

돼지감자 분말을 이용한 고정화 *Kluyveromyces marxianus* sp.의 에탄올 연속발효

신지현¹ · 최언호*

서울여자대학교 식품과학과, ¹일양약품(주) 중앙연구소

Continuous Ethanol Fermentation by Immobilized *Kluyveromyces marxianus* F043 Using Jerusalem Artichoke Powder

Ji-Hyun Shin¹ and Eon-Ho Chol*

Department of Food Science, Seoul Woman's University, Seoul 139-744, Korea

¹Central Institute of Reserch, Il Yang Pharmaceutical Co. Ltd., Yongin, 449-900, Korea

Abstract — To produce ethanol from Jerusalem artichoke powder efficiently, *Kluyveromyces marxianus* F043 cells were encapsulated in 2% sodium alginate and were cultured in a continuous reactor to investigate the fermentation properties. Immobilized *K. marxianus* F043 cells were activated for 48 hours in a fermentor for continuous ethanol production. The culture in a CSTR using a Jerusalem artichoke substrate treated with 2% cellulase showed a decrease in ethanol concentration and an increase in residual saccharide concentration with a increasing dilution rate. Optimum conditions for high ethanol productivity and low residual saccharide output were clarified to be given at a dilution rate of 0.2 h⁻¹ and a Jerusalem artichoke medium concentration of 75 g/l. Ethanol productivity of 3.1 g/l·h and saccharide utilization of 62.6% were obtained under the optimum condition. When the fermentation was performed for 3 weeks under these conditions, the effluent medium showed stable ethanol concentrations of 16.3~17.9 g/l and viable cells of 6.60~7.16 log cells/ml without contamination. Trace amounts of methyl, *n*-propyl, *iso*-butyl, *iso*-amyl alcohols besides ethanol were detected.

여러 형태의 대체에너지 개발중 bio-conversion에 관한 연구가 최근에 각광을 받고 있다(1). Biomass를 이용한 에탄올 생산의 원료로 가능성 있는 돼지감자 (Jerusalem artichoke : *Helianthus tuberosus* L.)는 탄수화물의 수율이 타작물에 비하여 높고 독특하게 fructose 중합체인 inulin으로 구성되어 있다. 본 연구실에서 분리(2)한 *Kluyveromyces marxianus* F043은 inulin을 당화하기 위한 전처리 공정을 거치지 않고 직접 inulin으로부터 에탄올을 생산한다.

전통적인 에탄올 발효공정은 회분식 방법이 이용되고 있으나, 발효조건이 계속 변화하는 단점을 가지고 있고, 미생물의 성장조건을 일정하게 한 CSTR (continuous stirred-tank reactor)은 회분식 발효조에 비하여 에탄올 생산성을 증가시키나, 발효조의 출구를 통하여 미생물이 연속적으로 손실되는 것과 기질용

액의 농도를 낮추어 운전하여야 하는 단점을 가진다 (3). 그러므로 에탄올의 생산성을 증가시키기 위한 방법으로 세포를 불활성 담체나 gel에 고정화시킨 후에 발효를 연속적으로 수행하는 것이 연구되어 왔다. 고정화 연속발효는 발효조 부피에 대한 세포의 중량이 회분식 발효조보다 높아서 에탄올 생산성을 증가시킬 수 있고 세포를 제거하거나 재순환시킬 필요가 없으므로 생산물을 회수하는 공정이 보다 효율적이며 기질의 유속으로 발효조내의 kinetics를 최적화할 수 있다(4-6).

본 연구에서는 전보(7, 8)의 결과를 토대로 *K. marxianus* F043 균체를 sodium alginate에 고정화하고 CSTR에 적용시켜 돼지감자 분말을 기질로 에탄올 발효특성과 발효공정의 최적조건을 조사하였다.

재료 및 방법

Key words: Ethanol fermentation, immobilization, *Kluyveromyces marxianus*, continuous culture
*Corresponding author

사용균주

본 연구실에서 분리(2)한 *K. marxianus* F043을 사면배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양 후 4°C에서 보관하였으며 1주일 간격으로 계대하여 사용하였다.

효모의 고정화

YPD(1l 수용액 중 yeast extract 10 g, peptone 20 g, dextrose 20 g) 액체배지에 *K. marxianus* F043을 접종하여 30°C에서 24시간 배양하고 3,000 rpm에서 3분 동안 원심분리시켜 상정액을 제거한 후 YPD 액체배지와 동량의 증류수에 균체를 섞어 전체 alginate 용액의 20%가 되는 효모 현탁액을 만들었다. 이 현탁액과 2% sodium alginate(Showa) 용액을 잘 혼합하여 균일하게 만든 후 peristaltic pump(EYELA MP-3, Japan)를 사용하여 2% CaCl₂ 용액에 방울 상태로 떨어뜨리면서 alginate bead를 제조하였다. Bead의 직경은 공기의 유속을 조절하여 2 mm로 만들었다. 견고성을 부여하기 위해 효모가 고정화된 alginate bead를 2% CaCl₂ 용액에 24시간 담그어 놓은 뒤 발효배지로 옮겼다.

