

산소전달계수 및 경험적 기질공급방법이 Baker's Yeast의 유가식배양에 미치는 영향

윤문영 · 박정극[†]

동국대학교 공과대학 화학공학과
(1998년 2월 4일 접수, 1998년 11월 14일 채택)

Effect of Oxygen-Transfer Coefficient and Empirical Substrate Feeding Policy on Baker's Yeast Fed-Batch Cultivation

Moon-Young Yoon and Jung-Keug Park[†]

Department of Chemical Engineering, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea
(Received 4 February 1998; accepted 14 November 1998)

요 약

Baker's yeast의 유가식배양에서 최적의 수율과 생산성을 위하여 K_La (산소전달계수)와 3가지 경험적 기질공급방법의 영향을 조사하였다. 발효기내의 교반속도(100에서 600 rpm)와 통기속도(1.0, 1.5, 2.0 vvm)를 변화시키면서 K_La 값을 측정하였고, 통기속도는 1.5 vvm으로 일정하게 유지하고 각각의 교반속도(300에서 600 rpm)에서 유가식배양을 실시하여 수율과 생산성을 조사하였다. K_La 값은 교반속도와 통기속도에 비례하여 빠르게 증가하였다. 기질공급pattern은 sigmoidal한 공급이 최적으로 나타났고, 최적의 총 기질공급량과 생산성은 K_La 값에 크게 의존하였으나 500 rpm부터는 일정한 값을 유지하였고, 수율을 K_La 값이 증가함에 따라 약간씩 감소하는 경향을 나타냈다. 이것은 molasses 투입량 증가에 의한 molasses내에 존재하는 저해작용물질축적과 발효대사산물의 축적, 점도의 증가, cell농도의 증가 등에 의해 cell 성장속도와 산소전달속도가 감소한 것으로 사료되고, 본 발효기는 500에서 600 rpm 부근에서 운전하는 것이 최적조건으로 판단된다.

Abstract— The effect of K_La (Oxygen Transfer Coefficient) and substrate feeding policy on the optimum cell yield and productivity was investigated in the baker's yeast fed-batch cultivation. K_La was measured at various agitation speed (100 to 600 rpm) and aeration rate (1.0, 1.5, 2.0 vvm), and the cell yield and productivity of fed-batch cultivation was determined at each agitation speeds (300 to 600 rpm) and constant aeration rate (1.5 vvm). K_La value was increased proportionally with increasing agitation speeds and aeration rate. Substrate feeding pattern was optimum in sigmoidal feeding. The optimum total fed-sugar and productivity was largely dependent on the K_La and did not change at above 500 rpm, and the cell yield was decreased gradually as the K_La increased. It is considered that the increase of the accumulation of inhibitory substances in the molasses by the increase of molasses feeding, the accumulation of fermentation metabolites, the viscosity and cell concentration of fermentation broth, and so forth was decreased the cell growth rate and oxygen transfer rate. So, the optimum operation condition of this fermentor was estimated to near 500 to 600 rpm.

Key words: Baker's Yeast, Fed-Batch Fermentation, Substrate Feeding Policy, K_La

1. 서 론

Baker's yeast의 효율적인 생산은 비교적 최근의 발전이었다. 19세기 동안 brewing과 distilling industry의 by-product로서 생산된 효모가 빵을 만들 때 leavening agent로서 사용되어졌다. 1860년대초에 industrial brewing process로부터 효모의 수율을 향상시키려는 가능성에 많은 주의를 기울였다. 상업적 bakery들이 큰 규모로 증가하였기 때문에 많은 양의 빵의 제조가 요구되었고, 그로 인해 자연적으로 산업차원에서 대규모의 효모생산이 대두되었다. 1860년경에 약간의 통기를 시도하는 Vienna process가 개발되어 훨씬 더 높은 효모의 수율을 얻었고, 이것으로 인해서 높은 효모수율을 얻기 위해서는 많

은 양의 압축공기를 사용하는 것이 필요하다는 것을 점점 인식하게 되었다[1]. 1876년에 Louis Pasteur가 당용액(sugar solution)에서 성장하는 효모의 양에 산소의 영향을 묘사하는 일련의 실험보고서를 발표하였다. 이것은 당의 고정된 양으로부터 생산된 효모의 양이 통기하지 않은 상태에서 보다 통기상태에서 훨씬 더 크다는 것이었고, 이 기술이 계속 개발되어 1900년도에는 전세계에 퍼지게 되었다. 1915에서 1919년 사이에 독일의 Dane, Soren Sak, 그리고 Hayduck이 동시에 새로운 방법인 Z-method(또는 Danish Method)를 개발하는데 성공했다. 이 Z-method(Zulauf process, Incremental feeding)는 효모의 성장을 위하여 필요한 기질이 효모에 의하여 소비되는 만큼 발효액(fermenting liquid)에 점점 더해지는 방법이다. 이 방법을 통하여 훨씬 높은 효모의 수율을 얻었고 alcohol의 생성은 거의 없어졌으며, 효모의 품질도 매우 좋게 유지되었다. 현재까지 이 방법이 Baker's

