한국정밀공학회지 제 30 권 2 호 pp. 137-142 February 2013 / 137
Journal of the Korean Society for Precision Engineering Vol. 30, No. 2, pp. 137-142 http://dx.doi.org/10.7736/KSPE.2013.30.2.137
ISSN 1225-9071(Print), ISSN 2287-8769(Online)

◆ 특집 ◆ 바이오매스 대량생산을 위한 평판형 광생물반응기 개발

평판형 광생물반응기의 Dunaliella Salina 연속배양을 위한 생물공정 제어

Bioprocess Control for Continuous Culture of Dunaliella Salina in Flat Panel Photobioreactor

김광호 [1], 안동규 [2], 박종락 [3], 최강훈 [2], 김종태 [1], 김기원 [2], 정상화 [2,✉]
Gwang Ho Kim[1], Dong-Gyu Ahn[2], Jong Rak Park[3], Gang Hun Choi[2], Jong Tye Kim[1], Ki Won Kim[2], and Sang Hwa Jeong[2,✉]

1 조선대학교 바이오리파이너리연구센터 (Biorefinery Research Center, Chosun Univ.)
2 조선대학교 기계공학과 (Department of Mechanical Engineering, Chosun Univ.)
3 조선대학교 광기술공학과 (Department of Photonic Engineering, Chosun Univ.)
✉ Corresponding author: shjeong@chosun.ac.kr, Tel: +82-62-230-7178

Manuscript received: 2012.12.15 / Accepted: 2012.12.24

The indiscriminate use of the fossil fuel has caused serious environmental pollutions such as the shortage of energy and global warming. Microalgae have being emphasized as 3rd generation biomass which makes the carbon dioxide reduce effectively as well as produces the biofuel. Large scale production of microbial biomass by continuous culture is a quite challenging issue, because off-line optimization strategies of a microbial process utilizing a model-based scheme give rise to many difficult problems. In this paper, the static and simple control method which was able to be applied in time-variant growth environment and large scale of algae culture was studied. The significant disturbances in on-line measurement of cell density were reduced by Savitzky-Golay FIR smoothing filter. Dunaliella salina was cultivated continuously in a flat panel photobioreactor by the on-off control of the turbidostat process.

Key Words: Flat Panel Photobioreactor (평판형 광생물반응기), Sigmoidal Regression Model (S 자 회귀 모델), Turbidostat (터비도스탯), On-Off Control (온오프 제어), Biomass Productivity (바이오매스 생산성)

기호설명

x = biomass concentration
s = substrate concentration
Y = growth yield for substrate
$\mu(s)$ = specific growth rate depended only on substrate
P = productivity, defined as the amount of product cells per unit time
D = dilution rate, defined as the rate of the volumetric flow rate(F) over the constant culture volume(V)
A = maximal population
λ = lag time

1. 서론

화석연료 고갈과 기후변화를 극복할 수 있는 대체 에너지 및 청정에너지에 대한 관심이 고조되고 있으며, 전 세계 경기침체를 극복할 수 있는 성장동

력으로 신재생에너지가 급부상하고 있다. 3 세대 바이오매스인 미세조류는 이산화탄소 고정화 효율이 뛰어나고, 바이오디젤, 의약품 등 유용한 물질로 전환이 가능해 최대 바이오매스 생산성을 얻기 위한 많은 연구가 진행되고 있다.[1,2] 발효 또는 배양 세포 안에서 일어나는 대사조절은 매우 복잡하며, 세포 안에서 변하는 여러 가지 반응성분의 농도를 시간에 따라 측정하는 것도 어렵기 때문에 생물공정을 정확하게 조절하는 것은 불가능하다. 하지만, 미생물을 측정 가능한 환경변수나 입력변수(D)와 출력변수(x, CMPR)의 관계를 온라인 방식으로 측정하여 조작변수를 적절하게 조절하면 생물반응을 어느 정도 조절할 수 있다.[3]

