

부레옥잠을 이용한 *Clostridium beijerinckii*의 Biobutanol 생산

박봉제, 박혜민, 윤현식*

Production of Biobutanol by *Clostridium beijerinckii* from Water Hyacinth

Bong-Je Park, Hye Min Park, and Hyun Shik Yun*

Received: 21 February 2016 / Revised: 21 March 2016 / Accepted: 22 March 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Biofuel has been considered as promising renewable energy to solve various problems that result from increasing usage of fossil fuels since the early 20th century. In terms of chemical and physical properties as fuel, biobutanol has more merits than bioethanol. It could replace gasoline for transportation and industrial demand is increasing significantly. Production of butanol can be achieved by chemical synthesis or by microbial fermentation. The water hyacinth, an aquatic macrophyte, originated from tropical South America but is currently distributed all over the world. Water hyacinth has excellent water purification capacity and it can be utilized as animal feed, organic fertilizer, and biomass feedstock. However, it can cause problems in the rivers and lakes due to its rapid growth and dense mats formation. In this study, the potential of water hyacinth was evaluated as a lignocellulosic biomass feedstock in biobutanol fermentation by using *Clostridium beijerinckii*. Water hyacinth was converted to water hyacinth hydrolysate medium through pretreatment and saccharification. It was found that productivity of water hyacinth hydrolysate medium on biobutanol production was comparable to general medium.

Keywords: Water hyacinth, Lignocellulosic biomass, Biobutanol, *Clostridium beijerinckii*, CaCO₃ alginate bead

1. INTRODUCTION

화석연료는 20세기 초부터 전 세계에서 사용이 증가되어 왔으며 최근에는 온실가스의 배출로 인한 환경문제와 원유가격의 잦은 변화로 경제적인 문제를 일으키고 있다 [1-3]. 전 세계적으로 화석 연료를 주요 에너지로 약 80.3% 이상 사용하고 있고 그 양의 50% 이상을 수송용 연료로 사용하고 있다 [2]. 이러한 상황은 화석연료를 수입에 의존하는 국가에 상당히 부담이 되고 있어서 이에 따라 화석연료를 대체할 수 있는 신재생 에너지의 필요성이 증가하고 있다. 특히 휘발유를 대체 할 수 있는 수송용 바이오 연료로 바이오에탄올과 바이오부탄올의 필요성이 크게 높아지고 있으며 [3], 바이오 연료를 생산하기 위해 셀룰로오스계 바이오매스는 신재생 에너지의 풍부한 재생 가능한 자원으로 언급된다 [4].

최근 바이오 연료로 관심을 끌고 있는 바이오부탄올의 생산은 미생물 발효를 이용하여 1861년 파스퇴르에 의해 처음 보고되었고 [5], 현재까지 미생물을 이용한 바이오부탄올 생산에 관한 여러 연구들이 진행되고 있다 [6-10]. 바이오부탄올은 바이오에탄올보다 화학적, 물리적인 특성이 수송 연료로 사용하기에 더 적합하다. 연료로 사용하는데 적합한 바이오부탄올의 장점은 낮은 증기압과 더 높은 발화점을 가지는 등 다양하며 [11] 바이오부탄올을 생산하는 대표적인 미생물은 *Clostridium acetobutylicum*이고 부산물로 아세트산과 에탄올을 생산한다 [12]. 이외에도 바이오부탄올을 생산하는 미생물에는 *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum* 등이 있다 [6, 13-16].

부레옥잠은 수생식물로 주로 열대지역에서 서식하며 부레옥잠의 원산지는 남아메리카 아마존이지만 현재는 전 세계에 분포되어 산야 및 습지에서 서식하고 7-9월에 개화한다

인하대학교 생물공학과
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 22212, Korea
Tel: +82-32-860-7517; Fax: +82-32-872-4046
e-mail: hyunshik@inha.ac.kr

