

효모 *K. marxianus*에 의한 돼지감자 착즙에 대한 에탄올 발효 특성

김진한·허병기·배천순·김현성  
인하대학교 공과대학 생물공학과

Ethanol Fermentation Characteristics of *K. marxianus*  
on Jerusalem Artichoke tuber Extract

Jin Han Kim, Byung Ki Hur, Cheon Sun Bae and Hyun Sung Kim  
Department of Biotechnology and Bioengineering, Inha University

ABSTRACT

The investigations of specific growth rate, specific alcohol production rate, cell yield, alcohol yield of *K. marxianus* LG were performed according to the sugar concentrations, 50, 80, 110, 190, and 250 g / l of extracted solution of Jerusalem Artichoke.

The functional relationship between specific growth rate, specific alcohol production rate, and alcohol concentrations were devoted study to. In case of low concentration of alcohol, the functions were linear relationships. But in the region of high concentration of alcohol, they expressed the exponential relationships. The growth rate of *K. marxianus* was prohibited at higher than 50 g / l of alcohol concentrations regardless of concentration of residual sugar. Cell and alcohol yield showed the maximum values around 25 g / l of alcohol concentration without being related to initial sugar concentrations.

서론

에탄올은 개술린에 비하여 액체연료로서의 여러가지 잇점(1,2)을 가지는 대체에너지원으로 순수 알콜 또는 개소홀, 디조홀등이 브라질을 비롯한 여러국가에서 청정 연료로 이용되고 있다.

돼지감자(*Helianthus tuberosus*)는 수율이 높고(3), 토지이용이나 경작측면에서 여러가지 잇점을 가지므로(4), 알콜의 상업적 생산에 유망한 작물로 평가되고 있다. 알콜발효에 사용되어 오던 종래의 효모는 돼지감자 중의 이눌린을 발효하기가 어려워, 이눌린을 가수분해한 후, 이것을 알콜발효에 이용하여 왔다(5,6). 그러나, 산가수분해 공정에서는 고온반응으로 생성된 부산물이 효모의 대사과정을 저해하고, 효소 가수분해 공정에서는 효소의 특이성 및 활성의 향상성 유지가 곤란하여 경제성이

낮은 결점이 있다.

이눌린을 직접 발효하기 위해서는 inulinase 활성이 높고, 균체증식속도 및 발효속도가 크며, 에탄올에 대한 내성이 비교적 큰 균체가 요구된다. 이들 균체로는 *Candida pseudotropicalis*, *Candida kefyr*, *Torulopsis colliculosa*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces cicerisporus* 등이 있다(7). 이 중 에탄올 수율, 전화율, 발효속도등이 가장 높은 균체는 *K. marxianus*로 보고 되었다.

*K. marxianus*에 의한 돼지감자의 알콜발효 연구는 초기 당농도, 초기 에탄올농도 및 pH, 온도등이 균체증식 및 알콜생성에 미치는 영향을 규명한 것이 대부분이다. 이들 결과에 의하면, 적정 환경조건은 온도 35°C, pH5로 보고되었고, 균체의 최대 비중식속도는 초기 당농도에 따라 0.13hr<sup>-1</sup>와 0.44hr<sup>-1</sup> 사이에 분포되어 있다. 또 초기 당농도 250 g/l에서 최대 에탄올 농도는 102 g / l,

에탄올 수율은 이론치의 90%, 총당이용율은 90%로 보고되었다(7).

그러나, *K. marxianus*의 알콜발효 특성을 균체에 의해 생성된 발효액중 알콜농도의 함수로 구명한 연구는 찾아 보기 어려운 상태이다. 본 연구에서는 *K. marxianus*를 이용한 돼지감자의 알콜발효 특성치를 발효액중의 생성 알콜농도 및 소모된 당농도의 함수로 체계화함으로써, 알콜 생산의 적정조건을 규명하고자 하였다.

