

(S4-D) 인위적 전자흐름의 조작에 의한 혐기성 대사의 조절

한국과학기술연구원

김 병 홍

1. 서 론

산소를 생산하는 광합성 생물이 출현하기전 지구상에는 분자상태의 산소가 없었기 때문에 혐기성 생물이 서식하였으며, 현재에도 지구상에 산소를 전자수용체로 이용하지 못하는 미생물이 많이 서식하고 있다. 산소를 이용하지 못하는 혐기성 미생물중에는 산소의 존재로 생육이 저해되는 절대 혐기성 미생물로 많이 알려지고 있다.

산소를 최종 전자수용체로 이용하지 못하는 미생물도 생육에 필요한 탄소골격과 ATP를 생산하기 위해 다양한 종류의 유기물을 산화시킨다. 이때 발생하는 환원력 즉 전자는 NAD를 위시한 각종 전자 전달체를 환원시킨다. 환원된 전자전달체가 다시 산화되지 않으면 대사가 계속될 수 없다. 혐기성 상태에서 수소분압이 높거나 다른 조건으로 전자대사에 이상이 생기게 되면 이 생태계의 미생물 대사에 많은 변화가 생기게 된다. 메탄발효에 관여하는 syntrophic bacteria 가 수소분압이 높을 때 생육하지 못하며, 메탄생산균이나 황산염 환원세균등 수소를 소비하는 미생물과 공생관계를 갖는 것은 좋은 예이다.

2. 혐기성 호흡과 발효

혐기성 미생물대사를 환원된 전자전달체를 산화시킬때 이용하는 전자수용체에 따라 혐기성 발효와 혐기성호흡으로 구분할 수 있다(표 1). 질산염, 황산염, 탄산염 등 외부에서 공급되는 전자수용체를 이용하여 전자전달계를 통해 양성자구동력(protonmotive force)를 형성하는 대사를 혐기성호흡이라 하며, pyruvate, acetyl-CoA, H^+ 등 대사에서 생산되는 중간산물을 전자수용체로 이용하며 산화. 환원 반응에서 양성자구동력을 형성하지 않는 대사를 발효라 한다.(김병홍 1988)

표 1 혐기성 호흡과 발효

특 징	혐기성 호흡	발 효
전자수용체	대사의	대사내
주되는 ATP 생산	ETP	SLP
ATPase의 역할	PMF → ATP	ATP → PMF

(김병홍 1988)

3. Linear catabolism과 Branched catabolism

혐기성 발효대사에서는 단일의 발효산물을 생산하는 동형젖산발효(homolactic fermentation), ethanol 발효 등 linear catabolism과 브티르산 발효와 같이 다수의 발효산물을 생산하는 branched catabolism이 있다(Thauer 등 1977). Branched catabolism에 속하는 대사경로에는 일반적으로 수소를 생산하거나 소비하는 수소화효소(hydrogenase)가 관여하는 예가 많다. Linear catabolism에서 환원되는 전자전체는 곧바로 대사중간산물을 환원시키기 때문에 비교적 전자전달계가 간단하다(그림 1). 장내 세균에 의한 혼합산 발효, *Clostridium* 속 세균에 의한 브티르산 발효 등은 환원력의 일부를 수소화효소의 작용을 통해 수소생산에 이용하므로 수소분압과 이용하는 기질에 따라 발효산물의 조성이 변할 수 있다.

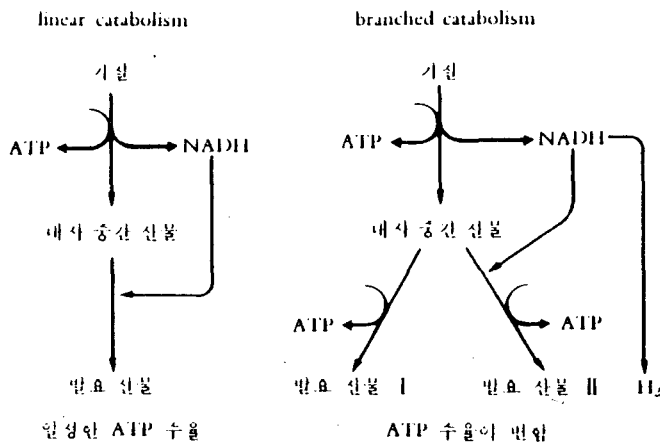


그림 1. 혐기성 발효대사의 Linear Catabolism 과 Branched Catabolism (Thauer 등 1977)

4. 전자흐름의 조작방법

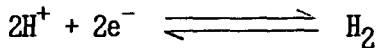
발효경로 조절기작의 연구와 산업적 활용을 위해 인위적으로 대사를 조절하는 연구가 많이 진행되었다. 인위적으로 전자의 흐름을 조작하는 방법은 각 대사경로의 특성에 따라 결정될 수 있으며, 실제 여러 종류가 시도되었다.

