

고농도 균체 배양에 의한 알콜 발효에서의 균체농도와
발효특성치 사이의 함수관계 규명
-균체농도와 비성장속도, 균체 수율, 알콜 생산성 사이의 함수관계-

배 천 순·김 범 준·김 현 성·김 진 한·허 병 기
인하대학교 생물공학과

A Study on the Functional Relationship between Biomass Concentration
and Fermentation Characteristics in the Culture of High density Cell

Cheon Sun Bae, Bum Jun Kim, Hyun Sung Kim, Jin Han Kim and Byung Ki Hur

Department of Biological Engineering, Inha University

ABSTRACT

The effect of biomass concentration of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858 on specific growth rates, biomass yields, ethanol yields and productivities in the batch fermentation of rotary shaker was investigated.

The specific growth rate decreased according to the increase in the biomass density and finally became zero at a biomass concentration, 55g/L. The ethanol yield $Y_{p/s}$, represented a constant value, 0.43, regardless of the change of biomass concentrations. However, the biomass yield $Y_{x/s}$ showed a trend to diminish in values with augmentation of biomass density and ultimately to reach zero at 55g/L of biomass concentration. The ethanol productivity increased linearly with biomass concentration so that, in case of initial sugar concentration, 170g/L, the productivity for 55g/L of biomass density rose up to 30g/L · hr for all the batch fermentations. And also the ethanol concentration inhibiting completely the growth was verified 95g/L by applying experimental data to Luong's equation.

서 론

에탄올의 높은 생산성을 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 대표적인 예가 균체농도를 증가시켜 생산성을 증가시키는 방법으로 막을 이용한 재순환 방법(1~4)과 flocculent cell을 이용하는 방법(5~8)이 있다. 막 장치는 비용이 많이 들고 scale-up시 장시간 운전조건에는 맞지 않는 문제점을 내포하고 있으나, 고농도의 균체를 얻을 수 있다(1, 3). Flocculent cell을 이용하여 고농도의 균체를 얻는 것은 장치설비의 문제와 장시간의 운전으로 발생하는 문제

를 해결할 것으로 기대되어지나, 에탄올 생산성이 막을 이용하는 경우에 비하여 다소 낮다는 단점이 있다.

지금까지 보고된 연구결과에 의하면 최대 균체농도에 있어서는 막을 이용할 경우 110~210g/L로 flocculent cell의 60~90g/L에 비해 상당히 높다. 최대 에탄올 농도에 있어서는 막을 이용하는 경우 90g/L(1)이며, flocculent cell인 경우에는 80~92g/L(5, 8)로 보고되어 있다. 균체를 110~210g/L의 고농도로 유지시키는 경우에는 영양분의 공급과 생성물의 저해 작용, 균체의 저해작용등의 문제가

수반된다. 따라서 균체성장과 에탄올의 생성이 완전히 저해되는 균체농도와 에탄올 농도를 규명하기 위하여 많은 연구가 수행되었으나 대부분 연역적 방법에 의하여 제시된 값들이다(1, 2, 9).

본 실험에서는 flocculent cell를 이용할 때 성장이 멈추는 균체농도와 에탄올 농도를 실험을 통하여 규명하였다.

재료 및 방법

균주 및 균체 초기농도

본 연구에서 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858이다. 4°C 사면배지에 냉장 보관된 균주를 YM액배지에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 진탕배양하였다.

초기 당농도 120g/L인 본 연구의 발효배지와 동일한 조성의 액체배지 200ml가 주입된 500ml 삼각 플라스크 5개 내지 20개에 위의 배양액 20ml를 각각 가하고 30°C에서 20시간 진탕 배양하였다. 본 실험실에서 고안한 500ml 삼각 플라스크 원심 분리기틀을 사용하여 위의 발효액으로부터 균체를 농축하였다. 이 농축균주를 발효배지에 접종하여 균체의 초기농도가 0.5g/L, 6g/L, 20g/L, 37g/L, 55g/L가 되도록 한 후 발효 실험을 수행하였다.

발효기질

본 연구에 사용한 발효기질의 기본 조성은 포도당 100g/L, NH₄Cl 1.3g/L, MgSO₄·7H₂O 12g/L, CaCl₂ 0.06g/L, Yeast extract(Difco) 8.5g/L이다.

