

발효공정 자동제어를 위한 포도주 발효 중 포도당 농도 온라인 측정

송대빈

On-line Monitoring of a Glucose Concentration on a Fermentation Process of Wine for an Automatic Control of a Fermentation Process

D. B. Song

Abstract

A flow injection analysis method (FIA), which analyzes sample conditions after injecting a sample and reagents into a continuous stream, are recognized as the most adequate analyzing method according to the increase of sampling frequency, the decrease of measuring time and the diversity of measuring targets. Specially, the FIA is considered to be used effectively for the control of a fermentation process to produce fermentation food and useful microbial production by activation of a fermentation industry for development of biological materials. In this study, a flow injection analysis sensor unit was developed for on-line monitoring of the fermentation process. The performance was verified by on-line measuring the concentration of glucose of the fermentation process of wine. The glucose concentrations of the samples were measured every 12 hours during the whole fermentation process and compared with those by a HPLC. The concentration relative errors of glucose on the fermentation process of wine showed below 30% within 72 hours and over 50% after the 72 hours. The sensor unit had potential to on-line monitoring of the fermentation process but some problems to overcome for an commercial application.

Keywords : Automatic control, Fermentation, Biosensor, Automation, FIA

1. 서론

미생물의 발효기능을 이용해서 유용물질을 생산하는 발효공정은 재조합 DNA 기술, 세포융합 생물반응기 등 생물공학의 진전에 따라 자연발효를 이용한 발효식품의 제조에서 알코올, 유기산, 핵산, 항생물질, 기타 유용 미생물 등을 생산하는, 생물산업의 전 분야에 걸쳐 없어서는 안 될 중요한 분야로 자리 잡고 있다.

발효공정에서 미생물의 성장을 촉진시키고 생산성을 증대시키기 위해서는 반응에 관여하는 여러 요인(pH, pO₂, 온도 및 CO₂ 등)들을 최적의 조건으로 유지시켜야 하며, 이를 위

해서는 공정 중 발생하는 반응 산물 및 기질의 농도 등을 온라인으로 감시하는 장치가 사용되어야 한다.

Ruzicka와 Hansen(1975)에 의해 처음으로 소개된 흐름주입분석법(flow injection analysis, FIA)은 완충용액 중에 효소와 반응대상물인 기질을 직접 투입하여 반응결과 발생하는 산소 또는 과산화수소를 산화시켜 발생하는 전자를 전위차나 전류값으로 측정하여 반응대상물의 농도를 측정하는 방법이다. 흐름주입분석은 기존의 분석 방법에 비해 시료 샘플링 회수를 높일 수 있고, 반응 시간을 단축시킬 수 있으며, 다양한 대상물 측정에 적용이 가능한 등의 이점이 있어 신뢰할 수 있는 분석법의 하나로 자리 잡았고, 특히 생물공정의 최적화를 위한

This study was conducted by the Agricultural R&D Promotion Center(ARPC). The article was submitted for publication on 2008-7-28, reviewed on 2008-8-6, and approved for publication by editorial board of KSAM on 2008-8-12. The author is Dae Bin Song, Associate Professor, KSAM member, Division of Agricultural Engineering, Gyeongsang National University/Institute of Agricultural & Life Science, Jinju, Korea. Corresponding author: D. B. Song, Associate Professor, Division of Agricultural Engineering, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea; Fax: +82-55-762-0610; E-mail: <dbsong@gsnu.ac.kr>.

