

추출발효에 의한 알콜제조 공정개발(I)
- 수성이상계 구성 고분자의 영향 -

김진한·허병기·목영일*

인하대학교 생물공학과, *아주대학교 화학공학과

Process Development for Alcohol Production by Extractive Fermentation(I)
- Effect of Phase Forming Polymer -

Jin Han Kim, Byung Ki Hur, Young Il Mok*

Department of Biotechnology and Bioengineering, Inha University

*Department of Chemical Engineering, Ajou University

ABSTRACT

Ethanol fermentations of inulin by *K.fragilis* in aqueous two-phase system of PEG/Dextran were performed not only to investigate the characteristics of partition of ethanol, sugar, and cell in the upper phase and the bottom phase but also to compare the fermentation properties with those of single phase system.

In the range of 1 to 3 wt% of Dextran, ethanol fermentability and ethanol productivity reduced according to the increase of the molecular weight of PEG. But the cell yield and the cell productivity showed the opposite trend. In the region of 6 to 10 wt% of PEG, the increase of the concentration of PEG, caused the minute decrease of ethanol productivity but the remarkable augmentation of cell productivity.

According to the increase of the molecular weight of PEG, the partition coefficient of inulin slightly decreased. But with the increment of the concentration of Dextran, the partition coefficient and the partition yield of inulin in the bottom phase represented the trends of increase.

서론

알콜발효에 있어서 생산성의 한계는 알콜에 의한 저해 영향에 기인한다. 에탄올은 저농도에서 저해영향을 주기 시작하여, 발효액중 에탄올 농도가 약 10~12%에 도달하면 발효가 거의 정지(1)된다.

반응기내에서 발효중에 에탄올 생성과 동시에 에탄올을 분리제거함으로써 저해 영향을 줄일 수 있다. 이 방법으로 진공정유법(2), 흡착법(3), 투석법(4), 추출법(5-7)등이 제안되었으며, 이중 액액추출법이 저렴한 공정(1)으로 보고되었다.

추출발효는 추출용매를 반응기에 직접 도입(6-7)하거나, 발효액을 외부용기에서 용매와 함께 순환추출(5)에 의하여 행해진다. 추출용매를 반응기에 직접도입하는 경우 상업적 규모의 반응기에서는 용매를 발효액에 분산시켜 안정한 에멀전을 만들려면 교반속도를 크게 해야한다. 이것은 하류공정에서 용매와 발효액의 분리를 어렵게 한다. 추출용매는 균체에 대한 독성이 낮고, 생성물에 대한 선택도 및 분배계수가 커야할 뿐 아니라, 하류공정에서 분리회수가 용이한 것이어야 한다.

여러가지 수용성 고분자들 사이에서, 또는 고분자와 무기염류사이에서 용이하게 형성되는 수성이상계(8-

9)는 두상 모두 함수율이 높고, 독성이 낮아 균체 및 효소에 좋은 주위환경을 제공한다. 계면장력이 매우 작은 에너지로도 안정한 에멀전을 만들 수 있고, 교반하지 않으면 용이하게 두상으로 분리된다. 이와같은 특성은 추출발효에 이용하기에 적합하다. 또 균체, 기질, 생성물 등은 수성이상계에서 어느 한쪽 상에 치우쳐 분배되거나, 두상 사이에 고르게 분배되므로 여러가지 생물공학제품의 분리에 많이 이용되고 있다(10-11).

