

알콜증류폐액을 이용한 빵효모배양에서 Glucose와 Ammonium의 자동첨가에 의한 증균 : 온라인 FIA시스템에 의한 Ammonium의 자동분석 및 제어

†이 형 춘

서원대학교 식품영양학과

(접수 : 2000. 2. 29., 게재승인 : 2000. 4. 10.)

Increase of Cell Concentration by the Automatic Addition of Glucose and Ammonium to an Alcohol Distillery Wastewater Reutilized for Cultivating a Baker's Yeast : Automatic Analysis and Control of Ammonium Concentration with an On-line Flow Injection Analysis System

Hyeong Choon Lee†

Department of Food and Nutrition, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea

(Received : 2000. 2. 29., Accepted : 2000. 4. 10.)

Automatic addition of glucose and ammonium to an alcohol distillery wastewater and the control of them at low concentration were tried to efficiently increase the cell concentration of a baker's yeast cultivated in that wastewater. Added glucose was indirectly controlled to less than 116 mg/L by a method which used DO as control parameter. Ammonium was automatically measured and controlled within the range of 7.0~27.7 mM by a homemade on-line system which adopted FIA as measurement method. Maximum specific growth rate and biomass yield to glucose were 0.21 hr⁻¹ and about 0.78 g/g, which were significantly increased values in contrast to those of an experiment without ammonium control. Biomass yield to ammonium was 11.3 g/g. Cell concentration could be increased from 2.6 g/L to 18.5 g/L by the addition of glucose and ammonium.

Key Words : Baker's yeast, alcohol distillery wastewater, nutrient addition, FIA

서 론

저자는 전보(1)에서 알콜증류폐액에 빵효모를 배양하는 중에 glucose와 ammonium을 자동으로 첨가하여 줌으로써 증균 농도를 효과적으로 높일 수 있었다. Glucose는 용존산소농도(DO)를 제어파라미터로 하는 간접 feedback 제어방법을 사용하여 자동공급하였고, ammonium은 glucose의 공급에 의하여

저하하는 pH의 중화제로 NH₄OH를 사용함으로써 pH제어기에 의하여 자동공급되도록 하였다. Glucose의 경우에는 방법의 특성상 효과적으로 낮은 농도로 제어된다고 생각되었다. Ammonium의 경우에는 배양중에 증식정체가 없었으므로 결핍은 일어나지는 않는다고 생각되었으나, ammonium농도를 직접 제어한 것이 아니므로 필요량 이상으로 과량 첨가될 가능성이 높다고 생각되었다. Ammonium이 필요량 이상으로 첨가되어 농도가 높아지면 증식속도와 균체수율이 감소하게 된다. Kole 등(2)은 배양액의 암모늄농도가 높을 경우 *Saccharomyces cerevisiae*의 증식이 억제된다고 하였으며, 자동제어시스템을 사용하여 암모늄농도를 낮게 유지함으로써 *Saccharomyces cerevisiae*(2)와 *Escherichia coli*(3)의 증식속도, 균체생산성 및 균체수율을 높였다. 따라서 알콜증류폐액

†Corresponding Author : Department of Food and Nutrition, Seowon University, 231, Mochung-dong, Cheongju 361-742, Korea

Tel & Fax : 0431-261-8744

E-mail : hcllee@dragon.seowon.ac.kr

에 빵효모를 배양할 경우에도 ammonium 농도를 적정수준으로 제어하면 glucose만 제어할 경우에 비하여 증식속도와 균체수율을 더욱 높일 수 있을 뿐만 아니라 필요량 만큼만 경제적으로 사용할 수 있게 되므로 폐액의 재이용성을 더욱 높일 수 있다고 생각되었다.

배양액의 ammonium 농도를 자동제어하기 위해서는 먼저 자동분석하여야 하는데, 자동분석방법으로는 온라인 flow injection analysis(FIA)법을 사용하는 것이 적당하다고 생각하였다. FIA는 아주 작은 량의 시료로 분석이 가능하여 배양액의 손실을 최소화할 수 있으며, 빠르고, 신뢰성이 크며, 자동화가 쉽다(4). 실제로 미생물배양(5-11) 또는 동물세포배양(12)에서 ammonium 농도의 자동측정 또는 제어에 FIA법이 사용되었다. Ammonium의 검출방법으로는 비색법(6-8,11), 전극법(5,9,10) 및 형광검출법(12) 등이 사용되었는데, ammonia 전극을 검출기로 사용할 경우, carrier solution의 유로(流路)를 한 줄의 PTFE관으로 구성할 수 있으므로 시스템이 단순해진다는 이점이 있다.

