한국생물공학회지 제5권 제4호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 5. No. 4 329-334(1990)

역원추형 발효조에서의 동시당화발효에 의한 전분으로 부터의 연속 에탄올 발효

김 철 호 · *유 연 우 · **김 철 · 이 상 기
한국과학기술연구원, 유전공학연구소, 대사공학연구실
아주대학교 공과대학, *생물공학과, **화학공학과

Continuous Ethanol Production from Starch by Simultaneous Saccharification and Fermentation in a Tapered Column Fermentor

Chul Ho Kim, Yeon Woo Ryu*, Chul Kim** and Sang Ki Rhee
Lab. of Metabolic Engineering, Genetic Engineering Research Institute KIST
**Department of Biotechnology, **Department of Chemical Engineering, Ajou University*

ABSTRACT

In an attempt to develop a novel process for ethanol production from starch, a simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process using *Zymomonas mobilis* and amyloglucosidase (AMG) was studied in continuous modes.

Compared with a conventional cylindrical column type of fermentor, the tapered column type of fermentor was found to be superior in terms of reactor performance for ethanol fermentation. The tapered columm fermentor packed with coimmobilized *Z. mobilis* and AMG alleviated the problems which were associated with CO_2 evolution and provided a significantly better flow pattern for both liquid and gas phases in the fermentor without channelling. However, the fluidized bed type of tapered column fermentor using flocculent strain of *Z. mobilis* and immobilized AMG showed lower productivity (5.2g/l/h) than that of packed bed type of tapered column fermentor(9.2g/l/h).

서 론

에탄올 발효는 회분식이나 연속식 발효조에서 수행될 수 있으나 현재 대부분의 산업적 에탄올 생산공정은 회분식으로 이루어지고 있다. 그러나 연속식 공정은 회분식 공정과 비교할 때 여러가지 장점들을 지니고 있어 장차 산업적으로 많이 이용될 것으로 예상된다. 지금까지 에탄올 발효에 이용되고 있는 반응기로는 일련의 CSTR(continuous stirred tank reactor)(1), 연속 균체 재순환 발효조(continuous cell recycle fermentor)(2), 탑 발효조(tower fermentor)(3), 진공 발효조(vacuum fermentor)(4), 막 발효조(membrane fermentor)(5) 및 충진층형 관형 발효조(packed column fermentor)(6)등이 있다. 이들 중에서 특히 충진층형 관형 발효조는 특정 담체에 고정화된 균체를 사용하는 공정에 적당한 형태의 발효조이다. 이 발효조에서는 균체를 고농도로 유지할 수 있을 뿐만 아니라 고정화된 균체들이 주변의 물리 화학적 환경변화에 대하여 높은 저항력을 갖기 때문에 균주의 생물학적 안정성을 장시간 유지할 수 있어 주로 현탁 배양을 하는 다른 발효조들에 비하여

높은 전환율 및 생산성을 얻을 수 있는 것이 장점이다(6). 그러나 에탄올 발효에서 충진층형 발효조를 장시간 운전할 경우 항상 CO_2의 발생으로 인한 여러가지 문제점들이 야기된다. 특히 균체를 sodium alginate나 κ-carrageenan 과 같은 gel에 bead 형태로 고정화하여 사용할 경우 발효조 내에 기체, 액체, 고체의 3상이 동시에 존재하게 되므로 CO_2에 의한 channelling 현상과 부분적인 압력강하(pressure drop) 현상 및 기질의 불균일한 이동현상이 일어나게 된다. 이러한 문제점들을 극복하기 위하여 Shiotani등(7)은 수평형 충진층 접속류 반응기(holizontal packedbed cross-flow reactor)를 사용하였고, Furui등(8)은 관형 발효조(cylindrical column reactor)안에 수평으로 baffle을 설치하여 압력강하 문제를 해결하고자 하였다.

