

## Pilot Scale Multi-stage CSTR에서 전분질 원료의 연속 에탄올발효

남기두\* · 이인기 · 조훈호 · 최명호 · 김운식  
일산실업(주) 부산주정공장 연구실

### Continuous Ethanol Fermentation Using Starchy Raw Material in Pilot Scale Multi-stage CSTR

Nam, Ki-Du\*, In-Ki Lee, Hoon-Ho Cho, Myung-Ho Choi and Woon-Sik Kim  
Laboratory, Il San Trading Co., Ltd., Pusan 608-044, Korea

**Abstract** — In order to develop more economic processes, continuous ethanol fermentation from starchy raw materials in a pilot scale multi-stage CSTR was investigated. Ethanol fermentation could be successfully operated for 30 days with naked barley and 60 days with cassava, respectively. Starchy raw materials used for this study were ground and passed through a 20-mesh sieve for low temperature cooking. Under the optimized conditions, the overall productivity of cassava was 1.27g/l·h with an ethanol concentration of 9.51% (v/v), which was higher about 2 times than that obtained from a conventional batch system in industrial scale

최근 대체 에너지로서 연료용 에탄올의 발효공정 개발이 활발히 진행되고 있다.(1-3) 이와 때를 같이 하여 국내 주정 공장에서도 오랜 생산 경험을 바탕으로 1,2차 석유 위기를 거울 삼아 유한성인 석유 자원의 대체 방안으로써 연구조합 설립 등 조직적인 연구를 추진하고 있는 실정이며 13개 주정제조 회사들이 연간 에탄올을 204천kl를 생산 공급하고 있다(4). 그러나 우리나라는 주정 제조 원료인 곡물 가격이 국제시장 보다 약 5배 정도 비싸며 제조 원가 중 원료비중이 80% 이상으로 매우 클 뿐만 아니라 수입원료의 종류에 따라 가격이 다르다. 따라서 종래 회분식 공정 보다 생산성이 높은 연속 발효공정의 채택은 필연적이나 국내의 주정제조 원료가 소맥, 대맥, 쌀보리, 옥수수, 고구마, 쌀, 수입원료인 cassava chip과 pellet 등 다양하여 우리 실정에 부합되는 공정의 개발이 요구된다. 이미 외국에서는 주로 단일 원료를 사용한 연속 발효공정이 상업적으로 운전되고 있으나 다양한 원료에 대한 작업의 신속성이 회분식 작업에 비하여 떨어지므로 문제를 극복하기 위하여

지금까지 국내에 소개된 바 있는 연속 발효공정 중 오스트리아의 Vogelbusch Arbios E process, 브라질의 Zanini process, 스웨덴의 Chematur AB의 Biostil process 등(5)의 장단점을 검토하여 우리여건에 접근할 수 있는 다단연속 에탄올 발효공정(multi-stage continuous stirred tank reactor)을 설계 제작하여 전분질 원료 중 쌀보리와 cassava의 연속 발효를 수행하였던 바 얻어진 결과를 보고코자 한다.

### 재료 및 방법

#### 균주

당 연구실에서 보존하고 있는 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 1-84를 사용하였다.

#### 원료

쌀보리 및 수입 cassava(origin : Indonesia)를 분쇄하여 20-mesh sieve를 통과한 미분쇄 가루를 사용하였으며 원료 분석 결과는 Table 1과 같다.

