한국생물공학회지 제4권 제1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 4 No. 1. 21-30(1989)

連續 生物反應器 안에서 抽出 醱酵에 依한 알코올 生産

金在亨, 全順培*, 李基永, 金東運
全南大學校 工科大學 工業化學科
*全南大學校 自然科學大學 生物學科

Alcohol Production by Extractive Fermentation in a Continuous Bioreactor

Jae-Hyung Kim, *Soon-Bai Chun, Ki-Young Lee and Dong-Woon Kim

*Department of chemical Technology, *Department of Biology, Chonnam National University*

ABSTRACT

Lauryl alcohol was used as extracting solvent of ethanol, and its toxicity on the free cells or immobilized cells was tested.

To increase ethanol productivity, extractive fermentation method combined with ethanol fermentation and ethanol recovery was applied to the immobilized batch and continuous fermenter.

As the concentration of LaOH was increased, the lag phase became longer, but specific growth rate did not change greatly. And a cell entrapment technique could protect the yeast cells against both substrate inhibition and solvent toxicity.

When the glucose concentration was 400 g/l and the LaOH/fermentation medium ratio was 4, total ethanol productivity increased with the enhancement of LaOH volume, and maximum productivity was 2.75 g/l.hr in the immobilized batch fermentation.

序 論

醱酵에 依한 에탄올 生産에 있어서, 生産性을 높이기 爲한 많은 硏究가 進行 中에 있다. 에탄올의 生産性을 높이기 爲해서는 醱酵時 醱酵液의 濃度를 높이거나, 連續工程을 하여야 하는데, 醱酵 反應이 進行되어 醱酵液 中의 에탄올 濃度가 增加하게 되면 에탄올에 依한 生成物 沮害現象이 나타나기 때문에 生産性은 減少하게 된다(1).

이러한 生成物 沮害現象을 減少시켜 醱酵 生産性을 增加시키기 위해서는 醱酵 終了 後 보다는 醱酵와 同時에 醱酵 生成物을 除去하는 것이 바람직한데, 이들 중에는 眞空醱酵(2), 蒸發醱酵(3), 隧析醱酵(4), 그리고 抽出醱酵法(5~13) 等이 있다. 이들 중 大部分이 에너지 費用이나 設置費가 높게 評價되므로 魅力的이지 못하고, 液一液 抽出工程이 比較的 값싼 것으로 報告 되었다.

抽出醱酵가 成功的인 工程이 되기 爲해서 抽出劑가 갖춰야 할 一般的인 條件은 1) 酵母에 毒性이 없어야 하고 2) 熱에 安定하여 滅菌이 可能하고 3) 값이 싸야 하고 4) 물 層에 녹지 않아야 하며 5) 生成物이 回收되는 分配係數가 크고 6) 필수 영양분의 分配係數가 작아야함과 同時에 7) 抽出劑에서 生成物이 쉽게 分離될 수 있고 8) 水性狀과 抽出狀 사이의 密度差가 커야 한다는 것이다.

에탄올 醱酵에 쓰인 抽出劑로서 1) Dibutyl phosphate 2) Tri-butyl phosphate 3) Activated carbon 4) 水性 2狀系 5) Organic acid (6) 6) Lauryl alcohol(7,12) 等이 있는데 이 중 LaOH이 分配係數는 낮지만 나머지 條件들을 가장 充足시켜 주는 抽出劑로 알려져 있다.

또한, 固定化 醱母細胞는 低, 高濃度 葡萄糖의 에탄올 醱酵에 適用되었으며, 菌體의 損失이 없어 連續 操業이 수월하고 에탄올에 依한 生成物 沮害現象을 減少시킬 수

있다.

그러므로, 本 硏究에서는 抽出劑로 Lauryl alcohol-(LaOH)을 使用하여, 葡萄糖 消費에 對한 釉出製의 影響을 實驗하고, 酵母菌體를 K-carrageenan에 固定化시켜 固定化 回分醱酵 및 固定化 連續醱酵를 抽出醱酵와 組合하여 細胞에 對한 生成物 沮害現象을 減少시키고 에탄올의 生産性을 增加시키는데 本 硏究의 目的이 있다.

材料 및 方法

微生物

本 實驗에 使用된 酵母菌株는 에탄올 生成能이 높은 *Saccharomyces cerevisiae(IF00222)*이다.

菌株保管 및 基質溶液

酵母菌株는 YM agar 斜面培地 狀態로 4℃의 냉장고에 保管하고 使用하였으며, 增殖培地의 組成은 glucose 50 g/ℓ, KH_2PO_4 2 g/ℓ, $(NH_4)_2SO_4$ 2g/ℓ, yeast extract 20 g/ℓ, Streptomycine 100 mg/ℓ로 4N-H_2SO_4를 利用하여 pH를 5.5로 維持시켰다.

또한, 醱酵培地는 yeast extract 2.0g/ℓ, $(NH_4)_2SO_4$ 1.6 g/ℓ, KH_2PO_4 1.6 g/ℓ, KH_2PO_4 1.6 g/ℓ, $MgSO_4 7H_2O$ 0.16 g/ℓ, $CaCl_2 2H_2O$ 0.16 g/ℓ, Silicon oil 0.08g/ℓ과 適當한 濃度의 葡萄糖을 混合한 다음 4N-H_2SO_4를 利用하여 pH를 4.0이 되도록 調節하였다.

