

발효기 하드웨어 변환을 이용한 용존산소 제어

†이 중 현 · ²이 인 영 · ²박 영 훈
¹조선대학교 화학공학과, ²생명공학 연구소 생물공정 연구부
(접수 : 2000. 5. 22., 게재승인 : 2000. 6. 9.)

Feedback Control of Dissolved Oxygen with Hardware Modification of Fermenter

Jung-Heon Lee†¹, In Young Lee², and Young Hoon Park²
¹Department of Chemical Engineering, Chosun University
²Bioprocess Research Unit, KRIBB
(Received : 2000. 5. 22., Accepted : 2000. 6. 9.)

The simple microprocessor device was provided for the control of dissolved oxygen(DO) level. The DO analog signal output from fermenter was used as a measurement variable and the agitation speed of fermenter was used as a manipulation variable. Agitation speed was manipulated to maintain DO level above 10% of saturation condition during cell growth period with microprocessor. Since the experimental results showed that the DO level was maintained above 10% and agitation speed was inverse proportional to DO level, this simple control device can be used for the DO control of fermenter.

Key Words : curdlan, DO control, feedback control

서 론

발효 공정에 있어서 세포의 성장이나 생산물의 생산 도중에 DO level을 일정량 이상 유지하는 것이 바람직하다. 이는 세포의 성장기에는 에너지원이 많이 필요하기 때문에 이를 많이 생산할 목적으로 산화공정이 많이 일어나 산소의 요구량이 많아지기 때문이다(1-3).

많은 연구자들은 발효조의 교반속도를 변화시켜 발효하면서 교반속도에 따른 효과를 본연구가 많은데 이는 발효공정에서 세포의 산소 요구량을 충족시키기 위한 산소의 전달량이 어느 정도 인지를 맞추어 조절하는 과정이다. 또한, DO level을 일정량으로 맞추어주는 것이 중요한 이유중의 하나는 산소의 농도가 높으면 산화 반응공정이 많이 일어나 대부분의 기질이 세포의 성장에 소모되며, 산소의 농도가 낮으면 환원 반응이 많이 일어나 세포의 성장이 잘 일어나지 않아 세포 성장 저해로 인하여 최적의 교반속도가 존재하기도 한다(4-7). 이러한 최적 교반 속도를 구하기 위하여 많이 사용되는 기존의 방법으로는 여러 가지 교반속도를 실험하여 이중 최대 생산물의 농도를 갖는 교반

속도를 구하는 방법을 사용하였다. 그러나 대부분의 경우 이러한 과정에서 중요한 요소는 발효조 내의 DO level이다(8,9). DO를 지속적으로 monitoring하여 교반속도를 계산식으로 올리는 형태의 조절전략을 택하는 경우가 많으나, 이러한 경우에 실험하는 연구자가 항상 DO를 monitoring해야하는 단점이 있기 때문에 간단한 hardware를 구성하여 DO level을 일정량 이상으로 조절하는 방법을 고안하였다.

본 연구에서는 현재 많이 이용되고 있는 발효조에 간단한 hardware를 장착하여 DO level에 따른 교반속도의 변화를 측정하여 이를 DO 제어에 응용하였으며 실제 발효 시스템에서 feedback control algorithm을 적용하여 DO limitation을 방지하여 curdlan의 생산성을 높였다.

재료 및 방법

세포배양 : 균주 및 재료

ATCC사로부터 curdlan 생성능이 우수한 *Agrobacterium* sp. ATCC 31750 (formerly *Alcaligenes faecalis* subsp. *myxogenes*)를 curdlan 생산을 위한 균주로 구입하여 여러 번에 걸쳐 single colony isolation 방법에 의하여 생성능이 우수한 균주를 선택하여 커들란 생산 균주로 사용하였다. 균주는 고체배지에서 30℃, 2주 간격으로 계대 배양하여 보관하였으며, 장기간의 보존을 위해서는 5 g/l yeast extract, 5 g/l peptone, 20 g/l sucrose, pH 7.0

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Chosun University
Tel : 062-230-7159, Fax : 062-230-7226
E-mail : leejh@mail.chosun.ac.kr

조성으로 된 Nutrient rich medium (YP)에서 15-18시간 배양한 후 40% glycerol 용액에 넣어 -70℃에서 보관하였다.

