

에탄올 생산 균주 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858의 비성장속도에 관한 수학적 모형연구

김 휘 동 · 허 병 기

인하대학교 공과대학교 화공·고분자·생물공학부
(접수 : 1998. 9. 18., 게재승인 : 1998. 11. 16.)

Investigation of Mathematical Model for the Specific Growth Rate of Ethanol Producing Microorganism, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858

Hwi-Dong Kim and Byung-Ki Hur†

School of Chemical, Polymer, and Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 1998. 9. 18., Accepted : 1998. 11. 16.)

The mathematical model of specific growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858 is proposed as a function of sugar and ethanol concentrations by the combination of Andrew's equation and Alba's equation. The maximum concentration of sugar S_m , which was the highest concentration of sugar not having any effect on the growth inhibition, was 150 g/L and the substrate inhibition was expressed as a function of $(S-S_m)$. The maximum specific growth rate μ_m , Monod's constant K_s , and Andrew's inhibition constant K_i were 0.49 hr⁻¹, 19 g/L, and 139 g/L, respectively. The maximum ethanol concentration, P_m , which did not show any inhibition effect on the specific growth rate was found to be 2 g/L. Therefore, the ethanol inhibition was represented as a function of $(P-P_m)$. The final mathematical model for the specific growth rate of the microorganism in this work is proposed as the following And the average percent of errors between the calculated specific growth rate and the experimental values was 5.96%.

$$\mu = \left[\frac{0.49 S}{(19 + S) \left(1 + \frac{S-150}{139} \right)} \right] e^{-0.035(P-2)}$$
$$0 < S \leq 150 \text{ g/L}, \quad \frac{S-150}{139} = 0$$
$$0 < P \leq 2 \text{ g/L}, \quad e^{-0.035(P-2)} = 1$$

Key Words : inhibition constant, substrate inhibition, ethanol inhibition, mathematical model, specific growth rate

서 론

석유 자원이 고갈될 2000년대의 석유의 대체 연료와 화학 제품의 대체 기초 원료로 가장 각광을 받고 있는 화합물 중의 하나가 에탄올이다. 이러한 필연성으로 말미암아 고전적인 발효공정 중의 하나인 에탄올 발효 공정에 대한 연구가 지속되고 있다. 현재 가장 활발히 진행되고 있는 연구는 에탄올 생산성을 경제적 수준까지 향상시키기 위한 발효 시스템의 개발이다. 발효와 동시에 에탄올을 분리해냄으로써 에탄올의 저해 영향을 경감시킬 뿐만 아니라 발효기 내의 균체 농도를 높임으로써 에탄올의 생산성을 향상시킬 수 있는 발효 시스템이 가장 많이 연

구되어지고 있다. 현재 개발중인 발효 시스템은 추출, 증류 및 흡착의 개념을 도입한 액-액 추출 발효(1,2), 감압 발효(3), 고상 흡착에 의한 선택적 발효(4), 막분리 공정의 개념을 도입한 투석 발효(5), 수상 stripping의 역삼투 발효(6) 유기상 stripping의 perstraction 발효(7), pervaporation 발효(8) 등의 시스템으로 대별할 수 있다. 또한 고농도의 균체 배양을 위하여 연구되어지고 있는 공정으로는 막을 이용한 균체 재순환 공정(9), 균체를 응집시켜 재 순환하는 공정, 상분리 조작을 이용하여 균체를 재 순환하는 공정(10), 원심분리법을 이용하여 균체를 재순환 하는 공정 등이 있다. 현재까지의 연구 결과에 의하면 막을 이용하여 균체를 재순환시킬 경우 최대 균체농도를 210 g/L까지 증가시킬 수 있었으며, 균체의 응집법에 의하여서는 90 g/L까지 상승시켰다. 각각 그 고유한 특성과 장점을 갖고 있으나 균체를 고 농도로 유지시킨 채 지속적인 제품을 생산하기 위하여서는 선결되어야 할 문제점이 많다.

