

Zymomonas mobilis 에 의한 알코올 발효

I. 발효 환경이 생육에 미치는 영향

박 무 영* · 천 병 익**

Alcohol Fermentation by *Zymomonas mobilis*

Part. 1. Effects of environmental conditions on the growth kinetics of *Zymomonas mobilis*

MooYoung Park* · Byong-ik Chun**

Abstract

The effect of various environmental conditions on the growth kinetics of *Zymomonas mobilis* were studied and the kinetic parameters were evaluated.

The value of μ_m was 0.45 hr^{-1} and K_s was 0.23 g/L . Inhibition of growth at high glucose concentration was found to follow the threshold substrate inhibition. Threshold substrate concentration was 102 g/L and substrate inhibition constant was 196 g/L .

The effects of yeast extract concentrations were found to follow the Monod equation. μ_m value was 0.45 hr^{-1} and K_s was 0.3 g/L at 20 g/L of glucose and 0.24 hr^{-1} and 0.24 g/L respectively at 200 g/L of glucose.

The optimum temperature was found to be 35°C and the activation energy of growth was 7.7 Kcal/mole below 35°C and -29 Kcal/mole above 35°C .

I. 서 론

70년대 초반의 석유 위기이후 계속되는 석유 가격의 상승과 화석 연료의 사용에 따르는 대기 오염 문제는 새로운 대체 에너지의 개발을 촉진케 되었다. 이들 대체 에너지중 발효 알코올은 자원 고갈의 염려가 없으며 대기 오염이 적으므로 많은 주목을 받고 있다. 그러나 아직

까지는 낮은 경제성으로 인하여 발효 알코올의 사용이 제한되고 있으며 발효 공정의 개선 및 개발, 강력한 발효 미생물의 개발, 저렴한 발효원료의 개발 등에 의한 생산성 향상이 요구되고 있다.

Zymomonas mobilis 는 자연계에서 고농도의 당류가 존재하는 환경에서 발견되는 bacteria로 알코올 발효 균주로 많은 장점을 가지고 있다. Swings와 De Ley¹⁾에 따르면 이들은 고

* 韓國科學院 生物工學科 教授

** 江原大學校 工科大学 醱酵工學科 專任講師

* Professor, Dept. of Biological Science and Engineering, KAIST.

** Instructor, Dept. of Fermentation Technology, Kangweon National University.

농도의 당 및 알코올에서의 낮은 저해 작용, 고수율의 알코올생산 및 저수율의 균체 생산 등의 특징을 갖고 있다. 또한 높은 알코올 생산 속도를 나타내며 유전 공학적 기술을 쉽게 응용할 수 있는 것도 이 미생물의 장점으로 고려되고 있다.²⁾ 따라서 *Z. mobilis*를 이용한 알코올 발효에 최근 많은 관심이 모여지고 있다.

본 연구에서는 *Z. mobilis*를 이용한 고생산성의 발효 공정 개발을 위한 기초적 연구로 배양 환경이 *Z. mobilis*의 생육 속도에 미치는 영향을 규명하고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 사용 배지

본 실험에 사용한 균주는 *Zymomonas mobilis* ATCC 10988로 한국 과학 기술원 생물공학과 응용 미생물실에서 분양 받았다.

사용 배지는 포도당 20 g/L, Yeast extract 10 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L를 기본 배지로 하였으며 포도당과 Yeast extract는 실험에 따라 각각 0.5 g/L~300 g/L 및 1 g/L~10 g/L의 범위에서 변화시켰다.

배지의 pH는 살균전 6.0으로 조절하였으며 살균은 121°C에서 15분간 행하였다. 이때 포도당은 따로 멸균한 후 무균적으로 첨가하였다.

계대용 배지는 기본 배지에 1.5%의 Agar를 첨가한 slant를 사용하였다. 사용균주는 30°C에서 1~2일간 배양한 후 냉장고에 보관하면서 사용하였고 3주일마다 계대하였다.

2. 배양 방법

접종균은 보존 균주에 10 ml의 기본 배지를 가한 후 30°C에서 정지 배양하여 gas의 발생이 왕성해진 후에 사용하였다.

모든 실험에서 배지 20 ml를 spectronic 20용 1 in. cuvette에 넣어 정지 배양하였으며 접종균 배양액 1 ml를 접종하였다.

