

효모 고정화 캡슐을 이용한 에탄올 생산

정수환 · 박중곤 · 장호남*

경북대학교 공과대학 화학공학과

*한국과학기술원 화학공학과

(1993년 5월 26일 접수, 1993년 8월 21일 채택)

Ethanol Production Using Membrane-Encapsulated Yeast

Soo Hwan Cheong, Joong Kon Park and Ho Nam Chang*

Dept. of Chem. Eng., College of Eng., Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

**Dept. of Chem. Eng., and BPERC, KAIST, Taejeon 305-701, Korea*

(Received 26 May 1993; accepted 21 August 1993)

요 약

미생물의 고농도 고정화법으로서 고정화 bead 대신 고정화 캡슐을 사용하였다. 캡슐은 bead에 비해 내부공간이 넓으므로 미생물의 캡슐당 고정화 배양공간이 넓은 장점이 있다. 본 연구에서는 yeast를 실험균주로 선택하였다. 캡슐제조시에 surfactant를 첨가하여 막을 통한 가스의 flux를 약 두 배 정도 증가시킬 수 있었고 에탄올 생산시의 이산화탄소 발생으로 막이 파괴되는 것을 방지할 수 있었다. Yeast를 캡슐내부에 고정화시킨 후 배양과정에서 성장배지에 calcium chloride를 미량 첨가하여 막의 swelling을 막을 수 있었고 캡슐내부의 yeast 건조중량 밀도는 약 310 g/l에 달하였다. Yeast 고정화 bead의 경우와 비교하여 캡슐막의 yeast 격리효과는 거의 완벽하였다. 연속공정에서 고정화 캡슐을 사용하는 경우에 에탄올 생산성은 4.75 g/h·l이고 고정화 bead를 사용하는 경우는 4.71 g/h·l로 거의 비슷하였다. Surfactant를 첨가하지 않은 yeast 고정화 calcium alginate 캡슐은 성장배지내의 성장단계에서 캡슐내부에 yeast가 건조중량 밀도로 약 74 g/l 정도 차도록 성장시킨 다음 생산배지내에서 생산을 하게 되면 캡슐막이 elasto-plastic deformation에 의한 팽창·수축을 하여 막을 통한 물질전달은 약 20배에 달하게 되며 막의 파괴는 없었다.

Abstract—An encapsulation method in which yeast cells were immobilized in calcium alginate capsule was investigated. The calcium alginate capsule could burst because of carbon dioxide gas produced during ethanol fermentation. A new method for preparing calcium alginate microcapsules was developed and it was observed that gas transfer was further facilitated about two times as fast as in conventional capsule membrane. By adding a small amount of calcium chloride in the medium it was possible to control the swelling of the microcapsules and increase the dry cell density to 310 g/l. The rate of ethanol production of the system was nearly the same as that of bead system in continuous operation. For the calcium alginate capsule without adding surfactant, it was possible to increase the gas transfer rate about 20 times by lowering the dry cell density of the capsule to about 74 g/l. This was possible because of thin wall thickness and expanded surface area of the capsule.

1. 서 론

균체를 고농도로 하여 생산성을 높일 수 있는 방법으로 발효조내의 균체를 고정화하는 방법이 있다[1]. 현재까지의 고농도 배양을 위한 미생물의 고정화 방법은 크게 세 가지로 나누어 볼 수 있다. 첫째는 폴리우레탄이나 셀라이트 등의 담체에 미생물을 부착시키는 방법이고[2], 둘째는 alginate, chitosan, collagen 등에 미생물을 함께 섞어서 담체를 제조하고 담체내에서 미생물을 배양, 생산하는 방식이다[3, 4]. 셋째는 막을 이용하는 것으로서 hollow fiber 막 속[5]이나 capsule 속에 미생물을 가두어서 사용하는 방식이다[6-9]. 현재까지의 성공사례는 셀라이트에 미생물을 흡착시킴으로써 실험실 규모로서 가능성이 확인되었고[10] 이중실관반응기는 실험실 규모로서의 연속조업이 성공하였다[12]. 그러나, 실관반응기를 제외한 고정화 미생물반응기에서는 일반적으로 공통적인 문제를 안고 있다. 담체에 부착된 미생물이나 담체내에 포함된 미생물들이 성장하여 담체 밖으로 스며나오게 되어 용액중으로 씻겨져 나오게 된다. 또한 미생물이 담체의 표면과 담체내의 공극에서만 배양이 가능하므로 미생물의 배양영역이 매우 작으며 담체의 중심부근에서는 영양분 및 산소공급의 부족 등으로 미생물보존이 불가능한 영역도 생겨날 수 있다[11]. 또한 미생물을 담체에 고정화시켜 배양하는 경우에는 자유용액에서와 다른 주변환경에 따라 미생물의 형태나 특성이 변화될 수도 있다. 이와는 달리 이중실관반응기는 미생물의 농도가 최대가 될 수 있다는 장점이 있으나[12] scale-up에 어려움이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 미생물을 막으로 된 미세캡슐 내부에 고정화시켜서 고농도 배양을 함으로써 생물공학제품의 생산성을 극대화 시킴에 이바지하고자 하는 것이 이 연구의 목적이다.

