

## 固定化 酵母를 利用한 Ethanol 醱酵

A Study on Ethanol fermentation by Immobilized yeast.

李 漢 昌\*  
Lee, Han Chang

### Abstract

A Study for ethanol fermentation with immobilized yeast that is entrapped to Ca-alginate beads and batch system was carried out using molasses as substrate.

The results are as follows.

1. The yield of alcohol fermentation is more efficacious than that of conventional fermentation process. The beads were used 15 times and got a result of fermentation yield rate 89.57%~92.35%, which is comparable with the rate of 86.3% gained from the conventional fermentation process.
2. The concentration of Ca-alginate was 1~5% For long run use (2520 hours) it is necessary 2% or more concentration of Ca-alginate.
3. The amount of the yeast cells for entrap to Ca-alginate beads was required 1.0g (in dried material) or more for 200g Ca-alginate beads.

### 1. 서 론

最近 地球上의 에너지 수급밸런스는 産油國의 원유가격 戰略의 수정이나 先進工業國들의 에너지 대책의 研究 등 여러 要因에 의하여 약간완화된 상태이나 中長期的으로 보면 石油資源의 有限性和 우리나라의 에너지자원의 빈곤성으로 볼때 대체 에너지 開發에 대한 研究는 絶대로 必要하다 하겠다.

石油代替 에너지는 原子力, 天然가스, 石炭, 및 Biomass 등이 있으나 이 중에서 Biomass 는 太陽에너지에 의한 産物로서 영원히 연속성이 있는 유일한 代替에너지자원이라 할수 있다. FAO

의추정<sup>1)2)</sup>에 의하면 一年間에 生産되는 Biomass 는 Ethanol로 전환했을 때 7억 3천만 kl에 해당된다 하였다.

우리나라의 Biomass 전환利用面을 보면 고구마 등의 전분질이 利用되어 ethanol化되고 있으나 이 全量이 酒類用으로 消費되고 있는 實情이다.

그런데 外國의 例<sup>3)4)</sup>를 보면 미국, 브라질을 위시한 諸國에서 Biomass에서 전환된 ethanol을 휘발유와 混合使用하는 研究가 활발하다.

Biomass의 ethanol 전환은 주로 酵母에 依存하는 것이 現實인데 醱酵率이나 그 速度 등을 改善하기 위하여 酵母를 適當한 擔體에 固定하여 연속적으로 使用하는 研究<sup>5)~10)</sup>가 활발하다.

\* 産業應用技術士(食品製造加工). 理博·慶熙大學校 食品加工學科.

本研究에서도 固定化酵母法에 의한 ethanol 발효의 기초적인 몇가지를 검토하였으므로 보고 코저 한다.

## 2. 材料 및 方法

### (1) 培地

種酵母를 培養하기 위한 培地나 ethanol 醱酵用 培地는 다같이 國產糖蜜을 利用하였으며 그 總糖含量은 48.3%(w/w)였다.

種培養用으로는 水道水와 N/10 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 利用하여 總糖이 8%되게, PH는 4.5가 되게 調整 하였으며 醱酵用培地로는 마찬가지로 하여 總糖이 9.5%되게 調整하였으며 여기에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.08g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.17g/l 를 醱酵助成劑로서<sup>13)</sup> 添加하였다.

容器는 500ml 容의 三角플라스크를 썼으며 種培養培地는 200ml, 醱酵用 培地는 350ml 씩 注入하고 121°C 15分 殺菌하였다.

### (2) 菌株

本研究에서 使用한 菌株는 豊韓醱酵株式會社에서 糖蜜의 ethanol 발효용으로 使用하고 있는 Saccharomyces formosences No. 396를 분양 받아서 이용하였다.

### (3) 種酵母의 培養

調製된 種酵母用培地 10ml 에 寒天사면 培養에서 1白金耳를 接種, 24시간 배양한 것을 上記(1)의 배지에 接種한 것을 30rpm의 왕복진탕기에서 30°C로 유지하면서 48시간 배양하였다.

