

생물 반응기

우리는 이미 5장 발효공학에서 발효 또는 세포 배양법에는 회분식 배양(batch culture), 연속식 배양(continuous culture), 유가식 배양(fed-batch culture)이 있고 발효조의 종류에는 통기 교반형 발효조(stirred tank fermentor), 기포탑형 발효조(air-lift fermentor)과 유동층 발효조(fluidized fermentor) 등이 있음을 설명하였다. 이 장에서는 이러한 배양법과 발효조(생물반응기)의 특성을 수식을 이용하여 정량적으로 기술하였다.

생물반응기(bioreactor)에 사용되는 생체축매는 효소, 미생물, 동물세포 및 식물세포가 있으며 이 생체축매를 현탁(suspension) 상태 또는 고정화하여(immobilized) 사용한다. 생물공학 제품을 생산하기 위하여 생물반응기를 설계, 제작 및 운전하는 것은 생물공학도가 해야 할 일 중의 하나이다. 생물반응기를 설계할 때 고려해야 하는 중요한 사항은 기질(substrate)을 생성물로 전환시키는 속도(conversion rate), 생성물 수율(product yield), 생성물 농도, 생산성(productivity)을 높이는 것이며 연속 배양인 경우에는 장기간 교체 없이 사용할 수 있는 효소고정화 또는 세포 고정화 방법을 활용하는 것이다.

생물 반응기는 발효조(fermentor)라고도 부르며 이상적인 생물반응기의 종류는 다음과 같이 네 가지로 나눌 수 있다.

- ① 회분식 배양기(batch fermentor)
- ② 연속 교반 배양기(continuous stirred tank fermentor)
- ③ 플러그흐름 배양기(plug flow fermentor)
- ④ 유가식 배양기(fed-batch fermentor)

이 들 배양기에 관하여 이 장에서 제시될 식들은 균일반응(homogeneous reaction)에 대한 식들이다. 여기서 균일반응이란 효소나 세포가 액상에 균일하게 분포되어 있어 반

응이 액상에서 균일하게 일어나는 반응을 말한다. 다음 장에서 다룰 고정화 효소(세포) 반응은 불균일반응(heterogeneous reaction)이라 하며 이 경우에 반응은 액상이나 기상에서 가 아니라 효소 또는 세포가 고정화된 고체 부위에서 일어난다.

9.1 회분식 배양기

회분식 배양기(batch fermentor)란 배양이 완전히 끝난 후 다시 배지를 교체하는 방식이다. 즉, 초기에 한번 배지를 채운 후 배양이 끝날 때까지 더 이상 영양물질을 공급하거나 제거하지 않는 배양기를 말한다. 회분식 배양기에는 교반기가 설치되어 있어 내용물의 조성이 균일하다고 가정한다. 회분식 배양의 전형적인 공정도가 그림 9.1에 표시되어 있다. 이러한 형태의 배양기는 단순하기 때문에 실험실과 산업계에서 널리 사용된다.

회분식 배양(batch culture)에서 미생물의 성장곡선은 여섯 구간으로 구분된다(그림 9.2). 지연기(lag phase) 동안 세포는 새로운 배지에서 성장하는 데 필요한 효소를 합성하는 등의 준비 작업을 한다. 가속 성장기(accelerating growth phase)를 거쳐 지수 성장기(exponential growth phase)가 시작되면 세포의 수효는 지수적으로 급속히 증가한다. 감속 성장기(decelerating growth phase)를 거쳐 세포의 수가 더 이상 증가하지 않는 정지기(stationary phase)로 들어가고 결국은 세포가 사멸하는 쇠퇴기(decline phase)로 한 사이클을 마친다. 동물세포나 식물세포도 유사한 성장곡선을 나타낸다.

