

## 효모 *S. cerevisiae* 의 돼지감자 알콜발효 특성과 발효시간과의 함수관계

허 병 기 · 김 현 성 · \* 목 영 일  
인하대학교 공과대학 생물공학과  
\* 아주대학교 공과대학 화학공학과

### Functional Relationship between the Fermentation Characteristics of *S. Cerevisiae* and Fermentation Time

Byung Ki Hur, Hyun Sung Kim and Young Il Mok\*

Department of Biological Engineering Inha Univ.

\*Department of Chemical Engineering Ajou Univ.

#### ABSTRACT

Functional relationship between the Fermentation characteristics of *S.cerevisiae* SIV-89 and the fermentation time was investigated. According to the increase in the initial sugar conc. from 50 g/L to 80 g/L, maximum specific growth rate and maximum specific alcohol production rate were increased until 0.35 and 1.98. But the two values were decreased with increase of initial sugar conc. in the region of more than 80 g/L. Maximum alcohol yield and biomass yield were 0.45 and 0.15 respectively.

However those vlaue were found to be reduced with the argument of initial sugar concentration. Sugar conversion was decreased with sugar concentration. When the sugar concentration was more than 190 g/L, the conversion was dropped below 70%. The increase of alcohol concentration in the fermentation broth induced the phenomenon of decline of metabolism. In case of more than 80 g/L of alcohol conc., biomass growth and alcohol production were completely stopped regardless of remaining sugar concentration.

#### 서 론

20세기의 과학기술은 석유원료를 기반으로 구축되었다고 하여도 과언이 아닐 정도로 석유는 그 이용성 및 효용성이 다른 어느 자원보다 다양하다. 그러나 현 인류는 이런 귀중한 자원을 보다 유용한 제품의 원료로 사용하기보다는 수송, 난방, 발전 등의 에너지 원으로 그 대부분을 소비하고 있다. 1973년에 유발된 석유파동으로 석유자원의 귀중함과 유한성을 다시 한 번 절감한 세계 각국은 석유에너지에 대응할 대체에너지의 연구개발에 많은 투자와 노력을 아끼지 않고 있다.

대체에너지 자원으로는 태양에너지, 바이오매스, 수력, 풍력 등 여러 종류가 있다. 이 중 바이오매스의 발효로 부터 생산되는 알콜은 그 물리적, 연소적 특성이 석유 특성과 비슷하여 석유의 대체에너지로 가장 각광을

받고 있다. 더욱이 몇몇 국가에서는 순수 알콜이나 개솔린-알콜 혼합물인 개소홀 및 디젤-알콜 혼합물인 디조홀이 내연기관에 사용되어지고 있는 실정이다(1,2).

에탄올 생산을 위하여 사용되는 바이오매스로는 다당류의 탄수화물을 내포하고 있는 사탕수수, 옥수수, 고구마, 돼지감자 등이 있다. 이 중 돼지감자는 나쁜 토양에서도 잘 자라고 서리와 병충해에도 강할 뿐만 아니라 탄수화물의 수율 또한 높다는 장점을 지니고 있어서 산업용 에탄올 생산에 적합하다.

돼지감자의 알콜발효에 이용되는 미생물은 *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, 및 *Saccharomyces cerevisiae* 등이 있다. 연구결과에 의하면 기질이 돼지감자이고 균주가 *K. fragilis* 인 경우 비성장속도 값은 0.046과 0.48 사이에,  $Y_{p/s}$  값은 0.09에서 0.5 사이에, 그리고  $Y_{x/s}$  값은 0.05와 0.14 사이에 분포되어 있다(3-8). *K. marxianus* 의 발효특성은 비성장속도인 경우 0.086

과 0.41,  $Y_{p/s}$  인 경우 0.41에서 0.49,  $Y_{x/s}$  인 경우 0.039 와 0.049 사이에 분포되어 있다(9-12). 이 외에 *Saccharomyces* 나 *Zymomonas* 속의 균주에 의한 돼지감자의 알콜발효특성에 관한 연구 또한 수행되고 있다(3,6,11,12). 그러나 돼지감자의 알콜발효특성을 시간의 함수로 규명한 연구는 별로 많지 않다.

