한국생물공학회지 제5권 제1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 5. No. 1. 09-18(1990)

pH 변화와 인산 제한이 *Clostridium acetobutylicum* 의 연속발효에 미치는 영향

신 순 영 · 김 병 홍
한국과학기술연구원 유전공학센터 응용미생물연구실

Effects of pH variation and phosphate limitation on the continuous fermentation of *Clostridium acetobutylicum*

Soon-Young Shin and Byung-Hong Kim
Applied Microbiology Laboratory,
Genetic Engineering Center,
Korea Advanced Institute of Science and Technology

ABSTRACT

The growth and fermentation profiles of *Clostridium acetobutylicum* KCTC 1037 were examined in batch and continuous modes with pH variation and phosphate limitation. *Clostridium acetobutylicum* KCTC 1037 grew better at pH 4.5 than at pH 5.5 or 6.5. Acetate and butyrate were produced at pH 5.5, whereas culture at pH 4.5 produced acetone and butanol. Solvent production was increased by the phosphate limitation in a batch culture, but in a phosphate-limited continuous culture for 400 hours steady-state solventogenesis was not observed. The induction and maintenance of solventogenesis presumably require not only acidic condition or phosphate limitation but also favourable bioenergetic condition.

서 론

*Clostridium acetobutylicum*은 혐기성 세균으로서 당을 발효하여 아세톤, 부탄올 을 생성하는 산업적으로 잘 알려진 균주이다. *C. acetobutylicum* 대사는 발효 초기 아세트산, 부티르산 등이 생성되는 산생성기와 pH 저하, 세포생육 속도 감소와 더불어 생성된 산이 아세톤, 부탄올, 에탄올 등으로 전환되는 용매 생성기로 뚜렷이 구분된다.

이러한 *C. acetobutylicum* 대사에 산생성기와 용매생성기의 생화학적 특징은 잘 알려져 있지만(1,2), 산생성기에 생성된 유기산이 어떠한 생리적 기작에 의하여 용매생성을 시작하며 조절될 수 있는지에 대해서는 아직 알려지지 않고 있다(3,8).

C. acetobutylicum 발효의 용매 생성을 위하여 낮은 pH가 필요하다는 것은 이미 오래전 부터 알려져왔다(9). 그러나 pH 자체는 용매 생성을 직접 자극하지 않으며 pH와 관련된 다른 여러 복합적인 요인들이 관련되어 있으리라는 견해가 많다(3,8). 그 한 예로 인산 고갈에 의한 용매생성 유도 기작이 제안 되기도 하였으며(14), 산 생성기에서 축적되는 유기산에 의해 pH가 내려가고 유기산이 낮은 pH에서 전리되지 않은 상태로 평형을 이루게 되므로 이 분자상태의 유기산이 용매생성에 필요한 대사 전이를 유발 한다는 주장도 있다(3,8). 그러나 아직 많은 연구 결과들이 서로 상반된 결과를 보이고 있다(3,4,7,14).

이러한 배경으로 부터, 이 실험에서는 *C. acetobutylicum* 발효에 용매생성의 조건을 알기 위하여 pH의 변화와 인산 제한을 시도 하였으며 회분배양과 이단 연속배양에 미치는 영향을 조사하여, 발효 생성물의 변화와 용매발효와의 관련을 논의하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

균주는 *Clostridium acetobutylicum* KCTC (Korean Collection for Type Cutures) 1037과 이 균주의 무포자 변이주로서 용매 생성능이 향상된 균주인 *C. acetobutylicum* KCTC 1724(15)를 사용하였다. 배지는 발효 기질로서 포도당 45 g / L이 함유된 복합배지(CAB)를 사용하였으며 그 조성은 1L의 증류수에 대하여 yeast extract 4 g, trptone 1 g, K_2HPO_4 0.7 g, KH_2PO_4 0.7 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, $MnSO_4$ 0.1 g, $FeSO_4$ $7H_2O$ 0.015 g, NaCl 0.1 g, 0.02% resazulin 1mL 이었다. pH는 autoclave (121℃ 20분)전에 5.4로 맞추었다. 배지의 인산의 량은 실험 조건에 따라 조절하였다. 즉 연속배양에 사용된 배지는 CAB 배지의 K_2HPO_4 0.7 g과 KH_2PO_4 0.7 g 대신 KH_2PO_4 0.1 g 을 사용한 인산제한 배지였다. 배지 제조는 Kim등(5)의 방법에 의하였다. 즉, 배지 성분들을 증류수에 녹인 후, 끓여서 용존산소를 제거하고 산소가 없는 질소를 공급하여 완전히 혐기적 조건으로 하였다.

보존 및 배양

C. acetobutylicum KCTC 1037은 Walton과 Martin의 방법(16)에 따라 soil stock으로 냉장고에 보관하여 필요할 때 마다 사용 하였다. 배양을 하기 위하여 이 soil 약간량을 10mL의 CAB 배지에 혐기적으로 접종하여 80℃ water bath에 2분간 가열(heat shock)하였다. 이것을 35℃ water bath에 24시간 배양한 후 3.5mL을 취하여 70mL CAB 배지에 접종하여 생육을 관찰하거나 발효조의 접종액으로 사용하였다. *C. acetobutylicum* KCTC 1724 는 균체를 진공건조하여 ampule을 만들어 냉장고에 보관하여 사용하였다. 이 균주는 접종한 후 heat shock를 주지않고 직접 배양하였다.

발효조를 이용한 회분배양에서는 700mL 들이 Bioflow C 30 fermentor (New Brunswick Scientific, Co. Inc. Edison, NJ)에 400mL의 배지를 채워 발효에 이용하였다. 배양은 350℃ 구리 furnace를 통과한 질소 가스를 계속적으로 흐르게 하면서 35℃에서 200 RPM의 교반을 유지하였다. pH는 pH 자동조절기와 pH 전극을 사용하여 5N NaOH와 2.5 N H_2SO_4로 적정하여 원하는 pH로 조정하였다.

