



가압을 통한 도시형 생활 폐기물 기반 합성가스발효 공정 개발

신수빈¹⁾ · 고재희¹⁾ · 문명훈^{2),3)} · 김민식⁴⁾ · 이문규^{2),5)} · 장인섭^{6),7)} · 손성수⁸⁾ · 박권우^{2),9)*}

Municipal Solid Waste-derived Syngas Fermentation Process by Pressurization

Subin Shin¹⁾ · Jae Hee Go¹⁾ · Myoungsoon Moon^{2),3)} · Min-Sik Kim⁴⁾ · Mungyu Lee^{2),5)} ·
In Seop Chang^{6),7)} · Seongsoo Son⁸⁾ · Gwon Woo Park^{2),9)*}

Received 11 October 2023 Revised 29 November 2023 Accepted 12 December 2023 Published online 18 December 2023

ABSTRACT Global efforts are focused on achieving carbon neutrality due to the increases in the levels of greenhouse gases. Moreover, the greenhouse gases generated from the disposal of municipal solid waste (MSW) are the primary sources of emissions in South Korea. In this study, we conducted the biological conversion of syngas (CO, H₂, and CO₂) generated from MSW gasification. The MSW-derived syngas was used as a feed source for cultivating *Eubacterium limosum* KIST612, and pressurization was employed to enhance gas solubility in culture broth. However, the pH of the medium decreased owing to the pressurization because of the CO₂ in the syngas and the cultivation-associated organic acid production. The replacement of conventional HEPES buffer with a phosphate buffer led to an approximately 2.5-fold increase in acetic acid concentration. Furthermore, compared with the control group, the pressurized reactor exhibited a maximum 8.28-fold increase in the CO consumption rate and a 3.8-fold increase in the H₂ consumption rate.

Key words Carbon-monoxide(일산화탄소), Syngas fermentation(합성가스 발효), Acetogen(아세트젠), Municipal solid waste(도시고형폐기물), Pressurization(가압공정)

1) Researcher, Gwangju Clean Energy Research Center, Korea Institute of Energy Research

2) Researcher, Research Center for Innovative Energy and Carbon Optimized Synthesis for Chemicals (Inn-ECOSysChem), Gwangju Institute of Science and Technology

3) Principal Researcher, Gwangju Clean Energy Research Center, Korea Institute of Energy Research

4) Principal Researcher, Bioenergy and Resources Upcycling Research Laboratory, Korea, Institute of Energy Research

5) Post-doc Researcher, School of Earth Sciences and Environmental Engineering, Gwangju Institute of Science and Technology

6) Director, Research Center for Innovative Energy and Carbon Optimized Synthesis for Chemicals (Inn-ECOSysChem), Gwangju Institute of Science and Technology

7) Professor, School of Earth Sciences and Environmental Engineering, Gwangju Institute of Science and Technology

8) Senior Researcher, CMC department PI Team, Kobiolabs

9) Senior Researcher, Gwangju Clean Energy Research Center, Korea Institute of Energy Research

*Corresponding author: werwers@kier.re.kr

Tel: +82-62-717-2424

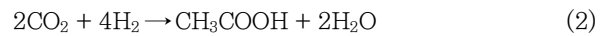
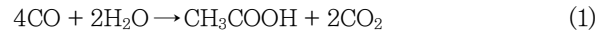
Fax: +82-62-717-2453

1. 서론

산업화가 시작된 후, CO₂와 메탄과 같은 온실 가스의 배출이 증가하게 되고, 이로 인해 지구의 기온이 1.4°C 상승하며 기후변화에 따른 심각성이 증가하고 있다. 전 세계적으로 지구온난화와 화석연료의 희소성에 대해 온실가스 감축과 화석연료 의존도를 낮추기를 요구하고 있으며 파리기후변화협약을 통해 산업부분에서 연료 대체 기술, 폐기물 및 농업 등의 부문에서 매립가스 발전 등 가연성 폐기물의 에너지화와 같은 온실가스 감축 시도를 하고 있다.^[1,2] 대한민국은 CO₂ 배출이 9번째로 발생 규모가 큰 온실가스 배출국이며, 주원인 중 한 가지는 도시형 생활 폐기물 (Municipal Solid Waste, MSW)로 인한 문제이다. 우리나라는 90% 이상이 도시에서 생활하고 있으며 단위 면적당 발생량이 다른 나라에 비해 8-9배 정도 더 높다. 도시형 생활 폐기물은 폐기물들이 혼합되어 있어 산업 폐기물과 달리 자원화가 어렵다. 그래서 지금까지 발생량의 41%는 소각 및 매립되어 CO₂를 배출하고 있으며, 연평균 MSW 유래 온실가스 배출량은 폐기물 전체에서 87% 이상 차지하고 있다.^[3,4] 하지만 증가하는 MSW 발생량을 감당하기엔 매립의 경우 가능한 면적이 점점 한계에 다다르고 있고 소각의 경우 온실가스 배출이 문제가 되고 있다. 이에 가스화 방식은 기존 폐기물 처리 방식 문제점을 극복하여 불완전연소를 통해 SO_x, NO_x가 발생하지 않고 기존 연소소각방식은 주 생성물이 열량이 없는 CO₂인 것에 반해 가스화는 주요 생성물이 합성가스인 CO와 H₂이므로 에너지 회수가 가능하고, 연료와 화학물질로 변환이 되어 고부가가치를 이끌어낼 수 있다.^[5,6]

합성가스 전환은 금속 촉매를 이용하는 화학 촉매와 미생물 등의 생물 촉매를 사용한다. 화학촉매는 Fischer-Tropsch 공정을 통해 고온(150-350°C) 및 고압(30 bar)의 조건에서 액체 연료 및 화학물질로 변환한다.^[7] 이에 반해 미생물 전환을 이용한 가스발효공정은 30-37°C의 온도와 대기압 조건에서도 주로 진행되므로 합성가스 전환할 때 생촉매를 이용하는 것이 공정비용 측면에서 유리하다. 따라서 합성가스를 미생물 배양의 탄소원으로 이용하는 공정비용이 저렴하지만, 합성가스에 포함 된 고농도의 CO는 미생물 배양을 저해시키고, 낮은 용해도로 미생물이 이용하기에 어려움이 있다. 합성가스를 통해 발효가 가능한 아세트젠(Acetogen)

이 있으며 이중에 *Eubacterium limosum* KIST612는 높은 CO 농도에서도 뛰어난 성장률과 H₂를 이용하여 CO₂를 전환할 수 있어서 공정 내 온실가스를 기질로 활용 할 수 있다.^[8-10] 아세트젠은 Wood-Ljungdahl 경로를 통해 CO 및 CO₂, H₂를 통해 acetic acid을 생산하며 반응식은 다음과 같다.^[11-15]



Acetic acid 뿐만 아니라 butyric acid를 포함한 유기산을 아세트젠을 통해 얻을 수 있으며, 이러한 유기산은 분리 정제를 통해 그 자체로 이용할 수 있거나 vinyl acetate나 cellulose acetate등과 같은 chemical 전환 또는 유기산을 기질로 하는 bacteria나 yeast, fungi의 유용한 탄소원 기질이 될 수 있다.^[16]

