

특집: 생물공정 기술의 최적화(II-IV)

생물공정의 온라인 모니터링

장 용 근

한국과학기술원 생물공정연구센터 화학공학과

현재 미생물을 이용하여 생산해 내는 산물들은 많은 산업 분야에 깊은 연관성을 갖고 있는 것과 동시에 앞으로 그 중요성과 수요량이 더욱 증가할 전망이다. 따라서 그 수요와 경제성을 충족시키기 위해 높은 생산성을 갖도록 조업을 유지시키는 일이 매우 중요하다.

일반적으로 미생물 발효는 발효기 내의 온도나 압력, pH 또는 배양액의 성분 등의 변화에 따라 생산성이 크게 좌우되기 때문에 조업 도중 반응기 내의 물리적, 화학적 상태를 원하는 상태로 조절해 주는 일이 무엇보다 중요하다. 이를 위해 여러 가지 형태로 생물공정을 모니터링함으로써 직접, 간접적으로 공정 상태를 파악하는 방법이 개발되어 왔다. 생물공정의 모니터링 방법으로는 여러 가지가 있지만 측정 장치의 자동화 정도에 따라 크게 off-line 방법과 on-line 방법의 두 가지로 나눌 수 있다.

온라인 발효액 분석 방법은 이론적 배경도 충분하고 여러 가지 기술이 제시되어 있지만 오프라인 방법에 비해 여러 가지 실제 산업적 생산에 대해 적용이 어려운 점이 있는데 그 이유는 우선 발효시 측정해야 할 생물학적 변수들이 일반적인 화학 공정에서 측정하는 물리적, 화학적 변수보다 매우 복잡하므로 온라인으로 자동화하여 분석하기가 어렵고 측정에 이용되는 기기는 멸균 조건을 견딜 수 있을 정도의 내구성이 요구되며 조업 상태가 계속되는 동안 일정한 측정 상태를 유지할 수 있는 안정성을 필요로 하기 때문이다. 또한 어떤 성분의 측정에 있어서는 그 측정하여야 할 영역이 매우 넓기 때문에 (예: glucose 분석의 경우 생리학적 연구에 이용할 때에는 1 mg/L 이하의 농도에서부터 산업적 규모로서 10 g/L 이상의 농도까지 변화함) 이에 대한 제약도 발생한다.

이런 측정상의 어려움에도 불구하고 연속적인 데이터 처리가 가능하고 오프라인 분석시 매 분석 때마다 필요한 manual labor가 불필요하며 real-time으로 분석이 가능하다는 장점 때문에 생물공정의 온라인 모니터링에 대해 많은 연구가 이루어져 왔는데 컴퓨터와 측정 기기의 발달로 인해 분석 대상과 자동화 정도에 있어 지속적으로 향상되고 있다.

본 고에서는 지금까지 개발되었던 각종 공정 변수의 온라인 측정 방법과 기기에 대한 원리 및 실제 적용에 대해 전반적으로 기술한 후 별도로 세포 농도 측정에 대해 좀더 자세히 다루고자 한다.

생물공정의 온라인 모니터링

변수의 직접적인 측정에 의한 모니터링

(1) 형광 분석

어떤 화학 물질들은 특정한 파장의 빛을 흡수하면 그보다 약간 긴 파장의 빛을 방출하는 특성이 있다. 형광 분석법은 세포 내의 물질 중 이러한 성질을 갖는 fluorophore를 이용하여 세포 농도를 간접적으로 측정하는 방법이다(그림 1). 세포 구성 요소 중 형광성을 갖는 물질들은 NADH, FAD, 방향족 아미노산, nucleotides 등 여러 종류가 있지만 현재까지는 주로 NADH를 이용한 방법이 개발되어 있다. 미생물을 포함한 배양액에 350 nm 정도의 파장을 가진 자외선을 가하면 세포 내의 NADH가 여기되어 약 450 nm 정도의 파장을 방출한다(표 1).

측정 시간이 빠르고 내구성이 있으며 세포내 물질들을 측정할 수 있는 장점이 있지만 세포 내의 다른 fluorophore나 배양액 내의 성분들에 의해 측정치의 오차가 유발될 가능성이 있

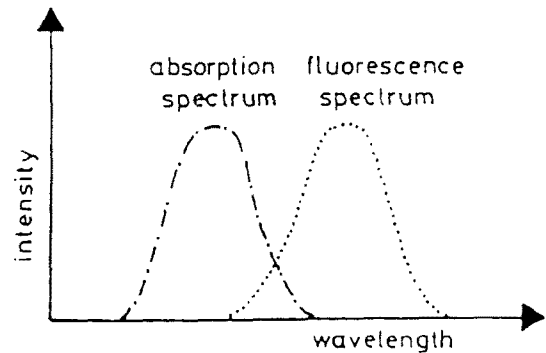


그림 1. Fluorescence의 측정 원리.

표 1. 여러 세포내 물질들의 형광 파장.

Fluorophore	Wavelength (nm) of maximum	
	Excitation	Fluorescence
NADH, NADPH	350	450
FAD	450	520
Aromatic amino acids	275	310
Nucleotides	280	375
Riboflavins	445	520
F(420)	425	470

다. 또한 세포의 exponential growth phase에서는 세포 내의 NADH의 농도가 일정하지만 대사 상태의 변화에 따라 NADH 농도가 크게 달라지기 때문에 일정한 growth state에서의 측정이 요구된다. 교반 속도나 aeration, probe의 위치 등도 측정값에 영향을 주는 중요한 인자이다.

