

# CO 내성을 갖는 *Clostridium* sp. AWRP 돌연변이주의 분리 및 이를 이용한 합성가스로부터의 에탄올 생산 연구

권수재<sup>1,2†</sup>, 이종민<sup>1†</sup>, 이현숙<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>한국해양과학기술원 해양생명공학연구센터

<sup>2</sup>과학기술연합대학원대학교 한국해양과학기술원 스쿨

Received: June 10, 2019 / Revised: July 10, 2019 / Accepted: July 12, 2019

## Enhanced Alcohol Production from Synthesis Gas Using a CO-resistant Mutant of *Clostridium* sp. AWRP

Soo Jae Kwon<sup>1,2†</sup>, Jongmin Lee<sup>1†</sup>, and Hyun Sook Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Marine Biotechnology Research Center, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Busan 49111, Republic of Korea

<sup>2</sup>KIOST School, University of Science and Technology, Busan 49111, Republic of Korea

In this study, the carbon monoxide (CO)-fermenting acetogen, *Clostridium* sp. AWRP was subjected to chemical mutagenesis with *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) to generate a CO-resistant mutant. Among the 26 colonies obtained, the highest alcohol production was observed in one isolate, named C1. Compared to the wild-type strain, the C1 strain exhibited 1.5- and 3.4-fold higher CO consumption rate and alcohol selectivity, respectively. The total CO consumption of strain C1 could be further enhanced by increasing the content of metal ions, such as nickel and iron. The highest ethanol titer (5.7 g/l) was achieved by 5-fold increase in the iron concentration.

**Keywords:** Acetogen, synthesis gas, random mutagenesis

온실가스 배출로 인한 급격한 지구 온난화는 생태계 변화를 넘어서 인류의 생존에 위협이 되고 있으며, 기존 원유 자원 기반의 화학 공정을 재생 가능한 자원을 이용한 공정으로 전환해야 할 필요성이 지속적으로 요구되고 있다[1, 2]. 이러한 문제를 극복하기 위하여 최근에는 비식용 바이오매스의 활용 및 광합성 이외에도 합성 가스나 부생 가스의 생물학적 전환에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[3].

아세트젠(acetogen)은 화학무기독립영양생물에 속하는 미생물로서, 환원적 아세틸-CoA 경로로 알려진 Wood-Ljungdahl 경로를 사용한다[4, 5]. 이 경로는 아세트산의 메틸기를 합성하는 메틸 분기(methyl branch)와 카복시기를 합성하는 카보닐 분기(carbonyl branch)로 구성되어 최종적으로 두 탄소 원자를 연결하여 아세틸-CoA를 합성하는 것이

특징이다. 이들 미생물은 절대혐기 조건에서 일산화탄소(CO) 또는 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)와 수소(H<sub>2</sub>)를 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 생장이 가능하며, 이를 이용해, 석탄이나 폐자원 연소시켜 얻는 합성 가스(synthesis gas) 전환 연구가 활발히 이루어지고 있다[6–8]. 특히, *Clostridium* 속의 미생물은 CO로부터 알코올 생산이 가능하여 아세트젠 중에서도 연구가 활발히 진행되고 있으며, 대표적인 균주로 *C. ljungdahlii*, *C. autoethanogenum*, *C. ragsdalei* 등이 알려져 있다[9]. 그러나 현재 야생형 균주의 경우에는 CO에 의한 저해로 에탄올 생산성이 높지 않은 편으로, 공정의 생산성 향상을 위해서는 균주의 CO 저해가 개선되어야 한다[10]. CO 저해의 원인은 명확하지 않으나 Wood-Ljungdahl 경로의 효소 중 하나인 개미산 탈수소화 효소(FDH)가 고농도의 CO에 저해받는 것이 알려져 있다[11].

