

I. 서 론

알코올 醱酵의 生産性 向上 技術

- 脂質 및 蛋白質의 이용 -



申 喆 秀

〈한국화학연구소 생물공학연구실·공학박사〉

目 次

- I. 서 론
- II. 알코올농도와 알코올생산성을 향상시키는 전략
- III. 결 론
- IV. 참고문헌

알코올 발효는 오래 전부터 酒類의 제조에 주로 이용되어 왔다. 酒質은 그 속에 함유되어 있는 알코올 성분보다는 오랜 숙성과정을 통해 만들어지는 맛과 향기성분에 의해 결정된다.

한편, 소주 등의 원료가 되는 주정을 생산하는 경우 맛과 향기성분 보다는 알코올 성분을 많이 생성시키는 것이 더욱 중요할 것이다. 生産性이란 단위시간, 단위부피당 목적하는 生産物의 量을 의미한다. 알코올 발효에 있어 生産성이란 개념은 주류에 따라 달라질 것이다. 즉, 高質의 주류에 대해서는 알코올 성분보다는 맛과 향기 성분의 생성속도가 중요할 것이며, 주정을 제조할 시에는 알코올의 생성속도가 더욱 중요할 것이다. 한편, 근래에 들어와 에너지원으로서 이용되는 알코올의 생산도 주정 생산의 경우와 비슷하다 하겠다. 여기서는 주정 생산시에 고려될 수 있는 알코올의 생산성에 대해서만 살펴보기로 한다. 알코올 생산성은 발효중 발효조 내에 유지되는 均체농도와 그들의 단위 均체당 알코올의 생산능력에 의해 결정된다. 즉,

$$\text{알코올 생산성} = \text{均체농도} \times \text{단위 均체당 알코올 생성속도}$$

$$(g\text{-alcohol}/\ell \cdot h) \quad (g\text{-cell}/\ell) \quad (g\text{-alcohol}/g\text{-cell} \cdot h)$$

알코올 생산성을 향상시키기 위해서는 발효조 내의 均체 농도를 높게 유지시키는 전략과 아울러 均체의 活性, 즉 알코올 생성능력을 향상시키는 전략을 병행할 필요가 있다.

한편, 알코올 발효시에 알코올의 생산성과 아울러 발효액의 알코올 농도가 또다른 중요한 因子라고 할 수 있다. 주정 생산의 경우 발효 濾液의 알코올 농도가 매우 낮아 증류과정을 통하여 높여주어야 한다. 발효 여액의 알코올 농도가 낮을수록 증류시간은 길어질 것이며 이들은 주정 생산의 단가를 높히게 될 것이

다. 이러한 연유에서 발효가 끝난 여액의 알코올 농도 역시 생산성과 마찬가지로 신중히 고려되어야 할 것이다. 알코올 농도와 알코올 생산성을 향상시키는 여러가지 방법들이 개발되어 왔다. 여기서는 그들 방법에 대해 대략적으로 기술하는 한편, 특히 脂質 및 단백질을 배지 중에 첨가하여 알코올 생산성에 미치는 영향과 아울러 그들 매카니즘에 대해 비교적 자세히 살펴보고 그들을 산업적으로 응용하는 전략에 대해 논의하고자 한다.

II. 알코올 농도와 알코올 생산성을 향상시키는 전략

1. 回分式 배양법과 連續式 배양법

1) 회분식 배양법(Batch Culture Process)