최근 에탄올 생산에 관한 연구는 주로 새로운 발효공정의 개발에 촛점을 맞추고 있으며, 동시당화발효(SSF; Simultaneous Saccharification and Fermentation)공정도 이들중의 하나로서 이는 전분의 당화와 에탄올 발효를 한 단계로 수행하는 공정이다(9-11). 이 공정은 당화와 발효를 두 단계로 나누어서 수행하는 종래의 공정에 비하여 전분의 가수분해율 및 발효율을 증가시키고, 발효시간을 단축시키며, 시설비 및 유지비를 감소시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 *Zymomonas mobilis*와 amyloglucosidase(AMG)를 이용하여 sago전분으로 부터 에탄올을 효율적으로 생산하기 위한 동시당화발효 공정개발의 일환으로 위에서 언급한 관형 충진층 발효조의 사용시 CO_2의 발생에 의해 야기되는 제반 문제점들을 해결하기 위한 방안으로 반응기의 하층부보다 상층부의 직경 즉 단면적이 종축에 따라 하층부에서 상층부로 갈수록 증가하는 형태에 의해 CO_2의 양을 쉽게 소화시킬 수 있는 역원추형 발효조(tapered column fermentor)를 사용한 연속 동시당화발효공정의 개발을 시도하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에서 사용한 균주는 *Zymomonas mobilis* ZM4 (ATCC31821)와 응집성 균주인 *Zymomonas mobilis* ZM401 (ATCC31822)로서 glucose 20 g / *l*, yeast extract 10 g / *l*, KH_2PO_4 1 g / *l*, $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g / *l* 로 구성된 agar 배지를 사용하여 30℃에서 24시간 배양한 후 4℃에서 보존되었다. 균체의 고정화를 위한 배양용 배지는 상기한 보존용 배지에서 glucose 농도만을 증가시켜 사용하였다.

발효원료로는 말레이지아 SIRIM으로 부터 공급받은 sago 전분에 yeast extract (10 g / *l*)를 가하여 사용하였다. 이때 사용된 sago전분의 총 당농도는 dextrose equivalent value(D.E value)로 93이었다. 고정화 gel을 사용한 경우에는 이들 배지에 alginate gel의 안정제로서 0.3% $CaCl_2$를 첨가하였고, 초기 pH는 5.0으로 조정하였다.

효소 및 시약

*Bacillus licheniformis*의 α-amylase (E.C.3.2.1.1 ; Termamyl-120L)와 *Aspergillus niger*의 amyloglucosidase (E.C.3.2.1.3 ; AMG-300L)는 Novo Industri A / S Korea로 부터 공급받았다. Sodium alginate는 Junsei Chemical Co. (Japan)에서 구입한 것이고, chitin 및 glutaraldehyde 등의 시약들은 Sigma Chemical Co. (USA)의 제품이었다.

실험조건 및 장치

연속 에탄올 발효의 원료물질인 sago 전분은 10%나 15%의 농도로 수돗물에 현탁시킨 후 pH를 6.5로 조정하고 α-amylase 0.2%(v / w)를 첨가하여 95℃에서 1시간 동안 액화시켰다. 연속 동시당화발효는 역원추형 발효조(Fig. 1)와 일반적인 형태의 관형 충진층 발효조(내경 2cm, 길이 40cm)를 사용하여 30℃에서 수행하였다. 응집

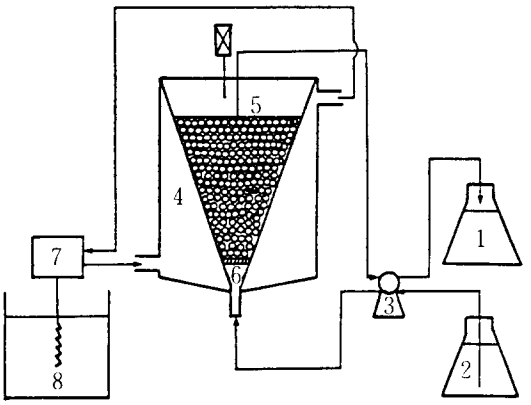

Fig. 1. Schematic diagram of tapered column fermentor. 1. product reservoir 2. substrate reservoir 3. peristaltic pump 4. glass column 5. stainless sieve 6. sintered glass 7. water circulator 8. thermostat

