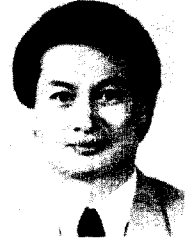


# 알콜 발효공정의 Scale-up : 사례연구



KIST 유전공학센터 대사공학연구실장 이 상 기

## 1. 서 론

미생물 발효공정에서 scale-up의 성공여부는 어떻게 실험실적 규모의 발효조에서 얻은 결과를 대용량의 산업발효조에서도 그대로 얻을 수 있느냐에 달려 있다. Scale-up에 영향을 미치는 인자들중 가장 중요한 것으로서 호기성 발효계에 있어서의 산소전달과 배양액의 적절한 교반을 들 수 있는데 사용하는 미생물의 발효동력학적 연구를 통해 얻어진 이러한 인자들에 대한 기본 data를 이용하여 scale-up시 대두될 수 있는 여러 가지 문제점을 해결해야 한다 (1).

에탄올 발효의 경우에는 일반적으로 사용 미생물의 산소요구량이 적거나 전혀 없는 혐기성 발효이므로 scale-up시 호기성 발효의 문제점인 산소전달 속도가 고려의 대상에서 제외될 수 있어 비교적 scale-up이 용이하다고 볼 수 있다. 그러나 이 경우에는 교반과 발효열 냉각을 목적으로 한 단위용적당 소요되는 동력량에 대해서는 충분한 고려가 있어야 한다.

대규모의 산업적 에탄올 발효는 전통적으로 주정을 생산하기 위한 목적에서 다양한 공정이 개발되어 왔다. 현재 대부분의 주정생산은 효모를 에탄올 발효균주로 하여 회분식 배양법에 의해 이루어지고 있으나(2) 에탄올의 수율과 생산성을 높이기 위해 반회분식(3) 또는 연속식(4,6) 발효공정도 일부 이용되고 있다. 또한 응집성 (floculent) 미생물이나 막을 사용하여 균체를 재순환(recycle)시키거나(6), 고정화 (immobilization) 균체 (8-9)를 이용하려는 공정들이 산업적 규모로 개발되었으나 실용성에 있어서는 일부 개선이 필요한 상태이다.

1980년대 들어 고효율 에탄올 생산 세균인 *Zymo-*

*monas mobilis*를 산업적인 에탄올 생산균주로 이용하려는 연구가 국내외적으로 활발히 전개되고 있는데 이 균주는 혐기성 균주로서 효모에 비해 균체증식 속도가 빠르고 에탄올의 수율 및 생산성이 월등한 것으로 판명됨으로써(10) 앞으로 주정 및 공업용 연료 에탄올의 생산 균주로서 크게 각광받을 것으로 예상된다. 그러나 기존의 에탄올 생산 공정 및 설비가 효모를 발효균주로 한 것이며 *Z. mobilis* 균주를 이용한 대규모 에탄올 생산공정 개발(11)은 상대적으로 부진하여 아직 전세계적으로 이 균주를 이용한 산업 plant는 실용화 된 것이 전무한 실정이다.

본 고에서는 이제까지 개발되어 현재 산업적으로 사용되고 있는 에탄올 생산공정을 살펴보고 scale-up의 사례로서 KIST 유전공학센터에서 *Z. mobilis* airlift 발효조에서 수행한 연구결과를 중심으로 에탄올 발효에 있어서 scale-up시 나타나는 문제점과 고려해야 할 제반사항에 대해 살펴 보기로 한다.

## 2. 에탄올 생산공정

에탄올 생산공정은 세 가지 단계, 즉 기질의 준비, 발효 및 생성된 에탄올의 회수공정으로 되어있다. 이 중 발효공정은 가장 중요한 단계라고 할 수 있으며, 적당한 발효공정의 선택에 따라 투자액과 운전비가 결정된다. 발효공정의 선택시 고려해야 할 사항은 발효조의 형태, 운전방식 (회분식, 반회분식 혹은 연속식), 발효조의 크기 및 제어장치 등이다.

