

특집: 생물공정 기술의 최적화(II-II)

발효최적화에서의 미생물 생리 및 대사분석

반재구

생명공학연구소 생물공정연구부

발효최적화 연구는 우리가 원하는 미생물의 대사산물을 경제적으로 생산하는데 최종목표가 있다. 미생물의 배양공학은 기본적인 생물공정 기술이다. 다만 경제적으로 생산할 수 있는 나라는 질문으로부터 최적화의 문제가 시작된다. 미생물의 성장곡선을 그리기 시작하여 최종적으로 원하는 대사산물을 과생산하는 단계까지 도달하는 데는 많은 의사결정을 필요로 한다. 더구나 대사공학을 생각하는 지금은 발효최적화 단계에서 일하는 연구자의 중간결론이 '여기 이 단계를 유전적으로 변화시켜야 하겠다'는 것일 수도 있다. 어떤 실험의 중간 결론이 또 다른 여러 배치의 발효조 실험이 아니고 몇가지 유전자조작일 때는 상당한 설득력을 갖는 이론 및 실험적인 데이터를 필요로 하게 된다. 본 강의는 어떻게 최적화 실험을 디자인할 수 있으며 거기에 필요한 최소한의 이론 및 실험적 방법은 어떤

것인가 하는 내용을 초점으로 구성된다. 그래서 발효분야에서 일하는 연구자들이 다분히 경험적이고 반복적인 실험에 의존해서 문제를 해결하려는 태도를 벗어나 균주육종과 공정디자인의 문제를 조직적으로 해결해 나갈 수 있는 기초를 제공하는 것에 목적이 있다.(12)

미생물은 정확하게 디자인된 배지에서 성장하면서 생리적으로 의미없는 대사산물은 생산하지 않는다. 몇몇 발효(fermentation)과정의 최종대사산물 및 산화 중간물질인 lactate, ethanol, gluconate, sorbose, acetate 등이 잘 자라고 있는 미생물에서 많이 생산되는 것들이다. 미생물 균체의 합성에 필요한 것보다 많이 생산된다는 점에서 과생산(over-production)이라고 부르는 것이 타당하다.(Neijssel, 1993) 미생물 성장의 가장 간단한 모듈식 해석은 Fig. 1과 같다.(Neidhardt,

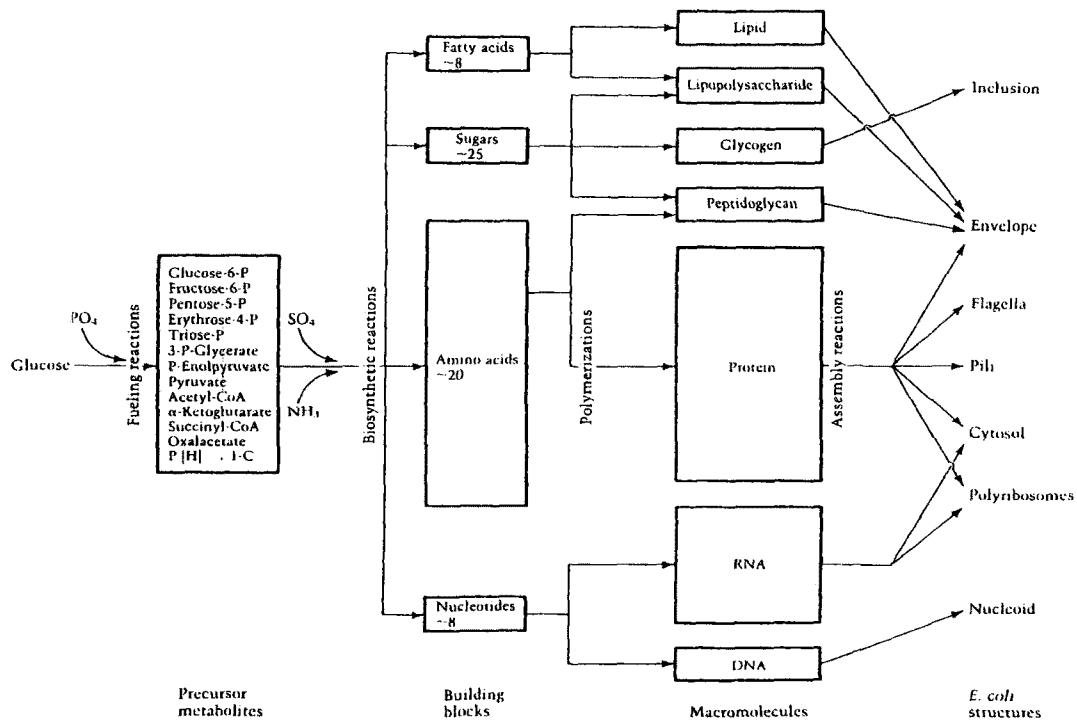


Fig. 1. Overall view of metabolism leading to chemical synthesis of *E. coli* from glucose. Boxes are proportional to need in making *E. coli*.(7)

