

*Clostridium acetobutylicum*의 대사망의 동적모델 개발

김우현** · 엄문호* · 이상현* · 최진달래* · 박선원†

한국과학기술원 생명화학공학과
305-701 대전광역시 유성구 대학로 291
*GS칼텍스(주) 기술연구소 바이오연료팀
305-380 대전광역시 유성구 문지동 104-4
(2012년 11월 13일 접수, 2012년 12월 17일 채택)

Development of the Dynamic Model for the Metabolic Network of *Clostridium acetobutylicum*

Woohyun Kim**, Moon-Ho Eom*, Sang-Hyun Lee*, Jin-dal-ae Choi* and Sunwon Park†

Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST),
291 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea

*Biofuel & Biochemical Team, R&D Center, GS Caltex Corporation, 104-4 Munji-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-380, Korea
(Received 13 November 2012; accepted 17 December 2012)

요 약

부탄올을 생산하는 발효반응기에서는 아세톤, 부탄올 그리고 에탄올을 주로 생산하는 *Clostridium acetobutylicum*이 사용된다. 본 연구에서는 이 미생물을 이용한 발효공정의 개발을 위하여, *Clostridium acetobutylicum* ATCC824의 대사망의 동적 모델이 제안되었다. 많은 효소기반의 대사반응들로 구성된 대사망의 복잡성과 대사반응속도식의 비선형적 특성 때문에, 유전 알고리즘과 Levenberg-Marquardt 알고리즘이 결합된 효율적인 최적화 기법을 이용하여 회분식 발효반응기의 실험 결과값으로 58개의 반응속도상수들을 결정하였다. 그리고 이 반응속도상수 결정의 정확도를 제고하기 위하여, 유전자 조작을 통해 특정 대사경로를 차단한 미생물을 이용했을 때의 실험과 초기 글루코스의 농도를 다르게 한 실험들을 수행하여 개발된 대사망의 동적모델을 분석하였다. 결과적으로, 본 연구를 통해서 개발된 대사망 모델의 정확도를 확인하였고, 이를 활용하여 발효반응공정의 생산성 향상을 위한 적절한 클로스트리듐의 개발과 발효반응기의 최적화를 위한 연구에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract – To produce biobutanol, fermentation processes using clostridia that mainly produce acetone, butanol and ethanol are used. In this work, a dynamic model describing the metabolic reactions in an acetone-butanol-ethanol (ABE)-producing clostridium, *Clostridium acetobutylicum* ATCC824, was proposed. To estimate the 58 kinetic parameters of the metabolic network model with experimental data obtained from a batch fermentor, we used an efficient optimization method combining a genetic algorithm and the Levenberg-Marquardt method because of the complexity of the metabolism of the clostridium. For the verification of the determined parameters, the developed metabolic model was evaluated by experiments where genetically modified clostridium was used and the initial concentration of glucose was changed. Consequently, we found that the developed kinetic model for the metabolic network was considered to describe the dynamic metabolic state of the clostridium sufficiently. Thus, this dynamic model for the metabolic reactions will contribute to designing the clostridium as well as the fermentor for higher productivity.

Key words: *Clostridium Acetobutylicum*, Metabolic Reactions, Parameter Estimation

1. 서 론

원유 가격의 지속적인 상승으로 신재생 에너지의 생산을 위한 바이오 매스의 사용이 각광받고 있다. 이러한 관심에 따라, 최근에 이

러한 바이오 매스의 발효반응을 이용한 화학물질 및 부탄올과 같은 연료의 생산에 대한 기술개발이 재조명되고 있다[1-4]. 바이오 매스의 발효를 이용한 부탄올 생산을 산업용 공정으로 확대 개발하기 위해서는 이러한 미생물의 대사에 의한 발효과정을 잘 이해하고 예측하기 위한 연구가 필요하다. 그러므로 이러한 예측 모델의 개발을 위해서 미생물의 대사경로에 대한 반응을 모사하는 것이 미생물의 유전자 조작을 통한 개량이나 발효 반응 시스템의 설계에 유용한 정보를 제공할 수 있다[5-7].

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: sunwon@kaist.ac.kr

**현재주소: 대전광역시 유성구 가정로 152 한국에너지기술연구원 신재생 에너지본부 수소연료전지연구단

‡이 논문은 KAIST 박선원 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

여러 미생물들 중, *Clostridium acetobutylicum*은 100여 년간 상업적인 아세톤, 부탄올, 에탄올의 생산을 위한 발효 공정에 사용되어 왔다. 이 클로스트리듬의 대사과정에 의해 발생하는 주요 대사산물이 이상의 세 가지 물질(acetone, butanol, ethanol)이므로 이 발효공정을 ABE 발효공정이라고 부르고 있다. ABE 발효공정은 1911년에 Fernbach과 Strange에 처음으로 개발되었고 20세기 제 1, 2차 세계대전을 거칠 때까지 빠르게 보편화 되었으나, 20세기 중반에 석유화학공정이 당시의 저렴한 원유가격을 바탕으로 발효공정의 생산비용보다 훨씬 적은 가격으로 아세톤 및 알코올을 생산하게 되어서 발효공정을 이용한 상용 공정은 쇠퇴할 수 밖에 없었다[8,9]. 그러나 최근 원유가격의 상승으로 바이오매스와 클로스트리듬을 이용한 ABE 발효공정을 이용한 바이오 연료의 생산공정에 대한 관심이 제고되고 있다.