발효실험의 초기 당농도는 50g/L, 75g/L, 120g/L, 170g/L, 210g/L이었으며 초기 당농도 변화에 따른 다른 성분의 조성은 위의 기본 조성에 대한 당의 변화량과 비례적으로 변화시켰다.

발효배지의 pH는 0.2N NaOH용액과 0.2N HCl용액을 사용하여 5.5가 되도록 조절하였으며 발효배지의 평균은 당과 나머지 성분을 분리하여 수행함으로써 갈변현상을 방지하였다.

발효실험

위에 언급한 다섯 종류의 균체 초기농도 각각에 대하여 초기 당농도를 다섯가지로 변화시켜 가면서 발효실험을 수행하여 시간에 따른 발효 특성을 규명하여 보았다.

이 경우 회전식 진탕배양기의 작동 조건은 온도 30°C, 150rpm이었다. 시료채취는 균체의 초기농도

에 따라 조절하였다. 초기 균체농도가 0.5g/L인 경우에는 3시간 내지 4시간 간격으로, 초기 균체농도가 6g/L인 경우에는 1시간 간격으로, 초기균체농도가 20g/L이상인 경우에는 30분 내지 40분 간격으로 시료를 채취하였다.

시료분석

시료가 담긴 시험관을 100°C 끓는 물에 3분간 증탕한 후 4000rpm에서 30분간 원심분리하였다. 상등액은 잔당과 에탄올농도 분석에 침전물은 균체 농도분석에 사용하였다.

잔당농도는 분광 광도계(Shimadzu UV-120)를 사용하여 DNS법(10)으로 분석하였으며, 에탄올농도는 n-propanol을 기준물질로 하여 Gas Chromatography(Hewlett Packard HP-5890A)를 사용하여 분석하였다(11). 균체농도는 균체시료를 증류수로 2회 세척한 후 95°C의 건조기에서 건조시켜 함량이 되었을때의 양으로부터 구하였다.

결과 및 고찰

균체농도가 비성장속도에 미치는 영향

위에서 언급한 발효실험을 수행하여 얻은 발효시간과 당농도, 균체농도, 에탄올농도의 함수관계로부터 초기 당농도가 95퍼센트 소모되는 시점에서의 발효시간 균체농도를 구하고 이 결과를 다음 식(1)에 적용하여 각 경우에 대한 균체의 평균 비성장속도를 구하였다.

당 소모가 95퍼센트 진행된 시점에서 각 변수 값을 고려한 것은 95퍼센트 이상의 당 소모 범위인 정체기에서 지연되는 발효시간이 발효특성치 계산에 미치는 영향을 가급적 줄이기 위해서이다.

$$\mu = \frac{1}{X_{av}} \cdot \frac{\Delta X}{\Delta t} \dots\dots\dots (1)$$

위 식에서 X_{av}는 균체의 초기 농도와 당이 95퍼센트 소모되는 시점에서의 균체농도의 평균값을, ΔX는 이 두 시점사이의 균체농도의 차이값을 그리고 Δt는 이 경우에 소요되는 발효 시간을 의미한다.

Fig. 1은 식(1)에 의하여 구한 평균 비성장속도와 평균 균체농도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 균체의 비성장속도는 균체농도가 증가하면 초기 당농도에 관계 없이 감소하여 균체농도 55g/L에 이르게 되면 균체성장이 멈추게 됨을 알 수 있다. 균체성장이 멈추는 균체농도에 대한 재

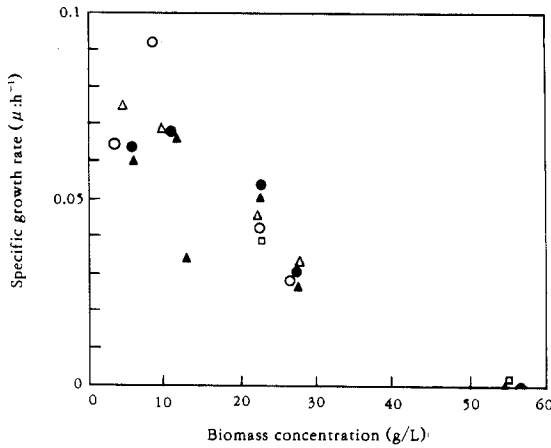


Fig. 1. Relationship between biomass concentration and specific growth rate at different initial sugar concentrations:(○) 50, (△) 75, (●) 120, (▲) 170, (□) 210g/L.

