

## 발효 초기조건이 에탄올 발효 특성치에 미치는 영향

민경호 · 김휘동 · 허병기\*  
인하대학교 공과대학 생물공학과

### Effect of Initial Condition on the Characteristics of Ethanol Fermentation

Kyung-Ho Min, Hwi-Dong Kim and Byung-Ki Hur\*

Department of Biological Engineering, Inha University

**Abstract** — The effect of initial cell concentration on the characteristics of ethanol fermentation was investigated in the batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858. The characteristics were investigated in the range of 60 to 230 g/l of the initial sugar concentrations and 0.5 to 85 g/l of the initial cell concentrations. When the initial cell concentrations were 27 g/l for 60 g/l of the initial sugar and 85 g/l for 230 g/l, the fermentation time required for the complete consumption of the initial sugar was one hour, respectively. The ethanol productivity increased with the initial cell concentration so that, in the case of 100 g/l of initial sugar, the productivity rose up to 55 g/l/hr at 55 g/l of the initial cell concentration. The specific growth rate decreased according to the increase in the initial biomass concentration and finally became zero at around 25 g/l of the cell concentration regardless of the initial sugar concentration. The specific ethanol production rate was constant as 1.02 g/l/hr up to 150 g/l of the initial sugar. However, the rates decreased sharply with the augmentation of concentration of the initial sugar above 160 g/l. The overall ethanol yield represented a constant value, 0.475 g/g irrespective of the initial cell and sugar concentrations. The overall biomass yield showed a trend to diminish in values with the biomass and ultimately to reach zero more than 25 g/l of the initial cell concentration.

자원은 대단히 귀중한 자원이나 대부분의 생산량이 에너지원으로 사용된다. 석유 자원이 에너지원으로 사용될 경우 연소로 말미암아 발생하는 대기 오염 문제는 물론 석유 자원의 최대 단점인 고갈성 때문에 현 인류는 석유 자원을 에너지 자원 대신 고 부가가치 생산품의 원료로만 사용하기 위한 방안 모색에 부심하고 있다. 이런 배경으로 인하여 21세기 초반까지 석유 대체 에너지원의 개발이 현 인류가 해결하여야 할 최대 과제중의 하나가 되었다. 현재까지 알려진 석유 대체 에너지원으로는 여러 종류가 있으나 석유와 물리 화학적 특성이 가장 유사한 알콜이 가장 유망한 석유 에너지 대체 원료로 고려되고 있다. 알콜은 연소성, 에너지 밀도, 수송 및 저장 특성에서 인류가 사용하고 있는 에너지 전환 시스템의 별다른 개조없이 석유 대신 사용할 수 있다는 장점을 지니고 있다.

**Key words:** Initial cell concentration, initial sugar concentration, ethanol productivity, specific growth rate, specific ethanol production rate

\*Corresponding author

알콜의 생산 공정은 알콜의 종류에 따라서 서로 다르다. 알콜 생산 원료의 재생성을 고려하면 가장 풍부한 원료가 바이오 메스이며, 이로부터 생산되는 알콜은 에탄올과 메탄올이다. 에탄올은 주로 생화학적 공정에 의하여 생산되며, 메탄올은 화학적 공정에 의하여 생산된다. 전 세계적으로 가장 널리 연구되고 있을 뿐만 아니라 오랜 역사와 전통을 지닌 공정이 에탄올 생산 공정이다. 그러나 에탄올이 석유 대체 연료로서 경제성을 띠기 위해서는 값싼 바이오 메스의 생산과 더불어 에탄올 생산성이 대폭 개선된 생산 공정의 개발이다.

에탄올 생산성이 높은 공정으로는 막을 이용한 균체 재순환 공정(4, 6), 균체를 응집시켜 재순환하는 공정(7, 8), 상분리 조작을 이용하여 균체를 재순환하는 공정(1, 3), 기계적 조작, 특히 원심 분리법을 이용한 균체 재순환 공정(9) 등이 있다. 이들 공정은 모두 균체의 고농도 유지에 따른 에탄올 생산성 향상에 초점을 맞추고 있다. 현재까지의 연구 결과에 의하면 막을 이용하여 균체를 재순환시킬 경우 최대 균체

농도를 210 g/l까지 증가시킬 수 있었으며, 균체의 응집법에 의하여서는 90 g/l까지 상승시켰다. 에탄올 농도 측면에서 살펴보면 막을 이용하는 경우 정상 상태의 에탄올 농도는 90 g/l(4)이었으며, 응집법의 경우에는 92 g/l이었다.

균체를 고농도로 유지시키는 경우 영양분의 공급과 생성물에 의한 저해, 균체의 저해 작용 등의 문제가 야기된다. 균체의 초기 농도에 따른 균체의 성장 특성, 에탄올 생성 특성, 에탄올의 생산성 등에 대한 연구가 많이 수행되었으나 대부분 연역적 방법에 의하여 제시된 값들이다(4, 5, 10). 따라서 본 연구에서는 균체의 초기 농도 및 초기 당 농도 변화에 따른 발효 실험을 통하여 초기 당 농도 및 초기 균체 농도와 균체의 성장 특성, 발효 관료 시간, 에탄올 생성 속도, 에탄올 생산성 사이의 함수 관계를 규명하여 보았다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양

본 연구에서 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858이다. 4°C 사면배지에 냉장 보관된 균주를 YM 액체 배지에 접종하여 30°C에서 20시간 진탕 배양하여 초기 균체 농도 제조를 위한 발효의 접종용 균주로 사용하였다.