1990) 즉 포도당과 각종 무기영양원을 섭취하여 key metabolic intermediate를 만드는 과정(catabolic fueling reactions), 각각의 필요 구성요소를(building blocks) 만드는 과정(anabolic reactions) 그리고 building blocks으로부터 polymerization reaction을 통하여 세포 구성성분 폴리머를 만든다. 이러한 과정이 아무런 제한없이 잘 진행되도록 배지성분이 골고루 갖추어져 있으면 미생물은 balanced growth를 하고 있는 것이다. 이때의 산물은 물론 미생물 균체이다. 이때는 CO₂와 약간의 부대사산물 외에는 아무것도 생산하지 않는다. 하지만 어떤 필요영양분에 의해 성장이 제한되는 limited-growth 상태에서는 상황이 다르다. 제한 성장 단계에서는 어떻게 대사가 운용되는가? 제한 영양원을 더 잘 uptake하는 transport system을 이용하게 될 것이고 경제적으로 사용하도록 대사가 재구성될 것이며 제한영양원에 영향을 받지 않는 대사과정만 계속될 것이다.

우리가 가장 쉽게 접할 수 있는 생산 균주는 그러므로 제한 성장단계에서 특정 대사산물을 과생산하는 균주이다. 정확히 말한다면 효모가 생산하는 ethanol도 oxygen-limited growth 상태에서 그렇지 않은 경우보다는 과생산되는 대사산물이라고 구분될 수 있다.

발효최적화를 위해서 과생산되는 대사산물의 유형을 나누어 보면;

0) 에너지대사 관련 대사산물 (예, ethanol),

1) 특별한 제한조건에 대한 미생물의 반응(예, PHB),

2) regulation network을 망가뜨린 변이주(예, 아미노산 생산 균주), 아니면

3) 유전자조작 균주(예, 재조합단백질)

중 한가지일 것이다.

위의 네가지 대사산물을 가리기에 합당한 질문은 다음과 같다.

0) 대사산물이 미생물의 에너지 생산 대사에 연결되어 있느냐?

1) 대사산물이 해당 미생물의 어떤 physiological response에 의해 생산되느냐?

2) 생합성단계의 regulation network이 해제되어 생산되는 것이냐?

3) 유전적으로 외부에서 도입되어 명령된 것인가?

최적화 실험 디자인

위의 질문에 답이 되면 각각의 경우에 원하는 대사산물을 생산할 수 있는 기본이 갖추어진 것이다. 미생물이 잘 만들수 있다는 것이 확인되었는데 왜 최적화를 얘기하는가? 첫번째 경우로 에너지 대사에 연결된 경우로 에탄올(ethanol)을 생각해 보자. 잘 알려진 것처럼 i) 에탄올은 효모의 제한성장 조건이 아닌 단순한 호기적 배양조건에서도 잘 생산된다. ii) 하지만 산소를 제한하면 더 잘 생산된다. 산소제한조건이 그냥 배

양하는 것보다는 최적화된 조건이 된다. 에탄올은 에너지 생산과 관련되어 생산된다. 에너지 대사에 연결된 것이라는 점에서, iii) 에너지를 더 소모하게 하는 생리조건이나 에너지 생산효율을 낮추는 배양조건에서 에탄올은 더 많이 생산될 것이다. 이론적으로 얘기하면 무한히 에너지를 많이 소모하도록 하는 대사생리상태에서 결국 iv) 어떤 단계의 효소(들)인가가 율속단계(rate-limiting step)일 것이고 그것이 어디인지를 알아내는 것과 그런 단계를 가속할 수 있는 유전적인 조작을 통해서 대사산물의 생산을 극대화해 나가는 것이다. 그런 의미에서 생리적으로 또는 유전적으로 대사산물이 생산될 수 있는 metabolic network을 갖춘 균주를 분리 또는 육종하는 것이 대사산물 과생산에서의 필요조건이라면 미생물 대사플럭스(metabolic flux) 전체가 그 대사산물로 집중(orientation)되도록 하는 생리 및 유전적 조건을 최적화하는 것은 그 충분조건이라고 할 수 있다. 결국은 최적화의 답을 공정최적화를 위주로 찾느냐 아니면 균주 유전자조작에서 찾느냐 하는 문제는 결국 두개의 바퀴와 같은 것이다. 문제는 어디서부터 그 최적화의 논리를 찾아가 하는 것이다.