이러한 바이오연료 생산공정의 효율화와 대형화를 위하여 발효반응에 대한 이해가 필수적이다. 따라서, 본 연구에서는 ABE 발효공정에 사용되는 *Clostridium acetobutylicum*의 대사경로의 동적모델을 구성하였다. *Clostridium acetobutylicum*의 대사과정은 알려져 있고 이러한 대사현상을 모사하기 위한 시도가 이루어지고 있다[5-7,10]. 그러나 이러한 연구들은 다음과 같은 문제들로 인하여 여전히 제한적일 수 밖에 없다.

- 클로스트리듬의 대사망(metabolic network)의 복잡성: ABE 발효공정에 사용되는 클로스트리듬의 대사망은 비교적 간단한 편일지라도 30개 이상의 효소반응으로 이루어져 있다. 따라서, 각각의 효소반응에 대한 반응속도식의 정의가 어렵고 실험값들을 이용하여 반응속도식의 속도상수들을 결정하는 것도 어려운 최적화 문제가 될 수 밖에 없다[6,11].

- 클로스트리듬 내부의 대사산물: 실험을 통해서 측정할 수 있는 대부분의 대사산물은 미생물의 체외로 나온 물질이다. 그러나 대사과정에서 발생한 대사산물 중 클로스트리듬의 체내에 존재하는 물질은 정확한 양을 측정하기 어렵다. 따라서, 이러한 체내에 존재하는 대사산물의 생성에 관여하고 있는 효소반응의 정확한 모사에 장애가 된다.

본 논문에서는 Jones와 Woods에 의해서 밝혀진 대사망을 바탕으로 [10] 효소반응들 및 클로스트리듬의 성장과 죽음 등에 관련된 반응속도식을 정의하였다. 그리고 이 반응속도식들에 포함된 반응속도상수들을 실험결과값과 효율적인 최적화 알고리즘을 사용하여 결정하였다. 또한, 반응속도상수 결정의 정확도를 제고하기 위해서, 대사경로 중 일부 반응이 일어나지 않도록 유전자 조작을 한 클로스트리듬을 사용한 실험과 초기 글루코스의 농도를 달리한 실험을 진행하였다.

2. 실험

2-1. 클로스트리듬

Clostridium acetobutylicum ATCC824가 본 연구에서 사용되었다. 이것은 American Type Culture Collection (USA)에서 구입하였고 대사경로의 조작을 위한 미생물의 개량에는 Heap에 의해서 제안된 방법을 사용하였다[12].

2-2. 클로스트리듬 증식배지

실험에서 사용되는 클로스트리듬의 증식배지는 다음과 같은 구성 성분으로 이루어져 있다. 물 1 L에 글루코스 80 g, yeast extract 5 g, KH_2PO_4 0.751 g, K_2HPO_4 0.754 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.710 g, MnSO_4

$5\text{H}_2\text{O}$ 0.014 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.010 g, asparagines 2.3 g, NaCl 1 g 그리고 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g이 들어있다. 그리고 발효과정 동안 약간의 antifoam agent가 추가된다.

2-3. 배양

클로스트리듬의 배양을 위한 회분식 배양장치는 7L 크기의 발효반응기(New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, USA)를 사용하고 이 발효반응기에서 실제로 발효가 이루어지는 부피(working volume)는 2 L이다. 그리고 회분식 배양을 위한 이 발효반응기의 증식배지에 폭기형태로 질소 가스를 계속 공급한다. 배양시 최초 pH는 5.5로 조정되고 배양이 진행되는 동안 자동으로 30% 압모니아수가 공급되어 pH는 5.0이 유지된다. 배양온도는 항상 37 °C로 유지하였다. 그리고 배양 실험에 대한 글루코스, 아세톤, 에탄올, 부탄올, 아세트산과 부르산의 초기 농도는 Table 1과 2에 표시되어 있다.

2-4. 분석방법

발효액 중의 대사산물의 농도를 분석하기 위해 발효기에서 발효액을 샘플링 하였다. 채취된 발효액은 약 13,000 rpm으로 고형분을 원심분리하여 제거한 후 분석을 수행하였다. 글루코스의 농도는 HPX-87H Aminex 이온교환컬럼과 Agilent 사의 1200 series high pressure liquid chromatography (HPLC)를 사용하여 분석하였다. 그리고 부탄올, 에탄올, 아세톤 및 유기산의 농도는 Agilent 사 6890N gas chromatography를 이용하여 분석하였다. 분석용 컬럼은 300 mm * 7.8 mm glass 80/120 carbopack BAW packed column을 사용하였으며 불꽃이온화검출기(flame ionization detector)를 사용하였다. 이 동상인 헬륨은 3 ml/min. 유속으로 공급하였다. 주입부 온도와 검출기의 온도 조건은 각각 220 °C 및 280 °C로 고정하였다. 오븐의 온도조건은 다음과 같이 설정하였다. 초기온도 100 °C를 30초간 유지 후, 30 °C/min의 속도로 135 °C까지 상승한 후 30 °C/min의 속도로 170 °C/min까지 상승시켜 최종적으로 170 °C에서 9분간 유지하였다. 부탄올, 에탄올, 아세톤의 수율은 투입된 글루코스의 질량 대비 생성된 질량으로 계산하였다. 미생물의 질량은 샘플의 흡광도를 측정하여

