

Ch. 10 생물반응기의 선택, 대규모화, 제어, 멸균

대규모화와 문제점

❖ 대규모 시스템의 특징:
불균일성,
부피 대 표면적 비 변화,
배양시간 장기화

❖ 반응기 형태

(1) 교반탱크 반응기

(Stirred-tank reactor):

내부에서 기계적으로 교반

(2) 기포탑(bubble column):

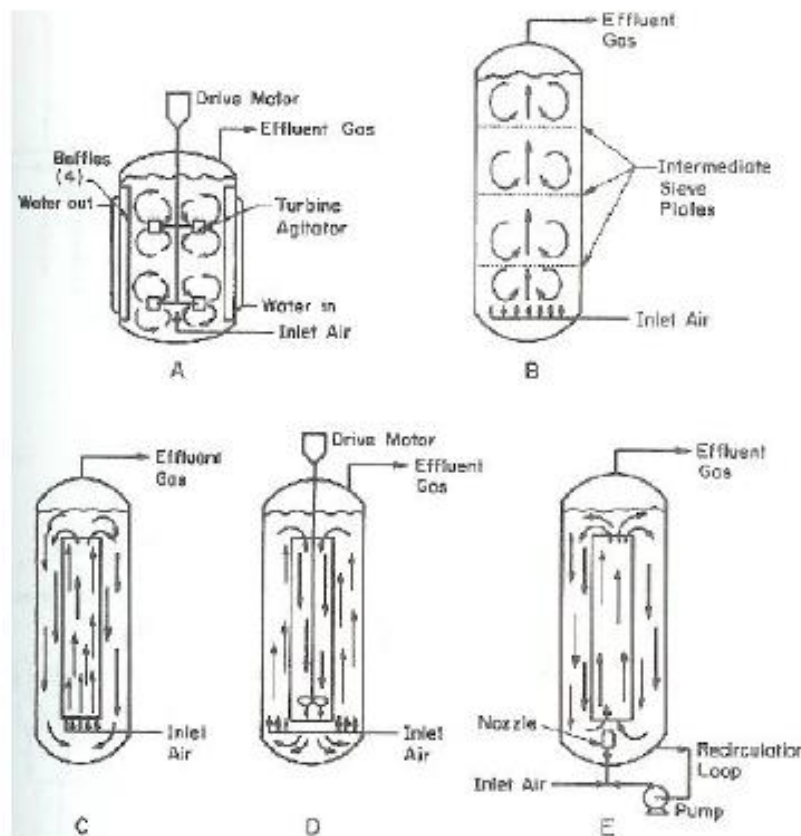
기체 분사에 의해 교반

(3) 루프식 반응기(loop reactor):

기체 또는 펌프로 액체순환 유도

삼상(기체-액체-고체)반응기:

복잡한 유체역학, 예측곤란



Bioprocess Engineering I

교반탱크 반응기(stirred-tank reactor)

- 발효기(fermentor): 미생물 또는 곰팡이 배양
- 생물반응기(bioreactor): 살아 있는 세포를 배양하는 어떤 시스템이라도 포함, 동물세포배양에 우선적 사용
- 400 m³ 까지의 교반반응기: 5 KW/m³의 교반기 용량으로 항생제 생산에 사용, 약 2000 cP까지의 점도를 갖는 발효액에 대해 상업적 사용
- 동물세포 반응기: 20 m³ 상한
- 식물세포 반응기: 75 m³ 상한

교반탱크 반응기(Stirred Tank Reactor)

- 가장 전통적, 융통성, 기체전달 효율적 (high kLa)
- ❖ 분사기(sparger): 기체공급, 분사기 고리 (다수의 배출점, 잘 막힘)
or 오리피스 (하나의 배출점)
- ❖ 방해판(baffle): 보통 4개, 반응기 지름의 약 8-10% 너비
- ❖ 용기재질: 부식성, 마모성 고려, ss316, ss304(뚜껑, 재킷), 유리용기는 최대 500L
- ❖ 반응기: 높이 대 지름 비(2-3), 대규모화의 두 요인: 산소공급, 열제거, 내부코일(미생물막 형성, 열전달 효율 감소) 또는 외부 재킷

Bioprocess Engineering I

교반탱크 반응기(Stirred Tank Reactor)

❖ 임펠러(impeller): 기체분산,

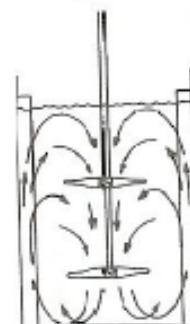
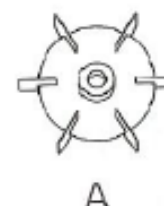
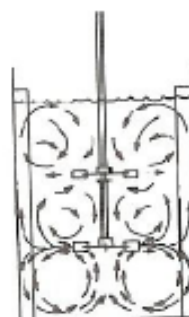
• 임펠러 설계인자: 산소전달, 전단민감성, 층형성

• turbine, marine, paddle

• rushton impeller(A): 방사류, 6-8개의 판(blade)

• axial flow hydrofoil impeller(B): 축류, 에너지 효율 우수, 낮은 전단민감성(shear sensitivity), 동물세포, 곰팡이 배양에 적용, 층형성 억제

• 반응기 지름의 30-40%의 임펠러 지름, 축류는 50% 까지



Bioprocess Engineering I

교반탱크 반응기(Stirred Tank Reactor)

❖ 거품발생(foaming)

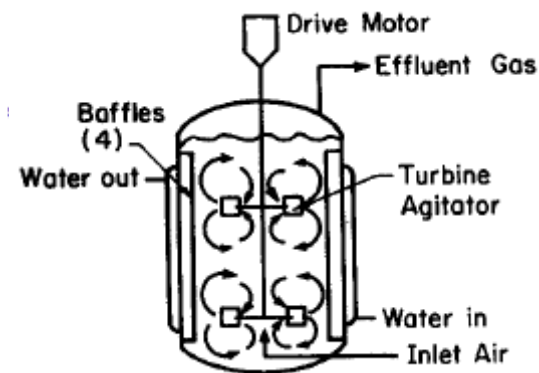
- 세포외고분자 등이 원인, 압력강하 증가(여과기 수분), 기체흐름 감소, 오염
- 기계적 거품 제거 or 소포제(화학물질), 소포제는 kLa 값 감소시킴, 세포생장 억제
- 상부공간(headspace), 작동부피(working volume): 전체의 약 75%

