

추출 발효에 의한 알콜 제조 공정개발
- PEG/D_x 최적 이상계의 선정 -

김진한·허병기·*목영일
인하대학교 공과대학 생물공학과
*아주대학교 공과대학 화학공학과

Process Development for Alcohol Production by Extractive Fermentation

Jin Han Kim · Byung Ki Hur · Young Il Mok*
Department of Biological Engineering, Inha University
*Department of Chemical Engineering, Ajou University

ABSTRACT

The quantitative effects of molecular weight and concentrations of two phase-forming polymers-polyethylene glycol and crude dextran on the two phase extractive ethanol fermentation were investigated using a Box-Wilson central composite protocol. The regression model obtained was used in order to determine optimum compositions of aqueous two phase system. In the aqueous two phase extractive ethanol fermentation of *Kluyveromyces fragilis* CBS 1555 with Jerusalem artichoke juice, it was found from the regression model that the variables influencing on ethanol fermentation were PEG concentration, time, D_x concentration, and PEG molecular weight strongly in order. The interaction of PEG concentration and PEG molecular weight was also found, and the effect of PEG concentration decreased with increase in molecular weight of PEG. The ethanol concentration increased with increase in molecular weight of PEG, and with decrease in concentration of PEG. In conclusion, maximum concentration of ethanol produced was obtained at the following compositions: PEG MW 20000, D_x concentration ranged from 4% to 5%, and PEG concentration ranged from 3% to 7%.

서론

수성 이상계 추출공정은 효소, 균체, 세포내 물질의 추출정제에 성공적으로 이용되었다(1, 2). Polyethylene Glycol(PEG)과 Dextran(Dx), 또는 PEG와 엽들로 구성된 수성이상계가 추출공제에 일반적으로 이용된다. PEG-Dx 이상계에서 이들 고분자는 비이온성이며 PEG가 Dx보다 더 소수성이다. 이에 따라 두 상 및 계면에서 분배양상은 다르게 나타난다. 수성 이상계는 생성물 저해 반응이

있거나, 또는 생성물과 균체를 온화한 조건하에서 분리해야 하는 공정에서 유리하다. 생성물 저해영향을 줄이기 위하여 수성이상계를 이용한 반응공정으로는 셀룰로오스의 효소 분해, *Saccharomyces cerevisiae*에 의한 에탄올 생산, *Lactobacillus delbrückii*에 의한 lactic acid 생산, *Clostridium acetobutylicum*에 의한 아세트산-부탄올 발효등이 있다(3-7). 이들 결과에 의하면 효소나 균체는 아랫상에 분배되고 생성물은 두상에 비슷하거나 윗상에 다소 더 많이 분배되며, 이상계가 아닌 합성배지에서 보다

이상계에서의 발효 생성속도 및 최대 생성속도가 더 큰 것으로 알려졌다.

수성 이상계 추출의 성능에 대한 주요 영향인자는 두 상 사이에서의 생성물의 분배계수와 두 상의 부피비이다(8). 이들은 이상계 수성 고분자의 분자량과 농도, 이온조성, 온도 등에 따라 달라진다. 따라서 추출 공정에 대한 최적 이상계를 찾는 것은 중요하다. 분자량 및 농도 등의 영향을 고려하여 적정 이상계를 선정한 연구들(3, 9, 10)에 있어서 이상계 구성성분의 농도를 고정하고 분자량을 변화시키거나 분자량 및 이상계 구성성분중 하나의 농도를 고정하고 다른 성분의 농도를 변화시켜 실험함으로써 적정 이상계를 선정하였다. 이와같이 다변수(Multifactor)시스템의 최적 조건의 선정을 위한 실험에서 1회에 하나의 변수를 조사하는 것에 대한 취약점은 이미보고(11-3)된 바 있다. 한편 알콜의 이상계 추출발효에 대한 이상계 구성성분의 영향이나 최적 이상계의 선정에 관한 연구는 찾아보기 어려운 상태이다.

