

## 글리세롤을 함유한 유지산업 부산물의 1,3-propanediol 발효

김 승 환·김 세 정·<sup>1</sup>박 건 규·이 상 기·\*김 철 호  
한국생명공학연구원 생물공정연구실, <sup>1</sup>(주) 무궁화  
(접수 : 2002. 4. 13., 게재승인 : 2002. 6. 21.)

### 1,3-Propanediol Fermentation using the by-Products from Fat Industry

Seung-Hwan Kim, Se-Jeong Kim, Kun-Gyu Park<sup>1</sup>, Sang-Ki Rhee, and Chul-Ho Kim\*  
Biomolecular Process Engineering Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB),  
Yusong, Daejeon 305-333, Korea.

<sup>1</sup>Mukunghwa NUVO R&D Institute, 533 Gongneung Dong, Nowon-ku, Seoul 139-240, Korea.

(Received : 2002. 4. 13., Accepted : 2002. 6. 21.)

1,3-Propanediol as a bifunctional organic compound could be used in polymerization reactions producing polyesters and polyurethanes. Byproduct containing high concentration of glycerol from fat industry was used to produce 1,3-propanediol in lower production cost as well as waste treatment. In this study, various attempts were made to increase 1,3-propanediol production under different conditions using *Klebsiella pneumoniae* ATCC 15380. The conversion yield and byproduct formation were influenced significantly by the fermentation pH and temperature. The optimal glycerol and nitrogen concentration for 1,3-propanediol production were found to be 25 g/L and 1%(w/v), respectively. The formation of 1,3-propanediol was optimal at pH 6.0 and temperature 35°C. 1,3-Propanediol production from byproduct from 2.5% glycerol was lower than that of 2.5% commercial glycerol and amounted only to 9.84 g/L from byproduct, while to 12.13 g/L from commercial glycerol.

**Key Words :** 1,3-propanediol, glycerol, *Klebsiella*, wastewater

#### 서 론

글리세롤은 생물학적 방법에 의하여 dihydroxyacetone, organic acid와 1,3-propanediol(1,3-PD) 등과 같은 유용한 물질로 전환할 수 있으며(1-4), 이 중에서 특히 1,3-PD는 고분자와 다른 유기화학물의 합성에 이용할 수 있는 중요한 원료물질로 근래에 와서는 이를 단량체로 이용한 새로운 polyester를 상업화하기 위한 산업적 노력이 계속되고 있다(5). 1,3-PD를 단량체로 사용하여 만든 플라스틱 중합체는 1,2-propanediol, butanediol 또는 ethylene glycol로 만든 제품과 비교하여 우수한 광학 안정성을 가지고 있다. 이 외에도 1,3-PD 중합체는 polyglycol-type의 윤활제와 용매로도 사용할 수 있다(6-7). 그리고 세계 최대의 화학회사인 미국의 듀폰사에서는 1,3-PD와 phthalate를 이용하여 PTT(polytrimethylene terephthalate)을 계획하고 있으며 이 경우 1,3-PD는 포도당으로부터 생물학적

방법을 만들어 현재 사용 중인 PET(polyethylene terephthalate)를 대체할 계획을 세우고 있다(8). 1,3-PD는 호기적 조건에서는 생성되지 않으며 혐기적 상태에서만 대사적으로 생성되며, *Clostridium sp.*(12-13), *Citrobacter*, *Klebsiella* (14-16) 및 *Lactobacillus*(17)와 같은 혐기성 및 통성 혐기성세균에 의해서 생성된다.

지금까지 보고된 1,3-PD생산 연구의 대부분은 순수글리세롤을 이용한 연구이다. 유지의 분해공정 중에 생성되는 저순도의 글리세롤은 정제, 농축, 증류, 탈색 및 탈취 공정을 거쳐 고순도 글리세롤로 전환시켜 산업용, 의약품 및 식품첨가물에 이용하고 있으며, 글리세롤 정제 후 최종 잔류물에 여전히 남아있는 고농도의 글리세롤이 포함된 폐글리세롤은 폐기물로 취급되고 있는 실정으로 아직 이러한 폐기물을 이용한 1,3-PD 생산에 관한 연구는 이루어지고 있지 않다. 이러한 폐글리세롤의 총 발생량은 통계적으로 산출된 수치는 없으나, 통상적으로 정제 글리세롤 대비 10%의 폐글리세롤이 발생하는 것으로 추정되고 있다. 국내에서 생산되는 정제 글리세롤의 생산량을 근거로 산출할 때 2000년 기준으로 정제 글리세롤의 총 생산량은 7,534톤으로, 폐글리세롤은 연간 약 754톤 정도가 발생하는 것으로 추정되고 있으며(18), 매년 발생하는 비누세제산업에서 발생하는 글리세롤 함유 폐액은 전