정리하여 얘기한다면; i) 어떤 대사산물이 최대 생산되는 생리적인 조건을-유전적인 조작이 가해지지 않으면 더 증가하지 않을 정도로- 밝히고, ii) 그러한 생리상태에서의 rate-limiting step을 규명하여 변화시키고, iii) 조작후의 효과를 분석하여 새로운 rate-limiting step을 찾아 또 변화시키는 반복적인 사이클(iterative design cycle)이 되는 것이다. 그러한 연구를 수행하기 위해서는 대사산물이 과생산되는 physiological state를 규명하는 연구방법이 필요하고 대사에서의 최대생산성을 결정하는 대사분석 방법이 필요하다. 가장 간단한 대사분석 방법은 원하는 대사산물의 생산에 필요한 carbon flux와 cofactor flux의 필요도를 계산해 보아 미생물에게 도움이 되는 어떤 면이 있으면 예시한 0)과 1)의 경우고 그렇지 않으면 2)와 3)으로 구분하는 것이다. 자연적으로 만들어지는 대사산물(physiological metabolites)과 억지로 만들려고 하는 대사산물(engineered metabolites)을 과생산할 때의 미생물 생리상태는 다를 것이다.

발효 최적화의 목적함수

실험디자인에서 발효 최적화의 목적함수를 생각해 보는 것은 당연하고도 중요하다. 공정의 목적함수는 rate, yield, titer이다. 생물공정의 미생물 성장단계에서는 성장속도(μ), 균체수율($Y_{x/s}$), 최고균체농도(x)가 목적함수가 되고 대사산물 생산단계에서는 생산속도(Q_p), 전환수율($Y_{p/s}$), 최고생산농도(p)가 된다. 우리가 디자인하는 실험이 세가지 중 어느 것을 주요 목표로 하는 것인가 하는 것은 잘 생각해 보아야 하는 문제이다. 현재 최적화하고 있는 parameter가 최종농도보다는 생산속도에 영향이 있을 것 같은 경우에도 정해진 시간에 샘플링해서 산물의 농도만을 측정하여 그 영향을 검토하는 경우를 때때로

코게 된다. 잘못된 실험 방법이다. 최종농도만을 측정하여 최적화 실험을 수행하는 것은 부정확할 뿐 아니라 많은 정보를 알아낼 수 없다.

최종농도는 생산이 시작되는 단계에서의 균체농도와 그때의 비생산속도(specific production rate, g-product/g-cell/hr) 그리고 생산기간으로 정해진다; $p = \int_0^T Q_p \cdot x dt$. 그러므로 최종농도는 균체농도, 대사속도, 생산기간에 의해 정해지는 어떤 결과이지 그것이 직접적인 실험목적이 되기 어렵다. 생산된 대사산물이 생산단계에 있는 미생물 생리에 영향을 줄만큼 높은 농도까지 도달하는 때만 그 영향을 검토할 수 있을 것이다. 그러므로 실험디자인은 위의 설명처럼 생산개시시점의 균체농도, 비생산속도(specific production rate), 그리고 생산기간을 중심으로 이루어져야 한다. 각각의 최적화를 위하여 해야 할 일이 다를 것임은 자명하다.

위의 설명을 생각하며 최적화 순서를 임의로 나열해 본다.

0) 첨가된 대사산물에 대한 저해 영향을 실험하여 도달가능한 최고 농도를 검토한다.

1) 생산개시시기의 균체농도를 디자인한다. Limiting nutrient의 농도 조절로.

2) 대사산물 생산단계 미생물에서의 대사흐름을 추측하여 그 metabolic balance를 유지할 수 있는지 생리상태를 계산 추측한다.

3) 대사속도와 생산기간을 향상시킬 수 있는 실험을 디자인한다.

4) 도달할 수 있는 최고농도, 전환수율 그리고 최고 생산속도를 제시할 수 있는 실험적 결과와 대사공학적으로 유전자조작을 시도할 수 있는 potential site를 찾는다.