현재 발효 에탄올의 약 75% 정도는 1940년대에 개발된 발효방식인 교반식 발효조(stirred tank fermentor)를 사용한 회분식 발효에 의해 생산되고 있다. 회분식 발효는 투자액이 비교적 소규모이고 조작이 비교적 간편한 점이 장점이다. 또한 반회분식

발효공정은 발효 후 발효액을 발효조로부터 완전히 제거하지 않고 소량을 남겨놓아 다음 발효를 위한 inoculum으로 사용하므로 회분식에 비해 생산성과 경제성이 높다. 그러나 회분식과 반회분식 공정의 단점은 에탄올의 생산성이 낮다는 것이다. 주정회사에서 수행되는 대부분의 회분식 발효의 경우 36 시간의 발효로 약 6 vol%(=47 g/l)의 에탄올을 얻고 있으며, 이로부터 에탄올 생산성을 계산하면 1~4 g/l, h에 불과하다(12). 이와 같이 낮은 이유는 회분식 발효에서는 미생물의 물리적 특성이 충분히 고려되지 않기 때문에 균체의 증식속도가 낮아지기 때문이다.

에탄올은 일차 대사산물로서 균체의 증식과 더불어 생성되므로 효모의 경우 에탄올의 생성은 증식속도가 증가함에 따라 증가하게 된다. 그러나 회분식 발효에 있어서 초기의 높은 기질농도와 발효 말기의 높은 에탄올 농도가 미생물의 증식에 저해를 일으키게 되므로 에탄올 생산을 최대로 하기 위해서는 배지중의 포도당 농도를 3.5~150 g/l로 조절해야 한다. 그 이유는 기질농도 3.5 g/l 이하에서는 기질의 결핍현상이 일어나고, 150 g/l 이상에서는 기질저해(substrate inhibition) 현상이 일어나기 때문이다(13). 효모의 에탄올 농도 11.4 vol%(=90 g/l)에서는 균체의 성장이 완전히 저해되는 것으로 알려져 있다(14).

또 한가지의 발효법인 연속발효는 기질의 연속공급과 균체와 발효액의 연속적인 제거가 가능하므로 발효초기에 균체의 증식은 회분식 발효와 동일하나 대수증식기가 되었을 때는 influx와 efflux의 조절에 의하여 전체적으로 평형상태(steady state)에서 운전이 이루어지게 되고 균체는 대수증식기를 계속 유지하게 됨으로써 짧은 시간내에 높은 기질 전환율을 얻을 수 있게 된다. 이러한 높은 생산성의 결과 작은 발효조에서도 경제적으로 에탄올을 생산할 수 있다. 그러나 연속발효의 문제점으로는 오염 가능성이 높고 균주의 돌연변이 가능성이 증가된다는 점이다. 효모는 일반적으로 혐기적으로 성장하지만 불포화 지방산이나 지질과 같은 생체막의 필수성분의 합성을 위해서 소량의 산소를 요구한다. 회분식 발효의 경우 발효전 배지를 통기 해주는 것으로 충분하나 연속발효의 경우에는 지속적인 산소의 공

급이 필요하게 된다. 이 경우 효모가 알콜발효 대신에 호흡대사를 취하는 것을 방지하기 위해 배지중의 산소농도는 0.1% 정도로 유지되도록 한다(15).

