

반 연속식 배양에 의한 효모 *K. fragilis* 의 알콜발효 특성에 관한 연구

허 병 기 · 류 장 수 · *목 영 일

인하대학교 공과대학 생물공학과

*아주대학교 공과대학 화학공학과

Investigation of the Ethanol Fermentation Characteristics of *K. fragilis* by Semicontinuous Culture

Byung Ki Hur, Jang Soo Ryoo and Young Il Mok*

Department of Biological Engineering Inha Univ.

*Department of Chemical Engineering Ajou Univ.

ABSTRACT

Semicontinuous alcohol fermentation of Jerusalem Artichoke by *K. fragilis* CBS 1555 was performed to investigate the effect of the effective dilution rate and influent sugar concentration to the ethanol concentration and alcohol productivity at steady state.

When the time interval for the replacement of fresh influent with fermentation broth was less than or equal to 1 hr, the effective dilution rate was found out to be equal to the specific growth rate. Wash out was not occurred until the effective dilution rate, 0.425 hr⁻¹, and the maximum alcohol productivity was around 5.5 g/l-hr. In this case, the effective dilution rate was 0.25 hr⁻¹ and the influent sugar concentration was distributed from 85 g/l to 135 g/l.

서 론

효모에 의한 알콜생산성은 균주의 발효특성, 발효의 환경 및 조성특성, 생물반응기 시스템의 특성에 따라서 몇 배 내지 몇 십배의 차이를 나타내고 있다. 기질이 돼지감자인 경우 알콜생산성이 우수한 균주로는 *K. fragilis*, *K. marxianus*, *Z. mobilis* 등이 알려져 있다(1). 발효의 환경 및 조성특성이 알콜발효 및 균체 성장에 최적인 상태는 pH 5.5, 발효온도 35°C 근방, 기질초기 농도 150 g/l 근방으로 연구 보고되어 있다(2,4). 또한 알콜생산성은 생물반응기의 종류에 따라 2내지 3g/lh에서부터 30내지 100 g/lh 사이의 분포를 이루고 있다(1, 5).

선정된 균주의 알콜생산성에 미치는 여러 특성 중 발효의 환경 및 조성특성에 대한 연구는 생물반응기 선정 및 설계의 기반을 이룬다. 이들 특성연구는 대부분 연속

식 배양법에 의하여 이루어지고 있으나, 반응특성에 미치는 환경 및 조성인자가 많은 경우에는 시간과 경제공학 측면에서 연속배양법 보다 반연속배양법이 채택되는 경우가 있다(6-8).

따라서 본 연구에서는 효모 *K. fragilis*에 의한 돼지감자 알콜발효특성을 반연속배양법에 의하여 규명하고, 실험결과와 이론적 계산치를 비교분석함으로써 반연속배양법에 의한 결과를 타당성, 알콜 최적생산에 필요한 희석비, 주입 기질농도 등을 규명하는 데 목적을 두었다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Kluyveromyces fragilis* CBS 1555(9)를 사용하였다. 접종용 균주는 YM배지(4)를 사용, 35°C에서 24시간 진탕배양하여 사용하였다.

발효기질

본 실험에서는 돼지감자 착즙을 기질로 사용하였으며 그 처리과정을 문헌(4)의 방법을 이용하였다.

발효실험

진탕배양기를 사용하였으며 반응온도 35°C, pH 5.5, 분당 왕복회전수는 110으로 하였다. 당농도 45, 85, 115, 135 g/l인 기질용액 및 접종용 균주용액의 혼합물 300 ml를 500 ml의 삼각플라스크에 넣고 24시간 발효시킨 후 당농도 45, 85, 115, 135 g/l의 기질로 매 시간 작동 부피의 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.35씩 교환시키면서 시간에 따른 당농도, 균체농도, 알콜농도의 변화를 측정하였다.

