

유지산업 부산물을 이용한 1,3-propanediol 생산공정 개발

김 승환, 이 제혁, 박 권규*, 김 철호, 이 상기
 생명공학연구소 미생물공정연구실, ㈜ 무궁화*
 전화 (042) 860-4456, FAX (042) 860-4594

ABSTRACT

1,3-Propanediol as a bifunctional organic compound could potentially be used for many synthesis reactions, in particular as a monomer for polycondensations to produce polyesters, polyethers and polyurethanes. Wastewater containing high concentration of glycerol was used to produce 1,3-propanediol in lower production cost which inturn the quantity of wastewater to be treated. In this study, various attempts were made to increase 1,3-propanediol production under different conditions by *Klebsiella pneumoniae* ATCC 15380. 1,3-Propanedio conversion yield and by-product formation were influenced significantly by pH and temperature. The Optimal glycerol and nitrogen concentration for 1,3-propanediol production were found to be 25g/L and 1%(w/v), respectively. The production formation of 1,3-propanediol was optimal at pH 6.0 and temperature 35°C.

서 론

산업폐기물을 이용한 생물전환 기술은 폐기물의 재활용이라는 측면 뿐 만 아니라 폐기물의 처리의 관점에서 매우 중요한 의의가 있다고 하겠다. 즉 폐기물의 성공적인 재이용은 폐기물 양의 감소, 폐기물 처리에 수반되는 환경오염문제를 최소화 시킬 수 있기 때문에 그 중요성이 갈수록 증대되고 있다. Glycerol은 혐기적 조건에서 생물학적 공정으로 dihydroxyactone²⁾, organic acid⁷⁾, 1,3-Propanediol^{4,5)}과 같은 유용한 생물자원으로 전환할 수 있다. 1,3-Propanediol을 단량체로서 만든 플라스틱과 중합체는 1,2-propanediol, butanediol, ethylene glycol로 만든 제품 보다 더 좋은 광학 안정성 특성을 나타낸다³⁾.

1,3-propanediol의 생산 방법은 화학적 방법(hydration of acroleine)¹⁾, ethylene oxide의 hydroreformylation 또는 생물공학적인방법(utilisation of glycerol as sole substrate by *Clostridia* and *Enterobacteria*)⁶⁾, 유전학적 방법을 이용한 당류로부터 직접발효, *Clostridium* strains을 이용한 co-substrate로써 당류를 이용한 glycerol 발효 등이 있다. 그러나 지금까지 보고된 연구의 대부분은 순수 glycerol을 이용한 연구로 고농도의 glycerol을 포함한 유지산업 부산물을 이용한 연구는 거의 없다. 고농도의 glycerol을 함유하고 있어 폐수처리에 어려움이 있는 유지산업 폐액을 단순히 깨끗한 물을 얻기 위한 폐수처리의 개념을 넘어서 polymer 생산의 기초가 되는 monomer와

heterocycles 생산의 중간 대사물로 사용되는 1,3-propanediol 와 같은 유용물질을 생산하는 공정 개발을 위한 기초 자료를 위해 조사하였다.

재료 및 방법

1. 균 주

본 실험에 사용된 균주는 통성 혐기성 세균의 일종으로 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 15380, *Citrobacter freundii* ATCC 8455 는 ATCC 로 부터 분양 받았고, 균주 101 은 시내 하수천에서 채취한 토양시료로 부터 분리 하여 본 연구실에서 보관 중인 균주를 사용하였다.

2. 배양방법

플라스크 배양은 500ml screw-capped bottle 에 배지를 100ml 을 넣고 배양조건을 혐기적 상태로 만들어 주기 위해 멸균 전 질소를 불어 넣으면서 공기를 질소로 치환한 뒤 멸균하였다. 5L 발효조(model BIOFLOⅢ, NBS, USA)의 증 배양은 500ml screw-capped bottle 에 150ml 을 채우고 혐기적 조건을 만들어 주기 위해 멸균 전에 질소를 불어 넣어 주었으며 30C 에서 20 시간 배양하였다. 5L Fermentor 에 3L 배양액을 넣고 121°C 15psi 에서 25 분간 멸균한 후, 멸균 전 배지 내에 녹아 있는 산소를 제거하기 위해 0.5vvm 의 질소를 air filter 를 통해 불어 넣으면서 냉각시켜 혐기적 상태를 얻을 수 있었다. 배지 내에 수소이온 농도는 pH controller 를 사용하였으며 5N NaOH, 2.5N HCl 을 이용하여 조절하였다. 배양시 거품을 제거하기 위해 antiform A(sigma, USA)를 사용하였다.

3. 분석 방법

Ethanol 과 acetic acid 분석은 HPLC(Aminex HPX-87H 300x7.8mm column, Bio-Rad)를 사용 하였고, mobil phase 0.008N H₂SO₄(0.5ml/min)으로 40°C 에서 실시하여 refractive index(RI)로 검출하였다. 1,3-propanediol 및 2,3-butanediol 농도는 Gas Chromatography(wide bore column HP17(cross-linked), 10m length, Hewlett Packard model HP5890)를 사용하였고, 검출기로 FID 사용하였고 자동 정량 분석기(D520B, computing integrator)에 연결하여 정량 하였다. 그리고 glycerol 정량은 Boehringer(Mannheim, FRG)사의 효소를 이용한 glycerol 정량 키트를 이용하여 정량 하였다.

