

# *Clostridium ljungdahlii* 배양에서 배지 조성에 따른 균주 성장과 바이오에탄올 생산에 대한 영향

안보혜 · 박소은\* · 김영기<sup>†</sup>

한경대학교 화학공학과, \*한경대학교 해양과학기술연구원  
(2018년 3월 21일 접수, 2018년 4월 7일 심사, 2018년 4월 17일 채택)

## Effect of Medium Composition on Cell Growth and Bioethanol Production in *Clostridium ljungdahlii* Culture

Bohye Ahn, Soeun Park\*, and Young-Kee Kim<sup>†</sup>

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

\*Research Institute for Marine Science and Technology, Hankyong National University, Anseong, Gyeonggi-do 17579, Korea

(Received March 21, 2018; Revised April 7, 2018; Accepted April 17, 2018)

### 초 록

무기탄소원으로부터 에탄올을 생산하는 acetogenic 박테리아인 *Clostridium ljungdahlii* 발효공정에서 배양 배지 조성에 따른 영향을 분석하여 균주 성장과 에탄올 생산 향상을 시도하였다. 균주 성장 및 에탄올 생산에 영향을 줄 수 있는 배지 구성성분으로 yeast extract, fructose, NH<sub>4</sub>Cl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 선정하였다. Yeast extract 농도가 증가할수록 균주 성장과 에탄올 생산이 증가하였으며 에탄올 비생산성은 yeast extract 기본 배지 농도보다 낮은 0.05 g/L에서 가장 높았다. Fructose 농도가 증가할수록 균주 성장은 증가하였지만 5 g/L을 초과하는 fructose 투입은 에탄올 생산을 감소시켰다. Yeast extract 5 g/L인 조건에서 fructose 5 g/L와 넣었을 때 에탄올 생산농도가 0.297 g/L로 가장 높았으나, fructose를 넣지 않았을 때 매우 낮은 균주 농도로 인해 에탄올 비생산성은 0.281 g/g DCW로 높았다. NH<sub>4</sub>Cl은 균주 성장이나 에탄올 생산은 큰 차이를 보이지 않았으며 30 g/L 이상 과다 투입하면 성장저해가 나타났다. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>에 대해서는 농도가 증가할수록 균주 성장과 에탄올 생산이 모두 증가하였다. NH<sub>4</sub>Cl과 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 사용한 경우 에탄올 비생산성은 yeast extract를 적게 사용한 경우 크게 나타났다.

### Abstract

In this work, effect of the culture medium composition on the fermentation process of *Clostridium ljungdahlii*, which is acetogenic bacteria to product ethanol from synthesis gas, was examined to improve the microbial growth and ethanol production. Components of the culture medium such as yeast extract, fructose, NH<sub>4</sub>Cl, and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> were selected as influence factors for the cell growth and ethanol production. As the concentration of yeast extract increased, both of the cell growth and ethanol production increased. And the ethanol productivity was the highest at an yeast extract of 0.05 g/L, which is lower than that of base medium. As the concentration of fructose increased, the cell growth increased, but the ethanol production decreased when the concentration of fructose was higher than that of base medium (5 g/L). In an experiment with the yeast extract of 5 g/L, produced ethanol concentration was the highest (0.297 g/L) when fructose concentration was 5 g/L, however, the specific ethanol productivity was higher (0.281 g/g DCW) when the fructose was not added due to very low cell mass. The cell growth and ethanol production were not significantly influenced by NH<sub>4</sub>Cl concentration, however the growth inhibition was observed at a 30 g/L of NH<sub>4</sub>Cl. When the concentration of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> increased, both of the cell growth and ethanol production increased. In experiments with NH<sub>4</sub>Cl and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, specific ethanol productivities were higher when the low concentration of yeast extract was used.

**Keywords:** *Clostridium ljungdahlii*, acetogenic bacteria, bioethanol, medium composition

## 1. 서 론

화석 연료의 사용은 환경 문제와 자원 고갈을 초래하며, 이를 극복하고자 바이오 연료와 같은 지속 가능하고 재생 가능한 에너지의 개발이 활발히 이루어지고 있다[1]. 바이오 연료 중 에탄올 생산은 가장 오랜 기간 연구성과가 축적되어 실제 생산도 가장 활발히 이루어지고 있다. 옥수수, 사탕수수와 같은 농업 원료를 기반으로 하는 곡물계 바

