

## 응집성 *Saccharomyces cerevisiae* CA-1에 의한 에탄올 연속발효

이용범\* · 심상국<sup>1</sup> · 한면수 · 정동호

중앙대학교 산업대학 식품가공학과, <sup>1</sup>동남보건전문대학 식품가공과

### Continuous Ethanol Fermentation in Air-lift Reactor by Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1

Yong-Bum Lee\* Sang-Kook Shim<sup>1</sup>, Myun-Soo Han and Dong-Hyo Chung

Department of Food Science and Technology, College of Industrial Science,  
Chung-Ang University, Ansung 456-714, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Technology, Dongnam Health Junior College, Suwon 440-714, Korea

**Abstract** — Using a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* CA-1, an air-lift reactor equipped with a modified settler was used for ethanol fermentation. The effects of conditions such as aeration rate, initial glucose concentration, and dilution rate were studied using the air-lift reactor. In batch fermentation, optimum aeration rate was 0.5 vvm. In continuous fermentation, aeration rate and initial pH were fixed 0.5 vvm and 4.5, substrate concentration and dilution rate were changed 10~15% and 0.1~1.3. The maximum ethanol productivity was shown to be 20.4 g/l·h in 10% glucose and 0.7 h<sup>-1</sup> dilution rate., and optimum operation condition considering the ethanol productivity and glucose utilization ratio was 0.5 h<sup>-1</sup> dilution rate in 10% glucose concentration.

발효공정의 효율을 높이기 위한 연구는 무증자 발효(1), 고농도 발효(2), 고온 발효(3), 연속발효(4), 혼합 발효, 고정화 발효(5), 감압 발효(6) 등의 고수율 발효공정이 있으며 발효 후 발효산물에서 에탄올 회수를 위한 증류공정의 개선이 연구되었다.

연속발효의 경우 반응기내부의 균체를 항상 대수기로 유지하고 유입되는 기질과 유출되는 반응산물의 비를 최적화 하여 에탄올생산성을 최적화하는 방법으로 반응기 내부의 균체를 고농도로 유지시키기 위하여 균체를 고정화시키거나 균체를 침전시켜 재순환하는 방법을 사용하고 있다. 이 경우 고정화 시키는 방법은 균체를 고정화하는 비용이 추가되고, 일정시간 이상 사용시 담체가 깨어지며 고정화된 균체도 발효중 균체가 유리되어 발효산물이 혼탁되는 단점이 있다. 이에 비하여 응집성 균주를 사용할 경우 발효산물을 2~3분간 성치하면 균체가 응집되어 침전하므로 균체를 제거하는데 소요되는 원심분리와 여과 장치와 에너지를 절약할 수가 있어 생산원가를 낮출 수가 있다. Air-lift reactor는 균체농도를 고농도로 유지할

수 있고, 장기간 안정하게 조업할 수 있으며, 응집성 균주를 사용하면 원심분리나 교반 장비가 필요없어 노동비와 유지 보수비가 적게 되는 이점이 있다(7). 또한 응집 침전분리되는 특성을 이용한 새로운 형태의 발효조를 설계할 수가 있다.

응집성균주의 특성을 이용한 연속발효기를 설계하여 실험한 Limtong(8)의 경우 반응기 외부로 발효산물을 유출시킨 후 침전조에서 균체를 분리하여 재순환하는 방법을 사용하였으나, 본 실험의 경우 반응물과 균체의 분리에 있어서 외부로부터의 오염을 방지하고 간편한 발효조 조작을 위하여 반응기 내부에 균체의 침전분리조를 설치하여 발효산물중 균체를 분리 하였으며 기질과 균체와의 반응량을 높여주기 위하여 반응기 하부에서 공기를 공급하여 교반과 통기를 겸하는 구조의 침전조가 부착된 air-lift reactor를 설계하여 발효 특성치를 실험하여 이들로부터 에탄올 발효공정의 최적조건등 몇 가지 새로운 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배지

균주는 전보(9)에서 분리 동정한 *Saccharomyces ce-*

**Key words:** Continuous ethanol fermentation, flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1, air-lift reactor

\*Corresponding author

*revisiae* CA-1을 사용하였으며 발효배지는 전보와 같은 방법으로 yeast extract 10 g, peptone 20 g과 소정농도의 glucose를 tap water에 녹여 1l로 한 후 살균하여 사용하였다.

**분석**

균체량은 600 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였고, 잔당량은 DNS법(10)으로 에탄올의 정량은 isopropanol을 internal standard로 하여 gas chromatography (Delsi 700, Germany)로 분석하였다(11).

**발효**

Air-lift형의 연속 반응기(Continuous Air-Lift Reactor)를 Fig. 1과 같이 높이 260 mm 직경 40 mm 크기의 Pyrex 관으로 제작하였다. 반응기 외부는 물 재킷을 부착하여 온수를 순환시켜 일정한 온도를 유지하였으며 반응기 하부에서 공기를 공급하는 형태로 하였다. 반응기 상단부에 냉각기를 설치하여 배출 가스 중의 에탄올을 회수하였다. 최적 aeration rate는 초기 glucose 농도 15%, 배지의 초기 pH 4.5, 발효온도 35°C로 고정하여 24시간동안 배지의 유입, 유출없이 반응기로 공급되는 공기의 양을 0, 0.16, 0.34, 0.5, 0.67 vvm로 하여 회분발효한 후 에탄올 양을 측정하여 최적 조건을 설정하였다(12).