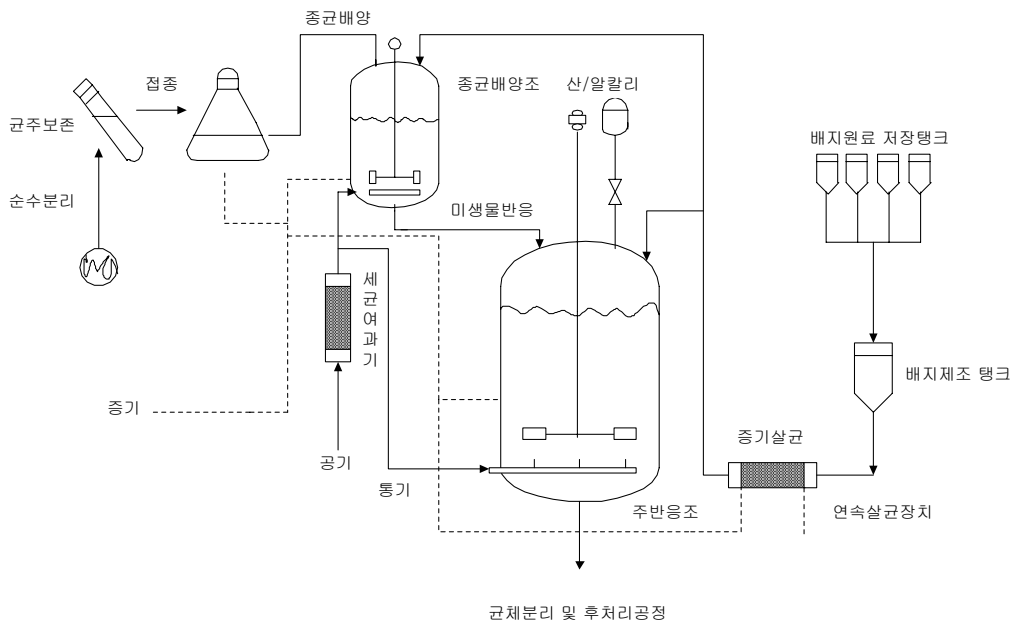
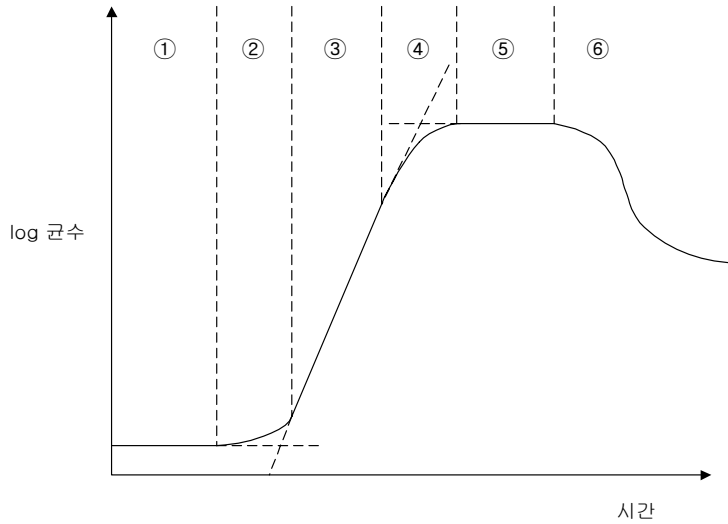


그림 9.1 전형적인 회분식 배양 공정도



① 지연기, ② 가속 생장기, ③ 지수 생장기, ④ 감속 생장기, ⑤ 정지기, ⑥ 사멸기

그림 9.2 회분식 생장곡선

여기서 지수 생장기가 가장 중요한 구간으로 이 구간에서 세포 균체량(X)과 기질의 양(S)에 관한 상관관계를 수학적으로 표현해 보자. 그런데 배지의 부피가 불변이라고 가정하면 균체량(X)을 부피로 나눈 균체의 농도(x)로, 기질의 양(S)도 부피로 나눈 기질의 농도(s)로 표시할 수 있다. 단, 여기서 기질은 균체의 생성에만 사용된다고 가정한다(즉, 생성물을 만드는 데 사용되지 않는다고 가정한다).

