

투과증발과 유기산 저생산 균주를 이용한 부탄올 추출발효

윤지용·*박창호·¹김왕준
경희대학교 화학공학과, ¹한국식품개발연구원 생물공학연구본부
(접수 : 2000. 7. 19., 게재승인 : 2000. 8. 21.)

Extractive Butanol Fermentation Using Pervaporation and a Low Acid Producing Strain

Ji Yong Yoon, Chang-Ho Park*, and Wang June Kim¹

Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University, Yongin-si 449-701, Korea

¹Division of Food Chemistry and Biotechnology, Korea Food Research Institute, Sunghnam-si, 463-420, Korea

(Received : 2000. 7. 19., Accepted : 2000. 8. 21.)

An extractive fermentation process using pervaporation was studied in a 7 liter fermentor. Pervaporation was performed using a silicone membrane module, and a low-acid-producing strain, *Clostridium acetobutylicum* B18, was used to produce butanol. In batch culture without pervaporation, pH 5.5 and initial glucose concentration of 60 g/L resulted in the highest butanol productivity (0.216 g/L · h) with butanol yield of 0.261. Butanol flux through the membrane was best at 2.0 L/min-tubing of air flow rate. In batch and fed-batch fermentation glucose consumption rate increased by 1.3 times with pervaporation.

Key Words : butanol, pervaporation, membrane, fed-batch, *Clostridium acetobutylicum* B18

서 론

발효에 의해 생산된 부탄올은 자동차연료 첨가제로서의 물리적, 화학적 특성이 현재 사용되고 있는 에탄올에 비하여 우수하며, 특히 에탄올에 비하여 증기압이 낮아 연료공급 라인에 증기 막힘 (vapor lock)이 적고, 물과의 용해도가 낮으며 발열량이 높은 장점이 예상된다(1). 부탄올을 연료로 사용하면 석유 수입 대체 효과를 가져올 뿐 아니라 휘발유를 구성하는 탄화수소보다 더 산화된 연료(oxygenated fuel)이기 때문에 대기 오염에 미치는 환경적 측면에서 더 바람직하다. 부탄올의 대체연료로서의 이런 장점과 가치에도 불구하고 에탄올에 비해 상대적으로 덜 인식되어 있는 주된 원인은 부탄올의 생산성이 비교적 낮았기 때문이며 이는 생산균주에 미치는 독성이 에탄올 보다 심하기 때문이다.

부탄올은 에탄올과 마찬가지로 녹말, 셀룰로오스, 당밀 등을 기본 원료로 하여 분해 및 발효에 의해 생산할 수 있다. 부탄올을 발효에 의해 생성하는 대표적인 미생물 균주는 *Clostridium acetobutylicum* 인데 이 균주는 5가지 생성물(용매인 부탄올, 아세톤, 에탄올, 세가지와 유기산인 부티르산

과 아세트산의 두가지)을 배지내에 만들어내며, 이산화탄소와 수소가 가스부산물로 만들어진다. 부탄올 발효에서 얻어지는 5가지 생성물 중에서 부탄올이 주요 성분이나 가장 독성이 심하기 때문에 배지 내의 부탄올 농도는 14~16 g/L로 제한된다(2, 4).

이러한 부탄올의 독성을 극복하고 부탄올의 생산성을 제고하기 위하여 부탄올을 발효와 동시에 추출하여 제거하는 추출발효 방법이 몇 가지 도입되었다. 그 원리는 발효배지내의 주 독성물질인 부탄올을 발효와 동시에 제거함으로써 미생물의 성장 및 부탄올 생산을 원활히 할 수 있도록 하는 것이다. 문헌에 보고된 부탄올 추출발효 방법 중 투과증발(pervaporation)을 이용한 방법이 가장 우수한 것으로 보고되어 있다(4, 5). 투과증발법이란 막을 사용하는 분리공정의 한가지로 반 투과성막(semi-permeable membrane)을 통한 침투(permeation)와 증발(vaporization)이 동시에 일어나는 공정을 말한다. 부탄올 발효의 경우에는 용매 선택적인 막을 사용하여 배지(주로 물) 중에 존재하는 소량의 용매들(부탄올, 아세톤 및 에탄올)을 선택적으로 분리하는 것이다.

투과증발에 의해 부탄올 추출발효를 수행할 때 부탄올은 균주에 대해 가장 유독한 성분이라는 하지만 투과증발막을 통해 배지로부터 용이하게 제거되기 때문에 상대적으로 잘 제거되지 않는 유기산이 배지에 축적되는 문제에 부딪히게 된다. 이를 해결할 수 있는 방법의 하나로 유기산의 생성량이 적은 균주를 사용할 수 있으며 *Clostridium acetobutylicum*

*Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University, Yongin-si, Kyunggi-do, 449-701, Korea
Tel : 82-31-201-2531, Fax : 82-31-202-1946
E-mail : chpark@khu.ac.kr

B18이 이러한 목적에 적합한 균주라는 것이 본 연구진에 의하여 보고되었다 (1).

본 연구는 이 *C. acetobutylicum* B18에 의해 부탄올을 발효하며 동시에 막을 이용한 투과증발을 병행하는 추출발효를 수행하였다. 부탄올 추출발효의 조업조건으로 포도당농도와 pH의 영향을 연구하였다. 그리고 발효조 내에 투과증발 모듈을 장착하여 추출 발효를 수행함으로써 부탄올의 축적에 의한 균주 활성저하를 막아 부탄올 생산성을 증가시켰다. 또한 유가식(fed-batch) 발효를 수행하여 연속적인 부탄올 생산 가능성을 연구하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서 사용된 균주는 *Clostridium acetobutylicum* B18로서 미국 미네소타 주립대학교 (University of Minnesota, Minneapolis) 미생물학과의 Palmer Rogers 교수로부터 확보하였다. 이 균주는 혐기성 균주로서 부탄올 발효시 유기산의 생성량이 적기 때문에 부탄올의 수율이 높고 유기산에 의한 독성이 다른 부탄올 생성 균주에 비해 상대적으로 적다는 이점이 있다(1, 3).