[17]. 부레옥잠은 우수한 수질 정화능력이 있다 [18]. 한편 부레옥잠은 가축의 사료, 유기질 비료, 바이오매스 원료물질 등으로 활용할 수 있다 [19]. 부레옥잠은 질소원, 탄소원, 조단백질, 조섬유질, NDF (neutral detergent fiber), ADF (acid detergent fiber) 이외에 여러 영양 염류들이 함유되어 있으며 [20], 빠른 성장으로 풍부한 자원을 확보할 수 있고, 저렴한 원가로 에너지 생산을 위한 바이오매스 원료 물질로 사용할 수 있다. 부레옥잠을 바이오매스로 이용하여 에너지를 생산하기 위한 연구도 여러 나라에서 진행되고 있다 [21-26]. 본 연구에서는 부레옥잠은 *C. beijerinckii*의 바이오부탄올 생산을 위한 바이오매스 원료 물질로 사용하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 전처리

본 연구에 사용된 부레옥잠은 경기도 용인시에 위치한 신갈 저수지에서 확보하였다. 확보한 부레옥잠의 줄기는 불순물 제거를 위해 물로 세척하였다. 세척한 부레옥잠의 줄기는 105°C에서 건조하였다. 건조한 부레옥잠은 일정 크기의 분말 입자를 얻기 위해 체 (USA standard testing sieve no. 30)를 이용해 600 μm 이하의 크기로 만들었다.

부레옥잠 배지의 이용가능성을 알아보기 위해 성분 분석을 하였다. 1 g의 분말 부레옥잠과 72% (w/w) 황산 (H_2SO_4) 수용액 10 g을 함께 30°C에서 2 시간 동안 반응을 하였다. 반응물은 황산의 농도를 4% (w/v)가 되도록 증류수로 희석하고 120°C에서 1시간 동안 후 고체와 액체 상으로 분리하였다. 액체 상은 pH 5~6으로 만들기 위해 탄산칼슘 (CaCO_3)을 이용하였다. 중화 시킨 용액은 당 성분과 양을 분석하기 위해 HPLC (Younglin, Anyang, Korea)로 분석하였다. 고체 상은 무게 측정을 위해서 105°C 드라이 오븐 (dry oven)에서 건조하였다. 건조된 샘플은 리그닌 (lignin)과 재 (ash)의 양을 계산하기 위하여 550°C의 머플로 (muffle furnace)에서 4시간 가열하고 무게를 측정하였다.

60 g의 분말 부레옥잠은 전처리를 위해 7% (w/v) 수산화나트륨 (NaOH) 수용액 1 L와 함께 100°C에서 2시간 동안 가수분해 반응을 시켰다. 가수분해된 샘플에 30% (w/v) 황산 수용액이 15배 희석되도록 황산을 넣어주고 상온에서 24시간 동안 반응을 하였다. 전처리 과정을 마친 반응물은 75 μm 크기의 구멍을 가진 체 (USA standard testing sieve no. 200)를 이용해 수돗물로 세척을 하였다. 세척한 샘플은 동결건조하고 30 mM 황산 수용액과 함께 멸균하였다. 멸균된 용액은 pH 5로 조절하고 당화를 위해 Celluclast 1.5L (Novozymes, Franklinton, USA)와 Viscozyme (Novozymes, Franklinton, USA)을 1:1 비율로 전체 부피의 1%가 되도록 첨가하였다. 당화 효소가 첨가된 반응물은 50°C 진탕 배양기에서 200 rpm으로 96시간 동안 당화 반응을 하였다. 당화 과정 후 반응물은 배양 배지로 사용하기 위하여 100°C에서 10분 동안 가열하여 당화 효소를 불활성화하였다. 분리된 불활성화한

반응물 상등액은 1 g/L 효모 추출물 (yeast extract)을 첨가하고 멸균하였다. 전처리와 당화 과정을 거친 부레옥잠은 접종하기 전에 P_2 mineral stock [27]을 1 mL 첨가하여 미생물 배지로 사용하였다.

