

바이오디젤 부산물인 폐글리세롤을 이용한 생물학적 1,3-propanediol 생산

전 선 애 · 강 철 희 · ¹공 성 욱 · 상 병 인 · † 엄 영 순
한국과학기술연구원 환경기술연구단, ¹(주)인우코퍼레이션
(접수 : 2008. 7. 14., 게재승인 : 2008. 10. 17.)

Biological production of 1,3-propanediol using crude glycerol derived from biodiesel process

Sun-Ae Jun, Cheol-Hee Kang, Sean W Kong¹, Byoung-In Sang, and Youngsoo Um[†]

Korea Institute of Science and Technology, Center for Environmental Technology Research, ¹INWOO Corporation, Korea
(Received : 2008. 7. 14., Accepted : 2008. 10. 17.)

The production of 1,3-propanediol (1,3-PD) was investigated with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026 and *K. pneumoniae* DSM4799 using crude glycerol obtained from biodiesel industry. Crude glycerol was used without prior purification to investigate effects of impurities in crude glycerol on 1,3-PD production. In the batch cultures, 1,3-PD production with crude glycerol was 1.1~2.5 times higher than that with pure glycerol, indicating that crude glycerol is even a better substrate than pure glycerol for 1,3-PD fermentation. When glucose was added, 1,3-PD production and yield decreased in spite of enhanced cell growth. Furthermore, the addition of glucose was found to increase 2,3-butanediol, a by-product, significantly because of the change in metabolism in the presence of glucose. In semi-batch cultures without glucose addition, 26 g/L 1,3-PD was produced with crude glycerol, which was 2~3 times higher than that with pure glycerol. Based on our results, it was clearly shown that crude glycerol is an effective substrate for biological 1,3-PD production, making it more feasible to produce 1,3-PD at a lower price.

Key Words : Biodiesel, Glycerol, 1,3-propanediol, *Klebsiella pneumoniae*

서 론

바이오디젤 (fatty acid methyl esters)은 바이오에탄올과 더불어 최근 가격이 상승하고 있는 화석연료를 대체할 수 있는 액체 연료 에너지원으로서 각광받고 있다. 특히 바이오디젤은 경유 대비 온실가스 및 대기오염물질 (일산화탄소, 황화합물 등) 배출을 상당량 감소시킬 수 있는 환경친화적 특성을 가지고 있어서 유럽 및 선진국을 중심으로 바이오디젤 생산 및 보급을 지원하려는 정책을 펴고 있다. 전 세계 바이오디젤 생산량의 95%를 차지하고 있는 유럽에서는 연간 200만 톤 규모의 시장이 형성되어 있으며, 2010년까지 현재의 3배로 성장할 것으로 예측되고 있다. 또한 미국에서도 바이오디젤에 대한 세금감면의 혜택이 주어지면서 앞으로 10년 후에 연간 3~7백만톤의 수요가 있을 것으로 전망되고 있다(1).

바이오디젤을 생산하는 공정에서 부산물로 고농도의 글리세롤을 포함한 폐액이 발생하게 되는데, 이는 바이오디젤 생산량 대비 10% 정도로 상당량 발생하게 된다(2). 이러한 글리세롤을 함유한 부산물은 2차 오염을 유발시킬 수 있으며, 특히 다량의 폐글리세롤을 처리하는데 있어서 많은 비용이 요구되어 바이오디젤 생산 공정의 경제성을 악화시키므로 부산물인 폐글리세롤의 새로운 용도로의 개발이 필요하다(3). 글리세롤은 미국 에너지성 (US DOE)에서 top value-added chemicals로 선정된 대체 화학 원료 중 하나로서, 바이오 디젤 생산 과정의 부산물로 얻어지는 글리세롤의 공급량 확대에 따라 향후 2010년에는 \$ 0.5~0.75/ kg 정도로 하락할 것으로 추정되어 각종 정밀화학제품의 원료물질로서 사용될 수 있는 가능성이 높아지고 있다. 실제 독일의 경우 글리세롤 가격이 바이오디젤 생산에 의해 절반 이하로 하락한 예가 보고되고 있다(4).

† Corresponding Author : Center for Environmental Technology Research, Korea Institute Science and Technology, Seoul 136-791, Korea
Tel : +82-2-958-5819, Fax : +82-2-958-6858
E-mail : yum@kist.re.kr

글리세롤은 화학적/생물학적 방법에 의하여 propanol, glyceric acid, propylene glycol, 1,3-propanediol (1,3-PD) 등으로 전환될 수 있다. 이 중에서 1,3-PD는 최근 상용화되어 용도가 확대되고 있는 폴리트리메틸렌 테레프탈레이트 (polytrimethylene terephthalate, PTT)의 단량체로 이용될 수 있는 중요한 원료 물질이며, 또한 윤활제와 용매로도 사용될 수 있다(5, 6).

