

평판형 막생물반응기를 이용한 연속 에탄올 생산 및 농축

김준석 · 정용섭*[†] · 홍석인

*전북대학교 식품공학과
고려대학교 화학공학과
(1994년 6월 9일 접수, 1994년 9월 25일 채택)

Simultaneous Ethanol Production and Enrichment in a Membrane Moderated Bioreactor

Jun-Seok Kim, Yong-Seob Jeong*[†] and Suk-In Hong

*Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University
Dept. of Chemical Engineering, Korea University
(Received 9 June 1994; accepted 25 September 1994)

요 약

한외여과막과 역삼투막 사이에 샌드위치 형태로 균체를 고정화시켰다. 균체층으로 모든 영양물들이 자유롭게 이동하며, 균체가 배지와 접촉하지 않도록 한외여과막이 이용되었다. 고정화 균체층에서는 에탄올을 생산하는 생물반응이 일어난다. 마지막으로 역삼투막은 균체를 고정화하며 생성물을 선택적으로 고정화 균체층의 미반응 배지와 분리한다. 그러므로 농축된 에탄올 용액을 당 및 영양분에 많이 오염되지 않은 상태로 얻을 수 있다. 고정화된 균체층 위에 거름층을 첨가하여 한외여과막의 아래부분이 균체성장으로 인한 부분적 막힘현상을 감소시키고 동시에 균체의 성장공간 증가를 유도하였다. 또한, 생산물인 에탄올이 기질층으로의 역확산량을 최소화하기 위하여 한외여과막을 셀룰로오스 아세테이트막보다 소수성인 폴리 설펜막으로 대체하여 발효를 수행하였다. 저장조로부터 발효배지를 반응조에 400 psig의 압력으로 강제이송시켜 400시간 동안 연속적으로 발효를 수행한 결과, 최대 70.3 g/l까지 에탄올을 생산할 수 있었다.

Abstract—The living cells, *Saccharomyces cerevisiae*, are sandwiched between ultrafiltration and reverse osmosis membranes. The ultrafiltration membrane separates the cells from the feed volume, while providing free passage for all nutrients to the cell mass below. Therein, the bioreaction starts to occur, leading to product ethanol. The reverse osmosis membrane, while immobilizing cells, also helps in separating the nutrients from the product stream preferentially. Therefore, the enriched ethanol solution could be obtained without much contamination from glucose and nutrients. Above the filtered cell mass a coarse filter paper was placed to provide the cells extra room for growth and to eliminate the partial closing of pores of the ultrafiltration membrane which is in contact with the cells. In order to minimize the back diffusion of ethanol from the yeast cell layer to the feed solution, the cellulose acetate ultrafiltration membrane was replaced into the more hydrophobic polysulfone ultrafiltration membrane. In these cases, performance data for glucose fermentation to ethanol by yeast cells were obtained. As a result, the maximum ethanol concentration was 70.3 g/l after 400 hours of operation continuously and at the operating pressure of 2758 kPag(=400 psig) on the substrate solution for the forced convection flow of substrate to the cell layer.

1. 서 론

발효에 의해 산업적으로 유용한 화합물을 대량 생산하는 경우 정제공정에 많은 어려움이 있다. 이러한 문제 해결을 위해 많은 연구와 노력이 진행되고 있는데, 그 중 막분리 기술이 많은 공정에서 적용되어지고 있다. 반투과성막을 이용한 균체재순환방법[1,2]이 복합된 생물반응기의 경우 높은 발효효율을 얻을 수 있는 효과적인 공정으로 알려져 있다. 막 생물반응기는 회분식 공정을 연속적 공정으로 전환시키거나, 반응기 내에 고농도의 균체를 유지시킬 경우, 높은 회석속도 유지, 그리고 계속적으로 균체성장 저해 요인인 최종산물의 분리로서, 동시 발효 및 분리라는 생물공정[3,4]으로서 주목 받아왔다. Gerhardt 등[5]에 의해서 반투과성 막이 미생물 분리에 처음 제안되었으며, 1960, 70년대에는 투석배양(dialysis culture)[6,7]이 투석을 거치지 않는 공정보다 우수하다는 것이 발표되었다.

막생물반응기는 반응기 내의 균체를 고농도로 배양시킬 수 있으며, 동시에 효소나 생물반응 및 배양액 중의 생성물 또는 저해작용이 있는 부산물을 연속적으로 회수할 수 있는 장점이 있다. 유용되고 있는 형태로서는 막모듈을 이용하여 균체 및 효소를 생성물과 분리하여 발효조에 순환시키는 공정과, 평판형 막생물반응기 형태를 이용한 공정, 중공사모듈(hollow fiber module)을 효소 및 미생물 발효에 직접 응용한 공정, 나선형(spiral wound) 막생물반응기의 응용 및 기타 다른 고안에 의한 막생물반응기 등이 있다. 막분리 순환발효조(membrane recycle fermentor)는 발효가 일어나는 반응기 부분과 균주를 발효 및 생성물질의 혼합으로부터 분리 발효조에 순환시키는 막모듈 부분의 두 부분으로 구성되어 있다. 많은 연구팀에 의해 생축매로서 균체 혹은 효소가 사용되는 막분리 순환발효조의 기본적인 개념이 제안되어졌으며, 일반적인 공정조건으로서 발효조의 전체 부피는 생성물과 함께 배출되는 양과 공급되는 배양액의 양을 일치시킴으로써 항상 일정하도록 유지했으며, 이러한 공정의 장점은 생축매인 효소 혹은 균체를 재사용 및 세포의 밀도를 증가시킴으로써 생산성을 증가시킬 수 있다는 점이다. 특히 생성물이 세포성장에 저해작용이 있는 경우에는 생산성의 증가에 막모듈을 사용한 분리효과가 있음이 발표되었다. *Clostridium hystolyticum*을 균주로 하여 연속식세포 배양법에 의해서 세포와 효소인 protease생산에 관한 연구를 통하여, Wang 등[8]은 회분식 반응기에서 보다 연속식 막분리를 사용한 공정이 균체농도 및 생성물 농도가 높음을 보여주었다. 에탄올 생산을 위해 cheese whey lactose를 발효하는 막순환공정이 Cheryan과 Mehaia[9]에 의해 개발되어, 그 가

