

Wood Chip에 고정화된 *Saccharomyces Formosensis*에 의한 연속적 에탄올 발효

서근학 · 송승구*

부산수산대학 응용화학과

*부산대학교 공과대학 화학공학과

(1985년 12월 12일 접수, 1986년 2월 21일 채택)

Continuous Ethanol Fermentation using Immobilized *Saccharomyces Formosensis*

Kuen Hack Suh and Seung Koo Song*

Department of Applied Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Korea

*Department of Chemical Engineering, College of Engineering,
Pusan National University, Pusan, Korea

(Received 12 December 1985; accepted 21 February 1986)

요 약

관형반응기에 wood chip을 충전한 후 *Saccharomyces formosensis* 용액을 통과시켜 효모를 고정화 할 시 효모 용액 유량과 wood chip 크기에 따른 고정화 정도를 고찰하였다.

고정화된 관형발효조에서 포도당을 에탄올로 발효시키면서 에탄올 생산성, 발효조 특성, 에탄올 수율, 물질전달 및 운전안정성을 연구하여 다른 형태의 발효조와 서로 비교하였다.

Abstract—A Tubular Fermentor was prepared by packing the wood chips and pumping the yeast solution in a tubular column. The experiments were prepared to determine the immobilization process variables, such as flow velocity and wood chip size.

Investigations to characterize ethanol fermentation in the immobilized cell tubular fermentor were undertaken and these results were compared with those of other fermentors.

1. 서 론

과학기술의 발달, 인구의 증가 및 생활양식의 다양화로 인한 에너지 수요가 급격히 증가하고 있으므로 한정된 석유에너지원의 보충으로 대체에너지 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히 재생가능한 biomass를 연료와 화학제품으로 전환하는 bio-conversion에 대한 연구가 앞으로의 에너

지원의 부족을 해결할 방법중 중요한 몫을 차지할 것으로 판단된다. bio-conversion중 섬유소를 가수분해시켜 당화시킨후 발효시켜 에탄올을 생산하는 방법에 대한 연구[1]가 가장 활발하게 이루어지고 있으며 에탄올발효에 대한 관심의 증대로 여러형태의 발효조 개발이 이루어지고 있다.

에탄올 발효공정은 주로 회분식으로 운전되고 있으며 회분식의 에탄올 생산성은 매우 낮다[2]. 회

분석보다 높은 생산성을 나타내는 CSTF (Continuous Stirred Tank Fermentor)는 생성물과 같이 cell이 손실되는 문제를 가지며, 또한 발효조내 cell 농도를 증대하기 위하여 출구의 cell을 재순환하여 에탄올 생산성을 증대하였으나 cell 분리 및 재순환을 위한 운전압력 증대는 이 발효조의 상용적 적용에 대한 단점이 되고 있다.

상기 발효조의 대체방안으로 cell을 관형반응기내의 충전물 표면에 고정화시킨 관형발효조가 발표되어 있으며[3~6], 효모 용액이 충전물 표면을 통과할 때 확산되어 효모의 표면부착성등으로 불활성담체의 표면에 물리적으로 흡착되는 고정화 방법등이 알려져 있다[7~11].

고정화된 발효조는 cell이 재순환하는 CSTF에 비하여 cell분리와 washout 문제등의 제한을 적게 받을 뿐 아니라 생성물 저해작용의 영향을 적게 받는 장점을 갖는다.

본 연구에서는 주정업계에서 많이 사용하는 효모인 *Saccharomyces formosensis*를 불활성 담체로서 wood chip에 고정화하는 적절한 조건을 선정하여, 상기조건에서 고정화된 관형 발효조에서 발효를 수행하며 에탄올 생산성, 에탄올과 cell의 수율, 운전안정성과 물질전달 영향의 특성을 연구하여 다른 발효조와 서로 비교, 연구하는 실험을 수행하였다.

2. 실험재료 및 방법

2-1. 실험재료와 분석방법

2-1-1. 사용균주

일산 실업(부산 문현동 소재)으로부터 분양받은 *Saccharomyces formosensis*를 배양하여 실험에 이용하였다.