1,3-PD의 현재 생산공정은 acrolein (DuPont사)이나 ethylene oxide (Shell사)로부터 화학적 합성법에 의해 생산되고 있다(7, 8). 글리세롤로부터 화학촉매를 이용하여 1,3-PD로 전환하는 연구도 진행되고 있으나, 지금까지 보고된 바에 의하면 주로 고온·고압 조건에서 유해한 화학용제를 사용하고, 특히 수율이 5~15% 정도로 매우 낮고, 1,2-propanediol (1,2-PD) 등의 부산물이 다량 생성되어 상업적 생산공정 적용에는 어려움이 있다(9, 10). 이에 반해 생물학적인 글리세롤 유래 1,3-PD 전환공정은 화학공정에 비해 환경친화적이고 저온·저압에서 이루어져 경제적으로 1,3-PD를 생산할 수 있다는 장점이 있어 최근 많은 관심을 받고 있다. DuPont사와 Genencor사는 대사공학기술을 이용하여 대장균으로부터 포도당을 이용하여 높은 농도 (135 g/L)의 1,3-PD를 생산하는 기술을 개발하였으나, 곡물가격의 상승으로 인해 포도당이 아닌 폐글리세롤과 같은 비곡물성 기질을 원료로 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(11). 1,3-PD는 *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum* 등의 혐기성 및 통성 혐기성 미생물들에 의해서 혐기적 조건에서 생성된다(5). 1,3-PD 생산은 기질인 글리세롤이 고농도로 존재할 경우 저해를 받으므로 유가식 공정 (fed-batch)을 통한 고농도 1,3-PD 생산 연구가 진행되었으며(12), 또한 새로운 미생물의 발굴과 공정 개선을 통한 고농도 1,3-PD/L 생산 및 고정화 미생물을 이용하여 생산성을 2~3 g/L/h에서부터 30 g/L/h 수준으로 향상시킨 결과가 보고된 바 있다(1).

국내에서도 바이오디젤이 연 20만톤 생산되고 있고 향후 생산 및 수요가 증가할 것으로 예상되므로 부산물인 폐글리세롤의 용도 개발이 필요한 실정이다. 본 연구는 통성 혐기성 미생물인 *K. pneumoniae* DSM2026와 *K. pneumoniae* DSM4799을 이용하여 두유 및 폐식용유를 이용한 국내 바이오디젤 생산공정에서 발생된 폐글리세롤로부터 1,3-PD를 생산하기 위한 것으로서, 폐글리세롤은 전처리 없이 이용하여 공정 간소화 및 경제적 생산을 도모하였다. 또한 글루코스 첨가 여부가 미생물 농도 및 1,3-PD 생산에 미치는 영향을 알아보았으며, 반회분식 (semi-batch) 발효공정을 통해 폐글리세롤을 이용한 1,3-PD 고농도 배양을 도모하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

본 실험에 사용된 균주 *K. pneumoniae* DSM2026와 *K. pneumoniae* DSM4799는 German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany)에서 구입하였으며, 각각의 균주는 DSMZ에서 제공되어진 종배양용 배지 및 배양온도 (26°C, 37°C)에 따라 6시간 배양시킨 후, 25% 글리세롤이 포함된 상태로 -80°C 냉동고에 보관하였다. 균주의 1,3-PD 생산배지 조성은 증류수 1 L에 글루코스 20 g, 글리세롤 2 g, K₂HPO₄ 5 g, KH₂PO₄ 3 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g, CaCl₂·2H₂O 0.1 g, yeast extract 2 g, peptone 0.5 g, beef extract 0.3 g (Difo Laboratories, Becton, Dickinson & Co., USA), 미량원소(13) 1 ml 첨가하였으며, 초기 pH는 7.0 으로 조절하였다. 단, 글루코스를 첨가하지 않았을 경우의 1,3-PD 생산 연구를 위해서는 글루코스를 위의 배지 조성에서 제외하였다.

탄소원으로는 순수 글리세롤 (J.T.Baker, 99.9%)과 두유 및 폐식용유를 사용한 바이오디젤 공정 (알칼리 촉매 사용)에서 발생한 폐글리세롤 2가지를 바이오디젤 생산업체로부터 제공 받아 사용하였다. 두유를 이용한 바이오디젤 생산공정에서 발생한 폐글리세롤 (G-SO)과 폐식용유 유래 폐글리세롤 (G-WO) 성분은 Table 1에 나타내었다. 사용된 폐글리세롤은 순수 글리세롤과 달리 색깔이 검고 불투명했으며, 특히 G-SO의 경우 상온에서 흐름성이 전혀 없는 젤 형상을 나타내었다. 폐글리세롤은 500 g/L의 농도의 stock solution을 만들고 정제 과정 없이 멸균하여 배양액에 적정 글리세롤 농도로 뭉혀 사용하였다.

Table 1. Composition of crude glycerol from biodiesel production*

Composition [wt%]	Crude glycerol	
	G-SO (from Soybean oil-based biodiesel production)	G-WO (from waste vegetable oil-based biodiesel production)
Glycerol	79.7	70.7
Water	0.1	12.5
Methanol	0.3	6.7
†MONG	16.9	9.7
Sodium (Na)	1.4	0.5
Magnesium (Mg)	0.0002	0.005
Potassium (K)	0.007	2.7

