

糖蜜의 菌体循環式 Ethanol 連續醱酵

金益煥, 金炳弘, 閔泰益
韓國科學技術院 生物工學研究部
(1982년 6월 4일 수리)

Cell-Recycled Continuous Ethanol Fermentation of Molasses

Ik Hwan Kim, B. Hong Kim and Tae Ick Mheen

Biotechnology Research Department, Korea Advanced Institute of Science and Technology

P.O. Box 131, Dongdaemun, Seoul, Korea

(Received June 4, 1982)

Abstract

A cell-recycled continuous fermentation process was studied to produce ethanol from molasses using *Saccharomyces uvarum* ATCC26602 at 35°C. The fermentation system was divided into two stages in order to reduce the inhibitions of ethanol and substrate for cell growth and fermentation rate. The first reactor was aerated at the rate of 0.12 vvm whilst the second was kept anaerobic. In medium composition studies, it was revealed that inorganic nutrient supplement to the diluted molasses with 14% fermentable sugar was not needed for the fermentation, however, phosphate limitation was observed when cell propagation was contemplated.

By using the cell-recycled continuous fermentation system, 14.5 hour was required to produce 8.4-9.0% (v/v) of ethanol from diluted molasses containing 14% of fermentable sugar. The ethanol productivity was 6.2g/l/hr with the yield of 88.1-94.4% to the theoretical value.

諸 論

近來 全世界的인 石油波動 이후 化石energy 에 대한 代替energy 로서 再生性 資源의 醱酵에 依한 ethanol의 位置가 매우 높아져 왔다. Brazil 등의 몇나라에서는 이미 사탕수수나 cassava 와 같은 農産物로 부터 ethanol을 醱酵하여 工業的으로 生産하기 위한 研究를 계속적으로 進行해 왔으며 實用化 段階에 이르고 있다.^(1,2) 그러나 生産價格을 줄여서 ethanol을 經濟性있는 energy源으로 使用하는 데에는 아직도 解決해야 할 많은 문제점들이 있다.

醱酵法에 依한 ethanol 生産에서 生産費를 줄이기 위해서는 醱酵速度를 높이고 高温에서 高

濃度의 ethanol을 生産할 수 있어야 한다. 醱酵速度를 높이기 위해 比生産速度가 높고 高濃度의 基質이나 ethanol에 阻害를 받지 않는 菌株를 使用해야 한다. 이러한 菌을 利用하여 醱酵槽內에 높은 菌体濃度를 유지하면 高生産性의 ethanol醱酵가 可能하다.^(3,4) 이에 따라 高濃度의 基質에서 높은 醱酵速度를 갖는 菌株를 選別하기 위한 많은 研究가 進行되었으며 그 結果 *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602가 比較的인 우수한 菌株로 밝혀졌다.⁽⁵⁾ 이 醱酵는 凝集性이 크고 ethanol과 基質에 대해서 耐性이 강한 菌株로서 菌体循環式 連續醱酵에 有用한 것으로 알려져 있다.

比較的인 高温에서 高濃度의 ethanol을 醱酵시

키면 醱酵過程에서 發生하는 醱酵熱을 除去하는 데 필요한 energy를 줄일수 있으며, 高濃度醱酵는 蒸溜時 ethanol 回收原價를 節減할 수 있다. 또한 基質이 ethanol 生産 原價에 차지하는 비중이 상당히 크므로 비교적 싼 기질 또는 非食用 資源으로부터 ethanol을 생산하는 것이 바람직하다.

本 研究에서는 糖蜜로 부터 ethanol을 生産하기 위해 *S. uvarum* ATCC 26602를 利用하여 菌體循環에 의한 連續醱酵의 最適條件을 검토하였다.

材料 및 方法

菌 株

菌株는 *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602 '41 로서 KAIST 應用微生物 研究室에 保存中인 菌株를 使用하였다.