변수의 온라인 측정에 가장 적합한 기법이 되었다. Schugerl 등(1996)은 생물공정상에서 생물반응기 내 기질이나 생산물의 농도를 온라인 모니터링하기 위한 흐름주입분석 기술은 온라인 모니터링기법에 있어 중요한 분석기법으로 자리 잡고 있다고 기술하였다. Werasak 등(1999)은 세 종류의 효소를 두 단계로 고정화시킨 여러 개의 전극봉을 사용하여 흐름주입분석으로 식품 속에 있는 자당(sucrose)과 포도당(glucose)의 농도를 연속적으로 측정이 가능함을 보여주었다. 그리고 흐름주입분석을 사용하기 위한 최적의 조건들과 효소의 양, pH, 온도의 영향을 측정하였다. Rocha와 Ferreira(2002)는 대장균(*E. coli*) 배양 공정 중에 발생하는 초산의 농도는 흡광도, 포도당 농도는 고정 효소 전극봉을 사용하여 흐름주입분석으로 측정하는 실험을 하여 배양공정 중 두 가지 성분의 동시 측정의 가능성을 제시하였다. White 등(1996)은 은, 백금 및 포도당 효소를 얇은 막 형태로 제조한 전극봉을 사용하여 발효공정 중 포도당 농도를 측정했다. 또한 일주일간 전극봉을 사용하여 높은 수준의 재현성을 나타내었다. Rajendran와 Irudayaraj(2002)는 미세투석장치를 사용하는 흐름주입식 전류센서를 이용하여 우유 속의 포도당, 젖당, 유당의 농도를 온라인으로 측정하였다. 또한 전극봉에 효소를 고정시키지 않고 직접 주입하여 각 성분의 측정이 가능함을 보여주었다. Rhee(1998)는 효소 고정식 전극봉을 사용한 흐름주입분석으로 대장균 발효공정에서 포도당과 초산(acetic acid)의 농도를 온라인으로 측정하였는데, 오프라인 분석결과와 비교했을 때 6% 이내에서 일치함을 보였다. Kim 등(1998)은 포도당, 젖산, 에탄올을 동시에 측정하기 위해 한 개의 음극과 여섯 개의 양극으로 구성된 효소 고정식 산소 전극봉을 개발하고 실험을 통하여 그 성능을 검증하였다. Park 등(1996)은 한 개의 음극과 두 개의 양극(dual cathode system)으로 구성된 효소 고정식 산소 전극봉을 이용하여 탁주 발효공정 중 포도당과 에탄올의 농도 변화를 측정하였다. Kim과 Noh(2002)는 Park 등(1996)이 개발한 센서를 이용하여 식체제조 공정 중 포도당과 맥아당 농도를 측정하고 이 결과를 사용하여 식체제조공정을 최적화하고 그 결과를 제시하였다. Song와 Irudayaraj(2003)은 미세투석장치를 사용하고 기질·효소를 완충 용액 중에서 직접 반응시키는 흐름주입분석 방식으로 포도당 농도를 측정하였다.

발효공정 중 기질 및 발효생성물의 농도를 흐름주입식 방법으로 연속 측정하기 위해서는 발효조 내부와 외부가 차단된 상태로 발효용액을 채취하는 장치가 필요하다. 곡물 및 과실을 주원료로 사용하는 경우에는 발효가 진행됨에 따라 발효생성물은 용액과 고형분이 혼합된 형태가 되며, 고형분의 농도는 투입 원료의 형태 및 첨가량에 따라 다르게 나타난다. 따라서 채취된 용액의 농도 측정을 위해서는 고형분을 제거

시키는 여과공정이 수반되어야 하며, 또한, 여과시간이 길어지면 발효작용으로 인해 용액농도가 달라지기 때문에 흐름주입식 농도 측정 방식에서는 용액 채취와 여과가 동시에 이루어지는 장치의 사용이 반드시 필요하다.

따라서 본 연구에서는 발효공정 감시용 센서장치를 구성하고 포도주를 제조하여 포도주 발효 중 포도당 농도를 시간별로 측정하여 그 성능을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 장치구성

1) 시료채취 및 여과장치 구성

실험에 사용된 샘플용액 자동채취 및 여과는 Song 등(2007)이 개발한 그림 1과 같은 장치를 사용하였다. 그림 1에서 자동채취 및 여과장치는 샘플을 발효시키는 발효조, 샘플 내의 고형분을 여과시키는 여과장치, 샘플 흡입과 송출기능을 갖는 다이어프램 펌프, 방향제어밸브, 샘플을 담은 수집용기로 구성되며, 발효조 및 펌프 조작과정은 수작업으로 이루어지고, 방향제어밸브는 전용 PC를 사용하여 온라인으로 작동된다. 발효조는 교반기를 사용하여 샘플용액을 일정한 속도로 저어주고, 다이어프램 펌프에서 발효조 내의 샘플용액을 흡입하여 방향제어밸브로 보내게 된다. 이 때 샘플용액의 고형분은 여과장치 내의 필터를 통과하면서 제거된다. 방향제어밸브(a port)를 통과한 샘플은 수집용기에 저장되고, 필요한 양이 수집용기에 충전 되면 관로에 남은 샘플은 다음 채취 및 여과공정에 혼입되지 않도록 방향제어밸브(b port)를 사용하여 배출되도록 공정을 구성하였다. 여과장치는 그림 2와 같이 홀더와 글라스필터로 구성되었으며, 글라스필터를 교환 할 때에는 홀더의 결합을 풀어 쉽게 작업이 가능하도록 하였다. 실험에 사용된 장치의 상세한 규격은 표 1과 같다.

