

CAD 프로그램을 이용한 돼지 성장호르몬 생산공정모사

김 성 구 · 공 인 수 · 공 재 열 · *김 영 숙 · **박 돈 회

부산수산대학교 생물공학과, *양산전문대학교 전통조리학과, **전남대학교 생물화학공학과

Process Simulation for the Production of Porcine Growth Hormone Using CAD Program

Sung-Koo Kim, In-Soo Kong, Jai-Yul Kong, *Young-Sook Kim, **Don-Hee Park

Dept. of Biotech. & Bioeng., National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

*Dept. of Food & Nutrition, Yangsan Junior College, Yangsan 626-800, Korea

**Dept. of Biochemical Engineering, National Chonnam University, Kwangju 500-757, Korea

ABSTRACT

A computer simulation of biochemical process was carried out using Macintosh-based BioDesigner™ developed at Bioprocess and Engineering Center(BPEC) of MIT. Based on the assumptions and flask culture experiments, a porcine growth hormone(PGH, Porcine Somatotropin) production process was simulated by a two-stage continuous culture. The economical and sensitivity analyses were evaluated for the scale-up production of PGH. A high return on investment(ROI, 104%/year) suggested that the process be profitable. However, sensitivity analysis indicated that ROI was dependent on the yield of PGH, selling price, dose and the achievement of projected market penetration.

서 론

돼지성장호르몬(PGH)은 돼지의 성장을 촉진하여, 양돈농가에서 돼지에게 투여할 경우 양돈기간 동안 도체의 무게를 증가시킨다(1). 아울러 일정한 도체의 무게에 도달하는 기간을 감소시키며, 지방질을 적게 하고 육질의 양을 증가시킨다고 보고되고 있다(2). Smith와 Kasson(1)에 의하면, 돼지성장호르몬을 투여하지 않았을 경우 돼지를 100~110kg의 성돈으로 키우는 데 100일이 걸리지만 돼지성장호르몬을 투여할 경우 사육일수가 80일로 줄어든다고 보고되고 있다. 또한 돼지성장호르몬의 투여의 경우 사료의 도체변환율이 증가한다고 보고되었다.

돼지 한 마리당 PGH 투여량의 양은 사료사육과 PGH의 투여기간 및 방법에 따라 달라지게 되지만 평균 200mg의 PGH를 돼지 사육기간 100일 중에 투여하여 도체중량 증가를 꾀할 수 있다(3).

돼지 성장호르몬은 분자량이 20,000 Dalton 정도의 작은 펩티드 호르몬이며, 돼지의 뇌하수체에서 적은 양이 생성된다. 그러므로 도살장에서 얻은 돼지의 뇌하수체로부터 돼지 성장호르몬을 분리 추출하는 것은 힘든 작업이며 아울러 가격이 비싸게 될 것이다. 그러므로 돼지 성장호르몬의 유전자를 λ P₁ promoter (thermal induction promoter)에 연결하여 *E. coli*에 insertion시킨 뒤 inclusion body 형태로 분리하여 solubilization 및 refolding process를 통해 대량으로 PGH를 얻을 수 있다(2). 생물공학

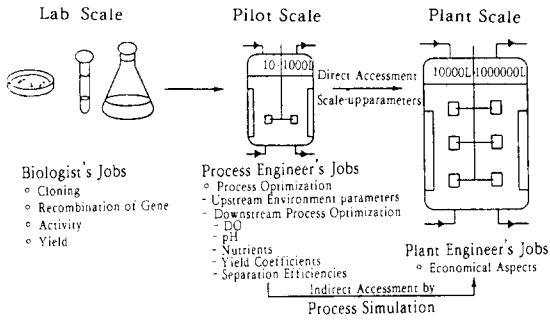


Fig. 1. Scale-up flow chart of biochemical engineering process.

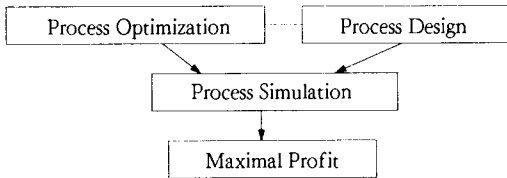


Fig. 2. Biochemical engineering processes.