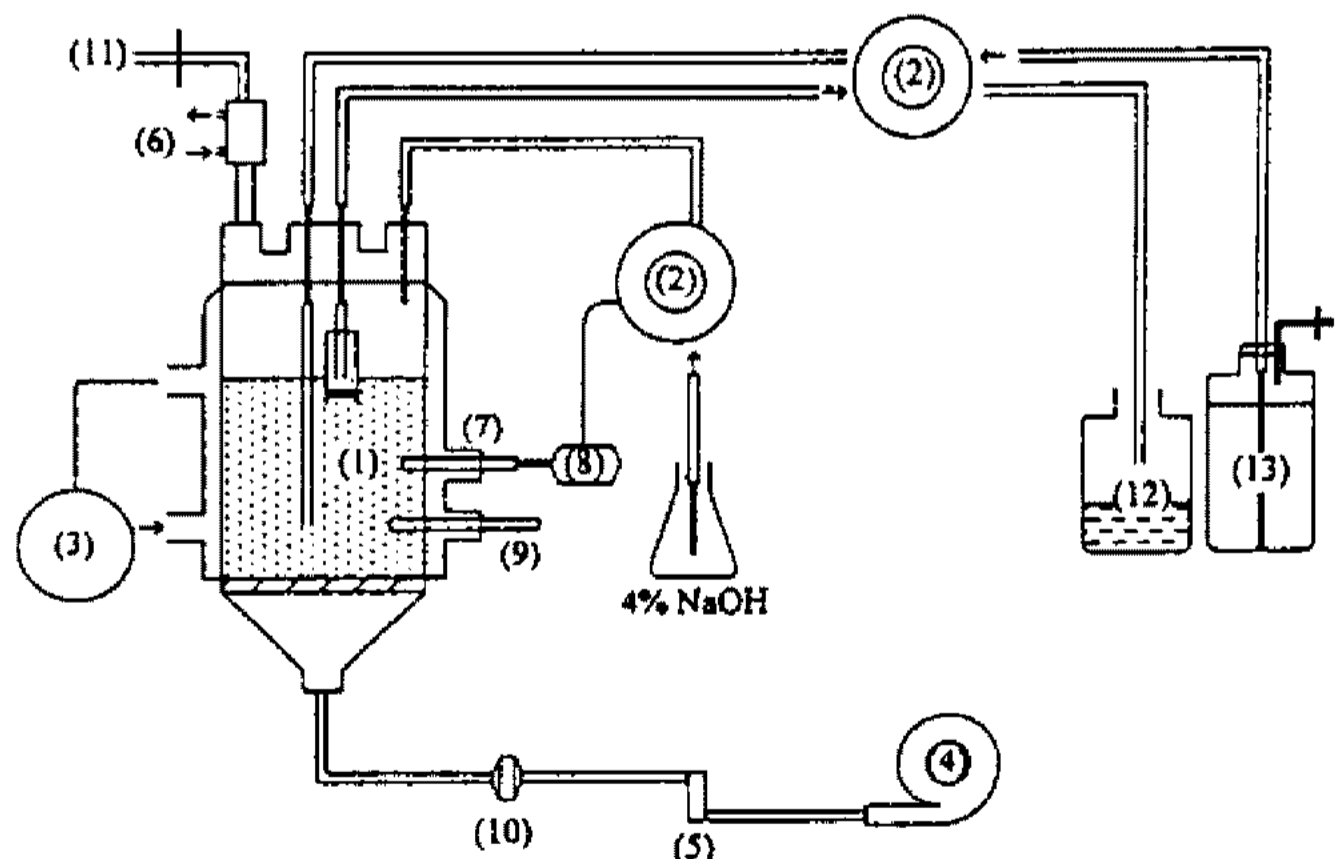
연속발효는 glucose 농도 10%의 발효배지에 1%의 seed를 가하여 300 ml가 되게 한후 24시간동안 배양하여 반응기를 활성화시킨 후 시작하였다. 이때 활

성화된 반응기의 조건은 잔당량 2 g/l 이하, 균체량 14~15 g/l, 에탄올 농도 40~45 g/l이었으며 연동펌프 (Eyela, Japan)를 작동시켜 발효배지를 공급하고 발효액을 유출시켜 연속발효를 유지 하였다. 균체와 발효액의 분리는 반응기 내부의 발효액 유출부에 균체가 분리되는 공간을 만들고 균체와 함께 유입된 발효액은 이곳에서 정지되며 균체는 침전되어 침전조 옆의 공극을 통해 반응기 내부로 순환되고 발효액은 유출되도록 하였다. 발효배지의 glucose 농도는 10, 13, 15%로 하였으며 pH는 4% NaOH 용액을 사용하여 pH 4.5로 조정하였고 반응기 내부의 온도는 35°C로 하였다. 그리고 각 유입 glucose 농도의 회석속도를 0.1~1.3 h<sup>-1</sup>까지 조절하면서 평형상태에 도달할 때까지 에탄올 발효를 하였다.

