

Ralstonia eutropha의 유기식 발효에 의한 Poly(3-hydroxybutyrate) 생산의 경제성 분석

김갑진 · 양영기¹ · 이영하*

충남대학교 미생물학과, ¹조선대학교 생물과학부

Pilot plant (200 l)에서의 유기식 배양에 의한 *Ralstonia eutropha* KHB 8862의 고농도 배양을 통하여 poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)의 대량생산을 모색하였다. 그 결과 배양 80시간 후 168 g/l의 전체량과 전체량의 74%에 달하는 PHB를 생산할 수 있었으며, 이때의 고과당 시럽으로부터의 PHB 전환수율 및 PHB 생산성은 각각 0.27 (w/w) 및 1.6 g l⁻¹h⁻¹이었다. 이를 토대로 본 연구에서는 미생물 발효에 의한 PHB 생산 cost 및 그 경제성을 분석하였다. 신규 설비투자를 고려하지 않은 경우의 PHB의 생산 cost는 US\$2.41/kg으로 산출된 반면에 신규 설비투자를 고려한 경우에는 US\$3.15/kg으로 상승되었다. 탄소원의 PHB로의 전환수율과 발효 생산성 모두 PHB 생산비를 결정하는 중요 요인이지만 전체 생산비의 37%를 차지하는 탄소원 원료비의 비중이 설비투자의 감가상각비 비중 (17%)에 비해 높기 때문에 생산성을 높이는 노력보다는 전환수율을 개선하는 것이 PHB 생산비용 절감의 핵심이 되는 것으로 나타났다. PHB chip으로의 제조시 PHB 생산 cost는 US\$4.0/kg의 수준으로 현재로서는 범용 합성플라스틱에 비하여 경쟁력을 확보하지 못한다. 따라서 생산비 절감을 통한 범용수지로서 경쟁력 제고와 함께 바이오의약 분야 등의 고부가가치 영역에서의 새로운 용도 개발 등이 적극 요구된다.

Key words □ economic evaluation, poly(3-hydroxybutyrate), polyhydroxyalkanoates, *Ralstonia eutropha*

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)는 미생물이 세포 내에 축적하는 polyhydroxyalkanoate (PHA) 계열의 폴리에스터 저장물질로서 우수한 생분해성과 함께 합성 고분자들과 유사한 특성을 가지고 있기 때문에 기존의 난분해성 플라스틱에 의한 환경오염을 방지할 수 있는 대체 소재로서 많은 관심을 모으고 있다(2). 1970년대 초 오일쇼크를 계기로 기초연구가 시작된 이래 1980년대 초 ICI사의 Biopol 개발을 시작으로 전세계적으로 주목받기 시작한 PHB 개발연구는 지난 20여년간 수많은 생산균주의 분리, 새로운 발효기술의 개발, 저렴한 탄소원과 보조기질을 이용하는 새로운 공정 등의 분야에서 괄목한 발전이 이루어졌다(4,14). 하지만, PHB 생산을 위해 사용되는 발효원료로서는 비교적 고가의 탄소원이라 할 수 있는 glucose나 sucrose 등의 당류가 주로 이용되고 있고, 또 이로부터 PHB로 전환되는 수율이 30~40% 수준에 불과하기 때문에 상대적으로 PHB의 생산원가는 높은 수준이다 (4,5). 이로 인하여 PHB는 아직 범용수지와 경쟁력을 확보하지 못하고 있으며, 본격적인 상업화의 전망도 아직은 불확실한 실정이다.

발효공정을 통하여 경쟁력 있는 가격수준의 제품을 생산하기 위해서는 먼저 선택된 미생물이 경제적으로 적절하게 예견된 충분한 양의 최종산물을 제공해 줄 수 있어야 하는데 이러한 의미에서 생산성이 높은 균주의 개발은 필수 요건이라 할 수 있다. 아울러, 가격이 저렴한 원료의 선택, 적절한 공정의 자동화, 생산

수율과 설비의 가동 효율이 높은 공정 개발, 그리고 단순하고 신속한 최종 발효산물의 회수 및 정제공정 개발은 발효제품의 경제성 확보를 위한 기본 목표가 된다.

일반적으로 주어진 발효공정에 있어서 원가절감을 위하여 가장 먼저 살펴보아야 할 점이 있다면 그것은 원가 구성요소에 대한 항목별 분석(cost breakdown) 일 것이다(18). 원가의 구성요소를 분석함으로써 각각의 구성 요소들이 차지하는 비율을 세부적으로 검토하면 가장 효과적으로 원가를 절감할 수 있는 방안이 마련될 수 있을 것이다. Nyiri와 Charles (16)는 여러 가지 미생물 발효공정을 비교 검토한 결과 cost에 가장 큰 영향을 미치는 근본적인 4가지 요인들을 찾아내었는데 원료비(raw materials), 설비비(fixed cost), 동력비(utilities), 인건비(labour) 등이 그것이다. 따라서 만약 원료비가 전체 cost의 대부분을 차지하고 있다면 사용하는 배지와 균주의 개발연구가 cost down을 위한 주요 개발 목표가 될 것이다.

