

## 에탄올 발효에서 부산물 생성에 미치는 환경인자의 영향

김진현·유영제  
서울대학교 공과대학 화학공학과

### Effect of Environmental Factors on By-products Production in Ethanol Fermentation

Jin Hyun Kim and Young Je Yoo

Department of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

#### ABSTRACT

In ethanol fermentation, by-products such as glycerol, acetic acid and lactic acid are produced along with ethanol. The effects of culture conditions on cell growth ethanol production and by-products biosynthesis were investigated in ethanol fermentation using *S. cerevisiae*. With increasing aeration rate or yeast extract concentration, ethanol and by-products biosynthesis decreased while final cell mass increased. With increasing glucose concentration or decreasing temperature, final cell mass, ethanol and by-products concentrations all increased. The optimal pH for the cell growth, ethanol and by-products productions was found to be pH 4.5. By-products biosynthesis was found, in general, to proceed with the ethanol biosynthesis. The results can be applied for the optimization of ethanol fermentation and for the recovery and purification of ethanol from the culture broth.

#### 서론

효모를 이용한 에탄올 발효공정에서 유입된 포도당은 주요 대사산물인 에탄올과 이산화탄소 이외에 glycerol, acetic acid, lactic acid 등과 같은 여러 가지 발효부산물 생성에 이용되어진다. 이러한 효모의 대사작용은 1954년 Lemoigne 등(1)에 의하여 처음으로 연구되기 시작하여 최근까지 많은 연구가 진행되고 있다. Lemoigne 등은 호기성 효모의 성장에 대하여 정량적인 연구를 수행한 결과 효모의 성장에 먼저 유입된 포도당을 소모하여 성장한 다음 포도당이 고갈되면 생성된 부산물을 소모하여 다시 성장하는 diauxic growth pattern을 보여줌을 발견하였다. 이러한 사실은 Beck과 von Meyenburg(2)에 의하여 재확인되었다. 연속발효공정에서 희석률(dilution

rate)이 낮은 경우에는 유입된 포도당은 부산물의 생성없이 완전 산화되는 반면 희석률이 높은 경우에는 유입된 포도당이 부분 산화되어 부산물이 생성된다(3). 즉, 포도당 유입이 적으면 호흡계(respiratory system)가 산소요구량을 만족시켜 포도당이 완전 산화된다. 이러한 경우에는 부산물 생성이 일어나지 않는다. 그러나 세포성장속도가 증가하면서 포도당 소모속도가 증가하여 임계성장속도를 넘어가면 호흡용량(respiration capacity)이 산소요구량을 충족시키지 못하게 된다. 이러한 경우 유입된 포도당은 완전히 산화되지 못하고 더 많은 ATP를 얻기 위하여 부산물로 전환된다. 이상에서의 부산물 생성은 산소제한(oxygen limitation)이 없는 것으로 하고 있으나 실제 산소공급은 발효부산물 생성에 영향을 미치는 또 다른 요인이다.

일반적으로 에탄올 발효공정을 통하여 생성되는 부산물의 양은 발효에 사용되는 원료, 균주, 배지 조성, 발효공정 등에 영향을 받는 것으로 알려져 있다 ((4). 특히 Cachot 등(5)은 *S. cerevisiae*를 이용한 cane molasses의 에탄올 발효에서 접종량, molasses 농도, molasses의 아미노산 함량 및 배양형태 (batch, fed-batch)에 따른 부산물 생성에 관하여 보고하였으나 에탄올 발효에서 매우 중요한 환경인자들이 부산물 생성에 미치는 영향에 관한 연구는 아직 상당히 부족한 실정이다. 발효공정을 통한 부산물의 생성은 최종적으로 에탄올 분리공정을 포함한 에탄올 생산공정 전반에 영향을 미치므로 이에 대한 연구는 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 에탄올 발효에서의 주요 환경인자의 온도, pH, 통기 속도, 초기 포도당농도, 효모추출물(yeast extract) 농도 등이 세포성장과 에탄올 및 부산물 생성에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 이러한 연구결과를 효모를 이용한 효율적이고 경제적인 에탄올 생산공정에 이용가능하다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

*Saccharomyces cerevisiae*(ATCC 24858)을 에탄올 생산을 위한 균주로 사용하였다. 균주를 20g/l glucose, 5g/l bacto-peptone, 3g/l yeast extract, 3g/l malt extract, 15g/l agar를 첨가하여 고형화한 고형 배지 위에서 배양하여 4°C에서 보관하면서 접종에 사용하였다.

