

## 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* DSM4799를 이용하여 순수 글리세롤과 국내 바이오디젤 생산공정에서 발생된 폐글리세롤로부터 1,3-PD를 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 종배양용 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)     | 0.0002  | 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 1 L에 5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.4 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 g yeast extract, 0.5 g peptone, 0.3 g beef extract(Difco Laboratories, Becton, Dickinson & Co., USA), 미량원소[14] 1 ml를 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 종배양용 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 선행배양(preculture)하였다. 이 후 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. 이 후 선행배양된 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 선행배양된 *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 KOH을 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

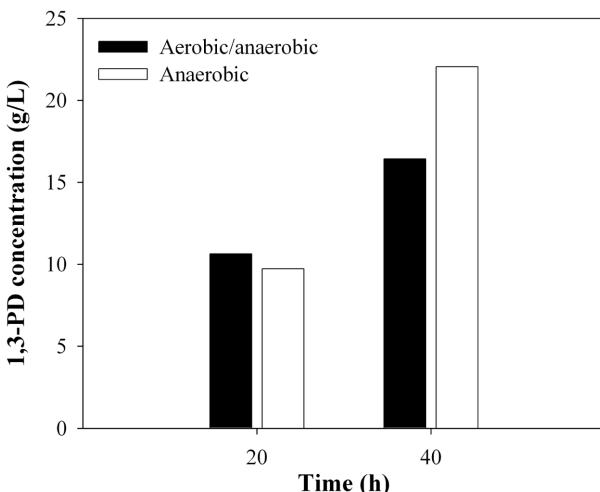


Fig. 1. Effect of aerobic and anaerobic conditions on 1,3-PD production by *K. pneumoniae* DSM4799.

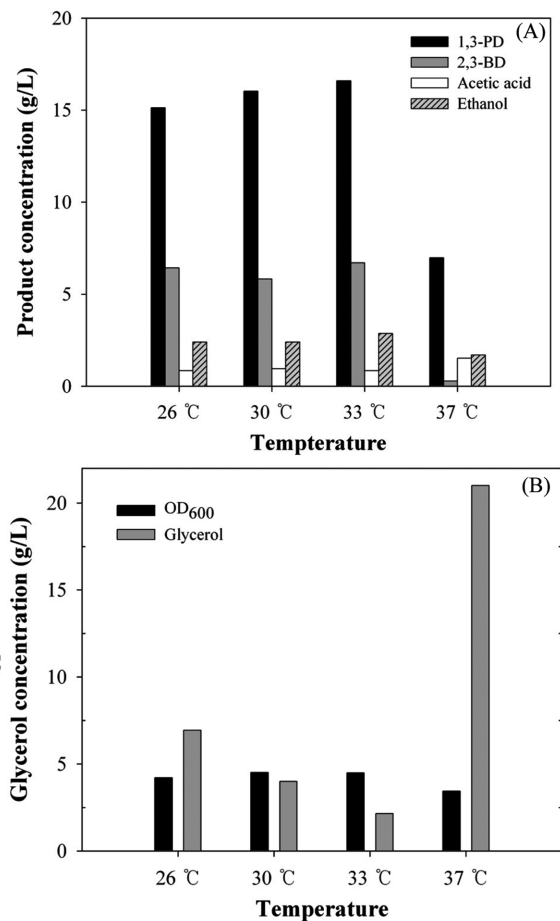


Fig. 2. Effect of temperature on (A) product concentrations (B) cell growth, and glycerol consumption by *K. pneumoniae* DSM4799 at 48 hr

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 (OD<sub>600</sub>=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 <sub>PD</sub> (mol/mol) | pH   | OD <sub>600</sub> |
|----------|------------------------------|----------------------------|--------------|----------------------|----------------------------|------|-------------------|
| 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 | *ND               |
|          | 40                           | 26.9                       | 8.0          | 0.33                 | 0.36                       | 6.03 |                   |
|          | 60                           | 34.3                       | 8.7          | 0.36                 | 0.31                       | 6.14 |                   |
|          | 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 | *ND               |
|          | 40                           | 34.2                       | 14.4         | 0.60                 | 0.51                       | 5.88 |                   |
|          | 60                           | 33.7                       | 11.2         | 0.46                 | 0.40                       | 5.77 |                   |
|          | 80                           | 22.0                       | 5.1          | 0.21                 | 0.28                       | 5.71 |                   |
|          | 100                          | 47.8                       | 5.2          | 0.22                 | 0.13                       | 5.98 |                   |

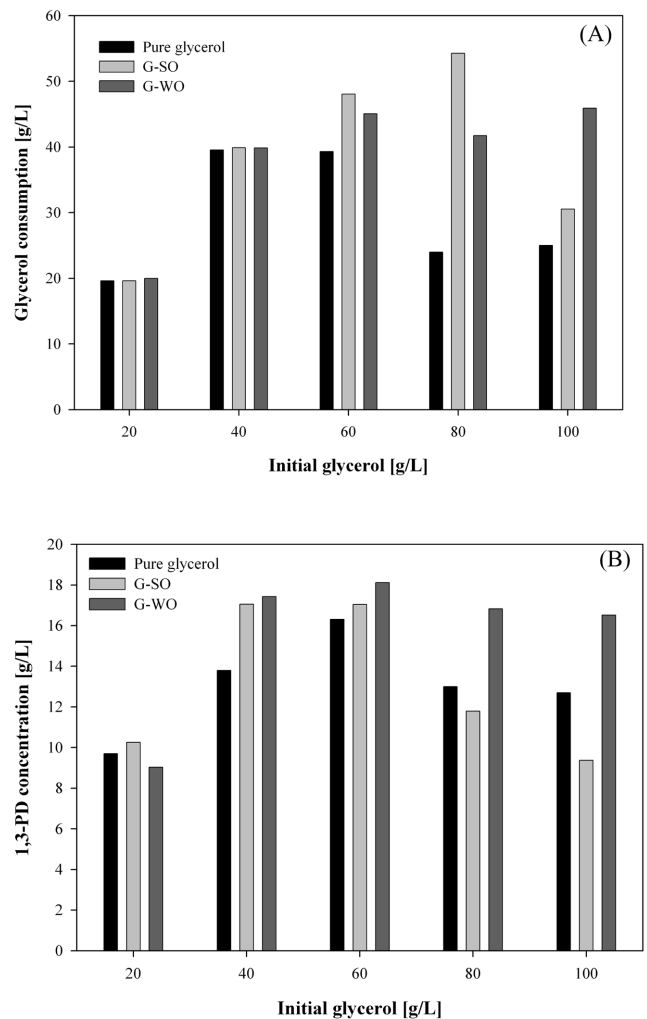
\*Moles of 1,3-PD produced/moles of glycerol consumed.