본 연구에서는 CO를 이용하는 아세트젠 *Clostridium* sp. AWRP 균주(이하 AWRP)의 *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) 무작위 돌연변이를 통하여 CO 내성이 증대된 균주를 선별하고, 이렇게 획득된 CO 내성이 알

### \*Corresponding author

Tel: +82-51-664-3373 Fax: +82-51-955-3981

E-mail: leeh522@kiost.ac.kr

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

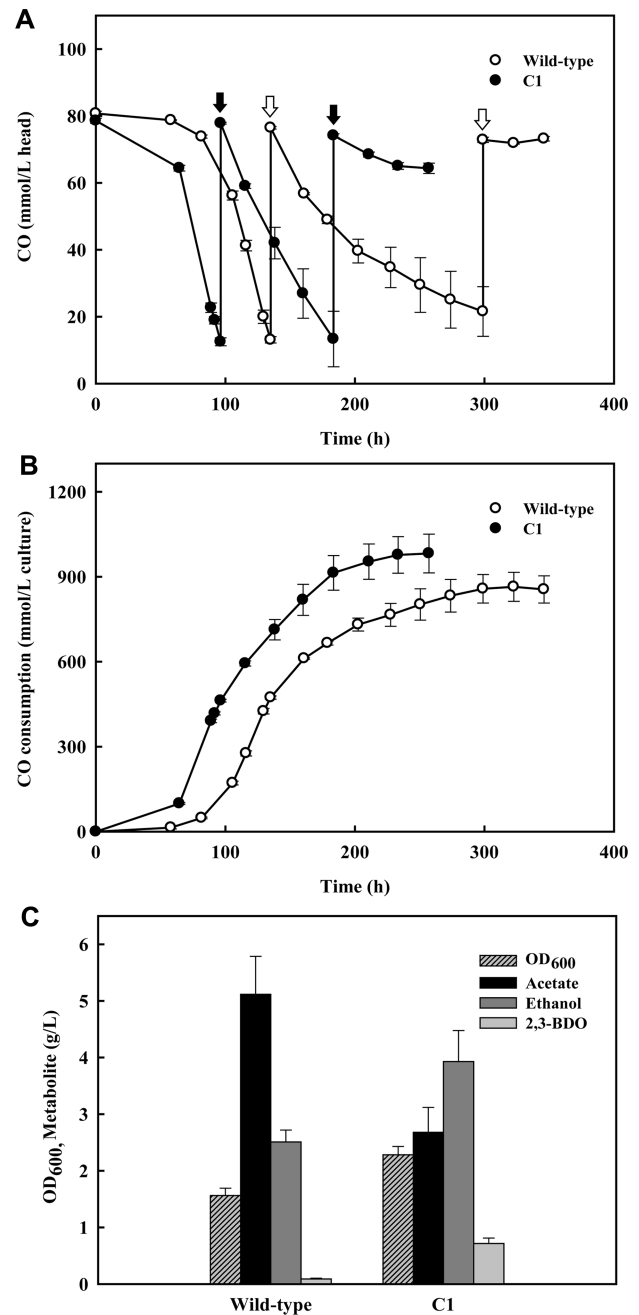
코올 생산성을 증가시키는지 확인하고자 하였다.

실험에 사용된 AWRP 균주는 안산 갈대습지에서 분리되었으며 *C. ljungdahlii*, *C. autoethanogenum*과 유사하게 아세트산, 에탄올 및 2,3-부탄디올을 생산하며, 배양 조건에 따라 높은 선택도로 알코올을 생산한다[12]. 균주는 20% 글리세린을 포함한 배양액을 -80°C에 동결하여 보관 및 사용하였다. 모든 배양은 serum bottle (Wheaton, USA)을 이용하여 진행하였으며, 별도의 표기가 없을 경우 50-ml bottle을 사용하였다. 모든 bottle은 배지 분주 후 blue butyl stopper (Chemglass Life Sciences, USA)로 밀봉하고, 내부 기체를 질소(99.999%)로 치환 후 121°C에서 20분간 멸균하였다. 일반적인 배양과 돌연변이주 제작에는 AM 배지를 이용하였으며 1 L의 조성은 다음과 같다: NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.33 g; MgCl<sub>2</sub>, 0.52 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1 g; KCl, 0.33 g; NaCl, 1.0 g; NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 g; cysteine-HCl, 0.5 g; yeast extract, 0.5 g; trace mineral solution (DSM 141), 10 ml; 0.1% resazurin, 1 ml; 0.5% Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O, 20 ml; Wolfe's vitamin 용액(50x) 출처[13], 20 ml. AM 배지는 멸균 전 2 N HCl로 pH를 5.5로 조정하였으며, Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O 용액과 Wolfe's vitamin 용액은 따로 필터 멸균하여 멸균된 배지에 주입하였다.

