

(S5-B) 라이신 발효의 생산성 향상 : 대사 분석과 미생물 생리학

반재구, J. M. Lebeault

한국과학기술연구원 유전공학연구소, University of Compiègne, France

라이신은 글루탐산과 함께 발효공정으로 양산되는 주요 아미노산이다. 1970년대 초반 대사조절 기작이 해제된 변이주로부터 생산되기 시작한 라이신은 세계적으로 일본과 한국에 의해 기술이 독점되어 왔다. (Aida *et al.*, 1986) 최근 미국의 ADM과 Eastman-Kodak 이 합작하여 신규로 참여하기까지의 주요 기술 개발을 요약하면 라이신 아날로그인 AEC(Amino-Ethyl-Cysteine)에 대한 내성 변이주, 각종 부반응의 차단, 라이신 생산 전구체로 이르는 metabolic flux의 조절, 당 소비 속도가 향상된 생산균주의 개발, 그리고 라이신 합성에 관련된 효소들의 유전공학적 증폭 등이 될 것이다. 공정분야의 진보로는 고정화 미생물에 의한 생산 (Souza *et al.*, 1987), 연속생산 (Michalski *et al.*, 1984; Ackerson *et al.*, 1989; Hirao *et al.*, 1989), Recycled fed-batch culture (Sweeting *et al.*, 1990), 라이신의 효율적인 분리정제 (Kawakita *et al.*, 1990) 등을 들 수 있다.

본 연구에서는 라이신 생산의 최대수율과 생산속도 분석, 연속생산의 가능성 검토, 그리고 고생산성 공정을 디자인하기 위하여 대사분석과 생산균주의 생리학 실험을 수행하였다. 전통적인 방법에 의해 많은 최적화 연구가 된 라이신 발효의 경우에도 좀 더 조직적인 대사분석과 생리학 실험을 통하여 여러 방면의 개선점을 찾을 수 있다는 생각에서 성장단계와 라이신 생산단계에 있는 미생물의 metabolic flux 차이, 최대 수율과 최대 비생산속도를 결정하는 요인, 그리고 연속생산의 기본이 되는 생산능력의 감퇴(degeneration)를 일으키는 원인, 연속 배양을 이용한 media balancing 등을 연구하였다. 그 결과를 바탕으로 ATCC에서 입수한 라이신 생산균 *Corynebacterium glutamicum* 을 이용했을 때, 최종라이신 농도 135 g/L, specific productivity 0.09-0.11 g lys/g cell/hr, volumetric productivity 2 g/L/hr의 유가식 발효 공정을 확립할 수 있었다. 또한 본 연구에서 시도한 대사분석 결과는 라이신 합성에 관여하는 anabolic enzyme(s) 이 조절해제 또는 증폭된 기존의 균주에 라이신 합성

이신 합성 단계에서 생기는 metabolic unbalance를 줄여주기 위한 catabolic enzymes 들을 조작할 수 있는 이론적 근거를 세우는 데 도움이 될 것이다.

대사분석

방법론

미생물의 대사과정을 조직적으로 단시간 내에 분석하기 위하여 컴퓨터 전문가 시스템형 소프트웨어를 개발하였다.(Pan *et al.*, 1989) 미생물 대사의 기본인 각 enzyme step 은 kinetics와 stoichiometry 로 구성되어 있다. 각 단계의 in vivo kinetics는 잘 알려지지 않았지만 그 stoichiometry는 거의 다 알려져 있다. 간단히 말해서 in vivo kinetics 가 대사조절의 방법론이라면 그 결과는 각 enzyme step의 stoichiometry 의 합으로 나타난다고 볼 수 있다.