우선 비성장속도(μ)의 정의에 의하여 단위시간(dt)에 일어나는 균체농도의 변화(dx)는 다음과 같이 표현된다.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \tag{9.1}$$

세포의 생장이 모노드 속도식(Monod kinetics)을 따른다고 가정하면

$$\mu = \mu_m \frac{s}{s + K_s} \tag{9.2}$$

위 식에서 μ_m 은 최대 성장속도, K_s 는 모노드 상수이다.

여기서, 기질 소모량에 대한 생성된 균체의 양의 비(ratio)를 $Y_{x/s}$ 라 하면

$$x - x_0 = Y_{x/s}(s_0 - s) \tag{9.3}$$

x_0 : 최초의 균체량

s_0 : 성장 제한기질(growth limiting substrate)의 초기량

$Y_{x/s}$ 는 세포수율(biomass yield)이라 하며 기질 소모량에 대한 생성된 균체량의 비(ratio)를 나타낸다. 예를 들어, 1g의 포도당이 소모되어 0.5g의 세포 건조중량이 만들어 졌다면 $Y_{x/s} = 0.5$ 이다.

식 (9.2)를 (9.1)에 대입하고 식 (9.3)을 이용하여 s 를 x 로 표시하면 다음과 같다.

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu_m(Y_{x/s}s_0 - x + x_0)}{(K_s Y_{x/s} + s_0 Y_{x/s} + x_0 - x)}$$

이 식의 양변을 변수분리하여 적분하면

$$\int_{x_0}^x \frac{(K_s Y_{x/s} + s_0 Y_{x/s} + x_0 - x)}{Y_{x/s}s_0 + x_0 - x} dx = \mu_m \int_0^t dt$$

정리하면

$$A \int_{x_0}^x \frac{dx}{x} + B \int_{x_0}^x \frac{dx}{Y_{x/s}s_0 + x_0 - x} = \mu_m \int_0^t dt \tag{9.4}$$

단,

$$A = \frac{K_s Y_{x/s} + s_0 Y_{x/s} + x_0}{Y_{x/s}s_0 + x_0}$$

$$B = \frac{K_s Y_{x/s}}{Y_{x/s}s_0 + x_0}$$

미분 방정식 (9.4)를 풀면 해는 다음과 같다.

$$A \cdot \ln\left(\frac{x}{x_0}\right) - B \cdot \ln\left[\frac{Y_{x/s}s_0 + x_0 - x}{Y_{x/s}s_0}\right] = \mu_m \cdot t \tag{9.5}$$

식 (9.5)에서 x 와 t 는 변수이며 그 이외에 다른 기호에 대한 값은 상수로 주어진다.

이 해는 회분식 배양에서 균체의 농도(x)가 시간(t)에 따라 변하며 S자 모양으로 이루어짐을 보여준다.

X 에 대응하는 기질의 농도(s)를 구하려면 다음 식을 쓴다.

$$s = \left(s_0 + \frac{x_0}{Y_{x/s}}\right) - \frac{x}{Y_{x/s}} \tag{9.6}$$

9.2 연속식 배양기

회분식 배양기는 배양 시작 후 일정한 시간이 지나면 세포가 생장을 멈추고 그 후 기질이 더 이상 소비되지 않음과 동시에 생성물도 만들어지지 않는다. 그러나 연속식 배양

기(continuous fermentor)에서는 새로운 배지(fresh medium)가 계속적으로 공급되며 동시에 세포가 배양기로부터 빠져 나온다. 따라서 연속식 배양기에 있어서는 성장(growth)과 산물생성(product formation)이 오랫동안 유지될 수 있다. 연속식 배양기가 정상상태(steady state)에 도달하면 세포(cell mass), 생성물(product), 기질(substrate)의 농도가 일정하게 유지된다.

