

미생물을 이용한 일산화탄소로부터 에탄올 생산공정 최적화

†강 환 구·이 충 렬
한남대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2002. 1. 11., 게재승인 : 2002. 2. 21.)

Optimization of Microbial Production of Ethanol from Carbon Monoxide

Whankoo Kang† and Chunglyol Lee
Department of Chemical Engineering Hannam University, Taejon 306-791, Korea
(Received : 2002. 1. 11., Accepted : 2002. 2. 21.)

The method to optimize the microbial production of ethanol from CO using *Clostridium ljungdahlii* was developed. The kinetic parameter study on CO conversion with *Clostridium ljungdahlii* was carried out and maximum CO conversion rate of 37.14 mmol/L-hr-O.D. and K_m of 0.9516 atm were obtained. It was observed that method of two stage fermentation, which consists of cell growth stage and ethanol production stage, was effective to produce ethanol. When pH was shifted from 5.5 to 4.5 and ammonium solution was supplied to culture media as nitrogen source at ethanol production stage, the concentration of ethanol produced was increased 20 times higher than that without shift. Ethanol production from CO in a fermenter with *Clostridium ljungdahlii* was optimized and the concentration of ethanol produced was 45 g/L and maximum ethanol productivity was 0.75 g ethanol/L-hr.

Key Words : *Clostridium ljungdahlii*, CO, conversion, ethanol, two stage fermentation

서 론

산업공정에서 발생하는 부생가스(waste gas)는 매우 많은 양의 일산화탄소, 이산화탄소, 수소, 황, 질소 산화물들을 포함하고 있다. 이들 중 일산화탄소, 수소 등은 유용한 에너지 원임에도 그냥 버려지고 있어 경제적인 손실이 될 뿐 아니라 대기 환경에도 악영향을 미치고 있다. 특히 제철소에서 발생하는 COG(코오크스로 가스), BFG(고로가스), LDG(전로가스), carbon black 제조시 발생하는 부생가스 등은 일산화탄소와 이산화탄소를 다량 함유하는데 이렇게 발생하는 부생가스의 양은 포항, 광양제철소에서만 1년에 3×10^{10} m³에 이르며 이들 중 BFG 와 LDG 경우에는 부생가스 중 일산화탄소의 구성 비율이 20%, 60%로서 매우 높은 편이다.(1) 또한 carbon black 제조시 발생하는 부생가스는 13% 가량의 일산화탄소를 포함하고 있다. 이들 국가 산업 기간인 제철소의 부생가스 경우 재활용 실적이 부진하여 극히 일부만 회수되고 나머지는 모두 폐기되고 있는 실정이다. 특히 Table 1에 보여지는 바와 같이 제철소 부생가스 중 BFG나 LDG 중 20~60%를

차지하는 일산화탄소는 에너지원으로 활용될 수 있는 귀중한 자원임에도 불구하고 회수나 재활용이 거의 되지 않고 버려지는 실정이다. 우리나라는 1990년대 후반 한해 동안 에너지 수입이 2백 41억\$(20조원)에 달하여 국가 총수입액의 16%를 차지하여, 국제 수지 관리와 국민 경제에 막대한 어려움을 주고 있다. 특히 국내 에너지 수요의 97% 이상을 수입에 의존하는 산업구조를 가지고 있음으로써 에너지 공급 안정성의 취약, 유사시 에너지 파동에 대응할 수 있는 위기 관리 능력이 취약한 실정이다.

그러므로 부생가스 회수 이용 기술은 최근 세계적인 지구 환경보전을 위해 개발하여야 할 선결과제이다. 그러나 현재 추세를 살펴보면 폐가스 중 일부 CO₂ 와 H₂의 회수 이용이 시도되고 있으나 많은 양의 일산화탄소에 대해서는 특별한 연구가 진행되지 않고 있다. 따라서 국내의 전체 산업 폐가

Table 1. 산업체 부생가스의 조성

구 분	발 열 량 (kcal/Nm ³)	가 스 조 성						
		CO ₂	O ₂	C _m H _n	CO	CH ₄	H ₂	N ₂
BFG	740	20.7	-	-	20.0	-	3.2	54.1
COG	4400	3.1	0.3	2.9	8.4	26.6	56.4	2.3
LDG	2000	18.0	5.9	-	58.2	-	2.0	15.9

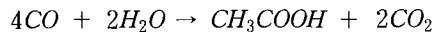
†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering
Hannam University, Taejon 306-791, Korea
Tel : +82-42-629-7932, Fax: +82-42-623-9489
E-mail : wkang@eve.hannam.ac.kr

스를 고려할 때 이들 일산화탄소가 수소나 에탄올 또는 아세트레이트로 전량 회수되어질 수 있다면 수소 및 에탄올 생산 경우 수조원의 경제적이익이 창출되어지리라 생각된다. 또한 이렇게 생산될 수 있는 수소와 에탄올은 유용한 청정에너지원이 될 수 있을 것이다.

