

## 응집성 효모를 이용한 연속 알코올 발효

남기두\* · 이인기 · 조훈호

일산실업(주) 부산주정공장 연구실

### Continuous Alcohol Fermentation by a Flocculating Yeast

Nam, Ki-Du\*, In-Ki Lee and Hoon-Ho Cho

Laboratory, Ilsan Trading Co., Ltd., 824, Munhyun 4-dong, Nam-Ku, Pusan 608-044, Korea

**Abstract** — In this study continuous alcohol fermentation of molasses by the recirculation system has investigated. After cultivation of yeast cells in the YPD medium with increasing the medium concentration from 10 to 183.5 g/l stepwisely, the fermentation medium was replaced by molasses. The maximum cell mass was 25 g/l, and the mean cell mass during the operation was 23.5 g/l, which was 3.4 times higher compared with a conventional batch system. The optimum fermentation conditions with feeding molasses of 180 g/l were obtained when the fermentation was carried out at 500 rpm and at the dilution rate of 0.037 h<sup>-1</sup>. Under these conditions we could safely operate the fermentor for 645 h without any trouble. The maximum alcohol productivity was 4.9 g/l·h with an alcohol concentration of 53.9 g/l at the dilution rate of 0.091 h<sup>-1</sup>.

연속식은 회분식 발효공정보다 진보된 공정이다. 남미 혹은 유럽에서는 주로 당밀이나 밀을 주원료로 하여 연속발효공정을 통해 연료 및 음용 알코올을 생산하고 있으며, 곡물인 밀을 사용하는 알코올 공장은 대부분 제분 공장과 병행 설치되어 있는 경우가 많다(1, 2).

Biostil 연속발효법은 하나의 발효조를 사용하여 효모를 재순환시켜 10시간 이내에 발효를 끝내고 beer탑에서 연속적으로 알코올을 회수한다. 폐액의 일부는 mash 제조의 회석수로서 재활용하며 beer탑에 공급되기 전, 분리공정에서 회수된 섬유질이나 큰 입자상 물질등은 beer stripper에 공급되어 고형분 25~30%까지 농축된 폐액으로 배출되므로 증발농축시켜 단미사료인 distillers dried grains with solubles (DDGS)를 생산하여 원료와 비슷한 가격인 250~300 US\$/T에 판매되고 있다(1, 3).

따라서 이와같은 연속발효공정이 다양한 원료를

사용하고 있는 국내실정에 부합되는지를 검토하고, 나아가 국내 여건에 알맞는 공정개발을 목적으로 전 분질 연속발효용 Pilot plant 설계를 위하여 먼저 당 밀을 이용한 Two-stage 연속발효(Two-stage CSTR)를 실시하였던 바 그 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배지

당 연구실에 보관 중인 *Saccharomyces uvarum* IS 026을 사용하였으며, 0.1% yeast extract, 0.5% bacto peptone, 10% glucose, 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 및 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(pH 5.0)의 조성 배지와 0.5% yeast extract, 0.5%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 4.5)를 함유한 배지를 121 °C에서 20분간 살균하여 사용하였다.

#### 연속 발효

알코올 발효는 Two-stage CSTR system으로 jar-fermentor(Sanko Bio, Japan)에 자체에서 제작한 발효조를 연결구성하였다. 발효조의 working volume은

**Key words:** *Saccharomyces uvarum*, molasses, flocculating yeast, two-stage CSTR

\*Corresponding author

1st ; 1,500 ml, 2nd ; 500 ml)이고 효모회수용 침전조는 200 ml로써 침전된 효모는 연속적으로 1st 발효조에 micro tube pump(Eyela MP-3, Japan)로 재순환시키고, 1st 발효조에만 0.03 vvm, 6 h/d의 호기적 조건으로 운전하였다.

**분석 방법**

환원당은 Bertrand법(4)으로 분석하였고, 알코올 및 효모농도는 전보(5)와 같은 방법으로 분석하였다.