본 연구에서도 전보(1)와 같이 알콜증류폐액에 빵효모를 배양하면서 glucose와 ammonium을 자동첨가함으로써 균체 농도를 증가시켜 폐액의 재이용성을 향상시키고자 하였다. 다만, 전보(1)와 달리 ammonium의 경우에는 FIA를 이용한 온라인 자동제어시스템을 구성하여 제어함으로써 ammonium의 농도를 낮은 수준으로 제어가능함을 알아보았으며, ammonium을 제어할 경우 제어하지 않은 경우에 비하여 균의 증식속도와 균체수율이 개선되어 균체생산성을 높일 수 있는가를 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 폐액

사용균주는 전보(1)와 같다. 알콜증류폐액은 S사(전북 전주 시 소재)에서 쌀보리와 타피오카를 1:1로 섞은 것을 원료로 사용하여 주정을 생산하고 폐기되는 폐액을 수집하여 No. 5C 여과지로 여과하여 사용하였다

배양방법

전보(1)와 같게 하였다. 즉, 5 L jar-fermenter(한국발효기, KFC-5L)를 사용하여 배양하였으며, 배양액의 양은 3.0 L였고, 접종량은 10%(V/V)였다. 배양온도는 30℃로 유지하였으며, pH는 4N HCl 및 4N NaOH를 사용하여 4.5로 유지하였다. 배양액의 용존산소농도는 20%이상으로 유지하였다. 소포제는 실리콘소포제(럭키디씨실리콘, LS-300)를 사용하였다.

Glucose의 자동첨가방법

Glucose 자동첨가장치의 구성을 Figure 1의 발효조 왼쪽위 부분에 나타내었으며, 자동첨가방법은 전보(1)와 같게 하였다.

Ammonium의 자동첨가장치

Ammonium의 자동첨가장치의 구성을 Figure 1의 발효조 오른쪽 부분에 나타내었다. Sampling probe는 공경(孔徑) 0.2 μ, 내경 7 mm, 외경 10 mm, 여과면적 10.4 cm²인 원통형의 ceramic filter(제공처: 한국발효기(주))를 사용하였다.

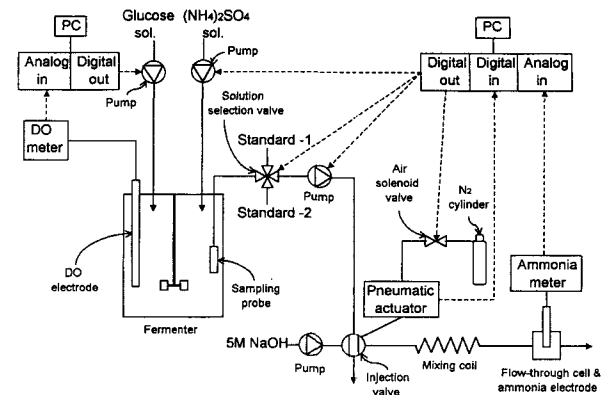


Figure 1. Schematic diagram of experimental apparatus for the automatic addition of glucose and ammonium into fermenter.

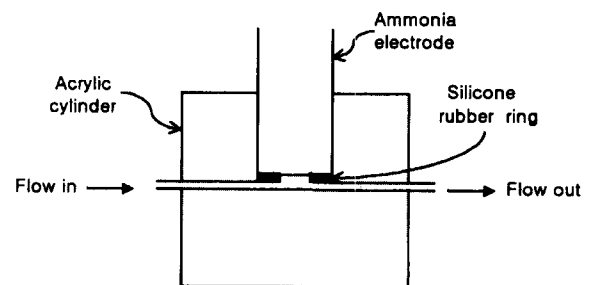


Figure 2. Flow-through cell and ammonia electrode.