배지 및 배양방법

본 실험에 사용된 배지는 변형된 YEM (modified yeast extract medium)배지(3, 6)로 조성은 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20 g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L, yeast extract 8.0 g/L, asparagine 1.0 g/L, cystein 0.5 g/L, thiamine HCl 1.0 mg/L, casein hydrolysate 2.2 g/L, *p*-amino benzoic acid 1.0 mg/L, biotin 0.02 mg/L 이다. 이상의 양을 변형된 YEM배지 1배 (1x)로 한다. 초기 pH는 3N NaOH (Sigma)이용해서 pH 6.5로 보정하였다. 배지 pH가 발효에 미치는 영향에 관한 실험에서도 pH control용으로 3N NaOH를 사용하였다.

접종배지는 기본배지에 2%의 포도당이 포함된 배지를 사용하였고, plating 배지는 접종배지에 1.5%의 agar를 첨가하였다. 배지는 121℃에서 20분간 가열멸균하였고, 이때 배지 중의 용존산소가 제거되었다. 접종은 혐기성 chamber 내에서 수행하였다. 배양과정은 균락 (colony)이 잘 형성된 세포를 agar plate에 streaking 한 후 35℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그리고 plate로부터 하나의 균락체를 취해 10 mL 접종 배지가 담긴 시험관에 접종하고 18시간 동안 배양한 후 이 시험관에서 5 mL의 배양균을 취하여 100 mL의 변형된 YEM 배지가 담긴 serum병으로 옮기고, 10시간 배양 후 발효조 (7L, 한국발효기)에 접종하였다. 발효조 배양온도는 32℃를 유지하였다.

투과증발 module의 제작

투과증발 module은 silicone tubing (VWR Scientific Products, McGaw Park, IL, USA, 내경:1.95 mm, 두께:240μm)를 이용하여 수직으로 놓여진 두 개의 둥근판의 구멍을 통해 엮어서 만들었다. 총 32가닥의 tubing을 사용하였으며 총 길이는 154.7 m, 외부지름 기준으로 표면적은 0.947 m² 이다. 둥근

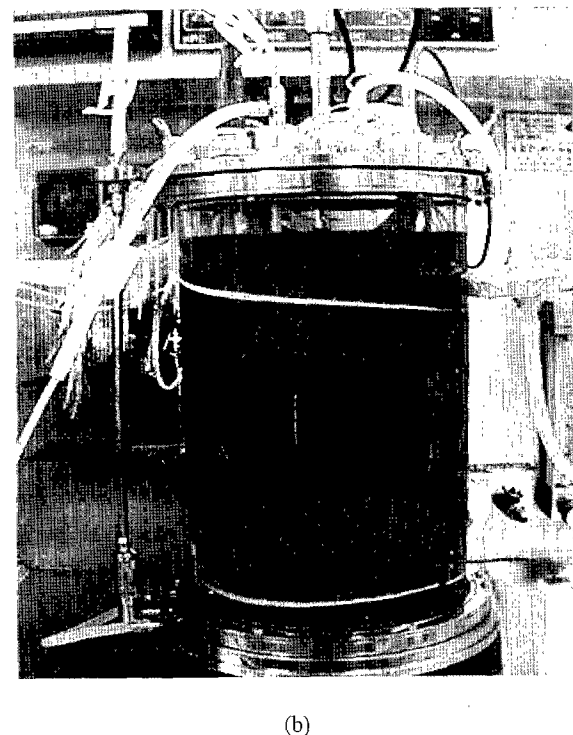
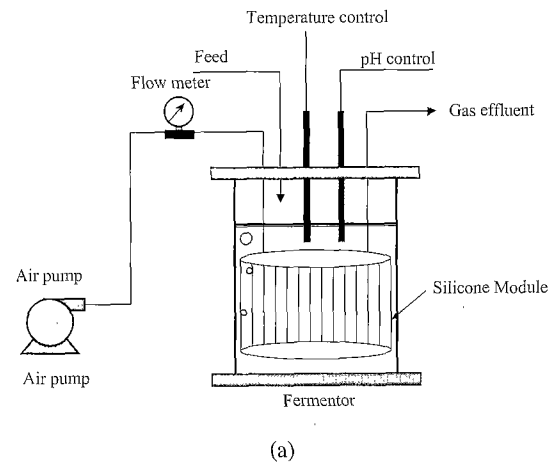


Figure 1. (a) Schematic diagram of pervaporative fermentation system. (b) A photo of actual pervaporative fermentation system.

판의 지름은 160 mm, 두 판사이의 거리는 250 mm이며 발효조 내의 impeller가 차지하는 공간을 고려해서 판 가운데 지름 90 mm의 구멍을 만들었다(Figure 1).

발효조 조건

7L 발효조 (한국발효기)에 working volume 6L로 하여 실험을 수행하였다. 변형된 YEM 배지 6L를 발효조에 넣고, 온도계, pH meter, anti-foam sensor를 설치하였다. 고압멸균기를 이용하여 121℃와 15 psi로 20분간 멸균하고 방온도까지 냉각시켰다. 이때 발효기 headspace로부터 배지내로 산소가 침투하는 것을 방지하기 위해 질소를 퍼징시켰다. 배지내의 산화환원전위의 감소는 지시약인 resazurine (Sigma)의 색깔이 선홍색에서 무색으로 변하는 것으로 확인하였다. 실험은 투

Table 1. Effect of glucose concentration on the fermentation characteristics in batch culture without pH control.

Glucose concentration	20 g/L	40 g/L	60 g/L	60 g/L + extra nutrient (added at 27hr)
Glucose consumption (g/L)	18.23	34.10	29.34	36.10
Butanol(g/L)	3.44	6.32	5.77	7.43
Acetone(g/L)	1.50	2.91	2.52	3.28
Ethanol(g/L)	0.46	0.81	0.45	0.46
Acetic acid(g/L)	1.12	1.86	1.05	0.98
Butyric acid(g/L)	0.57	0.48	0.71	0.55
Butanol yield(%)	18.86	18.53	19.66	20.58
Solvent yield(%)	29.62	29.44	29.78	31.01
Acid yield(%)	9.27	6.86	6.02	4.23
Total yield(%)	38.89	36.3	35.8	35.24
Butanol productivity (g/L · h)	0.063	0.099	0.081	0.112

과증발 모듈을 장착하지 않고 발효반 수행한 경우와 투과증발 모듈을 장착하고 추출발효를 수행한 경우의 두가지이다. 투과증발 모듈을 이용한 실험에서는 발효조내에 투과증발 모듈을 장착한 후 멸균시켰다. 투과증발 모듈을 이용한 추출발효 시스템을 Figure 1에 나타내었다. 투과증발을 이용한 회분식 및 유기식 배양에서 pH는 5.5로 control하였다. 본 실험은 혐기성 발효이므로 발효도중 교반을 가하지 않았다.