미세캡슐내의 고정화는 동물세포[9]나 hybridoma cell[8] 배양에는 적용된 바가 있다. 미생물의 고정화는 무엇보다도 기존에 널리 이용되는 bead내의 고정화 배양법에 비하여 캡슐내부의 미생물 성장공간이 넓고 내부공간이 bead에 비하여 상대적으로 자유용액에 더 가깝다는 것이다. 본 연구에서는 미생물중에서 다루기가 비교적 쉽고 생산공정과정이 혐기성상태이며 에탄올 생산중 이산화탄소 발생량이 많아 캡슐막의 특성을 연구하기 좋은 yeast를 선택하였다.

캡슐내의 고정화 미생물이 성장하는 동안 막의 swelling을 막을 수 있도록 배지내에 금속이온을 첨가하였고 막팽창 저지에 따른 막내의 미생물 농도변화 등을 분석하였다. 또한 막을 통한 가스투과속도를 증가시키기 위하여 막내의 공극이 넓은 agarose 등으로 제조해 보고 calcium alginate 막에 surfactant나 silicone oil 등을

첨가하여 보았다. 현재까지는 bead내에 미생물을 고정화시키는 방법이 널리 이용되므로 yeast를 bead내에 고정화시키고 성장시켜 미생물의 건조중량과 에탄올 생산에 따른 bead의 변화상태를 캡슐을 이용하는 경우와 비교 검토하였고 고정화 담체내의 미생물과 배양액사이의 미생물 격리효과도 조사하였다. 막내에 yeast를 고정화시켜 완전 충전시키면 에탄올 발생으로 막이 파괴되지만 막내에 yeast를 불완전 충전시키면 막이 elasto-plastic deformation[24] 형으로 변형을 하므로 이에 대한 막팽창과 에탄올 생산성변화 등도 검토하였다.

2. 재료 및 실험방법

2-1. 캡슐제조 및 미생물고정화

Calcium-alginate 캡슐제조에 사용된 재료는 sodium alginate(Yakuri, LOT 311304), CaCl_2 (Duksan, LOT 712101), xanthan gum(Sigma, 40H0742), silicone oil (Shin-Etsu, KF-96)이다.

캡슐의 제조방법은 먼저 0.6%(w/v) sodium alginate 용액을 준비한다. 또한 용액 L당 13 g의 calcium chloride와 0.234 g xanthan gum을 녹이고 0.5 g의 surfactant를 첨가하여 만든 calcium chloride 용액도 준비한다. Bead 제조에서와 반대로 sodium alginate 용액을 잘 회전시키고 여기에 calcium chloride 용액을 주사기로부터 drop으로 떨어뜨려서 완전구형의 캡슐을 제조한다[13]. 이 때 calcium chloride 용액은 dispenser (Hamilton, U.S.A.)를 이용하여 일정량씩 떨어지게 한다. 수분동안 용액을 stirring하여 capsule을 성장시킨 후 제조된 캡슐을 건져내어 증류수에서 10분간 세척하여 캡슐벽면의 alginate 용액을 씻어낸다. 세척한 캡슐을 HEPES 완충용액(pH 7.2)에서 10분 이상 수축시킨다.

캡슐내에 미생물을 고정화시키는 방법은 다음과 같다. 성장배지를 autoclave에 넣고 15분 동안 멸균후 laminar flow cabinet에서 30 ml의 성장배지에 *saccharomyces cerevisiae*(ATCC 24858) 균주를 접종한다. Shaking incubator내에서 34°C 110 rpm에서 약 24시간 성장시킨후 배지용액 3 ml를 채취한 후 원심분리기(3600 rpm)에서 효모를 분리해낸다. 분리해낸 효모를 50 ml의 calcium chloride 용액에 섞는다. 효모가 섞인 calcium chloride 용액을 사용하여 위에서 서술한 방법과 같이 고정화 캡슐을 제조한다. 성장배지에 미생물 고정화 캡슐을 넣어 미생물을 성장시킨후 생산배지에서 생산한다. 본 연구에서 사용된 성장배지 및 생산배지는 Table 1과 같다. 성장배지(M_1)는 기존의 일반적 배지이며, 새로운 성장배지(M_3)는 일반 성장배지에 CaCl_2 를 배지 liter당 0.2 g 첨가한 것이다.

