

## 발효배지의 완충용량의 온라인 측정 및 유기산 생산 추정

†허 원·정 윤 군  
강원대학교 공과대학 환경·생물공학부  
(접수 : 1998. 4. 24., 게재승인 : 1998. 6. 18.)

### On-line Measurement of Buffer Capacity of a Fermentation medium and Estimation of Organic Acid Production

Won Hur† and Yoon Keun Jung

Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwon 200-701, Korea  
(Received : 1998. 4. 24., Accepted : 1998. 6. 18.)

A fermentation system was supplemented with a device for the measurement of the durations of alkali pump feeding for automatic pH control and an A/D convertor for precise monitoring of pH value by computer. A software program was developed to measure buffer capacities from the pH signal and the pH control signal during fermentation. By measuring the buffer capacity on-line, levels of acetic acid were estimated by a software sensor using pH signal in a fermentation process of *E. coli* growing in a minimal medium. The measured values of acetic acid showed good correlation to those of estimated by the software sensor. Lactic acid production was also successfully estimated by the values of buffer capacities measured on-line.

Key Words : on-line estimation, on-line monitoring, software sensor, pH control, buffer capacity

### 서 론

미생물 배양 공정 및 생물학적인 공정의 효율적인 운전과 제어를 수행하기 위해서는 그 공정의 주요 변수를 정확하게 측정하는 것이 필수적이다. 온도, 유량, pH 및 교반 속도 등과 같은 장치적 혹은 물리화학적인 공정 변수는 비교적 용이하게 측정할 수 있으며 신뢰할 수 있다(1). 그러나 중요한 발효 및 생물공정의 변수라 할 수 있는 균체 및 기질 그리고 생성물의 농도를 온라인으로 측정할 수 있는 방법은 현재까지도 지속적으로 연구 개발되고 있으나 많이 사용되고 않고 있다. 균체의 양은 광 파이버를 이용하여 탁도를 측정하거나 형광 프로브를 이용하여 배지내의 NADH 및 FAD의 농도를 온라인으로 측정하는 방법이 개발되어 보고되었다(2,3). 가장 흔히 사용되는 기질인 포도당은 바이오센서를 이용하여 온라인으로 측정가능하고 같은 방법으로 젖산의 농도도 젖산 바이오센서를 이용하여 온라인으로 측정할 수 있다(4,5). 발효조에서 배지내의 ATP의 농도를 온라인으로 측정하여 균체의 에너지 상태를 온라인으로 추정할 수 있는 시스템의 개발도 보고되었다(6). 그러나 추가 측정장치를 사용하는 경우에는 공정의 복잡성이 증가하여

운전의 어려움이 있으며 추가적으로 비용이 발생하므로 적용 범위가 제한적이다.

이에 대한 대안으로서 기존의 공정의 장치에서 발생하는 신호로부터 간접적으로 공정변수를 추정하는 방법도 사용될 수 있다. 발효공정의 운전시 발생하는 산소소비속도, 탄산가스의 생성속도 및 일칼리의 소비속도등을 이용하여 공정의 상태를 추정하는 방법이 보고되었다(7,8). 소비된 알칼리의 양으로부터 생산된 젖산의 농도 및 균체의 생산을 수학적 모델을 결정하고 소비된 알칼리의 양을 온라인으로 측정하여 생산된 젖산의 농도를 추정할 수 있는 소프트웨어 센서의 개발을 보고되었다(9). 이와 같이 일차적 공정 변수로부터 균체의 양이나 대사활동도 및 기질의 소비 속도 등과 같은 새로운 변수를 추정할 수 있는 소프트웨어 센서는 기존의 공정 모니터링 시스템에 주로 소프트웨어의 형태로 쉽게 추가될 수 있다. 그리고 분석장치의 추가 설치 및 공정 자체를 변경할 필요가 없으므로 기존의 공정에 쉽게 적용 가능하다. 그러나 온라인으로 측정 가능한 1차적 공정변수가 제한되어 새로운 공정 변수의 개발이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 발효 및 생물반응기의 운전에서 필수적인 자동 pH 조절 장치의 제어신호로부터 새로운 공정변수가 될 수 있는 배지의 완충용량을 측정하는 방법을 개발하고 이를 이용하여 배지내의 유기산 및 혹은 배양 pH 영역에서 완충용량을 가지는 주 생물물질의 농도를 추정하는 발효공정 모니터링 시스템의 원형을 개발 하고자 한다. 특히 발효배지의 완충용량의 온라인 측정은 전세계적으로 보고된 바 없다. 그리고 완충용량의 변화는 배지의 성분중 배양 pH에서 해리되어 완충용량을 나타내

† Corresponding Author : Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwon 200-701, Korea.  
Tel : 0361-250-6276, Fax : 0361-243-6350  
e-mail : wonhur@cc.kangwon.ac.kr

는 성분들의 변화를 반영할 수 있으므로 배지내의 성분의 변화를 관찰할 수 있는 공정변수가 될 수 있다. 따라서 유기산 및 아미노산과 같이 배지의 다른 성분과 비교하여 고 농도로 생산되는 발효 생성물의 농도를 추정하는데 사용될 수 있다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 보존

본 연구에 사용한 균주는 *Escherichia coli* K12(ATCC10798)와 *Lactobacillus delbrueckii*(ATCC 9649)로써 Coli Genetic Stock Center(CGSC, Yale USA)와 종균협회(한국, 연세대)에서 각각 분양 받아 사용하였다. *E.coli* K12는 agar plate에서 37°C로 24 시간 배양한 후, 4°C에서 보존하였으며, 주기적으로 재배양하여 보관하였다. *L.delbrueckii* ATCC9649는 한천배지에서 40°C에서 48 시간 배양한 후 4°C에서 보존하였으며, 주기적으로 재배양하여 보관하였다.