수성이상계를 이용한 알콜 발효연구(12-14)는 수성이상계에서 알콜발효 가능성을 검토하는 수준에 머무르고 있다. 본 연구에서는 이상계 구성고분자중 널리 이용되는 PEG / Dextran계를 이용하고, 돼지감자의 탄수화물인 이눌린을 기질로 하여 *K. fragilis*에 의한 알콜발효시 발효특성과 기질, 균체, 알콜의 분배 및 분리특성에 대한 PEG분자량, PEG농도, Dextran농도의 주 영향을 조사하는데 목적을 두었다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 *Kluyveromyces fragilis* CBS 1555이며, 접종용배지에서 35°C, 24hr진탕배양한 후, 2시간 침강시켜 얻은 농축균체를 접종용 균주로 하였다. 접종용배지는 Glucose대신 Inulin을 10 g / l로 사용한 것을 제외하고 문헌(7)과 동일하며, pH를 5.5로 조정하기 위하여 Citric Acid와 Na₂HPO₄·7H₂O의 양을 증감하였다.

수성이상계 발효기질

이상계 구성고분자는 평균분자량 6000, 1000, 2000의 폴리에틸렌글리콜(PEG, Yakuri Chemical Co)과, 평균분자량 5백만~4천만의 Dextran(Sigma Chemical Co.)를 사용하였다. Dextran은 함수율이 높아, 40°C에서 3일간 진공 건조하여 사용하였다. PEG농도는 6%, 8%, 10%로 하였고, Dextran농도는 1%, 2%, 3%로 하였다. PEG분자량과 PEG농도, Dextran농도의 주효과를 검토하기 위하여 3³요인 실험계획(15)에 의거, 여러쌍의 PEG / Dextran이상계 발효기질 용액을 조제하였다. 모든 이상계 발효기질 용액에 대하여 PEG, Dextran이외의 성분 농도는 모두 동일하게 하였다. Dextran은 고압증기 멸균시 배지중의 질소원과 반응하여 불용성의 갈색침전을 형성하므로 PEG상과 Dextran상을 따로 조제하고 각각을 멸균시킨 후 혼합하여 발효실험에 사용하였다. 6% PEG 6000 / 1% Dextran 이상계 발효기질은 다음과 같이 조제하였다. 즉 PEG상은 PEG, 7.2 g ; Yeast Extract, 0.9 g ; K₂

PO₄, 0.36 g ; Na₂HPO₄·7H₂O, 0.66 g ; NH₄Cl, 1.2 g ; MgSO₄·7H₂O, 0.33 g ; CaCl₂, 0.0012 g ; Citric acid, 0.24 g ; Sodium citrate, 0.3 g을 증류수에 녹여 60ml가 되게 하여 사용하였고, Dextran상은 Dextran 1.2 g 과 이눌린 1.2 g을 증류수에 녹여 전체 부피 60ml로 하여 사용하였다.

발효실험

접종용 균주 3ml(균체농도 12 g / l)를 250ml 삼각플라스크내의 120ml 발효기질용액에 접종한 후, 35°C, 120rpm에서 3시간 진탕 배양하였다. 동일한 실험조건하에서 PEG / Dextran을 포함하지 않은 기질용액(접종용배지와 동일)에 대한 발효실험을 동시에 수행하여 수성이상계 발효실험결과와 비교하였다.

이눌린의 분배특성

이눌린 농도를 5 g / l로한 여러가지 이상계 발효기질 용액을 조제한 후 35°C 항온수조에서 1시간 방치후 시료를 채취하여 당농도를 분석하였다.

분배특성 연구

이상계에서 분배특성치, 즉 분배계수(K), 농축인자(α), 한쪽상에서의 분배수율(Y), 분배비(G)들은 다음과 같이 정의된다.

