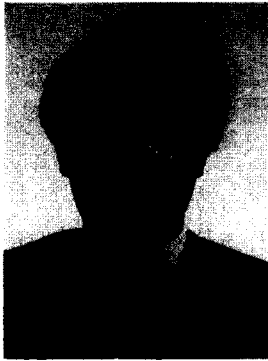


에탄올을 생산할 세균의 위한 육종



방 원 기

<고려대학교 농화학과 교수>

황 인 균

<고려대학교 농화학과>

■ 目 次 ■

- I. 머리말
- 1. *Zymomonas* 세균의 세균학적 및 생화학적 특성
- 2. 돌연변이 처리에 의한 *Zymomonas* 세균의 육종
- 3. 유전공학적 기법에 의한 *Zymomonas* 세균의 육종
- 4. 대장균에 의한 에탄올 생산
- II. 맺음말
- III. 참고문헌

I. 머리말

오늘날 인류는 인구의 증가, 과학 기술의 발달, 그리고 생활양식의 다양화에 따른 에너지 수요의 급증으로 인하여 에너지가 부족한 상태에 처하여 있다. 20세기 이후 현재까지 비교적 값싼 원유가 주된 에너지 및 화학공업의 원료로서 사용되어 왔으나 1973년과 1979년의 2차에 걸친 원유파동과 정치, 경제적 국제정세 및 원유의 고갈에 따라 원유를 대체할 수 있는 에너지들의 개발이 필요하게 되었다. 그중, 연료용 대체 에너지로서 기존의 술의 제조기술을 바탕으로 한 바이오매스로부터 에탄올의 생산이 주목받게 되었으며, 연료용 에탄올의 경제적 생산에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 현재 에탄올 생산에 관한 연구는 최근 급격히 발달한 유전자 조작 및 DNA 기술등의 생물공학 기법을 이용한 미생물의 육종 및 기존의 발효공정의 개선과 새로운 발효공정의 개발에 집중되고 있다. 한 예로 일본의 경우 1980년 6월에 신연료 개발 기술 연구 조합이 설립되어 1983년부터 Bench Plant 규모로 셀룰로오스계 바이오매스로부터 연료용 에탄올을 얻는 공정에 대한 연구가 소개된 바 있다.¹⁾

에탄올 발효의 원료로서 바이오매스는 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스계 원료와 전분질 원료, 당질 원료로 나뉘어진다. 이것들을 원료로 사용한 에탄올 발효는 대개 효모에 의한 것으로 알려져 왔으나, *Rhizopus*, *Fusarium* 등의 균사 형성 균류와, 유산균에서 에탄올을 생성하는 것도 있으며, 근래에는 *Clostridium thermocellum*, *C. thermohydrosulfuricum*, *C. saccharolyticum*, *Thermoanaerobium brokii*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Zymomonas mobilis* 등의 세균에 의한 에탄올 발효가 보고되고 있다. 이들 *Clostridium* 계 세균과 호열성 혐기성균은 에탄올을 직접 생산하는 능력을 지니고 있으며 고온 발효로 발효속도가 빠르며, 회

수가 용이하다는 잇점이 있으나 발효액중에 에탄올의 농도가 낮으며 초산과 유산등의 부산물이 많이 생성 되는 것으로 보고되어 있다.²⁾ 그러나, Rogers등³⁾에 따르면 *Z. mobilis*는 Glucose로부터 에탄올을 생산시 에탄올 생산성이 효모보다 높은 것으로 보고되어 많은 관심을 집중시켜 왔다. 따라서 *Z. mobilis*는 생물학적 연료로서 에탄올을 생산하고자 하는 목적에 알맞으나, 공업화하기에는 아직 많은 문제점들이 남아있는 것으로 알려져 있다.²⁾

여기서는 세균에 의한 에탄올 생산을 위한 *Zymomonas*세균과 대장균의 육종에 관하여 기술하고자 한다.

1. *Zymomonas*세균의 세균학적 및 생화학적 특성

1.1 세균학적 성질

*Zymomonas*세균은 1928년 Linder에 의해 멕시코의 용설란, Agave즙 발효액, Pulque중에서 분리되었다. 유럽에서는 상한 맥주, 상한 사이더와 배로 빚은 술 등에서 발견되며, 열대지방의 팜와인, 브라질의 발효된 사탕수수즙, 꿀 중에도 존재하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾

*Zymomonas*세균은 혐기성 그람 양성 간균으로서 공기가 존재해도 생육할 수 있으며, 일부는 호기적 조건에서 Glucose-yeast extract 배지상에서 Glucose를 에탄올과 초산까지 대사시킬 수 있다. *Zymomonas*는 혐기적 조건에서 Entner-Doudoroff 경로를 통하여 Glucose나 Fructose를 에탄올과 CO₂로 분해하며, 또한 대부분 Sucrose를 탄소원으로 이용할 수 있으며, 이때 Sucrose로부터 levan sucrase에 의해 levan을 형성한다. 다른 탄소원으로는 극히 일부만 Raffinose나 Sorbitol을 이용하지만 대부분 Raffinose, Sorbitol, Lactose, Maltose, Cellobiose, 오탄당, 지방산들을 이용하지 못한다.

질소원으로는 질산염, 아질산염은 이용하지 못하며, 암모늄염, α -아미노산, 펩티드 형태로 이용 가능하다. 이외에도 모든 균주들은 Pantotheate와 Biotin을 요구하며, 제한될 때에는 생육속도 및 균체량이 저하된다.⁵⁾

*Zymomonas*세균의 최적 생육온도는 25~31°C이며, *Z. mobilis* ATCC 10988의 경우 33°C 이상에서는 Growth yield가 감소하며, 37°C 이상에서는 생육을 멈춘다.^{5,6)} 또한, 성장가능한 pH는 3.5~7.5이며, 비교적 내산성을 나타내는 것으로 알려져 있다.^{4,5)}

*Zymomonas*세균은 대개 200g/l의 Glucose농도에서 에탄올 발효가 가능하며, 분리 균주의 반정도는 400g/l에서도 가능하다. *Zymomonas* 세균은 2%의 NaCl의 존재하에서는 전혀 생육하지 못하며, 1%의 NaCl의 존재하에서는 분리 균주의 71%가 생육 가능함에 따라 고농도의 염에 대하여 매우 민감하다. 또한 에탄올에 대해서는 55g/l의 에탄올 존재하에서는 모두 생장이 가능하며 100g/l의 에탄올 존재하에서는 분리 균주의 47% 정도가 생육 가능한 것으로 보고되어 있다.⁴⁾

상기와 같은 성질을 지니는 *Zymomonas*세균은 Bergey's Manual(8th Edn.)⁷⁾에서는 Sucrose의 이용 여부에 따라 *Z. mobilis*와 *Z. anaerobia*로 분류되었으나, Swings와 그 동료들은^{5,6,8,9)} *Zymomonas*의 많은 균주들에 대해 Phenotype, DNA 염기 조성, 염색체 크기, 염색체-DNA 연관성, Protein electropherogram 등을 시험하였으며, 이를 바탕으로 Swings와 De Ley⁴⁾는 *Zymomonas*를 하나의 속, 하나의 종인 *Z. mobilis*로 모아 Subsp.로 하여 2가지로 분류하였다.