2-1-2. 기질용액

호기성 조건의 균 배양과 발효시 기질용액은 Cyswski 등[12]이 사용한 조건과 동일하게 하여 사용하였으며, 그 조성을 Table 1에 나타내었다.

포도당과 영양분은 5N-H₂SO₄을 이용하여 pH=4.8로 조정후 121℃에서 30분간 멸균하여 냉각 후 혼합하였다.

2-1-3. 관형발효조

스테인레스 강으로 만든 발효조를 제작 사용하였

Table 1. Medium composition(Per liter medium).

| Component | For cell cultivation (g) and Fermentation (g) | | |
|----------------------|---|--------|--------|
| Anhydrous Glucose | 100.00 | 160.00 | 180.00 |
| Yeast Extract | 8.50 | 13.60 | 15.30 |
| Ammonium Chloride | 1.32 | 2.11 | 2.38 |
| Magnesium Sulfate | 0.11 | 0.18 | 0.20 |
| Calcium Chloride | 0.06 | 0.10 | 0.11 |
| Tap Water (ml) | 500 | 500 | 500 |
| Distilled Water (ml) | 500 | 500 | 500 |

으며, 발효조(높이: 124cm, 직경: 2.7cm, 샘플 배출구: 20cm, 높이 차로 5개)의 개요는 Fig. 1과 같다.

샘플배출구는 발효조 높이에 따라 20cm 간격, 30° 각도로 5개 설치하였고 배출관은 column 내부로 연장되며 내부액이 잘 통하도록 2φ 구멍을 4개 뚫었다. column 외부에는 일정온도 조절을 위하여 스테인레스강으로 된 jacket를 설치하였다. 충전물은 column 상, 하부 flange 사이에 다공판을 설치하여 이탈을 방지하였다.

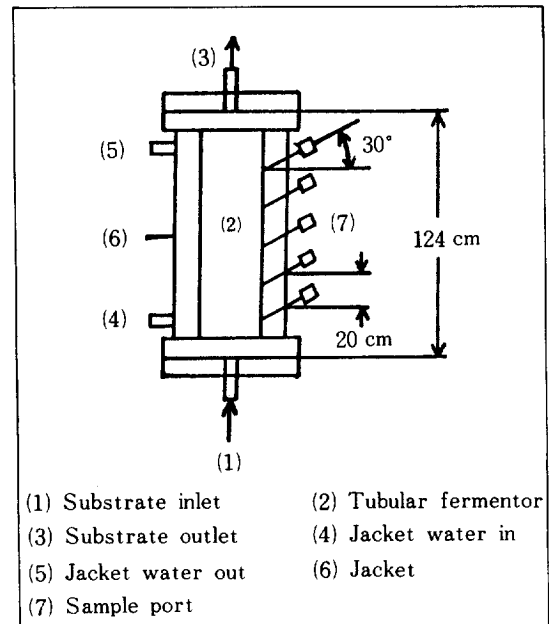


Fig. 1. Tubular fermentor.

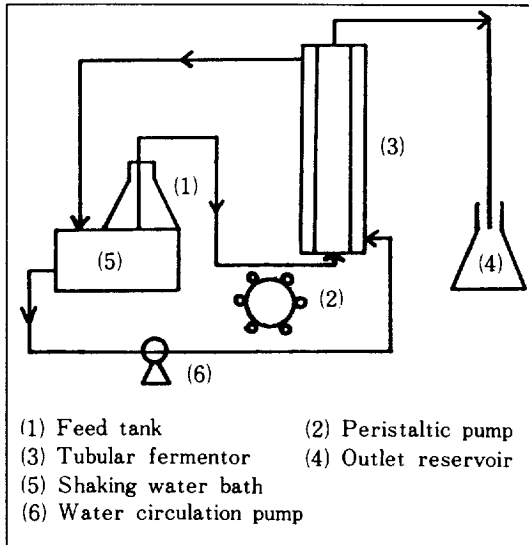


Fig. 2. Schematic diagram of experimental apparatus.

