

# Enterobacter aerogenes를 이용한 crude glycerol 기반의 바이오에탄올 생산

정홍섭, 성필제, 고아라, 이상준<sup>1</sup>, 김승욱<sup>1</sup>, 한성욱<sup>2</sup>, 조재훈<sup>3</sup>, 조대행, 김용환, 박철환\*

## Bioethanol Production Based on Crude Glycerol Using *Enterobacter aerogenes*

Hongsub Jung, Pil-Je Seong, A-Ra Go, Sang Jun Lee<sup>1</sup>, Seung Wook Kim<sup>1</sup>, Sung Ok Han<sup>2</sup>, Jaehoon Cho<sup>3</sup>, Dae Haeng Cho, Yong Hwan Kim, and Chulhwan Park\*

접수: 2011년 4월 4일 / 게재승인: 2011년 5월 16일  
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** The effects of pH, glycerol concentration and salt on cell growth and ethanol production using *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190 were evaluated in the anaerobic culture condition. In condition of initial pH 5, cell growth and ethanol production were highest. An initial concentration of 10 g/L of pure glycerol gave the highest cell growth and ethanol production. However, in case of over 15 g/L of pure glycerol, they decreased. The cell growth and ethanol production decreased with the increase of salt concentration. When 10 g/L of crude glycerol was used as the carbon source, the cell growth and ethanol production were 1.32 OD<sub>600</sub> and 3.95 g/L, respectively, which were about 94.4% and 88.5% compared to those of pure glycerol. These result indicates that the crude glycerol produced in the biodiesel manufacturing process may

be useful as a potential carbon source for ethanol production form *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190.

**Keywords:** *Enterobacter aerogenes*, ethanol, glycerol, crude glycerol

### 1. 서론

국제 에너지 기구 (IEA: International Energy Agency)는 세계 에너지 전망 2009 (World Energy Outlook) 발표를 통해 화석연료의 생산량은 감소되고 있으며, 고갈 속도는 이전의 예측보다 가속화되고 있다고 보고하였다 [1]. 바이오 에너지는 세계적으로 급등하는 유가에서 기인한 경제문제와 무분별한 화석연료의 사용으로 인한 환경오염 문제를 해결할 수 있는 재생 가능한 대체 에너지로 인식되면서 지속적인 연구가 진행되고 있다 [2].

바이오디젤은 화석연료와 비교하여 높은 세탄가로 높은 연료효율을 가지며, 배기가스에 황성분을 배출하지 않는 생분해성 청정연료이다. 바이오디젤은 식물성 기름과 동물성 지방으로부터 염기촉매인 NaOH 또는 KOH을 이용한 에스테르 교환 반응을 통해 생산되는 것이 일반적이다. 이러한 바이오디젤 생산 공정에서는 바이오디젤 생산량 대비 약 10% (v/v) 의 폐글리세롤 (waste glycerol)이 부산물로 발생한다 [3-6]. 바이오디젤 생산량은 지속적으로 증가하고 있는 추세이며, 이에 따라 부산물인 폐글리세롤의 생산량도 지속적으로 증가하고 있는 실정이다. 글리세롤의 공급량이 증가함에 따라

광운대학교 화학공학과  
Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University,  
Seoul 139-701, Korea  
Tel: +82-2-940-5173, Fax: +82-2-912-5173  
e-mail: chpark@kw.ac.kr

<sup>1</sup>고려대학교 화공생명공학과  
<sup>1</sup>Department of Chemical Biological Engineering, Korea University,  
Seoul 136-701, Korea

<sup>2</sup>고려대학교 생명과학대학 생명과학부  
<sup>2</sup>School of Life Science and Biotechnology, Korea University,  
Seoul 136-701, Korea

<sup>3</sup>한국생산기술연구원 그린공정연구부  
<sup>3</sup>Green Manufacturing Process R&D Group, Korea Institute of  
Industrial Technology (KITECH), Cheonan 330-825, Korea

글리세롤의 경제성이 저하되어 바이오디젤 생산 공정의 효율 감소 및 글리세롤 생산 중단 등의 문제가 발생할 수 있다 [7-8]. 이러한 이유로 폐글리세롤의 고부가가치화를 위한 연구들이 활발히 진행 중이며, 그 중 하나가 미생물을 이용한 발효를 통해 바이오에탄올을 생산하는 것이다 [2].