Z. mobilis subsp. *mobilis*

Lectotype strain : ATCC 10988 =
NCIB 8938 =
NRRL B-806
DSM 424

Phenotypic centrotypic strain :

ATCC 29191=NCIB 11199

Z. mobilis subsp. *pomaceae*

Lectotypic strain : ATCC 29192=

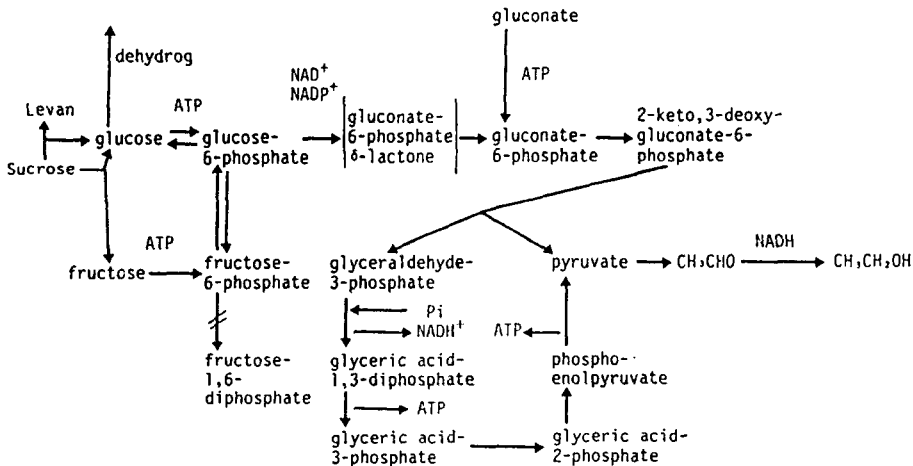
NCIB 11200

이것은 *Zymomonas*가 유전적 다양성을 지니기에 충분히 진화되지 않았든지 혹은 유전적으로 안정하기 때문으로 추정되고 있다. 또한 Swings와 De Ley⁴⁾는 *Zymomonas*는 초산세균과 매우 밀접하며

특히, *Gluconobacter*와 매우 유사하여 공통의 선조로부터 진화한 것으로 추정하고 있다.

1.2 당대사

*Zymomonas*세균은 해당경로로서 Glucose를 Embden-Meyerhof-Parnas 경로(EMP 경로)에 의하여 Pyruvic acid로 분해하지 않고 이와는 다른 Entner-Doudoroff 경로를 통하여 Glucose를 Pyruvic acid로 분해한다[그림 1]¹⁰⁾.



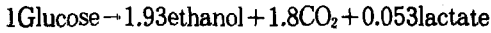
[그림 1] Mechanism of carbohydrate catabolism in *Zymomonas* strains. (Entner-Doudoroff pathway)

이 경로는 *Pseudomonas saccharophila*에서 처음 발견된 것으로서, *Zymomonas*, *Azotobacter*, *E. coli* 등의 그람음성균을 비롯, *Arthrobacter*, *Cellulomonas* 등의 그람양성균에서도 보고되어 있다. 이 경로에서는 Glucose가 Phosphoenolpyruvate를 거치지 않으며, 또한 Fructose-6-phosphate로부터 Fructose-1, 6-diphosphate를 생성하는 Phosphofructokinase가 없어 EMP 경로가 작동하지 않는다. 대신 Hexokinase에 의해 Glucose-6-phosph-

ate는 6-phosph-gluconolactone을 거쳐 6-phosphogluconate로 전환되며, 이것은 Pyruvate와 Glyceraldehyde-3-phosphate로 분해된 후 EMP 경로와 같이 Pyruvate로 된다. 전환된 Pyruvate는 Pyruvate decarboxylase에 의해 Acetaldehyde로 탈탄산되며 Acetaldehyde는 Entner-Doudoroff 경로 중에서 생성된 NADH를 이용, Alcohol dehydrogenase에 의해 에탄올로 전환된다.

ATP 생성량은 EMP 경로에서는 1mole의 Glu-

cose로부터 2mole의 ATP를 생성하지만 Entner-Doudoroff 경로에서는 1mole밖에 생성되지 않아 *Zymomonas*가 효모보다 균체량이 적게 생성된다. 또한 *Zymomonas*에서는 TCA 회로가 불완전하기 때문에 호기적으로 배양해도 ATP의 생성량은 늘어나지만 균체량은 효모만큼 증가되지 않고 오히려 Acetaldehyde가 축적되어 생육을 저해하는 것으로 알려져 있다. 따라서 발효의 부산물을 무시할 경우 *Zymomonas*가 소비한 Glucose로부터 효모보다 균체가 적게 생성되어 더 높은 에탄올 수율을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이것을 Gibbs 등은



으로 표현하고 있다. 에탄올외에도 부산물로서 유기산들과 미량의 Acetaldehyde, Acetylmethylcarbinol, 초산, Glycerol, 고급 알코올이 생성되는 것으로 보고되어 있다. ^{4, 10-11)}

1.3 에탄올 생산시의 장단점

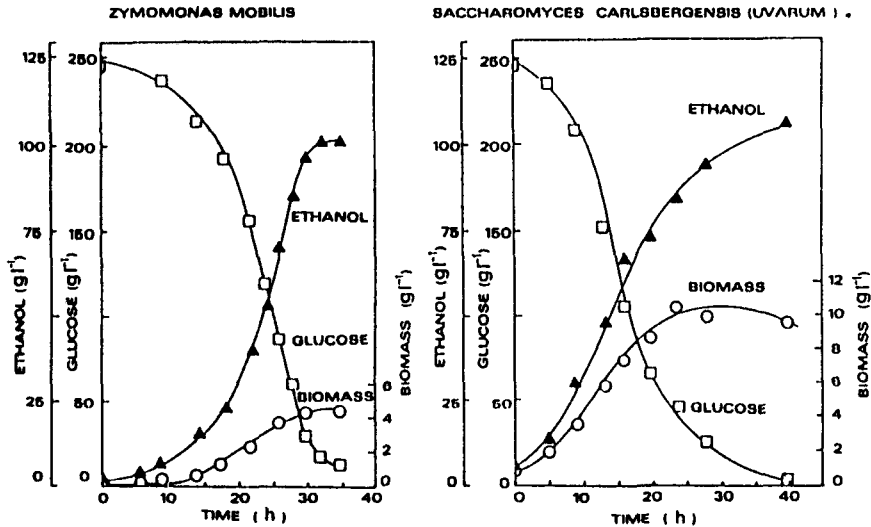
이러한 *Zymomonas*(*Z. mobilis*)는 에탄올 발효에 있어서는 몇가지 장단점들을 지닌다. 장점으로서는 상기에서 기술한 바와 같이 에탄올의 수율이 높으며, 효모보다 에탄올 발효속도가 빠르다는 점이다. 여러가지 장점들은 <표 1>에 나타난 바와 같다.

<표 1> Advantages of *Zymomonas* process for ethanol production

1. Considerably faster specific rates of sugar uptake and ethanol production (rates of 3-4 times faster than yeasts)
2. Higher ethanol yields and lower biomass yields compared to yeasts due to different carbohydrate metabolism
3. Higher productivities ($120-200\text{g l}^{-1}\text{h}^{-1}$) in continuous processes with cell recycle (Maximum reported values for yeasts are $30-40\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$)
4. Simpler growth conditions. *Zymomonas* grow anaerobically and do not require the controlled addition of oxygen to maintain viability at high cell concentrations
5. Ethanol tolerance is comparable if not better than yeasts. Concentrations of 85g l^{-1} (11% v/v) can be sustained in continuous culture and up to 127gl^{-1} (16% v/v) in batch culture
6. Studies with strains of *Z. mobilis* over a period of several years have revealed no significant contamination or bacteriophage infection problems
7. The wide range of *in vitro* and *in vivo* techniques developed for the genetic manipulation of bacteria can be applied to the important problem of broadening the range of substrates utilized by *Z. mobilis* to include starch and cellulosic raw materials

예로써 Rogers 등은 ^{3, 5)} *Z. mobilis* (ZMI, ATCC 10988)와 효모 *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602와의 에탄올 발효를 비교하여 [그림 2]와 <표 2>에 나타내었다.