본 연구에서 *S. cerevisiae* 를 이용한 돼지감자의 알콜발효특성을 시간의 함수로 비교분석함으로써 알콜생산 최적조건을 규명하는 데 목적을 두었다.

**재료 및 방법**

**균주**

본 실험에서 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* SIV-89(13,14)이다. 35°C YM 배지(15)에서 24시간 동안 진탕배양하여 접종용 균주로 사용하였다.

**발효기질**

본 실험에서는 돼지감자 착즙을 기질로 사용하였다. 폐경의 전처리하는 문헌(15)의 방법을 이용하였다.

**실험장치 및 운전조건**

진탕배양기를 사용하였으며 반응온도 35°C, 분당 왕복 회전수는 110으로 하였다.

**총당의 분석**

총당은 Anthrone 법(16)을 사용하였으며, 분석과정은 문헌(15)의 방법을 이용하였다.

**알콜농도 분석**

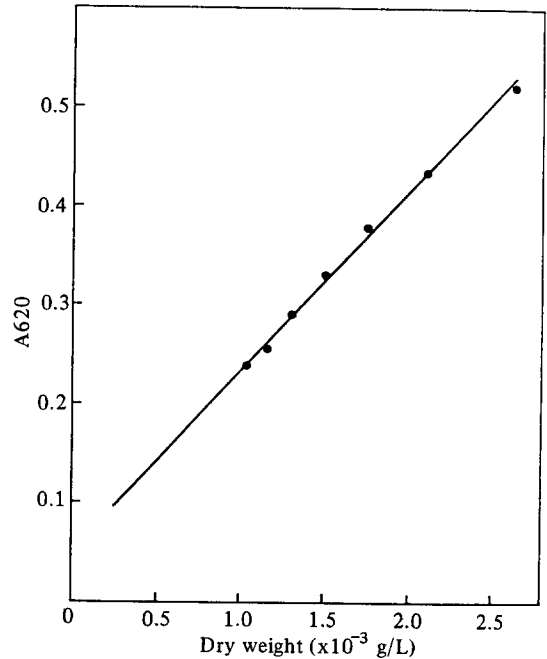
알콜농도는 Gas Chromatography(Varian Aerograph 1860-1)를 사용하였으며 시료 10 ml에 대해 iso-propanol 1g을 internal standard로 하였다. 시료의 주입은 5  $\mu$ l syringe를 사용하였으며 주입량은 1  $\mu$ l로 하였다. Gas Chromatography의 운전조건은 Table 1과 같다.

**균체량 측정**

발효액 시료를 시험관에 넣고 4000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 효모를 3회 세척 및 원심분리한다. 효모의 농도가 표준균체농도곡선 Fig. 1의 범위 내에 포함되도록 희석한다. 분광광도계(Shimadzu, UV-120-2)를 사용하여 파장 620 nm에서 희석액의 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도를 이용하여 Fig. 1으로 부터 균체농도를 구한후 희석비를 곱하여 실제 균체농도를 구하였다.

**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
	TCD Temp.	200°C
	Inj. Temp.	170°C
Carrier Gas	Helium (flow rate 22 ml/min)	
Current	150 milliamperes	
Chart Speed	5 mm/min	



**Fig. 1. Standard Calibration curve for Biomass Density**

**초기 당농도 및 시료채취**

균주를 삼각플라스크 내의 YM 배지에 접종한 후 진탕배양기를 사용하여 35°C, pH 5.5에서 24시간 동안 배양한 후 알콜발효를 위하여 준비된 삼각플라스크 내의 기질에 10% (V/V)가 되도록 접종하였다. 발효특성 규명을 위하여 사용된 초기 당농도는 50, 110, 190, 250 g/l이었다.