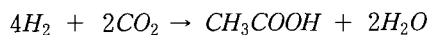
따라서 미생물을 이용한 일산화탄소를 포함한 산업체 부생가스로부터 유용한 물질로의 bioconversion방법의 개발 필요성이 대두되고 있다. 현재 일산화탄소를 유용 물질로 전환할수 있는 여러 미생물들이 알려져있다. 먼저 일산화탄소를 수소로 전환하는 미생물들이 보고되어지며 이들은 *Rhodospseudomonas gelatinosa*와 *Rhodospirillum rubrum* 등이며 혐기적 광합성 박테리아로서 CO dehydrogenase 효소를 이용하여 일산화탄소와 물로부터 다음 식에 의해 이산화탄소와 수소를 만든다고 알려지며(2,3,4) 이와 같은 미생물을 이용한 fermenter에서의 일산화탄소로부터 수소생산 연구가 본 연구실을 포함한 여러 연구자들에 의해 보고되고 있다.(3,5)



또한 일산화탄소를 아세트레이트로 전환하는 미생물들에 관하여도 여러가지 연구 결과가 보고 되는데 (6,7,8.) 그 중 *Peptostreptococcus productus* 또는 *Acetobacterium woodii* 등에 의하여 일산화탄소로부터 아세트레이트가 생성된다고 알려져 있으며 반응식은 다음과 같다.

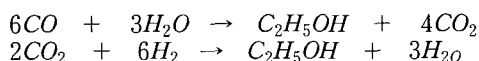


한편 *Acetobacterium sp.* 나 *P.productus*를 이용하면 다음의 반응을 통하여 폐가스 중의 이산화탄소와 수소로부터도 아세트레이트를 생산할수 있다고 알려져 있다.



본 연구실에서는 이들 미생물을 이용한 bioreactor study를 통하여 일산화탄소로부터 30 g/L 농도의 아세트레이트 생산을 보고한바 있다.(9)

한편 일산화탄소로부터 에탄올을 생성하는 미생물에 관한 연구에 관해서 살펴보면 극히 제한된 종류의 bacteria에 의한 일산화탄소로부터 에탄올 생성이 보고되어지는데 그중에서 *Clostridium ljungdahlii*가 일산화탄소 및 CO₂와 H₂로부터 에탄올을 감지할수 있는 농도로 생성한다고 보고되며 이때 일정비율의 에탄올과 아세트레이트를 함께 생성한다고 보고된다. 따라서 발효조건에 최적화에 의한 에탄올 생성 최적화 연구가 필요한 실정이다. 이 *C. ljungdahlii* 박테리아는 *Dr. ljungdahlii*에 의해 animal waste로부터 isolation되어졌다고 보고되나 이 *C. ljungdahlii*를 이용한 에탄올 생성연구는 기초적인 수준에 머물러 있는 실정이다(10,11) 참고로 일산화탄소 및 CO₂와 H₂로부터의 에탄올 생산 반응식은 다음과 같다.



따라서 본 연구에서는 *C. ljungdahlii*를 이용하여 체계적인 일산화탄소로부터 에탄올 전환방법 최적화 연구를 수행하였다. 이를 위하여 *C. ljungdahlii*를 이용하여 일산화탄소로부터 에탄올을 생성하는 경우에 있어서 일산화탄소 소비속도에 대한 Michaelis-Menten kinetics에 의한 parameter study 및 일산화탄소로부터 에탄올 생성을 최적화 하는 배양조건 등을 조사하였고 이를 이용하여 발효기내에서 세포성장과 에탄올 생성을 분리한 2 stage 발효방법을 적용 고농도 에탄올 생성 최적화 방법을 연구하였다.

재료 및 실험 방법

사용 균주 및 배양방법

본 연구에서 사용된 *Clostridium ljungdahlii* ATCC55383의 배양용 배지의 성분은 Yeast Extract 1~5 g/L, NH₄Cl 1~5 g/L, mineral solution 50 mL/L(KH₂PO₄ 10 g/L, MgCl₂·6H₂O 6.6 g/L, NaCl 8 g/L, CaCl₂·2H₂O 1 g/L, NH₄Cl 8 g/L), trace metal solution 1 mL/L(ZnSO₄·7H₂O 0.1 g/L, MnCl₂·4H₂O 0.1 g/L, H₃BO₃ 0.03 g/L, CoCl₂·6H₂O 0.2 g/L, CuCl₂·H₂O 0.01 g/L, NiCl₂·6H₂O 0.02 g/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.03 g/L, FeCl₂·4H₂O 1.5 g/L, Na₂SeO₃ 0.01 g/L), Vitamin solution 5 mL/L(Biotin 0.02 g/L, Folic acid 0.02 g/L, Pyridoxal HCl 0.01 g/L, Lipoic/Thioctic acid 0.06 g/L, Riboflavin 0.05 g/L, Thiamin HCl 0.05 g/L, Ca-D-Pantothenate 0.05 g/L, Cyanocobalamin 0.05 g/L, P-aminobenzoic acid 0.05 g/L, Nicotinic acid 0.05 g/L)의 조성이고 사용한 chemical은 모두 Sigma사 제품이였다. 균체배양에는 crimp seal이 있는 150 mL짜리 serum bottle 및 side-arm flask 등이 이용되어지며 이 병에 30 mL의 배지와 1.5 mL의 seed culture를 넣고 나머지 공간은 원하는 양의 일산화탄소와 tracer로 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 μm filter를 통해 주입하며 serum bottle는 250 rpm 진탕배양기(vision 과학)에 넣어 37℃에서 배양하였다. 사용한 발효기는 5 L(코바이오텍, KF-5L)이며 실험 조건에 따라 pH는 4~5.5, rpm은 400~900으로 운용되며 배지가 준비된 발효기에 질소를 purging하고 이를 멸균한 후 용존산소 수준이 0으로 떨어질 때까지 다시 질소를 흘려준다. 그 후 원하는 일산화탄소농도를 gas flow meter, 압력계와 가스크로마토그래피를 이용하여 실험 조건에 따라 60%~90% 정도로 맞추어 준다. 이때 사용한 일산화탄소는 99.5%의 순도이였다.