Agrawal[4] 은 터비도스탯 공정에서 배지의 증류수와 영양분을 분류하여 기동(startup) 효율을 향상하고자 하였으며, PID 제어를 적용하여 영양분의 공급량을 조절하였다. 그러나, 성장 환경의 변화는 세포의 대사반응의 되먹임 조절(feedback regulation)과 자기적응(self-adaptation) 때문에 다양한 정상상태와 복잡한 시불변 특성을 갖는다. 이로 인해 PID 게인을 매번 재조정해야 한다. Hwang[5] 은 튜닝 파라미터를 적용한 디지털 제어를 통해 PID 제어보다 우수한 제어기를 제안하였다. Sauvaire[6] 는 튜닝 파라미터에 둔감하고 바이오매스 생산성 최적화가 빠르게 가능한 비선형 적응 제어 기법을 제안하였다. 하지만, 최근에 미세조류 배양 시설의 상업화가 진행되면서 간단하고 효율적인 제어 방법을 필요로 하게 되었다. 본 논문에서는 환경변화에 둔감하고 대용량・대규모 배양기에서 적용할 수 있는 온오프 제어 연속배양에 관해 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 균주 및 배지

본 연구에서는 조선대학교 김시욱 교수 연구팀으로부터 분양 받은 *Dunaliella salina* DCCBC2 를 균주로 사용하였다.[7] 배양에 사용된 배지는 Castenholz D medium 을 사용하였으며, 배지의 조성은 58.44 g NaCl, 4.844 g Tris, 0.5055 g KNO_3, 0.91576 g $MgCl_2{\cdot}6H_2O$, 0.12325 g $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, 0.0441 g $CaCl_2$, 0.0228 g K_2HPO_4, 0.00055 g $FeCl_3$, 0.00245 g EDTA, 0.000305 g H_3BO_3, 0.000198 g $MnCl_2{\cdot}4H_2O$, 0.000023 g $ZnSO_4{\cdot}5H_2O$, 0.00001 g $CuSO_4{\cdot}5H_2O$, 0.000048 g $NaMoO_4{\cdot}2H_2O$, 0.000005 g $CoCl_2{\cdot}6H_2O$, 0.000027 g $NaVO_3$, 2.1 g $NaHCO_3$ 이다.[8] 배지는 121℃에서 20 분간 멸균 및 냉각 후 사용하였다.

2.2 종균배양

각 미세조류는 배양기(incubator)에서 미세조류용 culture flask 를 이용하여 15 일을 주기로 계대배양하면서 균주를 보존하였고, 배양기의 온도는 26℃로 일정하게 유지하였다. 빛의 세기는 80~110 $\mu E/m^2/s$ 로 설정하였다.

2.3 분석 및 연속배양

연속배양을 위한 측정 및 제어 과정을 Fig. 1 에 나타내었다. 균주의 배양 환경을 제어하기 위해 탁도, pH, 조도, 온도, 통기량을 실시간 측정하였다. 균체량(cell concentration)은 분광광도계(Biochrom, LibraS22)를 이용하여 파장 680 nm 에서 광학밀도(optical density) 를 측정하였고, cell counter(Invitrogen, Countess) 를 이용하여 균체수를 측정하였다. 건조중량은 배양액 10 ml 을 채취하여 0.45 ㎛ 멤브레인 필터(membrane filter)로 여과하여 60℃에서 24 시간 건조한 후 중량을 측정하였다. 회분 배양을 통해 성장 곡선을 모델링하였고, 연속배양을 위한 제어 파라미터로 활용하였다. 온라인 측정이 가능

