

고농도 효모 농축법에 의한 삼상탑형 발효조에서의 에탄올 발효

김우식 · 유인상*

연세대학교 공과대학 화학공학과

*경원대학교 이공대학 화학공학과

(1989년 4월 4일 접수, 1989년 6월 15일 채택)

Ethanol Fermentation in a Three Phase Tower Fermenter with Highly Concentrated Yeast Cells

Woo-Sik Kim and In-Sang Yoo*

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

*Department of Chemical Engineering, College of Science and Engineering, Kyungwon University

(Received 4 April 1989; accepted 15 June 1989)

요 약

에탄올 생산성을 높이기 위하여 균체를 두 가지 방법으로 고정화시켜 삼상탑형 발효조에 적용하였다. 고정화 방법으로는 효모 자체 플럭의 빠른 침강에 의한 균체 재순환 농축법과 Ca-alginate 구형 겔 내부에 효모를 포괄하여 농축시키는 방법을 사용하였으며, 혐기 및 준호기 조건에서 에탄올 발효 특성 규명과 이때의 최적 생성조건을 구하였다.

삼상탑형 발효조에서 균체 재순환 농축법을 이용할 경우 혐기 조건에서 D_i (dilution rate)를 0.2 hr^{-1} 로 하여 200 g/l 의 글루코오스를 발효시켰을 때 최대 생성 수율인 96% (98 g/l)의 에탄올을 얻었으며, 또한 D_i 가 0.6 hr^{-1} 일 때 에탄올 최대 생산성은 $36 \text{ g/l} \cdot \text{hr}$ 였다. 한편 $\text{DO}=0.1 \text{ ppm}$ 의 준호기 조건에서 고정화 효모 겔을 이용한 에탄올 발효시 D_i 를 0.2 hr^{-1} 로 하여 125 g/l 의 글루코오스를 발효시켰을 때 최대 생성 수율인 84.7% (54 g/l)의 에탄올을 얻을 수 있었고, D_i 가 2.0 hr^{-1} 일 때 에탄올 최대 생산성은 $46 \text{ g/l} \cdot \text{hr}$ 였다.

Abstract— Two methods for increasing cell concentration in a fermenter were evaluated in terms of ethanol productivity; cell recycling with settling of yeast flocs and immobilization of yeast cells in Ca-alginate gels. A three phase tower fermenter was designed and used through this study. Under aerobic and anaerobic conditions, the characteristics of ethanol fermentation process were investigated for each of the methods.

It was found that the maximum dry cell concentration in the three phase tower fermenter with floc recycle system was 86 g/l . The maximum ethanol yield (96.1%) was obtained at $D_i=0.2 \text{ hr}^{-1}$ under anaerobic condition. The maximum ethanol productivity in this system was 36 g/hr/l at $D_i=0.6 \text{ hr}^{-1}$.

On the other hand, the fermentation using the Ca-alginate immobilized yeast cell was found to be possible at relatively high dilution rates ($0.1-0.2 \text{ hr}^{-1}$) in the three phase tower fermenter. The maximum ethanol yield in this system was 84.7% at $D_i=0.2 \text{ hr}^{-1}$ under aerobic condition. The maximum ethanol productivity of 46 g/hr/l was obtained at $D_i=2.0 \text{ hr}^{-1}$.

1. 서 론

균체를 이용한 에탄올의 발효 반응시 경제성을 고려한 주요 설계인자로는 균체의 생물학적 특성과 반응속도에 따른 반응기의 형태를 들 수 있는데, 최근에는 생물반응기에서 전통적으로 사용해 오던 회분 발효조 및 연속 흐름 발효조를 보완하여 균체를 고농도로 농축시켜 발효 효율을 증대시키고, 발효 공정을 정확히 제어할 수 있는 새로운 생물반응기의 설계가 시도되고 있다[1-3]. 이들 가운데 특히 탑형 발효조와 고정층 발효조가 관심의 대상이 되고 있는 바[4-6] 고정층 발효조는 기존의 어느 발효조보다 단위 부피당 생산성은 좋으나, pH 조절이 곤란하여 반응시간에 따라 생산성이 감소되고, CO₂가스의 생성으로 반응기 내부에서의 편기현상(channelling) 때문에 전환율이 일정치 않으며, 고정화에 따른 외부 물질전달저항이 비교적 크고, 균주 생존에 필요한 산소 부족으로 균체가 사멸되어 장시간 조업시 생산성이 급격히 감소되는 단점이 있다[7].

