

고정화된 효모로 충전된 관형발효기에서의 에탄올 연속발효

서근학¹·최명호²·송승구^{3*}

¹부산수산대학 응용화학과 ²일신산업(주) ³부산대학교 화공과

Comparative Study on Continuous Ethanol Fermentation by Immobilized Tubular Fermentor

Suh, Kuen Hack¹, Myung Ho Choi², and Seung Koo Song^{3*}

¹Department of Applied Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-023, Korea

²Ilsan Trading Company, Pusan 608-040, Korea

³Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

The immobilized cell tubular fermentor was prepared by wood chips or alginate gel. Investigations of characterization of the performance of ethanol fermentation in the immobilized cell tubular fermentor were undertaken and the results were compared with those of other fermentors. The immobilized cell fermentor packed with alginate gel showed much higher ethanol productivity than that with wood chip. It was concluded that the immobilized cell tubular fermentor packed with alginate gel might offer better perspectives for continuous ethanol production than that with wood chip.

여러 형태의 대체에너지 개발중 재생가능자인인 biomass를 연료 또는 화학제품으로 전환하는 bio-conversion에 관한 연구가 최근에 각광을 받고 있으며 에너지원의 부족을 해결할 방법중에서 중요한 몫을 차지할 것으로 판단된다(1, 2). Bio-conversion을 이용한 연구 개발중에서 cellulose를 가수분해시켜 당화시킨 후 발효시켜 에탄올을 생산하는 방법에 대한 연구(2, 3)가 가장 활발하게 이루어지고 있다.

전통적으로 에탄올 발효공정은 회분식 방법이 널리 이용되고 있으나, 회분식 발효는 cell이 발효조내에서 성장주기의 모든 과정을 경과하여야 하므로 발효조건이 계속 변화하는 단점을 가지고 있으며, 생성된 에탄올은 발효 억제작용이 있어 cell의 성장속도를 억제한다. Cell의 성장조건을 일정하게 한 CSTF(continuous stirred tank fermentor)는 회분식 발효조에 비하여 에탄올 생산성을 증가시키나, 발효조의 출구를 통하여 cell이 연속적으로 손실되는 것과 생성물 억제작용의 영향으로 기질용액의 농도를 낮추어 운전하여야 하는 단점을 가진다. 에탄올의

생산성을 증가시키기 위한 한 방법으로는 cell을 불활성 support나 gel에 고정화시킨 후에 관형발효기에 충전하여 발효를 연속적으로 수행하는 것이다. 이러한 관형발효기에서는 고정화법에 따라 cell의 농도를 증가시킬 수 있으며, plug flow의 유체특성에 의해 관형발효기의 뒷부분에 생성물의 농도가 증가되므로 생성물에 의한 억제작용의 영향을 감소시켜 생산성을 증가시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. Cell을 고정화시키는 방법으로는 가교법(cross-linking method), 포괄법(entrapping method) 및 흡착법(adsorption method) 등이 있으나, 에탄올의 연속발효 공정에서는 주로 포괄법(4-6) 또는 흡착법(7, 8)이 이용되고 있다.

본 연구는 상기와 같은 이점을 가진 관형발효기를 이용한 발효공정을 좀더 세분화하여 관찰함으로써 발효기의 제반 특성에 따른 생산성의 영향을 검토하고, 포괄법과 흡착법에 의한 고정화도 및 관형발효기에서 연속발효시의 발효특성을 고찰하고자 하였다.

Key words: Continuous ethanol fermentation, immobilized tubular fermentor

*Corresponding author

재료 및 방법

사용 균주

주정업계에서 에탄올 발효시 이용되고 있는 6종류의 *Saccharomyces* sp.를 일산실업(주)으로부터 사면배지 형태로 분양받아 보관하여 실험에 이용하였다.

사용 배지

포도당 배지와 기질용액은 Cysewski와 Wilke(9)가 사용한 합성배지의 조건과 동일하게 조제하였으며, 그 성분 및 조성을 Table 1에 기술하였다. 포도당과 영양분은 별도로 5N-H₂SO₄를 이용하여 pH를 4.8로 조정한 후에 121°C에서 20분동안 멸균하고 냉각한 다음에 혼합하였다.

