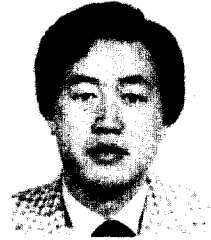


# 생물공정의 최적화 및 제어



서울대학교 공과대학 화학공학과 유영제

## 1. 서론

1970년대의 유전자재조합 및 세포융합 기술개발에 의하여 insulin, interferon 등의 많은 의약품이 개발되고 있으며, 최근에는 아미노산, 효소 등 정밀 화학 제품의 개발, 식유화학 대체공정의 개발, 환경보존에의 응용, 대체에너지의 개발 등을 목표로 많은 연구가 수행되고 있어 생물공학의 분야가 계속 영역을 넓혀가고 있다. 실험실에서 개발한 생물공학의 연구결과를 실용화하기 위하여는 경제성있는 생물공정기술이 뒷받침되어야 하는데 이러한 생물공정기술 중에서 핵심이 되는 부분의 하나가 생물반응기 기술이라고 하겠다. 우수한 생물반응기를 설계하고 경제적으로 운전하기 위해서는 공정연구 및 개발단계에서 최적화 및 제어에 대한 개념을 포함시켜야 하며, 실제 조업을 하는 경우에도 제품 품질의 균일성, 에너지 및 자원의 절약, 운전실수의 방지 및 안전을 목적으로 조업조건을 최적화하고 제어하여야 한다. 또한 접종상태 및 생물반응 조건의 사소한 차이에도 원하는 제품의 생합성이 다르게 변화하므로 그림 1에서와 같이 생물공정을 monitoring하여 사소한 변화라도 공정의 최적화 및 제어전략에 반영되도록 하여야 한다.

본 고에서는 생물반응기의 최적화 및 제어기술에 대하여 몇 가지 예를 들어 그 필요성과 최근의 연구동향을 간단히 소개하고자 한다.

## 2. 일반적인 최적화 및 제어

미생물 또는 세포를 배양하는 경우 기본적으로 규명되어야 할 사항은 최적온도, 최적 pH 및 최적 영양분의 조성 등이다. 이러한 것들은 일반적으로

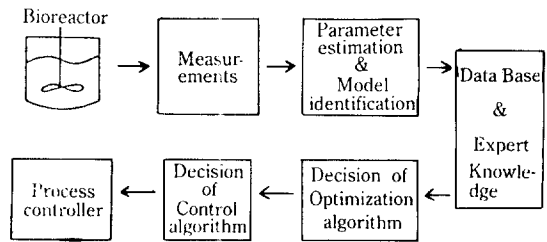


Fig. 1. System flow of bioreactor optimization and control.

실험을 통하여 제품의 최종농도 또는 생산성이 최대가 되는 조건들을 찾고 있다. 그러나 생물반응기 제어의 궁극적인 목적은 원하는 물질의 생산성을 극대화하도록 생물체의 대사를 조절하기 위한 환경을 만들어 주는 것이다. 따라서 pH나 온도 또는 기질의 농도를 어떤 일정한 값으로 유지시키는 대신 미생물의 성장속도나 호흡지수 등 미생물의 metabolism이 원하는 수준으로 유지되도록 생물반응기를 제어하는 것이 더 유용하다. 몇 가지의 환경변수를 측정하면 배양시의 대사특성을 추정할 수 있기 때문에 추정된 대사특성을 최적화하고자 하는 설정점과 비교하여 최적화 알고리즘 중의 하나를 이용하여 대사를 제어하는 방식을 사용할 수 있다. 또한 제품이 대사산물인 경우에는 일반적으로 미생물의 성장과 대사산물의 생합성 조건이 다르기 때문에 이 점을 고려하여 최적조건을 찾게 된다. 이러한 예는 페니실린 생산(1), 알코올 생산(2) 등의 경우에 있어서 많이 보고되고 있다.

에탄올 발효에 대하여는 오래 전부터 상업화된 공정이므로 많은 내용들이 보고되었는데, 에탄올 발효에 있어서 한계점의 하나는 에탄올 저해현상이다. 에탄올 저해현상은 발효온도와 밀접한 관계가 있어서 발효온도가 높으면 발효속도는 증가되나 최

중 에탄올 농도는 반대로 저하되고 발효온도가 낮을 경우에는 균체성장과 에탄올 생산속도는 느려지지만 최종에탄올 농도는 높은 수준에 도달한다. 여러 가지 온도에서의 에탄올 발효 결과를 이용하여 모델식의 변수를 추정하고, 변수를 온도에 대하여 나타낸다. 다음 이 모델식을 이용하여 simulation(초기 sugar 농도=100g/l인 경우)을 하면 유용한 결과들을 얻을 수 있는데, 발효 초기에는 36°C에서 비성장 속도가 높으나 발효가 진행됨에 따라 30°C가 최적의 조건임을 알 수가 있다. 따라서 발효온도를 처음에는 33-36°C 범위에서 시작하여 발효가 진행됨에 따라 점차로 온도를 30°C 정도로 낮추어 가는 방법이 최적임이 보고되었다(2).

