Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 19, No. 4, 419-427 (1991)

Membrane Cell Recycle Fermentor에 의한 에탄올 연속 발효

김태석 · 이석훈 · 손석민 · 권윤중[1] · 변유량*
연세대학교 식품공학과, [1]경기대학교 식품가공학과

Continuous Ethanol Fermentation Using Membrane Cell Recycle Fermentor

Kim, Tae-Seok, Seok-Hoon Lee, Suck-Min Son, Yun-Joong Kwon[1] and Yu-Ryang Pyun*
**Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea*
[1]Department of Food Science and Technology, Kyonggi University, Suwon 440-760, Korea

Abstract — Ethanol fermentation of glucose by a strain of *Saccharomyces cerevisiae* was studied in membrane recycle bioreactor, where the fermentation vessel was coupled with cross flow hollow fiber membrane. The cell recycle system controlled backflushing with fresh medium was proven to be effective in alleviating membrane fouling and allowing long term operation of high-cell continuous fermentation. Using 100 g/*l* initial glucose concentration, the maximum productivity of about 95 g/*l*·h has been achieved at dilution rate 2.5 h^{-1} and bleed stream ratio 0.05 with the corresponding ethanol concentration of 35 g/*l* and glucose conversion of 100%. Increasing the glucose concentration to 200 g/*l* resulted in an increase in ethanol concentration to 48 g/*l* and productivity to 120 g/*l*·h. Substrate conversion, however, was only 69%. This productivity was the highest value in the study, and about 38 fold more than that of batch culture and 17 fold more that of single stage continuous culture without cell recycling. No further increase in the productivity was obtained when the glucose concentration was increased to 300 g/*l*.

재래식 회분 발효에서 효모를 이용한 표준적인 에탄올 생산성은 1~2.5 g/*l*·h이며 연속배양에서의 생산성은 약 7.0 g/*l*·h이다(1). 연속배양에서의 에탄올 생산성은 비생산성(specific productivity, g ethanol/g cell·h)과 균체농도에 좌우되므로 고농도 균체 배양과 에탄올 저해를 가능한 최소화하여 비생산성을 향상시키고자 하는 많은 연구가 진행되고있다.

고농도 배양법으로는 균체를 고정화 시키거나 배출액중의 균체를 분리하여 그 일부 또는 전부를 재순환시키는 방법이 연구되고 있다. 이중에서 특히 최근 개발되고 있는 막 균체 순환 발효조(membrane cell recycle fermentor, MRF)는 연속적으로 균체를 배양액으로부터 분리하여 재순환 시킬 수 있으며 다른 재순환 방법에 비해 조작이 간편한 이점이 있어 유용한 고농도 균체 배양법의 하나로 전망되고 있다(2).

회분 및 연속배양에서 균체농도는 약 10 g/*l*, 균체 침강 순환 시스템에서는 약 50 g/*l*를 유지할 수 있으나(1), 막 균체 순환 시스템에 의하면 균체농도 100 g/*l* 이상에서 안정적으로 조업할 수 있으며 에탄올 생산성은 현저히 향상되어 85~120 g/*l*·h를 얻을 수 있는 것으로 보고되고 있다(3-5). 그러나 막 균체 순환 발효조에서 문제되는 것은 살균 가능하고 여과 능력이 우수한 membrane의 선택과 개발, membrane이 막히는 것을 방지하면서 장기간 조업할 수 있는 적절한 방법 등이며 많은 개발 가능성이 남아있다.

증식 균체(growing cell)를 이용한 균체 순환 발효에서는 계속적으로 일정량의 균체를 배출시키지 않으면 발효조내의 균체가 계속 증가하여 조업할 수

Key words: Ethanol fermentation, membrane recycle fermentator
*Corresponding author

없는 상태가 된다. 현재까지의 membrane filter를 이용한 균체 순환 발효연구에서는 균체농도를 목적하는 일정한 농도로 유지하기 위하여 증식 균체를 간헐적으로 배출시키거나 bleeding 양을 조절하였으며 또는 기질이 거의 소비되는 조건을 유지한 상태에서 발효조의 성능을 연구하였다(3-5). 본 연구에서는 균체 순환 발효조에서 가장 중요한 operating parameter인 bleed stream ratio의 영향에 대해서 상세히 연구하기 위하여 여러 단계로 bleed stream ratio를 고정시킨 조건에서 희석율을 변화시키면서 기질전환율, 균체농도, 에탄올 생산성 등을 연구하였다.

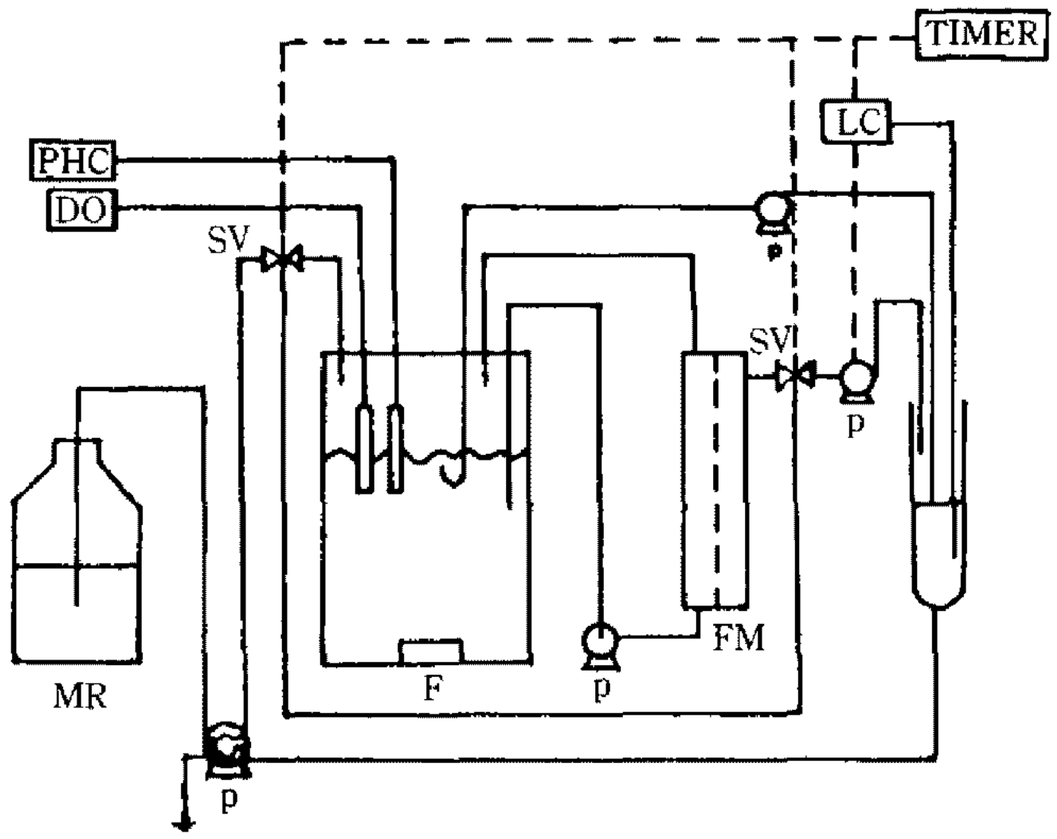

Fig. 1. Schematic diagram of cell recycle fermentor.
PHC: pH controller
LC: level controller
DO: dessolved oxygen meter
MR: medium reservoir
FM:filter module
F: fermentor
P: pump
SV: solenoid valve

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서는 ATCC, 주정회사, 한국미생물 보존센터에서 분양받은 총 9주의 알콜 생산성 효모 중에서 예비 실험을 통하여 가장 우수한 *Saccharomyces*속 효모를 선발하여 사용하였다.

배지 조성

본 실험에 사용된 배지의 조성은 증류수 1*l*당 효모 추출물 8 g/*l*, NH_4Cl 8 g/*l*, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 3.9 g/*l*, KH_2PO_4 0.5 g/*l*, $MgSO_4$ 0.5 g/*l*, $CaCl_2$ 0.28 g/*l*, citric acid 4.3 g/*l*, sodium citrate 1.25 g/*l*, antifoam 0.1 ml이며 글루코오스 농도를 실험 조건에 따라 변화시키면서 사용하였다. 배지의 살균 중 갈색화 반응과 침전 반응을 방지하기 위하여 글루코오스와 $CaCl_2$는 그 외의 성분들과 분리하여 121℃에서 15분간 살균한 후 상온으로 냉각시킨 다음 혼합하여 사용하였다.