Table 1. Initial concentrations of metabolites and glucose in the experiment using *Clostridium acetobutylicum* ATCC824

Components	Initial Concentration (g/L)	
	Experiment 1	Experiment 2
Glucose	81.85	70.97
Acetone	0.030	0.000
Ethanol	0.039	0.060
Butanol	0.799	0.000
Acetic acid	0.867	0.500
Butyric acid	0.013	0.370

Table 2. Initial concentrations of metabolites and glucose in the experiment using the genetically modified *Clostridium acetobutylicum*

Components	Initial Concentration (g/L)
Glucose	81.92
Acetone	0.017
Ethanol	0.045
Butanol	0.427
Acetic acid	0.548
Butyric acid	0.003

여 사전에 측정하여 작성된 흡광도와 미생물 건조무게 간의 검정곡선으로부터 계산하였다. 흡광도와 미생물 건조무게 간의 검정곡선에 있어 비례계수 값은 0.333 g/L 였다.

3. 모델링

3-1. *Clostridium acetobutylicum*의 대사망

Clostridium acetobutylicum ATCC824의 대사망은 1986년 Jones와 Woods에 의해 최초로 제안되었고 그 이후로도 관련된 다수의 연구 결과가 발표되고 있다. 그 제안된 대사경로 내의 각각의 효소반응에 대한 반응속도론에 대한 연구가 그 동안 많이 이루어졌지만 전체의 효소반응들을 모두 포함하는 동적 모델에 대한 연구는 현재까지는 매우 제한적으로 이루어졌다[6,7,13-19]. 본 논문에서는, Shinto가 사용한 Jones와 Woods의 대사망에 실험적으로 존재할 것으로 추정되는 몇 개의 반응경로를 추가한 Fig. 1로 표현된 클로스트리듐의 대사망이 사용되었다. 추가된 대사경로는 다음과 같다.

- 에탄올 및 부탄올 대사경로의 가역반응들: R5r, R6r, R14r 및 R15r [17,18]
- Pyruvate에서 acetaldehyde가 생성되는 반응: R11 [19]
- 추가적인 acetate 생성반응: R9

이상의 추가적인 대사반응들을 고려한 *Clostridium acetobutylicum* ATCC824의 대사망은 Fig. 1로 표현되었다. 현재까지 문헌으로 발표된 대사경로에 추가적으로 R9 반응을 추가한 것은 acetyl-CoA로부터 acetyl-P를 거쳐서 acetate가 합성되는 경로 이외에 다른 경로가 있을 것으로 추정되는 실험 결과를 얻었기 때문이다. 실제로 부탄올의 생산량을 향상시키기 위해서 클로스트리듐의 유전자 조작을 통해서 acetyl-CoA-to-acetyl-P 대사반응을 막았음에도 불구하고, 발효액에서 acetic acid가 의미 있는 양으로 측정되었기 때문이다. 아직 정확한 대사경로에 대한 연구는 추가적으로 진행되어야 하나, R9를 아직 알려지지 않은 acetate 합성 대사경로들의 대표반응으로 가정하여 기존의 대사망에 이를 추가하였다.

대사망의 모사를 위한 실험은 두 종류의 *Clostridium acetobutylicum* 을 이용하였다. 첫 번째와 두 번째의 실험에서는 어떠한 유전자 조작도 이루어지지 않은 클로스트리듐을 사용하였고, 세 번째 실험에서는 유전자 조작을 통해서 acetyl-CoA-to-acetyl-P 대사반응을 제거

한 클로스트리듐을 사용하였다. 이상의 실험에서 얻어진 실험데이터를 이용하여 제안된 대사망의 효소반응들의 반응속도 상수들을 결정한다.

3-2. 대사반응모델

대사반응모델은 Shinto의 방법과 같이 일반적인 효소반응 모델 중의 하나인 Michaelis-Menten equation 형태로 표현되었다[6]. Fig. 1에 나타난 대사망에 포함된 모든 반응들은 아래의 식으로 나타낸다. 이 대사반응들은 총 30개이며 58개의 반응속도 상수를 포함하고 있다.

$$R1 = \frac{V_{m1}[\text{Glucose}][\text{Cell}]}{K_{m1} + [\text{Glucose}]} \tag{1}$$

$$R2 = \frac{V_{m2}[\text{Pyruvate}][\text{Cell}]}{K_{m2} + [\text{Pyruvate}]} \tag{2}$$

$$R3 = \frac{V_{m3}[\text{Acetyl-CoA}][\text{Cell}]}{K_{m3} + [\text{Acetyl-CoA}]} \tag{3}$$

$$R3r = \frac{V_{m3r}[\text{Acetoacetyl-CoA}][\text{Cell}]}{K_{m3r} + [\text{Acetoacetyl-CoA}]} \tag{4}$$

$$R4 = \frac{V_{m4}[\text{Acetoacetyl-CoA}][\text{Cell}]}{K_{m4} + [\text{Acetoacetyl-CoA}]} \tag{5}$$