2.2. 배양

바이오부탄올 생산 균주는 *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (ATCC 51743) 를 사용하였다. 전 배양을 위해 RCM (reinforced clostridial medium) 배지를 사용하였으며 조성은 포도당 5 g/L, 효모 추출물 3 g/L, 쇠고기 추출물 (beef extract) 10 g/L, 트립톤 (tryptone) 5 g/L, 펩톤 (peptone) 5 g/L, 가용성 전분 (soluble starch) 1 g/L, 시스테인 염산염 (cysteine hydrochloride) 0.5 g/L, 염화나트륨 (NaCl) 5 g/L, 아세트산나트륨 (sodium acetate) 3 g/L이다. 전 배양된 배양액을 부레옥잠 배지의 5%가 되도록 접종하였고 혐기 조건 하에 37°C에서 배양하였다. 본 배양 중에는 기질의 소모, 균주의 성장, pH, 바이오부탄올의 생산 등을 측정하기 위하여 접종 후 6시간마다 샘플링을 하였다. 바이오부탄올 생산성 비교를 위하여 사용한 CAB 배지의 조성은 포도당 18 g/L, 효모 추출물 4 g/L, 트립톤 1 g/L, 인산수소이칼륨 (K_2HPO_4) 1.5 g/L, 인산이수소칼륨 (KH_2PO_4) 1.5 g/L, 아스파라긴 (asparagine) 0.5 g/L, 황산마그네슘 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.1 g/L, 황산망간 (II) 1 수화물 ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.1 g/L, 황산철 (II) 7 수화물 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.015 g/L, 염화나트륨 0.1 g/L이다. 바이오부탄올의 생산에 영향을 주는 인자를 알아보기 위해 본 배양 중에 무기물 (인산수소이칼륨, 인산이수소칼륨, 황산마그네슘, 황산망간 (II) 1 수화물, 황산철 (II) 7 수화물, 염화나트륨)의 첨가, 수산화나트륨의 첨가, 초기 pH의 조건을 조절하였다. P_2 mineral stock은 무기물 첨가에 따른 효과를 알아보기 위해 배양 0, 6, 12시간에 1 mL씩 0회, 1회, 2회, 3회 첨가하고 부탄올 농도가 최고값에 도달할 때까지 배양을 하였다. 3 M 수산화나트륨 수용액은 배양 중 pH 안정화에 대한 효과를 알아보기 위해 6, 12, 18시간에 100 μL 씩 0회, 1회, 2회, 3회 첨가하고 부탄올 농도가 최고값에 도달할 때까지 배양을 하였다. 초기 pH는 pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0로 조절하여 배양을 하였다.

2.3. 탄산칼슘 비드를 이용한 완충 시스템

바이오부탄올 생산을 위한 본 배양에서 pH를 일정하게 유지하기 위하여 탄산칼슘 비드 (CaCO_3 bead)를 제조하였다 [28]. 알긴산나트륨 (sodium alginate) 2% (w/v) 수용액에 탄산칼슘을 15% 되도록 첨가하였다. 탄산칼슘이 혼합된 알긴산나트륨 콜로이드액은 100 mM CaCl_2 수용액에 떨어뜨려 직경이 약 2.1 mm인 비드 (bead)로 제조를 하였다. 제조된 탄산칼슘 비드는 증류수로 3회 세척하고 105°C 드라이오븐에서 6시간 건조한 후 멸균하여 사용하였다. 탄산칼슘 비드는 완충 효과를 알아보기 위하여 10% (w/v) 이 되도록 배양액에 첨가하여 탄산칼슘 비드를 첨가하지 않은 배양액과 비교하였다. 배양 중에 균주의 성장속도가 최대로 유도될 수 있는 탄산칼슘 비드의 회수 시간을 알아보기 위하여 배양액만을 배양 후 6,

12, 18, 24시간에서 새로운 플라스크로 이동하고 탄산칼슘 비드는 첨가 양에 따른 완충 효과의 차이를 알아보기 위하여 배양액의 5%, 10%, 15%, 20% (w/v)가 되도록 첨가하고 배양 후 6시간에 회수를 하였다.

2.4. 분석

배양에서 OD (optical density)는 UV 가시분광광도법 (visible spectrophotometer; UV-1601, Shimadzu, Tokyo, Japan)으로 측정하였다. pH 값은 pH 측정기 (MP220, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)로 측정하였다. HPLC 분석은 배양액의 당, 유기산 (organic acid) 및 용제 (solvent)의 정량분석을 위하여 사용하였다. HPLC 분석을 위한 샘플은 원심 분리한 상등액을 사용하였다. 상등액은 분석에 불필요한 불순물을 제거하기 위하여 0.2 µm RC-membrane syringe filter (Satorius, Gottingen, Germany)로 거른 후에 사용하였다. HPLC는 HPLC 컬럼 (300 mm × 7.8 mm, 9 µm particle size; HPX-87H anion exchange column, Bio-Rad, Hercules, USA)과 RI detector (RI 750F, Younglin, Anyang, Korea)를 함께 사용하였다. 완충제 (buffer)는 0.014 M 황산 수용액을 사용하고 유속은 0.6 mL/min, 컬럼 온도는 40°C로 유지하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 부레옥잠 배지 사용을 위한 전처리

