

Clostridium ljungdahlii 성장 및 에탄올 생산에 pH가 미치는 영향

박소정 · 홍성구* · 강권규** · 김영기†

한경대학교 화학공학과, *한경대학교 지역자원시스템공학과, **한경대학교 원예학과
(2011년 8월 19일 접수, 2011년 9월 7일 심사, 2011년 9월 20일 채택)

Effect of pH on Growth and Ethanol Production of *Clostridium ljungdahlii*

So Jung Park, Sung-Gu Hong*, Kwon-Kyoo Kang**, and Young-Kee Kim†

Department of Chemical Engineering, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea

*Department of Bioresources & Rural Systems Engineering, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea

**Department of Horticultural Science, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea

(Received August 19, 2011; Revised September 7, 2011; Accepted September 20, 2011)

본 연구에서는 합성가스를 기질로 *Clostridium ljungdahlii*를 생물촉매로 바이오에탄올을 생산하는 공정을 개발하고, pH가 미생물 성장 및 에탄올 생산에 미치는 영향을 분석하였다. 다양한 초기 pH 조건(pH 5~8)에서 pH제어 없이 발효실험을 수행한 결과, 부산물인 acetic acid의 축적에 따라 모든 조건에서 24 h 이내에 pH 4.5 이하로 감소되고 미생물의 성장과 에탄올 생산이 중단되는 것을 확인하였다. 사용된 pH 조건 중에서 가장 높은 초기 pH 8의 경우가 가장 높은 미생물 성장과 에탄올 생산량(0.53 g/L)을 보였으며, 이는 상대적으로 pH의 감소가 늦게 일어나기 때문으로 생각된다. pH를 제어할 수 있는 생물반응기를 사용하여 pH 7로 유지시키며 생물공정을 운전한 결과, 최대 미생물 농도 1.65 g/L과 최대 에탄올 농도 1.43 g/L를 24 h 이내에 얻을 수 있었으며, 이는 pH를 중성영역에서 유지할 경우 *C. ljungdahlii*의 성장을 최대화할 수 있고, growth-associated production의 특성을 보이는 에탄올의 생산량을 최대화할 수 있는 것을 확인시켜준다.

In this study, we developed a bioprocess using *Clostridium ljungdahlii* as a biological catalyst to produce bio-ethanol, and the effect of pH on microbial growth and ethanol production was investigated. From the results of fermentation at various initial pH condition without pH control, pH of fermentation broth decreased to 4.5 within 24 h due to accumulation of by-product acetic acid and both microbial growth and ethanol production were stopped. The experimental result of initial pH 8 showed the highest microbial growth and ethanol production (0.53 g/L), since the pH drop was relatively slow. From the experiment of pH 7 maintained fermentation using pH controllable bioreactor, the maximum cell dry weight of 1.65 g/L and the maximum ethanol concentration of 1.43 g/L were obtained within 24 h. In conclusion, the *C. ljungdahlii* growth was enhanced by pH maintenance of neutral range, and the ethanol production was also enhanced based on the growth-associated ethanol production characteristics of *C. ljungdahlii*.

Keywords: bioethanol, *Clostridium ljungdahlii*, synthesis gas, fermentation, bioreactor

1. 서 론

화석연료는 지난 세기보다 17배나 증가한 에너지 소비의 80% 이상을 담당하고 있지만, 보유량은 점차 줄어들고 있어 가격 상승이 지속될 수 밖에 없다[1]. 또한, 화석연료 사용으로 인한 지구온난화, 기후변화와 같은 환경문제가 발생하고 있다[2,3]. 이에 따라 전 세계적으로 화석연료를 대체할 대체에너지에 대한 연구개발 및 투자가 활발히 이루어지고 있다. 특히, 최근 원유값 급등과 석유 소비량의 급증에 따라, 석유 대체에너지로 바이오 에탄올 생산에 관심이 집중되고 있다. 바이오 에탄올은 미국과 브라질을 중심으로 그 생산량이 증대되고 있으며, 이는 바이오에탄올이 화석연료에 비해 지구온난화에 미치는 영

향이 적고, 기술개발에 따른 생산단가의 감소에 따른 것이다[4]. 미국의 바이오에탄올 생산량은 2008년에 35백만 kL로 미국 전체 수송연료 소비량의 4~5%를 차지하고, 2017년까지 전체 석유소비의 15%, 2030년까지 30%를 바이오연료로 대체할 계획이다[5]. 브라질은 자동차 연료의 25% 이상을 의무적으로 바이오에탄올을 사용해야 하며, 현재 바이오에탄올 의무 혼합비율이 4%이고 2013년까지 5%로 확대할 계획이다[5].