분석방법

세포농도는 분광광도계(Milton roy. spectronic 21) 660 nm에서 구한 흡광도를 나타내었다. 일산화탄소, 수소 그리고 질소 분석은 가스크로마토그래피(Donam, DS6200)에서 수행하였다. 사용된 칼럼은 길이 6 ft의 녹슬지 않은 stainless steel이고 충전 물질은 Carbosphere 60/80이였으며 TCD detector를

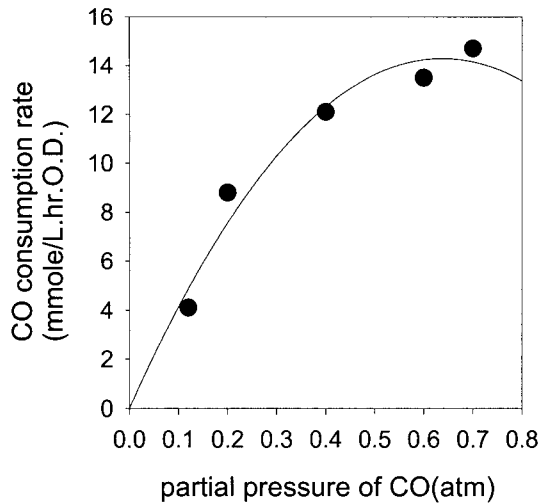


Figure 1. Effect of CO concentration on its consumption rate.

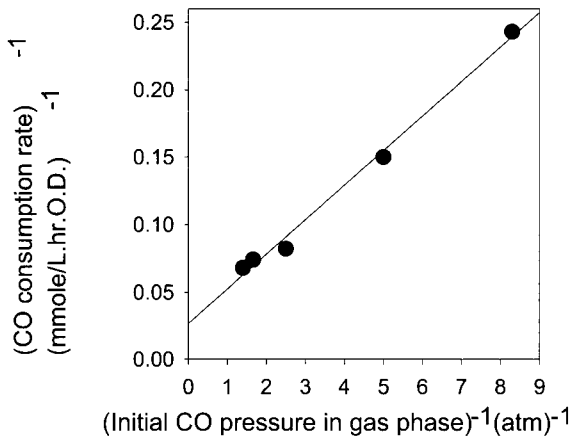


Figure 2. Double-reciprocal plot for low CO concentration.

이용하였다. 실험 조건은 주입부 120°C, 오픈 85°C 그리고 검출부 120°C이었고 carrier gas로는 He를 30 cc/min로 흘려주었다. 에탄올 분석에 사용된 충전물질은 HayeSep Q(CRS)이며 FID detector, 조건은 오픈 175°C, 주입부와 검출부는 225°C이었고 carrier gas는 He 50 cc/min를 사용하였다.

결과 및 고찰

일산화탄소 소비속도에 대한 kinetic model

Clostridium ljungdahlii ATCC 55383를 이용한 일산화탄소 소비속도에 대한 kinetic model과 그에 따른 여러 가지 상수 값을 계산하기 위한 실험을 수행하였는데 Figure 1에서는 일산화탄소의 농도에 따른 소비속도를 나타내었다. 일산화탄소의 소비속도는 낮은 농도에서 선형적으로 증가하지만 농도가 높아짐에 따라 점차 최대치 도달하는 경향을 보였고, 이에 enzyme kinetics에서 잘 알려진 속도식인 Michaelis Menten식이 적용되어진다.

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

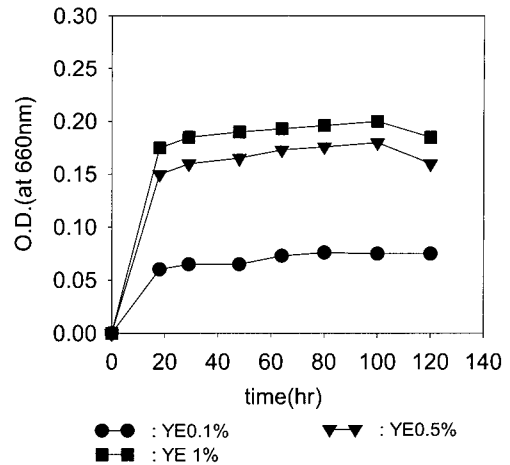


Figure 3. The effect of YE concentration on cell growth with *C. ljungdahlii*.

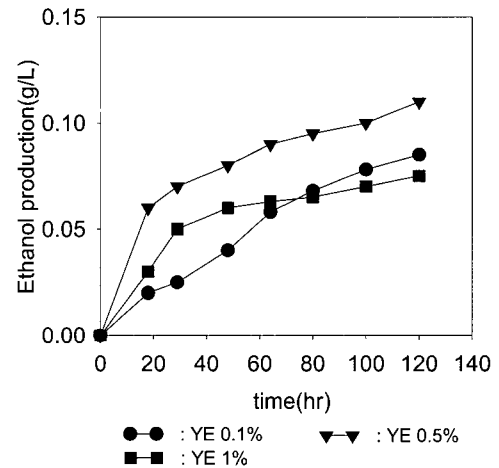


Figure 4. The effect of YE concentration on ethanol production with *C. ljungdahlii*.

