

## 한지자숙폐액을 이용한 *Saccharomyces cerevisiae*의 배양에서 온-라인 FIA시스템에 의한 Glucose의 자동분석 및 첨가에 의한 증균

†이 형 춘

서원대학교 식품영양학과

(접수 : 2000. 7. 21., 게재승인 : 2000. 8. 21.)

### Increase of Cell Concentration by the Automatic Analysis and Addition of Glucose with an On-line Flow Injection Analysis System in the Cultivation of a *Saccharomyces cerevisiae* Using a Korean Paper Digestion Wastewater

Hyeong Choon Lee†

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

(Received : 2000. 7. 21, Accepted : 2000. 8. 21.)

An on-line glucose flow injection analysis system was developed and used for the automatic analysis and addition of glucose in the cultivation of a *Saccharomyces cerevisiae* in a Korean paper digestion wastewater in order to increase the cell concentration. The system was composed of a ceramic sampler, a sampling valve, an injection valve, an immobilized glucose oxidase column, a debubbler, a flow cell with platinum electrodes, a potentiostat, a computer and interface system, and tubing pumps. The glucose concentration of the wastewater medium was maintained at the low concentration of  $176 \pm 31 \text{ mg/l}$  with the on-line FIA system, and by adding glucose and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , the cell concentration as total cell count can be increased by 3.1 times.

**Key Words :** *Saccharomyces cerevisiae*, Korean paper digestion wastewater, glucose addition, FIA

#### 서 론

지자는 전보(1)에서 한지자숙폐액에 사료첨가효모제로부터 분리한 *Saccharomyces cerevisiae*를 배양하는 중에 자숙원액을 첨가함으로써 균농도를 증가시켜 폐액의 재이용성을 향상시키는 연구를 수행하였다. 균농도를 증가시키는 또 다른 방법으로서는 배양중에 glucose와 같은 탄소원을 첨가하는 방법도 있으며, 이 경우 원료비는 증가하지만, 자숙원액을 첨가하는 방법에 비하여 배양관리가 쉬운 이점이 있다. 이(2,3)는 알콜증류폐액을 이용한 빵효모배양에서 glucose를 첨가함으로써 균농도를 증가시켰다. Glucose를 첨가할 경우 배양액의 glucose농도가 높아지면, glucose effect(4)에 의하여 glucose의 일부가 ethanol로 전환되므로 첨가된 glucose의 이용효율을 높이기 위해서는 glucose농도를 낮게 유지시키면서 첨가할 필

요가 있으며, 정밀하게 제어하기 위해서는 자동제어방법을 사용할 필요가 있다. Glucose농도의 자동제어법중 본 연구와 같은 호기성배양에 이용할 수 있으면서 간단한 방법중의 한 가지는 배양액의 용존산소(DO)를 제어파라미터로 이용하는 방법(2,3,5-12)이다. 그러나, 효모의 균체농도가 본 연구에서와 같이  $10^8/\text{mL}$ 이하로 낮을 경우에는 산소섭취속도가 너무 낮으므로 DO를 제어파라미터로 이용하기 어렵기 때문에 glucose 농도를 직접 자동분석하면서 그 농도를 제어할 필요가 있다고 생각되었다. 배양액의 glucose농도 자동분석법중 자주 이용되는 방법중 한가지가 glucose oxidase를 이용한 flow injection analysis(FIA)법(13-16)이다. FIA법은 아주 작은 량의 시료로 분석이 가능하여 배양액의 손실을 최소화할 수 있으며, 빠르고, 신뢰성이 크며, 자동화가 쉽다(17). 반면에, FIA법은 대상물질의 분석에 어느정도의 시간이 걸리기 때문에 균농도가 높아져서 glucose섭취속도가 커지면 섭취속도에 비하여 측정속도가 느리므로 정밀한 제어가 곤란해진다. 그러나, 본 연구에서는 낮은 범위의 균농도에서 glucose를 제어하는 것이므로 문제가 없다고 생각되었다.

