

# 근적외선 분광분석법을 이용한 발효과정 중 갈락토즈 및 미생물 농도의 측정에 관한 연구

## Measurement of Galactose and Cell Concentrations in Fermentation Process by Near-infrared Spectroscopy

김학성\*    노상하\*    김기복\*\*\*    서진호\*\*    김명동\*\*  
정희원    정희원    정희원  
H.S.Kim    S.H.Noh    K.B.Kim    J.H.Seo    M.D.Kim

### 1. 서론

발효공정에 있어 배양법으로는 회분식 배양법, 연속식 배양법과 유가식(fed-batch) 배양법이 있다. 이것은 발효 과정 중 기질과 균류 등의 추가 투입 및 추출에 따른 분류로서 특히, 유가식 배양의 경우 배양액의 농도가 너무 높거나 낮으면 에탄올의 생산이 많아지거나 효모의 성장 속도가 늦어지게 된다. 유가식 공정은 항생제, 비타민, 아미노산, 효소 및 재조합 단백질 등의 생산에 주로 이용된다.

항혈전 단백질인 히루딘의 발효 공정을 통한 대량 생산 과정에 있어 최적 수율을 얻기 위하여 발효과정 중 carbon source인 갈락토스의 농도를 일정하게 유지할 필요가 있다. 기존의 off-line 방식은 발효과정 중에 시료를 채취한 후 DNS 방법 또는 LC(liquid chromatography)를 이용하여 당농도를 분석하고, 필요한 양을 예측하여 투입하는 것이다. 이 두 방법은 정확성에 있어 매우 뛰어나지만 DNS 방법은 진단 시약이 독성물질이라는 점과 일정 시간동안 100℃로 가열해야 하는 등 취급에 문제가 있고 LC는 전처리 및 데이터 처리에 많은 시간이 걸린다. 또한, 발효가 진행 중인 모든 기간동안 일정 시간 간격으로 당과 미생물 양을 측정해서 발효의 정상 진행 여부를 판단해야 한다.

이와 같이 대부분의 식품 가공 공정이나 화학 제조 공정에서 효소나 미생물 등의 반응에 의해 소비되는 당분과 잔존량을 측정하고, 부족한 양을 공급하는 작업이 자동화되어 있지 않은 실정이다. 본 연구에서는 근적외 투과 스펙트럼을 이용하여 발효과정중의 주요성분의 스펙트럼 특성을 구명하며, 이를 이용한 주요성분의 예측 모델을 개발하여 실시간 모니터링 가능성을 구명하고자 한다.

---

\* 서울대학교 생물자원공학부 농업기계전공

\*\* 서울대학교 식품공학과

\*\*\* 한국표준과학연구원

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시재료

히루딘생산을 위한 발효배지는 galactose 4%(Sigma, USA), bacto peptone 2%(Becton Dickinson, USA) 및 bacto yeast extract 1%(Becton Dickinson, USA) 구성되었다. 모두 분말 원료를 증류수에 희석하여 사용하였다.

발효에 사용한 yeast균은 *Saccharomyces cerevisiae* M8HIR10C로서 김(2001)에 의해 재조합된 효모이다. 발효조는 스위스 Bioengineering사의 AG Fermenter System으로서 서울대학교 식품공학과 생물화학공학 실험실에 설치되어 있는 것을 사용하였다.

### 나. 발효

5 mL의 멸균한 YPD(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)배지에 300  $\mu$ L균을 접종하여 24시간 동안 30°C에서 인큐베이터에서 200 rpm으로 진탕하여 배양하였다. 접종 다음 단계로 전배양을 수행하였으며 삼각 플라스크에 YPD배지(yeast extract 10g/L, peptone 20 g/L, glucose 20 g/L)의 혼합액 100 mL를 담아 접종액 5 mL를 넣어 같은 조건으로 24시간 배양하였다. 본 발효에서 배지(YPG)는 전배양액과의 합이 1.5L가 되도록 만들어졌으며 이때의 농도는 yeast extract 1%, peptone 2%, galactose 4%가 되도록 하였다. 발효 조건은 온도 30°C, pH 5.5, 교반 속도 500 rpm이었다.