4-1. 최종 전자수용체의 고정

전술한 바와 같이 대사중간산물을 전자수용체로 이용하는 발효대사에서 이 전자수용체를 화학적으로 고정하여 전자대사경로를 차단하는 방법으로 효모를 이용하는 glycerol 생산이 좋은 예이다.

4-2. 수소분압의 조절

수소화효소는 다음과 같이 proton을 전자수용체로 사용하여 수소를 생산한다.



이 반응에서 반응의 방향과 속도는 전자공여체의 환원전위와 H^+/H_2 의 환원전위 그리고 반응계의 수소농도에 의해 결정된다. 따라서 수소분압을 증가시키면 수소생산이 열역학적으로 어렵게 되므로 환원된 전자전달체의 산화를 위해 proton 대신 다른 전자수용체를 이용하게 된다. 반대로 수소분압이 낮아지면 수소화효소의 작용으로 수소생산이 증가되어 산화된 발효산물의 생산이 증가하게 된다. 수소분압에 의한 대사조절의 가장 좋은 예는 syntrophic bacteria 이다.

4-3. 효소저해

Branched Catabolism에서 특이한 효소의 활성을 저해하면 이 효소가 관여하는 경로는 전체적으로 줄어들고 대신 다른 경로에서 전자의 흐름이 증가하게 된다.

부티르산 발효에서 수소화효소를 저해하면 부티르산 내지는 부탄올의 생산이 증가되는 것이 좋은 예이다.

4-4. 인공전자전달체

산화. 환원 효소의 작용에서 전자전달체로 작용할 수 있는 물질을 첨가한 경우 이 전자전달체가 환원되어 전자의 저장물질로 작용하여 첨가하지 않은 발효에서와 다른 발효양상을 보인다. 특히 Clostridium acetobutylicum에 의한 용매생산에서와 같이 생육기에 따른 발효경로가 다른 경우에 인공전자전달체의 영향이 크게 나타난다.

4-5. 젖산

여러 종류의 발효산물 중에서 다른 발효균의 탄소 및 에너지 원으로 이용되는 것은 젖산 뿐이다. 젖산은 프로피온산 발효세균에 의해 이용될 뿐 아니라 아세트산이 있는 조건에서는 Clostridium butyricum에 의해서도 발효되어 브티르산으로 합성된다. Clostridium acetobutylicum은 젖산을 이용할 수 없으나 당을 발효할 때 젖산을 첨가하면 전자의 흐름을 변화시켜 발효양상을 바꾼다.

이처럼 젖산이 혐기생태계에서 2차적으로 발효되는 성질은 젖산탈수소효소의 작용으로 해당 경로의 중간산물인 pyruvate로 산화되며, 이 반응의 환원전위가 $-0.19V$ 로 비교적 높기때문이다.

4-6. 생물전기화학

최근 산화. 환원반응에 필요한 환원력이나 산화력을 전기적으로 공급하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다. 이러한 분야를 전기화학합성이라 부르며, 생물촉매를 사용할 때 생물전기화학 합성이라 한다. 간단한 전기화학합성은 NADH를 재생하기 위해 전기에너지를 이용하는 방법이다. NAD를 비롯한 생체 전자전달체는 전극표면에서 직접 환원되지 않기때문에 전극표면과 전자전달체를 연결시켜 주는 매개체가 이용된다. 가장 많이 연구되는 매개체로 methyl viologen(MV), benzyl viologen(BV) 등이 있다. MV 나 BV를 첨가한 배양액을 전기화학 cell에서 배양하면 이들이 전극표면에서 환원되어 세포안으로 이동하면 대사에 전자를 전달할 수 있게되어 전자의 흐름을 변화시킬 수 있다. 가장 간단한 전기화학장치는 그림 2와 같다.

