

회분 및 연속세포유지 배양에 의한 타피오카당화액으로부터의 에탄올 생산

이 용 석 · 이 우 기 · 박 병 건 · † 장 용 근 · 장 호 남
한국과학기술원 생물공정연구센터 및 화학공학과

Ethanol Production from Tapioca Hydrolysate by Batch and Continuous Cell Retention Cultures

Yong-Seok Lee, Woo-Gi Lee, Byung-Geon Park,
Yong-Keun Chang[†] and Ho-Nam Chang

BioProcess Engineering Research Center and Dept. of Chemical Engineering, Korea
Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

ABSTRACT

Batch and continuous cell retention cultures were carried out using tapioca hydrolysate. In batch culture, reducing sugar of about 180g/l was almost consumed in about 36 hours, and the concentration of ethanol produced was about 84g/l making the ethanol yield 0.48 g-ethanol/g-(reducing sugar). The final yeast concentration was 8.5×10^7 cells/ml (about 2.1g/l). In a total cell retention culture operated with a dilution rate of $0.18h^{-1}$, the yeast concentration, the residual reducing sugar concentration, the ethanol concentration, and the volumetric ethanol productivity were about 40g/l, about 15g/l, 81.4g/l, and 14.7g/l-h, respectively. In another cell retention culture operated with a dilution rate and a bleed ratio of $0.2h^{-1}$ and 0.14, respectively, the yeast concentration increased to 22g/l and the ethanol concentration oscillated around 68g/l. The volumetric ethanol productivity was about 13.6g/l-h and the residual reducing sugar concentration about 12g/l containing glucose of about 4.5g/l. According to the results of batch fermentation using the solid residue from hydrolysate filtration as the substrate, it seemed to have a certain value. Thus, development of an effective reactor system to produce ethanol from this solid residue is in need.

서 론

전 세계적으로 대기오염을 감소시키기 위하여 대체 수송연료로서의 발효 에탄올에 대한 관심이 급증하고 있으며 이에 따라 발효 에탄올의 대량 생산을 위한 효율적인 공정 개발의 중요성이 점차 부각되고

있다. 국내에서의 한 연구 결과에 의하면 휘발유에 에탄올을 10% 혼합하여 사용할 경우 휘발유만 사용할 때보다 일산화탄소 배출량이 평균 27% 감소하는 것으로 밝혀진 바 있어(1), 환경문제가 심각하게 대두되고 있는 최근 동향에 비추어 볼 때 발효 에탄올에 관한 연구가치는 더욱 높아지고 있다고 할 수 있다.

공정개발에 있어서 생산성은 물론 기질 전환율의

† Corresponding Author

Table 1. Residence times of liquefaction and saccharification.

Run	Residence Time[hours]		Solid Separation	Result	Operation
	Liquefaction	Saccharification			
1	2	6.5	Centrifuge	Fig. 2	Batch
2	6	12	Filter Press	Fig. 3	Continuous
3	6	12	Filter Press	Fig. 4	Continuous
4	2	4.7	Centrifuge	Fig. 5	Batch

극대화도 경제적인 관점에서 매우 중요하지만 보다 저렴한 가격의 산업용 기질의 확보가 선행되어야 한다. 이러한 목적으로 시험된 기질 중 보고된 것으로는 sugar beet molasses, sugar cane molasses, Jerusalem artichoke juice, corn residue prehydrolysate, cellulose, naked barley, cassava 등이 있다(2-8).

본 연구에서는 산업용 전분기질 중 국내 주정 업계에서도 사용 중이며 가장 저렴한 것으로 알려진 타피오카를 분쇄, 액화, 당화, 여과시켜 얻어진 당화액을 에탄올 발효 기질로 사용하였다. 타피오카 당화액으로는 회분배양 실험 및 본 연구센터에서 개발한 내부 세포여과기(9)를 이용한 연속 cell retention culture 실험을 하였으며, 여과과정에서 걸러진 슬러리 상태의 고형분으로는 회분배양 실험을 하여 기질로서의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

균주

서영주정(주)에서 분양받은 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 사용하였다. 이 효모를 고형배지(YM agar, Difco)에서 약 24시간 동안 30℃로 배양한 후 4℃로 보관하면서 3주마다 계대배양하였다. 보관용 고형배지의 효모를 플라스크에 접종하여 진탕 배양한 후 이를 발효조에 접종하였다.