$$R4r = \frac{V_{m4r}[\text{Butyryl-CoA}][\text{Cell}]}{K_{m4r} + [\text{Butyryl-CoA}]} \tag{6}$$

$$R5 = \frac{V_{m5}[\text{Acetyl-CoA}][\text{Cell}]}{K_{m5} + [\text{Acetyl-CoA}]} \tag{7}$$

$$R5r = \frac{V_{m5r}[\text{Acetaldehyde}][\text{Cell}]}{K_{m5r} + [\text{Acetaldehyde}]} \tag{8}$$

$$R6 = \frac{V_{m6}[\text{Acetaldehyde}][\text{Cell}]}{K_{m6} + [\text{Acetaldehyde}]} \tag{9}$$

$$R6r = \frac{V_{m6}[\text{Ethanol}][\text{Cell}]}{K_{m6} + [\text{Ethanol}]} \tag{10}$$

$$R7 = \frac{V_{m7}[\text{Acetyl-CoA}][\text{Cell}]}{K_{m7} + [\text{Acetyl-CoA}]} \tag{11}$$

$$R7r = \frac{V_{m7r}[\text{Acetyl-P}][\text{Cell}]}{K_{m7r} + [\text{Acetyl-P}]} \tag{12}$$

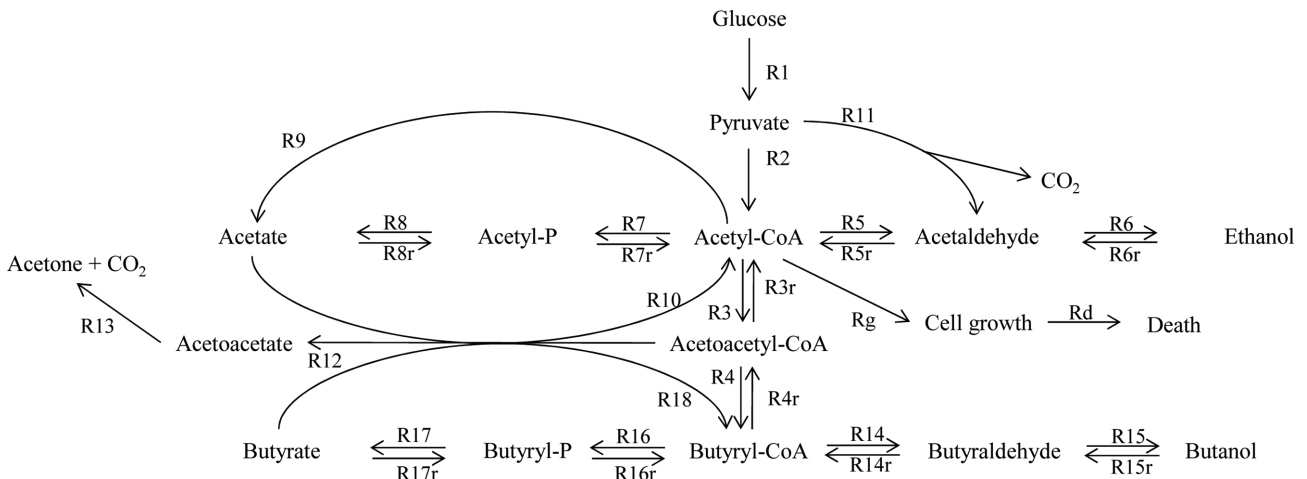


Fig. 1. The proposed metabolic network of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824.

$$R8 = \frac{V_{m8}[\text{Acetyl-P}][\text{Cell}]}{K_{m8} + [\text{Acetyl-P}]} \quad (13)$$

$$R8r = \frac{V_{m8r}[\text{Acetate}][\text{Cell}]}{K_{m8r} + [\text{Acetate}]} \quad (14)$$

$$R9 = \frac{V_{m9}[\text{Acetyl-CoA}][\text{Cell}]}{K_{m9} + [\text{Acetyl-CoA}]} \quad (15)$$

$$R10 = V_{m10} \left(\frac{1}{1 + (K_{m10A}/[\text{Acetate}])} \right) \times \left(\frac{1}{1 + (K_{m10A}/[\text{Acetoacetyl-CoA}])} \right) [\text{Cell}] \quad (16)$$

$$R11 = \frac{V_{m11}[\text{Pyruvate}][\text{Cell}]}{K_{m11} + [\text{Pyruvate}]} \quad (17)$$

$$R12 = R10 + R18 \quad (18)$$

$$R13 = \frac{V_{m13}[\text{Acetoacetate}][\text{Cell}]}{K_{m13} + [\text{Acetoacetate}]} \quad (19)$$

$$R14 = \frac{V_{m14}[\text{Butyryl-CoA}][\text{Cell}]}{K_{m14} + [\text{Butyryl-CoA}]} \quad (20)$$

$$R14r = \frac{V_{m14r}[\text{Butyraldehyde}][\text{Cell}]}{K_{m14r} + [\text{Butyraldehyde}]} \quad (21)$$

$$R15 = \frac{V_{m15}[\text{Butyraldehyde}][\text{Cell}]}{K_{m15} + [\text{Butyraldehyde}]} \quad (22)$$

