

## 발효조의 냉각률 연속 측정 및 이를 이용한 유가배양제어

† 허 원 · 홍 건 표  
강원대학교 바이오산업공학부  
(접수 : 2003. 8. 11. 게재승인 : 2003. 10. 26.)

### On-line Measurement of Cooling Rate of a Fermenter and its Application for Fed-batch Control

Won Hur† and Keun-Pyo Hong  
School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701  
(Received : 2003. 8. 11. Accepted : 2003. 10. 26.)

A laboratory jar fermenter was modified to measure the duration for cooling water supply and the temperatures of the coolant at the inlet and outlet of water jacket. Successful operation of temperature control and on-line measurement was achieved by adjusting optimum parameters of the Proportion-Integral-Derivative temperature controller. The variables measured on-line were used to estimate cooling rates from empirical equations comprised of the time period of cooling water supply and the temperatures of coolant. The measured cooling rate showed a good correlation to the specific growth rate during batch cultivation of *E. coli*. Cooling rate was measured and applied to programmed cell growth in a fed-batch cultivations. Three fed-batch cultivations were demonstrated by feeding substrate to follow the programmed cooling rates increasing exponentially.

**Key Words** : Calorimeter, metabolic heat, cooling rate, fed-batch

#### 서 론

모든 생명체에는 생명현상이 유지되는 한 예외 없이 대사열이 발생된다(1) 대사열의 발생은 대사 경로의 종류, 균체량 및 기질의 종류 및 그 소모 속도에 따라 다르며 대사열을 측정하면 미생물의 대사 속도 및 균체량, 이차 대사산물의 생산 등에 대한 정보를 얻을 수 있다(2, 3). 따라서 대사열의 측정은 미생물 대사활동을 분석하는 수단으로 사용되어왔다. 미생물의 배양이 가능한 열량계를 사용하여 이론적으로 알려져 있는 *Yeast*와 *Zymomonas*의 에탄올 발효과정에서의 열에너지의 발생량을 실험적으로 측정하고 확인하였다(4). 호기적 배양의 대사열의 발생(5), 다른 기질을 사용하여 배양하는 경우 대사열의 변화(6, 7) 및 연속배양시 대사열의 측정을 통한 *Klebsiela*의 유지에너지 (maintenance energy) 측정 등의 미생물의 배양과 대사열의 발생과의 관계를 밝히는 이론적이 연구가 주로 보고되었다(8). 이외에도 여러 종류의 기질에 대한

열량 발생을 측정하여 유산균의 분류 및 동정에 대한 연구에도 활용된 것으로 보고되어 있다(9).

세포의 대사활동을 직접적으로 나타내는 대사열의 측정은 미생물이나 세포를 배양하는 공정에도 활용되어 공정 변수의 하나로 사용되고있다. 온라인으로 대사열을 연속 측정하여 발효공정을 관찰하는 방법(10), 대사 열량을 측정하여 균체의 농도를 추정하는 방법(11) 및 발효공정을 상태를 추정하고 판단하는 연구(12)들도 보고되었다. 뿐만 아니라 대사속도가 낮아 대사열의 발생량이 매우 적은 동물세포 배양에도 미세 열량계를 사용하여 대사열의 발생량을 측정하고 공정을 모니터링 할 수 있다고 보고되고 있다(13). 이와 같은 연구결과 들은 대사열의 온라인 측정을 통하여 공정의 모니터링 및 발효공정의 제어에 활용할 수 있음을 증명하고 있다. 따라서 물리적인 공정 변수인 대사열은 세포 배양시 세포의 생물학적인 상태를 나타내는 유용한 수단이며 이를 이용하여 세포의 상태를 모니터링하고 제어하는데 활용할 수 있다(14). 특히 유가 배양 발효공정에 있어 기질의 소비속도는 세포의 양 뿐 아니라 세포의 활성에 의하여 결정되므로 대사열을 측정하여 기질의 첨가 속도를 제어하는 것이 유리할 것으로 예상할 수 있다. Randolph(15)의 연구에서는 2차 대사산물의 생산시 대사열을 온라인으로 측정하여 유가배양을 시도하여 생산성을 향상시켰다. 최근 Voisard(16)의 연구에서는 300 L 규모의 발

† Corresponding Author : School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon 200-701, Korea  
Tel : +82-33-250-6257, Fax : +82-33-243-6350  
E-mail : wonhur@kangwon.ac.kr

효조에서 열량의 출입을 모니터링하여 대사열량의 측정신호에 비례하여 유가배양을 실시하여 대규모의 발효조에서도 열량의 측정이 용이하고 온라인으로 측정된 대사열량 신호를 유가배양에 활용할 있음을 보고하였다.