발효배지 및 배양방법

본 연구에서 사용된 배지는 두 개의 다른 배지를 사용하였다. 종배양 배지 조성은 20 g/l sucrose, 5 g/l yeast extract 그리고 5 g/l peptone 이며 초기 pH를 7.0으로 맞추었다. 본 발효배지 조성은 리터당 100 g sucrose, 2.3 g (NH₄)₂HPO₄, 1.0 g KH₂PO₄, 0.4 g MgSO₄·7H₂O, 그리고 10 ml의 미량원소 용액 (0.1 N HCl 1 리터에 5 g FeSO₄·7H₂O, 2 g MnSO₄·H₂O, 1 g CoCl₂·6H₂O, 그리고 1 g ZnCl₂를 녹여서 만듦)이고, 초기 pH는 7.0이었다. 플라스크 배양을 위하여, 100 ml 종배양 배지에서 30℃에서 17시간 동안 배양한 세포 5 ml를 0.3% (W/V)의 칼슘카보네이트를 포함한 발효배지에 접종하여 30℃에서 배양하였다.

발효조 배양은 용존산소 분석기와 pH 조절기를 장착한 한국 발효기 5 리터 발효기(Inchon, Korea)를 사용하였다. DO level에 따른 analog output은 multimeter로 측정하였으며 input voltage에 따른 교반속도의 변화도 calibration 하였다. 30℃에서 17시간 동안 배양한 종배양액 300 ml를 발효배지 2.7리터를 포함한 발효조에 접종하였다. 배양 pH는 4N NaOH를 사용하여 7.0으로 조절하였다. 또한, curdlan 생산기에는 pH를 5.5로 조절하여 배양하였다.

분석방법

생체량 및 curdlan 측정 : Curdlan은 물에 불용성이므로 배양이 끝난 배양액을 적당히 희석하여 5000 rpm, 4℃, 15분간 원심 분리하였다. 얻어진 침전물에 0.5N NaOH를 처리하여 curdlan을 녹인 후 다시 원심 분리하였다. 얻어진 침전물은 생체량 측정을 위해 2-3회 증류수로 세척하여 80℃, 24시간 dry oven에서 건조시켜 질량을 측정하였다. 또한 얻어진 상등액에는 curdlan이 녹아있으므로 2.0 N HCl을 처리하여 중화시킨 후 원심 분리하여 수확하고, 2-3회 증류수로 세척하여 80℃, 24시간 dry oven에서 건조시켜 질량을 측정하였다.

Sucrose 및 Ammonium 농도 측정 : Sucrose 농도는 2N HCl을 이용하여 100℃에서 15분간 가수 분해시킨 후 dinitrosalicylic acid 방법 (Miller, 1959)을 이용하여 측정하였으며, ammonium 이온분석은 indophenol 방법(Srienc 등, 1984)에 따랐다.

Hardware Setup

본 연구에서는 DO signal output을 측정값으로 이를 이용하여 교반 속도를 조절하여 DO level을 조절하는 전략을 취하였다. 실제 실험에서는 DO level이 낮아질수록 교반 속도를 증가시켜야 하기 때문에 DO signal voltage가 감소함에 따라서 제어출력 voltage를 증가시켜 교반 속도를 증가시킴으로서 DO level을 올릴 수 있는 간단한 feedback regulation을 사용하기 위하여 Figure 1과 같은 analog circuit을 구성하여 제어에 응용하였다. 실제로 제어출력은 다음과 같은 DO signal output과 같은 관계를 갖도록 circuit을 구성하였다.