효모를 고정화하기 위한 불활성 충전물로는 다공성이며 hardwood인 red oak의 wood chip을 사용하였다. 3 가지 크기의 wood chip (2×3 , 2×5 , 3×5 mm)을 제작하여 고정화 실험에 사용하였으며, 발효 실험시에는 가장 높은 고정화율을 나타낸 2×3 mm, wood chip을 발효조에 충전하였다.

2-1-4. 분석방법

시료를 3 ml 취하여 원심분리 (4,000 r. p. m, 10분)시킨 후 상등액을 냉장고에 보관하였다.

포도당 농도는 DNS (dinitrosalicylic acid) 방법 [13]을 이용하여 분석하였으며 에탄올 농도는 Chromosorb 101 (60-80 mesh)로 충전된 가스 크로마토그래피 (Hitachi 163)를 사용하여 측정하였다 [14].

효모 농도는 spectrophotometer (Shimadzu UV-140-02)에 의해 660 nm에서 OD (optical density)를 측정하여 g dry Wt/l로 환산하였다 [15].

2-2. 실험 방법

2-2-1. 고정화 실험

관형 발효조에 wood chip을 상부에서 충전하고 효모 고정화전에 멸균된 증류수를 통과시켜 충분히 적게한 후 관형발효조 하부에서 drain된 물량을 측정하여 공간율을 계산하였다.

호기성 조건의 발효조 (New Brunswick Scientific

Co, M-19-071)에서 20시간 배양된 효모용액 1 l를 일정 유량속도로 wood chip이 충전된 멸균된 발효조를 통과, 고정화시켰다. 이 때 관형발효조와 효모용액은 고정화기간 동안 성장을 억제하기 위하여 $5 \sim 7^\circ\text{C}$ 로 유지하였다.

2-2-2. 연속발효 실험

발효실험시 2×3 mm wood chip을 column에 충전한 후 증류수를 통과시킨 뒤 관형발효조 내부를 에탄올로 멸균한 후 멸균된 증류수로 내부를 세척하였다.

세척후 호기성 조건에서 배양된 효모용액을 유량 300 ml/hr 로 통과시켜 효모를 고정화한 후 기질용액을 통과시켜 발효실험을 수행하였다. 발효조온도는 순환수를 발효조 자켓에 통과시켜 $(33 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 로 일정하게 유지하였고 발효실험에 사용된 장치는 Fig. 2에 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

관형반응기에서의 효모고정화 실험과 상기 발효조에서 발효를 수행한 결과를 다음과 같이 고찰하였다.

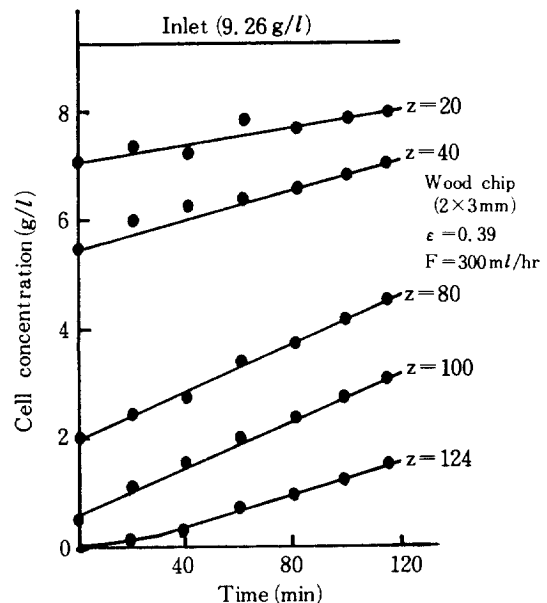


Fig. 3. The concentration profile of yeast in a column.

