

비정상 상태의 실관 비이커 발효조의 특성

박태현 · 김인호

대덕단지 사서함 10, 럭키중앙연구소
(1985년 1월 16일 접수, 1985년 3월 18일 채택)

Transient Behavior of Hollow-Fiber Beaker Fermenter

Tai Hyun Park and In Ho Kim

Lucky Central Research Institute P. O. Box 10, Dae Duk, Chungnam, Korea

(Received 16 January 1985; accepted 18 March 1985)

요 약

발효조의 튜브측을 N개의 혼합탱크로 생각하여, 실관 비이커 발효조의 수학적 모델을 제시하였다. 실관 비이커 발효조의 셸측에서 *Saccharomyces cerevisiae*를 배양하였다. 수치모사와 실험을 통해 시간에 따른 발효조의 양상을 조사하였다. 공급되는 배양액의 기질 농도에 비해 셸측의 초기 기질 농도가 낮으면 출구 기질 농도는 단순히 감소하지 않고 감소, 증가, 그리고 감소하는 복잡한 형태를 나타냈다. 세포가 어느 정도 이상 자라면서 막의 투과도는 감소하기 시작하였다. 수치모사를 통해 실험 결과를 잘 설명할 수 있었다.

Abstract - A mathematical model for a hollow-fiber beaker fermenter was presented to investigate time-dependent behaviour of the fermenter. Tube side of the fermenter was modelled as n-mixed tanks and the shell side was segregated from the tube side by membrane. To compare numerical simulation with experimental data, *Saccharomyces cerevisiae* was cultured in the shell side. When the initial substrate concentration in the shell side was low, history of outlet tube-side substrate concentration has a complex pattern instead of monotonous profile. Membrane permeability was observed to decrease rapidly with the growth of cells.

I. 서 론

단위 부피당 표면적이 크다는 장점을 갖는 실관 모듈(hollow fiber module)은 1970년대 들어 효소 반응기로서 사용되어, 실험과 이론적인 연구가 계속되어 왔다[1, 2, 3]. 정제된 효소뿐 아니라, Kan과 Shuler는 열처리된 세포(*Pseudomonas fluorescens*)를 실관 투석기(hollow fiber dialyzer)의 셸측(Shell side)에 고정화하여 urocanic acid를 생산하였다. 그리고 순환 비율이 큰 경우 막(membrane)

의 확산 저항이 없다는 가정하에 실관 투석기 전체를 CSTR로 모델화 하였다[4]. Webster와 Shuler는 같은 system에서 실관내의 축방향 농도 변화는 무시하고 반경 방향의 농도 변화만을 고려하여 해석해를 구했으며[5], 유효인자를 계산하였다[6]. 그러나 상업적 규모의 투석기에서는 축방향의 농도 변화는 크게 나타난다. 그들은 또한 축방향의 농도 변화를 무시한 경우 비정상 상태에서의 기질 농도 분포를 계산하였다[7].

1972년 Knazek등은 실관 내부(lumen)로 배양액

을 흘러 보내 영양분을 공급하며, 실관의 바깥 부분 (shell side) 에서 동물세포를 배양하였다(8).

한편 1983년 Inloes 등은 실관 내부로 배양액을 흘러 보내며 쉘측에 효모를 배양하여 에탄올을 발효하였다(9). 이 방법은 쉘측에 미생물을 고정화 시킴으로써 종래의 chemostat보다 높은 세포농도를 유지할 수 있다. 따라서 알코올의 생산성을 높일 수 있다.

기질인 포도당과 생산물인 에탄올은 실관 막을 통해 확산에 의한 물질 전달이 일어나므로, 막의 투과도가 이와같은 실관 발효조(hollow fiber fermenter)의 성능에 커다란 영향을 미친다.

본 연구에서는 실관 비이커(hollow fiber beaker)의 실험과 이론적 모델을 통해, 미생물이 자람에 따른 실관 막의 투과도에 미치는 영향과 실관 막의 투과도가 포도당 소모에 미치는 영향을 조사하였고, 시간 경과에 따른 양상을 관찰하였다. 특히 실관 모델이 인공 장기로 사용될 경우에는 시간에 따른 특성 변화가 중요시 된다.

II. 수학적 모델

Fig. 1 과 같이 실관 내부를 N개의 같은 부피의 CSTR로 가정하고, 쉘측은 완전 혼합된다고 가정한다.