에서의 규모화는 Fig. 1에서 보여 주는 바와 같이 실험실규모의 균주개발 및 개발을 하고, 이어서 개발된 균주를 사용하여 파이롯트 규모에서 공정최적화요소를 결정한 뒤 산업적 생산단계로 옮겨가게 되는 것이다(5). 그러나 파이롯트 규모에서 공장생산규모로 옮겨갈 때는 규모화요소에 따라 공정설계 및 장치화 한다. 대부분의 경우 규모화의 전단계로서 공정모사를 해 봄으로써 이러한 생산공정의 경제성 및 가능성을 타진하여 공정설계, 특히 자본 및 생산가의 절감과 생산물의 품질의 향상을 꾀할 수 있는 것이다. 아울러 공정개발에 걸리는 시간을 절약할 수 있고, 결과적으로는 연구개발에 많은 시간을 투자할 수 있게 되는 것이다. 결과론적으로 Fig. 2에서 보는 바와 같이 생물공학공정의 최종목표는 최대의 이익을 추구하는 방향으로 유도되어야 하는 것이다. 이 모사공정에서는 플라스크배양에서 얻은 단백질 함량 및 inclusion body 내의 PGH의 함량을 구한 뒤 다른 인자들의 가정으로서 1년에 6000kg의 PGH를 생산하는 2단 연속배양방법으로 공정을 설계한 뒤 그 경제성 및 가정조건에 의한 수익률 변화를 보았다.

Table 1. Protein and PGH content from flask culture

Item	Contents
Intracellular Protein	50%
PGH in inclusion body	25%
Yield of downstream process	25%

재료 및 방법

플라스크 배양

PGH와 λP_1 Promoter를 insertion시킨 *E. coli* clone을 플라스크 배양으로 Table 1과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

공정설계 목표

산업화 규모의 공정개발목표는 PGH를 미국 양돈 업계의 30%의 시장을 침투한다는 목표 즉, 3천만 마리의 돼지에게 PGH를 주사, 투여한다는 것으로 시장점유율 가정을 세우고 마리당 200mg을 투여하는 것으로 가정하고 1년간 6000kg의 PGH를 생산하는 공정을 모사해 보았다.

공정의 설계로는 세포증식발효조 및 PGH 생산발효조의 2단계 연속발효조를 채택해 보았고 편의상 배양개시시간 및 종균배양의 발효조는 생략하였다. 발효는 1년에 300일 동안 연속으로 발효를 행하며 분리회수공정은 저장조를 경계로 하여 1일 8시간 근무하는 것으로 공정을 설계하여 보았다.

각 공정은 3개의 큰 공정으로 분리할 수 있는 데 Fig. 3에서 보는 바와 같이 원료의 혼합에서 살균,

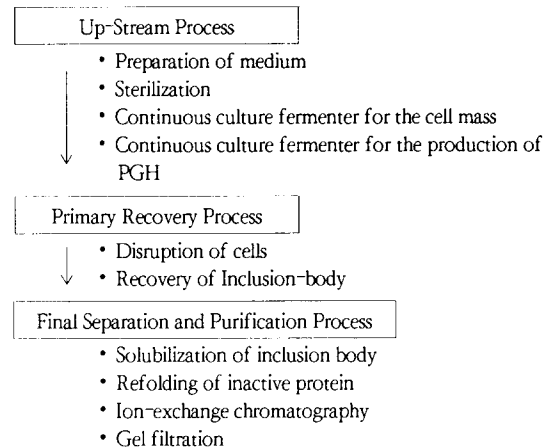


Fig. 3. Process block diagram for PGH production.

