

고정화 균체 반응기에서 첨가물 희석발효배지를 이용한 연속 알콜생산

임 성 한 · †신 철 수

연세대학교 공과대학 식품생물공학과 및 생물산업소재연구센터

Continuous Ethanol Production Using Diluted Fermentation Media with Supplements in an Immobilized Cell Reactor

Seong-Han Lim and Chul-Soo Shin[†]

Department of Food and Biotechnology, College of Engineering, and
Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

ABSTRACT

For continuous ethanol production in an immobilized cell reactor consisting of *Saccharomyces sake*, feedings of one tenth to three tenths times diluted fermentation media were effective for maintaining the high ethanol productivity and physical stability of immobilized beads. In case two tenths times diluted one of the fermentation medium supplemented with egg albumin hydrolysate(0.5%) and phosphatidylcholine(0.5%) was fed, a maximum ethanol productivity of 69 g/ℓ-hr was attained at a dilution rate of 1.1 hr⁻¹, and it was 50% higher than that of the two tenths times diluted one of the fermentation medium without any supplement, 46 g/ℓ-hr.

서 론

알콜 생산성을 증대시키는 방법으로 발효공정에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으며, 대표적인 예로 다단 CSTR형 발효조(1), 탑 발효조(2), 균체회수식 발효조(3, 4), 고정화 발효조(5-7), 진공 발효조(8, 9) 등을 이용하는 공정을 들 수 있다. 한편, 보통 효모의 경우 발효액의 알콜농도가 7~8%(v/v)에 이르면 증식이 멈추고 10~12%(v/v)에 도달하면 발효가 종식된다. 고농도의 알콜 발효액을 얻기 위한 연구로서 알콜내성 균주의 개발(10)과 균체 세포막을 변화시켜 알콜내성을 유도하는 방법(11-13)이 있다.

불포화지방산과 ergosterol이 첨가된 발효배지에

서 증식된 효모는 알콜내성이 증대되고 발효 종료 후 얻을 수 있는 알콜농도가 높아지는 것으로 보고되었다(11, 12). 이들 물질은 효모에 의해 균체내로 흡수되어 효모의 세포막 성분으로 변환되어 세포막의 불포화 지방산과 ergosterol 함량이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 이렇게 변화된 균체는 알콜에 대해 높은 내성을 가지는 것으로 보고되었다(12). 이들 첨가물질과 비슷하게 불포화 인지질의 일종인 phosphatidylcholine과 아울러 egg albumin을 첨가하였을 때 알콜농도가 급격히 증가하였다는 보고가 있다(2). 이들 첨가물이 균체를 알콜저해로부터 보호하는 효과가 있을 것으로 추측하였으며 이에 대한 자세한 작용기작은 보고되지 않았다. 한편, albumin 대신 albumin hydrolysate를 phosphatidylcholine과 함께 첨가할 때 균체는 높은 알콜내성을 가지며,

† Corresponding Author

이는 균체외에 물리적인 보호막을 형성하기보다 영양원으로 이용되어 균체막의 단백질 조성이 변화되어 일어나는 것으로 보고되었으며 최종 알콜농도가 40% 이상 증가하였다(13, 14). 한편, egg albumin을 soybean meal으로 대체하여도 비슷한 결과가 얻어짐이 보고되었다(10).

한편, 고정화 균체를 이용한 연속생산공정에서 문제시 되는 점은 장기간 높은 균체활성과 아울러 beads의 물리적 안정성이다. 장기 조업중에 고정화 균체의 활성은 급격히 저하되기 쉬우며 beads가 swelling 되거나 용해되어 문제가 일어나고 있다(15).

