

고정화 효모에 의한 연속적 에탄올 발효

서근학 · 송승구* · 문성훈

부산수산대학 응용화학과
*부산대학교 공과대학 화학공학과
(1986년 3월 5일 수리)

Continuous Ethanol Fermentation using Immobilized Yeasts

Kuen Hack Suh, Seung Koo Song* and Sung Hoon Moon

Dept. of Applied Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Korea

*Dept. of Chemical Engineering, College of Engineering,
Pusan National University, Korea

(Received March 5, 1986)

A tubular fermentor was prepared by packing the wood chips and pumping the yeast solution of *Saccharomyces formosensis* in a tubular column. Investigations to characterize the ethanol fermentation in the immobilized cell tubular fermentor and to compare such a fermentors with other type fermentors were undertaken. Ethanol productivity of 24.4g EtOH/l.hr has been obtained from glucose substrate. This productivity is higher or compared favourably with that reported in immobilized bio-reactors.

Biomass를 화학제품 및 식용원료로 전환하는 bio-conversion 중 cellulose를 가수분해시켜 당화시킨 후 발효시켜 ethanol을 생산하는 방법에 대한 연구⁽¹⁾가 가장 활발하게 이루어지고 있다.

발효공정은 일반적으로 생성속도가 매우 느려 체적이 큰 발효조를 필요로 하기 때문에 효율적인 발효조 개발이 매우 중요하다. 회분식 발효조의 경우 미생물 성장조건이 계속 변화하여 짧은 시간 동안만 최대 발효속도를 유지할 수 있어 생산성이 매우 낮다. 미생물 성장조건을 일정하게 하여 발효속도를 증대한 CSTF(Continuous Stirred Tank Fermentor)는 생성물과 함께 cell이 손실되는 문제점을 가진다. 발효조내 cell의 농도를 증대하기 위하여 출구의 cell을 분리 및 재순환하여 발효속도를 증대하였으나 cell의 분리 및 재순환을 위한 운전압력 증대는 이 발효조의 공업적 적용에 대한 단점이 되고 있다. 상기 발효조의 대체방안으로 미생물을 고정화한 관형발효조에 대한 연구⁽²⁻⁵⁾가 활발하게 이루어지고 있는데, cell이 고정화된 관형발효조는 cell

을 재순환하는 CSTF에 비하여 cell분리와 wash-out 등의 제한을 적게 받을 뿐만 아니라 생성물 저해작용의 영향을 적게 받는 장점을 갖는다. 고정화 방법 중 미생물의 표면부착성을 이용하여 불활성 support에 흡착시키는 방법에 대한 연구⁽⁶⁻¹⁰⁾가 최근에 활발하게 이루어지고 있다.

본 연구의 목적은 주정업계에서 발효시 사용하는 *Saccharomyces formosensis*를 불활성 담체인 wood chip에 흡착시켜 고정화시킨 관형발효조에서 ethanol 발효를 수행하며 ethanol 생산성, ethanol 과 cell 수율 및 운전안전성 등의 특성을 연구하여 다른 형태의 발효조와 서로 비교, 연구하였다.

재료 및 방법

사용균주

일산실업(부산시 문현동 소재)으로부터 분양받은 *Saccharomyces formosensis*를 배양하여 실험에 사용하였다.

Table 1. Medium Composition(grams per liter -medium).

Component	For Cell Cultivation	Fermentation
Anhydrous Glucose	100.00	160.00
Yeast Extract	8.50	13.60
Ammonium Chloride	1.32	2.11
Magnesium Sulfate	0.11	0.18
Calcium Chloride	0.06	0.10

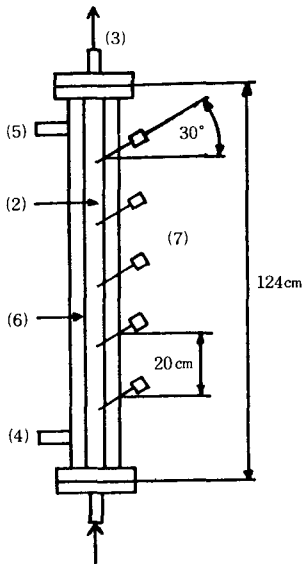
기질용액

호기성 조건의 균배양과 발효시 기질용액은 Cysewski⁽¹¹⁾등이 사용한 조건과 동일하게 하여 사용하였으며 그 조성을 Table 1에 나타내었다.

