

글리세롤로부터 1,3-propanediol 생산을 위한 *Klebsiella pneumoniae* 배양 조건 최적화

전선애 · 공성욱* · 상병인 · 엄영순†

한국과학기술연구원 환경기술연구단
136-791 서울시 성북구 하월곡동 39-1
*(주)인우코퍼레이션
138-828 서울시 송파구 방이 2동 50-8
(2009년 8월 3일 접수, 2009년 9월 22일 채택)

Optimization of Culture Conditions for 1,3-propanediol Production from Glycerol Using *Klebsiella pneumoniae*

Sun-Ae Jun, Sean W Kong*, Byoung-In Sang and Youngsoon Um†

Center for Environmental Technology research, Korea Institute of Science and Technology
39-1 Hawolgok-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-791, Korea

*INWOO Corporation, 50-8 Bangi-dong, Songpa-gu, Seoul 138-828, Korea
(Received 3 August 2009; accepted 22 September 2009)

요 약

본 연구는 통성 혐기성 미생물인 *K. pneumoniae* DSM4799을 이용하여 순수 글리세롤과 국내 바이오디젤 생산공정에서 발생된 폐글리세롤로부터 1,3-PD을 생산하기 위한 연구로서, 혐기 및 호기 조건, 배양온도, 글리세롤 농도, pH에 따른 1,3-PD 생산성 비교를 통해 최적 배양조건을 찾고자 하였다. *K. pneumoniae* DSM4799를 혐기조건과 호기/혐기 2단계 배양을 한 결과, 혐기조건에서 더 효율적인 1,3-PD 생산이 이루어졌다. 배양 온도를 26~37 °C로 변화시키면서 배양한 결과, 30~33 °C에서 높은 1,3-PD 생산성을 나타내었고, 글리세롤 농도는 글리세롤의 종류에 상관없이 60 g/L 이상에서 균주의 성장 및 1,3-PD 생산이 저해되는 현상을 관찰할 수 있었다. 폐글리세롤 사용시 순수 글리세롤에 비해 초기 1,3-PD 생산은 감소하였으나, 48시간 후에는 오히려 더 높은 농도의 1,3-PD를 생산하였다. 유가식 배양으로 글리세롤 농도를 40 g/L 이하로 조절하면서 pH 조절유무에 따른 1,3-PD 및 부산물의 변화를 살펴본 결과, pH를 7.0으로 유지시켰을 때 pH 조절을 하지 않은 경우보다 25% 향상된 1,3-PD 수율을 나타내었다(0.56 g/g vs. 0.45 g/g). 본 연구를 통해 *K. pneumoniae* DSM4799를 이용하여 1,3-PD 생산시 혐기조건, 온도 30 °C, 순수 또는 폐글리세롤 40 g/L 이하, pH 조절 등의 배양조건이 적합함을 알 수 있었으며, 최적화된 배양조건을 통해 보다 가격경쟁력이 있는 생물학적 1,3-PD 생산이 가능할 것으로 기대된다.

Abstract – To improve the productivity of 1,3-propanediol(1,3-PD) with *K. pneumoniae* DSM4799 using pure glycerol and crude glycerol derived from the biodiesel process, optimizing fermentation conditions was performed by changing environmental factors such as anaerobic/aerobic condition, temperature, glycerol concentration, and pH. When anaerobic conditions were maintained, there was an improved 1,3-PD production compared with that from aerobic/anaerobic 2-stage fermentation. From the results with temperature 26~37 °C, the higher 1,3-PD production yield was observed at 30~33 °C. For an initial glycerol concentration higher than 60 g/L, cell growth and 1,3-PD production were inhibited. When crude glycerol was used, the initial 1,3-PD production appeared to be inhibited. After 48 hr of incubation, however, 1,3-PD production with crude glycerol was even higher than that with pure glycerol, demonstrating the feasibility of 1,3-PD production using crude glycerol as a substrate. Fed-batch fermentation was applied for the high concentration of 1,3-PD without substrate inhibition. By regulating pH at 7 during the fed-batch with glycerol lower than 40 g/L, the yield of 1,3-PD was 25% higher than that without pH regulation(0.56 g/g vs. 0.45 g/g). In conclusion, based on our results, anaerobic conditions, temperature at 30 °C, pure or crude glycerol lower than 40 g/L, and pH regulation at 7 were the optimized conditions for 1,3-PD production using *K. pneumoniae* DSM4799, making it more feasible to produce 1,3-PD at higher concentration and a lower price.