막 균체 순환 발효시스템

Membrane cartridge(Amicon, H1, H5 module)를 1*l* 발효조에 연결시킨 막 순환 발효시스템의 구성은 Fig. 1과 같다. Pump P2에 의해 배양액은 hollow fiber의 tube side를 통하여 다시 발효조로 재순환하게 된다.

Backflushing을 위해서는 신선 배지를 주기적으로 membrane module의 shell side에 공급하도록 고안하였다. 즉, 자동시간 조절 장치를 이용하여 일정한 시간 간격으로 회로에 연결된 three-way solenoid valve와 액위 조절 장치의 전원을 단락시킴으로써 발효조에 공급되는 신선 배지를 주기적으로 membrane module의 shell side에 공급하여 tube side에 흐르는 배양액에 공급함으로써 막 위에 퇴적된 균체를 tube side 안으로 밀쳐냄으로써 backflushing 효과를 얻도록하는 것이다.

발효조내의 균체량을 일정하게 유지하기 위하여 배양액의 일부를 pump P4에 의하여 연속적으로 제거하였다. 이 bleed는 여과액과 액위 조절 chamber에서 합쳐져서 배출되게 함으로써 발효조로부터 배출되는 액량과 공급되는 신선 배지량이 일치되도록 하였다.

Membrane module은 0.2 N-NaOH, 2% formaline 용액에 침지시켜 화학 살균한 다음 무균적으로 완전히 결합하여 사용하기 전 20*l*의 살균 증류수로 세척하였다.

배양 온도는 30℃, 교반 속도 300 rpm, pH는 2N-NaOH로 4.5로 자동 조절하였으며, 0.03 vvm의 공기를 공급하였다. Working volume은 발효조내의 액량과 membrane filter 및 연결 튜브내를 흐르는 액량과 합하여 500 m*l*가 되도록 하였다.

분석방법

배양액 1.4 m*l*를 15,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 침전된 균체를 2회 증류수로 세척한 후 spectrophotometer(Shimazu Co.)로 525 nm에서 흡광도를 측정하여 미리 작성한 검량 곡선으로부터 건조 균체량을 구하였다.

글루코오스 농도는 glucose analyzer(Yellow Spring Instrument Model 27)와 Miller(6)에 의한 dinitrosalicylic acid reagent method(DNS법)로 정량하였다. 에탄올은 gas chromatography(Varian 1440)로 분석하였으며, 이때 내부 표준물질은 butanol을 사용하였다.

결과 및 고찰

단조 연속배양

실험 균주를 발효조에서 16시간 회분 배양한 다음 연속배양으로 전환하였다. 균체농도가 일정하게 유지되는 정상 상태는 발효조 부피의 4 내지 5배의 배지를 공급한 후 도달하였으며, 저농도의 글루코오스(20 g/*l*) 배지를 사용한 연속배양의 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 각 희석율에서 정상 상태 균체농도의 변화를 살펴보면 $D=0.054\ h^{-1}$일때 균체 농도 $X=4.3$ g/*l*에서 희석율의 증가에 따라 전반적으로 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 글루코오스의 전환율을 살펴보면 $D=0.28\ h^{-1}$ 이상부터 잔존 글루코오스가 검출되기 시작하였으며 $D=0.47\ h^{-1}$일 때 잔존 글루코오스는 0.42 g/*l*를 나타내었다. 에탄올 농도는 $D=0.24\ h^{-1}$까지는 9.47 g/*l*, 에탄올 생산 수율 Yp/s=0.474로 거의 일정하게 유지되었으나 그 이상의 희석율에서는 서서히 감소하기 시작하였다. 한편 에탄올 생산성(PD)은 희석율의 증가에 따라 거의 일직선으로 증가하여 $D=0.4h^{-1}$일 때 최대 생산성 3.64 g/*l*·h를 나타내었다. 이때 에탄올 비생산 속도와 비글루코오스 소비속도는 각각 $q_p=1.213\ h^{-1}$, $q_s=2.66\ h^{-1}$를 나타내었다.

한편, 고농도 글루코오스(100 g/*l*) 배지로 연속배양한 결과는 Fig. 3과 같다. 희석율 $0.072\ h^{-1}$일 때 기질은 완전히 소비되었고 이때 균체농도는 18 g/*l*, 에탄올 농도는 45 g/*l*였다. 그러나 희석율이 점차 증가함에 따라 정상상태에서 균체농도와 에탄올 농도가 현저히 감소하였다.기질은 희석율 $0.072\ h^{-1}$에서 완전히 소비되었으나 희석율이 점차 증가하면서 잔존율이 현격히 증가되어 희석율 $0.39\ h^{-1}$에서 69 g/*l*의 당이 잔류하였으며 전환율은 32%에 지나지 않았다. 에탄올 생산성은 희석율 $0.24\ h^{-1}$에서 최대 생산성인 7.2 g/*l*·h를 나타내었으며 이때 균체농도는 9.3 g/*l*, 잔당은 32 g/*l*, 균체 수율 $Y_{X/S}=0.15$, 에탄올 수율 $Y_{P/S}=0.48$, 글루코오스 전환율은 62%, 비에탄올 생산속도와 비글루코오스 소비속도는 각각 $0.77\ h^{-1}$과 $1.6\ h^{-1}$이었다.

고농도의 글루코오스 배지가 저농도의 글루코오스 배지에 비해 균체와 에탄올이 희석율의 증가에 따라 급격히 감소하는 이유는 생성된 에탄올이 균체의 생육을 저해하기 때문인 것으로 생각된다.(7)

저농도에서의 연속배양 결과로부터 구한 최대 비증식 속도 $\mu_{max}=0.5\ h^{-1}$, $k_s=15$ mg/*l*였으며, Esener

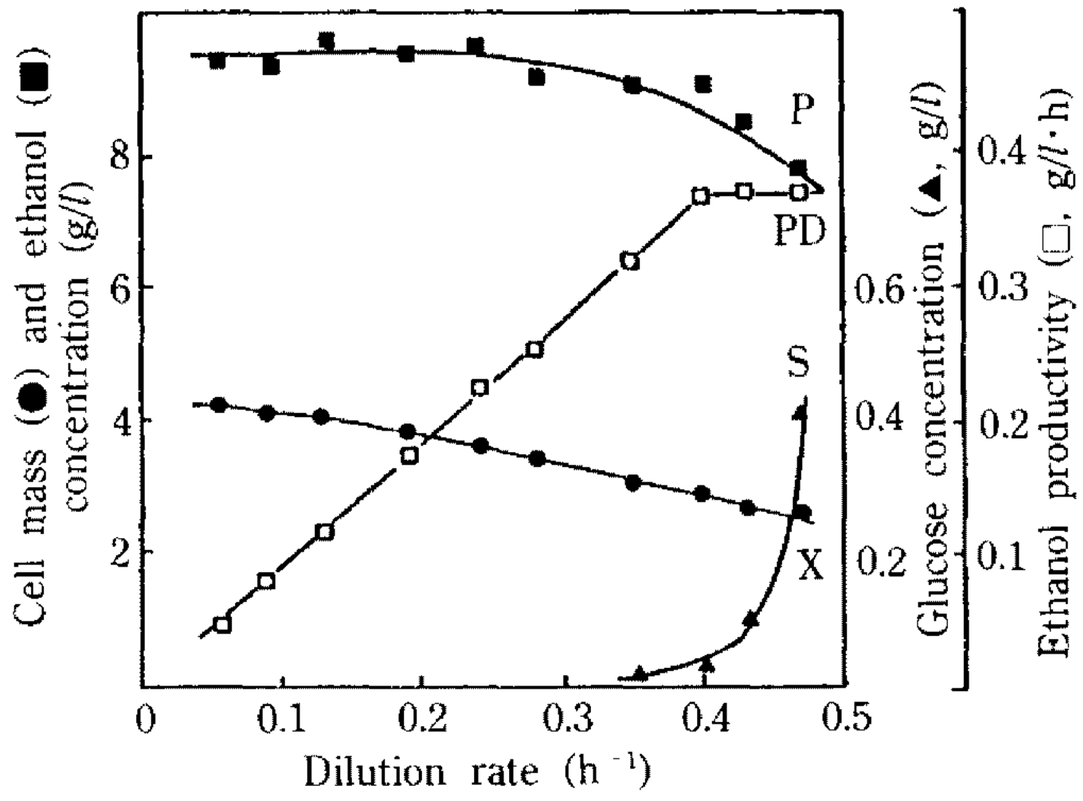

Fig. 2. Fermentation kinetics of CSTR using inlet glucose concentration of 20 g/*l*.