초기 당 농도 120 g/l 인 본 연구의 발효 배지 200 ml가 주입된 500 ml Erlenmeyer Flask 5개 내지 10개에 접종용 균주 배양액 20 ml를 각각 접종하고 30°C에서 20시간 진탕 배양한 후 본 실험에서 고안된 원심 분리기를 사용하여 위의 발효액으로부터 균체를 농축하였다.

### 초기 당 농도와 초기 균체 농도

Table 1은 본 연구의 발효 실험에서 수행한 초기 당 농도와 초기 균체 농도의 분포를 나타내고 있다. 이 Table에서 알 수 있듯이 초기 당 농도 60 내지 230 g/l 사이의 값과 초기 균체 농도 0.3 내지 85 g/l 사이의 값의 조합으로 이루어진 38종류에 대한 발효 실험을 수행하였다.

### 발효 실험

본 연구에서 사용한 발효 기질의 기본 조성은 포도당 100 g/l, NH<sub>4</sub>Cl 1.3 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.12 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0.06 g/l, Yeast Extract 8.5 g/l이다. 발효 실험의 초기 당 농도는 60, 100, 120, 150, 200, 그리고 230 g/l이었으며 초기 당 농도 변화에 따른 다른 성분의 조성은 위의 기본 조성에 대한 당의 변화량과 비례적으로 변화시켰다. 발효 배지의 초기 pH는 1N HCl과 1N NaOH 용액을 사용하여 4.5로 맞추었다.

발효 실험은 진탕 배양기를 사용하여 수행하였으며 작동 온도 30°C, 회전수는 150 rpm이었다. 시료 채취는 균체의 초기 농도에 따라 조절하였다. 초기 균체 농도가 0.5 g/l 인 경우에는 3내지 4시간 간격으로, 초기 균체 농도가 1 내지 10 g/l 사이인 경우에는 1시간 간격으로, 20 g/l 이상인 경우에는 20분 내지 40분 간격으로 시료를 채취하였다.

### 분석 방법

마개 달린 시험관에 시료를 채취한 후, 즉시 100°C 끓는 물에서 3분간 증탕한다. 시험관을 상온으로 빠르게 냉각시킨 후 4,000 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 상등액은 잔당과 에탄올 농도 분석에, 침전

Table 1. The pairs between the initial biomass concentrations and the Initial Sugar Concentrations

S <sub>0</sub> ** (g/l)	X <sub>0</sub> * (g/l)											
		0~1	1~10	10~20	20~30	30~40	40~50	50~60	60~70	70~80	80~90	
60		0.5	8.4	15.0	27.1	34.5						
100		0.3	7.8	14.8	24.5	36.0	49.0					
120		0.3	8.1	14.0	26.5	31.5 38.0		58.0				
150		0.3	8.4	13.5	27.0	35.0	48.0			79.0		
200		0.4	7.8	14.3	24.0	34.0	45.0			76.0		
230			7.6	13.9	25.0		48.0			72.0	85.0	

\*Initial cell concentration, \*\*Initial glucose concentration

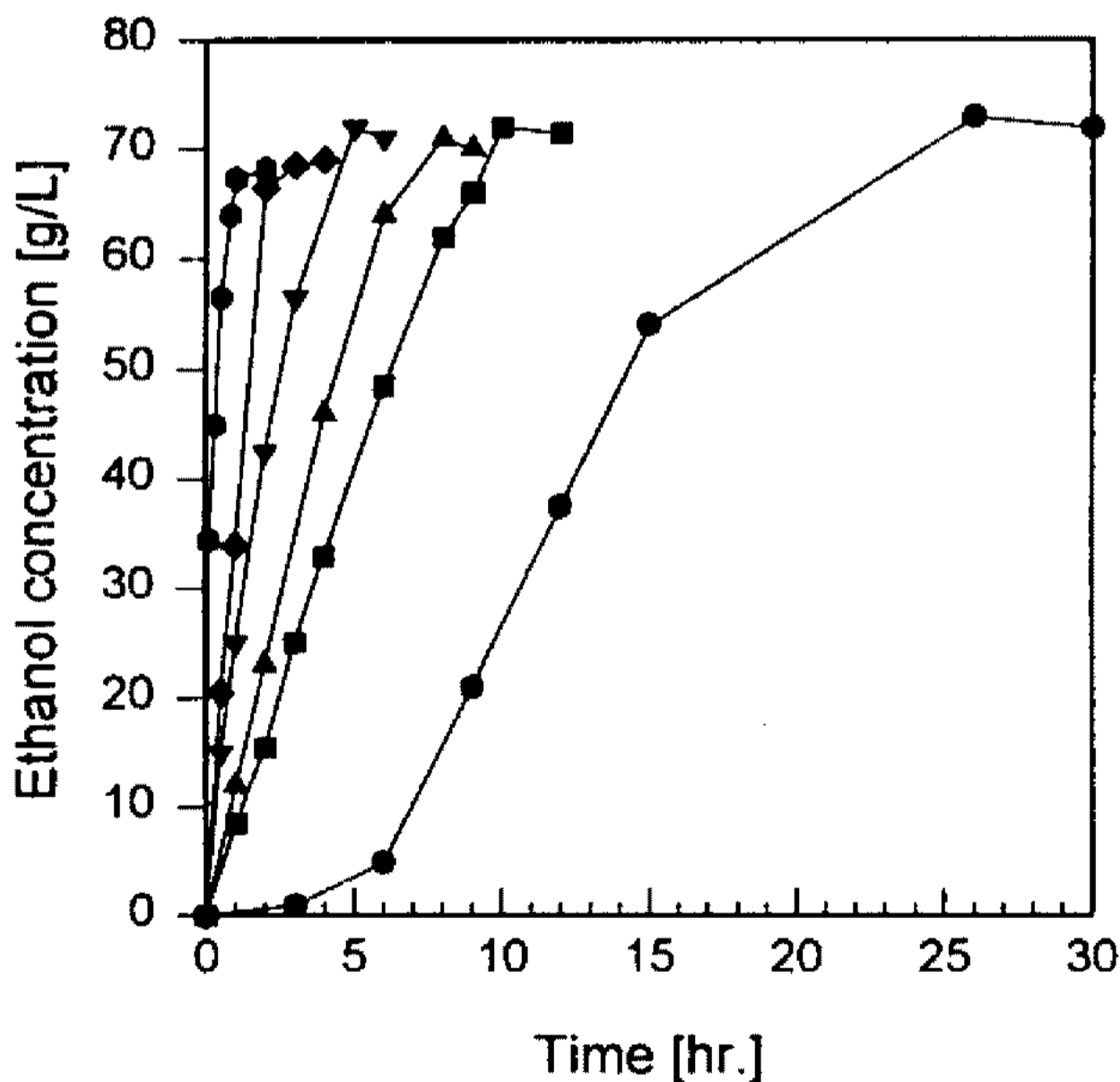
물은 균체 농도 분석에 사용하였다. 포도당 농도는 Glucose Analyzer(TOA, Glu-11, Japan)를 사용하여 분석하였으며, 에탄올 농도는 n-propanol을 internal standard로 하여 Gas-chromatography(Hewlett Packard, HP 5890 SeriesII)를 사용하여 분석하였다. 균체 농도는 균체 시료를 증류수로 3회 세척한 후, 알루미늄 보트를 이용하여 85°C의 건조기에서 항량이 될 때까지 건조시켜 무게를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