**결과 및 고찰**

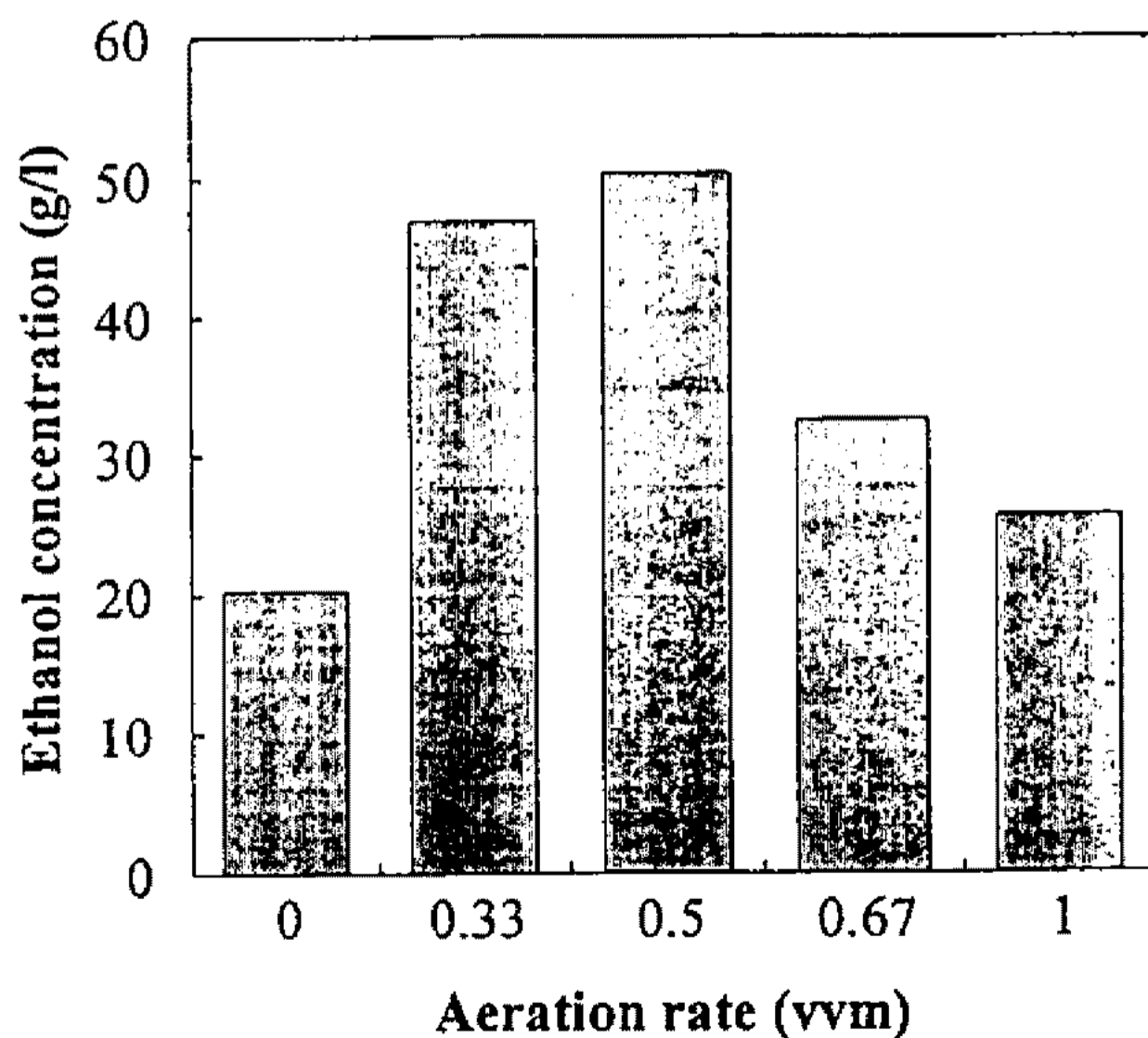
**최적 aeration rate**

회분발효로 aeration rate를 변화하여 생성된 에탄올량은 Fig. 2와 같았다. 즉 0.5 vvm 부근에서 최대 에탄올 생산량 52 g/l를 나타냈으며 이때의 aeration rate를 연속발효시 최적 aeration rate로 설정하였다. 김 등(13)은 혐기 조건과 0.125 vvm으로 통기한 조건에서 에탄올을 74.5 g/l, 97.1 g/l를, 균체량은 6.79 g/l, 11.80 g/l를 생산하였다고 보고하였으며, 조 등(14)은 발효배지의 용존산소를 제거한 경우와 공기로 배지중에 용존산소를 포화시킨 후 발효시킨 경우를 비교하여 용존산소를 포화시킨 경우 에탄올 생산량이



**Fig. 1. Schematic diagram of air-lift continuous reactor for ethanol production.**

- (1) Air-lift reactor
- (2) Peristaltic pump
- (3) Circulation water bath
- (4) Air pump
- (5) Flow meter
- (6) Condenser
- (7) pH electrode
- (8) pH controller
- (9) Thermometer
- (10) Air filter
- (11) Exhaust gas
- (12) Production receiver
- (13) Medium tank



**Fig. 2. Effect of aeration rates on the ethanol production in a batch fermentation by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1.**

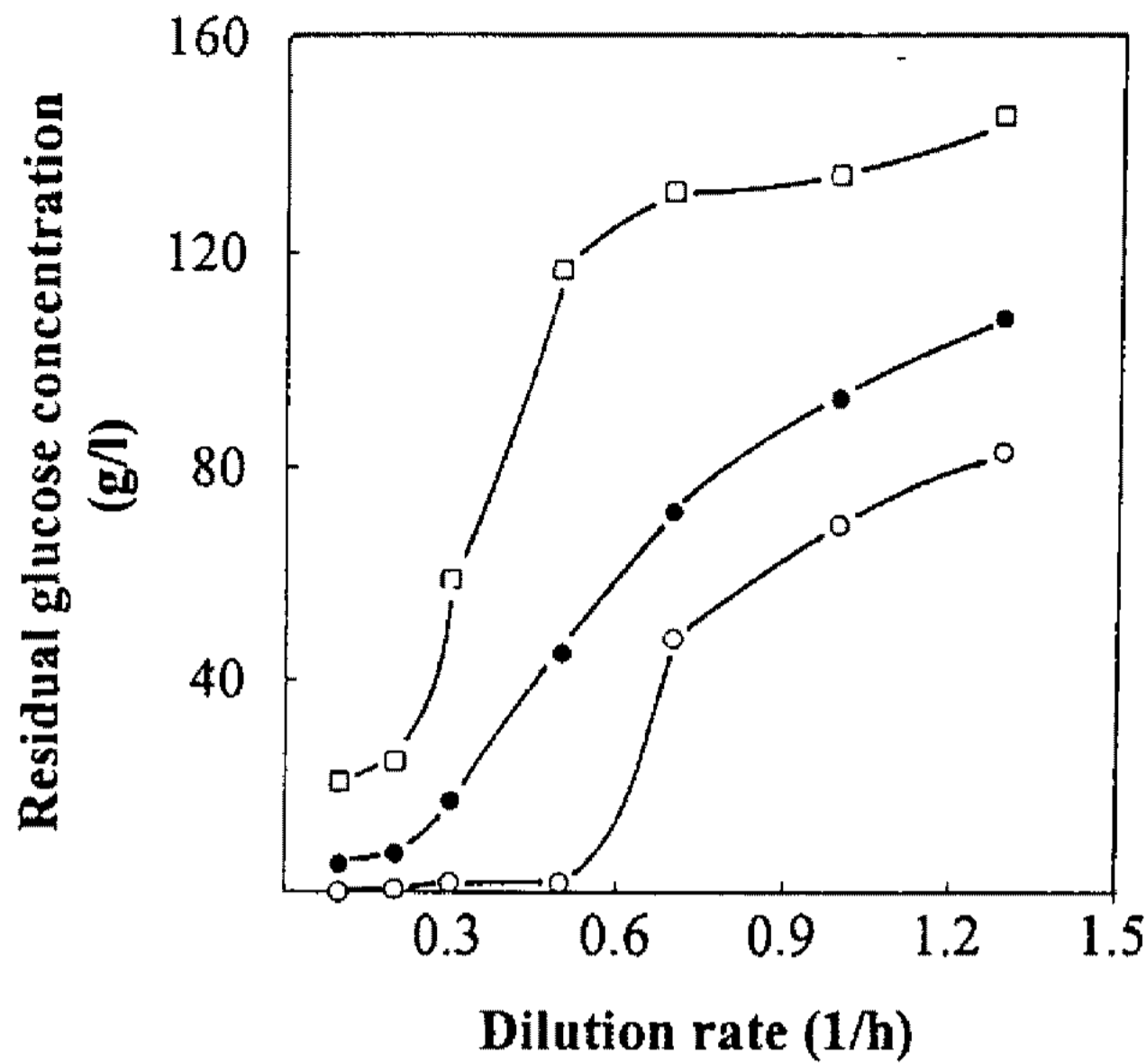


Fig. 3. Effect of dilution rate and glucose concentration on residual glucose in the air-lift continuous reactor. -○-: 10% Glucose, -●-: 13% Glucose, -□-: 15% Glucose

28.5% 향상되었다고 보고하였다. 이와 비교하여 본 실험의 0.5 vvm은 aeration rate가 상당히 높았으며 본 실험에 사용된 생물반응기는 교반날개가 없는 점과 관련하여 aeration에 의하여 산소의 공급과 함께 반응기내부에서 교반효과가 일어나기 때문으로 추측된다.