$$V_{out} = A_{amp}(V_{ref} - V_{DO}) \tag{1}$$

A_{amp}의 값은 증폭 값이고 V_{DO}는 reference voltage로 이 값들은 가변 저항기를 사용하여 발효기의 DO 출력 및 교반속도

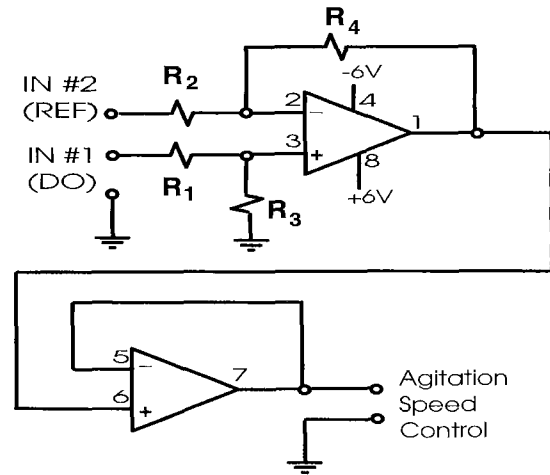


Figure 1. Diagram of simple DO controller circuit (LM358)

입력에 따라서 결정할 수 있도록 하고 조절하고자 하는 DO level에 따라서도 이를 조절할 수 있도록 하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이 회로를 구성하였다. 본 연구에서 사용한 IC chip은 두 개의 amplifier가 장착되어 있는 LM358[10]을 이용하였다.

결과 및 고찰

용존산소 농도에 따른 출력전압의 보정

DO를 측정하는 장치에서 출력되는 측정값은 전압 또는 전류의 형태로 나타나기 때문에 이를 실제 값인 DO (% saturation) 값으로 전환하기 위해서는 calibration process가 필요하다. 실험을 통하여 DO level에 변함에 따라서 출력 전압을 측정하여 다음과 같은 calibration curve를 얻었다.

$$DO(\% \text{ saturation}) = 51.28 \times (V_{output} - 1.0) \tag{2}$$

교반속도에 따른 입력전압의 보정

Input voltage에 따라서 교반속도가 변하기 때문에 두 값의 관계를 수식으로 나타내는 것이 필요하다. 그래서 input voltage에 따른 교반속도를 calibration 하여 다음과 같은 식을 얻었다. 이 값은 본 연구에서 실험한 한국 발효기 모델 (DO controller MK-250K 와 RPM controller MK-250C)을[11] 이용하여 구한 값들이다. 이 값들은 발효기에 따라 모델에 따라 다르게 나타난다.

$$Agitation \text{ Speed (RPM)} = 356 \times V_{input} \tag{3}$$

교반속도 제어를 이용한 용존산소농도 제어

DO level이 떨어짐에 따라서 agitation speed를 올림으로서 DO level을 다시 올릴 수 있게 하기 위하여 DO level이 떨어짐에 따라서 교반속도를 증가시키는 단순한 feedback control 실험을 하였다. DO level이 85% 이상이 될 때에는 교반속도를 최소 10 rpm으로 맞추도록 하였고 DO level이 5%가 되면 교반속도를 1000 rpm으로 맞추도록 제어 변수를 조절하였다. 실험상에서는 실제로 전압에 의해서 구동되기 때문에 전압의 conversion의 관계에 의해서 이를 표시하였다. 측정 출력과 제어 입력의 관계는 다음과 같이 나타난다.

$$V_{input}(Control) = 4.43 - 1.63V_{output}(DO\ Signal) \tag{4}$$

$$= 1.63 \times (2.72 - V_{output})$$

식 (4)에서 1.63과 2.72는 Figure 1의 가변 저항 값을 맞추어 제어 시스템을 구성하였다.

