

돼지감자 분말을 이용한 고정화 *Kluyveromyces marxianus* F043의 에탄올 발효특성

이희숙 · 최언호*

서울여자대학교 식품과학과

초록 : 돼지감자 분말을 원료로 alginate에 고정화된 *Kluyveromyces marxianus* F043의 에탄올 생산성을 향상시키기 위한 연구를 수행하였다. 15% 돼지감자 배지에서 발효시킨 고정화 효모에 의한 에탄올 농도와 이론치에 대한 에탄올 수율은 4일 후에 각각 3.38%(w/v), 54.20%로 이것은 고정화하지 않은 효모의 3.76%(w/v), 71.13% 보다 낮았다. Cellulase의 첨가는 15~20% 돼지감자 배지의 점조성을 크게 낮추어 고정화 효모의 에탄올 생산성을 증가시켰다. 그리하여 20% 배지에서도 효소를 처리하여 고정화 효모를 4일 발효 시키면 에탄올 농도를 5.57%(w/v), 이론치에 대한 에탄올 수율을 68.86% 까지 얻을 수 있었다. Repeated batch culture를 실시한 결과 bead의 활성이 22일 동안 저하되지 않고 유지되었다(1995년 1월 3일 접수, 1995년 2월 22일 수리).

서 론

Biomass의 발효로부터 생산되는 에탄올은 그 물리적, 연소적 특성이 석유와 비슷하여 석유의 대체에너지로 가장 각광을 받고 있다.^{1,2)} 대체 에너지용 에탄올의 생산원료로 유망되는 돼지감자(Jerusalem artichoke : *Helianthus tuberosus* L.)는 그 주성분이 fructose의 중합체인 inulin으로 구성되어 있다.^{3,4)} 본 연구실에서 분리⁵⁾한 *Kluyveromyces marxianus* F043은 inulin의 당화공정을 거치지 않고 직접 Inulin으로 부터 에탄올을 생산한다.

최근에 에탄올의 생산성을 향상시키기 위하여 고정화균체를 이용한 에탄올 발효에 많은 관심을 가지고 있다. 균체를 고정화시키는 방법으로는 가교법, 포괄법⁶⁾, 흡착법⁷⁾ 등이 있는데 에탄올 연속발효 공정에서는 주로 포괄법이 연구되고 있다.⁸⁾

돼지감자분말 배지는 액체상태보다는 고체상태가 많이 존재하는 고분자 물질로 구성되어 있으므로 고정화 세포를 이용한 에탄올 발효를 행할 때는 사용하기 곤란한 점이 있다. 고체가 존재하는 기질인 경우에는 mass transfer에 제한이 생겨 결국에는 높은 수율의 에탄올 생산도 기대하기 어렵게 된다. 따라서 이를 해결할 수 있는 방법이 연구되어야 한다. 세포를 고정화시켜 연속 배양을 하기 위해서는 먼저 고정화조건 및 발효조건을 회분배양에서 결정하고 고정화된 효모의 재사용의 안정성을 검토하기 위해 일반적으로 repeated batch culture를 실시한다.^{9,10)}

본 연구에서는 전보¹¹⁾에서 sucrose 를 기질로 사용하여 결정한 고정화조건들을 토대로 돼지감자 분말을 기질로 하여 *K. marxianus* F043의 에탄올 생산성을 증대시키기 위한 최적 조건을 회분배양으로 검토하였다. 이때 cellu-

lase를 사용하여 돼지감자 분말을 액화시키면 고정화 효모의 mass transfer가 향상되고 발효율이 향상될 것이라 기대되어 이것에 대한 것도 검토하였다. 그리고 bead의 안정성을 검토하기 위해 repeated batch culture를 실시하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구실에서 분리⁵⁾된 *K. marxianus* F043을 사면배지에 접종하여 30°C 에서 24시간 배양후 4°C 에서 보관하였으며 1주일 간격으로 계대하여 사용하였다.

