**Appl. Chem. Eng.,** Vol. 30, No. 6, December 2019, 681-686
https://doi.org/10.14478/ace.2019.1078

Article

# *Clostridium autoethanogenum*을 이용한 합성가스 발효에 대한 비타민과 황 공급원의 영향

**임홍래 · 안태광 · 박소은* · 김영기†**

한경대학교 화학공학과, *한경대학교 화학기술연구소
(2019년 10월 4일 접수, 2019년 10월 20일 심사, 2019년 10월 28일 채택)

# Effect of Vitamin and Sulfur Sources on Syngas Fermentation Using *Clostridium autoethanogenum*

**Hongrae Im, Taegwang An, Soeun Park*, and Young-Kee Kim†**

*Department of Chemical Engineering, Hankyong National University, Anseong, Gyeonggi-do 17579, Korea*
**Research Center of Chemical Technology, Hankyong National University, Anseong, Gyeonggi-do 17579, Korea*
*(Received October 4, 2019; Revised October 20, 2019; Accepted October 28, 2019)*

초 록

이 연구에서는 합성가스를 기질로 사용하는 *Clostridium autoethanogenum* 배양 공정에서 에탄올 생산성 향상을 위하여 배지 성분의 농도가 균주 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향을 조사하였다. *C. autoethanogenum* 배양에 사용되는 기본 배지 구성 성분 중 비타민 종류인 D-Ca-pantothenate, vitamin $B_{12}$와 황 공급원인 sodium sulfide를 조사 대상 성분으로 선정하여 이 성분들의 농도를 달리하였을 때 균주 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향을 확인하였다. D-Ca-pantothenate는 0.5, 5, 50, 500 mg/L 농도를 시험하였으며 0.5 mg/L에서 에탄올 생산량이 약간 증가하는 경향을 보였지만 시험한 농도 범위에서 균주의 성장이나 에탄올 생산에 대한 주목할 만한 영향은 관찰되지 않았다. Vitamin $B_{12}$는 0.1, 1.0, 10, 100 mg/L의 농도범위에서 균주 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향을 관찰하였으며, 0.1 mg/L 농도에서 에탄올 생산농도가 일반적 기본배지 농도인 10 mg/L에서보다 245% 증가되는 것을 확인하였다. Sodium sulfide는 0.5, 5, 10 g/L 농도범위에서 균주 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향을 분석하였으며, 기본배지의 사용농도인 0.5 g/L을 초과하여 과잉 공급하였을 때, 균주 성장 저해 현상이 관찰되었다. 결과적으로 연구에 사용된 세 가지 배지 성분 중, D-Ca-pantothenate와 sodium sulfide는 배지 내 성분 농도에 따른 에탄올 생산농도 향상을 이루지 못하였으나, vitamin $B_{12}$는 기본 배지 내 일반적인 농도의 1/100을 사용함으로써 에탄올 생산농도 향상을 이룰 수 있었다.

**Abstract**

In this work, the effect of the culture medium composition on microbial growth and ethanol production in *Clostridium autoethanogenum* culture was investigated to enhance the ethanol productivity. D-Ca-pantothenate, vitamin $B_{12}$ (as vitamins), and sodium sulfide (as sulfur source) were selected as examined components, and the effects of components' concentration on cell growth and ethanol production was investigated. For D-Ca-pantothenate concentrations varing from 0.5, 5, 50 and 500 mg/L, a slight increase in the ethanol production was observed at the 0.5 mg/L, but negligible differences in microbial growth and ethanol production were measured for the concentration ranges examined. The effect of vitamin $B_{12}$ concentrations from 0.1, 1.0, 10, and 100 mg/L on the microbial growth and ethanol production was investigated, and it was found that the ethanol production using a 0.1 mg/L of vitamin $B_{12}$ concentration increased by 245% compared to that of using the basic medium concentration (10 mg/L). The effect of sodium sulfide concentrations (0.5, 5, and 10 g/L) on the microbial growth and ethanol production was also studied, and the inhibition of microbial growth was observed when the sodium sulfide usage was over 0.5 g/L. In conclusion, changes in D-Ca-pantothenate and sodium sulfide concentrations did not affect the ethanol production, whereas even a 100 times lower concentration of vitamin $B_{12}$ than that of the basic medium improved the production.

***Keywords**: Clostridium autoethanogenum, Syngas fermentation, Pantothenate, Vitamin $B_{12}$, Sodium sulfide*

## 1. 서 론

화석연료의 과다한 사용으로 인한 환경오염의 발생과 화석연료 자원고갈 문제를 해결하기 위한 방안으로 바이오 연료 등 재생 가능한 에너지의 필요성이 증대되고 있다. 바이오 연료 중 바이오에탄올은

† 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

pISSN: 1225-0112 eISSN: 2288-4505 @ 2019 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. All rights reserved.