**재료 및 방법**

**균주**

본 실험에서 사용한 균주는 *Kluyveromyces marxianus* LG이며, YM배지를 이용, 35℃에서 24시간 진탕배양한 후, 이것을 발효기질 용액에 10% (v/v)로 접종하였다.

**발효기질**

본 실험에서는 문헌(10)의 방법을 이용하여 처리한 돼지감자 착즙을 기질로 하였다. 기질용액의 pH는 2 N-NaOH 용액을 적량 가하여 pH5.5로 조정하였으며, 발효실험에 이용한 초기 당농도는 50, 80, 110, 190, 250 g / l 이었다.

**발효실험**

회전식 진탕배양기에서 온도 35℃, 회전수 110rpm로 진탕배양하였으며, *K. marxianus*의 발효특성을 규명하기 위하여, 발효 시작후 8시간까지는 매시간마다, 16시간까지는 매2시간마다, 그리고 24시간까지는 매시간마다 시료를 채취하고, 알콜농도, 균체농도, 당농도를 측정하였다.

**시료의 분석**

시료는 4000rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액은 총당 및 알콜농도 분석에, 침전물은 균체농도 분석에 이용하였다.

총당의 농도는 분광광도계(Shimadzu UV-120-2)를 사용하여 Anthrone법(10)으로 분석하였다. 알콜농도는 isopropanol을 기준물질로 하여 Gas chromatography(Varian Aerography 1800)로 분석(10)하였다. 균체농도는 분광광도계를 사용하여 파장 620nm에서 균체회색액의 흡광도를 측정하고, 흡광도와 균체건중량(10)사이의 표준농도곡선으로부터 균체농도를 구한후, 회석비를 곱하여 균체의 실제농도를 구하였다.

**결과 및 고찰**

**발효시간에 따른 발효특성치 변화**

초기 당농도 80 g / l 일때, 발효시간에 따른 기질농도, 알콜농도, 균체농도의 변화경향을 Fig.1에 나타내었다. 16시간 경과후 발효는 거의 종료되고 알콜농도는 33 g / l 생성되었으며, 기질86%가 이용되었으며, Yp/s는 0.48(이론치의 94%)로써 당농도 100 g / l에서 *Z. mobilis*의 Yp/s와 동일한 값(11)을 나타내며, *K. marxianus* UCD(FST) 55-82, *K. marxianus* SU(B)79-2 67-5의 Yp/s(7)보다 높은 값을 나타내었다.

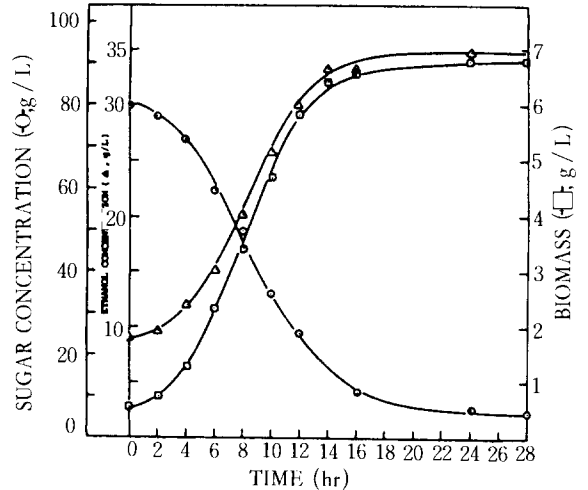


Fig. 1. Ethyl alcohol fermentation characteristics as function of time.