연속식 배양기는 플러그흐름 배양기(plug flow fermentor)와 연속 교반 배양기(continuous stirred tank fermentor)가 있는데 플러그흐름 배양기를 생물 반응기에 사용하는 예는 거의 없으므로 연속교반 배양기만을 설명한다. 연속식 배양기를 이해하기 위해서는 반응기 부피와 배지 공급속도 사이의 관계를 설명하는 희석률(dilution rate)의 개념을 알아야 한다.

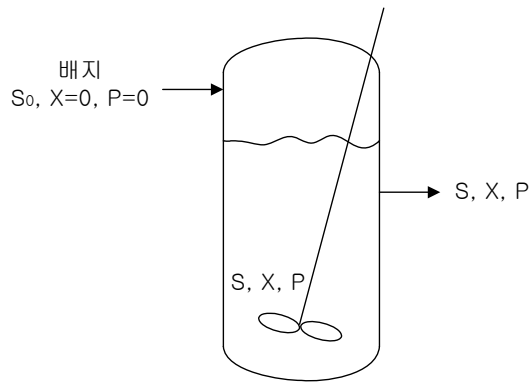
희석률이란 단위시간에 공급되는 배지의 부피(F)를 배양기 부피(V)로 나눈 것으로 D 로 표시한다. 희석률은 반응공학에서 사용하는 공간속도(space-velocity)란 개념과 동일하다.

$$D = \frac{F}{V} = \frac{\text{배지 공급속도}}{\text{배양기 부피}} \quad (9.7)$$

9.2.1 연속교반 배양기

연속교반 배양기는 배양기 내용물이 잘 혼합되므로 배출흐름(effluent) 중의 성분농도는 배양기 내의 성분농도와 동일하다. 연속교반 배양기는 키모스탯(chemostat)과 터비도스탯(turbidostat)으로 구분된다.

키모스탯(chemostat)은 기질의 농도(s), 생성물의 농도(p), pH 등 배양액 중의 모든 환경인자를 일정하게 유지하는 방법이다(그림 9.3). 펌프가 가동되어 새로 가해진 배지만큼



(a) 키모스탯

그림 9.3 키모스탯의 모식도

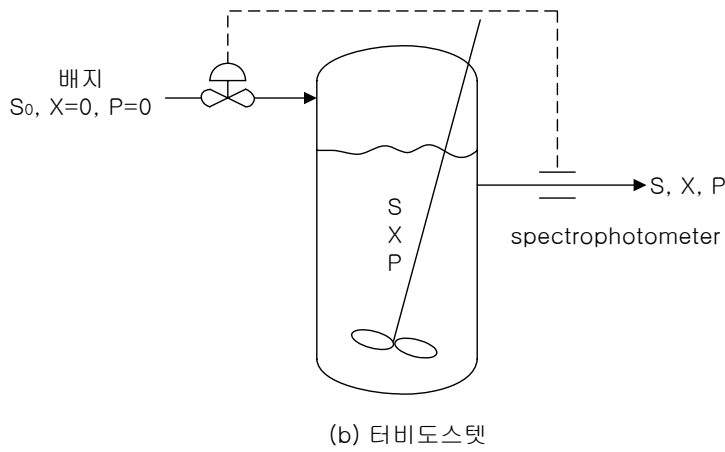


그림 9.4 터비도스텝의 모식도

배양액이 제거됨으로써 항상 일정한 부피를 유지한다. 정상상태(steady state)에 도달한 키모스텝에서 배지 공급속도(즉, 희석률)를 조절하면 쉽게 세포 성장속도도 조절된다. 키모스텝은 화학공학자들에게 잘 알려져 있는 연속교반탱크 반응기(continuous stirred tank reactor, CSTR)와 같다.

터비도스텝(turbidostat)은 배양액 중의 균체농도가 일정하게 유지되도록 배지 공급속도 및 배출속도를 제어하는 연속 배양 방법이다(그림 9.4). 분광광도계(spectrophotometer)로 배양액의 탁도(turbidity)를 조절하여 균체농도를 일정하게 유지한다.

