

## Ethanol 연속발효시 온도와 pH 영향

서근학·홍용기\*·송승구\*\*

부산수산대학 응용화학과

\*부산수산대학 생물공학과

\*\*부산대학교 화학공학과

(1988년 10월 6일 접수, 1989년 1월 19일 접수)

## Effect of Temperature and pH for Continuous Fermentation of Ethanol

Kuen Hack Suh, Yong Ki Hong\*, and Seung Koo Song\*\*

Department of Applied Chemistry, National Fisheries University of Pusan

\*Department of Biological Science and Technology, National Fisheries University of Pusan

\*\*Department of Chemical Engineering, Pusan National University

(Received 6 October 1988; accepted 19 January 1989)

### 요 약

관형발효기에 효모 *Saccharomyces formosensis*를 고정화한 alginate gel을 충전하여 연속발효 실험을 수행하여 온도와 pH 변화에 따른 ethanol 생산성에 대한 영향을 검토하였다. 관형발효기의 최적 pH는 5 였으나 pH 변화에 따른 생산성 변화는 매우 완만하였다. 관형발효기의 최적온도는 33°C였으며, activation 에너지는 3 kcal/mol였다.

관형발효기에서 최대 ethanol 생산성은 ethanol 농도 48.7-53.6g/l 범위에서 69.1-76.1g EtOH/l·h 로서 매우 높아 본 고정화법에 의한 ethanol 생산이 매우 효과적인 것을 알 수 있었으며, ethanol 수율은 0.465g EtOH/l였다.

**Abstract**—*Saccharomyces formosensis* cells were immobilized in calcium alginate beads and used for a continuous production of ethanol. The immobilized yeast cells were examined in a packed-bed reactor operated under various temperature and pH. Ethanol production rate with the immobilized yeast showed a temperature optimum of 33°C and a broad range of optimum pH. Under the optimum conditions, ethanol productivity of 69.1-76.1 g EtOH/l·h could be obtained by using 12.4% (W/V) glucose as the substrate.

### 1. 서 론

Biomass를 화학제품 및 연료로 전환하는 bio-conversion 중에서 cellulose를 가수분해하여 당화 및 발효함으로써 ethanol을 생산하는 방법에 대한 연구가 미래의 에너지자원 부족을 해결할 방법의 중요한 몫을 차지할 것으로 판단된다[1, 2]. 전통적으로 ethanol 발

효공정은 회분식이어서 생산성이 낮기 때문에 효율적인 발효조 개발이 매우 중요하다. 최근에는 균체를 gel에 고정화시켜 발효하는 공정이 활발하게 연구되고 있다. 고정화 관형발효기에서는 고정화 방법에 따라 균체의 농도를 증가시킬 수 있으며, plug flow의 유동특성에 의하여 발효기 뒷부분에 생성물의 농도가 증가되므로, 생성물에 의한 억제작용의 영향을 감소시켜 ethanol

생산성을 증가시킬 수도 있다[3]. Ethanol 생산시 온도와 pH 조건은 미생물의 성장 및 신진대사 등에 큰 영향을 미치므로 상기 변수들은 최적조건의 제어를 위하여 매우 중요하다. Free cell을 이용한 ethanol 생산시 미생물의 성장과 생성물에 관한 온도와 pH 영향에 관한 연구[4-6]는 매우 활발하였으나, 고정화 관형발효기의 생산성에 대한 온도와 pH의 영향을 연구한 노력은 많지 않다[7, 8].

본 연구는 효모를 고정화한 bead를 충전한 관형발효기에서 온도와 pH의 변화에 따른 ethanol 생산성에 관한 영향을 연구하여 고정화 효모 관형발효기의 특성을 파악하고자 한다.

## 2. 실험

### 2-1. 사용 균주 및 기질용액

일산실업(부산시 문현동 소재)으로부터 분양받은 *Saccharomyces formosensis*를 배양하여 실험에 이용하였다. 효모배양 및 연속발효 실험시 기질용액은 Cysewski 등[9]이 사용한 조건과 동일하게 제조하여 사용하였으며, 그 조성을 Table 1에 나타내었다. Glucose와 영양분은 별도로 pH를 조절한 후에 121°C에서 20분간 멸균한 후에 냉각하여 혼합하였다.

