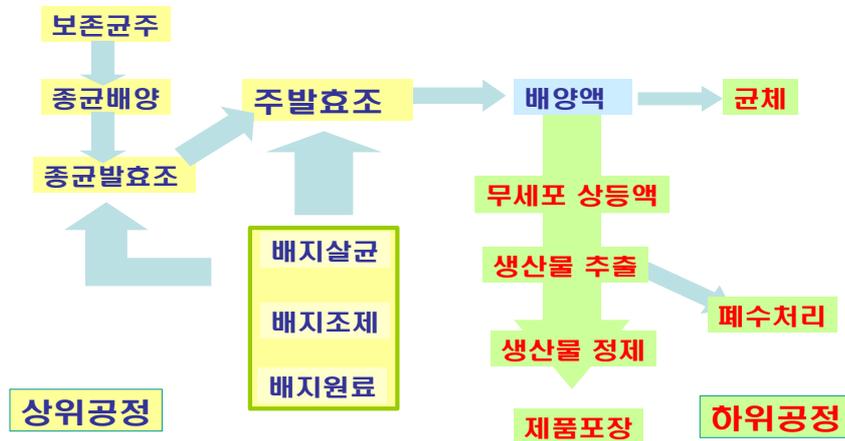


1. 발효공정의 일반체계

: 배지조제, 살균, 종균배양, 본 배양, 미생물의 분리정제, 폐수·폐기물처리

- 1) 배지조제 - 발효의 종류, 원료의 차이에 의존
- 2) 살균공정 - 무균상태(배지, 장치, 공기)
 - 가압수증기 살균, 증기살균
- 3) 배양 - 온도, pH 조절, 통기
 - **종균배양, 본 배양 (발효조)**
- 4) 배양물의 분리 및 정제공정 : 제품조제
- 5) 폐수·폐기물처리

전형적인 발효공정의 일반체계



2. 생산물 생성의 유형

- * 발효공정은 에너지대사와 생산물 생성과의 관계에 의해 분류
- * 증식 관련형, 비증식 관련형, 증식·비증식 관련형

1) 증식 관련형

- 균 생육과 더불어 대수증식기에 생산물이 생산되는 경우
- 1차대사산물(탄소원), biomass 생성과정
- 기질 A → 생산물
- 기질 A → B → C → 생산물

ex) SCP 생산, 에탄올발효, 글루콘산발효등(연속발효)

2) 증식·비증식관련형

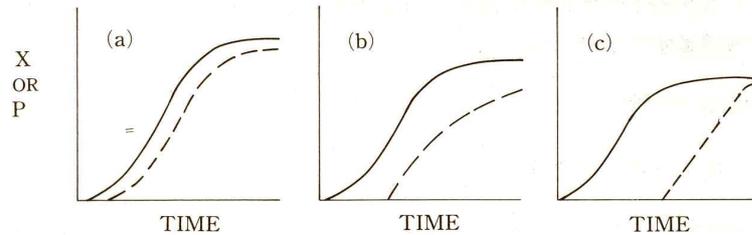
- 기질 A → B → C → D → 1차대사
- ↓
- E → F → 생산물

ex) 젖산, 구연산, itaconic acid, lysine, glutamic acid등

3) 비증식관련형(non-growth associated)

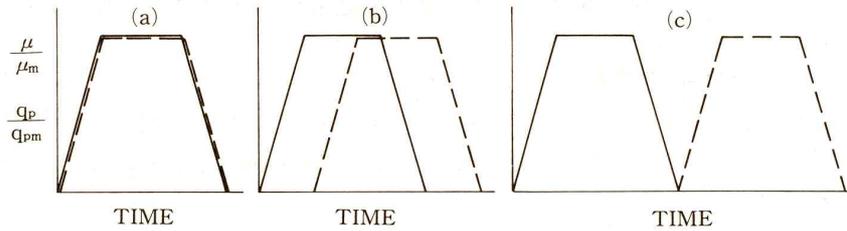
- * 균증식이 끝난 후 생산물 생산이 일어나는 것
- * 생산물은 amphibolic 대사경로에 의해서 합성된다,