이외에 특정한 균주와 항체가 결합하면 형광 작용이 일어나는 성질을 이용한 fluorescence-antibody technique도 이용되고 있다. 이 방법은 특정한 종류의 균주에만 적용 가능한 단점이 있다.

(2) Turbidity

세포 농도를 측정하는 데 있어 가장 먼저 개발된 방법 중의 하나이며 온라인 방법에 적용되기 이전부터 오프라인 분석시 널리 이용되어 왔다. 미생물을 포함한 배양액에 빛을 통과시켜 주어 absorbance나 transmittance에 의해 줄어든 빛의 양을 측정함으로써 세포 농도를 예측한다. 그러나 이 방법은 배양액 내의 미생물이 아닌 다른 입자나 공기방울 등에 의해서도 빛이 산란되기 때문에 이에 의한 오차를 감안해야 한다. 또한 세포 농도의 변화에 따른 빛의 투과율 변화가 선형적이지 않아 이에 따른 calibration이 필요한데 측정값이 기기의 종류나 형태, 파장, 빛 통과 경로의 길이 등과 균주 종류 등에 영향을 받기 때문에 건조 세포 중량과 측정값과의 calibration은 같은 장치에서 같은 종의 균주에 대해서만 유효하다.

(3) 전기적 방법

미생물의 표면은 전기전도도가 낮은 lipid membrane으로 구성되어 있어 세포 바깥의 배양액과 전기적 성질에 있어 차이가 있다. 반응 중 배양액 내의 미생물이 가진 이러한 전기적 특성을 이용하여 세포 농도를 예측하는 방법이 있다. Coulter counter는 cell suspension을 일정한 전기장이 가해진 작은 구멍에 통과시킨다. 정전기적 특성이 없어 저항이 있는 suspension 내의 미생물이 구멍을 통과함에 따라 발생하는 전기 저항을 증폭하여 통과한 미생물 수를 계산하는 원리이다(그림 2). Coulter counter의 단점은 고농도의 세포 농도를 측정할 수 없다는 것인데 그 이유는 구멍을 지나갈 때 세포들이 서로 겹쳐서 통과하면 각각의 저항이 정확히 측정되지 않기 때문이다. 그러므로 고농도의 세포를 측정할 경우에는 coulter counter를 통과하기 전에 희석하는 과정을 거쳐야 한다. 또한 죽은 미생물들도 각각의 저항을 가지고 있기 때문에 viable cell count를 할 수 없는 단점도 있다.

배양액에 교류 전류를 걸어 주면 세포의 표면이 분극되어 유전체와 같은 역할을 한다. 이때 배양액의 capacitance는 교류 전류의 진동수가 증가하거나 세포농도가 증가함에 따라 증가하게 되는데 이러한 성질을 이용한 측정 기기도 영국의 ABER 사를 선두로 개발되고 있다.

Piezoelectric membrane을 이용한 세포 농도 측정 방법도 개발되어 있다. Microbial suspension 내부에 absorbent를 부착한 생물산업

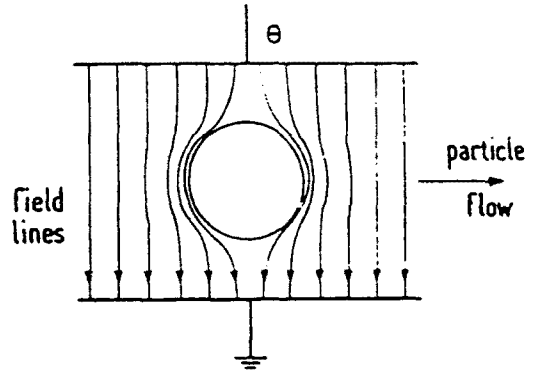


그림 2. Coulter counter의 원리.

piezoelectric material을 삽입하고 일정한 진동을 걸어 준다. 세포 농도가 높을수록 막에 흡착되는 양이 많아지고 이에 따른 진동수의 변화에 의해 세포 농도를 예측한다. 저렴하고 real-time 분석이 가능하지만 piezoelectric membrane의 내구성 문제로 인해 멸균을 할 수 있는 횟수가 제한되고 viable cell과 non-viable cell, 그리고 막에 부착되는 물질 중 세포와 그외의 suspended solids를 구별할 수 없는 단점이 있다.

(4) Calorimetry

생물 반응은 반응시 열을 발산한다. 세포 성장 중 발산하는 열은 세포내 여러 효소들의 반응열들의 합이므로 이 열량을 측정함으로써 미생물의 농도와 대사 상태를 파악할 수 있다.

Calorimeter의 종류는 크게 3가지로 구분된다. Microcalorimeter는 1~100 ml 정도의 작은 부피 내의 반응에 이용되고 1 μW 정도의 감도를 갖지만 매우 작은 반응 부피만을 허용하므로 pH 등 반응 상태의 조건들을 맞추어 주기가 힘들고 microcalorimeter 이외의 센서를 동시에 이용하기 힘든 단점이 있다. Flow calorimeter의 원리는 배양액의 시료를 연속적으로 microcalorimeter 측정 부피 정도의 작은 공간에 이동시켜 측정하는 방법으로 microcalorimeter와 거의 같은 감도를 갖고 여러 종류의 반응기에 적용시킬 수 있다. 그리고 bench scale calorimeter는 온도 제어 장치를 특별히 갖춘 bioreactor로 microcalorimeter에 비해 1/100 정도의 감도를 갖는다.