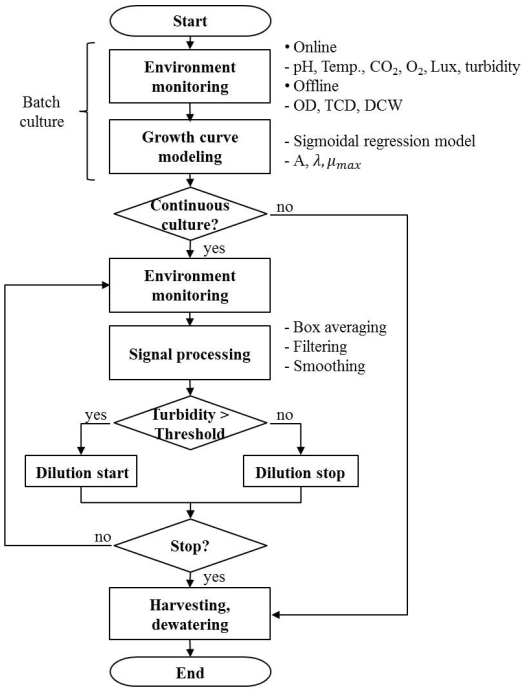

Fig. 1 Analysis process for turbidostat on-off control

한 탁도센서(Mettler Toledo, Trb 8300)를 이용하여 배지공급량을 조절함으로써 *D. salina* 를 연속배양하였다.

2.4 광생물반응기 제작

반응기는 배불림 현상을 방지할 수 있는 50L 평판형으로 제작하였으며, 통기(aeration)가 가능하도록 미세 공기 공급기(sparger)를 설치하고, 이산화탄소가 함유된 공기를 5% CO_2 0.02VVM 으로 주입하였다.[9] 배지와 이산화탄소의 균일한 혼합상태를 유지하기 위해 와류를 형성할 수 있는 정적 교반기(static mixer)를 배양기 내부에 설치하였다. 광원은 배광균일도가 70%이상인 LED 도광판(light guiding plate)을 이용하여 빛의 세기를 100 μE/m^2/s 로 공급하였다.[10,11] 배양온도는 28±2℃, 산도는 pH 8±1 을 유지하였다.

3. 성장곡선 모델링

3.1 성장 곡선

50 L 평판형 광생물반응기에서 *D. salina* 를 16 일 동안 회분 배양하고, 세포 농도와 광학밀도를 측정하여 Fig. 2 에 나타내었다. 최대 세포농도는 6 × 10^6 cells/mL 이고, 광학밀도는 1.37 이 측정되었다. 탁도법은 세포가 차지하는 체적의 양을 구하는 방법으로 탁도와 건조중량의 상관성을 이용하여 배양중인 바이오매스 농도(biomass concentration)를 판정할 수 있다. 일반적으로 높은 농도에서 흡광도가 낮아지므로 OD 0.3 이상에서 비선형 특성을 보인다. 따라서, 광학밀도와 건조중량의 관계를 Fig. 3 과 같이 3 차 방정식을 이용하여 근사화하였다.[12-14] 오차가 큰 측정데이터는 격리 처리하였다. OD 1.2 에서 1.45 g/L 의 바이오매스 농도가 측정되었다.

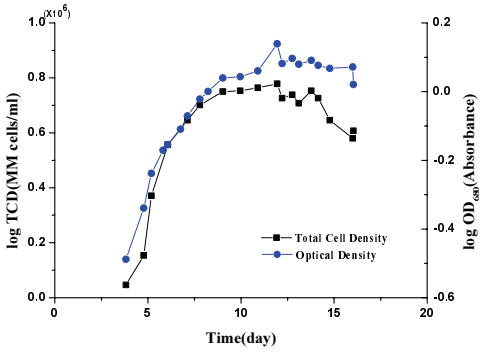

Fig. 2 Typical growth curve of D. salina

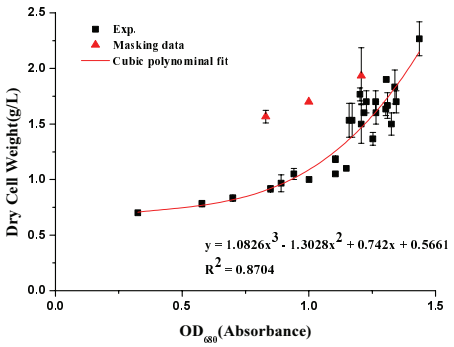

Fig. 3 Dry cell weight conversion from optical density

3.2 회귀 모델

비구조(unstructured) 비분별(unsegregated) 모델을 사용하여 비성장속도(specific growth rate)를 예측하였다. 비성장속도를 예측하기 위해 Table 1 과 같이