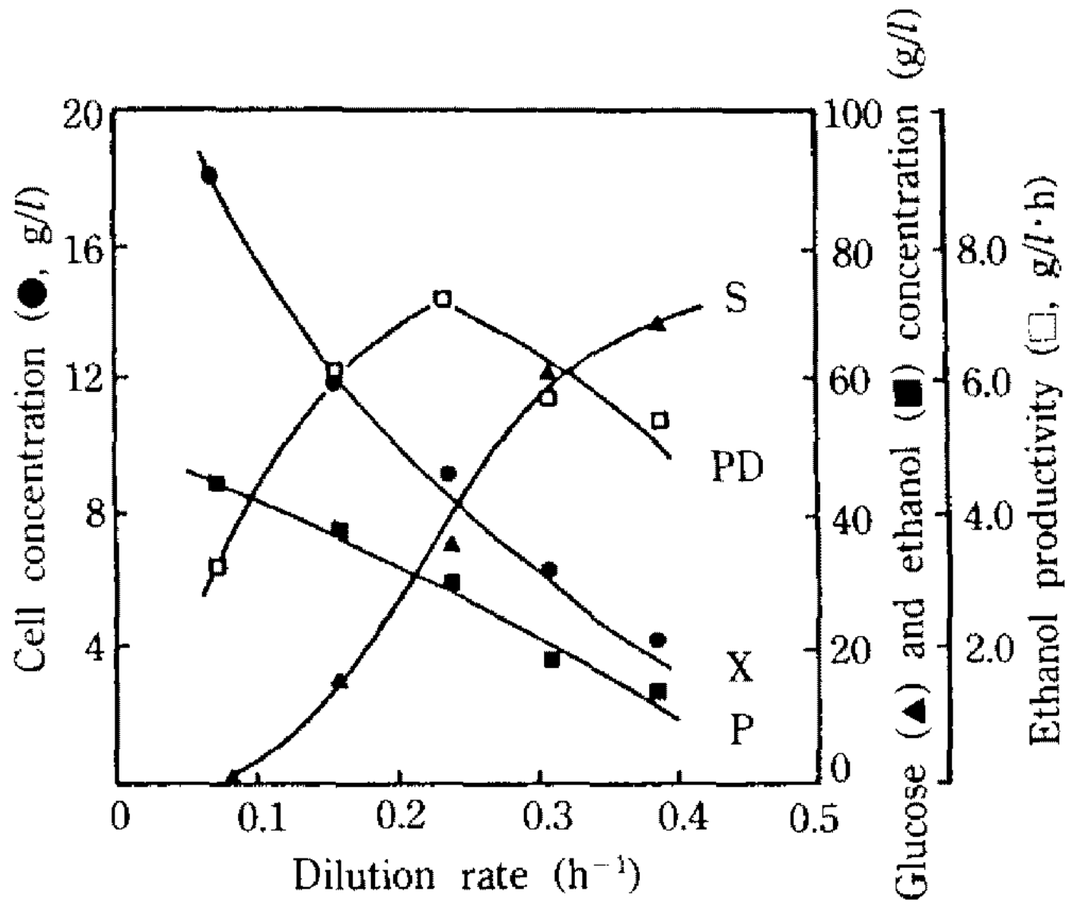

Fig. 3. Fermentation kinetics of CSTR using inlet glucose concentration of 100 g/*l*.

와 Roels 등(37)이 제시한 washout 방법으로 구한 $\mu_{max}=0.54\ h^{-1}$로서 유사한 값을 얻었다.

총 균체 재순환 발효

글루코오스 100 g/*l*의 배지를 연속 공급하면서 bleed없이 균체를 전부재순환시키는 비정상 상태 발효. 결과 21시간 이후 균체농도가 25 g/*l*에 도달했을 때 배양액 중의 기질이 완전히 소모되었으며 에탄올 농도는 46 g/*l*로 이 이후에는 균체농도의 증가에 관계없이 일정하게 유지되었고 에탄올 생산성은 23 g/*l*·h였다. 균체농도는 발효시간에 따라 직선적으로 증가하여 최대 160 g/*l*까지 증가시킬 수 있었으며, 그 이상의 농도에서는 배양액의 점도가 증가하고 CO_2 발생량이 많아지면서 tube side의 배양액중의 CO_2가 shell side의 공간을 차지하고 또한 압력을 높임으로써 신선 배지의 투과를 방해하는 현상이 관찰되어 정상적인 작업이 어려웠다. Lee 와 Chang(5)은 총 균체 순환 배양에서 최대균체 210 g/*l*까지 얻었으며 그 이상의 농도에서는 조업이 곤란한 것으로 보고하였다. Maiorella 등(8)과 Janusz(9)는 균체농도가 100 g/*l* 이상이 되면 비뉴톤성 유체의 성격을 띠게 되어 혼합과 수송이 비경제적인 것으로 보고하였다.

막순환 발효에서 bleed stream ratio(B/F)의 영향

증식 세포에 의한 균체 재순환 배양의 경우 발효조내의 균체농도를 일정하게 유지시키기 위해서 배양액의 일부를 배출시켜야 하며 이 bleed stream의 양이 생산성에 중요한 영향을 미치므로 각 희석율에서 bleed stream ratio(bleed stream rate/feed rate, B/F)가 에탄올의 생산성에 미치는 영향을 검토하였다.

Membrane module은 50~60분 간격으로 3~5분간 신선 배지를 backflushing하였으며 각 희석율에서 완전한 정상상태를 얻기 어려우나 몇 시간 동안 균체의 농도가 일정하게 유지되면 정상상태에 도달한 것으로 생각하였다.

희석율 0.5, 1.0, 및 1.25 h^{-1}에서 bleed stream ratio가 에탄올 발효에 미치는 영향을 Fig. 4에 나타내었다. 희석율 0.5 h^{-1}로 낮을 때는 bleed stream ratio에 관계없이 발효액 중의 글루코오스는 완전히 소비되었으며 에탄올 농도는 40 g/*l*를 유지하였다. 이와 같은 현상은 희석율이 낮기 때문에 발효조에 공급되는 글루코오스에 비하여 균체가 과량이기 때문인 것으로

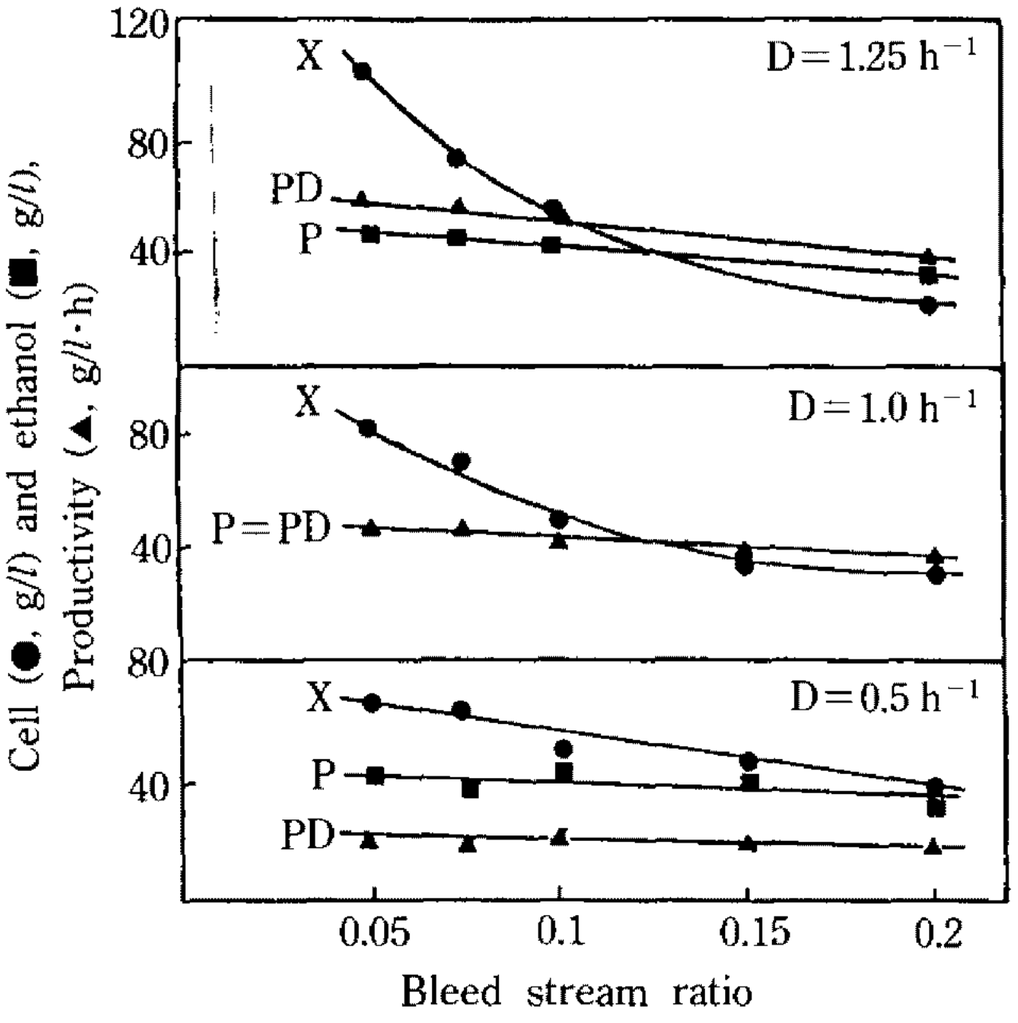

Fig. 4. Effect of bleed stream ratio on ethanol fermentation in MRF at various dilution rate (S_0=100 g/*l*).