<sup>†</sup> 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

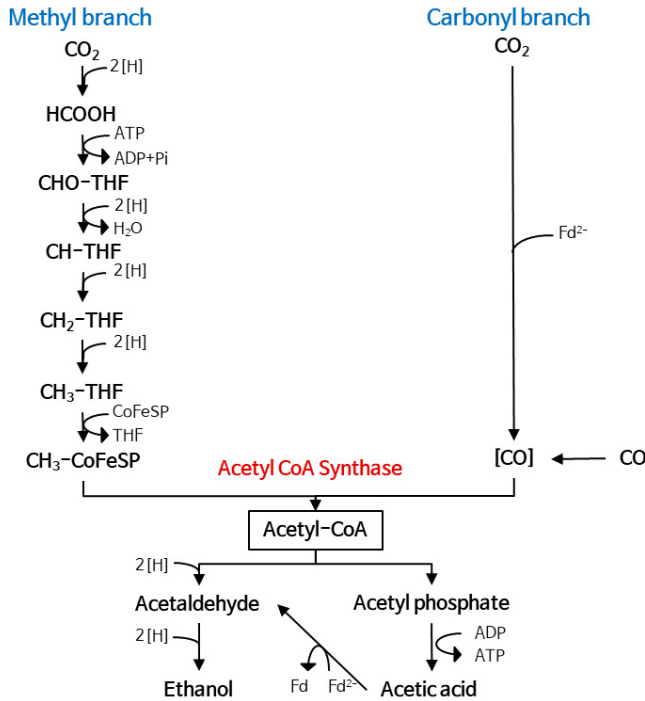
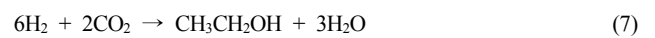
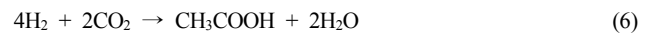
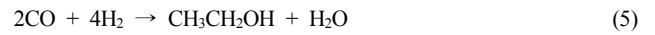
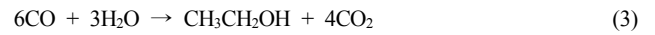
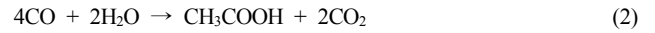


Figure 1. Scheme of Wood-Ljungdahl pathway.

이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산은 경제적이며 사용시 오염물질 배출이 적어 대기 오염을 줄일 수 있다는 장점이 있어 자원 고갈과 환경 오염에 대한 대책으로 상용화에 성공하였다[2]. 하지만 곡물계 바이오매스의 수확을 위해 큰 규모의 경작지가 필요하고 재배에 오랜 시간이 걸리며 식량 수급과 가격에 영향을 끼치는 단점이 있다. 이에 대한 대안으로 리그노셀룰로오스 등 목질계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산 방법이 제안되어 개발되어져 있다[3]. 리그노셀룰로오스 원료인 목초, 폐지, wood chip과 같은 목질계 바이오매스는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 리그닌으로 이루어져 있다[4].

리그노셀룰로오스는 바이오매스 중 셀룰로오스의 산 가수분해나 효소 분해로 인해 생성된 당의 발효에 의해 에탄올로 전환된다. 산 가수분해는 산을 이용하여 리그노셀룰로오스를 분해하며, 효소반응은 효소 cellulase와 xylanase에 의해 5탄당이나 6탄당으로 분해한다. 이들의 분해 과정에는 리그닌을 제거하는 전처리 과정이 필요하여 공정이 복잡해지고 이에 따라 전체공정의 경제성을 악화시키는 문제가 있다. 산 가수분해나 효소 반응과는 달리 gasification은 리그닌을 비롯한 모든 바이오매스 성분을 합성 가스(synthesis gas)로 전환시킬 수 있으며, 주로 CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> 및 N<sub>2</sub>로 구성된 합성가스를 이용할 수 있는 능력을 가지는 박테리아에 의해 발효되어 에탄올 등 바이오연료로 전환 가능하다[5,6]. *Clostridium ljungdahlii*와 같은 acetogenic 박테리아는 혐기 조건에서 Wood-ljungdahl pathway를 통하여 에탄올과 아세트산 등의 유용산물을 생산할 수 있다(Figure 1)[7].

합성가스 중 CO는 acetogenic 박테리아의 주 탄소원으로 사용되고, 수소는 전자공여체(electron donor)로 사용된다. Acetogenic 박테리아는 acetyl-CoA를 생성하며, 이 acetyl-CoA가 에탄올과 아세트산으로 전환된다[8]. 생산된 아세트산은 아세트알데하이드를 거쳐 에탄올로 다시 전환될 수 있다[9]. 이러한 일련의 과정에서 일어나는 반응식은 식 (1)-(7)과 같다[10].



