

막분리를 이용한 미생물 재순환 연속 알콜발효에 관한 연구

이준형 · 목영일 · *허병기

아주대학교 화학공학과, *인하대학교 생물공학과

A Study on Continuous Alcohol Fermentation with Cell Recycle by Means of Membrane Separation

Joon Hyung Lee, Young Il Mok and* Byung Ki Hur

Department of Chemical Engineering Ajou Univ.

*Department of Biological Engineering Inha Univ.

ABSTRACT

One of the objectives of this work is to obtain information relevant to the industrial production of alcohol from sugar.

The fermentation of alcohol by a strain of *saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858 was studied in a continuous single-stage process with recycle of the cells via tangential flow microfiltration membranes.

The experimental results reported in this study pertain to continuous cultures with total cell-recycle by varying the dilution rate ($D=0.3, 0.5, \text{ and } 0.7 \text{ hr}^{-1}$) and glucose concentration (50, 100, 150, and 200 g/l sugar solution).

Productivity using a repeated cell recycle system was found extremely high, i.e., over 10 to 29 times higher than that of a simple batch system. When a sugar concentration of 200g/l at dilution rate, 0.7 hr^{-1} was used, 83.9g/l ethanol was formed with an ethanol yield of 0.42(82% of theoretical) based on sugar utilized.

서 론

발효공정은 반응 및 균체의 배양방식에 따라 회분식, 반회분식, 연속식, 교체배양 등으로 구분할 수 있으며, 이들 각 공정은 그 특성에 따라 각각의 장단점이 있다. 회분식공정은 조작이 간편하다는 장점이 있으나, 비증식속도, 비생성속도에 미치는 생성물의 저해 영향이 발효후반부에 크게 나타나고 반응기 용적효율이 낮다는 단점이 있다^(1,2). 반 회분식공정은 미생물의 농도를 높게 할 수 있는 장점이 있는 반면 조업이 번거롭고 해석이 어렵다. 이에 비하여 균체 재순환 연속식 공정은 생성물을 연속적으로 분리함으로써 생성물이 미생물의 성장에 미치는 저해현상을 줄일 수도 있고 회색속도도 단순 연속공정에 비하여 크게 증대시킬 수 있어서 생성물의 수율과 생산성을 높일 수 있다^(3,4). 에탄올 발효의 경우 회분식

발효에 의한 생산성은 $3\text{g/l} \cdot \text{hr}$ 근방의 값을 나타내나 균체 재순환 연속식 발효에서는 운전조건에 따라 $100\text{g/l} \cdot \text{hr}$ 까지 증대된다⁽⁵⁻⁷⁾.

생성물 분리방법에는 침전, 증류, 증발, 원심분리 및 막분리 등이 있다. 이 중 막분리는 원리 및 공정이 간편하고 균일한 크기의 생성물을 분리할 수 있는 장점이 있어 제품의 양산에 유리하다. 막 분리공정은 분리하고자 하는 분자의 크기에 따라 역삼투, 한외여과 및 정밀여과로 분류되며 각 공정에 사용되는 막의 세공경도 각각 0.0001 내지 $0.001\mu\text{m}$, 0.001 내지 $0.02\mu\text{m}$, 0.02 내지 $10\mu\text{m}$ 이다⁽⁸⁾. 막의 재료로는 초기에 cellulose acetate가 주로 사용되었으나, 현재에는 고온 및 강산 등의 조건 하에서도 그 기능을 발휘할 수 있는 aromatic polyamides, polysulfonates, polybenzimidazolone, 및 Durapore 등이 이용되고 있다. 또한 재래의 여과공정은 여과시간이

지남에 따라 퇴적되는 불용물로 인하여 여과속도가 급격히 감소하는 문제점이 있었으나, 접선류 또는 십자류 여과방법이 개발되어 여과성능이 획기적으로 개선되었다⁽⁹⁾. 그러나 재순환 장치의 무균처리와 설치 및 운전문제등으로 인하여 이론적 해석이 어렵기 때문에 최근에는 미생물 재순환 장치의 모든 공정은 유효전환율과 생산성재고에 중점을 두고 있다⁽¹⁰⁻¹³⁾.

