

산성 발효 산물과 배양 pH가 *Clostridium acetobutylicum*의 유지 에너지에 미치는 영향

신순영* · 김병홍

한국과학기술연구원 유전공학센터, 응용미생물연구실

Effects of Acidic Fermentation Products and Culture pH on the Maintenance Energy of *Clostridium acetobutylicum*

Shin, Soon-Young and Byung-Hong Kim

Applied Microbiology Laboratory Genetic Engineering Center,

Korea Institute of Science and Technology

P.O. Box 131, Cheonyryang, Seoul 130-650, Korea

ABSTRACT: In order to elucidate the acid tolerance mechanism of *Clostridium acetobutylicum* against organic acid, the maintenance energy with added butyrate at different pH was determined. Maintenance coefficient in acidogenic chemostat was higher at pH 6.5 than at pH 5.5, showing that this organism is an acidophile. The addition of butyrate at pH 5.5 and different dilution rate caused linear decrease of the cell concentration though Y_{ATP} did not decrease with increasing undissociated organic acid. Y_{ATP} decreased by increasing the concentration of undissociated organic acid at pH 5.0 by the addition of butyrate. From these results it is hypothesized that the ATP consumption for pH stat of acidophile *C. acetobutylicum* is increased at the circumstance with over 30 mM of undissociated organic acid.

Key words □ *Clostridium acetobutylicum*, Acidogenic chemostat, Maintenance energy

생물은 환경에서 공급되는 화학 혹은 광에너지를 생물학적 에너지로 전환시켜 생존과 자기 복제에 이용한다. 미생물의 생육에서 에너지가 얼마나 효율적으로 이용되는가를 비교하기 위하여 Y_{ATP} 를 측정하며, 실제 측정되는 Y_{ATP} 와 이론적인 최고 Y_{ATPmax} 사이에는 큰 차이가 있다. 이 차이는 미생물이 성장에 관계없이 생존에 이용하는 에너지로 성장 조건에 따라 크게 다르다(Gottschalk, 1985; 김, 1988). 이처럼 생존에 이용되는 에너지를 유지 에너지(maintenance energy)라 부르며 이 관계를 소비되는 총에너지로 생육에 필요한 에너지와 유지 에너지의 합으로 표현한다(Pirt, 1975).

유지 에너지는 membrane energization, 세포물질의 turn over, transport, 운동성, 그리고 세포내부의 pH 유지 등 세포의 여러 기본 작용에 이용된다. Tempest

(1978)은 이렇게 세포의 유지에 필요한 에너지를 'slip reaction'이라는 용어를 사용하였으며, 특히 발효 산물로 아세트산 같은 대사산물을 분비하는 미생물의 경우 그 산의 해리되지 않은 형태(undissociated form)가 산화적 인산화 작용의 protonophore로 작용하기 때문에 이 유지에너지의 소모 비율은 증가할 것이라고 하였다.

혐기성 발효에서 생산되는 아세트산, 프로피온산, 부티르산 등은 pKa 값이 4.8 부근으로 발효가 진행되어 이들 산물이 축적되면 pH가 내려 가면서 대부분 해리되지 않은 상태로 존재한다. 해리되지 않은 유기산은 protonophore로 작용하기 때문에 (Kell *et al.*, 1981), *Clostridium thermoaceticum*(Wang and Wang, 1984; Baronofsky *et al.*, 1984), *C. thermocellum*(Herrero and Gomez, 1981) 등의 발효 세균들은 자신이

생산한 발효 산물에 의하여 생육이 저해되는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 균주들과는 달리 *C. acetobutylicum*의 경우는 발효와 더불어 배양액의 pH가 저하되어, 생성된 아세트산과 부티르산이 대부분 해리되지 않은 형태로 존재 하는데도 불구하고, 정상적으로 생육을 계속하며 용매 발효로 전환된다(Ross, 1961; 김, 1988).