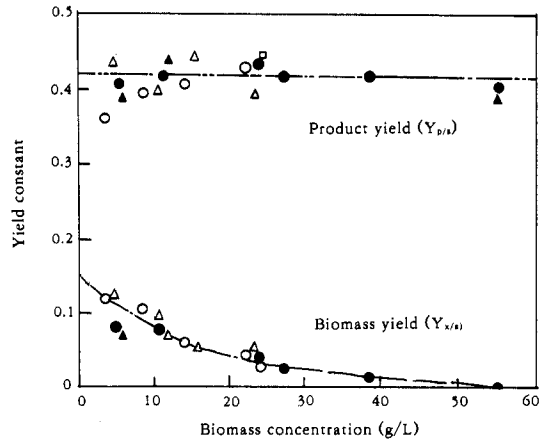


Fig. 2. Relationship among biomass concentration, biomass yield, $Y_{x/s}$ and product yield, $Y_{p/s}$ at different initial sugar concentrations:(○) 50, (△) 75, (●) 120, (▲) 170, (□) 210g/L.

순환 연속발효의 연구 결과(1, 12, 13)에 의하면 균체 성장이 멈추는 농도가 250g/L이상으로 제시되어 본 연구결과와 큰 차이를 나타내고 있다.

이런 현상은 발효방식의 차이, 발효액내의 용존산소 농도의 차이, 균체가 단일세포로 분산되어 있느냐 아니면 플러크의 형태로 분산되어 있느냐 등의 요인에 의하여 발생되는 결과로 예측할 수 있다. 이에 반하여 발효방식이 유사한 flocculent cell의 회분식 배양에 의한 균체 성장특성은 본 연구의 결과와 거의 동일한 경향을 나타내어 초기 균체농도 30g/L인 경우 발효 시작 8시간 후에 4내지 5g/L정도의 증가를 나타내었다(5).

균체농도가 발효수율에 미치는 영향

Fig. 2는 초기 당농도를 매개변수로 하였을 때 평균 균체농도와 알콜수율 및 균체 수율사이의 함수관계이다. 당 소모량에 대한 알콜수율 $Y_{p/s}$ 는 균체농도 55g/L까지는 균체농도 변화에 관계없이 일정한 값 0.43을 나타낸다. 이 값은 균체 재순환 연속배양 실험(14)에서 얻은 0.454와 거의 동일하다는 것을 알 수 있었다. 반면 당 소모량에 대한 균체수율 $Y_{x/s}$ 값은 균체농도가 낮은 경우에는 0.14의 값을 나타내었으나 균체농도가 증가하면 서서히 감소하여 균체농도 55g/L 근방에서는 0에 도달하였다.

균체 농도가 에탄올 생산성에 미치는 영향

Fig. 3은 다음 식(2)로 정의되는 발효시간 및 에탄올 생산성과 평균 균체농도사이의 함수관계이다.

$$PD = \frac{\Delta P}{\Delta t} \dots\dots\dots (2)$$

윗 식에서 PD는 에탄올 생산성을, Δt 와 ΔP 는 초기 당이 95퍼센트 소모되는데 소요되는 발효시간과 그 때의 에탄올농도와 초기 에탄올농도 차이값을 나타낸다.

이 결과에 의하면 평균 균체농도가 5g/L인 경우 초기 당의 95퍼센트가 소모되는데 소요되는 발효시간이 25시간 내지 30시간 사이에 분포되어 있으나 평균 균체농도가 10g/L로 증가하면 발효시간이 15시간 이하로 줄어들며 균체농도가 55g/L까지 증가하면 발효시간이 2시간 반 이하로 감소하였다. 식(2)로 정의되는 에탄올생산성은 균체농도 증가에 따라 거의 비례적으로 증가하여 초기 당농도 170g/L인 경우 평균 균체농도 11.5g/L에서는 에탄올생산성이 5g/L · hr이었으나 균체농도가 55g/L까지 증가하면 에탄올 생산성 또한 30g/L · hr까지 상승하였다.