ex) 항생물질, 미생물독소등의 생성, 비타민생성, glucoamylase등의 효소 생산



X는 균체농도, P는 생산물농도

그림 4-2 회분배양에서 생육(-)과 생산물 생성(···)의 동력학적 유형



(a) 증식 관련형 (b) 증식·비증식 관련형 (c) 비증식 관련형

그림 4-3 비증식속도(-)와 비생산물합성속도(···)와의 관계

3. Scale up

1) Scale up의 의의

- * 실험실규모의 결과를 공장규모의 산업적 생산으로 전환시키는 과정

* 단계 : 기초연구 ⇒ bench scale ⇒ pilot plant ⇒ plant scale

① 미생물의 생화학적 공정개발 단계

- **Bench scale** : 기본적인 균주 선별과정이 수행되는 단계 (1단계)
- **Pilot plant** : 최적 조작조건을 찾기 위한 단계 (2단계)
- **Plant scale** : 공정이 경제적인 결실을 나타내는 단계 (3단계)
(우량 균주, 우수한 배지, 효율적인 장치)

2) Scale up 의 기준

- ① 산소이동속도 일정하게 한다.
- ② 교반날개 선단의 속도를 일정하게 한다.
- ③ 교반 소요동력을 일정하게 한다.
- ④ 혼합시간을 동일하게 한다.
- ⑤ Feedback 조절에 의한 주요환경 인자를 가능한 동일하게 조절한다.

II. 배양방법

1. 고체배양과 액체배양

1) 고체배양(solid-state culture)

- * 곰팡이증식에 사용
- * Koji(국의 생산) - 탁주, 약주, 청주, 장류 등의 생산에 이용
- * Amylase의 생산 - 주류, 장류 (양조식품 생산에 이용)
- * **고체배양의 주요인자 - 습기, 온도, 고체입자의 형상, 공극률**

① 배양형식

- **정치배양** : 수분을 함유한 곡류 등을 용기에 넣고 곰팡이포자를 접종 배양
- **회전배양** : 공기와 미생물의 접촉이나 열의 발산을 용이하게 하는 Rotary형 배양장치를 이용하여 배양

② 특징

- (**장점**) : 배지조성이 단순하고 특별히 산소공급동력이 불필요 하며 종균 배양조가 필요 없다.
- (**단점**) : 열의 제거가 어렵고 컴퓨터에 의한 제어 배양이 어렵다.

2) 액체배양

- * 액체배지 중에 미생물을 배양하는 것으로 호기성 발효에는 **표면배양**과 **심부배양**으로 나눈다.

① 표면배양 (surface culture)

- 배양액의 표면적을 크게 하여 **표면에서 배양액 내부로 산소이동을 촉진**
- 호기적 정치배양으로 액상의 발효원료 표면에 미생물이 부유한 상태로 배양하는 것

ex) 초산발효, 구연산 생산

② 심부배양(submerged culture) : 액내배양

- 공기를 배양액 중에 강제로 공급하여 배양액의 산소용해율을 촉진시키는 배양법

ex) 아미노산, 항생물질 생산

2. Batch 배양과 연속배양

1) Batch culture (회분배양) 의 특징

- * 미생물을 일정량의 배지 중에 배양하는 방법으로 일련의 배양조작 (살균, 냉각, 배양, 배출, 세척 등)을 매번 따로 하는 배양기술이다.
- * 다품종 소량생산에 적합하며, 잡균오염, 제법이나 운동조건 변동시 쉽게 대처

* 배양과정 : 유도기 → 대수기 → 정상기 (growth)

* 배양과정 중 배지성분, 미생물 수가 변화

* 배양 중 pH, 공기량 등 → 배양 최적조건 유지

* Doubling time (배양조건에 따라 다름)

- 대장균 : 15 -20 분

- 공업적 발효 : 1.5 - 3 시간

- 활성오니 : 5 - 8 시간

2) 유가배양(fed-batch culture)

* 배양기간 중 제한인자로 되어있는 특정기질을 배양조에 공급 → 일정농도 유지(저농도)하면서 목적생산물 배양하는 방법

* 특징 : 유가하는 기질용액 농도와 유가량을 조절하여 미생물수와 생산물 농도를 독립적으로 제어할 수 있다

◎ 이용범위

- 기질의 용해도가 낮을 때

- 고농도 기질에 의한 증식저해가 있을 때

- 기질농도에 의존 목적 생산물의 수율, 수량, 생산이 저하될 때 주로 사용

3) 연속배양(continuous culture)