\* Corresponding Author : Biomolecular Process Engineering Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB), Yusong, Daejeon 305-333, Korea.  
Tel : +82-42-860-4452, Fax : +82-42-860-4594  
E-mail : kim3641@mail.krribb.re.kr

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

Concentration (%)	Glycerol consumed (g/L)	Product concentration (g/L)				YPD/S (g/g,%)
		1,3-propanediol	2,3-butanediol	Acetic acid	Ethanol	
Pure (2.5%)	23.6	12.13	1.79	1.81	0.50	51.0
Waste (2.5%)	18.5	9.84	1.77	1.56	0.09	52.1
Pure (5.0%)	41.5	17.83	3.39	2.08	1.59	42.9
Waste (5.0%)	30.4	12.10	2.69	1.65	1.41	39.8

The experiments were performed at pH 6.0, 35°C and 150 rpm. YPD/S(g/g); yield, g 1,3-propanediol formed per g of glycerol consumed.

량 폐기되어 2차 오염을 유발하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이러한 폐글리세롤을 활용하여 1,3-PD(PD)와 같은 유용물질을 생산하기 위한 것이다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 실험에 사용된 균주는 통성 혐기성 세균인 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 15380 과 *Citrobacter freundii* ATCC 8455 및 하수천에서 채취한 토양시료로부터 분리하였다. 실험에 사용한 균주는 글리세롤을 포함한 액체 배지에서 24시간 배양 후 한천 배지에 도포하여 30°C에서 24시간 배양시킨 후 4°C 냉장고에 보관하였다. 이러한 계대 배양은 20일 간격으로 수행하였다(14).

### 배지조성

유지공장의 증류 탐을 거친 유지 폐액은 고농도의 글리세롤, 지질 및 여러 가지 복합물을 함유하고 있으며, 폐액 중 글리세롤 농도는 250 g/L~500 g/L으로 일정하지 않으며, 색깔이 검고, 다량의 현탁물이 포함 되어있다. 따라서 폐액을 실험에 이용하기 위하여 적당한 글리세롤농도가 되도록 증류수로 희석한 다음 저온실(4°C)에서 12시간 한 후 침전물을 제거하였다. 침전물이 제거된 상등액을 실험용 기본 폐액 배지로 이용하였으며 필요에 따라 질소원으로 corn steep powder (CSP)를 첨가하였다.

균주의 종 배양 배지와 발효배지의 조성은 증류수 1리터에 글리세롤 20 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.4 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.3 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.02 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5 mg, Yeast extract 1.0 g, 미량원소 20 mL [ZnCl<sub>2</sub> 3.42 mg/L, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 27 mg/L, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10 mg/L, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.85 mg/L, CoCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.38 mg/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.31 mg/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 21.75 mg/L] 로 하였으며, 글리세롤 농도는 필요에 따라 변화 시켰다.

### 배양방법

플라스틱 배양은 500 mL screw-capped bottle에 배지를 100 mL을 넣은 후 혐기적 상태로 만들어 주기 위해 플라스틱 내부공기를 질소로 치환한 뒤 멸균하였으며, 종 배양을 접종 할 때에도 질소가스를 삽입하면서 접종하였다.

5 L 발효조(model BIOFLO III, NBS, USA)에 3 L 배양액을 넣고 121°C 15 psi에서 25분간 멸균한 후, 멸균 전 배지내에 녹아 있는 산소를 제거하기 위해 0.5 vvm의 질소를 air filter

5 L 발효조의 종 배양은 500 mL screw-capped bottle에 150 mL을 넣은 후 위와 같은 조건으로 준비한 후 30°C에서 20시간 배양하였으며, 접종량은 발효조 배양액의 5 %(v/v)로 접종하였다. 배지 내의 수소이온 농도는 pH controller와 5N NaOH, 2.5N HCl을 사용하여 조절하였다. 소포제로는 antifoam A (Sigma, USA)를 사용하였다.

### 분석방법

배양 후 생성된 발효 산물은 15,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액을 회수하여 0.45 μm필터로 여과하여 측정하였다. 에탄올과 아세트산 분석은 HPLC(Aminex HPX-87H 300×7.8 mm column, Bio-Rad)를 이용하였으며, 이동상은 0.008 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 mL/min)로 40°C에서 실시하였으며 refractive index(RI)을 사용하여 검출하였다.