Table 1. Composition of culture medium

Medium 1(M ₁) (/L)			
(growth medium)	glucose	20 g, yeast extract	3 g
	bactopeptone	5 g, malt extract	3 g
Medium 2(M ₂) (/L)			
(production medium)	glucose	100 g, yeast extract	8.5 g
	NH ₄ Cl	1.3 g, MgSO ₄ 7H ₂ O	0.12 g
	CaCl ₂	0.06 g	
Medium 3(M ₃) (/L)			
(growth medium)	glucose	20 g, yeast extract	3 g
	bactopeptone	5 g, malt extract	3 g
	calcium chloride	0.2 g	

2-2. 분석법

캡슐과 bead내의 균체 건조 중량 측정은 다음과 같이 하였다. pH 5의 citric acid-Na₂HPO₄ buffer solution에 캡슐과 bead를 각각 넣어 완전히 녹인다. 녹인 용액을 원심분리기(3600 rpm)로 20분간 원심분리시킨 후 상등액은 버리고 침전물을 증류수로 세척하여 다시 원심분리시킨다. 위의 과정을 수회 반복한 후 균체를 105°C의 항온건조기에서 무게변화가 없을 때까지 건조시켜 측정한다.

Glucose 농도측정은 PGO enzyme(Sigma, No. 510-A)을 사용하여 측정하였다. Sample 용액을 700배로 희석하여 희석된 용액 0.5 ml과 combined enzyme-color reagent solution 5 ml을 함께 시험관에 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨후 UV-VIS(Shimadzu 1201) spectrophotometer로서 450 nm에서 O.D.를 측정하여 글루코즈 농도를 계산하였다.

에탄올의 발생량은 gas chromatograph(HEWLETT PACKARD 5890 series II)로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. Surfactant를 첨가한 calcium alginate capsule

본 연구에서 효모를 배양하여 에탄올을 생산하는 동안의 가장 큰 문제점은 고정화 캡슐내에서 발생하는 이산화탄소의 배출 문제이다. 이론적으로는 에탄올 생산 단계에서 glucose 1 mol을 소모하면 1 mol, 즉 약 20여 리터 정도의 이산화탄소 가스가 발생하게 된다. 수율이 100%가 되지 않더라도 이산화탄소의 부피는 상당히 많게 되어 막의 가스 투과성이 크지 않게 되면 막은 지탱하기 힘들게 된다. 온도가 34°C인 생산배지에서 에탄올생산 조업을 하는 경우 이산화탄소가 캡슐내에 축적되어서 본 연구에서는 20시간 이내에 캡슐이 파괴되었다. 따라서 캡슐의 막벽을 통하여 빠져 나가는 가스의 투과속도를

증대시키는 것은 발생한 이산화탄소의 효과적인 제거를 위하여서 뿐만 아니라 aerobic cell culture에 대한 적용에서도 산소의 투과속도 증대를 위하여 필요하다고 하겠다.

본 연구에서는 막을 통한 가스의 투과속도를 증진시키기 위하여 거품제거제인 실리콘 오일을 첨가하였으나 이산화탄소로 인한 캡슐의 파괴방지에는 전혀 잇점이 없었다. Calcium alginate 막은 친수성 막이므로 막내의 공극이 모두 물분자로 젖어 있게 되어 물에 녹지 않은 이산화탄소가 막을 통과하는 것이 어렵게 된다. Surfactant는 짧은 친수성의 head에 소수성의 긴 탄소 chain 꼬리를 가지고 있다. Capsule membrane 제조시에 surfactant를 첨가하게 되면 막 내부에 소수성의 긴 탄소 chain이 존재하게 되므로 소수성의 긴 chain은 물분자를 멀리하게 되고 물에 녹지 않은 이산화탄소가 막을 통과하기는 훨씬 쉽게 될 가능성이 있다. 따라서 본 연구에서는 일반적으로 nonionic surfactant가 미생물에 가장 독성이 없는 것으로 알려져 있으므로 nonionic surfactant인 nonoxynol[polyethylene-glycols mono(nonyl-phenyl) ether : C₉H₁₉C₆H₄(OC₂H₄)₉₅OH]를 캡슐 막제조시 미량 첨가하였다. Surfactant를 첨가하였을 때의 capsule 안정성을 검토하기 위하여 다음과 같은 실험을 행하였다. Yeast용액 3 ml을 원심분리하여 얻은 yeast를 무게비로 1.3% calcium chloride, 0.26% xanthan gum 용액 100 ml에 혼합하고 surfactant 0.05 g을 섞어 용액을 제조하였다. 이 용액으로 capsule 10개를 제조하여 성장배지에 투입하고 온도가 34°C인 성장배지에서 약 13 시간 가량 성장시키면 capsule내에 yeast가 성장하여 팽창하게 된다. 이 때 기존의 calcium alginate 캡슐과는 달리 surfactant의 영향으로 이산화탄소 방출은 capsule 내에 전혀 발견이 되지 않았다. Yeast로 충전된 capsule을 생산배지에 투입하여 40시간이 지날 때까지 capsule내에 이산화탄소 방출은 보이지 않고 capsule은 전혀 파괴되지 않은 채 안정하였다.

