

생산성 향상을 위한 대사공학적 접근 방법 1, 2

박정진

GLBRC, Michigan State University

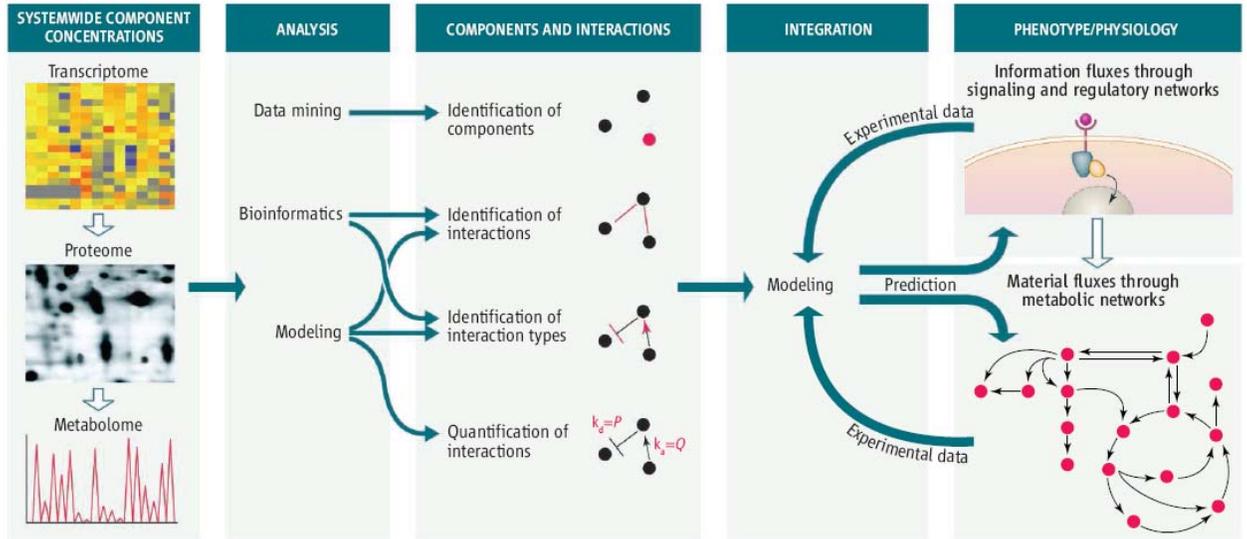
To whom correspondence should be addressed e-mail: jjpark@msu.edu

대사공학 (Metabolic engineering) 기술은 유용 생물소재의 대량생산을 위하여 세포의 대사과정을 인위적으로 조절하는 기술로 정의되지만, 기존에는 주로 단일 숙주를 대상으로 제한된 수의 유전자를 조작하는 수준에 머물러있었다. 최근에는 목적 물질의 생산성 증대를 도모하거나 새로운 물질 생산 능력을 부여하기 위하여 동시에 다수의 유전자를 조작하거나 다른 생물 종의 유전자를 도입하여 새로운 대사회로를 구성하는 세포 재설계 차원으로 발전하고 있다. 이러한 세포 재설계 차원의 미생물 대사공학을 위해서는 미생물 생리에 대한 전반적인 이해와 미생물 유전체 정보, 특히 최근 급속한 속도로 축적되고 있는 다양한 미생물의 게놈 정보를 분석하고 활용할 수 있는 능력이 필수적이다. 따라서 대사공학은 Transcriptome, Proteome, Metabolome 분석 등을 통해 유전체의 기능을 종합적으로 연구할 수 있는 기능 유전체학 기술이 가장 유용하게 활용되는 분야 중 하나라고 할 수 있다.

다시 말해 대사 공학이란, 유전자 재조합 기술을 사용하여 세포내의 특정한 생화학 반응을 변형하거나 또는 새로운 생화학 반응을 도입시켜 세포의 특성이나 대사물질의 생산을 의도적으로 증가시키는 것을 말한다. 이러한 대사 공학에 관한 개념은 1990년대 들어 대두된 다음, 그 이후 수많은 생명 공학자에 의해 발전되어 왔다. 하지만, 초기에 기대했던 것처럼, 핵심 유전자 몇 개를 조작하더라도 대개의 경우 self regulation 에 의해 그리 큰 효과를 보지 못하며, 이를 해결하기 위한 방법으로 되도록이면 생명 현상 전체를 보기 위한 노력이 계속되어 왔다. 즉, E. coli 와 같은 미생물의 경우에도 1000 개 이상의 효소가 정교하게 조절되고 상호 연결된 대사체계로 구성되어 있으므로, 대사 체계를 재구성하여 대사의 흐름을 우리가 원하는 데로 조절하고 변화시키기 위해서는, 대사의 부분이 아니라 전체적인 면을 보는 것이 중요하다.