Key words: Glycerol, Biodiesel Waste, 1,3-Propanediol, Optimization

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: yum@kist.re.kr

‡ 이 논문은 KAIST 장호남 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

1. 서 론

1,3-propanediol(1,3-PD)는 고분자 폴리트리메틸렌 테레프탈레이트 (polytrimethylene terephthalate, PTT)의 단량체로 이용될 수 있는 중요한 물질이며, 또한 화장품, 식품, 섬유, 윤활제 및 의약품의 원료로 최근 상용화되어 용도가 확대되고 있다[1,2]. 1,3-PD는 acrolein이나 ethylene oxide로부터 화학적 합성법에 의해 생산되고 있으며, 글리세롤로부터 화학촉매를 이용한 1,3-PD로 전환하는 연구도 진행되고 있다[3,4]. 그러나 이러한 화학적 생성공정은 주로 고온·고압 조건에서 유해한 화학용제를 사용하고, 낮은 수율(5~15% w/w)과 더불어 1,2-propanediol(1,2-PD) 등 여러 부산물이 주로 생성되어 상업적 생산공정 적용에 어려움이 있다[5,6]. 반면에 생물학적 1,3-PD 전환공정은 상온·상압의 조건에서 비교적 적은 에너지를 소모하므로, 경제적이고 환경친화적이면서 또한 화학적 공정에 비해 높은 수율을 나타내는 장점이 있어 최근 많은 연구가 진행되고 있다[2,7,8]. 1,3-PD는 *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum* 등의 다양한 미생물에 의해 혐기 및 미세혐기 조건에서 생성되며[2,9], DuPont사와 Genencor사는 대사공학기술을 이용하여 대장균으로부터 포도당을 이용하여 고농도의 1,3-PD(135 g/L)를 생산하는 기술을 개발하기도 하였다[10]. 그러나 곡물가격의 상승으로 포도당이 아닌 폐글리세롤과 같은 비곡물성 기질을 원료로 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[7,8,11].

최근 바이오디젤(Fatty acid methyl esters)은 환경친화적이고 재생 가능한 대체연료의 특성으로 생산 및 보급이 상당히 증가되고 있다. 바이오디젤을 생산하는 공정에서 생산량 대비 10% 정도의 고농도 글리세롤이 부산물로 발생하고 있으며, 글리세롤의 공급량 확대에 따라 2006년에는 약 2.5 cents/lb로 가격이 하락되었다[12]. 글리세롤은 미국 에너지성(US DOE)에서 top value-added chemicals로 선정된 대체 화학원료 중 하나로, 각종 정밀화학제품의 원료물질로서 사용될 가능성이 높아지는 만큼, 향후 시장은 더 확대될 것으로 추정되고 있다[12]. 국내에서도 바이오디젤이 연 20만톤 생산되고 있으며, 향후 생산 및 수요가 증가될 것으로 예상되는 만큼, 부산물인 폐글리세롤의 용도 개발이 필요한 실정이다.

본 연구팀의 선행결과에 의하면, *K. pneumoniae* DSM4799를 이용하여 1,3-PD를 생산하는 경우 폐글리세롤을 단독 기질로 사용시 미생물 성장 저해와 1,3-PD 저해가 없는 것이 관찰되었다[13]. 본 연구에서는 통성 혐기성 미생물인 *K. pneumoniae* DSM4799를 이용하여 순수 글리세롤과 국내 바이오디젤 생산공정에서 발생된 폐글리세롤로부터 고농도 1,3-PD의 생산을 도모하기 위해 배양조건을 최적화하였다. 혐기조건과 호기/혐기조건 2단계 배양, 배양 온도, 글리세롤의 농도에 따른 1,3-PD 생산성을 회분식 발효를 통해 비교하였으며, 유가식 배양에서 pH 조절에 따른 1,3-PD 생산성을 비교하여 최적의 배양조건을 찾고자 하였다.

2. 재료 및 실험방법

2-1. 균주 및 배지

본 실험에서 사용된 균주 *K. pneumoniae* DSM4799는 German Collection of Microorganisms and Cell Cultures(DSMZ, Braunschweig, Germany)에서 구입하였으며, DSMZ에서 제공된 중배양용 배지 및

Table 1. Composition of crude glycerol from biodiesel process*

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)	0.002	0.005
Potassium(K)	0.007	2.7

†MONG : matter organic non-glycerol

*Analyzed by SGS Testing Korea

배양온도(26 °C)에 따라 6시간 배양시킨 후, 25% 글리세롤이 포함된 상태로 -80 °C 냉동고에 보관하였다. 1,3-PD 생산을 위해 사용된 배지의 조성은 증류수 1L에 5 g K₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 2 g(NH₄)₂SO₄, 0.4 g MgSO₄·7H₂O, 0.1 g CaCl₂·2H₂O, 2 g yeast extract, 0.5 g peptone, 0.3 g beef extract(Difco Laboratories, Becton, Dickinson & Co., USA), 미량원소[14] 1 ml을 첨가하였다. 탄소원으로는 순수 글리세롤(J. T. Baker, 99.9%)과 알칼리 촉매를 사용한 바이오디젤 공정에서 발생한 폐글리세롤 2가지를 바이오디젤 생산업체로부터 제공받아 사용하였다. 두유를 사용한 바이오디젤 생산공정에서 발생한 폐글리세롤을 G-SO, 폐식용유 유래 폐글리세롤을 G-WO로 각각 명명하였으며, 성분은 Table 1에 나타내었다. 사용된 폐글리세롤은 500 g/L 농도의 stock solution을 만들고 정제 과정 없이 멸균하여 배양액에 적정 글리세롤 농도로 희석하여 사용하였다.

2-2. 회분식 배양방법

본 실험에서는 25% 글리세롤에 동결시킨 *K. pneumoniae* DSM4799를 50 mL 중배양용 배지에서 16시간 동안 seed 배양하였다. 호기/혐기 2단계 배양의 경우, 생산배지 50 mL이 포함된 250-mL 삼각 플라스크에 2.5%(v/v) 접종하고 6시간 동안 30 °C, 120 rpm에서 호기적으로 선배양(preculture)하였다. 이후 배양액을 멸균한 serum bottle에 옮겨 담은 후 항균 필터를 통과한 아르곤 가스를 불어넣어 혐기조건을 형성하고 부틸 고무마개와 알루미늄 캡으로 밀봉하였다. 혐기 배양인 경우, 125-mL serum bottle에 50 mL 생산배지를 넣고 아르곤 가스를 통과시켜 혐기성 조건을 만들었으며, 부틸 고무마개와 알루미늄 캡으로 밀봉하여 autoclave하였다. 이후 선배양된 균주를 2.5%(v/v) 접종하고 24~48시간 동안 배양되었다. 순수 글리세롤과 폐글리세롤의 농도와 배양온도는 실험의 목적에 따라 다양하게 변화시켰다. 혐기/호기 상태에 따른 1,3-PD 생산을 비교시에는 배양 20시간 후 20 g/L 글리세롤을 첨가하는 반회분식 배양을 하였다.