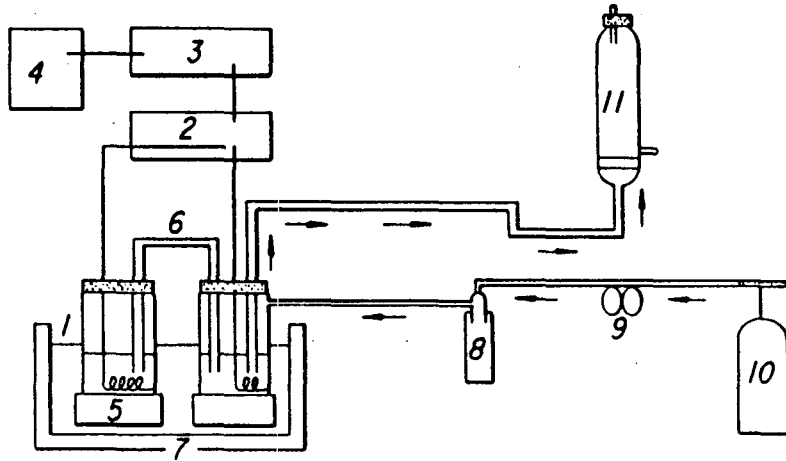


그림 2. 생물전기화학장치

1. Cathodic and anodic cells
2. Potentiostat
3. Ampere metre
4. Recorder
5. Stirrer
6. Agar Bridge
7. Water Bath
8. Humidifier
9. Low pressure regulator
10. N₂ Tank
11. H₂S Absorber (김병홍등 1990c)

5. 효모에 의한 Glycerol 발효 (Prescott and Dunn 1959)

효모가 당을 발효하여 ethanol을 생산하면서 소량의 glycerol을 생산하는 것을 잘 알려져 있다. 해당 경로에서 발생하는 전자는 acetaldehyde를 전자수용체로 하여 소비된다.(그림 3) Ethanol 발효에서 아황산염을 처리하면 acetaldehyde가 고정되어 전자수용체로 작용할 수 없게된다. 따라서 acetaldehyde를 생산하는데 발생하는 전자는 triose-phosphate를 전자수용체로 이용하여 glycerol로 환원시킨다. 이 때 glycerol의 생산은 acetaldehyde와 거의 1:1의 비율임을 알 수 있다. (표 2)

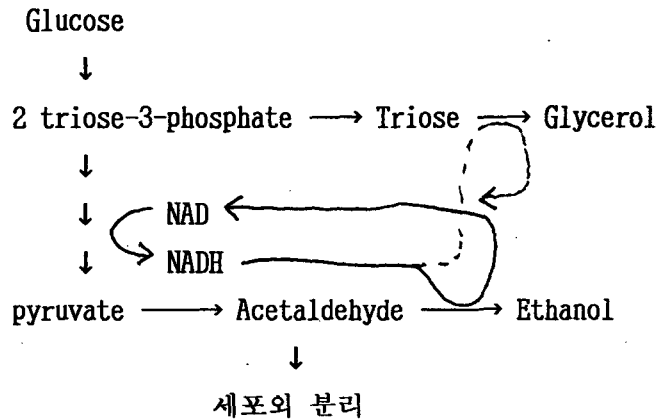


그림 3. *Saccharomyces cerevisiae*의 발효경로와 아황산에 의한 acetaldehyde의 고정으로 일어나는 glycerol 발효경로

표 2. *Saccharomyces cerevisiae*의 당발효에 첨가한 아황산염의 농도가 Glycerol 및 Acetaldehyde의 생산에 미치는 영향

Na ₂ SO ₃ 첨가량 (M/M hexose)	발효산물(M/M hexose)	
	Acetaldehyde	Glycerol
0.26	0.46	0.43
0.39	0.48	0.46
0.59	0.54	0.51
1.19	0.72	0.68

(Prescott and Dunn 1959)