능성을 보여주었다. 그리고 개발된 공정의 장점으로서는 발효시 환경조건의 제어가 용이하며, 균체 고정화 발효조와 비교하여 생성되는 가스에 의한 문제가 없으며, 생성물이 균체에 의해 오염이 되지 않아 분리공정에 있어서 간편하여 생성물 가격을 낮추는 요인이 되며, 그리고 배지의 살균시 막모듈을 사용함으로써 증기멸균 중 발생할 수 있는 당의 caramelization을 피할 수 있는 점 등이다. 중공사형 막생물반응기(hollow fiber membrane bioreactor)는 중공사형 모듈을 사용한 것으로서 응용범위는 역삼투압막 및 한외여과막의 특징을 이용한 물질의 분리 및 농축, 생축매의 고정화에 의한 생물공학 적 응용 등 다양하다. 가장 큰 장점은 단위부피당 표면적이 크며, 기질로부터의 세포 분리, 계속적인 저해물질의 제거, 높은 세포밀도의 유지, 오염위험의 감소 그리고 높은 생산성 등이 되겠다. 단점으로는 세포성장 조절이 용이하지 못한 이유로 인한 과도한 세포성장에 의한 중공사막의 파괴, 세포에 의한 중공사막의 막힘 현상, 세포채취의 어려움, 기질의 확산한계, 운전조작 중 막의 누출(membrane leakage) 및 공정제어의 어려움 등이 있다. 중공사형 생물반응기에 *Saccharomyces cerevisiae*를 고정화하여 에탄올을 생산한 결과 생산성 역시 기존의 연속흐름교반탱크반응기보다 3-4배 정도 높음을 Inoles[10] 등이 보고하였다. 최근들어 중공사형 모듈이 동물세포배양 및 효소고정화에 많이 이용되는 추세이며, 미생물 배양에서도 응용되고 있음이 보고되었다. Shuler[11] 연구그룹 역시 식물 세포로부터 고가의 화학물질을 중공사형 모듈을 사용하여 생산했으며, 중공사형 고정화방법은 낮은 전단(shear)에서의 발효 환경조건을 유지함으로써 식물세포 배양에 적절함을 언급했다. 평판형 막생물반응기(flat sheet membrane bioreactor)는 중공사형 반응기에 비해 다른 장점이 있다. 평판형 막사이에 고정화된 전체 세포의 농도를 자유롭게 조절할 수 있으며, 고정화된 세포의 모든 부분에 배지 및 영양분이 골고루 공급될 수 있어 배지의 확산 제한의 염려를 덜 수 있다. 생물반응 및 추출용매를 사용한 분리를 동시에 실시할 수 있는, 전체 효모균주를 고정화한 평판형 막생물반응기가 Cho와 Schuler[12]에 의해 개발됐다. 사용된 추출용매가 효모에 대단한 독성이 있지만 적절한 다수의 막을 선택함으로써, 효모균주와 추출용매의 접촉이 없는 상태에서 생물반응을 억제하는 최종 생성물 에탄올을 추출용매를 사용하여 추출하였다. 교원질막(collagen membrane)에 효소나 균체를 고정화시킨 막생물반응기에 대해서 Vieth 등[13]이 언급하였는데, 이러한 막의 응용은 생축매 작용과 분리공정을 함께 수행할 수 있기 때문에 막반응기는 생산수율을 증가시킬 수 있으며, 결과적으로 효

소전환작용, 생산물분리, 농축을 동시에 수행할 수 있었다. 또한 그의 연구그룹[14]은 두 종류의 막 사이에 균주를 고정화시킨 막생물반응기를 도입하여 생성물에 대한 억제작용을 제거함과 동시에 단위체적당 생산량을 극대화할 수 있었음을 발표했다.

본 연구에서는 샌드위치 형태로 균체를 한외여과막과 역삼투막 사이에 고정화시켜 발효를 수행할 경우 나타나는 문제점을 해결하고자 하였다. 발효시 균체성장장에 의해 나타나는 한외여과막 아랫부분의 막힘현상과 생산물인 에탄올이 배지수용액층으로 역확산되는 현상을 해결하기 위하여, 셀룰로오스 아세테이트(cellulose acetate, CA) 한외여과막 보다 소수성인 폴리설폰(polysulfone, PSf)막을 제조하여 발효시 사용하였으며 결과를 비교해 보았다. 또한 고정화된 균체층위에 거름종이를 첨가하여 균체 성장공간 부여효과 및 사용된 한외여과막과 고정화된 균체가 접촉함으로써 발생하는 균체에 의한 부분적인 막의 막힘현상을 거름종이 사용으로 제거하여 효율성을 검토해 보았다. 결과적으로 한외여과막/거름종이/균체/역삼투막으로 고정화된 평판형 막생물반응기를 이용하여 생산물에 의한 억제작용을 해소함과 동시에 균체 고정화를 위해 사용된 역삼투막을 통해 에탄올을 농축생산하고 장시간 연속적으로 발효를 수행하여 보았다.