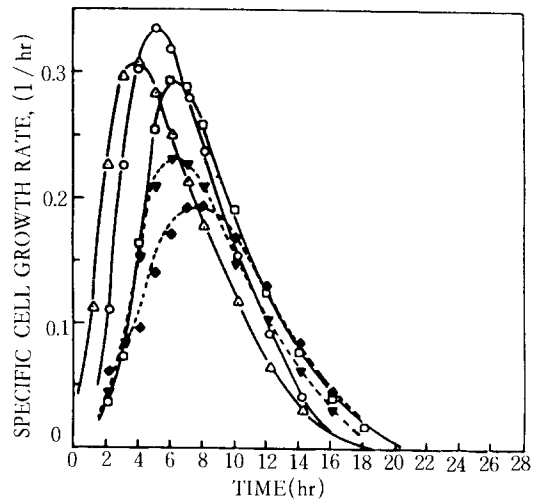


Fig. 2. Specific growth rate vs. fermentation time according to initial sugar concentrations: ○=50 g / l, △=80 g / l, □=110 g / l, ▼=190 g / l, ◆=250 g / l

Fig.2는 여러가지 초기 당농도에 대하여 비증식속도를 시간의 함수로 나타낸 것이다. 초기 당농도가 높아질수록 최대비증식속도는 감소하였으며, 최대치에 도달하는 시간 및 정체기에 도달하는 시간도 당농도 증가에 따라 지연되는 경향을 보이고 있다.

**알콜농도에 따른 당및 균체농도의 변화 특성**

Fig.3은 여러 초기당농도에서 알콜 생성에 따른 발효액 중의 당농도및 균체농도의 변화경향을 나타낸 것이다. 발효액중의 알콜농도 30 g / l 이하에서는 알콜생성량 증가에따라 당농도는 선형적으로 감소하였고 당의 감소율은 당농도 증가에 따라 다소 증가하는 경향을 보였다.

그러나 알콜농도 40 g / l 이상에서는 알콜생성량 증가에 따라 당농도는 매우 완만하게 감소하였고, 감소율은 당농도 증가에따라 다소 감소하는 경향을 보이고 있다.

발효액중의 알콜농도 증가에 따라 알콜농도 25 g / l 이하에서는 균체농도가 선형적으로 증가하였으며, 그 증가경향은 초기 당농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보이고있다. 알콜농도 40 g / l 이상에서는 알콜농도증가에 따라 균체증가 경향은 매우 완만하게 나타났다. 이 결과에 의하면 초기당농도가 110 g / l 이하인 경우 당의 대부분이 알콜로 전환되지만, 초기당농도가 증가할수록 알콜의 전환율은 감소하였다.

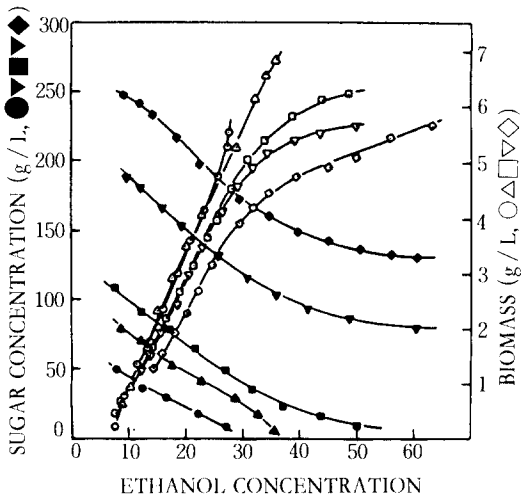


Fig. 3. Fermentation characteristics vs. EtOH concentrations with initial sugar concentrations : ○●=50 g / l, △▲=80 g / l, □■=110 g / l, ▽▼=190 g / l, ◇◆=250 g / l

**알콜농도와 비증식속도 사이의 함수관계**

Fig.4는 발효액중에 생성된 알콜농도와 균체의 비증식속도 사이의 함수관계를 나타낸 것이다. 비증식속도가 최대치를 나타내는 알콜농도는 초기당농도에 따라서 약간 차이를 나타내어 10 g / l 내지 16 g / l 범위에 분포되어 있다. 생성알콜농도가 20 g / l 이하일 경우 비증식속도는 알콜 생성량이 증가함에 따라 초기 당농도에 무관하게 선형적으로 감소하는 경향을 보이며, 알콜농도 20 g / l 이상에서는 알콜생성량에 따라 지수함수적으로 감소하는 경향을 나타내어 알콜농도 50 g / l 에 이르게 되면 균체의 증식이 정지하는 현상을 나타내었다.

