

균체재순환 및 동시당화발효에 의한 전분으로 부터의 반회분식 에탄올 발효

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

Semibatch Ethanol Production from Starch by Simultaneous Saccharification and Fermentation Using Cell Recycle

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 order to develop economic processes for ethanol production from starch, a simultaneous saccharification and fermentation(SSF) process using *Zymomonas mobilis* and amyloglucosidase (AMG) was studied in semibatch modes using cell recycle. The cell recycle was carried out by adopting two different methods: microfiltration and settling. The cell recycle using microfiltration revealed higher productivity(5.4 g/l/h) than that using a settler(4.3 g/l/h). Taking the large-scale ethanol fermentation into account, the semibatch process using microfiltration system appeared most promising among others with respect to ethanol productivity, feasibility of scale-up and simplification of operation.

서 론

미생물 발효에 의하여 biomass로 부터 에탄올을 생산할 때 에탄올의 생산성을 높이기 위해서는 발효조내에 균체를 고농도로 유지하여야 하며 장기간동안 안정된 조건하에서 높은 발효속도를 유지할 수 있어야 한다.

발효조내의 균체농도를 고농도로 유지하기 위한 방법은 균체를 고정화시키는 방법과 재순환 시키는 두가지 방법으로 대별된다. 균체를 고정화시켜 고생산성의 에탄올 발효공정을 개발하려는 시도는 주로 *Saccharomyces cerevisiae*(1~4)나 *Zymomonas mobilis*(5~7)를 alginate나 *k-carrageenan gel*에 고정화시켜 충전층 반응기 (packed bed reactor)에서 에탄올을 생산하는 공정의 개발

에 대하여 많이 보고되었다. 균체를 재순환 시키는 대표적인 방법으로는 원심분리를 사용하는 Melle-Boinot 공정(8)과 Biostill 공정(9)등이 있으며 이밖에도 미세여과막(microfiltration)을 사용하는 방법(10)과 침전조(settling tank)를 사용하는 방법(11) 및 다공성 막이 부착된 rotor 발효조를 사용하는 방법(12)등이 보고된 바 있다. 고정화 균체를 사용하는 방법은 주로 연속발효 공정에 적합하며 실험실적 소규모에서는 높은 생산성을 얻을 수 있는 효과적인 공정이라고 할 수 있으나 에탄올의 생산규모가 대용량이어야 한다는 점과 고정화 균체의 준비과정이 복잡한 점등을 고려하면 실제 산업화에 이르기까지 이 방법에 대해서는 더 많은 연구가 선행되어야 할 것이다. 이에 비하여 균체를 재순환 시키

는 방법은 주로 반 회분식 또는 반 연속식 발효공정에 적합하며 에탄올 생산성은 고정화 균체를 사용하는 연속발효 공정에 비하여 떨어지더라도 에탄올의 대량생산에는 더 적합한 공정이 될 수 있을 것이다.

최근에 전분이나 섬유소로부터 동시당화 발효공정에 의하여 에탄올을 생산하고자 하는 많은 연구들이 이루어지고 있다(13~15). 이 공정은 전분을 액화시킨 후 당화와 발효를 동일 발효조에서 동시에 수행하는 공정으로 종래의 액화, 당화, 발효로 이어지는 3단계 공정을 2단계 공정으로 단축시킬 수 있어 시설비의 절감과 공정시간의 단축 및 생산성의 향상 등이 가능한 공정으로 알려져 있다.

이러한 관점에서 본 연구에서는 균체 재순환 공정에 의한 대규모 에탄올 발효공정 개발을 위한 예비연구의 일환으로 침전성이 강한 *Z. mobilis* ZM401(flocculent strain)과 침전조를 사용하는 방법과 통상 *Zymomonas* 균주인 *Z. mobilis* ZM4와 미세여과막을 사용하는 방법의 반회분식 동시당화 발효공정에 의한 sago 전분으로부터의 에탄올 생산공정의 응용 가능성 및 이들의 효용성을 비교 및 평가하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 에탄올 발효능이 우수한 것으로 알려진 *Zymomonas mobilis* ZM4(ATCC 31821)와 100개 정도의 균체가 모여 덩어리를 형성하는 응집성 균주인 *Zymomonas mobilis* ZM401(ATCC 31822)였으며(16), 균주의 보존 및 배양에는 20 g / l의 glucose, 10 g / l의 yeast extract, 1 g / l의 KH_2PO_4 , 1 g / l의 $(NH_4)_2SO_4$ 및 0.5 g / l의 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 구성된 배지를 사용하였다. 원료물질인 sago 전분은 말레이시아 SIRIM으로부터 공급받았으며(총 당농도 93.3%) 150 g / l의 농도로 수돗물에 현탁시킨 후 pH를 6.5로 조정하고 α -amylase 0.2%(v/w)를 첨가하여 95°C에서 1시간동안 액화시키고 10 g / l의 yeast extract를 첨가한 후 1N HCl을 사용하여 pH를 5.0으로 조정하여 발효배지로 사용하였다.