이런 와중에, microarray 나 MS, NMR 등의 기술과 이를 통해 얻어지는 방대한 양의 데이터를 처리하는 기술의 개발을 통해 -omics 연구가 가능하게 되었다.

<그림 1> A systems roadmap to metabolic engineering



출처: U. Sauer, M. Heinemann, N. Zamboni, *Science* **316**, 550 (2007).

<그림 1>에서 볼 수 있는 바와 같이 생명체의 복잡한 조절 기작을 이해하고 이를 바탕으로 우리가 목적하는 물질의 생산을 늘리기 위해서는 다양한 기술의 접목이 필요하다. 즉, 현재 생산성 향상을 위한 대사공학은, 다양한 기술을 활용한 유전체, 전사체, 단백질체 및 흐름체 등의 데이터의 확보와 분석과 연계되어 연구가 수행되고 있다. 이를 통해, 유전자 조작에 따른 결과를 보다 거시적으로 확인할 수 있게 되는 것이다. 그러나 복잡한 생물체 내부의 현상을 제대로 이해하기 위해서는 앞에서 언급한 유전체, 전사체, 단백질체 및 흐름체 데이터의 유기적인 결합을 통한 새로운 지식 창출이 필수적으로 요구된다. 따라서 이와 같은 실험 데이터를 바탕으로하여, 생물체에 대한 컴퓨터 모델을 개발하고, 이를 다양한 조건에서 시뮬레이션 함으로써, 생물체의 특성을 파악하는 것이 중요하게 되었다. 특히 이와 같은 확보된 데이터의 효과적인 분석을 통해, 생물체의 복잡한 조절 기작의 이해에 도움을 줄 수 있으며, 궁극적으로는 실제 생명체와 거의 유사한 행동을 보여주는 컴퓨터 생명체 모델의 개발이 가능하게 될 것으로 전망된다.

Glucose 나 xylose 와 같은 재생 가능한 탄소원을 사용하여 수소를 생산하는 것은 여러 미생물을 통해 그 생산 가능성을 보여 왔다. 이론적으로는 미생물이 가지고 있는 생물학적 공정을 통해 수소를 생산한다는 것은 열역학적 관점에서 봤을 때 매우 매력적인 방법이다. 하지만 현재와 같은 생물학적 공정으로 수소를 생산한다는 것은 다음과 같은 이유로 상업화를 한다는 것은 어려운 상태라고 단언할 수 있다.

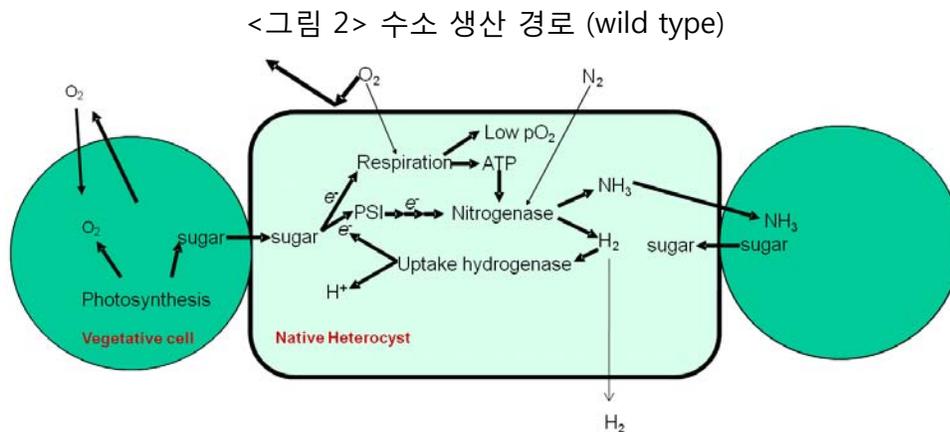
우선 첫째로 사용되는 미생물들이 수소 농도에 민감하게 반응한다. 그러므로 생산되는 수소의 양이 매우 소량이다. 두번째로는 수소 생산에 사용되는 에너지가 너무 많아 공정의 효율이 떨어진다. 세번째로는 외부에서 공급해 주는 탄소원의 소비가 타 미생물에 비해 느린 편이다. 그래서 자라는 속도가 느린 편이다. 마지막으로 수소 생산에 중심 역할을 하는 효소가 대기 중의 산소에 너무 민감하다. 그래서 실험실에서는 대부분 산소가 없는 조건에서 수소 생산량을 측정하게 된다. 하지만 이러한 단점들은 수소 생산과 관련된 대사 경로를 대사공학을 통해 최적화한다면 충분히 극복할 수 있는 것들이다.