에탄올농도가 균체 성장에 미치는 영향

발효실험을 통하여 얻은 균체농도, 당농도 및 에

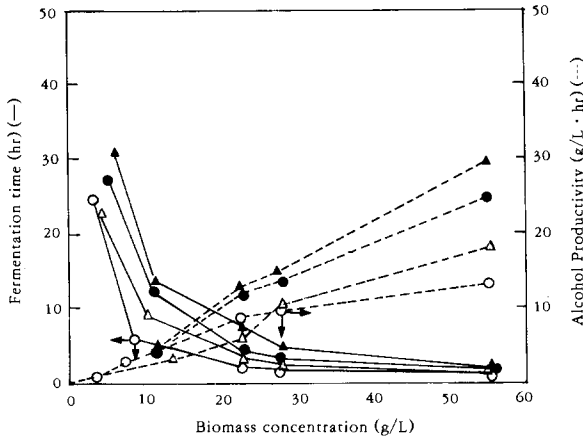


Fig. 3. Relationship among biomass concentration, fermentation time and ethanol productivity at different initial sugar concentrations(○) 50, (△) 75, (●) 120, (▲) 170g/L.

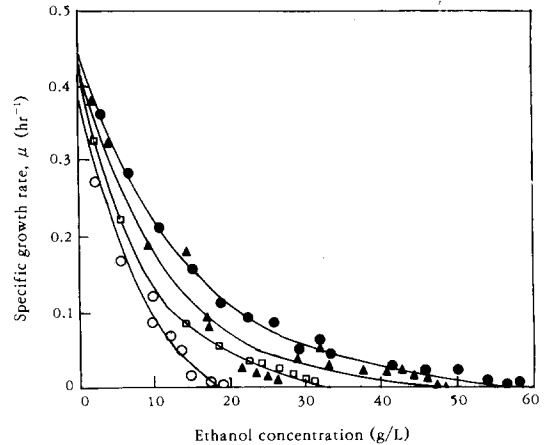


Fig. 4. Relationship among specific growth rate and product concentration at initial sugar concentrations(○) 50, (□) 75, (▲) 120, (●) 170g/L.

탄올농도와 발효시간 사이의 함수관계 그래프로부터 임의의 발효시간에서 균체농도의 시간에 대한 미분값을 그때의 균체 농도로 나눈 다음 식(3)을 균체 비성장 속도로 구하였다.

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \dots\dots\dots (3)$$

초기 당농도를 매개변수로 하여 식(3)의 값을 에탄올농도의 함수로 표현한 것이 Fig. 4이다.

Fig. 4로부터 각 초기 당농도에 대하여 농도를 0 까지 외삽하여 균체 비성장속도를 구한 후 이 결과를 Lineweaver-Burk plot방법에 의하여 Monod식의 최대 비성장속도 μ_m 와 Monod상수 K_s 를 구하면 각각 $0.44hr^{-1}$ 와 $25g/L$ 이었다.

이 값을 다음의 Luong식(15)에 적용하여 균체 성장에 미치는 에탄올농도의 영향을 규명하여 보았다.

$$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{X}{X_m} \right) \left(1 - \frac{P}{P_m} \right) \dots (4)$$

위 식에서 P_m 은 균체성장이 멈추는 에탄올농도를, X_m 은 균체성장이 멈추는 균체농도를 의미한다. 위 식(4)를 변형하여 에탄올 농도의 함수와 나머지 변수들의 함수로 분리하여 정리하면 다음식과 같이 된다.

$$\mu / \left[\mu_m \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(1 - \frac{X}{X_m} \right) \right] = \left(1 - \frac{P}{P_m} \right) \dots (5)$$

초기 균체농도 $0.5g/L$ 내지 $55g/L$, 초기 당농도 $50g/L$ 내지 $210g/L$, 초기 에탄올농도 $0g/L$ 내지 $40g/L$ 범위에 대한 본 연구의 실험 결과로부터 구한 μ , μ_m , K_s , X_m 값을 이용하여 식(5)의 오른쪽 항을 구하고 이 값을 에탄올농도 P의 함수관계로 나타낸 것이 Fig. 5이다.

이 결과에 의하면 본 연구의 실험 범위에서는 잔여 당농도에 상관없이 알콜 농도 $95g/L$ 이상에서는 균체 성장이 멈추어 짐을 알 수 있다.