에탄올의 생산단가를 낮추고 연료용 에탄올 생산의 산업화를

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : 032-860-7512, Fax : 032-875-0827
e-mail : biosys@inha.ac.kr

보다 신속히 실현하기 위하여서는 관련 여러 변수에 의한 반응기의 성능 해석은 물론 컴퓨터 등의 첨단 장비를 이용한 반응기내 상태의 자동예측 및 제어 등이 필요하다 이를 위해서는 미생물의 성장특성, 에탄올의 생산특성 등에 대한 수학적 모델의 개발이 필수적이다. 본 연구에서는 다양한 조건과 환경에서의 미생물의 배양실험을 통하여 미생물의 성장특성과 기질농도 및 에탄올의 농도사이의 함수관계를 수식화함으로써 연료용 에탄올 생산의 산업화에 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858이다. 4℃ 사면배지에 냉장 보관된 균주를 YM액체 배지에 접종하여 30℃에서 20시간동안 진탕 배양하여 발효의 접종용 균주로 사용하였다.

발효기질

본 연구에서 사용한 발효 기질의 기본 조성은 포도당 100 g/L, NH₄Cl 1.3 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.12 g/L, CaCl₂ 0.06 g/L, Yeast Extract 8.5 g/L 이다. 발효 실험의 초기 당농도는 30에서 230 g/L 사이였으며 초기 당농도 변화에 따른 다른 성분의 조성은 위의 기본조성에 대한 당의 변화량과 비례적으로 변화시켰다. 발효배지의 pH는 1N HCl 과 1N NaOH 용액을 사용하여 4.3으로 맞추었다.

발효실험

본 연구에서는 500 mL Erlenmeyer flask를 이용하여 작동 부피 200 mL, 온도 30℃, 회전수 150 rpm, 초기 pH 4.3으로 수행하였다. 시료채취의 간격은 초기 균체 농도에 따라서 조절하였다. 초기 균체 농도는 수개의 같은 농도의 균체를 배양한 후 균체의 활성이 떨어지기 전에 본 실험실에서 고안한 원심분리기를 사용하여 조절하였다. 농축과정에서 잃어버린 활성을 되살리기 위하여 초기 균체 농도가 20 g/L 이상일 경우에는 30분에서 1시간, 그 이하일 경우에는 약 2시간가량 시료 채취를 하지 않은 채 배양 하였다.

분석

Erlenmeyer flask로부터 시료를 채취한 후에 즉시 100℃의 끓는 물에 3분간 증탕가열 하여 균체의 대사작용을 정지시킨 후 빠르게 냉각시킴으로써 일종의 손실을 최대한으로 줄였다. 4000rpm, 20분간 원심분리 한 후 상등액은 잔당과 에탄올 분석에, 침전물은 균체 농도 분석에 이용하였다. 포도당 농도는 Glucose Analyzer (TOA, GLU-11, Japan)을 이용하였으며 에탄올 농도는 stainless packed column(충진제 ; Propak-Q)을 장착한 Gas-chromatography(Hewlett Packard, HP5890 Series II, USA)를 이용하여 측정하였다. FID detector를 사용하였으며 오븐 온도는 180℃, 주입구 및 detector 온도는 각각 210℃로 조절하였다.

균체 분석은 균체 시료를 증류수로 3회 세척한 후 알루미늄 접시(평균 무게 0.2~0.3 g)에 옮겨 85℃의 건조기에서 항량이 될 때까지 건조시켜 무게를 측정하였다.

결과 및 고찰

비성장속도에 관한 수학적 모델

균체의 비성장속도는 식(1)과 같이 여러 가지 환경인자, pH, 온도, 용존산소 등과 조성인자, 기질 농도, 생성물 농도, 균체의 밀도 등의 함수로 표현된다.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = f(S, P, X, pH, Temp, \dots) \quad (1)$$

식 (1)에서 μ 는 비성장속도, S는 기질 농도, P는 생성물의 농도, X는 균체의 농도를 의미한다. S, P 및 X를 제외한 나머지 환경변수를 고정하면 식(1)의 비성장속도는 S, P 및 X만의 함수인 식(2)로 표현된다(11-13).

