

*Clostridium thermosaccharolyticum*에 의한 에탄올생산에 관한 연구

조은경 · 이윤광 · 변유량 · 유주현

연세대학교 식품공학과
(1985년 10월 10일 수리)

Studies on the Ethanol Production by *Clostridium thermosaccharolyticum*

Eun Kyung Cho, Yun Kwang Lee, Yu Ryang Pyun and Ju Hyun Yu

Department of Food Engineering Yonsei University
(Received October 10, 1985)

The fermentation of various sugars by *C. thermosaccharolyticum* was examined under pH controlled, anaerobic condition. The kinetic model for product formation at various sugars was the combination of growth and non-growth associated mode. In the utilization of a single sugar, glucose was the best carbon source for growth. The specific growth rate of glucose, xylose and cellobiose were 0.363 h^{-1} , 0.242 h^{-1} and 0.144 h^{-1} , respectively. The production of ethanol from glucose showed a negatively growth associated mode, so the higher growth rate decreased the productivity of ethanol. The maximum concentrations of the produced ethanol were 2.42 g/l, 3.76 g/l, and 3.4 g/l on glucose, xylose, and cellobiose. No glucose was detected during cellobiose fermentation. Sequential utilization of sugars was observed in the mixtures of glucose, xylose and cellobiose. It preferred glucose, followed by xylose and then cellobiose. The presence of other sugars had little or no effect on the rate of another sugar utilization. Cell lysis at the end of fermentation occurred more slowly in the mixtures of sugars than a single sugar.

섬유질 원료로부터의 에탄올생산은 과거에는 주로 *Trichoderma reesei* 등의 곰팡이가 생산하는 cellulase를 이용한 당화공정과 효모를 이용하여 에탄올을 생산하는 발효공정으로 나뉘어 많이 연구되어 왔다⁽¹⁻²⁾. 그러나 최근에는 비교적 균의 생육속도가 빠르고, 에탄올회수가 용이하며, 산소공급 및 오염의 염려가 없는 고온 혐기성세균을 이용한 동시 당화발효공정이 연구되고 있다⁽³⁻⁵⁾.

Wang⁽⁶⁾, Zeikus⁽⁷⁾ 및 Ng⁽⁸⁾ 등은 1978년 이후 고온 혐기성세균인 *Clostridium thermocellum*과 *Clostridium thermohydrosulfuricum* 및 *Clostridium thermosaccharolyticum*과의 혼합배양에 의하여 섬유질 원료로부터 직접 에탄올을 생산할 수 있

는 방법을 연구하였다. *C. thermocellum*은 cellulose와 hemicellulose를 분해하여 에탄올, 아세트산(acetic acid), CO₂, H₂ 및 락트산(lactic acid) 등을 생산하며, 동시에 glucose, xylose, cellobiose 등의 환원당을 축적하는 것으로 알려져 있다⁽⁹⁻¹³⁾. 한편 *C. thermosaccharolyticum*은 섬유질원료를 직접 자화할 수는 없으나, 섬유소 가수분해시 축적되는 위의 환원당들을 에탄올로 전환시킬 수 있으므로⁽¹⁴⁾, 두 미생물을 혼합배양하면 에탄올생산성을 현저히 증대시킬 수 있다⁽⁵⁾.

본 연구에서는 두 미생물을 혼합배양한 경우 *C. thermocellum*이 축적하는 환원당을 *C. thermosaccharolyticum*이 자화하는 메카니즘을 규명하기 위하여

여 glucose, xylose, cellobiose등을 단독 및 혼합하여 기질로 사용하였을때의 기질 특이성과 생육특성 및 대사산물의 축적 양상등을 연구 검토하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용한 균주는 *Clostridium thermosaccharolyticum* ATCC 31925였다.