Glucose와 영양분은 별도로 5 N-H₂SO₄를 이용하여 pH=4.8로 조정한 후에 121°C에서 30분간 멸균한 후 냉각하여 혼합하였다.

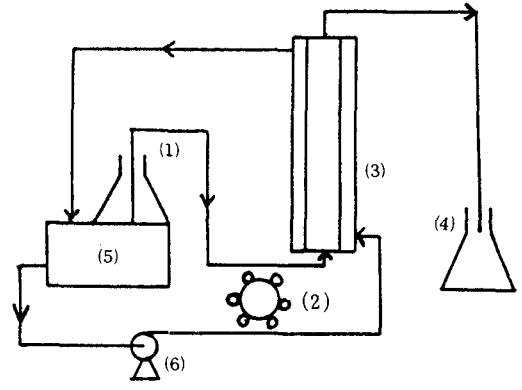
불활성 support

Hardwood인 태국산 red oak를 수입하여 제작한 무늬목을 구입하여, 2×3 mm 직사각형 형태로 wood chip을 제조하여 사용하였다.



- (1) Substrate Inlet
- (2) Tubular Fermentor
- (3) Substrate Outlet
- (4) Jacket Water in
- (5) Jacket Water out
- (6) Jacket
- (7) Sample Port

Fig. 1. Tubular Fermenter



- (1) Feed Tank
- (2) Peristaltic Pump
- (3) Tubular Fermentor
- (4) Outlet Reservoir
- (5) Shaking Water-bath
- (6) Water Circulation Pump

Fig. 2. Schematic diagram of experimental apparatus.

관형발효조

스테인레스 강으로 만든 발효조를 제작, 사용하였으며 발효조(높이 : 124 cm, 직경 : 2.7 cm)의 개요는 Fig. 1과 같다.

Sample 배출구는 발효조 높이에 따라 20 cm 간격, 30° 각도로 5개 설치하였고, 배출관은 column 내부로 연장되며 내부액이 잘 통하도록 2φ 구멍을 4개 뚫었다. Column 외부에는 일정온도 조절을 위하여 jacket를 설치하였고 불활성 support는 발효조 상, 하부 flange 사이에 다공판을 설치하여 이탈을 방지하였다.

분석방법

시료를 3 ml 취하여 원심분리(4,000 r.p.m, 10분)시킨 후 상등액을 시료용으로 냉장고에 보관하였다. 포도당 농도는 DNS(dinitrosalicylic acid) 방법⁽¹²⁾을 이용하여 분석하였으며, 에탄올 농도는 Chromsorb 101(60~80 mesh)로 충전된 gas chromatograph(Hitachi 163)을 사용하여 측정⁽¹³⁾하였다. 효모농도는 spectrophotometer(Shimadzu UV-140-02)를 사용하여 660 nm에서 OD(optical density)를 측정하여 g dry wt/l로 환산하였고⁽¹⁴⁾, 효모 생존율은 methylene blue 염색법⁽¹⁵⁾으로 측정하였다.

