

연속 발효조를 이용한 Soluble Glucan 생산 공정 개발

문찬준, 이 중현, 권규혁
조선대학교 공과대학, 화학·고분자 공학부

Development of Soluble Glucan Production Process with Continuous Stirred Tank Fermentor

Chan Jun Moon, Jung Heon Lee, Kyu Hyuk Kwon
Department of Chemical Engineering Chosun University

서론

생물공학분야에서 대부분의 생물 반응기를 이용한 세포배양은 생산단가 절감을 위해 고농도 세포배양에 중점적으로 연구되고 있다. 고농도 세포배양은 회수율 증가와 함께 분리비용의 절감이라는 두 가지 문제를 모두 해결해 준다. 이러한 공정개발의 일환으로 유가식 배양을 이용한 고농도 세포배양 방법¹⁾이 많이 소개되고 있다. 하지만 본 연구에 사용된 mutant *Agrobacterium sp.*가 생산하는 soluble glucan은 8g/L 이상이 되면 높은 점성 때문에 분리를 위한 다단계 공정이 필요하므로 막대한 비용이 소모된다. 이를 개선하기 위한 방안으로 생산물의 농도를 일정하게 유지시킬 수 있는 연속교반반응기(CSTR)를 착안하게 되었다. CSTR은 세포성장이 하나의 제한기질에 의해 성장 속도가 제한을 받고, 시스템이 정상상태에서 발효기 내의 세포농도 및 생산물농도를 일정하게 유지할 수 있게 된다. 그러므로, 실험을 통해 생산물의 최적 분리 농도를 찾아 flow rate를 조절함으로써 최적화 된 공정을 개발할 수 있다.

본 연구에서는 soluble glucan의 최적생산을 위한 조건을 구하기 위하여 실험과 수학적인 모델을 통하여 발효조건에 따른 세포 및 생산물의 농도 변화를 수식화 하였다. 수학적인 모델을 이용 computer simulation을 통하여 생산 및 분리에 최적인 연속 발효공정을 개발하였다.

본론

균주 및 보존 : 본 연구에 사용한 균주는 mutant *Agrobacterium sp.* ATCC 31750으로 nutrient agar 배지에서 30℃로 2일간 배양 후, 4℃에서 보관하였고 2주마다 계대배양을 하면서 생체활성을 유지하였다.

배지조성 : 본 연구에 사용된 종배양 배지 조성은 sucrose 20g/L, yeast extract 5g/L, peptone 5g/L(pH 7.0)으로 조성하였으며 본 배양 배지 조성은 sucrose 40g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5g/L, NH₄Cl 4g/L, KH₂PO₄ 0.5g/L, 그리고 10ml의 미량원소 용액(0.1N HCl 1L에 5g FeSO₄·7H₂O, 2g MnSO₄·H₂O, 0.5g CaCl₂, 1g ZnCl₂, 1g CoCl₂·6H₂O를 녹여 만듦)이고 초기 pH는 7.0으로 하였다. 배지는 121℃에서 15분간 멸균 후에 사용하였으며 반응기의 pH 조절은 2N HCl, 2N NaOH를 사용하였다.

배양방법 : 본 연구에서는 초기 회분식 배양에서는 본 발효의 5%에 해당하는 flask medium 100ml를 만들어 shaking incubator(30℃, 120rpm)에서 17시간 동안 배양한 후 1.9L의 본 배지에 접종하였다. 본 배지의 초기 pH는 7.0이고, 배양온도는 30℃로 하였으며, 교반속도는 초기 300 rpm에서 700 rpm으로 조절하였으며 통기량은 1~2vvm으로 조절하여 배양하였다.

연속식 배양 공정은 세포가 최대 활성을 갖게 되는 24시간 후부터 기질의 유입속도를 유량 펌프를 사용하여 0.19L/hr로 조절하여 최종 생산물의 농도를 일정하게 유지하였다.

분석방법 : 균체량은 centrifuge를 이용하여 6000 rpm에서 15분동안 원심분리하여 침전된 균체를 80℃ dry oven에서 24시간 건조시켜 건조중량을 측정하였고, 최종 생산물인 glucan은 에탄올에 침전시켜 회수하여 3회 증류수로 세척 후 80℃ dry oven 24시간 건조시켜 건조중량을 측정하였으며, ammonium 이온분석은 indophenol 방법²⁾으로 분석하였으며 Sucrose 농도는 1N HCl을 이용하여 100℃에서 15분간 가수분해 시킨 후 dinitrosalicylic acid 방법³⁾을 이용하여 측정하였다.