효 소

*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 NovoIndustri A/S Korea로부터 공급 받았다.

실험장치 및 조건

균체재순환 방식을 사용한 반 회분식 발효는 2가지 방법 즉 침전조를 사용하는 방법(Fig. 1)과 미세여과막(Fig. 2)을 사용하는 방법으로 30°C에서 수행하였다. 미세여과막에 사용된 장치는 Millipore 사의 Minitan system 이었으며 filter는 pore 규격 0.45 μ m 인 Durapore filter였다. 응집성 균주인 *Z. mobilis* ZM401을 사용한 sago 전분의 반회분식 동시당화 발효조건은 다음과 같았다. 즉, 첫번째 발효조에서는 총 배지용량(15% sago 전분 400ml)에 대하여 5%가 되게 균주를 접종하였으며 여기에 AMG 0.5%(v/w), 즉 300 μ l 를 첨가하여 발효를 수행하였다. 발효가 끝난다음 발효액은 pump를 사용하여 침전조로 보내지고 이곳에서 30분 동안 침전시킨 다음 침전된 균체는 다시 발효조로 재순환시켰다. 여기에 다시 액화된 sago 전분용액과 AMG를 가하는 방법으로 제2, 제3 단계의 반회분식 발효를 수행하였다.

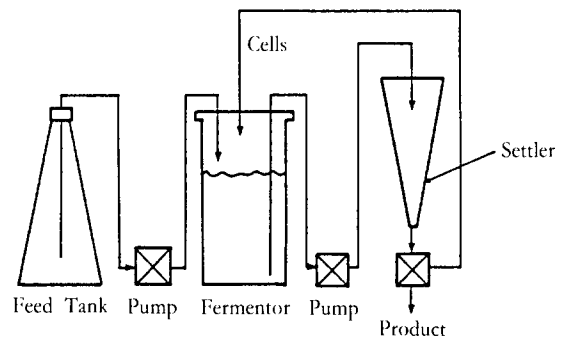


Fig. 1. Schematic representation of semibatch fermentation with cell recycle using settler.

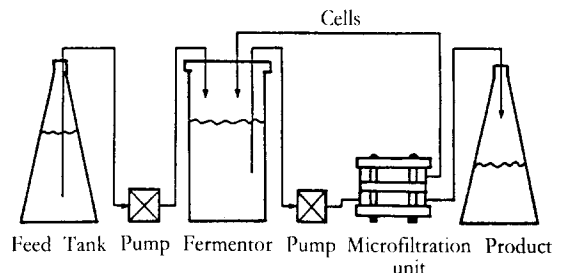


Fig. 2. Schematic representation of semibatch fermentation with cell recycle using microfiltration.

분석방법

에탄올 농도는 gas chromatograph (Hewlett Packard 5890A, USA)를 사용하여 측정하였고, 환원당은 2,3-dinitrosalicylic acid (DNS)방법으로 정량하였으며(17), 균체량은 건조균체량 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

침전조를 사용한 균체 재순환에 의한 반회분식 동시당화 발효과정

침전능력이 강한 응집성 균주인 *Z. mobilis* ZM401을 사용한 sago 전분의 반회분식 동시당화 발효 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같았다. 결과에서 보는 바와 같이 첫번째 발효조에서는 발효시작 22시간후 정상기에 도달하여 에탄올 농도는 64 g / l로 총 당의 90%가 에탄올로 전환되었다. 이때 발효시간 22시간을 기준으로 하여 계산한 에탄올 생산성은 2.9 g / l / h였다. 이에 비해 두번째 및 세번째 단계의 발효에서는 16시간만에 정상기에 도달하였으며 이때의 에탄올 농도는 각각 65 g / l(전환율 91%) 및 68 g / l(전환율 95%)였고, 에탄올

생산성은 각각 4.1 g / l / h 및 4.3 g / l / h로 첫번째 발효에서보다 높아졌다. 이는 첫번째 발효의 경우 초기 접종량이 0.3 g / l였던 반면 2차와 3차 발효에서는 각각 1.2 g / l 및 1.5 g / l로 증가하여 발효시간이 단축될 수 있었기 때문인 것으로 판단된다.

