

세포증식과 증식속도의 On-line Monitoring 을 위한 Computer-coupled Mass Spectrometer 의 응용

남수완 · 최춘순 · 김정희*

한국과학기술원 생물공학과

Application of Computer-coupled Mass Spectrometer for Continuous On-line Monitoring of Cell Growth and Growth Rate

Nam, Soo W., Choon S. Choi and Jung H. Kim*

Department of Biological Science and Engineering,
KAIST, POB150, Cheongyang, Seoul 130-650, Korea

Continuous on-line monitoring of cell concentration and growth rate in aerobic batch fermentation process was carried out by analyzing the exhaust gas composition of fermentor with a quadrupole mass spectrometer. From the mass spectrometric analyses of major gaseous components, i.e. N₂, O₂, CO₂ and H₂O, and the material balance equations for oxygen and carbon dioxide, oxygen uptake rate (OUR) and carbon dioxide evolution rate (CER) were instantaneously calculated using a computer (16-bit IBM PC-AT) interfaced to a quadrupole mass spectrometer. The calculated OUR and CER data were used for the estimation of cell concentration and growth rate of *Candida utilis* during batch culture. It was found that the cell concentration could be satisfactorily estimated from the data of OUR and CER during the culture and this method could be successfully used for the continuous monitoring of cell growth and growth rate.

대부분 발효공정에서 세포농도와 증식속도는 공정 제어 및 최적화 등에 이용되는 가장 기초적인 상태 변수이다. 따라서 이들 변수를 on-line 측정하기 위한 간접적 방법의 개발에 많은 노력이 기울어져 왔다(1-4).

그 중에서 발효 배기가스의 분석을 통해 산소 소비속도 또는 이산화탄소 발생속도를 계산하여 세포 증식을 on-line 으로 측정하는 방법이 많이 보고되었다(5-7). 발효 배기가스 중 이산화탄소는 Infrared CO₂ analyzer, 산소는 paramagnetic O₂ analyzer 를 주로 사용하여 분석하였으나 이들 분석기들은 기계적 오차가 크고 응답시간이 느려서 산소나 이산화탄소 분석치의 정확성이 떨어진다고 알려졌다(8,9). 따라서 이러한 문제점들을 극복하여 정확한 발효 배

기가스의 분석을 하나의 분석기로 할 수 있고 오차가 적을 뿐 아니라 응답시간도 빠른 Mass spectrometer (MS)를 발효공정에 이용할려는 연구가 80년대 초부터 활발히 진행 중에 있다(9-13). 그러나, 이들은 MS를 이용하여 발효 배기가스와 발효액 중 휘발성분의 on-line 분석에 응용된 것이 대부분이다. 따라서 본 연구에서는 MS를 이용한 발효 배기가스의 정확한 분석을 통해 산소 소비속도와 이산화탄소 발생속도를 on-line 으로 산출하고 이들로부터 세포농도와 증식속도를 on-line 으로 계산할 수 있는 방법과 그 결과에 대하여 기술하고자 한다.

세포농도와 증식속도의 On-line 추정법 :
이론적 배경 및 전개

Key words: Quadrupole mass spectrometer, on-line monitoring, oxygen uptake rate, carbon dioxide evolution rate, indirect estimation of cell concentration.

*Corresponding author

산소 소비속도와 이산화탄소 발생속도

발효조의 입·출구 가스의 분압을 측정하면 다음 식들에 의하여 산소 소비속도(Oxygen Uptake Rate; OUR)와 이산화탄소 발생속도(Carbon dioxide Evolution Rate; CER)를 계산할 수 있다(14).

$$OUR = \frac{F_N}{V} \left(\frac{P_{O_2, in}}{P_i - P_{O_2, in} - P_{w, in} - P_{C, in}} - \frac{P_{O_2, out}}{P_i - P_{O_2, out} - P_{w, out} - P_{C, out}} \right) \quad (1)$$

$$CER = \frac{F_N}{V} \left(\frac{P_{C, out}}{P_i - P_{C, out} - P_{w, out} - P_{O_2, out}} - \frac{P_{C, in}}{P_i - P_{C, in} - P_{w, in} - P_{O_2, in}} \right) \quad (2)$$