초기 바이오에탄올 생산은 corn starch, cassava starch, cane sugar 등 곡물로부터 시작되었다[6]. 그러나 이러한 곡물원료는 식량과의 경쟁관계로 식량부족현상과 바이오에탄올 생산소비량과 곡물가격이 함께 연동되어 농산물 가격이 급등하는 결과를 가져왔다[7]. 따라서 비식물원료를 이용한 바이오에탄올 생산 기술 개발이 요구되고 있다.

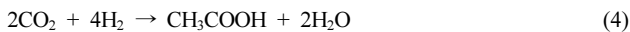
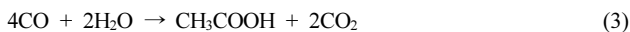
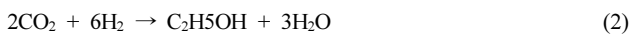
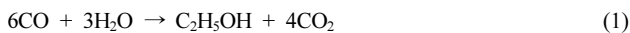
이러한 문제점을 해결하기 위해, crop residues, grasses, sawdust,

† 교신저자(e-mail: kim@hknu.ac.kr)

wood chips 등 목질계 바이오매스와 solid animal waste 등을 원료로 하는 바이오에탄올 생산기술이 개발되고 있다[8]. 목질계 바이오매스로부터 에탄올을 얻는 방법으로는 생화학적, 열화학적 경로가 개발되었다[6]. 생화학적 전환방법에서는 바이오매스의 셀룰로오스-헤미셀룰로오스-리그닌의 상호작용을 깨뜨리기 위해 산, 알칼리 또는 증기 폭발 등의 전처리 방법들이 사용된다[9]. 전처리된 바이오매스는 발효 가능한 당을 얻기 위해 효소 가수분해되고, 얻어진 가수분해물은 에탄올로 발효된다[10]. 그러나 생화학적 방법은 전처리와 효소가수분해에 과도한 비용이 소모되고 낮은 발효성능을 보이는 문제점들이 발생한다[6].

반면, 열화학적 방법은 바이오매스를 합성가스(syngas)로 가스화한 후, 화학적 촉매(Fischer-Tropsch 공정) 또는 미생물 촉매(합성가스 발효공정)를 이용하여 합성가스를 바이오에탄올로 전환한다[11]. 화학적 촉매를 이용한 공정은 고온, 고압에서의 조작, 고가의 촉매 사용과 낮은 선택도 및 에탄올 생산량으로 상업적 응용에 매력적이지 못하다[12]. 그러나 미생물 촉매를 이용한 합성가스 공정은 생촉매의 높은 특이성, 낮은 에너지 비용, 촉매독성의 저항성, 고정된 CO : H₂ 비율 요구하지 않는[13] 등의 많은 이점을 가지기 때문에 연구가 집중되고 있다.

바이오매스의 가스화를 통해 생성되는 합성가스는 주로 CO, H₂와 CO₂의 혼합물로, 혐기성 발효공정에 의해 메탄, 아세트산, 부탄산, 에탄올과 부탄올을 포함한 다양한 연료와 화학제품을 생산할 수 있다[14,15]. *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium carboxidivorans*, *Butyribacterium methylotrophicum*과 같은 생물학적 촉매는 acetyl-CoA pathway를 이용하여 합성가스로부터 에탄올 생산을 가능하게 하는 혐기성 발효공정에 사용될 수 있다[6,16]. 이 반응에 대한 화학양론식은 다음과 같다[6].



