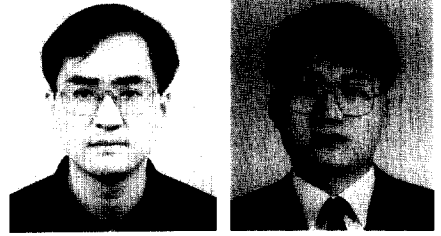


실관막 생물 반응기 (Hollow Fiber Membran Bioreactor)



유전공학연구소 생물공정연구그룹 정봉현 · 심상준

서 론

실관막은 단위부피당 표면적이 커서 상과 상간의 물질전달속도를 증가시킬수 있다는 장점때문에 효소, 미생물, 동식물의 고정화 반응기로서 많은 연구가 진행되어 왔다 (1,2). 실관막반응기는 이러한 장점이외에도 고정화가 수월하며, 생산물과의 1차분리가 이루어지며, scale-up시 에너지 소모가 적다는 장점을 가지고 있다. 그러나, 불용성 기질을 사용할 경우, 실관막 기공의 막힘으로 인해 장시간의 조업이 어렵고, 고분자 재질 실관막의 경우, 몇몇 특수 재질을 제외하고 고온/고압 멸균이 불가능하다는 단점을 지니고 있다. 또한 반응기의 구조상 기질의 원활한 공급이 어려우므로 산소소비속도가 빠른 호기성 미생물 배양을 위해서는 이중실관막과 같은 특수설계의 실관 반응기가 이용될수 있다 (3,4). Fig. 1은 독일 Enka사의 polypropylene 실관의 단면과 전형적인 조업방식을 보여준다.

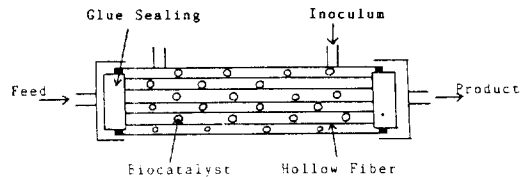


Fig. 1. Scanning electron micrograph showing polypropylene hollow fiber (upper); Schematic diagram of a typical hollow fiber bioreactor (lower).

실관막 효소 반응기

실관막을 이용한 효소의 고정화는 기타 다른 방법과는 달리 고정화가 용이하고 화학적인 처리가 불필요하며, 미생물로부터 효소를 차단할 수 있다는 장점을 갖는다. 실관막을 이용한 효소 방법은 Rony (5)에 의해 최초로 시도되었으며, 그후 많은 연구가 진행되었다 (6-10).

실관막을 이용한 효소의 고정화 방법은 크게 두

가지로 구별된다 (11). 첫째, 효소용액을 실관의 lumen이나 shell side에 고정화하고, 기질 용액을 효소용액이 없는 부분으로 흘려보냄으로써 확산에 의해 기질과 효소와의 접촉을 유도하여 반응이 진행되는 것이다. 두번째로는 효소를 포함하고 있는 lumen이나 shell side로 직접 기질용액을 흘려보내어 반응을 시킨 후 생성물을 한외여과에 의해 얻는 방법이다. 확산을 이용한 방법은 기질의 확산이 용

Table 1. Advantages and disadvantages of dual hollow fiber bioreactor for the immobilization of enzyme.

Advantages	Disadvantages
· No enzyme fixation cost	· High membrane cost
· No immobilization losses	
· High enzyme loading per unit reactor volume	· Possible mass transfer resistance
· High volumetric productivity	
· No shear force	
· Easy temperature control	
· Protection of enzyme from microbial attack by membrane	

속단계(limiting step)가 되어 생산성을 낮추는 문제점이 있는 반면, 한외여과 조업방법은 기질과 효소를 직접 접촉시킴으로써 물질전달속도를 극대화할 수 있으나 효소가 막기공을 막음으로써 장기간 조업시 flux가 떨어지는 문제점을 지니고 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 주기적으로 한외여과를 유도하는 조업방법이 개발되었다 (12-14).

실관반응기에는 구조적으로 기체공급이 원활하지 못하므로 산소 등의 기질을 필요로 하는 산화효소 반응 및 기체를 부산물로 생산하는 반응기로는 사용이 제한되어 있다. 기상을 포함하는 효소반응을 수행하기 위한 실관반응기로서 이중실관반응기가 개발되었으며 Chang 등 (15)은 모델시스템으로 포도당 산화반응을 성공적으로 수행한 바 있다.

일반적으로 whole cell enzyme을 고정화하는 방법으로는 cell을 배양하여 원심분리 등에 의해 균체를 회수한 후 얻어진 whole cell enzyme을 고정화한다. Chang 등 (16)은 실관막을 이용하여 위의 여러 단계를 동시에 수행할 수 있는 방법을 개발하였다. 즉, 이중실관막 반응기를 이용하여 cell을 고농도로 배양함과 동시에 in situ 고정화가 이루어진다. 본 방법의 장단점을 Table 1과 같다.