### 배지 및 발효조건

접종을 위한 성장배지의 조성은 20g/l glucose, 5g/l bacto-peptone, 3g/l yeast extract, 3g/l malt extract이며 발효를 위한 생산배지(기본배지)의 조성은 탄소원으로 포도당 100g/l, yeast extract 5g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5g/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1g/l이었으며 초기 포도당 농도 변화에 따른 다른 성분의 조성은 위의 기본 조성에 대한 포도당의 변화량과 비례적으로 변화시켰다.

### 실험장치 및 방법

종균배양은 250ml-삼각플라스크를 사용하였고 균주를 100ml의 멸균된 배지에 접종하여 진탕배양기에서 150rpm, 30°C의 조건에서 배양하였다. 회분식 배양은 5ℓ-발효조를 사용하였고 배양용량은 2ℓ로

**Table 1. Effects of the aeration rate on the maximum dry cell weight, ethanol production and by-products formation.**

Aeration rate (vvm)	maximum cell conc. (g/l)	Maximum ethanol conc. (g/l)	Maximum glycerol conc. (g/l)	Maximum acetaldehyde conc. (g/l)	Maximum acetic acid conc. (g/l)
0.0	1.98	13.0	0.52	0.44	0.31
0.1	2.43	12.2	0.48	0.40	0.29
0.5	2.60	11.9	0.47	0.38	0.28
1.0	2.68	10.2	0.43	0.33	0.25
2.0	2.80	9.80	0.39	0.32	0.23
2.5	3.17	8.50	0.33	0.28	0.20

\* Initial glucose concentration = 30g/l

\* Initial pH = 4.0

\* Temperature = 30°C

하였다. 통기속도는 0.5vvm, 배양온도는 30°C, 교반속도는 400rpm 그리고 pH는 배양시작 전에 4.0으로 맞추었다.

### 분석방법

세포농도는 분광광도계(Bausch & Lomb, Spectronic 20)를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하여 보정곡선으로부터 결정하였다. 포도당 농도는 DNS방법(6)을 사용하여 측정하였다. 에탄올, acetic acid, acetaldehyde, glycerol 및 그 이외의 발효 부산물의 농도는 Fermentation monitoring column (BIO-RAD 125-0115)이 부착된 HPLC(Waters)를 사용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 통기속도 영향

초기 포도당 농도 30g/l로 회분식 배양을 수행하여 통기속도에 따른 세포성장, 에탄올 생성 및 부산물 생성 정도를 관찰하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. *S. cerevisiae*의 경우 통기속도가 증가함에 따라 최대세포농도는 거의 선형적으로 증가하는 반면 최대 에탄올 및 부산물 농도는 감소함을 알 수 있었다. 이러한 선형적인 관계는 *Pichia stipitis*와 *Candida sp.*를 이용한 Rizzi 등(7), Baillargeon 등(8) 및 Grootjen 등(9) 등에 의하여 보고된 바와 일치한다. 또한 이러한 선형관계는 산소가 제한될 때까지 계속되는데 이는 효모의 유전적인 호흡능력

에 한계가 있기 때문에 판단된다. 통기속도 2.5vvm으로 배양하였을 경우에는 산소공급이 전혀 없이 배양한 경우에 비하여 최대 세포 농도는 60% 정도 증가하는 반면 최대 에탄올 농도는 35% 정도 감소하였으며 부산물의 경우에는 glycerol 37%, acetaldehyde 36%, acetic acid 35% 정도 더 적게 생성되었다. 전체적으로 에탄올 및 부산물 생성보다는 세포성장이 통기속도에 더 민감함을 알 수 있다. Cysewski와 Wilke(10), Ryu 등(11)도 이와 유사한 결과를 얻었는데 *S. cerevisiae*를 사용한 연속발효에서 미량의 산소농도(80  $\mu\text{mol oxygen}/\text{h}$ )에서 비에탄올 생산 속도가 최적일 때를 보였고 산소농도가 증가함에 따라 비에탄올 생산속도와 비포도당 소모속도가 감소함을 보고하였다. 여기에서 산소의 역할은 최종전자수용체보다는 필수영양분으로서의 기능이다(11). 낮은 수준의 산소는 효모막의 필수성분인 불포화 지방산과 스테롤의 생합성에 필요한데(11), 지질층의 불포화도의 증가는 효모의 활성을 증진시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 통기속도의 영향은 비성장속도와 비포도당 소모속도의 관계로부터도 알 수 있는데 Fig. 1에서 보는 바와 같이 통기속도가 높은 경우 세포성장을 위한 maintenance coefficient는 감소하는 반면 yield constant는 증가하는 경향을 보여주고 있어 세포성장은 증가하나 에탄올 및 부산물의 생성은 감소함을 설명해 주고 있다. Espinasa 등(12)과 Jones(13)도 이와 유사한 결과를 얻었는데 통기속도는 증가함에 따라 에탄올 발효공정에서의 주요 부산물인 glycerol의 생성은 감소하는 반면 비성장속도가 증가함에 따라서는 그 생성이 증가됨을 보고하였다.