抽出劑

본 實驗에 使用된 抽出劑로는 菌株에 害가 없는 LaOH를 使用하였으며, LaOH의 物理的 特性을 보면 Table 1과 같다. 또한, LaOH는 抽出 後에 回收하여 100℃에서 24時間 동안 蒸溜시켜 再 使用하였다. 〈Table 1〉

Table 1. Physical and EtOH extraction properties of LaOH.

Properties	Contents
Molecular weight	186.34
Specific gravity (g/cm^3)	0.831 (24°C)
Boiling temperature (°C)	225
Fusion temperature (°C)	19.5 25
EtOH distribution coefficient (30°C)	ca. 0.35
Solubility in water (g/100g H_2O)	2.3 x 10^{-4}

菌體 固定化

bead 製造 : 菌體는 20時間 동안 增殖培地를 使用하여 Shaking incubator(180 r.p.m, 30℃)에서 培養시켰으며, 培養된 菌體(wet. wt. 15g)를 滅菌蒸溜水를 利用하여 50㎖로 현탁시킨 다음, 미리 준비된 3% K-carrageenan 溶液 450㎖와 混合하여 이 溶液을 peristalic pump를 利用하여 一定한 速度로 0.2M-KCl溶液 속으로 10㎝ 정도 위에서 떨어뜨려 bead를 製造하였다.

生成된 bead는 0.2M-Kcl 溶液에서 2時間 硬化시킨 後 滅菌 蒸溜水로 2번 洗滌한 後 0.05M-KCl 溶液에 담가 4℃의 냉장고에 保管하였으며, 實驗 前에 bead 內의 細胞數를 增加시키기 爲하여 增殖培地에서 24時間 동안 activation시켰다.

film 製造 : bead 製造에서와 같이 準備된 細胞와 K-carrageenan 混合液을 알루미늄판(5x15x0.03㎝, 10個)에 입혀 0.2M-KCl 溶液에서 2時間 동안 硬化시킨 後 反應器에 끼워 넣고 滅菌 蒸溜水로 2번 洗滌한 後 增殖培地를 反應器에 채워 30℃의 低温 incubator에서 24時間 동안 activation시킨 後에 實驗을 實施하였다.

實驗 裝置

本 連續實驗에 使用한 裝置의 모식도는 Fig. 1, Fig. 2와 같으며, 生物反應器의 特徵과 크기는 Table 2와 같다. 反應器는 아크릴로 製作하였으며, film fermentor의 境遇 支持體로 알루미늄판을 使用하였다. 〈Fig. 1, Fig. 2, Table 2〉

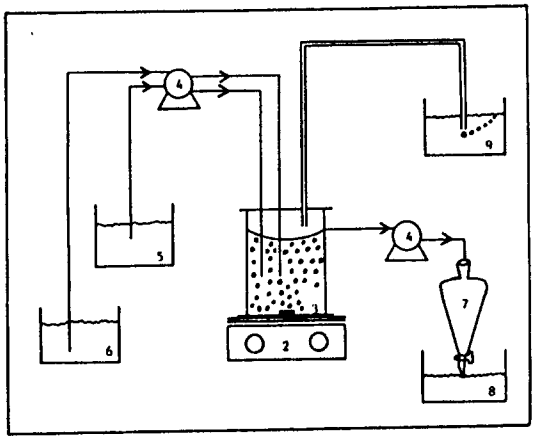

Fig. 1. Experimental apparatus.

1. Low temperature incubator
2. Magnetic stirrer
3. Bioreactor
4. Peristaltic pump
5. Substrate reservoir
6. LaOH reservoir
7. Seperating funnel
8. Product reservoir
9. CO_2 gas reservoir

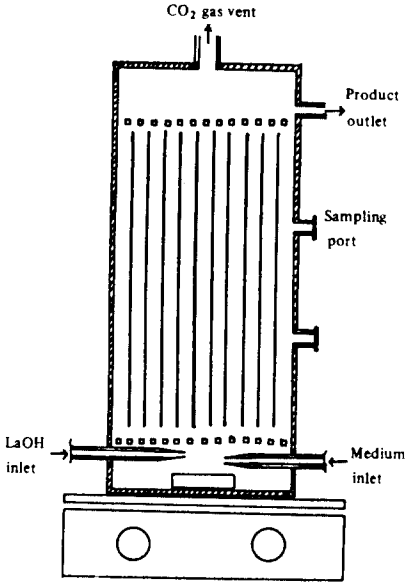

Fig. 2. Scheme of the film fermenter.