기존의 연구는 대부분 고가의 정밀한 열량계의 사용을 필요로 하고 있으나 본 연구에서는 발효조의 온도조절 장치를 이용하여 냉각량을 추정하는 방법을 고안하여 간단하게 열량의 변화를 온라인으로 측정할 수 있는 장치를 구현하였다. 먼저 발효조의 운전시 냉각수의 소비량과 냉각수의 유출입 지점의 온도를 온라인으로 측정할 수 있도록 구성하고 냉각량을 추정할 수 있는 실험식을 활용하여 냉각량을 추정하였다. 그리고 온라인으로 측정된 냉각량의 공정제어 변수로 사용될 수 있음을 보이기 위하여 미리 정해진 냉각량 증가에 맞추어 대사열이 발생하도록 유가배양제어를 실시하였다.

**재료 및 방법**

**냉각량의 측정 방법**

상부교반 방식의 5 L 실험용 발효조 (KBT Co. Ltd., Korea)를 냉각량을 측정할 수 있도록 Fig. 1과 같이 개조하였다. 발효조 하부의 가열체를 제거하고 50 W의 카트리지 형태의 가열체 (Φ13 mm x 250 mm)를 제작하여 배양액에 잠기도록 설치하고 지속적으로 가열되도록 하였다. 동시에 배양액의 온도가 설정온도보다 높아지면 온도조절장치에 의해 냉각수가 공급되어 배양액의 온도가 조절될 수 있도록 온도조절장치를 개조하였다. 냉각수의 유속을 일정하게 하기 위하여 수조를 설치하고 수위조절 스위치와 솔레노이드 밸브를 사용하여 항상 일정수압의 냉각수가 발효조로 공급되도록 하였다. 냉각수의 온도를 측정하기 위하여 발효조 하단의 냉각재킷의 유입부분과 유출부분에 온도 센서를 부착하였다. 온도 센서는 측온저항계의 한 종류인 pt100 소자를 응답시간을 최소화하기 위하여 에폭시 코팅한 후 냉각수에 직접 접촉하도록 냉각수 공급관에 T자관에 연결하고 삽입하여 냉각수의 온도 측정하였다. 동시에 발효조의 하단의 금속판을 통한 열 전달을 줄이기 위하여 받침판을 두께 1 cm의 테프론 판으로 교체하였다.

데이터 수집장치로는 Pentium 90 MHz 컴퓨터와 A/D convertor (PCL-818L, Advantech, USA)가 사용되었다. 측온저항계로부터 출력되는 신호는 pt-100용 트랜스듀스를 사용하여 4-20 mA의 전기신호로 변환되어 12bit의 해상도를 가지는 A/D convertor에 의하여 측정되었다. 동시에 냉각수를 공급하는 솔레노이드 밸브의 개폐시점을 측정하는 I/O 모듈을 사용하여 냉각수의 공급시간의 길이를 측정하였다. 실시간으로 냉각수의 공급량을 계산하고 냉각수의 온도로부터 냉각량을 계산하여 표시할 수 있는 소프트웨어를 작성하였다. 소프트웨어는 LabVIEW(National Instruments, USA)를 이용하여 제작하였으며 여러 온도 센서로부터 수집한 데이터를 분석하고 발효조의 대사열량을 계산하고 컴퓨터 화면으로 모니터링할 수 있도록 제작하였다. 온도센서로부터 측정되는 수치는 발효조 내부, 냉각수의 유출입 부분 및 외기 온도와외 보정을 위한 발효조 밖의 온도가 측정되며 이를 이용하여 대사열 측

정에 사용된다. 온도센서로부터 수집되는 데이터는 일정한 응답시간 (response time)을 갖고 있으므로 전달함수를 사용하여 실제 온도 값에 근접하도록 정확성을 높였다(17).

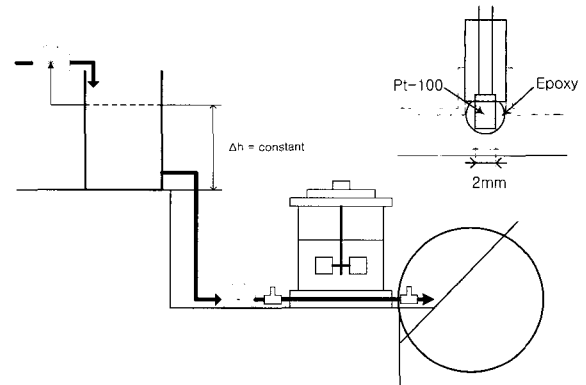


Figure 1. Schematic diagram of the cooling water supply system.