본 연구진에 의하여 albumin hydrolysate와 phosphatidylcholine을 첨가한 발효배지를 이용하여 회분식배양에서 알콜생산이 월등히 증진되며 그 물질들의 작용기작을 대하여 이미 분석되었다(13, 14). 본 연구에서는 이들 결과를 고정화균체 연속생산공정에 응용하고자 고정화균체 packed-bed reactor에서 연속알콜생산을 수행할시 albumin hydrolysate와 phosphatidylcholine 및 soybean meal hydrolysate와 phosphatidylcholine의 첨가효과를 극대화하고, 아울러 고정화 균체가 높은 알콜 생산성과 안정성을 유지하는 조건을 분석하여 효율적인 연속 알콜생산공정을 구축하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 발효배지

본 실험에서 사용한 균주는 *Saccharomyces sake* Kyokai No. 7(2, 4)이며 *S. cerevisiae*의 일종이다.

발효배지 조성은 1ℓ 증류수당 100g glucose, 6.0g yeast extract, 2.0g KH_2PO_4 , 0.2g NH_4Cl , 0.03g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 이며, pH는 살균전 4.3으로 조절하였다. 첨가물 발효배지의 경우 위의 발효배지에 egg albumin hydrolysate (5g/ℓ)와 phosphatidylcholine(5g/ℓ), 혹은 soybean meal hydrolysate(10g/ℓ)와 phosphatidylcholine(5g/ℓ)을 첨가하여 사용하였다.

연속 알콜생산에 이용된 희석발효배지의 경우 발효배지 또는 첨가물발효배지의 성분들을 1/10배, 2/10배, 3/10배 되게 각각 희석하여 조제하였으며, 모든 경우 포도당 농도는 200g/ℓ로 조절하였다.

균체 고정화 및 연속 알콜 생산

발효배지 또는 첨가물 발효배지 100ml을 250ml

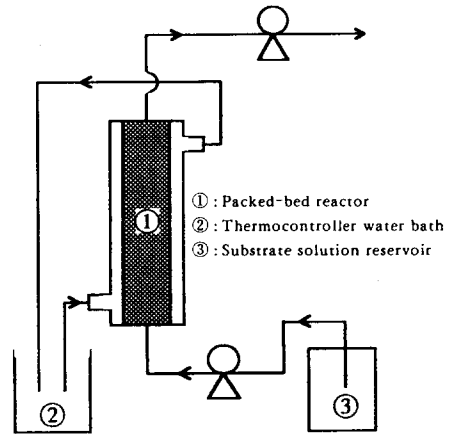


Fig. 1. A schematic diagram of packed bed reactor.

삼각플라스크에 넣어 살균한 후 보관중인 slant로부터 균체를 접종하여 30°C의 왕복식 진탕기에서 120rpm으로 1일간 배양하였다. 고정화 균체의 제조는 배양된 균체를 여과한 후 구연산 완충액(citric acid-sodium citrate buffer, 0.1M, pH4.3)으로 균체농도가 20g/ℓ 되게 조절한 후 동량의 3% sodium alginate와 혼합한 후 주사기를 통하여 0.05M CaCl_2 용액으로 적하시켜 대략 2~3mm 직경의 beads를 제조하였다.

알콜의 연속생산은 위와 같이 제조된 고정화 균체를 부피 50ml인 column(1.8×20cm)에 충전하여 packed-bed reactor를 준비하였다(Fig. 1). 여기에 기질로 발효배지 또는 첨가물발효배지를 각각 1/10배, 2/10배, 3/10배 되게 희석한 배지를 반응기 내로 연속적으로 공급하여 알콜생산을 수행하였다. 기질 공급속도는 0.7~1.5hr⁻¹의 희석율 범위에서 각각 조절하였다.

포도당 및 알콜 정량

포도당농도는 환원당 정량법인 DNS법(16)을 이용하여 측정하였으며, 알콜 정량은 gas chromatograph(Varian Aerograph, Series 1400)로 분석하였다. 이때 이용된 내부 표준물질로 isopropanol이 사용되었다.