[†]E-mail: jkpark@cakra.dongguk.ac.kr

yeast 생산의 기본으로 적용되고 있다[2, 3]. 그 후에도 Baker's yeast의 생산성을 증가시킬 목적으로 공기와 순수산소를 혼합 사용하는 방법[4], 세포 재 순환법에 의한 발효액 중에 축적되는 저해물질을 제거시키는 방법[5], computer coupled fermentation system을 적용하는 방법[6] 등이 보고되었고, Baker's yeast배양시 최적의 기질을 공급하기 위하여 배기가스 중에 O₂, CO₂를 분석해서 RQ제어에 의해 기질을 feedback control하는 방법[7-8], 알코올 감지기를 부착하여 alcohol 농도 제어에 의해 기질을 feedback control하는 방법[9] 등이 보고되었고, 유가식배양의 최적화를 위한 수학적 모델링과 computer 알고리즘의 개발[10-11] 등이 보고되고 있다. 그러나 국내 빵효모공장에서는 아직까지 현장의 경험을 바탕으로 한 기질공급방법을 많이 사용하고 있고, 산소공급방법도 perforated pipes를 이용하여 공기를 distribution시키는 옛날방식을 취하고 있어서 산소전달속도도 매우 적은 편이고 생산성도 외국에 비해 많이 떨어지는 실정이다. 본 연구에서는 경험적인 측면에서 3가지 기질공급방법에 따른 생산성과 수율의 최적값을 검토하여 보았고, 산소전달계수 측정실험과 유가식배양실험을 통해 산소전달계수가 증가함에 따라 빵효모의 생산성과 수율의 변화를 분석하여 차후 빵효모 발효반응조의 증설시 기초자료를 확립하고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2-1. K_La 측정

산소전달계수의 측정은 물이 담겨져 있는 발효조에 통기를 중단하고 질소가스를 공급하여 용존산소농도가 0이 되도록 한 다음 일정한 속도로 통기하여 용존산소농도의 변화를 연속적으로 check하였다. K_La값 측정을 위해 사용된 bioreactor는 agitated-aerated fermenter (B. Braun, West Germany, Type Biostat U 30D)이었고 교반속도는 100에서 600rpm, 통기속도는 1.0, 1.5, 2.0 vvm으로 변화시키면서 실험하였다. DO probe(Ingold Ltd., West Germany)의 응답지연시간은 K_La값을 계산하는데 크게 영향을 미치지 않기 때문에 무시하였다. 미생물에 의한 산소소비가 없는 경우 물속에서 용존산소의 변화는 다음식으로 주어진다[12, 13].

$$\frac{dC_L(t)}{dt} = K_L a [C_L^* - C_L(t)] \quad (1)$$

여기서, C_L^{*}는 포화상태의 용존산소농도이고 (1) 식을 적분하면 다음과 같다.

$$\ln \frac{C_L^* - C_L(0)}{C_L^* - C_L(t)} = K_L a \cdot t \quad (2)$$

산소가 완전히 소모되었을 때 C_L(0)=0이고, K_La값은 (2) 식의 linear regression에 의하여 계산하였다.

2-2. 유가식배양

제일유니버설(주)로부터 제공받은 baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 본 실험에 사용하였고, 인도네시아산 cane molasses를 탄소원으로 사용하였다. Molasses는 85 °C에서 1시간 동안 steam을 사용하여 가열하였고 원심분리하여 불순물을 제거한 후 당농도가 250 g/l 정도 되도록 희석하였다. 처리된 당밀은 10 l 저장조 2개에 나누어 저장하여 peristaltic pump를 사용하여 jar fermenter에 연속적으로 공급하였다. Bioreactor는 agitated-aerated fermenter(B. Braun, West Germany, Type Biostat U 30D)를 사용하였고 온도는 30 °C, pH는 4.0에서 6.0사이로 유지하였다. 통기속도는 1.0, 1.5, 2.0 vvm으로 변화

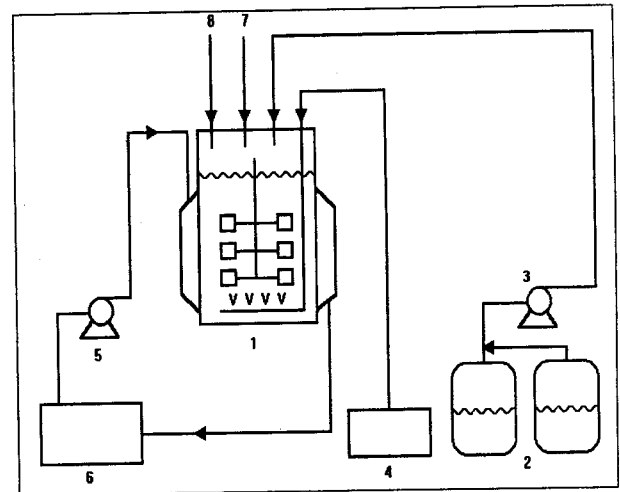


Fig. 1. The experimental equipment for fed-batch cultivation.

