

직물 여과기를 부착한 재순환 발효에 의한 에탄올 생산

정성구·이우기·장호남  
한국과학기술원 화학공학과, 청량리 사서함 150

Ethanol Fermentation by Cell Recycle Fermentor with a Fabric Filter

Sung-Goo Jung, Woo-Gi Lee and Ho-Nam Chang  
Department of Chemical Engineering, KAIST  
P. O. Box 150 Cheongryang  
Seoul 130-650, Korea

ABSTRACT

Ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* was carried out in the cell recycle filter system with a cheap fabric filter having a pore size of  $10\mu\text{m}$ .

Maximum biomass concentrations up to  $85\text{ g/l}$  were obtained, but in practice operational concentrations were between  $50$  and  $80\text{ g/l}$ . Ethanol productivity was  $42\text{ g/l-hr}$ , with an ethanol concentration of  $66\text{ g/l}$  and an ethanol yield of over  $86\%$ . Continuous operation was possible by applying periodic backflushing. The ethanol fermentation could be carried out without difficulty at a dilution rate up to  $0.8\text{ h}^{-1}$ . In order to obtain a high cell concentration and ethanol productivity, development of filter module with the larger filtration area is required.

서론

근래 대체연료로서 biomass로부터 연료용알콜 생산이 많은 관심을 모으고 있다. 이 연료용알콜이 다른 석유자원으로부터의 연료와 경제성을 갖기 위해서는 경제적인 생산공정의 개발이 필요하다(1-3). 재래의 회분식이나 연속식 배양에 의한 방법은 저 생산성에 따른 고 생산비 때문에 비경제적이다. 미생물의 생촉매적인 기능에서 보면 발효조내 균체농도를 높게하여 기질의 전환속도를 빠르게 하는 것이 생산성을 높일 수 있는 한가지 방법이다. 연속 발효공정에서 미생물의 washout을 방지하면서 균체의 농도를 높이는 방법에 대한 연구가 많이 보고되었는데 이들은 미생물 고정화법(4-6)이나 재순환에 의한 것들이다(2, 7-15).

효모에 의한 에탄올 발효에 있어서 회분식 또는 연속

식 배양에서는 발효조내의 균체농도는  $10\text{ g/l}$ 에 불과하고 침전 재순환 공정에서도  $50\text{ g/l}$ 라고 보고되고 있다(1-3, 6). 그러나 막재순환 system에서는  $100\text{ g/l}$  이상의 균체농도에서도 조업이 가능한 것으로 보여진다(9-11). 발효공정에서의 부피 생산성은 균체농도에 비례한다고 보면 균체농도의 증가는 그만큼의 생산성 증가를 의미한다. 그러나 이 재순환 실험의 어려움 때문에 연구 성과는 적었고 막재순환 반응기에서의 효모에 의한 에탄올 생산에 대한 연구역시 아직 생산성에 관한 초보적인 보고에 머물고 있는 실정이다. 특히 세포 재순환 발효에 사용되는 막은 단백질 분리용 한외여과막이나 미생물 분리에 사용되는 microfiltration 막이 사용되고 있으나 막이 자주 막혀 세포 재순환 발효에 적합한 새로운 형태의 membrane module 제작이 요구되고 있다. 또한 이들 membrane module이 고가여서 세포 재순

환 발효시스템을 개발할 경우 생산비에 미치는 영향이 크다.

본 연구에서는 고가의 막 재순환 반응기가 경제성이 있도록 하기 위하여 값이 싼 fabric filter를 이용한 재순환 반응기에서 효모의 고농도 배양에 의한 에탄올 생산성을 검토하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배지조성

본 연구에 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC # 24858)이다. 접종을 위한 성장배지는 glucose 20 g / l, yeast extract 3 g / l, malt extract 3 g / l, bacto peptone 5 g / l 로 되어있다. 생산배지의 조성은 glucose 100 g / l, yeast extract 8.5 g / l, NH<sub>4</sub>Cl 1.3 g / l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.12 g / l, CaCl<sub>2</sub> 0.06 g / l 이었다. 포도당 농도를 변화시킬 때는 다른 성분도 비례하여 변화시켰다. 성장배지의 포도당은 상업용(미원, 서울)을 사용하였고 다른 성분들은 시약급을 사용하였다.

