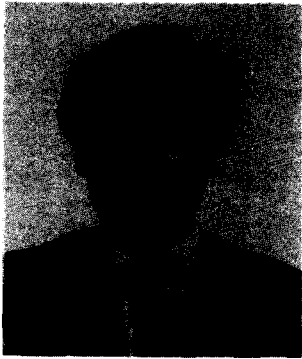


Zymomonas mobilis에 의한 에탄올, 솔비톨, 글루콘산 및 아세트알데히드의 생산



方元基

(高麗大學校 農化學科教授 理學博士)

■ 목 차 ■

1. 머리말
2. *Zymomonas mobilis*의 특성
3. *Zymomonas mobilis*에 의한 에탄올 생산
4. *Zymomonas mobilis*에 의한 솔비톨과 글루콘산의 생산
5. *Zymomonas mobilis*에 의한 아세트알데히드의 생산
6. 맺는말

1. 머리말

*Zymomonas mobilis*는 용설란(*Agave americana*)의 즙을 발효하여 만든 멕시코의 전통주 pulqué로부터 분리되었다. 이 세균이 당을 대단히 빨리 발효하여 에탄올을 생산한다는 사실은 1972년 제 1 차 원유파동과 1979년 제 2 차 원유파동을 거치면서 생물학적연료(biofuel)로서의 에탄올생산을 시도하려는 많은 연구자들의 관심을 끌어왔다.

실제로 이 세균을 이용하여 에탄올을 연속적으로 생산하는 공정이 1986년 서독의 포도당 제조공장인 Pfeifer and Langen회사에서 공업화되어 가동 중 이다.

그러나, 마치 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*가 Emden-Meyerhof-Parnas경로를 통해 당을 에탄올로 발효시키기도 하나, 분산물로 글리세롤을 생성하며, 이 때 발효중에 아황산나트륨(Na_2SO_3)를 가해 주면 부산물로 생성되던 글리세롤이 주산물로 생산될 수 있었던 바와 같이, Entner-Duodoroff경로를 통하여 당을 에탄올로 발효시키는 세균 *Zymomonas mobilis*도 배양중에 탄소원을 달리 해주거나, 또는 대사의 제어에 의해 에탄올 이외의 유용한 물질을 생산할 수 있다는 연구결과가 최근에 발표되어 여러 연구자의 주목을 끌고 있다.

본고에서는 먼저 *Zymomonas mobilis*의 특성과 이 균에 의한 에탄올 생산시의 여러 장점에 대하여 기술하고, 또한, 이 균에 의해 생성될 수 있는 유용한 물질, 솔비톨(sorbitol), 글루콘산(gluconic acid) 및 아세트알데히드(acetaldehyde)의 생산에 대하여 기술하려 한다.

2. *Zymomonas mobilis*의 특성

*Zymomonas mobilis*의 생물학적 특성은 다음과

같이 요약할 수 있다.

- ① 세포의 크기는 $2-6\mu m \times 1-4\mu m$ 이며, 모양은 끝이 원형인 막대형이다.
- ② 운동성은 필수적인 성질은 아니나, 운동할 경우 1~4개의 속모성 편모에 의해 운동한다.
- ③ 단세포 또는 쌍세포로 발견된다.
- ④ 그램염색(Gram staining) 음성이다.
- ⑤ 포자, 형막, 세포내지질 혹은 글리코겐이 없으며, 휴지기가 없다.
- ⑥ 혐기성이나 약간의 산소에도 견딘다.
- ⑦ Entner-Duodoroff경로에 의해 포도당과 과당을 거의 당량비로 에탄올과 이산화탄소로 전환할 수 있다.
- ⑧ 설당(sucrose)가 탄소원으로 사용될 수 있으며, 자주 레반을 형성한다.
- ⑨ 다른 여러 당과 지방산은 탄소원으로 이용되지 않는다.
- ⑩ 세포내의 DNA의 G+C함량은 약 47.5~49.5%이다.

