

## 알콜증류폐액을 이용한 빵효모배양에서 포도당, 암모늄 및 인산의 자동첨가에 의한 증균

† 이 형 춘  
서원대학교 식품영양학과  
(접수 : 2003. 4. 12., 게재승인 : 2003. 5. 9.)

## Increasing Cell Concentration by the Automatic Addition of Glucose, Ammonium and Phosphate in the Cultivation of a Baker's Yeast in Alcohol Distillery Wastewater

Hyeong-Choon Lee†  
Department of Food and Nutrition, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea  
(Received : 2003. 4. 12., Accepted : 2003. 5. 9.)

Automatic addition of glucose, ammonium and phosphate to alcohol distillery wastewater and their control at low concentrations have been carried out to increase the cell concentration of a baker's yeast cultivated in the wastewater. Glucose was automatically added using dissolved oxygen as the control parameter, and maintained below 300 mg/L. Ammonium was automatically added by a pH-stat method and maintained in the low range of 12.6~17.4 mM. An automated FIA system, which used an ascorbic acid-based method was developed for the automatic analysis and addition of phosphate. With this system, the phosphate concentration was successfully analysed and controlled after 19.4 hr in the range 23.3~43.4 mg/L. The cell concentration was increased by 33.0-fold by the addition of these three nutrients. The overall specific growth rate of the yeast was 0.19 hr<sup>-1</sup>.

**Key Words** : Baker's yeast, alcohol distillery wastewater, nutrient addition, automatic analysis of phosphate, flow injection analysis

### 서 론

알콜증류 폐액에 빵효모를 배양할 경우 탄소원, 질소원, 인원의 순서로 영양원이 결핍되는 것이 이미 보고되었으며(1), 또한 탄소원으로서 포도당과 질소원으로서 암모늄을 자동첨가함으로써 폐액배양액의 균체농도를 높여서 배양의 생산성을 향상시키는 연구(1, 2)가 수행되었다. 포도당은 용존산소농도를 제어파라미터로 하여 자동첨가 하였으며, 암모늄은 pH-stat 에 의한 방법 (1) 또는 자동화 FIA 장치(2)을 사용하였다.

탄소원, 질소원에 이어서 인원까지 자동첨가 한다면 배양액의 균체농도를 더 높여 배양의 효율성을 더욱 증가시킬 수 있다고 생각되었다. 인원은 인산염의 형태로 첨가하면 되며, 인산을 자동첨가하자면 배양액 인산 농도의 자동측정이 선행되어야 한다.

배양액의 인산을 자동측정하는 연구로써 Garn 등(3)은 on-line FIA법으로 대장균 배양액의 인산을 자동측정하였으며, 분석방법은 비색법인 ascorbic acid법을 사용하였다. Putten 등(4, 5)은 *Bacillus licheniformis*를 배양하여 alkaline protease를 생산하는 연구에서 on-line FIA 장치로 인산을 자동분석하였다. 분석방법은 역시 ascorbic acid법이었다. 이들의 방법이 본 연구에도 적용될 수 있다고 생각되었다.

따라서, 본 연구에서는 배양액의 인산을 자동분석하기 위하여 자동화 FIA 장치를 제작하였으며, 이 장치를 사용하여 알콜증류 폐액에 빵효모를 배양하면서 배양액에 포도당, 암모늄과 함께 인산까지 자동첨가 함으로써 균체농도를 효율적으로 더 증가시킬 수 있는가를 알아 보았다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 폐액

균주는 J사 (경기도 안산시 소재)의 건조이스트제품으로부터 YM 평판배지 (peptone 5 g, yeast extract 3 g, malt extract 3 g, glucose 10 g, distilled water 1 L)를 사용하여 순

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

Tel & Fax : 043-299-8744

E-mail : hclee@seowon.ac.kr

수분리한 빵효모를 사용하였다. 알콜증류 폐액은 J사 (경기도 안산시 소재)에서 현미를 원료로 사용하여 주정을 생산하고 폐기되는 폐액을 수집하여 여과지 (Toyo Roshi Kaisha, 5C)로 여과하여 사용하였다. 여과폐액의 pH는 3.5였다.

