

## 실관반응기 내의 *Saccharomyces cerevisiae*의 고농도 배양을 이용한 에탄올 생산성

장 호 남 · 양 지 원 · \*박 용 석 · \*\*정 봉 현  
한국과학기술원 화학공학과, \*유공물산연구소, \*\*유전공학연구소

### Ethanol Productivity in a Hollow Fiber Membrane Module Using High Density of *Saccharomyces cerevisiae*

Ho Nam Chang, Ji Won Yang, Yong Seok Park and Bong Hyun Chung  
Department of Chemical Engineering, KAIST  
\*\*Genetic Engineering Research Institute, KIST

#### ABSTRACT

We studied a continuous production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in a hollow fiber membrane bioreactor which consisted of 50 polypropylene fibers and 3 teflon fibers. The produced CO<sub>2</sub> was removed through the teflon fibers and excess biomass was removed through the shell side. We obtained the cell and ethanol concentrations of 266g/L and 205g/L based on the shell-side volume. A nitrogen deficient medium resulted in too low an ethanol productivity to be applied to a practical process.

#### 서 론

일반적인 회분식이나 연속식 발효에서는 세포의 농도가 10g/L 미만이어서 세포자신이 세포성장에 어떤 영향을 주는가는 고려의 대상이 되지 않는다. 그러나 세포재순환식 발효에서는 세포농도가 100g/L 근방에서 조업이 이루어지고(1), 실관형 생물반응기에서는 260g/L까지 관찰되기도 했다(2). 효모가 아닌 *E. coli*의 경우 이중실관 반응기 내에서 550g/L까지 관찰된바도 있다(3). 만일 세포농도가 자신의 생산활동에 아무런 영향을 미치지 않는다면, 세포농도를 높이는 것이 생산성을 높이는 방법과 직결될 것이며 그 반대의 경우라면 굳이 높은 세포농도를 얻기위한 여러가지 방법들을 시도할 필요성은 없을 것이다. 알콜발효의 경우 이와 같은 세포농도가 성장 및 세포활동에 미치는 영향을 고려한 경우가 있다. Lee 등(4)은 세포가 도달할 수 있는 최대 농도가 100g/L이며 그 이상에서는 전형적인 억제효과가 있다고 가정하여 재순환발효를 수치모사한 적이 있으나 현실적으로 150g/L에서 조업한 경우(1)가 있으므로 그 타당성은 결여된다. Ciftci 등(5)이 발효조의 외부에서 배양한 효모를 일정농도로 공급하면

서 세포농도가 미치는 영향을 관찰한 적이 있으나 다른 부수적 효과와 결합되어 정확한 영향을 구분하기는 힘들었다. 본 연구에서는 효모의 세포농도가 현실적으로 어느 정도까지 올라갈 수 있으며, 그러한 조건에서의 세포활동이 받는 영향과 에탄올 생산성에 대하여 고찰하고자 한다.

#### 재료 및 방법

사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae*(ATCC 24858)이었다. 보관배지는 Cysewski와 Wilke(6)의 성장배지에 0.15%의 agar를 넣은 고형배지이다. 균주는 이 고형배지에 모균을 접종하여 30°C에서 3일 간 배양한 후 4°C에서 보관하여 사용하였다. 보관용 고형배지는 3주마다 교환하였다. 배양은 250ml 삼각플라스크에 50ml의 배지를 넣고 2ml의 seed culture를 접종한 후 30°C, 250rpm의 회전식 shaker에서 행하였다.

Glucose의 분석은 glucose analyzer(YSI model 23A, Yellow Spring)를 이용했다. Ethanol은 gas chromatography(Gow Mac 7509 with FID)로 분석했으며 Internal standard는 2-butanol을 사용했

다. Yeast의 농도는 525nm에서의 흡광도(OD)를 측정하여 미리 작성된 표준곡선과 비교하여 구했다 (Spectrophotometer, Beckman Model 35). 또한 건조중량은 다음과 같은 방법으로 구하였다. 먼저 일정량의 발효액을 원심분리한 후 윗물을 버리고 증류수로 회석한 다음 다시 원심분리하는 것을 2회 반복한다. 여기서 남은 yeast를 105℃에서 더 이상 무게가 줄지 않을 때까지(대개 하루 정도) 건조시킨 후 무게를 측정하였다.