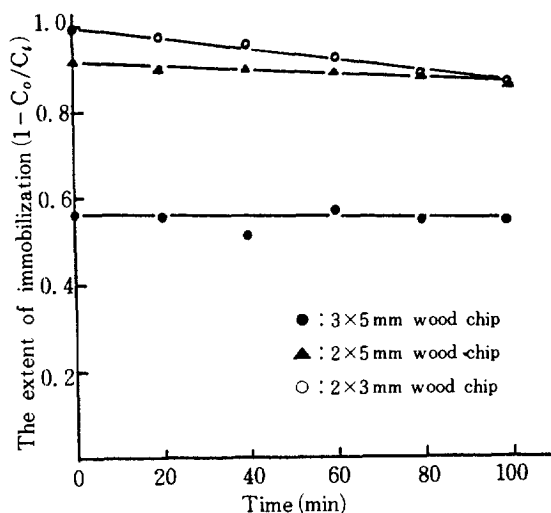


Fig. 4. The extent of immobilization depending the size of wood chips with time.

3 - 1. 고정화 실험

효모고정화 정도의 관찰은 관형발효조가 용액으로 채워진 후 20분간격으로 효모농도를 측정하여 행하였으며 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 효모농도는 관높이에 따라 감소하며 이는 효모용액이 관을 통과할 시 효모가 계속 고정화되는 것을 의미하며 고정화되는 정도는 시간이 따라 직선적으로 감소하는데 이는 고정화 가능한 공간이 시간이 경과함에 따라 계속 감소되어 나타내는 현상으로 생각된다.

3 - 1 - 1. Wood chip 크기의 영향

3 가지 다른 크기의 wood chip 을 충전하여 공간을 측정한 후 효모 용액을 300 ml/hr로 공급하여 고정화하며 관형발효조 출구에서 overflow 한 시점부터 고정화 정도를 측정한 결과를 Fig. 4에 도시하였다. 고정화 정도는 시간이 경과함에 따라 감소하고 평균고정화 정도는 wood chip의 크기에 따라 크게 차이가 나며, Table 2에서 나타난 바와 같이

Table 2. The average extent of immobilization.

| Wood chip size | Flow rate | Void volume fraction | The average extent of immobilization |
|----------------|-----------|----------------------|--------------------------------------|
| 3×5 mm | 300 ml/hr | 0.61 | 55 % |
| 2×5 mm | 300 ml/hr | 0.44 | 88 % |
| 2×3 mm | 300 ml/hr | 0.39 | 94 % |

Table 3. The retained cell amount.

| Wood chip size | Flow rate | The retained cell amount | The yeast concentration in the fermentor |
|----------------|-----------|--------------------------|--|
| 2×3 mm | 300 ml/hr | 8.70 g | 12.083 g/l |
| 2×3 mm | 150 ml/hr | 9.26 g | 12.861 g/l |

2×3 mm wood chip에 효모를 고정화할 시 평균 고정화율은 94%나 되었고 이 때 공간율은 0.39였다.

3 - 1 - 2. 효모용액 유량의 영향

고정화된 효모량에 대한 효모용액 유량의 영향을 검토하기 위해 효모용액을 150ml/hr로 감소시켜 고정화 실험한 결과를 Table 3에 실었다. 유량을 감소하여도 고정화된 효모량은 큰 차가 없었고 고정화된 후 관형 발효조 체적기준의 효모농도는 회분식 경우, stationary phase에서의 효모농도(9-12 g/l) [16] 보다 높은 농도를 유지하였다.

3 - 2. 연속발효 실험

효모용액을 통과시킨 뒤 관형발효조에 고정화된 효모량은 14.0g으로 발효조 체적기준의 효모농도는 19.44g/l였고 공간율은 0.39였다. 기질용액 발효에 따라 발효조 출구에서 측정한 포도당, 에탄올 및 효모농도의 시간에 따른 변화를 Fig. 5와 6에 표시하였으며 다음과 같은 특성을 나타내었다.