### 다. 시료의 채취 및 스펙트럼 측정

시료 채취에 있어 수동적인 방법으로는 발효조에 연결된 주사기를 통해 시료를 채취하였고 발효 실험의 끝부분에서 정량펌프를 이용하여 반자동 방식으로 시료를 채취하였다. 스펙트럼 측정에 있어서는 발효공정 중 온라인(On-line) 상태에서의 시료의 스펙트럼 측정과 성분 예측 가능성을 구명하기 위하여 실시간으로 스펙트럼의 측정이 가능한 CDI SNIR103스펙트로미터(Control Development, USA)를 사용하였으며, 냉동 보관된 시료의 스펙트럼은 CDI보다 분해능이 높은 서울대학교 NICEM에 설치되어 있는 NIRS6500(NIRS, USA)스펙트로미터를 사용하였다.

발효액의 당도는 DNS방법을 이용하여 측정하였다. 또한 발효액 속의 미생물 농도 측정에 있어서는 Ultrospec 2000(Pharmacia Biotech, USA)을 이용하여 미생물의 농도를 대표하는 흡광도(OD)를 측정하였다. OD(Optical Density)값에 건조 균체량을 곱하여 환산하면 균체 농도를 구할 수 있다.

### 라. 당도 및 미생물 농도 예측 모델의 개발 및 평가

본 연구에서는 PLS모델 구현을 위해 PLS\_Toolbox (ver 2.0, Eigenvector Research, USA) 및 Matlab(ver 5.3, Mathwork, USA)을 사용하였으며, 검량 표준오차(Standard Error of Calibration, SEC), 결정계수( $R^2$ ) 및 예측 표준 오차(Standard Error of Prediction, SEP)를 통해 개발된 모델의 정밀도와 예측 성능을 평가하였다.

### 3. 결과 및 고찰.

#### 가. 발효 배지내의 저농도 갈락토즈 예측

농도가 다른 혼합 수용액 배지 47개의 스펙트럼을 무작위로 반으로 나눈 다음, 절반은 검량식 (calibration equation) 개발에, 나머지는 검량식 검증용(validation)으로 사용하였다. 농도 예측 검량식을 개발하기 위해 PLS회귀법을 사용하였고, 적정 factor의 수는 PRESS curve를 이용하여 육안으로 결정하였다. 표1은 전처리 유무에 따른 검량식의 개발 및 검증결과를 보여주고 있다. 이 결과에 의하면 산란보정과 관계되는 MSC 또는 SNV 전처리를 수행하는 것이 전처리를 하지 않는 경우보다 양호한 결과를 가져옴을 알 수 있다.

Table 1 Effects of preprocessing on prediction of galactose concentrations in fermentation medium

Preprocessing combination	No. of opt. Factor	Calibration		Validation		
		$R^2$	SEC	$R^2$	SEP	bias
N	7	0.999	0.047	0.986	0.144	0.051
M	7	0.997	0.038	0.983	0.159	0.056
M1	9	0.999	0.029	0.886	0.354	-0.108
S	8	0.999	0.043	0.994	0.089	0.040
S1	6	0.995	0.100	0.926	0.286	-0.069
D	6	0.995	0.107	0.916	0.305	-0.078

(N: No preprocessing, M: Smoothing + MSC, M1:Smoothing+MSC+Deriv., S: Smoothing+SNV, S1: Smoothing+SNV+1st Deriv., D1: Smoothing+1st Deriv.)

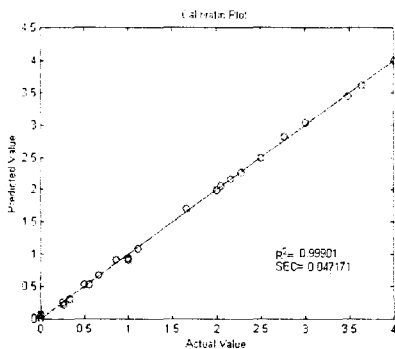


Fig. 1 Plot of calibration results in predicting galactose concentration by PLS model (400 ~ 2500 nm, no preprocessing).

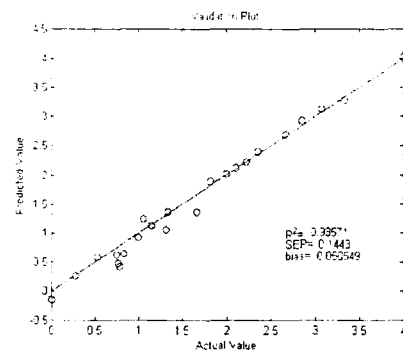


Fig. 2 Plot of validation results in predicting galactose concentration by PLS model (400 ~ 2500 nm, no preprocessing).