Table 1에 제시되어 있는 38가지의 경우에 대한 발효 실험을 수행하여 초기 당이 완전히 소모되는데 소요되는 시간과 초기 균체 농도 사이의 함수 관계, 발효가 완료되는 시간이 고정되었을 경우에 대한 초기 당 농도와 초기 균체 농도의 함수 관계, 에탄올 생산성과 초기 균체 농도 사이의 함수 관계, 비 성장 속도와 초기 균체 농도 사이의 함수 관계 및 균체 성장을 완전히 멈추게 하는 에탄올의 농도 등을 정량적으로 규명하였다.

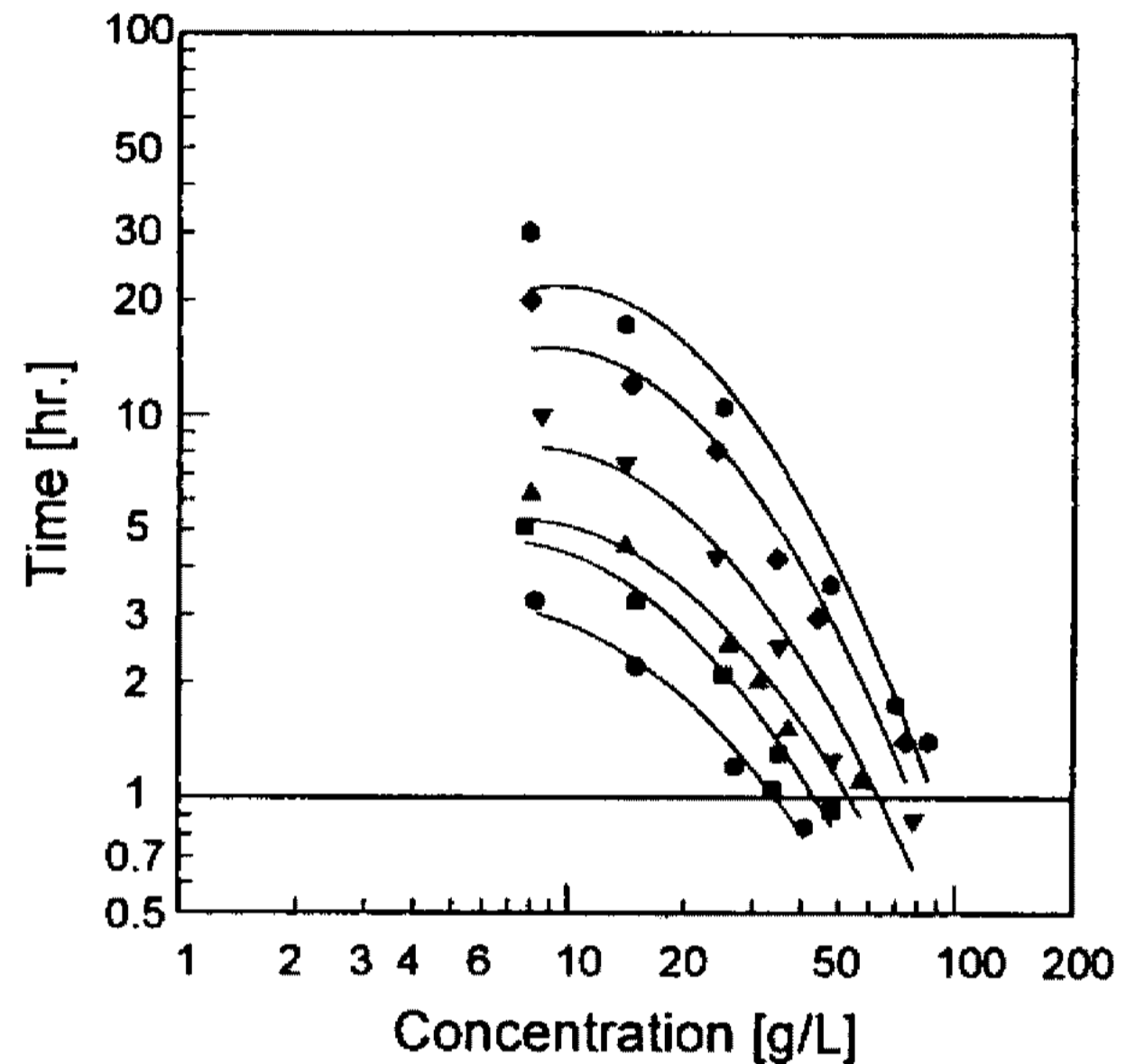
**초기 균체 농도와 발효 종료 시간 사이의 함수 관계**

Fig. 1은 초기 당 농도가 150 g/l 인 경우 초기 균체 농도에 따른 발효 시간과 에탄올 생성 농도 사이의 함수 관계를 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 초기

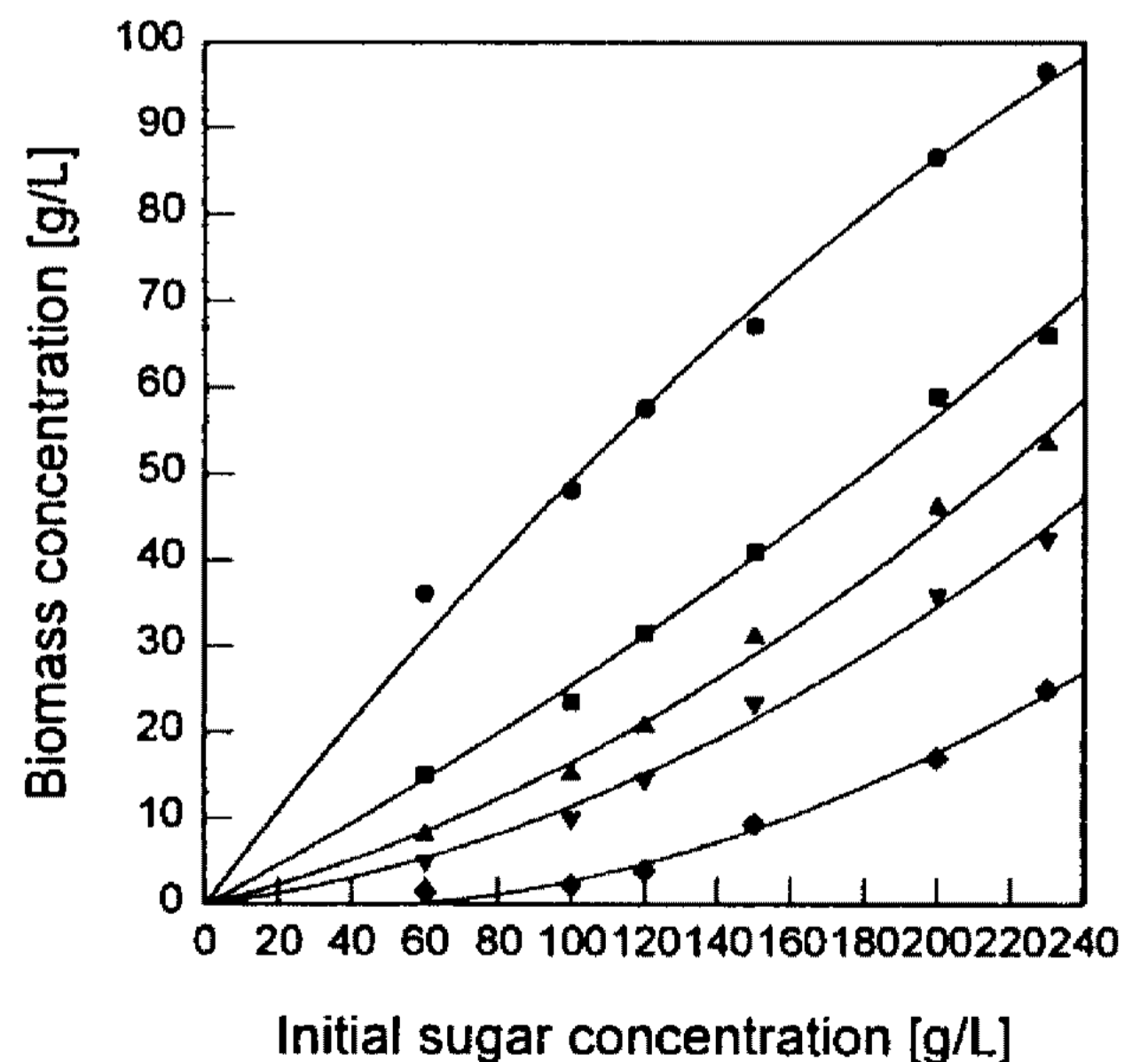


**Fig. 1. Fermentation time vs. ethanol concentration with initial biomass concentration.**  
 $S_0=150$  g/l; ●  $X_0=0.30$  g/l, ■  $X_0=7.80$  g/l, ▲  $X_0=15.20$  g/l, ▼  $X_0=29.30$  g/l, ◆  $X_0=39.20$  g/l, X<sub>0</sub>=79.00 g/l

균체 농도 증가에 따라 발효 종료 시간은 감소하여 초기 균체 농도 79 g/l 이상에서는 1시간 이내에 초기 당이 모두 소모되었다. 발효가 완료되는 시간은 초기 당 농도 및 초기 균체 농도의 함수로 나타낼 수 있다. Table 1의 38가지 경우에 대한 Fig. 1과 같은 발효 실험 결과로부터 초기 당이 완전히 발효되는데 소요되는 시간과 초기 당 농도 사이의 함수 관계를 도식화한 것이 Fig. 2이다. 이 그래프로부터 각 초기 당



**Fig. 2. Time for complete fermentation of initial sugar vs. initial biomass concentration with initial sugar concentration.**  
 ●  $S_0=60$  g/l, ■  $S_0=80$  g/l, ▲  $S_0=120$  g/l, ▼  $S_0=150$  g/l, ◆  $S_0=200$  g/l, S<sub>0</sub>=230 g/l



**Fig. 3. Fermentation time for complete consumption of initial sugar according to initial biomass.**  
 ● 1 hr., ■ 2 hr., ▲ 3 hr., ▼ 4 hr., ◆ 10 hr.