관형발효기

관형발효기는 높이 60cm이고 직경은 2.7cm인 스테인레스 강관으로 제작하였으며, 시료 채취구는 20cm간격으로 30° 각도로 2개를 설치하였다. 관형발효기의 외부에는 내부온도의 조절을 위하여 스테인레스 강관으로된 직경 5.5cm인 자켓트를 설치하여 온수를 순환시켰다.

분석방법

포도당 농도는 DNS(3,5-Dinitrosalicylic acid) (10, 11)법에 의하여 분석하였으며, 에탄올 농도 분석은 Gas Chromatograph(Hitachi-163)를 사용하였다. 효모의 농도는 분광광도계를 이용하여 구하였다.

효모균종 선별

15% 포도당 배지에 효모를 접종 후 32°C에서 96시간동안 정치배양하였다.

Table 1. Composition of medium.

Component	Composition (g/l)	
	10%	18%
Glucose	100.00	180.00
Yeast Extract (Difco)	8.50	15.30
Ammonium Chloride	1.32	2.38
Magnesium Sulfate	0.11	0.20
Calcium Chloride	0.06	0.11

고정화방법

흡착법의 담체는 wood chip(2×3mm)을 제조하여 관형발효기에 충전, 멸균시킨 후에 호기성 조건의 발효조에서 20시간 배양된 효모용액 2l(농도: 9, 5g/l)를 통과시켜 고정화시켰다. 포괄법은 alginate 용액과 농축된 효모용액을 혼합하여, alginate 농도가 2%(w/v)되게 하여 0.1M CaCl₂ 용액에 사출시켜 효모 고정화된 alginate gel(평균직경: 3.2mm)을 제조하였다.

연속발효 실험

고정화법으로 효모를 고정화하고 관형발효기에 10%(w/v) 포도당 용액을 통과시켜 활성화시킨 후 18%(w/v) 포도당 용액을 통과시켜 실제적인 발효 실험을 수행하였다. 연속발효 실험시 발효기의 온도를 32°C로 유지하였고, 장치의 개략도는 Fig. 1과 같다.

결과 및 고찰

효모균종 선별

6종류 균종에 대한 회분식 에탄올 발효 실험을 수행하여 Table 2의 결과를 얻었다. Table 2에서 효모 균종 선별을 에탄올 수율, 효모 생존율의 기준에 의하여 행한 결과, *Saccharomyces formosensis*가 고정화 및 연속 에탄올 발효 실험을 위하여 가장 적절한 것으로 사료되었다.

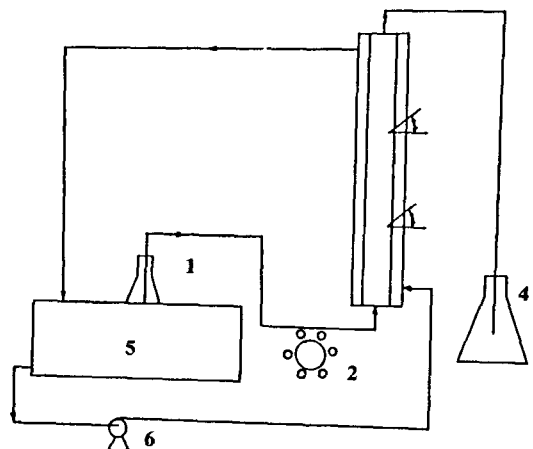


Fig. 1. Schematic diagram of experimental apparatus.

1. Feed tank
2. Peristaltic pump
3. Tubular fermentor
4. Product tank
5. Shaking water bath
6. Water circulation pump

Table 2. Screening of *Saccharomyces* sp. for ethanol fermentation.