효모 고정화 및 발효 실험

관형발효조 상부에서 2×3 mm wood chip을 낙하시켜 충전하고 증류수를 통과시켜 충분히 적게 한 후, 관형발효조 하부로 drain된 증류수 체적을 측정하여 공간을 계산하고 ethanol을 채워 멸균한

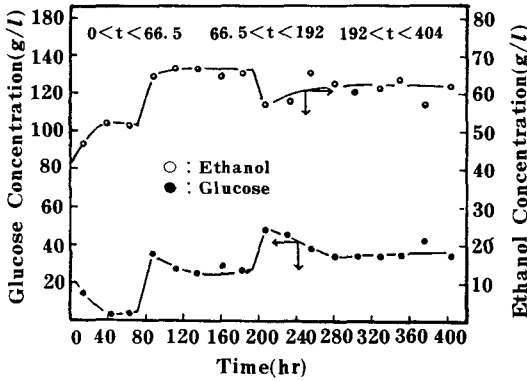


Fig. 3. Profile of glucose and ethanol concentration at the outlet.

후, 멸균된 증류수로 관형발효조 내부를 세척하였다.

호기적 조건의 발효조(New Brunswick Scientific Co., M-19-071)에서 20시간 배양된 효모용액(농도: 10.5 g dry wt/l) 3 l를 유량속도 300 ml/hr로 통과시켜 효모를 고정화 하였다. 고정화동안 효모의 성장을 억제하기 위하여 관형발효조와 효모용액의 온도를 5~7°C로 유지하였다.

관형발효조에 효모를 고정화한후 기질용액을 통과시켜 발효실험을 수행하였다. 발효조 온도는 순환수를 발효조 jacket에 통과시켜 33±0.5°C로 일정하게 유지하였고 발효실험에 사용된 장치는 Fig. 2에 도시하였다.

결과 및 고찰

효모용액을 통과시켜 관형발효조에 고정화된 효모량은 21.3 g이고 92 mg cell/g support로서, 발효조 체적기준의 효모농도는 29.6 g/l로서 다른 충전물에 비하여 고정화된 효모량이 많았고⁽¹⁶⁾, 이때 공간율은 0.34였다. 기질용액의 발효에 따라 발효조 출구에서 측정된 glucose, ethanol 및 효모의 시간에

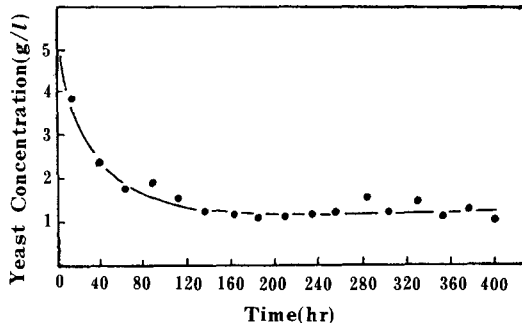


Fig. 4. Profile of yeast concentration at the outlet.

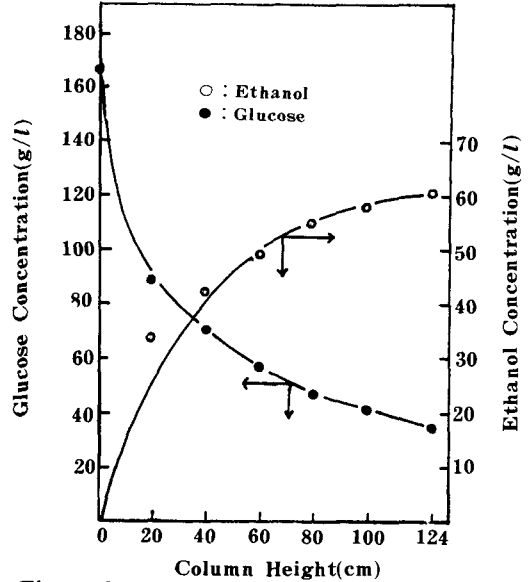


Fig. 5. Substrate and product profile along column height.

따른 농도의 변화를 Fig. 3와 4에 표시하였으며 다음과 같은 특성을 나타내었다.