세포가 없는 상태에서 제어응답

세포를 배양하기 전에 제어시스템의 제어능력을 시험하기 위하여 세포가 없는 상태에서 산소와 질소를 주입시키면서 제어능력 및 교반속도의 변화를 관찰하였다. Figure 2를 보면 DO level의 변화에 따른 교반속도의 변화를 그래프로 나타낸 것이다. 초기 상태에서 공기를 주입하면서 DO level에 따른 교반속도의 변화를 보면 시간이 지남에 따라 DO level은 증가하고 교반속도는 감소함을 볼 수 있었다. 통기량을 증가시켜도 세포가 자라지 않는 상태에서 어느 정도 DO가 증가된 상태이기 때문에 변화가 없음을 볼 수 있었다. 질소를 공급하여 발효조에 있는 DO를 감소시키면 반비례로 교반속도가 갑자기 증가함을 볼 수 있고 거의 1000 RPM까지 증가함을 볼 수 있었다. 다시 산소를 주입함으로써 DO가 갑자기 증가함을 볼 수 있었고 DO 측정값에 따른 제어 output의 변화가 반비례적으로 정확히 나타남을 볼 수 있었다. 그러므로, 이 시스템은 발효시스템에서 DO를 제어하는 것이 가능하게 되었다.

용존산소 농도를 제어하지 않은 실험결과

교반 속도를 고정시켜 (500 RPM) 발효를 진행 할 경우 교반 속도를 제어하지 않을 경우에 DO level은 초기 세포성장기에 높은 상태로 유지하다가 지수 성장기에 급격히 감소함을 볼 수 있었다. 그러나, 제어 loop가 설치되어 있지 않은 상태에서 DO level은 0로 감소하여 세포성장기에 산소 limitation이 되어 생물 생산에도 영향을 주어 생산량이 감소하게 된다.