이러한 연속발효공정에서는 에탄올 생산성이 6 g/l, h 정도로 회분식 발효의 경우보다 2~3배 높은 결과를 얻을 수 있으나 균체의 증식은 여전히 에탄올에 의하여 저해받게 된다. 따라서 원심분리나 한외여과막기술(ultrafiltration)을 사용, 균체와 생산물을 분리하여 균체만을 다시 발효조로 재순환시키면 높은 균체농도를 유지할 수 있으므로 수율과 에탄올 생산성이 높아지며 원심분리에 소요되는 에너지와 투자액은 이러한 높은 생산성에 의하여 상쇄될 수 있다. 진공발효는 교반식 발효조의 일종으로서 발효조에 진공(32~35 mgHg)을 걸어 에탄올과 물의 혼합물을 30°C의 발효조내에서 직접 증류하는 것이다. 이 공정에서 50 g/l의 균체농도에서 40 g/l, h의 에탄올 생산성을 얻을 수 있었는데 단일진공 발효공정과 균체 재순환 발효공정을 함께 사용하면 균체량 124 g/l 및 에탄올 생산성 82 g/l, h를 얻는 것이 가능한 것으로 보고되었다(16). 그러나 진공발효의 기술적인 응용은 cooling과 pumping에 소요되는 에너지 비용이 크다는 것이 애로사항으로 인식되고 있다.

이밖에 현재 개발 중에 있는 다른 공정으로는 dialysis 발효조와 extraction 발효조가 있는데 dialysis 발효조에서는 균체와 생성물이 반투막에 의하여 분리되고 extraction 발효조에서는 에탄올이 특수한 추출재료에 의하여 배양액으로부터 분리된다. 이러한 에탄올 발효공정의 공통적인 단점으로서 지적되는 것은 최종 발효액의 에탄올 농도가 6~20 vol% 정도로 낮아진다는 점이다. 따라서 발효 후 증류에 소요되는 비용의 비중이 커지게 된다. 예를 들어 100 kg의 순수한 전분으로부터 95.6 vol% 에탄올 54 kg을 얻을 수 있는데 이의 에너지가는 1400 MJ이다. 그러나 증류과정에서 1040 MJ 이 소모되므로 총에너지를 수득은 단지 360 MJ에 불과하게 된다(17). 이와 같이 증류에 필요한 에너지를 고려할때, 발효 후 얻어진 에탄올의 최종농도를 가능한한 높일 수 있는 방법의 개발이 필요하게 된다.

### 3. 전분의 동시당화 발효에 의한 에탄올 생산

에탄올 발효의 원료물질로서 사탕무우나 사탕수수 등의 당질성 바이오매스, 옥수수, 카사바, 고구마 등의 전분성 바이오매스, 혹은 농축산 폐기물이나 섬유소, 리그노셀룰로오즈성의 바이오매스 등을 다양하게 이용할 수 있으나, 여러 가지 이유로써 현재 산업적으로 가장 많이 쓰이고 있는 원료물질은 전분이다. 전분은 포도당의 중합체로서  $\alpha$ -amylase와 glucoamylase 등의 전분액화 및 당화효소에 의해 발효성당으로 가수분해 후 에탄올 발효에 이용될 수 있다. 이 경우 전분당화 효소와 함께 효모나 *Z. mobilis* 등 에탄올 발효균주를 함께 작용시키면 전분의 당화 및 에탄올 발효가 동시에 일어나므로 에탄올 발효의 생산성을 높일 수 있게 된다.

*Z. mobilis*를 이용, 열대성 전분작물인 싸고(sago)로 부터 에탄올을 효율적으로 생산하기 위해 당화 효소와 균체를 그대로 사용하거나 또는 고정화시켜 회분식, 반회분식, 연속식 등 여러 가지로 조업방법을 바꾸어 동시당화 발효를 수행한 결과(표 1) glucoamylase(AMG)와 *Z. mobilis* 균체를 동시고정화하여 연속발효를 행하는 것이 실험실적 규모에서는

