

감 즙으로부터 에탄올 생산을 위한 *Saccharomyces cerevisiae*의 고정화 조건

이상원 · 손미예* · 서권일**

진주산업대학교 미생물공학과, 경상대학교 식품영양학과*, 순천대학교 식품영양학과**

Immobilized Condition of *Saccharomyces cerevisiae* for Ethanol Production from Persimmon Juice.

Sang Won Lee, Mi Yae Shon* and Kwon il Seo**

Department of Microbiological Engineering, Chinju National University

* Department of Food and Nutrition, Gyeongsang National University

** Department of Food and Nutrition, Suncheon National University

Abstract

The immobilized culture system of *Saccharomyces cerevisiae* was examined to improve the efficiency of vinegar production from persimmon juice. Optimum concentration of Na-alginate for the immobilization was 2%. When the leakage of yeast from gel beads was checked by turbidity of culture medium with varying concentrations of Na-alginate from 1 to 4%, turbidity of culture medium increased from 8 hrs of cultivation with 1% Na-alginate concentration showing optical density of 0.82 at 20 hrs. However, the increase in turbidity of culture medium was slow with 2-4% Na-alginate showing optical density of 0.55-0.58 at 20 hrs. Microscopical analysis of gel matrix showed that the immobilized yeast was grown well regardless of Na-alginate concentration. Optimum size of gel bead and amount of inoculation were 2-3 mm and 33mg, respectively. For ethanol production aerobic cultivation for 12hrs using cotton plug followed by anaerobic cultivation using silicon plug equipped with a check valve was the most effective.

Key words : persimmon juice, immobilization, Na-alginate, ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*

서 론

발효공업에 있어서 미생물을 이용하여 알코올, 유기산, 아미노산, 항생물질 및 효소 등과 같은 유용물질 생산을 효율적으로 행하기 위해서 지금까지 여러 가지 방법이 검토되어져 왔다(1-4). 그 중에서도 고분자의 담체내에 효소나 미생물 세포를 그대로 고정화하는 포괄고정화법은 방법이 간단하고, 미생물을 고정

화시킨 상태에서 세포의 증식이 가능하며, 장시간 이용이 가능하기 때문에 많은 연구가 되어져 왔다(5-7).

본 연구자들은 biomass의 물질전환을 효율적으로 하기 위해서 성질이 전혀 다른 호기성 곰팡이와 혐기성 세균으로 구성된 새로운 혼합고정화 배양법을 개발하여 생 전분으로부터 에탄올생산을 행하는데 적용시켜 이미 성공한바있다(8-10). 이 고정화시스템의 특징은 기질로부터 생성된 glucose가 고정화된 두 미생물에 의해서 서로 경쟁적으로 소비되고, 혐기성 세균에 의해서 빠르게 에탄올로 전환되기 때문에 배양액 중에 glucose의 축적이 거의 보이지 않기 때문

Corresponding author : Sang Won Lee, Department of Microbiological Engineering, Chinju National University, Chinju, Kyeongnam, 660-758, Korea

에 외부 잡균의 오염 빈도가 현저하게 적게 발생하는 장점을 갖고있다.

일반적으로 전분을 기질로 하여 식초를 생산할 때에는 곡 또는 시판효소에 의해서 당화 시키고, 이 당화액을 효모에 의해서 에탄올 발효를 시킨 후 초산균에 의해서 초산발효를 행하는 3공정이 필요하다. 이러한 공정에는 각 단계의 최적조건이 필요하기 때문에 제조 관리가 복잡하게 되고, 제조기간도 장기화되고 있다.

따라서 본 연구에서는 이 고정화시스템을 식품산업에 적용시켜 그 유용성을 더욱 명확히 밝힐 목적으로 감즙으로부터 직접 식초생산을 행하기 위한 최적 담체 농도, gel beads의 형성조건, 효모의 최적 접종량 및 산소공급 시간 등이 에탄올 생산에 미치는 영향에 관한 기초적인 연구를 행하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용한 감은 1997년 가을에 경상남도 진영지방에서 수확한 단감 *Diospyros kaki*, L.을 냉동창고에 보관하면서 사용하였다.