최근, 미생물 발효를 통한 PHA 생산의 공정 및 경제성 평가와 관련하여 Yamane (21)은 theoretical study를 통하여 다양한 탄소원들로부터 PHB yield를 계산하였고, Hazenberg 등(10)과 Choi와 Lee (5-8)는 미생물 발효공정에 따른 PHA 생산의 경제성을 평가한 바 있다. 그러나 이들 연구의 대부분은 lab scale 수준의 결과만을 토대로 하여 simulation을 통해 연산 100,000톤 규모에서의 cost를 산정하고 있다. 그러나 이러한 경우, 100 batch/year 가동하는 것으로 가정하더라도 10,000톤 규모의 발효조가 필요하기 때문에 lab scale data를 10,000톤 발효조에 곧바로 적용한다는 것은 scale-up 범위를 100배까지 허용하는 통상적

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-821-6413, Fax: 042-822-7367
E-mail: yhrhee@cnu.ac.kr

인 예들에 비해 볼 때 상당한 무리가 있을 것으로 생각된다. 따라서 보다 정확한 simulation 결과를 얻기 위해서는 보다 큰 규모의 발효조에서의 배양결과가 필요하다고 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 lab scale의 jar fermentor에서 얻어진 연구결과를 바탕으로 200 l 용량의 pilot fermentor에서 고농도 유가배양을 통하여 PHB 대량생산 연구를 수행하고, 그로부터 얻어진 발효생산 data를 토대로 pilot fermentor 용량의 100배 규모인 20 m³ 규모의 발효조에서 cost simulation을 통하여 보다 정확한 PHB의 production cost를 산출함으로써 기존의 범용수지와의 경제성을 비교 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서는 *Ralstonia eutropha*의 type strain인 ATCC 17697로부터 자외선 조사를 통하여 얻어진 glucose 이용 돌연변이 균주를 C/N ratio가 30 이상인 plate에서 연속적으로 계대배양하면서 동일 plate 상에서 우유 빛(milky white)을 띄는 상위 5%에 속하는 대형 colony 만을 선택적으로 분리하는 방법으로 얻어진 *Ralstonia eutropha* KHB-8862 돌연변이주를 PHB 생산용 균주로 사용하였다. 종균 배양용 배지는 YM broth (yeast extract, 3 g/l; malt extract, 3 g/l; tryptone, 5 g/l)에 고과당 시럽 [high fructose syrup: HFS-55, 대상(주)] 20 g/l을 첨가한 배지를 사용하였다. 고농도 유가식 배양을 위한 기본배지 조성은 yeast extract 1 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, KH₂PO₄ 4 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 12 g, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.06 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.03 g, potassium citrate 1 g, CSL 1 g/l, mineral solution (H₃BO₃, 600 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 200 mg, MnCl₂ · 4H₂O 60 mg, CoCl₂ · 6H₂O 400 mg, CuSO₄ · 4H₂O 20 mg, NaMoO₄ · 2H₂O 60 mg/l) 5 ml이며, 배양액의 pH는 1N NaOH 용액을 사용하여 멸균전에 7.0으로 조정하였다. 유가식 배양을 위한 feeding용 배지 조성은 탄소원으로 고과당 시럽 원액을 사용하였으며, 균체 증식시기에는 암모니아수(18%)를 질소원과 pH 조절제로 사용하였고 PHB 축적단계에서는 2M KOH 용액과 1M NaOH 용액을 동량 섞은 용액으로 암모니아수를 대체하였다.

Pilot fermentor에서의 대량배양

Jar fermentor에서의 고농도 배양결과를 토대로 200 l pilot plant (Hitachi, Japan)를 이용하여 PHB 대량생산을 시도하였다. 배양액의 최종 volume은 120 l로 산정하여 초기 volume을 50 l로 하였다. 종균은 YM broth 10 l로 30 l fermenter (Hitachi, Japan)에서 18시간 배양한 후 접종하였다. 초기 교반속도는 120 rpm에서 시작하여 균체 증식에 따라 300 rpm까지 상승시켰고, 통기량은 1 vvm, 발효조 내부의 압력은 0.5~1.0 kgf/cm²에서 조절하였다. 배양온도는 33°C로 하였으며 균체 증식기간 동안 용존산소(DO) 농도와 pH는 각각 2~4 ppm, 6.8~7.2 사이에서 유지시켰다.

Feeding용 탄소원은 고과당 시럽을 30 l 발효조 2기에서 110°C에서 10분간 멸균 후, 디지털 정량펌프 (Watson Marlow

505Di, England)를 통하여 공급되었으며 배양액 중의 농도는 5~50 g/l 사이에서 유지되도록 하였고, 순수 산소는 액체산소 탱크 (Taylor Wharton XL-45, USA)에 기화기를 부착하여 공급하였다. 발효배기 가스중의 CO₂ 농도(CER)를 CO₂/O₂ gas analyzer system (VIA-300 infrared CO₂ analyzer & PMA-200 magnetic O₂ analyzer, Horiba Co., Japan)으로 분석함으로써 균체 성장을 지속적으로 monitoring 하였다.

배양 종료 후, 배양액은 200 l 회수용 tank로 이송하여 30분간 steam으로 가압(1.5 kgf/cm²) 멸균하여 균체를 사멸시키고 연속식 원심분리기(9,600×g) (BTPX 205 Alfa Laval, Italy)를 이용하여 균체를 회수하였고, 4°C에서 냉장 보관하였다. PHB의 추출 및 정제는 Soxhlet 장치를 이용하여 Kim 등(12)의 방법에 의하여 수행하였다.

