

Clostridium autoethanogenum을 이용한 합성가스 발효에 대한 중금속의 영향

임흥래 · 권록규 · 박소은* · 김영기[†]

한경대학교 식품생명화학공학부, *한경대학교 화학기술연구소
(2020년 7월 10일 접수, 2020년 7월 21일 수정, 2020년 7월 21일 채택)

Effect of Heavy Metal on Syngas Fermentation Using *Clostridium autoethanogenum*

Hongrae Im, Rokgyu Kwon, Soeun Park*, and Young-Kee Kim[†]

Faculty of Food Biotechnology and Chemical Engineering, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

*Research Center of Chemical Technology, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

(Received July 10, 2020; Revised July 21, 2020; Accepted July 21, 2020)

초 록

이 연구에서는 합성가스를 유일한 탄소원으로 사용하는 *Clostridium autoethanogenum* 배양에서 배지 성분 중 금속이온의 농도가 균주 성장과 대사산물 생산에 미치는 영향을 조사하였다. *C. autoethanogenum* 배양에 사용되는 기본 배지 구성 성분의 금속이온 종류 중 molybdenum, nickel, cobalt를 조사 대상으로 선정하여 이 성분들의 농도를 달리하였을 때 균주 성장과 에탄올, 아세트산 생산에 미치는 영향을 확인하였다. Molybdenum은 0, 0.001, 0.01, 0.1 g/L 농도를 시험하였으며 0.001 g/L에서 에탄올 생산량이 약간 증가하는 경향을 보였지만 시험한 농도 범위 내에서 뚜렷한 영향이 관찰되지 않았다. Nickel은 0, 0.001, 0.01, 0.1 g/L의 농도 범위에서 균주 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향을 관찰하였으며, 0.01 g/L 농도에서 에탄올 생산농도가 기본 배지 농도인 0.1 g/L에서보다 26% 증가되는 것을 확인하였다. Cobalt는 0, 0.018, 0.18, 1.8 g/L 농도 범위에서 균주 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향을 분석하였으며, 기본 배지 조건인 0.18 g/L의 이상의 농도에서는 균주 성장이 약간 저해되는 현상이 관찰되었다. 결과적으로 연구에 사용된 세 가지 금속이온 성분 중 cobalt는 배지 내 성분 농도에 따른 에탄올 생산농도 향상을 이루지 못하였으나, molybdenum, nickel은 기본 배지 내 일반적인 농도의 1/10을 사용함으로써 에탄올 생산농도 향상을 이룰 수 있었다.

Abstract

In this work, we investigated the effect of the concentration of medium components on microbial growth and ethanol production in order to improve ethanol productivity in the *Clostridium autoethanogenum* culture process using syngas as a sole carbon source. Molybdenum, nickel and cobalt (as heavy metal ions) were selected as examined components, and the effects of components concentration on the cell growth and ethanol production was examined. Among molybdenum concentrations of 0, 0.001, 0.01 and 0.1 g/L, a slight increase in ethanol production was observed at 0.001 g/L, but significant differences in the microbial growth and ethanol production were not observed in the examined concentration range. In the case of nickel concentration of 0, 0.001, 0.01 and 0.1 g/L, the change in the microbial growth and ethanol production was investigated, and it was found that the ethanol production using 0.001 g/L increased by 26% compared to that of using the basal medium concentration (0.01g/L). The effect of cobalt concentrations (0, 0.018, 0.18 and 1.8 g/L) on the microbial growth and ethanol production was also investigated, and the inhibition of microbial growth was observed when the cobalt usage was over 0.18 g/L. In conclusion, cobalt did not show any further improvement of ethanol production by changing concentration, however, molybdenum and nickel showed increases in the produced ethanol concentration compared to that of using 1/10 times of the basal medium concentration.

Keywords: *Clostridium autoethanogenum*, Syngas fermentation, Molybdenum, Nickel, Cobalt

1. 서 론

바이오 알코올은 수송용 연료로 사용이 가능한 환경친화적 재생연료이며, 온실가스 감축과 자원 고갈 문제를 해결할 수 있는 차세대 연료원이다[1]. 바이오 연료 중 에탄올은 옥탄가가 휘발유와 비슷하기 때문에 혼용이 용이하여 수송용 연료로 많이 사용한다[2]. 초기에 사용된 바이오 에탄올 생산기술은 곡물을 기반으로 하는 시스템으로, 원료로 옥수수, 사탕수수 등 식량자원인 곡물을 사용한다는 점과 많은

[†] Corresponding Author: Hankyong National University,
Faculty of Food Biotechnology and Chemical Engineering, Anseong 17579,
Korea
Tel: +82-31-670-5206 e-mail: kim@hknu.ac.kr