#### 온도 영향

여러 배양온도(25°C~40°C)에서 초기 포도당 농도 30g/l로 회분식 배양을 수행하여 에탄올 발효공정에 미치는 온도의 영향에 대하여 조사하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 배양온도가 높아질수록 최종 세포농도는 낮아짐을 알 수 있었으며 에탄올 생성과 부산물 생성에 대하여도 유사한 결과를 얻었는데 배양온도가 높을수록 최종 에탄올 및 부산물 농도는 낮게 나타났다. 또한 배양온도가 25°C, 30°C, 35°C, 40°C로 증가할수록 배양시간은 각각 17hr, 13hr, 11hr, 9hr로 감소하였다. 이러한 사실은 Nanba 등(14)에 의해서도 보고된 바 있다. 즉, *S. cerevisiae*를 이용한 에탄올 발효에서 배양온도가 낮으면 세포성장과 에탄올 생성속도는 낮으나 최종

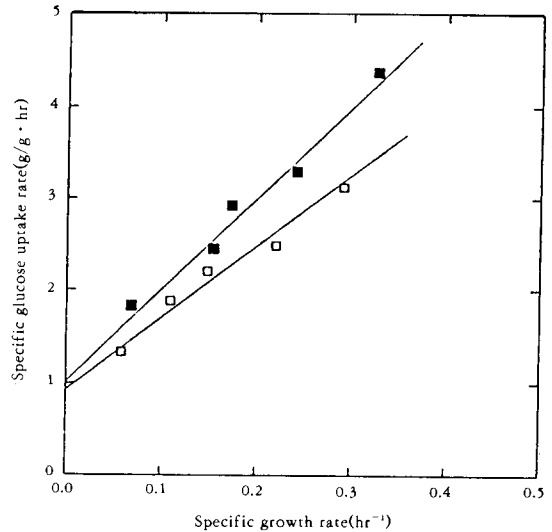


Fig. 1. Correlation between the specific glucose uptake rate and specific growth rate for various aeration rates.

■: 0.5vvm, □: 1.0vvm

Table 2. Effects of the temperature on the maximum dry cell weight, ethanol production and by-products formation.

Temperature (°C)	Maximum cell conc. (g/l)	Maximum ethanol conc. (g/l)	Maximum glycerol conc. (g/l)	Maximum acetaldehyde conc. (g/l)	Maximum acetic acid conc. (g/l)
25	2.60	11.2	0.44	0.37	0.27
30	2.55	10.7	0.41	0.35	0.25
35	2.21	9.5	0.36	0.31	0.22
40	2.03	8.0	0.32	0.25	0.18

\* Initial glucose concentration = 30g/l

\* Initial pH = 4.0

\* Aeration rate = 0.5vvm

세포농도와 에탄올 농도는 높은 온도로 배양하였을 경우에 비하여 높게 나타났다. 25°C로 배양하였을 경우에는 40°C로 배양하였을 경우에 비하여 최종 세포농도는 약 28%, 최종 에탄올 농도는 약 40% 증가하였다. 발효부산물의 경우에는 glycerol 38%, acetaldehyde 48%, acetic acid 50% 증가하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 낮은 배양온도에서 배양

시간은 연장되나 높은 농도의 에탄올 및 부산물을 얻게 된다.