그러나 탑형 발효조의 경우는 반응 초기에 고정층 발효조보다 단위 부피당 생산성은 작으나[8], 일정한 수율로서 오랜 기간 동안 연속 반응이 가능하고 교반장치가 별도로 필요없어 동력비를 절감할 수 있으며, 특히 고정화 효모를 사용하였을 경우 삼상탑형 발효조에서는 교반에 의한 고정화 효모의 손괴가 없어 상당히 안정하게 조업할 수 있다[9, 10]. 뿐만 아니라 일정량의 공기의 효과적인 주입으로 균체의 사멸을 최대한으로 억제할 수 있고, 상간의 열 및 물질전달 효과가 좋으며, 비교적 고농도 균체 상태로 반응시킬 수 있으므로 반응기 부피를 어느 정도 줄일 수 있어 호기성 발효공정을 중심으로 자체 응집 능력이 큰 균주에 대하여 성공적으로 연구되고 있다. 최근에는 유립을 중심으로 식초 및 에탄올의 발효와 폐수처리분야에 삼상탑형 발효조가 적용되어 이에 대한 연구가 활발히 진행되기 시작하였는데 특히 발효조 내부의 균체를 고농도로 농축시킬 수 있는 방법에 중점을 두어 연구하고 있다[11-13].

본 연구는 높은 자체 응집 능력을 갖고, 플러를 비교적 크게 형성하는 기저 효모인 *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602를 균주로 글루코오스를 발효시켜 에탄올을 생성하는 연구로서, 균체를 고농도로 농축시키고, 균체의 사멸을 방지하여 에탄올 생산성을 높이기 위한 방법으로 삼상탑형 발효조를 사용하여 균체를 두 가지 방법으로 고정화시켰는데, 효모 자체 플러의 빠른 침강에 의한 균체 재순환 농축법과 Ca-alginate 겔 내부에 효모를 포괄하여 농축시키는 고정화법으로

협기 및 준호기 조건에서 에탄올 발효의 최적 조작조건을 구하였으며, 다른 실험자들의 농축방법과 비교하여 본 발효조의 생산성을 나타내고자 하였다.

2. 실 험

2-1. 실험재료 및 균주

본 실험에서 사용한 기질로는 상업용 글루코오스를 사용하였으며, 발효 균주로는 *S. uvarum* ATCC 26602를 사용하였다. 균주의 활성을 유지하기 위하여 2주일에 한번씩 사면 배지에서 교대배양하였다.

2-2. 삼상탑형 발효조에서의 에탄올 생성실험

Fig. 1과 같은 발효장치에서, 반응기 외부에 항온 자켓을 설치하여 온도 조절을 하였으며 균체의 재순환을 위해 침전조를 반응기 외부(탑 하부로부터 80cm 지점)에 설치하였고 반응기 하부로부터 공기와 질소의 혼합기체가 분산되면서 유입할 수 있도록 분산판을 설치

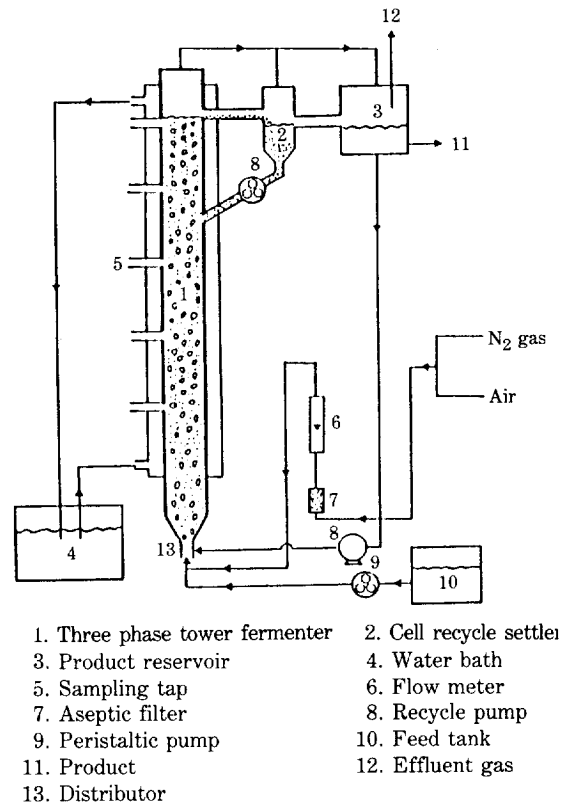


Fig. 1. Three phase tower fermenter for ethanol fermentation.