그 외에 이 세균의 배양에 있어서 물리적 환경조건으로는 증식최적온도로서 25~31°C인 것으로 알려져있으며, 최적 pH는 5~7로 밝혀져있다.

3. *Zymomonas mobilis*에 의한 에탄올생산

최근 미생물에 의한 에탄올생산에 대한 연구에 있어서 세균 *Zymomonas mobilis*가 지대한

Table 1. Kinetic parameters for *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces carlsbergensis*

	<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
Specific growth rate μ (h^{-1})	0.276	0.123
Specific ethanol production rate q_p (g/g/h)	5.44	0.82
Cell yield $Y_{x/s}$ (g/g)	0.028	0.043
Ethanol yield $Y_{p/s}$ (%)	95	90

관심을 끌은 것은 잘 알려진 사실이다. 효모에 비해서 이 세균은 에탄올생산시에 다음과 같은 장점을 지닌다(표 1).

- ① 증식속도가 효모에 비해 약2배이다.
- ② 에탄올생산 속도가 전통적인 효모의 에탄올발효에 비해 6내지 7배이다. 이같은 현상은 아마도 세균(크기 1~2 μm)에 있어서 물질전달이 효모(크기 5~10 μm)에서 보다 훨씬 더 일어나는 것에 기인할 것이다.
- ③ 에탄올수율이 효모에서 보다 약 5% 높다. 왜냐하면 세균에 있어서 더 적은량의 당이 세포물질로 이용되기 때문이다.

물질대사의 연구결과에 의할 것 같으면 이 세균 *Zymomonas mobilis*는 당을 효모에서와 같이 Emden-Meyerhof-Parnas/경로를 거쳐 분해하지 않고, Entner-Duodoroff경로를 거쳐 분해

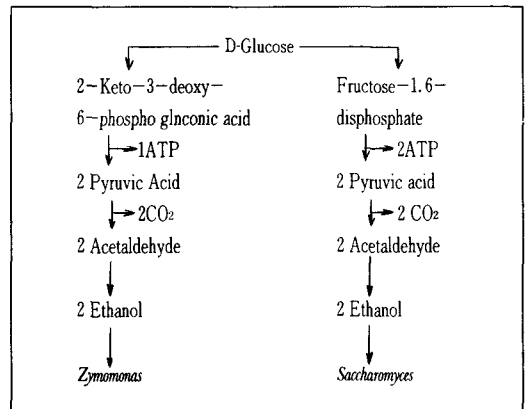


Fig. 1 Ethanol fermentation pathways of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*

한다.

그림 1에서 볼 수 있는바와 같이, Entner-Duodoroff경로에서도 중간대사물로 피루빈산(pyruvic acid)이 생성되며, 생성된 피루빈산은 효모에서와 같이 아세트알데히드로 탈탄산되고, 결국 에탄올로 환원되어, 포도당 1분자로 부터 2분자의 에탄올과 2분자의 탄산가스

가 생긴다. 그러나, 효모에 비해서 이 세균의 에너지수율(ATP)은 단지 반 밖에 생성되지 않는다. 이와같이 적은 에너지획득 때문에 이 세균은 효모에 비해 적은량의 균체량을 합성하나, 그에 상응하는 만큼의 에탄올을 더 생산한다.

