

*Clostridium ljundahlii*를 이용한 합성가스 발효에서 배지 내 tryptone 및 tungsten의 영향

박소은 · 김영기*,†

환경대학교 화학기술연구소, *환경대학교 화학공학전공
(2023년 3월 6일 접수, 2023년 3월 23일 수정, 2023년 3월 23일 채택)

Effect of Tryptone and Tungsten in Medium on Syngas Fermentation Using *Clostridium ljundahlii*

Soeun Park and Young-Kee Kim*,†

Research Center of Chemical Technology, Hankyong National University, Anseong, Gyeonggi-do 17579, Korea

*Department of Chemical Engineering, Hankyong National University, Anseong, Gyeonggi-do 17579, Korea

(Received March 6, 2023; Revised March 23, 2023; Accepted March 23, 2023)

초 록

본 연구에서는 *Clostridium ljundahlii* 배양에서 유기질소공급물인 tryptone과 sodium tungstate의 배양액 내 농도가 균주 성장과 아세트산, 에탄올 생산에 대한 영향을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 대조군 실험의 배지 조건(0 g/L tryptone)보다 tryptone 2.5 g/L를 투입한 경우 균주 성장이 144.6% 증가하였고, 에탄올 및 아세트산 생산은 각각 8.6%와 36.7% 향상되었다. 대조군 실험에 사용된 배지의 조건(0.01 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)보다 100배인 1 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 사용한 실험군에서, 균주 성장과 C2 대사산물의 총생산량에는 큰 차이가 없지만, 에탄올 생산 증가하고 아세트산 생산은 감소하여 에탄올/아세트산 생산비가 0.56로 대조군의 0.24에서 크게 증가하였다.

Abstract

In this study, an experiment was conducted to investigate the effect of the concentrations of tryptone, an organic nitrogen supplement, and sodium tungstate on the growth of microbial and the production of acetic acid and ethanol in the culture of *Clostridium ljundahlii*. Microbial growth increased by 144.6%, and ethanol and acetic acid production improved by 8.6% and 36.7%, respectively, when 2.5 g/L of tryptone was added to the medium of the control experiment (0 g/L tryptone). In the experiment with 1 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, which is 100 times higher than the condition of the medium used in the control experiment (0.01 μM $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), there was no significant difference in microbial growth or total production of C2 metabolites, but ethanol production increased and acetic acid production decreased. As a result, the ethanol/acetic acid production ratio increased significantly from 0.24 in the control experiment to 0.56.

Keywords: *Clostridium ljundahlii*, Syngas fermentation, Bioethanol, Tryptone, Sodium tungsten

1. 서 론

아세트젠 균주는 Wood-Ljungdahl 대사경로(acetyl-CoA 대사경로)를 통해서 CO_2 를 아세트산으로 환원하는 능력을 가지고 있다. *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljundahlii*, *Clostridium carboxidivorans* P7 과 같은 아세트젠 균주는 CO , CO_2 , H_2 를 포함하는 합성가스를 발효하여 에탄올 및 아세트산을 생산할 수 있음이 많은 선행연구에 의해 밝혀져 있다[1-4]. 하지만, 생산성이 낮다는 것이

합성가스 발효공정의 상용화에 걸림돌이 되고 있고[5], 낮은 생산성의 원인을 기체기질의 느린 물질전달 속도에 있다고 보고, 기체-액체 물질 전달을 향상시키기 위하여 반응기나 기체분산기, 교반기의 설계 변경, 나노입자를 이용하는 등 많은 연구가 이루어져 왔다[6-9]. 합성가스 발효공정의 생산성 향상을 위한 다른 접근방법으로 배지 내 영양성분의 추가나 농도 변화로 아세트젠 균주 대사경로의 주요 효소 활성을 향상시켜 세균 성장이나 대사산물 생산성을 증가시키기 위한 연구가 이루어져 왔다[10-14].