사용 균주 및 배지

에탄올 생산 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* NFR1 3002를 사용하였다. 효모의 배양을 위한 배지성분은 3.0% glucose, 0.8% yeast extract, 0.2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.8% KH_2PO_4 , 0.4% $(NH_4)_2SO_4$ 를 함유한 액체배지를 사용하였다.

고정화 및 배양

효모의 고정화배양은 액체배지에서 32℃, 20시간 전 배양시킨 배양액을 8,000×g에서 10분간 원심분리하여 멸균수로 2번 세척한 다음, 그 균체를 멸균수에 재현탁시킨 후 1~4%의 Na-alginate용액에 정량적으로(건조 균체량 : 8.3mg~42mg) 첨가하고, 본 연구에서 제작한 고정화 장치(Fig. 1)를 이용하여 0.1M $CaCl_2$ 용액 150ml 중에 떨어뜨려 2시간동안 온화하게 교반하면서 gel화를 시킨 다음(직경 : 0.76~5mm), 그 중의 35g를 멸균한 감즙액 200ml를 함유한 500ml 삼각플라스크로 옮겨 32℃로 28시간 동안 배양하였다.

Gel beads의 크기는 $CaCl_2$ 용액에 떨어뜨리는 속도(O_2 압력에 좌우)에 의해서 인위적으로 조절이 가능하게 하였다.

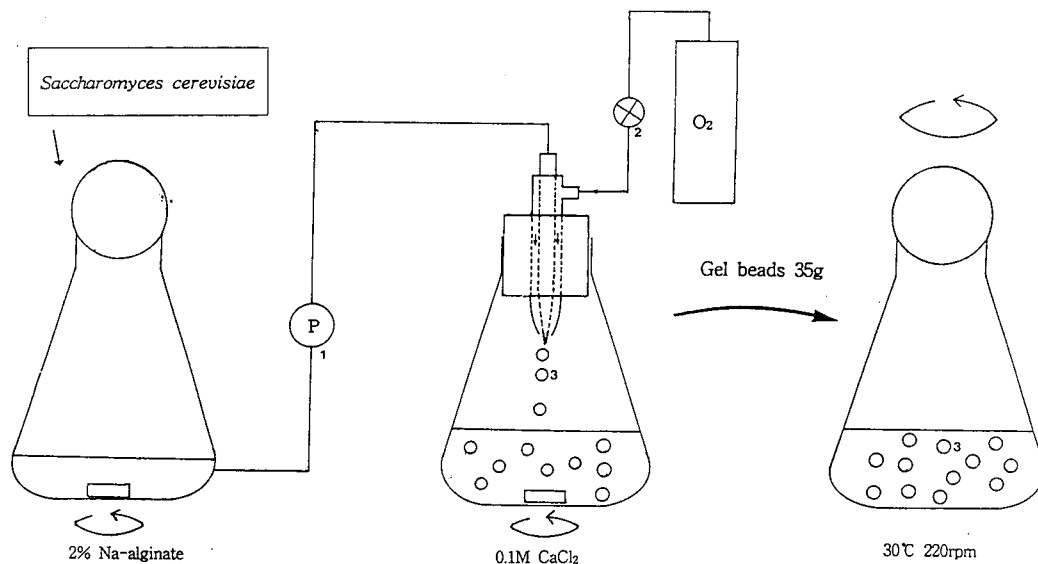


Fig. 1. A diagram of immobilized culture system for ethanol production.
1: peristaltic pump, 2: flowmeter, 3: Ca-alginate gel beads.

산소 공급의 조절

호기적 배양은 면전을 사용하였으며, 혐기적 배양은 본 연구실에서 제작한 check valve가 부착된 실리콘 plug(11)를 이용하였다. 혐기적 조건을 위한 산소공급 차단은 배양개시 후, 일정시간이 경과하였을 때 면전을 check valve가 부착된 실리콘 plug로 교환함으로써 이루어지게 하였는데, check valve의 역할은 외기의 산소유입이 일어나지 않도록 하면서 플라스크 내부가 고압이 되지 않도록 배양액 중에 발생된 탄산가스를 이 valve를 통하여 외부로 방출되도록 하였다.

