

*Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 반복 유가식 ethanol 발효에서 ethanol 생산량을 증가를 위한 운전 전략

이상은 · 서현범 · 권민철¹ · 이현용¹ · 정경환*

충주대학교 바이오산업학과, ¹강원대학교 생물소재공학전공

Operational Strategy for Increasing Ethanol Production in Repeated Fed-batch Ethanol Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae*

Sang-Eun Lee, Hyeon-Beom Seo, Min Cheol Kwon¹, Hyeon-Yong Lee¹, and Kyung-Hwan Jung*

Department of Biotechnology, Chungju National University, Jeungpyung, Chungbuk 368-701, Korea

¹Division of Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract We designed the optimal operational strategy in repeated fed-batch ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858 in views of ethanol yield, specific ethanol production rate, and ethanol productivity, when the aeration rate were controlled at 0.0 and 0.33 vvm. Coincidentally, the time intervals of withdrawal-fill of culture medium (24 and 36 h) were investigated. Ethanol yield and ethanol productivity when the aeration was carried out at 0.33 vvm were superior to those when the aeration was not carried out. Additionally, those parameters when the time interval of withdrawal-fill of culture medium was 24 h were superior to those when time interval of withdrawal-fill of culture medium was 36 h. The total ethanol production reached at the greatest value, 703.8 g-ethanol, when the aeration was carried out at 0.33 vvm and the time interval of withdrawal-fill of culture medium was 24 h. In this study, we verified experimentally the necessity of designing the operational strategy for increasing ethanol production in terms of aeration rate and time interval of withdrawal-fill of culture medium in the repeated fed-batch ethanol fermentation.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, repeated fed-batch ethanol fermentation, aeration, withdrawal-fill of culture medium

서 론

Renewable energy 자원으로서 bioethanol에 대한 관심으로 보다 경제적으로 ethanol을 생산하려는 연구와 이에 대한 선행기술 평가가 구체적인 실패와 함께 진행되어져 왔다 [1-4]. 특히 에탄올 발효에서의 에탄올 생산성 증가를 위하여서는 최종 발효액에서의 ethanol 농도의 증가를 통한 distillation cost의 절감 등이 고려되었으며 [5], 이때 고농도의 ethanol 조건에서의 ethanol 발효의 지속적인 진행을

어떻게 하면 효율적으로 할 것인가에 대한 운전전략이 productivity 측면에서 고려되기도 하였다 [6]. 그동안 많은 연구자들에 의하여 여러 가지 인자 중에서 ethanol inhibition을 감소시키고, by-product인 glycerol의 생성을 줄이기 위한 방법으로 미량으로 조절된 공기를 첨가하여 ethanol 발효를 진행하는 방법이 연구되어왔다 [7-15]. Ethanol 발효 시 aeration은 ethanol inhibition으로 부터 효모의 viability를 증가 시키고 [7-9], 세포막의 파괴를 방지 해주는 역할을 하는 것으로 알려져 왔다 [16-20]. 본 연구팀도 ethanol 내성을 가지고 있는 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용한 선행연구에서 공정 조절이 가능한 범위의 aeration 조건에서 공기의 주입이 ethanol inhibition을 감소시키고, ethanol 발효에서 ethanol 생산을 증가시킴을 확인하였다 [6,21,22]. 이때 최고

*Corresponding author

Tel: +82-43-820-5246, Fax: +82-43-820-5272

e-mail: khjung@cjnu.ac.kr

의 ethanol 생산을 보이는 최적의 aeration rate을 실험적으로 정하였고, 반복 유가식 발효를 통하여 조절된 공기의 주입이 ethanol 생산에 효과가 있음을 보여주었다 [22].

본 연구에서는 ethanol 발효 효모인 *S. cerevisiae* ATCC 24858 를 사용하여 ethanol 생산성이 최대가 되는 최적의 aeration rate을 확인하는 연구를 수행하였으며, 특징적으로 최적의 aeration 조건에서 glucose와 배지를 어떠한 전략으로 withdrawal-fill 해야 ethanol의 생산이 최대로 증가할 수 있는지에 대하여 연구하였다. 이러한 연구를 통하여 반복 유가식 ethanol 발효에서 최고의 ethanol 생산을 위하여서는 운전 전략의 설계와 실증이 매우 중요함을 보여 주었고, 다른 발효생산물 반복 유가식 발효 방법으로 생산 할 때 응용 되어 질 수 있을 것으로 생각 된다.