Strains	Ethanol Concentration (g/l)	Ethanol Yield Y p/So(g/g)	Cell mass ($\times 10^8$ cell/ml)	% Survival cell viability
<i>S. cerevisiae</i> (IFO-1)	63.7	0.425	1.40	84
<i>S. formosensis</i> (IFO-0216)	64.0	0.427	1.46	85
<i>S. peak</i> (IFO 0222)	60.3	0.402	1.25	79
<i>S. robustus</i> (IFO 0224)	62.7	0.418	0.76	72
<i>S. cerevisiae</i> (IFO 2363)	63.0	0.420	1.60	81
<i>S. cerevisiae</i> (IFO 1806)	62.2	0.415	0.95	79

*Substrate conc. ; 150 g/l as glucose (glucose synthesized broth)

*Yield(Y p/So) was expressed as the yield of conversion of glucose to ethanol

고정화 실험

Wood chip(2×3 mm)에 효모를 고정화하기 위하여 관형발효기에 효모용액 2l을 통과하여 고정화된 효모량 10.7g을 얻었다. 고정화된 효모량은 발효기 체적 기준으로 29.6g D.W/l fermentor였다. Alginate gel에 효모를 고정화할 경우 고정화된 효모량은 alginate 용액과 농축된 효모 혼합비를 조정하여 bead 체적 기준 20-140g D.W/l bead 범위로 조절 가능하였으나 흡착법 실험과의 비교를 위하여 52.1g D.W yeast/l bead로 제조하였다. 상기 고정화량은 관형발효기 체적 기준으로 29.2g D.W/l fermentor로서 wood chip의 효모고정화 최대농도와 비슷하게 조절하였다. 상기 고정화법에 의한 고정화 정도를 다른 support에 고정화한 결과와 함께 Table 3에 비교하였다.

본 실험의 고정화법에 의한 관형발효기 체적 기준의 효모 농도는 다른 고정화법보다 높게 나타나 매우 효과적으로 고정화된 것을 알 수 있으며, 회분식 발효조의 stationary phase에서의 효모 농도(9-12g D.W/l)보다 매우 높은 농도를 유지하였다.

연속발효 실험

관형발효기에 wood chip 및 alginate를 충전하여 연속발효 실험을 수행할 때의 관형발효기의 특성을 고찰하기 위하여, 각각의 고정화방법에 따라 효모를 고정화하고 기질용액인 포도당 용액을 통과시켜 연속발효 실험을 수행하였다. 고정화 실험시 관형발효기에 고정화된 초기 효모 농도는 wood chip 사용시 29.6g D.W/l이고 alginate 사용시 29.2g D.W/l이고 이때 공극율은 각각 0.39, 0.44였다. 발효를 행하면서 관형발효기 출구에서 발효시간에 따라 측정된 포도당, 에탄올 및 효모 농도를 Fig. 2, 3, 4에

Table 3. Retention amount of cell on different support.

Support	Cell retention (mg cell/g support)	Cell retention (g cell/l fermentor)	Reference
Wood chips (2 × 3mm)	100	29.6	This work
Ca-alginate gel	43	29.2	This work
Porous bricket	20	12.3	16
Raschig ring (5—7mm o.d)	17	7.3	16
PVC-flake	253.0	5.3	16
Ca-alginate	151.0	10.5	16

도시하였으며 다음과 같은 특성을 나타내었다.

관형발효기의 특성

연속발효 실험 초기에는 10.7%(w/v) 포도당 용액을 공급하여 고정화된 효모를 활성화시킨 후 t=128시간에 공급액을 18.7%(w/v) 포도당 용액으로 교체하여 회석율이 0.25-0.59/h되게 공급하였다.

유량공급 및 포도당 농도의 변화시 새로운 정상상태에 도달하는 시간이 초기에 비하여 감소되는 것은 관형발효기내 고정화된 효모 농도의 증대 및 환경적응 등에 기인하는 것으로 판단되었다.