Table 1 Unstructured and unsegregated sigmoidal regression model for biological growth curve (Adapted from reference 14, 15, and 16)[14-16]

Model	Biological parameter
Logistic	$y = \frac{A}{1+e^{[\frac{4\mu_m}{A}(\lambda-t)+2]}}$
Gompertz	$y = Ae^{-e^{[\frac{\mu_m e(1)}{A}(\lambda-t)+1]}}$
Baranyi	$y = \mu_m A(t) - \ln(1+\frac{e^{\mu_m A(t)}-1}{e^A})$ $A(t) = t + \frac{\ln[e^{-\mu_m t}(1-e^{-\mu_m \lambda}) - e^{-\mu_m \lambda}]}{\mu_m}$

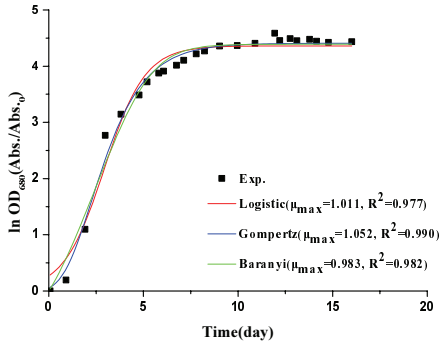

Fig. 4 Growth curve of D. salina fitted with Logistic(red), Gompertz(blue), and Baranyi(green) models

Logistic, Gompertz, Baranyi model 을 사용하여 성장 모델을 근사화하였다. 일반적으로 S 자형(sigmoidal shape) 성장 곡선은 수학적 파라미터(a, b, c, …)를 포함하고 있기 때문에 생물학적 의미를 갖는 파라미터(A, μ_m, and λ)로 수정하여 회귀분석하였다.[15-17] Fig. 4 에서와 같이 Gompertz model 결정계수(R^2)는 0.990 로 성장 곡선을 가장 잘 근사화하였다. *D. salina* 의 비성장속도(SGR_{avg})는 0.62day^{-1} 이고, 최대 비성장속도(SGR_{max})는 1.04day^{-1} 로 예측되었다.

4. 생물공정 On-Off 제어

4.1 터비도스탯 모델링

터비도스탯은 세포 농도와 용액(solution)에 첨가되는 기질(substrate)의 양에 관한 일차 미분 방정식으로 모델링할 수 있다. 회분식 성장곡선은 S 자 형태를 취한다. Monod 식을 성장식과 기질소비에 근거한 세포수율에 관한 식과 결합하여 식 (1)과 같이 예측할 수 있다. 단위시간에 대한 세포 농도의 변화량은 생육량과 유출량의 관계를 통해 구할 수 있다. 정상상태에서는 비성장속도와 희석률이 동일하다고 가정한다. 터비도스탯 블록선도를 Fig. 5 에 나타내었다. 실시간 측정이 가능한 탁도법을 이용하여 세포농도를 추정하여 공정 제어를 수행하였다.

$$\begin{aligned} \dot{x} &= \mu(s)x - Dx \\ \dot{s} &= \frac{-\mu(s)x}{Y} + D(s_0(t) - s) \\ P &= Dx \end{aligned} \tag{1}$$