공정설계 : 최적미생물 배양조건으로 회분식 반응기에서 수회에 걸쳐 실험한 데이터를 이용하여 Monod equation에 대입하여 modeling 하였으며 Figure 1. 에서와 같이 반응조에서는 각각의 source들이 조건에 일치하도록 제어하였으며 기질 저장조에서는 공급되는 기질의 농도와 온도, pH를 반응조와 같은 조건으로 유지하였다.

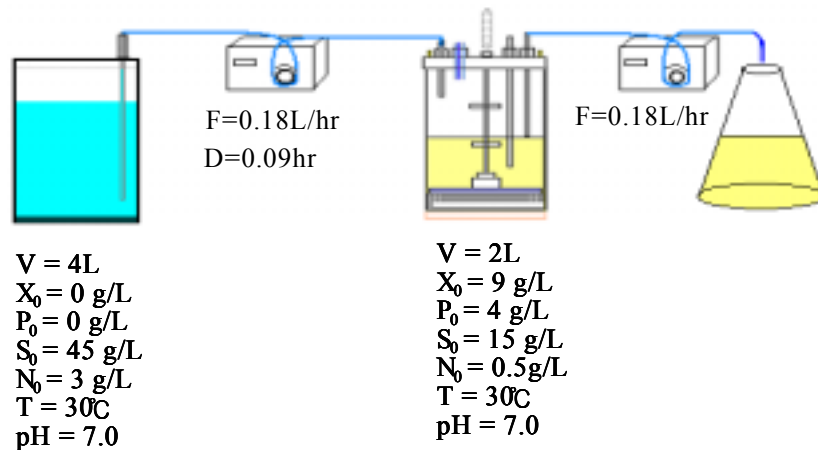


Figure 1. List of fermentation conditions for continuous stirred tank fermentor

$$\frac{dX}{dt} = -DX + \frac{\mu_{\max} S}{k_m + S} X$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_r - S) - \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{\pi}{Y_{P/S}} \right) X$$

$$\frac{dP}{dt} = -PD + \frac{\pi_{\max} S}{k_p + S} X$$

위와 같이 X, S, P에 대한 mass balance를 확립한 후 회분식에서 얻은 데이터를 대입하여

modeling equation을 완성하였으며 fortran을 사용하여 계산한 결과를 바탕으로 simulation 하였다.

$$\frac{dX}{dt} = -0.09 \times S + \frac{0.165 \times S \times X}{13.15 + X} \quad X_o = 9g/L \quad \text{----- (1)}$$

$$\frac{dS}{dt} = 0.09 \times (45 - S) - \left(\frac{0.165 \times S}{13.15 + S} \times \frac{1}{0.34} + \frac{0.065 \times S}{10.31 + S} \times \frac{1}{0.2} \right) \times X \quad S_o = 15g/L \quad \text{---- (2)}$$

$$\frac{dP}{dt} = -0.09 \times P + \frac{0.065 \times S}{10.31 + S} \times X \quad P_o = 4g/L \quad \text{----- (3)}$$

결론

회분식 반응기 실험을 통해 얻은 데이터를 이용하여 Michalis-Menten 반응식에서 μ 와 S의 그래프로부터 μ_m 과 k_s 의 추정치를 구하였다. 위에서 구한 상수들을 이용하여 연속반응식인 CSTR의 mass balance에 대입하여 기질의 성장, 최종 산물의 생산, 분리에 최적인 X, P, S, D를 계산하여 simulation하였고, 이를 바탕으로 분리에 최적인 CSTR 공정을 개발하였다. 이론적인 결과 값들이 실제 공정에서 정확히 부합되지는 않았지만 그 경향성은 매우 근접하였고, 미리 예측하고 제어할 수 있는 장치를 마련할 수 있었다. 이론적으로 희석속도를 0.09hr^{-1} 로 조절하였을 때 최종 유출되는 세포농도는 약 50시간 경과 후 9g/L 로 유지되었으며 이때 glucan의 농도는 4g/L 로 정상상태를 나타내었다. 결론적으로 CSTR공정을 이용한 생산 공정에서는 $0.72\text{g/L}\cdot\text{hr}$ 의 생산 속도를 얻을 수 있었으며, 회분식에서의 $0.25\text{g/L}\cdot\text{hr}$ 의 생산 속도보다 약 3배 높은 효과를 얻을 수 있었다.