FIA시스템은 carrier solution 이송용 tubing pump(Eyela, SMP-23S), 3-channel solenoid valve(Cole-Parmer, H-01367-81), 시료 또는 표준용액 이송용 tubing pump(Watson Marlow, 101U/R), injection valve(Rheodyne, 5020), valve actuator(Rheodyne, 5701), air solenoid valve(Rheodyne, 7163-033), 질소압력통, mixing coil 및 detector로 구성하였다. Detector는 ammonia electrode(Orion, 95-12), flow-cell 및 ammonia meter(Suntex, SP-701)로 구성하였다. Flow-cell은 원통형 아크릴을 가공하여 제작(Figure 2)하였으며, flow-cell의 전극막 밑부분의 부피는 약 40 μL였다. 튜빙은 내경 0.8 mm의 PTFE 튜빙을 사용하였다. Carrier solution의 유량은 0.8 ml/min였으며, injection valve의 loop의 용량은 100 μL였다.

컴퓨터시스템은 486급의 PC, multifunction card(Advantech, PCL-812PG), signal conditioning board(Advantech, PCLD-770 및 PCLD 7701), relay board(Advantech, PCLD-785) 및 SSR board(근흥전자, PD-4)로 구성하였다.

(NH₄)₂SO₄용액의 공급에 tubing pump(Watson Marlow, 101U/R)를 사용하였다.

Ammonium의 자동첨가 프로그램

Ammonium의 자동분석 및 제어프로그램을 QuickBASIC(ver. 4.0)으로 작성하였으며, main program과 4개의 sub program으로 구성하였다. Figure 3에 main program의 흐름도를 나타내었다. 자동분석으로 측정된 배양액의 ammonium 농도가 15 mM이하가 되면 20 mM이 되도록 (NH₄)₂SO₄용액을 공급(배양액의 양은 3.0 L로 가정)하는 것으로 구성하였다. (NH₄)₂SO₄용액 공급후의 배양액의 농도가 20 mM정도가 되

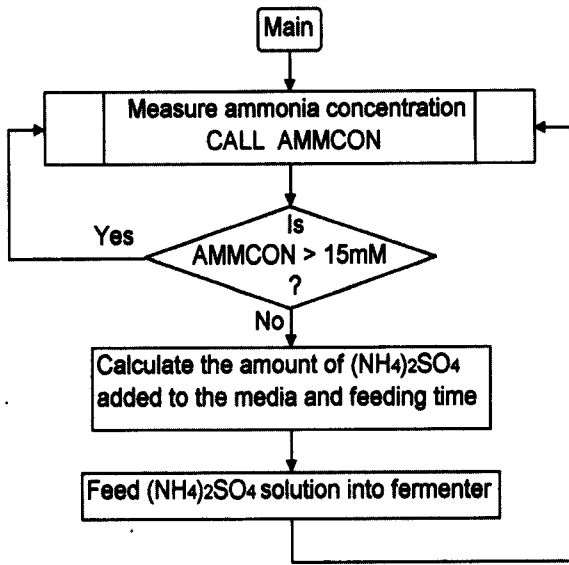


Figure 3. Flowchart of main program.

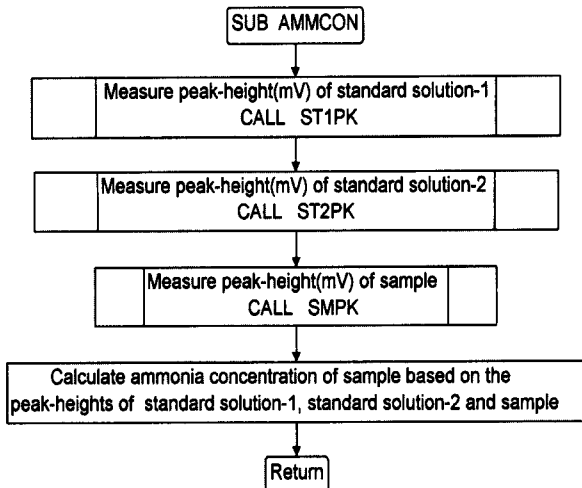


Figure 4. Flowchart of subprogram for measuring ammonium concentration.