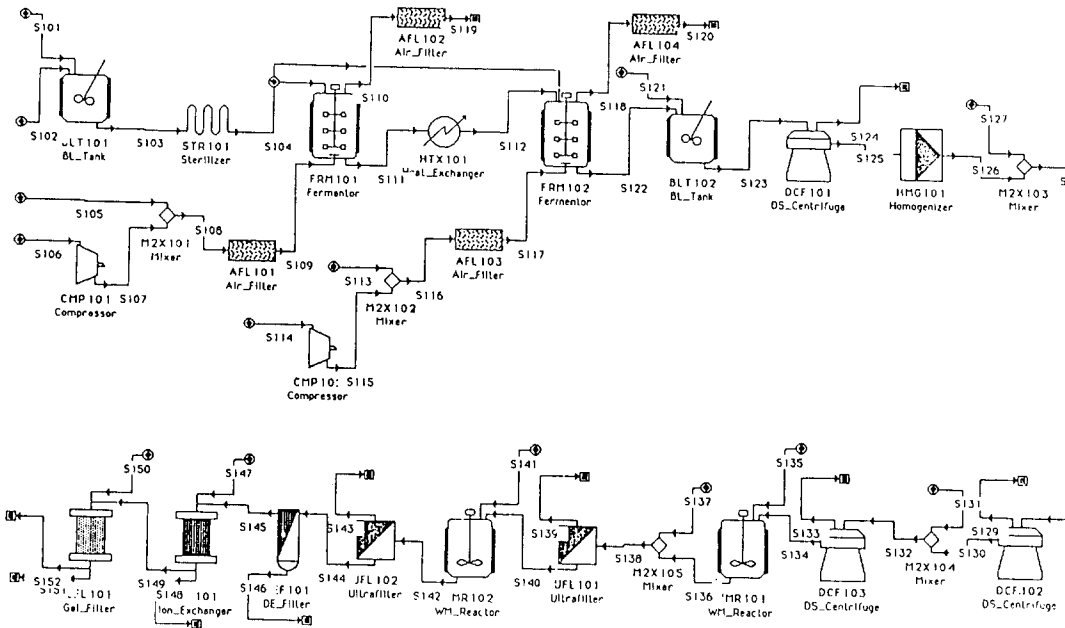


Fig. 4. Flow sheet of the production of porcine growth hormone by two stage continuous fermentation.

PGH 생산까지의 up-stream 공정, 세포를 분쇄하여 inclusion body를 구하는 제1차 회수공정과 불활성 PGH를 활성을 지닌 PGH로 만들고 98%까지 순도를 높이는 최종분리정제공정으로 나눌 수 있다.

설계하였다. 각각의 단위조작공정의 크기를 결정하기 위해 PGH 생산량과 회수율에 기초를 두고 간단한 계산을 행하여 그 공정의 크기 및 가격을 결정하였다.

CAD 프로그램

Computer Assisted Design(CAD) 프로그램은 BioDesigner™ Version 1.03을 사용하였으며, 분석 부분에서의 각각의 단위조작의 기계가격 및 계산가격은 계산자(multiplier)의 가격('91년 기준)을 이용하여 분석하였다.

배지혼합탱크(BLT101)

포도당(80g/l)와 미네랄 및 Thiamine을 첨가한 뒤 혼합을 하여 972l/hr의 유속으로 배지혼합물을 공급하도록 설계했다. 그러므로 2시간의 체류시간을 가지도록 가정하면 배양조의 크기는 2500l 이었으며 전력소비는 0.5kw/m²이었다.

결과 및 고찰

공정설계

BioDesigner의 단위조작을 선택하여 연결시켜줌으로써 전체의 공정을 완성하였다. Fig. 4에 보여준 공정흐름도(process flow diagram)는 일반적인 유전자 조합에 의한 단백질 생산공정에 기초하여 작성하였다. PGH생산공정(up stream)은 24시간 가동하는 3교대 작업으로 연속발효공정으로 설계되어 있고, PGH분리회수공정(down stream)은 임시저장조를 경계로 하여 하루 8시간 작업하는 공정으로

살균기(STR101)

연속살균기로써 살균공정을 설계하였다(6). 살균공정목표는 3000시간 작업시 spore가 1개 오염될 확률로 가정하고 계산하였으며, 초기 포자균수는 10⁶/ml, Arrhenius상수는 10⁴⁷/min, 활성화 에너지는 84.6kcal/mole로 가정하고 살균공정의 가열 사멸상수(thermal death constant)를 계산하였다. 970l/hr의 유속과 플러그흐름의 가정에 의해 구해 본 살균기의 제원은 1인치 파이프 6.2m가 필요하다는 계산치를 STR101 계산자에 대입하였다.

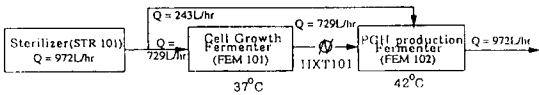


Fig. 5. Detail description of fermenters and flow rates.

공기 압축기(CMP101)

1vvm의 속도로 암모니아 가스를 공기혼합기(M2X101)에서 암모니아를 혼합한 후 공기필터(AFL101)를 통과하여 1vvm으로 발효조에 통기시키도록 설계하였다.

