

## Computer-coupled Mass Spectrometer를 이용한 세포증식과 기질소모의 연속적 On-line추정

남 수 완 · 김 정 희  
한국과학기술원 생물공학과

### Continuous On-line Estimation of Cell Growth and Substrate Consumption Using a Computer-coupled Quadrupole Mass Spectrometer

Soo W. Nam and Jung H. Kim

Department of Biological Science and Engineering, KAIST, P.O. Box 150, Cheongyang, Seoul 130-650,  
Korea.

#### ABSTRACT

From the on-line mass spectrometric analyses of the exhaust gaseous composition of fermentor and the material balance equations for oxygen and carbon dioxide, oxygen uptake rate (OUR) and carbon dioxide evolution rate (CER) were calculated using a personal computer (IBM PC-AT) interfaced to a quadrupole mass spectrometer. The calculated OUR and CER were used for the indirect estimation of cell and substrate concentrations during the batch culture of *Candida utilis*. For the estimation of substrate concentration, the yield model of Pirt was applied. It was found that the cell and substrate (glucose) concentrations could be satisfactorily estimated and the results showed the more accurate estimations of both fermentation state variables when OUR data were used than CER data.

#### 서 론

호기적 발효공정에서 발효 배기ガ스中 산소 또는 이산화 탄소의 농도를 측정함으로써 산소 소비속도(Oxygen Uptake Rate ; OUR) 또는 이산화 탄소 발생속도(Carbon Dioxide Evolution Rate ; CER)를 계산하고 다시 이를 이용하여 세포증식을 on-line추적 또는 발효공정을 on-line 제어하려는 연구가 많이 있었다(1-7). 이때 발효 배기ガ스中 산소와 이산화 탄소의 분석을 위해 주로 사용한 paramagnetic O<sub>2</sub> analyzer와 infrared CO<sub>2</sub> analyzer는 응답시간이 길고 큰 보정편차(calibration drift) 때문에 발효 진행 중 6~12시간마다 표준기체로 재보정해야 하는 단점들이 있었다(8-10). 따라서 이러한 단점을 극복하여 정확한 발효 배기ガ스의 분석을 위해 Mass Spectrometer(MS)를 발효공정에 이용하려는 연구가 활발히 진행중에 있으며(9-16) 그 주된 이유는 다음과 같다(13~15) : 첫째로, 응답시간이 짧아서 0에서 90% 응답을 보

이는데 1초 이하이다. 따라서 하나의 MS로 발효조의 여러 가지 배기ガ스 즉, 산소, 질소, 이산화 탄소와 기타 휘발성의 여러 성분을 동시에 분석할 수 있다. 둘째로, 보정편차가 1개월에 2% 이하로써 보정을 자주 할 필요가 없으며 6개월 이상 연속 작동시켜도 높은 신뢰도(reliability)를 보인다. 셋째로는 MS에서 분석된 값(분압 또는 mole백분율)들은 0~10 V의 analog신호로 출력되기 때문에 host computer와 interface가 쉽다. 따라서 host computer에 의해 산소 소비속도, 이산화 탄소 발생속도, 호흡율, 세포증식등의 계산 및 발효공정의 제어가 on-line으로 가능하다.

이상의 장점들로 인해 효모나 항생제 발효공정에 많이 이용되어온 MS는 발효 배기ガ스 또는 발효액中 휘발성 분의 on-line분석에 응용된 것이 대부분이었다.

따라서 본 논문에서는 MS를 이용한 발효 배기ガ스의 정확한 분석을 통해 세포농도와 기질농도를 on-line으로 추정하는 방법과 그 결과에 대해 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주와 배양조건

본 실험에 사용한 균주는 *Candida utilis* ILM C-45로써 KCTC로부터 분양받아 사용하였다. 접종 배양배지는 종류수 1 liter당 yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g 그리고, glucose 10 g이 포함된 YM배지를 사용하였다. 회분 배양에서는 종류수 1 liter당 glucose 50 g, yeast extract 7.5 g, peptone 7.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, KCl 1.15 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.65 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.03 g 그리고  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  0.1 g이 함유된 배지를 사용하였다.