부레옥잠의 당 성분은 24% 셀룰로오스 (cellulose), 10% 자일란 (xylan), 3% 아라비노오스 (arabinose)이었다. 24% 셀룰로오스는 당화 과정을 거쳐 포도당이 될 수 있어서 미생물 배양에서 탄소원으로 사용될 수 있다. 리그닌 (11%)은 다른 리그노셀룰로오스 (lignocellulose) 계열의 바이오매스보다 적은 양인 것을 알 수 있다. 부레옥잠의 배지 전처리과정에서 전처리 전의 부레옥잠 시료로 환산하면 100 g/L 건조 중량 부레옥잠당 약 18 g/L 포도당이 생성되었다 (data not shown).

3.2. 부레옥잠 배지에서의 바이오부탄올 생산

부레옥잠 배지에서의 바이오부탄올 생산의 효율성을 알아보기 위하여 포도당 18 g/L의 CAB 배지에서의 바이오부탄올 생산과 함께 비교 실험을 진행하였다 (Fig. 1). 포도당 농도가 18 g/L인 부레옥잠 배지와 CAB 배지의 수율 (yield)은 각각 48시간과 36시간에서 0.238 g/g와 0.218 g/g이었고, 생산성 (productivity)은 각각 0.093 g/L/h와 0.110 g/L/h이었다. CAB 배지가 생산성 측면에서는 효과가 더 좋았지만 부레옥잠 배지는 수율 측면에서 더 좋은 효과를 보였다.

미생물 성장에는 무기물이 필요하므로 바이오부탄올 생산성에 무기물의 요구 및 공급 횟수에 따른 영향을 알아보기 위하여 배양 중에 무기물을 추가적으로 공급하였다 (Fig. 2). 무기물의 공급량이 증가할수록 균주의 생장이 가속화되었고, 이에 따라 포도당도 빠르게 소모되었다. 무기물을 0회, 1회, 2회, 3회 공급하였을 때 바이오부탄올의 수율은 각각 0.223 g/

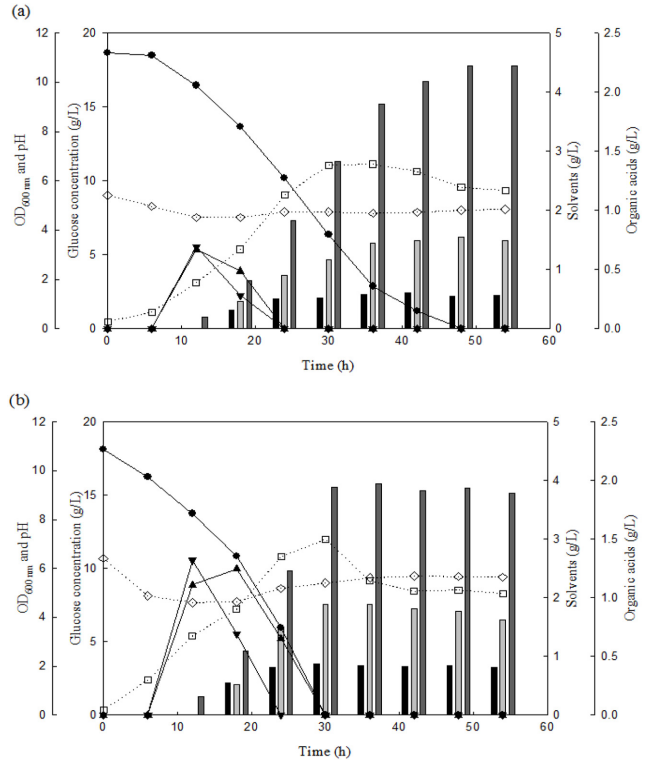


Fig. 1. Change in the concentration of acetone, butanol, and organic acids during flask culture of *C. beijerinckii* on water hyacinth medium (a) and on CAB medium (b) (■: Ethanol, □: Acetone, ▒: Butanol, ●: Glucose, ▲: Acetic acid, ▼: Butyric acid, □: OD, ◇: pH).