3. 균체량 측정

균체량은 660 nm에서의 흡광도로 측정하였으

며 이를 건조 균체량으로 환산하였다. 건조 균체량 측정 방법은 다음과 같다. 균 배양액 500 ml을 6000 g에서 균체를 원심 분리하였으며 증류수 500 ml을 사용 2회 세척하였다. 분리된 균체는 80°C에서 항량이 될 때까지 건조시켜 무게를 측정하였다.

4. kinetic parameter의 계산

kinetic parameter들은 久保田 *et. al.*³⁾의 비선형 최소 자승법 program을 삼성 personal computer sp-1000에 맞도록 변형시켜 계산하였다.

III. 실험결과 및 고찰

1. 포도당의 영향

포도당의 농도를 0.5 g/L에서 20 g/L까지 변화시켜 *Z. mobilis*를 배양한 결과 포도당의 농도가 증가함에 따라 생육 속도가 증가하였으며 (Fig. 1) Monod 식을 따르는 것으로 사료되었다.

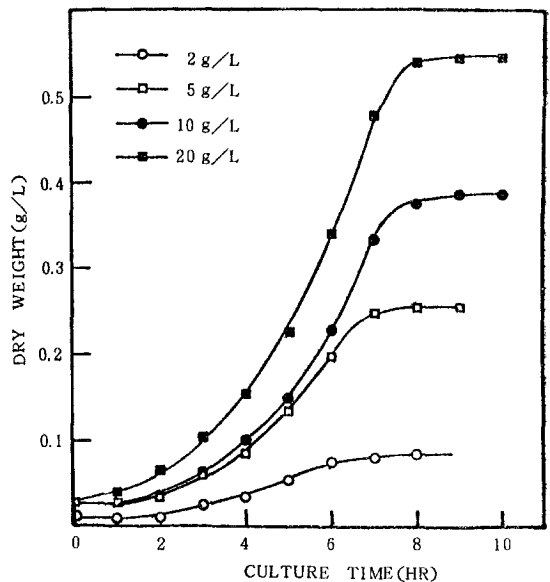


FIG. 1. EFFECTS OF GLUCOSE CONCENTRATION ON THE GROWTH KINETICS OF *ZYMONOMAS MOBILIS*.

$$\mu = \mu_m \cdot S / (K_s + S) \dots\dots\dots \textcircled{1}$$

각 농도에서의 specific growth rate(μ)를 구하여 Monod 식에 fitting 한 결과 maximum specific growth rate(μ_m)은 0.45 hr⁻¹, saturation constant는 0.23 g/L이었으며 (Fig. 2) 균체 수율은 0.049에서 0.027까지 감소하였다. 위 값들은 타 연구자들의 결과와 비교한 결과 생육 속도는 다소 높았으며 균체 수율은 낮은 것으로 나타나 본 실험 균주가 우수한 알코올 발효 균주임을 알 수 있었다. (Table 1)

2. 고농도의 포도당에 의한 저해작용

알코올을 발효는 생산성을 높이기 위하여 고농도의 기질에서 발효시키는 것이 유리하나 기질에 의한 저해 작용이 문제가 된다. 따라서 기질 저해 작용의 기작에 대한 이해가 필요하다. Edwards⁹⁾에 의하여 저해 기작을 탐할 수 있는 모델 들이 제안되었으며 이들을 Table. 2에 도

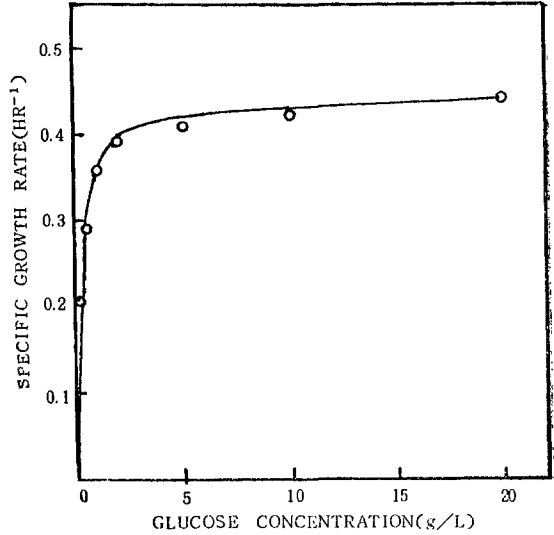


FIG. 2. EFFECTS OF GLUCOSE CONCENTRATION ON THE SPECIFIC GROWTH RATE OF *ZYMONOMAS MOBILIS*.

