

최 종  
연구보고서

## 발효공정 온라인 감시를 위한 흐름주입식 센서장치 개발

Development of flow injection analysis type biosensor for  
on-line monitoring of fermentation process

주관연구기관  
경 상 대 학 교

농림자료실



0013483

농 림 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “발효공정 온라인 감시를 위한 흐름주입식 센서장치 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 24일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 송 대 빈

세부연구책임자 : 송 대 빈(제1세부과제)

세부연구책임자 : 조 성 환(제2세부과제)

연 구 원 : 정 효 석

연 구 원 : 정 대 홍

연 구 원 : 박 성 우

연 구 원 : 이 동 근

# 요 약 문

## I. 제 목

발효공정 온라인 감시를 위한 흐름주입식 센서장치 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

생물 산업 시장의 세계적 규모는 2002년 산업연구원의 생물의약품 발전전략에 의하면 생명공학 관련 기술의 개발과 이에 따른 제품의 수요 창출로 2000년을 기준으로 크게 증가하고 있으며, 2012년에는 약 2천억 불을 상회할 것으로 추정된다. 특히 제품 개발 및 생산에 필수적인 생물공정 및 측정시스템 분야는 전체 시장의 약 15% 정도를 차지할 것으로 예상된다.

국내 생물 산업 시장 규모는 생명공학 분야에 대한 정부의 집중적 투자와 육성정책에 힘입어 크게 확대되고 있다. 특히 생물 공정에 관련된 기기류의 경우 수입품이 시장의 대부분을 차지 할 정도로 국내 제품개발 상황이 미진한 형편이며, 센서류의 경우는 최근 들어 그 중요성이 인식되어 시장규모가 증가되고 있다. 생물반응공정 및 발효공정에서 반응에 관여하는 효소의 활성은 공정관리에서 가장 중요한 요인의 하나이다. 그러나 이를 직접 측정하는 것은 매우 어렵다. 따라서 발효 생성물의 농도, 기질농도, 균체농도 등을 측정하는 것이 공정관리상 중요하다.

발효공정에서 반응에 관여하는 기질의 농도나 생성물의 농도를 기존의 물리적 현상을 이용하는 계측장치로 측정하는 것은 정확성 측면에서 적절한 방법이라고 볼 수 없다. 따라서 생물반응공정에서 나타나는 생물학적 인식요소들을 측정 가능한 전기적 신호로 변환시켜 주는 센서장치의 적용이 필요하다.

생물반응에 관여하는 특정 기질이나 생성물의 농도를 실시간, 온라인으로 감시하기 위해서는 효소반응을 이용한 흐름주입식 전류센서(flow injection

amperometric sensor) 장치를 이용해야 하는데, 기존에 사용되는 효소 고정막을 이용한 전극봉 측정 장치는 측정회수에 따라 측정 오차가 발생하는 문제점을 내포하고 있으며, 여러 성분을 동시에 측정하는 경우 다수의 전극봉을 사용해야하기 때문에 이로 인한 측정 전류 값의 변동 등 센서 성능의 안정성에 문제가 있다. 또한 효소 고정화에 많은 노력과 시간이 요구되므로 효소와 기질 용액을 혼합하여 반응을 시키면서 전류의 최대치를 측정하는 새로운 측정 장치의 개발이 필요하다.

또 전류센서의 가장 큰 문제점 중의 하나인 기질 농도 변화 폭에 대한 측정 범위의 제약성을 해결하는 방법이 제시되어야 한다. 이는 단순히 측정 범위의 제약뿐만 아니라 센서의 제작비용과 관련하여 시급히 해결해야만 할 중요한 문제이다. 그러므로 생물반응공정, 특히 발효공정을 감시하는 센서장치는 기존에 개발되어 사용되는 센서와는 달리 온라인 모니터링에 적합한 기술들이 개발되고 그 성능이 충분히 검증되어야 한다.

따라서, 본 연구에서는 흐름주입식 바이오센서를 구성하는 장치개발을 위해 완충용액 유속변화, 펌프 작동요인, 기질·효소 및 전극봉 특성에 따른 전류값 특성을 구명하고, 완충용액 종류 및 효소 사용조건에 따른 효소활성도를 측정하여 적정 완충용액 및 효소 사용조건을 구명하고자 하였다. 또한 흐름주입식 바이오센서를 이용하여 기질의 농도를 온라인으로 측정하기 위해 샘플용액 채취 및 여과장치, 기질용액 자동 희석장치를 구성하고 실험을 통하여 특성을 구명하며, 상업용 시료를 사용하여 흐름주입식 센서의 성능을 검증하고자 하였다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 온라인 모니터링을 통해 발효공정을 감시하는 흐름주입식 센서장치를 개발하는 것으로 연구내용은 크게 센서장치를 구성하는 요소기술개발, 온라인 감시용 측정 장치개발, 발효공정 감시용 센서장치 구성으로 나누어진다.

요소기술개발에서는 완충용액 유속에 따른 전류값 특성 구명, 완충용액 이송용 펌프장치 개발 및 특성 구명, 기질·효소·전극봉 요인에 따른 전류값 특성 구명, 효소 농도, 반응 체적 비, 이중효소 혼합에 따른 활성도 구명의 연구를 수행하여 흐름주입식 센서장치 구성 시 기본적으로 요구되는 적정 완충용액 유속, 전극봉 크기 및 형상, 효소농도, 완충용액 종류를 파악하였다.

온라인 감시용 측정 장치 개발에서는 농도측정 자동화를 위해 필요한 시료의 전처리 기술인 샘플용액 채취 및 여과장치, 샘플용액 희석장치를 개발하고 그 성

능을 관행의 분석법과 비교하여 검증하였다.

발효공정 감시용 센서장치 구성에서는 앞서 개발된 장치 및 요인들을 바탕으로 일체형 센서장치와 발효장치를 제작하여 포도주와 동치미 발효 중 알코올, 포도당, 젖산 농도를 측정하고 그 성능을 관행의 분석법과 비교하여 검증하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 흐름주입식 바이오센서의 전류측정 장치 개발을 위해 전극봉의 크기와 유속에 따른 전류값을 측정하였다. 과산화수소수를 사용한 실험 결과 전류값은 전극봉 크기와 관계없이 유속 0.17 cm/s에서 최대 전류값을 나타냈다. 기질과 효소를 사용한 실험 결과 전류값은 유속이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나, 과산화수소수와는 달리 유속이 느릴수록 기질과 효소의 반응시간이 길어져서 높게 나타났다. 작동시간과 전류값 변화를 기준으로 각 전극봉에서 적정 유속은 전극봉 직경 1.0 mm의 경우 0.10 cm/s~0.26 cm/s, 1.4 mm의 경우 0.12 cm/s~0.24 cm/s, 2.4 mm의 경우 0.10 cm/s~0.25 cm/s, 3.4 mm의 경우 0.05 cm/s~0.10 cm/s의 구간으로 판단되었다.

2. 배치식 장치에서 발생 가능성이 큰 공기방울의 경우 발생 위치에 관계없이 센서 성능에 큰 영향을 미치는 것으로 나타나 유로 내 공기 배출 장치가 필요한 것으로 확인되었다. 연속식 장치에서 나타나는 맥동 역시 센서 성능에 큰 영향을 미치는 것으로 나타나 완충용액 유속 선택 시 주의해야 할 것으로 확인되었다. 반복 및 장시간 측정에 따른 실험 결과 반복 간 및 장시간 사용에 따른 전류값의 변화는 배치식과 연속식 모두 큰 차이를 나타내지 않아 온라인 측정 가능성을 확인할 수 있었다.

3. 기질·효소 간 반응시간이 길어짐에 따라 예상과는 달리 혼합과 희석에 따른 문제로 전류값이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 기질·효소 간 반응시간은 센서 작동시간을 고려하여 적절한 길이를 선정할 필요가 있음을 알 수 있었다. 반응 체적 비를 달리한 실험결과 기질과 효소는 동일 체적으로 혼합해야 됨을 알 수 있었다. 전극봉 단면적에 따른 실험결과 유속이 0.1 cm/s 이하에서는 단면적에 비례하여 전류값이 크게 나타났으나 그 이상의 유속에서는 차이를 보이지 않았다. 전극 간 거리에 따른 실험 결과 거리가 적을수록 전류값이 크게 나타

났으나, 전극봉을 평행으로 배치한 경우는 거리에 따른 전류값 차이는 나타나지 않았다. 전극봉 배치 형상은 교차형으로 해야 함을 알 수 있었다.

4. 적정 완충용액 구멍 실험 결과 효소활성도는 완충용액 종류보다는 산도에 많은 영향을 받았으며, 산도 7.0인 인산염 용액의 경우 알코올효소를 제외하고 나머지 효소에 사용 가능함을 알 수 있었다. 효소 농도의 경우 자당효소를 제외한 나머지는 50 units/ml로 희석 사용하는 것이 가능하였다. 기질·효소 간 사용체적 비 실험 결과 동일 체적으로 사용해야 함을 알 수 있었다. 효소 혼합 사용가능성 실험 결과 자당효소, 카탈라제는 혼합사용이 불가능 하였고 포도당효소, 젓당효소, 알코올효소는 혼합사용이 가능함을 알 수 있었다.

5. 다이아프램식 진공펌프를 사용하여 발효조 내의 샘플을 채취하는 것이 가능한 것으로 판단되며, 발효공정 특성상 고형분이 혼합될 가능성이 있으므로 필터는 펌프 흡입부에 설치해야 되고, 이 경우 흡입부 유로의 길이는 최대 1000 mm까지 가능한 것으로 예상되었다. 필터의 규격은 0.45  $\mu\text{m}$ 의 사용이 가능함을 알 수 있었으며, 이 규격은 HPLC 샘플용액의 여과규격으로 발효공정의 여과장치에 적용이 가능함을 확인할 수 있었다. 다만 발효조의 크기가 클 경우 여러 곳에서 샘플링이 필요한 경우는 흡입 압력이 큰 원심식의 진공 펌프 사용이 필요한 것으로 판단되었다.

6. 희석장치는 샘플링간 오차 및 상대오차를 기준으로 볼 때 실제 적용이 가능할 것으로 판단되었으며, 오차를 줄이기 위해 희석비율은 크게, 희석에 사용되는 기질용액의 체적은 크게 하는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

에탄올의 경우 희석 시 대기에 일정시간 노출 될 경우 농도의 오차가 심각해질 우려가 있으므로 기밀유지에 노력을 기울여야 할 것으로 판단된다.

7. 센서장치를 구성하여 실험한 결과 유속에 관계없이 일정 농도 이상에서는 전류값이 증가하지 않음을 알 수 있었고, 동일 농도에서 유속이 적을수록 전류값이 높게 나타남을 알 수 있었다. 흐름주입식 센서로의 적용 가능성을 농도변화에 따른 전류값 변화량, 측정시간을 기준으로 볼 때 전극봉 직경 1.0 mm의 경우가 가장 효과적으로 판단되었다. 그리고 센서장치의 성능검증 결과는 오렌지 쥬스와 소주의 상대오차는 5%이내에 있었으나, 포도 쥬스와 요구르트는 심각한 오차를 나타내어 지속적인 반복실험이 요구된다.

8. 기존의 시료 채취를 위한 샘플링 장치에서 발생하는 문제점을 해소하기 위해 발효공정의 온라인 감시를 위한 바이오센서 개발에 반드시 필요한 기질용액 채취 및 여과장치를 개발하여, 화학분석에서 시행되는 관행의 방법을 이용하여 그 성능을 평가한 결과. 시간이 지남에 따라 샘플용액 농도는 표준용액의 농도에 수렴하는 것으로 나타났으며, 최대 오차 및 샘플용액 채취 가능시간은 고형분 함량이 1%의 경우 3.8%, 6분, 고형분 함량이 3%의 경우 4.8%, 8분, 고형분 함량이 5%의 경우 7.0%, 8분으로 나타나 개발된 샘플용액 자동 채취 및 여과 장치는 발효조 내 샘플 채취장치로 사용가능함을 확인할 수 있었다. 다만, 발효조 내 다양한 생성물(고점도, 미세분말) 등에 대한 실제 적용 실험이 추가되어야 할 것으로 판단된다.

9. 발효공정 온라인 감시를 위한 센서장치를 구성하고 포도주와 동치미 제조 중 포도당, 알코올, 젖산 농도를 측정하고 HPLC 및 GC를 사용하여 성능을 검증한 결과 100% 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.

# SUMMARY

## (영문 요약문)

### I. Title

Development of flow injection analysis type biosensor for on-line monitoring of fermentation process

### II. Research Backgrounds

A biosensor is an analytical device monitoring a state change of a material occurring during any reaction that converts the biochemical signal to a electrical signal. The biosensor have been widely applied to various fields in combination with Nano technology.

A flow injection analysis method(FIA), which analyze 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, 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 was developed for on-line monitoring of the fermentation process. And the performance was verified by on line measuring the concentration of glucose, alcohol and lactic acid of the fermentation process of wine and Dongchimi.

### III. Experimental results

This research explored the performance of an electric current according to flow velocity, operating variables of a pump, substrate-enzyme and electrode variables, and also explored an adequate buffer solution and the optimum condition of enzyme use through the use of different enzymes and the



measurement of enzyme activity. The testing apparatus was composed of basic elements required for development of the flow injection-type biosensor as a preliminary step of the biosensor for on-line monitoring of a fermentation process. Moreover, it was aimed to explore the features of electric current, and finally to verify its performance by the use of commercial specimens. The values of electric current was most sensitively influenced by the flow velocity of the buffer solution and electrode area, but displayed different results according to operation conditions of pump and reaction time between a substrate and an enzyme. The sampling unit of a substrate solution for the on-line monitoring process was considered to be possible to take a sample from the fermentation tank by the diaphragm pump. The minor error, 4%, of an error and relative error between samples led to great possibility for field application. The greater dilution ratio and the more volume of the substrate solution became desirable in decreasing the error. The flow injection-type biosensor was then applied to measure the concentration of commercial samples and finally it was concluded that each concentration error measured by the biosensor, HPLC and GC was 5% from orange juice and Soju(white distilled liquor), and 30% from grape juice and 2244% from yogurt. The concentration relative errors of glucose, alcohol, and lactic acid on the fermentation process of wine and Dongchimi showed over 30%, 60%, and 100%, respectively.

#### IV. Practical use of research results

The auto suction-filtering unit, dilution unit, and whole sensor system have systematical originality and capability of extension to the other biosensor system. After taking out a patent for the technology, the technical know-how will be transferred to any company having a capacity able to produce biosensor with further study.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	15
1. Research objectives .....	15
2. Research needs .....	16
2.1 Technical aspect .....	16
2.2 Economical and industrial aspect .....	17
2.3 Social and cultural aspect .....	18
3. Research ranges .....	19
3.1 Objectives and contents .....	19
3.2 Yearly objectives and contents .....	21
<b>Chapter 2. Present situation of the research</b> .....	24
1. Domestic .....	24
2. Overseas .....	24
2.1 FIA .....	24
2.2 On-line monitoring .....	26
<b>Chapter 3. Results and discussion</b> .....	30
1. Development of unit technologies .....	30
1.1 Introduction .....	30
1.2 Materials and methods .....	32
1.3 Discussion .....	50
1.4 Results .....	82
2. Development of the on-line monitoring units .....	85
2.1 Introduction .....	85
2.2 Materials and methods .....	86
2.3 Discussion .....	99

2.4 Results .....	122
3. Development of on-line monitoring of the fermentation process .....	125
3.1 Introduction .....	125
3.2 Materials and methods .....	126
3.3 Discussion .....	141
3.4 Results .....	155
4. Conclusions .....	157
<b>Chapter 4. Goal achievement and contribution to related fields .....</b>	<b>161</b>
1. Yearly research goal .....	161
2. Goal achievement and contribution to related fields .....	162
2.1 Development of unit technologies .....	162
2.2 Development of the on-line monitoring units .....	162
2.3 Development of on-line monitoring of the fermentation process .....	163
<b>Chapter 5. Plans for practical use of the research results .....</b>	<b>164</b>
1. Practical use of the research results .....	164
2. Necessity of a further research .....	164
<b>Chapter 6. Overseas information collected during the research .....</b>	<b>166</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>168</b>

# 목 차

<b>제 1 장</b>	<b>연구개발과제의 개요</b> .....	15
제 1 절	연구개발의 목적 .....	15
제 2 절	연구개발의 필요성 .....	16
1.	기술적 측면 .....	16
2.	경제·산업적 측면 .....	17
3.	사회·문화적 측면 .....	18
제 3 절	연구개발 범위 .....	19
1.	연구개발 목표와 내용 .....	19
2.	연차별 연구개발 목표와 내용 .....	21
<b>제 2 장</b>	<b>국내외 기술개발 현황</b> .....	24
제 1 절	국내현황 .....	24
제 2 절	국외현황 .....	24
1.	흐름주입분석 .....	24
2.	온라인 모니터링 .....	26
<b>제 3 장</b>	<b>연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	30
제 1 절	요소기술 개발 .....	30
1.	서언 .....	30
2.	재료 및 방법 .....	32
가.	실험 재료 .....	32
나.	실험 장치 .....	34
다.	실험 방법 .....	39
1)	유속변화에 따른 전류값 특성 .....	39
2)	펌프의 작동요인에 따른 전류값 특성 .....	40
3)	기질·효소 및 전극봉에 따른 전류값 특성 .....	42

4) 효소 활성화도 .....	46
3. 결과 및 고찰 .....	50
가. 유속변화에 따른 전류값 특성 .....	50
1) 과산화수소수를 사용한 전류값 특성 .....	50
2) 기질·효소를 사용한 전류값 특성 .....	52
나. 펌프의 작동요인에 따른 전류값 특성 .....	60
1) 배치식 완충용액 공급 장치 .....	60
2) 연속식 완충용액 공급 장치의 성능 .....	65
다. 기질·효소 및 전극봉에 따른 전류값 특성 .....	67
1) 기질·효소 반응 시간에 따른 특성 .....	67
2) 반응 체적 비에 따른 특성 .....	69
3) 전극 단면적에 따른 특성 .....	70
4) 전극 설치 형상과 거리에 따른 특성 .....	72
라. 효소활성도 .....	73
1) 적정 완충 용액 .....	73
2) 적정 반응 효소농도 .....	77
3) 기질·효소 간 적정 반응체적 비 .....	79
4) 이종 효소 혼합에 따른 활성화도 측정 .....	81
4. 결론 .....	82
제 2 절 온라인 감시용 측정 장치 개발 .....	85
1. 서언 .....	85
2. 재료 및 방법 .....	86
가. 실험 재료 .....	86
나. 실험 장치 .....	87
다. 실험 방법 .....	96
1) 샘플용액 채취 및 여과장치 .....	96
2) 샘플용액 회석장치 .....	97
3) 온라인 감시용 측정 장치 개발 .....	98
3. 결과 및 고찰 .....	99

가. 샘플용액 채취 및 여과장치 .....	99
나. 샘플용액 회석장치 .....	104
다. 온라인 감시용 측정장치 개발 .....	110
4. 결론 .....	122
제 3 절 발효공정 감시용 센서 장치 구성 .....	125
1. 서언 .....	125
2. 재료 및 방법 .....	126
가. 시료 채취 및 여과장치 구성 .....	126
1) 실험 재료 .....	126
2) 실험 방법 .....	128
나. 발효 장치 구성 .....	131
다. 센서 장치 구성 .....	132
라. 성능 검증 .....	135
1) 포도주 제조 중 포도당 및 알코올 농도 측정 .....	135
2) 동치미 제조 중 젖산 농도 측정 .....	138
3. 결과 및 고찰 .....	141
가. 시료 채취 및 여과장치 구성 .....	141
1) 중량비교 .....	141
2) 농도비교 .....	144
나. 포도주 제조 중 포도당 및 알코올 농도 측정 .....	148
1) 장치 calibration .....	148
2) 농도 비교 .....	149
다. 동치미 제조 중 젖산 농도 측정 .....	153
1) 장치 calibration .....	153
2) 농도 비교 .....	153
4. 결론 .....	155
제 4 절 종합결론 .....	157

<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b> .....	161
제 1 절 연도별 연구목표 및 평가 착안점 .....	161
제 2 절 연구개발 목표 달성도 및 관련분야 기여도 .....	162
1. 요소 기술 개발 .....	162
가. 목표 달성도 .....	162
나. 기여도 .....	162
2. 온라인 감시용 측정 장치 개발 .....	162
가. 목표 달성도 .....	162
나. 기여도 .....	163
3. 발효공정 감시용 센서장치 구성 .....	163
가. 목표 달성도 .....	163
나. 기여도 .....	163
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획</b> .....	164
제 1 절 활용계획 .....	164
제 2 절 추가연구 필요성 .....	164
<b>제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b> .....	166
<b>제 7 장 참고문헌</b> .....	168

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적

최근 바이오 및 나노 산업의 발전으로 생물 산업은 생물의약, 생물공정, 생물화학, 바이오식품, 바이오에너지, 생물환경, 생물검정·정보 및 생물전자 등으로 영역이 확대되고 있으며 시장규모 역시 급속하게 증가되고 있다. 이와 같이 생물 산업이 규모화 됨에 따라 제품의 경쟁력 제고를 위한 대량 생산 체제 구축과 공정관리에 필요한 다양한 기술이 필요하며, 특히 생물반응 공정을 실시간으로 감시할 수 있는 센서장치의 적용이 필수적이다.

바이오센서는 생물 또는 화학적 반응 생성물을 이용하여 반응과정을 측정 가능한 전기적인 신호로 변환시켜주는 장치를 의미한다. 즉 생화학적 반응정도 또는 결과를 전기적 신호를 이용하여 감지·측정하는 장치로서 관행의 정량·정성분석방법에서 요구되는 측정절차 및 소요시간을 단축하여 반응과정을 실시간에 가깝게 감시할 수 있는 장점이 있다. 특히 흐름주입식 바이오센서는 반응공정의 전 과정을 온라인으로 감시할 수 있어 생물 산업분야에 즉시 적용이 가능한 기술로 인식되고 있다.

바이오센서를 이용한 반응공정관리의 간편성과 신속성에도 불구하고, 관행의 화학적 분석방법에서 요구되는 측정절차를 완벽하게 기계적으로 구현시키는 데는 구조적으로 많은 어려움이 있기 때문에 결과의 정확성 측면에서 바이오센서의 실용화는 아직 매우 미진한 형편이다.

따라서 이 연구는 생물반응 공정을 온라인으로 감시할 수 있는 바이오센서를 개발하기 위해 발효공정을 대상으로 공정 중 시료 채취, 여과, 회석을 기계화하고 흐름주입식 방법으로 농도를 측정하는 센서장치 개발을 목적으로 수행되었다.



## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

○ 발효공정에서 반응에 관여하는 효소의 활성은 공정관리에 가장 중요한 요인이다. 그러나 이를 직접 측정하는 것은 매우 어렵다. 따라서 발효 생성물의 농도, 기질 농도, 균체 농도 등을 측정하는 것이 공정관리상 중요하다. 특히 발효 배양 공정에서 미생물의 성장과 생산성을 증대시키기 위해서는 반응에 관여하는 요인, 즉 pH, pO<sub>2</sub>, 온도 및 CO<sub>2</sub> 등을 온라인으로 감시하는 것이 필요하다.

○ 발효공정에서 반응에 관여하는 기질의 농도, 생성물의 농도를 기존의 물리적 현상을 이용하는 계측장치로 측정하는 것은 정확성 측면에서 적절한 방법이라고 볼 수 없다. 따라서 생물반응공정에서 나타나는 생물학적 인식요소들을 측정 가능한 전기적 신호로 변환시켜 주는 센서 장치의 적용이 필요하다.

○ 생물반응에 관여하는 특정 기질이나 생성물의 농도를 실시간, 온라인으로 감시하기 위해서는 효소 반응을 이용한 흐름주입식 전류센서(Flow injection amperometric sensor) 장치가 필요하다. 기존에 사용되는 효소 고정막을 이용한 전극봉 측정 장치는 측정회수에 따라 측정 오차가 발생하는 문제점을 내포하고 있으며, 여러 성분을 동시에 측정하는 경우 다수의 전극봉을 사용해야하기 때문에 이로 인한 측정 전류값의 변동 등 센서 성능 안정성에 문제가 있다. 또한 효소 고정화에 많은 노력과 시간이 필요하다.

○ 따라서 효소와 기질 용액을 혼합하여 반응을 시키면서 전류 최대치를 측정하는 새로운 측정 장치의 개발이 필요하다. 또 전류센서의 가장 큰 문제점 중의 하나인 기질 농도 변화 폭에 대한 측정 범위의 제약성을 해결하는 방법이 제시되어야 한다. 이는 단순히 측정 범위의 제약뿐 만 아니라 센서의 제작비용과 관련하여 시급히 해결해야만 할 중요한 문제이다.

○ 생물반응공정, 특히 발효공정을 감시하는 센서 장치는 기존에 개발되어 사용되는 센서와는 달리 다음과 같은 내용의 기술들이 개발되고 그 성능이 충분히 검증되어야 한다.

- 발효조 내의 기질 용액을 자동으로 채취하는 장치
- 채취된 기질 용액 중 고형분을 여과 처리하는 장치
- 여과된 기질 용액을 희석하는 장치
- 완충 용액, 효소 용액, 기질 용액 주입장치
- 효소-기질 반응 장치
- 전류 측정 장치
- 장치 자동화 및 운영 프로그램
- 성능 검증을 위한 정량, 정성 분석
- 공정 온라인 감시 성능 확인을 위한 검증 실험

## 2. 경제·산업적 측면

○ 생물 산업 시장의 세계적 규모는 표 1-1에서 보는 바와 같이 생명공학 관련 기술의 개발과 이에 따른 제품의 수요 창출로 2000년을 기준으로 크게 증가하기 시작하여 10년 후에는 약 2천억 불 정도로 예측 되고 있다. 특히 제품 개발 및 생산에 필수적인 생물공정 및 측정 시스템 분야는 전체 시장의 약 15% 정도를 차지할 것으로 예상된다.

표 1-1 생물 산업 세계시장 동향

(단위 : 억불)

구분	1997	2000	2003	2008	2013
생물공정 및 측정시스템	47	81	111	188	315
전체	313	540	740	1,250	2,100

자료 : 한국생물 산업협회, 「2001년도 국내 생물 산업 실태 조사」  
 산업연구원, 「생물의약산업의 발전전략」  
 OECD, Biotechnology&Trade

○ 국내 생물 산업 시장 규모는 표 2-1와 같이 생명공학 분야에 대한 정

부의 집중적 투자와 육성 정책에 힘입어 크게 확대되고 있다. 특히 생물 공정에 관련된 기기류의 경우 수입품이 시장의 대부분을 차지 할 정도로 국내 제품 개발 상황이 미진한 형편이며, 센서류의 경우는 최근 들어 그 중요성이 인식되어 시장규모가 증가되고 있다. 이러한 기기류 및 센서류에 대한 시장규모는 급속도로 확대될 전망이며, 따라서 생물공정과 관련된 발효공정의 온라인 감시를 위한 요소기술의 개발은 반드시 필요하다.

표 2-2 국내 생물 산업 시장 규모

(단위 : 백만 원)

년도		생물 공정		전체	계
		장치류	센서류		
2001	국내 제품	30,639	4,921	758,717	1,178,334
	수입 제품	157,596	1,885	419,617	
2000	국내 제품	20,119	3,252	569,494	900,052
	수입 제품	107,653	390	330,558	
1999	국내 제품	16,802	-	458,671	670,074
	수입 제품	46,801	-	211,403	

자료 : 한국생물 산업협회, 「2001년도 국내 생물 산업 실태 조사」

산업연구원, 「생물의약산업의 발전전략」

OECD, Biotechnology&Trade

### 3. 사회·문화적 측면

○ 인류는 농산물의 자연발효로부터 주류, 장류, 요구르트 등의 발효식품을 이용하여 왔으며, 우리나라의 경우 김치, 젓갈, 간장, 된장, 탁주 등으로 대표되는 전통발효식품을 먹거리로 이용하였다.

○ 단순 식품으로 인식되던 이런 전통발효식품은 최근 생명공학 기술의 발전과 접목되어 건강·기능성 식품으로 그 용도가 확대되어 오늘날에는 바이오 식품으로 그 시장이 급속하게 확대되고 있다. 발효산업의 한 분야인 미생물 배양

기술의 발전은 농산물을 단순한 1차 산물에서 고부가가치의 2차 가공품으로 용도를 전환시켜 생산자인 농민에게 안정적인 소득을 보장하는 기여를 할 것으로 예상된다.

- 이러한 발효식품의 다기능성은 쌀로 대표되는 우리나라 농업의 인식을 바꾸어 경쟁력 논리에 의해 도태된 우리 농산물의 복원에 직접적인 영향을 미칠 것으로 생각된다.

- 따라서 다양한 발효식품의 개발과 다 기능성 부여를 위해서는 발효과정을 적절하게 유지하는 기술이 필요하며, 이를 위해서는 공정을 실시간 온라인으로 감시하는 기계장치 및 센서 장치의 개발이 우선되어야 한다고 판단된다.

### 제 3 절 연구개발 범위

#### 1. 연구개발 목표와 내용

##### [제 1 세부과제] 센서장치 개발 및 성능 검증

- 요소 기술 개발
  - 배치식 주입장치 개발
  - 연속식 주입장치 개발
  - 반응(효소-기질)장치 개발
  - 전류 측정장치 개발
- 온라인 측정용 센서 장치 개발 및 실험
  - 샘플 용액 채취 및 여과 장치 개발
  - 샘플 용액 희석 장치 개발
  - 센서 장치 제작 및 실험
  - 시스템 자동화 및 운영 체제 개발
- 발효 공정 감시용 센서 장치 구성
  - 발효 및 센서 장치 구성
  - 장치 calibration

- 공정 온라인 감시

[제 2 세부과제] 반응조건 구명 및 정량분석

- 반응 조건 구명
  - 적정 완충용액 구명
  - 적정 반응 효소농도 구명
  - 효소·기질간 적정 반응 체적비 구명
  - 이종 효소 혼합에 따른 활성화도 측정
- 성능 검증용 정량 분석
  - 샘플 용액 채취 및 여과 장치 성능 검증
  - 샘플 용액 희석 장치 성능 검증
  - 정량 분석
- 발효 공정 구성 및 센서 성능 평가
  - 발효 공정 구성
  - 센서 성능 평가를 위한 정량 분석

## 2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2004)	요소기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배치식 주입장치 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유량, 유속 변화에 따른 효소-기질 반응 특성 파악</li> <li>- 온라인 측정 가능 여부 판단</li> </ul> </li> <li>○ 연속식 주입장치 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 펌프 토출 맥동에 따른 효소-기질 반응 특성 파악</li> <li>- 유량, 유속 변화에 따른 효소-기질 반응 특성 파악</li> <li>- 온라인 측정 가능 여부 판단</li> </ul> </li> <li>○ 반응(효소-기질)장치 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 반응 시간, 체적 변화에 따른 반응 특성 파악</li> </ul> </li> <li>○ 전류 측정장치 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전극 설치 형상, 단면적, 노출면적, 전극간 간극 변화에 따른 반응 특성 파악측정장치 개발</li> </ul> </li> </ul>
	반응조건 구명	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 적정 완충 용액 구명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 완충용액의 반응 특성 파악</li> </ul> </li> <li>○ 적정 반응 효소 농도 구명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 효소 농도에 따른 반응 특성 파악</li> </ul> </li> <li>○ 효소-기질간 적정 반응 체적비 구명               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동일 농도의 효소-기질간 체적비에 따른 반응 특성 파악</li> </ul> </li> <li>○ 이종 효소 혼합에 따른 활성화도 측정               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 이종 효소 혼합액의 효소-기질간 반응특성 파악</li> </ul> </li> </ul>

구 분	연구 개발 목 표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2005)	온라인 측정용 센서 장치 개발 및 실험	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 샘플 용액 채취 및 여과장치 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 용액 채취장치 제작</li> <li>- 여과장치 제작(고형분 제거)</li> <li>- 진공펌프 작동 조건에 따른 샘플 용액 조성 측정</li> </ul> </li> <li>○ 샘플 용액 희석 장치 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 장치 제작</li> <li>- 증류수 주입펌프 작동조건에 따른 희석특성 파악</li> </ul> </li> <li>○ 센서 장치 제작 및 실험 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 표준 용액을 사용한 장치 calibration</li> <li>- 상업용 시료(오렌지, 포도 주스)를 사용한 성능 검증</li> <li>- 농도 변화에 따른 센서 선형성 측정</li> <li>- 동일 농도 용액을 사용한 센서 재현성 측정</li> <li>- 장시간 사용에 따른 센서 내구성 측정</li> </ul> </li> <li>○ 시스템 자동화 및 운영 체제 개발</li> </ul>
	성능 검증용 정량 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 샘플 용액 채취 및 여과장치 성능 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 여과처리 된 샘플 용액 성분 분석</li> </ul> </li> <li>○ 샘플 용액 희석 장치 성능 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 희석 용액 농도 측정</li> </ul> </li> <li>○ 정량 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 상업용 시료(오렌지, 포도 주스)의 성분 정량·정성 분석</li> </ul> </li> </ul>

구 분	연구 개발 목 표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2006)	발효 공정 감시용 센서 장치 구성	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효 및 센서 장치 구성               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 장치 제작</li> </ul> </li> <li>○ 장치 calibration               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 표준 용액(당, 에탄올, 젖산)을 사용한 장치 calibration</li> </ul> </li> <li>○ 공정 온라인 감시               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 포도주 제조 중 당·에탄올 농도 측정</li> <li>- 동치미 제조 중 젖산 농도 측정</li> </ul> </li> </ul>
	발효 공정 구성 및 센서 성능 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효 공정 구성               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 포도주 제조 공정 구성</li> <li>- 동치미 제조 공정 구성</li> </ul> </li> <li>○ 센서 성능 평가를 위한 정량 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 당, 에탄올, 젖산 농도 정량 분석</li> <li>- 관행 분석법에 의한 장치 성능 평가</li> </ul> </li> </ul>



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내현황

Rhee<sup>22</sup>는 효소 고정식 전극봉을 사용한 흐름주입분석으로 대장균 발효공정에서 포도당과 초산(acetic acid)의 농도를 온라인으로 계측하였는데, 오프라인 분석결과와 비교했을 때 6% 이내에서 일치함을 보였다.

Kim 등<sup>23</sup>은 포도당, 젖산, 에탄올을 동시에 측정하기 위해 한개의 음극과 여섯 개의 양극으로 구성된 효소 고정식 산소 전극봉을 개발하고 실험을 통하여 그 성능을 검증하였다.

Park 등<sup>24</sup>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.

Kim 등<sup>25</sup>은 Park 등<sup>24</sup>이 개발한 센서를 이용하여 식혜제조 공정 중 포도당과 맥아당 농도를 측정하고 이 결과를 사용하여 식혜제조공정을 최적화하고 그 결과를 제시하였다.

Song 등<sup>26</sup>은 미세투석장치를 사용하고 기질·효소를 완충 용액 중에서 직접 반응시키는 흐름주입분석 방식으로 포도당 농도를 측정하였다.

### 제 2 절 국외현황

#### 1. 흐름주입분석

Ruzicka와 Hansen<sup>4</sup>에 의해 도입된 흐름주입분석법(flow injection analysis, FIA)은 연속적인 흐름을 유지하는 완충용액 중에 효소와 반응대상물인 기질을 투입하여 반응결과 발생하는 산소의 농도나 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 변수의 온라인 측정에 가장 적합한 기법이 되었다.

Karlberg, B. 등<sup>5</sup>은 흐름주입분석이 작은 내경의 관 내부로 연속적으로 흐르는 운반용액 속에 소량의 시료를 주입함으로써 이루어지며, 주입된 시료는 대역을 형성하여 검출기로 운반되고, 검출기에서 시료물질이 관내를 지남에 따라 변화하는 신호결과를 기록하는데, 운반용액 속에 함유되어 있거나 고정화된 시약 및 촉매에 의해 측정이 가능한 물질이 생성된다고 기술하였다.

생물반응공정에서는 물질의 생물화학적 성분과 특성을 알기 위해 공정에서 시료를 주기적으로 채취하여 분석하는 방법이 요구된다. 그러나 시료가 옮겨지는 동안 시료의 상태가 공정 내의 시료상태와 달라지거나, 오염이 될 확률이 높고, 시간도 많이 걸리기 때문에, 철저한 공정관리와 신속하고 경제적인 분석을 위해 보다 적극적인 분석법이 요구되어 왔다.

최근에는 이러한 문제를 해결하기 위해 생물공정상에서 원하는 성분을 온라인으로 분석해 실시간 제어하고자 하는 시도들이 활발히 이루어지고 있다. 특히, 복잡하고 생산량이 방대한 공정일 경우, 공정흐름에서 잘못된 공정을 즉각 발견하지 못하면 이는 막대한 경비 지출로 이어질 수 있기 때문에 온라인 모니터링은 매우 중요하다. 즉, 온라인 모니터링은 공정 개선을 통해 공정의 생산성을 향상시키고, 실시간 분석으로 공정에 유연하게 대처하도록 할뿐만 아니라 단시간 내에 공정을 최적화할 수 있는 가장 바람직한 방법이다.

Schugerl, K 등<sup>6</sup>은 생물공정상에서 생물반응기 내 기질이나 생산물의 농도를 온라인 모니터링하기 위한 흐름주입분석 기술은 온라인 모니터링기법에 있어 중요한 분석기법으로 자리 잡고 있다고 기술하였다.

생물반응기에서 반응액에 침지된 상태로 측정하는 현장 실험(in situ)방법과는 달리, 흐름주입분석에 의한 측정은 여과 혹은 투석 등을 통한 무균적인 반응액의 샘플링이 필요하게 된다. 또한 대사 저해 물질의 첨가나 가스방출 등의 전처리, 바이오센서의 측정 가능한 범위 내로 반응액을 재현성 있게 희석하는 일 등이 가능해야만 한다. 현재 이용되고 있는 샘플링 방법들은 측정대상에 따라 기

상과 액상에서의 샘플링으로 크게 나눌 수 있다.

Hall, E<sup>7</sup>는 바이오센서를 통해 분석을 하는 경우 에탄올과 같은 휘발성 저분자를 기체 투과막(예를 들면, 실리콘 또는 테프론 튜브)을 통해 채취 분석하거나, 한외여과막 투석을 통해 균체와 다른 고분자 물질을 제거시킴으로써 반응액 내의 기질이나 산물의 농도를 측정하였다. 샘플링 된 반응액 중 대상물질의 농도는 대개 바이오센서의 측정범위 밖이므로 희석이 필요하게 된다. 이 단계를 재현성이 높고 정확하게 수행하는 것이 흐름주입분석 시스템의 성능에 매우 큰 영향을 끼친다.

Garn, M 등<sup>8</sup>은 흐름주입분석에서 희석방법을 대역 샘플링 기법과 흐름 분류(stream splitter) 기법으로 채택하였는데 두 방법 모두 희석배율을 쉽게 변경 조절할 수 있다. 전자의 경우 주입된 시료액이 튜브관이나 혼합실을 지나면서 확산될 때, 다시 그 특정한 일부만을 채취하여 또 다른 흐름경로로 자동 주입함으로써 희석효과를 얻는 방법이다. 이 경우 10000배 이상의 높은 희석배율까지 가능하며, 주어진 시스템에서 확산효과는 일정하므로 컴퓨터를 이용하여 정확한 시기에 밸브들의 동작을 제어함으로써 높은 재현성을 얻을 수 있다.

Valero, F 등<sup>9</sup>은 흐름분류 기법에서 시료가 주입되는 관으로부터 또 다른 펌프를 사용하여 상당량의 시료 층을 제거하는 동시에 다시 운반용액을 보충함으로써 희석이 진행 되게 하였다. 이에 따라 펌프들의 유속을 조절함으로써 요구되는 희석이 가능하다. 흐름주입분석은 측정하고자 하는 물질과 반응물질을 반응시켜서 이 때 생성되는 신호를 검출하는 방법과 효소나 항체 등 생화학적 반응을 유발시키는 것을 고정화시킨 담체를 칼럼 내에 충전시킨 후 측정물질을 완충용액과 같이 흘려보내서 이 때 발생하는 신호를 측정하는 방법으로 크게 나눌 수 있다.

## 2. 온라인 모니터링

미생물의 배양은 세포와 배양환경에 따라 다양한 상호작용과 공정변수에 의해 성장상태 및 생산성이 달라질 수 있다. 이러한 공정변수를 모니터링하고 제

어하는 것은 생물공정의 효율을 증대시키기 위해 매우 중요하다. 특히, 대개의 생물공정에서 기질로 포도당(glucose)을 사용하고 있으며, 유기산 발효공정에 의해 생산되는 젖산(lactic acid)은 자연계에 존재하는 가장 작은 이성질체로 식품 산업, 의약산업 뿐만 아니라 공업적으로 폭넓게 이용되는 유기산 가운데 하나이다. 또한 알코올(alcohol)은 기존의 주류 산업뿐만 아니라 요즘 널리 각광받고 있는 와인의 제조공정에 있어 정확한 알코올 함유량의 온라인 모니터링이 필요하다. 따라서 포도당과 젖산 그리고 알코올에 대한 적절한 모니터링 기술 개발은 미생물의 성장 및 물질의 생산에 중요한 역할을 할 수 있다.

효소센서의 전류측정장치는 Updike 등<sup>10</sup>에 의해 효소전극봉의 명칭으로 처음 소개되었는데 흐름주입식 바이오센서에서 기질의 농도는 백금 전극봉의 촉매작용으로 과산화수소수를 이온화시켜 발생하는 전자를 양극에서 받아들임으로 전류값으로 표시하였다.

Werasak 등<sup>11</sup>은 세 종류의 효소를 두 단계로 고정화시킨 여러 개의 전극봉을 사용하여 흐름주입분석으로 식품 속에 있는 자당(sucrose)과 포도당의 농도를 연속적으로 측정이 가능함을 보여주었다. 그리고 흐름주입분석을 사용하기 위한 최적의 조건들과 효소의 양, pH, 온도의 영향을 측정하였다.

Weigel 등<sup>12</sup>은 흐름주입분석법을 이용하여 세 가지의 다른 효소센서의 작용원리에 따라 포도당과 여러 당의 성분을 측정하고 비교하였다.

Gaspar 등<sup>13</sup>은 필름기술을 접목시킨 마이크로셀을 이용한 효소고정 전극시스템에 미세투석장치를 사용하여 콜린(choline), 포도당 등을 측정하였다.

Kiyoshi 등<sup>14</sup>은 식품 속의 포도당, 자당, 과당(fructose)을 흐름주입분석법을 이용하여 농도를 분석하였는데 효소를 조정시킨 전극은 분석하고자 하는 대상물의 개수에 맞춰서 제작하였다.

Rocha 등<sup>15</sup>은 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<sup>16</sup>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.

Vander Pol 등<sup>2</sup>은 당시까지 개발된 방법들을 사용하여 단일 센서로 여러 성분의 농도를 측정하는 방법들을 제시하였다. 그리고 흐름주입분석시스템에 있어 샘플용액의 처리, 소프트웨어 조절 및 하드웨어의 구성이 중요한 변수임을 보여주었다.

Schuhmann 등<sup>17</sup>은 여러 개의 효소고정 전극봉을 사용한 집적식 전류감지 장치를 사용한 센서를 이용하여 표준 유당(lactose) 용액과 포도당 용액으로 보정(calibration)한 후 제빵용 효모의 발효공정 중 포도당 농도를 온라인으로 측정하였다.

Min 등<sup>18</sup>은 두 개의 효소고정 전극봉과 미세투석장치를 사용하여 발효공정 중 유산과 포도당 농도를 측정하는 실험을 하여 기질 용액 채취에 미세투석 장치의 사용 가능성을 제시하였다.

Compagnone 등<sup>19</sup>은 과산화수소 전극에 두 개의 효소를 고정시켜 알코올 발효공정 중 글리세롤(glycerol)의 농도를 측정하는 흐름주입분석 장치를 개발하였다.

Becker 등<sup>20</sup>은 흐름주입시스템에서 두 가지의 기질을 연속적으로 검출하기 위해 이에 반응하는 효소를 전극봉에 함께 고정시켜 농도를 측정하였다. 또한, 흐름주입 시스템을 검출하고자하는 성분에 맞추어 제작하여 실용가능성을 보여주었다.

