

고농도 균체배양에 의한 알콜발효특성 규명
(비성장속도와 당농도, 균체농도, 알콜농도의 함수관계)

허 병 기 · 김 형 철 · *양 지 원 · **목 영 일
인하대학교 생물공학과
*한국과학기술원 과학기술대학 화학공학과
**아주대학교 화학공학과

Characteristic of Alcohol Fermentation by the Culture of High Cell Density
(Functional Relationship among Specific Growth Rate, Sugar Concentration,
Cell Concentration and Alcohol Concentration)

Byung Ki Hur, Hyung Chul Kim, Ji Won Yang*, Young Il Mok**
Department of Biotechnology and Bioengineering, Inha University
**Department of Chemical Engineering, KAIST*
***Department of Chemical Engineering, Ajou University*

ABSTRACT

Experiments of alcohol fermentation of the yeast, *K. fragilis* CBS 1555 were performed to obtain the following results. In these experiments, the initial concentrations of sugar which was composed of inulin and fructose as weight ratio of one to one were 30, 50, 75, 100 and 150 g/l and the initial densities of the microorganism were less than 0.5 g/l, 10 g/l to 15 g/l, and 50 g/l. The functional relationship among specific growth rates, sugar concentrations, and alcohol concentrations could be expressed by Aiba-shoda equation, and the specific growth rate represented the trend that decreased with increase in the initial concentration of the microorganism. Also, μ_{max} and K_s of Monod's equation could be expressed as the function of initial cell concentration like the following equations.

$$\mu_{max} = 0.8 - 0.008 X$$
$$K_s = 0.54 X + 8$$

In the region that sugar, alcohol and cell concentrations were 10 g/l to 120 g/l, 0 g/l to 60 g/l and 0.5 g/l to 50 g/l respectively, the differences between the experimental values and the calculated ones for specific growth rate approached to 40% with respect to experimental values at the worst cases, but in most cases, those were distributed in the range of less than 20%.

서 론

70년대의 제1차 석유파동과 최근의 걸프전쟁을 치르면

석 인류는 석유와 같은 특성의 대체에너지 개발에 많은 관심을 기울이게 되었다. 특히 바이오매스의 발효로부터 생산되는 알콜은 그 물리적 연소적 특성 측면에서 석유

의 특성과 유사하여 석유의 대체 에너지로 각광을 받고 있다. 더욱이 몇몇 국가에서는 오래전부터 순수 알콜이나 개소홀 및 디조홀을 내연기관의 연료로 사용하고 있는 실정이다(1, 2).

발효에 의한 알콜이 경제성을 갖기 위해서는 풍부한 바이오매스와 저렴한 생산가격, 높은 알콜생산성 등의 분제가 우선적으로 해결되어야 한다. 여러가지 바이오매스 자원 중 돼지감자는 광합성 효율, 재배의 경제성 및 알콜생산의 용이성 등의 측면에서 분석하여 불 때 알콜발효에 적합한 자원이라는 연구 결과가 발표되어 있다(3-5).

알콜 생산성 향상을 위하여 현재 두 부류의 연구가 활발히 진행되고 있다. 한편으로는 우수한 균주의 분리 및 선정은 물론 환경변화에 의한 균주의 자연적 변이 또는 유전공학 기법에 의한 인위적 변이과정을 통한 균주의 개량에 의하여 알콜생산성을 향상시키기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 다른 한편으로는 선정된 균주의 고농도 배양, 배지의 개발 등의 발효공정 개선을 통한 알콜생산성 향상에 관한 연구가 활발히 추진되고 있다(6-14).

고농도 균체배양 시스템을 설계 해석하는데는 균체의 발효특성에 관한 연구가 선행되어야 한다. 따라서 이 문제에 관한 연구 또한 여러 학자들에 의하여 진행되고 있다(11, 15, 16).

본 연구에서는 기질을 돼지감자로 사용할 경우 알콜생산성이 우수한 균주로 알려져 있는 효모 *K. fragilis*의 비성장속도와 균체농도, 기질농도 및 알콜농도 사이의 함수관계를 규명하여 보았다. 특히 초기 균체농도를 0.5 g / l 에서 50 g / l 까지 증가시키면서 이에 따른 비성장속도의 영향도 규명하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용한 균주는 *K. fragilis* CBS 1555로써 35°C YM 배지에서 20시간동안 진탕배양하여 집중용 균주로 사용하였다.