바이오에탄올은 이산화탄소 저감, 저장과 이동의 용이성, 재생자원의 이용 등의 이점을 지니고 있어 화석연료로 인한 환경오염을 감소시키기 위한 대체에너지로 제시되는 재생 가능한 에너지원 중 하나이며, 주로 수송에너지로 많이 사용되고 있다. 2006년에는 전 세계적으로 4천만 톤 정도가 생산되었으며, 미국, 브라질 그리고 유럽의 많은 국가들에서는 바이오에탄올 생산량이 지속적으로 증가하고 있는 추세이다. 앞으로도 새로운 산업에도 많이 이용될 것으로 예상되어 바이오에탄올의 가치는 상승할 것으로 예측되고 있다 [9].

*Citrobacter freundii*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Lactobacillus reuteri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* 그리고 *Enterobacter aerogenes* 등과 같은 다양한 미생물들은 혐기조건에서 글리세롤을 탄소원으로 이용할 수 있다. *E. aerogenes*는 글리세롤을 탄소원으로 이용할 수 있을 뿐만 아니라 에탄올과 수소의 생산이 가능하다 [10-16]. *E. aerogenes*를 이용한 폐글리세롤 발효를 통한 효율적인 바이오에탄올의 생산이 가능할 경우, 폐글리세롤 처리 비용 절감과 바이오에너지로써 바이오에탄올의 생산이 가능해 바이오디젤 생산 공정의 효율의 증대가 가능할 것으로 보인다.

본 연구에서는 폐글리세롤의 성분을 고려하여, *E. aerogenes* KCTC 2190의 균체의 성장, 글리세롤의 섭취 및 에탄올 생산량에 대하여 초기 pH의 영향, 초기 글리세롤의 농도의 영향, 염의 종류 (NaCl, KCl)와 초기 농도의 영향을 파악하고자 하였으며, crude glycerol을 적용한 에탄올 생산 가능성을 확인하고자 하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 균주 및 시약

본 연구에서는 바이오에탄올 생산을 위한 균주로 통성혐기성균인 *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190을 사용하였다. Deep freezer (-80°C)에서 40% 글리세롤 liquid stock으로 보관 중이던 *E. aerogenes* KCTC 2190을 액체 배양을 통해 활성화시킨 후, nutrient agar plate에 도말 배양하였다. 종균 배양 (seed culture)은 250 mL erlenmeyer flask에 80 mL의 nutrient broth를 첨가하여 진탕 배양기에서 37°C, 150 rpm으로 *E. aerogenes* KCTC 2190을 12시간 배양한 후, 균체 성장량이 1.9-2.1 OD<sub>600</sub>이 되었을 때 1% (v/v)로 본 배양 (main culture) 배지로 접종하였다. 종균 배양 배지 조성은 증류수 1 L 당 beef extract 3 g/L, peptone 5 g/L이다.

배지 제조에 사용된 nutrient broth, nutrient agar, peptone은 Difco (USA) 제품, NaCl, KCl은 Wako Pure Chemical (Japan) 제품, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, trisodium citrate dehydrate는 Junsei (Japan) 제품, 그리고 글리세롤

은 Sigma-Aldrich (USA) 제품을 사용하였다. Crude glycerol은 국내 D사의 바이오디젤 생산 공정 부산물을 공급받아 사용하였다.

### 2.2. 초기 pH, 글리세롤 농도 및 염 농도 변화에 따른 에탄올 생산

본 배양은 125 mL serum bottle에 50 mL의 본 배양 배지를 첨가하여 종균배양과 동일하게 진탕 배양기에서 37°C, 150 rpm으로 24시간 동안 배양하였다. 본 실험에서 사용된 복합배지의 조성은 증류수 1 L 당 peptone 5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L, trisodium citrate dehydrate 1 g/L 그리고 탄소원인 순수한 글리세롤 (pure glycerol)이다. 초기 pH, 삼투압, 그리고 염이 *E. aerogenes* KCTC 2190에 미치는 영향을 파악하기 위해 각각의 실험 조건을 설정하여 진행하였다.

초기 pH에 따른 *E. aerogenes* KCTC 2190의 에탄올 생산 경향 파악하기 위하여 본 배양 기본 배지 구성에서 탄소원인 글리세롤의 초기 농도를 10 g/L로 일정하게 유지하고, 초기 pH 3-9의 조건에서 실험을 진행하였다.