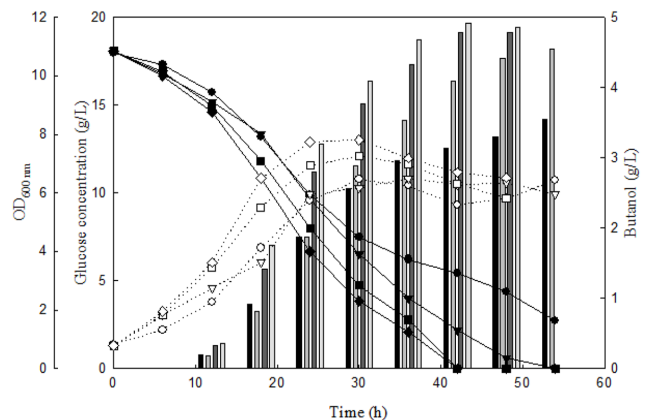


Fig. 2. Effect of mineral addition on the production of butanol (Butanol - ■: no addition, □: once, ▒: twice, ▓: three times, Glucose - ●: no addition, ▼: once, ■: twice, ◆: three times, OD - ○: no addition, ◇: once, □: twice, ◇: three times).

g, 0.252 g/g, 0.264 g/g, 0.272 g/g이었고, 생산성은 각각 0.066 g/L/h, 0.084 g/L/h, 0.114 g/L/h, 0.117 g/L/h이었다. 무기물 공

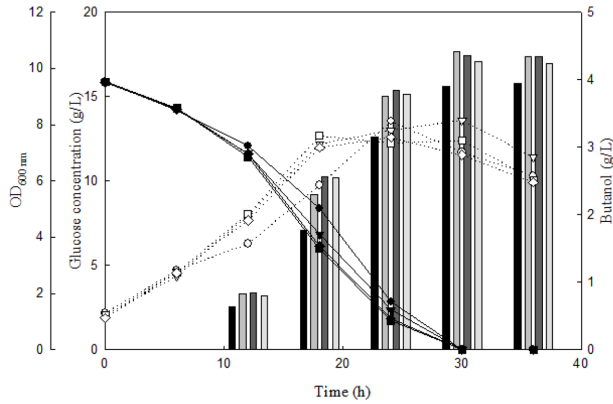


Fig. 3. Effect of NaOH addition on the production of butanol (Butanol - ■: no addition, ▨: once, ▩: twice, ▪: three times, Glucose - ●: no addition, ▼: once, ■: twice, ◆: three times, OD - ○: no addition, ▽: once, □: twice, ◇: three times).

급량의 증가는 수율과 생산성 측면에서 좋은 효과를 보였다. 바이오부탄올 생산을 위한 배양 중에 미생물의 생장은 유기산의 생성으로 pH 변화가 발생하여 둔화되고 용제 (solvent)의 생성이 유도된다. pH의 변화를 최소화하면서 용제 (solvent)의 생성을 유도하기 위하여 배양 중에 수산화나트륨을 추가적으로 첨가하였다 (Fig. 3). 수산화나트륨을 1회 첨가하였을 때 바이오부탄올의 수율은 0.278 g/g, 생산성은 0.147 g/L/h이어서 첨가하지 않을 때 수율 (0.246 g/g), 생산성 (0.130 g/L/h)보다 증가하였으나 2회, 3회에서는 큰 차이가 없었다. 수산화나트륨을 첨가했을 때 수율과 생산성이 증가하였고 미생물의 성장 속도도 빨랐다.

부레옥잠 배지에서서의 바이오부탄올 생산성에 배양 초기의 pH에 따른 영향을 알아보았다. 초기 pH가 pH 7.0일 때 바이오부탄올의 생산이 가장 좋은 효과를 나타냈지만 pH 5.5는 제외한 pH 6.0~7.0 결과는 유사한 균주 성장과 바이오부탄올 생산을 나타냈다. 모든 초기의 pH 값은 배양 18시간 부근에서 pH 4.5로 변화하는 것을 알 수 있다 (data not shown).