2. 실험재료 및 방법

2-1. 효모

한국종균협회에서 분양받은 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126(American Type Culture Collection, MD)를 YM Agar(Difco 0712) 사면배지에 접종하여 30°C에서 24시간동안 배양시킨 후, 4°C에서 냉장 보관하여 사용하였다. 사면배지는 매달 한번씩 계대배양시켰다. 성장배지는 YM broth를 pH 5로 조절하여 접종배지로 사용하였다. 발효배지는 yeast extract 0.15, NH_4Cl 0.25, K_2HPO_4 0.55, NaCl 0.10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15, citric acid 0.3, 글루코오스 18%(w/v%)를 pH 4.7로 조절하여 사용하였다.

2-2. 한외여과막 및 역삼투막 제조

셀룰로오스 아세테이트 막의 고분자 용액의 조성 및 분리막 제조방법은 Table 1에 나타났다. 고분자 용액은 마개가 있는 유리병에 넣고 밀봉하여 상온, 상압에서 24시간 이상 교반시켰다. 완전히 용해된 용액은 5°C로 보관하였다. 막의 제조시 상온의 고분자 용액을 유리판 위에 붓고 유리막대를 이용하여 5초이내로 얇게 편다. 얇게 편 분리막을 공기 중에 60초간 방치하여 용매인

Table 1. Details of cellulose acetate membrane preparation

	UF	RO
	Membrane	Membrane
Casting solution composition, wt%		
1. Cellulose acetate(E-398-3)		17.0
2. Acetone		69.2
3. Magnesium perchlorate		1.45
4. Water		12.35
Temperature of casting solution, (°C)		4
Temperature of casting atmosphere		room
Humidity of casting atmosphere		room
Solvent evaporation period, (s)		60
Ethanol/Water volume ratio in gelation medium	30/70-50/50	
Gelation period, (min)	60	
Temperature of gelation medium, (°C)	0	
Shrinkage temperature, (°C)		67-77
Shrinkage period, (min)		10

Table 2. Details of polysulfone membrane preparation

	UF membrane
Casting solution composition, wt%	
1. Polysulfone(Udel-1700)	20.0
2. NMP(N-Methyl-2-Pyrrolidone)	80.0
Temperature of casting solution, (°C)	4
Temperature of casting atmosphere	room
Humidity of casting atmosphere	room
Solvent evaporation period, (s)	60
Temperature of gelation medium, (°C)	4
H_2SO_4 /Water volume ratio in gelation medium	15/85-25/75
Gelation period, (min)	15

아세톤을 증발시킨 후, 한외여과막의 경우 에탄올-증류수 용액에 60분간 겔화(gelation)시킨다. 겔화 매질 중 에탄올의 농도가 30, 40 그리고 50 vol%일 때 제조된 분리막을 각각 UF-30, UF-40 그리고 UF-50이라 하였다.

역삼투막의 경우 0°C로 유지된 증류수에서 60분간 겔화한다. 그리고 막의 표면에 기공(pore)크기를 조절하기 위하여 증류수의 온도를 적절하게 변화시켜 10분동안 shrinkage 한다. 증류수의 온도가 67, 72 그리고 77°C일 때 제조된 분리막을 각각 RO-67, RO-72 그리고 RO-77이라 하였다.

폴리설폰 막의 고분자 용액의 조성 및 분리막 제조

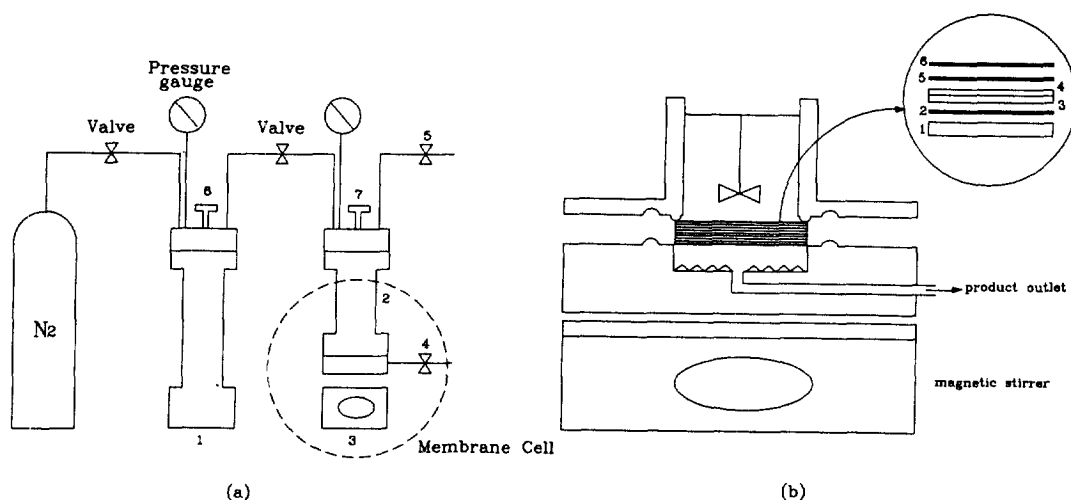


Fig. 1. (a) A schematic diagram of the reactor.