3-2. Capsule내에서의 yeast 성장

본 연구에서 surfactant를 사용하였을 때 capsule내의 yeast 성장량을 측정하였다. 제조된 캡슐 30개를 50 ml의 성장배지(M₁) 또는 생산배지(M₂)에 넣고 온도를 37°C로 유지하고 20시간 flask culture를 하였을 때의 yeast 성장량은 다음의 Table 2와 같다. Capsule내의 효모 고정화는 100 ml의 calcium chloride 용액에 yeast 배양액 3 ml을 원심분리하여 얻어진 yeast를 혼합하여 capsule을 제조함으로써 이루어졌다. Bead내의 효모 고정화는 yeast 용액 3 ml의 원심분리 물질을 sodium alginate 용액에 섞어서 bead를 제조함으로써 이루어졌

Table 2. Yeast cell growth inside the capsule

CaCl ₂ (%)	Xanthan (% to CaCl ₂)	Surfactant (g/l)	Medium		Yeast cells dried wt(g/capsule or bead)	g/cm ³ of capsule
1.0	15	0.25	M1	Capsule	0.0013	0.102
1.0	15	0.25	M2	Capsule	0.0013	0.362
1.0	15	0.50	M1	Capsule	0.0010	0.138
1.0	15	0.50	M2	Capsule	0.00127	0.354
1.3	18	0.25	M1	Capsule	0.0011	0.086
1.3	18	0.25	M2	Capsule	0.0010	0.278
1.3	18	0.50	M1	Capsule	0.00107	0.084
1.3	18	0.50	M2	Capsule	0.0012	0.286
1.0			M1	Bead	0.0012	0.035
1.0			M2	Bead	0.0022	0.066

다. 캡슐내부의 효모량을 캡슐당의 건조중량과 캡슐내 부공간을 기준으로한 건조 중량 밀도로서 Table 2에 나타내었다. 위의 결과에서 볼 수 있듯이 성장배지(M₁)에서 성장한 효모의 캡슐당 건조 중량은 생산배지(M₂)에서 생산시킨 효모의 캡슐당 건조 중량과 거의 같으나 내부부피를 기준으로한 건조 중량 밀도는 성장배지의 경우 약 0.1 g/cm³이고 생산배지의 경우는 약 0.3 g/cm³으로 어느 경우든 생산배지(M₂)의 건조 중량 밀도가 약 3배 정도 크다. 이는 성장배지에서 배양을 하는 경우 막의 팽창에서 그 원인을 찾을 수 있다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 기존의 성장배지(M₁)에서는 직경이 2.0-3.5 mm까지 캡슐이 팽창하게 된다. 그러나 생산배지에서 배양하는 경우는 캡슐의 팽창이 전혀 없고 막의 두께도 약 0.1-0.2 mm 정도로 거의 일정하였다. 고정화 캡슐을 생산배지에서 배양하는 경우 캡슐막의 팽창이 없으며 성장배지에서 배양하는 경우 캡슐막의 팽창이 큰 이유는 성장배지와 생산배지의 조성에서 찾아볼 수가 있다. 본래 calcium alginate 막은 calcium 이온과 alginate 이온이 공유결합이 아닌 이온결합을 함으로써 형성된다. 그러므로 그 결합인력은 공유결합에 비하여 매우 약함을 알 수 있다. 위의 Table 1에서 성장배지(M₁)의 조성을 보면 금속이온이 전혀 존재하지 아니한다. 반면에 생산배지(M₂)에서는 MgSO₄·7H₂O와 CaCl₂가 0.18 g이나 존재한다. 따라서 본 연구에서는 금속이온의 일종으로서 배지 liter당 CaCl₂ 0.2 g을 첨가한 새로운 성장배지(M₃)를 제조하였다. Fig. 1에서의 생산배지(M₂)에서와 같이 새로운 성장배지(M₃)에서 성장시킨 경우에도 캡슐의 팽창은 전혀 관찰할 수 없었다.

새로운 성장배지에서 캡슐에 고정화된 효모를 배양하는 경우 시간에 따른 캡슐내부에서의 효모의 성장량을 측정하여 Table 3에 나타내었다. Table 3 내용으로 관찰할 수 있는 바와 같이 기존의 성장배지(M₁)에서는 성장기간 동안 캡슐이 팽창을 하여 캡슐의 내부공간이



Fig. 1. The state of encapsulated yeast after 7 hrs of cultivation which were grown in the conventional growth medium(left) and the medium containing CaCl₂ (right) for 10 hrs(×27).