연속배양은 2개의 발효조를 연결한 two-stage chemostat를 실시하였다(Fig.1). 배지 저장고는 13L들이 큰 유리용기(carboy)로서 12L 배지를 담아 사용하였다. 사용된 배지는 인산제한 배지로서 stage 1에는 750mL들이

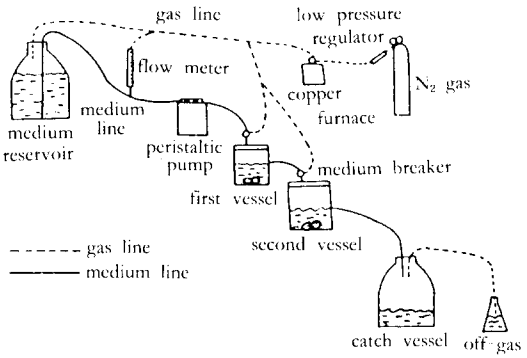

Fig. 1. Schematic representation of the equipment used for continuous product with two stage chomostat.

Bioflow C 30 fermentor에 375mL, stage 2는 2L 들이 LH fermentor 502 D (LH fermentation LTD, Stoke Poges, UK)에 1125mL을 담아 사용하였다. 전체 system을 121℃에서 1시간 autoclave 한 후 질소 가스를 흘려주면서 배지를 식혔으며, 필요에 따라 환원제 titanium(III) nitrilotriacetic acid(NTA)(17)를 가하여 완벽한 혐기적 조건이 유지되도록 하였다. 배양의 시작은 접종량을 5%하여 24시간 회분배양을 한 후, carboy로 부터 일정한 속도가 유지된 peristaltic pump를 이용하여 새배지를 stage 1에 주입하였다. stage 1에서 overflow 되는 배양액은 side arm을 통하여 유출되어 stage 2에 발효가 계속된다. 이어 stage 2에서도 일정한 부피가 유지되기 위하여 배양액은 outvessel로 내려간다. 배양을 하는 동안 발효조의 head space는 50mL / min 속도로 질소를 흘려주어 carboy를 포함한 system 전체에 일정한 압력을 유지하였다. 배양은 회분배양과 같이 200 RPM 교반, 35℃ 온도로 유지하였고 pH 자동조절기와 5N NaOH와 2.5 N H_2SO_4를 이용하여 배양액의 pH를 조정하였다. 배양을 계속하면서 1주일 간격으로 배양액을 채취하여 현미경으로 관찰하고, CAB agar 배지에 접종하여 호기성과 혐기성 상태에서 배양함으로서 오염이 되지 않았는지 정기적으로 관찰하였다.

분 석 방 법

균체농도: Spectrophotometer (JASCO SSE-343, Tokyo, Japan)를 이용하여 660nm 에서 측정하였다. 발효산물: 배양액 1mL을 취하여 10M phosphoric acid 100μL로 산성화 한 후 원심분리하여 상등액 1μL를 gas chromatography에 주사하였다. 아세트산, 부티르산, 부탄올은 Chromosorb W AW (GP, 10 of SP 1200, 1% of H_3PO_4 on 8

0/100 mesh, Supelco, Bellefonte, PA) glass column을 120℃에서 이용 하였다. 이때 injector 와 detector의 온도는 210℃였다. 에탄올과 아세톤은 Porapak Q (10/100 mesh, 2 m x 2mm, Supelco, Inc.) glass column을 180℃에서 이용하였다. Injector 와 detector의 온도는 210℃였다. 양쪽의 경우 모두 detector는 flame inoization detector, carrier gas는 N_2 (30mL/min) 이었고, gas chromatograph는 Varian 3300(Varian Associates, Inc. Sunnyvale, CA), integrator는 Varian 4290이었다. 전리되지 않은 부티르산의 농도: 배양액의 pH와 부티르산의 pKa, 4.82를 이용하여, pH = pKa + log ([Bu]/[HBu]) 의 식에서 계산하였다.

결 과

pH에 따른 *C. acetobutylicum* KCTC 1037의 생육

C. acetobutylicum 생육에 있어 pH의 영향을 조사하기 위하여 *C. acetobutylicum* KCTC 1037을 배양액의 pH를 일정하게 유지하면서 생육속도를 관찰하였다. 그 결과 pH 4.5로 유지한 조건에서 가장 잘 자랐으며 그 다음은 5.5, 6.5의 순서였다(Fig. 2). 최대 비증식속도 (μmax)는 0.658, 0.495, 0.433 이었다. 이러한 결과는 *C. acetobutylicum* KCTC 1037이 중성보다는 산성에서 더 잘자라는 것을 나타낸다.

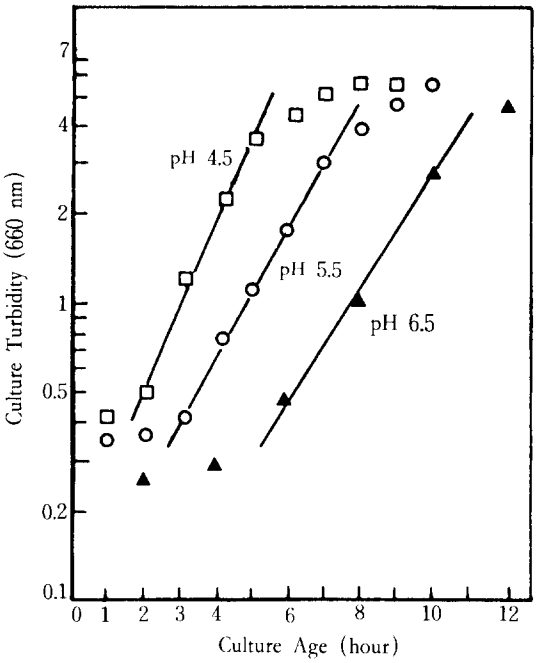

Fig. 2. Growth of *C. acetobutylicum* KCTC 1037 at different pH. The pHs of culture were controlled by automatic addition of 5N NaOH and 2.5N H_2SO_4. The working volume was 375 mL in 750mL in vessel. An 18 hr old inoculum(5%) was used.