†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* DSM4799를 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 보인 이유로 유추되는 것은, 폐글리세롤(pH 10~11)에 함유되어 있는 알칼리 성분들이 배양 중 발생하는 pH 감소를 완하시켜 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

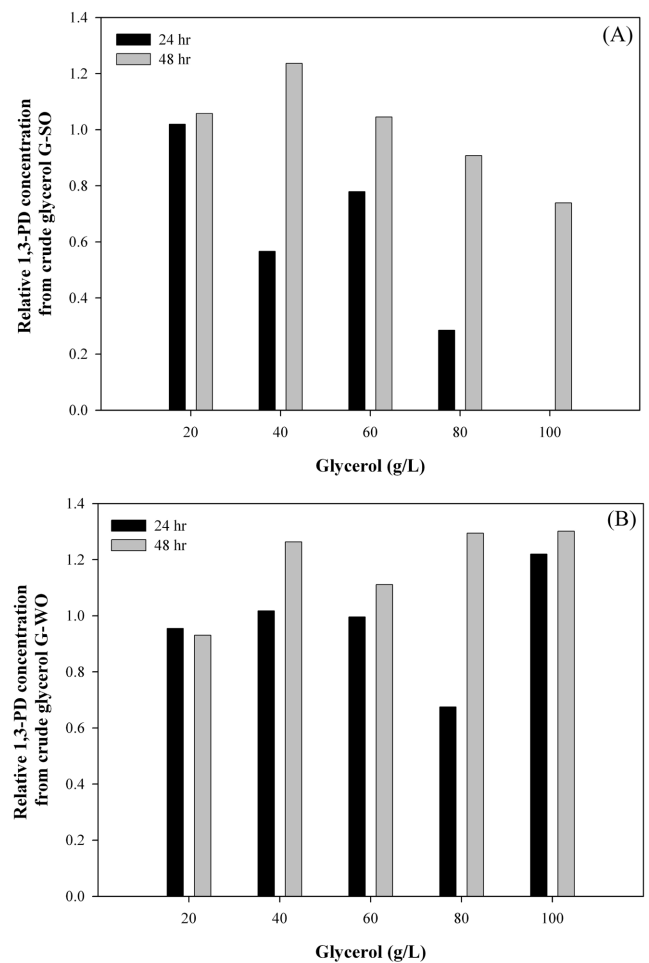


Fig. 4. 1,3-PD production using (A) G-SO and (B) G-WO relative to that using pure glycerol.

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

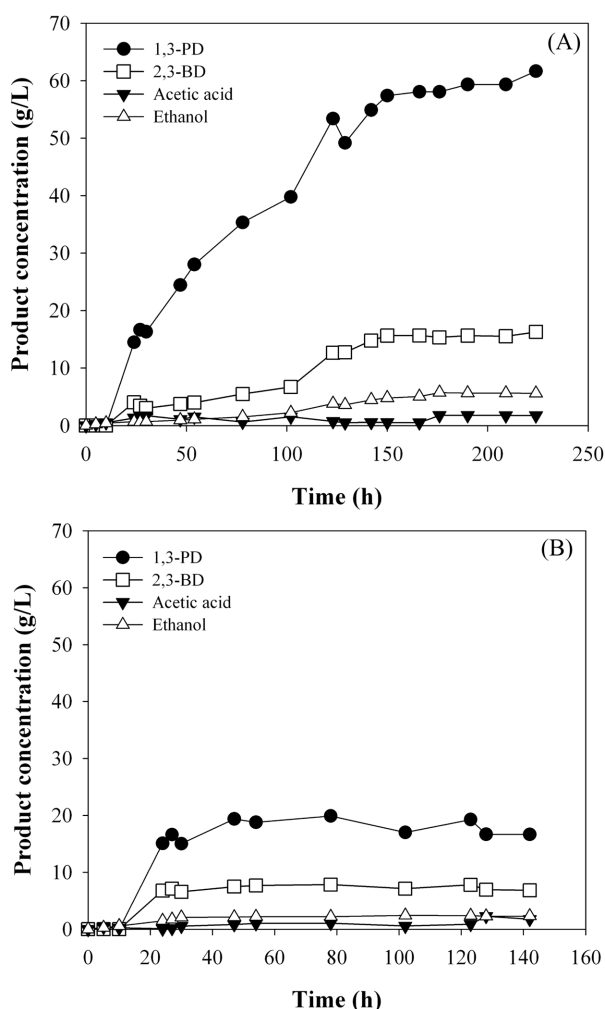


Fig. 5. Comparison of 1,3-PD and by-products concentrations (A) with pH control and (B) without pH control.

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 알칼리성분이 pH 감소를 완하시켜 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 Reifsnyder, 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).