- | | |
|-----------------------|---|
| 1. Jar fermenter | 5. Cooling water pump |
| 2. Molasses reservoir | 6. Refrigerator |
| 3. Peristaltic pump | 7. Alkali(Na ₂ CO ₃ saturated solution) |
| 4. Air compressor | 8. Antifoam agent(silicon defoamer) |

시켰고, 교반속도는 300-600 rpm까지 변화시켰다. 접종량은 5-10 g/l 정도로 하였고, 초기 volume은 15 l, 소포제는 20 % silicon 소포제(한국다우코닝(주), LS-300 실리콘 소포제)를 사용하였다. 유가식배양을 위한 실험장치는 Fig. 1에 나타내었다.

2-3. 기질공급방법

기질공급방법은 기질공급 pattern과 기질공급속도를 결정하는 총 기질공급량 두 가지를 고려하였다. 기질공급 pattern은 exponential, linear, sigmoidal 한 3가지 형태를 비교하여 보았고, 총 기질공급량은 당밀 중의 총 당공급(total fed-sugar)량을 200 g씩 증가시키면서 실험하였다.

2-4. 분석방법

Dry cell weight측정은 sample을 증류수로 희석한 후 원심분리한 다음 상등액은 버리고 침전물을 다시 증류수로 washing하고, 이 조작을 3번 반복한 후 100 °C에서 16시간 건조시켰다. Dry cell weight는 발효액의 liter당 g dry cell weight로서 나타내었다. 발효액 중의 ethanol농도측정은 산화환원적정법[14]을 사용하였고, 당밀 중에 포함된 total reducing sugar농도는 50 % HCl을 첨가하여 70 °C에서 10분 가수분해한 후 Lane-Eynane방법[15]으로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 교반속도와 통기속도가 K_La에 미치는 영향

본 발효기에서 산소전달계수의 측정을 위해 발효조내의 물의 온도는 30 °C를 유지하였고 교반속도는 100에서 600 rpm까지, 통기속도는 1.0 vvm에서 2.0 vvm까지 변화시켰다. 그 결과는 Fig. 2에 나타내었고, 교반속도와 통기속도가 증가할수록 K_La값이 비례하여 빠르게 증가하였다.

3-2. 기질공급 pattern의 영향

기질공급 pattern은 Fig. 3에 나타난 것처럼 linear feeding, exponential feeding, sigmoidal feeding 3가지를 사용하였고, 이들 feeding pattern을 고정시킨 후 교반속도 400 rpm, 통기속도 1.5 vvm의 조건

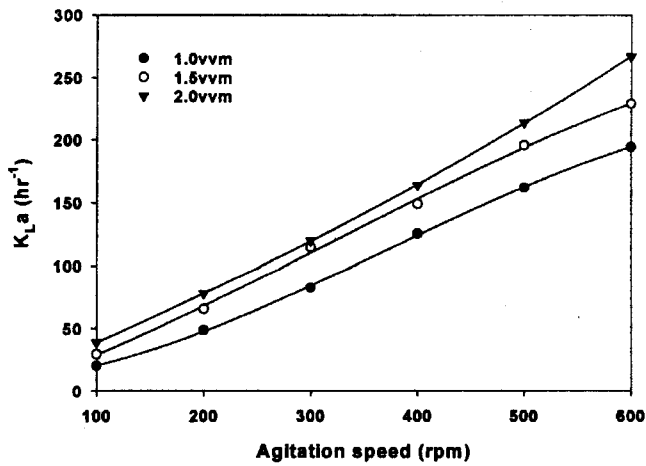


Fig. 2. Effects of agitation and aeration on K_La in tap water.

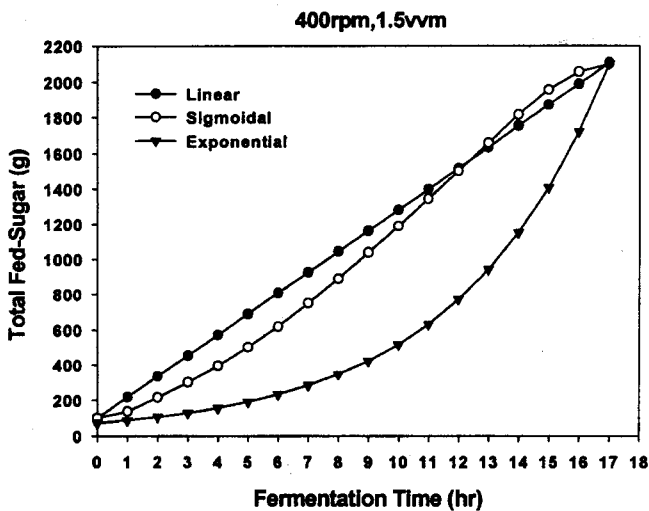


Fig. 3. Substrate feeding pattern (Agitation speed at 400 rpm, air flow rate at 1.5 vvm).