본 연구에서는 접선류 막 분리 시스템을 이용한 미생물 재순환 연속식 발효공정에서 균체농도와 에탄올 생산성을 주입기질농도와 희석비의 함수관계로 규명하여 보았다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 균주는 오염이 적고 에탄올 발효능이 우수한 *sacchromyces cervisiae* ATCC 24858이다. YM배지를 사용하여 30°C에서 24시간 진탕배양한 배양액을 접종용 균주로 사용하였으며 접종량은 발효배지의 5%(v/v)로 하였다. 회분 및 연속발효 실험에 사용한 발효배지의 조성은 glucose 150g/l, yeast extract 8.5g/l, NH₄Cl 1.3g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.12g/l, CaCl₂ 0.06g/l를 기준으로 하였으며 당 농도를 150g/l 이외의 값으로 변화시킬 때는 다른 조성의 값도 비례적으로 변화시켰다.

실험장치

발효조는 Marubishi 회사의 용량 21인 MD-250을 사용하였으며 pH와 anti-foam제의 조절을 위하여 같은 회사 제품인 MDL-4CR Controller를 사용하였다. 여과장치는 Millipore사의 랩 카셀 시스템을, 여과막으로는 면적이 232cm²이고 세공경이 0.45 μm인 정밀여과막의 패킷을 사용하였다. 여과막의 한 패킷은 두장의 여과막과 그 사이에 filtrate separator 한장으로 구성되어 있다. 여과패킷을 두개이상 사용할 경우에는 패킷과 패킷사이에 retentate separator를 삽입하여 패킷이 서로 분리되도록 하였다. Fig.1은 본 연구에서 사용한 실험장치도를 나타내고 있다.

실험방법

본 연구에서 수행한 모든 실험에서 발효액의 pH는 5.5, 온도는 30°C이었다. 균체 재순환 연속 발효 실험에 대한 주입기질의 당 농도는 50, 100, 150, 200 g/l로 하였으며 각 당농도에서 희석비가 0.3, 0.5,

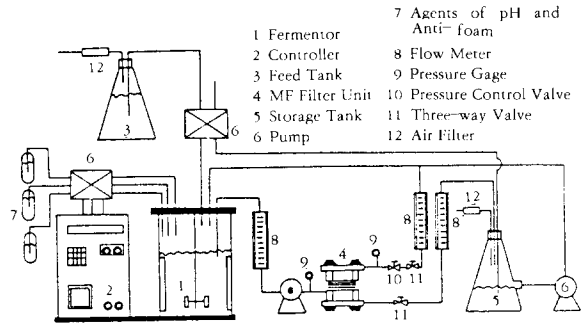


Fig. 1. Schematic Representation of Continuous Fermentation with Cell Recycle via Microfiltration Unit.

0.7 hr⁻¹인 세가지 경우에 대하여 발효특성치를 규명하여 보았다. 균체재순환 연속발효실험은 초기 당농도 140g/l인 배지를 28시간동안 회분식 발효한 후에 연속하여 수행하였다.

분석방법

환원당의 정량은 DNS법⁽¹⁴⁾을 사용하였다. 여과액과 재순환액의 에탄올은 Hitachi사의 236-30형 Gas Chromatography를 사용하여 분석하였다. 사용한 detector는 FID이며 사용한 column은 Chromosorb W/AW (60-80 mesh)에 20% Carbowax 20M을 포화시킨 분말로 채워진 2.0 mmφ×2.0m stainless column이다. Injector와 detector의 온도는 250°C, oven의 온도는 90°C로 하였다. 균체무게는 건조무게와 흡광도에 대한 표준곡선을 이용하여 구하였다.

결과 및 고찰

미생물 재순환 연속발효

Fig.2는 초기 당농도가 140g/l인 발효배지를 28시간 동안 회분식으로 발효시킨 후 균체를 재순환 시켜가면서 연속발효시킨 결과를 나타내고 있다. 이 경우 연속 주입기질의 당농도는 50g/l이고 희석비는 0.3hr⁻¹이다.