### 배지 조성 및 조제

본 실험에서 사용한 배지는 *E. coli*의 경우 20 g/l glucose, 5 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 최소배지와 0.4 g/l MgSO<sub>4</sub>와 40 g/l glucose를 포함한 LB 배지를 사용하였으며, *L.delbrueckii*는 100 g/l glucose, 10 g/l yeast extract, 10 g/l peptone, 1 g/l의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 사용하였으며, 모든 배지는 121°C에서 15분간 가압 살균하여 사용하였다.

### 배양 방법

집중균의 전배양의 경우 *E. coli*는 한천배지에서 보존하였던 균주를 배지 100 ml를 함유한 250 ml 삼각 flask에 백금으로 1회 접종하고, 37°C에서 12시간 진탕 배양하여 종균 배양액으로 사용하였다. 본 배양은 배지 3 L를 포함한 5 L jar fermenter에 종균배양액을 약 0.5 %(v/v)접종한 후, 37°C에서 200 rpm으로 12 시간 배양하면서 시료를 채취하여 실험하였다.

*L. delbrueckii*는 뚜껑이 밀폐된 125 ml 병에 100 ml의 배양액을 첨가하여 48 시간동안 정지 배양한 후 종균배양액으로 사용하였다. 본 배양은 배지 3 L를 포함한 5 L jar fermenter에 종균배양액을 약 0.5 %(v/v)접종한 후, 질소를 불어넣어 무산소 상태를 유지하였다. 이후 발효조의 온도도 40°C를 유지하고 시료를 채취하면서 90시간 이상 배양하였다.

### 실험 장치

본 배양에는 5 L용량의 실험용 발효조(BK5L, 복성엔지니어링)를 사용하였다. 여기에 pH신호 및 pH제어신호를 온라인 모니터링하기 위한 장치를 추가하였다. 발효조의 pH자동제어장치로부터 4-20 mA의 전류신호로 변환되어 발생하는 pH신호를 250 Ω의 정밀저항을 이용하여 1-5V의 전압신호로 변환한 후 16bit A/D convertor(Adam 4017, Adventech USA)의 입력에 연결하였다. pH자동제어장치가 알칼리 펌프를 구동하는 전기신호에 릴레이를 병렬로 연결하여 릴레이 점접동작을 I/O module(Adam 4050, Adventech USA)에 연결하여 펄스형태로 발생하는 제어신호를 온라인으로 측정하였다. A/D convertor와 I/O Module은 잡음에 강한 RS485방식의 통신 프로토콜을 사용하여 컴퓨터에 연결하였다(Figure 1).

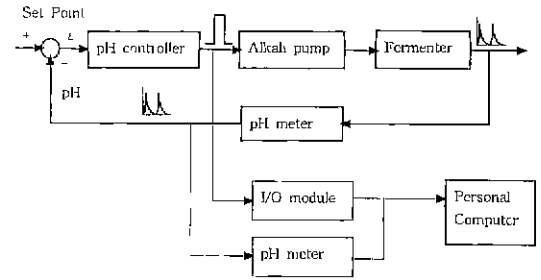


Figure 1. Diagram of on-line buffer capacity measurement.

### 분석 방법

*E. coli* 배양시 생성된 유기산인 초산의 정량은 가스크로마토그래프를 사용하였다. 배양시 채취하여 원심분리후 배양여액을 냉동 보관하였다. 이 시료로부터 가스크로마토그래프(Varian star 3400cx)를 사용하여 초산을 정량하였다. 칼럼은 Gaschrom 220을 사용하였으며, 칼럼은 수 시간동안 220°C로 안정화시킨 후 사용하였다. 초산의 가스크로마토그래프 조건은 Injector 200°C, Column 175°C, Detector 250°C로 유지한 상태에서 FID 검출기로 측정하였다. 배양액의 암모니아의 농도는 Glutamate dehydrogenase(GLDH)에 의하여 340nm에서 흡광도를 나타내던 NADPH가 NADP로 환원되어 흡광도가 감소하는 효소반응을 이용하는 Ammonia kit(Sigma Chemical Co., 171-A)을 사용하여 측정하였다.

*L. delbrueckii* 배양으로 인하여 생산된 젖산의 정량 역시 가스크로마토그래프를 사용하였다. 시료를 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>과 에탄올을 1 : 1 : 2의 부피비율로 혼합한 후 65°C에서 1시간동안 반응시켜 가스크로마토그래프(Varian star 3400cx)를 사용하여 정량하였다. 젖산의 가스크로마토그래프 조건은 칼럼은 Chromosorb 101을 사용하였으며, Injector 230°C, Column 210°C, Detector 250°C로 유지한 상태에서 FID 검출기로 측정하였다.