Rajendran 등<sup>21</sup>은 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.

Francis 등<sup>27</sup>은 맥동을 완화시키기 위해 최근에 적용되고 있는 다양한 방법(sequential injection analysis, lab-on-value technology, bead injection, multi-commutation)들을 제시하였으며, Weeks 등<sup>28</sup>은 기계적 메카니즘에 의한

맥동의 영향을 완화시키기 위해 솔레노이드 구동식 펌프를 사용한 실험을 통하여 그 성능을 검증하였다.

Vijayakumar<sup>29</sup>은 에탄올 농도 측정 실험에서 효소와 기질의 혼합량에 따른 전류값 특성을 분석한 결과 일정량 이상에서 오히려 전류값이 감소함을 밝혔다.

Kriz 등<sup>30</sup>은 효소농도에 따른 전류값 특성을 분석한 결과 농도 50 units/ml 이상에서는 전류값이 일정하게 나타는 것을 확인하였다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 요소기술 개발

#### 1. 서언

흐름주입식 바이오센서는 연속적인 흐름을 유지하는 완충용액 중에 효소와 반응대상물인 기질을 투입하여 반응결과 발생하는 과산화수소의 농도를 전위차나 전류값으로 측정하여 반응대상물의 농도를 측정하는 방법이다.

과산화수소수는 일정한 전위차를 갖는 양극과 음극 전극봉 사이를 흐르면서 산화되어 전자를 방출하게 되고, 방출된 전자는 양극 전극봉으로 이동하여 과산화수소수의 농도에 해당하는 전류값으로 검출된다.

흐름주입식 바이오센서를 구성하는 요소는 완충용액을 이송시키는 펌프, 기질과 효소를 투입하는 인젝션밸브, 기질의 농도를 측정하는 전류측정장치로 이루어진다. 일정한 흐름으로 완충용액을 주입하는 펌프는 흐름의 반복성, 안정성 및 정밀성이 요구되는데, 이는 전류값 검출의 구조적 특성상 흐름주입식 센서가 전극봉 사이를 흐르는 완충용액의 유속에 민감한 영향을 받기 때문이다. 따라서 완충용액의 적정 유속을 구명함으로써 센서 구성의 기본이 되는 이송완충용액 공급펌프의 용량과 형식 선정, 이송관로의 규격 결정 및 작동시간 결정을 할 수 있다.

펌프는 공급방식에 따라 연속식과 배치식으로 구분할 수 있다. 우선 연속식 공급 장치는 용액을 연속적으로 공급하는 장점이 있는 반면, 용액의 흡입·송출에 의한 기계적 메카니즘으로 맥동이 발생된다. 흐름주입식 분석에서 펌프에 의한 맥동은 용액의 흐름을 불균일하게 하여 성능을 저하시키는 주요인이 된다. 한편 주사기펌프는 일정량의 완충용액을 주사기에 투입하고 피스톤을 전진시켜 공급하는 형태로, 주사기 용량에 따라 공정이 단속되는 배치식 용액공급 장치이기 때문에 맥동 발생의 우려는 없으나 용액 재충진 시 부압으로 인해 공기방울이 장치 내로 흡입되는 문제가 발생된다. 공기방울은 압축성질로 인해 기계적 메카니즘에 의한 것처럼 크지는 않지만 맥동을 발생시키며 흐름 단면적을 감소시

켜 유속을 증가시키는 문제를 일으킨다. 특히 효소를 사용하는 흐름주입식 바이오센서에서 공기방울과 맥동현상은 센서의 성능에 직접적으로 영향을 미치는 중요한 작동요인으로, 공기방울의 형성과 발생정도, 맥동의 크기와 주기는 장치의 구성형태, 작동 시간 및 반복 사용 등의 요인을 결정하게 된다.

인젝션밸브는 기질과 효소를 전류측정장치로 투입하며, 투입된 기질과 효소는 완충용액에 의해 이송되면서 확산 등의 요인에 의해 혼합되어 기질·효소 반응이 일어난다. 이때 반응생성물인 과산화수소수 양은 반응시간에 따라 달라지며, 이는 동일 농도의 기질에 대해 반응 시간에 따라 측정 전류값이 다르게 나타나는 것을 의미한다. 따라서 기질·효소의 반응 시간과 반응체적 비에 대한 전류값 특성을 파악할 필요가 있다.

전류측정장치는 전극봉 사이를 흐르는 반응생성물인 과산화수소수가 백금 전극봉에 의해 산화되고, 이 때 방출되는 전자가 양극으로 이동하여 기질의 농도를 전류값으로 변환시키는 장치로 흐름주입식 바이오센서의 성능에 직접 영향을 끼치는 가장 중요한 장치이다. 동일 농도의 기질에 대해 전극봉의 기하학적 요인에 의해 전류값이 달라지기 때문에 전극봉 단면적, 전극봉간 거리, 전극봉 배치에 따른 전류값 특성을 파악할 필요가 있다.

흐름주입식 바이오센서의 측정원리인 효소센서는 분석대상 물질에 따라 다양한 효소를 사용해야 한다. 따라서 효소센서에서 여러 기질의 농도를 측정하는 경우 사용되는 효소의 종류에 따라 효소활성도를 유지시켜 주는 완충용액의 사용이 필요하다. 따라서 센서의 성능에 민감한 영향을 끼칠 수 있는 기질·효소 반응에 관여하는 요인을 파악하는 것이 중요하다.

기질과 효소는 완충용액 중에 투입되어 전류측정 장치로 이송되면서 혼합과 반응이 일어나므로 완충용액의 종류, pH, 온도 등이 바이오센서의 성능에 큰 영향을 미칠 것으로 예상되며, 반응에 사용되는 효소 농도, 기질과 효소의 반응체적 비 등에 따라 반응정도가 달라질 것으로 예상된다. 특히 여러 종류의 기질을 동시 측정하기 위해서는 효소를 혼합하여 사용해야 하는데 이처럼 서로 다른 효소를 혼합한 경우 반응정도가 어떤 특성을 나타내는지 파악하여야 한다.



따라서 이 장에서는 흐름주입식 바이오센서를 구성하는 장치개발을 위해 완충용액 유속변화, 펌프 작동요인, 기질·효소 및 전극봉 특성에 따른 전류값 특성을 구명하고, 완충용액 종류 및 효소 사용조건에 따른 효소활성도를 측정하여 적정 완충용액 및 효소 사용조건을 구명하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 실험 재료

실험에 사용된 재료의 종류 및 상세한 규격은 표 3-1과 같다. Sodium phosphate(mono/dibasic), Sodium chloride, 증류수를 사용하여 0.5 M의 Sodium phosphate 완충용액(pH 6.86, 10 mM NaCl)을 제조하여 사용하였다. 센서의 전류값 특성은 포도당( $\beta$ -D-glucose)과 포도당효소(glucose oxidase)를 사용하여 측정하였다. 효소활성도 측정을 위해 인산염(phosphate), 아세트산염(acetate), 시트르산염(citrate)의 3종류의 완충용액을 pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 제조하여 사용하였으며, 5종의 효소(glucose oxidase, lactate oxidase, invertase, alcohol oxidase, catalase), 5종의 기질( $\beta$ -D-glucose, sucrose, fructose, lactic acid, ethanol) 및 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid), 4-aminoantipyrine, Dinitrosalicylic acid, Sodium azide, O-dianisidine을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

표 3-1. 실험 재료 규격

Descriptions	Specifications	Remarks
Glucose oxidase	EC 1.1.3.4, X-S, 47.2 U/mg	Sigma Chemical Co.
Invertase	EC 3.2.1.26, 228 U/mg	Sigma Chemical Co.
Lactate oxidase	EC not available, 49 U/mg	Sigma Chemical Co.
Alcohol oxidase	EC 1.1.3.13, 40 U/mg	Sigma Chemical Co.
Catalase	EC 1.11.1.6, 5270 U/mg	Sigma Chemical Co.
Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$ , FW 342.3	Sigma Chemical Co.
D-Glucose	$C_6H_{12}O_6$ , FW 180.16	Sigma Chemical Co.
Fructose	$C_6H_{12}O_6$ , FW 180.2	Sigma Chemical Co.
Lactic-acid	$C_3H_6O_3$ , FW 90.08	Sigma Chemical Co.
Ethanol	$C_2H_6O$ , FW 46.07, 190 PROOF	Sigma Chemical Co.
2,2'-azinobis	$C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$ , FW 548.7	Sigma Chemical Co.
4-aminoantipyrine	$C_{11}H_{13}N_3O$ , FW 203.2	Sigma Chemical Co.
Dinitrosalicylic acid	$C_7H_4N_2O_7$ , FW 228.1	Sigma Chemical Co.
Sodium azide	$NaN_3$ , FW 65.01	Sigma Chemical Co.
O-dianisidine	$C_{14}H_{16}N_2O_2$ , FW 244.3	Sigma Chemical Co.
Hydrogen peroxide	F.W. 34.01	Duksan 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.

#### 나. 실험 장치

실험에 사용된 배치식 완충용액 공급 장치는 그림 3-1, 그림 3-2와 같이 구성하였고, 연속식 완충용액 공급 장치는 그림 3-3, 그림 3-4와 같이 구성하였다. 펌프(syringe, diaphragm)에 의해 송출된 이송완충용액은 인젝션밸브와 전류 측정 장치(electro-chemical cell)를 순차적으로 통과한다. 그림 3-5에서 인젝션밸브의 유로선택은 1의 위치로 선택된 경우로 펌프에서 송출된 완충용액은 주사기에 의해 투입된 기질용액을 인젝션밸브 밖으로 밀어낸다. 이 때 인젝션밸브의 유로가 차단된 2의 위치에 주사기로 효소용액을 투입하는 작업이 동시에 이루어진다. 효소용액 투입 과정은 인젝션 밸브가 2의 위치로 선택된 경우로 펌프에서 송출된 완충용액은 주사기로 투입된 관로 내 효소를 인젝션밸브 밖으로 이송시키는 사이클이다. 위의 두 과정이 연속적으로 진행되면 인젝션밸브를 통과한 기질과 효소는 인젝션밸브와 전류측정장치 사이의 흐름 관로 내에서 혼합과 반응이 이루어지며, 전류측정장치의 전극봉 사이를 통과하여 배출된다. 전류측정 장치는 그림 3-6과 같이 은과 백금으로 제작된 원형 전극봉과 전류계로 구성되었으며, 기질과 효소 반응으로 생성된 과산화수소수의 양을 전류값으로 측정한다. 측정된 전류값은 자료수집장치(Lab VIEW)를 이용하여 컴퓨터로 저장하였다. 실험에 사용된 장치의 상세한 규격은 표 2와 같다.

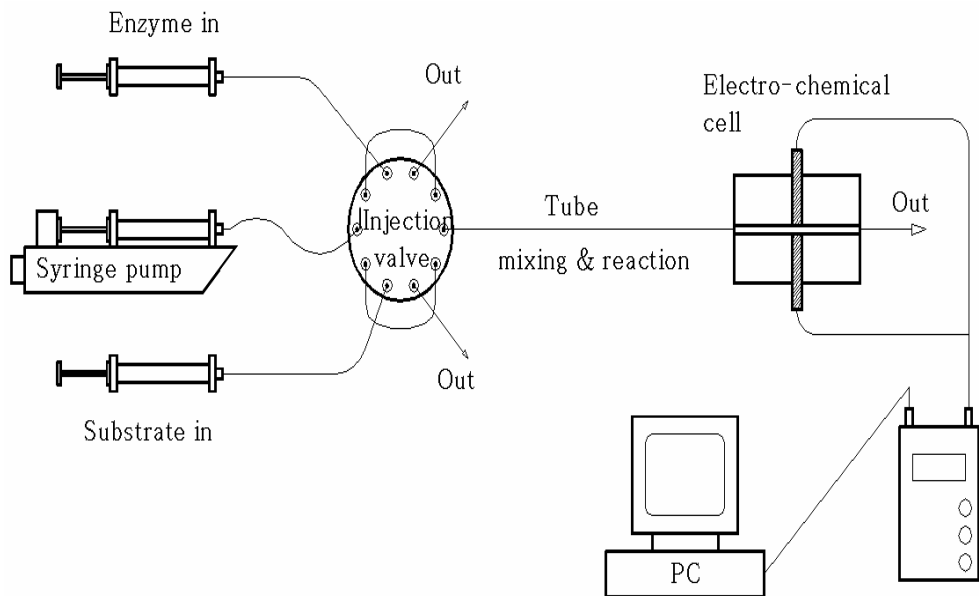


그림 3-1. 배치형 센서장치 구성도.

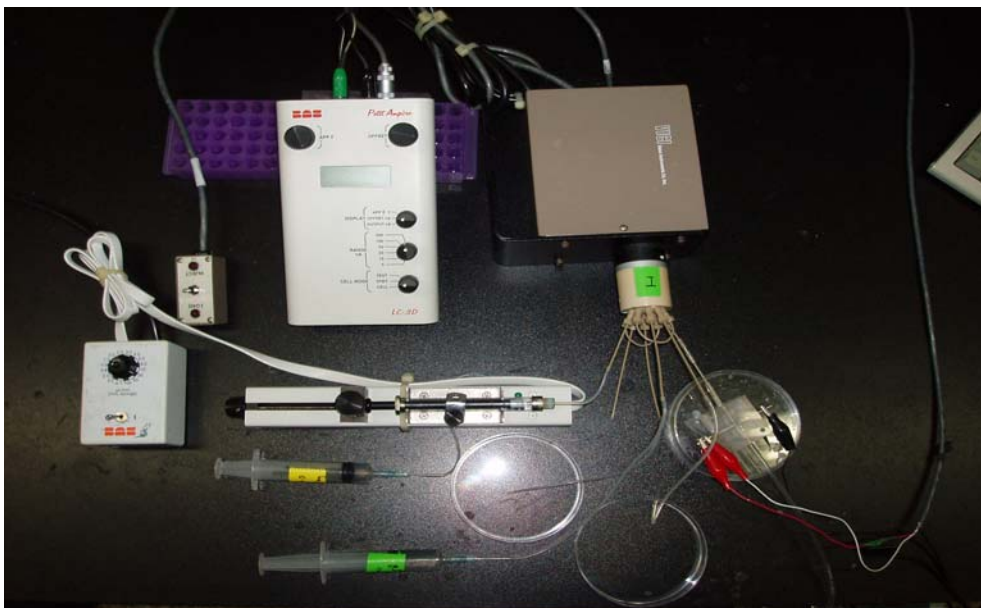


그림 3-2. 배치형 센서장치 형상.

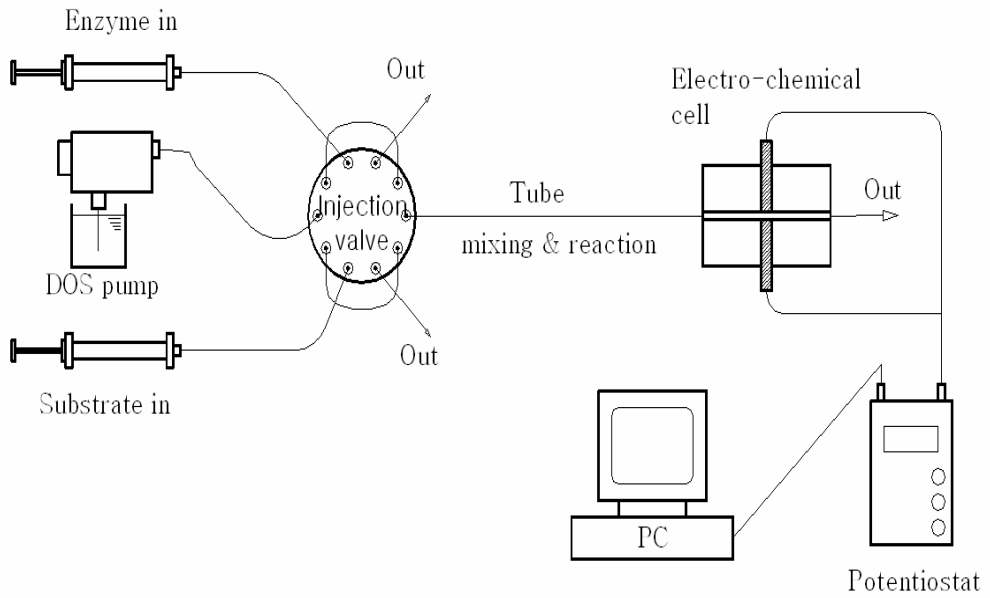


그림 3-3. 연속식 센서장치 구성도.

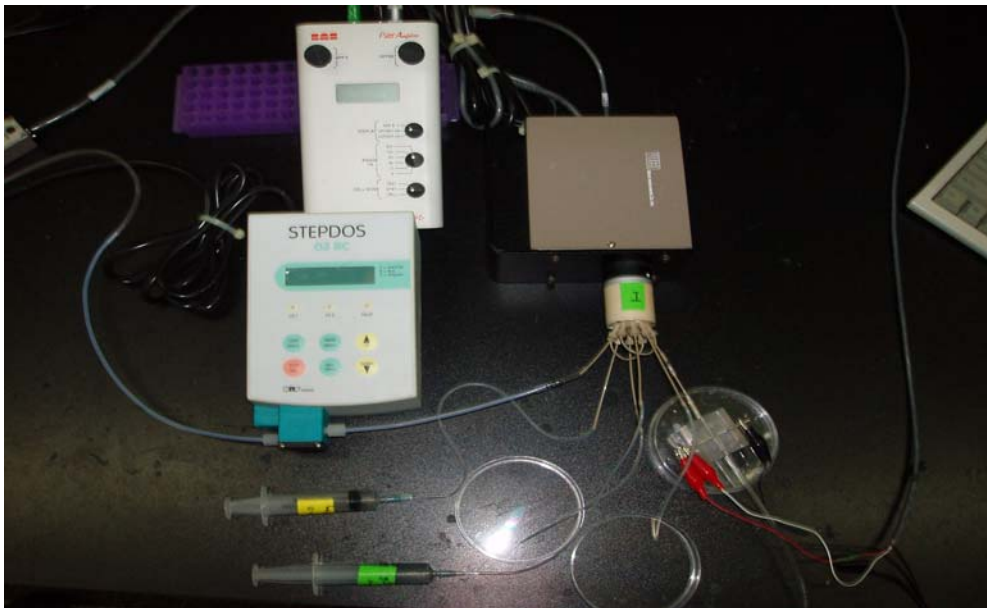


그림 3-4. 연속식 센서장치 형상.

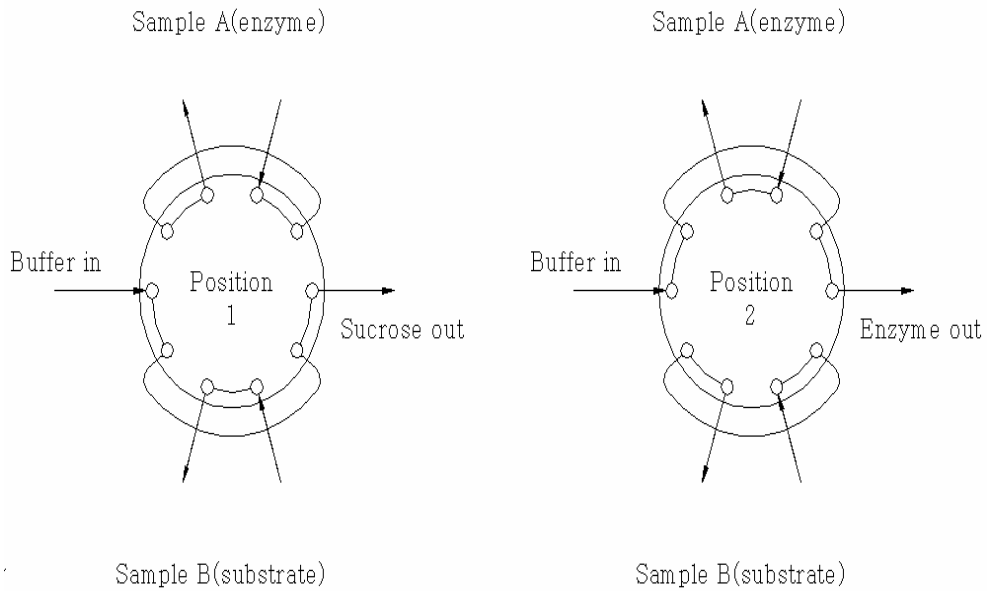


그림 3-5. 인젝션 밸브 구성도.

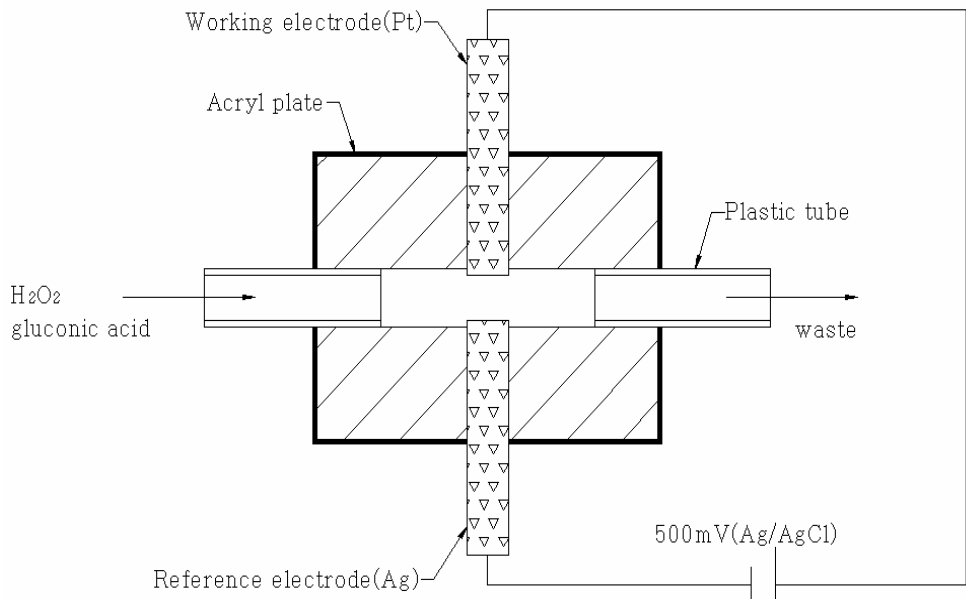


그림 3-6. 전류 측정 장치 구성도.

표 3-2. 장치 규격

Component	Specification	Remarks
Syringe pump	2.5 ml, 25 $\mu$ l/min	BioAnalytical Systems, Inc.
Diaphragm pump	0.03 - 30 ml/min.	KNF Flodos
Injection valve	10port, C22Z-3180E	Valco Instrument Co. Ins.
Electrochemical cell	0.02, 0.016, 0.039, 0.092 ml	Acryl
Electrode	1.0, 1.4, 2.4, 3.4 mm	W. E.(platinum) R. E.(silver)
Tube	1.45, 1.52, 2.29 mm	Cole-parmer Co.
Potentiostat	200 nA, +500mV(Ag/AgCl). LC-3D	BioAnalytical Systems, Inc.
Data acquisition	Lab VIEW	National Instruments.

## 다. 실험 방법

### 1) 유속변화에 따른 전류값 특성

#### 가) 과산화수소수를 사용한 전류값 특성

완충용액 유속에 따른 전류값 특성을 알아보기 위해 과산화수소수를 사용하여 전극봉 지름과 유속에 따른 전류값을 측정하였다. 과산화수소수 농도는 전류 측정 장치의 전류계 검출상한치인 199 nA를 고려하여 예비실험을 통해 전극봉 지름 1.0 mm, 2.4 mm의 경우에 0.00005%로, 1.4mm, 3.4 mm의 경우에는 0.00002%로 하였다. 유속은 전극봉 지름에 따른 유로 내경을 고려하여 0.10 cm/s, 0.17 cm/s, 0.26 cm/s, 0.53 cm/s의 4 수준으로 하였다. 각 수준에서 5회 반복하여 전류값을 측정하였고 평균값을 각 유속에서의 대표 전류값으로 하였다.

#### 나) 기질과 효소를 사용한 전류값 특성

완충용액 유속에 따른 전류값 특성을 알아보기 위해 포도당과 포도당효소를 사용하여 전극봉 직경과 유속에 따른 전류값을 측정하였다. 기질의 농도는 전류계의 검출상한치인 199 nA를 고려하여 전극봉 지름에 따라 결정하였으며, 상세한 규격은 표 3-3과 같다. 전극봉 지름이 1.0 mm 및 1.4 mm의 경우 10 mM, 전극봉 지름이 2.4 mm의 경우 3 mM, 전극봉 지름이 3.4 mm의 경우 1 mM로 하였다.

포도당효소의 농도는 25 units/ml, 포도당과 포도당효소의 투입량은 동일하게 하였다. 유속은 전류 측정 장치의 유로내경을 고려하여 0.005 cm/s~0.300 cm/s의 범위에서 5 수준으로 선정하였다. 각 수준에서 5회 반복하여 전류값을 측정하였고 평균값을 각 유속에서의 대표 전류값으로 하였다.



표 3-3. 실험 조건

Electrode diameter (mm)	Substrate (mM)	Enzyme (units/ml)
1.0	10	25
1.4	10	25
2.4	3	25
3.4	1	25

2) 펌프의 작동요인에 따른 전류값 특성

가) 배치식 완충용액 공급 장치의 성능

(1) 공기방울의 영향

인젝션밸브와 전류측정용 셀 사이의 유로와 전류측정용 셀 내에 완전한 공간이 형성될 정도의 한 개의 공기방울을 만들어, 기질 농도와 유속을 동일 작동 조건에서 전류값을 측정하여 공기방울의 영향을 조사하였다. 각 실험 조건에서 5회 반복 실험하였으며 상세한 실험 조건은 표 3-4와 같다.

표 3-4. 실험 조건

Variables	Levels	Remarks
Electrode diameter (mm)	2 (Ø1.0, Ø1.4)	batch type
Bubble	3 (tube, cell, none)	
Buffer solution velocity (cm/s)	Ø1.0 : 0.1061 cm/s Ø1.4 : 0.1179 cm/s	

\* Tube : bubble located in the tube between injection valve and electro-chemical cell.

\* Cell : bubble located in electro-chemical cell.

\* None : no bubble.

(2) 온라인측정 가능성

온라인측정에 필요한 실험장치의 재현성과 내구성을 조사하기 위해 기질 농도와 유속을 동일 작동 조건에서 1일 1시간씩 6시간동안 장시간 반복 측정과 1일 1시간씩 6일 동안 장기간 반복 측정을 실시하여 반복 및 장시간 사용에 따른 전류값 변화를 측정하였다. 모든 시험구에서 전극봉 지름은 1.4 mm, 유속은 0.1179 cm/s로 일정하게 하였으며, 각 실험 조건에서 5회 반복 실험하였다.

나) 연속식 완충용액 공급 장치의 성능

(1) 펌프 맥동의 영향

포도당 농도와 유속을 동일 작동 조건에서 맥동이 없는 주사기펌프와 맥동이 발생하는 연속식 펌프의 전류값을 측정하여 맥동에 의한 영향을 조사하였다. 각각 표 3-5와 같이 전극봉 지름은 2.4 mm 및 3.4 mm의 2수준으로 하였으며, 실험 조건에서 5회 반복 측정하여 비교하였다.

표 3-5. 실험 조건

Variables	Levels	Remarks
Electrode dia. (mm)	2 (Ø2.4, Ø3.4)	
Pulsation	2 (with pulse, without pulse)	with pulse : diaphragm pump without pulse : syringe pump
Buffer velocity (cm/s)	Ø2.4 : 0.0849 cm/s Ø3.4 : 0.0433 cm/s	

(2) 온라인 측정가능성

온라인측정에 필요한 실험 장치의 재현성과 내구성 성능을 조사하기 위해 동일 작동 조건(포도당 농도, 유속)에서 장시간 반복 측정(1일 1시간씩 6시간 동안 6회 반복 측정)과 장기간 반복 측정(1일 1시간씩 6일 동안 6회 반복 측정)을 실시하여 반복 및 장시간 사용에 따른 전류값 변화를 측정하였다. 각 실험 조건에서 전극봉 지름은 2.4 mm, 유속은 0.0849 cm/s로 일정하게 하여 5회 반복 실험하였다.

3) 기질·효소 및 전극봉에 따른 전류값 특성

가) 기질·효소 반응 시간에 따른 특성

기질과 효소의 반응시간에 따른 전류값 특성을 알아보기 위해 기질과 효소가 혼합되는 인젝션밸브와 전류측정용 셀 사이의 유로 길이를 조절하여 기질과 효소의 반응 시간에 따른 전류값을 측정하였다. 유로길이는 표준길이를 기준으로 2배, 3배, 4배 길이의 4수준으로 하였다. 기질로는 5 mM 포도당 용액을 사용하였고, 효소는 25 units/ml 포도당효소 용액을 사용하였다. 전극봉지름은 1.4 mm, 전극봉 사이를 지나는 완충용액 유속은 0.1179 cm/s로 하였다.

각 실험 조건에서 5회 반복 측정하였으며 평균값을 대표 전류값으로 하였다. 상세한 실험 조건은 표 3-6과 같다.

표 3-6. 실험 조건

Variables	Levels	Remarks
Tube length	4 (1X, 2X, 3X, 4X)	1X : 60 mm (standard length)
		2X : 120 mm
		3X : 180 mm
		4X : 240 mm
Repeat	5	

나) 반응체적 비에 따른 특성

기질과 효소의 적정 반응 혼합비를 알아보기 위해 인젝션밸브로 투입되는 기질과 효소의 투입량을 다르게 하여 반응체적 비에 따른 전류값을 측정하였다. 기질로는 10 mM 포도당 용액을 사용하였고, 효소는 25 units/ml의 포도당효소 용액을 사용하였다. 전극봉 지름은 1.4 mm, 전극봉 사이를 지나는 완충용액 유속은 0.0471 cm/s로 하였다. 또 반응체적 비는 인젝션밸브로 투입되는 기질과 효소의 체적비로 하여, 0.5, 1.0, 1.5의 3수준으로 하였다.

각 실험은 조건에서 5회 반복 측정하였으며 평균값을 대표 전류값으로 하였다. 상세한 실험 조건은 표 3-7과 같다.

표 3-7. 실험 조건

Variables	Levels	Remarks
Volume ratio	3 (0.5, 1.0, 2.0)	$Ratio = \frac{ml_{enzyme}}{ml_{substrate}}$
Repeat	5	

다) 전극 단면적에 따른 특성

전극봉의 노출 면적에 따른 전류값 특성을 알아보기 위해 전류값 측정용 전극봉 크기를 달리하여 전류값을 측정하였다. 기질로는 전극봉 지름이 1.0 mm, 1.4 mm의 경우 10 mM, 전극봉 지름이 2.4 mm, 3.4 mm의 경우 3 mM의 포도당 용액을 각각 사용하였고, 효소는 25units/ml의 포도당효소 용액을 사용하였다. 각 실험조건에서 5회 반복 측정하였으며 평균값을 대표 전류값으로 하였다. 상세한 실험조건은 표 3-8과 같다.

표 3-8. 실험 조건

Variables	Levels	Remarks
Electrode diameter (mm)	4 (Ø1.0, Ø1.4, Ø2.4, Ø3.4)	
Buffer velocity (cm/s)	5	varied with the electrode diameter
Repeat	5	

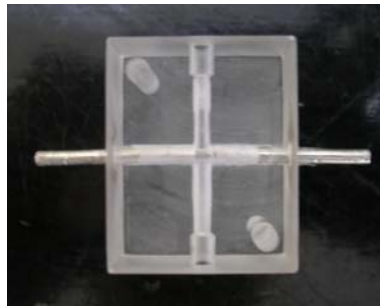
라) 전극설치 형상과 거리에 따른 특성

전극봉 설치형상 및 전극봉간 거리에 따른 전류값 특성을 알아보기 위해 전류값 측정용 전극봉을 직교와 평행으로 한 배치 형상과 전극봉 거리를 달리하여 전극설치 형상과 거리에 따른 특성을 파악하였다. 기질로는 10 mM 포도당 용액을 사용하였고, 효소는 25 units/ml 포도당효소 용액을 사용하였다. 전극봉 지름은 1.4 mm, 전극봉 사이를 지나는 완충용액의 유속은 0.0471 cm/s로 하였다.

각 실험 조건에서 5회 반복 측정하였으며 평균값을 대표 전류값으로 하였다. 상세한 실험 조건은 표 3-9와 같고, 직교형과 평행형 전극 배치 상세 사진은 그림 3-7과 같다.

표 3-9. 실험 조건

Variables	Levels	Remarks
Arrangement	2 (cross, parallel)	
Distance (mm)	2 (4.5, 9.0)	
Repeat	5	



(교차형)



(평행형)

그림 3-7. 전극봉 배치 형상.

#### 4) 효소 활성도

포도당효소의 활성은 Sigma사 및 Habech<sup>31</sup>의 방법에 준하여 측정하였으며, 자당효소(invertase)의 활성은 DNS(Dinitrosali-cylic acid)법, Dols 등<sup>32</sup> 및 Nam 등<sup>33</sup>의 방법에 의하여 측정하였다.

젖당효소(lactate oxidase)의 활성은 Worthington 등<sup>34</sup>의 방법에 의하여 측정하였으며, 알코올효소(alcohol oxidase)의 활성은 Majkic-singh 등<sup>35</sup> 및 Fuji 등<sup>36</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 카탈라제(catalase)의 활성분석은 Havar<sup>37</sup> 및 Beers<sup>38</sup>의 방법에 의하여 측정하였다.

##### 가) 적정 완충용액

적정 완충용액 및 완충용액의 동시사용 가능성을 파악하고자 완충용액의 종류에 따른 효소의 활성도를 측정하였다. 각 실험 조건에서 5개 시료의 값을 측정하고 평균값을 효소활성도로 하였다. 상세한 실험 조건은 표 3-10과 같다.

표 3-10. 실험 조건

Items	Levels	Remarks
Buffer solution	3 (phosphate, acetate, citrate)	phosphate : pH 6.0, 7.0, 8.0 acetate : pH 5.0 citrate : pH 5.0
Enzyme	5 (glucose oxidase, invertase, lactate oxidase, alcohol oxidase, catalase)	
Enzyme activity	glucose oxidase(47.2 units/mg) invertase(228 units/mg) lactate oxidase(49 units/mg) alcohol oxidase(40 units/mg) catalase(5270 units/mg)	

나) 적정 반응 효소농도

효소농도를 각각 5 units/ml, 25 units/ml, 50 units/ml, 75 units/ml, 100 units/ml으로 한 효소의 활성도를 측정하여 사용 가능한 효소의 농도범위를 구명하였다. 각 실험 조건에서 5개 시료의 값을 측정하고 평균값을 효소 활성도로 하였다. 상세한 실험 조건은 표 3-11과 같다.

표 3-11. 실험 조건

Items	Levels
Buffer solution	1 (phosphate, pH 7.0)
Enzyme	5 (glucose oxidase, invertase, lactate oxidase, alcohol oxidase, catalase)
Enzyme concentration	5 (5, 25, 50, 75, 100 units/ml)

다) 기질 · 효소 간 적정 반응체적 비

반응체적 비가 각각 0.1 ml/ml, 0.5 ml/ml, 1.0 ml/ml, 2.0 ml/ml, 10.0 ml/ml로 다른 시료의 효소의 활성도를 측정하여 적정 반응체적 비를 구명하였다. 각 실험 조건에서 5개 시료의 값을 측정하고 평균값을 효소활성도로 하였다. 상세한 실험 조건은 표 3-12와 같다. 여기에서 반응체적 비는 다음과 같이 정의하였다.

$$\text{Reaction volume ratio} = \frac{\text{ml} - \text{substrate}}{\text{ml} - \text{enzyme}}$$



표 3-12. 실험 조건

Items	Levels
Buffer solution	1 (phosphate, pH 7.0)
Enzyme concentration	1 (50 units/ml)
Enzyme	5 (glucose oxidase, invertase, lactate oxidase, alcohol oxidase, catalase)
Volume ratio	5 (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 10.0 ml/ml)

라) 이중 효소 혼합에 따른 활성화도

각 효소 활성화도 측정 시 5개의 효소(glucose oxidase, invertase, lactate oxidase, alcohol oxidase, catalase)를 혼합한 용액을 사용하여 활성화도 변화를 측정하였다. 이를 근거로 각 기질의 농도 측정 시 혼합효소 용액을 사용할 수 있는지의 여부를 알아보려고 하였다. 각 실험 조건에서 5개 시료의 값을 측정하고 평균값을 효소 활성화도로 하였다. 상세한 실험 조건은 표 3-13과 같다

표 3-13. 실험 조건

Items	Levels
Buffer solution	1 (phosphate, pH 7.0)
Enzyme concentration and volume ratio	1 (50 units/ml) / 1 (1.0 ml/ml)
Enzyme	1 (mixed with glucose oxidase, invertase, lactate oxidase, alcohol oxidase and catalase)
Substrate	5 (D-glucose, sucrose, lactic acid, ethanol, $H_2O_2$ )

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 유속변화에 따른 전류값 특성

##### 1) 과산화수소수를 사용한 전류값 특성

전극봉 지름이 1.0 mm, 1.4 mm, 2.4 mm, 3.4 mm인 경우 완충용액의 유속을 0.10 cm/s, 0.17 cm/s, 0.26 cm/s, 0.53 cm/s로 하였을 때 전류값의 특성은 그림 3-8과 같다. 그림에서 전류값은 완충용액의 유속이 0.10 cm/s~0.53 cm/s로 변화함에 따라 각각 전극봉 지름 1.0 mm는 69 nA에서 75 nA로, 1.4 mm는 123 nA에서 98 nA로, 2.4 mm는 102 nA에서 83 nA로, 3.4 mm는 67 nA에서 44 nA로 민감하게 변하는 것을 알 수 있다. 전극봉 직경 1.0 mm, 1.4 mm, 2.4 mm일 때 전류값은 완충용액의 유속 0.17 cm/s 부근을 기준으로 그 이하에서는 급격하게 감소하고 이상에서는 유속이 증가함에 따라 점차 감소하는 것을 알 수 있다.

전극봉 직경 3.4 mm의 경우는 유속 0.10cm/s를 기준으로 동일한 현상이 나타났다. 낮은 유속에서 전류값이 감소하는 것은 과산화수소수가 완충용액 중에 투입되어 이송되면서 확산에 의해 농도가 낮아지기 때문인 것으로 판단되며, 유속증가에 따라 전류값이 낮아지는 것은 과산화수소수가 전극봉에 접촉되는 시간이 짧아지기 때문인 것으로 판단된다.

과산화수소수 농도가 0.0005%인 전극봉 1.0 mm, 2.4 mm의 경우 전극봉 직경이 큰 2.4 mm의 전류값이 높게 나타났으나, 과산화수소수 농도가 0.0002%인 전극봉 직경 1.4 mm, 3.4 mm의 경우는 1.4 mm의 경우가 오히려 크게 나타났다. 이는 그림 3-9로 설명될 수 있는데, 각 유속에서 측정된 전류값을 각 전극봉 직경에 따른 전류측정 장치의 체적으로 나눈 값을 나타낸 것으로 체적이 가장 적은 1.4 mm의 경우가 완충용액의 유속 변화와 관계없이 가장 큰 전류값을 보였고 체적이 가장 큰 3.4 mm의 경우가 가장 작은 전류값을 나타냈다. 전류측정 장치의 체적은 과산화수소수가 전극봉과 접촉되는 공간의 크기를 나타내는 것으로 체적이 클수록 확산에 의해 과산화수소수 농도가 쉽게 감소된다. 따라서 동일 농도의 경우 전극봉 직경에 관계없이 농도에 영향을 주는 전류측정 장치 체적에 따라 전류값이 변하는 것을 알 수 있다. 따라서 기질·효소를 충분히 반응시킨 후

전류값을 측정하는 경우 적정 완충용액 유속은 0.17 cm/s~0.20 cm/s 범위로 판단되었다.

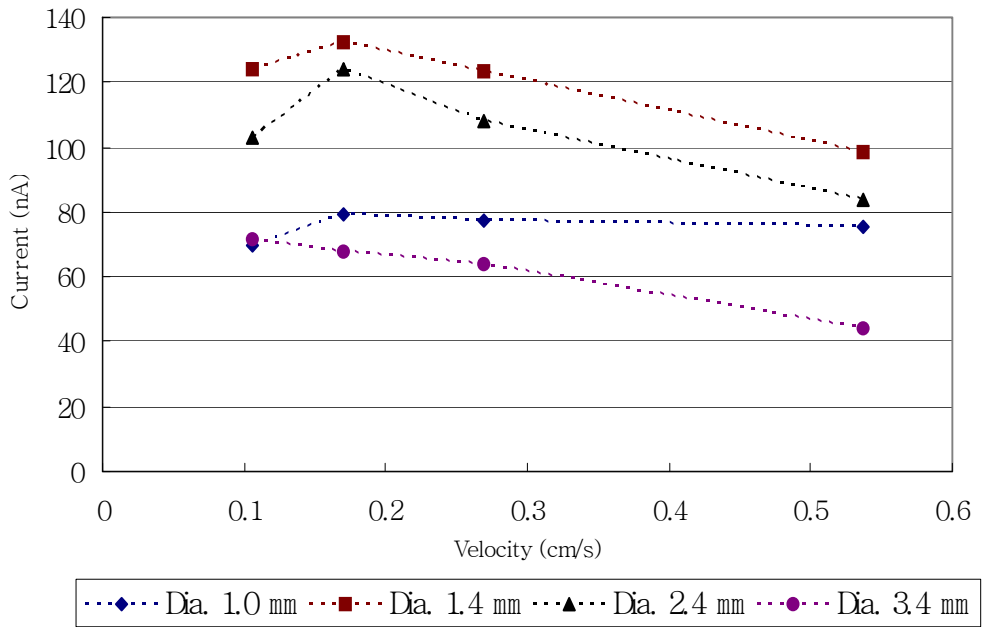


그림 3-8. 유속에 따른 전류값.

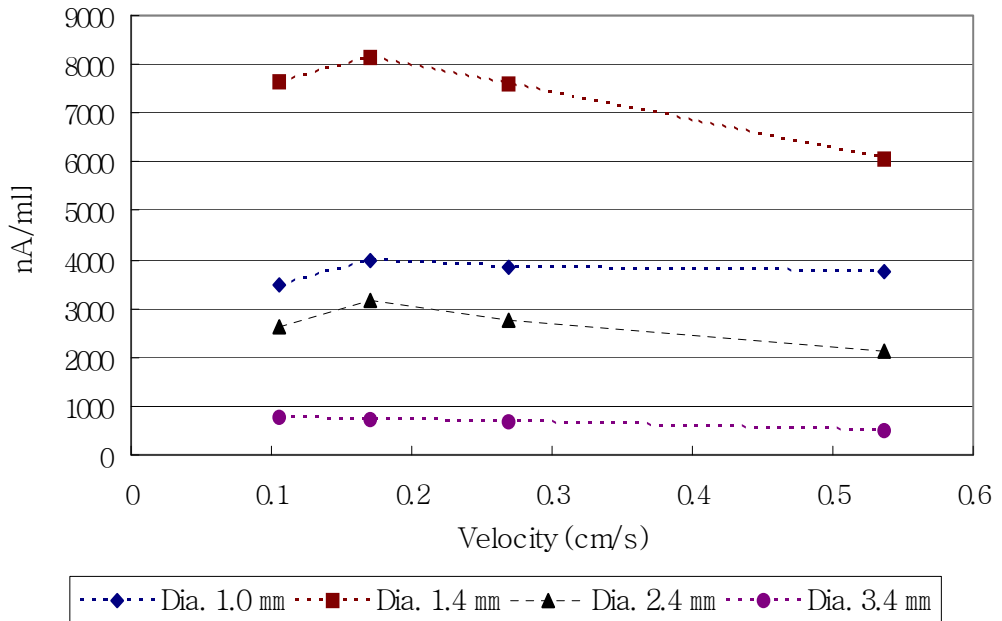


그림 3-9. 전류 측정 장치 체적에 따른 전류값.