각 발효단계에서 침전조를 사용한 균체의 재순환 수율을 조사한 결과 1차 발효가 끝났을 때의 균체량은 2.7 g / l였으나 침전조를 사용하여 재순환 시킨 결과 2차 발효조에서는 초기 균체량이 1.4 g / l로 재순환율은 51.9%였다. 마찬가지로 2차 발효후의 균체량은 1차 발효시와 별차이가 없었고(2.9 g / l) 이를 재순환시켰을 때의 재순환율은 51.7%(1.5 g / l)로 1차 재순환의 경우와 거의 동일하였다. 이와같이 재순환율이 50% 정도에 머무른 원인은 발효조 내에서 impeller의 회전 마찰에 의하여 응집성 균주의 덩어리(aggregate)형성이 저해되거나 형성된 덩어리의 일부가 파괴되어 침전특성을 상실했기 때문인 것으로 판단되며, 이는 settler 에서의 침전시간을 연장하면 다소 향상될 것지만 작업시간의 지연으로 생산성이 저하되어 효과적이지 못할 것이다. 또한 발효 후 발효조 자체내에서 균체를 침강시키고 발효액을 제거한 후 새로운 배지와 AMG를 재충진하는 방법으로도 반회분식 동시당화 발효를 수행할 수 있으나 이러한 공정은 반연속적인 균체재순환 발효과정 개발에의 적용이 어려울 것이다.

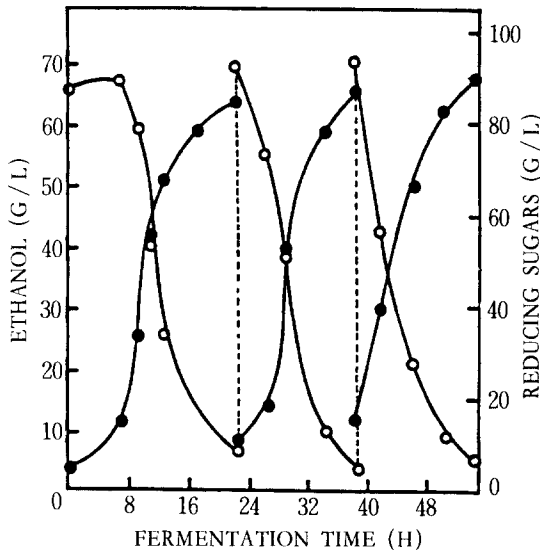


Fig. 3. Semibatch SSF of sago starch to ethanol by cell recycle using settler in a jar fermentor with flocculent strain of *Z. mobilis* and AMG.

(●...●: ethanol, ○...○: reducing sugars)

미세여과막을 사용한 균체 재순환에 의한 반회분식 동시당화 발효

에탄올 생산성을 높이기 위한 반회분식 동시당화 발효공정의 하나로 미세여과막 장치를 사용하여 균체 (*Z. mobilis* ZM4)를 재순환시키는 공정을 실험한 결과 Fig. 4와 같았다. 에탄올 생산성을 보면 1차 발효에서는 3.1 g / l / h였고, 2차 및 3차 발효에서는 공히 5.4 g / l / h로서 응집성 균주를 사용한 경우(4.3 g / l / h) 보다 높았다.