자동 분석 시스템을 이용한 모니터링

(1) Flow injection analysis(FIA)

On-line monitoring에 사용되는 측정 기기들은 연속적인 신호의 측정이 가능하지만 멸균이 가능하여야 하고 오랜 조업 기간 동안 신호의 측정에 있어 안정성을 가져야 하는 제약이 있다. 이러한 문제점에 대한 대응책 중 소량의 발효액을 sampling하여 분석을 행하는 FIA 기법이 널리 응용되어지고 있다.

FIA system은 시료의 전처리 및 이송, 화학적 처리, 그리고 측정 등 모두 3단계로 이루어져 있다(그림 3). 측정 원리는 작은 내경의 관 내부로 연속적으로 흐르는 캐리어 용액 속으로

소량의 시료를 주입한 뒤 일정 시간 후 고정화되어 있는 시약 및 촉매에 의해 시료의 화학적 처리 과정이 끝난 후 측정한다. 이때 응답신호는 peak 형태로 얻어지게 되며 일정한 조건하에서 측정이 이루어지므로 peak의 높이에 의해 정량적인 분석이 가능하다.

측정 결과를 연속적으로 나타낼 수 없다는 단점에 비해 FIA system은 중요한 몇 가지 장점들이 있다. 측정기기가 발효액과 분리되게 되어 멸균이 불필요하며 샘플링 간격을 시간당 100회 이상으로 줄일 수 있고 분석 조건을 일정하게 유지시켜주는 일이 용이하므로 높은 재현성이 있다. 그리고 기존의 거의 모든 측정원리와 접목이 가능하여 매우 넓은 적용 범위를 갖는다.

FIA에 의한 여러 물질들의 분석 방법이 보고되어 있다. 단백질 분석의 경우 *Candida boidinii*의 배양시 Bradford 방법으로, 분쇄된 *Saccharomyces cerevisiae*의 분석시 biuret 방법으로 각각 단백질의 농도를 분석하였다. FIA 시스템에 공급되는 유량은 각각 0.25 ml/min, 0.34 ml/min이었고 6분, 2분 간격으로 분석이 시행되었다. Biuret 방법에 의한 분석은 단백질 농도 0.1에서 40 g/L까지 선형적인 결과를 보였고 Bradford 방법은 biuret 방법에 비해 오차에 영향을 덜 받고 더 민감한 분석이 가능하지만 각 측정이 끝날 때마다 FIA의 세척 과정이 필요하다.

동물 세포 배양에 있어 3-cell parallel FIA를 amperometric biosensor에 연결하여 포도당과 glutamate, 그리고 glutamine을 동시에 real-time으로 측정한 결과 오프라인 분석과 비교했을 경우 매우 성공적인 결과를 나타내었다. *Streptococcus cremoris* 균주의 배양시 포도당과 젖산, 단백질과 세포 농도를 모니터링하는 공정도 제시되었다. 반응기로부터 채취된 시료는 일단 sample chamber에 모여 미생물 성장 억제제 첨가후 펌프를 통해 4개의 튜브로 이송된다. 포도당과 젖산은 효소법으로, 단백질은 biuret 방법으로, 그리고 세포 농도는 시료를 희석시켜 흡광도를 이용함으로써 각각 측정된다.

(2) Mass spectrometry(MS)

Mass spectrometry는 주로 용액 내에 용해된 gas(pO_2 , pCO_2 , pN_2 , pH_2 , pCH_4)와 휘발성 물질(alcohols, acetoin, butanediol) 등의 정량적인 분석에 이용된다. 이전까지는 주로 오프라인 기체 분석에 이용되었지만 최근 온라인 생물공정 제어에 활발히 응용되고 있다. 분자들의 질량 분석뿐만 아니라 electron impact ionization이나 collisional activation 등에 의해 원래 분자를 분해시켜 이온들을 분석함으로써 물질의 구조적인 정보까지도 얻을 수 있다. 또한 C^{13} 등과 같은 동위 원소의 양을 추적함으로써 미생물의 대사 과정에 대해 상세히 분석하는 것도 가능하다.

Mass spectrometry를 이용한 분석 방법은 다음과 같다. 분석하고자 하는 sample이 진공 상태의 chamber(보통 10^{-5} mbar 이하의 기압)에서 주입되어 적절한 방법으로 이온화된다. 이온화된 물질들은 그들의 mass to charge ratio(m/z)에 의해 분리

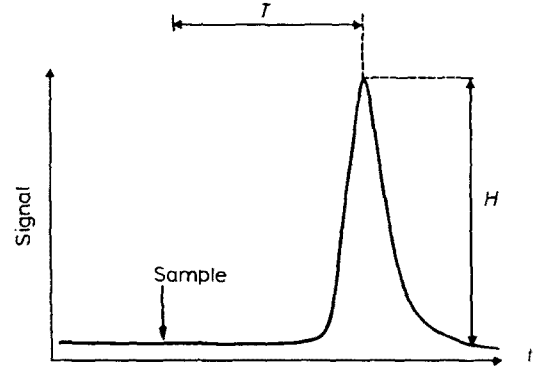
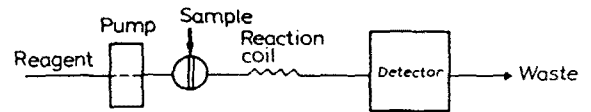


그림 3. FIA의 분리. T : residence time, H : peak의 높이.