성분분석 및 균수측정

배양액 중의 에탄올 농도는 8,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액 2μl를 GLC(Yanaco G180)로 측정하였다. 분석조건은 chromosorb 105(60~80mesh) column (3.4mm i.d.×2m) ; injector temp., 210℃ ; column temp. 210℃ ; detector, FID로 하였으며, 내부표준 물질로서는 n-propanol(和光純藥)을 시료 3ml당 120μl를 첨가하여 사용하였다. Glucose 농도는 mutalotase · GOD법(Glucose-C II-Test Wako, 和光純藥)을 이용하여 정량 하였고, 총 당량은 phenol-sulfuric acid법으로 정량 하였다(12). Gel bead로부터 누출 균수의 관찰은 고정화한 gel bead를 최적 온도에서 진탕 배양하면서 경시적으로 시료를 채취하여 UV/Vispectrophotometer로 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

Gel bead의 표면 및 내부관찰

Gel bead 단편의 관찰은 배양이 끝난 gel bead를 절제하여 위상차 현미경(Carl Zeiss Jene, Germany)으로 배율 200배에서 행하였다(1). 전자현미경을 이용하여 gel bead 중심부의 균주 관찰을 위해서는 배양이 끝난 gel bead를 증류수로 3번 세척하고, 2.5% glutaraldehyde 용액에 하룻밤, 1% OsO4 용액에 2시간 방치하였다. 이를 다시 증류수로 세척한 후 30~100% 에탄올 용액에 담구어 탈수시킨 후 아세톤에 담구어 건조시켜 현미경 촬영 시료로 사용하였다.

결과 및 고찰

최적 담체 농도

담체로 사용한 Na-alginate 농도가 고정화된 효모에 미치는 영향의 검토는 효모를 고정화한 gel beads를 32℃, 210rpm으로 진탕배양하면서 배양액 중으로 누출되는 균수의 흡광도를 660nm에서 경시적으로 측정하여 나타냈다(Fig. 2). 담체로 사용한 Na-alginate의 각

농도에서 효모는 고정화되었지만 배양이 경과됨에 따라 고정화된 효모의 누출 현상은 차이를 나타내었다. 대조구로 사용한 free culture 시험구는 배양초기부터 흡광도가 급격하게 증가하다가 배양 12시간 이후부터는 완만하였다. 효모를 고정화시킨 gel beads를 접종한 시험구에서는 사용된 담체의 농도에 관계없이 거의 직선적으로 흡광도가 증가하여 1, 2, 및 3%의 Na-alginate 농도에서는 배양 20시간째까지 배양하여도 흡광도 값이 각각 0.55, 0.57 및 0.58를 나타내어 큰 차이를 보이지 않았지만, 1%의 Na-alginate 농도에 고정화한 시험구에서는 배양 8시간째부터 배양액의 탁도가 흐려지는 것이 관찰되기 시작하여 배양 20시간째에는 0.82의 높은 흡광도 값을 나타내었다. 이러한 결과는 배양초기에 gel beads로부터 누출된 효모가 배지 중에서 증식했기 때문으로 사료된다.

배양이 끝난 후, 각 시험구의 gel beads를 무작위로 채취하여 gel beads 내부의 효모생육 상태를 전자현미경으로 관찰한 결과(Fig. 3), 접종한 효모는 Na-alginate의 농도에 관계없이 gel beads의 전체에 고른 분포상태를 나타내어 gel beads의 중심부에서도 잘 생육하고 있음을 알 수 있었다. 또한 gel beads의 형태도 아주 안정하게 배양초기의 gel beads 형태를 유지하였다. 이상의 결과로 이후의 연구에서는 2%의 Na-alginate 농도를 본 실험에 사용하였다.

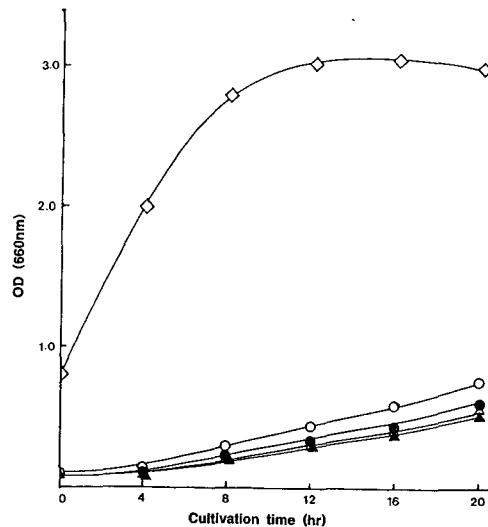


Fig. 2. Effect of Na-alginate concentration on leakage cell of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized from gel beads during fermentation. ○—○: 1% Na-alginate. ●—●: 2% Na-alginate. △—△: 3% Na-alginate. ▲—▲: 4% Na-alginate. ◇—◇: free culture.