1. Reservoir, 2. Reactor, 3. Magnetic stirrer, 4. Permeation port, 5. Sampling port, 6, 7. Feeding port

(b) A pop-up view of the membrane cell.

1. Porous plate, 2. R.O. membrane, 3. Macrofilter membrane, 4. Cell layer, 5. Filter paper, 6. U.F. membrane

방법은 Table 2에 나타났다. 유리병에 밀봉시킨 후, 40℃에서 24시간정도 교반시켰으며, 완전용해된 용액은 5℃에서 보관하였다. 분리막 제조시 상온에서 유리판 위에 얇게 편후 공기 중에 60초간 방치하여 용매인 NMP (N-Methyl-2-Pyrrolidone)을 증발시켰다. 증발시킨 분리막을 황산-증류수 용액에 넣어 10분간 겔화시킨다. 겔화매질 중 황산의 농도가 15, 20 그리고 25 wt%일 때 제조한 한외여과막을 각각 PSf-H15, PSf-H20 그리고 PSf-H25라 하였다.

2-3. 막 특성 측정

제조된 한외여과막과 역삼투막을 발효조건의 압력인 400 psig에서 순수한 물에 대하여 투과도(pure water permeability, PWP)를 측정하였다. 각각 시간당 투과되어 나오는 물의 양을 측정하여 한외여과막과 역삼투막의 특성을 분석하였다. 또한 제조된 한외여과막을 발효조건의 압력인 400 psig에서 글루코오스 0.10, 0.25 그리고 0.50몰농도의 수용액에 대하여 시간당 투과된 글루코오스의 양을 측정하였다. 역삼투막은 글루코오스 0.10, 0.25 그리고 0.50몰농도와 에탄올 1.0, 1.5 그리고 2.0몰농도 수용액에 대하여 시간당 투과되어 나오는 양으로 투과속도(permeation rate, PR)를 측정하였다. 한외여과막과 역삼투막에 대해서 글루코오스와 에탄올의 배제율(separation factor, β)을 구하기 위하여 발효시 압력에서 투과시키기 전의 초기 글루코오스와 에탄올의 양과 한외여과막과 역삼투막을 투과한 후의 글루코오

스와 에탄올의 양을 비교하여 측정하였다.

2-4. 에탄올 및 당 분석

에탄올 분석은 가스크로마토그래피(gas-liquid chromatography : Packard 437)를 사용하였으며, 충전물로는 SE30(80/100 mesh) chromosorb W를 사용하였고 FID(Flame ionization detector)검출기를 사용하여 측정하였다. 주입구(injection port), column 및 검출기(detector)의 온도는 각각 250, 200 및 250℃이었으며, 운반가스로는 질소가스를 20 ml/min로, 수소가스와 공기를 연소가스로 사용하였다. 당 분석은 효소 발색을 이용한 UV-Spectrophotometer(Beohringer Mannheim GMBH Co.)를 사용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

2-5. 균농도 및 생존성측정

균농도는 Spectronic 20D(Milton Roy Co.)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 균체수와 흡광도의 보정곡선으로부터 결정하였다. 생존성 역시 methylene blue 용액을 이용하여 균체를 염색한 후 hemocytometer를 이용하여 총 균수에 대한 염색되지 않은 생존균수를 백분율로 나타내었다.

2-6. 균체 고정화

성장 배지에서 18시간 배양한 후 1 ml당 균체수를 측정하여 총 고정화 균체수가 1.5×10^8 가 되도록 적절

Table 3. The experimental data of glucose separation by using cellulose acetate UF membranes

Membranes	PWP(g/hr)	Molality	PR(g/hr)	f*
UF-50*	1007	0.10	883.2	0.005
		0.25	700.5	0.032
		0.50	675.0	0.088
UF-40	325	0.10	305.5	0.080
		0.25	274.0	0.122
		0.50	219.8	0.190
UF-30	98	0.10	76.3	0.513
		0.25	67.8	0.555
		0.50	55.6	0.672

*The number after UF means the ethanol concentration (vol%) in gelation medium

#f = feed glucose concentration

$$-\frac{\text{permeate glucose concentration}}{\text{feed glucose concentration}}$$

량을 0.2 μm 정밀여과막(Cellulose Nitrate Membrane : Whatman Co.)을 통해 초기 균체수를 일정하게 유지시켰다. 정밀여과지의 윗부분은 한외여과막을, 아랫부분은 역삼투막을 샌드위치 형태로 포갠 후 다공성 판위에 옮겨 반응기에서 고정시켰다.

2-7. 실험장치 및 방법

실험은 회분식 공정을 통하여 얻은 최적화조건을 이용하여 연속 발효공정을 수행하였다. 먼저 반응조의 막장치부분을 이용하여 한외여과막과 역삼투막의 특성을 각각 조사하였다.

회분식 발효공정은 Fig. 1처럼 막장치의 아랫부분으로부터 다공성판, 역삼투막, 정밀여과막, 균체, 한외여과막을 차례로 포갠 후 반응조의 밑부분에 설치하였다.