분석방법

총당의 농도는 Anthrone법(10)을 사용하여 분석하였으며, 알콜농도는 Table 1의 운전조건 하에서 Varian Aerograph 1860-1의 Gas Chromatography를 사용하여 분석하였다. 균체 농도는 분광광도계(Shimadzu, UV-120-2)를 사용하여 파장 620 mm에서 효모회색액의 흡광도를 측정한 후 Fig. 1의 표준균체농도곡선으로 부터 구하였다.

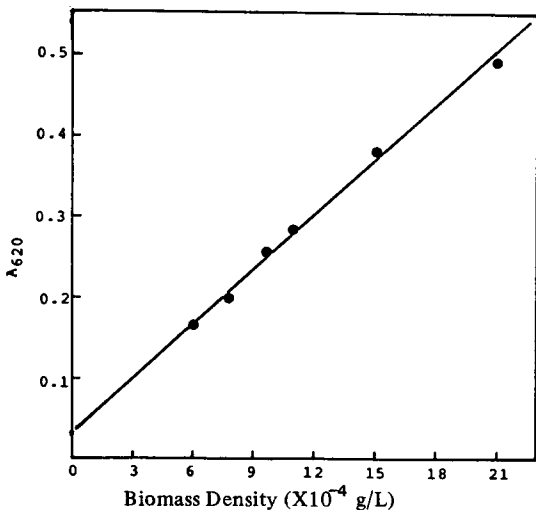


Fig. 1. Calibration Curve for Biomass Density.

결과 및 고찰

Fig. 2는 기질의 초기 당농도 45 g/l인 경우 회분식 발효 24시간 후 부터 시작된 반연속식 발효과정을 나타낸 그림이다. 시간 경과에 따라 알콜농도 및 균체농도는

Table 1. Operation Conditions of TCD Gas Chromatography

Gas Chromatography	Varian aerograph (Series 1800)
Detector	Thermal Conductivity Detector
Column material	Porapak Q 80-100 mesh
Control Temperature	Oven Temp. 150°C T C D Temp. 200°C I n j. Temp. 170°C
Carrier Gas	Helium (flow rate 22 ml/min)
Current	150 milliamperes
Chart Speed	5 mm/min

감소하는 반면 당농도는 증가하나 반연속식 발효 후 약 6시간 후에는 모든 변수가 정상 상태에 도달하여 균체의 증식속도와 유출속도, 알콜의 생성속도와 유출속도, 당의 주입량과 감소량이 동일하게 되었다. Fig. 2는 본 연구의 4가지 초기 당농도 결과 중요한 결과를 나타내는 그림이나 나머지 당농도에 대하여서도 비슷한 결과를 얻을 수 있었다.

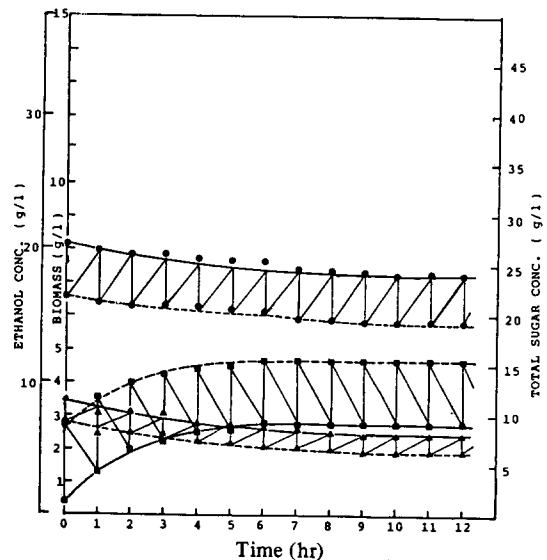


Fig. 2. Functional Relationship among Fermentation Time and Ethanol Concentration, (—●—), Biomass, (—▲—), Total Sugar Concentration, (—■—) in Semicontinuous Culture.