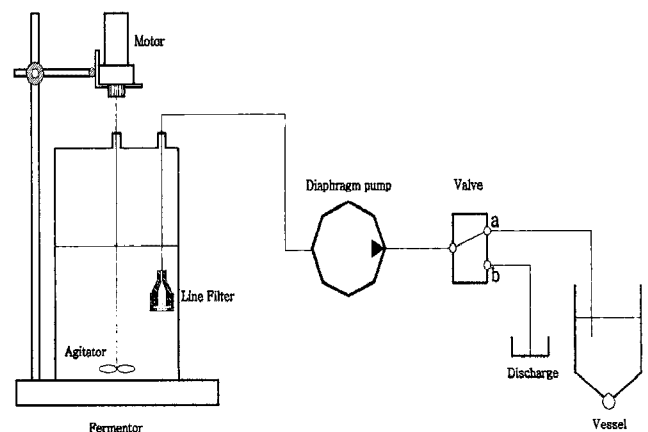


Fig. 1 Schematic diagram of the auto sampling and filtering unit.

Table 1 Specifications of experimental apparatus

Component	Specification	Remarks
Diaphragm pump	0.03~30 mL/min	KNF Co.
Pinch Valves	075P, 100P	Bio-Chem valve.
Tube	I.D. 2.79 mm	Cole-parmer Co.
Controller	RS-232	Compile technology.
Fermentor Motor	0~600 rpm	Panasonic Co.
Glass filter	O.D. 40 mm (100 μm, 40 μm, 16 μm)	Schott Duran Co.

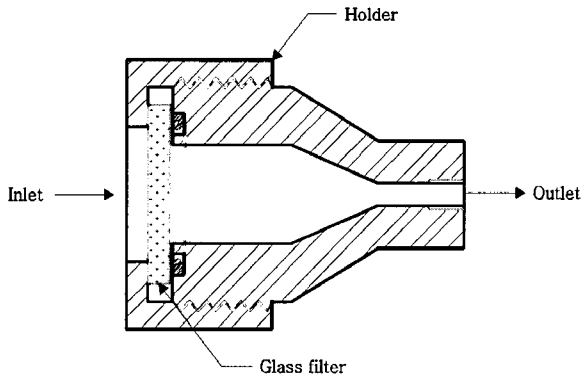


Fig. 2 Cross section of the filtering unit.

2) 발효장치 구성

발효실험을 위한 발효 장치는 발효조(10 L, Ø180×450 mm, Pyrex), 용액 교반용 오거(stainless), 오거 구동용 감속 모터(AC220V, 23 W, Panasonic), 감속 모터 회전수 조절용 인버터(AC220V, 23 W, 600 rpm, Youngjin), 밀폐용 캡 및 오링, 발효조 고정용 프레임 및 지지대로 구성하였다. 제작·조립 된 상세한 장치 형상은 그림 3과 같다.

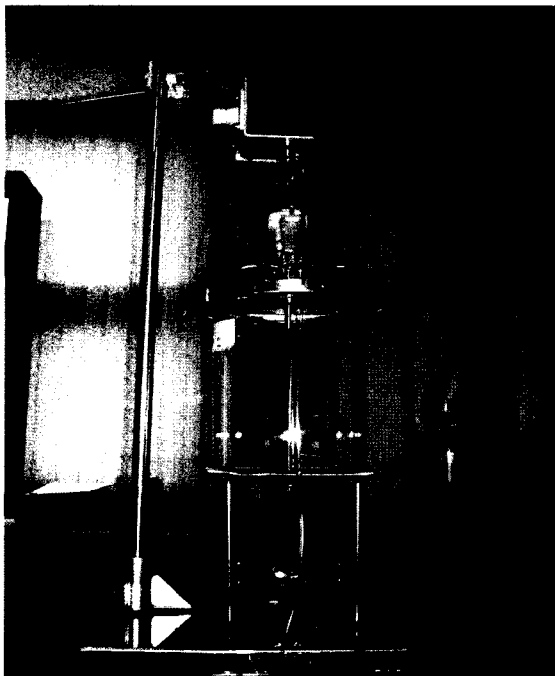


Fig. 3 Photograph of the fermentation unit.