**결과 및 고찰**

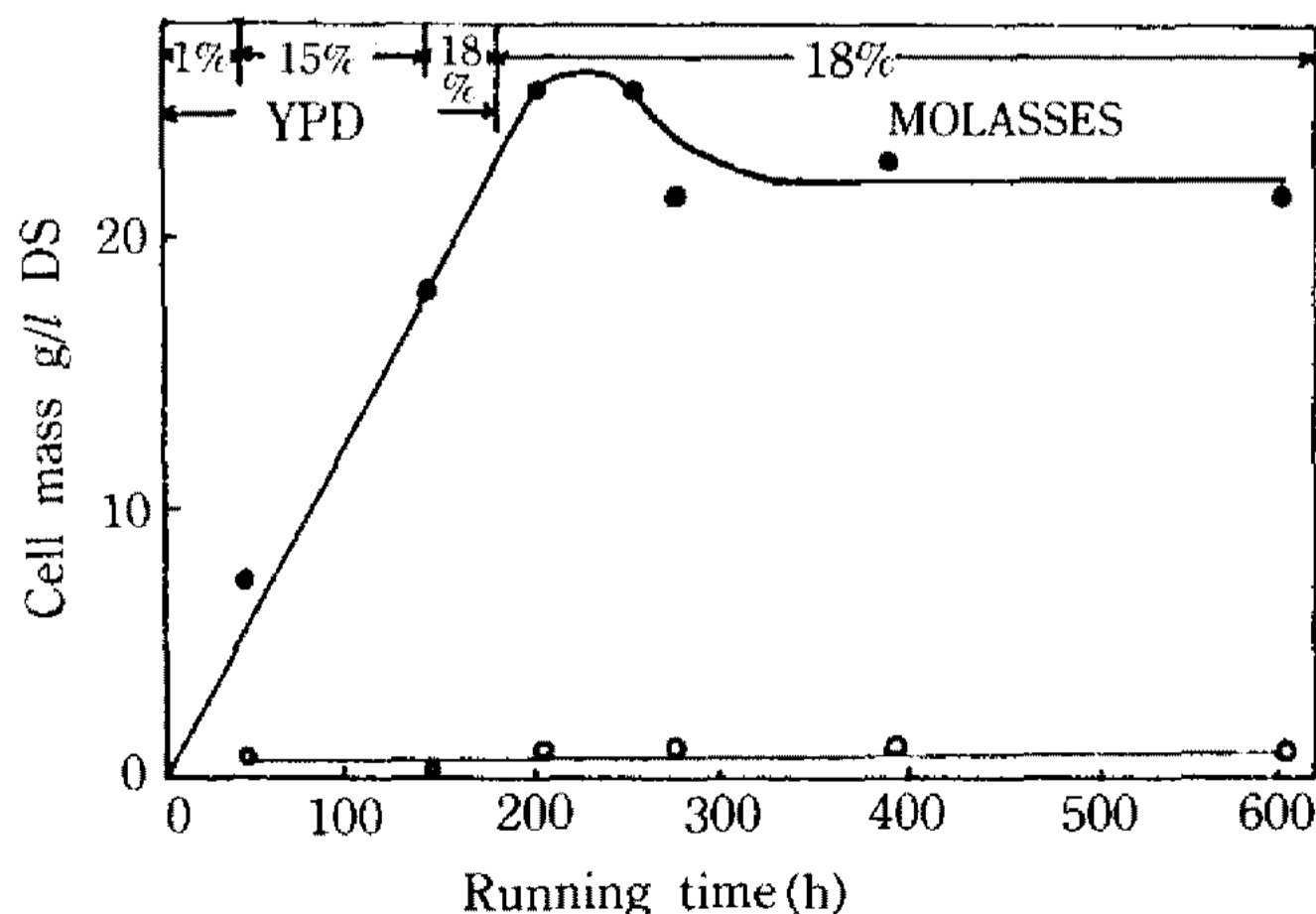
**효모 증식 배양**

본 Two-stage CSTR에서 효모증식을 위해 1% YPD 배지 34 ml/h를 47시간동안 호기적 조건으로 배양한 결과 효모농도는  $1.3 \times 10^8$  cells/ml였다.