$$K_1 = C_{II} / C_{I1} = C_{IU} / [(C_{IO}V_0 - C_{IU} V_U) / V_1] \quad (1)$$

$$\alpha_1 \text{ bottom} = C_{II} / C_{IO} \quad (2)$$

$$\alpha_1 \text{ top} = C_{IU} / C_{IO} \quad (3)$$

$$Y_1 \text{ top} = 100C_{II} V_U / C_{IO} V_0 \quad (4)$$

$$Y_1 \text{ bottom} = 100C_{IU} V_e / C_{IO} V_0 \quad (5)$$

$$G_1 = C_{IU} V_U / C_{IO} V_0 \quad (6)$$

여기서 K₁, G₁는 각각 물질₁의 분배계수와 분배비이고, $\alpha_1 \text{ bottom}$ 과 $\alpha_1 \text{ top}$ 은 각각 아랫상과 윗상에서 물질₁의 농축인자, 그리고, Y_{1 top}과 Y_{1 bottom}은 각각 윗상과 아랫상에서 물질₁의 분배수율이다. 또, C_{IO}, C_{I1}, C_{II}은 각각 전체상, 윗상, 아랫상에서 물질₁의 농도이며 V₀, V_U, V_e은 각각 전체상, 윗상, 아랫상의 부피이다. 아랫상은 점도가 매우 높아서, C_{II}은 C_{I1}와 C_{IO}의 측정치로부터 계산하였다.

실험자료의 분석

실험결과는 Yates방법(13)에 따라 분산분석을 하였고, 유의수준 5%에서 F분포로 검정한 결과, 수순간 유의차가 있는 인자에 대하여, 95%신뢰도로 구간추정을

하였다. 유의차가 있는 한 인자의 주효과는 이상계 구성의 다른 인자의 수준이 어떻든, 유의차가 있는 인자만의 영향을 나타내는 것이다. PEG 6000이 주효과는 다른 이상계 구성인자인 PEG농도, Dextran 농도가 어떤 것이든 관계없이 PEG 6000만의 영향을 나타낸다. 연구대상 인자들, 즉 PEG분자량, PEG농도, Dextran농도중에서 분산분석결과, 유의차가 없는 인자는 기술하지 않았다.

시료의 분석

원심분리(2000 rpm, 5분)에 의하여 윗상과 아랫상을 분리한 후, 윗상과 아랫상의 부피를 측정하였다. 원심분리하기전에 전체상에 대하여 현미경으로 관찰한 결과 균체는 윗상에서 나타나지 않았다. 균체농도는 아랫상에 대하여만 분석하였고, 이것을 균체의 전체농도로 보았다. 알콜농도와 당농도는 전체상과 윗상을 각각 분석하고 이로부터 아랫상의 농도를 구하였다. 총당농도는 Anthrone 법(10-16)에 의하여 분광광도계(Shimadzu UV-120-2)로 분석하였고, 알콜농도는 isopropanol을 기준물질로하여 Table 1의 조건하에서 Gas Chromatography (Varian Aerography 1800)로 분석하였다. 균체농도는 50℃증류수로 10회 세척하였고 매 세척시마다 5000rpm에서 15분 원심분리하였으며, 105℃건조기에서 24시간 건조후 균체의 건조중량을 측정하였다.

Table. 1. Operation Conditions of Gas Chromatography

Detector	Flame Ionization Detector
Column Material	Porapak Q 80 / 100
Oven temp	200℃ isothermal
Detector temp	230℃
Injector temp	230℃
Gas flow rate	Carrier gas, He, 20ml / min Air 300ml / min H ₂ 30ml / min

결과 및 고찰

에탄올발효특성에 대한 PEG분자량의 영향

Table 2는 분산분석결과 PEG분자량에 대하여 유의차가 있는 발효특성치, 에탄올 발효능(F), 균체수율($\Delta x / \Delta s$), 에탄올생산성($\Delta p / \Delta t$), 균체생산성($\Delta x / \Delta t$)에 대한 PEG분자량의 영향을 나타내고 있다. 에탄올발효능은 PEG분자량이 증가함에 따라 감소하였으나, PEG10000이하인 경우에는 순수기질 용액의 발효능보다 높게 나타났다. 반면 균체수율은 PEG20000인 경우, PEG10000인 경우보다 2배이상 높게 나타났을 뿐만아니라 순수기질용액의 균체수율보다 높았다. 에탄올생산성은 PEG분자량이 감소할수록 증가하는 경향을 나타내었으며, 균체생산성은 PEG분자량이 증가할 수록 증가하였다.