각 기질의 초기 농도에 따라서 발효시간과 알콜생성량, 균체생성량, 기질의 감소량 사이의 상관관계를 구하기 위하여 발효시작 후 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 32, 36, 40시간마다 시료를 채취하여 알콜, 균체, 기질의 농도를 G.C., U.V.로 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**발효시간에 따른 발효특성치 변화경향**

Fig. 2 내지 6은 초기 당농도 50, 79, 110, 190 및 250 g/l의 각 경우에 대한 발효시간과 기질농도, 알콜농도, 균체밀도, 비증식속도, 알콜 비생성속도 사이의 함수관계를 나타내고 있다.

Fig. 2에서 알 수 있듯이 초기 당농도가 50 g/l인 경우에는 발효 시작 후 4시간 내지 5시간 사이에서 균체의 비성장속도가 최대치를 나타내었으며 그 이후는 계속 감소하여 12시간이 지나면 균체의 증식이 종식되었다. 알콜이 비생성속도는 4시간 내지 7시간 사이에서 가장 큰 값을 나타내었고 시간이 지남에 따라 계속 감소하여 12시간 이후에는 알콜생성이 정지되었다. 이 경우 알콜생성율,  $Y_{p/s}$  및 균체생성율,  $Y_{x/s}$  역시 발효시간의 함수

임을 알 수 있었다. 발효 초기에는 낮은 값을 나타내었으나 대사활동이 왕성한 5시간 부터 8시간 사이에서  $Y_{x/s}$  값은 0.15 내지 0.17,  $Y_{p/s}$  값은 0.42 내지 0.45 사이에 분포됨을 알 수 있었다.

Fig. 3은 초기 당농도가 79 g/l인 경우에 대한 발효시간과 발효특성치 사이의 관계를 나타내고 있다. 이 경우 역시 발효 시작 후 4시간 내지 6시간 사이에서 최대 비증식속도 및 최대 알콜 비생성속도의 값을 나타내었으며 그 이후에는 두 값 모두 감소하는 경향을 나타내었다.  $Y_{p/s}$  및  $Y_{x/s}$ 의 값은 발효 시작 후 7시간 부근에서 최대치 0.42 및 0.09를 나타내었으며 그 외의 구간에서는 이보다 낮은 값을 나타내었고 발효시간에 따른 일관된 경향성은 얻을 수 없었다.

Fig. 4,5,6에서 알 수 있듯이 초기 당농도 110, 190, 250 g/l인 경우에도 균체 비증식속도 및 알콜 비생성속도가 낮은 알의 경우와 비슷한 경향을 나타내었으나 초기 당농도가 증가할 수록 최대치에서 감소하는 경향이 완만해짐을 알 수 있었다. 에탄올수율 및 균체수율은 발효 전 구간에 걸쳐 당농도의 증가에 따라 감소하는 경향을 보였으며 초기 당농도가 190 및 250 g/l인 경우에는 발효 전 구간에서 거의 일정한 값을 나타내었다.  $Y_{p/s}$  값인 경우 초기 당농가 190 g/l일 때는 약 0.22, 초기 당

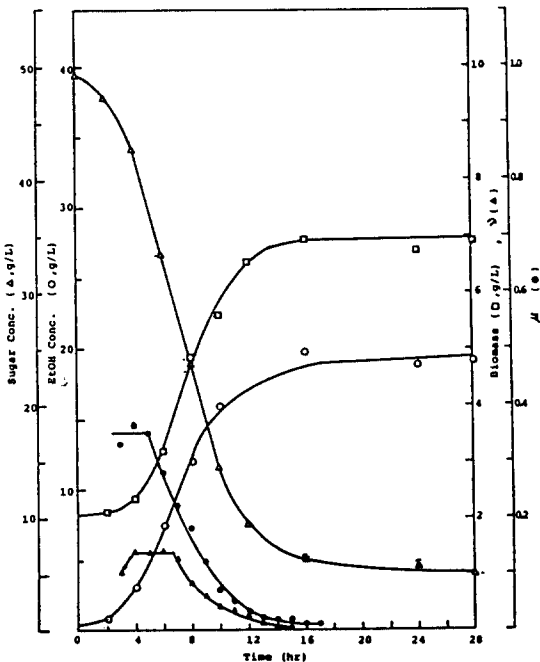


Fig. 2. Changes of Fermentation Characteristics According to Time in Batch Experiment; Initial Sugar Conc. = 50 g/L