발효기질

서울여자대학교 농장에서 가을에 수확한 야생 돼지감자와 강원도 김화에서 수확한 야생 돼지감자를 수세하여 약 1 mm 정도로 얇게 절간한 다음 24시간 풍건하고 50°C에서 열풍건조하여 분말화한 후 2:3의 비율로 혼합하여 냉동고(-20°C)에 보관하고 121°C에서 15분간 가압멸균하고 고정화 효모의 mass transfer를 향상시켜 에탄올 발효력을 높이고 연속발효시 생산배지의 유동성을 좋게 하기 위하여 cellulase를 2% 첨가(12)하여 발효기질로 이용하였다. Cellulase의 최적온도는 40°C, 최적 pH는 4.8, 1% 사용하였을 때 activity는 1,500 NCU이다.

연속발효

연속 교반식 반응기는 jar fermentor(KFC, SY-500 2.5L, KF-601 2.5L) 2대를 연결하여 1대는 배지 저장조로 사용하였다. 본 반응기와 부속품은 121°C에서 30분간 가압멸균하였다. 살균된 반응기내에 돼지감자 배지 750 ml와 고정화 효모 225 ml를 넣고 교반속도 20 rpm, 온도 40°C, pH 5.5(배지 자체 pH)로 하고, 회분발효로 48시간 반응시켜 고정화 효모를 활성화시켰다. 생산배지는 peristaltic pump를 사용하여 생산배지를 반응기 상부로부터 회석속도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 h⁻¹로 유입시켰고 발효액도 동일속도로 유출시켰다.

원료와 발효액의 성분분석

수분은 상압건조법으로 정량하였고, 총당은 환원당을 Somogyi 변법으로 정량하여 glucose로 환산하였고, 조단백질은 semi-microkjeldahl method에 의해 질소를 정량하고 질소계수 6.25를 곱하여 조단백질량을 정량하였다. pH는 발효액 10 ml를 취하여 pH meter(Toa Electronics Ltd., Japan)로 측정하였고 적정산도는 발효액 10 ml에 증류수 40 ml를 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. 에탄올은 Gay-Lussac meter와 gas chromatograph를 사용하여 정량하였다. 점조도 측정은 Bostwick consistometer를 모방하여 아크릴로 주문제작한 점조계를 사용하여 시료 50 ml 넣고 최장거리까지 이동하는데 걸리는 시간(sec)을 점조도로 나타내었다. 생균수는 발효액 0.5 ml를 취하여 0.6 M KCl 용액으로 10배 단위로 희석하고 각 희석액 0.1 ml를 YPD 평판배지에 옮겨 30°C에서 48시간 배양 후 나타난 집락(colony)의 수를 계수하여 구하였다. Cell viability는 고정화된 bead를 소량 취해 포화 sodium tripolyphosphate 용액(100 g/l)에 넣어 alginate를 완전히 녹인 후(10) 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 gel 부스러기를 제거하고 methylene blue 염색액을 넣어 염색 및 비염색 세포를 hemacytometer로 계수하여 구하였다(11).