Table 1. Characteristics and reaction conditions of three phase tower fermenter

Content	Condition
Reactor height	120 cm
diameter	5.0 cm
volume	20l
Air flow rate	0.25l/min (0.125 vvm)
Dilution rate	0.1 - 0.7 hr ⁻¹ , 0.1 - 2.0 hr ⁻¹
Inlet pH	5.0
Reaction temperature	33°C
Inlet glucose concentration	100-200g/l

하였다.

또한 반응기의 높이 방향으로 20 cm 간격의 샘플 채취 탭을 만들어 샘플을 채취하였다. 반응기의 멸균은 75% 에탄올 용액으로 1시간 가량 해주었으며, 샘플 채취 탭에 이중 쿼크를 설치하여 가능한 한 타균으로부터의 오염을 방지하였다. 본 반응기의 제 특성을 Table 1에 나타내었다.

S. uvarum ATCC 26602를 사면배지로부터 culture로 단계적으로 옮긴 후 100 ml의 중균 배양을 반응기에 투입한 후, 기질용액(30g/l 글루코오스)의 유속을 300 ml/hr로 일정하게 유지하고, 공기의 유속을 0.25l/min로 하여 약 10일간 발효시켜 균주를 성장시킨 후, 기질의 농도를 100g/l로 하여 5일간, 200g/l로 하여 5일간 더 반응시켰다. 이와 같은 호기 조건에서 반응기 안의 균체량은 약 85g/l(건조 균체량 기준)로 일정하게 유지되어 정상상태를 유지하였다.

정상상태의 확인은 6시간 간격으로 각 샘플 탭에서 샘플을 채취하여 균체량의 변화와 에탄올 농도 변화가 더이상 없는 상태로 하였다. 본 실험에서 반응액의 DO를 원하는 조건으로 일정하게 유지하기 위하여 공기와 질소를 적절한 비율로 혼합시키면서 DO를 조절하였으며, 이 조건에서 dilution rate, 기질농도 및 반응 pH를 변화시키면서 실험하였다. DO는 용존산소 측정장치(Beckman, Model 39557)를 사용하여 측정방향을 발효조 내부의 중간부분에 산소전극을 삽입시켜 측정하였다.

혐기 조건에서의 실험은 DO가 0.1 ppm인 준호기 조건의 실험을 완료한 후 행하였으며, 전 실험을 통하여 글루코오스를 제외한 나머지 성분의 조성은 회분 실험시와 동일하며, 글루코오스 농도가 증가함에 따라 같은 비율로 증가시키면서 기질 용액을 조제하였다.

또한 Ca-alginate 고정화 효모-겔을 이용한 삼상탑

형 발효조에서는 반응온도가 33°C, pH가 3-7 및 DO가 0.1 ppm인 조건에서, 기질농도가 가장 낮고, 유속이 큰 상태에서부터 기질농도가 가장 높고, 유속이 낮은 상태로 변화시키면서 각각의 의사 정상상태가 이루어질 때까지 발효시킨 후, 에탄올 농도 및 잔여 기질 농도를 샘플 탭으로부터 채취하여 측정하였다. 제조한 고정화 효모 겔 비이드의 평균 지름은 3 mm였으며 유[14]의 실험방법으로 제조하였다.

2-3. 기질 및 생성물 분석

기질로 사용한 글루코오스의 정량은 DNS(dinitrosalicylic acid) 발색법으로 UV-spectrophotometer(Shimadzu, Model 200S)로 측정하였다[15]. 또한 확인 분석으로는 HPLC(Waters, Model 244)를 사용하였으며, 발효실험으로부터 생성되는 에탄올은 gas chromatography(Shimadzu, Model G.C-7A)로 측정하였다.

2-4. 균체량 및 생균 측정

샘플 탭으로부터 채취한 균체량은 건조 균체량으로서, 초고속 원심분리기에서 8000 rpm으로 20분간 원심분리시킨 후 중류수로 세척하여 다시 원심분리시키고, 여과 셀과 함께 항온 건조기에서 90°C, 24시간 건조 평량하였다. 이와 병행하여 용액 중의 소량의 균체는 UV-spectrophotometer(Shimadzu, Model 200S)로 620 nm에서 O.D.를 측정하여 검량 곡선으로부터 건조 중량을 환산하였다. 또한 겔 내의 균체량은 포화 sodium tripolyphosphate 용액(100 mg/ml)으로 녹인 후 이를 원심분리하여 건조한 후 건조 질량으로 나타내었다. 한편 자유 균체 및 겔 비이드 내의 균체 사멸 정도는 변형된 methylene blue 염색법으로 측정하였다[16].