성장단계에 있는 미생물 대사의 목적은 metabolic balance 를 유지하는 한 빠르고 경제적인 방법으로 균체를 만드는 데 필요한 metabolic intermediates 와 cofactors 를 공급하는 데 있다. 그러나 라이신 생산을 위하여 성장을 제한시킨다면 그 때의 대사는 빠르고 경제적인 방법으로 라이신을 합성하는 데 필요한 전구 물질과 cofactors 를 생산한다기보다는 제한된 기질의 공급으로 인해 야기된 metabolic unbalance로부터 어떻게든 벗어나 balance가 이루어지는 쪽으로 대사조절이 움직일 것이다. 그러므로 대사분석의 기본은 선택 가능성이 없는(fixed stoichiometry) anabolism의 metabolic demand 를 주어진 catabolism 의 enzyme set 로부터 balance 를 유지하면서 그 요구를 충족시킬수 있는 metabolic pathway의 조합이 있는지를 찾아내는 것이 된다. 컴퓨터 소프트웨어에서 Knowledge base는 그러므로 anabolism과 catabolism 쪽 두 개가 있어야 한다. Anabolism쪽의 요구, 즉 필요한 metabolic intermediates 와 cofactors의 상대적인 양을 계산하면 catabolism쪽에서는 가능한 모든 enzyme step 을 거친 길들을 나열하고 필요한 비율에 맞는 길들의 조합이 있는지 비교한다. 이 과정에서 컴퓨터에 의해 생성된 '길'들이 생리학적으로 의미있는 길인지 검토하는 것이 필요하며 컴퓨터가 찾는 goal 을 정의해 주고 되도록이면 그것을 단순화시켜 주어야 한다. 일견 이 작업은 시간이 많이 걸리고 이론적으로 호

르기 쉬운 것으로 보일지 모르지만 anabolic enzymes이 증폭된 균주에서 생기는 metabolic unbalance 문제를 해결하는 것은 또다른 차원의 균주 개발 전략으로 이용될 수 있을 것이다. 필자들과 방법에 있어 차이를 보이지만 비슷한 연구가 최근 보고되었다. (Seressiotis 와 Bailey, 1988; Mavrovouniotis *et al.*, 1990)

최대 이론 수율

라이신 합성에는 phosphoenolpyruvate, pyruvate, NADPH, ATP가 1:1:4:1 의 비율로 필요하다. *Corynebacterium* 에는 그에 꼭 맞는 metabolic pathway의 조합이 없는 데 가장 근접한 답 1:1:4:x는 EMP 비율 0-67% boundary 안에 있다. 이말이 의미하는 것 처럼 여러종류의 답이 있을 수 있는데 각기 EMP, HMP, 그리고 HMP 안의 cycle 참여정도가 다르지만 공통된 것은 NADH 와 ATP가 너무 많이 만들어진다는 점이다. 과생산된 cofactors를 고려하지 않는다면 최대 대당 수율은 0.6 g lysine/g glucose 이다. 보통의 batch 나 fed-batch 에서의 수율은 0.35-0.40 정도인 것은 다 알려진 사실이지만, chemostat 에서의 최대 수율은 0.53-0.54 까지 얻을 수 있으며 잘 조절된 fed-batch에서 얻을 수 있는 순간 수율은 0.4-0.48 정도이다. 문제는 컴퓨터로 찾은 많은 답 중에서 미생물 생리학적으로 의미가 있는 답을 찾는 것과 과생산된 cofactors 를 어떻게 미생물이 처리하는가 하는 것이다. 또한 그것이 라이신합성의 최대 수율과 속도, 부산물의 생산, 그리고 degeneration 과 어떤 관계에 있는지를 알아 내는 것이다.

대사분석결과와 관련 실험의 요약

위에서 설명한 대사분석으로부터 얻은 결론과 실험적으로 입증된 사실을 다음과 같이 요약하였다.