### 2-2. 관형발효기

Stainless강으로 만든 관형발효기(직경: 2.5 cm, 높이: 25 cm)를 Fig. 1 형태로 제작하였으며, 관형발효기 working volume은 124 ml이며 고정화시킨 bead를 충전할 때 공간율은 0.3이었다.

관형발효기 외부에는 온도조절을 위하여 jacket를 설치하였고, 발효기 상, 하부 flange 사이에 screen을 설치하여 bead의 이탈을 방지하였다.

### 2-3. 고정화 방법

호기적 조건의 발효조(New Brunswick, M-19-071)에서 20시간 배양된 효모용액을 원심분리(4000

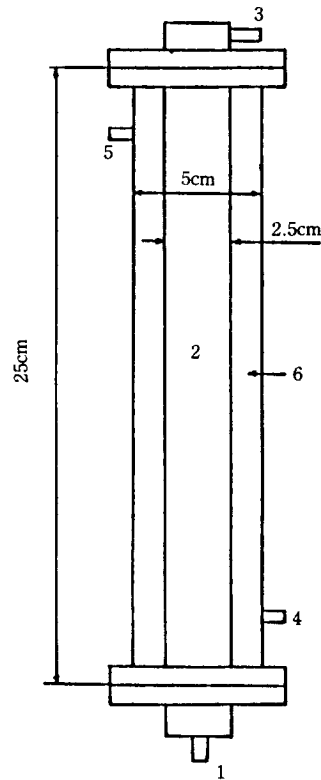


Fig. 1. Tubular fermentor.

- |                      |                     |
|----------------------|---------------------|
| 1. Substrate Inlet   | 4. Jacket Water In  |
| 2. Tubular Fermentor | 5. Jacket Water Out |
| 3. Substrate Outlet  | 6. Jacket           |

rpm, 15분)한 후 증류수를 가하여 제조한 100 ml 효모용액(12.8-15g dry wt./100 ml)과 3%(w/v) alginate 용액 100 ml를 혼합하여, 50 ml 주사기(Needle size; 20 G)를 이용하여 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  용액에 사출시켜 4-5°C에서 24시간 보관하여 gel을 제조하였다[10]. 초기에 고정화된 gel 내 효모량은 64.2-75.0g dry wt./l gel이며, gel의 평균직경은 약 3.0 mm였다.

### 2-4. 분석방법

관형발효기 배출구에서 시료를 5-6 ml 취하여 효모 농도를 분석하고, 원심분리(4000 rpm, 15분)시켜 상등액을 이용하여 포도당과 에탄올 농도를 분석하였다.

효모농도는 분광광도계를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 건조 균체량으로 환산하였다[11]. 포도당 농도는 DNS(3-5-dinitrosalicylic acid) 방법[12]을, 에탄올 농도는 효소법[13]을 이용하여 분석하였다.

Table 1. Medium composition (g/l)

Component	Cell Cultivation	Fermentation
Anhydrous Glucose	100.00	120.00
Yeast Extract	8.50	10.30
Ammonium Chloride	1.32	1.58
Magnesium Sulfate	0.11	0.13
Calcium Chloride	0.06	2.00

## 2-5. 실험방법

관형발효기에 고정화된 bead를 충전한 후에 12.4% (w/v) 포도당 용액을 51ml/h로 일정하게 공급하였다. 연속발효 실험중에는 jacket에 순환수를 통과시켜 관형발효기의 온도를 일정하게 유지하였으며, 연속발효 실험의 개괄적인 장치를 Fig. 2에 도시하였다. 시료는 관형발효기의 출구에서 정기적으로 취하여 포도당, 에탄올 및 효모농도를 분석하였다.