Recombinant DNA 기술을 사용하여 제품을 생산하는 경우, 일반적인 효소의 경우와 마찬가지로 high cell density를 얻어야 하며, 이러한 목적으로 유가식(fed-batch) 배양방식이 많이 채택된다. *E. coli*를 배양하여  $\beta$ -galactosidase를 생산하는 경우에 부산물로 생산되는 acetate가 inhibitor로서 작용하게 된다. 배양액을 분석하면 fumarate, citrate, lactate, succinate 및 acetate 등을 확인할 수 있는데, 배양시작 후 약 20시간이 경과하면 acetate의 농도는 0.55 M까지 증가한다. 별도의 실험결과  $\beta$ -galactosidase의 생합성은 acetate의 농도가 0.17 M 이상이 되면 미생물의 성장이 저해를 받으며 acetate가 생성되는 원인은 배양액 중의 높은 포도당 농도에 기인하는 것으로 판단되었다. 그러므로 포도당의 농도를 낮은 수준으로 유지시켜 주는 것이 바람직 한데, 이것은 배양액 중의 포도당이 소모되면 DO 농도가 증가하게 되므로 DO를 기준하여 제어할 수 있다. 또는 직접 배양액을 샘플링하여 liquid chromatography 또는 mass spec을 사용하여 acetate의 농도를 측정하여 배양액 중에 acetate가 어느 일정 이상의 농도를 넘어 축적되면 포도당의 주입을 중단하는 방식으로 제어를 할 수 있다. 이렇게 제어한 경우에 acetate의 축적이 없어지고 cell yield가 향상되며 효소의 생합성이 derepression되어 효소의 생산도 증가하였음이 보고되었다(3).

또한 효소를 사용하여 제품을 생합성하는 경우에 시간이 경과함에 따라 효소가 비활성화되어 반응전 환율이 감소하게 된다. 전환율을 일정하게 하여 제품의 농도를 일정하게 하는 것이 필요하므로 비활

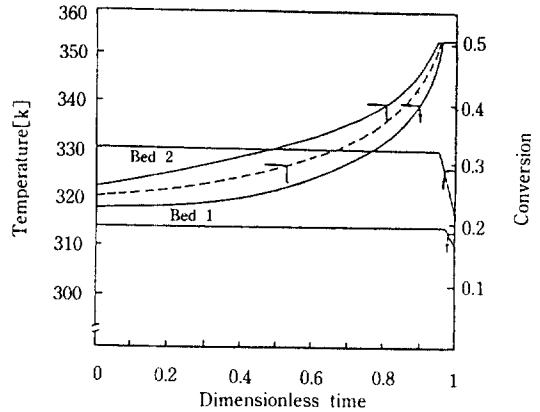


Fig. 2. Profiles of optimal temperature and conversion for operating time 200 hr. (— ; Two bed reactor, --- ; One bed reactor)

성화되는 속도에 비례하여 기질(반응물)의 공급속도를 점차 느리게 조절하든가, 반응온도를 허용한 계치까지 상승시켜 주든가, 또는 전환율이 어느 수준 이하로 내려가면 반응을 중단하고 새로운 효소로 대체하는 방법 등을 고려할 수 있다. 기질의 공급속도를 조절하는 방법은 물질전달 저항을 크게 하여 반응속도가 감소하게 되어 큰 효과를 기대할 수 없으므로 반응온도를 조절하여 조업을 계속한 후 적당한 시점에서 새로운 효소를 대체하는 방법이 많이 채택되고 있다. 또한 대량생산 및 연속조업을 위하여는 일단(single-stage) 반응기 뿐 아니라 다단(multi-stage) 반응기도 많이 사용된다. 효소반응기에서 효소의 비활성화를 고려하는 반응기의 모델식에 최적화 이론인 Pontryagin의 최대치 원리를 이용하면 일단 반응기 및 다단 반응기에서의 최적온도 조건을 구할 수 있다(4, 5). 예를 들면 glucose isomerase에 의하여 glucose를 fructose로 전환시키는 경우에 Fig.2와 같이 초기에 어느 온도에서 반응을 시작하여 계속 온도를 증가시켜 온도가 어느 허용 최고점에 달하면 최고온도를 반응을 수행하는 방식을 따르므로서 일정온도로 반응을 수행하는 경우보다 2단 반응기에 있어서 생산성을 10-16.5% 향상시킬 수 있음이 보고되었다(5).

