

마이크로컴퓨터를 이용한 고농도 유가배양시스템

이 형 춘 · *이 계 호 · 허 윤 행

서울보건전문대학

*서울대학교 농과대학

Microcomputer-aided Fermentation System for High Density Fed-Batch Cultivation

Hyeong-Choon Lee, Ke-Ho Lee* and Yun-Haeng Hur

Seoul Health Junior College

*College of Agriculture, Seoul National University

ABSTRACT

A microcomputer-aided fermentation system was constructed for high density fed-batch culture using dissolved oxygen(DO) as a substrate feeding indicator. DO signal was processed prior to acquisition to computer. Agitation speed and oxygen flow rate were changed stepwisely to maintain DO value at a constant level. Agitation speed was controlled by the output signal of D/A converter. Oxygen flow rate was controlled by a flow rate control valve connected to a stepping motor. Substrate was fed with a feeding pump operated by the abrupt increase of DO signal. *Methylobacillus* sp. SK1 was cultivated to test the system and 16.53 g/l of cell density was obtained after 10 hr.

서 론

미생물을 고농도로 배양할 경우 균체 생산성 및 균체 증식과 비례하여 증가하는 대사산물의 생산성이 크게 향상되며, 배양액의 양도 감소하므로 고농도배양에 대한 관심과 요구가 증대하고 있다.

일반적으로 고농도배양에 있어서는 기질요구량과 호기성미생물의 경우 산소요구량이 커지므로 기질공급과 산소공급 및 배양액의 용존산소제어가 중요하다.

첫째, 기질공급에 있어서는 한번에 많은 량의 기질을 공급할 경우 대부분의 기질이 미생물의 증식을 저해하므로(1) 회분식 배양은 바람직하지 않으며, 기질농도를 저해수준 이상으로 증가하지 못하도록 제어할 수 있는 유가배양법이 좋다. 유가배양으로 배양액의 기질농도를 제어함에 있어서는 제어변수를 사용하는 피이드백제어

가 우수하며(2), 제어변수로서는 기질농도를 직접 측정하여 사용하든가(3, 4) 또는 DO(5, 6), RQ(7, 8), pH(9), CER(10) 및 OUR(11) 등 배양과정과 밀접하게 관련되어 있는 간접적인 제어변수를 사용할 수 있다. 이것들 중 DO는 배양액내의 기질이 균증식에 이용되어 완전 고갈될 경우 급격히 증가하고 기질이 재공급되면 원래의 농도로 신속하게 복귀되는 특성을 쉽게 제어변수로 이용할 수 있기 때문에 오래전부터 기질공급의 제어변수로 사용되어 왔으며(2), 또한 고농도 배양에 이용되었다(5, 6).

둘째로, 균체가 고농도가 되면 산소 요구도가 커지며 특히 메탄올 및 에탄올과 같은 환원성기질의 경우에는 더욱 요구도가 커지므로 공기유량과 교반속도를 최대로 하더라도 배양액의 DO가 한계농도에 도달하기 때문에 균을 계속 증식시키기 위해서는 산소소를 공급해야만

한다. 순산소를 공급할 경우 on-off제어와 같은 단순한 제어방식으로는 배양액의 DO의 교란이 너무 심하기 때문에 균체가 손상을 받게되어 증식속도가 감소하므로 (12) 더욱 정밀한 DO제어가 요구된다. 이와같은 목적을 달성하기 위하여 여러가지 형태의 DO-stat(5, 6, 13)가 발전적으로 개발되었으며, 마이크로컴퓨터를 이용한 DO제어시스템(14)까지 개발되어 정밀한 제어가 가능함이 보고되어 있다.