정상상태에서는 효모농도가 25 g/l( $4.4 \times 10^8$  cells/ml)까지 증가하였고 운전중 평균 효모농도는 23.5 g/l였다(Fig. 1). 이 농도는 회분식 발효조의 세포농도보다 3.4배 높았으며 발효 유출액중 침전되지 않고 free 상태로 wash out되는 효모농도는 0.7 g/l였다. 따라서 응집성을 가진 *Sacch. uvarum* IS026 균주가 효모 재순환계에서 좋은 효과가 인정되었다.

**희석율과 교반속도에 대한 알코올농도 변화**

정상상태에서 18% 당밀배지를 공급한 결과 Fig. 2와 같이 희석율 증가에 따라 발효유출액중의 환원당 농도와 생산성이 증가하였다. 발효유출액중의 환원당



**Fig. 1. Cell mass variation during operation.** Aeration was controlled as 0.33 vvm/6h/day. Viability was kept over 95%.

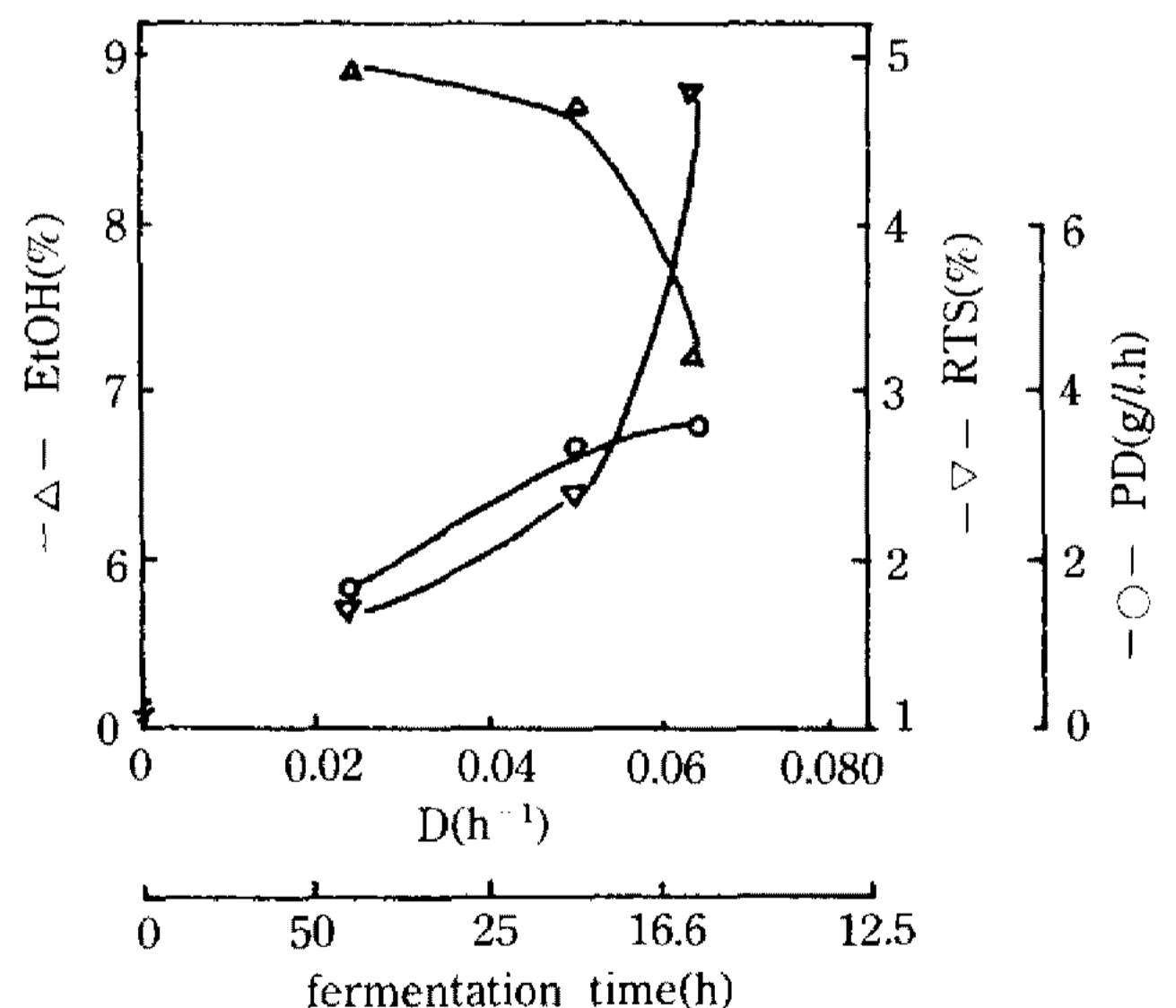
증가는 배지의 손실을 초래하여 원가와 직결된다. 본 실험에서 최적 운전 희석율은  $0.024 \text{ h}^{-1}$ 였으며 이때 생산성은  $1.71 \text{ g/l} \cdot \text{h}$ 로서 up-flow stream을 이용한 탑형 발효조의 생산성보다는 낮았다(6-8). 당농도를 낮추면 생산성은 증가될 것으로 예상되나 알코올 회수공정에서 알코올 농도가 낮아 원가가 상승하게 된다.