성 균주인 *Z. mobilis* ZM401을 사용하여 역원추형 유동층 발효조 내에서의 에탄올 발효를 수행할 경우에 있어서 AMG는 chitin(flake type)에 고정화 시켰고, *Zymomonas* 균체는 고정화하지 않은 상태로 사용하였다. 유동층 발효조에 응집성 균주를 접종하기 위해서는 균체배양용 glucose-yeast extract 배지 1.5 *l* 를 사용하여 30℃에서 24시간동안 정치배양한 후 상등액을 제거하고 남은 균체만을 회수, 접종하는 방법을 사용하였다. 이때 발효조의 총 운전부피는 108ml로 하였으며 여기에 chitin 5 g에 AMG 1ml을 가하여 고정화한 효소와 균체를 함께 넣고 30℃에서 10% 액화 sago 전분용액(pH5.0)을 연속적으로 공급하면서 동시당화발효를 수행하였다. 이때 희석율은 반응기의 총 운전부피를 기준으로 하여 계산하였다.

고정화 방법

Z. mobilis 균체와 AMG의 동시 고정화는 다음과 같은 방법으로 준비하였다(12). AMG 1ml을 분말형 chitin 5 g과 섞은 다음 1% glutaraldehyde를 충분량 가하고, 실온에서 자석교반기를 사용하여 저어주면서 1시간 동안 방치한 후 4℃에서 하룻밤 동안 유지시킨다. 이어서 Buchner funnel 위에서 증류수 및 3M NaCl과 0.1M acetate buffer(pH 4.4)를 사용하여 과량의 glutaraldehyde 및 고정화되지 않은 상태의 효소를 세척 제거하여 고정화 효소를 준비하였다. *Z. mobilis*는 대수기에서 회수한 균체 (6 g dry cell weight)를 5000 rpm으로 원심분리하여 회수하고, chitin에 고정화된 AMG와 함께 생리식염수에 현탁시켜 최종부피가 50ml이 되도록 맞춘 다음 여기에 4% sodium alginate 용액 50ml을 가하여 잘 혼합한 후 주사바늘(gauge No. 21)을 사용하여 0.05M $CaCl_2$ 용액중으로 떨어뜨려 평균 직경 1.84㎜의 bead를 만들고 4℃에서 하룻밤 방치하여 굳게한 다음 동시당화발효에 사용하였다.

분석방법

에탄올 농도는 n-propanol을 internal standard로 하여 gas chromatograph(FID, Hewlett Packard 5890A, USA)를 이용하여 정량하였으며 환원당 농도는 2,3-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 정량하였다(13). 총당의 농도는 시료의 pH를 진한 황산을 사용하여 1.5로 조정한 후 100℃에서 1시간 동안 가수분해 시킨다음 생성된 환원당의 농도를 DNS 방법으로 정량하여 결정하였다.

에탄올 수율(전환율)은 사용한 전분으로 부터 이론적으로 생산될 수 있는 에탄올량(이론수율)에 대한 실제로 생산된 에탄올의 백분율로 나타내었고, 에탄올 생산성은 기질의 반응기에서의 체류시간(residence time)을 기준으로 하여 계산한 희석율에 생산된 에탄올의 농도를 곱하여 계산하였다.