†MONG : matter organic non-glycerol

*Analyzed by SGS Testing Korea

배양방법

본 실험에서는 글리세롤 25%에 동결된 미생물을 50 ml 종배양용 배지에서 overnight 동안 seed 배양하였고, 250 mL 삼각 플라스크에 50 mL 생산배지를 넣은 후, seed 배양 균주를 1% (v/v) 접종하여 6시간 동안 각각 37°C (*K. pneumoniae* DSM2026) 및 26°C (*K. pneumoniae* DSM4799), 120 rpm 조건에서 호기적으로 배양시켰다. 이후 배양액에 항균필터를 통과한 아르곤 가스를 불어넣어 멸균한 serum bottle에 옮겨 담은 후, 1,3-PD 생산을 위해 20 g/L 글리세롤을 첨가하고 아르곤 가스를 10 분간 주입한 후 부틸고무마개와 알루미늄 캡으로 serum bottle을 밀봉하였다. 위와 같은 조건으로 혐기 상태로 전환한 후 호기 배양 조건과 동일한 배양조건에서 48시간 배양하였다. Serum bottle에서의 반회분식 배양 연구를 위해서 20 g/L의 순수 글리세롤 및 폐글리세롤을 24시간마다 첨가 하였다.

분석 방법

균주의 증식은 syringe로 채취 후 UV-Spectrophotometer (UVmini-1240, Shimadzu, Japan)를 이용하여 600 nm에서 optical density (OD)를 측정하였다. 글리세롤, 글루코스, 생성된 발효 산물은 serum bottle에서 배양액을 syringe로 채취하여 16,000 x g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 0.2 μm 필터 (Whatman)로 여과하여 측정하였다. 글리세롤의 정량 분석은 Free glycerol reagent (Sigma, USA)를 이용하였고, 글루코스는 reflect quant strip (glucose test strip, Merck co.)을 이용하여 측정하였다. pH는 pH meter (Orion Modil 290A)을 이용하여 측정하였다. 1,3-PD 및 2,3-butanediol (2,3-BD), acetic acid는 불꽃 이온화 검출기 (FID)를 장착한 Gas chromatography (Shimadzu

Table 2. Production of 1,3-PD using different glycerol sources with glucose addition at 48 hr

Strains (DSM No.)	Glycerol source	Glycerol consumption [g/L]	Product concentration [g/L]				Y _{PD} ^c (mol/mol)	Final pH
			Ethanol	Acetic acid	2,3-BD ^b	1,3-PD ^a		
2026	Pure	8.30	2.58	0.27	6.16	2.54	0.37	4.5
	G-SO	16.61	4.06	0.16	8.66	6.38	0.46	5.6
	G-WO	13.88	3.85	0.20	9.46	6.00	0.52	5.6
4799	Pure	16.14	0.99	0.13	5.58	7.77	0.58	4.4
	G-SO	22.61	2.37	0.22	8.32	10.73	0.57	5.1
	G-WO	20.70	3.14	0.18	8.75	8.63	0.50	5.7

^a1,3-propanediol, ^b2,3-butanediol, ^cMoles of 1,3-PD produced/moles of glycerol consumed.

Table 3. Production of 1,3-PD using different glycerol sources without glucose addition at 48 hr

Strains (DSM No.)	Glycerol source	Glycerol consumption [g/L]	Product concentration [g/L]				Y _{PD} ^c (mol/mol)	Final pH
			Ethanol	Acetic acid	2,3-BD ^b	1,3-PD ^a		
2026	Pure	16.13	1.36	0.65	0.12	7.32	0.55	5.0
	G-SO	18.91	1.31	1.00	0.16	10.15	0.65	5.5
	G-WO	17.45	0.93	1.10	0.14	9.42	0.65	5.5
4799	Pure	23.04	1.18	0.21	1.87	9.69	0.51	5.7
	G-SO	23.87	0.60	0.70	1.14	10.26	0.52	5.8
	G-WO	21.09	0.67	0.71	0.09	9.03	0.52	5.8

^a1,3-propanediol, ^b2,3-butanediol, ^cMoles of 1,3-PD produced/moles of glycerol consumed.

GC-1200, Japan)을 이용하여 분석하였다. 칼럼은 HP-INNOWax (Agilent, 30 m×0.32 mm×0.25 μm)을 이용하였고, 오븐 온도는 초기 50°C에서 30°C/min씩 최종 240°C까지 증가시켜 분석하였다. 주입부 온도는 200°C, 검출부의 온도는 240°C로 유지하였으며 carrier gas는 질소 가스를 28 mL/min의 유속으로 주입하였다.

결과 및 고찰

폐글리세롤과 순수 글리세롤을 이용한 1,3-PD 생산 비교

1,3-PD 생산균주로 알려진 *K. pneumoniae* DSM2026과 *K. pneumoniae* DSM4799를 사용하여 두유 및 폐식용유를 이용한 바이오디젤 생산 공정에서 발생한 폐글리세롤 G-SO와 G-WO를 이용하여 1,3-PD 생산성을 조사하였다. 본 연구에서 사용한 폐글리세롤은 색깔이 검고 고농도 글리세롤 외 여러 불순물이 섞여있어 이에 대한 1,3-PD 생산 영향을 알아보기 위해 비교 실험으로 순수 글리세롤을 이용한 1,3-PD 생산도 함께 조사하였다. 사용한 *K. pneumoniae* 균주들의 농도를 높여 고농도의 1,3-PD 생산을 피하고자 글루코스 20 g/L를 첨가하여 호기성 조건에서 6시간 배양하였고, 그 후 혐기성 조건으로 전환하여 1,3-PD 생산성을 관찰하였다. 이러한 호기 배양과 혐기 배양의 2단 배양은 Németh 등에서도 적용된 바 있다(13).

