P226

CO로부터 고농도 아세테이트 발효 방법 개발

강환구, 이충열, 박형수, 유은정, 황선덕, 이선
한남대학교 화학공학과

Abstract

The anaerobic bacterium *P. productus* was known to produce acetate from CO, CO_2 and H_2. In this research the production of acetate at high concentration from carbon monoxide was studied. In this research the effect of CO_2, H_2, and CODH co-factor on cell growth and acetate production was studied. Also the toxicity of acetate on cell growth was examined. Acetate formation in lab scale fermenter was tested and specific acetate production rate of 0.43 g/L · hr · O.D. was obtained and the concentration of the acetate obtained in a fermenter higher than 40g/L.

서론

산업공정에서 발생하는 폐가스(waste gas)는 매우 많은 양의 일산화탄소, 이산화탄소, 수소, 황, 질소 산화물들을 포함하고 있다. 이들중 일산화탄소, 수소등은 유용한 에너지원임에도 그냥 버려지고 있어 경제적인 손실이 될 뿐아니라 대기 환경에도 악영향을 미치고 있다. 특히 제철소 부생가스중 BFG나 LDG중 20~70%를 차지하는 일산화탄소는 에너지원으로 활용될 수 있는 귀중한 자원임에도 불구하고 회수나 재활용이 거의 되지 않고 버려지는 실정이다. 그러므로 미생물을 이용해서 유용한 물질로의 bioconversion방법이 개발될 필요가 있다고 생각되어진다. 폐가스중의 일산화탄소, 이산화탄소, 수소로부터 아세테이트의 생성은 일반적으로 *Peptostreptococcus productus* 또는 *Acetobacterium sp.*에 의하여 된다고 알려져 있는데 본 연구에서는 *P. productus*를 이용하여 고농도 아세테이트 생성 방법을 연구하고 이를 최적화하여 생전환 공정의 경제적 이용가치를 규명하고자 한다.

재료 및 방법

본 연구에서 사용된 *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244는 ATCC로부터 구매하여 사용하였으며 균체 배양용 배지의 성분은 YE, Peptone, nitrate, phosphate염과 $MgCl_2$, NaCl, $CaCl_2$ 및 trace element와 미량의 vitamin들이고 사용한 chemical은 모두 sigma사 제품이었다. 균체배양에는 Crimp seal이 있는 150㎖짜리 serum bottle이 이용되어지며 이 병에 30㎖의 배지와 1.5㎖의 seed culture를 넣고 나머지 공간은 원하는 양의 일산화탄소와 tracer로의 약간의 질소를 원하는 압력으로 채워 실험하게 된다. 실험은 혐기성 조건에서 진행되는데 이를 위해 serum

bottle에 배지를 채우고 질소가스로 purging 하면서 100℃에서 2~5분간 끓인 다음 상온에서 50℃까지 식힌 후 stopper를 이용하여 capping하고 이를 다시 멸균하여 사용하였다. 일산화탄소는 0.22㎛ filter를 통해 주입하며 serum bottle은 분당 200회 회전운동을 하는 진탕배양기(vision 과학)에 넣어 37℃에서 배양하였다. 또한 발효기에서의 실험은 배지가 준비된 발효기에 질소를 purging하고 이를 멸균한 후 용존산소 수준이 0으로 떨어질 때까지 다시 질소를 흘려준다. 그 후 원하는 일산화탄소 농도를 gas flow meter, 압력계와 가스크로마토그래피를 이용하여 맞추어 준다. 이때 사용한 일산화탄소는 99.5%의 순도이었다. 세포농도는 분광광도계(Milteon roy. spectronic 21D) 660nm에서 구한 흡광도를 나타내었다. 일산화탄소, 수소 그리고 질소 분석은 가스크로마토그래피(Donam, DS6200)에서 수행하였다. 사용된 칼럼은 길이 6 ft의 녹슬지 않은 stainless steel이고 충진 물질은 Molecular sieve 13x(CRS)이었으며 TCD detector를 이용하였다. 실험 조건은 주입부 60℃, 오븐 35℃ 그리고 검출부 100℃ 이었고 carrier gas로는 Ar gas를 30cc/min로 흘려주었다. 아세테이트와 에탄올 분석에 사용된 충진물질은 HayeSep Q(CRS)이며 FID detector, 조건은 오븐 175℃, 주입부와 검출부는 225℃이었고 carrier gas는 He gas 50cc/min를 사용하였다.

결과 및 고찰

Peptostreptococcus productus 에 의한 CO로부터 아세테이트 생성능력 및 이에 관한 여러 가지 영향에 관하여 실험 하였다.