되고 magnetic analyzer 또는 quadropole filter에 의해 얻어진 측정치들은 컴퓨터를 이용한 분석방법에 의해 처리된다(그림 4). 분석 목적에 따라 mass spectrometry의 분석 방법은 다양하게 변화할 수 있다.

미생물 배양 중 mass spectrometry를 이용하여 에탄올이나 배양액 중에 녹아 있는 산소, 탄산가스 등의 농도를 측정함으로써 OUR(oxygen uptake rate)이나 탄산가스 발생량을 계산하여 반응기의 상태를 추정하는 방법이 여러 논문에 제시되어 있다. 또한 에탄올과 용존 가스 등의 분석된 데이터를 이용한 피드백 제어 방법과 효모 균주에 대해 생산물의 수율을 최대로 할 수 있도록 하는 최적화 방법도 개발되어 있다.

여러 가지의 물질들을 동시에 분석할 수 있는 장점과 함께 최근 들어 휘발성이 없는 물질들을 휘발성 물질들로 변화시켜 측정하는 방법이 개발되고 있어 생물공학 산업에 있어 mass spectrometry가 차지하는 비중은 점차 증가할 것으로 기대된다. 유기산을 에스터화시켜 모니터링하는 방법이 페니실린 생산 공정에서 2-oxo-glutaric acid를 메탄올을 이용해 에스터화함으로써 성공을 거두었다. 열분해를 이용해 DNA와 글리코젠을 분석하는 방법도 보고되었고 측정하고자 하는 물질에 고에너지의 이온을 쏘아주어 물질이 이온화된 후 분석하는 secondary ion mass spectrometry(SIMS) 방법도 개발되었다.

(3) High performance liquid chromatography(HPLC)

이전까지의 액체 크로마토그래피는 비교적 큰 지름의 column과 중력 또는 저압 펌프를 이용하여 작은 유속에서 사용되었기 때문에 분리 시간이 대부분 몇 시간씩 걸리는 단점이 있었다. 이에 비해 column 내의 충전제를 작고 균질하며 고 밀도로 하여(입자의 지름 5~10 μm) 빠른 질량이동이 가능하

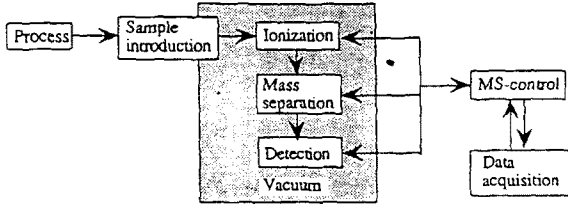


그림 4. Mass spectrometer의 기본 원리.

도록 함으로써 분석 시간을 분 단위로 줄인 기기를 HPLC라 한다(그림 5).

HPLC 분석방법이 갖는 이점은 우선 spectroscopic method 나 전기화학적 측정 등과 달리 complex matrix를 이용하여 배양액 내의 여러 성분들을 분석할 수 있는 능력이다. 또한 가스 크로마토그래피로는 측정이 불가능한 단백질이나 항생제 등의 비휘발성 물질들을 분석할 수 있고 액체 크로마토그래피 방법에 비해 자동화가 가능하고 신속한 분석 방법이다.

HPLC를 이용한 온라인 모니터링과 자동화 공정에 관해 많은 연구가 진행되고 있다. 알콜과 erythromycin, 여러 가지 단백질의 모니터링과, 제어가 가능하고 한 column에서 여러 가지 아미노산이나 유기산을 동시에 분석하여 제어에 이용하는 사례도 보고되었다. 또한 염화나트륨이나 polypeptides, polysaccharides 등 capillary tube에 악영향을 끼치는 물질들을 분리해 내기 위해 HPLC를 mass spectroscopy와 연결시켜 분석 함으로써 시료의 전처리 과정까지 자동화시킨 경우도 있다.

(4) Near infrared spectroscopy(NIRS)

온라인 분석 방법의 하나인 NIRS는 30초 정도의 빠른 분석 시간과 한 sample 내의 여러 성분들을 동시에 분석할 수 있는 능력, 그리고 sample의 형태가 고체이건 액체이건 별 영향을 받지 않고 전처리 과정이 필요 없는 등의 여러 장점 덕분에 생물공정의 분석에 새로운 가능성을 제시할 수 있는 방법으로 기대되고 있다.

NIRS의 측정 원리는 분석하고자 하는 sample 내에 존재하는 특정한 분자들이 700~2500 nm 정도의 near infrared 파장을 흡수하는 데에 근거하고 있다. 우선 sample은 적절한 필터에 의해 선택된 NIR 파장에 의해 빛을 발산한다. 이들 방사 에너지 중 시료에 존재하는 성분의 양에 비례하여 시료 자체에 흡수되지만 나머지는 spectrometer 내의 integrating sphere에서 수집되어 전기적 신호로 전환된다(그림 6). 측정하고자 하는 성분의 농도는 방사광을 측정할 값을 장치에 대한 적절한 calibration을 거쳐 결정된다. 몇 가지 파장에 의해 측정된 시료 농도의 calibration에 사용되는 식은 다음과 같다.

$$\text{Constituent \%} = F_2 \log\left(\frac{1}{R_2}\right) + F_3 \log\left(\frac{1}{R_3}\right) + \dots + F_0$$

