

총 설

*Clostridium acetobutylicum*의 대사와 발효

이 상 엽

한국과학기술원 생물공정연구센터

Metabolism and Fermentation of *Clostridium acetobutylicum*

Sang Yup Lee

BioProcess Engineering Research Center, KAIST, Taejon 305-701, Korea

ABSTRACT

The acetone-butanol fermentation by *C. acetobutylicum* has gained increasing attention for the following reasons. First, the finite supply of petrochemical resources, combined with increasing concern over global environmental effects and the unstable nature of the price of petroleum has renewed interest in the development of fermentation technology that allows utilization of biomass wastes for the production of alcohols. Second, it serves as excellent model system for understading the regulation and molecular biology of tightly regulated complex primary metabolism, and for applications of metabolic engineering. In this review various aspects of acetone-butanol fermentation by *C. acetobutylicum* including strain and fermentation characteristics, enzyme regulation, and solvent formation mechanism, and product recovery and summarized.

서 론

*Clostridium acetobutylicum*에 의한 부탄올의 생산이 1861년 Louis Pasteur에 의해 처음 발견된 이래 이 균주에 의한 아세톤과 부탄올의 생산은 1950년대 말까지(남아프리카 공화국에서는 값싼 기질이 풍부하여 1981년까지 발효에 의한 생산이 가능 했음) 지속 되었으나 그 후 화석연료로부터 유도된 것과의 가격 경쟁 상실로 대부분의 공장이 문을 닫게 되었다. 하지만 세계적으로 환경문제에 많은 관심이 집중됨에 따라 renewable biomass로부터의 아세톤과 부탄올(특히 부탄올)의 생산 연구가 다시 시작되었다. 또한 제지공정의 waste와 cheese whey, apple pomace와 같은 식품공정에서 나오는 처치 곤란의 물질들을 기질로 이용하여 유용한 solvent를 생산할 수 있어서 더욱 관심을 끌게 되었다. 하지만 석유 유도체와의

가격 경쟁을 위하여 값싼 기질의 이용, 탁월한 생산성을 가진 균주 개발, product 분리의 경제성 향상의 세 가지가 꼭 해결되어야 할 과제로 인식되어 미국·영국·프랑스·남아프리카공화국·스페인 등 세계 각국에서 많은 연구를 진행하고 있다. 현재는 발효조건에 대한 연구보다는 유전자 조작에 의한 균주개량에 많은 연구 노력이 집중되고 있다.(1).

이 논문에서는 *C. acetobutylicum*의 primary metabolism과 그에 관한 효소들의 조절에 대하여 간략히 살펴봄으로써 현재 진행중인 *C. acetobutylicum*의 대사공학 연구의 방향 설정에 도움을 주고자 한다.

*Clostridium acetobutylicum*

*C. acetobutylicum*은 포자를 형성하는 막대기 모양의 편성 혐기성 그람 양성 균주이고, Bergey's manual of systematic bacteriology에만도 83종이 기록

되어 있는 큰 genera 중의 하나로서 부탄올 생산에 가장 적합한 균주로 분류되어 많은 연구가 되어 왔다. *C. acetobutylicum*의 genomic DNA는 % G+C가 28%로서(2) 가장 낮은 균주 중의 하나이다. 이 사실은 gene 조작에 있어서 종종 문제를 불러 일으키는데 특히 polymerase chain reaction(PCR)을 이용한 연구에 있어서 DNA amplification시 상당한 주의를 요한다(S. Y. Lee, unpublished results). 현재 세계적으로 널리 연구되는 *C. acetobutylicum* strain은 다섯 가지가 있는데 이것을 발효·생화학·유전학적 특성을 비교할 때 두 부류로 나눌 수 있다.

첫번째 group은 ATCC 824와 DSM 1731이 속하고, 두번째 부류에는 NCIMB 8052와 P262가 속한다. 프랑스 Pasteur Institute에서 많이 쓰는 NI-4 strain의 분류는 연구되지 않았다(2). 특별히 유의해야 할 사항은 ATCC에서는 ATCC 824와 NCIMB 8052 strain을 동일한 것으로 간주하고 있고 지난 몇 년간은 혼동되어 사용되어 왔다. 그러나 Lee et al. (3)의 vector 제조와 형질전환 연구 결과에서 보여진 것처럼 두 개의 strain은 엄격한 다름을 알 수 있다. *C. acetobutylicum*이 기질로 이용할 수 있는 탄소원은 많은 종류가 있는데 그중의 일부를 Table 1에 정리하였다. *C. acetobutylicum*의 발효과정은 두 개의 growth phase로 나눌 수 있는데 첫번째 phase는 acidogenic phase라 불리우며 이때는 세포들이 왕성히 자라며 수소, 아세트산, 부티르산을 만들며 성장에 필요한 ATP를 충당한다. 두번째 phase는 solventogenic phase라 불리우며 acidogenic phase에서 만들어진 아세트산과 부티르산, 그리고 residual carbon source로부터 에탄올, 아세톤, 부탄올을 만든다. 그러므로 첫번째 phase에서는 external pH가 4.3 정도까지 떨어지고, 두번째 phase에서는 acids가 uptake됨에 따라 다시 증가하게 된다. 이러한 *C. acetobutylicum*의 primary metabolim은 세포내의 에너지, reducing power, 그리고 metabolite의 농도 등에 따라 아주 엄격히 조절된다. 보통 정상적인 회분식 발효시 부탄올, 아세톤, 에탄올이 6:3:1의 비율로 생성된다. 회분식 발효에 의해 얻어지는 전형적인 발효 생성물의 농도를 Table 2에 정리하였다(4).