액상 기질과 달리 가스 기질은 넣어주는 만큼 전환이 쉽게 이뤄지지 않고, 기-액 전달된 만큼만 미생물이 기질로 이용 할 수 있다. MSW 유래 합성 가스의 주성분은 CO, CO₂, H₂이다. 이중 H₂와 CO는 난용성 기체로 배지 내에 쉽게 용해되지 못한다. 그렇기 때문에 물질 전달 개선을 위한 공정이 필요하였다. 또한 합성 가스 내 CO₂로 인해 배지 pH가 낮아 합성 가스에 따라 가장 최적의 pH 농도를 확인한 후, 배지 최적화 연구도 진행되었다.^[17-20]

본 연구는 *E. limosum* KIST612로부터 합성가스발효를 통한 유기산 생산 증진을 위해 고압반응기를 사용하였다. 또한 생성물인 유기산과 기질 CO₂ 유래 탄산으로 인한 pH 저감을 보완하기 위해 다양한 버퍼와 농도로 배양을 하였다. 또한, MSW 유래 합성가스는 성상, 가스화기 타입, 산화제, bed, 반응 온도에 따른 합성가스 조성이 다양하다.^[21] 그렇기 때문에 H₂/CO 비율을 3가지로 정하여 모사 표준가스 제작을 통해 진행하였으며 H₂/CO 비율은 0.5, 1, 1.5로 하였다.

2. 실험 방법 및 재료

2.1 균주 및 배지 준비

본 연구에서는 가스발효 균주인 *E. limosum* KIST612를

혐기조건하에서 배양하였다.^[22] 모든 배지는 trace element 을 포함한 기본배지를 제조, 살균한 다음 따로 제조, 멸균한 HEPES, vitamin 용액을 균주 접종 직전에 적량 첨가하며 준비하였다. 기본 배지는 NaCl 0.9 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, CaCl₂·2H₂O 0.1 g, NH₄Cl 1 g, trace mineral 10 ml, yeast extract 2.0 g, redox indicator(resazurin solution, 0.2 % v/v) 0.1 ml을 증류수 1 L에 용해하여 최종 pH는 7.2로 조절하였다. 100X trace mineral은 chelating agent인 nitriletriacetic acid(NTA) 1.5 g/L을 포함하여 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, Na₂MoO₄ 0.01 g/L, Na₂SeO₃ 0.017 g/L, NiSO₄·6H₂O 0.026 g/L 및 NaCl 1 g/L을 함유하는 수용액이다. 기본 배지를 혐기로 serum vial 160 ml에 배지와 head space의 비가 각각 3:5이 되도록 분주하여 121°C에서 15분간 멸균한다. Filter 멸균한 vitamin 용액과 HEPES buffer(0.02 M, pH 7.2)을 기본 배지에 첨가하여 사용하였다. 제작된 500X Vitamin 용액은 biotin 2.0 mg/L, folic acid 2.0 mg/L, lipoic acid 5.0 mg/L, pyridoxine HCl 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 및 lipoic acid 5.0 mg/L로 조성되었다.^[16] 배지는 serum vial을 사용하여 MFC (5850E, Brooks, USA)를 활용하여 N₂ 기체를 통해 혐기성 조건을 만들었다. Serum vial의 가스상은 고압 멸균되기 전에 순수한 CO를 사용하여 절대압 2 bar로 하였다. Seed culture의 1%(v/v) 접종하였고, 바이알 배양은 37°C, 150 rpm으로 배양되었다. 5N NaOH 용액을 첨가하여 pH를 7.0로 조절하였다. 균주는 동일한 조건에서 OD 0.4에서 계대 배양을 통해 활성을 유지하였다.

2.2 미생물 배양

2.2.1 버퍼에 따른 배양

합성가스 내 CO₂와 acetic acid생성에 따른 pH 저해로 인해 HEPES buffered basal medium(HBBM), phosphate buffered basal medium(PBBM), bicarbonate buffered basal medium(CBBM)을 비교하여 실험을 진행하였다. HEPES

buffer와 0.02 M에 P 성분을 위해 KH₂PO₄ 0.01 M을 추가하여 버퍼로 이용하였다. PBBM은 KH₂PO₄와 K₂PO₄를 혼합하여 1 M을 제작 후 이용하였다. CBBM은 NaHCO₃ 1 M을 제작하여 이용하였고, 접종 시 역시 P 성분을 위해 KH₂PO₄ 0.01 M을 넣어주어 사용되었다. 기존에 사용하던 HEPES buffer 0.02 M을 대체하여 PBBM, CBBM를 각 합성가스 조성 별로 0.02 M, 0.06 M, 0.1 M의 조건으로 실험을 진행하였다. 120h 배양 동안 기질의 양이 부족하지 않도록 head space에 각 합성가스 조성별로 48, 96h에 가스치환하여 재가압하였다. 본 연구에서 사용한 가스조성은 H₂/CO = 0.5(CO 30%, H₂ 15%, CO₂ 45%, N₂ 10%), H₂/CO = 1(CO 30%, H₂ 30%, CO₂ 30%, N₂ 10%), H₂/CO = 1.5(CO 30%, H₂ 45%, CO₂ 15%, N₂ 10%)로 나누어서 실험하였다.

2.2.2 가압 반응기 배양

배지 조건이 성립이 된 후, 기체 상 기질의 문제점인 난용성을 해결하기 위해 가압 공정을 진행하였다. 실시간 가스 분석, 세포 성장 및 생산성 확인을 위해 샘플링이 가능하게 포트를 구성하였다. 또한 혐기 상태로 실험이 진행되어야 했기 때문에 가스치환이 가능하고, 10 bar 이상의 고압을 버틸 수 있도록 스테인리스로 반응기를 제작하였다. 압력계와 가스 샘플링 세팅을 이용하여 12h마다 압력과 가스 조성을 확인하였다. 전체 110 ml에 배양액은 40 ml을 이용하였다. 기존 배양과 동일하게 배지 준비를 한 후, 가스 조성은 H₂/CO = 1 이용하여 합성가스 1 bar부터 10 bar까지 N₂를 이용하여 압력에 변화를 주었다. 가압 반응기 샘플링을 하면 압력을 빼야 하므로, 각 실험 조건당 2개의 반응기를 통해 72h, 120h 두 번 OD와 유기산 농도를 확인하였다. 설계된 가압반응기의 모습은 Fig. 1과 같으며 tilting shaker를 통해 배양하였다.