Do-stat로 배양액의 DO를 한계농도 이상으로 일정하게 유지하면서 DO를 기질공급을 위한 제어변수로 사용하는 피이드백제어 유가배양으로 단시간에 고농도의 균체를 배양하여 균체생산성을 크게 향상시킨 연구가 메탄올 이용균(5, 13, 14)과 에탄올 이용균(6, 15)을 중심으로 집중적으로 이루어졌다. 이러한 고농도 배양에 대한 산업체의 요구는 증가하고 있으나 이분야에 대한 국내의 연구는 아직 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 마이크로컴퓨터와 배양조를 접속하여 각종 미생물의 고농도 배양을 수행할 수 있는

배양제어 시스템을 구성하였으며, 메탄올이용균인 *Methylobacillus* sp. SK1(16)을 이용하여 시스템을 시험하였다. 주요한 연구방향은 첫째, 기질공급의 제어변수로는 고농도배양에 잘 사용되는 DO를 이용하고, 둘째, 컴퓨터를 이용하여 시스템을 구성하되 현재 국내에 널리 보급된 16bit 마이크로컴퓨터와 접속장치를 사용하며, 셋째 종래의 고농도 배양시스템에서는 기질공급의 제어와 배양액의 DO제어를 두가지의 독립된 하아드웨어시스템으로 수행하였으나, 본 연구에서는 한가지의 하아드웨어 및 소프트웨어로 수행하는 것으로 하였다.

재료 및 방법

마이크로컴퓨터제어 배양시스템

배양기, 마이크로컴퓨터 및 접속장치로 이루어진 시스템의 구성은 Fig. 1과 같다.

배양기(Mituwa Co., model KMJ-2)는 용량이 2l인 것을 사용하였으며, 마이크로컴퓨터는 IBM PC-XT를

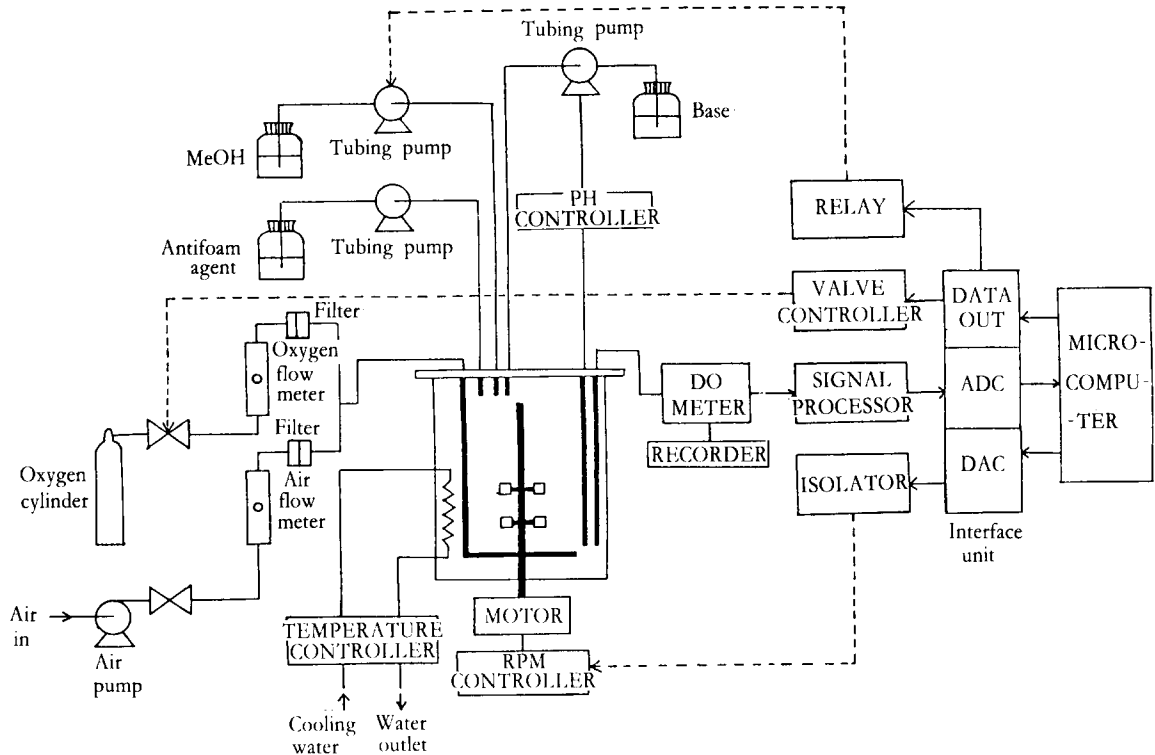


Fig. 1. Schematic diagram of microcomputer-controlled fermentation system.