회분배양에서 pH에 따른 *C. acetobutylicum* KCTC 1037의 발효

pH에 따른 *C. acetobutylicum*의 발효 양상을 관찰하기 위하여 발효조 내 pH를 4.5와 5.5로 유지하여 발효 산물을 비교하였다(Fig. 3). pH 5.5로 유지한 발효에서는 아세트산과 부티르산 등의 유기산 만이 생성되었고(산생성기의 유지), 반면 pH 4.5로 유지한 조건에서는 접종후 10시간 까지는 유기산 만이 생성되었으나, 그 이후는 아세톤, 부탄올, 에탄올 등의 용매가 생성되고(용매생성기 유도), 그 량이 계속 증가되었다.

*C. acetobutylicum*의 용매 생성 조건으로 배양액 중에 전리되지 않은 분자상의 부티르산이 일정 농도 이상에 도달 해야 한다는 연구도 있다(3,8).

이 실험에서 pH를 5.5로 유지한 발효 과정의 말기(28시간)에 전리되지 않은 부티르산은 17.8mM이었으며 pH 4.5로 유지한 발효에서 용매 생성이 시작된 시점(16시간)의 전리되지 않은 부티르산의 농도는 20.3mM 이었다. 즉 *C. acetobutylicum* KCTC 1037은 pH 4.5의 전리되지 않은 부티르산이 약 20mM인 환경에서 용매 발효가 유도됨을 보여 주었다.

인산 제한 조건에서 *C. acetobutylicum* 발효

C. acetobutylicum 생육에 있어서 인산제한의 영향을 조사하기 위하여 CAB 배지에 인산의 량을 KH_2PO_4와 K_2HPO_4로 0.01-1.4 g/L의 범위로 첨가하여 생육과 발효 산물을 관찰하였다.

그 결과 *C. acetobutylicum* KCTC 1037의 용매 발효는 인산 제한 조건에서 용매의 부탄올 생성량이 현저히 증가하였다(Fig. 4). 그러나 인산제한으로 균의 최대 생육속도는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 첨가하는 인산의 양이 0.01 g/L이상이면 yeast extract, tryptone에 함유된 인산과 함께 초기 생육 속도에 제한을 받지 않으나, 첨가하는 인산양이 0.1 g/L 이하이면 용매생성에는 영향을 주는 것을 나타낸다.

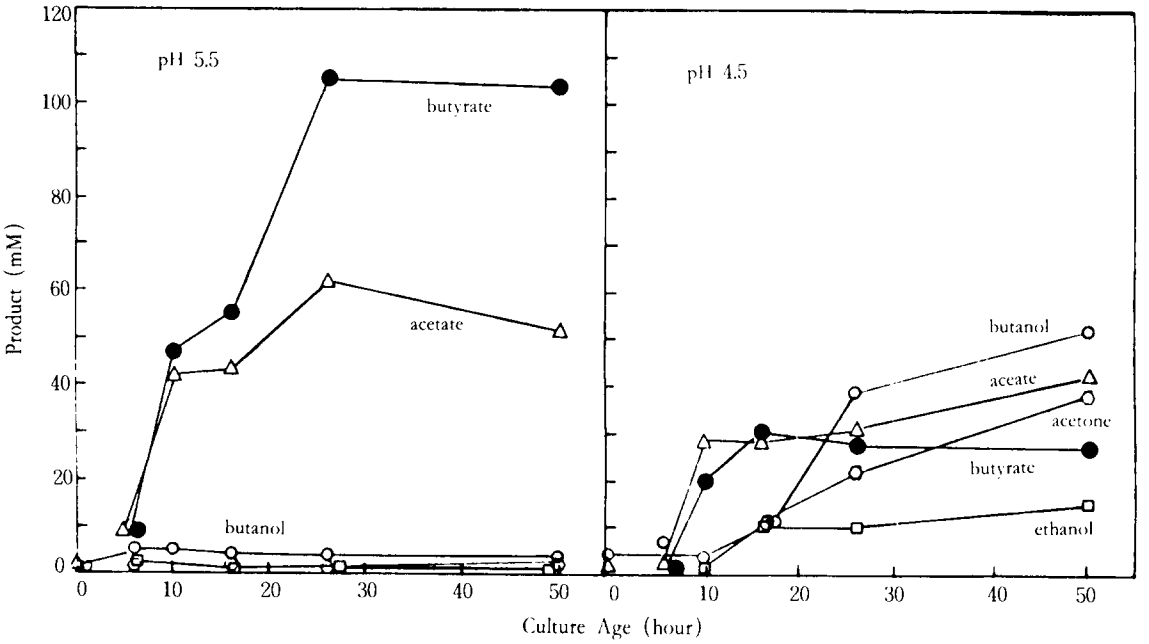

Fig. 3. Time course of *C. acetobutylicum* KCTC 1037 at constant pH 4.5 and pH 5.5 in batch fermentation. The experiments were performed in 750 mL fermentors that contained 400mL of CAB medium with 45 g glucose. pH was regulated by automatic pH controller.