#### 분석

에탄올의 분석은 FID gas chromatography(Gow Mac, Model 750P)를 사용하였고 2-butanol을 첨가하여 internal standard로 하였다. 포도당은 효소법 (God Pod 효소법, 영동제약)을 이용하여 측정했다. 효모의 농도는 spectrophotometer (Milton Roy Co.)에 의해 측정하였으며 525nm에서 1 OD는 0.32mg / ml였다.

#### 직물여과기의 module

막으로 쓰인 직물은 polyester (BIAx의 중간가공물)

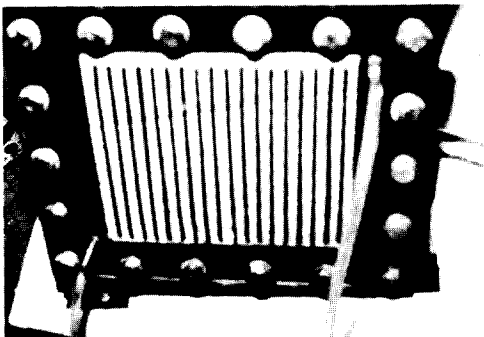


Fig. 1. Rectangular fabric filter module.

로서 밀도(114×68)와 denier(125<sup>d</sup>×250<sup>d</sup>)의 규격을 갖고, 여과기 module의 형태는 단일 평판형으로 제작하였다(Fig. 1). 여과기의 막 투과면적은 210cm<sup>2</sup>(10×21)이다.

#### 재순환 반응기의 설치와 조업

재순환 장치의 개념도는 Fig. 2에 나타내었다. 1L의 조업부피를 가진 발효조(Bioflo C 30, New Brunswick)에 직물 막 여과기를 연결하고 peristaltic pump에 의해 발효액이 순환된다. 재순환 회로에 채워지는 발효액의 부피는 전체의 5% 정도였다. 새로운 배지를 연속적으로 공급하면서 발효 생성물은 여액으로 여과기를 통해 연속적으로 제거하였다.

Backflushing 효과도 조사해 보았는데 효모의 농도가 40 g / l 이하에서는 1시간 간격으로, 그 이상에서는 20분 간격으로 20초씩 backflushing을 해주었다. 반응기의 온도는 30℃, 교반속도는 300 rpm, pH는 4.5를 유지하였다.

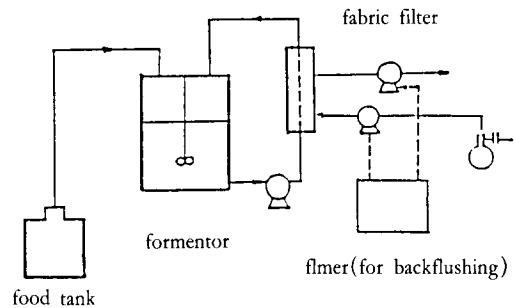


Fig. 2. Schematic diagram of experimental set up for fermentation with backflushing.

### 결과 및 고찰

#### 직물여과기의 효모 분리능력 및 여과속도

Fig. 3은 bulk cell 농도에 따른 apparent rejection을 나타낸 것으로 사용된 직물의 효모 분리능력을 보여주고 있다. 여액으로 빠지는 효모의 농도는 고농도 상태의 조업으로 갈수록 fouling으로 인해 약간씩 줄어들었다. 이때 여액의 절대농도는 0.5~1 g / l 정도였다. 이러한 apparent rejection에 영향을 미치는 요인은 막의 pore size, 압력차, bulk 농도와 유속을 고려할 수 있다. 하지만 조업농도인 40~60 g / l에서는 이러한 요인에 따른