Gasification을 이용한 바이오매스의 합성가스로의 전환과 생물 촉매를 이용한 바이오 에탄올 생산은 최근 10여 년간 연구가 본격화되고 있다. 하지만, acetogenic 박테리아의 느린 성장 속도, 이에 따른 낮은 에탄올 생산성은 실용적인 공정의 개발을 위한 걸림돌이 되고 있다. 이러한 문제 해결을 위해 배지조성과 반응기 설계 최적화 등의 연구가 요구되고 있다[11]. 본 연구에서는 합성가스의 생물학적 전환을 위한 생체 촉매로 acetogenic 박테리아인 *C. ljungdahlii* 균주를 사용하여, 배양 배지의 조성에 따른 미생물 성장과 에탄올 생산에 대한 영향을 확인하였다. 배지 성분 중 yeast extract, fructose, NH<sub>4</sub>Cl, 그리고 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도의 변화에 따른 균주의 성장과 에탄올, 아세트산 생산에 미치는 영향을 고찰하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험 재료 및 배양 배지

실험에 사용된 미생물은 *Clostridium ljungdahlii* PETC (55383)를 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하여 사용하였다. 균주 배양을 위한 기본배지는 다음과 같은 조성으로 이루어져 있다. 기본배지는 NH<sub>4</sub>Cl 1.0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.33 g/L, MgCl<sub>2</sub> 0.52 g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, KCl 0.33 g/L, NaCl 1.0 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 1.0 g/L, yeast extract 0.5 g/L, resazurin 0.001 g/L, L-cysteine · HCl 0.5 g/L, Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, fructose 4 g/L, 1 M phosphate buffer solution 10 mL/L, trace element solution 10mL/L, vitamin solution 1 mL/L로 구성되며 trace element solution은 nitrilotriacetic acid 1.5 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 3.0 g/L, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, NaCl 1.0 g/L, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, CoSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.18 g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.10 g/L, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.18 g/L, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O 0.02 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01 g/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.03 g/L, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.0003 g/L, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.0004 g/L, vitamin solution은 biotin 20 mL/L, folic acid 20 mg/L, pyridoxine · HCl 100 mg/L, thiamine · HCl 50 mg/L, riboflavin 50 mg/L, nicotinic acid 50 mg/L, D-Ca-pantothenate 50 mg/L, p-aminobenzoic acid 50 mg/L, vitamin B12 10 mg/L, lipoic acid 50 mg/L로 이루어져 있다. 실험에 사용된 합성가스는 MS 동민가스(Gyeonggi-Do, Korea)에서 주문 제조하여 공급되었으며 20 vol% CO, 20 vol% CO<sub>2</sub>, 10 vol% H<sub>2</sub>, 50 vol% N<sub>2</sub>의 조성으로 구성되어있다.

Table 1. Ethanol and Acetic Acid Production Change by Adding Yeast Extract in *C. ljungdahlii* Culture

Yeast extract conc. (g/L)	EtOH conc. (g/L)	Acetic acid conc. (g/L)	EtOH/Acetic acid ratio	EtOH productivity (g/g DCW)
0	0.001	0.074	0.007	0.014
0.05	0.036	0.219	0.164	1.143
0.5	0.296	0.415	0.715	0.607
5	0.370	0.464	0.797	0.409
10	0.394	0.580	0.679	0.315
50	0.587	1.422	0.413	0.271

## 2.2. 실험 방법

### 2.2.1. 배지 조성 변화 배양 실험

250 mL 미디어병에 75 mL의 배양 배지를 넣은 후 특수 제작된 마개의 inlet에 N<sub>2</sub>를 3~5 min 동안 주입하여 배지 안의 산소를 제거하였다. 전 배양된 미생물 배양액을 배지의 10 vol% 접종하였고 균주가 접종된 배지에 합성가스를 5~7 min 동안 주입하였다. 이때 미디어병 내의 압력은 대기압보다 약간 높은 120 kPa 내외로 유지하였다. 균주는 shaking incubator에서 배양 온도 37 °C, 200 rpm의 교반 조건에서 배양하였다. 분석을 위한 시료 채취는 마개의 outlet에 주사기를 이용하여 수행하였다. 배지 조성에 대한 영향을 분석하기 위한 성분으로는 yeast extract, fructose, NH<sub>4</sub>Cl 그리고 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 총 4가지를 사용하였다. 이 성분들이 균주 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 기본 배지에서 해당 영향인자의 조성을 달리하여 실험을 진행하였다. 기본 배지에서 농도가 0.5 g/L인 yeast extract는 기존 농도보다 높거나 낮은 0, 0.05, 0.5, 5, 10, 50 g/L의 6가지 농도에서 실험을 진행하였다. Fructose, NH<sub>4</sub>Cl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 영향은 yeast extract 0.5, 5 g/L의 두 농도에서 각 인자의 농도에 대하여 실험을 진행하였다. Fructose는 0, 5, 10, 15 g/L의 농도에서, NH<sub>4</sub>Cl은 1.0, 10, 30 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 0.33, 3.3, 33 g/L의 농도에서 실험을 수행하였다.