질소결핍배지는 Inloes 등(7)이 사용한 것을 이용했으며 Table 1과 같다.

Table 1. Nitrogen deficient medium(g/L)

glucose	100.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
potassium acid phthalate	10.21
NaOH	1.42
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.25
CaCl <sub>2</sub>	0.06
meso-inositol	1.125
mineral salts solution <sup>a</sup>	1.0mL
vitamin solution <sup>b</sup>	1.0mL

<sup>a</sup>Mineral salts solution(g/L)    <sup>b</sup>Vitamin solution(g/L)

ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.0	thiamin HCL	5.0
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0	pyridoxine HCL	6.25
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.5	nicotinic acid	5.0
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2.0	Ca-D-pantothenate	6.25
		D-biotin	0.125

실관생물반응기의 자세한 구조는 Fig. 1에 나타내었고, Table 2에는 자세한 제원이, 그리고 Fig. 2는 반응기 단면을 보여 주고 있다. 배지관은 polypropylene fiber를 기체관은 teflon fiber를 사용하였는데 전자현미경으로 보았을 때 다공성이지만 효모가 빠져 나갈만큼 기공이 크지는 않음을 알 수 있었다. 배지가 흘러갈 실관은 50 가닥이고 기체가 흘러갈 관

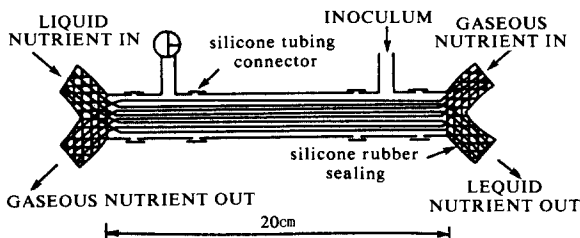


Fig. 1. Detailed structure of the reactor

Table 2. Detailed specification of the hollow fiber reactor

	Material	Size
Reactor body	Glass	0.8cm i.d. 20cm long
Medium-tube	Polypropylene Enka, FRG	0.33cm i.d. 0.063cm o.d. 0.4-0.6 μm pore
Gas-tube	Polytetrafluoroethy lene Sumitomo, Japan	0.1cm i.d. 0.2cm o.d. 1 μm pore

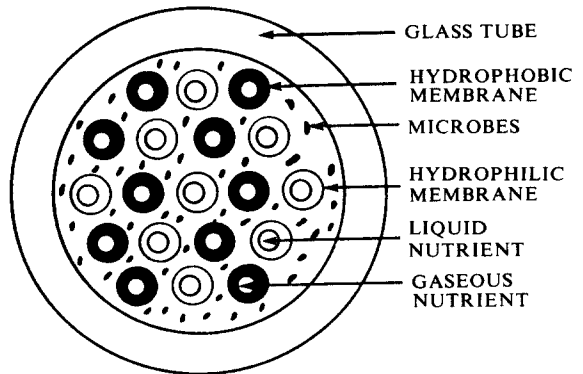


Fig. 2. Cross section of the reactor(refer to Tabel 2) 50 polypropylene fibers and 3 PTFE fibers

은 3가닥으로 되어 있으며 충전율은 46%이다. 양단의 밀봉은 Epoxy를 사용했다. 멸균은 70% ethanol 용액을 하루 동안 흘려보낸 뒤 멸균된 증류수로 하루동안 흘려보내서 행하였다. 하루동안 키운 seed culture를 주사기로 실관반응기의 shell-side에 주입하여 접종한 후 가스관 쪽으로 공기를 보내주고, 배지관 쪽으로 배지를 보내 줌으로써 조업이 시작되었다. 온도는 실관반응기를 30℃의 수조에 넣은 상태로 조업하면서 조절하였다. 한외여과방식의 조업은 먼저 배지관의 출구 쪽을 막고 기체관의 입구를 막은 상태에서 배지를 계속 주입하였다. 이 때는 배지가 배지관의 실관벽을 통과하여 세포가 자라고 있는 실관반응기의 shell-side로 빠져나온 뒤 세포를 통과하여 반응이 일어난 후 기체관을 통하여 실관 밖으로 빠져 나오게 되는 방식이다.