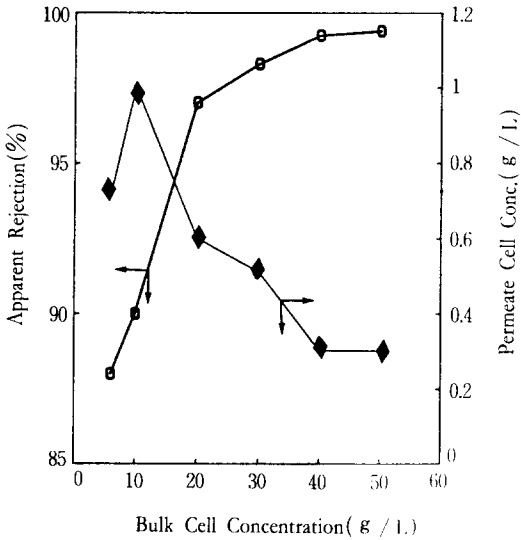


Fig. 3. Apparent rejection of *Saccharomyces cerevisiae* cells with various bulk cell concentrations by the fabric filter module.

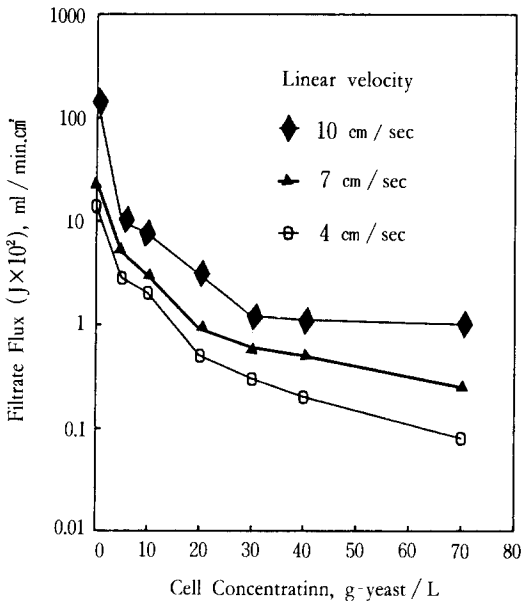


Fig. 4. Flux changes with cell concentration and linear velocity.

rejection의 변화가 심하지 않기 때문에 고려할 사항은 아니었다. 사용된 직물은 전단력 및 어느 정도의 압력하에서도 쉽게 신축되지 않았고, 친수성이 있어 water phase 여과에 용이하며, 장기조업에도 지장이 없었다.

효모 농도 및 유체의 선속도와 pressure drop에 따른 여과속도 변화를 조사하였다. 30 g/l 이상의 효모 농도에서는 농도에 의한 여과속도의 변화가 없었으며, 단지 유속의 변화에 의해 여과속도가 결정되었다(Fig. 4). Fig. 5에서 조업상의 한계압력은 0.5atm으로 0.2atm 이상의 압력에서는 거의 일정한 여과속도를 보여주었다(16). 압력차에 따른 여과속도의 변화가 없게 되면, 실제 저항은 막저항에 관계없이 겔층저항에 의해 결정된다. Cross flow 여과에서는 이러한 겔층의 감소가 여과속도를 결정하기 때문에 결국 압력차보다는 유속이 영향인자가 된다(17).

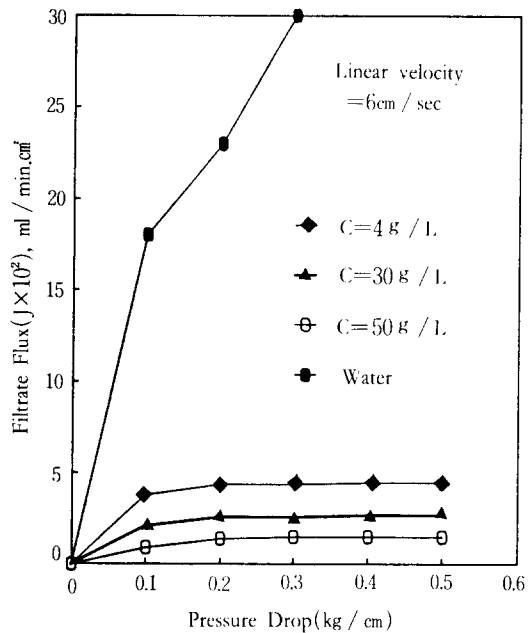


Fig. 5. Flux changes with pressure drop and cell concentration.