6. Clostridium acetobutylicum 에 의한 Butanol 발효

C. acetobutylicum 은 당을 기질로 생육할 때 발효초기에는 아세트산과 브티르산을 생산하고, 이들 산이 축적되어 배지의 pH가 내려가면 부탄올, 아세톤, 그리고 에탄올을 생산한다(그림 4). 이 세균은 수소화효소를 보유하고 있기 때문에 발효초기 산을 생산할 때는 많은 양의 수소를 생산하고 발효말기 이미 생산된 산을 solvent로 환원시킬 때는 수소를 소비한다. (Kim and Zeikus 1985). 이 세균은 pyridine nucleotides:ferredoxin oxidoreductase를 보유하고 있어(Petitdemange 등 1976) 산 생산기에는 pyruvate의 산화에서 환원되는 ferredoxin 뿐 아니라 해당 경로에서 환원되는 NADH도 ferredoxin을 통해 수소생산에 이용된다. 또한 solvent 생산기에는 수소를 소비하는 수소화효소(uptake hydrogenase)의 작용으로 ferredoxin이 환원되고 이어서 NADP도 환원되어 용매생산에 필요한 환원력으로 이용된다.(그림 5)

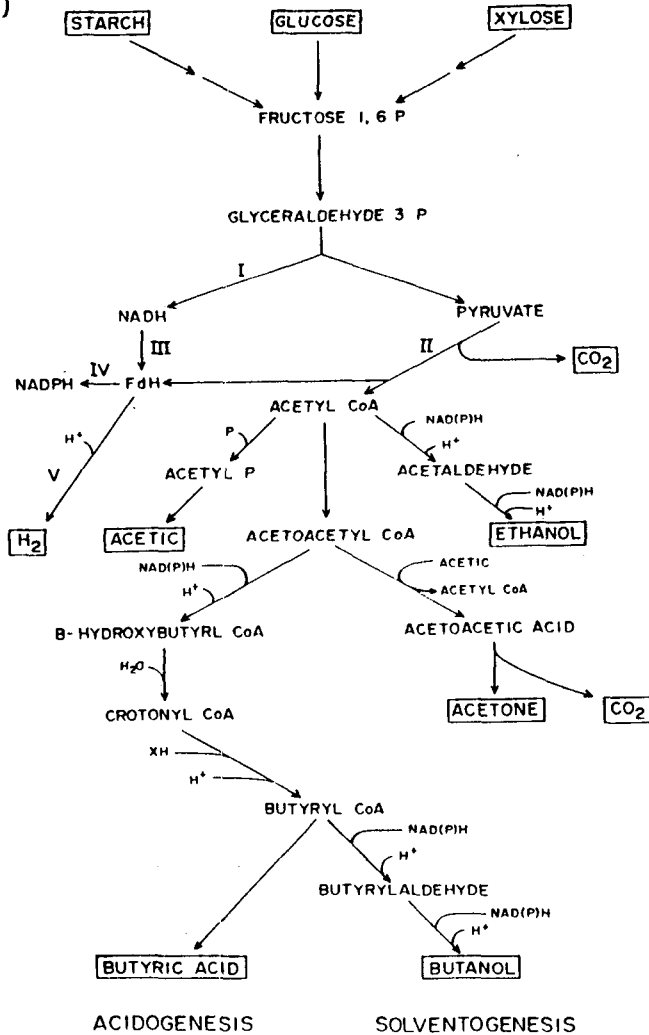


그림 4. Clostridium acetobutylicum 의 발효경로

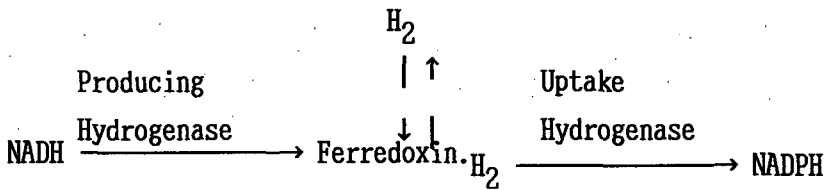


그림 5. Clostridium acetobutylicum의 수소대사 경로
(김병홍 1988)

6-1. 수소 분압의 영향

회분발효에서 수소분압의 영향을 보기위해 수소와 알콘으로 각각 gassing한 발효조의 부탄올 및 수소생산을 측정한 결과 알콘으로 처리한 경우 수소생산은 증가하고 부탄올 생산은 감소하는 반면 수소로 처리하면 수소생산은 감소하고 부탄올 생산은 증가하였다(그림 6). 수소분압이 증가하면 수소를 생산하는 수소화 효소의 작용이 늦어진다. 이러한 조건에서는 환원된 ferredoxin과 산화된 ferredoxin의 비율이 높아지고 환원전위가 높은 NADH로 부터는 ferredoxin으로 전자가 전달될 수 없게 된다. 세포안에 NADH의 농도가 높아지고 NAD의 농도가 낮아지면 acetyl-CoA를 전자수용체로 이용하므로 acetone의 생산은 감소하고 butanol의 생산은 증가한다. 따라서 butanol/acetone 비율이 수소대사의 변화를 비교하는데 편리한 지표가 된다(표 3).