시약

발효배지의 첨가물로 이용된 egg albumin hydrolysate (No. A-3154), phosphatidylcholine

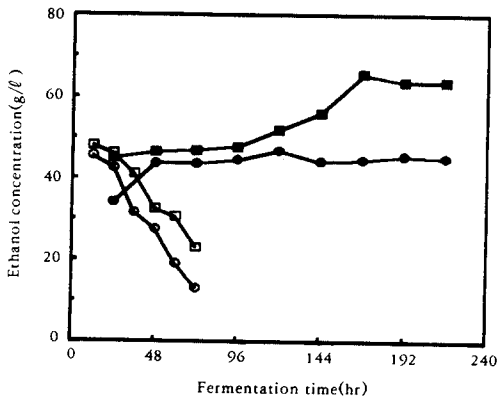


Fig. 2. Operational stabilities of packed bed reactors depending on the feeding of various media at a dilution rate of 1.1hr^{-1} .

- : yeast extract-free fermentation medium
- : yeast extract-free fermentation medium supplemented with 0.5% albumin hydrolysate and 0.5% phosphatidylcholine
- : three tenths times diluted fermentation medium
- : three tenths times diluted one of the fermentation medium supplemented with 0.5% albumin hydrolysate and 0.5% phosphatidylcholine

(Type II-S, No. P-5638), soybean meal hydrolysate (Type IV, No. P-0521) 등을 Sigma Chemicals사에서 구입하였다.

결과 및 고찰

고정화 균체 연속발효공정의 안정성

고정화 균체로 충전된 packed-bed reactor에서 연속적으로 알콜을 생산할 시에 중요한 점은 장기간의 높은 알콜 생산성과 안정성의 유지이다. 고정화 균체의 안정성을 위해서는 균체활성의 유지와 고정화 beads의 swelling 또는 용해가 일어나지 않는 것이 중요하다.

예비적인 실험결과, 고정화 균체의 안정성은 발효 배지의 성분에 의하여 영향이 매우 큰 것으로 나타났다. 발효배지를 그대로 사용하는 경우 연속발효공정에서 4~5일 이후에 beads가 용해되기 시작하고 swelling되는 현상이 나타났다(data not shown). 이는 발효배지 내의 potassium phosphate와 yeast

extract에 의한 것으로 사료되었으며 연속생산을 일주일 이상 진행하기 어려웠다. 한편, 발효배지 성분 중 yeast extract를 제외한 용액을 기질로 공급하여 연속 알콜생산을 시도하였을 때 Fig. 2에서 보는 바와 같이 반응액의 알콜농도는 연속공정 20~30 시간 이후에 지속적으로 감소하여 이들 배지성분만으로는 균체를 maintenance 할 수 없는 것으로 사료되었다. 그러나, 발효배지 성분의 농도를 3/10배 희석하여 사용할 경우에 10일까지 beads는 물리적으로 비교적 안정하였으며, Fig. 2에서 보는 바와 같이 1.1hr^{-1} 희석율에서 43g/l 의 높은 알콜농도가 지속적으로 유지되었다. 그리고 0.5% albumin hydrolysate와 0.5% phosphatidylcholine의 첨가발효배지의 3/10배 희석배지에서 62g/l 정도의 높은 알콜농도가 얻어졌다.

고정화 균체 beads의 물리적 안정성은 beads의 크기를 측정하여 분석하였다. 균체를 alginate로 고정화한 직후의 직경은 대략 2.6mm 정도였으며, 대략 10일간의 연속생산후 3/10배 희석배지에서 3.3mm, 첨가물 희석배지에서 2.9mm로 약간의 swelling 현상이 일어났으나 깨짐현상은 일어나지 않았다. 이러한 결과로부터 고정화 균체를 이용한 연속 알콜생산 공정에서는 발효배지를 희석하여 공급함으로써 높은 균체활성과 beads의 물리적 안정성을 얻을 수 있으며, 경제적인 측면에서도 바람직한 것으로 판단되었다.