Fig. 1. Pressurized reactor

2.3 분석 방법

균주의 성장 분석을 위해 샘플링을 통해 분광광도계 (UV-2600, Shimadzu, Japan)를 이용하여 600 nm에서 흡광도(Optical density, OD)를 측정하였다. 배양액 내 대사산물인 acetic acid과 butyric acid을 측정하기 위해 배양액을 원심분리(3100 × g, 10분)하고 상등액 1 ml을 0.2 μm 실린지필터를 통해 여과하였다. HPLC 분석은 Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-Rad Laboratories, USA)을 갖춘 HPLC(Agilent 1260 Infinity II LC system, Agilent, USA)로 분석하였다. 온도는 50°C 이고, 이동상은 5 mM H₂SO₄를 유속 0.6 ml/min으로 사용하였다. RID 검출기를 통해 acetic acid과 butyric acid 농도를 분석하였다. 기체분석을 경우, GC(7890B, Agilent, USA)를 사용하여 serum 병의 헤드스페이스 가스 조성(CO, CO₂, H₂, N₂)를 측정하였다. Porapak Q 및 molsieve 컬럼을 이용하였고, TCD로 측정하였다. TCD를 200°C로 가열한 후 헬륨을 이동상 가스로 사용하였다. 기체 조성 측정 후 압력계(ECO-2, KELLER, Switzerland)를 이용하여 serum 병 내부의 기체 압력을 측정하고 기체상의 조성비를 정량 값으로 환산하였다.

3. 결과 및 논의

3.1 합성가스에서의 버퍼 최적화

CO₂에 따른 pH 저감정도를 확인하기 위해서 미생물 미

Table 1. Comparison of pH value on HEPES and Phosphate buffers under abiotic conditions at CO₂ 100% gas

Run	Buffer	Phosphate (M)	HEPES (M)	pH
1		0.00	0.00	4.00
2		0.01	0.02	6.20
3		0.03	0.02	6.35
4		0.05	0.02	6.56
5		0.07	0.02	6.73
6		0.01		6.04
7		0.03		6.47
8		0.05		6.59
9		0.07		6.77

접종한 상태의 세럼반응기 내 배지에 CO₂ 100% 가스로 치환한 후 pH 변화를 확인했다. Table 1를 통해 알 수 있듯이 버퍼를 넣지 않은 경우에는 pH가 4까지 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, PBBM을 0.01 M에서 단독으로 사용하면 HEPES를 넣은 버퍼보다 pH가 0.16 정도 더 강하였으나 PBBM 0.03 M이상에서 HEPES와 함께 사용하는 것보다 pH 조절 능력이 뛰어난 것을 확인하였다. 이를 통해 PBBM으로 HEPES buffer의 대체 버퍼로 이용이 가능하다는 것을 확인 한 후 본 실험을 진행하였으며 PBBM 버퍼를 통해 배양하였을 때 셀재순환공정에서 0.232 mol AA/mol CO로 이론적수치인 0.25와 근접한 선형연구도 있었다.^[23]

3.1.1 H₂/CO=0.5 조성에서 배양

합성가스 조성 H₂/CO = 0.5 조건에서 버퍼 종류에 따라 배양하였다. 모든 버퍼에서 농도가 높을 때 pH 조절이 효과적인 것을 확인하였다. Fig. 2와 같이 PBBM은 0.1 M에서 OD 1.58, CO 소비 7.82 mmol로 가장 높았고 acetic acid과 butyric acid 농도를 합한 유기산 농도는 1.70 g/L로 가장 높았다. CBBM은 버퍼의 농도가 높아질수록 생장이 증가되었으나 0.06 M이상 농도에서 PBBM보다는 소폭 낮았다. CBBM의 조건에서는 0.1 M에서 OD 1.51로 가장 높았고, CO 소비는 7.57 mmol, 유기산 농도는 1.60 g/L로 확인하였다. 두 버퍼 모두 0.1 M에서 가장 높은 성장과 대사산물을 만들었지만 0.06 M과 큰 차이를 보이지는 않았다.

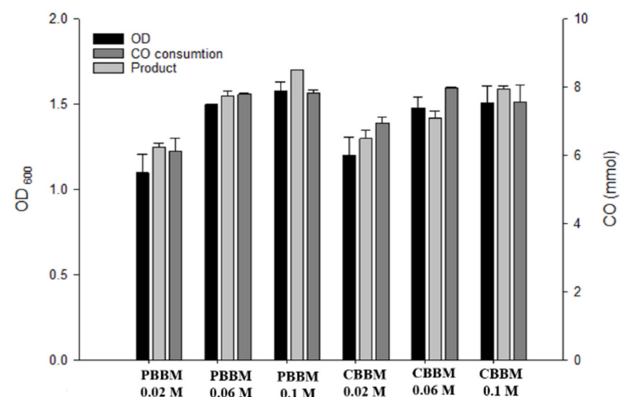


Fig. 2. Effects of buffer and buffer concentration on *E. limosum* KIST612 cultivation at syngas composition H₂/CO = 0.5

Table 2. Effects of concentration of PBBM and CBBM on cultivation at syngas composition H₂/CO = 0.5

Buffer	OD (600 nm)	CO (mmol)	AA (g/L)	BA (g/L)	Initial pH	Final pH
PBBM 0.02M	1.10 ±0.11	6.14 ±0.38	0.68 ±0.08	0.58 ±0.07	6.39 ±0.00	5.68 ±0.01
PBBM 0.06 M	1.50 ±0.00	7.80 ±0.04	1.02 ±0.01	0.53 ±0.00	6.66 ±0.00	6.09 ±0.01
PBBM 0.1 M	1.58 ±0.05	7.82 ±0.11	1.21 ±0.08	0.49 ±0.01	6.77 ±0.03	6.28 ±0.04
CBBM 0.02 M	1.20 ±0.11	6.96 ±0.18	0.65 ±0.09	0.64 ±0.01	6.54 ±0.00	5.73 ±0.01
CBBM 0.06 M	1.48 ±0.06	7.97 ±0.04	0.94 ±0.06	0.48 ±0.06	6.78 ±0.01	6.19 ±0.06
CBBM 0.1 M	1.51 ±0.13	7.57 ±0.05	1.10 ±0.01	0.50 ±0.04	6.93 ±0.00	6.57 ±0.00

세포 성장과 소비된 CO, acetic acid 및 butyric acid의 생산 농도 및 pH는 Table 2를 통해 확인할 수 있다. 가스 주입전에 초기 pH는 7.0으로 조절하였으나 가스 주입후 pH를 바로 측정할 결과 합성가스 내 CO₂로 인하여 바로 떨어진 것을 알 수 있다. 가스 조성 H₂/CO = 0.5 에서 가장 최적의 버퍼 농도는 PBBM 0.1 M로 확인되었다.

