

## *Clostridium acetobutylicum* B18를 이용한 부탄올 발효에서 pH 및 extra nutrient가 부탄올 생성에 미치는 영향연구

윤지용, 김태용, 박찬엘, 박창호

경희대학교 환경응용화학부, 경희대학교 환경연구소

전화 (0331) 201-2975, FAX (0331) 202-1946

### ABSTRACT

*Clostridium acetobutylicum* B18 can produce a large amount of butanol by control characteristics such as glucose concentration, pH and extra nutrient.

It is known that this stain is potentially useful in simultaneous ABE fermentation-seperation system because of its low acid production<sup>1)</sup>. The purpose of this study is to determine optimal condition of fermentation to produce maximum butanol in batch and fed-batch by strain B18.

### 서론

부탄올은 자동차연료의 첨가제로 사용함에 있어서 발열량이 높고 흡수성이 낮은 등 물리적, 화학적 특성이 기존 메탄올이나 에탄올보다 우수하다. 부탄올의 이러한 장점을 갖고 있는데도 불구하고 연구 개발이 뒤쳐져 있는 것은 발효에 의한 부탄올 생산공정개발이 에탄올 발효공정에 비해 늦었기 때문이다. 자동차 연료에 청정에너지인 부탄올을 사용하여 완전 연소를 시키게 되면 가솔린이나 경유보다 산성비의 원인이 되는 질소산화물(NOx)과 황산화물(SOx)

등의 공해물질의 배출을 감소시킬 수 있다.

본 연구는 부탄올 생산균주로 기존균주보다 낮은 산을 생산해 내어 산에 의한 활성 저하가 상대적으로 적은 *Clostridium acetobutylicum* B18을 이용해 7L 발효조에서 발효시켜 부탄올 생산을 극대화하는 실험을 수행 중에 있다. 부탄올 생산에 미치는 영향 중 pH와 extra nutrient에 따른 부탄올 생산량을 살펴보고, glucose소모량에 대한 부탄올 생산 수율을 비교하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재료

본 실험에서 사용된 균주는 혐기성 균주인 *Clostridium acetobutylicum* B18을 사용하였고, 접종배지는 modified YEM배지로 그 성분은 다음과 같다.

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g/L, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g/L yeast extract

8g/L, casein hydrolysate 2.2g/L, apuragine 1.0g/L, cystein 0.5g/L, p-aminobenzoic acid 1.0mg/L, biotin 0.02mg/L, thiamine-Cl 1.0mg/L, glucose 20g/L

## 2. 실험방법

접종배지는 잘 배양된 plate내에 colony 한 개를 취하여 10mL serum bottle에 접종하고 18시간 배양후 100mL serum bottle에 5mL을 접종시키고 10시간 배양한 뒤 발효조에 최종 접종시켰다. 7L 발효조에서 glucose 농도는 40g/L, 60g/L로 변화시켜가며 배양하였다. 배양조건은 온도 32℃로 유지하였고, glucose농도 60g/L에서는 pH uncontrol과 pH control(5.5)한 실험을 수행하였다. 그리고 영양분 고갈을 보충하기 위해 60g/L에서 extra nutrient를 30시간 내외에서 발효 중에 주입하였다. Extra nutrient성분은 발효조에서의 배지 성분과 같고 다만 glucose만 넣지 않은 것으로 발효조 배지 농도의 0.5배로하여 300mL 정도 농축하고 멸균한 후 주입하였다. 발효조는 최대 100시간까지 배양시켰고 pH는 3N NaOH로 control 하였으며 (주)한국발효기를 이용하였다.