Two-stage CSTR에서 동일농도의 배지를 공급할 때, 교반속도의 증가에 따라 알코올 농도가 증가하였으나 계속증가에 의하여 현저히 감소하였다. 이와 같이 지나친 교반속도 증가는 빠른 tip speed에 의하여 효모가 shear stress를 받는데 기인된 것으로 사료된다(Fig. 3).

**수율**

YPD 배지를 공급하여 정상상태가 되었을 때 당밀 배지로 교체하였다. Two-stage CSTR에서 효모 생존율 증가와 발효촉진을 위해 1st 발효조에만 호기적 조건으로 645시간 동안 연속 운전하였으며, 운전 중 알코올과 잔당농도의 변화는 Fig. 4와 같다. 1st 발효조에서 환원당의 98%가 발효되었고, 효모 생존율을 95% 이상 유지되었다.

Table 1에 나타난 바와 같이 희석율  $0.024 \text{ h}^{-1}$ 에서 평균 알코올 농도는  $71.4 \text{ g/l}$ 으로서 수율이 회분식의 0.4 g/g과 같았다. 이 결과는 회분식 수율과 비교했을



**Fig. 2. Variation of EtOH and RTS on the dilution rate.** Fermentation conditions: 200 rpm, 32°C; aeration rate, 0.33 vvm, 6 h/day; total sugar, 178.8 g/l.

때 효모의 재순환으로 효모증식에 소모되는 당농도가 절약되므로 수율이 증가되어야 한다. 그러나 통기량 증가로 인해 발효액중의 휘발성이 강한 알코올이 CO<sub>2</sub>

및 공기와 같이 증발손실되므로 가능한 적은 양의 공기를 공급하는 것이 바람직하였으며, 배출가스로부터 알코올 회수를 위해 scrubber를 설치하였다.