효모의 고정화

YPD(1L 수용액 중 yeast extract 10g, peptone 20g, dextrose 20g) 액체배지에 균주 *K. marxianus* F043을 접종하여 24시간 배양하고 3,000 rpm에서 3분 동안 원심분리시킨 후 YPD 액체배지와 동량의 증류수에 균체를 섞어 전체 alginate 용액의 20% 되는 효모 현탁액을 만들었다. 이 현탁액과 sodium alginate(Junsei) 용액을 잘 혼합하여 균일하게 만든 후 peristaltic pump(Eyela MP-3, Japan)를 사용하여 2% CaCl₂ 용액에 방울 상태로 떨어뜨리면서 alginate bead를 제조하였다. 견고성을 부여하기 위해 효모가 고정화된 alginate bead를 2% CaCl₂ 용액에 24시간 담그어 놓은 뒤 발효 배지로 옮겼다.

발효 기질

강원도 금화에서 가을에 수확한 야생 돼지감자를 수세하여 약 1mm 정도로 얇게 절간한 후 24시간 풍건하고 50°C 에서 열풍건조하여 분말화한 후 이를 냉동고(-

찾는말 : 에탄올 발효, 고정화, *Kluyveromyces marxianus*, 돼지감자
*연락처자

20℃)에 보관하면서 이의 15~20% 현탁액을 121℃에서 15분간 가압멸균하여 발효기질로 사용하였다.

에탄올 발효조건

1) 배양기간

돼지감자 배지에서 고정화된 효모의 배양기간에 따른 에탄올 생성을 알아보기 위해 처음 1일은 100 rpm에서 진탕배양하고 그 다음 2, 3, 4일은 50 rpm으로 진탕배양하여 24시간마다 에탄올 함량을 측정하였다.¹¹⁾ 이 때 사용한 배지의 농도는 15%이었고 배양온도는 30℃로 유지하였다.

2) 진탕조건

진탕조건을 달리하여 에탄올 생성에 관한 영향을 검토하기 위하여 4일 배양기간 중 처음 1일은 100 rpm에서 진탕배양하고 그 다음 3일은 정치배양, 처음 2일은 100 rpm에서 진탕배양하고 그 다음 2일은 정치배양, 처음 1일은 100 rpm에서, 그 다음 3일은 50 rpm에서 진탕배양, 처음 2일은 100 rpm에서, 그 다음 2일은 50 rpm에서 진탕배양하여 에탄올 함량을 측정하였다. 이 때 배지의 농도는 15%이었고 배양온도는 30℃로 유지하였다.

3) Cellulase 처리

돼지감자 건조분말을 기질로 하여 고정화 효모의 mass transfer를 향상시켜 에탄올 발효력을 높이기 위해 cellulase(상품명: celluclast, NOVO)를 돼지감자 15, 20% 배지에 2% 첨가하였다. 이 때 사용한 cellulase의 최적 온도는 40℃, 최적 pH는 4.8, 1%를 사용하였을 때 activity는 1,500 NCU이다. *K. marxianus* F043를 고정화시키기 위한 조건은 sucrose 배지의 최적 고정화 결과¹¹⁾에서 나온대로 사용하였으며 15% 배지는 사용 효소의 최적온도인 40℃에서 1시간 30분 반응시킨 뒤 고정화 효모를 접종하였고, 20% 배지에서는 2시간 반응시킨 뒤 고정화 효모를 접종하여 30℃에서 4일간 배양하였다. 처음 1일은 100 rpm에서 진탕배양하고 그 다음 2, 3, 4일은 50 rpm에서 진탕배양하여 24시간마다 발효액의 pH, 적정산도, 총당, 점도, 에탄올 함량을 조사하였다.

4) 고정화효모의 안정성 시험

고정화된 효모의 재사용의 안정성을 검토하기 위해 2% cellulase로 액화된 20% 돼지감자 배지에 고정화된 효모를 접종하여 30℃에서 진탕배양(100 rpm)하였다. 이 때 고정화 조건은 sucrose 배지의 최적 고정화 결과¹¹⁾에서 나온대로 사용하였다. 회분배양의 한 주기를 2일간격으로 하여 11회(22일)실시하였고 매 주기마다 발효액의 총당과 에탄올 함량을 조사하였다.