**균주 및 배지**

균주는 Coli Genetic Stock Center (CGSC, Yale USA)로부터 분양 받은 야생주 *Escherichia coli* K12 (ATCC10798)를 사용하였다. 균주의 보관 및 유지에는 LB medium(18)을 사용하였다.

**배양 및 분석**

*E. coli*는 한천 배지에 보존하였던 균주를 백금이로 배지 100ml를 함유한 250 ml 삼각 flask에 접종하고, 37℃에서 12 시간 진탕 배양하여 종균 배양액으로 사용하였다. 배지 3 L를 포함한 5 L 발효조에 종균배양액을 3 % (v/v) 접종한 후, 37℃에서 200 rpm으로 12시간 배양하면서 시료를 채취하여 실험하였다. 유가배양에서는 배양온도 30℃, 교반속도 500 rpm, 1 vvm 공기공급으로 배양하였고 배지는 Glycerol 1 g/L, Yeast extract 0.5 g/L, Tryptone 1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/L를 사용하였다. 유가배양용 공급기질로는 초기배지의 100배 농축된 배지를 사용하였다.

균체의 건조 중량과 680 nm에서 흡광도를 측정하여 균체의 건조중량과 OD<sub>680</sub>과의 관계식 구하고 배양시 균체의 양은 OD<sub>680</sub>을 측정하여 환산하였다. 배양액 중의 포도당 농도는 배양액을 6000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 얻은 상등액을 DNS법과 glucose kit (Sigma, 510-A)로 측정하였다.

**유가배양 방법**

발효조의 온도가 일정하게 유지되는 조건에서 온라인으로 측정되는 냉각량은 미생물의 성장시 발생하는 대사열량과 같다. 따라서 세포가 대수증식기 처럼 자라는 것과 같이 냉각량이 지수적으로 증가하도록 유가배양제어를 하기 위하여 냉각량의 지수적으로 증가하는 목표 냉각량 함수 ( $Q_p$ )를 설정하였다. 배양초기는 회분 배양과 같이 진행시키고 일정시간이 지난 후부터 냉각량을 측정하여  $Q_p$ 보다 적으면 기질을 공급속도를 증가시키고 반대의 경우에는 기질의 공급속도의 변화를 주지 않는 방법으로 유가배양제어를 실시하였다.

$$Q_p = Q_{p0} \cdot e^{\gamma \cdot t}$$

여기서  $Q_p$ 는 조절을 원하는 목표 냉각량이고  $Q_{p0}$ 는 초기 냉각량을 나타내며  $\gamma$ 는 비증가 계수이며  $t$ 는 시간이다. 미생 물이 지수적으로 증가할 때의 비증식속도에 해당하는  $\gamma$ 값을 미리 결정하여 목표 냉각량 값을 1분 간격으로 계산하고 온라인으로 측정된 지난 15분간의 평균 냉각량과 비교하여 기질의 공급속도의 증감을 결정할 수 있도록 LabView로 프로그램 하였다.

**결과 및 고찰**

**냉각량의 측정**

발효조의 온도가 자동 조절되는 동안 냉각수의 유출입 지점의 각각의 온도의 변화를 측정하고 냉각수의 ON/OFF 제어신호와 함께 나타내었다(Fig. 2). 발효조의 온도 조절은 일정시간 동안 ( $\Delta t_{pulse}$ ) 반복하여 냉각수의 공급이 ON/OFF 되는데 ON 과 OFF의 시간의 비를 조절하여 온도를 일정하게 유지되도록 제어되고 있다. 냉각수가 공급되는 동안 ( $\Delta t_{on}$ )은 냉각수 유입부의 온도는 처음에는 급격하게 감소한 후 다소 완만하게 감소하였다. 그리고 냉각수의 공급이 중단되는 동안 ( $\Delta t_{off}$ ) 서서히 증가하였다. 반면 유출부의 온도는 급격하게 증가한 후 지속적으로 감소한다. 냉각수 유입부의 온도는 차가운 냉각수가 유입되므로 온도가 낮아지며 냉각수의 흐름이 중단되면 주변의 열을 흡수하여 서서히 온도가 상승한다. 유출부의 급격한 온도의 상승은 발효조의 냉각 재킷에서 데워진 냉각수가 나오기 때문이며 이후 차가운 냉각수가 계속 유입되기 때문에 온도가 다시 감소하게 된다.