Table 1. Comparison of the kinetic parameters in batch culture for the strain used.

Strain used	Medium	Glucose (g/L)	Parameters		Reference
			μ	$Y_{x/s}$	
NCIB 8938	complex synthetic minimal	2	0.40	0.046	Belaich et. al. (4)
		2	0.39	0.036	
		2	0.30	0.026	
NCIB 8938	complex	20	—	0.052	Dawes & Ribbons (5)
ATCC 10988	complex	10	—	0.046	Forrest (6)
ATCC 29191	complex	100	0.41	0.039	Lavrs et. al. (7)
ZM 1	complex	100	0.21	0.038	Lee (2)
		150	0.17	0.036	
ATCC 10988	complex	2	0.39	0.045	This work
		10	0.43	0.039	
		20	0.44	0.028	
		80	0.445	0.020	
		160	0.37	0.015	

Table 2. Plausible mechanisms for substrate inhibition and kinetic models tested with substrate inhibition data

Mechanisms	Kinetic model
Formation of inactive enzyme-substrate complex	$v = V_m \cdot S / ((K_s + S) \cdot (1 + S/K_i)) \dots\dots\dots 2)$
Allosteric substrate inhibition	$v = V_m \cdot S \cdot (1 + S/K) / (K_s + S + S^2/K_i) \dots\dots\dots 3)$
Formation of multiple inactive enzyme-substrate complex	$v = V_m / S \cdot (K_s + S + (S^2/K_i) \cdot (1 + S/K)) \dots\dots\dots 4)$
Empirical model derived from product inhibition	$v = V_m \cdot S \cdot \exp(-S/K_i) / (K_s + S) \dots\dots\dots 5)$

시하였다. 또한 Lee는 기질 저해 작용은 일정 기질 농도 이상에서만 나타나기 시작함을 밝히고 식 ②의 변형식을 제안하였다.

$$\mu = \mu_m \cdot S / ((K_s + S) \cdot (1 + (S - S_i) / (K_i - S_i)))$$

$$S < S_i \text{ 시 } (S - S_i) / (K_i - S_i) = 0 \dots \dots \text{식 ⑥}$$

고 농도의 기질에 의한 *Z. mobilis*의 생육 저해 작용을 규명하기 위하여 포도당의 농도를 40g/L에서 300g/L까지 변화시켜 배양하였다.

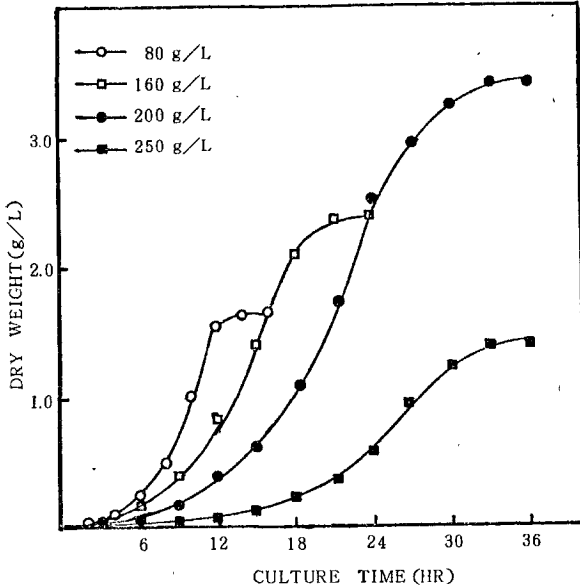


FIG. 3. EFFECTS OF HIGH GLUCOSE CONCENTRATION ON THE GROWTH KINETICS OF *ZYMONOMAS MOBILIS*.