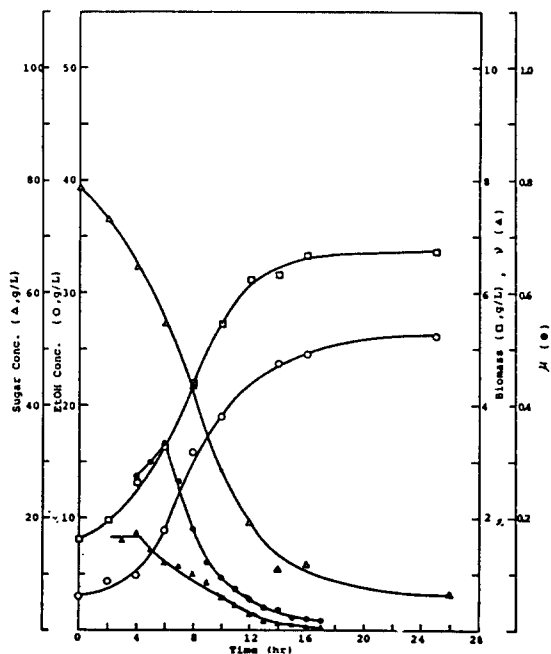


Fig. 3. Changes of Fermentation Characteristics According to Time in Batch Experiment; Initial Sugar Conc. = 79 g/L

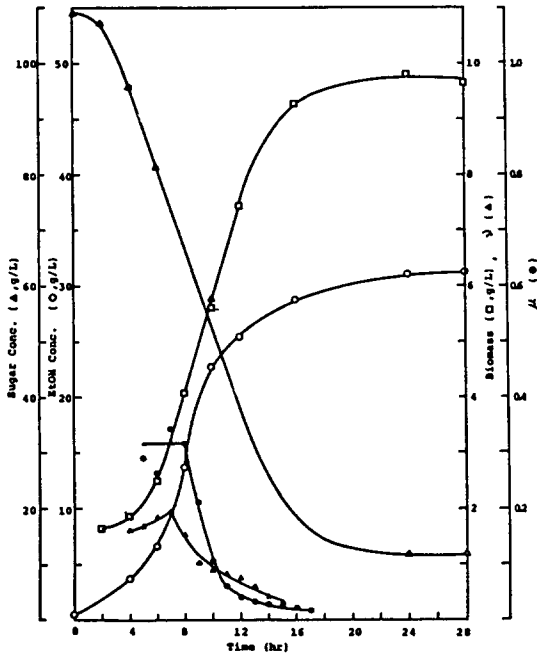


Fig. 4. Changes of Fermentation Characteristics According to Time in Batch Experiment; Initial Sugar Conc. = 100 g/L

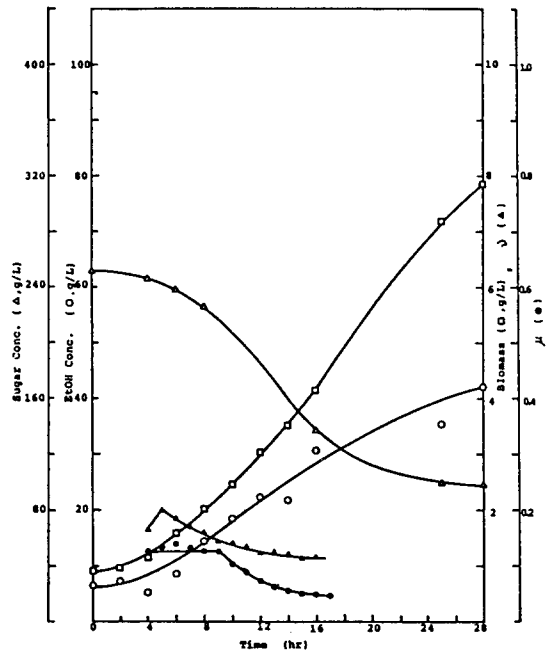


Fig. 6. Changes of Fermentation Characteristics According to Time in Batch Experiment; Initial Sugar Conc. = 250g/L