培 地

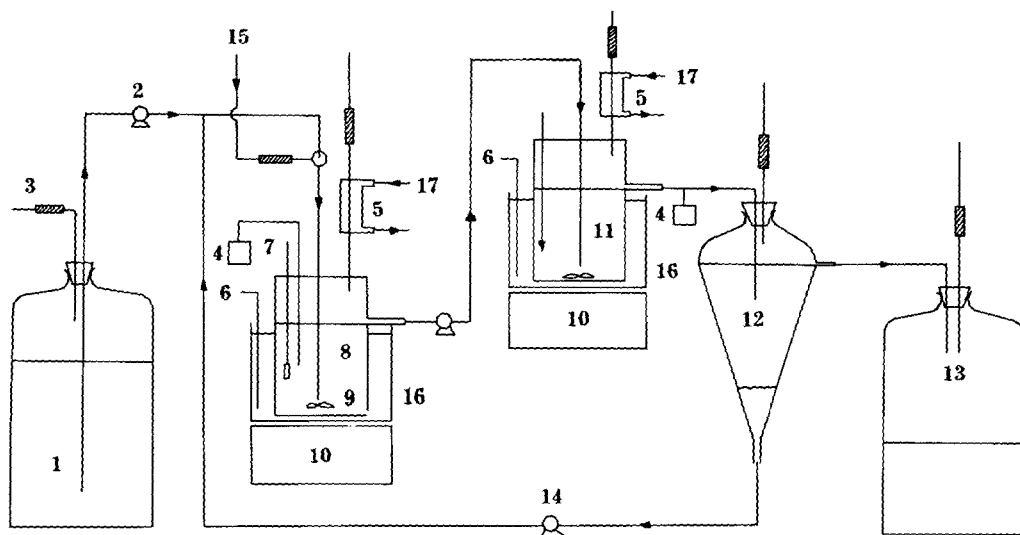
炭素源은 全糖 51.9%의 糖蜜(서울味元 주식 회사제공)을 使用하였다. 糖蜜은 120℃에서 15 分間 열처리한 뒤에 생긴 침전을 3000rpm 에서 연속원심분리하여 그 상등액을 적당히 (糖濃度 10~20%) 희석하여 培地로 使用하였다.

回分醱酵

적당한 濃度로 희석된 糖蜜 50ml을 500ml삼각 플라스크에 넣고 121℃에서 15분간 가압살균한 후 酵母를 接種하여 35℃에서 24시간 진탕배양 하였다. 이 培養液 5ml을 같은 條件으로 처리한 本培地 100ml을 함유하는 500ml 삼각플라스크에 接種하여 條件을 달리하여 回分醱酵를 실시하였다.

連續醱酵

本 實驗의 連續醱酵時 使用된 장치의 基本圖



- | | | |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 1. Feed reservoir | 7. Thermometer | 13. Product reservoir |
| 2. Peristaltic pump | 8. First stage fermentor | 14. Cassette pump |
| 3. Air filter | 9. Magnetic spin bar | 15. Compressed air |
| 4. Sampling bottle | 10. Magnetic stirrer | 16. Water bath |
| 5. Condenser | 11. Second stage fermentor | 17. Cold water |
| 6. Heater with controller | 12. Yeast separator | |

Fig. 1. Schematic Diagram of Two Stage Fermentation

는 Fig. 1과 같다. 20ℓ들이 배지저장탱크에 들어있는 糖度 14%의 배지는 맥동식 펌프로 流速을 條節하면서 1.8ℓ들이 一次醱酵槽에 供給하였다. 一次醱酵槽에는 3개의 Stainless steel로 만들어진 baffle이 부착되었으며 醱酵液量을 일정하게 유지하여 magnetic stirrer로 150rpm으로 교반하였다. 一次醱酵槽의 溫度는 항온조에 있는 thermostat을 利用하여 35±0.5℃로 유지하였으며 공기는 0.12vvm으로 공급하였다.

一次醱酵가 끝난 醱酵液은 맥동식펌프로 二次醱酵槽에 供給되었다. 二次醱酵槽는 공기를 전혀 供給하지 않고 혐기적으로 醱酵하였으며 나머지 條件은 一次醱酵槽와 같았다. 二次醱酵가 끝난 醱酵液은 重力에 의하여 自然的으로 cell separator에 流入되었다. 2 liter 용량의 cell separator에 流入된 醱酵液中 酵母는 凝集沈降되어 맥동식 펌프를 통하여 다시 一次醱酵槽로 連續供給되었으며, 상등액은 20 liter 용량의 最終탱크에 流入되었다.