이러한 관점에서, glucose oxidase를 이용한 on-line FIA시

†Corresponding Author : Department of Food and Nutrition, Seowon University, 231, Mochung-dong, Cheongju 361-742, Korea  
Tel & Fax : 82-43-261-8744  
E-mail : hlee@seowon.ac.kr

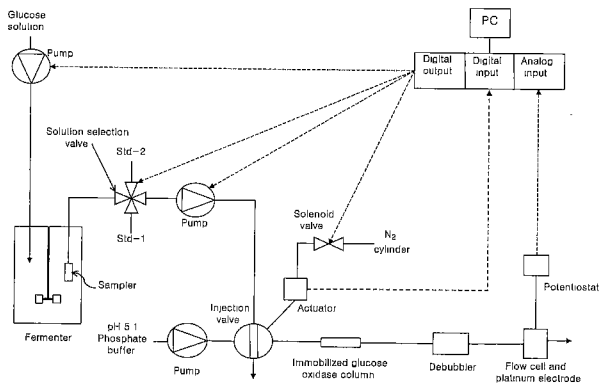


Figure 1. Schematic diagram of the fermenter with on-line glucose FIA and glucose addition system.

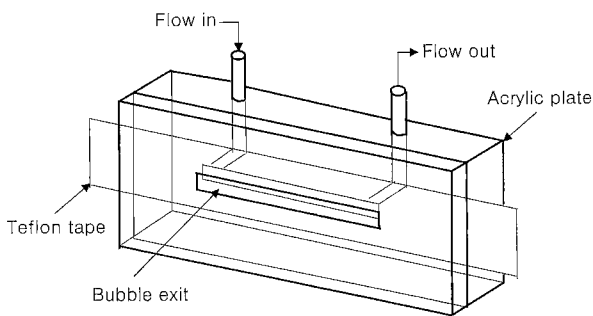


Figure 2. Schematic diagram of debubbler.

시스템을 제작하였으며, 이 시스템을 사용하여 한지자숙폐액을 이용한 *Saccharomyces cerevisiae*의 배양중에 배양액의 glucose 농도를 자동분석하고 자동첨가함으로써 균농도를 증가시키는 실험을 수행하였다.

**재료 및 방법**

**사용균주 및 폐액**

균주는 C사 (경기도 안산시 소재)의 사료첨가용 건조효모 제품으로부터 yeast extract malt extract agar media(YM 한천 배지)를 분주하여 고화시킨 평판배지를 사용하여 순수분리한 *Saccharomyces cerevisiae*종을 사용하였다.

폐액은 D사 (충청북도 단양군 소재)의 한지자숙폐액을 이용하였다. 이 폐액은 자숙탱크에 물 약 0.5 m<sup>3</sup>를 부은다음 닳나무껍질 60 Kg과 NaOH (대원화학공업(주), 98%) 20kg을 넣고 약 2시간 자숙시키는 과정에서 생성된 폐액으로서, BOD 24,000 ppm, COD 24,000 ppm, SS 8,300 ppm으로 분석되었으며, pH 13.3인 강알칼리성 폐수였다.

**배양액**

한지자숙폐액을 증류수로 7.5배 희석하고 conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하여 pH 4.0으로 조정한 다음 No.5C 여과지로 여과한 액을 배양액으로 사용하였다.

**배양방법**

5 L jar-fermenter (한국발효기, KFC-5L)에 배양액 2.7 L를

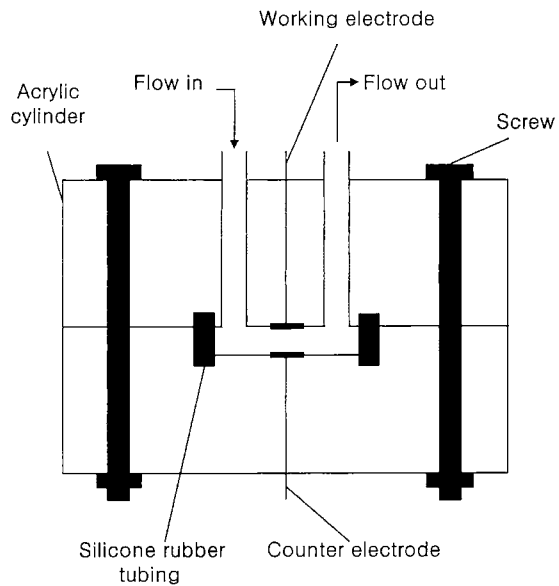


Figure 3. Schematic diagram of flow cell and platinum electrode.