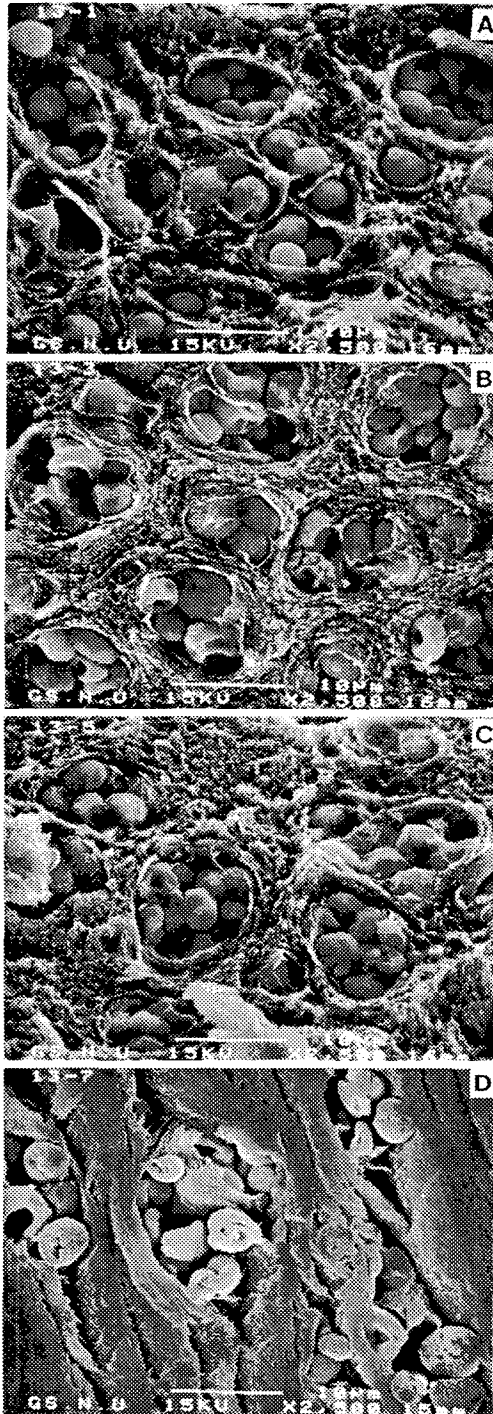


Fig. 3. Electromicroscopic photographs of cross sections from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized with gel beads of Na-alginate.

A: 1% Na-alginate. B: 2% Na-alginate.
C: 3% Na-alginate. D: 4% Na-alginate.

Gel beads의 크기가 에탄올 생산에 미치는 영향

2%의 Na-alginate 농도에 효모를 25mg 집중하고 gel beads의 크기를 0.76mm, 1.0mm, 2.0mm, 3.0mm, 5.0mm로 조절하면서 각각 제조한 후(Fig. 4), CaCl₂ 용액에서 경화시킨 각 gel beads 35g를 200ml의 감즙액에 접종하여 에탄올 생산량을 검토하였다(Fig. 5).

본 연구에서 제작한 고정화 장치(Fig. 1)를 이용하여 제조한 gel beads는 Fig. 4에서와 같이 크기가 매우 균일하고, 형태도 아주 안정하였다.