원전 재순환에 의한 에탄올 생산

포도당 농도 100 g/l의 배지를 연속 공급하면서 bleed없이 재순환시킨 비정상 상태의 조업 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 배지 공급에 의해 포도당 농도는 급격히 증가했다가 효모 농도가 증가하면서 감소하여 30

시간 조업후에는 잔당이 거의 없었다. 초기농도 5 g / l 인 효모 농도는 50여시간 조업후 85 g / l 까지 증가 하였다. 이때 여액으로부터의 에탄올 농도는 44 g / l 로 이론수율의 약 86%였다. Fig. 7은 bleed없이 회석율 0.37h<sup>-1</sup>에서 포도당 농도변화에 따른 발효 kinetics를 본 것으로 포도당 농도가 100 g / l, 150 g / l 인 경우 당은 거의 소모가 되었다. 그러나 포도당 농도 200 g / l에서는 여액의 포도당 농도가 22 g / l 정도로 기질의 이용측면을 고려할 때 적정하지 않음을 알 수 있다. 포도당의 공급농도가 100, 150, 200 g / l로 변화함에 따라 효모 농도가 각각 60, 80, 85 g / l로, 에탄올 농도가 각각 43, 66, 72로 변화하였다.

효모를 이용한 에탄올 발효에서 Cysewski와 Wilke (1-3)는 연속 발효조에서 효모의 농도가 10 g / l 정도이며 재순환시킨 경우 50 g / l이고 진공을 걸어 에탄올 저해를 막아주면서 재순환하면 124 g / l 까지 올릴 수 있었다. 그러나 진공을 걸어 에탄올을 추출하더라도 증기압이 높은 유기산이나 부탄올은 여전히 발효 조내에 축적되어 균체의 성장을 저해함으로써 연속조업에 한계가 있다고 하였다. Hollow fiber membrane을 이용한 세포 재순환에서는 조업 가능한 효모 농도가 100

~ 150 g / l (11). 하지만 membrane 및 module 값이 비싸고 구조가 복잡하여 scale-up이 힘들다.

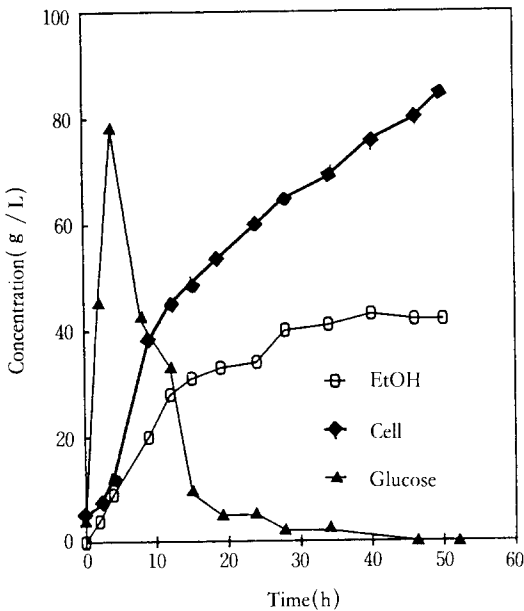


Fig. 6. Fermentation kinetics in a cell recycle reactor with a fabric filter at  $S_0=100$  g / l,  $D=0.47h^{-1}$ ,  $B=0$ .

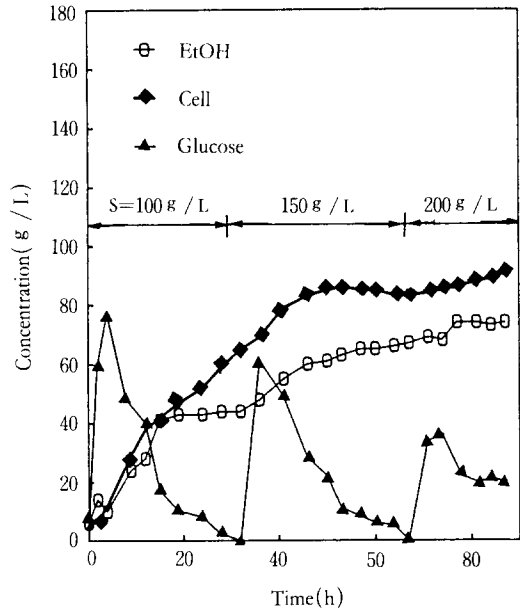


Fig. 7. Fermentation kinetics in a cell recycle reactor with a fabric filter for the change of initial glucose concentrations at  $D=0.37h^{-1}$ ,  $B=0$ .