에탄올의 생산성이 가장 높은 것으로 판명되었다(18). 그러나 이 공정을 산업화시키는데는 몇 가지 문제점이 있는데, 예를 들면 무균적으로 효소와 균체를 대량으로 고정화시키는 공정이 쉽지 않으며 이들을 사용하여 연속발효조를 운전할 때 원료물질인 액화전분용액의 청정성이 유지되어야 하므로 원료의 준비 과정이 복잡하게 된다. 또한 에탄올 생산설비는 연간 수백만톤의 에탄올을 생산하기 적합하도록 설계되어야만 경제성이 있는데, 연속식 방법의 경우 생산된 에탄올의 부가가치에 비하여 설비투자자가 너무 크다는 단점이 있다. 따라서 *Z. mobilis*를 이용하는 에탄올 생산공정은 산업화를 고려할 때 한외여과막기술을 사용하여 균체를 재순환시키는 공정이 가장 유리한 것으로 판단된다. 이 공정에서는 발효방식은 반회분식이지만 전분의 액화, 당화 및 발효가 연속적인 단일공정으로 연결되어 있어 액화액을 발효온도(30~35°C)로 냉각시키는 도중 glucoamylase의 최적온도인 60°C에서 당화효소를 첨가함으로써 일부 전분을 발효성 당으로 전환시키면서 발효온도 부근으로 냉각되었을 때 발효조로 보내져 재순환된 균체와 함께 동시당화 및 발효를 시킬 수 있다는 장점이 있다.

표 1. 전분당화 효소와 *Z. mobilis*를 이용한 실험실적 규모에서의 에탄올 생산공정의 효능 비교.

Process	Condition	Dilution rate(h <sup>-1</sup> )	Ethanol conc.(g/l)	Ethanol yield(%)	Productivity (g/l,h)
Continuous SSF					
Tapered bioreactor	Coimmobilized AMG and <i>Z. mobilis</i> ZM4	0.20	46.0	97	9.2
Cylindrical bioreactor	"	0.21	44.3	93	9.3
Fluidized-bed bioreactor	Free AMG and <i>Z. mobilis</i> ZM401	0.12	44.9	94	5.2
Batch SSF	Free AMG and <i>Z. mobilis</i> ZM4	—	69.2	97	3.5
Batch Presaccharified	Free <i>Z. mobilis</i> ZM4	—	68.1	96	1.7
Semibatch SSF					
Recycle using settler	Free AMG and <i>Z. mobilis</i> ZM401	—	68	96	4.3
Recycle using ultrafiltration	Free AMG and <i>Z. mobilis</i> ZM4	—	65	91	5.4

\* Sago starch was used as substrate in 10% and 5% for continuous and batch fermentation, respectively.

### 4. *Z. mobilis*를 이용한 에탄올 발효공정의 scale-up

싸고(sago) 전분을 원료로 *Z. mobilis*의 에탄올 발효공정을 scale-up시키기 위해 20 L, 100 L 및 500 L 규모의 airlift형 pilot scale 발효조에 한외여과막 장치를 부착한 후 기질농도를 20%(초기 총당 농도 : 180 g/l)로 하여 반회분식 동시당화발효 공정을 수행하였다(그림 1). 1차 발효가 끝난후 한외여과막 장치를 이용하여 배양액 총부피의 30%까지 균체를 농축하여 발효조로 재순환시키고 새로운 배지를 충전한 후 이를 기준으로하여 당화효소 0.5%(v/w)를 가한 다음 35°C, pH 5.0에서 발효를 계속 수행하였다. 이 때 공정의 효율성을 높이기 위한 목적으로 airlift 발효조에 CO<sub>2</sub> 재순환장치(그림 2)를 부착시킨 새

로운 형태의 발효조를 사용하였다. 이 발효조는 발효 중 *Z. mobilis*에 의해 발생되는 CO<sub>2</sub> 가스를 발효조 상부로부터 파이프와 공기펌프를 이용하여 압력가스 저장용기로 보낸 다음 이것을 다시 발효조 하단으로 보내어 발효배지 용액을 교반할 수 있도록 고안되었다.