이 경우 N개의 CSTR에서 기질에 대한 물질 수지식은 다음과 같다.

$$\left. \begin{aligned} \frac{dS_1}{dt} &= \frac{1}{V_t} [S_0 F - F S_1 - k_a (S_1 - S_s)] \\ \frac{dS_2}{dt} &= \frac{1}{V_t} [S_1 F - F S_2 - k_a (S_2 - S_s)] \\ &\dots\dots\dots \\ \frac{dS_N}{dt} &= \frac{1}{V_t} [S_{N-1} F - F S_N - k_a (S_N - S_s)] \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

세포의 성장은 Monod equation에 따른다고 가정하면, 기질에 대한 쉘측에서의 물질수지식은 다음과 같다.

$$\frac{dS_s}{dt} = \frac{1}{V_s} [k_a (S_1 + S_2 + \dots + S_N - N S_s) - \frac{V_s \mu_{max} S_s X}{Y (K_s + S_s)}] \quad (2)$$

여기서 Y는 specific growth yield를 표시한다. 또한 Monod equation에 의해 다음식을 얻는다.

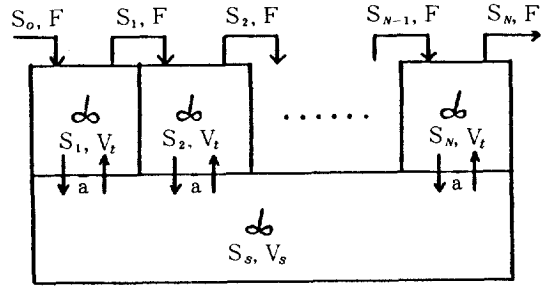


Fig. 1. Models for the hollow-fiber beaker fermenter; N equal-sized mixed tanks for the tube side and one mixed tank for the shell side.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} S_s X}{K_s + S_s} \quad (3)$$

윗식들을 무차원 변수를 사용하여 표시하면 다음과 같다.

$$S_{1 \dots N, s} = \frac{S_{1 \dots N, s}}{S_0}, t^* = \frac{tF}{NV_t} = tD, X^* = \frac{X}{S_0 Y}$$

여기서 $D = \frac{F}{NV_t}$ 이다.

$$\left. \begin{aligned} \frac{dS_1^*}{dt^*} &= N(1 - S_1^*) - P(S_1^* - S_s^*) \\ \frac{dS_2^*}{dt^*} &= N(S_1^* - S_2^*) - P(S_2^* - S_s^*) \\ &\dots\dots\dots \\ \frac{dS_N^*}{dt^*} &= N(S_{N-1}^* - S_N^*) - P(S_N^* - S_s^*) \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

$$\frac{dS_s^*}{dt^*} = \frac{PR}{N} (S_1^* + S_2^* + \dots + S_N^* - N S_s^*) - K \frac{X^* S_s^*}{1 + \beta S_s^*} \quad (5)$$

$$\frac{dX^*}{dt^*} = K \frac{X^* S_s^*}{1 + \beta S_s^*} \quad (6)$$

여기에 나타난 무차원 변수는 다음과 같다.

$$P = \frac{k_a N}{F} = \frac{kA}{F} \quad (7)$$

$$K = \frac{\mu_{max} S_0}{K_s D} \quad (8)$$

$$R = \frac{NV_t}{V_s} \quad (9)$$

$$\beta = \frac{S_0}{K_s} \quad (10)$$

P는 막의 무차원 투과도를, K는 무차원 반응 속도 상수를 각각 나타낸다. 무차원 변수로 표시된

Table 1. Specification of Hollow-Fiber Beaker.

Beaker material	polycarbonate
Beaker volume	200ml
Number of fibers	25
Fiber length	18cm
Membrane surface area	150cm ²
Inner diameter of fiber	0.6mm
Fiber material	polyamide
Molecular weight cutoff	10,000

앞의 식들은 Runge-Kutta방법에 의해 수치모사 하였다.