- 1) 과생산된 NADH 는 pyruvate를 lactate로 전환시키며 사용되어 성장단계에서 라이신 생산단계로 transition 될 때 주로 축적된다. NADH 저장물질인 PHB 는 축적되지 않는다.
- 2) 라이신 생산단계에서 polyphosphate granule 이 관찰되는 것으로 보아 ATP 과생산은 계속 유지되는 것으로 생각된다. 강력한 uncoupler인 2,4-dinitrophenol을 라이신 생산상태에 있는 미생물에 첨가해도 아무 영향이 없거

나 (batch, flask culture), 오히려 라이신 생산 속도를 증가시키는 것이 관찰되었다. (chemostat, 제한기질과 회석율에 따라 다름)

3) 라이신을 생산하고있거나 그 potential 을 갖고 있는 상태의 균체에 Glycogen 이 축적된다. 그것은 gluconeogenesis 에 관련되는 효소들이 activity를 나타낼 수 있는 조건이라는 것을 의미한다. 즉 Fru-6-P 와 Fru-1,6-diP 사이에 futile cycle 이 움직여서 과생산된 ATP를 dissipation 시킬 뿐 아니라 NADPH 생산을 할 수 있는 완전한 cycle 이 EMP와 동시에 작동할수 있는 가능성이 있다. 그런 cycle은 metabolic balance 면으로만 본다면 유리하다.

4) 높은 energy charge로 pyruvate kinase 와 PTS 가 PEP carboxylase 보다 원활치 않을 것이다.

5) Glucose와 동시에 사용될 수 있으면서 metabolic unbalance를 해결할수 있는 secondary substrate 를 주면 degeneration을 방지할수 있을 것으로 보인다.

6) Metabolic flux 로는 HMP 의 비율이 EMP보다 높은 것이 유리하다. 그 어떤경우에도(비록 전체 carbon중 EMP로 대사된 비율이 높더라도) HMP를 통한 cyclic oxidation이 일어나고 있기 때문에 HMP의 net flux 가 높다.

7) 과생산된 NADH를 NADPH로 바꿀 수 있는 transhydrogenase 가 존재한다면 성장단계로부터 라이신 생산단계로 넘어갈 때 유리할 수 있다.

8) 라이신 생산단계의 세포에서는 catabolism과 anabolism의 tight coupling이 되지 않는다. 즉, 라이신 생산을 위한 배지 디자인에서 그 점을 고려하여 uncoupling 이 허용될 수 있도록 하여야 한다.

연속 배양에서의 미생물 생리학

라이신이 carbon 과 nitrogen 으로 구성되어 있으므로 균체성장을 제한시킬 수 있는 기질은 P, K, Mg, amino acid, O₂, trace minerals 등이다. 라이신 합성의 feedback regulation이 해제된 생산균주는 어떤 기질을 사용해서 성장을 제한하더라도 일단 성장이 제한되면 라이신을 생산하기 시작한다. 다만 생산속도와 생산이 계속되는 기간이 다를 뿐이다. Batch 에서는 제한 기질이 고갈됨과 (exhaustion) 함께 몇시간

내에 생산이 시작되어 방치된 상태에서는 30-40 시간 동안 계속된다. 이때 균체량은 약간씩 증가하나 시간에 따른 라이신 비생산속도 (Q_p , glys/gcell,hr)로 볼때 실제 성장속도는 (-) 인 것으로 생각된다. (참조, 그림 1)

연속 배양에서는 limiting substrate의 종류와 다른 기질과의 상대적인 농도에 따라 라이신이 생산될 수 있는 최대 및 최소 dilution rate ($=\mu$) 가 변한다. Single stage chemostat 에서 라이신생산이 가능한 최소 dilution rate 는 $0.02-0.03 \text{ hr}^{-1}$ 이다. 그렇지만 fed-batch 에서처럼 성장단계와 라이신생산 단계가 분리되어 있는 상황을 더 잘 나타내기 위해서 디자인한 이단연속 배양에서의 결과를 보면 실제 성장 속도 (-)에서도 (이 때의 마이너스 속도는 degeneration 되는 속도를 의미함) 라이신생산이 낮은 Q_p 를 유지하지만 생산이 계속되는 것을 볼 수 있다. (그림 1) 그것은 최적으로 조절되지 못한 fed-batch에서 발효시간이 경과됨에 따라 점점 Q_p 가 낮아지