시료의 분석

포도당 농도분석

포도당의 농도는 HPLC (Waters 600S)를 사용하여 분석하였다. 컬럼은 High performance carbohydrate column (4.6 × 250 mm, Waters)을 사용하였다. Mobile phase는 acetonitrile : water (80:20), flow rate는 1.5 mL/min, detector는 RI detector를 사용하였다. 시료는 원심분리기를 이용해서 15000 rpm에서 5분 동안 전처리한 후 1 mL을 취하여 tube에 보관하였다. 유기식배양 실험에서 신속한 포도당 농도 정량을 위해 DNS법 (dinitrosalicylic acid method)을 사용하였다(7). 이 방법은 환원당을 정량하는 방법으로 환원당의 경우 알카리성에서 3,5-dinitrosalicylic acid와 반응하여 NO₂로 전환되면서 적갈색을 띄게되는데 당 농도에 따른 색깔의 변화를 spectrophotometer로 측정함으로써 당의 농도를 알아낼 수 있다.

용매와 유기산의 농도 분석

용매 (부탄올, 아세톤, 에탄올)와 유기산(아세트산, 부티르산)의 농도는 FID (flame ionization detector)와 auto linear temperature programmer가 갖추어진 gas chromatography (HP5890 series II, Hewlett Packard Co.)를 이용하여 정량하였다. Column은 HP-INNOWax capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm 필립 두께)을 사용하였으며, carrier gas로는 질소(순도 99.999%)를 사용하였다. 시료 분석조건으로 주입구 온도를 250℃로 유지하였고, split은 50 : 1로 희석하여 컬럼으로 들어가게 하였다. 오븐 온도는 초기 40℃에서 4분간 유지한 후 10℃/min의 속도로 210℃까지 상승시켰다. 시료의 전처리는 원심분리기를 이용하여 15000 rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 제거하였고 상등액 1 mL을 병에 담아 보관했다.

실험수행순서

투과증발을 수행하기에 앞서 우선 7 L 발효조에서 *C. acetobutylicum* 18의 특성을 파악하기 위하여 pH가 조절되지 않은 상태와 pH를 일정한 값에 고정시킨 상태에서 회분식 발효를 수행하였다. 그리고 나서 추출발효 수행을 위한 투과증발시스템을 set up하였고 실제 발효 생성액이 아닌 용매와 유기산을 혼합한 make up 용액을 사용하여 투과증발 시스템의 성능을 연구하였다. 그다음 투과증발시스템을 가동시키면서 회분식 발효와 유기식 발효를 수행하였다.

결과 및 고찰

pH가 조절되지 않은 회분식 발효에서 포도당 농도의 영향

부탄올 발효에서 균주 활성 및 부탄올 생산에 중요한 영향을 미치는 인자는 기질(포도당) 농도와 배지의 pH이다. 일반적으로 부탄올 발효시 포도당 농도가 5~10 g/L로 낮을 때는 유기산(부티르산, 아세트산)의 생성을 촉진한다고 알려져 있다. 이것은 소모된 포도당이 주로 ATP생성과 세포생장에 쓰임을 나타낸다. 포도당의 농도가 20 g/L 이상일 때 용매(부탄올, 에탄올, 아세톤)가 생성되는 것으로 보고되었다(8). 따라서 본 실험 조건에서 최적의 포도당 농도를 찾기 위해 발효 초기 포도당농도가 20, 40 및 60 g/L일 때 부탄올 생성량을 비교하였다. 또한 60 g/L의 포도당 농도에서는 추가로 포도당 이외의 영양소를 공급했을 때의 발효특성도 연구하였다.

포도당 초기 농도 20 g/L에서 발효를 수행했을 때 pH, 세포 건조중량 포도당 농도, 용매와 유기산 농도의 시간에 따른 변화 추이를 Figure 2a에 나타내었다. 발효초기에는 유기산이 생성되다가 10시간이 지나면서 유기산은 감소추세이고 용매의 농도가 증가하는 것을 알 수 있었다. 이것은 발효생성물이 유기산에서 용매로 전환되는 것을 나타내며 부티르산이 부탄올로, 아세트산이 아세톤으로 전환된다(9). 즉 부탄올과 아세톤등 용매는 발효 시작후 10시간이상 지나서 pH가 낮아졌을 때 생성되기 시작한다. pH는 유기산 생성단계의 끝 무렵에 4.7까지 하락하다가 용매생성 단계로 접어들면서 소폭 상승하여 pH 4.86으로 안정되었다. 이것은 초기 세포생장에 의해 유기산이 생성되고 세포생장이 정지기에 들어갔을 때 용매생성 쪽으로 전환 됨을 알 수 있다(4). 부티르산을 recycle하여 부탄올을 형성하는데 작용하는 효소는 butyrate