전보에서 (1990a) *C. acetobutylicum*이 유기산이 있는 환경에서 protonmotive force를 유지하는 것은, 특히 산 생산기 세포에 있어서 H^+ -ATPase의 역할이 매우 큰 것으로 제안 하였다. *C. acetobutylicum*의 산 생산기 세포가 유기산이 세포내로 유입되어 세포안의 pH가 내려가는 것을 방지하기 위하여 H^+ -ATPase의 작용으로 ATP를 이용하여 세포 밖으로 H^+ 를 방출한다면, *C. acetobutylicum*의 배양에서 해리되지 않은 유기산의 농도에 따라 유지 에너지의 필요량이 결정될 수 있을 것으로 예상할 수 있다.

이러한 관점에서, 이 실험에서는 유기산의 농도에 따른 *C. acetobutylicum* 산 생산기 세포의 유지 에너지를 측정하여 이 세균이 자신이 생산하는 유기산으로부터 자신을 보호하기 위하여 ATP를 소비하는 지를 살펴보았다.

재료 및 방법

균주와 배지

균주는 *Clostridium acetobutylicum* KCTC (Korean Collection for Type Cultures) 1037을 사용하였으며, 배지는 발효 기질로 포도당 45 g/l을 넣은 CAB 배지 (Kim *et al.*, 1984)를 사용하였다.

보존 및 배양

균주의 보존은 soil stock (Walton과 Martin, 1979)으로 하였으며, 모든 배양 방법은 이미 보고한 방법 (신과 김, 1990b)과 같이 하였다. 연속 배양은 750 ml/들이 발효조(NBS, Co. Inc, Edison, NJ)에 인산 제한 배지를 350 ml/ 넣고 pH 자동조절기(NBS)와 peristaltic pump로 5 N NaOH와 2 N H_2SO_4 를 적정하여 원하는 pH로 조절하면서 배양하였다. 실험에 따라 배지 저장고(Carboy)에 부티르산을 25~75 mM이 되도록 첨가하기도 하였다.

건조 균체량

배양액 20 ml/을 원심분리하고 증류수로 3회 세척하여 95°C에서 12시간 건조한 후 데시케이터에 건조한 무게를 측정하였다.

발효산물의 분석

발효산물은 배양액 1 ml/을 0.1 ml/의 H_3PO_4 로 산성화하여 원심분리한 후, 상등액 1 μ l/를 gas chromatograph에 주사하였다. G.C.의 작동 조건은 이미 보고한 조건 (신과 김, 1990b)과 같이 하였다.

전리되지 않은 유기산의 농도

배양액의 pH와 유기산, 아세트산과 부티르산의 pK_a 4.76과 pK_a 4.82를 이용하여 각각 $\log([A^-]/[AH]) = pH - pK_a$ 의 식에 대입하여 계산 하였다.

유지 에너지

Pirt(1975)의 식, $1/Y_E = 1/Y_{EG} + m/\mu$ 에 따라 연속 배양에서 회석율(μ)를 변화 시키면서 측정된 균체 수율(Y_E)을 double reciprocal plot법으로 처리하여 유지 에너지 계수(m)로 계산하였다. 이 때 $Y_E = \Delta x / \Delta S_E$, Δx = 건조 균체량(g), ΔS_E = 소모 총 에너지원(mol), $Y_{EG} = \Delta x / \Delta S_G$, ΔS_G 는 생육에 필요한 에너지원(mol), m = 유지 에너지 계수(mmol, substrate/g cell·h)이다.

Y_{ATP}

Y_{ATP} 는 배양액 중의 발효산물을 gas chromatograph로 정량하여 각 발효 산물당 생성되는 ATP를 합하여 ATP mol당 건조 균체량(g·dry weight/ATP mol)으로 계산하였다. 즉 포도당이 발효되면서 1 mol의 부티르산을 생산할 때에 3 mol의 ATP, 1 mol의 아세트산이 될 때는 2 mol의 ATP, 1 mol의 부탄올이나 아세톤으로 되는 데는 2 mol의 ATP, 그리고 1 mol의 에탄올을 생성하는 경로로 가면 1 mol의 ATP를 생성하는 것으로 계산하였다.