**Table 1. Basal Medium Composition for *Clostridium autoethanogenum* Culture**

| Basal medium (per liter) |
|---|
| $NH_4Cl$ 1.0 g, $MgCl_4 \cdot 6H_2O$ 1.11 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 g, KCl 0.33 g, NaCl 1.0 g, $NaHCO_3$ 1.0 g, yeast extract 0.5 g, resazurin 2 mg, L-cysteine · HCl 0.5 g, $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.5 g, 1 M phosphate buffer solution 10 mL, trace mineral solution 10 mL, vitamin solution 1 mL |
| Trace mineral solution (per liter) |
| Nitrilotriacetic acid 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.0 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.5 g, NaCl 1.0 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.18 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.18 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 10 mg, $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 20 mg, $H_3BO_3$ 10 mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 10 mg, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 10 mg, $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ 0.3 mg, $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ 0.4mg |
| Vitamin solution (per liter) |
| Biotin 20 mg, folic acid 20 mg, pyridoxine · HCl 100 mg, thiamine · HCl 50 mg, riboflavin 50 mg, nicotinic acid 50 mg, D-Ca-pantothenate 50 mg, p-aminobenzoic acid 50 mg, vitamin $B_{12}$ 10 mg, lipoic acid 50 mg |

화석연료의 문제점들을 보완할 수 있는 차세대 에너지원으로 평가되어 가장 오래된 개발 역사를 가지고 있다[1-4]. 처음 개발되어 상용화된 1세대 바이오 에탄올 생산기술은 곡물을 기반으로 하는 시스템이며, 공정이 비교적 간단한 장점이 있는 반면 식량자원인 곡물을 사용하는 한계를 가지고 있다. 2세대 바이오 에탄올 생산기술은 식량자원의 사용을 회피하기 위하여, 셀룰로오즈, 헤미셀룰로오즈, 리그닌 등으로 이루어진 리그노셀룰로오즈 바이오 매스를 이용하는 것을 특징으로 한다.

전통적인 2세대 바이오 에탄올 생산기술은 셀룰로오스를 가수분해하여 발효 가능한 당류로 변환하는 당화공정과 변환된 당을 효모나, 박테리아 등을 이용하여 에탄올로 전환하는 발효공정으로 이루어진다. 여기에서 당화공정은 속도와 효율이 낮아 전체 바이오 에탄올 생산공정의 효율을 제한하고 있으며, 생물학적 가수분해에 의한 당화는 리그닌을 분해하지 못하는 한계를 가지고 있다. 이에 비해 열화학적 공정인 가스화 공정은 바이오매스를 구성하는 모든 구성성분을 이용할 수 있게 해주는 장점을 가지고 있다[5,6]. 열화학적 공정을 활용하는 기술로, 바이오매스를 가스화하여 합성가스(syngas)를 생산하고 합성가스의 주성분인 CO, $CO_2$, $H_2$를 기질로 사용할 수 있는 acetogen 미생물을 이용하여 낮은 온도와 압력에서 에탄올, 부탄올과 같은 바이오연료를 생산하는 연구가 활발히 이루어지고 있다[7-11]. *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* 등의 acetogen 미생물은 혐기조건에서 Wood-Ljungdal pathway를 통하여 acetyl-CoA를 생산하고, acetyl-CoA가 에탄올 또는 아세트산으로 전환되며, 생산된 아세트산은 아세트알데하이드를 거쳐 에탄올로 재전환될 수도 있다.

가스화에 의해 생성된 합성가스를 이용한 생물학적 전환 기술은 Fischer-Tropsch 공정기술로 대표되는 고비용의 복잡한 화학적 리그노셀룰로오즈 바이오매스 활용 기술의 한계를 극복할 수 있는 기술로 평가받고 있다[12-16]. 하지만 현재까지 합성가스의 주성분인 CO를 활용한 생물학적 전환 시스템에서 미생물의 성장속도가 느리고 최종 산물의 생산농도가 낮아 생산성이 떨어지는 한계가 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 생물공정공학적 접근법으로 반응기 설계, 합성가스 조성, 운전 전략, 배지 성분 및 조성 등을 변화하는 다양한 시도가 이루어져 왔다[17-22]. 이러한 기존 연구 결과에 의하면 합성가스 발효공정에서 배지의 성분은 미생물의 성장을 위한 필수적인 영양물질을 제공할 뿐만 아니라 대사 공학적 전략을 이용하여 생산성을 증가시킬 수 있다고 한다. 대표적으로 배지 성분 중 무기염류(질소 및 인), 미량성분(중금속 등)과 enzyme cofactors 등의 성분은 Wood-Ljungdahl pathway를 통하여 에탄올을 생산하는 각각의 효소에 영향을 끼쳐 미생물의 성장과 에탄올의 생산을 증가시킬 수 있다는 보고가 있다[23-25].