#### 대사와 관여 효소

*C. acetobutylicum*의 대사는 지난 10 여년에 걸쳐 다시 면밀히 검토·연구되어 왔고 Jones and Woods(4)의 총설에 잘 정리되어 있다. 포도당을 탄

**Table 1. Substrate for *C. acetobutylicum* fermentation.**

Sugar/Molasses	Hexose, Pentose
Starch	Maize, Wheat, Millet, Rye
Noncellulosic	Jerusalem artichokes, Cheese whey, Apple pomace
Lignocellulose	Sulfite waste liquor, cellulosic hydrolysate

**Table 2. Typical *C. acetobutylicum* fermentation balance.**

Product	mol/mol of glucose fermented
Acetate	0.14
Butyrate	0.04
Ethanol	0.06
Butanol	0.56
Acetone	0.22
Hydrogen	1.35
Carbon dioxide	2.21

소원으로 한 primary metabolic pathway를 Figure 1에 나타내었다. 최근에 정립된 결과를 나름대로 간략히 정리하면 다음과 같다. 포도당과 같은 6탄당은 Embden-Myerhof pathway에 의해 1mole의 6탄당이 각각 2 moles의 pyruvate, ATP, 그리고 NADH를 생산한다. 5탄당의 경우에는 Warburg-Dickens pathway를 통하여 3moles의 5탄당이 2moles의 fructose-6-phosphate와 1mole의 glyceraldehydes-3-phosphate 그리고 각각 5moles의 ATP와 NADH를 생성한다. Glycolysis에 의해 생성된 pyruvate는 pyruvate ferredoxin oxidoreductase에 의해 이산화탄소와 acetyl-CoA로 된다. 이때 환원된 ferredoxin은 hydrogenase에 의해 수소가 생성되면서 다시 산화된다. 혐기성 박테리아가 모두 그러하듯이 *C. acetobutylicum*도 glycolysis에 의해 얻어지는 적은 양의 energy를 보충하기 위하여 특유의 대사과정을 가지고 있는데 아세트산과 부티르산의 생성이 그것이다. 아세트산과 부티르산은 각각 acetyl-CoA와 butyryl-CoA로부터 두 개의 흡사한 효소들을 거쳐 생성된다. 이 두가지 효소는 kinase와 phosphotransferase이다. 아세트산과 부티르산 생성시 1mole의 포도당을 기준으로 할 때 각각 2moles과 1mole의 추가적인 ATP가 얻어진다. 여기서 주의해야 할 것은 acetyl-CoA가 계속적

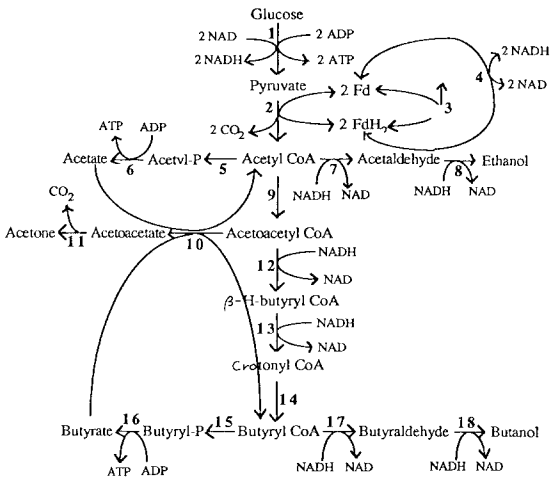


Fig. 1. Metabolic pathways in *C. acetobutylicum*. Enzymes are indicated by numbers as follow: (1) Embden-Meyerhof pathway enzymes; (2) pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; (3) hydrogenase; (4) NADH-ferredoxin oxidoreductase; (5) phosphotransacetylase; (6) acetate kinase; (7) acetaldehyde dehydrogenase; (8) ethanol dehydrogenase; (9) thiolase; (10) acetoacetyl-CoA:acetate/butyrate:CoA transferase(CoA transferase); (11) acetoacetate decarboxylase; (12)  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; (13) crotonase; (14) butyryl-CoA dehydrogenase; (15) phosphotransbutyrylase; (16) butyrate kinase; (17) butyraldehyde dehydrogenase; (18) butanol dehydrogenase.

으로 생성·소모되기 위하여 세포내에 적절한 redox potential이 유지되어야 하며 그러기 위해 hydrogenase에 의한 여분의 reducing power가 수소 발산에 의해 제거되어야 한다. 그러나 *C. acetobutylicum*은 적절한 조건에서는 lactate dehydrogenase에 의해 pyruvate로부터 젖산도 만드는데 이때는 2mole의 reducing equivalent가 제거될 수 있다.