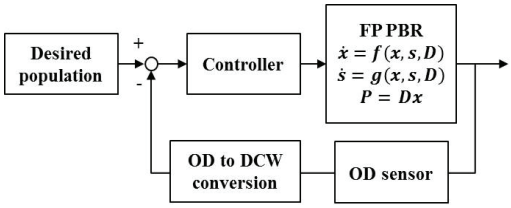

Fig. 5 Block diagram of turbidostat control system

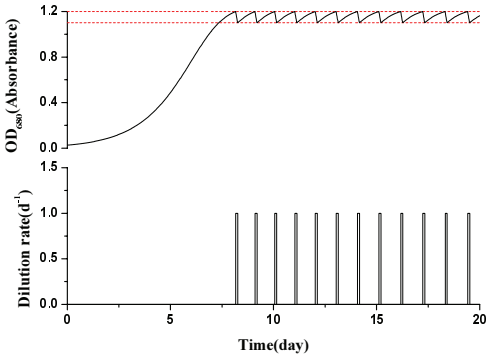

Fig. 6 On-off control simulation based on optical density when flow rate is 50 L/day in 50 L FP PBR

희석률이 최대 비성장속도보다 큰 경우에는 세출(washout) 현상이 일어나기 때문에 희석률을 1.0day^{-1} 로 설정하고 On-Off 제어기를 구현하여 Fig. 6 에 나타내었다. OD 1.15±0.05 를 유지하기 위해서는 10% 듀티사이클(duty cycle)이 예측되었다.

4.2 신호처리 알고리즘

배양액내에 세포가 비균질(nonhomogeneous)하게 존재하기 때문에 측정 신호의 변동(fluctuation)이 발생한다. 따라서, 구간 평균(box averaging)을 이용하여 신호를 샘플링하였다. 또한, Fig. 7 과 같이 측정데이터의 추세를 반영할 수 있도록 기울기 벡터를 이용하여 설정범위를 벗어난 이상신호를 제거하였고, Savitzky-Golay 신호 평활법을 사용하여 센서 노이즈를 감소하였다. Savitzky-Golay 필터(S-G FIR filter)는 측정값을 중심으로 이동 창(moving window) 내의 이전과 이후에 측정된 값(side points)을 최소자승법을 이용하여 다항식으로 보간함으로써 잡음 신호를 제거한다.[18]

4.3 On-Off 제어

OD 1.2 를 유지하며 연속배양하기 위해서 실시간 세포 농도 측정이 가능한 탁도 센서를 이용하여 제어하였다. 탁도 신호 180±5%를 제어 변수로 하였고, 조작변수는 연동펌프(peristaltic pump)의 작동 유무로 설정하였다. 펌프의 속도는 회분식 배양

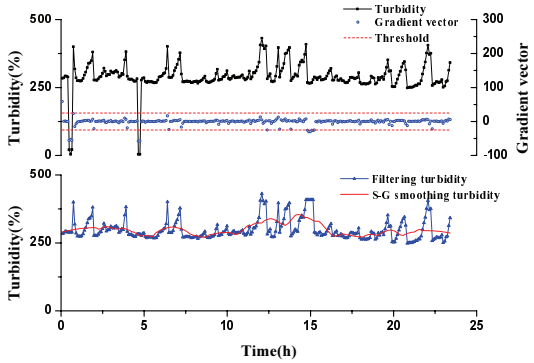

Fig. 7 Signal processing by gradient vector filtering and Savitzky-Golay smoothing methods

에서 Gompertz 성장 모델을 통해 예측된 최대 비성장속도 1.0day^{-1} 가 되도록 12.2 RPM 으로 설정하였다. 7 일 동안 터비도스탯 연속 배양하고, 측정 결과를 Fig. 8 에 나타내었다. 신호 처리를 하지 않은 경우에 비해 펌프의 작동 횟수가 감소하였고, *D. salina* 의 건조 중량은 1.3 ~ 1.7 g/L 를 유지하였다. 환경 변화에 따른 제어기 구동 특성을 확인하기 위해 Fig. 9 와 같이 온도와 pH 변화를 주었다. 환경 변화에 따라 성장속도의 차이를 보였으나 설정 범위를 유지하였다. 광학밀도는 평균 1.25 가 측정되었으며, 건조중량은 평균 1.52 g/L 가 측정되었다. Fig. 2 의 광학밀도와 건조중량의 상관식을 통해 산출한 1.57 g/L 와 유사한 결과를 보였다. 듀티 사이클은 53%로 측정되었고, 오버슈트(overshoot)는 2.9 ~ 6.5%, 언더슈트(undershoot)는 0.2 ~ 1.3%가 발생하였다.