**회석속도와 잔당량의 상관성**

유입하는 발효배지의 glucose 농도를 변수로 하여 회석속도와 잔당량의 상관성을 Fig. 3에 나타내었다. 회석속도와 유입 glucose 농도가 증가됨에 따라 발효액중 잔당량도 증가되었다. 10% glucose 발효배지에서 회석속도 0.5 h<sup>-1</sup>까지는 유입된 glucose가 98% 수준으로 소모되었으나 회석속도 0.7 h<sup>-1</sup>부터는 잔당량이 증가하여 회석속도 1.3 h<sup>-1</sup>에서는 유입량의 약 83%가 유출되었다. 13% glucose 농도에서는 회석속도 0.1 h<sup>-1</sup>에서 유입된 기질이 거의 전량 소모되었고 회석속도 0.3 h<sup>-1</sup>까지 유입량의 12.4%만이 유출되었다. 그러나 회석속도 0.7 h<sup>-1</sup>부터 잔당량이 급격히 증가하여 회석속도 0.7 h<sup>-1</sup>에서는 83%가 유출되었다. 15% glucose 농도에서는 회석속도 0.1 h<sup>-1</sup>에서 13.5%의 기질이 유출되었으나 회석속도가 증가함에 따라 잔당량도 급격히 증가하여 회석속도 0.3 h<sup>-1</sup>에서 39%, 회석속도 1.3 h<sup>-1</sup>에서 98%가 유출되었으며 동일한 회석속도에서도 기질농도가 증가함에 따라 기질저해현상이 일어났음을 알 수 있었다.

최저 잔당량은 10% glucose 농도에서 회석속도 0.12

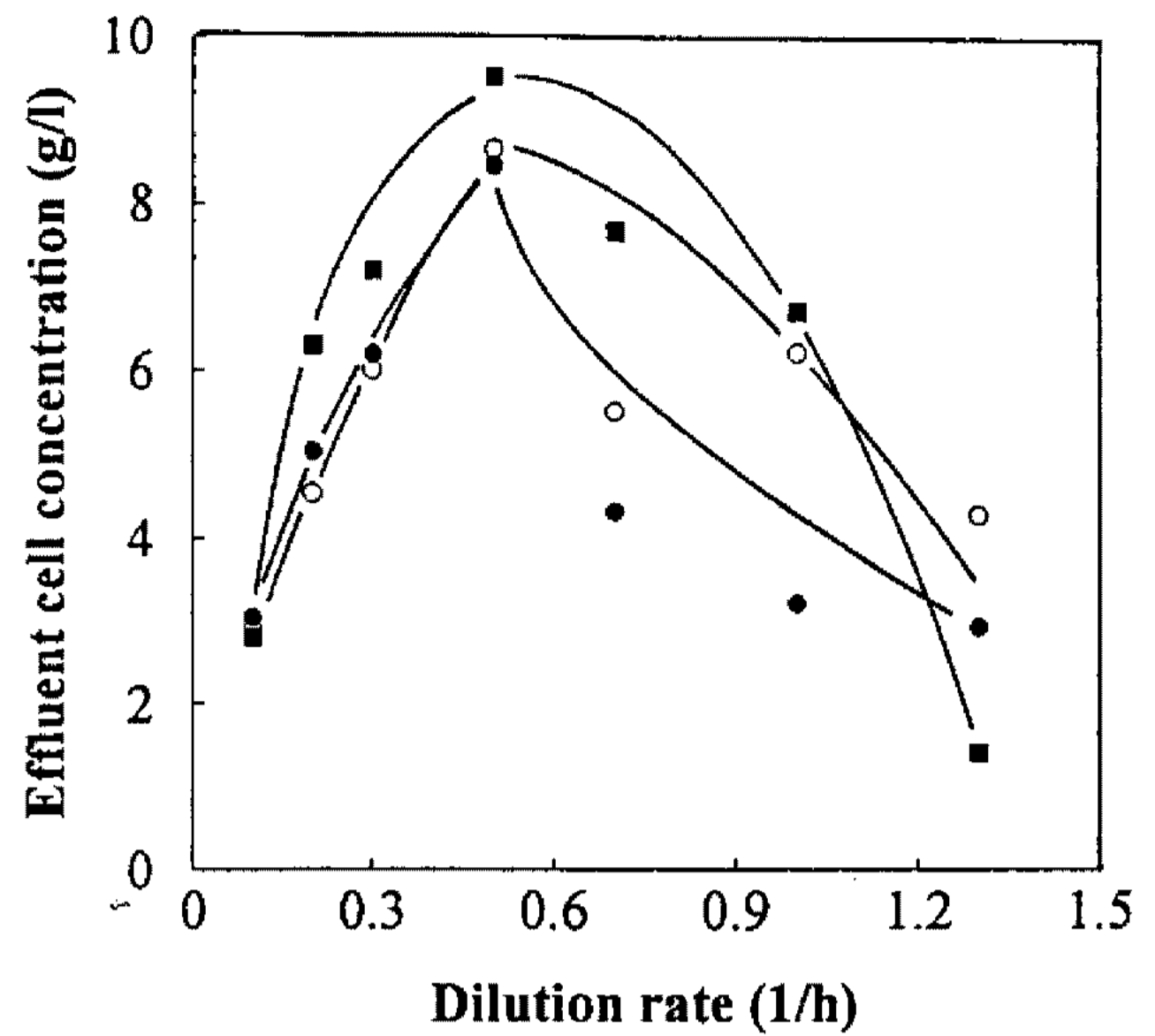


Fig. 4. Effect of dilution rate and glucose concentration on effluent cell in the air-lift continuous reactor. -○-: 10% Glucose, -●-: 13% Glucose, -□-: 15% Glucose

h<sup>-1</sup>인 경우 0.5 g/l이었고, 최고 잔당량은 15% glucose 농도에서 회석속도 1.3 h<sup>-1</sup>인 경우 146.4 g/l이었다. 따라서 회석속도와 유입기질 농도의 증가가 연속반응기에서 균체의 기질소모비에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 한편 Shin 등(15)은 회석속도를 0.07~0.396 h<sup>-1</sup> 사이로 변화시키면서 평형상태에 이를 때까지 *Saccharomyces sake*를 이용하여 9.5% glucose 농도로 연속발효시킨 결과 회석속도가 증가됨에 따라 잔당량이 증가되었고 회석속도 0.396 h<sup>-1</sup>에서는 잔당 유실량이 78 g/l를 나타내었다고 보고하였다.