AWRP 균주에서 무작위 돌연변이를 유도하기 위해 먼저 AWRP 균주를 50 ml의 AM 배지가 포함된 4개의 125-ml bottle에 접종하였다. 접종 및 돌연변이원 처리 실험은 95%의 질소와 5%의 수소가 포함된 혐기 챔버(Coy Laboratory, USA)에서 진행하였다. 접종된 bottle은 내부 기체를 150 kPa의 혼합 가스(50% CO, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, and 30% N<sub>2</sub>)로 충전 후 30°C, 180 rpm으로 배양하였다. 600 nm에서 배양액의 흡광도(OD<sub>600nm</sub>)가 0.4일 때, 배양액에서 균체를 회수하여, 20 ml의 AM 배지에 현탁하였다. 이를 50-ml의 AM 배지가 포함된 125-ml bottle 2개에 각각 10 ml씩 접종한 뒤, 하나는 1 mg/ml의 NTG를 포함한 0.1 M sodium citrate 용액을 2.5 ml 첨가하였고, 다른 하나는 대조군으로서 동일 부피의 0.1 M sodium citrate만을 첨가하였다[14]. NTG 처리된 bottle은 150 kPa의 혼합 가스로 충전하여 1시간 배양한 후, 균체를 AM 배지로 2회 세척하고, 50 ml의 AM 배지에 현탁하였다. 다양한 돌연변이주를 쉽게 확보하고자, NTG 처리 균체를 바로 고체 배지에 도말하지 않고 24개의 bottle에 (AM 배지 20 ml 포함) 각각 1 ml씩 접종하여 농후 배양을 통하여 활성이 우수한 균주를 선별하는 과정을 적용하였다. 남은 배양액을 reinforced clostridial medium (BD, USA) 고체 배지에 도말하여 NTG를 처리하지 않은 대조군과 콜로니 생성 수를 비교하며 사멸률을 계산한 결과, 약 98%로 확인되었다.

위에서 NTG 처리한 균체를 접종한 24개의 bottle은 CO

내성 변이주를 선별하기 위해 내부를 150 kPa의 CO (99.95%)로 충전하여 농후 배양을 진행하였다. 각 bottle을 동일 조건에서 3회의 계대 배양을 추가로 실시한 뒤, 최종