글리세롤 농도가 에탄올에 미치는 영향을 파악하기 위해 본 배양 기본 배지 구성에서 탄소원인 순수 글리세롤의 초기 농도 5-20 g/L의 범위에서 실험을 진행하였다. 초기 pH는 pH 영향 실험 결과를 바탕으로 *E. aerogenes* KCTC 2190의 에탄올 생산 최적조건인 pH 5로 선정하였다.

염이 *E. aerogenes* KCTC 2190에 미치는 영향을 파악하기 위해 상기의 본 배양 기본 배지 구성에서 탄소원인 순수 글리세롤의 초기 농도를 10 g/L, 배지의 초기 pH는 5로 일정하게 유지하였으며, 추가적으로 폐글리세롤에 포함되어 있는 염 성분의 농도를 고려하여 KCl과 NaCl을 각각 5-20 g/L의 농도범위로 첨가하여 저해영향을 파악하였다.

혐기 발효를 통해 에탄올 생산을 극대화하기 위해 배지를 첨가한 serum bottle에 질소를 충분히 주입한 후, rubber septa와 aluminum crimp caps를 이용하여 산소의 제거와 유입을 차단함으로써 혐기조건을 만들었다.

### 2.3. Crude glycerol을 이용한 바이오에탄올 생산

실제 crude glycerol을 이용한 바이오에탄올 생산 가능성을 확인하고자 상기의 본 배양 기본 배지를 기반으로 하여, 탄소원으로써 순수 글리세롤 대신 5-25 g/L의 초기 농도범위를 지닌 crude glycerol을 탄소원으로 사용하였으며, 초기 pH 5의 조건에서 실험을 진행하였다.

### 2.4. 분석 방법

*E. aerogenes* KCTC 2190을 18시간 동안 진탕 배양기에서 배양한 후, serum bottle에서 균체 성장량 측정을 위한 샘플 0.05 mL과 에탄올 및 글리세롤 농도 측정을 위한 샘플 1 mL을 각각 채취하였다.

균체 성장량은 샘플을 증류수로 20배 희석한 후, UV/VIS spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Japan)를 이용하여 600 nm의 파장에서 광학밀도 (OD, optical density)를 측정하였다.

에탄올 및 글리세롤의 농도 측정을 위해 샘플을 10,000 rpm으로 15분간 원심분리를 통해 균체를 침전시켰다. 원심분리한 샘플의 상등액을 0.20 µm microfilter (DISMIC-13JP PTFE 0.20 µm, Advantec, Japan)로 여과한 후, Refractive Index Detector (RID-10A, Shimadzu, Japan)가 탑재된 High-Performance Liquid Chromatograph (HPLC)를 사용하여 분석하였다. HPLC 운전조건은 다음과 같다: column은 Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm, Bio-Rad, CA, USA)를 사용하였으며, 온도는 55°C로 설정하였다. 이동상으로는 0.005 N의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였으며, 유속은 0.8 mL/min로 하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. pH 변화에 따른 에탄올 생산

바이오티셀 생산 공정에서 발생하는 폐글리세롤은 일정하지 않은 pH 조건을 지니고 있다. 다양한 초기 pH 조건에서 *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190을 이용한 에탄올 생산 영향을 확인하기 위하여 순수 글리세롤에 대한 균체 성장량, 에탄올 생산량 및 탄소원인 순수 글리세롤의 소비량을 측정하였다.

Fig. 1에서는 초기 pH 3-9의 배지에 *E. aerogenes* KCTC 2190을 혐기배양한 후, 균체 성장량, 글리세롤 소비량 및 에탄올 생산량을 측정한 결과를 보여주고 있다.

초기 pH가 3에서 5로 증가함에 따라 에탄올 생산량 및 균체 성장량이 증가하는 경향을 보이지만, pH 6에서 9로 증가함에 따라 에탄올 생산량 및 균체 성장량이 점차적으로 감소되는 경향을 확인하였으며, 최적의 초기 pH는 5였다. 최적 조건인 pH 5에서 1.75 OD<sub>600</sub>의 균체 성장량, 4.45 g/L의 에탄올을 생산량으로 보였으며, 에탄올의 생산수율은 약 0.49 g (ethanol)/g (glycerol)으로 이론수율의 98.0%를 보였다.