Table 3. Cell growth of encapsulated yeast cells cultivated in the medium containing calcium chloride

Time(hr)	Cell growth(Dry weight)			
	(g/capsule)		(g/cm ³ based on the inner volume of the capsule)	
	Medium 3	Medium 1	Medium 3	Medium 1
6	0.0008		0.164	
8	0.0013		0.268	
10	0.0015		0.309	
12	0.0017		0.351	
14	0.0015		0.309	
20		0.0010		0.138

약 50% 가까이 늘어나게 되므로 내부공간은 늘어난 것으로 추정되었지만 팽창과정에서 막의 두께가 약 0.7-0.8 mm로 5배 이상 팽창하여 물질전달에 큰 영향을 받아 약 20시간이나 성장시킨 경우의 캡슐 내부공간에

Table 4. Theoretical yield for the ethanol production of the flask culture using encapsulated yeast at 33 °C

Time(hr)	0-1	1-2	2-4	4-6	6-24	0-24
Consumed glucose(g/l)	17.73	5.9	11.6	11.38	53.19	99.8
Produced ethanol(g/l)	0.54	0.29	2.79	3.98	29.13	36.74
Theoretical yield(%)	6.0	9.7	47.2	68.6	100.0	72.18

대한 건조 yeast 중량비는 0.138 g/cm^3 에 불과하다. 그러나 새로운 성장배지(M_3)의 경우 막 팽창이 없게 되며 캡슐 내부공간에 대한 건조 yeast 중량비는 약 10시간 정도의 배양에서도 0.31 g/cm^3 에 달하며 캡슐내부에 효모가 완전충진이 되어 더 이상의 시간에 따른 효모중량의 증가는 없게 된다. 일반 발효반응기내에서의 yeast 건조 중량 농도가 $0.03\text{--}0.05 \text{ g/cm}^3$ 이고 막 재순환 반응기내에서는 0.21 g/cm^3 임을 감안할 때 매우 높은 건조 중량 농도라고 볼 수 있다. 일반 발효조내에서 cell내의 수분함량은 약 80%에 달한다고 되어 있고 고정화시키는 경우 cell 내부의 수분함량이 50%로까지 줄어든다고 보고되어 있다. 본 연구결과를 캡슐내부에 yeast가 완전히 충전이 되었다고 가정하면 yeast 내부의 수분함량은 약 70%가 된다.

Bead의 경우 bead당 효모 건조 중량은 캡슐의 경우와 큰 차이는 없으나 bead 내부에서 발생하는 이산화탄소의 양으로 bead의 직경이 매우 팽창하여 약 3 mm 정도까지 된다. 따라서 bead 내부공간을 기준으로한 건조 중량 밀도는 Table 2에서와 같이 캡슐의 경우보다 상당히 작았다.

Calcium alginate bead와 캡슐로써 yeast를 고정화시킨 경우 플라스크 배양을 하는 동안 bead나 캡슐내부에서 새어나온 효모가 배양액 속에서 성장한 중량을 측정하여 각 경우의 격리효과를 비교해 보았다. 기존의 성장배지 50 ml에 70개의 고정화 bead를 8시간 성장시키고 50 ml의 생산배지로 옮긴 후 14시간 ethanol을 생산시킨 다음 생산배지 용액내의 yeast의 건조 중량을 측정한 바 0.2 g 이었다. 이는 70개의 bead내의 건조 yeast 중량의 약 650%에 달하였다. 그러나 고정화 캡슐을 사용하면 생산배지의 온도를 37°C 이하로 유지하는 한 캡슐외부로 스며나오는 yeast는 관찰되지 아니하였다.

3-3. 에탄올 생산

3-3-1. 플라스크 배양

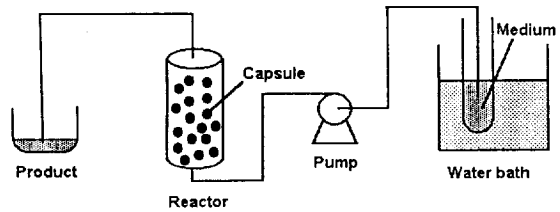


Fig. 2. Schematic diagram of experimental set-up for the continuous operation.

Surfactant를 첨가한 yeast 고정화 캡슐을 제조하여 37°C 의 새로운 성장배지(M_3) 50 ml에 1100개의 캡슐을 투입하여 글루코오스가 완전 소모될 때까지 성장시킨 후 33°C 의 생산배지 50 ml에 옮겨 에탄올을 생산한 결과가 Table 4와 같다.

에탄올 생산단계에서 glucose 100 g이 소모되어 51 g의 에탄올이 생산되었을 때 소모된 글루코오스는 모두 에탄올 생산에 사용되었다고 할 수 있으므로 이 때를 이론수율(theoretical yield) 100으로 한다. Table 4에서 보면 24시간 생산을 하였을 때 생산배지내의 글루코오스가 99.8% 소모되었고 에탄올 생산의 이론수율은 72.8%임을 알 수 있다.