III. 실험

실관 비이커 (hollow fiber beaker)

Nuclepore사의 Type H가 사용되었고, 그 특성은 Table 1 과 같다. 실험 장치의 모식도는 Fig. 2 와 같다. 실관과 연결관들은 5% 포르말데히드로 24 시간 멸균하였다. 그 후 멸균된 증류수로 씻어내고 배지를 흘려 보내며 충분히 씻었다. 실관 내부로 흐르는 배지는 실관 막을 통해 셀측으로 확산되어, 그곳에서 자라는 미생물에 영양분을 공급한다. 셀측에서 발효에 의해 생성된 알코올은 실관 막을 통해 실관 내부로 확산되어 미반응된 기질과 함께 출구로 흘러 나온다.

미생물

Saccharomyces cerevisial ATCC 24858 을 30°C 합성 배지에서 배양하였다.

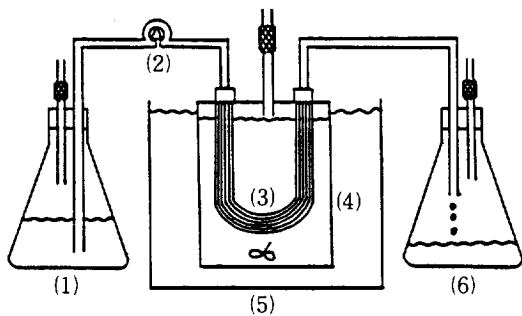


Fig. 2. Schematic diagram of experimental apparatus; (1) feed tank, (2) pump, (3) hollow fiber, (4) hollow-fiber beaker, (5) water bath, (6) outlet reservoir.

Table 2. Medium Composition(per liter medium).

D-glucose	100 g
NH ₄ Cl	4.56 g
CaCl ₂	0.06 g
Potassium acid phthalate	10.2 g
NaOH	1.42 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Meso-inositol	0.125g
MgSO ₄ , CuSO ₄ solution ^a	5 ml
Mineral solution ^b	1 ml
Vitamin solution ^c	1 ml

a MgSO₄, CuSO₄ solution

dH ₂ O	100 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.04 g

b Mineral solution

dH ₂ O	100 ml
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.21 g

c Vitamin solution

dH ₂ O	100 ml
Thiamin HCl	0.5 g
Ca-d-pantothenate	0.63 g
Pyridoxine HCl	0.63 g
d-biotin	0.013g
Nicotinic acid	0.5 g

배양액

합성 배지가 사용되었으며 그 조성은 Table 2 와 같다. 무기염류 용액과 비타민용액은 0.45μm Milipore 막으로 여과하여 멸균하였다. 나머지는 120°C 에서 20분간 스팀 멸균하였다. 이때 침전 생성을 막기 위해 MgSO₄·CuSO₄ 용액, 포도당 용액, 그 밖의 것들로 나눠 따로 멸균하였다.

분석방법

포도당 농도는 glucostat 방법으로 측정하였다. 에탄올 농도는 가스 크로마토그래프를 사용하여 측정하였다. 세포 농도는 spectrophotometer를 사용하여 525nm에서 O. D. 를 측정하였다.

Batch 및 CSTR 실험

Specific growth yield (Y) 를 측정하기 위해 Batch 실험을 하여 포도당 농도 감소에 대한 세포 농도 증

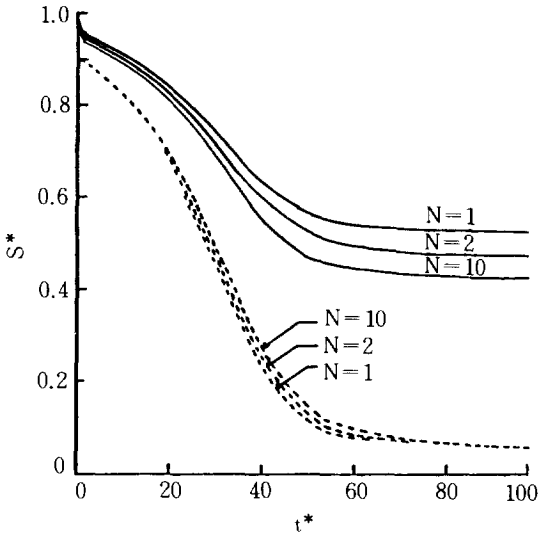


Fig. 3. Simulated transient behavior of the hollow-fiber beaker fermenter; - : tube-side outlet substrate concentration; ···: shell-side substrate concentration; $Y = 0.2, K = 0.2, \beta = 2.2, R = 0.05, P = 1, S_{s0}^* = 0.9, X_0^* = 0.15$.