발효기질

본 실험에서는 발효기질로 Table 1과 같은 조성의 합성배지를 사용하였다. 이눌린과 과당이 무게비로 1 대 1인 혼합당을 사용하였으며 합성배지 중의 초기 당농도는 30, 50, 75, 100, 그리고 150 g / l 가 되도록 하였다. 갈변현상을 방지하기 위하여 당은 나머지 성분들과 분리 멸균하였으며 pH는 0.2N NaOH 용액과 0.2N HCl

Table 1. Composition of Substrate

Composition	Content (g / l)
Yeast Extract	7.50
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
KH ₂ PO ₄	3.00
NH ₄ Cl	10.0
Ma ₂ HPO ₄	5.50
CaCl ₂	0.01
Citric Acid	2.00
Sodium Citrate	2.50
Sugar	30, 50, 75, 100, 150

용액을 사용하여 5.5가 되도록 조절하였다.

균체 초기농도

본 실험에서의 발효 초기 균체농도는 1 g / l 미만인 경우, 10 g / l 내지 15 g / l 사이인 경우, 50 g / l 인 경우로 나누어진다. 균체농도가 1 g / l 미만인 경우의 실험은 YM 배지에 접종한 균주를 35°C에서 20시간 배양한 후 발효기질 용액에 5%(v/v) 주입하였다.

초기 균체농도가 10 g / l 내지 15 g / l 사이인 경우에 대한 실험은 다음과 같이 수행하였다. 20개의 500ml 삼각 플라스크에 YM 배지를 주입하여 작동부피가 250 ml가 되도록 한 후 균을 집중하고 35°C에서 20시간 배양하였다. 5시간 동안 균체를 침전시킨 후 상등액을 제거하고 남은 균체를 모아 균체농도를 측정하였다. 실제 발효기질의 균체농도가 12 g / l 근방이 되도록 농축균체용액을 주입한 후 발효실험을 수행하였다. 초기 균체농도가 50 g / l 근방인 경우에는 앞의 과정에서의와 같이 하여 얻은 농축균체 용액을 원심분리하여 균체의 농도를 보다 증가시킴으로써 초기균체농도가 50 g / l 근방이 되도록 하였다.

발효 시험

회전식 진탕배양기에서 온도 35°C 회전수 130 rpm으로 진탕배양하였다. 각각의 초기 균체농도와 초기 당농도에서 시간에 따른 *K. fragilis*의 발효특성을 규명하기 위하여 초기 균체농도가 1 g / l 미만인 경우에는 매 2시간 내지 5시간 간격으로, 초기 균체농도가 10 g / l 근방인 경우에는 매 1시간 간격으로, 초기 균체농도가 50 g / l 인 경우에는 매 30분 간격으로 시료를 채취하여 알콜농도, 균체농도를 측정하였다.

시료의 분석

시료는 4,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액은 총당 및 알콜농도 분석에 침전물은 균체농도 분석에 사용하였다. 총당의 농도는 분광광도계(Shimadzu UV-120)를 사용하여 Anthrone법(17)으로 분석하였다. 알콜농도는 isopropanol을 기준물질로 하여 Gas Chromatography (HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II)로 분석(18)하였다. 균체농도는 분광광도계를 사용하여 620 nm에서 균체 회색액의 흡광도를 측정하고 흡광도와 균체 건조량 사이의 표준곡선(18)으로부터 구하였다.

결과 및 고찰

발효시간에 따른 발효특성치의 변화 경향

Fig. 1은 초기 당농도가 50 및 93 g / l이며 초기 균체농도가 0.5 g / l 인 경우에 대한 시간에 따른 알콜발효 경향을 나타내고 있다. 초기 당농도 50 g / l인 경우에는 발효 시작 12시간이 경과하게 되면 당이 거의 소모되고 알콜농도와 균체농도는 최대치에 접근하였다. 반면 당농도 93 g / l인 경우에는 발효시작 24시간 후까지 당이 다 소모되지 아니하였다. 최종 균체농도는 당농도 93 g / l인 때가 50 g / l인 경우보다 약 2 g / l 높았으며 알콜농도는 두 경우 모두 이론 알콜 생성 농도의 90% 근방값을 나타내었다.