접종 균주는 YM배지에서 30°C, 250 rpm으로 8시간 shaker incubator에서 배양하였다. 회분 배양은 2-L jar-fermentor(New Brunswick Scientific Co.; BioFlo 30)에서 배양액 부피 1 liter, 온도 30°C, 그리고 pH 6.0으로 조절하며 배양하였고 용존산소는 공기 포화수준의 20% 이상 되도록 교반속도를 600-900 rpm에서 조절하여 유지시켰다.

### 세포와 기질농도의 측정

1시간 간격으로 채취한 배양액을 540nm에서 spectrophotometer (Milton Roy Co.; Spectronic 21)로 혼탁도를 측정한 후 전조중량으로 환산하였다 ( $1\text{ O.D.}_{540} = 0.515\text{ g dry cell / l}$ ).

기질인 포도당의 농도는 배양액을 원심분리한 후 얻은 상등액으로 glucose analyzer (Yellow Spring Instrument Co.; Model 23A)를 사용하여 측정하였다.

### Mass spectrometer

본 실험에 사용한 mass spectrometer는 quadrupole mass spectrometer (VG Quadrupoles Ltd., UK)이며 주요 사양과 발효조 및 computer (IBM PC-AT)와의 장치 모식도는 이 외 논문(17)에 자세히 수록되어 있으므로 생략한다.

발효 배기가스중 주요성분인 질소, 산소, 이산화 탄소 및 수증기의 질량대 전하비(mass-to-charge ratio; m/z)는 각각 28, 32, 44 및 18로 선택하여 분압 또는 mole% 분율(%)로 측정하였다.

### 산소 소비속도와 이산화 탄소발생속도의 on-line계산

발효조의 입·출구 기체의 조성을 MS로 분석하여 다음 식들의 의해 산소 소비속도(OUR)과 이산화탄소 발생 속도(CER)을 계산하였다. (18)

$$\text{OUR} = \frac{F_N}{V} \left( \frac{P_{o,in}}{P_t P_{o,in} P_{w,in} P_{c,in}} - \frac{P_{o,out}}{P_t P_{o,out} P_{w,out} P_{c,out}} \right) \quad (1)$$

$$\text{CER} = \frac{F_N}{V} \left( \frac{P_{c,out}}{P_t P_{c,out} P_{w,out} P_{o,out}} - \frac{P_{c,in}}{P_t P_{c,in} P_{w,in} P_{o,in}} \right) \quad (2)$$

### 세포농도의 on-line추정

세포농도의 간접적 추정은 발효중 소비되는 산소와 발생되는 이산화 탄소에 대한 Luedeking & Piret model식을 적분하여 얻은 다음 식을 이용하여 계산하였다(17, 19).

$$X(t) = \frac{1}{k_2} \exp(-\frac{k_1}{k_2} t) \left[ \int_0^t \exp(\frac{k_1}{k_2} t) r(t) dt + k_2 X_0 \right] \quad (3)$$

식(3)에서  $r(t)$ 은 식(1) 또는 식(2)를 이용하여 on-line으로 계산되는 OUR과 CER값이며 식(3)을 trapezoidal rule에 의해 적분하여 세포농도  $X(t)$ 를 5분마다 계산하였다.

이때, 상수  $k_1$ 과  $k_2$ 는 Luedeking & Piret model식을 변형한 다음 식에 의해 실험적으로 결정하였다.

$$\frac{r(t)}{X(t)} = k_1 + k_2 \mu(t) \quad (4)$$

회분 배양의 실험치에서 계산한  $\frac{r(t)}{X(t)}$ 와  $\mu(t)$ 를 plot하여 기울기로부터  $k_2$ , y축 절편으로부터  $k_1$ 을 산소와 이산화 탄소에 대해 각각 구하였다.