기질과 영양물을 투입구로 막표면으로 투입 후 질소를 불어 넣어 혐기적 조건으로 유지하였으며, 압력을 2758 kPag (= 400 psi) 까지 올려 발효를 수행했다. 반응기 내의 발효조건은 30°C 로 유지시켰으며, 생산되어 투과된 용액과 막표면에서 채취한 용액은 에탄올과 당 분석을 위해 냉동고에 보관하였다.

연속 발효공정은 회분식 공정과 같이 반응조에 막을 이용하여 균체를 고정시킨 후 기질과 영양물이 공급된 저장조와 반응조를 각각 혐기적 조건을 유지시킨 후 발효를 수행하였다. 반응조는 압력을 조절하여 배지가 일정하도록 유지하도록 하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3-1. 분리막 선택

Table 4. The experimental data of glucose separation by using cellulose acetate RO membranes

Membranes	PWP(g/hr)	Molality	PR(g/hr)	f
RO-67*	71.5	0.10	56.7	0.910
		0.25	48.4	0.907
		0.50	14.2	0.903
RO-72	58.0	0.10	47.3	0.985
		0.25	38.5	0.981
		0.50	23.0	0.980
RO-77	45.5	0.10	30.0	0.998
		0.25	22.7	0.982
		0.50	18.8	0.982

*The number after RO means the shrinkage temperature

3-1-1. 한외여과막

셀룰로오스 아세테이트로 제작된 한외여과막 각각을 순수한 물에 대한 투과도와 투과특성인 투과속도 및 배제율을 글루코오스 0.1, 0.25 및 0.5 몰농도에서 발효 수행시 압력인 2758 kPag (= 400 psig)에서 실시하여 Table 3에 나타내었다. 투과도의 경우 UF-50막이 UF-40이나 UF-30막 보다 높음을 알 수 있었는데 이것은 겔화 매질(gelation medium)의 농도에 따른 기공크기의 조절이 잘 이루어졌음을 의미한다. 투과속도의 경우 당 농도에 따라 UF-50막이 가장 높음을 알 수 있었으며, 또한 배제율도 가장 낮음으로 글루코오스를 원활히 통과시킴을 알 수 있었다. 결과적으로 한외여과막은 당에 대한 배제율이 낮고, 높은 투과도를 갖는 UF-50막이 본 연구를 위해 최적임을 알 수 있었다.

3-1-2. 역삼투막

발효시 역삼투막은 균체를 고정화하며 생성물인 에탄올을 선택적으로 투과시키며, 글루코오스는 배제시킬 수 있는 기능을 갖추어야 한다. 그러므로 발효시 압력 하에서 RO-67, RO-72 그리고 RO-77 막에 대하여 글루코오스는 0.1, 0.25 및 0.5몰에 대하여 에탄올은 1.0, 1.5 및 2.0몰에 대하여 각각 투과도와 배제율을 측정하여 Table 4, 5에 나타냈다. 역삼투막에 대한 글루코오스 각 농도에 따른 투과도 및 배제율을 확인할 수 있었다.

먼저 역삼투막에 대한 PWP(pure water permeability)는 shrinkage온도가 낮을수록 높은 값을 갖는다. 또한 막특성 결과를 보면 RO-72 및 RO-77막이 당에 대한 배제율이 높은 것을 알 수 있어 RO-72 및 RO-77막의 사용이 본 연구를 위해 유리함을 알 수 있다. 에탄올에 대한 막특성 결과를 보면 배제율의 경우 모두 낮은 값을 나타내었는데, 에탄올의 투과도는 RO-77막이 RO-72막보다 매우 낮은 값을 나타내고 있다. 즉, RO-72막이 RO-77막보다 에탄올에 대한 투과도 및 투과속도가

Table 5. The experimental data of ethanol separation by using cellulose acetate RO membranes

Membranes	Molality	PR(g/hr)	f
RO-67*	1.0	70.8	0.210
	1.5	67.0	0.191
	2.5	46.3	0.170
RO-72	1.0	53.3	0.220
	1.5	50.6	0.190
	2.5	46.7	0.155
RO-77	1.0	46.5	0.266
	1.5	40.3	0.200
	2.0	35.5	0.152

*The number after RO means the shrinkage temperature

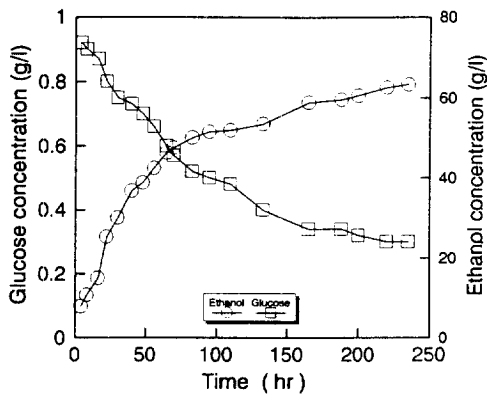


Fig. 2. Ethanol and glucose concentration in batch fermentation (400 ml, 400 psig, 18% glucose UF-50/cells/RO-72).

높음을 알 수 있다. 그러므로 역삼투막의 경우는 글루코오스는 배제하고 에탄올에 대해 선택적으로 잘 투과시킬 수 있는 RO-72막을 선택하였다.