3) 센서장치 구성

발효공정 온라인 감시를 위한 센서장치는 크게 샘플용액 채취·여과장치, 샘플용액 희석장치, 전류측정 장치, 자료수집 장치 및 제어부로 구성되었다. 발효조에서 펌프(SP1)로 채취된 샘플용액은 정량 공급용 펌프(SP2) 및 증류수 공급용 펌프(SP3)에 의해 일정 비율로 희석되어진 후 펌프(SP4)에 의해 인젝션밸브(IV1)로 공급된다. 완충용액은 2대의 펌프(BP1, BP2)로 연속적으로 공급되어 인젝션밸브 및 전류측정장치(electro-chemical cell)를 통과하여 배출된다. 효소용액은 펌프(EP1)에 의해 인젝션밸브로 공급되어 샘플용액과 혼합되고 완충용액에 의해 이송되면서 반응이 일어나고 반응 생성물인 과산화수소수의 농도가 전류측정장치에서 전류값으로 계측된다. 계측된 전류값은 표준 포도당용액으로 측정된 calibration 전류값을 기준으로 포도당 농도로 환산된다. 공정을 구성하는 펌프, 방향제어밸브, 인젝션밸브의 제어는 basic 언어와 ladder 언어를 동시에 구현할 수 있는 제어장치(compile technology 사, CUBLOC290)를 사용하였으며, 제어장치는 controller, 그래픽 LCD, 접촉형 pad가 일체형으로 구성되었다. 측정된 전류값은 자료수집장치(Lab VIEW)를 이용하여 컴퓨터로 저장하였다. 센서장치의 전체 공정 흐름도는 그림 4와 같으며, 그림 5는 제작 설치된 장치 사진이다.

나. 실험재료

포도주 제조를 위해 칠레산 거봉 포도, 백설탕, 효모를 시중에서 구입하여 사용하였으며, 포도당 농도 측정을 위해 포도당, glucose oxidase를 사용하였다. Sodium phosphate(mono), sodium phosphate(dibasic), sodium chloride, 증류수를 사용하여 0.5 M의 sodium phosphate 완충용액(pH 7.0, 10 mM NaCl)을 제조하여 사용하였으며, 표준 포도당 용액은 완충용액으로 희석시켜 제조하였다. 실험에 사용된 재료의 상세한 규격은 표 2와 같다.