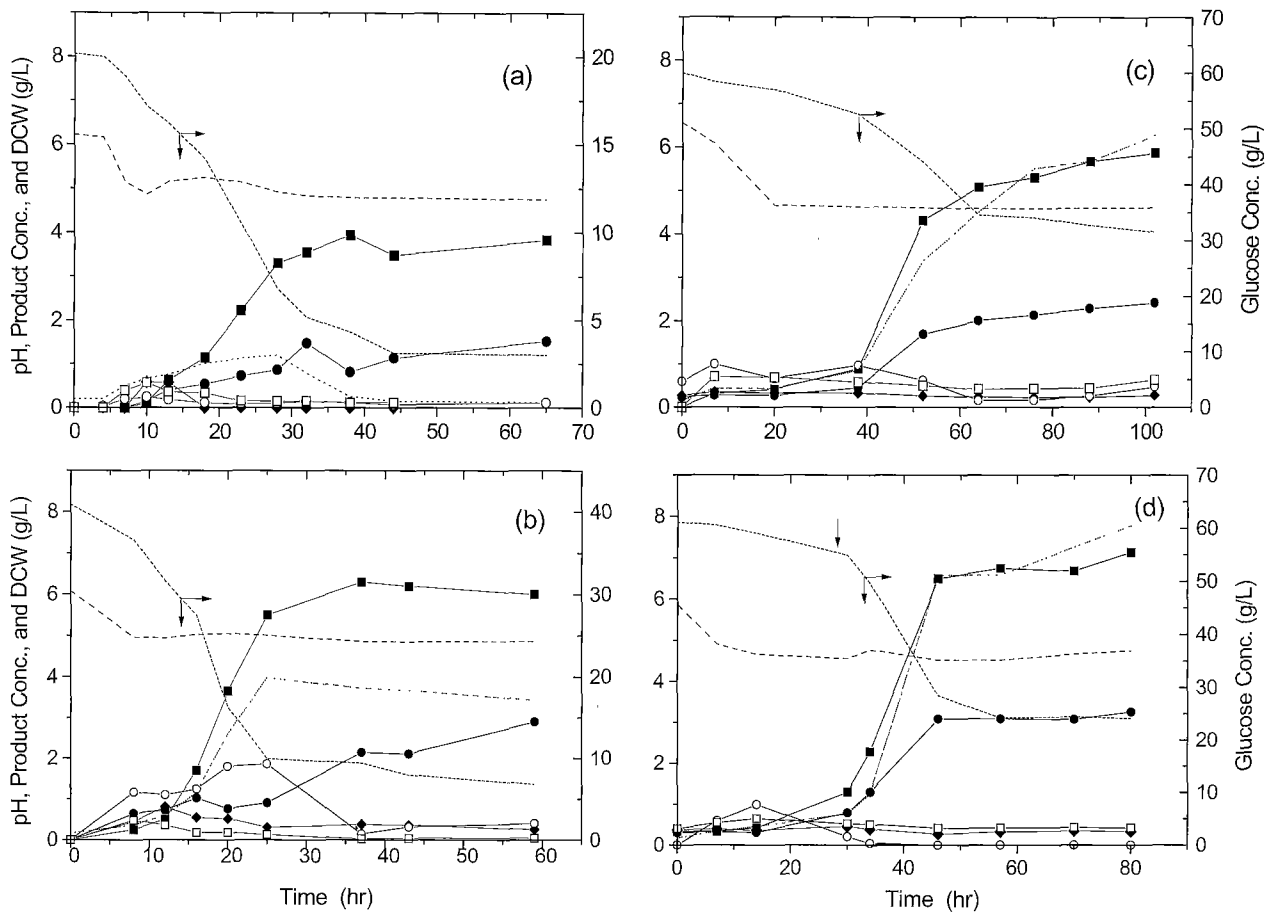


Figure 2. Profiles of pH, cell growth, glucose and product concentrations in batch culture without pH control, for initial glucose concentrations (g/L) of 20 (a), 40 (b), 60 (c) and 60 with extra nutrient (0.5×) added 30hrs after fermentation start up (d): The arrow(↓) indicates the moment of nutrient addition; ---- pH; -.-.- dry cell weight (DCW); glucose; (■) butanol; (●) acetone; (◆) ethanol; (□) butyric acid; (○) acetic acid.

kinase, phosphotransbutyrylase, butyraldehyde dehydrogenase and butanol dehydrogenase이며 butyryl-CoA에서부터 용매로의 전환은 유기산 생성으로 인한 계속적인 pH의 감소를 막아주는 세포의 자기방어기전 (cell's self-defensive mechanism) 때문인 것으로 알려져 있다(9). 포도당 소모에 대한 부탄올 및 용매의 수율은 각각 18.86% 및 29.62%이었다(Table 1).

초기포도당의 농도가 40 g/L 에서는 아세트산의 생성량이 초기포도당 20 g/L 에서보다 높은 농도를 유지하였으나 배양 후 25시간정도부터 급격히 감소하였다. 아세트산이 감소하면서 아세톤은 증가추세를 나타내었다. 초기 포도당 농도 20 g/L와 비교하면 부탄올 수율과 총 용매 수율이 18.53% 및 29.44%로 거의 비슷한 수준이었다(Figure 2b).

포도당 초기 농도가 60 g/L인 실험에서는 세포생장의 지연기가 상당히 길어졌다. 이는 과량의 포도당농도에 대한 균의 적응기간이 길어진 것으로 생각된다. 초기 포도당 농도가 40 g/L의 경우보다 전체적으로 발효생성물의 농도는 감소하였다(Figure 2c). 포도당 소모량이 29.34 g/L로 초기포도당 농도가 40 g/L인 경우의 포도당 소모량인 34.10 g/L보다 감소하였고 부탄올 생성량 역시 5.77 g/L로서 초기포도당 농도가 40 g/L인 경우의 6.32 g/L보다 감소하였다. 이 부탄올 생성량의 감소는 1L 규모에서 얻은 본 연구진의 결과와 동일하다(1).

초기 포도당농도가 60 g/L일 때 탄소원의 양에 비하여 탄소원 이외의 영양소의 양이 부족하여 포도당 소모가 29.34 g/L 로 제한된 것으로 생각되어 배양 도중에 추가로 탄소원 이외의 영양소를 주입하는 실험을 실시하였다. 초기포도당 농도 60 g/L에서 배양을 시작하지 27시간 후에 발효 시작 때 넣은 영양소의 양의 절반 (0.5x)을 추가로 주입하였다. 추가 영양소를 주입하지 않았을 때와 비교하여 포도당 소모가 6.8 g/L만큼 증가한 36.1 g/L이었다 (Figure 2d). 부탄올의 수율은 20.58%로서 추가로 영양소를 주입하지 않았을 경우와 비슷한 수준이었으나 용매전체의 수율은 29.78%에서 31.01%로 증가하였다(Table 1). 이 실험에서 중요한 결과는 유기산의 수율이 4.23%로 다른 포도당 농도 실험에 비하여 가장 낮은 것이다. 포도당 농도가 발효에 미치는 영향에 대한 결과는 Table 1에 요약되어 있다.