포도당과 에탄올의 발효기 높이에 따른 농도분포는 Fig. 5과 같다. 그림에서 나타난 바와 같이 에탄올이 발효기 하부에서 많이 생성되고 있음은 포도당 공급액중의 미량 용존산소와 생성물의 농도가 낮아 생성물 억제작용의 감소에 의한 영향인 것으로 사료되었다. 관형발효기 출구에서 효모의 농도는 초기에는 높았으나 시간이 경과함에 따라 거의 일정하게

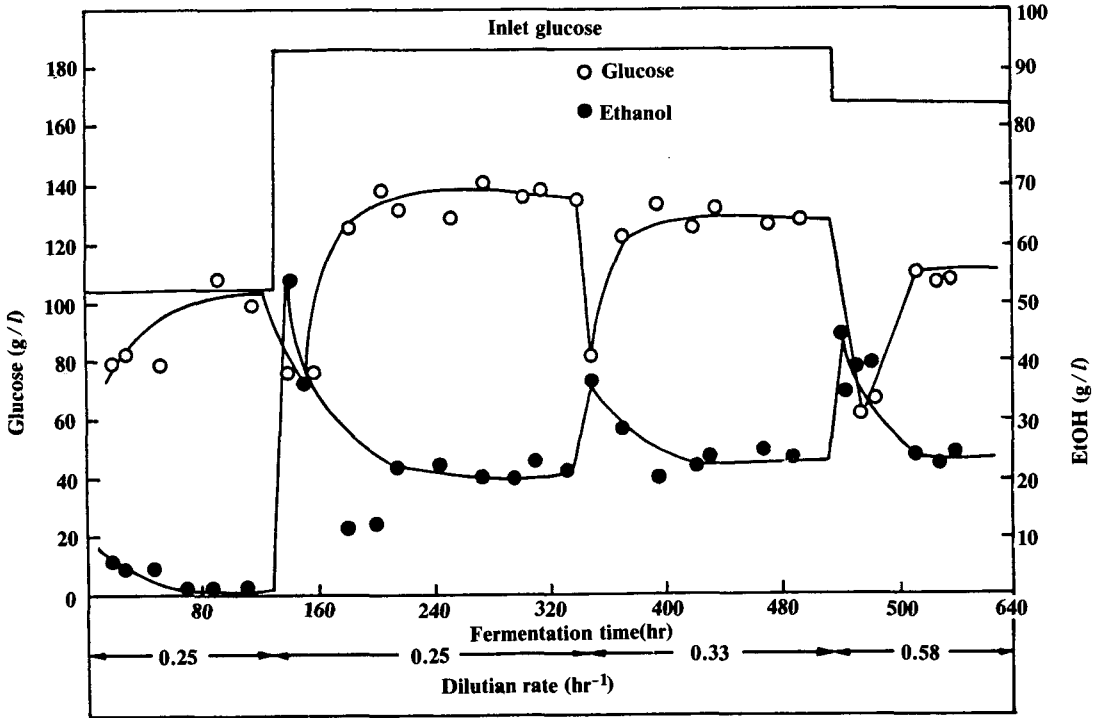


Fig. 2. Glucose and EtOH concentration at the fermentor outlet packing wood chip

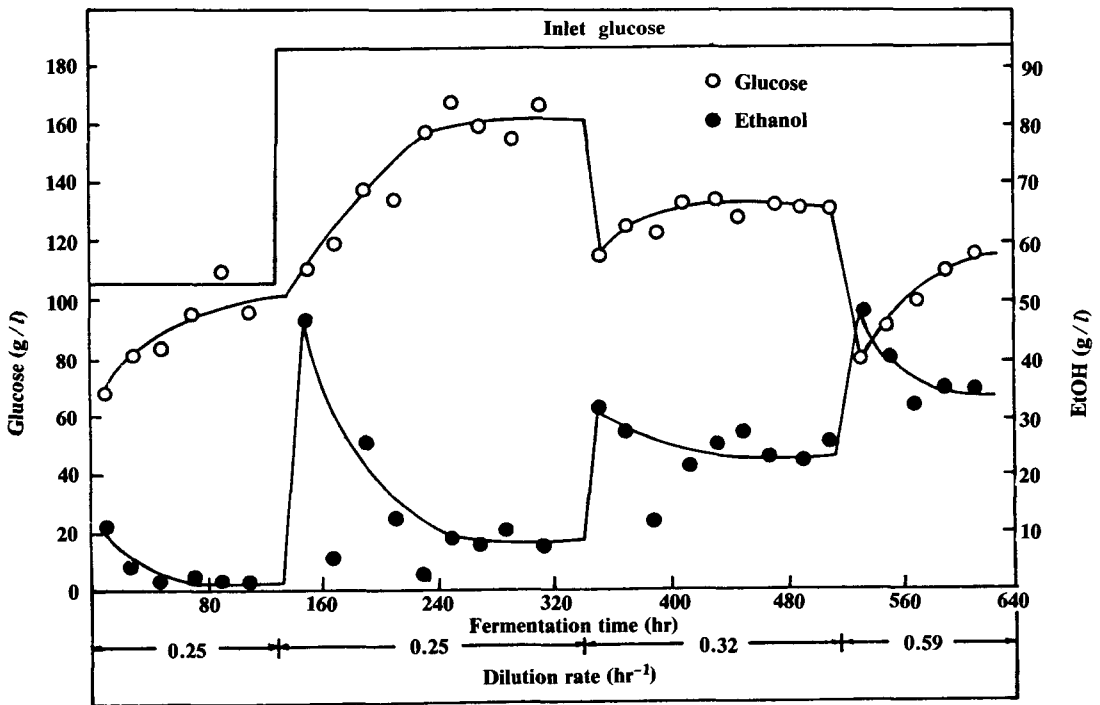


Fig. 3. Glucose and EtOH concentration at the fermentor outlet packing alginate gel.