❖ 멸균성(sterility)

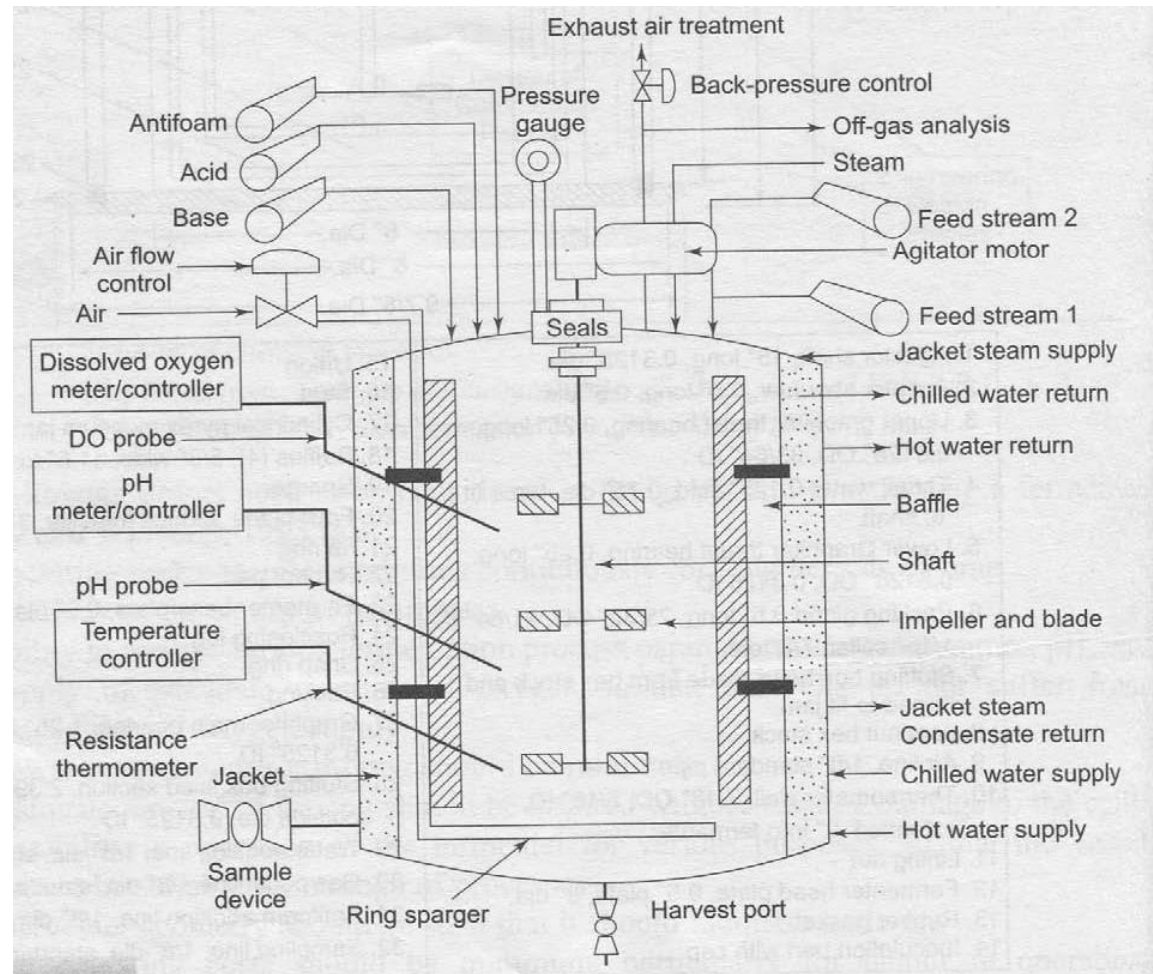
- 고압증기 활용, in-place 멸균, 오염가능성: 탐침, 교반기, 시료채취, 연결부위, 밸브

❖ 세척

- CIP 공정: clean-in-place, 강알칼리성, 재질에 주의



Bioprocess Engineering I



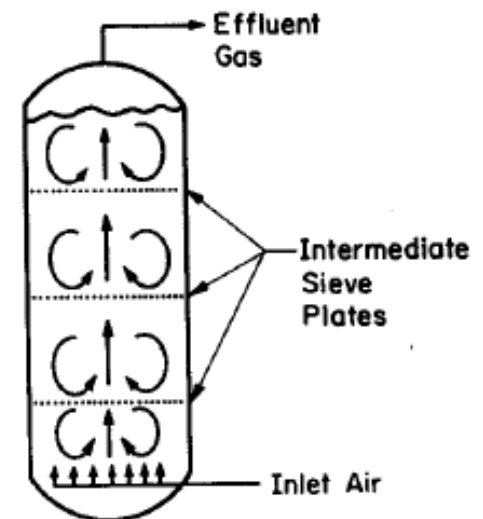
□ 기포탑 (Bubble column)

❖ 장점:

- 교반탱크보다 높은 에너지효율 (단위공급동력당 산소전달)
- 작은 전단응력
- 세포가 기포표면에 존재하는데 기포파열 시 세포사멸 가능성
- 교반기가 없으므로 오염경로 하나가 제거됨