농도에서 발효가 종료되는 시간에 따른 초기 균체 농도를 구할 수 있다. 초기 당 농도가 60 g/l 인 경우 발효가 1시간에 완료되는데 필요한 초기 균체 농도는 약 35 g/l이며 초기 당 농도가 230 g/l 인 경우에는 초기 균체 농도가 약 100 g/l까지 증가됨을 알 수 있다. Fig. 3은 발효 종료 시간을 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 및 10시간으로 고정시켰을 때 초기 당 농도와 초기 균체농도 사이의 함수 관계를 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 발효 종료 시간이 1시간인 경우에는 초기 균체 농도와 초기 당 농도 사이의 관계가 선형적인 함수 관계를 나타내며 발효 종료 시간이 증가할수록 비선형적인 증가함수로 변화하였다.

**초기 균체 농도가 비 성장 속도에 미치는 영향**

균체의 비성장 속도는 당농도, 에탄올농도, 균체농도의 함수로 나타난다. 초기 균체 농도가 증가하면 발효가 종료되는 시간이 짧기 때문에 초기 당 농도가 낮은 경우에는 균체 증가 속도를 시간의 함수로 정확히 규명하기 어렵다. 따라서 본 연구에서는 초기 당 농도가 낮은 값인 60 g/l에서 높은 값인 230 g/l 사이의 여러 당 농도에서 발효 실험을 수행하면서 당이 충분히 남아있는 발효 조건에서도 균체의 성장이 멈추는 초기 균체 농도를 규명하려고 하였다. 다음의 식 (1)은 초기당의 95%가 소모된 시점에서의 균체 농도 증가량, 균체 평균 농도, 발효 시간을 고려한 균체 비 성장 속도 식을 나타내고 있다.

$$\mu = \frac{1}{X_{av}} \cdot \frac{\Delta X}{\Delta t} \tag{1}$$

윗 식에서  $X_{av}$ 는 균체의 초기 농도에 당이 완전히 소모된 시점에서의 균체 농도를 더한 값의 1/2을,  $\Delta X$ 는 이 두점 사이의 균체 농도 차이값을, 그리고  $\Delta t$ 는 이 경우에 소요된 발효 시간을 의미한다.

Fig. 4는 Table 1의 발효 배지 조성에 따라서 수행된 발효 실험으로부터 식(1)을 이용하여 구한 균체 비 성장 속도를 균체 초기 농도의 함수로 나타낸 그림이다. 이 결과에 의하면 균체의 비성장 속도는 초기 균체 농도 증가에 따라 감소하며 초기 균체 농도 55 g/l 이상에는 균체 성장이 멈추어짐을 알 수 있다.

**균체 성장이 멈추어지는 에탄올 농도**

발효 실험을 통하여 발효 시간과 균체 농도, 당 농도 및 에탄올 농도 사이의 함수 관계를 구하였다. 이 결과로부터 임의의 발효 시간에서의 균체 농도, 에탄올 농도, 당 농도 및 균체의 시간에 대한 미분값을 구한 후 식(2)의 균체 비 성장 속도를 도출하였다.

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \tag{2}$$

식 (2)의 결과와 에탄올 농도 사이의 함수 관계를 이용하여 에탄올 농도 0까지 균체 비 성장 속도를 외삽하여 각 초기 당 농도에서의 균체 비 성장 속도를 구하였다. 이 비 성장 속도와 초기 당 농도 사이의 함수 관계를 Lineweaver-Burk Plot 방법에 적용시켜 최대 비 성장 속도,  $\mu_{max}$  와 Monod 상수,  $K_s$  를 구하여