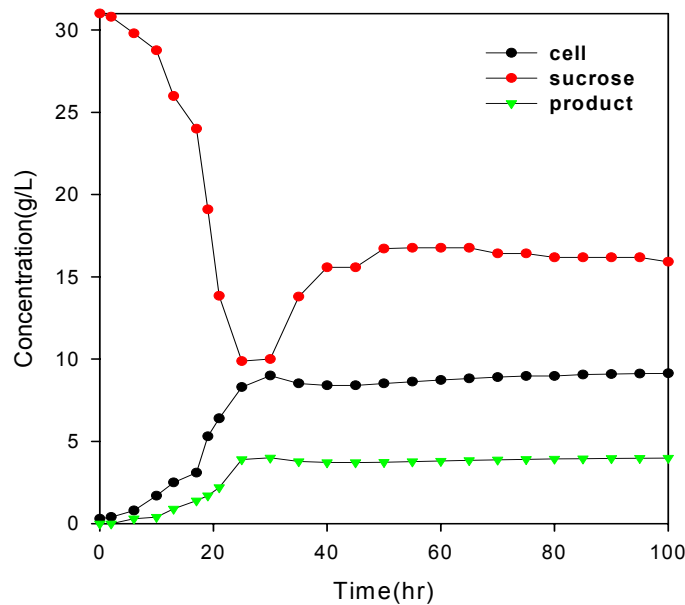


Figure 2. Effect of dilution rate on the cell mass, soluble glucan and sucrose concentration.

또한 분리비용이 큰 비중을 차지하고 있는 미생물 산업에서 centrifuge만으로도 cell과 glucan의 분리가 용이하므로 분리공정의 개선에 따른 분리 비용의 절감도 기대해 볼 수 있으며, 최종적으로 모델화된 수식을 통해 제어변수들을 변화시키면서 생산목적에 맞추어 공정을 최적화 시킬 수 있는 지능화 발효 시스템의 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 본다.

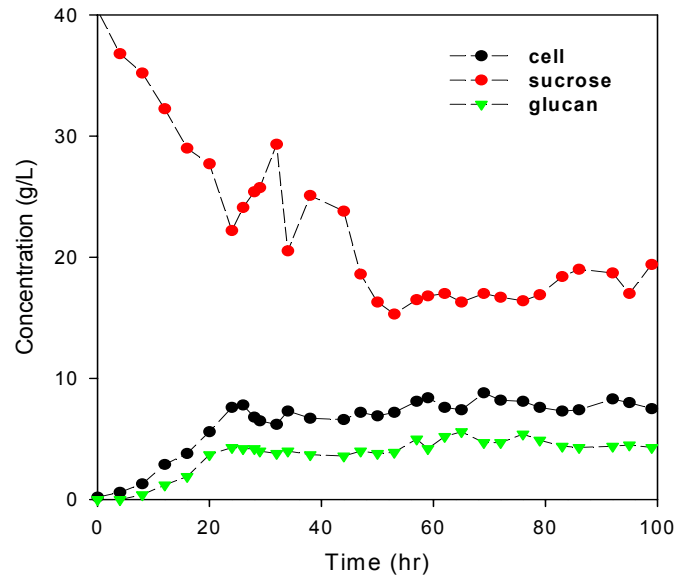


Figure 3. Time course of the cell mass, soluble glucan and sucrose concentration profiles with dilution rate changes of CSTR

참고문헌

1. Chen, Q., W. E. Bentley, and . A. Weigand, "Optimization for a recombinant *E. coli* fed-batch fermentation", *Appl. Biochem. Biotechnol*, **51**, 449 (1995).
2. Srienc, F., Arnold, B., Bailey, J. E., "Characterization of intracellular accumulation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry", *Biotechnol. Bioeng*, **26**, 982 (1984).
3. Miller, G. L., "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).