**유입기질의 치환부피비 (Replacement Volume Ratio)
와 비증식속도 사이의 함수관계**

본 연구는 연속식 실험결과가 아니기 때문에 작동부피에 대한 유입기질의 치환부피비가 연속실험의 희석속도 (Dilution Rate) 값과 일치하지 않을 것이다. 반연속식 실험의 치환부피비와 비증식속도 사이의 함수관계를 알아보기 위하여 반연속식 실험에서 정상 상태에 도달했을 때의 비증식속도를 다음과정을 통하여 구하였다.

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \tag{1}$$

윗 식을 적분하면

$$\mu = \frac{1}{\sigma t} \ln \frac{X_2}{X_1} \tag{2}$$

여기서 X_1 은 유입기질을 치환한 순간의 균체농도이고, X_2 는 발효 한 시간 후의 균체농도이다. 따라서 X_1 과 X_2 사이의 함수관계는 다음식과 같이 표현할 수 있다.

$$X_1 = \frac{V \cdot F}{V} X_2 = (1 - \frac{F}{V}) X_2 = (1 - R) X_2 \tag{3}$$

윗 식에서 V 는 작동부피, F 는 주입기질의 부피, R 은 치환부피비를 의미한다. 식(3)을 식(2)에 대입하고 정리하면 비증식속도는 다음과 같이 된다.

$$\mu = D_e = \frac{1}{\Delta t} \ln (1 - R) \tag{4}$$

Fencil(11,12) 등은 윗 식의 값을 유효희석속도 (Effective Dilution Rate)로 정의하고 이들 값과 연속발효의 희석속도 사이의 타당성 검토에 관한 연구를 수행한 바 있다.

Fig. 3은 주입기질 농도에 따른 치환부피비와 식(2)의 비증식속도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 각 경우 모두 치환부피비보다 비증식속도가 크게 나타남을 알 수 있다. 따라서 치환부피비가 연속발효의 희석속도가 될 수 없음을 알 수 있다.