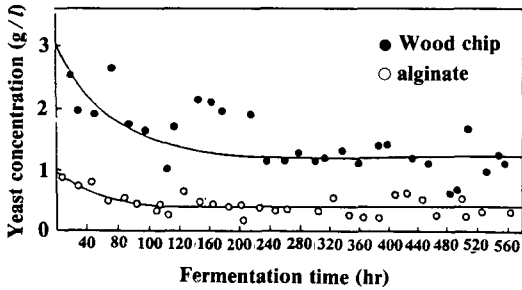


Fig. 4. Yeast concentration at the fermentor outlet

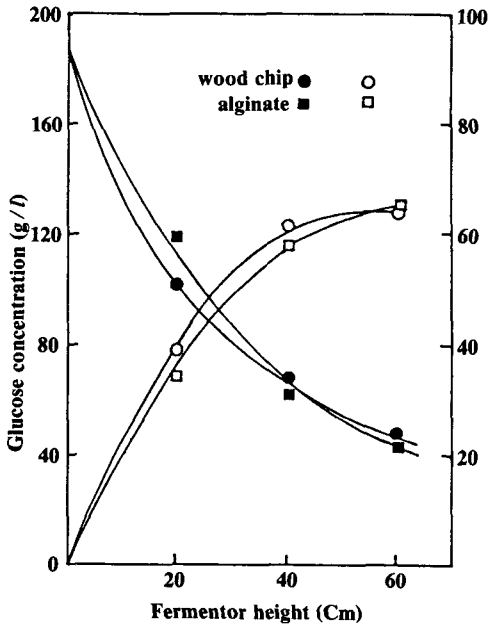


Fig. 5. Glucose and ethanol concentrations profile at the steady state (Dilution rate; wood chip, \circ 33 hr⁻¹; alginate, 0.32 hr⁻¹)

유지되었는데 wood chip 관형발효기의 경우 1.2g D, W/ l이고 alginate 관형발효기의 경우 0.4g D, W/ l였다. 이러한 사실로 부터 일단 고정화된 효모는 쉽게 탈착되지 않음을 알 수 있었으며, alginate에 고정화할 경우가 wood chip에 비하여 효모증식이 느린 것으로 생각되었다.

