

세포와 포도당 농도의 자동측정

김재형·이기영·임광택
전남대학교 공업화학과

Automatic Measurement of Cell and Glucose Concentration

Jae-Hyung Kim, Ki-Young Lee and Kwang-Taek Im
Dept. of Chemical Technology, Chonnam National University

ABSTRACT

In on-line measurement, there were two difficult problems to remove the biomass in the sample and to prevent the contamination at the sampling. In this study, the problem of the contamination at the sampling was solved by using the sampling device consisting of sterilizable sampling line, peristaltic pump and three-way valve. The glucose concentration was measured by glucose calibration equation without removing the biomass. Xanthan fermentation was performed satisfactorily using this automatic analyzing device.

서론

포도당은 가장 일반적인 탄소원임과 동시에 유가식이나 연속식 발효공정에서 세포농도와 함께 발효공정의 제어와 최적화를 위해 측정되어야 할 중요 공정변수이다(1-4). 그러나 현재의 기술로는 DO, pH, 온도와 같이 발효조에 설치되어 세포농도나 포도당 농도를 on-line 상태로 측정할 수 있는 sensor의 개발이 미흡하기 때문에 세포농도의 경우는 gas chromatography, mass spectrometer, CO₂ 분석기, O₂ 분석기 등을 이용하여 배출가스의 농도와 물질 수지식으로 부터 추정하기도하는데(5) 장치가 복잡해지고 정확성이 떨어진다. 그리고 포도당 농도의 경우는 효소 전극, liquid chromatography, 포도당 분석기를 사용하고 있는데(6) 효소전극은 멸균하여 사용할 때 안정성, 정확도에 문제점이 있으며 liquid chromatography, 포도당 분석기를 자동분석기에 연결시켜 사용할 때는 장치의 복잡성과 운영비때문에 실험실에서나 산업체에서 사용하기 곤란하므로 본 연구에서는 cds(CdS)로 구성된 photosensor를 이용하여 세포농도와 포도당 농도 측정이 가능한 장치를 제작한 후 personal computer와 연결시켰다. 그리고 이 장치를 *Xanthomonas campe-*

stris 로 균주가 xanthan gum을 생산하는 xanthan 발효조에 연결시켜 본 장치의 유용도를 확인하였다.

재료 및 방법

미생물

본 실험에 사용된 균주는 *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 이다.

균주보관 및 기질용액

균주는 YM agar 사멸배지 상태로 4°C 냉장고에 보관하여 사용하였고 전배양배지의 조성은 glucose 10g/l, peptone 5g/l, yeast extract 3g/l 이며 발효배지는 glucose 20g/l, peptone 2.5g/l, K₂HPO₄ 5g/l, sodium L-Glutamate 2.5g/l, MgSO₄ 0.6g/l이고 발효조건은 28°C, 1 vvm, 500 rpm, pH 7.0이었다.

실험장치

회분식과 유가식 실험에 사용된 장치는 Fig.1과 같으며 발효조의 크기는 직경 25cm, 높이 40cm이고 임펠러는 single stage screw type를 사용하였다.