다. 실험방법

1) 포도주 제조

시중에서 구입한 칠레산 거봉 포도(8 kg)의 가지를 제거한

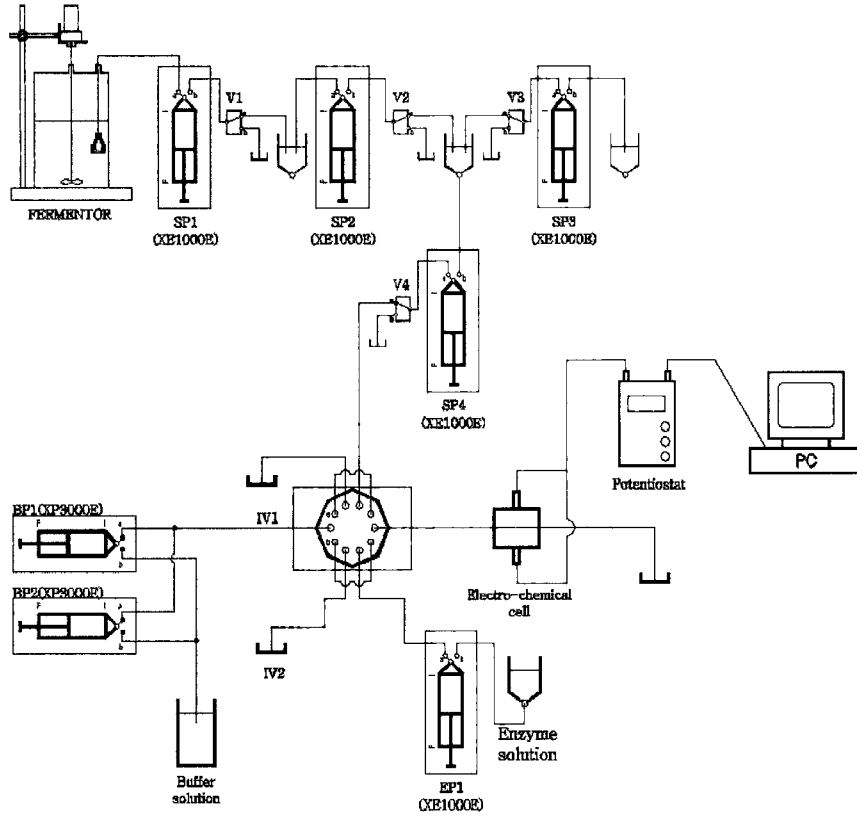


Fig. 4 Schematic diagram of the sensor system.

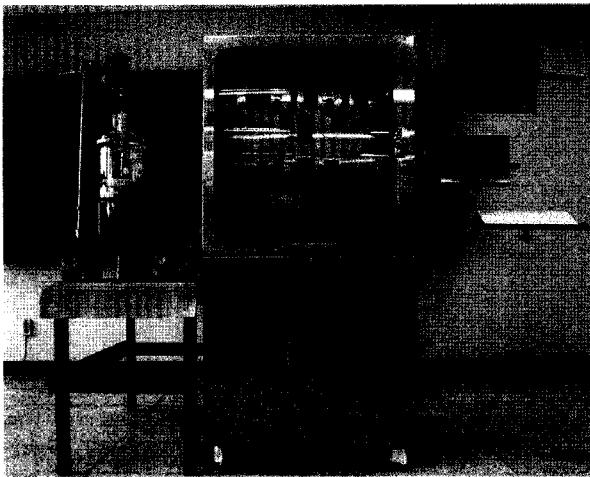


Fig. 5 Photograph of the sensor unit.

후 물로 깨끗이 세척하고 약 1시간 정도 표면 수분을 제거하였다. 당도를 24도로 유지하기 위해 600 g의 백설탕과 효모 1.6 g을(포도 중량의 0.02%) 세척된 포도에 혼합하고 손으로 잘게 파쇄하여 발효장치에 투입하였다. 발효장치에 투입된 포도액은 실험실 내에서 상온상태로 약 1주일간 발효시켰다. 발효장치에 투입된 시료의 상태는 그림 6과 같다.

2) 농도 측정 및 성능 검증

시료의 농도를 측정하기 전 10, 20, 30 mM의 표준 포도당 용액을 증류수로 희석하여 제조 한 후, 5 Unit/mL의 포도당 효소액을 사용하여 각 시료 표준 농도에 대한 표준 전류값 곡선을 구하였다. 각 농도에서 3회 반복 측정하여 평균값을 대

Table 2 Specifications of the experimental materials

Descriptions	Specifications	Remarks
Glucose oxidase	EC 1.1.3.4, X-S, 47.2 U/mg	Sigma Chemical Co.
D-glucose	$C_6H_{12}O_6$, FW 180.16	Sigma Chemical Co.
Sodium Phosphate	Monobasic ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	Sigma Chemical Co.
Sodium Phosphate	Dibasic (Na_2HPO_4)	Sigma Chemical Co.
Sodium Chloride	NaCl	Sigma Chemical Co.
Grape	Red glove	Chile
Sugar	Pure cane	CJ
Yeast	Dry	Choheung

표값으로 사용하였다.

발효장치에서 채취된 시료의 전류값을 측정하여 전류값이 전류계의 측정범위(199.0 nA)이상이거나 표준 전류값 농도 범위 이외의 경우 시료를 다시 채취하여 표준 전류값 적정범위로 자동희석 시킨 다음 전류값을 측정하고 이를 표준 전류값과 비교하여 농도로 환산하였다. 발효 중 포도당 농도는 발효 직 후부터 1주일 간 매 12시간 간격으로 측정하였으며, 3회 반복 측정 후 평균값을 대표값으로 하였다.