실험 결과, Table 2에서 보이는 바와 같이 혐기 배양 48시간 동안 두 균주 모두 폐글리세롤을 사용한 경우 순수 글리세롤에 비해 향상된 1,3-PD 생산량을 나타내었다. 특히, G-SO 폐글리세롤을 사용한 경우 순수 글리세롤을 사용한 경우에 비해 *K. pneumoniae* DSM2026로부터 2.5배, *K. pneumoniae* DSM4799로부터 1.4배 증가된 1,3-PD 생산량을 나타내었다. G-WO 폐글리세롤을 사용한 경우에도 두 균주에서 각각 6.00 g/L, 8.63 g/L

의 1,3-PD가 생성되어 순수 글리세롤 대비 각각 2.4배, 1.1배의 1,3-PD 생산량 증가를 나타내었다. 글리세롤 소비량은 사용된 글리세롤 종류에 상관없이 *K. pneumoniae* DSM2026에 비해 *K. pneumoniae* DSM4799가 더 많이 소모하였으며, 두 균주 모두 순수 글리세롤에 비해 폐글리세롤의 소모량이 1.3~2배 정도 크게 나타났다. 1,3-PD의 수율 또한 *K. pneumoniae* DSM2026는 폐글리세롤을 사용한 경우 24~40% 향상되었으며, *K. pneumoniae* DSM4799의 경우는 1,3-PD 수율이 비슷하거나 (G-SO 폐글리세롤) 약간 감소하는 경향 (G-WO 폐글리세롤)을 나타내었다. 참고로, 본 연구에서 얻은 폐글리세롤로부터 전환된 1,3-PD 수율은 Mu 등이 보고한 폐글리세롤로부터의 1,3-PD 전환 수율인 0.47 mol/mol과 비슷하거나 높은 수준을 보였다(14). 본 실험을 통해 각각 다른 원료를 이용한 바이오디젤 공정에서 생산된 두 가지 폐글리세롤을 이용했을 경우 불순물에 의한 1,3-PD의 생산 저해가 관찰되지 않았고, 오히려 순수 글리세롤에 비해 1,3-PD 생산량이 증가하는 양상을 보였으므로, 바이오디젤 생산 부산물인 폐글리세롤을 전처리 없이 1,3-PD 생산용 기질로 사용 가능함을 알 수 있다.

Glucose 첨가 여부에 따른 균주 농도 및 1,3-PD 생산량 비교

Glucose는 미생물의 성장을 촉진하는 대사 물질로, 균주 농도를 증가시켜 1,3-PD 생산량을 증가시킨다고 보고된 바 있다(15, 16). 반면 Németh 등에 의하면 글루코스가 존재할 경우 catabolite repression에 의해 글리세롤의 소모가 억제되고 그 결과 1,3-PD 생산이 억제된다고 보고된 바가 있다(17). 이에 글루코스 영향을 알아보기 위해 호기배양에서 첨가되었던 글루코스를 배제하고 그에 따른 균주 농도, 1,3-PD 생산량, 부산물 생산량 및 pH 변화 등을 조사하였다. 폐글리세롤을 사용한 경우 기질

자체의 혼탁도가 높은 관계로 정확한 OD 측정이 불가하여 순수 글리세롤을 사용했을 경우에만 OD를 측정하였다. 그 결과, 글루코스를 첨가한 경우 호기배양에서부터 혐기배양 전환 후 24시간동안 글루코스가 소모되면서 OD 기준 30% 정도 균주의 성장이 촉진됨을 알 수 있었으며, *K. pneumoniae* DSM2026에 비해 *K. pneumoniae* DSM4799에서 낮은 글루코스 소모량 및 균주 농도를 나타내었다(Fig. 1). 균주 성장 속도 (specific growth rate)는 *K. pneumoniae* DSM2026인 경우 글루코스 첨가 유무에 따라 각각 0.75 h⁻¹, 0.62 h⁻¹, *K. pneumoniae* DSM4799는 각각 0.64 h⁻¹, 0.57 h⁻¹ 였으며 글루코스 첨가시 높은 값을 나타내었다. 폐글리세롤을 사용했을 경우에도 두 균주 모두 순수 글리세롤을 이용했을 경우와 유사한 글루코스 소모 경향을 나타내었다(data not shown).

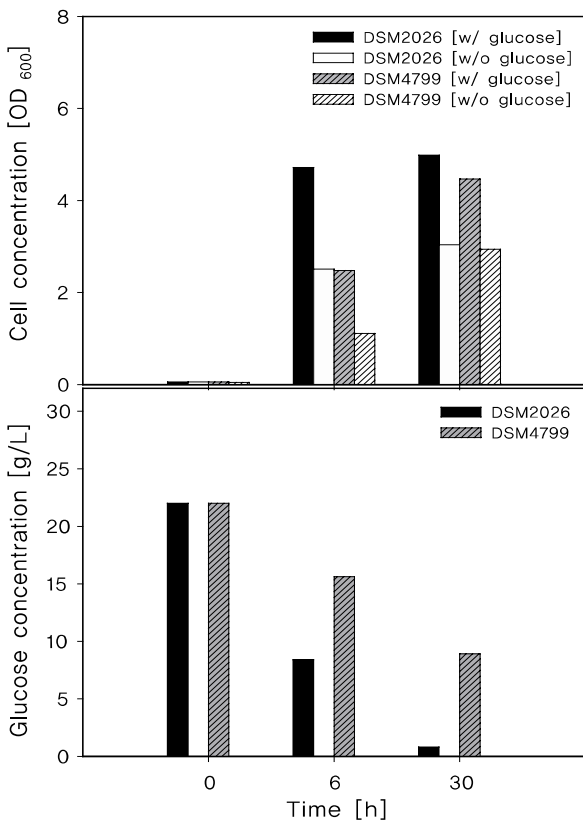


Figure 1. Effect of glucose on cell growth in pure glycerol.