세포증식발효조(FRM101)

균체증식발효조의 경우 공급된 탄소원이 다 소모(즉 $S_1=0$)된다고 가정하고 균체의 양을 계산하여 Fig. 5와 같이 각각의 제원에 대한 계산을 할 수 있었으며 이들의 값을 계산자에 대입하였다. 생산되는 균체의 양은 효율 $Y_{x/s}$ 를 0.4로 가정하고 doubling time을 2시간일 때라고 가정하면 최대비증식속도 $\mu_{max}=0.35/hr$ 이므로 μ 를 0.2로 잡으면 정상상태일 때의 세포농도는 32 g/l로 계산된다. 아울러 $K_{L,a}=952mmol/l \cdot hr \cdot atm$ 이며 Fakuda들에 의한 관계식으로 전력소비를 구하면 6hp의 모터가 필요하다는 계산이 나온다(7).

열교환기(HTX101)

λP_i Promoter 즉 thermal induction promoter에 의한 유도는 온도를 37°C에서 42°C로 올려줌으로써 PGH생산이 유도되어지는 것이다. 열교환기를 통과함으로써 온도를 올리고 PGH 생산단계로 792l/hr의 유속으로 PGH생산발효조로 보낸다.

PGH 생산발효조(FRM102)

792l/hr의 유속으로 32g/l의 세포양으로 2번째의 연속발효조로 발효액이 옮겨지면서 243l/hr의 유속으로 흘러오는 새로운 배지와 섞어지면서 균체량이 24g/l로 희석되어진다. 42°C로 유지되면서 3.4g/l의 PGH가 생산되어서 inclusion body 내부고형물을 형성하게 되며 최종 균체의 양은 27.4g/l이며, 이어서 정치조로 보내진다.

정치조(Hold-up tank BLT102)

연속발효에서 생산된 발효액을 모아 놓는 탱크로서 24시간 작업한 양의 발효액을 모아서 분리회수공

정에서는 8시간 작업으로 PGH를 분리하도록 하는, 발효와 분리회수공정의 분계점이 되는 공정이다.

디스크스택 원심분리기(DCF101)

세포 균체를 얻기 위해 발효액을 원심분리시켜 제거한다. 약 3.5배 이상의 부피감소의 효과를 볼 수 있다.

고압균질기(HMG101)

세포를 파쇄하여 세포속의 inclusion body를 얻기 위해 세포파쇄를 고압균질기로서 800압력의 기압차로서 세포를 파쇄한다.

디스크스택 원심분리기(DCF102, 103)

파쇄된 세포에서 나온 inclusion body는 평균 크기가 0.5~0.6 μm 의 크기로 그 비중은 1.3g/l이므로 원심분리기(DCF102)로 분리하고 난뒤, 다시 원심분리기(DCF103)에 건 다음 과량의 물을 첨가해 줌으로써 세척할 수 있다.

교반반응조(WMR101)

Inclusion body의 불용성 불활성화 단백질을 4M 요소와 0.5M 2-mercaptoethanol을 첨가함으로써 용해시킨다.

한외여과(UFL101)

한외여과를 통해 요소와 2-mercaptoethanol을 제거하고 이어서 pH9.5의 완충용액을 첨가한다.

교반반응조(WMR102)

단백질용액이 0.05%(w/v) 이하가 되도록 유지하고 pH를 9.5로 조절하여 단백질의 산화 및 활성화된 구조로 재구성(refolding)되도록 환경을 만들어 준다. 필요에 따라서 산소통기를 해줄 수도 있다.

한외여과(UFL102)

재구성된 활성PGH를 한외여과를 통해 수분을 제거함으로써 농도를 15~20배 정도로 높인다.

데드엔드여과기(DEF101)

1~2% 정도의 PGH용액의 큰 부유물을 데드엔드여과를 통해 제거한다.