### 2.2.2. 분석 방법

미생물의 건조질량은 UV-vis 분광광도계(Optizen POP, Mecasys Co., Korea)를 이용하여 600 nm에서 optical density를 측정하였다. 측정된 optical density는 검량곡선에 의해 dry cell weight으로 변환되었다. 배양 배지에서 에탄올과 아세트산의 농도는 high performance liquid chromatograph (LC-20AT, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 측정하였으며, 컬럼은 Aminex HPX-87H column (300, 7.8 mm; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)를 사용하며 온도는 60 °C로 유지하였다. 이동상인 5 mM 황산 용액을 0.6 mL/min의 유량으로 설정하여 RI detector로 에탄올과 아세트산 농도를 분석하였다. 배양액을 원심 분리하여 균주와 액상을 분리한 후, 상층액은 pore size 0.45 µm인 syringe filter (6784-1304, Whatman, Germany)를 사용하여 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다[12].

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Yeast extract 농도가 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향

Yeast extract의 농도 변화가 *C. ljungdahlii*의 성장에 미치는 영향을 분석한 결과를 Figure 2에 나타내었다. 기본 배양 배지에서 yeast extract의 농도는 0.5 g/L이며, 이보다 낮은 0 또는 0.05 g/L의 yeast extract를 첨가한 경우 균주 성장은 거의 이루어지지 않았다. Yeast ex-

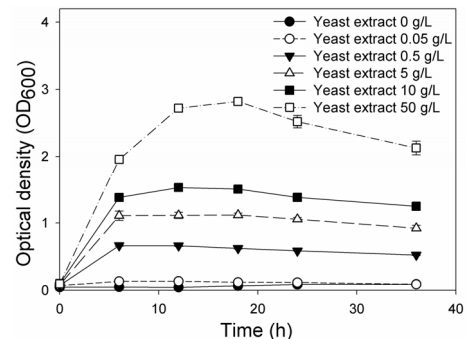


Figure 2. Growth curve in *C. ljungdahlii* culture according to yeast extract concentration.

tract 농도를 기본 배지농도인 0.5 g/L에서 5, 10, 50 g/L까지 증가시킬수록 균주의 OD는 최대 0.66, 1.12, 1.53, 2.82로 증가하였다. 50 g/L 이상의 yeast extract 첨가는 경제성 있는 배양공정을 위한 배지 제조에 부적합하여 실험하지 않았다. Clostridium 속 균주 배양에서 yeast extract 농도에 대한 영향을 평가하는 연구가 보고된 바 있으며, 이를 통해 yeast extract가 균주 성장과 에탄올 생산에 영향을 끼친다는 사실이 알려져 있다[13]. 이 연구에서는 배지 내 yeast extract 농도를 0.5, 1, 2 g/L로 달리하며 실험한 실험에서 균주의 건조질량이 각각 0.20, 0.21, 0.28 g/L로 증가하는 것을 관찰하였다. 또한, yeast extract 농도가 증가할수록 생산된 에탄올 농도는 1.05, 0.85, 0.40 g/L로 감소하였으며, 아세트산 농도는 3.20, 4.00, 4.90 g/L로 증가하였다. 본 연구에서는 yeast extract의 농도 범위를 기존 연구에 비해 더 크게 하여 실험을 수행하였다.