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = F(S, P, X) = f_1(S) \cdot f_2(P) \cdot f_3(X) \quad (2)$$

본 연구에서 수행한 발효실험의 초기균체농도는 대부분 10 g/L이하 이었으며 이 값은 균체의 비성장속도를 정지시키는 균체농도 210내지 320 g/L (14, 15)에 비하여 대단히 낮은 값이므로 본 연구에서는 균체농도가 비성장속도에 미치는 영향을 고려하지 않았으며 실제 발효실험결과를 분석하여 본 연구에서 수행한 발효실험의 균체농도 범위에서는 균체농도가 비성장속도에 영향을 미치지 아니함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 식 (2)의 균체비성장속도를 기질농도와 에탄올 농도만의 함수로 규정하고 다음식 (3) 및 (4)와 같이 $f_1(S)$ 는 Andrews식(16)을 $f_2(P)$ 는 Aiba식(17)을 사용하여 효모 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858의 비성장속도에 대한 수식을 완성하였다. 또한 완성된 수식의 계산값과 실험값사이의 상관관계를 비교 분석하여 완성된 수식이 실험값을 어느 정도 잘 대변하는지 검토하였다.

$$f_1(S) = \frac{\mu_{max} S}{(K_S + S)(1 + \frac{S}{K_I})} \quad (3)$$

$$f_2(P) = e^{-kP} \quad (4)$$

균체의 비성장속도와 기질농도사이의 함수관계

균체의 비성장속도와 기질농도 사이의 함수관계를 규명하기 위하여 초기 균체 농도를 0.7 g/L 이하로, 초기 당농도를 10 g/L내지 230 g/L범위에서 서로 다른 17가지 농도로 고정된 후 발효실험을 수행하였다. 발효시간에 따른 시료분석을 통하여 발효시간(t)과 당농도, 균체농도 및 에탄올농도사이의 함수관계 그래프를 얻었다. 이 결과로부터 각 초기 당농도에 대하여 발효시간에 따른 균체비성장속도와 P값을 구하여 에탄올 농도와 균체 비성장속도 사이의 함수관계를 도출하였다. 이 함수관계로부터 $P \rightarrow 0$ 까지 균체비성장속도를 외삽하여 각 초기 당농도에 대한 $P=0$ 에서의 균체비성장속도를 구하였다. 초기 균체농도를 0.7 g/L 이하로 고정하였으므로 위의 경우에 대한 균체비성장속도는 균체농도와 에탄올의 영향을 받지 않는 비성장속도라고 해석할 수 있다. 또한 기질의 저해영향을 무시하면 식(2)의 균체비성장속도는 식(5)의 Monod식으로 표현된다.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \quad (5)$$

알코올과 균체농도의 영향이 없는 균체비성장속도와 초기 당 농도사이의 실험결과가 Figure 1이다. 이 결과로부터 1/S과 1/μ을 각각 x축과 y축으로 한 Lineweaver-Burk plot를 수행하여 식(6)의 최대비성장속도 μ_{max}와 Monod상수 K_s로 각각 0.49 hr⁻¹와 19 g/L를 구하였다.

기질농도의 저해영향을 규명하기 위하여 식(3)을 다음식으로 변형시켰다.

$$\frac{\mu_{monod}}{g_1(S)} = \frac{\mu_{monod}}{\mu_{mea}} = 1 + \frac{S}{K_I} \quad (6)$$

위 식에서 μ_{mea}는 발효실험을 통하여 구한 각 초기당농도에 서의 실험값을 의미한다. μ_{monod}/μ_{mea}를 y축, S를 x축으로 하면 식(6)은 y축의 절편이 1이고 기울기가 1/K_I인 선형함수관계식이 된다 저해상수K_I를 구하기 위하여 Figure 1의 결과와 각 당농도에 대한 식(5)의 μ_{monod}값을 이용하여 μ_{monod}/μ_{mea}와 S사이의 함수관계를 x-y 평면에 도시하면 Figure 2와 같다.

Figure 2에 의하면 기질저해상수 K_I값은 139 g/L이나 식(6)의 S변수는 S-S_{max}=S-150으로 변형됨을 알 수 있다. 기질에 저해영향을 미치는 농도의 크기는 기질전체농도와 기질의 저해영향을 미치지 않는 최대당농도 150 g/L의 차이값으로 표현되며,