분석방법

균체 생장의 정도는 spectrophotometer (U-1100, Hitachi Co., Japan)를 이용한 570 nm에서의 optical density (OD) 측정을 통하여 분석되었고, 세포건체량(DCW)은 세포 회수 후 acetone 건조를 거쳐 80°C의 dry oven에서 항량이 될 때까지 건조하여 측정하였다. 배양액 중에 고과당 시럽의 농도는 HPLC (Hewlett Packard Co., USA)를 이용하여 측정하였고, 암모늄 이온 (NH₄⁺)의 농도는 photometer (SQ 118 Merck, Germany)로 측정하였다. PHB의 함량분석은 Braunegg 등(3)의 gas chromatography법으로 측정하였다.

20 m³ 발효조에서의 PHB 생산비용 추정

Pilot fermentor에서의 결과를 토대로 하여 100배 scale-up 된 20 m³ fermentor에서의 PHB의 production cost를 산정하였다. 전체 생산공정에서 최종 배양액 volume은 발효조 전체 volume의 60%, 발효조 가동 일수는 연간 300일, batch time은 100 시간, 그리고 PHB의 생산수율은 pilot plant scale과 동일한 124 g PHB/l를 기준으로 정하였다.

발효 원료비는 실제 공업용 원료가격의 구매가격을 기준으로 산정하였으며 기타 동력비, 인건비, 유지 관리비 등은 Mogren (15)이 single cell protein과 norprotein 생산을 통해 산정한 비율을 참고로 하여 결정하였다. 또한, 20 m³ 발효조의 신규 설비투자비용은 Humphrey (11)와 MacLennan (13)의 설비와 cost의 경험적 관계식인 $cost_1/cost_2=(size_1/size_2)^n$ (single cell protein plant의 경우, $n=0.7-0.8$; brewing의 경우, $n=0.6$)으로부터 8억원 (주변설비 포함)으로 추정하였고 발효조의 사용 내구연한은 10년 그리고 설비의 잔존 가치는 무시하는 것으로 가정하여 감가 상각비(depreciation)를 산정하였다.

PHB 회수 및 정제공정은 PHB 발효 배양방법 만큼이나 다양하게 개발되어 있다. 최근에는 alkaline digestion (1M NH₄OH, 10 min/0.2 M NaOH, 1h) 만으로도 순도 95% 이상의 PHB를 얻을 수 있는 방법들이 개발됨에 따라 recovery cost는 전체 PHB 생산 cost 중에서 거의 무시될 수 있는 수준까지 감소하였다(7,17). 따라서 본 연구에서는 PHB recovery cost는 별도로 고려하지 않았다. 아울러, 고농도 배양에 따른 용존산소 고갈 방지

를 위해 공급된 pure oxygen 비용은 utility cost에 포함하였다.

PHB 생산비용과 배양학적 변수의 상관성

발효제품의 생산 cost에 영향을 미치는 주요한 인자로서는 크게 기질로부터의 전환수율(Yp/s)과 발효 생산성(productivity)을 들 수 있다. 그러나 대부분의 경우 기질에 대한 수율 보다는 발효 생산성을 우선하는 경우가 많다. 본 연구에서는 기존 발효설비를 이용하는 경우와 신규로 20 m³ 규모의 발효설비를 투자한 경우를 대비하여 PHB 제조비용을 비교하였으며 실제 PHB 생산시에 기질(탄소원)의 PHB로의 전환수율 변화($Yp/s=0.25-0.48$ g/g)에 따른 PHB 생산비 변화와 생산성 변화($productivity=1.24-5.0$ gL⁻¹h⁻¹)에 따르는 PHB 생산비 변화를 조사하여 그 영향을 비교하였다.

미생물 발효 생산과 경제성 평가

미생물 발효에 의한 PHB의 경제성 분석은 전문 program인 Superpro Designer (Intelligen, Inc, Scotch Plains, N. J., USA)로부터 얻어진 결과를 근거로 하여 석유화학계 범용 플라스틱에 비교하여 평가하였다. 이때, 비교대상인 PET의 가격은 US\$0.9/kg (1US\$=₩1,120), 원유가격은 US\$25/barrel (1 barrel=42 gallons=158.97 L)로 가정하였으며, 생산규모는 10,000 t/year 기준으로 비교하였다.

결과 및 고찰

Pilot fermenter를 이용한 PHB의 대량생산

Pilot fermenter에서의 80시간 유기식 배양 후 얻은 최종 건체량은 168 g/l에 달하였으며, 이때의 PHB 축적량은 건체량의 74%이었다(Fig. 1). 배양초기 균체 성장단계에서는 균체 증식 속도가 jar fermenter에서 보다 다소 빠르게 나타나기도 하였으나 PHB 축적단계에 이르러 균체의 증식속도는 크게 둔화되었다. Pilot fermenter에서의 발효수율을 jar fermenter의 경우와 비교한 내용은 Table 1에서와 같다. 최종적인 수율면에서 전체 배양기간

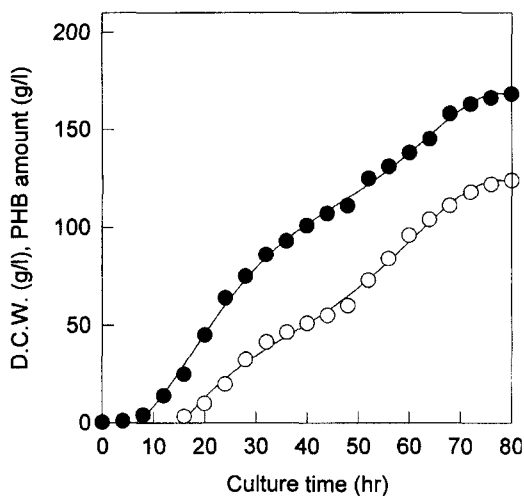


Fig. 1. Experimental results for mass production of PHB in pilot fermenter. Symbols: ●, dry cell weight; ○, PHB amount.