分析方法

Ethanol : ethanol은 Varian 3700 gas chromatograph (Varian Instrument, California, USA)를 使用하여 分析하였다. Column은 1/8inch, 1m의 poropak Q column을 使用하였으며 injector, column oven, 그리고 detector의 溫度는 각각 150℃, 120℃, 200℃로 유지하였고 carrier gas인 질소의 流速은 40ml/min이었다.

全糖 : 全糖은 10% HCl로 65℃에서 15分間 물중탕하여 加水分解시킨 다음 10% NaOH 용액으로 中和한후 Somogyi-Nelson⁽⁶⁾法으로 分析하였다.

菌體濃度 : Hemacytometer를 使用하여 菌數를 측정하였다.

結果 및 考察

培地組成的 영향

實驗에 사용한 糖蜜의 일반성분은 Table 1에, 그리고 酵母의 原素分析 結果를 Table 2에 표시하였다. Table 3은 이들 分析結果를 비교한 것으로, 菌體收率은 낮은 ethanol條件에서는 糖

蜜 中の 無機物이 酵母의 增殖에 필요한 양 이상으로 存在하는 것을 알 수 있다. 그러나 糖蜜 中の 糖을 菌體增殖에 利用할 때는 phosphorus가 모자라는 것으로 나타났다.

糖蜜희석액에 yeast extract 등 각종 질소원 및 인산염을 첨가하여 酵母의 增殖 速度와 醱酵速度를 檢討한 結果는 Table 4와 같다.

yeast extract를 첨가한 실험구에서 酵母增殖 速度와 醱酵速度가 약간 증가한 것은 yeast

Table 1. General Composition of Molasses Produced in South-east Asia, 1980

Component	g/100ml
Sugar	50.7
N	0.69
P	0.05
K	2.66
S	0.59
Mg	0.29
Ca	0.88
Fe	0.03
Cu	0.001
Mn	0.004
Ash	8.22

Table 2. Typical Composition of *Saccharomyces* Cell⁽⁷⁾

Component	Concentration, g/100g dry yeast
C ⁽⁸⁾	46-52
N ⁽⁸⁾	6.0-8.5
P	0.8-2.6
K	1.0-4.0
S	0.01-0.24
Mg	0.1-0.5
Ma N	0.01-0.1
Ca	0.1-0.3
Fe	0.01-0.5
Cu	0.002-0.01
Mn	0.0005-0.007
Mo	0.0001-0.0002
Ash	5-10

Table 3. Comparison of the Compositions of Yeast and Molasses

Component	g/100g yeast	g/molasses ^a to produce 100g yeast at yield ^b of	
		3.85%	7.70%
N	7.3	34.5 (4.8) ^c	17.3 (2.4)
P	1.7	2.5 (1.5)	1.3 (0.74)
K	2.5	133.0 (53)	66.5 (26.6)
S	0.13	29.6 (228)	14.8 (114)
Mg	0.30	14.5 (48)	7.3 (24.0)
Ca	0.20	44.0 (220)	22.0 (110)
Fe	0.26	1.5 (5.8)	0.75 (2.9)
Cu	0.006	0.05 (8.4)	0.025 (4.2)
Mn	0.004	0.2 (50)	0.1 (25)

- a. 14% sugar concentration
- b. cell yield against sugar (wt%)
- c. the number in parenthesis is the ratio of each component in molasses and yeast

extract 중의 vitamin source가 酵母의 増殖에 影響을 미친 것이라고 생각되지만 그리 큰 增加는 아니다. 또한 urea 등의 無機窒素源을 糖蜜에 添加하여 培養했을 때에는 오히려 약간씩 阻害를 받는 것으로 나타났으며 Fig. 2에서 보는 바