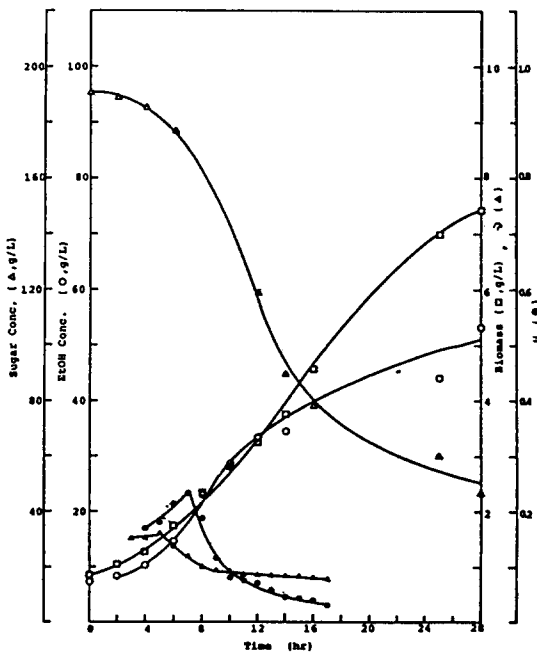


Fig. 5. Changes of Fermentation Characteristics According to Time in Batch Experiment; Initial Sugar Conc. = 190 g/L

농도가 250 g/l 일 때는 0.2 근방의 값을 나타내었다.

대수기에 이르는 시간 및 정체기에 도달하는 시간은 당농도 증가에 따라 늦어지는 경향성을 보였으며 알코올의 총괄이론수율은 당농도가 증가할 수록 감소하였으며 총괄균체생성량은 초기 당농도 증가에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나 선형적인 관계는 아니었다.

**최대 비증식속도와 알코올 및 당농도 사이의 함수관계**

Fig. 7은 각 초기 당농도에 대한 앞의 실험결과로 부터 구한 균체의 비증식속도와 발효기질 내의 알코올 및 당농도와의 함수관계를 나타내고 있다. Fig. 7의 제일 위의 사각형은 초기 당농도 250 g/l의 실험에서 얻은 최대 비증식속도와 알코올 및 당농도 사이의 함수관계이며, 아랫 방향의 순으로 초기 당농도 190, 110, 79, 50 g/l의 실험결과이다. 이 결과에 의하면 각 초기 당농도에서 최대 비증식속도는 당의 농도에 상관없이 알코올 농도 20 g/l 이하에서 발생함을 알 수 있었으며, 일정한 알코올농도에서는 당의 농도가 75 g/l까지는 당농도 증가에 따라 비증식속도도 증가하나 그 이상에서는 당농도 증가에 따라 비증식속도가 감소함을 알 수 있다.

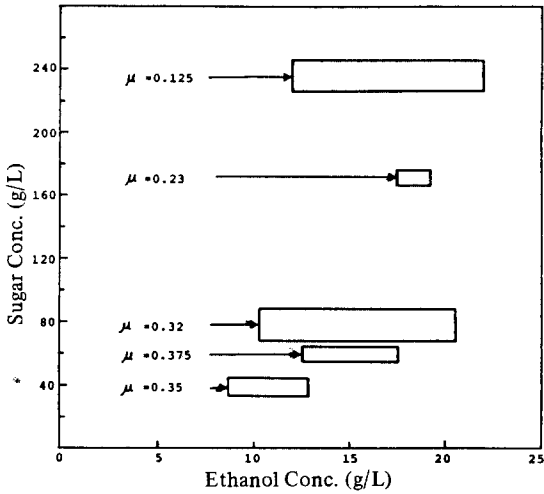


Fig. 7. Functional Relationship among Maximum Specific Growth Rates and Range of Sugar Conc., that of EtOH Conc.