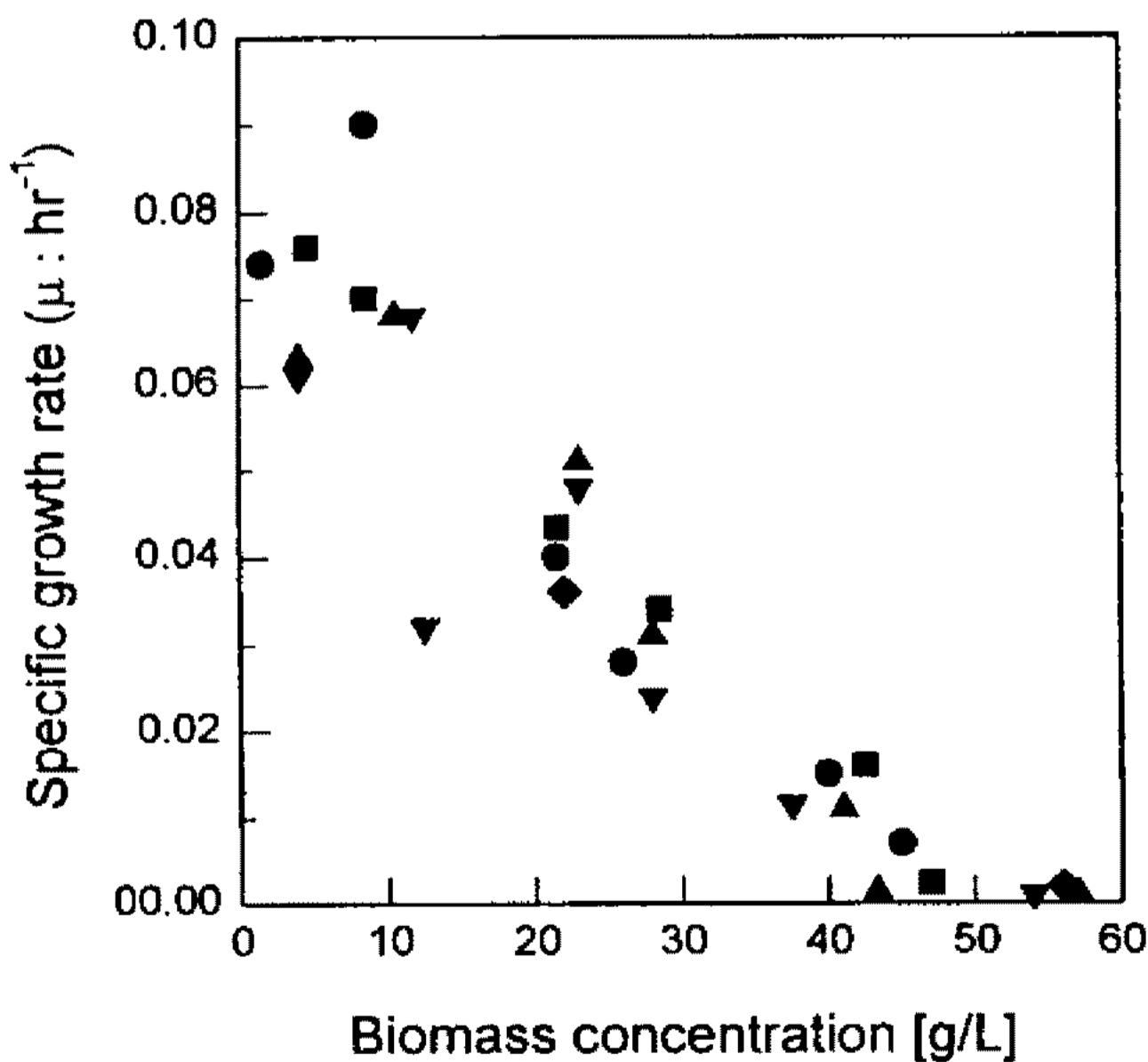


Fig. 4. Relationship between biomass concentration and specific growth rate at different initial sugar concentration. ●  $S_0=50$  g/l, ■  $S_0=75$  g/l, ▲  $S_0=120$  g/l, ▼  $S_0=170$  g/l, ◆  $S_0=210$  g/l