결과 및 고찰

Bead의 활성화

효모세포를 alginate에 포괄시킬 때 아무리 높은 농도의 세포 현탁액을 사용하더라도 고정화 과정에서

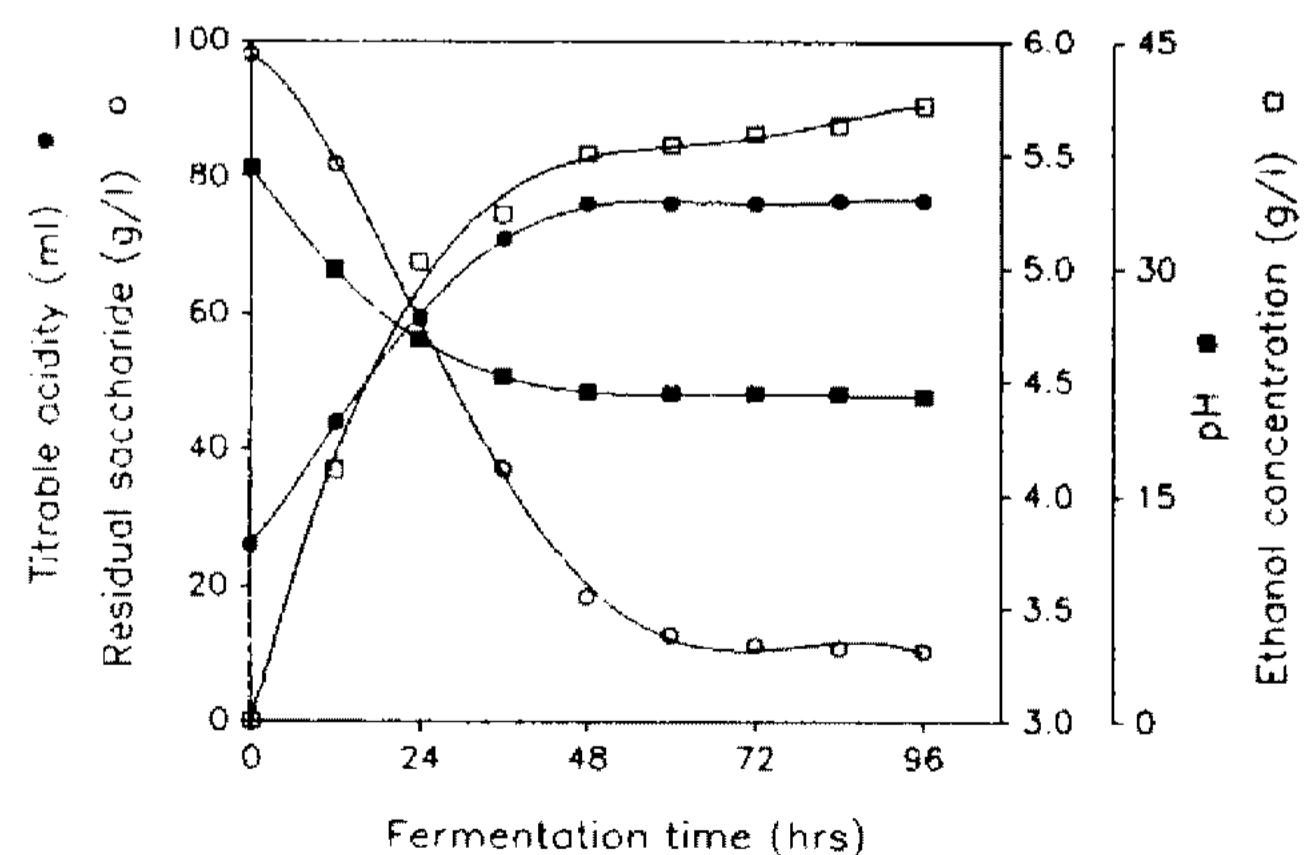


Fig. 1. Determination of bead activation time using immobilized *Kluyveromyces marxianus* F043 in a jar fermentor.

세포농도가 희석되고 또한 불활성화되는 세포가 있기 때문에 반응기 조업전에 고정화된 세포의 활성이 필요하다(6). 그리하여 비교적 고농도인 15% 돼지감자 배지에 2% cellulase를 처리(12)하고 고정화 효모를 접종한 뒤 96시간 회분배양하였다. Fig. 1에서와 같이 96시간 후에 잔당은 98.1 g/l에서 10.7 g/l로 크게 감소하였고, pH는 5.44에서 4.43으로 저하되었으며 적정산도는 26.05에서 76.59로 증가하였다. 일반적으로 연속배양을 할 때에는 회분배양의 대수증식기 말기부터 기질을 주입하기 시작하는데 본 실험에서는 48시간 경과 후에 잔당이 18.5 g/l로 당이 거의 소모되었으므로 연속발효전 48시간을 bead의 활성화 시간으로 결정하였다.

기질농도와 희석속도에 따른 CSTR의 발효특성

연속교반식 반응기(CSTR)의 내부 온도를 40°C로, 교반기의 회전속도를 20 rpm으로 고정하고 반응기에 유입되는 돼지감자 배지의 농도와 희석속도를 각각 5~12.5%와 0.1~0.5 h⁻¹로 조절하면서 steady state에 도달할 때까지 에탄올 발효를 하였다. 본 실험에서 사용한 돼지감자 분말의 수분함량은 5.54%이었고 총당질은 70.20%이었다. Fig. 2는 주입 기질의 농도가 7.5%일 때 희석속도의 변화에 따른 에탄올과 잔당의 농도를 나타낸 것이다. 희석속도가 낮을 때는 유입되는 기질이 대부분 소모되는 기질제한성의 특성과 희석속도가 증가함에 따라 에탄올 함량은 감소하는 전형적인 CSTR 발효특성을 보여주고 있다.