본 연구에서는, 탄소원으로 CO와 CO₂를, 전자 공여체로서 H₂를 가지는 합성가스를 기질로 *C. ljungdahlii*를 이용하여 에탄올로 전환하는 생물학적 공정을 개발하였고, 이 공정에서 pH 변화에 따른 *C. ljungdahlii*의 성장 및 에탄올 생산에 미치는 영향을 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. *C. ljungdahlii* 배양방법

본 연구에 사용된 *C. ljungdahlii*는 American type culture collection (ATCC 55383)에서 구입하였다. *C. ljungdahlii* 배양을 위한 배지의 구성 성분은 basal medium (NaCl 0.9 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.32 g/L, CaCl₂ · 2H₂O 0.2 g/L, NH₄Cl 1.0 g/L), trace mineral solution (nitrotriacetic acid 1.5 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g/L, MnCl₂ · 4H₂O 0.1 g/L, CoCl₂ · 6H₂O 0.17 g/L, ZnCl₂ 0.1 g/L, CaCl₂ · 2H₂O 0.1 g/L, CuCl₂ · 2H₂O 0.02 g/L, H₃BO₃ 0.01 g/L, NaMoO₄ · 2H₂O 0.015 g/L, NaSeO₄ 0.017 g/L, NiSO₄ · 6H₂O 0.026 g/L, Na₂WO₄ · 2H₂O 0.000 2g/L, Al₂



Figure 1. Experimental set-up of pH control bioreactor.

(SO₄)₃ · 12H₂O 0.014 g/L, NaCl 1.0 g/L, KCl 0.1 g/L), yeast extract 2 g/L, resazurin 0.02 mg/L, L-cysteine · HCl 0.4 g/L, Na₂S · 9H₂O 1.3 g/L, fructose 2~10 g/L, vitamin solution 10 mL/L (biotin 2.0 mg/L, folic acid 2.0 mg/L, pyridoxine hydrochloride 10.0 mg/L, thiamine · HCl 5.0 mg/L, riboflavin 5.0 mg/L, nicotinic acid 5.0 mg/L, pantothenic acid 5.0 mg/L, cyanocobalamine 0.1 mg/L, p-aminobenzoic acid 5.0 mg/L, lipoic acid 5.0 mg/L), phosphate buffer solution 20 mL/L (Na₂HPO₄ 0.72 g/L, KH₂PO₄ 0.68 g/L)이고 사용된 시약은 Sigma-Aldrich와 Samchun에서, vitamin은 ATCC에서 구입하였다.

250 mL bottle에 배지 200 mL를 채운 후, 1~2 mL의 배양액을 접종하고 bottle 내에 산소를 제거하기 위해 N₂ 가스를 5~10 min간 퍼징한다. 그리고 syngas를 1.5 bar의 압력이 되도록 채우고, shaking incubator (비전과학)에서 37 °C, 200 rpm의 조건으로 배양시켰다.

2.2. pH Control 반응기

본 연구에서는 Figure 1과 같이 1 L용 vacuum/pressure glass 반응기 (대한과학)와 5개의 구멍이 달린 vessel cover (대한과학)로 구성된 반응조를 생물반응기시스템(KT-L, 코바이오텍)에 장착하여 발효실험을 수행하였다. 1 L의 배양액을 넣고 vessel cover의 각 구멍에 pH전극, gas inlet/outlet tube, sampling tube, pH보정 용액 주입 tube를 실리콘 마개에 연결하여 밀폐시킨 상태로 장치하였다. 반응기 내의 교반 속도는 마그네틱 교반기를 이용하여 200 rpm으로 일정하게 유지하고, water jacket에 물을 순환시켜 37 °C로 온도를 유지시켰다.

2.3. Cell Mass 측정

Cell dry weight은 0.2 µm pore size의 cellulose nitrate membrane filter (7182-005, Whatman, Germany)를 통해 여과하고, dry oven에서 55 °C, 24 h 동안 건조하여 측정하였다. 측정된 질량과 분광광도계 (V-630, JASCO, Japan)를 이용하여 600 nm에서 측정된 흡광도로부터 검량곡선을 작성하였으며, cell mass는 흡광도를 측정하고 검량곡선에 의해 결정하였다.