본 연구에서는 합성가스를 이용하는 생물학적 촉매로서 acetogen의 일종인 *Clostridium autoethanogenum*을 이용하여 배양에 사용되는 배지의 조성을 변화시켜 미생물의 성장과 에탄올 생산 증가를 시도하였다. 연구에 사용된 배지 성분으로는 수용성비타민인 D-Ca-pantothenate, vitamin $B_{12}$와 황 공급원인 sodium sulfide를 선정하고 각 성분의 사용 농도를 조절하여 균주 성장과 에탄올, 아세트산 생산에 미치는 영향을 고찰하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 균주 및 배양배지

실험에 이용된 미생물은 *Clostridium autoethanogenum* (DSM 10061)을 German Collection of Microorganisms and Cell Culture에서 구입하여 사용하였다. 균주 배양을 위한 기본배지의 조성은 Table 1에 표시하였다. 실험에 사용된 합성가스는 MS 동민가스(Pyeongtaek, Gyeong-gi-Do, Korea)에서 주문 제조하여 공급되었으며 20 vol% CO, 20 vol% $CO_2$, 10 vol% $H_2$, 50 vol% $N_2$로 구성되어 있다.

### 2.2. 배지조성 변화 배양실험

150 mL serum bottle에 25 mL의 배양배지를 넣은 후 고무마개를 이용하여 입구 부분을 막고, 알루미늄 캡으로 캡핑하여 외부와의 산소 접촉을 차단시킨 상태로 합성가스를 퍼징하여 혐기조건으로 만들었다. 계대 배양된 미생물 배양액을 배지 부피의 10 vol% 접종하고, 균주가 접종된 배지에 합성가스를 5 min 동안 주입하였다. 이때 serum bottle 내부압력은 240 kPa 내외로 유지되었다. 준비된 serum bottole은 진탕배양기에서 배양온도 37 ℃, 200 rpm의 교반조건으로 배양하였다. 분석을 위한 시료 채취는 고무마개 부분에 주사기를 투과시켜 48 h마다 수행하였다. 배지 조성 최적화를 위해 사용된 배지 구성 성분으로는 D-Ca-pantothenate, vitamin $B_{12}$, sodium sulfide ($Na_2S \cdot 9H_2O$)의 3가지를 사용하였다. 이 성분들이 균주 성장과 에탄올, 아세트산 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 배지 내 해당 성분의 농도를 달리하여 실험을 진행하였다. 기본 배지 조건은 D-Ca-pantothenate 50 mg/L, vitamin $B_{12}$ 10 mg/L, sodium sulfide 0.5 g/L이며, D-Ca-pantothenate는 0.5, 5, 50, 500 mg/L, vitamin $B_{12}$는 0.1, 1, 10, 100 mg/L, sodium sulfide는 0.5, 5, 10 g/L의 농도에서 배양 실험을 수행하였다.

### 2.3. 분석 방법

균주의 성장을 분석하기 위하여 UV-Vis 분광광도계(Optizen POP, Mecasys Co., Korea)를 이용하여 600 nm에서 배양액의 optical density를 측정하였다. 측정된 optical density는 사전에 작성된 검량곡선에 의해 세포건조질량으로 변환하여 생산성의 계산에 이용하였다. 배양액

을 원심 분리하여 균주와 액상을 분리한 후, 균주가 없는 상등액을 pore size 0.45 μm인 syringe filter (6784-1304, Whatman, Germany)로 여과하여 생성물 분석을 위한 시료를 준비하였다. 시료 내 에탄올과 아세트산의 농도는 gas chromatograph (Agilent 7890B, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 측정하였으며, 컬럼은 HP-5 column (30 m × 0.32 mm × 0.25 m)을, 검출기는 flame ionization detector를 이용하였고 이동상기체로 헬륨을 사용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. D-Ca-pantothenate의 농도가 미생물 성장과 유용산물 생산에 미치는 영향