효모를 고정화시킨 관형발효기에서 pH에 따른 ethanol 생산성의 영향을 고찰하기 위한 고정화된 초기 효모농도는 52.4g dry wt./l fermentor였다. 관형발효기의 온도를 33°C로 일정하게 유지시키고, pH 4.8인 기질용액을 초기에 공급하였다. 관형발효기 출구에서 시료를 채취 및 분석하여 농도가 거의 일정한 값을 유지할 경우를 정상상태로 가정하고, pH 3인 기질용액을 공급하여 새로운 정상상태에서 ethanol, 포도당 및 효모농도를 확인하였다. 상기와 동일한 방법으로 pH 4, 5, 6, 7, 8에서 실험을 반복하였다. Ethanol 생산성에 대한 온도영향을 고찰한 경우의 고정화된 효모농도는 45.34g dry wt./l였다. 관형발효기에 공급한 기질용액의 pH는 4.8로 유지하고, 초기온도는 33°C로 하여 유출물을 분석하였다. 유출 농도가 일정한 정상상태를 확인하고 온도를 20, 25, 30, 33, 35, 40, 45°C로 변화시켜 상기 과정을 반복하여 새로운 정상상태에서 ethanol, 포도당 및 효모농도를 확인하였다.

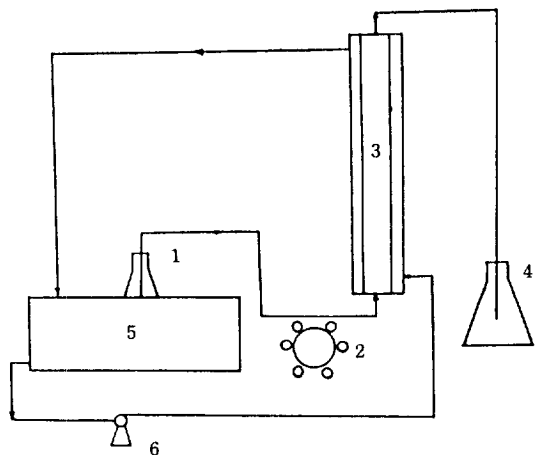


Fig. 2. Schematic diagram of experimental apparatus.

- |                      |                           |
|----------------------|---------------------------|
| 1. Feed Tank         | 5. Shaking Water-bath     |
| 2. Peristaltic Pump  | 6. Water Circulation Pump |
| 3. Tubular Fermentor |                           |
| 4. Outlet Reservoir  |                           |

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. pH 영향

Ethanol 발효 초기에는 pH 4.8인 12.4% (w/v) 포도당 용액을 관형발효기에 공급하였다. 시간이 경과함에 따라 ethanol 농도는 증대하고 포도당 농도는 감소하여, 5일 후에 ethanol, 포도당 및 효모농도는 거의 일정하게 유지되었다. 상기 현상은 alginate gel 내부의 효모성장과 효모유출 속도가 거의 평형이 된 상태를 의미한다[18, 20]. 평형상태 후에 pH를 변화하여 새로운 정상상태에 도달하는데 소요되는 시간은 1-2일이였다. pH 변화에 따른 정상상태에서 ethanol과 포도당 농도를 Fig. 3에 도시하였다. Fig. 3에 의하면 pH 5인 경우, ethanol 농도가 가장 높아서 최적 조건이라고 판단되나 pH 변화에 따른 ethanol 농도의 변화는 매우 완만하였다. 상기 결과는 free cell을 사용할 시의 ethanol 생성속도가 pH 변화에 예민하게 영향을 받는 사실과 매우 상이하다. 이러한 현상은 용매의 pH가 free cell에는 직접적인 영향을 미치는 반면에 고정화 cell에는 확산 등으로 그 영향이 감쇠되는 것으로 생각되며 Williams 등[6]의 free cell과 고정화 cell의 특성을 비교한 연구결과와 비슷하였다. 또한 Halwachs [14]는 고정화 chymotrypsin으로 D, L-phenylalanine의 가수분해 반응에서 고정화 gel 내의 세공 확산에 관한 저항을 발표한 바 있으며 위의 결과와 거의 일치하고 있다. pH가 5에서 ethanol 생산성(공간체적 기준)은 ethanol 농도 53.6g/l에서 76.1g EtOH/l·h였으며, 포도당 전화율은 92.0%이였다.

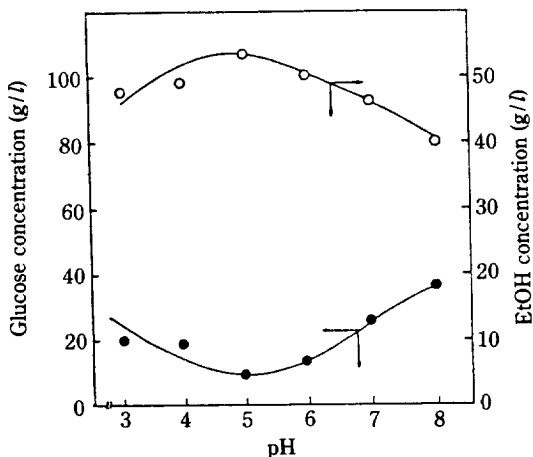


Fig. 3. Glucose and Ethanol concentration at various pH.