발효에 의해 생성되는 유기산이 용매보다 적은 양이지만 유기산은 투과증발막에 의해 거의 제거가 되지 않으므로 계속 축적되어 균의 활성을 저하시킬 수 있다. 따라서 유기산의 생산량이 적을수록 투과증발을 이용한 부탄올 추출발효에서는 유리한 균주이다. *C. acetobutylicum* B18은 다른 부탄올 생성균주보다 상대적으로 유기산 생성이 적을 뿐만 아니라 이미 생성된 유기산도 시간이 지남에 따라 recycle되어 용매

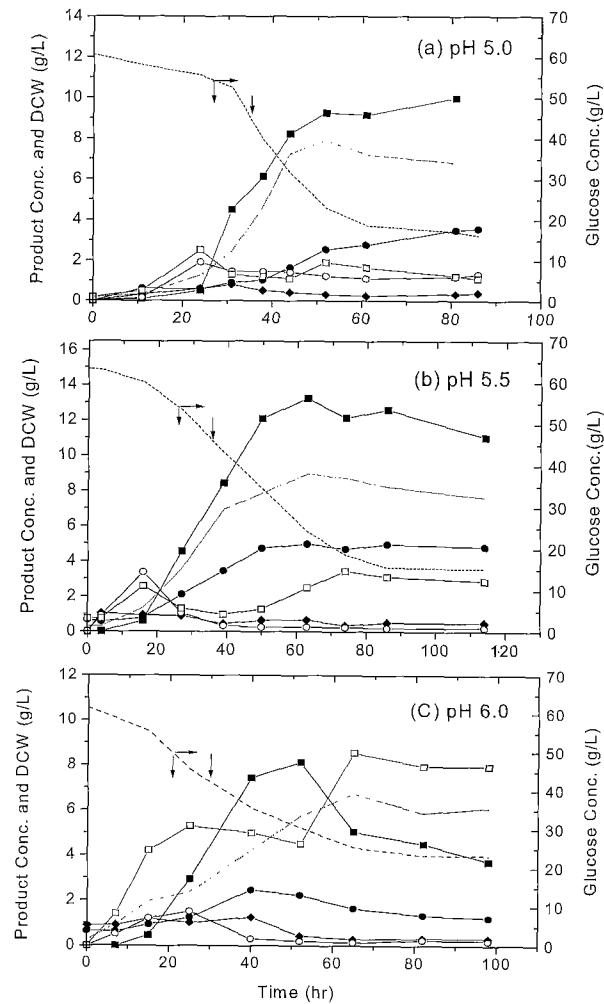


Figure 3. Profiles of cell growth, glucose and product concentrations in batch fermentation with 60 g/L of initial glucose and pH controlled at 5.0 (a), 5.5 (b) and 6.0 (c) with extra nutrient (0.5 \times) added 30hrs after fermentation start up: The arrows (\downarrow) indicate the moments of extra nutrient (0.5 \times) addition; ----- dry cell weight (DCW); ---- glucose; (■) butanol; (●) acetone; (◆) ethanol; (□) butyric acid; (○) acetic acid.

로 전환시키므로 유기산에 의한 독성을 감소시킬 수 있음을 확인하였다(1).

본 실험결과 발효 초기에 세포 성장에 의해 유기산이 증가하다가 세포생장이 거의 완료되었을 때 유기산이 급격히 감소하였다. 이것은 발효 초기에는 대사과정이 ATP를 생산해 내는 유기산 생성 쪽으로 진행되다가 세포의 생장이 거의 완료되어 정지기로 접어들면서 ATP가 상대적으로 덜 생산되는 용매 생성 쪽으로 전환되기 때문으로 보인다(10).

pH control된 상태에서의 회분식 발효

포도당의 농도가 발효에 미치는 영향에 관한 먼저 실험에서 초기 포도당 농도 60 g/L에 추가로 영양소를 배양중 주입하는 것이 가장 좋은 부탄올 생산성을 나타냈다. 그러나 이 때 배지의 pH는 control되지 않았기 때문에 발효가 진행됨에 따라 낮아졌다. 그런데 배지의 pH는 균주가 유기산을 생성할 것인지 용매를 생성할 것인지를 결정하는 주요인자이므로 용매의 생산을 극대화하기 위한 적정 pH를 결정하는 것이 중요하다(12, 13).

부탄올 생성에 대한 배지 pH의 영향을 알아보기 위하여 초기 포도당 60 g/L에 추가로 영양소를 주입하는 조건에서 배지 pH를 5.0, 5.5 및 6.0에 각각 고정하여 부탄올 발효를 수행한 결과 pH 5.5에서 가장 부탄올 생산성이 높기 때문에 (0.216 g/L·h) pH 5.5가 발효의 최적 pH 조건이었다 (Table 2).

pH를 5.0으로 조절했을 때 포도당 소모에 대한 부탄올 수율은 22.43%로 pH를 조절하지 않았을 때의 수율인 20.58%보다 2.15%가 증가하였고, 총 용매수율 역시 32.20%로 1.2% 증가하였다. 유기산의 수율은 반대로 5.39%로 낮아졌다.

pH를 5.5로 조절한 상태에서는 포도당 소모량은 48.20 g/L로 pH를 5.0으로 조절한 실험에서보다 3.7 g/L만큼 증가하였다(Figure 3b). 부탄올 수율 또한 26.10%로 3.7% 증가하였다. 총 용매의 수율도 38.61%로 가장 높았다. 반면에 유기산 수율은 6.39%로서 pH 5.0의 경우보다 1% 증가하였다.

pH를 6.0으로 조절한 실험에서는 포도당 소모량이 38.41 g/L로 현저히 떨어졌고, 부탄올 수율도 21.13%로 감소하였다. 반면 유기산의 수율은 20.15%로서 상당히 높아졌는데 이것은 균주가 유기산 생성 쪽으로 대사를 전환한 것을 의미한다. 이 결과는 pH를 6.0 이상으로 조절하면 세포의 대사가 용매 생산 쪽보다는 유기산 생성 쪽으로 작용한다는 문헌의 내용과 일치한다(9). 배양 20시간이후에 부티르산의 증가와 부탄올의 감소는 서로 반대의 경향을 보였는데 이는 부티르산

Table 2. Effect of pH on fermentation characteristics in batch culture with pH control.

pH	5.0	5.5	6.0
Glucose consumption (g/L)	44.50	48.20	38.41
Butanol(g/L)	9.98	12.59	8.12
Acetone(g/L)	3.55	4.98	2.45
Ethanol(g/L)	0.81	1.04	1.25
Acetic acid(g/L)	2.35	3.37	1.52
Butyric acid(g/L)	2.83	3.44	7.54
Butanol yield(%)	22.43	26.10	21.13
Solvent yield(%)	32.20	38.61	30.77
Acid yield(%)	5.39	6.39	20.15
Total yield(%)	37.59	45.01	50.92
Butanol productivity (g/L·h)	0.154	0.216	0.103

* Glucose concentration was 60 g/L and extra nutrient was added 30hrs after fermentation start up.