본 연구진은 배지 성분이 아세트젠 발효에서 균주 성장과 아세트산, 에탄올 생산에 미치는 영향에 대한 선행 연구를 *C. autoethanogenum*을 이용하여 수행하였다. 이 연구의 결과로 *C. autoethanogenum* 성장에 영향을 미치는 영양성분으로 질소공급원인 tryptone의 배지 내 추가 공급과 에탄올 생산성 향상에 영향을 미치는 주요 인자로 텅스텐

† Corresponding Author: Hankyong National University,
Department of Chemical Engineering, Anseong, Gyeonggi-do 17579, Korea
Tel: +82-31-670-5206 e-mail: kim@hknu.ac.kr

의 배지 내 농도 증가를 확인하였다[15-16]. 본 연구에서는 *C. autoethanogenum*을 모델로 개발된 대사조절에 의한 발효공정 효율 향상 기법이 다른 아세트젠 종의 세균에도 동일하게 적용되는 지에 대한 연구를 수행하였다. *C. ljundahlII*를 실험 균주로 하여 배지 내에 tryptone을 추가로 공급하거나 텅스텐의 농도를 변화시켜 아세트젠 균주 성장과 에탄올, 아세트산 등 대사산물 생산에 미치는 영향을 고찰하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 균주 및 배양배지

합성가스 발효를 위한 아세트젠 균주는 *C. ljundahlII* PETC (55383)를 ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입하여 사용하였다. 균주 배양을 위한 영양배지의 성분과 조성은 Table 1과 같다. 배양실험에서 탄소원은 영양배지 내 유기탄소원으로 공급하지 않았으며, CO와 CO₂를 포함하는 합성가스를 통해서만 공급되었다. 합성가스는 20 vol% CO, 20 vol% CO₂, 10 vol% H₂, 50 vol% N₂의 조성을 가지는 가스혼합물을 MS동민특수가스(Pyeongtaek, Gyeonggi-Do, Korea)에서 주문 제조하여 사용하였다.

2.2. 배양실험

150 mL serum bottle에 배지 22.5 mL를 채운 후 계대배양된 지수성장기의 미생물 배양액을 2.5 mL 접종하여 총 배양액 부피를 25 mL가 되게 하였다. *C. ljundahlII* 균주가 접종된 배양액은 배양온도 37 °C와 교반속도 200 rpm으로 운전되는 진탕배양기에서 14일간 배양하였다. 배양을 위해 사용된 배지에는 복합유기질소원으로 효모추출물이 0.5 g/L 포함되어 있으며 여기에 다른 질소원인 tryptone (8617-8805, Daejung Chemicals and Metals Co. Ltd, Siheung, Korea)을 0.5, 2.5, 5 g/L 농도로 추가한 배지를 이용한 배양실험을 수행하였다. 여기서 얻어진 균주 성장과 대사산물 생산의 결과는 tryptone을 사용하지 않고 효모추출물만 사용한 배지를 이용한 결과와 비교하였다. 텅스텐의 농도 변화가 균주 성장과 대사산물 생산에 미치는 영향을 고찰하기 위한 실험에서는 Na₂WO₄·2H₂O의 최종 배지 내 농도를 기존 선행 연구에서 사용하던 일반적인 농도인 0.01 μM과 100배인 1 μM을 사용한 배양에서 균주 성장과 아세트산 및 에탄올 생산량을 비교하였다.

2.3. 분석 방법

균주의 성장을 평가하기 위한 균주량은 optical density를 이용하여 표시하였으며, optical density는 UV-vis 분광광도계(V-650, Jasco Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 600 nm 파장에서 측정하였다. 생산된 에탄올과 아세트산의 배양액 내 농도는 기체크로마토그래프 (7890B, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 측정하였으며, 컬럼은 HP-5 capillary column (30 m × 0.32 mm × 0.25 m, Agilent Technologies Inc.), 검출기는 flame ionization detector를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Tryptone 사용에 의한 Clostridium ljundahlII 성장과 에탄올 생산 영향

Casein 가수분해 펩톤인 tryptone이 *C. ljundahlII*의 성장과 에탄올, 아세트산 생산에 미치는 영향을 살펴보기 위한 실험의 결과를 Figure 1과 Table 2에 나타냈다. 대조군 실험의 배양배지에는 tryptone이 포함