[그림 2]와 <표 2>에서와 같이 *Z. mobilis*가 *S. uvarum*보다 균체량은 적은 반면, 비중식 속도, 에탄올 발효속도, 에탄올 수율면에서 모두 높은 것으로 나타나 있다.



[그림 2] Comparative kinetics for *Z. mobilis* ZMI and *S. uvarum* on 250g l⁻¹ glucose media

(표 2) Comparative kinetic parameters for *Z. mobilis*(ZMI) and *S. uvarum* in batch culture (250g l⁻¹ glucose media, pH=5.0, T=30°C)

Kinetic parameters	<i>Z. mobilis</i>	<i>S. uvarum</i>	<i>S. uvarum</i>
	(non-aerated)	(non-aerated)	(aerobic)
Specific growth rate, μ	0.133	0.055	0.12
Specific ethanol productivity, q_p	2.53	0.87	0.61
Specific glucose uptake rate, q_g	5.45	2.08	1.47
Cell yield, $Y_{x/s}$	0.019	0.033	0.045
Ethanol yield, $Y_{p/s}$	0.472	0.438	0.395
Ethanol yield, (% of theoretical)	92.5	85.9	77.5

그러나 이러한 *Z. mobilis*에 의한 에탄올 발효 시 여러가지 결점들이 존재하여 공업화하는데 문제가 되고 있다. 첫째로는 *Z. mobilis*는 발효시킬 수 있는 당의 종류가 Glucose와 Fructose, Sucrose에 한정되어 있다는 점이다.¹⁰⁾ 둘째로 *Z. mobilis*는 2%의 NaCl 존재하에서는 전혀 생육할 수 없으며, 따라서 이와 같은 낮은 내염성때문에 다량의 무기염을 함유하는 폐당밀의 발효가 효모보다 떨어진다. 때문에 폐당밀의 발효속도를 증대시키기 위해

서 탈염처리를 해야 한다. 셋째로 고농도의 Glucose(12~13% 정도) 존재하에서 에탄올 발효 속도가 저해된다는 점이며, 넷째는 Sucrose로부터 Fructose의 중합체인 Levan을 형성하거나, 그밖에 H₂S등이 생성되어 에탄올의 생산성을 감소시킨다는 점이다. 그밖에 생육의 최적온도가 30°C 부근으로 38~42°C에서 생육이 급격히 저하하며, 48°C, 15분간의 열처리로도 생존율이 6% 이하로 저하하여 열에 민감하다는 단점도 있다.^{2, 4, 12)}

이런 이유로 *Z. mobilis*는 돌연변이처리 및 DNA 재조합 기술등을 이용한 균주의 개량 연구가 십수년간 지속되어 왔다.

2. 돌연변이 처리에 의한 *Zymomonas*세균의 육종

2.1 균주의 선발

Swings와 De Ley⁴⁾는 그들의 보문에서 에탄올 내성, 온도 내성, 고농도의 당에서의 생육, 발효성

당, 응집성 등을 고려하여 약 40주의 *Z. mobilis*를 비교한 바 있다. 또한 Rogers등⁵⁾은 *Z. mobilis* 12주를 비교하였으며(표 3), 그중 ZM1(ATCC 10988)과 ZM4(CP4)가 짧은 lag기간과 빠른 에탄올 발효속도를 나타내었다(표 4). 특히 ZM4는 에탄올 내성이 높아 60g/l의 에탄올에서도 생육이 가능하며, 30°C 이상의 온도에서도 생육 및 에탄올 생산이 가능하였다.(표 5)¹³⁾

〈표 3〉 Strains of *Zymomonas* used for strain selection studies

	Strain	Source
<i>Z. mobilis</i>	ZM1(ATCC 10988)	Fermenting <i>Agave</i> juice
	Ag11	Fermenting <i>Agave</i> juice
	3TH Delft	Fermenting <i>Arenga</i> sap
	ZM6(ATCC 29191)	Fermenting <i>Elaeis</i> sap
	ZM4(CP4)	Fermenting sugarcane juice
	B70	Infected British ale
	ZAbi	Beer
	Za10	Beer
<i>Z. mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i>	ATCC 29192	Sick cider
	238	Cider
	S30. A	Apple pulp
	S30. 2	Cider

〈표 4〉 Ethanol production by *Z. mobilis* strains growing on 200gl⁻¹ glucose or sucrose in test tubes

Strain	Ethanol production from : 200 gl ⁻¹ glucose		200gl ⁻¹ sucrose	
	Rate(gl ⁻¹ h ⁻¹)	Final conc.(gl ⁻¹)	Rate(gl ⁻¹ h ⁻¹)	Final conc.(gl ⁻¹)
ZM1	1.43	60	1.22	56
ZM4	2.00	81	1.21	56
ZM6	1.25	77	0.80	51
Ag11	1.40	55	1.00	39

〈표 5〉 Final ethanol concentrations produced by *Z. mobilis* strains from 200gl⁻¹ glucose in test tubes at different temperatures

Strain	Final ethanol concentration(gl ⁻¹)		
	30°C	37°C	42°C
ZM1	60	40	0
ZM4	81	52	30
ZM6	77	0	0
Agl1	55	0	0

2.2 에탄올 내성 돌연변이주의 선발

Rogers등⁵⁾은 높은 에탄올 내성을 지니는 균주를 얻기 위하여 ZM4에 돌연변이 유발원인 NTG를 처리하여 에탄올에 더 높은 내성을 지니는 ZM48을 얻었으며, 다시 2차 처리하여 고농도의 당 농도에

서도 빠르게 생육하면서 더 많은 에탄올을 생성하며, 생성된 에탄올에 대해서도 내성을 지니는 ZM481을 얻었다(표 6). 실제 연속 발효시 모균주보다 우수한 85g/l의 에탄올 수율을 얻었다고 보고하였다.¹⁴⁾

〈표 6〉 Final ethanol concentrations of strain ZM4 and ethanol tolerant mutants growing on 300gl⁻¹ glucose medium

Strain	Final ethanol conc.(gl ⁻¹)	Time taken to reach max. ethanol conc.(h)
ZM4	93	108
ZM444	98	110
ZM48	101	101
ZM485	108	110
ZM488	112	132
ZM481	110	84

2.3 응집성 돌연변이주의 선발

Rogers등⁵⁾은 연속배양시 균체를 회수하기 위하여 Cross-flow membrane을 사용하면 당밀이나 전분 가수분해물에 의해 막히므로 산업화하기에 비실용적임을 발견하였다. 따라서 이것을 해결하기 위하여 ZM4에 돌연변이 유발원인 NTG를 처리하여 높은 응집성 균주 ZM401을 분리하였다. 이 균주는 교반을 멈출 때 1분내에 수mm의 직경의 Floc을 형성하며, 반연속식 배양에서 50g/l·h의

에탄올 생산성을 나타내었다.

2.4 온도 내성주의 선발

온도는 균체 회수, 진공 조작, 당화, 발효 등을 고려할 때 에탄올 생산의 조절에 매우 중요하다. Rogers등⁵⁾은 42°C에서 어느 정도 온도 내성 및 에탄올 생산을 보이는 ZM4에 돌연변이 유발원 처리를 하여 돌연변이주를 얻었으나 단지 몇도의 증가에 그쳤음을 보고하였다.

3. 유전공학적 기법에 의한 *Zymomonas* 세균의 육종

*Z. mobilis*의 가장 큰 단점은 발효성 당이 Glucose와 Fructose, Sucrose에 한정되어 있다는 점이다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 많은 연구자들이 *Z. mobilis*의 육종에 대해 많은 시도를 하였으며, 특히 유전공학적 기법에 의한 대표적인 육종의 몇가지 예를 소개한다.