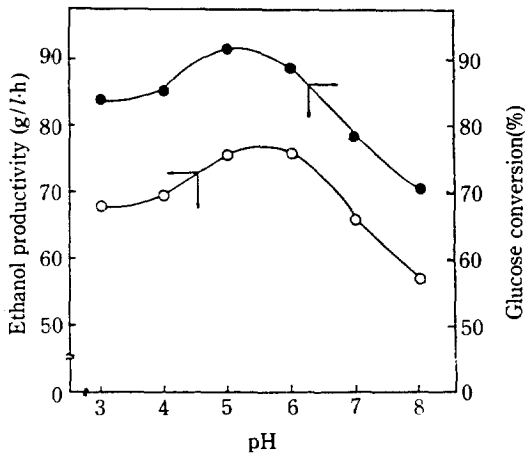


Fig. 4. Ethanol productivity and glucose conversion at various pH.

### 3-2. 온도영향

관형발효기에서 정상상태에 도달한 후, 온도를 변화시켜 새로운 정상상태에 도달하는데 1-2일 소요되었다. 온도변화에 따른 정상상태에서 ethanol과 포도당 농도를 Fig. 5에 도시하였다.

온도가 20°C에서 33°C로 상승함에 따라 정상상태의 ethanol 농도는 40.8에서 48.7g/l로 증대하였으나, 온도가 더 상승하여 45°C가 되었을 때 ethanol 농도는 매우 급격하게 12.0g/l로 감소하였다.

온도변화에 따른 ethanol 생산성, 포도당 전환율을 Fig. 6에 도시하였다.

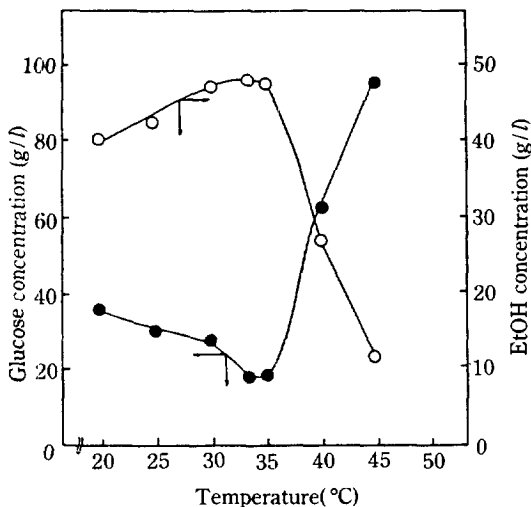


Fig. 5. Glucose and ethanol concentration at various temperature.

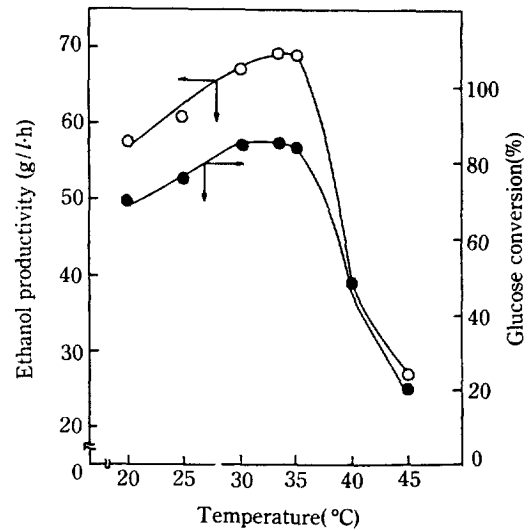


Fig. 6. Ethanol productivity and glucose conversion at various temperature.

Ethanol 생산성은 온도가 20°C에서 33°C로 상승함에 따라 57.9에서 68.6g/l·h로 증대하여 33°C에서 최대 ethanol 생산성을 얻었으나 온도가 계속 상승하여 45°C인 경우 ethanol 생산성은 17.0g/l·h로 급격히 감소되었다. 최적온도인 33°C에서 포도당 전환율은 85.2%였다.