3.3. 탄산칼슘 비드를 이용한 완충 시스템

탄산칼슘은 배양에서 생성된 유기산과 반응하여 pH가 낮아지는 것을 막아주는 역할을 한다. 탄산칼슘 알지네이트 비드 (CaCO₃, alginate bead)는 분말보다 취급이 용이하고 회수 및 재사용이 가능하여 경제성이 크며 배양 시 흡광도를 이용한 성장 정도를 측정할 수 있기 때문에 편리하다 [28].

바이오부탄올 발효에 있어서 pH의 영향을 보기 위하여 탄산칼슘 알지네이트 비드를 pH의 급격한 변화를 막아주는 완충제로 이용하였고 완충 효과를 알아보기 위하여 탄산칼슘 비드를 첨가하였다 (Fig. 4). 탄산칼슘 비드를 첨가하였을 때 바이오부탄올의 수율은 0.189 g/g, 생산성은 0.089 g/L/h이었다. 탄산칼슘 비드를 첨가한 배양에서는 균주의 성장 속도는 첨가하지 않는 경우의 2배 이상 빠른 것을 확인하였다.

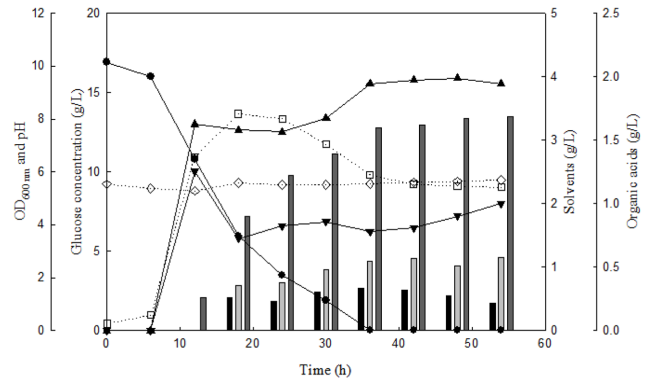


Fig. 4. Change in the concentration of acetone, butanol, and organic acids during cultivation of *C. beijerinckii* with CaCO₃ bead (■: Ethanol, ▨: Acetone, ▩: Butanol, ●: Glucose, ▲: Acetic acid, ▼: Butyric acid, ○: OD, ◇: pH).

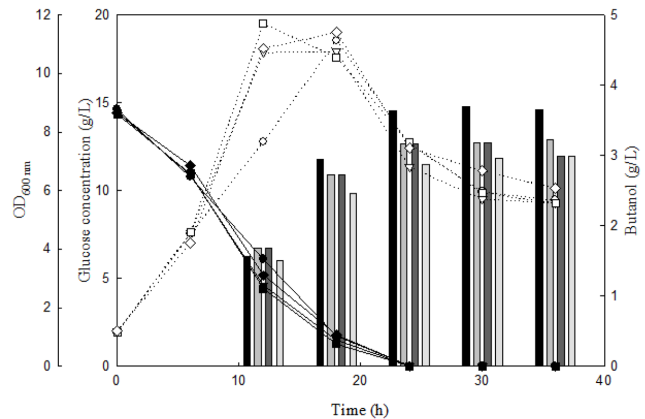


Fig. 5. Effect of CaCO₃ bead removal during cultivation on the production of butanol (Butanol - ■: 6 h, ▨: 12 h, ▩: 18 h, ▪: 24 h, Glucose - ●: 6 h, ▼: 12 h, ■: 18 h, ◆: 24 h, OD - ○: 6 h, ▽: 12 h, □: 18 h, ◇: 24 h).

탄산칼슘 비드를 첨가하였을 경우 바이오부탄올 농도가 낮은 이유는 탄산칼슘 비드가 배양액의 pH를 지속적으로 안정시키는 역할을 하여 산 발생 (acidogenesis)에서 용제 발생 (solventogenesis)으로 전환이 이루어지지 않은 결과이다 [29]. 따라서 바이오부탄올 생산 균주가 충분히 성장할 수 있는 상태 하에 탄산칼슘 비드를 회수하는 실험을 진행하였다 (Fig. 5). 탄산칼슘 비드를 배양 후 각 6, 12, 18, 24시간에서 회수하였을 때 6시간 후 회수 실험에서 바이오부탄올의 수율은 0.249 g/g, 생산성은 0.152 g/L/h로 다른 회수 시간과 비교하여 가장 좋은 효과를 보였다. 이 결과를 탄산칼슘 비드를 첨가하지 않은 경우와 비교하면 바이오부탄올의 수율은 크게 차이가 없었지만 배양 시간이 크게 단축되어 생산성은 탄산칼슘 비드를 첨가하지 않은 포도당 농도가 18 g/L인 부레옥잠 배지의 결과보다 63% 이상 향상되었다.