장치 성능 검증을 위해 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph)를 사용하여 포도당 농도를 측정한 후 이를 센서에서 측정한 값과 비교하였다. 발효장치에서 채취 및 희석된 시료를 원심분리기(12,000 rpm, 30 min.)에서 고형분을

분리시킨 후 주사기 필터(0.45 μ m)로 여과하여 성능 검증용 시료로 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 장치 calibration

표 3은 발효 중 용액의 포도당과 알코올 농도를 측정하기 위해 포도당 표준용액(10, 20, 30 mM)에 대한 전류값을 측정하여 표준농도에 대한 전류값 회귀직선의 기울기, 절편 및 계수를 표시한 것이다. 표에서 측정 간 기울기, 절편이 각각 다르게 나타나는 것을 알 수 있다. 이는 측정 시 효소상태(온도, 농도), 기질용액 상태(온도, 농도) 및 센서 작동 조건에 따라 전류값이 달라지는 것을 의미하는 것으로 효소액을 기질용액에 투입하여 농도를 측정하는 흐름주입식의 경우 측정할 때마다 표준용액으로 장치를 반드시 calibration 해야 함을 알 수 있다.

나. 농도 비교

그림 7은 포도주 발효 중 포도당 농도를 센서로 측정한 값과 HPLC로 측정한 값을 비교하여 나타낸 것이다. 그림에서 센서로 측정한 값은 샘플여과장치에서 기공크기 100 μ m필터로 여과된 고형분이 포함된 시료와 원심분리 후 기공크기 0.45 μ m로 여과된 고형분이 포함되지 않은 시료를 각각 비교하여 나타내었다. 포도당의 경우 발효가 진행됨에 따라 농도는 점차 감소하다가 발효 후 60시간 이후부터 급격하게 줄어드는 것을 알 수 있으며 센서 측정값이 HPLC 측정값보다 크게 나타남을 알 수 있다. 그림 8은 HPLC 측정값을 기준으로 환산한 센서 측정값의 상태오차를 나타낸 것으로 발효 후 72시간까지는 30%이하로 나타났으나 그 이후에는 100% 이상으로 매우 크게 나타남을 알 수 있다. 다만 고형분이 완전히



Fig. 6 Photograph of the wine fermentation.

Table 3 Regressive relations between the standard solution and electric current of glucose

No. of measurement (hr)	Glucose		
	Slope	Intercept	R ²
1(12)	0.9033	11.9220	0.9962
2(24)	0.7283	10.9000	0.9918
3(48)	1.2150	12.3330	0.9984
4(60)	0.7667	5.8337	1.0000
5(72)	0.7750	17.4220	0.9963
6(84)	0.6550	13.4220	0.9999
7(96)	0.5183	14.2010	0.9948
8(108)	0.4983	14.6880	0.9773
9(120)	0.6634	15.5330	0.9988
10(132)	0.5300	12.4110	0.9937

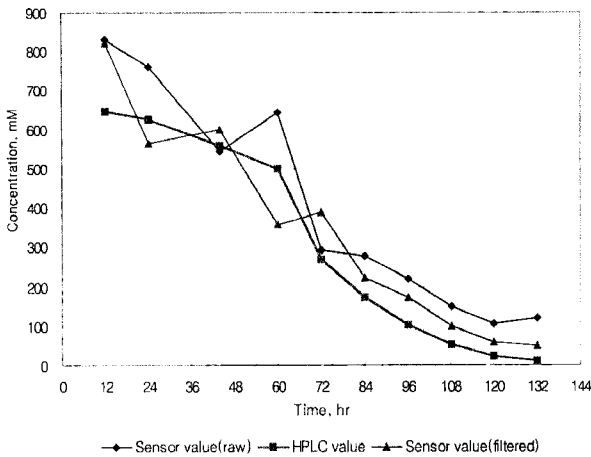


Fig. 7 Concentration change of glucose during wine fermentation.

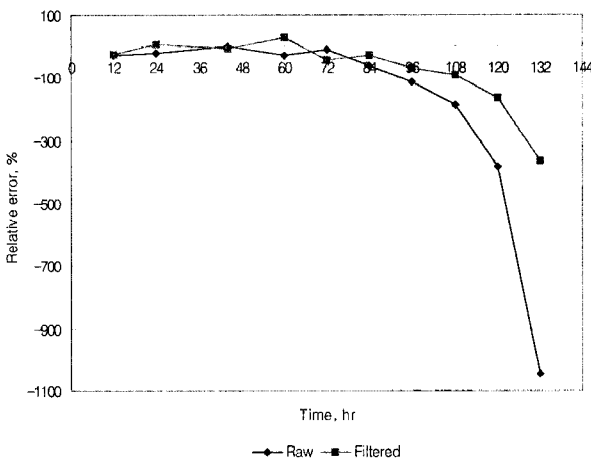


Fig. 8 Relative error of the concentration of glucose.

