

***Clostridium butyricum*을 이용한 1,3-propanediol의 생산**

이 정태, 김 의용
서울시립대학교 화학공학과

Produce of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*

Jeong Tae Lee, Eui Yong Kim
Dept. of Chemical Engineering, University of Seoul

서론

최근 들어 환경적인 문제와 함께 화학공정에 있어 친환경적인 방법에 의한 생산 공정이 각광을 받고있고, 그중 glycerol 발효전환에 의한 1,3-propanediol 생산이 크게 대두되고 있다. 이에대한 연구는 1981년 August Freund에 의해 처음 발견되었지만 단지 용제, 다이옥산의 생산제품, 특별한 폴리머 등의 이용에만 국한되었으나, 1,3-propanediol은 폴리에스테르, 폴리에테르, 폴리우레탄생산과 같은 많은 합성반응에 있어 축중합을 위한 단량체로 사용될수 있음이 밝혀지면서 1,3-propanediol 생산에 관한 많은 연구가 진행되고 있다[1].

일반적으로 1,3-Propanediol 생산은 화학적(acroleine의 수소화, ethylene oxide의 수소첨가), 생물학적(*Clostridia*와 *Entrobacteria*를 이용한 glycerol 발효 전환, *Clostridium strains*을 이용하여 co-substrate로 sugars와 glycerol를 발효 전환) 방법을 이용한다. 그러나 환경적인 문제로 점차 화학적인 방법에서 생물학적 방법으로 생산공정이 전환되고 있다[1].

1,3-propanediol은 다른 유기 기질의 혐기 전환에서는 발견되지 않고 글리세롤발효의 전형적인 생산물로, *Clostridia*, *Lactobacilli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*와 같은 미생물에 의해 생산될수 있다.

글루코스와 글리세롤을 기질로한 *Clostridium butyricum*의 당발효로 생산되는 1,3-propanediol의 공정은 Figure 1. 과 같다. Glycerol을 기질로 하여 미생물은 glycerol에서 H₂O을 탈수 시켜 3-Hydroxypropionaldehyde을 형성시키고 pyruvate에서 acetyl-coA로 전환되는 과정에서 형성되는 H₂를 받아 형성된 NADH₂(nicotin amide adenine dinucleotide)가 산화되면서 1,3-propanediol은 형성된다.

본론

1. 미생물과 배양조건 : 균주로 *Clostridium butyricum*(KCTC 1871)을 유전자은행(Korean Collection for Type Culture, KCTC)으로 부터 분양 받았다. *Clostridium butyricum*으로부터 1,3-propanediol을 생산하기 위해 배지는 DI(deionized) water 1L기준으로 K₂HPO₄ 3.4g, KH₂PO₄ 1.3g, (NH₄)₂SO₄ 2g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, CaCl₂·2H₂O 0.02g, FeSO₄·7H₂O 0.05g, yeast extract 2g, mineral oil 40ml, glucose 20g, glycerol 20g을 500ml 플라스크에 200ml을 채우고, pH 6.5, 37°C에서 130rpm으로 배양하였다. 배양 방법은 배지를 121°C 15분간 멸균한 후, 미생물(*Clostridium butyricum*)을 접종하였다. 플라스크는 N₂ gas로 충전하여 혐기 상태를 유지 시켜 주었고, 일정 시간마다 시료 2ml을 취

해 원심분리 하여 상등액을 분석하였다. cell이 정상기에 도달하기 전 glycerol을 feeding 하였다.

2. 세포 농도 : 일정 시간마다 1ml과 10ml씩 취하여 1ml 배양액은 10배 희석해 UV/vis spectrophotometer(HP8452, USA)를 이용해 optical density 값을 측정하고 10ml 배양액은 12500rpm, 5min, 4°C조건 하에 원심분리 한 후 cell의 건조하여, 건조 질량을 측정 후 표준 검량선 작성 하여 상관관계식을 이용하여 측정하였다.