**배양방법**

5 L 발효조 (코바이오텍, KFC-5L)에 여과폐액 2.4 L를 넣고 121°C, 15분 멸균한 다음 접종액 600 mL를 접종하여 배양하였다. 접종액은 500 mL 삼각플라스크에 여과폐액 100 mL을 넣고 121°C, 15분 멸균 후 보존균 1 백균이를 접종하여 180 rpm, 30°C로 24시간 진탕배양(회전식)한 것을 사용하였다. 배양온도는 30°C로 유지하였으며, pH는 pH전극 (Ingold, 4480)과 pH제어기 (코바이오텍, mk-250pH)를 사용하여 4.5로 유지하였다. pH조정제는 2.0N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 4.0N NH<sub>4</sub>OH를 사용하였다. 배양액의 용존산소농도는 통기량과 교반속도를 조절함으로써 용존산소포화백분율을 20%이상으로 유지하였다. 소포제는 실리콘소포제 (럭키디씨실리콘, LS-300)를 사용하였다.

**포도당의 자동첨가방법**

포도당 자동첨가장치의 구성을 Fig. 1의 발효조 왼쪽 바로 윗부분에 나타내었으며, 자동첨가방법은 전보들(1, 2)과 같이 DO를 제어파라미터로 하는 방법을 사용하였다.

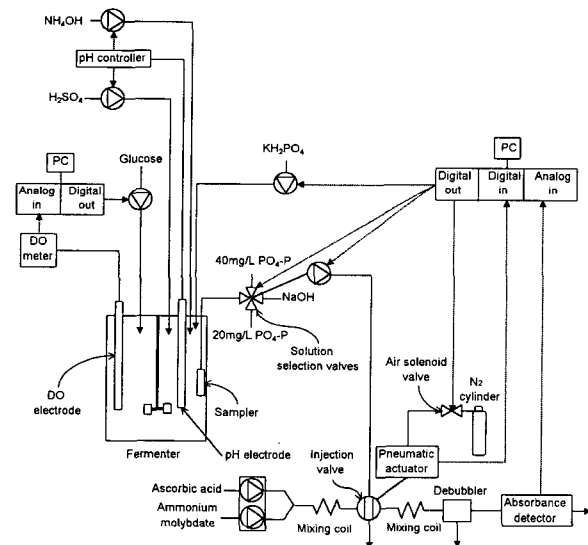


Figure 1. Schematic diagram of the fermentation system.

**암모늄의 자동첨가방법**

암모늄의 자동첨가는 전보(1)의 pH-stat 방법을 사용하였다.

**인산의 자동첨가방법**

인산 자동첨가장치를 제작하여 사용하였으며, 그 구성을 Fig. 1의 발효조 오른쪽 부분에 나타내었다. 시료채취장치 중 sampling probe는 공경(孔徑) 0.2 μm, 내경 7 mm, 외경 10 mm, 여과면적 10.4 cm<sup>2</sup>인 원통형의 ceramic filter (제공처: 코바이오텍(주))를 사용하였다. 시료, 두 가지 표준용액 또는 2M NaOH 용액 중 한 가지를 선택하는 valve는 3 inlet-1

outlet valve (Cole-Parmer, H-01367-81) 1개와 three-way valve (Cole-Parmer, E-01367-72) 2개를 조합하여 사용하였다. FIA 시스템은 carrier solution을 이송하는 tubing pump (Eyela, SMP-23S), 시료, 표준용액 또는 2M NaOH용액을 이송하는 tubing pump (Eyela, SMP-21), injection valve (Rheodyne, 5020), valve actuator (Rheodyne, 5701), air solenoid valve (Rheodyne, 7163-033), 질소 압력통, 혼합 coil (50cm), debubbler(6) 및 흡광도 검출기 (660 nm) (영린기기, M720)로 구성하였다. 모든 tubing은 내경 0.8 mm의 PTFE tubing을 사용하였다. Carrier solution은 0.005M ammonium heptamolybdate (0.4M HNO<sub>3</sub>로 제조)와 0.7%(w/v) ascorbic acid (glycerine을 1% 되게 첨가)를 사용하였다. Carrier solution의 유량은 0.6 ml/min였으며, injection valve의 loop 용량은 약 40 μL였다. 10%(w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 공급에 tubing pump (Eyela, SMP-21)를 사용하였다.