### 완충용량의 온라인 측정

pH가 감소하는 발효 시스템에서는 기체상태의 암모니아 혹은 농축된 염기나 산 용액을 사용하여 발효공정의 pH를 자동조절하며 Figure 2에서와 같은 톱니형의 pH 응답 곡선을 나타낸다. 이 응답곡선의 형태는 배지의 완충용량이나 교반특성에 따라 달라진다. 완충용량은 투입된 알칼리의 양을 측정하고 이 응답곡선으로부터 변화된 pH를 측정하면 계산할 수 있다. 본 실험에서는 펌프의 공급속도는 사용하는 공급관에 따라 미리 측정하고, 농축된 알칼리의 농도를 알고 있으므로 제어신호의 길이를 온라인으로 측정하여 pH 조절을 위하여 공급된 알칼리의 농도를 식(1)로 측정할 수 있다.

$$[OH]_{fed} = \frac{N_{alk} \cdot F_{pump} \cdot T_{pump}}{V_{broth}} \quad (1)$$

알칼리가 공급된 후 배지의 pH값이 급격히 변화하지만 균체가 성장하고 있는 동안에는 암모니아를 소비하고 유기산을 생성하므로 지속적으로 수소이온을 발생시킨다. 따라서 pH가 서서히 감소하고 교반효과등의 영향으로 Figure 2와 같은 pH응답곡선을 나타낸다. 염기의 투입에 의하여 실제로 변화된 pH의 값은 응답곡선의 pH감소부분을 연장하여 제어펄스신호의 시작부분과

만나는 지점의 pH값이다. 이 값에 초기의 pH의 값을 감한 것은 ΔpH라 할 때 완충용량(β)은 다음 식과 같이 쓸 수 있다.

$$\beta = \frac{N_{alk} \cdot F_{pump} \cdot T_{pump}}{V_{broth} \cdot \Delta pH} \quad (2)$$

완충용량을 온라인으로 측정하기 위하여 펌프의 구동시간을 I/O module로부터 측정하고 A/D convertor로부터 얻어진 pH 값을 컴퓨터에 저장하고 동시에 pH 응답곡선으로부터 pH가 감소하는 영역에서 자동적으로 외삽을 통하여 염기의 첨가에 의한 실제 pH변화 값을 구하는 소프트웨어를 제작하였다. 소프트웨어는 Labview(National Instrument, USA)의 개발도구인 G언어를 사용하여 작성하였다. 이 소프트웨어는 Window95/NT 환경에서 운용할 수 있으며 pH 신호 및 제어신호를 변환하고 저장하는 부분과 온라인으로 완충용량을 측정하여 유기산의 농도를 추정하는 두 개의 프로그램으로 구성되어있다(Figure 3). 이 소

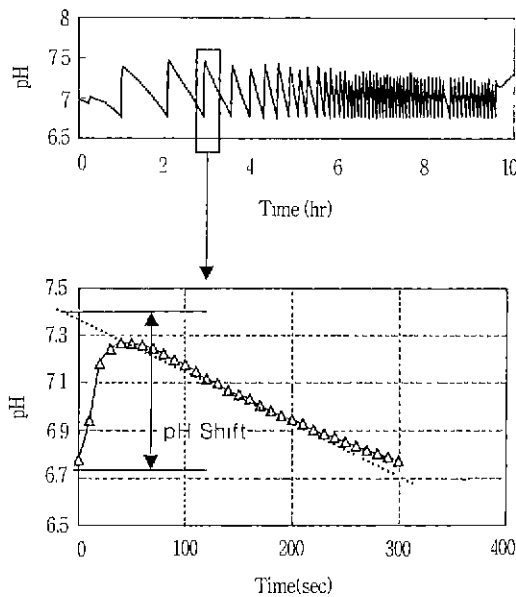


Figure 2. Schematic of obtaining ΔpH from pH profile in response to pulse-type feeding of alkali.

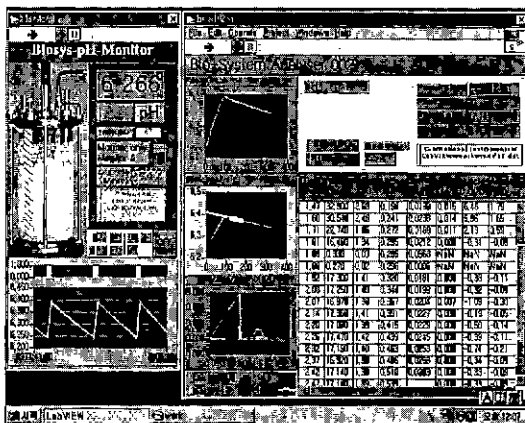


Figure 3. Software used for monitoring pH change, for the measurement of buffer capacity and for the estimation of organic acid.

프트웨어는 알칼리의 소비량 및 소비 속도를 측정하는 기능도 가지고 있다. 소비된 알칼리의 양은 식(1)의 값을 누적하여 계산하였다. 알칼리의 소비속도에 해당하는 양생자 생성속도는 제어 펄스신호의 길이를 펄스신호의 시작시간 간격으로 나눈 값에 비례하므로 식(3)으로 계산하였다.

$$\text{Rate of proton generation} = \frac{N_{alk} \cdot F_{pump} \cdot T_{pump}}{V_{broth} \cdot T_{interval}} \quad (3)$$

**완충용량의 변화로부터 초산 및 암모니아의 농도추정**

유기산의 농도가 [HA]이고 pH조절을 위하여 첨가된 강염기의 농도가 [OH]<sub>adj</sub>면 이때의 수소이온농도는 다음과 같다(10).

$$[H^+] = \frac{k_w}{[H^+]} + \frac{[HA]}{1 + \frac{[H^+]}{k_a}} - [OH]_{adj} \quad (4)$$

여기서 [OH]<sub>adj</sub>를 pH로 미분한 값이 바로 초산의 농도에 의하여 결정되는 완충용량이다.

$$\beta = 2.303 \left\{ [H^+] + \frac{k_w}{[H^+]} + [HA] \cdot \frac{[H^+] \cdot k_a}{(k_a + [H^+])^2} \right\} \quad (5)$$