점도는 Dextran분자량이 높을수록 증가하지만, 윗상의 PEG분자량이 높은것을 사용함으로써 아랫상의 점도를 낮게 할수있다(15). 점도가 높으면 산소의 전달저항이 커지므로, PEG분자량이 낮은 경우에 비하여, PEG분자량이 높은 경우에 아랫상은 보다 더 호기성 환경에서 될 것이다.

균체와 에탄올에 대한 PEG분자량의 영향이 위에서 기술한 바와 같이 나타나는 것은 아랫상에 존재하는 균체주위의 산소농도 차이에 기인한 Pasteur 효과 때문인 것으로 보인다. 에탄올수율($\Delta p / \Delta s$)은 분산분석결과 유의수준 5%에서 유의차가 없었다.

에탄올 발효특성에 대한 PEG농도와 Dextran농도의 영향

에탄올 발효특성중 에탄올 발효능, 에탄올수율, 균체수율은 PEG농도에 대하여 분산분석결과 유의수준 5%에서 유의차가 없었다. 또 Dextran 농도에 대하여는 분산분석결과 유의수준 5%에서 에탄올 수율만이 유의차가 있는 것으로 나타났다.

Table 3은 $\Delta p / \Delta t$ 와 $\Delta x / \Delta t$ 에 대한 PEG농도의

Table. 2. Effect of PEG molecular weight on the Ethanol fermentation characteristics

MW	F	$\Delta x / \Delta s$	$\Delta p / \Delta t$	$\Delta x / \Delta t$
PEG 6000	93.1 ± 3.7	0.035±0.023	1.21 ± 0.05	0.076±0.034
PEG 10000	92.8 ± 3.7	0.038±0.023	1.10 ± 0.05	0.084±0.034
PEG 20000	85.9 ± 3.7	0.079±0.023	1.0 ± 0.05	0.144±0.034
Control	87.2	0.057	0.89	0.13

영향과 $\Delta p / \Delta s$ 에 대한 Dextran농도의 영향을 나타낸 것이다. 에탄올 생산성($\Delta p / \Delta t$)은 PEG농도가 증가함에 따라 감소하였고, 균체생산성($\Delta x / \Delta t$)은 에탄올생산성과 반대의 경향을 나타내었다. 에탄올발효특성에 대한 PEG농도의 영향은 PEG분자량의 영향과 유사한 경향을 나타내었다.

에탄올수율($\Delta p / \Delta s$)은 Dextran농도가 감소할수록 다소 증가하는 경향을 보였다. 순수기질용액의 에탄올수율, 0.39에 비하면 이상계를 이용한 경우에 에탄올수율은 크게 증가하였다. 이상의 결과들로 부터 PEG분자량은 10000이하에서, PEG농도는 8%이하에서, Dextran농도는 1%이하에서 에탄올 발효능 및 에탄올생산성에 대하여 양호함을 알 수 있었다.

발효알콜의 분배특성

발효후 3시간에 생성된 에탄올의 분배특성에 대하여 PEG분자량, PEG농도, Dextran 농도의 영향을 조사하였다. 분배계수(K) 농축인자(α_{top}), 분배비(G), 에탄올의 분배수율(Y_{top})에 대한 분산분석 결과, 에탄올의 분배수율(Y_{top})이 유의수준 5%에서 Dextran농도에 대하여 유의차가 있는 것으로 나타났다. 이 결과를 Table 4에 나타내었다. Dextran농도가 낮을수록 발효액중에 존재하는 알콜 총량중 윗상에 존재하는 알콜량이 증가하는 경향을 보였다. 이것은 두가지 요인에 의한 것으로 생각

할 수 있다. 하나는 Dextran농도의 감소에 따른 부피비(V_u / V_l)증가에 기인하는 것이고, 다른 하나는 두상 사이에 이온분포이 불균형에 기인하는 것이다. 발효기질용액이 성분들중 citric acid를 제외한 나머지 성분들은 모두 아랫상에 보다 많이 분배된다. 또한 SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^{2-}$, 및 Citrate이온등 산소함유이온은 Dextran의 hydroxyl 기와 수소결합을 이루는 반면 PEG와 산소함유이온사이에는 약한 반발력이 존재한다(10).