포도당의 농도가 80g/L 이상일 경우 포도당의 농도가 증가할수록 생육 속도의 감소, lag phase의 연장, 균체 수율 감소등이 나타났으며 이는 기질 저해 작용에 기인한다. (Fig. 3) 각 농도에서의 specific growth rate를 식 ②~⑥을 사용하여 curve fitting한 결과 식 ⑥이 저해 작용을 가장 잘 나타내었다. (Fig. 4) 식 ⑥에 따르면 기질 저해는 102g/L에서 시작되며 기질 저해 상수(K_i)는 196g/L임이 판명되었다. (Table 3)

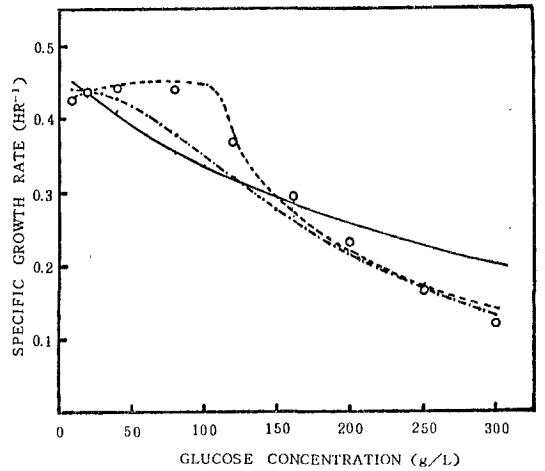


FIG. 4. SUBSTRATE INHIBITION PATTERN AT HIGH GLUCOSE CONCENTRATION

Table 3. Constants obtained by least square fit of models to data of substrate inhibition.

Model fitted	V_m (hr^{-1})	K_s (g/L)	K_i (g/L)	K (g/L)	S_i (g/L)	standard deviation
2)	0.49	0.33	215	—	—	0.041
3)	0.49	0.33	273	49805	—	0.048
4)	0.46	0.27	1964	20	—	0.026
5)	0.48	0.32	292	—	—	0.034
6)	0.45	0.23	196	—	102	0.013

3. Yeast extract의 영향

Yeast extract의 농도를 0.5 g/L에서 10 g/L까지 변화시켜 생육 속도에 미치는 영향을 조

사하였다. 이때 포도당의 농도를 20 g/L와 200 g/L로 하여 포도당의 저해가 미치는 영향을 검토하였다. 생육 속도의 변화는 Monod 식으로

표현할 수 있었으며 μ_m 과 K_s 값은 포도당 20 g/L에서 0.45 hr⁻¹ 및 0.3 g/L이었으며 200 g/L에서는 0.24 hr⁻¹ 및 0.24 g/L이었다. (Fig. 5) 포

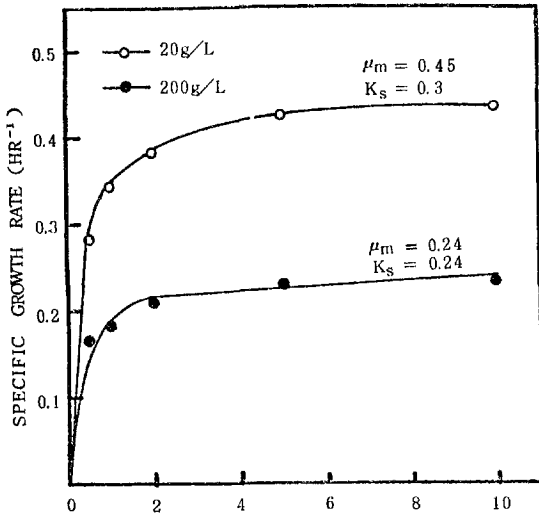


FIG. 5. EFFECTS OF YEAST EXTRACT ON THE SPECIFIC GROWTH RATE OF *ZYMONOMAS MOBILIS* AT 20g/L and 200g/L OF GLUCOSE.

도당에 의한 기질 저해 작용은 전체 성장 속도는 감소시켰으나 Yeast extract에 의한 영향과는 상관 관계가 없음을 알 수 있었다.

Yeast extract 10 g/L에서의 specific growth rate는 각 포도당 농도에서 0.44 및 0.23으로 μ_m 값과 거의 일치하였다.

4. 온도의 영향

미생물의 생육 속도에 대한 온도의 영향은 Arrhenius 식에 의해 잘 나타내어 진다.

$$\ln \mu = \frac{-E}{R \cdot T} + C \dots \dots \dots \text{식 ⑦}$$

*Z. mobilis*의 Specific growth rate를 Arrhenius 식에 의하여 도시한 결과 35°C에서 최대 생육속도를 나타내었으며 35°C 이상에서는 급격히 감소하였다. (Fig. 6) 활성화 에너지는 35°C 이하에서는 7.7kcal/mole, 35°C 이상에서는 -29kcal/mole이었다. 이는 Forrest⁶⁾의 결과와 유사하였으나 본 실험 균주는 최적 온도

