

효모 *Kluyveromyces fragilis*의 연속 에탄올 발효 특성에 관한 연구

허 병 기 · 김 진 한 · 류 장 수 · * 목 영 일

인하 대학교 생물공학과

*아주 대학교 화학공학과

Ethanol Fermentation Characteristics in Chemostat Culture of *Kluyveromyces fragilis*

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

Department of Biological Engineering, Inha University

*Department of Chemical Engineering, Ajou University

ABSTRACT

It was investigated that the influent sugar concentration and the dilution rate have an influence on the ethanol fermentation characteristics at steady state in a chemostat culture of *K. fragilis* using Jerusalem Artichoke juice as substrate. And also the optimum condition of high ethanol productivity and low residual sugar output in the ethanol production by *K. fragilis*, was clarified to be given at a dilution rate of 0.22/hr and at an influent sugar concentration of 85g/l.

서 론

1970년대 초, 석유가격의 앙등에 기인하여 바이오매스 자원을 이용한 발효알콜 생산에 많은 관심이 집중되었다. 바이오매스 자원중 돼지감자(Jerusalem Artichoke)는 건량기준으로 68.4~83.1%의 탄수화물을 함유하며, 황폐한 토양에서도 잘 자라고, 비료를 필요로 하지 않는 작물로서, 생산성 및 에탄올 잠재수율이 높아서(1,2) 상업용 에탄올 생산자원으로 유망하다.

돼지감자의 알콜발효에 이용되는 균주로는 *K. fragilis*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *Z. mobilis*, *S. diastaticus* 등이 보고되어 있다. 이들에 의한 돼지감자의 알콜발효는 대부분이 회분식공정에서 균주의 알콜생성 경향, 균체성장 경향과 pH, 온도, 용존산소 등 환경인자가 반응에 미치는 영향에 대하여 연구되었다(3).

중래의 회분식 발효공정에서 알콜생산성은 1내지 2.5 g/lhr이었다(4). 발효알콜의 생산성을 향상시키기 위하여 에탄올 저해작용을 저감하고, 높은 균체농도를 사용하는 등의 방법들이 제안되었다(5). 유가배양식(Fed-batch)발효, 단순 연속발효(CSTR), 균체제순환

연속발효, 고정화 균체를 이용한 연속발효 등의 방법에 의하여 알콜 생산성을 30내지 100 g/lhr (3)까지 향상시키는 결과를 얻게 되었다. 돼지감자의 연속 알콜발효 실험은 주로 *Z. mobilis*와 *K. marxianus* 변이종에 의한 돼지감자 착즙의 발효에 대하여 수행되었다. 전자의 경우 알콜생산성은 가수분해방법, 회석속도에 따라 4.1 내지 29 g/lhr 이고, 후자의 경우는 0.55 내지 2.55 g/lhr 사이에 분포되어 있다(3).

본 연구에서는 알콜발효능이 높은 것으로 보고(6)된 *K. fragilis*에 의한 돼지감자 착즙의 연속 알콜발효 실험을 통하여 연속 알콜생산 시스템의 발효특성과 최적 알콜생산성을 위한 작동조건 등을 구명하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서는 *Kluyveromyces fragilis* CBS 1555를 사용하였다. 4°C, YM 사면배지상에서 냉장보관된 균주를 500 ml 삼각플라스크내의 200 ml YM 배지(7)에 접종하고, 35°C에서 24시간 진탕배양한 후, 이것을 접종용 균주로 사용하였다.

발효기질

본 실험에서는 문헌(7)의 방법을 이용하여 처리한 패지갑자 착즙을 기질로 사용하였으며, 주입기질의 당농도는 45, 85, 115, 135 g/l이었다. 기질용액의 pH는 2 N-NaOH 를 사용하여 pH 5.5로 조정하였다.

발효실험

본 실험에서 사용한 공정의 개략도를 Fig. 1에 나타내었다. 11 Jar Fermenter (선미과학)에서 작동부피를 0.8 l로하여 실험을 수행하였다. 모든 실험에서 공기공급속도는 0.1 vvm, 교반속도 150 rpm, 온도 35°C, pH 5.5로 하였고, pH 조정은 발효액 조성변화를 최소화 하기 위하여 2 N-NaOH 용액을 사용하였다. 또한 공기공급에 의한 알콜의 유실량을 최소화하기 위하여 냉각관 (Graham Condenser, 600mmL)을 설치하였고, 냉각수 온도는 1°C, 유속은 1 GPM 으로 하였다. 발효조내의 기질에 작동부피의 10% (v/v)에 해당하는 접종용 균주용액을 주입하여 24시간동안 발효시킨 후, 희석속도 0.05, 0.11, 0.16, 0.22, 0.36, 0.43 hr⁻¹에 대한 알콜 발효실험을 수행하면서 발효시간에 따른 당농도, 균체농도, 알콜농도를 측정하였다.