2-3. 유가식 배양방법

유가식 배양은 3 L 발효조(Fermentec Co. Ltd., Korea)에 1.5 L의 working volume으로 운전되었다. 발효조와 배지를 멸균한 후, 혐기조건을 만들기 위해 필터링된 아르곤 가스를 주입시켰으며 선배양된 *K. pneumoniae* DSM4799의 5%(v/v)를 접종하였다. 초기 글리세롤 농도를 40 g/L로 조정하였고 30 °C, 125 rpm에서 배양하였다. 유가식 배양 동안 600 g/L의 농축된 글리세롤을 첨가하여 배양

액의 글리세롤 농도를 10~30 g/L로 유지하였다. pH는 5 N KOH를 사용하여 7.0으로 조절하였으며, 산화환원전위(Oxidation reduction potential, ORP)는 질소가스 주입없이 -150 ~ -450 mV로 유지되었다.

2-4. 분석방법

균주의 증식은 UV-Spectrophotometer(UVmini-1240, Shimadzu, Japan)을 이용하여 600 nm에서 optical density(OD)를 측정하였다. 채취한 배양액을 16,000×g에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 회수하여 0.2 µm 필터(Whatman)로 여과하여 글리세롤과 생성된 발효 산물을 측정하였다. 글리세롤 정량 분석은 Free glycerol reagent (Sigma, USA)를 이용하였고, 1,3-PD, 2,3-butanediol(2,3-BD), acetate, ethanol은 불꽃 이온화 검출기(FID)를 장착한 Gas Chromatography (Shimadzu, GC-1200, Japan)을 이용하여 분석하였다. 칼럼은 HP-INNOWax(Agilent, 30 m×0.32 mm×0.25 µm)을 이용하였고, 주입부 온도는 200 °C, 검출부 온도는 240 °C로 유지하였으며 오븐 온도는 초기 50 °C에서 30 °C/min씩 최종 240 °C까지 증가시켰다. Carrier gas로 질소 가스를 28 mL/min의 유속으로 주입하였다.

3. 연구결과

3-1. 혐기 또는 호기 조건에 따른 *K. pneumoniae* DSM4799의 1,3-PD 생산 비교

*K. pneumoniae*는 호기적 조건에서 균주 생장이 빠르고, 혐기성 조건에서는 균주 생장은 느리지만 1,3-PD를 생산하므로 호기적 조건과 혐기적 조건 배양의 장점을 이용한 2단계 배양이 연구된 바 있다[14]. 하지만, 이러한 2단계 배양은 실제 공정에서는 공기유입에 에너지가 소모되는 단점이 있으므로, 혐기적 조건을 유지하면서 1,3-PD 생산성을 높이는 것이 더 바람직하다. 이에 본 실험에서는 호기/혐기의 2단계 배양과 혐기 배양에 따른 1,3-PD 생산성을 비교하여 보았다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이, 혐기로 배양할 경우, 20시간 동안 호기/혐기 2단계 배양(10.6 g/L)과 혐기 배양에서의 1,3-PD 생산은 유사하였다. 하지만, 20 g/L 글리세롤을 더 첨가한 반유기식 배양을 한 후, 혐기배양을 한 경우 호기/혐기 2단계 배양보다 34% 증가한 22 g/L의 1,3-PD가 생산되었다. 본 실험결과에

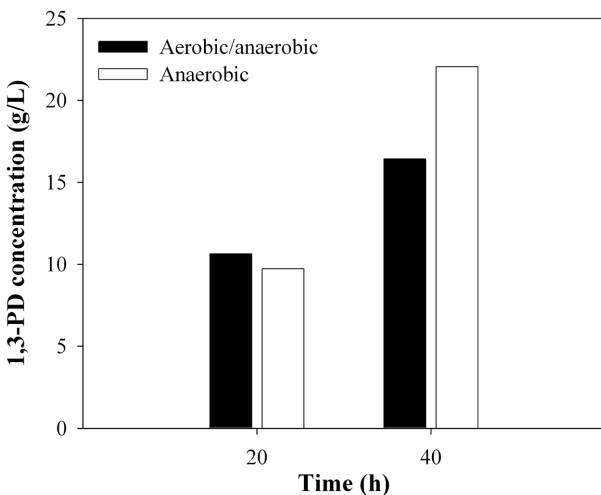


Fig. 1. Effect of aerobic and anaerobic conditions on 1,3-PD production by *K. pneumoniae* DSM4799.