3.1.2 H₂/CO=1 조성에서 배양

Fig. 3을 통해 낮은 농도의 버퍼에서는 HEPES가 효과적인 것을 확인할 수 있었지만 버퍼의 농도가 높아짐에 따라 PBBM에서는 유기산 농도가 약 2.2배 높았고, CBBM에서는 약 1.9배 높아 대체 버퍼가 더 효과적인 것을 확인하였다. PBBM에서 버퍼의 농도가 높을 때 OD는 1.5, CO 소

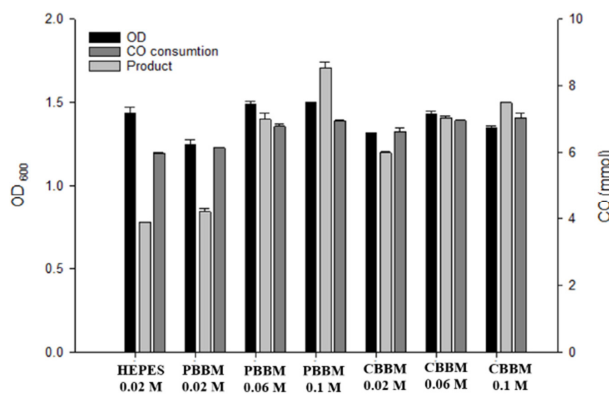


Fig. 3. Effects of buffer and buffer concentration on *E. limosum* KIST612 cultivation at syngas composition H₂/CO = 1

Table 3. Effects of concentration of PBBM and CBBM on cultivation at syngas composition H₂/CO = 1

Buffer	OD (600 nm)	CO (mmol)	AA (g/L)	BA (g/L)	Initial pH	Final pH
PBBM 0.02M	1.25 ±0.03	6.15 ±0.01	0.50 ±0.01	0.34 ±0.02	6.55 ±0.01	5.95 ±0.05
PBBM 0.06 M	1.49 ±0.02	6.79 ±0.06	0.76 ±0.00	0.64 ±0.00	6.72 ±0.00	6.24 ±0.05
PBBM 0.1 M	1.50 ±0.00	6.95 ±0.03	1.14 ±0.00	0.57 ±0.01	6.89 ±0.00	6.49 ±0.01
CBBM 0.02 M	1.32 ±0.00	6.63 ±0.10	0.56 ±0.01	0.64 ±0.00	6.67 ±0.00	6.26 ±0.01
CBBM 0.06 M	1.43 ±0.02	6.97 ±0.02	0.88 ±0.00	0.53 ±0.02	6.90 ±0.01	6.79 ±0.01
CBBM 0.1 M	1.35 ±0.01	7.05 ±0.14	1.05 ±0.00	0.46 ±0.04	7.02 ±0.00	7.07 ±0.01

비는 6.95 mmol로 가장 높았고 유기산 농도 또한 1.71 g/L 로 가장 높았다. CBBM의 농도가 높을 때 오히려 생장이 떨어지는 것을 확인하였다. CBBM의 0.06 M 조건에서는 OD는 1.43로 가장 높았고, 0.1 M에서 CO 소비 7.05 mmol, 유기산 농도는 1.51 g/L로 가장 높았다.

미생물 성장과 유기산 각각의 생산 농도는 Table 3을 통해 확인할 수 있다. 가장 최적의 버퍼 농도는 PBBM 0.1 M로 확인되었고 0.06 M에서도 생장이 비슷한 모습을 보였다.

3.1.3 H₂/CO=1.5 조성에서 배양

합성가스 조성 H₂/CO = 1.5 조건에서 배양하였다. 버퍼 농도가 높을 때 pH 조절이 효과적인 것을 확인하였다. Fig. 4를 통해 PBBM의 0.1 M에서 OD 1.6, CO 소비 7.41 mmol

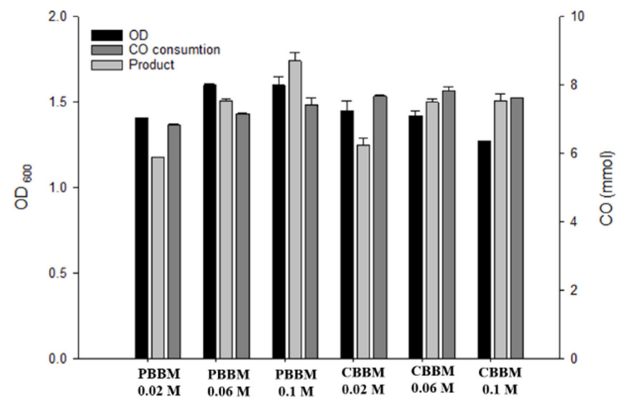


Fig. 4. Effects of buffer and buffer concentration on *E. limosum* KIST612 cultivation at syngas composition H₂/CO = 1.5

Table 4. Effects of concentration of PBBM and CBBM on cultivation at syngas composition H₂/CO = 1.5

Buffer	OD (600 nm)	CO (mmol)	AA (g/L)	BA (g/L)	Initial pH	Final pH
PBBM 0.02M	1.41 ±0.00	6.84 ±0.03	0.54 ±0.02	0.64 ±0.01	6.64 ±0.00	5.90 ±0.01
PBBM 0.06 M	1.60 ±0.01	7.16 ±0.03	0.86 ±0.00	0.65 ±0.00	6.82 ±0.00	6.29 ±0.01
PBBM 0.1 M	1.60 ±0.05	7.41 ±0.21	1.10 ±0.03	0.63 ±0.01	6.89 ±0.03	6.44 ±0.01
CBBM 0.02 M	1.45 ±0.06	7.68 ±0.03	0.62 ±0.04	0.63 ±0.02	6.82 ±0.04	6.17 ±0.11
CBBM 0.06 M	1.42 ±0.03	7.83 ±0.11	0.95 ±0.03	0.56 ±0.03	7.03 ±0.00	6.56 ±0.01
CBBM 0.1 M	1.27 ±0.00	7.68 ±0.00	1.08 ±0.00	0.43 ±0.00	7.12 ±0.00	6.89 ±0.00

로 가장 높았고 유기산 생산 또한 1.73 g/L 로 가장 높았다. CBBM의 농도가 높을 때 생장이 떨어지는 모습을 볼 수 있었다. CBBM에서는 0.02 M 조건에서 OD는 1.45 로 가장 높았고, 0.06 M에서 CO 소비 7.83 mmol, 유기산 농도는 1.51 g/L로 가장 높다.

세포 성장과 유기산의 생산 농도는 Table 4를 통해 확인할 수 있다. 가장 최적의 버퍼 농도는 PBBM 0.1 M로 확인되었고, 0.06 M 일때도 생장이 비슷한 모습을 보였다.

3.1.4 버퍼별 가격 비교

다양한 가스 조성에서 기존 HEPES와 대체제인 PBBM, CBBM을 비교해보았다. H₂/CO =1 조건에서 동일한 농도 (0.02 M)에서 HEPES의 생장역할이 더 뛰어난 것을 확인할 수 있었으나 대체 버퍼농도가 올라갈수록 HEPES 보다 더 효과가 뛰어난 것을 확인하였다. 기존의 HEPES가 아닌 phosphate와 carbonate 버퍼를 통해 미생물 배지를 대체

Table 5. Comparison of buffered basal medium prices

Buffer	Composition	Market Price (\$/kg)
HBBM	HEPES	575,873
	KH ₂ PO ₄	8,589
PBBM	KH ₂ PO ₄	8,589
	K ₂ HPO ₄	8,073
CBBM	NaHCO ₃	2,302
	KH ₂ PO ₄	8,588

해 보았다. 이는 Table 5와 같이 HEPES의 비용이 다른 버퍼들에 비해 60배 이상 가격이 비싸기 때문이다.