**회석속도와 유출 균체량의 상관성**

유입하는 발효배지의 glucose 농도를 변수로 하여 회석속도와 발효중 유출되는 균체사이의 관계를 Fig. 4에 나타내었다. 10% glucose 농도의 경우 회석속도 0.1 h<sup>-1</sup>에서 유출균체량이 2.48 g/l이었으나 회석속도가 증가됨에 따라 증가되어 회석속도 0.5 h<sup>-1</sup>에서는 8.52 g/l로 증가되었다가 다시 감소되어 회석속도 1.3 h<sup>-1</sup>에서는 4.64 g/l로 감소되었다. 이는 유입되는 기질의 농도에 상관없이 회석속도가 증가됨에 따라 균체 분리 침전조 내부의 유속이 증가되어 발효액과 균체가 분리되지 못하고 함께 유출되는 경향을 보이다가 회석속도 0.7 h<sup>-1</sup> 이상에서는 균체가 유실되어 반응기 내부의 균체량이 감소되어 유출균체도 감소되는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에 이용된 침전조는 회석속도 0.7 h<sup>-1</sup> 부근에서 유출균체량과 생산균체량의 평형이 이루어지는 것으로 보이며 발효조의 효율을

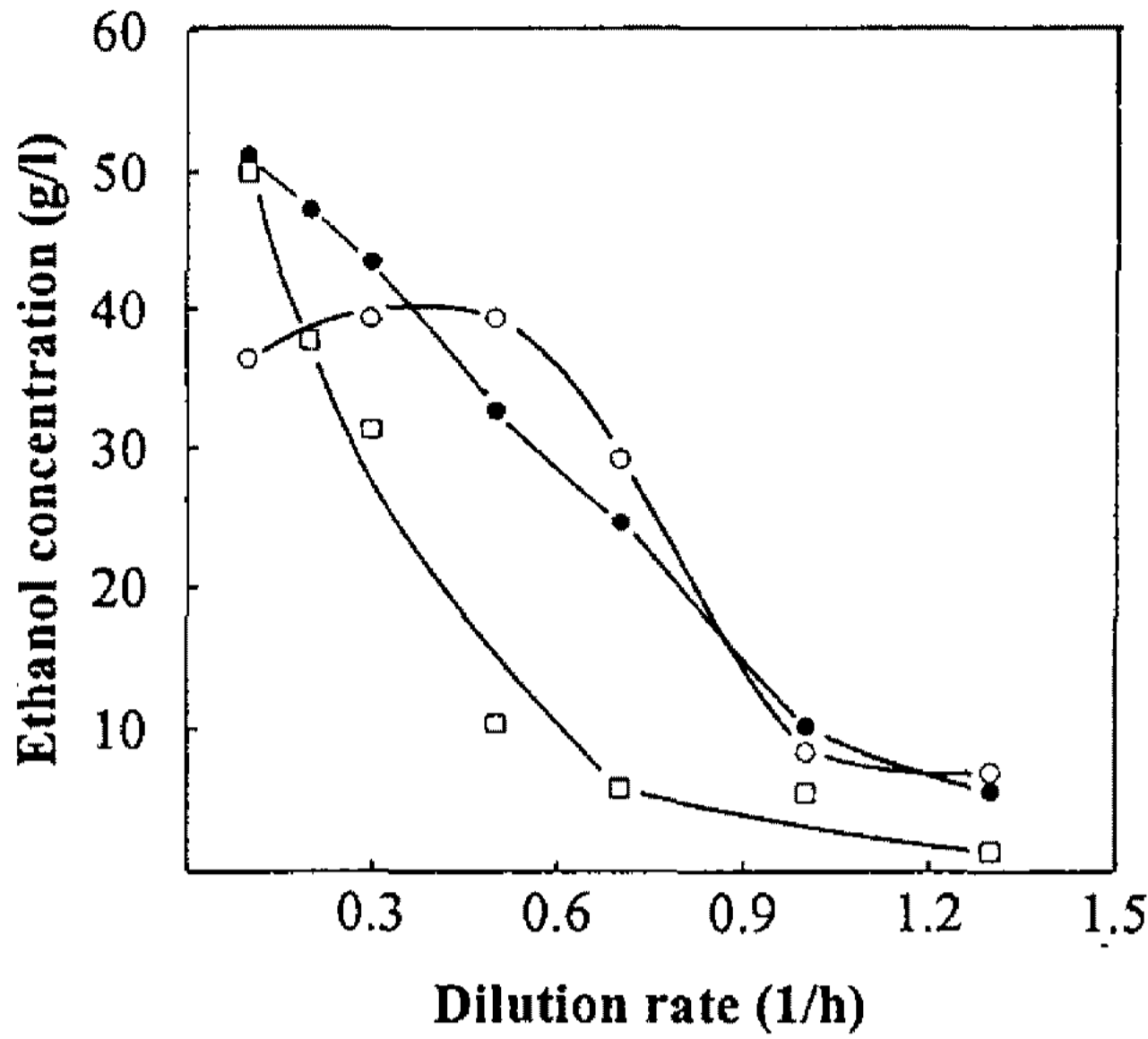


Fig. 5. Effect of dilution rate and glucose concentration on ethanol concentration in the air-lift continuous reactor. -○-: 10% Glucose, -●-: 13% Glucose, -□-: 15% Glucose

높이기 위해서는 보다 효과적인 균체분리장치의 고안이 요구된다.

**회석속도와 에탄올함량의 상관성**

유입되는 발효배지의 glucose 농도를 변수로 하여 회석속도와 에탄올 함량의 상관성을 Fig. 5에 나타내었다. 10% glucose 농도의 경우 0.5 h<sup>-1</sup>까지 기질에 의한 저해현상이 발생하지 않았으나 13%, 15%의 경우 회석속도가 증가됨에 따라 급격히 에탄올 함량이 감소하다가 완만히 감소하였다. 한편 회석속도를 고정하고 기질농도를 변화시킨 경우 기질에 의한 저해가 크다는 것을 알 수 있었다. 이는 한 등(11)의 보고에서 20% glucose 농도의 배지에서 회석속도는 0.5 h<sup>-1</sup>까지는 급격히 감소하다가 1.0 h<sup>-1</sup> 이상에서는 완만히 감소하였으며 동일한 회석속도에서 유입기질의 농도가 증가함에 따라 유출되는 에탄올 함량이 감소하였다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다.