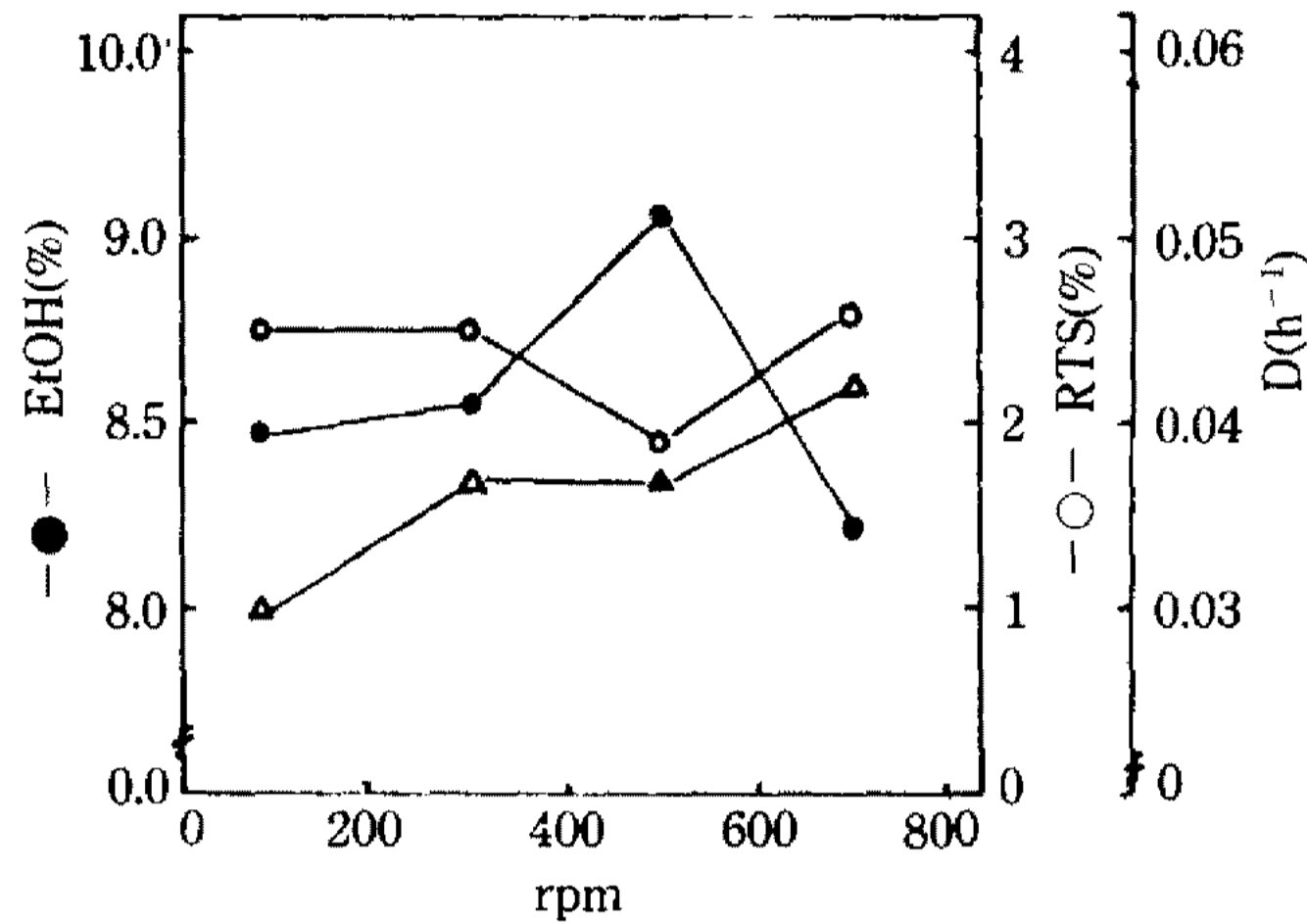


Fig. 3. Variation of EtOH and RTS on the agitation speed and the dilution rate.