Fig. 2는 초기 당농도 75 g / l이며 초기 균체농도가 0.412, 12, 50 g / l인 경우에 대한 알콜 발효시간과 알콜생성농도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 동일한

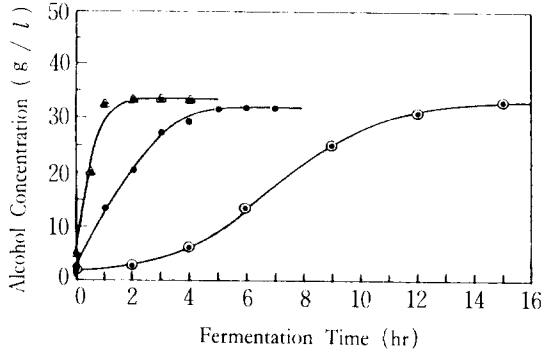


Fig. 2. Fermentation time vs. alcohol concentration with different initial biomass concentrations. Biomass concentration, $\odot=0.5 \text{ g / l}$, $\bullet=12 \text{ g / l}$, $\blacktriangle=50 \text{ g / l}$

초기 당농도에 대하여 균체의 초기농도가 변함에 따라 알콜 생성속도가 급격히 변화됨을 알 수 있다. 균체 초기농도가 0.4 g / l인 경우에는 발효 시작 후 12시간 만에 최종 알콜농도에 도달할 수 있었으나 균체농도가 12 g / l인 경우에는 1시간 반 만에 최종 알콜농도에 도달하였다. 따라서 알콜 생성속도는 초기 균체농도에 따라서 크게 변화됨을 알 수 있다.

비성장속도와 당농도 및 알콜농도와의 함수관계

Fig. 3은 초기균체 농도가 0.5 g / l 근방이고 초기

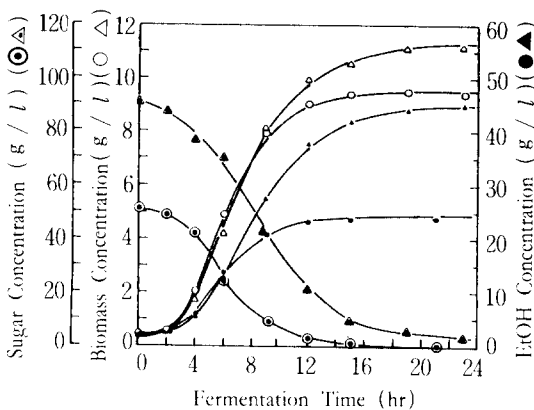


Fig. 1. Fermentation time vs. sugar, biomass, and alcohol concentration. Initial sugar concentration, $\odot \bullet: 95 \text{ g / l}$, $\triangle \blacktriangle: 50 \text{ g / l}$

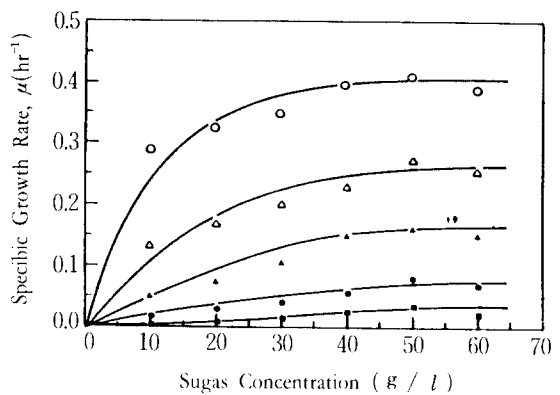


Fig. 3. Sugar concentration vs. specific growth rate at various alcohol concentrations. $\circ: 10 \text{ g / l}$, $\triangle: 20 \text{ g / l}$, $\blacktriangle: 30 \text{ g / l}$, $\bullet: 40 \text{ g / l}$, $\blacksquare: 50 \text{ g / l}$