**회석속도에 의한 잔당 유실속도의 특성**

유입하는 발효배지의 glucose 농도를 변수로 하여 회석속도가 미발효된 잔당의 유실속도에 미치는 영향을 Fig. 6에 나타내었다. 회석속도와 유입시키는 glucose 농도가 증가될수록 유실속도는 증가되었다. 잔당 유실속도는 10% glucose, 회석속도 0.1 h<sup>-1</sup>에서 0.5 g/l·h이었고 15% glucose, 회석속도 1.3 h<sup>-1</sup>에서는 190.32 g/l·h이었다. 또한 회석속도 0.3 h<sup>-1</sup>에서의 잔당

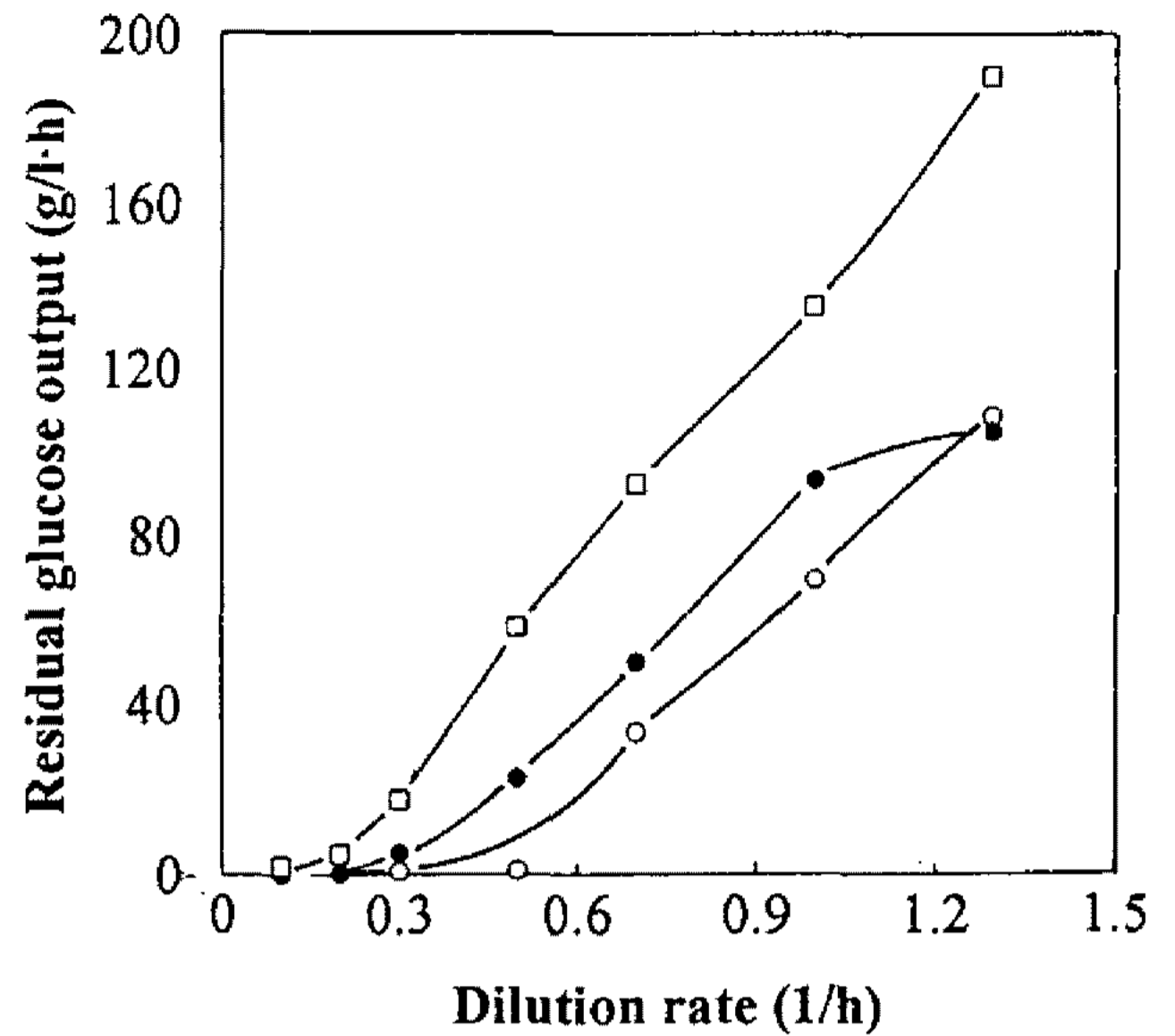


Fig. 6. Effect of dilution rate and glucose concentration on residual glucose output in the air-lift continuous reactor. -○-: 10% Glucose, -●-: 13% Glucose, -□-: 15% Glucose