넣고 고압멸균한 다음 균을 접종하여 배양하였다. 접종액은 250 mL 삼각flask에 배양액 50 mL을 넣고 고압멸균한 다음 보존균 1백균이를 접종하여 30℃, 180 rpm으로 24시간 진탕 배양 (왕복식)한 것을 사용하였으며, 접종량은 300 mL였다 (10%). 배양온도는 30℃로 유지하였으며, pH는 pH제어기 (한국발효기, mk-250pH)를 사용하여 4N HCl과 4N NaOH를 배양기간동안 자동적으로 공급함으로써 4.0으로 제어하였다. DO%는 DO meter (한국발효기, mk-250DO)로 측정하면서 통기량과 교반속도를 조절하여 70%이상으로 유지하였다. 소포제는 silicone소포제 (한국다우코닝, LS-300)를 사용하였다.

**Glucose 자동분석 및 첨가시스템**

Glucose 자동분석 및 첨가시스템의 구성은 Figure 1과 같다. 기본적인 구성은 이(3)의 ammonium 자동분석 및 첨가시스템과 같다.

Glucose-FIA장치중 고정화 glucose oxidase column은 내경 3 mm, 길이 50 mm인 유리 column에 고정화 glucose oxidase를 충전하여 제작하였다. 고정화 glucose oxidase는 *Aspergillus oryzae*의 glucose oxidase (Sigma, 7200 units/g)를 3-aminopropyl triethoxy silane (Sigma)으로 silanization시킨 controlled pore glass (Sigma, 120~200 mesh)에 고정화 시켜서 얻었으며, silanization 및 고정화방법은 신(18)의 방법에 의하였다. Debubbler는 아크릴판을 이용하여 제작하였으며, 그 구조는 Figure 2와 같다. 그림에서와 같이 아크릴판 한 장에는 폭 1.6 mm, 깊이 0.8 mm, 길이 30 mm의 홈을 내고 그 위를 테프론테이프와 홈에 맞추어서 홈의 길이만큼 밖으로 통하게 뚫어준 또 다른 아크릴판을 덮어준 다음 두장의 아크릴판을 나사로 고정시켜 주었다. 홈의 양끝으로는 직경 0.8 mm의 구멍을 내어 carrier solution의 유로와 연결시켜 주었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 검출용 flow cell의 구성은 Figure 3과 같다. Flow cell중의 백금전극은 백금 sheet (지름5mm, 두께0.3mm)를 이용하여 제작하였으며, 백금전극사이에 형성되는 공간의 부피는 약 50 μL였다. 백금전극에 potentiostat(EG&G, 362)을 연결하여

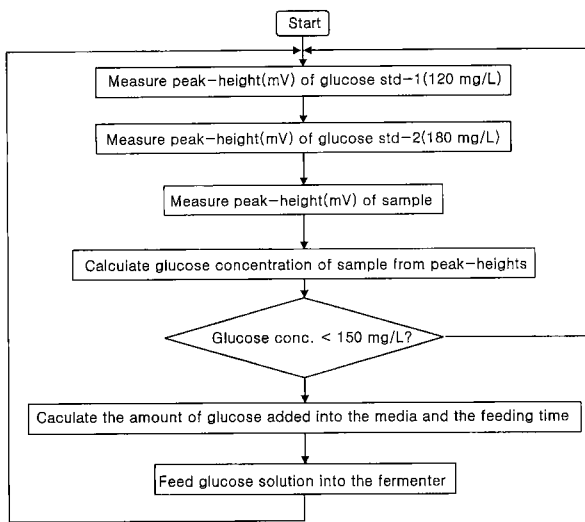


Figure 4. Flowchart for the automatic addition of glucose to the wastewater medium.