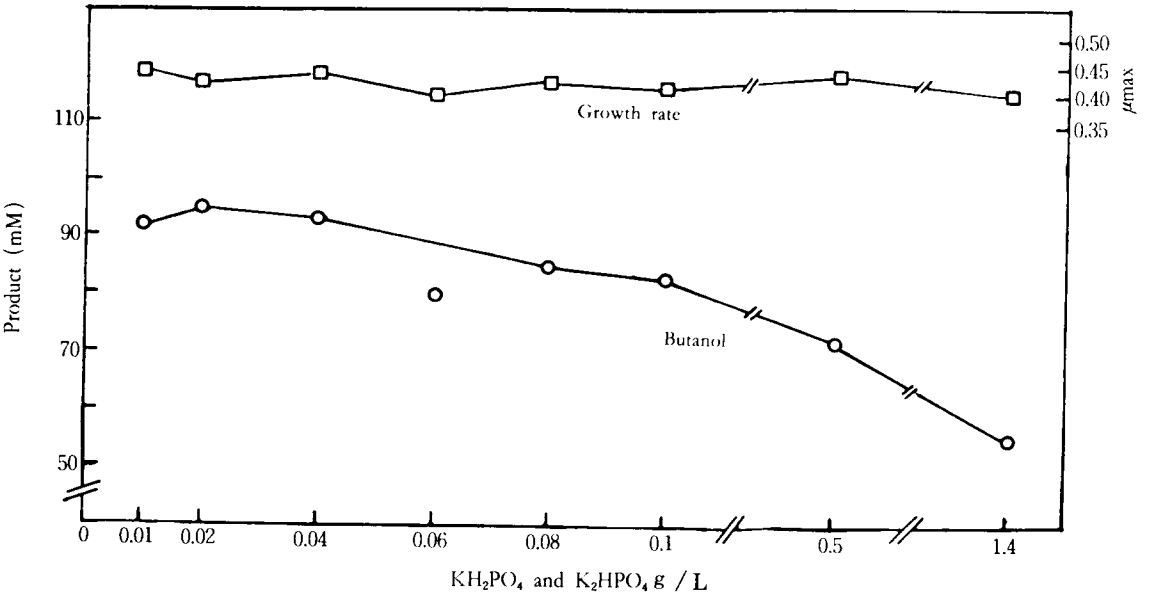

Fig. 4. Changes in specific growth rate and butanol formation of *C. acetobutylicum* KCTC 1037 under phosphate limitation. Modified CAB media with 45 g / L glucose containing 0.01-1.4 g / L of K_2HPO_4 and KH_2PO_4 were used in the experiment. Inoculum size: 5%, pH: 5.4, cultare time 72hr.

인산제한 two-stage 연속배양에서 *C. acetobutylicum* 의 발효

앞의 실험 들에서 *C. acetobutylicum*의 용매 생성은 pH 4.5의 산성조건이나 또는 배지에 인산을 제한할 경우 유도되거나 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 3, 4). 그러므로 pH 4.5의 인산제한 조건에서 연속 배양을 실시하여 회분 배양과 관련될 수 있는 요인을 제거한 상태에서 용매 생성을 관찰하였다. 실험 방법은 *C. acetobutylicum* 발효에 있어 이제까지 비교적 성공적인 연속 배양방법으로 제안된 two-stage chemostat(5,6)로 하였다.

C. acetobutylicum 1037을 two-stage chemostat로 400시간 연속배양 한 결과, stage 1(pH 5.5, 희석률: 0.2 h^{-1}) 에서는 부티르산과 아세트산이 약 100mM 이상 생성되었다. 이때 전리되지 않은 부티르산의 농도는 8.5mM 이었으며 배양이 계속될수록 총 유기산의 농도는 증가하였다(Fig. 5). Stage 2(pH4.5, 희석율: 0.067h^{-1})에서는 발효초기(120시간까지)에 부탄올과 아세톤 등이 약 100mM 생성되었으나 발효시간이 경과함에 따라(150시간 이후) 그량은 점점 감소되고 대신 아세트산과 부티르산이 점점 증가 되었다(Fig. 5). Stage 2에서 200시간 이후에 불규칙하게 용매가 생성되는 것이 관찰 되었으나 그량은 초기에 비해 현저히 적었다.