위의 식에서 F_N 은 inert gas인 질소의 유속, V 는 배양액 부피, P_i 는 발효조내의 압력이다. 그리고, $P_{O_2, in}$, $P_{w, in}$, $P_{C, in}$ 은 발효조로 들어가는 공기 중 산소, 수증기, 이산화탄소의 분압이며, $P_{O_2, out}$, $P_{w, out}$, $P_{C, out}$ 는 발효 배기가스 중 산소, 수증기, 이산화탄소의 분압이다. MS를 이용하여 공기와 배기가스의 질소, 산소, 수증기, 이산화탄소의 분압을 on-line 측정하고 RS-232C interface card로 연결된 16-bit IBM PC-AT에서 OUR과 CER을 식 (1)과 (2)에 의해 계산하게 된다.

세포농도

발효 중 산소와 이산화탄소에 대한 물질 수지식은 Luedeking and Piret Model 식에 의하여 다음과 같이 표시할 수 있다(15).

$$r(t) = k_1 \cdot X(t) + k_2 \cdot \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

산소의 경우 $r(t)$ 는 OUR, k_1 은 maintenance를 위하여 소비되는 산소의 소비속도, k_2 는 산소에 대한 세포의 증식수율의 역수($=1/Y_{X/O_2}$)이다. 그리고, 이산화탄소의 경우 $r(t)$ 는 CER, k_1 은 세포의 maintenance 동안에 발생하는 이산화탄소 발생속도이고 k_2 는 단위세포당 발생하는 이산화탄소 양($=Y_{CO_2/X}$)이다.

1차 선형 미분방정식인 식 (3)을 $t=0$ 때 $X=X_0$ 라는 초기 조건에서 X 에 대해서 풀면 다음 식으로 표시할 수 있다.

$$X(t) = \frac{1}{k_2} \cdot \exp\left(-\frac{k_1}{k_2} \cdot t\right) \left\{ \int_0^t \exp\left(\frac{k_1}{k_2} \cdot t\right) \cdot r(t) dt + k_2 \cdot X_0 \right\} \quad (4)$$

식 (4)에서 $r(t)$ 는 MS에 의해 측정된 가스조성으로부터 식 (1) 또는 (2)를 이용하여 계산되어 5분 간격으로 입력된다. 식 (4)를 Trapezoidal rule에 의해 적분하면 세포농도를 계산할 수 있다.

이 때, 상수 k_1 과 k_2 는 식 (3)으로부터 유도된 다음 식에 의해 먼저 결정한다.

$$\frac{r(t)}{X(t)} = k_1 + k_2 \cdot \mu(t) \quad (5)$$

식 (5)에서 $r(t)/X(t)$ 와 $\mu(t)$ 를 plot하여 최소 자승법에 의해 k_1 과 k_2 를 구한다.

증식속도와 비증식속도

식 (3)을 다음과 같이 정리하면 증식속도(dX/dt)를 구할 수 있다.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{1}{k_1} \cdot r(t) - \frac{k_1}{k_2} \cdot X(t) \quad (6)$$

식 (6)에서 $X(t)$ 는 식 (4)에 의해서, $r(t)$ 는 식 (1) 또는 식 (2)에서 구한 on-line data이다.

비증식속도(μ)는 식 (6)의 양변을 $X(t)$ 로 나누어서 얻은 다음 식에 의해 구한다.

$$\frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X(t)} = \mu(t) = \frac{r(t)}{k_1 \cdot X(t)} - \frac{k_1}{k_2} \quad (7)$$

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 *Candida utilis* ILM C45 로써 KCTC로부터 분양받아 사용하였다.

Inoculum 배양배지는 YM 배지로써 증류수 1 l 당 조성은 다음과 같다. Yeast extract 3g, Malt extract 3g, Peptone 5g, Glucose 10g.

회분 배양에서는 Glucose 50g, Yeast extract 7.5g, Peptone 7.5g, KH_2PO_4 1.5g, KCl 1.15g, NH_4Cl 1.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.65g, $MnSO_4 \cdot 6H_2O$ 0.03g, Zn $(NO_3)_2$ 0.1g을 증류수 1 liter에 녹여 사용하였다.