#### pH 영향

일반적으로 미생물의 성장속도는 중성 근처에서 최대치를 보이고 높거나 낮은 pH 범위에서는 급격히 저하된다. 본 연구에서는 여러 pH(3.5~6.5) 범위에서 초기 포도당 농도 30g/l로 회분식 배양을 통하여 에탄올 발효공정에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 pH 4.5와 5.0인 경우에는 거의 비슷한 경향으로 세포성장, 에탄올 생성 및 부산물 생성이 이루어지거나 pH 범위가 4.0 이하나 6.0 이상으로 되면 세포성장, 에탄올 생성 및 부산물 생성이 급격히 감소함을 알 수 있다. 초기 포도당 농도 30g/l로 회분식 배양한 결과 pH 4.5에서 최대 세포 농도, 최대 에탄올 농도, 최대 glycerol 농도, 최대 acetaldehyde 농도, 최대 acetic acid 농도를 나타내었다. 배지 내의 pH는 세포성장과 발효대사산물의 생성에 영향을 주는 매우 중요한 환경인자로서 미생물에 미치는 pH 영향에 대해서는 많이 보고되고 있다(15). 예를 들면, 효모의 성장에 있어서 Wasungu와 Simard(16)는 pH 4.0~4.5, Reed와 Pepler(17)는 pH 4.4~4.8, Eroshin 등(18)은 pH 4.2에서 각각 최적임을 보고하였다. 이러한 수치는 본 연구 결과의 pH 4.5와 거의 일치한다.

#### 초기 포도당 농도 영향

초기 포도당 농도를 달리한(15, 30, 60, 80g/l) 회분식 배양에서 에탄올 발효공정에 미치는 포도당의 영향에 대하여 조사하여 초기 포도당 농도 변화에 따른 최대 세포 농도, 에탄올 및 부산물 농도를 Table 4에 나타내었다. 초기 포도당 농도의 증가에 따라 세포 농도, 에탄올 및 부산물 농도는 증가하는 반면 수율은 감소하였다. 세포농도와 에탄올 농도는 초기 포도당 농도 80g/l인 경우에 비해서 15g/l일 경우에는 각각 44%, 77% 감소하였으며 발효부산물의 경우에도 유사한 결과를 보여 glycerol 78%, acetaldehyde 79%, acetic acid 79% 감소하였다. 또한 초기 포도당 농도가 높을수록 수율(yield)이 감소함으로써 생성된 에탄올에 의하여 세포성장, 에탄올 및 부산물 생성이 더 심하게 저해받는 것으로 추측되는데 이러한 저해정도는 에탄올 생성이나 발효 부산물 생성에 비하여 세포성장이 더 심하게 저해됨을 알 수 있었다.

Table 3. Effects of the pH on the maximum dry cell weight, ethanol production and by-products formation.

pH	Maximum cell conc. (g/l)	Maximum ethanol conc. (g/l)	Maximum glycerol conc. (g/l)	Maximum acetaldehyde conc. (g/l)	Maximum acetic acid conc. (g/l)
3.5	2.25	9.90	0.38	0.30	0.22
4.5	2.58	11.5	0.45	0.36	0.27
5.0	2.48	11.1	0.41	0.33	0.24
6.5	2.21	9.50	0.35	0.28	0.18

\* Initial glucose concentration = 30g/l

\* Aeration rate = 0.5vvm

\* Temperature = 30°C

Table 4. Effects of the initial glucose concentration on the maximum dry cell weight, ethanol production and by-products formation.

Initial glucose conc. (g/l)	Maximum cell conc. (g/l) (Yield)	Maximum ethanol conc. (g/l) (Yield)	Maximum glycerol conc. (g/l) (Yield)	Maximum acetaldehyde conc. (g/l) (Yield)	Maximum acetic acid conc. (g/l) (Yield)
15	1.90 (0.127)	6.80 (0.453)	0.28 (0.019)	0.23 (0.015)	0.18 (0.012)
30	2.20 (0.073)	13.0 (0.433)	0.54 (0.018)	0.45 (0.015)	0.33 (0.011)
60	2.90 (0.048)	24.0 (0.400)	0.98 (0.016)	0.86 (0.014)	0.65 (0.011)
80	3.40 (0.043)	30.0 (0.375)	1.26 (0.015)	1.08 (0.013)	0.84 (0.010)

\* Initial pH = 4.0

\* Aeration rate = 0.5vvm

\* Temperature = 30°C

#### 효모추출물 영향

일반적으로 많은 질소원을 함유하고 있는 것으로 알려져 있는 효모추출물(yeast extract)은 효모에 의하여 흡수·동화되어 주로 아미노산, 핵산, 단백질 및 세포벽 구성성분 합성에 이용된다(19, 20). 이러한 효모추출물(DIFCO Co.)이 에탄올 발효에서 세포성장과 에탄올 및 발효 부산물 생성에 미치는 영향에 관하여 조사하였다. 초기 배지 내의 효모추출물 양에 따라 세포성장, 에탄올 및 부산물 생성, 포도당 소모 등이 영향을 받게 되는데 세포성장의