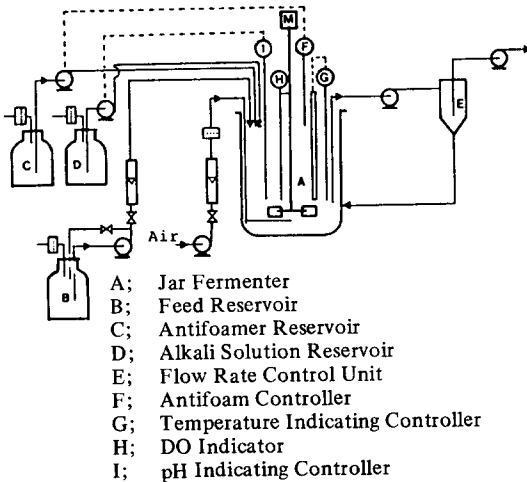


Fig. 1. Schematic Diagram for Experimental Apparatus.

시료 분석

시료를 4000 rpm에서 30분간 원심분리하여, 상등액은 총당 및 알콜농도 분석에, 침전물은 균체농도 분석에 이용하였다. 총당의 농도는 분광광도계 (Shimadzu UV-120-2)를 사용하여 Anthrone 법(7)으로 분석하였다. 알콜농도는 가스크로마토 그래피, Varian aerograph

series 1800)을 사용하고 isopropanol을 기준물질로 하여 분석하였다(7). 균체농도는 분광광도계를 사용하여 620 nm에서 균체 회색액의 흡광도를 측정하고, 흡광도와 균체 건조중량(7) 사이의 표준 농도곡선으로부터 구하였다.

결과 및 고찰

CSTR에서의 발효실험 결과

Fig. 2는 주입기질의 당농도가 45 g/l인 경우에 희석 속도에 따른 잔당농도, 균체농도, 알콜농도 및 알콜생산성, 균체유실율의 변화경향을 나타낸 것이다. 이 결과에 의하면 희석속도가 낮을때, 기질이 거의 다 소모되는 기질제한성의 균체발효특성이 나타남을 알 수 있으며, 전체적으로는 전형적인 CSTR의 발효특성을 보이고 있다.

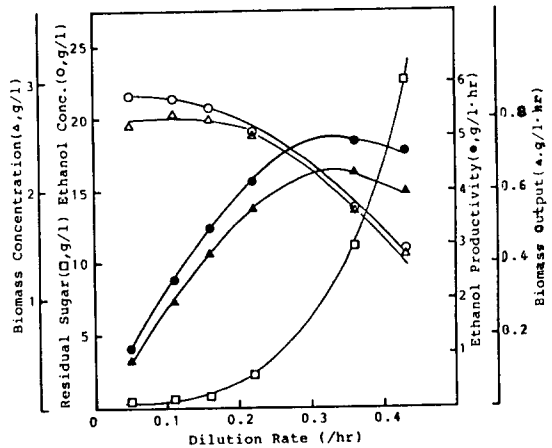


Fig. 2. Steady State Data for *K. fragilis* with Jerusalem Artichoke Juice of 45g Sugar/l.

잔당농도와 희석속도 사이의 함수관계

Fig. 3은 주입 당농도를 매개변수로 하였을때 희석속도와 발효액중 잔당농도 사이의 함수관계를 나타낸 것이다. 실험범위내의 희석속도와 주입 당농도에서는 희석속도 및 주입당농도가 증가할수록 발효액중 잔당농도는 증가하였다. 주입당농도 115 g/l 이상에서는 잔당농도가 급격히 증가하였으며, 희석속도 0.36 hr⁻¹에서는 주입 당농도에 관계없이 0.22 hr⁻¹에서 보다 2배 이상으로 급격히 증가하였다.