결과 및 고찰

순수 glycerol 대신에 유지산업 부산물로서 고농도의 glycerol 이 포함된 폐액을 이용하여 1,3-propanediol 생산의 최적조건을 조사하였다. 그 결과 폐액을 채취하는 시

기에 따라 250 - 500g/L 의 glycerol 이 포함되어 있었다. 1,3-propanediol 은 균주의 성장이 혐기적 조건일 때 생성되는데 glycerol 을 1,3-propanediol 로 전환하는 여러 미생물 중 실험 균주로 절대 혐기성 균주 보다 다루기 쉽고 배양하기 편리한 통성 혐기성 균주인 *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* 을 선택하였다. 폐액을 최종 glycerol 농도가 25g/L 가 되도록 조정된 배지에서 1,3-propanediol 수율과 생육이 좋은 *Klebsiella pneumoniae* 를 실험 균주로 선택하였다. 플라스크 배양에서 1,3-propanediol 생산의 최적조건을 조사해본 결과 폐액을 25g/L 의 glycerol 농도로 조정했을 때 폐액에 포함된 다른 성분의 저해를 적게 받고 수율이 가장 높았고 폐액에 부족한 질소원으로 corn steep powder 를 1%(w/v)로 첨가했을 때 수율 높았다.

배양액을 scale-up 한 5L 발효조 배양에서 pH 가 6.0 일 때 1,3-propanediol 과 2,3-butanediol 의 수율이 가장 높았으며 pH 가 6.0 이하로 낮아졌을 때 균주가 성장하지 못하고 사멸하는 것을 알 수 있었다. 그리고 최적온도는 35°C 였으며 pH 의 급격한 변화를 방지하기 위해 첨가한 인산염의 첨가는 효과가 없었다. 그리고 순수 glycerol 의 비교 실험에서 순수 glycerol 최종 농도가 25g/L 1,3-propanediol 으로 전환율을 보면 폐액은 0.53, 순수 glycerol 은 0.51 로 거의 비슷하고 2,3-butanediol 으로 전환율도 비슷하였다. Glycerol 최종 농도가 50g/L 로 조정할 했을 때 시간당 생성량을 보면 순수 glycerol 이 1.92, 폐액이 1.13 으로 순수 glycerol 을 이용한 1,3-propanediol 이 높음을 알 수 있었다.

산업적으로 유지산업 부산물로 나오는 폐액을 1,3-propanediol 생산에 사용하기 위해서 폐액의 glycerol 농도를 25g/L 조정했을 때 순수 glycerol 을 사용했을 때와 유사한 결론을 얻을 수 있었다. 앞으로 고 농도의 폐액에서 생육저해가 없이 1,3-propanediol 을 생산할 수 있는 돌연변이 균주의 개발과 유가배양 및 연속 배양 같은 고효율의 배양에서 최적 배양조건을 찾아야 할 것이다.

Table 1. Comparison of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol production with different strains from diluted wastewater.

Strains	Glycerol consumed (g/l)	Fermentation time (h)	Products formed (g/l)		Product recovery(%)	
			1,3-propanediol	2,3-butanediol	Propanediol	Butanediol
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC15380	26.7	24	9.29	5.88	34.79	22.02
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC8454	3.1	24	1.38	0.12	44.51	3.87
Isolate strain 101	11.0	24	-	0.77	-	7.00

Table 2. Comparison of an anaerobic batch production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *K. pneumoniae* ATCC 15380 using different glycerol sources

	Glycerol consumed(g/l)	Product concentration(g/l)				$Y_{PD/S(g/g)}$	$Y_{BD/S(g/g)}$	Overall productivity (g/lh) (A+B)
		1,3-propanediol (A)	2,3-butanediol (B)	Acetic acid	Ethanol			
Pure (2.5%)	23.6	12.13	1.79	1.81	0.50	0.51	0.07	2.32
Waste (2.5%)	18.5	9.84	1.77	1.56	0.09	0.53	0.09	1.93
Pure (5.0%)	41.5	17.83	3.39	2.08	1.59	0.42	0.08	1.92
Waste (5.0%)	30.4	12.10	2.69	1.65	1.41	0.39	0.08	1.13

The experiment were performed at pH 6.0, 35°C and 150rpm. $Y_{PD/S(g/g)}$: yield, g 1,3-propanediol formed per g of glycerol consumed. $Y_{BD/S(g/g)}$: yield, g 2,3-butanediol formed per g of glycerol consumed. Pure : pure glycerol, waste : wastewater.

참 고 문 헌

1. Biebl, H., Marten, S. (1995) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol: Use of co-substrates. *J. Microbiol Biotechnol.*, 44, 15-19
2. Bories A, Claret C, Soucaille P(1991) Kinetic study and optimisation of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem.*, 26, 243-248
3. Elm R, Falbe J, Hahn HD, Gelbke HP (1980) Propanediol. In: Bartholome E, Biekert E, Hellmann H, Ley H, Weigert M, Weise E(eds) *Ullmanns Encyklopadie der technischen Chemie*, vol. 19. Verlag Chemie, Weinheim
4. Gottschalk G, Averhoff B (1990) Process for the microbiological preparation of 1,3-propanediol from glycerol. European patent application 0373 230 A1
5. Gunzel B, Yonsel S, Decker WD (1991) Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2m³. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 36, 289-294
6. Homann T., Tag, C., Biebl, H., Deckwer, W.D., Schink, B. (1990) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *J. Microbiol Biotechnol.*, 45, 575-579
7. Leaver FW, Wood HG, Sternholm R (1995) The fermentation of three carbon substrate by *Clostridium propionicum* and *priopionibacterium*. *J. Bacteriol*, 66, 611-619