본 에탄올 생산실험에서는 50 ml의 성장배지에 1100개의 캡슐을 성장시켰으므로 성장배지내에서는 캡슐내부에 효모가 완전 충전이 되지 않은 상태이기 때문에 생산배지내에서도 초기에는 일부균체 성장이 이루어지므로 에탄올 이론 수율이 약 6시간 까지는 매우 낮다. 그러나 약 6시간이 지나게 되면 캡슐에서 배지속으로의 이동이 지연된 에탄올이 지속적으로 배지속으로 나오고 효모의 성장도 거의 끝난 상태이므로 에탄올 생산의 이론수율이 100%에 도달함을 알 수 있다.

3-3-2. 연속공정

Surfactant를 첨가하고 yeast가 완전성장된 캡슐을 반응기내에 충전시키고 에탄올을 생산하는 실험을 행하였다. 실험장치는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 반응기는 내부직경 2 cm, 길이 5 cm인 유리튜브 양단을 glass filter plate로 차단하였다. 반응기 내부에는 37°C 의 새로운 성장배지(M_3) 25 ml에서 glucose가 완전 소모될 때까지 성장시킨 500개의 캡슐을 충전하였다. 평균유속 4.3 ml/h 로 생산배지를 공급하였으며 이 때 저장탱크는 30°C 의 항온조 속에서 온도를 일정하게 유지하였다. Bead의 경우 도 캡슐과 같은 조건으로 충전하여 평균유속 3.1 ml/h 로 생산배지를 공급하였다. 각각의 경우 에탄올 생산량을 비교하여 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 캡슐의 경우 약 20시간 조업후 에탄올 생산성은 반응기 단위체적을 기준으로 $4.75 \text{ g/h} \cdot \text{l}$ 이고 glucose 소

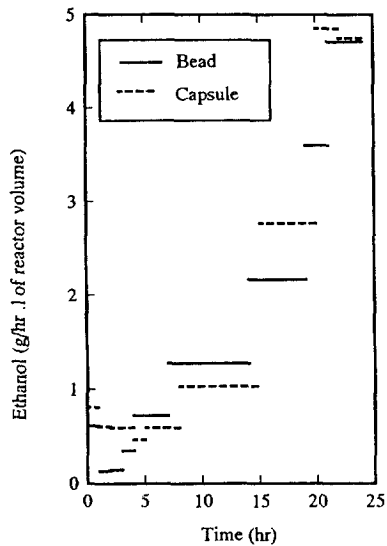


Fig. 3. Ethanol production and glucose consumption profiles of the continuous operation using encapsulated yeast at 30°C.

모량은 7.39 g/h·l였다. Bead의 경우도 캡슐과 비슷한 시간에 정상상태에 도달하며 에탄올 생산성은 4.71 g/h·l로 캡슐과 비슷하며 glucose 소모량은 6.64 g/h·l였다. 이는 성장배지에서 성장시킨 경우 bead 내부의 효모 충전량은 캡슐 내부의 효모 충전량과 서로 비슷하지만 캡슐의 크기보다 bead의 크기가 매우 크게 된다. 그렇지만 bead 사이의 공극이 더 크므로 물질전달이 원활하여 수율이 비슷하게 나타나는 것으로 사료된다. 또한 bead가 들어있는 반응기 내부에는 bead의 크기가 팽창되어 이산화탄소 방울의 발생이 육안으로 관찰되었으며 반응기에서는 이산화탄소 기포가 양단에 설치된 glass filter plate를 잘 통과하지 못하고 있었다. 그러나 캡슐의 경우 막 속에 존재하는 계면활성제의 영향으로 미세한 기포 상태의 이산화탄소가 캡슐막을 잘 통과하는 반응기내에서는 이산화탄소의 방울을 육안으로 관찰할 수 없었다. 또한 조업기간 내내 막팽창을 전혀 관찰할 수 없었고 반응기속에 새어나온 효모도 측정불가능한 범위로 없었다. 따라서 캡슐을 이용한 연속적 고정화 반응기의 사용은 가능한 것으로 판명되었고 미생물 격리효과는 완벽한 것으로 드러났으며 생산수율면에서는 bead를 사용하는 경우와 거의 비슷하지만 반응기 조업상의 장점이 돋보였다.