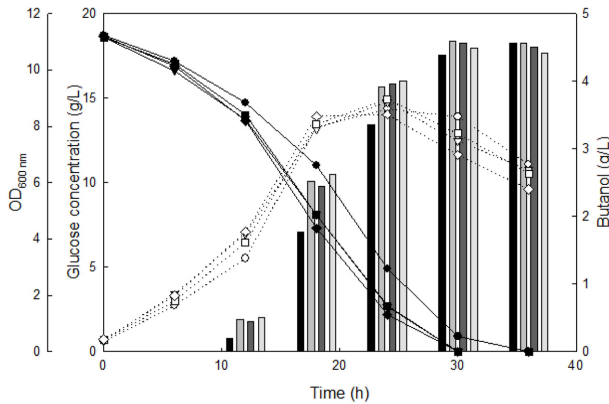


Fig. 6. Effect of the amount of CaCO_3 bead added during cultivation on the production of butanol (Butanol - ■: 5%, ▨: 10%, ▩: 15%, ▪: 20%, Glucose - ●: 5%, ▼: 10%, ■: 15%, ◆: 20%, OD - ○: 5%, ▽: 10%, □: 15%, ◇: 20%).

탄산칼슘 비드의 첨가량에 따른 바이오부탄올의 생산을 비교하기 위하여 각각 5%, 10%, 15%, 20% 탄산칼슘 비드를 첨가하여 배양을 진행하였다 (Fig. 6). 10% 탄산칼슘 비드를 첨가하였을 때 바이오부탄올의 수율은 0.247 g/g, 생산성은 0.153 g/L/h로 15% 및 20% 탄산칼슘 비드와 비교하여 가장 좋은 효과를 보였지만 큰 차이는 없었다.

4. CONCLUSION

목질계 바이오매스인 부레옥잠을 전처리 과정과 당화 과정을 거쳐 부레옥잠 배지로 만들었고 *C. beijerinckii* NCIMB 8052의 바이오부탄올 생산으로 산업적 부탄올 생산 배지인 CAB와 비교하여 부레옥잠 배지의 이용가능성을 볼 수 있었다. 부레옥잠 배지와 무기물 및 수산화나트륨 첨가는 바이오부탄올의 수율과 생산성에 모두 좋은 효과를 보였다. 하지만 초기 pH는 바이오부탄올 생산에 큰 영향을 주지 않았다. 탄산칼슘 알지네이트 비드를 부레옥잠 첨가하면 균주의 성장 속도는 증가하였지만 바이오부탄올의 생산 측면에서는 효과가 좋지 않았다. 바이오부탄올 생산 균주의 성장 속도를 빠르게 유지하기 위해 배양 중에 탄산칼슘 비드를 회수 하였고 바이오부탄올 생산성이 63% 이상 향상된 것을 볼 수 있었다. 본 연구 결과들은 *C. beijerinckii* NCIMB 8052 균주를 이용한 바이오부탄올 생산에서 부레옥잠 배지가 생산용 배지로 이용될 수 있는 가능성을 보여주었다.