대부분의 발효의 경우에 DO level을 일정농도 이상 유지하는

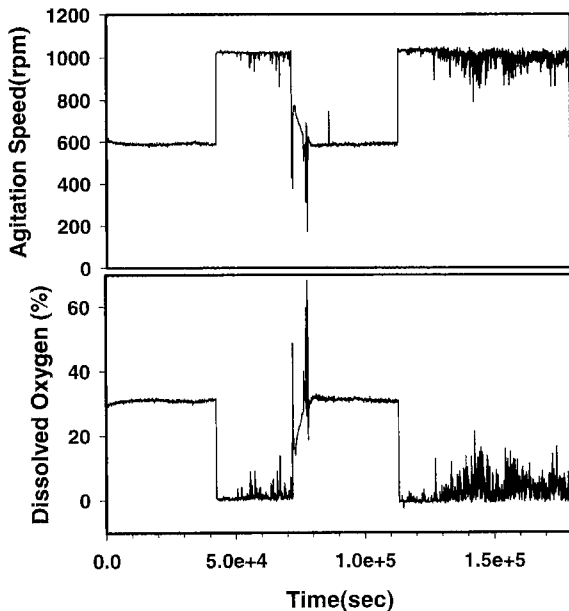


Figure 2. Response of agitation speed with the variation of DO level

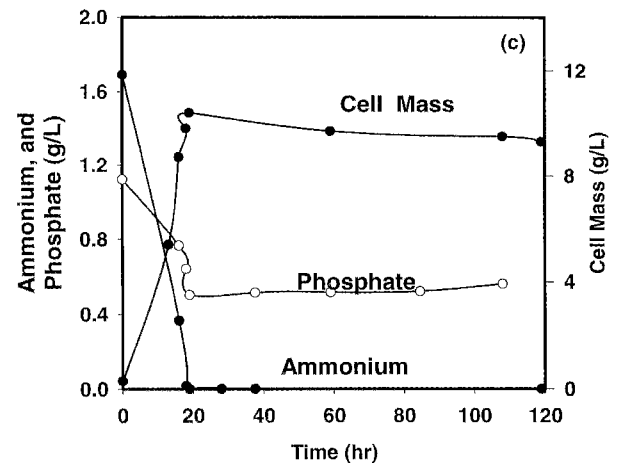
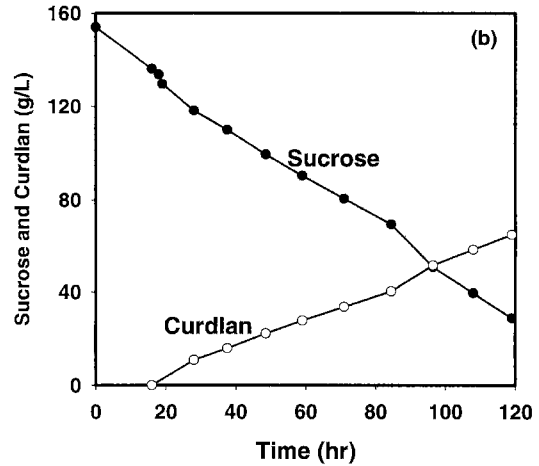
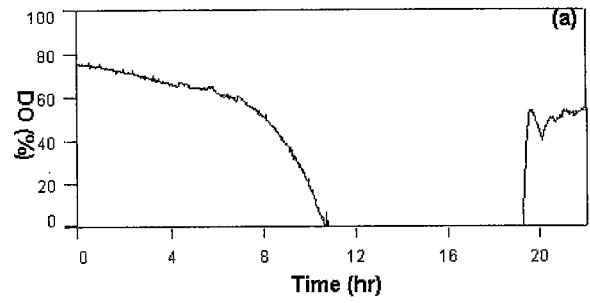


Figure 3. Experimental results without DO control (a) DO, (b) Sucrose and curdlan, (c) Cell mass, Phosphate, and Ammonium

것이 필요하다. 많은 연구에서는 이러한 DO level을 제어하기 위한 방법으로 DO level을 측정하면서 교반 속도를 계단식으로 올려주는 전략을 택하고 있는 실정이다. 그러므로 DO regulation system은 발효 도중에 세포에 영향을 주지 않을 정도의 DO level을 유지하기 위하여 필요한 장치이다.

실험결과 세포의 성장 및 curdlan의 생성은 Figure 3과 같이 나타났다. 산소의 농도가 지수 성장기에 0이 되었음에도 세포가 지속적으로 성장하는 것으로 관측되었다. 최종 curdlan의 농도는 120 시간만에 65 g/L를 생산하는 것으로 나타났다.

용존산소 농도를 제어한 실험결과

세포의 지수 성장기에 산소의 limitation을 방지하기 위하여

Figure 1에서 제안한 Feedback analog controller를 이용하여 DO 제어에 응용하였다. 그 결과 Figure 4에서 보는 바와 같이 세포의 성장기에 DO level은 10% 이상을 유지하는 것으로 측정되었고 이때 최고 교반 속도는 750 RPM 정도를 나타내는 것으로 측정되었다. 이는 이전 실험에서 사용했던 500 RPM을 훨씬 능가하는 것으로 배양도중의 산소 결핍을 방지하기 위해서는 적어도 750 RPM이 필요하다고 할 수 있으나 반응 초기부터 이러한

교반 속도로 제어할 수 없기 때문에 초기 DO level이 높은 상태에서는 교반 속도를 감속하고 DO level이 필요한 시기에 교반 속도를 증가시키는 전략을 취하였다. 이는 실제 공정 상에서 교반을 위한 동력을 감소시켜 에너지 절감의 효과를 가져올 것이다. 초기 DO level이 높은 경우의 교반속도는 거의 70 정도가 되어 산소 전달의 효과보다는 mixing의 효과만을 주는 정도로 나타났고 세포가 자람에 따라서 산소요구량이 많아지고 이에 따라 교반속도를 증가 시켜주는 제어 형태를 취하고 있다. 또한, 이러한 제어의 형태는 autoregulation을 하고 있어 DO level과 교반속도의 적합한 지점을 찾아 제어되는 형태를 띄고 있다.

DO 제어를 통하여 얻은 curdlan의 생산량은 73 g/L가 되어 DO를 제어하지 않았을 때보다 12%의 curdlan 생산량 증가를 보였다. 이는 세포가 growth phase에서 oxygen이 풍부한 상태에서 자라 curdlan의 생산성이 DO limitation 상태에서 자란 세포보다 좋기 때문이다.