실관막 미생물 반응기

실관막 미생물 반응기에서는 미생물을 shell side에서 배양하여 영양분은 lumen으로 흘러보내어

막을 통해 영양분이 공급된다. 실관막을 이용한 미생물 배양에서는 높은 유속에서도 cell wash-out이 없으므로 고농도 배양이 가능하고 고생산성을 얻을 수 있다는 장점을 갖는다.

Vick Roy 등 (17)은 *Lactobacillus delbruchii*를 실관반응기의 shell side에서 배양하면서 lactic acid를 생산하였다. 480 g DCW/L의 고농도 배양이 가능했으며, 단위반응기 체적당 생산성은 회분식 생산에 비해 20배나 높은 결과를 얻었다. 그러나 계속 증가하는 미생물에 의해 막이 파손되어 미생물이 실관막의 lumen side로 유출됨으로써 장기적인 조업이 어려웠다.

기존의 실관막 반응기에서는 산소소비속도가 빠른 호기성 미생물 배양에는 부적합하였다. Inloes 등 (18)은 asymmetric 실관의 sponge layer에 대장균을 고정화하고 shell side에는 산소를 공급하고 lumen side에 영양분을 공급함으로써 실관막을 이용한 대장균 배양을 시도하였다. 결과로는 10^{12} cells/ml의 고농도 대장균 배양이 가능하였으나 영양분의 고갈로 인하여 더이상의 조업이 불가능하였다. 위의 문제점들을 개선한 반응기로서 이중실관 생물반응기가 개발되어 *Streptomyces aureofaciens*, *E. coli*, (19), *Nocardia mediterranei* (20,21), *Aspergillus niger* (4) 등의 고농도 배양이 가능하였다. Chung and Chang (4)에 의해 개발된 이중실관 반응기의 구조는 Fig. 2과 같으며 Fig. 3는 구연산 생산을 위해 *A. niger*를 이중실관 반응기에서 배양한 후 이중실관을 절단하여 찍은 사진이다. 왼쪽은 배양전의 이중실관의 단면을 나타내며 오른쪽은 *A. niger* 배양후의 실관의 단면 사진이다. 세포가 제대로 자란 후에도 실리콘튜브의 바깥쪽으로는 팽창이 계속되어 500 g DCW/L이상의 고농도 배양이 가능하였다.

Chung and Chang 등 (22)은 친수성, 소수성 실관막을 서로 섞어 친수성 실관막으로는 액체배지를, 소수성 실관막으로는 공기를 공급하는 새로운 형태의 삼상실관반응기를 개발하였다 (Fig. 4). 호기성 미생물인 *A. niger*를 배양한 결과, 성공적인 배양 결과를 얻었으나 배양말기의 실관막의 구조가 변하는 등 반응기 제작 및 조업에 있어 해결해야 할 많은 문제점을 나타내었다.

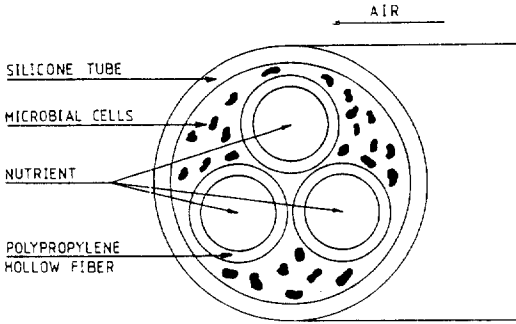


Fig. 2. Cross sectional diagram of a dual hollow fiber unit.

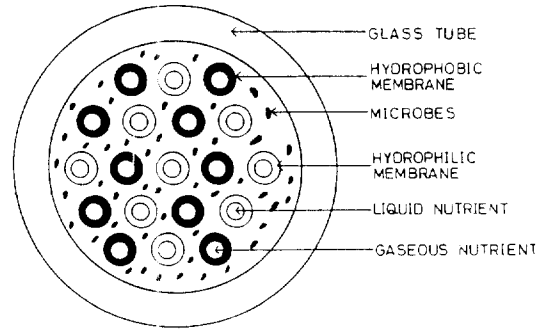


Fig. 4. Conceptual design of the aerobic hollow fiber bioreactor.

