

연속 발효조를 이용한 soluble glucan 생산 공정 개발

문찬준 · 이중헌*

조선대학교 공과대학 화학공학과

Received June 15, 2006 / Accepted July 25, 2006

Development of Soluble Glucan Production Process with Continuous Stirred Tank Fermentor. Chan Jun Moon and Jung Heon Lee*. *Department of Chemical Engineering, Chosun University* – Continuous fermentation process for the production of soluble glucan using mutant *Agrobacterium* sp. ATCC31750 has been developed in this research. When the concentration of soluble glucan was higher than 6 g/L, the viscosity of the fermented broth was too high and it needs complex separation process to separate from culture broth. Mathematical models which describe the cell growth and glucan production was developed and they kinetic parameters were estimated with experimental data. They are used for the optimization of continuous fermentation process and calculate optimal dilution rate for easy separation of glucan 4 g/l. With continuous fermentation, glucan production rate was increased 1.8 times more than that with batch fermentation.

Key words – Glucan, continuous fermentation, modeling, separation

서 론

미생물에 의해 생산되는 biopolymer들은 미생물의 1, 2차 대사 산물로서 일반적으로 다당류나 그의 유도당으로 구성되어 있으며, 분자량이나 결합양식등에 따라서 다양한 물성을 나타내는 물질이다. 이들 미생물이 생산한 biopolymer는 생산조건에 따라 구성성분, 결합순서, 분자량, 결합양식, 결합위치 및 결합지가 다른 다양한 형태로 존재한다.

생물공학분야에서 대부분의 생물 반응기를 이용한 세포배양은 생산단계 절감을 위해 고농도 세포배양에 중점적으로 연구되고 있다[1,2]. 고농도 세포배양은 회수율 증가와 함께 분리비용의 절감이라는 두 가지 문제를 모두 해결해 준다. 이러한 공정개발의 일환으로 유가식 배양을 이용한 고농도 세포배양 방법[3]이 많이 소개되고 있다. 하지만 본 연구에 사용된 변이주 *Agrobacterium* sp.가 생산하는 soluble glucan은 8 g/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(Continuous stirrer tank reactor, CSTR)를 착안하게 되었다. CSTR은 세포성장이나 하나의 제한기질에 의해 성장 속도가 제한을 받고, 시스템이 정상상태에서 발효기내의 세포농도 및 생산물농도를 일정하게 유지할 수 있게 된다. 그러므로, 실험을 통해 생산물의 최적 분리 농도를 찾아 flow rate를 조절함으로써 최적화 된 공정[5,6]을 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.

재료 및 방법

균주 및 보존

본 연구에 사용한 균주는 *Agrobacterium* sp. ATCC 31750을 개량한 변이주로 평판배지에서 30℃로 2일간 배양 후, 4℃에서 보관하였고 2주마다 계대배양을 하면서 생체활성을 유지하였다.

배지조성

본 연구에 사용된 종배양 배지 조성은 sucrose 20 g/L, yeast extract 5 g/L, peptone 5 g/L(pH 7.0)으로 조성하였으며 본 배양 배지 조성은 sucrose 40 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L, NH₄Cl 4 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, 그리고 10 mL의 미량 원소 용액(0.1N HCl 1L에 5g FeSO₄ · 7H₂O, 2g MnSO₄ · H₂O, 0.5g CaCl₂, 1 g ZnCl₂, 1 g CoCl₂ · 6H₂O)을 녹여 조제한 후 초기 pH는 7.0으로 하였다. 연속배양공정 개발을 위한 배지는 회분식 배양의 조성고 동일한 배지조성을 이용하였다. 배지는 121℃에서 15분간 멸균 후에 사용하였으며 반응기의 pH 조절은 2 N HCl, 2 N NaOH를 사용하였다.

회분식 및 연속식 배양방법

본 연구에서는 초기 회분식 배양에서는 본 발효의 5%에 해당하는 종배양액 100 mL을 키우기 위해 flask에서 120rpm, 30℃의 조건으로 17시간 동안 배양한 후 1.9 L의 본 배지에 접

*Corresponding author

Tel : +82-62-230-7159, Fax : +82-62-230-7226

E-mail : leejh@chosun.ac.kr

중하였다. 본 배지의 초기 pH는 7.0이고, 배양온도는 30°C로 하였으며, 교반속도는 초기 300 rpm에서 700 rpm으로 조절하였으며 통기량은 1~2 vvm으로 조절하여 배양하였다. 연속식 배양 공정은 세포가 최대 활성을 갖게 되는 24시간 후부터 기질의 유입속도를 유량펌프를 사용하여 0.18 L/hr로 조절하여 최종 생산물의 농도를 일정하게 유지하였다.