## 2) 기질 · 효소를 사용한 전류값 특성

그림 3-10, 3-11, 3-12, 3-13은 포도당과 포도당효소를 사용한 실험으로 전극봉 지름이 각각 1.0 mm, 1.4 mm, 2.4 mm, 3.4 mm인 경우 전극봉 간격이 각각 1.0 mm, 1.5 mm, 2.5 mm, 3.5 mm에서 측정된 전류값과 작동시간을 나타낸 것이다.

그림에서 전극봉 지름 1.0 mm의 경우 0.013 cm/s~0.260 cm/s, 1.4 mm의 경우 0.012 cm/s~0.240 cm/s, 2.4 mm의 경우 0.008 cm/s~0.260 cm/s, 3.4 mm의 경우 0.008 cm/s~0.260 cm/s로 완충용액의 유속이 증가함에 따라 전류값은 각각 86 nA에서 30 nA로, 105 nA에서 43 nA로, 165 nA에서 23 nA로, 169 nA에서 8 nA로 감소하는 경향을 보였다. 이는 유속이 증가함에 따라 전극봉에 접촉하는 시간이 짧아져 전극봉에서 전자를 충분히 받아들이지 못하기 때문으로, 과산화수소수를 사용한 경우와 동일한 경향을 나타냈다. 반면 전극봉 직경 1.4 mm의 경우

를 제외하고 유속이 적은 경우 전류값이 높게 나타났는데 이는 유속이 느릴 경우 포도당과 포도당효소의 반응 시간이 길어져 나타나는 현상으로, 과산화수소수를 사용한 경우와는 다른 특성을 보였다.

그림 3-10에서 전극봉 직경이 1.0 mm의 경우 유속 0.26 cm/s에서 전류값이 상승하는 것을 알 수 있다. 흐름주입식 바이오센서에서 기질농도를 측정하기 위한 적정 유속은 최대 전류값을 나타내는 점에서 선택하는 것이 좋으나 이 경우 작동시간이 길어지는 문제가 있다.

기질과 효소를 직접 반응시켜 전류값을 측정하는 경우는 과산화수소수와는 달리 반응 시간에 따라 전류값이 영향을 받게 된다. 따라서 적절한 유속은 사이클 시간과 연계하여 결정하는 것이 타당할 것으로 생각된다. 일반적으로 센서의 작동 시간이 10분 이상이 되면 온라인 측정 범위를 넘는다고 생각할 때, 사이클 시간이 10분 이내에서 전류값의 변화가 급격하게 변화하지 않는 범위에서 유속을 결정하는 것이 합리적이다. 작동시간과 전류값 변화를 기준으로 각 전극봉에서 적정 유속은 전극봉 직경 1.0 mm의 경우 0.10 cm/s~0.26 cm/s, 1.4 mm의 경우 0.12 cm/s~0.24 cm/s, 2.4 mm의 경우 0.10 cm/s~0.25 cm/s, 3.4 mm의 경우 0.05 cm/s~0.10 cm/s의 구간으로 판단된다.

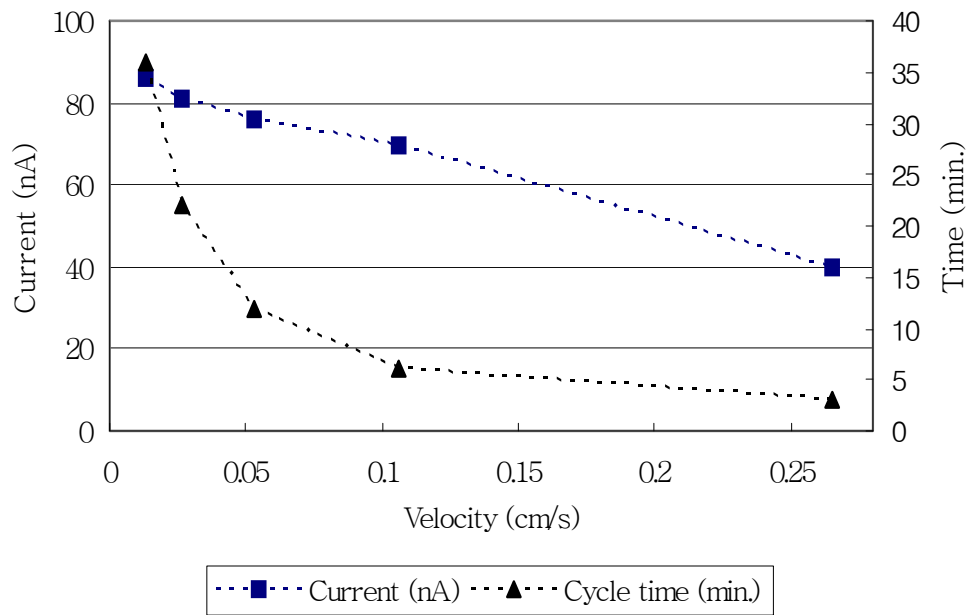


그림 3-10. 유속에 따른 전류값과 작동시간(전극봉 지름 1.0 mm)

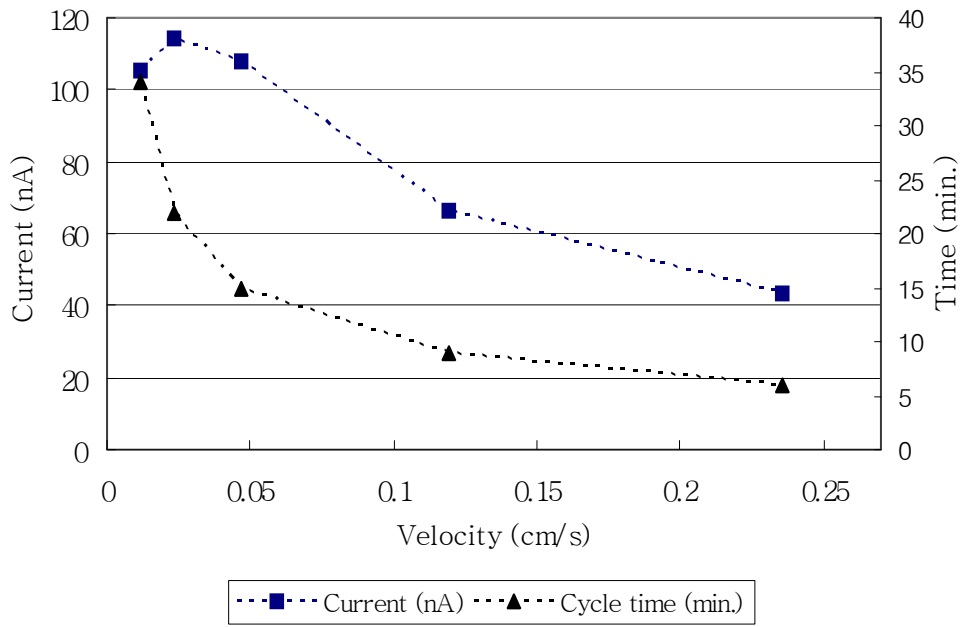


그림 3-11. 유속에 따른 전류값과 작동시간(전극봉 지름 1.4 mm)



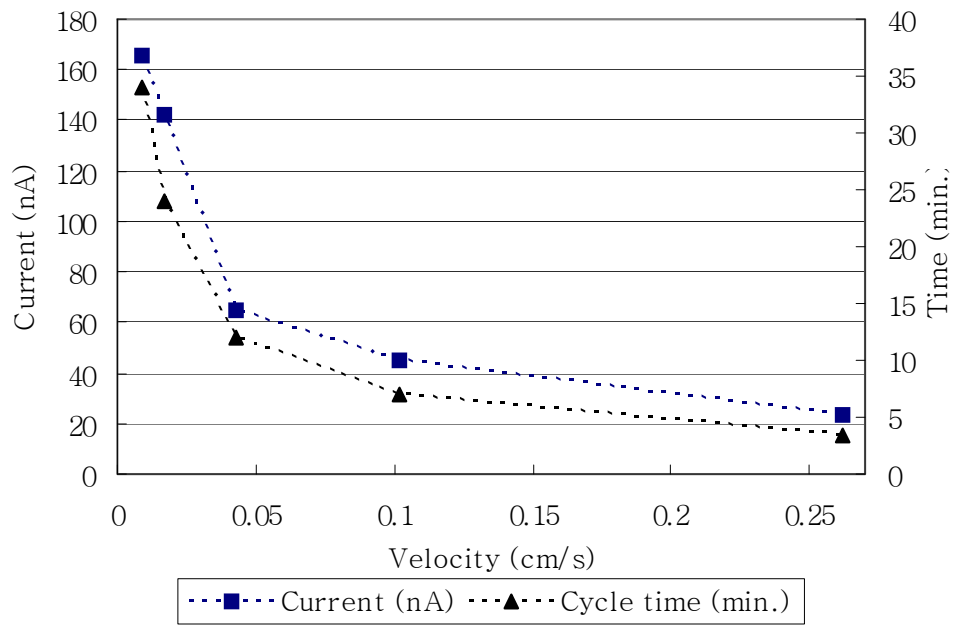


그림 3-12. 유속에 따른 전류값과 작동시간(전극봉 지름 2.4 mm)

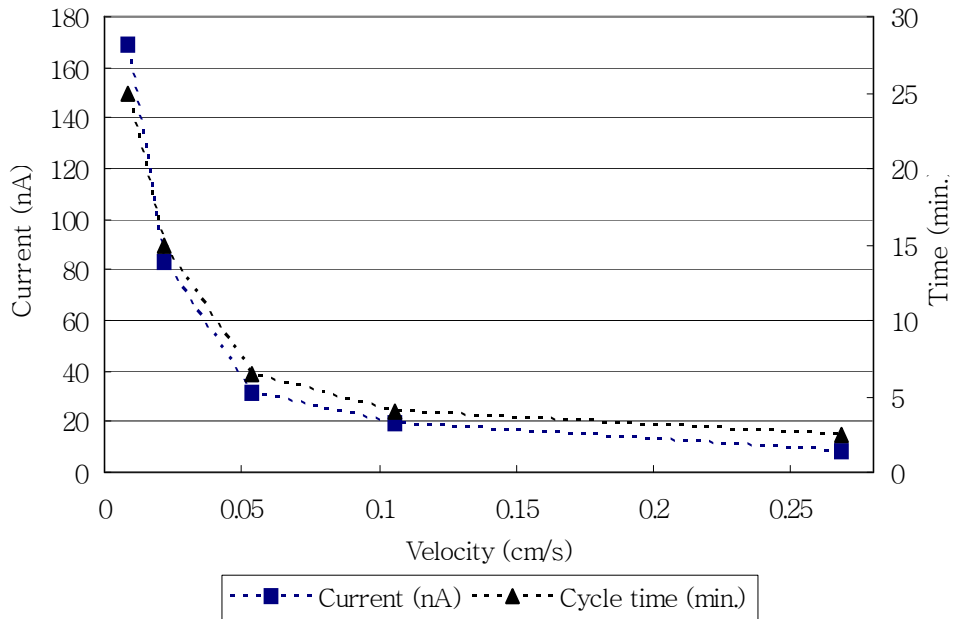


그림 3-13. 유속에 따른 전류값과 작동시간(전극봉 지름 3.4 mm)

그림 3-14는 전극봉 지름 2.4 mm 및 3.4 mm에서 포도당농도 0.1 mM, 전극봉간 거리 1.5 mm로 동일하게 한 경우 유속이 0.001 cm/s~0.492 cm/s로 변화함에 따른 전류값 특성을 나타낸 것이다. 동일 조건에서 전극봉 지름이 큰 경우 전류값이 크게 나타날 것으로 예상되었으나 실험결과 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 전류값은 완충용액의 유속에 민감하게 반응을 하지만 일정 수준의 전극봉 직경에서는 전극간 거리가 동일함에 따라 접촉 면적이 비슷해진 것으로 판단된다. 따라서 전극봉 지름 2.4 mm 및 3.4 mm의 경우 기질 농도가 직경에 따른 영향을 받기 때문에 검출상한치인 199 nA에 적합한 농도를 선택해야 할 것으로 판단된다.

그림 3-15는 전극봉 지름 1.0 mm 및 1.4 mm의 경우 동일 포도당농도 10 mM를 사용하여 각 유속에서 측정된 전류값을 전류측정 장치의 체적으로 나

는 값을 나타낸 것이다. 전류측정 장치의 체적은 0.020 ml , 0.016 ml로 거의 비슷하였으나, 전극봉 지름에 따라 전류값이 큰 차이를 나타냄을 알 수 있다. 결론적으로 흐름주입식 바이오센서에서 기질농도를 나타내는 전류값은 전극봉의 직경과 완충용액의 유속에 따라 큰 영향을 받는 것을 알 수 있다.

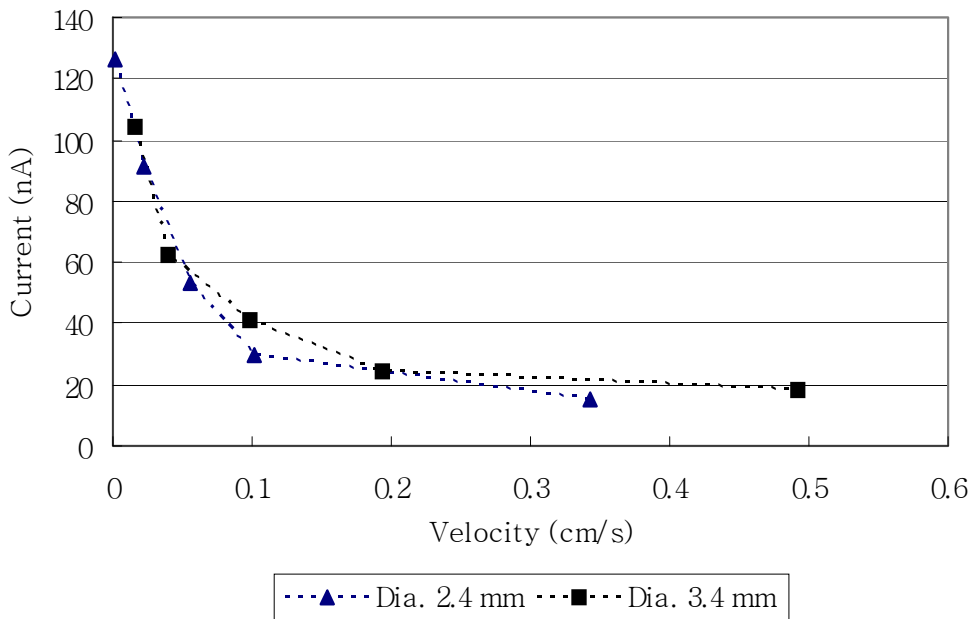


그림 3-14. 전극봉 간격에 따른 전류값.

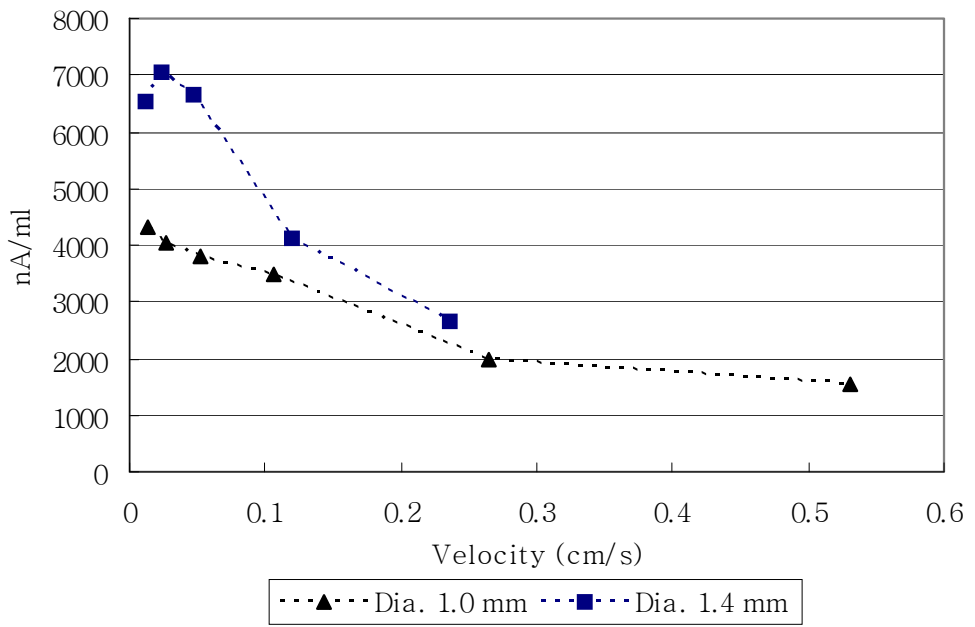


그림 3-15. 전류 측정 장치 체적에 따른 전류값.

나. 펌프의 작동요인에 따른 전류값 특성

1) 배치식 완충용액 공급 장치

가) 공기방울의 영향

완충용액 주입펌프 및 센서장치의 유로 중간에서 공기흡입 시 공기방울에 의한 센서의 성능 변화를 조사하기 위하여, 유로 중간 및 전류 측정 장치 셀 내에 공기방울을 형성시켜, 공기방울이 없었을 때의 전류값과 비교하였다.

표 3-14는 전극봉 지름 1.0 mm 및 1.4 mm에서 공기방울의 영향에 의한 전류값을 측정한 결과이다. 전극봉 지름 1.0 mm의 경우, 공기방울이 없을 때의 전류값은 67.5 nA로, 공기방울이 셀 내에 있을 경우의 57.9 nA 보다는 크게 나타났다으며, 공기방울이 유로 중간에 있을 경우의 74.0 nA 보다는 작게 나타났다. 전극봉 지름 1.4 mm의 경우의 전류값 역시 공기방울이 없을 때 111.5 nA, 셀 내에 있을 때 95.0 nA, 유로중간에 있을 때 125.9 nA로 전극봉 지름이 1.0 mm일 경우와 동일한 경향을 보였다. 이처럼 공기방울은 전류값에 직접적인 영향을 끼치는 것을 알 수 있으며, 특히 전류 측정 장치의 셀 내에 공기방울이 있을 경우가 유로 내에 공기방울이 있을 때보다 더 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이는 공기방울이 유로 단면적을 감소시켜 나타나는 현상으로, 단면 감소는 유속의 변화를 초래하고, 유속의 변화에 따라 전류값이 변하는 것으로 판단된다.

표 3-14. 공기방울에 따른 전류값 변화

Electrode dia. (mm)	Bubble	Buffer velocity (cm/s)	Current (nA)					S. D.	Mean value (nA)
			1	2	3	4	5		
1.0	Tube	0.1061	72.3	68.2	77.4	77.7	74.5	3.9	74.0
	Cell	0.1061	61.1	59.2	56.1	55.6	57.5	2.2	57.9
	None	0.1061	63.3	71.7	70.4	65.4	66.5	3.5	67.5
1.4	Tube	0.1179	131.9	114.6	128.6	122.6	131.7	7.3	125.9
	Cell	0.1179	95.5	95.7	89.5	95.7	98.7	3.3	95.0
	None	0.1179	113.2	112.2	109.8	105.9	116.2	3.8	111.5

유로중간에 공기방울이 있는 경우는 공기방울 부근에서 단면적의 감소로 증가된 유속이 전극봉에 도달하기 전에 단면적의 증가로 원래 유속으로 회복되지만, 셀 내에 공기방울이 있는 경우는 공기방울에 의한 단면 감소로 인하여 증가된 유속으로 전극봉을 지나기 때문에 전류값이 작게 나타난 것으로 판단되었다. 유로중간에 공기방울이 있는 경우 전류값이 크게 나타난 이유는 공기방울을 통과하기 전의 흐름의 정체로 인한 효소와 기질의 반응시간이 길어졌기 때문으로 판단된다.

따라서 흐름 주입식 센서 장치에서는 외부 공기가 관로 내부로 흡입되지 않도록 주의해야 하며 흡입된 공기를 장치 외부로 배출시키는 장치가 반드시 설치되도록 해야 할 것으로 판단된다.

## 나) 온라인측정가능성

그림 3-16은 센서장치의 반복측정 성능을 위해 장시간 반복측정 시험 결과로서, 1시간에 5회씩 5번에 걸쳐 측정한 전류값 변화를 측정값 분포와 각 시험구에서의 평균값을 나타낸 것이다. 그림에서 첫 번째 1시간의 측정값을 제외한 나머지는 거의 동일한 값을 나타내는 것을 알 수 있다. 이는 첫 번째 실험 후 전류 측정 장치가 안정화를 이루어져 나타난 결과로 판단된다. 각 시험구 평균값의 표준편차는 2.40 nA, 평균값은 99.01 nA로 나타났다.

그림 3-17은 센서장치의 장기간 사용 시 성능의 일관성을 확인하기 위해, 1일 1시간에 5회씩 6일에 걸쳐 측정한 전류값 변화를 측정값 분포와 각 시험구에서의 평균값으로 나타낸 것이다.

각 시험구 전류값의 평균은 99.02 nA, 표준편차는 2.74로 나타나 장기간 사용에 따른 측정 성능에 문제가 없음을 확인할 수 있었다. 특히 장시간 반복성 측정의 평균값과 장기간 측정의 평균값이 99.01 nA, 99.02 nA로 거의 동일하게 나타나 센서의 반복 성능과 장기간 사용 시 내구성이 충분히 확보됨을 알 수 있었다.

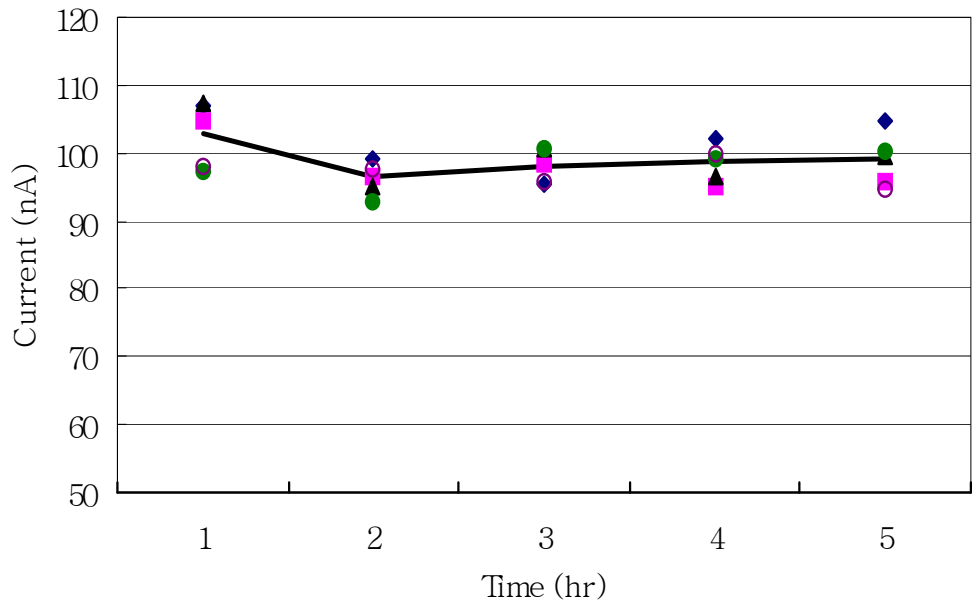


그림 3-16. 배치형 센서의 반복특성.



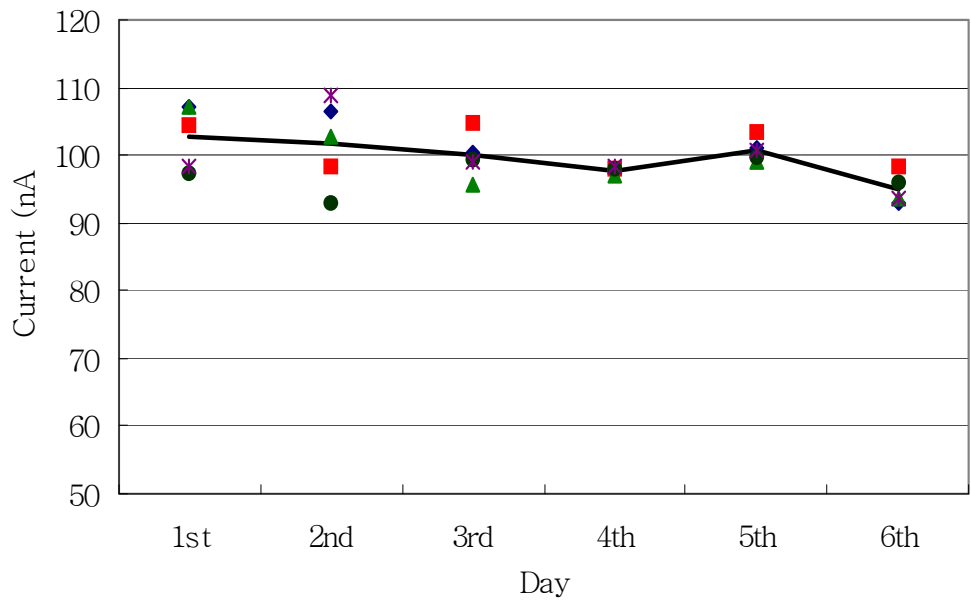


그림 3-17. 배치형 센서의 내구특성.

2) 연속식 완충용액 공급 장치의 성능

가) 펌프맥동의 영향

표 3-15는 연속식펌프를 사용하는 경우 수반되는 완충용액의 맥동에 의한 영향을 알아보기 위해 전극봉 지름 2.4 mm 및 3.4 mm에서 맥동이 없는 주사기펌프와 맥동이 있는 연속식펌프의 전류값을 측정하였다. 맥동 유무에 따라 전류값이 약 20 nA 정도로 매우 큰 차이를 나타내고 있음을 알 수 있다. 맥동이 있는 경우가 없는 경우에 비해 전류값이 크게 나타난 것은 전극봉 부근에서 효소-기질 반응용액이 맥동의 영향으로 전·후진을 함에 따라 체류시간이 길어져서 나타나는 것으로 판단되었다. 따라서 연속식펌프를 사용하는 센서장치의 경우, 맥동이 발생되지 않도록 펌프 선택에 주의를 기울여야 할 것으로 판단된다. 특히 전극봉 직경이 1.5 mm 이하로 작은 경우에는 적은 유량에서도 맥동이 쉽게 일어나므로 주의해야 할 것으로 판단되었다.

표 3-15. 펌프 맥동에 따른 전류값 변화

Electrode dia. (mm)	Pulse	Buffer velocity (cm/s)	Current (nA)					S. D.	Mean value (nA)
			1	2	3	4	5		
2.4	Without pulse	0.0849	120.1	125.9	123.7	119.5	124.5	2.8	122.7
	With pulse	0.0849	140.6	135.5	143.0	141.5	142.0	2.9	140.5
3.4	Without pulse	0.0433	31.5	28.2	30.6	27.4	28.2	1.8	29.2
	With pulse	0.0433	47.9	40.2	48.9	46.9	46.4	3.4	46.1

### 나) 온라인 측정가능성

그림 3-18은 센서장치의 반복측정성능을 위해 1시간에 5회씩 5번에 걸쳐 측정된 전류값 변화를 측정값의 분포와 각 시험구에서의 평균값으로 나타낸 것이다. 배치식의 경우와 동일하게 첫 번째 1시간의 측정값 이외의 나머지는 거의 동일한 값을 나타내는 것을 알 수 있었다. 각 시험구 평균값의 표준편차는 2.80, 평균값은 140.0 nA로 나타났다. 그림 3-19는 센서장치의 장기간 사용 시 성능의 일관성을 조사하기 위해 1일 1시간에 5회씩 6일에 걸쳐 측정된 전류값 변화를 측정값 분포와 각 시험구에서의 평균값으로 나타낸 것이다. 각 시험구 평균값의 평균은 135.43 nA, 표준편차는 1.68로 나타나 장기간 사용에 따른 측정 성능에 문제가 없음을 확인할 수 있었다. 따라서 배치식 주입장치의 경우와 마찬가지로 연속식 센서장치의 반복성과 내구성에는 아무런 문제가 없음을 다시 확인할 수 있었다.

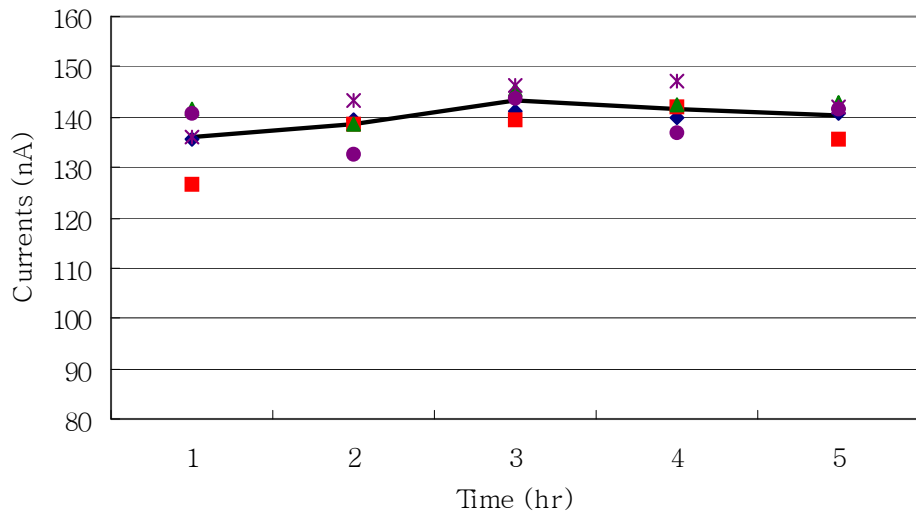


그림 3-18. 연속형 센서의 반복특성.

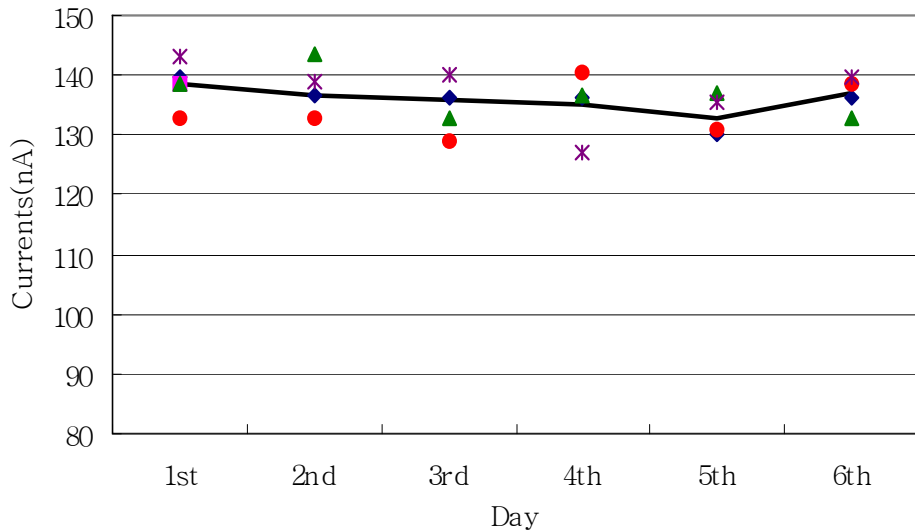


그림 3-19. 연속형 센서의 내구특성.

다. 기질·효소 및 전극봉에 따른 전류값 특성

1) 기질·효소 반응 시간에 따른 특성

그림 3-20은 전극봉 지름 1.4 mm, 유속 0.1179 cm/s에서 인젝션밸브와 전류측정용 셀 사이의 유로길이를 60 mm(1X), 120 mm(2X), 180 mm(3X), 240 mm(4X)로 달리하여 측정된 전류값의 특성을 나타낼 수 있다.

포도당과 포도당효소는 인젝션밸브에서 혼합된 후 유로를 통과하면서 반응이 일어나게 된다. 따라서 유로의 길이를 길게 하면 반응시간이 길어져서 전류값이 높게 나타날 것으로 예상하였으나 그림 3-20에서 알 수 있듯이 유로 길이가 60 mm, 120 mm, 180 mm, 240 mm로 길어짐에 따라 전류값이 각각 51.9 nA, 46.5 nA, 40.2 nA, 38.8 nA로 감소하는 것으로 나타났다. 이는 그림 3-21의 결과로 설명되어 질 수 있다. 그림은 각 유로길이에 따라 전류값의 변화를 나타내 주는 것으로서 유로길이가 60 mm, 120 mm, 180 mm, 240 mm로 길어짐에 따라 최대 전류값까지 상승되는데 걸리는 시간이 각각 60 초, 90 초, 100 초, 120 초로 증가하

는 것을 알 수 있다. 이는 유로 내에서 혼합된 포도당과 포도당효소 용액이 완충 용액에 확산되지 않고 전극봉 사이를 통과 할 때 최대 전류값을 나타내지만, 시간이 너무 지연되면 유로 내에서 완충용액에 확산에 의해 희석되어져서 전류값 측정은 길게 일어나지만 최대 전류값은 낮게 나타나는 것으로 판단된다. 따라서 포도당과 포도당효소가 유로에서 혼합된 후 완충용액과의 혼합에 의한 희석이 일어나지 않는 적절한 유로길이를 선정할 필요가 있을 것으로 생각된다.

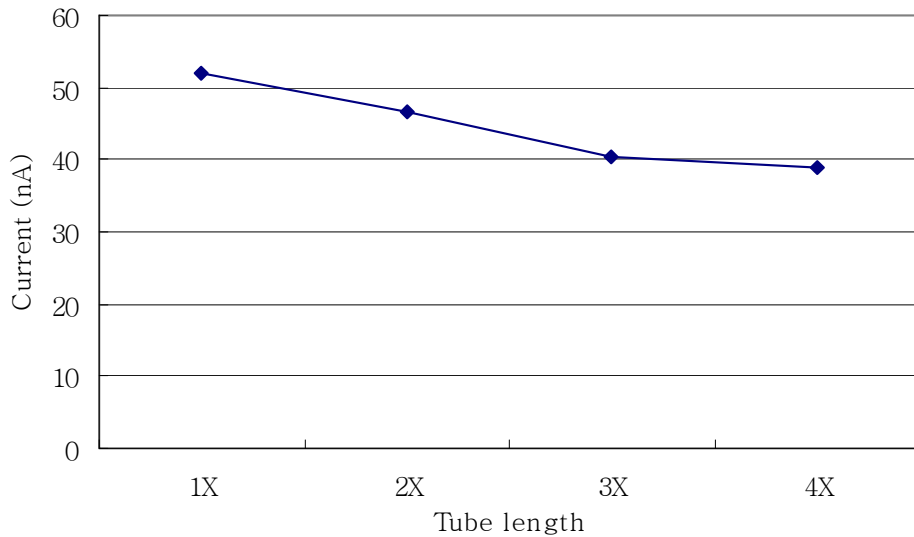


그림 3-20. 튜브 길이에 따른 전류값.

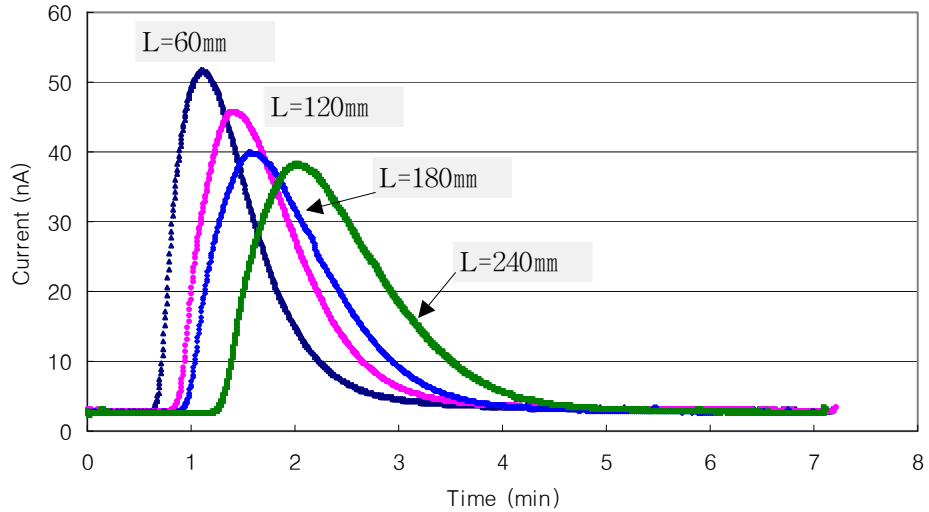


그림 3-21. 튜브 길이에 따른 전류값 변화 경향.

## 2) 반응 체적 비에 따른 특성

그림 3-22는 전극봉 지름 1.4 mm, 유속 0.0471 cm/s에서 포도당과 포도당효소의 혼합 체적비를 각각 0.5, 1.0, 2.0으로 달리 하였을 때 측정된 전류값이다. 그림에서 체적비가 0.5와 1.5 일 때 전류값은 약 98.76 nA와 93.84 nA로 비슷하게 나타났으며, 체적비 1.0일 때는 120.40 nA로 가장 크게 나타났다. 일반적으로 기질과 효소는 결합하여 반응을 일으킨 후 다시 기질과 연속적으로 반응한다. 따라서 기질보다 적은 효소량을 이용해도 충분히 반응할 것으로 기대하였으나, 오히려 효소량을 많게 한 경우와 비슷한 경향을 나타냈다. 이는 반응이 안정적인 상태에서 충분한 시간을 두고 진행된 것이 아니기 때문인 것으로 판단된다.

따라서 흐름주입식 센서장치에서 기질 용액과 효소 용액은 서로 같은 체적으로 혼합해야 할 것으로 판단되었다.

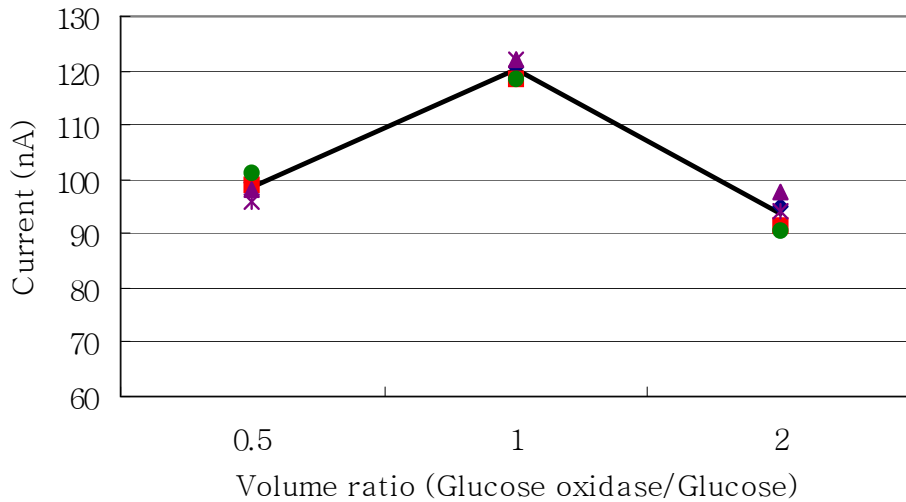


그림 3-22. 효소액 농도에 따른 전류값.

### 3) 전극 단면적에 따른 특성

그림 3-23은 포도당 농도 10 mM을 사용했을 때 전극봉지름 1.0 mm 및 1.4 mm의 전류값을 나타낸 것이다. 그림에서 완충용액의 유속이 0.1 cm/s 이하에서는 전극봉 직경이 1.4 mm인 경우 1.0 mm일 때 보다 전류값은 약 40 nA정도 크게 나타났으나, 그 이상의 유속에서는 전극봉 지름에 관계없이 비슷하게 나타났다.

그림 3-24는 포도당 농도 3 mM을 사용했을 때 전극봉 지름 2.4 mm 및 3.4 mm의 전류값을 나타낸 것이다. 그림 3-23과 같이 완충 용액 유속 0.1 cm/s 이하에서는 전극봉 지름이 3.4 mm인 경우 2.4 mm일 때 보다 전류값은 약 300 nA 정도 크게 나타났으나, 그 이상의 유속에서는 전극봉 지름에 관계없이 비슷하게 나타났다.

전극봉 직경은 센서의 감도와 관련이 있다. 저 농도범위 용액의 경우 적은 농도변화를 충분하게 검출하기 위해서는 가능한 발생되는 전자를 많이 흡

수할 수 있는 큰 단면적의 전극봉 사용이 필요하다. 그러나 고농도의 경우는 발생하는 전류값이 전류계 측정범위를 초과하는 경우가 발생되기 때문에 검출 정도(精度)가 변하지 않는 범위에서 전극봉의 크기를 선정하여야 한다.

실험에 사용된 전류계의 측정 상한값이 199.99 nA임을 감안할 때 전극봉 지름이 2.0 mm를 넘는 경우는 전류계 측정 상한값이 큰 것을 사용해야하는 문제가 발생되므로 적절한 전극봉 지름은 1.0 ~ 1.5 mm 사이에서 결정되는 것이 타당할 것으로 생각된다.

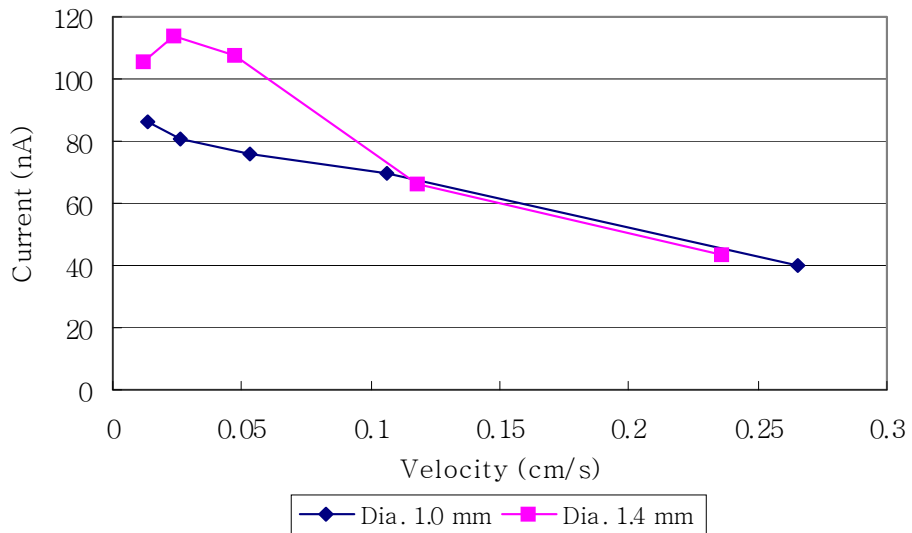


그림 3-23. 전극봉 지름에 따른 전류값 변화.



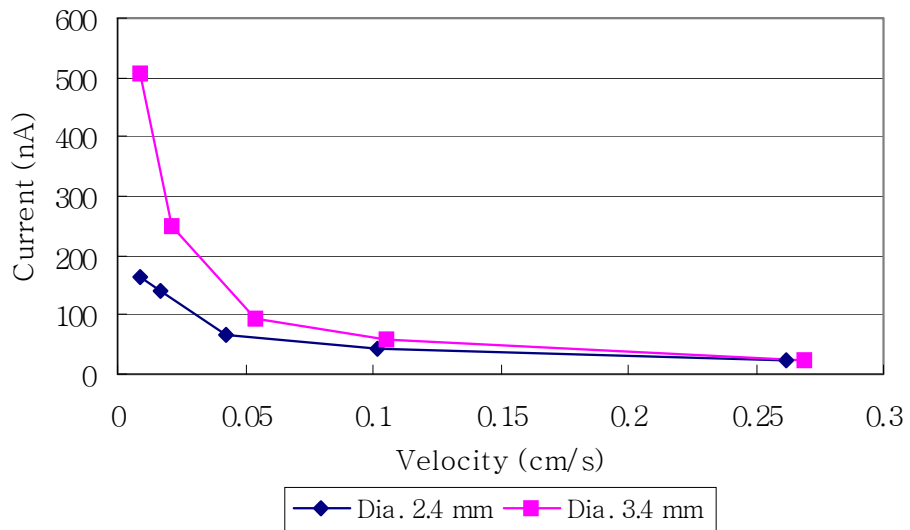


그림 3-24. 전극봉 지름에 따른 전류값 변화.