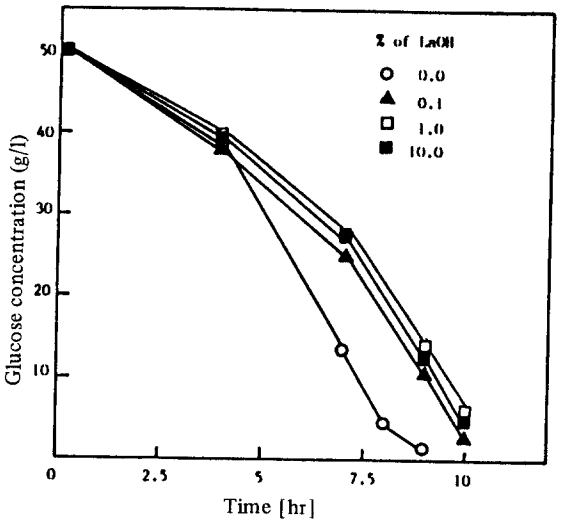

Fig. 5. Effect of LaOH (% v/v) on glucose consumption by immobilized *S. cerevisiae*.

Table 2. Dimension of fermenter.

	Immobilized mixed tank fermenter	Film fermenter
Fermenter volume, cm^3	730.4	540.8
Cross sectional area, cm^2	54.1	27.0
Outlet height, cm	9.8	16.5
Bead/gel film volume, cm^3	130	100
Working volume, cm^3	360	325

에탄올에 對한 平衡分配係數 實驗

抽出狀과 水性狀 사이의 에탄올 分配係數의 測定은 30℃의 Shaking incubator(180 r.p.m.)에서 삼각 flask에 의해 實驗하였다. 水性狀은 菌體가 없는 醱酵培地 혹은 蒸溜水에 여러가지 濃度의 에탄올을 添加하여 使用하였으며, 時間의 變化, 初期 에탄올 濃度, 그리고 抽出狀/水性狀의 比에 따라, GC를 利用하여 水性狀 中의 殘留 에탄올 濃度를 測定하였다.(Fig. 5).

LaOH 回收 및 에탄올 分離 實驗

抽出劑로 使用된 LaOH는 醱酵培地와 쉽게 分離되며, 生成物인 에탄올과도 간단히 分離되기 때문에 回收하여 再 使用하였으며, 本 硏究에서는 물 100g과 에탄올 100g의 混合液, LaOH 100g과 에탄올 100g의 混合液을 各各 單蒸溜시켜 一定時間에 純粹한 에탄올이 잘 分離될 수 있는가를 確認 實驗을 하였으며, 實驗裝置는 간단한 單蒸溜 裝置를 使用하였고, 알콜램프에 点火한 後 0-20分, 20-30分, 30-35分, 35-40分, 40-46分에 試料를 받아내어 定量하고 GC로 에탄올 濃度를 測定하였다.

葡萄糖 消費에 對한 抽出劑의 影響 實驗

本 實驗은 自由酵母와 固定化된 酵母를 利用하여 100mℓ 삼각 flask에서 實施하였으며, 接種菌은 shaking incubator(180 r.p.m.)에서 20時間 동안 前 培養시켜 (30℃) 2mℓ를 사용하였으며, adaptation의 影響에 對한 實驗은 0.1% (v/v) LaOH 를 包含한 培地에서 培養된 inoculum을 使用하였다.

여기에서는 100mℓ 삼각 flask에 50mℓ의 增殖培地 (50g/ℓ)와 여러 比率의 LaOH(0, 0.01, 0.1, 1.0, 10% v/v)를 添加시키고 30℃의 Shaking incubator에서 平衡이 이루어진 後에 inoculum을 接種하여 實驗하였으며, 時間에 따른 殘餘 葡萄糖 濃度를 測定하였다.

固定化 回分抽出醱酵 實驗

300mℓ 삼각 flask에 醱酵培地 50mℓ(250 및 400g/ℓ 葡萄糖 溶液)와 여러 比率의 LaOH(LaOH/medium ratio =

0, 1.0, 2,0, 4.0)를 넣고 shaking incubator (180r.p.m, 30℃)에서 平衡을 시킨 다음 activation시킨 bead 5㎖씩을 接種하여 氣 條件下에서 實驗하였다. 그리고, 試料 採取로 인해 減少된 量은 같은 條件으로 醱酵시킨 다른 flask로 부터 一定時間 間隔으로 補充시켜 주었으며 醱酵中 殘餘 葡萄糖 濃度, 에탄올 濃度, 그리고 培地 中의 自由細胞 濃度 等을 測定하였다.

固定化 連續抽出醱酵 實驗

固定化 連續抽出醱酵 實驗은 固定化 混合 醱酵 (Fig. 1)와 film fermentor (Fig. 2)를 利用하여 實施하였으며, 培地 供給速度는 peristalic pump를 利用하여 25㎖/hr로 하고 抽出劑의 供給速度를 培地의 1,2,3,4 倍로 增加시켜 가면서 連續抽出醱酵를 實施하여 基質溶液 稀釋率의 逆數에 2.5倍되는 時間부터 每 2時間마다 下層液(기질+에탄올)을 採取하여 細胞濃度, 에탄올 濃度, 殘餘 葡萄糖 濃度를 測定하였으며 이때 反應器는 使用하기 前에 에탄올로 滅菌하고 gel bead 및 gel film은 滅菌 生理식염수 (0.9 NaCl 溶液)로 洗滌한 다음 다시 蒸溜水로 洗滌하여 使用하였다.