1,3-PD 및 2,3-butanediol 농도는 Gas Chromatography(wide bore column HP17(cross-linked), 10m length, Hewlett Packard model HP5890)를 사용하여 분석하였으며, 검출기는 FID (flame ionization detector)를 사용하였고, 수소와 압축공기를 각각 20 psi와 40 psi로 공급하여 자동 정량 분석기(D520B, computing integrator)에 연결하여 정량 하였다. 오븐온도는 초기 40°C에서 2분간 유지한 후 10°C/min씩 최종 130°C까지 증가 시켜 분석하였다. 주입구 온도는 200°C, 검출기 온도는 230°C를 유지하였으며 carrier gas는 질소를 사용하였고, 내부 표준 용액은 1% 1,4-butanediol을 사용하였다. 본 실험에서 사용된 글리세롤 정량은 Boehringer(Mannheim, FRG)사의 글리세롤 정량 키트를 사용하여 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### 폐글리세롤과 순수 글리세롤의 1,3-PD 생산 비교

글리세롤은 glucose에 비해 상대적으로 가격이 높기 때문에 글리세롤 대용으로 사용할 기질을 찾기 위한 연구가 계속되고 있다. 최근에는 유전학적 방법을 이용하여 당류로부터 직접 발효하는 방법 같은 싼 기질을 이용하기 위한 노력이 계속되고 있다(11). 그러므로 유지산업 부산물로 버려지는 글리세롤 함유 폐액을 1,3-PD의 생산용 기질로 이용할 수 있는지를 검토하기 위하여 1,3-PD 생산균주로 알려진 *K. pneumoniae* 를 사용하여 순수 글리세롤 생산성을 조사하였다. 폐액의 글리세롤 최종 농도를 각각 25 g/L, 50 g/L가 되도록 조정하였으며, 비교 실험으로 순수 글리세롤의 최종농도를 25 g/L, 50 g/L로 조정하였다. 그 결과 table 1에서와 같이 글리세롤의 최종농도가 2.5%일 때 23.6 g/L의 순수 글리세롤이 소비

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

Strains	Glycerol consumed (g/L)	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 3.** Production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *K. pneumoniae* ATCC 15380 using different dilution of wastewater

Medium (dilution folds)	Glycerol consumed (g/L)	Time (h)	Products formed (g/L)		Product recovery (%)	
			1,3-propanediol	2,3-butanediol	Propanediol	Butanediol
10	14.9	24	4.21	2.09	28.25	14.03
10 + 0.5 % CSP	27.0	24	11.89	4.62	44.03	17.11
7.5	10.6	24	6.99	3.60	33.96	15.28
7.5 + 0.5 % CSP	36.5	24	14.25	6.72	39.04	18.4

의 글리세롤을 소비하여 9.84 g/L의 1,3-PD을 생산하였다. 그리고 부산물의 생성 경향을 보면 2,3-butanediol 및 acetic acid의 생성은 비슷하였지만 에탄올의 생성에서는 많은 차이를 나타내었으며 폐액의 경우 순수 글리세롤을 기질로 사용했을 때 보다 상대적으로 적은 양의 에탄올이 생산되었다. 이는 폐액 속에 함유되어 있는 여러 복합성분 때문인 것으로 추측되었다. 기질농도를 5.0%로 조정하였을 때의 수율은 2.5%로 기질농도를 조절했을 때 보다 10%가량 낮았으며 이는 1,3-PD로 전환이 기질 농도에 영향을 받으며, 폐글리세롤 함유 배지에서 글리세롤 소비량과 1,3-PD의 전환 수율이 더 낮아지는 것은 폐글리세롤의 농도가 증가하면서 글리세롤을 제외한 다른 성분의 농도도 같이 증가하게 되므로 이 성분들로 인하여 균주의 글리세롤 이용이 저해되기 때문으로 추정된다. 그러나 글리세롤 농도를 25 g/L 정도로 폐액을 희석한 배지는 순수 글리세롤 배지와 비교하여 차이가 크게 나타나지 않기 때문에 산업적으로 글리세롤이 포함되어있는 유지부산물 1,3-PD의 생산용 기질로 이용할 수 있을 것으로 사료되었다.