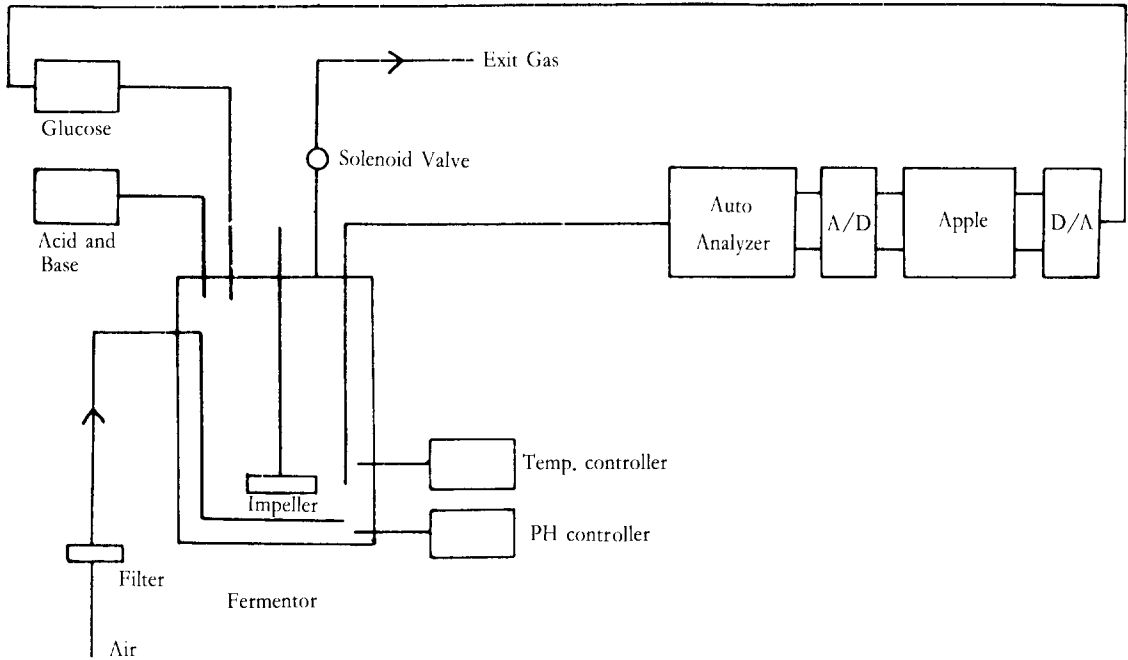


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental apparatus.

세포 및 포도당 자동 분석기

Fig. 2 는 자동 시료채취기와 자동 측정장치이다. 시료 채취는 발효조내에서 peristaltic pump에 의해 발효액을 연속 순환시키며 시료 채취시간때에 three way valve (10)에 부착된 solenoid valve에 의해 시료를 채취하게 되며, 이때 three way valve 윗 쪽에서 여과된 압축공기가 공급되고 시료 채취선은 고온 증기로 멸균된다. 시료 채취시간에 발효조안으로 유입된 시료 10ml는 solenoid valve(11)를 통해 반응조내로 유입된 증류수 90ml와 충분히 혼합된 후 10ml를 제한 90ml가 분광광도계(7)로 내려가 세포 농도측정에 사용된다. 반응조내에 남아있는 시료 10ml와 solenoid valve(12)를 통해 반응조로 들어온 DNS 시약 10ml는 가열기(16)에 의해 반응하고 반응이 끝나면 증류수 80ml를 반응조내로 유입시킨다음 냉각과 혼합을 시킨다. 혼합이 종료되면 반응조내에 있는 모든 용액을 분광광도계로 보내 흡광도를 측정하는데 이 값이 포도당 농도이다. 이상의 모든 과정은 timer, 전기 스위치, 수위계 등을 사용하여 analog로 제어한다. 그리고 포도당 농도 측정시 세포가 측정값에 영향을 미치므로 원심분리나 여과에 의해 먼저 세포를 제거한 다음 포도당 농도를 측정하여야 하나 본 연구에서는 먼저 측정된 세포농도를 감안하여 포도당 농도를 구했는데 그 보정식은 다음과

같다.

$$C(Gt) = C \left[g_t + \frac{g_o + c_o}{2} - ct \right]$$

분광광도계

Fig.3은 본실험에 사용된 분광광도계의 구조로서 분광 광도계의 파장은 540nm로 고정시켜 사용하였으며 채용된 photosensor는 cds이다. cds는 Table 1에서 볼 수 있듯이 응답시간과 hysteresis 에서는 다른 photosensor에 비해 성능이 떨어지지만 본 연구 실험에는 그것이 별로 문제가 되지 않으므로 장치의 단순성과 비용문제를 고려하여 선정하였다.

computer와 interface

본 실험에 사용된 personal computer는 apple 기종이고 A/D converter와 D/A converter는 제작하여 사용하였고, 회로도 는 Fig. 4와 같다.

세포농도용 표준시료의 준비

원심분리기와 진공진조기를 이용하여 건조세포를 만든 다음 적당량의 증류수를 가하여 0.5-4.0 g / l의 표준시료를 제조하였다.