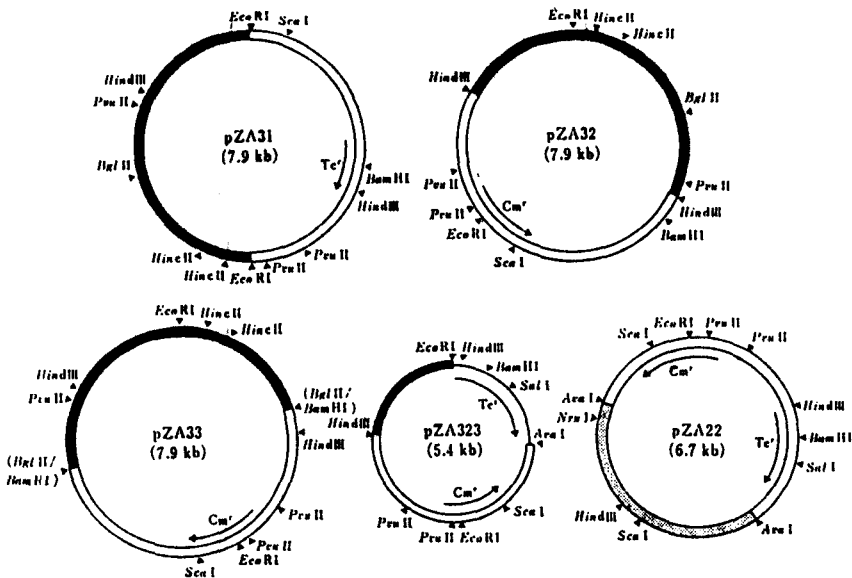
3.1 Lactose, galactose의 발효

D-galactose와 D-glucose가 β -1, 4 결합된 Lactose는 유청의 45%를 차지하는 것으로서 연료용 에탄올 생산의 기질로서 주목받고 있다.

대장균을 비롯한 장내세균은 Lactose permease 수송계에 의해 흡수된 후 β -galactosidase에 의해

Glucose와 Galactose로 분해되어 EMP 경로와 Galactose-1-phosphate를 경유하는 경로를 통해 대사되나 *Z. mobilis*에서는 Lactose가 이용되지 않는다.

Tonomura 등¹⁵⁾은 *Z. mobilis* ATCC 10988에 저분자량의 Plasmid 3종, 즉, pZM1, pZM2, pZM3이 존재하는 것을 발견하였으며, 이 Plasmid에 적당한 Marker를 부여하기 위하여 pZM2와 pZM3을 각각 대장균의 벡터 pACYC 184에 붙여 재조합 Plasmid pZA31, pZA32, pZA33 및 pZA22를 만들고, pZA32를 축소화하여 pZA323을 만들었다[그림 3]. 특히 pZA22는 6.7kb로 작 으면서 높은 복제수를 지니기 때문에 대장균과 *Z. mobilis*간의 셔틀 벡터로서 이용할 수 있으며, 이 벡터에 외래유전자를 붙여 *Z. mobilis*에 도입하는 것이 가능하다고 보고하였다.^{2, 16, 17)}

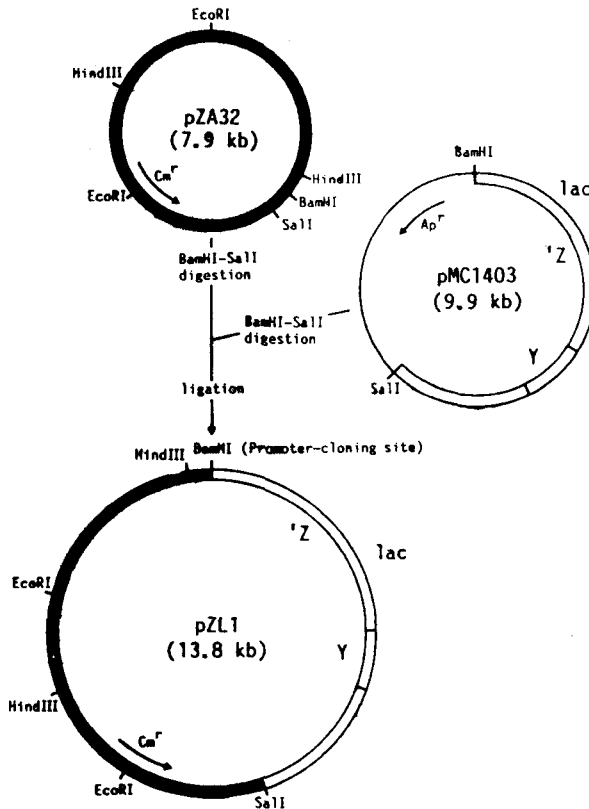


[그림 3] The shuttle vectors for *Zymomonas* and *E. coli*

- : derived from pZM3,
- ▨ : derived from pZM2,
- : derived from pACYC184,
- : derived from pBR322

그 후 Yana-se 등¹⁸⁾은 대장균 유래의 Lactose 발효성 유전자 *lac*을 pZA32에 재조합시킨 후, 대장균과 *Z. mobilis*에 도입하였으나 *Z. mobilis*에서는 대장균의 *Lac* promoter가 작용하지 않아 β -galactosidase가 대장균에 비해 9%밖에 발현되지 않았다. 따라서 이들은 대장균의 β -galactosidase의 구조유전자를 함유한 Promoter 검색용 벡터 pMC1403을 pZA32에 재조합하여 Plasmid pZL1을 구성하였다[그림 4]. *Z. mobilis* 염색체 DNA의

*Bam*HI절단 단편을 pZL1의 *Bam*HI 부위에 재조합시킨 후, <표 7>과 같은 재조합 Plasmid들을 구성하였으며 대장균 및 *Z. mobilis*에서의 활성을 비교하였다. 그 결과 pZL5가 *Z. mobilis*에서 5864u/mg 단백질의 수준으로 높게 발현되었으며, Glucose로부터 에탄올을 생산할 수 있었다. 그러나 이 재조합 Plasmid를 지니는 균주는 유일한 탄소원으로 Lactose를 함유하는 최소배지에서는 생육하지 못하였다.



[그림 4]

Construction of a Promoter-cloning Vector. pZL1.

lac genes *Z* and *Y* code for β -galactosidase and galactoside permease, respectively. *lac Z* indicates that the lactose operon lacks the promoter region and the first eight codons of the N-terminal end of the β -galactosidase gene.

(표 7) Expression of the β -Galactosidase Gene on *lac* Z, Y in *E. coli* MC 1061 and *Z. mobilis* CP4

E. coli and *Z. mobilis* were grown in L-broth and RM medium, respectively, at 30°C for 24hr. The cells were treated with a one-twentieth volume of toluene for 15 to 30 sec prior to the β -galactosidase assay. The β -galactosidase activity was determined in a reaction mixture containing toluenized cells (about 15 μ g of protein), 0.5mg of ONPG, 100 μ mol of sodium phosphate buffer (pH 7.5), 100 μ mol of 2-mercaptoethanol and 1 μ mol of MgSO₄·7H₂O in a final volume of 1.0ml. The reaction was carried out at 28 °C for 10 min, and stopped with 1.0ml of 0.1MNa₂CO₃. The increase in absorbance at 420nm was measured. One unit(U) of β -galactosidase was taken as the amount of the enzyme which liberated 1nmol of o-nitrophenol per min. The size of DNA fragments was determined by agarose gel electrophoresis using % phage DNA digested with *Hind*III as a standard.

