Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 17, No. 2, 165-169 (1989)

균체고정화 생물반응기에서 산소공급에 의한 에탄올 생산성 향상

조의철·김정회[1*]·김영준[2]

[1]한국과학기술원 생물공학과 [2]제철화학중앙연구소

Enhancement of Ethanol Productivity by Air Supplement in Immobilized Cell Reactor System

Jo, Eui C., Jung H. Kim[1*] and Young J. Kim[2]

[1]Department of Biological Science and Engineering, KAIST, POB150, Seoul, Korea
[2]Central Research Institute, Korea Steel Chemical Co. Ltd., Sungnam, Korea

To achieve higher ethanol productivity in the fermentation system, a continuous ethanol production has been investigated with the air-supplement in a packed-bed immobilized cell reactor system. Yeast cells were immobilized using sodium alginate gel.

The results showed that, when the feed medium was saturated with oxygen through aeration into the medium reservoir, the maximum ethanol productivity of the reactor was enhanced from 35 g/*l*-gel-hr to 55 g/*l*-gel-hr at the residence time of 10-20 min. and the residence time for the 90% conversion of substrate to ethanol was reduced from 40 min. to 25 min. In case of 18% glucose medium, the maximum productivity was increased from 35 g/*l*-gel-hr to 45 g/*l*-gel-hr and time required for 90% conversion was from 90 min to 70 min. This behavior of air-supplemented reactor system might be due to the fact that both growth and viable fraction of yeast within the gel were increased during reactor operation.

대체 연료의 필요성이 가일층 대두되면서 많은 생물공학자들은 생산성 향상을 위하여 고정화균체 반응기를 이용한 에탄올 발효에 많은 관심을 갖게 되었다. 많은 종류의 담체와 균주들이 물색되고 있는 가운데, 담체로는 κ-carragenan, sodium alginate, gelatin, chitosan, polyacrylamide, agar 와 photo-crosslinkable resin oligomer 들이 있고 균주로는 *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces uvarum,* 그리고 *Zymomonas mobilis* 가 연구되어 왔다.

효모가 최초로 고정화된 것은 1977 년으로 다공질의 유리알에 고정화시킨 것(1)을 계기로 하여 고농도 에탄올 생산에 관한 많은 연구결과가 보고되었다. 이 때 전자현미경으로 gel 의 내부를 관찰한 결과 gel 내부에 고정화된 세포들은 그 표면 부근에 층을 이루면서 밀집해서 자란다고 보고하였다(2, 3).

공학적인 측면에서 에탄올의 생산성을 향상시키기 위하여 여러가지 형태의 반응기의 개발과 그 성능을 조사 연구한 결과 전형적인 기계적 교반식 반응기에 비하여 충전탑 반응기(4), 수평형 충전탑 반응기(5), 다단식 충전탑 반응기(6, 7), 그리고 세포 순환식 반응기(8, 9) 등의 여러가지 새로운 형태들이 우수하다고 보고되었다.

저자 등은 효모에 의한 알콜발효시 완전히 혐기적인 조건보다는 미량의 산소를 공급하는 것이 효모생존률과 알콜 생산성을 증가시키는데 매우 효과적이라는 연구결과를 얻었다(10). 그러나, 아직 고정화 균체에 대하여 산소의 공급효과를 조사한 사례가 없기 때문에 본 논문에서는 현재까지 균체고정화에 우수하다고 알려진 sodium alginate 를 담체로 사용하여 세포를 고정화 시킨 후 충전탑 반응기에서 산소첨가가 에탄올 생성에 미치는 효과에 관하여 중점적으로 연구하였다.

Key words: Ethanol productivity, air supplement, immobilized cell reactor
* Corresponding author

재료 및 방법

사용균주

고농도 알콜을 생산하는 균주로 알려진 *Saccharomyces cerevisiae* SC 4126(아주공대 유연우 교수로부터 분양)를 사용하였다.