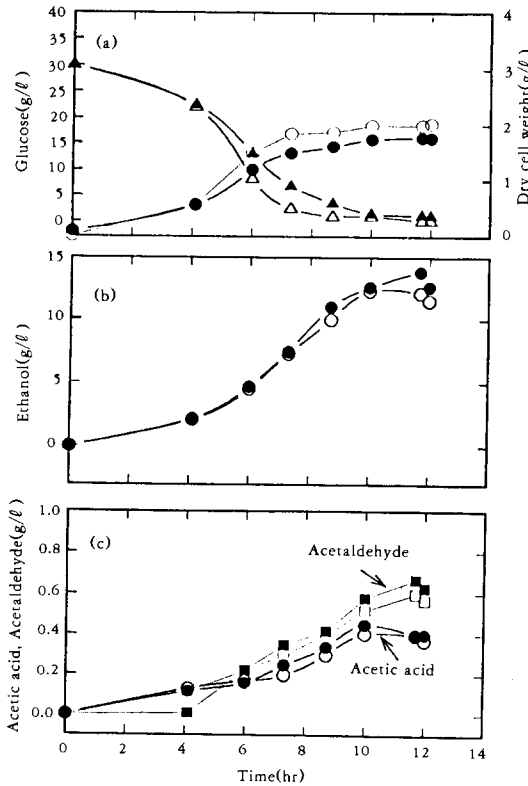


Fig. 2. Effect of yeast extract concentration on (a) the cell growth and glucose uptake, (b) ethanol production and (c) acetic acid and acetaldehyde production during ethanol fermentation.

△, ○, □: Yeast extract 5.0g/l  
 ▲, ●, ■: Yeast extract 2.5g/l

경우 Fig. 2에서 보는 바와 같이 초기 효모추출물의 농도를 2.5g/l로 하여 배양하였을 경우 최종 세포 농도 1.80g/l를 얻었는데 비하여 초기 효모추출물의 농도를 5.0g/l로 하여 배양하였을 경우 최종 세포농도 2.05g/l를 얻어 세포성장의 측면에서 14% 정도 증가함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 효모추출물이 여러 가지 세포구성 성분으로 이루어진 질소 원이기 때문으로 판단된다. 포도당 소모형태의 경우에도 차이를 보였는데 초기 효모추출물의 농도를 2.5g/l로 하여 배양하였을 경우에 비하여 5.0g/l로 하여 배양하였을 경우 포도당 소모속도가 증가함을 알 수 있었다. 에탄올 및 발효부산물의 생성은 세

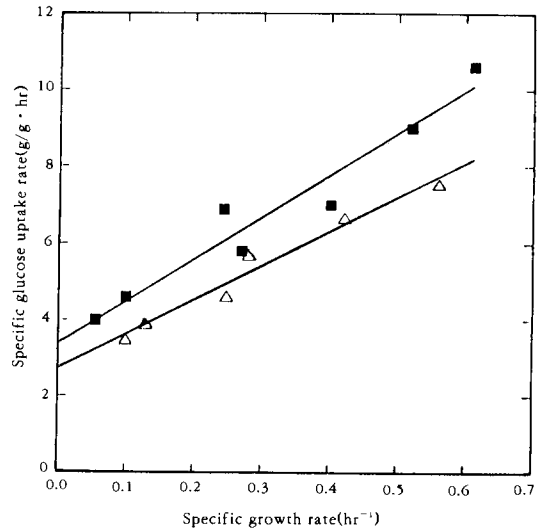


Fig. 3. Correlation between the specific glucose uptake rate and specific growth rate for various yeast extract concentrations.

■: 2.5g/l, △: 5.0g/l

포성장의 경우와는 달리 효모추출물 농도의 증가에 따라 오히려 감소함을 알 수 있었다. 초기 효모추출물의 농도를 2.5g/l로 하여 배양하였을 경우 초기 효모추출물의 농도를 5.0g/l로 하여 배양하였을 경우에 비하여 에탄올, acetic acid 및 acetaldehyde는 각각 10%, 12%, 12% 정도 더 많이 생성되었다. 이러한 효모추출물의 영향은 비성장속도와 비포도당 소모속도의 관계로부터도 알 수 있는데 Fig. 3에서 보는 바와 같이 효모추출물의 농도가 높은 경우 세포성장을 위한 maintenance coefficient는 감소하는 반면 yield constant는 증가하는 경향을 보여주고 있어 세포성장은 증가하나 에탄올 및 부산물의 생성은 감소함을 설명해 주고 있다. Han 등(21)에 의하여도 이와 유사한 결과가 보고되었는데 *E. coli* 발효에서 부산물로 생성되는 acetic acid 생성을 배지에 효모추출물 농도를 증가시켜줌으로써 줄일 수 있었다.