발효에 의한 연료 알콜의 생산에 있어 알콜 생성속도 및 알콜 수율을 높이는 것은 중요하다. 이를 위한 발효 조건의 최적화는 여러 요인들의 상호 작용때문에 많은 시간과 노력을 필요로 하지만 적절한 통계적 기법을 이용하면 비교적 용이해진다. 통계적 기법들 중 반응표면계획법은 실험실 또는 파일로트 규모에서 적은 횟수의 실험으로 회귀식을 얻을 수 있고, 그 식의 적합결여를 추정할 수 있기 때문에 다변수 시스템의 최적화에 많이 이용된다(11-13). 본 연구에서는 반응표면계획법을 이용하며 PEG 분자량, PEG 농도, Dextran 농도 및 발효 시간 사이의 정량적인 영향을 고려함으로써 저해영향이 적고 알콜발효에 최적인 PEG-Dextran (Crude) 이상계의 조성을 선정하고자 하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Kluyveromyces fragilis* CBS 1555이며, YM배지를 이용하여 35°C, 22시간 진탕 배양한 것을 2시간 침강 농축시켜 발효기질에 0.2ml씩 접종하였다. 발효 기질용액 중 균체의 초기농도는 0.3 g / l 이었다.

실험계획

PEG분자량, PEG농도, 원액 Dx 농도 및 발효시간을 변수로하고 5수준의 Box-Wilson 중심합성계획(13)에 따라 실험을 계획하였다. 실험점의 크기에 따른 영향을

Table 1. Values of the process variables in the experiments

| Process variables | Level values | | | | |
|-----------------------|--------------|------|------|------|-------|
| | -2 | -1 | 0 | 1 | 2 |
| Mol. Wt. of PEG | 2000 | 4000 | 6000 | 8000 | 10000 |
| Conc. of PEG(%w/v) | 7.0 | 10.0 | 13.0 | 16.0 | 19.0 |
| Conc. of Dx(%w/v) | 1.0 | 2.5 | 4.0 | 5.5 | 7.0 |
| Fermentation Time(hr) | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 |

없애기 위하여 Table 1에 나타낸 바와 같이 변수들의 실험점들은 선형변환하여 실험수준치로 표준화하였다. 이와 병행하여 PEG분자량 20000에 대하여도 동일한 실험을 추가하였다. 다중회귀 분석에서 독립변수 값은 수준치를 사용하였으며 PEG 20000은 수준치 7로 처리하였다. 실험 batch의 수는 총 217개이었다.

발효기질

본 연구에서 발효기질은 돼지감자 착즙을 사용하였고 당농도는 알콜발효시 저해영향이 있는 농도 200 g / l (18)로 실험을 하였다. 문헌(18)의 방법을 이용하여 얻은 돼지감자 즙의 당 농도는 120 g / l 이었다. 돼지감자 이눌린의 조성은 과당 / 포도당의 평균값이 4이다 (15-17). 따라서 기질의 당농도를 높이기 위하여 과당과 포도당의 혼합물(F/G=4)을 첨가하여 당농도를 240 g / l로 조정하고, NH₄OH용액을 사용하여 pH를 5.5로 조정한 것을 발효 기질로 이용하였다. 각 회분식 실험의 이상계 발효기질용액의 부피는 모두 20ml로 하였다. 각 회분식에서 PEG와 Dx의 부피는 PEG와 Dx의 partial specific volume 0.833 g / cm³와 0.611 g / cm³(2)를 이용하여 계산하였고, 이 부피를 고려하여 각 회분식의 초기 당농도를 200 g / l가 되도록 당 용액의 첨가량을 달리하였다.

발효실험 및 시료의 분석

발효기질용액을 넣은 검사 튜브(30φ×250)를 45°경사로 설치하고, 회전식 진탕 배양기에서 온도 35°C, 회전수 150rpm로 진탕 배양하였으며, 발효 시작후 10시간 부터 18시간까지 2시간 간격으로 윗상의 시료를 채취하고 알콜농도를 분석하였다. 시료중의 에탄올 농도는 n-propanol 을 기준물질로 하여 Table 2의 분석조건하에서 기체 크로마토그래피(HP5890A)로 분석하였다.