수소분압과 관련하여 발효조 압력을 높이거나 용존수소의 과포화상태가 일어나는 조건에서도 butanol의 생산성이 증가된다(Doremus 등 1985).

표 3. Butanol 발효에서 수소 분압과 Butanol/Acetone 비율의 관계

초기 수소분압 (PKa)	Butanol/acetone 비율(M/M)
0	1.70
274	2.67
446	2.83
790	3.80
1,135	4.12

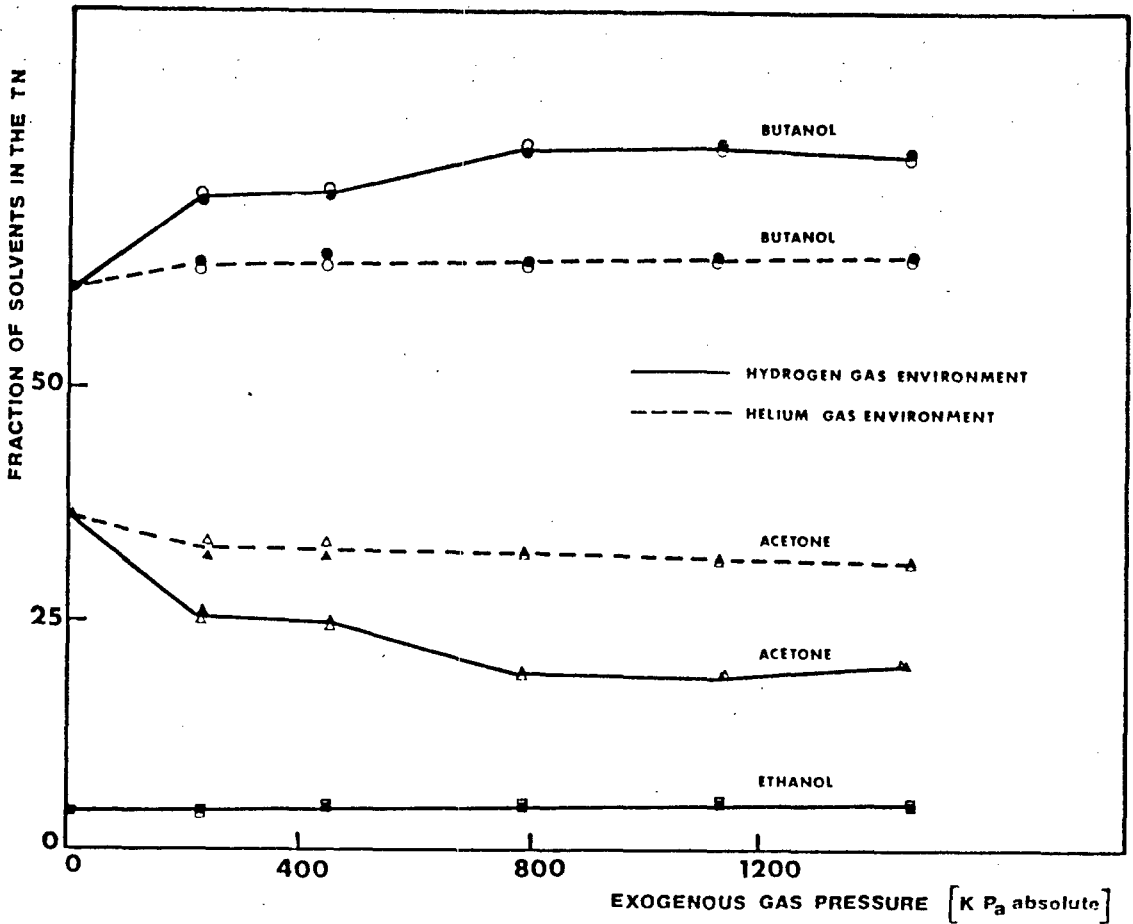


그림 6. 수소와 알곤분압이 Butanol 생산에 미치는 영향
(Yerushalmi 등 1985)