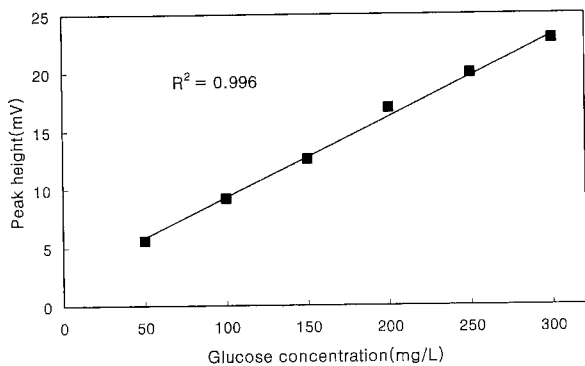


Figure 5. Relationship between glucose concentrations and their peak heights.

주었으며, potentiostat의 출력은 컴퓨터로 측정하는 동시에 기록계(영인과학, D520B)로도 기록하였다. PTFE튜브 (내경: 0.8mm)와 fitting류는 Upchurch사의 것을 사용하였다. Glucose-FIA의 carrier solution은 pH 5.1 phosphate buffer를 사용하였으며, 유량은 1.3 mL/min였다. Injection valve의 loop-용량은 50  $\mu$ L였다.

Glucose 자동분석 및 첨가 program의 기본구성은 이(3)의 ammonium 자동분석 및 첨가 program과 같으며, program의 흐름도는 Figure 4와 같다. 그림에서와 같이, 제1표준용액의 전압피크치, 제2표준용액의 전압피크치 및 시료의 전압피크치를 순서대로 검출한 다음 이들을 환산식에 대입하여 시료의 농도를 산출하고 시료의 농도가 일정농도이하일 경우 폐액배양액에 포도당 용액을 공급하여 주는 것으로 하였다. 전압치는 10000개 신호의 평균치를 취하였다. 전압피크치는 시료 또는 표준용액이 고정화 glucose oxidase column을 거쳐서 flow cell을 통과할 때 일어나는 전압치의 증가를 추적하여 최고치를 검출하였다(3). Glucose표준용액의 농도와 전압피크치의 관계를 Figure 5에 나타내었다. 그림에서와 같이 300 mg/L까지 직선성( $R^2=0.996$ )이 우수하였으므로, 150 mg/L 정도에서 제어를 하면 낮은 농도에서 무난히 제어가 가능하리

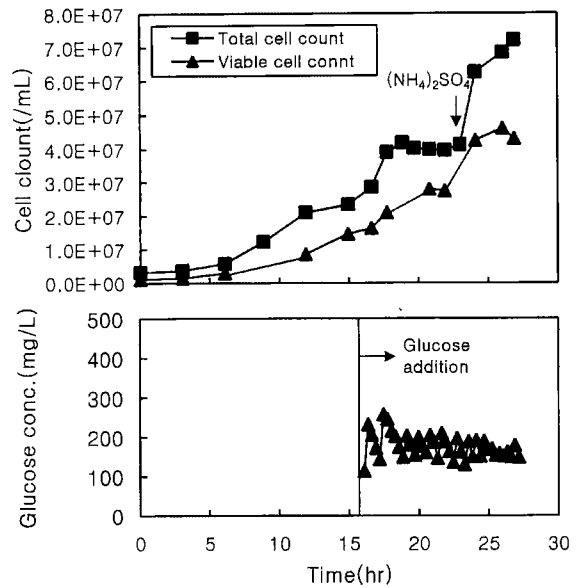


Figure 6. Automatic glucose measurement and addition with an on-line FIA system in a *Saccharomyces cerevisiae* cultivation using a Korean paper digestion wastewater (Glucose was added from 16.1 hr and 4.8 g of  $(NH_4)_2SO_4$  added at 23.0 hr).