미생물이 성장하는데 필수적인 비타민 중 하나인 pantothenate가 *C. autoethanogenum*의 성장과 에탄올, 아세트산 생산에 미치는 영향을 분석한 결과를 Figure 1에 도시하였다. 기본 배양배지에서 D-Ca-pantothenate 농도는 50 mg/L이며, pantothenate의 농도를 0.5, 5, 50, 500 mg/L로 사용한 실험 결과에서 균주의 최대 OD인 1.50은 0.5 mg/L 농도에서 관찰되었다. 0.5 mg/L 이상의 농도에서는 미생물의 성장이 약간 저해되는 경향을 보이나, 큰 차이를 보이지는 않았다[Figure 1(a)]. *Saccharomyces cerevisiae*를 대상으로 한 타 연구에서 수용성 비타민인 pantothenate는 미생물 성장에 필수적이긴 하나 최소한의 농도만으로도 성장이 가능하다고 보고하였으며, 이는 pantothenate 농도가 *C. autoethanogenum*의 성장에 근본적인 영향을 주지 않는 본 연구의 실험 결과와 부합한다[26]. 또한 pantothenate의 농도가 에탄올 및 아세트산에 미치는 영향을 알아보기 위해 14일 배양 후 에탄올과 아세트산 농도를 분석하였다[Figure 1(b), (c)]. 기본 배지 농도 조건에서 에탄올의 생산농도는 3.81 g/L이고, pantothenate 0.5 mg/L 조건에서 에탄올의 생산농도는 4.02 g/L으로 기본배지조건에서 생산된 농도보다 5.5% 증가되었다. 또한 아세트산의 생산농도도 기본 배지 농도에서 1.73 g/L인데 비해 0.5 mg/L의 pantothenate 조건에서 2.22 g/L로 증가하였다. Pantothenate의 농도가 낮은 조건에서 에탄올과 아세트산의 생산농도가 증가하는 경향이 관찰되었으며, 이는 *Clostridium ragsdalei*, *E. Coli*를 대상으로 한 기존 연구에서 pantothenate는 coenzyme A의 전구체로, pantothenate의 배지 내 농도를 제한하면 acetyl-coA의 생성속도가 CO cycle 속도보다 감소하여 환원된 ferredoxin을 증가시키고, 이로 인해 NAD(P)H가 증가하여 생산물의 농도가 증가할 수 있다는 보고와 부합한다[27,28].

### 3.2. Vitamin $B_{12}$ 농도가 미생물 성장과 유용산물 생산에 미치는 영향

Figure 2는 미생물이 성장하는 데 필수적인 비타민 구성 성분 중 vitamin $B_{12}$가 *C. autoethanogenum*의 성장과 에탄올, 아세트산 생산에 미치는 영향을 분석한 결과이다. 기본 배양배지에서 vitamin $B_{12}$의 농도는 10 mg/L이며, vitamin $B_{12}$의 농도를 0.1, 1, 10, 100 mg/L로 변화시켜 배양실험을 수행하였다. Vitamin $B_{12}$를 100 mg/L 사용한 조건에서 최대 OD인 1.73을 얻었다[Figure 2(a)]. Vitamin $B_{12}$의 농도가 에탄올 및 아세트산 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 배양 후 에탄올과 아세트산 농도를 분석하였다. 배양실험에서 14 day 이후에도 에탄올 생산이 지속되는 현상이 관찰되어 18 day까지 배양 실험을 수행하였다[Figure 2(b), (c)]. 실험 결과, 기본 배지 조건에서 에탄올의 생산농도는 0.85 g/L이며, vitamin $B_{12}$ 0.1 mg/L의 조건에서 에탄올의 생산농도가 2.93 g/L로 가장 높았고, 기본 배지 조건과 생산농도와 비교했을 때 245% 증가하였다. *Clostridium ragsdalei*를 이용한 타 연구에서 vitamin B12는 cobalamin-dependent methyl transferase synthase (MeTr)에 중요한 역할을 수행하며, vitamin $B_{12}$의 농도를 제한시키면 Wood-Ljungdahl pathway에서 tetrahydrofolate cycle 속도를 감소시켜 에탄올 생산에 관여하는 핵심적인 효소 활성에 영향을 끼치고 NADH의 비율을 증가시켜 에탄올의 생산성을 증가시킨다는 보고가 있으며