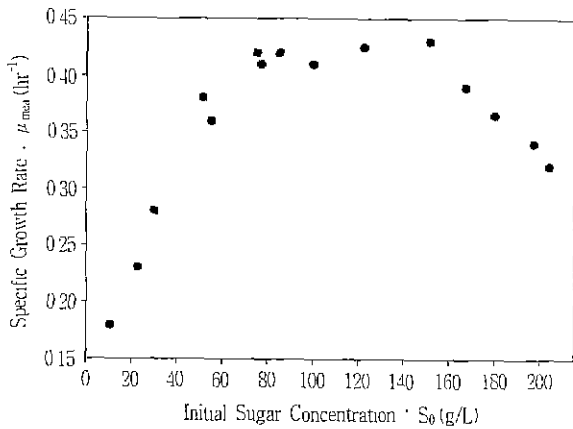


Figure 1. Specific growth rates vs. initial sugar concentrations

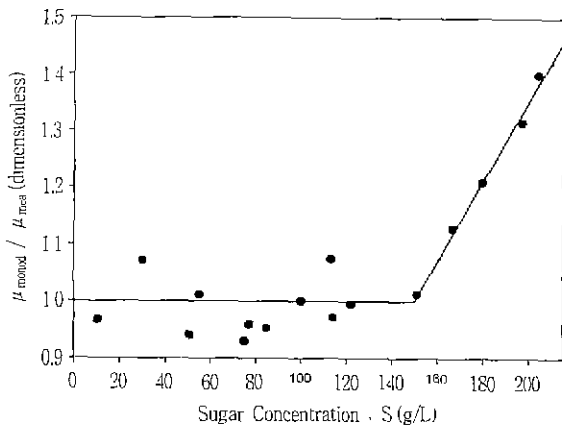


Figure 2. Ratios of specific growth rates of Monod's equation to measured rates vs Sugar concentrations

비성장속도와 기질농도사이의 함수관계식(3)은 다음 식(7)로 변형되었다.

$$\begin{aligned} \mu &= \mu(S) = g_1(S) \cdot g_2(0) \cdot g_3(0) \\ &= \frac{0.49 S}{(19 + S) \left(1 + \frac{S-150}{139}\right)} \end{aligned} \quad (7)$$

식(7)의 계산값이 실험값을 어느 정도 대변하는지를 확인하기 위하여 균체비성장속도 계산값 μ_{cal}과 실험값 μ_{mea}사이의 함수관계를 Figure 3에 도시하였다. μ_{mea}와 μ_{cal}사이의 상관계수는 0.97이며 대부분의 상관관계 점들이 μ_{mea}와 μ_{cal}사이의 대각선 위에 위치함을 알 수 있었다.

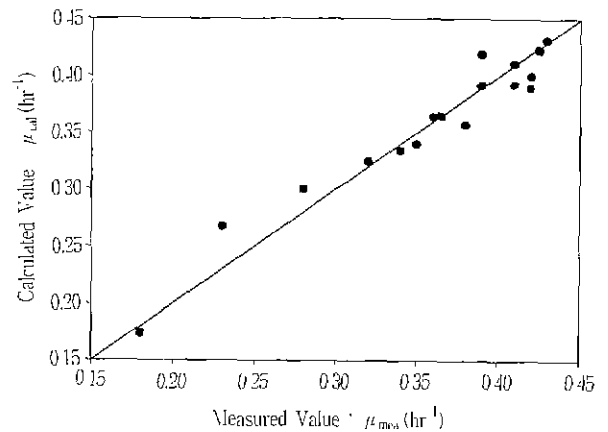


Figure 3. Correlation between measured specific growth rates and calculated specific growth rates

균체 비성장속도와 에탄올 농도사이의 함수관계

식(2), (4) 및 (7)로부터 균체비성장속도와 기질농도 및 에탄올 농도사이의 함수관계식을 정리하면 다음식과 같이 된다.

$$\begin{aligned} \mu &= \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = f_1(S) e^{-kP} \\ &= \left[\frac{0.49 S}{(19 + S) \left(1 + \frac{S-150}{139}\right)} \right] e^{-kP} \end{aligned} \quad (8)$$

식(8)의 양변을 f₁(S)로 나누고 양변에 log를 취하면 식(8)은 다음식으로 변형된다.

$$\ln \left(\frac{\mu_{mea}}{f_1(S)} \right) = -kP \quad (9)$$

균체농도가 0내지 10 g/L범위의 값이고, 알코올농도가 0내지 60 g/L 사이의 값이며, 당농도가 10내지 230 g/L사이의 값인 발효 조건에서 수행한 실험결과로부터 균체비성장속도 μ_{mea}를 구하고 이때의 S와 P값으로부터 y축을 ln(μ_{mea}/μ(S))로, x축을 P로 한 함수관계점을 도시하면 Figure 4와 같다. 이 결과로부터 기울기 k를 구하면 k=-0.035가 되며 P축의 절편은 P=2가 되게 된다. 따라서 본 연구의 균주에 대한 식(9)는 다음과 같이 된다.