실험방법 및 장치

본 실험에서는 서영주정에서 제공한 태국산 타피오카를 원료물질로 사용하였으며 이의 전분함량은 약 70~71%이었다. 전분을 제외한 나머지는 주로 섬유질, 수분 등이었다.

타피오카를 분쇄기로 잘게 부순 후에 이를 20 mesh sieve로 걸름으로써 크기를 0.83mm 이하로 조절하였다. 타피오카의 액화 및 당화를 위하여 사용한 효소는 각각 Thermamyl 120 l (α -amylase)

과 AMG 300G(glucoamylase)이었다. 이 두 가지 효소는 모두 용액상태로 Novo Nordisk Korea(주)로부터 공급받았으며 효소의 역가를 보전하기 위하여 4℃의 냉장실에 보관하며 사용하였다. 사용된 액화 및 당화 효소의 양은 각각 0.02%(v/w)와 0.5%(v/w)이었다. 액화시 온도는 90℃, 당화시 온도는 60℃로 하였다. 액화 및 당화에 소요된 체류시간은 실험목적에 따라 달리하였는 바 이를 Table 1에 나타내었다. 액화 및 당화가 끝난 후 당화여과액 중의 고형분을 filter press(일진환경 IGF-13) 또는 원심분리기(한일 HMR-210)를 이용하여 분리하였으며 당화액 및 고형분을 각각 발효 시작전에 121℃에서 20분간 멸균처리하였다.

회분실험을 위한 전처리의 경우, 배지 소요량이 작으므로 당화액 중의 고형분을 실험실용 원심분리기를 이용하여 분리하였다. 회분식 배양에서는 고형분이 제거된 당화액은 물론 걸러진 고형분과 물의 혼합액에 대한 실험도 수행하였다. 발효조건은 온도 30℃, 교반속도 300rpm으로 하였으며, pH는 조절과 공기주입은 하지 않았다. 1.5 l 용량의 발효조(NBS Co., U. S. A.)를 사용하였으며 조업부피는 1 l이었다. 타피오카 당화액 중에는 효모의 성장에 필요한 탄소원뿐만 아니라 질소원 등 여러 가지 성분도 들어있기 때문에 아무 것도 추가하지 않았다.

연속실험의 경우, 높은 세포농도의 유지를 위하여 내부 세포여과기를 발효조에 설치하였으며 filter press로 고형분이 제거된 당화액을 배지로 사용하였다. 발효시 온도는 30℃, 교반속도는 400rpm 하였으며 pH는 4.5로 조절하였다. 2.5 l 용량의 발효조(한국발효기)를 사용하였으며 조업부피는 1.8 l이었다. 단위시간당 공기주입량은 0.56vvm이었다. 연속배양에 사용한 발효조 시스템에 대한 개략도가 Fig. 1에 있다. 회분실험에서는 당화액을 전처리없이 사용하였으나 효모의 성장에 해로운 시안화화합물이 타피오카에 들어있는 것으로 문헌에 보고된 바가 있어(9), 이를 제거하기 위하여 타피오카 당화액을 활

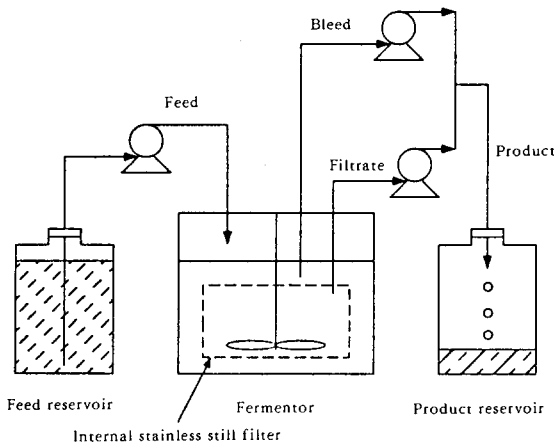


Fig. 1. Schematic diagram of experimental apparatus for continuous cell retention culture.

