

추출발효에 의한 알코올 제조공정 개발(III)
- 추출 알코올 발효에 최적인 PEG/Dx의 조성 -

허 병 기 · 김 진 한 · *목 영 일
인하대학교 공과대학 생물공학과
*아주대학교 공과대학 화학공학과

Process Development of Alcohol Production
by Extractive Fermentation(III)
- An Optimum Composition of PEG/Dx for Extractive Alcohol Fermentation -

Byung Ki Hur, Jin Han Kim and Young Il Mok*

Department of Biological Engineering, Inha University

*Department of Chemical Engineering, Ajou University

ABSTRACT

Extractive fermentations with the extract of *Jerusalem artichoke* in an aqueous-two-phase-system of polyethyleneglycol(PEG) and dextran(Dx) were investigated to obtain the effects of composition of PEG and Dx on both fermentation characteristics and partition ratio of alcohol.

The specific growth rate of *K. fragilis* CBS 1555 increased with a decrease of concentration of PEG and Dx. It augmented along with concentration of initial sugar up to 80g/l but decreased thereafter. The specific production rate of alcohol showed a rising tendency up to 100g/l of initial sugar, whereafter represented a decreasing trend.

The partition ratio of alcohol between two phases augmented according to decrease of Dx conc. and increase of PEG conc. regardless of initial sugar concentrations. The ratio, however, decreased with increment of initial sugar concentration at constant composition of PEG and Dx. The partition coefficient of alcohol had an ascending effect to the increase of PEG conc., but it had little effect on the changes of concentrations of Dx and initial sugar.

The present study suggests that the optimum composition of PEG and Dx in the aqueous-two-phase-system by extractive fermentation were around 6.5%(w/v) of PEG and 3%(w/v) of Dx in considerations of emulsion state, sedimentation and separation of two phases, alcohol partition ratio, and specific growth rate.

서 론

석유의 대체 에너지원으로 각광을 받고 있는 발효 알코올이 경제성을 갖기 위해서는 현재의 알코올 생

산성을 획기적으로 향상시킬 수 있는 공정이 개발되어야 한다. 현재 연구가 진행중인 알코올 발효공정에는 발효와 동시에 알코올을 분리해냄으로써 알코올의 저해영향을 경감시키는 공정이 주종을 이루고

있다. 추출, 증류 및 흡착의 개념을 도입한 액-액 추출발효(1-3), 감압발효(4-5), 고상 흡착제에 의한 선택적 흡착발효(6), gas-stripping 발효(15) 등에 대한 기술적 응용성과 타당성 연구가 진행되고 있다. 최근에는 막분리 기술을 응용한 투석(8, 9), 수상 stripping의 역삼투(10), 유기상 stripping의 perstraction(11), pervaporation(12, 13) 등의 발효공정도 개발 중에 있다.

감압발효에는 진공에 의하여 증발된 에탄올 증기를 완전히 회수하기 어려울 뿐만 아니라 증기를 회수하기 위하여서는 매우 낮은 온도의 냉매가 필요하다는 단점이 내포되어 있다. 막을 이용한 발효공정이 산업화되기 위해서는 막제조기술에 대한 여러 문제점을 우선적으로 해결하여야함은 물론 성능이 우수한 막분리 시스템의 개발이 선결과제로 남아 있다. 액-액 추출 발효공정은 아직 완성된 단계가 아니나 이 공정에 대한 타당성 연구결과에 의하면 발효 알코올의 생산비가 가장 낮은 공정의 하나로 알려져 있다(14).

유기용매는 대부분 생물물질에 손상을 입히기 때문에 생물공업에서 유기용매 추출공정은 몇 가지의 특수한 경우에만 이용된다. 분배계수가 큰 유기용매는 독성이 강할 뿐 아니라 수상과 유기용매상 사이의 계면장력과 유전상수의 차이가 크기 때문에 생물물질이 손상되는 것은 불가피하다. 따라서 생물공업에 이용되는 추출발효에는 생체에 나쁜 영향을 미치지 않는 폴리에틸렌글리콜, 덱스트란 등의 수용성 고분자에 의한 수성이상계가 널리 사용된다.