여기서 V_{max} 는 일산화탄소의 최대소비속도이고 K_m 은 $V=1/2V_{max}$ 일 때의 일산화탄소 분압이고 S 는 기체상의 일산화탄소 분압이다. 본 연구에서는 기상내의 초기 일산화탄소의 분압을 농도항으로 이용하였다. V_{max} 와 K_m 을 얻기 위해 낮은 일산화탄소 농도에 대해 $1/V$ vs. $1/S$ 를 도사(Lineweaver-Burke plot)하였으며 이 결과를 Figure 2에 나타내었다. 기울기 값 K_m/V_{max} 및 y-절편값 $1/V_{max}$ 로부터 구한 V_{max} 는 37.14 mmol/L-hr-O.D. 그리고 K_m 은 0.9516 atm 임을 알 수 있다.

질소원이 균주 성장 및 에탄올 생성에 미치는 영향

배지 중 질소원인 YE(Yeast extract)의 농도에 따른 균주의 성장과 에탄올 생성 정도를 알아 보기 위하여 side-arm flask를 이용하여 실험을 진행하였다 Figure 3, 4에서 보여지는 것과 같이 pH 5.0에서 YE의 농도를 0.1, 0.5, 1.0%로 하여 실험을 수행한 결과 YE농도 1%에서 최대 세포성장을 보였고 0.5, 0.1%의 경우는 각각 세포성장 최대치의 약 85%, 25% 정도의 성장을 보였다. 또한 에탄올 생성에 미치는 영향에 관해서는 YE 1%, YE 0.5%, YE 0.1% 변화될 때 에탄올 생성량이 0.06 g/L, 0.12 g/L, 0.075 g/L로 변화됨을 확인하

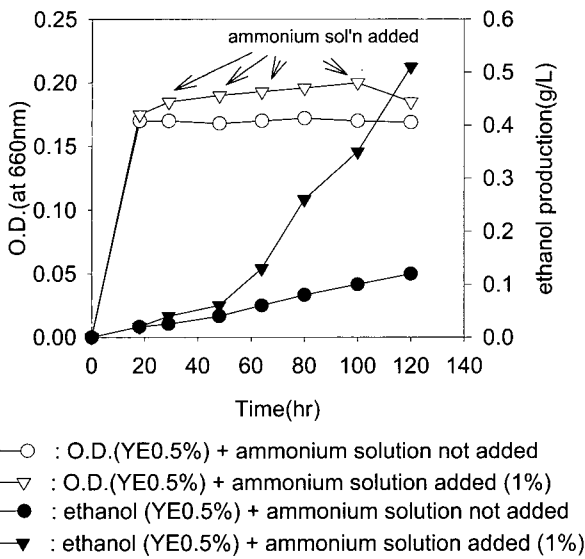


Figure 5. The effect of ammonium solution on ethanol production with *C. ljungdahliae*.

였다. 이 결과는 단위 세포당의 에탄올 생성량을 고려할 경우 YE 0.1% 경우 YE 0.5%에 비해 2배 이상 YE 1%에 비해 5배 이상 증가됨을 보여준다. 이 결과로서 YE의 양이 증가될수록 세포성장은 증가하나 단위 세포당 에탄올 생성량은 감소됨을 알 수 있다. 따라서 YE 대신 첨가할 수 있는 다른 질소원에 관한 실험을 수행하였다. 이의 해결을 위해 YE를 대신해서 N source로서 사용할 수 있는 ammonium solution이 에탄올 생산에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. Figure 5에서 보여지는 것과 같이 초기 YE 0.5%를 N source로서 첨가하고 균주가 일정 O.D.까지 성장한 후 ammonium ($\text{NH}_4\text{Cl} : (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 1 : 1$) solution을 0.25%씩 4회에 걸쳐 첨가하여 cell growth와 에탄올 생성에 미치는 영향을 확인한 결과 ammonium solution을 첨가한 경우 균주의 성장 및 에탄올 생성이 증가되어 약 0.5 g/L 에탄올을 생성하여 이는 N source로서 YE 0.5%만을 사용하였을 경우에 비해 500% 증가되었다. 이로서 *C. ljungdahliae*를 이용하여 에탄올 생성시 N source로서 YE는 균주의 성장에 도움이 되지만 에탄올 생성에는 도움이 되지 않았고 ammonium solution의 경우는 균주 성장을 낮은 속도로 유지하며 에탄올 생성량을 증가시키지 확인되어 이 균주를 이용한 일산화탄소로부터 에탄올을 생산시 YE를 이용한 균주 성장 단계와 ammonium solution을 이용한 에탄올 생성 단계를 나누어 실험을 진행하는 것이 필요함을 확인하였다. 이러한 질소원을 YE와 같은 complex 배지로부터 minimal인 ammonium solution으로 전환시 에탄올 생성이 증가되는 요인은 정확히 알려져 있지 않으나, 이 조건에서 에탄올을 생성하는 대사과정 및 관련 효소의 생성 및 활성이 증가되는 것으로 생각되며 이에 관하여 본 연구실에서의 transcriptome 분석 및 2D gel 분석이 계획 중이다.

에탄올 생성에 미치는 pH의 영향

*C. ljungdahliae*를 이용하여 에탄올 생성을 최적화하기 위해 초기 pH가 균주 성장 및 에탄올 생성에 미치는 영향을 살펴 보았으며 side-arm flask를 이용하여 실험을 진행 하였다. 이

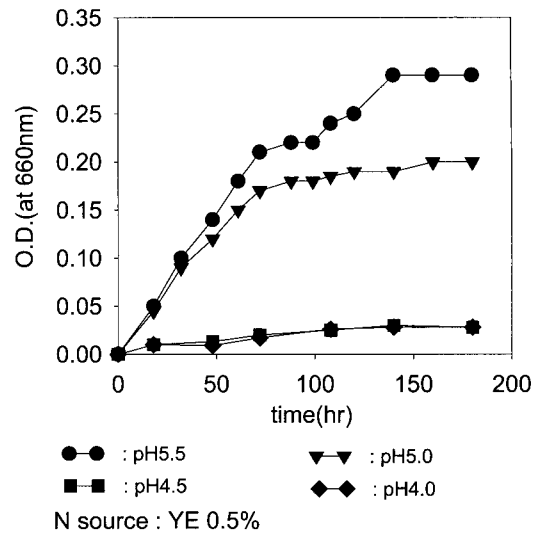


Figure 6. The effect of initial pH on cell growth with *C. ljungdahliae*.