조업(operation) 측면에서 터비도스텝보다 키모스텝이 더 편리한데, 이것은 터비도스텝이 분광광도계와 제어가 필요한 반면 키모스텝은 유속을 일정하게 유지하는 펌프 설치로 가능하기 때문이다. 터비도스텝은 세포농도가 일정하게 유지되므로 높은 에탄올 농도와 같은 스트레스 조건을 견딜 수 있는 세포 그룹을 선택하는 데 있어서 매우 유용할 수 있다.

9.2.2 키모스텝 배양기의 물질수지

키모스텝 배양에서 균체와 기질에 대한 물질 수지를 세우면 다음과 같다. 우선 여기서는 문제를 단순화하기 위하여 기질은 균체를 만드는 데만 소모된다고 가정한다. 다음 절에서는 보다 일반적인 경우로서 기질이 균체 생산뿐만 아니라 제품의 생성에도 소모되는 경우에 대한 물질수지를 설명한다.

기질이 균체 생산에만 소모되는 경우

(1) 균체에 대한 물질수지

전체 배양액(V)에 대해 미분시간 dt 에 대해 균체에 대한 물질수지(material balance)를 세우면 다음과 같다.

시간에 따른 균체의 변화량(dX) = 성장한 균체의 양(dX) - 유출된 균체의 양(dX)이므로

$$\begin{aligned} dX &= (dX)_{\text{성장}} - (dX)_{\text{유출}} \\ V \cdot dx &= V \cdot \mu x \cdot dt - F \cdot x \cdot dt \end{aligned} \quad (9.8)$$

V : 배양액의 부피, x : 세포의 농도, μ : 비성장속도, F : 배지 공급속도

단, 여기서 $xV = X$, $F \cdot dt = dV$ 임에 유의하라. 또한 식 (9.8)의 우변의 첫째 항은 비성장속도의 정의 $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$ 에서 얻어짐에 주목하라.

식 (9.8)의 양변을 $V \cdot dt$ 로 나누면

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - \frac{F}{V} x \quad (9.9)$$

여기서, F/V 를 D 로 표시하면

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D) \cdot x \quad (9.10)$$

정상상태에서 시간에 따른 균체량의 변화가 없으므로

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad (9.11)$$

따라서

$$\mu = D \quad (9.12)$$

(2) 기질에 대한 물질수지

전체 배양액의 미분시간 dt 에 대해 제한기질(S)의 양에 대한 물질수지를 세우면 다음과 같다. 시간에 따른 기질의 변화량 = 유입된 기질의 양 - 유출된 기질의 양 - 성장에 소모된 기질의 양이므로

$$V \cdot ds = F \cdot s_0 \cdot dt - F s \cdot dt - \frac{V \cdot \mu x}{Y_{x/s}} dt \quad (9.13)$$

여기서, $Y_{x/s}$ 는 기질 소모량에 대한 생성된 균체의 양의 비(ratio)이다.

양변을 $V \cdot dt$ 로 나누면

$$\frac{ds}{dt} = D(s_0 - s) - \frac{\mu x}{Y_{x/s}} \quad (9.14)$$

정상상태에서 시간에 따른 기질농도의 변화가 없으므로

$$\frac{ds}{dt} = 0 \quad (9.15)$$

따라서

$$D(s_0 - s) - \frac{\mu x}{Y_{x/s}} = 0 \quad (9.16)$$

식 (9.16)에는 두 개의 미지수 x 와 s 가 있다. 여기서 s 를 구하기 위해 Monod kinetics를 사용한다. Monod kinetics는 다음 식으로 주어진다.

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{s}{s + K_s}$$

여기서, μ_m 은 최대 성장속도, K_s 는 Monod 상수이다.