이세토젠인 *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium ragsdalei*에서도 MES 버퍼가 전체 배지가격의 90% 이상을 차지하여 버퍼를 줄이는 연구를 하였다.^[24,25] H₂/CO 조성과 무관하게 PBBM에서는 0.06 M과 0.1 M의 생장수치가 비슷하였으나 0.1 M에서 배지에서 많은 염이 발생됨을 확인하였다. 또한 CBBM은 합성가스 조성에 따라 농도별 양상이 달랐다. CO₂ 함량이 많은 H₂/CO = 0.5에서는 버퍼 농도가 증가할수록 미생물 생장이 증가하였고 H₂/CO = 1.5에서는 버퍼 농도가 높아질수록 세포 성장에 좋지 못한 영향을 주어 반대 양상을 보였다. 더욱이 CBBM 0.06 M 이상에서는 염이 많이 발생하여 최적 버퍼는 합성가스 조성에 관계 없이 성장량이 우수하고 염이 발생하지 않은 PBBM 0.06 M로 설정하였다. 가압 반응에서는 도시형 생활 폐기물에서 가장 많은 비율을 차지한 H₂/CO = 1을 가스 조성으로 고정하여 진행되었다.

3.2 가압 반응기 배양

3.2.1 합성가스 1 bar 조건에서 배양

합성가스 농도를 1 bar로 고정된 후, N₂ 가스 가압을 통해 대조군(syngas 1 bar, N₂ 1 bar)을 포함하여 절대 압력 2, 4, 6, 8, 10 bar로 설정하여 배양하였다. Fig. 5는 압력에 따른 CO 소비, H₂ 소비, OD이다. 압력이 높을수록 빠르게 CO의 고갈을 보여주었고 절대압 10 bar에서는 48시간 이내에 CO가 모두 전환되었다(Fig. 5a 참조). H₂는 초기에는 이용되지 못하다가 CO의 농도가 낮아짐에 따라서 사용되어졌다(Fig. 5b 참조). 이는 CO에 의해 저해되었던 hydrogenase가 다시 활성화되기 때문으로 사료된다.^[26] 또한 6, 8, 10 bar의 경우에는 CO가 72h 이전에 모두 전환되었기 때문에 2, 4 bar에 비해 초기에는 OD가 높은 상태를 보였으나 CO, H₂가 모두 사용된 120h에서는 기질부족에 따른 cell lysis로 오히려 낮은 수치를 보여주었다(Fig. 5c 참조).

합성가스 농도 1 bar로 고정했을 때 전체 2 bar(syngas 1 bar, N₂ 1 bar)의 경우 CO와 수소 소비속도는 각각 0.007, 0.005 mmol/h 었다. 최적 압력은 10 bar이며, 기질의 양이 동일하게 주어졌을 때 압력 증가에 따라 CO 소비 속도

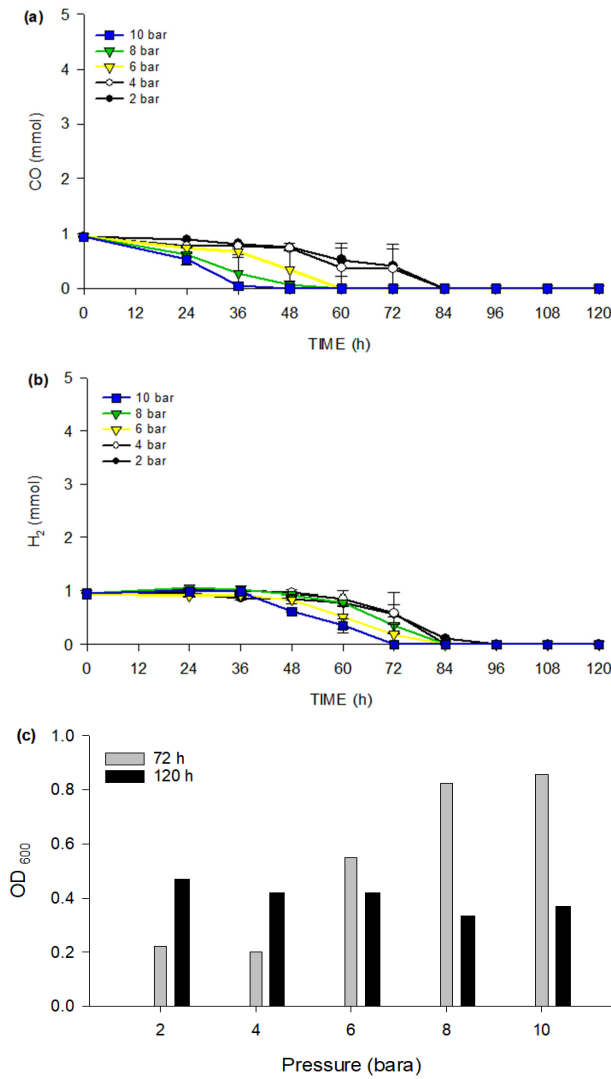


Fig. 5. Effects of pressurization on *E. limosum* KIST612 cultivation. (a) Carbon monoxide consumption, (b) Hydrogen consumption, (c) Cell growth. Syngas composition ratio was H₂/CO = 1. Total pressure was maintained with a fixed composition of 1 bar syngas and balanced with N₂

와 H₂ 소비 속도 및 생장에 영향을 주었다. 비슷한 사례로 *Thermococcus onnurineus* NA1을 통해 CO를 기질로 하여 수소를 생산하는 미생물 수성가스전환 반응이 있다. 이때 CO 부분압력은 동일하고 전체압은 1-10 bar으로 배양하였으며, 4 bar까지는 CO의 소비 속도가 증가하였다.^[27]

3.2.2 합성가스 3 bar 조건에서 배양

Fig. 6은 합성가스 농도 3 bar를 고정한 후, N₂ 가스로 압력 차이를 주어 압력에 따른 성장 차이를 확인해 보았다.

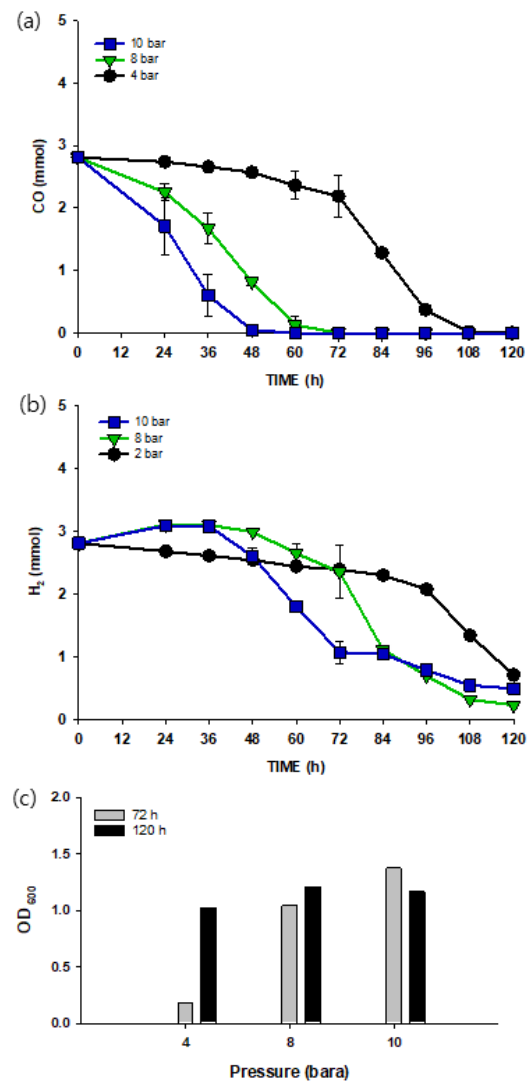


Fig. 6. Effects of pressurization on *E. limosum* KIST612 cultivation (a) CO consumption, (b) H₂ consumption, (c) OD. Syngas composition ratio was H₂/CO = 1. Total pressure was maintained with a fixed composition of 3 bar syngas and balanced with N₂