### 균주에 따른 1,3-PD 생산

1,3-PD 생산 균주를 선택하기 위하여 폐액을 10배 희석한 후, 질소원으로 0.5% corn steep powder(CSP)를 첨가한 배지를 상기의 혐기적 배양 방법에 따라 멸균한 후 ATCC에서 분양 받은 2종류의 균주와 토양으로부터 분리한 균주 1종을 각각 접종하여 1,3-PD 생성 능력을 조사하였다. Table 2의 결과에 따르면 *K. pneumoniae*는 배양 24시간 후 26.7 g/L의 글리세롤을 소모하여 9.29 g/L의 1,3-PD를 생성하였으며, *C. freundii*의 경우는 3.1 g/L의 글리세롤을 이용하여 1.38 g/L의 1,3-PD을 생성하였다. 그러나 본 연구실에서 분리한 균주는 11.0 g/L의 글리세롤을 소모하였으나 1,3-PD는 전혀 생성하지 못하였다. 1,3-PD로의 전환율은 *C. freundii*가 44.5%로 *K. pneumoniae*의 34.79%보다 높았으나, 1,3-PD의 생산량은 *K. pneumoniae*가 더 좋은 결과를 나타내었다. Homann 등에(10) 의하면 *K. pneumoniae*의 경우 1,3-PD의 수율은 *Citrobacter* sp. 보다 낮으나 1,3-PD을 짧은 시간에 생산하기 때문에 생산성은 더 높다고 보고한 결과와 일치하였다. 따라서 본 실험에서는 *K. pneumoniae*을 1,3-PD 생산에 가장 적합한 균주로 선택하였다.

### 폐액의 농도에 따른 1,3-PD 생산

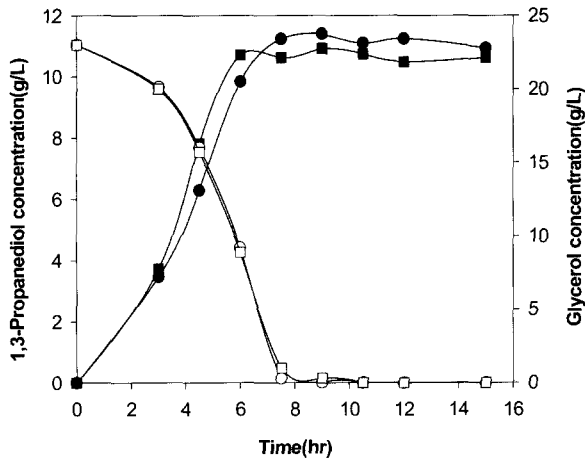
본 연구에 사용한 기질은 리터 당 250-300 g의 글리세롤을 함유할 뿐만 아니라 글리세롤의 정제, 농축과정에서 생성된 여러 혼합물이 섞여 있을 것으로 추측된다. 따라서 *K. pneumoniae*를 이용하여 고농도의 글리세롤을 함유한 폐액을 발효에 사용할 경우 균주 성장 및 1,3-PD의 생산성이 높은 배지 조건을 찾기 위해서 폐액을 단계적으로 희석하였고 질소원으로 corn steep powder(CSP)을 0.5%씩 첨가하여 1,3-PD의 생성량을 조사하였다. Table 3과 같이 배양 24시간 후, 10배 희석한 배양액에서 CSP를 첨가하지 않은 배양액은 CSP를 첨가한 배양액에 비해 글리세롤 소모량이 12 g/L 적었으며, 7.5배 희석하여 CSP를 첨가한 배양액은 CSP를 첨가하지 않은 배양액에 비하여 글리세롤을 24 g/L 더 소비하였다. CSP를 첨가한 배양액 중 7.5배 희석한 배양액은 36.5 g/L의 글리세롤을 소모하여 14.25 g/L의 1,3-PD을 생성한 반면 10배 희석한 배양액은 27.0 g/L의 글리세롤을 소모하여 11.89 g/L의 1,3-PD을 생성하였다. 위와 같은 결과는 CSP가 균주의 글리세롤대사에 필요한 질소원과 무기질의 공급원이 된 것을 알 수 있었다. 1,3-PD의 생성량에서 보면 7.5배 희석하여 CSP를 첨가한 배양액이 높지만 1,3-PD로 전환율을 보면 10배 희석한 것이 5% 더 높기 때문에 이후의 실험은 폐액을 10배 희석하여 최종 글리세롤농도가 25 g/L이 되도록 조정하여 실험에 사용하였다.

질소원으로 CSP는 다양한 무기질과 질소원을 함유할 뿐만 아니라 가격이 저렴하기 때문에 본 실험에 사용하였다. 폐액 자체에 함유된 질소원의 농도 및 종류를 확인할 수 없었기 때문에 다양한 농도의 CSP를 첨가하여 1,3-PD 생산에 대한 실험을 실시하였으며 그 결과는 table 4에 나타내었다. 글리세롤을 함유한 폐액은 10배 희석한 후 CSP를 0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%와 2.0%씩 각각 첨가하였다. 그 결과 CSP를 첨가하지 않은 경우 31.1% 정도의 전환율을 보인 반면, CSP의 농도가 증가할수록 1,3-PD로의 전환율도 점차 증가함을 알 수 있었다. Table 3에서와 같이 첨가한 CSP 농도가 1%일 때 1,3-PD의 전환율은 45.44%로 가장 높았으며, CSP 농도가 1% 이상일 때에는 더 이상 증가하지 않았다.