사용배지와 배양방법

균주보관은 증류수 1*l* 당 glucose 10g, peptone 5g, malt extract 3g, yeast extract 3g 그리고 agar 10g을 포함하는 배지를 이용하여 시험관에서 사면배양한 후 30℃에서 보관하였고 매 3주 마다 계대배양하였다.

발효용 배지는 증류수 1*l* 당 glucose 90-180g, yeast extract 7.5g, peptone 7.5g 그리고 무기물로 구성되었다(11). pH는 약염산 용액을 이용하여 4.0으로 조절하였다. 세포의 현탁배양은 진탕배양기에서 30℃로 24시간 동안 500 m*l* 삼각 플라스크를 이용하여 100 m*l*를 배양하였다. 이 때 회수된 세포를 다음의 고정화 단계에서 사용하였다.

세포의 고정화

진탕배양기에서 24시간 동안 미리 배양한 세포배양액 5 m*l*를 1-4%(w/v)의 sodium alginate 용액 50 m*l*와 잘 혼합한 후 구멍의 크기가 23 gauge인 주사기 바늘을 통하여 syringe pump를 사용하여 0.05 M의 염화칼슘 용액에 방울 상태로 떨어뜨리면서 alginate bead를 제조하였다. 이 때 형성된 bead의 직경은 대략 2-3 mm 정도였다. 세포가 포괄된 alginate bead를 발효배지 상에서 40시간 동안 배양하여 세포를 활성화시켰다.

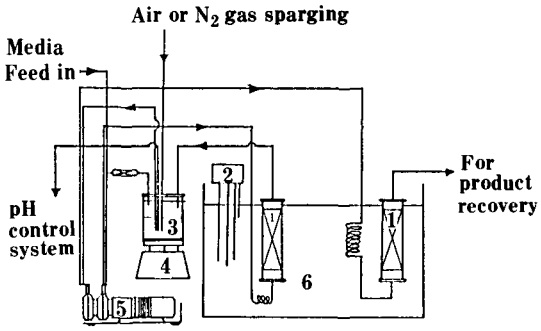

Fig. 1. Schematic diagram of the two-stage alcohol fermentation system.

1. Packed-bed reactor (Height; 17 cm, internal diameter)
2. Temperature controller
3. Trap for the gas sparging and pH control
4. Magnetic starer 5.Ultramasterflex pump
6. Water bath.

충전탑 반응기의 조업

Column(높이 17 cm, 내경 3.1 cm)에 활성화된 alginate bead 50 m*l*를 넣고 발효배지를 공급하면서 30℃에서 발효를 수행하였다.

초기배지 중에 용존되어 있는 산소를 제거하기 위하여 Fig. 1에서 medium 병에 질소가스를 보내어 용존산소를 제거하였고 또한 pH를 4.0으로 조절하였다. 통기효과를 조사하기 위하여는 질소 대신에 공기를 공급하여 배지를 용존산소로 포화시켰다. 그리고 반응기의 중간에 50 m*l* 정도의 trap bottle을 연결하였고 여기에서 다시 배양액을 공기로 포화시키고 pH를 4로 조절한 후 계속해서 다시 다음 반응기로 배양액을 공급하였다. 자세한 장치는 Fig. 1과 같다.

포도당과 에탄올의 정량

얻은 시료 중에 남아 있는 포도당의 양은 dinitrosalicylic acid method를 이용하여 측정하였다. 생산된 에탄올의 양은 chromosorb-101 column과 FID를 이용하여 gas chromatograph로 측정하였다. 이 때 각 시료를 1 m*l* 취하여 internal standard로 25 μl의 *n*-butanol을 섞어서 그 비율에 의하여 에탄올의 농도를 정하였다.

고정화 담체내 생존세포의 농도측정

Alginate를 약 0.3-0.5 m*l* 취하여 3 m*l*의 1 M-K_2HPO_4 용액으로 녹인 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 gel 부스러기를 제거하였다. 여기에 ringer 용액을 넣고 잘 혼합하여 세포 현탁액을 얻었다. 이 현탁액에 wolford 용액으로 세포를 염색하여 생존세포를 hemacytometer로 측정하였다(10).