경작지가 필요하다는 한계를 갖고 있다[3]. 대안으로 개발된 2세대 바이오 에탄올 생산기술은 식량자원이 아닌 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 등으로 이루어진 리그노셀룰로오스 바이오매스를 이용하는 것을 특징으로 한다[4]. 하지만, 2세대 생산기술에서 필수적으로 필요한 당화과정의 공정이 복잡하고 비용이 많이 드는 단점이 있어, 이를 대체하기 위한 가스화공정이 개발되었다. 가스화 공정은 바이오매스의 모든 구성성분을 가스화하여 합성가스(syngas)를 생산하고, 합성가스의 주성분인 CO, CO₂, H₂를 기질로 사용하는 acetogenic 미생물 발효공정에서 에탄올, 부탄올과 같은 바이오 알코올을 생산하는 연구가 활발히 이루어지고 있다[5-7]. *Clostridium autoethanogenum*, *C. ljungdahlii*, *C. ragsdalei*와 같은 대표적인 혐기성 acetogens들은 Wood-ljungdahl pathway를 통하여 acetyl-CoA를 생산하고, acetyl-CoA가 에탄올 또는 아세트산으로 전환되며, 생산된 아세트산은 아세트알데하이드를 거쳐 에탄올로 재전환 될 수도 있다[8,9]. 하지만 합성가스의 주성분인 CO, CO₂를 유일한 탄소원으로 활용한 생물학적 전환 시스템에서 미생물의 성장속도가 느리고 최종 산물의 생산농도가 낮아 생산성이 떨어지는 한계가 있다[10-13]. 이러한 문제를 해결하기 위한 생물공정 공학적 접근법으로 반응기 구조, 합성가스 조성, 배지 조성, 운전조건을 변화하는 등 다양한 시도가 이루어져 왔다[14-17]. 선행 연구에서는 합성가스 발효공정에서 배지 구성 성분들은 미생물의 성장에 필수적인 영양분일 뿐만 아니라, 대사공학적 방법에 의해 생산성 향상에 도움이 된다는 보고가 있다[18-21]. 배지성분 중 탄소원, 질소원, 금속이온 및 비타민 등 다양한 구성성분의 성분의 조성을 변화하는 시도가 이루어져 왔다[22,23]. Acetogen 배양을 위한 배지성분 중 molybdenum, nickel, cobalt와 같은 중금속들은 대사과정에 관여하는 formate dehydrogenase (FDH), carbon monoxide dehydrogenase (CODH), hydrogenase (H₂ase), carbon monoxide dehydrogenase/acetyl CoA synthase (CODH/ACS), alcohol dehydrogenase (ADH), corrinoid 효소의 보조인자로서 역할을 하며, 각각의 효소 활성에 영향을 끼쳐 대사공학적으로 미생물의 성장과 대사산물의 생산성을 증가시킬 수 있다는 보고가 있다[24]. 최근 연구들 중에서 *C. ragsdalei*, *Sporomusa ovata*를 이용한 실험에서 배지 내 금속이온 농도에 따른 미생물의 성장과 대사산물의 생성에 대한 연구결과가 있다[24,25]. 하지만 합성가스를 유일한 탄소원으로 공급하여 *C. autoethanogenum* 균주를 이용한 발효과정에서 중금속이온 농도에 따른 미생물 성장과 대사산물 생산에 대한 연구결과는 보고된 바는 없다.

본 연구에서는 CO, CO₂, H₂로 구성된 합성가스를 유일한 탄소원으로 이용하고, acetogen의 일종인 *C. autoethanogenum* 배양과정에서 배지의 중금속 조성을 변화시켜 미생물의 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향을 관찰하였다. 연구에 사용된 중금속이온으로는 molybdenum (Mo), nickel (Ni)과 cobalt (Co)를 선정하여, 각 성분의 배지 내 농도를 조절하여 균주 성장과 에탄올, 아세트산 생산에 미치는 영향을 고찰하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 균주 및 배양배지

실험에 사용된 acetogenic 미생물은 *C. autoethanogenum* (DSM 10061)을 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH (Braunschweig, Germany)에서 구입하였다. 균주 배양을 위한 기본배지의 조성은 기존 연구와 같으며[16], 구성성분은 시약용 화합물을 사용하였다. 실험에 사용된 합성가스는 20 vol% CO, 20 vol% CO₂, 10 vol% H₂, 50 vol% N₂의 조성을 가지며 MS 동민가스

(Pyeongtaek, Gyeonggi-Do, Korea)에 주문 제조하여 공급받았다.