최적 조건으로 확인된 pH 5에서의 균체 성장량과 에탄올 생산량을 대조군으로 하여 비교하였을 때, 초기 pH 6의 균체 성장량은 1.68 OD<sub>600</sub>로 대조군 대비 96.0%의 상대 균체 성장량을 보였다. 에탄올 생산량은 4.02 g/L로 대조군 대비 90.3%의 상대 에탄올 생산량을 보였으며, 에탄올의 생산수율은 0.48 g/g으로 이론수율의 96%를 보였다.

초기 pH 7과 8인 경우의 균체 성장량은 각각 1.2 OD<sub>600</sub>와 1.0 OD<sub>600</sub>로 대조군 대비 67.1%, 57.1%의 상대 균체 성장량을 보였다. 에탄올의 생산수율은 0.48 g/g과 0.46 g/g으로 이론수율의 96%와 92%의 높은 값을 보였으나, 글리세롤의 섭취량이 상대적으로 낮아 에탄올 생산량은 각각 2.99 g/L, 2.28 g/L로 대조군 대비 67.1%, 51.2%의 상대 에탄올 생산량을 보였다.

그 외 pH 3에서는 글리세롤의 섭취 (uptake)가 없었으며, pH 4 및 9에서는 각각 배지의 배양 초기 글리세롤 농도의 15% 이하의 글리세롤만 섭취하여, 글리세롤의 흡수과정에서 강한 저해영향이 있음을 확인하였다. 그 결과 이론수율의 22% 이하인 0.98 g/L 및 0.43 g/L의 낮은 에탄올 생산량을 보였다.

미생물 배양 배지의 초기 pH는 미생물의 형태와 구조 그리고 영양분 흡수, 염의 용해도, 생합성 등의 세포의 기능

과 관련이 있으며, 세포 내외의 pH 차이는 양성자 구동력 (proton-motive force)에 강한 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 세포 내외의 pH 차이가 증가할수록 양성자 구동력이 낮아지게 되고, 양성자 생산을 위한 ATP 요구량은 증가하게 된다. 이러한 이유로 에탄올 생산을 위한 균체의 대사과정에 필요한 균체 내부의 ATP의 양이 상대적으로 감소하게 되어 균체의 성장 및 에탄올 생산에 저해영향을 초래하게 된다 [17-21].

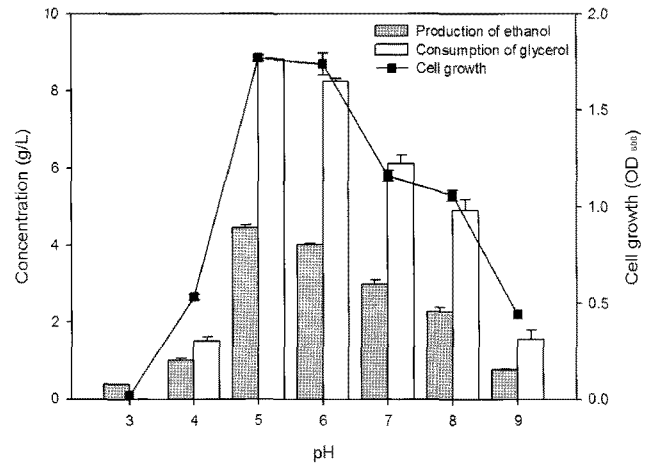


Fig. 1. Ethanol production, glycerol consumption and cell growth at different initial pHs after 18 h.

#### 3.2. 글리세롤 농도 변화에 따른 에탄올 생산

폐글리세롤을 기반의 효율적인 바이오에탄올 생산을 위해서는 배지 내 탄소원인 글리세롤의 농도의 영향에 대한 연구가 필수적이다. 이에 대한 영향을 확인하기 위하여 순수 글리세롤의 초기 농도 (5-25 g/L)가 다른 배지에서의 *E. aerogenes* KCTC 2190의 균체 성장량, 글리세롤 소비량 및 에탄올 생산량을 측정을 통해 최적의 초기 글리세롤 농도 조건을 파악하고자 하였다.

Fig. 2는 배지의 순수 글리세롤의 초기 농도 범위 5-25 g/L에서 *E. aerogenes* KCTC 2190을 혐기배양 한 후, 균체 성장량, 글리세롤 소비량 그리고 에탄올 생산량을 측정하여 나타낸 것이다.