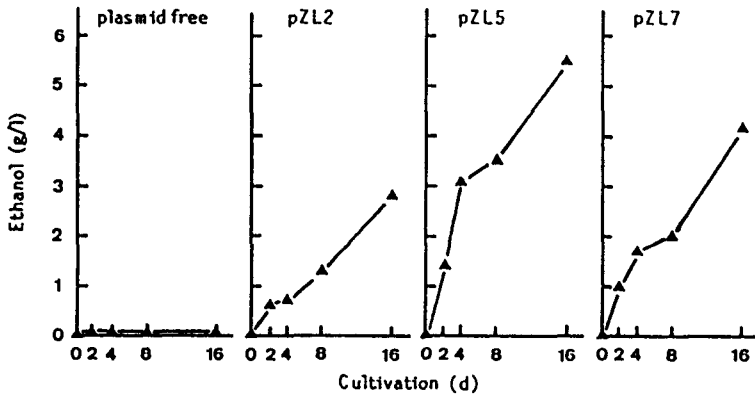
Plasmid	Size(kb) of <i>Z. mobilis</i> DNA inserted	β -Galactosidase(U/mg protein)		B/A ^a
		in <i>E. coli</i> (A)	in <i>Z. mobilis</i> (B)	
None	—	2	2	—
pZL1	—	2	2	—
pZL2	1.6	1944	449	0.2
pZL3	6.0	145	140	1.0
pZL4	1.6	1574	385	0.2
pZL5	10.9	305	5864	19
pZL6	2.4	994	578	0.6
pZL7	2.4	1004	823	0.8
<i>E. coli</i> K 12 ^b				
(-IPTG)		70		
(+IPTG)		4440		

^a B/A, Ratio of β -galactosidase activity in *Z. mobilis* to that in *E. coli*

^b A Lac⁺ strain of *E. coli* K 12 was grown with or without 1mM IPTG.

이것에 대해 이들은 Lactose로부터 β -galactosidase에 의해 생성된 Galactose가 균주의 생육을 저해하는 것으로 추측하였으며, 또한 Galactose는 *Z. mobilis*의 세포막에 존재하는 탈수소 효소에 의해 Galactonic acid로 산화되어 축적되는 것을 관

찰하였다. 따라서 이들은 Glucose에서 생육된 균체를 이용하여 Lactose를 70% 함유하는 유청분말 10% 함유 배지로부터 에탄올을 생산하였음을 보고하였다.[그림 5]^{19, 20)}



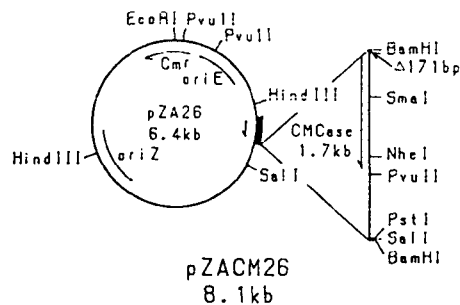
[그림 5] Ethanol production from whey by *Z. mobilis* CP4 carrying a Lac⁺ recombinant plasmid. The cultural conditions were the same as in Fig. 2. Cells (2.4mg of wet weight/ml) were suspended in RM medium containing 10% whey powder (lactose concentration, approximately 7%) instead of glucose, and incubated at 30°C, Ethanol (▲).

3.2 Cellulose, Cellobiose의 발효

직선형 β -1, 4-glucan인 Cellulose는 식물 세포벽의 주요 성분으로서, 가장 풍부하게 존재하는 유기 화합물이며, 발효성 당을 공급할 수 있는 재생 자원이기도 하다.

Misawa 등²¹⁾은 *Cellulomonas uda* CB4의 Cellulose 분해효소 Cellulase(endo- β -glucanase, C-MCase)의 유전자 1.8kb *Pst* I DNA 단편과 대장균 벡터 pUC9로 구성된 Plasmid pCM44로부터 Reading frame이 올바르게 변환된 pCH46 Plas-

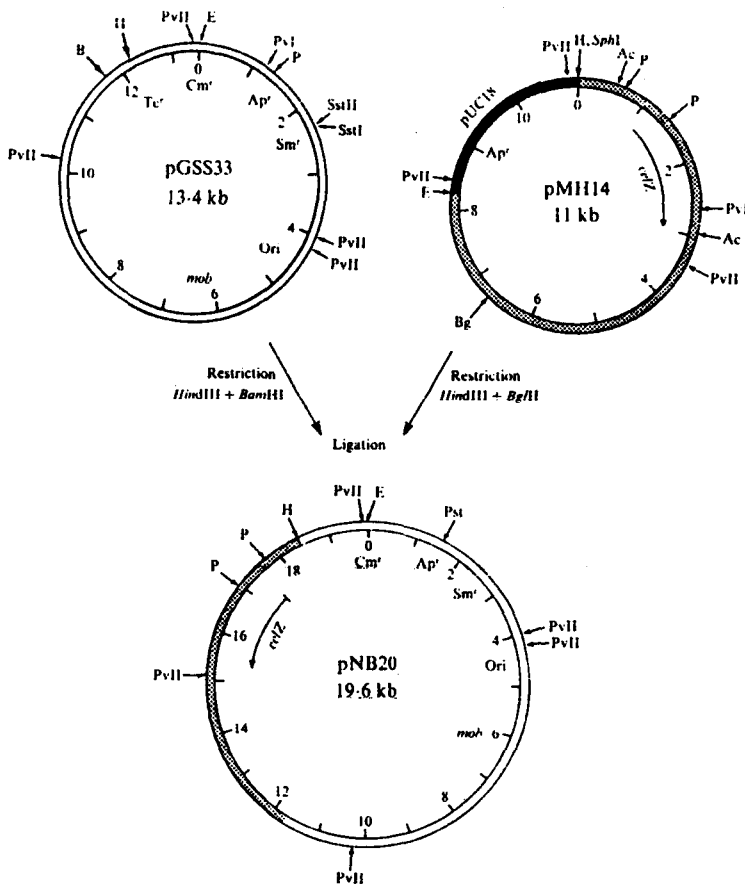
mid를 얻었다. 이것에 *Z. mobilis*의 벡터 pZA22 Plasmid에 *Z. mobilis* 염색체 DNA의 전사 개시점이 포함된 강한 Promoter로 구성된 발현 벡터 pZA26을 재조합하여 Plasmid pZACM26을 구성하였으며[그림 6], 이것을 Helper plasmid pRK 2013을 이용하여 *Z. mobilis* NRRL β -14023에 접합 전달하여 유전자를 발현시켰다. 그러나 이 효소는 세포외의 배양액중으로 분비되어 Cellobiose 이용에 문제가 있는 것으로 보고되었다.



[그림 6] Construction of hybrid plasmid pZACM26. In pZACM26, the CMCase gene is inserted with a proper reading frame.

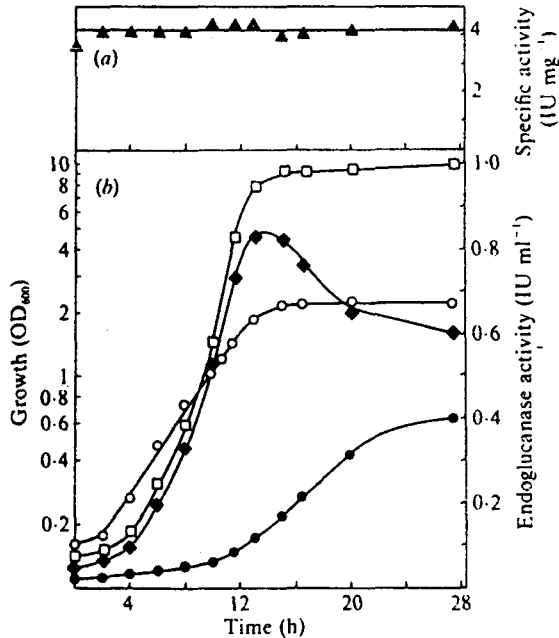
또한 프랑스의 Brestic과 Goachet²²⁾은 *Erwinia chrysanthemi*은 Cellulase cendo- β -1, 4-glucanase)의 유전자를 대장균의 pUC18에 클로닝하여 Plasmid pMH13을 얻은 후, 이 pMH13의 일부가 결실된 pMH14로부터 *cel I* 유전자 단편을, RSF 1010의 복제 개시점을 지나는 광속주영역성 Plas-

mid pGSS33에 클로닝하여 pNB20을 구성하였으며[그림 7], 이것을 Helper plasmid RP4를 이용, *Z. mobilis* ATCC 10988에 도입하여 대장균보다 높은 수준으로 *Z. mobilis*에서 발현시켰음을 보고하였다.[그림 8]



[그림 7] Construction of plasmid pNB20.