알코올 발효는 전통적으로 회분식 배양법에 의해 주로 수행되어 왔다. 이러한 경우 균체가 증식을 시작하여 충분한 양의 균체가 형성되기까지 상당한 시간이 소요된다. 한편, 알코올의 생성속도는 발효조 내의 균체량과 비례적인 상관관계가 있기 때문에 전체적으로 알코올 생산성의 감소를 초래한다. 그러나 발효조 내의 균체농도가 증가함에 따라 알코올 농도는 점차 높아져 5~6% (v/v)의 알코올 농도에 이를 때까지 균체의 증식은 계속된다. 한편 그 이상의 농도에서 균체의 증식은 중단되거나 알코올 생성은 계속 진행되어 최종농도(12~15%, v/v)에 도달하게 된다. 발효 말기에 얻어지는 최종 알코올 농도는 발효조 내의 균체량에 관계없이 균체의 알코올에 대한 耐性(Alcoholtolerance)에 의해 결정된다. 발효조 내의 알코올 농도가 증가할 때 균체는 알코올 성분에 대해 적응하므로서 높은 알코올 농도에서도 견디게 되고 기질이 존재하는 한 알코올의 생성은 계속된다. 그러나 발효조 내의 알

코올 농도가 균체가 더 이상 견딜 수 없는 정도에 이르면, 균체의 세포막 및 알코올 생성시스템이 파괴되어 알코올의 생성이 멈추게 되고 그때의 알코올 농도가 얻어질 수 있는 최고 농도가 될 것이다.

높은 최종 알코올 농도를 얻기 위해서는 배양 초기에 충분한 양의 基質(포도당)을 첨가하여야 한다. 그러나 발효조 내의 기질 농도가 10% 이상이 되는 경우, 이들 기질에 의한 삼투압의 영향을 받아 균체 증식이 저해(Substrate Inhibition)되어 균체의 증식속도가 감소하고 알코올의 생산성 또한 감소하게 된다. 이러한 문제점을 해결하는 방법으로 균체를 별도로 증식시켜 높은 농도로 배양 초기에 접종하는 것이다. 이와 같이 하여 균체의 증식기간을 단축시키고 알코올 생성을 배양 초기부터 촉진시켜 알코올 생산성을 증대시킬 수 있다. 다른 방법으로는 유가배양(Fed-Batch Culture)을 들 수 있다(Figure 1a). 농축된 기질 용액을 발효조 내로 연속적으로 소량씩 공급하므로써 발효 중 소비되는 기질을 보충하고 발효조 내에 기질농도를 낮게 유지하여 기질에 의한 균체 증식의 저해를 감소시켜 알코올 생산성을 향상시킬 수 있다.

2) 연속식 배양법(Continuous Culture Process)

연속식 배양법은 크게 CSTR(Continuous Stirred Tank Reactor)形과 PFR(Plug Flow Reactor)形의 두가지 형태로 구분할 수 있다.

① CSTR형의 발효조

살균된 발효배지가 발효조 내로 일정하게 연속적으로 流入되고 유입되는 양만큼 발효조 외부로 流出된다(Figure 1b). 발효조 내에서 균체의 증식과 알코올 생산이 동시에 일어나며 정상상태(Steady State)에 이르면 균체, 기질, 알코올 농도 등이 일정하게 유지된다. 알코올 생산성은 회분식 배양법에 비해 훨씬 높은 반

면, 발효액의 알코올 농도는 매우 낮아 균체 증식을 멈추게 하는 농도(5-6%, v/v) 이상으로 얻어질 수 없다. 이러한 점을 보완하기 위하여 다수의 CSTR형 발효조를 직렬식으로 연결시켜 초기단계에서는 균체 생육을 활발히

진행시키고 후기단계에서 알코올 농도를 높게 증가시킬 수 있다(Figure 1c). 이들의 단점으로는 다수의 발효조를 필요로 하므로 장치 비용이 많이 드는 점이다.

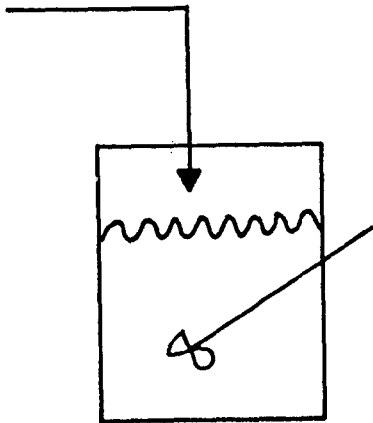


Figure 1a. Fed-Batch Fermentor.