같은 방법으로 암모니아의 완충용량은 다음 식으로 계산할 수 있다.

$$\beta = 2.303 \left\{ [H^+] + \frac{k_w}{[H^+]} + [NH_4^+] \cdot \frac{[H^+] \cdot k_{a_{NH_4}}}{(k_{a_{NH_4}} + [H^+])^2} \right\} \quad (6)$$

따라서 균체의 성장에 따라 유기산이 주로 생산되고 암모니아를 이용하여 자동 pH조절하는 경우 완충용량의 변화는 β<sub>HA</sub>와 β<sub>NH<sub>3</sub></sub>의 합이 된다.

$$\Delta\beta = \beta_{HA} + \beta_{NH_3} \quad (7)$$

미생물이 성장하면서 배지내의 암모니아가 소비되면 pH를 강하 시키므로 pH의 자동제어 과정에서 소비된 만큼의 암모니아가 공급된다. 동시에 생성된 유기산을 중화시키기 위하여 유기산이 해리되어 발생하는 수소이온과 같은 당량의 하이드록실 이온(OH<sup>-</sup>)을 발생시키는 암모니아를 추가적으로 공급되어야 한다. 따라서 유기산을 중화시키기 위하여 추가된 암모니아가 해리된 [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]는 생성된 유기산이 해리되어 발생한 [A<sup>-</sup>]와 동당량이므로 배지내 증가된 암모니아이온의 농도는 생성된 유기산에 의하여 결정되며 그 관계식은 다음과 같다.

$$[NH_4^+]_{supp} = \left( 1 + \frac{[H^+]}{k_{a_{NH_3}}} \right) \cdot [HA] \cdot \frac{k_a}{k_a + [H^+]} \quad (8)$$

따라서 완충용량의 변화를 온라인으로 측정하고 식(7), (8)로부터 유기산의 농도와 암모니아의 농도의 증가를 측정할 수 있다. 그리고 pH 조절을 위하여 NaOH를 사용하는 경우에는 첨가된 NaOH는 완충용량에 영향을 미치지 아니하므로 균체의 성장

에 따라 증가되는 완충용량은 유기산의 생산에 의한 것으로 볼 수 있다. 따라서 식(5)로부터 주어진 pH에서 완충용량의 증가분에서 생산된 유기산의 농도를 추정할 수 있다.

**결과 및 고찰**

**완충용량의 온라인 측정**

완충용량을 온라인으로 측정할 수 있도록 구성된 발효조에 완충용액을 채워 미생물의 성장이 없는 상태에서 측정의 신뢰도를 검사하였다. 이 발효조에 pH 4.1의 초산용액을 10, 20, 30, 40 및 50mM로 증가시켜 가면서 온라인으로 완충용량을 측정하였다. pH 4.1에서의 초산의 농도의 변화에 따른 이론적 완충용량을 식(5)를 이용하여 계산하여 온라인으로 측정된 값과 같이 표시하였다(Figure 4). 초산의 해리상수는 발효조의 온도인 37°C의 값으로 보정하였다. 이때 사용된  $k_a$  값과 온도 보정값은 Table 1에 나타내었다. 온라인으로 측정된 초산 용액의 완충용량은 이론적으로 계산된 초산의 완충용량의 값과 잘 일치하였다. 염화암모늄용액의 농도를 달리하면서 온라인으로 완충용량을 측정하고 각각의 경우의 이론적 완충용량을 식(6)으로 각각 계산하였다 (Figure 5). 젖산용액은 pH 4.3에서 농도를 변화시키며 완충용량을 측정하였으며 젖산의 해리상수 및 온도 보정치를 식(5)에 대입하여 이론적 완충용량을 계산하였다(Figure 6).

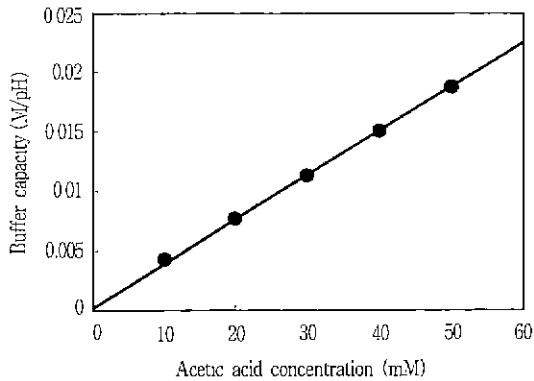


Figure 4. Buffer capacities measured on-line (●) and its comparison to the calculated values (-) with varying acetic acid concentrations

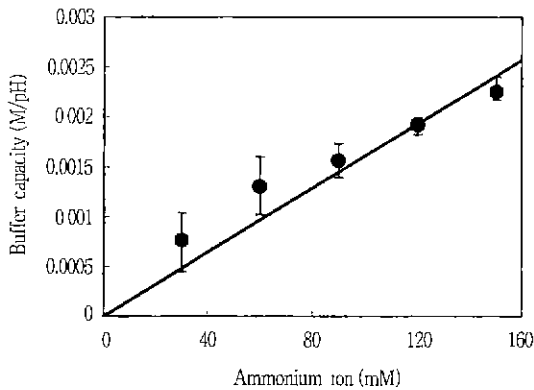


Figure 5. Buffer capacities measured on-line (●) and its comparison to the calculated values (-) with varying ammonium ion concentrations.