*K. pneumoniae* 균주의 경우 글리세롤을 이용하여 1,3-PD 외의 부산물로 2,3-butanediol, ethanol, acetic acid, lactic acid, formic acid와 이산화탄소 등을 동시에 생성한다고 알려져 있

**Table 4.** Product of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *K. pneumoniae* ATCC 15380 with different concentration of nitrogen source using diluted wastewater

Nitrogen concentration (%)	Time (h)	Glycerol consumed (g/L)	Products formed (g/L)		Product recovery (%)	
			1,3-propanediol	2,3-butanediol	Propanediol	Butanediol
0	24	13.7	4.26	2.37	31.10	17.29
0.5	24	24.3	10.55	4.16	43.42	17.12
1.0	24	25.0	11.36	4.43	45.44	17.72
1.5	24	26.0	11.60	4.29	44.62	16.50
2.0	24	25.9	11.36	4.69	43.86	18.11

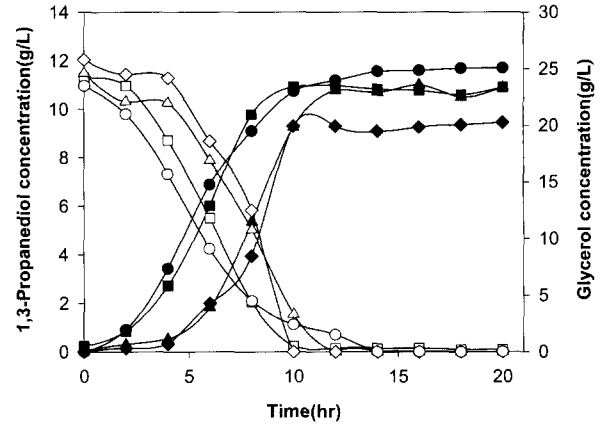


**Figure 1.** Effect of  $K_2HPO_4$  (1 g/L) and  $KH_2PO_4$  (0.5 g/L) on production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol from diluted wastewater during an anaerobic batch fermentation by *K. pneumoniae* ATCC 15380. ●, No; ■, Added

다. 이는 acetic acid 등의 부산물에 의해 배지의 pH가 급격히 강하하여 균주 자신의 생리적 활성에 좋지 않은 영향을 끼치게 되어 결국은 세포의 성장이 억제되는 것으로 여겨진다. 1,3-PD 생산용 배지를 보면  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ 와 같은 인산염을 첨가하여 pH강하를 완화시켰음을 알 수 있다(3). 폐액 배지에 인산염을 첨가하여 1,3-PD의 생산성을 검토하였으며, 그 결과 Figure 1와 같이 1,3-PD 생산량은 인산염을 첨가하지 않았을 경우 11.4 g/L이었으며 첨가 시에는 10.9 g/L로 큰 차이는 나타나지 않았다. 이 결과 인산염의 첨가는 1,3-PD의 생산에 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다.

**발효조건의 최적화**

글리세롤이 1,3-PD로의 전환 시에는 pH와 온도 변화 따라서 생성되는 생성물의 농도가 변화한다고 보고되었다(3,18, 19). 폐액의 최종 글리세롤 농도를 25 g/L로 조정하고 pH를 일정하게 유지시키면서 생성물의 농도를 조사하였다. 그 결과 Figure 2에서와 같이 배양액의 pH에 따라 1,3-PD 및 부산물로 생성되는 2,3-butanediol, acetic acid와 ethanol의 생성량이 변화했다(data not shown). 글리세롤의 소비속도는 pH 6.0 일 때 가장 빠르게 나타났으며 pH가 알카리쪽으로 갈수록 소비속도는 느려졌다. 그러나 1,3-PD의 생성속도는 pH 6.5일 때 가장 빨랐으며, pH 6.0일 때는 2,3-butanediol의 생성량이 많아졌다(data not shown). pH 변화에 따른 최종



**Figure 2.** Effect of pH on production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol from diluted wastewater during an anaerobic batch fermentation by *K. pneumoniae* ATCC 15380. ●, pH 6.0, ■, 6.5, ▲, 7.5, ◆, 8.5