여기서 F(i)는 regression 상수이고 R(i)는 서로 다른 파장에

생물산업

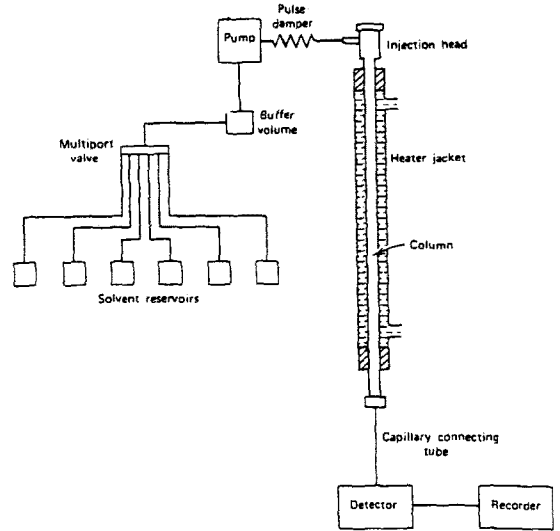


그림 5. HPLC 장치의 기본적인 구성.

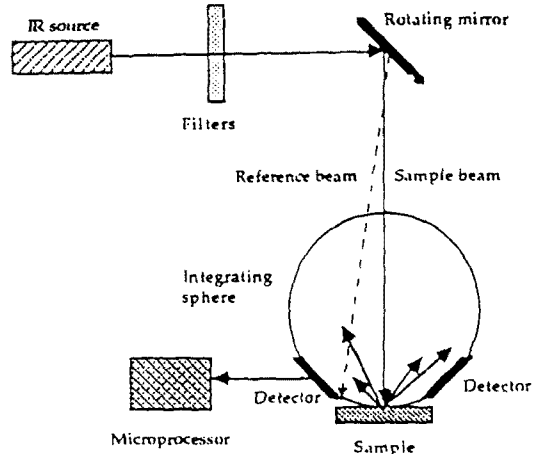


그림 6. Near infrared spectrometry의 내부 구조.

대해 수집된 빛의 양이다. 한 번의 측정 과정에 있어 여러 파장의 빛이 한꺼번에 기록되므로 바로 시료 내 성분의 양이 결정된다.

NIRS 장치를 이용하여 젖산, 포도당, 그리고 세포 농도를 각각 측정했을 때 오프라인 방법으로 측정할 값에 비해 젖산과 포도당은 약 100 g/L, 세포 농도는 약 20 g/L 정도까지 선형적인 결과가 얻어진다(그림 7). 그리고 NIRS 분석법을 이용하여 에탄올의 농도를 측정했을 경우 오프라인 분석과 비교해 물과 에탄올의 혼합액일 경우 0~15%까지의 농도에 대해 평균적으로 0.2% 정도, 효모가 포함된 배양액에서의 경우 0.27%w/w의 오차 한도 범위 내에서 잘 일치하는 결과가 보고되었다. 또한 세포 농도 측정에 있어서는 대장균의 경우 약 0.2 g/L 정도의 평균 오차를 갖는 것으로 나타났다.

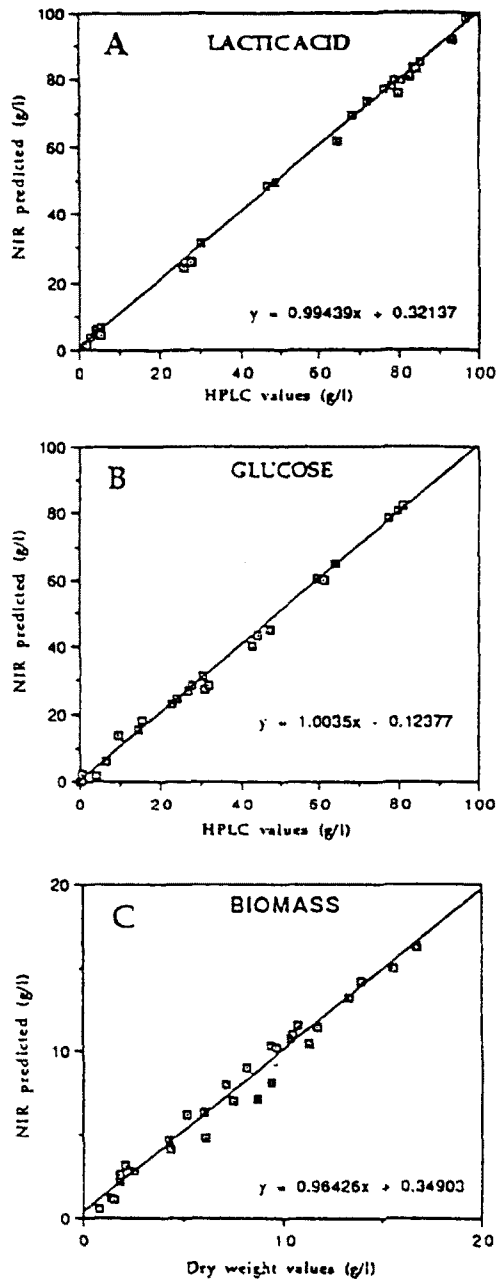


그림 7. (A) 젖산 (B) 포도당 (C) 세포 농도의 regression.