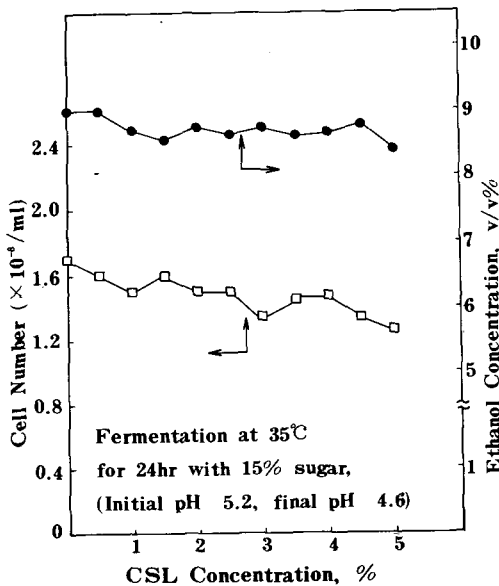


Fig. 2. The Effects of Corn Steep Liquor Addition to Molasses on Cell Growth

와 같이 corn steep liquor (CSL)는 酵母의 増殖과 ethanol의 生産에 거의 影響을 미치지 못하였다. 따라서 *S. uvarum*은 糖蜜에 다른 窒素源을 追加하지 않아도 糖蜜을 충분히 잘 利用하여 生育할 수 있음을 알 수 있었으므로 이후의 實驗은 糖蜜희석만을 발효배지로 사용하였다. 酵母의 増殖에 대한 糖度の 影響을 알아보기 위하여 糖蜜내의 糖度を 11%에서 부터 20%까지 변화시키면서 回分醱酵를 시행한 결과는 Fig. 3과 같다. 즉 糖度が 증가할수록 *S. uvarum*의 増殖

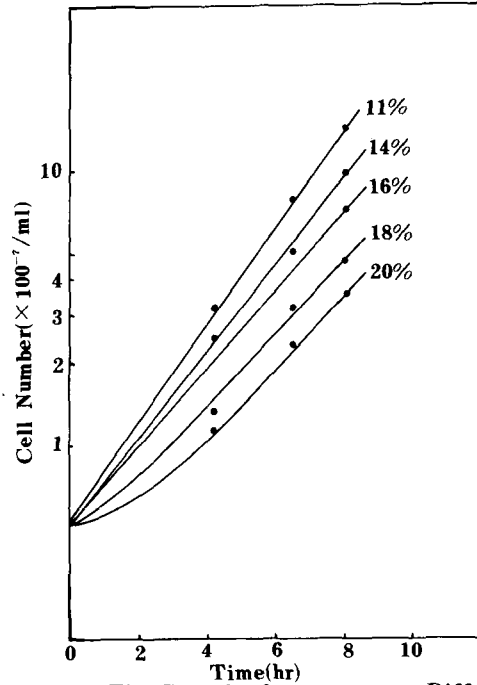


Fig. 3. The Growth of *S. uvarum* at Different Sugar Concentration Initial pH 5.2 at 35°C

이 阻害를 받는 것으로 나타났다. *S. cerevisiae*의 경우에는 糖度 5% 이상에서는 糖도가 增加할수록 比増殖速度가 減小되었으며,⁹⁾ *Zyomonas mobilis*의 경우도 높은 基質濃度에서는 菌體의 増殖이 阻害를 받았다고 한다.¹⁰⁾ 따라서 高濃度の ethanol을 얻기 위해서는 糖도가 높아야 하지만 酵母의 増殖을 위해서는 적당한 濃度까지 糖도를 낮출 필요가 있다.

通氣效果

通氣條件이 菌體増殖과 ethanol 生産성에 미

치는 효과를 比較한 結果는 Fig. 4, 5와 같다. 即, Fig. 4에서와 같이 酵母의 比增殖 速度는 0.12vvm으로 通氣하였을 때 0.11 hr⁻¹ 通氣하지 않았을 때 0.092 hr⁻¹로서 菌體의 增殖을 위해서는 通氣가 必要함을 알 수 있었다. 그러나 Fig. 5에서 나타낸것 같이 通氣條件은 ethanol 生産性에는 별다른 차이를 나타내지 않았다. Fig. 6은 比生産速度에 대한 通氣의 影響을 나타낸 것으로 발효초기에는 通氣할 때와 하지 않을 때의 比生産速度가 거의 差異가 나지 않았으나 발효후기에는 通氣하지 않았을 때가 通氣시켰을 때보다 比生産速度가 더 큰 것으로 나타났다. *S. cerevisiae*의 경우에는 약간의 空氣를 供給해 줌으로써 productioity가 증가 되었으나^(9,11) *S. uvarum*은 菌株에 따라 특성이 달랐다고 한다.⁽¹²⁾ 本實驗의 結果 *S. uvarum*은 菌體 增殖速度를 增加시켜주기 위해서는 通氣가 필요