음이온 교환수지 크로마토그래피(INX101)

음이온 교환수지 크로마토그래피를 통해 PGH를

Table 2. Overall material balance(kg/h)

Component	In	Out	△(Out-In)
PGH	0.000000	0.826110	0.826110
Biomass	0.000000	19.780360	19.780360
H ₂ O	15089.554459	15145.141649	55.587190
CO ₂	0.000000	166.364190	166.364190
Glucose	77.780000	0.000000	-77.780000
NH ₃	10.376700	3.531404	-6.845296
O ₂	152.740000	0.000000	-152.740000
N ₂	574.590000	574.590000	0.000000
Salt	11.000000	5.468836	-5.531154
PGH-Den	0.000000	0.118936	0.118936
Incl-Body	0.000000	0.025044	0.025044
Urea	56.800000	56.800000	0.000000
Debris	0.000000	0.118936	0.118936
Protein	0.000000	0.185368	0.185368
MrEtOH	8.660000	8.660000	0.000000
Inx-Salt	0.086359	0.086359	0.000000
Detergent	0.880000	0.880000	0.000000
Total	15982.467518	15982.467977	0.000460

통과시킴으로써 95%의 PGH를 얻을 수 있다.

젤여과 크로마토그래피(GEL 101)
95%의 PGH를 젤 여과 크로마토그래피를 통해서 최종적으로 98%의 PGH를 얻을 수 있다.

종합적인 분리회수 수율
최종분리 회수 수율은 발효에서 생산된 PGH의 25%를 얻는 것으로 가정하고 계산자에 의한 계산을 하였다.

물질수지

물질수지는 Table 2에서와 같이 구할 수 있었다.

경제성 분석

자본금 투자(Capital Investment)

BioDesigner™의 경제성 분석에 의한 분석에 의하면 10%의 여유(contingency)를 감안한 결과 2천 9백만불의 자본이 들어간다고 나타났다(Table 3).

Table 3. Fixed capital estimate summary(1991 Prices)

A. Total Plant Direct Cost(TPDC) (physical cost)			
1. Equipment Purchase Cost	(PC)	\$	4902000
2. Installation	(0.40×PC)		1961000
3. Process Piping	(0.35×PC)		1716000
4. Instrumentation	(0.40×PC)		1961000
5. Insulation	(0.03×PC)		147000
6. Electrical	(0.10×PC)		490000
7. Buildings	(0.15×PC)		2206000
8. Yard Improvement	(0.15×PC)		735000
9. Auxiliary Facilities	(0.40×PC)		1961000
			TPDC=16079000
B. Total Plant Indirect Cost(TPIC)			
10. Engineering	(0.25×TPDC)		4020000
11. Construction	(0.35×TPDC)		5628000
			TPIC=9648000
C. Total Plant Cost(TPDC+TPIC) TPC=25727000			
12. Contractor's fee	(0.05×TPC)		1286000
13. Contingency	(0.10×TPC)		2573000
			Σ(12+13)=3859000
D. Direct Fixed Capital(DFC) TPC+12+13			29586000

운전비용(Operating Cost)

운전비용의 경우 감가상각을 고려한 경우 천 6백만US\$이 들며 감가상각을 고려치 않은 경우 천 4백만불이 든다는 것을 BioDesigner로 분석할 수 있었다(Table 4).

연간운전비용의 사용비율을 보면 Fig. 6의 표시에 보여준 바와 같이 감가상각 및 건물유지에 의한 비용이 가장 많았으며, 생물공업회사의 특징적인 연구 개발에 많은 비중을 차지하도록 하였다. 그 다음으로 인건비, 화학약품들 순으로 그 비중을 차지하였다.

이익분석

PGH200mg 당 2US\$로 판매하며 시장점유율 목표를 달성하게 될 때 Table 5에 보여준 바와 같이 3천 백만불의 순이익을 얻을 수 있으며 이로써 투자에 대한 자본회수율이 1년에 104%라고 할 수 있으며 은행부채에 대한 상환기간은 0.96년이라고 분석할 수 있었다.

경제성 변수 분석(Sensitivity Analysis)

앞서의 경제성 분석의 경우 시장점유율, 투여량에 대한 PGH가격에 대한 고려를 하지 않고 분석하였다. 그러나 실제상황에서는 이러한 목표달성이 쉽지