2.2. 배양실험

배양 실험을 위해 150 mL serum bottle을 배양기로 하여 25 mL의 배양 배지를 넣은 후, 고무마개를 이용하여 입구 부분을 막고 알루미늄 캡으로 캡핑하여 외부 공기와 접촉을 차단시킨 상태로 합성가스를 퍼징하여 혐기조건이 유지되게 하였다. *C. autoethanogenum*은 절대 혐기성 균주로 완벽한 혐기조건을 유지하는 매우 중요하다. 준비된 serum bottle에 계대 배양된 미생물 배양액을 배지 부피의 10 vol% 접종하였다. 균주가 접종된 후, serum bottle 내 배지부분에 합성가스를 5 min 동안 주입하였으며, bottle의 내부압력은 약 240 kPa이 되도록 유지시켰다. 준비된 배양 bottle은 진탕배양기에서 배양온도 37 °C, 교반속도 200 rpm의 조건으로 배양하였다. 균주 성장과 대사산물 분석을 위한 시료는 48 h마다 고무마개 부분에 주사기를 투과시켜 채취하였다. 균주 성장과 대사산물 생산에 대한 영향을 보기 위해 사용된 중금속인 molybdenum, nickel, cobalt는 sodium molybdate (Na₂MoO₄ · 2H₂O), nickel chloride (NiCl₂ · 6H₂O), Cobalt(II) sulfate (CoSO₄ · 7H₂O)의 형태의 것을 배지 제조에 사용하였다. 기본 배지에서 세 가지 성분의 농도는 각각 sodium molybdate 0.01 g/L, nickel chloride 0.01 g/L, cobalt sulfate 0.18 g/L이며, 중금속 농도의 배양에 대한 영향을 시험하기 위하여 sodium molybdate, nickel chloride, cobalt sulfate의 배지 내 농도는 기본 배지 농도의 0(사용하지 않음), 0.1, 1, 10배로 변화시켜가면서 배양실험을 수행하고, 미생물 성장과 대사산물 생산을 분석하였다.

2.3. 분석 방법

미생물 성장을 평가하기 위한 균주량 분석은 자외선-가시광선 분광광도계(Optizen POP, Mecasys Co., Seoul, Korea)를 이용하여 600 nm 파장에서 배양액의 광밀도 측정을 수행하였다. 비생산성의 계산을 위해 필요한 세포건조질량은 측정된 광밀도를 작성된 검량곡선에 의해 세포건조질량으로 변환하여 얻었다. 채취된 배양액 시료는 원심분리를 통하여 균주와 액체배양액을 분리한 후, 균주가 없는 액체배양액을 기공 크기가 0.45 µm인 syringe filter (Product No. 6784-1304, Whatman, Germany)로 여과하여 대사산물인 아세트산과 에탄올 분석에 사용하였다. 에탄올과 아세트산의 농도 측정은 gas chromatograph (7890B, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 이용하며, 컬럼은 HP-5 capillary column (30 m × 0.32 mm × 0.25 m, Agilent Technologies Inc.), 검출기는 flame ionization detector를 이용하였고, 헬륨을 이동상기체로 사용하였다. 유입구의 온도와 검출기의 온도는 각각 225, 250 °C로 고정하였다. 헬륨 이동상 기체의 초기속도는 2 mL/min이며, 0.5 mL/min씩 증가시켜 최종적으로 4mL/min이 되도록 하였다. 초기 오븐 온도는 50 °C이며, 40 °C/min의 속도로 증가시켜 250 °C에 도달하도록 하였다. 에탄올과 아세트산 농도의 계산은 Chemstation® data analysis package (Agilent Technologies)를 이용하여 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Molybdenum 농도가 미생물 성장과 대사산물 생산에 미치는 영향

미생물 성장의 필수 금속이온 중 하나인 molybdenum이 *C. autoethanogenum*의 성장과 에탄올, 아세트산 생산에 미치는 영향을 분석한 결과를 Figure 1에 도시하였다. 기본 배지에서 sodium molybdate의 농도는 0.01 g/L이며, 농도를 0, 0.001, 0.01, 0.1 g/L로 변화시킨 실험에