* 발효원료를 연속적으로 배양장치에 공급하여 배양하는 것

* 장기간 대수기의 증식을 유지시키고 배양액량을 항상 일정하게 유지하여 정상상태(steady state)를 얻는 조작방법으로 생산성이 높다.

ex) 클로렐라 및 빵효모의 생산, 맥주의 생산, 폐수처리(활성오니법)

◎ 한정된 제품을 다량, 장기간 생산하거나 처리하는데 적합

◎ 자동 공정수행 장치 : Chemostat, turbidostat의 2가지가 있다

◎ 연속배양장치 (배양조의 수에 따라)

- 단조 (single stage) 연속배양

- 다단 (multi-stage) 연속배양

- 균체 재순환 연속배양

◎ 연속배양장치의 주요 조작변수(운전조건)

- 공급하는 원료 중의 증식제한 기질농도

- 원료의 배양장치 내 평균체류시간

3 배양장치

* 배양장치 : 발효조, 발효장치(fermenter)

* 배양방법 : 표면배양, 심부배양

1) 표면배양형 발효장치

* 미생물이 고체표면에 부착되어 있어서 산소가 연속적으로 젖은 고체 표면으로 공급

① 유동층 발효조(Fluidized-bed fermenter)

- 미생물을 고정화 하지 않고 응집성 미생물을 배양액내에 부유시켜 연속적인 유동층 조작에 의해 이루어진다.
- 맥주-식초생산, 에탄올 생산, 고체배양에 의한 koji생산, 폐수처리 (표준활성 오니법 보다 5-10배 높은 유기물 부하에서도 처리 가능)

② 충전층 발효조(Packed-bed fermenter) = 고정층발효조

- 에탄올 → 식초생산
- 충전층 → 대패밥(shaving) ← 초산균 접종
- 효과적인 통기가 매우 어렵다.

③ 살수층 발효조(Trickle-bed fermenter)

- 미생물에 대한 기체와 액체의 공급이 용이
- 폐수처리에 살수생물막법이 이용

2) 심부배양형 발효장치

* 배양조에서 기체와 액체의 교환이 일어나고 연속적인 에너지 공급에 의해 공기가 액체 속으로 분산

① 통기 교반형 배양장치 :

○ 표준형 배양장치 :

- 기계적인 교반에 의한 산소공급
- 장치 : 원통형 탱크, 교반기(stirrer), 공기취입장치(air sparger), 방해판(baffle plate), 소포장치, 온도조절장치, pH전극, 용존산소 측정용 전극, 시료 채취구, 배지주입구, 배출구 등

② 탑형 배양장치

○ 기포탑형 발효조 :

- 가스 와 액체배지가 접촉하는 발효조로 기계적인 교반장치가 없다.
- 기포 교반과 산소전달의 2가지 기능
- 메탄올을 이용한 SCP 생산, 폐수처리에 이용, 동물세포배양

○ **Air-lift형 발효조 :**

- Air lift란 압축공기가 수직관속을 팽창하여 상승할 때 유체를 동반 수송하는 air-lift pump를 말한다.
- 미생물배양에 응용하여 산소공급과 배양액의 순환을 동시에 가능케 한 장치가 **air-lift 형 발효조** 이다.

4. 산소공급

- * 심부배양 : 초기는 배양액에 용해된 산소를 이용
- * 공기 중의 산소가 균체까지 이동하는 과정(3단계)
 - 기포로부터 배양액 중으로 이동
 - 배양액에서 균체세포로 용존산소 이동
 - 균체에 의한 용존산소의 흡수

5. 제균 및 무균조작

1) 통기공기의 제균

① 공기여과

- 공기 : 미생물 ($10^4/m^3$)이 존재
- 공기여과장치(air filter) : 공기의 제균장치
- 공기공급 : compressor

◎ 공기여과기 종류 :

- 섬유층진층여과기(depth filter) = 심부여과
 - 섬유상여재 : 면, glass wool, PVA(poly vinyl alcohol)로 충전
- 막상여과기 (membrane filter) = 절대여과
 - 0.2 -0.5 μ m 막상여과기 사용

② 제균기구

섬유층진층 여과기 : 관성충돌, 접촉, 확산, 중력침전, 정전기인력

◎ 관성충돌(inertial impaction)

유속이 높을 때 관성충돌에 의한 미생물 포집이 많다.