대부분의 세균이 10~20 g/l의 에탄올 농도에서 증식이 방해되지만, *Zymomonas mobilis*는 효모에서와 같은 정도로 높은 에탄올내성을 가지기 때문에 상응하는 농축 당용액으로부터 120 g/l의 에탄올생산이 가능하다. 그러나 여러 연구의 결과가 나타낸 바와 같이, 고농도의 에탄올은 세포막의 구조와 기능을 파괴하는 것으로 알려져 있다. 최근 *Zymomonas mobilis*의 세포내에서 원유의 분획에서 발견되었던 pentacyclic triterpenoid(hopanoide)가 다량 검출되었다. 이 세균에 있어서 hopanoide의 량과 에탄올내성 사이에 긴밀한 관계가 있다는 실험결과가 있는데, 아마도 이 세균에 있어서의 hopanoide는 일반효모에 있어서 스테로이드와 비슷한 기능을 갖는 것으로 추측되었다. 즉, 스테로이드는 일반 효모의 세포막에서 안정제로 작용하며, 에탄올내성에 큰 의미가 있기 때문이다. 비록 효모에 있어서의 스테로이드 생합성시에 산소가 필수적으로 있어야하지만, 이 세균에 있어서 hopanoide의 합성은 혐기적상태에서 가능하다.

또한, 흥미롭게도 *Zymomonas mobilis*는 대단히 높은 당농도에 대해서도 내성이다. 이 세균은 예로서 300 g/l의 포도당을 지닌 배지에서도 자라는 것으로 알려져 있다. 이와같이 높은 삼투내성은 세균에 널리 알려져 있는 양면성용질(compatible solute)이론에 기인하는 것이 아니라 효과적인 포도당이동계(glucose transport system)을 통하여 포도당이 세포내부 및

세포외부에서 농도의 평형을 이루는 것으로

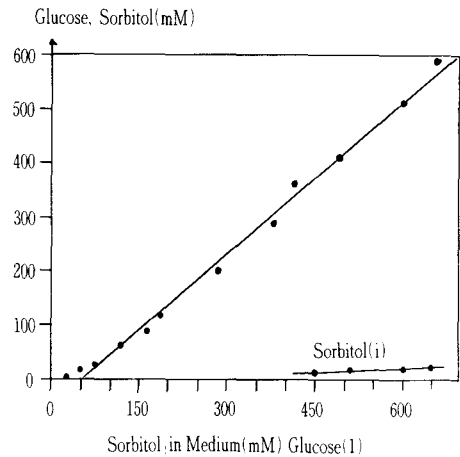


Fig 2. Intracellular concentrations (i) of glucose and sorbitol during growth of *Zymomonas mobilis* in different glucose concentration

알려져있다(그림 2). 또한 이 세균의 Entner-Duodoroff경로에 관여하는 효소들이 역시 높은 당농도에서도 최대의 활성을 갖는 것으로 알려져 있다.

4. *Zymomonas mobilis*에 의한 솔비톨과 글루콘산의 생산

1) 솔비톨과 글루콘산의 용도

솔비톨은 그의 흡습성 때문에 식품과 의약품의 수분안정제로 이용된다. 더우기 이 당은 충치를 유발하지 않으며, 인슐린에 의존하지 않고 이용되기 때문에 당뇨병자에게 당 대용물로 사용될 수 있다. 특히 솔비톨이 비타민C 합성의 출발물질로 사용되어 온것은 널리 알려진 사실이다. 솔비톨의 히드록시구룹을 지방산이나 포리옥시에틸렌옥사이드(polyoxyethyleneoxide)로 에스테르화하여 생물학적 유화제를 만드는 것이 가능하다는 것은 매우 흥미있

는 연구분야 이기도 하다.

글루콘산의 용도에서 칼슘글루코네이트(calcium gluconate)가 용해도가 매우 좋아 경구 투입 도는 주사제로서 칼슘결핍치료에 이용된다. 글루콘산은 약한 유기산이기 때문에 식품공업에서 산미제로 이용하고 있으며, 그의 이용이 점점 증가추세에 있다. 또한, 글루콘산의 나트륨염은 금속가공공업에 이용되고 있다.

2) 화학합성법 및 그외의 방법에 의한 생산

솔비톨은 현재 화학합성법에 의하여 생산된다. 50~70%의 포도당 용액을 교반압력솥에 넣고 닉켈과 같은 중금속 촉매를 사용하여 20바압력의 수소를 가해 120~150℃에서 2~4시간동안 수화반응을 수행한다. 그다음 생성된 솔비톨을 정제한다. 고압과 고온이 필요하기 때문에 이 생산공정은 비교적 에너지가 많이 소비되는 방법이다. 현재 년 약 400,000톤이 생산되고 있다.