Gel beads의 크기에 따라 에탄올의 생산량은 큰 차이를 보이지 않았지만, gel beads의 크기가 적을수록 배양초기에 에탄올의 생산 속도가 빠르게 나타났다. Gel bead의 크기가 5.0mm인 경우는 배양 8시간부터 20시간까지 에탄올의 생산속도가 급격히 증가하다가 그 이후부터는 천천히 감소하는 경향을 보였다. 3.0mm인 경우에는 배양 28시간까지 에탄올의 생산속도가 거의 일정하게 증가하여 배양 28시간째에 약 12g/l의 에탄올을 생산했다. 이와 같은 결과는 gel beads의 크기가 용존산소의 공급에 영향을 미치기 때문으로 추측된다. 즉, gel beads의 크기가 클수록 gel beads의 중심부에 생육하는 효모에 용존산소의 공급이 불충분하기 때문에 효모의 생육이 느려진 결과로 사료된다. Kurosawa 등(5)의 연구 결과에 의하면 포괄고정화의 경우, *Aspergillus awamori*의 고정화 균체를 보통의 산소공급 조건에서는 얻을 수 없는 높은 용존 산소농도(0.218 mmol/l = 7ppm)로 배양하여도 산소는 gel bead의 표층에서부터 불과 300 μ m 정도까지 이동하는 것으로 보고하고 있다. 이러한 연구 보고를 기초로 할 때 효모 균체를 이용한 에탄올 생산에서 gel beads의 크기는 2~3mm정도가 적당한 것으로 사료된다.

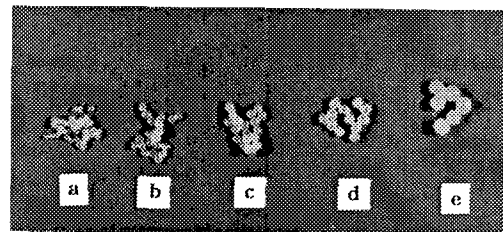


Fig. 4. Photographs of whole immobilized gel beads size.
a: 0.76mm, b: 1mm, c: 2mm, d: 3mm, e: 0.76mm.

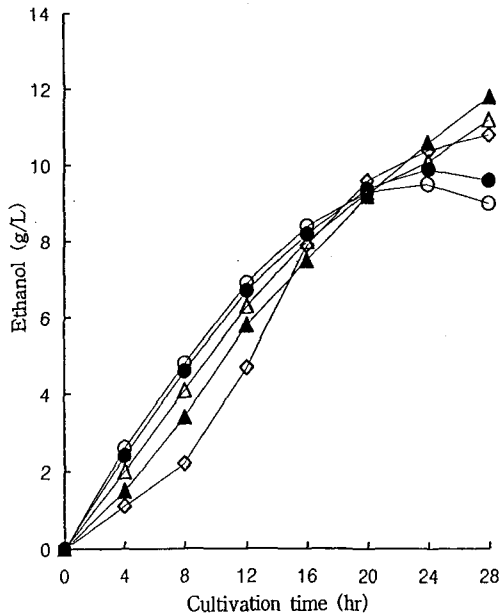


Fig. 5. Effect of gel beads size on ethanol production from persimmon juice by an immobilized culture system.
 ○: 0.76mm. ●: 1mm. △: 2mm.
 ▲: 3mm. ◇: 5mm.

효모 최적 접종량

접종하는 효모의 초기 균수를 8.3mg, 16mg, 25mg, 33mg 및 42mg으로 변화시키면서 2% Na-alginate에 고정화시킨 후, 형성된 gel beads를 감 즙액 200ml를 함유한 500ml 삼각플라스크에 접종하여 발효시간에 따른 에탄올 생산량을 측정하여 Fig. 6에 나타냈다. 모든 시험구에서 고정화된 효모는 감 즙액으로부터 에탄올을 생산할 수 있었으나 그 접종량에 따라 에탄올의 생산량은 큰 차이를 보였다. 효모의 균체를 8.3mg, 16mg, 25mg 고정화한 시험구에서는 배양 0시간부터 28시간까지 거의 같은 속도로 에탄올이 생산되어 배양 24시간째에 6.2g/l, 6.7g/l 및 8.5g/l을 생산하였다. 그러나 33mg 및 42mg의 효모를 접종한 시험구에서는 배양초기에 에탄올 생산량이 급격히 증가하고 배양 16시간 이후에는 에탄올의 생산속도가 천천히 떨어지는 현상을 보였다. 특히 33mg의 효모를 고정화한 시험구에서는 배양 28시간째에 약 17g/l의 에탄올 생산량을 나타내어 16mg를 고정화했을 때보다 약 2배 높은 에탄올 생산량을 나타냈다.