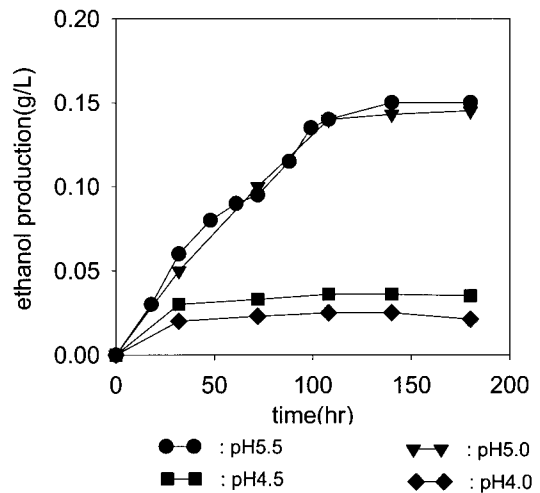


Figure 7. The effect of initial pH on ethanol production with *C. ljungdahliae*.

결과가 Figure 6과 7에 나타나는데 초기 pH 5.5에서 균주 성장이 O.D. 0.29로 최대를 보였지만 에탄올은 0.15 g/L를 생성하는데 그쳤다. 그러나 초기 pH 4.0, 4.5에서는 균주가 거의 성장하지 않았고 따라서 낮은 세포농도에 의하여 에탄올 0.03 g/L를 생성하는데 그침을 알 수 있었다. 따라서 세포 성장과 분리하여 pH가 에탄올 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 two stage로 실험을 진행하였는데 Figure 8, 9에서 보여지는 것과 같이 초기에 pH 5.5, YE 0.5% 조건에서 O.D. 0.22까지 세포를 성장 시킨 후 pH를 각각 4.5와 4.0으로 낮추어 주었다. 이후 N source로서 Ammonium solution ($\text{NH}_4\text{Cl} + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)을 지속적으로 공급하였다. 이때 균주는 더 이상 성장하지 않았으며 에탄올은 pH를 변화시킨 시점으로부터 지속적으로 증가하여 3.6 g/L를 생성하였다. 이는 pH shift 없이 YE 0.5%, pH 5.5로 유지한 경우에 비해서도 20배 이상 증가된 값을 알 수 있다. 이는 균주 성장 단계에서 N source를 YE로 하고 pH를 5.5로 유지하여 균주를 원하는 농도까지 자라게 한 후 N source를 ammonium solution으로, pH를 4.5 정도로 shift할 경우 에탄올 생성이 극대화함을 확

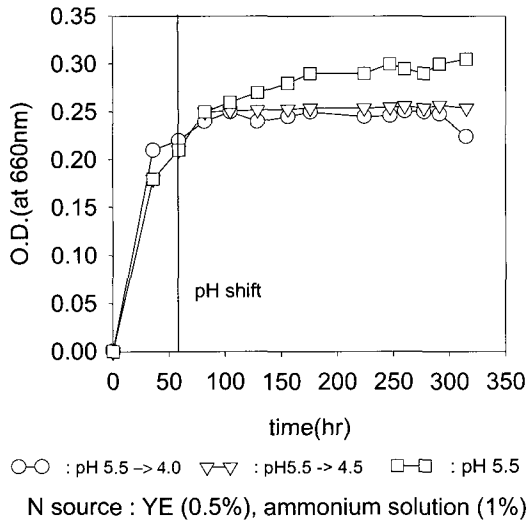


Figure 8. The effect of pH shift on cell growth with *C. ljungdahliae*.

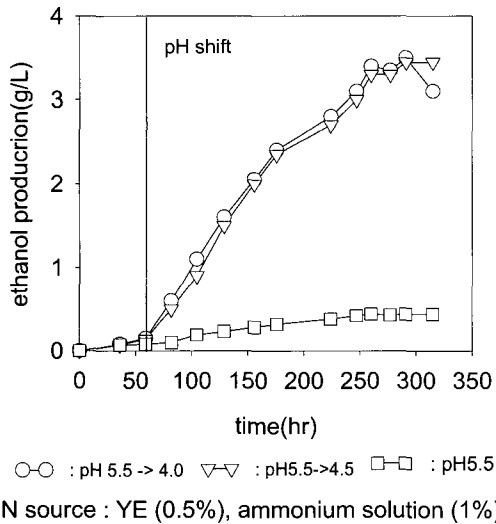


Figure 9. The effect of pH shift on ethanol production with *C. ljungdahliae*.