글루콘산은 화학적으로는 파라디움이나 백금촉매하에 50℃에서 포도당용액에 공기중의 산소를 가해 반응시키므로써 생산한다. 그러나 여러가지 원하지않는 부산물이 동시에 생성되므로 정제시 많은 정제과정을 거치므로 대단히 비싼 방법이다. 때문에 현재는 글루콘산의 생산을 위해 *Aspergillus niger* 혹은 *Gluconobacter suboxydans*에 의해 생물공학적인 공정으로 생산하고 있다. 여기서는 30℃에서 강력히 공기를 공급하면서 상기 균주들을 배양하면 20~40시간이내에 약 50~100 g/l의 포도당이 글루콘산으로 전환된다. 현재 년 약 50,000톤의 글루콘산이 생산되고 있다.

3) 효소공정에 의한 생산

지난 수년간 솔비톨과 글루콘산을 효소를

이용하여 효소-막반응기내에서 생산하려는 연구가 시도 되었다. 여기서는 다음의 두 효소가 이용된다.

① 포도당을 글루콘산으로 산화하기 위해 NAD의존성 glucose dehydrogenase가 필요하다,

② 과당을 솔비톨로 환원시키기 위해 sorbitol dehydrogenase가 필요하다.

이와같이 2개의 반응을 연속적으로한 반응기내에서 수행하기 위해서는 2효소와 조효소

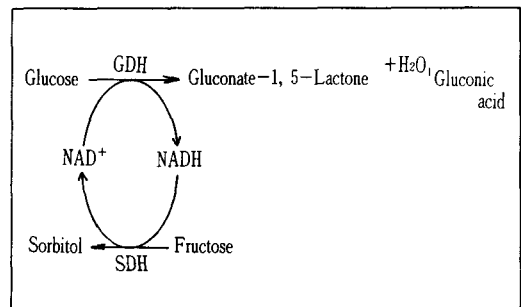


Fig 3. Enzymatic conversion of glucose-fructose mixture to gluconic acid and sorbitol in enzyme-membrane reactor
GDH:Glucose dehydrogenase
SDH:Sorbitol dehydrogenase

NAD⁺가 반응기내에 머물러 있어야 한다(그림 3). 이와같은 반응계를 위해 효소-막반응기가 고안되었다. 이때 조효소 NAD⁺는 포리에틸렌이민 혹은 에폭사이드기를 지닌 고분자 물질에 공유결합시켜 고정화하여 사용하였다.

그러나 상기 반응계에서 가장 취약한 점은 sorbitol dehydrogenase가 매우 낮은 안정성을 갖기 때문에 반응계에 효소의 재공급을 하지 않으면 전환율이 불과 20일 이내에 50%로 떨어지는 것이다.

4) *Zymomonas mobilis*에 의한 생산

*Zymomonas mobilis*는 포도당이외에 과당과 셀

당을 탄소 및 에너지원으로 이용하기 때문에 대단히 좁은 당기질 영역을 가진다. 이 세균이 단지 포도당에서 성장하면 주로 에탄올과 탄산가스를 생성하지만, 포도당과 과당이 동시에 존재하는 배지에서 성장하면 솔비톨과 글루콘산의 생산량은 배지중의 포도당과 과당

Table 2. Fermentation products during growth of *Zymomonas mobilis* in different concentrations of glucose-fructose mixture.