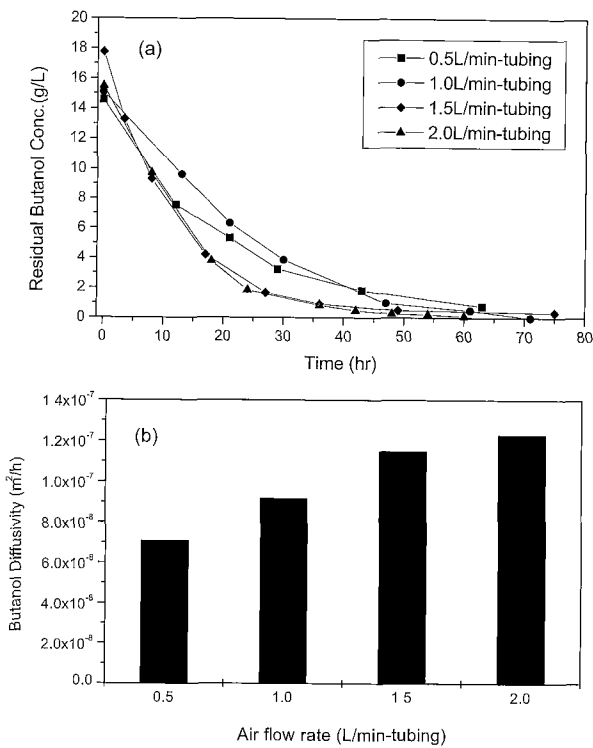


Figure 4. Profiles of butanol concentration vs time (a) and diffusivity vs air flow rate (b) during pervaporation with make-up solution at different air flow rates.

과 부탄올이 상호 recycle되었기 때문으로 사료된다 (Figure 3c).

부탄올 추출 발효를 위한 투과증발시스템 set up

회분식 발효에서는 발효시작한지 70시간 정도되면 부탄올의 농축으로 인하여 균주의 활성이 급격히 저하되었다. 따라서 균주의 활성을 유지시키고 부탄올을 연속적으로 생산하기 위해 투과증발시스템을 제작하였다(Figure 1). 투과증발 시스템에 이용된 막 소재로서 문헌에 보고된 것으로는 poly(methoxysilane), poly-tetrafluoroethylene (PTFE)(5), silicone rubber(11)등이 있는데 이 중에서 기존에 상업화 되어있는 silicone 튜빙을 본 실험에서 사용하였다.

투과증발시스템을 이용해서 발효조 내의 부탄올을 효율적으로 분리해내기 위해서는 실리콘 튜빙내로 흐르는 공기의 최적 흐름속도를 결정해야 한다. 이를 위하여 실제 발효에 의해 만들어지는 생성물의 농도와 유사한 make-up 용액을 만들었다. 그리고 공기흐름속도를 변화시켜가면서 공기흐름속도가 용액제거에 미치는 영향을 연구하였다. 공기흐름속도는 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 L/min-tubing으로 변화시켰으며 각 속도에 대한 용액내의 부탄올의 농도 변화를 시간에 따라 분석하여 확산계수를 구하였다.

각 공기흐름속도에 대한 농도의 변화를 살펴보면 공기흐름속도가 증가할수록 부탄올의 제거율도 증가하였다 (Figure 4a).공기흐름속도가 0.5 L/min-tubing일 때 부탄올은 초기농도 14.57 g/L에서 약 25시간 경과 후 5.01 g/L로 감소하였고, 60시간 후 제거율이 65.61% 였다. 공기흐름속도가 1.0 L/min-tubing로 증가되었을 때 부탄올은 초기농도 15.9 g/L에서 25시간 경과 후 4.10 g/L로 감소하였고, 제거율은

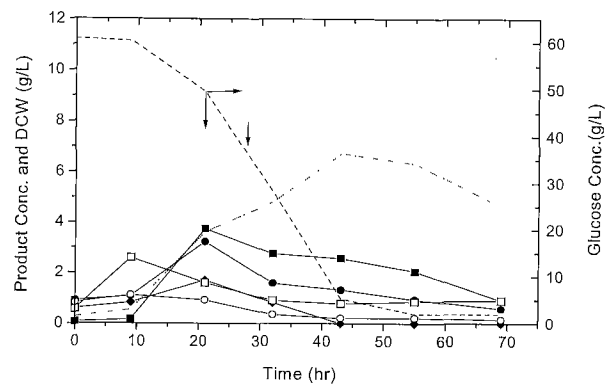


Figure 5. Profiles of pH, cell growth, glucose and production concentrations during pervaporation in batch culture. The arrow(↓) indicates the moment of extra nutrient (0.5×) addition; ---- dry cell weight (DCW); -.-.- glucose; (■) butanol; (●) acetone; (◆) ethanol; (□) butyric acid; (○) acetic acid.

74.21%였다. 이 때 부탄올 농도 변화의 형태는 0.5 L/min-tubing일 때와 유사하였다. 공기흐름속도가 1.5 L/min-tubing로 더욱 증가 되었을 때 부탄올은 초기농도 17.7 g/L에서 25시간 경과 후 2.09 g/L로 감소하여 제거율이 88.19% 이었다. 마지막으로 공기흐름속도가 2.0 L/min-tubing일 때 부탄올은 초기농도는 15.48 g/L에서 25시간 경과 후 1.65 g/L로 감소하였으며 제거율은 89.34%로 가장 높은 값을 나타내었다.

이상의 부탄올 농도변화를 이용하여 계산된 확산계수가 공기흐름속도 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 L/min-tubing에 대하여 각각 0.71×10^{-7} , 0.918×10^{-7} , 1.150×10^{-7} 및 1.230×10^{-7} m²/h 이었다(Figure 4b). 이는 공기흐름속도가 증가할수록 부탄올 제거능력이 증가하는 것을 말한다. 이것은 유속이 증가하면 그만큼 확산계수가 커지기 때문이며 Fick의 법칙에 의해 설명할 수 있다 (11). 그러나 유속의 증가에 따라 계속해서 제거율이 증가하는 것은 아니다. 공기흐름속도가 1.5와 2.0 L/min-tubing사이의 확산계수의 증가량은 6.5%에 불과하며 이는 1.0과 1.5 L/min-tubing사이의 증가량인 20% 보다 현저히 작다. 이것은 투과증발막이 갖는 고유의 물질전달의 한계 때문이다. 따라서 공기흐름속도를 2.0 L/min-tubing이상으로 하더라도 확산계수는 더 이상 크게 증가하지 않을 것으로 판단되어 2.0 L/min-tubing을 공기흐름속도로 선택하였다.