Table 2. Operation conditions of GC for ethanol analysis

| | | |
|-----------------|-------------|-------------------------|
| Column Material | Porapak Q, | 1 / 8" × 6' SS column |
| Detector | FID | |
| Temperature | Column oven | :200℃ |
| | Injector | 220℃ |
| | Detector | 220℃ |
| Gas & flow rate | Helium | 30ml / min(Carrier gas) |
| | Hydrogen | 30ml / min |
| | Air | 400ml / min |

결과 및 고찰

회귀분석

에탄올 농도를 종속변수로하고 Table 1에 나타낸 실험 변수들 및 이들의 상호작용의 수준치를 독립변수 값으로 하여 최소자승법(13, 14)에 의하여 회귀모형을 구하였으며, 분산분석 및 F-검정을 하여 유의하지 않은 독립변수항들은 최종 회귀모델에서 제외하였다. 본 연구에서 얻어진 최종 결과는 식(1)과 같으며 각 항의 계수는 Table 3에 나타내었다.

$$\text{Ethanol conc. (g / l)} = \text{constant} + a(\text{PEG MW}) + b(\text{PEG Conc}) + c(\text{Dx Conc}) + d(\text{Time}) + e(\text{PEG conc})^2 + f(\text{Dx conc})^2 + g(\text{Time})^2 + h(\text{PEG MW})(\text{PEG conc}) + i(\text{PEG conc})(\text{Time}) \quad (1)$$

Table 3. Results for regressions and analysis of variance

| Independent Variables | Coefficients | F ratio |
|---|--------------|-------------------|
| Molecular Weight of PEG | 0.79931 | 23.2**1 |
| Concentration of PEG | -7.6119 | 504.66** |
| Concentration of Dx | 0.76772 | 5.18* |
| Fermentation Time | 6.37586 | 315.93** |
| PEG Conc. × PEG Conc | 0.19438 | 10.22** |
| Dx Conc × Dx Conc | -1.25268 | 10.88** |
| Time × Time | -0.60869 | 3.67 ⁰ |
| PEG MW × PEG Conc | 0.34162 | 8.55** |
| PEG Conc × Time | -0.70929 | 4.99* |
| Constant | 32.58346 | |
| Regression Model | F ratio | 98.59** |
| Coeffioient of determination(R ²) | | 0.8108 |

Symbols, O, *, and **, represent the levels of significance of 10%, 5%, and 1% respectively

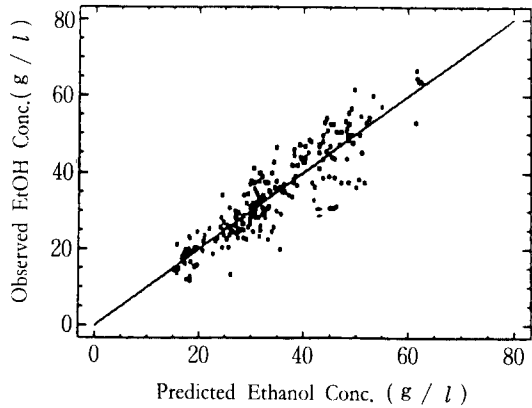


Fig. 1. Correlation of the predicted ethanol concentrations to the observed ones.

Fig. 1은 회귀모델의 예측치와 실험 측정치 사이의 상관 관계를 나타낸 것이다. 식(1)의 회귀모델의 결정계수(coefficient of determination), R²는 0.8108이고, 또 F 검정 결과에 의하면 위험을 1%로 회귀변동이 대단히 유의하므로, 적용된 회귀모델은 수성 이상계에서 알콜의 추출발효에 대한 실험변수들의 정량적인 관계를 잘 표현하고 있음을 알 수 있다. 회귀모델에서 수준치를 사용함으로써 변수들의 실제 크기에 기인하는 영향은 무시되므로 회귀모델의 계수의 절대치로 부터 해당 변수들이 알콜발효에 미치는 영향의 정도를 확인할 수 있다. Table

3의 회귀계수를 보면, 알콜발효에서는 PEG농도의 영향이 가장 크고, 다음으로는 발효시간, Dx농도, PEG분자량 순으로 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 또한 PEG 분자량과 PEG농도의 상호작용(interaction)이 상당히 유의한 것으로 나타났으며 PEG분자량과 Dx농도의 상호작용 및 PEG농도와 Dx농도의 상호작용은 무시할 수 있는 것으로 나타났다.