6-2. 수소화효소의 저해

일산화탄소는 많은 수소화 효소의 강력한 저해제로 알려져 있으며, *C. acetobutylicum* 의 수소생산 수소화효소의 활성도 CO에 의해 저해된다(표 4). CO를 처리한 발효에서는 acetoacetyl-CoA로부터 전자를 소비하지 않고 생산되는 acetone의 생산이 감소하였으며 같은 대사 중간산물을 전자수용체로 하여 4X2H를 소비하는 butanol의 생산이 증가하였다. 이러한 결과는 다른 연구자들의 연구에서도 확인되었다(Datta and Zeikus 1986, Meyer 등 1986).

수소화효소가 저해된 조건도 높은 수소분압과 같이 세포안에 NAD(P)H/NAD(P)의 비율이 높아지므로 acetyl-CoA 및 acetoacetyl-CoA가 전자수용체로 이용된다.

표 4. Clostridium acetobutylicum의 Butanol 발효에서 일산화탄소에 의한 전자대사의 변화

CO 농도	Butanol/acetone 비 (M/M)
0	2.2
15	2.8

(Kim 등 1984)

6-3. 인공전자전달체

생체에서 NAD(P), ferredoxin, cytochrome 등의 전자전달체를 이용하는 많은 종류의 산화 환원 효소중에는 methyl viologen(MV), neutral red(NR), benzyl viologen (BV)등 인공전자전달체와도 전자를 주고 받을 수 있다. Clostridium acetobutylicum 에 의한 butanol 발효에서 NAD, NADP 그리고 ferredoxin이 전자전달의 중심적 역할을 담당한다. 이들이 반응하는 효소에 의해서 이용될 수 있고 환원전위가 비슷한 MV, NR, BV등을 butanol 발효에 첨가한 경우 butanol의 생산량상과 더불어 acetone 생산감소가 가능하다(Hongo 1957, Rao and Mutharasan 1986, 1987, 1988, Kim and Kim 1988).

이들 인공전자전달체를 butanol에 첨가하면 수소생산이 왕성한 산 생산기에 환원되고 환원력이 필요한 용매 생산기에 이용되는 것으로 판단된다. 따라서 이들 인공전자전달체를 전자의 저장물질로 생학할 수 있다(표 5)

표 5. Methyl Viologen(MV)에 의한 Butanol 발효 전자흐름의 조절

MV 농도 (g/l)	Butanol/acetone 비 (g/g)
0	2.6
0.1	14.0

(Rao and Mutharasan 1986)

6-4. 젖산에 의한 Butanol 발효의 조절

산업적으로 butanol-acetone을 발효법으로 생산하는 공정에서는 옥수수를 주로 이용하여 corn steep liquor(CSL)을 질소원으로 사용하였다. 실험실에서 CSL을 포함하지 않는 배지를 사용할 경우 사용한 당의 30%이상이 발효되지 않았으며 butanol 수율도 낮았다 (Kim 등 1984). 정상적인 butanol 발효에서 butanol-acetone acetone-ethanol 생산비율이 6:3:1 정도이지만 젖산이 함유되어 있는 cheese whey를 기질로 한 경우 그 비율이 10:1:1로 butanol의 생산이 증가하고 acetone의 생산이 감소되었다(Maddox 1980).

CSL을 첨가하지 않은 배지에 젖산을 첨가한 경우에도 대조구에 비해 당 이용성이 월등히 우수하였으며 butanol 수율도 높았다(표 6). 젖산을 팜유제조부산물에 첨가하여 기질로 이용한 결과 butanol 최종농도가 130mM까지 생산되었다.