Glucose /Fructose (g/1)	Ethanol (g/1)	Sorbitol (g/1)	Gluconic acid(g/1)	Incubation time(h)
150	64	16	N.D	14
200	74	23	4	48
235	79	26	5	50
300	64	65	34	168

N.D: not determined

의 농도에 따라 다르다(표 2). 이 반응에서 당의 농도가 급격히 소모되며, 솔비톨과 글루콘산의 양은 증가한다. 물론 에탄올의 수율은 그에 상응해서 낮아진다. 최근에 밝혀진 바에 의하면 *Zymomonas mobilis*에 의한 솔비톨과 글루콘산의 생성은 glucose-fructose oxidoreductase에 의해 촉매되는 것으로 알려졌다(그림 4). 이 효소는 한편은 포도당을 글루코노락톤

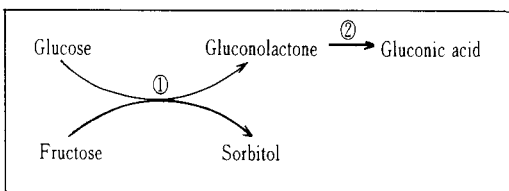


Fig 4. Formation of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*

- ① Glucose-fructose oxidoreductase with NADP⁺
- ② Gluconolactonase

으로 산화하고, 다른 한편으로는 과당을 솔비톨로 환원한다. 이와같은 산화환원반응에서 전자들은 효소에 꼭 붙어있는 NADP⁺의 도움으로 옮겨진다. 글루코노락톤고리의 가수분해는 gluconolactonase에 의해 촉매된다. 이 세균은 솔비톨을 탄소 또는 에너지원으로 이용할 수 없는 반면, 생성된 글루콘산은 gluconate kinase에 의해 글루콘산-6-인산으로 전환되어 Entner-Duodoroff경로를 통해 분해된다(그림 5). 아직도 이 세균에 있어서 glucose-fruct-

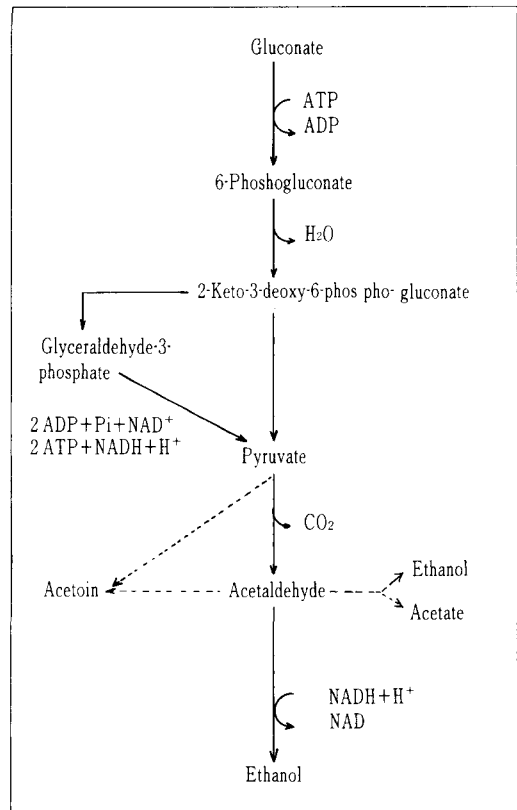


Fig. 5 Degradation pathway of gluconic acid by *Zymomonas mobilis*

ose oxidoreductase의 생리학적 의미는 밝혀지지 않았다. 그러나, 높은 glucose-fructose oxidoreductase의 활성을 지닌 *Zymomonas mobilis*의 세포가 솔비톨과 글루콘산의 생산을 위해 일

종의 효모-막반응기로서 이용될 수 있는 연구가 수행되었다. 여기서 이 세균세포는 저분자 화합물의 세포막투과성을 높이기 위해 유화제, 톨유엔, 혹은 물리적방법으로 처리된다. 더욱이 이 방법으로 세포내부에 있는 저분자 보조인자와 조효소, 예를들면 ATP, ADP, NDA⁺와 NADP⁺를 세포의 외부로 방출시켜 포도당과 과당이 에탄올과 탄산가스로 전환되고 글루콘산이 분해되는 것을 불가능하게 한다. 그림 6에서 볼 수 있는 바와 같이 투