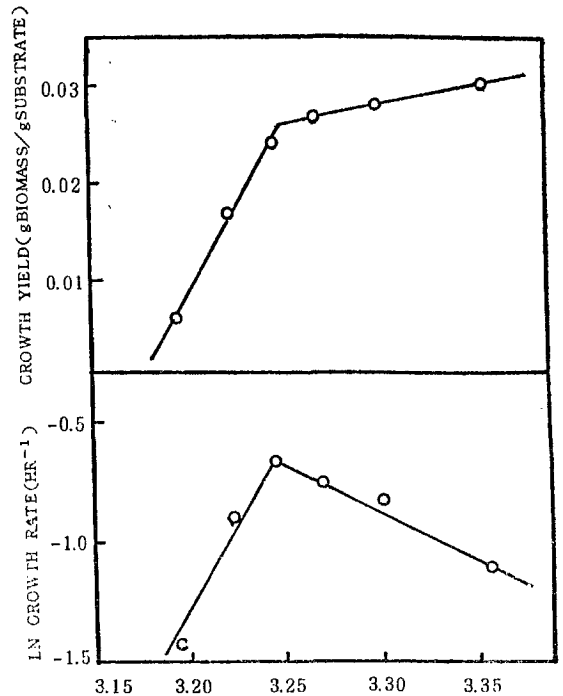


FIG. 6. ENERGIES OF ACTIVATION AND GROWTH YIELDS IN *ZYMONOMAS MOBILIS*.

가 2°C 더 높았으며 35°C 이하에서는 온도의 영향을 크게 받는 반면 35°C 이상에서는 매우 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 또한 균체 수율도 최적 온도를 기준으로 변화율이 크게 바뀌었으며 Forrest⁶⁾의 결과와 일치하였다.

이러한 온도의 영향은 온도 증가에 따른 사멸 속도의 증가, maintenance energy의 증가 및 포도당의 소비와 성장의 분리 등에 의한 것으로 생각된다.

IV. 결 론

배양 환경이 *Zymomonas mobilis*의 생육에 미치는 영향은 다음과 같다.

1. *Z. mobilis*의 포도당에 대한 μ_m 값은 0.45 hr⁻¹이며 K_s 값은 0.23 g/L이었다.

2. 기질 저해 작용은 일정농도 이상에서 나타나며 이때 S_i 값은 102 g/L, K_i 값은 196 g/L이었다.

3. Ycast extract 의 영향은 Monod 식을 따르며 기질 저해 작용이 없을 경우 μ_m 과 K_s 값은 각각 0.45 hr^{-1} 및 0.23 g/L 이었다.

4. 최적 온도는 35°C 이며 활성화 에너지는 7.7 kcal/mole 이었다.

參 考 文 獻

1. SWINGS, J. and J. De LEY : "The Biology of *Zymomonas*." Bacterial Review, 41, 1-46 (1977).
2. LEE, K. J. : Ph. D. Thesis, Univ. New South Wales, Kensington, Australia (1981).
3. 久保田清, 鈴木寛一, 保坂秀明 : "食品工業關係者のための電子計算機入門; IV 應用的な FORTRAN PROGRAM の作成" 食品工業 60-73 (1977)
4. BELAICH, J. P., A. BELAICH and P. SIMONPIETRI : "Uncoupling of Bacterial Growth : Effect of Pantothenate Starvation on Growth of *Zymomonas mobilis*." J. Gen. Microbiol., 70, 179-185 (1972).
5. DAWES, E. A., D. W. RIBBONS and P. J. LARGE : "The Route of Ethanol Formation in *Zymomonas mobilis*." Biochem. J., 98, 795-803 (1966).
6. FORREST, W. W. : "Energies of Activation and Uncoupled Growth in *Streptococcus faecalis* and *Zymomonas mobilis*" J. Bacteriol., 94, 1459-1463 (1967).
7. LAVERS, B. H., P. PANG, C. R. MACKENZIE, G. R. LAWFORD, J. R. PIK and H. G. LAWFORD : "Industrial Alcohol Production by High Performance Bacterial Fermentation." In "Proceedings of 6th International Fermentation Symposium" Ontario, Canada, (1980).
8. EDWARDS, V.H. : "The Influence of High Substrate Concentrations on Microbial Kinetics" Biotech & Bioeng., 12, 679-712(1970).