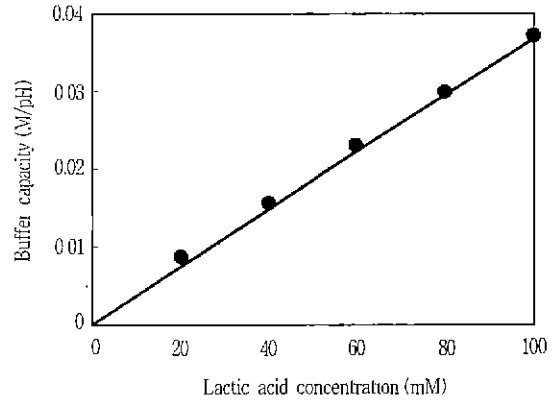


Figure 6. Buffer capacities measured on-line (●) and its comparison to the calculated values (-) with varying lactic acid concentrations.

Table 1. Acidity constants used in this study.

	Acidity constant ( $pK_a$ )	Temperature compensation ( $dpK_a/dt$ )
Acetic acid	4.76	0.0002
Lactic acid	3.86	0
Ammonia	9.25	-0.031

pH 7.0에서 측정된 염화암모늄 수용액의 완충용량은 식(6)으로 계산된 값과 비교적 일치하였으나 암모니아의 농도가 100mM 이하에서는 측정치가 계산치 보다 높음을 알 수 있다. 반복된 실험을 통해서도 동일한 결과를 얻었다. 온라인으로 측정된 완충용량은 이론치와 잘 일치하였다. 유기산의 경우 비교적 정확하게 온라인으로 완충용량을 측정 할 수 있었다.

배지내의 완충용량의 변화는 직접적으로 배지성분중 이온성분의 변화를 반영하므로 발효상태를 알 수 있는 중요한 공정변수가 될 수 있다 그러나 오프라인 측정시의 번거로움으로 인하여 주요 측정대상 공정변수로 사용되지 않고 있다. 그러나, 발효 및 생물공정의 필수적인 자동 pH제어장치로부터 그 pH측정신호 및 제어신호만으로 완충용량을 온라인으로 측정하는 본 시스템은 기존의 공정에 쉽게 적용하여 공정모니터링에 사용될 수 있다. 그리고 배양액의 pH부근에서 완충효과를 나타내는 유기산이 주 생산물이면 완충용량의 온라인 모니터링을 통하여 그 농도를 추정할 수 있을 것이다.

**미생물 배양시 완충용량의 온라인 측정 및 초산 생산량의 추정**

초산의 생산을 동반하는 *E. coli* K12 야생주를 최소배지에서 배양하였다. 전술한 pH신호 및 pH제어신호 모니터링이 가능한 발효조시스템을 사용하여 배양중의 완충용량을 온라인으로 측정하였다. 완충용량은 3.8 mM/pH의 초기 값에서 6.5 mM/pH 까지 점차적으로 증가하였다. 완충용량의 온라인 측정시 알칼리 공급관내 기포의 발생으로 인하여 알칼리의 공급량이 과량으로 환산되어 완충용량이 급격하게 감소하는 경우가 가끔 발생하였다. 따라서 완충용량의 증가 분을 필터를 사용하여 부드럽게 만든 후 식(7)과 식(8)을 이용하여 초산과 암모니아의 농도의 증

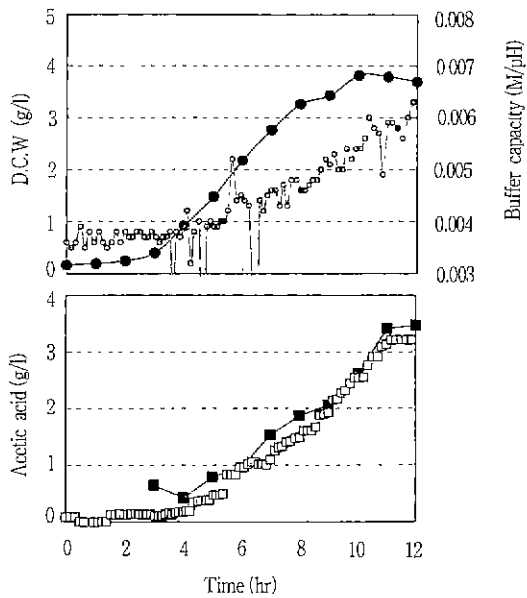


Figure 7. On-line measurement of buffer capacity (•), acetic acid estimation (□), acetic acid measured (■) and biomass (●) during cultivation of *E.coli* K12 in a minimal medium.

가로 환산하였다. 환산된 초산의 농도를 균체의 배양시 채취된 시료를 분석하여 초산의 생성량을 비교하였다(Figure 7). 12시간 배양후의 가스크로마토그래프를 이용한 측정치는 3.5g/l이고 온라인 추정치는 3.2g/l를 나타내었다. 최소배지에서 12시간 동안 *E. coli*는 3.8g/l의 균체를 생산하였고 이 과정에서 3.5g/l의 초산이 생성되었다. 발효초기의 초산의 측정치가 계산치 보다 높았으나 이는 분석오차로 추정되며 이후에는 전반적으로 완충용량으로부터 측정된 초산의 농도 값과 일치하였다.