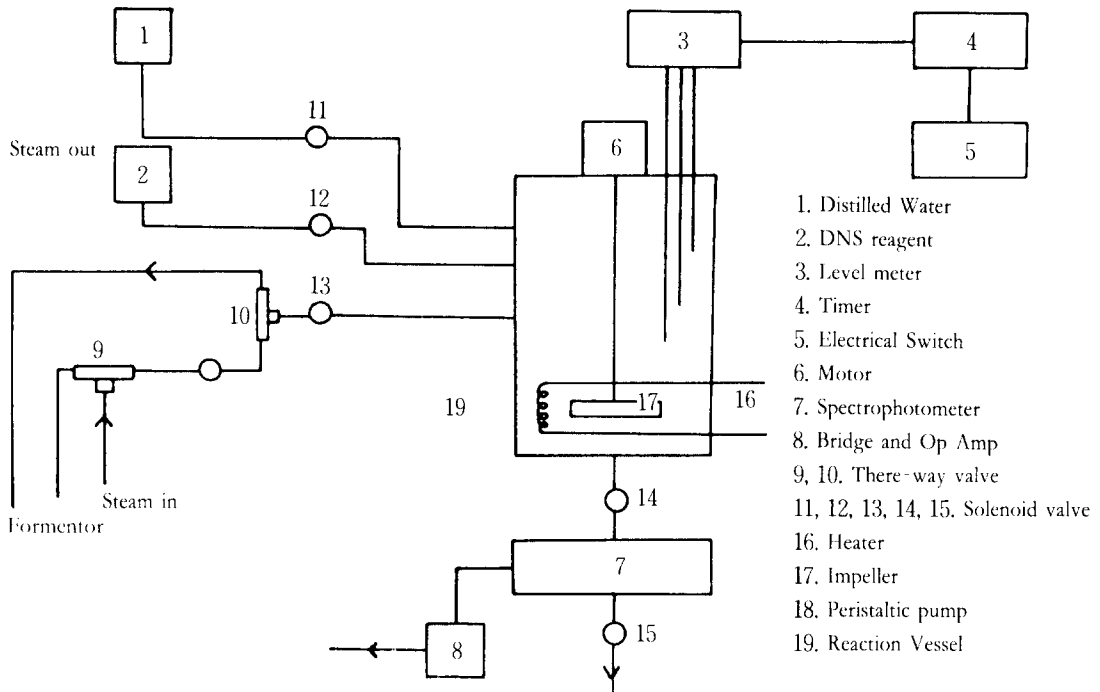


Fig. 2. Schematic diagram of the auto analyzer.

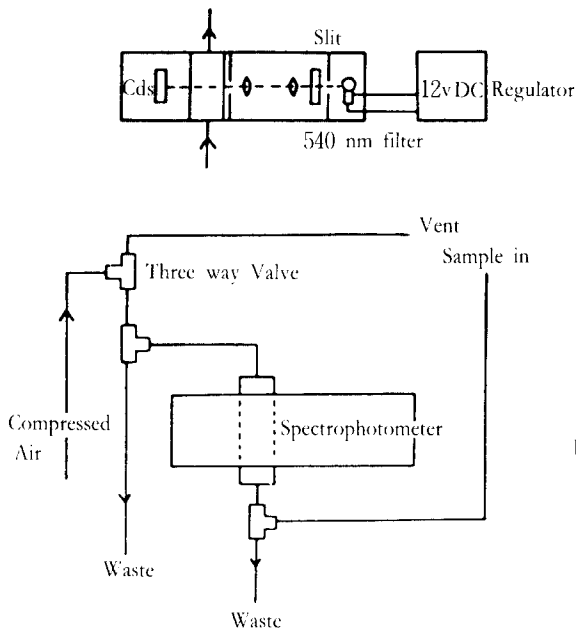


Fig. 3. Schematic diagram of spectrometer.

포도당 농도용 표준시료의 준비

중류수 100ml에 포도당 적당량을 용해시켜 5.30 g / l 의 표준시료를 제조하였다.

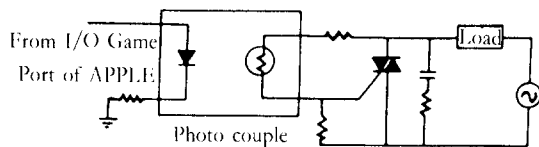
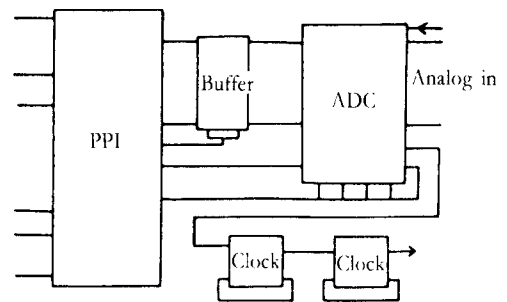


Fig. 4. The circuit of the A / D and D / A converter.