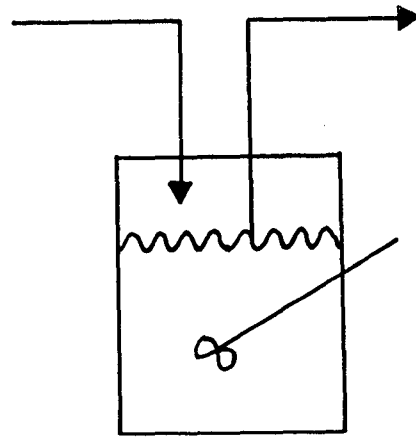


Figure 1b. CSTR Fermentor.

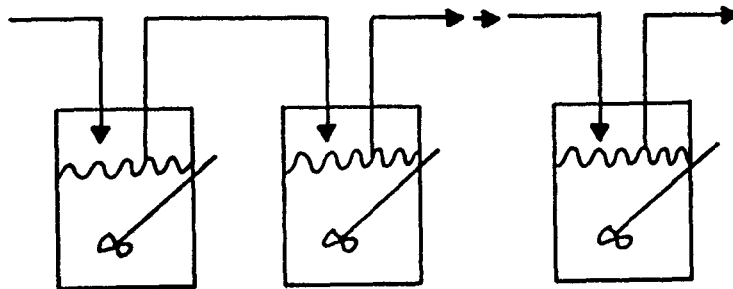


Figure 1c. A Cascade of CSTR Fermentors.

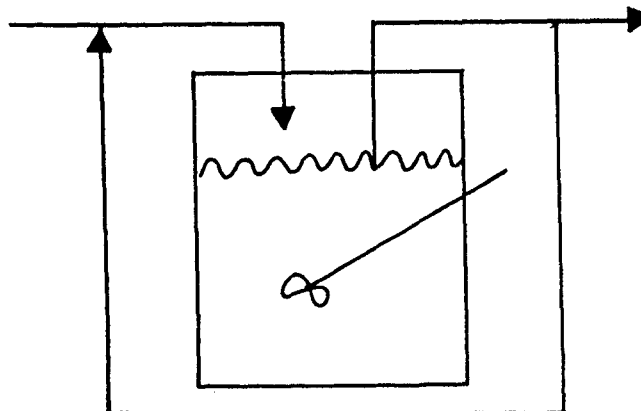


Figure 1d. Cell-Recycle Fermentor.

한편, 한 개의 CSTR형 발효조로 알코올 생산성을 높히는 방법으로는 외부로 유출되는 균체를 회수하여 다시 발효조로 유입시키는 균체 회수식 발효조(Cell-Recycle Fermentor)를 생각할 수 있다(Figure 1d). 균체의 재유입에 의해 발효조 내의 균체농도를 엄청나게 증가시킬 수 있으므로 균체 회수를 하지 않는 CSTR형 발효조에 비해 알코올 생산성을 10배 이상 증가시킬 수 있다. 그러나 이들 역시 한 개의 발효조로 이루어져 있어 얻을 수 있는 알코올 농도에 한계성이 있다.

② PFR형의 발효조

PFR형은 Fluidized-Bed형과 Packed-Bed형으로 나눌 수 있다. Fluidized-Bed형의 경우 배지를 발효조 하단으로 부터 유입시켜 상단으로 유출시킨다(Figure 2a). 균체의 증식은 주로 발효조 하단에서 이루어지고 최종 알코올 농도는 유입된 배지의 발효조 내에서의 머무르는 시간(Residence Time)에 의해 좌우된다. 이들의 단점은 발효조 내에 균일하고 높은 균체농도를 유지하기 어려운 점이다. 한편, 이들을 보완하는 방법으로 CSTR형과 PFR형의 연결형을 생각할 수 있다(Figure 2b). 첫 번째 단계로 CSTR형 발효조를, 두 번째로 PFR형 발효조를 설치한다. CSTR형 발효조에서는 저 농도의 기질용액을 유입하여 균체를 왕성하게 증식시켜, 연속적으로 PFR형 발효조로 유입시킨다. 한편, PFR형 발효조로 또 하나의 펌프를 통해 고농도의 기질용액을 연속적으로 공급한다. CSTR형 발효조에 산소를 공급하면 균체의 증식속도를 더욱 향상시킬 수 있고, PFR형 발효조에서는 산소 공급을 하지 않고 미량의 산소가 존재하게 하여 알코올 생성을 촉진시킬 수 있다.