분석방법

균체량은 원심분리기를 이용하여 6000 rpm에서 15분동안 원심분리하여 침전된 균체를 80°C dry oven에서 24시간 건조시켜 건조중량을 측정하였다. 그리고 최종 생산물인 glucan은 에탄올에 침전시켜 회수하여 3회 증류수로 세척 후 80°C dry oven 24시간 건조시켜 건조중량을 측정하였으며, Sucrose 농도는 1 N HCl을 이용하여 100°C에서 15분간 가수분해 시킨 후 dinitrosalicylic acid 방법[7]을 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

회분식 발효공정 모델링

반응기에 따른 생산 특성을 비교하기 위해서 *Agrobacterium* sp. 생산에 최적조건인 pH 7.0 과 sucrose 30 g/L의 조건에서 실험을 하였다. 교반 발효조에서는 용존산소량이 떨어지면 교반속도를 증가시키면서 배양시켰으며[4], 세포에 과도한 stress를 주지 않는 600-700 rpm 범위에서 산소전달 효율과 배양액 혼합이 잘 되어 최종 생산물의 수율이 높은 것으로 나타났다. 하지만 bubble column reactor에서는 배양액의 점도가 증가할수록 배양액 내의 산소전달 효율이 떨어져 용존산소량이 줄어들면서 다당류의 생산량 효율이 떨어짐을 알 수 있다.

이러한 결과는 발효배양 중 미생물에 따라 교반시 발생하는 과도한 전단력 때문에 미생물이 손상을 받아 생산량이 감소하는 경우도 있고, 교반속도의 증가에 따른 산소전달이 용이하여 다당생산을 증가시켰다는 보고도 있는데 본 연구에 쓰인 *Agrobacterium* sp.의 경우 교반속도의 증가에 따른 전단력에 의해 다당의 생산량이 감소기 보다는 용존산소량이 높을수록 다당류의 생산량이 증가하는 것으로 보여진다.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} S}{k_m + S} X \quad X_o = 0.4g/L \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{\pi}{Y_{P/S}}\right)X \quad S_o = 30g/L \quad (2)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\pi_{max} S}{k_p + S} X \quad P_o = 0g/L \quad (3)$$

위 식에서 X는 세포농도, S는 sucrose 농도, P는 glucan의

농도이다. μ 는 세포의 비성장속도, π 는 glucan 비생산 속도이며 Y는 세포 및 glucan의 수율을 나타낸다. 회분식 반응기 실험을 통해 얻은 데이터를 이용하여 Monod 반응식[8]에서 μ 와 S의 그래프로부터 μ_m 과 k_m 의 추정치를 구하였다. 세포 성장 및 glucan 생산에 관련된 반응 상수는 Table 1에 정리하였으며 실험 결과와 변수추정을 통하여 모사한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

연속 발효공정 설계

최적미생물 배양조건으로 회분식 반응기에서 수회에 걸쳐 실험한 데이터를 이용하여 Monod 식에 대입하여 모델링 하였으며 각 반응조에서는 각각의 농도들이 조건에 일치하도록 제어하였으며 기질 저장조에서는 공급되는 기질의 농도와 온도, pH를 반응조와 같은 조건으로 유지하였다.

$$\frac{dX}{dt} = -DX + \frac{\mu_{max} S}{k_m + S} X \quad (4)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_i - S) - \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{\pi}{Y_{P/S}}\right)X \quad (5)$$

$$\frac{dP}{dt} = -PD + \frac{\pi_{max} S}{k_p + S} X \quad (6)$$

Table 1. List of estimated kinetic parameters

| Parameters | Values |
|-------------|------------------------|
| μ_{max} | 0.165 hr ⁻¹ |
| π_{max} | 0.065 hr ⁻¹ |
| k_m | 13.15 g/l |
| k_p | 10.31 g/l |
| $Y_{X/S}$ | 0.34 |
| $Y_{P/S}$ | 0.2 |

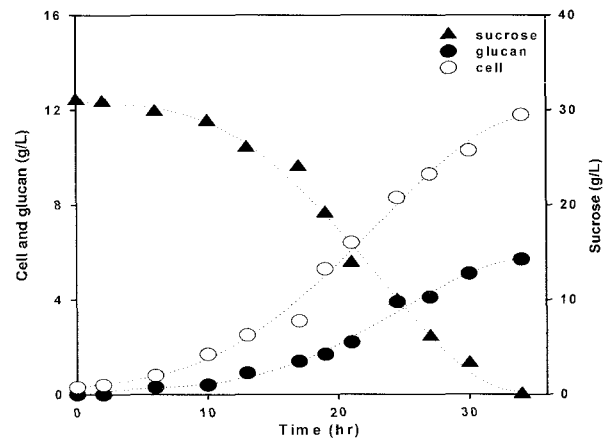


Fig. 1. Cell growth and glucan production with batch fermentation. Symbol represents data point and line represents computer simulation results.