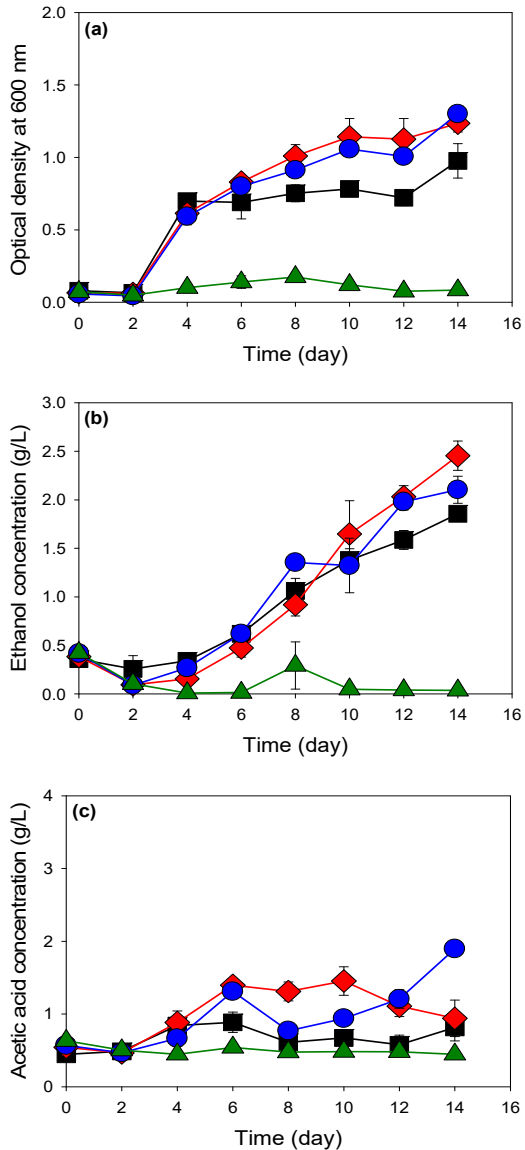


Figure 1. Time course profile of (a) optical density at 600 nm (b) ethanol concentration, and (c) acetic acid concentration in *C. autoethanogenum* culture at various molybdenum addition (■: 0 g/L, ◆: 0.001 g/L, ●: 0.01 g/L, ▲: 0.1 g/L). Error bars (n = 3) represented ± 1 standard deviation.

서 균주의 최대 OD인 1.30은 기본배지 농도인 0.01 g/L 농도에서 관찰되었다. 배지 내 molybdenum 농도가 기본 배지 농도의 10배 조건 (0.1 g/L)에서는 균주의 성장이 거의 일어나지 않는 것이 관찰되었다 [Figure 1(a)]. Molybdenum의 농도가 에탄올 및 아세트산 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 14 day 배양 후 배양액 시료를 이용하여 에탄올과 아세트산의 농도를 분석하였다[Figure 1(b),(c)]. 분석 결과를 살펴보면, 기본 배지에서 에탄올의 생산 농도는 2.10 g/L이며, molybdenum 0.1배의 조건(0.001 g/L)에서 에탄올 생산농도가 2.45 g/L로 가장 높았다. 기본 배지에서 생산된 농도와 비교했을 때 17% 증가를 보였다. 아세트산의 배양액 내 농도는 기본 배지 조건에서 1.90 g/L으로 가장 높은 값을 나타냈다. Molybdenum은 Wood-ljungdahl pathway에서 formate dehydrogenase (FDH)의 보조인자로서 역할을 수행하며,

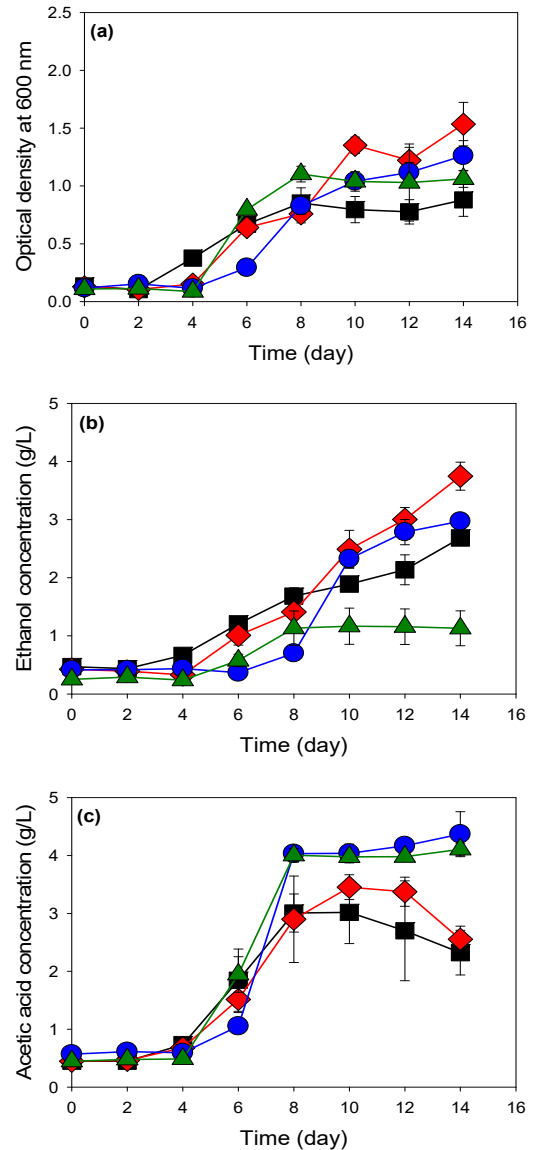


Figure 2. Time course profile of (a) optical density at 600 nm (b) ethanol concentration, and (c) acetic acid concentration in *C. autoethanogenum* culture at various nickel addition (■: 0 g/L, ◆: 0.001 g/L, ●: 0.01 g/L, ▲: 0.1 g/L). Error bars (n = 3) represented ± 1 standard deviation.