Table 1. Summary of experimental results of lab scale and pilot scale fermentation

Scale	5L (jar fermentor)	200L (pilot fermentor)	Theoretical value
Operating Vol. (L)	3.5	140	
Initial vol. (L)	2	60	
Final vol. (L)	4	110	
Feeding vol. (L)	2	50	
Culture time (h)	76	80	
HFS consumption (g/L)	500	455	
Dry cell weight (g/L)	202	168	
PHB content (%)	78	74	75-90
μ_{max} (1/h)	0.35	0.37	
Q_{PHB} (1/h)	0.29	0.26	
$Y_{DCW/HFS}$ (g/g)	0.40	0.37	0.44-0.48
$Y_{PHB/HFS}$ (g/g)	0.32	0.27	0.33-0.43
Productivity (g/L/h)	2.1	1.6	

중 최대 비증식속도(μ_{max})는 0.37/h로 배양초기에는 jar fermenter에서 보다 오히려 높게 나타났는데 이것은 종균 배양액 volume이 jar fermenter에서 보다 많았기 때문인 것으로 추측되었다. 그러나 최대 PHB 생산속도(Q_{PHB})는 오히려 0.26/h로 jar fermenter에서 보다 감소하였다. 전체 배양수율에 있어서 탄소원에 대한 건체량 수율(Yx/s)은 0.37 g/g, PHB 수율(Yp/s)은 0.27 g/g로 jar fermenter에서 보다 낮았으며 PHB productivity 또한 1.6 g/L/h으로 20% 이상 감소하였다. 이러한 배양결과와의 차이는 pilot scale fermenter에서는 실험실의 jar fermenter처럼 배양조건을 정밀하게 조절하기가 힘들며 발효진행 경과에 따른 즉각적인 대응이 신속하지 못한 원인이 큰 것으로 추측되었다. 아울러, 본 실험에 사용된 pilot fermenter의 tank diameter에 대한 impeller diameter의 비율(D_i/D_t)이 일반적인 발효조(0.35)에 비해 0.31로 작은 구조적 문제점이 교반 효율 및 산소이동 용량계수($k_L a$) 값의 저하로 이어지고 발효조 내의 산소고갈을 앞당겨 전체적인 발효 수율을 떨어뜨린 원인으로 작용한 것으로 생각되었다. 또한, 본 실험에 사용된 pilot fermenter의 Length/Diameter인(L/D) ratio 역시 고농도 유기식 배양에는 다소 부적당하였다는 점도 하나의 원인으로 추측되었다.

Jar fermenter와 pilot scale에서의 배양결과 탄소원에 대한 균체수율과 PHB 전환 수율은 비증식 속도와 관련이 있다는 것을 알 수 있었는데 즉, 비증식 속도가 빠를수록 배양액 중에 유기산의 농도가 증가하여 균체 성장을 저해할 뿐만 아니라 PHB로 전환되어야 할 탄소원이 유기산으로 배지 중에 유리되어 탄소원에 대한 PHB 수율을 저하시킴을 알게 되었다. 따라서 비증식 속도를 높여 균체 성장을 빠르게 유지하는 것도 중요하지만 배지 중에 제공된 탄소원으로부터 생합성되는 PHB의 특성상 기질에 대한 전환수율을 개선하는 노력이 더욱 절실할 것으로 생각되었다.

또한, PHB의 대량생산을 위한 생산용 대형 발효조로의 scale-

Table 2. Overall process data for the estimation of PHB production cost in commercial scale (20 m³) for fermentor.

Item	Unit	Amount	Remark
1. Final Volume	L	12,000	60% of total tank volume
2. Operating time/yr	H	7,200	30 day/yr×24 hr
3. Plant batch time	H	100	including turn-around time (washing, sterilizing, filling with media)
4. Batches/yr	bth	72	
5. Output/bth	Kg	1,488	124 g PHB/L, Final vol.: 12,000L
6. Output/yr	Kg	107,136	100 ton/yr
7. Productivity (g/L/h)		1.24	

up을 위해서는 k_La 값의 유지와 교반효과를 높이기 위해 현재 많은 발효조에서 사용되는 Rushton turbine을 축류형(axial flow impeller)으로 교체를 검토하는 것과 동일한 소요동력에서도 교반효과를 늘릴 수 있도록 초기에 diameter의 크기 조절이 가능한 가변형 impeller를 설치함으로써 $Di/Dt=0.35-0.45$ 가 되도록 하는 것이 바람직 할 것으로 사료되었다(19).