결과 및 고찰

역원추형 유동층 발효조를 이용한 에탄올 생산

역원추형 발효조의 이용성을 시험하기 위하여 응집성 균주인 *Z. mobilis* ZM401과 chitin에 고정화한 AMG를 사용하여 역원추형 유동층 발효조에서 연속 동시당화발효를 수행하였으며 그 결과를 여러 희석율에서의 에탄올 농도 및 생산성의 변화로서 Fig. 2에 나타내었다. 이때 희석율은 반응기의 총 운전부피를 기준으로하여 계산하였다. 결과에서 보는 바와 같이 희석율 0.08h^{-1}에서 에탄올 농도는 46.8 g / *l* (전환율 98%)로 가장 높았고, 이때의 에탄올 생산성은 3.6 g / *l* /h였다. 희석율을 0.12h^{-1}로 증가시켰을 경우 생성된 에탄올 농도는 44.9 g / *l* (전환율 94%)로 약간 감소하였으나 에탄올 생산성은 5.2 g / *l* /h로 증가하였고, 전환율이 80%정도(에탄올 농도 38 g / *l*)인 희석율 0.18h^{-1}에서는 에탄올 생산성이 6.9 g / *l* /h로 증가하였다. 이어서 희석율

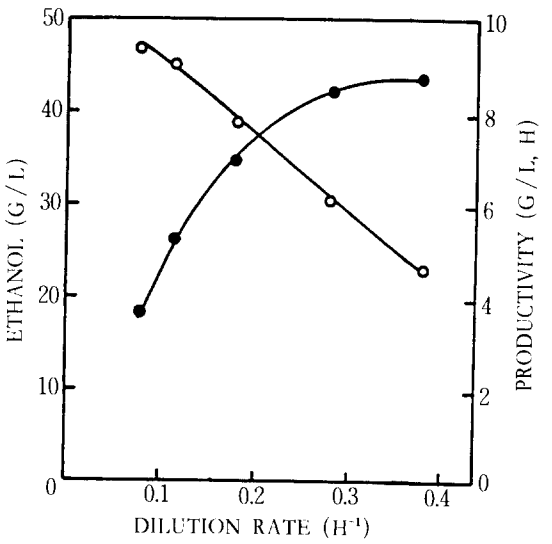

Fig. 2. Continuous SSF using flocculent strain of *Z. mobilis* and immobilized AMG in tapered fluidized bed column fermentor with 1% sago starch.
(○···○: ethanol, ●···●: productivity)

0.38h^{-1}까지는 생산성이 계속 증가하여 8.7 g / l / h에 이르렀으나 이보다 더 높은 희석율에서의 실험에서는 배지 유속의 증가와 더불어 CO_2가스의 발생에 의한 균체 및 배지의 폭발적인 폭기현상이 동반되어 균체의 washout이 일어나기 시작하여 생산성이 감소되었고 정상상태도 유지할 수 없었다. 따라서 이와같은 응집성 균주와 역원추형 유동층 발효조를 사용한 연속 동시당화 발효공정에 있어서도 CO_2 가스의 발생이 문제점으로 지적되었으며 이는 발효조내의 균체농도가 높을수록 더욱 문제시 될 것으로 사료되어 균체 및 효소의 고농도 유지방안으로 균체-효소 동시 고정화에 의한 역원추형 충진층 발효조에서의 동시당화발효를 시도하였다.

역원추형 충진층 발효조를 이용한 에탄올 생산

10%와 15% 전분을 기질로하여 동시고정화 된 AMG와 *Z. mobilis* ZM4 균체를 사용한 역원추형 발효조에서의 연속 동시당화발효 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. 결과에서 보는 바와 같이 에탄올 생산성은 10%

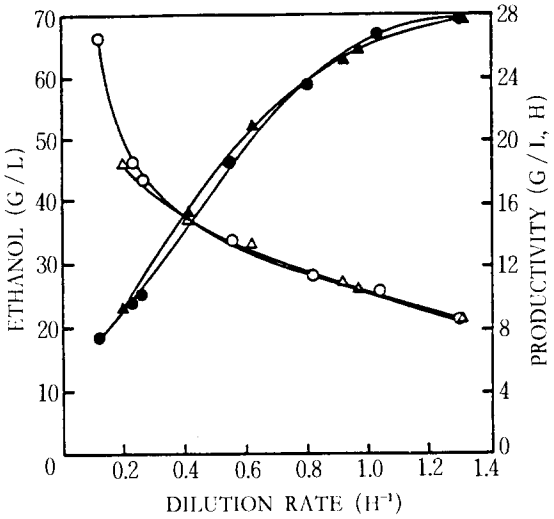

Fig. 3. Continuous SSF using coimmobilized AMG and *Z. mobilis* in tapered packed bed column fermentor with 10% and 15% sago starch.
closed symbols : productivity (▲–▲: 10%, ●–●: 15%)
open symbols : ethanol (△–△: 10%, ○–○: 15%)