결론

본 연구에서는 DO level을 자동적으로 조절하기 위하여 analog 자동조절기를 부착하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 이는 세포의 성장기에 산소부족으로 성장이 저해되면서 세포의 활동도가 떨어짐에 따라 curdlan을 생성하는 시기에 영향을 미치는 이유 때문일 것으로 추정된다. 또한, agitation speed의 증가에 따라서 세포벽의 permeability가 높아짐에 따라서 세포내부의 curdlan이 세포 외부로 전달속도가 빨라짐에 따른 결과이다.

Table 1. Effect of DO control on the cell growth and curdlan production.

	Cell Mass (g/L)	Curdlan (g/L)
without DO control	10.5	65
with DO control	10.9	73

본 연구결과 curdlan의 생성을 극대화하기 위하여 간단한 적분기를 이용 회로를 구성함으로써 발효기 내부의 DO level을 일정이상으로 자동으로 유지할 수 있는 회로를 구성함으로써 성공적으로 curdlan의 생산을 극대화 시킬수 있는 방법을 고안하였다.

이 논문에서는 간단한 원리를 이용하여 발효조내의 DO level을 일정하게 유지시킬 수 있는 방법을 개발하였다. 이로부터 발효조에서 응용할 수 있는 장치를 제조하였으며 커들란 생산발효에 적용시켜 생산성을 12% 증가시킬 수 있었다.

요약

본 논문에서는 기존의 발효기에 복잡한 computer control loop를 설치하지 않고도 dissolved oxygen(DO) level을 일정한 기준 이상 제어하기 위한 방법으로 전자 microprocessor를 이용하였다. 기존의 발효기에서 기록을 위해 출력되는 analog output을 제어의 측정 변수로하여 이를 이용하여 교반속도를 조절함으로써 세포가 자라는 동안에 DO limitation의 상태가 일어나지 않도록 하였다. 실험결과 세포가 활발히 자라는 상태에서도 10% 이상으로 유지됨을 볼 수 있었고 DO의 변화에 따라서 교반속도가 반비례함으로써 일정한 상태에서 조절이 되는 것으로 나타나 이러한 제어방법이 간단한 DO 조절에 사용될 수 있음을 보여주었다.