#### 4) 전극 설치 형상과 거리에 따른 특성

그림 3-25는 전극봉 지름 1.4 mm, 완충용액의 유속 0.0471 cm/s, 포도당 농도 10 mM에서 전극봉의 설치 형상에 대한 전류값을 측정하여 얻은 것이다. 전극봉의 설치형상이 직교(cross)의 경우 전극봉 간의 간격은 1.5 mm, 전극봉의 설치형상이 평행(parallel)의 경우는 4.5 mm, 9.0 mm로 하여 설치 형상과 전극봉 간격에 따른 전류값 특성을 살펴보고자 하였다. 전극봉 설치에 따른 문제로 평행한 형태의 경우 전극봉 간격을 직교의 경우와 같게 할 수 없었다.

그림에서 직교 형태로 설치한 경우 전류값이 120 nA, 평행하게 설치한 전극봉의 간격이 4.5 mm, 9.0 mm 경우 전류값이 각각 58 nA, 66 nA로 나타났으며, 전극봉 설치형상이 직교일 때가 약 60 nA 정도 큰 값을 나타냈는데 이는 전극봉 간격이 커짐에 따라 포도당과 포도당효소의 혼합용액이 완충용액으로 인해 희석됨으로서 나타나는 당연한 결과라 생각된다. 평행한 형태로 설치한 경우 전극봉 간격이 긴 경우가 짧은 것에 비해 전류값이 높게 나타났는데, 이는 포도

당과 포도당효소의 혼합용액이 동시에 접촉되는 시간 때문인 것으로 판단된다. 즉 전극봉 간격이 4.5 mm인 경우에 비해 9.0 mm인 형태가 전극봉에 접촉되는 시간이 길어 전류값이 높게 나타난 것으로 판단된다.

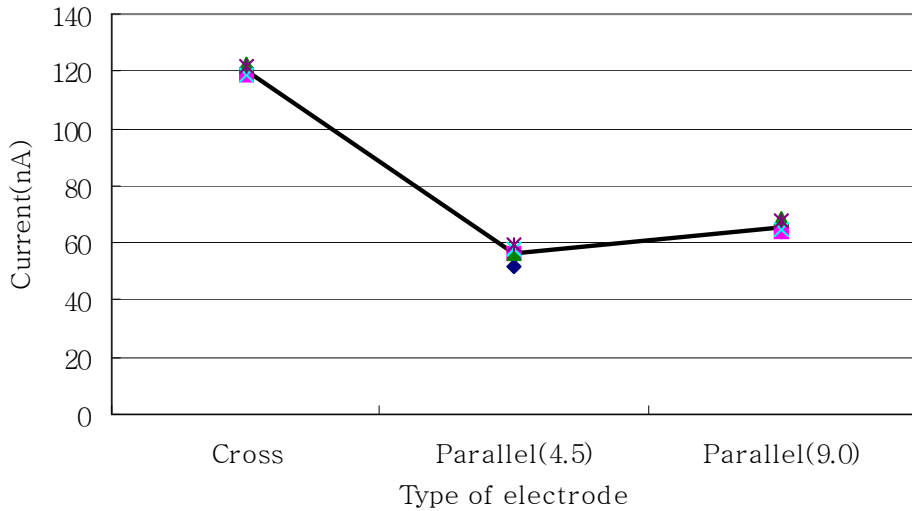


그림 3-25. 전극봉 배치형상에 따른 전류값 변화.

#### 라. 효소활성도

##### 1) 적정 완충 용액

그림 3-26, 3-27, 3-28, 3-29, 3-30은 완충용액 종류(phosphate, acetate, citrate)와 산도(pH5.0, pH6.0, pH7.0, pH8.0)에서 측정된 효소(glucose oxidase, invertase, lactate oxidase, alcohol oxidase, catalase)의 활성도를 나타낸 것이다.

그림 3-26에서 포도당효소의 활성도는 완충용액이 인산염일 경우 산도 6.0, 산도 7.0, 산도 8.0에서 각각 17 units/mg, 20 units/mg, 19 units/mg을 나타내었다. 또한 완충용액이 산도 5.0의 아세트산염의 경우 21 units/mg, 산도 5.0의

시트르산염일 경우 23 units/mg로 나타나 완충용액의 종류와 산도에 따라 활성도가 다소 차이를 나타내지만 그 차이가 크지 않음을 알 수 있다. 그림 3-27은 자당효소의 활성도를 나타내는 것으로 인산염 완충용액에서 산도 6.0, 산도 7.0, 산도 8.0에서 각각 60 units/mg, 336 units/mg, 230 units/mg을 나타내 활성도가 크게 변하는 것을 알 수 있다. 하지만 완충용액이 산도 5.0의 아세트산염의 경우 337 units/mg, 산도 5.0의 시트르산염일 경우 328 units/mg로 나타나 그 차이가 크지 않음을 알 수 있다.

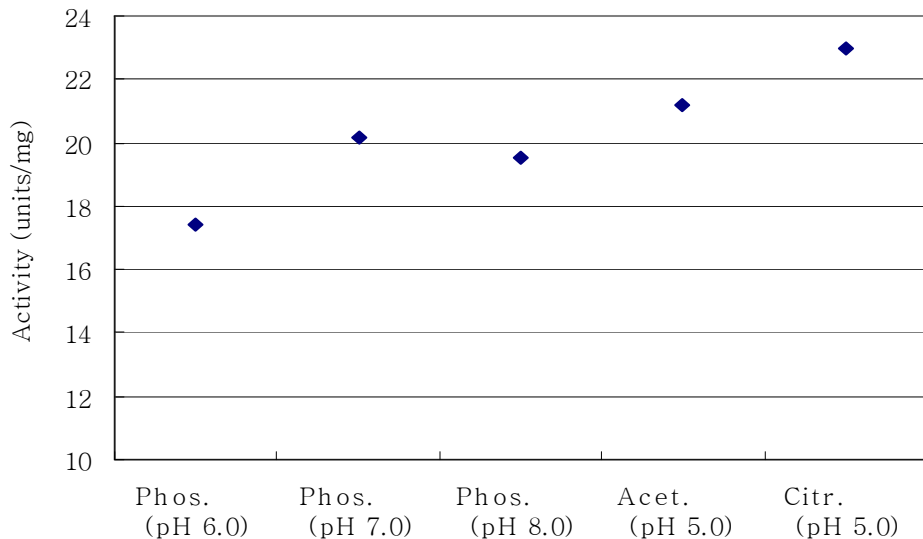


그림 3-26. 완충용액에 따른 포도당 효소액의 활성도(Phos.=phosphate, Acet.=acetate, Citr.=citrate).

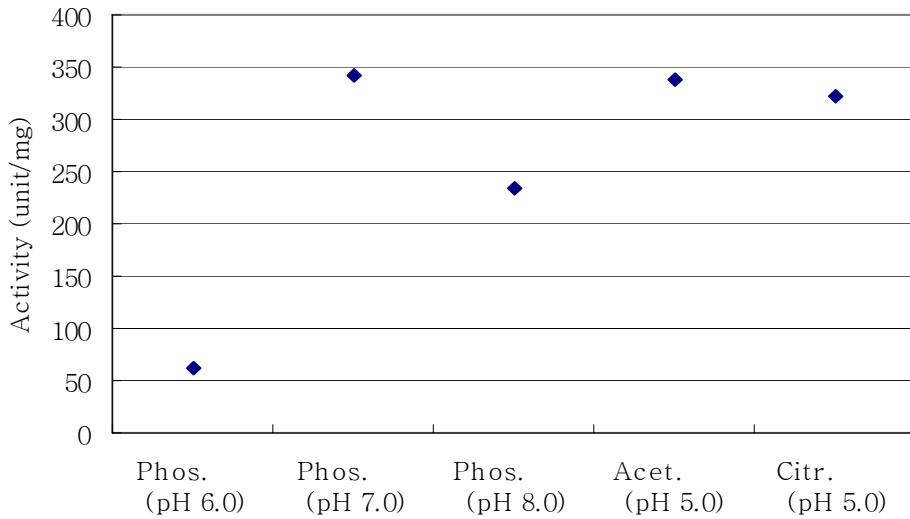


그림 3-27. 완충용액에 따른 자당 효소액의 활성도(Phos.=phosphate, Acet.=acetate, Citr.=citrate).

그림 3-28은 젓당효소의 활성도를 나타내는 것으로 인산염 완충용액 산도 7.0에서는 16 units/mg으로 가장 크게 나타났으나 산도 6.0과 산도 8.0에서는 효소활성도가 크게 떨어지는 것을 알 수 있다. 그리고 완충용액이 산도 5.0의 아세트산염의 경우 0.1 units/mg, 산도 5.0의 시트르산염일 경우 0.1 units/mg로 나타나 활성도가 거의 없음을 알 수 있었다. 그림 3-29는 알코올효소의 활성도를 나타내는 것으로 인산염 완충용액 산도 6.0과 8.0 이외는 효소활성도는 거의 없는 것으로 나타났다. 또한 완충용액이 산도 5.0의 아세트산염과 시트르산염일 때 효소활성도가 거의 없음을 알 수 있었다.

그림 3-30은 카탈라제의 활성도를 나타내는 것으로 완충용액과 산도에 따라 심하게 변하는 것을 알 수 있다. 이에 따라 인산염 완충용액의 산도 7.0의 경우 알코올효소를 제외하고 나머지 효소에 사용이 가능할 것으로 판단된다.

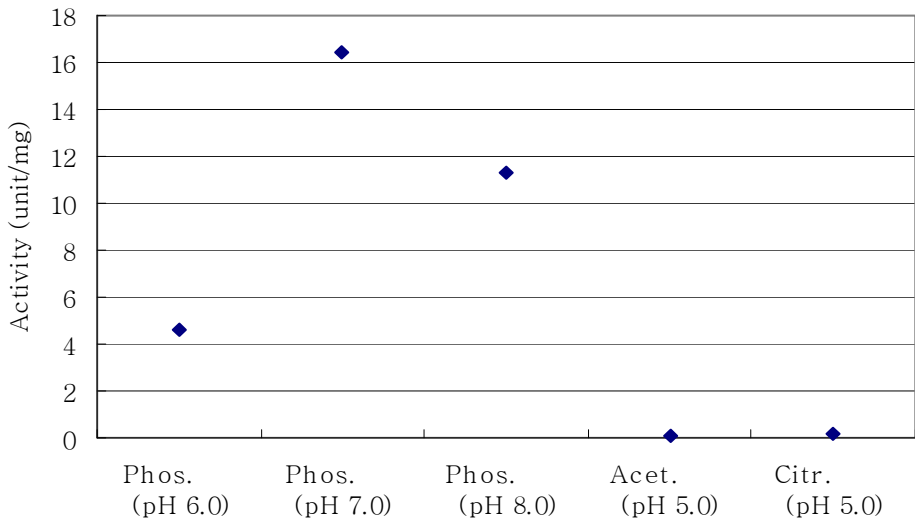


그림 3-28. 완충용액에 따른 젖산 효소액의 활성도(Phos.=phosphate, Acet.=acetate, Citr.=citrate).

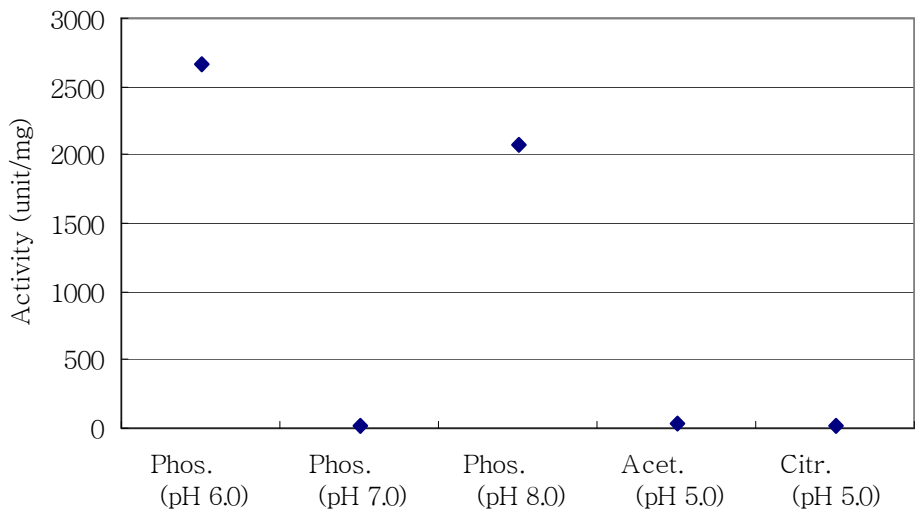


그림 3-29. 완충용액에 따른 알코올 효소액의 활성도(Phos.=phosphate, Acet.=acetate, Citr.=citrate).

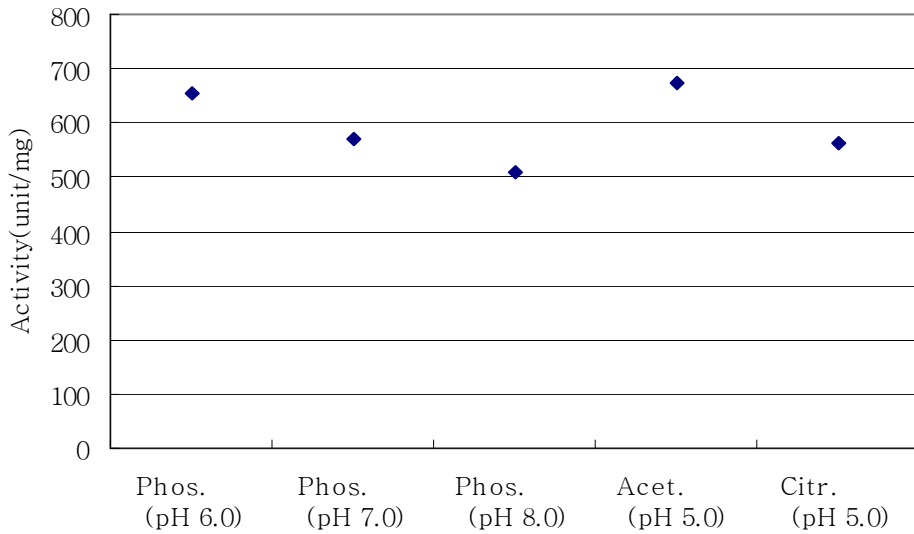


그림 3-30. 완충용액에 따른 카탈라제 효소액의 활성도(Phos.=phosphate, Acet.=acetate, Citr.=citrate).

## 2) 적정 반응 효소농도

그림 3-31은 산도 7.0인 인산염 완충용액을 사용하여 각각 포도당효소, 젓당효소, 알코올효소의 농도에 따른 활성도를 나타낸 것이다. 그림에서 포도당효소는 효소농도가 5 units/ml ~ 100 units/ml로 변할 때 효소활성도는 17 units/mg ~ 19 units/mg으로 비슷한 값을 나타내기 때문에 효소농도 5 units/ml까지 사용할 수 있다고 판단된다. 또한 젓당효소는 효소농도 50 units/ml, 알코올효소는 효소농도 5 units/ml까지 사용할 수 있다고 판단된다.

그림 3-32는 산도 7.0인 인산염 완충용액을 사용하여 각각 카탈라제와 자당효소의 농도에 따른 활성도를 나타낸 것이다. 카탈라제는 5 units/ml까지 농도를 희석하여 사용해도 문제가 없을 것으로 생각된다. 다만, 자당효소는 농도 25 units/ml에서 활성도가 농도 50 units/ml에 비해 거의 반 수준으로 떨어져 농도를 낮춰 사용하는 것이 곤란할 것으로 판단된다. 효소는 정제과정을 거쳐 제조되는 관계로 가격이 고가인 경우가 많다. 따라서 가능한 사용 효소의 양을 줄이

는 것이 바이오센서의 경제적 측면에서 유리하다.

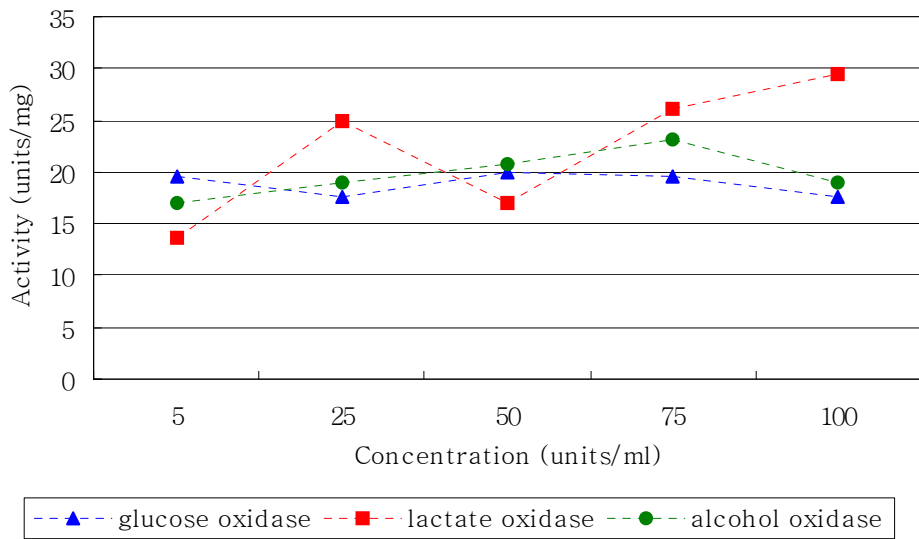


그림 3-31. 효소액 농도에 따른 활성도 변화(glucose oxidase, lactate oxidase, alcohol oxidase)

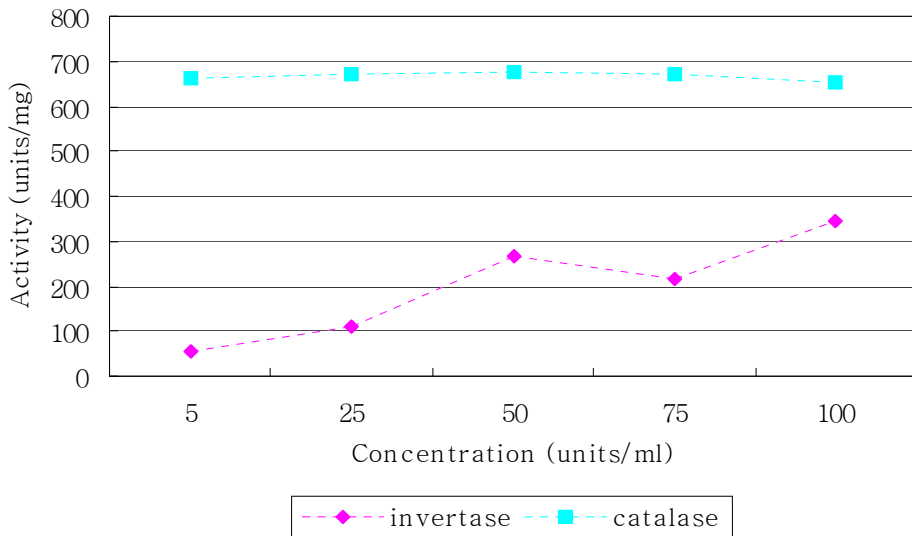


그림 3-32. 효소액 농도에 따른 활성도 변화(invertase, catalase)

### 3) 기질 · 효소 간 적정 반응체적 비

그림 3-33 및 3-34는 산도 7.0의 인산염 완충용액을 사용하여 기질과 효소의 반응 체적 비를 0.1 ml/ml, 0.5 ml/ml, 1.0 ml/ml, 2.0 ml/ml, 10.0 ml/ml로 달리하였을 때 각각 효소 활성도를 나타낸 것이다. 그림에서 효소활성도의 평균 값을 기준으로 포도당 및 에탄올은 기질과 효소의 반응체적을 달리 사용해도 효소활성도는 약 20 units/mg로 비슷하게 나타나 문제가 없을 것으로 판단된다. 또한 젓산도 기질과 효소의 반응체적 비 0.1 ml/ml을 제외하고는 효소활성도는 약 50 ~ 60 units/mg로 비슷하게 나타나 문제가 없을 것으로 판단된다. 그러나 자당과 과산화수소수는 그 편차가 심하여 반응체적의 변화에 따라 측정값이 다르게 나타날 가능성이 있는 것으로 예상된다. 따라서 기질과 효소의 반응 체적 비는 1.0 ml/ml, 즉 같은 체적으로 사용하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.



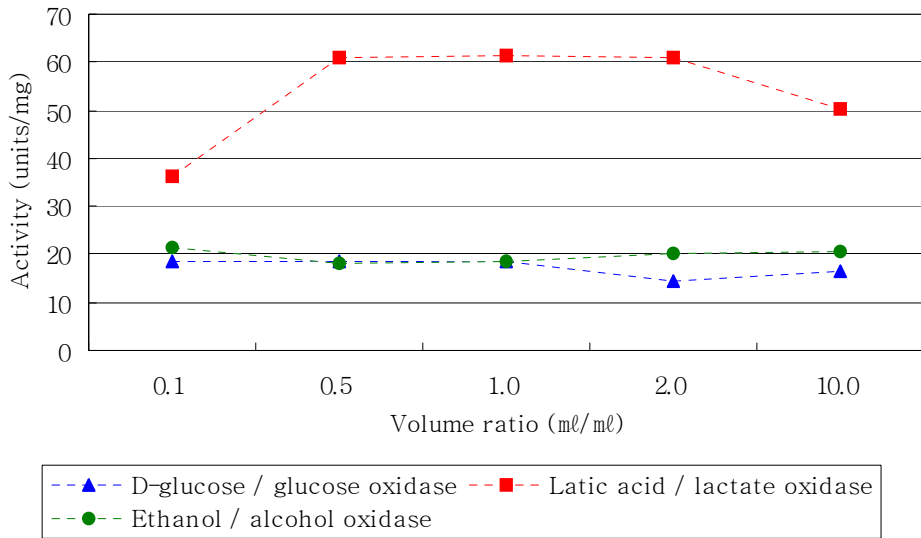


그림 3-33. 기질 · 효소 반응체적 비에 따른 효소 활성도(glucose, lactic acid, ethanol)

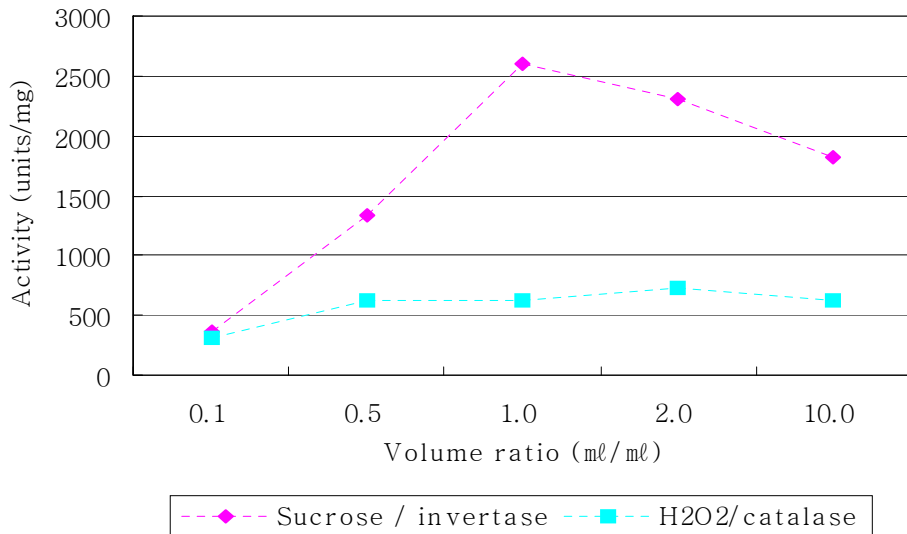


그림 3-34. 기질 · 효소 반응체적 비에 따른 효소 활성도(sucrose,  $H_2O_2$ )

4) 이중 효소 혼합에 따른 활성도 측정

그림 3-35 및 3-36은 산도 7.0의 인산염 완충용액, 기질과 효소 반응 체적 비 1.0 ml/ml, 효소농도 1.0 mg/ml의 조건에서 5종의 효소를 혼합한 용액으로 개별 효소의 활성도를 측정한 결과이다.

그림에서 포도당효소, 젖당효소, 알코올효소는 활성도의 표준편차가 1.4 ~ 2.2로 비교적 작아 혼합사용이 가능할 것으로 판단되나, 자당효소와 카탈라제의 활성도는 표준편차가 36 ~ 496으로 크게 나타나 혼합사용이 불가능한 것으로 판단된다.

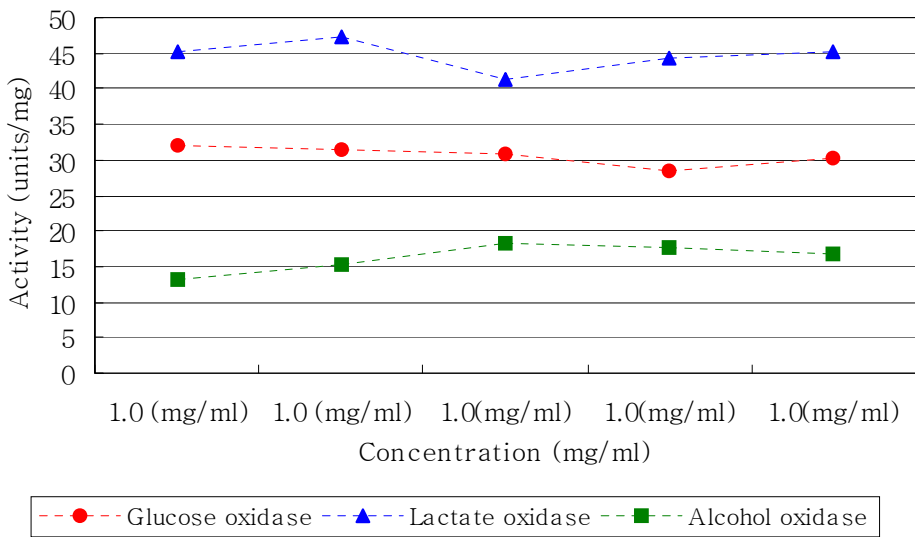


그림 3-35. 혼합 효소액의 활성도(glucose oxidase, lactate oxidase, alcohol oxidase)

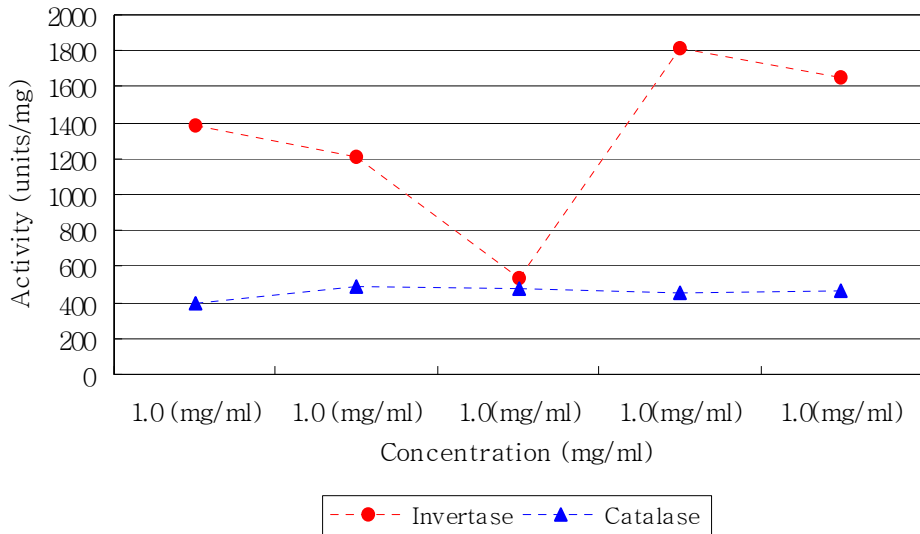


그림 3-36. 혼합 효소액의 활성도(invertase, catalase)

#### 4. 결론

첫째, 흐름주입식 바이오센서의 전류측정 장치를 개발하기 위해 전극봉의 크기와 유속에 따른 전류값을 측정하였다. 과산화수소수를 사용한 실험 결과 전류값은 전극봉 크기와 관계없이 유속 0.17 cm/s에서 최대 전류값을 나타내었으며 그 이하나 이상의 유속에서는 점차 감소하였다. 포도당과 포도당효소를 사용한 실험 결과, 전류값은 유속이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나, 과산화수소수와는 달리 유속이 느릴수록 포도당과 포도당효소의 반응시간이 길어져서 높게 나타났다. 작동시간과 전류값 변화를 기준으로 각 전극봉에서 적정 유속은 전극봉 직경 1.0 mm의 경우 0.10 cm/s~0.26 cm/s, 1.4 mm의 경우 0.12 cm/s~0.24 cm/s, 2.4 mm의 경우 0.10 cm/s~0.25 cm/s, 3.4 mm의 경우 0.05 cm/s~0.10 cm/s의 구간으로 확인되었다.

둘째, 흐름주입식 바이오센서에서 배치식과 연속식 완충용액 공급 장치의 성능 검증을 위해 공기방울과 맥동에 의한 영향 정도와 온라인 측정 가능성 여

부를 판단하기 위해 반복성 및 재현성을 알아보았다. 배치식 장치에서 전류 측정 장치의 공기방울은 셀 내에 있을 경우가 유로 내에 있을 때보다 더 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이는 공기방울이 유로 단면적을 감소시켜 나타나는 현상으로, 단면 감소는 유속의 변화를 초래하여 전류값이 변하는 것으로 판단된다. 따라서 흐름주입식 센서장치에서는 외부 공기가 관로 내부로 흡입되지 않도록 주의를 해야 하며 흡입된 공기를 장치 외부로 배출시키는 장치가 반드시 설치되도록 해야 할 것으로 판단된다. 연속식 장치에서 나타나는 맥동은 있는 경우가 없는 경우에 비해 전류값이 크게 나타났다. 이것은 전극봉 부근에서 기질·효소 반응용액이 맥동의 영향으로 전진과 후진을 함에 따라 체류시간이 길어져서 나타나는 것으로 판단되었다. 따라서 연속식 펌프를 사용하는 센서장치의 경우 맥동이 센서 성능에 큰 영향을 미치는 것으로 나타나, 완충용액의 유속 선택 시 주의해야 할 것으로 판단되었다. 반복 및 장시간 측정에 따른 재현성 실험 결과, 반복 간 및 장시간 사용에 따른 전류값의 변화는 배치식과 연속식 모두 큰 차이를 나타내지 않아 온라인 측정 가능성을 확인할 수 있었다.

셋째, 흐름주입식 바이오센서에서 센서성능에 직접적인 영향을 미치는 기질·효소 반응과 배치 및 간격 등의 전극봉 요인에 따른 반응특성을 파악하기 위해 기질·효소 간 반응시간, 반응체적 비, 전극 단면적 및 전극 설치 형상과 거리에 따른 전류값 특성을 알아보았다. 기질·효소 간 반응시간이 길어짐에 따라 예상과는 달리 완충용액과의 혼합 및 회석에 따른 문제로 전류값이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 기질·효소 간 반응시간은 센서 작동시간을 고려하여 적절한 길이를 선정할 필요가 있음을 알 수 있었다. 반응체적 비를 달리한 실험 결과, 기질보다 적은 효소량을 이용해도 충분한 반응을 기대하였으나, 오히려 효소량을 많게 한 경우와 비슷한 경향을 나타냈다. 이는 반응이 안정적인 상태에서 충분한 시간을 두고 진행된 것이 아니기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 효소와 기질은 동일 체적으로 혼합해야 됨을 알 수 있었다.

전극봉 단면적에 따른 실험결과, 완충용액의 유속이 0.10 cm/s 이하에서는 단면적에 비례하여 전류값이 크게 나타났으나 그 이상의 유속에서는 차이를 보

이지 않았다. 그러나, 실험에 사용된 전류계의 측정 상한값이 199.99 nA임을 감안할 때 전극봉 직경이 2.0 mm를 넘는 경우는 전류계 측정 상한값이 큰 것을 사용해야하는 문제가 발생되므로 적절한 전극봉 직경은 1.0 mm~1.5 mm 사이에서 결정되는 것이 타당할 것으로 생각된다. 전극 간 거리에 따른 실험 결과 거리가 적을수록 전류값이 크게 나타났으나, 전극봉을 평행으로 배치한 경우는 거리에 따른 전류값 차이는 크게 나타나지 않았다. 전극봉 배치 형상은 직교형으로 해야 함을 알 수 있었다.

넷째, 바이오센서에 사용되는 적정 완충용액, 효소농도, 체적 비 및 혼합 효소의 사용가능성을 파악하고자 각 조건에서 효소의 활성도를 측정하였다. 적정 완충용액 구명 실험 결과 효소활성도는 완충용액 종류보다는 산도에 많은 영향을 받았으며, 산도 7.0의 인산염 완충용액의 경우 알코올효소를 제외하고 나머지 효소에 사용 가능함을 알 수 있었다. 효소 농도의 경우 자당효소를 제외한 나머지는 50 units/ml로 희석 사용하는 것이 가능하였다. 기질·효소 간 사용체적 비 실험 결과 동일 체적으로 사용해야 함을 알 수 있었다. 효소 혼합 사용가능성 실험 결과 자당효소와 카탈라제는 혼합사용이 불가능 하였고 포도당효소, 젓당효소, 알코올효소는 혼합사용이 가능함을 알 수 있었다. 이 결과는 종류를 알 수 없는 성분의 검출 시 특정 효소를 반복적으로 사용하는 번거로움을 해소함과 동시에 효소를 반복적으로 사용함에 따른 비용절감을 위해 혼합 효소의 사용 가능성을 알아보기 위한 것이다. 이에 따라 포도당, 젓산, 에탄올 검출 시 유용하게 사용할 수 있을 것으로 예상된다.

## 제 2 절 온라인 감시용 측정 장치 개발

### 1. 서언

흐름주입식 바이오센서는 생물반응에 관여하는 특정 기질이나 생성물의 농도를 실시간, 온라인으로 감시하는데 유용하다. 하지만, 발효공정을 측정 감시하는 센서 장치는 기존의 기질농도를 측정하기 위한 센서와는 달리 발효조 내의 기질 용액을 자동으로 채취하는 장치, 채취된 기질용액 중 고형분을 여과 처리하는 장치와 여과된 기질용액을 회석하는 장치 등이 필요하다. 이렇게 전 처리된 기질을 흐름주입식 바이오센서를 통해 발효생성물의 농도를 실시간으로 측정하여 전체 발효공정을 온라인으로 감시하게 된다.

기질용액 채취 장치는 농도측정을 위해 발효조 내 용액을 외부로 배출시키는 장치로 특정 시간대의 용액을 성분 변화 없이 가능한 빠르게 채취하는 것이 중요하다. 발효조는 반응조건 유지 및 이물질 혼입 방지를 위해 외부와 밀폐된 구조로 되어있다. 밀폐형 발효조에서 용액을 취출하기 위해서는 진공펌프를 사용해야 하며, 발효공정 전후에 발생하는 모든 고형분은 필터장치를 사용하여 제거시켜야 한다. 따라서 진공펌프 작동특성, 필터종류 및 설치위치, 배관길이에 따른 용액채취 성능을 파악하여야 한다.

흐름주입식 바이오센서를 이용하여 공정을 자동으로 제어하기 위해서는 전류 측정 장치에 투입되는 기질용액의 농도를 초기부터 반응이 진행되는 동안 연속적으로 측정하여야 한다. 일반적으로 반응 초기의 기질농도는 매우 높으며 반응이 진행될수록 낮아지게 된다. 따라서 전류값으로 기질농도를 측정하는 바이오센서의 경우 전류계의 전류값 측정 범위가 커야한다. 그러나 전류값이 수 nA 이하로 나타나는 기질농도의 경우 상용전류계의 전류값 측정 범위가 매우 제한적이기 때문에 모든 반응과정의 기질농도를 측정하는 것은 불가능하다. 따라서 반응 초기 고농도의 기질용액을 전류계의 측정가능 범위로 회석시키는 작업이 필요하다.

현재 수작업으로 용액을 회석시키는 장비들은 많이 보급되고 있으나, 반응

공정의 전 과정을 자동으로 감시하는 경우에는 자동화된 회석장치의 적용이 필요하다. 따라서 온라인 측정 장치에서 공정제어에 필연적으로 적용되어야 하는 기질용액 자동회석장치를 개발하고 그 성능을 파악하여야 한다. 따라서 이장에서는 온라인 측정을 위한 샘플용액 채취 및 여과장치, 기질용액 자동회석장치를 구성하고, 실험을 통하여 특성을 구명하고, 상업용 시료를 사용하여 흐름주입식센서의 성능을 검증하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 실험 재료

실험에 사용된 재료의 종류 및 상세한 규격은 표 3-16과 같다. Sodium phosphate(mono/dibasic), Sodium chloride, 증류수를 사용하여 0.5M의 Sodium phosphate 완충용액(pH 6.86, 10 mM NaCl)을 제조하여 사용하였다. 샘플용액의 여과장치 성능검증을 위해 분말 셀룰로오스(cellulose)를 사용하였으며, 온라인 측정장치의 성능검증을 위해 기질로는 포도당, 젖산, 에탄올을, 효소로는 포도당효소, 젖당효소, 알코올효소를 사용하였다. 회석장치 성능검증을 위해 증류수를 회석용 용액으로 사용하였다. 또한 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph System)분석을 위해 당 분석용 Carbohydrate analysis column 및 이동상 용매(mobile phase solution)로 70% Acetonitrile 용액을 사용하였다.

표 3-16. 실험 재료 규격

Descriptions	Specifications	Remarks
Glucose oxidase	EC 1.1.3.4, X-S, 47.2 U/mg	Sigma Chemical Co.
Lactate oxidase	EC not available, 49 U/mg	Sigma Chemical Co.
Alcohol oxidase	EC 1.1.3.13, 40 U/mg	Sigma Chemical Co.
D-glucose	$C_6H_{12}O_6$ , FW 180.16	Sigma Chemical Co.
Lactic acid	$C_3H_6O_3$ , FW 90.08	Sigma Chemical Co.
Ethanol	$C_2H_6O$ , FW 46.07, 190 PROOF	Sigma Chemical Co.
Cellulose	EC 232-674-9	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.

#### 나. 실험 장치

실험에 사용된 샘플용액 채취 및 여과장치는 그림 3-37과 같이 구성하였고, 샘플용액 희석장치는 그림 3-38과 같이 구성하였다. 그림 3-37에서 샘플용액 채취 및 여과장치는 다이어프램식 진공펌프와 튜브, 흡입과 송출 측에 부착된 라인 필터로 구성된다. 발효조의 기질은 다이어프램식 진공펌프에 의해 기질용기로 토출되는데 각각의 용기와 다이어프램식 진공펌프로 연결하는 튜브에 필터가 설치되어 고형분이나 불순물을 여과하게 된다.

그림 3-38에서 자동희석장치는 샘플용액의 흡입과 송출기능을 갖는 주사기펌프(SP1, SP2) 2개, 방향제어밸브(V1, V2) 2개로 구성되며, 모든 조작과정은 온라인으로 이루어진다. 1번 펌프(SP1)는 기질용액을 2번 펌프(SP2)는 증류수를 일정량 샘플탱크로 송출하여 원하는 희석 비율로 자동희석이 되며, 관로에 남



은 기질용액과 증류수는 다음 회석공정에 혼입되지 않도록 방향제어 밸브(V1, V2)를 사용하여 배출되도록 공정을 구성하였다.

온라인 측정장치 개발을 위한 실험에 사용된 흐름주입식 바이오센서는 그림 3-39와 같이 구성되었다. 2대의 주사기펌프(XP3000E)로 송출된 이송완충용액은 인젝션밸브(IV1)와 전류측정장치(Electro-chemical cell)를 순차적으로 통과한다. 효소용액은 주사기펌프(SP4)에 의해 인젝션밸브(IV1)에 공급된다. 기질용액은 주사기펌프(EP1)에 의해 인젝션밸브(IV2)로 공급된 후 선택적으로 인젝션밸브(IV1)로 공급된다. 인젝션밸브(IV1)에 투입된 기질과 효소용액은 인젝션밸브와 전류측정장치 사이의 흐름 관로 내에서 혼합과 반응이 이루어지며 전류측정장치의 전극봉 사이를 통과하여 배출된다. 전류측정장치는 은과 백금으로 제작된 원형 전극봉과 전류계로 구성되었으며 측정된 전류값은 자료수집장치(Lab VIEW)를 이용하여 컴퓨터에 저장되게 하였다. 그림 3-40은 구성된 실험장치 사진이다. 실험에 사용된 장치의 상세한 규격은 표 3-17과 같다.

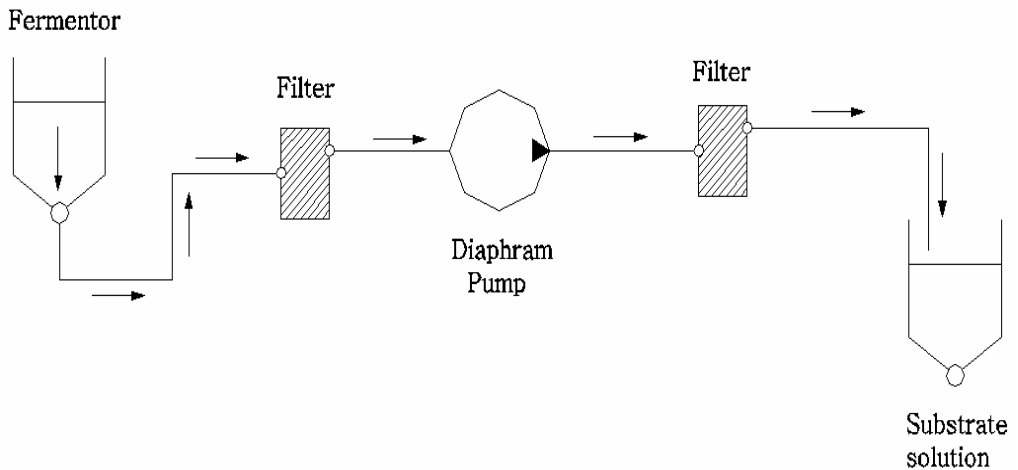


그림 3-37. 자동 샘플 채취 장치 구성도.

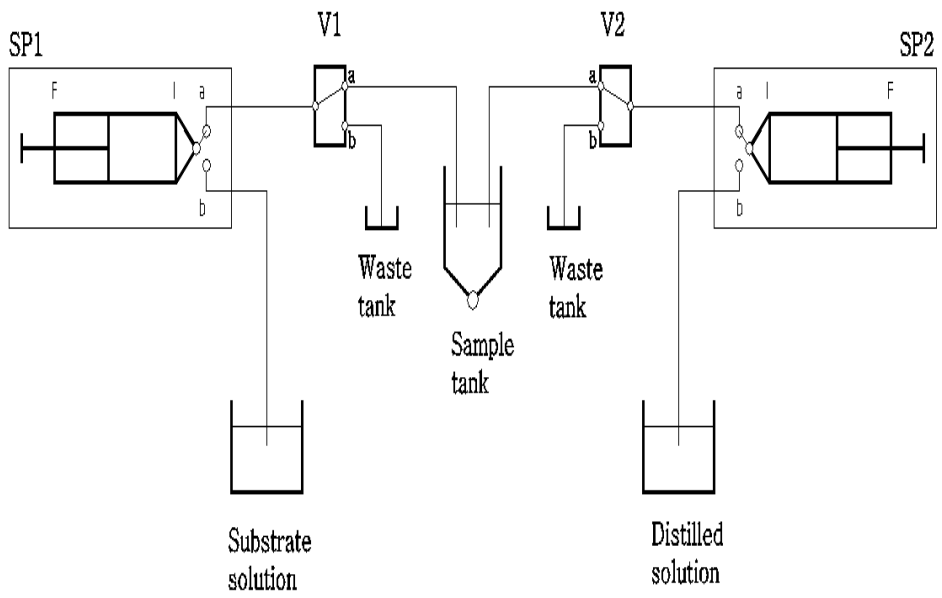


그림 3-38. 자동 희석 장치 구성도.