Table 4. Annual operating cost(1991 Prices) calculated from biodesigner

1. DFC-Dependent Items(DFC=\$ 29586000)		
Depreciation	\$	2811000
Maintenance Material	$(0.03 \times \text{DFC})$	888000
Insurance	$(0.01 \times \text{DFC})$	296000
Local Taxes	$(0.02 \times \text{DFC})$	592000
Factory Expense	$(0.05 \times \text{DFC})$	1479000
		6066000
2. Labor-Dependent Items		
a. Operating labor	(28×28000)	784000
b. Maintenance labor	$(0.03 \times \text{DFC})$	888000
c. Fringe benefits	$(0.40 \times (a + b))$	669000
d. Supervision	$(0.20 \times (a + b))$	334000
e. Operating supplies	$(0.10 \times a)$	78000
f. Laboratory	$(0.15 \times a)$	118000
		2871000
3. Administration and Overhead Expense($0.6 \times (a + b + c)$)		
		120400
4. Raw Materials		
		338000
5. Process Chemicals & Other Consumables		
		1731000
6. Utilities		
		146000
7. Waste Treatment		
		344000
8. Running R & D		
		3000000
9. Running Royalties		
		0
10. Sales Cost		
		1000000
Total Annual Operating Cost		
Including Depreciation		16700000
Excluding Depreciation		13889000

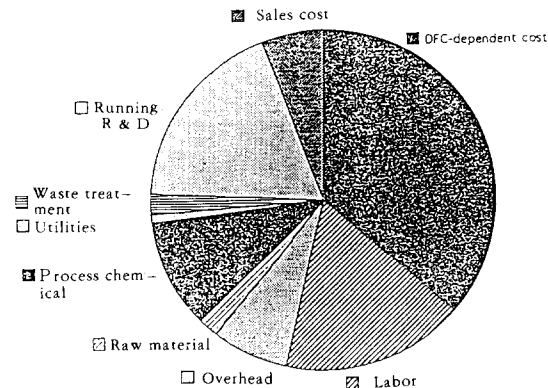


Fig. 6. Breakdown of an annual operating cost.

Table 5. Profitability analysis(1991 Prices)

A. Direct Fixed Capital	\$	29586000
B. Working Capital		663000
C. Total Investment(A+B)		30249000
D. Production Rate(kg/year)		
pGH		5948
E. Production Cost(\$/kg)		2081
F. Selling Price(\$/kg)		
pGH		10000
G. Revenue(\$/year)		59480000
H. Annual Operating Cost		16700000
I. Gross Profit(G-H)		42780000
J. Taxes(33%)		14117400
K. Net Profit(I-J+Depreciation)		31473600
Gross Margin		0.97
Return on Investment		104%
Rayback Time(years)		0.96

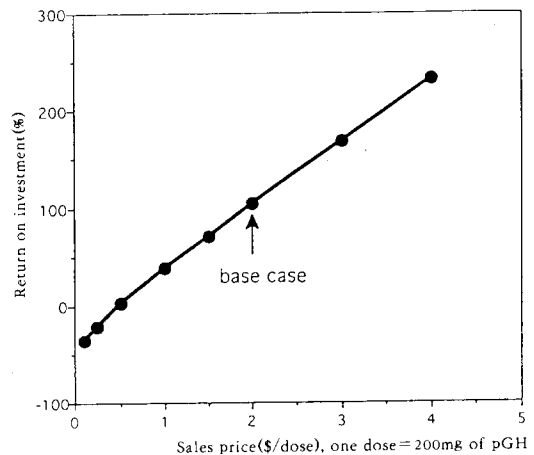


Fig. 7. Sensitivity analysis on the sales price of pGH.

않은 것이 현실이다. 그러므로 ‘만약(what if)’이라는 가정에 의해서 일어날 수 있는 변수를 예측해 봄으로써 실제적인 예상변수에 대한 대비를 할 수 있는 것이다. 그 각각의 변수분석의 예를 PGH가격 변동, PGH dose량, 시장점유율 달성에 대한 분석으로써 있을 수 있는 경제적인 변화요인을 점쳐 보았다.

요 약

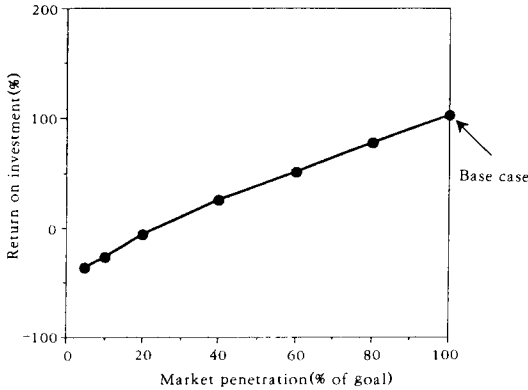


Fig. 8. Sensitivity analysis on the market penetration(\$2/dose, 200mg pGH/dose).