결 과

*C. acetobutylicum*의 pH 5.5와 6.5의 연속 배양에 있어서 유지에너지의 소비 비교

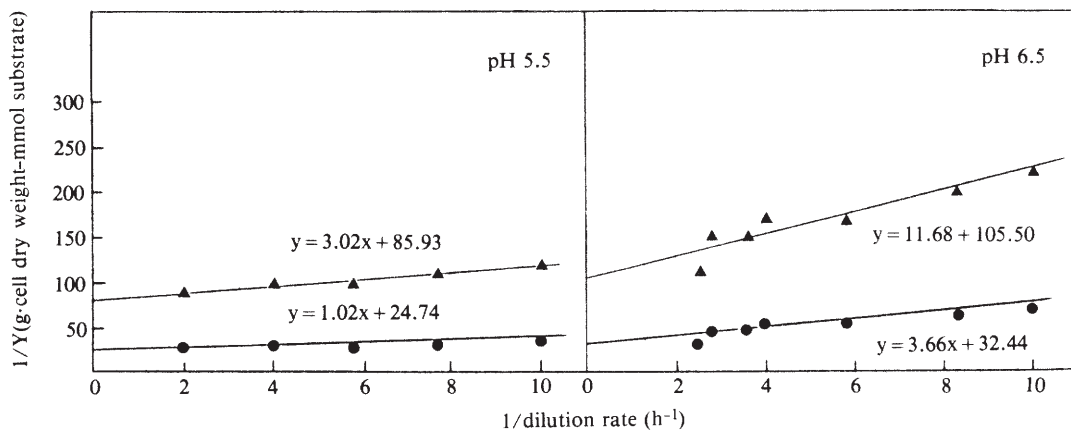
*C. acetobutylicum*의 발효에서 해리되지 않은 유기산의 농도에 대한 유지 에너지의 소비를 관찰하기 위하여, *C. acetobutylicum*의 연속 배양을 실시하고, pH 변화로 해리되지 않은 형태의 유기산의 양을 변화시켜 이 때의 유지 에너지 계수를 비교하였다. 이 때 pH 5.5의 chemostat에서는 배지내 전리되지 않은 유기산(아세트산과 부티르산의 합)이 9.5~15.8 mM이 있었고, pH 6.5에서는 1.2~3.1 mM인 환경이었다 (Table 1). 이러한 조건에서 $Y_{glucose}$, Y_{ATP} 와 그 회석율의 역수를 plot한 결과, Fig. 1에서 나타난 바와 같이 pH 5.5에서는 유지 에너지 계수인 기울기가 3.02 mmol ATP/g. dry biomass. h 혹은 1.02 mmol glucose/g. dry biomass. h이었으며 pH 6.5에서는 11.68 ATP mmol/g. dry biomass. h 또는 3.66 glucose mmol/g.dry biomass. h로 나타났다. 즉 해리되지 않은 유기산의 농도는 pH 6.5에서 보다 pH 5.5에서 더 많았으나, 세포대사를 위한 유지 에너지의 소모는 pH 6.5에서 더 많았음을 나타낸다.

pH 5.5의 연속 배양에서 부티르산의 첨가에 의한 Y_{ATP} 의 변화

*C. acetobutylicum*의 발효에 있어서 대사 작용이

Table 1. Yields and products of *C. acetobutylicum* KCTC 1037 in continuous culture as determined at various dilution rates in pH 5.5 and 6.5

pH	Dilution rate (h ⁻¹)	Acetate (mM)	Butyrate (mM)	Y _{glucose} (g dry weight/ glu.M)/ATP M)	Y _{ATP}	Undissociated acetic + butyric acid (mM)
5.5	0.10	43	62	27.5	8.4	15.8
	0.13	43	50	30.8	9.3	14.0
	0.17	41	38	34.1	10.2	13.1
	0.25	40	37	33.3	9.9	11.6
	0.50	31	27	36.4	10.8	9.5
6.5	0.10	60	98	14.4	4.5	3.1
	0.12	52	85	16.1	5.0	2.7
	0.17	45	69	19.1	5.9	2.2
	0.25	39	68	19.0	5.9	2.1
	0.28	39	59	21.0	6.5	1.9
	0.36	37	51	21.7	6.7	1.7
	0.40	27	34	30.3	9.2	1.2