4. 분석 : 1,3-propanediol을 분석하기 위해 Waters HPLC(HPX-87H column)을 이용하였고 이때 조건들은 eluent는 5mM H₂SO₄, column온도 60°C, 유속 0.7ml/min으로 유지하였다.

결과 및 고찰

1,3-propanediol을 생산하기 위해 *Clostridium butyricum* 배양을 시작한 후 배양시간에 따라 glucose는 일정량 감소하고, 이에 반해 미생물은 일정량 성장하여 30시간에 최대 세포농도(cell mass, 0.75 g/L)를 나타냈다. 그 후 glucose의 일정한 감소와 함께 미생물도 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig 2). Acetic acid와 lactic acid는 계속 증가 하다가 126시간에 최고치(0.42g/L)를 가지고 차츰 지연기가 지나면서 감소하게 되고, lactic acid 또한 126시간에 최고치(1.71g/L)를 보였으나 180시간부터 급격히 감소함을 보였다(Fig 3).

1,3-propanediol은 glycerol이 조금 감소함과 동시에 생성되었다. 하지만 대부분의 glycerol이 lactic acid와 acetic acid생산에 사용되면서 1,3-propanediol은 지연기가 유지되다가 lactic acid와 acetic acid생산이 감소한 후, 180시간대에 glycerol량이 감소함에 따라 1,3-propanediol은 급격히 증가하여 192시간에 최대 6.5g/L까지 생성되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4, 5). 결과적으로 glycerol당 생성된 1,3-propanediol은 0.32로 나타났으며, 생산성(g/L·h)은 0.034로 다소 낮게 나왔다(Table 1).

이 실험을 통해 glycerol이 feeding된 후, 상당히 긴 지연기를 가지는 것을 알 수 있었다. 이러한 이유는 glycerol이 3-Hydroxypropionaldehyde를 거쳐 1,3-propanediol로 가는 경로에 있어 필요로 하는 NADH₂가 lactic acid생성에 사용된다. 이런 lactic acid량이 감소 하면서 lactic acid생성에 사용되던 NADH₂가 1,3-propanediol생성에 사용되면서 1,3-propanediol생산이 급격히 증가하는 것을 알 수 있다.

참고 문헌

1. H. Biebl, K. Menzel, A. P. Zeng, W. D. Deckwer; Microbial production of 1,3-propanediol (1999) 52: 289-297
2. S. Papanikolaou, P. Ruiz-Sanchez, B. Pariset, F. Blanchard, M. Fick; High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. Journal of Biotechnology (2000) 77: 191-208
3. T. Colin, A. Bories, G. Moulin; Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. Apply Microbiol Biotechnol (2000) 54: 201-205

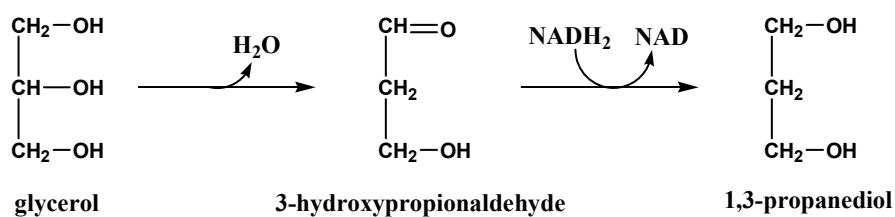


Figure 1. The pathway to 1,3-propanediol production from glycerol substrate.

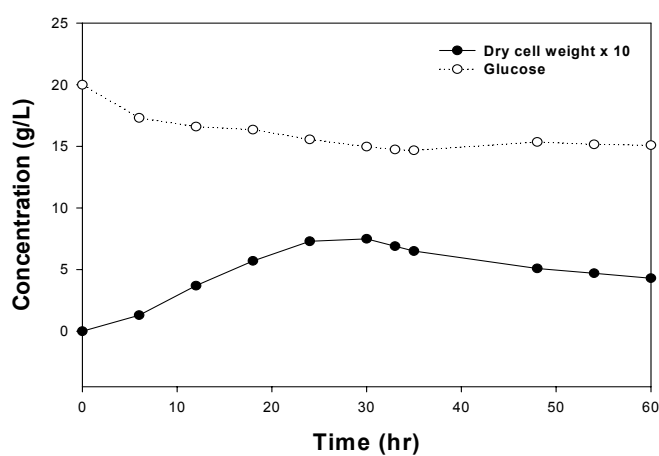


Figure 2. The time course of cell growth and glucose concentration.