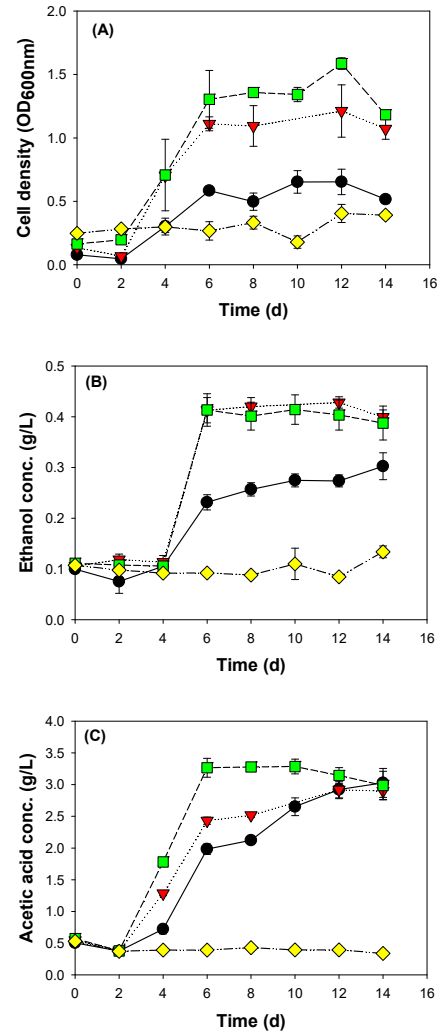


Figure 1. Time course profile of (A) cell density at 600 nm, (B) ethanol concentration, and (C) acetic acid concentration in *Clostridium ljundahlII* culture by adding tryptone in medium (Tryptone conc. ● solid line: 0 g/L, ▼ dotted line: 0.5 g/L, ■ short dash line: 2.5 g/L, ◆ dash-dot-dot line: 5 g/L).

Table 1. The Medium Composition of *Clostridium ljundahlII* Culture for Control Experiment

Composition of medium (per liter)
NH ₄ Cl 1.0 g, MgCl ₂ ·6H ₂ O 1.11 g, CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.1 g, KCl 0.33 g, NaCl 1.0 g, NaHCO ₃ 1.0 g, yeast extract 0.5 g, resazurin 2 mg, L-cysteine-HCl 0.5g, Na ₂ S·9 H ₂ O 0.5 g, 1 M phosphate buffer solution 10 mL, trace mineral solution 10 mL, vitamin solution 1 mL
Composition of trace mineral solution (per liter)
Nitrilotriacetic acid 1.5 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 3.0 g, MnSO ₄ ·H ₂ O 0.5 g, NaCl 1.0 g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.1 g, CoSO ₄ ·7H ₂ O 0.18 g, CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.1 g, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.18 g, CuSO ₄ ·5H ₂ O 10 mg, KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O 20 mg, H ₃ BO ₃ 10 mg, Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 10 mg, NiCl ₂ ·6H ₂ O 10 mg, Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O 0.2 mg, Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O 0.4 mg
Composition of vitamin solution (per liter)
Biotin 20 mg, folic acid 20 mg, pyridoxine-HCl 100 mg, thiamine-HCl 50 mg, riboflavin 50 mg, nicotinic acid 50 mg, D-Ca-pantothenate 50 mg, p-aminobenzoic acid 50 mg, vitamin B ₁₂ 10 mg, lipoic acid 50 mg