성분 분석

pH는 발효액 10 ml/을 취하여 pH meter(Toa Electronics Ltd., Japan)로 측정하였고 적정산도는 발효액 10 ml/에 증류수 40 ml/를 넣고 0.1 N NaOH 용액을 pH 8.3이 될 때까지 적하하여 시료 100 ml/당 소비된 0.1 N NaOH 용액의 ml/수를 적정산도로 표시하였다. 잔당은 발효액 20 ml/에 증류수 180 ml/과 25% HCl 15 ml/를 가하여 2시간

가열하고 7 N NaOH로 중화시킨 후 환원당을 Somogyi 방법으로 정량하여 glucose로 환산하였다. 에탄올은 발효액 100 ml/와 증류수를 500 ml/ 삼각 플라스크에 넣고 단순 증류시킨 증류액 100 ml/을 받아 Gay-Lussac meter에 의하여 정량하였다. 점조도는 Bostwick consistometer를 모방하여 아크릴로 주문제작한 점조계에 발효액 50 ml/을 넣고 최장 이동거리(cm)로 점조도를 비교하였다. 점조계의 시료 최대용량은 81 ml/(4.5×4.0×4.5 cm)이고 경사는 10°, 최대 이동거리는 41 cm이었다.

결과 및 고찰

배양기간에 따른 에탄올 생성

2% sodium alginate에 고정화시킨 효모를 15% 돼지감자 배지에서 배양하였을 때 배양기간에 따른 에탄올 생성의 변화를 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 배양기간이 경과함에 따라 에탄올 농도는 계속 증가하였으나 전보¹¹⁾의 sucrose 배지와는 달리 배양기일 4일 후에도 이론치에 대한 에탄올 수율은 64%에 불과하였으며, productivity도 0.36 g/L·h로 매우 낮았다. 돼지감자 배지는 함유액 상태의 sucrose 배지와는 달리 현탁용액이어서 solid가 많아 고정화된 효모에 mass transfer에 제한이 발생되기 때문으로 추측된다. 본 실험에서 사용한 돼지감자의 수분은 7.03%이었고 총 당질은 건물 중 70.77%이었다.

진탕조건에 따른 에탄올 생성

Solid가 많은 돼지감자 배지에서 mass transfer의 향상이 고정화 효모의 에탄올 발효력을 향상시킬 수 있다고 판단되어 진탕조건을 달리하여 에탄올 생성에 관한 영향을 검토한 결과는 Table 1과 같다. Han 등⁹⁾이 보

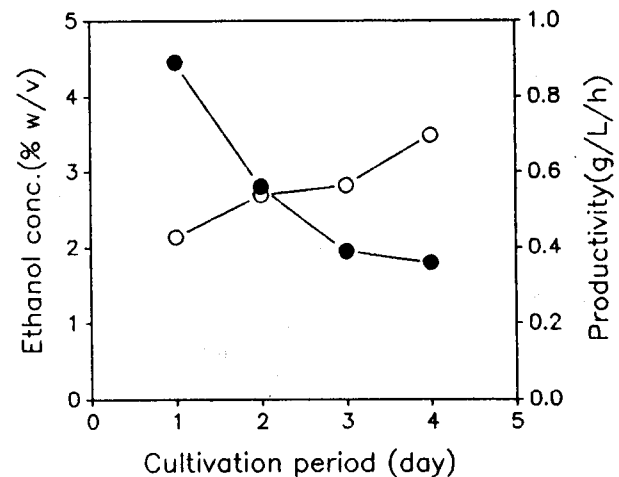


Fig. 1. Effect of cultivation period on the ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* F043.

The strain was incubated in 15% Jerusalem artichoke medium at 30℃ for a day with high speed shaking(100 rpm) and then for 3 days with low speed shaking (50 rpm).