위 식에서 D는 희석속도를 나타내며 S₀는 sucrose 유입 농도로 45 g/l 용액을 사용하였다. 위와 같이 X, S, P에 대한 물질 수지식을 확립한 후 회분식에서 얻은 데이터를 대입하여 modeling equation을 완성하였으며 computer를 사용하여 계산한 결과를 바탕으로 전산모사하여 Fig. 2에 나타내었다[10]. 회분식 발효를 통하여 구한 상수들을 이용하여 연속 반응식인 CSTR의 물질 수지식에 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 0.18 L/hr로 조절하였을 때 최종 유출되는 세포농도는 약 50시간 경과 후 9 g/L로 유지되었으며 이때 glucan의 농도는 4 g/L로 정상상태를 나타내었다. 결론적으로 CSTR공정을 이용한 생산 공정에서는 0.36 g/L/hr의 생산속도를 얻을 수 있었으며, 회분식에서의 이론적인 0.2 g/L/hr의 생산 속도보다 약 1.8배 높은 효과를 얻을 수 있었다. 또한, 분리비용이 큰 비중을 차지하고 있는 미생물 산업에서 원심 분리기 만으로도 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 발효 시스템의 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 본다.

교반형 발효기를 이용한 연속배양 공정

교반 발효기를 사용하여 고점도 수용성 글루칸을 생산하기 위해서는 원활한 산소공급이 필요하며 원활한 산소공급을 위해 동력비가 많이 드는 단점이 있다. 본 실험에서는 교반형 발효기의 운전비용을 줄이고 생산된 수용성 글루칸의 분리비용을 줄여 경제적인 공정을 실현하고자 전산모사의 결과를 이용하여 실제공정에서 유출되는 배양액 속에 수용성 글루칸 농도가 4 g/L의 농도로 유지되는지를 실험을 통해서 검증하였다. 먼저 회분식 공정으로 22시간 동안 세포배양을 실시하였으며, 이때 통기량은 0.5 vvm에서 1 vvm까지 운전하였으며, 용존 산소량이 포화용존 산소량의 20% 이하로 떨어지지 않도록 교반속도를 300에서 700 rpm까지 단계적으로 운전하였다. 배양 22시간 이후에 세포농도가 약 8 g/L가 되었을때 기질 주입속도를 0.18 L/h로 운전하였으며, 반응이 안정화되는 약 160시간 동안 운전하여 데이터를 분석하였다(Fig. 3). 이론적인 모델식의 전산모사를 통하여, 희석속도에 따른 생산물의 농도 변화가 예측 가능하였고, 실험을 통하여 분리에 최적농도인 안정된 상태로 생산물을 연속적으로 생산할 수 있었다. 또한 같은 배양 조건에서 유동층반응기에 전산모사했던 데이터를 적용하여 반응기 효율을 비교 실험한 결과 앞서 실험한 회분식반응기에서도 확인했듯

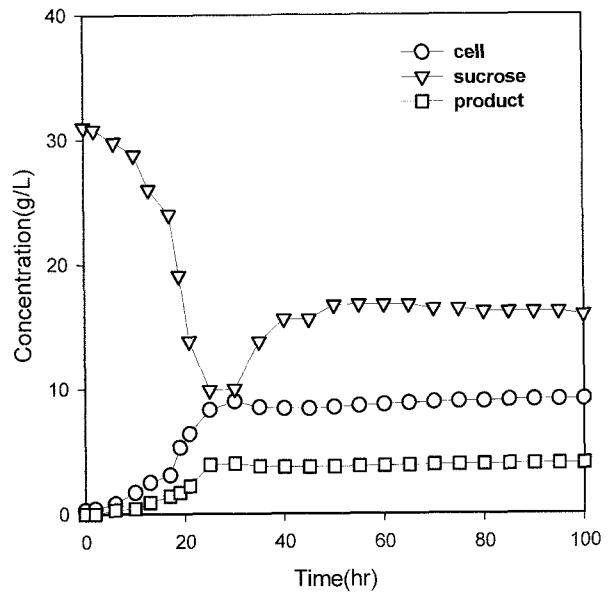


Fig. 2. Effect of dilution rate on the cell mass, soluble glucan and sucrose concentration. The result was simulated with estimated parameters using batch results.