배지 및 배양조건

CM4⁽¹²⁾ 배지를 사용하였으며, 그 조성은 yeast extract 0.5%, (NH₄)₂SO₄ 0.13%, KH₂PO₄ 0.15%, K₂HPO₄·3H₂O 0.29%, MgCl₂·6H₂O 0.1%, CaCl₂ 0.015%, 0.2% resazurin 1.0ml, 5% FeSO₄ 0.025ml, cysteine·HCl 0.1%, Sodium citrate 0.3%이다. 탄소원으로는 glucose(Wako Pure Chemical Co.), xylose(Sigma Chemical Co.), cellobiose(J. T. Baker Chemical Co.)를 사용하였으며, 단독 기질의 이용성실험에는 1%, 혼합당기질의 이용성 실험에는 각 당을 0.5%씩 혼합하여, 별도로 살균 후 첨가하였다.

전배양에는 Hungate 혐기성시험관(Bellco, Inc)과 500ml Serum Bottle을 사용하였으며 혐기적 조건을 만들기 위하여 N₂ 가스나 CO₂ 가스로 치환한후 밀폐하여 살균후 배양하였다. 본 배양은 2.6l 용발 효조(Model Marubish Co., Japan)를 사용하였으며, 이때 working volume은 1.5l, 균의 접종량은 10% (v/v), pH는 5N NaOH를 사용하여 7.0으로 조절하고, N₂ 가스를 주입시키면서 60°C, 100 rpm 에서 배양하였다.

분석방법

균의 생육정도는 spectrophotometer (Model Shimadzu Co., Japan)을 사용하여 660nm에서 일정시

Table 1. Operating conditions of High Performance Liquid Chromatography.

Column	:	μ carbohydrate
Mobile phase	:	acetonitril : water 80 : 20
Flow rate	:	1.5 ml/min
Detector	:	RI
Sample size	:	20 μ l
Temperature	:	25°C
Pressure	:	800 psi

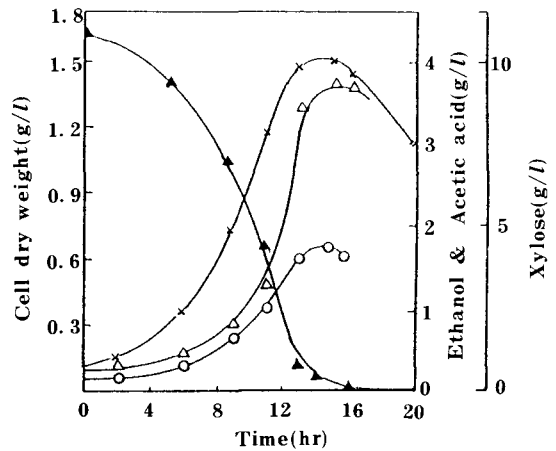


Fig. 1. Fermentation profile of xylose by *C. thermosaccharolyticum*.

x-x : Cell dry weight, \triangle - \triangle : Ethanol, \circ - \circ : Acetic acid, \blacktriangle - \blacktriangle : Xylose

간 간격으로 채취한 배양액의 흡광도로 측정하였다. 환원당정량은 DNS⁽¹⁴⁾ 법과 HPLC (Waters Associated, M-244)를 사용하여 분석하였으며⁽¹⁰⁾, 분석 조건은 Table 1과 같다.

에탄올과 아세트산은 FID 검출기를 사용하여 GC (GC-7AG, Shimadzu, Co.)로 측정하였으며, 분석 조건은 다음과 같다^(15,16). 1m x 3mm I.D. 스테인레스 스틸관에 Porapak Q (80/100 mesh)를 충전하였으며, N₂ 가스를 carrier gas로 하여 50ml/min로 유입시켰다. 주입온도는 150°C, 검출온도는 200°C였으며, 시료의 주입량은 3 μ l였다. 시료는 배양액 1.5ml를 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상등액 1ml에 내부표준물질로 0.12% propionic acid 1ml를 첨가하여 분석하였다.