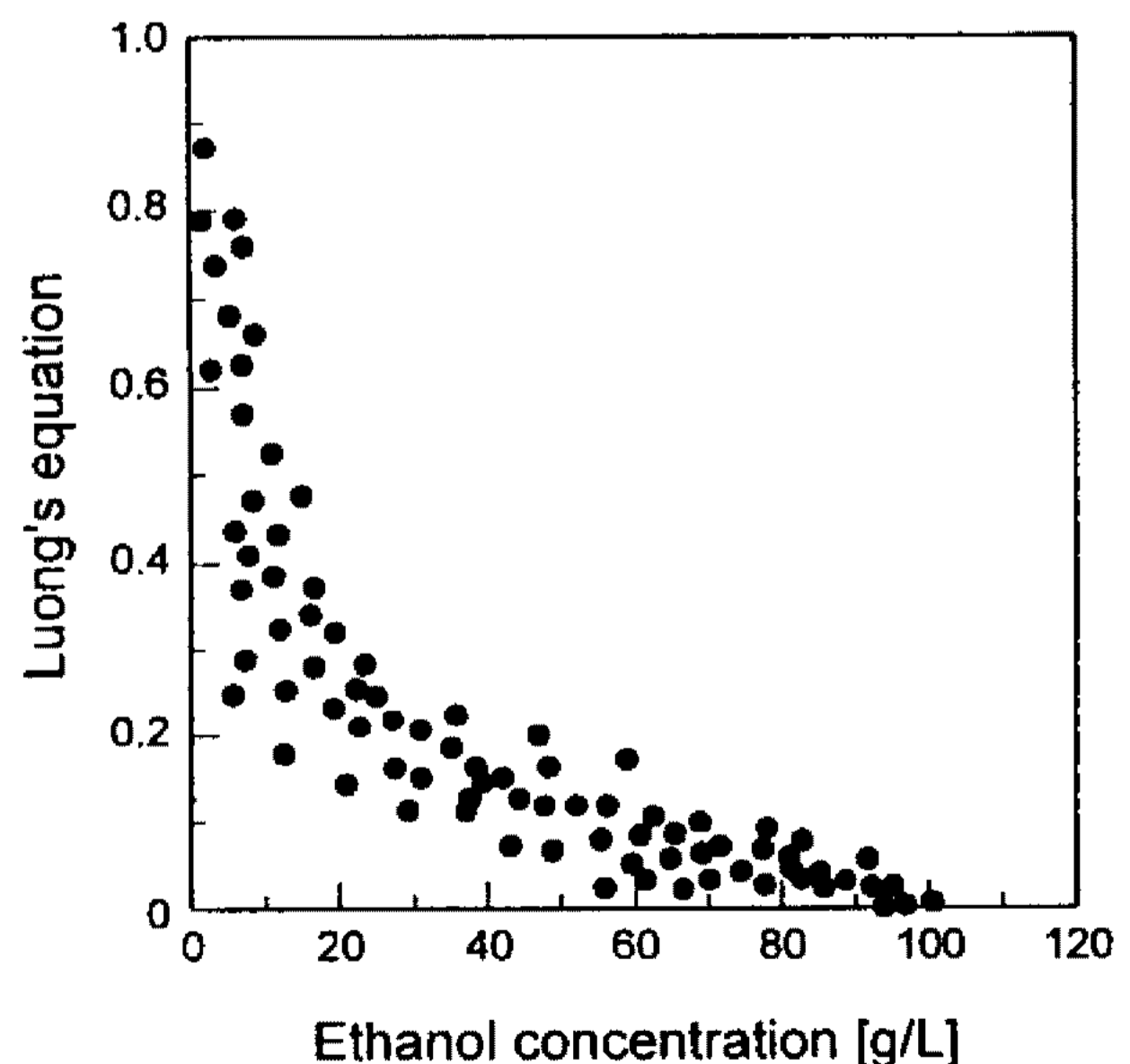


Fig. 5. Relationship between Luong's equation  $[\theta/\{\theta_m(S/(K_s+S))(1-(X/X_m))\}]$  and ethanol concentration.

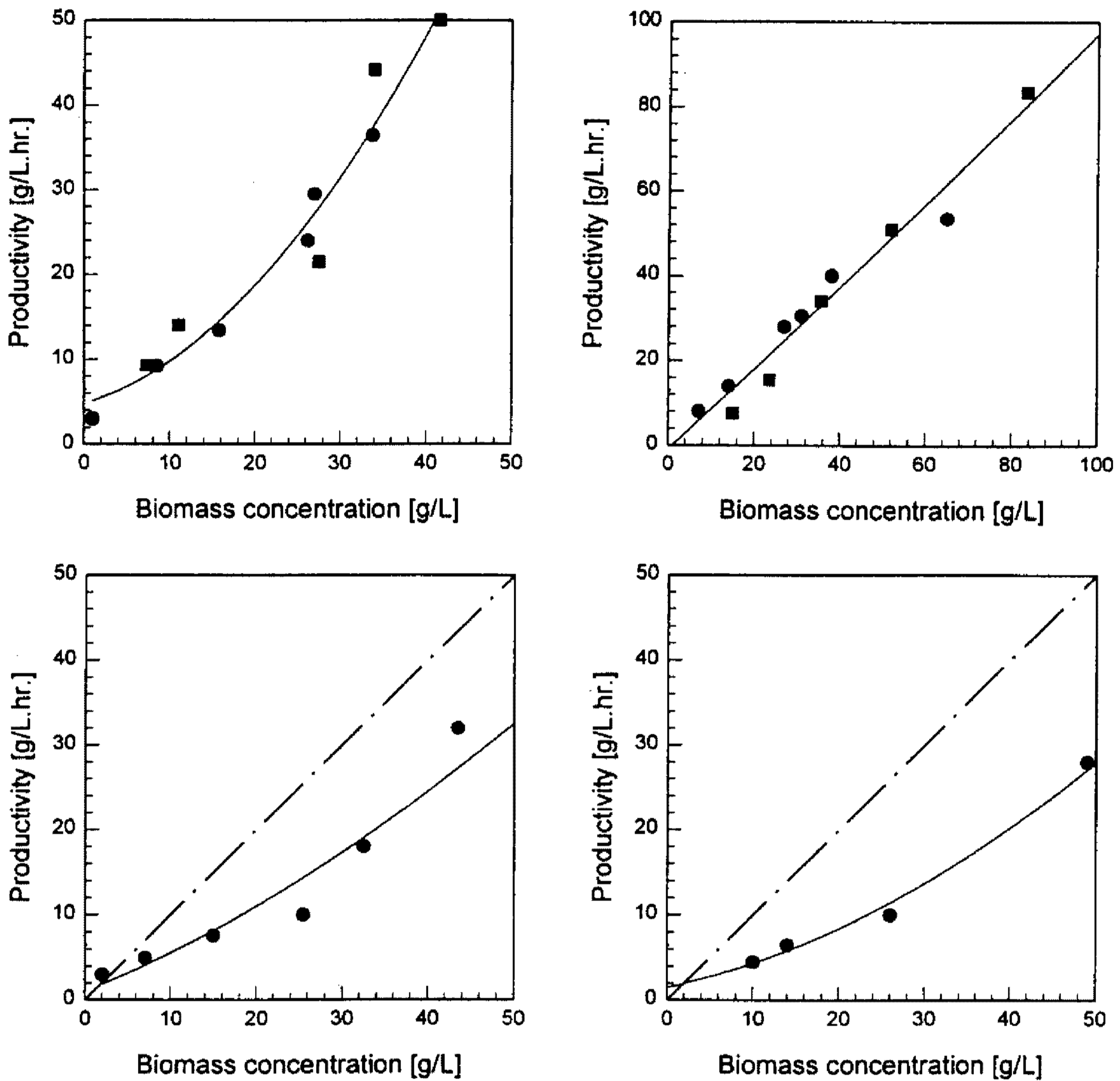


Fig. 6. Relationship between ethanol productivity and initial biomass concentration according to initial sugar concentration.

A: ●  $S_0=60$  g/l, ■  $S_0=100$  g/l, B: ●  $S_0=120$  g/l, ■  $S_0=150$  g/l, C: ●  $S_0=200$  g/l, D: ●  $S_0=230$  g/l

각각  $0.44 \text{ hr}^{-1}$ 과  $25 \text{ g/l}$ 를 얻을 수 있었다.