다음은 *C. acetobutylicum* KCTC 1037의 무포자 변이주로서 용매 생성능이 향상된 균주인 *C. acetobutylicum*

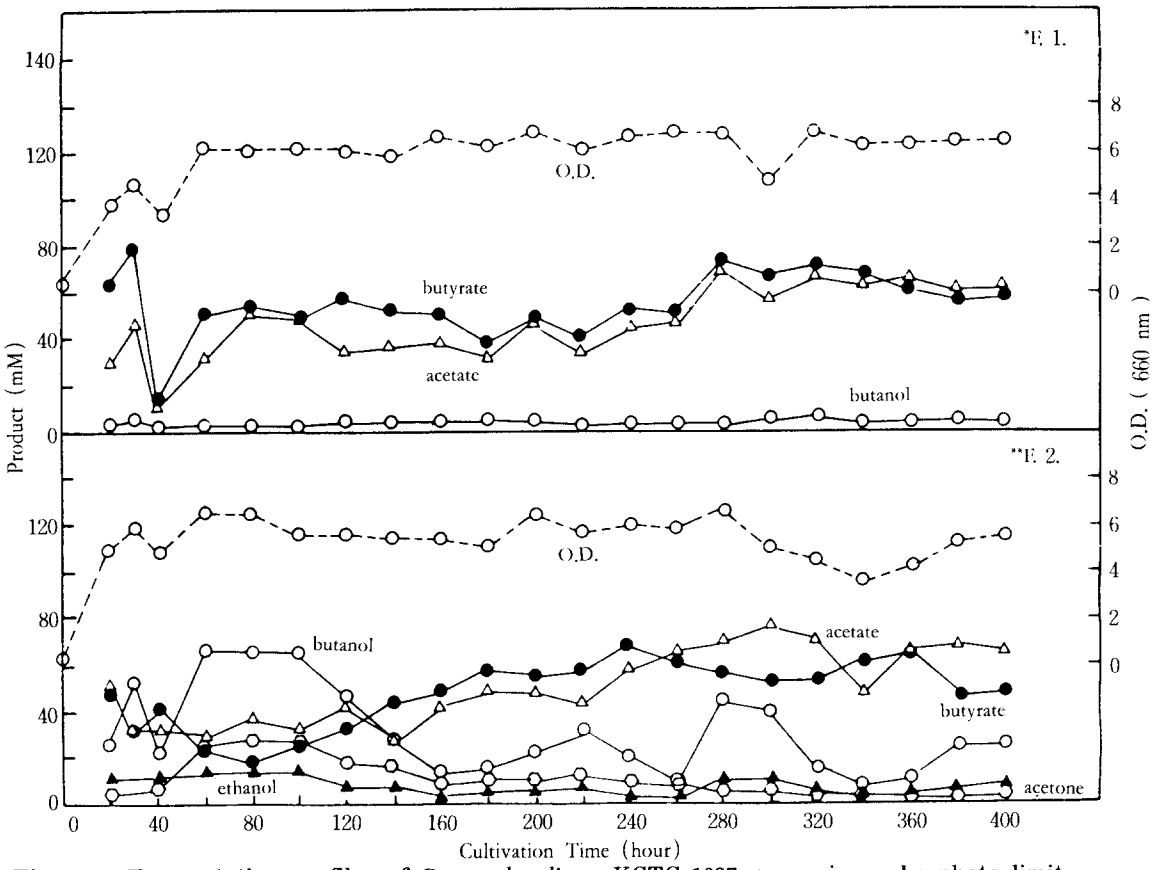

Fig. 5. Fermentation profiles of *C. acetobutylicum* KCTC 1037 grown in a phosphate limited-two-stage chemostat. The initial glucose concentration 45 g / L. The first stage (F. 1.)* was controlled at pH5.5 and dilution rate at 0.2h^{-1}, while the second stage (F. 2.)** was maintained at pH 4.5 and dilution rate at 0.067 h^{-1}. The culture was started-up in a batchtype, and the continuous substrate feeding was started when the cells were at the end of growth phase indicated by arrow.

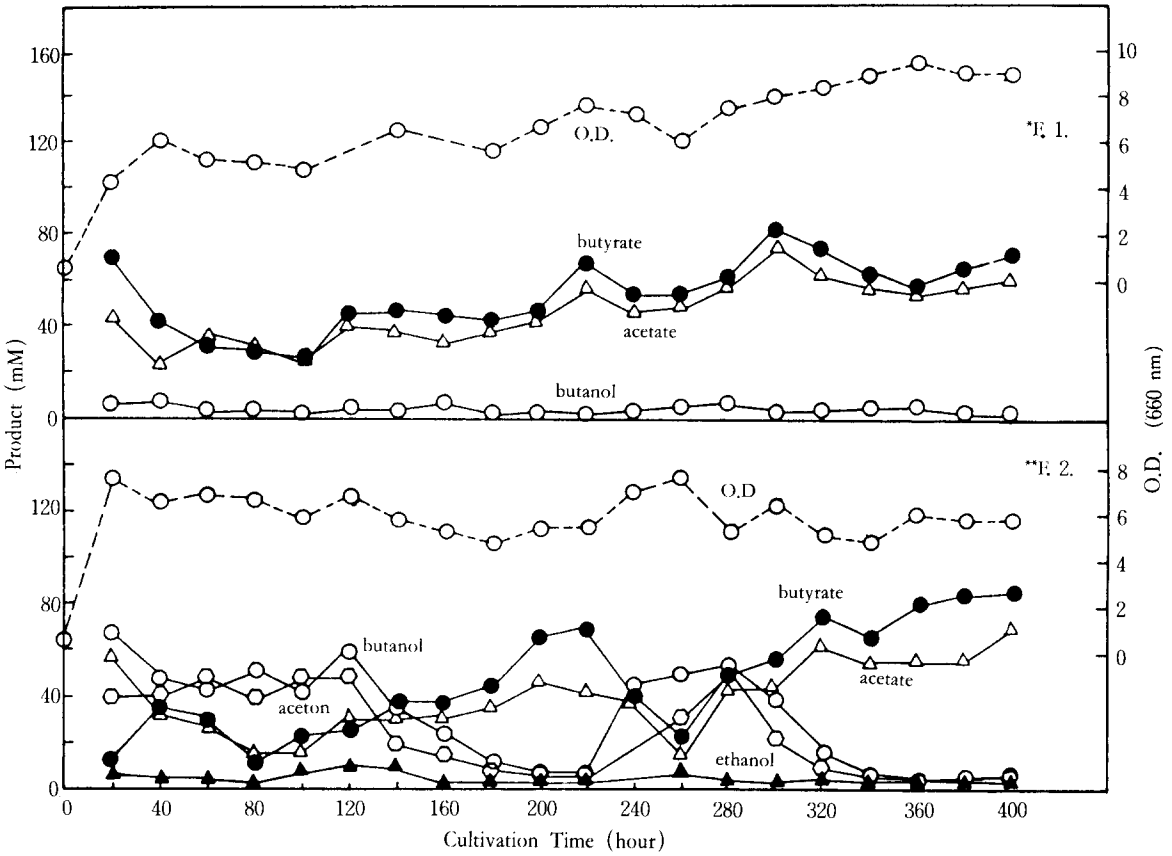

Fig. 6. Fermentation profiles of C. *acetobutylicum* KCTC 1724 growth in a phosphate limited-two-stage chemostat. The initial glucose concentration 45 g / L. The first stage (F.1)* was controlled at pH 5.5 and dilution rate at 0.2 h^{-1}, while the second stage (F.2)** was maintained at pH 4.5 and dilution rate at 0.067 h^{-1}. The culture was started-up in a batch type, and the continuous substrate feeding was started when the cells were at the end of growth phase indicated by arrow.