성장제한과 대사산물 생산

위와 같은 실험디자인을 위해서는 미생물의 성장단계(growth phase)와 제한성장 단계(limited-growth phase)를 이해하여야 한다. 잘 자라는 미생물은 대사산물을 효과적으로 과생산하지 않기 때문에 미생물 성장을 제한하는 것이 필요하다. 성장의 제한은 어떤 필요 영양원으로도 가능하다. 어떤 limiting-substrate로 성장을 제한하여 전체대사의 밸런스를 깨고 그 때도 열려 있는 metabolic flux를 원하는 방향으로 유도하는 것이다. 성장단계에서 대사산물 생산 단계로 transition된다는 것은 그러므로 필요영양원의 고갈 또는 제한공급에 피 성장제한이 선결조건이다. 위에서 예를 든 것처럼 ethanol은 산소를 제한하여야 하고 세포내 축적물질인 PHB(poly- β -hydroxy-butyrate)나 세포외 축적물질(?)인 EPS(exopolysaccharides)는 질소원을 제한하여야 한다. 특정 아미노산 auxotroph인 아미노산 과생산균주라면 필요아미노산의 제한으로 아미노산 생산이 시작된다.

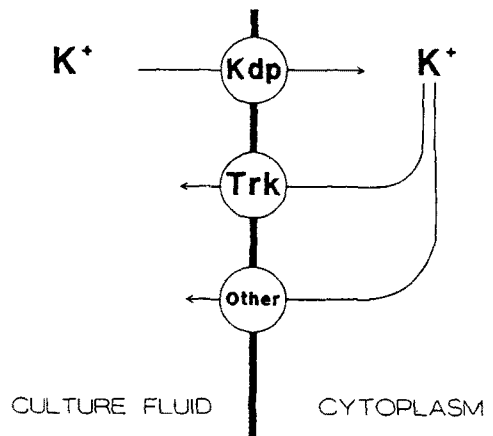


Fig. 2. Futile cycling of K^+ ions across the cel membrane, due to energy-linked uptake via the high-affinity uptake system Kdp, and leakage via the low-affinity uptake system Trk, or other systems.(8)

전체대사를 catabolism과 anabolism으로 나누는 것처럼 제한 성장상태도 catabolic limitation과 anabolic limitation으로 나눌 수 있다. 미생물의 구성성분으로 incorporation되는 영양원, 즉, nitrogen, sulfur(amino acid auxotroph인 경우는 해당 아미노산) 등에 의해 성장이 제한되면 anabolic limitation으로 분류할 수 있다. 에너지 대사를 필요로 하는 영양원의 제한 즉, carbon, potassium, magnesium, oxygen 등의 제한은 catabolic limitation이다. Carbon source는 carbon의 골격과 에너지를 공급한다는 면에서 제한이 되면 (carbon/energy)-limitation이 된다. Limiting-nutrient에 대한 미생물의 반응중 공통되는 것이 있다면 각각의 nutrient에 대해 미생물은 적어도 2개 이상의 transport system을 갖는다는 것이다. 즉, 한 시스템은 해당 nutrient의 농도가 높을때(low affinity, high max. rate), 다른 하나는 제한이 될때(high affinity, low max. rate) 작동한다(참조 Fig. 2).

Oxygen-limitation

위의 관점에서 산소제한 조건은 정확히 에너지(ATP) 제한 조건이다. 산소의 부족으로 NADH cofactor가 산화되지 못하여 NADH stress를 겪기 때문에 NAD(P)H를 필요로 하는 균체내 축적 물질을 생산하기에 적합한 제한조건이 된다. PHB가 이러한 조건에서 축적된다. NADH-regeneration의 결과로 각종 유기산 및 ethanol이 생산되는 것은 잘 알려진 것이다.

Carbon-limitation

탄소 제한 조건에서는 특별한 경우가 아니면 어떤 대사산물도 의미있는 수준으로 생산되지 않는다. 전체대사는 carbon source uptake에 의해 제한되므로 high affinity transport sys-