사용하였고, 접속장치(Labin Master NM-7, 나노텍)는 12bit A/D 변환기와 12bit D/A 변환기 및 단말접속 IC가 내장된 것을 사용하였다.

배양액의 DO계측은 DO미터(Mituwa Co, model MD-1C)의 출력신호를 신호처리로 잡음제거 및 증폭후 접속장치의 A/D 변환기를 거쳐 컴퓨터로 읽어들이므로써 수행하였다. 또한 DO미터에 기록계를 연결하여 DO 값을 연속적으로 기록하였다.

배양기의 교반속도제어는 컴퓨터에서 출력되는 디지털 신호를 접속장치의 D/A 변환기로 아날로그화한 후 신호분리기를 거쳐 배양기의 모터제어 회로부에 입력시킴으로써 수행하였다.

배양기의 산소공급량제어는 컴퓨터 및 접속장치로부터 출력되는 디지털 신호로써 밸브콘트롤러의 스테핑모터(North American Philips Controls co., model A82709-M 2)를 시계방향(유량의 증가) 혹은 시계반대방향(유량의 감소)으로 한 스텝(3.75°)씩 회전시켜 모터축에 연결시킨 니들형 유량제어 밸브를 미소하게 개폐함으로써 수행하였다.

본 실험에서 제작하여 사용한 밸브콘트롤러는 mass flow controller와 같이 유량의 계측에 의한 피드백 제어 방식이 아닌 개방식제어이므로 밸브의 회전정도에 따른 산소유량의 변화가 직선적이지 않고, 또한 산소압력용기의 압력변화에 영향을 받음으로 컴퓨터에 의한 제어가 원활하지 못하여 배양액의 DO가 설정치보다 약±1.0 ppm 이상으로 벗어날 경우에는 산소압력과 밸브의 회전을 수동으로 조절하여 컴퓨터에 의한 제어범위에 들어가도록 하였다.

기질공급의 제어는 접속장치의 출력신호를 이용하여 릴레이를 on-off함으로써 펌프를 제어하여 일정량의 기질을 배양기에 공급하는 것으로 하였다.

유가배양의 제어

유가배양의 제어방법은 제어시스템을 이용하여 배양액의 용존산소농도를 일정수준으로 유지하면서 균증식의 결과 배양액의 기질이 완전 소모될 경우 갑자기 증가하는 DO를 신호로 하여 일정량의 기질을 공급하는 방법 즉, DO를 기질공급의 제어변수로 사용하는 간접피드백제어에 의한 유가배양법으로 하였다. 배양중의 DO의 제어는 먼저 일정시간간격으로 컴퓨터로 읽어들이는 DO값에 따라서 교반속도를 한스텝씩 증감시키면서 제어하였으며 균증식으로 최대교반속도에 도달할 경우에는 산소공급제어밸브를 작동시켜 산소공급량을 한스텝 증가시키며, 배양액의 DO가 계속 하강하여 최저교반속도에 도달할 경우에는 산소공급량을 한스텝 감소시킴

으로써 DO가 일정수준으로 유지되도록 하였다. 즉, Stepwise control(14)을 이용하였다. 배양액의 DO제어 방법으로써는 Stepwise control외에 PID제어, 적응제어(17)등이 연구되어 있으나, 순산소의 공급에 의한 고농도유가배양과 같이 미생물의 동특성이 극심하게 변화하는 경우에 적용된 예는 아직 없으므로 고농도 유가배양의 DO제어시 사용된 바 있는 Stepwise control을 사용하였다.