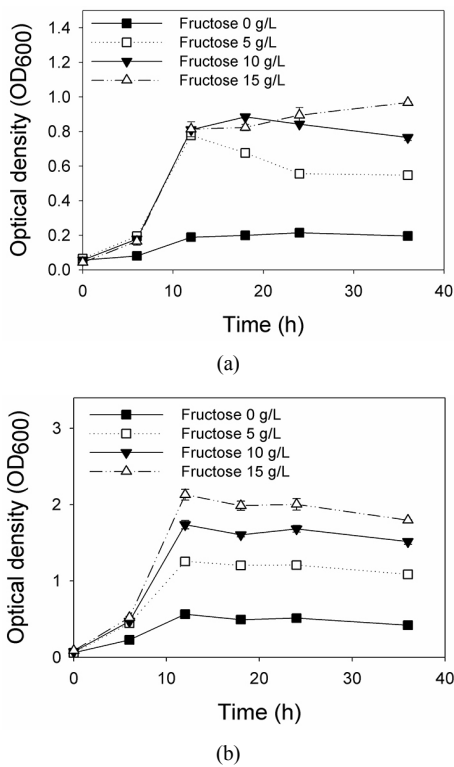
Table 1에서는 yeast extract의 농도 변화에 따른 *C. ljungdahlii* 배양 과정에서 36 h 경과 후 에탄올과 아세트산 생산농도를 나타내고 있다. 배지 내 yeast extract의 농도가 높아질수록 에탄올과 아세트산의 생산 농도는 모두 증가한다. 에탄올의 농도는 yeast extract를 첨가하지 않았을 때 거의 생산되지 않았고, yeast extract의 농도가 0.05에서 50 g/L로 증가할수록 0.036에서 0.587 g/L로 증가하였다. 하지만, 에탄올/아세트산 비율은 yeast extract의 농도가 5 g/L일 때까지 0.797로 증가하다가 그 이상의 농도에서는 감소한다. 균주 건조질량당 에탄올 비생산성을 비교하였을 때, yeast extract 5 g/L에서 최대인 1.143 g/g DCW를 얻었고, 그 이상의 yeast extract 첨가농도 증가는 에탄올 생산성을 오히려 감소시켰다.

### 3.2. Fructose 농도가 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향

Figure 3에는 fructose의 농도 변화가 *C. ljungdahlii* 균주 성장에 미치는 영향을 나타내었다. 기본 배지 조성인 yeast extract 0.5 g/L를 사

**Table 2. Ethanol and Acetic Acid Production Change by Adding Fructose in *C. ljungdahliae* Culture at Different Yeast Extract Concentration**

	Initial fructose (g/L)	EtOH conc. (g/L)	Acetic acid conc. (g/L)	EtOH/Acetic acid ratio	EtOH productivity (g/g DCW)
Yeast extract 0.5 g/L	0	0.032	0.058	0.558	0.223
	5	0.144	0.250	0.577	0.281
	10	0.093	0.886	0.105	0.125
	15	0.064	1.270	0.050	0.067
Yeast extract 5 g/L	0	0.107	0.212	0.504	0.281
	5	0.297	0.367	0.809	0.275
	10	0.135	0.915	0.148	0.088
	15	0.191	1.440	0.133	0.105



**Figure 3. Growth curve in *C. ljungdahliae* culture with yeast extract concentration of (a) 0.5 g/L and (b) 5 g/L according to fructose concentration.**

용한 실험에서는 배지 내 fructose의 농도를 5, 10, 15 g/L로 증가시키도 균주 농도를 나타내는 OD가 12 h에서 0.8 내외로 비슷한 성장을 보였다(Figure 3(a)). 이는 유기탄소원인 fructose를 추가하더라도 기본 배지에서는 균주의 추가 성장이 이루어지지 못하는 것을 나타내며, 이를 극복하기 위한 다양한 시도를 통하여 yeast extract를 추가 공급하여 대사과정의 환원력 부족을 해소할 경우 추가적인 성장이 가능함을 보였다. Figure 3(b)는 yeast extract를 기본 배지 조성의 10배인 5 g/L를 사용한 실험의 결과이며, fructose 농도를 0, 5, 10, 15 g/L로 증가시키기에 따라 12 h에서의 OD가 0.56, 1.26, 1.74, 2.13으로 지속적으로 증가하는 것을 확인하였다.

Yeast extract 농도와 fructose 농도를 달리하였을 경우 *C. ljungdahliae*의 배양에서 에탄올과 아세트산 생산농도(36 h에서)를 Table 2에 비교

하였다. Yeast extract 농도가 0.5 g/L일 때 생산된 에탄올 농도와 비생산성, 그리고 에탄올/아세트산 비율은 fructose 5 g/L를 넣었을 때 가장 높았다. Yeast extract 농도가 5 g/L일 때에 생산된 에탄올 농도와 에탄올/아세트산 비율은 fructose 5 g/L를 넣었을 때 가장 높았으며, 에탄올 비생산성은 fructose를 사용하지 않았을 때 가장 높았다. 결과적으로 yeast extract 추가에 의해 충분한 환원력이 공급된다는 가정하에서 fructose 농도의 증가는 에탄올 생산농도 증가로 이어지지만, 에탄올 비생산성과 에탄올/아세트산 생산 비율은 유기탄소원인 fructose를 적게 사용할 때 높아진다고 볼 수 있다.