*Clostridium thermoaceticum*을 이용한 타 연구에서 배지 내 molybdenum의 농도가 증가하면 FDH의 활성이 감소한다는 연구결과가 있다. 이는 Wood-ljungdahl pathway에서 CO_2 가 formate로 전환되는 과정 중에 NADPH의 환원력을 공급받아야 하는데, FDH의 활성이 감소하게 되면 NADPH의 생성도 감소하게 되어 충분한 환원력을 공급받지 못하게 되고 이는 대사산물의 생산을 저해시키는 경향을 보인다[26,27].

3.2. Nickel 농도가 미생물 성장과 대사산물 생산에 미치는 영향
미생물 성장의 필수 금속이온 중 하나인 nickel이 *C. autoethanogenum*의 성장과 에탄올, 아세트산 생산에 미치는 영향을 분석한 결과를 Figure 2에 도시하였다. 기본 배지에서 nickel chloride의 농도는 0.01 g/L이며, nickel chloride의 농도를 0, 0.001, 0.01, 0.1 g/L로 변화시킨

실험에서 균주의 최대 OD인 1.53은 기본배지 내 농도의 0.1배인 0.001 g/L 농도에서 관찰되었다. Nickel을 첨가하지 않은 배지에서는 미생물의 성장이 약간 저해되는 경향을 보이나, 성장에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다[Figure 2(a)]. 타 연구에서 일반적으로 배지 내 금속이온들은 최소한의 양으로도 미생물의 성장이 가능하다고 알려져 있고, 반대로 과량의 농도는 독성을 나타내어 성장을 저해시킨다는 결과가 보고되어 있으며[28], 이는 nickel 농도가 *C. autoethanogenum*의 성장에 근본적인 영향을 주지 않는 본 연구의 실험 결과와 부합한다. Nickel의 농도가 에탄올 및 아세트산에 미치는 영향을 알아보기 위해 14 day 배양 후 채취된 배양액 시료의 에탄올과 아세트산 농도를 분석한 결과를 Figure 2(b)와 (c)에 도시하였다.

기본 배지 조건(0.01 g/L)에서 배양액 시료의 에탄올 농도는 2.97 g/L이고, nickel을 0.1배 사용한 조건(0.001 g/L)에서 에탄올의 농도는 3.75 g/L으로 기본 배지 조건에서 생산된 농도와 비교하여 26 % 향상된 결과를 보였다. 아세트산의 농도는 기본 배지 조건에서 4.37 g/L이고, nickel을 사용하지 않거나 0.1배 사용한 조건에서는 아세트산 생산이 크게 감소하는 경향을 보이며, 10배를 사용한 조건에서는 기본 배지 조건과 거의 같은 아세트산 생산농도(4.11 g/L)를 보였다. Nickel은 Wood-ljungdahl pathway에서 carbon monoxide dehydrogenase (CODH), hydrogenase (H_2ase), carbon monoxide dehydrogenase/ acetyl CoA synthetase (CODH/ACS), phosphotransacetylase, acetate kinase의 보조 인자로서 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. *Clostridium ragsdalei*, *Methanosarcina thermophila*를 이용한 타 연구에서 고농도의 nickel은 CODH, H_2ase , CODH/ACS, phosphotransacetylase, acetate kinase의 활성을 증가시켜 acetyl-CoA의 양이 많아지게 되면서 acetate의 생산량이 많아지는 반면, ADH의 활성에는 영향을 주지 않아 에탄올 생산량이 증가시키지 못한다는 보고가 있다[29,30]. 이 결과로부터 nickel 사용량을 0.01 g/L 이상으로 조절함으로써 대사산물 중 아세트산의 생산성을 높일 수 있는 것을 확인하였다.