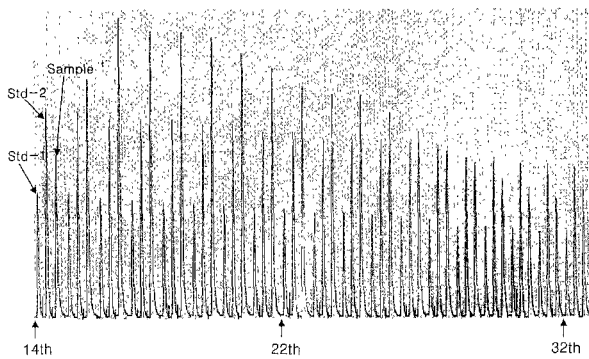
라고 생각되었다. 따라서, 제1표준용액의 농도는 120 mg/L로 설정하였고, 제2표준용액의 농도는 180 mg/L로 설정하였다. 시료농도를 산출하기 위한 환산식은 시료농도(mg/L) =  $120 + (180-120) \times (\text{시료의 전압피크치} - \text{제1표준용액의 전압피크치}) / (\text{제2표준용액의 전압피크치} - \text{제1표준용액의 전압피크치})$ 였다. 시료농도가 150 mg/L 이하일 경우, glucose용액(350 g/L)을 첨가하여 주었는데, 배양액의 양을 3.0 L로 가정하고 배양액의 농도가 300 mg/L가 되도록 첨가하였다.

### 총균수 및 생균수 측정

총균수는 haemocytometer (Brand, Neubauer improved)로 측정하였다. 생균수는 배양액 1 mL를 생리식염수로 10진희석법으로 희석한 희석액 0.1 mL씩을 YM 평판배지상에 도말하고, 30 $^{\circ}$ C로 48시간 배양후 생성된 colony를 계수하여 측정하였다.

### 결과 및 고찰

폐액배양액에 효모를 접종하여 glucose를 자동첨가하면서 배양한 결과는 Figure 6과 같다. 총균수는 배양초기  $3.3 \times 10^6$ /mL에서 11.9시간에  $2.1 \times 10^7$ /mL, 15.0시간에  $2.3 \times 10^7$ /mL에 도달하여 정체되는 양상을 보였으므로 16.1시간부터 glucose 자동첨가를 시작하였더니 증식이 재개되어 18.9시간에  $4.2 \times 10^7$ /mL에 도달후 다시 증식이 정체되었다. 그러나, 23.0시간에 다시  $(NH_4)_2SO_4$  4.8 g을 첨가하자 다시 빠르게 증식하여 24.1시간에  $6.3 \times 10^7$ /mL에 도달후 어느 정도 정체되는 양상을 나타내었고 26.9시간에  $7.2 \times 10^7$ /mL에 도달하였다. 11.9시간에 증식이 정체인 것은 배양액중의 영양성분이 결핍되었기 때문인데 16.1시간부터의 glucose첨가로 증식이 재개된 것으로 보아 탄소원이 고갈되었기 때문이라고 생각되



**Figure 7.** Recorder output showing peaks of standards and samples (19 measuring values from 14th to 32th; Of each three peaks, the first is for glucose standard-1 (120 mg/L), the second for glucose standard-2 (180 mg/L) and the third for sample).