*C. acetobutylicum*의 발효시 acidogenic phase에서 solventogenic phase로의 전환은 acidogenic phase에 관여하는 효소들의 activity가 감소하고(butyrate kinase는 예외) solventogenic phase에 관여한 효소들의 activity가 증가되며, 이에 따른 reducing power와 carbon flow의 diversion으로 특징지어진다. Acidogenic phase에서 생성된 아세트산과 부티르산은 CoA-transferase에 의해 uptake되어 각각

acetyl-CoA와 butyryl-CoA로 되어 에탄올과 부탄올로 바뀐다. 이때 관여하는 효소는 에탄올 생성시 acetaldehyde dehydrogenase와 ethanol dehydrogenase이며, 부탄올 생성시 butyraldehyde dehydrogenase와 butanol dehydrogenase이다. 또한 관여하는 cofactor로는 NADH와 NADPH가 있는데 각각의 cofactor에 대한 상대적 activity는 실험실마다 보도되는 결과가 조금씩 다르다. 아세트산은 acetoacetyl-CoA로부터 CoA-transferase와 acetoacetate decarboxylase의 작용에 의해 생성된다. 잠깐 언급했듯이 *C. acetobutylicum*의 대사에서는 reducing power의 흐름 변화를 잘 살펴봐야 한다. Acidogenic phase에서는 acetyl-CoA 생성시 환원된 ferredoxin을 수소 생성에 의해 regenerate한다. Pyruvate 생성시 생긴 NADH형태의 reducing power는 NADH-ferredoxin oxidoreductase와 hydrogenase의 작용에 의해 수소로 제거된다. 그럼으로써 생긴 충분한 acetyl-CoA는 ATP를 만들기 위해 산의 생성에 이용될 수 있다. 그 나머지의 reducing power는 butyryl-CoA의 생성시 소모된다. Solventogenic phase에서는 환원된 pyruvate linked ferredoxin이 수소 생성이 아닌 NADH-혹은 NADPH-ferredoxin oxidoreductase에 의해 regeneration되며 이때 생긴 reducing equivalents(NADH와 NADPH)가 solvent 생성에 쓰이게 된다. 발효과정의 이해를 돕기 위하여 한 예로 ATCC 824의 회분식 발효 결과를 Fig. 2에 나타내었다(1). 그러면 이제 solvent의 생성은 어떻게 조절되는가에 대하여 알아보자.

#### Acid와 Solvent생성-발효조건에 의한 영향

아세트산-부탄올 발효에 관한 연구는 이제까지 많이 되어 왔지만 solvent 생성을 조절하는 kinetic 그리고 생화학적 mechanism은 아직 확실히 이해되지 못하고 있는 상태이다. 이 section에서는 여러 lab에서의 실험 결과를 토대로 하여 조금이나마 solvent 생성 과정의 이해에 보탬을 주고자 한다. 일반적으로 pH가 4.5 이상이며 탄소원이 제한된 회분식 혹은 연속 발효시는 acid만이 생성된다(5, 6, 7, 8, 9). 반면에 pH가 5.2보다 낮고 질소원이 제한된 회분식 혹은 연속 발효시는 solvent가 생성된다(6, 7, 8, 10, 11). Phosphate나 iron이 제한된 pH 5.0 이하의 발효조건에서도 solvent가 잘 생성되었다(12, 13). 일반적으로 충분한 초기 탄소원의 존재가 solvent 생성을 유도하며, 탄소원 제한 발효시는 세포들

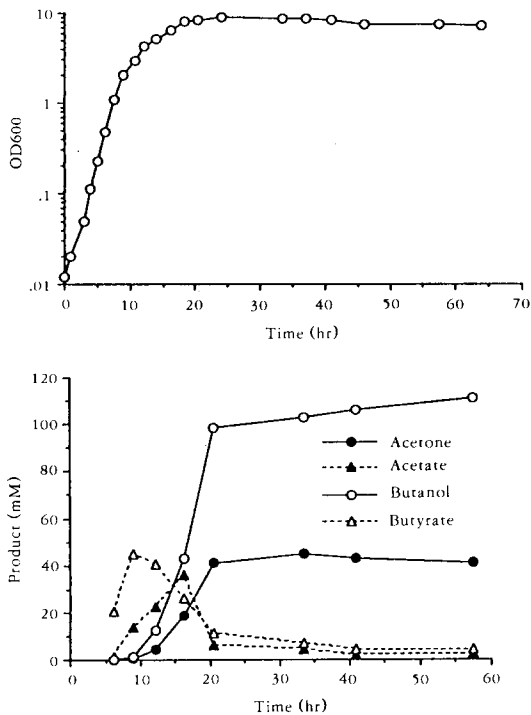


Fig. 2. The results from uncontrolled pH fermentation of *C. acetobutylicum* ATCC 824 (1). The growth medium was souble glucose medium which contained the following(per liter):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.75g;  $\text{K}_2\text{HP}_4$ , 0.75g;  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.4g;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.01g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01g;  $\text{NaCl}$ , 1.0g; yeast extract, 5.0g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.0g; and glucose, 50g. Ethanol concentration profile is not given to avoid complexity.