3 - 2 - 1. 관형발효조 특성

발효초기에는 10.69% (w/v) 포도당 용액을 71.3 ml/hr로 공급하였는데 첫번째 정상상태에 도달하는데 약 100 시간 소요되었다. t=128 시간에 공급액

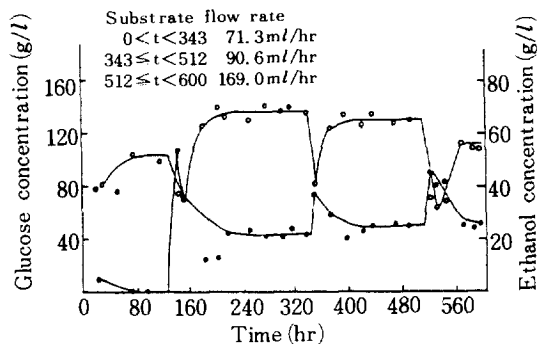


Fig. 5. Glucose and ethanol concentration profile at the outlet.

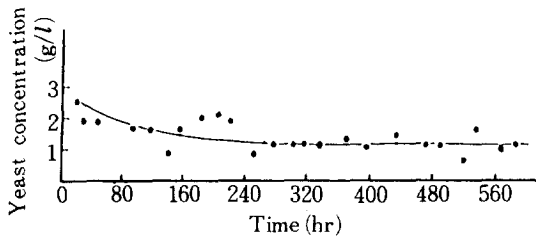


Fig. 6. Yeast concentration profile at the outlet.

을 18.69% (w/v) 포도당 용액으로 교체하여 공급하였는데 두번째 정상상태에 도달하는데 약 70시간정도 소요되었고 $t=343$ 시간에 기질용액유량을 90.6 ml/hr로 증대하여 세번째 정상상태에 도달하는데 약 70시간 필요하였다. $t=512$ 시간에 유량을 169.0 ml/hr로 증대하여 새로운 정상상태에 도달하는데 약 60시간 소요되었는데 상기와 같이 조건 변화시 새로운 정상상태에 도달하는 시간이 초기에 비하여 감소되는 것은, 발효조내 효모 농도의 증대등에 기인하는 것으로 판단된다. 정상상태에서 포도당과 에탄올의 발효조 높이에 따른 농도분포는 Fig. 7과 같다. 그림에서 에탄올이 발효조 하부에서 많이 생성되고 있는데 하부에는 에탄올 농도가 낮아 생성물

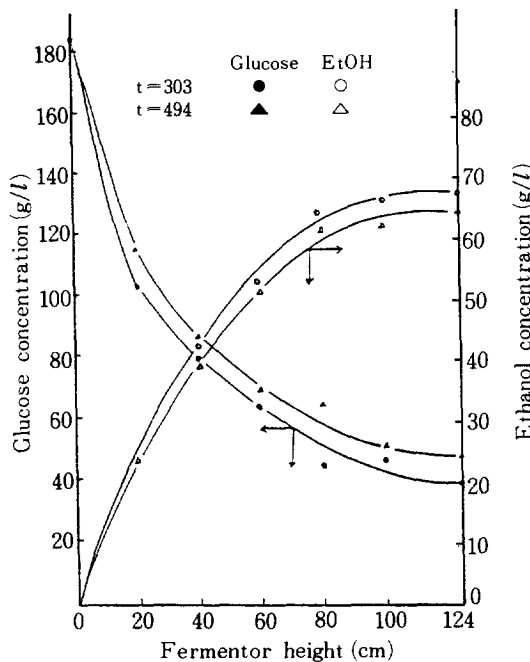


Fig. 7. Substrate and product profile versus column height.

억제작용이 감소되는 때문이라 생각된다.

3-2-3. 체류시간 영향

관형발효조 성능을 확인하기 위하여 체류시간에 따른 포도당과 에탄올 농도를 확인하였다.

18.7% (w/v) 포도당 용액을 유량속도 71.3 ml/hr로 공급한 두번째 정상상태에서 출구의 포도당 농도는 43.8 g/l 이고 에탄올농도는 68.3 g/l였다. 상기 포도당 용액을 유량속도 90.6 ml/hr로 공급한 세번째 정상상태에서 포도당 농도는 48.1 g/l 이고 에탄올농도는 64.8 g/l였다. 16.5% (w/v) 포도당 용액을 유량 169 ml/hr로 공급한 네번째 정상상태에서 출구의 포도당 농도는 49.8 g/l, 에탄올농도는 54.9 g/l였다.