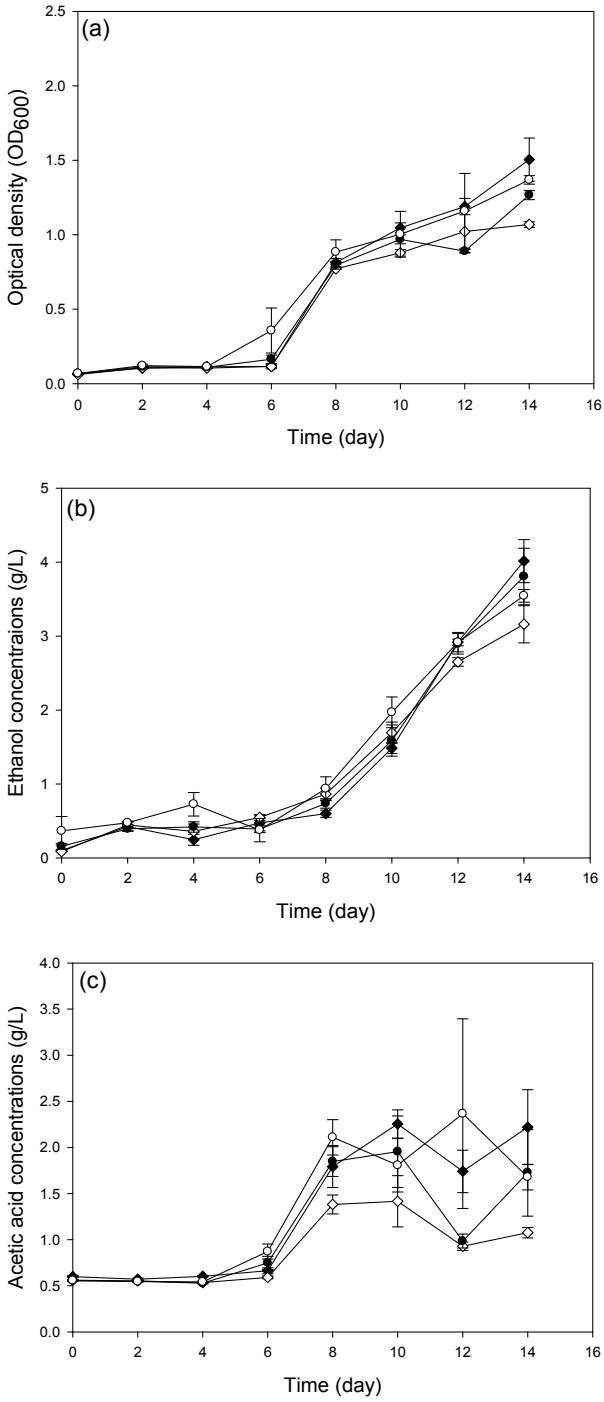


**Figure 1. Time course profile of (a) optical density (b) ethanol concentration, and (c) acetic acid concentration in *C. autoethanogenum* culture at various pantothenate addition (◆: 0.5 mg/L ,◇: 5 mg/L, ●: 50 mg/L ,○: 500 mg/L). Error bars (n = 3) represented ± 1 standard deviation.**

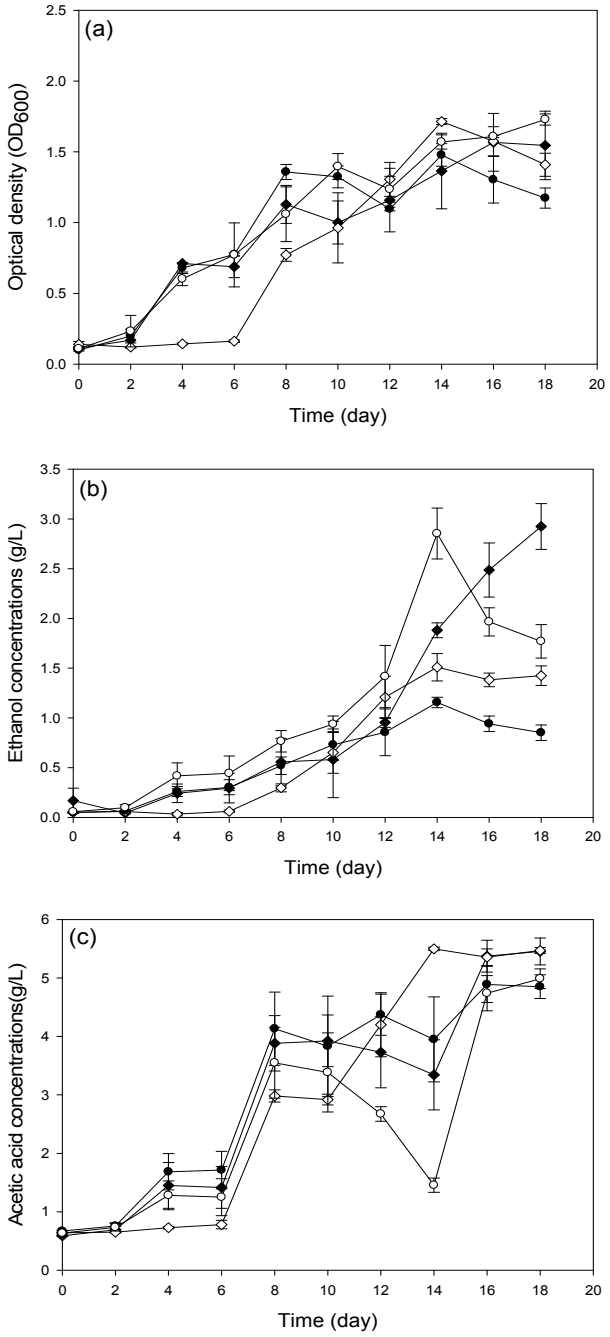


**Figure 2. Time course profile of (a) optical density (b) ethanol concentration, and (c) acetic acid concentration in *C. autoethanogenum* culture at various vitamin $B_{12}$ addition (◆: 0.1 mg/L ,◇: 1 mg/L , ●: 10 mg/L ,○: 100 mg/L). Error bars (n = 3) represented ± 1 standard deviation.**