와 15% sago 전분에서 서로 비슷한 양상을 보였으나 sago전분의 에탄올로의 전환율과 에탄올 생산성을 희석율 0.2h^{-1}에서 비교 검토할 때 10% sago 전분을 사용하였을 경우의 전환율은 97%(에탄올 농도 46 g / l), 에탄올 생산성은 9.2 g / l / h였으며, 15%기질을 사용하였을 경우의 전환율은 68.7%(에탄올 농도 49 g / l)로 10% 기질을 사용했을 경우보다 낮았으나 생산성은 9.8 g / l / h로 약간 높았다. 15% 기질을 사용하였을 경우에도 희석율을 0.12h^{-1}로 낮추면 85%의 전환율(에탄올 농도 60.1 g / l)을 얻을 수 있었으나, 이때의 에탄올 생산성은 7.3 g / l / h로 감소하였으며 이 값은 10% 기질을 사용하여 97%의 전환율을 보였을 때의 생산성(7.5 g / l / h)과 비슷하였다. 한편, 높은 희석율에서 발효를 수행한 결과 10%의 경우 희석율 0.97h^{-1}에서 에탄올 생산성은 25.7 g / l / h로 크게 증가하였으나 전환율은 55.8%(에탄올 농도 26.5 g / l)로 낮아졌다. 마찬가지로 15%의 경우에서도 희석율 1.03h^{-1}에서 에탄올 생산성은 26.6 g / l / h로 증가한 반면 전환율은 36.1%(에탄올 농도 25.8 g / l)로 아주 낮았다.

이와 같이 본 동시당화발효의 경우에 있어서도 희석율을 높일 경우 에탄올 생산성은 크게 증가하는 반면 기질의 전환율과 발효액 중의 에탄올 농도가 반감하는 일반적인 연속발효의 특징을 보였다. 이와 같은 결과들을 놓고 볼 때 연속 동시당화 발효공정을 사용하여 sago 전분으로부터 에탄올을 생산하기 위해서는 기질인 sago 전분의 가격과 에탄올의 생산성을 고려하여 10% 기질을 사용하여 희석율 0.2~0.4h^{-1}에서 발효를 수행하는것이 경제적일 것으로 사료된다.

역원추형 충진층 발효조의 조업 생산성

Sodium alginate와 chitin을 사용하여 동시고정화한 AMG와 *Z. mobilis* ZM4 균체를 포함하고 있는 bead (평균직경 1.84㎜)를 사용하여 역원추형 충진층 발효조와 관형 충진층 발효조에서 수용성 전분을 원료로 하여 동시당화 발효공정에 의한 에탄올 생산 실험을 수행하였다. 이때 각 발효조에서의 에탄올 농도와 조업 생산성을 여러 희석율에서 구하여 비교하였다(Fig. 4). 역원추형 충진층 발효조의 경우 에탄올 생산성은 희석율 1.0h^{-1} 이상에서도 증가 추세에 있었으나 에탄올 농도가 20 g / l에 불과해 이보다 큰 희석율에서의 발효실험은 비경제적인 것으로 판단되었다. 최대 에탄올 농도는 희석율 0.23h^{-1}에서 얻어졌으며 이때의 에탄올 농도는 40.7 g / l였고(전환율 85%), 에탄올 생산성은 9.4 g / l / h였다. 동일조건에서 관형 충진층 발효조를 사용하여 역원추형 충진층 발효조에서의 에탄올 발효결과와