지금까지 열거된 연속식 배양법에 있어서는 알코올 성분과 균체가 발효조 외부로 계속적으로 유출되기 때문에 유출되는 만큼의 균체가

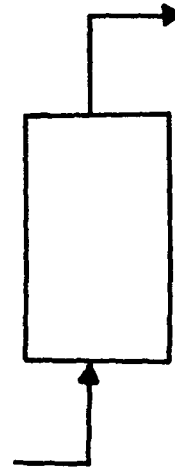


Figure 2a. PFR Fermentor.

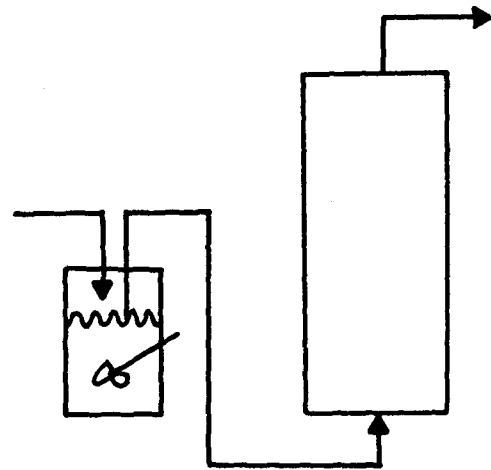


Figure 2b. Combination of CSTR and PFR Fermentors.

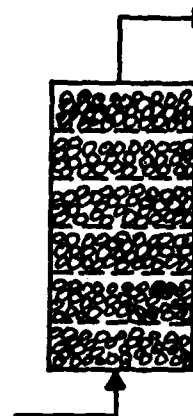


Figure 2c. Fixed-Bed Fermentor.

발효조 내에서 증식되어야 한다. 이와 같이 균체의 증식에 계속적으로 소비되는 기질을 일종의 낭비로서 간주할 수 있다. 한편 균체를 계속 증식시킬 필요없이 균체를 담체에 고정화시키는 방법(Whole-Cell Immobilization)이 있다. 균체를 담체 안에 높은 농도로 고정화시킨 뒤 Packed-Bed형 발효조에 충전한다.(Figure 2c). 담체 물질은 큰 분자들로 되어 있어 발효조 밖으로 유출되지 않아 발효조 내에 균체농도를 일정하고 높게 유지할 수 있어 알코올 생산성을 증대시킬 수 있다. 고정화 된 균체를 이용하는 발효조나 균체 회수식 발효조의 경우 단위 균체당의 알코올 생산능력은 감소하지만 발효조 내에 엄청나게 높은 균체농도를 유지할 수 있어 전체적으로 알코올 생산성을 크게 향상시킬 수 있다. 더우기 고정화 균체 시스템에 의해 알코올 생산을 하는 경우 생산과정 중 오래동안 그 시스템의 안정을 유지할 수 있는 것으로 알려져 있다.