◎ 접촉(차단, interception)

공기를 타고 이동하는 미생물이 섬유에 접촉하여 포집되는 것

◎ 확산(diffusion)

공기의 유속이 느릴 때 미생물이 브라운 운동에 의해 섬유에 부착 포집되는 현상(직경 0.3 μ m 이하의 미생물)

2) 무균조작(Aseptic manipulation)

6. 살균

- * 기계적인 살균법 : 여과, 원심분리, 정전기적 세균
- * 물리·화학적 살균법 : 자외선, 전자선, microwave, 원적외선, 초음파처리, 가스살균 등
- * 발효공업 → 배양탱크살균(가열) : 증기(steam)
- * 살균방법 : batch sterilization, 연속살균 (continuous sterilization)
- * 살균온도 10℃ 상승 : 살균효과 10배 이상, 단백질 비타민 변성 2-3배
- * 고온 단시간 살균유리

7. 발효공정제어

- * 목적 : 미생물의 대사활동을 위한 최적의 환경조성
- * 환경변수 : 온도, pH, 산소 분압, 영양물질농도

1) 발효공정의 자동제어

- ① 물리적 parameter
 - 온도 : sensor (백금 저항체 온도계)
 - 압력, Gas 유량, 액체 및 배지의 유량
 - 거품 : 기계적 소포
- ② 화학적 parameter
 - pH, 용존산소

2) 발효공정의 컴퓨터제어

- ① Data 취득 : sensor
- ② Parameter 계산 및 Data 처리
- ③ 공정제어
 - 단순 monitoring, on-off 제어, alarm
 - Batch 및 유가공정에서의 차례조작단계(공정자동화)
 - 개개공정 parameter의 조절
 - 전 공정의 조절(공정최적화)
- ◎ 발효공정 system 제어방식에 따라
 - Sequence 제어 : 발효장치의 운전을 위한 제어
 - 발효공정제어 : on-off 제어, 정치제어, 최적화제어
pH, 온도에 적용
- ④ 발효의 modelling과 최적화
 - Modelling : 발효공정의 목적에 맞는 대상이 나타나는 어느 일면을 모델로 하여 이를 수식화 시켜 실제 발효공정의 설계나 조작에 적용시키는 것

ex) Monod 식 : 균체의 증식 모델

Luedeking & Piret 식 : 생산물 생성모델

- 최적화 (optimization) : 경제적 최적

- 컴퓨터 제어발효의 기본구조

* 발효조 : 압력, 온도, pH, 용존산소, 공기유량,
배기가스조성, 거품형성

↓ 연속적 조절

공기와 배기가스유량, 냉각수와 steam,

산과 염기의 첨가, 배지 feed 및 소포제 첨가

* 공정조절용 computer : sensor, 증폭기, 조절부위

8. 발효생산물의 분리정제

* 배양물 내용 : 세포, 수용성세포의 생성물, 세포내생성물, 미발효기질,
발효될 수 없는 기질

* 생산공정 :

- 발효공정(상위공정) : 원료에서 배양물을 생산할 때까지의 단계

- 발효후공정(하위공정) : 배양물에서 목적물질을 얻기 위한 마무리 단계

1) 분리·정제공정의 기본구성

① 회수공정

* 멸균 → 회수공정

* 목적물의 위치에 따라 변화

◎ 균체 그 자체인가

- 회수공정 : 집균 조작

- 빵효모, SCP

◎ 균체내에 존재하는가

- 인슐린, 성장호르몬, 인터페론, 세포내효소 생산

- 세포내 목적물질의 존재형태에 따라 → 회수공정변화

○ 과립(inclusion body) 상태로 존재

○ 용해되어 존재

○ 용제에 의해서 추출될 수 있는가

◎ 배양액 중에 분비되어 있는가?