합성가스 농도 1 bar와 마찬가지로 CO의 농도는 전체압이 높을수록 빠르게 소모가 되었다(Fig. 6a 참조). 또한 높은 압력인 전체압 8, 10 bar에서 수소 소비도 빠르게 일어났다(Fig. 6b 참조).

최대 CO 소비 속도는 10 bar조건에서 0.058 mmol/h 이었고(0-48h) 이는 1.45 mmol/L/h 이다. 성장 역시 72h 이전에는 2, 4 bar에서는 CO 전환이 다 되어있지 않고 수소를 활용하지 못하기 때문에 성장량이 낮았다(Fig. 6c 참조). Table 6은 유기산 생산성과 기질 소비속도를 표시하

Table 6. Comparison of organic acid production and gas consumption at various pressure (syngas = 3 bar fixed)

Pressure (Syngas, N ₂) (bar)	AA (g/L)		BA (g/L)		CO consump. (mmol/h)	H ₂ consump. (mmol/h)
	72h	120h	72h	120h		
4 (3,1)	0.16	2.10	0.00	0.23	0.026	0.018
8 (3,5)	1.68	2.26	0.02	0.12	0.045	0.022
10 (3,7)	2.16	2.22	0.04	0.10	0.058	0.019

였다. 합성가스 농도 3 bar에서 압력이 높아질수록 CO, H₂ 소비 속도가 증가하는 것을 확인하였다. 유기산의 농도는 120h에서는 2.33, 2.38, 2.32로 큰 차이가 나지는 않았지만 72h에서는 0.16, 1.70, 2.20으로 압력이 높을수록 유기산이 증가하여 유기산 생산성이 높음을 알 수 있다. 합성가스 농도 3 bar에서 최적 압력은 10 bar이며, 기존(syngas 1bar, N₂ 1bar) 보다 CO 소비 속도는 8.28배, H₂ 소비 속도는 3.8배, OD는 2.9배를 보여주었다.

3.2.3 합성가스 5 bar 조건에서 배양

합성가스 농도 5 bar를 고정하고 후, N₂ 가스로 압력 차이를 주어 압력에 따른 성장 차이를 확인해 보았다. 실험 조건은 절대 압력 6, 8, 10 bar로 설정되었다. 합성가스의 압력이 높아져서 1, 3bar와는 달리 고압의 조건에서도 CO 전환이 72h 이전에도 50%가 되지 않았고 6 bar의 경우 120h에도 모두 전환되지 못하였다(Fig. 7a 참조). 또한 수소의 전환율은 24.3-35.6%만 전환되었고(Fig. 7b 참조) 미생물의 성장의 경우 72h에는 모두 CO 전환율이 저조하였기 때문에 모든 압력에서 OD는 비슷하였고 120h에 고압조건의 경우 CO를 모두 전환되었기 때문에 6 bar에 비해 각각 56.8, 66.1% 증가하였다(Fig. 7c 참조).

Table 7은 유기산 생산과 기질의 소비속도를 나타내었고 합성가스 농도 5 bar에서 압력이 높아질수록 CO 소비 속도가 증가하는 것을 확인하였으면 10 bar에서 0.042 mmol/h 이었고 합성가스 3 bar, 절대압력 10 bar에 비해 27.5% 감소하였으며 이는 CO에 의한 저해로 보인다. 합성가스 농도 5 bar에서 최적 압력은 10 bar이며, 기존조건(합성가스 1 bar, N₂ 1 bar)보다 CO 소비 속도는 6배 높았으며, OD는 4.17배 유기산 농도는 1.82배 되었다.

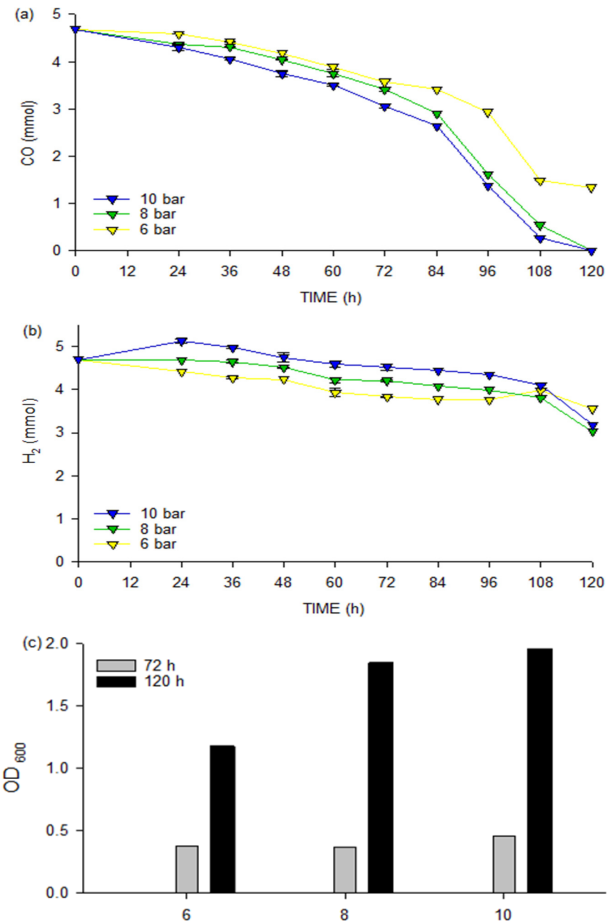


Fig. 7. Effects of pressurization on *E. limosum* KIST612 cultivation. (a) CO consumption, (b) H₂ consumption, (c) OD. Syngas composition ratio was H₂/CO = 1. Total pressure was maintained with a fixed composition of 5 bar syngas and balanced with N₂

Table 7. Comparison of organic acid production and gas consumption at various pressure (syngas = 5 bar)

Pressure (Syngas, N ₂) (bar)	AA (g/L)		BA (g/L)		CO consump. (mmol/h)	H ₂ consump. (mmol/h)
	72h	120h	72h	120h		
6 (5,1)	0.43	1.00	0.01	0.03	0.028	0.010
8 (5,3)	0.42	1.48	0.01	0.14	0.038	0.014
10 (5,5)	0.50	1.96	0.00	0.06	0.042	0.013