배양방법

YM agar plate 상의 colony를 YM 배지로 옮겨 shaker incubator에서 30°C, 250 rpm으로 8시간 배양한 후 2l-jar fermentor(New Brunswick Scientific Co.)에 접종하여 회분 배양하였다. 배양액 부피는 1 l 이고 온도는 30°C, pH는 6.0으로 조절하였다. 용존산소(DO)는 공기 포화수준의 20% 이상되도록 교반속도를 조절하여 유지시켰다.

Mass spectrometer

본 실험에 사용한 Mass spectrometer(MS)는

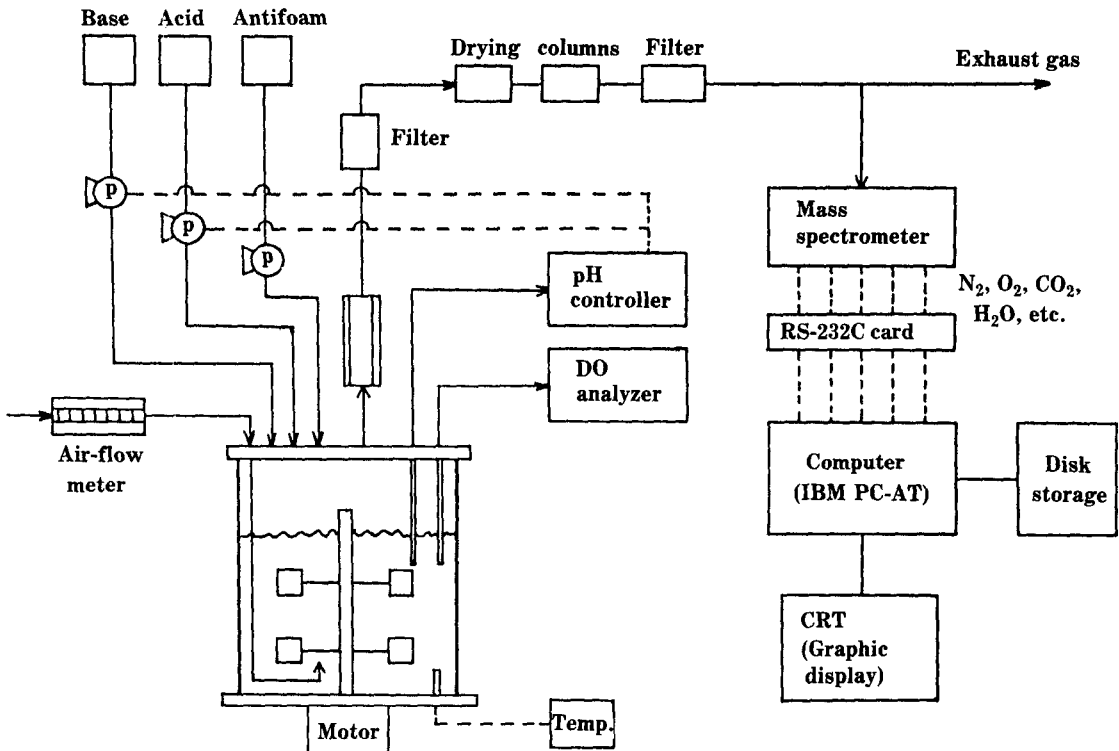


Fig. 1. Schematic diagram of mass spectrometer-computer coupled fermentation system.

Quadrupole mass spectrometer(VG Quadrupoles Ltd., UK)이며 주요 사양은 다음과 같다. Mass range 1-200 AMU ; Electron impact ionization ; Quadrupole mass filter(6.3mm diameter, 50mm long rods) ; Capillary inlet system ; Detectable partial pressure 10^{-4} - 5×10^{-11} torr ; Thoriated Iridium filament.