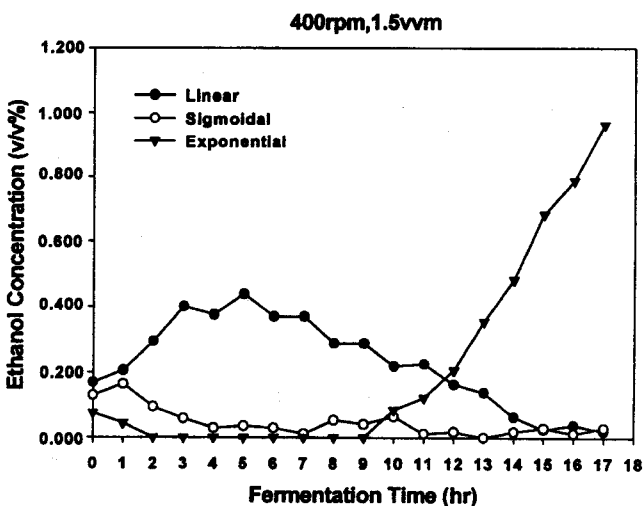


Fig. 4. The effects of substrate feeding pattern on the ethanol concentration.
(agitation speed at 400 rpm, air flow rate 1.5 vvm)

에서 Baker's yeast의 유가식배양을 실시하여 에탄올을 발생량과 생산성, 수율을 조사하여 보았다. Fig. 4는 기질공급 pattern이 에탄올발생

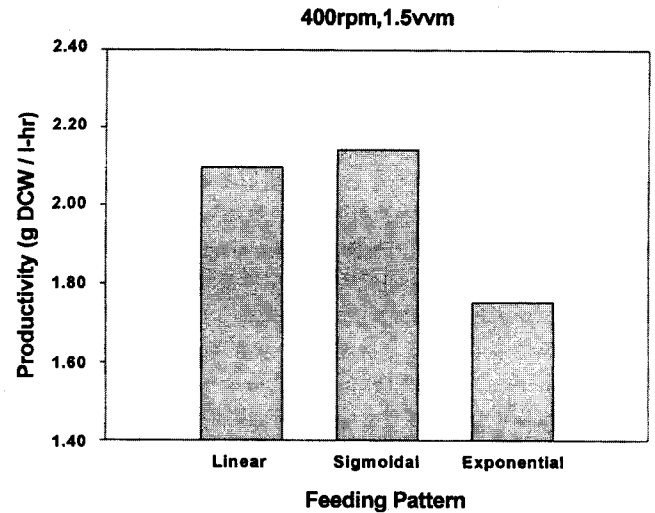


Fig. 5. The effects of substrate feeding pattern on the cell productivity.
(agitation at 400 rpm, air flow rate at 1.5 vvm)

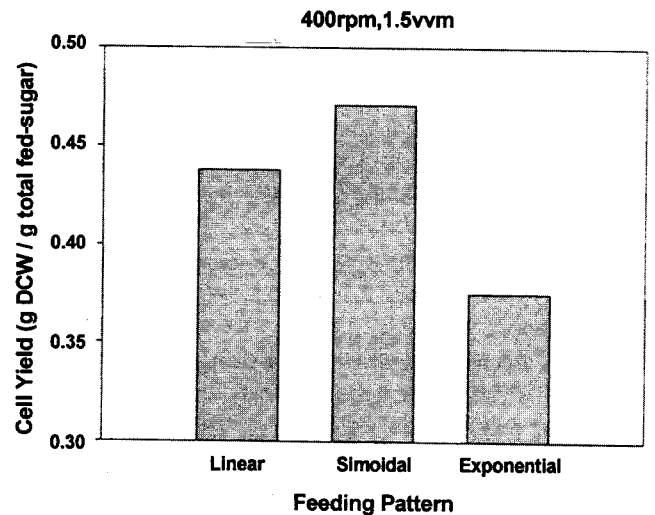


Fig. 6. The effects of substrate feeding pattern on the cell yield.
(agitation speed at 400 rpm, air flow rate at 1.5 vvm)