문헌(7)에 의하면 균체가 *K. marxianus* 일 경우 초기알콜농도 80 g / l 에서도 작기는 하나 최대 비증식속도 0.09hr<sup>-1</sup>를 나타내어 균체성장이 멈추지 않음을 알수있다 따라서 *K. marxianus*의 증식속도는 외부에서 첨가한 알콜에 비하여 발효중에 생성된 알콜에 의하여 보다 큰 영향을 받고 있음을 알수있다.

본 연구에 의하면 비증식속도와 생성알콜농도사이의 함수관계는 알콜농도 20 g / l 이하에서는  $\mu = \mu_m(1 - RP)$  형으로, 알콜농도 20 g / l 이상에서는  $\mu = \mu_m \exp(-RP)$  형으로 나타낼수 있다. 각 초기당농도에 해당하는 최대

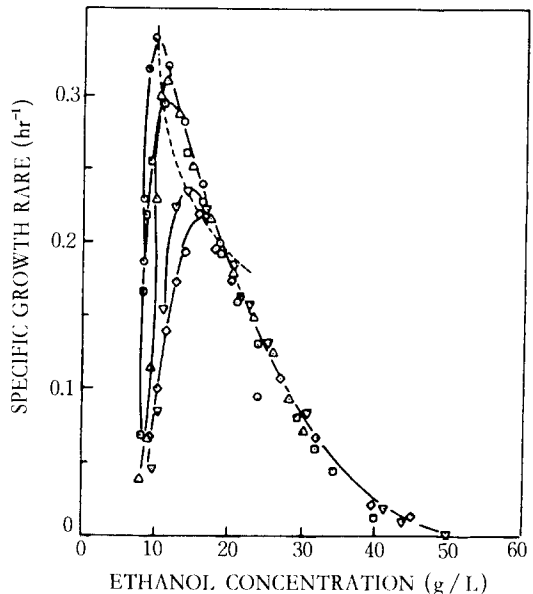


Fig. 4. Specific growth rate vs. EtOH concentration with initial sugar concentration : ○=50 g / l, △=80 g / l, □=110 g / l, ▽=190 g / l, ◇=250 g / l.

비증식속도들은 초기당농도가 증가할수록 알콜농도 증가에 따라 지수함수적으로 감소하는 경향(Fig. 4의 점선)을 보이고 있다.

**알콜농도와 알콜비생성속도 사이의 함수관계**

Fig.5는 발효액중의 생성알콜농도와 알콜 비생성속도 사이의 함수관계를 나타낸 그림이다. 초기당농도에 따라서 생성알콜농도 10 g / l 내지 14 g / l 사이에서 알콜비생성속도의 최대치가 나타났다.

각 초기당농도에 해당하는 비생성속도의 최대치들은 알콜생성량이 증가할수록 선형적으로 감소하는 경향을 보이고 있다. 알콜농도 14 g / l 이상에서 알콜의 비생성속도는 초기당농도에 무관하게 알콜생성량의 증가에 따라 지수함수적으로 감소하는 경향을 나타내는 것으로 보아, 알콜의 비생성속도와 생성알콜농도 사이의 함수관계는  $V = V_m \exp(-RP)$ 형으로 생각할 수 있다. 한편 초기당농도 250 g / l에서의 비생성속도와 190 g / l에서의 비생성속도는 생성알콜농도가 40 g / l 이상일때 각각 0.55 g / l · hr 및 0.43 g / g · hr로서 일정한 값을 나타내고 있다.