MS에 의해 측정된 값은 interface를 통해 개인용 컴퓨터(IBM PC)로 전송되며 전송속도(Baud rate)는 1200으로 하였다. 요 가스성분의 질량대 전하비(m/z)는 질소는 28, 산소는 32, 이산화탄소는 44, 수증기는 18로 선택하여 분압 또는 백분율(%)로 측정하였다. 발효조와 MS 및 computer와의 장치 모식도는 Fig.1과 같다.

본 실험에 사용된 data acquisition과 graphic display 및 세포농도, 증식속도의 계산은 BASIC 언어를 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

발효 배기가스의 분석

*Candida utilis*의 회분배양에서 대수증식기 중기와

말기에서의 배기가스를 MS로 분석하였다. 질량대 전하비(m/z)가 28인 질소를 기준으로 하여 각각의 가스성분에 대하여 그 상대적인 분석치를 나타내면 Fig.2에서와 같다. 주로 검출되는 ion peak 들은 m/z 값이 2, 15, 18, 32, 44 그리고 45에서 나타났고 56 (n-butanol), 58 (acetone), 60 (acetic acid), 73 (butyric acid) 등은 검출되지 않았다. 그리고, m/z 값이 2, 15 및 45는 거의 변화가 없거나 매우 낮은 intensity를 보였다.

배기가스내 산소 (m/z=32)와 이산화탄소 (m/z=44)양을 5분마다 on-line monitoring 한 결과는 Fig.3에서와 같다. 산소는 배양초기 20.5%에서 대수 증식기 말기 때 14.6%까지 감소하였고 이산화탄소는 최고 5.3%까지 발생되었다. 정지기에 들어가면서 산소소비와 이산화탄소 발생은 감소하여 배양초기와 거의 같은 수준으로 유지되었다.

산소 소비속도와 이산화탄소 발생속도

*Candida utilis*의 회분배양 도중 5분마다 분석되는 배기가스내 질소, 산소, 이산화탄소 및 수증기농도로부터 식 (1)과 식 (2)를 이용하여 산소 소비속도(OUR)과 이산화탄소 발생속도(CER)을 계산하였다