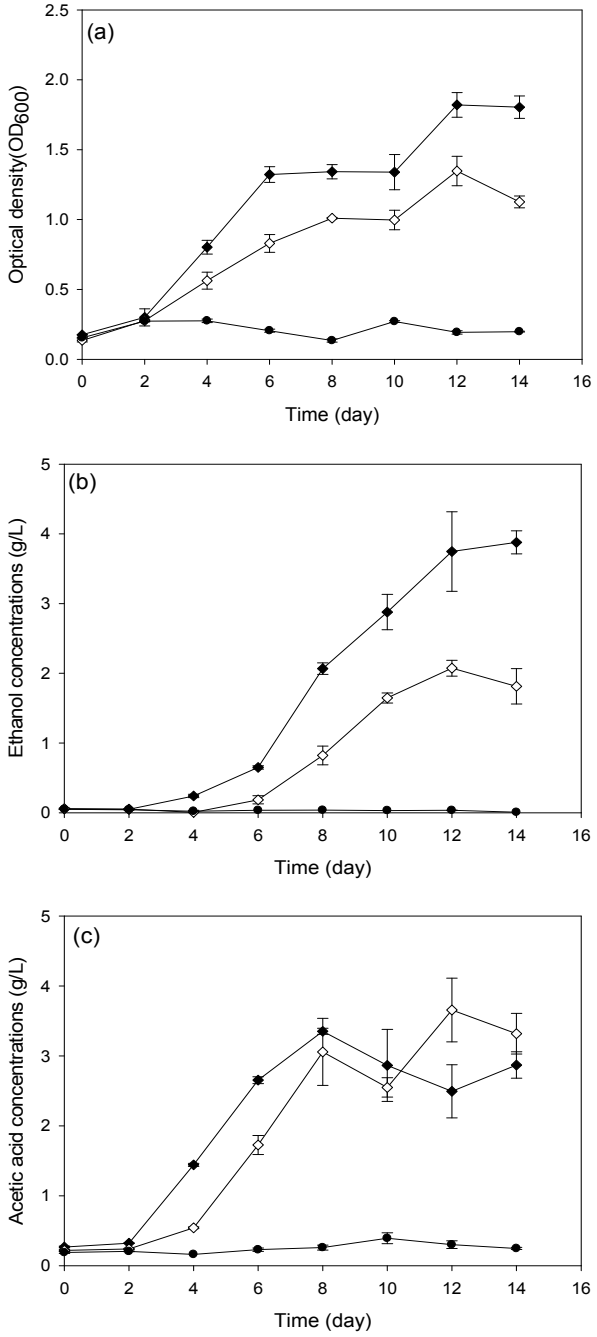


**Figure 3. Time course profile of (a) optical density (b) ethanol concentration, and (c) acetic acid concentration in *C. autoethanogenum* culture at various sodium sulfide addition (◆: 0.5 g/L ,◇: 5g/L , ●: 10g/L). Error bars (n = 3) represented ± 1 standard deviation.**

[28], 본 연구의 결과도 이 연구 결과와 유사한 경향을 보이고 있다.

### 3.3. Sodium sulfide 농도가 미생물의 성장과 유용산물 생산에 미치는 영향

Figure 3은 배양배지 내 황 공급원인 sodium sulfide의 농도 변화가 *C. autoethanogenum* 균주 성장과 에탄올 및 아세트산 생산에 미치는 영향을 분석한 결과이다. Sodium sulfide의 기본 배지 농도는 0.5 g/L 이며, 황공급원 투입량 증가에 따른 성장과 생산 촉진을 시험하기 위해 0.5, 5, 10 g/L 농도에서 배양실험을 수행하였다. 최대 OD값은 1.80으로 기본 배지 농도인 0.5 g/L에서 관찰되었고, 배지 내 sodium sulfide 농도가 기본 배지 농도의 10배 조건(5 g/L)에서 균주 성장이 약간 둔화되고, 20배 조건(10 g/L)에서는 균주의 성장이 거의 일어나지 않는 것이 관찰되었다[Figure 3(a)]. *Clostridium aceticum*을 이용한 기존 연구에서 sodium sulfide의 높은 공급 농도가 균주 성장에 독성을 나타내지 않는 다는 보고가 있지만, 일정 수준 이상의 농도는 균주 성장