## 결과 및 고찰

실관반응기로 조업 중인 에탄올 발효계의 세포농도와 생산성을 정확히 측정하기 위해서는 잘 규정된 구조의 반응기와 균일한 배양조건을 유지시키는 것이 중요하다. 실관반응기에서 몇가지 문제점을 제거한다면 이 목적을 달성할 수 있다. 먼저 문제가 되는 것은 발효의 부산물로 발생하는 이산화탄소의 제거이다(8). 생산성이 높을수록 이 문제는 더욱 심각하다. 즉 실관의 일부분에 이산화탄소 기포가 차면 그 부분의 생산성 저하는 물론, 그 실관으로의 배지흐름을 방해하여 균형있는 성장을 방해한다. 따라서 이의 효율적 제거가 요구된다. 본 연구에서 고안한 실관반응기는 배지가 흘러갈 실관 외에 기체가 흘러나갈 수 있는 소수성 실관을 함께 삽입하여 이산화탄소 제거 문제를 해결하였다. 다음 문제는 shell-side에 세포가 자라고 실관을 통해 배지가 흘러갈 경우 막두께 및 세포층에 의해 배지의 공급이 원활하지 못하다는 점이다(9). 이는 고농도 배양일수록 문제가 심각하여 배지관과 떨어진 부분에서는 영양부족으로 생산성 감소 및 죽은세포가 생긴다. 즉 확산에 의한 물질전달의 한계로 인한 문제인 것이다. 이 문제를 본 실관반응기에서는 조업방식을 확산방식에서 한외여과 방식으로 바꿈으로써 해결하였다. 즉 shell-side에 접종한 후 얼마동안은 배지관으로만 배지를 흘러 보내는 확산방식으로 조업을 한다. 이 때 발생한 이산화탄소는 기체관을 통하여 공급되는 공기와 함께 빠져나간다. 세포농도가 어느정도 되면 배지관의 출구쪽을 막아 배지의 흐름이 배지관 내에서 배지관 바깥으로 스며 나오게 하는 한외여과방식을 택한다. 이렇게 하면 배지는 세포가 자라고 있는 shell-side로 흘러들어가 균일하고도 빠르게 공급되고, 발생한 이산화탄소 및 알코올은 기체관을 통하여 함께 제거되므로 세포의 활동성을 좋게 할 수가 있는 것이다.

Fig. 3은 실험결과를 나타낸 것이다. 먼저 shell-side에 주사기로 접종한뒤 배지관으로는 배지를 5mL/h로, 기체관으로는 습윤된 공기를 흘려보냈다. 하루가 지난 후 shell-side에는 발생한 이산화탄소가 차 있었으며 세포는 배지관 근처에 모여서 자라는 것이 관찰되었다. 하지만 배지관 출구로는 이산화탄소나 세포의 유출이 없었다. 3.5일간 조업하는 동안 세포량은 눈에 띄게 증가했으나 glucose의 소비는 약 60-70% 근처에 머물 뿐이었다. 이는 shell-side에 있는 세포들이 배지관에 바로 붙어 자라는 것들

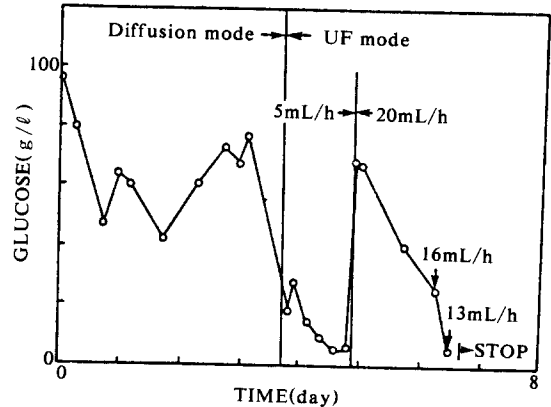


Fig. 3. Fermentation kinetics of hollow fiber reactor in diffusion mode and ultrafiltration mode

외에는 배지의 공급이 충분하지 못함을 뜻한다. Shell-side의 부피를 기준으로 할때 생산성(PD)은 다음과 같다.

$$PD = 5(\text{mL/h}) \times 13.5(\text{g-ETOH/L}) / 2.68(\text{mL}) \\ = 25.2(\text{g-ETOH/L.h})$$