이 실험 결과 투과증발에 의해 발효의 주요 생성물질인 부탄올이 발효조로부터 효과적으로 제거될 수 있음을 확인하였다.

투과증발시스템을 이용한 부탄올 추출 회분식발효(Batch fermentation)

투과증발시스템을 이용한 회분식발효는 포도당 초기 농도를 60 g/L으로 하고, 변형된-YEM을 1배(1x)를 가하여 수행하였다. 이 실험에서 투과증발을 하지 않고 수행한 회분식 발효에서 최적으로 결정된 pH 5.5로 조절하였고, 공기흐름속도는 2.0 L/min-tubing로 조절하고 배양을 시작한지 24시간 후부터 펌프를 이용해서 공기를 흘려보냈다. 28시간이 경과하여 추가로 변형된-YEM 배지 0.5배(0.5 x)를 가하였다. 투과증발시스템을 이용한 부탄올 회분식 발효의 결과는 Figure 5에 나타내었다. 부탄올 농도는 21시간후 최고치인 3.74 g/L

이 되었고 그후 sweep air에 의해 막을 통해 투과되어 제거되면서 줄어드는 경향을 보여 70시간 후에는 0.90 g/L를 유지하였다. 아세트산의 경우 발효시작 21시간후에 3.22 g/L를 나타내었고 70시간후에는 0.57 g/L였다. 에탄올의 경우도 21시간에 0.83 g/L였으나 70시간에서의 농도는 0에 가까웠다. 유기산의 경우 아세트산은 9시간후 최고 1.11 g/L에서 70시간 후에는 0.15 g/L으로 감소하였다. 부티르산의 경우 9시간후 2.57 g/L에서 70시간후에는 0.9 g/L으로 감소하였다(Figure 5). 부티르산이나 아세트산은 부탄올이나 아세톤에 비하여 막을 통해 효율적으로 제거되지 않았다. 그러나 배양기내에 축적되지 않은 것은 용매로 전환되었기 때문으로 보인다. 포도당 소모량은 58.56 g/L로 처음에 투입된 포도당이 거의 대부분이 소모되었는데 이것은 투과증발막을 통해 부탄올이 제거됨으로써 그만큼 균주에 대한 독성이 줄어 발효가 계속 진행되었음을 나타낸다. 이것은 투과증발이 없는 경우 (Figure 2-(d)) 35 g/L 이상의 포도당이 소모되지 않고 남은 것과 대조된다. 투과증발을 이용한 회분식 발효의 포도당 소모속도는 1.07 g/L · h 이었다.

투과증발 모듈을 이용한 부탄올 추출 유가배양 (Fed-batch fermentation)

투과증발 모듈을 설치한 상태에서 연속배양의 가능성을 알아보기 위해 유가배양을 수행되었다. 배지의 초기 조성은 포도당 60 g/L에 변형된-YEM 1배(1 x)로부터 시작되었다. 발효조내의 pH는 5.5로 control하였다. 배지의 포도당 농도를 40~60 g/L로 유지하기 위해서 배양 중에 포도당과 영양소의 혼합액을 주입하였다. 총 4회에 걸쳐 500 mL의 포도당과 영양소의 혼합액을 주입하였는데, 각각 140 g의 포도당이 포함되어 있었고 주입시간은 발효시작후 33, 45, 58 및 75 시간이었다(Figure 6a). 배양 중에 주입된 포도당의 총량은 560 g 이었고, 변형된-YEM배지는 초기 농도의 3배가 더 추가되었다. 포도당 소모속도는 1.06 g/L · h 이었다.

유가배양시 세포생장은 초기 14시간까지는 지연기였고 15 시간에서 32시간 구간에서는 직선적으로 증가하였다. 39시간 후에 6.43 g/L의 세포건조중량을 나타내었는데 이것은 투과증발을 이용한 회분식 발효 때와 비슷한 양이었다. 하지만 추가로 포도당과 YEM배지를 주입한 후에는 세포건조중량이 6.4 g/L에서 다소 등락을 거듭하는 경향을 보이다가 80시간 이후에는 두드러지게 감소하였다(Figure 6a).

부탄올은 투과증발막을 통해 효율적으로 제거되었다. 발효 개시 33시간후 최고 농도인 3.22 g/L이었으나 그 이후에 계속 감소하여 90시간부터는 0에 접근하였다(Figure 6b).

유기산의 경우 투과증발막을 통해 효율적으로 제거되지 않았다. 아세트산은 20시간 정도에서 아세톤으로 recycle됨으로써 그 이후에는 배지중에 존재하지 않았고, 부티르산은 20시간까지 부탄올로 전환되어 급격히 줄어들었으나 다시 약간씩 증가하여 0.98 g/L에 도달하였다(Figure 6c). 결과적으로 투과증발시스템을 이용한 유가배양에서도 유기산의 축적은 미미했고, 부탄올은 효율적으로 제거되었으므로 *C. acetobutylicum* B18을 이용해 투과증발을 이용한 연속공정의 가능성을 확인하였다.