가를 측정하였다. μ_{max} 와 K_s 를 구하기 위해 CSTR 실험을 하였다. 이때 feed의 포도당 농도는 100g/l였고 체류 시간을 변화시키며 실험하였다. Batch와 CSTR의 두 경우 모두 배양액의 부피는 200ml였고 30°C에서 배양되었다.

IV. 결과 및 고찰

실관의 내부는 plug flow reactor 형태이므로 여러개의 CSTR로 생각할 수 있다. Fig. 3은 실관 내부를 1개, 2개, 10개의 CSTR로 가정했을 때의 기질 농도를 나타낸다. 여기서 $Y = 0.2, K = 0.2, \beta = 2.2, R = 0.05, P = 1, S_{s0}^* = 0.9, X_0^* = 0.15$ 이다. 갯수가 많을수록 출구 농도는 감소하고, 쉘측의 농도는 증가한다. 시간이 경과함에 따라, 미생물이 자라 기질을 섭취하므로, 실관 내부와 쉘측에서의 농도차가 커진다. 이때 확산 속도가 커져 CSTR갯수가 출구 농도에 미치는 영향은 점점 커진다. 쉘측에서의 기질 농도는, CSTR갯수가 미치는 영향이 약간 나타났다가 시간이 지남에 따라 사라진다. 이것은 시간이 경과함에 따라 확산의 구동력인 실관

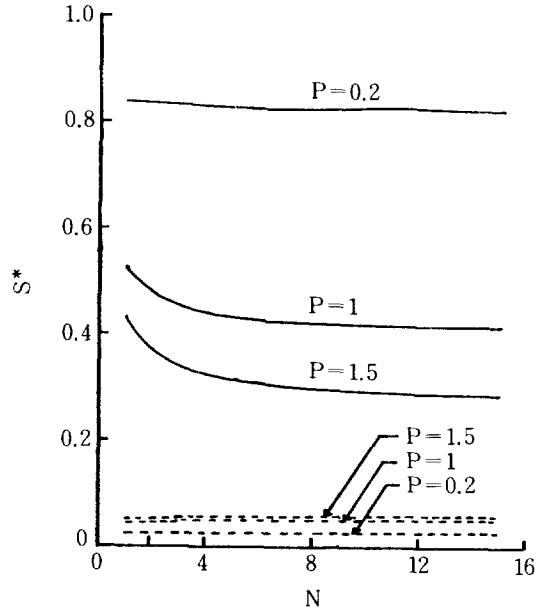


Fig. 4. Effect of the number of mixed tanks on the substrate concentration; - : tube-side outlet substrate concentration; ···: shell-side substrate concentration; $Y = 0.2, K = 0.2, \beta = 2.2, R = 0.05, t^* = 100, S_{s0}^* = 0.9, X_0^* = 0.15$.

내부와 쉘측의 농도차가 증가하므로, 효과가 나타나기 시작하다가 미생물이 자랄수록 반응 속도가 커져 확산에 의한 기질 공급 증가 효과는 금방 사라지기 때문이다.

Fig. 4는 CSTR의 갯수가 실관 출구 기질 농도와 쉘측 기질 농도에 미치는 영향을 나타낸다. 여기서는 무차원 반응 속도 상수(K)가 0.2일때를 표시하였다. 막의 투과도가 증가할수록 1개의 CSTR로 가정한 경우에서의 실관의 출구 농도는 많은 수의 CSTR로 가정한 경우와 차이를 보인다. 그러나 막의 투과도가 작으면 CSTR가정과 plug flow reactor가정 사이에는 차이가 없다. 따라서 실관내부의 기질 용액을 재순환 시키지 않고 연속 조업하는 경우에도 막의 투과도가 작다면 실관 내부를 1개의 CSTR로 가정할 수 있다.