이 acid만을 생성함으로써 모자란 에너지를 충당한다. Phosphate, nitrogen, 그리고 iron limitation의 효과도 이처럼 biosynthetic energy(ATP)의 availability로 해석할 수 있다. 이러한 결과는 직접적으로 우리 group에서 행한 direct intracellular ATP 측정 (14)에 의해 확인되었다. 탄소원이 충분할 시 제한시와 비교하여 100~800%의 ATP양의 증가가 나타났으며 왕성한 solvent 생성이 뒤따랐다. 또한 biomass-recycle bioreactor에서의 향상된 solvent 생성도 높은 ATP양에 따른 것이라는 것을 밝혔다 (14, 15). 회분식 혹은 연속 발효에서 낮은 pH와 아세트산 혹은 부티르산의 첨가는 보통 solvent yield와 solvent 생성 속도를 빠르게 하는 것이 보도되었다(7, 9, 16, 17, 18, 19). Propionic, valeric,

acetoacetic산과 같은 발효 대사물과 다른 종류의 산의 첨가 역시 solvent 생성에 도움이 되었다(20, 21). 이러한 관찰로부터 solvent 생성의 시작은 낮은 pH와 높은 carboxylic acid농도의 combination한 효과에 의한 것임을 추측할 수 있다. Terraciano와 Kashket(22)는 solvent 생성이 individual 혹은 total undissociated 아세트산과 부티르산 농도와 가장 잘 correlation된다는 결과를 얻었다. 우리 group에서는 높은 부티르산의 농도와 낮은 intracellular pH가 solvent 생성에 중요하며 아세트산은 간접적으로 영향을 준다는 것을 밝혔다(23). 이러한 현상은 또한 높은 carboxylic-acid의 존재시에 세포들의 solvent 생성에 의한 cytosol detoxification으로도 해석될 수 있다(22, 24). Electron flow의 조절에 의한 solventogenesis의 연구 또한 많이 보고되었다(16, 25, 26, 27). Carbon monoxide의 gassing을 겸한 발효시 hydrogenase가 activity를 잃어 수소 생성이 방해되고, 따라서 많은 여분의 reducing power(많은 400%의 증가)가 solvent 생성으로 이용되는 것을 알게 되었다. Carbon monoxide gassing을 한 연속 발효시에는 부티르산의 uptake가 증가되어 부탄올이 많이 생성되었으며, 흥미롭게도 acetoacetate decarboxylase의 inactivation에 의해 아세톤이 생기지 않았다(27). 또한 methyl viologen과 같은 인공 전자전달물질과 다른 형태의 electrochemical energy 첨가에 의해 solvent 생성이 증가되는 결과도 보고되었다(28, 29). 간단히 다시 말하자면 부탄올 생성시 cofactor로 필요한 NADH와 NADPH가 많이 존재할 수 있는 조건에서 solvent 생성이 유도·증가된다고 볼 수 있다. 또한 가지 특색 있는 것은 *C. acetobutylicum* 세포들이 발효 동안에 많은 morphological change를 한다는 것이다. 여러 group에서 cell morphology solventogenesis의 연관성을 연구했으나 특별히 중요한 의미가 있다고 생각되지 않는다. 다만 Table 3에 요약한대로 변화가 있다는 사실만 기억하면 되겠다.

#### 효소조절-Enzyme levels vs. metabolic fluxes

Andersch 등은(30) 연속 이단 phosphate-limited 발효를 통해 acidogenic phase에 관여하는 효소들의 activity는 acid 생성시에 solvent 생성시 보다 높음을 알아내었다. 회분식 발효에서는 두 개의 phosphotranslase와 kinase(acidogenic enzymes)의 activity가 전체 발효과정 동안에 상당히 일정하

**Table 3. Morphological changes of *C. acetobutylicum* during fermentation.**

Time(hr)	Characteristics	Dimensions( $\mu\text{m}$ )
3	granulose negative highly motile actively dividing	4.7×0.72
27	granulose positive swolled phase-bright clostridial form	4.7×1.6
75	endospore formation smaller vegetative rods some free spores	2.6×0.6 2.4×1.2

게 유지되며 solventogenic phase에서 아주 조금 감소한다(31). 연속식 발효에서는 이 효소들은 높은 activity를 유지했으며 *in vivo* metabolic flux와는 잘 correlate하지 않았다(31). 그러므로 acid 생성에 관여하는 효소들의 조절은 enzyme level에서 행해짐을 알 수 있다. 알코올 생성에 관여하는 aldehyde-와 alcohol-dehydrogenase는 회분식 발효시 알코올 생성이 시작되기 전에 미리 induce된다(31, 32, 33, 34). 이들은 NADH와 NADPH를 모두 cofactor로 사용할 수 있는데 효소의 최적 activity가 두 cofactor따라 다른 time profile을 보여 주었다(31, 32). pH controlled 회분식 발효시에는 alcohol dehydrogenase의 activity가 각각 metabolite의 *in vivo* flux와 잘 일치되었다. 그러나 연속발효시 부탄올의 생성은 NADPH를 cofactor로 하는 butyraldehyde dehydrogenase activity에 크게 의존하며, 이 효소의 genetic level regulation에 의해 좌우됨을 알았다(31, 32). CoA-transferase의 activity는 회분식 발효시 solventogenic phase에서 가장 높았다(30, 31, 35). Acidogenic phase에서 생성된 산들이 CoA-transferase에 의해 uptake되어 에탄올과 부탄올로 전환되기 때문에 같은 양의 아세트산이 꼭 생길 것으로 추측되었다. 그러나 부티르산이 butyrate kinase와 phosphotransbutyrylase의 역방향 반응에 의해서도 uptake됨이 밝혀짐으로서 이 가설이 틀렸음이 증명되었다. pH controlled 회분식 발효시 아세트산의 생성은 CoA-transferase와 acetoacetate decarboxylase의 induction에 의해 genetic level에서 regulation됨을 알았고, 연속발효시는 오직 CoA-transferase의 induction에 의해 조절되는 것임을 알았다(31, 32). CoA-transferase는 포