세포농도의 온라인 모니터링

반응기의 조업 중 세포 농도의 측정은 반응기 내의 미생물 성장 상태를 알 수 있는 척도가 되는 중요한 과정이다. 따라서 온라인 세포 농도 측정 방법이 개발되기 이전부터 오프라인으로 세포 농도를 측정하는 방법이 연구되고 실용화되었지만 분석하는 데 걸리는 시간이 길고 노동력이 소요되며 측정을 위해 회석하는 과정에서 발생하는 오차 등의 문제점을 극복하기

표 2. 온라인 세포 농도 측정 장치가 갖추어야 할 기본 조건들.

Category	Requirement
Reliability	Long-term stability and sterility (1-20 days) in pilot plant environment
Calibration	Linear with cell concentration in useful ranges; wide range from inoculation to harvest Best resolution at critical points (induction and harvest) Single calibration curve for each scale On-line calibration during initial use at minimum number of points Minimal impact of polynomial regression
Interferences	Non-biological solids (media particulates) Non-viable cells Agitation and/or aeration shifts Fluctuating culture conditions (DO, pH, temp) Room light Medium composition changes Indicators such as phenol red Biomass or protein buildup on probe tip
Design suitability	Ability for repeated SIP and CIP Insertion into 25 mm Ingold port at 15 degree incidence angle in well-mixed reactor zone DCS signal of 4~20 mA Single probe design for multiple cell types (bacterial, yeast and animal) Avoidance of external stream loop Avoidance of additional sensor interfaces

힘들기 때문에 최근 들어 세포 농도를 온라인으로 측정하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 세포 농도 측정 장치가 갖추어야 할 일반적인 조건을 표 2에 나타내었다.

Optically-based instruments

빛에 대한 세포의 흡광도를 측정하여 세포 농도를 예측하는 개념은 여러 가지 온라인 세포 농도 측정 방법 중에서도 가장 먼저 발달한 방법이지만 원리의 단순성과 넓은 적용성 등 여러 가지 이점 때문에 계속해서 새로운 방법 및 장치가 개발되고 있다.

Cerex사에서 제작한 세포 농도 측정 기기는 transmit된 레이저광의 감소량에 의해 세포 농도를 측정한다(그림 8). 측정에 사용된 빛의 파장은 820~850 nm이고 교반이나 공기방울 등에 의해 발생하는 오차를 줄이기 위해 배양액을 측정기기 내부의 공간으로 끌어들이어 측정하는 방법을 택했다. 세포 농도가 클 경우 transmittance signal의 감도가 떨어져 비선형적인 데이터가 얻어지지만 5차 함수 정도에 의해 regression이 가능하다.

실험 결과 고차함수를 이용하여 regression을 할 때 regression에 사용할 측정값을 선택하는 방법의 차이에 따라 오차가 매우 커질 수 있으므로 선택한 측정값 간의 간격이 일정

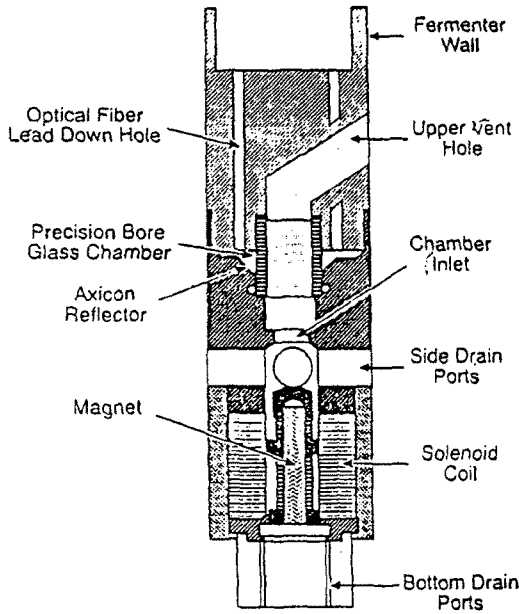


그림 8. Cerex cell mass sensor.

하도록 신중한 데이터의 처리가 중요하다. 또한 OD 2.5 이하에서는 감도가 매우 낮고 pilot plant scale의 배양시 내구성에 문제가 있는 것으로 나타났다.

Wedgewood model 650 측정 장치가 사용하는 파장의 영역은 약 750~950 nm 정도이다. 이 기기는 빛이 통과하는 경로인 notch의 길이에 따라 2종류로 구분되는데 2 cm의 notch length를 가진 기기의 경우 감도가 뛰어나 동물 세포 배양 등의 낮은 세포 농도 배양시 이용되고 0.5 cm의 notch length를 이용할 경우 고농도 배양의 측정이 가능하다. 이 기기도 Cerex사의 경우와 마찬가지로 측정값이 선형적이지 않아 fitting이 필요한데 거의 동일한 두 그룹의 데이터가 선택한 측정값 간격에 따라 전혀 다른 regression 곡선을 유발하였다(그림 9).

Monitek에서 개발한 model FS1/FT1 세포 농도 측정 장치는 광원으로 레이저광 대신 백열광을 사용하였고 적외선 필터를 이용하여 800 nm 이하 파장의 빛을 차단함으로써 미생물 자체 내외 배양액에 존재하는 발광성 물질들에 의한 영향을 최소화시켰다. 또한 notch의 길이를 0.2~4 cm로 다양화하여 여러 배양 조건에 따라 선택이 가능하도록 하였다(그림 10). 반응기 내에 장착할 때 위로 솟아오르는 공기방울이 notch에 미치는 영향을 최소화하도록 설계하였지만 교반에 의한 측정값의 오차가 심한 것으로 나타났다.