**Table 2. Comparison of Microbial Growth and Product Formation in *C. autoethanogenum* Culture at Various Concentration of D-Ca-pantothenate, Vitamin $B_{12}$, and Sodium Sulfide**

| | | Optical density | Ethanol concentration (g/L) | Acetic acid concentration (g/L) |
|---|---|---|---|---|
| D-Ca-pantothenate | 0.5 mg/L | 1.50 | 4.02 | 2.22 |
| | 5 mg/L | 1.07 | 3.16 | 1.08 |
| | 50 mg/L | 1.27 | 3.81 | 1.73 |
| | 500 mg/L | 1.37 | 3.54 | 1.70 |
| Vitamin $B_{12}$ | 0.1 mg/L | 1.55 | 2.93 | 5.45 |
| | 1 mg/L | 1.41 | 1.43 | 5.47 |
| | 10 mg/L | 1.17 | 0.85 | 4.85 |
| | 100 mg/L | 1.73 | 1.77 | 4.99 |
| Sodium sulfide | 0.5 g/L | 1.80 | 3.88 | 2.87 |
| | 5 g/L | 1.13 | 1.81 | 3.32 |
| | 10 g/L | 0.20 | 0.00 | 0.25 |

에 독성을 나타내기 때문에 적절한 농도로의 공급제한이 필요한 것으로 보인다[29]. 또한 sodium sulfide의 농도가 에탄올 및 아세트산 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 14 day 배양 후 에탄올과 아세트산 농도를 분석하였다[Figure 3(b), (c)]. 분석 결과로부터 sodium sulfide의 기본 배지 조건인 0.5 g/L에서 에탄올 생산농도가 3.88 g/L로 가장 높았고, sodium sulfide의 사용농도가 증가하면 에탄올 생산농도가 감소하는 경향을 보였다. 다만, 아세트산의 생산농도는 sodium sulfide 0.5와 5 g/L의 조건에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 배지 구성성분인 D-Ca-pantothenate, vitamin $B_{12}$, sodium sulfide의 농도 변화에 따라 혐기성 박테리아인 *C. autoethanogenum*의 성장과 유용산물 생산에 대한 영향을 분석하였으며 그 결과를 Table 2에 요약하였다. 실험 결과로부터 pantothenate, vitamin $B_{12}$는 농도를 달리하여도 균주 성장에 뚜렷하게 영향을 보이지 않았으며, pantothenate 사용량은 에탄올 생산에도 크게 영향을 주지 않는데 비해 vitamin $B_{12}$를 기본 배지 농도의 0.01배 공급하였을 때 에탄올 생산이 245% 증가되는 것을 확인하였다. 또한 sodium sulfide 0.5 g/L를 공급할 경우 균주 성장과 에탄올 생산량이 최대화 되었고, 과다한 고농도의 sodium sulfide 사용은 균주 성장 저해를 보였다.

## 감 사

이 논문은 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단 - C1 가스리파이너리사업의 지원(NRF-2018M3D3A1A0107944)과 교육부의 재원으로 한국연구재단-이공학개인기초연구지원사업(NRF-2018R1D1A-1B07043323)의 지원을 받아 수행한 연구입니다.