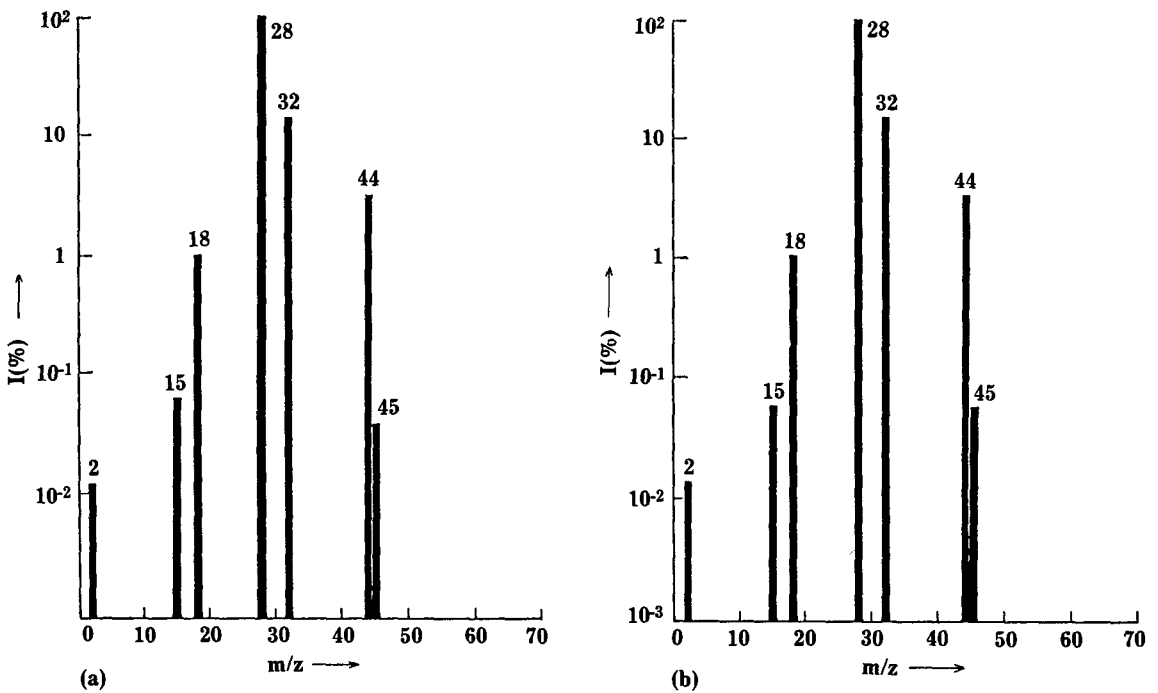


Fig. 2. Peak spectra from batch culture of *Candida utilis*. (a) at mid-log phase, (b) at late-log phase.

(Fig.4), OUR 과 CER 은 배양시간 13시간에서 최대 160 mmol O₂/l · hr (5.35 mmol O₂/g-cell · hr) 와 140 mmol CO₂/l · hr (4.69 mmol CO₂/g-cell · hr) 에 각각 도달하였다. 실제로 세포의 대사과정 중 발생하는 이산화탄소는 배기가스 외에 배양액내 bicarbonate(HCO₃⁻) 형태로 용존되어 있기 때문에 (13) 정확한 이산화탄소 양 및 CER 을 측정하기 위해서는 이

의 보정이 필요할 것으로 생각된다.

세포농도의 추정

OUR 및 CER data로부터 식 (4)를 이용하여 Trapezoidal rule 에 의해 세포농도를 계산하였다. 이때 상수들 k₁ 과 k₂ 는 회분배양의 결과로부터 식 (5) 을 이용하여 먼저 구하였다. 산소의 경우 k₁ 은 0.90 mmol O₂/g-cell · hr 이었고 k₂ 는 21.2 mmol O₂/g-cell

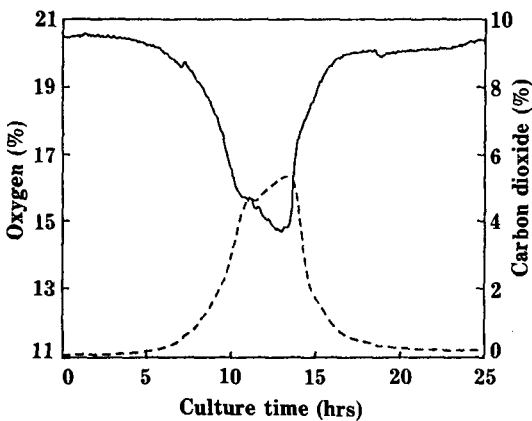


Fig. 3. Oxygen and carbon dioxide contents in exhaust gas during the culture. (—) oxygen, (---) carbon dioxide.

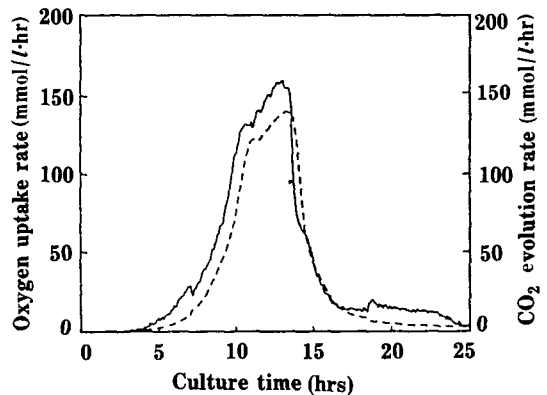


Fig. 4. Oxygen uptake rate (OUR) and carbon dioxide evolution rate (CER) during the culture. (—) OUR, (---) CER.