폴리에틸렌글리콜과 덱스트란 등의 수용성 고분자와 무기염의 혼합 수용액은 적당한 농도범위에서 자발적으로 두 상으로 분리되며 이것은 두 고분자의 상반성(incompatibility)에 기인한다(15). 수성이상계를 이용한 생체 고분자 및 세포의 분획 정제방법이 Albertsson(15)에 의하여 제안된 이래 저해영향이 있는 아세톤, 부탄올, 에탄올 발효와 같은 여러 종류의 생물공업분야에 응용되고 있다(15).

수성이상계는 각 상의 함수율이 85 내지 95%이다. 두 상 사이의 계면장력이 물과 유기용매 혼합물에 비하여 매우 낮기 때문에 미약한 교반으로도 쉽게 에멀전이 생성된다. 미세한 에멀전 방울에 의하여 두 상 사이의 접촉면적이 대단히 클 뿐만 아니라 기질과 생성물의 확산속도 또한 크기 때문에 추출발효에 적합하다. 수성이상계에 용해되고 전하를 띄지 않은 저분자 물질들은 두 상 사이에서 고르게 분배되는 반면 세포와 세포내의 소기관 등과 같은 큰 입

자들은 두 상 중의 한 상 또는 그 계면에 농축된다. 수성이상계의 조성이 변할 때는 생성물이 비대칭으로 분배되므로(17, 18) 분배에 영향을 미치는 고분자의 분자량, 이상계의 pH, 공존하는 무기 이온의 종류와 농도들을 적절히 조합하여 바람직한 조건을 설정하여야 한다.

본 연구에서는 수성이상계를 이용한 돼지감자 착즙의 알코올 발효에서 수용성 고분자의 조성에 따른 알코올 발효 특성과 알코올의 분배특성을 규명하고, 이 결과로부터 알코올 발효에 최적인 수성이상계를 찾고자 하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Kluyveromyces fragilis* CBS 1555이다. 포도당 농도가 40g/L인 것을 제외하고는 문헌(2)와 동일한 조성의 배지를 사용하여 35℃에서 24시간 동안 진탕배양한 후 4시간 동안 침강 농축시켜 얻은 농축균체를 접종용 균체로 사용하였다.

발효기질

발효기질은 문헌(3)의 방법을 이용하여 얻은 돼지감자즙을 사용하였으며 이것의 당농도는 120g/L이었다. 돼지감자즙의 이눌린 조성은 Fructose/Glucose비의 평균값이 4이다(19). 발효기질의 당농도를 높이기 위하여 Fructose와 포도당의 혼합물(F/G=4)을 첨가하여, 당 농도를 240g/L로 조정후 실험에 사용하였다. 각 회분실험의 수성이상계 발효기질용액의 부피는 모두 200ml로 하였다. PEG 농도와 Dextran농도, 당농도 및 발효시간을 변수로 하고 다섯 가지 수준의 Box-Wilson 중심합성계획(20)에 따라 실험을 계획하였다. 실험점의 크기에 따른 영향을 없애기 위하여 변수들의 실험점은 선형 변환하여 실험수준치로 표준화하였다. 문헌(21)의 결과를 기초로 하여 PEG는 분자량 20,000의 것을 사용하였다. PEG농도가 8, 6.5, 5, 3.5, 2% (w/v)인 경우와 Dextran 농도가 7, 5.5, 4, 2.5, 1% (w/v)인 경우를 조합하여 얻어진 13개 수성이상계와 임계점 근방의 조성을 가진 PEG-Dx계로 실험하였다. 또한 PEG와 Dextran을 첨가하지 않고 돼지감자즙을 이용하여 대조실험을 하였다. 발효기질의 당농도는 수성이상계의 고분자의 부피를 고려하여 당용액의 첨가량을 달리함으로써 초기 당농도가 40,

80, 120, 160, 200g/L가 되도록 조제하였다. 각 회 분실험에서 PEG와 Dextran의 부피는 PEG와 Dextran의 partial specific volume 0.833g/cm³와 0.611g/cm³(16)을 이용하여 계산하였다.

발효실험

접종용 균주를 500ml 발효기질 용액에 접종한 후 35℃, 150rpm으로 진탕배양 하였으며 발효 시작 후 12시간까지는 2시간 간격으로, 28시간까지는 4시간 간격으로 기질용액을 혼합하면서 주사기로 12ml씩 시료를 채취하였다. 채취된 시료를 잘 혼합하여 1.0ml를 분취하고 균체농도 측정에 이용하였다. 그리고 나머지 시료는 눈금이 있는 15ml 원심시험관에 넣고 끓는 물 중에서 1분간 중탕하고 급냉혼합시킨 후 다시 35℃의 항온수조에서 30분간 방치하여 윗상과 아랫상의 부피 및 알코올 농도 측정에 이용하였다.