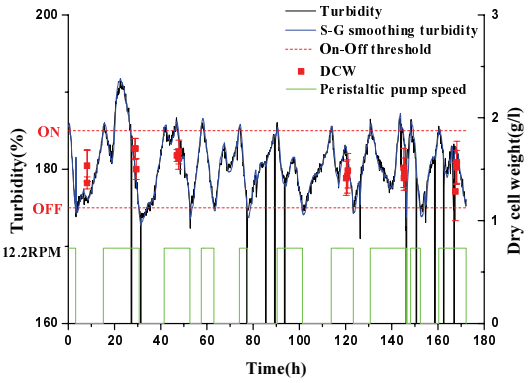

Fig. 8 On-off control for continuous turbidostat culture of D. salina

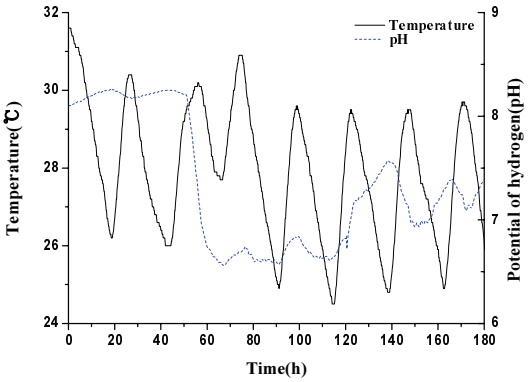

Fig. 9 Environment monitoring during on-off control for continuous turbidostat culture of D. salina

5. 결론

평판형 광생물반응기에서 *D. salina* 를 회분식 배양하고, 성장 환경을 실시간 모니터링하였다. 정상상태에서 성장 속도는 희석 속도와 같은데, 이는 공급되는 배지의 유량에 의해 결정된다. 터비도스탯의 경우, 일정한 세포 농도의 유지를 위해 희석 속도를 조절한다. 본 연구에서는 배지공급 속도를 일정하게 유지하고, 연동펌프의 온오프 제어를 통해 *D. salina* 를 연속 배양하였다.

1. 탁도 센서의 신호를 Savitzky-Golay 평활법을 이용하여 필터링함으로써 펌프의 불필요한 동작을 제거하였다.

2. 조작 변수인 희석률의 변화량(*dD*)에 비해 제어 변수인 세포 농도(DCW)의 변화량(*dx*)이 적어, 세포 농도에 비해 희석률이 상대적으로 민감하게 반응하였다.

3. 오버슈트와 언더슈트가 차이를 보여 기동(startup)에 의한 영향이 좀 더 크게 나타났으나, 펌프의 동작 듀티 사이클이 53%로 적절한 온오프 제어가 수행되었다.

4. 성장 환경 변화에도 온오프 제어를 통한 균일한 세포 농도 유지가 가능하기 때문에 상업화 규모의 광생물반응기에도 적용 가능할 것으로 판단된다.

후 기

본 연구는 2010 년도 지식경제부의 재원으로 한국에너지기술평가원(KETEP)의 지원을 받아 수행한 연구 과제입니다(No. 20103020090020).