2. 알코올 생산 균주

주류 생산을 위한 알코올 발효 균주로서 *Saccharomyces* 계통의 균이 전통적으로 사용되어 온 것은 잘 알려져 있는 사실이다. 고급 품질의 주류 제조 시와는 달리 주정발효의 경우, 높은 알코올 농도와 아울러 높은 알코올 생성 속도, 즉 높은 생산성은 매우 중요한 비중을 차지하고 있다. 고농도의 알코올 발효액을 얻기 위해서는 발효조 내의 균체농도에 의존되기 보다 균체 자체의 알코올에 대한 내성(Alcohol-Tolerance)에 의해 결정된다는 것은 이미 언급한 바 있다. 균체의 알코올에 대한 내성은 두가지 측면에서 고려될 수 있다. 첫째는 발효 중에 생성된 알코올은 균체의 증식을 저해한다. 그러나 알코올에 더욱 내성을 가진 효모를 분리하여 이용한다면 동일한 알코올 농도하에서 균체의 증식속도 뿐만 아니라 균체농도를 높

힐 수 있다. 둘째로 균체 내의 알코올 생성 시스템이 얼마나 높은 알코올 농도까지 견딜 수 있느냐 하는 문제이다. 보다 높은 알코올 내성을 가지는 균주를 이용한다면 좀 더 높은 알코올 농도의 발효액을 생산할 수 있을 것이다.

근래에 들어와 에너지원으로 쓰이는 알코올의 생산에 효모 외에 *Zymomonas mobilis*라는 세균에 의한 알코올 발효에 대해 많은 연구가 진행되어 왔다. 이들 세균은 알코올 생산성이 효모에 비해 우수한 것으로 보고되고 있으나 효모 이용시와는 달리 이들 발효액으로부터 악취가 나는 문제점이 있어 주정 발효에 이용되기 어려울 것으로 생각된다.

3. 배지 중에 지질과 단백질의 이용

지금까지는 주로 발효장치 내지는 발효공정을 변화시킴으로써 최종 알코올 농도를 높이거나 알코올 생산성을 향상시키는 관점에서 논의하였으며, 또한 알코올에 내성이 강한 균주를 개발하는 것을 생각하여 보았다. 다음에서는 발효배지 외에 부수물로 지질 및 단백질을 첨가하여 생산균 효모의 성질을 변화시킴으로써 최종 알코올 농도와 알코올 생산성을 향상시키는 전략과 그 이면의 기초를 이루고 있는 매카니즘에 대해 살펴 보기로 한다.

1) 지질(Lipids) 및 단백질(Proteins)의 영향

Andreasen과 Stier(1954)은 혐기적 조건하에서 *Saccharomyces Cerevisiae*를 증식시키는 과정에서 발효배지 성분 외에 Tween80+ergosterol, 혹은 Triton+oleic acid+ergosterol을 부수적으로 첨가하여 균체의 증식을 상당히 향상시켰다는 보고를 하고 있다. Tween 80분자를 이루고 있는 지방산은 oleic acid와 같은 불포화 지방산으로 이루어져 있다.

한편, Hayashida 등(1976)은 곰팡이균의 일

Table 1. Fatty acid composition of *Aspergillus oryzae*-proteolipid (Hayashida et al., 1976).

Fatty acid	Content (%)
12 : 0	0.4
14 : 0	0.0
16 : 0	15.6
16 : 1	0.0
16 : 2	0.4
18 : 0	3.8
18 : 1	14.3
18 : 2	59.0
18 : 3	3.8

Table 2. Fatty acid composition of the plasma membranes of *S. sake* grown in the medium supplemented with or without proteolipid.

Fatty acid	None (%)	Proteolipid (%)
10 : 0	10.7	5.4
12 : 0	13.4	7.2
14 : 0	10.9	9.2
14 : 1	0.6	0.4
16 : 0	39.2	35.6
16 : 1	7.5	2.6
18 : 0	5.1	5.2
18 : 1	6.2	8.6
18 : 2	5.6	23.0
18 : 3	0.0	1.6

특히 발효액 속에 축적되는 알코올 농도에 민감하게 대처하여 균체 세포막의 성분이 변화하는 것으로 알려져 왔다. 발효액의 알코올 농도가 증가함에 따라 세포막 성분 중 불포화 지방산의 함량이 점차 증가하는데 이는 증가되