**복합배지에서 E.coli 배양시 유기산 생산 추정**

야생주 *E. coli* K12를 포도당이 첨가된 LB배지에서 배양하면서 완충용량의 변화를 PC를 이용하여 온라인으로 모니터하고 초산과 암모니아의 생산량을 측정하였다. 추정된 값을 채취한 시료로 분석한 값과 비교하였다(Figure 8). 완충용량으로부터 추정된 초산의 농도는 5시간부터 급격히 증가하여 12시간에는 17.5 g/l 수준까지 증가하였고, 완충용량으로부터 추정된 암모니아는 5 g/l까지 점차적으로 증가하였다. 그러나, 시료를 가스 크로마토그래프로 측정한 초산의 농도는 12시간 동안에 약 9.8 g/l 생산되었으며 암모니아는 균체의 성장이 둔화된 5시간 후부터 급격히 증가하였다.

균체의 성장이 둔화된 이후에는 완충용량으로부터 추정된 초산의 농도는 측정치보다 매우 높게 나타났다. 반면에 추정된 암모니아의 농도는 실제 측정치보다 낮게 나타났다. 따라서 복합배지에서는 최소배지와 달리 완충용량의 변화로부터 초산 및 암모니아의 농도를 추정할 수 없었다. 이는 복합배지에서 균체의 성장이 둔화된 5 시간 이후에 암모니아의 농도가 급격하게 증가하는 것으로 보아 배지내의 암모니아농도의 변화가 초산의 생성에 따른 pH자동제어 동안 추가된 것 보다 배지의 성분이 분해되어 과량의 암모늄이온이 발생하고 완충용량을 변화시켜 온라인 추정을 방해한 것으로 사료된다. 따라서 균체의 성장이 둔화되기 전까지는 복합배지에서도 유기산의 온라인추정이 가능하나

전체적으로는 불가능하겠다. 그러나 완충용량의 변화는 이 경우에도 역시 중요한 공정변수로 사용될 수 있다.

균체의 성장의 둔화에 따른 암모니아의 농도의 변화를 다른 공정 변수를 측정하여 이론적으로 보정할 수 있을 것으로 사료된다. Figure 9에는 완충용량의 온라인 측정시 동시에 온라인으로 측정된 양성자 생성속도와 균체의 양과의 관계를 나타내었

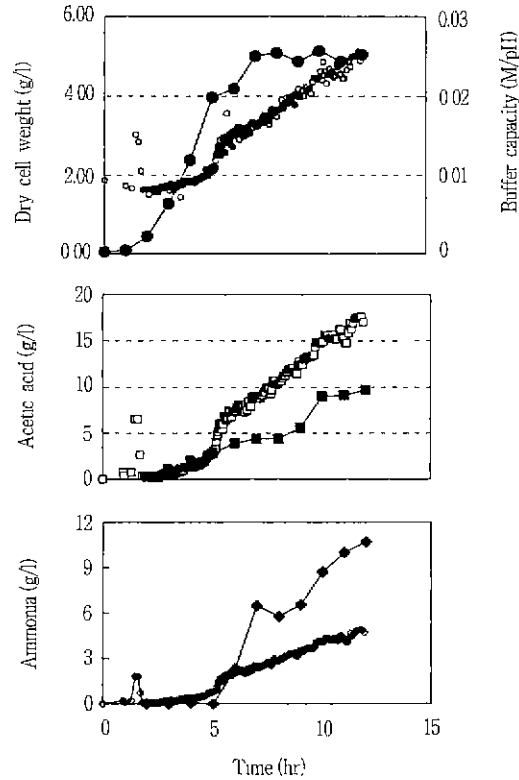


Figure 8. On-line measurement of buffer capacity (•), acetic acid estimation (□), ammonia estimation (◇), acetic acid measured (■), ammonia measured (◆) and dry cell weight (●) during cultivation of *E.coli* K12 in a complex medium.

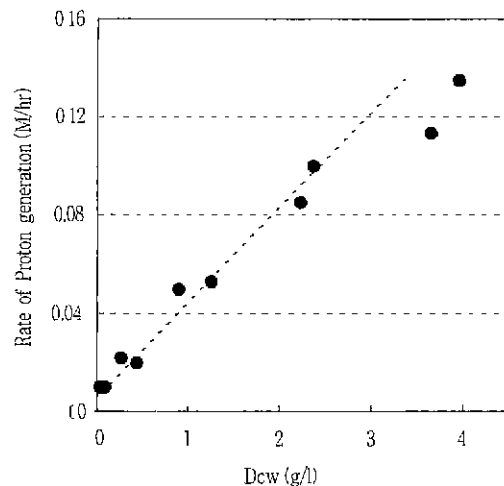


Figure 9. The relation between rate of proton generation and biomass during exponential phase.

다. 균체의 성장이 둔화되기 전인 3g/l 이하의 대수증식기 초기에 균체량과 양성자 생성속도는 비교적 정확한 비례관계에 있음을 알 수 있다. 그러나 균체가 대수증식기를 지나면 양성자 생성속도도 급속히 감소하였다. 대수 증식기에 양성자 생성속도가 균체의 양을 측정할 수 있는 중요한 공정변수임을 알 수 있다. 따라서 향후 더 연구를 진행하면 온라인으로 측정된 두 가지의 공정 변수를 사용하여 상호 보완하여 균체의 양이나 유기산 및 암모니아의 농도를 변화를 추정할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 완충용량의 온라인 측정과 젖산 생산량의 추정

본 시스템을 사용하여 *L. delbrueckii*를 배양하는 동안 완충용량을 온라인으로 측정하고 식(5)를 이용하여 생성된 젖산의 양을 추정하였다(Figure 10). 균체는 약 30시간 후부터 성장이 둔화되었으나 젖산은 지속적으로 축적되어 가스크로마토그래프로 측정된 결과 56시간에는 52 g/l의 농도를 나타내었다. 온라인으로 측정된 완충용량은 0.003 M/pH에서 0.15 M/pH까지 지속적으로 증가하였고 이로부터 50 g/l의 젖산이 지속적으로 생성되는 것으로 추정할 수 있었다. 추정된 젖산의 농도와 측정치와 잘 일치하였다.