글루코스 첨가 여부에 따른 1,3-PD 및 2,3-BD의 생산량을 살펴 보면(Fig. 2), 순수 글리세롤을 사용시 글루코스를 첨가하지 않은 경우에 1,3-PD 농도가 높았으며, *K. pneumoniae* DSM2026인 경우 2.9배, *K. pneumoniae* DSM4799인 경우는 1.3배 증가된 1,3-PD 생산량을 보였다. 반면, 폐글리세롤을 사용한 경우에는 두 균주가 다른 양상을 보였다. *K. pneumoniae* DSM2026은 글루코스를 첨가하지 않은 경우 1.6배 향상된 1,3-PD 생산량을 보였으나, *K. pneumoniae* DSM4799는 글루코스 첨가 여부에 따른 1,3-PD 생산량 변화가 크지 않았다. 본 실험 결과, 글루코스 첨가로 균주 농도가 증가하였지만 1,3-PD 생산량 증가는 관찰되지 않았고, 오히려 균주 농도가 낮은 글루코스 미첨가 배양액에서 향상된 1,3-PD 생산량을 보였다. Ruch 등은 *K. pneumoniae* 배양에서 글루코스를 co-substrate로 사용할 경우 효과적인 1,3-PD

생산을 위해서는 글루코스/글리세롤 비율의 최적화가 요구된다고 보고한 바 있다 (17). 따라서, 1,3-PD 생산성 향상을 위해서는 균주의 농도 증가뿐만 아니라 글루코스/글리세롤 비율의 최적화와 그에 따른 호기·혐기성 배양에서의 1,3-PD 생산으로의 대사작용 전환이 중요함을 알 수 있다.

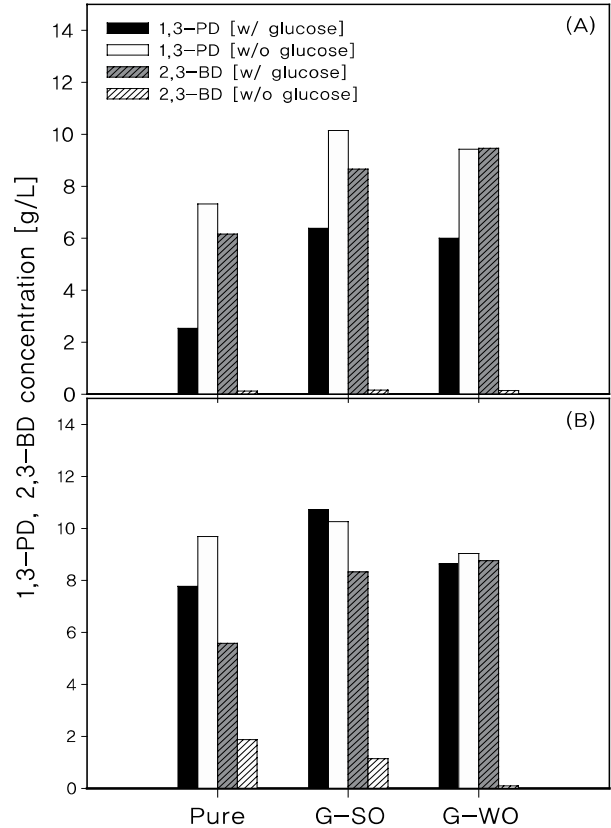


Figure 2. Effect of glucose on production of 1,3-PD and 2,3-BD with pure and crude glycerol by (A) *K. pneumoniae* DSM2026 and (B) *K. pneumoniae* DSM4799.

글루코스 첨가 여부에 따른 발효 부산물 생산 정도를 살펴 보면, 글루코스가 첨가 되었을 때 2,3-BD가 6-9 g/L 정도 생성되었으나 글루코스가 배제된 경우에는 2 g/L 이하의 낮은 생성량을 나타내었다(Fig. 2). 또한 글루코스가 첨가된 배양액에서는 글루코스 미첨가 배양액보다 에탄올의 생성량이 1.9~4.7배 높은 값 (단, *K. pneumoniae* DSM4799, 순수 글리세롤 사용시 제외) 을 나타내었다(Table 2 & Table 3). 2,3-BD는 *K. pneumoniae* 에 의한 글리세롤 발효과정에서 생산되는 주부산물 중 하나로, 이는 젖산 및 에탄올을 생산하는 과정과 더불어 환원인자 (NADH)를 소모하게 되므로 1,3-PD의 수율을 감소시키는 요인이 된다고 알려져 있다(18, 19). *K. pneumoniae*의 경우 글루코스를 탄소원으로 이용하는 대사 경로는 2,3-BD 및 에탄올 생산 경로를 포함하므로(20) 이러한 이유로 본 실험에서도 글루코스 첨가시 2,3-BD와 에탄올의 생산량이 증가된 것으로 추정되며, 글루코스를 배제했을 경우에는 2,3-BD 및 에탄올 생산보다는 상대적으로 1,3-PD 생산 경로로 대사 작용이 이루어져 1,3-PD 생성량이 증가한 것으로 사료된다. Biebl(21) 등은 pH 조절 없이 연속배양 했을 경우, 배양 12시간 이후부터 pH가 7.3에서 5.4로 낮아지면서 에탄올과 2,3-BD 농도가 증가되었다고 하였다. 본