에탄올 생산성과 발효조 특성

에탄올 발효에서는 고농도 생산성이 경제적인 면에서 유리하며, 기질 이용율이 높아야하고 에탄올 농도가 효모 성장이나 에탄올 생성속도를 저해할 만큼 높아서는 안된다. 이러한 점을 고려하여 포도당 농도를 100 g / l와 150 g / l로하여 발효 kinetics, 효모 농도 및 생산성을 알아보았다. 본 실험에서 회석율을 0.8h<sup>-1</sup>와 0.63h<sup>-1</sup>까지 증가시켰는데 더이상의 회석율의 증가는 여과용량의 한계 때문에 불가능하였다(Fig. 8, 9). 효모 농도와 생산성이 회석율 증가에 의해 증가하였다.(Fig. 10, 11). 포도당 소비능력은 효모 농도와 거의 비례하나 효모 농도가 높을수록 포도당 이용능력이 떨어짐을 알 수 있었다. 에탄올 생산성은 42 g / l.h이었으며, 이는 회분식보다 15배, 연속식 보다 10배이상 큰 것이다. 회석율을 증가시키므로써 생산성을 증가시킬 수는 있지만 포도당 이용율이 낮아져 기질손실이 많고 여과

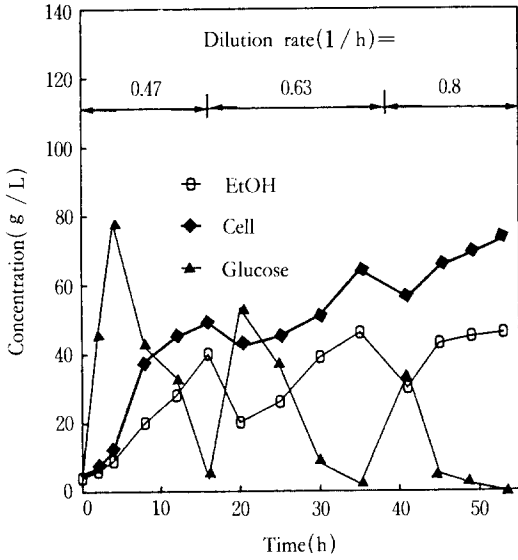


Fig. 8. Effect of dilution rate on ethanol, cell and glucose concentrations at  $S_0=100 \text{ g/l}$  and  $B=0$ .

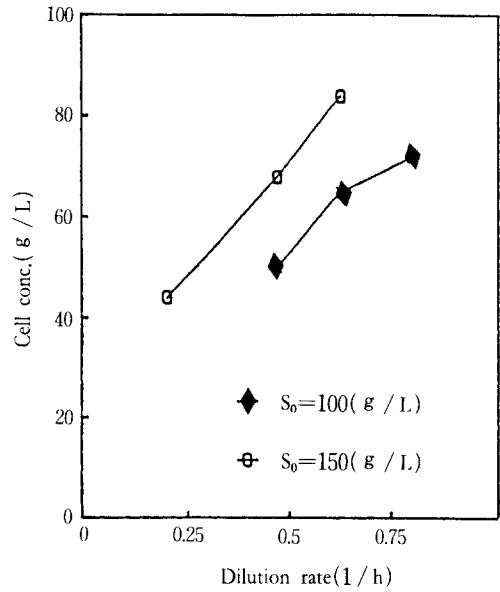


Fig. 10. Effect of dilution rate and initial substrate concentration on cell concentration at 99% glucose utilization.