순수 글리세롤 5 g/L 및 10 g/L의 배양 조건에서는 1.32 OD<sub>600</sub> 및 1.75 OD<sub>600</sub>의 균체 성장량, 4.85 g/L 및 8.84 g/L의 글리세롤 소비량과 2.46 g/L 및 4.45 g/L의 에탄올 생산량을 보임으로써 순수 글리세롤의 농도 10 g/L 범위까지는 순수 글리세롤의 농도가 증가할수록 *E. aerogenes* KCTC 2190의 탄소원인 글리세롤의 흡수량이 증가하여 균체 성장량 및 에탄올 생산량이 점차적으로 증가됨을 확인할 수 있었다.

순수 글리세롤의 농도가 15-25 g/L인 배양조건에서는 10 g/L의 배양조건의 결과를 대조군으로 하여 비교하였을 때, 균체 성장량은 각각 1.32-1.06 OD<sub>600</sub>로 대조군 대비 75.4-60.6%의 상대 균체 성장량을 보였다. 글리세롤 소비량은 대조군 대비 72.2-48.9%의 상대 글리세롤 소비량을 보였으며, 에탄올 생산량은 3.41-2.33 g/L로 대조군 대비 76.6-52.4%의 상대 에탄올 생산량을 보였다.

배지 내의 글리세롤의 농도가 미생물 내부의 농도보다 높

아지게 되면 삼투압 상승으로 인해 미생물의 탈수 현상이 발생하게 되고, 이는 미생물 생장에 저해현상을 초래하게 된다 [22]. 미생물의 최대 기질 섭취량 보다 많은 양의 기질을 공급하게 되면 기질 과잉 (substrate excess)으로 인한 기질저해 (substrate inhibition) 현상이 발생하게 된다. 15 g/L 이상의 글리세롤 농도 조건에서는 기질저해로 인해 균체의 글리세롤의 흡수량이 감소하면서 균체 성장량 저하 및 에탄올 생산량 감소의 결과를 가져 온 것으로 보인다. 또한 기질의 농도가 증가함에 따라 pH의 감소, 산 생산 등의 원인으로 생산물에 대한 저해영향이 발생할 수 있으며, 이로 인해 생산 수율이 감소하게 된다 [23-24].

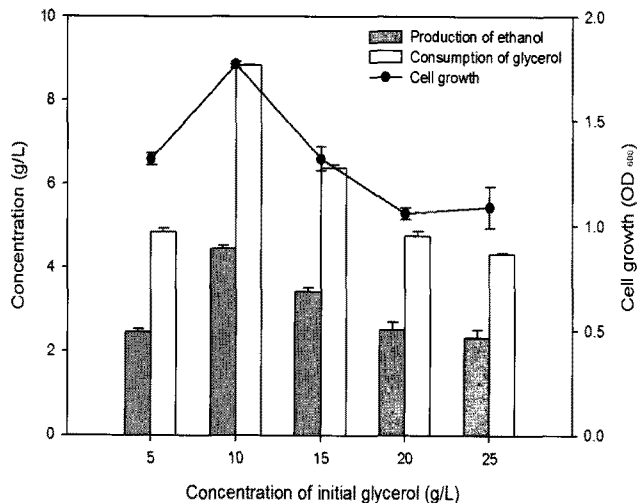


Fig. 2. Ethanol production, glycerol consumption and cell growth according to change of osmotic pressure by concentration of pure glycerol after 18 h.

### 3.3. 염 농도 변화에 따른 에탄올 생산

바이오디젤 생산 공정의 부산물인 폐글리세롤에 포함되어 있는 염 (NaCl, KCl)이 *E. aerogenes* KCTC 2190의 성장과 에탄올 생산에 미칠 수 있는 저해영향을 확인하고자 하였다.

Fig. 3은 5-20 g/L 범위의 염이 추가된 배양 조건에서의 *E. aerogenes* KCTC 2190의 균체성장 및 에탄올 생산량을 보여주고 있다. 염을 첨가하지 않은 배양 조건을 대조군으로 설정하였으며, 대조군의 균체 성장량과 에탄올 생산량은 각각 1.75 OD<sub>600</sub>와 4.45 g/L였다.

NaCl이 배지 내 5-20 g/L의 농도로 존재 시, 대조군 대비 78.9-28.6%의 상대 균체 성장량 1.38-0.50 OD<sub>600</sub>를 보였으며, 대조군 대비 89.7-37.1%의 상대 에탄올 생산량 3.99-1.65 g/L를 보였다.