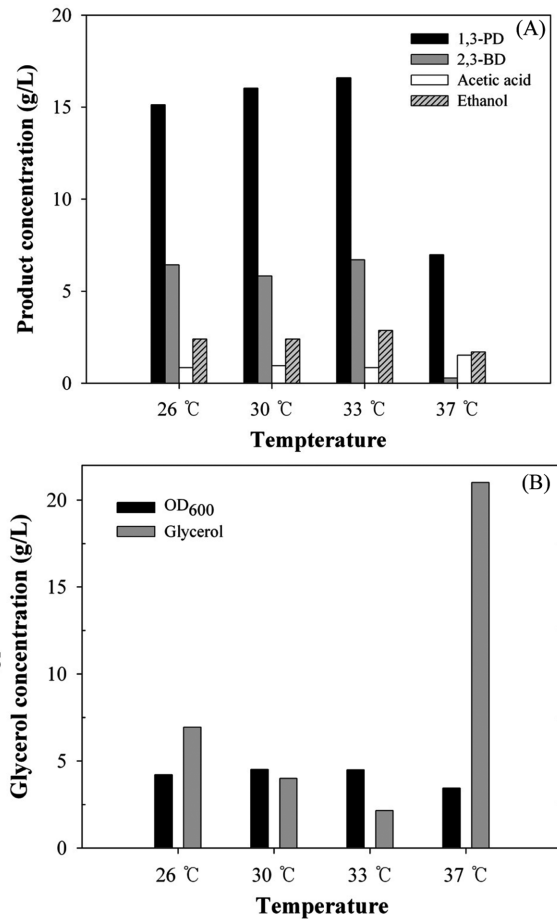


Fig. 2. Effect of temperature on (A) product concentrations (B) cell growth, and glycerol consumption by *K. pneumoniae* DSM4799 at 48 hr

서 나타난 바와 같이 *K. pneumoniae* DSM4799의 경우 혐기 배양 조건에서 1,3-PD 생산이 더 우수하며, 본 연구팀에서 보고한 바와 같이 글루코스를 첨가하지 않은 경우 더 효과적인 1,3-PD 생산이 이루어지므로[13], 향후 연구는 *K. pneumoniae* DSM4799를 이용하여 글리세롤을 단독 기질로 이용하여 혐기적 조건에서 수행하였다.

3-2. 온도에 따른 1,3-PD 생산

1,3-PD 생산을 위한 최적의 온도 조건을 찾기 위해 균주 *K. pneumoniae* DSM4799를 배양온도 26, 30, 33, 37 °C로 유지하면서 초기 글리세롤 농도 40 g/L으로 혐기 조건으로 회분식 배양하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 온도가 26, 30, 33 °C로 증가할수록 1,3-PD 생산량과 글리세롤 소모량이 조금씩 증가하였다. 반면, 37 °C에서는 오히려 1,3-PD의 생산량이 감소되었으며, 다른 온도에 비해 낮은 미생물 농도 (OD₆₀₀=3.4)와 낮은 글리세롤 소모량을 보였다. 본 연구에서는 *K. pneumoniae* DSM4799를 이용한 1,3-PD 생산에서 30 °C와 33 °C에서의 1,3-PD 수율이 유사하게 나왔으므로 에너지 소비량 등을 고려하여 30 °C가 배양 온도로 적합한 것으로 판단하였다.

3-3. 순수 글리세롤 농도에 따른 1,3-PD 생산 비교

1,3-PD 생산을 위한 최적의 기질농도 조건을 찾기 위해 생산배지에 초기 글리세롤 농도를 20, 40, 60, 80, 100 g/L를 각각 첨가하여,

Table 2. Effect of glycerol concentration on *K. pneumoniae* DSM4799 cultivation at 24 hr

Glycerol	Initial glycerol conc. [g/L]	Glycerol consumption [g/L]	1,3-PD [g/L]	Productivity [g/L/h]	*Y _{PD} (mol/mol)	pH	OD ₆₀₀
Pure	20	20.0	7.6	0.35	0.52	5.33	4.3
	40	39.5	14.0	0.59	0.44	5.12	4.2
	60	32.2	11.0	0.47	0.42	5.47	3.7
	80	17.4	7.1	0.32	0.53	5.53	2.5
	100	10.3	4.3	0.18	0.50	5.67	2.0
G-SO	20	19.6	7.8	0.29	0.43	5.85	
	40	26.9	8.0	0.33	0.36	6.03	
	60	34.3	8.7	0.36	0.31	6.14	†ND
	80	24.8	2.2	0.09	0.11	6.97	
	100	27.8	0.0	0.00	0.00	8.72	
G-WO	20	20.0	7.3	0.36	0.52	5.92	
	40	34.2	14.4	0.60	0.51	5.88	
	60	33.7	11.2	0.46	0.40	5.77	†ND
	80	22.0	5.1	0.21	0.28	5.71	
	100	47.8	5.2	0.22	0.13	5.98	

*Moles of 1,3-PD produced/moles of glycerol consumed.