시료의 분석

균체농도는 Hemacytometer slide를 이용하여 균체수를 측정하고 균체수와 건조 중량의 상관관계로부터 구하였다. 시료를 50℃의 0.9% NaCl용액으로 8회, 증류수로 2회 세척하였고 세척시마다 5000 rpm에서 30분간 원심분리하였으며 이것을 105℃ 건조기 안에서 24시간 건조한 후 데시케이터에서 30분간 실온으로 냉각하여 균체의 건조중량을 측정하였다. 데시케이터의 건조제로는 P₂O₅를 사용하였다.

윗상과 아랫상의 알코올농도 측정은 n-propanol을 내표준물질로 하여 문헌(21)의 분석조건에서 가스크로마토그래피(HP5890A)로 분석하였다. 알코올측정 시료는 부피측정 후 윗상과 아랫상 각각에 대하여 분석용 저울로 0.500g을 평량하고 여기에 2g/L n-propanol 용액 10ml를 넣어 알코올농도를 측정하였다. 윗상과 아랫상 시료의 밀도는 문헌(15)의 값을 이용하였다. 윗상과 아랫상의 알코올농도로부터 분배계수를 계산하고, 계산된 분배계수와 부피비, 윗상과 아랫상의 알코올 농도로부터 전체상의 알코올농도를 계산하였다.

알코올의 분배특성

수성이상계에서의 분배 특성치, 즉 분배계수(K), 농축인자(α_{top}), 분배수율(Y_{top}), 분배비(G)는 다음과 같이 정의된다.

$$K = C_{top}/C_{bottom} \dots\dots\dots (1)$$

$$\alpha_{top} = C_{top}/C_{total} \dots\dots\dots (2)$$

$$Y_{top} = 100C_{top} V_{top}/C_{total} V_{total} \dots\dots\dots (3)$$

$$G = C_{top} V_{top}/C_{bottom} V_{bottom} \dots\dots\dots (4)$$

여기서 α_{top} 과 Y_{top} 는 각각 윗상에서 알코올의 농축인수와 분배수율이고 C_{top} , C_{bottom} , C_{total} 은 각각 윗상, 아랫상, 전체상에서의 알코올농도이며 V_{top} , V_{bottom} , V_{total} 은 각각 윗상, 아랫상, 전체상의 부피이다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 초기 당농도 40, 80, 120, 160 및 200g/L인 경우에 대한 추출발효 실험을 수행하여 수성이상계를 구성하는 수용성 고분자의 조성과 발효 특성치, 알코올 분배 특성치 사이의 함수관계를 규명하였다. Fig. 1은 초기 당농도 80g/L에 대한 PEG/Dx 수성이상계의 추출발효 특성치를 나타내고 있다. 이 그림에서 점선은 대수기에서 동일한 균체비성장속도를 나타내는 PEG와 Dx의 함수관계를 의미하며, 가는 실선은 식(4)에 의하여 정의되는 분배비(G)를 나타내고 굵은 실선은 PEG/Dx의 수성이상계에 대한 평형조성을 의미한다.

PEG/Dx 조성비가 발효특성치에 미치는 영향

본 연구의 결과에 의하면 초기 당농도에 관계없이 수성이상계를 형성하는 PEG와 Dx의 조성이 낮아

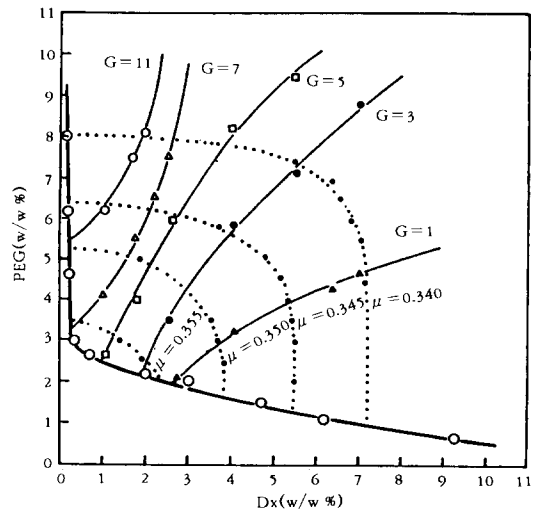


Fig. 1. Specific growth rate(μ) and alcohol partition ratio(G) as a function of PEG and Dx composition in aqueous-two-phase system. Initial sugar concentration is 80g/L.