3.3. Cobalt 농도가 미생물 성장과 대사산물 생산에 미치는 영향

미생물 성장의 필수 금속이온 성분 중 하나인 cobalt가 *C. autoethanogenum*의 성장과 에탄올, 아세트산 생산에 미치는 영향을 분석한 결과를 Figure 3에 도시하였다. 기본 배지에서 cobalt sulfate의 농도는 0.18 g/L이며, cobalt sulfate의 농도를 0, 0.018, 0.18, 1.8 g/L로 변화시켜 배양실험을 수행하였다. 기본 배지 조건인 cobalt를 0.18 g/L 사용한 실험에서 최대 OD인 1.87을 얻었다. Cobalt 10배의 농도에서는 미생물의 성장이 약간 저해되는 경향을 보였으나, 기본배지 내 농도보다 낮은 영역에서는 미생물 성장에 대한 큰 영향을 보이지는 않았다[Figure 3(a)]. 이는 *E. coli*를 이용한 타 연구에서 얻어진 일정 수준 이상의 cobalt 농도는 균주에 독성을 나타내기 때문에 적절한 농도로의 공급제한이 필요하다는 결과와 부합한다[31]. Cobalt 농도가 에탄올 및 아세트산 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 14 day 배양 후 채취된 배양액 시료의 에탄올과 아세트산 농도를 분석한 결과를 Figure 3(b)과 (c)에 도시하였다. Cobalt의 기본 배지 조건인 0.18 g/L에서 배양액 내 에탄올 농도가 2.43 g/L로 가장 높았고, cobalt의 사용농도가 증가하면 생산된 에탄올과 아세트산의 농도가 감소하는 경향을 보였다. *Clostridium ragsdalei*를 이용한 타 연구에서 cobalt의 사용농도를 제한시키면 NAD(P)H가 증가하여 대사산물을 생산하는데 환원력을 공급할 수 있다는 결과가 보고되었으며[32], 본 연구에서 cobalt의 농도를 0.18 g/L를 초과하게 사용한 경우 에탄올과 아세트산의 생산이 모두 저해되는 결과와 부합한다.

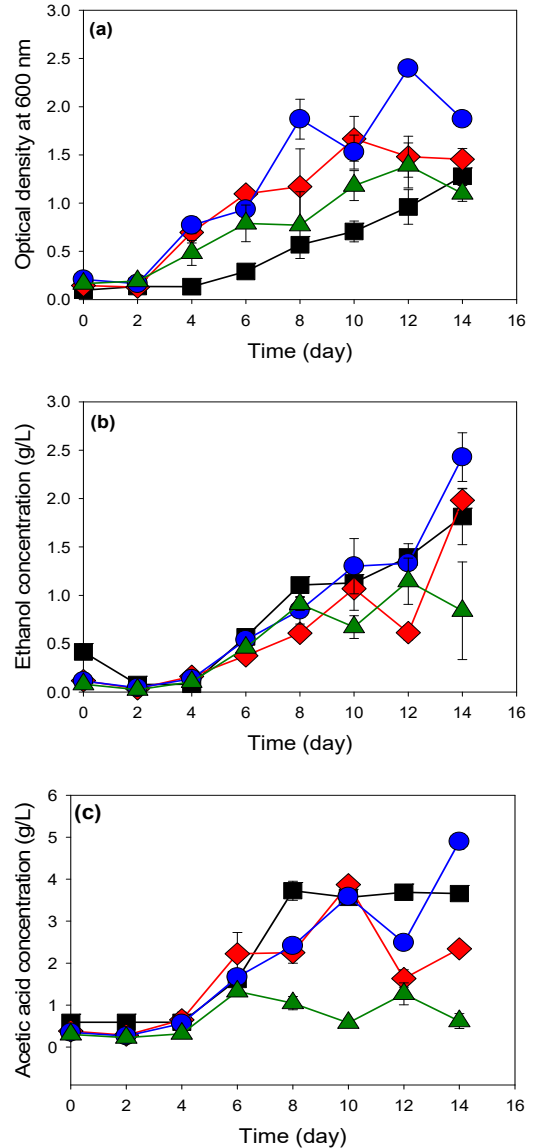


Figure 3. Time course profile of (a) optical density at 600 nm (b) ethanol concentration, and (c) acetic acid concentration in *C. autoethanogenum* culture at various cobalt addition (■: 0 g/L, ◆: 0.018 g/L, ●: 0.18 g/L, ▲: 1.8 g/L). Error bars (n = 3) represented ± 1 standard deviation.

4. 결 론

본 연구에서는 배지의 구성성분 중 금속이온인 molybdenum, nickel, cobalt의 농도 변화에 따라 혐기성 박테리아인 *C. autoethanogenum*의 성장과 에탄올, 아세트산 대사산물 생산에 대한 영향을 분석하였으며 그 결과를 Table 1에 요약하였다. 실험 결과, 과량의 molybdenum은 균주 성장을 거의 하지 못하게 억제하는 경향을 보였으며, nickel의 경우, 첨가하지 않은 배지나 과량을 공급한 배지의 경우에는 미생물의 성장을 저해하는 경향을 보였다. 즉, molybdenum과 nickel의 두 가지 금속이온은 기본배지 농도와 0.1배 조건에서 유사한 성장 특성을 보였다. 또한 molybdenum과 nickel은 기본 배지 조건보다 0.1배인 조건(0.001 g/L)에서 에탄올 생산농도가 각각 17, 26% 증가되는 것을 확

Table 1. Comparison of Microbial Growth and Metabolites Formation in *C. autoethanogenum* Culture at Various Concentration of Molybdenum, Nickel and Cobalt