†ND: not detectable due to the turbidity caused by crude glycerol

30 °C에서 48시간 동안 혐기적으로 회분식 배양하였다. 그 결과 Table 2와 같이 초기 20, 40 g/L의 글리세롤을 첨가한 경우, 배양 24 시간 동안 모두 소모되었으며 각각 7.6 g/L와 14.0 g/L의 1,3-PD가 생산되었다. 글리세롤 농도 20 g/L와 40 g/L를 첨가한 경우 24시간 후 OD는 별 차이가 없지만, 1,3-PD 농도와 생산성(productivity)을 비교하면 40 g/L를 첨가하였을 경우 보다 효과적인 1,3-PD 생산인 것을 알 수 있다(Table 2). 반면, 초기 글리세롤 농도를 60 g/L 이상을 첨가한 경우는 40 g/L를 첨가한 경우와 비교하면 24시간 배양 후 OD, 1,3-PD 농도, 생산성, 수율 등에서 낮은 결과를 나타내었다 (Table 2). 이는 글리세롤 농도가 60 g/L 이상인 경우 균주 성장과 1,3-PD 생산을 저해하기 때문인 것으로 생각된다. 글리세롤 60 g/L를 첨가한 경우, 고농도 글리세롤에 대해 적응이 이루어진 48시간 후에는 글리세롤 40 g/L 첨가한 경우보다 1,3-PD 농도가 2.5 g/L 높은 것이 관찰되었으나, 80~100 g/L 첨가한 경우는 60 g/L인 경우보다 1,3-PD 농도가 낮았다(Fig. 3). Cheng 등[15] 호기성 조건과 혐기성 조건에서 *K. pneumonia* M5a를 이용하여 글리세롤 농도가 40 g/L보다 높은 경우 미생물 성장 및 1,3-PD 생산에 저해를 준다고 보고하였으며, 이는 본 실험의 결과와 유사하다. 또한, Cheng 등[15]의 결과에 의하면 혐기성 조건에서는 110 g/L 이상의 글리세롤을 첨가한 경우 미생물 성장이 완전 저해되었고, 호기조건에서는 133 g/L 이상에서 완전 저해되었다. 본 실험의 결과로 볼 때, *K. pneumoniae* DSM4799을 이용한 효율적인 1,3-PD 생산을 위해서는 40 g/L 이하의 글리세롤 농도가 적합할 것이라 판단된다. 또한, 배양 초기에 고농도 글리세롤을 첨가시 균주 성장에 저해를 주는 기질 저해 (substrate inhibition)가 일어나므로, 유가식(fed batch) 배양을 통한 고농도 1,3-PD 생산이 바람직하다.

3-4. 폐글리세롤 농도에 따른 1,3-PD 생산 비교

본 연구팀에서 보고한 바와 같이[13] 각각 다른 원료를 이용한 바이오디젤 공정에서 생산된 폐글리세롤(G-SO, G-WO)을 이용했을 경우 폐글리세롤에 포함되어 있는 불순물에 의한 1,3-PD의 생산저해가 관찰되지 않았고, 오히려 순수 글리세롤을 사용했을 경우와 비

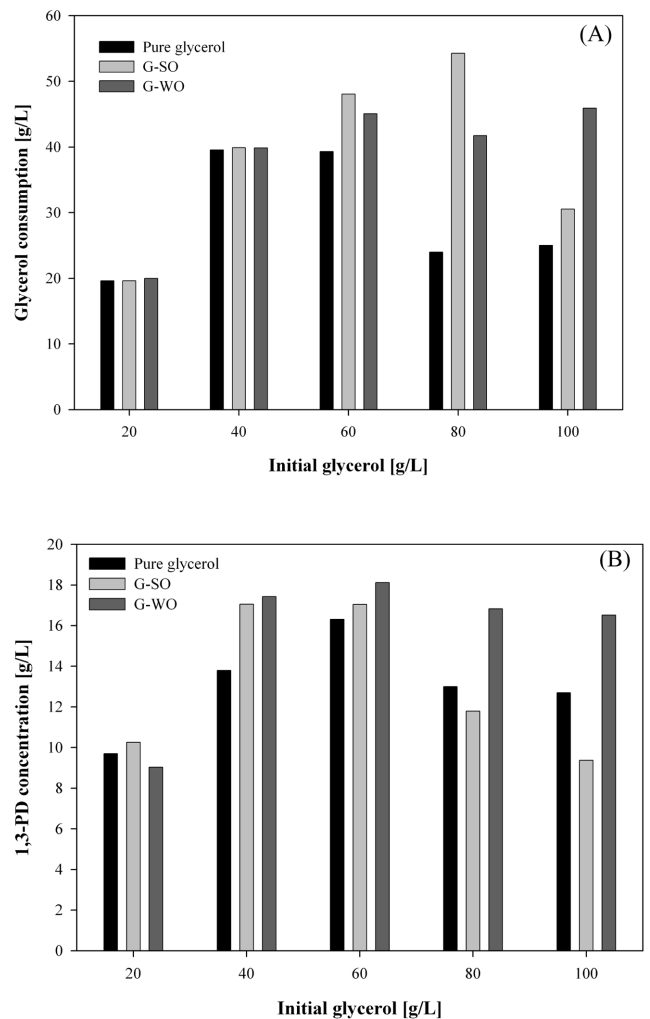


Fig. 3. Effect of initial glycerol(pure, G-SO, and G-WO) concentrations on (A)glycerol consumption and (B)1,3-PD production by *K. pneumoniae* DSM4799 at 48 hr.