첨가된 배지중 암모니아 및 기타 전해질이 존재하지만 젖산을 생산하는 동안 증가된 완충용량은 대부분 젖산의 생산에 기인한 것으로 가정하고 식(5)만을 사용하여 젖산의 농도로만 추정하였다. 이는 pH 5.0에서는 완충용량에 암모니아가 기여하는 부분은 매우 적기 때문이다. 이를 살펴보기 위하여 Figure 11에 각각 10 mM의 초산, 젖산 및 암모니아의 완충용량을 계산하여 pH의 변화에 따라 나타내었다. 초산은  $pK_a$ 값에 해당하는 4.8을 중심으로 높은 완충용량을 나타냄을 알 수 있었고, 젖산은 pH 3.2 부근에서 최대의 완충용량을 나타내었다. 10 mM의 암모니아는 pH 9.5에서는 5.33 M/pH의 완충용량을 보이나 젖산 발효과정의 pH인 5.0에서는 0.7 mM/pH의 낮은 값을 나타내고 있다. 따라서 복합배지를 사용하는 경우에는 완충용량만을 측정하여 암모니아의 농도와 관계없이 젖산의 농도를 추정할 수 있었다. 동시에 가스크로마토그래프상으로도 초산의 피크는 발견되지 않았으며 젖산 생산균인 *L. delbrueckii*는 pH 5에서 완충용량에 영향을 주는 초산은 생성하지 않는다고 알려져 있다. 따라서 본 시스템은 젖산생산과 같은 유기산 생산의 공정모니터링에 적용될 수 있으리라 사료된다.

최소배지의 경우 다른 이온의 영향이 적으므로 완충용량을 온라인으로 측정하여 정확하게 초산의 농도를 추정할 수 있었다. 그러나 복합배지를 사용하는 경우 중성 pH 영역에서는 균체의 성장이 증진된 이후 급격히 증가하는 유리 암모늄 이온에 의하여 유기산의 정확한 추정이 불가능하였다. 젖산의 경우에는 pH 5 영역에서 암모늄 이온이 완충용량이 매우 적어 영향을 주지 않으므로 비교적 정확하게 젖산의 생산량을 추정할 수 있었다. 따라서 본 결과에서처럼 단일 유기산이 주로 생성되는 경우 완충용량으로부터 그 유기산의 생산 농도의 온라인 추정이 가능하겠다고 할 수 있다. 동시에 온라인으로 측정된 완충용량 및 양성자 생성속도는 새로운 공정 변수로서 동물세포 배양시 암모니아의 축적이나 아미노산 생산을 모니터링 하는 수단으로 사용될 수 있는 가능성을 본 연구를 통하여 제시할 수 있었다.

본 연구에서는 잠입신호에 강한 RS-485방식의 디지털통신에 의한 PC와 A/D인터페이스를 이용하여 발효조 모니터링 시스템

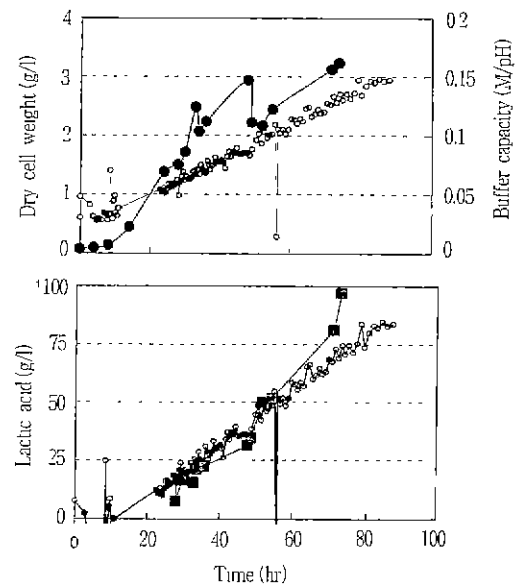


Figure 10. On-line measurement of buffer capacity (•) and lactic acid estimation (□), lactic acid measured (■) and dry cell weight (●) during lactic acid production by *L. delbrueckii*.

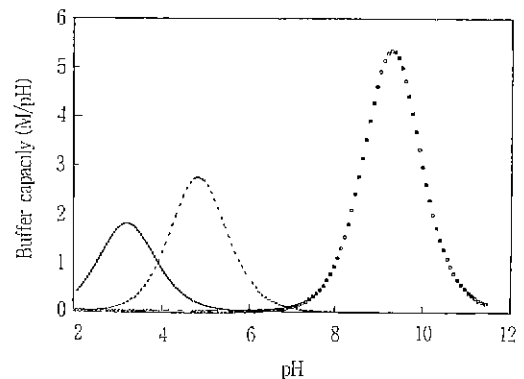


Figure 11. Profiles of buffer capacities of lactic acid (-), acetic acid (···) and ammonia (- -).

을 pH측정의 정밀도를 향상시켰으며 향상된 정밀도에 의하여 새로운 공정 변수인 완충용량을 온라인 측정할 수 있게 되었다. 또한 본 연구에서 사용된 방법은 기존의 발효공정을 변화시키지 않고 기존의 pH 자동제어장치에 추가적으로 Digital I/O Module과 A/D인터페이스만을 추가하여 온라인으로 완충용량을 모니터링 하는 것으로 실제 공장규모의 생산공정에도 쉽게 적용 가능하다는 장점이 있다.