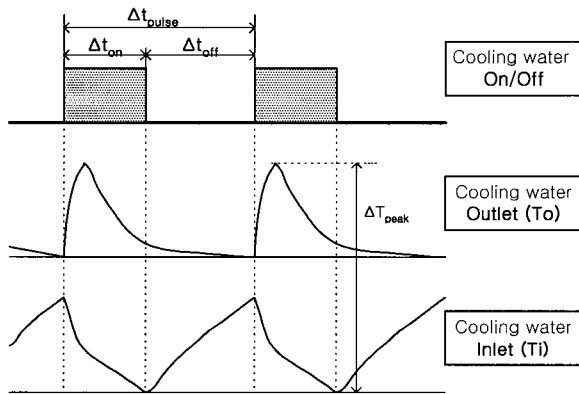


Figure 2. Profiles of temperature of cooling water at inlet and outlet.

냉각량은 냉각수의 유속에 해당하는 ON/OFF 시간의 비와 유출입지점의 냉각수의 온도의 log mean temperature difference (LMTD) 및 냉각수의 온도 증가 등의 몇 가지 방법으로 계산할 수 있다. 그러나 온도조절장치에 의하여 ON/OFF 방식으로 제어되어 냉각수가 단속적으로 흐르기 때문에 냉각수가 흐르지 않는 동안에도 실제적으로 냉각이 일어나 LMTD를 사용할 경우에는 비교적 오차가 많이 발생하였다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 냉각수가 흐를 때는 냉

각시간과 온도 변화량을 계산하고 냉각수가 흐르지 않을 때는 냉각 재킷에 있는 냉각수가 발효조에 빼앗기는 열량을 계산할 수 있는 몇 가지 실험식을 고안하였다.

따라서 냉각수가 흐를 때 발생하는 발효조의 냉각량과 흐르지 않을 때의 냉각량을 분리하여 식을 계산하였다. 냉각수가 공급되는 동안의 냉각량을  $Q_{c1}$ 이라고 하고 냉각수가 공급이 중단된 동안의 냉각량을  $Q_{c2}$ 라고 하면 각각의 냉각량은 다음과 같이 정하였다.

$$Q_{c1} = u_1 \cdot (T_o - T_i) \cdot \frac{\Delta t_{on}}{\Delta t_{pulse}}$$

$$Q_{c2} = u_2 \cdot (T_f - T_i) \cdot (1 - e^{-\Delta t_{off}/\tau})$$

즉 냉각수가 공급되고 있는 동안의 냉각량은 유출입 지점의 냉각수의 온도차 ( $T_o - T_i$ )에 냉각수가 공급되는 시간의 비 ( $\Delta t_{on}/\Delta t_{pulse}$ )를 곱하고 여기에 비례상수  $u_1$ 를 사용하여 나타내었다. 냉각수의 공급이 중단된 동안은 발효조의 냉각 재킷에 체류하고 있는 냉각수와 발효조의 온도 ( $T_f$ )차가 냉각량을 결정되므로 비례하여 냉각이 되며 재킷 속의 냉각수의 온도가  $T_i$ 에 가까워지면 열전달이 감소하므로 시계수  $\tau$ 를 도입하여  $(1 - e^{-\Delta t_{off}/\tau})$ 의 비율로 열전달이 감소한다고 가정하였다. 따라서 냉각수량을 계산하는 식은 다음과 같다.

$$Q_c = u_1 \cdot (T_o - T_i) \cdot \frac{\Delta t_{on}}{\Delta t_{pulse}} + u_2 \cdot (T_f - T_i) \cdot (1 - e^{-\Delta t_{off}/\tau})$$

이와 같이 냉각량을 측정하는 식을 구성하여 발효조에서 카트리지 히터를 이용한 열량을 가변적으로 공급하여 장시간 동안 냉각량을 측정하였을 때 가장 오차가 적은 비례상수  $u_1, u_2$  및  $\tau$ 를 결정하였다.

여러 가지 실험식에 대하여 최적화된 비례상수가 결정된 후 장시간 냉각량을 측정하였을 때의 최대 오차를 Table 1에 나타내었다. 전술한 방법을 사용하였을 때 가장 오차가 적었고 장시간 안정적으로 냉각량을 측정할 수 있었다.