량에 미치는 영향을 나타낸 것인데 linear feeding인 경우 에탄올 발생량이 배양초기에 점점 증가하여 5시간 시점에서 0.44 v/v%까지 도달하였고 5시간 이후부터는 점점 감소하였다. Exponential feeding의 경우는 배양 10시간 때부터 에탄올 발생량이 점점 증가하다가 완료시점에서 에탄올 발생량이 0.96 v/v%까지 도달하였다. Sigmoidal feeding의 경우는 배양전반에 걸쳐 0.05 v/v% 이하를 유지하였다. Fig. 5는 기질공급 pattern이 생산성에 미치는 영향을 나타낸 것인데 linear feeding인 경우 2.10 g DCW/l-hr, sigmoidal feeding인 경우 2.14 g DCW/l-hr, exponential feeding인 경우 1.75 g DCW/l-hr를 나타내었다. Fig. 6에는 기질공급 pattern이 수율에 미치는 영향을 나타내었고 linear feeding인 경우 0.44 g DCW/g total fed-sugar, sigmoidal feeding인 경우 0.47 g DCW/g total fed-sugar, exponential feeding인 경우 0.38 g DCW/g total fed-sugar의 수율을 나타내었다. 상기의 결과로 sigmoidal feeding pattern이 3가지 중 가장 최적의 기질공급방법임을 알 수 있다.

3.3. 총 기질공급량의 영향

최적의 기질공급 pattern이 정해졌으면 그 feeding pattern에서 산소

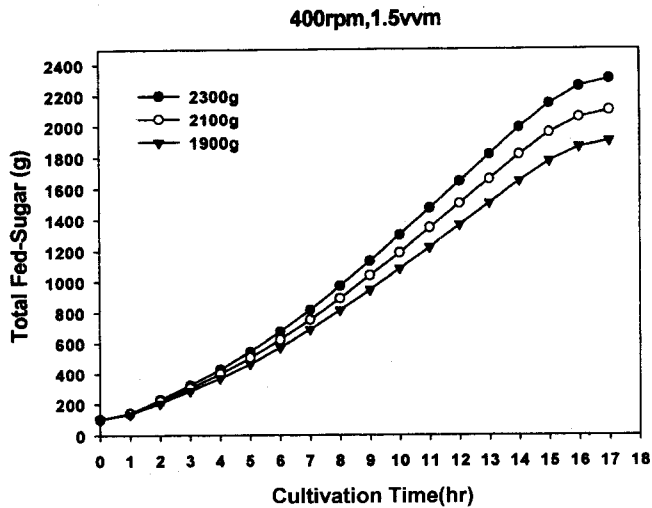


Fig. 7. The feeding profile of total fed-sugar.

(●: 2,300 g ○: 2,100 g ▼: 1,900 g, Agitation speed at 400 rpm, air flow rate at 1.5 vvm)

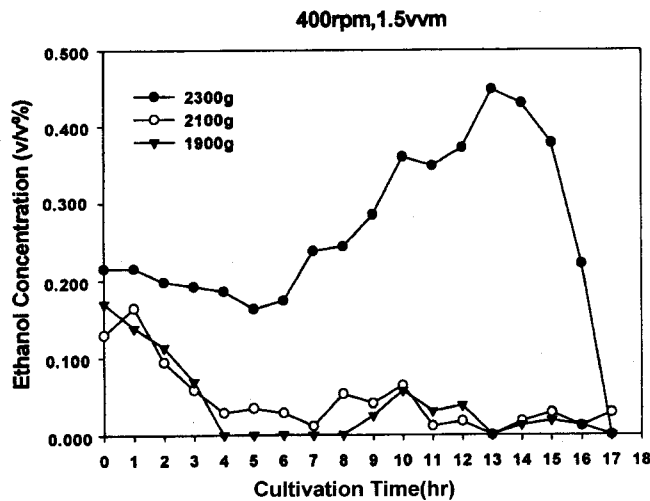


Fig. 8. The effects of total fed-sugar on the ethanol concentration.

(agitation speed at 400 rpm, air flow rate at 1.5 vvm)