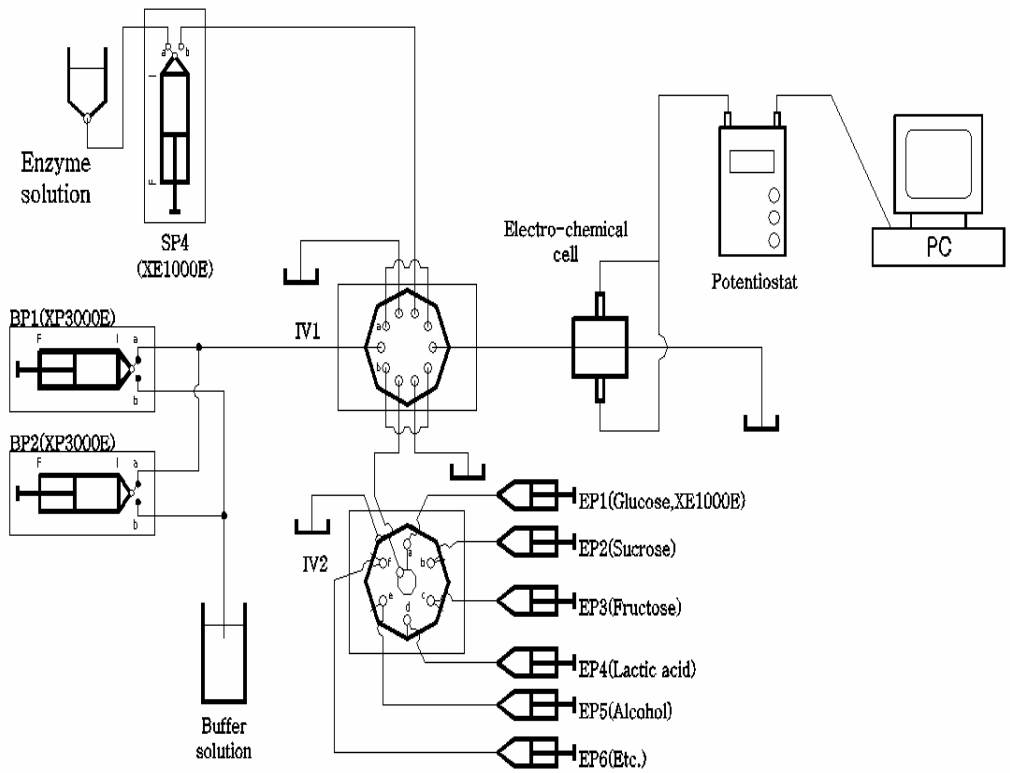


그림 3-39. 센서장치 구성도.

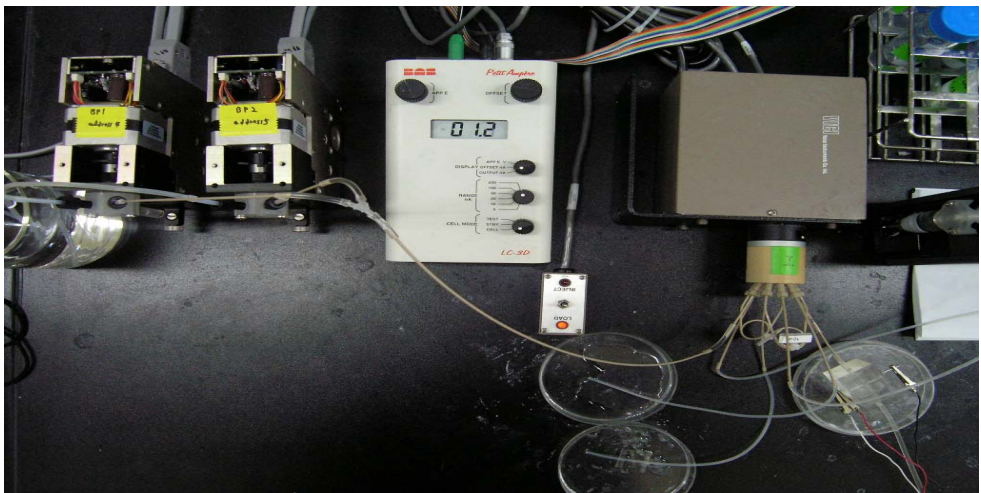


그림 3-40. 센서장치 형상.

표 3-17. 실험장치 규격

Component	Specification	Remarks
XE1000E	5.0 ml, 5.0 - 150 ml/min.	TECAN CO.
XP3000E	0.1 ml, 0.01 - 5.0 ml/min.	TECAN CO.
Injection valve	10port, C22Z-3180E	Valco Instrument Co. Ins.
Multi-position valves	6port, E2CSC6MWE	Valco Instrument Co. Ins.
Pinch Valves	075P, 100P	Bio-Chem valve.
Electrochemical cell	0.03, 0.06, 0.09, 0.14 ml	Acryl
Electrode	0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mm	W. E.(platinum) R. E.(silver)
Tube	1.45, 1.52, 2.29 mm	Cole-parmer Co.
Potentiostat	200 nA, +500mV(Ag/AgCl). LC-3D	BioAnalytical Systems, Inc.
Data acquisition	Lab VIEW	National Instruments.

온라인 측정장치의 공정을 제어하기 위해 제어장치를 그림 3-41과 같이 구성하였다. 제어하드웨어는 Basic언어와 Ladder언어를 동시에 구현할 수 있는 compile technology사의 CUBLOC290 을 사용하였다. 제어기는 controller와 그래픽 LCD 및 touch pad가 일체형으로 구성되었다. 전원 입력단자는 9~30V DC를 공급하고, RS-232 Channel을 사용하여 외부 제어기모듈과 통신에 사용하며, 입출력채널의 결선은 그림 3-42 및 3-43과 같다. download port는 작성된 제어용 프로그램 download에 사용하며, I/O port는 추가된 add-on board의 layout에 따른다. 제어시스템 결선이 완료되고 전원이 공급되면 제어기의 touch Pad은 그림 3-44와 같이 표시된다.

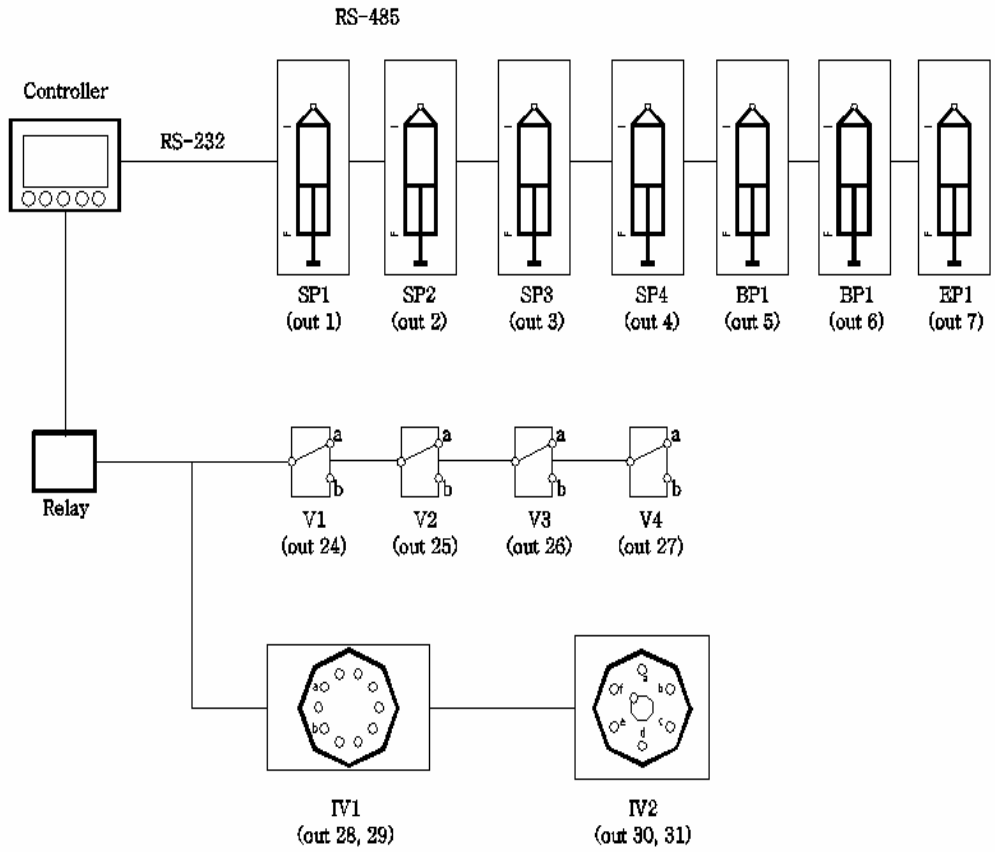


그림 3-41. 제어반 구성도.

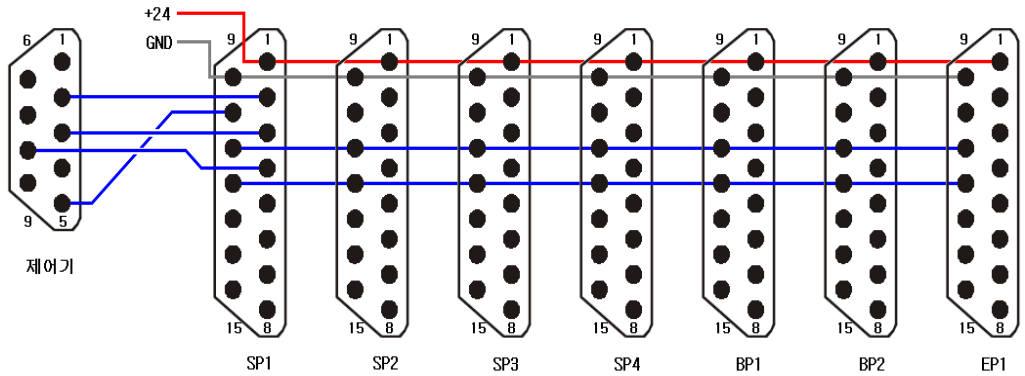


그림 3-42. 통신포트 결선도(RS-232 and RS-485)

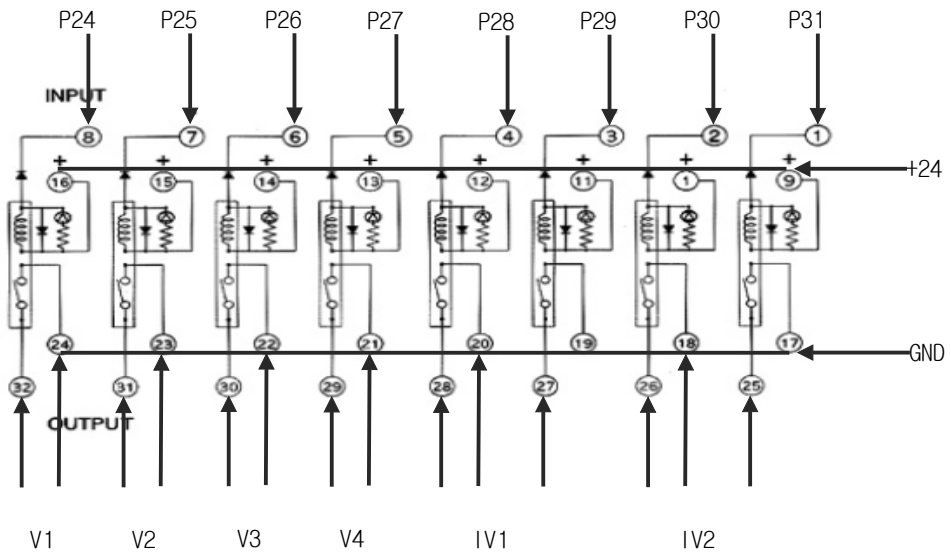


그림 3-43. 릴레이 결선도.

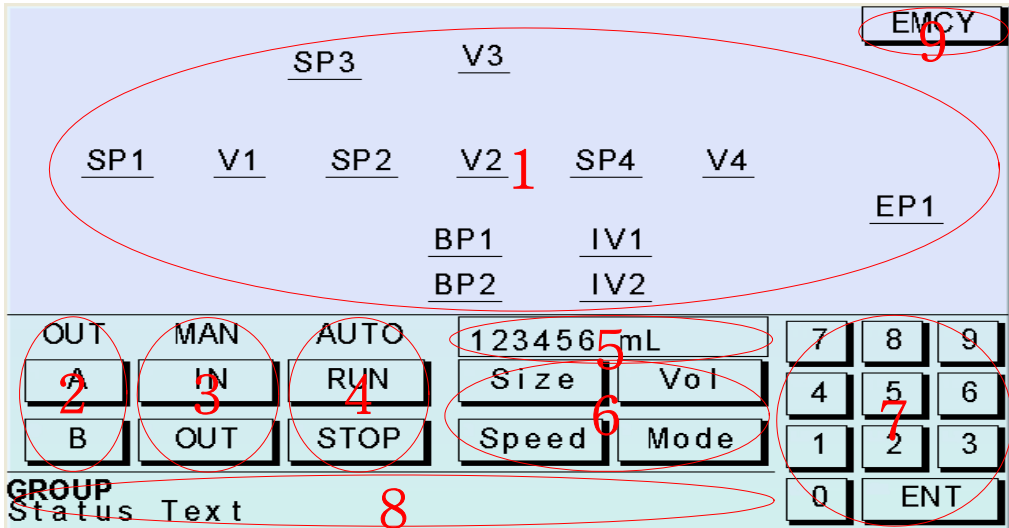


그림 3-44. 제어반 입력 장치.

제어대상 선택부는 밑줄문자들로 이루어지며 각 정량펌프 또는 밸브를 제어대상으로 선택할 수 있다. 출력방향 선택은 A 포트를 출력으로 선택하면 펌프는 흡입방향으로, 밸브는 이송방향으로, 기질주입장치(IV1)를 원료 이송방향으로, 기질주입장치(IV2)를 시계방향으로 1스텝 회전시킨다. B 포트를 출력으로 선택하면 펌프를 배출방향으로, 밸브를 제거방향으로, 기질주입장치(IV1)를 원료 배출방향으로, 기질주입장치(IV2)를 반시계방향으로 1스텝 회전시킨다.

펌프를 수동으로 작동하여 완충용액 및 기질, 효소를 흡입하고 배출할 때 IN을 선택하면 펌프의 주사기 내부로 흡입시키고, OUT을 선택하면 펌프의 주사기 외부로 배출시킨다. 자동동작으로 시작과 정지를 할 때 RUN을 선택하면 자동동작 시작하며 완충용액 주입펌프(BP1, BP2)를 자동교대운전 시작한다. 그리고 기질주입장치(IV1)를 이송방향으로 맞추고, 효소주입장치(EP1)를 배출 후, 기질주입장치(IV1)를 배출방향으로 맞추고, 희석 펌프(SP4)를 배출한다. STOP은 완충용액 주입펌프(BP1, BP2)의 자동교대운전 정지시킨다.

설정값 선택은 변경할 설정값 또는 해당 설정값을 확인할 때 선택하는

데, SIZE는 선택된 펌프에 장착된 Syringe의 용량확인 및 변경, SPEED 는 선택된 펌프의 동작속도확인 및 변경, VOL은 선택된 펌프의 흡입 및 배출용량확인 및 변경, MODE는 선택된 펌프의 동작모드 및 배출방향확인 및 변경을 나타낸다.

설정값 입력부는 변경할 설정값을 입력하며, 입력후 ENT 버튼을 눌러야 값이 변경된다. SPEED의 경우 XP1000E는 20~600, 기본단위는 1/10초이며 XP3000은 1~40, 기본단위는 표 3-18에 나타내었다. 그리고 IV1은 1~3600 초이다. VOL은 0~설정SIZE 이며, 기본단위는 1  $\mu$ l이다. 설정SIZE가 변경될 경우 VOLUME 값도 비례하여 변경된다. MODE는 0의 경우 절대값 모드를 나타내며 1은 상대값 모드, 2는 펌프의 배출방향 좌측, 3은 펌프의 배출방향 우측을 나타낸다. 비상정지를 누를 경우 완충용액 주입펌프(BP1, BP2)의 동작을 비상정지 시킨다. 단, 비상정지 시 완충용액 주입펌프(BP1, BP2)의 모든 설정 값을 잃어버리므로 동작 전에 반드시 재설정해야 한다.

표 3-18. 펌프 속도

Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Time(s)	1.2	1.3	1.4	1.6	1.9	2.2	2.6	2.9	3.3	3.7
Code	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Time(s)	4.3	5.0	6.0	7.5	10.0	15.0	30.0	31.0	33.0	35.5
Code	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Time(s)	37.5	40.0	43.0	46.0	50.0	55.0	60.0	67.0	75.0	86.0
Code	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Time(s)	100.0	120.0	150.0	200.0	300.0	333.3	375.0	428.6	500.0	600.0



다. 실험 방법

1) 샘플용액 채취 및 여과장치

샘플용액 채취 및 여과장치의 적정 작동조건을 구명하기 위해 용액 용기에 증류수를 채우고 채취 및 여과장치 성능시험을 실시하였다. 펌프의 흡입부와 송출부에 필터를 설치하여 튜브길이를 다르게 1분간 펌프를 구동하였을 경우 샘플의 체적을 중량으로 측정하여 샘플용액 채취성능을 검증하였다. 검증된 내용에 따라 샘플용액에 고형분이 포함된 경우 펌프의 성능을 알아보기 위해 분말 셀룰로오스를 증류수에 혼합하여 탁도(turbidity)가 500 NTU, 1000 NTU인 용액을 조제하여 필터의 종류, 필터의 설치위치, 흡입관의 길이에 따른 1분 동안의 송출량을 펌프의 작동 송출량과 비교하였다.

또한 흡입관의 길이는 예비실험을 통해 필터의 설치위치에서 흡입 및 송출관의 끝단까지 250 mm를 기준으로 하여 500 mm, 750 mm, 1000 mm로 증가하였다. 그리고 여과장치를 통과하는 경우 샘플용액의 농도변화를 알아보기 위해 10 mM의 포도당용액을 제조하여 펌프를 5분간 작동하여 여과 전후의 샘플용액의 농도를 HPLC를 사용하여 비교하였다. 상세한 실험조건은 표 3-19와 같다.

표 3-19. 실험 조건

Variables	Levels	Remarks
Filter	2 (0.45, 0.80 $\mu\text{m}$ )	position (suction, delivery)
Pump	10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ml/min)	
Tube length	4 (250, 500, 750, 1000 mm)	
Turbidity	2 (500, 1000 NTU)	
Repeat	3	

## 2) 샘플용액 희석장치

희석장치 성능실험은 증류수를 이용하여 희석비율을 8 수준, 각 펌프의 작동시간은 5 ml/min으로 하여 각 펌프의 작동송출중량에 따른 전체 샘플중량을 측정하였다. 펌프 송출량은 기질 용액 체적과 증류수 체적을 더한 것으로 각 희석 비율에서 샘플중량이 펌프 송출량과 동일하면 원하는 비율로 희석이 되었음을 나타낸다.

이에 따라 각 펌프의 송출중량과 샘플중량과의 상대오차를 비교하여 희석비율별 적정 기질 및 증류수 토출중량을 구명하였다. 포도당(100 mM), 젖산(100 mM), 에탄올(100 mM) 용액을 기질용액으로 사용하여 희석비율별 샘플용액의 농도를 포도당과 젖산은 HPLC, 에탄올은 GC(Gas Chromatograph)로 측정하여 이를 희석농도와의 상대오차를 비교하여 자동희석장치의 성능을 검증하였다. 상세한 실험조건은 표 3-20과 같다.

표 3-20. 실험 조건

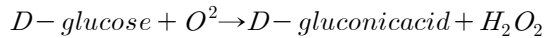
Variables	Levels	Remarks
Dilution	5 (1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50)	
Substrate	8 (100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 $\mu\ell$ )	glucose, lactic acid, ethanol (100 mM)
Distilled water	5	
Repeat	5	

### 3) 온라인 감시용 측정 장치 개발

#### 가) 측정원리

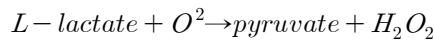
##### (1) 포도당

포도당은 산화효소인 포도당효소와 반응하여 글루콘산과 과산화수소를 생성한다. 이 반응에서 산소가 소모되는데, 소모된 산소나 과산화수소를 측정함으로써 농도를 분석하였다.



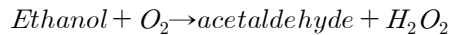
##### (2) 젖산

젖산은 산화효소인 젖당효소와 반응하여 피루브산이 생성되며, 포도당과 동일한 방법으로 소모된 산소의 농도를 측정하였다.



##### (3) 에탄올

에탄올은 산화효소인 알코올효소와 반응하여 아세트알데이드가 생성되며, 포도당과 동일한 방법으로 소모된 산소의 농도를 측정하였다.



#### 나) 실험방법

농도변화에 따른 센서의 선형성을 측정하기 위해 전극봉의 직경을 0.5 mm, 1.0 mm, 1.5 mm, 2.0 mm의 4 수준, 이송완충용액 유속을 0.0118 cm/s, 0.0189 cm/s, 0.0283 cm/s, 0.0377 cm/s, 0.0472 cm/s로 5 수준, 기질농도를 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM로 10 수준으로 하여 각 실험 조건에서 나타나는 전류값을 측정하였다.

포도당효소 농도는 이송완충용액을 사용하여 50 units/ml로 제조하였으며, 기질농도는 100 mM의 포도당 용액을 제조한 후 이송완충용액을 사용하여 각 10 수준으로 제조하였다. 실험에 사용된 효소, 기질, 이송완충용액은 실험 시작 전에 제조하여 사용하였으며, 1일 이상 실험이 지연되는 경우 냉장보관 후

온도를 20℃로 유지하여 사용하였다. 시험 시 실험실의 온도 역시 25℃를 유지하였다. 센서장치의 Calibration을 위해 포도당, 젖산, 에탄올의 표준용액을 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM로 9 수준으로 제조하여 유속 0.2123 cm/s, 0.4109 cm/s의 2 조건에서 농도에 따른 전류값을 측정하였다. 상업용 시료의 농도를 측정하기 위해 오렌지주스, 포도주스, 유산균 발효유, 소주 등의 4종류 제품을 시중에서 구입한 후, 센서장치로 전류값을 측정하고 이를 포도당과 젖산은 HPLC로 에탄올은 GC로 측정한 값과 비교하여 센서장치의 성능을 검증하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 샘플용액 채취 및 여과장치

그림 3-45 및 3-46은 펌프 흡입부와 송출부에 0.45  $\mu\text{m}$ 의 필터를 설치하고 튜브의 설치길이를 다르게 할 때 1분간 펌프를 구동하여 얻은 샘플의 체적을 나타낸 것이다. 흡입관의 길이 및 송출관의 길이는 각각 250 mm, 500 mm, 750 mm, 1000 mm로 동일하게 하였고, 펌프의 작동송출량은 1 ml/min에서 10 ml/min 사이를 10등분으로 하여 실시하였다.

그림 3-45에서 필터 규격 0.45  $\mu\text{m}$ 의 흡입측의 경우 흡입관의 길이 및 송출관의 길이는 각각 250 mm, 500 mm일 때 샘플량이 펌프송출량보다 0.1 ml 정도 적게 나타났다. 그러나 흡입관의 길이 및 송출관의 길이는 각각 750 mm, 1000 mm일 경우 샘플량이 펌프송출량에 비해 각각 0.2~2.2 ml, 0.21~4.4 ml로 샘플량이 증가함에 따라 갑자기 줄어드는 것으로 나타났다. 따라서 흡입관의 길이가 750 mm 이상부터 흡입저항이 송출량에 영향을 끼치는 것을 알 수 있다.

그림 3-46의 경우 필터 규격 0.45  $\mu\text{m}$ 의 송출측의 경우 흡입관의 길이 및 송출관의 길이는 각각 250 mm, 500 mm, 750 mm, 1000 mm일 때 샘플량이 펌프송출량보다 0.05~0.2 ml정도 적게 나타났으며, 흡입측에 비해 큰 차이는 보이지 않았다. 전반적으로 필터종류 및 설치위치에 따른 변화는 보이지 않았다.

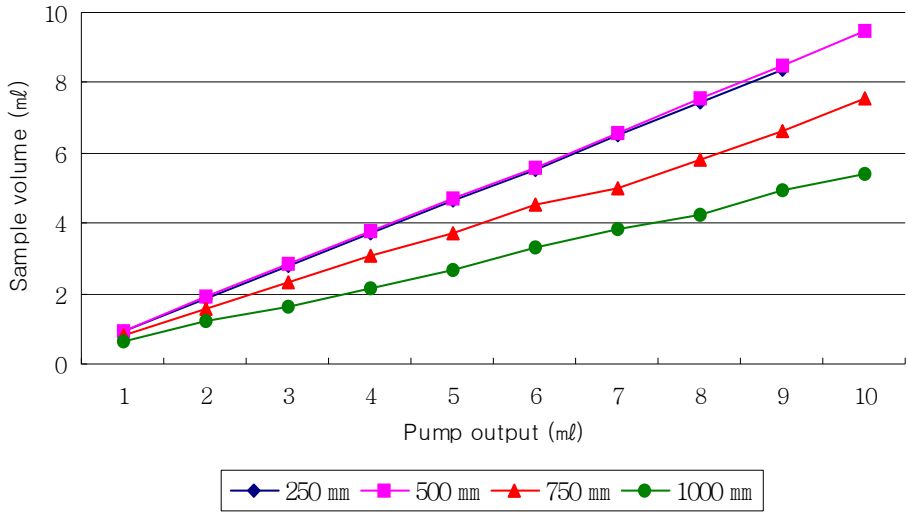


그림 3-45. 펌프 토출량(0.45  $\mu\text{m}$  suction tube)

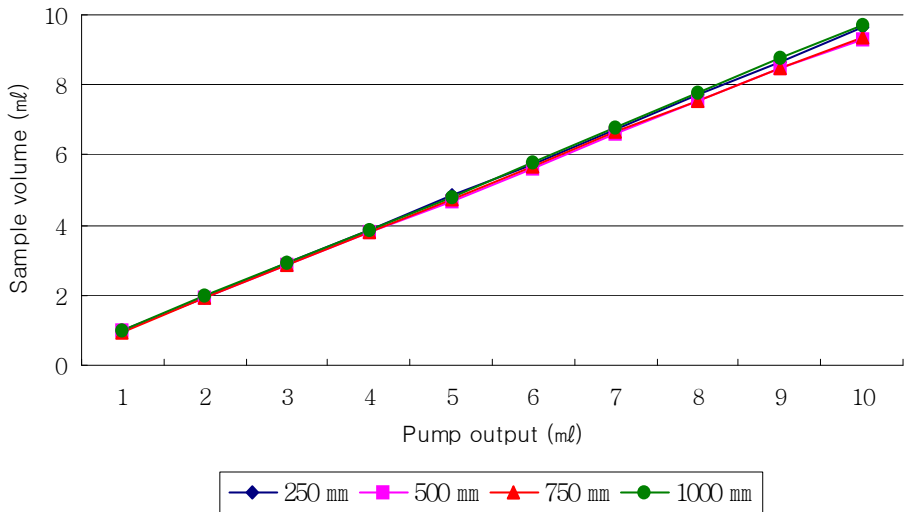


그림 3-46. 펌프 토출량(0.45  $\mu\text{m}$  delivery tube)

그림 3-47 및 3-48은 펌프 흡입부와 송출부에 0.80  $\mu\text{m}$ 의 필터를 설치하고 튜브의 설치길이를 다르게 할 때 1분간 펌프를 구동하여 얻은 샘플의 체적을 나타낸 것이다. 흡입관의 길이 및 송출관의 길이는 각각 250 mm, 500 mm, 750 mm, 1000 mm로 동일하게 하였고, 펌프의 송출량은 1 ml/min에서 10 ml/min 사이의 10등분으로 하였다. 그림 3-47에서 필터 규격 0.80  $\mu\text{m}$ 의 흡입측의 경우는, 길이 250 mm, 500 mm, 750 mm는 펌프송출량이 샘플량과 0.1 ml~0.4 ml 정도의 차이를 나타내었다. 이와 송출측의 길이 250 mm, 500 mm, 750 mm에서 펌프송출량과 샘플량의 차이와 비슷한 값을 보였다. 하지만 흡입측의 길이 1000 mm에서는 펌프토출량 1 ml~4 ml까지는 샘플량이 없었으며 펌프토출량 5 ml~10 ml에서는 샘플량과의 차이는 크게 나타나 흡입이 불가능 한 것을 알 수 있다. 따라서 실제 발효 공정에 적용 시 흡입 길이가 1000 mm가 넘지 않도록 유의해야 할 것으로 판단된다. 그림 3-48에서 필터 규격 0.80  $\mu\text{m}$ 의 송출측의 경우는 필터규격 0.45  $\mu\text{m}$ 와 샘플량이 펌프송출량과 비슷하게 나타났다.

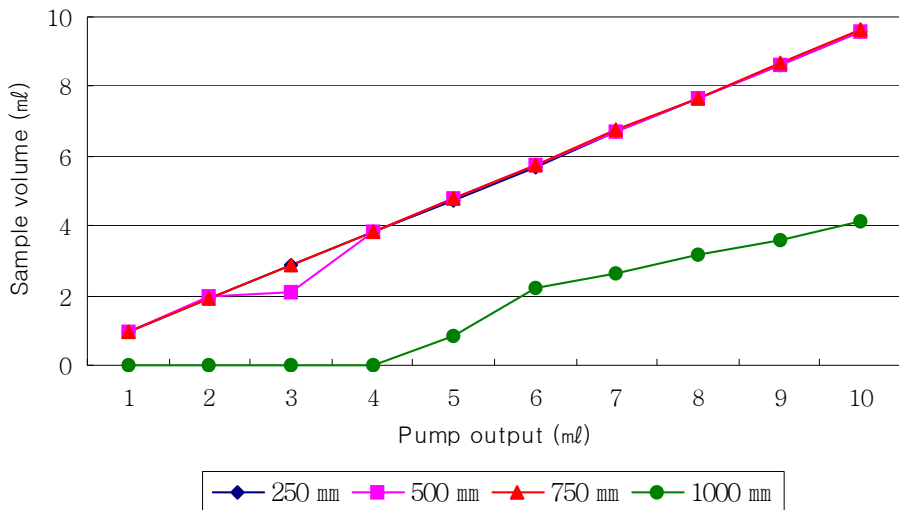


그림 3-47. 펌프 토출량(0.80  $\mu\text{m}$  suction tube)

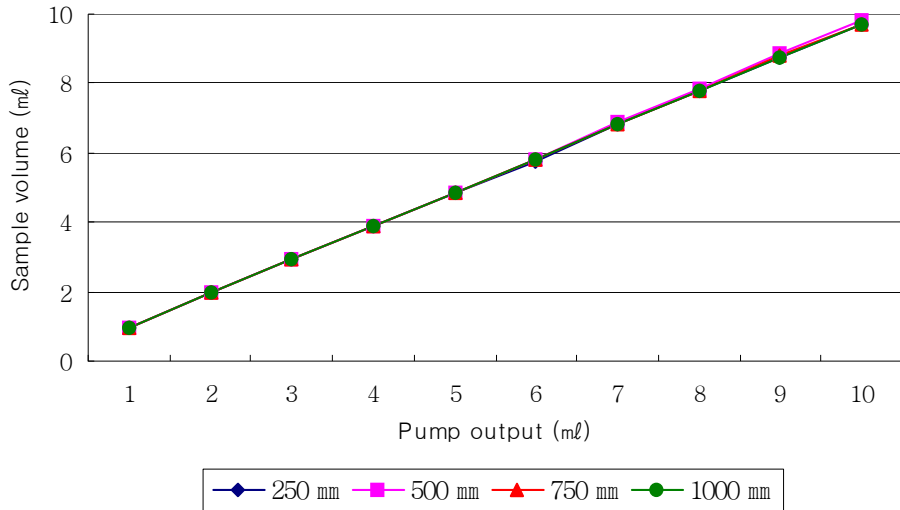


그림 3-48. 펌프 토출량(0.80  $\mu\text{m}$  delivery tube)

그림 3-49는 증류수에 분말 셀룰로오스를 혼합한 탁도 500 NTU, 1000 NTU의 용액을 원료로 하고 흡입관의 길이를 1000 mm로 필터를 흡입측에 설치한 경우 펌프송출량을 나타낸 것이다. 탁도가 500 NTU일 경우 필터 규격이 0.45  $\mu\text{m}$  와 0.80  $\mu\text{m}$ 으로 달리 했을 때 송출량 차이는 거의 없는 것으로 나타났으며 샘플량과 비교했을 때 0.6 ml~1.8 ml의 차이를 나타내었다.

동일 필터의 경우 탁도에 따른 송출량의 차이는 샘플량이 4 ml~8 ml을 제외한 나머지 크게 나타나지 않았다. 다만 동일조건의 증류수를 사용한 그림 3-48과 비교할 때 고형분이 혼합된 경우 송출량이 증가하는 것으로 나타났다.

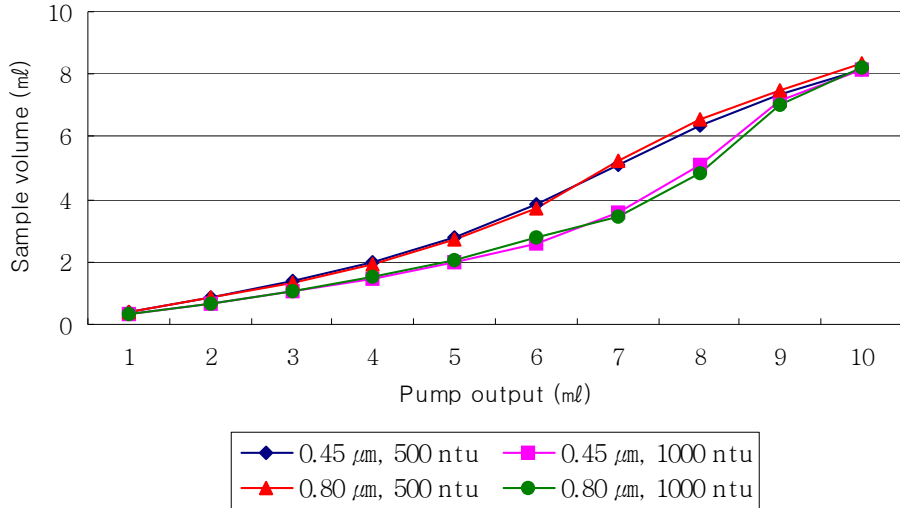


그림 3-49. 탁도에 따른 펌프 토출량(0.45  $\mu\text{m}$ , 1000 mm, suction tube)

그림 3-50은 10 mM 포도당 용액을 사용하고, 흡입 길이 750 mm, 흡입측에 필터를 설치한 경우 여과전의 포도당 용액을 송출후의 포도당 용액과 농도를 HPLC를 사용하여 비교한 것이다. 그림에서 농도의 상대 오차는 필터가 0.45  $\mu\text{m}$ 인 경우 펌프송출량 6 ml/min, 7 ml/min, 8 ml/min, 9 ml/min, 10 ml/min일 때 각각 2%, 5.6%, 4%, 1%, 0.8%를 나타내었다. 또한 필터가 0.80  $\mu\text{m}$ 인 경우 펌프송출량에 따른 상대오차는 2% 이내를 나타내었다. 이는 필터 규격이 0.80  $\mu\text{m}$ 일 때 보다 0.45  $\mu\text{m}$ 인 경우 차이가 크게 나타나는 것을 알 수 있으며, 펌프 송출량에는 무관 한 것을 알 수 있다.



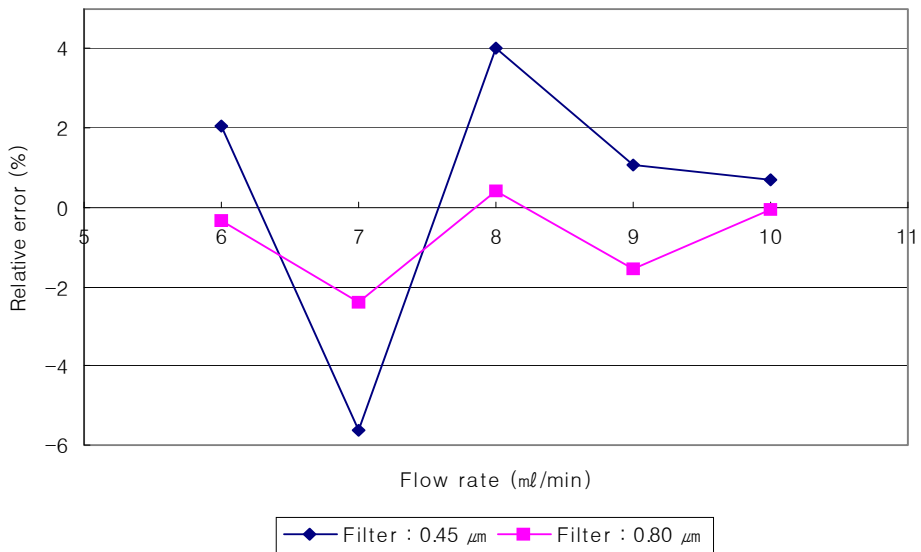


그림 3-50. 샘플용액 농도의 상대오차.

나. 샘플용액 희석장치

그림 3-51은 펌프 송출량에 대한 샘플 중량의 상대오차를 기질 중량별로 나타낸 것으로, 희석비율 1/50에서 기질 중량 100  $\mu\text{l}$ 일 때 1.85%로 가장 크게 나타났으며, 희석비율 1/10에서 기질중량 50  $\mu\text{l}$ 일 때 0.5%로 가장 적게 나타났다. 또한 뚜렷하지는 않지만 희석비율 클수록 상대오차가 다소 증가하는 것을 알 수 있다.

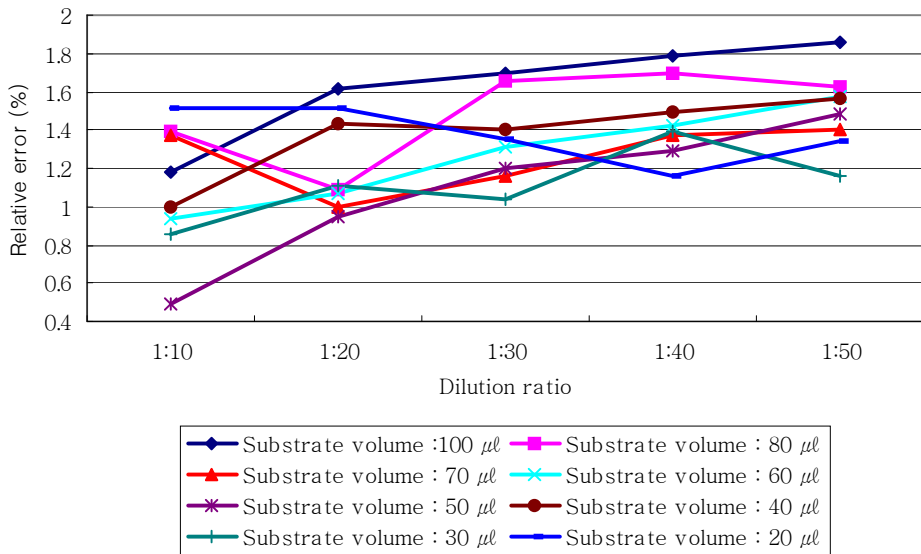


그림 3-51. 기질 희석 체적에 따른 자동희석 용액의 상대오차.

그림 3-52는 포도당의 희석비율별 펌프 송출량에 대한 샘플 중량의 상대오차를 나타낸 것으로, 희석비율이 클수록 상대오차가 커지는 것을 알 수 있다. 특히 기질용액 체적이 40 μl인 경우 희석 비율에 관계없이 상대오차가 크게 나타난 것을 보여준다. 이는 용액 희석 시 기질용액 사용량이 적을수록 오차가 크게 나타난다는 사실을 보여주는 것이다. 그림에서 희석비율 1/10에서 기질용액 체적 40 μl를 제외하곤 모든 구간에서 상대오차율이 2% 이내로 가장 작게 나타남을 알 수 있으며, 기질용액 체적 100 μl에서는 희석비율에 관계없이 상대오차율이 4% 이내로 비교적 작게 나타나는 것을 알 수 있다.

그림 3-53은 희석에 사용된 포도당용액의 체적별 상대오차를 나타낸 것으로, 사용 기질체적이 클수록 상대오차가 작아지는 것을 알 수 있다. 이상에서의 결과로 2대의 주사기펌프를 사용한 용액자동희석장치는 반복 간 오차 및 상대오차를 고려할 때 충분히 사용가능함을 확인 할 수 있었다.

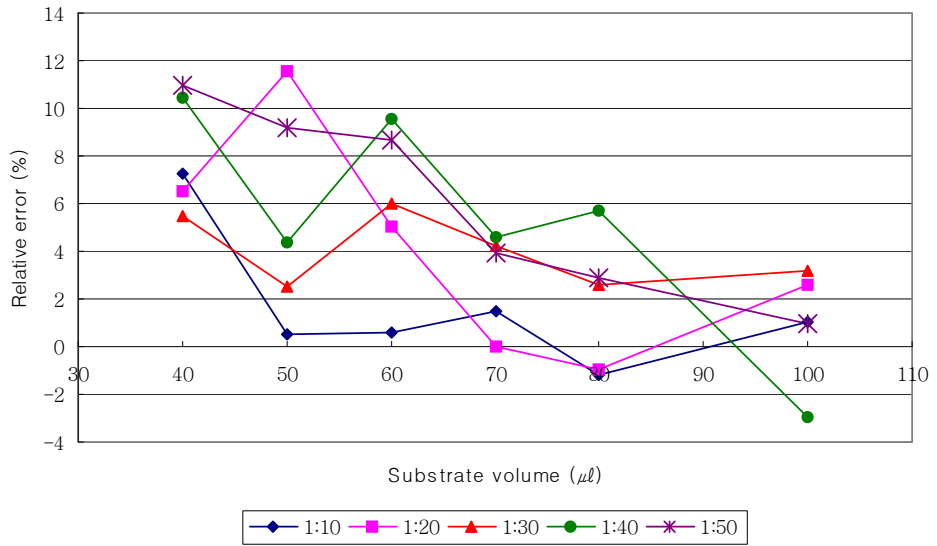


그림 3-52. 희석 비에 따른 자동희석용액의 상대오차(glucose)

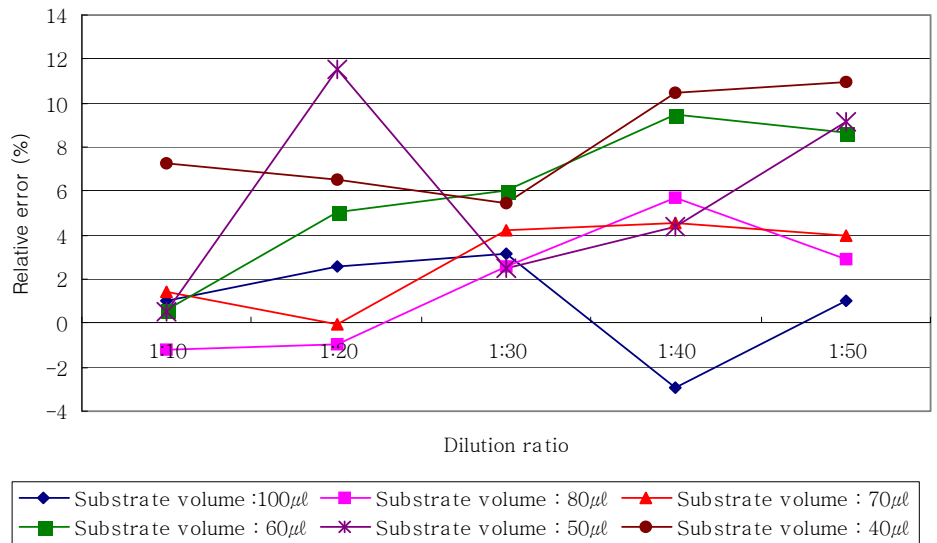


그림 3-53. 기질 체적에 따른 자동희석용액의 상대오차(glucose)

그림 3-54는 젖산의 회석비율별 펌프 송출량에 대한 샘플 중량의 상대 오차를 나타낸 것으로, 포도당 용액의 경우와 같이 회석비율이 클수록 상대오차가 커지는 것을 알 수 있다. 특히 기질용액 체적이 80  $\mu\text{l}$ 인 경우 회석 비율 1/10을 제외하고는 상대오차가 크게 나타난 것을 보여준다. 이는 포도당 용액에서와 동일하게 용액 회석 시 기질용액 사용량이 적을수록 오차가 크게 나타난다는 사실을 보여주는 것이다. 그림에서 회석비율 1/10에서 기질용액 체적 60  $\mu\text{l}$ 를 제외하곤 모든 구간에서 상대오차율이 2% 이내로 가장 작게 나타남을 알 수 있으며, 기질용액 체적 100  $\mu\text{l}$ 에서는 회석비율 1/50을 제외하고는 상대오차율이 4% 이내로 비교적 작게 나타나는 것을 알 수 있다.