3. 결과 및 고찰

삼상탑형 발효조에서 에탄올 생성 실험에서는 플럭스 상태의 효모 및 Ca-alginate 겔에 포괄시킨 효모를 이용하여 두 가지 경우에 대해 반응 pH, dilution rate 및 탭 높이에 대한 영향을 실험하였는 바, 실험결과들은 다음과 같다.

3-1. 반응 pH에 따른 에탄올 생성

100g/l의 글루코오스 용액을 dilution rate 0.1 hr⁻¹, 혐기 및 예비실험결과 최적의 생성조건을 갖는

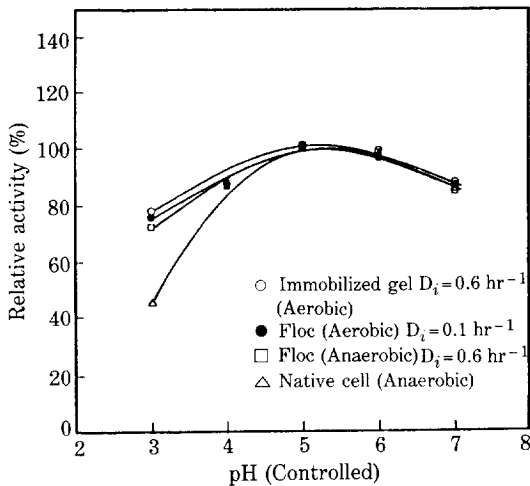


Fig. 2. Effect of pH on ethanol fermentation at various conditions.

용존산소농도 0.1 ppm 인 준호기 조건에서 반응기 용액의 pH를 변화시키면서 실험한 결과를 Fig. 2에 내었는 바, pH 5의 값을 상대활성으로서 1로 하였다. 그림에서 보는 바와 같이 플러 상태의 효모, Ca-alginate 겔 고정화 효모 및 회분 실험의 자유 균체 효모의 경우 pH 변화에 대한 상대활성은 거의 비슷한 경향을 나타내었는 바, pH 5.0에서 가장 높은 값을 가졌으며, 낮은 pH에서 에탄올 생성이 현격하게 줄어드는데, 이는 효모의 대사경로에서 생성억제작용을 받는 것으로 사료되며 낮은 pH에서 Ca-alginate 겔보다 플러 효모가 더욱 감소하는 데 이는 pH가 감소함에 따라 효모가 응집되지 못함으로써 반응기밖으로 씻겨 나가게 되기 때문으로 사료된다.

3-2. Dilution rate에 따른 에탄올 생성

혐기 조건의 자체 응집 플러인 경우 Fig. 3에서 보는 바와 같이 dilution rate가 0.2 hr^{-1} 까지는 초기 기질 농도의 변화에 대한 에탄올의 생성량에 변화가 적으나, 그 후 점차로 변화하여 0.6 hr^{-1} 이후에는 급격히 감소하는 경향을 보이는 데, 이러한 급격한 감소는 Fig. 1의 침전장치에서 균주의 재순환 속도의 한정으로 균주가 씻겨나가 반응기 외부로 유출되어 전체적인 반응속도가 감소하는 것으로 해석할 수 있다.

본 실험의 결과를 다른 연구자들[17, 18]의 실험결과와 비교하여 Fig. 4a에 나타내었는 바, 본 실험에서 dilution rate가 0.2 hr^{-1} 인 경우 글루코오스 농도가 200 g/l 일 때 에탄올 수율이 이론값의 97.1%인 98 g/l

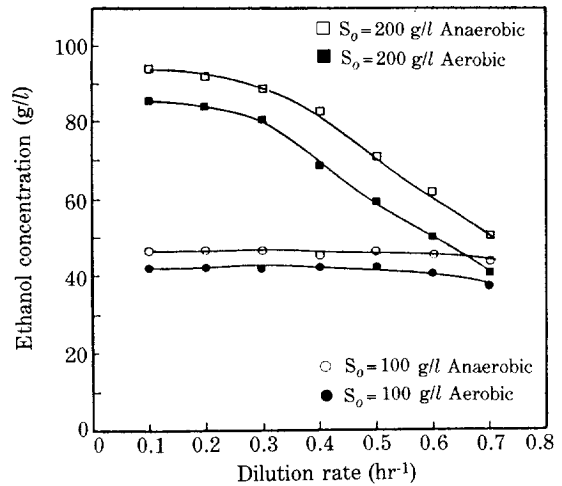


Fig. 3. Effect of dilution rate on ethanol production in floc recycle system.