REFERENCES

1. Agarwal, A. K. (2007) Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Prog. Energ. Com-*

- bust.* 33: 233-271.
2. Escobar, J. C., E. S. Lora, O. J. Venturini, E. E. Yáñez, E. F. Castillo, and O. Almazan (2009) Biofuels: environment, technology and food security. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 13: 1275-1287.
3. Swana, J., Y. Yang, M. Behnam, and R. Thompson (2011) An analysis of net energy production and feedstock availability for biobutanol and bioethanol. *Bioresource Technol.* 102: 2112-2117.
4. Rubin, E. M. (2008) Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454: 841-845.
5. Veronica, G., J. Pakkila, H. Ojamo, E. Muurinen, and R. L. Keiski (2011) Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency? *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15: 964-980.
6. Jones, D. T., and D. R. Woods (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* 50: 484-524.
7. Liu, Z., Y. Ying, F. Li, C. Ma, and P. Xu (2010) Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 495-501.
8. Ahn, J. H., B. I. Sang, and Y. Um (2011) Butanol production from thin stillage using *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technol.* 102: 4934-4937.
9. Lu, C., J. Zhao, S. T. Yang, and D. Wei (2012) Fed-batch fermentation for *n*-butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed bioreactor with continuous gas stripping. *Bioresource Technol.* 104: 380-387.
10. Malaviya, A., Y. S. Jang, and S. Y. Lee (2012) Continuous butanol production with reduced byproducts formation from glycerol by a hyper producing mutant of *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 1485-1494.
11. Festel, G. W. (2008) Biofuels—economic aspects. *Chem. Eng. Technol.* 31: 715-720.
12. Jork, N., G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Makarova, Q. Zeng, R. Gibson, H. M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, GTC Sequencing Center Production, Finshig, and Bioinformatics Teams, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, F. Sabathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M. J. Daly, G. N. Bennett, E. V. Koonin, and D. R. Smith (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* 183: 4823-4838.
13. Lee, S. Y., J. H. Park, S. H. Jang, L. K. Nielsen, J. H. Kim, and K. S. Jung (2008) Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Bio-technol. Bioeng.* 101: 209-228.
14. Ezeji, T., and H. P. Blaschek (2008) Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic *Clostridia*. *Bioresource Technol.* 99: 5232-5242.
15. Thang, V. H., K. Kanda, and G. Kobayashi (2010) Production of acetone-butanol-ethanol (ABE) in direct fermentation of cassava by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161: 157-170.
16. Al-Shorgani, N. K., M. S. Kalil, and W. M. Yusoff (2012) Biobutanol production from rice bran and de-oiled rice bran by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35: 817-826.
17. Gopal, B. (1987) *Water hyacinth*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands.

18. Narain, S., C. S. P. Ojha, S. K. Mishra, U. C. Chaube, and P. K. Sharma (2011) Cadmium and chromium removal by aquatic plant. *Int. J. Environ. Sci.* 1: 1297-1304.
19. Kim, B. Y., S. K. Lee, C. S. Kweon, K. H. So, and E. H. Yun (1991) Studies on the purification of sewage water by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Korean J. Environ. Agric.* 10: 1.
20. Gunnarsson, C. C. and C. M. Petersen (2007) Water hyacinths as a resource in agriculture and energy production: A literature review. *Waste Manage.* 27: 117-129.
21. Hronich, J. E., L. Martin, J. Plawsky, and H. R. Bungay (2008) Potential of *Eichhornia crassipes* for biomass refining. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 35: 393-402.
22. Mishima, D., M. Tateda, M. Ike, and M. Fujita (2006) Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. *Bioresource Technol.* 97: 2166-2172.
23. Girisuta, B., B. Danon, R. Manurung, L. P. B. M. Janssen, and H. J. Heeres (2008) Experimental and kinetic modelling studies on the acid-catalysed hydrolysis of the water hyacinth plant to levulinic acid. *Bioresource Technol.* 99: 8367-8375.
24. Nigam, J. (2002) Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *J. Biotechnol.* 97: 107-116.
25. Mishima, D., M. Kuniki, K. Sei, S. Soda, M. Ike, and M. Fujita (2008) Ethanol production from candidate energy crops: water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Bioresource Technol.* 99: 2495-2500.
26. Aswathy, U., R. K. Sukumaran, G. L. Devi, K. P. Rajasree, R. R. Singhanian, and A. Pandey (2010) Bio-ethanol from water hyacinth biomass: an evaluation of enzymatic saccharification strategy. *Bioresource Technol.* 101: 925-930.
27. Annous, B., and H. Blaschek (1990) Regulation and localization of amylolytic enzymes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microb.* 56: 2559-2561.
28. Lee, K. Y., I. B. Hwang, and T. R. Heo (1997) Enhancement of cultivation efficiency of *Bifidobacterium longum* using calcium carbonate buffer system. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 29: 126-132.
29. Tashiro, Y., K. Takeda, G. Kobayashi, K. Sonomoto, A. Ishizaki, and S. Yoshino (2004) High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fed-batch culture with pH-stat continuous butyric acid and glucose feeding method. *J. Biosci. Bioeng.* 98: 263-268.