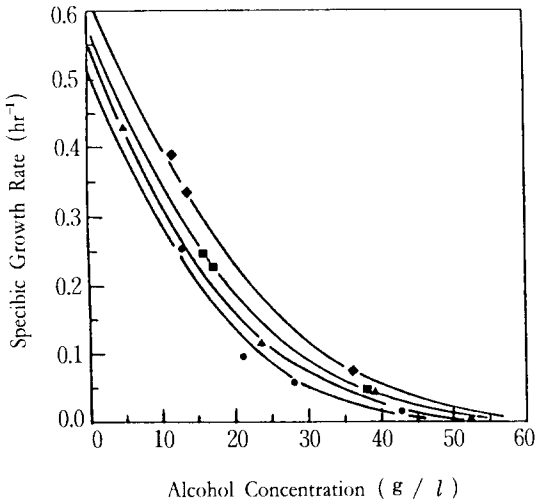


Fig. 4. Specific growth rate vs. alcohol concentration at various sugar concentrations.
 ●: 10 g / l, ▲: 20 g / l, ■: 30 g / l, ◆: 40 g / l

당농도가 30, 50, 75, 100, 그리고 150 g / l 인 경우에 대한 알콜발효실험으로부터 Fig. 1과 같은 결과를 얻고 이 결과의 $X=f(t)$, $S=g(t)$ 곡선으로부터 알콜농도가 10, 20, 30, 40 및 50 g / l 인 경우에 대하여 구한 S 값과 μ 값을 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 일정한 알콜농도에서 비성장속도와 기질농도 사이에는 Monod 식의 함수관계를 나타냄을 알 수 있으며 비성장속도는 알콜의 저해 영향을 받고 있음을 알 수 있다.

Fig. 4는 기질농도를 매개변수로 한 비성장속도와 알콜농도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 이 결과 역시 위의 발효실험 결과로부터 계산한 값들이다. 일정한 당농도에서 알콜농도가 증가함에 따라서 비성장속도는 감소하여 당농도 40 g / l 인 경우에는 알콜농도가 55 g / l 이상으로 증가하게되면 비성장속도가 0 g / l 에 접근함을 알 수 있다.

비성장속도식 계산

Fig. 5는 Fig. 4의 결과를 Semi-log 좌표에 표시한 것이다. 이 결과에 의하면 효모 *K. fragilis* CBS 1555의 알콜저해 영향은 다음식 (1)과 같이 Aiba-Shoda 식(19)으로 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \exp(-kP) \tag{1}$$

여기서, μ : 비성장 속도

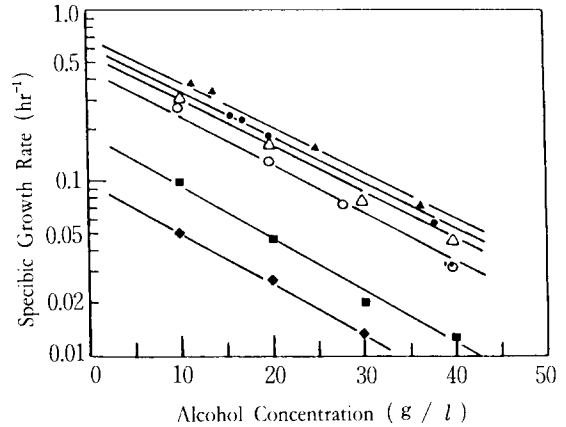


Fig. 5. Specific growth rate vs. alcohol concentration at various sugar concentrations (S) and average biomass concentrations (X)

- : S=10 g / l, X=5 g / l, △: S=20 g / l, X=5 g / l, ●: S=30 g / l, X=5 g / l
- ▲: S=40 g / l, X=5 g / l, ■: S=10 g / l, X=15 g / l, ◆: S=10 g / l, X=50 g / l

- μ_{max} : 최대 비성장 속도 (hr)
- K_s : Monod 상수 (g / l)
- k : 알콜 저해 상수 (l / g)
- P : 알콜 농도 (g / l)