分析 方法

에탄올 濃度는 Gas Chromatograph (Shimadzu, GC-9A, FID)로 分析하였으며, 葡萄糖은 DNSA法(14)으로, 그리고 菌體量은 Spectrophotometer (Milton Roy, Spectronic 20D)로 520nm에서 測定하였다.

結果 및 考察

에탄올에 對한 平衡分配係數

Minier의 三角 圖表(7)에 依하면 에탄올 濃度가 낮을 때 抽出醱酵係에서의 平衡分配係數는 0.35程度지만 適當한 값 以上의 에탄올 濃度에서는 0.6까지 올라갈 수 있다는 事實을 알 수 있었다.

Fig. 3은 Minier의 測定値와 Fredenslund의 UNIFAC 法을 利用한 計算値(5) 및 本 硏究에서의 實驗値로서 LaOH/water의 比가 1이었을때 平衡到達時間은 약 2時間이었으며, 平衡에 到達한 後에는 오랜 時間 平衡 狀態가 維持되었다.

또한, 抽出劑로 LaOH를 使用한 에탄올에 對한 平衡分配係數는 抽出狀과 水性狀의 比가 1에서 4까지는 대체로 一定한 값을 보였는데, 이러한 結果는 두값과 대체로 一致함을 잘 나타내 주고 있으나 Minier實驗値와 마찬가지로 UNIFAC法을 利用한 計算値보다는 苦干 낮은 값을 보였다. 〈Fig. 3〉

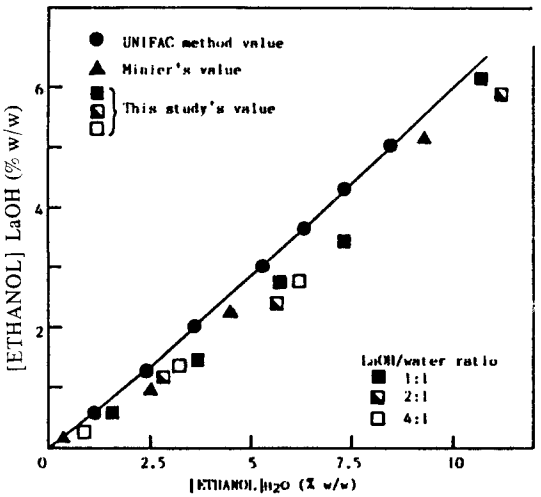

Fig. 3. Partition of EtOH between water and LaOH.

LaOH 回收 및 에탄올 分離

물과 에탄올은 沸點이 비슷하여 95% 以上의 高純度 에탄올을 單蒸溜로 얻기는 어렵지만, LaOH는 沸點(225℃)이 높아 에탄올과 沸點差가 많이 나므로 Table 3,4에서 보는바와 같이 大氣壓下에서 단 한번의 單蒸溜로 97% 以上의 에탄올을 거의 모두 回收할 수 있어서 醱酵 生成物을 高純度로 回收하는데는 抽出醱酵가 效果的임을 알 수 있었다. 〈Table 3.4〉

葡萄糖 消費에 對한 抽出劑의 影響

Fig. 4는 初期 葡萄糖 濃度를 50g/ℓ로 하고 LaOH가 0~1%인 境遇의 時間에 葡萄糖 濃度를 나타낸 것으로 LaOH를 抽出劑로 使用하였을때도 park 等(15)의 硏究

Table 3. Simple distillation results with a mixture of a water and EtOH.

Time, min	amount of effluent, g	EtOH conc. of effluent, %
0 – 20	61.67	77.85
20 – 30	41.65	68.88
30 – 35	18.19	60.69
35 – 40	14.98	52.08
40 – 46	12.47	17.63
raffinate	47.86	1.0

Table 4. Simple distillation results with a mixture of LaOH and EtOH.

Time, min	amount of effluent, g	EtOH conc. of effluent, %
0 – 20	68.82	98.13
20 – 30	24.06	99.73
30 – 35	4.21	98.67
35 – 40	1.04	96.93
40 – 46	0.39	97.60
raffinate	97.70	0.51

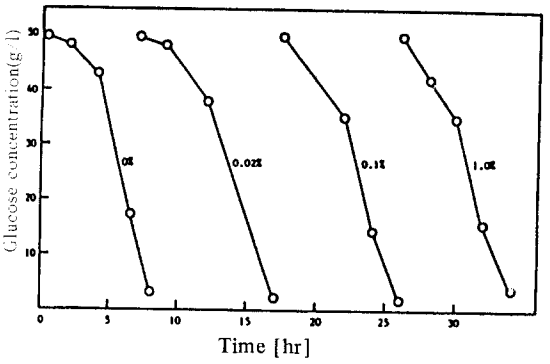

Fig. 4. Effect of LaOH(% v/v) on the glucose consumption by *S. cerevisiae*.

結果와 같이 LaOH 濃度가 높아질수록 lag phase는 延長되지만, 基質 消耗速度는 抽出劑가 없는 境遇와 比較했을때 크게 變하지 않았다.