질수록 균체 비성장속도는 증가하였다. PEG농도를 고정시키고 Dx농도를 증가시키면 비성장속도는 감소하였다. 동일한 Dx농도의 증가에 대한 균체 비성장속도의 감소량은 고정된 PEG농도가 높은 경우보다 낮은 경우에 보다 큰 값을 나타내었다. Dx농도를 고정하였을 때는 PEG농도가 증가하면 균체 비성장속도는 감소하였다. 또한 고정된 Dx농도가 높은 경우보다 낮은 경우에 PEG 증가량에 대한 균체 비성장속도의 감소량이 더 큰 변화를 나타내었다.

Fig. 2는 PEG농도 3.5%(w/v)와 Dx농도 2.5%(w/v)인 수성이상계의 추출발효 및 돼지감자 착즙액만으로 수행된 발효에서의 초기 당농도와 대수기에서의 비성장속도 사이의 함수관계이다. 초기 당농도 80g/L 이하인 경우에는 두 종류의 발효에 대한 비성장속도 값이 차이를 나타내지 않았으나 초기 당농도가 80g/L보다 큰 경우에는 추출발효에 대한 비성장속도가 순수돼지감자 착즙에 의한 발효의 비성장속도보다 높은 값을 나타내었다. 또한 두 종류 발효의 경우 모두 초기 당농도 80g/L까지는 당농도 증가에 따라 비성장속도 값이 상승하였으나 그 이상에서는 감소하여 기질의 저해영향을 나타내었다.

Fig. 3은 PEG농도 3.5%(w/v)와 Dx농도 2.5%(w/v)로 구성되어 있는 수성이상계 추출발효 및 순수 돼지감자 착즙의 발효에 대하여 초기 당농도 값에 따른 알코올의 비생성속도 변화를 나타내고 있다. 두 경우 모두 초기 당농도 100g/L까지는 당농도 증가에 따라 알코올의 비생성속도 값이 증가하였으나 100g/L 이상에서는 당농도 증가에 따라 비생성속도 값이 감소하였다. 또한 초기 당농도 80g/L까지는 두 종류의 발효에서 나타나는 알코올 비생성속도 값이 차이를 나타내지 않았으나 80g/L 이상에서는 추출발효에 의한 알코올 비생성속도 값이 순수 돼지감자 착즙의 발효에 의한 값보다 큰 값을 보였으며 이들 두 값의 차는 초기 당농도 증가에 따라 증가하는 경향을 나타내었다.

PEG/Dx 조성비가 알코올의 분배 특성치에 미치는 영향

본 연구의 결과에 의하면 아랫상에 용해되어 있는 알코올의 무게에 대한 윗상의 알코올 무게비로 정의되는 식(4)의 G값은 초기 당농도에 관계없이 Dx농도값이 감소하고 PEG농도값이 증가할수록 증대됨을 알 수 있다. 동일한 G값을 나타내는 Dx농도와 PEG농도 사이의 함수관계에 대한 미분값을 살펴보면 G값 5를 중심으로 5보다 큰 경우에는 Dx농도가

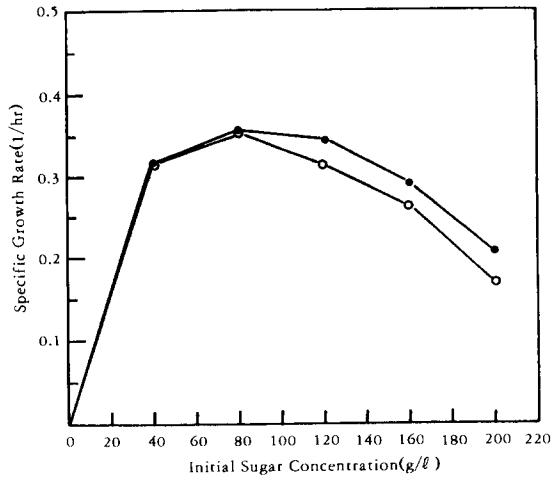


Fig. 2. Specific growth rate vs. initial sugar concentration. ●: An aqueous-two-phase system composed of PEG, 3.5% (w/v) and Dx, 2.5% (w/v), ○: the single phase system.