3-3-3. 막팽창 이용

Surfactant를 첨가하지 않고 제조한 yeast 고정화캡슐을 성장배지내에서 캡슐내의 건조 중량 밀도로 약 74 g/l 정도 배양한 후 낮은 온도에서 에탄올을 생산할 경우

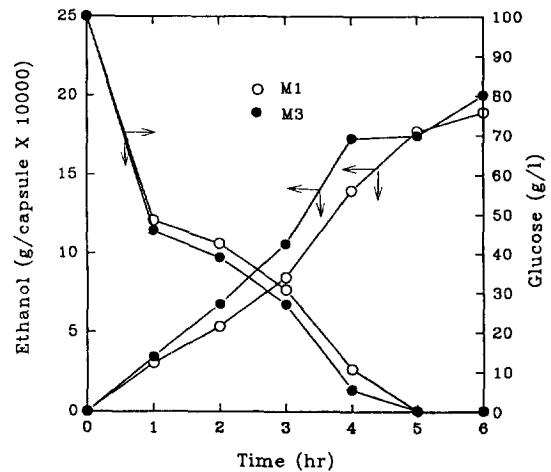


Fig. 4. Ethanol production and glucose consumption in shake flask fermentation using yeast immobilized in the surfactant-free capsule at 35°C.

(M1: traditional growth medium, M3: growth medium containing CaCl_2)

캡슐의 변화 양태를 조사하였다. Surfactant를 첨가하지 않고 yeast 고정화 캡슐을 제조한 후 37°C의 calcium chloride가 첨가된 새로운 성장배지(M₃) 50 ml에 1100개의 캡슐을 투입하고 glucose가 완전히 소모되도록 배양한 후 캡슐을 35°C의 생산배지 50 ml에 옮겨 한 시간이 지나면 거의 대부분 캡슐이 내부에 이산화탄소 가스가 차이게 되어 배지용액 표면에 뜨게 된다. 세시간이 지나면 캡슐은 더욱 팽창하여 캡슐의 직경이 약 5 mm 이상으로 되며 모든 캡슐이 배지용액의 표면에 뜨게 된다. 본 실험의 배양조건에서는 새로운 성장배지(M₃) 50 ml에 1100개를 성장시켰기 때문에 캡슐 내부에 효모가 완전 충전이 된 상태가 아니므로 한 개의 캡슐내부에서의 단위시간당 이산화탄소 생산량은 캡슐이 터질 정도는 아니며 부풀어 오를 정도가 된다. 따라서 이 경우의 에탄올 생산양태를 검토하고자 한다.

본 실험에서는 약 5-6시간 생산을 하게 되면 생산배지내의 글루코오스가 모두 소모되어 에탄올 생산이 끝나게 되므로 그 때까지는 캡슐이 팽창되지만 더 이상의 에탄올 생산이 없게 되면 캡슐은 elastic 수축을 하지 않고 elasto-plastic deformation[14] 형태로 수축되어 쭈그러들게 된다. 막은 이미 plastic 팽창을 거친 후이므로 막의 두께는 얇아져 있고 막의 표면적은 크게 늘어난 상태이며 막내의 pore도 크게 팽창된 상태로 유지된다. 이러한 캡슐을 다시 새로운 생산배지에 재투입하였을 경우 곧 캡슐이 팽창되었던 원래의 상태로 되돌아간다. 이 때 글루코오스의 소모량과 에탄올의 생산량을 Fig. 4,

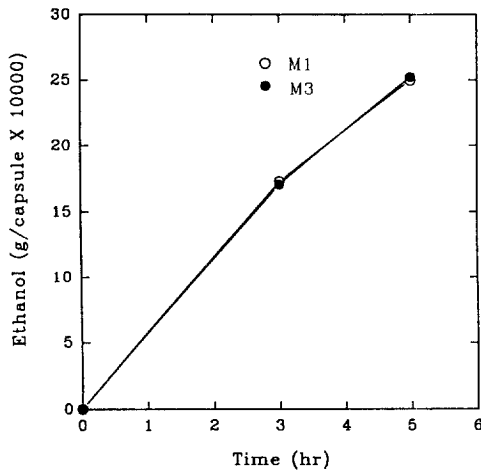


Fig. 5. Ethanol production profile in the 2nd shake flask fermentation using yeast in the surfactant-free capsule at 35°C.

(M1: traditional growth medium, M3: growth medium containing CaCl_2)

Table 5. Theoretical yield for the ethanol production of the flask culture using surfactant-free encapsulated yeast at 35°C

	1st production						2nd prod.
Time(h)	0-1	1-2	2-3	3-4	4-6	0-6	0-6
Consumed glucose(g/l)	54.3	6.8	11.8	21.6	5.2	99.7	99.9
Produced ethanol(g/l)	6.0	5.8	6.7	11.7	4.8	34.8	43.8
Theoretical yield(%)	21.5	100				68.5	85.9

5에 나타내었다. 생산배지에서 에탄올 생산을 할 때의 이론수율을 계산하여 Table 5에 나타내었다. 부풀 캡슐은 원래 캡슐의 지름보다 약 2.2배가 늘어났으므로 캡슐의 표면적은 약 4.84배가 늘어난 상태가 되며 막의 두께는 약 4.84배가 줄어든 상태가 된다. 따라서 한 개의 캡슐을 통한 물질전달은 캡슐이 팽창하지 않은 경우에 비하여 면적이 4.84배 늘어나고 두께가 4.84배 줄어들었으므로 약 23배 증가하게 된다.