제측제어장치는 486급 PC, multifunction card (Advantech, PCL-812PG), 신호변환기 (미래전자, MR-ISO), relay board(제작) 및 SSR board(제작)로 구성하였다.

인산의 자동분석 및 제어프로그램을 QuickBASIC으로 작성하였으며, 그 흐름도를 Fig. 2에 나타내었다. 제어방법은 인산의 형태로 존재하는 인 (PO<sub>4</sub>-P)의 농도를 자동분석하고 그 농도가 30 mg/L이하가 되면 40 mg/L가 되도록 10% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 용액을 공급 (배양액의 양은 3.0 L로 가정)하는 것으로 하였다. 자동분석방법은 20 mg/L 표준용액, 40 mg/L 표준용액 및 시료의 순서로 흡광도 peak값을 검출한 후 내삽에 의하여 시료의 PO<sub>4</sub>-P 농도를 산출하는 것으로 하였다. 흡광도 peak값을 검출한 후에는 매번 2M NaOH 용액으로 loop를 채우고 유로를 따라 흘림으로서 tubing과 검출기 flow cell의 벽에 침착된 청색의 반응물을 세척하여 주었다. 흡광도 피크값의 검출, signal smoothing 등의 세부적인 program은 전보(2)와 같게 하였다.

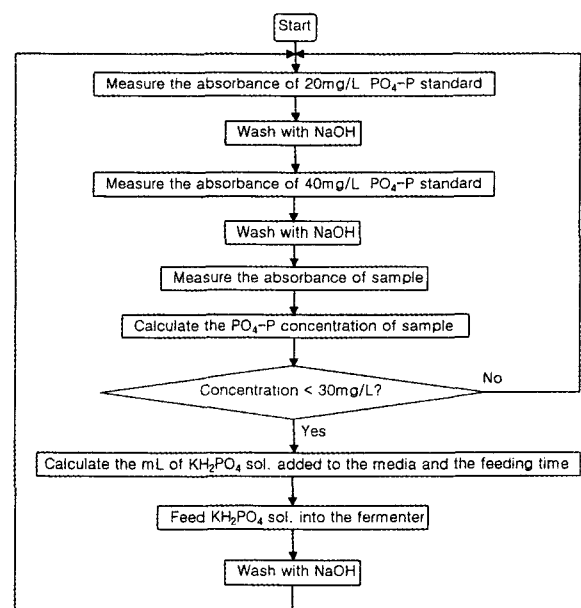


Figure 2. Flowchart for the automatic addition of phosphate to the media.

**건조균체량 측정**

건조균체량은 배양액 10 mL을 4000 rpm으로 20분간 원심 분리 후 세척하는 과정을 2회 반복하고 80 °C로 24시간 건조시킨 다음 칭량하여 구하였다.

**분석방법**

포도당 농도는 배양액을 공경 0.45 μm membrane filter로 여과한 여액에 포도당측정용 시약 (아산제약, AM201)을 첨가하여 발색시킨 후 비색법으로 측정하였다. 암모늄 농도의 측정은 배양액을 membrane filter로 여과한 여액에 대하여 자동화 FIA장치(2)를 사용하여 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**인산의 자동분석**

FIA 장치로 인산을 ascorbic acid법으로 분석할 경우 생기는 문제가 발색반응에서 형성되는 푸른색의 미세한 침전물이 tubing과 검출기 flow cell의 벽에 침착되는 것이다. 본 연구의 측정대상 PO<sub>4</sub>-P 농도는 20~40 mg/L 범위로서 낮은 농도가 아니므로 분석과정에서 상당량의 침전물이 생성되어 유로의 tubing 안벽에 침착되는 것을 관찰할 수 있었다. 미생물 배양액의 인산을 자동제어하기 위해서는 상당히 긴 시간에 걸쳐서 여러 번 자동분석을 수행하여야 하므로 침전물을 효과적으로 제거하여야 한다. 본 연구에서는 두 가지 방법으로 이 문제를 해결하고자 하였다. 첫 번째 방법은 표준용액과 시료를 분석한 후 매번 injection valve loop를 2M NaOH 용액으로 채우고 유로를 따라 흘려서 침착된 침전물을 세척하여 제거 하여 주는 것이었다. 두 번째 방법은 검출기의 출구에 적당한 길이의 내경 0.01 inch stainless steel tubing을 연결하여 역압을 걸어줌으로서 침전물이 debubbler(6)의 PTFE membrane (Satorius, 11806-47-N)을 통하여 유로 밖으로 배출되도록 하는 것이었다. 이들 방법을 사용함으로써 결과적으로 원활한 자동분석이 가능하였다.