생각된다.

희석율 1.0 및 1.25 h^{-1}인 경우에는 bleed stream ratio 각각 0.1 및 0.075이하에서 기질이 완전히 소비되었으나 그 이상에서는 글루코오스가 잔존하였으며 bleed stream ratio가 증가할수록 균체량도 현저히 감소하였다. 낮은 bleed stream ratio에서는 균체농도는 급격히 증가하나 발효액 중의 에탄올 농도는 43 g/*l*에서 45 g/*l*로 2 g/*l*밖에 증가되지 않았다.

이와같은 결과로 미루어 볼 때 기질이 완전히 소비되는 조건에서 과량의 균체는 배양액 중의 에탄올 농도에 영향을 미치지 않으며 오히려 membrane에 여과 부담을 주게 되므로 적절한 균체농도를 유지할 필요가 있었다.

Lee 등(10)이 컴퓨터 simulation을 통하여 밝힌 바와 같이 발효조의 조업상 허용되는 균체농도에 이를 때까지 bleed stream ratio를 감소시킬수록 생산성은 향상될 수 있을 것이다. 그러나 bleed stream ratio가 감소할수록 생산성은 향상되지만 결과적으로 발효조내의 균체농도가 증가하게 되면 고농도의 균체를 여과하기 위하여 membrane module에 과중한 부담을 주게 되어 조업에 문제점이 발생하게 되며, 또한 고농도 균체에서는 생육속도와 에탄올 생산성이 감소되는 것으로 보고되고 있다.

본 실험 결과에 의하면 희석율 1.25 h^{-1}, bleed stream ratio 0.02에서 균체농도가 123.3 g/*l*으로써

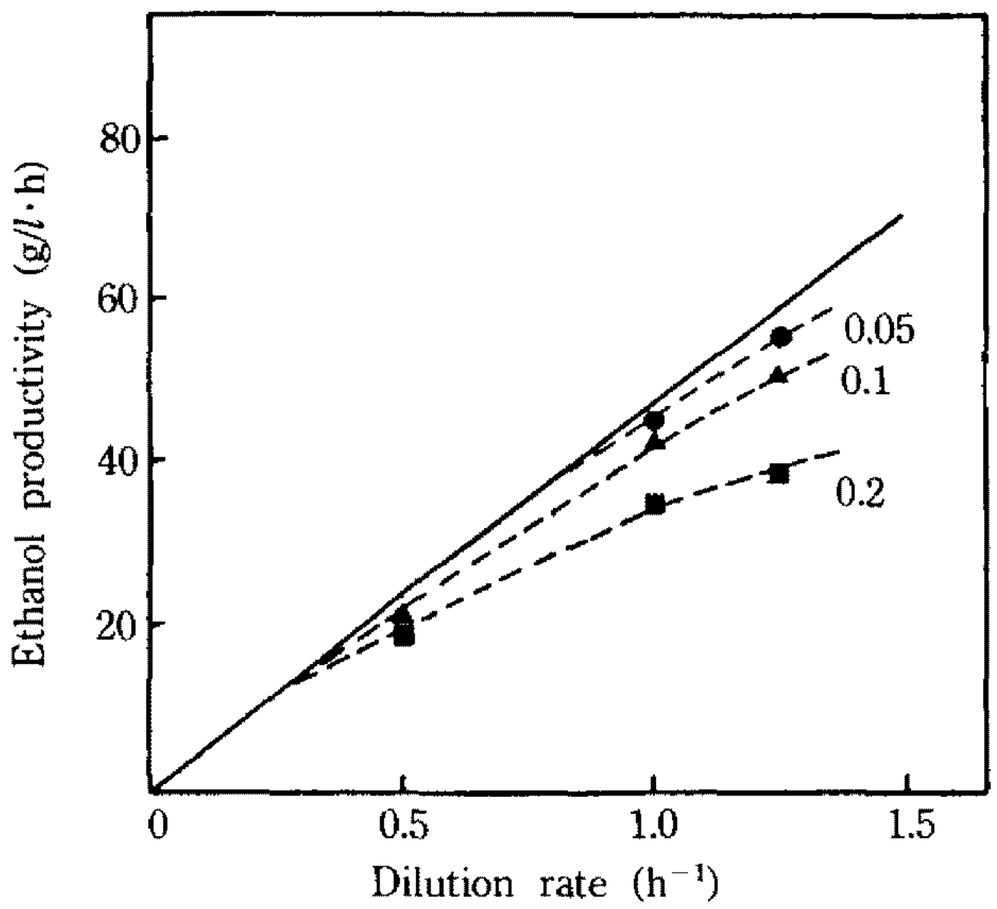

Fig. 5. Effect of dilution rate and bleed stream ratio on ethanol productivity in MRF.
A solid line indicates the maximum value of ethanol productivity.

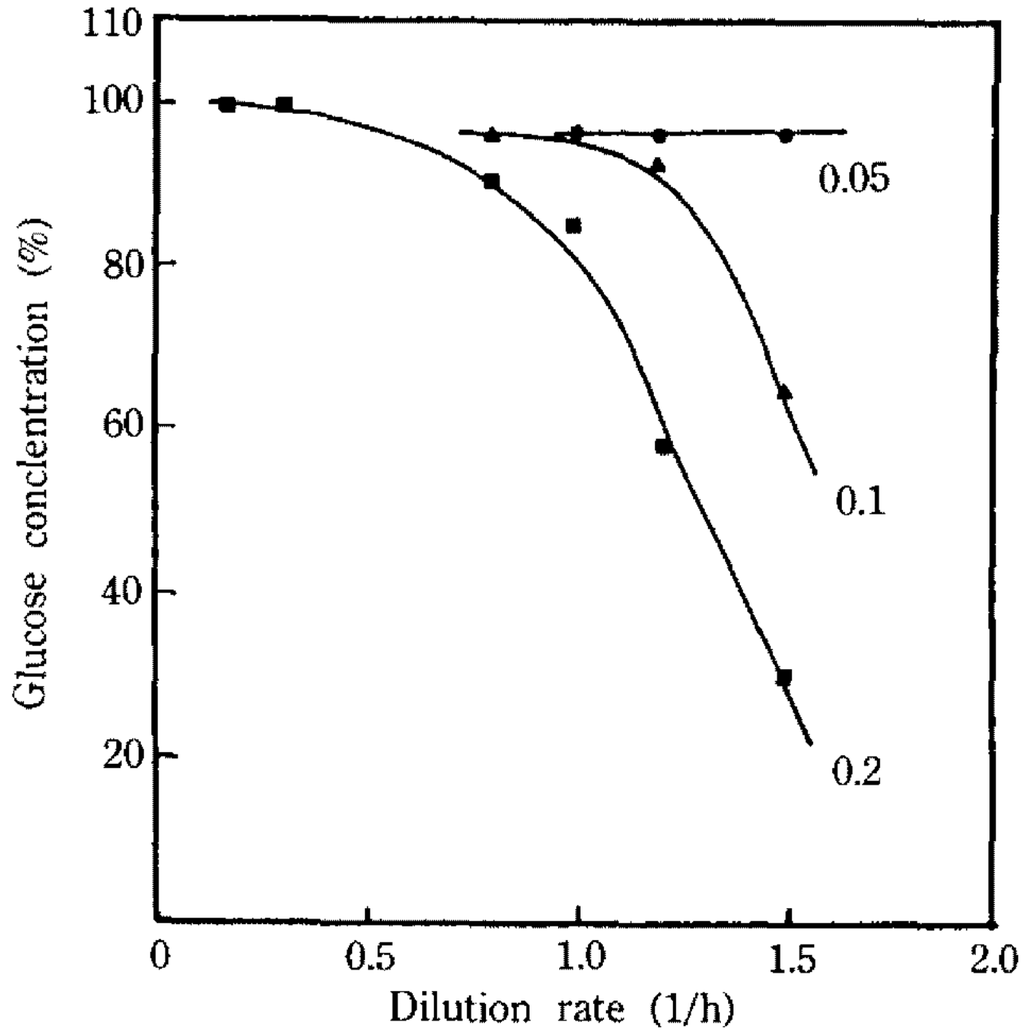

Fig. 6. Effect of dilution rate and bleed stream ratio on glucose conversion in cell recycle bioreactor.