KCTC 1724를 같은 조건으로 연속배양하였다(Fig. 6). 그 결과, stage 1은 유기산 만이 축적되고 그량은 발효 후반에 더 증가되었다. Stage 2는 발효초기 부탄올, 아세톤 등이 각각 약 50mM 생성되었으나 시간이 지남에 따라 생성된 용매는 감소되고 유기산이 축적 되었으며 그 이후에 불규칙적으로 용매가 생성되었다가 감소되었다. 이 균주는 *C. acetobutylicum* 1037에 비해 용매의 생성량은 더 많았지만 발효 전 과정을 거쳐 균체의 농도 등 배양 상태는 *C. acetobutylicum* KCTC 1037 보다 더욱 불규칙 했다.

Fig. 7은 *C. acetobutylicum* 1037을 배양 조건을 달리하여 stage 1은 pH 6.5, 희석율: 0.15h^{-1}로, stage 2는 pH 5.0, 희석율: 0.05h^{-1} 배양한 결과이다. stage 1은 산생성기로서 부티르산이 약 80mM 이상, 아세트산이 약 50mM 이상 생성되었으며 발효 200시간 이후에는 유기산이 총 150mM 이상 생성 되었다. Stage 2에서는 약 30-40 mM의 부탄올, 아세톤 등의 용매가 생성 되었지만 부티르산과 아세트산이 약 180mM 생성되는 산생성이 우세한 발효였다. 이러한 결과들은 *C. acetobutylicum*의 연속배양에 있어서 산 생성 발효는 양적인 변화는 있더라도 pH 5.5 이상의 조건에서 장기적으로 유지되지만, 용매생성 발효는 pH 4.5의 인산 제한 조건일지라도 일시적이며 산생성기로 전환되는 등 불규칙함을 보여주었다.

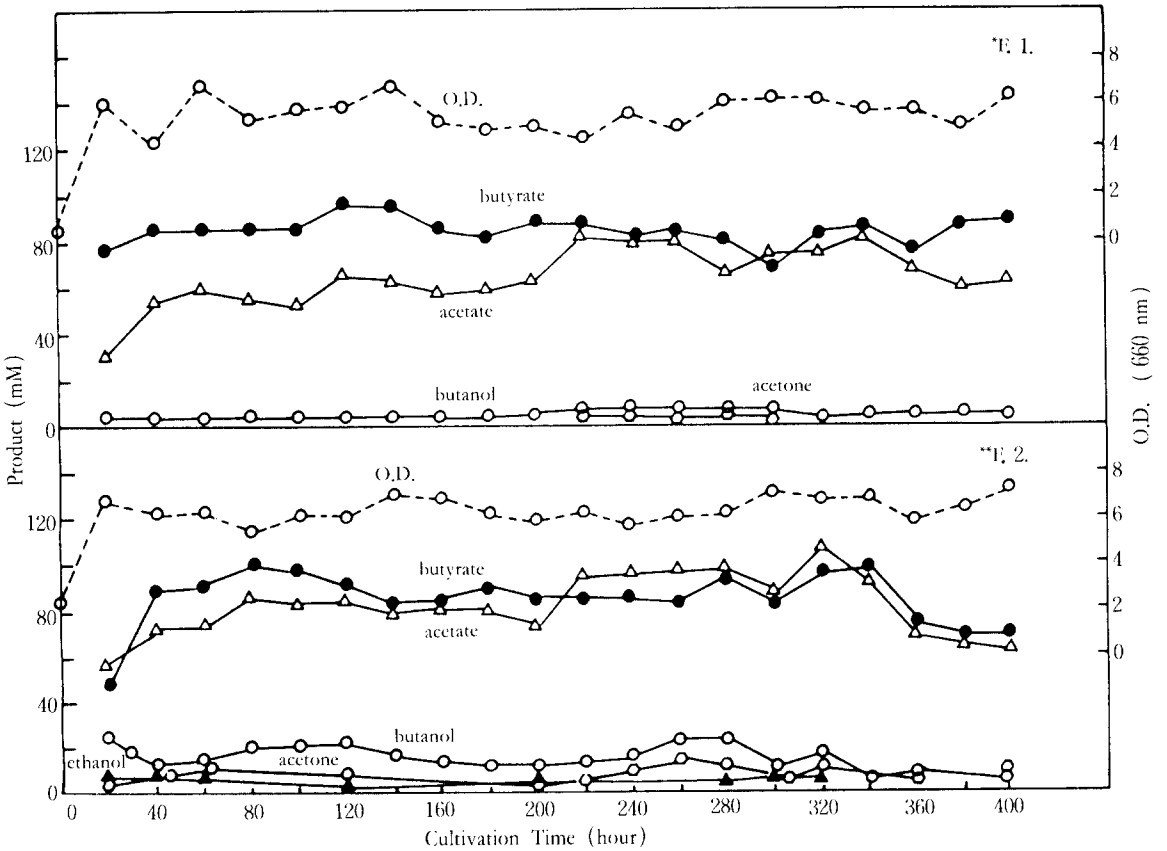

Fig. 7 Fermentation profiles of *C. acetobutylicum* KCTC 1037 growth in a phosphate limited-two-stage chemostat. The initial glucose concentration 45 g / L. The first stage(F. 1)* was controlled at pH 6.5 and dilution rate at 0.15 h^{-1}, while the second stage(F. 2)** was maintained at pH 5.0 and dilution rate at 0.05 h^{-1}. The culture was started-up in a batchtype, and the continuous substrate feeding was started when the cells were at the end of growth phase indicated by arrow.