### 기질농도의 on-line추정

기질농도의 간접 추정은 Pirt의 기질에 대한 yield model식과 앞질의 방법에 의해서 추정된 세포의 농도를 이용하여 다음과 같은 방법으로 계산하였다. 즉, 기질인 포도당에 대한 yield model식은

$$-\frac{dS}{dt} = m X(t) + \frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

이 되며 초기조건( $S=S_0$  at  $t=0$ )에서 식(5)를  $S(t)$ 에 대하여 풀면

$$S(t) = S_0 - \int_0^t (m X(t) + \frac{1}{Y} \frac{dX}{dt}) dt \quad (6)$$

이 된다. 여기서  $X(t)$ 와  $\frac{dX}{dt}$ 는 5분마다 계산된 on-line data이며 trapezoidal rule에 의해 식(6)을 수치적분하면 기질농도  $S(t)$ 를 on-line으로 계산할 수 있다.

이 때, 상수  $m$ 과  $Y$ 는 식(5)의 양변을  $X(t)$ 로 나누어서 얻은 다음 식에서

$$q_s = m + \frac{1}{Y} \mu \quad (7)$$

실험치로부터 계산한  $Q_s$ 와  $\mu$ 를 plot하여 구하였다.

본 실험에 사용된 data acquisition, graphic display,

OUR, CER, 세포농도, 증식속도 및 기질농도등의 계산은 모두 BASIC언어를 사용하여 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 발효 배기ガ스의 분석

*Candida utilis*의 회분 배양에서 매수 증식기 중기와 말기에 서의 배기ガ스를 MS로 분석하였다. 질량대 전하비( $m/z$ )가 28인 질소를 기준으로 각각의 가스성분을 상대적 분석치로 나타내면 Fig. 1 과 같다.  $m/z$ 값이 56(n-butanol), 58(acetone), 60(acetic acid) 그리고 73(butyric acid)는 검출되지 않았으며 2(hydrogen), 15(ammonia) 및 45(ethanol)은 거의 변화가 없거나 매우 낮은 intensity를 보였다. 따라서, OUR과 CER를 식(1)과 식(2)를 이용하여 on-line계산할 때는 주요성분인 질소( $m/z=44$ ), 산소( $m/z=32$ ), 이산화탄소( $m/z=44$ ) 및 수증기( $m/z=18$ )의 4가지 만을 선택하여 5분마다 분석하였다.

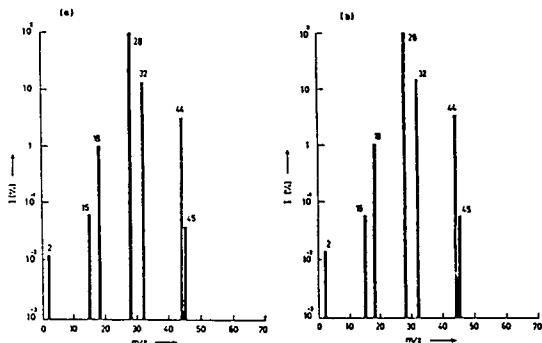


Fig. 1. Peak spectra from batch culture of *Candida utilis* (a) at mid-log phase, (b) at late-log phase.

### 상수 $k_1$ 과 $k_2$ 의 결정

회분 배양의 실험 결과로부터 계산한 산소의 비소비속도,  $Q_{O_2} = \text{OUR} / X$ 와 세포의 비증식속도,  $\mu$  및 이산화탄소의 비발생속도,  $Q_{CO_2} = \text{CER} / X$ 와  $\mu$ 를 식(4)에 따라 각각 plotting하였다(Fig. 2와 Fig. 3). 최소 자승법에 의해 회귀분석한 결과 산소와 이산화탄소의 경우  $k_1$ 값이 각각  $0.90 \text{ mmol O}_2 / \text{g-cell}\cdot\text{hr}$ ,  $0.93 \text{ mmol CO}_2 / \text{g-cell}\cdot\text{hr}$ 였고  $k_2$ 값은 각각  $21.28 \text{ mmol O}_2 / \text{g-cell}$ ,  $17.09 \text{ mmol CO}_2 / \text{g-cell}$ 이었다. 두 경우 모두 상관계수는 0.9 이상으로 좋은 직선관계를 보였다.