재료 및 방법

유가식 에탄올 발효

본 연구에서는 ethanol 발효 효모인 *S. cerevisiae* ATCC 24858를 사용하였다. Seed culture는 250 mL 삼각플라스크에 100 mL YPD 배지 (yeast extract, 10 g/L; peptone, 20 g/L; glucose; 20 g/L)를 사용하여 30°C, 150 rpm에서 배양하였으며, 유가식 에탄올 발효 시 5 L의 발효조 (KoBiotech, Korea)에서 초기 배지 1.5 L로 하여 배양을 시작하였다. 초기 배지 조성은 glucose 60 g/L, CSL (corn-steep liquor) 20 g/L, yeast extract 5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.2 g/L, KH₂PO₄ 2.4 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.2 g/L 이며, 배양 온도는 27°C, agitation speed는 200 rpm, pH 4.0으로 하였으며 pH 보정 시 acid로는 phosphoric acid solution (10%, v/v), base로는 ammonia water를 사용하였다. 그리고 배양 중 12 h 마다 glucose의 소비를 확인하여 non-sterile glucose powder를 feeding 하였다. 모든 실험에서 glucose (Daesang Corp., Republic of Korea), CSL (Corn Product Korea, Republic of Korea) 그리고 yeast extract (Choheung Chemical Co., Republic of Korea)는 모두 값이 저렴한 산업용 성분을 사용하였다.

반복 유가식 에탄올 발효

운전방법은 유가식 에탄올 발효와 같은 방법으로 12 h 마다 glucose 소비를 측정 한 후 non-sterile glucose powder를 넣는 방법을 택하였고, 첫 harvest를 제외하고는, 24 h 또는 36 h마다 약 1.5 L 배지를 harvest하여, 0.5 L가 되게 한 후 glucose를 포함하는 1.5 L의 새로운 배지를 넣어 2 L를 만들었다. 배양 중은 배지부피 변화와 운전 방법은 Fig. 4에 설명하였다. 새로운 feeding medium의 조성은 glucose를 제외한 CSL 20 g/L, yeast extract 5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.2 g/L, KH₂PO₄ 2.4 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.2 g/L 이었다. 그리고 이외의 조건은 유가식 배양과 동일하였다.

분석방법

Dry cell weight (DCW)는 spectrophotometer (Spectronic, Thermo Scientific, USA)를 사용하여 600 nm (OD₆₀₀)에서 흡광도를 측정하여, DCW와 OD₆₀₀ 표준곡선으로부터 구하였고. 배지내의 잔여 glucose의 측정은 dinitrosalicylic acid (DNS) 방법을 사용하였으며, 배양액의 에탄올 함량은 gas chromatography (8610C, SRI, USA)를 이용하여 분석하였다. 이때 컬럼은 Chromosomb 101 [L=6 ft, ID=1/8 inch, 80/100 mesh, stainless steel tubing (Alltech, USA)]을 사용하였고, FID (flame ionization detector)를 이용하여 검출하였다. Injector와 FID 온도는 250°C, 오븐온도는 150°C로 조절하였고, carrier gas로는 헬륨을 사용하여 40 mL/min으로 흘러주었다. 정량분석을 위하여 표준내부물질로 n-butanol을 사용하였다.

Kinetic parameter 계산

일정시간 간격의 구간별 에탄올 생산성 (instantaneous ethanol productivity)은 $P(i)$ 로, 구간별 ethanol 수율 (instantaneous ethanol yield)는 $Y_{E/S}(i)$ 로, 구간별 비 ethanol 생산속도 (instantaneous specific ethanol production rate)는 $Q_p(i)$ 로 각각 표시하였으며, 아래와 같이 계산하였다.

$$Y_{E/S}(i) = \frac{E_2 - E_1}{S_2 - S_1} \quad (\text{g-ethanol/g-glucose})$$

$$P(i) = \frac{E_2 - E_1}{t_2 - t_1} \quad (\text{g-ethanol/L/h})$$

$$Q_p(i) = \frac{P(i)}{X_{avg}} \quad (\text{g-ethanol/g-cell/h})$$

여기서 E_2 , E_1 , S_2 , S_1 는 t_2 , t_1 에서의 ethanol 농도와 glucose 농도이며, X_{avg} 는 t_2 과 t_1 사이의 평균세포 농도 이다.