**3.3. NH<sub>4</sub>Cl 농도가 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향**

배양 배지 내 NH<sub>4</sub>Cl의 농도 변화에 따른 *C. ljungdahliae* 균주 성장과 에탄올, 아세트산의 생산에 미치는 영향을 분석하였다. 기본 배양 배지에 NH<sub>4</sub>Cl의 농도를 1, 10, 30 g/L로 달리하였을 때 균주의 성장 특성을 살펴보면(Figure 4(a)), NH<sub>4</sub>Cl의 농도가 1 또는 10 g/L일 때 균주 성장 특성은 거의 같았다. 하지만, NH<sub>4</sub>Cl의 농도를 30 g/L로 사용한 경우에는 성장 저해현상이 관찰되었다. 배지 내 yeast extract의 농도를 5 g/L로 증가시킨 상태에서 NH<sub>4</sub>Cl의 농도를 1, 10, 30 g/L로 달리하며 균주 성장 특성을 분석한 결과(Figure 4(b)), yeast extract 농도에 관계없이 1, 10 g/L의 NH<sub>4</sub>Cl 농도에서는 동일한 성장 특성을 보이고, 30 g/L의 농도에서는 성장저해현상이 관찰되었다. NH<sub>4</sub>Cl의 농도를 달리하며 에탄올과 아세트산 생산성을 36 h 배양 후 비교하였을 때 (Table 3), NH<sub>4</sub>Cl 농도에 따른 에탄올과 아세트산의 생산농도에는 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. 다만, yeast extract의 농도가 0.5 g/L인 기본배지를 이용한 실험에서 얻어진 균주농도가 yeast extract를 5 g/L 사용한 실험에 비해 매우 낮으므로 에탄올 비생산성은 기본배지에서의 배양에서 2배 이상의 수치를 보였다.

**3.4. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 농도가 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향**

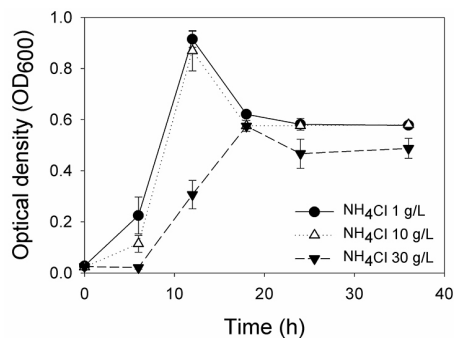
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 배양공정의 발효 중에서 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 함께 pH를 유지하는 완충작용을 한다. 발효공정에서 지수성장기에 생성되는 유기산에 의해 pH가 떨어지게 되는데, 이를 완화시킬 수 있다. 완충 작용이 충분하지 않은 발효 배지는 유기산의 과도한 축적으로 미생물 성장이나 에탄올 생산에 해롭다[14,15]. 배양 배지 내 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도 변화가 *C. ljungdahliae* 균주 성장과 에탄올, 아세트산의 생산에 미치는 영향을 분석하였다. 기본 배양 배지에 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도를 0.33, 3.3, 10 g/L로 달리하였을 때 균주의 성장 특성을 살펴보면(Figure 5(a)), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도 증가에 따라 균주 성장이 비례하여 향상되는 현상이 관찰되었다. 기본 배양 배지보다 10배의 yeast extract 농도인 5 g/L을 적용한 실험

Table 3. Ethanol and Acetic Acid Production Change by Adding NH<sub>4</sub>Cl in *C. ljungdahlii* Culture at Different Yeast Extract Concentration

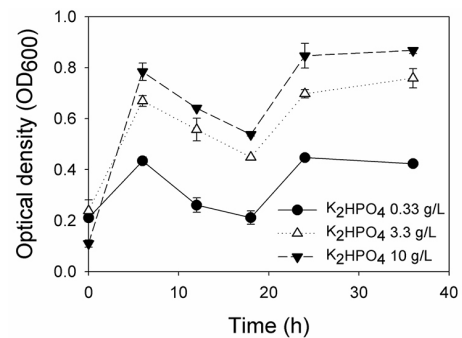
	NH <sub>4</sub> Cl conc. (g/L)	EtOH conc. (g/L)	Acetic acid conc. (g/L)	EtOH/Acetic acid ratio	EtOH productivity (g/g DCW)
Yeast extract 0.5 g/L	1	0.234	0.410	0.570	0.428
	10	0.273	0.373	0.732	0.499
	30	0.238	0.335	0.709	0.527
Yeast extract 5 g/L	1	0.261	0.392	0.667	0.187
	10	0.241	0.433	0.557	0.181
	30	0.258	0.352	0.733	0.274