유입하는 돼지감자 배지의 농도를 변수로 하여 희석속도와 잔당량의 관계를 조사하였다(Fig. 3). 희석속도와 돼지감자 배지의 농도가 증가할수록 발효액 중 잔당량은 증가하였다. 5% 배지에서는 희석속도 0.1 h⁻¹일 때 주입된 당이 거의 소비되었고 7.5% 배지의 경우 희석속도 0.1 h⁻¹에서 0.2 h⁻¹로 증가되었을 때 잔당량이 2.6배로 급격히 증가하였다. 10% 배지에서는 희석속도가 0.1 h⁻¹일 경우에도 잔당량이 22.7 g/l이었고 12.5% 배지에서도 잔당량이 36.0 g/l였다.

유입하는 돼지감자 배지의 농도를 변수로 하였을 때 희석속도와 고정화 효모의 기질이용율 사이의 관계는 Fig. 3에서와 같이 모든 배지 농도에서 희석속도가 증가함에 따라 기질이용율은 감소하였다. 희석속도를 고정해 보면 돼지감자 배지의 농도가 증가할수록 기질이용율이 감소하였다. 최대 기질이용율은 5% 배지, 희석속도 0.1 h⁻¹에서 89.2%이었고 최소 기질이용율은 12.5% 배지, 희석속도 0.5 h⁻¹에서 27.8%였다.