결과 및 고찰

Table 1. The properties of the photo sensors

| | response time | stability | hysteresis | reliability |
|-------------|---------------|-----------|------------|-------------|
| photo tube | ○ | ○ | ○ | ○ |
| photo diode | ○ | ○ | | ○ |
| photo TR | ○ | ○ | | ○ |
| cds | | ○ | | ○ |

세포농도와 포도당 농도에 대한 표준곡선

Fig. 5는 세포농도에 대한 표준곡선이고 Fig. 6는 포도당 농도에 대한 표준곡선으로 두가지 모두 실제 발효조건에서 전압과 선형관계에 있음을 알 수 있었다. Fig. 7은 세포가 들어있는 시료를 자동분석기로 측정하여 포도당 농도 보정식에 넣어 구한 보정곡선과 세포가 존재하지 않는 포도당 표준시료를 자동분석기로 측정한 표준곡선을 보여주는데 포도당농도가 5 g / l 이하인 저농도에서는 포도당 농도에 대한 표준곡선과 보정곡선이 거의 일치하였지만 그 이상에서는 약간의 차이를 보였다.

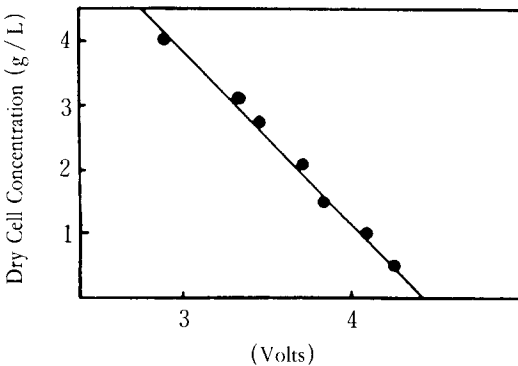


Fig. 5. Standard curve of the dry cell concentration.

회분식 발효

탄소원이 20 g / l인 조건으로 5l의 발효배지를 만들어 발효실험을 수행하였다. Fig. 8은 자동분석기로 측정된 세포농도와 전통적인 세포 건조법으로 얻은 세포농도이고, Fig. 9는 자동분석기로 측정된 포도당 농도와 전통적인 DNS법으로 구한 포도당 농도이다. 두 경우 모두 발효초기와 말기에는 자동분석기로의 측정치와 전통적

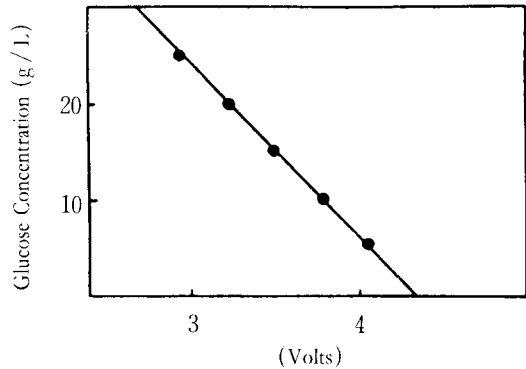


Fig. 6. Standard curve of the glucose concentration.

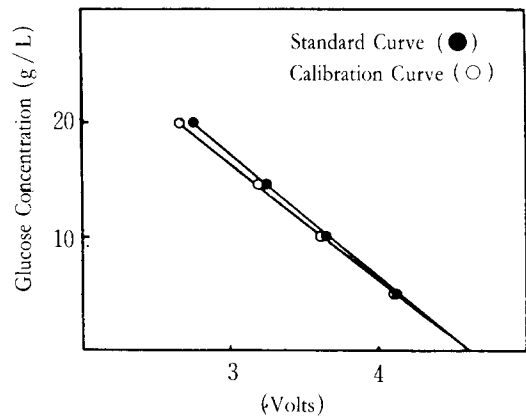


Fig. 7. Comparison of the standard curve and calibration curve for the glucose concentration.

방법으로의 분석치가 거의 일치하였으나 중반부분에는 약간의 오차를 보였다. 이는 발효중기에 거품이 많이

발생하여 정확한 시료 채취 분석이 되지 못했기 때문인 것으로 생각된다.