두번째는 배지관의 출구를 막고 기체관의 입구를 막은 상태로 조업하는 확산방식을 취했다. 기체관의 출구로 반응한 배지와 발생한 이산화탄소가 함께 배출되었다. 기체관인 teflon관의 공경이 1 $\mu\text{m}$ 로 큰편이지만 세포의 유출은 없었다. Shell-side로 배지의 공급이 원활해지자 세포의 활성이 좋아져 glucose는 약 95%의 소비가 이루어졌다. 이때의 생산성은 80g/L.h로 확산방식의 약 3.2배였다. 이 방식의 또 다른 장점은 channeling의 자연적방지에 있다. 즉 배지가 실관의 일부분에서 바로 기체관으로 빠져 나간다면 그곳은 세포들이 활동하기 좋은 환경이 되고 곧 증식된 세포로 인해 흐름이 균일해질 수 있는 것이다. 실제로 세포의 자람이 확산방식보다 균일함이 관찰되었다.

세번째는 배지의 공급속도를 20mL/h로 4배 증가시켰다. Shell-side의 부피가 2.68mL이므로 희석율이 약 7.5h<sup>-1</sup>에 해당된다. 두번째와 마찬가지로 발생한 이산화탄소의 배출은 원활했으며 세포의 누출도 없었다. 그리고 shell-side는 빈공간없이 거의 세포로 꽉 차있음을 관찰할 수 있었다. 6.25일째 전환율은 75%지만 유량이 16mL/h로 줄어들었다. 이는 shell-side에 막힌 세포로 인해 배지의 흐름저항이 커졌기 때문이다. 6.5일째 유량은 13mL/h로 더욱 줄어들었으며 이는 세포들이 아직도 자라고 있음을

입증하는 것이다. 이 때의 생산성은 105g/L.h로 나타났다. 여기서 세포의 농도와 생산성과의 관계를 알아보기 위해 조업을 중단했다.

반응기의 실리콘 연결부를 칼로 절단해본 결과 배지관과 기체관을 제외한 shell-side는 세포로 꽉 차있음을 알 수 있었다. 세포농도를 측정하기 위해 유리관을 깨어낸 후 나머지를 증류수에 희석시켜 shell-side에 부착된 세포를 분리시켰다. 이를 원심분리하여 다시 증류수로 씻어내는 작업을 2회 반복한 후 건조중량을 재었다. 그결과 shell-side부피를 기준으로 할때 세포농도는 266g/L가 얻어졌다. Inloes등(8)은 실관막의 기공에 yeast를 배양하여  $1.3 \times 10^{10}$  cells/mL의 고밀도를 얻었으며 이때 기공의 70-100%에 세포가 자라 있음을 보고했다. Del Rosario등(10)에 의하면 *Saccharomyces cerevisiae*는  $4 \times 10^{10}$  cell/g-DCW이라 하므로 이를 적용하면 325g/L정도가 된다.

Yeast(ATCC 24858)의 비성장 속도는 다음과 같다(1).

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} (1 - P/P_m)$$

상수값들은 Table 3에 나타나 있다. 6.5시간째의  $\mu$ 를 계산해 보면 다음과 같다.

$$\begin{aligned} \mu &= 0.4 \frac{7}{0.24 + 7} (1 - 43/90) \\ &= 0.206(1/h) \end{aligned}$$

따라서 알콜생산성은 다음과 같다.

$$\begin{aligned} PD &= \mu X \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \\ &= (0.206) (266) (0.454)/(0.12) \\ &= 207(g/L \cdot h) \end{aligned}$$

실제 생산성은 205 g/L.h이므로 이와 같은 결과에서 yeast는 266g/L까지는 세포농도에 의한 억제 효과는 무시할 수 있다.

Table 3. Fixed model parameters

parameter	value
$K_s$ (g/L)	0.24
$\mu_m$ ( $h^{-1}$ )	0.4
$Y_{c/s}$	0.426
$Y_{p/s}$	0.454
$Y_{x/s}$	0.120
$P_m$ (g/L)	90

또다른 실관반응기를 위의 조업에서 계속한 결과 배지흐름이 완전히 멈출때까지 yeast가 자랐으며, 배지관이 찌그러진 것을 관찰할 수 있었다. 이 반응기의 생산성은 위와 같이 매우 높지만 계속 자라는 세포로 인해 장기조업이 불가능하였다. 이와 같은 문제는 확산방식에 의해 조업한 Mehaia와 Cheryan(9)에 의해서도 지적되었다. 그들은 외관에 접촉하기 위해 만든 출구를 통해 가끔씩 세포가 흘러 나오게 하여 줌으로써 생성된 세포만큼 제거하여 문제를 해결하려 했다. 본 반응기도 그와 같은 조업을 시도했으나 세포농도가 일정이상되면 흘러나오는 것도 멈추어 막혀버리고 말아 이 같은 방법으로는 장기조업을 할 수 없었다. Inloes등(7)은 질소 결핍배지를 이용하여 yeast의 성장을 멈춤으로써 이 문제를 해결하려 했다. 하지만 생산성은 완전배지의 10%에 불과했다.