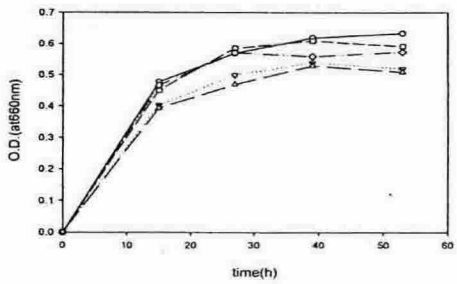


Fig. 1 Effect of CO - CO2 - H2 on cell growth

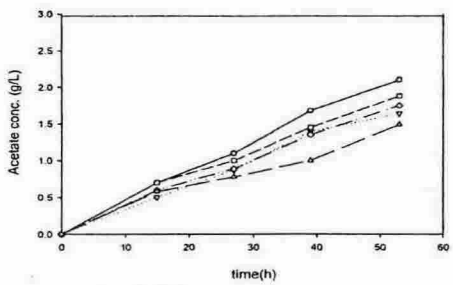
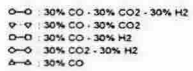


Fig. 2 Effect of acetate production



먼저 CO, CO_2, H_2를 이용한 균체성장 정도와 아세테이트 생성량을 확인하는 실험을 수행 하였다 Fig.1 과 2에 결과가 보여지는데 CO만의 경우에 비하여 H_2가 함께 첨가 되었을 경우 cell growth는 16%증가 되었고 CO_2의 경우는 5% 증가 CO_2, H_2

가 함께 첨가 되었을 경우 cell growth는 24% 증가 되었다. 한편 acetate 생성에 있어서는 CO에 H_2가 함께 첨가 되었을 경우 26%증가 CO_2의 경우는 10% 증가 CO_2, H_2 가 함께 첨가 되었을 경우 41%의 acetate 생성량이 증가 되었다. 산업체 부생가스중 대부분을 차지하고 있는 CO, CO_2, H_2를 동시에 이용할 경우 많은 양의 아세테이트를 생성할 수 있을것으로 기대된다. CO의 대사과정에 관여하는 CODH(carbon monooxide dehydrogenase)의 활성에 관여한다고 알려진 Zn, Ni등의 CODH co-factor의 농도가 균주의 성장 및 아세테이트의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 진행하였다. CODH는 균주자 CO를 에너지 또는 탄소원으로 이용할 때 직접적으로 관여하는 효소로서 이 효소의 활성은 균주의 성장 및 대사산물로서 아세테이트의 생산에많은 영향을 미칠 것으로 사려되어 CODH의 활성에 영향을 미친다고 알려진 Ni, Zn등의 배지중 농도를 높여주는 방법으로 실험을 진행하였다. control로 쓰인 기본배지는 YP 1%, nitrate, phosphate염과 $MgCl_2$, NaCl, $CaCl_2$ 및 trace element(Ni, Zn 포함)와 미량의 vitamin들이었고 이중 CODH co-factor인 Ni, Zn등이 포함되어 있는 trace element solution의 농도를 각각 control의 2배, 5배, 10배, 20배로 증가시켜 실험을 수행하였다. 이 실험의 결과가 Fig. 3, 4에 보여지는데 각 경우의 균주성장은 trace element solution의 농도가 증가할수록 함께 증가하여 20배 첨가된 경우의 O.D.가 약 1.0으로 control의 O.D. 0.7에 비해서 약 30% 정도 증가하였지만 아세테이트 생성량은 3.2~3.3 g/L로 큰 차이가 없었다. 즉 CODH co-factor의 첨가에 의한 세포 성장 증대는 관측되었으나 acetate 생성 증가에 미치는 영향은 거의 없었다.

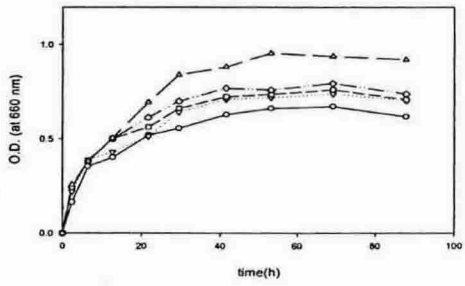


Fig. 3 Effect of CODH co-factor conc. on cell growth

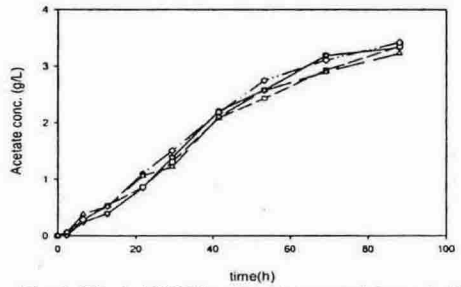


Fig. 4 Effect of CODH co-facocter on acetate production

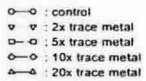


Fig. 5은 배지내에 아세테이트 농도가 균주 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 아세테이트 농도를 다르게 첨가한 경우의 균주 성장을 확인 하였다. 아세테이트를 각각 20, 30, 35, 40, 45, 50 g/L 농도로 expoential cell growth stage에서 첨가하여