단일당의 발효

*C. thermosaccharolyticum*을 xylose에 배양하였을 때의 생육결과는 Fig. 1과 같다. Glucose와 cellobiose를 기질로 하였을 때도 이와 유사한 생육곡선을 얻었으며, 이들로부터 구한 발효특성값을 정리하면 Table 2와 같다. 배양 14시간 후 최대 균체증식량은 1.52g/l에 달하였으며, 에탄올과 아세트산의 수율은 각각 0.376g ethanol/g xylose, 0.168g acetate/g xylose로 이들의 생산비는 2.2 : 1이었다. 에탄올 생성모델은 증식연동형 (growth associated mode)와 비증식연동형 (non-growth associated mode)이 혼합된 Ludeking-Piret 모델에 따라 다음 식으로 표현되었다.

$$q_p = \alpha \mu + \beta$$

Table 2. Fermentation results of *C. thermosaccharolyticum* at various substrates.

Parameter	Substrate		
	xylose	glucose	cellobiose
Max. dry cell wt, (g/l)	1.52	1.68	1.34
Max. ethanol (g/l)	3.76	2.42	3.4
Max. acetic acid (g/l)	1.68	1.4	1.6
Specific growth rate (h ⁻¹)	0.242	0.363	0.144
Max. substrate uptake rate (g/h)	1.469	2.632	0.605

여기서 q_p 는 생산물의 비생산속도 (specific product formation rate, g product/g cell·h)이며, α 는 증식연동상수 (g product/g cell), β 는 비증식연동상수 (g product/g cell·h)이다. Xylose를 기질로 사용할 경우 Fig. 2로부터 α 는 1.29g ethanol/g cell 이었고, β 는 0.314 g ethanol/g cell·h를 얻었으며, 균의 생육이 멈춘 후에도 에탄올을 생산하였다. Glucose를 기질로 했을 때 균의 비증식속도와 기질 소비속도는 xylose 경우보다 현저히 컸으며, 배양 12시간 후에 발효가 완료되었다. 최대 균체중식량은 1.68g/l였으며, 발효가 끝난 후 자기 소화에 의해 급격히 감소하는 현상을 나타내었다. 에탄올과 아세트산수율은 0.24g ethanol/g glucose, 0.14 g acetate/g glucose로 에탄올수율이 낮았다. 에탄올 생산양상은 α 값이 -0.28g ethanol/g cell, β 가

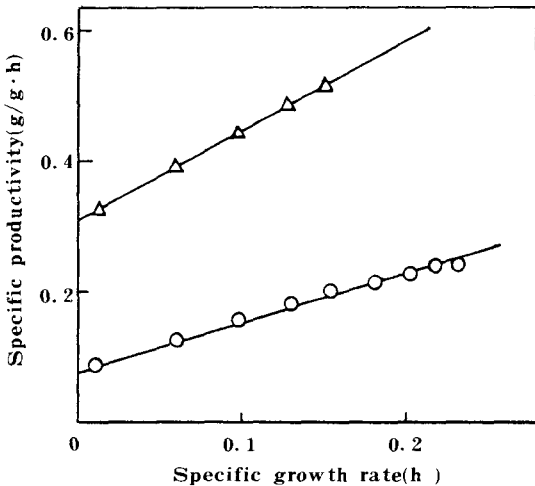


Fig. 2. Product formation constant for *C. thermosaccharolyticum* in xylose fermentation.
 △-△ : Ethanol ○-○ : Acetic acid