는 알코올 분자들에 대응하기 위한 수단이라고 생각된다. 세포막에 존재하는 알코올 분자수가 증가하면, 세포막은 점차 流動性을 잃어가며 마침내는 견딜 수 없어 파괴되어 버리고 균체는 사멸하게 된다. 그러나 배지 중에 불포화 지방산을 함유하는 지질이 풍부하게 존재할 때 균체는 그들을 흡수하여 균체성분으로 변형시켜 균체 세포막의 불포화 지방산 함량을 증가시킨다. 이렇게 하여 세포막은 유동성 (Fluidity) 을 더욱 갖게 되고 알코올 분자들에 대한 포용성을 증대시켜 균체로 하여금 알코올 분자들에 대해 내성을 증가시키어 보다 높은 알코올 농도에서도 생존할 수 있게 된다. 그러나 균체 세포막의 알코올에 대한 내성은 불포화 지방산 성분의 증가만으로는 불충분하다. 불포화 지방산 성분과 아울러 ergosterol 혹은 단백질 성분이 세포막에 적당히 분포되어 있을 때 세포막은 알코올에 견디어 낼 수 있는 단단한 구조를 가지는 것으로 추측된다. 발효 배지에 불포화 지방산을 함유하는 지질만으로는 높은 알코올 내성을 나타내지 못하는 반면, 이와 함께 ergosterol이나 egg albumin이 존재할 때 균체는 알코올 내성을 증대시키게 되며 결과적으로 높은 알코올 농도의 발효액을 얻게 된다.

3) 산업적 응용

지금까지 최종 알코올 농도 및 알코올 생산성을 높히는데 있어서 phosphatidylcholine 와 같은 불포화 지방산을 함유한 지질 및 ergosterol 혹은 egg albumin의 효과에 대하여 살펴 보았다. 산업적으로 이들 물질을 이용한다고 가정할 때 이들은 알코올 생산원가를 상당히 상승시키게 되므로 실제로 이용되기는 어려운 실정이다. 한편, 앞에서 여러 차례 언급한 바와 같이 이들 물질들이 균체의 증식속도와 알코올 내성을 증대시킬 수 있다는 결과를 토대로 값싸게 대응할 수 있는 물질에 대해 생각하

기로 한다. 첫째로 불포화 지방산과 단백질을 함유하고 있는 대두분을 생각할 수 있다. Damiano와 Wang(1984)은 발효배지에 대두분을 첨가하여 CSTR형 균체회수식 발효조에서 알코올 발효를 행하였을 때 균체량의 증가와 아울러 알코올 생산성이 20% 이상 증가하였다고 보고하였다. 그리고 Kawaharada 등(1969)은 당근 주스액을 발효배지에 첨가하여 발효액의 알코올 농도를 상승시켰다고 보고하였다. 한편 ergosterol과 구조가 비슷하고 비슷한 효과가 있다고 알려진 stigmasterol을 함유한 식물성유, 즉 미강유, 옥수수유, 대두유, 야자유 등을 이용할 수 있다.

4. 알코올 발효공정의 최적화 (Optimization)

지금까지 열거된 방법 내지는 공정들을 모

두 포괄할 수 있고 비용이 가장 적게 드는 발효공정의 최적화는 반드시 필요하다 하겠다. 최적화 관점에서 발효액의 최종 알코올 농도를 결정하는 방법에 대해 논의하고자 한다. 주정의 제조는 발효의 공정과 발효여액을 농축하여 알코올 농도를 높이는 증류공정으로 대별할 수 있다. Figure 4에서 보는 바와 같이 1 gallon의 동일한 알코올 농도의 주정을 제조한다고 할 때, 발효액의 알코올 농도가 낮으면 발효와 증류공정에 드는 비용은 증가하는 반면, 알코올 농도가 높으면 발효에 드는 비용은 증가하고 증류비용은 감소한다. 발효액의 최종 알코올 농도에 따라 각각 드는 발효와 증류의 비용들을 합계한 곡선으로 부터 최소점, 즉 가장 비용이 적게 드는 점으로부터 목적하는 최종 알코올 농도를 결정할 수 있다.