실험에서는 순수 글리세롤에 비해 상당량의 알칼리 성분이 함유되어 있는 폐글리세롤은 배양 중 pH 감소 완화 효과를 나타냈으며(Table 2 & 3), 그 결과 에탄올 및 2,3-BD의 생성을 감소시킴으로써 높은 1,3-PD 생성량을 나타낸 것으로 추정된다. 반면, *K. pneumoniae* DSM4799의 경우, 글루코스 무첨가 배양시 폐글리세롤 사용에 의한 pH 감소 완화효과가 미미하여 (pH 5.7 vs. 5.8) 순수 글리세롤을 사용했을 경우와 비교했을 때 1,3-PD 생성량 향상 효과가 없는 결과를 나타낸 것으로 사료된다. 본 실험 결과, 글루코스를 첨가하지 않은 경우 전체적으로 1,3-PD 생성량은 증가하고 그 외 다른 발효 부산물의 생성량은 감소하였으므로, 1,3-PD 생산시 글루코스 대비 가격 경쟁력이 있는 폐글리세롤을 단독 기질로 사용하는 것이 효과적임을 알 수 있다.

반회분식 배양을 통한 1,3-PD 생산

반회분식 배양은 회분식 배양과 동일한 온도, 초기 pH 및 초기/헛기적 배양조건에서 운전되었으며, 위 실험 결과를 토대로 글루코스를 첨가하지 않은 배양액에 20 g/L의 순수 글리세롤 및 폐글리세롤을 각각 20-24시간마다 첨가시켜주면서 그에 따른 글리세롤 소비량 및 1,3-PD 생산량을 관찰하였다. 그 결과, 각 균주로부터 순수 글리세롤 사용 시 1,3-PD 생성량 (7.2 g/L, 13.7 g/L)에 비해 폐글리세롤을 사용했을 경우 2배 이상 높은 생성량 (16.9 g/L, 26.0 g/L)을 나타내었다(Fig. 3 and Fig. 4). 순수 글리세롤을 사용했을 경우에는 총 20-40 g/L 글리세롤을 소모한 후에는 더 이상의 1,3-PD 생성량 증가가 나타나지 않았지만, 폐글리세롤을 사용했을 경우에는 *K. pneumoniae* DSM2026는 총 글리세롤 60 g/L 이상, *K. pneumoniae* DSM4799는 총 80 g/L 글리세롤을 소모하면서 1,3-PD 생성량이 증가하였다. 순수 글리세롤에 비해 폐글리세롤을 사용한 경우 1,3-PD 생성량이 증가한 것은 알칼리 성분을 함유한 폐글리세롤 첨가로 인해 배양액의 pH 강하를 완화시켜서 균주 활성 및 글리세롤 소모가 지속될 수 있었고, 그 결과 1,3-PD 생산 증가도 지속될 수 있었기 때문으로 추정된다. 이러한 폐글리세롤 사용에 의한 pH 보정 효과는 실제 공정에서 pH 조절을 위한 염기의 사용을 생략하거나 줄일 수 있어 보다 효과적인 1,3-PD 발효 공정이 가능할 것으로 사료된다. 글리세롤의 소모 속도는 시간이 지남에 따라 감소하면서, 그에 따른 글리세롤 잔류 농도가 증가하고 1,3-PD 생성 속도도 감소되는 것이 관찰되었다. 순수 글리세롤을 사용했을 경우는 20-40시간 이후에는 글리세롤이 거의 소모되지 않으면서 동시에 1,3-PD 생산 증가는 없었으며, 폐글리세롤의 경우에는 배양 100 시간 이상 지속적으로 글리세롤을 소모하지만 잔류 글리세롤 농도가 증가하면서 기질 소모 및 1,3-PD 생산 속도가 감소되는 등 잔류 글리세롤 농도 증가에 따른 1,3-PD 생산 저해가 관찰되었다. 회분식 배양에서와 마찬가지로 반회분식 배양에서도 폐글리세롤 내 불순물에 의한 1,3-PD 저해 현상은 관찰되지 않았으며, Fig. 3과 Fig. 4에서 보는 바와 오히려 순수 글리세롤에 비해 효과적인 고농도의 글리세롤 소모 및 1,3-PD 생산이 가능하므로 전처리되지 않은 폐글리세롤을 이용한 1,3-PD의 생산이 보다 효과적임을 알 수 있다. 사용되어진 두 균주를 비교했을 때, *K. pneumoniae* DSM2026에 비해 *K. pneumoniae* DSM4799에서 1.5~2배 높은 1,3-PD 생산량은 나타내었으며, 이를 통해 1,3-PD 생산 균주로 *K. pneumoniae* DSM4799가 보다 적합하다고 사료된다. 1,3-PD 발효에서는 생산된 1,3-PD

농도 (≥ 60 g/L) 에 따른 미생물 생장이 저해된다고 보고(22)되고 있으나, 본 실험에서는 30 g/L 이하의 1,3-PD가 생산되었으므로 생산물에 의한 저해도는 미비했을 것으로 사료된다.