교시 1,3-PD 생산량이 증가하는 양상을 보였으므로, 바이오디젤 생산 부산물인 폐글리세롤을 전처리없이 1,3-PD 생산용 기질로 사용 가능함을 알 수 있다. 본 실험에서는 1,3-PD 생산을 위한 최적의 폐글리세롤 농도 조건을 찾고, 순수 글리세롤을 사용했을 경우와 비교하기 위해 생산배지에 초기 폐글리세롤의 농도를 20, 40, 60, 80, 100 g/L를 각각 첨가하여, 30 °C에서 48 시간 동안 균주 *K. pneumoniae* DSM4799를 혐기 배양하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 초기 20, 40 g/L의 폐글리세롤 G-SO와 G-WO를 각각 첨가한 경우 배양 48시간 동안 모두 소모되었고, 글리세롤 20 g/L를 소모하여 9~10 g/L 1,3-PD가 생산되었고, 글리세롤 40 g/L로부터 17 g/L의 1,3-PD가 생산되었다. 초기 폐글리세롤 농도를 60 g/L 이상 첨가한 경우는 글리세롤이 다 소모되지 않았고, 40 g/L를 첨가한 경우와 비교하면 24시간 배양 후 1,3-PD 농도, productivity, 수율 등에서 낮은 결과를 나타내었다(Table 2). 이는 글리세롤 농도가 60 g/L 이상인 경우 균주의 초기 성장 및 1,3-PD 생산을 저해하기 때문인 것으로 사료되며, 이는 앞서 설명한 고농도 순수 글리세롤에 의한 저해현상과 유사하다. 순수 글리세롤에서와 마찬가지로 고농도 글리세롤에 대해 적응이 끝난 후에는 (배양 48시간 후) 1,3-PD 농도가 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 3). 40 g/L 이상의 폐글리세롤 G-SO를 사용한 경우는 G-WO를 사용했을 때보다 1,3-PD 농도, productivity, 수율이 낮은 경향을 보였으며(Table 2), G-SO에 의한 1,3-PD 생산 저해 현상은 글리세롤 농도가 80 g/L 이상인 경우 더 현저하게 관찰되었다(Fig. 3). 폐글리세롤에 의한 1,3-PD 생산 저해가 있는지 알아보기 위해, 폐글리세롤 농도에 따른 1,3-PD 생산 농도를 순수 글리세롤 사용시 생산된 1,3-PD 농도로 나누어 상대적인 값을 비교하였다(Fig. 4). 폐글리세롤 G-SO를 사용한 경우 24시간 배양 후 순수 글리세롤을 사용한 경우보다 25~70% 감소된 1,3-PD 농도를 나타내지만, 48시간 배양 후에는 순수 글리세롤을 사용한 결과의 76% 이상이거나, 글리세롤 농도 40 g/L에서는 오히려 더 높은 1,3-PD 생산을 보였다. 폐글리세롤 G-WO를 사용한 경우에는 24시간 배양 후에도 80 g/L 글리세롤을 사용한 경우를 제외하고는 순수 글리세롤을 사용한 경우와 유사하거나 더 향상된 1,3-PD 생산을 보였으며, 48시간 배양 후에도 비슷한 경향을 나타내었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이, 폐글리세롤 G-SO에 의한 1,3-PD 생산 저해는 글리세롤 농도가 높아질수록 더 뚜렷이 나타났으며, G-WO의 경우는 순수 글리세롤을 사용한 경우보다 오히려 더 나은 1,3-PD 생산을 보였다. 폐글리세롤 사용시 향상된 1,3-PD 생산을 보이는 이유로 유추되는 것은, 폐글리세롤(pH 10~11)에 함유되어 있는 알칼리 성분들이 배양 중 발생하는 pH 감소를 완화시켜 미생물 성장과 1,3-PD 생산에 적합한 조건을 조성했기 때문인 것으로 보여진다. 이러한 폐글리세롤의 pH 감소 완화효과는 Table 2에서도 확인할 수 있으며, 또한 Biebl 등[16]의 연구에 의해 pH가 낮아질수록 1,3-PD의 생산량이 낮아지는 것이 보고된 바, 폐글리세롤 사용으로 인한 1,3-PD 생산 향상은 폐글리세롤의 pH 감소 완화 효과인 것으로 유추된다. 본 실험을 통해, 다른 바이오디젤 공정에서 생산된 폐글리세롤 G-SO와 G-WO를 1,3-PD 생산 원료로 사용 가능함을 확인할 수 있으며, Fig. 3과 4의 결과로부터 글리세롤 40 g/L 이하의 농도가 가장 적합함을 알 수 있다.

3-5. pH 조절에 따른 1,3-PD 생산

앞선 결과에 의하면 *K. pneumoniae* DSM4799를 균주로 사용시 혐기성 조건, 배양 온도 30 °C 이상, 순수 글리세롤 또는 폐글리세

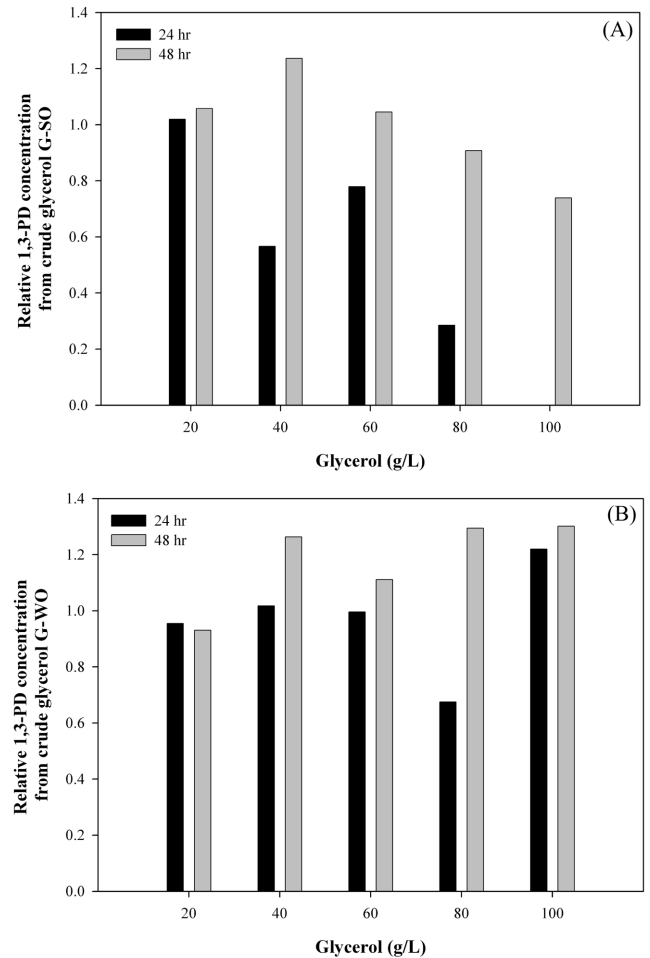


Fig. 4. 1,3-PD production using (A) G-SO and (B) G-WO relative to that using pure glycerol.