이 식을 다음과 같이 변형한다.

$$\begin{aligned} \frac{s + K_s}{s} &= \frac{\mu_m}{\mu} \\ 1 + \frac{K_s}{s} &= \frac{\mu_m}{\mu} \end{aligned} \quad (9.17)$$

식 (9.17)에 식 (9.12)를 대입하여 정리하면

$$\frac{K_s}{s} = \frac{\mu_m}{D} - 1 = \frac{\mu_m - D}{D}$$

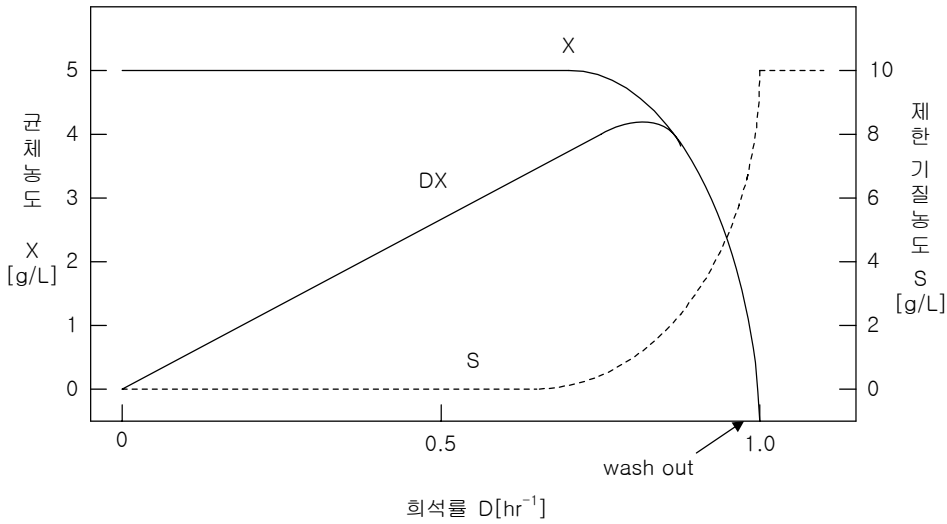
이 식으로부터 정상상태에서 키모스탯 내의 기질의 농도는 다음 식으로 표현된다.

$$\tilde{s} = \frac{K_s D}{\mu_m - D} \quad (9.18)$$

식 (9.18)과 식 (9.12)를 (9.16)에 대입하여 정리하면 정상상태에서 키모스탯 내의 균체의 농도는 다음 식으로 표현된다.

$$\tilde{x} = Y_{x/s}(s_0 - \tilde{s}) = Y_{x/s} \left(s_0 - K_s \frac{D}{\mu_m - D} \right) \quad (9.19)$$

식 (9.18)과 (9.19)에서 기질의 농도(s)와 세포의 농도(x)를 D 의 함수로 나타낼 수 있



$$\mu_m = 1 \text{ hr}^{-1}, Y_{x/s} = 0.5, K_s = 0.2 \text{ g/L}, s_0 = 10 \text{ g/L}$$

그림 9.5 키모스탯에서 희석률에 따른 세포농도(x)와 기질농도(s)의 변화

으며 이것을 도시하면 그림 9.5와 같다. $D=0$ 일 때 $s=0$ 이며, $D=\mu_m$ 일 때 식 (9.18)에 의하면 s 는 무한대 값을 가지나 실제로는 공급되는 기질의 농도(10 g/L)를 초과할 수 없으므로 $s=10 \text{ g/L}$ 가 된다. 또한 $D=0$ 일 때 $x = Y_{x/s} \cdot s_0 = 0.5 \times 10 \text{ g/L} = 5 \text{ g/L}$ 이며, $D=\mu_m$ 일 때 $S = 10 \text{ g/L}$ 이므로 $x = 0.5(10 - 10) = 0$ 이 된다.

키모스탯에 있어서 세포는 성장속도와같은 속도로 배양기로부터 제거되며 따라서 성장속도(μ)는 희석속도(D)와 같다. 그런데 만약 D 가 μ_m 만큼 증가하면 배양기에서 나가는 세포수에 비하여 성장되는 세포수가 더 적기 때문에 시간이 지남에 따라 배양기 내의 세포수가 점차로 줄어들어 세출 현상(washout)에 발생한다.