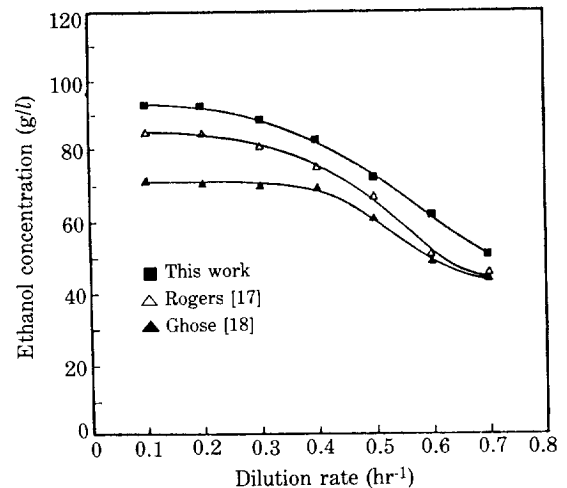


Fig. 4(a). Comparison of ethanol concentration according to dilution rate between data available and this work

의 에탄올을 생성하였는 데 다른 연구자들의 결과보다 약 10% 이상 더 좋은 결과를 나타내었다. 이런 결과는 Tyagi 등[17]이 사용한 발효조가 고정화 효모를 이용한 고정층 연속 발효조로서 약 $0.132 \text{ g Cells/g carrier}$ 의 균체를 농축시켰으며, Roger 등[18]은 재순환이 있는 연속교반 발효조로서 $50\text{--}70 \text{ g/l}$ 의 균체를 농축시켰는 바, 실험장치의 구조적 면에서 본 실험장치가 약 10-15% 정도 더 많은 균체를 유지할 수 있고 균체가 사멸되지 않고 살아있는 채로 발효에 참여할 수 있는 데 기인하는 것으로 사료된다.

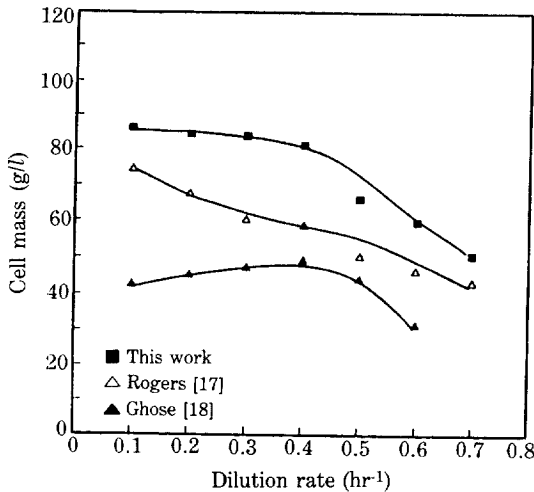


Fig. 4(b). Comparison of yeast cell mass according to dilution rate between data available and this work.

Fig. 4b에서 보는 바와 같이 본 반응기에서 농축할 수 있는 균체의 최대량은 86g/l(건조 균체량 기준)로서 상당히 큰 값을 나타내었으며, dilution rate가 0.4 hr⁻¹일 때까지는 반응기 외부로의 씻김 현상이 일어나지 않았다.

한편 DO를 0.1 ppm으로 일정하게 유지하고 실험한 경우, 혐기 조건에서의 실험결과보다 전반적으로 에탄올 생성량이 10% 정도 감소하여, 수율면에서 약간 떨어짐을 알 수 있었다.

그러나 단기간의 조작이 아닌 장기간 반응시켰을 경우 Fig. 5에서 보는 바와 같이 혐기 조건인 경우 약 21일이 지나면 cell viability가 급격히 감소하여 약 60%를 유지하는 반면 DO를 0.1 ppm으로 유지하였을 경우에는 95% 이상의 균체가 살아 있으므로 에탄올 생성량은 약 20% 이상 더 좋은 결과를 보임을 알 수 있었다. 따라서 완전 혐기 상태보다는 균체가 생존할 수 있는 어느 정도의 DO가 유지되어야 함을 알 수 있다.