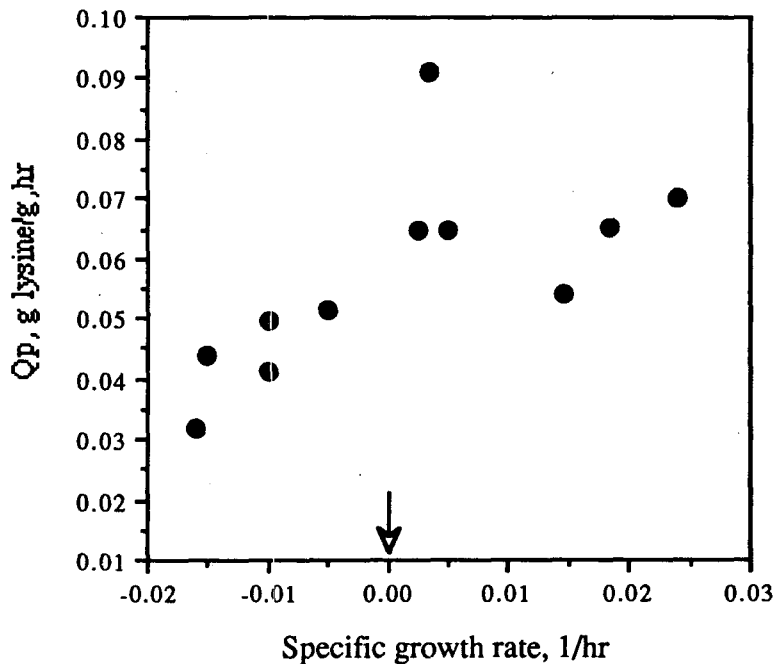


Fig. 1 Q_p as a function of μ_2 . $\mu_2 = D_2(1-x_1/x_2)$

는 것을 설명한다. 즉, 겉으로 보기에는 최소한의 성장속도 $0.01-0.02 \text{ hr}^{-1}$ 를 유지하는 것처럼 보이지만 실제 성장 속도는 마이너스일 수 있다는 것이다. 그림 1로부터 최적 생산 속도를 유지하려면 실제 성장속도를 0 이상은 유지시켜야 한다는 것을 알 수 있다.

연속 배양에서 phosphate를 limiting substrate로 하여 D를 0.08 hr^{-1} 로(라이신 생산 없음) 유지하다가 0.015 hr^{-1} 로 shift-down 했을때 즉각적으로 라이신 생산이 시작되며, 반대로 shift-up 시키면 거의 즉각적으로 라이신 합성이 멈춘다. 라이신합성이 시작됨과 함께 세포내의 효소 변화가 함께 일어나는지를 알기 위하여 5 가지의 효소, citrate synthase, PEP carboxylase, isocitrate dehydrogenase, aspartate kinase, 6-phosphogluconate dehydrogenase 역가를 측정하였다. 그 중 6-phosphogluconate dehydrogenase 만 역가의 증가를 보였다. 이결과가 의미하는것은 라이신을 생산하고 있지 않더라도 어떤기질에 의해 제한상태에 놓여 있으면 라이신을 생산할 수 있는 potential 을 갖고 있다는 점이며 또한 라이신생산의 시작과 함께 HMP pathway의 activity가 증가한다는 것이다.