3.2.4 합성가스 7, 9 bar 조건에서 배양

Fig. 8과 같이 합성가스 농도 7, 9 bar로 고정하고 후, N₂ 가스로 압력 차이를 주어 압력에 따른 성장 차이를 확인해 보았다. 실험 조건은 10 bar로 설정되었다. CO 전환율은 72h까지 7, 9 bar 각각 25.21, 20.84%로 낮았으나 120h에는 90.63, 39.25%로 7 bar에서 72h 이후에 급격하게

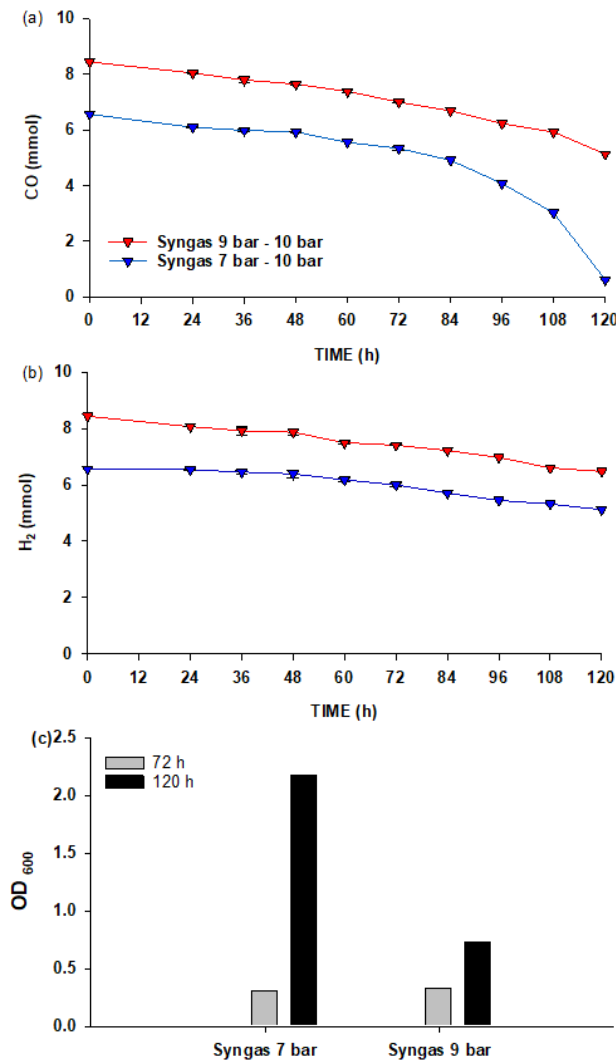


Fig. 8. Effects of pressurization on *E. limosum* KIST612 cultivation at 10 bar. (a) CO consumption, (b) H₂ consumption, (c) OD. Syngas composition ratio was H₂/CO = 1. Total pressure was maintained with a fixed composition of 7 and 9 bar syngas and balanced with N₂

CO 전환이 되었고 그로인해 OD는 9 bar에 비해 2.99배였다(Fig. 8a,c 참조). H₂의 전환은 CO전환이 적기 때문에 7, 9 bar 모두 20%대의 낮은 전환율을 보여 주었다(Fig. 8b 참조). 합성가스 7 bar에서는 대조군과 비교했을 때, CO 소비 속도는 7.14배, acetic acid 농도는 1.73배 되었고 9 bar에서는 대조군 대비 CO 전환속도는 4배로 모두 대조군보다 높은 전환속도를 보여주었다. 합성가스 압력 9 bar로 고압 및 높은 농도임에도 불구하고 미생물 생장이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. Table 8에서는 절대압력 10 bar에서의 각 합성가스 압력에 따른 결과를 비교하였

Table 8. Comparison of organic acid production, gas consumption, pH and CO conversion at various pressure

Pressure (Syngas, N ₂) (bar)	AA (g/L)	CO consump. (mM/h)	H ₂ consump. (mM/h)	pH	CO conv. (%)
10 (1,9)	1,36 (1,00)	0.63	0.25	6.34	100
10 (3,7)	2,22 (1,63)	1.45	0.48	5.21	100
10 (5,5)	1,96 (1,44)	1.05	0.33	5.51	100
10 (7,3)	1,91 (1,40)	1.25	0.30	5.74	90.63
10 (9,1)	1,27 (0,93)	0.70	0.40	5.94	39.25

다. 대표적인 생산물인 acetic acid의 경우 3 bar에서 가장 높았으나 대조군 대비 합성가스의 양이 3배가 증가하였지만 acetic acid는 1.63배로 대조군 대비 carbon flux가 생산물 쪽이 아닌 미생물 성장 및 maintenance energy 쪽으로 쓰이는 것으로 사료된다.

더욱이 syngas가 증가함에 따라 포함되어 있는 CO₂가 더욱 용해되고 산생성에 따른 pH가 낮아져서 acid-crash에 따른 저해도 존재한다.^[28] 이러한 저해는 CO를 이용하고 H₂와 CO₂를 통해 유기산을 만들어야 하지만 낮은 pH로 인하여 미생물 활성이 좋지 않았을 수 있고 그로 인해 모든 압력조건에서 H₂의 소비속도가 크게 차이 나지 않은 것으로 보인다. 특히, Syngas 압력이 9 bar의 경우 저해에 따른 lag가 길어져서 CO 전환속도와 전환율이 낮은 수치를 보였다.

4. 결론

도시형 생활 폐기물 기반 모사 합성 가스를 이용하여 pH 저하에 따른 미생물 성장 저해 감소를 위해 버퍼최적화를 진행하였고, 가스 기질인 CO와 H₂의 전환율 증가시키기 위해 가압 공정을 하였다. 그 결과 기존 버퍼인 HEPES 버퍼를 보다 저렴한 PBBM으로 변경해도 pH 저감 억제를 할 수 있으며 배지 가격 역시 감소하였다. 최적화된 PBBM 0.06 M을 포함한 미생물 배지를 통해 가압운전을 하였고 절대압력을 10 bar로 고정하여 다양한 합성가스 부분압력

으로 배양하였을 때에는 합성가스 3 bar에서 최적조건으로 CO의 전환속도는 1.45 mM/h이다. 이를 통해 가압을 통한 폐기물 기반 가스의 CO 및 H₂, CO₂ 성분의 전환을 통해 upcycling이 증진 될 수 있으며, 추가적으로 미생물 활성을 위해 pH-stat, 연속배지 주입, 배지 조성 최적화, CO 내성 강화 균주 개량 등을 통해 전환속도 증진과 생산물 증대를 하는 추후 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 2021년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(No. 2021R1A5A1028138).