### (4) 酵母의 固定化

酵母의 固定化法은 實驗目的에 따라서 두가지로 하였다. 즉 그 한가지는 固定化된 苦體數를 精確히 알아야 할 경우에는 위 (3)에서 種酵母로서 培養된 것을 400rpm로 10分間遠沈하여 菌體를 回收하고 生理的 食염水 100ml로 2回 세척하고 菌數를 計測후 그 一定量씩을 必要濃도의 멸균된 Na-alginate 一定量에 混合하고 이것을 멸균된 뷰렛을 使用하여 Eikemeir<sup>15)</sup>의 方法에 따라서 서서히 멸균된 2% CaCl<sub>2</sub> 용액에 한

방울씩 落下시키면서 CaCl<sub>2</sub> 용액을 가볍게 흔들어 주면 Na-alginate는 Ca-alginata로 되어 보다 견고 하며 직경이 3~4mm인 beads가 형성되었다. 약 20分 동안 2% CaCl<sub>2</sub> 용액內에서 가볍게 흔들어주고 生理的 食鹽水로 세척 후 使用하였다.

또한 가지는 Wada<sup>14)</sup>의 方法에 따랐다. 즉 種培養된 培養液 1ml를 50g의 各濃도의 Na-alginate에 混合하고 上記와 같이 하여 Ca-alginate beads로 한 다음 種培養培地 200ml에 投入하여 30°C 30rpm의 왕복진탕기 위에서 60時間 지속하여 beads內部の 酵母의 증식을 妨하였다.

이 方法을 圖示하면 fig 1과 같다.

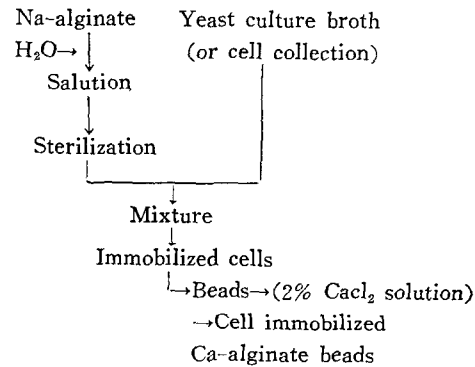


Fig. 1. Preparation of immobilized yeast entrapped Ca-alginate beads

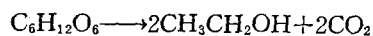
### (5) 醱酵方法

위 (4)에서 얻은 beads 200g을 350ml의 당밀 培地에 投入하여 30°C로 유지하면서 精製발효시켰다. 발효가 끝난 것은 液汁을 멸균된 망사를 利用하여 除去하고 新培地로 代替하여 beads를 연속使用하였다.

### (6) 分析

糖의 定量은 Bertrand法<sup>12)</sup>을 利用하였으며 生成된 ethanol은 증류法<sup>13)</sup>으로 증류한 다음 酒精計로 그 濃도를 측정하고 이것을 15°C의 상태로 환산하여 表示하였다. 酒精計는 和光 Co의 極純試蓋 alcohol로 눈금을 보정하였다.

對糖 ethanol의 收率計算은 다음의 式으로 하였다.



對糖 ethanol 收率(%)

$$= \frac{\text{生成된 ethanol\%}}{\text{糖농도(}\%)\times 0.644} \times 100$$

$$\text{단 } \frac{\text{ethanol mol}(46\times 2)}{\text{糖 mol}(180)\times \text{ethanol 比重}(0.7936)} = 0.644$$

### (7) 培地中の 酵母 농도 測定

培地中の 효모를 400rpm 10分間 遠沈回收하고 生理的食鹽水로 2回 洗滌한 다음 그 半量은 105°C로 건조 秤量하고 나머지 半量은 증류수로 순차적으로 희석하면서 450nm의 波長으로 OD를 측정하여 그래프로 나타내면 Fig와 같이 OD 0.1~0.7의 범위 內에서는 효모농도(mg/100ml)와 OD 사이에 直線關係가 成立하였으며 이 커브는  $y=80x-2$ 의 一次方程式으로 表示할 수 있었다.

발효액中的 효모는 上記方法으로 回收洗滌하고 OD가 Fig 2의 범위가 되도록 一定하게 희석하여 OD 값(x)을 求하면 上記 方程式에 의해서 효모농도(y)를 求할 수 있다.