0.275g acetate/g cell·h였으며, α 값이 음의 값을 나타내어 균의 증식속도가 증가되면 오히려 에탄올 생산율이 감소하는 negative growth associated mode를 나타내었다. Hsu⁽¹⁷⁾ 등에 의하면 *C. thermosaccharolyticum*은 glucose 농도가 높은 경우에는 에탄올보다 락트산을 다량 생산하며, 저농도에서는 락트산보다 에탄올을 생산하는 것으로 보고하였다. 이는 glucose 농도가 높을 경우 EMP-pathway 중 fructose-1,6-diphosphate의 생산이 증가하며, 이는 lactic acid dehydrogenase의 activator로 작용함으로써 락트산의 생산량이 많아지고 에탄올 생산량은 감소되는 것으로 제안되었다. 이당류인 cellobiose를 단독기질로 배양한 경우 기질의 소비속도는 0.6 g/h로 glucose나 xylose보다 낮았으며, ethanol 수율은 0.34g ethanol/g cellobiose로 glucose에서보다 높았다. 이는 cellobiose가 느린 속도로 소비되어 대사에 이용되므로 앞에서 설명한 바와 같이 glucose에서 보다는 ethanol 생산성이 증가한 것으로 생각된다. 에탄올 생산양상은 α 가 1.948 g ethanol/g cell, β 가 0.154g ethanol/g cell·h를 나타내었다. *C. thermosaccharolyticum*과 동일한 조건에서 생육하는 *C. thermocellum*은 cellobiose를 기질로 이용할 때 발효후기에 glucose를 축적하나¹⁰, 본 실험에서는 배양중 glucose 축적이 없는 것으로 미루어 보아 두 미생물의 cellobiose 대사양상이 크게 다른 것으로 추측된다.

혼합당발효

섬유질 원료를 산이나 효소 또는 미생물을 이용

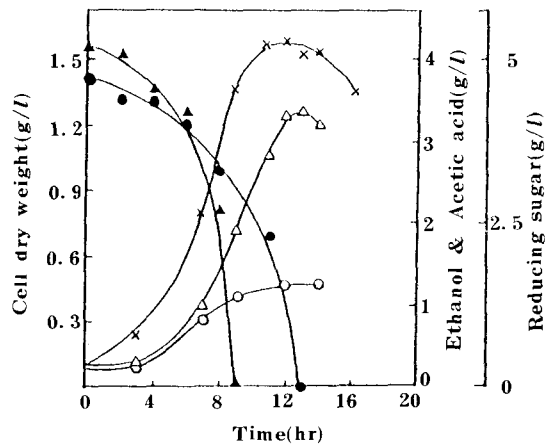


Fig. 3. Utilization of sugars from a mixture of xylose and glucose by *C. thermosaccharolyticum*.
 ×-× : Cell dry weight, △-△ : Ethanol, ○-○ : Acetic acid, ▲-▲ : Glucose, ●-● : Xylose

Table 3. Fermentation results of *C. thermosaccharolyticum* at various mixed substrate.

Parameter	Substrate			
	X+G* C+C*	G+C* C+X*	C+X* X+G+C*	X+G+C*
Max. dry cell wt. (g/l)	1.59	1.51	1.5	1.68
Max. ethanol (g/l)	3.38	3.06	3.56	5.36
Max. acetic acid (g/l)	1.24	1.24	1.18	1.62
Specific growth rate (h ⁻¹)	0.342	0.330	0.222	0.373
Max. substrate uptake rate (g/h)				
xylose	1.96	-	0.92	1.05
glucose	1.88	2.1	-	1.83
cellobiose	-	0.87	0.58	0.48

X+C* ; xylose 5 g/l+glucose 5 g/l

G+C* ; glucose 5 g/l+cellobiose 5 g/l

C+X* ; cellobiose 5 g/l+xylose 5 g/l

X+G+C* ; xylose 5 g/l+glucose 5 g/l+cellobiose 5 g/l

하여 가수분해시키면 xylose 나 glucose, cellobiose 등이 혼합된 상태로 생성되므로, *C. thermosaccharolyticum*에 의한 이들 혼합당의 이용특성을 검토하기 위하여 위의 당들을 임의로 혼합하면서 이를 기질로 사용하였을때의 균의 배양특성을 살펴 보았다.