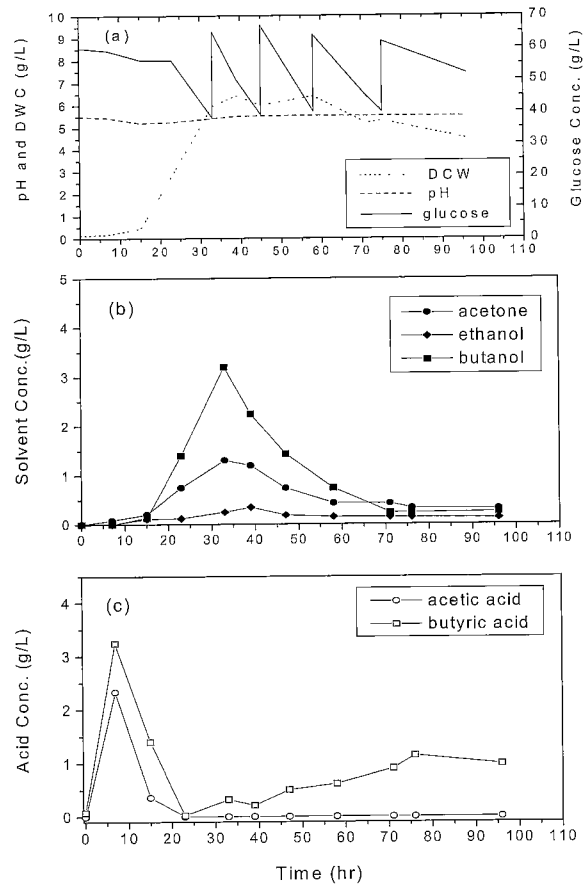


Figure 6. Profiles of pH, cell growth, glucose and product concentrations during pervaporative fermentation. Nutrient mixtures of glucose and other nutrients were added at 33, 45, 58 and 75 hrs after fermentation start up (The vertical lines in (a)). DCW means dry cell weight (g/L)

부탄올 생산성 및 포도당 소모속도 비교

투과증발을 하지 않은 회분식 발효실험에서의 부탄올 생산성을 비교해 볼 때, 초기 포도당 농도 60 g/L 에 YEM 0.5 x 를 추가한 경우 pH를 조절하지 않았을 때는 0.112 g/L · h 이었으나 (Table 1) pH를 5.5에 control하였을 때는 그 보다 1.9배 증가한 0.216 g/L · h 이었다(Table 2). 투과증발을 이용한 회분식 및 유가식 추출발효 실험에서 포도당 소모 속도는 각각 1.07 및 1.06 g/L · h 이었다. 만일 투과증발에 의해 부탄올 수율이 (0.261) 변하지 않는다고 가정하면 이것은 부탄올 생산속도 0.279 및 0.277 g/L · h 에 해당한다. 투과증발 없이 pH를 5.5 로 조절한 회분식 발효에서 보다 투과증발 시스템을 이용하였을 때 부탄올 생산성이 1.3배 향상되었다. 그런데 소모된 포도당과 YEM 배지의 비율을 보면 회분식 발효는 40 g:1 x 이었고 유가식 배양은 152 g: 1 x 로서 유가식 배양에서 훨씬 YEM 배지 사용량을 감소시킬 수 있었다.

요 약

본 연구는 에탄올보다 물리적, 화학적 특성이 뛰어난 부탄올을 투과증발을 이용한 추출 발효를 이용해 효율적으로 생산하기 위한 조건을 찾아내었다. *Clostridium acetobutylicum*

B18 균주를 이용한 부탄올 회분식 발효 결과 최적 포도당 농도는 60 g/L이며 배양 시작 30시간 후에 탄소원 이외의 영양소를 추가로 주입했을 때 부탄올 생산성이 0.112 g/L·h 으로 가장 높았다. 그리고 pH가 조절된 실험에서는 pH가 5.5 에서 부탄올 생산성이 0.216 g/L·h 로 가장 높았다. 투과증발시스템을 적용하기 위한 공기흐름속도는 2.0 L/min-tubing 일 때가 가장 부탄올 투과 효율이 높았다. 투과증발시스템을 이용한 회분식 및 유가식발효에서 포도당 소모 속도가 1.3배 증가하였다. 유가식 배양에서는 영양분의 공급으로 장시간 배양이 가능하였고, 결과적으로 포도당소모를 촉진시킬 수 있었다. 생성되는 부탄올은 투과증발시스템에 의해 제거해 줌으로써 균주의 활성을 장시간 유지하여 연속적인 부탄올 생산 가능성을 확인 할 수 있었다.

감 사

본 연구는 과학기술부 '99 중점 국가연구개발사업비 (97-N1-01-03-A-03) 및 한국과학재단 지원 핵심전문연구비 (981-1105-019-2)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사합니다.

REFERENCES

- Park, C.-H., Q. Geng, and P. Rogers (1993), Characteristics of Butanol Fermentation by a Low Acid Producing *Clostridium acetobutylicum* B18, *Appl. Microb. Biotech.*, **39**, 148-154.
- Ounine, K., H. Petidemange, G. Raval, and R. Gay (1985), Regulation and Butanol Inhibition of D-xylose and D-Glucose Uptake in *Clostridium acetobutylicum*, *Appl. and Environ. Microbiol.*, **49**, 874-880.
- Rogers P., and N. Palossari (1987), *Clostridium acetobutylicum* mutants that produce butyraldehyde and altered quantities of solvents, *Appl. and Environ. Microbiol.*, **53**, 2761-2766.
- Park, C.-H. (1996), Pervaporative Butanol Fermentation Using a New Bacterial Strain, *Biotech Bioprocess Eng.*, **1**, 1-8.
- Fleming H. L., and C. S. Slater (1992), Pervaporation-applications and economics, *Membrane Handbook*, W. S. W. Ho, and K. K. Sirkar, 132-159, Van Nostrand Reinhold. New York, NY.
- O'Brien, R. W., and J. G. Morris (1971), Oxygen and Growth and Metabolism of *Clostridium acetobutylicum*, *J. Gen. Microbiol.*, **68**, 307-318.
- Miller, G. L. (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.
- Monot, F., and J. M. Engasser (1983), Production of Acetone and Butanol by Batch and Continuous Culture of *C. acetobutylicum* under Nitrogen Limitation, *Biotechnol. Lett.*, **5**, 213-218.
- Booth, I. R. (1985), Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria, *Microbiol. Reviews*, **49**, 359-378.
- Gottschal, G., and H. Bahl (1981), Feasible Improvements of the Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum*. in Trends in Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals, (Basic Life Science 18) Hollaender, A., 463-471, Plenum Press, N.Y.
- Geng, Q., and C.-H. Park (1994), Pervaporative Butanol Fermentation by *Clostridium acetobutylicum* B18, *Biotech. and Bioeng.*, **43**, 978-986.
- Nishio, N., H. Biebl, and M. Meiners (1983), Effect of pH on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a minimum medium, *J. Ferment. Technol.*, **61**, 101-104.
- Geng, Q., and C.-H. Park (1993), Controlled-pH Batch Butanol-Acetone Fermentation by a Low Acid Production *Clostridium acetobutylicum* B18, *Biotech. Lett.*, **15**, 421-426.