유량을 증대하면 발효조 출구에서 에탄올 농도는 감소하나 에탄올 생산성은 에탄올 농도와 Dilution rate의 곱이어서 wash out 현상이 생기지 않는 범위내에서 증대한다. 발효조 공간체적 기준한 dilution rate 따른 에탄올 생산성을 Fig. 8에 나타내었으며, 최대에탄올 생산성은 dilution rate 1.84 hr^{-1} 경우 68.0 g ethanol/l · hr였다.

3-2-4. 에탄올 생산성

실험결과 *Saccharomyces formosensis*를 고정화한 관형발효조에서 에탄올생산성은 매우 높았다. 본 실험결과를 다른 형태의 발효조와 에탄올 생산성을 서로 비교한 결과를 Table 4에 수록하였다.

본 연구의 에탄올 생산성(전체체적 기준)은, 효모

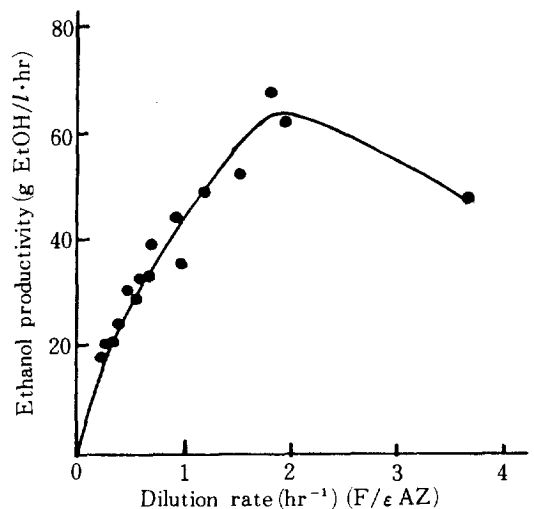


Fig. 8. Ethanol productivity versus dilution rate.

Table 4. Comparison of ethanol productivities.

| System | Dilution rate (hr^{-1}) based on | | Ethanol productivity ($\text{g/l} \cdot \text{hr}$) based on | | Steady-state ethanol concentration (g/l) | Reference |
|---|---|---------|--|---------|---|-----------|
| | Liquid V | Total V | Liquid V | Total V | | |
| CSTF | | 0.13 | | 4.1 | 38.0 | 17 |
| CSTF with cell recycle | | 0.3 | | 18.3 | 60.0 | 17 |
| Tower fermentor | | 0.196 | | 11.7 | 59.7 | 18 |
| Physical adsorption (wood chips) | 0.25 | 0.10 | 17.07 | 6.66 | 68.3 | This work |
| | 0.32 | 0.12 | 20.62 | 8.04 | 64.8 | This work |
| | 0.59 | 0.23 | 32.55 | 12.69 | 54.9 | This work |
| Physical adsorption (wood chips) | 0.36 | — | 21.8 | — | 60.6 | 7 |
| Physical adsorption (wood chips) | 0.28 | 0.10 | 21.2 | 7.42 | 76.0 | 9 |
| Immobilized cells (Carrier A) | 0.35 | — | 24.9 | — | 65.0 | 11 |
| Immobilized cells (Ca-alginate gels) | 0.50 | 0.16 | 29.9 | 9.57 | 59.7 | 19 |
| Immobilized cells (Gelatin crosslinked with glutaraldehyde) | 0.36 | 0.18 | 10.23 | 5.02 | 28.4 | 20 |

를 재순환하는 CSTF보다 낮으나, 효모를 원심분리하지 않아도 되므로 운전이 용이하고 장치가 간단한 장점을 가지며, Ca-Alginate gel과 raschig ring에 고정화된 발효조보다 높은 생산성을 나타내므로 wood chip을 충전한 관형발효조는 충분한 경제적 잇점을 갖는 것으로 고찰된다.