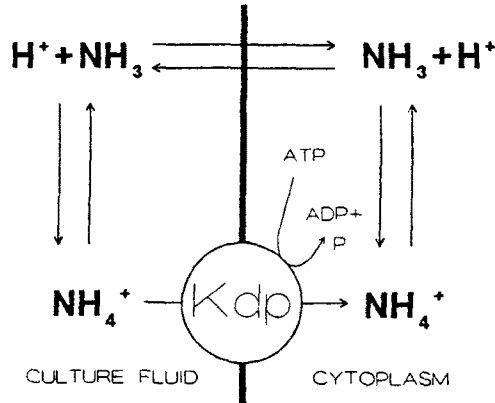


Fig. 3. Futile cycling of NH_4^+ and NH_3 across the cell membrane, due to energy-linked uptake of the NH_4^+ ion via the high-affinity K^+ uptake system Kdp and diffusion of NH_3 through the cell membrane. Pumping of protons by the respiratory chain is not shown.(8)

tem이 transport에 이용된다. 유의해야할 점은 배양 broth에서 탄소원이 검출되지 않는다고 전부 탄소제한조건이 되는 것은 아니라는 점이다.

Nitrogen-limitation

질소원은 아미노산 합성에 이용되어 단백질의 구성성분이 되기 때문에 제한되면 단백질의 합성이 원활치 못한만큼 질소를 함유하지 않은 각종 carbohydrate polymer가 축적된다. 단순히 말한다면 여유가 있는 탄소원을 에너지 밸런스가 맞는 각종 산물로 축적한다(참조 Table 2). 균체의 다당체, exopolysaccharides와 균체내 PHB, polyphosphate등이 그 예이다. Auxotrophic amino acid에 의한 제한과 sulfur-limitation 등도 단백질로 incorporation된다는 면에서 크게 보면 같은 메카니즘을 갖는다.

Phosphate-limitation

Phosphate는 핵산에 incorporation되지만 free ion으로도 다양한 에너지 대사에 직접 관여하기 때문에 N-limitation과는 다르다. 그결과 N-limitation에서 축적되는 물질도 축적될 뿐만 아니라 뒤의 K-limitation에서 축적되는 물질들도 축적된다. 그런 면에서 두 조건의 반응을 다 보인다.

Potassium-limitation

Potassium은 어느 폴리머로도 incorporation되지 않고 cytoplasm에 일정농도 존재하여야 한다는 점에서 다른 limiting-nutrient와는 완전히 다르다. 제한조건이 되면 high affinity Kdp system으로 이동된 potassium은 low affinity이고 control이 leaky한 Trk system을 통해 concentration gradient 때문에 밖으로 배출된다(Fig. 2). 이 과정에서 ATP가 소모되고 결과

적으로 한 일 없이 에너지만 소모한 futile cycle이 형성된다. 이때의 미생물은 에너지-스트레스 상태가 된다. 에너지가 필요한 과정이라면 무엇이든 가동하게 될 것이다. 예로 *Klebsiella*에서는 (*E. coli*에서는 cofactor PQQ가 필요함) periplasmic glucose oxidation으로 에너지를 생산하는 과정으로 gluconate가 과량 생산된다. 문제가 더욱 복잡한 것은 Kdp system이 ammonium ion, NH_4^+ 을 potassium ion, K^+ 대신 받아 들인다는 것이다. Fig. 3에서 보는 것처럼 cytoplasm에서는 NH_4^+ ion이 NH_3 와 평형에 있고 NH_3 는 자유롭게 세포막을 투과하기 때문에 마찬가지로의 futile cycle이 생긴다. Magnesium-limitation도 비슷한 반응을 보인다.

Trace-metal limitation

Trace-metal에 의한 제한은 특정 효소와 미생물의 구성성분의 부족을 일으켜 대사산물 생산과 morphology, aggregation 등 폭넓은 영향을 미친다.

Internal-limitation?

이와 같은 외부로부터의 성장제한이 아니고 미생물의 대사 자체의 구조적인 문제 때문에도 성장 제한이 될 수 있다. 예를 들면 O_2 소모에 관련된 respiratory chain activity가 낮으면 다른 electron acceptor나 그 대사자체의 능력을 변화시키지 않으면 적당한 limiting condition을 찾기 어려워질 수 있다. 혐기성 미생물 *Zymomonas mobilis*가 대사구조상 internal O_2 -limitation(anaerobic)이라는 사실을 모르고 실험디자인을 한다고 상상해보면 쉽게 이해된다.