PEG 농도가 알콜생성에 미치는 영향

Fig. 2는 PEG 분자량 10000, Dx농도 5.5%에서 PEG 농도 및 발효시간에 따른 알콜 농도의 등고선을 나타낸 것이다. Fig. 2에서 표시(★)는 식(1)의 회귀모델의 타당성을 검토하기 위하여 나타낸 실험 측정치들로서 계산치와 실측치 사이에 좋은 상관관을 보이고 있다.

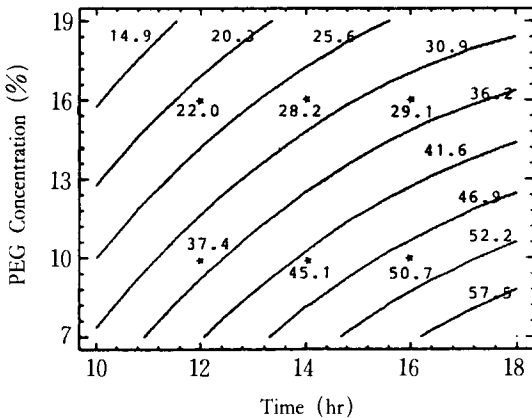


Fig. 2. Contour plot of ethanol concentration: PEG conc. vs time held constant at PEG MW 10000 and 5.5% dextran.

발효시간을 고정하고 보면 PEG농도의 증가에 따라 알콜 생성량은 급격히 감소하여 PEG농도가 19%일 때는 PEG농도가 7%일때에 비하여 생성알콜 농도는 50%정도에 불과하였다. 또한 동일한 발효시간에 대하여 보면 PEG농도가 증가할 수록 발효속도가 감소하는 것으로 나타났다. 다른 분자량의 PEG나 Dx농도에서도 마찬가지로의 결과를 얻을 수 있었다. 문헌(4)에 의하면 Dx농도 3%내지 6%범위에서 PEG농도 10%이상일때에 에탄올의 분배계수(K)가 1.2이상으로 비교적 많은 양의 알콜이 윗상에 분배되지만 알콜발효에는 적합하지 않은 것으로 나타났다. 7%미만의 PEG농도는 실험 범위에서 제외되

었으나 알콜량과 PEG분자량 사이의 관계를 고려하면 PEG분자량 20000이고 PEG농도가 3%내지 7%범위내에서 PEG농도의 최적치가 있을 것으로 추정된다.

PEG 분자량이 알콜생성에 미치는 영향

Fig. 3은 발효시간 18hr, Dx농도 4%일 때에 PEG농도 및 PEG 분자량에 따른 알콜 농도의 등고선을 나타낸 것이며 표시(★)는 실험 측정치들이다. PEG분자량 및 농도에 따른 알콜농도의 등고선은 다른 Dx농도 및 발효시간에 대해서도 비슷한 유형으로 나타났다. PEG분자량이 알콜생성량에 미치는 영향은 PEG농도에 따라 큰 차이를 보였다. PEG농도가 7%, 13%, 19%인 경우를 각각 비교해 보면 PEG분자량 2000일 때의 생성 알콜량은 분자량 20000일 때의 알콜량에 비하여 각각 98%, 85%, 63%로 나타났다. PEG농도가 높을수록 알콜 생성량에 대한 PEG분자량의 의존성은 컸으며 PEG농도가 낮을수록 PEG분자량의 영향은 작았다.