초기의 쉘측 기질 농도가 작은 경우에는 Fig. 5와 같이 기질 농도가 증가하다가 감소하는 경향을 보인다. 이것은 초기에 실관 내부와 쉘측의 농도차로 인해 큰 확산 속도를 보여 실관 내부의 농도는 급격히 감소하고 쉘측의 농도는 증가한다. 이로 인

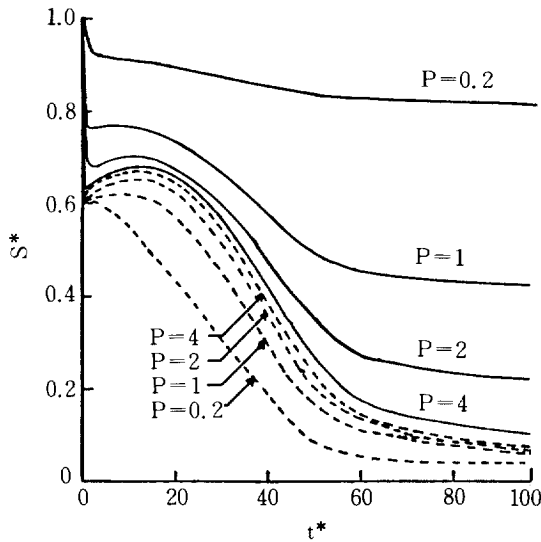


Fig. 5. Simulated transient behavior of hollow-fiber beaker fermenter at a low initial substrate concentration of the shell side ; - : tube-side outlet concentration ; ... : shell side concentration ; Y=0.2, K=0.2, $\beta=2.2$, R=0.05, N=10, $S_{s0}^*=0.6$, $X_0^*=0.15$.

해 농도차가 줄어들게 되면 확산 속도가 작아져서 실관 내부의 농도는 다시 증가한다. 시간이 경과함에 따라 미생물 농도가 증가하여 반응 속도가 커지면, 실관 내부와 쉘측의 농도는 감소하기 시작한다. 막의 투과도가 클수록 농도 변화의 기복이 심하다. Fig. 6은 시간에 따른 세포 농도 증가를 나타낸다. 막의 투과도가 클수록 성장 속도가 빠르고, station-

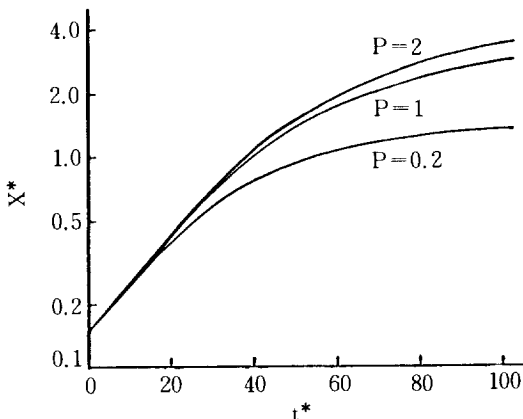


Fig. 6. Simulated transient cell density; Y=0.2, K=0.2, $\beta=2.2$, R=0.05, N=10, $S_{s0}^*=0.6$, $X_0^*=0.15$.

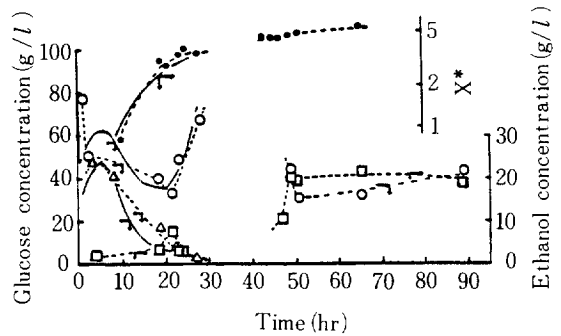


Fig. 7. Experimental data and simulated results; \circ : glucose concentration at the outlet; \triangle : glucose concentration of the shell side; \square : ethanol concentration at the outlet; \bullet : dimensionless cell density; ...: experimental data; -: numerical simulation.

ary phase에도 늦게 도달한다. Fig. 7은 실관 비이커 발효조 실험에서의 포도당, 에탄올, 세포 농도를 나타내고 실선은 이론적 계산 결과이다. 이론적 계산에 사용된 변수값은 N=10, Y=0.2, K=0.2, $\beta=2.2$, R=0.05, P=1.3, 초기 $X^*=0.15$, 초기 $S_s^*=0.2$ 이다. Y는 batch 실험에서 구한 specific growth yield이다. K와 β 는 CSTR 실험에서 구한 $\mu_{max}=0.43$ (hr^{-1}), $K_s=46.1$ (g/l)에 의해 얻어진 값이다. 막의 투과도는 parameter fitting에 의해 P=1.3일때 실험 결과와 잘 일치했다. 배양액의 공급 속도는 42ml/h로 유지되었다. 시간이 경과함에 따라 포도당 농도는 감소하고, 에탄올 농도는 증가하다가 20시간($t^*=91.4$) 이후 부터는 미생물이 자라 막의 투과도가 떨어져, 포도당 농도는 증가하고 에탄올 농도는 감소한다. 20시간($t^*=91.4$) 후부터 막의 투과도 감소율을 $-\frac{dP}{dt^*}=0.03$ 이라 가정했을 때, 이론적 계산값은 실험결과와 잘 일치했다.