이 값들을 다음의 Luong 식(3)에 적용하여 균체 성장에 미치는 에탄올 농도의 영향을 규명하여 보았다.

$$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{s}{K_s + S} \right) \left( 1 - \frac{X}{X_m} \right) \left( 1 - \frac{P}{P_m} \right) \quad (3)$$

윗 식에서  $P_m$ 은 균체 성장이 멈추는 에탄올 농도를,  $X_m$ 은 균체 성장이 멈추는 균체 농도를 의미한다. 식 (3)을 변형하여 에탄올 농도의 함수와 나머지 변수들의 함수로 분리하여 정리하면 다음 식과 같다.

$$\frac{\mu}{\left\{ \mu_{\max} \left( \frac{s}{K_s + S} \right) \left( 1 - \frac{X}{X_m} \right) \right\}} = \left( 1 - \frac{P}{P_m} \right) \quad (4)$$

Table 1의 실험 결과로부터 구한  $\mu_{\max}$ ,  $K_s$ ,  $K_m$ 을 이용하여 식 (4)의 오른쪽 항을 구하고 이 값을 에탄올 농도의 함수 관계로 나타낸 것이 Fig. 5이다. 이 결과에 의하면 본 연구 실험 범위에서는 잔당농도에 관계없이 에탄올 농도가  $95 \text{ g/l}$  이상에서는 균체 성장이 멈추어짐을 알 수 있다.

#### 초기 균체 농도와 에탄올 생산성 사이의 함수 관계

초기 당 농도가  $60$  및  $100 \text{ g/l}$ 인 경우에는(Fig. 6A) 초기 균체 농도 증가량에 대한 에탄올 생산성 증가량이 1보다 다소 큰 값을 나타내었다. 초기 당 농도가  $120 \text{ g/l}$  및  $150 \text{ g/l}$ 인 경우에는(Fig. 6B) 초기 균체량 증가와 에탄올 생산성 증가 사이에 선형적인 함수관

계를 나타내었다. 반면 초기 당 농도가 200 g/l(Fig. 6C) 및 230 g/l(Fig. 6D)인 경우에는 초기 균체 농도 증가량에 대한 에탄올 생산성 증가량의 비가 1보다 작은 값을 나타내었다.

## 요 약

*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858의 회분식 에탄올 발효에서 초기 균체 농도가 에탄올 발효 특성치에 미치는 영향을 규명하여 보았다. 발효 특성치는 초기 당 농도 60 내지 230 g/l 범위에서 초기 균체 농도 0.3 내지 85 g/l 범위에 대하여 규명된 값들이다. 초기당이 1시간내에 완전히 소모되는데 필요한 초기 균체 농도는 초기 당 농도가 60 g/l 인 경우에는 약 27 g/l이었으며, 초기 당 농도가 230 g/l 인 경우에는 85 g/l이었다. 에탄올 생산성은 초기 균체 농도가 증가하면 상승되었다. 초기 균체 농도 55 g/l, 초기 당 농도가 100 g/l 인 경우 에탄올 생산성은 55 g/l·hr까지 향상되었다. 균체의 비 성장 속도는 초기 균체 농도 증가에 따라 감소하는 경향을 나타내었으며 균체 농도가 55 g/l에서는 초기 당 농도에 상관없이 균체 성장이 멈추어졌다. 균체 성장은 초기 균체 농도 이외에 에탄올 농도에도 크게 영향을 받았다. 에탄올 농도가 증가하면 균체 성장 속도는 감소하였으며 에탄올 농도 95 g/l 이상에서는 균체 성장이 완전히 멈추었다. 에탄올의 생산성은 균체의 초기 농도, 초기 당 농도에 따라 서로 다른 결과를 나타내었다. 초기 당 농도가 60 내지 100 g/l 인 경우에는 균체 증가량에

대한 에탄올 생산성 증가비가 1보다 큰 값을 나타내었으며, 초기 당 농도가 120 내지 150 g/l 인 경우에는 이 비가 선형적인 관계를 나타내었고, 초기 당 농도가 200 내지 230 g/l 인 경우에는 이 비가 1보다 작은 값을 나타내었다.

## 참고문헌

1. J.A. Philips, and A.E. Humphrey. 1983. Process Biotechnology for the Conversion of Biomass into Liquid Fuels, Pp. 65-95. In D.L. Wise. (ed.), *Liquid Fuel Developments, CRC. Series in Bioenergy Systems.*, CRC Press. Boca Raton. FL.
2. M. Minier, and G. Goma. 1982. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 1565.
3. S. Ishii, M. Taya, and T. Tobayashi. 1985. *J. Chem. Eng. Jpn.* **18**: 125.
4. C.W. Lee, and H.N. Chang. 1987. *Biotechnol. Bioeng.* **19**: 1105-1112.
5. A.B. Jarzebski, and J.J. Malinowski. 1989. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 1225-1230.
6. P. Bajpai, and A. Margaritis. 1986. *Biotechnol. Lett.* **8**(5): 361-364.
7. C.B. Neto, and G. Goma. 1987. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 320-324.
8. K. Kida, S.I. Asano, M. Yamataki, K. Iwasak, T. Yamaguchi, and Y. Sonoda. 1990. *J. Ferment. Bioeng.* **69**(1): 39-45.
9. H.D. Kim, K.H. Min, and B.K. Hur. 1995. *Korean. J. Biotechnol. Bioeng.* **10**(1): 55-62.
10. G.L. Miller. 1959. *Anal. Chem.* **31**: 426.

(Received 24 December 1994)