The stippled lines represent *Er. chrysanthemi* DNA; the arrows indicate the direction of transcription of the *celZ* gene. Sites for restriction endonucleases are: *Accl* (Ac), *Bam*HI (B), *Bg*/II (Bg), *Eco*R I (E), *Hind*III (H), *Pst* I (P), *Pvu*I (Pv I), *Pvu*II (Pv II)



[그림 8] Growth and kinetics of endoglucanase production by *Z. mobilis* ZM1-3(pNB20).

Cells were grown at 30°C on a complex medium containing 10g fructose l⁻¹ as carbon source and 100μg chloramphenicol ml⁻¹. (a) Total specific activity expressed as units(mg cellular protein)⁻¹ (▲). (b) Growth(OD₆₀₀)(○), and total activity(□), cellular activity(◆) and extracellular activity (●) of endoglucanase. The kinetics were done three times and mean values are given for each parameter.

이외에도 Su등²³⁾은 Cellulase에 의해 Cellulose에서 분해된 분해산물중의 하나인 Cellobiose를 Glucose로 분해하는 효소 β-glucosidase의 유전자를 *Z. mobilis*에서 발현시켜 Cellobiose로부터 에탄올의 생산을 보고하였다. 즉, Cellulose 분해세균 *Xanthomonas albineans*의 염색체 DNA를 pKT 230에 재조합한 후 대장균에 도입, Cellobiose를 이용하는 대장균을 선별하여 그 클론으로부터 β-glucosidase 유전자를 지니는 Plasmid pNSW904를 분리하였으며, 이것을 광속주영역성 Plasmid pRK404에 클로닝한 후, Helper plasmid pRK 2013을 이용, *Z. mobilis*에 도입하여 재조합균주 ZM6901과 ZM6902를 얻었다. ZM6901의 경우

1.4mM의 Cellobiose를 포함하는 배지에서 자란 생균체를 이용하였을 때 11일후에 110mM의 Cellobiose로부터 132mM의 에탄올이 생산되었다고 보고되었다. 그러나, 개선해야 될 몇가지 점들도 제시되었다. 즉, Cellobiose가 대사되기 위한 Cellobiose의 세포내 수송 문제와 에탄올 발효의 최적온도가 β-glucosidase효소 활성 및 발현의 최적온도와 다르다는 점과, 발현되는 β-glucosidase의 효소 활성 수준이 pNSW904를 지니는 대장균에서 발현되는 수준에 비하여 10% 이하의 수준으로 낮다는 점 등이다.

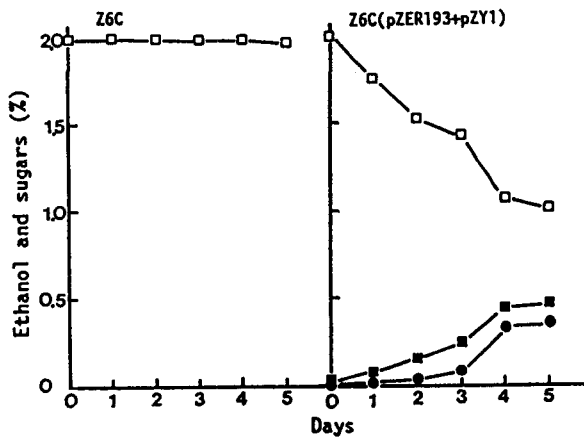
그 외에도 Misawa등²⁴⁾은 *Ruminococcus albus*의 β-glucosidase 유전자를 pZA22에 재조합시켜 H-

elper plasmid pRK2013을 이용하여 *Z. mobilis*에 접합전달법으로 도입, pBR322상에 같은 유전자를 지니는 대장균에서 발현되는 β -glucosidase활성과 같은 수준으로 발현시켰음을 보고하였다.

3.3 Raffinose, Melibiose의 발효

Raffinose는 사탕무우 당밀의 3~4%를 차지하는 것으로 D-galactose, D-glucose, D-fructose로 구성되어있어 좋은 에탄올 발효의 기질로 이용될 수 있다. Yanase²⁵⁾ 등은 *Z. mobilis* ATCC 29191의 세포외 효소 Invertase를 과잉으로 생산하는 자연 돌연변이주 Z6C를 분리하였으며, 이 균주를 이용하여 Raffinose를 발효기질로서 이용하여 에탄올을 생산하고자 하였다. 이들은 Z6C에 대장균의

α -galactosidase 유전자를 붙인 pZER193과, 넓은 기질 특이성을 지니고 있어 Raffinose와 Melibiose를 세포내로 수송할 수 있는 효소 Lactose permease의 유전자를 붙인 pZY1을 Z6C에 도입하였으며, Raffinose에 의해 Invertase에 의해 Fructose가 제거되면서 생성된 Melibiose를 분해하여 생성된 Glucose 부분을 발효시키고자 하였다. 그러나 Melibiose로부터 생성된 Galactose에 의해 균체의 생육이 저해되었기 때문에, 그들은 Glucose에서 균체를 먼저 생육시킨 후 melibiose로부터 에탄올을 생산할 수 있었음을 보고하였다 [그림 9].



[그림 9] Ethanol production from 2% melibiose by *Z. mobilis* Z6C carrying both pZER193 and pZY1.

Z. mobilis Z6C carrying both pZER193 and pZY1 was cultured at 30°C for 24h in RM medium supplemented with 100 μ g/ml of Cm and 30 μ g/ml of Tc. Harvested cells(2.0mg of wet weight/ml) were suspended in RM medium containing 2% melibiose instead of glucose, and incubated at 30°C. Symbols : □, melibiose : ■, galactose : ●, ethanol.

3.4 Xylose의 발효

D-xylose는 농업 및 임업의 부산물로부터 얻어지는 재생 바이오매스의 헤미셀룰로오스에서 유래되는 탄수화물의 10~30%를 차지하는 것으로 재

생 바이오매스에 풍부하며, 온화한 산 가수분해공정에 의해 고수율로 회수된다는 점등으로 에탄올 생산의 중요한 기질로 이용될 수 있다.²⁶⁾

이러한 D-xylose는 세균에서는 Xyloseisomer-

ase에 의해 D-xylulose로 전환된다. D-xylulose는 D-xylulose-5-phosphate로 대사되어 Pentose-phosphate 회로로 들어가는 것으로 알려져 있으며, *Zymomonas*에서는 발효되지않는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾

Okita 등²⁸⁾은 D-xylose isomerase의 유전자를 대장균으로부터 분리하여 *Pdc*를 Promoter로 하는 발현 벡터에 연결하여 *Zymomonas*세균에 도입, 강한 효소 활성을 발현시켰다고 보고한 바 있다. 이들은 Xylose를 Xylulose로 전환시키거나 Fructose를 Glucose로 전환시켜 Fructose의 발효속도를 증대시킬 목적으로 Xylose isomerase의 유전자(*xyl A*)를 *Zymomonas*세균에 도입, 발현시키고자 시도하였다. 이들은 *Zymomonas* 세균과 대장균의 서플 벡터 pZM17(5.3Kb, cm^r, Tc^r)을 구성한 후, *Zymomonas*의 Pyruvatedecarboxylase 유전자의 Promoter를 DNA 염기 정보에 따라 화학합성한 후 재조합하여 pZM17EX를 구성하였으며, 이 pZM17EX와 대장균에서 클로닝한 *xylA*를 재조합하여 pX1PX를 구성하여 *Zymomonas*와 대장균에 도입하였다. 이때, 이들은 두 균주 모두에서 야생주에 비해 2배 이상의 Xylose isomerase 활성을 확인했다고 보고하였다.