앞의 조건에서 계속적으로 조업한 후 45시간($t^*=205.65$)이 지난 후 배양액 공급 속도를 42ml/h에서 15.6ml/h로 변화시켜 체류시간을 크게하면 포도당 농도는 다시 떨어지고 에탄올 농도는 증가한다. 막의 투과도는 거의 최소값에 도달하게 되어, 50시간 이후의 농도들은 일정한 값을 유지하였다. 세포 농도는 계속적으로 증가하나, 50시간 이후의 증가 정도는 미미하다.

V. 결 론

실관 비이커 발효조를 튜브측을 N개의 혼합탱크로 생각하고 수치모사한 결과, 실험 결과와 잘 일치하였다. 관내부에서는 반응이 일어나지 않고 외부로 확산만이 있는 경우에도 막의 투과도가 크면 plug flow reactor 가정은 CSTR 가정보다 타당하다. 그러나 실관 내부를 10개 이상의 CSTR로 가정하면, plug flow reactor의 결과와 별 차이가 없다. 막의 투과도가 작은 경우에는 plug flow reactor를 1개의 CSTR로 가정할 수 있다. 미생물이 자람에 따라 막의 투과도는 감소한다. 감소율이 시간에 비례한다고 가정했을 때, 본 실험에서 감소율은 $-\frac{dP}{dt^*} = 0.03$ 이었다. 이 감소율은 투과도가 감소하기 시작하여 8시간이 경과할 때까지는 실험 결과와 잘 일치한다.

NOMENCLATURE

- A : Membrane surface area (cm²)
 a : Membrane surface area per one CSTR (cm²)
 D : Dilution rate (F/N V_r) (hr⁻¹)
 F : Flow rate (cm³/hr)
 K : Dimensionless parameter defined by Eq. (8)
 K_s : Saturation constant (g/cm³)
 k : Mass transfer coefficient (cm/hr)
 N : Number of CSTRs
 P : Dimensionless parameter defined by Eq. (7)
 R : Dimensionless parameter defined by Eq. (9)
 S : Substrate concentration (g/cm³)
 t : Time (hr)
 V : Reactor volume (cm³)
 X : Cell concentration (U.O.D.)

- Y : Specific growth yield (U.O.D. l/g substrate)

Greek Letters

- β : Dimensionless parameter defined by Eq. (10)
 μ_{max} : Maximum value of specific growth rate (hr⁻¹)

Subscripts

- o : Feed
 1-N : 1-Nth CSTR
 s : Shell side
 t : Tube side

REFERENCES

1. Rony, P.R. : *Biotech. Bioeng.*, **13**, 431 (1971).
2. Waterland, L.R., Michaels, A.S. and Robertson, C.R.: *AIChE J.*, **20**, 50 (1974).
3. Waterland, L.R., Robertson, C.R. and Michaels, A.S. : *Chem. Eng. Commun.*, **2**, 37 (1975).
4. Kan, J.K. and Shuler, M.L.: *Biotech. Bioeng.*, **20**, 217 (1978).
5. Webster, I.A. and Shuler, M.L.: *Biotech. Bioeng.*, **20**, 1541 (1978).
6. Webster, I.A., Shuler, M.L. and Rony, P.R.: *Biotech. Bioeng.*, **21**, 1725 (1979).
7. Webster, I.A. and Shuler, M.L.: *Biotech. Bioeng.*, **23**, 447 (1981).
8. Knazek, R.A., Gullino, P.M., Kohler, P.O. and Dedrick, R.L.: *Science*, **178**, 65 (1972).
9. Inloes, D.S., Taylor, D.P., Cohen, S.N., Michaels, A.S. and Robertson, C.R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 264 (1983).