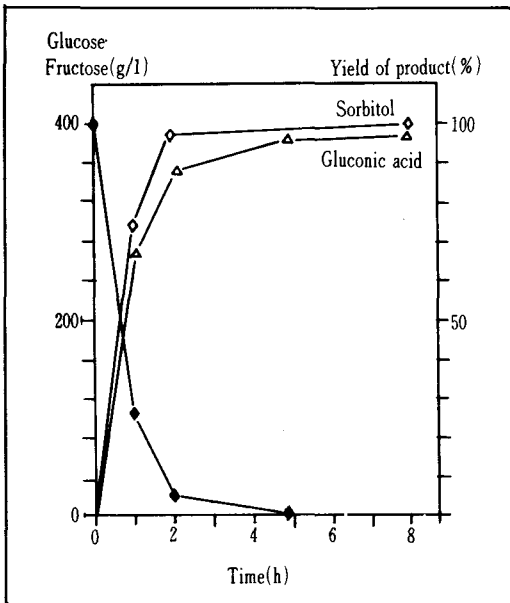


Fig.6 Conversion of glucose-fructose mixture to sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*

과성이 향상된 *Zymomonas mobilis*의 세포는 포도당과 과당의 농도가 100내지 300 g/l의 혼합용액내에서 5~10시간 이내에 95%이상의 수율로 솔비톨과 글루콘산을 생산한다. glucose-fructose oxidoreductase의 최적 pH가 6.2~6.5이기 때문에 글루콘산의 생성에 의해 생기는 pH의 강하를 알카리로 보정해 주어야한다(표 3). 연속공정에 의해 솔비톨과 글루콘

Table 3. Production of sorbitol and gluconic acid by permeability increased *Zymomonas mobilis*

Glucose	234g/l(1.3M)
Fructose	234g/l(1.3M)
Dry Cell Mass	43g/l
pH	6.5
Temp	30°C
Titration	2M Na ₂ CO ₂
Reaction time	5 h
Sorbitol	233g/l(1.28M)
Gluconic acid	247g/l(1.26M)

산을 생산하기 위해 투과성처리를 한 세포를 고정화하여 사용하였다. 칼슘알지네이트에 고정화된 세포를 지닌 연속교반반응기를 사용하여 솔비톨 7.5 g/l · h(0.26 g 솔비톨/g 건균체 · 시간)을 생산하였으며, 글루콘산의 생산량도 거의 같았다. 상기의 방법은 250시간이상 안정하였으며 이 기간동안에는 효소활성의 감소도 생산성의 감소도 관찰되지 않았다.

또한, hallow fibre 반응기를 사용하여 세포를 재순환 시킴으로서 생산율 10~20 g/l · h(0.25~0.5 g/g 건균체 · 시간)의 솔비톨과 글루콘산이 생산되었다.

5. *Zymomonas mobilis*에 의한 아세트알데히드의 생산

1) 아세트알데히드의 용도

아세트알데히드는 프라스틱, 합성고무 생산에 사용되며, 사진필름공업분야와 지연성 질소비료제조에도 이용되고 있다. 또한, 아세트알데히드는 대단히 반응성이 큰 화합물이기 때문에 표 4에서 볼 수 있는 바와 같이 다수의 다른 화합물합성에 사용되고 있다. 식품공업

Table 4 Major compounds derived from acetaldehyde

Acetic acid	Pentaerythritol
Acetic anhydride	Chlorinated acetaldehydes
Ethyl acetate	Glyoxal
Peracetic acid	Alkyl amines
Butanol	Pyridines
2-ethylhexanol	

에 있어서는 향미첨가제로 이용되고 있으며, 과실의 후숙에도 사용될 수 있는 잠재력을 지니고 있다.