균체량에 있어서는 미세여과막 장치를 사용할 경우 발효단계마다 점차 증가하여, 1차 발효후 2.2 g / l였고, 2차 및 3차 발효후에는 각각 4.2 g / l 및 5.2 g / l로 증가하여 침전조를 사용할 경우보다 많았으며 특히 균체의 재순환율은 100%를 계속 유지할 수 있었다. 한편, *Z. mobilis*의 경우에는 에탄올 생성속도가 균체의 성장속도와 직접적으로 비례하지 않고(partially growth associated)효모에 비하여 균체량의 형성이 적으므로 breeding의 필요성은 없었다. 재순환에 소요되는 시간은 0.45μm filter(여과면적 120cm²) 6매를 사용할 때 30분이었고, 여과속도는 10 l / h / m²이었다. 에탄올

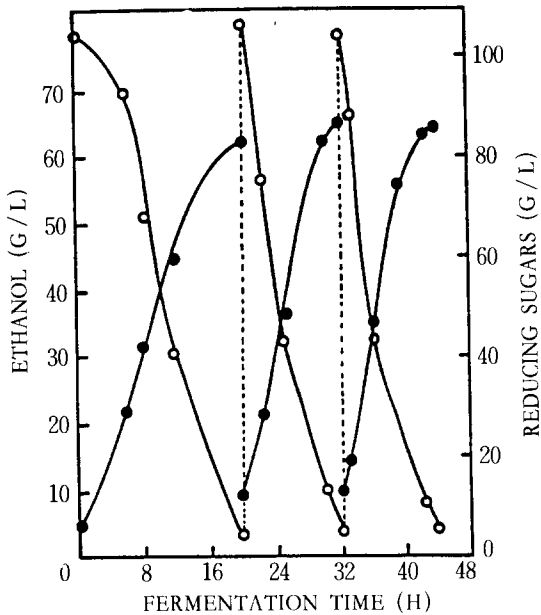


Fig. 4. Semibatch SSF of sago starch to ethanol by cell recycle using microfiltration in a jar fermentor with *Z. mobilis* and AMG.
(●---●; ethanol, ○---○: reducing sugars)

농도는 1차 발효시에는 20시간에서 62 g / l로 전환율이 90%이상이었다. 이와같은 막 재순환 공정을 사용한 경우 균체량의 지속적인 증가와 함께 발효시간이 단축됨으로써 침전조와 응집성 균주를 사용하는 공정에 비하여 높은 에탄올 생산성을 얻을 수 있었다.

균체재순환 동시당화 발효공정의 조업 생산성

*Z. mobilis*와 sago전분을 이용한 균체재순환 동시당화 발효공정의 조업생산성을 다른 동시당화 발효공정과 비교한 결과를 Table 1에 결과를 나타내었다(15, 18, 19).여기에서 보면 amyloglucosidase와 *Z. mobilis*를 동시 고정화하여 연속발효를 행하는 것이 에탄올 생산성이 가장 높음을 알 수 있으나 이 공정은 실질적으로 산업화 시키는데에는 몇가지 문제점이 있는 것으로 판단되었다. 즉, 무균적으로 효소와 균체를 대량으로 준비하는 공정이 추가되어야 하고 이들을 사용하여 연속반응기를 운전할 때 원료물질인 전분용액의 청정성이 유지되어야 하기 때문에 원료의 준비공정이 복잡하게 된다. 또한 보다 근본적인 문제로서 에탄올 생산 설비는 연간 수백 만톤의 에탄올을 생산할 수 있도록 대규모이어야 하므로 동시고정화 방법을 전분으로 부터 에탄올을 생산하는데에 적용하기 위해서는 앞으로 많은 연구와 기술개발이 보완 되어야 할 것이다. 균체의 재순환 공정을 사용한 발효공정에 있어서는 응집성 균주를 사용하여 발효조 자체 내에서 침전시키거나 혹은 침전조를 사용한

Table 1. Comparison of various processes for ethanol production from sago starch*

Process	Condition	Dilution rate(1/h)	Ethanol conc. (g/l)	Ethanol yield(%)	Productivity (g/l/h)	Reference
Continuous SSF						
Tapered fermentor	Coimmobilized AMG and <i>Z. mobilis</i> ZM4	0.20	46.0	97	9.2	(18)
Cylindrical fermentor	"	0.21	44.3	93	9.3	(15)
Fluidized-bed fermentor	Immobilized AMG and free <i>Z. mobilis</i> ZM401	0.12	44.9	94	5.2	(18)
Batch SSF	Free AMG and <i>Z. mobilis</i> ZM401	—	69.2	97	3.5	(19)
Batch Presaccharified	Free <i>Z. mobilis</i> ZM4	—	68.1	96	1.7	(19)
Semibatch SSF						
Recycle using settler	Free AMG and <i>Z. mobilis</i> ZM401	—	68.0	95	4.3	This work
Recycle using microfiltration	Free AMG and <i>Z. mobilis</i> ZM4	—	65.0	91	5.4	"

*Sago starch was used as substrate in 10% and 15% for continuous and batch fermentations, respectively.