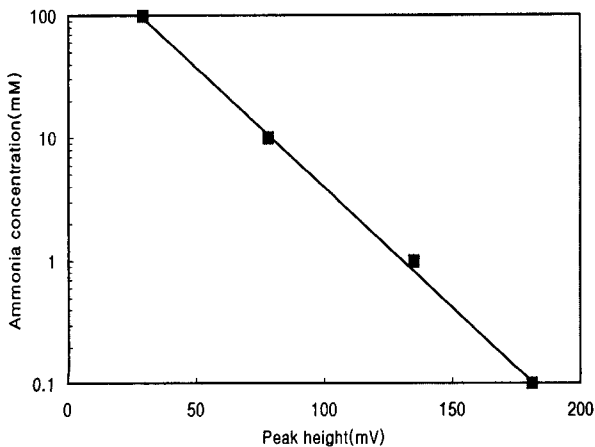


Figure 5. Relationship between ammonium concentrations and their peak heights.

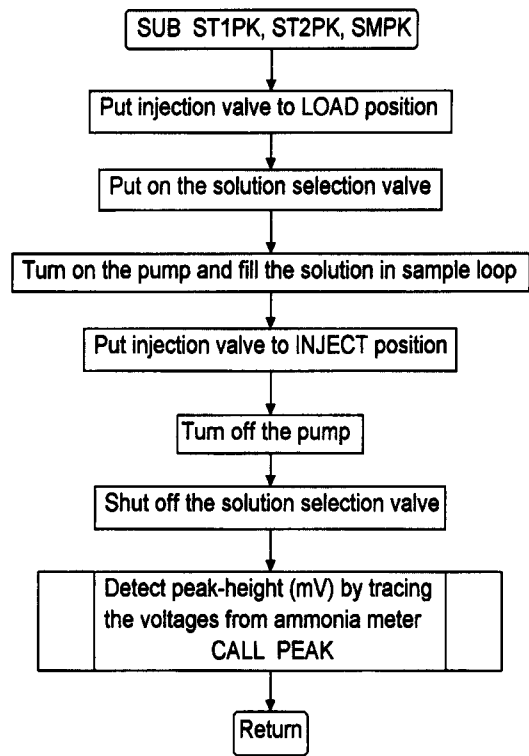


Figure 6. Flowchart of subprogram for getting peak-heights of standards and sample.

도록 한 것은 sampler로 인한 응답시간지연때문에 배양액의 ammonium농도가 너무 낮아지는 것을 방지하기 위한 것이다.

Figure 4는 ammonium농도를 산출하는 subprogram의 흐름도이다. 암모니아미터의 신호를 교정(calibration)하기 위하여 제1표준용액(10 mM NH₄Cl)의 전압피크치(ST1PK)와 제2표준용액(100 mM NH₄Cl)의 전압피크치(ST2PK) 및 시료의 전압피크치(SMPK)를 차례로 검출한 후 전압피크치들을 환산식에 대입함으로써 시료의 암모늄농도(AMMCON)를 산출하는 것으로 하였다. 환산식은 암모늄농도의 대수치와 전압피크치(mV)의 관계가 직선적(R²=0.997)이며 음의 상관관계임(Figure 5)을 이용하여 도출하였다. 환산식은

$$AMMCON(mM) = 10^{-(A \cdot SMPK + B)} \quad (A = 1.0 / (ST2PK - ST1PK), B = 1.0 - A \cdot ST1PK) \text{ 이다.}$$

Figure 6은 표준용액과 시료를 carrier solution의 유로(流路)에 주입하기 위하여 valve와 tubing pump의 작동을 제어하는 subprogram의 흐름도이다. Injection valve를 LOAD상태로 전환시키고 loop를 용액으로 채운다음, 다시 injection valve를 INJECT상태로 전환시켜서 시료 또는 표준용액을 carrier solution의 유로에 주입하는 것으로 하였다.

Figure 7은 전압피크치를 검출하는 subprogram의 흐름도이다. 전압치의 감소를 추적하여 최저치를 검출하되, 최저치에 도달하기 전에 신호가 진동할 경우 발생하는 오류를 방지하기 위한 알고리즘을 프로그램에 포함시켰다.