본 연구를 통해 국내 바이오디젤 생산 공정에서 발생한 폐글리세롤이 생물학적 1,3-PD 생산에 효과적으로 사용되어질 수 있음을 알 수 있으며, 향후 고농도 1,3-PD 생산과 1,3-PD 생산물 저해 현상을 해결하기 위한 공정 개선을 통해 보다 효과적인 1,3-PD 생산을 도모할 것이다.

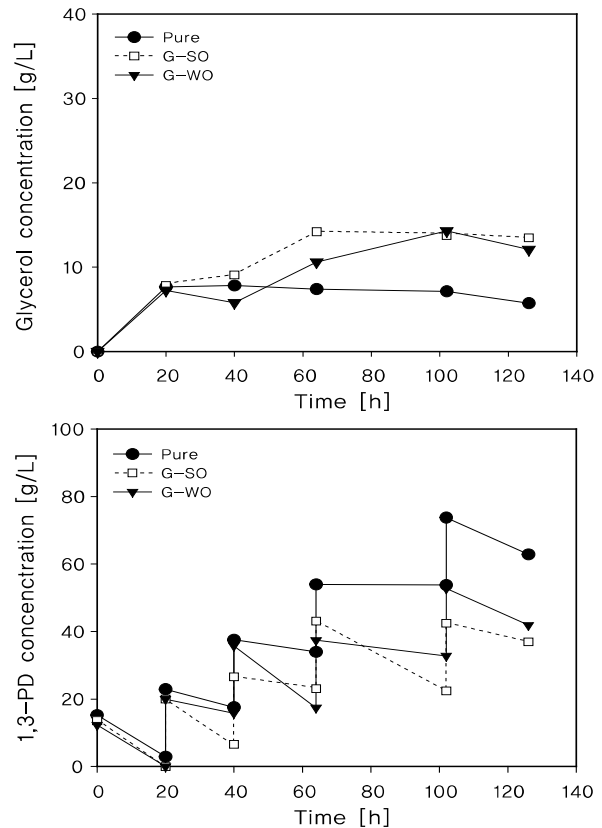


Figure 3. Comparison of 1,3-PD production and glycerol consumption with pure and crude glycerol by *K. pneumoniae* DSM2026 in semi-batch cultures.

요 약

본 연구에서는 통성 혐기성 세균인 *K. pneumoniae* DSM2026 *K. pneumoniae* DSM4799를 이용하여 국내 바이오디젤 생산공정에서 발생된 폐글리세롤로부터 1,3-PD를 생산하고자 하였다. 폐글리세롤은 전처리 없이 이용하여 폐글리세롤에 포함되어 있는 불순물의 영향을 알아보았다. 실험 결과, 회분식 발효에서 폐글리세롤을 사용한 경우 순수 글리세롤에 비해 1.1~2.5배 향상된 1,3-PD 증가량을 나타내었으며, 이를 통해 바이오디젤 부산물인 폐글리세롤은 순수 글리세롤보다 효과적인 1,3-PD 생산 기질로의 사용가능성을 확인하였다. 배양액에서 글루코스 첨가 유무에 따른 1,3-PD의 생성 변화를 살펴본 결과, 글루코스에 의해 미생물의 생장이 30% 증가된 반면, 1,3-PD의 생산량은 글루코스가 첨가되지 않은 배양액에서 1.3~2.9배 정도 증가되었다. 또한 1,3-PD 발효 부산물인 2,3-BD 생산량은 글루코스 첨가시 6-9 g/L까지

증가하는 경향을 보였다. 반회분식 배양에서는 글루코스 미첨가 시 페글리세롤로부터 26 g/L의 1,3-PD가 생성되었으며, 이는 순수 글리세롤 사용했을 경우에 비해 2~3배 높은 생성량이었다. 본 연구를 통해, 전처리 과정을 거치지 않은 바이오디젤 부산물인 페글리세롤이 효과적으로 1,3-PD 생산에 이용될 수 있음을 알 수 있으며, 이를 통해 보다 가격경쟁력이 있는 생물학적 1,3-PD 생산이 가능할 것으로 기대된다.