전체 구간 에탄올 생산성은 (overall ethanol productivity)는 $P(o)$ 로 표시하였으며, 아래와 같이 계산하였다.

$$P(o) = \frac{E_t}{t} \quad (\text{g-ethanol/L/h})$$

여기서 t 는 시료를 채취할 때의 시간이고, E_t 는 t 시간에서의 ethanol 농도이다.

결과 및 고찰

*S. cerevisiae*을 이용한 유가식 에탄올 발효

Aeration rate을 0.0에서 0.8 vvm으로 변화시키면서 유가

식 에탄올 발효를 실시하였다 (Fig. 1). 배양이 시작된 후 12시간 마다 남아있는 glucose양을 측정하여 glucose 농도가 100~150 g/L를 유지하도록 non-sterile glucose powder를 feeding 하였다. Aeration rate이 증가함에 따라서 세포의 성장이 증가함을 보였고, 36시간 이후 ethanol 농도가 100 g/L 이상이 되면서 세포의 성장과 에탄올 생산이 늦춰지는 현상이 관찰되었다. 36시간이 경과 했을 때 모든 경우 ethanol 농도는 114~128 g/L 정도였으며, 24시간과 36시간 사이에 ethanol 농도가 100 g/L 이상이 되면서 ethanol inhibition으로 인하여 이 시간대의 ethanol 수율 ($Y_{ES}(i)$) (Fig. 2(a))과 specific ethanol production rate ($Q_p(i)$) (Fig. 2(b))이 급격히 감소하였으며, ethanol productivity ($P(o)$, $P(i)$)의 급격한 감소도 관찰되었다 (Fig. 3). 배양 후반부에 가서는 aeration으로 인하여, ethanol의 소비 현상이 관찰되어, $Y_{ES}(i)$, $Q_p(i)$, $P(i)$ 값이 negative 값을 보였다.

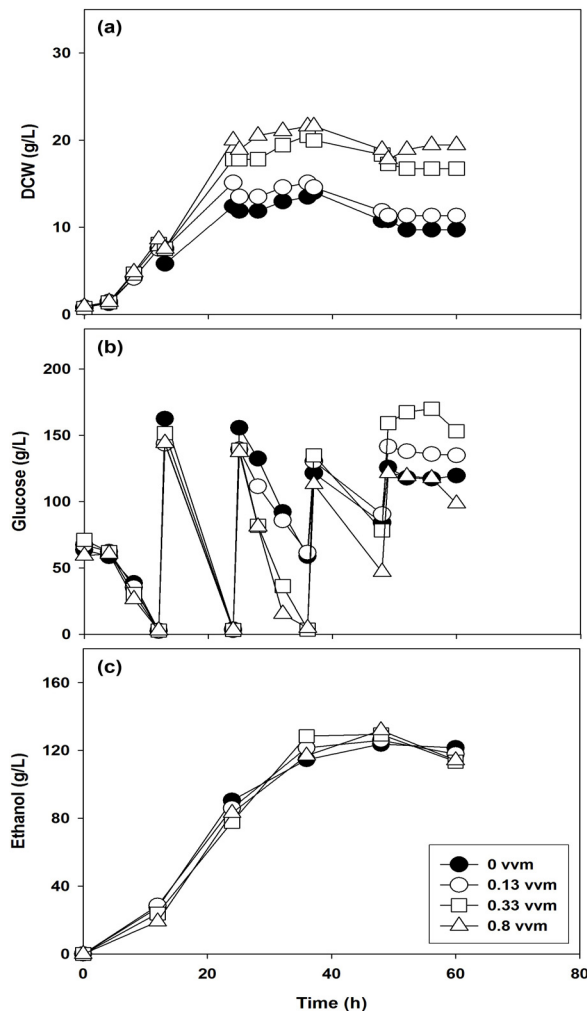


Fig. 1. Fed-batch ethanol fermentations of *S. cerevisiae* ATCC 24858 under various aeration conditions. (a) Dry cell weight, (b) residual glucose concentration, and (c) ethanol production. The fermentation cultures were aerated at rates of 0.0, 0.13, 0.33, and 0.8 vvm.