롤 40 g/L 이하 등의 배양조건이 1,3-PD 생산에 적합함을 알 수 있다. 미생물 발효에서는 pH 조절이 중요한 변수이므로, 글리세롤 농도를 40 g/L 이하로 유지하면서 1,3-PD 생산량을 증가시키기 위한 유가식 배양을 수행하였고, 발효조에서 pH 조절유무에 따른 1,3-PD 및 부산물의 변화를 관찰하였다. Fig. 5에서 나타나는 바와 같이, pH를 조절하지 않을 경우, 배양 30시간 동안 pH는 5.4까지 급격히 낮아졌으며, 40 g/L의 글리세롤이 거의 모두 소모되면서 1,3-PD가 15 g/L 생산되었다. 그 후 20 g/L의 글리세롤을 더 첨가하였지만 거의 소모하지 못하였고 1,3-PD 생성량도 더 이상 증가하지 않았다. 반면 pH를 7.0으로 조절하였을 경우에는 배양 30시간 경과 후, 초기 주입된 40 g/L 글리세롤을 모두 소모하면서 16 g/L의 1,3-PD를 생산하였고, 이 후 첨가된 글리세롤이 소모되면서 최종 1,3-PD가 62 g/L 생성되었다. 또한 pH 조절시 배양 57시간 경과 후 수율이 0.56 g/g(i.e., 0.68 mol/mol)에 달하였으며, 이는 pH 조절을 하지 않은 경우의 수율 0.45 g/g에 비해 25% 향상된 것이다. 참고로, 본 연구에서 얻은 1,3-PD 수율은 Mu 등[7]이 보고한 1,3-PD 전환 수율 0.47 mol/mol에 비해 훨씬 수준을 보였다. 부산물의 생성 정도를 살펴보면, 배양시간이 증가함에 따라 1,3-PD와 2,3-BD의 농도가 증가되었으며, 배양 30시간 후에는 pH를 조절하지 않을 경우 pH 조절을 한 경우에 비해 2,3-BD의 농도가 2배 정도 높게 나타났다. 이는 Biebl 등 [16]의 pH의 변화에 따른 1,3-PD 연속 생산 연구에서 pH가 낮아질

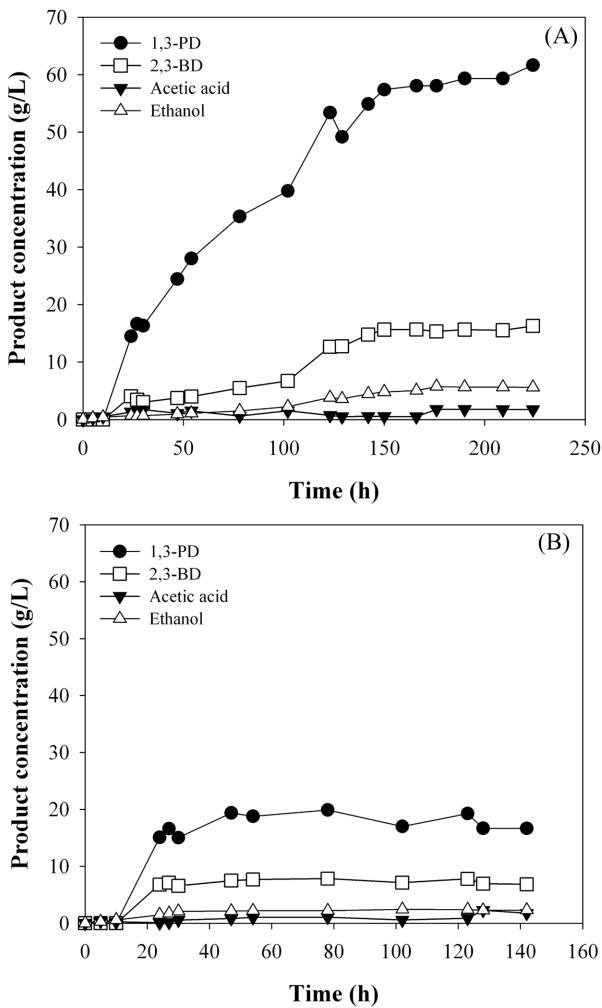


Fig. 5. Comparison of 1,3-PD and by-products concentrations (A) with pH control and (B) without pH control.

수록 1,3-PD의 생산량은 낮아지고 에탄올과 2,3-BD의 농도가 높게 나타났다는 보고와 일치하였다. 본 실험을 통해 다른 연구자들의 결과와 같이 1,3-PD 고농도 생산을 위해서는 pH 조절이 필수적임을 알 수 있으며, 유가식 배양을 통해 고농도 1,3-PD 생산과 높은 발효 수율(50% 이상)을 얻을 수 있었다.