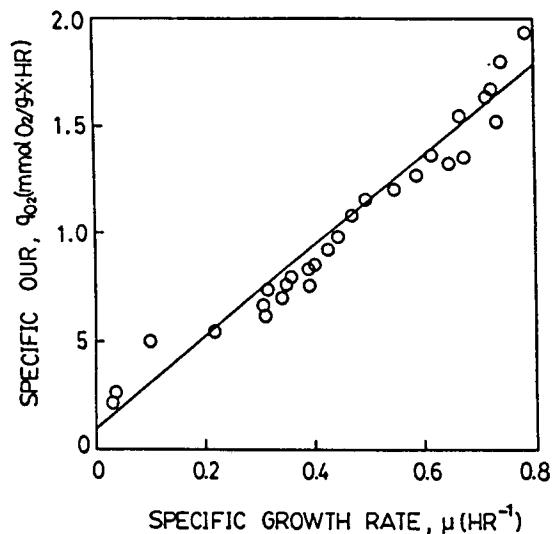


Fig. 2. Plot of specific oxygen uptake rate,  $q_{O_2}$  versus specific growth rate,  $\mu$ .

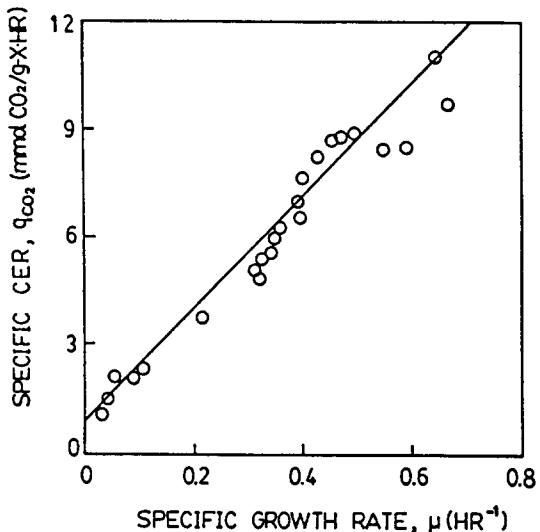


Fig. 3. Plot of specific carbon dioxide evolution rate,  $q_{CO_2}$  versus specific growth rate,  $\mu$ .

### 상수 $m$ 과 $Y$ 의 결정

식(7)에 의해 실험 결과로부터 계산한 포도당의 비소비속도,  $gs$ 와 세포의 비증식속도,  $\mu$ 를 plotting하면 Fig.4와 같다. 최소 자승법에 의해 회귀 분석한 결과 상관계수는 0.98로 좋은 직선 관계를 보였으며  $m$ 값은  $0.032 \text{ g-glucose} / \text{g-cell}\cdot\text{hr}$ 였고,  $Y$ 값은  $0.73 \text{ g-cell} / \text{g-glucose}$ 였다.

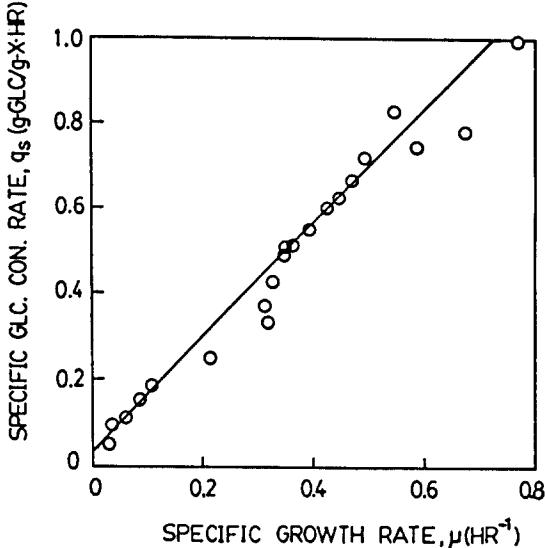


Fig. 4. Plot of specific glucose consumption rate,  $q_s$  versus specific growth rate,  $\mu$ .

이상에서 구한 상수  $k_1$ 과  $k_2$  및  $m$ 과  $Y$ 값은 세포농도와 기질인 포도당의 농도를 식(3)과 식(6)에 의해 on-line으로 추정하는데 사용하였다.