에탄올의 전자쌍공여치는 20으로 물의 전자쌍공여치, 18보다 다소 크며, 에탄올의 전자쌍수용치 37.1은 물의 전자쌍수용치 54.8보다 작다(11). Lewis 염기는 Lewis 산보다 에탄올에 대한 선택성이 작을 것이다. 그러므로 에탄올은 SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^{2-}$ 등 Lewis 염기가 많이 분배된 아랫상에서 윗상으로 이동하게 될 것으로 생각된다. 따라서 이러한 요인들이 Dextran 농도의 영향을 반영하는 것으로 보인다.

이눌린의 분배특성

이눌린의 분배특성에 대한 분산분석결과 유의수준 5%에서 이눌린의 분배계수는 PEG분자량에 대하여 유의차를 보였다. 그러나, 농축인자($\alpha_{inulin, bottom}$), 분배비(G_{inulin}), 아랫상에서 이눌린의 분배수율($Y_{inulin, bottom}$)은 PEG분자량에 대하여 유의차가 없었다.

Table 5는 이눌린의 분배계수에 대한 PEG분자량의

Table. 3. Effect of PEG concentration and Dextran concentration on the Ethanol Fermentation Characteristics

	PEG Conc.			Dextran Conc.		
	6%	8%	10%	1%	2%	3%
$\Delta p / \Delta t$	1.16±0.05	1.13±0.05	1.02±0.05	—	—	—
$\Delta x / \Delta t$	0.081±0.034	0.080±0.034	0.142±0.034	—	—	—
$\Delta p / \Delta s$	—	—	—	0.49±0.01	0.47±0.01	0.46±0.01

Table. 4. Effect of Dextran Concentration on the Ethanol Partition Yield in the top phase

	1%	2%	3%
$Y_{EtoA, top}$	95.5±7.9	88.3±7.9	76.9±7.9

Table. 5. Effect of PEG molecular weight on Inulin partition Coefficient.

	PEG 6000	PEG 10000	PEG 20000
K	0.138±0.012	0.135±0.012	0.114±0.012

영향을 나타낸 것이다. 이눌린의 분배계수는 PEG분자량이 증가함에 따라 다소 감소하는 경향을 보였으나, 그 차이는 크지 않았다. 이 경향은 전분이 PEG분자량과 무관하게 아랫상에 분배하는 경향을 보인다(10)는 사실과 유사하였다.

Table 6은 이눌린의 분배특성에 대한 PEG농도의 영향을 나타낸 것이다. 분산분석결과 유의수준 5%에서 PEG농도가 유의차를 나타낸 것은 이눌린의 분배계수와 농축인자이었다. 분배비와 분배수율에 대하여는 유의차가 없었다. PEG농도가 증가함에 따라 이눌린의 분배계수는 감소하는 경향을 보였으며 농축인자는 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 7은 유의수준 5%에서 Dextran농도가 유의차를 보인 이눌린의 분배계수, 분배비, 아랫상에서의 분배수율을 나타낸 것이다. Dextran농도에 대하여 유의수준 5%에서 농축인자(α)는 유의차가 없었다. Dextran농도가 증가함에 따라 이눌린의 분배계수와 아랫상에서의 이눌린 분배수율은 증가한 반면, 이눌린의 분배비는 감소하였다. 이들 이눌린의 분배특성 실험결과로부터 아랫상에 존재하는 이눌린의 양이 많은 조건은 PEG분자량 2000, PEG농도 3%이었다.