$$R15r = \frac{V_{m15r}[\text{Butanol}][\text{Cell}]}{K_{m15r} + [\text{Butanol}]} \quad (23)$$

$$R16 = \frac{V_{m16}[\text{Butyryl-CoA}][\text{Cell}]}{K_{m16} + [\text{Butyryl-CoA}]} \quad (24)$$

$$R16r = \frac{V_{m16r}[\text{Butyryl-P}][\text{Cell}]}{K_{m16r} + [\text{Butyryl-P}]} \quad (25)$$

$$R17 = \frac{V_{m17}[\text{Butyryl-P}][\text{Cell}]}{K_{m17} + [\text{Butyryl-P}]} \quad (26)$$

$$R17r = \frac{V_{m17r}[\text{Butyrate}][\text{Cell}]}{K_{m17r} + [\text{Butyrate}]} \quad (27)$$

$$R18 = V_{m18} \left(\frac{1}{1 + (K_{m18A}/[\text{Butyrate}])} \right) \times \left(\frac{1}{1 + (K_{m18A}/[\text{Acetoacetyl-CoA}])} \right) [\text{Cell}] \quad (28)$$

$$Rg = \frac{V_{m,g}[\text{Acetyl-CoA}][\text{Cell}]}{K_{m,g}(1 + [\text{Butanol}]/K_g) + [[\text{Acetyl-CoA}]](1 + [\text{Butanol}]/K_g)} \quad (29)$$

$$Rd = k_d[\text{Cell}] \quad (30)$$

이상과 같은 효소반응속도식들로 대사산물의 농도 및 클로스트리듐의 양을 예측하기 위해선 각각의 대사산물들에 대한 물질수지식을 정의해야 한다. 각 대사산물과 클로스트리듐의 생성과 소멸에 대한 항으로 표현되는 물질수지식들은 다음과 같이 표현된다.

$$\frac{d[\text{Glucose}]}{dt} = -RI \quad (31)$$

$$\frac{d[\text{Pyruvate}]}{dt} = R1 - R2 - R11 \quad (32)$$

$$\frac{d[\text{Acetyl-CoA}]}{dt} = R2 + R3r + R5r + R7r + R10 - R3 - R5 - R7 - R9 \quad (33)$$

$$\frac{d[\text{Acetoacetyl-CoA}]}{dt} = R3 + R4r - R3r - R4 - R12 \quad (34)$$

$$\frac{d[\text{Butyryl-CoA}]}{dt} = R4 + R14r + R16r + R18 - R4r - R14 - R16 \quad (35)$$

$$\frac{d[\text{Acetaldehyde}]}{dt} = R5 + R6r + R11 - R5r - R6 \quad (36)$$

$$\frac{d[\text{Ethanol}]}{dt} = R6 + R19 - R16r \quad (37)$$

$$\frac{d[\text{Acetyl-P}]}{dt} = R7 + R8r - R7r - R8 \quad (38)$$

$$\frac{d[\text{Acetate}]}{dt} = R8 + R9 - R8r - R10 \quad (39)$$

$$\frac{d[\text{Cell}]}{dt} = Rg - Rd \quad (40)$$

$$\frac{d[\text{Acetoacetate}]}{dt} = R12 - R13 \quad (41)$$

$$\frac{d[\text{Acetone}]}{dt} = R13 \quad (42)$$

$$\frac{d[\text{Butyraldehyde}]}{dt} = R14 + R15r - R14r - R15r \quad (43)$$

$$\frac{d[\text{Butanol}]}{dt} = R15 + R21 - R15r \quad (44)$$

$$\frac{d[\text{Butyryl-P}]}{dt} = R16 + R17r - R16r - R17 \quad (45)$$

$$\frac{d[\text{Butyrate}]}{dt} = R17 - R17r - R18 \quad (46)$$

이상의 모든 대사반응과 관련된 모델 식들은 MATLAB 2010a의 상미분 함수 solver를 이용하여 계산되었다. 그리고 이 모델 식들의 반응속도상수들은 앞서 언급한 두 종류의 클로스트리듐을 배양한 실험의 데이터를 통해서 결정되었다.

3-3. 반응속도상수 결정방법

이전 장에서 표시된 모든 반응속도상수들은 클로스트리듐 배양 실험의 데이터를 기준으로 결정되었다. 각 실험에 대한 글루코스, 아세트론, 에탄올, 부탄올, 아세트산과 부티르산의 초기 농도는 Table 1과 같다. Table 1은 *Clostridium acetobutylicum* ATCC824를 사용한 실험에서의 조건이고 Table 2는 acetyl-CoA-to-acetyl-P의 반응과 관련된 유전자 삭제된 클로스트리듐을 사용한 실험에서의 조건이다. 그리고 이외의 다른 대사산물들(클로스트리듐 내부)의 초기 농도는 0.001 g/L로 가정하였다.