고 찰

Clostridium acetobutylicum 발효의 용매 생성 조건은 낮은 pH와 관련되어 있는 것으로 알려져 왔으며 이에 따른 유기산의 축적, 전리되지않은 부티르산의 농도, 세포내부 pH 등이 제안되었다(3,8). 그러나 *C. beijerinckii* 의 경우 pH 6.8에서 부탄올이 생성되었으며(18), Holt등 (4)은 *C. acetobutylicum*에서도 각 100mM의 아세트산과 부티르산이 있는 pH 7의 환경에서 용매 생성이 되는 것을 보고하였다. 즉 용매 발효에서 산성 조건이 절대적인 것은 아니라는 견해가 제안되었다.

*C. acetobutylicum*의 연속 발효에 있어 용매 발효의 요건으로 낮은 pH, 낮은 희석율, 충분한 기질, 적당한 정도의 부티르산 및 아세트산, 적절한 제한 영양소(예: 인산) 등이 필요한 것으로 제안되고 있으나 이러한 조건들이 어떻게 용매 생성과 관련되는지는 밝혀지지 않았다.

이 실험에서 pH에 따른 *C. acetobutylicum*의 생육과 발효산물의 생성을 관찰한 결과 *C. acetobutylicum*은 중성(pH 6.5) 보다 산성(pH 4.5)에서 더 잘 자라는 호산성 특징을 보여 주었으며(Fig. 2), pH 4.5에서만 용매발효가 유도되었다 (Fig. 3). *C. acetobutylicum*이 용매를 생산하는 조건에 대해서 Monot (3)는 배지 내 전리되지 않은 부티르산이 일정농도 (16 mM) 이상에 이르러야 한다고 주장하였다.

이 실험에서 pH 4.5에서 용매 발효가 시작되는 시점이

라고 할 수 있는 발효시간 16시간에 전리되지 않은 부티르산의 농도는 약 20mM 이었다. 한편 pH 5.5에서 같은 시간에 전리되지않은 부티르산의 농도는 10mM으로 용매 발효로 전환되지 않았다. 이처럼 16시간 까지의 결과는 Monot의 주장처럼 전리되지 않은 부티르산의 농도가 높은 pH 4.5에서만 용매 발효가 관찰되었다. 그러나 발효가 진행되어 발효 생성물이 최고에 이르는 28시간을 비교하여 보면, pH 4.5에서는 계속 용매 발효가 진행되는데 비하여, pH 5.5에서는 부티르산이 105mM로 증가되어 전리되지않은 부티르산도 상당히 높은 17.8mM의 농도에 이르렀으나 용매의 생산은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 전리되지않은 부티르산의 농도가 언제나 용매 발효를 유도하는 것이 아님을 보여준다.

중성 조건에서 용매 발효를 보고한 Holt(4)의 실험에서 기질로 포도당 2%, 아세트산과 부티르산이 각각 100mM 그리고 pH 7인 환경에서 아세톤 33mM 과 부탄올이 51mM 생성되는 것이 관찰되었다. 그러나 같은 조건이라도 아세트산과 부티르산을 첨가하지 않은 경우 용매들은 거의 생성되지 않았다.

그러므로 *C. acetobutylicum*의 발효에서 용매 생산이 일어나기 위해서는 배지의 pH나 전리되지않은 부티르산의 농도만으로 불충분하며 균의 적당한 대사과정과 유기산이 조달되야하는 과정에 pH의 역할이 관련되어 있는 것으로 생각된다.

이 실험에서 인산 제한에 의한 생육 속도와 발효산물의 생성을 관찰한 결과 균의 생육 속도는 인산 제한에 의하여 거의 영향을 받지 않았으나, 용매(부탄올) 생성량은 인산을 제한한 경우, 그량이 증가됨이 관찰되었다(Fig. 4). *C. acetobutylicum*의 용매 발효는 2차 대사작용이므로 대사속도를 감소 시키는 요인과 더불어 시작되지만 용매 대사에 원인이 되는 대사 속도의 감소와 균의 증식 속도에 영향을 주는 제한인자와는 개별적인 조건으로 생각된다. 더구나 *C. acetobutylicum*은 산생성기와 용매생성기로 구분되는 branched pathway로 생육하기 때문에 균의 생육과 대사에 영향을 주는 조건은 더욱 복잡할 것이다.

이 실험에서 얻어진 인산 제한 two-stage chemostat 결과(Fig. 5, 6), 발효 중 세포농도나 발효산물은 그 양의 변동이 관찰 되었지만 stage 1에서는 산생성기가 비교적 일정하게 유지되었다. 반면 stage 2의 용매발효는 초기 용매의 생성 이후 산생성이 유도되거나 다시 용매 생성이 되더라도 처음보다 적은량이 불규칙하게 생성되는 형태이었다. 또 Fig. 7에서 stage 2의 pH 5.0인 조건에서 생성된 전리되지 않은 부티르산이 36mM에 이르지만 생성된 용매의 양은 pH 4.5에 비해 현저히 적었다.

이러한 용매생성기의 불규칙한 발효 상태가 어떤 원인에 의한 것인지 이 실험에서는 정확히 알 수 없다. 그러나 *C. acetobutylicum* 발효에 용매 발효로의 전환과 지속적인 용매 생성을 유지하기 위해서 산성의 pH나 인산제한 이외에 branched pathway에 따르는 복합적인 대사작용이 필요하다면, 이 작용은 *C. acetobutylicum*의 용매 발효에 최대로 유리한 bioenergetic condition을 유지하려는 경향을 가질 것이다.

