

레이저 탁도계를 이용한 세포 농도의 온라인 측정과 제어

조윤남, 장용근
한국과학기술원 화학공학과

ON-LINE MEASUREMENT AND CONTROL OF CELL CONCENTRATION USING A LASER TURBIDIMETER

Yun Nam Cho and Yong Keun Chang
Dept. of Chemical Eng., KAIST, Taejeon, Korea

서론

균체 농도의 온라인 측정은 생물반응기의 효율적인 운전과 제어에 매우 중요한 인자이다. 기존의 배양액 탁도(OD) 측정에 의한 온-라인 균체 농도 측정법들은 간단하고 정확한 반면 비교적 낮은 농도범위에만 적용 가능하였다. 최근에는 laser turbidimeter를 이용하여 재조합 대장균, 동·식물 세포 등의 농도를 온-라인으로 측정하려는 시도가 이루어지고 있다. Laser turbidimeter는 비교적 고농도에서도 회석 과정없이 균체 농도의 온라인 측정이 가능하며 반응기에 설치한 상태에서 증기멸균할 수 있다는 장점을 지닌다.

본 연구에서는 laser turbidimeter를 이용하여 효모 농도의 온라인 측정과 제어를 수행하였다. 먼저, 수확된 효모를 사용하여 비이커와 발효조에서의 실험을 통하여 배양액의 탁도와 세포건조중량 간의 상관식을 마련하였다. 특히 발효조 실험에서는 교반 속도, 폭기 속도, 소포제 농도 등이 배양액의 탁도 측정에 미치는 영향을 알아 보았으며 이를 상관식에 반영하였다. 이렇게 만들어진 상관식을 회분식, 세포재순환 연속식 및 turbidostat 배양 시 균체 농도를 온-라인 측정하는데 사용하였다.

실험

Laser turbidimeter로는 일본 ASR Co.의 MODEL LA-300LT를 사용하였으며, 균주로는 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였다. 배지는 glucose(100g/l), yeast extract(8.5g/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.12g/l), NH_4Cl (1.3g/l), $CaCl_2$ (0.06g/l)의 조성을 가졌으며, 소포제로는 Antifoam 289 (Sigma Co.)를 사용하였다. 배양 실험은 컴퓨터와 연결된 7L 발효조에서 행하였으며, 조업부피, 온도, pH등은 각각 4 L, 33°C, 4.5 로 유지하였다. 균체농도와 센서신호(OD) 간의 상관식을 구하기 비이커에서는 기포가 없는 상태에서 균체농도의 변화에 따른 OD값을, 발효조에서는

균체농도를 비롯한 교반속도, 폭기량, 소포제 농도의 영향이 모두 포함된 OD값을 측정하였다. 구해진 상관식은 회분식 또는 연속 배양 시 세포건조중량의 온-라인 측정에 사용하였다. 연속식의 경우 균체의 고농도 배양을 위해 세라믹 필터 (Millipore Co.)가 외부에 장착된 막 재순환 연속반응기를 사용하였다.(Fig. 1) Turbidostat 배양은 회석율과 bleed ratio를 조절변수로 하여 수행하였다.

결과 및 토의

교반과 폭기로 인해 발생하는 기포의 영향은 교반 속도 400 rpm이하, 폭기 속도 0.5 vvm이하에서는 무시할 만하였으며, 500 rpm의 강한 교반 하에서는 그 영향이 매우 큼을 알 수 있었다. 그러나 이러한 영향은 균체 농도가 증가함에 따라 감소하였다. 따라서 균체 농도가 상대적으로 낮은 회분식 배양에서는 오차를 최소화하기 위해 동일한 조업조건의 발효조에서 얻어진 상관식을 이용하여 균체 농도를 측정하였으며, 연속배양 시에는 대략 8 gDCW/L 이상의 균체 농도에서는, 비이커에서 기포가 없는 상태에서 만들어진 상관식을 큰 오차없이 사용할 수 있었다. 회분식 배양 도중 수행한 온-라인 측정은 교반 속도 500 rpm일 때를 제외하면 교반 속도에 관계없이 전반적으로 만족스러운 것이었으나, 포도당의 고갈과 함께 균체의 성장이 정지기에 들에 따라 온-라인 측정치와 오프-라인으로 측정된 실제 균체 농도간에 상당한 편차가 발견되었는데(Fig. 2) 이는 균체 물폴로지의 변화에 기인하는 것으로 생각된다. 균체 재순환 연속 배양을 통한 고농도 배양시 균체 농도 35 gDCW/L의 범위까지도 비교적 정확한 측정이 가능했으며, 균체 농도 25 gDCW/L와 35 gDCW/L에서 수행한 turbidostat 배양 역시 측정과 제어 면에서 성공적이었다.(Fig. 3) 균체 농도 측정시 소포제의 첨가로 인한 측정 오차는 거의 없었다.