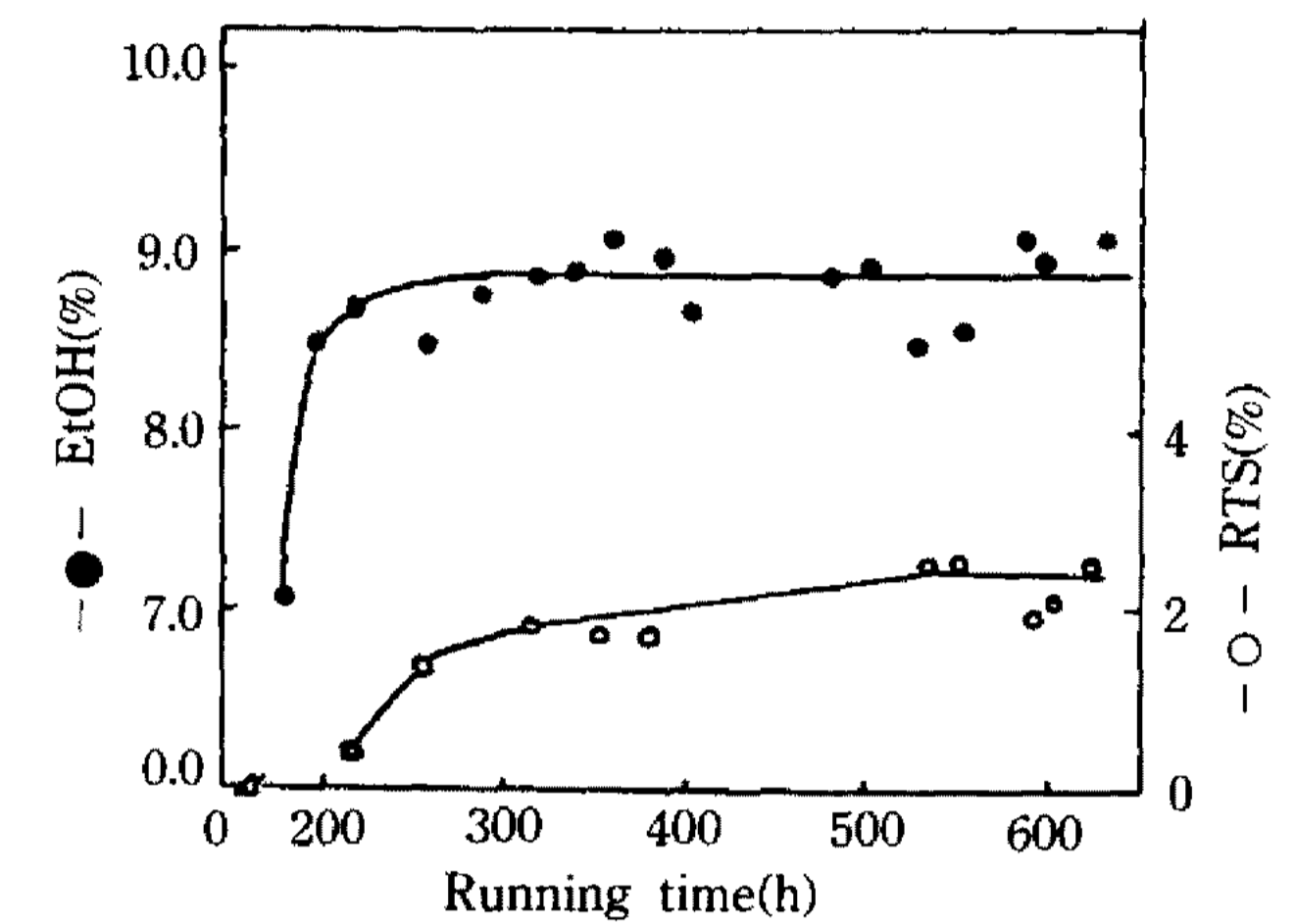


Fig. 4. Profiles of EtOH and RTS during continuous alcohol fermentation.

Table 1. Kinetic data obtained from batch (B) and continuous fermentation (C)

Broth	D(h <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	Total sugar(g/l)	Remained total sugar(g/l)	Alcohol(g/l)	Y <sub>p/s</sub> <sup>2)</sup> (g/g)
Molasses(C)	0.024	178.8	16.7	71.4	0.40
Molasses(C)	0.036	179.2	17.0	70.0	0.39
Molasses(B)	—	181.7	—	72.1	0.40

<sup>1)</sup>D: dilution rate=1/retention time.

