 902-910.
57. Posillico, E.G. 1986. *Bio/Technology*. **4**: 114-117.
58. Putnam, J.E. 1987. Commercial production of monoclonal antibodies:a guide for scale-up, Marcel Dekker, New York, 119-138.
59. Quarles, J.M., N.G. Morris and A. Leibovits. 1980. *In Vitro*. **16**: 113-118.

60. Ramirez, O.T. and R. Mutharasan. 1989. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 1072-1076.
61. Ratafia, M. 1987. *Bio/Technology.* **5**: 692-694.
62. Rhodes, M. and J. Birch. 1988. *Bio/Technology.* **6**: 518-523.
63. Robertson, C.R. and I.H. Kim. 1985. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 1012-1020.
64. Scheirer, W. 1988. 8th International Biotechnology Symposium Proceedings. **2**: 216-227.
65. Spiekermann, P., K.D. Vorlop and J. Klein. 1987. Proc. 4th European Congress on Biotechnology. **3**: 590-593.
66. Spire, R.E. 1988. *Trend. Biotechnol.* **6**: 2-6.
67. Spire, R.E. 1988. 8th International Biotechnology Symposium Proceedings. **2**: 205-215.
68. Strand, J.M., J.M. Quarles and S. McConell. 1984. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 503-507.
69. Strand, J.M., J.M. Quarles and S. McConell. 1984. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 508-512.
70. Sun, A.M., G.M. O'Shea and M.F.A. Goosen. 1984. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **10**: 87-99.
71. Takazawa, Y., M. Tokashiki, Ka. Hamamoto and H. Murakami. 1988. *Cytotechnology.* **1**: 171-178.
72. Tharakan, J.P. and P.C. Chau. 1986. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 329-342.
73. Tharakan, J.P. and P.C. Chau. 1986. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 1064-1071.
74. Tolbert, W.R., J. Feder and R.C. Kimes. 1981. *In Vitro.* **17**: 885-890.
75. Tovey, M.G. 1980. *Advances in cancer research.* **33**: 1-37.
76. van Wezel, A.L. 1967. *Nature.* **216**: 64-65.
77. Wood, L.A. and P.W. Thompson. 1987. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **15**: 131-143.
78. Zwerner, R.K., R.M. Cox, J.D. Lynn and R.T. Acton. 1981. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 2717-2735.