표 6. 젖산이 Butanol 발효에 미치는 영향

배 지	당이용율	Butanol/acetone비 (M/M)
복합배지	57.2	1.75
복합배지 + +0.5% Na Lactate	97.2	3.24

(킴기석, 김병홍 unpublished data)

젖산이 *C. acetobutylicum*의 발효에서 butanol의 생산성을 높이고 당 이용성을 향상시키는 이유는 잘 알려지지 않고 있으나, 환원전위가 -0.19V로 다른 반응보다 높기때문으로 추측된다. 수소화효소와 NAD(P) : ferredoxin oxidoreductase가 촉매하는 반응은 젖산산화반응보다 훨씬 낮기때문에 젖산의 산화반응이 수소생산에는 연결될 수 없다. Butanol 발효경로에서 젖산산화가 연결될 수 있는 단계는 crotonyl-CoA dehydrogenase가 촉매하는 반응이다. 따라서 젖산이 첨가되면 이를 pyruvate를 통해 중심대사로 연결하기 위해 crotonyl-CoA를 소비하여 acetoacetyl-CoA가 acetone으로 대사되는 것을 방지하고 당의 소비를 촉진하는 것으로 설명할 수 있을 것이다.

6-5. 전기화학적 방법

MV를 전자매개체로 이용하여 *C. acetobutylicum*을 그림 1과 같은 전기화학 장치의 음극에서 발효를 실시한 결과 butanol의 생산성이 증가되었다(Kim and Kim 1988). 이러한 결과는 전극으로부터 공급되는 전자가 매개체인 MV를 환원시키고 환원된 MV가 균체안으로 들어가서 정상적인 전자대사에 들어갈 수 있기 때문이므로 판단된다(표 7).

표 7. 전기화학적 방법에 의한 Butanol 발효의 조절

발 효	Butanol/acetone 비 (M/M)
대조구	1.97
MV 첨가	2.65
전기화학	3.30

(Kim and Kim 1988)

7. 프로피온산 발효

Propionibacterium 속에 속하는 혐기성 세균은 당이나 젖산을 발효하여 프로피온산-아세트산-이산화탄소를 2:1:1로 생산한다(그림 7). 이 발효경로에서 한 분자의 젖산이 아세트산으로 산화되면서 발생하는 환원력이 두 분자의 젖산을 프로피온산으로 환원시키는데 이용된다.

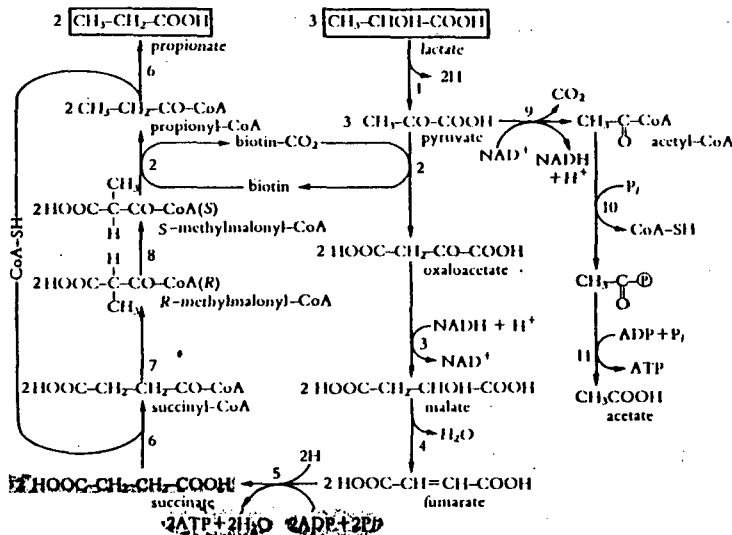


그림 7. *Propionibacterium*에 의한 프로피온산 발효 경로

Propionibacterium freudenreichii 를 전기화학장치의 음극에서 배양한 결과 당이 거의 모두 프로피온산으로 대사되었으며(Emde and Schink 1990a), 양극에서 배양한 결과 당이나 젖산이 모두 아세트산으로 산화될 뿐 아니라 첨가하는 프로피온산도 아세트산으로 산화되었다(emde and Schink 1990b, 표 8).

표 8. 전기화학적 방법에 의한 프로피온산 발효의 조절

발 효	프로피온산/아세트산 비 (M/M)
대 조 구	2.71
전기화학(음극)	36.71
전기화학(양극)	0*

* 프로피온산이 소비되었음

8. Desulfovibrio desulfuricans 의 황산염 환원

Desulfovibrio속에 속하는 황산염 환원세균은 젖산을 아세트산으로 산화시키고 여기서 발생하는 환원력을 이용하여 황산염을 유화수소로 환원시킨다(그림 8). 이 때 한 분자의 황산염을 환원시키기 위해 두 분자의 젖산을 산화하므로 CO_2/H_2S 비율은 2.0이 된다.