관형발효조 특성

발효초기에는 10.91% (w/v) glucose 용액을 공급하였으며 t=66.5 시간에 공급액을 16.55% (w/v) glucose 용액으로 교체하여 공급하였는데 이때 정상상태에 도달하는데 약 60시간 소요되었다. 정상상태에서 glucose와 ethanol의 발효조 높이에 따른 농도의 분포는 Fig. 5와 같다. 이때 ethanol이 관형발효조 하부에서 많이 생성되고 있는데, 하부에는 ethanol 농도가 낮아 생물물 억제작용이 감소되고, 공급되는 glucose 용액에 포함된 용존 산소의 영향 등에 인한 것으로 생각된다.

Ethanol과 cell수율

정상상태에서 소모된 glucose량과 생성된 ethanol

Table 2. Ethanol Yield

Consumed Glucose (g/l)	Ethanol (g/l)	Ethanol Yield
106.8	51.6	0.483
138.8	65.7	0.473
129.8	61.4	0.473

Table 3. Cell Yield

Consumed Glucose (g/l)	Cell Concentration (g/l)	Cell Yield
138.8	1.21	0.0087
129.8	1.21	0.0093

Table 4. Effect of Residence Time on Ethanol Productivity

Concentration of of Glucose Feed (g/l)	Residence Time (hr)	Ethanol Concen- tion at Steady-State (g/l)	Conversion (%)	Ethanol Productivity (g/l·hr)
109.1	3.44	51.6	97.9	15.02
165.5	3.44	65.7	83.9	19.12
165.5	2.52	61.4	78.4	24.38

량을 Table 2에 나타내었는데 ethanol 수율은 0.47~0.483으로서 회분식발효조 경우의 0.44~0.45⁽¹⁷⁾보다 높은 값을 나타내었는데 이는 ethanol 생성이 회분식 경우보다 효율적으로 수행되는 것을 의미한다.

정상상태에서 관형발효조 출구에서 배출되는 효모량은 생성되는 효모량과 같다는 가정하에 cell 수율은 출구에서 효모의 농도와 소모된 glucose 량을 계산함으로써 구하여졌고 그 결과를 Table 3에 나타냈다.

관형발효조 출구에서 구한 cell 수율값 0.0087~0.0093은 회분식 발효조 경우의 값 0.087~0.089⁽¹⁷⁾보다 매우 낮은데 Moo-Young⁽¹⁸⁾등도 역시 관형발효조에서 낮은 값을 얻었다.

체류시간 영향

관형발효조 성능을 확인하기 위하여 체류시간 변화에 따른 glucose와 ethanol의 농도를 확인하였다. 발효초기에는 10.9% (w/v) glucose 용액을 72 ml/hr 유량속도로 공급하여 도달한 정상상태에서 glucose 농도는 2.3 g/l 이고 ethanol 농도는 51.6 g/l였다. t=

66.5 시간에 공급액을 16.55% (w/v) glucose 용액으로 교체하여 공급하였는데 정상상태에서 출구의 glucose 농도는 26.6 g/l 이고 ethanol 농도는 65.7 g/l였고, t=192 시간에 기질용액을 유량속도 98 ml/h로 증가하여 공급한 정상상태에서 출구의 glucose 농도는 35.8 g/l 이고 ethanol은 61.4 g/l였다. 발효조 출구에서 ethanol 농도는 유량을 증가하면 감소하나 ethanol 생산성은 ethanol 농도와 dilution rate의 곱이어서 증대한다. 발효조 공간체적 기준한 체류시간에 따른 ethanol 농도 및 생산성은 Table 4와 같았다. 체류시간 2.52시간 경우 ethanol 농도는 61.4 g/l였고 ethanol 생산성은 24.38 g/l·hr였다.

Ethanol 생산성

본 실험결과 ethanol 생산성을 다른 형태의 발효조와 서로 비교한 결과를 Table 5에 수록하였다.