**Fig. 1.** Double reciprocal plot of molar growth yields versus growth rate of *C. acetobutylicum* KCTC 1037 grown under phosphate limitation at pH 5.5 and 6.5 (▲ Y_{ATP} ● Y_{glucose}).

pH의 차이에 의하여 영향을 받음이 없는, 해리되지 않은 유기산의 농도에 의한 유지에너지의 소비를 관찰하기 위하여 *C. acetobutylicum*을 pH 5.5로 고정하여 배지에 25~75 mM의 부티르산을 가하여 연속 배양을 한 후, Y_{ATP}의 변화를 관찰하였다(Fig. 2). 그 결과 세포의 농도는 해리되지 않은 아세트산과 부티르산의 농도의 합이 10 mM에서 20 mM로 증가할수록 비례적으로 감소하였으나, 이 때의 Y_{ATP}는 거의 비슷하게 유지되거나, 때때로 오히려 증가 하는 현상이 관찰되었다. 즉 해리되지 않은 유기산이 증가할수록 균체의 합성은 저해 되었지만, ATP 소비량과는 비례

하지 않았다.

pH 5.0 연속 배양에서 해리되지 않은 부티르산이 Y_{ATP}에 미치는 영향

앞의 실험보다 해리되지 않은 유기산의 농도가 더욱 증가된 환경에서 *C. acetobutylicum* 발효의 유지 에너지 소비를 관찰하기 위하여 pH 5.0, 5.5의 연속 배양에서 부티르산을 25~75 mM 첨가하여 Y_{ATP}의 변화를 관찰하였다(Fig. 3). pH 5.0에서 해리되지 않은 분자상의 유기산의 농도가 증가될수록 균체의 농도가 감소되었다. 이 실험의 조건에서 분자상의 아세트산과 부티르산의 합은 29~39 mM이었다. 이러한 조건에

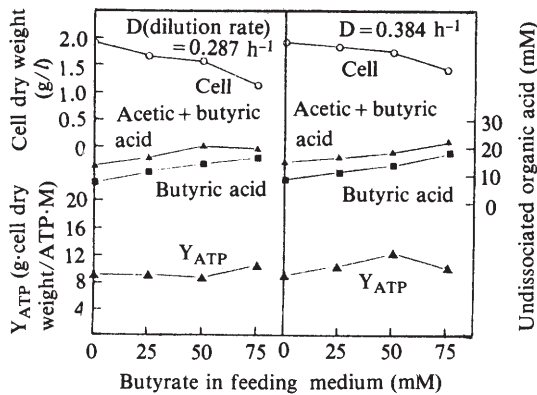


Fig. 2. Changes in the cell growth of *C. acetobutylicum* KCTC 1037 and Y_{ATP} by the addition of butyric acid at pH 5.5.

서는 분자상의 농도가 증가됨에 따라 Y_{ATP} 가 감소하였다.

이러한 결과에 의하여 *C. acetobutylicum*의 산 생성기 세포의 유지 에너지는 분자상태의 유기산이 약 30 mM 이상인 환경에서 내산성을 위한 유지 ATP의 소모가 비례적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

고 찰

미생물이나 세포의 생육에는 세포의 생합성에 필요한 에너지 이외에 유지 에너지가 필요하다. 서론에서 언급 했듯이, 이 유지 에너지는 환경에 따라 소모 정도가 다르며 세포의 내부 pH를 유지하기 위하여 서로 쓰여진다. *C. acetobutylicum*은 protonophore로 작용하는 해리되지 않은 유기산이 있을 때도 PMF를 유지하면서 생육을 계속한다. 그러므로 환경에 유기산이 증가하면 세포 내부를 일정하게 유지하기 위한 에너지가 많이 필요할 것이라고 예상된다.