(그림 3)에서 보는 바와 같이 첫 회분식 발효의 양상은 100 L 발효조의 경우 24시간 이내에 에탄올 발효가 완료되어 최종 에탄올 농도는 85.1 g/l(에탄올 수율 : 0.47 g ethanol/g starch)였고 균체의 최대 비증식 속도( $\mu_m$ )은 0.13 h<sup>-1</sup>였다. 두번째 회분식 발효부터는 에탄올 생성 및 균체의 성장곡선과 환원당 및 포도당의 농도변화 등 모든 발효 양상이 일정한 형태를 유지하였으며 균체의 재순환에 의해 발효시간이 단축되어 배양이 반복될수록 더 높은

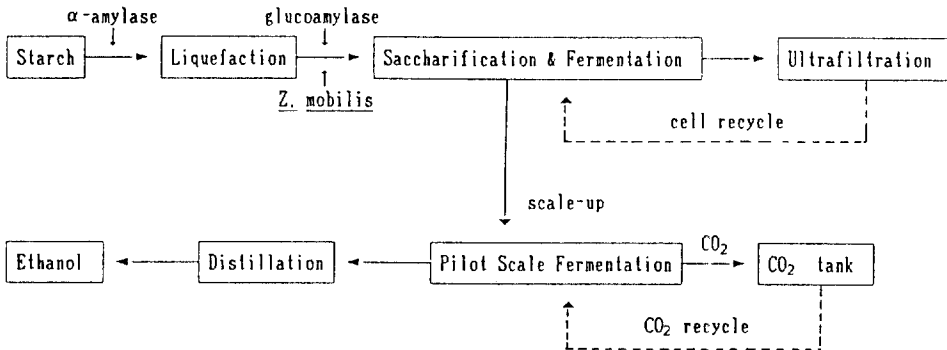


그림 1. 동시당화발효법에 의한 전분질로부터 에탄올의 생산공정.

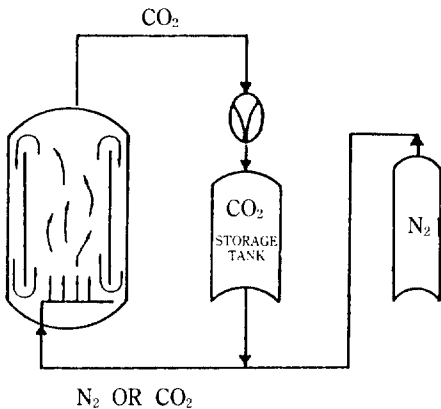


그림 2. CO<sub>2</sub> 재순환을 이용한 airlift 발효조.

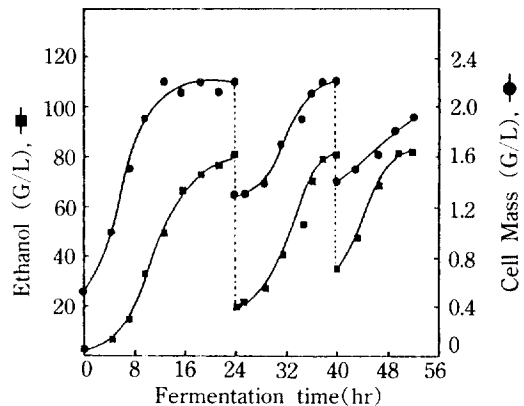


그림 3. 20% 싸고(sago) 전분에서 CO<sub>2</sub> 재순환과 한외여과막을 이용한 균체 재순환 방식을 도입한 100 L airlift 발효조에서의 반회분식 에탄올 생산.

표 2. Pilot scale에서의 조업방식에 따른 에탄올의 생산성 비교.