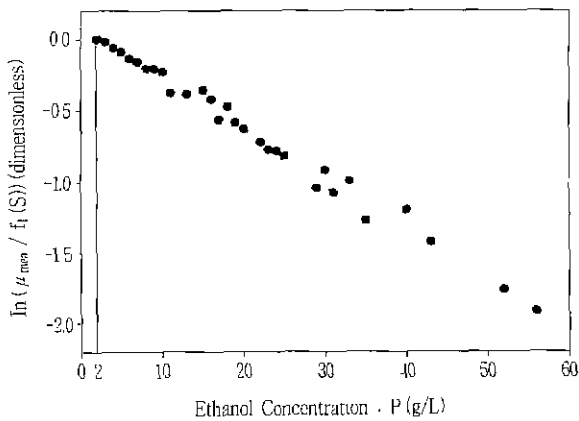


Figure 4. Logarithmic values of ratios of specific growth rates vs. Ethanol concentrations. μ_{mea} : measured specific growth rates, $f_1(S) = \frac{0.49S}{(19+S)(1+\frac{S-150}{139})}$

$$\ln\left(\frac{\mu_{mea}}{f_1(S)}\right) = -0.035(P-2) \quad (10)$$

위 식에 의하면 알코올농도가 2 g/L이하의 범위인 경우에는 알코올이 균체의 비성장속도 영향을 미치지 않으나 알코올농도가 2 g/L를 초과한 범위에서는 식(10)의 함수관계식에 따라서 알코올이 균체의 비성장속도에 영향을 주게 된다.

식(2), (7) 및 (10)으로부터 본 연구의 균주에 대한 비성장속도식을 완성하면 식(11)과 같이 된다.

$$\mu = f_1(S) \cdot f_2(P) = \left[\frac{0.49S}{(19+S)\left(1+\frac{S-150}{139}\right)} \right] e^{-0.035(P-2)} \quad (11)$$

식(11)의 계산값과 실험값 사이의 함수관계가 1 대 1의 대응 관계에 있는지 이 값들이 나타내는 차이값의 크기가 어느 정도 인지를 분석하여 보았다. Figure 5는 균체비성장속도에 대한 실험치 μ_{mea} 를 x축에 식(11)의 계산치 μ_{cal} 를 y축에 도시한 결과이다. 대부분의 점들이 x-y평면의 대각선 주위에 몰려 있어서 식(11)에 의한 균체비성장속도 계산값은 실험치를 잘 대변하

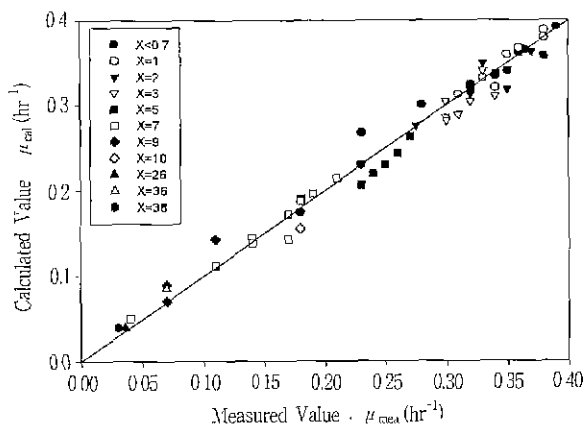


Figure 5. Correlation between measured specific growth rates and calculated specific growth rates

고 있다고 평가할 수 있다. 균체 비성장속도에 대한 계산치와 실험치 사이의 차이를 정량적으로 평가하기 위하여 70여개의 비성장속도에 대한 값을 다음식에 대입하여 평균오차 퍼센트를 구하여 보았다

$$\epsilon_{av}(\%) = \frac{1}{n_t} \left[\sum_i \frac{|\mu_{mea,i} - \mu_{cal,i}|}{\mu_{mea,i}} \times 100 \right] = 5.96(\%) \quad (12)$$

본 연구에서 도출해낸 비성장속도식에 의한 계산값은 실험치에 대하여 오차 5.96 %내외에 분포되어 있으며 이들 사이의 상관계수는 0.98을 나타내었다.