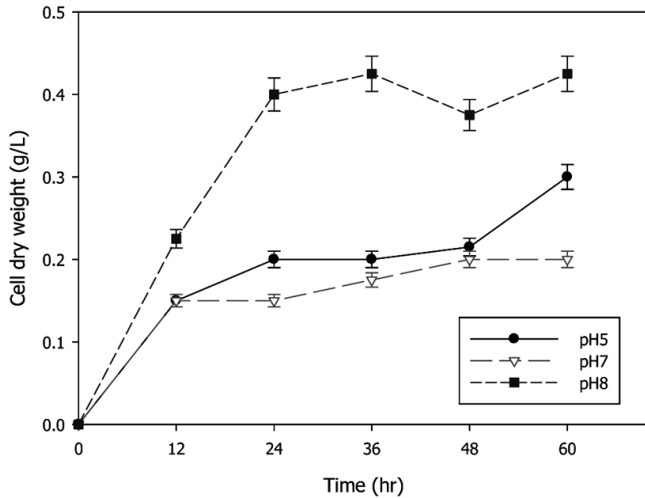


Figure 2. Time course behavior of cell dry weight of *C. ljungdahliae* cultivation at various initial pH.

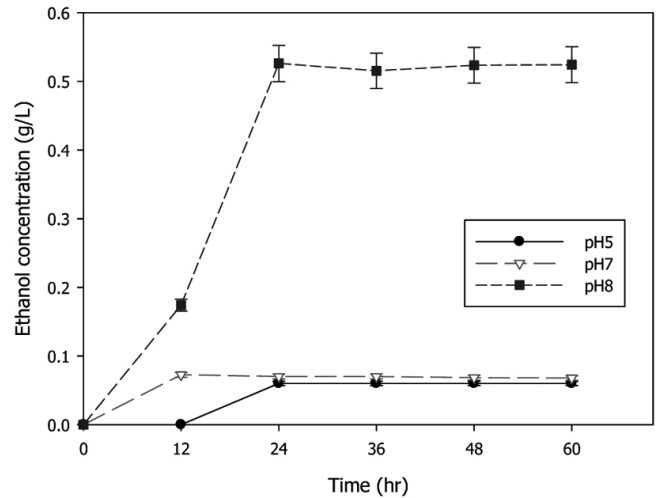


Figure 3. Time course behavior of ethanol concentration of *C. ljungdahliae* cultivation at various initial pH.

2.4. 에탄올 분석

에탄올은 FID (flame ionization detector)가 장착된 gas chromatography (Agilent 789)를 이용하여 분석하였다(Aglient J&W GC column). 주입부, 검출부, 오븐의 온도는 각각 250, 300, 210 °C이고, 1 µL의 분석시료는 10 min간, 8000 rpm으로 원심 분리하여 고액분리 후, 주입하였다. Carrier gas인 He은 24.25 mL/min로 공급하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 초기 pH에 따른 *C. ljungdahliae* 성장 및 에탄올 생산 비교

250 mL bottle에 200 mL의 배양액을 채우고 합성가스를 주입하여, 각각의 bottle의 초기 pH를 5, 7, 8로 맞춰 37 °C, 200 rpm의 shaking incubator에서 배양하였다. 12 h 마다 시료를 채취하여 pH, 미생물중량, 에탄올생산량을 분석, 비교하였다.

미생물의 성장비교를 위해, 접종 미생물 중량은 건조기준으로 0.008 g/L로 통일하여 각각의 pH조건에서 실험을 수행하였다. Figure 2에 나타난 결과에 따르면, 초기 pH값이 8에서 가장 높은 상대적 성장을 보였고, 나머지 조건에서는 상대적으로 낮은 미생물 성장경향을 보였다.

Figure 3의 에탄올 생산량 비교 결과, 미생물 성장과 같이 초기 pH 8에서 0.53 g/L의 최대 생산량을 보였고, pH 5, 7에서는 에탄올 생산이 상대적으로 적은 것을 확인하였다. 결론적으로 pH 5, 7에서는 미생물 성장과 에탄올 생산 특성의 유효한 차이를 볼 수 없으며, pH 8에서 미생물 성장과 에탄올 생산이 크게 향상되는 것을 확인하였다. 미생물 성장과 에탄올 생산과의 상관관계를 살펴보면 미생물 성장이 대폭 향상된 초기 pH 8의 조건에서 에탄올의 생산도 최대값을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 에탄올 생산의 최대화를 위해서는 미생물 성장의 최대화 전략이 필요하다.