도당에 의해서도 induce되고 acetoacetate decarboxylase는 carbon monoxide gassing에 의해 inhibition 받는다(4, 32).

### Solvent 생성 시작 조건-Shift from acidogenesis to solventogenesis

위의 두 section에서 기술한 바와 같이 acidogenesis로부터 solventogenesis로의 전이시에는 세포내의 energy level, reducing power, primary metabolite 농도, 그리고 효소 활성도 등에 여러 변화가 생긴다. 많은 group에서 독특한 연구를 통해 solvent 생성 시작 조건에 대한 나름대로의 해석을 했는데 이는 양적으로 너무 방대하고 간혹 모순되는 결과가 나타나서 solventogenesis를 유발하는 조건의 이해에 어려움을 주고 있다. 이러한 관점에서 Gottschalk의 group에서 1992년 말에 발표한 논문은 systematic한 연구를 통해 solventogenesis initiation 조건을 잘 규명했다고 할 수 있다(50). 그들은 연속배양시 pH를 5.6에서 4.3으로 낮추거나 50mM의 아세트산과 부티르산의 첨가, 그리고 methyl viologen을 첨가하여 그때의 physiological events를 살펴보았다. 그들은 전이시 세포내 산의 농도가 440mM까지 증가하고, solventogenesis 중에는 ATP와 NAD(P)H로 대변되는 reducing power의 농도가 진동하는 현상을 보이는 것이 흥미롭다. 이러한 연구결과를 토대로 볼 때 solventogenesis의 시작은 에너지 상태의 변화로 해석될 수 있으며 이는 ATP/ADP level의 변화와 NAD(P)H의 증가에 의해서라고 결론 지워질 수 있다.

### 부탄올의 저해작용

*C. acetobutylicum*의 발효에 의한 solvent 생산에 있어서 상대적으로 낮은 solvent 농도가 얻어진다는 것이 큰 단점중의 하나이다. 이 낮은 농도 때문에 큰 발효기가 필요하고 분리시(주로 증류로 해왔음) 에너지 비용이 많이 들게 된다(37, 38). 이것은 부탄올이 cell membrane에 손상을 입혀서 nutrient transport system과 membrane-bound ATPase activity 등을 저해시키기 때문이다. 부탄올의 이러한 chaotropic effect는 모든 lab에서 동의하여 보통 발효시 최종 부탄올의 농도가 15g/L를 넘을 수 없는 것으로 알려져 있다(4). 부탄올은 또한 cell membrane의 구성과 fluidity에 영향을 주어서 membrane  $\Delta\text{pH}$ 와  $\Delta\psi$ 를 파괴하고 intracellular pH와 ATP 농도를 낮추는 것이 발견되었다(22, 24, 39,

40). 부탄올에 내성을 갖는 변이 균주의 개발은 serial enrichment에 의해 혹은 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin(MNNG)에 의한 mutation에 의해 시도되었다(41, 42). 그러나 Baer 등의 연구결과(43)에서 보듯이 부탄올에 내성을 더 갖은 균주가 반드시 부탄올을 더 생산하지는 않았다. 현재로서 이 문제의 해결책은 세포들에게 좀 더 adaptation 하기 쉬운 환경을 만들어 줄 수 있는 연속 cell-recycle 발효기를 이용하는 것이 가장 적합하다고 보여진다(15). 하지만 궁극적으로는 많은 양의 solvent를 생산할 수 있는 균주의 개발과 동시에 cell membrane 자체의 modification이 불가피하다고 하겠다.

### Bioreactors

아세트 · 부탄올의 발효는 실험실에서나 실제 산업적으로나 모두 회분식이 쓰였다. 실제 생산공정에 쓰인 전형적인 반응기는 seed fermentor가 5,000gallon이고 production fermentor는 여러개로 구성된 60,000~500,000gallon의 capacity를 가진 것이다. 이제까지 알려진 바로는 pH control된 것이 없으며 초기 pH 6.0-6.5, 그리고 50-60h의 발효후 마지막 pH가 4.2-4.4 정도인 것으로 알려져 있다. 반응기 디자인과 조작에 관하여는 몇 개의 논문에 정리되어 있다(51, 52, 53, 54). 연속배양은 산업적으로는 쓰인 적이 없고 실험실 scale로 대사의 이해 및 solvent 연속생산의 가능성 타진으로만 사용되었다. Productivity를 높이기 위해 이미 기술한 바와 같이 biomass-recycle에 의한 연속배양도 역시 실험실 scale로 연구되었다. 부탄올의 저해 작용을 없애기 위한 *in situ* extraction coupled bioreactor도 연구가 많이 되었는데 이는 뒤에서 간략히 기술한다. 고정화 세포반응기도 사용이 되었는데 calcium alginate(55, 56)와 beechwood savings(57)이 세포 고정화에 사용되었다. 이렇게 고정화된 *C. acetobutylicum*으로 solvent productivity는 향상시킬 수 있었으나 본래 취지대로 연속배양을 오래 할 수는 없었다. 이는 역시 부탄올의 저해 작용 때문으로 해석된다. 또 한가지 흥미로운 것은 *C. acetobutylicum*의 shear activation에 의한 활성도 증가이다(58). *C. aceto-butylicum*을 capillary로 pumping하여 shear activation 했을 때 세포성장, 탄소원 소비, product 형성에 현저한 향상이 있었다.