희석속도가 균체의 기집이용율에 미치는 영향

Fig. 4는 주입당농도를 매개변수로 하였을때 희석속도

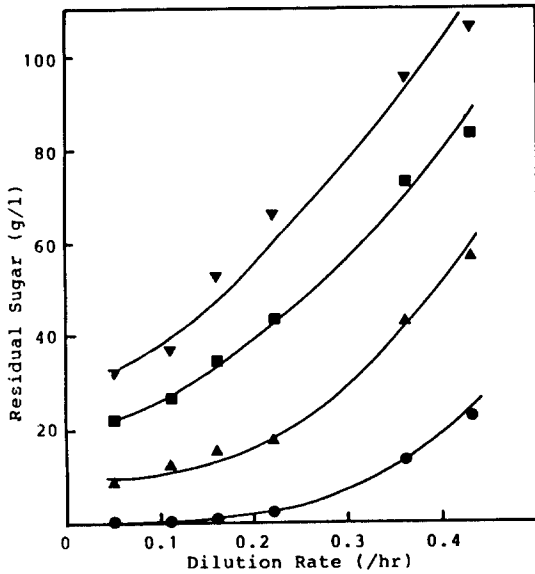


Fig. 3. Residual Sugar as a Function of Dilution Rate in various Influent Sugar Concentrations; \bullet —, 45g/l; \blacktriangle —, 85g/l; \blacksquare — 115g/l; \blacktriangledown — 135g/l.

가 발효액중 균체에 의한 당이용율에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 회석속도를 고정하고 보면, 주입당농도가 증가함에 따라, 당의 이용율은 감소하였으며 일정한 주입 당농도에 대하여는 회석속도가 증가할수록 당의 이용율은 감소하였다.

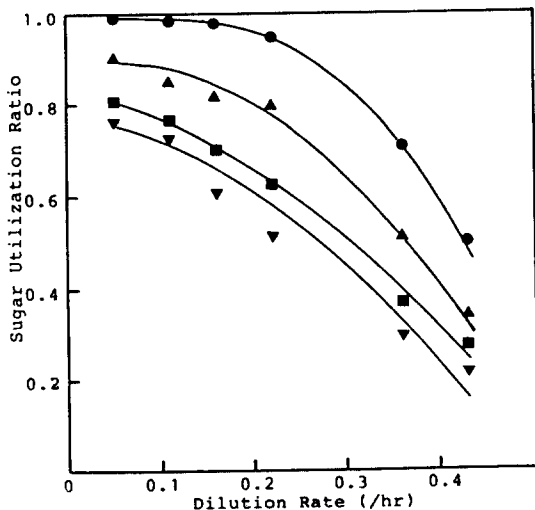


Fig. 4. Sugar Utilization Ratio as a Function of Dilution Rate in various Influent Sugar Concentrations; \bullet —, 45g/l; \blacktriangle —, 85g/l; \blacksquare — 115g/l; \blacktriangledown —, 135g/l.

회석속도와 균체농도 사이의 함수관계

Fig. 5는 주입 당농도를 매개변수로 하고 회석속도와 발효액중 균체농도 사이의 함수관계를 나타낸 것이다. 실험범위내의 모든 주입당농도에서 회석속도가 증가할수록 균체농도는 감소하였다. 회석속도 0.22 hr^{-1} 이하에서 회석속도를 고정하고 보면, 주입당농도가 증가함에 따라 당농도 115g/l까지는 균체농도가 증가하지만, 당농도가 그 이상이 되면 균체농도는 감소하였다. 회석속도 0.16 hr^{-1} 이상일때 주입 당농도 85g/l, 115g/l에서의 균체농도는 차이가 거의 없었다. 실험범위내 회석속도에서 당농도 135g/l의 균체농도는 당농도 45g/l와 85g/l에서의 균체농도 사이에 분포하였다. 회석속도에 따른 균체농도 변화정도와 주입당농도에 따른 균체농도 변화정도를 비교해 볼때, 전자가 후자에 비하여 큰 것으로 보아서, 회석속도가 균체농도에 미치는 영향이 주입당농도의 영향보다 큰 것으로 추정할 수 있다.