결과 및 고찰

세포의 활성화

효모세포를 alginate에 포괄 시킬 때 아무리 높은 농도의 세포 현탁액을 사용 하더라도 고정화 과정에서 세포농도가 희석되고 또한 불활성화되는 세포가 있기 때문에 반응기 조업 전에 고정화된 세포의 활성화가 필요하다. Fig. 2는 여러가지 농도의 alginate 용액을 사용하여 세포를 활성화 시켰을 때 gel 내의 생존 효모세포의 농도변화를 보여 주고있다. Alginate의 농도에 무관하게 최종 세포수는 약 $2-3\times10^9$ cell/m-gel로 나타나고 있으나 alginate의 농도가 높을수록 세포의 증식속도는 현저하게 저해

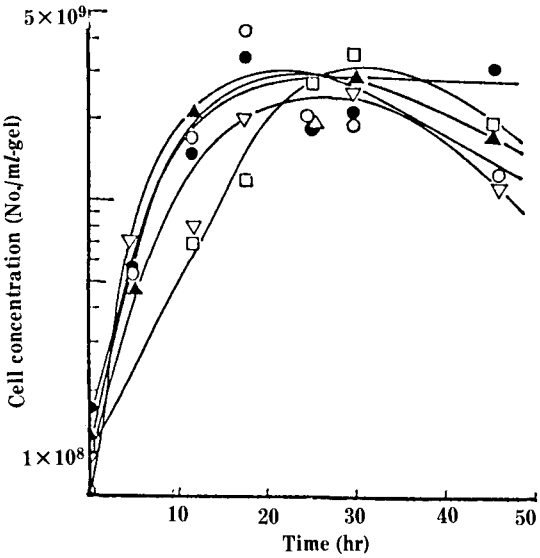

Fig. 2. Cell growth inside gel beads of different alginate concentration.
● : 1% of sodium alginate
○ : 2% of sodium alginate
▲ : 2.5% of sodium alginate
▽ : 3% of sodium alginate
□ : 4% of sodium alginate

Table 1. Effect of alginate concentration on cell viability.

Cell viability (%) / Time (hr)	Concentration of alginate				
	1%	2%	2.5%	3%	4%
0	84	79	77	89	76
5	80	78	67	80	—
11.5	77	69	81	68	82
17.5	79	74	80	82	83
24.5	77	82	78	70	71
29.5	71	71	82	80	83
45.5	74	60	73	82	76
average	77	73	77	79	79

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{No. of viable cells}}{\text{No. of viable cells + No. of dead cells}} \times 100$$

를 받고 있으며 농도가 1-2.5% 까지는 유사한 증식 속도를 보여 주고있다. 이러한 현상은 alginate의 농도가 높을수록 고분자의 gel이 형성될 때 좀 더 치밀하고 단단하게 되기 때문에(견고성 증가) gel의 구멍크기가 작아져서 물질전달 속도가 떨어지기 때문인 것으로 생각된다. 한편 gel 내에서의 세포의

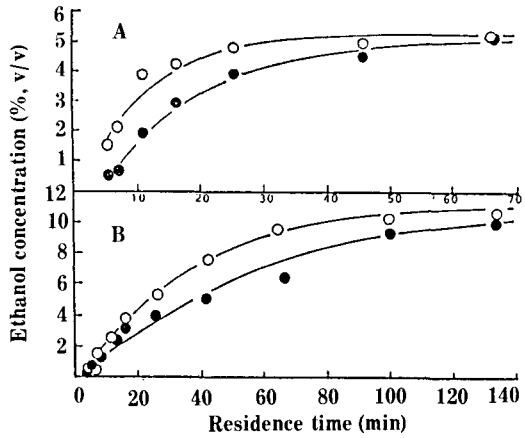

Fig. 3. Ethanol concentration in effluent.
(Aerated (○), Oxygen-free (●))
A: 9% glucose media, B: 18% glucose media