Xylose와 glucose를 각각 5g/l 씩 혼합하여 배양한 결과는 Fig. 3 및 Table 3 과 같다. 그림에서 보는 바와같이 glucose를 우선 소비하였으며, glucose만을 단독기질로 배양하였을 때의 기질 소비양상과 거의 유사하였다. 이 결과로부터 xylose의 존재는 glucose 이용에 별로 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었으며, glucose를 이용하여 균의 증식이 빠르게 일어난 후 증식이 왕성한 시기에 xylose가 급격히 소비되므로써, xylose의 기질소비속도는 xylose를 단독배양했을 때의 1.47g/h보다 증가한 1.96g/h를 나타내었다. 또한 에탄올과 아세트산의 생산비가 2.7:1로 glucose만의 배양에서보다 증가하였으며, 이는 발효후기에 xylose로부터 에탄올이 생산되기 때문인 것으로 생각된다. 균의 최대 비증식속도는 xylose에서 0.24h⁻¹, glucose에서 0.36h⁻¹인데 비하여, 두 당을 혼합한 경우는 0.34h⁻¹로 발효초기에 glucose가 균의 생육을 좌우하는 것으로 생각된다. Glucose와 cellobiose를 혼합 배양한 결과는 Fig. 4와 같으며, 역시 glucose가 우선 소비되면서 균의 증식이 일어나고, glucose 소비이후 cellobiose가 소비되면서 균의 증식과 대사산물 생산에 이용되었다. 균의 비증식속도는 0.33

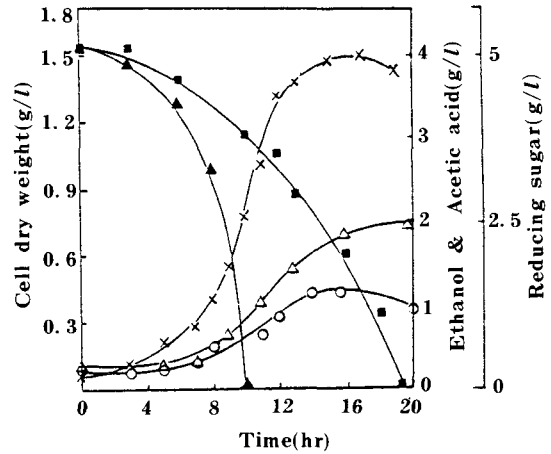


Fig. 4. Utilization of sugars from a mixture of glucose and cellobiose by *C. thermosaccharolyticum*.

×-× : Cell dry weight, △-△ : Ethanol, ○-○ : Acetic acid, ▲-▲ : Glucose, ■-■ : Cellobiose

h⁻¹로 cellobiose만의 단독기질에서보다 증가하였고, 최대 기질소비속도도 0.87g/h로 증가하였다. 에탄올과 아세트산의 생산비는 2.7:1이었으며, cellobiose로부터의 에탄올 생산에 의하여 glucose만의 단독기질에서보다 증가하였다. glucose만을 단독기질로 사용할 경우 발효후기에 자기소화현상이 현저하였으나, 혼합당의 경우는 완만하게 진행되었다.

Xylose와 cellobiose를 혼합한 경우는 Fig. 5와 같다. 발효초기에서 xylose가 우선 균의 증식에 사용

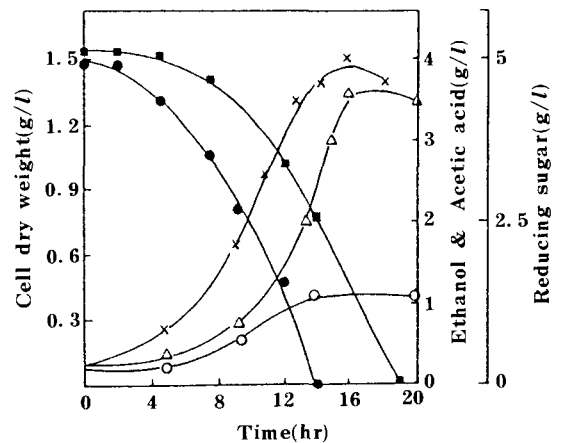


Fig. 5. Utilization of sugars from a mixture of xylose and cellobiose by *C. thermosaccharolyticum*.