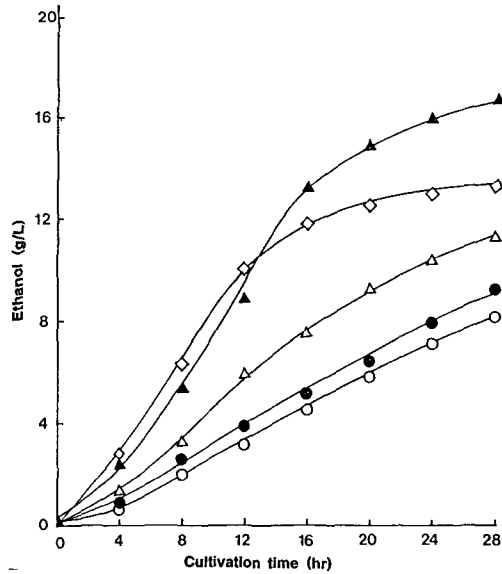


Fig. 6. Effect of initial cell concentration of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol production from persimmon juice by an immobilized culture system.
 ○: 8.3mg. ●: 16mg. △: 25mg.
 ▲: 33mg. ◇: 42mg.

산소의 공급이 에탄올 생산에 미치는 영향

에탄올 발효는 혐기적 조건에서 이루어지기 때문에 배양 도중에 면전으로 배양하는 호기적 조건을 혐기적 조건으로 전환하므로 호기적 조건인 배양 초기에는 효모의 균체 증식을 왕성하게 하고, 혐기적 조건인 배양 후기에는 고정화된 효모로부터 에탄올 생산을 촉진시켜 고정화 효모의 균체 누출과 배양액의 pH변화를 억제하게 된다. 이러한 점을 고려하여 본 연구자들은 산소의 공급을 조절하기 위하여 배양 초기에는 면전을 사용한 호기적 배양을 실시한 후, 0hr, 12hr, 24hr 및 36hr에 본 연구실에서 특수 제작한 check valve가 부착된 실리콘 plug로 교체시켜 혐기적 배양을 실시한 결과(Fig. 7), 산소공급 시간이 길어질수록 에탄올의 생산량은 감소하였다.

배양 0시간째부터 check valve가 부착된 실리콘 plug를 사용하여 혐기적 배양을 행한 시험구는 배양 84시간째에 24g/l의 에탄올만이 생산되고, 호기적 배양조건인 면전만으로 배양을 행한 시험구에서는 배양 60시간째에 약 20g/l의 에탄올이 생산되었다.

이러한 결과는 효모의 균체 성장이 불충분하거나, 반대로 과잉 균체 성장으로 인하여 일어난 현상으로 추측된다. 그러나 배양 12, 24, 36시간째까지 면전으로 호기적 배양을 행하고, 그 이후부터는 check valve가 부착된 실리콘 plug를 이용하여 혐기적 조건으로

전환하여 배양한 시험구는 에탄올의 생산속도가 급격히 증가하여 48시간째에 25, 21, 19g/l의 에탄올이 생산되었다. 특히 배양 12시간째부터 배양조건을 혐기적 조건으로 전환한 시험구는 60시간째까지 배양하여도 에탄올의 생산 속도가 떨어지지 않고 계속 증가하여 배양 84시간째에는 약 35g/l의 에탄올이 생산되어 면전으로 배양한 호기적 조건보다 약 2배 높은 에탄올을 생산하였다.

이상의 결과는 Dostalek와 Haggstron(13)이 *Saccharomyces fibulinger*와 *Zymomonas mobilis*를 혼합배양하여 수용성 전분으로부터 에탄올을 생산하는 연구에서 배양계의 진탕속도를 배양 중에 바꾸어 산소 공급량을 조절함으로써 30g/l의 전분에서 9.7g/l의 까지 에탄올 생산을 증가시켰다는 연구와 유사하였다.

효모 균수를 검토한 결과, 1%의 농도에서는 배양 8시간째부터 배양액의 탁도가 흐려지는 것이 관찰되어 배양 20시간째에 0.82의 흡광도를 나타내었다. 그러나 2-4%에서는 거의 변화가 없었다. 배양이 끝난 후, 전자현미경으로 gel beads내부의 균주 생육상태를 관찰한 결과 고정화한 효모는 Na-alginate의 농도에 관계없이 왕성하게 생육하였다. Gel beads의 크기는 2-3mm정도가 최적이었다고, 효모의 최적 접종량은 약 33mg이었다. 효율적인 에탄올 생산을 위한 산소공급 시간을 검토한 결과, 배양초기부터 12시간까지는 면전으로 호기적 배양을 행하고, 그 이후부터는 check valve가 부착된 실리콘 plug를 사용하여 혐기적 배양을 행하는 것이 효과적이었다.