이러한 실험을 ethanol에 보다 내성이 강한 *S. cerevisiae* SC 1024로 실험한 결과와 비교하여 보면 [6], 본 연구의 *S. cerevisiae* ATCC 24858가 보다 빨리 세포성장 저해와 ethanol 생산 저해가 일어나는 것으로 관찰되었다 (Fig. 1). *S. cerevisiae* SC 1024의 경우 배양 후반부에 ethanol inhibition이 관찰되었으나, 적어도 36 시간까지는 ethanol inhibition이 관찰되지 않았으며, 그때에 ethanol 수율, specific ethanol production rate, 그리고 ethanol productivity의 급격한 감소도 관찰되지 않았다 [6].

선행연구에서 ethanol 발효 시, aeration의 효과가 여러 가지 parameter에서 분명하여, 반복 유가식 ethanol 발효 전략이 제안되었고 [6], ethanol productivity 관점에서 36시간마다 새로운 배지를 교체하여 그 효과를 검증하였다 [22]. 그러나 본 연구에서는 Fig. 1, Fig. 2의 결과로부터 확실한 운전 전략을 얻을 수 없을 정도로 aeration의 효과가 분명치 않아서, Fig. 3의 ethanol productivity data를 근거로 반복 유가식 공정 전략을 설계하였다.

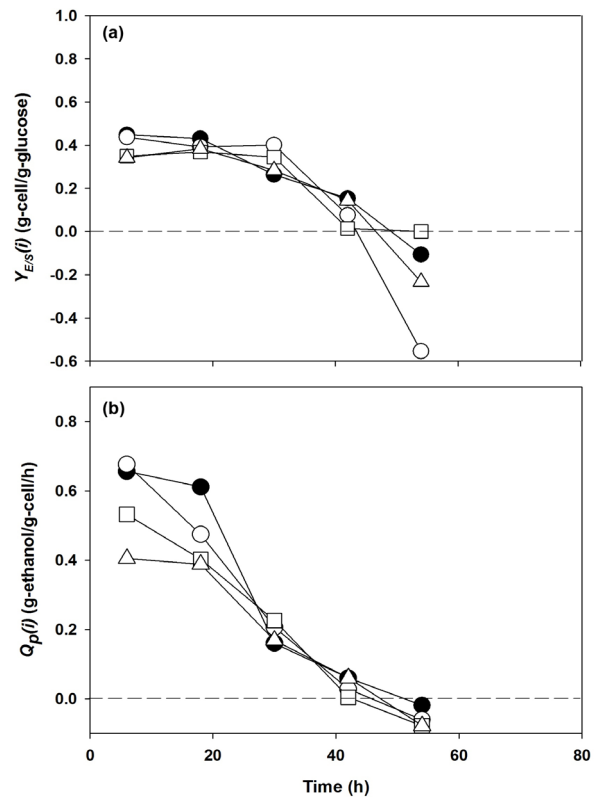


Fig. 2. (a) Instantaneous ethanol yield ($Y_{ES}(i)$) and (b) instantaneous specific ethanol production rate ($Q_p(i)$) of *S. cerevisiae* ATCC 24858 cultured under various aeration conditions. The symbols are the same as those used in Fig. 1.

반복 유가식 ethanol 발효공정 운전 전략

Ethanol 생산성 향상을 위하여 withdrawal-fill 공정을 포함하는 반복 유가식 ethanol 발효공정 운전 전략을 고안할

때, 어느 시점에서 배지를 새로 교환하고, 어떤 aeration rate 을 선택하여야 할지는 Fig. 3의 ethanol productivity 결과를 참고하였다. 최대 ethanol productivity ($P(o)$)는 24시간 까지 배양했을 때에는, 공기를 전혀 첨가하지 않은 경우에 3.7 (g-ethanol/L/h)로 최대값을 보였으나, 36시간 까지 배양했을 때에는, 공기를 0.33 vvm 첨가 했을 때, 3.6 (g-ethanol/L/h)로 가장 큰 값을 보였다. 그리고 $P(i)$ 값은 24시간과 36시간 사이에 aeration rate을 0.33 vvm으로 공급한 것이 가장 그 감소효과가 작았다 (Fig. 3(b)). 반면에 공기를 전혀 공급하지 않은 경우에는 급격한 $P(i)$ 값 감소가 관찰 되었다. 그래서 withdrawal-fill 공정을 포함하는 반복 유가식 ethanol 발효공정의 최적의 공정 운전전략을 찾기 위해서 공기를 전혀 공급하지 않은 경우와 0.33 vvm 공급한 경우, 그리고 배지의 withdrawal을 24시간 혹은 36시간에 실시한 경우 등 모두 4가지의 조건을 선택하여 조사하였다. 이때의 운전 전략은 Fig. 4에서 설명하였다.