여 자연 침전시키는 방법과 일반 균주를 사용하여 막이나 원심분리로 균체와 생성물을 분리하여 균체만 재순환시키는 방법이 사용될 수 있다. 이 중에서 침전조와 미세여과막을 사용하는 방법을 시험해본 결과 후자가 균체의 재순환율과 에탄올 생산성 면에서 더 우수한 것으로 판명되었다. 원심분리 방법은 균체의 재순환율과 생산성면에서 미세여과막 방법과 동일한 것으로 판단되지만 이의 설치비용 및 운전비용이 후자에 비하여 훨씬 더 높고, 처리시간도 더 길리므로 효과가 낮은 것으로 알려져 있다. 따라서 현재까지의 연구결과를 가지고 평가할 때 전분으로 부터 대량으로 에탄올을 생산할 경우 막투과(membrane filtration) 방법에 의하여 *Z. mobilis* 균체를 재순환시키는 공정을 사용하는 것이 가장 경제적인 것으로 판단되며 앞으로는 본 공정의 scale-up을 위한 pilot-scale에서의 연구를 수행할 예정이다.

요 약

전분으로 부터 에탄올을 생산하기 위한 경제적인 공정을 개발하기 위하여 *Zymomonas mobilis*와 당화효소(AMG)를 사용한 반 회분식 동시당화 발효공정을 연구하였다. 응집성 에탄올 균주인 *Z. mobilis* ZM401과 침전조를 사용한 균체 재순환 방식에 의한 반회분식 동시당화발효 공정에서는 에탄올 생산성이 제2차 및 제3차 발효에서 각각 4.1 g / l / h 및 4.3 g / l / h이었다. 이에 비해 미세여과막(microfiltration) 장치에 의한 *Z. mobilis* ZM4의 재순환 방식을 사용하는 공정에서는 에탄올 생산성이 제2차 및 제3차 발효에서 모두 5.4 g / l / h로 더 높았다. 에탄올 생산 시설이 large-scale임을 고려할 때 미세여과막을 사용하는 반회분식 공정이 에탄올 생산성과 scale-up의 용이성 및 운전의 간편성등의 관점에서 가장 개발 가능성이 높은 공정인 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. M. Kierstan and C. Bucke (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 387.
2. F. B. Kolot(1980), *Process Biochem.*, **15**, 2.
3. I. A. Veliky and R. E. Williams (1981), *Biotechnol. Lett.*, **3**, 275.
4. D. Williams and D. M. Mannecke(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1813.
5. P. K. Bajpai and A. Margaritis (1985), *Enzyme Microb.*

- Technol.*, **7**, 42.
6. V. K. Jain, I. Toran-Diaz and J. Baratti(1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 613.
7. C. H. Kim, G. M. Lee, Z. Abidin, M. H. Han and S. K. Rhee (1988) *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 426.
8. J. M. Lagomasino (1949), *Ind. Sugar J.*, **51**, 338.
9. G. E. Guidoboni (1984), *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 194.
10. P. L. Rogers, K. J. Lee and D. E. Tribe (1980), *Process Biochem.*, **15**, 7.
11. T. K. Ghose and R. D. Tyagi (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1387.
12. A. Margaritis and C. R. Wilke (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 709.
13. J. H. Lee, R. L. Pagan and P. L. Rogers, *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 659(1983)
14. J. N. Saddler, M. Mes-Hartree, E. K. C. Yu and H. H. Brownell, *Biotechnol. Bioeng., Symp.*, No. 13, 225(1983)
15. S. K. Rhee, G. M. Lee, C. H. Kim, Z. Abidin and M. H. Han(1986), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 17, 482.
16. P. L. Rogers and D. E. Tribe(1984), *U. S. Patent* 4, 443, 543.
17. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
18. 김철호, 유연우, 김철, 이상기(1991), *한국생물공학회지.*, **5**, 329.
19. G. M. Lee, C. H. Kim, Z. Abidin, M. H. Han and S. K. Rhee (1987), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **38**, 235.

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