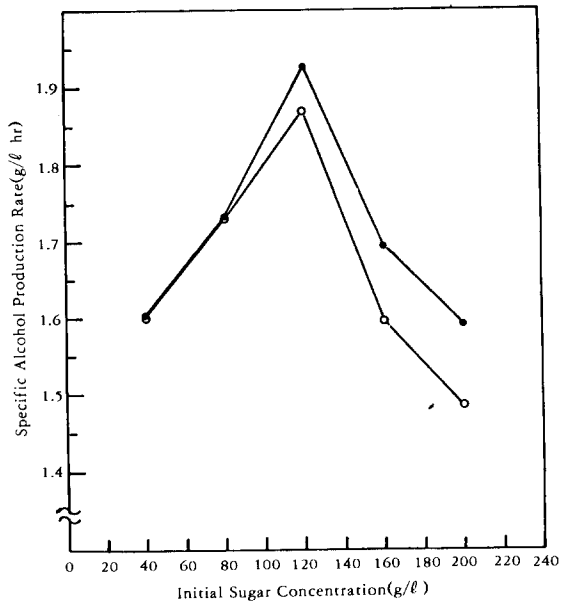


Fig. 3. Specific alcohol production rate vs. initial sugar concentration. ●: Aqueous-two-phase system composed of PEG 3.5% (w/v) and Dx, 2.5% (w/v), ○: the single phase system.

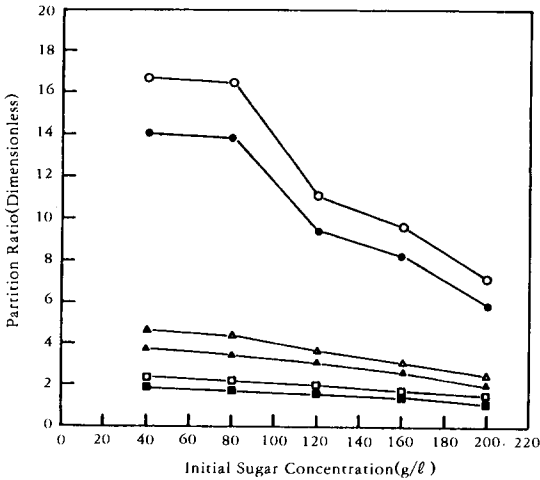


Fig. 4. Partition ratio vs. initial sugar concentration. Open symbols are alcohol partition ratios and closed symbols are volume partition ratios. \circ \bullet : PEG, 8%(w/v) and Dx, 4%(w/v) system. \square \blacksquare : PEG, 8%(w/v) and Dx, 7%(w/v) system.

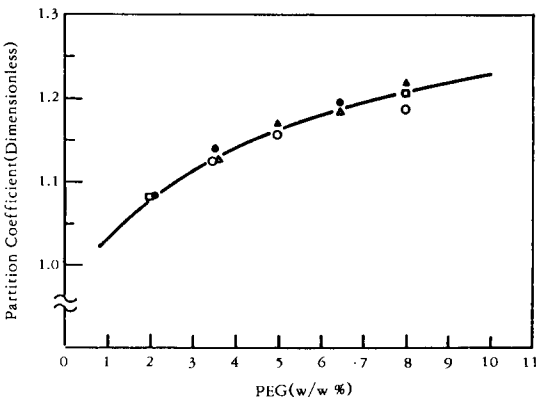


Fig. 5. Partition coefficient vs. % (w/w) of polyethylen glycol at initial sugar concentration, 40g/L. \circ : 1%(w/w) of Dx, \triangle : 2.5%(w/w) of Dx, \square : 4%(w/w) of Dx, \bullet : 5.5%(w/w) of Dx, \blacktriangle : 7%(w/w) of Dx.

증가하면 PEG농도에 대한 Dx농도의 미분값 역시 증가하나 G값이 5보다 작은 경우에는 Dx농도 증가에 따라 미분값은 감소하는 경향을 나타내었다.

초기 당농도 변화에 따른 아랫상에 대한 윗상의 부피비와 알코올 분배비가 Fig. 4에 표시되어 있다.