앞선 장에서 보여진 반응속도식들의 반응속도상수들을 결정하기 위해서는 실험결과값과 모델의 예측값을 최소화하는 최적화 기법의 적용이 필요하다. 따라서, 3.2장에서 기술된 각 대사산물의 물질수지식을 통해서 계산된 결과값과 발효 실험결과값의 차이를 최소화하는 반응속도상수의 결정은 아래의 목적함수를 푸는 것으로 결정할 수 있다. 목적함수는 식 (47)와 같이 실험결과와 모델 예측값의 차의 제곱을 모두 합한 형태로 설정되었다. 반응속도상수의 결정을 위한 제한 조건은 Shinto의 논문을 참고하여 upper bound를 설정하였다[6,7].

$$\min: f(K) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M (C_{i,j,experiment} - C_{i,j,prediction})^2 \quad (47)$$

우, 그 점에서부터 deterministic 최적화 기법의 적용으로 수렴성을 향상시킬 수 있다. 즉, 유전 알고리즘은 global optimum을 구하기 위해서 초기값에 민감한 영향을 받는 deterministic 최적화 기법보다 먼저 사용되어 최적값에 가능한 근접하는 역할을 담당하고 이 후에 deterministic 최적화 기법을 적용하여 수렴성을 향상시킬 수 있는 것이다. 본 논문에서는, deterministic 최적화 기법으로서 LMA가 사용된 것이다. 이러한 두 개의 최적화 기법을 연계한 최적화 방법론은 Fig. 2로 보여진다.

이러한 최적화 기법은 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824와 유전자 조작으로 특정 대사경로가 삭제된 클로스트리듐을 Table 1과 2와 같은 조건 하에 수행된 실험 데이터를 이용하여 식 (47)의 값을 최소화하는 대사반응속도상수를 결정하였다.

4. 결 과

대사망의 효소반응들의 속도상수를 결정하기 위해서 총 3개의 실험이 수행되었다. 먼저, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824을 이용한 배양실험에서 초기 글루코스의 농도를 다르게 한 두 개의 실험이

수행되었다. 그리고 두 개의 실험이 수행된 후, 클로스트리듐의 유전자 조작을 통해 acetyl-CoA-to-acetyl-P 대사반응을 막은 *Clostridium acetobutylicum*을 이용한 실험이 수행되었다. 이 실험을 통해서 얻어진 실험데이터에 제안된 최적화기법을 이용하여 최적 반응속도상수들을 결정할 수 있었다. Fig. 3과 4는 결정된 대사반응들의 반응속도상수를 적용하여 시간에 따라 변하는 대사산물의 농도를 모델로 예측한 값과 실험값의 비교를 보여준다. 주요 대사산물인 아세톤, 부탄올 그리고 에탄올의 농도와 미생물의 영양분인 글루코스의 농도를 실험으로 측정된 값과 모델로 예측한 값이 비교되었다. 24시간에 걸친 실험데이터와 모델로 예측된 값을 비교해보면 대사산물의 농도 변화의 경향성이 매우 우수한 정확도로 예측된 것을 확인할 수 있다. Fig. 3과 4를 보면, 대사망 모델에 의한 예측 값이 실험 데이터와 매우 유사하므로, 새로운 경로가 제안된 대사망과 그것의 수학적 모델이 유효하다고 판단된다. 그리고 모델에 의한 예측 값의 정확도 측면에서, 최적 대사반응속도상수들을 결정하기 위하여 제안된 최적화 방법이 복잡한 반응망의 반응속도상수들의 동시 추정에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