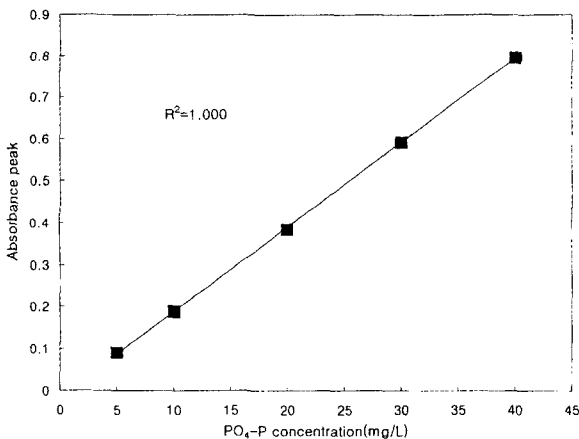


Figure 3. Relationship between PO<sub>4</sub>-P concentrations and their absorbance peaks.

자동분석장치로 PO<sub>4</sub>-P 표준용액들의 농도별 흡광도 peak값을 구하여 Fig. 3에 나타내었다. 그림에서와 같이 40 mg/L까

지 직선성이 우수 ( $R^2=1.000$ )하였으므로 배양액의 인산농도를 20~40 mg/L 범위로 제어하는 것으로 하였다.

알콜증류 폐액에 빵효모를 배양하면서 19.4시간부터 23.8시간까지 배양액의 PO<sub>4</sub>-P를 자동분석한 내용을 기록계 (영인과학, D520B)로 기록한 것을 Fig. 4에 나타내었다. 그림에서와 같이 자동분석이 무리없이 이루어졌다. 두 가지 표준용액과 시료의 피크들 사이에 출현하는 낙타등 모양의 작은 피크들은 NaOH 용액으로 세척하는 과정에서 나타나는 피크들로서 NaOH에 씻긴 tubing의 침착물이 flow-through cell을 통과하면서 형성되는 것이라고 생각되었다. 시료의 1회 분석에 소요되는 시간은 약 11분이었다. 농도를 정확히 측정하기 위하여 매회 분석시마다 두 가지 표준용액으로 calibration을 실시하였으므로 분석시간이 비교적 길어졌다. 그러나, 20 mg/L 표준용액의 흡광도 값의 평균이  $0.398 \pm 0.0055$  ( $n=34$ )이고 변이계수가 1.38%이며, 40 mg/L 표준용액의 흡광도 값의 평균이  $0.766 \pm 0.010$  ( $n=34$ )이고 변이계수가 1.33%로써 값의 변화가 크지 않은 것을 감안하면 calibration을 매번 수행할 필요는 없다고 생각되었다. 자동첨가시 초기에 한번만 calibration한다고 가정하면 시료의 1회 분석시간은 약 3.7분이 된다.

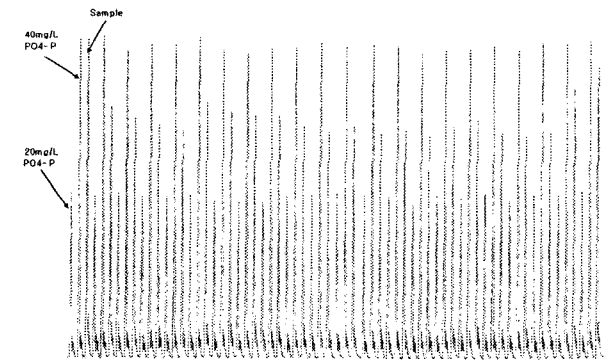


Figure 4. Recorder output showing automatic analysis of PO<sub>4</sub>-P from 19.4 hr to 23.8 hr in the fermentation(of each main three peaks, the first was for 20 mg/L PO<sub>4</sub>-P, the second for 40 mg/L PO<sub>4</sub>-P and the third for sample. Small double-peaked peaks between two main peaks are those formed during NaOH wash).