Liu 등²⁹⁾은 *Xanthomonas*의 D-xylose 대사계 유전자들을 *Zymomonas*에 도입하여 발현시켰다고 보고하였다.

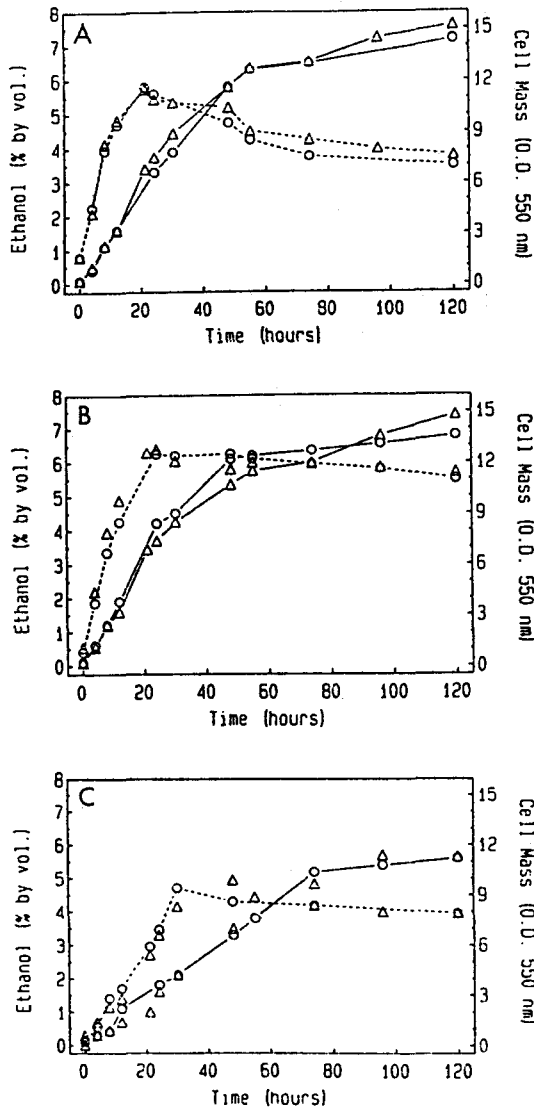
4. 대장균에 의한 에탄올의 생산

*Z. mobilis*는 효율적으로 에탄올을 생산할 수 있음에도 불구하고 Lactose, Xylose, Cellulose, Starch 등의 재생탄소 화합물들을 이용할 수 없기 때문에 *Z. mobilis*의 유전자를 대장균에 도입하여 에탄올 생산능을 갖는 대장균을 육종하고자 하는 연구가 수행되어 왔다. Braü와 Sahn³⁰⁾은 *X. mobilis*와 효모에서 에탄올 생산의 주효소가 Pyruvate decarboxylase로, 대장균 및 다른 세균에서는 거의 발견되지않기 때문에, *Z. mobilis*의 Pyruvate decarboxylase 유전자 *pdc*를 대장균에 도입하여 호기적 및 혐기적으로 자라는 대장균에서 발

현시켰다고 최초로 보고하였다. 이들은 25mM의 Glucose로부터 41.5mM의 에탄올을 생산하였으며, 또한 일반적으로 대장균에서 Pyruvic acid는 유기산과 알코올 생산에 이용되지만 이 재조합 대장균에서는 유기산이 적게 생산되며, 아울러 에탄올의 생산이 당농도에 영향받는다는 사실도 발견하였다. 이후 Conway 등³¹⁾과 Neale 등³²⁾은 Pyruvate decarboxylase의 뉴클레오티드 서열을 밝힌 바 있다.

Ingram 등³³⁾은 에탄올 생산의 주된 효소인 Alcohol dehydrogenase II (*adhB*)와 Pyruvate decarboxylase의 유전자(*pdc*)를 *lac* promoter에 연결, Plasmid pLO1295를 구성한 후 대장균에 도입하여 높은 수준으로 발현시켰으며, 아울러 균체의 성장 및 Glucose로부터 에탄올의 생산성도 증가시킬 수 있었다. 이 재조합 균주는 10% Glucose로부터 750mM(4.3%, v/v)의 에탄올을 생산할 수 있었다. 이들은 이 이유로서 NAD⁺ 재생계를 형성하는 효소들의 유전자가 포함되어 보통 Oxaloacetate와 Formate, Lactate등으로 유도되는 Pyruvate가 에탄올로 유도되기 때문으로 추정하였다.

Alterthum과 Ingram³⁴⁾은 상기의 PLO1295 Plasmid로부터 구성된 pLO1297을 내염성, 당농도, 내산성, 에탄올 내성등의 환경적 요인들과 에탄올 생산성등을 고려하여 선발한 대장균에 도입하였다. 선발된 ATCC 여덟개 균주에 대해 환경적 요인들에 대한 내성, 플라스미드 안정성, *Z. mobilis* pyruvate decarboxylase의 발현, 기질 범위, Glucose와 Lactose, Xylose로부터 에탄올의 생산 등에 대해 비교하였으며, 그중 pLO1297이 도입된 ATCC 9637과 11303, 15224에 대해 환경적 요인들에 대한 내성 및 에탄올 생산에 대해 조사하였다. 선발된 ATCC 11303과 15224는 12%(w/v)의 Glucose와 Lactose, 8%의 Xylose로부터 각각 7.2, 6.5, 5.2%(v/v)의 높은 에탄올 생산 및 적당한 환경적 장애에 대한 내성도 지니는 것을 확인하였다 [그림 10].



[그림 10] Growth and ethanol production from 12% glucose(A). 12% lactose(B). and 8% xylose(C).

Symbols : —, ethanol : ----, cell mass : ○, strain ATCC 11303(pLO1297) : △, strain ATCC 15224(pLO1297).

이때 에탄올 생산은 <표 8>과 같이 요약되었다. 이들은 식물 바이오매스의 주된 당성분들(Xylose 와 Glucose)이 *Z. mobilis*의 에탄올 발효 경로를 지나는 재조합 대장균에 의해 *S. cerevisiae* 및 다른 오탄당 발효 효모들보다 높은 효율로 에탄올로 전

환시켰다는 점에서 의의가 크며, 바이오매스의 다양한 당들을 에탄올로 전환시키는데 재조합 대장균을 사용하는 것이 Cellulose와 Hemicellulose 등으로 부터 연료용 에탄올을 생산하는데 잠재력을 제공할 것으로 보고하고 있다.

〈표 8〉 Average Kinetic parameters for ethanol production by ATCC 11303(pLO1297) and ATCC 15224(pLO1297)

Sugar (%)	Productivity		Yield ^a	Efficiency ^b (%)	Ethanol ^c
	Volumetric ^d	Specific ^e			
Glucose(12)	1.4	2.1	0.48	95	58
Lactose(12)	1.3	2.0	0.43	80	52
Xylose(8)	0.6	1.3	0.52	102	42

^a Grams of ethanol per gram of sugar.