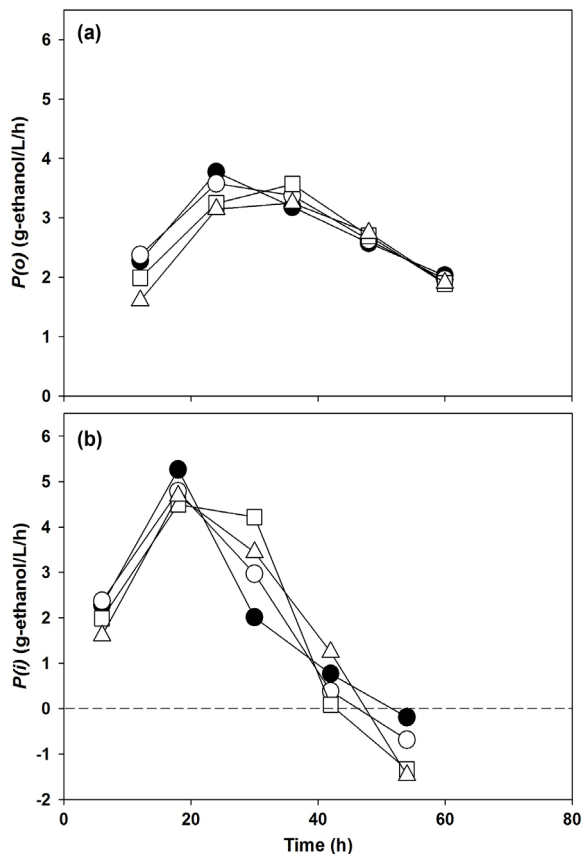


Fig. 3. Ethanol productivities of *S. cerevisiae* ATCC 24858 under various aeration conditions. (a) Overall ethanol productivity ($P(o)$) and (b) instantaneous ethanol productivity ($P(i)$). The symbols are the same as those used in Fig. 1.

네 가지 운전 전략으로 withdrawal-fill을 포함하는 반복 유가식 ethanol 발효공정은 Fig. 5과 같이 약 100 g/L의 glucose 농도를 유지하는 조건으로 약 100시간에 걸쳐 실시

하였고, 이때 최대 120~143 (g/L)의 ethanol이 생성되었다. 이러한 유가식 배양 운전에 대한 ethanol 수율 ($Y_{ES(i)}$)과 ethanol productivity ($P(i)$)를 분석해보면, Fig. 6(a)와 Fig. 6(b)에서와 같이 공기를 0.33 vvm 첨가하여 배양한 결과에서 $Y_{ES(i)}$ 와 $P(i)$ 값이 공기를 넣지 않고 배양한 것에 비하여 더 큰 값을 보였고, 24시간 마다 배지를 교체한 배양이 36시간 마다 배지를 교체한 배양 보다 $Y_{ES(i)}$ 와 $P(i)$ 값이 더 큰 값을 보였다. 이는 공기주입의 효과와 배지교체로 인한 영양 성분의 새로운 공급과 새로운 배지의 주입에 의한 ethanol inhibition의 감소로부터 기인한다고 할 수 있다.