bleed stream ratio 0.05일 경우의 균체 농도 105.8 g/*l*보다 오히려 에탄올 생산성이 감소하는 경향을 보여 균체 재순환 발효에 적합한 균체농도는 100 g/*l*로 생각되었다. 이러한 현상은 과다한 균체농도가 발효액 중의 에탄올의 일부를 자화하며 또한 균체의 생체 활성이 감소되기 때문으로 생각되었으며 Lee 등(10)이 제시한 bleed stream ratio 감소에 따른 세포 성장 저해 모델과 일치하는 경향을 보였다.

연속배양에서 얻어진 에탄올 수율은 0.47로써 이론 수율인 0.51보다는 다소 낮으며 이는 글루코오스의 일부가 균체 생육과 2차 산물의 생성에 소비되기 때문이다. 따라서 실제 발효에서 얻을 수 있는 에탄올의 최대 생산성 $PD=Y_{p/s}(S_0-S)D=0.47(100)D=47D$같이 계산될 수 있다.

배지 중 글루코오스의 농도는 100 g/*l*이며 배양액 중의 기질은 완전히 소비된다는 가정하에서 각 희석율에서 얻을 수 있는 최대 생산성과 bleed stream ratio를 달리했을 때 각 희석율에서 실제 생산성을 비교하여 Fig. 5에 나타내었다. Bleed stream ratio 0.05일 경우 희석율 1.0 h^{-1} 이하에서는 계산된 최대 생산성과 거의 같은 값을 얻을 수 있었으나 희석율이 1.0 h^{-1} 이상으로 증가함에 따라 최대 생산성보다 약간 적은 값을 나타내어 희석율 1.5 h^{-1}에서 63.6 g/*l*·h를 나타내었다. 또한 bleed stream ratio값이 증가함에 따라 균체는 소비되는 기질량이 증가함으로 얻어진 에탄올 생산성과 계산된 최대 생산성과의 차이가 점차 커지는 경향을 보였다.

경제적인 측면을 고려할 때 가능한 한 기질의 전환율을 높이는 것이 필요하다. 희석율과 bleed stream ratio가 글루코오스 전환율에 미치는 영향을 Fig. 6에 나타내었다. Bleed stream ratio가 0.05일 경우에는 실험 범위내의 희석율에 관계없이 글루코오스는 완전히 소비되었으나 bleed stream ratio 0.1 이상에서는 희석율이 약 1.0 이상으로 증가함에 따라 급격히 전환율이 감소되어 희석율 1.25 h^{-1}에서 bleed stream ratio가 0.2인 경우 글루코오스 전환율은 60% 정도에 지나지 않았다. 이러한 현상은 bleed stream ratio가 증가함에 따라 균체농도가 급격히 감소되기 때문인 것으로 생각된다.

이와 같은 결과를 종합해 볼 때 $\mu/D=B/F$이므로 에탄올 생산성을 증가시키기 위해서는 희석율을 증가시키고 허용되는 범위에서 bleed stream ratio는 작아야 한다. 그러나 앞서 지적한 바와 같이 bleed stream ratio가 감소하면 발효조내의 균체농도와 에탄올 농도가 증가하여 세포의 생육 저해현상이 일어나기 때문에 비증식 속도가 감소하게 되고 에탄올 비생산성이 급격하게 감소하는 등 균체의 생체 활성이 억제되기 때문에 최적 bleed stream ratio의 결정은

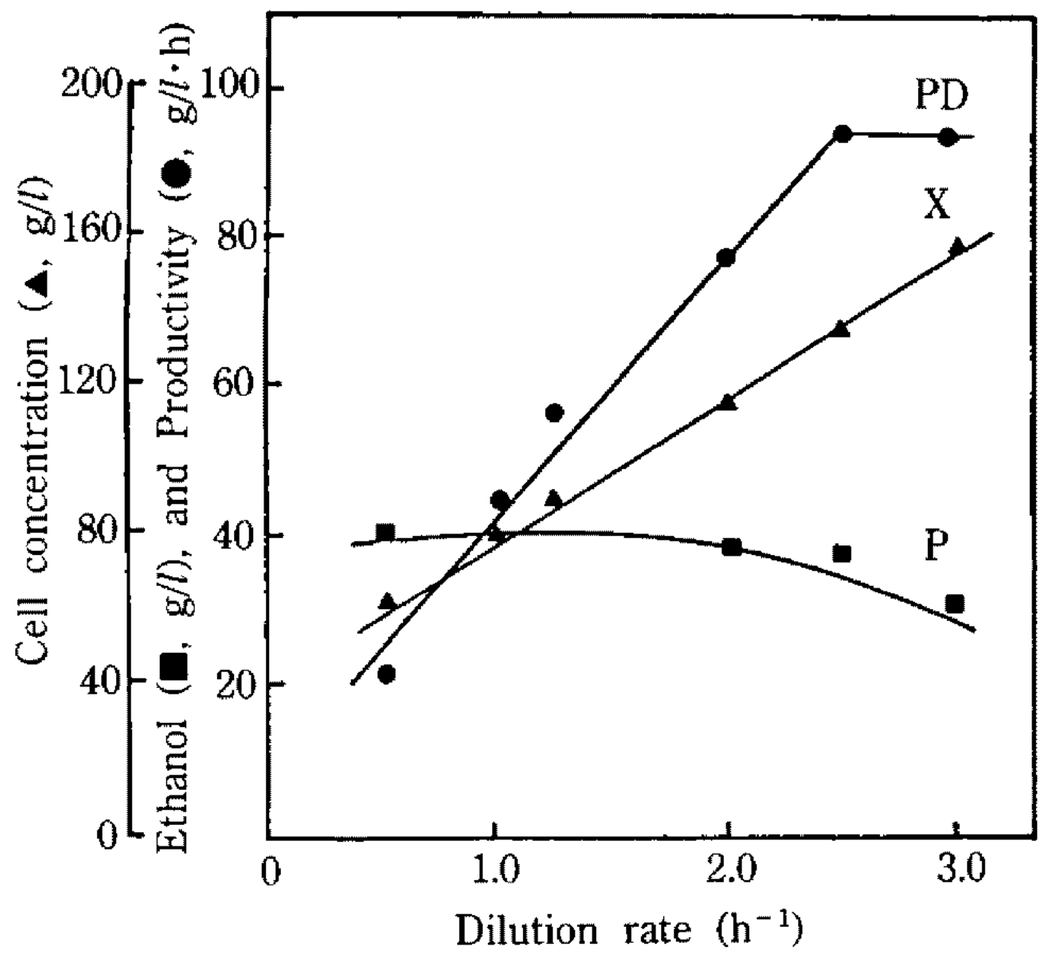

Fig. 7. Effect of dilution rate on ethanol fermentation under conditions of S_0=100 g/*l* and B/F=0.05.

매우 중요하다.

막 순환 발효에서 희석율의 영향

공급 배지 중의 글루코오스 농도 100 g/*l*, bleed stream ratio 0.05로 고정시키고 높은 희석율까지 연속 발효한 정상상태의 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 희석율의 증가에 따라 발효조내의 균체량은 거의 직선적으로 증가하여 D=3.0 h^{-1}일 때 균체농도는 159 g/*l* 까지 도달하였으며 전 희석율 범위에서 글루코오스는 완전히 소비되었다. 대당 에탄올 수율($Y_{p/s}$)은 0.41에서 0.46으로 증가하였다가 희석율이 증가함에 따라 다시 0.31까지 감소하였다. 한편 에탄올 생산성을 보면 낮은 희석율 범위에서는 희석율의 증가에 비례하여 증가하여 D=2.5 h^{-1}일 때 최대 생산성인 95 g/*l*·h를 나타내었고 D=3.0 h^{-1}에서는 이보다 약간 감소된 93.0 g/*l*·h를 나타내었다.