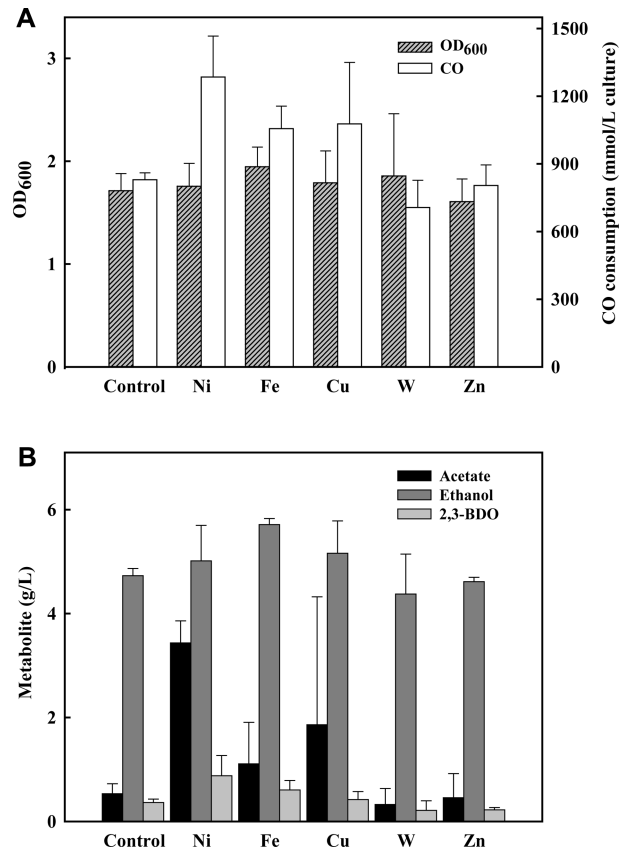
**Fig. 1. CO concentration in the headspace (A), CO consumption (B), OD<sub>600</sub> and final metabolite concentrations (C) of the wild-type *Clostridium* sp. AWRP and strain C1 during autotrophic growth.** Gas recharge is indicated by open (wild-type) and filled (C1) arrows. An average total volume of 158 ml was assumed for a 125-ml serum bottle in order to calculate CO consumption.

농후 배양시에는 CO의 공급량을 증가시키기 위해 125-ml의 bottle (AM 배지 20 ml)을 이용하여 배양을 진행하였다. 최종 배양에서 가스 소모 속도가 야생형보다 증가한 bottle 3개와, 최종 산물 생산량이 높은 bottle 1개를 선별하였다. 이들의 배양액을 AM 고체 배지에 도말 후 150 kPa의 CO가 충전된 내압 용기에서 배양하여, 총 26개의 colony를 확보하였다. 각각의 colony를 125-ml bottle에서 (배지 20 ml) 150 kPa CO로 충전 후 배양한 후, CO 소모량과 알코올 생산량이 가장 많은 무작위 돌연변이주를 선별하여 C1으로 명명하였다. 내부 기체의 가스 농도는 YL6100 GC (YL Instrument Co., Anyang, South Korea)를 이용하여 분석하였고[15], 배양액 분석에는 Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-Rad, USA)이 장착된 HPLC (YL9100; YL Instrument)를 이용하였다.

아세트젠 배양에 널리 쓰이는 PETC 배지를 이용하여 야생형 AWRP 균주를 배양시 CO 소모량과 알코올 생산량이 증가함을 확인하였다(unpublished). 따라서, C1 균주의 배양 특성을 고찰하기 위하여 PETC 배지를 이용하여 125-ml bottle (배지 20 ml)에서 배양하였다. PETC는 기존 조성에서  $\text{NaHCO}_3$ 와 fructose를 제외하였으며[16], 유기산 누적에 따른 pH 감소를 완화시키기 위하여 20 g/l의 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid를 첨가 후 2 N NaOH로 최종 pH를 5.8로 조정하였다. 배양 중 지연기를 단축시키기 위하여 초기 CO 압력은 100 kPa로 하되, 배양 중 headspace CO 농도가 20 mM 이하로 감소하면 동일 압력의 CO로 재충진하였다.

배양 결과, 야생형 균주 대비 C1 균주의 초반 CO 저해가 완화되었음을 확인하였다(Fig. 1A). 또한, C1 균주의 경우 257시간 동안 총 982 mmol/(L culture)의 CO를 소모하였으며(Fig. 1B), 평균 CO 소모 속도는 약 3.8 mmol/(L culture)/h로 이는 야생형 균주의 2.5 mmol/(L culture)/h 대비 약 52% 증가한 수치이다. 대사산물의 분석 결과, C1의 경우 야생형 대비 에탄올은 약 1.6배(3.9 vs. 2.5 g/l), 2,3-부탄디올은 약 7배(0.7 vs. 0.1 g/l) 증가하였으며, 아세트산의 경우 야생형 대비 50% (2.68 vs. 5.12 g/l) 감소하였다(Fig. 1C). 아세트산 기준 알코올 선택성은 C1 균주의 경우 약 1.7로 야생형 균주(0.5) 대비 3배 이상 증가한 수치를 나타내었다.