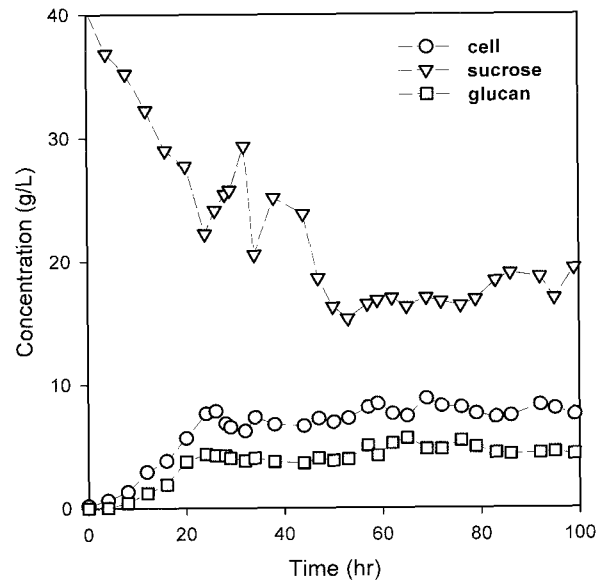


Fig. 3. Time course of the cell mass, soluble glucan and sucrose concentration profiles with dilution rate changes of CSTR.

이 산소전달효율이 상대적으로 높았던 유동층반응공정이 실제 미생물 배양에서는 배양액의 점도상승으로 산소전달 저해현상이 나타남을 확인 할 수 있었다. 결과적으로 변이주 *Agrobacterium sp.*를 이용한 수용성 글루칸의 연속 배양공정에서는 0.36 g/L/h의 생산 속도를 얻을 수 있었으며, 회분식에서의 0.2 g/L/h의 생산 속도보다 약 1.8배 높은 생산 속도를 얻을 수 있었다. 또한 생산물의 농도를 최적으로 유지시

켜 줌으로써 생산물 분리과정에서 유실되는 영양물의 농도가 거의 없으며, 고속원심분리(5000 rpm, 15 min)만으로도 균체와 수용성 글루칸의 분리가 쉽게 되어 실제 공정상에서 수용성 글루칸 생산 공정과 분리/정제 공정 등의 전체적인 효율성을 고려할 때 생산성향상과 더불어 운전비의 절감 효과도 기대된다.

감사의 글

본 연구는 조선대학교 2005년도 교내 연구비 지원으로 이루어졌습니다. 연구비 지원에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Altintas, M. M., C. K. Eddy, M. Zhang, J. D. McMillan and D.S. Kompala. 2006. Kinetic modeling to optimize pentose fermentation in *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **94(2)**, 273-95.
2. Cheema, J. J., N. V. Sankpal, S. S. Tambe and B. D. Kulkarni. 2002. Genetic programming assisted stochastic optimization strategies for optimization of glucose to gluconic acid fermentation. *Biotechnol. Prog.* **18(6)**, 1356-65.
3. Chen, Q., W. E. Bentley and A. Weigand. 1995. Optimization for a recombinant *E. coli* fed-batch fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51**, 449-454.
4. da Costa, A. C. and R. M. Filho. 2004. Evaluation of optimization techniques for an extractive alcoholic fermentation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **113-116**, 485-96.
5. Ganusov, V. V., A. V. Bril'kov and N. S. Pechurkin. 2000. Mathematical modeling of population dynamics of unstable plasmid-containing bacteria during continuous cultivation in a chemostat. *Biofizika* **45(5)**, 908-914.
6. Gron, S, K. V. Jochumsen, K. Biedermann and C. Emborg. 1996. Mathematical modeling of proteinase A overproduction by *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **782**, 350-362.
7. Miller, G. L. 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-432.
8. Millitzer, M, E. Wenzig and W. Peukert. 2005. Process modeling of in situ-adsorption of a bacterial lipase. *Biotechnol. Bioeng.* **92(6)**, 789-801.
9. Srien, F., F. Arnold and J. E. Bailey. 1984. Characterization of intracellular accumulation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry, *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 982-988.
10. Yu, J and Y Si. 2001. A dynamic study and modeling of the formation of polyhydroxyalkanoates combined with treatment of high strength wastewater. *Environ. Sci. Technol.* **35(17)**, 3584-8.