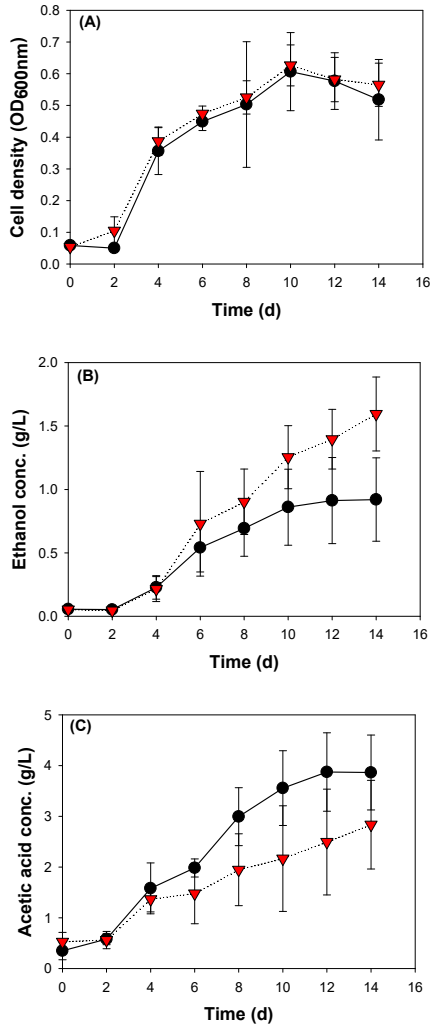


Figure 2. Time course profile of (A) cell density at 600 nm, (B) ethanol concentration, and (C) acetic acid concentration in *Clostridium ljundahlia* culture by changing tungsten concentration in medium ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ conc. ● solid line: 0.01 μM , ▼ dotted line: 1 μM).

Table 2. Effect of Tryptone and Tungsten on Cell Growth and Metabolite Production in *C. Ljundahlia* Culture

Component	Conc.	OD	Ethanol conc. (g/L)	Acetic acid conc. (g/L)	Total C2 products (g/L)	Ethanol/ acetic acid ratio
Tryptone	0 g/L	0.65	0.30	3.03	3.33	0.10
	0.5 g/L	1.21	0.43	2.92	3.35	0.15
	2.5 g/L	1.59	0.41	3.29	3.70	0.13
	5.0 g/L	0.40	0.13	0.43	0.56	0.30
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01 μM	0.61	0.92	3.87	4.79	0.24
	1.0 μM	0.63	1.60	2.84	4.44	0.56

되지 않았으며, 실험군에서는 tryptone 농도를 0.5, 2.5, 5 g/L로 달리 하여 실험을 수행하였다. Tryptone 농도 0, 0.5, 2.5, 5 g/L를 사용한 배양실험에서 14일의 배양기간에 보인 최대 optical density는 각각 0.65, 1.21, 1.59, 0.40이며, 에탄올 최대 농도는 각각 0.30, 0.43, 0.41,

0.13 g/L이고, 아세트산 최대 농도는 각각 3.03, 2.92, 3.29, 0.43 g/L로 관찰되었다. 균주 성장과 아세트산 생산을 최대화할 수 있는 배양조건은 2.5 g/L tryptone을 추가한 실험군이었다. 에탄올 생산 경향은 균주 성장과 아세트산 생산과는 달라, 0.5 g/L tryptone을 사용한 실험군에서 최대 에탄올 생산농도(0.43 g/L)를 얻었다. 하지만, 2.5 g/L tryptone을 사용한 실험군에서 에탄올 생산농도도 0.41 g/L로 최대값과 유의미한 차이를 보이지는 않았다. Tryptone 5 g/L를 투입한 경우에는 균주의 성장과 대사산물의 생산에 대한 저해가 일어나는 것을 확인하였다. 2.5 g/L의 tryptone을 투입한 경우를 대조군과 비교해보면 균주량은 144.6% 증가하였으며, 아세트산과 에탄올의 생산 증가는 각각 8.6%와 36.7%로 나타나 성장 촉진에 크게 효과가 있는 것으로 관찰되었다. 이는 유기질소원이 대사산물 과정에서 핵심 단백질 합성을 위한 필수요소이고, 유기 질소의 보충은 탄소 흡수량을 증가시켜서 추가적인 환원력을 제공하므로 아세토젠 박테리아 성장을 향상시키고 대사산물 생산도 증가시키기 때문으로 판단된다. 이 결과는 연구진의 선행연구인 *C. autoethanogenum* 배양에서 관찰한 결과와 유사한 경향이다[15].