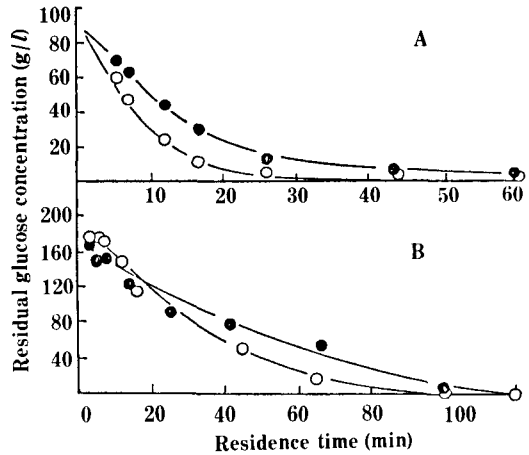

Fig. 4. Residual glucose concentration in effluent.
(Aerated (○), Oxygen-free (●))
A: 9% glucose media, B: 18% glucose media

생존율은 Table 1과 같다. 사용한 alginate의 농도에 관계없이 거의 일정하게 73-79% 수준을 보여 주고있다. 이상의 두 결과로 미루어 보아 사용하는 alginate의 농도는 형성된 bead의 기계적 강도가 강하면서 동시에 아마도 물질전달의 제한을 받지 않아 세포의 증식속도가 높은 2-2.5% 수준이 적절한 것으로 판단되었다.

반응기 성능에 미치는 기질의 체류시간의 영향

배지내 포도당 농도를 각각 9%와 18%로 하여 배지의 체류시간이 에탄올 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 배지의 체류시간은 반응기의 void volume

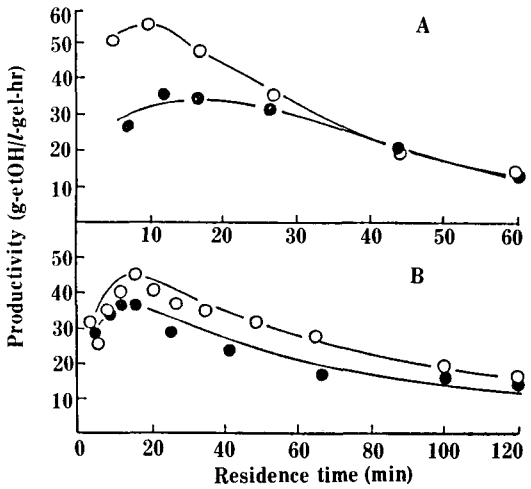

Fig. 5. Ethanol productivity of reactor.
(Aerated (○), Oxygen-free (●))
A: 9% glucose media, B: 18% glucose media

을 배지의 유량으로 나누어 계산하였다. 산소를 전혀 공급하지 않았을 경우 반응기내 배지의 체류시간에 따라서 반응기 출구에서의 에탄올 농도, 잔여 포도당의 농도, 그리고 생산성을 분석한 결과 Fig. 3, 4, 5와 같다. 9%의 포도당을 사용하였을 경우에는 90%의 전환율을 얻기 위하여 체류시간이 약 50-60분 정도 필요하나 포도당의 농도를 18%로 증가시켰을 때는 약 100분이 소요되었다. 약 120분 이후에는 포도당이 거의 대부분 소모되었다. 이 때 알콜의 농도는 약 10-11%(v/v)이었으며, 알콜의 생산성은 20-25g/*l*-gel-hr이었다. 물론 최대 생산성은 체류시간 15-20분 정도에서 약 35g/*l*-gel-hr를 얻을 수 있었으나 이 때의 전환율은 50-60%에 머물었다.