본 반응기에서 세포가 어느정도 자란후 Inloes의 질소결핍배지로 바꾸어 키웠다. Fig. 4가 그 결과이다. 처음에는 한외여과 방식으로 조업하여 세포농도를 충분히 높인다음 질소결핍배지로 바꾸었다. 알콜 생산성은 74g/L.h에서 17g/L.h로 낮아졌고 전환율은 87%에서 20%로 낮아졌으나 활성은 계속 유지되었다. 그러나 6일이 지난후 배지에 포함된 비타민 때문에 세포성장이 조금씩이나마 유지되어온 결과로 결국 막힘이 일어났다. 비타민마저 제거한 배지를 사용했을때는 성장은 중지되어 막힘은 일어나지 않았으나 생산성은 너무 낮아 의미가 없었다. 지금까지의 실험결과와 고찰을 통하여 내릴 수 있는 결론은 특정 영양소의 결핍배지의 사용으로는 장기조업 시 생산성을 높일 수 없으며 과다하게 생성되는 반

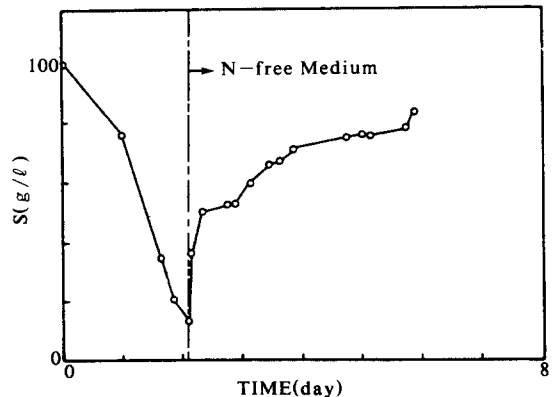


Fig. 4. Fermentation kinetics with nitrogen deficient medium.

응기내의 세포를 일정량씩 제거해줌으로써만 생산성의 증대가 가능하다는 것이다.

### 요 약

50개의 폴리프로필렌 실관과 3개의 테프론 실관으로 구성된 실관반응기에서 *Saccharomyces cerevisiae* 효모를 이용하여 알콜의 연속 생산을 연구하였다. 생산된 CO<sub>2</sub>는 테프론 실관으로 내어 보냈고 과잉 효모 세포는 shell-side를 통하여 제거하였다. Shell-side 부피를 기준으로 세포농도는 266g/L이었고 알콜 생산성은 205g/L를 얻었다. 질소 결핍배지를 사용했을 경우 생산성이 너무 낮아 실제 응용할 가치는 없었다.

### 참 고 문 헌

1. C. W. Lee and H. N. Chang(1987), *Biotech. Bioeng.*, **29**, 1105.
2. M. A. Mehaia and M. Cheran(1984), *Appl. Microb. Biotech.*, **20**, 100.
3. B. H. Chung(1987) Ph. D. Thesis, Dept. of Chem. Eng, KAIST, Korea
4. J. M. Lee, J. F. Pollard and G. H. Coalman (1983), *Biotech. Bioeng.*, **25**, 497.
5. T. A. Ciftci, A. Costantinides and S. S. Wang (1983), *Biotech. Bioeng.*, **25**, 2007.
6. G. R. Cysewski and C. R. Wilke(1977), *Biotch. Bioeng.*, **19**, 1125.
7. D. S. Inloes, A. S. Michaels, C. R. Robertson and A. Malin(1985), *Appl. Microb. Biotech.*, **23**, 85.
8. D. S. Inloes, D. P. Taylor, S. N. Cohen, A. S. Michaels and C. R. Robertson(1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 264.
9. M. A. Mehaia and M. Cheryan(1984), *Appl. Microb. Biotech.*, **20**, 100.
10. E. J. Del Rosario, K. J. Lee and P. L. Rogers (1979), *Biotech. Bioeng.*, **21**, 1477.