요 약

균주 *K. fragilis*에 의한 이눌린의 PEG / Dextran 수성 이상계 알콜발효실험에서 알콜발효특성, 알콜 및 이눌린의 분배특성에 미치는 PEG분자량, PEG농도, Dextran농도의 영향을 구명하여 보았다.

Dextran농도 1내지 3wt% 범위에서 에탄올 발효능과 에탄올생산성은 PET분자량 증가에 따라 감소하였으며

균체수율과 균체생산성은 그 반대 경향을 나타내었다.

PEG농도 6내지 10wt% 범위에서 PEG농도가 증가함에 따라 에탄올생산성은 미세한 감소현상을 나타내었으나 균체생산성은 뚜렷한 증가 경향을 보였다.

PEG농도 6내지 10wt% 범위에서 윗상에서의 에탄올분배수율은 아랫상의 Dextran농도가 증가할수록 감소하였다.

이눌린 분배계수는 PEG분자량 증가에 따라 미세하게 감소하였으며, PEG농도 증가에 따라서는 분배계수는 감소하였으나 농축인자는 증가 경향을 나타내었다. Dextran 농도에 영향을 받는 이눌린 분배특성은 분배계수, 분배수율 및 분배비이었으며, Dextran농도 증가에 따라 분배계수와 아랫상에서의 이눌린 분배수율은 증가하는 반면 이눌린 분배비는 감소경향을 나타내었다.

감 사

본 연구는 1989년도 한국학술진흥재단 학술연구조성비 지원에 의하여 이루어진 것입니다. 이에 대하여 심심한 감사사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. B. L. Maiorella, H. W. Blanch and C. R. Wilke (1984) *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1003.
2. M. C. Dale, M. R. Okos and P. C. Wankat(1985) *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 932, 943.
3. W. W. PiH Jr., G. L. Haag and D. D. Lee(1983) *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 123.
4. K. H. Kyung and P. Gerhardt (1984) *Biotechnol.*

Table. 6. Effect of PEG concentration on the partition coefficient and concentrating factor of Inuline

	6%	8%	10%
K	0.158-0.012	0.127±0.012	0.101±0.012
α_{bottom}	3.66±0.19	4.7 ± 0.19	5.55±0.19

Table. 7. Effect of Dextran concentration on K, G, Y_{bottom} of Inuline

	K	G	Y_{bottom}
1%	0.098±0.012	1.303±0.133	43.7±3.9
2%	0.152±0.012	0.993±0.133	50.6±3.9
3%	0.137±0.012	0.65 ± 0.133	60.7±3.9

- Bioeng.*, **26**, 252
5. T. K. Murphy, H. W. Blanch and C. R. Wilke (1982) *Process Biochem.*, Nov / Dec, 6
 6. M. Minier and G. Goma (1981) *Biotechnol. Lett.*, **3**, 405
 7. M. Minier and G. Goma(1982) *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1565
 8. P. A. Albertsson (1971), *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, 2nd ed., Wiley-Interscience, N.Y.
 9. M. R. Kula, K. H. Kroner, H. Hustedt (1982) *Adv. Biochem. Eng.*, **24**, 73
 10. L. H. Koehler (1952) *Anal. Chem.*, **24**, 1576
 11. C. L. Munson and C. J. King(1984) *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, **23**, 109
 12. I. Kuhn (1980) *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 2393
 13. B. H. Hagerdal, B. Matliasson and P. A. Albertsson (1981) *Biotechnol. Lett.*, **3**, 53
 14. B. H. Hagerdal et. al., (1982) *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **32**, 157
 15. D. C. Montgomery(1976) *Design and Analysis of Experiments*, p. 198, John Wiley & sons., N.Y.
 16. M. A. Jermyn(1975) *Anal. Biochem.*, **68**, 332

(Received: June 18, 1990 Accepted: June 25, 1990)