### 3. 공정의 2단계 최적화

대사산물의 생합성 조건은 미생물의 성장조건과

다른 경우가 많다. *Aspergillus*에 의한 citric acid의 생성, *Xanthomonas*에 의한 xanthan gum의 생성, *Euthropus*에 의한 PHB의 생합성은 질소원 또는 다른 영양분이 limiting인 경우에 수행되는 경우가 많다. 따라서 첫단계는 질소원 및 탄소원을 충분히 공급하여 미생물을 최대로 성장시킨 다음, 다음 단계에서 질소원 등을 고갈시키고 탄소원을 적정량 공급하여 대사산물의 생합성을 최대로 하여 주는 것이 필요하다. 2단계에서도 질소원을 완전 고갈시키는 것보다는 극소량씩 공급하여 대사산물 생합성에 필요한 최소한의 질소원은 공급하는 것이 필요하다. 이러한 목적으로 1단계에서는 미생물의 성장을 최대로 하고 2단계에서 생합성조건을 최적화하는 fed-batch 배양 또는 2단계 chemostat가 바람직하며, 이 경우 질소원 및 탄소원 등의 농도를 최적으로 유지시켜주기 위한 공급속도를 결정하는 것이 필수적인 과제이다. 기질 공급속도를 정량적으로 정확히 결정하기 위하여는 질소원 및 탄소원의 영향을 규명하여 모델링을 하는 것이 필요하다. 아직도 많은 경우 세포를 black-box라고 보고 수학적 모델링을 하고 있으나, 이에 한계가 있으므로 세포내의 metabolism을 고려하는 grey-box 정도의 모델링이 필요하게 된다. 예를 들면, *Aspergillus*에 의한 citric acid의 생합성 메카니즘은 오래 전부터 잘 연구되어 왔던 것으로서 질소원의 농도에 의하여 생합성 pathway내의 효소가 조절받는 것으로 알려져 왔다. 최근 연구결과 세포내 질소원의 농도가 10 mM/g cell인 경우 citric acid의 생합성이 최대가 되며, 이를 이용하여 fed-batch 방식으로 배양한 결과 citric acid의 생합성을 연장시켜 생산성을 향상시킬 수 있음이 보고되었는데(6), 이러한 예는 세포내 metabolism을 고려하여 생물공정을 최적화시킬 수 있는 가능성을 보여준 것이다. 이러한 metabolism control의 개념은 미국 등의 생물공학 관련 산업체에 응용되기 시작한 것으로서 어떠한 대사산물이 생성되는 pathway를 규명한 다음 반응공학적인 개념에서 각 pathway에서의 flux를 분석하므로써 bottleneck가 되는 pathway를 찾는 것으로 시작된다(7, 8). 이러한 bottleneck를 해결하기 위하여 gene을 amplification시키는 조작 등을 통하여 대사산물의 생합성을 최대로 하게 되는데, 실제로 Xanthan gum의 생산 등에 활용되어 좋은 성과를 거두고 있는

것으로 알려져 있다.

#### 4. 적응 최적 제어

실험 및 이에 근거한 모델식, 그리고 최적화 기법에 의하여 미생물 배양의 최적조건을 알아냈다고 할지라도 실제 배양을 하는 경우에는

- (i) 예상치와 실제 inoculum의 오차,
- (ii) 미세한 환경변화에 의한 미생물의 활성 차이,
- (iii) 영양분 공급시의 공급속도 또는 농도 등의 오차
- (iv) 측정 data의 오차 및 외부의 잡음, 그리고
- (v) 사용한 모델식의 한계성

등에 의하여 최적화조건을 찾았을 때의 조건과 달라지게 된다. 따라서 진정한 최적화는 미생물 배양시의 상태 등을 고려하여야 하며, 이러한 목적으로 적응최적제어(adaptive optimal control) 방법의 사용이 바람직하다. 적응최적방법은 배양상태 및 배양 모델식의 변수를 추정한 다음, 이에 근거하여 최적화 및 제어조건을 찾아 공정을 운전하는 방법으로서 (Fig. 1 참고) 이를 위해서는 최근의 진보된 제어 기술의 도입이 필요하다. Yeast의 고농도 세포배양(9-14), 연속배양에서의 균체농도 제어(15), fed-batch 배양에 의한 효소의 생산(16) 등에서의 응용이 보고되었다.

Yeast를 고농도로 배양하기 위해서는 sugar를 많이 공급해야 하는데 배양액 중에 glucose의 농도가 높거나, 산소가 부족하면 ethanol이 생성되어 yeast의 성장을 저해하고, 따라서 기질에 대한 세포농도의 수율 및 생산성이 낮게 되어 sugar 및 산소의 수준을 적절히 유지하는 것이 중요하다. Yeast 고농도 배양의 경우 배양의 효율성을 높이기 위하여 표 1에서 보는 바와 같이 점차로 진보된 제어방법을 도입하고 있음을 알 수 있다. 최근에는 제어방법의 한계성을 극복하기 위하여 expert system 등의 방법이 도입되고 있다.