참고문헌

1. Kim, J. T., Ahn, D. G., Park, J. R., Park, J. W., and Jeong, S. H., “Recent Trends of the Development of Photobioreactors to Cultivate Microalgae,” J. Korean Soc. Precis. Eng., Vol. 28, No. 2, pp. 125-132, 2011.
2. Ahn, D. G., Cho, C. G., Jeong, S. H., and Lee, D. G., “Design of Photobioreactor for Mass Production of Microalgae,” J. Korean Soc. Precis. Eng., Vol. 28,

No. 2, pp. 140-153, 2011.
3. Cho, M. G., “Culture Engineering,” Yu Han Publishing Co., pp. 102-133, 2004.
4. Agrawal, P., “An experimental study of a modified turbidostat,” Biotechnology Techniques, Vol. 1, No. 1, pp. 19-24, 1987.
5. Hwang, Y. B., Lee, G. B., Chang, H. N., and Lee, J. T., “Simple digital control of cell mass in turbidostat,” Biotechnology Techniques, Vol. 2, No. 1, pp. 7-10, 1988.
6. Sauvaire, P., Mellichamp, D. A., and Agrawal, P., “Nonlinear adaptive optimization of biomass productivity in continuous bioreactors,” Bioprocess Engineering, Vol. 7, pp. 101-114, 1991.
7. Kim, W. D., Park, J. M., Gim, G. H., Jeong, S. H., Kang, C. M., Kim, D. J., and Kim, S. W., “Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae,” Bioprocess Biosyst. Eng., Vol. 35, pp. 19-27, 2012.
8. Castenholz, R. W., “Thermophilic blue-green algae and the thermal environment,” Bacteriology Reviews, Vol. 33, No. 4, pp. 476-504, 1969.
9. Choi, G. H., Kim, K. W., and Jeong, S. H., “Design for Minimization of Static Deformation in 200L Flat Panel Photobioreactor,” Proc. of KSPE Autumn Conference, pp. 955-956, 2012.
10. Park, G. C., Kim, H., Kim, J. T., Park, J. W., Jeong, S. H., and Park, J. R., “Design of Light Guide Plate for Photobioreactor,” J. Korean Soc. Precis. Eng., Vol. 28, No. 2, pp. 133-139, 2011.
11. Kim, H., Park, J. R., Shin, S. S., Hwang, M. Y., Lim, H. C., Kim, G. H., Kim, J. T., and Jeong, S. H., “Study on Design and Fabrication of Illumination System for Photobioreactor by using Light Guiding Plate,” Proc. of KSPE Autumn Conference, pp. 951-952, 2012.
12. Zhao, B., Zhang, Y., Xiong, K., Zhang, Z., Hao, X., and Liu, T., “Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO_2 fixation,” Chemical Engineering Research and Design, Vol. 89, No. 9, pp. 1758-1762, 2011.
13. Nedbal, L., Trilek, M., Cerveny, J., Komarek, O., and Pakrasi, H. B., “A photobioreactor system for precision cultivation of photoautotrophic microorganisms and for high-content analysis of suspension dynamics,” Biotechnology and Bioengineering, Vol. 100, No. 5, pp. 902-910, 2008.
14. Stibal, M., “Comparison of life strategies in two green algae from snow and soil of the polar regions,” M.Sc. Thesis, Biological Sciences, University of South Bohemia, 2004.
15. Mytilinaios, I., Salih, M., Schofield, H. K., and Lambert, R. J. W., “Growth curve prediction from optical density data,” Int. J. of Food Microbiology, Vol. 154, pp. 169-176, 2012.
16. Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Bombouts, F. M., and Riet, K. V., “Modeling of the Bacterial Growth Curve,” Applied and Environmental Microbiology, Vol. 56, No. 6, pp. 1875-1881, 1990.
17. Baranyi, J. and Roberts, T. A., “Mathematics of predictive food microbiology,” Int. J. of Food Microbiology, Vol. 26, pp. 199-218, 1995.
18. Savitzky, A. and Golay, M. J. E., “Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures,” Analytical Chemistry, Vol. 36, No. 8, pp. 1627-1639, 1964.