때 11.6 g/L, pH 6.5일 때 10.9 g/L, pH 7.5일 때 10.7 g/L, pH 8.5일 때 9.4 g/L을 생성하였다. Biebl 등(18)의 pH 변화에 따른 연구에 의하면 pH가 낮아질수록 생성되는 1,3-PD의 양은 낮게 나타났으며 2,3-butanediol의 농도는 높게 나타났다고 보고하였다. 이것은 1,3-PD의 생산성 측면에서 보면 반대의 결과이다. 그리고 *Clostridium butyricum*을 사용하여 초기 글리세롤 농도를 50 g/L로 했을 경우 pH가 중성일 때 가장 많은 1,3-PD를 생성하였으며 시간당 생성량도 가장 높다고 보고하였다(3). 그리고 순수 글리세롤에서 pH 4.0까지 일 때 균주가 성장하고 1,3-PD이 생성된다는 보고가 있지만(19), 본 실험에서는 폐액의 pH가 6.0이하로 낮아졌을 때에는 글리세롤의 소비와 1,3-PD의 생성을 관찰할 수 없었다. 이것으로 보아 pH가 6.0이하로 낮아졌을 때 폐액 속에 포함된 다른 물질이 균주의 성장에 저해물질로 작용하는 것으로 사료된다.

*K. pneumoniae*에 의한 글리세롤의 소비 및 1,3-PD의 생산은 배양온도에 따라 달라지므로 배양온도를 28℃, 32℃, 35℃, 37℃로 다양하게 유지하였으며, 이때 생성되는 1,3-PD의 양은 Figure 3에 나타내었다. 그 결과 글리세롤의 소비속도와 1,3-PD의 생성속도는 배양온도에 의해 영향을 받으므로 나타났다. 글리세롤의 소비는 28℃에서는 12시간만에 23 g/L가 소모된 반면에 37℃에서는 배양 8시간만에 23 g/L의 글리세롤이 소모되었으며, 배양온도가 높을수록 글리세롤의 소비속도는 빨라졌다. 그리고 최종 1,3-PD의 생성량은 비슷하지만, 1,3-PD의 최고 생산량은 37℃의 경우 배양 6시간에 11.6 g/L가 생성을 하였다. 28℃는 배양 15시간에 11.6 g/L

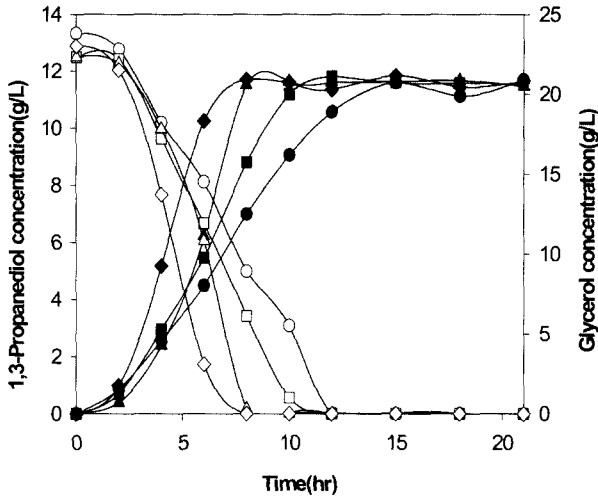


Figure 3. Effect of temperature on production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol from diluted wastewater during an anaerobic batch fermentation by *K. pneumoniae* ATCC 15380. ●; 28°C, ■; 32°C, ▲; 35°C, ◆; 37°C

생성하여 37°C에서 생성속도가 2.5배 정도 빨랐다. 이는 Gunzel 등(3)이 *C. butyricum*을 이용한 연구에서 시간당 생성량이 35°C 부근에서 가장 높다는 보고와 일치하였다.

시간별 1,3-PD 생산

대량의 폐액을 처리하여 1,3-PD 생성량을 늘이기 위해서는 배양의 scale-up이 필요하므로, 5L 발효조에서 pH 조절유무에 따라 생성되는 1,3-PD 및 여러 가지 생성물의 변화를 관찰하였다. 앞서 실험한 플라스크 배양의 결과를 바탕으로 폐액의 최종 글리세롤 농도를 25 g/L로 조정하고, CSP 농도는 1%(w/v)로 하여 30°C, 150 rpm에서 배양하였다. pH를 조절하지 않고 배양한 경우 그 결과는 Figure 4-a에 나타내었다. pH는 7.0에서 서서히 5.0으로 낮아졌으며 배양 5시간 때부터 15시간 사이에 20 g/L의 글리세롤이 모두 소비되면서 동시에