#### 세포농도와 기질농도의 on-line추정

회분 배양도중 5분마다 분석되는 배기ガ스내 질소, 산소, 이산화 탄소 및 수증기의 농도로부터 식(1)과 식(2)를 이용하여 OUR과 CER을 on-line으로 계산하고, 앞에서 구한 상수  $k_1$ 과  $k_2$ 값으로부터 식(3)을 이용해 세포농도를 추정하였다. 또한, 이렇게 계산한 세포농도  $X(t)$ 와 증식속도  $\frac{dX}{dt}$  및 상수  $m$ 과  $Y$ 값을 이용하여 식(6)에 의해 배양액내 잔존 포도당의 농도를 계산하였다. 이때 식(3)과 식(6)에서의 적분항은 trapezoidal rule에 의해 계산하였다. 이상에서 계산한 세포농도와 기질농도의 추정치를 실험치와 함께 나타내면 Fig. 5와 Fig. 6에서와 같다.

OUR과 CER data를 이용하여 계산한 세포농도와 기질농도는 모두 실험치와 잘 일치함을 알 수 있었고 최대 비증식속도,  $\mu_{max}$ 도 0.69~0.72 hr<sup>-1</sup>로서, 실험치인 0.73 hr<sup>-1</sup>과 거의 일치하였다. 단지, Fig. 5와 Fig. 6을 서로 비교해 보면 CER보다 OUR로부터 간접계산한 세포농도와 기질농도가 배양 말기에도 실험치와 더 정확하게 일치함을 알 수 있었다.

이상에서 MS에 의한 발효 배기ガ스의 on-line 분석치로부터 세포농도와 기질농도를 on-line으로 간접추정할 수 있었다. 이는 발효공정의 on-line monitoring 및 feed-

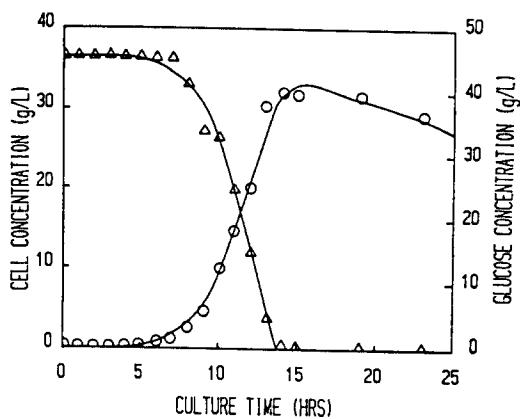


Fig. 5. Indirect estimations of cell and glucose concentrations from oxygen uptake rate data.

(—) estimated values, (○, △) experimental values of cell and glucose concentrations

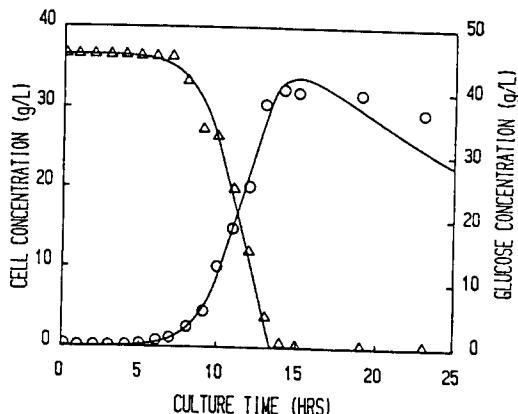


Fig. 6. Indirect estimations of cell and glucose concentrations from carbon dioxide evolution rate data.

Symbols are the same as in Figure 5.

back control에 의한 공정의 최적제어등에 응용될 수 있을 것이다.

#### 요약

*Candida utilis*를 model로 하여 세포증식과 기질소모를 on-line 간접측정하고자 개인용 컴퓨터(IBM PC-AT)와 interface된 quadrupole mass spectrometer로 발효 배기ガ스를 분석하였다. 5분마다 연속적으로 분석되는 질소, 산소, 이산화 탄소 및 수증기의 mole 백분율(%)로부터 산소 소비속도(OUR)와 이산화 탄소 발생속도(CER)를 on-line으로 계산하였다. 미리 실험 결과치로

부터 결정한 maintenance와 수율 상수들( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $m$  및  $Y$ )값을 이용하여 세포농도와 기질인 포도당의 농도를 on-line으로 간접추정하였다. 간접추정된 값들은 실험적으로 측정한 세포농도 및 기질농도와 잘 일치함을 알 수 있었다.