4. 결 론

본 연구는 *K. pneumoniae* DSM4799를 이용하여 순수 글리세롤과 폐글리세롤로부터 1,3-PD를 생산하기 위한 최적 배양조건을 도출하고자 하였다. *K. pneumoniae* DSM4799는 30~33 °C의 혐기조건에서 높은 1,3-PD 생산성을 나타내었고, 글리세롤 농도는 글리세롤의 종류에 상관없이 60 g/L 이상에서 균주의 성장 및 1,3-PD 생산이 저해되는 현상을 관찰할 수 있었다. 유가식 배양으로 pH 조절유무에 따른 1,3-PD 및 부산물의 변화를 살펴본 결과, pH를 7.0으로 유지시켰을 때 pH 조절을 하지 않은 경우보다 25% 향상된 1,3-PD 수율을 나타내었다(0.56 g/g vs. 0.45 g/g). 폐글리세롤 사용시, 순수 글리세롤에 비해 초기 1,3-PD 생산은 비슷하거나 저해되는 현상을 나타냈으나, 48시간 후에는 오히려 더 높은 농도의 1,3-PD를 생산하였다. 이는 pH 변화에 따라 본 공정의 생산물 조성이 달라지는

것으로 미루어 볼 때(Fig. 5), 폐글리세롤에 함유되어 있는 알칼리 성분이 pH 감소를 완화시켜 주어 보다 효과적인 1,3-PD 생산조건을 조성해 주기 때문으로 사료된다[13]. 또한, 폐글리세롤에 포함되어 있는 불순물에 의한 1,3-PD 생산 저해가 없거나 미미하게 관찰된 바, 바이오디젤 생산 부산물인 폐글리세롤을 전처리없이 1,3-PD 생산용 기질로 사용 가능함을 알 수 있었다. 본 연구를 통해 *K. pneumoniae* DSM4799의 최적화된 배양조건을 통해 보다 가격경쟁력이 있는 생물학적 1,3-PD 생산이 가능할 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 에너지관리공단 에너지자원기술개발사업의 지원과 교육과학기술부의 과학기술국제화사업 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A. P. and Deckwer, W. D., "Microbial Production of 1,3-propanediol," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 289-297(1999).
- Zeng, A.-P. and Biebl, H., "Bulk Chemicals from Biotechnology: The Case of 1,3-propanediol Production and the New Trends," *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, **74**, 239-259(2002).
- Knifton, J. F., James, T. G., Slaugh, L. H., Allen, K. D., Weider, P. R. and Powell, J. B., "One-step Production of 1,3-propanediol from Ethylene Oxide and Syngas with a Cobalt-iron Catalyst," US Patent No. 6,750,373(2004).
- Besson, M., Gallezot, P., Pigamo, A. and Reifsnnyder, S., "Development of An Improved Continuous Hydrogenation Process for the Production of 1,3-propanediol Using Titania Supported Ruthenium Catalysts," *Appl. Catal. A-Gen.*, **250**, 117-124(2003).
- Chaminand, J., Djakovitch, L. A., Gallezot, P., Marion, P., Pinel, C. and Rosier, C., "Glycerol Hydrogenolysis on Heterogeneous Catalysts," *Green Chem.*, **6**, 359-361(2004).
- Wang, K., Hawley, M. C. and DeAthos, S. J., "Conversion of Glycerol to 1,3-propanediol Via Selective Dehydroxylation," *Ind. Eng. Chem. Res.*, **42**, 2913-2923(2003).
- Mu, Y., Xiu, Z.-L. and Zhang, D.-J., "A Combined Bioprocess of Biodiesel Production by Lipase with Microbial Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*," *Biochem. Eng. J.*, **40**, 537-541(2008).
- Willke, T. and Vorlop, K., "Biotransformation of Glycerol Into 1,3-propanediol," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **110**, 831-840(2008).
- Chen, X., Zhang, D. J., Qi, W. T., Gao, S. J., Xiu, Z. L. and Xu, P., "Microbial Fed-batch Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* Under Micro-aerobic Conditions," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 143-146(2003).
- Laffend, L. A., Nagarajan, V. and Nakamura, C. E., "Bioconversion of a Fermentable Carbon Source to 1,3-propanediol by Single Microorganism," WO Patent No. 9,635,796(1996).
- Hirschmann, S., Baganz, K., Koschik, I. and Vorlop, K. D., "Development of an Integrated Bioconversion Process for the Production of 1,3-propanediol from Raw Glycerol Waters," *Landbauforsch. Volk.*, **55**, 261-267(2005).
- Yazdani, S. S. and Gonzalez, R., "Anaerobic Fermentation of

- Glycerol: a Path to Economic Viability for the Biofuels Industry;" *Curr. Opin. Microbiol.*, **18**, 213-219(2007).
13. Jun, S.-A., Kang, C.-H., Kong, S. W., Sang, B.-I. and Um, Y., "Biological Production of 1,3-propanediol Using Crude Glycerol Derived from Biodiesel Process;" *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 413-418(2008).
14. Németh, Á., Kupcsulik, B. and Sevelle, B., "1,3-propanediol Oxidoreductase Production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026;" *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 659-663(2003).
15. Cheng, K.-K., Liu, H.-J. and Liu, D.-H., "Multiple Growth Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol Fermentation;" *Biotechnol. Lett.*, **27**, 19-22(2005).
16. Biebl, H., Zeng, A. P., Menzel, K. and Deckwer, W. D., "Fermentation of Glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*;" *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 24-29(1998).