Table 5의 결과를 검토해 보면 1시간 이내의 생산 단계에서는 이론수율이 21.5%에 불과하지만 1시간 이후부터는 이론수율이 100%임을 알 수 있다. 그러므로 캡슐이 부풀어 올라 내부공간이 커지고 물질전달이 커짐에 따라 생산단계에서 1시간 이내에 yeast의 추가성장이 모두 끝남을 알 수 있다. 그리고 증가된 캡슐당의 물질전달로 인하여 6시간 이내에 모든 에탄올 생산이

끝남을 알 수 있다. 이는 Table 4에서 보는 바와 같이 surfactant가 첨가된 경우 캡슐의 팽창이 없으며 약 6 시간까지 yeast의 추가성장이 일어나며 24시간 이내에 글루코오스가 모두 에탄올 생산에 사용되는 것과 비교하면 모든 것이 캡슐의 elasto-plastic 팽창[14]에 따른 물질전달의 효과가 큼을 알 수 있다. Table 5의 두 번째 생산과정에서 이론수율이 86% 정도로 증가되어 생산 초기 단계에서 yeast의 추가 성장이 매우 줄어들었음을 알 수 있다. 따라서 surfactant가 포함되지 않은 캡슐로 조업을 하고자 할 경우는 새로운 성장배지(M₃)를 이용한 성장단계에서 캡슐을 어느 정도 충전시키느냐 하는 것은 매우 중요한 문제임을 알 수 있다.

4. 결 론

완전구형의 캡슐제조시 surfactant를 첨가함으로써 막을 통한 gas flux를 크게 증가시킬 수 있었다. 성장배지에 배지 L당 0.2 g의 calcium chloride를 첨가함으로써 yeast 고정화 캡슐을 성장배지에서 성장시킬 때 캡슐막이 swelling 되는 것을 막을 수 있었다. 뿐만 아니라 성장배지내에서 캡슐막의 swelling이 없을 경우 막내부의 건조 yeast 중량 농도는 310 g/l까지 가능하였다. Yeast를 calcium alginate bead에 고정화시켜 생산배지에서 ethanol을 14시간 생산하면 bead내의 yeast가 생산배지로 스며 나와 성장하는 yeast양은 bead내 고정화 yeast양의 650%까지 달하였다. 그러나, 고정화 캡슐을 사용하면 생산배지의 온도를 37°C 이하로 유지하는 한 캡슐외부로 스며나오는 yeast의 양은 전혀 관찰할 수 없어 캡슐의 yeast 격리 효과는 완벽하였다. 고정화 캡슐을 사용하여 연속공정을 할 경우 수율은 bead의 경우와 거의 비슷하였지만 조업상의 장점이 있었다.

Surfactant를 첨가하지 않은 캡슐내에 yeast를 고정화하고 성장시켜 캡슐내부에 건조 중량 밀도로 약 74 g/l 정도 충전시켜 ethanol을 생산하면 캡슐막은 터지지 않고 elasto-plastic deformation형으로 팽창되어 캡슐막을 통한 물질전달속도는 약 20배에 달할 수 있었다.

감 사

본 연구를 위하여 연구비를 지원해준 생물공정연구센터에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Black, G. M., Webb, C., Matthews, T. M. and Atkinson, B.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 134(1984).

2. Van Wezel, A. L.: *Nature*, **216**, 64(1967).
3. Kierstan, M. and Bucke, C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 387(1977).
4. Cheetham, P. S. J., Blunt, K. W. and Bucke, C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2155(1979).
5. Ku, K., Kuo, M. J., Delente, J., Wildi, B. S. and Feder, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 79(1981).
6. Lim, F. and Sun, A. M.: *Science*, **210**, 908(1980).
7. Gharapetian, H., Davies, N. A. and Sun, A. M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1595(1986).
8. Yoshioka, T., Hirano, R., Shioya, T. and Kako, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 66(1990).
9. Sefton, M. V., Dawson, R. M., Broughton, R. L., Bl-ysniuk, J. and Sugamori, M. E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1135(1987).
10. Kim, J. H., Oh, D. K., Park, S. K., Park, Y. H. and Wallis, D. A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1838(1986).
11. Kurosawa, H., Nomura, N. and Tanaka, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 716(1989).
12. Lee, C. W. and Chang, H. N.: *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1105(1987).
13. Park, J. K.: Bioprocess Engineering Research Center, Final Report(1993).
14. Park, J. K., Chang, H. N., Park, J. H. and Earmme, Y. Y.: *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, **25**, 189(1986).