최대 생산성 95 g/*l*·h는 회분 배양의 평균 생산성 3.2 g/*l*·h의 약 30배, CSTR 연속배양에서의 최대 생산성 7.2 g/*l*·h의 13배에 해당하는 높은 생산성이다.

고당 농도 균체 순환발효

지금까지의 실험에서는 주어진 희석율에 대해 bleed stream ratio를 고정시켜 정상상태의 균체농도에 도달하게 하였으나, 고당 농도의 배지를 사용한 경우에는 균체농도가 지나치게 증가하는 것을 방지하기 위하여 각 희석율에서 bleed stream 양을 적절히

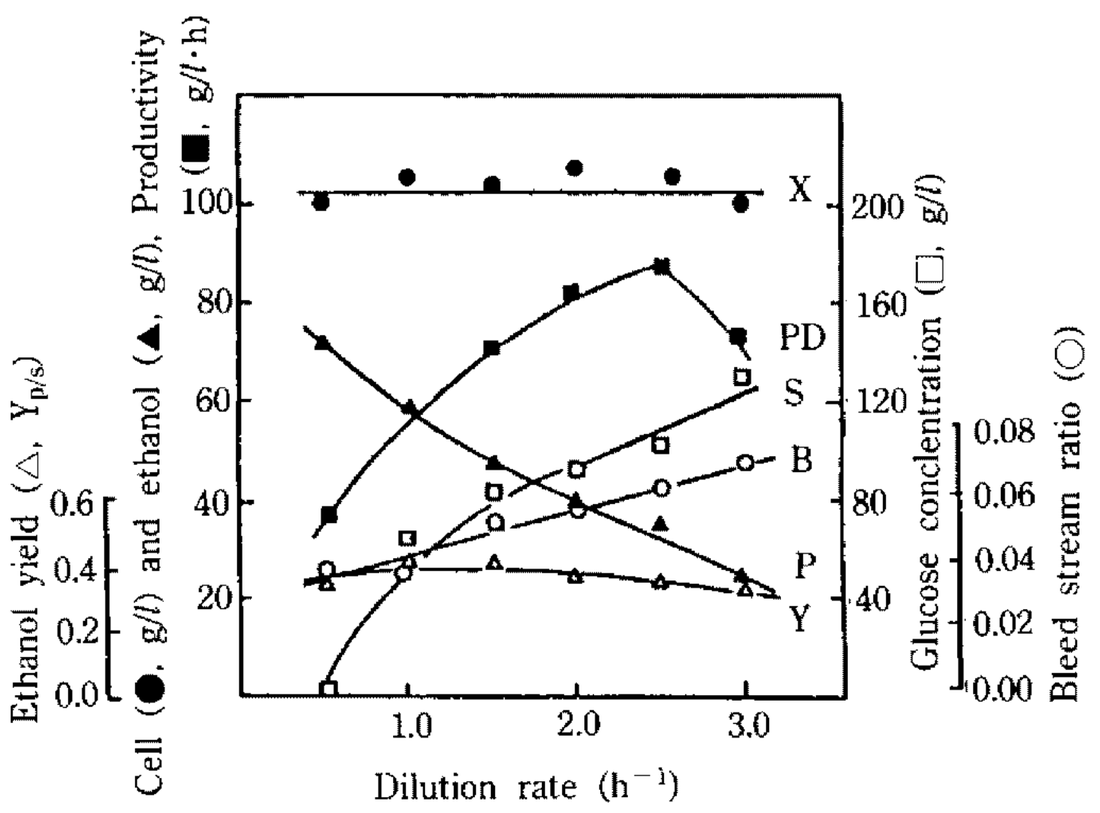

Fig. 8. Effect of dilution rate on ethanol fermentation under conditions of S_0=200 g/*l* and X=100 g/*l*.

조절하여 균체농도가 계속 100 g/*l* 수준으로 유지되도록 하면서 working volume의 4~5배 양의 배지를 공급한 이후 정상상태로 간주하였다.

글루코오스 200 g/*l*일 때 각 희석율에서의 발효 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 희석율 0.5 h^{-1}일 때 에탄올 농도는 72 g/*l*이고 기질 소비율은 100%였으나 희석율의 증가에 따라 기질 소비율은 급격히 감소하여 D=3.0 h^{-1}에서는 35.5%에 지나지 않아 배출액 중의 잔류 글루코오스 농도는 129 g/*l*에 달하였다. 또한 배양액 중의 에탄올 농도도 희석율의 증가에 따라 급격히 감소하였다. 에탄올 생산성은 희석율 D=2.5 h^{-1}에서 최대값 88 g/*l*·h를 나타내었으며 bleed stream ratio는 균체농도 100 g/*l*를 유지하기 위하여 희석율이 증가함에 따라 조금씩 증가하였다.

Cheryan 등(11)은 균체농도가 일정할 경우 각 희석율에서 최대 에탄올 생산성은 기질 전환율이 50~80% 정도일 때 얻어지며 기질 전환율이 최대인 희석율에서는 에탄올 생산성이 낮은 것으로 보고하였다. 한편 글루코오스 농도 300 g/*l*일 때의 발효 결과는 Fig. 9와 같다. D=0.5 h^{-1}일 때 에탄올 농도는 77 g/*l*에 달하였다. 그러나 이때는 bleeding을 하지 않아도 균체농도가 약 80 g/*l*로 유지되어 에탄올 농도 77 g/*l*에서 균체 생육이 현저히 저해됨을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 D=1.0 h^{-1}의 발효 결과와 비교해 볼 때 잔당 함량은 152 g/*l*로 현저히 증가되었으나 에탄올 농도가 62 g/*l*로 감소되므로서 100 g/*l*의 균체를 유지하기 위하여 bleed stream ratio를 0.05 범위로 조절하여 연속적으로 균체를 제거해 주어야 한다는

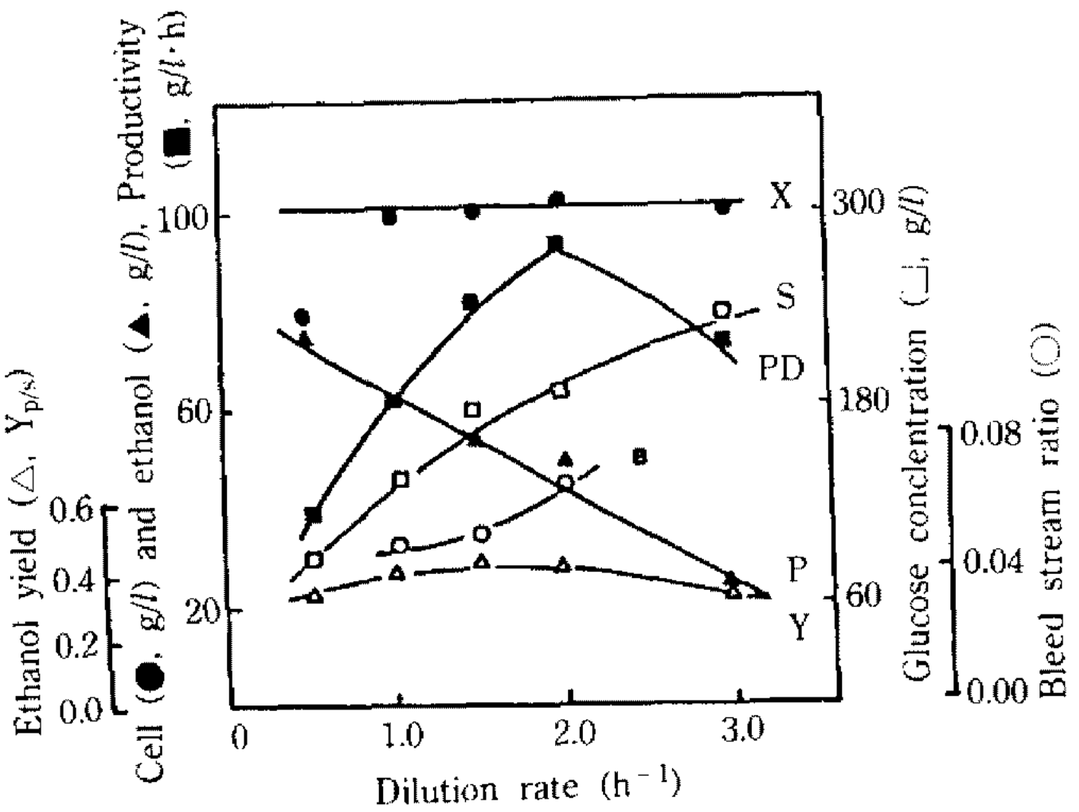

Fig. 9. Effect of dilution rate on ethanol fermentation under conditions of $S_0=300$ g/l and X = 100 g/l.