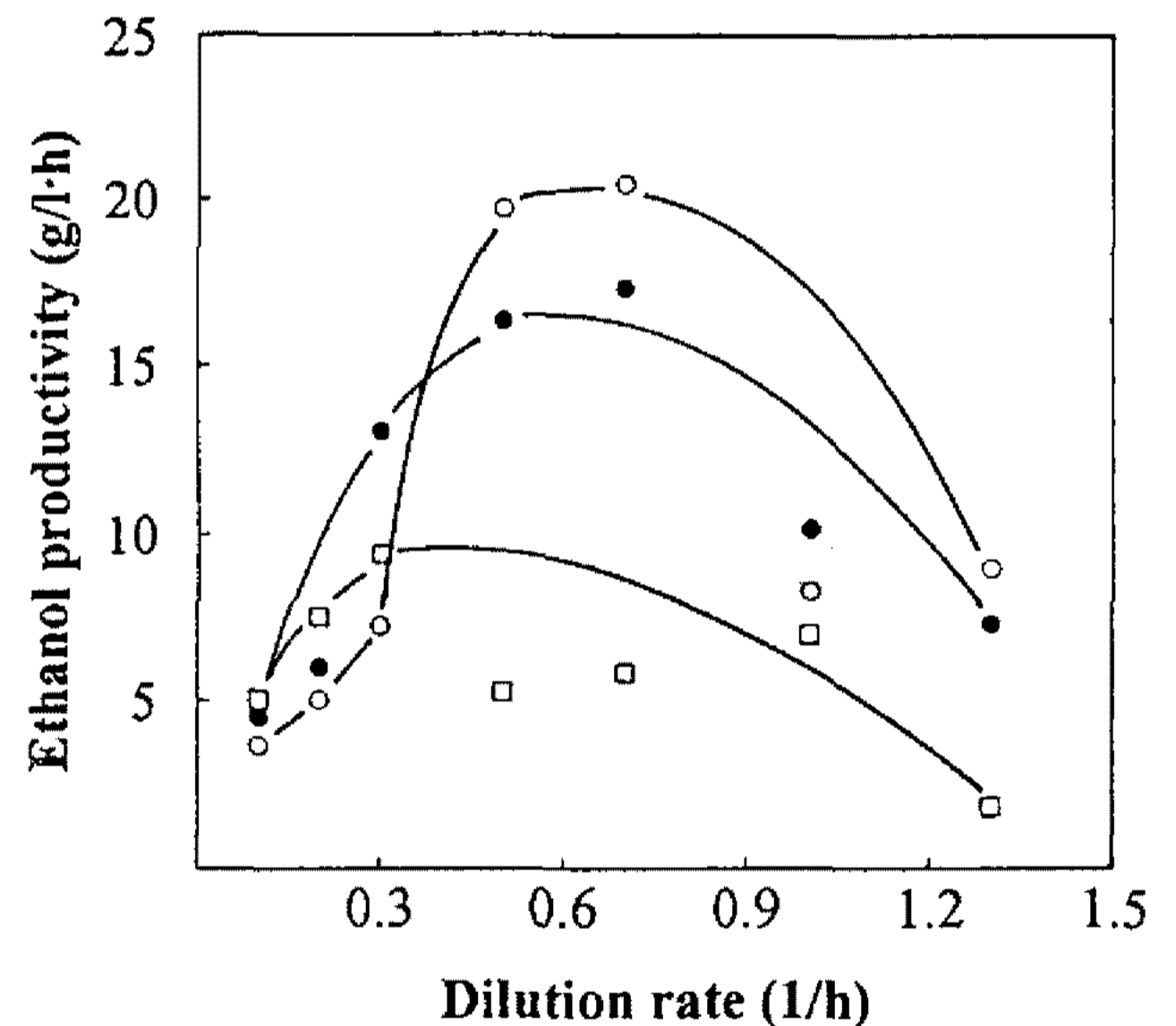


Fig. 7. Effect of dilution rate and glucose concentration on ethanol productivity in the air-lift continuous reactor. -○-: 10% Glucose, -●-: 13% Glucose, -□-: 15% Glucose

유실속도는 회석속도 0.2 h<sup>-1</sup>에서보다 3.7배 증가되었고, 회석속도 0.5 h<sup>-1</sup>에서는 회석속도 0.7 h<sup>-1</sup>에서보다 잔당량이 2배 증가되었다. 이는 회석속도가 증가됨에 따라 균체의 유실량이 증가되어 반응기 내부의 균체농도가 낮아져 기질이 에탄올로 전환되지 못하고 반응기 외부로 유출되는 현상으로 Chen 등(16)은 반응기 내부의 배지이동속도를 증가시킴에 따라 기질 소모율이 낮아졌다는 보고와 일치하였다.

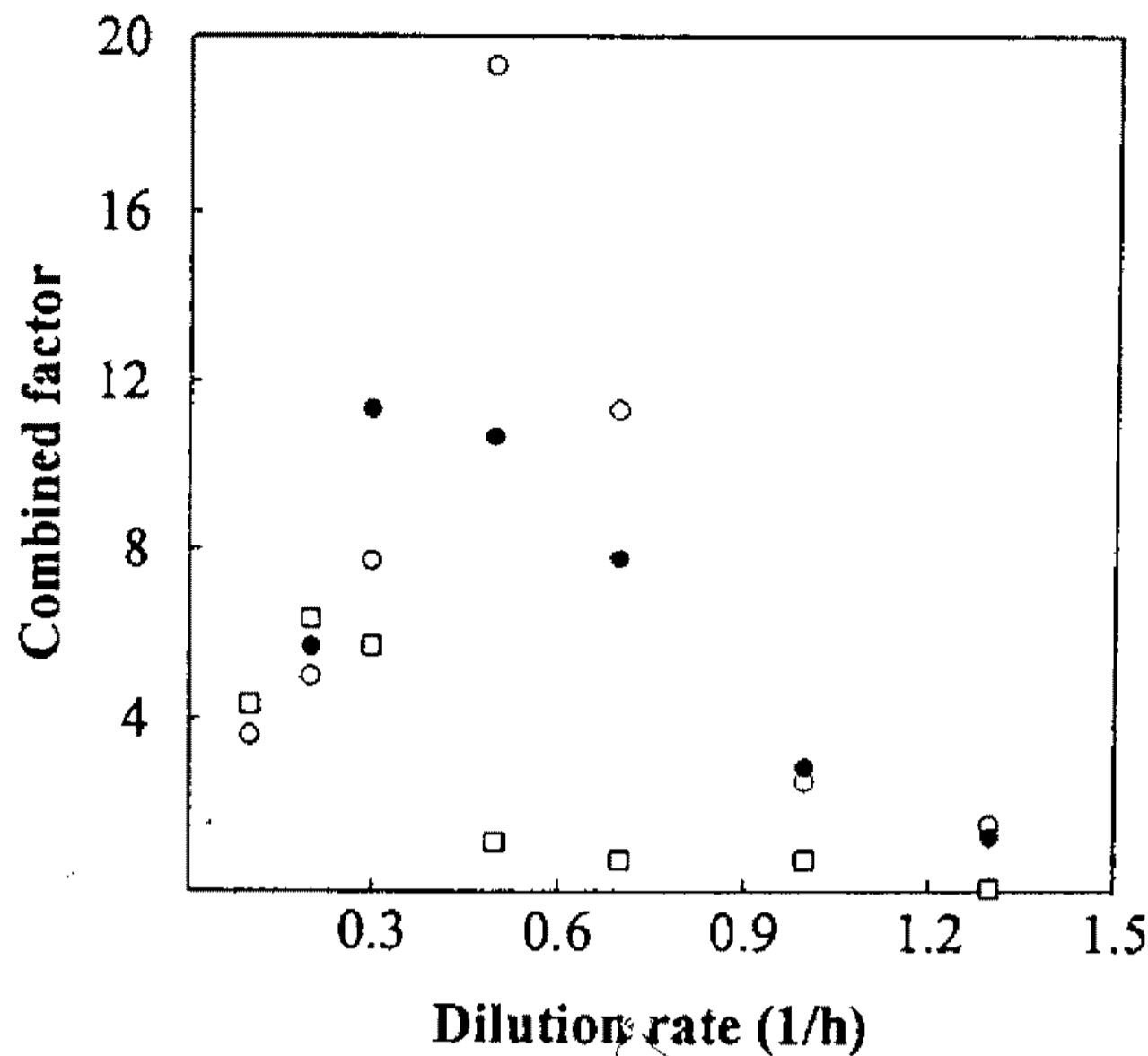


Fig. 8. Combined factor, affected by the ethanol productivity and glucose utilization ratio, as a function of dilution rate at various influent glucose concentrations. -○-: 10% Glucose, -●-: 13% Glucose, -□-: 15% Glucose