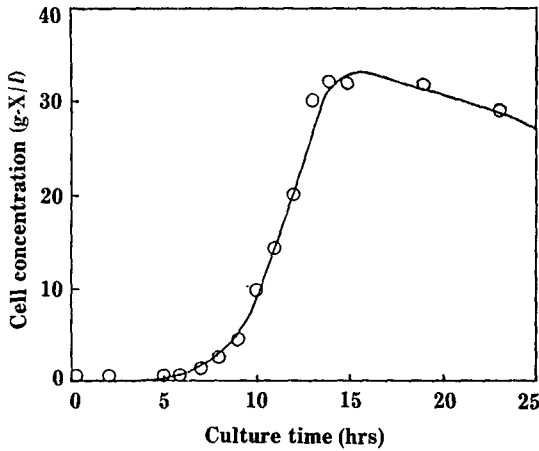


Fig. 5. Indirect estimation of cell concentration from oxygen uptake rate data.
(o) experimental values, (-) estimated values

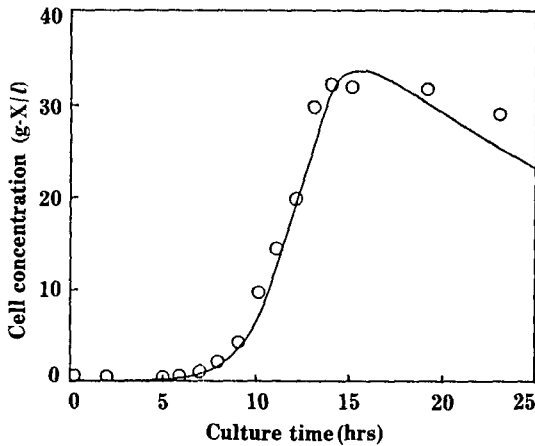


Fig. 6. Indirect estimation of cell concentration from carbon dioxide evolution rate data.
(o) experimental values, (-) estimated values

이었다. 이산화탄소의 경우 k_1 은 $0.93 \text{ mmol CO}_2/\text{g-cell} \cdot \text{hr}$ 이었고 k_2 는 $17.09 \text{ mmol CO}_2/\text{g-cell}$ 이었다. 이들 상수값과 OUR 및 CER data로부터 세포 농도를 추정된 결과를 실험치와 함께 Fig.5와 6에 각각 나타내었다. 두 증식곡선을 보면 모두 실험치와 잘 일치함을 알 수 있었다.

단지, CER을 이용한 경우는 정지기 이후에 다소 오차가 발생하였다. 그 이유는 이산화탄소의 발생은 여러 대사경로에서 일어나고(5) 또한 배양액내 용존되어 있는 이산화탄소의 양도 변할 수 있기 때문인

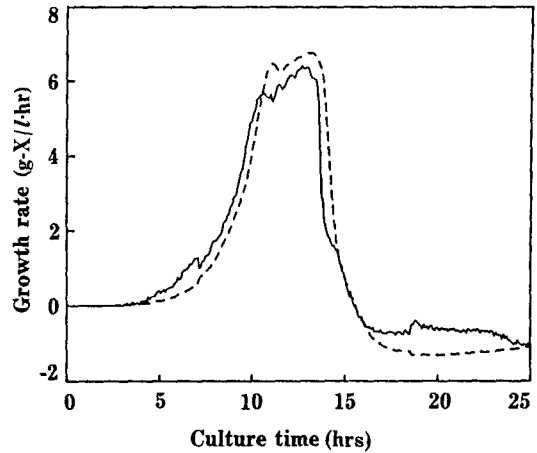


Fig. 7. Growth rates estimated from oxygen uptake rate (-) and carbon dioxide evolution rate (--).

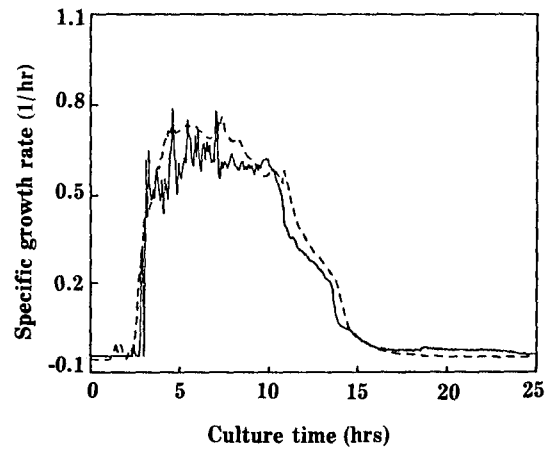


Fig. 8. Specific growth rates estimated from oxygen uptake rate (-) and carbon dioxide evolution rate (--).

것으로 생각된다.