Component	Concentration (g/L)	Optical density at 600 nm	Dry cell mass (g/L)	Ethanol concentration (g/L)	Acetic acid concentration (g/L)
Molybdenum	0	0.98	0.39	1.86	0.82
	0.001	1.24	0.48	2.45	0.94
	0.01	1.30	0.50	2.10	1.90
	0.1	0.08	0.03	0.04	0.45
Nickel	0	0.88	0.34	2.69	2.32
	0.001	1.53	0.60	3.75	2.55
	0.01	1.26	0.49	2.97	4.37
	0.1	1.06	0.41	1.13	4.11
Cobalt	0	1.28	0.50	1.82	3.66
	0.018	1.45	0.56	1.98	2.34
	0.18	1.87	0.73	2.43	4.89
	1.8	1.10	0.42	0.84	0.62

인하였다. Cobalt의 경우, 기본 배지 조건의 10배인 1.8 g/L를 공급하지 않는 한 미생물 성장과 대사산물 생산에 크게 영향을 주지는 않았으며, 기본 배지 조건에서 균주 성장과 에탄올 생산량이 최대화 되었다. 결론적으로 기본 배지 내 molybdenum, nickel 농도보다 0.1배 사용 조건에서 최대 에탄올 생산을 보이며, molybdenum, nickel, cobalt 모두 기존 배지 농도의 10배를 사용하면 미생물 성장과 대사산물의 생산을 저해시키는 결과를 보여, 안정적인 공정의 운전을 위해서는 과량의 금속이온 공급은 피해야하는 것으로 나타났다.

감 사

이 논문은 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단-C1가스리파이너리(NRF-2018M3D3A1A01017944)의 지원과 교육부의 재원으로 한국연구재단-이공학개인지조연구지원사업(NRF-2018R1D1A1B0704-3323)의 지원을 받아 수행한 연구입니다.

References

- X. Sun, H. K. Atiyeh, R. L. Huhnke, and R. S. Tanner, Syngas fermentation process development for production of biofuels and chemicals: A review, *Bioresour. Technol. Rep.*, **7**, 100279 (2019).
- S. E. Park, B. H. Ahn, and Y.-K. Kim, Growth enhancement of bioethanol-producing microbe *Clostridium autoethanogenum* by changing culture medium composition, *Bioresour. Technol. Rep.*, **6**, 237-240 (2019).
- H. Xu, C. Liang, Z. Yuan, J. Xu, Q. Hua, and Y. Guo, A study of CO/syngas bioconversion by *Clostridium autoethanogenum* with a flexible gas-cultivation system, *Enzyme Microb. Technol.*, **101**, 24-29 (2017).
- P. Di Donato, I. Finore, A. Poli, B. Nicolaus, and L. Lama, The production of second generation bioethanol: The biotechnology potential of thermophilic bacteria, *J. Clean Prod.*, **233**, 1410-1417 (2019).
- C. Liu, G. Luo, W. Wang, Y. He, R. Zhang, and G. Liu, The effects of pH and temperature on the acetate production and microbial community compositions by syngas fermentation, *Fuel*, **224**, 537-544 (2018).
- O. Pardo-Planas, H. K. Atiyeh, J. R. Phillips, C. P. Aichele, and S. Mohammad, Process simulation of ethanol production from biomass gasification and syngas fermentation, *Bioresour. Technol.*, **245**, 925-932 (2017).
- J. Jack, J. Lo, P. -C. Maness, and Z. J. Ren, Directing *Clostridium ljungdahlii* fermentation products via hydrogen to carbon monoxide ratio in syngas, *Biomass Bioenergy*, **124**, 95-101 (2019).
- J. Chen, J. Daniell, D. Griffin, X. Li, and M. A. Henson, Experimental testing of a spatiotemporal metabolic model for carbon monoxide fermentation with *Clostridium autoethanogenum*, *Biochem. Eng. J.*, **129**, 64-73 (2018).
- A. Singla, D. Verma, and P. Sarma, Enrichment and optimization of anaerobic bacterial mixed culture for conversion of syngas to ethanol, *Bioresour. Technol.*, **172C**, 41-49 (2014).
- J. L. Cotter, M. S. Chinn, and A. M. Grunden, Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas, *Enzyme Microb. Technol.*, **44**, 281-288 (2009).
- Y. Guo, J. Xu, Y. Zhang, H. Xu, Z. Yuan, and D. Li, Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source, *Bioresour. Technol.*, **101**, 8784-8789 (2010).
- J. Saxena, and R. Tanner, Optimization of a corn steep medium for production of ethanol from synthesis gas fermentation by *Clostridium ragsdalei*, *World J. Microb. Biotechnol.*, **28**, 1553-1561 (2012).
- G. Najafpour and H. Younesi, Ethanol and acetate synthesis from waste gas using batch culture of *Clostridium ljungdahlii*, *Enzyme Microb. Technol.*, **38**, 223-228 (2006).
- H. Heiskanen, I. Virkajärvi, and L. Viikari, The effect of syngas composition on the growth and product formation of *Butyrivibrio methylotrophicum*, *Enzyme Microb. Technol.*, **41**, 362-367 (2007).
- H. N. Abubackar, F. R. Bengelsdorf, P. Dürre, M. C. Veiga, and C. Kennes, Improved operating strategy for continuous fermentation of carbon monoxide to fuel-ethanol by *clostridia*, *Appl. Energy*, **169**, 210-217 (2016).