Table 1. Various empirical formula for cooling rate estimation

Cooling rate (Qc=)	Drift (24hr)	Remark
$\Sigma(u \cdot LMTD \cdot \Delta t_{on})$	15%	LMTD during cooling supply
$\Sigma(u_1 \cdot LMTD_{on} \cdot \Delta t_{on} + u_2 \cdot LMTD_{off} \cdot \Delta t_{off})$	high	LMTD during cooling ON and OFF with different rate
$\Sigma(u_1 \cdot LMTD_{on} \cdot \Delta t_{on} + u_2 \cdot \Delta t_{pulse})$	high	LMTD during cooling with constant cooling
$\Sigma(u_1 \cdot \Delta T_{peak} \cdot \Delta t_{on} + u_2 \cdot \Delta t_{pulse})$	16%	$\Delta T_{peak}$ : temperature difference of cooling water
$rC = \frac{\Delta t_{on}}{\Delta t_{pulse}} \cdot (T_f - T_i) + u_1 \cdot (1 - \frac{\Delta t_{on}}{\Delta t_{pulse}}) \cdot (T_f - T_i) + u_2 \cdot (T_o - T_i)$	14%	rC : relative rate of cooling
$u_1 \cdot (T_o - T_i) \cdot \frac{\Delta t_{on}}{\Delta t_{pulse}} + u_2 \cdot (T_f - T_i) \cdot (1 - e^{-\Delta t_{off}/\tau})$	11%	Temperature difference between inlet and outlet, jacket warming

**E. coli K12의 회분 배양과 냉각량 측정**

전술한 방법으로 냉각량을 측정할 수 있도록 개발된 발효조를 이용하여 *E. coli* K12를 회분 배양하고 냉각량을 온라인으로 측정하였다. 배양온도는 30 °C 에서 교반속도는 500 rpm, 통기량은 1 vvm을 유지하며 배양하였다(Fig. 3). 최대 균체량은 배양 20시간에서 5.4 g/L을 나타내었고 균체의 성장과 함께 대사열의 발생이 증가하였다. 냉각량으로 환산한 대사열의 발생은 최고 35 kJ/hr이었다. 대사열은 대수증식기 초반에는 급격히 증가하다가 대수증식기 후반부에서는 대사열의 감소가 시작되는 것을 볼 수 있다. 그러나 대사열의 감소하여도 균체량은 조금씩 증가하였다.

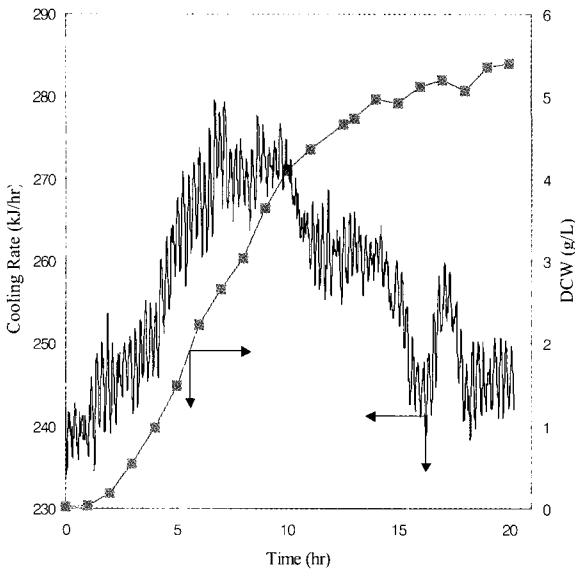


Figure 3. Measurement of cooling rate during batch culture of *E. coli*.

균체의 성장곡선으로부터 비증식속도를 계산하고 여기에 균체의 양을 곱한 값을 냉각량과 비교하였다(Fig. 4). 미생물의 성장시 발생하는 대사열에 해당하는 냉각량은 미생물을 접종하기전의 냉각량인 245 kJ/hr을 기준으로 비증식속도와 균체량의 곱과 대체적인 비례관계가 성립함을 보여주고 있으며 Nagai(2) 및 Birou(5)의 보고와 일치하고 있다. 결론적으로 회분 배양시 균체의 성장 속도가 늦어지기 시작하면 대사열의 발생이 급격하게 감소함을 확인할 수 있었다.

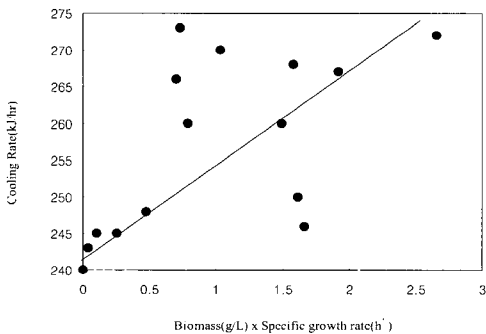


Figure 4. A positive correlation between cooling rate and the product of specific growth rate and biomass.