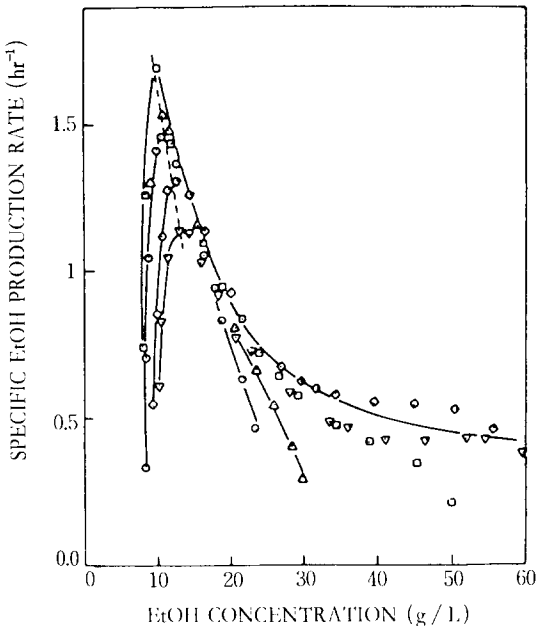


Fig. 5. Specific EtOH production rate vs. EtOH concentration with initial sugar concentrations : ○=50 g / l, △=80 g / l □=110 g / l, ▽=190 g / l, ◇=250 g / l.

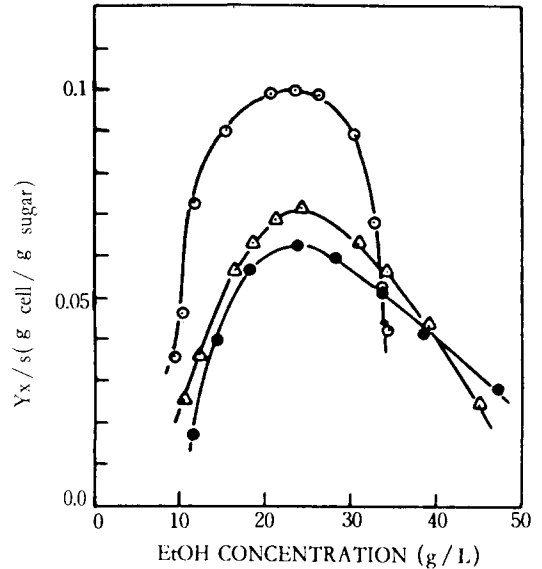


Fig. 6.  $Y_x/s$  vs. EtOH concentration with initial sugar concentrations : ○=80 g / l, △=100 g / l, ●=190 g / l.

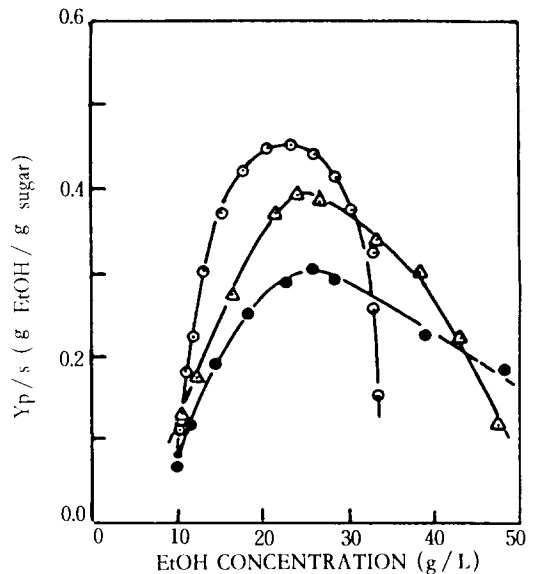


Fig. 7.  $Y_p/S$  vs. EtOH concentration with initial sugar concentrations : ○=80 g / l, △=100 g / l, ●=190 g / l

**알콜농도와 균체수율, 알콜수율사이의 함수관계**

초기당농도를 매개변수로 하고 알콜생성량과 균체수율 ( $Y_x/s = (dx/dt)/(ds/dt)$ ) 및 알콜수율 ( $Y_p/s = (dp/dt)/(ds/dt)$ ) 사이의 함수관계를 각각 Fig. 6 및 Fig.7에 나타내었다.