3-2. 회분식 발효

3-2-1. 농도분극 영향

반응조에 400 ml 용량의 발효배지를 넣고 혐기적 조건을 유지한 후, 2578 kPag의 압력으로 기질수용액을 균주층에 도달시켜 발효를 수행하였다. 농도분극 현상을 감소시키기 위해 막표면에서 교반을 시켰으며, 250시간 동안 반응시켜 투과한 생산물 중의 에탄올과 글루코오스량을 분석하여 Fig. 2에 나타냈다. 막의 오염이나 농도분극으로 인하여 발생하는 막의 기공 막힘현상에 의한 생산량 감소여부의 측정을 위하여 같은 조건하에서 교반을 수행하지 않고 발효를 수행하여 생산량을 분석하여 Fig. 3에 나타냈다. Fig. 2, 3에서 나타났듯이 반응

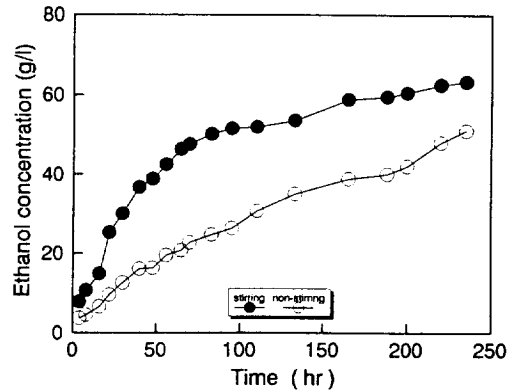


Fig. 3. Comparison of ethanol concentration between stirring and non-stirring system (400 ml, 400 psig, 18% glucose).

조의 막 윗부분에서 교반을 수행할 경우 교반을 하지 않을 경우보다 에탄올생산량이 많았으며, 또한 교반을 수행하지 않을 경우 발효수행 중 생산물의 투과속도(production permeation rate)가 0.79 g/l에서 0.52 g/l로 떨어짐이 관찰됐다. 이것은 교반을 수행하지 않을 시 농도분극 현상 및 막 오염현상(membrane fouling)이 발생한다는 것을 보인 결과라 하겠다.

결국, 발효수행시 교반을 수행하지 않을 경우 농도분극으로 인한 막 오염현상이 발생하며, 이로 인한 글루코오스용액이 균체층으로의 자유로운 공급이 제한되어 에탄올의 생산량 감소를 유도한다고 볼 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 한외여과막위에서 계속적인 교반을 수행하여야 하겠다.

3-2-2. 성장공간부여

균체를 한외여과막과 역삼투막으로 고정화하여 250시간 발효를 수행한 후 균체수를 측정할 결과 초기에 비해 5배 증가함을 보였다. 이것은 균체의 한계 성장공간 내의 최대성장으로 해석할 수 있으며, 또한 균체의 성장공간을 부여할 경우 균체가 보다 많이 성장할 수 있다는 것을 의미한다.

본 실험에서, 균체층위에 거름종이(filter paper: Whatman No. 1)를 첨가함으로써 균체의 성장공간부여를 시도하였으며, 발효후 균체수 증가 정도를 확인하여 보았다. 실험결과 거름종이를 첨가하여 발효를 수행하였을 경우 기존의 발효보다 높은 생산량을 보였으며, 최종 균체의 수도 초기보다 6.5배 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 교반을 실시하지 않았을 경우 한외여과막 윗부분에서의 농도분극 현상으로 인하여 생산량 감소현상을 확인할 수 있었다. 기존의 거름종이를 첨가하지 않을 경우와 비교한 결과 Fig. 4와 같이 거름종이를 첨

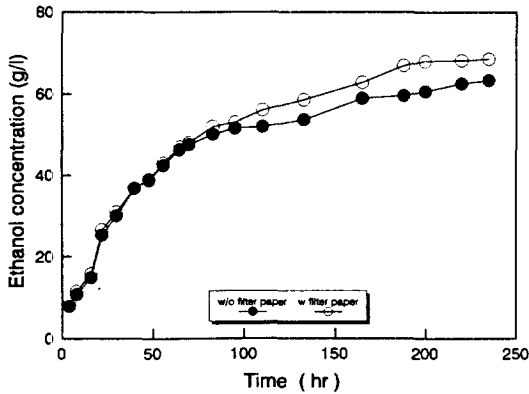


Fig. 4. Comparison of ethanol concentration between without filter paper and with filter system (400 ml, 400 psig, 18% glucose).

가할 경우 에탄올 생산량이 약 15% 증가함을 볼 수 있다. 이것은 거름종이를 첨가할 경우 약 90시간 이후부터 균체층의 균체성장애 의한 한외여과막의 부분적인 막힘 현상을 감소시킨 결과로 볼 수 있다. 이 현상은 기존의 투과도가 0.79 g/h에서 0.9 g/h까지 증가함으로써 확인할 수 있었다.

결과적으로, 막표면의 농도분극을 막기 위한 지속적인 교반수행과 균체층에 성장공간을 부여함으로써 보다 높은 알코올생산을 유도할 수 있었다.