Ethanol 발효속도에 대한 온도의 영향을 Arrhenius 식을 이용하여 activation 에너지를 Fig. 7에서 구한 결과 3kcal/mol임을 알 수 있었다.

Free cell을 이용한 Ethanol 발효의 activation 에너지는 9kcal/mol[9]로 보고되었으므로, 고정화 관형 발효기의 20-30°C 온도범위에서의 activation 에너지는 free cell에 비하여 매우 적고, 35°C 이상에서는 27

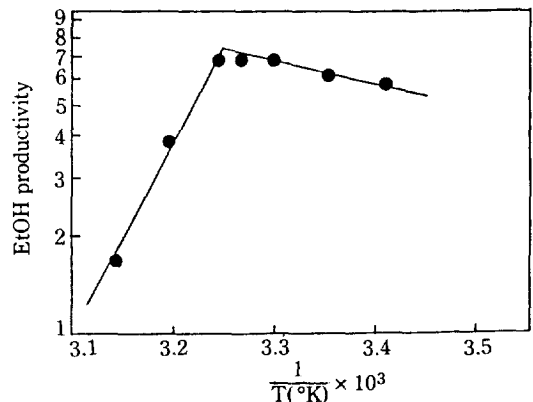


Fig. 7. Arrhenius type plot.

**Table 2. Comparison of ethanol productivities**

System	Dilution rate(h <sup>-1</sup> ) based on		EtOH productivity Steady state (q/l/h) based on EtOH			Ref.
	Liquid V.	Total V.	Liquid V.	Total V.	conc. (g/l)	
CSTF		0.13		4.1	38.0	15
CSTF with cell recycle		0.30		18.3	60.0	15
Tower Fermentor		0.196		11.7	59.7	16
Immobilized Cells						
Ca-alginate	1.42	0.43	69.1	20.7	48.7	This work
	1.42	0.43	76.1	22.8	53.6	This work
Ca-alginate	0.50	0.16	29.9	9.6	59.7	6
Ca-alginate	2.0	0.62	97.2	30.1	48.6	17
Wood chip	0.32	0.12	20.6	8.0	64.8	18
Wood chip	0.59	0.23	32.6	12.7	54.9	3

kcal/mol의 높은 값을 나타내므로 온도의 영향은 매우 큰 것으로 사료되었다. 이러한 현상은 온도가 상승함에 따라 ethanol 생성을 저해하는 작용이 증대하는 것으로 판단된다. 상기 실험으로부터 관형발효기는 회분식 발효조에 비하여 고온 운전시 정확한 온도조절이 필요한 것으로 사료된다.

### 3-3. Ethanol 생산성

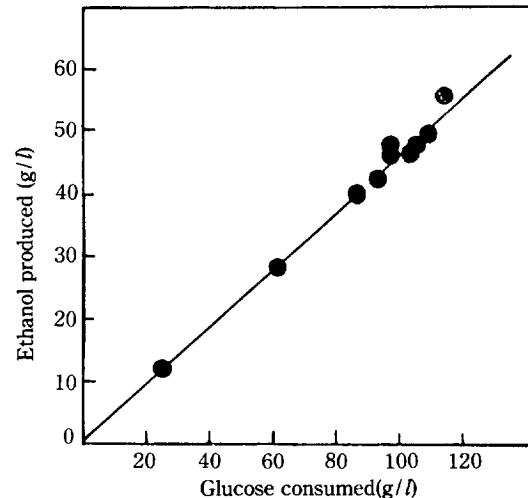
관형발효기에서 연속발효 실험시 최대 ethanol 생산성은 dilution rate가 1.4/h에서 정상상태 ethanol 농도가 48.7-53.6g/l·h일 때 얻을 수 있었다. 본 실험결과를 다른 형태의 발효기와 ethanol 생산성을 서로 비교하여 Table 2에 수록하였다.

본 연구의 ethanol 생산성(전체 체적기준으로 환산한 값)은 효모를 재순환하는 CSTF(Continuous Stirred Tank Fermentor)와 비슷하나 효모를 분리하기 위한 별도의 장치가 불필요하고 운전이 용이한 장점을 지니므로 고정화 균체를 이용한 관형발효기의 운전은 ethanol 생산성을 기준으로 매우 우수한 방법으로 사료된다.