References

- [1] Johari, A., Ahmed, S.I., Hashim, H., Alkali, H., and Ramli, M., 2012, "Economic and environmental benefits of landfill gas from municipal solid waste in Malaysia", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**(5), 2907-2912.
- [2] Luo, S., Xiao, B., Hu, Z., Liu, S., Guan, Y., and Cai, L., 2010, "Influence of particle size on pyrolysis and gasification performance of municipal solid waste in a fixed bed reactor", *Bioresour. Technol.*, **101**(16), 6517-6520.
- [3] Popli, K., Lim, J., Kim, H.K., Kim, Y.M., Tuu, N.T., and Kim, S., 2020, "Prediction of greenhouse gas emission from municipal solid waste for South Korea", *Environmental Engineering Research*, **25**(4), 462-469.
- [4] Hwang, K.L., Choi, S.M., Kim, M.K., Heo, J.B., and Zoh, K.D., 2017, "Emission of greenhouse gases from waste incineration in Korea", *Journal of Environmental Management*, **196**, 710-718.
- [5] Ryu, C., 2010, "Potential of municipal solid waste for renewable energy production and reduction of greenhouse gas emissions in South Korea", *J&AWMA*, **60**(2), 176-183.
- [6] Ryu, C. and Shin, D., 2013, "Combined heat and power from municipal solid waste: Current status and issues in South Korea", *Energies*, **6**(1), 45-57.
- [7] Chang, I.S., Kim, D.H., Kim, B.H., Shin, P. K., Sung, H.C., and Lovitt, R.W., 1998, "CO Fermentation of *Eubacterium limosum* KIST612", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **8**(2), 134-140.
- [8] Jeong, J., Bertsch, J., Hess, V., Choi, S., Choi, I.G., Chang, I.S., and Müller, V., 2015, "Energy conservation model based on genomic and experimental analyses of a carbon monoxide-utilizing, butyrate-forming acetogen, *Eubacterium limosum* KIST612", *Appl. and Environ. Microbiol.*, **81**(14), 4782-4790.
- [9] Roh, H., Ko, H.J., Kim, D., Choi, D.G., Park, S., Kim, S., Chang, I.S., and Choi, I.G., 2011, "Complete genome sequence of a carbon monoxide-utilizing acetogen, *Eubacterium limosum* KIST612", *J. Bacteriol.*, **193**(1), 307-308.
- [10] Chang, I.S., Kim, D.H., Kim, B.H., Shin, P.K., Yoon, J.H., Lee, J.S., and Park, Y. H., 1997, "Isolation and identification of carbon monoxide utilizing anaerobe, *Eubacterium limosum* KIST612", *Microbiology and Biotechnology Letters*, **25**(1), 1-8.
- [11] Dietrich, H.M., Kremp, F., Öppinger, C., Ribaric, L., and Müller, V., 2021, "Biochemistry of methanol-dependent acetogenesis in *Eubacterium callanderi* KIST612", *Environ. microbiol.*, **23**(8), 4505-4517.
- [12] Ragsdale, S.W., and Pierce, E., 2008, "Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation", *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, **1784**(12), 1873-1898.
- [13] Drake, H.L., Küsel, K., Matthies, C., 2006, "Acetogenic prokaryotes", *The Prokaryotes*, Springer, New York, 354-420.
- [14] Fuchs, G., 2011, "Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life?" *Annu. Rev. Microbiol.*, **65**, 631-658.
- [15] Fast, A.G. and Papoutsakis, E.T., 2012, "Stoichiometric and energetic analyses of non-photosynthetic CO₂-fixation pathways to support synthetic biology strategies for production of fuels and chemicals", *Current Opinion in Chemical Engineering*, **1**(4), 380-395.
- [16] Kiefer, D., Merkel, M., Lilge, L., Henkel, M., and

- Hausmann, R., 2021, "From acetate to bio-based products: Underexploited potential for industrial biotechnology", *Trends in Biotechnology*, **39**(4), 397-411.
- [17] Kim, J.Y., Park, S., Jeong, J., Lee, M., Kang, B., Jang, S.H., Jeon, J., Jang, N., Oh, S., and Park, Z.Y., *et al.*, 2021, "Methanol supply speeds up synthesis gas fermentation by methylotrophic-acetogenic bacterium, *Eubacterium limosum* KIST612", *Bioresour. Technol.*, **321**, 124521.
- [18] Dürre, P. and Eikmanns, B.J., 2015, "C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation", *Current Opinion in Biotechnology*, **35**, 63-72.
- [19] Liew, F., Martin, M.E., Tappel, R.C., Heijstra, B.D., Mihalcea, C., and Köpke, M., 2016, "Gas fermentation —A flexible platform for commercial scale production of low-carbon-fuels and chemicals from waste and renewable feedstocks", *Front. Microbiol.*, **7**, 694.
- [20] Molitor, B., Richter, H., Martin, M.E., Jensen, R.O., Juminaga, A., Mihalcea, C., and Angenent, L.T., 2016, "Carbon recovery by fermentation of CO-rich off gases—Turning steel mills into biorefineries", *Bioresour. Technol.*, **215**, 386-396.
- [21] Kwak, T.H., Maken, S., Lee, S., Park, J.W., Min, B.R., and Yoo, Y.D., 2006, "Environmental aspects of gasification of Korean municipal solid waste in a pilot plant", *Fuel*, **85**(14-15), 2012-2017.
- [22] Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, D.H., Lovitt, R.W., and Sung, H.C., 1999, "Formulation of defined media for carbon monoxide fermentation by *Eubacterium limosum* KIST612 and the growth characteristics of the bacterium", *J. Biosci. Bioeng.*, **88**(6), 682-685.
- [23] Chang, I.S., Kim, D., Kim, B.H., and Lovitt, R.W., 2007, "Use of an industrial grade medium and medium enhancing effects on high cell density CO fermentation by *Eubacterium limosum* KIST612", *Biotechnol. Lett.*, **29**(8), 1183-1187.
- [24] Phillips, J.R., Atiyeh, H.K., Tanner, R.S., Torres, J.R., Saxena, J., Wilkins, M.R., and Huhnke, R.L., 2015, "Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: Medium development and culture techniques", *Bioresour. Technol.*, **190**, 114-121.
- [25] Gao, J., Atiyeh, H.K., Phillips, J.R., Wilkins, M.R., and Huhnke R.L., 2013, "Development of low cost medium for ethanol production from syngas by *Clostridium ragsdalei*", *Bioresour. Technol.*, **147**, 508-515.
- [26] Bertsch, J. and Muller, V., 2015, "CO metabolism in the acetogen *Acetobacterium woodii*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**(17), 5949-5956.
- [27] Kim, M.S., Fitriana, H.N., Kim, T.W., Kang, S.G., Jeon, S.G., Chung, S.H., Park, G.W., and Na, J.G., 2017, "Enhancement of the hydrogen productivity in microbial water gas shift reaction by *Thermococcus onnurineus* NA1 using a pressurized bioreactor", *International Journal of Hydrogen Energy*, **42**(45), 27593-27599.
- [28] He, Y., Cassarini, C., and Lens, P.N.L., 2021, "Bioethanol production from H₂/CO₂ by solventogenesis using anaerobic granular sludge: Effect of process parameters", *Front. Microbiol.*, **12**, 647370.