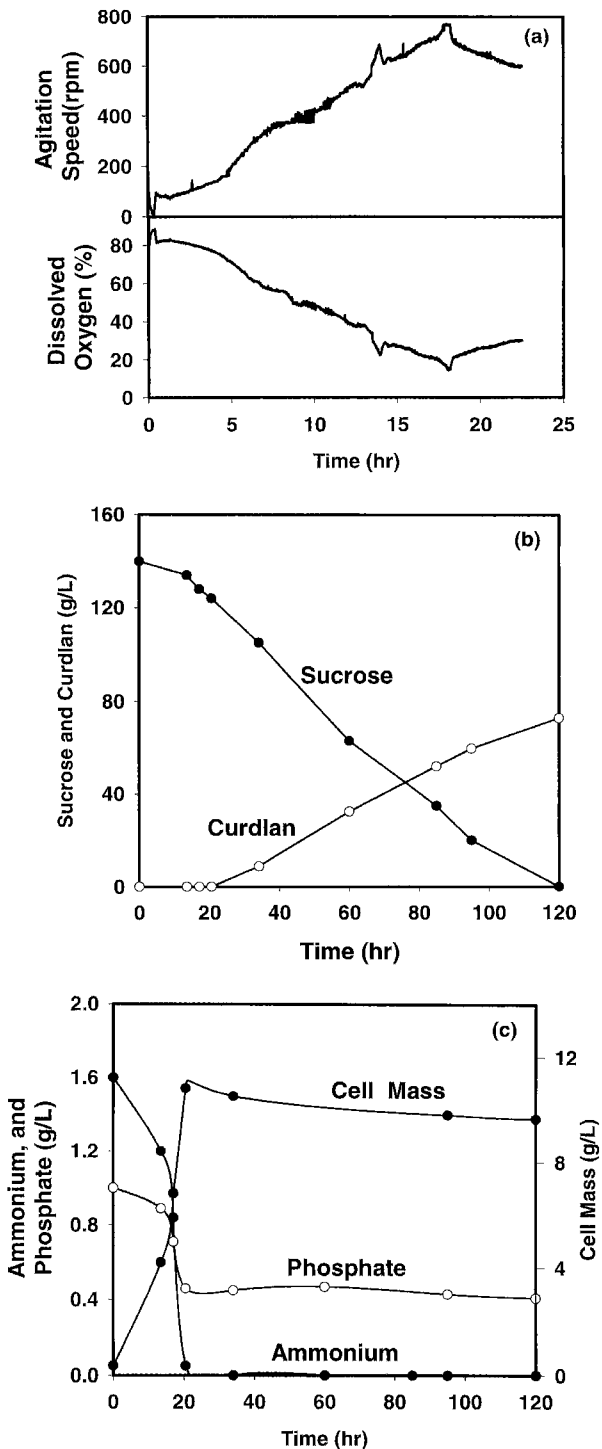


Figure 4. Experimental results with DO control (a) DO and agitation speed, (b) Sucrose and curdlan, (c) Cell mass, Phosphate, and Ammonium

REFERENCES

1. Chen, Y., J. Krol, V. Sterkin, and W. Fan (1999), New process control strategy used in a rapamycin fermentation, *Process Biochemistry*, **34**(4), 383-389.
2. Kojima, M., N. Tachikake, Y. Kyotani, K. Konno, S. Maruo, M. Yamamoto, and Y. Enzure (1998), Effect of Dissolved Oxygen and pH on Moranoline Fermentation by *Streptomyces lavendulae*, *Journal of Fermentation & Bioengineering*, **79**(4), 391-394.
3. Chen, W., C. Graham, and R.B. Ciccarelli (1997), Automated Fed-batch Fermentation with Feed-back Controls based on Dissolved Oxygen(DO) and pH for Production of DNA vaccines, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **18**, 43-48.
4. Oh, G., M. Moo-Young, and Y. Chisti (1998), Automated Fedbatch Culture of Recombinant *S. cerevisiae* based on On-line Monitored Maximum Substrate Uptake Rate, *Biochemical Engineering Journal*, **1**, 211-217.
5. Lee, I.Y., Y.H. Park, M.K. Kim, J.H. Lee, J.K. Chung, and H.W. Lee (1999), Effect of Agitation Speed on the Production of Curdlan, *Bioprocess Eng.*, **20**, 283-287.
6. Kong, D., R. Gentz, and J. Zhang (1998), Development of a Versatile Computer Integrated Control System for Bioprocess Controls, *Cytotechnology*, **26**, 227-236.
7. Rodrigues, J.A.D., and R.M. Filho (1999), Production Optimization with Operating Constraints for a Fedbatch Reactor with DMC Predictive Control, *Chemical Engineering Science*, **54**, 2745-2751.
8. Akesson, M., E.N. Karlson, P. Hagander, J.P. Axelsson, and A. Tacaj (1999), On-line detection of acetate formation in *E. coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients, *Biotechnology & Bioengineering*, **64**, 590-598.
9. Huang, G.-H., Y.-H. Huang, T.-M. Liang, and S. Chou (1999), Automatic Control with Dissolved Oxygen in a Sequencing Batch Reactor, Proceedings of the 7th IAWQ Asia - Pacific Regional Conference - ASIAN WATERQUAL '99 -, 2, 1601-1604.
10. Lee, S. W., D. S. Kho (1996), Computer control, Doseo Press, Seoul
11. KFC(Korea Fermentation Company) Manual, Korea Fermentation Company, Incheon Korea, 1997.