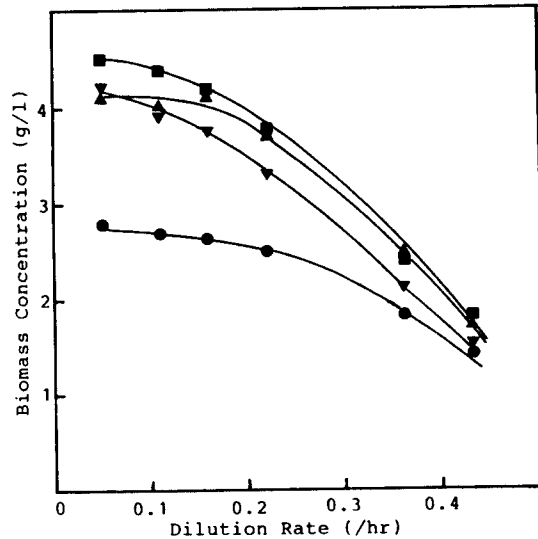


Fig. 5. Biomass Concentration as a function of Dilution Rate in Various Influent Sugar Concentrations; \bullet —, 45g/l; \blacktriangle — 85g/l; \blacksquare —, 115g/l; \blacktriangledown —, 135g/l

회석속도와 알콜농도 사이의 함수관계

Fig. 6은 주입 당농도를 매개변수로 하였을때 회석속도와 알콜농도 사이의 함수관계를 나타낸 것이다. 알콜농도는 회석속도가 증가할수록 감소하였으며, 회석속도를 고정하고 본 주입 당농도의 영향은 균체농도에 대한 것과 유사한 경향을 보이고 있다. 또 회석속도와 주입당농도가 각각 알콜농도에 미치는 영향을 비교해 보면, 이것도 균체농도의 경우와 유사한 경향을 보이고 있다.

Novak 등(8)은 효모인 경우, 당농도가 100 g/l 이상이 되면 기질의 저해영향이 나타나는 것으로 보고하였다. 허 등(7)은 *K. fragilis*에 대하여 기질당의 초기농도가 65 g/l일때, 최대 비성장속도는 0.40 hr⁻¹로써 가장 큰 값을 나타내며, 초기 당농도가 105 g/l일때 알콜의 최대 비생성속도는 1.68 g/g hr로 가장 높다고 보고하였다. 이들 연구 결과들과 앞의 실험결과들을 비교하면 다음과 같다. 즉, 기질의 저해작용이 없는 당농도 45 g/l에서 회석속도가 낮을때는 당이 거의 소모되어 알콜과 균체로 전환되는 기질제한성의 균체발효특성이 나타났다. 그러나 회석속도가 증가함에 따라 균체의 농도가 낮아지고, 그에따라 당의 이용율이 점차 감소하게 되므로, 잔당농도는 증가하게 된다. 또 주입 당농도가 증가함에 따라 낮은 회석속도에서는 균체의 증식속도가 증가하고, 소모되는 당의 양이 증가하여 알콜농도는 높아지지만 당농도와 회석속도가 더욱 증가하면 균체에 대한 기질의 저해작용으로 인하여 주입당농도 115g/l 이상에서 다시 균체농도가 감소하고, 그에따라 당의 이용율이 감소하게 되므로, 발효액 중 잔당농도는 증가하는 것으로 보인다.

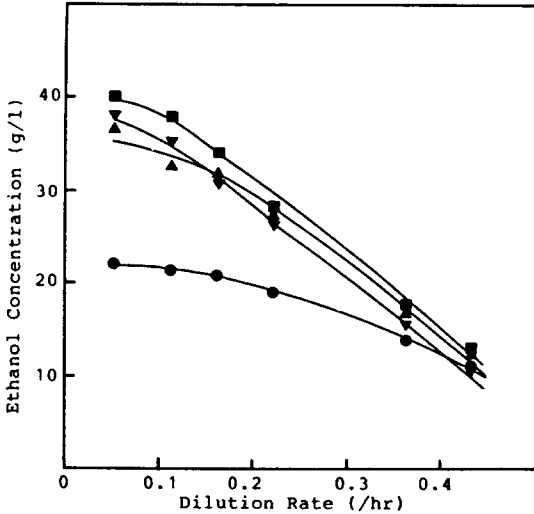


Fig. 6. Ethanol Concentration as a function of Dilution Rate in various Influent Sugar Concentrations; —●—, 45g/l; —▲—, 85g/l; —■—, 115g/l; —▼—, 135g/l.