나. 발효공정 중 갈락토스 및 미생물의 농도 변화와 예측

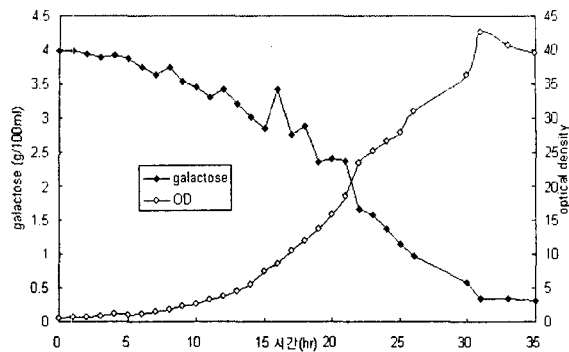


Fig. 3 Profiles of galactose concentration and optical density by *S. cerevisiae* MδHIR10C.

배지에 균 배양액(preculture)을 넣은 후 30°C로 증탕하여, 발효시작부터 35시간 동안 34개의 시료를 채취하였다. 그림3에서 미생물의 농도는 지수함수적으로 증가하고, 기질인 갈락토스는 이에 반하여 감소함을 알 수 있다. CDI스펙트رو미터를 이용한 스펙트럼을 전처리 하여 개발한 모델을 보면 여러 가지 전처리 중에서 MSC 전처리를 수행한 경우에 결정계수( $R^2$ )와 SEP가 각각 0.959 및 0.271로서 가장 우수하였다.

Table 2 Effects of preprocessing on prediction of galactose concentration in unfrozen fermentation samples

Preprocessing combination	No. of opt. factor	Calibration		Validation		
		$R^2$	SEC	$R^2$	SEP	bias
N	4	0.995	0.121	0.952	0.297	0.095
M	5	0.994	0.134	0.959	0.271	0.094
M1	7	0.996	0.126	0.953	0.297	0.092
S	8	0.994	0.155	0.968	0.245	0.054
S1	6	0.993	0.155	0.939	0.346	0.131

CDI 분광광도계를 이용하여 측정된 스펙트럼데이터를 이용하여 OD를 예측하는 검량식을 개발하였다(표 3). 검량식 개발 방법은 갈락토스 검량식 개발과 동일하다. 이 결과에 의하면 전처리 없이 개발된 모델에서 SEP=2.942로서 전체 OD범위(0~42.6) 대비 6.9%이었다. MSC 전처리는 처리 결과와 상관없이 비슷한 값을 보였지만 다른 전처리들은 factor수가 크게 증가하였다.

Table 3 Effects of preprocessing on prediction of OD(cell concentration) of unfrozen fermentation samples

wave range	Preprocessing combination	No. of opt. factor	Calibration		Validation		
			$R^2$	SEC	$R^2$	SEP	bias
900 ~ 1700 (nm)	N	4	0.997	0.879	0.962	2.942	0.407
	M	4	0.997	0.851	0.962	2.943	0.041
	M1	7	0.993	1.564	0.982	2.325	0.698
	S	7	0.996	1.180	0.983	2.287	0.561
	S1	7	0.986	2.123	0.970	2.671	-0.082
	D	7	0.993	1.528	0.982	2.292	0.664

실험의 여건상 채취한 샘플을 냉동보관 하였다가 동일한 조건에서 해동하여 분해능이 높은 NIRS6500분광기를 이용하여 스펙트럼을 측정하였다. 이 스펙트럼을 이용하여 갈락토즈의 농도를 예측하는 식을 500~1100 nm, 900~1700 nm, 400~2500 nm의 파장대별로 분리하여 개발하였다. 이 때 각각의 SEP는 0.168%, 0.168% 및 0.259%이었다. 범위에 따른 약간의 차이가 있었고 파장 범위를 900~1700 nm로 하였을 때 모델의 성능이 제일 좋았으며 전처리에 의한 효과가 두드러지게 나타나지는 않았다. 또한 냉동 전후의 스펙트럼 이상 여부를 조사한 결과 거의 변화가 없었다.

#### 다. 정량펌프와 flow-cell을 이용한 스펙트럼의 획득

발효시작 후 35시간이 지난 다음에 갈락토스의 소진으로 더 이상의 미생물의 성장이 없다고 판단되어 주사기와 큐벳 대신에 정량 펌프와 flow-cell을 이용하여 정상적인 스펙트럼이 측정됨을 확인하였다. 정량 펌프의 rpm을 변화시킬 때 약간의 맥동이 있었지만 곧 안정된 스펙트럼을 보였다.