○—○, ethanol concentration; ●—●, productivity.

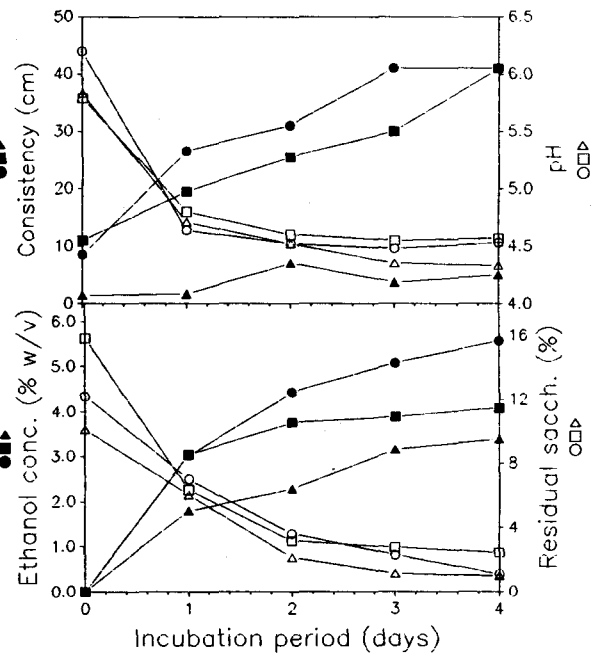
Table 1. Effect of shaking condition on the ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* F043. The strain was incubated in 15% Jerusalem artichoke medium at 30°C for 4 days

Shaking condition	Ethanol concentration (% w/v)	Ethanol yield to theoretical value(%)	Productivity (g/L/h)
Shaking (100 rpm)	1 day		
Without shaking	3 days	3.49	64.34
Shaking (100 rpm)	2 days		
Without shaking	2 days	3.41	62.87
Shaking (100 rpm)	1 day		
Shaking (50 rpm)	3 days	3.28	60.47
Shaking (100 rpm)	2 days		
Shaking (50 rpm)	2 days	3.37	62.13

Table 2. Effect of addition of 2% cellulase on the fermentation properties and ethanol production by immobilized or free cells of *Kluyveromyces marxianus* F043. The strain was incubated at 30°C for a day with high speed shaking (100 rpm) and then for 3 days with low speed shaking (50 rpm)

Incubation period (day)		Concentration of medium (%)				
		15		20		
		Free	Immobilized	A	B	B
Consistency (cm)	0	1.5	12.7	1.5	11.0	8.5
	1	2.5	41.0	1.7	19.5	26.5
	2	1.5	41.0	7.0	25.5	31.0
	3	5.0	41.0	3.7	30.0	41.0
	4	3.5	41.0	5.0	41.0	41.0
pH	0	5.95	5.56	6.20	5.83	5.79
	1	4.87	4.73	4.64	4.71	4.80
	2	4.90	4.61	4.52	4.52	4.60
	3	4.83	4.65	4.48	4.35	4.55
	4	4.77	4.71	4.53	4.33	4.57
Titrable acidity (m/ 1N NaOH/100 ml)	0	1.95	2.14	2.14	1.86	2.98
	1	4.84	4.37	4.32	4.65	6.19
	2	4.93	6.42	5.12	6.07	6.42
	3	5.81	6.60	4.93	6.44	7.16
	4	5.77	7.91	4.28	6.51	7.86
Residual saccharide (%)	0	10.33	9.96	12.22	10.14	15.82
	1	3.49	3.87	7.03	6.05	6.38
	2	2.89	2.76	3.62	2.12	3.16
	3	1.14	1.50	2.29	1.13	2.76
	4	1.27	1.10	1.09	0.98	2.42
Ethanol (% w/v)	1	3.91	4.11	1.80	3.04	3.02
	2	3.97	4.13	2.28	3.76	4.43
	3	4.07	4.21	3.15	3.89	5.08
	4	3.76	4.50	3.38	4.08	5.57
	Ethanol yield	1	0.38	0.41	0.15	0.30
2		0.38	0.42	0.19	0.37	0.28
3		0.39	0.42	0.26	0.38	0.32
4		0.36	0.45	0.28	0.40	0.35
Ethanol yield to theoretical value(%)		1	74.14	80.81	28.88	58.65
	2	75.19	81.12	36.49	72.59	54.81
	3	77.14	82.68	50.51	75.04	62.87
	4	71.13	88.46	54.20	78.71	68.86
	Ethanol productivity (g/l/h)	1	1.63	1.71	0.75	1.27
2		0.83	0.86	0.48	0.78	0.92
3		0.57	0.59	0.44	0.54	0.71
4		0.39	0.47	0.35	0.43	0.58