3.2. 미생물 성장 및 에탄올 생산과정에서의 pH 변화 비교

수행한 실험에서 미생물 중량 및 에탄올 생산량과 마찬가지로 12 h 마다 pH를 측정하여 Figure 4에 나타내었다. 모든 pH 조건에서 24 h 까지 pH가 급격히 감소하고, 이후에는 크게 변화되지 않는 것으로 관찰되었다. 또한, 4.5 이하 수준으로 pH가 감소하면 미생물 성장이 정지되는 것으로 관찰되어, 중요 배양조건인 pH는 중성영역에서 유지하

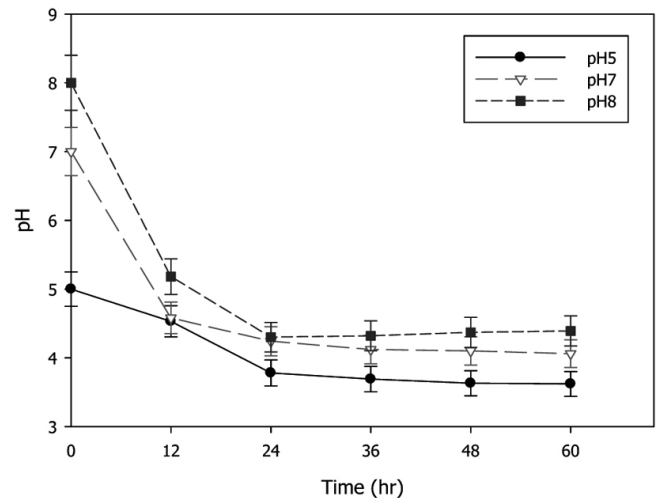


Figure 4. Time course behavior of pH in *C. ljungdahliae* cultivation at various initial pH.

는 운전전략이 미생물 성장을 최대화시킬 수 있고, 결과적으로 미생물 성장과 연계된 생산특성을 보이는 에탄올의 생산량을 최대화시킬 수 있는 것으로 분석되었다[17]. 따라서 pH 7의 중성영역을 유지하는 반응기 운전조건에서 발효실험을 통해 에탄올 생산량의 향상을 도모하였다.

3.3. pH 제어 생물반응기를 이용한 *C. ljungdahliae*의 성장 및 에탄올 생산

pH를 중성영역으로 제어하는 운전이 비제어 운전에 비해 에탄올 생산량 증가에 미치는 영향을 분석하기 위하여 pH 제어가 가능한 생물반응기를 이용하여 실험을 수행하였다. 배양액 1 L와 합성가스를 반응기에 주입하고, 12 h 마다 시료 채취와 합성가스의 재공급을 수행하였다. pH는 7로 유지하도록 제어하고, 37 °C, 200 rpm에서 반응기 운전을 수행하였다.

Figure 5에 나타난 결과에서 볼 수 있듯이, 12 h 발효 후 최대 미생물 농도 1.65 g/L에 도달하였고, 에탄올의 생산량은 24 h에서 최대값

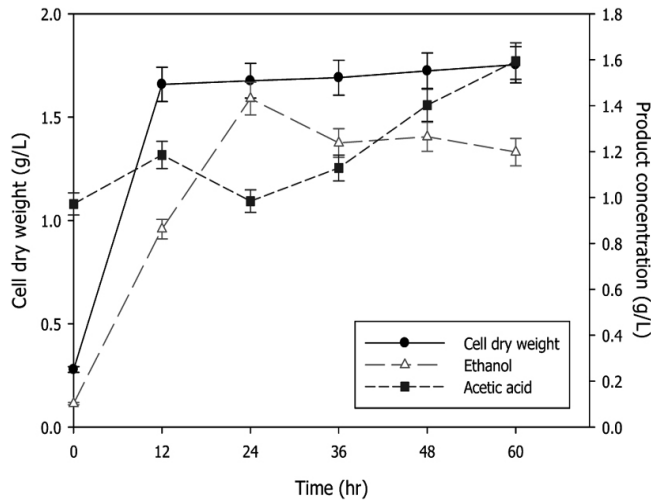


Figure 5. Growth and product concentration curves of *C. ljungdahlii* cultivation at a constant pH of 7.