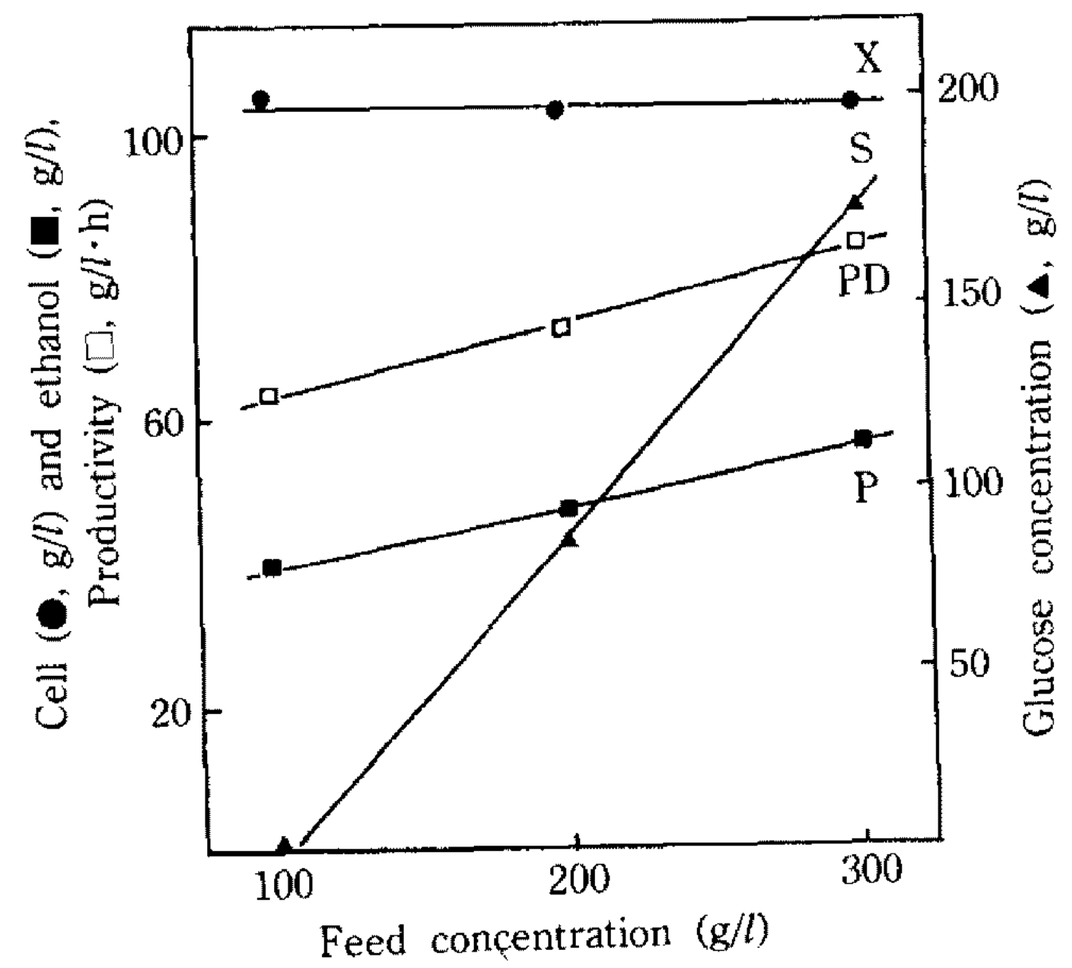

Fig. 10. Effect of dilution rate on ethanol fermentation under conditions of X = 100 g/l and $D=1.5\ h^{-1}$.

사실로 미루어 보아 더욱 명백히 알 수 있다. 에탄올 생산성을 살펴보면 희석율의 증가에 따라 직선적으로 증가하다가 $D=2.0\ h^{-1}$에서 최대값 96 g/l·h를 나타내었으며 배양액 중 에탄올 농도는 48 g/l였다. 그러나 글루코오스 소비율은 36.7%에 지나지 않았다.

한편 공급되는 기질농도의 변화에 따른 발효 양상을 Fig. 10에 나타내었다. 이때 발효조 중의 균체농도는 100 g/l, 희석율은 $1.5\ h^{-1}$로 고정하였다. 공급 배지 중의 글루코오스 농도가 증가할수록 잔류 글로코오스 농도는 0에서 177 g/l까지 거의 직선적으로 증가하여 과량의 글루코오스는 그대로 배출되었다. 에탄올 생산성은 60에서 83 g/l·h까지 직선적으로 증가하였으며

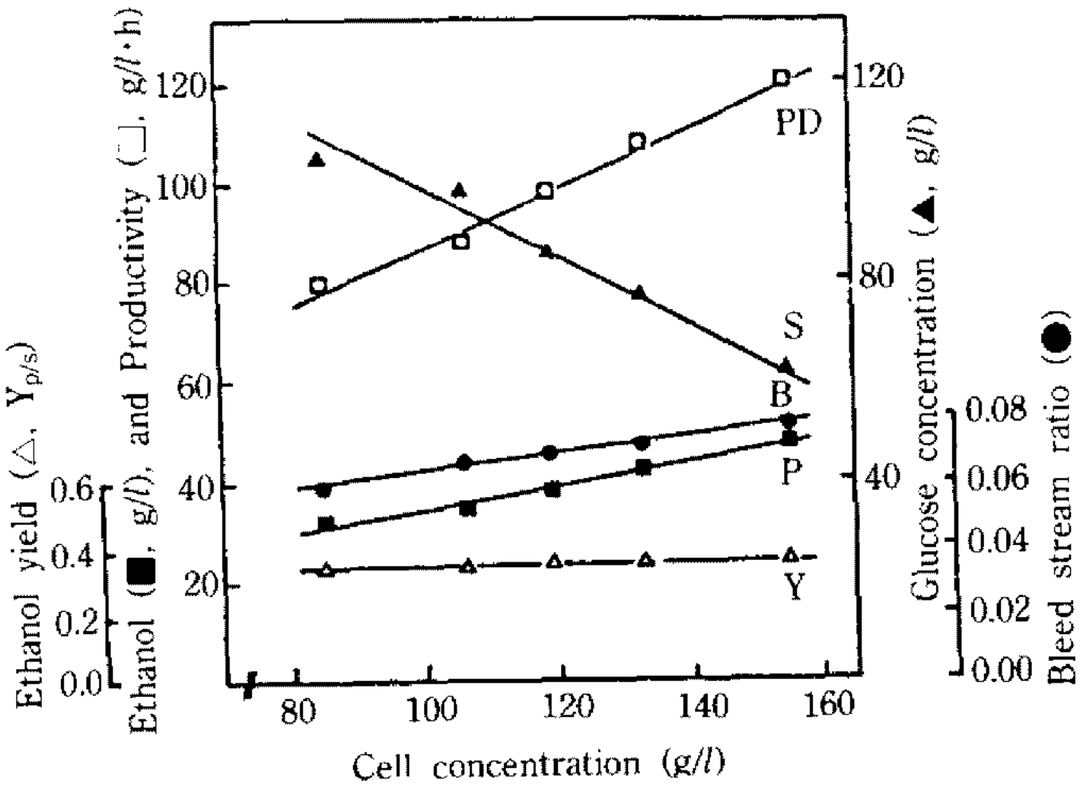

Fig. 11. Effect of dilution rate on ethanol fermentation under conditions of $S_0=200$ g/l and $D=2.5\ h^{-1}$.

배양액 중 에탄올 농도는 42.4에서 55 g/l까지 증가되었다.

고농도 균체 순환발효

전술한 실험 결과에서 발효액의 균체농도를 100 g/l로 고정시켰을 경우 공급되는 글루코오스 농도가 2~3배 증가하더라도 에탄올 생산성은 기질 농도가 증가된 배수만큼 증가하지 않았다. 따라서 공급 배지의 글루코오스 농도 200 g/l, 희석율 $2.5\ h^{-1}$에서 균체농도를 증가시키면서 이의 발효 양상을 연구하였으며 그 결과를 Fig. 11에 나타내었다. Bleed stream 양을 적절히 조절하여 발효조내의 균체농도가 일정하게 유지되도록 하였으며 working volume의 4~5배의 배지를 공급한 후 정상상태에 도달한 것으로 생각하였다. 균체농도는 막의 여과 능력이 허용하는 범위내에서 85에서 155 g/l까지 증가시켰다.