자체 응집 플러크 효모의 경우 dilution rate가 0.6 hr⁻¹ 이상인 경우 균체의 재순환 능력이 떨어져 균체의 씻김으로 인하여 생성량이 급격히 감소하였으나 Ca-alginate 겔에 포괄시킨 효모의 경우 dilution rate가 커져도 균체의 씻김 현상을 막을 수 있으므로 상대적으로 높은 에탄올 생성량을 얻을 수 있었다. 이 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Ca-alginate 겔에 포괄시킨 효모의 경우 125g/l의 글루코오스 용액을 dilution rate가 1.0 hr⁻¹이고, DO=0.1 ppm으로 유지하여 반응시켰을 때 약 35g/l의 에탄올을 생성하였다.

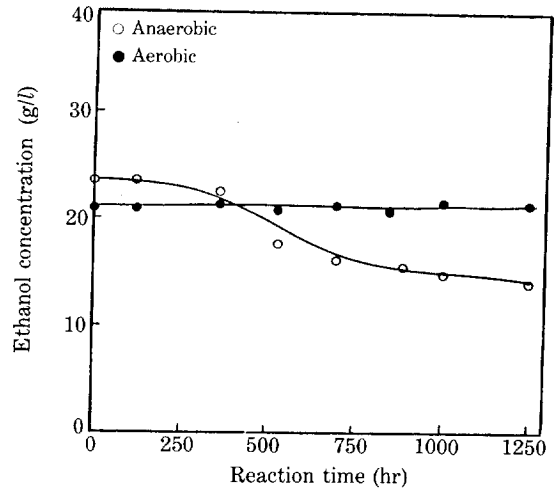


Fig. 5. Variation of ethanol concentration with fermentation time under anaerobic and aerobic conditions.

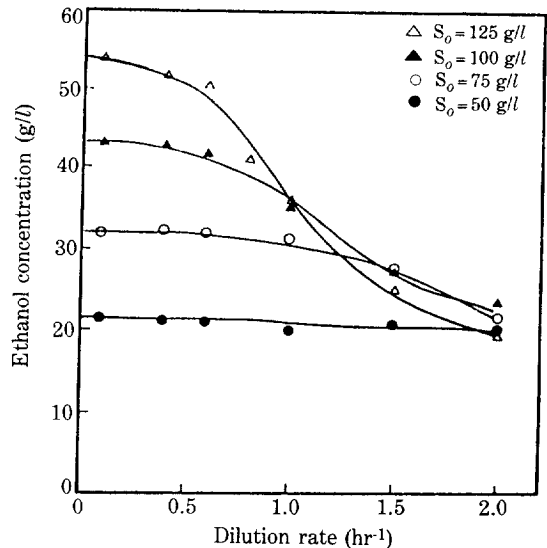


Fig. 6. Pseudo steady state continuous fermentation data for immobilized gel system.

3-3. Dilution rate 변화에 따른 생산성

3-2절의 실험결과를 생산성으로 나타내면 Fig. 7과 같다. 생산성은 단위 시간당 단위 반응기 체적당 생성되는 에탄올량으로 규정하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 dilution rate가 증가할수록 생산성은 점차적으로 증가하다 최대값을 가지며 그 후 감소하는 것을 볼 수 있는데, Fig. 8과 같이 플러크 효모의 경우 dilution rate가 0.6 hr⁻¹에서 최대값 36g/l·hr를 가졌으며,

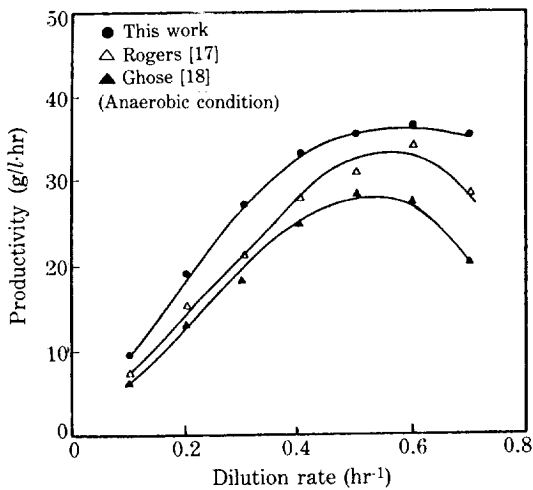


Fig. 7. Ethanol productivity with dilution rate at floc recycle system (anaerobic condition).