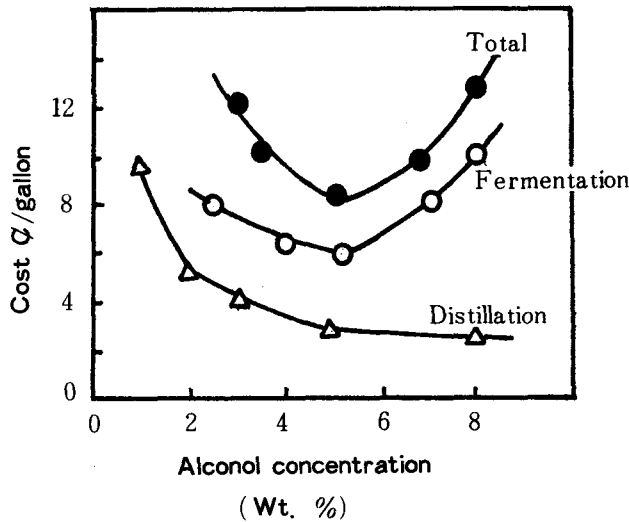


Figure 4. Optimization of Ethanol Production.

Ⅲ. 결 론

주정제조를 위한 알코올 발효에서 높은 알코올 농도의 발효액을 얻기 위해서는 회분식 발효법이 유리한 반면, 알코올 생산성을 고려한다면 연속식 발효법이 적당하다. 이들과는 달리, 발효배지 중에 불포화 지방산 성분을 함유하고 있는 지질과 ergosterol 혹은 단백질을 첨가할때 발효액의 최종 알코올 농도와 알코올 생산성을 모두 향상시킬 수 있다. 이러한 효과는 이들 첨가된 물질들이 균체 내로 유입되어 균체의 성질을 변화시켜 균체의 증식속도 및 알코올에 대한 내성을 증대시킨 것에 기인한다고 생각된다. 이들 결과는 연속식 및 회분식 발효법에 모두 응용될 수 있으며, 이들 첨가물질을 산업적으로 값싼 물질로의 대체가 가능하다.

Ⅳ. 참고문헌

- Alterthum, F., and Rose, A. H. : Osmotic lysis of sphaeroplasts from *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in media containing different unsaturated fatty acids. *J. Gen. Microbiol.*, 77, 371-382 (1973)
- Andreasen, A. A., and Stier, T. J. B. : Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Comp. physiol.*, 43, 271-281 (1954)
- Cysewski, G. R., and Wilke, C. R. : Utilization of cellulosic materials through enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 1297-1313 (1976)
- Damiano, D., Shin, C., Ju, N., and Wang, S. S. : Performance, kinetics, and substrate utilization in a continuous yeast fermentation with cell recycle by ultrafiltration membranes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 69-77 (1985)
- Hayashida, S., Feng, D. D., and Hongo, M. : Physiological properties of yeast cells grown in the proteolipidsupplemented media. *Agr. Biol. Chem.*, 39(5), 1025-1031 (1975)
- Hayashida, S., Feng, D. D., Ohta, K., Chattiumvong, S., and Hongo, M. : Compositions and a role of *Aspergillus oryzae*-proteolipid as a high concentration alcohol-producing factor. *Agr. Biol. Chem.*, 40(1), 73-78 (1976)
- Jin, C. K., Chiang, H. L., and Wang, S. S. : Steady state analysis of the enhancement in ethanol productivity of a continuous fermentation process employing a protein-phospholipid complex as a protecting agent. *Enzyme Microb. Technol.*, 3, 249-257 (1981)
- Kawaharada, H., Hayashida, S., and Hongo, M. : Influences of substances on formation of high concentration alcohol. *J. Ferment. Technol.*, 47(11), 689-692 (1969)
- Shin, C. S. : Analysis of the factors which enhance yeast growth and ethanol production. Ph. D. Thesis, Rutgers University, 1984
- Thomas, D. S., Hossack, J. A., and Rose, A. H. : Plasmamembrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 117, 239-245 (1978)