**Key words:** Ethanol fermentation, multi-stage CSTR, naked barley, cassava, pre-cooking

\*Corresponding author

#### 연속 에탄올 발효

전분질 원료의 연속 발효공정은 Fig. 1과 같이 mu-

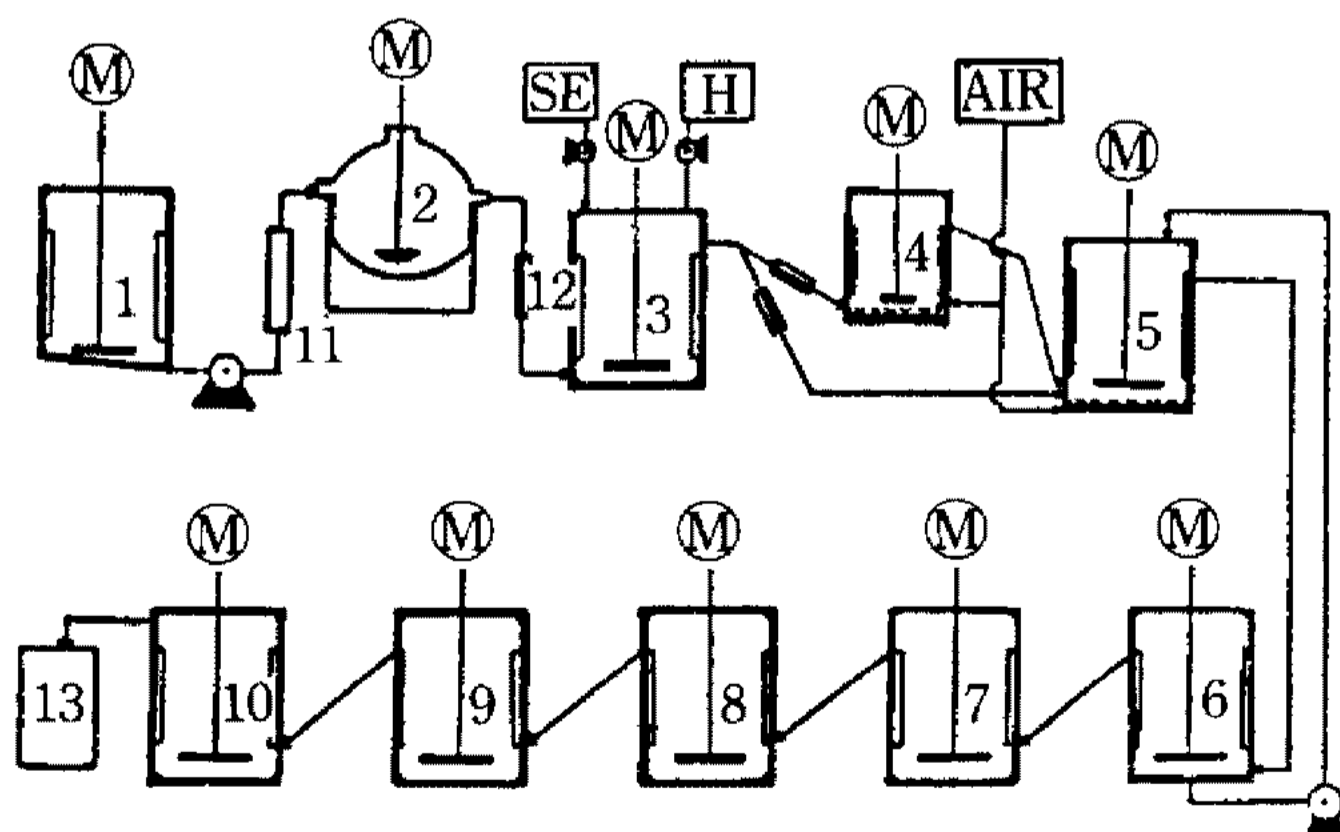
liti-stage CSTR를 이용하였다.  $V_5$ 에서  $V_{10}$ 까지의 working volume은 120l이며, 발효조는 설정한 온도가 자동조절 된다. 당화조는 당화 시간을 조절할 수 있도록 설계하였으며,  $V_1$ 에서 조제된 slurry는 예비 및 주 증자 과정을 거쳐 일정한 시간 동안 당화시켜 효모 배양조( $V_4$ )와 1st 발효조( $V_5$ )에 유입하여 0.025 vvm의 호기적 조건으로 운전하고,  $V_4$ 에서 연속 배양된 효모는  $V_5$ 에 공급하고, 여기서 나오는 유출액은  $V_{10}$ 까지 자동으로 유입되면서 발효가 완결된다. 당화조에 주입하는 당화효소는 무균적으로 증류수로서 희석하여 황산 Meissel 관이 부착된 저장 용기로부터 정량적으로 당화조에 공급(Eyela tube pump MP-3, Japan) 하고 같은 방법으로 1N- $H_2SO_4$  용액을 당화조에 공급하여 pH 4.5로 조정하였다.

**공정의 살균**

운전 전에 개방하여 잘 세척한 다음 조립하여 70% 에탄올과 live steam으로 2일간 간헐 살균하였다.