충분히 예상되고 있는 전세계적은 에너지 대란을 막기 위한 대체 에너지 개발은 누구나 그 중요성을 부인할 수 없을 것이다. 이러한 대체 에너지 중에서 환경과 에너지 문제를 함께 해결가능한 것으로 여겨지는, 미생물을 이용한 수소 생산 연구는 보통 다음과 같은 세가지 관점에서 시작되고 있다.

- 1) 수소 생산을 위한 대사경로와 그 조절 기작 확인
- 2) 수소 생산과 관련된 유전자와 그 발현 패턴 분석
- 3) 대장균이나 효모와 같은 모델 생명체에서 수소 생산 대사 경로 발현

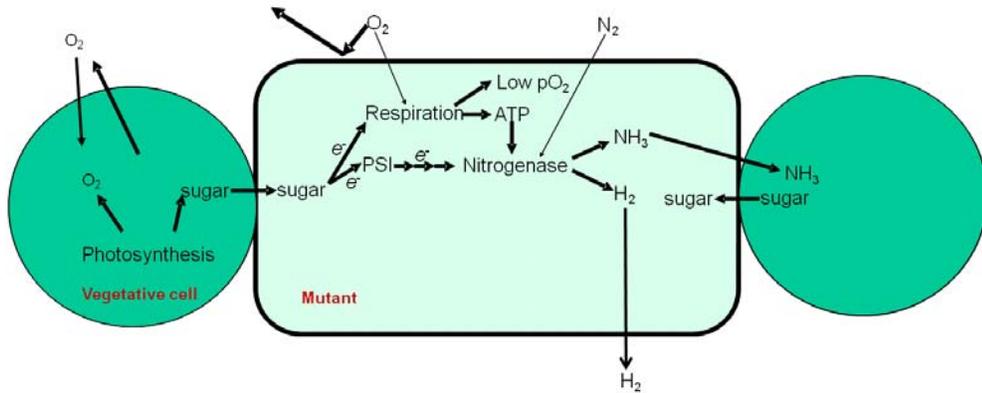
이제 수소 생산 미생물 중 대표라 할 수 있는 *Anabaena* spp 를 이용하여 수소 생산성 향상을 위한 대사공학적 접근 방법에 대해 알아보도록 하자.

Anabaena wild type 의 경우 <그림 2>와 같은 경로를 거쳐, 수소를 생산하게 된다.



이때 우리가 우선적으로 생각할 수 있는 것은 세포 내에서 생산된 수소를 이용하는 uptake hydrogenase 를 knock out 시키는 것이다 (<그림 3> 참조). 이를 nitrogenase 를 통해 생산된 수소는 더 이상 세포 내에서 소비되지 않게 될 것이다.

<그림 3> Step 1: Uptake hydrogenase mutation



그 다음 생각할 수 있는 일은 wild type 이 가지고 있는 nitrogenase 를 변형시켜 수소 생산 특성을 향상시키는 것이다 (<그림 4> 참조). 즉 native gene 의 염기서열을 치환시켜 돌연변이를 얻은 다음, 그 중에서 수소 생산성이 향상된 돌연변이를 찾아내는 것이다. 이때 또 다른 목적 돌연변이로는 산소 농도에 민감한 nitrogenase 를, 산소와 유무와 상관없이 수소를 생산할 수 있는 nitrogenase 개발도 들 수 있다.