회석율의 영향

회석율에 따른 영향을 검토하기 위하여 관형발효기에 공급하는 포도당 용액의 유량을 변화시켰다. Wood chip을 충전한 관형발효기에서 t=128시간에서 D=0.25/ hr되게 포도당 용액을 공급하여 정상상태가 될 때의 출구에탄올 농도는 68.3g/ l였고, D=0.3/ hr되게 포도당 용액을 공급하여 2번째 정상상태

에서의 출구에탄올 농도는 64.8g/ l였다. 포도당 용액을 D=0.59/ hr되게 공급한 세번째 정상상태에서의 에탄올 농도는 54.9g/ l였다.

Alginate gel을 충전한 관형발효기에서 t=128시간에서 포도당 용액을 D=0.25/ hr되게 공급한 경우, 첫째 정상상태에서의 출구에서 에탄올 농도는 80.0g/ l였고, D=0.33/ hr되게 포도당 용액을 공급하여 2번째 정상상태가 되었을 때 출구에탄올 농도는 64.8g/ l였고, D=0.58/ hr되게 공급한 셋째 정상상태에서 에탄올 농도는 56.8g/ l였다. 회석율을 0.25-0.59/ hr범위에서 유량을 급격하게 변화시켜도 정상상태에서 효모 농도는 일정하게 유지될 뿐만 아니라 CSTR의 운전한계인 D=0.4/ hr에서도 효모의 wash out 현상은 나타나지 않았다(12). 예상된 바와 같이 기질용액 공급유량은 증가하면 증가할수록 에탄올 생산성은 출구에서의 에탄올 농도와 회석율의 곱으로 계산되므로 증가하였다. Wood chip과 alginate gel을 충전한 관형발효기에서의 에탄올 생산성을 Fig. 6에 도시하였다. Wood chip에 고정화한 관형발효기는 회석율 0.25-0.59/ hr범위에서 에탄올 생산성을 17.1-32.6g EtOH/ l.hr로 나타내었고, alginate gel에 고정화한 관형발효기의 경우는 회석율 0.25-0.58/ hr범위에서 에탄올의 생산성은 20.0-32.9g EtOH/ l.hr였다. 상기 결과에 의하면 alginate gel에 고정화한 관형발효기의 경우가 wood chip에 고정화한 관형발효기에 비하여 에탄올 생산성

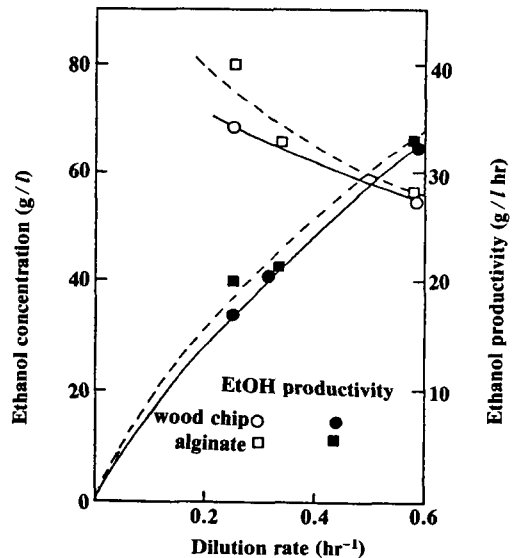


Fig. 6. Ethanol concentration and ethanol productivity vs. dilution rate

이 약간 높아, 에탄올 생산성 기준으로는 alginate gel에 효모를 고정화하는 것이 wood chip에 고정하는 것보다도 효과적인 것으로 사료되었다.