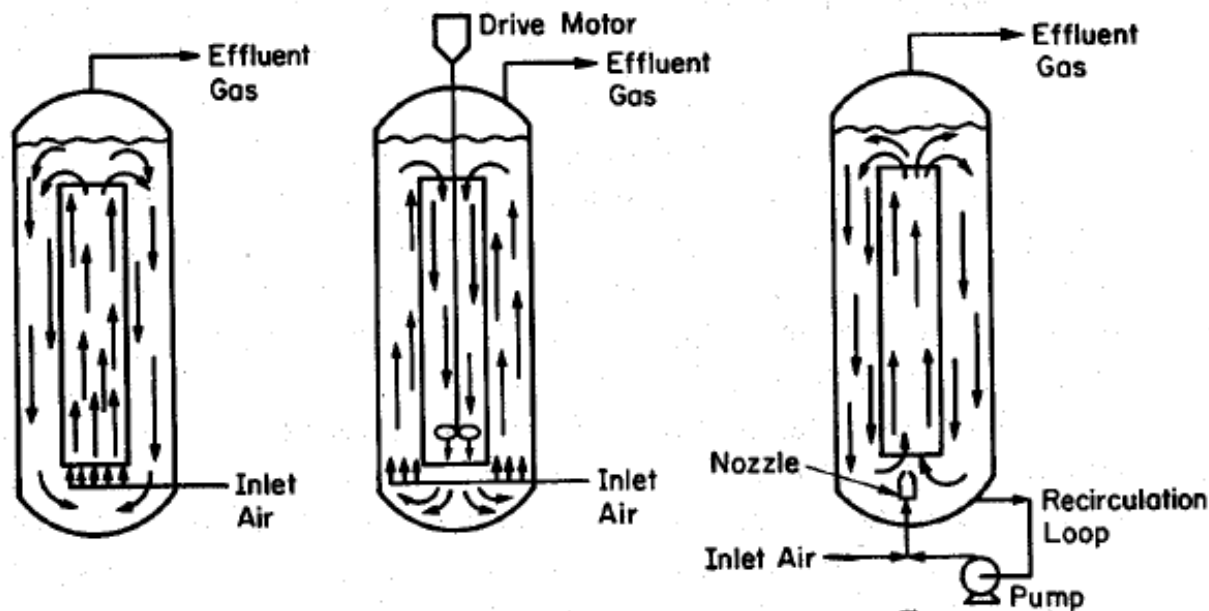
❖ 단점:

- 거품발생
- 기포합체(coalescence, 다단관으로 해결) 등의 문제
- 높은 점도에 부적절함



□루프식 반응기 (Loop reactor, Airlift, Propeller, Jet)

기포탑과 교반탱크의 중간특성, 대형화 가능(1500 m^3 ICI),
유체간 물질교환이 작음, 순환시간이 중요, 여러개의 기질주입지점 필요



일회용 생물반응기

- 동물세포 배양에서 생산되는 것과 같은 고가의 생산물에 집중
- FDA 승인 플라스틱(예: 폴리카보네이트, 폴리스티렌 등)으로 만들어 짐
- 장점: 멸균, 세정 과정과 이들의 인증이 필요 없기 때문에 신속한 대 규모화와 실행, 청결에 대한 규제제약이 까다로운 제약산업, 공정용 통성, 시장변화에 대한 대처성, 비용절감(초기자본금 여러 배 감소)
- 단점: 플라스틱에서 스며 나와 생성물을 오염시키는 화학물질, 플라스틱의 기계적 안정성, 산소전달용량(유효 세포농도 제한), 1회용 센서기술 낙후
- 현재 최대 사용가능 크기: 2 m³ (2000 L)
- 1회용 기술은 생물반응기뿐 아니라 배양액과 완충액 제조, 여과, 크로마토그래피까지도 개발

통기, 교반, 열전달

대규모 반응기 설계에서 가장 중요한 요인:
산소공급, 열 제거

- 산소전달속도 $OTR = k_L a(C^* - C_L)$
- 산소섭취속도 $OUR = q_{O_2} \times X$

q_{O_2} : 비산소 섭취속도 ($\text{mol O}_2/\text{g cell h}$)
--> 표 10.1

정상상태: $OUR = OTR$

TABLE 10.1 Typical Respiration Rates of Microbes and Cells in Culture

| Organism | q_{O_2} ($\text{mmol O}_2/\text{g dw-h}$) |
|---------------------------------------|---|
| Bacteria | |
| <i>E. coli</i> | 10–12 |
| <i>Azotobacter</i> sp. | 30–90 |
| <i>Streptomyces</i> sp. | 2–4 |
| Yeast | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 8 |
| Molds | |
| <i>Penicillium</i> sp. | 3–4 |
| <i>Aspergillus niger</i> | ca. 3 |
| Plant cells | |
| <i>Acer pseudoplatanus</i> (sycamore) | 0.2 |
| <i>Saccharum</i> (sugar cane) | 1–3 |
| Animal cells | $0.4 \frac{\text{mmol O}_2/\text{h}}{10^6 \text{ cells/ml}}$ |
| HeLa | |
| | $0.15 \frac{\text{mmol O}_2/\text{h}}{10^6 \text{ cells/ml}}$ |
| Diploid embryo WI-38 | |

Bioprocess Engineering I

$k_L a$ 관계식

- 다양한 $k_L a$ 예측식이 주어짐 (예: 식 10.2a)

$$k_L a = k(P_g/V_R)^{0.4} V_s^{0.5} (N)^{0.5}$$

k : 경험상수, P_g : 동력요구량, V_R : 반응기 부피,
 V_s : 공압가스 방출속도, N : 교반기 회전속도

- $k_L a$, C^* (산소용해도)에 미치는 변수: 배지조성 (특히 염과 계면활성제), 온도, 압력
- C_L : 임계산소농도 이상으로 유지 ($\sim 1\text{mg/L}$)

Bioprocess Engineering I

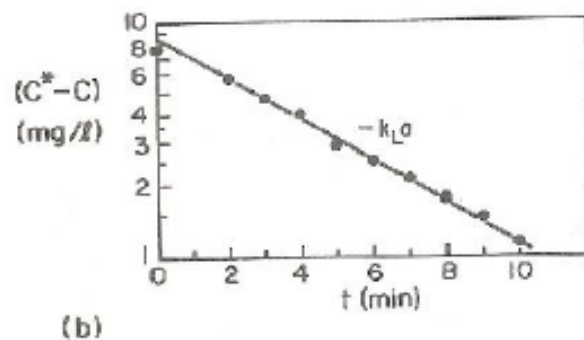
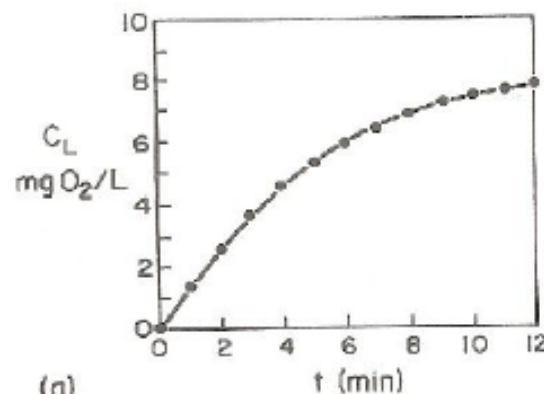
$k_L a$ 의 측정

(1) 비정상상태 (세포 무)

- 질소로 산소 제거
- 공기를 주입하여 시간에 따른 용존산소농도 (DO, dissolved oxygen) 측정
- --> 식 10.4, 10.5