Table 4. Ethanol and Acetic Acid Production Change by Adding K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in *C. ljungdahlii* Culture at Different Yeast Extract Concentration

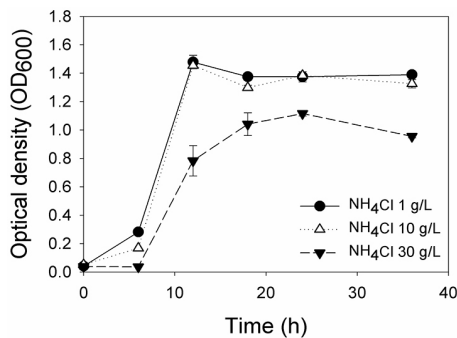
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> conc. (g/L)	EtOH conc. (g/L)	Acetic acid conc. (g/L)	EtOH/Acetic acid ratio	EtOH productivity (g/g DCW)
Yeast extract 0.5 g/L	0.33	0.219	0.182	1.203	0.572
	3.3	0.365	0.229	1.597	0.497
	10	0.381	0.357	1.066	0.448
Yeast extract 5 g/L	0.33	0.204	0.278	0.732	0.152
	3.3	0.286	0.457	0.625	0.168
	10	0.484	0.526	0.920	0.218



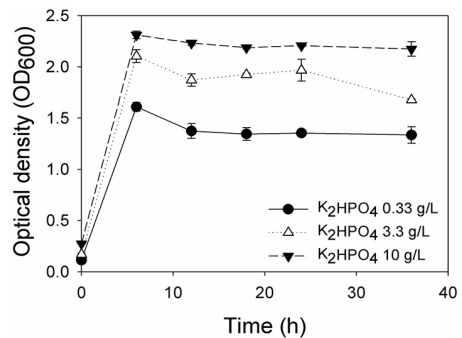
(a)



(a)



(b)



(b)

Figure 4. Growth curve in *C. ljungdahlii* culture with yeast extract concentration of (a) 0.5 g/L and (b) 5 g/L according to NH<sub>4</sub>Cl concentration.Figure 5. Growth curve in *C. ljungdahlii* culture with yeast extract concentration of (a) 0.5 g/L and (b) 5 g/L according to K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> concentration.

결과도 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 농도에 비례한 균주 성장 향상 특성을 보였으며, 같은 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 농도에서 yeast extract 농도를 0.5 g/L에서 5 g/L로 증가시키면 36 h 배양 후 균주 농도는 약 3배의 증가를 보였다(Figure 5(b)).

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도를 달리하며 에탄올과 아세트산 생산성을 36 h 배양 후 비교하였을 때(Table 4), yeast extract의 농도가 0.5 또는 5 g/L인 경우 모두에서, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도가 증가할수록 에탄올과 아세트산 생

산은 증가하였다. 또한, 같은  $K_2HPO_4$  농도에서는 yeast extract 농도에 따른 에탄올 생산 농도의 의미있는 차이가 관찰되지 않았지만, 아세트산 생산농도는 크게 증가하였다. 따라서 yeast extract를 0.5 g/L로 적게 쓴 경우가 낮은 균주 농도로 인하여 에탄올 비생산성은 높게 나오며, 아세트산의 생산량이 상대적으로 적어 에탄올/아세트산 생산비도 높게 나타난다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>로 구성된 합성가스로부터 에탄올을 생산할 수 있는 acetogenic bacteria인 *C. ljungdahlii* 배양에서 균주 성장 및 에탄올 생산성에 대한 배지 조성의 영향을 확인하였다. Yeast extract의 농도가 증가할수록 균주 성장은 향상되지만, 에탄올 비생산성은 yeast extract 0.05 g/L을 사용했을 때 가장 높게 나타났다. 유기탄소원인 fructose 농도가 증가할수록 균주 성장과 아세트산 생산이 증가하지만, 에탄올 생산 농도는 fructose 농도 5 g/L를 초과하면 감소하는 것으로 나타났으며, fructose를 사용하지 않았을 때 에탄올 비생산성이 가장 높게 나타났다. NH<sub>4</sub>Cl의 농도 변화에 대해서는 기본 배지의 30배인 30 g/L를 사용한 경우 성장 저해현상이 관찰되었으며 에탄올과 아세트산 생산농도에는 큰 차이가 관찰되지 않았다.  $K_2HPO_4$  농도를 증가시키면 균주성장이 향상되는 결과를 보였으며, 에탄올 생산에 대한 영향은 크지 않고 아세트산은 의미 있는 생산농도 향상을 보였다. 본 연구의 결과를 종합적으로 검토하면 yeast extract, fructose,  $K_2HPO_4$  농도 향상은 균주 성장 향상을 유도할 수 있었다. 하지만, 균주 성장 향상이 에탄올 생산농도, 특히 에탄올 비생산성의 향상으로 연결되지는 못하는 결과를 보였다. 이로부터 균주 배양을 위한 최적 배지 조건과 에탄올 생산을 위한 최적 배양조건이 다름을 확인할 수 있었으며, 성장과 생산을 위한 각각의 최적화된 배양이 공정의 생산성 향상에 유용할 것으로 판단된다.