아세트 · 부탄올 발효의 on-line analysis는 실제 생산에 이용된 바가 없으나 Papoutsakis 등의 "fer-

mentation equation"(59,60)과 "on-line chromatographic analysis"(61, 62)는 발효의 on-line analysis와 control strategy 설정에 도움이 될 것으로 보여진다.

### 발효의 안정성

1893년 이래 solvent를 생성하는 clostridia 균주가 회분식 발효에서 serial subculturing시 혹은 연속 발효시 degenerate되어 solvent를 더 이상 만들지 못하는 경우가 있다는 것이 종종 보고되어 왔다. 이러한 문제는 inoculum을 freshly germinated spore로서 사용함으로써 부분적으로 해결할 수 있었다(4, 44). 이러한 세포의 "loss of solvent-formation ability"는 영원한 것이 아니며 발효조건을 바꿔 줌으로써 회복될 수 있다고 보고 되었다(45, 46). 그러므로 이러한 "loss"는 genetic information의 loss가 아니고, 우리가 solvent 생성의 시작과 조절에 대한 molecular mechanism을 아직 확실히 이해하지 못하기 때문이라 함이 더 맞다고 할 수 있다. 특히 영국의 균주인 NCIMB 8052는 연속 발효시 상당히 불안정하다고 보도되어 알려져 있다.

### Solvent 분리 및 경제성

발효에 의해 생성된 solvent의 분리는 기질의 비용 다음으로 많이 차지하는 것으로서 경제성 향상에 큰 영향을 미친다(4, 44). 이제까지는 증류에 의해 분리가 되었으나 최근들어 보다 더 경제적인 방법들이 연구 발표되고 있다. 이들에 membrane을 사용하는 reverse osmosis와 pervaporation, absorbent의 사용, liquid-liquid extraction, 그리고 chemical의 사용 등이 있다(63). 이러한 새로운 분리 기술에 관심을 갖게 된 것은 세포성장 및 대사에 해가 되는 product의 *in situ* 제거에 의한 productivity의 향상이 주된 이유이다.

Pervaporation에 의한 부탄올의 분리는 Groot et al. (64)에 의해 사용되기도 했으나 아직 large-scale에서의 시험과 membrane의 개선, 그리고 removal selectivity를 높이는 문제가 해결되어야 한다. Garcia et al. (65)는 polyamide membrane를 이용하여 reverse osmosis에 의해 feed stream에서 70~80%이 부탄올을 제거할 수 있었다. Crossflow microfiltration을 이용한 시도도 있었는데 Afschar et al. (58)은 hollow fiber를 이용한 *C. acetobutylicum* ATCC 824의 연속 발효에 응용하였다. Dialysis는 membrane clogging 문제가 해결되지 않

는 한은 에탄올 발효와 마찬가지로 아세트-부탄올의 분리에도 사용될 가능성이 희박하다고 보여진다.

Liquid-Liquid extraction의 대표적인 방법인 solvent extraction도 역시 ABE 발효에 적용되었다. 우선은 효과적인 extractant의 선택이 연구되었는데 이 때 주로 고려된 사항들은 high distribution coefficient와 세포에의 non-toxicity이다. Ishii 등은 (66) oleyl alcohol과 C-20 guerbet alcohol을 이용한 *in situ* extraction을 통해 부탄올 생산을 약 2.6 배 정도 향상시킬 수 있었다. Entractant는 6번 정도 재사용될 수 있었으나 결국에는 다른 발효산물의 축적에 의한 저해작용으로 발효가 계속될 수 없었다. Solvent를 사용한 분리는 최근 환경오염 문제등 때문에 사용을 되도록 자제하고 있는 추세이로, 이러한 관점에서 보면 오히려 two-phase aqueous extraction의 사용이 바람직할 수도 있다.

Adsorption을 이용한 분리도 많이 연구가 되어 왔다. Groot과 Luyben(67)은 activated carbon과 XAD polymeric resin을 이용하였고, Nielson 등은 (68) Amberlite XAD-4와 Bonopore를 이용하여 단위 g adsorbent당 약 80mg의 부탄올을 흡착시킬 수 있었다. 하지만 이 방법은 alcohol과 더불어 다른 intermediate products도 같이 제거하게 되며 많은 양의 흡착제가 사용되므로 부적합하다고 보여진다.