배지 내 5-20 g/L의 농도로 KCl을 첨가하였을 경우, 대조군 대비 69.1-32.0%의 상대 균체 성장량 1.21-0.56 OD<sub>600</sub>를 보였으며, 대조군 대비 각각 67.6-24.3%의 상대 에탄올 생산량 3.01-1.08 g/L를 보였다. KCl이 첨가된 배양 조건에서 같은 농도의 NaCl이 첨가되었을 때보다 약 7-13% 낮은 균체 성장량과 약 25-40% 낮은 에탄올 생산량을 보임으로써, 그 결과 KCl이 NaCl보다 *E. aerogenes* KCTC 2190의 에탄올 생산 과정에서 상대적으로 강한 저해영향을 보임을

확인하였다.

NaCl 등의 염들은 *E. aerogenes*의 생장에 저해영향을 보이지만, 1% 이하 농도의 NaCl이 포함된 배양조건에서는 저해영향이 확인되지 않았다 [16]. Zheng 등 [25]은 배지에 포함된 NaCl은 높은 삼투압을 형성하여 미생물의 대사과정에 저해영향을 나타낸다고 보고하였으며, Das 등 [26]은 배지에 포함된 이온들은 농도에 따른 저해영향의 발생 가능성을 제시하였다. 또한, 미생물에 따라 염에 대한 내성 차이가 있지만, 외부의 높은 염농도는 세포 용해 (cell lysis) 현상을 초래할 수 있으며 [27-29], 배지에 포함된 염이 양성자 구동력에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 [22,30].

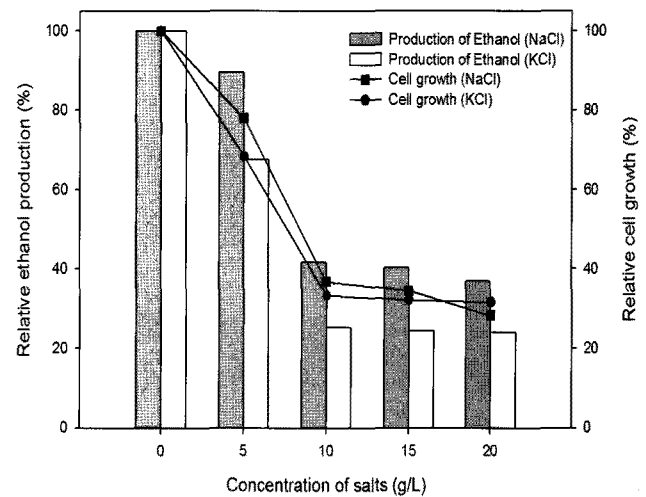


Fig. 3. Relative ethanol production and cell growth at different salt concentrations after 18 h.

### 3.4. Crude glycerol을 이용한 바이오에탄올 생산

바이오디젤 생산공정의 분리과정에서 MONG (matter of organic non glycerol) 성분과 염 및 불순물이 포함된 폐글리세롤이 부산물로 발생되며, 전처리 공정을 통하여 폐글리세롤 (waste glycerol)에 포함되어 있는 이러한 성분들이 일부 제거된 crude glycerol이 발생하게 된다.

본 실험에서는 초기 농도 범위 5-25 g/L의 crude glycerol을 탄소원으로 사용한 각각의 배지에서 *E. aerogenes* KCTC 2190을 혐기배양한 후, 균체 성장량과 에탄올 생산량을 측정하여 동일한 농도의 순수 글리세롤을 탄소원으로 사용한 결과값을 비교하였다 (Fig. 4).

탄소원으로 5 g/L와 10 g/L 농도의 crude glycerol을 사용한 배양 조건에서 균체성장량은 1.19 OD<sub>600</sub>와 1.67 OD<sub>600</sub>로 대조군 대비 90.2%와 94.4%의 상대 균체 성장량을 보였으며, 에탄올 생산량은 2.18 g/L과 3.95 g/L로 대조군 대비 88.4%와 88.5%의 상대 에탄올 생산량을 보임으로써, 대조군과 비슷한 결과로 탄소원의 농도가 증가할수록 균체 성장량과 에탄올 생산량이 증가하는 경향을 보였다.