성탄이 충전된 칼럼을 통과시켜서 전처리하였다.

분석

회분식 배양의 경우 배지를 원심분리기로 처리하였기 때문에 부유 고형분이 상당히 있는 관계로 효모의 농도를 hemacytometer를 사용하여 세포의 수를 셀으로써 측정하였다. 연속식의 경우에는 이러한 문제가 없었으므로 570nm에서 spectrophotometer (Beckman, U. S. A.)을 이용하여 측정하였다. 에탄올농도는 gas chromatograph (Varian 3300, U. S. A.)를 이용하여 측정하였다. 포도당과 맥아당 등의 농도는 HPLC (Hitachi, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 환원당농도는 2,3-Dinitrosalicylic acid (DNS)법으로 정량하였다(10).

결과 및 고찰

회분 발효

초기 환원당농도와 효모농도는 각각 약 180g/l와 0.5×10^8 cells/ml (약 0.13g/l)이었다 (Fig. 2). 효모농도는 약 10시간까지는 지수적으로 1.6×10^8 cells/ml까지 증가한 후 20~30시간 동안은 약 10^8 cells/ml (약 2.5g/l)로 일정한 값을 보였다. 에탄올농도도 환원당이 소모되어 감에 따라 약 84g/l까지 증가하였다. 이때 에탄올 수율은 0.48 g-ethanol/g-(reducing sugar)이었다. 약 45시간 경과했을 때 환원당은 거의 남아 있지 않았다. 배양액의 pH는 약 4.9에서 시작하여 발효가 진행되면서 3.4까지 낮아졌다. 발효를 시작한지 약 36시간이 경과한 후에는

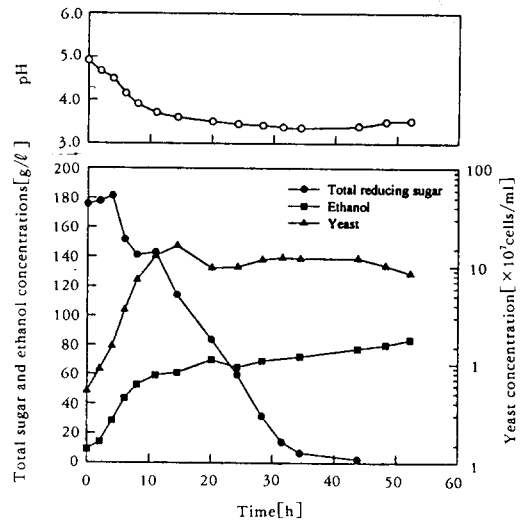


Fig. 2. Profiles of total reducing sugar, ethanol, and yeast concentrations and pH in batch culture using tapioca hydrolysate (liquefaction: 2h; saccharification: 6.5h).

발효가 거의 완료된 것으로 판단되었다.

Continuous Cell Retention Culture with Total Cell Retention

Fig. 3은 타피오카 당화액을 사용하여 bleeding 없이 total cell retention culture를 수행한 결과이다. 원료 용액 중의 총 환원당농도는 224g/l이었으며 회석속도는 0.18h^{-1} 이었다. 효모농도는 약 40g/l까지 높일 수 있었으며 에탄올농도는 80g/l 이상까지 얻을 수 있었다. 이는 배지를 활성탄으로 전처리하지 않은 경우 효모농도가 30g/l 미만이었고 에탄올농도가 약 70g/l 부근이었던 것에 비해 상당히 향상된 값이었다(11). 에탄올농도는 현재 주정공장에서 회분식으로 생산되는 에탄올농도인 9.0~10.5% (v/v)와 비슷한 값이다. 그러나 에탄올 부피 생산성은 약 14.7g/l-h로서 생산성이 1.0g/l-h 이하인 회분식 국내 주정공정의 경우에 비하여 매우 높은 생산성이라 할 수 있다. 잔류 환원당농도는 약 15g/l로 유지되었는데 이 중에는 포도당이 거의 남아 있지 않았고 맥아당은 약 6g/l이었으며 나머지는 미량의 maltotriose 또는 효모가 기질로 사용하지 못하는 다당류로서 초기 환원당의 3.6~4.0% (w/w)에 해당된다. 포도당농도가 낮음에도 불구하고 맥아당 등 일부 환원당이 소모되지 못하는 바 이는 포도