참고문헌

1. Automatic System Research Co.: On-line laser turbidimeter(Model LA-300LT) instruction manual., Tokyo, Japan. (1993).
2. Hibino, W., Kadotani, Y., Kominami, M., Yamane, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 445(1993).
3. Horiuchi, J.-I., Kamasawa, M., Miyakawa, H., Kishimoto, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 207(1993).
4. Konstantinov, K. B., Pambayun, R., Matanguihan, R., Yoshida, T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1337(1992).
5. Yamane, T.: *Biotechnol. Prog.*, **9**, 81(1993).
6. Yamane, T., Hibino, W., Ishihara, K., Kadotani, Y., Kominami, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 550(1992).
7. Zhong, J.-J., Fujiyama, K., Seki, T., Yoshida, T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 542(1993).
8. Zhong, J.-J., Konstantinov, K. B., Yoshida, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 445(1994).

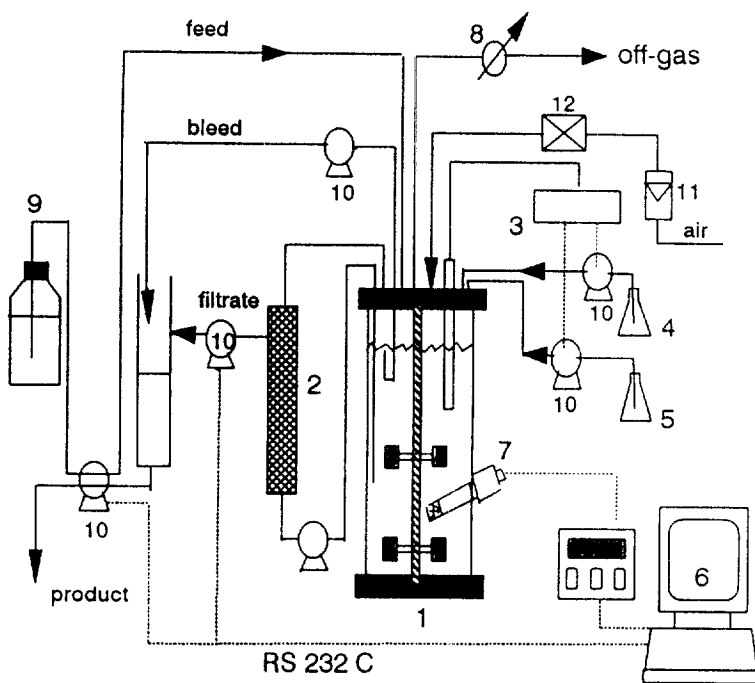


Fig. 1 Schematic diagram of experimental setup for turbidostat.
 1: fermentor, 2: ceramic filter, 3: pH indicating controller,
 4: 2N NaOH solution, 5: 2N HCl solution, 6: personal computer,
 7: laser turbidimeter, 8: condenser, 9: medium bottle,
 10: peristaltic pump, 11: flow meter, 12: aseptic filter

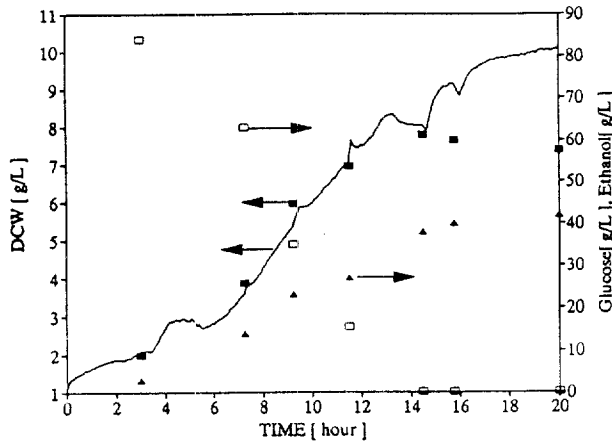


Fig. 2 Profiles of cell, glucose, and ethanol concentrations in a batch culture of yeast.; Agitation speed, 400 rpm; with no aeration
 (□) glucose concentration; (▲) ethanol concentration;
 (■) off-line measured cell concentration;
 (—) on-line estimated cell concentration

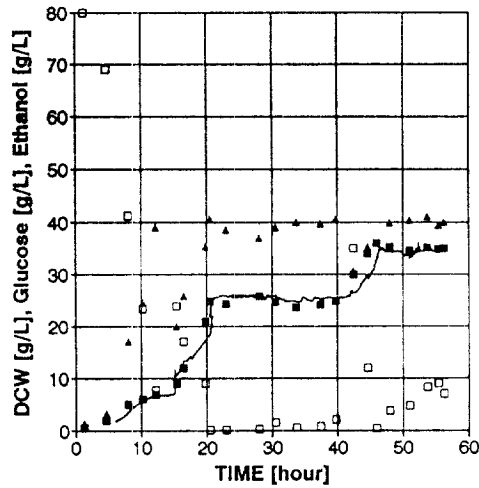


Fig. 3 Time courses of cell, glucose, and ethanol concentrations in a turbidostat culture. Agitation speed, 400 rpm; Aeration rate, 0.25 vvm.
 (□) glucose concentration; (▲) ethanol concentration;
 (■) off-line measured cell concentration;
 (—) on-line estimated cell concentration