기질공급은 DO가 기질공급을 위한 수준이상으로 높아질 경우 튜빙펌프를 일정시간 가동시켜 수행하였으며, DO계측상의 오류에 의해 기질이 잘못 공급되는 것을 방지하기 위해 공급전에 일정시간 지연후 재측정하여 공급하였다. 기질공급의 제어방법으로써 기질농도를 직접 측정하여 일정수준으로 제어할 경우 최적 증식속도를 보이는 기질농도로의 제어가 가능하나, 이 경우에는 사용기질의 온-라인측정법에 확립되어 있어야 한다. 따라서 본 연구에서는 시스템을 여러가지 배양에 융통성있게 활용하기 위하여 거의 모든 기질의 제어변수로써 사용이 가능한 것으로 알려진 DO를 이용하였다.

균 주

Methylobacillus sp. SK1(16)을 시험균주로써 사용하였다. 이 균은 탄소원으로써 유일하게 메탄올만을 이용하고 생육인자를 요구하지 않으며, 배지의 메탄올 농도가 1.0%(v/v) 이상에서 저해를 받아 비증식속도가 감소하는 특성이 있다.

배 지

본 실험에 사용한 배지의 조성은 Table 1과 같다. 배지의 성분중 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 따로 여과제균하여 첨가하였으며, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 및 나머지 무기성분의 혼합액은 각각 따로 가압살균하여 첨가하였다. 메탄올은 원액을 그대로 첨가하였으며 배양액중의 초기농도를 1.0%(v/v)로 하였다.

배 양

집종액은 보존균주 1백급니를 취하여 한천평판배지(메탄올 1.0%(v/v) 함유)에 도말한 후 35℃로 48시간 배양한 균 1백급니를 500ml 삼각플래스크에 들어있는 액체배지(메탄올 1.0%(v/v) 함유) 100ml에 접종하여 회전진탕배양기로 35℃, 20시간 진탕배양(200rpm)하여 조제하였으며, 집종액의 양은 300ml로 하였다.

배양액의 양은 집종액을 포함하여 1 l로 하였고, 배양온도는 35℃로 하였으며, pH는 28%암모니아수를 사용하

Table 1. Medium composition

Component	Concentration
K ₂ HPO ₄	6.10 g / l
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	3.04 g / l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g / l
NaNO ₃	1.0 g / l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g / l
CaCl ₂	50 mg / l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg / l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1 mg / l
H ₃ BO ₃	1 mg / l
MnSO ₄ · 5H ₂ O	5 mg / l
ZnSO ₄	2 mg / l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	2 mg / l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	10 mg / l
Methanol(Initial conc.)	1.0 % (v / v)

[pH 7.0 adjusted]

여 7.0으로 유지시켜 주었다. 소포제는 Silicone KM-7 2용액(20% (w/v))을 가압멸균하여 사용하였다.

배양중의 균중식도의 측정에는 동일한 균배양액에 대하여 Spectronic 20(Bausch & Lomb)로 660nm에서 OD(optical density)를 측정하는 동시에 건조중량을 측정하여 OD와 건조중량의 비를 구한 후 배양과정에서 측정된 OD값을 질량농도(g/l)로 환산하였다. 실험결과 OD를 질량농도로 환산하기 위한 계수는 0.61($r=0.998$)이었다.

제어시스템에 의해 *Methylobacillus* sp. SK1을 유가배양할 경우의 제어프로그램중의 파라미터값을 Table 2에 나타내었다. 파라미터값 중 DO설정치는 2.5ppm으로 비교적 높은 값으로 하였다. DO는 배양중 한계농도 이상으로 유지되면 아주 낮은 농도에서도 증식속도나 균체수율에 큰 손상을 주지 않음이 보고되어 있으나(18), 본 연구에서는 배양후기의 DO변화폭이 커질 경우 한계농도에 도달할 위험이 있기 때문에 2.5ppm정도로 높게 설정하였다.

1회 메탄올공급량을 8.04ml로 한 것은 *Methylobacillus* sp. SK1의 증식이 메탄올농도 1.0%(v/v)이상에서 저해받음이 보고되어 있으며(16), 또한 배양중 시료채취로 배양액의 양이 감소되는 것을 고려한 것이다.