ASR laser turbidimeter는 780 nm 정도의 텅스텐 램프 파장을 사용한다. 이 기기도 역시 측정값과 실제 세포 농도 사이에 비선형적인 관계가 성립되므로 calibration이 필요하다. *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 대상으로 실험한 결과 세포 농도 생물산업

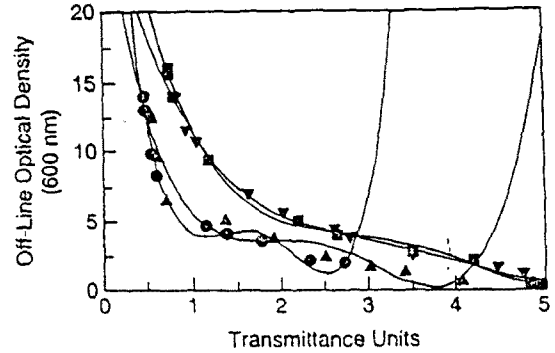


그림 9. 데이터 선택의 차이에 따른 Calibration 곡선의 변화. ■, ▼ Probe 1; ▲, ● Probe 2.

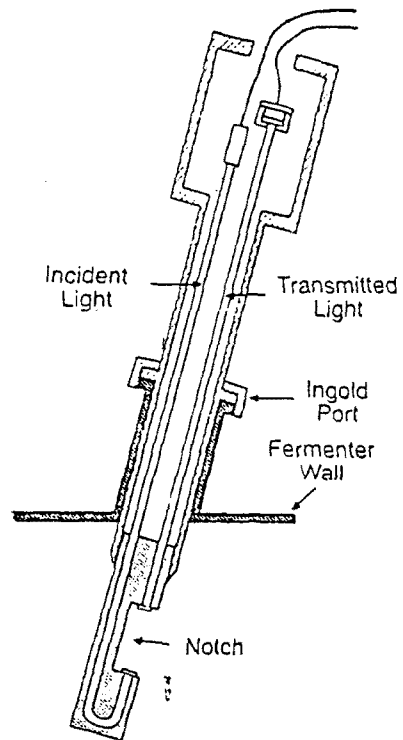


그림 10. Monitek analyzer.

와 측정값 사이의 관계는 다음과 같다.

$$\begin{aligned} \text{세포 농도} &= a_0 + a_1 \cdot \text{OD} + a_2 \cdot \text{OD}^2 + a_3 \cdot \text{OD}^3 \\ a_i &= c_0 + c_1 \cdot \text{RPM} + c_2 \cdot \text{RPM}^2 \quad (i=0,1,2,3) \end{aligned}$$

	c_0	c_1	c_2
for a_0	-2.66995	0.02639	-0.00005
for a_1	4.27964	-0.03206	0.00009
for a_2	-2.62294	0.04862	-0.00015
for a_3	2.87073	-0.02115	0.00006

폭기 속도의 변화는 측정값에 별 영향을 주지 못하지만 교

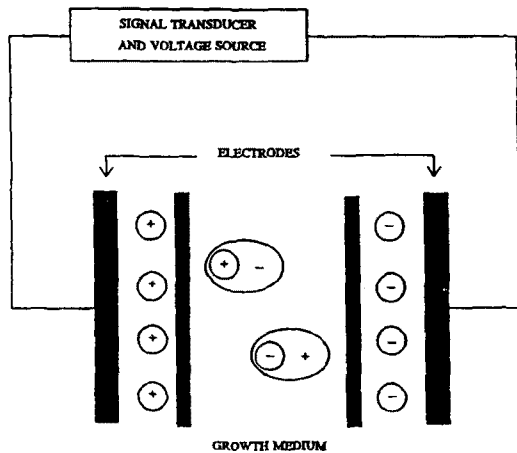


그림 11. 교류 전류에 의한 분극 현상.

반속도의 변화에 따라 측정값에 오차가 생길 수 있고 특히 400 rpm 이상에서는 상대적으로 큰 오차가 발생한다. 연속배양에서 35 g/L 정도의 세포 농도까지 정확한 측정이 가능한 실험 결과를 나타내었다.

이상과 같이 빛의 흡광도를 이용한 측정 기기는 공통적으로 세포 농도와 측정값 사이의 관계가 비선형적이므로 고차 함수에 의한 regression이 필요하다. 하지만 calibration 과정 중 데이터의 선택에 따라 오차 유발 가능성이 있으므로 새로운 regressioning 기술의 개발이 시급하다 하겠다.

Capacitance-based instruments

미생물의 외부에 교류 전류(0.1~10 MHz)를 걸어 주면 미생물 표면의 plasma membrane이 condenser로 변화한다. 이 원리를 이용하여 세포 농도를 측정하는 원리가 개발되어 있다. 한쌍의 전극이 cell suspension 내에서 전기장을 형성하면 전극 사이를 통과하는 미생물들은 위의 원리에 의해 전기장 중에서 분극된다(그림 11). 이때의 극간 전류와 전극간 전압으로부터 capacitance를 구할 수 있다. 측정된 capacitance와 세포 농도 사이에는 선형적인 관계가 성립한다. 또한 죽은 미생물이나 cell debris는 plasma membrane의 손상으로 인해 condenser가 되지 않아 capacitance에 영향을 주지 않는다. 마찬가지로 배양액 내의 입자나 색깔에 의한 영향도 없으므로 순수한 viable cell count를 할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 전체적인 세포 중량을 재는 데에는 부적합하다.