- 아미노산발효, 세포외 효소

- 회수공정 : 침강, 원심분리, 여과 → 제균

② 분리공정

- * 목적물질 분리·농축
- * 단백질의 활성손실방지
- * 저분자물질의 제거
- * Chromatography에 의한 분리조작이 많이 사용

③ 정제공정

- * 순도를 높인다.
- * 단백질 : gel filtration, 소수성 및 친수성 chromatography, 전기영동
- * 보관 : 동결건조

2) 회수(고액분리) 공정

① 원심분리

◎ 분획 원심법 (differential centrifugation)

- 밀도가 균일한 용매 중에서 입자의 밀도에 따라 분획하는 방법
- 고-액계, 액-액계 연속처리 가능

* **분리판형** - De Laval 형 : 10,000rpm 이하

고-액계의 경우 균체회수에 부적당

Nozzle 형 : 고-액계 연속조작가능

빵효모, 맥주효모에 사용

균체의 회수·정제 또는 제거용으로 사용

* **원통형** - Sharples형이 사용

회전수 : 10,000 -20,000rpm

침강면적이 분리판형 보다 작다.

* **Decanter** - 자동연속배출이 가능

◎ Zone 원심법 (zonal centrifugation)

- 원심관내의 용매에 밀도구배를 만든 후 그 상층에 시료용액을 중층하여 원심분리하는 방법

* 밀도구배침강속도법

- 밀도구배 : 설탕

* 밀도구배 침강평형법

- 고분자물질의 밀도차에 의한 분리법이다.

② 여과

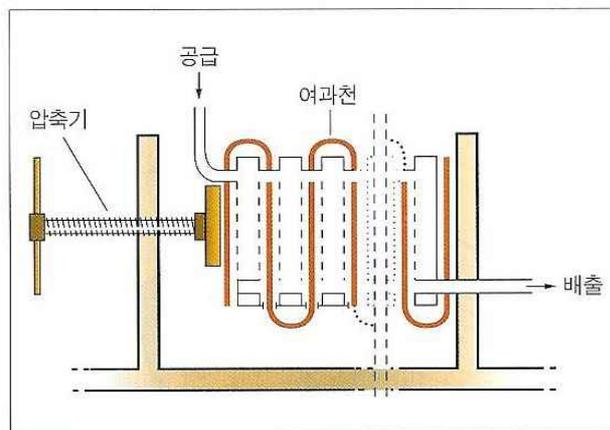
◎ 회전식 진공여과기

- 효모나 방선균의 회수, 세포외 효소생산에 사용
- 연속적으로 대량처리 가능

- * **가압여과기** - 압력 : 20bar, 연속적이 아님
여과하기 어려운 여과에 적당
- * **엽상가압여과기** - 엽상의 filter disc가 수직으로 배열 진공
또는 가압하에서 연속적으로 조작
- * **원심여과기** - basket형 원심여과기
원심력을 여과 압력으로 사용
방선균 효모분리에 사용, 세균의 분리는 불가능

◎ **판틀여과기 또는 필터프레스**

- 제빵효모회수, 단백질 침전물회수 등에 사용



③ **침강분리**

- * 미생물응집
- * 다가 양이온, 균체의 고분자 floc생성 → 균체침강 → 회수
- * 맥주제조에 응집성이 좋은 효모사용
- * 폐수처리에서 활성오니의 분리, 침강성 세균의 분리에 이용

3) 세포파쇄

- 생산물이 세포내 생산물로서 많은 효소나 경우에 따라 inclusion body (내포체)를 형성하는 재조합 단백질 등이 이에 포함된다.
- DNA 유출제어 : 핵산침전, DNA 분해효소이용
- 열의 발생제어 : 단백질 변성초래
- lysosome에 의한 가수분해제어
- 돌연변이 생산균주개발 요구

① 기계적 세포파쇄방법 :

- 프렌치프레스(french press) : 보통 실험실 규모에 사용
- Manton and Gaulin파쇄기 : 파일럿규모나 생산규모에 사용(고압파쇄기)
- 초음파(ultrasonic) 파쇄기

- ② 비기계적 세포파쇄방법 : 세포의 permeabilization 방법
 - 자동용해(autolysis), 삼투압충격, freeze & thaw method

4) 분리공정

① 증류(distillation)

- * 혼합액에서 증기압의 차를 이용하여 분리하는 조작
- * alcohol 증류

② 추출 (extraction)

- * 액-액간 용질의 분배차를 이용하여 분리하는 것

◎ 용매추출

- 물-유기용매계
- 항생물질, 지질의 분리에 이용
- 부탄올, 메틸이소부틸, 부틸아세테이트 (항생제 추출)