기질의 재공급하면 균체의 대사활동이 다시 증가하는 것을 보기 위하여 회분식으로 *E. coli* K12를 같은 방법으로 배양하고 냉각량을 측정하였다. 냉각량의 발생이 정체기에 들어서는 배양 후 6시간에 60 mL의 100배 농도의 유기배양용 기질을 공급하였고 또 10시간 이후부터 일정시간 간격으로 기질을 24 mL씩 공급하였다(Fig. 5). 배지의 양의 차이 및 교반속도의 차이로 인하여 냉각량의 초기 값은 194 kJ/hr에서 출발하여 계속 증가하다가 225 kJ/hr 값을 유지하였다. 회분 배양에서 볼 수 있었던 대사열의 감소는 발생하지 않았고 균체량도 13시간부터 다시 증가하였다. 따라서 이 실험을 통하여 기질의 재공급을 통하여 균체의 성장을 지속시킬 수 있음을 확인하였고 냉각량의 측정을 통하여 균체의 대사활동의 감소를 모니터링할 수 있음도 확인하였다.

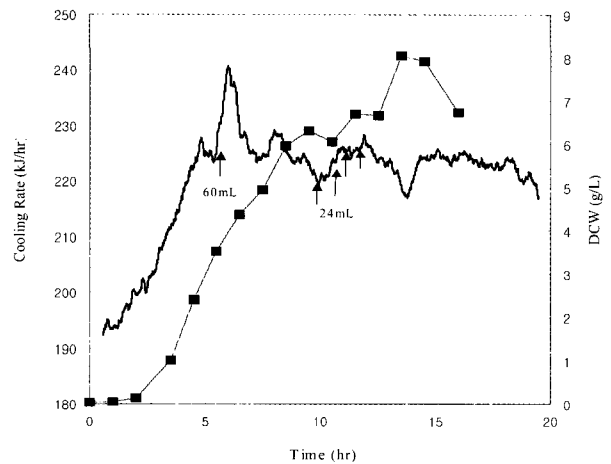


Figure 5. The effect on metabolic heat production by the supplemental substrate feeding at early stationary phase.

이것은 대사열이 균체성장을 반영하는 것을 나타내며 온라인으로 냉각량을 측정한다면 균체성장을 간접적으로 모니터링하는 것이므로, 냉각량의 발생을 일정하게 유지하거나 증가시키도록 기질을 공급을 제한한다면 유기배양에서 대사열을 공정변수로 이용할 수 있음을 나타내는 것이다. 따라서 유기배양에 앞서 냉각량 측정으로 균체의 유기배양에 적용할 수 있는가를 이 실험을 통하여 확인하였다.

**냉각량의 온라인 측정을 통한 유기배양제어**

냉각량을 온라인으로 측정하고 미리 프로그램된 냉각량의 증가에 맞추어 미생물이 성장하도록 제어된 유기배양을 실시하였다. 먼저 목표 냉각량이 0.2 h<sup>-1</sup>의 비증가속도 ( $\nu$ )로 지수적으로 증가하도록 설정하고 측정된 냉각량이 목표 냉각량 곡선을 따라가도록 유기배양을 실시하였다(Fig. 6). 초기의 회분식 배양에 이어 4시간부터 유기배양을 시작하였으며 14시간까지 목표 냉각량 곡선을 따라 냉각량이 증가하였다. 14시간 이후부터는 기질의 공급에 무관하게 대사열량은 더 이상 증가하지 않았으나 균체는 지속적으로 증가하였다. 산소의 공급의 부족으로 균체의 성장이 둔화된 것으로 판단되는 14시간 이전까지는 미리 결정된 냉각량 증가 곡선을 따라 유기배양제어가 성공적으로 진행되었음을 알 수 있다. 냉각량의

온라인 측정을 통하여 우리가 원하는 방식으로 제어 가능한 유가배양을 실시할 수 있음을 제시하고 있다. 균체의 성장속도를 낮추어 유가배양제어를 하기 위하여 냉각량의 비증가속도 ( $\gamma$ )를 각각  $0.25 \text{ h}^{-1}$  와  $0.15 \text{ h}^{-1}$ 로 설정하여 목표 냉각량 곡선을 결정하고 유가배양을 통하여 프로그램된 바와 같이 균체의 성장을 제어되는가를 확인하였다. 각각의 비증가속도에 따른 목표 냉각량 곡선과 유가배양제어에 따라 측정된 냉각량을 같이 Fig. 7에 나타내었다. 측정된 냉각량은 오차를 수반하기는 하지만 미리 프로그램된 냉각량 증가 곡선을 따라 증가함을 확인 할 수 있다. 이것은 냉각량의 측정을 통하여 유가배양제어가 성공적으로 진행되고 있음을 나타내며 우리가 원하는 방식으로 미생물의 대사속도 및 성장상태를 유가배양제어를 통하여 조절할 수 있음을 제시하고 있다.