영국의 ABER 사에서 제작한 bugmeter(그림 12)는 발효액과 접하는 끝부분에 2쌍의 금속 전극이 있어 바깥쪽의 2개 전극으로부터 교류 전류가 발생한다. 이 전극 부분은 전기장을 형성하게 되고 세포벽이 있는 살아있는 균은 전기장 중에서 분극되어 condenser를 형성한다. 이때 극간 전류와 내부에 있는 한쌍의 전극간 전압으로부터 capacitance를 구한다. 세포

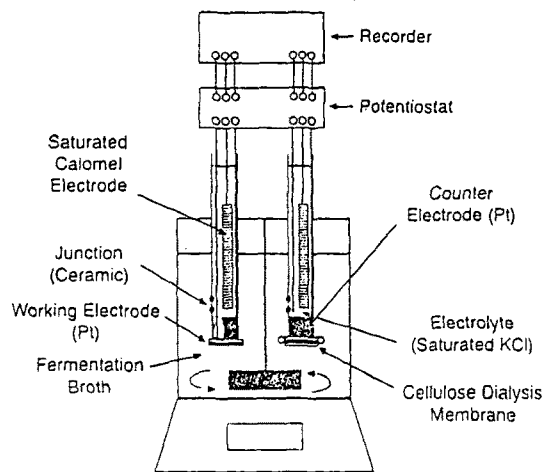


그림 12. ABER사의 Bugmeter 내부 구조.

밀도와 정전용량 사이에는 선형적인 관계가 성립한다. 배양액 내의 죽은 세포와 cell debris는 세포벽의 손상으로 인해 분극이 되지 않아 정전용량에 영향이 없고 배지의 색깔에 대한 영향도 받지 않는다. 또한 이 기기는 고주파역과 저주파역을 교대로 측정하여 양쪽 정전용량의 차를 해석함으로써 기포에 의한 측정치의 변동을 최소화할 수 있다. 본 기기로 효모에 대한 세포 농도 측정 실험을 한 결과 20 g/L 정도까지 선형적인 측정이 가능한 것으로 나타났다.

Capacitance의 측정에 의한 세포 농도의 모니터링은 미생물의 크기나 형태에 따라 그 측정값이 달라지고 최적 진동수와 감도도 크게 달라진다. 그리고 배양액 내의 capacitance를 측정하였을 때 배양액 자체의 conductance도 고려해 주어야 한다. 예로써 효모 배양시 yeast extract, peptides, ammonium nitrate 그리고 포도당이 첨가된 배지의 capacitance는 약 0.5 pF/mg/ml 정도의 값을 나타낸다.

Acoustic resonance densitometry(ARD)

배양액의 밀도는 미생물의 농도에 따라 달라진다. Acoustic resonance densitometry는 미생물을 포함한 배양액과 포함하지 않은 배양액과의 밀도 차이를 resonance frequency를 이용하여 측정함으로써 세포 농도를 예측하는 장치이다. 그 원리는 다음과 같다. 두 장의 piezoelectric membrane 사이에 배양액을 통과시키면서 한쪽의 막에 교류 전류를 걸어 주면 ultrasonic wave가 형성된다. 이 wave가 배양액을 통과하여 반대쪽 막에 도달하면 다시 전류로 바뀌게 되고 이때의 초기 전압과 나중 전압을 비교함으로써 세포 농도를 측정한다(그림 13).

ARD 기기는 약 200 g/L 정도까지 선형적인 세포 농도 측정 데이터를 얻을 수 있고 가격이 저렴하며 내구성이 우수하지만 배양액의 점도나 공기방울, pH 등에 크게 영향을 받고 미생물과 다른 suspended solids와의 구별이 불가능한 단점이 있다.

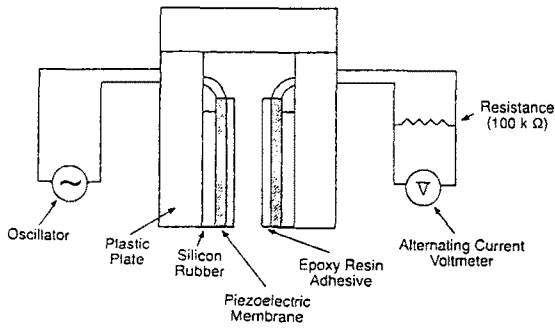


그림 13. ARD 측정 장치의 구조.

결 언

지금까지 생물공정의 온라인 모니터링 방법들에 대해 살펴

보았다. 최근 모니터링 기기들은 컴퓨터 소프트웨어의 발달과 더불어 자동화 부분에 대해 급격히 발달하고 있는 추세이다. 그리고 좀더 효율적이고 자동적인 모니터링을 위해 두 가지 이상의 분석 기기들을 연결하여 사용하는 사례도 늘고 있다.

실제 위에 열거한 방법들이 현장에서 사용되는 경우도 현재 어느 정도 존재하지만 아직까지 대부분의 온라인 모니터링 방법이 산업 공정에 적용되기 위해서는 평균 상태 유지, 현장 적용성, 기기의 유지와 보수, 그리고 시료 전처리 등 극복해야 할 약점들이 많다. 그러나 공정 자동화 등 온라인 모니터링만이 갖는 이점이 있으므로 제어하기가 일반 화학 공정에 비해 까다롭고 오프라인 방법으로 분석할 경우 manual labor가 과다하게 필요한 생물공정의 경우 얼마 지나지 않아 기존의 오프라인 분석 방법이 가지고 있는 위치를 온라인 공정이 대신 하게 될 것이다.