인해준 결과이다. 특히 pH가 4.0보다는 4.5로 shift되었을 때 세포의 viability가 유지되면서 에탄올을 생성함을 확인할 수 있었다. 따라서 *C. ljungdahliae*를 이용한 일산화탄소로부터 에탄올 생성시 두단계의 공정이 바람직하다고 생각되며 이 경우 첫 번째 단계에서 pH는 5.5 정도로 유지하며 세포성장을 최적화하고 두 번째 단계로 원하는 세포 농도가 얻어진 후 pH를 4.5 정도로 shift하여 에탄올을 생성하는 공정이 바람직하다고 생각된다. 이러한 pH shift시 에탄올 생성이 증가되는 요인은 정확히 알려지지 않았으나 pH가 낮아지는 acidic 조건에서 에탄올을 생성하는 대사과정의 gene들의 induction이 증가되거나 또는 관련효소의 활성이 증가되는 것으로 생각되며 이의 규명을 위하여 2D gel을 이용한 연구를 진행 중이다.

높은 농도의 *C. ljungdahliae* 세포배양을 위한 탄소원 실험

본 실험 중 일산화탄소를 이용한 *C. ljungdahliae*의 세포성장이 매우 낮음을 확인하여 초기에 다른 탄소원을 이용하여 세

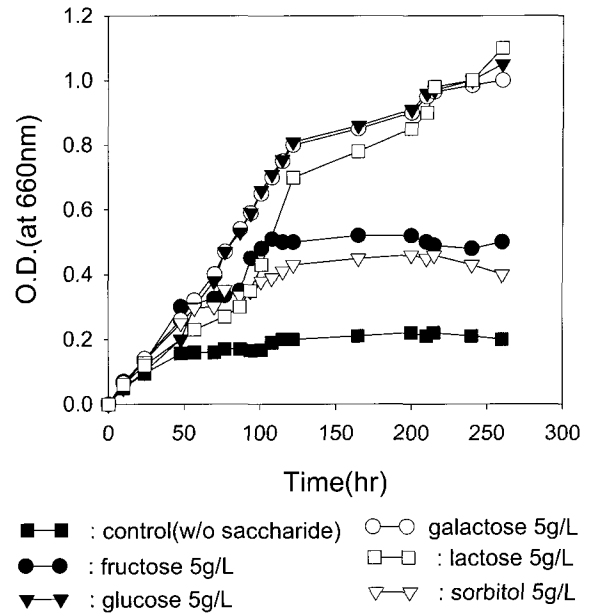


Figure 10. The effect several kinds of C sources on cell density.

포성장을 돕고 그 후 성장된 *C. ljungdahliae*의 일산화탄소 adaptation을 통하여 높은 세포농도의 *C. ljungdahliae*를 이용한 일산화탄소로부터 에탄올 전환공정 방법을 모색하기 위하여 여러 탄소원을 실험하였다. 이 실험에서는 탄소원을 제외한 배지성분은 앞에서 언급한 조성을 이용하였고 초기 pH는 5.5 이었다. 이때 각 탄소원에 따른 세포성장 정도 결과가 Figure 10에 보여지며 이 결과에 따르면 균주 성장의 경우 당을 첨가하지 않은 control에 비해 fructose, sorbitol 등은 세포농도가 2~2.5배 증가하였으며 galactose, glucose, lactose는 control에 비해 세포농도가 5배 이상 증가함을 알 수 있었다. glucose의 경우 주어진 당이 모두 소비된 후 세포의 일산화탄소 적응에 의한 소비가 바로 시작되고 원가 측면에서 다른 탄소원에 비해 경제적으로 glucose를 C source로 선택하고 이를 이용한 에탄올 생성 최적화 연구를 앞선 실험들의 결과를 바탕으로 수행하여 높은 세포농도를 이용한 fermenter에 적용하였으며 이 결과가 후에 보여진다.

***C. ljungdahliae*를 이용한 ethanol toxicity 실험**

위의 균주를 이용한 일산화탄소로부터 에탄올 생성시 생성되는 에탄올의 농도가 균주 성장에 미치는 저해하는 정도를 알아보기 위하여 에탄올의 농도를 다르게 첨가한 경우의 균주 성장 저해 정도를 확인하였다. 이 실험을 위하여 side-arm flask를 사용하였으며 초기 pH 5.5, 앞에서 언급한 조성을 가진 배지가 이용되었다. Figure 11에서 보여지듯 에탄올을 각각 40, 50, 55, 60, 65 g/L 농도로 exponential cell growth stage에서 첨가하여 세포성장을 확인하여본 바 그림에 나타나는 것처럼 ethanol의 농도가 50 g/L 농도까지는 균주의 성장에 큰 영향이 없는 것으로 확인되었다. 따라서 본 실험을 통하여 long term 발효조 운영에 의한 에탄올 생성 최대 농도는 대략 50 g/L 정도가 현실적이라 생각되며 이러한 높은 에탄올 농도에 의한 세포 viability의 유지를 위하여 향후 세포성장과 에탄올 생성을 완전히 분리한 2 bioreactor system

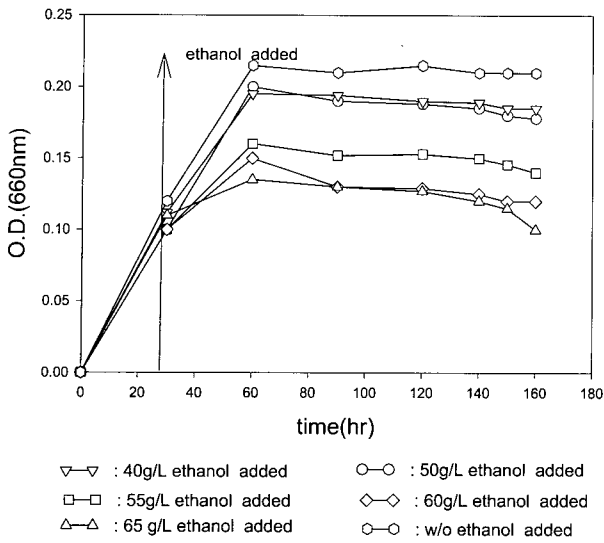


Figure 11. Ethanol toxicity test with *C. ljungdahlii*.