반응기의 성능에 미치는 산소공급의 효과

앞 절에서의 실험과 같은 방법으로 실험을 수행하면서 단지 초기배지 중의 용존산소 농도를 공기로 포화시키고 또한 Fig. 1의 장치에서 첫번째 반응기에서 나온 배양액을 (3)번의 trap에서 다시 공기로 포화시키고 pH를 4로 조절하면서 두번째 반응기의 출구에서 나온 배양액을 취하여 실험결과를 분석하였다. 그 결과는 Fig. 3, 4 그리고 5에서 볼 수 있듯이 공기를 공급하는 경우 알콜 발효속도가 현저히 촉진됨을 알 수 있다. 예를 들어 18%의 포도당을 사용하였을 때 90% 전환율에 도달하는데 필요한 체류시간은 약 90분에서 70분으로 단축되었다. 그리고 알콜 최대 생산성도 35g/*l*-gel-hr에서 45g/*l*-gel-hr로 약 30% 증가하였다. 그리고 9%의 포도당 배지에서는 약 40분에서 25분으로 단축되었고 최대 생산성은 35g/*l*-gel-hr에서 55g/*l*-gel-hr로 증가되었다. 이는 공기를 공급하여 줌으로 인하여 gel 내부의 세포의 생존율 및 대사능력이 활성화되었기 때문으로 생각된다(10).

Table 2. Comparison of ethanol productivity at different level of conversion.

Ethanol productivity (g/l-gel-hr) / Conversion(%)	9% Glucose		18% Glucose	
	No Aeration	Aeration	No Aeration	Aeration
60	34	55	25	37
65	33	54	23	35
70	33	53	22	34
75	32	52	20	33
80	31	50	19	30
85	30	47	17	29
90	25	35	15	26

이상의 결과에서 공기를 공급하였을 때와 혐기적으로 조업하였을 때, 전환율에 따른 알콜의 생산성을 비교하면 Table 2와 같다. 전반적으로 혐기적인 상태에서 반응기를 조업하는 것 보다 배지를 공기로 포화시켜 조업하는 것이 같은 전환율에서 약 40-50% 정도의 알콜 생산성의 향상을 가져왔다. 그리고 배지 중의 포도당의 농도를 9%에서 18%로 증가시키면 생산성이 떨어지는 경향을 보여주고 있는데 이는 고농도의 당에 의한 발효속도의 저해 때문인 것으로 생각된다(12).

요 약

고생산성의 알콜 발효용 생물반응기를 개발하기 위하여 sodium alginate로 효모균체를 고정화시킨 후 충전탑 반응기를 제조하였다. 이 때 gel 속에 고정화되어 있는 세포에 산소를 공급하기 위하여 배지를 공기로 포화시킨 후 공급하였다. 그 결과 9% 포도당을 함유한 배지를 사용하였을 경우 최대 알콜 생산성은 35g/*l*-gel-hr에서 55g/*l*-gel-hr로 증가되었고 90%의 전환율을 얻는데 걸리는 시간도 40분에서 25분으로 감소되었다. 즉 고정화세포 충전탑 반응기에서도 배지에 어느 정도의 산소를 공급하면 세포활성의 증가로 발효속도가 현저히 촉진됨을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Navarro, J.M. and G. Durand: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 243 (1977).
2. Wada, M., J. Kato and I. Chibata: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 241 (1979).
3. Siess, M. H. and C. Divies: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 10 (1981).
4. Sitton, O.C., G.C. Magruder, N.L. Book and J.L. Gaddy: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **10**, 213 (1980).
5. Shiotani, T. and T. Yamane: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 96 (1981).
6. Ryu, Y.W., J.M. Navarro and G. Durand: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, 1 (1982).
7. Klein, J. and B. Kressdorf: *Biotechnol. Letters*, **5**(8), 497 (1983).
8. Lee, C.W.: Ph.D Dissertation, KAIST (1987).
9. Limtong, S., M. Nakata and H. Taguchi: *J. Ferment. Technol*, **62**, 55 (1984).
10. Ryu, D.Y., Y.J. Kim and J.H. Kim: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 12 (1984).
11. Lee, T.H., J.C. Ahn and D.Y. Ryu: *Enzyme Microbiol. Technol.*, **5**, 41 (1983).
12. Ghose, T.K. and R.D. Tyagi: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1401 (1979).

(Received March 6, 1989)