본 연구의 ethanol 생산성(전체체적 기준)은 효모를 재순환하는 CSTF보다 낮으나 운전이 용이하며 장치가 간단한 장점을 지니며 다른 고정화법에 의한 ethanol 생산성과 비슷한 높은 생산성을 나타내

Table 5. Comparison of ethanol productivity

System	Ethanol Concentration at Steady-State (g/l)	Ethanol Productivity (g/l·hr) based on		Reference
		Liquid Volume	Total Volume	
Continuous stirred Tank Fermentor				
CSTF	38.0		4.1	17
CSTF with Cell Recycle	60.0		18.3	17
Tower Fermentor	59.7		11.7	19
Immobilized Fermentor				
Immobilized Cells (Wood Chips)	65.7	19.1	6.49	This work
"	61.4	24.4	8.30	"
"	60.6	21.8	-	6
Immobilized Cells (Carrier A)	65.0	24.9	-	10
Immobilized Cells (Ca-Alginate Gels)	59.7	29.9	9.57	8
Immobilized Cells (Raschig Ring)	28.4	10.2	5.02	20

어, 다른 충전물에 비하여 값싼 wood chip을 충전한 관형발효조는 충분한 경제적 이점을 갖는 것으로 판단된다.

운전안정성

관형발효조를 이용하여 연속발효를 410시간 동안 수행하였으나 편류 및 오염 현상은 발견되지 않았으며 별도로 효모의 투입을 필요로 하지 않았다. 효모 생존율은 methylene blue 염색법으로 측정된 결과 88~93%로 유지되었다.

요 약

Wood chip을 support로 충전한 관형발효조에 *Saccharomyces formosensis* 효모용액을 통과시켜 고정화한 관형발효조에서 연속 발효실험을 수행한 결과 wood chip은 support로서 높은 효모 고정화율을 나타내었다.

관형발효조에서 발효실험시 유량 및 농도의 변화시 정상상태에 도달하는데 약 60시간 소요되었고, 정상상태에서 ethanol 수율은 0.473~0.483로서 회분식발효조 경우보다 높은 값을 나타냈다. 정상상태에서 ethanol 생산성(공간체적 기준)은 ethanol 농도 61.4~65.7 g/l 범위에서 24.4~19.1 g EtOH/l·hr를 나타내어 다른 고정화법에 의한 것과 비슷하게 높았다.

관형발효조에서 410시간 연속 발효운전시 오염현상이 없었고 효모생존율은 88~93%로 유지되었다.

사 사

본 실험의 균주를 제공한 일산실업, 발효조를 제작한 한국비료측에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

- Slessor, M. and C. Lewis: Biological Energy Resources, John Wiley & Sons, New York (1979).
- Petre, D. and D. Thomas: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 127 (1978).
- Mattiason, B.: *J. Appl. Biochem.*, **3**, 183 (1981).
- Freeman, A. and Y. Aharonowitz: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2747 (1981).
- Furusaki, S. and K. Fukumura: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2921 (1983).
- Robinson, C.W., M. Moo-Young and J. Lamptey: Vth International Fermentation Symposium (London), 105 (1980).
- Sitton, O.C. and G.C. Magruder and J.L. Gaddy: Vth International Fermentation Symposium (London), 231 (1980).
- Williams, D. and D.M. Munecke: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1813 (1981).
- Tyagi, R.D. and T.K. Ghose: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 781 (1982).
- Ghose, T.K. and K.K. Bandyopadhyay: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1489 (1980).
- Cysewsk, G.R. and C.R. Wilke: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125 (1977).
- Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).
- Chung, I.J. and Y.S. Park: *Hwahak Konghak*, **21**, 151 (1983).
- Furusaki, S. and K. Fukumura: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2921 (1983).
- Lee, S.S. and F.M. Robinson: *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 11, 641 (1981).
- Ghose, T.K. and K.K. Bandyopadhyay: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1489 (1980).
- Ghose, T.K. and R.D. Tyagic: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1387 (1979).
- Robinson, C.W. M. Moo-Young and J. Lamptey: Vth International Fermentation Symposium (London), 105 (1980).
- Jones, S.T. and R.A. Korus: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 742 (1984).
- Sitton, O.C. and J.L. Gaddy: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 173 (1980).