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C^* - C_L)$$

$$\ln(C^* - C_L) = -k_L a t$$



Bioprocess Engineering I

$k_L a$ 의 측정

(2) 아황산염 (세포 무)

- 화학반응으로 산소제거, $\text{SO}_3^{2-} + 1/2\text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$, $C_L \sim 0$
- \rightarrow 식 10.6

$$\frac{1}{2} \frac{dC_{\text{SO}_4}}{dt} = k_L a (C^* - C_L)$$

- 시간에 따른 황산염 농도 측정

Bioprocess Engineering I

$k_L a$ 의 측정

(3) 정상상태 (세포 유)

- 운전 중 측정 가능, 기체에서의 산소농도와 C_L 측정 필요

OTR = OUR
(식 10.8)

$$k_L a = \frac{OUR}{C^* - C_L}$$

- 입구와 출구의 pO_2 에 근거한 지수평균 C^* 활용

Bioprocess Engineering I

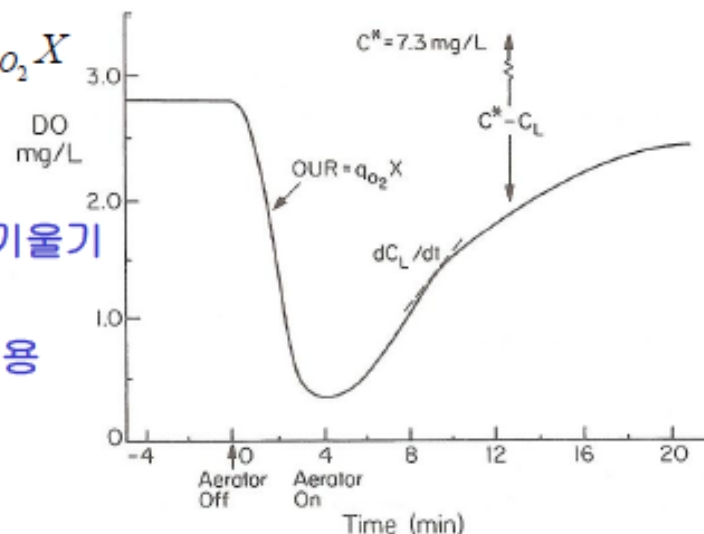
$k_L a$ 의 측정

(4) 동역학적 (세포 유)

- 기체분석 필요없음, 실제상황에서 측정 가능,

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR = k_L a (C^* - C_L) - q_{O_2} X$$

- 하강하는 곡선의 기울기 = OUR
- $k_L a$: $dC_L/dt + OUR$ 대 $(C^* - C_L)$ 의 기울기
- q_{O_2} 를 알면, OUR로부터 X 측정에 활용



❖ 열 발생 : $k_L a$ 로부터 예측 가능

열발생속도: Q_{GR} (kcal/h) = 0.12 Q_{O_2} (mmol O_2 /h) (식 6.29)

Bioprocess Engineering I

대규모화

- 일반적인 발효기 높이 대 지름비 = 2: 1 or 3:1
- 대규모화 동안 부피 대 표면적 비 감소
- 벽면생장(wall growth)

❖ 대규모화 원리

- 동력공급량 ($P/V \propto N^3 D_i^2$)
- 용기내의 일정한 액체순환속도, 임펠러의 펌핑속도 ($Q/V \propto N$)
- 임펠러 끝에서의 일정한 전단응력속도 (ND_i)
- Reynolds 수
- $k_L a$
- 기질 또는 생성물 농도 (DO)
- 모두 N , D_i 의 함수: 이 둘을 고정하면 이러한 양을 고정시킬 수 있다
- 소규모 반응기: 세포반응이 율속,
- 대규모 반응기: 이동현상(물질전달)이 율속

Bioprocess Engineering I

대규모화

TABLE 10.2 Interdependence of Scale-up Parameters

| Scale-up criterion | Designation | Small fermenter, 80 L | Production fermenter, 10,000:1 | | | |
|--|------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------|----------------------------|-------------------|
| | | | Constant, P_0/V | Constant, N | Constant, $N \cdot D_i$ | Constant, Re |
| Energy input | P_0 | 1.0 | 125 | 3125 | 25 | 0.2 |
| Energy input/volume | P_0/V | 1.0 | 1.0 | 25 | 0.2 | 0.0016 |
| Impeller rotation number | N | 1.0 | 0.34 | 1.0 | 0.2 | 0.04 |
| Impeller diameter | D_i | 1.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Pump rate of impeller | Q | 1.0 | 42.5 | 125 | 25 | 5.0 |
| Pump rate of impeller/volume | Q/V | 1.0 | 0.34 | 1.0 | 0.2 | 0.04 |
| Maximum impeller speed (max. shearing rate) | $N \cdot D_i$ | 1.0 | 1.7 | 5.0 | 1.0 | 0.2 |
| Reynolds number | $ND_i^2\rho/\mu$ | 1.0 | 8.5 | 25.0 | 5.0 | 1.0 |

With permission, from J. Y. Oldshue, *Biotechnol. Bioeng.* 8:3-24 (1996) John Wiley & Sons, Inc.

대규모화

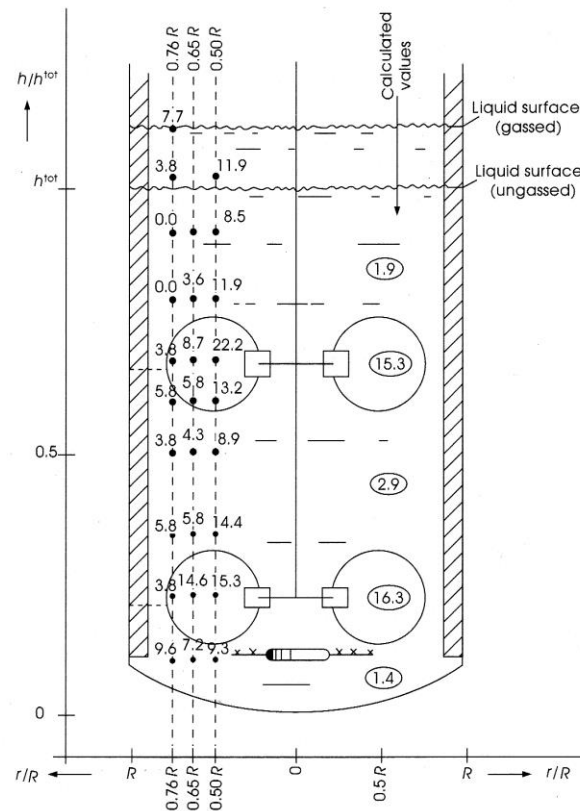


Figure 10.6 Measured oxygen concentrations in a 20-m³ production fermenter (figures in circle are model estimates). (With permission, from N. W. F. Kossen, in T. K. Ghose, ed., *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, United India Press, New Delhi, 1985, pp. 365-380.)