## 3. 분석방법

Glucose농도는 HPLC(waters)를 이용하였고 컬럼은 High performance carbohydrate (waters)를 사용하였다. mobil phase는 acetonitrile : water(80:20) ,flow rate는 1.5ml/min, detector는 RI detector를 사용하였다.

solvent(butanol, ethanol, acetone)와 acid(acetic acid, butyric acid)의 농도는 GC(HP 5890 seriesII)를 이용하였고, detector는 FID , 컬럼은 HP INNOWAX capillary column을 사용하였으며 출력은 HP3398A chemstation을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

<Extra nutrient 와 pH 에 따른 부탄올 생산성 비교>

pH control 및 uncontrol 상태에서의 부탄올 생산성을 보았으며, 영양분 고갈에 따른 보충을 위해 extra nutrient를 주입했을때의 결과를 보았다.

Glucose 40g/L 에서의 회분배양 실험결과 부탄올이 최고 6.2g/L 가 생성되었고, 포도당 소모량은 30.59g/L 였다. 따라서 수율은 19.62% 였다. acetic acid는 최고 1.86g/L, butyric acid는 최고 0.48g/L 이었으며 acetone은 2.14g/L, ethanol은 0.81 g/L 였다. pH는 4.86에서 더 이상 내려가지 않았다(Fig 1).

Glucose 60g/L 회분배양 실험에서는 부탄올이 최고 5.89g/L였고, 포도당 소모량은 28.34g/L였다. 산은 1g/L이하로 미량이 생성되었다. acetic acid의 경우 최고 0.97 g/L였고, butyric acid의 경우 최고 0.70g/L였으며 시간이 지날수록 줄어드는 경향을 보였다(Fig 2).

Glucose 60g/L 배양에서 30시간에 extra nutrient(27hr)를 첨가한 실험에서는 첨가하지 않은 실험에서의 결과가 부탄올이 glucose 40g/L 보다 낮은 양이 나왔으므로 glucose를 제외한 여분의 영양분을 첨가하였다. 그 결과 부탄올농도는 최대

7.13g/L를 보였고, glucose 소모량도 37.01g/L 였다. 산의 생성량은 1g/L이하로 미미하였다. pH는 4.52 이하로 내려가지는 않았다(Fig 3).

Glucose 60g/L에 pH를 5.5로 조절한후 배양중에 extra nutrient(31hr)를 첨가한 실험에서는 부탄올의 최대농도는 9.98g/L였고 glucose 소모량도 44.71g/L로 가장 많이 소모되었다. 이 실험에서는 산의 생성또한 많아서 acetic acid는 최고 4.99g/L까지 생성되었고 butyric acid의 생성량도 최고 3.44g/L였다. 그러나 50시간 이후부터는 급격히 줄어들었다.

아래 Table 1는 glucose 소모량에 따른 부탄올 생산성을 본 것이다.

Table. glucose 소모량에 따른 부탄올 생성량 및 수율

	Butanol 생성(g/L)	Glucose 소모(g/L)	수율(%)
Glucose 40g/L	6.3	30.59	19.62
Glucose 60g/L	5.87	28.34	20.71
Glucose 60g/L + Extra nutrient	7.13	37.01	19.23
Glucose 60g/L + Extra nutrient + pH 5.5 control	9.98	44.71	22.22

#### 요약

*Clostridium.aetobutylicum* B18에 의한 부탄올 발효에서 농도, extra nutrient, pH 대한 부탄올 생성량을 알아보았다. 실험결과 extra nutrient를 주입했을 때 부탄올의 농도가 주입하지 않았던 배양에서보다 약 17%정도 증가하는 결과를 보였고, pH를 control 했을 때에는 glucose 60g/L 회분 실험을 기준으로 부탄올 생산량이 약 41% 정도가 증가하는 것으로 나타났다.

#### 참고문헌

1. Rogers P, Palosaari N, " *Clostridium acetobutylicum* mutants that produce butyraldehyde and altered quantities of solvents"(1987). *Appl. and Environ. Microbiol.* **53**, 2761-2766.
2. Geng, Q. and C.-H. Park. " Pervaporative Butanol Fermentation by *Clostridium acetobutylicum* B18" (1994), *Biotech. and Bioeng.*, **43**, 978-986
3. R. W. O'Brien and J. G. Morris "Oxygen and the Growth and Metabolism of *Clostridium acetobutylicum*" (1971). *J. general Microbiol.* **68**, 307-318.