*Without cellulase ** Treated with 2% cellulase

Fig. 2. Effect of cellulase on the properties of fermentation by immobilized *Kluyveromyces marxianus* F043.

The strains were incubated in 15 and 20% Jerusalem artichoke media at 30°C for a day with shaking(100 rpm) and then for 3 days with shaking(50 rpm). ▲-△, without cellulase in 15% medium; ■-□, 2% cellulase in 15% medium; ●-○, 2% cellulase in 20% medium.

고한 바에 따르면 고정화 효모가 진탕에 의해 에탄올 발효력이 향상되었다고 보고하였는데 Table 1에 나타나 있는 본 연구의 결과는 진탕의 영향을 크게 받지 않은 것으로 나타났다. 이것은 본 실험에서 사용한 rpm이 고체가 많은 배지중에서 mass transfer를 향상시키기에 충분한 속도가 되지 못했기 때문으로 사료된다.

효소처리에 따른 에탄올 생성

돼지감자 배지를 홍 등⁵⁾의 보고를 토대로 하여 cellulase로 40°C에서 미리 액화시킨 뒤, 고정화 효모의 에탄올 발효력과 성분변화를 배양기간 별로 살펴본 결과는 Table 2, Fig. 2와 같다. 이 때 액화된 15% 돼지감자 배지에서 고정화된 효모의 에탄올 발효력이 고정화하지

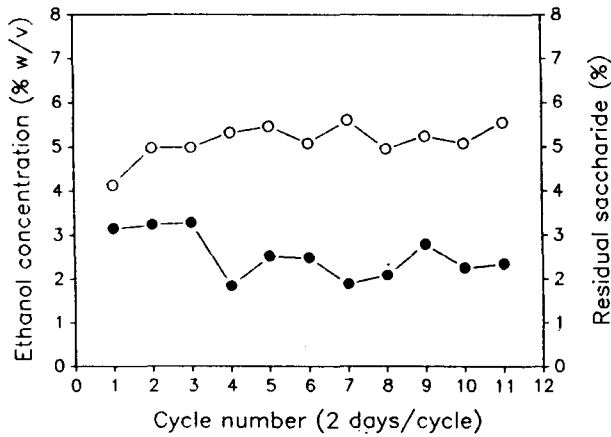


Fig. 3. Batch stability during repeated batch cultures in 20% Jerusalem artichoke. Immobilized cells were incubated at 30°C for 22 days (2 days/cycle) with shaking(100 rpm). ○-○, ethanol concentration; ●-●, residual saccharide.

않은 것에 비해 어느 정도 되는지 살펴보기 위해 고정화하지 않은 것도 함께 검토하였다. 배양기간 중에 점조도(유동성)의 변화로 보아 cellulase 처리한 것이 액화도 월등히 빠르고 그에 따라 에탄올 농도도 증가함을 볼 수 있다. 특히 고정화한 것의 경우 15% 돼지감자 배지에서 배양 4일 후에 cellulase 처리 하지 않은 것은 33.8 g/L 이었는데 반해 cellulase 처리한 것은 40.8 g/L로 고정화하지 않은 것에 cellulase 처리한 것과 유사한 에탄올 농도를 보여 주었다. 이와 같은 결과로 돼지감자와 같이 고체가 많은 배지의 경우라도 액화 효소의 처리로 고정화 효모의 mass transfer를 향상시켜 고정화 효모에 의한 에탄올 발효에 이용할 수 있음을 보여주었다. 고농도의 에탄올을 생산하기 위해서 기질을 20%로 높여 cellulase 처리한 결과 배양 4일 후에 에탄올 농도가 55.7 g/L로 증가되었다.