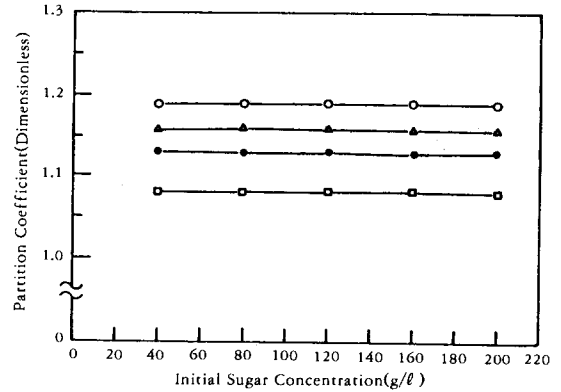


Fig. 6. Partition coefficient vs. initial sugar concentration at various compositions of PEG and Dx. \circ : Dx, 1%(w/w) and PEG, 8%(w/w), \triangle : Dx, 1%(w/w) and PEG, 5%(w/w), \bullet : Dx, 2.5%(w/w) and PEG, 3.5%(w/w), \square : Dx, 7%(w/w) and PEG, 2%(w/w).

Dx농도가 낮은 1%(w/v)이고 PEG농도가 높은 8%(w/v)인 경우 부피비와 알코올 분배비는 초기 당농도 증가에 따라 급격히 감소하였다. 반면 Dx농도가 높은 경우에는 초기 당농도 증가에 따라서 부피비 및 알코올 분배비의 값이 대단히 완만하게 감소하였다.

초기 당농도를 40g/L로 고정하고 Dx농도를 매개변수로 하였을 경우에 PEG농도와 식(1)로 정의되는 분배계수 사이의 함수관계가 Fig. 5에 표시되어 있다. Dx농도를 고정시켰을 때 PEG농도가 증가하면 분배계수 역시 증가하였으나 일정한 PEG농도에서 Dx농도를 증가시키는 경우에는 분배계수의 값이 거의 증가하지 않았다. 이런 경향은 초기 당농도가 다른 경우에도 동일하였다.

Fig. 6은 수성이상계를 구성하는 수용성 고분자의 조성을 매개변수로 하였을 경우에 대한 초기 당농도와 알코올 분배계수 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 고분자 조성이 고정된 네 종류의 수성이상계 추출효 모든 경우에서 고분자 조성에 따른 분배계수의 변화를 발견할 수 있었으나 초기 당농도 변화에 따른 분배계수의 변화경향을 찾을 수 없었다.

추출발효에 적절한 PEG/Dx 조성

수성이상계의 에멀전 상태, 침강분리 상태, 알코올 분배비 및 균체 비성장속도 등을 고려하여 수성이상계 추출발효를 위한 PEG/Dx 조성을 선정하는 것이

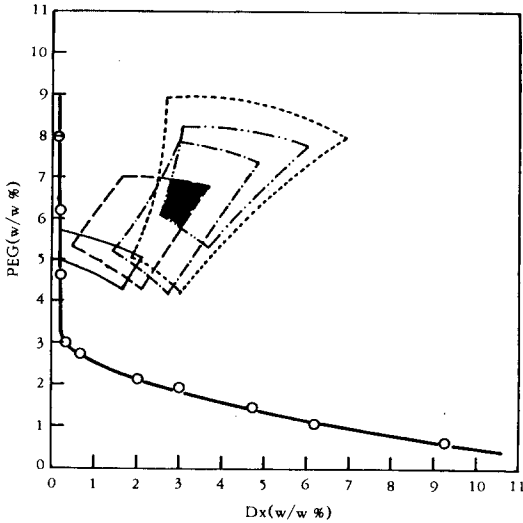


Fig. 7. Optimum range of composition of PEG and Dx in aqueous-two-phase systems at various initial sugar concentrations.

— : $S_0 = 200\text{g/L}$, --- : $S_0 = 160\text{g/L}$,
 -·-· : $S_0 = 120\text{g/L}$, ···· : $S_0 = 80\text{g/L}$,
 ···· : $S_0 = 40\text{g/L}$.