Fig. 5의 기울기로부터 식(1)의 k 값을 구하면 0.063 (l / g)을 얻게 되며 $P \rightarrow 0$ 가 되도록 외삽하면 각 당농도에서의 최대 비성장속도 $\mu_{max,si}$ 값을 얻게된다. Fig. 6은 이렇게 구한 비성장속도의 역수와 각 당농도의 역수 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 이 그림의 기울기와 절편으로부터 각 초기균체농도에 대한 식(1)의 μ_{max} 값과 Monod 상수 K_s 값을 구하면 Fig. 7과 같다. 이 결과로부터 μ_{max} 및 K_s 와 균체농도 사이의 함수관계를 구하면 다음식과 같이 된다.

$$K_s = 0.54 X + 8 \tag{2}$$

$$\mu_{max} = 0.8 - 0.008 X \tag{3}$$

윗 식에서 X : 균체의 농도 (g / l)

비성장속도에 대한 계산치와 실험치의 비교

Fig. 8은 본 실험에서 얻은 비성장속도의 실험치와 식 (1), (2), (3)을 이용하여 구한 계산치를 비교한 것이

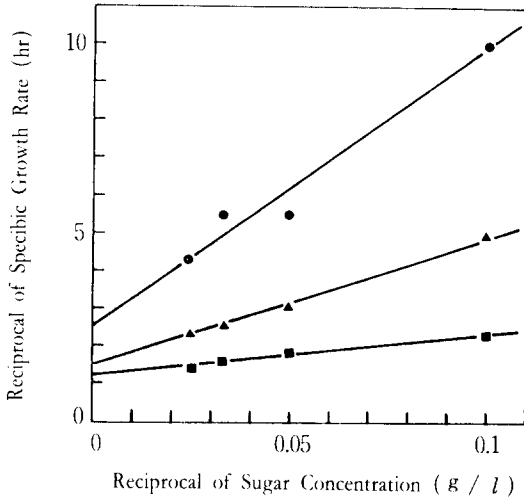


Fig. 6. Reciprocal of sugar concentration vs. reciprocal of specific growth rate at zero alcohol concentration. Average biomass concentration:
 ●: 50 g / l, ▲: 15 g / l ■: 5 g / l

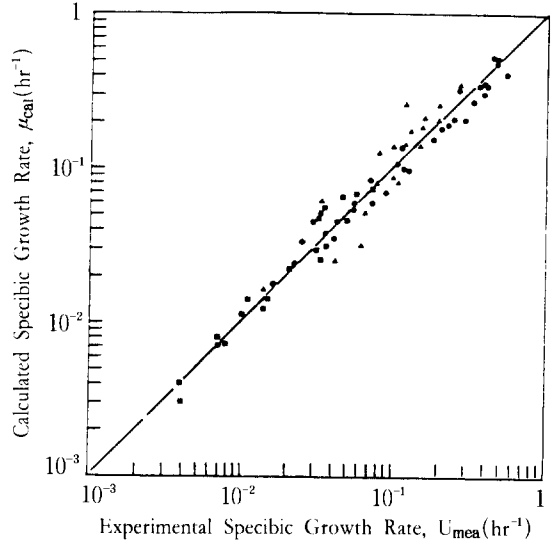


Fig. 8. Experimental Apeccibic growth rate vs. Calculated Apeccibic growth rate.
 Cell concentration,
 ●: 0.5 g / l to 11 g / l
 ▲: 11 g / l to 21 g / l
 ■: 49 g / l TO 59 g / l

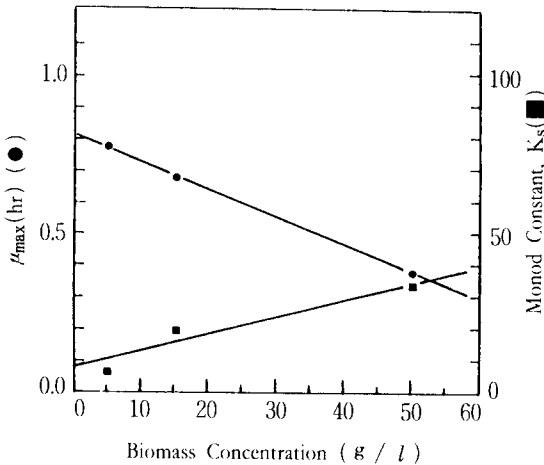


Fig. 7. Biomass concentration vs. μ_{max} and K_s at zero alcohol concentration

다. 이 결과는 본 연구에서 유도한 실험치를 얼마나 잘 대변하는지를 분석하기 위한 것이다. 알콜농도 0 내지 60 g / l, 기질의 당농도 10 g / l 내지 120 g / l, 균체농도 0.5 g / l 내지 50 g / l 범위내의 알콜발