×-× : Cell dry weight, △-△ : Ethanol, ○-○ : Acetic acid, ●-● : Xylose, ■-■ : Cellobiose.

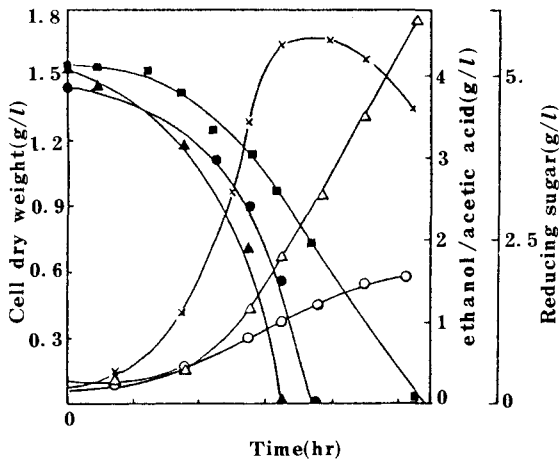


Fig. 6. Utilization of sugars from a mixture of xylose, glucose, and cellobiose by *C. thermosaccharolyticum*.

×-× : Cell dry weight, △-△ : Ethanol,
○-○ : Acetic acid, ▲-▲ : Glucose,
●-● : Xylose, ■-■ : Cellobiose

되었으며, 균의 비증식속도는 0.22 h^{-1} 로 glucose와 cellobiose의 혼합당에서보다 낮았다. 이는 xylose 단독기질의 경우 비증식속도가 0.24 h^{-1} 이고, cellobiose 단독기질에서는 0.14 h^{-1} 임을 비교할 때 xylose 단독인 경우의 증식속도와 유사하였다. 에탄올 생산성은 xylose와 cellobiose 모두 glucose보다 크므로, 이들 두 당을 혼합한 경우 에탄올수율이 3.56 g/l 로써 glucose가 혼합되었을 때보다 증가하였으며, 에탄올과 아세트산의 생산비는 3.1 : 1이었다.

서로 다른 두 당의 혼합결과로부터 각 당의 이용 특성은 이들을 단독기질로 배양하였을 때의 결과와 거의 유사하였으며, glucose가 혼합된 경우에는 발효초기에 균의 증식이 빠르게 일어나므로 비증식속도는 xylose나 cellobiose 각각의 단독기질배양에서보다 증가하였다. 또한 에탄올생산성은 glucose가 첨가될 경우 첨가된 농도 (5 g/l)가 낮고, 균이 왕성하게 증식한 상태에서 xylose나 cellobiose를 이용함으로써, glucose만의 단독기질에서의 배양결과보다 좋았다. 이러한 결과는 xylose와 glucose, cellobiose 등의 새당을 혼합한 배양에서도 Fig. 6과 같이 동일한 양상으로 나타났다. 기질의 소비는 glucose, xylose, cellobiose 순으로 소모되었으며, 두 당의 혼합 배양과는 달리 기질농도가 1.5% 가 되므로써 균의 증식 및 대사산물 생산량이 증가하였다. 최대 에탄올생산량은 5.36 g/l 로 균의 생육이 멈춘 후에도 잔존하는 xylose와 cellobiose를 이용하여 계속적으로

에탄올을 생산하였다. 한편 기질이 남아있는 상태에서 균의 생육이 멈춘 것으로 보아 축적된 대사산물에 의한 product inhibition이 일어나는 것으로 생각된다.

이상의 결과로 미루어보아 *C. thermosaccharolyticum*을 *C. thermocellum*과 혼합배양할 경우 *C. thermocellum*에 의하여 축적되는 xylose, glucose, cellobiose 등이 서로 독립적으로 사용되어, 에탄올로 전환되므로써 에탄올수율을 높일 수 있으며, 두 미생물이 동일한 조건에서 생육하므로써 상당히 안정된 혼합배양계를 이룰 수 있을 것으로 생각되었다.