무첨가물 발효배지를 이용한 연속알콜 생산

고정화 균체가 충전된 packed-bed reactor에 공급할 기질로서 포도당을 제외한 발효배지의 각 성분을 1/10배, 2/10배, 3/10배로 각각 희석하고, 이 경우 모두 초기 포도당 농도를 200g/l 로 조절하여 이용하였다. Fig. 3의 결과는 정상상태에서 얻어진 알콜농도와 알콜생산성을 나타낸 것이다. 세 가지 희석발효배지에서 동일하게 희석율이 0.7hr^{-1} 일 때 가장 높은 알콜농도(대략 40g/l)가 얻어졌으며, 희석율이 1.5hr^{-1} 로 증가됨에 따라 알콜농도는 점점 낮아졌으며, 세 가지 종류의 배지 중 2/10배 희석배지에서 가장 높은 알콜 농도가 유지되었다. 한편, 알콜생산성을 비교할 때 세 가지 배지 중 2/10배 희석배지의 기질공급 희석율 1.3hr^{-1} 에서 전체 최대치 생산성인 46g/l-hr 가 얻어졌다. 3/10배 희석배지에서는 1.1hr^{-1} 희석율에서 40g/l-hr , 1/10배 희석배지의 1.1hr^{-1} 희석율에서 33g/l-hr 가 얻어졌다. 이들 값은 Ca-alginate 혹은 carrageenan 고정

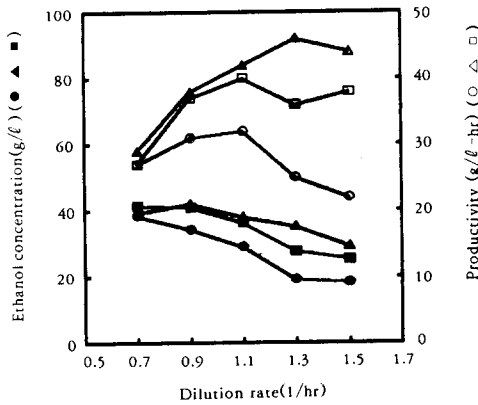


Fig. 3. Steady-state ethanol concentrations and productivities at various dilution rates without supplement.

- , ○: one tenth diluted fermentation medium
- ▲, △: two tenths diluted fermentation medium
- , □: three tenths diluted fermentation medium

화 균체 packed bed(17, 18), Ca-alginate 균체의 fluidized bed(19) 등의 20~40g/l-hr 알콜생산성과 비교할 때 비슷한 수준이라 할 수 있다.

첨가물 발효배지를 이용한 연속알콜 생산

발효배지의 첨가물로 albumin hydrolysate와 phosphatidylcholine을 첨가하면 균체의 알콜내성이 강해지고 발효종료 후 얻을 수 있는 최대 알콜농도가 30~40% 이상 증가된다는 보고(13)에 근거하여, 본 실험에서는 5g/l albumin hydrolysate 및 5g/l phosphatidylcholine을 첨가한 발효배지를 1/10배, 2/10배, 3/10배 희석하여 조절하였으며, 이들을 연속알콜생산에 기질로 이용하였다. 연속공정에서 기질공급의 희석율은 앞의 무첨가물배지의 경우와 동일하게 0.7~1.5hr⁻¹에서 조절하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 0.7hr⁻¹ 희석율의 경우 1/10배, 2/10배, 3/10배 희석배지에서 최고 알콜농도인 67, 72, 76g/l이 각각 얻어졌으며, 희석율이 증가함에 따라 알콜농도는 점차 낮아져 1.5hr⁻¹ 희석율에서 1/10배 희석배지의 경우 20g/l 수준으로 낮게 얻어졌다. 한편, 세 가지 희석배지에서 알콜 생산성을 비교할

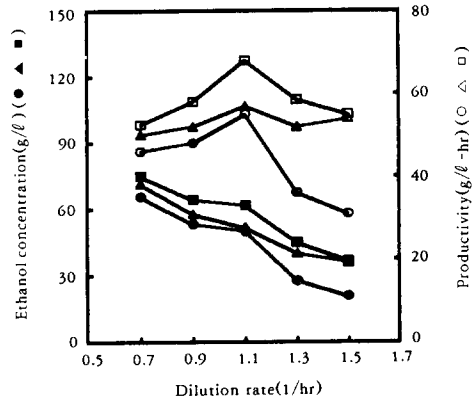


Fig. 4. Steady-state ethanol concentrations and productivities at various dilution rates with feeding of albumin hydrolysate and phosphatidylcholine.