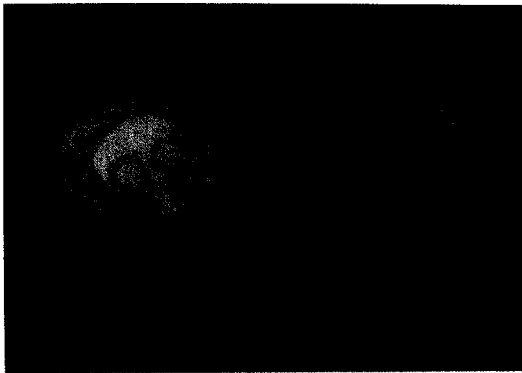


Fig. 3. Silicone tube expansion before cell inoculation and after excessive cell growth.

실관막 동물 및 식물 세포 반응기

이중실관 반응기 모듈을 이용한 동물 및 식물 세포의 고정화는 그 생성물의 가치와 함께 큰 잠재력을 가지고 있다. 특히 고착의존성(anchorage-dependent) 세포배양의 경우, 이중실관반응기는 그 큰 단위용적당의 표면적때문에 고농도 세포배양의 가능성이 매우 크다 (23). Knazek 등은 실관형 셀룰로오스 아세테이트 모세관에 mouse fibroblast를 배양한바 있고 미국 Amicon사에서 제작한 XM-50와 silicone polycarbonate 모세관의 bundle에 human choriocarcinoma 세포를 배양하기도 하였다 (24). 산소는 실관내로 배지가 공급되기전 Dow Corning mini-lung을 이용하여 공급되었다. 28일동안의 배양을 통해 3 mL의 공간에서 217×10^6 cells

농도로 hcG(Human chorionic gonadotrophin)이 생산되어 기존의 suspension culture의 경우에 비해 150배 이상의 생산성의 증가를 가져왔다. Ku 등 (25)은 일반 cartridge형 반응기에서 문제점을 줄이기 위해 큰 실관 표면의 이용을 극대화할수 있는 평면층 실관 세포배양기(flat-bed hollow fiber cell culture system)를 개발하여 SV3T3, baby hamster kidney 세포, Vero 및 rhesus monkey kidney 세포등이 이 반응기에서 배양되어 MIF (migration inhibition factor) 등이 생산되었다. Knazek의 시스템과는 달리 공기 및 CO₂의 혼합물이 실관의 lumen을 통하여 세포에 공급되었다. 한편 radial 실관막 반응기가 개발되어 H1 세포배양에 이용되었다 (26). 이 반응기는 실관막다발과 그 중앙에 중앙 유속 분배 튜브로 구성되어 있다. 하이브리도마 세포는 다양한 molecular cut-off를 가진 polysulfone 실관막 모듈에서 배양되었다 (27).

식물세포는 깨지기 쉽기 때문에 겔보다 막이 고정화에 적합하다. 1981년 Shuler는 *Glycine max* 세포를 이용한 phenolics 생산에 막반응기의 이용을 보고하였다 (28). 또한 *Daucus carrota* 세포를 이용한 phenolics의 생산에서는 한달동안 세포성장과 phenolics의 생산이 지속되었다. 1989년 Kim 등은 이중실관반응기에 *Lithospermum erythrorhizon*을 고정화하여 phenolics를 23일 동안 연속 생산하였다 (29). 동물 및 식물 세포의 경우 미생물과 같은 높은 산소소비를 요구하지 않고 그 생성물이 비교적 고가이므로 실관반응기의 이용이 미생물에 비해 훨씬

성공적일 수 있다. 최근에는 실관막반응기를 통한 동물세포배양이 상업적으로 이용되고 있기도 하다.

결 론

위에서 살펴본 바와 같이 실관막 반응기를 이용한 생촉매의 고정화는 효소, 미생물뿐만 아니라 동물 및 식물세포에 이르기까지 그 응용이 확대되어 왔다. 앞으로는 위와 같은 간단한 생전환 뿐만 아니라 추출 생전환 및 고정화 조효소를 이용한 아미노산 생산 등의 응용에도 실관막 반응기는 이용될 수 있다. 실관막 반응기는 동물세포시스템과 같은 고부가가치 생성물의 시스템에서 이미 산업화되어 응용되고 있고 그밖의 많은 생물시스템에 산업화 응용기술로서 각광을 받고 있다. 그러나 응용범위의 확대를 위해서는 *scale-up* 상의 여러 문제점이 극복되어야 하며 선택성등이 뛰어난 막재질의 개발도 뒤따라야 하겠다.