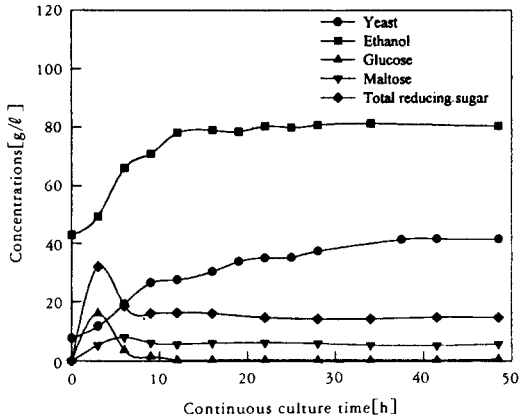


Fig. 3. Profiles of yeast, ethanol, glucose, maltose, and total reducing sugar concentrations in total cell retention culture (total reducing sugar : 224.0g/l ; dilution rate : 0.18h⁻¹).

당농도가 다당류의 소모를 억제하지 않는 수준이하로 더 낮아져야 함을 의미한다(12, 13). 그렇게 하기 위해서는 회석속도를 매우 작은 값으로 유지하여야 하는데 이는 생산성 측면에서 바람직하지 못하다. 따라서, 실제 공정에 있어서는 기질사용효율과 생산성을 모두 감안하여 조업조건을 선정하여야 할 것으로 생각된다. 또 한가지 고려할 사항은, 액화, 당화 및 발효공정이 연속화될 경우 멸균과정이 필요 없으므로 액화, 당화효소가 발효 중에도 작용하여 다당류를 효모가 이용가능한 포도당으로 전환시켜줄 경우 잔류 당농도를 더 낮출 수 있을 것으로 기대되는 점이다.

Culture with Bleed

일반적으로 세포재순환 발효조에서는 균체의 농도가 계속 증가함에 따라 균의 활성이 떨어지고 발효조내의 점도가 높아져서 이산화탄소의 제거가 힘들어지거나 여과기가 막히는 등의 조업곤란을 유발한다. 따라서 배양액 중의 일부를 세포 여과기를 통하지 않고 직접 반응기의 밖으로 배출시키는 bleeding이 필요하다. Fig. 4는 bleeding이 있는 경우 연속조업하였을 때의 결과를 보여준다. 당화액 중의 총 환원당농도는 205.0g/l 이었다. 회석속도는 0.20h⁻¹ 이었고, bleed rate(0.028h⁻¹)와 회석속도의 비로 정의되는 bleed ratio는 0.14이었다.

Total cell retention culture와는 달리 일정비율의 효모를 유출시키기 때문에 효모농도는 상대적으로

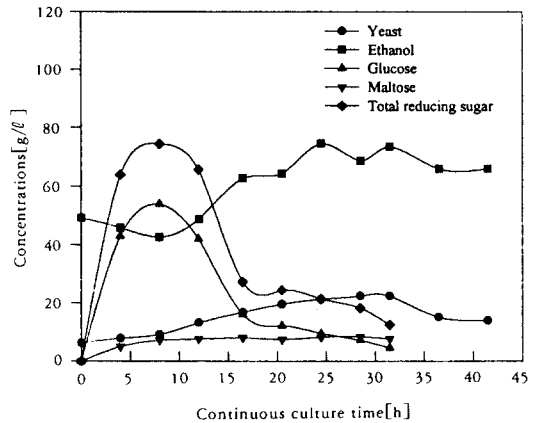


Fig. 4. Profiles of yeast, ethanol, glucose, maltose, and total reducing sugar concentrations in continuous culture with bleed (total reducing sugar : 205.0g/l ; bleed ratio : 0.14 ; dilution rate : 0.20h⁻¹).