그러나 이 실험에서 *C. acetobutylicum* 배양에 maintenance coefficient는 해리되지 않은 유기산의 농도에 관계없이 pH 5.5에서 보다 pH 6.5에서 더 큰 것으로 나타났다(Fig. 1). 이러한 결과는 *C. acetobutylicum*의 유지 에너지가 전리되지 않은 유기산의 농도에만 좌우되는 것이 아니기 때문으로 생각된다. 일반적으로 호산성 세균의 세포내 pH는 중성균이나 호알카리성균 보다 낮으며 세포내 효소나 transport carrier의 활성은 균마다 고유한 최적조건이 필요하다(Padan, 1981). *C. acetobutylicum*은 호산성이며 이미 보고한 바와 같이 pH 6.5인 중성환경에서 보다 pH 5.5의 산성쪽에서 더 잘자라며(신과 김, 1990b), 발효 중 세포 내부의 pH는 외부 pH보다는 알칼리성을 유지 하지만 외부 pH가 중성에서 산성으로 변하면

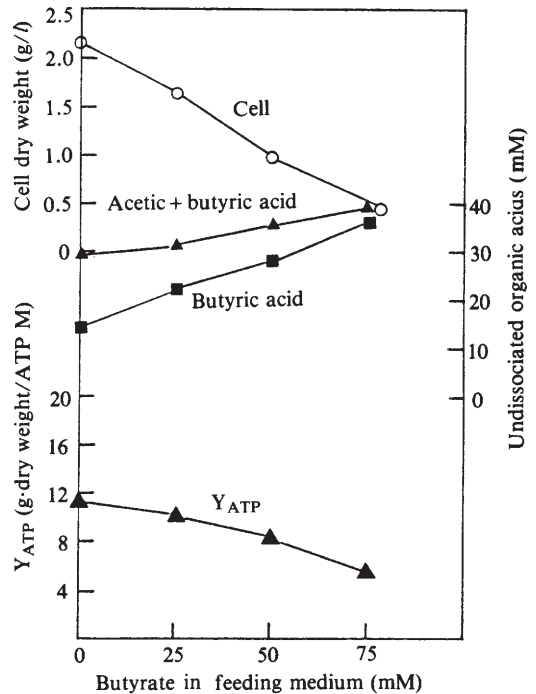


Fig. 3. Changes in the cell growth of *C. acetobutylicum* KCTC 1037 and Y_{ATP} by the addition of butyric acid at pH 5.0 and dilution rate 0.384 h^{-1} .

내부 pH도 어느 정도까지는 산성으로 낮아지면서 생육한다(Terracciano and Kashket, 1986; Gottwald and Gochalk, 1985). 그러므로 *C. acetobutylicum*의 배양에서, pH 5.5에서 보다 pH 6.5에서 유지 에너지의 소모가 더 많은 현상은 이 균이 호산성이기 때문에 pH 5.5에서 세포 내부의 alkaline pH를 유지 하기 위한 유지 에너지의 소비보다는 오히려 최적조건이 아닌 pH 6.5에서 유지 에너지의 소비가 증가된 것으로 생각된다.

또 pH 5.5로 고정한 환경에서 부티르산을 25~75 mM 첨가하여 그에 따른 유지 에너지의 소비를 관찰 하였을 때에도 전리되지 않은 유기산의 농도가 증가 함에 따른 유지 에너지의 소비는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

이 실험은 배지 저장고로부터 부티르산이 25~75 mM 함유된 배지가 주입되는 chemostat으로서 해리 되지 않은 아세트산과 부티르산의 합이 10 mM에서 20 mM로 증가되는 환경이었다. 이러한 경우 Y_{ATP} 가 거의 일정하거나 때로 증가하는 것으로 나타나는 현상은 두 가지로 나누어 생각해 볼 수 있다. 첫째는 이 조건에서 유지 에너지가 증가되었는 데도 Y_{ATP} 가 거의 일정 하다면, 균체의 조성이 해리되지 않은 유기산의 증가에 따라 ATP 소비가 낮은 성분들로 증