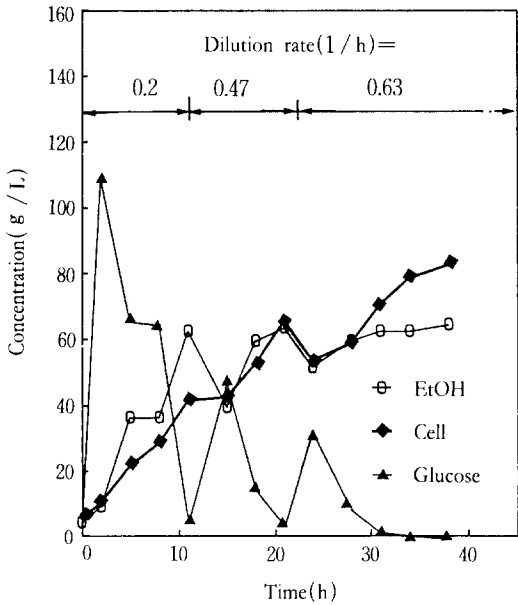


Fig. 9. Effect of dilution rate on ethanol, cell and glucose concentrations at  $S_0=150 \text{ g/l}$  and  $B=0$ .

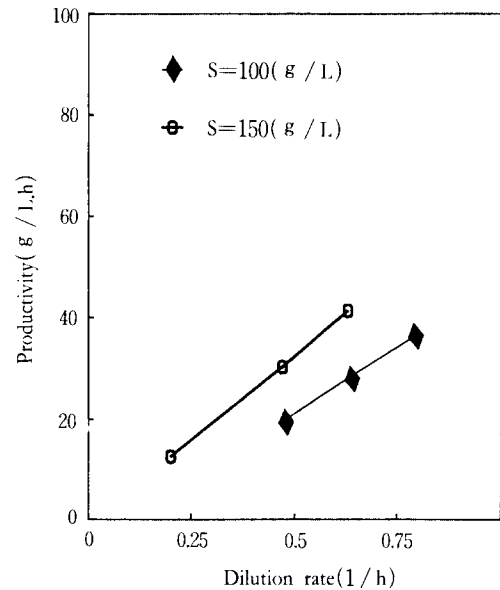


Fig. 11. Effect of dilution rate and initial substrate concentration on ethanol productivity at 99% glucose utilization.

성능에 제한을 받게된다. 또한 hollow fiber membrane (11)을 이용하였을 때보다 생산성이 반 정도이지만 값이 싸고 제작이 용이하여 산업화에 유리한 잇점을 갖고 있다.

**연속조업-bleed를 통한 효모 농도조절 및 back-flushing 효과**

재순환 발효조에서는 균체의 성장 및 축적에 의해 농도가 계속 증가하므로 적정농도를 유지하려면 bleed가 필요하다. 또한 장기조업을 위해서는 막의 fouling을 방지하여야 한다. 이를 해결하기 위해 backflushing 효과를 조사하였다(Fig. 12). 여기에서는 포도당이 완전히 이용될 때의 효모 농도를 유지하기 위한 bleed ratio의 변화를 나타내었는데 희석율이 증가할수록 효모의 washout을 방지하기 위해 bleed ratio를 낮게 하였다. 일정한 희석율에서 효모, 포도당, 에탄올 농도가 정확히 정상상태를 유지하기 위해선 bleed에 의한 효모 제거속도가 성장속도와 정확히 일치하여야 한다. 그러나 이러한 정상상태는 어떤 일시적인 조건의 변화에 따라 효모 농도나 기질농도가 계속 변하기 때문에 항상 fluctuation

하게 된다(18).

Backflushing 효과를 보면 backflushing이 없는 경우에는 고농도하에서 1시간 후 막 표면에 효모층이 형성되어 여과속도가 현저하게 감소하였으나 backflushing을 해준 경우 3일 정도의 연속조업을 할 수 있었다.

**요 약**

비싼 고분자 막 및 여과기 module 대신에 값싼 직물을 여과막으로 이용하여 세포 재순환 발효에서의 적용 타당성 및 실용성을 알아보았다. 본 실험에 사용한 직물 여과기의 효모 분리능력은 여액에서의 효모 농도가 0.5 g / l로 apparent rejection이 88~99.5% 정도였다. 사용한 직물이 기계적 강도가 있어 전단응력에 잘 견디고 장기조업에도 지장이 없었다. 이를 이용한 재순환 발효에서 얻은 효모의 최대농도는 85 g / l 이었고 생산성은 42 g / l-hr, 에탄올 농도는 66 g / l 가 얻어졌다. Backflushing에 의한 연속조업의 효과가 잘 나타났으며 보다 높은 효모 농도 및 생산성을 위해서는 투과면적이 큰 module의 개발이 필요하다.