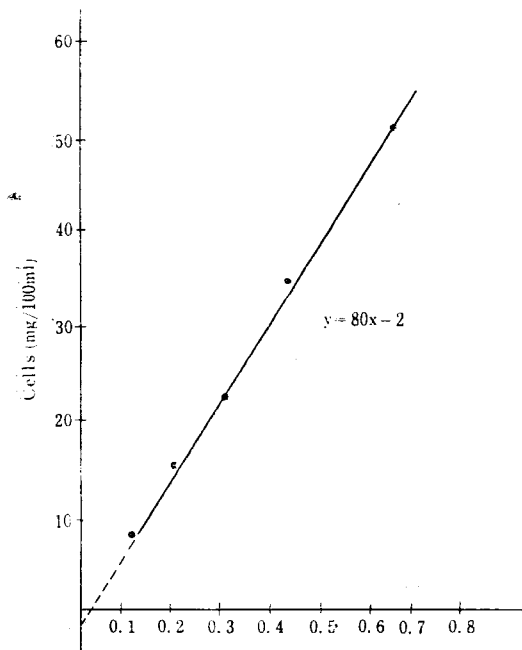


Fig. 2. Curve of yeast cell concentration in distilled water

y; cell mg in dry material mg/100ml  
x; OD

### 3. 結果 및 考察

#### (1) Ca-alginate gel의 농도와 발효와의 關係

酵母固定化用 Ca-alginate의 농도를 0.5~5.0%로 각각 달리 하였을 때의 ethanol生成結果를 보면 Fig 3과 같다.

Fig 3에 나타난 바와 같이 Ca-alginate의 농도가 0.5~1.0의 것이 4~5%의 것보다, 다소 우수한 結果를 보였다. 그러나 일반적으로 0.5% Ca-alginate beads를 使用한 시험구에서 특히 두드러지게 좋은 性能을 보이는 것은 Ca-alginate의 농도가 낮음으로서 包接된 효모가 거의 노출된 상태와 같은 구실을 했을 것으로 짐작되며 실제로 발효종료후의 beads의 모양을 보면 부풀어서 破裂이 된 것이 大部分이었는데 이는 beads의 粘着力이 그內部の 효모의 증식력에 견디지 못한 理由가 있을 것으로 보인다.

Chibata 등<sup>7)</sup>의 研究에서는 Ca-alginate의 농도를 4~5%로 하였으며 그 以下の Ca-alginate 농도의 影響에 關한 研究는 찾아 볼수가 없으므로 比較할 수는 없으나 다만 Chibata<sup>7)</sup>는 5%의 Ca-alginate를 使用해서 원통형발효장치를 利用한 연속발효에서 培地 1ml當 한 時間에 50mg의 ethanol을 生産하였다 하였으나 本實驗과는 方法이 다르므로 역시 比較할 수가 없었다.

그런데 그<sup>14)</sup>는 4% Carageenan을 효모 擔體

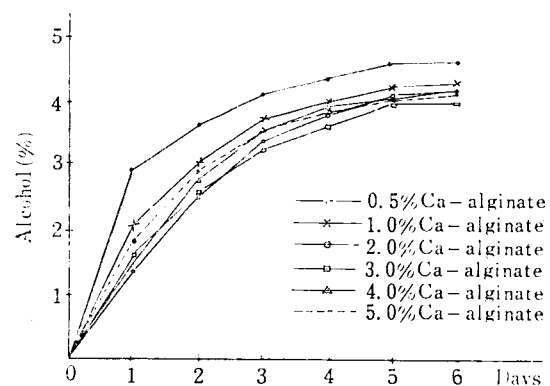


Fig. 3. Relationship between Ca-alginate concentration and alcohol producibilities(The sugar concentration was 8.5%, and the broth was incubated at 30°C.)

로 사용한 研究에서 完全培地 10ml 當 beads 10 ml 를 사용했을 때 收率 100%의 效果를 얻었다 하였으나 역시 擔體의 素材나 培地의 차이 때문에 本實驗과는 比較할 수가 없었다.