3-2-3. 새로운 합성막

회분식 발효를 통한 실험결과 기질수용액층에서 에탄올이 전체 생산량의 약 11%에 달하는 것을 측정할 수 있었다. 이것은 고정화된 균체층에서 생산된 에탄올이 완전히 역삼투막을 통과하여 분리되지 않고 소량의 에탄올이 고정화 균체층으로부터 한외여과막을 통하여 기질수용액층으로 역확산(back-diffusion)되는 현상으로 볼 수 있다. 이러한 역확산을 감소시키기 위해서는 사용한 셀룰로오스 아세테이트(cellulose acetate) 한외여과막보다 소수성인 새로운 합성막으로의 대체가 필요하겠다. 그 결과 실험실적 재조가 용이하고 현재 상용화되어 있는 폴리설폰(polysulfone)막을 제조하였다. 그리고 기 사용된 셀룰로오스 아세테이트 한외여과막 대신 대체한후 에탄올에 대한 역흐름량의 감소여부를 측정하였다. 먼저 기존의 셀룰로오스 아세테이트 UF-50 막과 투과도와 글루코오스에 대한 배제율이 유사한 폴리설폰막을 제조하여 Table 6에 나타냈다. 폴리설폰의 겔화 매질인 황산 25%인(PSf-H25) 경우의 합성막이 기존의 셀룰로오스 아세테이트 UF-50막의 투과도 및 투과속도와 비슷한 특성을 나타내었으며, 글루코오스에 대한 배제율도 매우 낮은 값을 나타내었다. 기존의 UF-

Table 6. The experimental data of glucose separation by using polysulfone UF membranes

Membranes	PWP(g/hr)	Molality	PR(g/hr)	f
PSf-15*	660.1	0.10	480.5	0.190
		0.25	405.0	0.268
		0.50	322.8	0.355
PSf-20	872.3	0.10	686.6	0.055
		0.25	551.3	0.070
		0.50	474.1	0.088
PSf-25	1150.4	0.10	818.9	0.0061
		0.25	792.7	0.0011
		0.50	665.4	0.0330

*The number after PSf means the H₂SO₄ concentration (vol%) in gelation medium

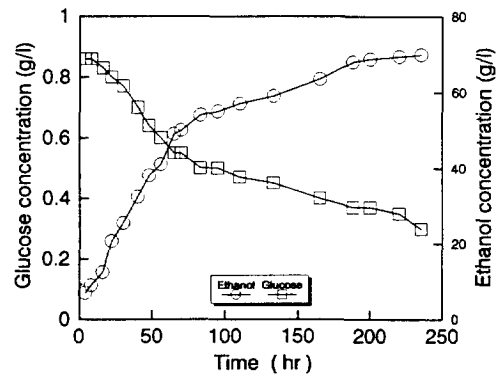


Fig. 5. Ethanol and glucose concentration in batch fermentation (400 ml, 400 psig, 18% glucose PSf-H25/filter paper/cells/RO-72).

50막을 PSf-H25막으로 대체하여 발효를 수행한 결과를 Fig. 5에 나타냈다.

폴리설폰(PSf-H25)막을 사용하여 발효후 에탄올의 역확산에 의한 배지저장 탱크에서의 에탄올농도는 7.0 g/l로 기존의 셀룰로오스 아세테이트(UF-50)막을 사용할 경우의 8.5 g/l보다 낮아 실제 역확산이 폴리설폰막을 사용한 경우 감소했음을 알 수 있었으며 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 투과된 에탄올량과 역확산된 양을 합한 생산된 전체 에탄올에 대한 각각 차지한 비를 비교하면, 셀룰로오스 아세테이트가 사용된 경우 막을 투과한 에탄올은 전체의 86.7%, 역확산에 의한 에탄올은 13.3%이었다. 그리고 폴리설폰을 사용한 경우에는 막을 투과한 에탄올은 전체 생산된 에탄올의 90.05%이며 역확산된 에탄올은 9.95%이었다. 이 결과분석으로 소수성 한외여과막으로 대체한 경우가 에탄올 역확산 방지에 상당한 효과가 있음을 알 수 있었다.

3-2-4. 최적 발효조건에서의 에탄올 연속생산

Table 7. A comparison of batch and continuous type fermentatin systems(*means continuous type fermentation system.)

Membrane system	Initial cell no. $\times 10^{-9}$	Final cell no. $\times 10^{-9}$	Max. glucose concentration in permeate(g/l)	Max. ethanol concentration in permeate(g/l)	Ave. area flux $\times 10^3(\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr})$	Productivity (g/l-hr)
UF-50/cells/RO-72	1.5	7.51	0.93	62.5	2.692	26.92
Non-stirring						
UF-50/cells/RO-72	1.5	4.64	0.93	51.7	1.583	15.83
UF-50/filter paper/ cells/RO-72	1.5	9.75	0.88	68.5	2.949	29.49
PSf-H25/filter paper/ cells/RO-72	1.5	9.92	0.86	70.0	3.036	30.36
PSf-H25/filter paper/ cells/RO-72*	1.5	11.0	0.86	70.3	3.23	32.28

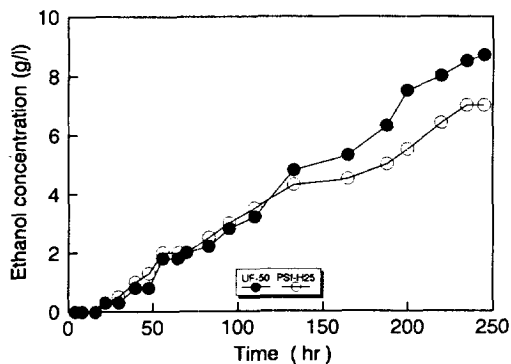


Fig. 6. Comparison of ethanol concentration in feed solution by back diffusion between UF-50 and PSf-H25 membrane system(400 ml, 400 psig, 18% glucose).