**Table 1. Analytical data of naked barley and cassava used in this study (unit=%)**

Analytical item	Naked barley	Cassava
Starch value	66.33	74.50
Fiber	-	Max. 5.00
Sand/silica	-	Max. 3.00
Total nitrogen	1.44	0.60
Moisture	10.00	11.00



**Fig. 1. Schematic diagram for continuous ethanol fermentation.**

1: Slurry vessel; 2: Cooker; 3: Saccharification vessel; 4: Yeast culturing vessel; 5~10: Fermentors; 11: Pre-cooker; 12: Condenser for cooling; 13: Product vessel; SE: Saccharification enzyme; H: 1N-sulfuric acid, M: Moter

**에탄올, 효모농도 및 당분석**

에탄올 농도는 1차 증류한 응축액(distillate)을 alcohol meter로써 시도와 품온을 측정하여 Gay lussac table로써 환산하여 GC분석(6)과 비교하였다. 당은 Bertrand법(7)으로, 효모 농도는 직접 haemocytometer로써 측정하였다.

**액화 및 당화 효소의 역가분석**

NOVO 효소분석법의 변법(8)에 따라 분석한 결과 내열성 alpha-amylase인 Termamyl 120L(EC 3.2.1.1, NOVO, Denmark)는 92,300 units/g, 액상 당화 효소(태평양화학 제품)는 13,790 units/g였다.

**결과 및 고찰**

**운전 최적화**

당화 및 발효의 교반속도와 증자온도의 최적 운전 조건을 결정하기 위하여 원료에 따라 검토한 결과, Table 2와 같이 쌀보리는 예비 및 주증자를 각각 60°C/5.4 min 및 95°C/60 min 하여 연속 발효를 하였으며, cassava는 93°C/60 min의 주증자만으로 효과적인 발효가 가능하였다. 당화 및 발효조의 교반속도는 원료 특성에 따라 다르게 운전하였고, 쌀보리는 cassava 보다 빠른 교반속도와 예비 증자가 발효수율 향상에 중요한 요인임을 알았다.

**효소 사용량과 당화율의 변화**

연속 발효에서는 당화율(효소 당화에 의해 유리된 환원당/총당)이 발효속도에 영향을 미치므로 가능한

**Table 2. Operation parameters optimized for continuous ethanol fermentation using starchy raw materials with multi-stage CSTR system**

	Naked barley	Cassava
For cooking		
Pre-cooking	60°C/5.4 min	Not necessary
Post-cooking	95°C/60 min	93°C/60 min
For saccharification		
Agitation(rpm)	225	150
Temp. and holding time(°C/hr)	60/8	60/8
Fermentor agitation(rpm)		
From $V_5$ to $V_7$	225	150
From $V_8$ to $V_{10}$	150	100