전달속도를 최대한으로 이용할 수 있는 총 기질공급량이 정해져야 한다. 총 기질공급량은 molasses내의 총 당공급(total-fed sugar)량으로 기준을 정하는 것이 가장 정확하므로 총 당공급량을 200 g씩 증가시키면서 교반속도는 400 rpm, 통기속도는 1.5 vvm으로 고정시키고 유가식배양을 실시하였고, 매시간 마다 에탄올 발생량을 분석하여 에탄올이 발생하기 직전의 총 당공급량을 최적의 총 기질공급량으로 정하였다. Fig. 7에 총 당공급량을 1,900 g, 2,100 g, 2,300 g으로 정한 후 sigmoidal한 feeding pattern을 나타내도록 매시간 일정비율로 분배한 feeding profile을 나타내었다. Fig. 8은 총 당공급량에 따른 에탄올 발생량을 나타낸 것인데 1,900 g과 2,100 g에서는 에탄올이 발생하지 않았으나 2,300 g에서는 배양시작부터 에탄올이 발생하여 배양 13시간에는 0.45 v/v%까지 도달하였다. Fig. 9는 총 당공급량에 따른 생산성을 나타낸 것인데 총 당공급량이 1,900 g일 때 생산성은 1.99 g DCW/l-hr를 나타내었고 2,100 g일 때 2.14 g DCW/l-hr를 나타내었고 2,300 g일 때 2.16 g DCW/l-hr를 나타내었다. Fig. 10은 총 당공급량에 따른 수율을 나타낸 것인데 총 당공급량이 1900 g일 때 0.466 g DCW/l-hr, 2,100 g일 때 0.471 g DCW/l-hr, 2,300 g일 때 0.427 g DCW/l-hr를 나타내었다.

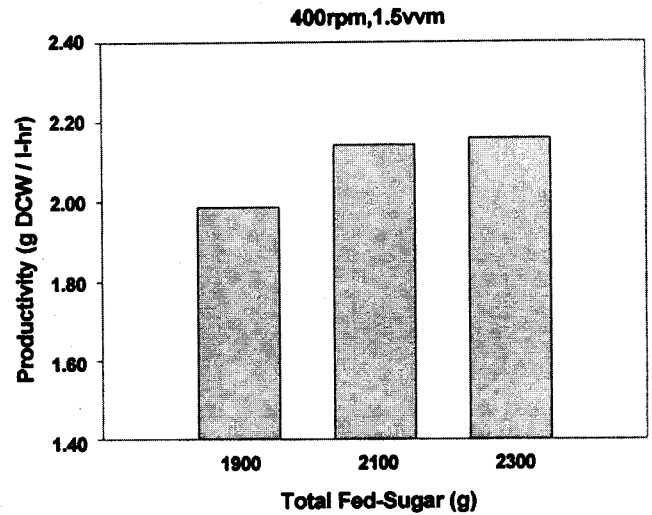


Fig. 9. The effects of total fed-sugar on the productivity.

(agitation at 400 rpm, air flow rate at 1.5 vvm)

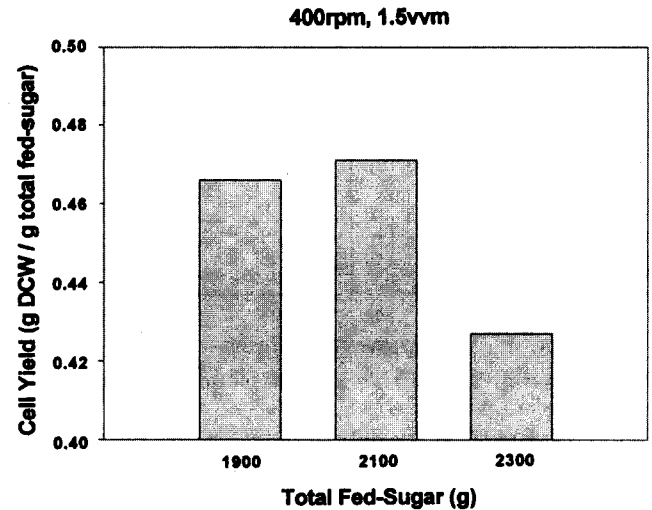


Fig. 10. The effects of total fed-sugar on the cell yield.

(agitation at 400 rpm, air flow rate at 1.5 vvm)

l-hr를 나타내었다. 상기의 결과에서 생산성은 2,300 g일 때 가장 높은 값을 나타내었으나 수율에서 감소한 반면, 2,100 g의 경우 생산성은 2,300 g일 때 보다 약간 낮은 값을 나타내었으나 수율은 2,300 g에서 보다 높은 수치를 나타내었고 에탄올도 발생하지 않았으므로 총 당공급량은 2,100 g이 최적값임을 알 수 있다. 같은 방법으로 300 rpm에서 최적의 총 당공급량은 1,100 g, 400 rpm에서 2,100 g, 500 rpm에서 2,900 g, 600 rpm에서 3,000 g으로 나타났다.

3-4. K_La 가 유가식배양에 미치는 영향

통기속도를 1.5 vvm으로 고정시키고 교반속도를 변화시켜가면서 상기에서 구한 최적의 기질공급 pattern, 최적의 총 당공급량을 사용하여 유가식배양을 실시하여 생산성과 수율을 분석한 결과를 Fig. 11에 나타내었다. 생산성은 300 rpm에서 1.12 g DCW/l-hr, 400 rpm에서는 2.14 g DCW/l-hr, 500 rpm에서는 2.74 g DCW/l-hr, 600 rpm에서는 2.74 g DCW/l-hr로 나타났다. 300 rpm에 비해 400 rpm에서 91.1%, 500 rpm에서 144.6% 증가하였고 500 rpm이상에서는 거의 변화가 없었다.