PGH의 판매가

PGH의 가격은 PGH를 돼지에 투여하고 투여한 만큼의 돼지 도체의 증가분의 25%를 PGH가격으로 지급한다는 논리하에서 PGH의 돼지 1마리 투여분인 200mg의 가격을 2볼로 정하였다. 즉 PGH를 투여하여서 돼지의 무게가 8~10kg 증가하므로 그것의 25% 즉 4~5lb의 가격 즉 2볼로 책정하였던 것이다. 그러나 돼지의 생육환경에 따라 그 편차가 있을 수 있으므로 PGH의 판매가격에 편차가 있을 수 있다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 200mg PGH의 가격이 50센트 이하로 떨어지게 되면 적자가 나게됨을 알 수 있다.

시장점유율 목표 달성

시장점유율의 목표를 미국의 양돈돼지 30%에게 투여한다고 시장점유율의 목표를 세웠다. 그러나 여러 가지의 변수 특히 유전자 재조합 단백질에 대한 거부감, 소비자단체의 로비 등의 방해요소에 의해서 그 목표달성이 쉽지 않으리라 짐작된다. 이러한 요소들의 영향력을 고려하여 목표달성 혹은 어느 정도 까지 목표에 접근해야 이익을 낼 수 있는지 예측해 보았다. Fig. 8에서 보여 주는 바대로 목표에 대한 (100%), 20% 이상의 시장점유율을 달성해야 이익을 올릴 수 있다는 것을 보여주고 있다. 최소한 양돈업계의 6% 즉 600만 마리 이상의 돼지에게 PGH 200mg씩을 양돈업자에게 2볼의 가격으로 팔아야만 수지타산을 맞출 수가 있는 것이다.

이외에도 여러 가지의 변수분석을 '만약(what if)'라는 가정으로 그 방향설정을 할 수 있는 것이다.

1. 돼지 성장호르몬을 연간 6000Kg을 생산하는 공장의 공정 설계를 Macintosh PC를 사용한 Bio-Designer를 이용해서 공정모사를 해 보았다. 각 단위공정의 계산자를 정하기 위한 계산을 가정과 플라스크배양의 결과를 이용하여 up-stream을 설계하고, downstream에서는 25%의 분리정제 수율을 가정하고 전체공정을 설계하였다.

2. 경제성 분석에 의하면 돼지 성장호르몬의 dose 당 \$ 2.00로 할 때 투자상환율(return on investment, ROI)이 일 년에 104%이었으며, 투자금액의 상환에 걸리는 시간은 약 1년(0.96년)이 걸리는 것으로 나왔다.

3. Sensitivity분석에 의하면 투자상환율은 돼지 성장호르몬의 수율, 가격, 사용량 및 시장잡식을 순서의 변수에 의해 결정되는 것을 알 수 있었다.

감 사

본 논문은 교육부 학술진흥조성비(BSR1-94-4410)의 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. C. W. Kasson and V. G. Smith (1990), "Growth Performance and Carcass Characteristics of Pigs Administered Recombinant Porcine Somatotropin during 30 to 110kg live Weight", *J. Animal Sci.*, **68**, 4109
2. C. S. Chung, T. D. Etherton and J. P. Wiggins, (1985), "Stimulation of Swine Growth by Porcine Growth Hormone", *J. Animal Sci.*, **60**(1), 118.
3. P. Petridis Dimitrios, C. L. Cooney, L. B. Evans, Field, Randall P. and Snoswell, Mark (1989) "Bioprocess Simulation: An Integrated Approach to Process Development", *Computers Chem. Engineering*, **13**(4/5), 553
4. P. Petridis Dimitrios (1991), "BioDesigner 1.03 manual.
5. P. Petridis Dimitrios (1990), "Computer-Aided Design of Integrated Biochemical Processes; Development of BioDesigner", MIT Ph. D. Thesis.

6. C. L. Cooney (1983), "The Principles of Biotechnology: Engineering Considerations: Chapter 18. Media Sterilization", pp. 287-298 Eds. Cooney, C. L. and Humphrey, A. E., Pub. Pergamon Press, NY, NY.
7. D. I. C. Wang, C. L. Cooney, A. L. Demain, P. Dunnill, A. E. Humphrey and M. D. Lilly, (1979), "Fermentation and Enzyme Technology, Chapter 9: Aeration and Agitation" pp. 157-193, Pub. John Wiley & Sons, NY, NY.