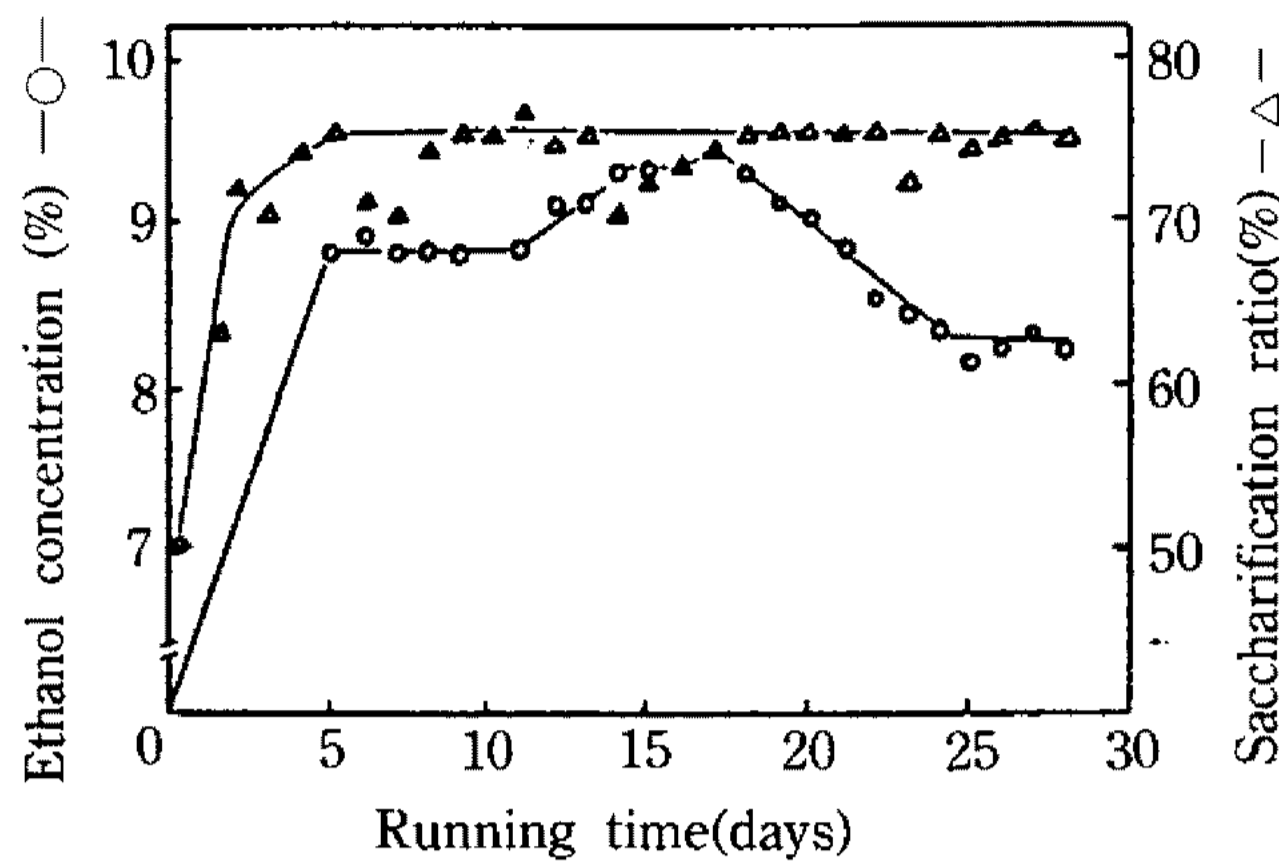


Fig. 2. Profiles of saccharification ratio and ethanol concentration in continuous fermentation using naked barley. (Feeding rate=1/2 l/h)