Fermentor type & Fermentation mode	Ethanol (g/l)	Productivity (g/l,h)	Calculation time(h)
Jar fermentor(1 L)	88.8	3.70	24
Stirred tank(70 L)			
Batch	85.1	4.05	21
Semibatch 1	85.7	3.17	27
2	80.5	5.03	16
3	80.6	6.72	12
4	79.2	6.60	12
5	82.3	6.86	12
Airlift(100 L)			
Batch	82.5	3.93	21
Semibatch 1	80.6	3.36	24
2	80.0	5.00	16
3	81.4	6.78	12
Airlift(500 L)			
Batch	82.2	3.57	23

는 별다른 차이가 나타나지 않을 것으로 추정된다. 에탄올 생산성을 나타내었다(19). 이러한 결과를 실험실적 규모의 소형 발효조를 사용하여 얻은 결과와 비교할 때 에탄올의 수율과 생산성면에서 거의 비슷하거나 오히려 더 우수한 것으로 판명되었다(표 2). 이는 scale-up시 일반적으로 나타나는 변수들이 *Z. mobilis*에 의한 산업적 규모의 에탄올 생산시에는 별다른 영향을 미치지 않고 있음을 의미한다. 그 이유로서 *Z. mobilis*의 경우 혐기성 세균이므로 통기과정이 불필요하고 CO<sub>2</sub>가스 재순환 방법에 의해 자체 교반이 충분히 이루어져 발효시 발생하는 열의 전달이 발효조내에서 효과적으로 일어나기 때문인 것으로 추정된다.

## 5. 결 론

*Z. mobilis* 균주를 사용하여 사코(sago) 전분으로부터 에탄올을 생산하기 위해 개발한 동시당화 발효공정은 pilot scale 규모로 약 1,000배 scale-up했을 경우에도 에탄올 수율 및 생산성에 있어서 실험실 규모의 소형 발효조와 유사한 결과를 얻었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 50~100톤 규모의 산업발효조를 이용하더라도 에탄올 수율 및 생산성에

그러나 실제로 *Z. mobilis* 균주를 사용하여 산업적 규모로 에탄올을 생산한 경험이 국내외적으로 극히 부족한 실정으므로 앞으로 경제성과 연계된 scale-up 연구를 통해 발생가능한 여러 가지 문제점을 해결해 나가야 할 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Aiba, S., A.E. Humphery and N.F. Mills, *Biochemical Engineering*. 2nd Ed. Univ. Tokyo Press (1973).
2. Rose, D., *Process Biochem.* **11**(3), 10(1976).
3. Yarovenko, V.L., *Adv. Biochem. Eng.* **9**, 1(1978).
4. Smith, R.E., Proc. 7th Symp. Prague (1980).
5. Greenshields, R.N., and E.L. Smith, *Process Biochem.* **9**(3), 11(1974).
6. Alfa-Laval Technical Report IB-8104-03, The Biostill Technique. (1981).
7. Rosen, K., *Process Biochem.* **13**(5), 25(1978).
8. Nojima, S., *Chem. Economy. Eng. Rev.* **15**, 16 (1983).
9. Kyowa Hakko Kogyo Technical Report(1985).
10. Rogers, P.L., K.J. Lee and D.E. Tribe, *Process Biochem.* **15**(6), 7(1980).
11. Bringer, S., H. Sabm and W. Swyzen, *Biotech. Bioeng. Symp.* **14**, 311(1984).
12. Blatkamp, P.J., M. Takagi, M.S. Pemberton and G.H. Emert, *AIChE Symp. Series* **74**, 85 (1978).
13. Maiorella, B., *Adv. Biochem. Eng.* **20**, 43(1981).
14. Ghose, T.K. and R.D. Tyagi, *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1401(1979).
15. Cowland, T.W. and D.R. Maule, *J. Inst. Brew.* **72**, 480(1966).
16. Cysewski, G.R. and C.R. Wilke, *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 1125
17. Faust, U. 4th Symposium der Technischen Chemie, p.37 Berlin (1979).
18. Kim, C.H. and S.K. Rhee, Preliminary Studies for Scale-up of SSF Ethanol Process. KIST Project No. BSF8012-105-2(1988).
19. Kim, C.H. and S.K. Rhee, Pilot-Scale Ethanol Production from Sago Starch by SSF Process. KIST Project NO. BSF80200-164-2(1989).