20 m³ 발효조에서의 항목별 PHB 생산비 산정

상업적 생산규모 발효조인 20 m³ 발효조에서의 PHB 생산 cost를 산정하기 위해 주어진 전체 공정 data가 Table 2에 나타나 있다. 연간 발효조 가동시간을 7,200시간(300일)으로 가정하고 batch time을 100시간으로 가정했을 때 연간 PHB의 생산량

은 100 t/year 규모가 되었으며 이때, PHB의 생산성은 1.24 g l⁻¹ h⁻¹ 이었다. 본 연구에서는 batch time을 100시간으로 설정하였는데, 그 이유는 발효조의 세척과 후처리 공정, 배지 제조시간 등의 turn-around time과 overhaul 시간까지를 포함하였기 때문이다. 흔히 scale-up 과정에서 쉽게 간과할 수 있는 부분의 하나가 batch time의 산정이다. 일반적으로 lab scale의 발효시간을 대량 생산 scale에서도 그대로 batch time으로 산정하는 경우가 많은데 이러한 경우, 실제 생산에서의 batch time과 2배 이상 차이가 나기도 한다. 최근 Choi와 Lee (8)는 PHA의 연간 생산량을 100,000 톤/년 기준에서 발효조 가동시간을 330 일/년으로 가정하고 있으나 발효조를 2기 이상을 교대로 가동하지 않는 한 실제의 생산 scale에서는 배지의 제조 및 mixing time, filling 및 emptying vessels time 그리고 transferring 및 processing time이 수 시간씩 소요된다는 점을 충분히 고려한다면 실제 연간 가동 시간은 300일/년 정도로 단축되어야 할 것이다(4).

Table 3에서 보듯이 PHB 생산비와 관련하여 원료비 중에서 탄소원의 비중이 65% 이상, 탄소원과 질소원의 비중이 93% 정도를 차지함을 알 수 있다. 이것은 PHB의 골격탄소는 기질의 탄소원으로부터 전환된 것이며 질소원은 세포 단백질로 전환되기 때문인데 결국 이로써 탄소원과 질소원의 가격이 PHB의 생산비용에 얼마나 영향을 미치는지를 직접적으로 확인할 수 있다.

Fig. 2에서와 같이 전체 PHB 생산 cost의 구성비율을 비교 검토한 결과 전체 원료비의 56% 중에서 탄소원이 65%, 질소원은 28%를 차지하는 것으로 조사되었다. 결국, 탄소원 한 종류가 전체 PHB 발효생산 cost에서 차지하는 비율은 37% 이상인 것으로

Table 3. Summary of raw materials cost

Item	Unit cost (\$/kg)	Cost/bth (\$)	Annual amount (\$)	Composition (Kg/ton)	%
Carbon source					64.72
High fructose syrup	0.36	1,623	116,876	376	64.72
Nitrogen sources					28.56
NH ₄ OH (28%)	0.3	540	38,880	150	21.53
Yeast extract	14.0	168	12,096	1	6.70
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4	8	605	2	0.33
Phosphates					5.74
KH ₂ PO ₄	1.5	72	5,184	4.0	2.87
Na ₂ HPO ₄	0.5	72	5,184	12	2.87
Trace					0.98
MgSO ₄	0.4	5	346	1	0.98
Corn steep liquor	0.2	2	173	1	0.10
Minerals	0.1	5	346	4	0.19
KOH (3M)	0.06	7	518	10	0.29
NaOH(1M)	0.02	2	173	10	0.10
Water	0.00025	3	216		0.12
Total (\$)		2,508	180,596		

PHB yield a carbon sources (Yp/s)=0.33

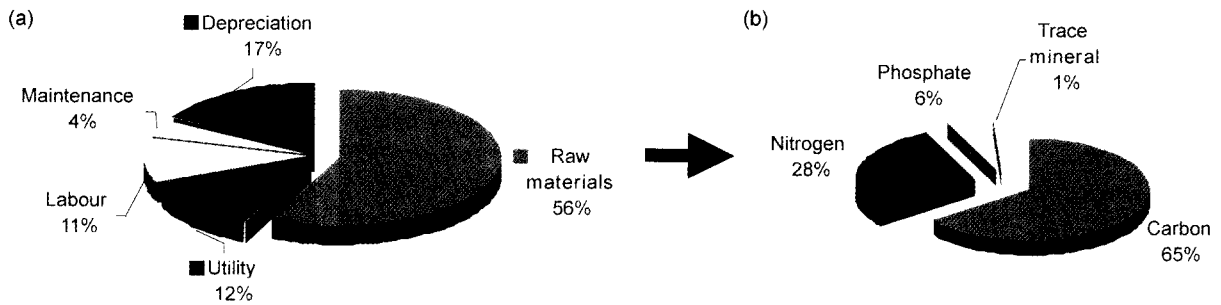


Fig. 2. The composition of PHB production cost; (a), total cost; (b), raw material cost.

Table 4. Estimation of PHB production cost in 20 m³ fermentor

(a) excluding fixed capital cost		
Item	Ratio (%)	Annual amount (\$/kg)
1. Raw materials	70	180,596
2. Utilities	15	38,699
3. Labour	10	25,799
4. Maintenance	5	12,900
Total	100	257,994
PHB unit cost (\$/kg)		2.41
(b) including fixed capital cost		
Item	Ratio (%)	Annual amount (\$/kg)
1. Raw materials	56	180,596
2. Utilities	12	38,903
3. Labour	11	33,666
4. Maintenance	4	12,718
5. Depreciation cost	17	72,000
Total	100	337,884
PHB unit cost (\$/kg)		3.15

확인되었는데, 이 값은 Choi와 Lee (6)가 산정한 38%와 비슷한 수준으로서 PHA 생산에 있어서 저가의 탄소원 개발과 탄소원에 대한 PHB 전환수율(*Yp/s*) 향상의 중요성을 보여 주는 것이다.