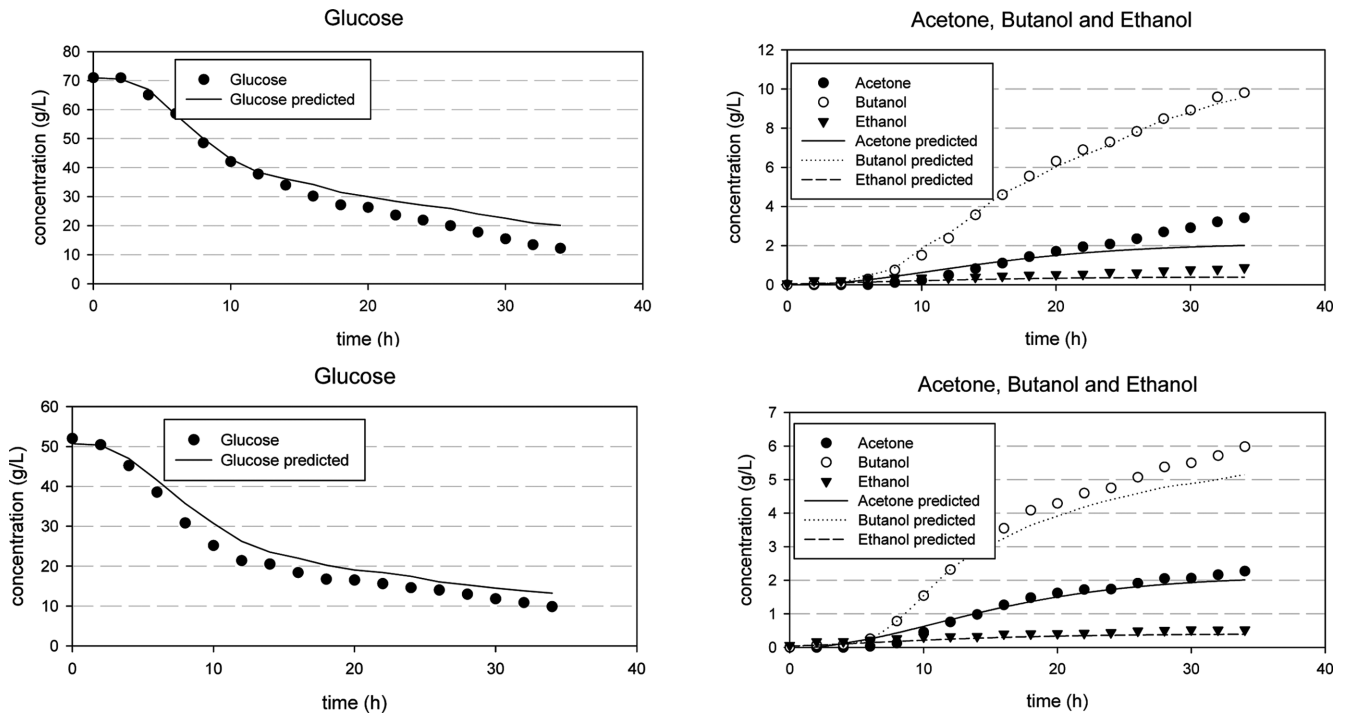


Fig. 3. Comparison between the experimental data using *C. acetobutylicum* ATCC 824 and the predicted concentrations of the glucose and the major metabolites (Top charts: Experiment 1, Bottom charts: Experiment 2).

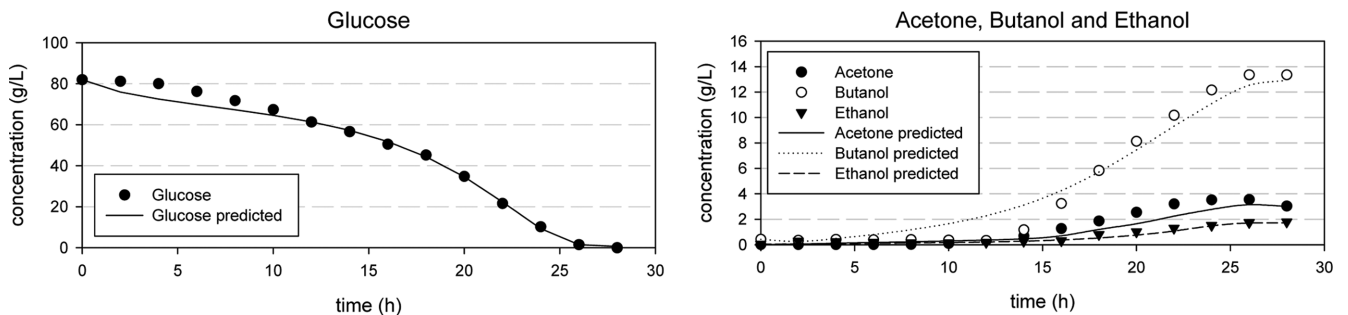


Fig. 4. Comparison between the experimental data using the clostridium, where the acetyl-CoA-to-acetyl-P pathway is deleted, and the predicted concentrations of the glucose and the major metabolites.

5. 결 론

본 논문에서는, 아세톤, 부탄올, 에탄올의 발효공정에 사용되는 클로스트리듐의 대사망의 동적 모델이 개발되었다. 대사망을 구성하는 효소반응들의 반응속도상수들을 결정하기 위하여, 먼저 알려진 *C. acetobutylicum* ATCC 824의 대사망에 새로운 대사반응을 추가하여 대사망을 수정하였다. 이러한 대사망이 포함한 대사반응들의 반응속도상수의 결정을 위해, 초기 글루코스 농도의 변화와 유전자 조작을 통해 acetyl-CoA-to-acetyl-P 대사반응이 삭제된 클로스트리듐을 이용한 배양실험을 통해 얻어진 실험데이터를 사용하였다. 결정된 속도상수들을 사용한 수정된 대사망의 모델이 예측한 대사산물의 농도가 실험값과 매우 유사하여 이 모델의 신뢰도가 우수한 것으로 판단된다. 또한, 최적화 방법론의 관점에서, 본 연구에서 사용된 GA와 LMA를 결합한 효율적인 최적화 기법은 30개에 이르는 대사망을 구성하는 모든 대사반응들이 포함하고 있는 총 58개의 반응속도상수들을 효과적으로 결정하였다. 따라서, 본 논문을 통해 제안된 대사망의 동적모델은 아세톤, 부탄올 그리고 에탄올 생산을 위한 발효공정의 설계에 크게 기여할 수 있을 것이고 사용된 최적화 기법은 이러한 복잡한 클로스트리듐의 대사망 모델의 개발에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 2012년도 지식경제부의 재원으로 한국에너지 기술평가원(KETEP)의 지원을 받아 수행한 연구 과제(No. 2010201010094C)입니다.