1,3-PD이 9 g/L으로 크게 증가하는 것을 알 수 있다. 또한 부산물인 2,3-butanediol과 acetic acid는 배양 8시간 때부터 증가하였으며 ethanol은 배양 4시간 후부터 생성되었다. Biebl (18) 등은 배양 시에 pH를 조절하지 않고 연속 배양하였을 경우, 배양 12시간 이후부터 ethanol과 2,3-butanediol이 증가하면서 pH가 7.3에서 5.4로 낮아진다고 보고하였으며, 1,3-PD의 생성량은 20 g/L의 글리세롤을 소모하면서 7.6 g/L의 1,3-PD 이 생산된다고 하였다. 그러나 동량의 글리세롤이 소모되어 생성된 1,3-PD의 생산량은 본 실험에서의 *K. pneumoniae*를 이용하였을 경우가 더 높은 것으로 나타났다. 그리고 pH를 2.5 N HCl과 5.0 N NaOH로 조절하면서 배양하였을 경우(Figure 4-b), Figure 4-a에서와 마찬가지로 배양 5시간부터 10시간까지 24 g/L의 글리세롤이 모두 소모되면서 11 g/L의 1,3-PD이 생성되었으며 pH를 조절하지 않은 것 보다 정지기에 도달하는 시간이 짧아진 것을 알 수가 있었다. 그러나 2,3-butanediol의 생성량은 감소한 반면 acetic acid의 양은 증가하였다. 위의 결과는 Biebl 등이(18) 보고한 것과 같이 pH를 조절하면서 배양하였을 경우 생성되는 주된 부산물은 2,3-butanediol이 아니라 acetic acid와 ethanol이 생성된다고 한 결과와 일치하였다. 이처럼 5L 발효조를 이용한 배양에서는 pH의 변화에 따라 생성물의 생성정도가 변화함을 알 수 있다.

요 약

순수 글리세롤 대신에 유지산업 부산물로서 고농도의 글리세롤이 포함된 폐액을 이용하여 1,3-PD 생산의 최적 조건을 조사하였다. 1,3-PD의 경우 혐기성 조건에서만 생성되므로 글리세롤을 1,3-PD로 전환하는 여러 미생물 중에서 절대 혐기성 균주보다 다루기 쉽고 배양하기 좋은 통성 혐기성 균주인 *Klebsiella pneumoniae*와 *Citrobacter freundii*을 비교하여 폐액의 최종 글리세롤 농도가 25 g/L일 때 1,3-PD의 수율과 균주 생육이 좋은 *Klebsiella pneumoniae*를 선택하였다. 1,3-

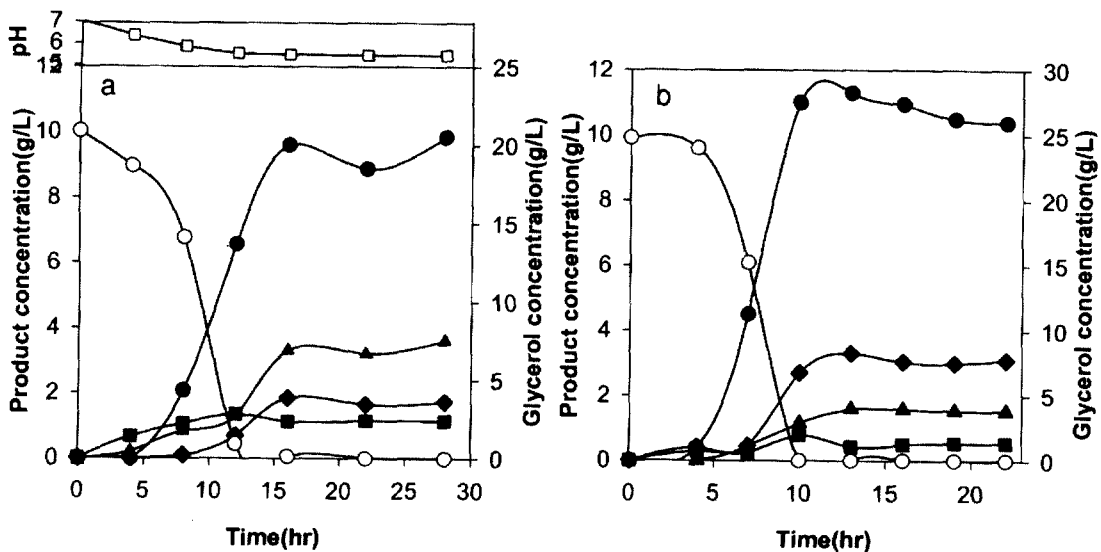


Figure 4. Comparison of fermentation production at the uncontrolled pH cultivation and the controlled pH cultivation. ○; Glycerol, ●; 1,3-Propanediol, ■; 2,3-Butanediol, ▲; Acetic acid, ◆; Ethanol