회석속도에 따른 미발효 잔당유실율의 특성

Fig. 7은 주입 당농도를 매개변수로 하였을때, 회석속도가 미발효 잔당의 유실율에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 회석속도 및 주입 당농도가 증가할수록 미발효 잔당의 유실율은 증가하였다. 회석속도 0.36 hr⁻¹에서의 잔

당유실율은 회석속도 0.22 hr⁻¹에서의 잔당유실율에 비하여 2.4배 내지 9.3배로 크게 증가하였다. 이 현상은 균체유실율이 회석속도 0.36 hr⁻¹에서 크게 증가함에 따른 미발효 잔당량의 증가에 기인하는 것으로 보인다.

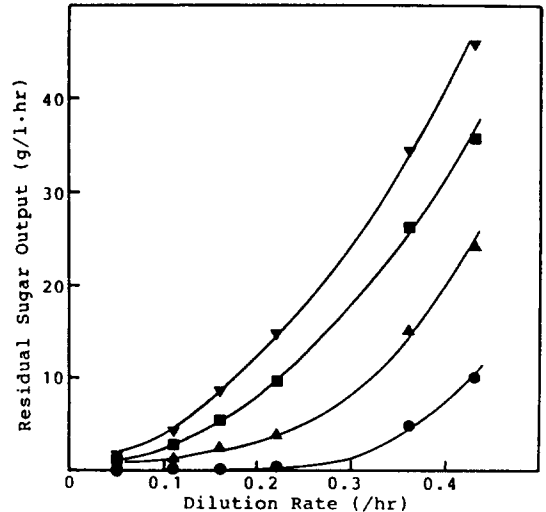


Fig. 7. Residual Sugar Output as a function of Dilution Rate in various Influent Sugar Concentrations; —●—, 45g/l; —▲—, 85g/l; —■—, 115g/l; —▼—, 135g/l.

회석속도에 따른 균체유실율의 특성

Fig. 8은 주입 당농도를 매개변수로 하고 회석속도와 균체유실율 사이의 함수관계를 나타낸 것이다. 균체유실율은 회석속도 0.36 hr⁻¹에서 최대값을 나타내었으며, 주입 당농도가 증가할수록 균체유실율은 증가하는 경향을 보였다. 그러나, 당농도 135 g/l에서는 균체에 대한 기질의 저해영향에 기인되어 균체농도가 낮아지게 되고 주입당농도 85 g/l 및 115 g/l에서의 균체유실율과 유사한 값을 나타내었다. 이 결과에 의하면 균체유실율은 주입 당농도보다는 회석속도에 의하여 더 큰 영향을 받는 것으로 추측된다.

회석속도에 따른 알콜생산성의 특성

Fig. 9는 주입 당농도를 매개변수로 하고 회석속도와 알콜생산성 사이의 함수관계를 나타낸 것이다. 알콜생산성은 대체로 회석속도 0.36 hr⁻¹에서 최대치를 나타내고 있으나, 당농도 135 g/l에서는 0.22 hr⁻¹에서 최대치를 보이고 있다. 전반적으로 알콜생산성에 대한 회석속도와 주입 당농도의 영향은 균체유실율에 대한 경향과 유사하게 나타났다.

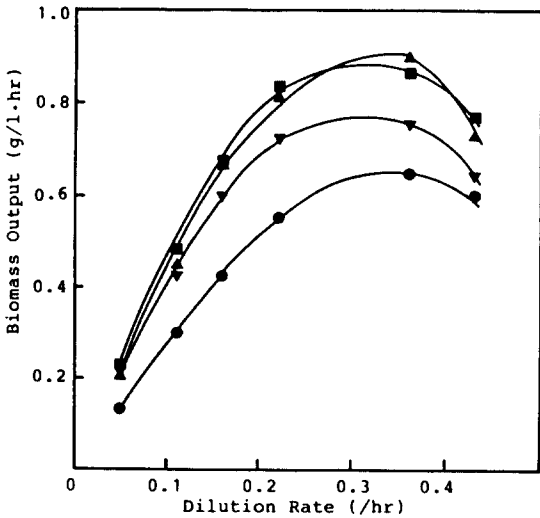


Fig. 8. Biomass Output as a function of Dilution Rate in various Influent Sugar Concentrations; —●—, 45g/l; —▲—, 85g/l; —■—, 115g/l; —▼—, 135g/l.