현재 대부분의 미생물의 수소생산 관련 실험들이 산소가 없는 조건에서 이루어지고 있으나 이는 실제 상업화하기 위해서는 큰 걸림돌로 작용할 것이 분명하다. 산소에 좀 더 잘 견딜 수 있는 nitrogenase 개발을 위한 실험 역시 많은 연구진들의 큰 관심거리로 여겨지고 있다.

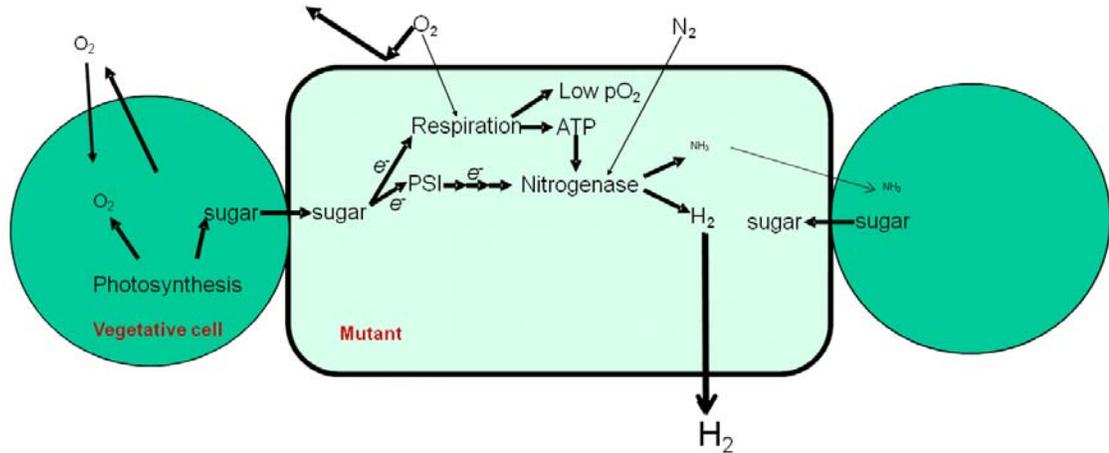
최근까지 미생물을 이용한 수소생산 현황을 조사하여 정리한 자료를 <표 1>에 나타내어 보았다. 이 표에 의하면, 가장 생산성이 높은 미생물로 *Anabaena variabilis* PK84 를 들고 있으며 시간당 $167.6\mu\text{mol } H_2/\text{mg chl a}$ 이나, 이것 역시 산소가 없는 조건에서 얻은 실험 결과로 나타났다. *A. variabilis* PK84 는 uptake hydrogenase 가 제거되어 세포 내부에서 수소의 사용을 제한한 돌연변이이다.