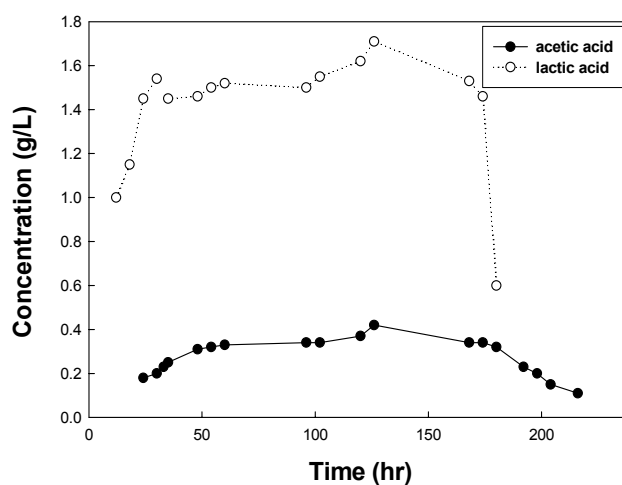


Figure 3. The time course of acetic acid and lactic acid concentration.

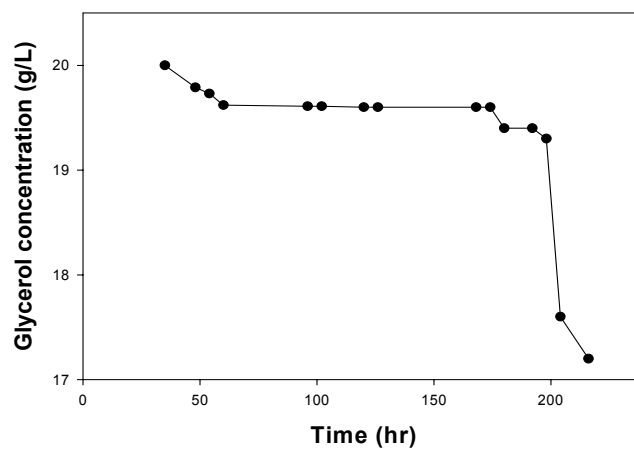


Figure 4. The time course of glycerol concentration.

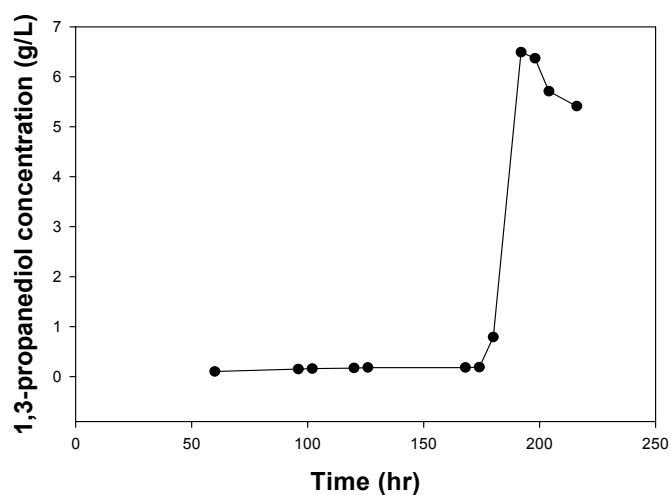


Figure 5. The time course of 1,3-propanediol concentration.

Table 1. Productivity and yield(1,3-propanediol/glycerol) of 1,3-propanediol production.

Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Productivity (g/L · h)	$Y_{PD/S}$ (kg /kg)
20	6.49	0.034	0.32