참고문헌

- Vick-Roy, T. B., Blanch, H. W. and Wilke, C. R. (1983). Microbial hollow fiber bioreactors. *Trends in Biotechnology*, **1**, 135-139.
- Chang, H. N. and Furusaki, S. (1991). Membrane bioreactors: Present and Perspectives. *Adv. in Biochem. Eng.*, **44**, 1074-1111.
- Robertson, C. R. and Kim, I. H. (1985). Dual aerobic hollow fiber bioreactor for cultivation of *Streptomyces aureofaciens*. *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1012-1020.
- Chung, B. H. and Chang, H. N. (1987). Aerobic fungal cell immobilization in a dual hollow fiber bioreactor: Continuous production of citric acid. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 205-211.
- Rony, P. R. (1971). Multiphase Catalyst. II. Hollow fiber catalysts. *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 431-447.
- Davis, J. C. (1974). Kinetics studies in a continuous steady state hollow fiber membrane enzyme reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1113-1122.
- Kawakami, K., Hamada, T., and Kusunoki, K. (1980). Performance of a hollow fiber beaker device for continuous enzymic reaction. *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 295-298.
- Engasser, J. M., Caumon, J., and Marc, A. (1980). Hollow fiber enzyme reactors for maltose and starch hydrolysis. *Chem. Eng. Sci.*, **35**, 99-105.
- Kohlway, D. E. and Cheryan, M. (1981). Performance of a β -D-galactosidase hollow fiber reactor. *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 64-68.
- Chang, H. N., Kyung, Y. S. and Chung, B. H. (1987). Glucose oxidation in a dual hollow fiber bioreactor for aerobic whole cell immobilization. *ACS Symp. Ser.*, **314**, 32-42.
- Kitano, H. and Ise, N. (1984). Hollow fiber enzyme reactors. *Trends in Biotechnol.*, **2**, 5-7.
- Kim, I.H. and Chang, H.N. (1982). Variable volume enzyme reactor with ultrafiltration swing. *AIChE J.*, **29**, 645-651.
- Kim, I. H. and Chang, H. N. (1983). Variable volume hollow fiber enzyme reactor with a pulsatile flow. *AIChE J.*, **29**, 910-914.
- Park, T. H., Kim, I. H. and Chang, H. N. (1985). Recycle hollow fiber enzyme reactor with flow swing. *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1185-1191.
- Chang, H. N., Kyung, Y. S. and Chung, B. H. (1987) Glucose oxidation in a dual hollow fiber bioreactor with a silicone tube oxygenator. *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 552-557.
- Chang, H. N., Joo, I. S. and Ghim, Y. S. (1984) Performance of rotating packed disk reactor with immobilized glucose oxidase. *Biotechnol. Lett.*, **6**, 487-492.
- Vick-Roy, T. B., Blanch, H. W. and Wilke, C. R. (1982). Lactic acid production by *Lactobacillus delbreuckii* in a hollow fiber fermenter. *Biotechnol. Lett.*, **4**, 483-488.
- Inloes, D. S., Taylor, D. P., Cohen, S. N., Michaels, A. S., and Roberson, C. R. (1983). Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in hollow fiber membrane bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 264-278.
- Inloes, D. S., Cohen, S. N., Michaels, A. S., Roberson, C. R. and Martin, A. (1985). Ethanol production by nitrogen-deficient yeast cells

- immobilized in a hollow fiber membrane bioreactor. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, **23**, 85-91.
20. Chang, H. N., Chung, B. H. and Kim, I. H. (1987). Continuous production of rifamycin B in dual hollow fiber bioreactor. World congress III of *chemical engineering*, **1**, 867-870.
 21. Chung, B. H., Chang, H. N. and Kim, I. H. (1987). Rifamycin B production by *Nocardia mediterranei* immobilized in dual hollow fiber bioreactor. *Enzyme Microbial Technol.*, **9**, 345-349.
 22. Chung, B. H. and Chang, H. N. (1990). Hollow fiber bioreactors with internal aeration circuits. *J. Ferm. Biotechnol.*, **69**, 175-177.
 23. Glacken, M. W., Fleischaker, R. J. and Sinskey, A.J. (1983). Mammalian cell culture: Engineering principle and scale-up. *Trends in Biotechnol.*, **1**, 102-108.
 24. Knazek, R. A., Gullino, P. M., Kohler, P. O. and Dedrick, R. L. (1972). Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth *in vitro*. *Science*, **178**, 65-67.
 25. Ku, K., Kuo, M.J., Delente, J., Wildi, B. S. and Feder, J. (1981). Development of a hollow fiber system for large-scale culture of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 79-95.
 26. Tharakan, J. P. and Chau, P. C. (1986). A radial flow hollow fiber bioreactor for the large-scale culture of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 329-342.
 27. Altshuler, G. L., Dziewulski, D. M., Soweck, J. A. and Belfort, G. (1986). Continuous hybridoma growth and monoclonal antibody production in hollow fiber reactors and separators. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 646-658.
 28. Shuler, M. L. (1981). Production of secondary metabolites from plant tissue culture - Problems and Perspects. *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, **369**, 65-79.
 29. Kim, D. J., Chang, H. N. and Liu, J. R. (1989). Plant cell immobilization in a dual hollow fiber bioreactor. *Biotechnol. Tech.*, **3**, 139-144.