인 1.43 g/L로 나타났다. 이 결과는 pH를 제어하지 않은 연구결과와 비교하였을 때 미생물 성장은 약 4배, 에탄올의 생산량은 약 3배가 증가한 것으로 적정 pH 제어를 통한 배양이 미생물의 성장과 이에 연계된 에탄올 생산을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

4. 결 론

초기 pH에 따른 *C. ljungdahlii*의 성장과 에탄올 생산을 비교한 결과, 초기 pH 8로 시작한 경우에 가장 높은 미생물 성장과 에탄올 생산 (0.53 g/L)을 보였으며, 부산물인 acetic acid의 축적으로 pH는 급격히 떨어지고 pH 4.5 이하로 감소하면 미생물 성장이 멈추는 것을 확인하였다. 따라서 *C. ljungdahlii*의 문헌상 최적 성장 조건인 pH 6.8 부근의 pH 7로 제어되는 반응기에서 발효를 수행하였으며, 24 h 이내에 미생물 농도 1.65 g/L와 에탄올 농도 1.43 g/L를 달성하였다.

연구 결과로부터, *C. ljungdahlii*의 에탄올 생산이 미생물 성장연계 특성을 보이며, 따라서 pH 제어로 미생물 성장을 최대화시켰을 때 에탄올 생산량을 3배 정도 늘릴 수 있는 것을 확인하였다.

감 사

이 논문은 2010년도 지식경제부의 재원으로 한국에너지기술평가원 (KETEP)의 지원(No. 2008NBI02P010000)과 2011년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원(No. 2011-0009293)을 받아 수행한 연구입니다.

참 고 문 헌

1. Z. Alimuddin, B. Z. Alauddin, P. Lahijani, M. Mohammadi, and A. R. Mohamed, *Renew. Sus. Energy Rev.*, **14**, 2852 (2010).
2. D. K. Kundiyana, R. L. Huhnke, P. Maddipati, H. K. Atiyeh, and M. R. Wilkins, *Bioresour. Technol.*, **101**, 9673 (2010).
3. K. R. Szulczyk, B. A. McCarl, and G. Cornforth, *Renew. Sus. Energy Rev.*, **14**, 394 (2010).
4. J.-J. Ko, S.-L. Yun, S.-W. Kang, and S.-K. Kim, *Journal of the Korea Organic Resource Recycling Association*, **16**, 79 (2008).
5. Y. E. Na, *J. Korea Organic. Resource Recycling Association*, **18**, 13 (2010).
6. P. C. Munasinghe and S. K. Khanal, *Biosour. Technol.*, **101**, 5013 (2010).
7. S.-M. Jeong, G.-S. Jin, Y.-J. Kim, S.-J. Kim, and D.-H. Lee, *J. Korea Society of Waste Management*, **26**, 419 (2009).
8. Y. Sun and J. Cheng, *Bioresour. Technol.*, **83**, 1 (2002).
9. Y.-S. Kim, *Mokchae Konghak*, **37**, 274 (2009).
10. L. Olsson and B. Hahn-Hagerdal, *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 312 (1996).
11. A. L. V. Perales, C. R. Valle, P. Ollero, and A. Gomez-Barea, *Energy*, **36**, 4097 (2011).
12. R. P. Datar, R. M. Shenkman, B. G. Catani, R. L. Huhnke, and R. S. Lewis, *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 587 (2004).
13. A. M. Henstra, J. Sipma, A. Ruinzema, and A. JM Stams, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**, 200 (2007).
14. H. Younesi, G. Najafpour, and A. R. Mohamed, *Biochem. Eng. J.*, **27**, 110 (2005).
15. M. D. Bredwell, P. Srivastava, and R. M. Worden, *Biotechnol. Prog.*, **15**, 834 (1999).
16. G. Najafpour and H. Younsei, *Enzyme Microb. Technol.*, **38**, 223 (2006).
17. J. L. Cotter, M. S. Chinn, and A. M. Grunden, *Enzyme Microb. Technol.*, **44**, 281 (2009).