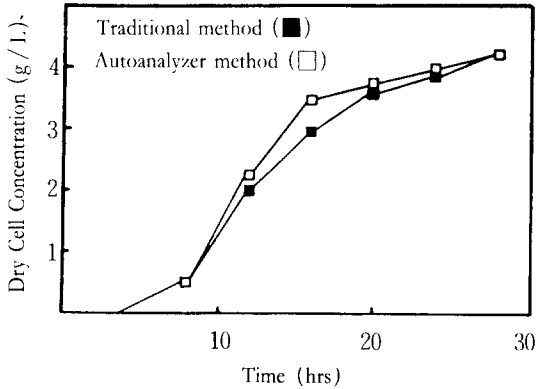


Fig. 8. Comparison of autoanalyzer method and traditional method for the cell concentration.

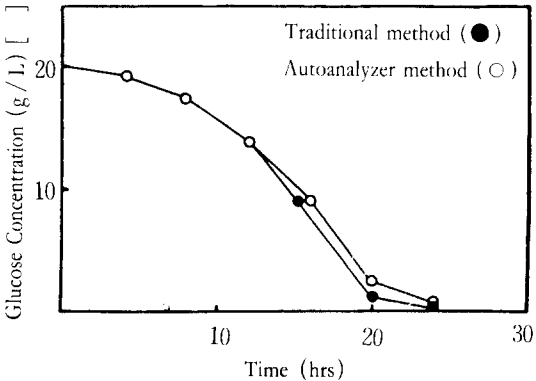


Fig. 9. Comparison of autoanalyzer method and traditional method for the glucose concentration measurement.

유가식 발효

Fig. 10은 초기 포도당 농도 20 g/l로 회분식 배양을 하여 포도당이 거의 고갈되었을 때 멸균된 농축 포도당 용액 적당량을 급액시켜 발효조내의 포도당 농도를 5 g/l로 높여 얻은 유가식 발효실험 결과이다. 발효 개시 20시간때 자동분석기로 측정된 포도당농도가 1 g/l였으므로 500 g/l의 포도당용액을 20ml/min의 유속으로 급액시켜 발효조내의 포도당 농도를 5 g/l로 높인 후 발효실험을 계속하였더니 10시간 후에 포도당이 전부 소모되었고 이때의 세포농도는 4.2 g/l였다.

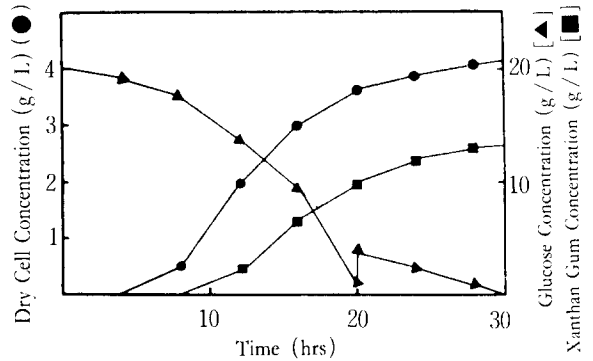


Fig. 10. Profile of the fed batch fermentation

요 약

자동시료 채취기를 사용할 때는 시료 채취시의 오염분제가 있는데 본 장치에서는 이 분제를 피할 수 있었고 분광광도법을 이용하여 발효액속의 포도당 농도를 측정할 때는 원심분리나 여과조작을 통해 시료속에 포함된 세포를 제거해야하는데, 본 연구에서는 세포를 제거하지 않고 포도당 농도 보정식을 사용하여 발효액속의 포도당 농도를 정확히 추정할 수 있었다.

사용기호

- co : voltage reading of cell free solution (v).
- ct : voltage reading related to biomass concentration in the fermentation broth (v).
- go : voltage reading of glucose free solution (v).
- gt : voltage reading of fermentation broth (v).
- Gt : calibrated voltage reading of fermentation broth (v).

참 고 문 헌

1. H. Y. Wang (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 729.
2. D. C. Thomas and J. W. Cagney (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 729.
3. R. C. Dinwoodie and D. W. Mehnert (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1060.
4. C.H. Bailey (1987), *Biochemical Engineering*, 1st ed., 132.
5. 남수환 외 2인 (1989), *한국산업미생물학회지.*, **17**, 3 241.

6. C.H. Bailey (1987), *Biochemical Engineering*, 1st ed., 157.

(Received February 10, 1990)