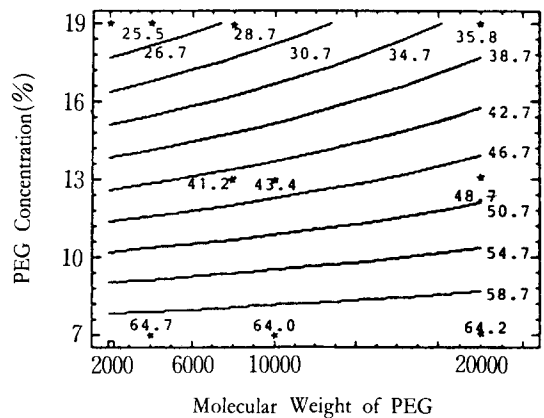


Fig. 3. Contour plot of ethanol concentrations: PEG conc. vs molecular weight of PEG held constant at 18hr and 4% dextran.

PEG분자량 2000일때 PEG농도가 7%에서 13%로 증가하면 알콜 생성량은 61.5 g / l에서 41.3 g / l로 33% 감소한 반면에, PEG분자량 20000일때는 동일 조건하에서 22% 감소하였다. PEG분자량을 2000에서 20000으로 증가시키면 PEG농도 증가로 인하여 나타나는 알콜생성량의 감소를 10%정도 줄일 수 있다. 이것으로부터 PEG농도의 영향이 PEG분자량 증가에 의하여 감소되며,

PEG농도 증가에 의한 알콜생성량 감소는 PEG분자량 증가에 의하여 보완될 수 있다는 것을 알 수 있었다.

Dextran 농도가 알콜생성에 미치는 영향

Fig. 4는 PEG 분자량 20000, 발효시간 18hr일 때에 Dx농도 및 PEG농도에 따른 생성 알콜농도의 등고선을 나타낸 것이다. 또한 Fig. 5는 발효시간 18hr, PEG 농도 7%일 때에 Dx농도 및 PEG분자량에 따른 생성 알콜농도의 등고선을 나타낸 것이다. Fig. 4와 Fig. 5를 보면

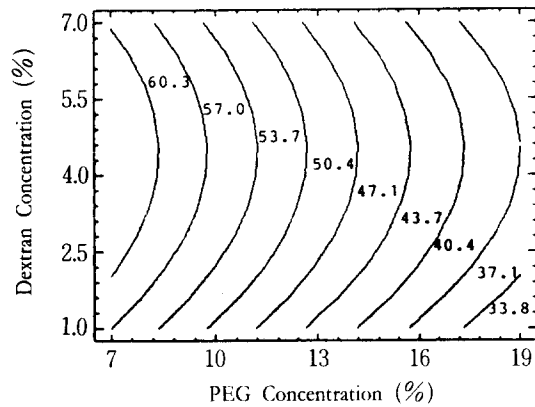


Fig. 4. Contour plot of ethanol concentration: Dextran conc. vs PEG conc. held constant at PEG MW 20000 and 18hr.

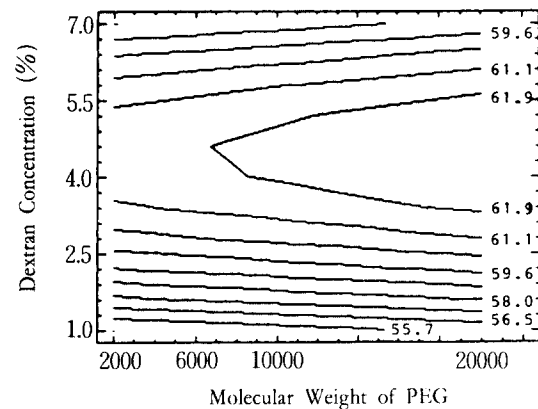


Fig. 5. Contour plot of ethanol concentration: PEG MW vs Dextran conc. held constant at 18hr and 7% PEG.