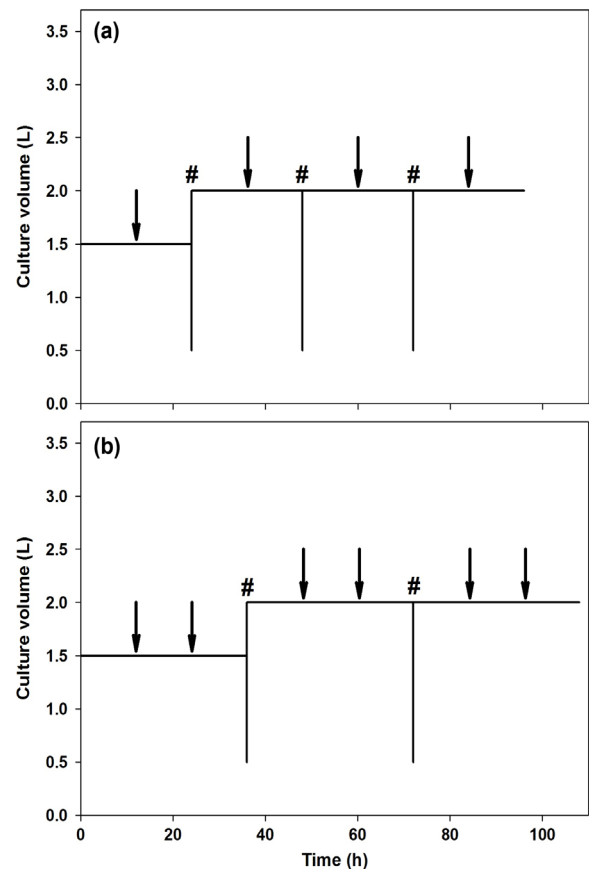


Fig. 4. Change in culture volume during repeated fed-batch ethanol fermentation. Symbol # indicate the withdrawal-fill of culture medium, and arrows indicate glucose powder feeding. Time intervals of withdrawal-fill of culture medium are (a) 24 h and (b) 36 h.

Fig. 4와 같은 운전 전략에 의한 총 ethanol 생산량을 모아서 계산해 보면 (Fig. 6(c)), 0.33 vvm의 공기를 넣고, 배지를 24 시간마다 완전히 갈아준 경우에 가장 많은 703.8 g의 ethanol이 생산되었고, 이때 공기를 넣지 않고 배양하면 약 100 g 정도가 적은 603.2 g의 ethanol이 생성되었다. 36시간마다 배지를 교체한 경우에는 공기를 0.33 vvm 넣을 경우와 넣지 않을 경우 모두 유사한 총 ethanol 생산 (약 602 g)을 보였다. 이는 Fig. 6(a)와 Fig. 6(b)에서와 같

이 $Y_{ES}(i)$ 와 $P(i)$ 값이 공기 공급에 의해서 덜 영향 받기 때문인 것으로 여겨진다.