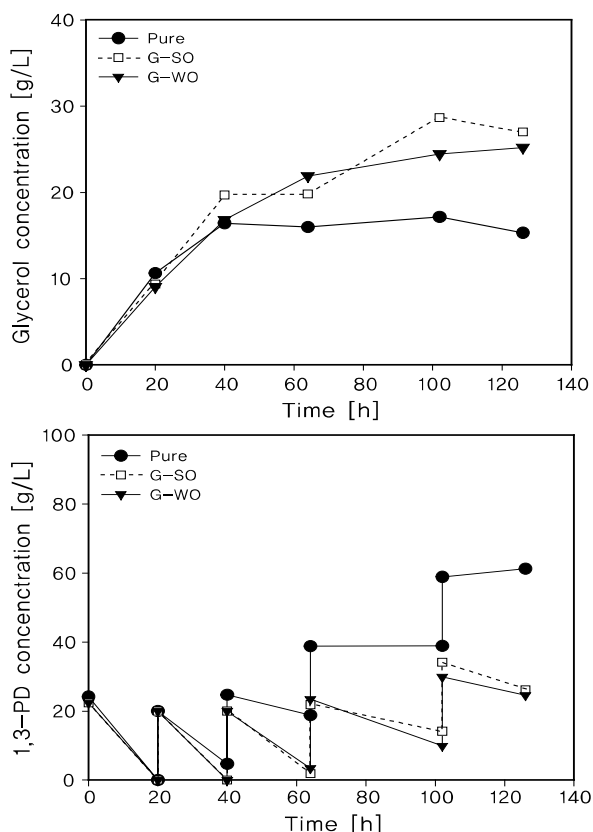


Figure 4. Comparison of 1,3-PD production and glycerol consumption with pure and crude glycerol by *K. pneumoniae* DSM4799 in semi-batch cultures.

감 사

본 연구는 에너지관리공단 에너지자원기술개발사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Lee, Sun-Gu and Sunghoon Park (2006), Industrial biotechnology : Bioconversion of biomass to fuel, chemical feedstock and polymers, *Korean Chem. Eng. Res.* **44**(1), 23-34.
- Ministry of Commerce, Industry and Energy (2005), Industrial Biotechnology : Current Status and National Policy for its Promotion.
- Kim, Seung-Hwan, Se-Jeong Kim, Kun-Gyu Park, Sang-Ki Rhee, and Chul-Ho Kim (2002), 1,3-Propanediol fermentation using the by-products from fat industry, *Korea J. Biotechnol. Bioeng.* **17**(3), 255-260.
- Wilke, T. and Vorlop, K. D. (2004), Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**(2), 131-142.
- Zheng, A. P. and Biebl, H. (2002), Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Adv. Biochem. Eng.* **74**, 239-259.
- Elm, R., Falbe, J., Hahn, H. D., and Gelbke, H. P. (1980), Propandiol. In: Ullmanns Encyklopädie der Technischen Chemie, vol. 19., Bartholomé, E., Biekert, E., Hellmann, H., Ley, H., Weigert, H., Weise, E. (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- Besson, M., Gallezot, P., Pigamo, A., and Reifsnnyder, S. (2003), Development of an improved continuous hydrogenation process for the production of 1,3-propanediol using titania supported ruthenium catalysts. *Appl. Catal. A.* **250**, 117-124.
- Knifton, J. F., James, T. G., Slaugh, L. H., Allen, K. D., Weider, P. R., and Powell, J. B. (2004), One-step production of 1,3-propanediol from ethylene oxide and syngas with a cobalt-iron catalyst. US Patent 6750373.
- Chaminand, J., Djakovitch, L. A., Gallezot, P., Marion, P., Pinel, C., and Rosier, C. (2004), Glycerol hydrogenolysis on heterogeneous catalysts. *Green. Chem.* **6**(88), 359-361.
- Wang, K., Hawley, M. C., and Deatros, S. J. (2003), Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol via Selective Dehydroxylation, *Ind. Eng. Chem. Res.* **42**, 2913-2923.
- Laffend, L. A., V. Nagarajan, and C. E. Nakamura (1996), Bioconversion of a fermentable carbon source to 1,3-propanediol by single microorganism. WO 9635796 to E.I Du Pont de Nemours and Genencor International.
- Xiu, Z. L., B. H. Song., Z. T. Wang, L. H. Sun, E. M. Feng, and A. P. Zeng (2004), Optimization of biodissimilation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* in one-stage and two-stage anaerobic cultures, *Biochem. Eng. J.* **19**, 189-197.
- Németh Á., Kupcsulik B., and Sevelia B. (2003), 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 659-663.
- Ying Mu, Hu Teng, Dai-Jia Zhang, Wei Wang, and Zhi-Long Xiu (2006), Microbiol production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnol. Lett.* **28**, 1755-1759.
- Cheng, K-K., Ling, H., Zhang, L., Sun, Y., and Liu, D. (2004), Effect of glucose as cosubstrate on 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*, *Guocheng. Gongcheng. Xuebao.* **4**(6), 561-566.
- Zhang, J., Zhao, H. Y., Liu H., Xiang, B., and Liu, D. (2002), Fermenting production of 1,3-propanediol by using glucose as cosubstrate. *Modern Chem. Industry* **22**, 32-35.
- Rush, F. E. and Lin, E. C. C. (1975), Independent constitutive expression of the aerobic and anaerobic pathway of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **124**, 348-352.
- Abbad-Andaloussi, S., Guedon, E., Spiesser, E., and Petitdemange, H. (1996), Glycerol dehydratase activity : the limiting step for 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSM5431. *Let. Appl. Microbiol.* **22**, 311-314.
- Abbad-Andaloussi, Samine, J., Gerard, P., and Petitdemange, H. (1998), Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM5431, *J. Appl. Microbiol.* **84**, 515-522.
- Syu, M.-J. (2001), Biological production of 2,3-butanediol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 10-18.
- Biebl, H., Zeng, A.-P., Menzl, K., and Deckwer, W.-D. (1998), Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 24-29.
- Huang, He., Gong, C. S., and Tsao, G. T., (2002), Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98-100**, 687-698.