<표 1> 미생물을 이용한 수소생산성 현황

Organism name	Organism description	Maximum Hydrogen evolution	Growth condition	H ₂ evolution assay condition	Reference
<i>Anabaena cylindrica</i> B-629	Marine cyanobacteria	0.103 μmol/mg dry wt/h	Air contained 5% CO ₂ ; 7000 lx at the surface of culture vessels	Argon environment with 3% CO ₂ 4000 lx at the surface of the culture vessel	9
<i>Oscillatoria brevis</i> B-1567	Marine cyanobacteria	0.168 μmol/mg dry wt/h	Air contained 5% CO ₂ ; 7000 lx at the surface of culture vessels	Argon environment with 3% CO ₂ 4000 lx at the surface of the culture vessel	9
<i>Calothrix scopulorum</i> 1410/5	Marine cyanobacteria	0.128 μmol/mg dry wt/h	Air contained 5% CO ₂ ; 7000 lx at the surface of culture vessels	Argon environment with 3% CO ₂ 4000 lx at the surface of the culture vessel	9
<i>Calothrix membrancea</i> B-379	Marine cyanobacteria	0.108 μmol/mg dry wt/h	Air contained 5% CO ₂ ; 7000 lx at the surface of culture vessels	Argon environment with 3% CO ₂ 4000 lx at the surface of the culture vessel	9
<i>Oscillatoria</i> sp. Miami BG7	Marine cyanobacteria	0.250 μmol/mg dry wt/h	Air; 100 μE/m ² /s; NH ₄ Cl (25 mg/l) used as combined nitrogen source	Ar (100%); 90 μE/m ² 11 day old cells 37°C	10
<i>Oscillatoria limosa</i>	Marine cyanobacteria	0.83 μmol/mg chl a/h	Air; incubation in 16 h light, 8 h darkness cycles	Same as culture condition	11
<i>Cyanothece</i> 7822	Marine unicellular cyanobacteria	0.92 μmol/mg chl a/h	N ₂ with 5% CO ₂	Same as culture condition	12
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Heterocystous cyanobacteria	2.6 μmol/mg chl a/h	Air; 20 μE/m ² /s	Air; 60 μE/m ² /s	13
<i>Anabaena cylindrica</i> IAMM-1	Heterocystous cyanobacteria	2.1 μmol/mg chl a/h	Air; 20 μE/m ² /s	Air; 60 μE/m ² /s	13
<i>Anabaena variabilis</i> IAMM-58	Heterocystous cyanobacteria	4.2 μmol/mg chl a/h	Air; 20 μE/m ² /s	Air; 60 μE/m ² /s	13
<i>Anabaena cylindrica</i> UTEX B 629	Heterocystous cyanobacteria	0.91 μmol/mg chl a/h	Air; 20 μE/m ² /s	Air; 60 μE/m ² /s	13
<i>Anabaena flos-aquae</i> UTEX 1444	Heterocystous cyanobacteria	1.7 μmol/mg chl a/h	Air; 20 μE/m ² /s	Air; 60 μE/m ² /s	13
<i>Anabaena flos-aquae</i> UTEX LB 2558	Heterocystous cyanobacteria	3.2 μmol/mg chl a/h	Air; 20 μE/m ² /s	Air; 60 μE/m ² /s	13
<i>Anabaenopsis circularis</i> IAM M-13	Heterocystous cyanobacteria	0.31 μmol/mg chl a/h	Air; 20 μE/m ² /s	Air; 60 μE/m ² /s	13
<i>Nostoc muscorum</i> IAM M-14	Heterocystous cyanobacteria	0.60 μmol/mg chl a/h	Air; 20 μE/m ² /s	Air; 60 μE/m ² /s	13
<i>Nostoc lindia</i> IAM M-30	Heterocystous cyanobacteria	0.17 μmol/mg chl a/h	Air; 20 μE/m ² /s	Air; 60 μE/m ² /s	13
<i>Nostoc commune</i> IAM M-13	Heterocystous cyanobacteria	0.25 μmol/mg chl a/h	Air; 20 μE/m ² /s	Air; 60 μE/m ² /s	13
<i>Anabaena variabilis</i> AVMI3	Heterocyst filamentous	68 μmol/mg chl a/h	Air and 1% CO ₂ ; 100 μE/m ² /s		14
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Heterocyst filamentous	32.3 μmol/mg chl a/h	Air and 2% CO ₂ ; continuous turbidostat mode; 113 μE/m ² /s	Argon environment.	15
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Heterocyst filamentous	167.6 μmol/mg chl a/h	73%Ar, 25%N ₂ , 2% CO ₂ ; 90 μE/m ² /s	93%Ar, 5%N ₂ , 2% CO ₂ ; 90 μE/m ² /s	16
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Heterocyst filamentous	0.11 μmol/mg chl a/h	Air and 2% CO ₂ ; outdoor condition	Air and 2% CO ₂ ; outdoor condition; 400 W/m ²	17
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Heterocyst filamentous	45.16 μmol/mg chl a/h	73%Ar, 25%N ₂ , 2% CO ₂ ; 90 μE/m ² /s	93%Ar, 5%N ₂ , 2% CO ₂ ; 90 μE/m ² /s	16
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Heterocyst filamentous	0.05 μmol/mg dry wt/h	5000 lx at the surface of culture vessels.	Ar and 5% CO ₂ ; 5000 lx addition of Tween 85 (77 mM)	18