PHB 발효 생산성을 1.24 g l⁻¹ h⁻¹, 탄소원 전환수율(*Yp/s*)을 0.33 g/g으로 가정하여 전체적인 PHB 생산 cost 산정결과를 보았을 때, 연간 100톤 생산규모에서 신규 설비투자를 고려하지 않은 경우, 분리 및 정제 cost를 제외한 PHB의 생산 cost는 US\$2.41/kg으로 나타났으며(Table 4a), 신규 설비투자를 고려한 경우에 PHB cost는 US\$3.15/kg으로 상승되었다(Table 4b). 이러한 수준은 Choi와 Lee (8)의 결과와 유사하지만 실제 compounding 공정과 압출(extruding) 과정을 거쳐 PHB chip으로 만들어진다면 PHB의 cost는 15~30% 정도 상승하여 약 US\$3.5~4.0/kg 수준이 될 것으로 예측되었다. 실제로 ICI사는 Biopol을 유럽과 미국, 일본 등지에서 US\$15/kg에 판매한 바 있다(20).

PHB 생산비 절감과 배양학적 변수

PHB 생산비에 가장 큰 영향을 미치는 배양학적 요인으로서

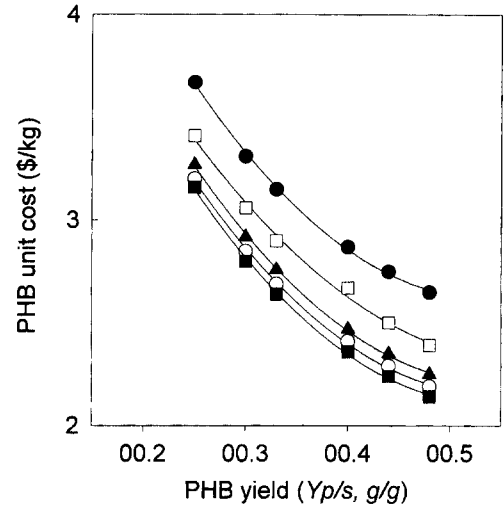


Fig. 3. The effect of PHB yield on PHB production cost. Symbol: ●, productivity=1.24; □, productivity=2.0; ▲, productivity=3.0; ○, productivity=4.0; ■, productivity=5.0.

탄소원의 전환수율과 PHB 생산성으로 조사되었다. 탄소원으로부터 PHB 전환 수율의 증가가 PHB 생산 cost에 미치는 영향은 Fig. 3에 나타난 바와 같다. *Yp/s* (생산성=1.24 g l⁻¹ h⁻¹ 일 때)가 0.25에서 Yamane (20)이 제시한 이론적 한계 수율인 0.48로 증가함에 따라 PHB 생산 cost는 US\$3.67/kg에서 US\$2.65/kg로 급격히 감소하였으며, *Yp/s*값이 증가할수록 PHB cost는 지속적으로 감소하는 경향을 보여주고 있다. 탄소원 전환수율은 원료비에 관계되는 요인으로 *Yp/s* 값의 향상은 원료비의 감소로 이어져 결국 전체적인 PHB 생산비를 감소시킨다. 그러나 대부분의 경우, 유기배양에서는 *Yp/s*가 0.44를 넘기가 힘들기 때문에 탄소원으로부터 전환수율 향상을 통한 PHB cost의 한계는 지금까지 *R. eutropha*에서 알려진 최고의 생산성(3.1 g l⁻¹ h⁻¹)을 감안할 때 US\$2.35/kg 수준이 될 것으로 예측되었다.

한편 productivity (*Yp/s*=0.33 g/g 일 때)가 1.24 g l⁻¹ h⁻¹에서 5.0 g l⁻¹ h⁻¹까지 변화할 때의 PHB 생산비는 US\$3.15/kg에서 US\$2.64/kg 수준으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 특히, 1.24 g l⁻¹ h⁻¹에서 3.0 g l⁻¹ h⁻¹ 사이에서는 감소 추세가 현저하게 나타났으나, 3.0 g l⁻¹ h⁻¹에서 5.0 g l⁻¹ h⁻¹ 사이에서는 기울기가 완만하였다.

Fig. 3과 4를 비교해 볼 때, PHB의 탄소원 전환수율 증가에 따른 PHB 생산비의 감소 경향이 PHB 생산성 증가에 따른 PHB 생산비 감소 경향에 비하여 기울기가 심한 것을 알 수 있

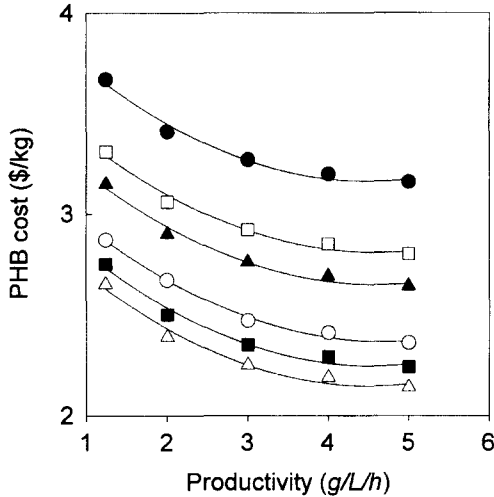


Fig. 4. The effect of PHB productivity on PHB production cost. Symbol: ●, $Y_p/s=0.25$; □, $Y_p/s=0.3$; ▲, $Y_p/s=0.33$; ○, $Y_p/s=0.4$; ■, $Y_p/s=0.44$; △, $Y_p/s=0.48$.