◎ 2상계 수용액 추출 = 수성 2상 분배법

- 수용성 고분자를 함유한 수용액이 적당한 조건하에서 2상으로 분배되는 원리
- 효소나단백질분리 , 핵산분리, 세포내 기관분리 등에 사용

* 수용성 고분자 물질 :

- dextran-polyethyleneglycol, dextran-methylcellulose, PEG-salt

◎ 초임계유체 추출

- 초임계 유체가 액체나 가스의 중간점의 성질을 이용하여 분리하는 방법
- CO₂가 가장 많이 사용

③ 흡착(adsorption)

- * 흡착 담체를 이용한 분리 농축법, 흡착 담체

◎ 이온교환수지

- 음이온 교환수지 : 암모니아부착
- 양이온 교환수지 : 술폰기부착

◎ 활성탄 및 탄소계 합성흡착제

◎ Cellulose 계 이온교환체 : 단백질 회수에 이용

◎ Silicagel 및 활성 alumina

◎ 기타교환기가 없는 합성 흡착기(column material)

- Carboxymethyl(CM) - cellulose
- Diethyl aminoethyl(DEAE) - cellulose
- Sulfopropyl(SP) - cellulose
- 단백질 → cellulose흡착 → 알칼리처리 → 단백질 추출

④ 침전(sedimentation)

- * 처리용량을 줄이기 위해서
- * 단백질의 용해도 - 염, 유기용매의 농도에 따라 변화
- * 단백질의 변성에 의해 침전되는 → 평형분리법

◎ 염석(salting out)

- 단백질의 물에 대한 용해도는 생리적 이온강도보다 낮거나(0.15~0.2 mol/kg)보다 높은 영역에서 감소함
- **염석(salting out)** - 높은 이온강도 영역에서의 단백질을 분획하는 것.
ex) 황산암모늄 : 분리공정에 들어가기 전에 통상 탈염이 필요함

◎ 등전점 침전 : 등전점에서 침전생성이 용이

- 낮은 이온 강도에서 단백질의 용해도가 감소

◎ 유기용매침전

- 아세톤 유기용매 → 용매의 유전율을 저하



단백질 분자간에 정전기적 상호작용 증가



침전생성

- 낮은 이온 강도, 등전점 부근에서 침전생성이 쉽다.
- 탈염 조작이 필요 없으나 변성을 일으키기 쉬우므로 저온 조작이 요구

◎ 불용성 염 생성에 의한 침전

- 용질과 반응 → 불용성 염을 생성 → 침전, 분획하는 방법
- 항생제, 구연산, Xanthan gum, 알긴산의 회수에 사용
- 구연산 → Ca-Citrate(불용성염)으로 침전
(소석회 첨가)

⑤ 막분리(membrane separation) :

- 역삼투압법, 한외여과법, 정밀여과법, 투석법(dialysis), 전기투석법, 투과기화법

◎ 십자류여과법(Cross flow filtration, CFF) 의 장점

- 높은 투과 유속을 얻을 수 있다.
- 여액이 청징하다.
- 여과 조제나 응집제의 첨가가 불필요하다.
- 균체의 관리가 용이하다.
- 다량처리가 가능하다.

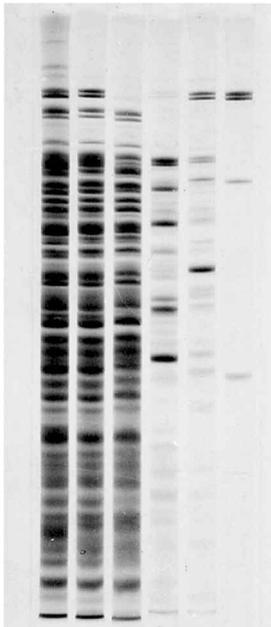
5) 정제과정

① 크로마토그래피

- * 고정상(stationary phase)과 이동상(mobile phase) 으로 구성되어 있다.
- * 이동속도 차에 의해 용질성분을 분리하는 방법
- * 이동상의 유체가 기체인가 액체인가에 따라 :
 - Gas Chromatography (GC),
 - Liquid Chromatography (LC)
- * Thin Layer Chromatography
- * Paper Chromatography
- * Column Chromatography

② 전기영동(electrophoresis)

- * SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) : **[A]**
- * 등전점 전기영동법(isoelectric focusing)
- * 2-dimension gel electrophoresis(2-D) : **[B]**



[A]



[B]