- , ○: one tenth diluted one of the fermentation medium supplemented with 0.5% albumin hydrolysate and 0.5% phosphatidylcholine
- ▲, △: two tenths diluted one of the fermentation medium supplemented with 0.5% albumin hydrolysate and 0.5% phosphatidylcholine
- , □: three tenths diluted one of the fermentation medium supplemented with 0.5% albumin hydrolysate and 0.5% phosphatidylcholine

때 최대값은 3/10배 희석배지의 1.1hr⁻¹ 희석율에서 69g/l-hr가 얻어졌으며, 1/10배 및 2/10배 희석배지에서도 1.1hr⁻¹ 희석율에서 56, 58g/l-hr 각각 얻어졌다. 무첨가물 발효배지의 경우 2/10배 희석배지에서 최대 알콜생산성이 얻어지는데 비하여 이 경우 3/10배 희석배지에서 얻어졌으며, albumin hydrolysate 첨가물배지의 경우 50% 가량 생산성이 높아짐을 알 수 있다. 2/10배 보다 3/10배 희석배지에서 beads 내에 배지성분이 높은 농도로 존재하여 균체활성이 높게 유지될 때 beads내에 알콜생산속도가 beads 외로의 유출속도에 비해 높을 수 있다. 이러한 상태에서 균체 내의 알콜농도가 증가하여 무첨가물배지의 경우 균체에 대한 알콜 저해 효과가 증대되어 균체의 알콜생산능이 감소할 수 있

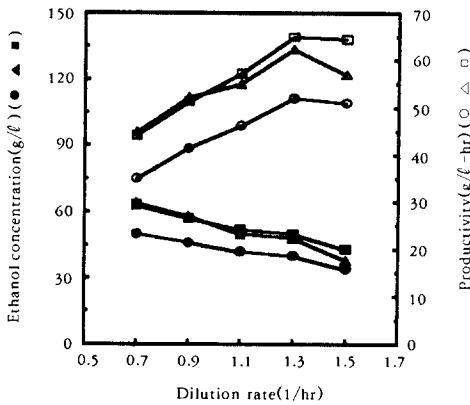


Fig. 5. Steady-state ethanol concentrations and productivities at various dilution rates with feeding of soybean meal hydrolysate and phosphatidylcholine.

- , ○: one tenth diluted one of the fermentation medium supplemented with 1.0% soybean meal and 0.5% phosphatidylcholine
- ▲, △: two tenths diluted one of the fermentation medium supplemented with 1.0% soybean meal and 0.5% phosphatidylcholine
- , □: three tenths diluted one of the fermentation medium supplemented with 1.0% soybean meal and 0.5% phosphatidylcholine

으므로 기질농도를 적당히 낮추어 공급하는 것이 유리하다. 이에 비하여 첨가물 배지의 경우 첨가물에 의하여 균체의 알콜내성이 현격히 증대되어(13) 균체활성이 높게 유지될 수 있으므로 3/10배 희석배지에서도 알콜내성이 높게 유지되어 결과적으로 높은 알콜생산성이 얻어지는 것으로 사료된다.

또다른 첨가물로 soybean meal hydrolysate(10g/l)과 phosphatidylcholine(5g/l)을 첨가한 발효배지를 1/10배, 2/10배 및 3/10배 희석하여 기질로서 연속알콜생산에 이용하여 정상상태에서 Fig. 5의 결과가 얻어졌다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 첨가물이 soybean meal hydrolysate인 경우 최고 알콜농도는 albumin hydrolysate의 경우와 비슷한 수준을 보여주었다. 그러나 희석율이 증가함에 따라

알콜농도는 크게 감소하지 않아 1/10배 희석발효배지의 1.5hr⁻¹ 희석율에서 34g/l로 비교적 높게 유지되었다. 최대 알콜생산성은 3/10배 희석배지의 희석율 1.1hr⁻¹에서 65g/l-hr이었으며, 1/10배 희석발효배지의 희석율 1.3hr⁻¹에서 52g/l-hr, 2/10배 희석발효배지의 1.3hr⁻¹에서 63g/l-hr가 얻어졌다. 최대 알콜생산성이 albumin hydrolysate의 경우 1.1hr⁻¹ 희석율에서 얻어진 데 비해 soybean meal hydrolysate에서는 1.3hr⁻¹에서 얻어졌다.