연속 배양에서 라이신 생산은 조건에 따라 약간 다르지만 2-3 주 가 지나면 현저히 생산능력이 저하된다. 이렇게 degeneration된 세포에서 공통적으로 관찰되는 것은 polyphosphate granule의 축적이다. 대사분석 항목에서 요약했듯이 과생산된 ATP의 처리과정에서 생기는 축적물인데 실제로 degeneration을 유발시키는 직접적인 원인이 되는지는 확실치 않다. 오랜동안 metabolic unbalance 문제를 해결하는 과정에서 생기는 metabolic stress 때문에 세포는 점점 degeneration 돼 간다고 볼 수 있을 것이다. Auxotroph 성질이던 균주에서 revertant 가 생기기 때문인지 확인했으나 revertant 는 생기지 않았다. 아직 보완 실험을 해야 하겠지만 너무 높은 Q_p 에서보다는 약간 낮은 Q_p 에서 유지되는 연속배양의 경우가 장기생산에 있어서 훨씬 안정적인 것으로 보인다. 또한 라이신을 안정적으로 생산하는 세포에서 glycogen 의 축적이 관찰되었는데 대사분석 항목에서 요약한대로 glycogen이 축적되는 조건은 NADPH 생성이 용이하고, futile cycle에 의한 ATP dissipation을 할 수 있으며, TCA cycle의 작동이 미미한 조건이어서 라이신 생산 단계에 있는 세포의 metabolic balance를 위해서는 좋은 조건으로 생각할 수 있다. 약간의 carbon을 waste하면서 metabolic balance를 유지하고 있다고 해석할 수 있는 것이다. 하지만

이것은 결론적으로 그럴 것이라는 단순한 설명에 지나지 않으며 어떤 조건에서 배양하면 degeneration 을 방지할 수 있는지라는 질문에 대답하기 위해서는 아직도 많은 연구가 필요하다. 이러한 생리학적인 면 외에 연속배양을 이용한 배지 및 최적 조건을 찾기 위한 최적화 실험을 (Goldberg, 1981) 하여 다음 항의 fed-batch operation 의 조건으로 이용하였다.

Fed-batch 에서의 생산성 향상

Glucose 의 초기농도를 130 g/L 로 시작하여 feeding 후에는 약 40g/L로 유지되도록 조절하였을 때(그림 2), 70시간에 135 g lys.HCl/L 를 생산할 수 있었다. 라이신 비 생산속도, Q_p 는 0.1 ± 0.01 (g/g.hr)로 유지되었고 라이신 생산이 개시된 후의 Q_s 는 0.2였다가 0.14 (g glu/g.hr)로 감소되었다. Q_p 를 Q_s 로 나누면 구간 수율을 계산할 수 있는 데 그값은 0.40- 0.54 였으며 overall yield는 0.36 이었다.

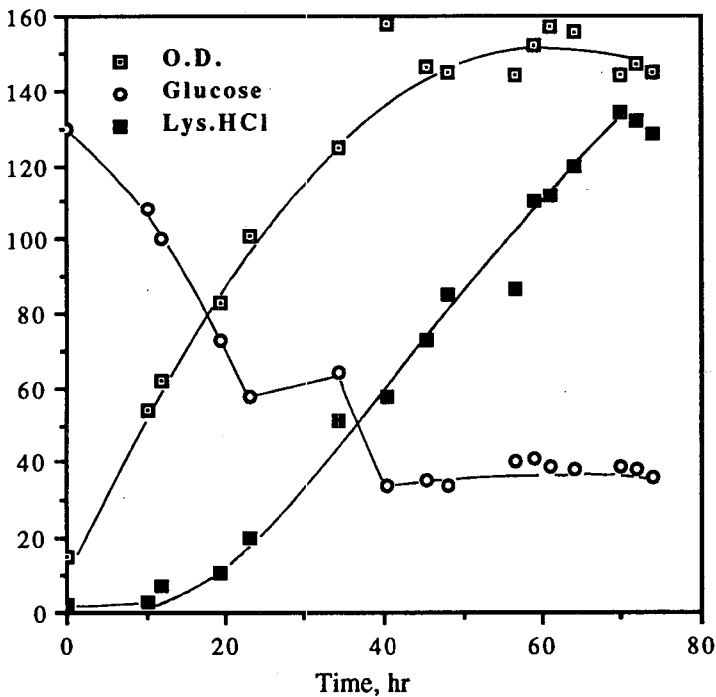


Fig 2. Fed-batch culture of C. glutamicum

최종 broth 에 축적된 부산물은 lactate 와 2-oxo-glutarate가 주였으며 아미노산 분석결과 라이신 외의 다른 아미노산은 축적되지 않았다. 전항에서 열거한 5 가지 효소역가 분석 결과 citrate synthase activity는 성장 단계에 비하여 라이신 생산 단계에서 반 정도로 감소되었으며 6-phosphogluconate dehydrogenase 은 Qp가 가장 높은 24 시간에서 제일 높은 activity를 보였다.