여과된 시료의 상대오차는 고형분이 포함된 것보다 적게 나타났다으나 오차 값은 50% 이상으로 역시 크게 나타났다. 포도주 발효 중 고형분 형상은 초기 48시간까지는 원형을 유지하다가 그 이후부터는 발효액이 형성되면서 매우 미세한 상태로 발효액 중에 존재한다. 발효가 진행되면서 센서값의 상대오차가 증가되는 이유는 시료 중에 존재하는 고형분의 영향으로 생각되며, 이러한 이유로 고형분이 포함된 시료의 상대오차가 고형분이 포함되지 않은 시료의 값보다 크게 나타난 것으로 생각된다.

4. 요약 및 결론

기존의 시료 채취를 위한 샘플링 장치에서 발생하는 문제점을 해소하기 위해 발효공정의 온라인 감시를 위한 바이오센서 개발에 반드시 필요한 자동 기질용액 채취 및 여과장치를 적용한 발효공정 온라인 감시를 위한 센서장치를 구성하고 포도주 제조 중 포도당 농도를 측정하고 HPLC를 사용하

여 성능을 검증한 결과, 장치 calibration, 고형분 농도, 희석비율 증가 등의 요인으로 약 30% 이상의 매우 큰 오차를 보였다. 따라서 개발된 센서장치의 현장 적용을 위해서는 장치의 정밀도와 관련된 문제점을 구체적으로 파악하고, 이를 해결할 방안에 대한 보다 심층적인 연구가 필요한 것으로 판단된다.

참고문헌

- Kim, H. K. and B. S. Noh. 2002. Optimization of Sikhe processing using the obtained data by biosensor. Korean J. Food Sci. Technol. 34(1):65-72. (In Korean)
- Kim, J. H., D. H. Rhie, T. J. Kim and B. S. Noh. 1998. Development of biosensor for simultaneous determination of glucose, lactic acid and ethanol. Korean J. Food Sci. Technol. 30(1):22-34. (In Korean)
- Park, I. S., J. H. Kim, T. J. Kim, N. S. Kim and B. S. Noh. 1996. Simultaneous determination of glucose and ethanol of Takju by biosensor using dual cathode electrode. Korean J. Food Sci. Technol. 28(5):974-980. (In Korean)
- Rajendran, V. and J. Irudayaraj. 2002. Detection of glucose and lactose in milk with a microdialysis-coupled flow injection amperometric sensor. J. Dairy Sci. 85:1357-1361
- Rhee, J. I. 1998. On-line monitoring of glucose and acetate by flow-injection analysis in Escherichia coli fermentation process. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 13(3):244-250. (In Korean)
- Rocha, I. and E. C. Ferreira. 2002. On-line simultaneous monitoring of glucose and acetate with FIA during high cell density fermentation of recombinant E. coli. Analytica Chimica Acta. 462:293-304.
- Ruzicka, J. and E. H. Hansen. 1975. Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. Analytica Chimica Acta. 78:145.
- Schugerl, K., B. Hitzmann, H. Jurgens, T. Kullick, R. Ulber and B. Weigal. 1996. Challenges in integrating biosensors and FIA for on-line monitoring and control. TIBTECH. 14:21-31.
- Song, D. B., H. S. Jung, S. K. Lee, D. H. Jung and S. W. Park. 2007. Performance evaluation of an auto sampling and filtering unit of substrate solution using a diaphragm pump. J. of Biosystems Engineering 32(4):263-268. (In Korean)
- Song, D. B. and J. Irudayaraj. 2003. Measurement of glucose concentration using μ FIA biosensor J. of Biosystems Engineering. 28(5):465-468. (In Korean)
- Werasak, S., W. Supinda, S. Pornpimol, T. Morakot and K. Krissanapong. 1999. Dual electrode signal-subtracted biosensor for simultaneous flow injection determination of sucrose and glucose. Analytica Chimica Acta. 380:7-15.
- White, S. F., I. E. Tothill, J. D. Newman and A. P. F. Turner. 1996. Development of a mass-producible glucose biosensor and flow-injection analysis system suitable for on-line monitoring during fermentation. Analytica Chimica Acta. 321:165-172.