지금까지의 반응은 physiological metabolites를 중심으로 기술한 것이고 그런 범주에 들지 않는 것은 구성성분에 해당하는 아미노산 및 핵산 building blocks, 이차대사산물, 재조합 단백질등이다. 아미노산은 auxotrophic amino acid의 제한 조건으로 생산하게 되는데 그 과생산이 특별한 미생물의 생리적인 반응이라기보다는 그런 제한조건에서 대사조절의 관점으로 볼때 '열려있는' 대사 흐름의 결과라고 간주하여야 한다. 2차대사산물인 항생물질등은 각 미생물의 영양원(주로 P-limitation) 고갈에 따른 starvation response인 대사분화과정에 의해 조절된다. 재조합 단백질을 생산하기 위한 적당한 제한조건이 있는가? 이것은 재조합 단백질을 생산하라는 명령인 induction후의 미생물 생리 분석이 필요하다.

연속 배양을 이용한 최적화 실험

이 모든 성장 제한조건과 발효환경에 관여하는 요인들을 체계적으로 하나 하나 최적화하기는 어려운 일이다. 그래서 생겨나는 대안이 통계학적 방법에 의한 최적화와 생리학적 방법인 연속배양에서의 최적화 방법이다(Greasham & Inamine,

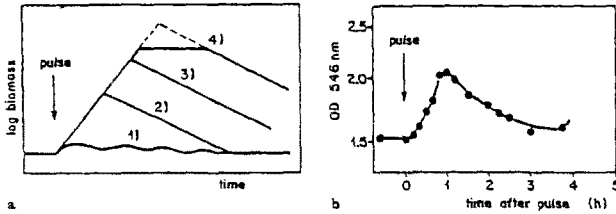


Fig. 4. a and b. Pulsing of potential media components to a chemistar culture during steady state is a most efficient method for media design. a. Time course of biomass after pulse: 1) "unspecific" chances indicate that the substance on question had no nutritional effect; 2), 3) true effects on growth exert exponential kinetics; 4) excessive dosage; b. Actual experiment with *Bacillus caldotemax*. Response of optical density OD to a pulse of methionin into an incomplete defined medium. Demonstration of an auxotrophy.(Kuhn et al. (44))(2)

1986; Fiechter, 1984). 일반적인 사실이지만 모든 배양 변수를 일정하게 유지하고 배양할 수 있는 연속배양은 변화시키고 싶은 변수별로 하나씩 체크해볼 수 있는 미생물생리 연구의 중요한 방법이다. 이러한 연속배양을 최적화에 이용하면 상당히 유용한 것이다. 일단 아무것도 모르는 상태에서는 연속배양에서의 limiting-nutrient shift에 의해 대사산물을 생산할 때의 기본적인 제한기질 조건을 알아내는 것이 필요하다. Limiting-nutrient가 정해진 상태에서의 최적화 변수들에 대한 개별적인 최적화실험을 조직적으로 처리할 수 있다. 최적배지조건의 결정, 성장속도, 대사산물의 최적 생산을 위한 각종 환경조건의 최적화를 손쉽게 처리할 수 있다. 성장속도에 관련된 실험으로는 정해진 limiting-substrate하에서 높은 성장속도로부터 낮은 성장속도로 내리는 dilution rate shift-down 실험과 그 반대인 shift-up 실험으로 간단히 그 영향을 수 있다.

Pulse-and-shift method.

연속배양을 이용한 최적화 방법은 그 실험 방법 그대로 pulse-and-shift method라고 한다(Fiechter, 1984). Fig. 4에서 보는 것처럼 영향이 있을 것으로 기대하는 medium을 pulse로 첨가한후 그 반응을 살펴보는 것이다. 그리고 다시 pulse를 할 수 있는 다른 조건으로 shift하고 steady-state가 될 때까지 기다린다. 그럼에는 biomass 만의 반응을 위주로 되어 있지만 product를 체크하면 미생물의 성장이 아닌 대사산물 생산에 영향을 주는 요소를 최적화할 수 있다. 자세한 내용은 해당문헌을 참고하기 바란다.

최근 독일에서는 발효대사공학의 실질적인 연구가 더욱 활발해지고 있는데 그중의 한 그룹은 이러한 원리를 이용한 반자동 배지 및 발효조건 최적화 도구를 개발하였다. 내용을 요약하면 위의 pulse-and-shift-analysis를 사람이 결어 없어도 계속 실험이 가능하도록 하였고 그 콘트롤을 단순한 프로그램으로 해결할 수 없어서 인공지능형 소프트웨어인 expert system

을 사용하였다. 이름을 EXPCON이라고 명명하였는데 궁극적인 목표는 on-line metabolic analysis와 통합하여 computer-assisted experimental station이 되도록 하는 것이라고 한다. 물론 최적화실험을 빠른 속도로 하기 위한 것이다. 6-12 주면 대강의 최적화 parameter identification을 수행할 수 있다고 한다.