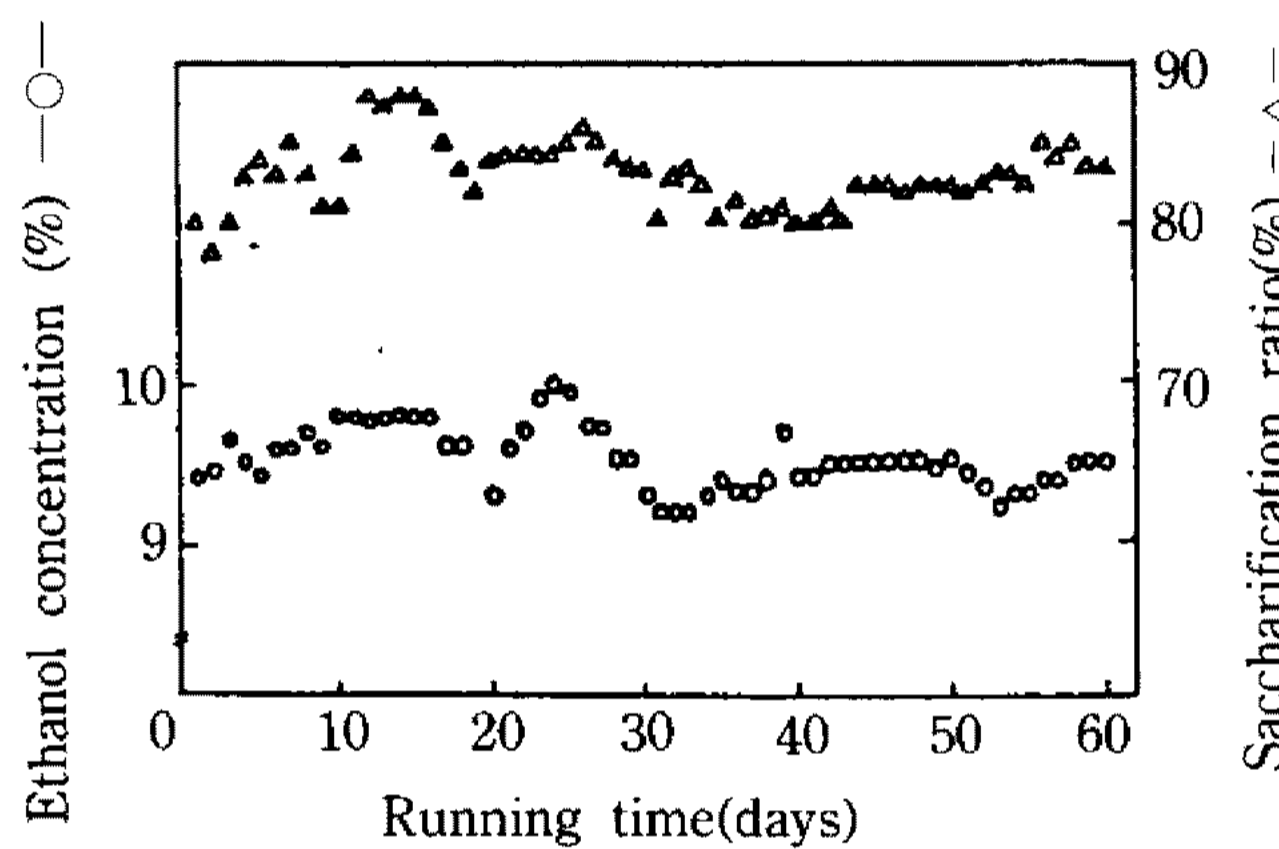


Fig. 3. Profiles of saccharification ratio and ethanol concentration in continuous fermentation using cassava. (Feeding rate=2 l/h)

높은 당화율을 얻을 수 있는 조건으로 운전하는 것이 바람직하다. 그러나 지나친 당화시간의 연장은 오염을 초래할 뿐만 아니라 노화 전분이 생성되어 수율이 떨어진다. 본 실험에서는 액화 및 당화 효소를 쌀보리 원료에 대해 53 units/g과 38 units/g, cassava에 대해 24 units/g과 42 units/g을 각각 사용하여 60°C에서 8 시간 당화시켰을 때 운전 중 평균당화율이 쌀보리 경우 74.06%, cassava 경우 83.11%였다(Fig. 2 & 3).

#### 공급 mash의 적정 당농도 결정

Mash 중의 에탄올 농도는 가능한 높을수록 증류시 내알코올성 또는 고온성 균주개발의 연구가 보고되고 있다(2, 9). 본 실험에 사용한 효모의 경우 회분식 고되고 있다. 본 실험에 사용한 효모의 경우 회분식 발효에서 11.5%(v/v)까지는 수율저하없이 발효가 가능하나 당농도, mash의 삼투압(10, 11), 점도에 따라 발효력과 효모증식이 영향을 받으며 주정제조 원료