참고문헌

1. Abdel-Halim, M., El-sayed, M. and Rehm, H.J. (1986) Morphology of *Penicillium chrysogenum* strain immobilized in calcium alginate bead and used in penicillin fermentation. *Applied Microbiology Biotechnol.*, **24**, 89-94
2. Fukada, K., Teramoto, Y., Goto, M. and Sakamoto, J. (1992) Specific inhibition by raw starch by fungal glucoamylase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 556-559
3. Mori, Y. and Inaba, T. (1990) Ethanol production from starch in a pervaporation membrane bioreactor using *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 849-853
4. Kurosawa, H., Ishikawa, H. and Tanaka, H. (1988) L-Lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*. *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 183-187
5. Kurosawa, H., Matsumura, M. and Tanaka, H. (1988) Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cell. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 926-932.
6. Shinmyo, A., Kimura, H. and Okada H. (1982) Physiology of α -amylase production by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 7-12.
7. Chen, C., Dale, M.C. and Okos, M.R. (1990) Minimal nutritional requirements for immobilized yeast. *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 993-1001
8. Sang-Won Lee, Tomoharu Ebata, Ying-Chun Liu, and Tanaka, H. (1993) Co-immobilization of three

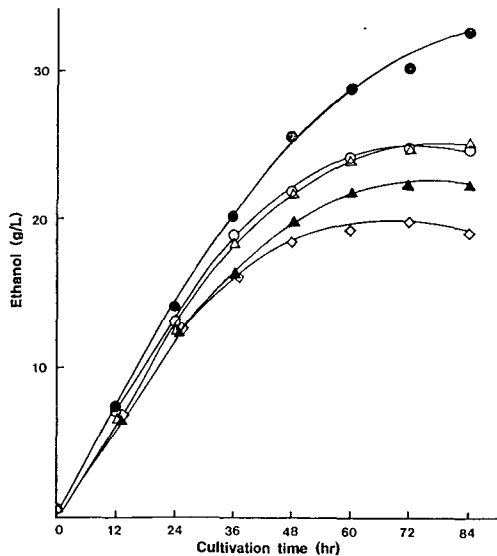


Fig. 7. Ethanol production from persimmon juice by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized with gel beads of 2% Na-alginate.

- : anaerobic culture at 0hr.
- : anaerobic culture at 12hr.
- △: anaerobic culture at 24hr.
- ▲: anaerobic culture at 36hr.
- ◇: aerobic culture.

요약

고정화 배양계를 이용하여 감 즙으로부터 식초생산을 효율적으로 행하기 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*의 고정화 형성조건을 검토하였다. 고정화를 위한 최적 Na-alginate의 농도는 2%이었다. 담체의 농도를 1-4%로 변화시키면서 gel beads로부터 누출되는

- strains of microorganisms and its application in ethanol production from raw starch under unsterile conditions. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 36-42.
9. Lee, S.W., Pack, S.K., Shon, B.S., Choi, S.C., Seo, K.I., Sung, N.K. and Kim, H.C. (1995) Optimal conditions of co-immobilized mixed culture system with *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*. *J. Korean soc. Food Nutr.*, **24**, 803-810.
 10. 이상원, 조용운, 김홍출, 박석규, 성낙계 (1997) *Aspergillus awamori* 와 *Zymomonas mobilis*로 구성된 혼합 고정화 배양계의 에탄올 생산에 미치는 Neupectin-L의 영향. *한국 농화학회지*, **40**, 89-94
 11. 이상원, 서권일, 박석규, 손봉수 (1995) *Aspergillus awamori* 와 *Zymomonas mobilis*로 구성된 혼합 고정화 배양계의 에탄올 생산에 미치는 Triton, PVA 및 PEG의 영향, *순천대학교 기초과학연구지*, **6**, 79-88
 12. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, P., Roberts A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356
 13. Dostalek, M. and Haggstron, M.H. (1983) Mixed culture of *Saccharomyces fibulinger* and *Zymomonas mobilis* on starch use of oxygen as a regulator. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 269-275
-
- (1999년 3월 18일 접수)