소규모화

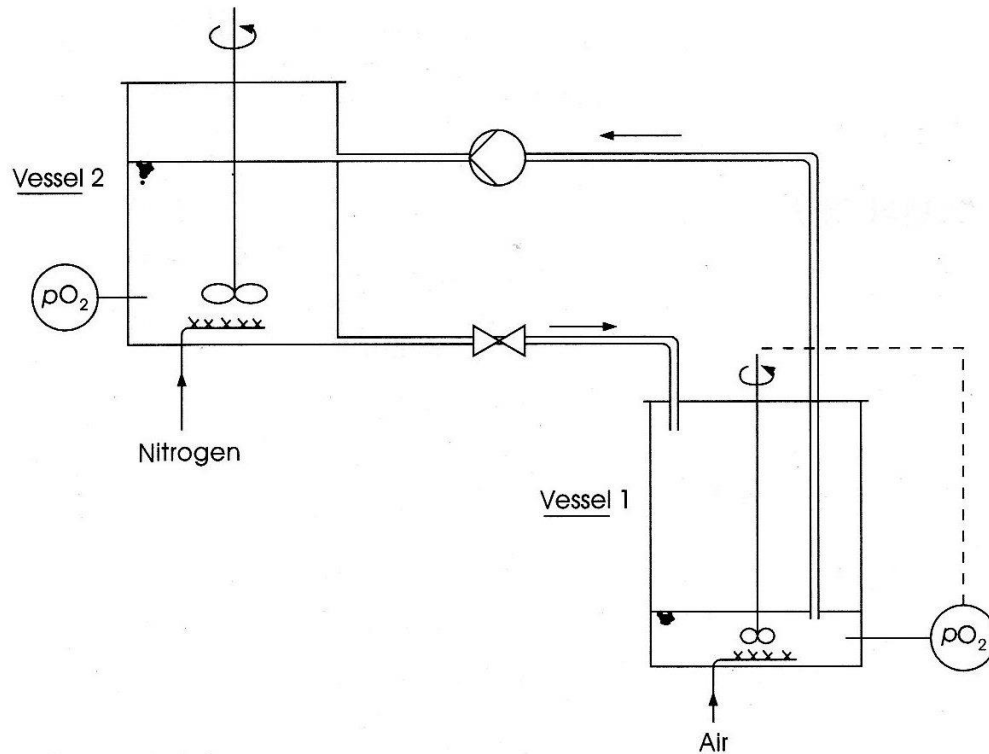
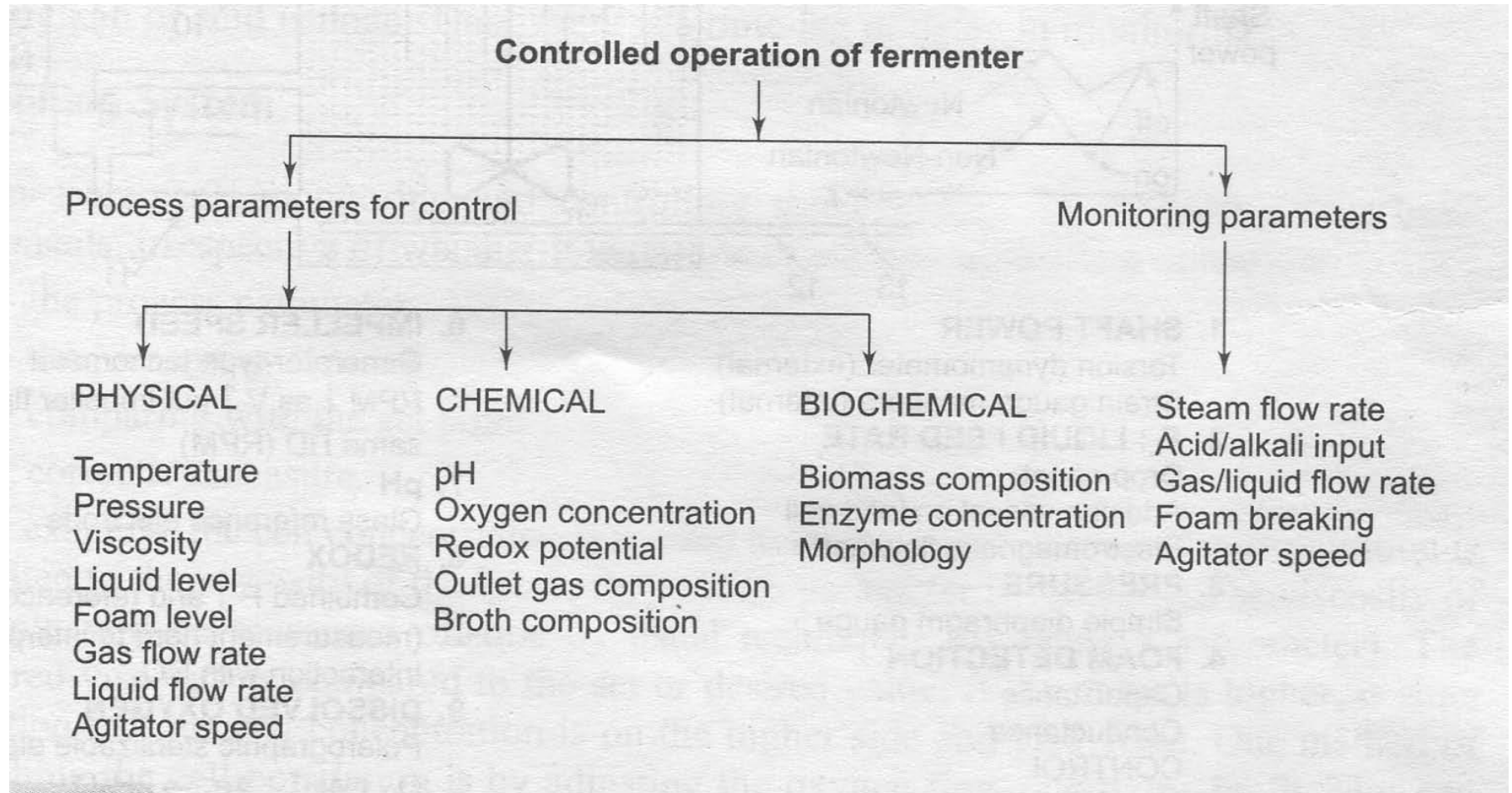