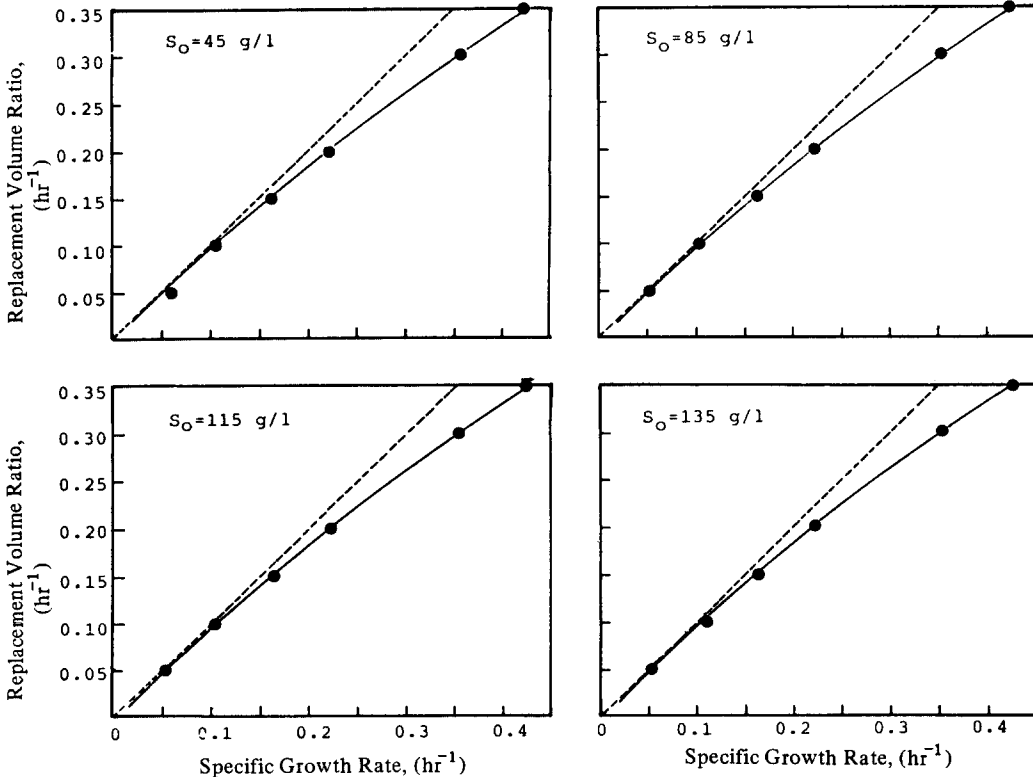


Fig. 3. Functional Relationship between Specific Growth Rate and Replacement Volume Ratio in various influent sugar concentration.

유효회석속도와 비증식속도 사이의 함수관계

식(2)에 의한 비증식속도와 식(4)에 의한 유효회석속도 사이의 함수관계를 나타내는 그림이 Fig. 4이다. 이 결과에 의하면 주입기질의 당농도에 상관없이 유효회석속도와 비증식속도 사이에는 1대 1의 정비례 관계가 성립함을 알 수 있다. 본 연구의 결과에 의하면 반연속식 실험에서 기질 전환의 시간간격을 1시간 이내로 할 경우에는 식(4)에 의한 유효회석속도가 연속실험의 회석속도와 거의 동일한 값을 가짐을 알 수 있다. 또한 기질이 돼지감자 착즙이고 균주가 *K. fragilis* 인 경우 회석속도 0.425 hr⁻¹에서도 wash out이 일어나지 않았다.

주입기질의 당농도와 균체농도 사이의 함수관계

Fig. 5는 전환부피비를 매개변수로 한 균체농도와 주입기질 당농도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 이 결

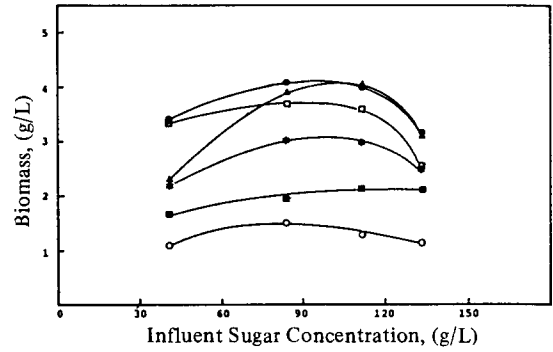


Fig. 5. Biomass versus Influent sugar concentration in various Replacement Volume Ratio; (●), R=0.05, (▲), R=0.10 (□), R=0.15, (☆), R=0.20, (◻), R=0.30, (○), R=0.35.