요 약

*C. thermosaccharolyticum*을 이용하여 xylose, glucose, cellobiose 등을 각각 단일기질 및 혼합기질로 배양한 결과는 다음과 같다.

기질의 종류에 관계없이 에탄올의 생산양상은 Leudeking-Piret 모델에 따랐으며 $q_p = \alpha \mu + \beta$ 의 식으로 나타낼 수 있었다. 단일당에서의 배양결과 glucose, xylose, cellobiose 각 당에서의 비증식속도는 0.36 h^{-1} , 0.24 h^{-1} , 0.14 h^{-1} 로 균의 증식은 glucose를 기질로 사용하였을 때가 가장 좋았다. 에탄올 생산성은 xylose에서 가장 좋았으며, 각 당에서의 에탄올수율은 $0.38 \text{ g ethanol/g xylose}$, $0.34 \text{ g ethanol/g cellobiose}$, $0.242 \text{ g ethanol/g glucose}$ 이었다. glucose에서의 배양결과, 배양 12시간 이후 균의 자기소화현상이 현저히 일어났으며, 다른 당에서와는 달리 에탄올 생산양상은 α 값이 음수를 나타내므로써, 균의 생육이 증가하면 오히려 에탄올 비생산속도는 감소하는 경향을 보였다. 서로 다른 당을 혼합하여 기질로 사용할 경우, 각 당의 이용특성은 이들을 단독기질로 배양하였을 때의 소비양상과 유사하여 각 당은 서로 영향을 미치지 않고, 독립적으로 자화되는 것으로 생각된다. 혼합당에서의 기질소비는 glucose, xylose, cellobiose 순으로 소비되었으며, 또한 에탄올 생산성은 glucose가 첨가된 경우 glucose 농도가 낮고 (5 g/l), glucose를 기질로 하여 균이 왕성하게 증식한 상태에서 xylose나 cellobiose를 이용하므로써 glucose만을 단독기질로 배양한 결과보다 좋았다.

참고문헌

1. 한국산업미생물학회, 제 2 회 한일 심포지움 "Biomass 생산과 Bioenergy 개발", 1 (1980)

2. 한국과학기술단체총연합회, "Bioenergy와 에너지 정책 심포지움" 논문집, (1984)
3. Sternberg, D.: *Biotech. Bioeng. Symp.*, **6**, 35 (1976)
4. Duong, C., E.A. Johnson and A.L. Demain: *Topics in Enzyme and Fermentation Biotech.*, J. Wiel and Son, N. Y., Vol. **7**, 157 (1983)
5. Avgerinos, G.C., D. I.C. Wang: *Biotech. Bioeng.*, **25**, 67, (1983)
6. Cooney, C.L., D. I.C. Wang, SY-DAR Wang, J. Gordon, M. Jiminez: *Biotech. & Bioeng. Symp.* **8**, 103 (1978)
7. Daniels L. and J.G. Zeikus: *Appl. Microbiol.*, **29**, 710 (1975)
8. Ng T.K. and J.G. Zeikus: *J. Bacter.*, **150**, 1391 (1982)
9. R.H. McBEE: *J. Bacter.*, **67**, 505 (1954)
10. Gordon, J.M. Jiminez, C.L. Cooney and D. I.C. Wang: *Aiche Symposium Series No. 181*, Vol. **74**, 91 (1978)
11. Sonnleitner, B.: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer-Verlage, N.Y., **27**, 69 (1983)
12. Gomez, R.F., P. Hernandez: *Adv. in Biotech.* Vol. **2**, 131, 20 (1981)
13. Moo Young, M.: *Advances of Biotech.*, Vol. **2**, 15 (1981)
14. Miller G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
15. Khaken, J.: *J. of G.C.*, 30 (1963)
16. Dave, S.B.: *J. Chromatographic science*, **7**, 389 (1969)
17. Hsu E.J. and Z.J. ORDAL: *J. Bacter.*, **102**, 369 (1970)