이런 고 생산성 Fed-batch 발효에서의 degeneration 정도를 분석하기 위해 72 시간후의(정상적인 발효가 끝난) broth 를 3/5 덜어내고 새 배지를 채운 다음 발효를 계속 할 수 있도록 하였다. 약 30 시간동안 Qp, 0.06-0.08 (g/g,hr) 로 라이신 생산이 계속되다가 정지되는 것으로 보아 높은 농도로 라이신을 생산하고 있던 미생물을 재사용할 수 있는 가능성이 있는 것으로 생각할 수 있다. 라이신 농도는 낮지만 비슷한 시도가 최근 보고되었다. (Sweeting, 1990)

결론과 전망

이상의 결과로부터 조직적인 대사분석과 연속배양에서의 미생물 생리 및 최적화 연구를 통하여 지금까지 많은 최적화 연구가 되어온 라이신 발효의 경우에도 생산성 향상을 이룰 수 있음을 알 수 있다. 또한 라이신생산 균주 개발시 중요시되어 왔던 anabolic enzyme(s) 의 유전자 조작과 함께 anabolic enzymes 의 증폭으로 늘어난 metabolic demand를 catabolic part 에서 충족시킬 수 있는 (unbalance 문제를 해결하면서) catabolic enzymes 의 유전자 조작이 필요하다는 것을 설명하였다. 이 때는 anabolic enzymes의 유전자 조작과 달리 target enzyme set를 찾아내는 대사분석 방법의 확립이 더욱 중요해진다. 그런 면에서 metabolic stress를 적게 줄 수 있는 균주 디자인과 media balancing 이 현재 생산성 향상의 큰 가능성을 지니고 있는 연속 생산의 key technology 중의 하나라고 결론지을 수 있을 것이다. 앞으로 공정 분야의 진보로 예상할 수 있는 것은 repeated fed-batch 에 의한 생산, 생산 균체의 recycling, 연속생산, 그리고 고농도 배양에 의한 생산성 향상 등이다. 이런 다운 스트림 분야의 진보가 업 스트림의 균주 디자인과 맞물려있다는 것을 본 연구를 통해 밝혔는데 라이신 뿐만 아니라 다른 많은 유기산 및 아미노산 등의 생산에도 비슷한 연구가 계속될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구의 여러 단계에서 참여한 A. Hadjsassi, C. Marchale, N. Coello, H.W. Lee 연구원들에게 감사의 뜻을 전한다.

참고문헌

- Ackerson, M.D. *et al.* (1989). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **20/21**, 511-528
- Aida, K. *et al.* (1986). " *Biotechnology of amino acid production* " Elsevier,
- Goldberg, I., Er-el, Z. (1981). *Process Biochem.* **16**, 2-8
- Hirao, T. *et al.* (1989). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 269-273
- Kawakita, T. *et al.* (1990). *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1-8
- Mavrounniotis *et al.* (1990) *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 1119-1132
- Michalski, H. J. *et al.* (1984). in " *Third European Congress on Biotechnology* " Vol. 2, pp 527-532
- Pan, J.G. *et al.* (1989). in " *Strategy of Metabolite Overproduction* ", SFM Symposium, Paris
- Seressiotis, A., Baiely, J.E. (1988) *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 587-602
- Souza, J. *et al.* (1987) in " *Fourth European Congress on Biotechnology* " Vol. 2
- Sweeting, K.B. *et al.* (1990). in " *Fifth European Congress on Biotechnology* " Vol. 2, pp 983-987