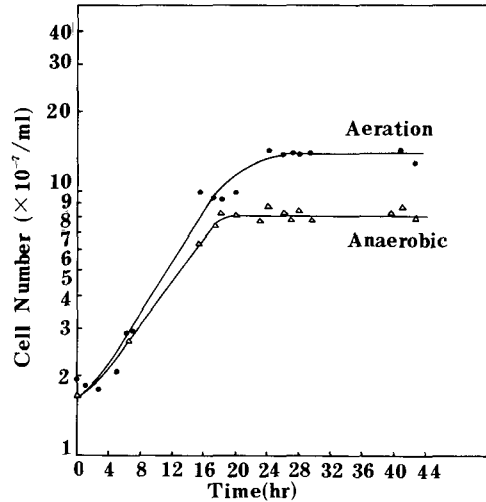


Fig. 4. The Effects of Aeration on Cell Growth

Table 4. The Effects of Yeast Extract and Inorganic Salts on Etanol Fermentation of Molasses*

Compositions	Cell number (x 10 ⁸ /ml)	Ethanol, v/v %
Molasses only	3.08	8.36
M+Y. E. 0.5%	3.37	9.09
M+Y. E. 1.0%	3.13	9.02
M+Y. E. 1.5%	2.87	8.94
M+Urea 1.0%	2.90	7.93
M+(NH ₄) ₂ SO ₄ 1.0%	2.95	7.89
M+NH ₄ H ₂ PO ₄ 1.0%	3.08	8.06
M+(NH ₄) ₂ HPO ₄ 1.0%	2.80	7.31
M+NH ₄ Cl 1.0%	2.78	7.43
M+NH ₄ NO ₃ 1.0%	2.75	7.84
M+Y. E. 1%+Urea 1%	3.10	8.34
M+Y. E. 1%+(NH ₄) ₂ SO ₄ 1%	3.25	9.09
M+Y. E. 1%+NH ₄ H ₂ PO ₄ 1%	3.38	9.24
M+Y. E. 1%+(NH ₄) ₂ HPO ₄ 1%	3.23	9.00
M+Y. E. 1%+NH ₄ Cl 1%	3.28	8.34
M+Y. E. 1%+NH ₄ NO ₃ 1%	3.20	8.53

*result of batch fermentation after 24hr at 35°C
(initial sugar=15%, initial pH=5.2, final pH=4.6)

M=Molasses

Y. E=yeast extract

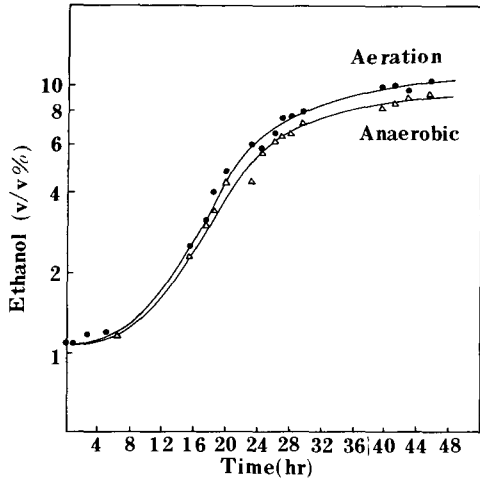


Fig. 5. The Effects of Aeration on Ethanol Production

하지만 ethanol 농도가 높을 때에 비생산速도를 증가시켜 주기 위해서는 혐기적조건이 필요하였다. 따라서 本 研究의 二段階醱酵에서는 ethanol 농도가 낮은 一次醱酵槽에는 空氣를 0.12 vvm의 速度로 供給하고 ethanol 농도가 比較的 높은 二次醱酵槽에는 혐기적 상태를 유지하여 醱酵을 進行시켰다.

菌体循環式 連續醱酵

Fig. 1의 장치를 利用하여 회석율 0.067hr^{-1} 로 連續醱酵을 시행한 結果는 Fig. 7과 같다. 즉, 각 醱酵槽에서 40시간 동안 菌体를 增殖시