참고문헌

1. Lee, T. M., Ishizaki, A., Yoshino, S. and Furukawa, K., "Production of Acetone, Butanol and Ethanol from Palm Oil Mill Effluent Using *C. Saccharoperbutylacetonicum* N1-4," *Biotechnol. Lett.*, **17**, 649-654(1995).
2. Lopez-Contreras, A. M., Claassen, P. A. M., Mooibroek, H. and De Vos, W. M., "Utilisation of Saccharides in Extruded Domestic Organic Waste by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for Production of Acetone," *Butanol and Ethanol. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 162-167(2000).
3. Madihah, M. S., Ariff, A. B., Khalil, M. S., Suraini, A. A. and Karim, M. I. A., "Anaerobic Fermentation of Gelatinized Sago Starch-derived Sugars to Acetone-1-butanol-ethanol Solvent by *Clostridium acetobutylicum*," *Folia Microbiol.*, **46**, 197-204(2001).
4. Qureshi, N., Meagher, M. M., Huang, J. and Hutkins, R. W., "Acetone Butanol Ethanol (ABE) Recovery by Pervaporation Using Silicalite-silicone Composite Membrane from Fed-batch Reactor of *Clostridium acetobutylicum*," *J. Membr. Sci.*, **187**, 93-102(2001).
5. Stephanopoulos, G. and Vallino, J. J., "Network Rigidity and Metabolic Engineering in Metabolite Overproduction," *Science*, **252**, 1675-1681(1991).
6. Shinto, H., Tashiro, Y., Yamashita, M., Kobayashi G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Kuriya, Y., Okamoto, M. and Sonomoto, K., "Kinetic Modeling and Sensitivity Analysis of Acetone-butanol-ethanol Production," *J. Biotechnol.*, **131**, 45-56(2007).
7. Shinto, H., Tashiro, Y., Kobayashi, G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Kuriya, Y., Okamoto, M. and Sonomoto, K., "Kinetic Study of

- Substrate Dependency for Higher Butanol Production in Acetone-butanol-ethanol Fermentation," *Process Biochem.*, **43**, 1452-1461(2008).
8. Dürre, P., "Fermentative Butanol Production Bulk Chemical and Biofuel," *Ann. NY Acad. Sci.*, **22**, 337-343(2008).
 9. Green, E. M., "Fermentative Production of 1-butanol-the Industrial Perspective," *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 337-343(2011).
 10. Jones, D. T. and Woods, D. R., "Acetone-1-butanol Fermentation Revisited," *Microbiological Reviews*, **50**, 484-524(1986).
 11. Milne, C. B., Eddy, J. A., Raju, R., Ardekani, S., Kim, P.-J., Senger, R. S., Jin, Y.-S., Blaschek, H. P. and Price, N. D., "Metabolic Network Reconstruction and Genomescale Model of Butanol-producing Strain *Clostridium Beijerinckii* NCIMB 8052," *BMC Systems Biology*, **5**, 130(2011).
 12. Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Carter, G. P. and Minton, N. P., "The Clostron: A Universal Gene Knock-out System for the Genus *Clostridium*," *Journal of Microbial Methods*, **70**, 452-464(2007).
 13. Desai, R. P., Harris, L. M., Welker, N. E. and Papoutsaki, E. T., "Metabolic Flux Analysis Elucidates the Importance of the Acid-formation Pathways in Regulating Solvent Production by *Clostridium acetobutylicum*," *Metabolic Engineering*, **26**, 1206-1213(1999).
 14. Lee, J., Yun, H., Feist, A. M., Palsson, B. and Lee, S. Y., "Genome-scale and in Silico Analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Metabolic Network," *Applied Microbial Biotechnology*, **80**, 849-862(2008).
 15. Borden, J. R. and Papoutsakis, E. T., "Dynamics of Genome-library Enrichment and Identification of Solvent Tolerance Genes For *Clostridium acetobutylicum*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 3061-3068(2007).
 16. Lee, J., Jang, Y., Choi, S. J., Im, J. A., Song, H., Cho, J. H., Seung, D. Y., Papoutsakis, E. T., Bennette, G. N. and Lee, S. Y., "Metabolic Engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for Isopropanol-butanol-ethanol Fermentation," *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 1416-1423(2012).
 17. Burdette, D. and Zeikus, J. G., "Purification of Acetaldehyde Dehydrogenase and Alcohol Dehydrogenases from Thermoanaerobacter Ethanolicus 39E and Characterization of the Secondary-alcohol Dehydrogenase (2° Adh) as a Bifunctional Alcohol Dehydrogenase-acetyl-CoA Reductive Thioesterase," *Biochemistry Journal*, **302**, 163-170(1994).
 18. Palosaari, N. R. and Rogers, P., "Purification and Properties of the Inducible Coenzyme A-linked Butyraldehyde Dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*," *J. Bacteriol.*, **170**, 2971-2976(1988).
 19. Lütke-Eversloh, T. and Bahl, H., "Metabolic Engineering of *Clostridium acetobutylicum*: Recent Advances to Improve Butanol Production," *Current Opinion in Biotechnology* (2011).
 20. Kim, W., Yun, C., Kim, Y., Park, J., Park, S., Jung, K. T., Lee, Y. H. and Kim, S., "Modeling of a Tubular Reactor Producing Epichlorohydrin with Consideration of Reaction Kinetics and Deactivation of Titanium Silicate-1 Catalyst," *Ind. Eng. Chem. Res.*, **50**, 1187-1195(2011).
 21. Goldberg, D. E., "Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning, 1st edition, Addison-Wesley Professional," Reading, Massachusetts, U.S.(1989).
 22. Holland, J. H., *Adaptation in Natural and Artificial Systems*, University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan, U.S.(1975).