첨가물로 albumin hydrolysate, soybean meal hydrolysate을 이용한 경우 비슷하게 50% 정도 알콜생산성이 증가하여 60~70g/l-hr의 높은 알콜생산성을 얻을 수 있었으며, 이는 기준에 보고된 고정화균체 반응기의 연속생산에서 얻어지는 20~40g/l-hr의 알콜생산성에 비하여 월등히 높은 값이다(17-19). 한편, 질소원으로서 값비싼 albumin hydrolysate 대신 Soybean meal hydrolysate와 같이 값싼 물질로 대체하여도 알콜생산을 효과적으로 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

Saccharomyces sake Kyokai No. 7을 이용한 고정화 균체 반응기에서 연속 알콜생산시에 발효배지 성분을 1/10배~3/10배 범위에서 희석하여 사용할 때 균체의 생산성과 고정화 beads의 물리적 안정성이 장기적으로 유지되었다. Egg albumin hydrolysate (0.5%)와 phosphatidylcholine(0.5%)을 첨가한 발효배지를 3/10배 희석하여 공급할 때 1.1hr⁻¹ 희석율에서 최대 알콜생산성인 69g/l-hr이 얻어졌으며, 이는 무첨가물의 2/10배 희석 발효배지의 최대치인 46g/l-hr에 비하여 50% 증가한 것이다.

감 사

본 연구는 동력자원부 대체에너지 연구비 지원(1990)에 의하여 이루어졌으며, 이에 대하여 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. C. D. Jin, H. L. Chiang and S. S. Wang(1981), *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 249.
2. C. K. Jin and S. S. Wang(1982), *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 256.

3. K. J. Lee and P. L. Roger(1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125.
4. D. Damiano, C. Shin, N. Ju and S. S. Wang (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 69.
5. G. K. Chotani and A. Constantinides(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 217.
6. M. J. Anselme and D. W. Tedder(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 736.
7. D. Williams and D. M. Munnecke(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1813.
8. G. R. Cysewski and C. R. Wilke(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125.
9. A. Ramalinghan and R. K. Finn(197), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 583.
10. J. Y. Yang, K. H. Park, U. H. Pak and J. H. Yu(1990), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**(5), 511.
11. A. A. Andreasen and T. J. B. Stier(1954), *J. Cell. Comp. Physiol.*, **43**, 271.
12. D. S. Thomas, J. A. Hossack and A. H. Rose (1978), *Arch. Microbiol.*, **17**, 239.
13. H. S. Kim, C. S. Shin and S. S. Wang(1990), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**(4), 373.
14. M. J. Rho, K. H. Park, W. H. Paik and J. H. Yu(1991), *J. Kor. Agr. Chem. Soc.*, **34**, 61.
15. J. Klein and K. -D. Vorlop(1985), *Comprehensive Biotechnology*, (M. Mooyoung, eds), Vol. 2, p. 203, Pergamon, Oxford.
16. M. F. Chaplin(1987), *Carbohydrate Analysis*, (M. F. Chaplin and J. F. Kennedy, eds), p. 3, IRL Press, Oxford.
17. M. Wads, J. Kato and I. Chibata(1981), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 67.
18. T. H. Lee., J. C. Ahn and D. D. Y.Ryu(1983), *Enzyme Microb. Technol.*, **5**, 41.
19. M. Nagashima, M. Azuma, S. Noguchi, K. Inuzuka and H. Samejima(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 992.