#### 감 사

이 논문은 과학기술정보통신부의 재원으로 C1 가스 리파이너리 사업단의 지원(NRF-2018M3D3A1A01017994)과 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원(NRF-2018R1D1A1B07043323)을 받아 수행한 연구입니다.

#### References

1. B. Molitor, H. Richter, M. E. Martin, R. O. Jensen, A. Juminaga, C. Mihalcea, and L. T. Angenent, Carbon recovery by fermentation of CO-rich off gases - Turning steel mills into biorefineries, *Bioresour. Technol.*, **215**, 386-396 (2016).
2. B. D. Yaccobucci, Fuel ethanol: Background and public policy issues, *CRS Report for Congress.*, **RL33290**, 1-23 (2007).
3. P. Maddipati, H. K. Atiyeh, D. D. Bellmer, and R. L. Huhnke, Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract, *Bioresour. Technol.*, **102**(11), 6494-6501 (2011).
4. Y. Sun and J. Cheng, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review, *Bioresour. Technol.*, **83**(1), 1-11 (2002).
5. S. Rajagopalan, R. P. Datar, and R. S. Lewis, Formation of ethanol from carbon monoxide via a new microbial catalyst, *Biomass Bioenergy*, **23**, 487-493 (2002).
6. E. Natarajan, A. Nordin, and A. N. Rao, Overview of combustion and gasification of rice husk in fluidized bed reactors, *Biomass Bioenergy*, **14**(5-6), 533-546 (1998).
7. F. R. Bengelsdorf, M. Straub, and P. Dürre, Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation, *Environ. Technol.*, **34**, 1639-1651 (2013).
8. D. K. Kundiyana, M. R. Wilkins, P. Maddipati, and R. L. Huhnke, Effect of temperature, pH and buffer presence on ethanol production from synthesis gas by "*Clostridium ragsdalei*", *Bioresour. Technol.*, **102**(10), 5794-5799 (2011).
9. M. E. Martin, H. Richter, S. Saha, and L. T. Angenent, Traits of selected *Clostridium* strains for syngas fermentation to ethanol, *Biotechnol. Bioeng.*, **113**(3), 531-539 (2016).
10. S. Esquivel-Elizondo, A. G. Delgado, B. E. Rittmann, and R. Krajmalnik-Brown, The effects of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> on CO metabolism by pure and mixed microbial cultures, *Biotechnol. Biofuels*, **220**(10), 1-13 (2017).
11. Y.-K. Kim, S. E. Park, H. Lee, and J. Y. Yun, Enhancement of bioethanol production in syngas fermentation with *Clostridium ljungdahlii* using nanoparticles, *Bioresour. Technol.*, **159**, 446-450 (2014).
12. Y.-K. Kim and H. Lee, Use of magnetic nanoparticles to enhance bioethanol production in syngas fermentation, *Bioresour. Technol.*, **204**, 139-144 (2016).
13. 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).
14. N. K. Al-Shorgani, A. A. Hamid, W. M. W. Yusoff, and M. S. Kalil, Pre-optimization of medium for biobutanol production by a new isolate of solvent-producing *Clostridium*, *Bioresour.*, **8**(1), 1420-1430 (2013).
15. C. Richmond, B. Han, and T. C. Ezeji, Stimulatory effects of calcium carbonate on butanol production by solventogenic *Clostridium* species, *Cont. J. Microbiol.*, **5**(1), 18-28 (2011).