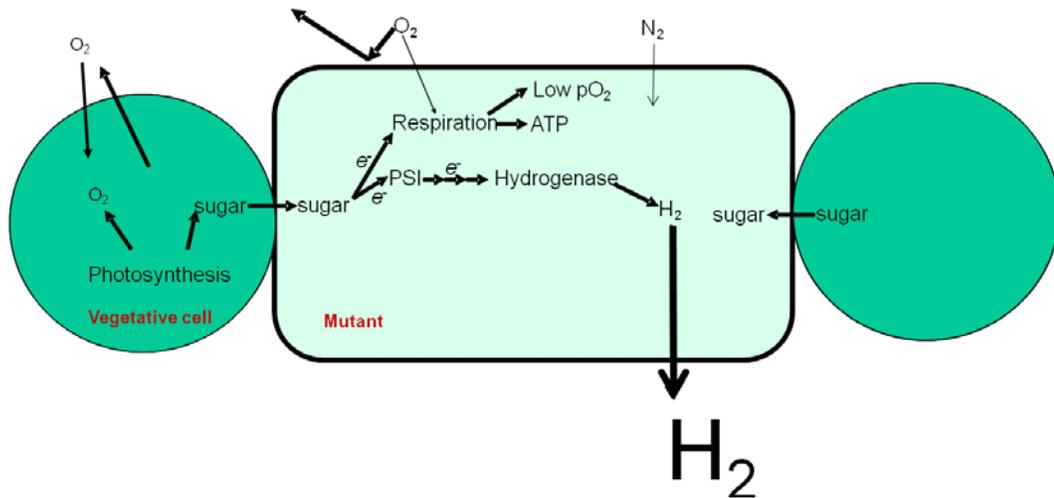
출처: D. Dutta, D. De, S. Chaudhuri, S. Bhattacharya, *Microbial Cell Factories* 4, 36 (2005).

<그림 4> Mutation of nitrogenase to increase hydrogen production



마지막으로 생각할 수 있는 것은, 세포 내에 있는 nitrogenase 의 경우 수소 뿐만 아니라 암모니아 역시 생산하게 되는데, 이 nitrogenase 를 hydrogenase 로 치환하게 된다면, 암모니아 생산을 위해 분산되었던 에너지와 자원을 수소 생산 쪽으로 전환시킬 수 있을 것이다 (<그림 5> 참조).

<그림 5> Replacement of nitrogenase by an hydrogenase



이러한 유전자 조작 방향은 잡혀져 있으나 현실적으로 원하는 돌연변이를 얻는 것은 그리 쉽지만은 않아 아직도 효율이 좋은 nitrogenase 를 탐색함과 동시에 nitrogenase 를 hydrogenase 로 바꾸는 연구는 이제 시작 단계에 있다.

지금부터 에탄올 생산에 사용되는 대사공학적 기법에 대해 살펴보도록 하겠다.

자연계에 존재하는 섬유소 바이오매스를 효과적으로 에탄올로 전환하는데 가장 장애가 되는 두 가지 요소기술들은 다음과 같다.

1. 셀룰로스 와 헤미셀룰로스, 그리고 리그닌으로 구성된 바이오매스를 효과적으로 depolymerize 하여 발효 가능한 당류를 효율적으로 유리시키는 기술
2. 바이오매스를 구성하는 당류인 포도당, 자일로스, 아라비노스 등의 다양한 당류를 발효하여 에탄올을 생산하는 균주개발 기술

현재 이와 관련하여 크게 세가지 방향에서의 균주개발 연구가 이루어지고 있는데, 첫째로는 cellulose 의 분해 및 발효를 동시에 수행하는 동시당화 발효를 위한 연구이며, 둘째는 섬유소 바이오매스의 전처리후에 유리되는 다량의 오탄당을 발효하는 균주 개발 연구이며, 셋째는 섬유소 바이오매스의 전처리 과정에서 생산되는 발효저해제에 내성을 가지는 균주의 개발 연구이다.

바이오 에탄올을 생산하는 방법중의 하나인 자일로스로부터 에탄올이 생산되는 과정에는 *Saccharomyces cerevisiae* 나 *Zymomonas mobilis* 가 사용된다. 자일로스를 이용할 수 있는 야생효모는 에탄올의 수율과 내성이 낮고 반대로 자일로스를 이용 못하는 *S. cerevisiae* 는 에탄올의 수율과 내성이 높다. 그러므로 자일로스 이용 효모에서 자일로스 대사 관련 유전자를 *S. cerevisiae* 에 발현시키면 자일로스에서 에탄올을 고농도로 생산할 수 있다. 그리고 *Z. mobilis* 에 *Klebsiella* 또는 *Xanthomonas* 의 자일로스 이용 효소인 xylose isomerase 와 xylulokinase 유전자를 발현시켜 자일로스와 포도당으로부터 에탄올의 전환을 각각 이론 수율의 86%와 94%까지 생산했다는 보고가 있다. 다만 자일로스를 기질로 생육하고 소량의 에탄올을 생산하는 결과가 보고되고는

있지만 현재까지 이러한 접근방법이 상업적으로 성공 가능한 정도에는 크게 미치지 못하고 있는 실정이다.