유입되는 돼지감자 배지의 농도를 변수로 하여 희

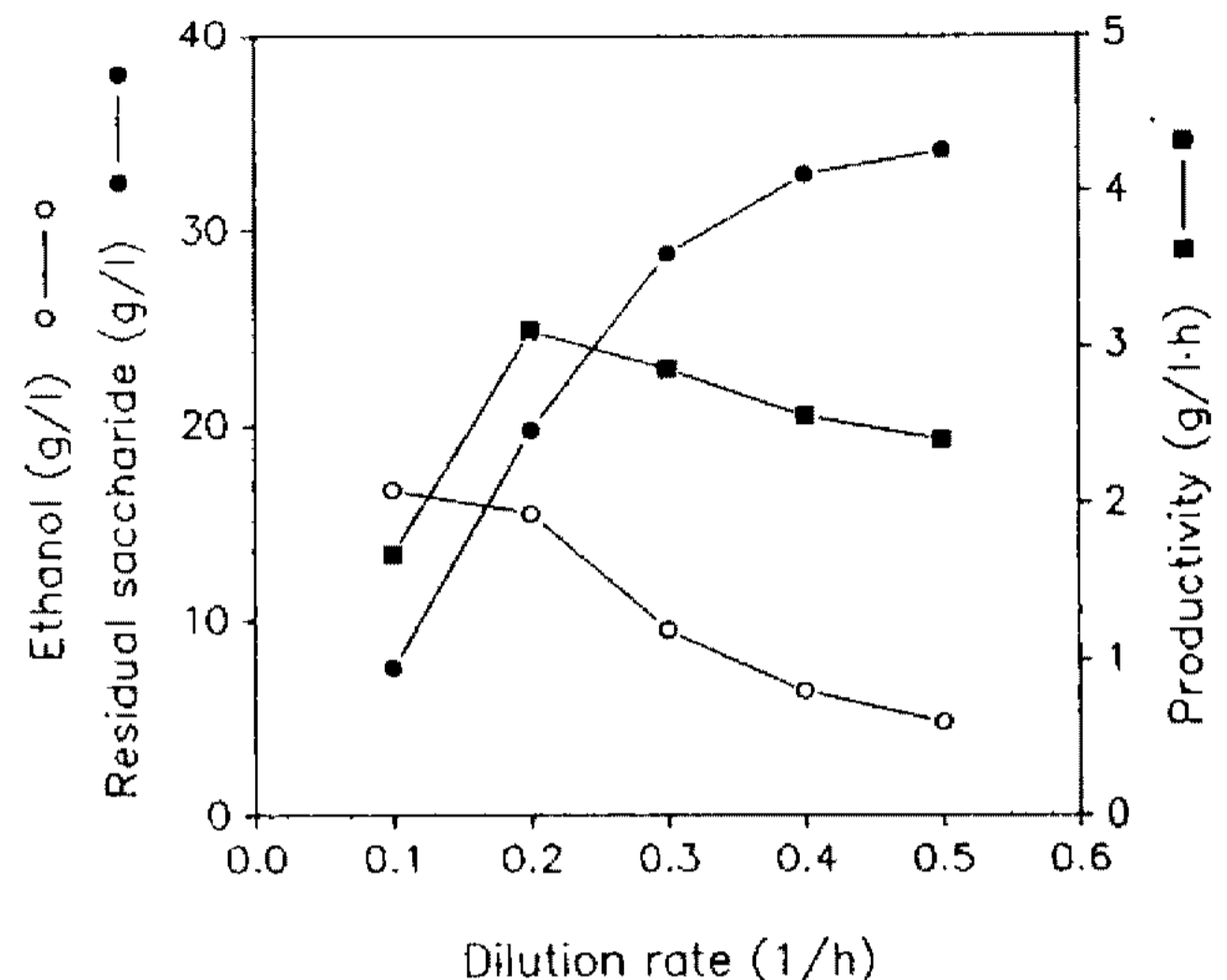


Fig. 2. The steady state on ethanol production during continuous fermentation *Kluyveromyces marxianus* F043 in 7.5% Jerusalem artichoke medium.

석속도와 에탄올 생성의 관계를 조사하였다(Fig. 3). 각 배지 농도에서 희석속도가 증가할수록 에탄올 생성농도는 감소하였다. 기질의 농도가 낮은 5%와 7.5%의 경우에는 희석속도가 낮을 때 기질이 거의 소모되어 에탄올과 균체로 전환되는 기질 제한성의 발효특성을 보였고 희석속도 0.3 h⁻¹에서 급격히 에탄올 농도가 각각 11.5 g/l에서 6.0 g/l로, 15.5 g/l에서 9.5 g/l로 감소하였고 10%와 12.5%에서는 희석속도 0.2 h⁻¹일 때 22.2 g/l에서 14.3 g/l로, 20.6 g/l에서 13.5 g/l로 크게 감소하였다.

유입되는 돼지감자 배지의 농도를 변수로 하여 희석속도와 에탄올 수율계수와 관계를 조사하였다(Fig. 3). 기질 농도가 5%와 7.5%의 경우에는 희석속도 0.2 h⁻¹에서 각각 0.44, 0.47로 가장 컸으며 기질 농도 10%와 12.5%에서는 희석속도가 증가할수록 에탄올 수율계수도 감소하였다.

유입되는 돼지감자 배지의 농도를 변수로 하여 희석속도와 에탄올 생산성의 관계를 조사한 결과는 Fig. 3과 같았다. 모든 돼지감자 배지는 희석속도 0.2 h⁻¹에서 가장 높은 에탄올 생산성을 얻었고, 최대 에탄올 생산성은 돼지감자 배지 7.5%에서 3.1 g/l·h이었다. 한 등(13)은 *Saccharomyces cerevisiae*를 sodium alginate에 고정화한 뒤 15% glucose를 이용하여 CSTR에서 에탄올 발효를 하였을 때 희석속도 0.2 h⁻¹에서 7.12 g/l·h의 에탄올 생산성을 얻었다고 보고하였으며 류 등(10)도 *Saccharomyces cerevisiae*를 sodium alginate에 고정화하고 column reactor에서 187 g/l glucose를 배지로 연속발효를 하였을 때 희석속도 0.21 h⁻¹에서 16.21 g/l·h를 얻었다고 보고하였다.