느리게 증가하여 약 22g/l 에 도달하였다. 에탄올농도는 68g/l 부근에서 진동하였으며 생산성은 약 13.6g/l 이었다. 잔류 당농도는 약 12g/l 이었으며, 이중 포도당농도는 약 4.5g/l 가 남아 있었다. 포도당을 전부 소모시키기에는 회석속도 또는 bleed ratio가 다소 높은 것으로 생각된다. 일반적으로 bleeding을 하는 것이 단기적으로 볼 때 생산성면에서 total cell retention culture에 비해 다소 불리한 것으로 보이나 장기조업을 할 경우 균의 활성유지 및 원활한 조업 등의 측면에서 더 유리할 것으로 예상된다. 향후 bleed ratio에 대한 최적화가 당연히 이루어져야 할 것으로 생각된다.

일정한 회석속도와 bleed ratio에서 기질농도, 효모농도, 에탄올농도는 정상상태에서 균일한 값을 유지될 것으로 예상하였으나, 실제의 경우 진동상태 (oscillation)를 보였다. 이러한 현상은 영구적인 것 (sustained oscillation)일 수도 있으며 일시적인 것일 수도 있다. 일시적인 진동일 경우 충분한 시간이 지나면 각 변수들이 시간에 따른 변화를 보이지 않게 된다. 이러한 진동현상은 장시간의 조업과 수학적 해석을 통해 체계적인 규명이 필요하다.

고형분을 사용한 회분 발효

당화액을 원심분리하여 얻은 고형분 336g과 물 1 l 를 혼합한 용액에 효모를 접종하여 발효를 수행한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 초기 효모농도는

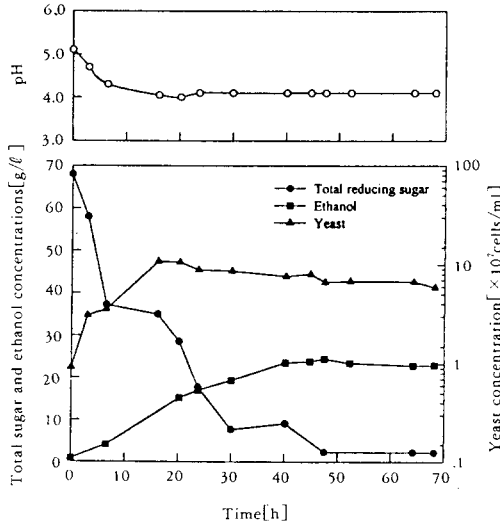


Fig. 5. Profiles of total reducing sugar, ethanol, and yeast concentrations and pH in slurry culture using solid part(liquefaction:2h; saccharification:4.7h).

0.9×10⁷cells/ml이었다. 초기의 당농도는 68g/l 이었으며 효모농도는 증가하다가 당이 거의 소모된 후인 47시간경부터는 약 0.7~0.8×10⁶cells/ml로 유지되었으며, 최대 에탄올농도는 24.5g/l 에 도달하였다. 이때 pH는 초기에 5.1에서 시작하여 발효가 진행됨에 따라 줄어들어 약 4까지 낮아졌으나 대부분의 효모의 최적 pH가 4~5인 것을 감안하면, pH는 조절할 필요가 없을 것으로 생각되었다.

위의 결과를 볼 때 타피오카의 액화, 당화후 원심 분리한 다음 남은 고형분에도 상당한 양의 환원당이 함유되어 있으므로 이를 폐기하는 것은 경제적, 환경적 측면에서 바람직하지 않으며 이러한 고형분을 적극 활용할 수 있는 특수 발효조의 개발이 필요한 것으로 사료된다.