**포도당, 암모늄 및 인산의 자동첨가에 의한 배양**

알콜증류 폐액배지에 빵효모를 접종하여 포도당, 암모늄 및 인산을 자동첨가하면서 배양한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 포도당은 폐액배양액의 탄소원이 전부 고갈되어 DO가 처음으로 60% 이상으로 증가된 4.4시간부터 DO신호가 증가할 때마다 0.9g씩 자동으로 첨가하여 주었으며(1, 2), 암모늄은 포도당 첨가가 시작된 후부터 저하하는 배양액의 pH를 증화하기 위하여 NH<sub>4</sub>OH를 알칼리제로 첨가함으로써 자동으로 첨가하였다(1). 인산의 경우에는 19.4시간까지는 sampler에서 시료를 수동으로 채취하여 희석한 후 자동분석장치로 분석하였으며, PO<sub>4</sub>-P 농도가 거의 40 mg/L 부근에 도달한 19.4시간 이후 완전자동으로 분석하는 동시에 필요한 경우에는 인산을 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>로써 자동첨가하였다.

그림에서와 같이 건조균체량은 초기 0.22 g/L에서 계속 증가하여 26시간에 32.3 g/L에 도달하였다. 포도당 첨가를 시작한 배양 4.4시간에 약 0.98 g/L에 도달하는 것으로 추산되었

으므로 포도당, 암모늄 및 인산의 첨가에 의하여 26시간까지 균체량을 0.98 g/L보다 약 31.3 g/L 더 증가시킬 수 있었으며, 이것은 0.98 g/L보다 약 33.0배 더 증가한 것이다. 또한, 인산이 전부 소모될 경우의 균체량이 약 21.0 g/L로 추산되었으므로 포도당과 암모늄의 첨가에 의하여 0.98 g/L보다 약 20.0 g/L 더 증가시킬 수 있었으며, 이것은 0.98 g/L보다 약 20.4배 더 증가한 것이다. 인산까지 첨가함으로써 포도당과 암모늄 두 가지만 첨가한 경우보다 균체량을 약 11.3g/L 더 증가시킬 수 있었다.

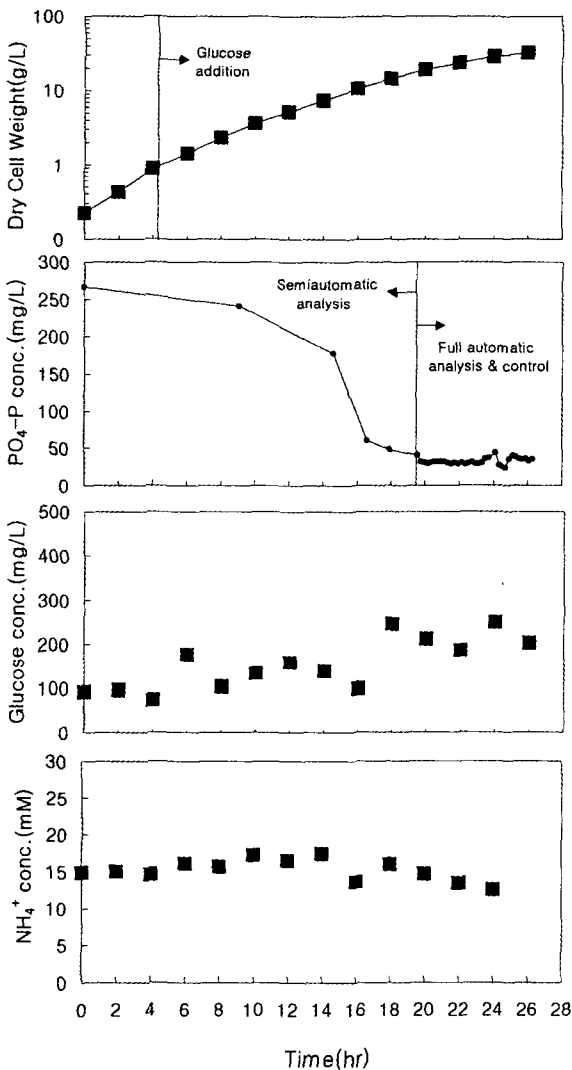


Figure 5. The cultivation of a baker's yeast in an alcohol distillery wastewater by the automatic addition of glucose, ammonium and phosphate (Glucose was added from 4.4 hr using DO as the control parameter. Ammonium was added using pH-stat method from after adding glucose. Phosphate was analysed semiautomatically to 19.4 hr, and thereafter analysed and controlled full-automatically).