Figure 8은 A/D변환된 전압측정치의 평균치를 산출하는 subprogram의 흐름도이다. 전압신호의 noise를 소프트웨어적으로 제거하는 동시에 최저전압치를 오류없이 추적하기 위한 측정간격을 확보하기 위하여 10,000개의 전압측정치의 평균을 산출하는 것으로 하였다.

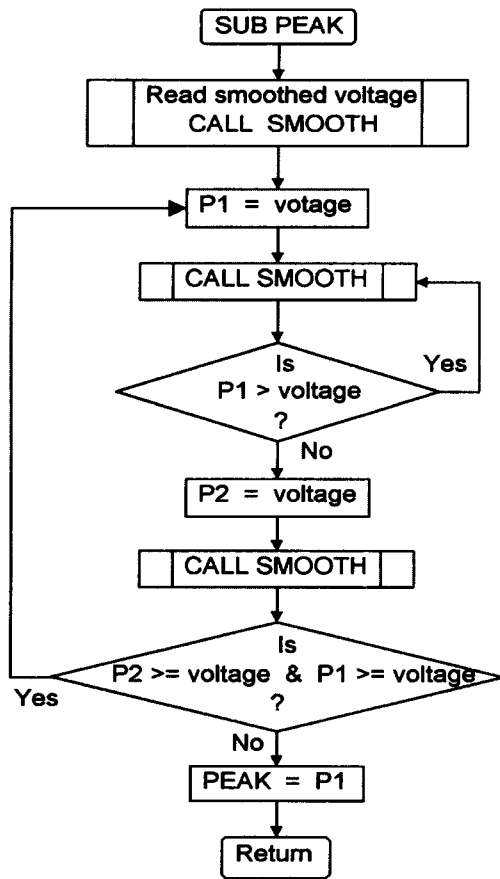


Figure 7. Flowchart of subprogram for getting peak voltage by tracing the decrease of voltage signals.

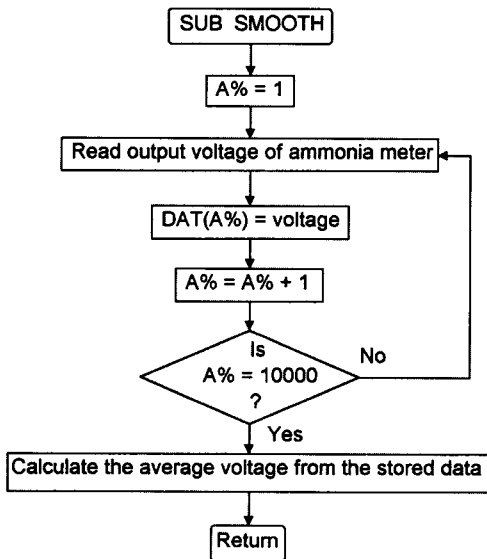


Figure 8. Flowchart of subprogram for smoothing voltage signals from ammonia meter.

기타 분석방법

건조균체량은 배양액 10 mL을 5000 rpm으로 15분간 원심 분리후 세척하는 과정을 2회 반복하고 80℃로 24시간 건조시킨 다음 칭량하여 구하였다.

Glucose첨가량은 전보(1)와 같이 측정하였다. Ammonium의 첨가량은 배양중 (NH₄)₂SO₄용액을 담은 병을 전자저울 (Shimadzu, EL-1200H)위에 올려놓고 측정된 무게감소량으로부터 산출하였다.

Glucose농도는 배양액을 공경 0.45 μM membrane filter로 여과한 여액에 glucose측정용 시약(아산제약, AM201)을 첨가하여 발색시킨 후 비색법으로 측정하였다.

Sampling probe에 의한 ammonium의 자동분석치가 배양액의 암모늄농도를 얼마나 잘 반영하는가를 알아보기 위하여 off-line으로도 ammonium농도를 측정하였다. 즉, 배양중에 채취한 배양액을 membrane filter로 여과한 여액에 대하여 FIA를 수행하여 on-line측정치와 비교하였다. 이 경우에도 on-line 측정시과 마찬가지로 매시료마다 10 mM표준액과 100 mM표준액을 사용하여 ammonia meter의 신호를 교정하였다.