Dx농도가 증가함에 따라 생성알콜량은 증가하다가 Dx농도가 5%이상이면 감소하는 경향을 보이고 있다. 다른 분자량의 PEG, 발효시간 및 다른 PEG농도에 대해서도 같은 경향을 나타내었다. 분산분석 결과에 의하면 Dx농도와 PEG분자량 및 PEG농도와의 사이에 상호작용은 무시할 수 있었고, 알콜생성량에 대한 Dx농도의 영향은 독립적이었다. PEG분자량 및 PEG농도에 관계없이 Dx농도가 4%내지 5% 범위내에서 생성 알콜량이 최대치에 도달함을 알 수 있었다.

요 약

알콜의 PEG-Dextran-H₂O 이상계 추출 발효에서 알콜 생성량에 대한 PEG 분자량, 농도, 그리고 Dextran농도의 정량적인 관계 및 최적 이상계 조성을 구명하기 위하여 Box-Wilson 중심합성법을 이용하여 분석하였다. 본 연구에서는 회귀모델로서 알콜의 이상계 추출발효에 대한 실험변수들의 정량적인 관계를 표현하였다. PEG농도가 에탄올의 수성이상계 추출 발효에서 알콜생성에 가장 큰 영향을 보였으며 PEG농도가 7%이하에서 알콜농도 및 발효속도가 최대치에 근접하였다. 생성알콜농도는 PEG분자량 증가에 따라 완만하게 증가하였다. PEG농도가 높을수록 알콜 생성량에 대한 PEG분자량의 의존성은 컸으며 PEG농도가 낮을수록 알콜생성량은 PEG분자량에 따라 차이가 거의 없었다. PEG농도의 영향은 PEG분자량 증가에 의하여 감소되었다. Dextran농도는 4%내지 5% 범위에서 알콜생성량이 최대이었다. 알콜의 추출발효에서 PEG-Dextran(crude) 이상계는 PEG분자량 20000, PEG농도 7%이하, Dextran 4-5%로 구성되었을 때 최대의 생성알콜농도를 얻을 수 있었다.

감 사

본 연구는 1990년도 한국학술진흥재단 학술연구조성비의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 대하여 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. P. A. Albertsson (1971), *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, 2nd ed., Wiley-Interscience, New York
2. H. Walter, D. E. Brooks, and D. Fisher (1985), *Partitioning in Aqueous Two Phase System*, Academic Press, New York

3. F. Tjerneld, I. Persson, P. A. Albertsson, B. Hahn-Hagerdal (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1036
 4. B. Mattiasson (1983), *Trends in Biotechnol.*, **1**, 16
 5. B. Hahn-Hagerdal, B. Mattiasson, P. A. Albertsson (1981), *Biotechnol. Lett.*, **3**, 53
 6. B. Hahn-Hagerdal, B. Mattiasson, E. Andersson, and P. A. Albertsson (1982), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **32**, 157
 7. B. Mattiasson, and B. Hahn-Hagerdal (1982), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 52
 8. M. Narodoslawsky, Ch. Reisinger, A. Moser (1988), *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **2**, 245
 9. Y. L. Wan, H. Hustedt, and M. -R. Kula (1988), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **10**, 173.
 10. K. H. Kroner and M. -R. Kula (1978), *Process Biochem.*, **13**, Apr., 7
 11. C. D. Hendrix(1980), *ChemTech*, **10**, 488
 12. C. D. Hendrix(1979), *ChemTech*, **9**, 167
 13. 박성현(1982), 현대실험계획법, 대영사
 14. 박성현(1982), 회귀분석, 대영사
 15. J. P. Guiraud, J. Bourgl, N. Chabbert and P. Galzy, (1986) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**, 371-381
 16. N. Chabbert, Ph. Braun, J. P. Guiraud, M. Arnoux and P. Galzy, (1983) *Biomass*, **3**, 209-224.
 17. N. Chabbert, J. P. Guiraud, M. Arnoux and P. Galzy, (1985) *Biomass*, **6**, 271-284
 18. 허병기, 유진선, 양지원(1989), 한국생물공학회지, **4**, 50
- (Received; June 10, 1991, Accepted; June 14, 1991)**