PD 생산의 최적조건을 조사한 결과 폐액의 글리세롤농도를 25 g/L으로 조정하였을 때 폐액에 포함된 다른 성분의 저해를 적게 받으면서 생산수율이 가장 높았으며, 질소원으로는 corn steep powder를 1%(w/v) 첨가하였을 때 수율이 가장 높았다. 배양액을 발효조 배양에서 pH는 6.0일 때 1,3-PD 수율이 가장 높았으며 pH가 6.0이하로 낮아졌을 때 균주가 성장하지 못하고 사멸하였다. 발효 최적온도는 35°C였으며 pH의 급격한 변화를 방지하기 위해 첨가한 인산염의 첨가는 효과가 없었다. 그리고 순수 글리세롤의 비교 실험에서 글리세롤 최종농도가 2.5%일 때 1,3-PD으로 수율을 보면 폐액은 53%, pure 글리세롤은 51%로 거의 비슷하였다. 글리세롤 최종 농도가 5.0%로 조정할 했을 때 1,3-PD 수율은 글리세롤함유 폐액 및 순수글리세롤의 기질농도를 2.5% 사용했을 때 보다 모두 낮아졌다. 산업적으로 비누 세제산업 부산물로 생성되는 글리세롤함유 폐액을 1,3-PD 생산에 사용하기 위해서 폐액의 글리세롤농도를 2.5% 조정했을 때 1,3-PD 수율이 순수 글리세롤을 사용했을 때와 비슷하게 생성됨을 알수 있었다. 앞으로 고농도 폐액에서 생육저해가 없이 1,3-PD을 생산할 수 있는 돌연변이 균주의 개발과 유가배양 및 연속 배양에서 최적 배양조건을 찾아야 할 것이다.

## REFERENCES

- Bories, A., C. Claret, and P. Soucaille (1991), Kinetic study and optimization of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*, *Proc. Biochem.* **26**, 243-248.
- Leaver, F. W., H. G. Wood, and R. Sternholm (1995), The fermentation of three carbon substrate by *Clostridium propionicum* and *priopionibacterium*, *J. Bacteriol.* **66**, 611-619.
- Gunzel, B., S. Yonsel, and W. D. Decker (1991), Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2m<sup>3</sup>. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 289-294.
- Gottschalk, G. and B. Averhoff (1990), Process for the microbiological preparation of 1,3-propanediol from glycerol, European patent application 0373 230 A1.
- Potera, C. (1997) Genencor & Dupont create "green" polyester, *Genet. Eng. News*, **17**(11, June 1), 17.
- Elm, R, J. Falbe, H. D. Hahn, and H. P. Gelbke (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.
- Witt, U., R. J. Muller, J. Augusta, H. Widdecke, and W. D. Deckwer (1994), Synthesis, properties and biodegradability of polyester based on 1,3-propanediol, *Macromol. Chem. Phys.* **195**, 793-802.
- Chang, Ho-Nam. and Jin-Ho. Seo (2001), *Biochemical engineering*, 2nd ed., p476, academybook Press, Korea.
- Biebl, H., S. Marten, H. Hippe, and W. D. Deckwer (1992), Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 592-597.
- Homann T., C. Tag, H. Biebl, W. D. Deckwer, and B. Schink (1990), Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains, *J. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 575-579.
- Laffend L. A., V. Nagarajan, and CE Nakamura (1996), Bioconversion of a fermentable carbon source to 1,3-propanediol by a single microorganism. WO 9635796 to E.I. Du Pond de Nemours and Genencor International.
- Abbad-Andaloussi, S., E. Guedon, E. Spiesser, and H. Pettidemange (1996), Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSM 5431, *Lett. Appl. Microbiol.* **22**, 311-314.
- Reimann, A., S. Abbad-Andaloussi, H. Biebl, and H. Pettidemange (1998), 1,3-Propanediol formation with product tolerant mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 in continuous culture: productivity, carbon and electron flow, *J. Appl. Microbiol.* **84**, 1125-1130.
- Thomas H., T. Carmin, B. Hanno, D. Wolf-dieter, and S. Bernhard (1990), Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citobacter* strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 121-126.
- Menzel, K., A. P. Zeng, and W. D. Deckwer (1997a), High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*, *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 82-86.
- Ahrens, K., K. Menzel, A. P. Zeng, and W. D. Deckwer (1998), Kinetic, dynamic and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture. III. Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation, *Biotechnol. Bioeng.* **59**, 544-552.
- Schutz, H. and F. Radler (1984), Anaerobic reduction of glycerol to 1,3-propanediol by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*, *Syst. Appl. Microbiol.* **5**, 169-178.
- Korea soap and detergent association, Report of Statistics 2000.
- Biebl, H., A.P. Zeng, K. Menzel, and W.D. Deckwer (1998), Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 24-29.