그림 3-55는 회석에 사용된 젖산용액의 체적별 상대오차를 나타낸 것으로, 포도당 용액의 결과와는 달리 사용 기질체적과 상대오차간의 관계가 뚜렷하게 나타나지 않았다. 이상 실험 결과, 주사기 펌프를 이용한 회석장치로 기질용액을 자동으로 회석하는 것이 가능한 것을 알 수 있었으며, 적정 혼합 조건은 기질용액 체적을 가능한 크게 회석비율은 작게 하는 것이 타당한 것으로 판단되었다.

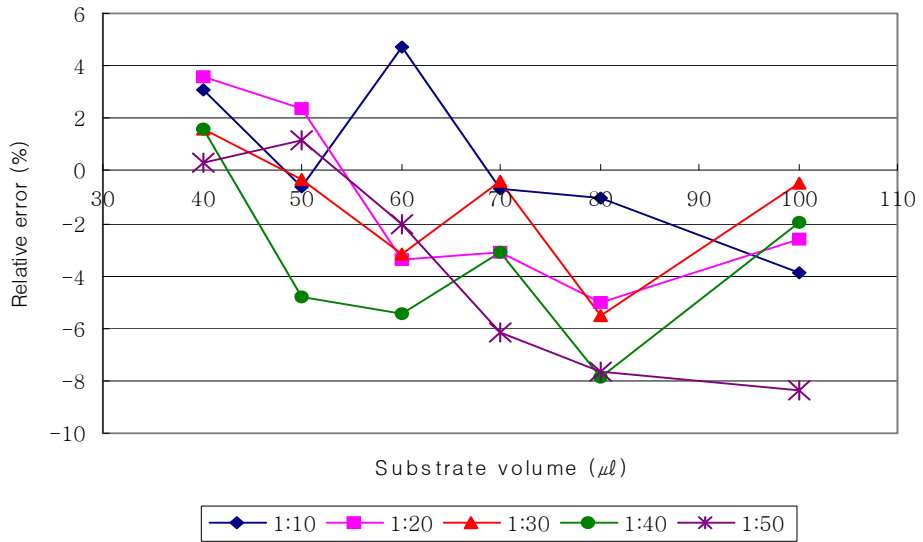


그림 3-54. 희석 비에 따른 자동희석용액의 상대오차(lactic acid)

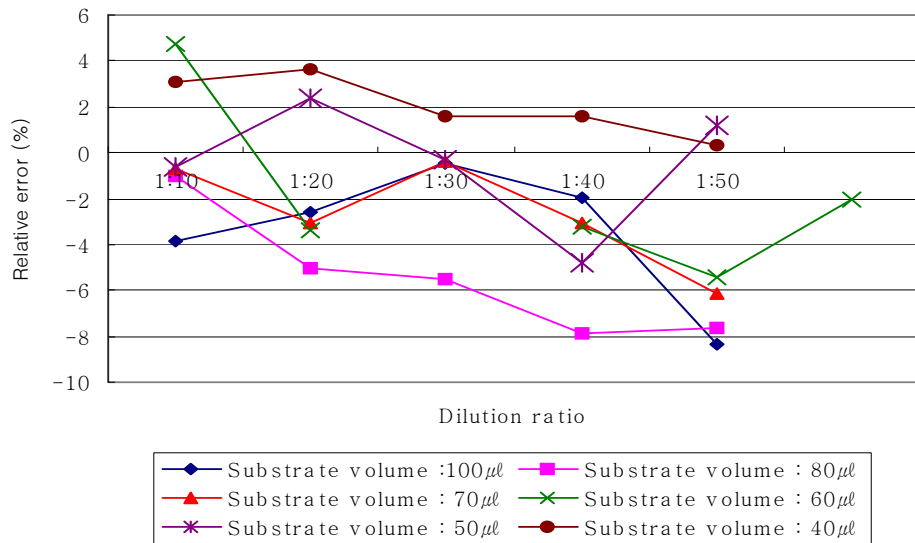


그림 3-55. 기질 체적에 따른 자동희석용액의 상대오차(lactic acid)

그림 3-56은 에탄올의 희석비율별 펌프 송출량에 대한 샘플 중량의 상대오차를 나타낸 것으로, 포도당, 젖산 용액의 경우와 같이 희석비율이 클수록 상대오차가 커지는 것을 알 수 있다. 특히 기질용액 체적이 80  $\mu\text{l}$ 인 경우 희석비율 1:40, 1:50의 경우 상대오차가 각각 32%, 51%로 크게 나타난 것을 보여준다. 이는 포도당, 젖산 용액과는 다르게 에탄올의 증발성이 작용함으로 용액 희석 시 기질용액 사용량이 적을수록 오차가 크게 나타난다는 사실을 보여주는 것이다.

그림 3-57은 희석에 사용된 에탄올용액의 체적별 상대오차를 나타낸 것으로, 사용 기질체적이 클수록 상대오차가 작아지는 것을 알 수 있다. 그리고 기질 용액 80  $\mu\text{l}$ 인 경우 상대오차가 크게 나타났으며, 희석비율 1:40 이상에서는 기질용액의 체적에 상관없이 상대오차가 30% 이상 크게 나타남을 알 수 있다.

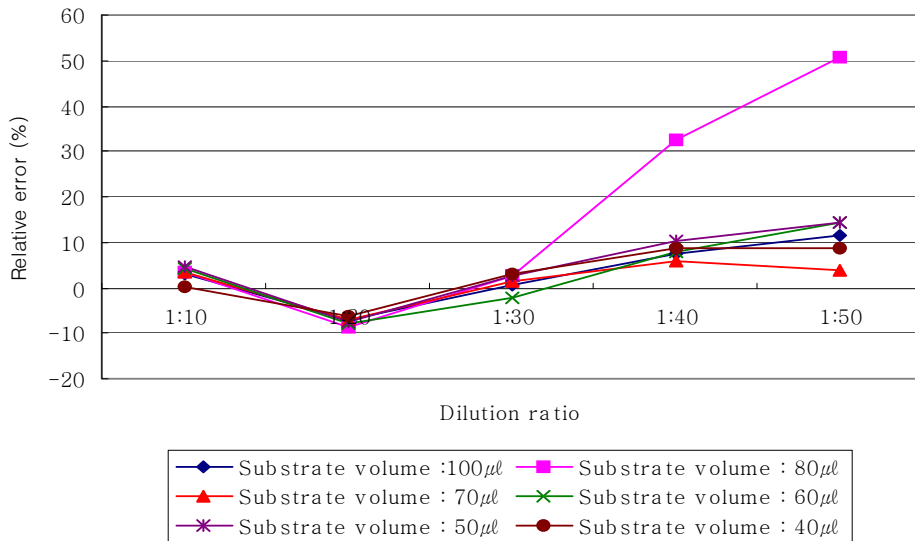


그림 3-56. 희석 비에 따른 자동희석용액의 상대오차(ethanol)

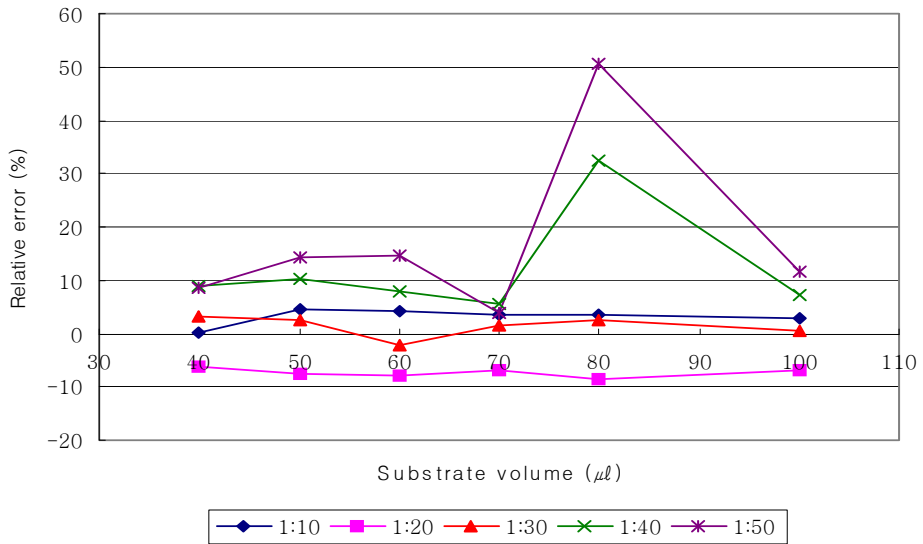


그림 3-57. 기질 체적에 따른 자동희석용액의 상대오차(ethanol)

#### 다. 온라인 감시용 측정장치 개발

그림 3-58은 전극봉 직경 0.5 mm인 경우 포도당 농도, 유속별 농도 변화에 따른 전류값을 나타낸 것이다. 그림에서 유속과 관계없이 30 mM까지는 농도가 증가할수록 전류값이 7 nA~9.2 nA까지 상승하다가 그 이상에서는 다소 감소하는 경향을 알 수 있으며, 특히 20 mM까지는 거의 직선적으로 전류값이 상승하는 것을 알 수 있다. 동일 농도에서는 유속이 적을수록 전류값이 높게 나타나는 것을 알 수 있다. 그러나 최소 전류값과 최대 전류값의 차이가 약 8 nA 정도로 농도변화에 따른 전류값 변화 차이가 크지 않기 때문에, 전류값 변화로 농도를 측정하기에는 문제가 있을 것으로 판단된다.

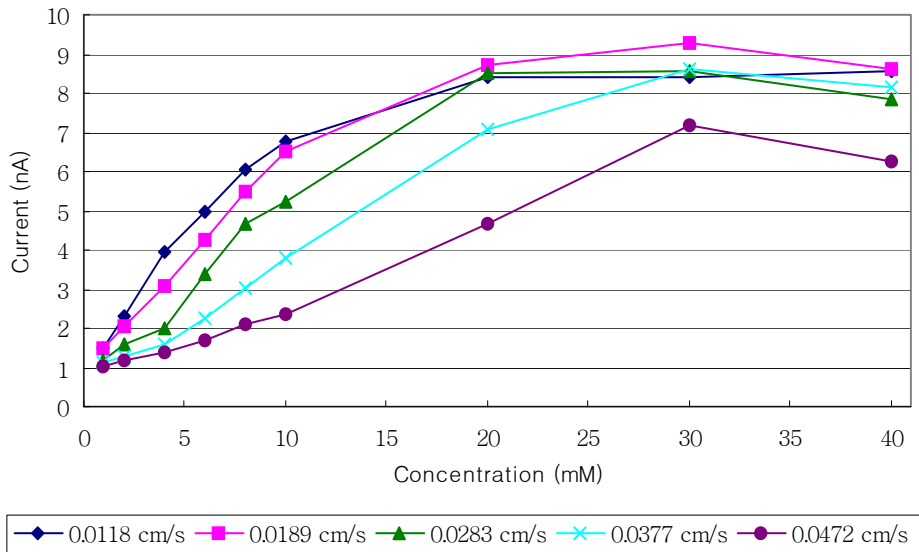


그림 3-58. 완충용액 유속과 포도당 농도에 따른 전류값(전극봉 지름 0.5 mm)

그림 3-59는 전극봉 직경 1.0 mm인 경우 유속별 농도 변화에 따른 전류 값을 나타낸 것이다. 유속이 0.0118 cm/s, 0.0189 cm/s, 0.0283 cm/s, 0.0377 cm/s, 0.0472 cm/s일 때 농도 10 mM에서의 전류값은 각각 41 nA, 38 nA, 30 nA, 10 nA, 8 nA를 나타내었다. 전극봉 직경 0.5 mm와는 달리 유속이 0.0283 cm/s 이하에서는 10 mM, 그 이상에서는 20 mM을 기준으로 전류값이 증가하지 않는 경향을 나타냈다. 그리고 유속이 0.0377 cm/s와 0.0472 cm/s인 경우 농도가 10 mM까지 증가해도 전류값은 10 nA를 넘지 않는 경향을 나타내었다.



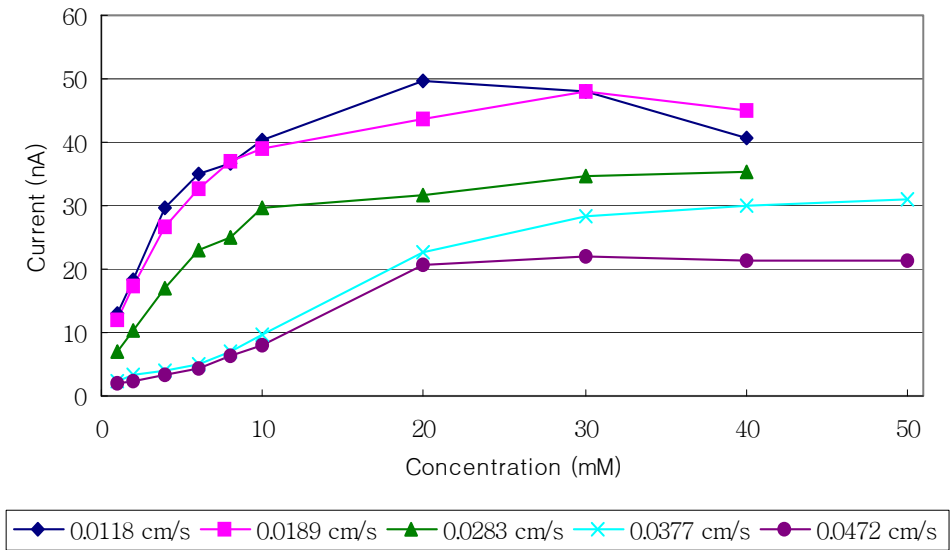


그림 3-59. 완충용액 유속과 포도당 농도에 따른 전류값(전극봉 지름 1.0 mm)

그림 3-60은 전극봉 직경 1.5 mm인 경우 유속별 농도 변화에 따른 전류 값을 나타낸 것이다. 유속이 0.0118 cm/s, 0.0189 cm/s, 0.0283 cm/s, 0.0377 cm/s, 0.0472 cm/s일 때 농도 10 mM에서의 전류값은 각각 62 nA, 55 nA, 40 nA, 32 nA, 24 nA를 나타내었다. 그리고 전극봉 직경 1.0 mm와 달리 농도 10 mM을 기준으로 그 이상의 농도에서는 전류값이 증가하지 않는 것으로 나타났다.

그림 3-61은 전극봉 직경 2.0 mm의 경우 유속별 농도 변화에 따른 전류 값을 나타낸 것이다. 유속이 0.0118 cm/s, 0.0189 cm/s, 0.0283 cm/s, 0.0377 cm/s, 0.0472 cm/s일 때 농도 10 mM에서의 전류값은 각각 98 nA, 86 nA, 70 nA, 62 nA, 54 nA를 나타내었다. 전극봉 직경 1.5 mm와 마찬가지로 농도 10 mM을 기준으로 전류값이 증가하지 않음을 알 수 있다. 그러나 농도 10 mM 까지 유속별 전류값이 거의 직선적으로 증가하는 것을 알 수 있다. 전극봉 직경 1.0 mm, 1.5 mm, 2.0 mm의 경우 농도 증가에 따른 전류값 증가량이 전극봉 직경 0.5 mm와는 달리 충분히 크기 때문에 전류값으로 농도를 측정하는 센서로 사용이 가능하다고

판단된다. 다만 측정 시간의 측면에서 전극봉 직경이 커지면 전류계를 안정화 시키는데 많은 시간이 소요되므로 농도에 따른 전류값 변화의 직선성, 측정 시간 등을 동시에 고려하여 적절한 전극봉의 크기 및 이송완충용액 유속을 결정해야 한다. 이 실험 결과 전극봉 직경 1.0 mm, 1.5 mm, 2.0 mm 사용이 가능하나, 측정 시간을 고려할 때 전극봉 직경 1.0 mm의 사용이 가장 효과적이라고 판단된다.

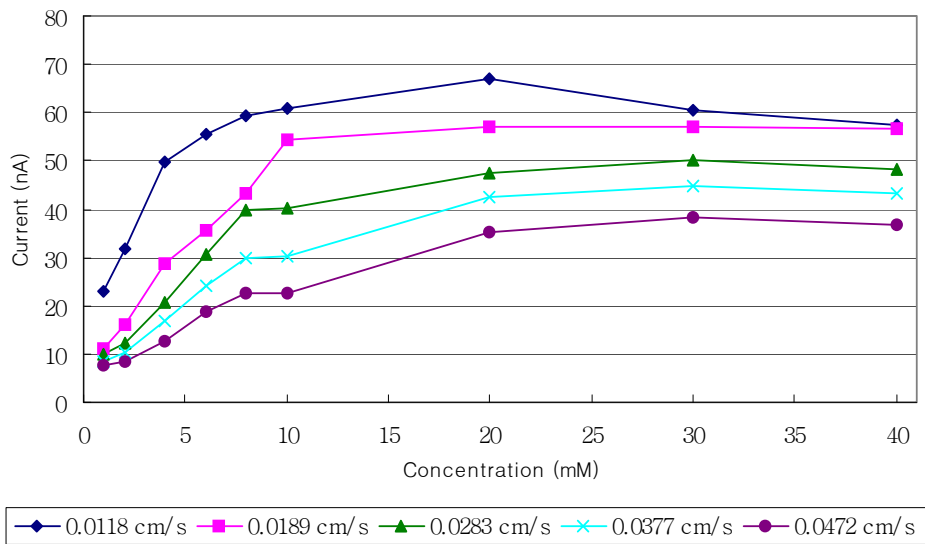


그림 3-60. 완충용액 유속과 포도당 농도에 따른 전류값(전극봉 지름 1.5 mm)

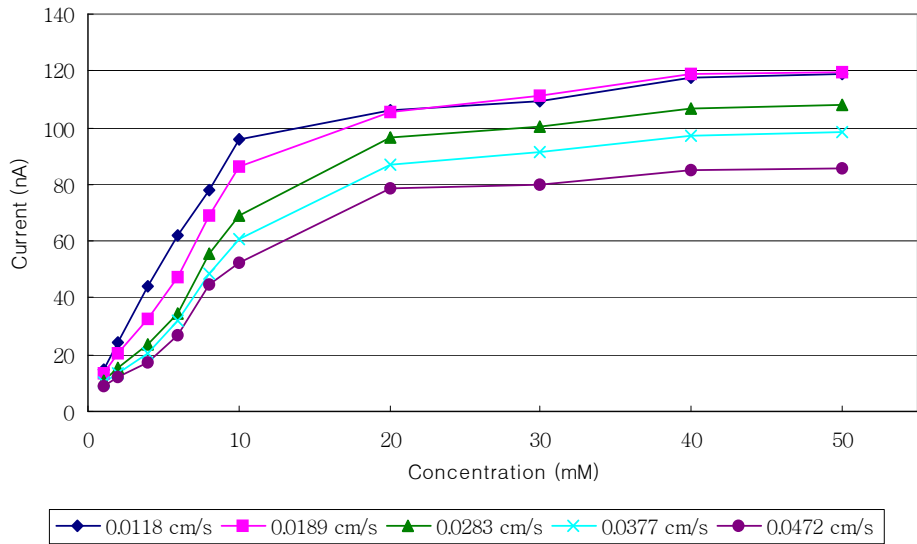


그림 3-61. 완충용액 유속과 포도당 농도에 따른 전류값(전극봉 지름 2.0 mm)

그림 3-62, 3-63, 3-64, 3-65는 포도당 용액을 사용한 유속별 선형성 결과를 토대로 전극봉 지름 1.0 mm, 유속 0.0283 cm/s 및 0.0472 cm/s의 2 조건에서 포도당 용액 농도에 따른 전류값 및 선형성을 나타낸 것이다. 실험은 1일 간격으로 총 3회 반복 실험하였다. 그림 3-62는 유속 0.0283 cm/s, 용액의 농도를 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM의 9 수준으로 하여 전체 구간에서 농도에 따른 전류값 및 선형성을 나타내는 것으로, 결정계수는 약 0.91 ~ 0.92의 범위로 나타났다. 그림 3-66은 3회 반복 실험의 평균값을 용액농도 10 mM까지만 사용한 것으로 결정계수는 0.8968로 전구간 보다 적게 나타났다. 그림 3-64와 3-65는 유속 0.0472 cm/s의 경우 농도 전구간과 10 mM 구간의 선형성을 나타내는 것으로 유속 0.0283 cm/s의 경우와 비교할 때 10 mM까지의 경우 결정계수가 0.9797로 매우 높게 나타남을 알 수 있다.

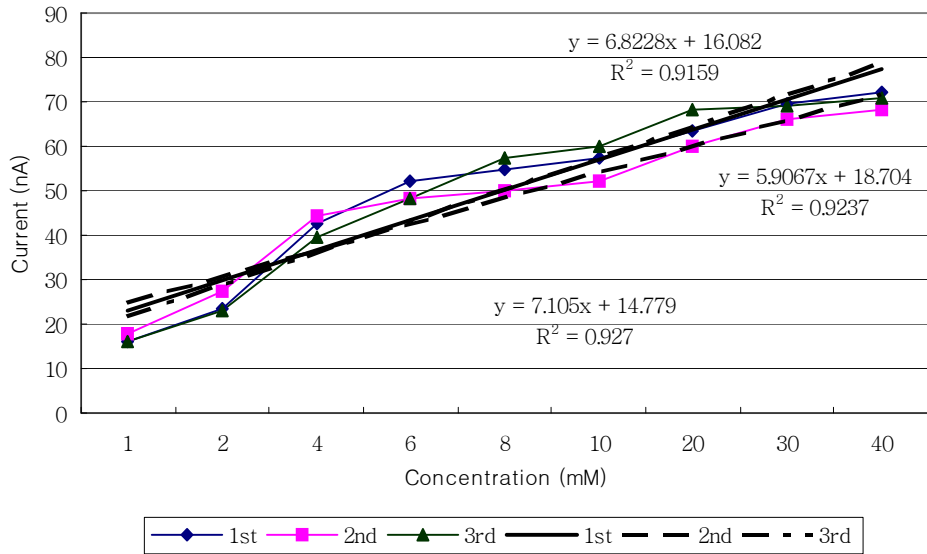


그림 3-62. 포도당 농도에 따른 전류값 표준곡선(within 40 mM, 0.0283 cm/s)

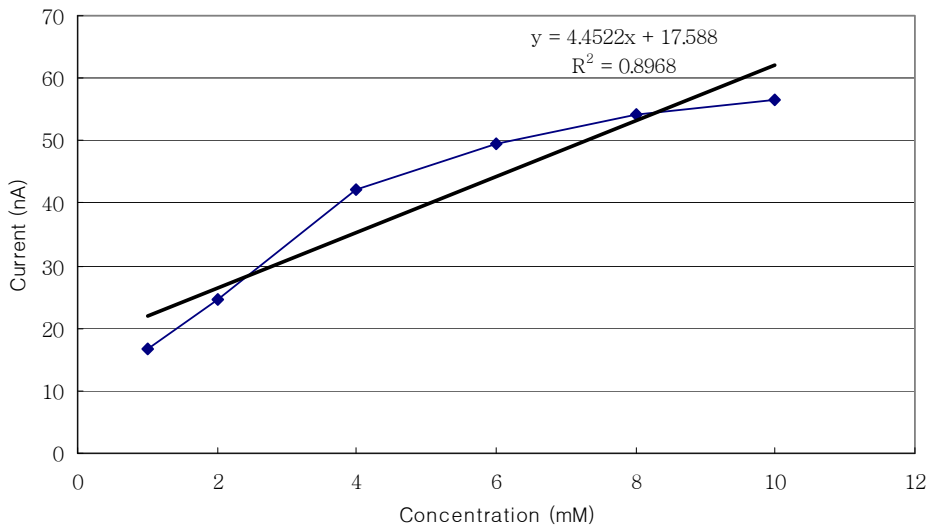


그림 3-63. 포도당 농도에 따른 전류값 표준곡선(within 10 mM, 0.0283 cm/s)

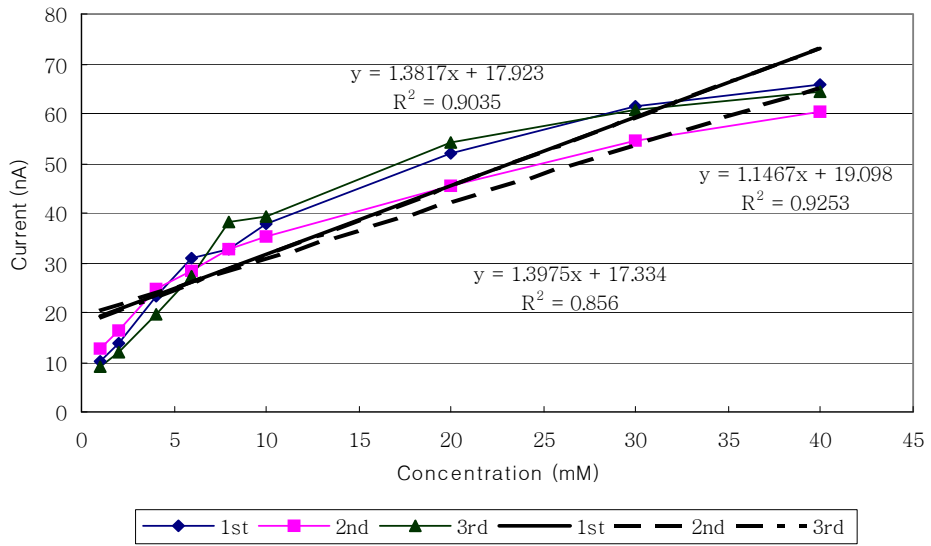


그림 3-64. 포도당 농도에 따른 전류값 표준곡선(within 40 mM, 0.0472 cm/s)

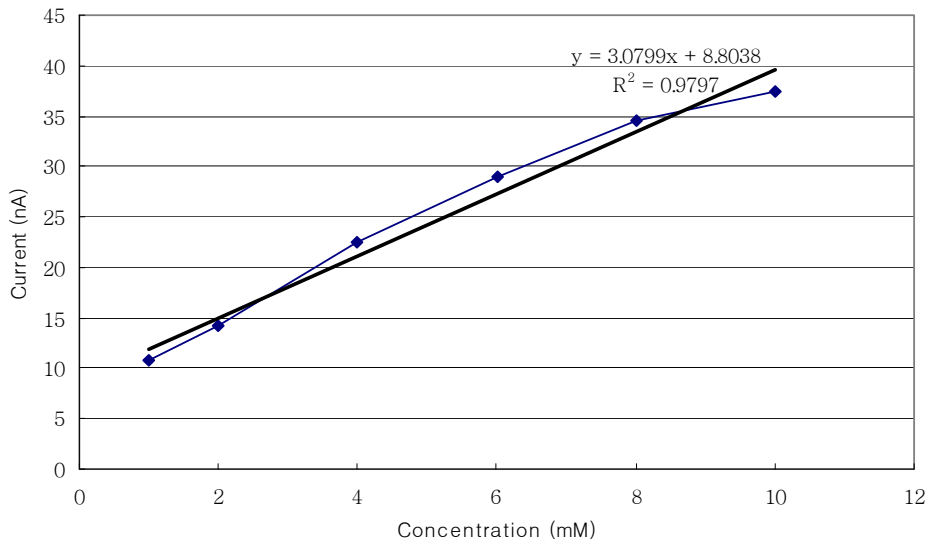


그림 3-65. 포도당 농도에 따른 전류값 표준곡선(within 10 mM, 0.0472 cm/s)

그림 3-66, 3-67, 3-68, 3-69는 젖산 용액을 사용한 유속별 선형성 결과를 토대로 전극봉 지름 1.0 mm, 유속 0.0283 cm/s 과 0.0472 cm/s의 2 조건에서 젖산 용액 농도에 따른 전류값 및 선형성을 나타낸 것이다. 실험은 1일 간격으로 총 3회 반복 실험하였다. 그림 3-66은 유속 0.0283 cm/s, 용액의 농도를 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM의 9 수준으로 하였을 때 전체 구간에서 농도에 따른 전류값 및 선형성을 나타내는 것으로, 결정계수는 약 0.95~0.96의 범위로 나타났다. 그림 3-67은 3회 반복 실험의 평균값을 용액농도 10 mM까지만 사용한 것으로 결정계수는 0.9874로 전구간 보다 크게 나타났다. 그림 3-68과 3-69는 유속 0.0472 cm/s의 경우 농도 전구간과 10 mM 구간의 선형성을 나타내는 것으로 유속 0.0283 cm/s의 경우와 비교할 때 10 mM 까지의 경우 결정계수가 0.9906으로 매우 높게 나타남을 알 수 있다.

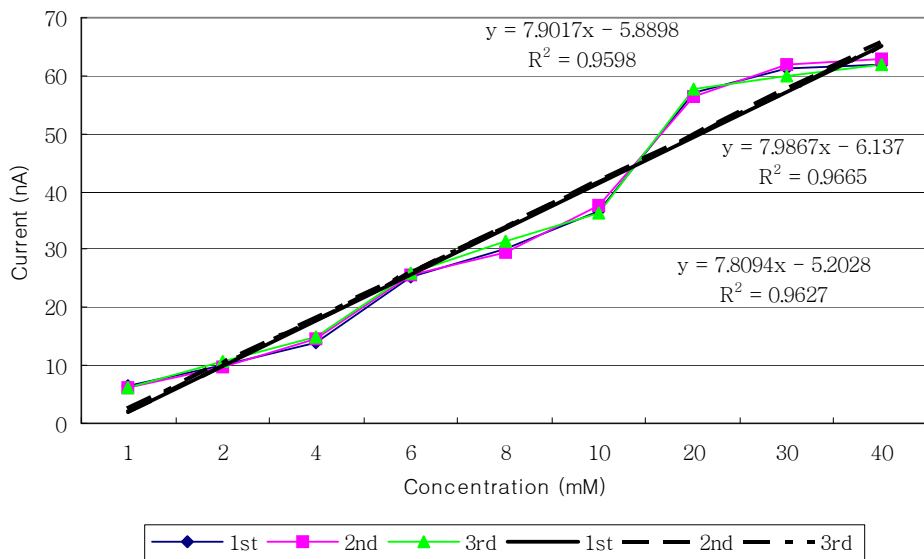


그림 3-66. 젖산 농도에 따른 전류값 표준곡선(within 40 mM, 0.0283 cm/s)

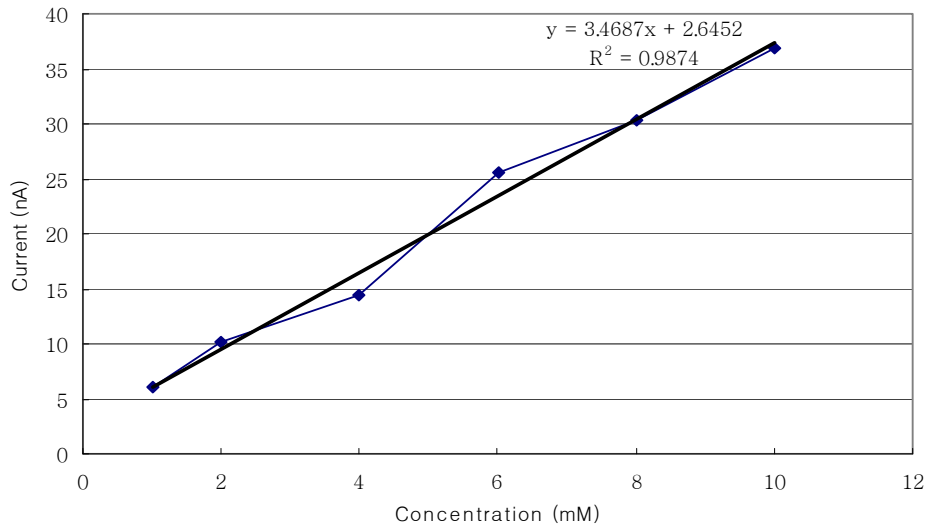


그림 3-67. 젓산 농도에 따른 전류값 표준곡선(within 10 mM, 0.0283 cm/s)

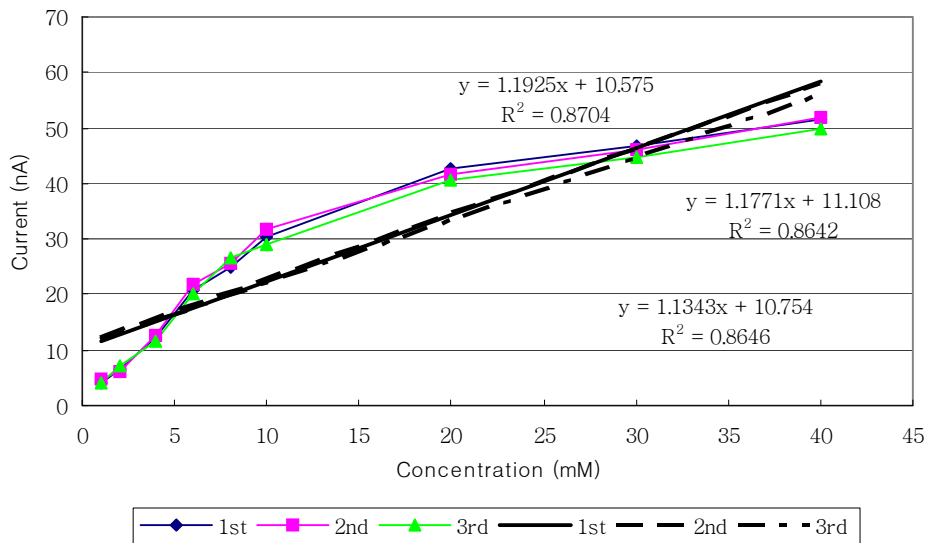


그림 3-68. 젓산 농도에 따른 전류값 표준곡선(within 40 mM, 0.0472 cm/s)

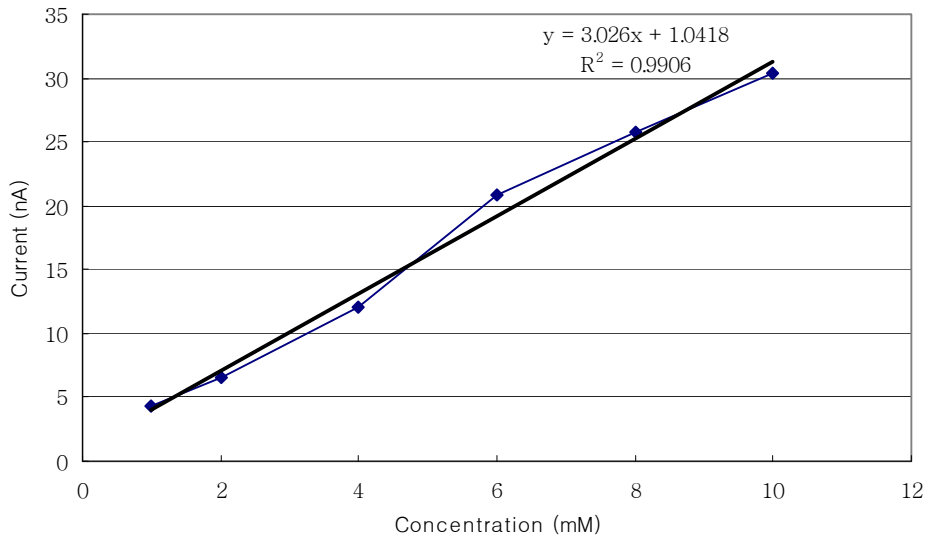


그림 3-69. 젖산 농도에 따른 전류값 표준곡선(within 10 mM, 0.0472 cm/s)

그림 3-70, 3-71, 3-72, 3-73은 에탄올 용액을 사용한 유속별 선형성 결과를 토대로 전극봉 지름 1.0 mm, 유속 0.0283 cm/s 과 0.0472 cm/s의 2 조건에서 에탄올 용액 농도에 따른 전류값 및 선형성을 나타낸 것이다. 실험은 1일 간격으로 총 3회 반복 실험하였다. 그림 3-70은 유속 0.0283 cm/s, 용액의 농도를 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM의 9 수준으로 하였을 때 전체 구간에서 농도에 따른 전류값 및 선형성을 나타내는 것으로, 결정계수는 약 0.90~0.97의 범위로 나타났다. 그림 3-71은 3회 반복 실험의 평균값을 용액농도 10 mM까지만 사용한 것으로 결정계수는 0.9891로 전구간보다 높게 나타났다. 그림 3-72와 3-73은 유속 0.0472 cm/s의 경우 농도 전구간과 10 mM 구간의 선형성을 나타내는 것으로 유속 0.0283 cm/s의 경우와 비교할 때 10 mM까지의 경우 상관계수가 0.9968로 매우 높게 나타남을 알 수 있다.



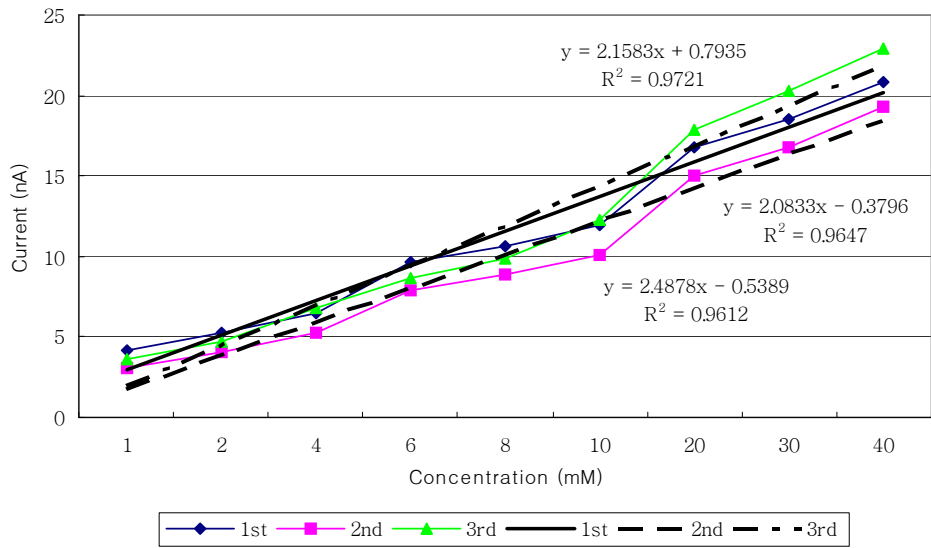


그림 3-70. 알코올 농도에 따른 전류값 표준곡선(within 40 mM, 0.0283 cm/s)

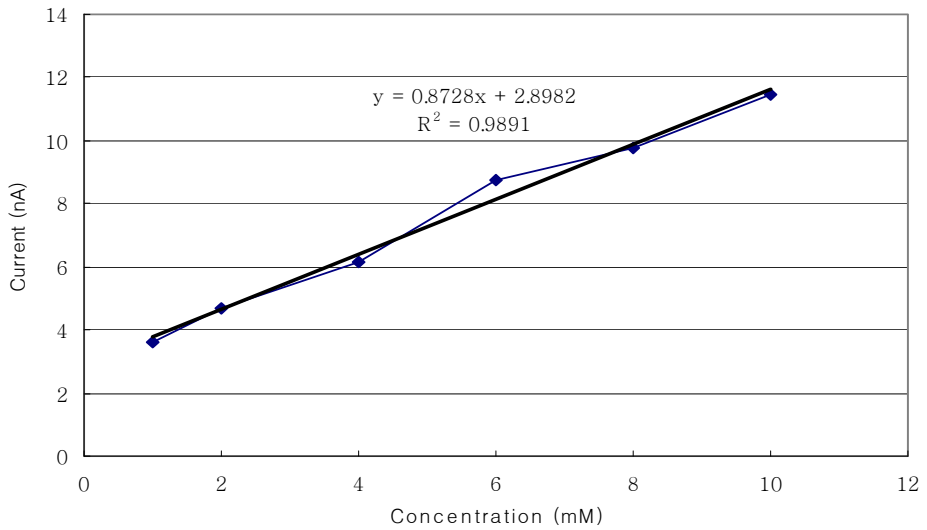


그림 3-71. 알코올 농도에 따른 전류값 표준곡선(within 10 mM, 0.0283 cm/s)

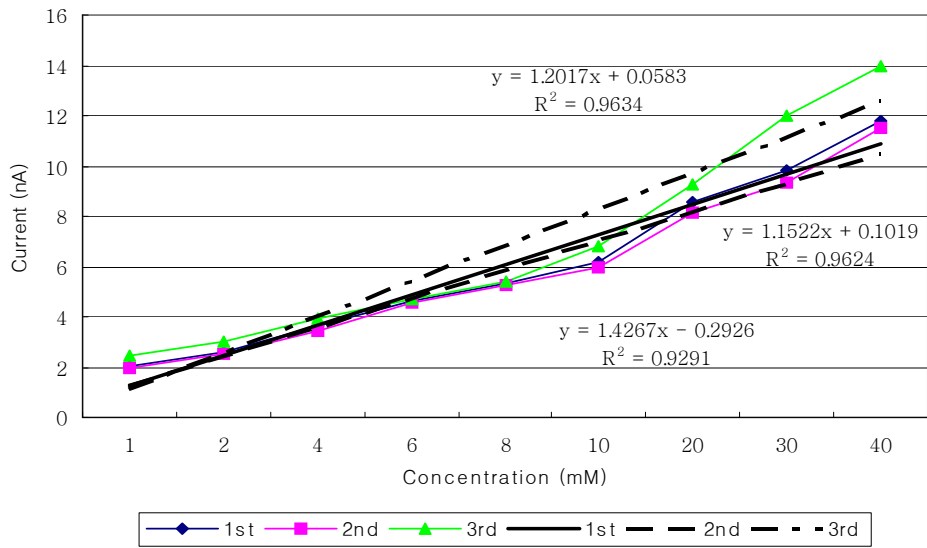


그림 3-72. 알코올 농도에 따른 전류값 표준곡선(within 40 mM, 0.0472 cm/s)

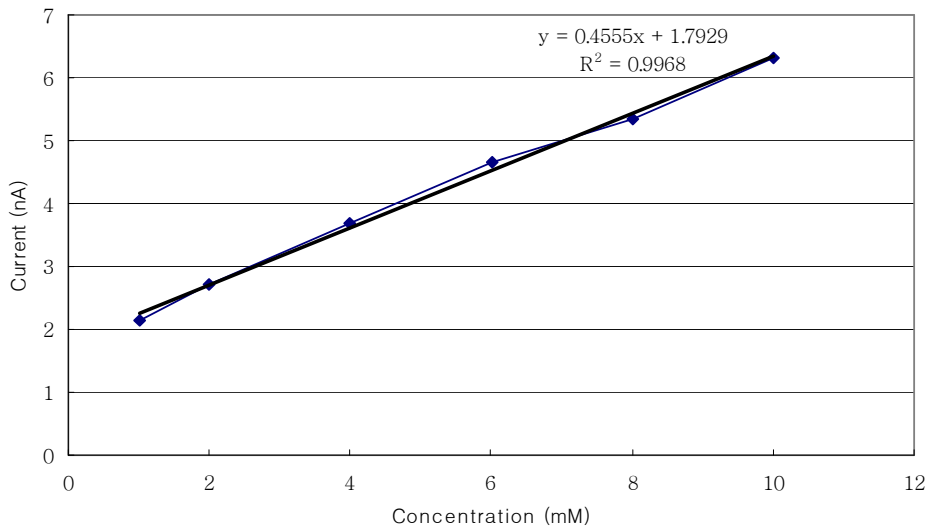


그림 3-73. 알코올 농도에 따른 전류값 표준곡선(within 10 mM, 0.0472 cm/s)

표 3-21은 시중에서 판매되는 음료(오렌지 및 포도 주스, 유산균 발효유, 소주)의 포도당과 자당 및 에탄올농도를 센서로 측정하고 포도당 및 자당은 HPLC를 이용하고 에탄올은 GC를 사용하여 측정한 값과 비교한 것이다. Table 25에서 상대오차는 센서 측정값과 HPLC 및 GC값과의 차를 HPLC 및 GC값으로 나누어 이를 백분율로 나타냈다. 측정결과 오렌지 주스와 소주의 측정 상대오차는 1.2765%, 3.8332%로 매우 적게 나타났으며, 포도 주스와 유산균 발효유는 30.8967%, 2244.2093%로 매우 높게 나타났다. 이는 센서 측정과 적량 분석 상에 심각한 측정 오류가 있었던 것으로 판단된다. 따라서 이에 대한 지속적인 반복 실험이 필요한 것으로 생각되었다.