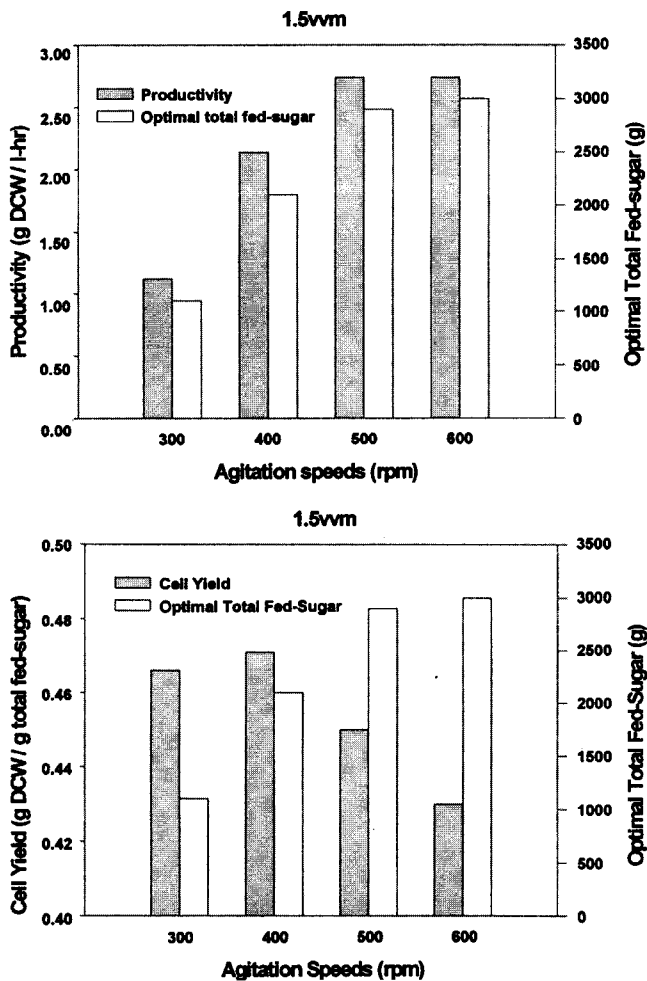


Fig. 11. Productivity, cell yield and optimal total fed-sugar at different agitation speeds.
(air flow rate at 1.5 vvm)

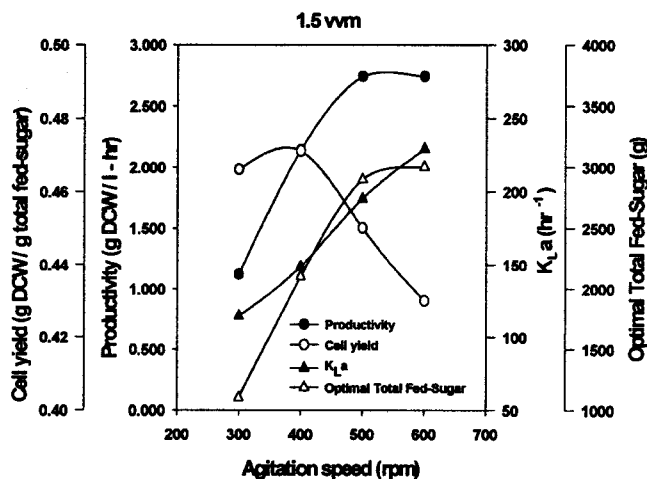


Fig. 12. Relationship between agitation speed, cell yield, productivity, $K_L a$ and total fed-sugar.
(air flow rate at 1.5 vvm)

수율은 300 rpm에서 0.466 g DCW/g total fed-sugar, 400 rpm에서 0.471 g DCW/g total fed-sugar, 500 rpm에서 0.450 g DCW/g total fed-sugar, 600 rpm에서 0.430 g DCW/g total fed-sugar로 교반속도가 증