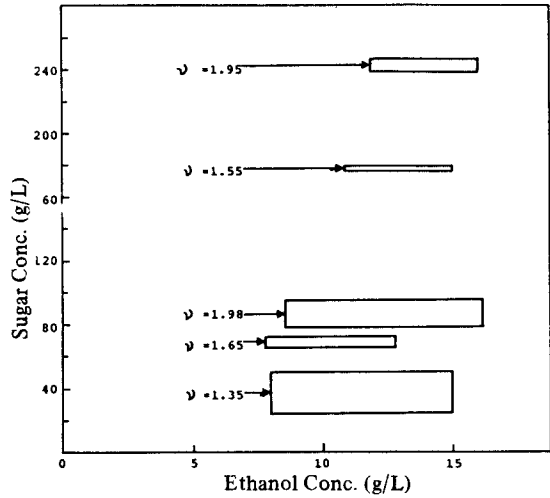


Fig. 8. Functional Relationship among Maximum Specific ethanol Production Rates and Range of Sugar Conc., that of EtOH Conc.

**최대 알콜 비생성속도와 알콜 및 당농도 사이의 함수 관계**

Fig. 8은 앞절의 실험결과로부터 얻은 최대 알콜 비생성속도와 발효기질내의 알콜 및 당농도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 이 그림에서 제일 윗 부분의 사각형은 초기 당농도 250 g/l인 경우의 실험결과이며, 아랫쪽으로 초기 당농도 190, 110, 79, 50 g/l의 결과이다. 알콜의 비생성속도는 알콜농도 16 g/l 이하이고 당농도 78 내지 95 g/l 사이에서 최대치를 나타냄을 알 수 있다.

Fig. 7과 Fig. 8의 결과를 종합하여 보면 기질이 폐지 감자이고 사용균주가 *S. cerevisiae* SIV-89인 경우에는 발효기질 내의 알콜농도가 16 g/l 이하이고 당농도가 75 내지 90 g/l 사이에서 균체의 비성장속도 및 알콜 비생성속도가 최대가 된다는 결론에 이른다.

**알콜농도와 당 및 균체농도 사이의 변화경향**

Fig. 9는 각 초기 당농도에서 알콜생성량에 따른 발효기질 내의 당농도 및 균체 변화량의 경향을 나타낸 그림이다. 초기 당농도가 110 g/l까지는 알콜생성량 증가에 따라서 당농도가 급격히 감소하나 당농도 190 g/l 이상에서는 알콜생성량이 증가할 수록 당농도는 완만하게 줄어드는 경향을 나타내어 알콜생성량이 75 내지 80 g/l 이상에서는 당이 거의 감소하지 않았다. 동일한 알콜농도에 대한 균체의 생성량 증가 경향은 초기 당농도가 증