16. H. R. Im, T. G. An, S. E. Park, and Y.-K. Kim, Effect of vitamin and sulfur sources on syngas fermentation using *Clostridium autoethanogenum*, *Appl. Chem. Eng.*, **30**, 681-686 (2019).
17. H. N. Abubakar, M. C. Veiga, and C. Kennes, Production of acids and alcohols from syngas in a two-stage continuous fermentation process, *Bioresour. Technol.*, **253**, 227-234 (2018).
18. R. Zabihi, D. Mowla, G. Karimi, and P. Setoodeh, Examination of the impacts of salinity and culture media compositions on *Clostridium acetobutylicum* NRRL B-591 growth and acetone-butanol-ethanol biosynthesis, *J. Environ. Chem. Eng.*, **7**, 102835 (2019).
19. H. N. Abubakar, M. C. Veiga, and C. Kennes, Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bio-reactor with no accumulation of acetic acid, *Bioresour. Technol.*, **186**, 122-127 (2015).
20. K. Arslan, B. Bayar, H. N. Abubakar, M. C. Veiga, and C. Kennes, Solventogenesis in *Clostridium acetivum* producing high concentrations of ethanol from syngas, *Bioresour. Technol.*, **292**, 121941 (2019).
21. D. K. Kundiyana, R. L. Huhnke, P. Maddipati, H. K. Atiyeh, and M. R. Wilkins, Feasibility of incorporating cotton seed extract in *Clostridium* strain P11 fermentation medium during synthesis gas fermentation, *Bioresour. Technol.*, **101**, 9673-9680 (2010).
22. 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).
23. X. Sun, H. K. Atiyeh, H. Zhang, R. S. Tanner, and R. L. Huhnke, Enhanced ethanol production from syngas by *Clostridium ragsdalei* in continuous stirred tank reactor using medium with poultry litter biochar, *Appl. Energy*, **236**, 1269-1279 (2019).
24. F. Ammam, P.-L. Tremblay, D. Lizak, and T. Zhang, Effect of tungstate on acetate and ethanol production by the electrosynthetic bacterium *Sporomusa ovata*, *Biotechnol. Biofuels*, **9**, 163 (2016).
25. P. R. Nimbalkar, M. A. Khedkar, R. S. Parulekar, V. K. Chandgude, K. D. Sonawane, P. V. Chavan, and S. B. Bankar, Role of trace elements as cofactor: An efficient strategy toward enhanced bio-butanol production, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **6**, 9304-9313 (2018).
26. J. R. Andreesen, and L. G. Ljungdahl, Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: Incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme, *J. Bacteriol.*, **116**, 867-873 (1973).
27. I. Yamamoto, T. Saiki, S. M. Liu, and L. G. Ljungdahl, Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein, *J. Biol.*, **258**, 1826-1832 (1983).
28. A. Hassen, N. Saidi, M. Cherif, and A. Boudabous, Resistance of environmental bacteria to heavy metals, *Bioresour. Technol.*, **64**, 7-15 (1998).
29. J. Saxena, and R. Tanner, Effect of trace metals on ethanol production from synthesis gas by the ethanogenic acetogen *Clostridium ragsdalei*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 513-521 (2011).
30. K. C. Terlesky, M. J. Barber, D. J. Aceti and J. G. Ferry, EPR properties of the Ni-Fe-C center in an enzyme complex with carbon monoxide dehydrogenase activity from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*, *J. Biol. Chem.*, **262**, 15392-15395 (1987).
31. L. M. Paulo, J. Ramiro-Garcia, S. Van Mourik, A. J. M. Stams, and D. Z. Sousa, Effect of nickel and cobalt on methanogenic enrichment cultures and role of biogenic sulfide in metal toxicity attenuation, *Front. Microbiol.*, **8**, 1341 (2017).
32. D. K. Kundiyana, R. L. Huhnke, and M. R. Wilkins, Effect of nutrient limitation and two-stage continuous fermentor design on productivities during “*Clostridium ragsdalei*” syngas fermentation, *Bioresour. Technol.*, **102**, 6058-6064 (2011).

Authors

Hongrae Im, M.S., Graduate Student, Faculty of Food Biotechnology and Chemical Engineering, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea; ky421100@hknu.ac.kr

Rokgyu Kwon, Undergraduate Student, Faculty of Food Biotechnology and Chemical Engineering, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea; krk8222@hknu.ac.kr

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

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