2) 화학합성법에 의한 생산

현재는 거의 모든 아세트알데히드가 Wacker-Hoechst공정에 의해 에틸렌을 산화하여 생산하고 있다. 1969년도 미국에 있어서의 생산량은 748,000톤 이었다.

3) 효소공정에 의한 생산

그림 7에서 볼 수 있는 바와 같이 *Candida*

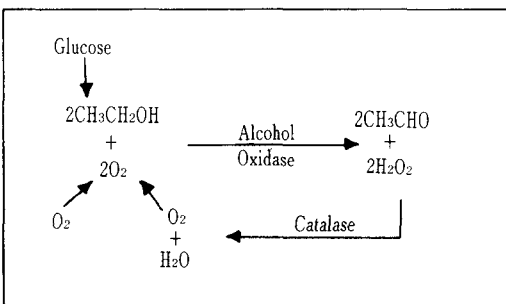


Fig.7 Free enzyme system for the oxidation of aqueous ethanol to acetaldehyde.

*boidinii*에서 분리한 alcohol oxidase에 의해 에탄올을 아세트알데히드와 과산화수소로 촉매반응 시키고 연이어 과산화수소를 catalase에 의

해 산소와 물로 분해시키는 실험이 1982년에 소개 되었으나, 그 후 더 이상 개발되지 않았다. 그 다음 그림 8에서 볼 수 있는 바와 같이

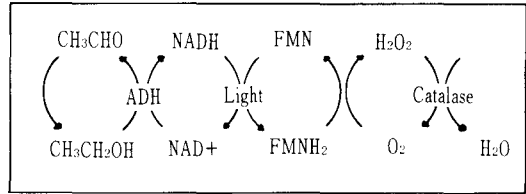


Fig. 8 Enzyme complex for the oxidation of ethanol to acetaldehyde.

alcohol dehydrogenase, NADA, FMN과 catalase를 사용하여 에탄올로부터 아세트알데히드를 생산하는 효소공정이 1984년 소개되었는데, 이 공정에서 특징적인 것은 NAD⁺가 NADH로부터 FMN과 광-유도산화에 의해 재생된다는 것이다. 이 공정에 의해 2.5 g / ℓ의 아세트알데히드 생성이 가능하였다. 그 외에 *candida utilis* 균체에 의해 직접 에탄올로부터 아세트알데히드를 생산하는 것이 개발되었는데, 이 때 6.5%의 에탄올로부터 3.5 g / ℓ의 아세트알데히드가 생산되었다.

4) Zymomonas mobilis에 의한 생산

Enter-Duodoroff경로를 이용하여 포도당을 분해하는 *Zymomonas mobilis*를 이용하여 직접 포도당으로부터 아세트알데히드를 생산하는 방법이 최근에 발표되었다. 이 때 사용한 *Zymomonas mobilis*는 ally alcohol의 존재하에 배양하여 아세트알데히드를 에탄올로 환원하는 능력이 저하된 alcohol dehydrogenase를 지닌 변이주 이었다. *Zymomonas mobilis*에 의한 아세트알데히드의 생산을 산소에 의해 더욱 향상되었는데, 이는 세포내부에서 아세트알데히드를 환원하여 에탄올을 생산할 때 사용되는 NADH의 감소에 기인하는 것으로 생각되

었다(그림 9, 표 5). 변이주를 사용하여 4%의

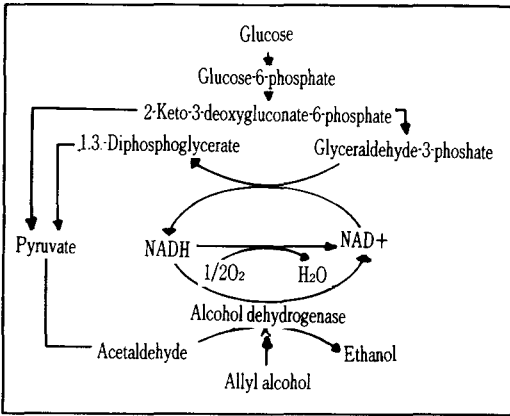


Fig.9 The Entner Duodoroff pathway for glucose metabolism in *Z. mobilis* ; inducing the formation of acetaldehyde through aerobic culture and allyl alcohol selection.