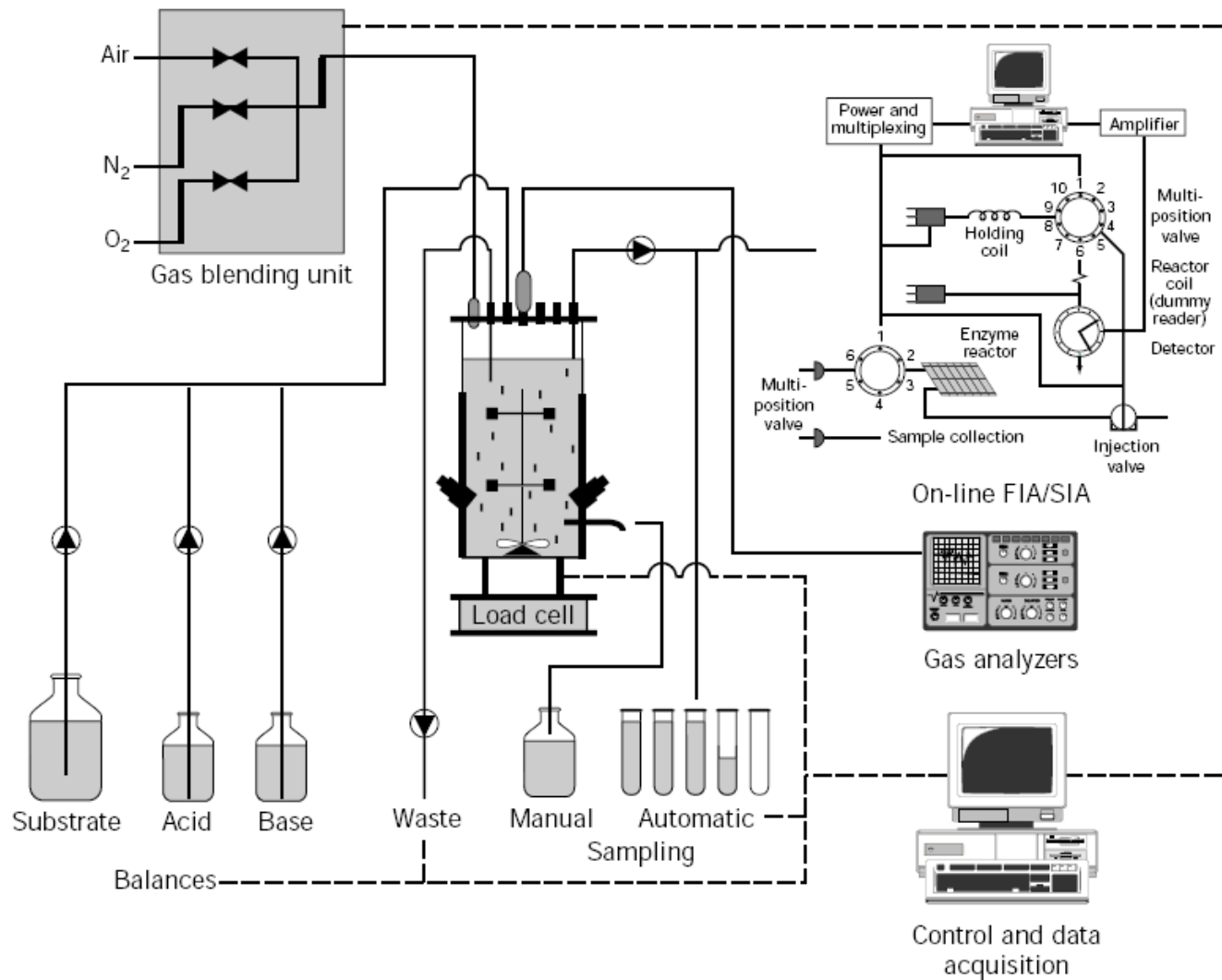
Figure 10.8 Experimental setup for scale-down experiments. (With permission, from N. W. F. Kossen, in T. K. Ghose, ed., *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, United India Press, New Delhi, 1985, pp. 365-380.)

생물반응기의 계장과 제어

- 생물반응기에서 생성물 생산을 최적화하기 위해 매개변수들을 측정하고 조절할 필요 (pH, 온도, 용존산소 등)
- 멸균상태 유지가 중요: 탐침의 증가는 방해요인 (발효기 표면 관통)
- 탐침 자체가 멸균 가능, 증기멸균(121°C)
- 매개변수들: 표 10.5
- 삽입 탐침: 위치 고려 (불균일성), 탐침의 오염(교반이 잘 되는 곳), 탐침작동의 안전성 (미생물 부착에 주의), 제거 교환 불가(2-20일), 역세척 기능
- 온라인 HPLC: 누출류 이용, 시료준비, 시료채취 시간 지연, 여과, 후속공정(칼럼 오염 방지), 분석시간, 오염 가능성, 중요 생성물 정보를 알려줌
- flow cytometry : 선택적 형광분석, 세포 내 매개변수의 분포
(예: 플라스미드 함량 분포)
- 기타 FTIR, NMR, GC 등 오프라인 분석 활용

Bioprocess Engineering I







공정유체의 멸균

1. 사멸속도론

- 멸균(sterilization): 100% 제거
- 살균(disinfection): 부분적인 제거
- 사멸: 물리적 제거, 열, 방사선, 화학물질로 세포 불활성화

– 전체 사멸확률: $P_o(t) = [1-p(t)]^{N_o}$ (10.12)

– t 시간에 생존 세포수 : $E[N(t)] = N_o p(t)$ (10.13)