제어프로그램의 흐름도를 Fig. 2에 나타내었다.

결과 및 고찰

마이크로컴퓨터 제어 배양시스템을 이용하여 *Methylobacillus* sp. SK1을 유가배양하면서 배양액의 DO와 균체농도의 시간에 따른 변화양상을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

균체농도는 초기 0.24 g / l로 부터 계속 증가하여 약10시간후에 16.53 g / l라는 상당히 높은 농도에 도달하였다. 김(16)은 본균의 Y_{MeOH} 가 0.4 g cells / g MeOH임을 보고하였다. 따라서 최적증식메탄올 농도인 1.0% (v/v)로 회분배양할 경우 3.168 g / l의 균체농도를 얻을 수 있음을 나타내는 것이므로, 본 실험의 유가배양으로 회분배양 5.2배 더 높은 균체농도를 얻을 수 있었다. 또한 배양 10시간까지의 증식양상이 지수적이므로 계속

Table 2. The values of operational parameters of computer control program for fed-batch cultures

Parameters	Values assigned
Measurement time interval	5 sec
Desired DO level of culture broth: DOS	2.5 ppm
Control accuracy of DO of culture broth: DOU	0.05 ppm
DO level for methanol feeding: DOF	6.0 ppm
Methanol feeding time	52 sec
(Amount of methanol fed each feeding time)	(8.04 ml)
Initial agitation speed: AGSP-INI	500 rpm
Maximum agitation speed: AGSP-MAX	1000rpm
Minimum agitation speed: AGSP-MIN	200 rpm
Step of agitation speed change: STEP	2 rpm

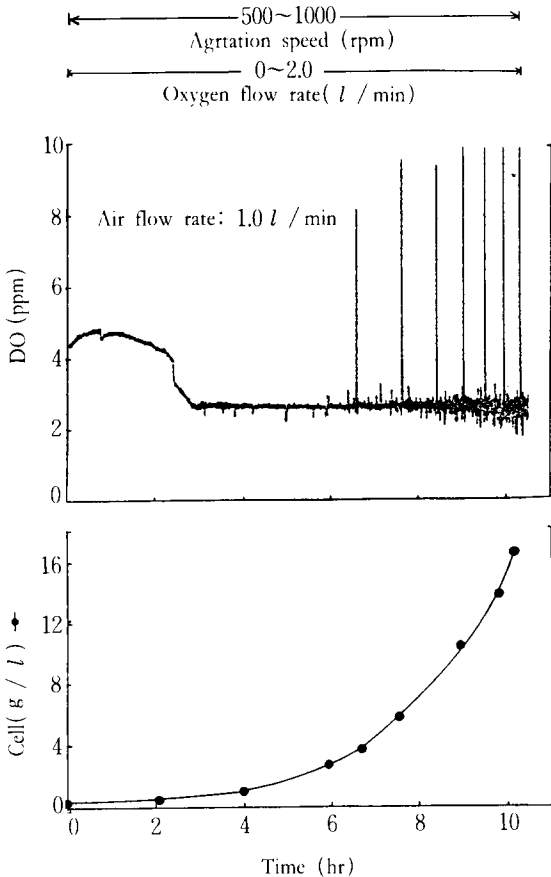


Fig. 3. Fed-batch cultivation of *Methylobacillus* sp. Sk1 with microcomputer-aided control system. When agitation speed reached 1000rpm, oxygen flow rate increased semiautomatically. Air flow rate was kept constant(1vvm). Methanol of 8.04ml was fed at each peak of dissolved oxygen.

배양할 경우 짧은 시간에 더 높은 균체농도에 도달할 수 있으리라고 본다.

배양액의 DO는 최대교반속도가 1000rpm에 도달한 후 산소유량을 약 2.0 l / min까지 증가시키는 과정에서 초기에는 약 2.5 ± 0.2 ppm으로 제어되었으며, 말기에는 약 2.5 ± 0.6 ppm으로 오차가 커지기는 하였으나 큰 무리 없이 제어되는 것을 알 수 있었다.