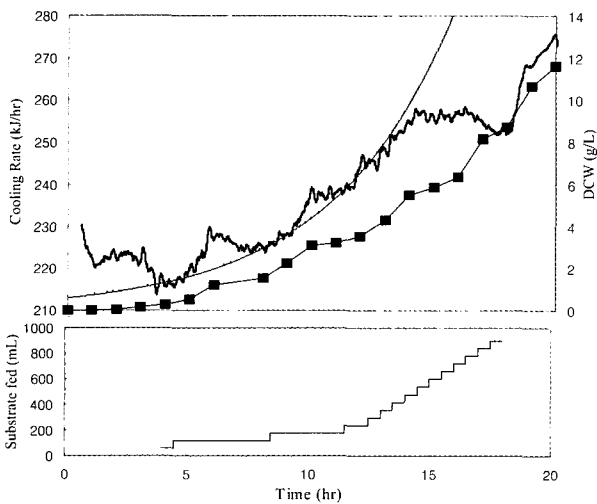


Figure 6. A fed-batch control experiment for cooling rate programmed to increase exponentially with fixed rate of  $\tau = 0.2 \text{ (hr}^{-1}\text{)}$ .

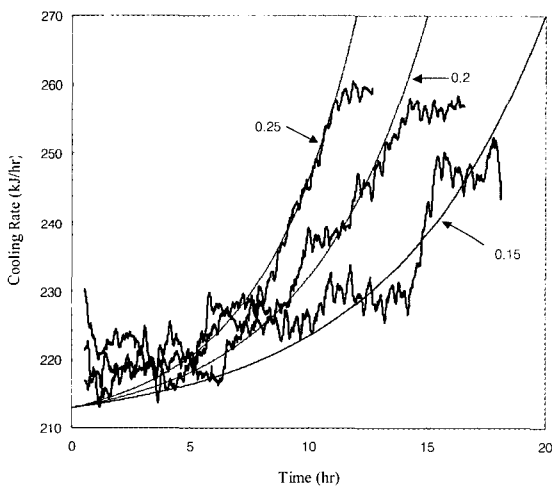


Figure 7. Fed-batch control experiments for cooling rates programmed to increase at the rates of  $0.15, 0.2$  and  $0.25 \text{ hr}^{-1}$ .

이 실험에서 냉각량의 비증가속도 값이 낮으면 유가배양 제어 과정에서 얻어진 냉각량과의 오차가 발생하였으나 비증가

속도 값이 커지면서 오차가 감소하는 것을 확인 할 수 있다. 유가배양용 기질의 농도가 배지의 100배를 사용하여 낮은 비증식속도에서 너무 많은 기질이 투입되어 오차가 많이 발생한 것으로 판단된다. 유가배양용 기질의 농도를 줄이면 오차는 감소할 것으로 예상되나 유가 배양과정에서 배양액의 부피의 증가가 크다는 단점이 있다. 냉각량이  $250 - 260 \text{ kJ/hr}$ 에서 더 증가하지 않는데 이것은 소형 발효조에서 균체가 자라면서 산소의 소비량이 증가하므로 산소의 고갈로 인한 것으로 생각된다.

기존에 대사열량을 측정하기 위해 사용 한 열량계에 비해 정밀도는 떨어지지만 고가의 열량계를 사용하지 않고 온도 조절 장치의 제어 신호와 냉각수의 유출입 지점의 온도만을 측정하여 냉각량을 추정하고 이를 이용하여 유가배양제어가 가능함을 제시하였다. 특히 산업용 대형발효조의 경우 온도 제어 방식이 냉각수의 공급에 의존하므로 본 연구를 통하여 제시된 냉각량의 측정 방법은 쉽게 적용 가능하다. 그리고 온라인으로 측정되는 공정 변수로 활용하여 회분 배양시에는 세포의 배양상태 및 성장속도가 둔화되는 지점을 판단하는데 사용할 수 있으며 유가배양제어를 통하여 미리 프로그램된 방식으로 미생물의 성장속도를 제어할 수 있었다.