균체수율 및 알콜수율은 알콜생성량이 증가함에 따라 급격히 증가하다가 알콜농도 25 g / l 부근에서 최대치를 나타내고 있다. 알콜농도 25 g / l 이상에서 초기당농도가 높아질수록 균체수율 및 알콜수율의 감소경향은 완만하게 나타났다. 동일한 알콜생성량에 대하여는 초기당농도가 증가할수록 균체수율 및 알콜수율이 감소하는 경향을 보이고 있다.

**당의 소모량과 균체의 비증식속도 사이의 함수관계**

Fig.8은 초기당농도를 매개변수로 하였을 때 당의 소모량에 따른 균체의 비증식 속도의 함수관계를 나타낸 것이다. 초기당농도가 증가할수록 당의 소모량이 높을 때 비증식속도의 최대치가 나타나는 경향을 보이고 있다. 당의 소모량이 동일할 때 초기당농도가 높을수록 비증식속도가 증가하는 경향을 보였다. 당의 소모량이

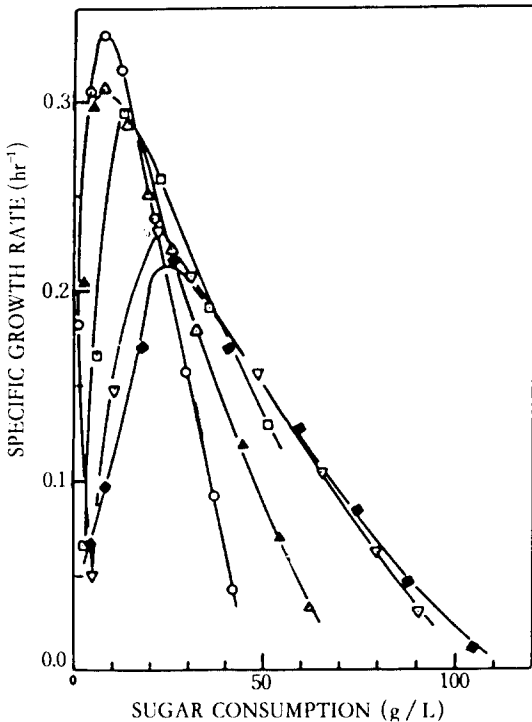


Fig. 8. Specific growth rate vs. sugar consumption (S.-S) with initial sugar concentrations : ○=50 g / l, △=80 g / l, □=110 g / l, ▽=190 g / l, ◆=250 g / l

증가할 수록 초기 당농도에 무관하게 비증식속도는 선형적으로 감소하는데, 그 감소경향은 초기 당농도가 높을수록 완만하였으며 당의 소모량이 100 g / l 정도이면 발효기질중에 당농도가 높아도 균체의 증식은 거의 정지하는 것으로 나타났다. 이것은 초기당농도가 높은 경우, 발효 가능한 당이 존재하여도 생성알콜에 의한 저해영향으로 인하여 균체증식이 정지(Fig.4)되기 때문인 것으로 추측된다.

**당 소모량과 알콜의 비생성속도 사이의 함수관계**

Fig. 9는 초기당농도를 매개변수로 하였을 때 당의 소모량에 따른 알콜의 비생성속도 사이의 함수관계를 나타낸 것이다. 비생성속도의 최대치는 초기 당농도에 따라 당의 소모량이 10 g / l 와 20 g / l 사이에 나타났다. 초기당농도 50 g / l, 80 g / l 인 경우에 당의 소모량이 증가함에 따라 알콜의 비생성속도는 선형적으로 감소하였다. 초기당농도 110 g / l 이상인 경우에 당의 소모량

