

CO로부터 고농도 에탄올 발효 방법 개발

강환구, 이충열, 박형수, 김원철, 윤지선, 박성훈¹
 한남대학교 화학공학과, 부산대학교 화학공학과¹

Abstract

The anaerobic bacterium *Clostridium ljungdahlii* was known to produce ethanol from CO, CO₂ and H₂. In this research the production of ethanol at high concentration from carbon monoxide was studied. ethanol production using fed-batch, ceramic filter supported system, and 2-stage bioreactors were tested and optimized.

서론

산업공정에서 발생하는 폐가스(waste gas)는 매우 많은양의 일산화탄소, 수소, 황, 이산화탄소, 질소 산화물들을 포함하고 있다. 이들중 일산화탄소, 수소등은 유용한 에너지원임에도 그냥 버려지고 있어 경제적인 손실이 될 뿐 아니라 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 bioconversion 방법이 개발될 필요가 있다고 생각되어진다. 폐가스중의 일산화탄소, 이산화탄소, 수소로부터 에탄올의 생성은 일반적으로 *Clostridium ljungdahlii* 에 의하여 된다고 알려져 있는데 본 연구에서는 *C. ljungdahlii*를 이용하여 고농도 에탄올 생성 방법을 연구하고 이를 최적화 하였다.

재료 및 방법

본 연구에서 사용된 *Clostridium ljungdahlii* ATCC 55383는 ATCC로부터 구매 한후 돌연변이 및 scering을 통하여 이를 사용하였으며 균체 배양용 배지의 성분은 YE, Peptone, nitrate, phosphate 염과 MgCl₂, NaCl, CaCl₂ 및 trace element와 미량의 vitamin들이고 사용한 chemical은 모두 sigma사 제품이었다. 균체배양에는 Crimp seal이 있는 150ml짜리 serum bottle이 이용되어지며 이 병에 30ml의 배지와 1.5ml의 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 2~5 분간 끓인 다음 상온에서 50℃까지 식힌 후 stopper를 이용하여

capping하고 이를 다시 멸균하여 사용하였다. 일산화탄소는 0.22 μ m filter를 통해 주입하며 serum bottle은 진탕배양기(vision 과학)에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 또한 발효기에서의 실험은 배지가 준비된 발효기에 질소를 purging 하고 이를 멸균한 후 용존산소 수준이 0으로 떨어질 때까지 다시 질소를 흘려주며 이를 resazurin을 이용하여 확인하였다. 그 후 원하는 일산화탄소농도를 gas flow meter, 압력계와 가스크로마토그래피를 이용하여 맞추어 준다. 이때 사용한 일산화탄소는 99.5%의 순도이었다. 세포농도는 분광광도계(Milteon roy. spectronic 21D) 660nm에서 구한 흡광도를 이용하였다. 일산화탄소, 수소 그리고 질소 분석은 가스크로마토그래피(Donam, DS6200)에서 수행하였다. 사용된 칼럼은 길이 6 ft의 녹슬지 않은 stainless steel이고 충전 물질은 Molecular sieve 13x(CRS) 이었으며 TCD detector를 이용하였다. 실험 조건은 주입부 60 $^{\circ}$ C, 오븐 35 $^{\circ}$ C 그리고 검출부 100 $^{\circ}$ C 이었고 carrier gas로는 Ar gas를 30cc/min로 흘려주었다. 에탄올 분석에 사용된 충전물질은 HayeSep Q(CRS)이며 FID detector, 조건은 오븐 175 $^{\circ}$ C, 주입부와 검출부는 225 $^{\circ}$ C이었고 carrier gas는 He gas 50cc/min를 사용하였다.

결과 및 고찰

CO를 C source로 이용하여 균주가 성장하는데 한계가 있고 high cell density로의 진행이 어려움을 감안하여 다른 C-source를 이용하여 균주가 성장하는지를 확인하는 실험을 진행하였다. 5L 발효기(코바이오텍, KF-5L)에서 고농도 에탄올 생성 실험을 수행 하였는데 pH 5.5, 400 rpm, 초기 C-source 농도 5g/L 배지에 균주를 접종하였다. 초기 첨가된 C-source가 모두 소비될 시점에서 혐기적으로 준비한 C-source를 feeding하여 O.D. 3.4까지 자라게 하였다. 그 후 C-source feeding을 중지하고 CO에 대해 adaptation 되어지기 까지 균주의 활성을 유지하기 위해 ammonium과 vitamin 및 trace metal을 첨가하여 주면서 CO를 소비하는 시점까지 세포농도를 유지하였다. CO의 소비 속도가 충분한 속도에 달했을 때 pH를 5.5에서 4.5로 낮추어 준다. 최종 에탄올 생성량은 45g/L 이었다. 특히 약 60시간 이내에 45g 정도의 ethanol을 생성 함으로써 0.75g ethanol/L · hr 의 ethanol 생산성을 확보 할수 있었다. 따라서 더 높은 세포농도에 의한 productivity 의 증가가 모색되어 졌으며 ceramic filter에 의한 고농도 세포배양 실험을 하게 되었다.