#### 5. 결 어

몇 가지 유형의 생물반응기 최적화 및 제어기술에 대하여 살펴보았으나 이외에도 신규 생물반응기(예 : 유동층 생물반응기, 재조합균주 이용 반응기, 세

표 1. yeast의 고농도 배양을 위한 유가배양 제어 추세.

년도	연구자	고농도 배양방법	참고문헌
1976	Aiba 등	호흡지수(RQ)를 $1.0 < RQ < 1.1$ 로 하기 위하여 sugar의 유입속도 조절	(9)
1979	Wang 등	RQ(set point)와 실제 RQ의 차이 및 에탄올 생성속도를 고려하여 sugar의 유입속도 조절	(10)
1981	Nanba 등	에탄올 생성비율에 의하여 sugar의 유입속도 조절	(11)
1985	Wu 등	적응제어 방법을 사용; 비성장속도 데이터로부터 비성장속도를 일정하게 유지하기 위하여 유입속도 조절	(12)
1985	Takamatsu 등	모델식으로부터 sugar 농도를 일정하게 유지시키는 기질 유입속도 및 세포농도 profile을 구한 다음 적응제어 방법을 사용하며 외부 교란시에도 세포농도를 profile대로 제어함	(13)
1986	Williams 등	적응제어 방법을 사용; 교반속도와 sugar 유입속도를 조절하여 용존산소 및 RQ값을 일정하게 유지시킴	(14)

포배양 반응기)의 최적화 제어, 공정의 자동관리 및 제어 등도 효율적인 생물반응기의 제어 및 최적화를 위해서는 중요한 사항이다. 또한 단위공정이 아닌 분리·정제공정을 포함하는 전체 공정의 최적화, 공정 flow sheet의 합성, 그리고 expert system 및 인공지능의 원리를 이용하는 컴퓨터 제어방식 등도 중요하나 본 고에서는 지면관계상 생략하였다. 우리나라 생물 산업체의 기술수준을 한마디로 평가하기는 어려우나 대부분 경험에 의존하고 있으며 최근 일부 산업체에서 컴퓨터와 연결시켜 온도, pH, RPM 등을 monitoring 및 제어하고 있는 정도로서 외국의 기술수준과 비교할 때 낙후되어 있다고 하겠다. 배양시의 조건을 안정화시키고 조건을 최적화시켜 수율 또는 생산성을 극대화시키는데는 고급 제어 및 최적화 기술의 도입이 필요하다. 따라서 산학협동 등의 방법을 통하여 국내의 생물공정 기술을 개발·향상시켜야 할 것이다. 제어방법이 복잡화될 수록 이와 비례하여 균일한 품질의 제품을 얻을 수 있으며, 더 안전한 조업을 할 수 있을 뿐 아니라, 경제성을 더욱 향상시킬 수 있다는 사실을 강조하고자 한다.

참고문헌

1. V.M. Fishman and V.V. Biryukov, *Biotech. Bioeng. Symp.*, **4**, 647(1974).  
 2. 박종경, 백승윤, 유영제, 산업미생물학회지, **17**,

619(1989).  
 3. N. Shimizu, et al., *J. Ferment. Technol.*, **66**, 187 (1988).  
 4. S.H. Park, S.B. Lee, and D.D.Y. Ryu, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1237(1981).  
 5. S.K. Yoon, Y.J. Yoo and H.-K. Lee, *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 136(1989).  
 6. 최재훈, 구연산 생산을 위한 생물반응기의 최적화 연구, 서울대학교 화학공학과 석사논문(1990).  
 7. H.V. Westerhoff and D.B. Kell, *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 101(1987).  
 8. J.L. Galazzo and J.E. Bailey, *Enzyme Microbial Technol.* **12**, 162(1989).  
 9. S. Aiba, s. Nagai, and Y. Nishizawa, *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1001(1976).  
 10. H.Y. Wang, C.L. Cooney, and D.I.C. Wang, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 975(1979).  
 11. A. Nanba, F. Hirota, and S. Nagai, *J. Ferment. Technol.*, **59**, 383(1981).  
 12. N.-T. Wu, K.-C. Chen, and H.-W. Chiou, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 756(1985).  
 13. T. Takamatsu, S. shioya, Y. Okada, and M. Kanda, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1675(1985).  
 14. Williams, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 631(1986).  
 15. Y.K. Chang, and H.C. Lim. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 8(1990).  
 16. Y.J. Yoo, T.W. Cadman, J. Hong, and R.T. Hatch, *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 426(1988).