바람직하다. 본 연구 결과에 의하면 수성이상계에 의한 돼지감자 착즙의 추출발효에서는 알코올 분배비가 3 내지 7 사이의 경우에 수성이상계의 에멀전 및 침강분리 특성이 우수한 것으로 나타났다. 따라서 추출발효에 적절한 PEG/Dx 조성의 범위를 선정하기 위하여 각 초기 당농도에서 최대 비성장속도를 나타내는 값의 95% 내지 98% 범위내의 값이 되도록 하는 PEG/Dx 조성의 범위와 알코올 분배비가 3 내지 7 사이가 되도록 하는 PEG/Dx 조성의 범위를 Fig. 7에 도시하여 보았다. 이 결과에 의하면 초기 당농도에 따라서 선정하여야 할 PEG/Dx 조성의 범위가 상이하나 초기 당농도 40g/L 내지 160g/L 인 경우에는 Fig. 7에서 검게 표시된 부분인 Dx농도 3%(w/v)부근 및 PEG농도 6.5%(w/v)부근의 값이 되도록 PEG/Dx 조성을 선정하는 것이 적절한 것으로 판단된다.

결 론

폴리에틸렌글리콜(PEG)과 덱스트란(Dx)으로 구성된 수성이상계를 이용한 돼지감자 착즙의 추출발효실험을 통하여 PEG/Dx의 조성비가 발효특성치

및 알코올의 분배특성치에 미치는 영향에 대한 다음 결과를 얻었다. 균체의 비성장속도 PEG와 Dx 조성이 낮아질수록 증가하였다. PEG와 Dx의 조성을 고정시켰을 때 균체의 비성장속도는 초기 당농도 80g/L까지는 상승하였으나 그 이상에서는 감소하여 기질의 저해영향을 나타내었다. 알코올의 비성장속도는 초기 당농도 100g/L까지는 증가하였으나 그 이상에서는 감소경향을 나타내었다. 알코올의 분배계수는 PEG 농도증가에 따라 증가하였으나 Dx농도에는 별 영향을 받지 않았으며 초기 당농도의 영향도 찾아보기 힘들었다.

수성이상계의 에멀전 상태, 침강분리 상태, 알코올 분배비 및 균체 비성장속도 등을 고려할 때 수성이상계 추출발효를 위한 PEG/Dx 조성은 Dx농도 3%(w/v) 부근, PEG농도 6.5%(w/v)부근의 값이 적절하다는 결론에 이를 수 있었다.

감 사

이 논문은 1989년도 문교부 지원 한국학술진흥재단 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었습니다. 이에 대하여 감사드립니다.

참고문헌

1. J. A. Philips and A. E. Humphrey(1983), "Process Biotechnology for the Conversion of Biomass into Liquid Fuels" in *Liquid Fuel Developments, CRC Series in Bioenergy Systems*, D. L. Wise, Ed. (CRC Press, Boca Raton, FL), pp. 65-95.
2. M. Minier and G. Goma(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1565.
3. S. Ishii, M. Taya, and T. Kobayashi(1985), *J. Chem. Eng. Jpn.*, **18**, 125.
4. A. Ramalingham and R. K. Finn(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 538.
5. G. R. Cysewski and C. R. Wilke(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125.
6. H. Y. Wang, F. M. Robinson, and S. S. Lee (1981), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **11**, 555.
7. M. C. Dale, M. R. Okos, and P. C. Wankat (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 932.
8. K. H. Kyung and P. Gerhardt(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 252.

9. B. J. Abbott and P. Gerhardt(1970), *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 577.
10. A. Garcia, III, E. L. Iannotti, and J. L. Fischer(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 785.
11. G. T. Frank and K. K. Sirkar(1985), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **15**, 621.
12. W. J. Groot, C. E. Van Den Oever, and N. W. F. Kossen(1984), *Biotechnol. Lett.*, **6**, 709.
13. M. A. Larrayoz and L. Puigjaner(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 692.
14. B. L. Maiorella et. al.(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 887.
15. P. A. Albertsson(1971), *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, John Wiley & Sons., New York.
16. H. Walter, D. E. Brooks and D. Fisher(1985), *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems*, Academic Press, New York.
17. B. Mattiasson, M. Suominen, E. Andersson, E. Häggström, P. A. Albertsson, and B. Hahn Hägerdal(1982), in *Enzyme Engineering*, **6**, pp. 153-155, (I. Chibata, S. Fukui, and L. B. Wingard Jr., eds), Plenum Press.
18. B. Mattiasson(1983), *Trends Biotechnol.*, **1**, 16.
19. J. P. Guiraud, J. Bourgl, N. Chabbert and P. Galzy(1986), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**, 371.
20. 박성현(1982), 현대실험계획법, 대영사.
21. 김진한, 허병기, 목영일(1991), 한국생물공학회지, **6**, 175.