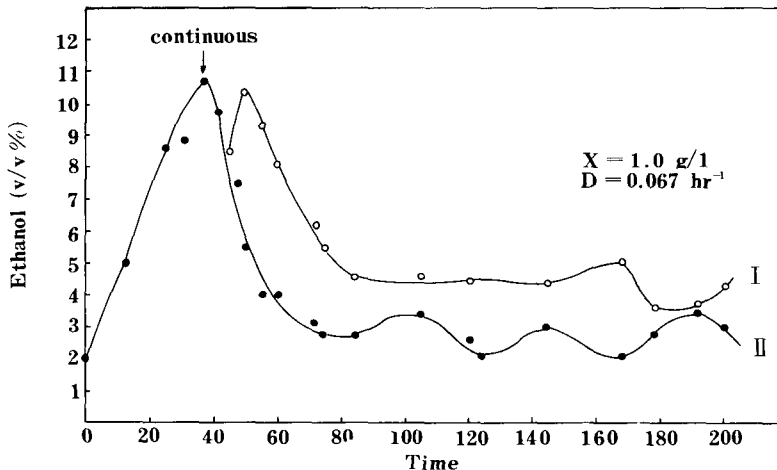


Fig. 7. Continuous Fermentation without Cell Recycle

킨 후 菌体를 循環시키지 않고 연속醱酵을 실시 하였을 때 ethanol 농도는 약간의 fluctuation 을 보이면서 一次醱酵槽가 약 2.6%, 二次醱酵槽가 약 4.5%를 나타내었다. 이렇게 ethanol 농도가 낮은 것은 菌体濃도가 1.0g/l로서 比較的 낮기 때문인 것으로 판단된다.

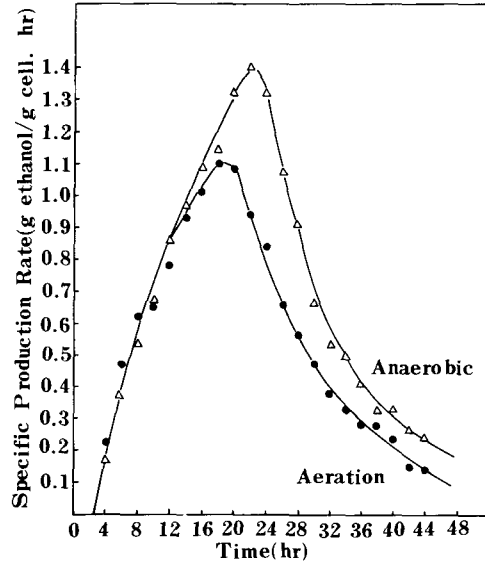


Fig. 6. The Effects of Aeration on the Specific Rate in Fermentation of Molasses Containing 14% Sugar at 35°C

菌体濃도를 좀더 높이기 위하여 cell separator를 使用, 最終 醱酵液中 沈降되는 酵母를 다시 一次醱酵槽로 循環시키면서 連續醱酵을 시행한 結果는 Fig. 8에서 보는 바와 같다. Feed rate

를 Fig. 7과 같이 하였을 때 recycle ratio는 0.09이었으며, 이때에도 약간의 fluctuation을 보였고 ethanol 농도는 一次醱酵槽가 4.0%, 二次醱酵槽가 5.8%이었다. 이때 菌體의 濃度는 平均 2.1g/l로 Fig. 7의 結果에 比하여 增加되었지만 最終 ethanol 濃度를 높여서 ethanol 收率을 90% 이상으로 유지하기 위해서는 醱酵時間을 좀더 길게 할 필요가 있다. 이때 菌體濃度가 크게 增加하지 못한 것은 최종발효액내의 糖度가 높아서 糖蜜의 粘도와 밀도가 比較的 높고, 또한 잔당이 cell separator內에서 계속 醱酵되어 발생하는 CO₂가 菌體의 沈降을 방해하므로 순환되는 菌體의 濃度가 낮기 때문인 것으로 생각된다.

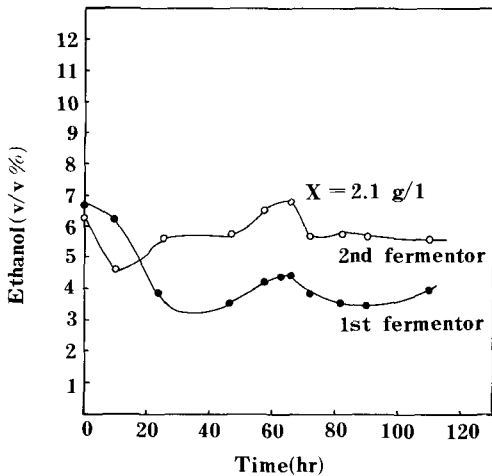


Fig. 8. Continuous Fermentation with Cell Recycle (I)