미생물 재순환 연속발효초기에는 잔여 당농도 13.6g/l, 에탄올 농도 42.7g/l, 균체농도 12.3g/l이었다. 균체 재순환 연속발효가 진행됨에 따라 당농도가 20.5g/l까지 증가하였다가 6시간 내지 7시간 경과 후에는 연속으로 주입되는 당의 대부분이 소모되었다. 에탄올의 농도는 계속 감소하다가 24g/l에서 일정하게 유지되었다. 반면 균체의 농도는 완만하게

증가하는 경향을 나타내었다.

Fig. 3과 4는 희석비가 0.5 hr^{-1} , 0.7 hr^{-1} 이고 주입기질의 당농도가 50 g/l 인 경우에 대한 발효시간과 발효특성치 사이의 함수관계이다. 발효조내의 당농도가 거의 영에 도달하는 시간은 희석비 0.5 hr^{-1} 에서는 12시간 희석비 0.7 hr^{-1} 에서는 15시간 정도이었으며 이때의 알콜농도는 모두 24 g/l 이었고 균체농도는 각각 20.5 g/l , 32.5 g/l 이었다.

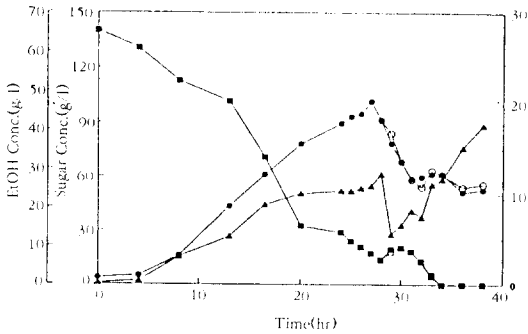


Fig. 2. Fermentation time vs. Concentration of Sugar, EtOH, and Biomass at Dilution rate 0.3 hr^{-1} , Sugar conc, 50 g/l . EtOH; ●, ○, Sugar; ■, □, Biomass; ▲.

The closed circles and squares represent retentate conc, while open ones represent those of filtrate.

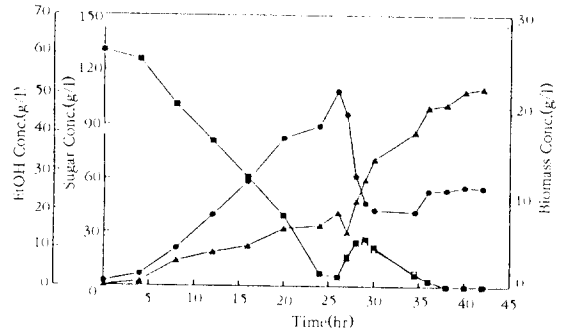


Fig. 3. Fermentation Time vs. Concentration of Sugar, EtOH, and Biomass at Dilution rate 0.5 hr^{-1} , Sugar conc. 50 g/l . EtOH; ●, ○, Sugar; ■, □, Biomass; ▲.

The closed circles and squares represent retentate conc, while open ones represent those of filtrate.

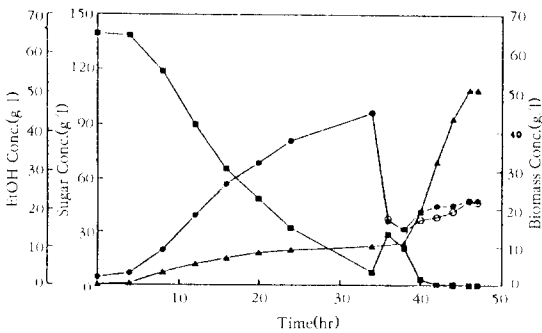


Fig. 4. Fermentation Time vs. Concentration of Sugar, EtOH, and Biomass at Dilution rate 0.7 hr^{-1} , Sugar conc. 50 g/l . EtOH; ●, ○, Sugar; ■, □, Biomass; ▲.

The closed circles and squares represent retentate conc, while open ones represent those of filtrate.