에탄올의 생산성

Wood chip과 alginate gel에 효모를 고정화한 관형발효기에서 매우 높은 에탄올 생산성을 얻었다. 이 결과를 다른 연구자들에 의하여 발표된 문헌에서의 에탄올 생산성과 서로 비교하여 Table 4에 나타내었다. 본 고정화 실험결과와 발효기 전체 기준의 에탄올 생산성은 효모를 재순환하는 CSTF보다는 낮았으나 위의 CSTF에 비하여 효모를 원심분리하지 않아도 되며, 운전이 용이하고 장치가 간단한 장점을 지니고 있어 관형발효기는 충분한 경제적 이점을 갖는 것으로 생각되어졌다. 고정화 방법중 alginate gel에 효모를 고정화한 관형발효기에서 발효기 전체 체적 기준의 에탄올 생산성은 wood chip에 고정화한 관형발효기보다 15-30% 정도 높아, 에탄올 생산을 위한 좀더 효과적인 고정화법으로 사료되었다.

에탄올과 cell 수율

2가지 고정화법에 의한 관형발효기에서 에탄올 생산 실험결과에서 정상상태에서 소모된 포도당량과 생성된 에탄올량을 구하여 에탄올 수율을 Table 5에 나타내었다. 상기 실험결과와 에탄올 수율은 wood chip에 고정화한 경우에 0.466-0.476g EtOH/g glucose로써 이론적 에탄올 수율의 91-93%이고 alginate gel에 고정화한 경우에 0.47-0.485g EtOH/g glucose로서 이론적 에탄올 수율의 92-95%였다. 고정화된 관형발효기의 에탄올 수율은 회분식 발효조의 에탄올 수율 0.44-0.45(13)보다 매우 높은 값을 나타내므로, 에탄올 생산이 매우 효과적으로 수행되는 것을 알 수 있었다. 상기 결과는 Mo-o-Young(8) 등의 관형발효기에서 에탄올 수율값 0.45-0.48과 거의 일치하고 있다. 정상상태에서 관형발효기에서 배출되는 효모는 생성되는 효모량과 동일하다는 가정하에서 효모수율을 발효기 출구에서의 효모 농도의 소모된 포도당량으로 부터 구하였으며, 본 실험에서 정상상태에서 관형발효기 출구의 효모 농도는 기질용액의 공급유량에도 불구하고 거의 일정하였다. Wood chip에 고정화한 관형발효기에서

Table 4. Comparison of ethanol productivity

System	Dilution rate(hr ⁻¹) based on		Ethanol productivity (g/l hr) based on		Ethanol con- centration(g/l) at steady-state	Reference
	Liquid V	Total V	Liquid V	Total V		
CSTF		0.13		4.1	38.0	17
CSTF with cell recycle		0.30		18.3	60.0	17
Entrapping method (Ca-alginate gels)	0.25	0.11	20.0	8.8	80.0	This work
	0.33	0.15	21.5	9.4	65.4	
	0.58	0.26	32.9	14.5	56.5	
Adsorption method (wood chips)	0.25	0.10	17.1	6.7	68.3	
	0.32	0.12	20.6	8.0	64.8	
	0.59	0.23	32.6	12.7	54.9	
Physical Adsorption (wood chips)	0.36	—	21.8	—	60.6	13
Physical Adsorption (wood chips)	0.28	0.10	21.2	7.4	76.0	12
Immobilized Cells (Carrier A)	0.35	—	24.9	—	65.0	16
Immobilized Cells (Ca-alginate gels)	0.50	0.16	29.9	9.57	59.7	4
Immobilized Cells (Gelatin crosslinked with glutaraldehyde)	0.36	0.18	10.23	5.02	28.4	18

Table 5. Ethanol and cell yield

Support	Consumed glucose (g/l)	produced ethanol (g/l)	Outlet cell (g/l)	Ethanol yield (g Ethanol/g glucose)	Cell yield (g cell/g glucose)
Wood chip	143.2	68.3	1.2	0.476	0.007
	138.9	64.8	1.2	0.466	0.009
	115.2	54.9	1.2	0.476	0.010
Alginate	168.9	80.0	0.4	0.470	0.002
	138.7	65.4	0.4	0.471	0.003
	116.6	56.5	0.4	0.485	0.003

효모수율은 0.007-0.010g yeast/g glucose이고, alginate gel에 고정화한 관형발효기의 경우 0.002-0.003g yeast/g glucose로서, 회분식 발효조경우의 0.087-0.089 값(13)보다 매우 낮다. Tyagi와 Ghose (14)도 고정화된 관형발효기에서 매우 낮은 효모수율값 0.02g yeast/g glucose를 얻었다. 상기 사실로 부터 효모가 고정화될 경우 효모 성장속도가 느려지는 현상을 발견할 수 있었으면 alginate gel에 고정화할 경우보다 훨씬 성장속도가 억제되는 것을 알 수 있었다.