표 3-21. 농도 비교(오렌지 주스, 포도 주스, 유산균 발효유, 소주)

Products	Concentration measured by sensor (%)	Concentration measured by HPLC/GC (%)	Relative error (%)
Glucose (Orange juice)	4.4519	4.3958	1.2765
Glucose (Grape juice)	3.3059	4.7840	30.8967
L-lactic acid (Yoghurt)	15.1811	0.6476	2244.2093
Ethanol (Soju)	20.3044	21.1138	3.8332

#### 4. 결론

첫째, 흐름주입식 바이오센서에서 샘플용액의 채취 및 여과장치의 성능 검증을 위해 튜브길이, 필터규격 및 설치 위치에 따른 샘플량을 측정하였다. 필터규격 0.45  $\mu\text{m}$ 의 흡입측에 설치할 경우 흡입관의 길이 및 송출관의 길이는 각각 250 mm, 500 mm일 때 샘플량이 펌프송출량보다 다소 적게 나타났다. 그러나 흡입관의 길이 및 송출관의 길이는 각각 750 mm, 1000 mm일 경우 샘플량이 펌프송출

량에 비해 갑자기 줄어드는 것을 알 수 있다. 따라서 흡입관의 길이가 750 mm부터 흡입저항이 송출량에 영향을 끼치는 것을 알 수 있다. 필터 규격 0.80  $\mu\text{m}$ 의 흡입측의 길이 1000 mm에서는 펌프송출량 1 ml~4 ml까지는 샘플량이 없었으며 펌프토출량 5 ml~10 ml에서는 샘플량과의 차이는 크게 나타나 흡입이 불가능한 것을 알 수 있다. 따라서 실제 발효공정에 적용 시 흡입 길이가 1000 mm가 넘지 않도록 유의해야 할 것으로 판단된다. 다이아프램식 진공펌프를 사용하여 발효조 내의 샘플을 채취하는 것이 가능한 것으로 판단되나, 펌프 송출량과 샘플량의 차이가 있으므로 이에 따른 차이를 고려할 필요가 있다.

증류수에 분말 셀룰로오스를 혼합한 탁도 500 NTU, 1000 NTU의 용액을 원료로 하고 흡입관의 길이를 1000 mm로 필터를 흡입측에 설치한 경우 펌프송출량은 탁도가 500 NTU일 경우 필터 규격이 0.45  $\mu\text{m}$ 와 0.80  $\mu\text{m}$ 으로 달리 했을 때 송출량 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 이에 따라 발효공정 특성상 고형분이 혼합될 가능성이 있으므로 필터는 펌프 흡입부에 설치해야 되고, 이 경우 흡입부 유로의 길이는 최대 1000 mm까지 가능한 것으로 예상되었다.

10 mM 포도당 용액을 사용하고, 흡입 길이 750 mm, 흡입측에 필터를 설치한 경우 여과전의 포도당 용액을 송출후의 포도당 용액과 농도를 HPLC를 사용하여 비교했을 때 필터의 규격은 0.45  $\mu\text{m}$ 의 사용이 가능함을 알 수 있었으며, 이 규격은 HPLC 샘플용액의 여과규격으로 발효공정의 여과장치에 적용이 가능함을 확인할 수 있었다. 다만 발효조의 크기가 클 경우 여러 곳에서 샘플링이 필요한 경우는 흡입 압력이 큰 원심식의 진공 펌프 사용이 필요한 것으로 판단되었다.

둘째, 반응공정제어에 필연적으로 적용되어야 하는 기질용액 자동희석장치를 개발하기 위해 주사기 펌프를 사용한 자동희석장치를 구성하고 그 성능을 조사하였다. 포도당, 젖산의 실험 결과 샘플링간 오차 및 상대오차를 기준으로 볼 때 실제 적용이 가능할 것으로 판단되었으며, 오차를 줄이기 위해 희석비율은 크게, 희석에 사용되는 기질용액의 체적은 크게 하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. 그리고 에탄올의 경우 희석 시 대기에 일정시간 노출 될 경우 농도의 오차가 심각해질 우려가 있으므로 기밀유지에 노력을 기울여야 할 것으로 판단된다.

셋째, 흐름주입식 바이오센서의 전류측정 장치 개발을 위해 전극봉 크기, 이송완충용액유속, 기질농도에 따른 영향을 전류값을 측정하여 조사하였다.

측정 시간의 측면에서 전극봉 직경이 커지면 전류계를 안정화 시키는데 많은 시간이 소요되므로 농도에 따른 전류값 변화의 직선성, 측정 시간 등을 동시에 고려하여 적절한 전극봉의 크기 및 이송완충용액 유속을 결정해야 한다. 이에 따라 전극봉 직경 1.0 mm, 1.5 mm, 2.0 mm의 경우 농도 증가에 따른 전류값 증가량이 전극봉 직경 0.5 mm와는 달리 충분히 크기 때문에 전류값으로 농도를 측정하는 센서로 사용이 가능하다고 판단되지만, 측정 시간을 고려할 때 전극봉 직경 1.0 mm의 사용이 가장 효과적이라 판단된다. 또한 유속에 관계없이 10 mM까지는 직선성이 유지되었으며, 10 mM 이상에서는 전류값이 증가하지 않음을 알 수 있었고, 동일 농도에서 유속이 적을수록 전류값이 높게 나타남을 알 수 있었다. 흐름주입식 센서로의 적용 가능성을 농도변화에 따른 전류값 변화량, 측정시간을 기준으로 볼 때 전극봉 직경은 1.0 mm, 완충용액의 유속은 0.0283 cm/s, 0.0472 cm/s인 경우가 가장 효과적으로 판단되었다. 그리고 센서장치의 성능검증 결과는 오렌지 주스와 소주의 상대오차는 5%이내에 있었으나, 포도주스와 요구르트는 심각한 오차를 나타내어 지속적인 반복실험이 요구된다.

## 제 3 절 발효공정 감시용 센서 장치 구성

### 1. 서언

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, 생물 산업의 전 분야에 걸쳐 없어서는 안 될 중요한 분야로 자리 잡고 있다.

발효공정에서 미생물의 성장을 촉진시키고 생산성을 증대시키기 위해서는 반응에 관여하는 여러 요인(pH,  $pO_2$ , 온도 및  $CO_2$  등)들을 최적의 조건으로 유지시켜야 하며, 이를 위해서는 공정 중 발생하는 반응 산물 및 기질의 농도 등을 온라인으로 감시하는 장치가 사용되어야 한다.

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 제거시키는 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 이 장에서는 앞서 개발된 장치를 이용하여 발효공정 감시용 센서 장치를 구성하고 포도주와 동치미를 각각 제조하여 포도주 발효 중 알코올, 포도당 농도와 동치미 발효 중 젖산 농도를 시간별로 측정하여 그 성능을 알아보고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 시료 채취 및 여과장치 구성

#### 1). 실험 재료

##### 가) 실험 장치

실험에 사용된 샘플용액 자동채취 및 여과장치는 그림 3-74와 같이 구성되었다. 그림에서 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 충전되면 관로에 남은 샘플은 다음 채취 및 여과공정에 혼입되지 않도록 방향제어밸브(b port)를 사용하여 배출되도록 공정을 구성하였다. 여과장치는 그림 3-75와 같이 홀더와 글라스필터로 구성되었으며, 글라스필터를 교환 할 때에는 홀더를 결합을 풀어 쉽게 작업이 가능하도록 하였다. 실험에 사용된 장치의 상세한 규격은 표 3-22와 같다.

표 3-22. 실험 장치 규격

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 $\mu$ m, 40 $\mu$ m, 16 $\mu$ m)	Schott Duran Co.

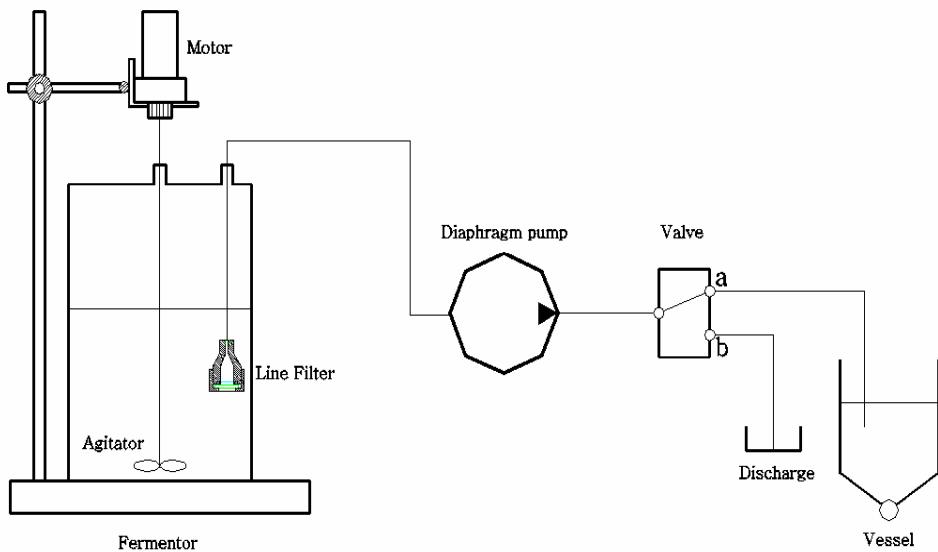


그림 3-74. 자동 샘플 채취 및 여과장치 구성도.



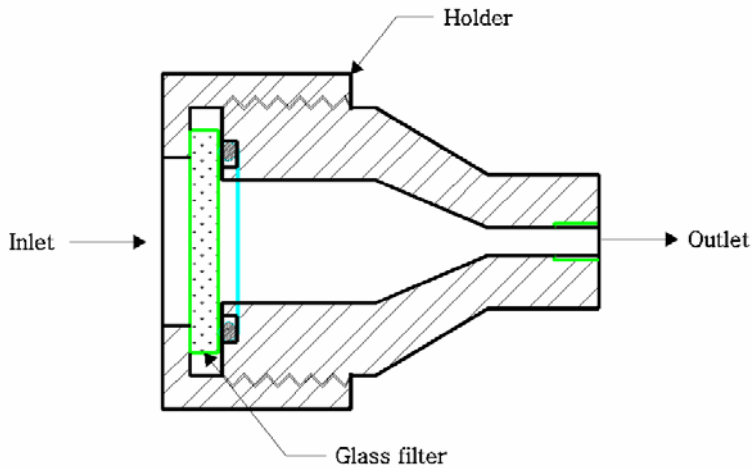


그림 3-75. 필터 구조도.

## 나) 실험 재료

샘플용액 자동채취 및 여과장치 성능검증을 위해 분말 셀룰로오스, 포도당(D-glucose, FW 180.16 g)을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였으며, 희석용 용액으로는 증류수를 이용하였다. 또한 개발된 장치를 이용한 샘플용액 농도 검증을 위해 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph System)를 사용하였으며, 당 분석용 Carbohydrate analysis column 및 이동상 용매(mobile phase solution)로 70% Acetonitrile 용액을 사용하였다.

## 2) 실험 방법

### 가) 중량 비교

샘플용액 채취 및 여과장치의 작동상태를 확인하기 위해 증류수를 사용하여 필터 기공크기, 고형분 함량, 흡입수두에 따른 펌프 토출량을 측정하고 이를 펌프 이론 토출량과 비교하였다. 흡입수두는 샘플용액 채취용 필터와 용액 흡입펌프의 설치위치 차를 나타내고 펌프 이론 토출량은 펌프 운전 시 설정된 토출량을 의미한다. 펌프 이론 토출량과 실제 토출량의 차를 실제 토출량으로 나

는 값을 상대오차로 하여 각 실험조건에서 샘플용액 채취 및 여과장치의 작동상태를 평가하였다.

샘플용액에 고형분이 포함된 경우 분말 셀룰로오스를 증류수에 혼합하여 고형분 함량 3수준(1%, 3%, 5%)으로 제조하였으며, 발효조 내에 설치된 글라스필터와 다이어프램 펌프의 흡입 측 높이 차 4수준(0 cm, 10 cm, 20 cm, 30 cm), 글라스필터 기공크기 3수준( 16  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ ), 펌프 운전조건 4수준(5 ml/min, 10 ml/min, 15 ml/min, 20 ml/min)으로 1분간 측정하였다. 각 실험 조건에서 3회 반복으로 측정하여 총 중량을 측정하였다. 상세한 실험조건은 표 3-23과 같다.

표 3-23. 실험 조건

Variables	Levels	Remarks
Pump delivery	4 (5, 10, 15, 20 ml/min)	
Contents of cellulose	3 (1, 3, 5 %)	$\frac{\text{cellulose}}{\text{distilledwater} + \text{cellulose}} \times 100$
Suction head	5 (0, 10, 20, 30 cm)	filter position - pump position
Pore size	3 (16, 40, 100 $\mu\text{m}$ )	

#### 나) 농도비교

발효공정은 공정이 끝날 때까지 외부와 완전히 차단된 상태로 진행되는 것이 일반적이다. 따라서 공정 감시를 위한 샘플용액 채취 및 여과장치는 발효조 내에 설치되어 공정이 끝날 때까지 사용된다. 발효조 내 기질 및 발효생성물은 시간이 지남에 따라 초기 고농도에서 저농도로 낮아진다. 이러한 발효공정 특성 때문에 순차적으로 샘플 용액을 채취하는 경우 샘플 용액의 농도는 앞서 채취된 고농도 샘플 용액의 영향을 받게 된다. 따라서 앞선 샘플 용액 채취

시 발효조 내 필터표면에 부착된 고형분 및 이송용 관로 내에 잔류하는 고농도의 용액을 완전히 제거시키기 위해서는 채취된 샘플 용액의 시간에 따른 농도변화 특성을 확인해야 한다.

샘플 용액 채취 시 시간에 따른 농도변화 특성을 파악하기 위해 셀룰로오스가 포함된 100 mM, 1 ℓ의 포도당 용액을 제조하여 샘플 용액을 채취한 후, 증류수를 사용하여 이를 80 mM로 희석한 후 샘플 용액을 채취하고, 같은 방법으로 60 mM, 40 mM, 20 mM로 농도를 변화시켜 각 농도에서 샘플 용액을 채취하였다. 희석 시 고형분 함량을 일정하게 유지하기 위해 고형분을 바닥에 완전히 침전시킨 후 증류수를 첨가하였다. 각 농도에서 1분 간격으로 총 10분 간 샘플 용액을 채취하였다.

각 실험 조건에서 여과장치를 통과하여 수집 용기에 담긴 샘플용액을 1 ml씩을 각각의 tube에 취하여 5 ml의 증류수를 가해 잘 혼합한 후, 12,000 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 0.45 μm filter를 이용해 여과하여 HPLC로 측정하였다. 상세한 실험조건은 표 3-24와 같다.

표 3-24. 실험 조건

Variables	Levels	Remarks
Pump delivery	10 ml/min	
Contents of cellulose	3 (1, 3, 5 %)	$\frac{\text{cellulose}}{\text{distilledwater} + \text{cellulose}} \times 100$
Suction head	0 cm	filter position - pump position
Pore size	16 μm	
Tube length	1000 mm	
Concentration of standard solution	5 (100, 80, 60, 40, 20 mM)	D-glucose + distilled water

나. 발효 장치 구성

발효실험을 위한 발효 장치는 발효조(10ℓ, 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 그림 3-76의 도면과 같이 구성하였다. 제작·조립 된 상세한 장치 형상은 그림 3-77과 같다.

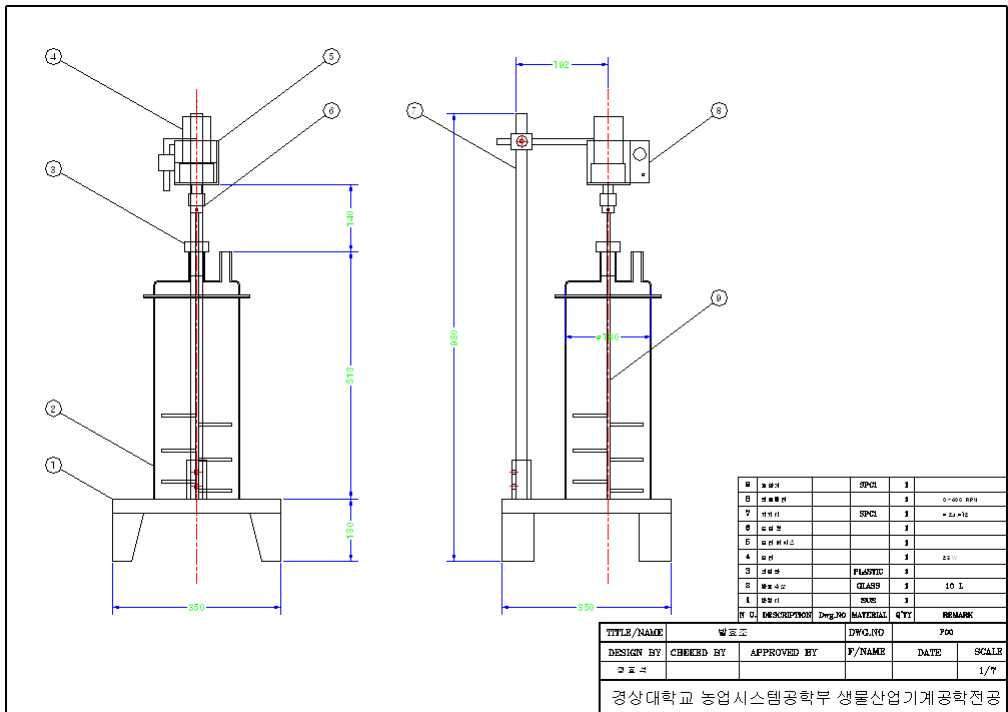


그림 3-76. 발효 장치 구성 도면.



그림 3-77. 발효 장치 조립 형상.

#### 다. 센서 장치 구성

발효공정 온라인 감시를 위한 센서장치는 크게 샘플용액 채취·여과장치, 샘플용액 희석장치, 전류측정 장치, 자료수집 장치 및 제어부로 구성되었다.



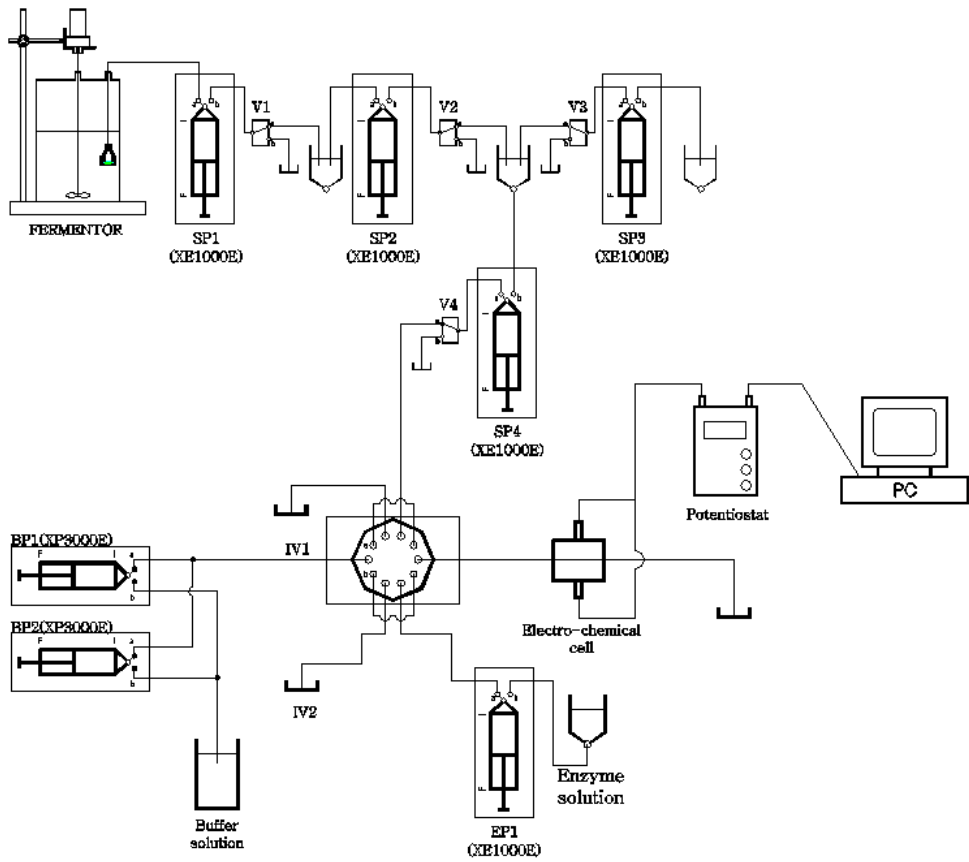


그림 3-79. 센서장치 공정도.



그림 3-80. 센서장치 조립 형상.

#### 라. 성능 검증

##### 1) 포도주 제조 중 포도당 및 알코올 농도 측정

##### 가) 실험 재료

포도주 제조를 위해 칠레산 거봉 포도, 백설탕, 효모를 시중에서 구입하여 사용하였으며, 포도당 및 알코올 농도 측정을 위해 포도당, 알코올, glucose oxidase, ethanol 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 및 알코올 용액은 완충용액으로 희석시켜 제조하였다. 실험에 사용된 재료의 상세한 규격은 표 3-25와 같다.



표 3-25 실험 재료 규격

Descriptions	Specifications	Remarks
Glucose oxidase	EC 1.1.3.4, X-S, 47.2 U/mg	Sigma Chemical Co.
Alcohol oxidase	EC 1.1.3.13, 40 U/mg	Sigma Chemical Co.
D-glucose	$C_6H_{12}O_6$ , FW 180.16	Sigma Chemical Co.
Ethanol	$C_2H_6O$ , FW 46.07, 190 PROOF	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

나) 실험 방법

(1) 포도주 제조

시중에서 구입한 칠레산 거봉 포도(8 kg)의 가지를 제거한 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 3-81과 같다.



그림 3-81. 포도주 제조(투입 직 후)

(2) 농도 측정 및 성능 검증

(가) 장치 calibration

시료의 농도를 측정하기 전 10, 20, 30 mM의 표준 포도당 용액

과 1, 5, 10 mM의 표준 알코올 용액을 증류수로 희석하여 제조 한 후, 5 Unit/ml의 포도당 및 알코올 효소액을 사용하여 각 시료 표준 농도에 대한 표준 전류값 곡선을 구하였다. 각 농도에서 3회 반복 측정하여 평균값을 대표값으로 사용하였다.

#### (나) 농도 측정

발효장치에서 채취된 시료의 전류값을 측정하여 이를 표준 전류값과 비교한 후, 표준 전류값 이상인 경우 시료를 다시 채취하여 적정범위로 자동희석 시킨 다음 전류값을 측정하여 이를 농도로 환산하였다. 발효 중 포도당 및 알코올 농도는 발효 직 후부터 1주일 간 매 12시간 간격으로 측정하였으며, 3회 반복 측정 후 평균값을 대표값으로 하였다.

#### (다) 성능 검증

장치 성능 검증을 위해 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph) 및 GC(Gas Chromatograph)를 사용하여 포도당 및 알코올 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  $\mu$ m)로 여과하여 성능 검증용 시료로 사용하였다.

### 2) 동치미 제조 중 젖산 농도 측정

#### 가) 실험 재료

동치미 제조를 위해 무, 파, 마늘, 생강, 굵은 소금을 시중에서 구입하여 사용했으며, 젖산 농도 측정을 위해 젖산, lactate 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 사용했으며, 표준 젖산 용액은 완충용액으로 희석시켜 제조하였다. 실험에 사용된 재료의 상세한 규격은 표 3-26과 같다.

표 3-26. 실험 재료 규격

Descriptions	Specifications	Remarks
Lactate oxidase	EC not available, 49 U/mg	Sigma Chemical Co.
Lactic acid	$C_3H_6O_3$ , FW 90.08	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.
무		시중구입
과		시중구입
마늘		시중구입

나) 실험 방법

(1) 동치미 제조

사각형(30 × 20 × 6 mm) 절편 형태로 썰은 무 2,200 g에 굵은 소금 60 g을 섞어 약 1시간 동안 절인다. 여기에 과 188 g, 절편 마늘 94 g, 절편 생강 47 g, 굵은 소금 50 g, 물 5 ℓ를 첨가하여 잘 섞은 다음 상온 상태에서 발효를 진행 시켰다. 발효장치에 투입된 시료의 상태는 그림 3-82와 같다.



그림 3-82. 동치미 제조(투입 직 후)

(2) 농도 측정 및 성능 검증

(가) 장치 calibration

시료의 농도를 측정하기 전 0.1, 0.5, 1.0 mM의 표준 젓산 용액

을 증류수로 희석하여 제조 한 후, 5 Unit/ml의 젓산 효소액을 사용하여 각 시료 표준 농도에 대한 표준 전류값 곡선을 구하였다. 각 농도에서 3회 반복 측정하여 평균값을 대표값으로 사용하였다.

#### (나) 농도 측정

발효장치에서 채취된 시료의 전류값을 측정하여 이를 표준 전류값과 비교한 후, 표준 전류값 이상인 경우 시료를 다시 채취하여 적정범위로 자동희석 시킨 다음 전류값을 측정하여 이를 농도로 환산하였다. 발효 중 젓산 농도는 발효 직 후부터 1주일 간 매 12시간 간격으로 측정하였으며, 3회 반복 측정 후 평균값을 대표값으로 하였다.

#### (다) 성능 검증

장치 성능 검증을 위해 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph) 및 GC(Gas Chromatograph)를 사용하여 젓산 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  $\mu\text{m}$ )로 여과하여 성능 검증용 시료로 사용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 시료 채취 및 여과장치 구성

##### 1) 중량비교

그림 3-83은 펌프 흡입수두 0 cm일 때 고형분 함량과 필터 기공크기 별 펌프 토출량의 상대오차를 나타낸 것으로, 펌프 송출량 20 ml에서 필터 기공크기 16  $\mu\text{m}$ , 고형분 함량이 5%일 때 44.99%로 가장 크게 나타났으며, 펌프 토출량 5 ml에서 필터 기공크기 100  $\mu\text{m}$ , 고형분 함량이 1%일 때 23.11%로 가장 적게 나타났다. 필터 기공크기가 100  $\mu\text{m}$ 일 때를 제외하고는 고형분 함량이 증가함에 따라 상대오차도 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 동일 고형분 함량에서 필터 기공크기가 줄어들에 따라 상대오차가 증가하는 것을 알 수 있는데, 이는 필터 기공크기 16  $\mu\text{m}$ 에서 더욱 더 증가하는 것을 확인할 수 있다.

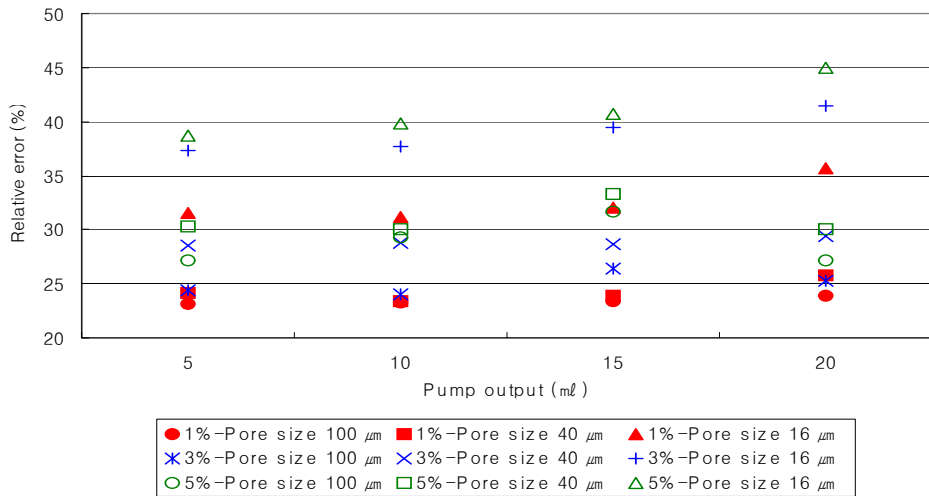


그림 3-83. 셀룰로즈 농도 및 필터기공 크기에 따른 펌프 토출량 상대오차(흡입수두 0 cm)

그림 3-84는 펌프 흡입수두 10 cm일 때 고형분 함량과 필터 기공크기 별 펌프 토출량의 상대오차를 나타낸 것으로, 펌프 송출량 20 ml에서 필터 기공 크기 16 μm, 고형분 함량이 5%일 때 48.82%로 가장 크게 나타났으며, 펌프 송출량 10 ml에서 필터 기공크기 100 μm, 고형분 함량이 1%일 때 23.25%로 가장 적게 나타났다. 펌프 흡입수두 0 cm일 때 펌프 토출량의 상대오차와 비교하면 고형분 함량 5%, 필터 기공크기 16 μm를 제외하고는 2 ~ 4%의 적은 차이를 나타내고 있다. 또한, 고형분 함량이 증가하고 필터 기공크기가 줄어들에 따라 상대오차도 증가하는 경향을 나타내었다.

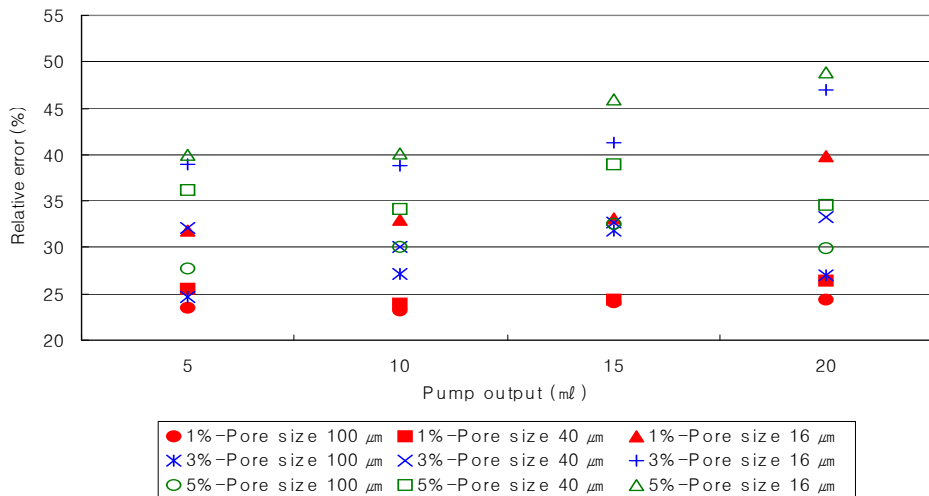


그림 3-84. 셀룰로즈 농도 및 필터기공 크기에 따른 펌프 토출량 상대오차(흡입수두 10 cm)

그림 3-85는 펌프 흡입수두 20 cm일 때 고형분 함량과 필터 기공크기 별 펌프 토출량의 상대오차를 나타낸 것으로, 펌프 송출량 20 ml에서 필터 기공 크기 16 μm, 고형분 함량이 5%일 때 54.96%로 가장 크게 나타났으며, 펌프 송출량 15 ml에서 필터 기공크기 100 μm, 고형분 함량이 1%일 때 26.28%로 가장 적게 나타났다. 펌프 흡입수두 0 cm, 10 cm일 때 펌프 토출량의 상대오차와 비교하면 고형분 함량 및 필터 기공크기에 관계없이 전 시험구별로 8 ~ 10%의 큰 차이를 나타내고 있다. 그리고, 펌프 흡입수두 30 cm일 때는 고형분 함량과 필터 기공크기에 관계없이 샘플용액이 토출되지 않았다. 이상 샘플용액 자동채취 및 여과장치를 구성하는 다이어프램 펌프의 작동상태를 확인하기 위해 펌프 토출량의 상대오차를 증류수를 사용하여 필터 기공크기, 고형분 함량, 펌프 흡입수두에 따라 검토한 결과, 상대오차는 펌프 흡입수두 20 cm, 필터 기공크기 16 μm일 때 가장 크게 나타났으며, 샘플용액 자동채취 및 여과장치를 구성할 때에는 펌프 흡입수두가 가장 중요한 요인임을 확인할 수 있었다.



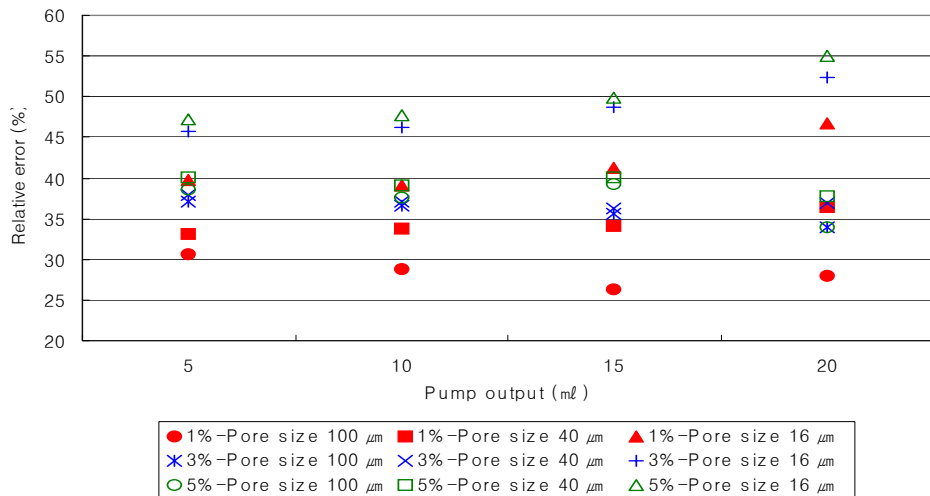


그림 3-85. 셀룰로즈 농도 및 필터기공 크기에 따른 펌프 토출량 상대오차(흡입수두 20 cm)

## 2) 농도비교

그림 3-86은 발효조 내 고형분 함량이 1%일 때 10분 동안 10 회에 걸쳐 여과장치를 통과한 포도당 용액 농도변화를 나타낸 것이다. 100 mM의 포도당 표준용액에서 여과 전후의 농도 오차는 최대 2.9%로 적게 나타났다. 100 mM의 포도당 표준용액을 여과시킨 후 순서대로 80 mM, 60 mM, 40 mM, 20 mM로 증류수를 이용하여 표준용액을 만들었다. 이 때 전 구간에 걸쳐 1분에서 5분 동안은 회석 전 단계 표준용액의 농도를 나타내다가 6분 이후부터는 회석시킨 표준용액의 농도를 나타내는 것을 알 수 있다. 이는 여과장치와 다이어프램 펌프와 연결된 관 내부에 전 단계의 표준용액이 충전 된 것이 측정되기 때문이다.

포도당 표준용액 80 mM, 60 mM, 40 mM, 20 mM일 때 6분 이후에 채취하여 측정된 샘플농도의 오차는 각각 3.6%, 3.8%, 2.8%, 4%로 적게 나타났다. 따라서 고형분 함량이 1%일 경우 발효조 내의 농도 변화에 따라 샘플용액을

채취할 때에는 5분 동안 채취된 용액을 방향절환 밸브를 이용하여 배출용기로 배출시킨 후 샘플을 채취하면 전 단계 샘플용액의 농도 영향을 받지 않음을 알 수 있다.

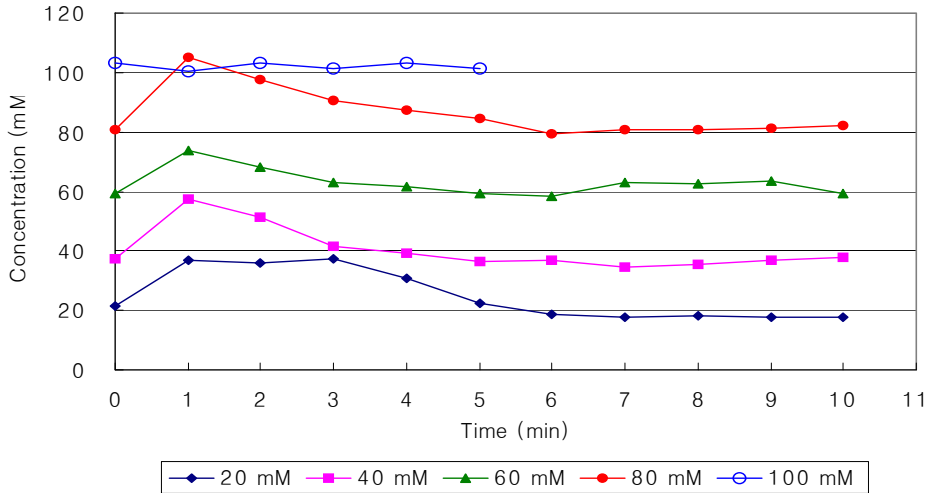


그림 3-86. 샘플용액 농도변화(셀룰로즈 농도 1%)

그림 3-87은 발효조 내 고형분 함량이 3%일 때 10 분 동안 10 회에 걸쳐 여과장치를 통과한 포도당 용액 농도변화를 나타낸 것이다. 100 mM의 포도당 표준용액에서 여과 전후의 농도 오차는 최대 4.8%로 적었지만 고형분 함량 1%일 때보다는 1.9% 높게 나타났다. 100 mM의 포도당 표준용액을 여과시킨 후 순서대로 80 mM, 60 mM, 40 mM, 20 mM로 증류수를 이용하여 표준용액을 만들었다. 이 때 80 mM은 7분, 60 mM은 8분, 40 mM은 5분, 20 mM은 8분 동안 회석 전 단계 표준용액의 농도를 나타내다가 그 이후부터 회석시킨 표준용액의 농도를 나타내었다.

포도당 표준용액이 80 mM, 60 mM, 40 mM, 20 mM일 때 표준용액 농도를 나타내는 시간 이후에 채취하여 측정된 샘플농도의 오차가 각각 4.8%,

3.2%, 4.0%, 3.0%로 적게 나타났다. 따라서 고형분 함량이 3%일 경우 발효조 내 농도 변화에 따라 샘플용액을 채취할 때에는 8분 동안 채취된 용액을 방향절환 밸브를 이용하여 배출용기로 배출시킨 후 샘플을 채취하면 전 단계 샘플용액의 농도 영향을 받지 않음을 알 수 있다.

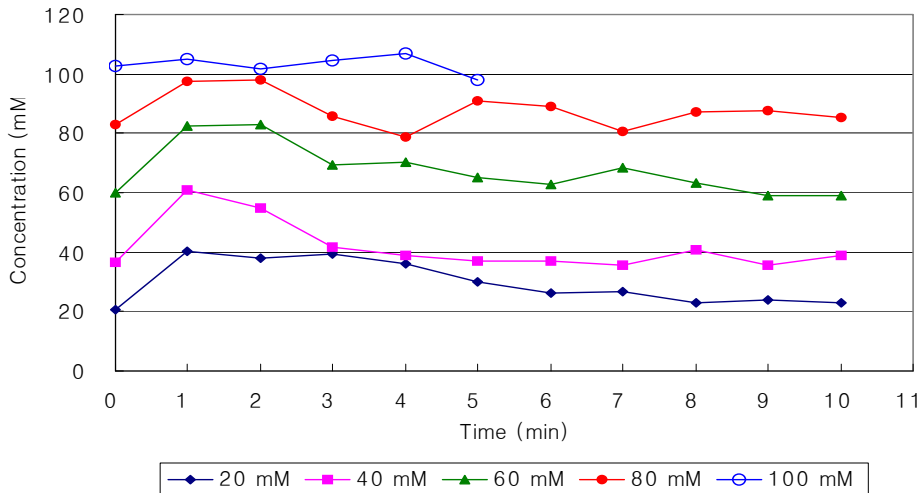


그림 3-87. 샘플용액 농도변화(셀룰로즈 농도 3%)

그림 3-88은 발효조 내 고형분 함량이 5%일 때 10 분 동안 10 회에 걸쳐 여과장치를 통과한 포도당 용액 농도변화를 나타낸 것이다. 100 mM의 포도당 표준용액에서 여과 전후에 따른 샘플농도의 오차는 2분이 경과 후에 채취된 용액을 제외하곤 최대 4.98%로 적게 나타났다. 100 mM의 포도당 표준용액을 여과시킨 후 순서대로 80 mM, 60 mM, 40 mM, 20 mM로 증류수를 이용하여 표준용액을 만들었다. 이 때 80 mM은 4분, 60 mM은 6분, 40 mM은 7분, 20 mM은 7분 동안 희석 전 단계 표준용액의 농도를 나타내다가 그 이후부터 희석시킨 표준용액의 농도를 나타내었다.

포도당 표준용액이 80 mM, 60 mM, 40 mM, 20 mM일 때 희석시킨

농도를 나타내는 시간 이후에 채취하여 측정된 샘플농도의 오차가 각각 7.0%, 4.8%, 3.9%, 3.3%로 80 mM을 제외하고는 적게 나타났다. 따라서 고형분 함량이 5%일 경우 발효조 내 농도 변화에 따라 샘플용액을 채취할 때에는 7분 동안 채취된 용액을 방향절환 밸브를 이용하여 배출용기로 배출시킨 후 샘플을 채취하면 전 단계 샘플용액의 농도 영향을 받지 않음을 알 수 있다.

이상 포도당 용액을 이용하여 여과전후의 시간의 변화에 따른 농도비교를 통한 샘플용액 채취 및 여과장치 성능 검증 결과 고형분 함량이 1%의 경우 최대 오차는 3.8%, 샘플용액 채취 가능시간은 6분 이후, 고형분 함량이 3%의 경우 최대 오차는 4.8%, 샘플용액 채취 가능시간은 8분 이후, 고형분 함량이 5%의 경우 최대 오차는 7.0%, 샘플용액 채취 가능시간은 8분 이후로 나타났으며, 고형분 함량이 증가함에 따라 농도의 오차 및 샘플용액 채취 가능시간도 증가함을 알 수 있었다. 따라서 적절한 샘플용액 채취 시간을 선택하고, 농도의 오차를 줄이기 위한 장치의 성능 개선이 이루어진다면 실제 적용 가능성이 충분하다고 판단된다.

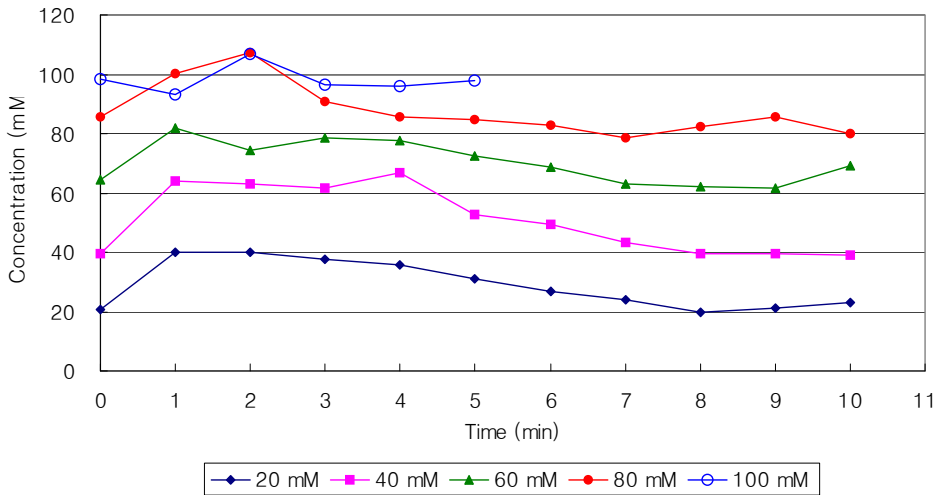


그림 3-88. 샘플용액 농도변화(셀룰로즈 농도 5%)

나. 포도주 제조 중 포도당 및 알코올 농도 측정

1) 장치 calibration

표 3-27은 발효 중 용액의 포도당과 알코올 농도를 측정하기 위해 포도당 표준용액(10, 20, 30 mM) 및 알코올 표준용액(1, 5, 10 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 흐름주입식 경우 측정할 때마다 표준용액으로 장치를 반드시 calibration 해야 함을 알 수 있다.