결과 및 고찰

알콜증류폐액배지에 빵효모를 접종하여 glucose와 (NH₄)₂SO₄를 자동첨가하면서 배양한 결과를 Figure 9에 나타내었다. 건조균체량은 초기 0.3 g/L에서 폐액배양액의 탄소원이 전부 고갈되어 DO가 처음으로 60%이상으로 증가된 7.8시간에 2.6 g/L에 도달하였으며, 7.8시간부터 DO신호가 증가할 때마다 glucose를 공급하면서 20시간까지 배양한 결과 균체량이 18.5 g/L에 도달하였으므로 glucose와 ammonium을 첨가함으로써 15.9 g/L의 균체를 더 증가시킬 수 있었다. Glucose는 그림에서와 같이 7.8시간부터 자동적으로 첨가되기 시작하여 배양말기까지 77.8 g이 공급되었다. Glucose를 첨가하기 시작한 7.8시간 이후의 glucose농도는 최고 116 mg/L의 낮은 농도를 나타내었으므로, glucose의 첨가가 효과적으로 이루어졌다고 생각되었다. Ammonium도 자동분석 및 제어 시스템에 의해 약 16분마다 한 번씩 자동분석되고 필요시 첨가됨으로써 전 배양기간동안 7.0 mM~27.7 mM의 낮은 농도로 유지되었으며, 배양기간동안의 ammonium의 총공급량은 5.4g이었다. Ammonium의 on-line측정치와 off-line측정치는 배양후기로 갈수록 차이가 약간 증가하는 양상을 보였으나, 전체적으로 비교적 잘 일치되는 것으로 나타났다.

배양기간동안 첨가된 glucose용액과 (NH₄)₂SO₄용액의 양을 고려하면 배양액의 양은 약 3.3 L이므로 첨가된 glucose에 의해 얻어진 균체량만을 고려할 경우 대당균체수율은 약 0.67 g/g이었고, 총균체량으로 산출할 경우에는 약 0.78 g/g이었다. 균의 최대비증식속도는 0.21 hr⁻¹였으며, 대암모늄균체수율은 약 11.3 g/g이었다. NH₄OH를 pH조정제인 동시에 ammonium의 공급원으로 사용한 전보(1)에서는 첨가된 glucose에 의해 얻어진 균체량만을 고려한 균체수율은 약 0.42 g/g이었고, 총균체량으로 산출한 대당균체수율은 약 0.54g/g이었으며, 균의 최대비증식속도는 0.18 hr⁻¹였다. 배양액의 ammonium농도를 제어함으로써 제어하지 않은 경우에 비해 glucose에 의해 얻어진 균체량만을 고려한 균체수율이 약 1.6배 증가하였으며, 총균체량으로 산출한 균체수율은 약 1.4배 증가하였고 비증식속도는 1.2배 증가하였다. Miskiewicz(13)는 본 연구의 glucose제어방법과 동일한 DO를 제어파라미터로 하는 방법으로 빵효모를 배양하여 최대비증식속도 0.192 hr⁻¹, 최대대당균