종합적으로 고찰하면 산소 공급 및 yeast extract 농도를 높게 한다면 세포농도는 증가하나 에탄올 및 부산물의 생성은 감소하는 경향을 보이며, 온도를 낮추던가 포도당 농도를 증가시키면 세포, 에탄올 및 부산물의 생성이 동시에 증가하는 경향을 보여주고 있으며, 세포, 에탄올 및 부산물의 생성을 토대로 하는 최적 pH가 있음을 확인하였다. 또한 효모에 의

한 부산물의 생성은 에탄올 생성과 비례하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 에탄올 발효공정의 최적화 및 에탄올 발효 후 부산물을 고려하여 에탄올을 분리 및 정제하는 공정에 활용될 수 있을 것이다.

## 요 약

에탄올 발효에서의 주요 환경인자인 온도, pH, 통기속도, 초기 포도당 농도, 효모추출물 농도 등이 세포성장과 에탄올 및 부산물 생성에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 통기속도가 증가함에 따라 최대 세포농도는 거의 선형적으로 증가하는 반면 최대 에탄올 및 부산물 농도는 감소하였다. 배양온도가 높아질수록 세포의 성장속도와 에탄올 및 부산물 생성속도는 증가하는 반면 최종 세포농도와 최종 에탄올 및 부산물 농도는 오히려 낮게 나타난다. 배지 내의 pH 범위가 4.0 이하나 6.0 이상으로 되면 세포성장, 에탄올 및 부산물 생성이 급격히 감소하였고 pH 4.5에서 세포농도와 에탄올 및 부산물 농도가 최대치를 나타내었다. 초기 포도당 농도의 증가에 따라 세포농도와 에탄올 및 발효 부산물 농도는 증가하였으나 수율은 오히려 감소하였다. 효모추출물 농도가 증가하면 세포성장은 증가하나 에탄올 및 부산물의 생성은 오히려 감소하였다.

## 참고 문헌

1. M. Lemoigne, J. P. Aubert and J. Millet (1954), *Ann. Inst. Pasteur*, **87**, 427.
2. C. Beck and H. K. von Meyenburg(1968), *J. Bacteriol.*, **96**, 479.
3. J. P. Barford and R. J. Hall(1979), *J. Gen. Microbiol.*, **114**, 267.
4. W. Borzani, M. L. R. Vairo, I. H. Koshimizu, M. R. De Melo Cruz and L. J. Perego(1981), *Biomass*, **1**, 115.
5. T. Cachot, M. Muller and M. N. Pons(1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 450.
6. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
7. M. Rizzi, C. Klein, C. Schulze, N. A. Bui-Thanh and H. Dellweg(1987), *Poster presented at ECB4 Amsterdam*.
8. M. W. Baillargeon, N. B. Jansen, C. S. Gong and G. T. Tsao(1983), *Biotechnol. Letts.*, **5**, 339.
9. D. R. J. Grootjen, R. G. J. M. van der Lans and K. Ch. A. M. Luyben(1990), *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 20.
10. G. R. Cysewski and C. R. Wilke(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125.
11. D. D. D. Ryu, Y. J. Kim and J. H. Kim (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 12.
12. R. Espinasa, V. Cojulum and F. Marroquin (1978), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **8**, 69.
13. C. W. Jones, H. W. Doelle and N. Pamment (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 4.
14. A. Nanba, Y. Nishizawa, Y. Tsuchiya and S. Nagai(1987), *J. Ferment. Technol.*, **65**, 277.
15. Z. Buzas, K. Dallmann and B. Szajani(1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 882.
16. P. K. Wasungu and A. Simard(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 824.
17. I. C. Reed and S. T. Pepler(1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1063.
18. J. Eroshin, H. Lawford, P. Holloway and A. Ruggiero(1988), *Biotechnol. Letts.*, **10**, 809.
19. F. R. Mistry and C. L. Cooney(1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1295.
20. J. Snay, J. W. Jeong and M. M. Attai(1971), *Can. J. Rev.*, **25**, 56.
21. K. H. Han, H. C. Lim and J. Hong(1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 663.