抽出劑 濃度가 增加하여도 lag phase만 길어지고 氣質消耗速度가 變하지 않는다는 것은 細胞가 抽出劑가 들어있는 새로운 環境에 適應하는데 時間이 걸림을 意味하지만 適應 後에는 抽出劑의 存在에 별 影響을 받지 않는다는 것을 暗示해 준다. 〈Fig. 4〉

Table 5는 抽出劑로 因해 길어진 適應時間을 줄이기 爲해 Park 等이 實驗한 結果로서, 20g/ℓ의 初期 葡萄糖 濃度를 갖는 基質에 TBP를 0~2%(v/v)넣었을 境遇 8.5時間에서의 葡萄糖 濃度는 TBP를 넣지 않은 境遇에만 6.2g/ℓ이고 TBP를 0.1% 以上 넣은 境遇에는 20g/ℓ의 葡萄糖이 그대로 남아 있었다는 것을 報告했다. 그러나 0.1%의 TBP가 包含된 培地에서 培養된 細胞는 TBP를 넣지 않은 境遇 葡萄糖 濃度가 10g/ℓ이지만 0.1% 以上의 TBP를 添加하여도 葡萄糖 濃度값은 크게 變하지 않아 0.1% TBP로 適應되지 않은 境遇보다 훨씬 높은 基質消耗速度 값을 나타내었다.

이같은 現象은 Table 6에서 보는바와 같이 LaOH의 境遇에 더욱 두드러지게 나타나는 것으로 보아 LaOH는 適應 課程을 거침으로서 LaOH에 依한 lag phase 지연효과가 效果的으로 除去될 수 있음을 보여주었다. 〈Table 5, 6〉

Table 5. Residual glucose in the culture incubated for 8.5 hr with the inoculum cultivated in a medium with/without 0.1%(v/v) TBP. (Initial glucose conc. = 20g/l).

TBP (%, v/v)		0	0.1	0.2	0.8	2.0
Glucose conc. (g/l)	no adaptation	6.2	20.0	20.0	20.0	20.0
	adaptation	10.0	10.2	13.7	14.0	15.6

Table 6. Residual glucose in the culture incubated for 9.5 hr with the inoculum cultivated in a medium with/without 0.1%(v/v) LaOH. (Initial glucose conc.=50g/l)

LaOH (%, v/v)		0	0.1	1.0	10.0
Glucose conc. (g/l)	no adaptation	0	50.0	50.0	50.0
	adaptation	12.1	13.8	15.2	15.6

抽出劑로 因한 lag phase를 短縮시키는 또 하나의 方法은 固定化 細胞法으로 Fig. 5는 初期 葡萄糖 濃度 50 g/ℓ일때 포괄 固定化된 細胞가 時間의 變化에 따라 LaOH 存在下에서 葡萄糖의 消耗速度를 나타낸 것으로 固定化된 細胞의 境遇 適應 課程을 거친 자유현탁세포에 못지 않게 lag phase를 短縮시키므로, 固定化 方法이 抽出醱酵에서 細胞의 lag phase를 줄이는데 效果的인 方法임을 보여주었다. 〈Fig. 5〉

固定化 回分 抽出醱酵

典型的 에탄올 醱酵는 初期 葡萄糖 濃度가 150g/ℓ 以上일때는 甚한 氣質 沮害作用 및 生成物 沮害作用을 받아 酵母가 에탄올 生產作用을 제대로 하지못해 初期 葡萄糖 濃度 250 g/ℓ 以上을 갖는 氣質의 醱酵는 無意味한 것이라는 것을 暗示해준다.(1)

Fig. 6은 K-carrageenan bead에 固定化된 酵母를 利用하여 250 g/ℓ 葡萄糖溶液의 醱酵結果를 時間의 變化에 따른 葡萄糖 濃度 및 水性狀 안의 에탄올 濃度를 나타내었으며, Table 7은 最終 醱酵 結果로써 LaOH/medium의 比가 1,2,4인 境遇 各各 40, 33, 27 時間이 消耗되었고, 全體 에탄올 生產性은 2.79, 3.41, 4.09 g/ℓ.hr로 非抽出의 2.32 g/ℓ.hr에 비해 훨씬 增加되었음을 알 수 있다. 〈Fig. 6, Table 7〉

Fig. 7과 Table 8은 初期 葡萄糖 濃度가 400 g/ℓ인 境遇의 結果로써, LaOH를 넣지 않은 境遇 120時間이 지난 後에도 殘餘 葡萄糖 濃度가 140.7 g/ℓ가 남아 있는 反面, LaOH/medium의 比가 4인 境遇 67時間만에 殘餘 葡萄糖 濃度가 6.1 g/ℓ로 거의 轉化가 되었으며, 非抽出에 비해 生產性이 2.78倍 增加하였음을 알 수 있다. 〈Fig. 7, Table 8〉