3.2. $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 농도에 의한 *Clostridium ljundahlia* 성장과 에탄올 생산 영향

배지를 통해 공급되는 미량금속성분인 tungsten의 농도 변화가 *C. ljundahlia* 배양에서 균주 성장과 에탄올, 아세트산 생산에 미치는 영향을 분석한 결과를 Figure 2과 Table 2에 나타냈다. 대조군에 사용된 배지에 포함되어 있는 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 농도는 0.01 μM 이며, 대조군 배지 농도의 100배에 해당하는 1 μM 의 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 포함하는 배지에서 배양한 실험군의 결과를 관찰하였다. 배지 내에 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 0.01과 1 μM 사용한 경우, 최대 optical density는 각각 0.61, 0.63이고, 에탄올 최대 농도는 각각 0.92, 1.60 g/L이며, 아세트산 최대 농도는 각각 3.87, 2.84 g/L이다. 배지 내 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 농도 변화에 따른 균주 성장은 큰 차이가 없었으며, 에탄올과 아세트산을 합친 C2대사산물의 총생산농도도 4.79와 4.44 g/L로 크게 달라지지는 않았다. 하지만, 과량의 텅스텐을 사용한 실험군에서 에탄올/아세트산 생산비는 0.56 g ethanol/g acetic acid로 대조군의 생산비인 0.24 g ethanol/g acetic acid보다 크게 증가되어, 텅스텐의 사용량 증가에 의한 에탄올 생산성 향상 가능성을 확인할 수 있었다. 이는 연구진의 선행연구인 *C. autoethanogenum* 배양에서 텅스텐의 농도변화에 따른 성장과 생산특성 분석결과와 동일한 경향을 보이고 있다[16]. 이는 acetogen에서 텅스텐의 역할이 acetyl-CoA 대사경로에서 CO_2 를 formate로 전환시켜주는 반응에 작용하는 효소인 formate dehydrogenase (FDH)와 acetate를 acetaldehyde로 전환시키는 반응의 효소인 aldehyde: ferredoxin oxidoreductase (AOR)의 보조인자로 작용하는데, FDH보다는 AOR활성 향상에 더 크게 기여하여 성장이나 대사산물 총생산량 향상보다는 생산된 아세테이트의 에탄올로의 전환에 크게 기여하기 때문으로 보인다[16-18].

4. 결 론

본 연구에서는 균주 성장과 대사산물 생산 향상 가능성을 확인하기 위하여 *C. ljundahlia* 배양공정에서 대조군에 사용되는 기본 배지에 tryptone을 추가하거나, 텅스텐의 사용농도를 높이는 배양조건이 acetogen 성장성과 생산성에 미치는 영향을 조사하였으며 그 결과를 Table 2에 요약하였다. Tryptone의 농도를 2.5 g/L까지 증가시킬 때는

균주 성장 및 대사산물 생산이 증가하는 경향을 보였으나 5.0 g/L의 tryptone을 사용한 경우에는 성장 및 대사산물 생산 저해가 관찰되었다. 배지 내 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 농도를 100배 증가시킨 배양실험에서는 균주의 성장과 C2대사산물의 총생산량에 뚜렷한 영향을 주지 못하였으나, 아세트산을 에탄올로 전환시키는 대사과정이 활성화되어 아세트산 농도가 낮아지고 에탄올 농도는 증가되는 현상이 확인되었다.

감 사

이 논문은 교육부의 재원으로 한국연구재단-이공학개인지초연구지원사업(NRF-2018R1D1A1B07043323)의 지원을 받아 수행한 연구입니다.