3-2-5. 에탄올과 Cell 수율

정상상태에서 소모된 포도당량과 생성된 에탄올량을 Fig. 9에 도시하였는데 에탄올 수율은 $0.475 \text{ g ethanol/g glucose}$ 였는데 회분식 경우의 $0.44-0.45$ 보다 높은 값을 나타내었으며, 이는 에탄올 생성이 회분식 경우보다 효율적으로 수행되는 것을 의미한다.

정상상태에서 관형발효조 출구에서 배출되는 효모량은 관형발효조내에서 생성되는 효모량과 같다는 전제하에, cell 수율은 출구에서 효모농도와 소모된 포도당량을 계산함으로써 구하여졌다.

유량속도 변화에도 불구하고 정상상태에서 관형발효조 출구의 효모농도는 거의 일정하였으며, Table 5에 cell 수율을 나타냈다.

고정화된 관형발효조에서 얻은 cell 수율은 회분식의 값($0.087-0.089$) [10]보다 매우 적은데 Moo-Young 등도 역시 고정화된 관형발효조에서 낮은 값($0.035-0.054$)를 얻었다[7].

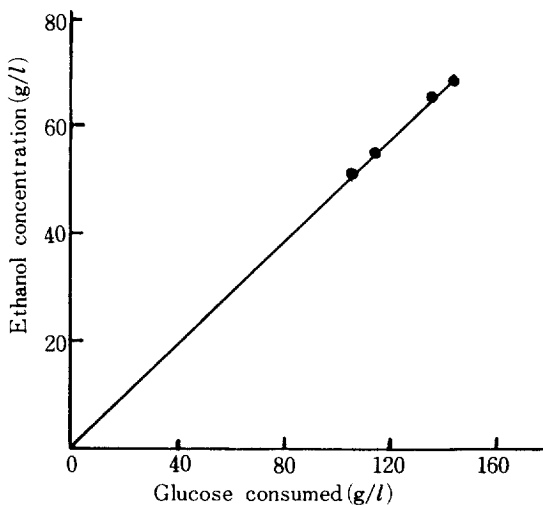


Fig. 9. Ethanol concentration versus glucose consumed.

Table 5. Cell yield at the fermentor exit.

| Feed flow rate (ml/hr) | Glucose consumed (g/l) | Cell concentration at the fermentor exit (g/l) | Cell yield |
|------------------------|------------------------|--|------------|
| 71.3 | 143.12 | 1.19 | 0.0070 |
| 90.6 | 137.13 | 1.19 | 0.0087 |
| 169.0 | 115.63 | 1.19 | 0.0103 |

Cell 수율은 기질용액 유량 증대와 함께 증대하는데 이는 공급액이 증대할수록 용존산소량이 증가되어 미치는 영향으로 판단된다.

3-2-6. 물질전달 영향

연속발효시 기질용액이 wood chip에 고정화된 효모에게 접근시 저항이 존재하면 에탄올 생성속도에 영향을 미친다. 만약 물질전달 저항이 존재할시 유량을 증대하면 전화율을 증가시킬 수 있는데 관형 발효조의 경우, 동일한 효모량으로 가정할때 체류 시간 일정한 경우 공급유량을 변경하여 전화율 변화 유무를 확인하여 물질전달 저항을 확인할 수 있다[21].

Table 6. Effect of liquid flow rate on glucose conversion.

| Liquid residence time (ϵ AZ/F) hr | Liquid flow rate (ml/hr) | Conversion (%) |
|---|--------------------------|----------------|
| 1.93 | 71.3 | 65.3 |
| 2.03 | 90.6 | 68.7 |
| 2.58 | 71.3 | 71.3 |
| 2.54 | 90.6 | 72.2 |
| 3.23 | 71.3 | 74.5 |
| 3.15 | 90.6 | 74.0 |

Table 6에서의 결과를 보면, 비슷한 체류 시간 경우 유량이 변하여도 전화율은 거의 일정한 것을 알 수 있으므로, wood chip을 사용한 관형발효조에는 물질전달 저항을 무시할 수 있음을 알 수 있다.