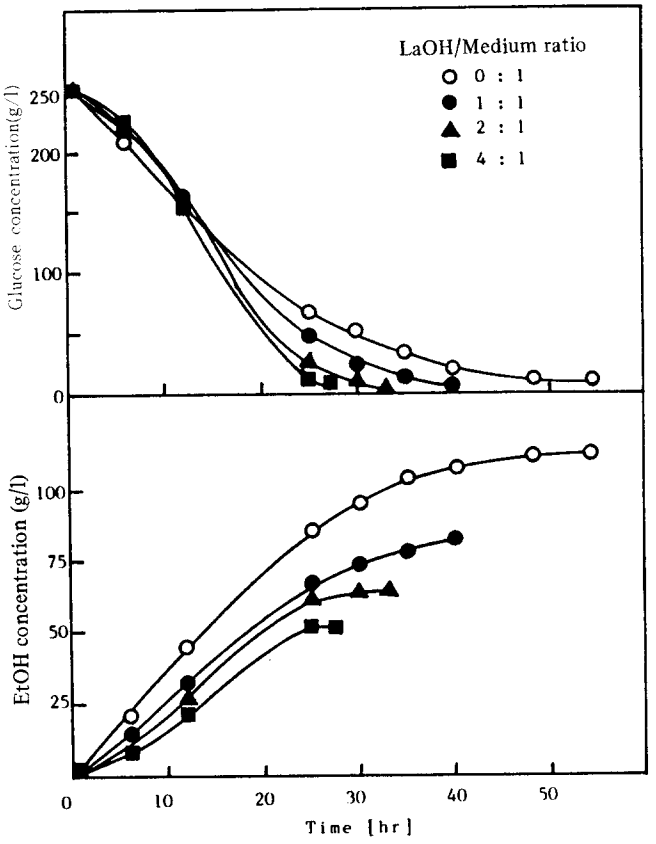

Fig. 6. Extractive fermentation of 250g/l of glucose solution by 2.7% w/v K-carrageenan entrapped cells and LaOH as extractant.

Table 7. Extractive fermentation of EtOH from 250 g/l of glucose solution with entrapped yeast using LaOH as extracting solvent.

LaOH to fermentation medium ratio	0	1.0	2.0	4.0
Residual glucose [g/l]	9.9	6.4	3.7	5.2
EtOH conc. in aqueous phase [g/l]	111.3	82.1	65.7	46.2
EtOH conc. in LaOH phase [g/l]	–	29.0	23.4	16.1
Total EtOH [g/l]	111.3	111.1	112.5	110.6
EtOH yield, $Y_{p/s}$	0.46	0.45	0.46	0.45
Total EtOH productivity [g/l.hr]	2.32	2.78	3.41	4.09

Table 8. Extractive fermentation of EtOH from 400 g/l of glucose solution with entrapped yeast cells using LaOH as extracting solvent.

LaOH to fermentation medium ratio	0	1.0	2.0	4.0
Residual glucose [g/l]	140.7	110.4	55.7	6.1
EtOH conc. in aqueous phase [g/l]	119.5	98.9	90.7	73.2
EtOH conc. in LaOH phase [g/l]	—	40.4	37.4	27.7
Total EtOH [g/l]	119.5	139.3	165.5	184.0
EtOH yield, $Y_{p/s}$	0.46	0.48	0.48	0.47
Total EtOH productivity [g/l.hr]	0.99	1.39	1.90	2.75

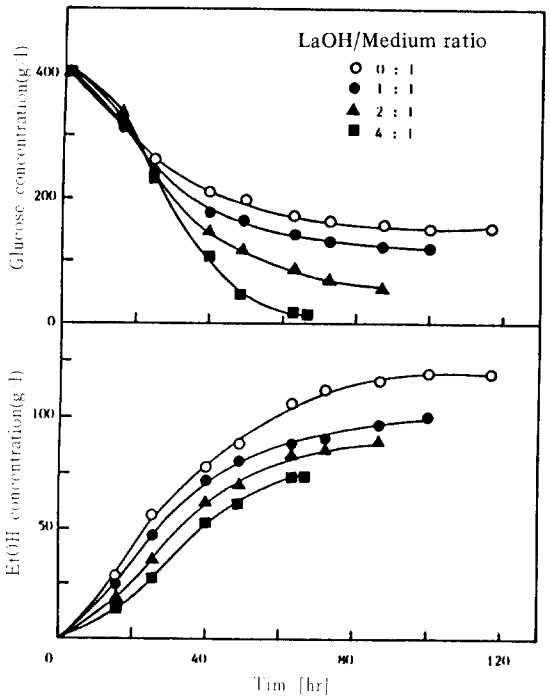

Fig. 7. Extractive fermentation of 400g/l of glucose solution by 2.7% w/v K-carrageenan entrapped cells and LaOH as extractant.

以上의 結果에서 보여준 것처럼 固定化 抽出醱酵는 高濃度의 葡萄糖 溶液에서 더 效果的임을 알 수 있었다.