– 1차 사멸모델 : $p(t) = e^{-k_d t}$ (10.16)

k_d : 비사멸속도

- 십진감소시간(D), 세포수가 10배 감소하는 데 걸리는 시간

$$0.1 = \exp(-k_d D) \rightarrow D = 2.303/k_d \quad (10.17)$$

- 생존곡선 ($\ln N(t)/N_o$) \rightarrow 그림 10.12

Bioprocess Engineering I

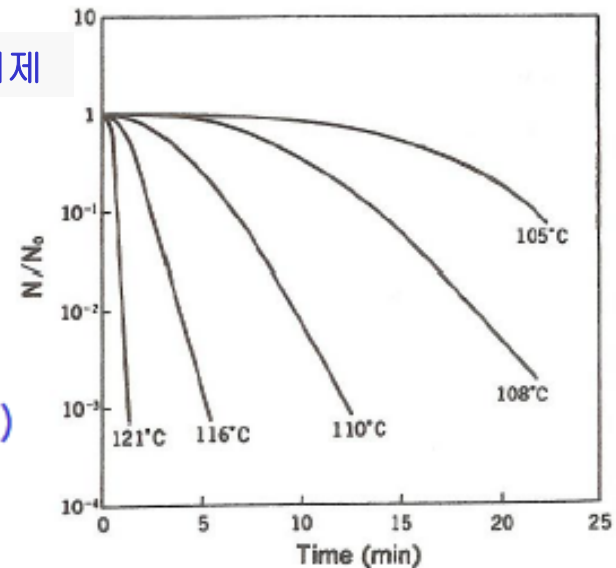
액체의 멸균

- 열: 일반적 (121°C, 20min 이상)
- 화학물질, 방사선: 열에 민감한 장치, 잔류물 유의, 에틸렌 옥사이드 기체, 70% 에탄올, 포름알데하이드 (~37%면 포르말린, CH₂O), 3% NaOCl
- 자외선(UV): 표면에만 효과적
- X선: 비용과 안전성, 대규모시스템에서 사용배제
- 액체의 경우: 열 또는 여과

- 온도 의존성: Arrhenius 식 (10.18)

$$k_d = \alpha e^{-E_{0d}/RT}$$

- k_d : 생장세포 (10¹⁰/min) > 포자 (0.5~5/min)
- 배지성분이 세포보다 온도에 덜 민감 (작은 E_{0d} 값)



Bioprocess Engineering I

액체의 멸균

- 대규모 반응기에서 멸균이 더 큰 문제: 실패확률($1-P_o(t)$) 비교 ($k_d t = 10$, $n_0 = 10^4$ 포자/L)
 $1\text{ L: } 1 - [1 - \exp(-k_d t)]^{n_0} = 0.003$, $10,000\text{ L: } 1 - [1 - \exp(-k_d t)]^{10,000 n_0} = 1$
- 더 높은 온도, 더 긴 시간: 배지 성질 변경 (갈변화 등)
- 멸균도표 (그림 10.14)
- 허용가능한 실패확률 (0.001), 초기세포수 (10^8), $k_d = 1/\text{min} \rightarrow 26\text{분 멸균}$
- ✓ 회분식 멸균: 가열전후 기간(<121°C): 포자사멸 X, 배지의 질 (비타민, 단백질, 당) 손상
- ✓ 연속멸균: 온도분포 주의, 배지 희석과 거품형성이 단점 \rightarrow 그림 10.15
- ✓ 여과멸균: < 0.2 μm , 예비여과 필요, 여과기 자체 멸균가능, 막 결함이 없어야 함

Bioprocess Engineering I

액체의 멸균

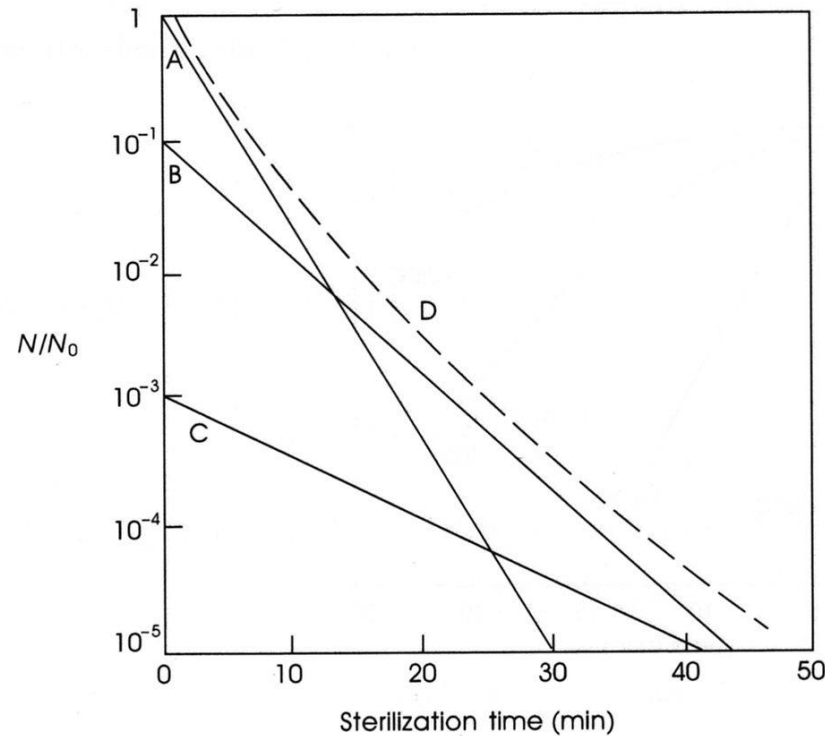
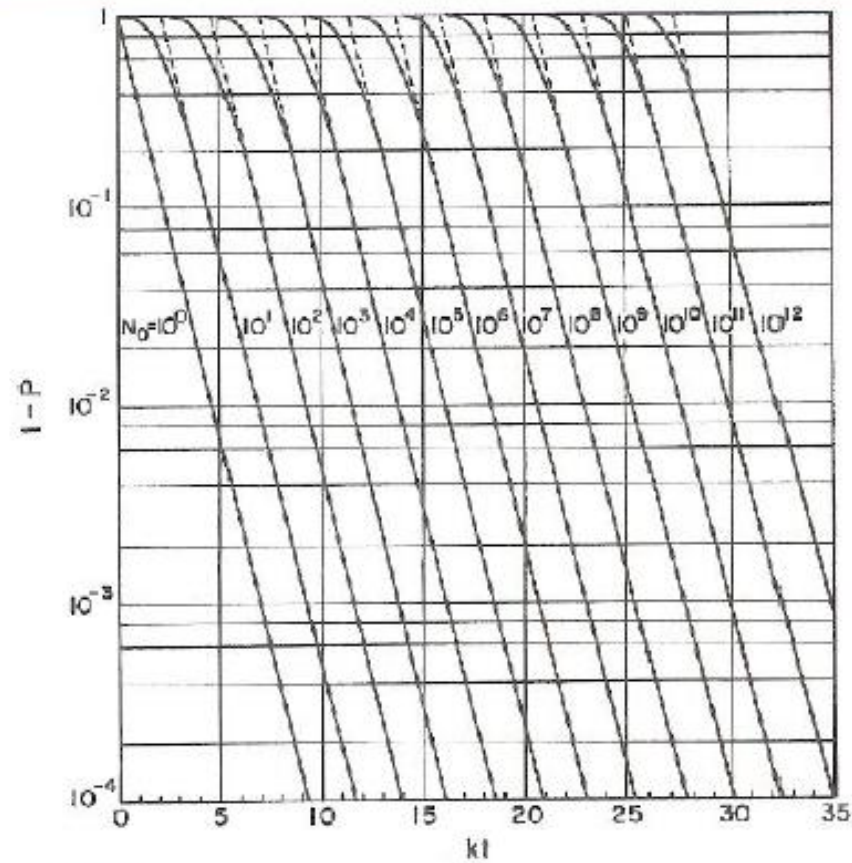