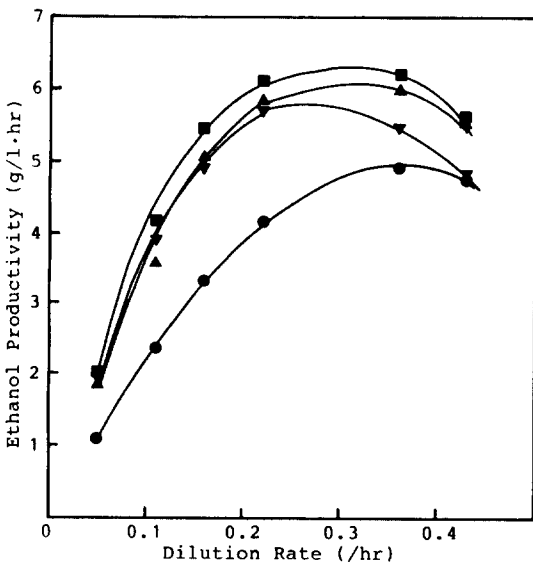


Fig. 9. Ethanol Productivity as a function of Dilution Rate in various Influent Sugar Concentrations: —●—, 45g/l; —▲—, 85g/l; —■—, 115g/l; —▼—, 135g/l.

양상을 보이고 있다. 알콜생산성이 균체의 증식과 밀접한 관계가 있음을 나타낸다고 할 수 있으며, 이미 앞에서 검토한 바와 같이 저해영향이 나타날 정도로 당농도가 높아지고, 또 희석속도가 크게 증가하면 균체농도가 낮아지게 되어 발효에 이용할 수 있는 미발효당의 농도가 높아도 알콜 생산성은 더이상 증가하지 않는 것으로 보인다.

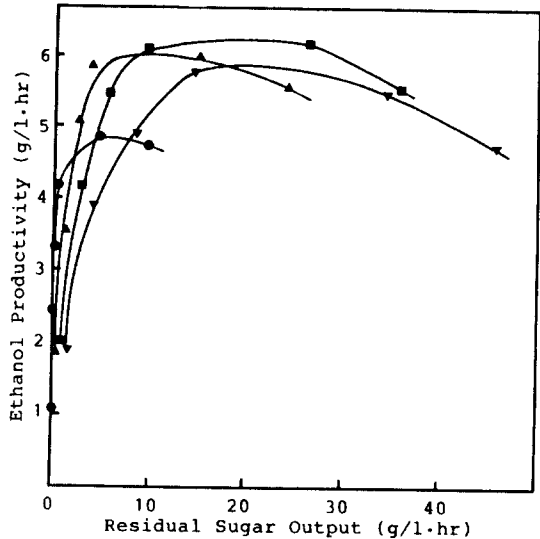


Fig. 10. Correlations between Ethanol Productivity and Residual Sugar Output in various Influent Sugar Concentrations; —●—, 45g/l; —▲—, 85g/l; —■—, 115g/l; —▼—, 135g/l.

최적 알콜생산성을 위한 작동조건

알콜생산에 대한 적정조건으로써 알콜생산성이 높고 미발효 당의 유실율이 낮은 조건을 설정하였다. 당의 유실율이 낮을 수록 당의 이용율이 높게 나타나는 본 실험 결과를 토대로 하여, 알콜생산성이 높고 동시에 당의 유실율이 낮은 작동조건을 구명할 수 있는 인자로서, 알콜생산성과 당 이용율의 곱을 조합인자로 택하였다. 희석속도와 조합인자 사이의 함수관계를 나타낸 Fig. 11에 의하면 당농도 45g/l, 85g/l인 경우에는 희석속도 0.22 hr⁻¹ 근방에서 조합인자는 최대치를 나타내었고, 당농도 115g/l, 135g/l인 경우에는 희석속도 0.16 hr⁻¹ 근방에서 최대치를 나타내었다. 그리고 주입 당농도 85g/l 근방에서 조합인자는 최대치를 나타내었다. 본 연구결과에 의하면 알콜생산성이 높고 동시에 당의 유실율이 낮은 알콜발효의 작동조건은 희석속도 0.22 hr⁻¹, 주입 당농도 85g/l이었다. 이 조건하에서 알콜생산성은 5.9

알콜생산성과 미발효 잔당의 유실율 사이의 함수관계

Fig. 10은 미발효 잔당의 유실율에 대한 알콜생산성의 함수관계를 나타낸 것이다. 이 관계는 Monod 식이 나타내는 기질농도에 대한 균체-식속도와와의 관계와 유사한