### 3-4. Ethanol 수율 및 cell 수율

정상상태에서 소모된 포도당과 생성된 ethanol을 Fig. 8에 도시하여 ethanol 수율 0.465g EtOH/g glucose를 구하였다. 상기 ethanol 수율값은 회분식 경우의 0.44-0.45[4]보다 높는데, 이는 관형발효기에서 ethanol 생성이 효과적으로 진행되는 것을 의미한다.

정상상태에서 관형발효기 출구에서 배출되는 효모량

**Fig. 8. Ethanol produced versus glucose consumed.****Table 3. Cell yield**

Consumed Glucose(g/l)	Cell concentration (g/l)	Cell yield (g cell/g glucose)
114.0	0.56	0.0049
105.6	0.60	0.0057

은 생성된 효모량과 동일하다는 가정하에 cell 수율을 관형발효기 출구에서 효모농도와 소모된 포도당농도를 이용하여 Table 3에 나타내었다. 관형발효기에서 얻은 cell 수율값, 0.0049-0.0057은 회분식 발효시 얻은 값 0.087-0.089[4]보다 매우 낮는데, Gencer[3] 등도

관형발효기에서 낮은 효모수율값 0.01-0.018을 얻었다.

#### 4. 결 론

관형발효기에 효모 *Saccharomyces formosensis*를 고정화한 alginate gel을 충전하여 연속발효 실험을 수행하여 온도와 pH 변화에 따른 ethanol 생산성에 대한 영향을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 관형발효기의 최적 pH는 5였으나 pH 변화에 따른 생산성 변화는 매우 완만하였다. 관형발효기의 최적 온도는 33°C였으며, activation 에너지는 3 kcal/mol 였다.

2. 관형발효기에서 최대 ethanol 생산성은 ethanol 농도 48.7-53.6g/l 범위에서 69.1-76.1g EtOH/l·h로서 매우 높아 본 고정화법에 의한 ethanol 생산이 매우 효과적인 것을 알 수 있었으며, ethanol 수율은 0.465g EtOH/l였다.

#### 감 사

본 연구는 1987년도 한국과학재단의 연구비로 수행되었으며 이에 깊은 감사를 표하는 바입니다.

#### REFERENCES

1. Slessor, M. and Lewis, C.: Biological Resources, 1st ed. (New York: John Wiley & Sons, 1979), 54.
2. Kosaric, D. and Russel, I.: Advances in Microbiology, Academic Press, Vol. 26, 147 (1980).
3. Gencer, M.A. and Mutharasan, R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2243 (1983).
4. Krouwel, P.G. and Braber, L.: *Biotechnol. Lett.*, **1**, 403 (1979).
5. Lee, K.J. and Rogers, P.L.: *Biotechnol. Lett.*, **3**, 291 (1981).
6. Williams, D. and Munnecke, D.M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1823 (1981).
7. Kim, B.G. and Choi, C.Y.: *Kor. J. Chem. Eng.*, **1**, 13 (1984).
8. Bajpai, P.K. and Margaritis, A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 824 (1986).
9. Cysewski, G.R. and Wilke, C.R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125 (1977).
10. Mattiason, B.: Immobilized Cells and Organells, 1st ed. Cleveland: CRC, 14, 1983.
11. Frusaki, S., Seki, M., and Fukumura, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2921 (1983).
12. Forouhi, E. and Gunn, D.J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1905 (1983).
13. Sigma diagnostics (No. 332-UV).
14. Halwachs, W., Wandrey, C., and Schugerl, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 541 (1978).
15. Ghose, T.K. and Tygai, R.D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1401 (1979).
16. Jones, S.T., Korus, R.A., and Heimsch, R.C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 742 (1984).
17. Nagashima, M., Azuma, M., Noguchi, S., Inuzuka, K., and Samejima, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 992 (1984).
18. Suh, K.H. and Song, S.K.: *Hwahak Konghak*, **24**, 247 (1986).
19. Tyagi, R.D. and Ghose, T.K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1907 (1980).
20. Suh, K.H., Choi, M.H., and Song, S.K.: *Korean J. of Appl. Microbiology and Bioengineering*, **16**(3), 205 (1988).