Wood-Ljungdahl 경로에서 CO 탈수소화 효소(CODH), FDH 등의 효소들은 혐기성 미생물에서 전자 전달에 주로 사용되는 Fe 외에도 Ni, W, Se 등의 원소를 보조 인자로 이용한다[17]. *C. autoethanogenum* 및 *C. ragsdalei*를 이용한 선행 연구에서 이러한 보조 인자의 농도를 최적화함으로써, 에탄올 생산 수율과 CO 소모량이 향상된다는 결과가 보고된 바 있다[18–20]. 따라서 배지 내 특정 금속 이온이 C1 균주의 알코올 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 PETC



**Fig. 2.** OD<sub>600</sub>, CO consumption (A), and product titers (B) of strain C1 grown in PETC medium supplemented with various metal ions.

배지에서 5종의 금속 이온을 각각 증량하여 배양하였다. Fe ( $\text{FeSO}_4$ ), Ni ( $\text{NiCl}_2$ ), Cu ( $\text{CuCl}_2$ ), W ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ )는 원래 농도에서 5배로 증량하였고, Zn의 경우는 기존 함량이 낮아 (7 nM) 10  $\mu\text{M}$ 의  $\text{ZnCl}_2$ 를 첨가하여 배양하였다.

배양 결과, Ni, Fe, Cu를 증량하였을 때 CO 소모가 약 30–50% 증가함을 확인하였으나(Fig. 2A), 에탄올 수율은 14–19 wt%로 대조군 대비(20%) 소폭 감소하였다. 특히, Ni 증량시 아세트산 농도가 3.4 g/l로 대조군 대비 약 6.5배 증가하였다(Fig. 2B). Fe 증량시에는 전반적으로 모든 대사 산물이 고르게 증가하였으며, 에탄올 최종 농도는 5.7 g/l로 가장 높게 나타났다(Fig. 2B). W의 경우 증량시 CO 소모량과 에탄올 농도는 대조군 대비 감소하였으나 에탄올의 수율은 22%로 가장 높은 수치를 기록하였다(Fig. 2B). Ni 증량시 C1 균주의 배양 결과는 에탄올 수율이 상승한 *C. ragsdalei*와 상반된다[19]. Ni는 acetyl-CoA synthase/CO dehydrogenase (ACS/CODH)의 보조 인자로서, CO를 산화시켜 전자를 얻는 역할과 CO와 메틸기를 결합하여 acetyl-CoA를 합성하는 두 가지 역할을 수행한다[4]. C1 균주에서는 Ni 증량이 상대

적으로 CODH보다는 ACS 활성에 크게 작용함으로써 에탄올 생산에 필요한 전자의 공급이 상대적으로 부족한 것으로 보인다. W는 에탄올 생산에 작용하는 aldehyde:ferredoxin oxidoreductase (AOR)의 보조 인자로 알려져 있는데[21], C1 균주에서는 W의 증량이 AOR의 세포 내 활성을 증가시켜 에탄올 수율이 증가한 것으로 판단된다.

본 연구를 통하여 얻어진 변이주 C1은 야생형 균주 대비 높은 CO 소모량과 에탄올 생산성을 가지고 있으며, 배지 내 특정 금속 이온의 증량을 통해 에탄올 생산성과 CO 소모량이 향상될 수 있음을 확인하였다. 이러한 CO 내성 변이주는 향후 배지 최적화를 통한 알코올 생산 및 반응기 수준에서의 합성 가스 전환 공정 연구에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

## Acknowledgments

This work was supported by KIOST In-House Program (PE99722).