### 사용 기호

CER: Carbon dioxide evolution rate (mol CO<sub>2</sub>/l-hr)  
 $F_N$  : Molal flow rate of inert(N<sub>2</sub>) gas (mol / min)  
 $k_1$  : Maintenance coefficient (mol O<sub>2</sub> / g-cell·hr or mol CO<sub>2</sub> / g-cell·hr)  
 $k_2$  : Yield coefficient (mol O<sub>2</sub> / g-cell or mol CO<sub>2</sub> / g-cell)  
 $m$  : Maintenance energy (g-glucose / g-cell·hr)  
 $P_{c,in}$ ,  $P_{c,out}$ : Partial pressure of carbon dioxide in inlet and outlet gas  
 $P_{o,in}$ ,  $P_{o,out}$ : Partial pressure of oxygen in inlet and outlet gas  
 $P_{w,in}$ ,  $P_{w,out}$ : Partial pressure of water vapor in inlet and outlet gas  
 $P_t$  : Total pressure  
OUR: Oxygen uptake rate (mol O<sub>2</sub> / l-hr)  
 $q_{CO_2}$ : Specific carbon dioxide evolution rate (mol CO<sub>2</sub> / g-cell·hr)  
 $q_{O_2}$ : Specific oxygen uptake rate (mol O<sub>2</sub>/g-cell·hr)  
 $q_s$  : Specific consumption rate of glucose (g-glucose/g-cell·hr)  
 $r(t)$  : OUR 또는 CER  
 $S_0$  : Initial glucose concentration (g / liter)  
 $S(t)$  : Residual glucose concentration (g / liter)  
 $t$  : Culture time (hr)  
 $V$  : Liquid volume in fermentor (liter)  
 $X_0$  : Initial cell concentration (g / liter)  
 $X(t)$  : Cell concentration (g / liter)  
 $Y$  : Cellul yield coefficient (g-cell / g-glucose)  
 $\mu$  : Specific growth rate (hr<sup>-1</sup>)  
 $\mu_{max}$ : Maximum specific growth rate (hr<sup>-1</sup>)

### 참 고 문 헌

- D.W. Zabriskie. and A.E. Hunphrey(1978), *J. AIChE*, **24**, 138
- L.E. Erickson(1978), *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No 9, 49
- H.Y. Wang, C.L. Cooney and D.I.C.Wang(1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 975
- A.A. Esener, J.A. Roels and N.W.F. Kossen(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1851
- D.G. Mou and C.L. Cooney(1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 225
- K.Y. San and G. Stephanopoulos(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1189
- W.T. Wu, K.C. Chen and H.W. Chiou(1985), *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 756
- H.Y. Wang., C.L. Cooney and D.I.C. Wang(1978), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 9, 13
- B.C. Buckland and H. Fastert(1982), *Computer Application in Fermentation Technology*, Society Chemical Industry, London, p 119
- S.J. Coppella, and P. Dhurjati(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 679
- E. Pungor Jr., C.R. Perley, C.L. Cooney and J.C. Weaver(1980), *Biotechnol. Lett.*, **2**, 409
- P. Doerner., J. Lehmann, H. Piehl and R. Megnet(1983), *Biotechnol. Lett.*, **4**, 557
- D. Lloyd, R.I. Scott and T.N. Williams(1983), *Trends Biotechnol.*, **1**, 60
- B.C. Buckland., T. Brix, H. Fastert, K. Gbewonyo, G. Hunt and D. Jain(1985), *BioTechnology*, **3**, 984
- E. Heinzle(1987), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **35**, 1
- J.P. Camelbeek., D.M. Comberbach, J. Goosens and P. Roelants(1988), *Biotechnol. Tech.*, **2**, 183
- S.W. Nam, C.S. Choi and J.H. Kim(1989) *Korean J. Applied Microbiol. Bioeng.* **17**, 241
- C.L. Cooney, H.Y. Wang and D.I.C. Wang(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 55
- J.H. Kim, M. Hosobuchi, M. Kishimoto, T. Seki, T. Yoshida, H. Taguchi and D.D.Y. Ryu(1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1445

(Received June 19, 1989)