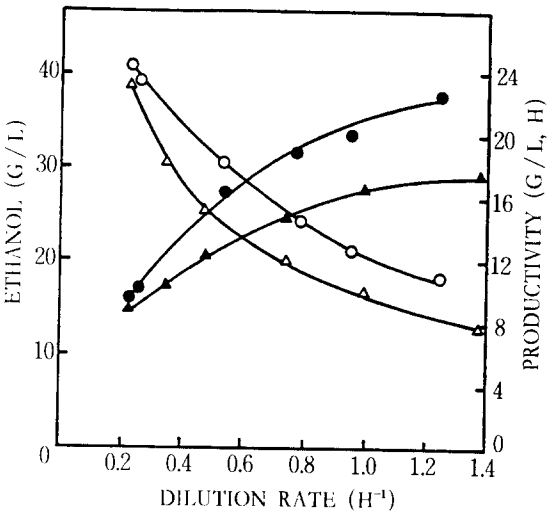

Fig. 4. Continuous SSF using coimmobilized AMG and Z. *mobilis* in cylindrical and tapered packed bed column fermentors with 10% soluble starch.
closed symbols: productivity (●–●: tapered, ▲–▲: cylindrical)
open symbols: ethanol (○–○: tapered, △–△: cylindrical)

비교할때 희석율 1.0h^{-1}에서의 에탄올 농도(16.4 g / l) 및 생산성(16.4 g / l / h) 모두 역원추형 충진층 발효조의 경우(에탄올 농도 20 g / l, 에탄올 생산성 20 g / l / h)보다 낮았다. 역원추형 충진층 발효조의 경우와 동일한 희석율 (0.23h^{-1})에서의 결과를 비교해 보면 관형 충진층 발효조의 경우 에탄올 농도는 38.4 g / l였고 (전환율 80.8%), 이때의 에탄올 생산성은 8.8 g / l / h로 역원추형 충진층 발효조의 경우보다 낮은 결과를 보였다. 이러한 결과를 가져온 원인은 발효시 발생하는 CO_2가 관형의 경우 channelling 현상을 일으키는 요인으로 작용하여 발효조의 효율을 저하시키는 반면, 역원추형의 경우에서는 발생된 CO_2가 반응기 상부로 쉽게 확산되어 channelling 현상이 감소되기 때문이다(14). 실제로 본 연구에서 관형의 경우 발효중 반응기의 총 운전부피(total working volume)중에서 CO_2가 차지하고 있는 부피가 7ml였으며 이는 발효조의 총 void 부피 (33ml)의 27%에 해당되었다. 한편 1.84㎜정도의 작은 크기의 bead를 사용할 경우 기질과 생성물의 확산저항이 감소되는 장점은 있으나 관형 충진형 발효조에서는 경우에 따라서 CO_2의 누출에 장애를 주어 압력강하를 가져올 수도 있다. 즉 발효조 내에 항상 고체상(bead)과 액체상(기질 및 생성물) 및 기체상(CO_2)의 삼상이 존재하고 있고, CO_2의 유속은 발효조의 상부로 갈수록 빨라지므로 channelling 현상이 일어나게 되어 만일 작은 크기의 bead에 의해서 통로가 막힐 경우에는 상당한 압력이 걸리게 된다. 그러나 역원추형 충진층 발효조의 경우에는 높이에 따라 단면적이 점차적으로 증가하는 형태이므로 상층부로 갈수록 증가하는 CO_2의 양을 모두 수용할 수 있으며 bead의 크기가 작을 경우에는 CO_2의 상승과 함께 CO_2가 차지했던 자리를 bead가 하강하면서 연속적인 자리바꿈 현상이 일어나게 되어 channelling 현상이나 압력강하 현상이 방지되는데 이것은 크기가 큰 CO_2 기포들의 축적이 방지되기 때문인 것으로 사료된다.