<sup>2)</sup>Y<sub>p/s</sub> was expressed as the yield of conversion of glucose to alcohol.

Table 2. Comparison of productivity (PD) obtained from batch (B) and continuous fermentation (C)

Broth	D(h <sup>-1</sup> )	Total sugar(g/l)	Alcohol(g/l)	PD(g/l·h)
Molasses(C)	0.024	178.8	71.4	1.71
	0.049	"	69.3	3.39
	0.062	"	57.8	3.58
	0.091	"	53.9	4.91
Molasses(B)	—	181.7	72.1	0.75
Cassava(B)	—	191.2	81.6	0.68
Naked barley(B)	—	178.9	71.0	0.59

Table 3. Fermentor volume needed for producing a 48,000 l/d 95% (v/v) alcohol (1,509.8 kg, EtOH/h)

Broth	Fermentor volume(m <sup>3</sup> )	No of fermentor with 117 kl	Settler volume(m <sup>3</sup> )	Remarks
Molasses (C)	883	10 <sup>1)</sup>	110	w=0.8 <sup>2)</sup>
Molasses (B)	2,020	21 <sup>3)</sup>		w=0.9
Naked barley (B)	2,560	27 <sup>3)</sup>		w=0.9

<sup>1)</sup>F<sub>n</sub>=1,509.8/1.71/0.8/117=9.5≅10 (Tanks) Where, 1.71: alcohol productivity (kg/m<sup>3</sup>·h)

<sup>2)</sup>Working volume

<sup>3)</sup>Included with 2 fermentors under distillation and stand-by.

### 생산성(PD)에 의한 발효조 용량 결정

회석율 증가에 따라 생산성이 증가(Table 2)하나 산업규모의 공장을 설계할 때 수율이 회분식과 같거나 높을 때의 생산성을 기준으로 설계해야 배지의 손실을 줄일 수 있다. 따라서 산업적 생산(48 kl/d)규모에서 여러가지 원료로부터 얻은 생산성과 당밀의 발효에 필요한 발효조 용량을 계산하면 Table 3과 같이 쌀보리의 경우 117 kl의 발효조가 27기, 당밀은 10기로서 같은 양의 알코올을 생산할 수 있다.

### 요 약

효모 재순환계에 의한 당밀의 연속발효를 하였다. 단계적으로 YPD배지 농도를 10 g/l에서 183.5 g/l로 증가시킨 후 최종 발효배지는 당밀로 하였다. 최고의 효모농도는 25 g/l였고, 운전중 평균 효모농도는 23.5 g/l으로 종래 회분식보다 3.4배 높았다. 최적 발효조건은 180 g/l의 당밀배지를 공급하였을 때 교반속도 500 rpm, 회석율 0.037 h<sup>-1</sup>였다. 이 조건을 645시간

연속 운전하였으며 최고 알코올 생산성은 4.9 g/l·h로서 이때의 회석율은 0.091 h<sup>-1</sup>, 알코올 농도는 53.9 g/l이었다.

### References

1. Roger, C.: *Sugary Azucar Yearbook*, 96 (1983)
  2. Roger, C.: *AC Biotechnics AS*, Arlov, Swden (1984)
  3. Adams, H. R. and G. Flynn: *Report of the tropical products institute*, G 169 (1982)
  4. Bertrand, G: *Bull. Soc. Chem. Paris.*, **35**, 1285 (1906)
  5. Ryu, B. H., W. S. Kim, M. H. Choi and K. D. Nam: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bieong.*, **14** 233 (1986)
  6. Ryu, B. H. and K. D. Nam: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bieong.*, **15**, 248 (1987)
  7. Netto, C. B. and G. Goma: *Biotech. Bieong.*, **30**, 320 (1987)
  8. Kida, K., M. Yamadaki, S. I. Asano, T. Nakaka and Y. Sonada: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 107 (1989)
- (Received September 28, 1990)