증식속도 및 비증식속도

OUR과 CER의 on-line 계산치 및 식 (4)에 의해 구한 세포농도의 측정치로부터 식 (6)을 이용하여 세포의 증식속도(dX/dt)를 계산하였다(Fig.7). 처음 유도기 때는 증식이 거의 일어나지 않다가 대수기 때는 급격히 증가하여 배양시간 13시간 때 최대 증식속도를 보였다. 그 후 정지기에 접어들면서 증식속도는 감소하기 시작하여 15시간 이후부터는 negative growth rate를 보였다. 전체 배양기간을 볼 때 OUR이나 CER로 계산한 증식속도는 비슷한 추세를 보이며 전형적인 증식곡선 형태를 보여주고

있다.

세포의 비증식속도(μ)는 식 (7)을 이용하여 계산하였으며 그 결과를 Fig.8에 나타내었다. 배양 후 약 3시간 후부터 10시간까지 최대 비증식속도(μ_{max})를 보이다가 그 후 점차 감소하여 15시간 후부터 증식속도(dX/dt)에서와 마찬가지로 negative growth rate를 보이고 있다. OUR로부터 계산한 μ_{max} 값은 0.65 hr^{-1} 이었고 CER로부터 계산한 μ_{max} 값은 0.72 hr^{-1} 였다. 이 값은 실험치로부터 구한 μ_{max} 값인 0.72 hr^{-1} 과 잘 일치함을 알 수 있었다. 전체 배양기간으로 보면 뚜렷하게 대수기를 확인할 수 있으며 시간의 변화에 따른 세포의 비증식속도를 빠르게 on-line으로 추정할 수 있음이 입증되었다.

이상과 같이 MS를 이용한 발효 배기가스의 on-line 분석을 통해 세포농도, 증식속도 및 비증식속도를 순간적으로 on-line 추정하는 방법을 확립하였으며 이는 발효공정의 제어 및 최적화에 유효하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

Quadrupole mass spectrometer를 이용한 발효 배기가스의 분석을 통해 세포의 증식을 on-line monitoring하고자 model 균주로 *Candida utilis*에 대해 연구하였다. Quadrupole mass spectrometer와 interface된 16-bit 개인용 컴퓨터(IBM PC-AT)에서 산소 소비속도(OUR)와 이산화탄소 발생속도(CER)를 on-line 계산할 수 있었고 계속해서 이들 계산치로부터 세포농도와 증식속도 및 비증식속도를 계산하였다. 계산된 값들은 실험적으로 측정된 세포농도와 비증식속도와 잘 일치함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Eriksson, R. and T. Holme: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No 4, 581 (1973).
2. Ohashi, M., et al.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No 9, 103 (1978).
3. Zabriskie, D.W. and A.E. Humphrey: *Appl. Environm. Microbiol.*, **35**, 337 (1978).
4. Luong, J.H.T. and D.J. Carrier: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 65 (1986).
5. Zabriskie, D.W. and A.E. Humphrey: *AIChE. J.*, **24**, 138 (1978).
6. Erickson, L.E.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No 9, 49 (1978).
7. San, K. Y. and G. Stephanopoulos: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1189 (1984).
8. Wang, H.Y., C.L. Cooney and D.I.C. Wang: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No 9, 13 (1978).
9. Buckland, B.C. and H. Fastert: *Computer Application in Fermentation Technology.*, Society of Chemical Industry, London, p119 (1982).
10. Pungor Jr., E., E. Schaefer, J.C. Weaver and C.L. Cooney: *Adv. Biotechnol.*, **1**, 393 (1981)
11. Buckland, B.C., T. Brix, H. Fastert, K. Gbewonyo, G. Hunt and D. Jain: *Bio/Technology*, **3**, 984 (1985).
12. Coppella, S.J. and P. Dhurjati: *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 679 (1987).
13. Heinzle, E.: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **35**, 1 (1987).
14. Cooney, C.L., H.Y. Wang and D.I.C. Wang: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 55 (1977).
15. Luedeking, R. and E.L. Piret: *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, **1**, 393 (1959).

(Received April 15, 1989)