표 3-27 포도당 및 알코올 표준농도와 전류값 관계

측정회수 (시간)	포도당			알코올		
	기울기	절편	R <sup>2</sup>	기울기	절편	R <sup>2</sup>
1(12)	0.9033	11.9220	0.9962	2.2083	5.3226	0.9846
2(24)	0.7283	10.9000	0.9918	1.6451	4.4932	0.9902
3(48)	1.2150	12.3330	0.9984	1.5399	4.8319	0.9755
4(60)	0.7667	5.8337	1.0000	2.0646	3.5334	0.998
5(72)	0.7750	17.4220	0.9963	1.7945	2.0845	0.9977
6(84)	0.6550	13.4220	0.9999	1.4826	3.5039	0.9889
7(96)	0.5183	14.2010	0.9948	1.3448	3.5057	0.9847
8(108)	0.4983	14.6880	0.9773	1.6145	2.8008	0.9989
9(120)	0.6634	15.5330	0.9988	2.0648	5.2209	0.9982
10(132)	0.5300	12.4110	0.9937	1.4656	5.5832	0.9722

2) 농도 비교

그림 3-89는 포도주 발효 중 포도당 농도를 센서로 측정한 값과 HPLC로 측정한 값을 비교하여 나타낸 것이다. 그림에서 센서로 측정한 값은 샘플여과장치에서 기공크기 100  $\mu\text{m}$  필터로 여과된 고행분이 포함된 시료와 원심분리 후 기공크기 0.45  $\mu\text{m}$ 로 여과된 고행분이 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 3-91은 HPLC 측정값을 기준으로 환산한 센서 측정값의 상대오차를 나타낸 것으로 발효 후 72시간까지는 30% 이하로 나타났으나 그 이후에는 100% 이상으로 매우 크게 나타남을 알 수 있다. 다만 고행분이 완전히 여과된 시료의 상대오차는 고행분이 포함된 것보다 적게 나타났으나 오차 값은 50% 이상으로 역시 크게 나타났다. 포도주 발효 중 고행

분 형상은 초기 48 시간까지는 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.

그림 3-90은 포도주 발효 중 알코올 농도를 센서로 측정된 값과 GC로 측정된 값을 비교하여 나타낸 것이다. 알코올 농도는 포도당의 경우 반대로 발효가 진행됨에 따라 점차 증가하다가 발효 후 60시간 이후부터 급격하게 증가하는 것을 알 수 있으며 발효 초기에는 센서 측정값이 GC 측정값보다 낮게 나타나다가 발효가 본격화되는 60 시간 이후부터는 GC 측정값이 센서 측정값보다 크게 나타나는 것을 알 수 있다. 그림 3-92는 GC 측정값을 기준으로 환산한 센서 측정값의 상대오차를 나타낸 것으로 발효초기 24 시간까지는 GC 측정값이 작아서 500% 이상으로 크게 나타났으며 그 이후에는 60% 이하로 나타났다. 이처럼 알코올 농도가 증가함에 따라 상대오차가 증가하는 이유는 알코올 농도 증가에 따른 희석비가 증가되었기 때문으로 판단된다. 발효 후 60 시간까지 희석비는 1/40 이하였으며 그 이후에는 1/100 이상으로 증가되었고 특히 마지막에는 1/165까지 희석비가 증가되었다. 이처럼 희석비가 증가되는 이유는 장치 calibration 시 표준농도에서 나타나는 전류값 범위로 시료의 전류값을 조절해야 하기 때문이다. 따라서 희석 시 발생하는 오차가 전체 농도 측정값에 큰 영향을 미치게 된다.

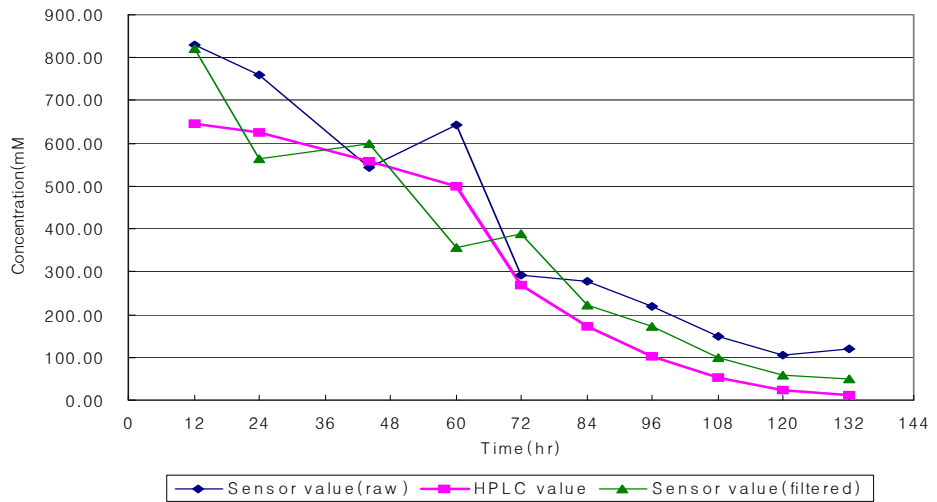


그림 3-89. 포도주 발효 중 포도당 농도변화.

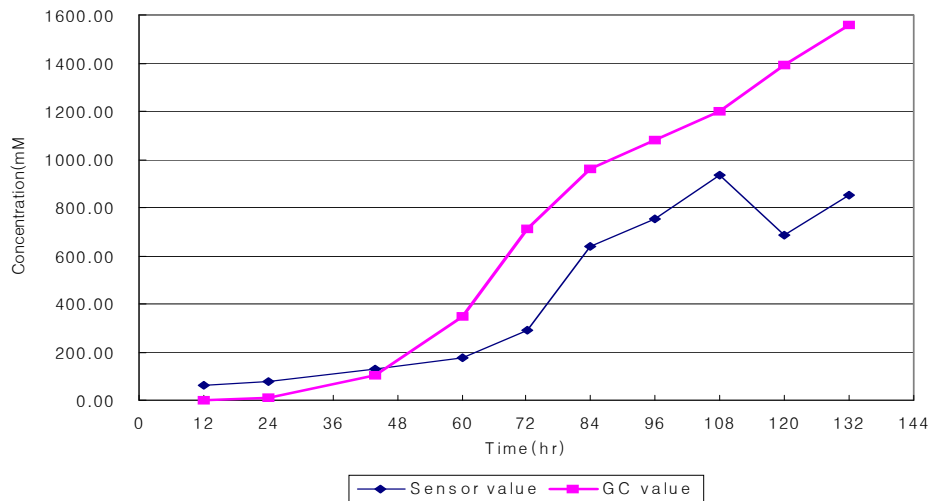


그림 3-90. 포도주 발효 중 알코올 농도변화.



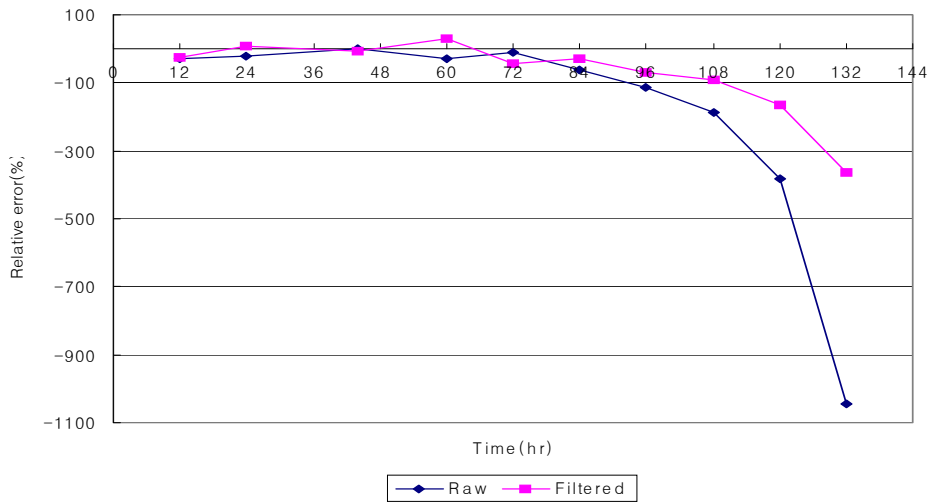


그림 3-91. 포도당 농도 상대오차.

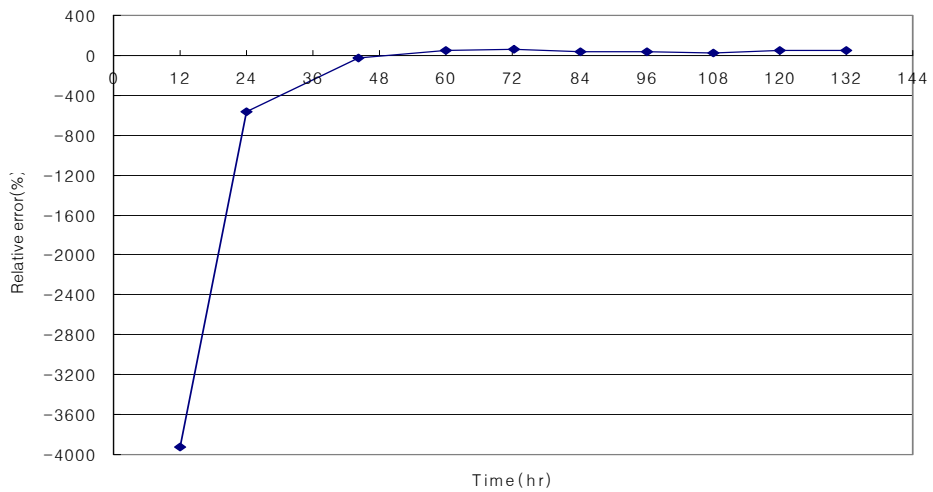


그림 3-92. 알코올 농도 상대오차.

다. 동치미 제조 중 젖산 농도 측정

1) 장치 calibration

표 3-28은 발효 중 용액의 젖산 농도를 측정하기 위해 젖산 표준용액 (0.1, 0.5, 1.0 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 있으며, 포도당 및 알코올의 경우보다 기울기 편차가 크게 나타남을 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 흐름주입식 경우 측정할 때마다 표준용액으로 장치를 반드시 calibration 해야 함을 알 수 있다.

표 3-28 젖산 표준농도와 전류값 관계

측정회수 (시간)	젖산		
	기울기	절편	R <sup>2</sup>
1(12)	50.377	0.0656	0.992
2(24)	18.145	3.0008	0.9992
3(36)	17.44	4.2434	0.9894
4(48)	20.762	5.0938	0.9778
5(60)	18.768	3.4682	0.99
6(72)	21.033	4.2822	0.9966
7(84)	18.386	4.1275	0.97
8(96)	16.202	2.3367	0.9745

2) 농도 비교

그림 3-93은 동치미 발효 중 젖산 농도를 센서로 측정한 값과 HPLC로 측정한 값을 비교하여 나타낸 것이다. 포도주 발효와는 달리 발효가 진행됨에

따라 젖산 농도가 꾸준히 증가하는 것을 알 수 있으며, 센서로 측정한 값과 HPLC로 측정한 값이 매우 큰 차이를 나타내는 것을 알 수 있다. 그림 3-94는 HPLC 측정값을 기준으로 환산한 센서 측정값의 상대오차를 나타낸 것으로 전 구간에서 걸쳐 80% 이상의 큰 차이를 보였다. 이는 장치 calibration 시 전류값의 직선성을 나타내는 농도 구간이 0.1 ~ 1.0 mM로 포도당 10.0 ~ 30.0 mM 및 알코올 1.0 ~ 10.0 mM에 비해 아주 좁게 나타났기 때문으로 판단된다.

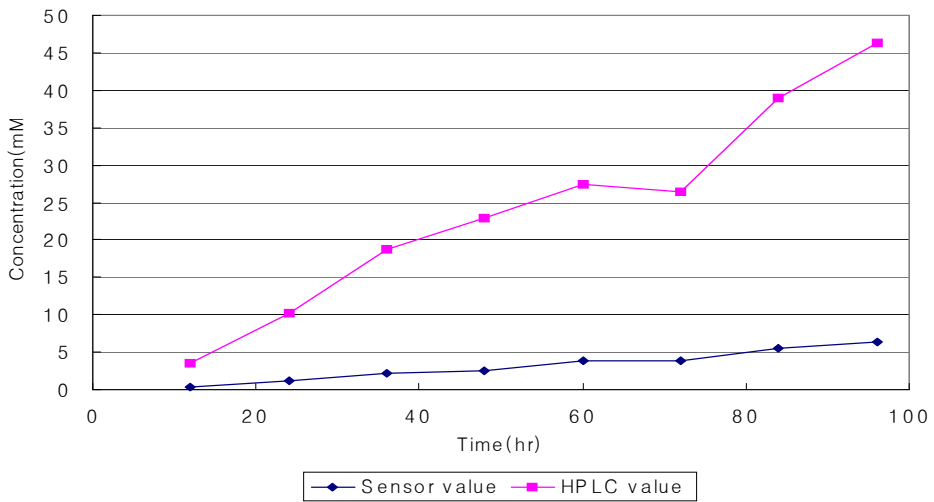


그림 3-93. 동치미 발효 중 젖산 농도변화.

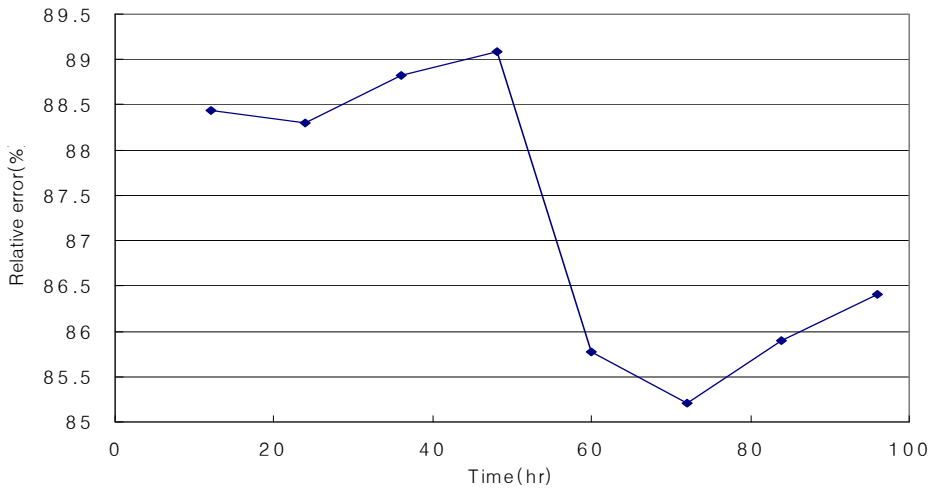


그림 3-94. 젖산 농도 상대오차.

#### 4. 결론

기존의 시료 채취를 위한 샘플링 장치에서 발생하는 문제점을 해소하기 위해 발효공정의 온라인 감시를 위한 바이오센서 개발에 반드시 필요한 기질용액 채취 및 여과장치를 개발하여, 화학분석에서 시행되는 관행의 방법을 이용하여 그 성능을 평가하였다. 필터 기공크기, 고형분 함량, 펌프 흡입수두에 따라 증류수를 사용하여 펌프 토출량을 검토한 결과, 상대오차는 필터 기공크기 16  $\mu\text{m}$ , 펌프 흡입수두 20 cm일 때 가장 크게 나타났으며, 그 외의 실험조건에서는 안정적으로 작동되는 것을 확인하였다. 다만, 흡입수두 30 cm에서는 실험조건에 관계없이 토출이 불가능하였다. 포도당과 증류수를 사용하여 여과장치를 통과한 후 농도변화를 실험한 결과, 시간이 지남에 따라 샘플용액 농도는 표준용액의 농도에 수렴하는 것으로 나타났으며, 최대 오차 및 샘플용액 채취 가능시간은 고형분 함량이 1%의 경우 3.8%, 6분, 고형분 함량이 3%의 경우 4.8%, 8분, 고형분 함량이 5%의 경우 7.0%, 8분으로 나타났다. 이상 작동상태와 시간에 따른 농도변화를 검토한 결과 개발된 샘플용액 자동 채취 및 여과 장치는 발효조 내 샘플 채

취장치로 사용가능함을 확인할 수 있었다. 다만, 발효조 내 다양한 생성물(고점도, 미세분말) 등에 대한 실제 적용 실험이 추가되어야 할 것으로 판단된다.

발효공정 온라인 감시를 위한 센서장치를 구성하고 포도주와 동치미 제조 중 포도당, 알코올, 젖산 농도를 측정하고 HPLC 및 GC를 사용하여 성능을 검증한 결과, 장치 calibration, 고형분 농도, 희석비율 증가 등의 요인으로 포도당의 경우 약 30%, 알코올의 경우 약 60%, 젖산의 경우 약 80% 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.

## 제 4 절 종합결론

흐름주입식 바이오센서는 연속적인 흐름을 유지하는 완충용액 중에 효소와 반응대상물(기질)을 투입하여 반응 결과 발생하는 과산화수소의 농도를 전위차나 전류값으로 측정하여 반응대상물의 농도를 측정하는 방법이다. 하지만, 생물반응에 관여하는 특정 기질이나 생성물의 농도를 실시간, 온라인으로 감시하기 위해서는 효소 반응을 이용한 흐름주입식 전류측정장치를 이용해야만 하는데, 기존에 사용되는 효소 고정막을 이용한 전극봉 측정장치는 측정회수에 따라 측정 오차가 발생하는 문제점을 내포하고 있으며, 여러 성분을 동시에 측정하는 경우 다수의 전극봉을 사용해야하기 때문에 이로 인한 측정 전류 값의 변동 등 센서 성능 안정성에 문제가 있다.

따라서 1차 년도에는 흐름주입식 바이오센서의 구성요소인 완충용액의 유속변화, 펌프의 작동에 의해 발생하는 맥동 및 공기방울, 효소·기질의 반응 체적비, 전류 측정 장치의 전극봉의 크기 및 형상에 따른 전류값 특성을 파악하였고, 2차 년도에는 이를 이용하여 온라인으로 농도의 감시를 위해 펌프의 체취 및 여과장치, 희석장치, 센서장치를 개발하고, 상업용 시료를 이용하여 성능시험을 실시하였다. 3차 년도에는 발효공정 온라인 감시용 센서장치를 구성하고 포도주와 동치미 제조 중 포도당, 알코올, 젖산의 농도를 측정하여 그 성능 및 현장 적용성을 평가하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 흐름주입식 바이오센서의 전류측정 장치 개발을 위해 전극봉의 크기와 유속에 따른 전류값을 측정하였다. 과산화수소수를 사용한 실험 결과 전류값은 전극봉 크기와 관계없이 유속 0.17 cm/s에서 최대 전류값을 나타냈다. 기질과 효소를 사용한 실험 결과 전류값은 유속이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나, 과산화수소수와는 달리 유속이 느릴수록 기질과 효소의 반응시간이 길어져서 높게 나타났다. 작동시간과 전류값 변화를 기준으로 각 전극봉에서 적정 유속은 전극

봉 직경 1.0 mm의 경우 0.10 cm/s~0.26 cm/s, 1.4 mm의 경우 0.12 cm/s~0.24 cm/s, 2.4 mm의 경우 0.10 cm/s~0.25 cm/s, 3.4 mm의 경우 0.05 cm/s~0.10 cm/s의 구간으로 판단되었다.

2. 배치식 장치에서 발생 가능성이 큰 공기방울의 경우 발생 위치에 관계없이 센서 성능에 큰 영향을 미치는 것으로 나타나 유로 내 공기 배출 장치가 필요한 것으로 확인되었다. 연속식 장치에서 나타나는 맥동 역시 센서 성능에 큰 영향을 미치는 것으로 나타나 완충용액 유속 선택 시 주의해야 할 것으로 확인되었다. 반복 및 장시간 측정에 따른 실험 결과 반복 간 및 장시간 사용에 따른 전류값의 변화는 배치식과 연속식 모두 큰 차이를 나타내지 않아 온라인 측정 가능성을 확인할 수 있었다.

3. 기질·효소 간 반응시간이 길어짐에 따라 예상과는 달리 혼합과 희석에 따른 문제로 전류값이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 기질·효소 간 반응시간은 센서 작동시간을 고려하여 적절한 길이를 선정할 필요가 있음을 알 수 있었다. 반응 체적 비를 달리한 실험결과 기질과 효소는 동일 체적으로 혼합해야 됨을 알 수 있었다. 전극봉 단면적에 따른 실험결과 유속이 0.1 cm/s 이하에서는 단면적에 비례하여 전류값이 크게 나타났으나 그 이상의 유속에서는 차이를 보이지 않았다. 전극 간 거리에 따른 실험 결과 거리가 적을수록 전류값이 크게 나타났으나, 전극봉을 평행으로 배치한 경우는 거리에 따른 전류값 차이는 나타나지 않았다. 전극봉 배치 형상은 교차형으로 해야 함을 알 수 있었다.

4. 적정 완충용액 구명 실험 결과 효소활성도는 완충용액 종류보다는 산도에 많은 영향을 받았으며, 산도 7.0인 인산염 용액의 경우 알코올효소를 제외하고 나머지 효소에 사용 가능함을 알 수 있었다. 효소 농도의 경우 자당효소를 제외한 나머지는 50 units/ml로 희석 사용하는 것이 가능하였다. 기질·효소 간 사용체적 비 실험 결과 동일 체적으로 사용해야 함을 알 수 있었다. 효소 혼합 사

용가능성 실험 결과 자당효소, 카탈라제는 혼합사용이 불가능 하였고 포도당효소, 젓당효소, 알코올효소는 혼합사용이 가능함을 알 수 있었다.

5. 다이아프램식 진공펌프를 사용하여 발효조 내의 샘플을 채취하는 것이 가능한 것으로 판단되며, 발효공정 특성상 고형분이 혼합될 가능성이 있으므로 필터는 펌프 흡입부에 설치해야 되고, 이 경우 흡입부 유로의 길이는 최대 1000 mm까지 가능한 것으로 예상되었다. 필터의 규격은 0.45  $\mu\text{m}$ 의 사용이 가능함을 알 수 있었으며, 이 규격은 HPLC 샘플용액의 여과규격으로 발효공정의 여과장치에 적용이 가능함을 확인할 수 있었다. 다만 발효조의 크기가 클 경우 여러 곳에서 샘플링이 필요한 경우는 흡입 압력이 큰 원심식의 진공 펌프 사용이 필요한 것으로 판단되었다.

6. 희석장치는 샘플링간 오차 및 상대오차를 기준으로 볼 때 실제 적용이 가능할 것으로 판단되었으며, 오차를 줄이기 위해 희석비율은 크게, 희석에 사용되는 기질용액의 체적은 크게 하는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

에탄올의 경우 희석 시 대기에 일정시간 노출 될 경우 농도의 오차가 심각해질 우려가 있으므로 기밀유지에 노력을 기울여야 할 것으로 판단된다.

7. 센서장치를 구성하여 실험한 결과 유속에 관계없이 일정 농도 이상에서는 전류값이 증가하지 않음을 알 수 있었고, 동일 농도에서 유속이 적을수록 전류값이 높게 나타남을 알 수 있었다. 흐름주입식 센서로의 적용 가능성을 농도변화에 따른 전류값 변화량, 측정시간을 기준으로 볼 때 전극봉 직경 1.0 mm의 경우가 가장 효과적으로 판단되었다. 그리고 센서장치의 성능검증 결과는 오렌지 주스와 소주의 상대오차는 5%이내에 있었으나, 포도 주스와 요구르트는 심각한 오차를 나타내어 지속적인 반복실험이 요구된다.



8. 기존의 시료 채취를 위한 샘플링 장치에서 발생하는 문제점을 해소하기 위해 발효공정의 온라인 감시를 위한 바이오센서 개발에 반드시 필요한 기질용액 채취 및 여과장치를 개발하여, 화학분석에서 시행되는 관행의 방법을 이용하여 그 성능을 평가한 결과. 시간이 지남에 따라 샘플용액 농도는 표준용액의 농도에 수렴하는 것으로 나타났으며, 최대 오차 및 샘플용액 채취 가능시간은 고형분 함량이 1%의 경우 3.8%, 6분, 고형분 함량이 3%의 경우 4.8%, 8분, 고형분 함량이 5%의 경우 7.0%, 8분으로 나타나 개발된 샘플용액 자동 채취 및 여과 장치는 발효조 내 샘플 채취장치로 사용가능함을 확인할 수 있었다. 다만, 발효조 내 다양한 생성물(고점도, 미세분말) 등에 대한 실제 적용 실험이 추가되어야 할 것으로 판단된다.

9. 발효공정 온라인 감시를 위한 센서장치를 구성하고 포도주와 동치미 제조 중 포도당, 알코올, 젖산 농도를 측정하고 HPLC 및 GC를 사용하여 성능을 검증한 결과 100% 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.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연도별 연구목표 및 평가 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도(점수)
1차년도(2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 주입 장치 개발</li> <li>○ 효소-기질 반응 장치 개발</li> <li>○ 전류 측정 장치 개발</li> <li>○ 적정 반응 조건 구명</li> </ul>	<p>30</p> <p>20</p> <p>20</p> <p>30</p>
2차년도(2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 샘플 채취 및 여과 장치 개발</li> <li>○ 샘플 희석 장치 개발</li> <li>○ 자동화 및 운영 체제 개발</li> <li>○ 온라인 측정 성능</li> </ul>	<p>30</p> <p>30</p> <p>10</p> <p>30</p>
3차년도(2006)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 센서 장치 구성</li> <li>○ 장치 calibration</li> <li>○ 공정 온라인 감시성능</li> </ul>	<p>50</p> <p>10</p> <p>40</p>
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 요소 기술 개발</li> <li>○ 온라인 측정 센서 개발</li> <li>○ 발효 공정 감시 성능</li> </ul>	<p>30</p> <p>30</p> <p>40</p>

## 제 2 절 연구개발 목표 달성도 및 관련분야 기여도

### 1. 요소 기술 개발

#### 가. 목표 달성도

1년차 목표인 요소기술개발에서 주사기 펌프를 사용한 배치식과 다이아프램 펌프를 사용한 연속식 주입장치를 개발하고 장치별 특성 및 성능을 검증하였다. 효소·기질의 반응 시간 및 반응 체적 비에 따른 전류값 특성을 분석하여 효소·기질 혼합 후 튜브 길이, 내경, 형상에 대한 요인을 파악하였다. 전극봉 단면적, 전극봉 간격, 전극봉 설치 형상에 따른 전류값 특성을 분석하여 1회 측정 시간(cycle time)을 고려한 전류 측정 장치의 규격 및 형상을 파악하였다. 완충용액 종류, pH, 효소농도, 혼합 효소액에 대한 특정효소 활성도를 측정하여 각 기질 별 사용가능한 완충용액 종류, 효소농도를 파악하였다.

#### 나. 기여도

주사기 펌프를 사용하여 연속적으로 완충용액을 공급하는 주입장치는 연속식 펌프에서 나타나는 맥동에 의한 문제를 해결한 것으로 **독창성 및 장치구성의 경제성 측면**에서 타 분야의 연구에 많은 기여를 할 것으로 생각된다.

### 2. 온라인 감시용 측정 장치 개발

#### 가. 목표 달성도

2년차 목표인 온라인 감시용 측정 장치 개발에서 온라인 감시를 위해 반드시 자동화 되어야 하는 샘플 채취 및 여과장치를 개발하고 수두 및 고형분 함량에 따른 펌프 토출량 변화특성을 파악하고, 포도당 용액을 사용한 토출농도 변화를 측정하여 그 성능을 검증하였다. 전류값으로 농도를 측정하는 형태의 효소센서에서 큰 농도 폭에 따른 전류값 변화에 대응하기 위해 필요한 샘플 자동 희석 장치를 개발하고 희석 비율에 따른 희석 전·후 용액 중량, 포도당, 젖산 및 에탄올 용액을 사용한 희석농도를 비교하여 그 성능을 검증하였다. 개발된 샘

플용액 채취 및 여과장치, 자동희석 장치를 사용한 센서장치를 이용하여 상업용 시료인 오렌지 쥬스, 포도 쥬스, 유산균 발효유, 소주의 포도당, 젖산, 에탄올 농도를 측정하고 이를 HPLC와 GC 측정값과 비교하여 장치 성능을 검증하였다.

#### 나. 기여도

2대의 주사기 펌프를 사용하여 희석비율에 따라 자동으로 용액을 희석시키는 희석장치는 관행의 화학분석법에서 손으로 수행되던 것을 자동화 한 것으로 **성능 및 장치구성의 경제성 측면**에서 타 분야의 연구에 많은 기여를 할 것으로 생각된다.

### 3. 발효공정 감시용 센서장치 구성

#### 가. 목표 달성도

연구의 최종 목표인 발효공정 감시용 센서장치 구성에서 발효장치 및 1, 2년차에서 개발된 센서장치를 일체형으로 구성하고 포도주 및 동치미를 제조하는 과정에서 알코올, 포도당 및 젖산의 농도를 측정하고 HPLC 및 GC를 사용한 측정값과 비교하여 장치 성능 및 사용 가능성을 검증하였다.

#### 나. 기여도

기질과 효소액을 직접 반응시켜 발효 중 농도를 측정하는 방식 및 발효조와 일체형으로 구성된 센서장치는 원리의 독특함과 공정의 온라인 감시에 반드시 필요한 방법적 시급성에 비추어 볼 때 매우 관련 분야의 후속연구에 많은 영향을 끼칠 것으로 판단된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 활용계획

#### 1. 상품화 기술 개발

- 요소기술개발에서 구명된 전극봉 지름, 배치형상, 완충용액 유속을 고려한 전류측정 장치를 일체형으로 개발함
- 샘플채취 및 여과장치, 용액 자동회석 장치를 일체형으로 개발함
- 발효 및 미생물 배양 공정 감시용 온라인 센서장치를 개발함

#### 2. 타 연구에의 응용

- 세균 개체 수 측정용 바이오센서 장치 개발에 샘플 채취 및 회석장치 적용
- 잔류농약 측정용 바이오센서 장치에 적용
- 바이오 펄프 공정에서 cellulase 농도 검출용 센서 개발에 적용
- 감식초 제조용 공정에 산농도 측정에 적용

#### 3. 사업화 방안

- 발효조 생산 업체 등과 연계한 공동 연구 추진으로 센서의 현장 적용성을 검증하여 사업화를 추진함
- 상품화 방안에서 개발된 요소기술을 관련 업체에 홍보 및 검증 실험을 통하여 사업화를 추진함

### 제 2 절 추가연구 필요성

현재까지 연구된 내용은 발효공정 온라인 감시용 기질 농도 측정 장치를 구성하는 것으로 그 가능성 여부를 파악한 것이었다. 따라서 현장 적용을 위해서는 장치의 정밀도와 관련된 문제점을 구체적으로 파악하고, 이를 해결할 방안에 대한 보다 심층적인 연구가 필요하다. 또한 온라인 감시의 목적이 정확한 공정변수의 제어로 최적의 생산물을 얻기 위함에 있는 것처럼 발효 공정 최적화가 필요

한 생산물(미생물 발효, 바이오 펄프, 감식초 등 고기능성 식품생산)의 공정을 대상으로 하는 공정제어 및 최적화에 대한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

## 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

연구수행 중 흐름주입식 센서 개발에 관한 새로운 논문은 없었다. 다만 장치 구성과 관련되어 새롭게 개발된 제품에 대한 자료는 다음과 같다

### 1. 완충용액 연속 공급 장치

4개의 연동펌프를 사용하여 연속적으로 완충용액, 기질, 용매를 선택적으로 공급하는 장치로 연동펌프의 단점인 맥동을 제거한 장치. 본 연구에서 개발된 완충용액 공급 장치와 유사한 장치로 완충용액 공급, 기질 및 용매 투입, 혼합 등의 공정을 동시에 수행 할 수 있는 장점이 있다. 상세한 형상은 그림 6-1과 같다.

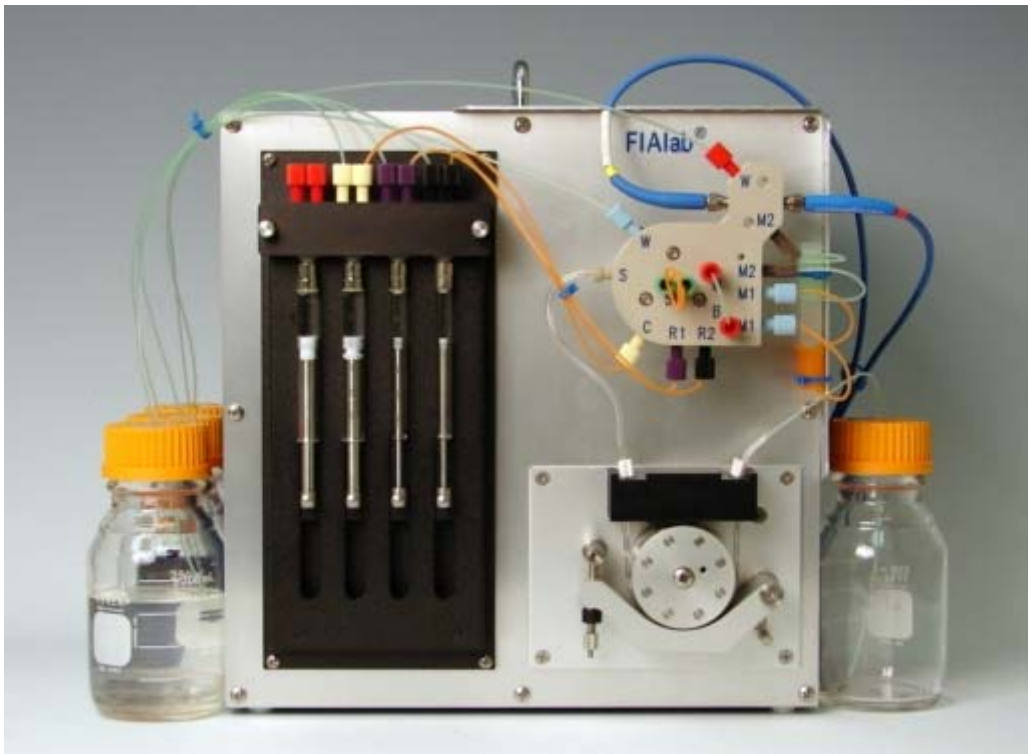


그림 6-1. 완충용액 연속 공급 장치

## 2. 용액순차주입장치(SIA, Sequential Injection System)

흐름주입식 센서장치에서 해결해야 할 문제 중 하나인 기질, 효소 용액을 튜브 내에서 완전하게 혼합 시켜주는 장치로, 다 수의 단면적을 갖는 유로를 형성하여 관로 내로 투입된 용액을 완전하게 혼합시켜주는 기능을 갖는다. 따라서 자동희석 장치 및 인젝션 밸브 다음에 설치를 하여 용액을 혼합시키는 데 유용하게 사용될 것으로 생각된다. 상세한 형상은 그림 6-2와 같다.

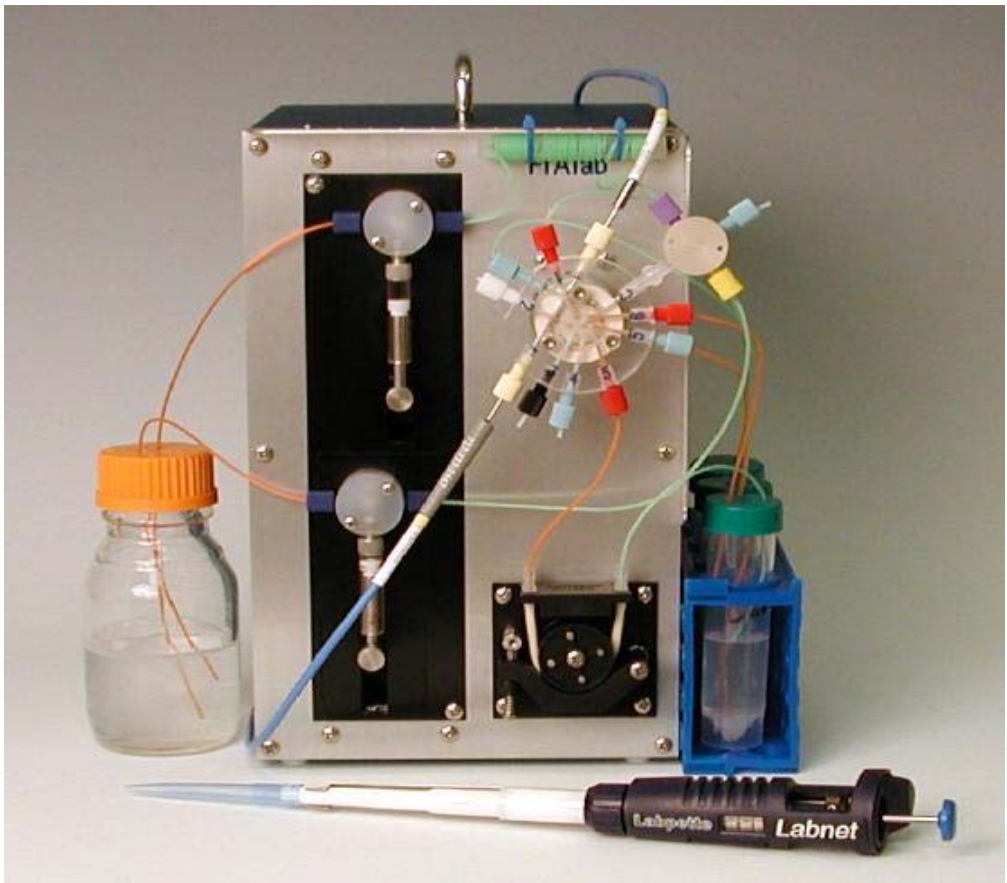


그림 6-2. 용액순차 주입장치



## 제 7 장 참고문헌

1. 산업연구원. 2002. 생물·의약산업의 발전전략.
2. Vander Pol, J. J., C. D. Degooijer, M. B. C. Wandrey and J. Tramper. 1996. Automation of selective assays for on-line bioprocess monitoring by flow-injection analysis. TIBTECH. 14:471-477.
3. Tuner, A. P. F., I. Karube and G. S. Wilson. 1987. Biosensor : Fundamentals and Applications, Oxford Univ., Press, Oxford.
4. 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.
5. Karlberg, B. and G. E. Pacey. 1989. Flow Injection Analysis-A Practical Guide. Elsevier Sci. Pub. Co., Inc.
6. Schugerl, K., B. Hitzmann, H. jurgens, T. Kullick, R. Ulber and B. Weigal. 1996. Challenges in intergrating biosensors and FIA for on-line monitoring and control. TIBTECH. 14:21-31.
7. Hall, E. A. H. 1991. Current opinion in Biotechnol. 2:3.
8. Garn, M., M. Gisin, C. Thommen and P. Cevey. 1989. Biotechnol. Bioeng. 34:423.
9. Valero, F., M. Lafuente, C. Sola, A. N. Araujo and J. L. F. C. Lima. 1990. Biotechnol. Bioeng. 36:647
10. Updike, S. J. and G. P. Hicks. 1967. The enzyme electrode. Nature 214(92):986-988.
11. Werasak, S., W. Supinda, S. Pornpimol, T. Morakot and K. Krissanapong. K. 1999. Dual electrode signal-substracted biosensor for simultaneous flow injection determination of sucrose and glucose. Analytica Chimica Acta. 380:7-15.

12. Weigel, B., B. Hitzmann, G. Kretzmer, K. Suhugerl, A. Huwig and F. Giffhorn. 1996. Analysis of various sugars by means of immobilized enzyme coupled flow injection analysis. *Journal of Biotechnology*. 50:93-106.
13. Gaspar, S., W. Xiaowen, S. Hiroaki and C. Elisabeth. 2004. Amperometric biosensor-based flow-through microdetector for microdialysis applications. *Analytica Chimica Acta*. 525:75-82.
14. Kiyoshi, M., K. Hideaki, M. Hiroaki and O. Yutaka. 1988. Simultaneous determination of glucose, fructose and sucrose in mixtures by amperometric flow injection analysis with immobilized enzyme reactors. *Analytica Chimica Acta*. 60:147-151.
15. 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.
16. White, S. F., I. E. Tohill, 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.
17. Schuhmann, W., H. Wohlschlager, J. Huber, H. L. Schmidt and H. Stadler. 1995. Development of an extremely flexible automatic analyzer with integrated biosensore for on-line control of fermentation processes. *Analytica Chimica Acta*. 315:113-122.
18. Min, R. W., V. Rajendran, N. Larsson, L. Gorton, J. Planas and B. H. Hagerdal. 1998. Simultaneous monitoring of glucose and L-lactic acid during a fermentation process in an aqueous two-phase system by on-line FIA with microdialysis sampling and dual biosensor detection. *Analytica Chimica Acta*. 366:127-135.

19. Compagnone, D., M. Esti, M. C. Messia, E. Peluso and G. Palleschi. 1998. Development of a biosensor for monitoring of glycerol during alcoholic fermentation. *Biosensors & Bioelectronics*. 13:875-880.
20. Becker, M. and U. Spohn. 1998. A new method to determine enzyme activities in two-phase systems by flow injection analysis(FIA). *Biosensors & Bioelectronics*. 13:925-930.
21. Rajendran, V. and Irudayaraj, J. 2002. Detection of glucose and lactose in milk with a microdialysis-coupled flow injection amperometric sensor. *J. Dairy Sci.* 85:1357-1361
22. Rhee, J. I. 1998. On-line monitoring of glucose and acetate by flow-injection analysis in *Escherichia coli* fermentation process. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* Vol. 13(3):244-250.
23. 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.* Vol. 30(1):22-34.
24. 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.* Vol. 28(5):974-980.
25. Kim, H. K. and B. S. Noh. 2002. Optimization of Sikhe processing using the obtained data by biosensor. *Korean J. Food Sci. Technol.* Vol. 34(1):65-72.
26. Song, D. B. and J. Irudayaraj. 2003. Measurement of glucose concentration using  $\mu$ FIA biosensor. *J. of KSAM.* Vol. 28(5):465-468.
27. Francis, P. S., S. W. Lewis, K. F. Lim, K. Carlesson and B. Karlberg. 2002. Flow analysis based on a pulsed flow of solution: theory, instrumentation and applications. *Talanta.* 58:1029-1042.
28. Weeks, D. A. and K. S. Johnson. 1996. Solenoid pumps for flow injection analysis. *Anal. Chem.* 68:2717-2719.

29. Vijayakumar, A. R. 1998. Amperometric Carbon Paste Biosensors Based on Horseradish Peroxidase and Oxidases. Ph. D. Thesis. Lund University, Sweden.
30. Kriz, D., C. Berggren, A. Johansson and R. J. Ansell. 1998. Sire-technology. Part I .amperometric biosensor based on flow injection of the recognition element and differential measurements. *Instrumentation Sci. & Tech.*, 26(1):45-57.
31. Habech. A. F. S. A. 1972. *Method in Enzymogy*, Academic Press, New York. Vol. 25, 457-464.
32. Dols. M., M. Remaud-Simeon and P. F. Monsan. 1997. Dextranucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Comparison with *L. mesenteroides* NRRL B-512F. *Enzyme Microb. Techonol.*, 20:523-530.
33. Nam, S. W., K. Yoda and M. Yamasaki. 1993. Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cervisiae*. *Biotechnol. Leet.* 15. 1049-1054.
34. Worthington, C. S. and V. Teller. 1972. In *Worthington Enzyme Mabual*. Frcchold, New Jersey. P.42-44.
35. Majkic-singh, N. and I. Berkes. 1980. Spectrophotometric determination of ethanol by an enzymatic method with 2,2-azino-di(3-ethyl-benz-thiazoline-6-sulfonate). *Anal. Chim. Acta*, 155:401.
36. Fuji, T., T. Murakami. A. Ando and M. Yabuki. 1984. Effect of methanol concentration on levels of Methanol dissimilating enzymes in *Candida* sp. N-16. *Agric. Biol. Chem.*, 48:1913.
37. Havar, A. and N. A. Mchale. 1987. *Plant Physiol.*, 84:450.
38. Beers, R. E. and W. S. Irwin. 1954. *J. Biol. Chem.*, 231, 133.