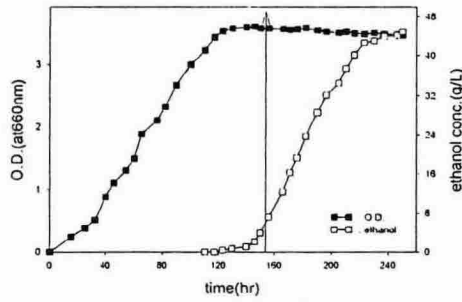


Fig. 1 cell growth and ethanol production profile in fed-batch fermenter with *C. ljungdahlii*

ceramic filter를 이용한 고농도 세포배양방법은 약 0.1 μ pore size의 ceramic filter를 이용 하였으며 cell를 제외한 배지를 연속적으로 제거 하였고 실험 목적상 O.D. 약 5.4 정도 까지만 실험을 진행 하였다. ethanol의 생성속도를 확인하여 본 바 최종적으로 52g/L의 ethanol을 생성하였다. 한편 낮은 pH와 높은 ethanol 농도에 오래 노출됨으로 인하여 세포의 viability가 급격히 떨어지는 것으로 생각되며 이러한 문제점을 해결하기 위해 2 bioreactor system을 개발 하였다. 첫번째 fermenter에서는 cell growth를 위한 stage로서 높은 농도의 세포 및 viability를 유지하게 하고 두 번째 fermenter에서는 높은 viability를 유지 하는 cell이 continuous mode로 흘러들어와 ethanol을 생산하는 stage로 구성되어 있다. 이 경우 ethanol을 생산하기 위한 조건인 pH4.5 이하의 낮은 pH에 cell이 노출되어 cell의 viability가 낮아지는 단점이 해결 되어지며 또한 높은 농도의 ethanol에 오랜시간 노출되어짐에 의한 cell viality 감소도 해결할수 있었다. 이실험을 통하여 안정적으로 ethanol을 약 62g/L의 농도로 연속생산할수 있었다.

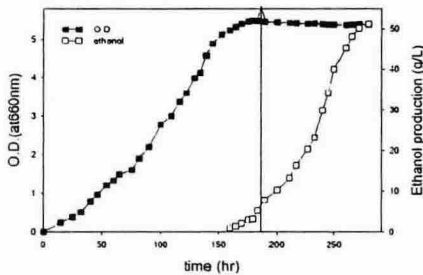


Fig. 2 cell growth and ethanol production with *C. ljungdahlii* in ceramic filter reactor

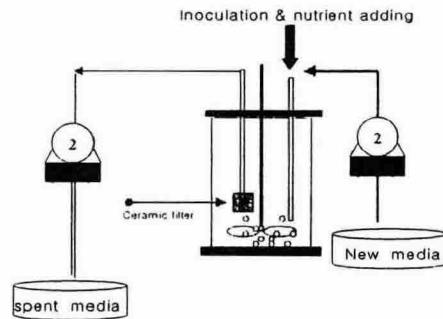


Fig. 3 고농도ceramic filter system

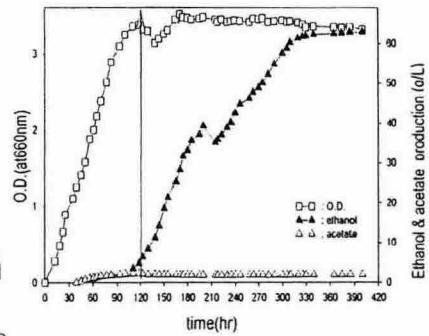
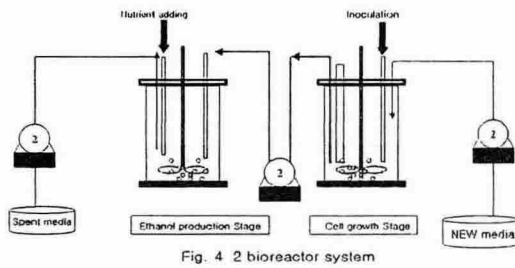


Fig. 5 The profile of cell density & produced Ethanol in fermenter (ethanol production stage)

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)