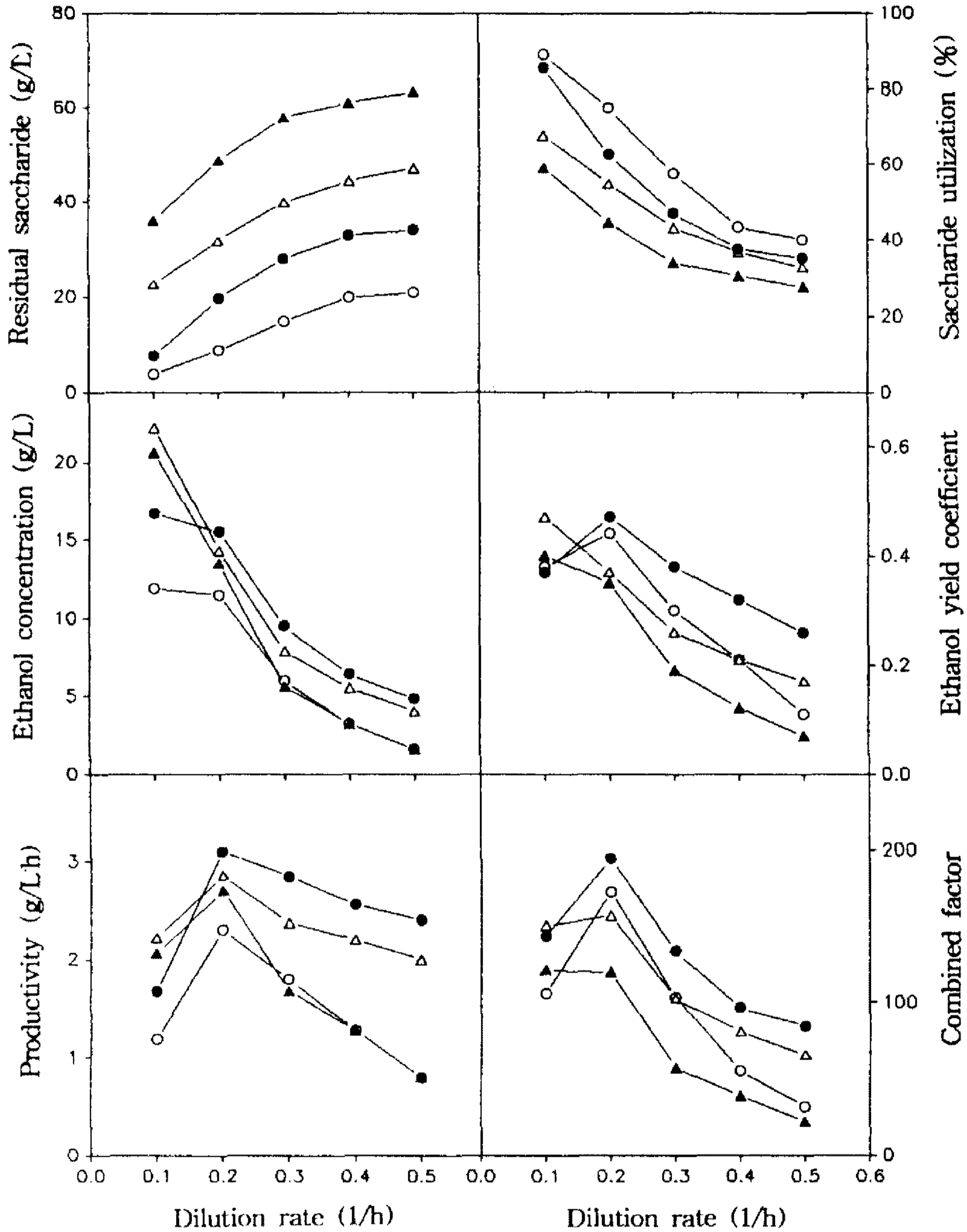


Fig. 3. Fermentation properties of CSTR as a function of dilution rate in various concentrations of influent Jerusalem artichoke medium.

○: 5.0%, ●: 7.5%, △: 10.0%, ▲: 12.5%

최적 작동조건의 결정

에탄올 생산에 대한 최적 조건으로 에탄올 생산성이 높고 미발효된 잔당 유실속도가 낮은 조건을 택하였다. 에탄올 생산성이 높고 동시에 잔당유실속도가 낮은 작동조건을 규명할 수 있는 인자로서 에탄올 생산성과 기질이용율의 곱을 조합인자로 하였다. Fig. 3에 의하면 돼지감자 배지의 농도 7.5%, 희석속도 0.2 h⁻¹에서 combined factor가 194.1로 가장 높았으며 이 때의 에탄올 농도는 15.5 g/l이었고 에탄올 생산

성은 3.1 g/l·h이었다.

연속발효의 안정성

고정화 효모를 사용하여 연속교반식 반응기에서 에탄올 발효의 안정성을 알아보기 위하여 2% cellulase가 처리된 7.5% 돼지감자 배지에 0.025% urea(14)와 20 ppm ampicillin(9)을 첨가하여 유입배지를 조제하고 희석속도 0.2 h⁻¹, 온도 40°C, 20 rpm에서 연속발효를 하면서 2일 간격으로 에탄올 농도, 잔당량,