었다. 탄소원인 glucose를 첨가함에도 불구하고 18.9시간 이후에 다시 증식이 정체된 것은 glucose이외의 영양성분의 결핍에 기인한 것으로 생각되었으며, 23.0시간에  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 첨가로 다시 증식한 것으로 보아 질소 또는 황성분의 결핍 때문인데, 황성분은 폐액의 pH를  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 로 조정하면서 충분히 첨가되었으므로 질소성분이 결핍되었기 때문이라고 생각되었다. 이(2)는 알콜증류폐액을 이용한 빵효모의 배양중 제일 먼저 결핍되는 영양성분이 탄소원이고 다음으로 결핍되는 것이 질소원이라고 하였는데, 본 연구의 양상과 일치하였다. 증식에 가장 많이 필요한 성분 두가지가 탄소와 질소이므로 다른 폐액에 미생물을 증식시키는 경우에도 비슷한 양상일 것으로 생각되었다. 생균수는 배양초기  $1.1 \times 10^6/\text{mL}$ , 11.9시간에  $8.6 \times 10^6/\text{mL}$ , 15.0시간에  $1.5 \times 10^7/\text{mL}$ , 20.8시간에  $2.8 \times 10^7/\text{mL}$ 으로 총균수와 유사한 양상으로 증식하여  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 첨가 후 26.1시간에  $4.6 \times 10^7/\text{mL}$ 에 도달하였으나, 26.9시간에는  $4.3 \times 10^7/\text{mL}$ 으로 떨어졌다.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 첨가후 균중식이 계속되지 못한 것을 생균수 결과로부터 더욱 뚜렷이 알 수 있었으며, 이는 탄소원과 질소원 이외의 다른 영양성분의 결핍 때문이라고 생각되었고, 본 연구에서 사용한 폐액배양액의 조성(1)에 따르면, 탄소와 질소 다음으로 많이 필요한 인성분일 가능성이 가장 크다고 생각되었다. 결국 glucose와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 첨가로 총균수를 3.1배 더 증가시킬 수 있었으며, 인성분등을 추가로 첨가할 경우 균수를 더욱 증가시킬 수 있다고 생각되었다.

Glucose의 자동첨가를 시작한 후 배양말기까지 총 41회의 자동분석이 수행되었으며, 배양액의 glucose농도가 최저 114 mg/L(초기치), 최고 257 mg/L로 얻어졌으므로 glucose첨가 이후의 glucose농도가 300 mg/L이하로 잘 유지되었다. 전체 분석치의 평균은  $176 \pm 31$  mg/L로써 c.v.(coefficient of variation) 값이 17.6이었고, 22번째 분석치 이후의 평균은  $165 \pm 19$  mg/L로써 c.v.값이 11.5로 더 낮아졌으므로 배양후기로 갈수록 제어효율이 향상되는 것으로 나타났다. 매분석마다 2가지 표준용액으로 calibration작업을 수행하였으므로 정확한 측정이 가능하였으나, 1회분석에 소요된 시간은 약16분으로 긴 편이었다. 따라서, 본 연구에서와 같이 균농도가 낮은 경우에는 오히려 배양후기에서 제어효율이 향상되었으나, 균농도가 더 커질 경우에는 균의 glucose소비속도는 증가하지만 측정속

도는 일정하므로 제어효율이 저하할 것이다(19). 따라서, 균농도를 더 증가시키고자 할 경우에는 분석시간을 단축시키는 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

Figure 7은 glucose의 자동분석중 14번째로부터 32번째까지의 기록계(영인과학, D520B)출력을 나타낸 것이다. 세개의 peak가 1회분석에 해당하며, 세 개중 제일 왼쪽의 것은 제1 표준용액 (120mg/l)에 대한 것이고 가운데 것은 제2 표준용액 (180mg/l)에 대한 것이며, 제일 오른쪽 것은 시료에 대한 것이다. 표준용액의 peak들을 보면 오른쪽으로 분석이 진행될수록 전압치가 상당히 빠른 속도로 낮아지는 양상을 나타내고 있다. 이러한 양상은 배양말기까지 계속되어 배양말기의 전압치는 배양초기의 약 38%에 불과하였고, 다른 연구의 보고(14)에 비하여 실험속도가 매우 빨랐다. 따라서, 효소의 경제적인 사용을 위해서는 효소의 실험을 방지하는 방법에 대한 고안이 필요할 것으로 생각되었다. 또한, 효소의 빠른 실험이 폐액배양액을 사용하였기 때문인지 또는 다른 이유인지는 보충실험을 통하여 확인되어야 할 것이다.