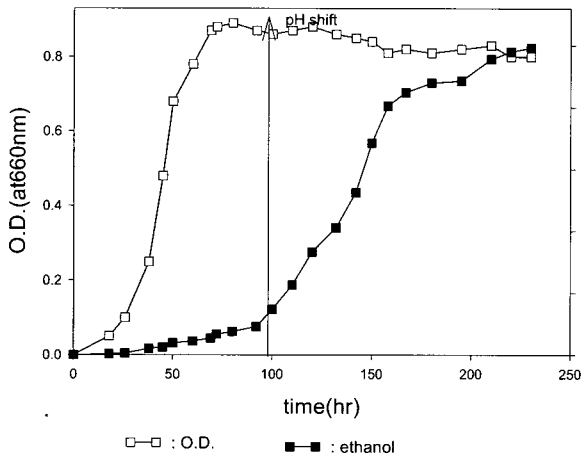


Figure 12. The profile of ethanol production and cell growth in fermenter with *C. ljungdahlii*.

이 필요하리라 생각 되어진다.

Fermenter를 이용한 일산화탄소로부터 에탄올 생성 최적화

위에서 flask를 사용하여 *C. ljungdahlii*를 이용한 일산화탄소로부터 에탄올 생성 극대화 방법이 모색되었으므로 이와 같은 pH 및 N source shift 방법을 fermenter에서 실시 하였다. 이때 초기 배지는 YE 0.5%를 포함한 앞에 언급된 배지 조성을 가지며 fermenter의 온도는 37°C, 초기 pH 5.5, 주입 되는 가스 (CO 90%, N₂ 10%)는 200 ml/min의 속도로 fermenter로 주입되었으며 rpm은 초기 400에서 900 이상까지 변화시켰고 O.D.가 약 0.8에서 pH는 4.5로 shift하고 간헐적으로 ammonium solution을 첨가 하였다. 본 결과는 Figure 12에 보여진다. rpm에 따른 일산화탄소 소비속도 및 ethanol의 생성을 보면 pH shift 후 400 rpm에서 일정시간동안 에탄올의 생성을 확인하고 600 rpm, 800 rpm으로 증가 시키면서 실험한 결과 CO 전달속도 증가에 의하여 400, 600, 800 rpm에서의 specific CO consumption rate가 각각 16.5, 23.8, 27.1 mmole CO/L · hr · O.D.이고 maximum specific ethanol production

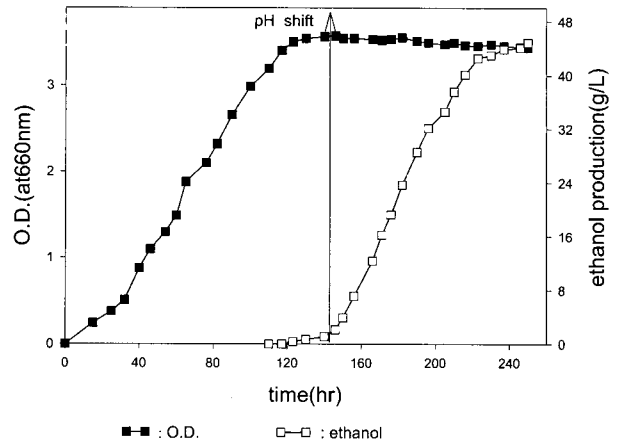


Figure 13. The profile of ethanol production and cell growth in high cell density fermenter.

rate는 0.25, 0.29, 0.49 g ethanol/L · hr · O.D.으로 나타났으며 최종 ethanol 생성량은 25 g/L 에 달함을 알 수 있었다.

높은 세포농도를 이용한 fermenter에서의 에탄올 생성 최적화

그러나 일산화탄소를 탄소원으로 이용하여 균주가 성장하는데 한계가 있고 high cell density로의 진행이 어려움을 감안하여 앞에서 언급된 세포성장에도 사용되는 탄소원 실험 결과를 바탕으로 glucose를 초기 stage에 탄소원으로 사용하였다. pH 5.5, 400 rpm 조건에서 초기 배지에 5 g/L의 glucose를 첨가한 후 균주를 접종하였다. 초기 첨가된 glucose가 모두 소비될 시점에서 혐기적으로 준비한 glucose를 총 2%되게 feeding하여 O.D. 3.4까지 자라게 하였다. 그 후 glucose feeding을 중지하고 일산화탄소에 대해 adaptation 되어지기까지 균주의 활성을 유지하기 위해 ammonium solution을 첨가하여 주면서 일산화탄소를 소비하는 시점까지 약 10시간 동안 CO adaptation을 실시하였다. 그 후 O.D. 3.4에서 일산화탄소의 소비 속도가 충분한 속도에 달했을 때 pH를 5.5에서 4.5로 낮추어 주었으며 그 후 간헐적으로 ammonium solution을 feeding한 결과 얻어진 최종 에탄올 생성량은 45 g/L에 달하였다. 특히 약 60시간 이내에 45 g/L 정도의 ethanol을 생성함으로써 0.75 g ethanol/L · hr 의 ethanol 생산성을 확보할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 *C. ljungdahlii*를 이용하여 일산화탄소로부터 에탄올 생성 방법을 최적화하였다. 먼저 *Clostridium ljungdahlii* ATCC 55383을 이용하여 일산화탄소 소비속도에 대한 kinetic model과 그에 따른 여러 가지 상수값을 계산하기 위한 실험을 수행하였다. 이 결과 일산화탄소 소비속도 data에 Michaelis Menten식이 잘 적용됨을 알 수 있었고 기울기 값 K_m/V_{max} 및 y-절편값 $1/V_{max}$ 로부터 구한 V_{max} 는 37.14 mmol/L-hr-O.D. 그리고 K_m 은 0.9516 atm임을 알 수 있었다. *C. ljungdahlii*에서의 ethanol의 생성에 미치는 pH와 질소원의 영향을 실험한 결과 세포성장에는 pH 5.5와 YE첨가가 에탄올 생