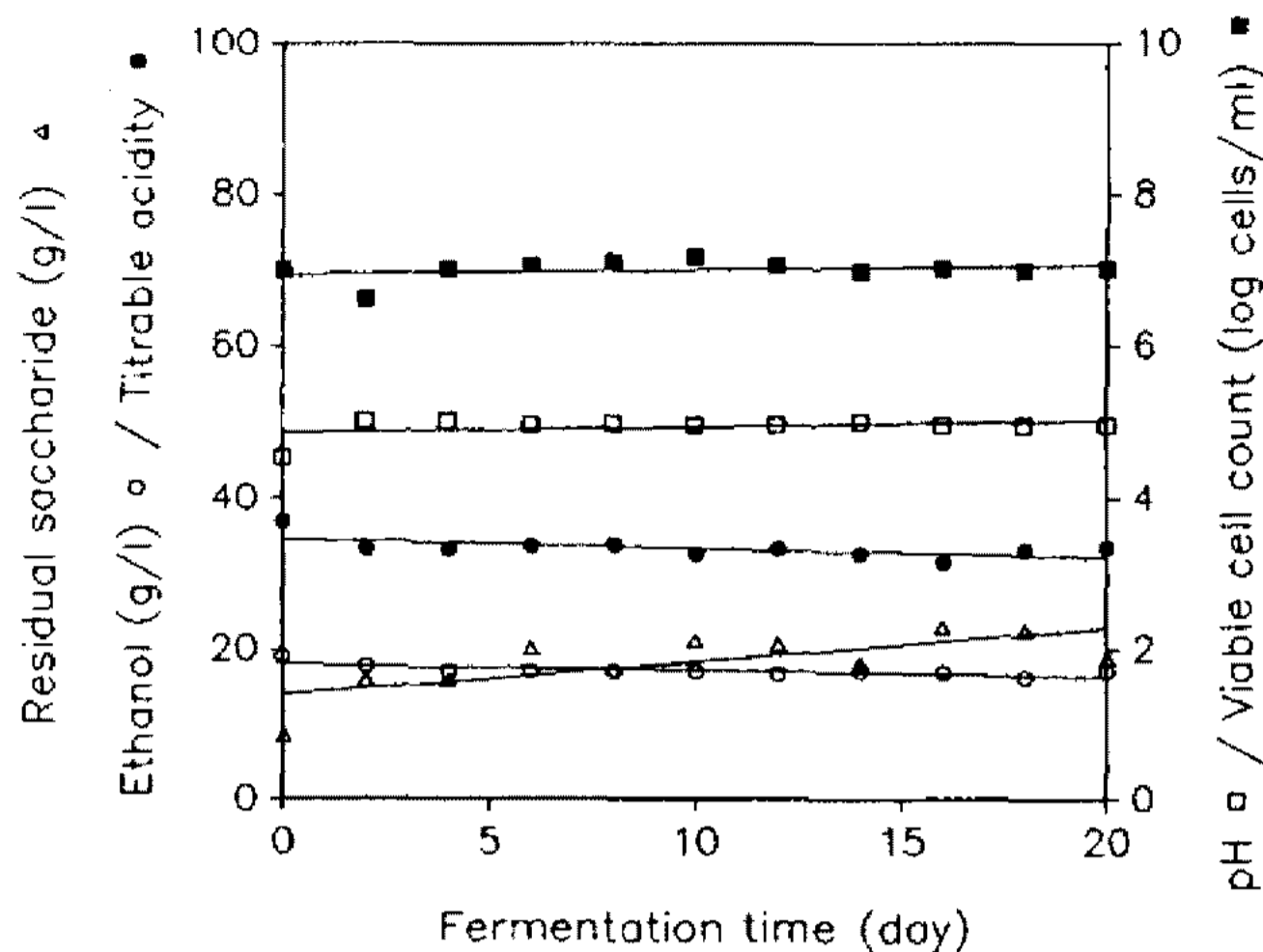


Fig. 4. Operation stability for continuous ethanol production with 7.5% Jerusalem artichoke medium on stirred tank reactor using immobilized *Kluyveromyces marxianus* F043.

Table 1. Alcohol content of effluent Jerusalem artichoke medium cultivated by *Kluyveromyces marxianus* F043 during continuous fermentation

Time (min)	Alcohol				
	EtOH (% w/v)	MeOH (ppm)	n-PrOH (ppm)	i-BuOH (ppm)	i-AmOH (ppm)
0(48*)	1.91	1.14	1.55	1.55	2.76
48	1.79	1.40	2.03	1.73	2.65
96	1.71	1.67	1.81	1.66	2.87
144	1.71	1.39	1.61	1.44	2.87
192	1.71	2.03	1.74	1.72	3.01
240	1.71	1.81	2.03	1.85	3.09
288	1.67	1.45	1.81	1.71	3.33
336	1.71	1.18	1.56	1.62	2.77
384	1.69	1.35	1.93	1.64	3.13
432	1.63	1.07	1.65	1.97	3.29
480	1.71	2.34	2.10	1.87	3.33