## 요 약

한지사죽폐액을 이용한 *Saccharomyces cerevisiae*의 배양에서 glucose의 자동분석 및 첨가에 의해 균농도를 증가시킴으로써 폐액의 재이용성을 향상시키고자 하였다. 배양액의 glucose를 자동분석하고 자동첨가하기 위하여 ceramic sampler, sampling valve, injection valve, glucose oxidase column, debubbler, flow cell과 백금전극, potentiostat, computer와 interface card, 및 tubing pump들로 구성된 glucose 자동분석 및 첨가시스템을 제작하였으며, glucose의 자동분석에는 glucose oxidase를 이용한 on-line FIA법을 채택하였다. 효모의 배양중 glucose자동분석 및 첨가시스템을 사용하여 glucose를 자동첨가한 결과 배양액의 포도당농도가  $176 \pm 31$  mg/L 의 낮은 농도로 제어되었으며, glucose와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 첨가에 의해 총균수가 3.1배 증가하였다.

## REFERENCES

- Lee, H. C. (2000), Cultivation of a *Saccharomyces cerevisiae* in a Korean Paper Digestion Wastewater, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(3), 274-279.
- 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, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(2), 134-138.
- 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 Analysis and Control of Ammonium Concentration with an On-line Flow Injection Analysis System, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(2), 139-144.
- Bellgardt, K. H. and J. Yuan (1991), Process Models: Optimization of Yeast Production- A Case Study, in *Biotechnology*, vol. 4, H. J. Rhem and G. Reed, Eds, p388, VCH, Weinheim.

5. Miskiewicz, T., W. Lesniak, and J. Ziobrowski (1975), Control of Nutrient Supply in Yeast Propagation, *Biotech. Bioeng.* **17**, 1829-1832.
6. Yano, T., T. Kobayashi, and S. Shimizu (1978), Fed-batch Culture of Methanol-utilizing Bacterium with DO-stat, *J. Ferment. Technol.* **56**(4), 416-420.
7. Mori, H., T. Yano, T. Kobayashi, and S. Shimizu (1979), High Density Cultivation of Biomass in Fed-batch System with DO-stat, *J. Chem. Eng. Japan* **12**(4), 313-319.
8. 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.
9. Hopkins, T. R. (1981), Feed-on-Demand Control of Fermentation by Cyclic Changes in Dissolved Oxygen Tensions, *Biotech. Bioeng.* **23**, 2137-2143.
10. Yamauchi, H., H. Mori, T. Kobayashi, and S. Shimizu (1983), Mass Production of Lipids by *Lipomyces starkeyi* in Microcomputer-aided Fed-Batch Culture, *J. Ferment. Technol.* **61**(3), 275-280.
11. 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.
12. Yano, T., M. Kurokawa, and Y. Nishizawa (1991), Optimum Substrate Feed Rate in Fed-batch Culture with the DO-stat Method, *J. Ferment. Bioeng.*, **71**(5), 345-349.
13. Schugerl, K. (1988): On-line Analysis and Control of Production of Antibiotics, *Analytica Chimica Acta* **213**, 1-9.
14. 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.
15. Christensen, L. H., J. Nielsen, and J. Villadsen (1991), Monitoring of Substrates and Products during Fed-batch Penicillin Fermentations on Complex Media, *Analytica Chimica Acta* **249**, 123-136.
16. Putten A. B., F. Spitzenberger, G. Kretzmer, B. Hitzmamm, 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.
17. Nielson, J., K. Nikolajsen, and J. Villadsen (1988), FIA for On-line Monitoring of Important Lactic Acid Fermentation Variables, *Biotech. Bioeng.* **33**, 1127-1134.
18. Shin, M. C. (1992), Development of Flow Injection Analysis System for Amperometric Determination of Cholesterol with Immobilized Enzyme Columns, M. S. Thesis, Department of Biological Science and Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon.
19. Mizutani, S., S. Iijima, M. Morikawa, K. Shimizu, M. Matsubara, Y. Ogawa, R. Izumi, K. Matsumoto, and T. Kobayashi (1987), On-line Control of Glucose Concentration Using an Automatic Glucose analyzer, *J. Ferment. Technol.* **65**(3), 325-331.