안전 안정성

2가지 방법에 의하여 효모를 고정화시킨 관형발효기를 이용하여 600시간 연속에탄올 생산을 수행하였으나 편류현상과 오염현상은 발견되지 않았다. 관형발효기 출구에서 정기적으로 효모생존을 측정할 결과 wood chip에 고정화한 경우는 95-100%로 나타났었다. 관형발효기에서의 생존율은 탐형발효조의 효모생존율이 55-75%인데 (15) 비하여 매우 높았고 alginate gel에 고정화한 경우가 효모생존율이 특히 높았다.

요 약

*Saccharomyces formosensis*를 wood chip과 alginate gel에 고정화 실험을 한 결과, 모두 효모 고정화도 매우 높으므로 고정화를 위한 support로서 적절한 것으로 판단되었다. 관형발효기에 효모를 고정화한 wood chip 및 alginate gel를 충전하여 연속 발효 실험을 수행한 경우 0.446-0.485g EtOH/g glucose로서 비슷하였으나, cell 수율은 alginate gel의 경우가 wood chip의 경우보다 낮아서 down stream의 처리시 유리하였다. 관형발효기의 에탄올 생산성은 wood chip을 이용할 경우 정상상태에서 에

탄올 농도 68.3-54.9g/l 범위에서 17.1-32.6g EtOH/l, hr를 나타내었고, alginate gel을 이용할 경우 정상상태에서 에탄올 농도 80.0-56.8g/l 범위에서 에탄올 생산성은 20.0-32.0g EtOH/hr를 얻었다.

본 실험의 에탄올 생산성은 다른 고정화법에 비하여 높았으며, 고정화 방법중 alginate gel을 이용한 고정화법은 에탄올 생산을 위하여 효과적인 에탄올 생산 방법으로 사료되었다.

사 사

본 연구는 1986년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 깊이 감사함을 드립니다.

참고문헌

- Slisser, M. and Lewis, C., *Biological Energy Resources*, 1st ed (New York: John Wiley & Sons, 1979), 54.
- Kosaric, D. and Russel, I. and Stewart, G.S. *Advanced in Microbiology*(Vol. 26)., Academic press, 147 (1980).
- Maiorella, B.L., Blanch, H.W. and Wilke, C.R., *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1003 (1984).
- Nagashima, M., Azoma, M. and Noguchi, S., *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 217 (1985).
- Furui, M. and Yamashita, K., *J. Ferment. Technol.*, **63**, 167 (1985).
- Furusaki, S., Seki, M. and Fukumura, K., *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2921 (1983).
- Gencer, M.A. and Mutharasan, R., *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2243 (1983).
- Robinson, C.W., Moo Young, M. and Lamptey, J., *Vth International Fermentation Symposium*(London), 105 (1987).

9. Cysewski, G.R. and Wilke, C.R., *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125 (1977).
10. Miller, G.I., *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).
11. Forouhi, E., *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1905 (1983).
12. Ghose, T.K. and Tyagi, R.D., *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1421 (1978).
13. Tyagi, R.D. and Ghose, T.K., *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1907 (1980).
14. Tyagi, R.D. and Ghose, T.K., *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 781 (1982).
15. Jones, S.T., Korus, R.A. and Heimsch, R.C. *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 742 (1984).
16. Ghose, T.K. and Bandyopadhyay, K.K., *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1489 (1980).
17. Ghese, T.K. and Tyagi, R.D., *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1421 (1978).
18. Sitton, O.C. and Gaddy, J.L., *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1487 (1980).

(Received April 20, 1988)