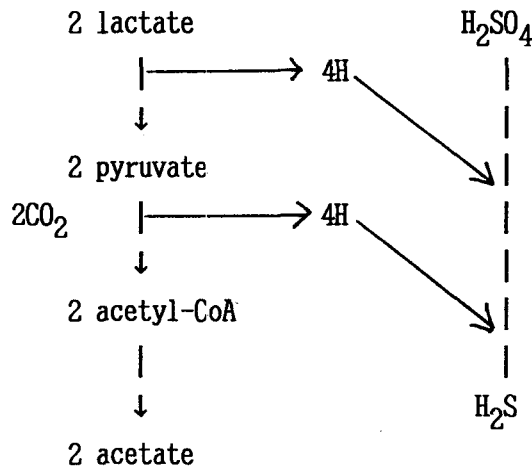


그림 8. Desulfovibrio desulfuricans 에 의한 황산염 환원 대사

석유중의 유기유황을 유화수소로 환원시키는 능력이 있는 Desulfovrio desulfuricans (Kim 등 1991)를 전기화학장치의 음극과 양극에 각각 배양한 결과 음극에서는 CO₂의 생산이 줄어들었으며 양극에서는 CO₂의 생산이 증가하였다(표 9).

이 결과는 적당한 전자매개체를 사용할 경우 전기적인 환원력을 직접 미생물의 전자대사에 이용할 수 있으며 미생물의 전자대사에서 전자를 전극으로 옮길 수 있음을 나타낸다. 이 결과로 부터 전기에너지를 이용한 석유의 탈황가능성이 있으며(Kim 등 1990a, 1990b, 1990c) 생물연료전지의 개발 가능성도 있다.

참 고 문 헌

1. Datta, R. and J.G. Zeikus(1985) Appl. Environ. Microbiol. 49, 522-529
2. Doremus, M.G., J.G. Linden and A.R. Moreira (1985) Biotechnol, Bioeng. 27, 852-860
3. Emde, R. and B. Schink (1990a) Appl. Environ. Microbiol. 56, 2771-2776
4. Emde, R. and B. Schink (1990b) Arch. Microbiol. 153, 506-512
5. Hongo, M (1957) Nippon Nogei Kagaku Kaishi 31, 735-738
6. Kim, B.H., P. Bellows, R. Datta and J.G. Zeikus (1984) Appl. Environ. Microbiol. 48, 764-770
7. Kim, B.H. and J.G. Zeikus (1985) Dev. Ind. Microbiol. 26, 549-556
8. Kim, T.S. and B.H. Kim (1988) Biotechnol Lett. 10, 123-128
9. Kim, T.S., H.Y. Kim and B.H. Kim (1990a) Biotechnol. Lett. 12, 757-760
10. Kim, H.Y. T.S. Kim and B.H. Kim (1990b) Biotechnol. Lett. 12, 761-764
11. Kim. B.H., T.S. Kim and H.Y. Kim (1990c) US patent 4, 954, 229
12. Kim, H.Y., T.S. Kim and B.H. Kim (1991) J. Microbiol, Biotechnol. 1, 1-5.
13. Maddox, I.S. (1980) Biotechnol. Lett. 2, 493-498
14. Meyer, C.L., J.W. Roos and E.T. Papoutsakis (1986) Appl. Microbiol. Biotechnol. 24, 159-167
15. Petitdemange, H., C. Cherrier, C.T. Raval and G.Gay (1976) Biochim. Biophys. Acta 421, 334-347
16. Prescott, S.C. and C.G. Dunn (1957) Industrial Microbiology, 3rd ed. McGraw-Hill, New York
17. Rao, G. and R. Mutharasan (1986) Biotechnol, Lett. 8, 893-896

18. Rao, G. and R. Mutharasan (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1232-1235
19. Rao, G. and R. Mutharasan (1988) *Biotechnol. Lett.* 10, 313-318
20. Thauer, R.K., K. Jungermann and K. Deker (1977) *Bacteriol. Rev.* 41, 100-180
21. Yerushalmi, L., B. Volesky and T. Szczesny (1985) *Appl. Microbiol. Biotechnol* 22, 103-107
22. 김병홍 (1988) 미생물 생리학, 아카데미서적, 서울
23. 김해영, 김태성, 김병홍(1990) *한산미*, 18, 31-34