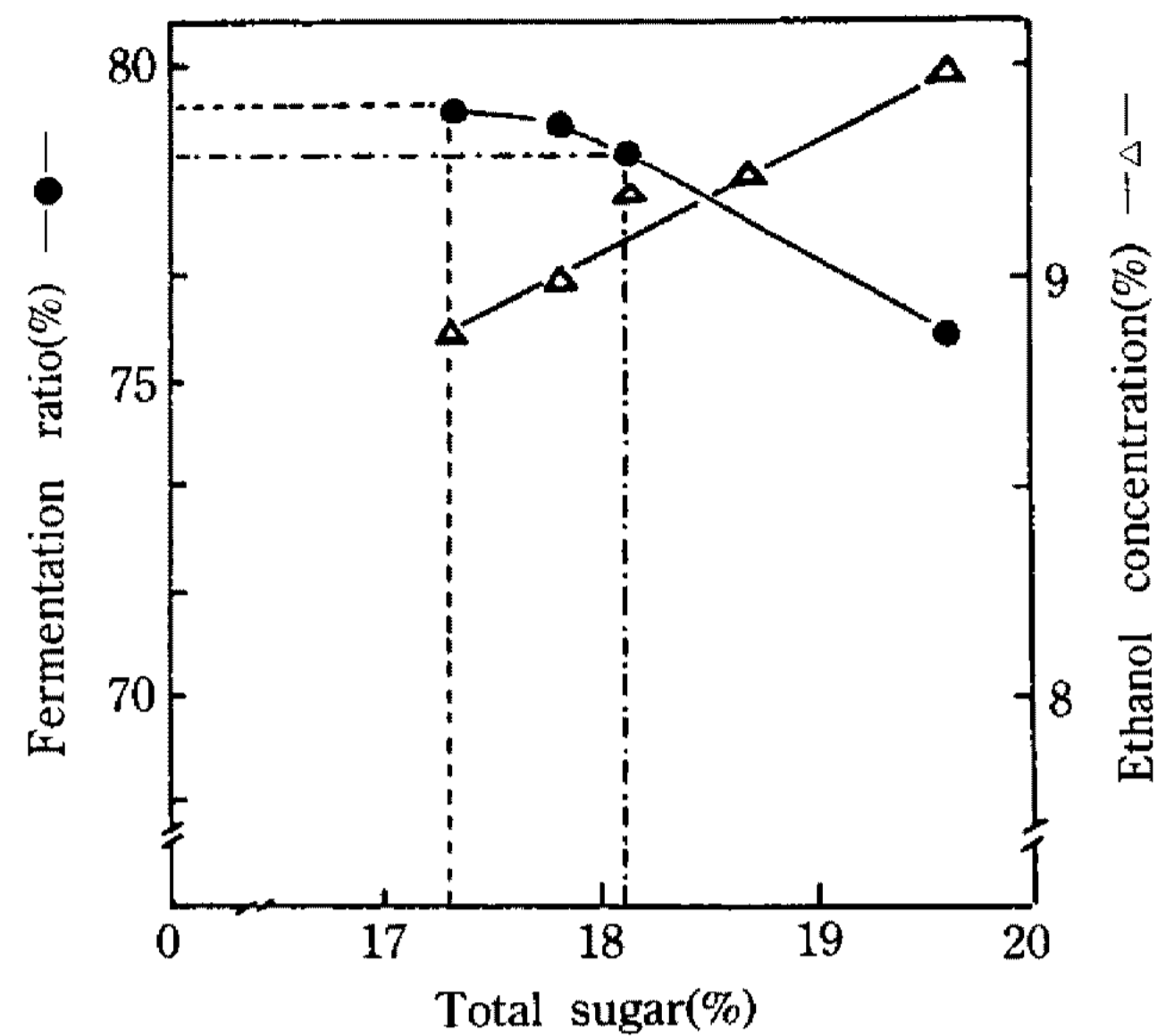


Fig. 4. Variation of fermentation ratio versus total sugar concentration in batch fermentation using naked barley.

Table 3. Ethanol losses in exhaust gas generated from fermentors ( $V_5$ ,  $V_6$  and  $V_7$ ) during continuous ethanol fermentation with multi-stage CSTRs

Fermentor no.	EtOH(%)	EtOH loss(ml/h)
$V_5$ 1st AC*	2.60	0.22
2nd AC*	0.24	0.02
$V_6$	4.08	0.34
$V_7$	3.32	0.28
Total loss(%)		0.043**

\*Equipped with Allihn condenser to the ventilator

\*\*Sum of EtOH loss/feeding rate $\times$ 100

중 특히 쌀보리는 Fig. 4와 같이 당농도 증가에 따라 에탄올 농도도 증가하나 경제성을 좌우하는 발효수율, 생산성, 당전환율(12)이 떨어지므로 본 연속 발효 실험에서는 당화 등을 고려하여 17.5% 수준으로 mash의 당 농도를 조절하여 운전하였다.

#### 배기가스 중의 에탄올 회수

발효조( $V_5 \sim V_7$ )에서 배출되는  $CO_2$ 와 공기 중에 상대휘발도가 높은 에탄올의 손실방지를 위해 250 ml Erlenmeyer flask에 증류수 200 ml를 넣어 2단으로 배출구(vent port)를 설치 흡수하여 분석한 결과 Table 3과 같이 발효가 왕성하게 일어나는  $V_5 \sim V_7$ 에서 mash를 2 l/h로 공급할 경우 0.043%가 휘발 손실되므로 Allihn 냉각기를 설치하여 충분한 냉각수로서 회수하였다.

**Table 4. Comparison of kinetic data obtained from multi-stage CSTRs(MS-CSTR) after operation for 28 and 60 days and batch fermentation (BF) depending upon raw materials**

Item	Naked barley		Cassava	
	MS-CSTR <sup>1)</sup>	BF	MS-CSTR <sup>2)</sup>	BF
Total sugar(%)	17.47	18.26	17.37	17.80
Saccharification ratio(%)	74.06	—	83.11	—
Ethanol(%)	8.92	9.22	9.51	9.58
Residual sugar(%)	2.04	2.00	0.90	0.89
Fermentation ratio(%)	79.30	78.42	85.03	83.58
Yield(EtOH l/ton) <sup>3)</sup>	390.20	385.90	469.90	461.90
Productivity(EtOH g/l·h)	1.19	0.61	1.27	0.70

<sup>1)</sup>Mean figures after running for 28 days using naked barley

<sup>2)</sup>Mean figures after running for 60 days using cassava

<sup>3)</sup>Yield was calculated as follows:

$$Y(95\% \text{ EtOH l/ton, raw materials}) = \text{starch value}(\%) \times 10 \times 0.7154 \times \text{FR} \times 0.985 / 0.95$$

where, 0.985 is distillation efficiency.