3-2-7. 운전 안정성

관형발효조를 이용하여 연속발효를 25일동안 수행하였으나 편류 및 오염현상은 발견되지 않았으며, 효모생존율은 methylene blue 염색법[22]으로 측정

한 결과 88-95%로 유지되었다.

4. 결 론

효모 *Saccharomyces formosensis* 용액 1l를 wood chip 충전한 발효조를 통과시켜 고정화실험을 한 결과, 2×3 mm wood chip 사용시 약 94%를 고정화할 수 있었다. Wood chip은 충전물로서 높은 고정화율을 나타내어 물리적 흡착을 위한 support로서 적절한 것으로 판단되었다.

관형발효조에서 발효실험을 수행한 결과 유량변화시 정상상태에 도달하는데 약 60-100 hr 소요되었고, 정상상태에서 에탄올 수율은 0.475로서 회분식 경우보다 높은 값을 나타냈다. 본 실험의 에탄올 생산성(발효조공간 체적기준)은 에탄올 농도 68.3-54.9 g/l 범위에서 17.1-32.6 g/l.hr를 나타내어 다른 고정화법에 의한 것보다 높았고, 효모를 재순환하는 CSTF보다는 약간 낮으나 CSTF보다 연속 운전이 용이하며 장치가 간단한 점 등의 장점을 가지고 있다.

관형발효조에서 기질용액이 wood chip에 고정화된 효모에 접근시 물질전달 저항은 무시할 정도였고, 25일동안 연속발효 운전시 오염현상이 나타나지 않았으며 안정적으로 운전되었다.

NOMENCLATURE

- A : Cross sectional area of fermentor (cm²)
 C_i : Inlet yeast concentration (g/l)
 C_o : Outlet yeast concentration (g/l)
 Z : Height above the base of fermentor (cm)
 ϵ : Void volume fraction

REFERENCES

1. Slessor, M. and Lewis, C. : "Biological Energy Resources," John Wiley & Sons, New York, 54 (1979).
2. Maiorella, B.L. and Wilke, C.R. : *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1421 (1978).
3. Petre, D. and Thomas, D. : *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 127 (1978).
4. Mattiasson, B. : *J. Appl. Biochem.*, **3**, 183

- (1981).
5. Freeman, A. and Aharonowitz, Y. : *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2747 (1981).
 6. Furusaki, S. and Fukumura, K. : *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2921 (1983).
 7. Robison, C.W., Moo-Young, M., and Lamprey, J. : Vth International Fermentation Symposium (London), 105 (1980).
 8. Sitton, O.C., Magruder, G.C., and Gaddy, J.L. : Vth International Fermentation Symposium (London), 231 (1980).
 9. Gencer, M.A. and Mutharasan, R. : *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2243 (1983).
 10. Tyagi, R.D. and Ghose, T.K. : *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 781 (1982).
 11. Ghose, T.K. and Bandyopadhyay, K.K. : *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1489 (1980).
 12. Cysewski, G.R. and Wilke, C.R. : *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125 (1977).
 13. Miller, G.L. : *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).
 14. Chung, I.J. and Park, Y.S. : *Hwahak Konghak*, **21**, 151 (1983).
 15. Furusaki, S. and Fukumura, K. : *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2921 (1983).
 16. Tyagi, R.D. and Ghose, T.K. : *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1907 (1980).
 17. Ghose, T.K. and Tyagi, R.D. : *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1387 (1979).
 18. Jones, S.T. and Korus, R.A. : *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 742 (1984).
 19. Williams, D. and Munecke, D.M. : *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1813 (1981).
 20. Sitton, O.C. and Gaddy, J.L. : *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 173 (1980).
 21. Levenspiel, O. : "Chemical Reaction Engineering," John Wiley & Sons, New York, 489 (1972).
 22. Lee, S.S. and Robinson, F.M. : *Biotechnol. Bioeng. Symp (Galtinburg)*, No. 11, 641 (1981).