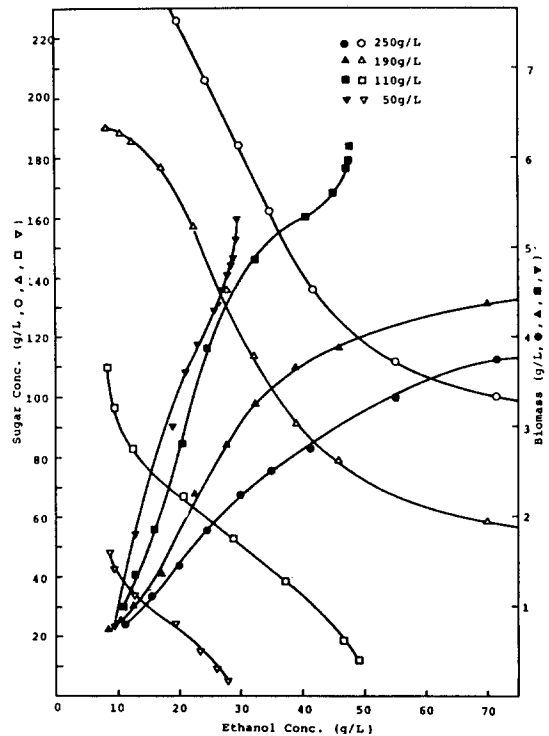


Fig. 9. Ethanol Conc. vs. Sugar Conc. and Biomass.

가할 수록 감소하는 경향을 보이고 있다.

이 결과에 의하면 초기 당농도가 50/1 내지 110 g/l 인 경우에는 당의 대부분이 알콜로 전환되거나 초기 당농도가 증가할 수록 당의 전환율은 감소하였으며 알콜농도가 75 내지 80 g/l 인 경우에는 발효기질 내의 당농도가 높더라도 미생물의 대사활동이 정지됨을 알 수 있다.

## 요 약

초기 당농도 50, 79, 110, 190 및 250 g/l 각 각에 대한 *S. cerevisiae* SIV-89 이 돼지감자 알콜발효특성(비생장속도, 비생성속도, 알콜생성율, 균체생성율, 알콜전환율, 알콜농도의 영향)을 시간의 함수로 규명하여 보았다. 최대 비증식속도 및 최대 알콜 비생성속도는 초기 당농도 70 내지 80 g/l 까지는 증가하여 최대값 0.35와 1.98을 나타내었으나 그 이상에서는 감소하였다. 또한 최대 비증식속도 및 최대 알콜 비생성속도가 나타나는 시간은 초기 당농도 증가에 따라 점차로 지연되는 현상을 나타내었다. 균체생성율  $Y_{x/s}$  와 알콜생성율  $Y_{p/s}$  의 최대값은 0.15, 0.45이였으며 초기 당농도 증가에 따라 감소 경향을 나타내었다.

당의 알콜 전환율은 당농도의 증가에 따라 감소하여 당농도 190 g/l 이상에서는 70% 이하로 떨어졌다. 또한 발효기질 내의 알콜농도가 증가하면 균체의 대사활동이 감퇴되어 알콜농도 70 내지 80 g/l에 이르게 되며 잔여 당농도에 관계없이 균체의 성장 및 알콜 생성이 완전히 중지되는 현상을 나타내었다.

## 참 고 문 헌

1. 목영일 (1980), *화학공학* **18**, (2)
2. 목영일 (1980), *화학공학* **18**, (4)
3. Z. Duvnjak, N. Kosaric and S. Kliza (1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 2297.
4. J.P. Guiraud, J. Bourgi, M. Stervinou and M. Claisse (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 850.
5. J.P. Guiraud, J. Daurelles and P. Galzy (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1401.
6. A. Converti, P. Perego, M.D. Borghi, F. Parisi and G. Ferraiolo (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 711.
7. J.S. Yu (1989), *M.S. Thesis*, Inha University, Incheon.
8. J.P. Guiraud, J. Bourgi, N. Chabbert and P. Galzy (1986), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**, 371.
9. A. Margaritis and P. Bajpai (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 306.
10. J. Baratti et al. (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 850.
11. A. Margaritis and P. Bajpai (1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 941.
12. 목영일, 김철호, 최기련, 허병기 (1989), 88년도 대체에너지 기술개발사업-연구 보고서, 동력자원연구소.
13. 유연우, 김철호, 김수일 (1983), *한국농화학회지*, **26**, 119.
14. 김철호 (1982), *M.S. Thesis*, Ajou University, Suwon.
15. 허병기, 유진선, 양지원 (1989), *한국생물공학회지*, **4**, (1), 48.
16. Weiner (1978), *J. Ind. Brew.*, **84**, 222.

(Received July 18, 1987)