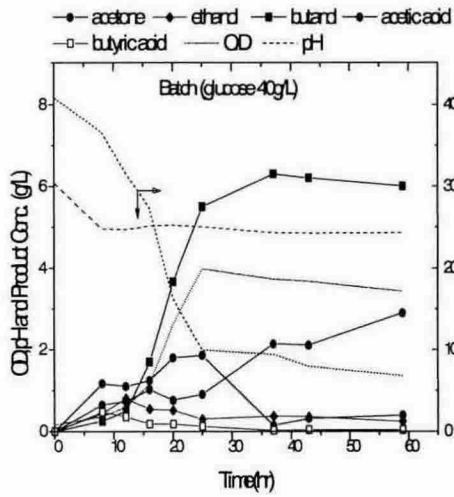


Fig 1. glucose 40g/L 회분발효에서 glucose 소모에 따른 butanol, acetone, ethanol, acetic acid, butyric acid 의 생성량

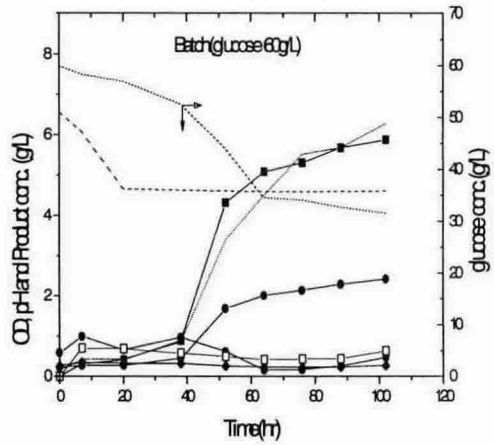


Fig 2. glucose 60g/L 회분발효에서 glucose 소모에 따른 butanol, acetone, ethanol, acetic acid, butyric acid 의 생성량

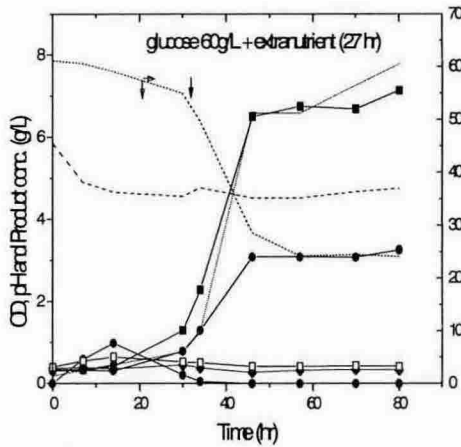


Fig 3. glucose 60 g/L에서의 extra nutrient 첨가시 glucose 소모에 따른 butanol, acetone, ethanol, acetic acid, butyric acid 의 생성량

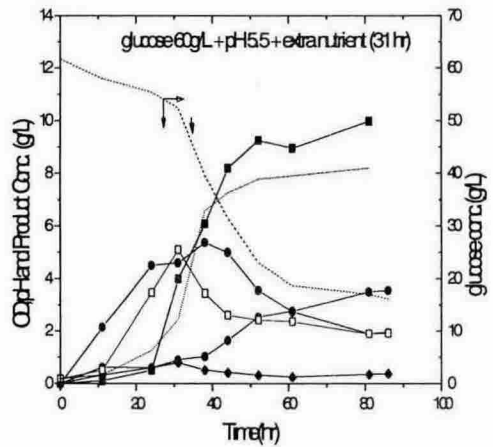


Fig 4. glucose 60g/L에서 extra nutrient 첨가 및 pH 5.5 control 발효시 glucose 소모에 따른 butanol, acetone, ethanol, acetic acid, butyric acid 의 생성량