주입기질의 당농도에 따른 균체농도의 변화

Fig. 5는 희석비를 매개변수로 했을 때 발효조내의 잔여 당농도가 주입기질 당농도의 1% 이하로 떨어지는 시간에서의 균체농도와 주입기질 당농도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 희석비가 일정한 경우, 균체농도와 주입기질의 당농도 사이에는 선형적인 함수관계가 성립됨을 알 수 있다. 발효조내의 당농도가 거의 영에 도달했을 때의

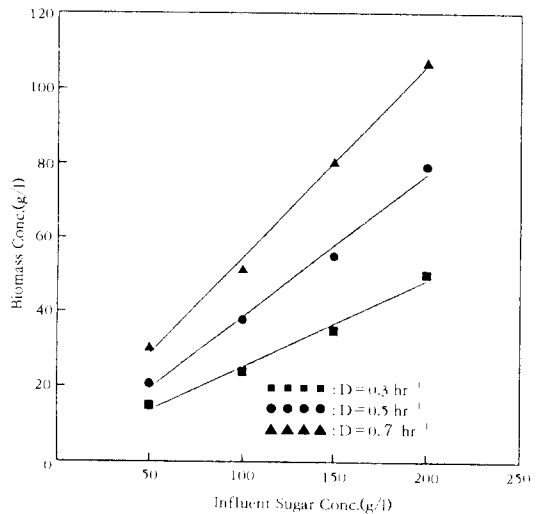


Fig. 5. The Relationships of Influent Sugar Conc. vs. Biomass Conc. with 99.9% consumption of influent sugar.

균체농도는 주입 당 농도 50g/l인 경우 희석비 0.3 hr⁻¹에서는 12g/l, 0.7 hr⁻¹에서는 32g/l이었으나 주입기질의 당농도가 200g/l까지 상승되면 각 희석비에서 50g/l와 107g/l까지 증가하였다.

주입기질의 당농도에 따른 알콜생산성의 변화

Fig. 6은 균체 재순환 연속알콜발효에서 발효조내의 당농도가 영에 도달했을때의 알콜생산성과 주입기질 당농도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 동일한 희석비에서는 주입기질의 당농도가 증가하면 알콜생산성은 선형적으로 증가하였으며, 그 증가율은 희석비가 클수록 높은 값을 나타내었다. 희석비가 0.3, 0.5, 0.7 hr⁻¹ 인 경우에 대한 알콜생산성을 살펴보면 주입기질 당농도 100g/l에서는 24.0, 38.0 및 55.6g/l · hr의 값을 나타내었으며, 주입기질 당농도 200g/l에서는 24.0, 38.0 및 55.6g/l · hr의 값을 보였다. 이들 값은 회분식 알콜생산성에 비하여 최소 3.7배에서 최대 29.3배까지 증가함을 나타내었다.

에탄올 수율

Fig. 7은 발효조내의 당농도가 거의 영에 이르렀을 때 알콜농도와 주입기질 당농도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 희석비에 관계없이 주입기질 당농도와 발효조내의 알콜농도사이 함수관계는 동일한 직선식을 나타내었다. 주입기질의 당이 거의다 소모되기 때문에 물질수지식에 의하면 에탄올의 평균수율 Y_{p/s}는 이 그래프의 기울기로 나타낼 수 있다. Fig. 7의 기울기로 부터 본 연구에서 수행한 균체 재순환 연속알콜발효의 평균수율이 0.42가 됨을 알 수 있었다. 이 값은 이론 수율의 82%를 나타내어 회분식발효의 결과치⁽¹⁵⁾보다 약간 높은 값을 나타내었다.

요 약

본 연구에서는 균주 *S. cerevisiae* ATCC 24858을 막분리를 이용한 미생물 재순환 연속에탄올 발효시스템에 적용하여 희석비(0.3, 0.5, 0.7 hr⁻¹)와 주입기질의 당농도(50, 100, 150, 200g/l)에 따른 균체농도 및 알콜생산성의 변화관계를 규명하여 보았다.