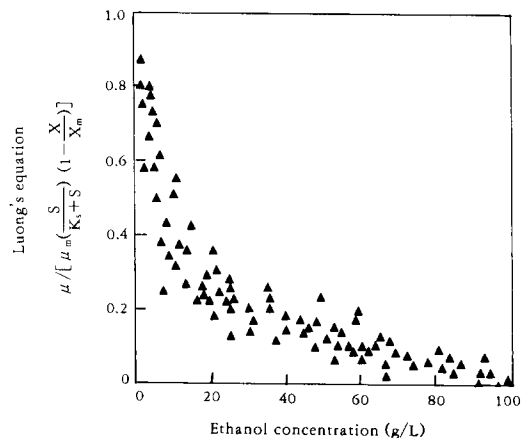


Fig. 5. Relationship between Luong's equation and product concentration.

요 약

회전식 진탕 배양기를 사용한 회분식 발효 실험을 통하여 효모 *S. cerevisiae* ATCC 24858의 균체농도 변화가 비성장 속도, 균체수율, 에탄올수율, 에탄올생산성 등에 미치는 영향을 규명하여 보았다.

균체의 비성장속도는 균체농도가 증가함에 따라 감소하여 균체농도가 55g/L에 이르게 되면 0hr^{-1} 에 도달하여 균체성장이 멈추게 되었다. 에탄올수율 $Y_{p/s}$ 는 균체농도 변화에 관계없이 일정한 값 0.43을 나타내었으나 균체수율 $Y_{x/s}$ 는 균체농도 증가에 따라 감소 경향을 나타내어 균체농도 55g/L에서는 그 값이 0을 나타내었다. 에탄올 생산성은 균체농도 증가에 따라 선형적인 함수관계로 증가하는 경향을 나타내어 초기 당농도 170g/L, 초기 균체농도 55g/L인 경우에는 30g/L까지 상승하였다. 또한 본 연구의 실험 결과를 Luong식에 적용하여 균체성장이 멈추는 에탄올의 농도가 95g/L임을 알 수 있었다.

감 사

이 논문은 1992년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제(지방대학육성) 학술연구 조성비에 의하여 연구되었습니다. 이에 대하여 감사를 드립니다. 또한 본 연구 수행에 참여한 대학원생의 장학금을 지원하여 주신 한국과학기술원 생물공정 센터에도 감사를 드립니다.

사용기호

- K_s ; substrate saturation constant (g/L)
 P ; product concentration (g/L)
 S ; substrate concentration (g/L)
 X ; biomass concentration (g/L)
 $Y_{x/s}$; yield of biomass based on substrate consumed (g/g)
 $Y_{p/s}$; yield of product based on substrate consumed (g/g)
 μ ; specific growth rate (hr^{-1})

참고문헌

1. C. W. Lee and H. N. Chang (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1105-1112.
2. A. B. Jarzebski and J. J. Malinowski, (1989), *Biotech. Bioeng.*, **34**, 1225-1230.
3. T. Watanabe et. al., (1990), *J. Ferment. Bioeng.*, **69**(1), 33-38.
4. K. Melzoch, M. Rychtera, S. Markvichov, V. Pospichalova, G. basarova and N. Manakov (1991), *Appli. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 469-472.
5. P. Bajai and A. Margaritis (1986), *Biotechnol. Lett.*, **8**(5), 361-364.
6. C. B. Neto and G. Goma, (1987), *Biotech Bioeng.*, **30**, 320-324.
7. R. Raghav, H. Sivaraman, D. V. Gokhale and B. Seetarama (1989), *Biotech. Lett.*, **11**(10), 739-744.
8. K. Kida, S. I. Asano, M. Yamataki, K. Iwasaki, T. Yamaguchi and Y. Sonoda (1990), *J. Ferment. Bioeng.*, **69**(1), 39-45.
9. B. L. Maiorella, C. R. Wilke, and H. W. Blanch (1981), *Adv. Biochem. Eng.*, **20**, 43.
10. G. L. Miller (1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
11. 김진한, 허병기, 목영일 (1991), 한국생물공학회지, **6**(2), 123.
12. S. J. Pirt (1975), Principles of microbe and cell cultivation, Blackwell Scientific Publication, London, 30-41.
13. E. J. Del Rosario (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1477.
14. C. W. Lee (1986), High density cell culture of *S. cerevisiae* and Recombinant *E. coli* in a membrane cell recycle fermentation, Ph D. Thesis, KAIST.
15. J. H. T. Luong (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 280.