*Bead activation time

적정산도, 유출배지 중의 생균수, pH를 조사하여 Fig. 4에 나타내었다. 예비실험에서 20 ppm ampicillin(9)은 F043 균주의 생육에 아무런 영향을 미치지 않았다. 48시간 활성화시켰을 때 pH는 4.54, 적정산도 37.0 이었고 에탄올 함량은 19.1 g/l이었으며 유출된 발효액 중 생균수는 6.99 log cells/ml이었다. 3주 동안 연속 발효를 하였을 때 에탄올 함량은 16.3~17.9 g/l를 유지하였다. 에탄올 이외의 에탄올로서 methyl, n-propyl, iso-butyl, iso-amyl alcohol이 미량 검출되었으며 그 결과는 Table 1과 같다. 유출액의 pH는 4.97~5.02 범위였고 발효액 중에 유출되는 생균수는 6.60~7.16

log cells/ml 수준으로 거의 일정하였다. Bead의 크기는 초기에 2 mm로 제조하였으나 3주간의 연속발효가 끝난 후에는 3 mm로 1.5배 증가하였다. 전보(7)에서 bead의 단면을 위상차 현미경으로 관찰하였을 때 bead의 표면으로 갈수록 효모가 밀집해 있었다고 보고한 바 있고 Johansen 등(15), Gosmann 등(16)도 이와 일치된 결과를 보고하였다.

요 약

돼지감자 분말로부터 에탄올을 효율적으로 생산하기 위하여 *Kluyveromyces marxianus* F043을 2% sodium alginate에 고정화시키고 연속발효를 수행하여 발효특성을 조사하였다. 연속발효 수행시 고정화 효모는 48시간으로 활성화되었다. 2% cellulase로 처리된 돼지감자배지의 CSTR 연속발효에서 회석속도가 증가할수록 에탄올 농도는 감소하였고 잔당 농도는 증가하였다. 에탄올 생산성이 높고 당의 유실율이 낮은 최적조건은 회석속도 0.2 h^{-1} , 유입 배지농도 75 g/l이었으며 이때 에탄올 생산성은 $3.1 \text{ g/l}\cdot\text{h}$, 기질이 용율은 62.6%이었다. 최적조건에서 3주 동안 연속발효를 수행하였을 때 유출액 중의 에탄올 농도는 16.3~17.9 g/l, 생균수는 6.60~7.16 log cells/ml로 거의 일정하게 유지되었고 에탄올 이외에 methyl, n-propyl, iso-butyl, iso-amyl alcohol이 미량 검출되었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 연구비 지원(KOSEF 921-1500-007-2)에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Hur, B.K., J.S. Yu, and J.W. Yang. 1989. Ethanol fermentation by *K. Fragilis* from Jerusalem artichoke. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 4: 50-58.
- 홍연, 최연호. 1994. 돼지감자를 이용한 고농도 알콜발효균주의 탐색. *한국산업미생물학회지* 22: 707-712.
- Suh, K.H., M.H. Choi, and S.K. Song. 1988. Comparative study on continuous ethanol fermentation by immobilized tubular fermentor. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 16: 205-212.
- Williams, D. and D.M. Munnecke. 1981. The production of ethanol by immobilized yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 1813-1825.
- Margaritis, A. and P. Bajpai. 1982. Continuous ethanol production from Jerusalem artichoke tu-

- bers. II. Use of immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 1483-1493.
6. Nunez, M.J. and J.M. Lema. 1987. Cell immobilization-Application to alcohol production. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 642-651.
 7. 이회숙, 신지현, 최언호. 1995. *Kluyveromyces marxianus* F043의 alginate 고정화와 에탄올 발효특성. 한국농화학회지 투고중.
 8. 이회숙, 최언호. 1995. 돼지감자 분말을 이용한 고정화 *Kluyveromyces marxianus* F043의 에탄올 발효특성. 한국농화학회지 투고중.
 9. 신지현. 1992. *Kluyveromyces marxianus* F043의 고정화에 의한 돼지감자 분말의 회분 및 연속 에탄올 발효. 석사학위논문.
 10. Ryu, B.H. and K.D. Nam. 1987. Continuous alcohol fermentation using immobilized growing yeast cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**: 248-252.
 11. Lee, S.S., F.M. Robinson, and H.Y. Wang. 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **11**: 641-649.
 12. 최언호. 1990-1992. 이눌린을 이용한 에탄올 생산. 대체에너지 기술개발사업 연구보고서.
 13. Han, M.S., S.D. Ha. and D.H. Chung. 1991. Continuous ethanol production using immobilized baker's yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 398-404.
 14. 채은미, 최언호. 1991. 돼지감자 분말을 이용한 *Kluyveromyces marxianus*의 에탄올 발효. 한국산업미생물학회지 **19**: 265-271.
 15. Johansen, A. and J.M. Flink. 1986. Influence of alginate properties and gel reinforcement on fermentation characteristics of immobilized yeast cells. *Enz. Microb. Technol.* **8**: 737-748.
 16. Gosmann, B. and H.J. Rehm. 1988. Influence of growth behaviour and physiology of alginate-entrapped microorganisms on the oxygen consumption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 554-559.

(Received 20 December 1994)