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

- Lee Y, Cho IJ, Choi SY, Lee SY. 2019. Systems metabolic engineering strategies for non-natural microbial polyester production. *Biotechnol. J.* **14**: e1800426.
- Liao JC, Mi L, Pontrelli S, Luo S. 2016. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 288-304.
- Bengelsdorf FR, Straub M, Durre P. 2013. Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation. *Environ. Technol.* **34**: 1639-1651.
- Ragsdale SW, Pierce E. 2008. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1784**: 1873-1898.
- Bengelsdorf FR, Beck MH, Erz C, Hoffmeister S, Karl MM, Riegler P, et al. 2018. Bacterial anaerobic synthesis gas (Syngas) and CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* **103**: 143-221.
- Liew F, Henstra AM, Kpke M, Winzer K, Simpson SD, Minton NP. 2017. Metabolic engineering of *Clostridium autoethanogenum* for selective alcohol production. *Metab. Eng.* **40**: 104-114.
- Jones SW, Fast AG, Carlson ED, Wiedel CA, Au J, Antoniewicz MR, et al. 2016. CO<sub>2</sub> fixation by anaerobic non-photosynthetic mixotrophy for improved carbon conversion. *Nat. Commun.* **7**: 12800.
- Park S, Yasin M, Jeong J, Cha M, Kang H, Jang N, et al. 2017. Acetate-assisted increase of butyrate production by *Eubacterium limosum* KIST612 during carbon monoxide fermentation. *Bioresour. Technol.* **245**: 560-566.
- Bengelsdorf FR, Poehlein A, Linder S, Erz C, Hummel T, Hoffmeister S, et al. 2016. Industrial acetogenic biocatalysts: a comparative metabolic and genomic analysis. *Front Microbiol.* **7**: 1036.
- Mayer A, Schadler T, Trunz S, Stelzer T, Weuster-Botz D. 2018. Carbon monoxide conversion with *Clostridium aceticum*. *Biotechnol. Bioeng.* **115**: 2740-2750.
- Wang S, Huang H, Kahnt J, Mueller AP, Kopke M, Thauer RK. 2013. NADP-specific electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase in a functional complex with formate dehydrogenase in *Clostridium autoethanogenum* grown on CO. *J. Bacteriol.* **195**: 4373-86.
- Lee J, Lee JW, Chae CG, Kwon SJ, Kim YJ, Lee JH, et al. 2019. Domestication of the novel alcohologenic acetogen *Clostridium* sp. AWRP: from isolation to characterization for syngas fermentation. *Biotechnol. Biofuels.* **12**: 228.
- Wolin EA, Wolin MJ, Wolfe RS. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* **238**: 2882-2886.
- Connor MR, Cann AF, Liao JC. 2010. 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**: 1155-1164.
- Kim MS, Bae SS, Kim YJ, Kim TW, Lim JK, Lee SH, et al. 2013. CO-dependent H<sub>2</sub> production by genetically engineered *Thermococcus onnurineus* NA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 2048-2053.
- Tanner RS, Miller LM, Yang D. 1993. *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 232-236.
- Ragsdale SW. 2008. Enzymology of the Wood-Ljungdahl pathway of acetogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.* **1125**: 129-136.
- Guo Y, Xu J, Zhang Y, Xu H, Yuan Z, Li D. 2010. Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source. *Bioresour. Technol.* **101**: 8784-8789.
- Saxena J, Tanner RS. 2011. Effect of trace metals on ethanol production from synthesis gas by the ethanologenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 513-521.
- Abubakar HN, Veiga MC, Kennes C. 2015. Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bioreactor with no accumulation of acetic acid. *Bioresour. Technol.* **186**: 122-127.
- Mukund S, Adams MW. 1991. The novel tungsten-iron-sulfur protein of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, is an aldehyde ferredoxin oxidoreductase. Evidence for its participation in a unique glycolytic pathway. *J. Biol. Chem.* **266**: 14208-14216.