가함에 따라 약간씩 감소하는 경향을 나타냈다. 생산성은 최적의 총 당공급량이 증가함에 따라 비례하여 증가하였으나 수율은 감소하는 것으로 보아 molasses 투입량의 증가로 인해 cell 성장이 저해작용을 받는 것으로 사료된다. Fig. 12에 1.5 vvm의 통기속도에서 각각의 교반속도에 따른 생산성, 수율, $K_L a$, 최적의 총 당공급량을 도시한 것인데 $K_L a$ 값은 교반속도가 증가함에 따라 비례적으로 증가하였으나 생산성과 최적의 총 당공급량은 교반속도가 증가함에 따라 기율이 약간씩 감소하다가 500 rpm부터는 일정하게 유지되는 것을 볼 수 있고, 수율도 약간씩 감소하는 것을 볼 수 있다. 생산성이 500 rpm 이상에서 더 이상 증가하지 않은 이유는 molasses내에 다량의 저해작용 물질들이 존재하기 때문에 molasses 투입량이 증가할수록 cell에 대한 저해작용이 증가하여 cell 성장속도가 감소하게 되고, 이 저해작용은 저해작용물질들이 어느 농도 이상 축적되었을 때 급속히 cell 성장속도를 감소시키기 때문에 이 농도가 500 rpm부근에서의 molasses 투입량일 때 농도라고 생각된다. 또한 발효액상에서의 $K_L a$ 는 cell농도와 점도의 증가로 인해 물에서 보다 산소의 용해도와 K_L (liquid side oxygen transfer coefficient)값이 감소하기 때문에 $K_L a$ 값이 감소하게 되고, $K_L a$ 값이 감소하면 최적의 총 당공급량도 감소하기 때문에 상응하여 생산성도 감소하는 것으로 사료된다. 본 실험의 경우 이러한 여러 가지 복합적인 현상으로 인해 500 rpm부근에서 생산성이 최대값을 나타내었고, 본 발효기는 500에서 600 rpm부근에서 운전하는 것이 최적조건으로 판단된다.

4. 결 론

Baker's yeast의 유가식배양에서 최적의 생산성과 수율을 위하여 $K_L a$ (산소전달계수)와 3가지 경험적 기질공급방법이 미치는 영향을 조사하여 보았다. 발효기의 $K_L a$ 값은 교반속도(100에서 600 rpm)와 통기속도(1.0, 1.5, 2.0 vvm)가 증가함에 따라 비례하여 증가하였다. 기질공급 pattern은 sigmoidal한 공급이 최적으로 나타났다. 최적의 총 기질공급량은 300 rpm에서 1,100 g, 400 rpm에서 2,100 g, 500 rpm에서 2,900 g, 600 rpm에서 3,000 g으로 나타났다. 생산성은 300 rpm에서 1.12 g DCW/l-hr, 400 rpm에서는 2.14 g DCW/l-hr, 500 rpm에서는 2.74 g DCW/l-hr, 600 rpm에서는 2.74 g DCW/l-hr로 300 rpm 비해 400 rpm에서 91.1 %, 500 rpm에서 144.6 % 증가하였고 500 rpm 이상에서는 거의 변화가 없었다. 수율은 300 rpm에서 0.466 g DCW/g total fed-sugar, 400 rpm에서 0.471 g DCW/g total fed-sugar, 500 rpm에서 0.450 g DCW/g total fed-sugar, 600 rpm에서 0.430 g DCW/g total fed-sugar로 교반속도가 증가함에 따라 약간씩 감소하는 경향을 나타냈다. 이것은 molasses 투입량 증가에 의한 molasses내에 존재하는 저해작용물질축적과 발효 대사산물의 축적, 점도의 증가, cell 농도의 증가 등에 의해 cell 성장속도와 산소전달속도가 감소한 것으로 사료되고, 본 발효기는 500에서 600 rpm 부근에서 운전하는 것이 최적조건으로 판단된다.

참고문헌

1. White, J.: "Yeast Technology", Chapman & Hall Ltd., 13(1954).
2. Reed, G. and Pepler, H. J.: "Yeast Technology", The AVI Publishing Company, Inc., 53(1973).
3. Berry, D. R., Russel, I. and Stewart G. G.: "Yeast Biotechnology", Allen & Unwin, 471(1981).
4. Ishikawa, S., Nose, Y., Ohashi, M., Nedate, S., Kanazawa, K. and Ichikawa, M.: Japanese Pat., Publication No. 9883(1976).
5. Hideki, F., Takeshi, S., Wataru, O. and Hisashi, M.: *J. Ferment.*

- Technol.*, **56**, 354(1978).
6. Wang, H. Y., Cooney, C. L. and Wang, D. I. C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 69(1977).
7. Aiba, S., Nagai, S. and Nishizawa, Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1001(1976).
8. Aiba, S.: *Biotechnol. and Bioeng. Simp.*, **9**, 270(1976).
9. Namba, A., Hirota, F. and Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 383(1981).
10. Park, C. H. and Geng, Q.: *Korean J. of Chem. Eng.*, **13**(6), 612 (1996).
11. Patkar, A., Lee, D. H. and Seo, J. H.: *Korean J. Chem. Eng.*, **10**, 146(1993).
12. Johnson, M., Andre, G., Chavarie, C. and Archambault, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 43(1990).
13. Zhang, S., Handa-Corrigan, A. and Spier, R. E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 252(1992).
14. Fessler, J.: *Wines Vines*, **22**, 17(1941).
15. Lane and Eynone: *J. Soc. Chem. Ind.*, **42**, 32T(1923).