고생산성 공정의 디자인

균체농도

고농도 배양은 배양공정으로 해결한다. 배지조성의 조절, 산소공급, 성장에 의해 생산된 열의 제거를 위한 냉각, 그리고 부대사산물 축적의 조절 등으로 실현할 수 있다. 생산개시 시기에서의 균체농도는 limiting-substrate에 대한 균체수율로부터 계산한다.

대사산물 생산속도

어떻게 위의 각 limited-growth별로 목적하는 대사산물에 연결되는 대사를 촉진하는가? 결국 우리가 극대화하고자 하는 것은 specific production rate(g-product/g-cell/hr)이다. 이러한 정의로부터 CO₂ 생산을 필요로 하는 제빵효모의 CO₂ 생산을 촉진하기 위해서는 대사공학적으로 genetic futile cycle(pfk-fbp)을 도입하는 것이 방법이 될 수 있다. Fructose-1,6-phosphate와 fructose-6-phosphate사이의 두 효소, pfk-fbp를 동시에 작동시키면 ATP만 소모된다. 즉 energy-linked product인 CO₂ 라는 대사산물을 효모균체에 비해 많이 생산되도록 에너지를 낮추는 것이다. 대사의 단순한 촉진을 위해서는 futile cycle을 갖는 potassium을 limiting-substrate를 선택하는 것이 타당할 것이다. 특히 energy-linked product인 경우라면 에너지를 버리게 하기 때문에 생산속도가 빨라진다. Futile cycle은 물에 용해된 CO₂와 acetic acid 등의 약산의 존재에서도 가능하다. 이러한 방법은 주로 대사의 catabolic part로만 생산되는 대사산물에 잘 적용될 수 있다. 하지만 대사의 anabolic part를 필요로 하는 building block 이후의 대사산물은 대사속도를 증진하는 방법이 달라야 한다. Physiological response 관련 대사산물이 아닌 경우에는 metabolic balance를 계산이 우선되어야 한다. 쉽게 생각하면 합성관련 효소의 증폭, metabolic precursor의 보강, metabolic balance의 계산 등이 순서대로 고려되어야 한다. 문제는 합성관련효소를 증폭하고 중간 metabolic precursor를 보강해도 대사속도의 증가가 쉽지 않다는데 있다. 그 이유는 substrate에서 product로 전환되는 전체 대사속도를 조절하는 mediator가 한두개의 합성효소가 아니고 metabolic balance 그 자체에 있을 수 있다는 사실을 간과하는데 있다. 에탄올 예를 다시 생각해 보자. 산소제한이라는 NADH cofactor 조절요인이 풀리지 않는한 ethanol 합성효소를 증폭해도 효과는 미미할 것이다. 같은 논리로 예를 들면 아미

Table 1. Design of pulse-and-shift method for medium optimization

step1: selection of essential components
step2: preparation of the medium
step3: preliminary x-D-Qp diagram
step4: assessment of limiting substrate
step5: optimization
step6: final x-D-Qp diagram

노산인 라이신 생산단계에서의 생산속도를 제한하는 어떤 요인을 밝히지 못한 상태에서의 합성효소 증폭은 별 효과가 없게 된다. Metabolic balance 계산을 다시 보자(Table 2). 어떤 대사산물도 carbon precursor의 carbon metabolic flux와 cofactor flux(ATP, NADPH)의 balance를 맞추지 않고는 과생산되지 못한다. 안 맞는 flux를 맞추는 방법은 무엇이 있는가? 모자라는 것을 더 생산되도록 하거나 남는 것을 갖다 버리게 하는 것이다. 또 한가지 방법은 미생물의 성장을 완전히 제한하는 것이 아니라 적당한 성장이 가능하도록 하여 미생물 스스로가 해결할 수 있는 공간을 제공하는 것이다. 실제의 예로 Table 1에 나와 있는 라이신을 생각해 보자. 라이신 1g당 단계에서는 모자라는 NADPH를 생산하도록 도와주는 gluconate를 보조 기질로 사용하였을 때 생산속도가 높아졌다. 하지만 전환수에는 큰 변화가 없다. 또한 남는 에너지를 버리는 어떠한 생리 조건도 라이신 생산을 촉진한다(Pan, 1995). 이러한 효과가 성장단계에 있는 미생물에는 어떤 효과로 나타날까? 전혀 효과가 다르다. 라이신 합성효소를 증폭하면 성장단계에 가까운 미생물 생리상태에서는 라이신 생산성이 향상되지만 라이신 생산단계에서의 미생물에서는 효과가 없다. 라이신 생산단계에서의 미생물에서는 합성효소가 아닌 metabolic balance 문제가 더 중요하다고 해석되는 것이다.