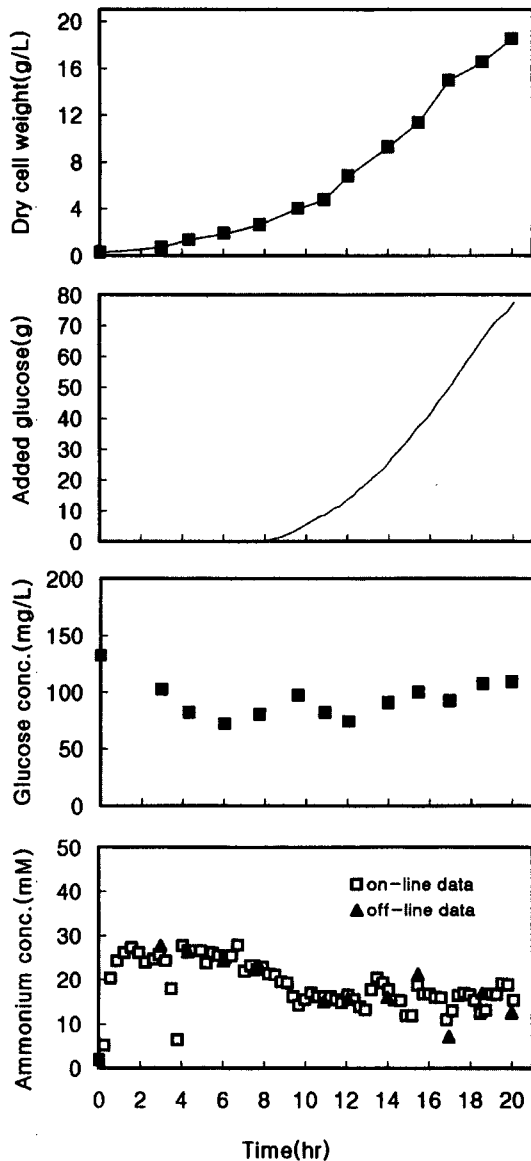


Figure 9. The cultivation of a baker's yeast in alcohol distillery wastewater by the automatic addition of glucose and ammonium (Ammonium was added from the beginning as $(NH_4)_2SO_4$, and was measured and controlled by on-line FIA. Glucose was added from 7.8hr and controlled by using DO as control parameter).

체수율 0.52 g/g을 얻었음을 보고하였으며, Nanba 등(14)은 빵효모 배양시 ethanol sensor를 사용하여 glucose feeding을 제어하는 연구로 비증식속도 0.17 hr⁻¹, 대당균체수율 0.50 g/g을 얻었음을 보고하였고, Park 등(15)은 fuzzy제어에 의해 빵효모 배양액의 glucose와 ethanol 농도를 제어함으로써 비증식속도 0.192 hr⁻¹, 대당균체수율 0.53 g/g을 얻었음을 보고하였다. 이들의 결과와 본 연구의 결과를 비교할 경우 본 연구에서 얻어진 비증식속도와 대당균체수율 결과가 가장 우수하였다. Nanba 등(14)과 Park 등(15)에서는 본 연구의 glucose 제어방법보다 더 우수한 제어방법을 사용하였음에도 불구하고 더 낮은 결과가 얻어진 것으로 보아 ammonium농도의 제어로 증식속도와 균체수율이 크게 향상됨을 알 수 있었으며, ammonium농도를 제어함으로써 첨가된 glucose의 이용효율을 더욱 증가시킬 수 있었다. 본 연구의 glucose제어방법은 그

특정상 배양중 영양물의 결핍이 반복적으로 일어나고 균의 활성도 저하할 수 있다(16). 따라서, 영양물의 결핍이 일어나지 않는 직접 feedback 제어법등의 방법을 사용하여 glucose 농도를 제어한다면 대당균체수율을 더 높여서 glucose의 첨가 효율을 극대화시킬 수 있다고 생각되었다.

요 약

알콜증류폐액에 빵효모를 배양하는 중에 glucose와 ammonium을 자동첨가하여 균체량을 효율적으로 증가시킴으로써 폐액의 재이용성을 향상시키고자 하였다. Glucose는 DO를 제어파라미터로 하는 제어방법을 사용하여 116 mg/L이하로 자동제어하였다. Ammonium의 경우에는 FIA를 이용한 온라인 자동계측제어장치와 프로그램을 이용하여 배양액의 ammonium농도를 자동분석하고 제어하였으며, ammonium농도를 7.0~27.7 mM의 낮은 농도범위로 유지시킬 수 있었다. Ammonium농도를 제어한 본 실험의 최대비증식속도는 0.21 hr⁻¹이었고, 대당균체수율은 약 0.78 g/g으로서 ammonium농도를 제어하지 않은 경우에 비하여 대당균체수율은 약 1.4배, 최대비증식속도는 1.2배 더 높아졌으므로 ammonium제어에 의하여 균의 glucose이용효율이 더욱 향상되었다. 대당모늄균체수율은 약 11.3 g/g이었다. Glucose와 ammonium을 첨가함으로써 균체량을 18.5 g/L까지 높일 수 있었으며, 이는 첨가하지 않은 경우보다 7.1배 더 높은 균체량에 해당한다. Glucose와 ammonium의 농도를 낮게 유지시킬 수 있었으므로 두가지 영양성분의 경제적인 공급이 가능하였다.