가되지 않았나 하는 추측이다. Förberg와 Häggström (1986)은 *C. acetobutylicum* 배양에서 때때로 접도가 높아지고 당소비량과 발효산물의 양 사이에 물질의 균형이 맞지 않는 것을 보고하였다. 그들은 이러한 현상은 산 생산기 세포가 용매 생산에 필요한 저장 acetylated carbohydrate polymer를 세포의 물질로 만들기 때문이라고 하였다. 이런 논의에 대하여서는 더 세밀한 연구가 필요 하겠지만, 만일 산 생산기 세포가 당을 발효하여 이러한 균체의 세포 물질을 만든다면, 세포의 발효산물의 양은 소비된 포도당의 양에 비하여 적으며 생성된 발효산물의 양으로 계산된 Y_{ATP} 값은 소비된 기질에 비하여 높게 계산된다. 이러한 가정을 확인하기 위해서는 유기산에 대한 내성이 없는 균주들과 *C. acetobutylicum* 같이 내산성을 가진 균주들의 유기산의 증가에 따른 유지 에너지의 소비 및 그 환경에서의 균체 조성의 변화에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 둘째는 해리되지 않은 유기산의 증가에 따라 균체의 합성이 저해 되지만, 그 농도는 10~20 mM 정도이기 때문에 호산성인 *C. acetobutylicum*의 유지 에너지의 소비 증가에 영향을 미칠 정도가 아니기 때문이라는 추측이다.

전보(신과 김, 1990a)에서 *C. acetobutylicum*의 산 생산기 세포가 pH 4.5의 75 mM의 부티르산이 있는 환경에서 정상적인 protonmotive force를 유지 하였으나, 12시간이 경과하였을 때 그 환경에서 발효가 저해됨을 보고하였다. *C. acetobutylicum* 대사가 산

생산기에서 용매 생산기로 전환될 때 보통 이 때의 배양액에는 pH 5.0 이하에서 유기산이 70 mM 정도 축적되어 해리되지 않은 유기산의 양이 약 25~35 mM로 상당히 높다(Bahl 등, 1982). 이와 같이 *C. acetobutylicum*의 발효에 유기산의 영향은 비교적 높은 농도에서 균의 생존과 대사의 전환에 영향을 주는 것으로 생각된다.

이와 같은 배경에서 pH 5.0의 환경에서 부티르산의 양을 25~75 mM 첨가하여 배양하여 해리되지 않은 부티르산의 농도가 10~50 mM의 범위로 증가되었을 때 유지 에너지의 소비를 비교하였다. 그 결과 해리되지 않은 유기산의 농도가 증가될수록 세포농도는 감소하였는데, 그 정도는 해리되지 않은 유기산이 10~20 mM 이었던 앞의 실험에 비하여 현격하였다 (Fig. 3). 또한 Y_{ATP} 가 감소됨을 보여주어 유지 에너지의 소비가 증가되고 있음을 나타내었다. 이러한 결과에 의하여 *C. acetobutylicum*은 해리되지 않은 유기산이 30 mM 이상일 때 산의 증가에 따른 세포 내부의 pH를 유지하기 위한 ATP의 소비가 많이 변한다는 것을 알 수 있었다. 또 *C. acetobutylicum*의 유기산에 대한 내산성에서 세포내의 항상성을 유지하기 위한 ATP의 사용은 그 농도에 비례하는 것이 라기 보다는 일정 농도 이상의 비교적 높은 농도의 해리되지 않은 유기산의 농도에서 더욱 현저해진다는 것을 알 수 있었다.