15-25 g/L 농도의 순수 글리세롤을 탄소원으로 사용한 경우, 1.32-1.09 OD<sub>600</sub>의 균체 성장량과 3.41-2.33 g/L 에탄올 생산량을 보였으며 탄소원의 농도가 증가할수록 저해영향이 증가하는 경향을 보였다. 동일한 농도의 crude glycerol을

사용한 경우, 1.74-1.75 OD<sub>600</sub>의 균체 성장량과 5.48-6.19 g/L의 에탄올 생산량을 보였으며 탄소원의 농도가 증가함에 따라 균체 성장량과 에탄올 생산량이 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만 10 g/L 이하 농도 조건의 배양 조건과 비교해 보았을 때, 에탄올 생산 및 균체 성장의 증가폭이 10% 이하로 급격히 감소하는 현상으로 볼 때, 순수 글리세롤 기반의 실험에서와 유사하게 저해영향은 존재하지만 crude glycerol 내 미확인된 성분들에 의해 저해영향의 상쇄효과가 있었던 것으로 판단된다.

Ito 등 [16]은 폐글리세롤을 이용한 에탄올 및 수소 생산 연구를 통해 에탄올 생산은 이론적 수율과 유사한 1.00 mol (ethanol)/mol (glycerol)의 수율을 보였으며, 수소 생산은 이론적 수율보다 높은 1.12 mol/mol의 수율을 보였다. 이론적 수율보다 높은 생산량이 나타난 원인은 폐글리세롤 내의 확인되지 않은 탄소원 (carbon source)과 전원 (electric source)의 영향의 가능성으로 본 연구와 유사한 결과를 보고하였다.

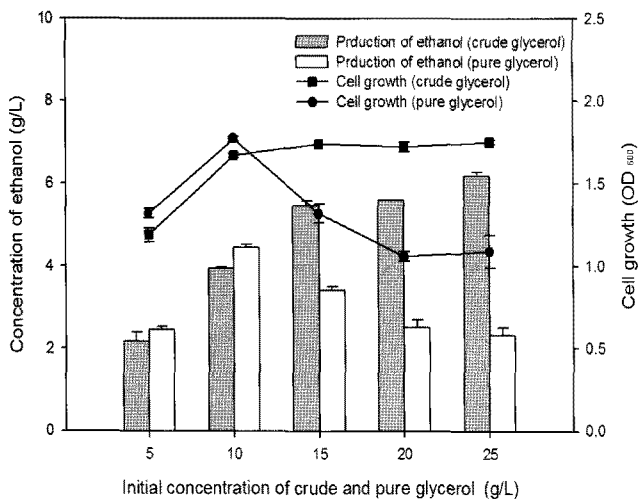


Fig. 4. Comparison of ethanol production and cell growth at different initial concentrations of crude glycerol and pure glycerol after 18 h.

#### 4. 결론

본 연구에서는 폐글리세롤 기반의 바이오에탄올 생산을 위하여 폐글리세롤의 특성을 고려하여 초기 pH, 초기 글리세롤 농도, 염의 종류 및 초기 농도의 변화가 *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190의 성장 및 에탄올 생산 경향을 파악하고 crude glycerol 기반의 에탄올 생산이 가능함을 확인하였다. 초기 pH의 영향은 세포 내외의 pH 차가 증가할수록 에탄올 생산량의 감소 및 균체 성장의 감소되는 현상을 확인하였으며, 최적의 초기 pH 값은 5였다. 15 g/L 이상의 글리세롤 농도에서는 *E. aerogenes* KCTC 2190의 글리세롤 섭취 능력 저하로 인해 에탄올 생산량의 감소 및 균체 성장량의 감소하였다. 염의 농도가 증가할수록 에탄올 생산 및 균체 성장에 대한 저해영향도 증가하였다. 마지막으로 Crude glycerol 기반의 에탄올 생산을 확인함으로써 폐글리세롤 기반의 에탄올 생산의 가능성을 제시하였다.