고정화 효모의 안정화

고정화된 효모의 재사용의 안정성을 검토하기 위해 2% cellulase로 액화된 20% 돼지감자 배지에 고정화된 효모를 접종하여 30°C 에서 배양한 결과는 Fig. 3과 같다. 한 주기를 2일(48시간) 간격으로 일정하게 하여 11회의 주기(528시간)동안 repeated batch culture를 실시한 결과, bead는 11주기 동안 안정하게 유지되었으며 에탄올 생산성도 일정하게 유지됨을 알 수 있었다. Han 등⁹⁾이 고정화된 효모의 안정성은 720시간 동안 유지됨을 보

고한 것과 유사한 결과이다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 연구비 지원(KOSEF 921-15 00-007-2)에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Hur, B. K., H. S. Kim, and Y. I. Mok (1989) Functional relationship between the fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* and fermentation time. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **4**, 191.
- Ryu, Y. W., C. H. Kim, and S. I. Kim (1983) Selection of yeast strains for alcohol production from Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **26**, 119-124.
- Ryu, Y. W., C. H. Kim, and S. I. Kim (1984) Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.) by *Kluyveromyces fragilis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12**, 51-55.
- Margaritis, A. and P. Bajpai (1983) Effect of sugar concentration in Jerusalem artichoke extracts on *Kluyveromyces marxianus* growth and ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 723-725.
- 홍 연, 최언호 (1994) 돼지감자를 이용한 고농도 에탄올 발효 균주의 탐색. *한국산업미생물학회지* **22**, 707-712.
- Klein, J. and B. Kressdorf (1983) Improvement of productivity and efficiency in ethanol production with Ca-alginate immobilized *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **5**, 497-502.
- Kuu, W. Y. and J. A. Polack (1983) Improving immobilized biocatalysts by gel phase polymerization. *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 1995-2006.
- Nunez, M. J. and J. M. Lema (1987) Cell immobilization-Application to alcohol production. *Enz. Microb. Technol.* **9**, 642- 651.
- Han, M.S., S.D. Ha, and D.H. Chung (1991) Studies on the immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **19**, 390-397.
- Ryu, B.H. and K.D. Nam (1987) Continuous alcohol fermentation using immobilized growing yeast cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**, 248-252.
- 이희숙, 신지현, 최언호 (1995) *Kluyveromyces marxianus* F 043의 alginate 고정화와 에탄올 발효특성. *한국농화학회지*, **38**, 20-25.

Ethanol Production by Immobilized *Kluyveromyces marxianus* F043 Using Jerusalem Artichoke Powder

Hee-Suk Lee and Eon-Ho Choi*(*Department of Food Science, Seoul Woman's University Seoul 139-744, Korea*)

Abstract : To produce ethanol from Jerusalem artichoke powder efficiently, *Kluyveromyces marxianus* F043 cells were encapsulated in 2% sodium alginate and were cultured in batch reactor to investigate the fermentation properties. Batch culture of immobilized cells left for 4 days in 15% Jerusalem artichoke medium showed ethanol concentration of 3.38%(w/v) and ethanol yield to theoretical value of 54.20%, lower than 3.76%(w/v) and 71.13% for the culture of free cells. Addition of cellulase to 15~20% Jerusalem artichoke media increased the production of ethanol, owing to remarkable reduction in consistency of the suspension. So it was possible to achieve an ethanol concentration of 5.57%(w/v) and an ethanol yield to theoretical value of 68.86% in even 20% Jerusalem artichoke medium by cultivation of immobilized cells for 4 days. The alginate beads showed constant ethanol productivity after recycling 11 times (22 days) in repeated batch fermentation.

*Corresponding author