### 4. 결론 및 요약

1. 이스트 추출물, 펩톤, 갈락토스를 증류수에 혼합한 발효 배지에서 실제 갈락토즈의 농도와 스펙트럼을 이용하여 400~2500 nm영역에서 당도 예측 모델을 개발하였다. 여러 전처리 중 SNV 전처리를 했을 때  $R^2=0.994$ 이고 SEP=0.089이었다. 전체 갈락토즈의 농도 대비 최소 2.2%의 오차 범위내에서 예측이 가능함을 알 수 있었다.

2. 실제 발효과정 중에 시료를 채취하여 온라인(on-line) 측정이 가능한 CDI 스펙트로미터로 흡광스펙트럼(파장범위: 900~1700 nm)을 측정한 결과, 각 파장에서의 흡광도는 미생물의 농도에 따라 증가하였다. 이는 미생물이 증가함에 따라 산란이 증가하였기 때문으로 판단된다. 이들 스펙트럼데이터를 이용하여 갈락토즈의 농도와 OD(Optical Density)로 측정된 미생물의 농도를 예측하는 PLS회귀모델을 개발한 결과, 갈락토즈의 경우  $R^2$ 와 SEP가 각각 0.952 및 0.297%(농도 대비

7.4%)였으며, OD의 경우 이들 값이 각각 0.962 및 2.942(전체 OD범위 대비 6.9%)로서 온라인 측정이 가능함을 알 수 있었다.

3. 실험의 여건상 시료를 냉동보관 하였다가 동일한 조건에서 해동하여 분해능이 높은 NIRS6500분광기를 이용하여 스펙트럼을 측정하였다. 갈락토즈의 농도를 예측하는 식을 500~1100 nm, 900~1700 nm, 400~2500 nm의 파장대별로 개발하였다. 각각의 SEP는 0.168%, 0.168% 및 0.259%이었다. 범위에 따른 약간의 차이가 있었고 파장 범위를 900~1700 nm로 하였을 때 모델의 성능이 제일 좋았으며 전처리에 의한 효과가 두드러지게 나타나지는 않았다.

4. 결론적으로 실시간 측정이 가능한 CDI 스펙트로미터로 발효 중 갈락토즈 및 미생물의 농도변화를 온라인 모니터링 할 수 있는 것으로 나타났으며 이를 토대로 유가식 배양에서 배양의 자동화가 가능할 것으로 추정된다. 당원(carbon source)으로 갈락토즈 한 종류만을 사용하였지만 나아가 복합당 및 당알코올 등의 물질을 사용하였을 때 이를 예측할 수 있는가에 대한 연구가 필요하다.

## 5. 참고문헌

1. 구운모 외 3인 역, 생물 공정 공학, 2001, 교보문고
2. 김명동, 2001, 재조합 효모를 이용한 항혈전 단백질 히루딘 발효 생산 공정의 해석 및 최적화, 서울대학교 박사학위논문.
3. 류동수, 2001, VIS/NIR 투과 분광분석법을 이용한 감귤의 비파괴 내부품질 판정 시스템 개발, 서울대학교 박사학위 논문.
4. 문석식 외 3인 역, 분광학적 분석입문, 1998, 자유아카데미
5. 조영일, 서진호, 유연우, 2002, *Candida tropicalis*의 2단계 유가식 배양에 의한 Xylitol 생산의 최적화, 한국 생물 공학회, Vol. 17(1): 93-99.
6. Cavinato, G., etc, 1990, Noninvasive method for monitoring ethanol in fermentation processes using fiber optic near-infrared spectroscopy, *Bioproc. Eng.*, Vol. 7: 319-323.
7. Fayolle, Ph., D. Picque and G. Corrieu, 1997, Monitoring of fermentation processes producing lactic acid bacteria by mid-infrared sepectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, Vol. 14: 247-252.
8. Fayolle, Ph., D. Picque and G. Corrieul, 2000, On-line monitoring of fermentation processes by a new remote dispersive middle-infrared spectrometer, *Food control* II: 291-296.
9. Zhang, G. and N. Sugiural, 2002, Monitoring of methanogen density using near-infrared spectroscopy, *Biomass and Bioenergy*, Vol. 22: 489-495.