각 정상상태에서 에탄올 생산성은 균체농도가 증가함에 따라 조금씩 증가하는 경향을 띠었는데 85 g/l의 균체농도에서 80 g/l·h의 생산성을 보였으나 155 g/l의 균체농도에서 120 g/l·h로 본 전체 실험 중 최고의 생산성을 얻을 수 있었다. 이때 잔존 글루코오스는 63 g/l로 글루코오스 전환율은 63%였으며, 배양액 중 에탄올 농도는 48 g/l였다.

Lee와 Chang(5)은 균체 생육은 에탄올 농도 90 g/l에서 정지되고 에탄올 생산은 132 g/l에서 정지하는 것으로 보고하였으며 Ghose등(12)도 에탄올 농도 87 g/l에서 균체 생육이 정지되고, 114 g/l에서 에탄올

Table 1. Comparison of ethanol productivity from different fermentation systems

System	Glucose concentration (g/*l*)	Ethanol concentration (g/*l*)	Sugar utilization (%)	Productivity (g/*l*·h)
Batch culture	100	45.1	100	3.2
Continuous	20	9.1	99	3.6
culture	100	30	62	7.2
	100	38	100	95
Membrane	200	35	51	88
recycle	300	48	37	96
fermentor	200	48	69	120

생산이 중단된다고 하였으며, Loung(13)는 105 g/*l*의 에탄올 농도에서 에탄올 생산 능력이 완전히 상실된다고 추정하였다. 또한 Nishizawa 등(14)은 에탄올 농도 30 g/*l* 이하에서는 에탄올 비생산성이 에탄올 농도에 영향을 받지않으나 그 이상에서는 거의 직선적으로 감소되며 100 g/*l*에서 완전히 정지한다고 하였다. 그러나 Aiba 등(15)은 에탄올 내성 균주를 사용하여 에탄올 농도가 200 g/*l* 이상까지 활성이 유지되었으며 250 g/*l* 이상에서 균체가 사멸한다고 보고하는 등 이러한 값들은 균주의 특성과 배양조건에 크게 영향을 받는 것임을 알 수 있다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 본 실험에 사용한 membrane module의 여과 능력과 작업 조건의 한계로 인해 희석율은 3.0 h ^{1} 이하에서 실험을 수행 하였으며 각 발효 시스템의 발효 성적을 Table 1에 비교 정리하였다. 에탄올 생산성을 비교해 보면 막 재순환 발효시스템의 경우 희석율 2.5 h^{-1}, 공급 배지의 글루코오스 농도 200 g/*l*, 균체농도 155 g/*l*에서 최대의 에탄올 생산성 120 g/*l*·h를 나타내었는데 이는 회분 배양의 38배, 연속 배양의 17배에 상당하는 높은 생산성이다. 그러나 글루코오스 전환율이 69%로서 비교적 낮았으며 공급 배지의 글루코오스 농도 100 g/*l*일 때 생산성은 95 g/*l*·h로 낮으나 글루코오스 전환율은 100%였다. 따라서 여과 능력이 우수한 membrane module의 선정과 이에 적합한 기질농도, 균체 농도 및 희석율의 선정이 중요하며 사용 균주의 에탄올 내성이 중요한 인자인 것으로 생각된다.

요 약

에탄올의 발효 생산성을 높이기 위해서는 발효조의 균체농도를 높여 고농도 배양을 해야하며 또한 에탄올에 의한 저해 작용을 감소시켜 비생산성을 향상시키기 위해서는 발효액 중에 축적되는 에탄올을 배출시킬 필요가 있다. 이와 같은 목적으로 본 연구에서는 고분자 hollow fiber membrane, ceramic filter를 이용하여 가장 중요한 조작 변수인 희석율과 bleed stream ratio가 에탄올 생산성에 미치는 영향 및 조작상의 문제점과 장기 조업 가능성을 검토하였다.

알코올 발효능이 우수한 균주를 선정하여 회분 배양 및 연속배양을 통하여 기본적 kinetic data를 얻은 결과 사용 균주의 최대 비증식 속도는 0.54 h^{-1}, 에탄올 수율 $Y_{p/s}=0.47$, $Y_{x/s}=0.15$, $K_s=15$ mg/*l*였다. 회분 배양에서는 평균 에탄올 생산성은 3.2 g/*l*였으며, 연속배양에서는 공급 배지 중의 글루코오스 농도 20 g/*l*일 때, 최대 생산성 3.6 g/*l*·h, 100 g/*l*일 때는 7.2 g/*l*·h였다.

희석율을 0.5~1.25 h^{-1}, bleed stream ratio를 0.02~0.2 범위로 변화시킨 결과 희석율 1.25 h^{-1}, bleed stream ratio 0.05에서 100% 글루코오스 전환율을 나타내었으며 이때 배양액 중 에탄올 농도 46 g/*l*, 최대 에탄올 생산성은 57 g/*l*·h였다.

초기 글루코오스 농도 100 g/*l*의 배지를 사용하여 bleed stream ratio를 0.05로 고정시켜 놓고 희석율을 최대한 높인 결과 막 여과 능력과 조업 조건상 희석율 3.0 h^{-1}까지 균체 순환 연속배양이 가능하였으며 희석율 2.5 h^{-1}에서 최대 에탄올 생산성 95 g/*l*·h를 얻었다. 최대 에탄올 생산성일 때 균체농도는 135 g/*l*, 배양액 중 에탄올 농도는 35 g/*l*, 기질 전환율은 100%였다. $D=3.0\ h^{-1}$일 때 균체농도는 159 g/*l*로 증가하였으나 에탄올 생산성은 오히려 약간 저하된 93 g/*l*·h였다.

균체농도를 100 g/*l*로 고정시킨 상태에서 공급 배지중 글루코오스 농도를 200 g/*l*와 300 g/*l*로 증가시킨 결과 에탄올 생산성과 발효액중의 에탄올 농도는 희석률의 증가에 따라 증가하였다. 글루코오스 농도 200 g/*l*의 경우 $D=2.5\,h^{-1}$에서 에탄올 최대 생산성 88 g/*l*·h를 얻었으며 이 때 배양액 중 에탄올 농도는 35 g/*l*였다. 한편 글루코오스 농도 300 g/*l*인 경우에는 $D=2.0\,h^{-1}$에서 최대 생산성 96 g/*l*·h를 얻었으며 배양액 중 에탄올 농도는 48 g/*l*였다. 그러나 균체농도를 100 g/*l*로 고정하였기 때문에 기질 전환율이 낮았다.

공급 배지중의 글루코오스 농도를 200 g/*l*로, 희석율을 $2.5\,h^{-1}$로 고정시킨 상태에서 균체 순환 연속배양을 하면서 균체농도의 영향을 검토한 결과 에탄올 생산성과 발효액 중 에탄올 농도는 균체농도가 증가함에 따라 증가하였고, 균체농도 155 g/*l*에서 배지중의 에탄올 농도 48 g/*l*, 에탄올 생산성은 최고인 120 g/*l*·h였으며 이때 기질 전환율은 69%였다.이 최대 생산성은 회분 배양에 비해 38배, 단순 연속배양의 17배에 해당하는 값이었다.

감사의 말

본 연구는 동력자원부에서 시행한 대체에너지 기술개발 사업의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Shama, G.: *Process Biochem.*, Oct., 138 (1988)
2. McGregor, W.C.: *Membrane separations in biotechnology*, vol 1 , Marcel Dekker, INC., New York, 255 (1986)4 and Belfort, G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1047 (1989)
3. Rogers , P.L., Lee, K.J. and Tribe, D.E.: *Process Biochemistry*, Aug./Sept., 7 (1980)
4. Mehaia, M.A. and Cheryan, M.: *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 1 (1984)
5. Lee, C.H. and Chang, H.N.: *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1105 (1987)
6. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
7. Ghose, T.K. and Tyagi, R.D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1401 (1979)
8. Maiorella, B., Blanch, H.W. and Wilke, C.R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 497 (1984)
9. Janusz, J. M., Cheristine, L. and Gerard, G.: *J. Ferment. Technol.*, **65**, 319 (1987)
10. Lee, J.M., Pollard, J.F. and Coulman, G.A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 497 (1983)
11. Cheryan, M. and Mehaia, M.A.: *Process Biochem.*, Dec., 204 (1984)
12. Ghose, T.K. and Tyagi, R.D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1401 (1979)
13. Loung, J.H.R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 280 (1985)
14. Nishizawa, Y., Mitani, Y., Fukunish, K. and Vagal, S.: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 42 (1984)
15. Aiba, S., Shoda, M. and Nagatani, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 845 (1968)

(Received July 5, 1991)