Table 5. Acetaldehyde produced by non-acrated(shake) and directly aerated cultures of the wild type strain and allyl alcohol selected strain (RZIE) of *Zymomonas mobilis*. 24-hours Culture in 125 ml Erlenmeyer Flasks with media containing 4% glucose. aeration at 23 ml min⁻¹.

Stain	Acetaldehyde production(g l ⁻¹)	Glucose used(g l ⁻¹)	%Theoretical yield of acetaldehyde
Wild type(shake)	0.78	38.8	4.1
Wild type(aerated)	2.20	34.5	13.0
RZIE(shake)	2.48	20.8	24.3
RZIE(aerated)	4.08	21.0	39.7

포도당을 지닌배지로부터 4.08 g / l 의 아세트알데히드의 생산이 가능하였다.

상기의 수치는 소모된 포도당의 량으로 환산하여 이른치의 40%이었다(표 5).

6. 맺는말

1990년 8월2일 새벽, 이라크가 쿠웨이트를 침공함에 따라 또다시 전세계는 에너지위기에 직면한 상태가 되었으며, 예상한대로 국내의 휘발유 및 등유의 값이 11월 25일 0시를 기하여 28% 인상되었다. 필자는 1987년도에 이미 본지를 통하여 대체연료로서의 에탄올생산에 대하여 기술한 바가 있으며, 생물학적연료로서의 에탄올의 생산은 앞으로도 전세계 각국의 매우 중요한 연구분야가 될 것으로 생각된다. 그 중에서도 *Zymomonas mobilis*에 의한 에탄올 생산은 이미 기술한 바와같이 많은 장점을 지니고있으며, 앞으로 유전자재조합기법을 사용하여 지금까지 이 세균이 직접 에탄올로 발효시키지 못하던 섬유질이나 헤미셀룰로스도 발효시킬 수 있는 새로운 변종이 육종되기를 기대한다. 아울러, 연료용 에탄올에 비해 부가가치가 큰 솔비톨, 글루콘산 및 아세트알데히드와 같은 유용한 물질들도 *Zymomonas mobilis*의 육종 및 새로운 공정의 개발(예를들면 효소의 고정화 혹은 효소-막반응기 등의 개발)에 의해 더욱 효과적이고 경제적으로 생산되기를 기대한다.

7. 참고문헌

1. 방원기 : 주류공업 6, 37(1987)
2. P.L.Rogers et al: Adv. Biochem. Eng. 23, 37(1982)
3. KFA Bericht: Biotechnologie und Mikrobiologie(1987)
4. J.Swings and J.Deley: Bacteriol. Rev. 41, 1(1977)
5. U.H Chun and A.H.Romano: Appl. Environ. Microbiol. 49, 151(1985)
6. A. A. Di Marco and A. H. Romano :

-
- Appl. Environ. Microbiol. 49, 151(1985)
7. M.J.Hardman and R.K.Scopes: Eur. J. Biochem. 173, 203(1986)
 8. L.O.Ingram and T.M.Buttke: Adv. Microbiol. Physiol. 25, 253(1984)
 9. S.L.Paterson et al: Biocatalysis 1, 217 (1988)
 10. H.Schulenberg-Shell et al: Anal. Biochem. 181, 120(1989)
 11. M.Strohdeicher et al: Appl. Microbiol. Biotechnol. 27, 378(1988)
 12. M.Zachariou and R.K. Scopes: J. Bacteriol. 167, 863(1988)
 13. B.Rehr and H.Sahm: forum mikrobiologie 3, 166(1990)
 14. M.S.A.Wecker and R.R. Zall: Process Biochem. 10, 135(1987)

바로지킬 질서의식, 바로서는 우리사회