요 약

현재 국내 주정공장에서 사용되고 있는 타피오카를 액화 및 당화시켜 얻은 당화액과 당화액에서 분리된 고형분으로 회분실험과 total cell retention culture 실험을 하였다. 당화액에 의한 회분 실험결과 에탄올 수율은 0.48 g-ethanol/g-(reducing sugar)으로서 약 180g/l 의 환원당이 36시간만에 거의 다 소모되어 약 84g/l 의 에탄올이 생성되었

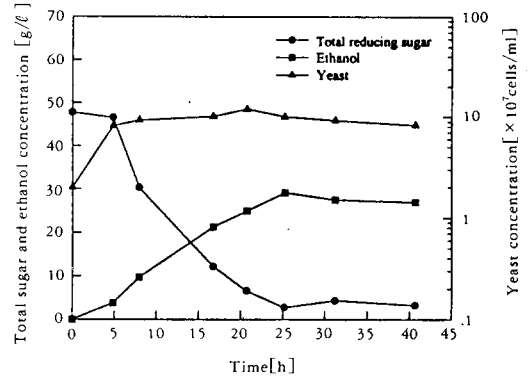


Fig. 6. Profiles of total reducing sugar, ethanol, and yeast concentrations in slurry culture using solid part(liquefactime:2h;saccharification:6.5h).

다. 이때 최종 효모농도는 8.5×10⁷cells/ml(약 2.3g/l)이었다. 원료 중 환원당농도가 224g/l 이고 회석속도가 0.18h⁻¹인 total cell retention culture 실험에서는 효모농도가 약 40g/l, 잔류 환원당농도가 약 15g/l 로서 포도당은 거의 소모된 것으로 나타났다. 에탄올농도는 약 81.4g/l 로서 이의 부피 생산성이 약 14.7g/l -h이었다. 원료 중 환원당농도가 205g/l 이고 회석속도가 0.2h⁻¹이며 bleed가 있는 cell retention culture 실험에서는 효모의 농도가 약 22g/l 까지 증가하였고 에탄올농도는 68g/l 부근에서 진동하였으며 생산성은 약 13.6g/l -h이었다. 약 12g/l 의 잔류 환원당 중에 약 4.5g/l 의 포도당이 포함되어 있었다. 타피오카 당화액으로부터 분리된 고형분을 사용한 실험을 통하여 고형분도 기질로서 효용가치가 어느 정도 있는 것으로 판명되었으며 당화액 발효조와 별도로 고형분 발효조의 개발도 필요한 것으로 생각되었다.

감 사

본 연구는 에너지자원기술개발지원센터와 대한알콜연료조합의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. 조강래, 김종춘, 엄명도, 박용희, 김수연, 홍유덕, 김선문, 한상묵(1994), 알콜 혼합연료 사용

- 휘발유 자동차의 배출가스 및 에너지소비효율에 관한 연구, 국립환경연구원 자동차공해연구소.
2. H. G. Lawford and J. D. Rousseau(1992), *Biotechnol. Lett.*, **5**, 421.
 3. S. C. Park and J. C. Baratti(1992), *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 16.
 4. S. Limtong, M. Kishimoto, T. Seki, T. Yoshida, and H. Taguchi(1987), *Bioprocess Engineering*, **2**, 141.
 5. E. Favela-Torres, J-J. Allais, and J. C. Baratti(1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 850.
 6. R. D. Tyagi and T. K. Ghose(1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1907.
 7. G. P. Philippidis, T. K. Smith, and C. E. Wyman(1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 846.
 8. K.-D. Nam, I.-K. Lee, H.-H. Cho, M-H. Choi, and W.-S. Kim(1992), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 324.
 9. H. N. Chang, W. G. Lee, and B. S. Kim (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 677.
 10. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
 11. W. G. Lee, Y.-S. Lee, H. N. Chang, and Y. K. Chang(1994), *Biotechnol. Techn.*, **8**, 817.
 12. I. Spebcer-Martins and N. van Uden(1979), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 241.
 13. R. De Mot and H. Verachttert(1987), *Eur. J. BioChem.*, **164**, 643.