역원추형 충진층 발효조의 조업 안정성

역원추형 충진층 발효조를 사용한 연속 동시당화 및 발효공정의 조업 안정성을 조사할 목적으로 10% sago전분을 기질로 하여 연속 발효조를 희석율 0.23h^{-1}에서 장시간 운전 시험하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 18일 이상 운전하여도 평균 40 g / l (전환율 84%)의 에탄올 농도가 유지되면서 발효조의 발효활성과 안정성에 별다른 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

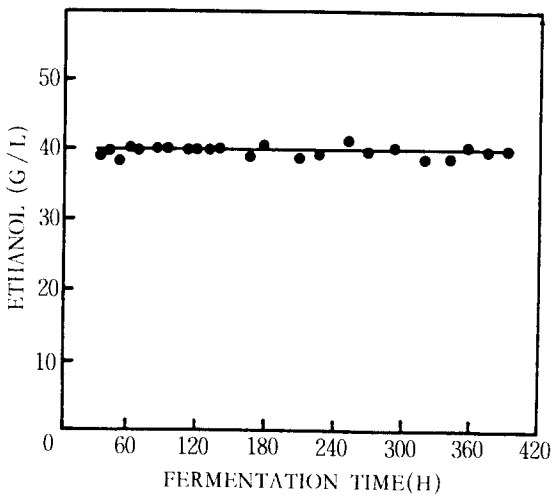

Fig. 5. Operational stability of continuous SSF using coimmobilized Z. *mobilis* and AMG in tapered packed bed column fermentor with 10% sago starch.

요 약

전분으로부터 에탄올을 생산하기 위한 공정을 개발할 목적으로 *Zymomonas mobilis*와 당화효소(AMG)를 사용한 연속식 동시당화 발효공정을 연구하였다. 본 연구에서 사용된 역원추형 충진층 발효조는 관형 충진층 발효조보다 에탄올 발효에 있어서 더 좋은 성능을 나타내었다. 역원추형 발효조의 구조적 특징에 따라 alginate gel bead에 동시고정화된 *Z. mobilis*와 당화효소를 사용하여 연속동시당화발효를 행할 때 발효중 발생하는 CO_2에 의한 압력강하나 channelling 현상등의 문제점을 효과적으로 제거할 수 있었다. 한편 역원추형 유동층 발효조에서 응집성 *Z. mobilis* 균주와 고정화 당화효소를 사용하여 연속 동시당화발효를 행할 경우 에탄올 생산성(5.2 g / l / h)은 역원추형 충진층 발효조를 사용할 경우(9.2 g / l / h)보다 낮은 것으로 판명되었다.

참 고 문 헌

1. J. D. Bu'Lock, M. C. Comberbach, C. Ghommidh and P. D. Williams (1984), *Chem. Ind.*, **June,** 432.
2. G. R. Cysewski and C. R. Wilke(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19,** 1125.
3. I. G. Prince and J. P. Barford(1982), *Biotechnol. Lett.*, **4,** 621.
4. A. Lamalingham and R. K. Finn (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19,** 583.
5. M. A. Mechaia and M. Cheryan (1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20,** 100.
6. O. C. Sitton and J. L. Gaddy (1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22,** 1735.
7. T. Shiotani and T. Yamane (1986), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **13,** 96.
8. M. Frui and K. Yamashida (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **21,** 1401.
9. N. Poosaran, R. H. Heyes and P. L. Rogers (1985), *Biomass*, **7,** 171.
10. J. H. Lee, R. J. Pagan and P. L. Rogers (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25,** 659.
11. G. M. Lee, C. H. Kim, K. J. Lee, A. Zainal, M. H. Han and S. K. Rhee (1986), *J. Ferment. Technol.*, **64,** 293.
12. S. K. Rhee, G. M. Lee, C. H. Kim, Z. Abidin and M. H. Han (1986), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **No. 17,** 482.
13. G. L. Miller (1959), *Anal. Chem.*, **31,** 426.
14. H. Hamamci and D. D. Y. Ryu (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29,** 994.

(Received; September 21, 1990, Accepted; December 30, 1990)