#### 감사

본 연구는 교육과학기술부 한국연구재단의 기초연구사업 (2010-0002313) 및 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업 (032-091-019)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### References

1. International Energy Agency, World Energy Outlook 2009. <http://www.iea.org>. (2009).
2. Yazdani, S. S. and R. Gonzalez (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotech.* 18: 213-219.
3. Alcantara, R., J. Amores, L. Canoira, E. Fidalgo, M. J. Franco, and A. Navarro (2000) Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow. *Biomass Bioenerg.* 18: 515-527.
4. Papanikolaou, S., L. Muniglia, I. Chevalot, G. Aggelis, and I. Marc (2002) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J. Appl. Microbiol.* 92: 737-744.
5. González-Pajuelo, M., J. C. Andrade, and I. Vasconcelos (2004) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 31: 442-446.
6. Mu, Y., H. Teng, D.-J. Zhang, W. Wang, and Z.-L. Xiu (2006) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol biodiesel preparations. *Biotechnol. Lett.* 28: 1755-1759.
7. Willke, T. and K.-D. Vorlop (2004) Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *J. Appl. Microbiol.* 66: 131-142.
8. Deckwer, W.-D. (1995) Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. *FEMS Microbiol. Rev.* 16: 143-149.
9. Franceschina, G., A. Zamboni, F. Bezzo, and A. Bertucco (2008) Ethanol from corn: a technical and economical assessment based on different scenarios. *Chem. Eng. Res. Des.* 86: 488-498.
10. Seifert, C., S. Bowien, G. Gottschalk, and R. Daniel (2001) Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *Eur. J. Biochem.* 268: 2369-2378.
11. Németh, Á., B. Kupcsulik, and B. Sevilla (2003) 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026. *World J. Microb. Biot.* 19: 659-663.
12. Biebl, H. (2001) Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*-batch and continuous culture studies. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 27: 18-26.
13. Malaoui, H. and R. Marczak (2001) Separation and characterization of the 1,3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant D. *J. Appl. Microbiol.* 90: 1006-1014.
14. Barbirato, F. and A. Bories (1997) Relationship between the physiology of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 grown anaerobically on glycerol and the culture conditions. *Res. Microbiol.* 148: 475-484.
15. Talarico, T. L., L. T. Axelsson, J. Novotny, M. Fiuzat, and W. J. Dobrogosz (1990) Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase. *Appl. Environ. Microb.* 56: 943-948.

16. Ito, T., Y. Nakashimada, K. Senba, T. Matsui, and N. Nishio (2005) Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J. Biosci. Bioeng.* 100: 260-265.
17. Fanga, Q.-H. and J.-J. Zhong (2002) Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* 37: 769-774.
18. Dürre, P., H. Bahl, and G. Gottschalk (1988) Membrane processes and product formation in anaerobes. pp. 187-205. In: L. E. Erickson, and D. Y.-C. Fung (eds.). *Handbook on anaerobic fermentation*. Marcel Dekker, NY, USA.
19. Zeng, A.-P., H. Biebl, and W.-D. Deckwer (1990) Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 485-489.
20. Bowles, L. K. and W. L. Ellefson (1985) Effects of Butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microb.* 50: 1165-1170.
21. Nath, K. and D. Das (2009) Effect of light intensity and initial pH during hydrogen production by an integrated dark and photofermentation process. *Int. J. Hydrogen Energ.* 34: 7497-7501.
22. Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap, and D. P. Clark (2009) *Brock biology of microorganisms*. 12th ed., pp. 167-169. Pearson Education, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, USA.
23. Ginkel, S. V., S. Sung, and J.-J. Lay (2001) Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4726-4730.
24. Fabiano, B. and P. Perago (2002) Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Int. J. Hydrogen Energ.* 27: 149-156.
25. Zheng, X. J., Y. M. Zheng, and H. Q. Yu (2005) Influence of NaCl on hydrogen production from glucose by anaerobic cultures. *Environ. Technol.* 26: 1073-1080.
26. Das, D. and T. N. Veziroglu (2001) Hydrogen production by biological process: A survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energ.* 26: 13-28.
27. Niel, E. W. J., P. A. M. Claassen, and A. J. M. Stams (2003) Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol. Bioenerg.* 81: 255-262.
28. Fan, D. P. (1970) Cell wall binding properties of the *Bacillus subtilis* autolysin (s). *J. Bacteriol.* 103: 488-493.
29. Jolliffe, L. K., R. J. Doyle, and U. N. Streips (1981) The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell* 25: 753-763.
30. Hamana, K., H. Hamana, M. Niitsu, and K. Samejima (1996) Polyamines of thermophilic gram-positive anaerobes belonging to genera *Caldicellulosiruptor*, *Caloramator*, *Clostridium*, *Coprothermobacter*, *Moorella*, *Thermoanaerobacter* and *Thermoanaerobacterium*. *Microbios.* 85: 213-222.