주입기질 당농도 50g/l, 희석비 0.3 hr⁻¹ 내지 당농도 200g/l, 희석비 0.7 hr⁻¹ 사이의 실험 범위에서 균체농도는 12g/l 내지 107g/l 사이에, 알콜생산성

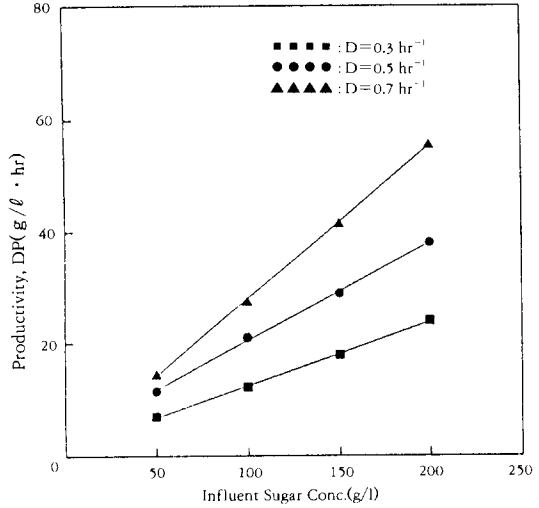


Fig. 6. The Relationship of Influent Sugar Conc. vs. Productivity.

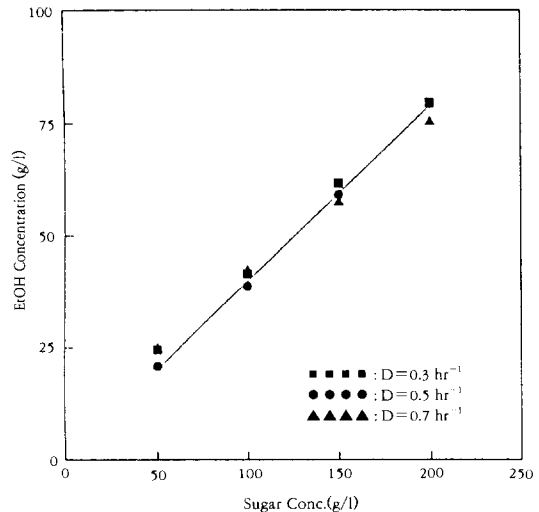


Fig. 7. The Relationship of Sugar Conc. vs. EtOH Conc.

은 7.0g/l 내지 55.6g/l 사이에 분포되었다. 더욱이 알콜생산성은 회분식 발효의 생산성에 비하여 최소 3.7배 내지 최대 29.3배 까지 증가하였다. 또한 본 연구의 실험범위에 대한 에탄올 평균수율은 0.42로써 이론수율의 82%이었으며 회분식 수율보다 약간 상회하였다.

감 사

본 연구는 동력자원부 대체에너지 기술개발 사업 연구비 지원에 의하여 이루어진 것입니다. 이에 대하여 감사를 드립니다.

참고문헌

1. C. Bazua and C. R. Wike (1976), presented at First Chemical Congress of the North American Continent, Mexico City, Mexico, December 1-5.
2. S. Aiba, M. Shoda, and M. Nagatave (1968), *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 845
3. T. K. Ghose and C. R. Wike (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1387.
4. E. J. Rosario, K. J. Lee, and P. L. Rogers (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1477.
5. 최기련, 허병기, 김철, 목영일 (1990), 대체에너지 개발사업연구보고서, 90-C405-348FG, 동력자원연구소.
6. 최기련, 허병기, 김철, 목영일(1989), 대체에너지 개발사업연구보고서, 89-C405-348FG, 동력자원연구소.
7. C. W. Lee (1987), Ph. D. Thesis, KAIST, Seoul.
8. Clyder Orr (1977), *Filtration*, p. 475, Marcel Dekker, Inc., New York & Basel.
9. S. W. Weller and W. A. Steiner (1950), *J. Appl. phys.*, **21**, 279.
10. K. J. Lee, M. Lefebvre, D. E. Tribe, and P. L. Rogers (1980), *Biotechnol. Lett.*, **487**.
11. G. R. Cysewski and C. R. Wilke (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125.
12. J. H. Lee, J. C. Woodward, R. J. Pagan, and P. L. Rogers (1981), *Biotechnol. Lett.*, **3**, 177.
13. D. N. Bull and M. D. Young (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 373.
14. G. L. Miller (1959), *Analytical Chemistry*, **31**, pp. 426-428
15. E. Favela-Torres et al. (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, pp. 850-856.