**감 사**

본 연구는 대체에너지개발을 목적으로 수행되었으며 연구비를 지원하여 준 동력자원부에 감사드립니다.

**NOMENCLATURE**

- So: initial substrate concentration(g / l)
- D : dilution rate(h<sup>-1</sup>)
- B : bleed ratio

**참 고 문 헌**

1. G. R. Cysewski and C. R. Wilke(1978), Biotech. Bioeng., **20**, 1421.
2. G. R. Cysewski and C. R. Wilke(1977), Biotech. Bioeng., **19**, 1125
3. G. R. Cysewski and C. R. Wilke(1976), Biotech, Bio-**18**, 1297.
4. D. William and D. M. Munnecke(1981), Biotech. Bioeng., **23**, 1813.
5. M. M. Nagashima, M. Azuma, S. Nouchi, K. Inuzuka and H. Samejima (1984), Biotech. Bioeng., **26**, 992.
6. M. Kierstan and C. Burke(1977), Biotech. Bioeng., **1**

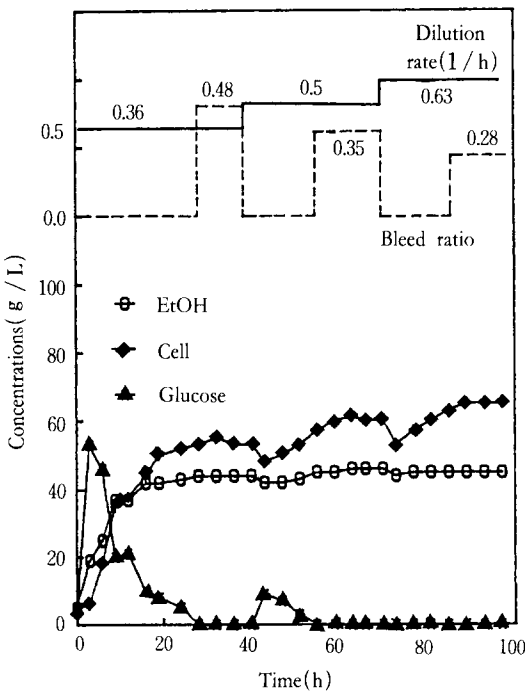


Fig. 12. Steady state kinetics of ethanol fermentation with bleeding backflushing.

- 9, 387.
7. T. K. Ghose and R. D. Tyagi(1979), *Biotech. Bioeng.*, **21**, 1387.
8. J. D. Bullock, D. M. Comberbach and C. Ghommidh (1984), *The Chem. Eng. J.*, **29**, B9.
9. M. Cheryan and M. Mehaia(1984), *Proc. Biochem.*, **1** **9**, 204.
10. H. W. Hoffman, W. Kuhlmann, H. D. Meyer and K. Schugel(1985), *J. Membrane Sci.*, **22**, 235.
11. C. W. Lee and H. N. Chang(1987), *Biotech. Bioeng.*, **29**, 1105.
12. K. H. Kroner, H. Schutte, H. Hustedt and M. R. Kula (1984). *Proc. Biochem.*, **19**, 68.
13. M. S. Lee and T. Ackinson(1985), *Proc. Biochem.*, **20**, 26.
14. J. H. Janssens, A. Bernard and R. B. Bailey(1984), *Biotech. Bioeng.*, **26**, 1.
15. P. L. Rogers, K. J. Lee and D. E. Tribe(1980) *Proc. Biochem.*, 15, 7.
16. Y. L. Lee(1985), M. S. Thesis, KAIST.
17. J. A. Dahlheimer, D. G. Thomas and K. A. Kraus (1970), *I&EC. Proc. Des. Develop.*, **21**, 566.
18. S. J. Pirt(1975), *Principles of microbe and cell cultivation*, Blackwell Scientific Publication., London.

**(Received: July 9, 1990, Accepted: August 30, 1990)**