다. 이러한 결과는 탄소원 전환수율의 증가를 통한 PHB의 생산비 절감이 발효 생산성 증가에 의한 것 보다 훨씬 효과적일 수 있음을 보여주는 것이다.

PHB 발효 생산성의 향상은 동일 생산량을 유지하면서도 생산설비의 규모 축소가 가능한 고정원가(fixed capital cost)에 영향을 미치는 요인이다. 즉, 생산성 향상은 곧바로 초기 설비투자비용의 절감으로 이어져 PHB 생산비 중에서 감가 상각비를 감소 시킴으로써 PHB 생산비 절감에 기여할 수 있다. 그러나 대부분의 발효제품과 마찬가지로 실제 PHB 생산비용의 구성면에서 보면 변동비 비율 즉, 원료비 비중(56%)이 고정비인 설비투자비의 감가상각비 비중(17%)에 비해 상당히 높은 수준을 유지하고 있음을 Fig. 2에서 알 수 있었다. 따라서 PHB 생산 cost 구성면에서 큰 부분을 차지하고 있는 원료비 부분에 대하여 집중적인 원가절감 노력이 있어야 할 것으로 판단된다. 실제로 생산 scale의 발효 공정상에서는 균체성장 속도의 증가를 통한 발효 생산성의 향상은 배양액 중에 유기산의 과다생성, heat removal, 그리고 O₂ 공급문제 등의 부작용을 초래할 수 있으며 이러한 문제 해결을 위해서 원가상승이 불가피하다. 또한, batch time의 단축을 통한 생산성의 증가에서는 늘어난 연간 batch 수만큼 비례적으로 원료비도 증가하며, 동력비, 인건비 그리고 유지 관리비 역시 발효공정에서는 변동비 성격이 강하므로 일정수준 비례적으로 증가되는 것으로 볼 수 있다. 따라서 batch time 단축에 의한 생산성 향상으로 얻어지는 PHB 원가절감은 Y_p/s 의 향상으로부터 얻어지는 것보다 미미한 수준이 될 것으로 추측 되었다.

따라서 탄소원 전환수율과 발효 생산성 모두 PHB 생산비용 절감에 크게 관련되는 요인이지만 대량생산 규모에서 PHB 발효 생산성이 2.0 g/L/h 정도라면 더 이상의 생산성을 높이는 노력보다는 Y_p/s 를 0.44 g/g 이상으로 개선하고 PHB의 축적율을 높이는 발효공정의 개발이 PHB 생산원가 절감에 더욱 유리하게 작용할 수 있을 것으로 예측되었다. 즉, 생산성 향상에 의한 원가절감 보다는 PHB로의 전환수율이 높은 저가의 탄

Table 5. Comparison of economic evaluation between PHB and PET

Items	PHB	PET	Remark
1. Starting materials	HFS ^a	Naphtha ^b	
2. Capital cost ^c	×1.7	1	*Capa: 10,000 t/yr
3. Raw material cost ^d	×2.3	1	
4. Production cost ^e	×4.0	1	*PET=1 (\$0.9/kg)

^aHFS (high fructose syrup): \$0.36/kg, ^bNaphtha: \$0.288/kg (petroleum=\$25/barrel), ^cECN, 1983; Manufacturing Chemist, 1983, ^dPHB yields=0.33 (g/g), ^ePHB chip production cost

소원을 발굴하고 90% 이상의 높은 PHB 축적율이 가능한 새로운 생산용 균주를 개발하는 것이 PHB 생산비용 절감의 핵심이 될 것으로 판단되었다.

범용수지로서의 PHB 경제성

발효기술의 개선으로 인한 발효 생산성의 향상은 분명 PHB 상업화 및 경제성 평가와 관련하여 초기 설비투자비용을 줄이는 유리한 요인으로서 작용하며, 기질에 대한 PHB의 전환수율 향상과 저렴한 탄소원 가격은 PHB의 생산 cost를 낮추는데 크게 기여할 수 있을 것이다. PHB의 상업화에는 위의 두 가지 항목이 모두 상호 보완적으로 만족되어야 할 것이다. 하지만 단순히 생산비 측면에서 PHB는 아직도 범용수지와 경쟁할 만큼의 여건은 갖추지 못하고 있는 실정이며 일반적으로 PHB 보다도 생산수율과 발효 생산성이 떨어지는 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) 공중합체(8,21) 및 medium-chain-length PHAs (10,12) 경우에는 훨씬 그 정도가 심할 것으로 추측된다.

Table 5에서는 PHB의 경제성 평가 결과를 범용 플라스틱인 폴리에스터(PET)와 비교하여 표시하였다. 2000년 현재, PET chip의 가격은 US\$850-900/톤 정도이며 PET 생산비에 비하여 현재 PHB 생산비는 4 배 이상을 차지하고 있어 범용수지와 경쟁력에서는 아직 열세에 있다. 그러나 이 정도의 가격은 ICI사의 Biopol가격(US\$15/kg)과 비교한다면 1/4 정도로 원가절감된 것으로 볼 수 있으며, 앞으로 더욱 새로운 고부가가치 분야에서 PHB와 기타 PHAs의 용도를 찾는다면 지금의 수율로서도 충분히 사업화가 가능할 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 발효생산으로 얻어지는 PHB는 향후, 신규주와 신공정 개발을 통한 설비투자비의 최소화과 새로운 저가 탄소원 개발에 의한 원료비의 절감을 통한 생산비용의 저하와 의료용 소재로서 화장품 및 biomedical 분야 등 고부가가치 영역에서의 새로운 용도개발 추진(9,13), 그리고 정부차원의 환경규제 및 보조(2)가 이루어진다면 범용수지로서 경쟁력을 제고하는데 한층 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업비의 지원에 의해 수행된 결과의 일부로서, 이에 감사드립니다 (과제번호: HMP-98-E-3-0014).