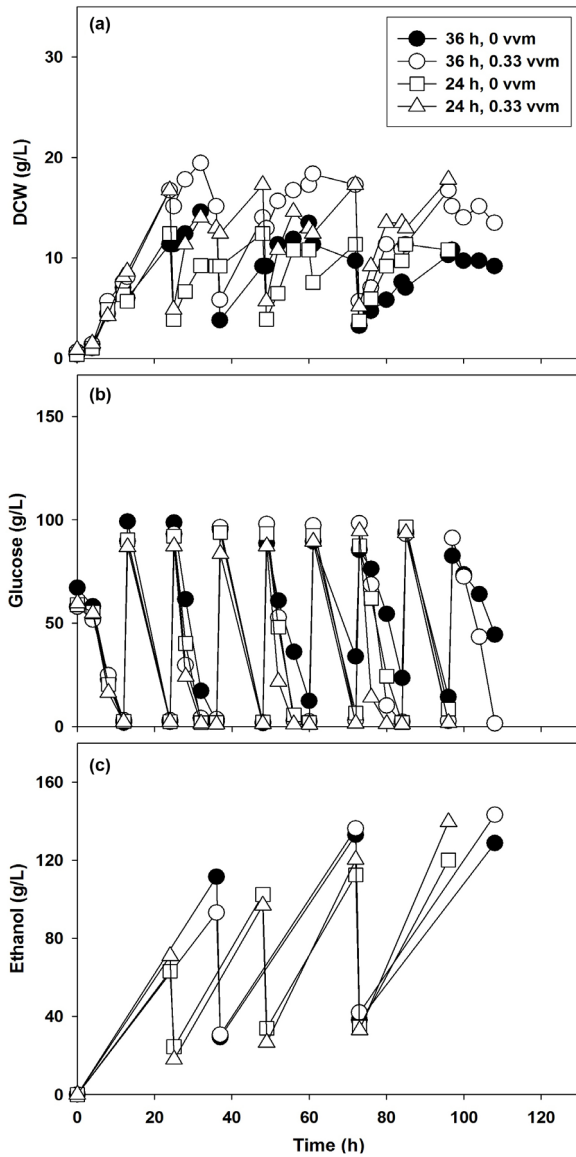


Fig. 5. Repeated fed-batch ethanol fermentations of *S. cerevisiae* ATCC 24858. (a) Dry cell weight, (b) residual glucose concentration, and (c) ethanol production. Time intervals of withdrawal-fill of culture medium and aeration rate are indicated in box of Fig. 5(a).

결론적으로 본 연구에 사용한 효모 균주는 선행연구에 사용한 *S. cerevisiae* 보다 ethanol 내성이 적은 균주이기 때문에 24시간 마다 배지를 교체하는 경우 가장 ethanol 생산이 좋았고, 또한 0.33 vvm의 공기를 넣고 배양하였을 때 ethanol 생산이 더 좋아짐을 알 수 있었다. 이러한 사실은 효모의 특성에 맞는 반복 유가식 ethanol 발효 전략의 개발이 필요하다는 것을 입증한 것이며, 조절된 공기의 첨가가 ethanol 생산을 증가시킬 수 있음을 실증하는 것이라 하겠다.

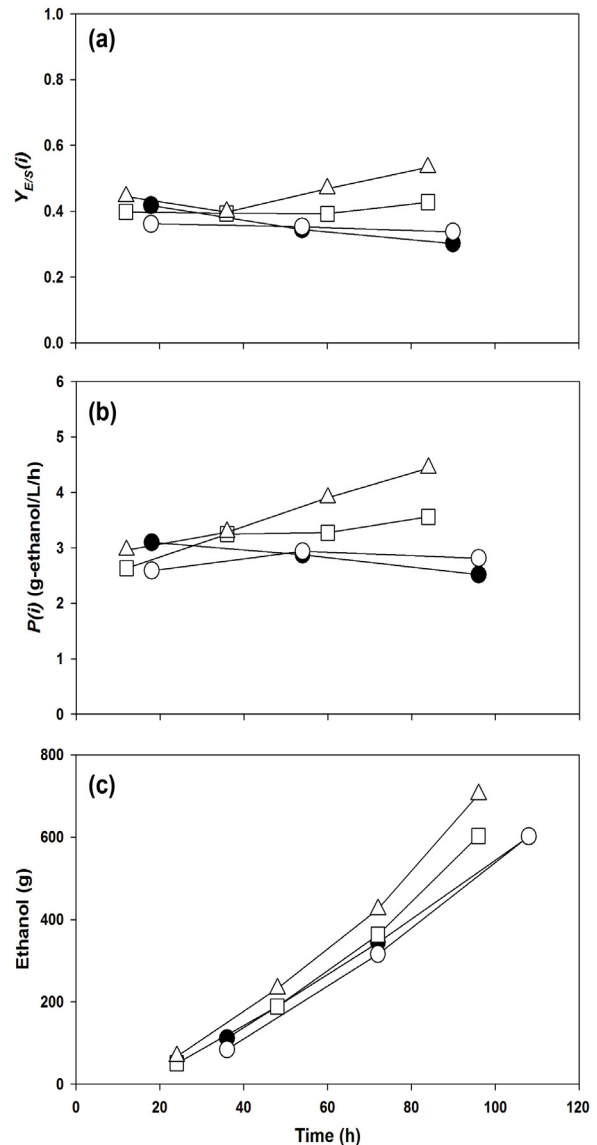


Fig. 6. (a) Instantaneous ethanol yield ($Y_{ES}(i)$), (b) instantaneous ethanol productivity ($P(i)$), and (d) total cumulative ethanol production of *S. cerevisiae* ATCC 24858 during repeated fed-batch ethanol fermentations. The symbols are the same as those used in Fig. 5.