## References

1. R. K. Prasad, S. Chatterjee, P. B. Mazumder, S. K. Gupta, M. G. Vairale, S. Datta, S. K. Dwivedi, and D. K. Gupta, Bioethanol production from waste lignocelluloses: A review on microbial degradation potential, *Chemosphere*, **231**, 588-606 (2019).
2. A. Singla, D. Verma, B. Lal, and P. M. Sarma, Enrichment and optimization of an-aerobic bacterial mixed culture for conversion of syngas to ethanol, *Bioresour. Technol.*, **172**, 41-49 (2014).
3. J. E. Woo and Y.-S. Jang, Recent advances on bioalcohol production from syngas using microorganisms, *Appl. Biol. Chem.*, **60**, 333-338 (2017).
4. K. Arslan, B. Bayar, H. N. Abubackar, M. C. Veiga, and C. Kennes, Solventogenesis in *Clostridium aceticum* producing high concentrations of ethanol from syngas, *Bioresour. Technol.*, **292**, 121941 (2019).
5. H. N. Abubackar, M. C. Veiga, and C. Kennes, Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bioreactor with no accumulation of acetic acid, *Bioresour. Technol.*, **186**, 122-127 (2015).
6. H. Xu, C. Liang, 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).
7. J. Saxena and R. S. Tanner, Effect of trace metals on ethanol production from synthesis gas by the ethanologenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 513-521 (2011).
8. X. Sun, H. K. Atiyeh, H. Zhang, R. S. Tanner, and R. L. Huhnke, Enhanced ethanol production from syngas by *Cl ostridium ragsdalei* in continuous stirred tank reactor using medium with poultry litter biochar, *Appl. Energy*, **236**, 1269-1279 (2019).
9. 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 fermenta-tion medium during synthesis gas fermentation, *Bioresour. Technol.*, **101**, 9673-9680 (2010).
10. K. Liu, H. K. Atiyeh, R. S. Tanner, M. R. Wilkins, and R. L. Huhnke, Fermentative production of ethanol from syngas using novel moderately alkaliphilic strains of *Alkalibaculum bacchi*, *Bioresour. Technol.*, **104**, 336-341 (2012).
11. S. Ramió-Pujol, R. Ganigué, L. Bañeras, and J. Colprim, Incubation at 25 ℃ pre-vents acid crash and enhances alcohol production in *Clostridium carboxidivorans* P7. *Bioresour. Technol.*, **192**, 296-303 (2015).
12. 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).
13. Y.-K. Kim, S. E Park, and B. H. Ahn, Effect of medium composition on cell growth and product formation in *Clostridium authethanogenum* culture, *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.*, **33**, 83-88 (2018).
14. D. K. Kundiyana, M. R. Wilkins, P. Maddipati, and R. L. Huhnke, Effect of tem-perature, pH and buffer presence on ethanol production from synthesis gas by "*Clostridium ragsdalei*", *Bioresour. Technol.*, **102**, 5794-5799 (2011).
15. Y.-K. Kim, S. E. Park, H. Lee, and J. Y. Yun, Enhancement of bioethanol pro-duction in syngas fermentation with *Clostridium ljungdahlii* using nanoparticles, *Bioresour. Technol.*, **159**, 446-450 (2014).
16. Y.-K. Kim and H. Lee, Use of magnetic nanoparticles to enhance bioethanol production in syngas fermentation, *Bioresour. Technol.*, **204**, 139-144 (2016).
17. J. J. Orgill, H. K. Atiyeh, M. Devarapalli, J. R. phillips, R. S.

Lewis, and R. L. Huhnke, A comparison of mass transfer coefficients between trickle-bed, hollow fiber membrane and stirred tank reactors, *Bioresour. Technol.*, **133**, 340-346 (2013).
18. D. Xu, D. R. Tree, and R. S. Lewis, The effects of syngas impurities on syngas fermentation to liquid fuels, *Biomass Bioenergy*, **35**, 2690-2696 (2011).
19. 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 re-placement to yeast extract, *Bioresour. Technol.*, **102**, 6494-6501 (2011).
20. R. Ganigué, P. Sánchez-Paredes, L. Bañeras, and J. Colprim, Low fermentation pH is a trigger to alcohol production, but a killer to chain elongation, *Front. Microbiol.*, **7**, 702-702 (2016).
21. Y. Shen, R. C. Brown, and Z. Wen, Syngas fermentation by *Clostridium carboxidivorans* P7 in a horizontal rotating packed bed biofilm reactor with enhanced eth-anol production, *Appl. Energy*, **187**, 585-594 (2017).
22. B. E. Skidmore, R. A. Baker, D. R. Banjade, J. M. Bray, D. R. Tree, and R. S. Lewis, Syngas fermentation to biofuels: Effects of hydrogen partial pressure on hydrogenase efficiency, *Biomass Bioenergy*, **55**, 156-162 (2013).
23. H. N. Abubackar, M. C. Veiga, and C. Kennes, Biological conversion of carbon monoxide: Rich syngas or waste gases to bioethanol, *Biofuel. Bioprod, Biorefin.*, **5**, 93-114 (2011).
24. J. Zhang, S. Taylor, and Y. Wang, Effects of end products on fermentation pro-files in *Clostridium carboxidivorans* P7 for syngas fermentation, *Bioresour. Technol.*, **218**, 1055-1063 (2016).
25. S. Ramió-Pujol, R. Ganigué, L. Bañeras, and J. Colprim, How can alcohol pro-duction be improved in carboxydotrophic clostridia, *Process Biochem.*, **50**, 1047-1055 (2015).
26. M. J. Taherzadeh, G.Liden, L.Gustafsson, and C. Niklasson, The effects of pan-tothenate deficiency and acetate addition on anaerobic batch fermentation of glu-cose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 176-182 (1996).
27. R. V. Vadali, G. N. Bennett, and K.-Y. San, Cofactor engineering of intracellular CoA/acetyl-CoA and its effect on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*, *Metab. Eng.*, **6**, 133-139 (2004).
28. 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).
29. J. H. Sim and A. H. Kamaruddin, Optimization of acetic acid production from synthesis gas by chemolithotrophic bacterium - *Clostridium aceticum* using statis-tical approach, *Bioresour. Technol.*, **99**, 2724-2735 (2008).