목질계 바이오매스는 자연계에 풍부하게 존재하며 저렴하게 수확이 가능하므로 바이오에탄올 생산을 위한 가장 현실적인 자원으로 인식되고 있다. 하지만 목질계 바이오매스가 산업적인 규모의 에탄올 생산공정에서 기질로 쓰이지 못하고 있는 원인 중 하나로, 목질계 바이오매스의 가수분해물에 다량 포함되어 있는 자일로스를 효과적으로 에탄올로 전환하는 균주의 부재를 들 수 있다. 현재로서는 어떠한 재조합 균주가 앞으로 목질계 자원을 이용한 에탄올 생산에 상업적으로 이용될지는 예측하기 어렵지만, 성공적인 균주는 바이오매스의 가수분해 과정에서 생산되는 미생물 생육저해 물질에 저항성을 가지며, 에탄올 수율의 향상을 위해서 부산물의 생산이 최소화되어야 하며, specific productivity가 우수하며, 생성된 에탄올에 의한 생육 및 발효 저해를 받지 않아야 하며, 대량 생산공정에 적용하기 용이한 균주가 되어야 한다. 자일로스 식물유래 바이오매스의 약 17~31%를 구성하므로, 이를 효과적으로 에탄올로 전환하는 균주의 개발은 매우 절실하다. 현재 당류 및 전분 유래 기질로부터 에탄올 생산에 쓰이는 효모는 자일로스를 대사하지 못하기 때문에, 대사 공학적 방법으로 자일로스 대사경로를 효모에 이식하는 연구가 현재 진행 중에 있다.

대사공학 기술은 몇가지 부문에서 차세대 에너지 생산성 향상에 관한 성공 가능성을 보여주고 있다. 하지만 전체적으로는 아직 초보 단계라고 할 수 있다. 아직은 세포 안에서 일어나는 복잡한 대사경로에 대한 전반적인 지식이 없기 때문이다. 즉 아직까지는 대사경로 전체 가운데 아주 일부분에 해당하는 단편적인 부분만 관찰하고 있는 형편이다. 상대적으로 미생물 유전자를 원하는 대로 제거하거나, 숫자를 늘리거나, 변형하거나, 다른 유전자로 교환하거나 하는 기술은 상당 수준 개발되어 있는 상황이다. 하지만 어떤 유전자들을 어떻게 조작해야 우리가 원하는 방향으로 미생물을 변형시킬 수 있는지에 대한 정보와 지식은 부족한 상황이다.

따라서 관건은 세포안의 대사경로를 전체적으로 파악하고, 대사경로 사이의 조절작용이나 대사물질의 흐름에 대한 정보를 모아 체계적으로 분석해야 할 것이다. 이러한 데이터가 계속 축적되고 어떤 임계점을 넘어서면 아주 빠른 속도로 전체 대사경로에 대한 종합 정보를 얻을 수 있을 것이다. 그렇게 되면 우리가 염원하는 차세대 에너지의 산업화가 충분히 가능하게 될 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 고(高) 바이오매스 양 사탕수수를 원료로 한 사탕·에탄올 복합생산, 백운화, KISTI-모니터링분석, 2007
2. **Wiechert W** (2001) ^{13}C Metabolic Flux Analysis. *Metabolic Engineering* **3**: 195-206
3. U. Sauer, M. Heinemann, N. Zamboni, *Science* **316**, 550 (2007).
4. 미국의 바이오에너지 개발현황과 시사점, 고유상, 2006, SERI 경제 포커스, 2006
5. GLBRC Annual Meeting, South Bend, MI, 2009
6. 선진 사례를 통해 본 국내 바이오에탄올 상업화 가능성, 김경연, LG 주간경제, 2006
7. D. Dutta, D. De, S. Chaudhuri, S. Bhattacharya, *Microbial Cell Factories* **4**, 36 (2005).