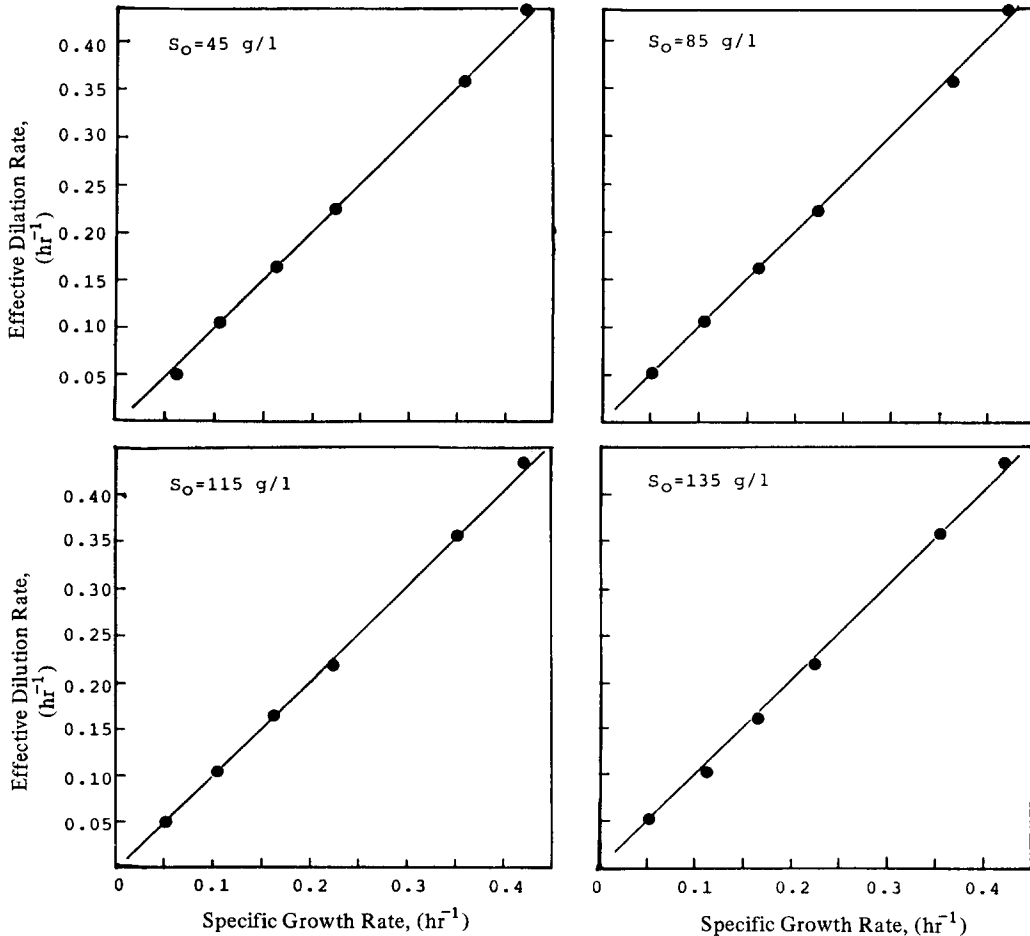


Fig. 4. Functional Relationship between Specific Growth Rate and Effective Dilution Rate in various influent sugar concentration.

과에 의하면 치환부피비에 관계없이 당농도 90 g/l 근방에서 균체의 농도가 최대치를 나타내었다. 주입 당농도를 고정하고 치환부피비에 따른 균체농도 변화관계를 고찰하여 보면 치환부피비가 증대할 수록 발효조 내의 균체농도는 감소하였다.

주입기질 당농도와 알콜농도사이의 함수관계

Fig. 6에서 알 수 있듯이 치환부피비에 상관없이 주입 기질의 당농도가 증가하면 발효조 내의 알콜농도는 증가한다. 반면 일정한 주입 당농도에서 치환부피비가 증가하면 알콜농도는 감소하였다.

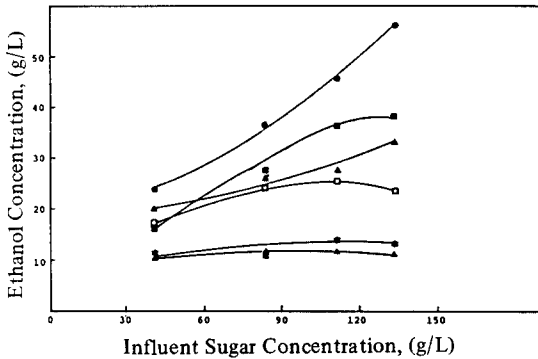


Fig. 6. Ethanol Concentration versus Influent Sugar Concentration in various Replacement Volume Ratio; (—●—), R=0.05, (—■—), R=0.10, (—△—), R=0.15, (—□—), R=0.20, (—☆—), R=0.30, (—▲—), R=0.35.