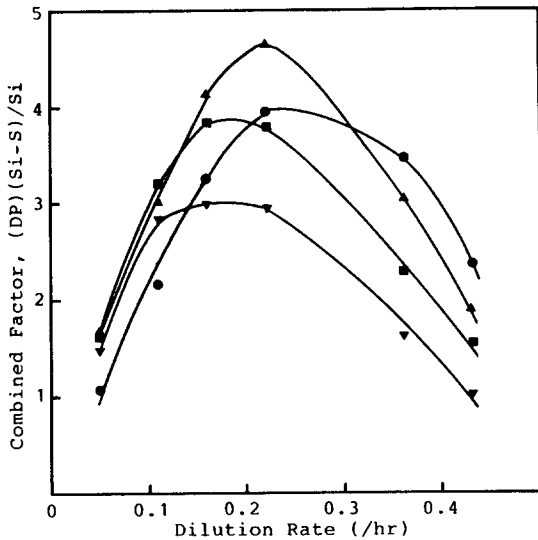


Fig. 11. Combined Factor, with Ethanol Productivity and Sugar Utilization Ratio, as a Function of Dilution Rate in various Influent Sugar Concentrations; —●—, 45g/l, —▲—, 85g/l; —■—, 115g/l; —▼—, 135g/l.

g/l-hr, 당의 유실율은 3.8g/l-hr이었으며, 에탄올 수율은 0.39, 당이용율은 80%, 비 알콜생성속도는 1.6g/gh이었다. 알콜생산성은 *K. marxianus*에 의한 돼지감자 착즙의 연속알콜발효시 알콜생산성 2.2g/l-hr(9)보다 높은 값이며, *S. cerevisiae*에 의한 glucose 연속 알콜발효시의 알콜생산성(10)보다 다소 낮은 값이다. 또 비 알콜생성속도는 *K. fragilis*의 회분배양시 최대 비알콜생성속도 1.68g/g-hr(7)에 근사하는 값이다. 이들 값은 연속공정에 대하여 보편적으로 인지되는 특성치들이지만, 경제적으로 타당성이 있다 할 수 없다. 따라서 경제적 타당성, 즉 알콜생산성을 향상시키기 위하여 고농도 균체에 의한 발효가 앞으로의 연구과제로 진행될 것이다.

요 약

균체 재순환이 없는 연속 발효조에서 *K. fragilis*에 의

한 돼지감자 착즙의 알콜발효시, 정상상태에서 주입 당 농도와 회석속도가 에탄올 발효특성에 미치는 영향에 대하여 구명한 결과를 요약하면 다음과 같다. 즉, 주입 당 농도가 낮고, 회석속도가 낮을 때는 기질제한성의 균체 발효특성을 보였다. 그리고 회석속도가 증가할수록 에탄올농도와 균체농도는 감소하였으나, 잔당농도는 증가하였다. 에탄올 생산성 및 균체유실율은 회석속도 0.36 hr⁻¹에서 최대값을 나타내었다. 에탄올 생산성과 균체유실율에 대한 회석속도 변화의 영향이 주입 당농도 변화의 영향보다 큰 것으로 추정되었다. 에탄올 생산성이 높고 동시에 당의 유실율이 낮은 최적조건은 회석속도 0.22 hr⁻¹, 주입 당농도 85g/l이었다. 이 조건하에서 에탄올 생산성은 5.9g/l-hr, 당유실율은 3.8g/l-hr, 에탄올 수율 0.39, 당이용율 0.8, 비 알콜생산성 1.6g/l-hr이었다.

참 고 문 헌

1. A. Margaritis and P. Bajpai(1982) *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 941.
2. L. A. Williams et. al.(1982), *Biotechnol. Letters*, **4**(1), 45.
3. 목영일, 김철, 최기현, 허병기(1989) 88년도 매체에너지 개발사업 연구보고서, 동력자원연구소.
4. R. L. Cysewski and C. R. Wilke(1977) *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125.
5. S. K. Tangnu(1982), *Process Biochem.*, **17**(5), 36.
6. 유연우, 김철호, 김수일(1983) *한국농화학회지* **26**, 119.
7. 허병기, 유진선, 양지원(1989) *한국생물공학회지*, **4**(1), 50.
8. M. Novak, P. Strehaiano, M. Moreno and G. Goma(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 201.
9. A. Margaritis and P. Bajpai(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1473.
10. R. L. Cysewski and C. R. Wilke(1976) *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1279.

(Received November 21, 1989)