Figure 10.13 Overall survival curve (D) for a system with three distinct subpopulations (A, B, and C). Population A is normally dominant, but it is the one most sensitive to the sterilizing agent, while subpopulation C is far more resistant.

멸균도표



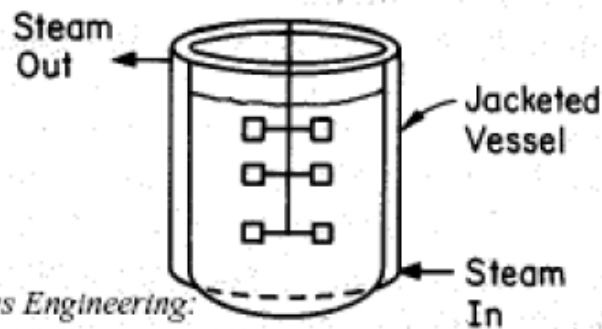
Bioprocess Engineering I

Batch vs. continuous sterilization

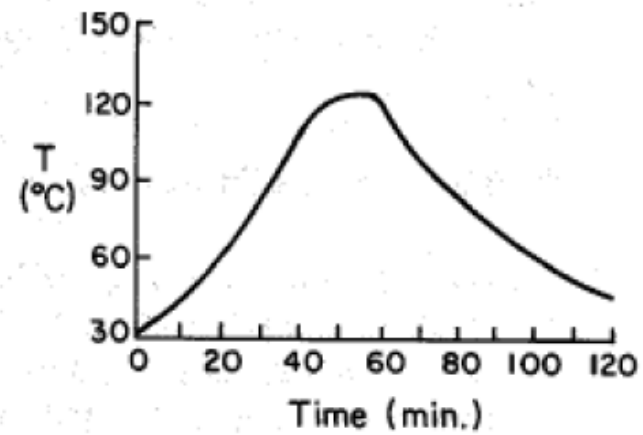
Batch

1. Longer heat-up/cool down time
2. Incomplete mixing

A) Batch Sterilization



*"Bioprocess Engineering:
Basic Concepts"
Shuler and Kargi,
Prentice Hall, 2002*

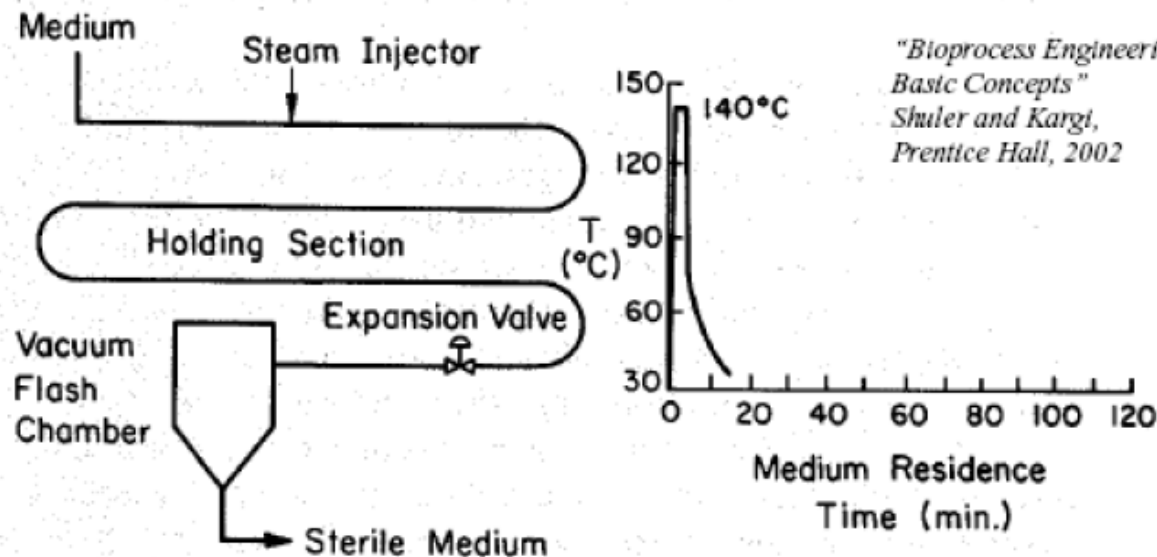


Batch vs. continuous sterilization

Continuous

1. Shorter time
2. Higher temperature

B) Continuous Sterilization



기체의 멸균

- 공기중 미생물 농도: 1~10개/L
- 압축기 고온발생($\sim 220^{\circ}\text{C}$) --> 공기여과
- 심층여과 (채널링, 젖음: 압력강하, 오염), 차단, 관성, 확산효과
- 표면여과(카트리지), sieve 효과 --> 그림 10.16
- 공기처리 비용: $\sim 25\%$ 까지, 압력강하 주의
- 장치 유효성 시험: 옥수수기름 에어로졸 시험 (FDA 승인)
- 유전자 조작 생물: 유출기체 제거

Bioprocess Engineering I