(2) Beads 中の 酵母농도와 醱酵와의 關係

8% 당밀培地에서 48時間 培養한 酵母를 遠沈回收하고 이것을 1% Ca-alginate 200g 에 대하여 0.2g, 0.6g, 1.0g, 1.4g 씩 各各 混合하여 beads 를 만든 다음 7日을 1회로 하여 5回 반복 使用해 본 結果의 ethanol 生成結果는 Fig 4 와 같다.

이 實驗은 beads 中の 初期酵母數의 影響을 알아보기 위한 것이며 實驗오차를 줄이기 위해서 同一한 條件을 3점으로 實施하여 그 結果를 平均하여 表示하였다.

여기에서 대조구는 在來式醱酵法<sup>13)</sup>으로 한 것이다. 즉 당밀境地 10ml 에 麴汁斜面境地에서 1 白金耳의 菌體를 接種하고 30°C 24時間 培養한 것을 醱酵境地에 添加하여 정치醱酵시켰다.

Fig 4 에서 보면 0.2g cells 첨가와 0.6g cells 첨가區에서는 1回 또는 2회까지 成績이 不良하였고 그 以後는 모두 비슷한 結果를 보였고 전반적으로 대조구에 比하여 월등히 우수한 成績을 나타내고 있다.

이와같은 結果를 볼때 좋은 발효율을 얻기 위해서는 beads 內에 高농도의 酵母密度가 必要함을 알 수 있으나 처음에 첨가된 苗수가 적다 할지라도 境地中에서 時間을 지체하여 beads 內에

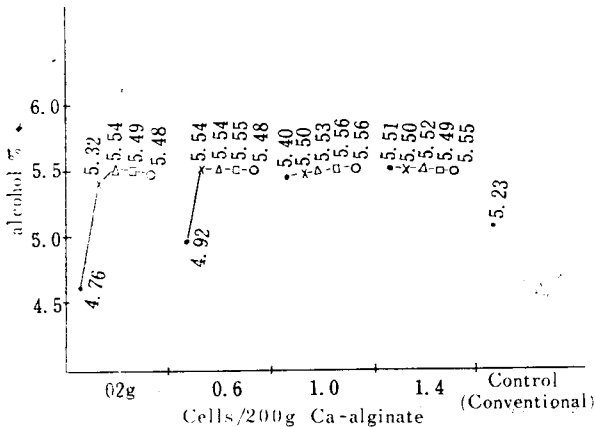


Fig. 4. Cell concentration in beads and alcohol production

서 充分히 菌數가 增加된 후에는 별 지장이 없음을 알 수 있다.

Wada<sup>14)</sup>는 4% Carrageenan beads 內에서 充分히 酵母가 자랐을 때의 수는 gel 1ml 當 生體重量으로서 220mg 였는데 培地中에서 自由로히 孳란 效모수는 최고 20mg(wet weight cells)/ml medium 로서 beads 內에서는 液狀培地內에서 보다 약 10倍는 더 많은 效모 밀도를 이루었음을 보았다.

本實驗에서 1.0g cells/200g beads 와 1.4g cells/200g beads 區는 生細胞重(量)로 환산(乾重×3=濕重으로 대략봤음) 해보면 8.6mg Wet cells/ml medium 및 12mg wet cells/ml medium 로서 wada<sup>14)</sup>의 최고치의 약 半에 해당되는 것을 알 수 있고 발효초기의 效모농도는 최고밀도의 半 또는 그 以下에서도 발효에 지장이 없는 것으로 짐작이 된다.

(3) 醱酵液中の 酵母농도의 變化

酵母가 包接된 beads 로 醱酵를 시킬경우 酵母는 beads 內에서도 계속增殖하여 노폐 細胞와 代替될 것이나 一部分의 細胞는 培地內로 빠져나와 培地中에서 自由로히 增殖할 것이 推理되기 때문에 발효액中の 自由細胞의 量的變化에 대하여 살펴 보았다.