固定化 連續 抽出醱酵

固定化 連續 混合 醱酵槽에서의 連續 抽出醱酵는 基質과 LaOH를 連續的으로 흘려 보내고 生成物도 連續的으로 流出시키면서 Solvent flow rate의 影響을 考察한 것으로, 初期 葡萄糖 濃度 200g/ℓ의 基質을 25㎖/hr의 流量으로 醱酵槽에 흘려 보냈을때 함께 들어가는 LaOH 流量이 增加함에 따라 水性狀 안의 正常狀態의 葡萄糖 濃度와 에탄올 濃度는 떨어지고 細胞 濃度는 增加함을 알 수 있다.〈Fig. 8〉

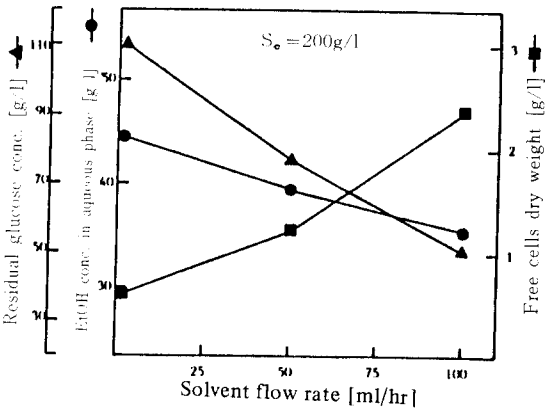

Fig. 8. Effects of solvent flow rate on EtOH concentration, glucose concentration and free cells concentration in the immobilized mixed tank fermenter. [medium flow rate = 25ml/hr]

이것은 生成된 에탄올 中의 相當 部分이 LaOH層으로 抽出되어 이로 因해 減少된 水性狀 안의 에탄올 濃度 값에 起因하여 細胞 活性이 높게 維持되어 生產性에 있어서도 抽出劑가 없는 境遇에 比해서 LaOH/medium의 比가 4인 境遇 1.7培 程度 높았다. 〈Table 9〉

또한, 培地 中의 自由細胞의 濃度가 抽出劑 流量의 增加에 따라 높게 나타난 것은 抽出劑로 因해 水性狀 안의 에탄올 濃度가 減少됨으로써 固定化 bead內에서 遊離된 酵母의 增殖이 促進된 것이라 생각된다. 〈Fig. 8, Table 9〉

film fermentor에서의 連續 抽出醱酵는 activation된 film fermentor 〈Fig. 2〉에 初期 葡萄糖 濃度 200g/ℓ의 基質을 25mℓ/hr로 흘려 보낼때 同時에 流入시키는 LaOH 流量에 따라 달라지는 水性狀 안의 正常狀態 葡萄糖 濃度, 에탄올 濃度 및 細胞 濃度 값을 나타낸 것으로, Fig. 8에서의 境遇와 비슷한 樣相을 보여주나 葡萄糖 消費量이나 水性狀 안의 에탄올 濃度 및 細胞 濃度값은 더 낮은 값을 보였다. 〈Fig. 9〉 이는 連續 混合 醱酵槽보다 더 낮은 初期 cell loading 및 固定化 gel 때문이지만, 比에탄올 生產性에 있어서는 film fermentor가 苦干 더 높은 값을 나타낸 것은 CO_2 gas의 圓滑한 放出 및 擴散抵抗의 減少 等에 原因을 돌릴 수 있을 것 같다. 〈Table 10〉.

또한, 포괄 一吸着法으로 固定化된 酵母는 連續 混合 醱酵槽 안의 bead內 酵母보다 더 낮은 전단력(shear force)을 받기 때문에 細胞가 덜 流出되리라 생각된다.

film fermentor는 連續 混合 醱酵槽보다 CO_2 gas 放出의 용이성 및 전단력으로 因한 固定化의 破壞가 적다는 長點을 가진 製作상의 어려움이 있어 scale-up에는 相當한 어려움이 따르므로 이러한 問題가 先決되어야만 產業化가 可能할 것이다. 〈Fig. 9, Table 10〉

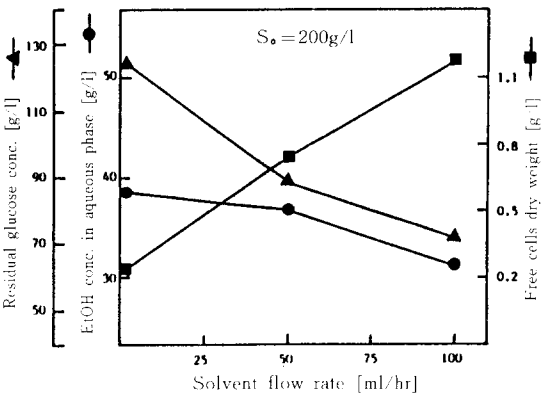

Fig. 9. Effects of solvent flow rate on EtOH concentration, glucose concentration and free cells concentration in the film fermenter. [medium flow rate = 25 ml/hr]

요 약

Lauryl alcohol을 抽出劑로 使用한 에탄올 抽出醱酵를 通하여 다음과 같은 結論을 얻을 수 있었다.

1. GC를 利用한 分配係數의 測定은 Fredenslund의 UNIFAC法을 利用한 計算値보다는 苦干 낮은 값을 보이나 Minier의 測定値와는 잘 一致하고, 에탄올 濃度

Table 9. Continuous alcoholic fermentation using immobilized *S. cerevisiae* with/without LaOH addition in the immobilized mixed tank fermenter.