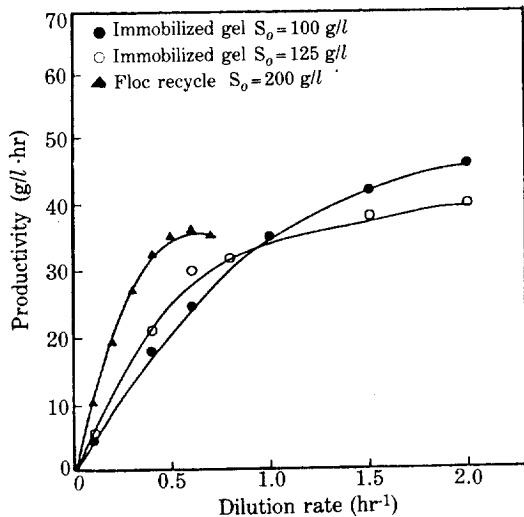


Fig. 8. Ethanol productivity vs. dilution rate (aerobic condition).

Ca-alginate 고정화 효모인 경우 dilution rate가 2.0 hr⁻¹일 때 최대값 46g/l·hr을 나타내었다.

3-4. 탑 높이에 따른 에탄올 생성

125g/l의 글루코오스 용액을 dilution rate가 0.2 hr⁻¹-1.47 hr⁻¹범위로 하고, 기체 유속을 0.6-1.2 v/v/m로 유입시키면서 균체 재순환 농축법과 Ca-alginate 효모-겔 포괄법을 삼상탑형 발효조에서 반응시킬 때 발효조 높이에 대한 에탄올 생성농도의 변화를 측정하

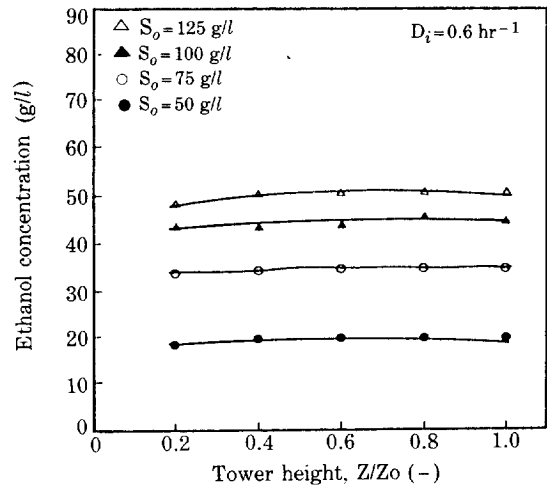


Fig. 9(a). Variation of ethanol concentration with fermenter height at various conditions.

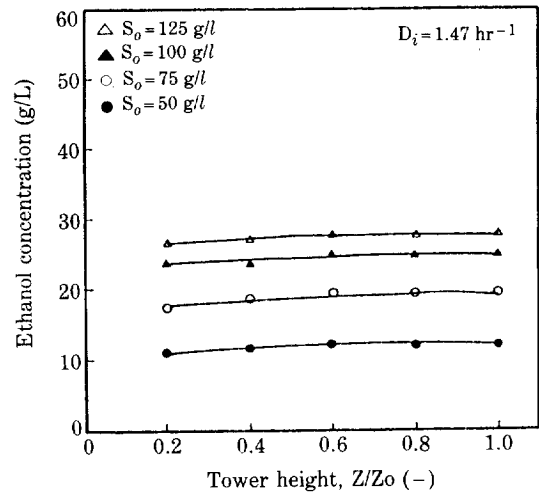


Fig. 9(b). Variation of ethanol concentration with fermenter height at various conditions.

여 Fig. 9a, b에 도시하였다. 그림과 같이 탑 높이에 대하여 본 실험의 기체 유속범위와 액상 dilution rate에 대하여서는 에탄올 농도가 거의 일정하게 나타났는 바, 본 실험범위에서 삼상탑형 발효조의 액상 흐름은 완전 혼합 흐름에 가깝게 진행되는 것을 알 수 있었다. 또한 기상의 유속을 변화시켜도 생성된 에탄올량은 Fig. 10과 같이 dilution rate에 따라 일정한 값을 나타내는 데 이는 본 실험범위에서는 고정화 겔 비이드의 외부 물질전달 영향이 거의 없음을 알 수 있다.