본 연구에서 사용된 방법은 다른 생물반응 시스템에도 응용 가능하다. 특히 동물 세포 배양시에는 소비된 포도당에 일경비로 젖산이 생성되거나 배양 pH에서는 젖산의 완충용량은 매우 약해서 젖산의 생성은 양성자 생성 속도로만 반영된다. 그러나 암모니아의 생성은 배지의 완충용량을 증가시키는데 기여하므로 온라인으로 완충용량과 양성자 생성 속도를 측정하면 세포배양시 대사상태를 모니터링 할 수 있는 좋은 방법이 될 수 있다고 사료된다. 이외에도 추가적인 연구를 통하여 아미노산 발효시 아미노산의 농도의 추정 및 온라인 모니터링이 가능할 것으로

사료된다. 이외에 pH의 변화를 수반하는 혐기성 소화조 및 질산화/탈질 반응기의 모니터링에도 응용될 수 있다고 사료된다.

## 요 약

발효조의 pH자동제어장치에 알칼리 펌프의 동작 시간을 측정할 수 있는 장치와 pH 값을 정밀하게 컴퓨터로 모니터링 할 수 있는 장치를 추가하였다. pH 제어신호 및 응답 신호를 이용하여 온라인으로 완충용량을 측정할 수 있는 소프트웨어를 개발하였다. 최소배지에서 대장균 야생주를 배양하는 동안에 온라인으로 완충용량을 측정하여 생성된 초산의 농도를 추정하였다. 측정된 초산의 농도는 소프트웨어 센서로 추정된 농도와 잘 일치하였다. 젖산의 생산도 완충용량을 온라인으로 측정하여 성공적으로 추정할 수 있었다.

## 감 사

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(생물공학연구비)에 의하여 수행된 연구입니다. 이에 감사드립니다.

## 사 용 기 호

$[OH]_{fed}$	: Alkali fed for neutralization (M)
$N_{alk}$	: Normality of alkali solution for pH control (N)
$F_{pump}$	: Speed of alkali feeding pump (ml/sec)
$T_{pump}$	: Duration of pulse for alkali pump feeding (sec)
$T_{interval}$	: Time duration between pulse signal initiation (sec)
$V_{broth}$	: Broth volume (L)
$\beta$	: Buffer capacity (M/pH)
$\Delta\beta$	: Buffer capacity increased during cell growth (M/pH)
$\beta_{HA}$	: Buffer capacity caused by organic acid (M/pH)
$\beta_{NH_3}$	: Buffer capacity caused by ammonia (M/pH)
$\Delta pH$	: pH shift caused by alkali supply during pH control
$k_a$	: Acidity constant for organic acid
$k_{aNH_3}$	: Acidity constant for ammonia
$k_w$	: Autoprotolysis constant of water
$[NH_4^+]_{supp}$	: Ammonium ion supplemented for the neutralization of organic acid produced (M)

## 참 고 문 헌

- Schügerl, K. (1991), Common Instruments for Process Analysis and Control, Biotechnology (H-J. Rehm, G. Reed, A. Puhler and P. Stadler eds.), Vol. 4, pp. 6-25, VCH Publishers Inc. New York.
- Bradley, J., P. A. Anderson, A. M. Dear, R. E. Ashby and A. P. F. Turner (1989), Glucose Biosensors for the Study and Control of Bakers Compressed Yeast Production, Computer Applications in Fermentation Technology (N. M. Fish, R.I. Fox and N. F. Thornhill eds.), pp. 47-65, Elsevier Science Publishers LTD. New York.
- Wolfbeis, O. S. (1990). Fiber-Optic Sensors in Bioprocess Control, Sensors in Bioprocess Control (J. V. Twork and A. M. Yacynych eds.) pp.95-125, Marcel Dekker, Inc., Newyork and Basel.
- Ozturk, S.S., J. C. Thrift, J. D. Blackie and D. Naveh (1997), Real-time Monitoring and Control of Glucose and Lactate Concentrations in a Mammalian Cell Perfusion Reactor, *Biotechnol. and Bioeng.*, **53**, 371-378.
- Chattaway, T. and G. N. Stephanopoulos (1988), An Adaptive State Estimator Detecting Contaminants in Bioreactor. *Biotechnol. and Bioleng.* **34**, 647-659.
- Lasko, D. R. and D. I. C. Wang (1996). On-line Monitoring of intracellular ATP Concentration in *Escherichia coli* Fermentations, *Biotechnol. and Bioeng.*, **52**, 364-372.
- Stephanopoulos, G. and K. San (1984). Studies on On-line Bioreactor Identification I. Theory, *Biotechnol. and Bioeng.*, **26**, 1176-1188.
- San, K. and G. Stephanopoulos (1984), Studies on On-line Bioreactor Identification IV. Utilization of pH Measurement for Product Estimation, *Biotechnol. and Bioeng.*, **26**, 1209-1218.
- Acuna, G., E. Latrille, C. Beal, G. Corrieu, and A. Cheruy (1994), On-line Estimation of Biological Variables during pH Controlled Lactic Acid Fermentations, *Biotechnol. and Bioeng.*, **44**, 1168-1176.
- 허 원 (1997), 인산 완충용액 배지에서 미생물의 성장에 따른 pH의 변화 해석, *한국생물공학회지*, **12**(2), 167-175.
- Perrin, D. D. and B. Dempsey (1974), Buffers for pH and Metal Ion Control. pp.157, Chapman and Hall, London.