Parameters	LaOH/Medium ratio		
	0	2.0	4.0
LaOH feed [ml/hr]	0	50	100
Medium feed [ml/hr]	25	25	25
Glucose input [g/l]	200	200	200
Glucose output [g/l]	111.0	78.4	51.3
EtOH conc. in aqueous phase [g/l]	44.1	39.7	35.9
EtOH conc. in LaOH phase [g/l]		11 2	9.87
Total EtOH productivity [g/l·hr]	3.06	4.31	5.23
EtOH yield constant, $Y_{p/s}$	0.50	0.51	0.51
Average conc. of free cells [g/l]	0.61	1.27	2.37
Specific EtOH productivity [g/hr·g gel bead]	0.0085	0.012	0.015

Table 10. Continuous alcoholic fermentation using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* with/without LaOH addition in the film fermenter.

Parameters	LaOH/Medium ratio		
	0	2.0	4.0
LaOH feed [ml/hr]	0	50	100
Medium feed [ml/hr]	25	25	25
Glucose input [g/l]	200	200	200
Glucose output [g/l]	124.0	89.4	72.3
EtOH conc. in aqueous phase [g/l]	38.4	37.4	30.6
EtOH conc. in LaOH phase [g/l]	–	9.6	8.6
Total EtOH productivity [g/l·hr]	2.95	4.35	5.01
EtOH yield constant, $Y_{p/s}$	0.50	0.51	0.51
Average conc. of free cells [g/l]	0.23	0.75	1.17
Specific EtOH productivity [g/hr·g gel film]	0.0096	0.014	0.016

2-10%일때 分配係數는 0.6에 달했다.

2. 물과 에탄올은 沸點이 비슷하여 95% 以上의 高純度 에탄올을 單蒸溜로 얻기 어렵지만, LaOH는 沸點(225℃)이 높아 에탄올과 沸點差가 많이 나므로 大氣壓下에서 단 한번의 單蒸溜로 97% 以上의 에탄올을 거의 모두 回收할 수 있었다.

3. TBP의 境遇와 마찬가지로, LaOH의 濃度가 높아질수록 lag phase는 延長되지만, 基質 消耗速度는 抽出劑가 없는 境遇와 比較했을때 크게 變하지 않았으며, 適應課程을 거침으로써 LaOH에 依한 lag phase 지연효과가 除去되었고, 固定化 方法 또한 lag phase를 줄이는데 效果的인 方法이었다.

4. 400 g/ℓ 葡萄糖 溶液의 回分 抽出醱酵에서 LaOH/medium의 比가 4였을때 葡萄糖은 거의 轉化가 되었으며, 全體에탄올生産性은 2.75g/ℓ·hr로 非抽出의 0.99g/ℓ·hr보다 2.78倍 增加하였다.

5. 固定化 連續 混合 醱酵槽에서 基質流量 25 mℓ/hr, LaOH流量 100 mℓ/hr일때 生産性은 5.23 g/ℓ·hr로 非抽出의 3.06 g/ℓ·hr보다 1.7倍 增加하였다.

6. film fermentor에서 基質濃度 200 g/ℓ, 基質抽出 25 mℓ/hr, LaOH 流量 100 mℓ/hr일때 生産性이 5.01 g/ℓ·hr로 連續 混合 醱酵槽에서 보다 낮은 값을 보였으나, 대체로 비슷한 樣相을 보였으며, 比에탄올生産性은 苦干 더 높은 값을 나타내었고, 連續 混合 醱酵槽 안의 bead 內 酵母보다 낮은 전단력을 받기 때문에 細胞가 덜 抽出되었다.

감 사

本 硏究를 遂行하는데 硏究費를 支援하여 주신 韓國科學財團에 深謝한 感謝를 드립니다.

사 용 기 호

S0 : glucose concentration (g/ℓ)
P : ethanol concentration (g/ℓ)
X : cell mass concentration (dry weight, g/ℓ)
Kd : equilibrium distribution coefficient (−)
Yp/s : ethanol yield constant (gp/gs)

참 고 문 헌

1. B.L. Maiorella, H.W. Blanch, and C.R. Wilke(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26,** 1003.
2. A. Ramalingam and R.K. Finn (1977). *Biotechnol. Bioeng.*, **19,** 583(1977).
3. M.C. Dale, M.R. Oko, and P.C. Wankat (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27,** 932.
4. K.H. Kyung and P. Gerhardt, *Biotechnol. bioeng.*, **26,** 252(1984).
5. L.F. Ronald (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28,** 1206.
6. M.R. Aires Barros and J.M.S. Cabral and J.M.

Novais(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29,** 1097.
7. M. Minier and G. Goma (1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24,** 1565.
8. F. Koolerup and A.J. Dauglis (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27,** 1346.
9. M. Matsumura, Herbert (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28,** 534.
10. T. Cho and M.L. Shuler(1986), *Biotechnology Progress,* **2,** 59.
11. T.F. Gregory and K.S. Kamalesh (1985), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **15,** 621.
12. J.H. Kim and K.Y. Lee (1986), *J. of the Research Institute for Catalysis,* Vol. **8.**
13. J.H. Kim and Lee (1987), *J. of the Research Institute for Catalysis,* Vol. **9.**
14. G.L. Miller (1959), *"Analytical Chemistry"*, Vol. **31,** No. 3, 426-428.
15. Y.S. Park, H.N. Chang and B.H. Kim (1988), *Biotechnol. Letters,* **10,** 261.

(Received January 11, 1989)