요 약

Andrew식과 Aiba식을 조합하여 에탄올 생산균주인 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858의 비성장속도를 당농도와 에탄올 농도의 함수로 표현하였다. 기질의 저해영향을 받지 않는 최대 당농도 S_m 은 150 g/L이며 기질의 저해영향은 기질농도 S 와 S_m 의 차이인 $S-S_{max}$ 항의 함수로 표현되었다. 최대 비성장속도 μ_{max} 은 0.49 hr⁻¹, Monod상수 K_s 는 19 g/L, Andrew식의 기질저해상수 K_i 는 139 g/L이었다. 또한 비성장속도에 영향을 미치지 않는 최대알코올농도 P_m 이 존재하였으며 그 값은 2 g/L이었다. 따라서 Aiba식에서 비성장속도에 영향을 미치는 에탄올 농도항은 $P-P_m$ 으로 표현되었다. 본 연구의 알코올생산균주에 대한 비성장속도의 완성된 수식은 다음과 같으며 이 수식에 의한 계산값은 평균오차 6% 내외의 범위에서 실험값과 일치하였다

$$\mu = \left[\frac{0.49S}{(19+S)\left(1+\frac{S-150}{139}\right)} \right] e^{-0.035(P-2)}$$

$$0 < S \leq 150 \text{ g/L}, \quad \frac{S-150}{139} = 0$$

$$0 < P \leq 2 \text{ g/L}, \quad e^{-0.035(P-2)} = 1$$

감 사

본 연구는 1996학년도 인하대 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Philips, J. A. 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, pp. 69-96, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Albertson, P. A (1985), Partition of Cell Particles and Macromolecules, pp. 231-235, John Wiley and Sons, Inc
- Mímer, M. and G. Goma (1982), Ethanol Production by Extractive Fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1565-1579.
- Yang, X., and G. T. Tsao (1995), Enhanced Acetone-

- Butanol Fermentation Using Repeated Fed-Batch Operation Coupled with Cell Recycle by Membrane and Simultaneous Removal of Inhibitory Products by Adsorption. *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 444-450.
5. Kyung, K. H. and P. Gerhardt (1984), Continuous Production of Ethanol by Yeast "Immobilized" in a Membrane-Contained Fermentor, *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 252-256.
 6. Garcia, A., E. L. Iannotti, and J. L. Fisher (1986), Butanol Fermentation Liquor Production and Separation by Reverse Osmosis, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 785-791.
 7. Frank, G. T and K. K. Sirkar (1985), Alcohol Production by Yeast Fermentation and Membrane Extraction, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **15**, 621-631.
 8. Larrayoz, M. A. and L. Puigjaner (1987), Study of Butanol Extraction Through Pervaporation in Acetobutylic Fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 692-696.
 9. Lee, C. W. and H. N. Chang (1987), Kinetics of Ethanol Fermentation in Membrane Cell Recycle Fermentors, *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1105-1112.
 10. Netto, C. B. and G. Goma (1987), Ethanol Fermentation by Flocculent Yeast : On the Kinetics of Biomass Accumulation, *Biotechnol Bioeng.*, **30**, 320-324
 11. Luong, J. H. T (1985), Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 280-285.
 12. Luong, J. H. T (1987), Generalization of Monod Kinetics for Analysis of Growth Data with Substrate Inhibition, *Biotechnol Bioeng.*, **29**, 242-248.
 13. Dourado, A., G. Goma, U. Albuquerque and Y. Sevely (1987), Modeling and Static Optimization of the Ethanol Production in a Cascade Reactor. I. Modeling, *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 187-194.
 14. Lee, C. W. (1986), High Density Cell Culture of *S. cerevisiae* and Recombinant *E. coli* in a Membrane Cell Recycle Fermentor, Ph.D. Thesis, KAIST.
 15. Jarzebski, A. B., J. J. Malinowski and G. Goma (1989), Modeling of Ethanol Fermentation at High Yeast Concentrations, *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1225-1230.
 16. Andrews, J. F (1968), A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibitory Substrates, *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 707-711.
 17. Aiba, S and M. Shoda (1969), Reassessment of the Product Inhibition in Alcohol Fermentation, *J. Ferment. Technol Jpn.*, **47**, 790-796.