요 약

발효조의 냉각수 공급 제어 신호와 냉각수의 유출입 지점의 온도를 온라인으로 측정하여 이 값들로부터 냉각량을 추정할 수 있는 실험식을 얻었다. 회분식 배양을 통하여 냉각량이 온라인으로 측정될 수 있음을 확인하였고 기질의 재투입시 냉각량의 변화를 통하여 유가배양의 제어변수로 활용할 수 있음을 점검하였다. 미리 프로그램된 목표 냉각량의 증가 곡선에 따라 냉각량이 증가되면서 세포가 자라도록 유가배양을 실시하였다. 본 연구를 통하여 냉각량의 온라인 측정방법을 제시하였고 이를 유가배양 제어변수로 활용하여 세포의 성장속도를 조절할 수 있음을 보였다.

사용기호

- $Q_c$  : Cooling rate estimated
- $Q_{c1}$  : Cooling rate by cooling water supply
- $Q_{c2}$  : Cooling rate by water jacket
- $u_1, u_2$  : Parameters for cooling rate estimation
- $\tau$  : Time constant for heat transfer to water jacket
- $\Delta T_{off}$  : A period of cooling water OFF
- $\Delta T_{on}$  : A period of cooling water ON
- $\Delta T_{pulse}$  : A period of ON/OFF control
- $Q_p$  : Object cooling rate
- $Q_{p0}$  : The object cooling rate at time zero
- $\gamma$  : A constant of cooling rate increment

REFERENCES

1. Gayford, C. G. (1986), Energy and cells, p1, MacMillan, London.
2. Nagai, S. (1983), Mass and energy balance for microbial growth kinetics, *Adv. Biochem. Biotechnol.* **11**, 49-83.

3. Marison I. W. and U. von Stockar (1986), The application of a novel heat flux calorimeter for studying growth of *Escherichia coli* W in aerobic batch culture, *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 1780-1793.
4. Meiser-Schneiders, M. and F. Schafer (1996), Quantification of small enthalpic differences in anaerobic microbial metabolism - a calorimetry supported approach, *Thermochimica Acta* **275**, 1-16.
5. Birou, B., I. W. Marison, and U. von Stockar (1987), Calorimetric investigation of aerobic fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 650-660.
6. Dermoun, Z. and J. P. Belaich (1979), Microcalorimetric study of *Escherichia coli* aerobic growth: kinetics and experimental enthalpy associated with growth on succinic acid, *J. Bacteriol.* **140**, 377-380.
7. Marison, I. W. and U. von Stockar (1987), A calorimetric investigation of the aerobic cultivation of *Kluyveromyces fragilis* on various substrates, *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 33-43.
8. Djanvan, A. and A. M. James (1980), Determination of the maintenance energy of *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture, *Biotechnol. Lett.* **2**, 303-308.
9. Fujita, T., P. R. Monk, and I. Wasdai (1978), Calorimetric identification of several strains of lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.* **45**, 3-8.
10. Mou, D. G. and C. I. Cooney (1976), Application of dynamic calorimetry for monitoring fermentation processes, *Biotechnol. Bioeng.* **18**, 1371-1392.
11. Von Stockar, U. and I. W. Marison (1989), The use of calorimetry in biotechnology, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **40**, 93-136.
12. Luong, J. H. T. and B. Volesky (1983), Heat evolution during the microbial process estimation, measurement and applications, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **28**, 1-40.
13. Guan, Y., P. M. Evans and R. B. Kemp (1998), Specific heat flow rate : an on-line monitor and potential control variable of specific metabolic rate in animal cell culture that combines microcalorimetry with dielectric spectroscopy, *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 464-474.
14. Konstantinov, K. B. (1996), Monitoring and control of the physiological state of cell culture, *Biotechnol. Bioeng.* **52**, 271-289.
15. Randolph, T. W., I. W. Marison, D. E. Martens, and U. von stockar (1990), Calorimetric control of fed-batch fermentations, *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 678-684.
16. Voisard D., P. Pugeaud, A. R. Kumar, K. Jenny, K. Jayaraman, I. W. Marison, and U. von Stockar (2002) Development of a large-scale biocalorimeter to monitor and control bioprocesses, *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 125-138.
17. Hong, K. P. and W. Hur (1999), Development of an integrated calorimeter using temperature control signals of a bioreactor and on-line measurement of metabolic heat of a microbial cultivation, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 543-549.
18. Roskams, J. and L. Rodgers (2002), Lab Ref: A handbook of recipes, reagents, and other reference tools for use at the bench, p134, Cold Spring Harbor, New York.