배양액의  $PO_4\text{-P}$  농도는 그림에서와 같이 초기 266.5 mg/L에서 균의 증식과 함께 계속 저하하여 17.9 시간에 48.1 mg/L에 도달하였으므로 19.4시간부터 자동분석 및 제어를 시작하였다. 인산의 자동첨가를 시작한 후 배양말기까지 총 34

회의 자동분석이 수행되었으며,  $PO_4\text{-P}$  농도는 23.3~43.4 mg/L의 낮은 농도범위로 유지되었으므로 자동첨가에 의하여 인산을 효율적으로 첨가할 수 있었고, 또한 효율적으로 증균할 수 있었다. 분석치들의 평균은  $31.7 \pm 4.5$  mg/L이었고, 변이계수는 14.2%였다.

포도당 농도는 포도당 자동첨가를 개시한 4.4시간 이후의 측정값 중 최소값이 100.3 mg/L이고 최대값이 250.6 mg/L로 얻어져서 배양액의 포도당 농도는 목적한대로 300 mg/L 이하로 유지되었다.

암모늄 농도는 4.4시간 이후 12.6~17.4 mM의 낮은 농도범위로 유지되었으며, 결핍의 가능성은 적다고 생각되었으므로 pH-stat 방법에 의한 암모늄의 자동첨가가 본 연구에서는 효율적임을 확인할 수 있었다.

배양 전 기간의 비증식속도는  $0.19 \text{ hr}^{-1}$ 이고 배양과정에서 증식의 정체가 일어나지 않았으므로 세 가지 영양성분의 자동첨가에 의하여 비교적 효율적으로 증균시킬 수 있다고 생각되었다. 그러나 증식속도가 배양 초기부터 계속 감소되는 양상을 나타낸 것은 주로 포도당의 제어방법이 간접적인 것과 관련이 있다고 생각되었으며, 포도당을 직접제어(6, 7)할 경우 증식속도가 더욱 커질 수 있다고 생각되었다. 배양 말기에 증식이 거의 정체되는 양상을 보인 것은 탄소원, 질소원 및 인원 외의 다른 영양 성분의 결핍이 원인일 수 있다고 생각된다.

## 요약

알콜증류 폐액에 빵효모를 배양하는 중에 포도당, 암모늄 및 인산을 자동 첨가하여 균체량을 효율적으로 증가시킴으로써 폐액의 재이용성을 향상시키고자 하였다. 포도당은 DO를 제어파라미터로 하는 제어방법을 사용하여 자동 첨가함으로써 그 농도를 300 mg/L 이하로 유지하였다. 암모늄은 pH-stat 방법을 사용하여  $NH_4OH$ 로서 자동 첨가함으로써 12.6~17.4 mM의 낮은 농도범위로 유지하였다. 인산의 경우에는 분석방법으로써 ascorbic acid법을 채택한 자동화 FIA system을 제작하여 사용하였다. 이 system으로 배양 19.4 시간 후부터 배양액을 자동분석하고 제어한 결과 배양액의  $PO_4\text{-P}$  농도를 23.3~43.4 mg/L의 낮은 농도범위로 유지할 수 있었다. 세 가지 영양성분을 자동첨가하면서 배양한 결과 증식의 정체없이 균체량을 33.0배 더 증가시킬 수 있었다. 비증식속도는  $0.19 \text{ hr}^{-1}$ 였다.

## REFERENCES

- 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**, 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**, 139-144.
- Garn, M., M. Gisin, and C. Thommen (1989), A Flow Injection

- Analysis System for Fermentation Monitoring and Control, *Biotechnol. and Bioeng.* **34**, 423-428.
4. Putten, A. B. V., 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.
  5. Putten, A. B. V., F. Spitzenberger, G. Kretzmer, B. Hitzmann, M. Dors, R. Simutis, and K. Schugerl (1996), Improvement of the production of Subtilisin Carlsberg alkaline protease by *Bacillus licheniformis* by on-line process monitoring and control in a stirred tank reactor. *J. Biotechnol.* **49**, 83-93.
  6. Lee, H. C. (2000), 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, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 388-392.
  7. 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**, 325-331.