이러한 문제점을 해결하기 위해 초기 균체 농도를 20g/l 이상으로 높여서 連續醱酵를 시도하였다. 즉 14l fermentor (Microferm MF-114, New Brunswick, Sci. Co., Edison, New Jersey, U. S. A.)에서 培養한 菌體를 無菌의 으로 回收, 接種하여 *S. uvarum*의 初期菌體濃度를 20g/l로 높이고 菌體를 循環시키면서 시행한 結果는 Fig. 9과 같다. 즉, 菌體濃度는 큰 변화가 없었으며, ethanol 濃度는 一次醱酵槽가 6.4~6.8%, 二次醱酵槽가 8.4~9.0%로 最終 ethanol 收率은 이론치의 88.1~94.4%였다. 이때의 最終 醱酵液內의 잉여당은 0.2% 미만이었으며 total retention time은 14.5hr였다.

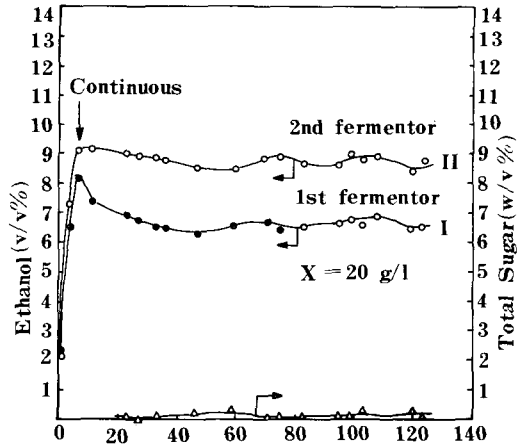


Fig. 9. Continuous Fermentation with Cell Recycle (II)

要 約

糖蜜로부터 ethanol을 生産하기 위한 菌體循環式 連續醱酵를 실시하였다. 菌株는 *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602를 使用 하였으며 醱酵溫度는 35°C였다. 발효중 ethanol에 의한 阻害를 줄이기 위하여 二段階醱酵를 시행하였는데, 첫번째 段階에서 空氣는 0.12vvm으로 供給하였고 두번째 段階에서는 혐기적상태로 醱酵를 進行하였다. 糖濃度를 14%로 희석했을 때 다른 無機物을 追加하지 않아도 ethanol 醱酵가 進行되었으며 단지 菌體增殖이 目的일 때는 phosphorus 添加가 必要하였다.

菌體循環式 連續醱酵로 14%의 糖을 含有한 糖蜜희석액을 醱酵시키는데 14.5시간이 소요되었다. 이때의 최종 ethanol 濃度는 8.4~9.0% (v/v)로서 ethanol 生産收率은 理論值의 88.1~94.4% 이었다.

參 考 文 獻

- 1) Jackson, E. A. : *Process Biochemistry*, **11**, 19 (1976)
- 2) Hammond, A. L. : *Science*, **195**, 564 (1977)
- 3) Cysewski, G. R. and C. R. Wilke; *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125 (1977)

- 4) del Rosario, E. J., K. J. Lee and P. L. Rogers : *Biotechnol. Bioeng.* : **21**, 1477 (1979)
- 5) Rose, D. : *Process Biochemistry*, **11**, 10 (1976)
- 6) Herbert, D., P. J. Phipps and R. E. Strange : *Method Microbiol.* 5B, 209 (1971)
- 7) Aiba, S., A. E. Humphrey and N. F. Millis : *Biochemical Engineering*, 2nd ed. Academic press, New York (1973)
- 8) Pepler, H. J : *Microbial Technology*, Reinhold Publ. Co., New York (1967)
- 9) Ghose, T. K. and R. D. Tyagi : *Biotechnol. Bioeng.* **21**,1387 (1979)
- 10) Rogers, P. L., K. J. Lee and D. E. Tribe : *Biotechnol. Lett.* **1**, 165 (1979)
- 11) Nagothawithana, T. W., C. Castellano and K. H. Steinkraus : *Appl. Microbiol.*, **28**, 383 (1974)
- 12) Jakobson, M. and R. S. W. Thorne : *J. Inst. Brew.*, **86**, 284 (1980)