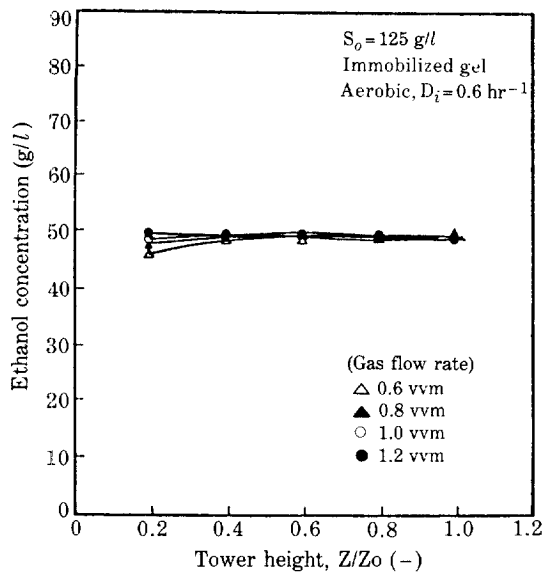


Fig. 10. Variation of ethanol concentration with fermenter height at various gas flow rates.

4. 결 론

증식효모 고정화 법에 의한 삼상탑형 발효조에서의 에탄올 생성 실험결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 균체 재순환 농축법을 이용한 삼상탑형 발효조에서 효모의 최대 농축량은 86g/l(건조균체 기준량)이었고 혐기 조건에서 D_i (dilution rate)를 0.2 hr⁻¹로 하여 200g/l의 글루코오스를 발효시켰을 때 98g/l의 에탄올(이론 수율의 96%)을 얻을 수 있었으며 $D_i=0.6$ hr⁻¹일 때, 생산성은 36g/hr · l 였다.

2. 구형 고정화 효모-겔을 이용한 삼상탑형 발효조에서의 에탄올 발효시, $D_i=0.1-2.0$ hr⁻¹로 매우 큰 상태까지 조업이 가능하였으며, 125g/l의 글루코오스를 DO=0.1 ppm의 준호기 조건으로 $D_i=0.2$ hr⁻¹에서 발효시켰을 때 54g/l의 에탄올(이론 수율의 84.7%)을 얻을 수 있었고, $D_i=2.0$ hr⁻¹일 때 생산성은 46g/hr ·

l 였다.

3. 삼상탑형 발효조 내부의 DO를 완전 혐기 조건으로 하였을 경우 발효시작 시간으로부터 약 20일이 경과하면 cell viability가 60%로 감소하고, DO=0.1 ppm인 준호기 조건인 경우 60일간 조작하였을 경우에도 95%의 높은 활성을 유지할 수 있었다.

REFERENCES

1. Atkinson, B. and Marituna, F.: "Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook", 624, Macmillian Publishers (1983).
2. Atkinson, B.: "Biochemical Reactors", 167, Pion (1974).
3. Moebus, O. and Teuber, M.: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, 194 (1982).
4. Lee, K.J., Lefebvre, M., Tribe, D.E., and Rogers, P.L.: *Biotechnology Letters*, **2**(11), 487 (1980).
5. Larsson, P.O. and Mosbach, K.: *Biotechnology Letters*, **1**, 501 (1979).
6. Ghose, T.K. and Bandyopadhyay, K.K.: *Biotech. Bioeng.*, **22**, 1489 (1980).
7. Toda, K.: *Biotech. Bioeng.*, **17**, 1729 (1975).
8. Grote, W., Lee, K.J., and Rogero, P.L.: *Biotechnology, Letters*, **2**(11), 481 (1980).
9. Vavilin, V.A.: *Biotech. Bioeng.*, **24**, 1721 (1982).
10. Black, G.M., Webb, C., Matthews, T.M. and Atkinson, B.: *Biotech. Bioeng.*, **26**, 134 (1984).
11. Heijnen, J.J., Van't Riet, K., and Wolthuis, A.J.: *Biotech. Bioeng.*, **22**, 1945 (1980).
12. Mishra, I.M., El-Temtany, S.A., and Schugel, K.: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 197 (1982).
13. Andrews, G.F.: *Biotech. Bioeng.*, **24**, 2013 (1982).
14. Yoo, I.S.: Ph.D. Thesis, Yonsei Univ., Seoul, (1988).
15. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).
16. Lee, S.S., Robinson, F.M., and Wang, H.Y.: *Biotech. Bioeng., Symp.*, **11**, 641 (1981).
17. Rosario, E.J., Lee, K.J., and Rogers, P.L.: *Biotech. Bioeng.*, **21**, 1477 (1979).
18. Tyagi, R.D. and Ghose, T.K.: *Biotech. Bioeng.*, **24**, 781 (1982).