효에 관한 효모 *K. fragilis* CBS 1555의 비성장속도 실험치와 식 (1), (2), (3)의 계산치는 비교적 양호한 상관관계를 나타내었다. 실험치와 계산치의 차이값이 가장 큰 경우는 그 차이값이 실험치의 40%까지 나타내는 경우도 있었으나 대부분의 경우는 실험치의 20% 범위 이내에 분포되어 있었다.

요 약

이눌린과 과당의 혼합비율이 무게비로 1 대 1인 혼합당의 초기 당농도가 30, 50, 75, 100, 그리고 150 g / l 이고 초기균체농도가 1 g / l 미만, 10 내지 15 g / l 사이, 50 g / l 인 경우에 대한 효모 *K. fragilis* CBS 1555의 알콜발효 실험을 통하여 다음 결과를 얻을 수 있었다. 비성장속도와 당농도, 알콜농도 사이의 함수관계는 Aiba-Shoda 식으로 표현할 수 있었다. 또한 균체의 비성장속도는 균체의 초기농도 증가에 따라서 감소하는 경향을 나타내었으며 Monod식의 μ_{max} 와 K_s 가 다음식과 같이 균체의 농도, X의 함수로 표현되었다.

$$\mu_{max} = 0.8 - 0.008 X$$

$$K_s = 0.54 X + 8$$

당농도 10 g / l 내지 120 g / l, 알콜농도 0 g / l 내지 60 g / l, 균체농도 0.5 g / l 내지 50 g / l 범위에서 균체의 비성장속도에 관한 본 연구의 실험치와 계산치 사이의 차이는 가장 큰 경우에 그 차이값이 실험치의 40%까지 나타내었으나 대부분의 경우는 20% 이내의 범위에 분포되었다.

감 사

본 연구는 1990년도 인하대학교 교비 지원 및 동력자원부의 대체에너지 개발 연구비 지원에 의하여 이루어진 것이며 연구비 지원에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 목영일 (1980), 화학공학과 **18**(2), 65.
2. 목영일 (1980), 화학공학과 **18**(4), 203.
3. D. G. Dorrel and B. B. Chubey (1977), *Can. J. Plant Si.*, **57**, 181.
4. Servert E. (1977), *Organic Gardening and Farming*, **17**, 90.
5. Pratima Bajpai and Pramod K. Bajpai (1989), *Biotechnol. Appl. Biotechnol.*, **11**, 155-186.
6. E. F. Phares (1971), *Method Enzymol*, **22**, 441.
7. T. K. Ghose and R. D. Tyagi (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1387.
8. G. R. Cysewski and C. R. Wilke (1976), *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1297.
9. A. Margaritis and C. R. Wilke (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 727.
10. G. R. Cysewski and C. R. Wilke (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1421.
11. A. B. Jarzebski and J. J. malinowski (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1225-1230.
12. M. Cheryan and M. Mehaia (1984), *Proc. Biochem.*, **19**, 204.
13. Tachaaki Watanabe et al. (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **69**, 33-38.
14. M. Nagashima et al. (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 992.
15. Pratima bajpay and Argyrios Margritis (1986), *Biotechnol. Letters.*, **8**(5), 361.
16. R. Raghav et al. (1989), *Biotechnol. Letters.*, **11**(10), 739-744.
17. 허병기, 유진선, 양지원 (1989), *한국생물공학회지*, **4**(1), 48.
18. 허병기, 김현성, 목영일 (1989), *한국생물공학회지*, **4**(2), 191.
19. S. Aiba and M. Shoda (1969), *J. Ferment. Technol.*, **47**, 790.

(Received; March 15, 1991, Accepted; April 30, 1991)