또한 배양중에 메탄올의 완전소모와 함께 2.5ppm으로

유지되던 DO가 급격히 증가하였으며 증가신호에 뒤이어 일정량의 메탄올이 주입되고 메탄올이 주입됨과 동시에 DO가 신속하게 설정농도로 복귀되는 과정이 원활하게 진행되었다. 즉, 기질의 공급과 배양액의 DO 제어과정이 하나의 프로그램으로 무리없이 수행되는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구의 제어시스템은 비단 메탄올 이용균만이 아니라 다른 종류의 호기성 미생물의 고농도 유가배양에도 큰 수정없이 적용될 수 있으리라고 생각된다.

요 약

배양기와 16비트 마이크로컴퓨터를 접속하여 호기성 미생물의 고농도 유가배양시스템을 구성하였다. 기질공급을 위한 제어변수로는 용존산소(DO)를 이용하였다. 용존산소측정기의 출력신호를 컴퓨터에 입력시켜 측정된 DO값에 근거하여 교반모터의 교반속도와 산소유량을 제어함으로써 배양액의 DO를 일정하게 유지하였으며, 연동펌프의 제어에 의해 기질공급을 안정하게 수행하였다. 기질공급의 제어와 DO의 제어를 한가지의 하어드웨어 및 소프트웨어로 수행할 수 있었다. 제어시스템을 이용하여 메탄올이용균인 *Methylobacillus* sp. SK1을 유가배양한 결과 배양액의 DO제어와 메탄올공급의 제어가 무리없이 수행되었으며, 배양 10시간만에 16.53 g / l의 균체농도에 도달하였다.

참 고 문 헌

1. S. J. Parulekar and H. C. Lim(1985), *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, **32**, 207.
2. T. Yamane and S. Shimizu (1984), *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, **30**, 47.
3. T. Yano, T. Kobayashi and S. Shimizu (1978), *J. Ferment. Technol.*, **56**(4), 421.
4. T. Yamane(1981), *Biotech. Bioeng.*, **23**, 2509.
5. T. Yano, T. Kobayashi and S. Shimizu (1978), *J. Ferment. Technol.*, **56**(4), 416.
6. H. Mori, T. Yano, T. Kobayashi and S. Shimizu (1979), *J. Chem. Eng. Japan.*, **12**(4), 313.
7. H. Y. Wang, C. L. Cooney and D. I. C. Wang (1977), *Biotech. Bioeng.*, **19**, 69.
8. H. Y. Wang, C. L. Cooney and D. I. C. Wang (1979), *Biotech. Bioeng.*, **21**, 975.
9. N. Nishio, Y. Tsuchiya, M. Hayashi and S. Nagai (1977), *J. Ferment. Technol.*, **55**(2), 151.

10. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu (1986), *J. Ferment. Technol.*, **64**(4), 317.
 11. W. T. Wu, K. C. Chen and H. W. Chiou (1985), *Biotech. Bioeng.*, **27**, 756.
 12. 淺田浩二 (1976), 生化學, **48**(4), 226.
 13. T. Yano, H. Mori, T. Kobayashi and S. Shimizu (1979), *J. Ferment. Technol.*, **57**(2), 91.
 14. T. Yano, T. Kobayashi and S. Shimizu (1981), *J. Ferment. Technol.*, **59**(4), 295.
 15. T. Suzuki, H. Mori, T. Yamane and S. Shimizu(1985), *Biotech. Bioeng.*, **27**, 192.
 16. 김시욱(1989), 연세대학교 박사학위논문.
 17. 이승진, 황영보, 장호남, 장용진(1990), *화학공학*, **28**(3), 292.
 18. M. J. Rolf, P. J. Hennigan, R. D. Mohler, W. A. Weigand and H. C. Lim (1982), *Biotech. Bioeng.*, **24**, 1191.
- (Received; October 19, 1990, Revised; November 19, 1990, Accepted; November 30, 1990)**