적 요

*Clostridium acetobutylicum*의 유기산에 대한 내산성 기작을 밝히기 위한 일환으로 *C. acetobutylicum* KCTC 1037의 해리되지 않은 유기산(undissociated organic acid)의 증가에 따른 유지 에너지의 소비를 관찰하였다. *C. acetobutylicum*을 pH 5.5와 pH 6.5에서 연속배양 하였을 때 유지 에너지의 계수는 pH 5.5에서 보다 pH 6.5에서 높아, 이 균이 호산성임을 알 수 있었다. pH 5.5에서 부티르산을 첨가하여 연속배양 하였을 때, 균체의 농도는 배양액의 해리 되지 않은 유기산의 농도가 증가함에 따라 감소하였으나, Y_{ATP} 는 감소하지 않았다. 그러나 pH 5.0에서 부티르산을 첨가하여 연속배양 하였을 때 Y_{ATP} 는 해리되지 않은 부티르산이 증가함에 따라 감소 하였다. 이와 같은 결과에 의하여 호산성인 *C. acetobutylicum*은 해리되지 않은 유기산의 농도가 30 mM 이상인 환경에서는 세포 내부의 pH 항상성을 유지하기 위한 ATP 소모가 증가되는 것으로 추측된다.

참고문헌

- Bahl, H., Andersch, W., Braun, K. and Gottschalk, G., 1982. Effects of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **14**, 17-20.
- Baronofsky, J.J., W.J.A., Schreus and E.R. Kashket, 1984. Uncoupling by acetic acid limits growth of acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 1134-1139.
- Bowles, L.K. and W.L., Effefson, 1985. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1065-1139.
- Gottschalk, G., 1985. Bacterial Metabolism, p. 229. Springer-Verlag, New York, Berlin. Heidelberg, Tokyo.
- Gottwald, M. and G. Gottschalk, 1985. The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effects on the shift from acid to solvent formation. *Arch. Microbiol.*, **143**, 42-46.
- Häggström, L. and C. Förberg, 1986. Significance of an extracellular polymer for the energy metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: A hypothesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 234-239.

7. **Herrero, A.A. and R.F. Gomez**, 1981. Inhibition of *Clostridium thermocellum*, by fermentation products and related compounds. *Adv. Biotechnol.*, **2**, 213-218.
8. **Huang, L., Försberg, C.W. and Gibbins, L.N.**, 1986. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermentation products. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 1230-1234.
9. **Kashket, E.R.**, 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 233-244.
10. **Kell, D.B., M.W., Peck, G. Rodger and J.G. Morris**, 1981. On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **99**, 81-88.
11. **Kim, B.H. P. Bellows, R. Datta and J.G. Zeikus**, 1984. Control of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* fermentation: utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogenase and to enhance solvent yields. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 764-770.
12. **김병홍**, 1988. 미생물생리학. pp. 239-243. 아카데미서적. 서울.
13. **Padan, E., D. Zilberstein and S. Schuldiner**, 1981. pH homeostasis in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **650**, 151-166.
14. **Monot, F. and J.M. Engasser**, 1983. Regulation of acetone butanol production in batch and continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotech. Bioeng. Symp.*, **13**, 207-216.
15. **Pirt, S.J.**, 1975. Principles of microbe and cell cultivation pp. 66-74. John Wiley and Sons. New York.
16. **Ross, D.**, 1961. The acetone- butanol fermentation. *Prog. Ind. Microbiol.*, **3**, 73-85.
17. **신순영, 김병홍**, 1990a. 일차산물 부티르산이 *Clostridium acetobutylicum*의 protonmotive force에 미치는 영향. 한국생화학회지. **23**, in press
18. **신순영, 김병홍**, 1990b. pH 변화와 인산 제한이 *Clostridium acetobutylicum*의 연속 발효에 미치는 영향. 생물공학회지. **5**, 9-17.
19. **Tempest, D.W.**, 1978. The biochemical significance of microbial growth yield: a reassessment. *Tre. Biochem. Sci.*, **3**, 180-184.
20. **Terraciano, J.S. and Kashket, E.R.**, 1986. Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 86-91.
21. **Walton, M.T. and J.L. Martin**, 1979. Production of butanol-acetone by fermentation. In "Microbial Technology", 2nd ed. Pepler, H.J. and Perlman, D. ed. pp. 187-209. Academic Press, New York.
22. **Wang, G. and D.I.C. Wang**, 1984. Elucidation of growth inhibition and acetic acid production by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 294-298.

(Received May 1, 1990)

(Accepted August 30, 1990)