요약

S. cerevisiae ATCC 24858을 이용한 ethanol 생산에서, aeration 효과를 ethanol 수율, specific ethanol production rate, ethanol 생산성 측면에서 분석하여, 반복 유가식 공정 전략을 설계하였다. Ethanol 수율과 ethanol 생산성은 공기를 0.33 vvm 넣었을 때, 공기를 넣지 않고 배양한 것에 비하여 더 큰 값을 보였고, 24시간 마다 배지를 교체한 배양이 36시간 마다 배지를 교체한 배양 보다 더 큰 값을 보였다. 총 ethanol 생산량 값이 가장 큰 경우는 0.33 vvm의

공기를 넣고, 배지를 24시간마다 완전히 갈아주었을 때이고, 이때 가장 많은 703.8 g의 ethanol이 생산되었다.

감 사

This study was carried out with the support of Research Cooperating Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. 200802A01036002), Rural Development Administration, Republic of Korea.

접수 : 2009년 11월 25일, 게재승인 : 2010년 4월 21일

REFERENCES

- Demirbas, A. (2007) Progress and recent trends in biofuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* 33: 1-18.
- Hamelinck, C. N., G. van Hooijdonk, and A. P. C. Faaij (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenergy* 28: 384-410.
- Sánchez, Ó. J. and C. A. Cardona (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99: 5270-5295.
- Cardona, C. A. and Ó. J. Sánchez (2007) Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresour. Technol.* 98: 2415-2457.
- Huanga, H. -J., S. Ramaswamy, U. W. Tschirner, and B. V. Ramaraob (2008) A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Sep. Purif. Technol.* 62: 1-21.
- Seo, H. -B., S. S. Kim, H. -Y. Lee, and K. -H. Jung (2009) High-level production of ethanol during fed-batch ethanol fermentation with a controlled aeration rate and non-sterile glucose powder feeding of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14: 591-598.
- Alfenore, S., X. Cameleyre, L. Benbadis, C. Bideaux, J. -L. Uribelarrea, G. Goma, C. Molina-Jouve, and S. E. Guillouet (2004) Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 537-542.
- Alfenore, S., C. Molina-Jouve, S. E. Guillouet, J. -L. Uribelarrea, G. Goma, and L. Benbadis (2002) Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 67-72.
- Cot, M., M. -O. Loret, J. François, and L. Benbadis (2007) Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Res.* 7: 22-32.
- Furukawa, K., E. Heinzle, and I. J. Dunn (1983) Influence of oxygen on growth of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2293-2317.
- Hoppe, G. K. and G. S. Hansford (1984) The effect of micro-aerobic conditions on continuous ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 6: 681-686.
- Grosz, R. and G. Stephanopoulos (1990) Physiology, biochemical, and mathematical studies of micro-aerobic continuous ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. I: Hysteresis, oscillations, and maximum specific ethanol productivities in chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 1006-1019.
- Kirsop, B. H. (1981) Aeration in fermentation for ethanol production. *Enzyme Microb. Technol.* 3: 375-375.
- Ryu, D. D. Y., Y. J. Kim, and J. H. Kim (1984) Effect of air supplement on the performance of continuous ethanol fermentation system. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 12-16.
- Sweere, A. P. J., J. R. Mesters, L. Janse, K. Ch. A. M. Luyben, and N. W. F. Kossen (1988) Experimental simulation of oxygen profiles and their influence on baker's yeast production: I. One-fermentor system. *Biotechnol. Bioeng.* 31: 567-578.
- Cardoso, H. and C. Leão (1992) Sequential inactivation of ammonium and glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* 73: 155-159.
- Gray, J. V., G. A. Petsko, G. C. Johnston, D. Ringe, R. A. Singer, and M. Werner-Washburn (2004) Sleeping beauty: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 187-206.
- Herman, P. K. (2002) Stationary phase in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 602-607.
- Leão, C. and N. van Uden (1982) Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 2601-2604.
- Leão, C. and N. van Uden (1984) Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 774: 43-48.
- Seo, H. -B., J. -H. Yeon, M. H. Jeong, D. H. Kang, H. -Y. Lee, and K. -H. Jung (2009) Aeration alleviates ethanol inhibition and glycerol production during fed-batch ethanol fermentation. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14: 599-605.
- Seo, H. -B., J. -H. Yeon, M. H. Jeong, D. H. Kang, H. -Y. Lee, and K. -H. Jung (2010) Long-term repeated fed-batch ethanol production in aerated condition. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15: 324-328.