#### 회석속도에 따른 에탄올 생산성

유입되는 발효배지의 glucose 농도를 변수로 하고 회석속도와 에탄올 생산성의 상관성을 Fig. 7에 나타내었다. 에탄올 생산성은 10% glucose에서 회석속도  $0.7 \text{ h}^{-1}$ 인 경우  $20.44 \text{ g/l}\cdot\text{h}$ 이었고 최저 생산성은 15% glucose에서 회석속도  $0.1 \text{ h}^{-1}$ 인 경우  $3.64 \text{ g/l}\cdot\text{h}$ 이었다. 10%와 13% glucose의 경우 회석속도  $0.7 \text{ h}^{-1}$ 까지는 에탄올 생산성이 증가되었으나  $1.0 \text{ h}^{-1}$  이상에서는 감소되었다. 15% glucose의 경우 회석속도  $0.3 \text{ h}^{-1}$ 까지는 증가되었으나 그 이상의 경우 일정한 수준을 보이며 감소되었다.

#### 최적 발효조건

응집성 효모를 이용한 air-lift형 연속반응기에서 에탄올 생산을 위한 최적 조건으로 에탄올 생산성이 높고 잔당 유실속도가 낮은 조건을 설정하였다. 즉 잔당 유실속도가 낮을 수록 기질이용률이 높게 나타나는 본 실험 결과를 토대로 하여 에탄올 생산성이 높고 동시에 기질이용률이 높은 작동조건을 규명할 수 있는 인자로서 에탄올 생산성과 기질이용률의 곱을 조합 인자로 택하여 함수관계를 Fig. 8에 나타내었다. 10% glucose 유입농도에서 회석속도  $0.5 \text{ h}^{-1}$ 에서 조합인자 값이 19.37로 가장 최적조건을 나타내었다. 이 조건에서 에탄올 생산성은  $19.7 \text{ g/l}\cdot\text{h}$ , 기질소모비는  $0.98 \text{ g/g}$ 이었다. 한편 남 등(17)은 효모의 재순환계에 의한 당밀의 연속발효시 최고 에탄올 생산성은  $4.9$

$\text{g/l}\cdot\text{h}$ 로서 이 때의 회석률은  $0.091 \text{ h}^{-1}$ , 에탄올 농도는  $53.9 \text{ g/l}$ 이었다고 보고하였다.

#### 요 약

침전조가 부착된 air-lift reactor를 제작하여 응집성 *Saccharomyces cerevisiae* CA-1의 에탄올 생산성을 검토하였다. 회분식 발효에서의 최적 aeration rate는  $0.5 \text{ vvm}$ 이었고 각 유입 기질농도에서 회석속도가 증가됨에 따라 반응기 내부의 균체가 반응산물과 분리되지 못하고 유출되어 잔당이 증가되었으며 기질소모비, 에탄올함량, 유출 균체량이 감소되었다. 에탄올 생산성은 10% glucose 농도에서 회석속도  $0.7 \text{ h}^{-1}$ 에서  $20.44 \text{ g/l}\cdot\text{h}$ 로 최대값이었으며 에탄올 생산성과 기질소모비로 복합시킨 최적 작동조건은 10% glucose 농도에서 회석속도  $0.5 \text{ h}^{-1}$ 이었고 이때 에탄올 생산성은  $19.7 \text{ g/l}\cdot\text{h}$ , 기질소모비는  $0.98 \text{ g/g}$ 이었다.

#### 참고문헌

1. Ueda S., C.T. Zenin, D.A. Monterio, and Y.K. Park. 1981. Production of ethanol from raw cassava starch by a non conventional fermentation method. *Biotechnol. Bioeng.* 6: 85-91.
2. Hur B.K., H.C. Kim, J.W. Yang, and Y.I. Mok. 1989. Ethanol fermentation characteristics in chemostat culture of *Kluyveromyces fragilis*. *Korean J. Biotech. Bioeng.* 4: 253-258.
3. Kamihara T.K., V. Vongsuvanlert, and J. Kumnuanta. 1981. Ethanol fermentation at high temperature. *Annual Report of ICME.* 4: 359-364.
4. Margaritis A. and P. Bajpai. 1982. Continuous ethanol production from *Jerusalem artichoke* tubers. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 1473-1479.
5. Navarro J.M. and G. Durand. 1977. Modification of yeast metabolism by immobilization onto porous glass. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 4: 243-251.
6. Ramalingham A. and R.K. Finn. 1977. The vacuum process new approach to fermentation alcohol. *Biotechnol. Bioeng.* 19: 583-591.
7. Raghav, R., H. Sivaraman, D.V. Gohale, and B. Seetaramarao. 1989. Ethanol fermentation of cane molasses by a highly flocculent yeast. *Biotech. Lett.* 11: 739-744.
8. Limtong S., M. Nakata, H. Funahashi, T. Yoshida, T. Seki, J. Kumnuanta, and H. Taguchi. 1984. Continuous ethanol production by a concentrated culture of flocculating yeast. *J. Ferment. Technol.* 62: 55-62.
9. Lee, Yong-Bum, S.K. Shim, and D.H. Chung. 1995. Screening and ethanol fermentation of floc-

- culent *Saccharomyces cerevisiae*. 투고논문
10. Miler, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-431.
  11. Han M.S. and D.H. Chung. 1992. Ethanol production using alginate immobilized cell of *Zyomonas mobilis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **20**: 588-596.
  12. Suihko M.L. and K. Poutanen. 1984. D-xylose fermentation by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Lett.* **6**: 189-196.
  13. Kim H.J. and Y.W. Ryu. 1988. The condition affecting ethanol tolerance of yeast strain in alcohol fermentation temperature and substrate type. *Korean J. Biotechnol. Bioeng* **4**: 167-176.
  14. Jo, E.C., J.H. Kim, and Y.J. Kim. 1989. Enhancement of ethanol productivity by air supplement in immobilized cell reactor system. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**: 165-169.
  15. Shin C.S. and Shaw S. Wang. 1987. Effect of dilution rate on the amount of wasted substrate during alcohol fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 559-565.
  16. Chen L.F. and C.S. Gong. 1986. Continuous ethanol production using induced yeast aggregates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 208-212.
  17. Nam K.D., I.K. Lee, and H.H. Cho. 1991. Continuous alcohol fermentation by a flocculating yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 487-490.

(Received 30 July 1995)