References

1. K. Liu, H. K. Atiyeh, R. S. Tanner, M. R. Wilkins, and R. L. Huhnke, Fermentative production of ethanol from syngas using novel moderately alkaliphilic strains of *Alkalibaculum bacchi*, *Bioresour. Technol.*, **104**, 336-341 (2012).
2. M. Mohammadi, G. D. Najafpour, H. Younesi, P. Lahijani, M. H. Uzir, and A. R. Mohamed, Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **15**, 4255-4273 (2011).
3. M. Mohammadi, H. Younesi, G. D. Najafpour, and A. R. Mohamed, Sustainable ethanol fermentation from synthesis gas by *Clostridium ljundahlia* in a continuous stirred tank bioreactor, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **87**, 837-843 (2012).
4. S. Schulz, B. Molitor, and L. T. Angenent, Acetate augmentation boosts ethanol production rate and specificity by *Clostridium ljundahlia* during gas fermentation with pure carbon monoxide, *Bioresour. Technol.*, **369**, 128387 (2023).
5. X. Sun, H. K. Atiyeh, A. Kumar, and H. Zhang, Enhanced ethanol production by *Clostridium ragsdalei* from syngas by incorporating biochar in the fermentation medium, *Bioresour. Technol.*, **247**, 291-301 (2018).
6. M. Devarapalli, H. K. Atiyeh, J. R. Phillips, R. S. Lewis, and R. L. Huhnke, Ethanol production during semi-continuous syngas fermentation in a trickle bed reactor using *Clostridium ragsdalei*, *Bioresour. Technol.*, **209**, 56-65 (2016).
7. P. C. Munasinghe and S. K. Khanal, Syngas fermentation to biofuel: evaluation of carbon monoxide mass transfer coefficient (k_{1a}) in different reactor configurations, *Biotechnol. Progr.*, **26**, 1616-1621 (2010).
8. J. J. Orgill, H. K. Atiyeh, M. Devarapalli, J. R. Phillips, R. S. Lewis, and R. L. Huhnke, A comparison of mass transfer coefficients between trickle-bed, hollow fiber membrane and stirred tank reactors, *Bioresour. Technol.*, **133**, 340-346 (2013).
9. Y. Shen, R. C. Brown, and Z. Wen, Syngas fermentation by *Clostridium carboxidivorans* P7 in a horizontal rotating packed bed biofilm reactor with enhanced ethanol production, *Appl. Energy*, **187**, 585-594 (2017).
10. J. Saxena and R. S. Tanner, Effect of trace metals on ethanol production from synthesis gas by the ethanologenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 513-521 (2011).
11. J. Saxena and R. S. Tanner, Optimization of a corn steep medium for production of ethanol from synthesis gas fermentation by *Clostridium ragsdalei*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 1553-1561 (2012).
12. J. Gao, H. K. Atiyeh, J. R. Phillips, M. R. Wilkins, and R. L. Huhnke, Development of low cost medium for ethanol production from syngas by *Clostridium ragsdalei*, *Bioresour. Technol.*, **147**, 508-515 (2013).
13. J. R. Phillips, H. K. Atiyeh, R. S. Tanner, J. R. Torres, J. Saxena, M. R. Wilkins, and R. L. Huhnke, Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: medium development and culture techniques, *Bioresour. Technol.*, **190**, 114-121 (2015).
14. S. J. Kwon, J. Lee, and H. S. Lee, Acetate-assisted carbon monoxide fermentation of *Clostridium* sp. AWRP, *Process Biochem.*, **113**, 47-54 (2022).
15. H. Im, T. An, R. Kwon, S. Park, and Y.-K. Kim, Effect of organic nitrogen supplement on syngas fermentation using *Clostridium autoethanogenum*, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **26**, 476-482 (2021).
16. T. An and Y.-K. Kim, Effect of selenium and tungsten on cell growth and metabolite production in syngas fermentation using "*Clostridium autoethanogenum*", *J. Biotechnol.*, **356**, 60-64 (2022).
17. H. N., Abubackar, M. C. Veiga, and C. Kennes, Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bioreactor with no accumulation of acetic acid, *Bioresour. Technol.*, **186**, 122-127 (2015).
18. F. Ammam, P. L. Tremblay, D. M. Lizak, and T. Zhang, Effect of tungstate on acetate and ethanol production by the electro-synthetic bacterium *Sporomusa ovata*, *Biotechnol. Biofuels*, **9**, 163 (2016).

Authors

Soeun Park; M.Sc., Researcher, Research Center of Chemical Technology, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea; soeun@hknu.ac.kr

Young-Kee Kim; Ph.D. Professor, Department of Chemical Engineering, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea; kim@hknu.ac.kr