위에서 본 것과 같이 ABE 발효의 경제성 향상을 위해 다양한 분리 방법이 연구개발되고 있으며 이들에는 각각의 장단점들이 Ennis 등(63)이 정리한 것을 토대로 다시 정리한 결과를 Table 5에 정리하였다.

경제성 타진에 관하여는 Linden et al.(37)이 정리한 것과 최근에 whey permeate를 기질로 유동층 반응기 발효와 gas stripping에 의한 분리를 한 예로 계산한 Maddox의 논문을(47) 보면 도움이 될 것이다. 참고로 크게 나누어 어느 비용이 크게 좌우되어

**Table 5. The characteristics of product recovery systems for the ABE fermentation.**

System	Energy required	Capital cost	In-situ usage	Current state
Distillation	Medium	Medium-high	No	Production scale
Liquid-Liquid Extraction	Low to Medium	High	Yes	Lab scale
Pervaporation	Low to Medium	Medium	Yes	Semi-commercial
Reverse Osmosis	Low	High	Yes	Pilot scale
Adsorption	Low	Medium	Yes	Pilot scale
Vacuum Fermentation	Medium	Medium	Yes	Pilot scale
Flash Evaporation	High	Unkown	Yes	Pilot scale

가는 Table 4에 보여지듯이 에탄올 공정의 비용 % 계산을 살펴보면 어렵짐작이 될 것이다(44).

### 결 론

우리들은 현재 세계 각국의 부단한 노력끝에 *C. acetobutylicum*의 발효에 의한 아세트-부탄올 생산에 대하여 전례없는 많은 지식과 기술이 축적되어 있다. 지난 5~6년간에 걸쳐 시도되어온 recombinant DNA technique을 이용한 metabolic engineering에 의한 *C. acetobutylicum* 균주의 개량 시도는 이러한 지도를 토대로 하는 것이다(48, 49). 대사공학에 의해 *C. acetobutylicum*의 primary metabolism을 우리는 원하는 방향으로 바꾸어 생성되는 solvent의 농도를 높이는 것 이외에도 solvent 특히 부탄올의 toxicity 문제를 해결하는 것과 보다 값싸고 다양한 기질을 사용할 수 있도록 하는 것이 앞으로 연구할 과제라고 하겠다. 이러한 노력이 경주되어 만들어진 새로운 아세트-부탄올 발효공정은 학문적으로 그리고 산업적으로 많은 기여를 하게 될 것임에 틀림없다.

### 감 사

이 원고 작성에 도움을 준 생물공정연구센터의 김 미희양께 감사드린다.

**Table 4. Comparison of ethanol production cost by chemical method vs. fermentation.**

Cost factor	Percentage(%)	
	Chemical route	Fermentation
Rew materials	62	50
Capital depreciation and overhead	13	25
Utilities	18	15
Labor and maintenance	7	10

## 참고문헌

1. S. Y. Lee(1991) Ph. D. thesis, Northwestern Univ., IL, U. S. A.
2. M. Young, N. P. Minton, and W. L. Staudenbauer(1989) FEMS Microbiol. Rev., **63**, 301
3. S. Y. Lee, G. N. Bennett, and E. T. Papoutsakis(1992) Biotechnol. Lett, **14**, 427.
4. D. T. Jones and D. R. Woods(1986) Microbiol. Rev., **50**, 484.
5. H. Bahl, W. Andersch, K. Braun and G. Gottschalk(1982) Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **14**, 17.
6. J. C. Gottschall and J. G. Morris(1981) Biotechnol. Lett., **3**, 525.
7. I. M. L. Jobses and J. A. Roels(1983) Biotechnol. Bioeng., **25**, 1187.
8. F. Monot and J. -M. Engasser(1983) Biotechnol. Bioeng, Symp., **13**, 207.
9. F. Monot, J. R. Martin, H. Petitemange, and R. Gay(1982) Appl. Environ. Microbiol., **44**, 1318.
10. W. Andersch, H. Bahl, and G. Gottschalk (1982) Biotechnol. Lett., **4**, 29.
11. J. W. Roos, J. K. McLaughlin, and E. T. Papoutsakis(1985) Biotechnol. Bioeng., **27**, 681.
12. H. Bahl, W. Andersch, and G. Gottschalk (1982) Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **15**, 201.
13. H. Bahl, M. Gottwald, A. Kuhn, V. Rale, W. Andersch, and G. Gottschalk(1986) Appl. Environ. Microbiol., **52**, 169.
14. C. L. Meyer and E. T. Papoutsakis(1989) Bioproc. Eng., **4**, 49.
15. C. L. Meyer and E. T. Papoutsakis(1989) Bioproc. Eng., **4**, 49.
16. R. Datta and J. G. Zeikus(1985) Appl. Environ. Microbiol., **49**, 522.
17. O. Fond, G. Matta-Ammouri, H. Petitemange and J. M. Engasser(1985) Appl. Microbiol. Biotechnol., **22**, 195.
18. M. Huesemann, E. T. Papoutsakis(1986) Biotechnol. Lett., **8**, 37.
19. J. R. Martin, H. Petitemange, J. Ballongue, and R. Gay(1983) Biotechnol. Lett., **5**, 89.
20. R. A. Holt, G. M. Stephens, and J. G. Morris (1984) Appl. Environ. Microbiol., **48**, 1166.
21. J. B. Jewell, J. B. Continho, and A. M. Kropinaki(1986) Current Microbiol., **13**, 215.
22. J. S. Terracciano and E. R. Kashket(1986) Appl. Environ. Microbiol., **52**, 86.
23. M. H. W. Huesemann and E. T. Papoutsakis (1988) Biotechnol. Bioeng., **32**, 843.
24. L. Huang, C. W. Forsberg, and L. N. Gibbins (1986) Appl. Environ. Microbiol. **51**, 1230.
25. B. H. Kim, P. Bellow, R. Datta, and J. G. Zeikus(1984) Appl. Environ. Microbiol., **48**, 764.
26. C. L. Meyer, J. K. McLaughlin, and E. T., Papoutsakis(1985) Biotechnol. Lett., **7**, 37.
27. C. L., Meyer, J. W. Roos, and E. T. Papoutsakis(1986) Appl. Microbiol. Biotechnol., **24**, 159.
28. G. Rao and R. Mutharasan(1986) Biotechnol. Lett., **8**, 893.
29. T. S. Kim and B. H. Kim(1988) Biotechnol. Lett., **10**, 123.
30. W. Andersch, H. Bahl, and G. Gottschalk (1983) Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **18**, 327.
31. M. H. W. Huesemann and E. T. Papoutsakis (1989) Appl. Microbiol. Biotechnol., **30**, 585.
32. M. H. W. Huesemann and E. T. Papoutsakis (1989) Appl. Microbiol. Biotechnol., **31**, 435.
33. P. Duerre, A. Kuhn, M. Gottwald, and G. Gottschalk(1987) Appl. Microbiol. Biotechnol., **26**, 268.
34. N. R. Palosaari and P. Rogers(1988) J. Bacteriol. **170**, 2971.
35. M. G. N. Hartmanis and S. Gatenbeck(1984) Appl. Environ. Microbiol., **47**, 1277.
36. J. W. Cary, D. J. and Petersen, E. T. Papoutsakis, and G. N. Bennett(1988) J. Bacteriol., **170**, 4613.
37. C.L. Cooney and A. E. Humphery(1985) Arch. Microbiol., **143**, 42.
40. L. K. Bowles and W. L. Ellefson(1985) Appl. Environ. Microbiol., **50**, 1165.