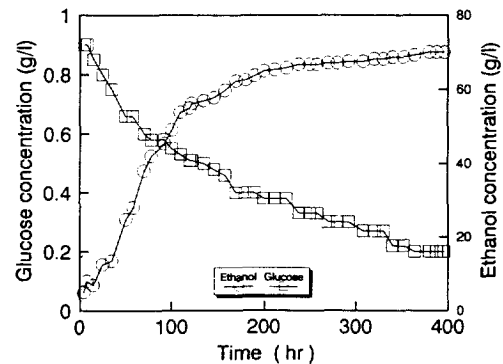


Fig. 7. Ethanol and glucose concentration in continuous fermentation(700 ml, 400 psig, 18% glucose, PSf-H25/filter paper/cells/RO-72).

여러 형태의 회분식 발효결과와 최적조건에서의 연속식 발효결과를 Table 7에 정리하여 비교한 결과, 막의 농도분극 및 막오염을 방지하기 위한 계속적인 교반을 실시하고, 균체의 성장과 한외여과막의 기공 막힘현상을 감소시키기 위한 거름종이의 첨가, 그리고 에탄올의 역확산 감소를 위한 소수성인 합성막을 도입한 발효공정이 가장 유리한 발효조건임을 알 수 있었다.

회분식 발효를 통해 얻은 최적의 발효조건에서 저장조에 발효배지를 780 ml 투입하고, 반응조에는 교반 및 발효 수행상 최적량을 유지시킨 후 혐기적인 조건에서 연속 발효를 수행하여 막을 투과한 에탄올 및 당 변화량을 Fig. 7에 나타냈다. 연속공정 중 반응조의 발효배지량은 균체중에서 생산된 에탄올이 발효배지상으로 역확산되어 희석되는 효과를 최소화하기 위해 250 ml로 일정하게 유지시켰다. 막표면에서 교반을 실시하며 400시간 동안 발효를 수행한 결과, 250시간까지 투과된 에탄올의 농도는 증가하였으며, 그 이후부터 일정량의 에탄올을 연속적으로 생산할 수 있었다. 상대적으로

투과된 글루코오스량은 반응초기에 높은 농도이었으며 점차 감소하는 결과를 보여주었다. 최종 에탄올 생산량은 70.3 g/l이고, 역확산에 의한 기질 수용액층의 최종 에탄올 농도는 7.0 g/l이었다. 연속 발효후의 막사이에 고정화된 효모의 최종 총 균체수는 1.1×10^{10} 이고, 균의 생존성(viability)은 80% 정도 유지되었다.

4. 결 론

한외여과막과 역삼투막 사이에 샌드위치 형태로 균체를 고정화한 평판형 막생물반응기의 문제점인 고정화 균체 성장에 의한 한외여과막의 부분적 막힘 및 막사이에 균체성장을 위한 공간 제공으로 성장의 정도를 확인하기 위하여 거름종이를 첨가하였을 경우, 막의 막힘현상 감소와 최종균체수가 초기보다 6.5배까지 증가함을 알 수 있었다. 그리고 셀룰로오스 아세테이트막보다 소수성인 폴리설폰막을 사용함으로써, 기질 수용액층으로의 에탄올 역확산량을 17.4% 감소시킬 수 있

었으며, 감소된 양만큼 생산성이 향상됨을 확인하였다. 기존의 공정에 거름종이를 첨가하고, 소수성인 합성막으로 대체된 최적화 발효조건하에서 400시간 동안 연속적으로 발효를 수행한 결과 최대 70.3 g/l까지 에탄올을 생산하였다.

감 사

본 연구는 1992년 교육부 지원 한국학술진흥재단의 학술연구 지원비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Anselme, M. J. and Tedder, D. W.: *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 736(1987).
2. Catapano, G., Iorio, G., Drioli, E. and Filosa, M.: *J. Mem. Sci.*, **35**, 325(1988).
3. Tripodi, M. K.: In The 1985 Third Annual Membrane Technology/Planning Conference Proceedings, 81(1985).
4. Cheryan, M. and Mehaia, M. A.: *Membrane Separations in Biotechnology*, 255, Marcel Dekker, New York(1986).
5. Schultz, J. S. and Gerhardt, P.: *Bacteriological Reviews*, **33**, 1(1969).
6. Abbott, B. J. and Gerhardt, P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 577(1970).
7. Abbott, B. J. and Gerhardt, P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 591(1970).
8. Wang, D. I. C., Sinskey, A. J. and Butterworth, T. A.: *Membrane Science and Technology*, 98, Plenum Press, New York(1970).
9. Cheryan, M. and Mehaia, M. A.: *Reverse Osmosis and Ultrafiltration*, 231, American Chemical Society, Washington D. C.(1985).
10. Inloes, D. S., Taylor, D. P., Cohen, S. N., Michaels, A. S. and Robertson, C. R.: *Applied Envi. Microbiology*, **46**, 264(1983).
11. Shuler, M. L., Sahai, O. P. and Hallsby, G. A.: *Annals N. Y. Acad. of Sci.*, **413**, 373(1983).
12. Cho, T. and Shuler, M. L.: *Biotechnol. Progress*, **2**, 53(1986).
13. Vieth, W. R. and Venkatasubramanian, K.: *Method in Enzymology*, 243, Academic Press, New York(1976).
14. Jeong, Y. S., Vieth, W. R. and Matsuura, T.: *I & EC Research*, **28**, 231(1989).
15. Mehaia, M. A. and Cheryan, M.: *Applied Microbiology Biotechnol.*, **20**, 100(1984).