참고문헌

1. Amass, W., A. Amass, and B. Tighe. 1998. A review of biodegradable polymers: use, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer International*. 47, 89-144.
2. Anderson, A.J. and E.A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial use of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54, 450-472.
3. Braunegg, G., B. Sconleitner, and R.M. Lafferty, 1978. A rapid method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6, 29-37
4. Byrom, D. 1992. Production of poly- β -hydroxybutyrate : poly- β -hydroxyvalerate copolymers. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 247-250.
5. Choi, J. and S.Y. Lee. 1997. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Eng.* 17, 335-342.
6. Choi, J. and S.Y. Lee. 1999. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 13-21.
7. Choi, J. and S.Y. Lee. 1999. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 546-553.
8. Choi, J. and S.Y. Lee. 2000. Economic considerations in the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 646-649.
9. Gogolewski, S., M. Jovanovic, S.M. Perren, J.G. Dillon, and M. K. Hughes. 1993. Tissue response and *in vivo* degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *J. Biomed. Mater. Res.* 27, 1135-1148.
10. Hazenberg, W. and B. Witholt. 1997. Efficient production of medium-chain length poly(3-hydroxyalkanoates) from octane by *Pseudomonas oleovorans*: economic considerations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 588-596.
11. Humphrey, A.E. 1975. Product outlook and technical feasibility of SCP. *In: Single cell protein* (Tannenbaum, S. R., and Wang D. I. C. eds.), pp. 1-23. MIT press, Massachusetts.
12. Kim, D.Y., Y.B. Kim, and Y.H. Rhee. 2000. Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas oleovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* 28, 23-29.
13. Kim, G.J., K.H. Bang, Y.B. Kim, and Y.H. Rhee. 2000. Preparation and characterization of native poly(3-hydroxybutyrate) microspheres from *Ralstonia eutropha*. *Biotechnol. Lett.* 22, 1487-1492.
14. MacLennan, D.G. 1976. Single cell protein from starch. *In: Continuous culture 6. Application and new field* (Dean A.C.R., Ellwood, D.C., Evans, C.G.T., and Melling, J. eds.) pp. 69-84. Ellis Horwood, Chichester.
15. Madison, L.L. and G.W. Huisman,. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 21-53.
16. Mogren, H. 1979. SCP from methanol: The norprotein process. *Proc. Biochem.* 14, 2-4.
17. Nyiri, L.K. and M. Charles. 1977. Economic status of fermentation processes. *Ann. Rep. Ferm. Processes* 1, 365-381.
18. Page, W.J. and A. Comish. 1993. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4236-4244.
19. Stanbury, P.F. and A. Whitaker. 1984. Principles of fermentation technology. Pergamon press, New York.
20. Verhoogt, H., B.A. Ramsay, and B.D. Favis. 1994. Polymer review: polymer blends containing poly(3-hydroxyalkanoate)s. *Polymer.* 35, 5155-5170.
21. Yamane, T. 1993. Yield of poly D(-)-3hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 165-170.
22. Yoon, J.S., J.Y. Kim, and Y.H. Rhee. 1995. Effects of amino acid additions on molar fraction of 3-hydroxyvalerate in copolyester of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate synthesized by *Alcaligenes* sp. SH-69. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 350-354.

(Received January 12, 2001/Accepted February 15, 2001)

ABSTRACT : Economic Consideration of Poly(3-hydroxybutyrate) Production by Fed-batch Culture of *Ralstonia eutropha* KHB 8862

Gap Jin Kim, Young Ki Yang¹, and Young Ha Rhee (Department of Microbiology, Chungnam National University, Daejeon 305-764; ¹Department of Biological Sciences, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea)

High-cell-density cultivation of *Ralstonia eutropha* KHB 8862 by fed-batch fermentation in a 200 l pilot plant was carried out for the mass production of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). After 80 h of cultivation, the dry cell weight (DCW), PHB concentration, and PHB yield from fructose syrup reached 168 g/l, 74 %DCW, and 0.27 (w/w), respectively, resulting in a productivity of 1.6 g of PHB/L/h. Based on these results, the PHB production cost from bacterial fermentation was analyzed and economic evaluation was performed. In the case of new investment being implemented or not, the production cost of PHB was US\$ 3.15/kg and US\$ 2.41/kg, respectively. PHB productivity and PHB yield on a carbon substrate were both important factors to be optimized. The increase of PHB yield on a carbon sources significantly decreased the PHB production cost but the increase in productivity had a relatively slight effect on the decrease in PHB production cost because the cost of carbon sources (37%) for PHB was larger in proportion to total cost than the depreciation cost (17%). These results suggest that the increased PHB yield from carbon sources and the development of new cheaper substrates would be more effective in decreasing PHB production cost than the increase in productivity. It was demonstrated that PHB is not in competition with consumable plastics such as PET in present market. Therefore, it is essential to lower production cost to be used as a bulk product and desirable to develop new application fields for PHB such as biomedical and cosmeceuticals.