41. M. Hermann, F. Fayolle, R. Marachal, L. Podvin, M. Sebald, and J. -P. Vandecasteele (1985) *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1238.
42. Y. Lin and H. P. Blachek(1983) *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 966.
43. S. H. Baer, H.P. Blachek, and T. L. Smith (1987) *Appl. Env. Microbiol.*, **53**, 2854.
44. B. McNeil and B. Kristiansen(1986) *Adv. Appl. Microbiol.*, **31**, 61.
45. J. Y. Barbeau, R. Marchal, and J. P. Vandecasteele(1988) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 369.
47. N. Qureshi and I. S. Maddox(1991) *Austral. J. Biotechnol.*, **5**, 56.
48. S. Y. Lee, L. D. Mermelstein, G. N. Bennett, and E. T. Papoutsakis(1992) *Ann. NY Acad. Sci.*, in press.
49. L. D. Mermelstein, N. E. Welker, G. N. Bennett, and E. T. Papoutsakis(1992) *Bio/Technol.*, **10**, 190.
50. H. Grope and G. Gottschalk(1992) *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3896.
51. B. Velesky, A. Mulchandani, and J. Williams (1981) *Ann. NY Acad. Sci.*, **369**, 205.
52. S. C. Beesch(1952) *Ind. Eng. Chem.*, **44**, 1677.
53. M. J. Spivey(1978) *Process Biochem.*, **13**, 2.
54. T. G. Lenz and A. R. Moreira(1980) *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **19**, 478.
55. L. Haggstrom and N. Molin(1980) *Biotechnol. Lett.*, **2**, 241.
56. C. Forberg, S. Enfors, and L. Haggstrom (1983) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 143.
57. C. Forberg and L. Haggstrom(1985) *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 230.
58. A. Afschar, K. Schaller, and K. Schugerl (1986) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 315.
59. E. T. Papoutsakis(1984) *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 174.
60. E. T. Papoutsakis and C. L. Meyer(1985) *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 67.
61. E. T. Papoutsakis and C. L. Meyer, and E. T. Papoutsakis(1985) *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1246.
62. C. Meyer, J. McLaughlin, and E. T. Papoutsakis(1986) *Ann. NY Acad. Sci.*, **469**, 350.
63. B. M. Ennis, N. Gutierrez, and I. S. Maddox (1986) *Process Biochem.*, 131.
64. W. Groot, G. Schoutens, P. Van Beelen, C. Van den Oever, and N. Kossen(1984) *Biotechnol. Lett.*, **6**, 789.
65. A. Garcia, E. Iannotti, and J. Fisher(1984) *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **14**, 543.
66. S. Ishii, M. Taja, and T. Kobayashi(1985) *J. Chem. Eng. Japan*, **18**, 125.
67. W. J. Groot and K. Luyben(1986) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 29.
68. L. Nielson, M. Larsson, O. Holst, and B. Mattisson(1988) *Appl. Microbiol.*, **28**, 335.