전항(2)에서 0.2g cells/200g Ca-alginate beads 로 발효시켰을 경우 첫回使用時에는 醱酵成績이

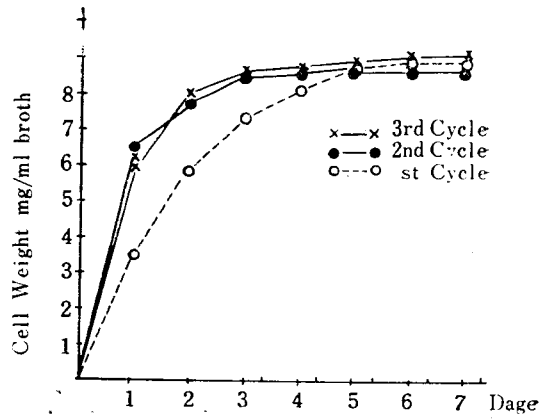


Fig. 5 Changes of cell concentration in broth in case of 0.2g cells/200g Ca-alginate beads added.

不良했으나 반복使用에 따라 발효성적이 向上되었는데 이때의 발효액中の 효모농도를 3회에 걸쳐 조사해 본 結果는 Fig 5와 같다.

발효액中の 효모농도는 첫번째발효時에는 점진的으로 增加하여 5日 후가 되면 8.7mg cells/ml broth로 最高値에 達하게 되는데 2회째나 3회째 使用時에는 거의 비슷한 傾向으로 3日이 후가 되면 8.5~8.8mg cells/ml broth로서 最高値에 達하게 되어 예상했던 바와 같이 酵母包接 beads를 使用해서 발효시켰을 경우에도 발효액中の 自由 효모농도는 상당히 많은 數에 이르게 됨을 볼 수 있다. 그리고 이와같은 數를 wada<sup>14)</sup>의 data와 比較해 보면 그가 관찰한 20 mg wet cells/ml broth(乾物로 보면 20÷3=7mg)는 本實驗에서 볼 수 있었던 8.5mg~8.8mg dried cells/ml broth의 값보다 多少 적은 듯이 여겨진다.

#### (4) 효모고정화 Ca-alginate beads의 반복 사용

本研究의 궁극적인 目的은 효모가 고정화된 beads를 반복 使用하므로써 種培養의 번잡성과 酵母가 增殖에 消費하는 糖의 절약에 있다.

1~5%까지의 各농도의 Ca-alginate 1.0g cells/200g beads 되게 효모를 包接한 것을 使用하여 1회발효주기를 7日로 하고 15회(7日×15回=105日=2,520時間) 연속 使用하여 발효시킨 結果는 表 1과 같다.

Ca-alginate gel의 濃도에 따른 影響을 보면 초기 1~2회때는 저농도 gel 쪽이 다소 有利한 傾向을 보였으며 結果的으로도 비교적 좋은 편이

다. 특히 2% gel인 경우 발효율 92.35%로서 가장 優秀한 結果를 보였다.

實驗이 끝난 후 beads의 모양을 조사해본 결과 gel 濃도 1%區의 beads는 약 30%정도가 파열되어 있었고 심한 것은 半쪽으로 쪼개져 있는 것도 있었다. 그러나 2%區 以上에서는 파열된 것을 별로 볼 수가 없었고 손가락으로 눌러 본 결과 아직도 견고한 감을 느낄 수가 있었다.

발효율은 일반적으로 89%以上을 보이고 있으며 (2)항에서 control區(在來式 발효方法)의 발효율 86.3%에 比하면 3~6%의 발효율 向上을 볼 수가 있다.

Noguchi<sup>11)</sup>는 고정화효모를 利用한 당밀발효에서 2,300時間의 연속발효結果 平均 87.9%의 발효율을 얻었다. 이것을 本연구의 結果와 比較해 보면 약 1~3%정도 저조한 結果이나 발효기질인 당밀은 產地나 종류에 따라서 非발효성 糖의 含量에 차이가 있으므로 그의 研究와 本研究는 直接比較할 수는 없을 것 같다.