알콜생산성과 유효희석속도 사이의 함수관계

Fig. 7은 주입기질의 당농도를 매개변수로 했을 때 유효희석속도와 알콜생산성 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 주입기질의 당농도가 증가할 수록 또한 유효희석속도가 증가할 수록 알콜생산성이 증대됨을 알 수 있다. 더욱이 주입당농도가 85 g/l와 135 g/l 사이에서는 유효희석속도가 0.25 hr⁻¹ 이상이 되면 알콜생산성이 동일하게 됨을 알 수 있다. 본 연구결과에 의하면 기질이 돼지감자이고 균주가 *K. fragilis* 인 경우 연속알콜발효공정으로 얻을 수 있는 최대 알콜생산성은 5.5 g/l·hr 근방이었으며 이 값은 문헌 (13) 및 (14)의 값보다 약간 높았다.

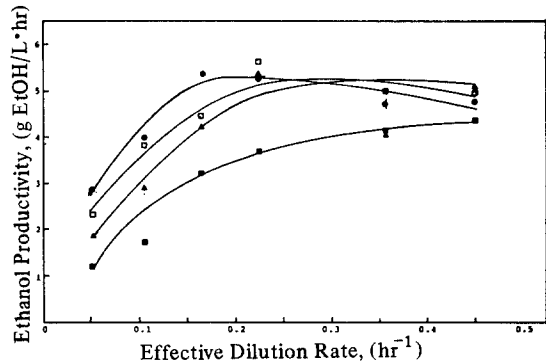


Fig. 7. Ethanol Productivity versus Effective Dilution Rate in various influent sugar concentration; (—■—), S₀=45, (—▲—), S₀=85, (—□—), S₀=115, (—●—), S₀=135 g/l.

요 약

K. fragilis 를 이용한 돼지감자의 반연속알콜발효에서 유효희석속도 및 주입기질 당농도의 변화가 정상 상태에서의 알콜농도 및 알콜생산성에 미치는 영향을 실험을 통해 규명하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다. 주입기질의 치환시간 간격을 1시간으로 했을 경우 유효희석속도는 비증식속도와 일치하여 연속발효실험의 희석속도와 같음을 알 수 있었다. 유효희석속도가 0.425 hr⁻¹에서도 wash out 이 발생되지 않았으며 최대 알콜 생산성은 5.5 g/l·hr 이었고 이 경우 유효희석속도는 0.25 hr⁻¹, 주입기질의 당농도는 85 g/l 내지 135 g/l 사이에 분포되어 있다.

감 사

본 연구는 동력자원부 대체에너지 기술개발 사업 연구비 지원에 의하여 이루어진 것입니다. 이에 대하여 심심한 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. 목영일, 김철, 최기련, 허병기(1989), 88년도 대체에너지 개발사업 연구보고서, 동력자원연구소
2. A. Margaritis and P. Bajpai(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 306.
3. J. Baratti et al.(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 850.
4. 허병기, 유진선, 양지원(1989), *한국 생물 공학회지*, **4**(1), 48.

5. C.W. Lee(1987), *Ph.D.Thesis*, KAIST, Seoul.
6. A.V. Quinlan(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1455.
7. D. Tilman, M. Mattson, and S. Kilham(1981), *Lim-
vol. Oceanogr.*, **26**, 1020.
8. D.K. Dougall, S. LaBrake, and G.H. Whitten(1983),
Biotechnol. Bioeng., **25**, 581.
9. 유연우, 김철호, 김수일(1983), *한국 농화학회지*,
26, 119.
10. Weiner(1978), *J. Ind. Brew*, **84**, 222.
11. Z. Fencil et al.(1961), *Folia Microbiol* **6**, 94.
12. Z. Fencil (1966), "*Theoretical and Methodological
Basis of Continuous Culture*", Academic, New York.
13. T.K. Ghase and R.D. Tyagi(1979), *Biotechnol.
Bioeng.*, **21**, 1387.
14. G.R. Cysewski and L.R. Wike(1979), *Biotechnol.
Bioeng.*, **18**, 1297.

(Receive July 18, 1989)