cell growth를 확인하여 본바 그림에 나타나는 것처럼 아세테이트 농도가 40g/L 농도까지는 균주의 성장에 영향이 없는 것으로 확인 된다. 이 결과를 바탕으로 Fig. 6에 보여지는 바와같이 5L 발효기(한국 발효기, KF-5L)에서 고농도 아세테이트 생성실험을 수행하였다. 배지는 YP 1%, nitrate, phosphate염과 $MgCl_2$, NaCl, $CaCl_2$ 및 trace element와 미량의 vitamin들이었고 5L 발효기 내에 배양액 부피는 2L, 500rpm, 37℃, pH는 6.0~7.0을 유지하면서 실험을 진행하였다. gas phase의 CO는 60%이었고 나머지는 질소(40%)를 이용하여 원하는 압력을 맞추었다. 또한 배양중 CO의 농도는 초기 주입량의 30%를 소비하기전 다시 충진하여 주어 필요에 따라 질소원인 YP(총7.5)를 첨가해 주었다. 그림에서 보여지는 것처럼 균주성장의 경우 초반에 1.1까지 성장했을 때 YP 1%를 첨가해줌으로 약 60시간까지 이 수준을 유지하다가 1% YP를 지속적으로 첨가해 주었을 때 O.D. 약 2.5까지 성장하였다. 아세테이트의 경우 접종초기 낮은 생성속도로 생성되다가 60시간 이후 활발한 생성을 보여 약 40g/L를 생산하였다. 이때의 최대 아세테이트 생성속도는 0.43 g acetate/L · hr · O.D.이었고 최대 CO 소비속도는 28.4 mmole CO/L · hr · O.D.이었다. 이 실험을 통하여 CO로부터 아세테이트로의 전환의 경우에 있어서 물질전달 문제가 해결되고 영양원의 결핍을 방지하면서 실험을 진행할 경우 40g/L 이상의 아세테이트를 생성할수있을 것으로 보여지고 이러한 CO로부터 acetate를 생산하는 생물학적 공정은 버려지는 수많은 CO의 자원 재활용 기술로 이용될 수 있으리라 생각된다.

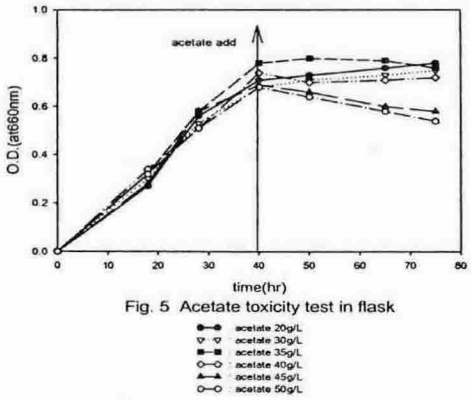


Fig. 5 Acetate toxicity test in flask

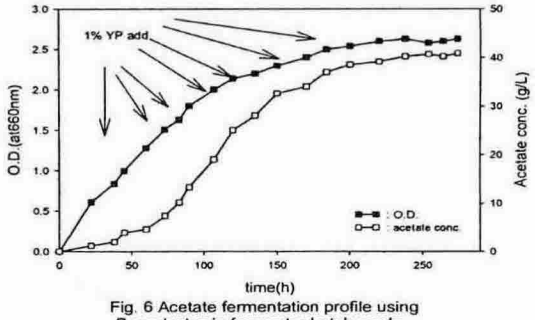


Fig. 6 Acetate fermentation profile using *P.productus* in fermenter batch mode

참고문헌

1. Balch, W.E., S. Schoberth, Int'l. J. Syst. Bacteriology, 27, pp355-361 (1977)
2. Lorowitz, W.H, Bryant, H.p. , Appl. Environ. Microbiol. , 47 ,p961(1984)
3. Barik, S., R.E. Corder, Abstr., Amer. Soc. Microbiol., Annual Meeting, Washington, D. C. Paper No. 024, P.265 (1986)