또 *C. acetobutylicum* 발효에서 산생성기는 용매생성기보다 ATP 생성량이 많아 에너지 면으로 유리하기 때문에(2), 연속 배양이 진행되면서 용매 발효에 적합하지 않은 어떤 상태에 이르게 된다면 균의 생육은 에너지 유지면으로 더욱 유리한 산생성기로 전환되리라 추측된다.

한편 인산의 제한과 관련되지 않은 용매 발효 유도에 대한 연구로 Kim등 (5)은 hydrogenase activity를 저해하는 CO gas를 사용하여 용매생성이 증가됨을 보고 하였으며, Rao와 Mutharasam(19)은 benzyl violen을 첨가하였을 때 연속 배양에서 부탄올 생성이 유도됨을 보고 하였다. 이러한 연구들은 전자의 흐름을 변경하여 용매 생성을 증가 시키는 관점이다. 또한 Monot 등은 ATPase 저해제를 첨가하여 용매 생성이 증가됨을 보고 하였다(20). 이러한 논의는 *C. acetobutylicum*의 발효에 인산 제한 자체가 용매생성의 인자가 아니라, pH처럼 부수적인 요인일 가능성이 크다는 것을 나타내며, 용매 생성 조건에 bioenergetic condition이 중요한 요인임을 나타낸다.

*C. acetobutylicum*의 연속배양에서 용매 발효가 감퇴되는 것을 막기 위하여 cell recycle system(21), immobilization system(22) 등이 개발되어 그 효력이 보고되었지만 그에 따른 기작은 아직 보고되지 않았다. 그러므로 *C. acetobutylicum*의 용매 발효로의 전환과 유지를 이해하기 위해서는 bioenergetic 부분이 포함된 세포생리적 연구가 수반되야 할 것이다.

요 약

Clostridium acetobutylicum KCTC 1037의 용매 생성 조건을 알기 위하여 pH 변화와 인산 제한의 조건 하에서 회분 배양과 연속 배양을 실시하였다. *C. acetobutylicum* KCTC 1037은 pH 5.5나 6.5에서 보다 pH 4.5에서 잘 자라는 호산성이었으며, pH 4.5의 전리되지 않은 부티르산이 약 20mM인 조건에서 용매 발효로 전환되었으나, pH 5.5의 전리되지 않은 부티르산이 17mM인 조건

에서는 용매 발효가 일어나지 않았다. 인산 제한 조건에서 배지에 인산이 KH_2PO_4나 K_2HPO_4로 0.1 g / L 이하인 경우 용매 생성량이 증가 하였으나, 생육 속도에는 영향을 미치지 않았다. 인산 제한 이단 연속 배양에서 pH 5.5인 stage 1에서는 산생성기가 유지 되었고 한편 pH 4.5인 stage 2에서는 초기에는 용매가 생성 되었으나 150시간 이후에는 용매의 양이 감소되었으며 산생성기로 전환되는 등 불규칙한 발효 양상을 보였다. 또 pH 5.0, 희석율 $0.05h^{-1}$인 stage 2에서 전리되지 않은 유기산이 36mM인 조건에서도 용매 발효가 일어나지 않았다. 이러한 결과로서 *C. acetobutylicum*의 용매 생성 조건은 산성 pH나 인산 제한 조건 외에 균의 최대 에너지 생성을 유지하려는 대사와 관련되었을 것으로 추측하였다.

참 고 문 헌

1. G. Gottschalk(1985), *Bacterial Metabolism*. 2th ed. p4. Springer-Verlag, New-York, Berlin, Heidelberg, Tokyo.
2. 김병홍(1988), *미생물 생리학*, p.239. 아카데미서적, 서울.
3. F. Monot, and J. M. Engasser(1983), *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **13**, 207.
4. R. A. Holt, G. M. Stephens, and J. G. Morris(1984) *Appl. Environ.* Microbiol. **48**, 1166.
5. B. H. Kim, P. Bellows, R. Datta, and J. G. Zeikus, (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 764.
6. H. Bahl, and G. Gottschalk, (1984) *Biotechnol. Bioeng. Symp. 14*, 215
7. J. W. Roos, J. K. Mclaughlin, and E. T. Papoutsakis, (1985) *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 681.
8. J. S. Terracciano, and E. R. Kashket, (1986) *Appl. Environ. Microbiol.* **52,** 86.
9. R. Davies, and M. Stephenson, (1941) *Biochem. J.* **35**, 1320.
10. W. Andersch, H. Bahl, and G. Gottschalk, (1982) *Biotechnol. Lett.* 4, 29.
11. J. C. Gottschal, and J. G. Morris, (1981) *Biotechnol. Lett.***3**, 525.
12. F. Monot, and J. M. Engasser, (1983) *Appl. Microbiol. Biotechnol,* **18**, 246.
13. H. Bahl, M. Gottwald, A. Kuhn, V. Rale, W. Andersch, and G. Gottschalk, (1986) *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 169.
14. M. Gottwald, and G. Gottschalk, (1985) *Arch. Microbiol.***143**, 42.
15. C. J. Lemme, and J. R. Frankiewicz, (1983) *Eur. Patent.* 0111638.
16. M. T. Walton, and J. L. Martin, (1979) *Microbial Technology*. 2nd. ed. (Pelper, H. J. and Perlman, D. eds.) Vol **1**. p. 187. Academic press. New York.
17. T. M. Moenca, and J. G. Zeikus, (1983) *J. Microbial. Method.***1**, 199.
18. H. A. George, and J. S. Chen, (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 321.
19. G. Rao, and R. Mutharasan, (1988) *Biotechnol. Lett.* **10**, 313.
20. F. Monot, J. M. Engasser, and H. Petitdemange, (1984) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 422.
21. A. S. Afschar, H. Biebl, K. Schaller, and K. Schugerl, (1985) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 394.
22. C. Forberg, S. O. Enfors, and L. Haggstrom,(1983) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 143.

(Received December 18, 1989)