^b Calculated as : (ethanol produced/theoretical maximum from sugar substrate) × 100

^c Final ethanol concentration in grams per liter.

^d Grams of ethanol per liter per hour

^e Grams of ethanol per g of cell dry weight per hour.

II. 맺음말

지금까지 돌연변이 유발원 처리 및 유전공학적 기법에 의한 *Z. mobilis* 및 대장균의 육종에 대해 서술하였다.

이외에도 이와 관련된 많은 연구들이 진행되어왔다. *Z. mobilis*는 Sucrose에서 생육시 Sorbitol과 Levan의 생성으로 에탄올 생성이 감소된다. Yanase^{2, 35)} 등은 Sucrose 분해 효소, 균체내 및 균체의 Invertase와 Levan Sucrase의 유전자를 분리, 분석하였으며, 아울러 Sucrose 비발효성주를 이용하여 Sucrose가수분해 효소의 제어기구 및 분비에 대해서도 연구하고 있다.

Ingram 등³⁶⁾은 *Z. mobilis*의 발현 벡터의 개발 뿐만 아니라 에탄올 발효와 관련된 효소의 유전자를 분리하여 분석하는 연구를 꾸준히 진행하였다. Ingram 등^{37~41)}은 해당계의 중심효소인 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase와 Phosphoglycerate kinase, 에탄올 발효의 중심효소인 Pyruvate decarboxylase와 Alcohol dehydrogenase I, II의 유전자분리 및 염기 서열의 분석, 다른

생물과의 상동성 비교, 효소학적 연구 등을 수행하여 왔다.

이러한 육종에 의한 에탄올 생산의 개선외에도 고정화등의 공정 개발을 통하여 생산균주가 지니는 단점을 극복하는 연구가 수행되고 있다.

그러나 특히 *Z. mobilis* 등의 세균을 이용한 에탄올 생산의 실용화에는 극복해야 할 점들이 많으며 따라서 많은 기초적 및 응용적 연구가 요구되고 있다.

이러한 에탄올 생산 연구는 현재로는 비경제적으로 생각되나, 대체 에너지측면에서 고려하면 큰 의미를 지니며, 앞으로 많은 연구 발전이 필요한 분야이다.

III. 참고문헌

1. 道木英之: 바이오사이언스와인더스트리, 47, 844(1989)
2. 外村健三, 築瀬英司: 化學と生物, 25, 177 (1987)
3. Rogers, P. L., K. J. Lee, and D. E. Tribe: Biotechnol. Lett. 1. 165. (1979)

4. Swings, J. and J. D. Ley : *Bacteriol. Rev.* 41. 1 (1977)
5. Rogers, P. L., K. J. Lee, M. L. Stotnicki, and D. E. Tribe : *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, p37. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. (1981)
6. De Ley, J. and J. Swings : *Inst. J. Syst. Bacteriol.* 25. 324. (1975)
7. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, 8th Ed., p352, Baltimore : The Williams and Wilkins Company, (1974)
8. Swings, J. and J. De Ley : *Inst. J. syst. Bacteriol.* 25. 324 (1975)
9. Swings, J., Kersters, K., and J. De Ley : *J. Gen. Microbiol.* 93. 266 (1976)
10. 外村健三, 築瀬英司 : *醸酵と工業*, 42. 180 (1991)
11. Gottschalk, G. : *Vacterial Metabolism* p. Springer-Verlag, New York. (19)
12. Michel, G. P. F. and J. Starka : *J. Bacteriol* 165. 1040(1986)
13. Skotnicki, M. L. et al. : *Appl. Env. Microbiol* 41. 889 (1981)
14. Rogers, P. L., K. J. Lee, and D. E. Tribe : *Process Biochem.* 15. 7. (1980)
15. Tonomura, K., N. Kurose, S. Konishi, and H. Kawasaki : *Agric. Biol. Chem.* 46. 2851. (1982)
16. Tonomura, K., T. Okamoto, M. Yasui, and H. Yanase : *Agric. Biol. Chem.* 50. 805. (1986)
17. Misawa, N., T. Okamoto, K. Nakamura, H. Yanase, and K. Tonomura : *Agric. Biol. Chem.* 50. 3201. (1986)
18. Yanase, H., J. Kurii, and K. Tonomura : *Agric. Biol. Chem.* 50. 2959 (1986)
19. 外村健三 : *バイオサイエンスとインダストリー* 49. 361. (1991)
20. Yanase, H., J. Kurii, and K. Tonomura : *J. Ferment. Technol.*, 66 409 (1988)
21. Misawa, N., T. Okamoto, and K. Nakamura : *J. Biotechnol.* 7. 167(1988)
22. Brestic-Goachet, N., P. Gunasekaran, B. Cami, and J. C. Baratti : *J. Gen. Microbiol.* 135. 893(1989)
23. Su, P., S. F. Delaney, and P. L. Rogers : *J. Biotechnol.* 9. 139 (1989)
24. Misawa, N. and K. Nakamura : *Agric. Biol. Chem.*, 53. 723 (1989)
25. Yanase, H., M. Masuda, T. Tamaki, and K. Tonomura ; *J. Ferment. Bioeng.* 70. 1. (1990)
26. Gong, C-S, L. F. Chen, M. C. Flickinger, and G. T. Tsao : *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, p92. Springer-verlag, Berlin (1981)
27. Jeffries, T. W : *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology.* p 93. Springer-Verlag, Berlin. (1981)
28. 沖田定喜, 横田智子, 松元信也, 紙野康美 : *農化*, 64. 491. (1990)
29. Liu, C., A. E. Goodman, and N. W. Dunn : *J. Biotechno* 7. 61. (1988)
30. Braü, B. and H. Sahm : *Arch. Microbiol* 144. 296 (1986)
31. Conway, T., Y. A. Osman, J. I. Konnan, E. M. Hoffmann, and L. O. Ingram : *J. Bacteriol*, 169. 949. (1987)
32. Neale, A. D., R. K. Scopes, R. E. H. Wettenhall, and N. J. Hoogenraad : *Nucleic Acids Res.* 15, 1753, (1987)
33. Ungram, L. O., T. Conway, D. P. Clark, G. W. Sewell, and J. F. Preston : *Appl. Environ.*

- Microbiol. 53, 2420. (1987)
34. Alterthum, F. and L. O. Ingram : Appl. Environ. Microbiol. 55. 1943. (1989)
35. 豊田 敦, 近藤 康, 福士英明, 築瀬英司, 外村健三 : 農化, 64. 500. (1990)
36. Conway, T., M. O.-K. Byun, and L. O. Ingram : Appl. Environ. Microbiol. 53. 235. (1987)
37. Conway, T., G. W. Sewell, and L. O. Ingram : J. Bacteriol. 169. 5653. (1987)
38. Conway, T. and L. O. Ingram : J. Bacteriol. 170. 1962. (1988)
39. Mackenzie K. F., C. K. Eddy, and L. O. Ingram : 171. 1063(1989)
40. Mackenzie K. F., T. Conway, H. C. Aldrich, and L. O. Ingram : 171, 4577 (1989)
41. Keshav, K. F., L. P. Yomano, H. J. An, and L. O. Ingram : 172, 2491 (1990)

儉美德也。過則爲慳吝，爲鄙嗇，反傷雅道。讓懿行也。過則爲足恭，爲曲謹，多出機心。

검약은 미덕이지만, 지나치면 인색하고 잔달아져 도리어 정도를 손상시키고, 겸양은 미행이지만, 지나치면 아첨과 비굴이 되어 마음을 꾸밈이 많아진다.

— 菜根譚중에서 —