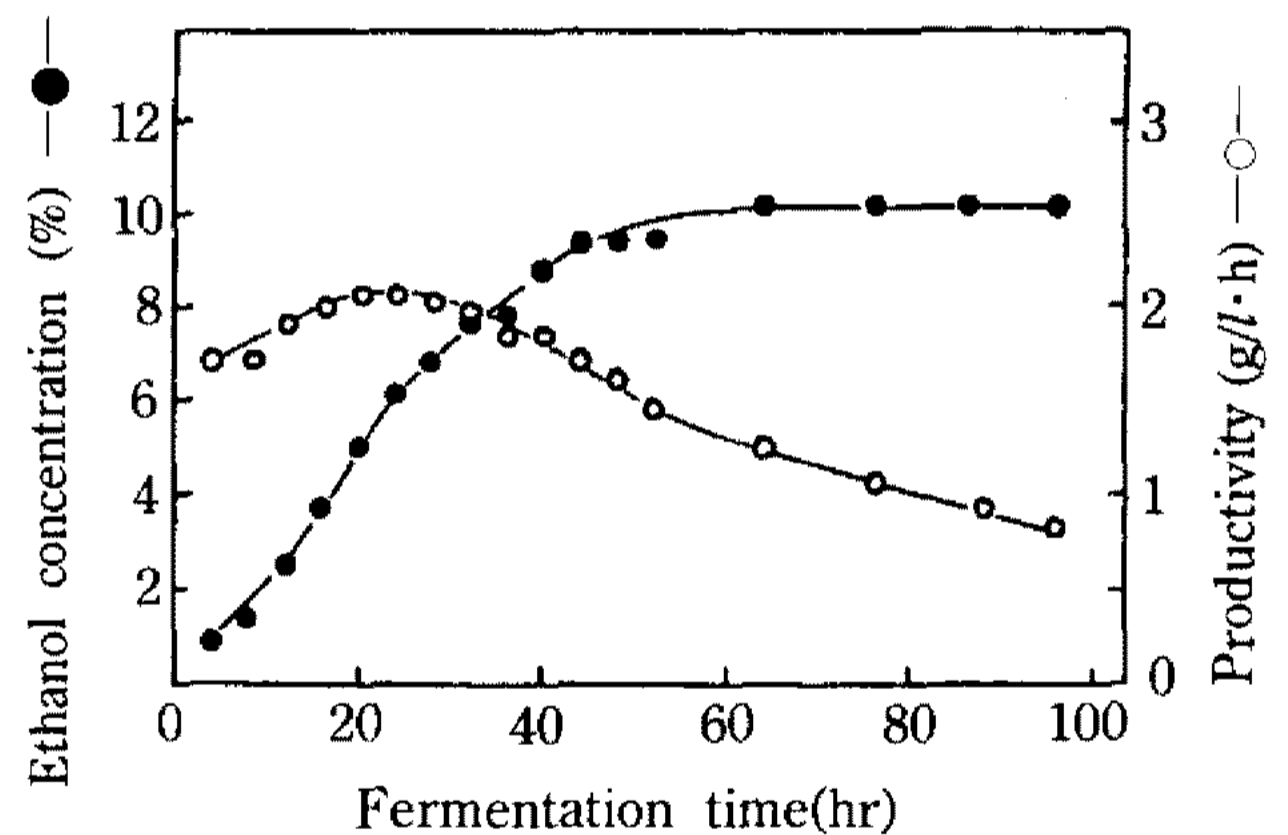
$$\text{FR}(\text{Fermentation ratio}) = \text{actual alcohol conc.} / \text{theoretical alcohol conc.} \times 100$$

**연속 에탄올 발효**

Fig. 1의 multi-stage CSTR에서 mash를 V<sub>6</sub>에서 V<sub>5</sub>로 정량펌프(Yaskawa electric Japan)로서 7l/h로 recycling하므로써 최종 유출액 중의 효모 농도가 9×10<sup>7</sup>cells/ml에서 1.5×10<sup>8</sup>cells/ml로 증가하였다. 당농도를 17.5% 정도로 조절하여 운전한 결과 쌀보리는 28일, cassava는 60일 동안 장기 운전이 가능하였다. 연속운전 중 에탄올 및 당화율은 Fig. 2 및 3과 같으며, 쌀보리의 장기운전은 미생물 오염과 의균사효모(pseudohyphae yeast)가 출현되면서 발효수율이 급격히 떨어졌다. 그러나 cassava 경우는 60일 이상 운전하여도 높은 발효수율을 유지할 수가 있었다.