성에는 pH 4~4.5, ammonium solution ($\text{NH}_4\text{Cl}+(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 첨가가 필요한 것으로 확인되었다. 따라서 pH 5.5와 YE 0.5%에서 *C. ljungdahliae*를 배양한 후 pH 4.5로 shift하고 ammonium solution을 계속 첨가한 경우 세포농도 O.D. 0.25에서 약 3.6 g/L의 에탄올 생성을 얻었으며 이것은 pH 및 질소원 shift가 없는 경우에 비하여 약 20배 이상 에탄올 생성량이 증가된 수치이다. 이를 바탕으로 pH shift 후 N source로서 ammonium solution을 지속적으로 공급하여 주면서 fermenter를 이용한 일산화탄소로부터 에탄올 최적화를 수행하였고 이 결과 최대 specific ethanol production rate 0.49 g ethanol/L · hr · O.D.를 얻을 수 있었으며 생성된 최종 에탄올 농도는 25 g ethanol/L에 달하였다. 이 결과를 이용하여 높은 세포농도를 얻기 위하여 세포성장에 도움을 주는 탄소원 실험을 수행하였고 이 결과 glucose를 이용한 세포성장후 일산화탄소로 전환하는 방법을 fermenter에 적용하여 pH 5.5, 400 rpm 조건에서 glucose를 feeding하여 O.D. 3.4까지 자라게 한 후 ammonium solution을 첨가하여 주면서 일산화탄소를 소비하는 시점까지 약 10시간 동안 CO adaptation을 실시 하여 일산화탄소의 소비속도가 충분한 속도에 달했을 때 pH를 5.5에서 4.5로 낮추어 주었고 그 후 간헐적으로 ammonium solution을 feeding한 결과 얻어진 최종 에탄올 생성량은 45 g/L 이었다. 특히 약 60시간 이내에 45 g/L 정도의 ethanol을 생성 함으로써 0.75 g ethanol/L · hr의 ethanol 생산성을 확보 할수 있었다.

또한 *C. ljungdahliae*의 에탄올 내성을 실험한 결과 약 50 g/L 정도의 에탄올에는 큰 성장 장애를 받지 않는 것으로 나타나 이 균주를 이용한 산업체 부생가스로부터의 에탄올 생산 가능성을 더하여 주고 있다.

현재 본 연구진에 의하여 *C. ljungdahliae*를 이용하여 long term operation시의 cell viability 유지를 위한 세포성장과 에탄올 생성을 완전히 분리시킨 2 bioreactor system의 연구 및 일산화탄소로부터 높은 농도의 에탄올을 생성하는 독창적인 새로운 균주가 분리되어 현재 실험 진행 중이다.

감 사

본 연구는 2000년도 “한남대학교 교비 학술 연구비” 지원

에 의하여 연구되었으며 이에 감사의 말씀을 드립니다.

REFERENCES

1. Sung, J. K. (1997), Consideration of Industrial Waste Gas useful energy source, *The Korean Journal of Energy and Resource technique*, **14**, 918-925.
2. Uffen, R. L. (1981), Metabolism of Carbon Monoxide, *Enzyme and Microbiol. Technol.* **3**, 197-206.
3. Uffen, R. L. (1976), Anaerobic Growth of a Rhodospirillum rubrum Species in the Dark With Carbon monoxide as sole carbon and Energy substrate, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* **73**, 3298-3302.
4. Hansen, T. A. (1983), Electron Donor Metabolism in Phototrophic Bacteria (J.G. Ormerod, ed), *J. Bacteriol.* **155**, 1208.
5. Kang, W., and Chun, H. (2000), The study on efficient biological hydrogen production scheme from coal synthetic gas. *Korean Journal of Biotechnol. Bioeng.* **15**(3), 268-273.
6. Lorowitz, W. H., and Bryant, H. P. (1984), *Peptostreptococcus productus* strain that grow rapidly with CO as the energy source, *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 961-968.
7. Geerlings, G., Aldrich, H. A., Handers, W., and Diekert, G. (1987), Isolation and characterization of a carbon monoxide utilizing strain of the acetogen *Peptostreptococcus productus*. *Arch. Microbiol.* **148**, 305-313.
8. Ljungdahl, L. G. (1986), The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria, *Ann. Rev. Microbiol.* **40**, 415-450.
9. Kang, W., and Chun, H. (2000), Production of acetate from waste gas using *P. productus*, *Korean Journal of Biotechnol. Bioeng.* **15**(2), 188-194.
10. Johnson, J. L., and Francis, B. S. (1975), Taxonomy of the clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. *J. Gen. Microbiol.* **88**, 229-244.
11. Buschhorn, H., Durre, P., and Gottschalk, G. (1989), Production and utilization of ethanol by the homoacetogen *Acetobacterium woodii*, *Appl Environ Microbiol.* **55**, 1835-1840.