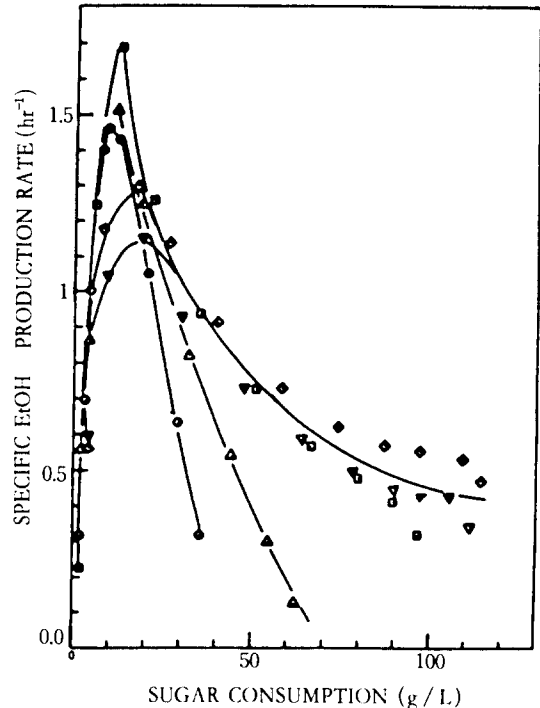


Fig. 9. Specific EtOH production Rate vs. sugar consumption (S.-S) with initial sugar concentrations : ○=50 g / l, △=80 g / l, □=110 g / l, ▽=190 g / l, ◆=250 g / l

이 증가함에 따라 알콜의 비생성속도는 지수함수적으로 감소하였으며, 초기당농도에 따라 그 차이는 크지 않았다. 동일한 당의 소모량에 대하여는 초기 당농도가 증가할수록 알콜의 비생성속도가 증가하는 경향을 보이지만 110 g / l 내지 250 g / l 사이에서 그 차이는 거의 없었다.

## 요 약

돼지감자 착즙의 당농도를 50, 80, 110, 190, 250 g / l 로 하고 *K. marxianus*의 비증식속도, 균체수율, 알콜수용율을 발효액중의 생성알콜농도 및 당 소모량의 함수로 구명한 결과 다음의 결론을 얻었다. 생성알콜농도에 대한 비증식속도 및 알콜의 비생성속도의 함수관계는 알콜생성량이 낮을때 선형 함수관계를, 알콜생성량이 높을때는 지수 함수관계를 나타내었다. 균체의 증식은 생성알콜농도가 50 g / l 이상에서, 그리고 당의 소모량이 100 g / l 이상에서 잔여 당농도에 무관하게 정지되는 경향을 나타내었다. 비증식속도와 당 소모량사이에는 선형 함수관계를 나타내었으며, 알콜 비생성속도와 당소모량사이의 함수관계는 초기당농도가 낮을때 선형 함수관계를 나타내었으나 초기당농도가 높아질 수록 지수 함수관계로 변이되었다. 균체수율 및 알콜수용율은 초기당농도에 무관하게 생성알콜농도 25 g / l 부근에서 최대치를 나타내었으며, 알콜생성량이 증가함에 따라 초기 당농도가 증가할수록 완만하게 감소하였다. 이상의 함수관계로 부터 *K. marxianus*의 알콜발효에 있어 한계 당농도는 110 g / l 인방으로, 한계 알콜농도는 50 g / l 인방인 것으로 추정되었다.

## 감 사

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

## 참 고 문 헌

1. J. L. Keller (1979), *Hydro carbon Process.*, **58**(5), 127
2. 목영일(1980), *화학공학*, **18**, 65~80, 203~214
3. R.M. Sachs et. al. (1981) *Calif. Agric.*, **35**, 4
4. S.E. Fleming and J.W.D Groot wassink (1979) *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **12**, 1
5. L.A. Underkoffer (1937), *Ind. Eng. Chem.*, **29**, 1160
6. L.A. Williams (1982) *Biotechnol. Letters*, **4**, 45
7. P. Bajpai and P.K. Bajpai (1989) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **11**, 155
8. A. Margaritis and P. Bajpai (1983) *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 723
9. P. Bajpai and A. Margaritis (1982) *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1325
10. 허병기, 유진선, 양지원(1989) *한국생물공학회지*, **4**(1), 48
11. E. Favela-Torres et. al., (1986) *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 850

(Received March 6, 1990)