**수율 및 생산성 검토**

쌀보리 보다는 cassava의 발효가 용이하고 원료 톤당 각각 4.3l와 8l씩 산업적 규모의 생산공장에서 얻어진 회분식 공정의 생산수율보다 증가하였다(Table 4). 이것은 원료전분의 특성에 기인된 것으로 판단되며 쌀보리의 경우 8~10% hemicellulose와 2~5% beta-glucan이 존재하므로 상대점도가 높고 C/N비가 낮아 발효과정 중 잡균의 오염빈도가 높았다. 그러나 cassava는 C/N비가 높으므로 질소원으로서는 황산암모늄(0.6g/kg 원료)을 보충하여 발효를 시켰으며, 쌀보리의 overall 생산성은 1.19g/l·h로서 Chen 등(13)의 당밀을 사용한 multi-stage multi-feeding 연속발효 보다는 낮았으나 산업적 규모의 회분식 공



**Fig. 5. Profiles of ethanol concentration and productivity in batch fermentation using cassava.**

정에서 얻은 생산성 보다는 약 2배 증가되었다. 생산성은 원료와 발효방법에 따라 다르나 Fig. 5와 같이 최고 생산성은 2g/l·h 이상까지 증가하나 발효가 진행됨에 따라 생산성은 감소하였다. 따라서 공장설계시 생산성은 다양한 원료사용을 고려하여 발효가 어려운 원료의 overall 생산성을 기준하여 설계되어야 원료(배지)의 손실을 줄일 수 있다(14).

**요 약**

보다 경제적인 공정개발을 위하여 pilot scale의 다단 연속발효공정(multi-stage CSTR)에서 전분질 원료의 에탄올 발효를 연구하였다. 에탄올 발효를

쌀보리는 30일, cassava는 60일 동안 성공적인 운전을 할 수 있었으며, 원료는 저온 증자를 위하여 20-mesh sieve를 통과한 가루를 사용하였다. 최적화된 운전 조건하에서 cassava의 overall productivity는 에탄올 농도 9.51%(v/v)에서 1.27g/l·h로써 종래 산업적 규모의 회분식 공정에서 얻은 것보다 약 2배 증가되었다.

### 참고문헌

1. NOVO File IB 237a-GB. 1977. *Fuel Ethanol from Agriculture Crops - A Review*.
2. Spinder, D.D., C.E. Wyman and K. Grohman. 1989. Evaluation of thermotolerant yeasts in controlled simultaneous saccharifications and fermentations of cellulose to ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 189-195.
3. Wayman, H., S. Chen, R.S. Parkekh and S.R. Parkeh. 1988. Comparative performance of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in alcohol fermentation of saccharified wheat starch B in a continuous dynamic immobilized biocatalyst bioreactor. *Starch* **40**: 270-275.
4. 張炳淳. 1991. 酒類工業. **28**: 86-87.
5. Roger, C. 1983. Biostil-A breakthrough in distillery design. *Sugary Azucar Yearbook* 96-99.
6. Ryu, B.H., W.S. Kim, M.H. Choi and K.D. Nam. 1986. Large scale of ethanol fermentation from sweet potato cooked at low and high temperature. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**: 233-237.
7. 酒稅實務要覽. 1975. 國稅廳技術研究所酒類分析法. 181-212.
8. Ryu, B.H. and K.D. Nam. 1987. Large scale alcohol fermentation with cassava slice at low temperature. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**: 75-79.
9. Rosa, M.F., I.S. Correia and J.M. Novais. 1987. Production of ethanol at high temperature in the fermentation of Jerusalem Artichoke Juice and simple medium by *Kluyveromyces maxianus*. *Biotechnol. Lett.* **9**: 441-444.
10. Essia, Ngang J.J., F. Letourneau and P. Villa. 1989. Alcohol fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on fermentation parameters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 125-128.
11. Damore, T., C.J. Panchal and G.G. Stewart. 1988. Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol. Jan*: 110-114.
12. Castellar, N.R., F. Borrego, M. Lanovas, A. Manjon and J.L. Iborra. 1989. Continuous ethanol production at high glucose concentrations by a passively immobilized *Zymomonas mobilis* system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 249-252.
13. Chen, H.C. and D.G. Mou. 1990. Pilot scale multi-stage multi-feeding continuous ethanol fermentation using non-sterile cane molasses. *Biotechnol. Lett.* **12**: 367-372.
14. Nam, K.D., I.K. Lee and H.H. Cho. 1991. Continuous alcohol fermentation by a flocculating yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 487-490.

(Received February 13, 1992)