固定化酵母 beads의 수명에 關한 yamada<sup>16)</sup>의 言及에 의하면 karrageenan을 擔體로 한 固定化酵母를 數千時間 連續使用한 結果 變化를 發見할 수 없었다 하였고 따라서 모든 固定化酵母는 擔體物質의 견고성만 유지 된다면 1~2年間의 表期使用도 可能할 것이라 하였다.

本實驗에서도 2,520時間의 연속使用結果 1% Ca-alginate beads區를 際外한 2%以上區에서는 外見上 beads의 모양에 별다른 變化가 없고 발효성도 지속성이 있는 점으로 보아 yamada의 言及에 타당성이 있는 것으로 짐작되었다.

Table. 1. The results of multiutilization of yeast entrapped beads(alcohol %)

A \ B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	M	RE
5.0	5.3	5.5	5.4	5.4	5.7	6.0	5.6	5.5	5.6	5.7	5.6	5.9	5.6	5.4	5.7	5.59	91.36
2.0	5.2	5.5	5.5	5.5	5.9	5.9	5.5	5.5	5.9	5.7	5.9	6.0	5.7	5.4	5.7	5.65	92.35
3.0	5.0	5.2	5.5	5.4	5.7	5.7	5.3	5.4	5.5	5.6	5.5	5.3	5.5	5.3	5.9	5.46	89.24
4.0	5.0	5.4	5.4	5.4	5.6	5.6	5.5	5.6	5.4	5.6	5.6	5.4	5.6	5.6	5.7	5.48	89.57
5.0	5.1	5.4	5.3	5.7	5.7	5.7	5.4	5.5	5.6	5.6	5.6	5.4	5.6	5.6	5.7	5.49	89.73

A: The concentration of Ca-alginate gel(%)

B: The cycle of beads utilization. 1 cycle is 7days.

M: The means of alcohol%(V/W)

RE: The ratio of fermentation efficiency(%)

#### 4. 要 約

酵母를 包接시킨 Ca-alginate 로 된 beads 를 사용하여 糖蜜을 回分法에 의해서 alcohol 醱酵시킨 結果는 다음과 같다.

(1) 在來式醱酵方法에 관하여 醱酵率의 向上을 期할 수가 있으며 15 回의 반복使用에 있어서 平均 89.24~92.35%의 醱酵率을 나타냈으며 在來式方法(86.3%)에 比하여 3~6%의 醱酵率向上을 보였다.

(2) Ca-alginate 의 濃도는 2% 以上되면 2,520 時間의 使用에 견디었으며 發효성능의 쇠퇴현상이 나타나지 않았다.

(3) beads 中の 初期酵母 濃도는 1.0g(乾物)/1200g Ca-alginate beads 이상이 必要하며 그 以下일때는 첫번째 (또는 두번째)의 醱酵率이 다소 저조하였다.

#### 參 考 文 獻

- 1) FAO: Production year book. (1979)
- 2) FAO: Year book of Forest Production, (1978)
- 3) 日本 新燃料油技術開發研究會: 바이오메스利用技術 海外調査報告書, (1981)
- 4) 日本 新燃料油技術開發研究會: 바이오메스利用技術 海外調査報告書, (1983)
- 5) J.M. Navaro and G. Donand: Europ. J. Appl. Microbiol., 4, 243(1977)
- 6) M. Kierston and C. Buche: Biotechnol., 19, 387 (1977)
- 7) I. Chibata: J. Ferment, technol., 58, 327(1980)
- 8) G. Cysewski and C.R. White: Biotech. Bioeng., 20(1978)
- 9) J.M. Navarro: Europ. J. Appl. Microbiol., 4(1977)
- 10) I. Chibata: U.S.P 4, 138, 282(1979)
- 11) S. Noguchi: Biotech, 83(1983)
- 12) 朴在柱: 食品分析(梨花文化社), 117(1973)
- 13) 東京大學 農藝化學教室編: 實驗農藝化學 p.64, p. 620(1957)
- 14) M. Wada, J. Kato and I. Chibata: Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 10(1980)
- 15) H. Eikmeier: Appl. Microbiol. Biotechnol., 10(1984)
- 16) T. Yamada: Research Association for Petroleum Alternative Development, (1985)

과학 기술 혁신속에

2천년은 밝아 온다