REFERENCES

1. Lee, H. C. (2000), Increase of Cell Concentration by the Automatic Addition of Glucose and Ammonium to an Alcohol Distillery Wastewater Reutilized for Cultivating a Baker's Yeast - Automatic Addition of Ammonium with pH-stat Method -, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 134-138.
2. Kole, M. M., B. G. Thompson, and D. F. Gerson (1985), Ammonium Concentration Control in Fed-Batch Fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Ferment. Technol.*, **63**(2), 121-125.
3. Kole, M. M., D. Ward, and D. F. Gerson (1986), Simultaneous Control of Ammonium and Glucose Concentrations in *Escherichia coli* Fermentations, *J. Ferment. Technol.*, **64**(3), 233-238.
4. Nielson, J., K. Nikolajsen, and J. Villadsen (1988), FIA for On-line Monitoring of Important Lactic Acid Fermentation Variables, *Biotech. Bioeng.*, **33**, 1127-1134.
5. Schugerl, K. (1988), On-line Analysis and Control of Production of Antibiotics, *Analytica Chimica Acta*, **213**, 1-9.
6. Garn, M., M. Gisin, and C. Thommen (1989), A Flow Injection Analysis System for Fermentation Monitoring and Control, *Biotech. Bioeng.*, **34**, 423-428.
7. Chung, S., X. Wen, K. Vilholm, M. D. Bang, G. Christian, and J. Ruzicka (1991), Novel Flow Injection Analysis Method for Bioprocess Monitoring, *Analytica Chimica Acta*, **249**, 77-85.
8. Christensen, L. H., J. Nielsen, and J. Villadsen (1991), Monitoring of Substrates and Products during Fed-Batch

- Fermentation on Complex Media. *Analytica Chimica Acta*, **249**, 123-136.
9. Schugerl, K., L. Brandes, T. Dullau, K. Holzhauer-Rieger, S. Hotop, U. Hubner, X. Wu, and W. Zhou (1991), Fermentation Monitoring and Control by On-line Flow Injection and Liquid Chromatography, *Analytica Chimica Acta*, **249**, 87-100.
 10. Putten, A. B., F. Spitzenberger, G. Kretzmer, B. Hitzmann, and K. Schugerl (1995), On-line and Off-line Monitoring of the Production of Alkaline Serine Protease by *Bacillus licheniformis*, *Analytica Chimica Acta*, **317**, 247-258.
 11. Honda, H., T. Nakazeko, K. Ogiso, Y. Kawase, N. Aoki, M. Kawase, and T. Kobayashi (1997), Colomic Acid Production from *Escherichia coli* in a Fed-Batch Culture under the Control of Ammonium Ions Using an FIA System, *J. Ferment. Bioeng.*, **83**(1), 59-63.
 12. Spohn, U., J. Pol, R. Everhardt, B. Joksch, and Ch. Wandrey (1994), An Atomated System for Multichannel Flow-injection Analysis, *Analytica Chimica Acta*, **292**, 281-295.
 13. Miskiewicz, T. (1981), Control of Substrate Concentration in Baker's Yeast Process with Dissolved Oxygen as Nutrient Feed Indicator, *J. Ferment. Technol.*, **59**(5), 411-413.
 14. Nanba, A., F. Hirota, and N. Shiro (1981), Microcomputer-coupled Baker's Yeast Production, *J. Ferment. Technol.*, **59**(5), 383-389.
 15. Park, Y., S., Z. P. Shi, S. Shiba, C. Chantal, S. Iijima, and T. Kobayashi (1981), Application of Fuzzy Reasoning to Control of Glucose and Ethanol Concentrations in Baker's Yeast Culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 649-655.
 16. Yano T., T. Endo, T. Tuji, and Y. Nishizawa (1991), Fed-Batch Culture with a Modified DO-Stat Method, *J. Ferment. Bioeng.*, **71**(1), 35-38.