생산기간과 최종농도

최종 대사산물에 대한 sensitivity와 생산기간에 의해 정해지는 것이 대사산물의 최고농도이다. 물리화학적으로 제한이 될 때까지 생산이 계속된다면 항상 우리가 원하는 만큼의 최고농도를 생산할 수 있을 것이다. 대사산물 생산기간이라는 변수는 가장 연구가 안되어 있는 분야이다. 잘 생산하고 있던 미생물에서 생산성이 낮아지는 이유는 여러가지를 생각해볼 수 있다. 관련합성효소의 실활, 대사흐름의 balance가 맞지 않아서 생길수 있는 metabolic degeneration(?), 생산성을 상실한 revertant의 출현 등을 고려할 수 있다. 이외에도 많은 이유가 있겠지만 physiological degeneration과 genetic degeneration으로 크게 분류된다. 필자의 연구실에서 지금까지 연구한 결과를 고려하여 생각하면 가장 확실한 사실은 사용하고 있는 substrate에서 product까지 생산될 때의 metabolic balance가 문제라고 생각된다. 쉬운 설명으로 미생물의 physiological

생물산업

Table 2. Metabolic balance calculations for representative product classes

Type	precursor metabolite(s) and cofactor(s) needed	cofactor flux from glucose-to-precursor
1. Ethanol (energy metabolites)	1 pyruvate 1 NADH	1/2 glucose 1 NADH
2. PHB (reserve compounds)	2 acetyl-CoA 1 NAD(P)H	1 glucose 1 NAD(P)H
3. Glutamate (building blocks)	1 a-ketoglutarate 1 NADPH	1 glucose 1 NADPH 1 ATP, 3 NADH
Lysine	1 oaa, 1 pyruvate 2 ATP 4 NADPH	1 glucose(1.2) 1 ATP(1) 0 NADPH(2.4) 2 NADH(2)
Methionine	1 oaa(oxaloacetic acid) 7 ATP 8NADPH 1 1-C unit	0.5 glucose(0.6) 0 ATP 1 NADH(1.2 NADPH) -

response로 생산되는 산물들은 metabolic balance가 너무 잘 맞으면서 생산되기 때문에(참조 Table 2), 세포내가 꽉차서 더이상 자리가 없을때까지나(PHB), 외부의 viscosity가 문제가 될 때까지(EPS), 또는 생산된 대사산물에 의해 미생물의 성장과 대사가 저해받을 때까지(ethanol, organic acid) 생산된다. 하지만 그외의 대사산물은 생산이 개시된후 일정한 시간이 지나면 생산이 정지된다. 이러한 building block 대사산물의 metabolic balance를 계산해보면 주어진 기질로부터 목적물질까지 도달하는 정상적인 대사의 흐름에서 생산되는 carbon precursor와 cofactor flux가 product합성에 필요한 요구와 맞지 않는다(Table 2). Metabolic balance가 맞지 않으면 잠깐동안은 생산되지만 오랫동안은 생산되지 않을 것이다. 이런 경우의 해결책은 마땅치 않다. 궁색한 것이지만 미생물의 성장제한이 심하지 않도록 하여 미생물 스스로 대사의 재구성을 할 수 있는 여유를 제공하여야 한다고 생각된다. 가장 극단적인 예 methionine인데 Table 2의 계산처럼 아미노산 중 가장 높은 cofactor flux를 요구한다. 많은 아미노산이 자연적인 변이주에서 생산이 시작되었던 것에 비해 methionine은 변이주로 생산된 적이 없으며 대사공학적 균주 육종으로도 의미있는 수준을 생산하지 못한다. 또 다른 예는 외래단백질의 과생산인데 induction후의 생산속도에 관계없이 2시간이면 생산이 정지되는 것으로 보아 외래 단백질을 만드는 미생물내에서 building block인 아미노산의 starvation (stringent response)나 실제적인 energy-starvation을 경험하고 있는 것으로 보인다(Hahm, 1995). 높은 수준으로 외래단백질을 발현하려면 induction 후의 생산기간이 정해져 있으므로 그 생산속도를 최대화하는 방향으로 노력이 경주되어야 한다는 것은 자명해진다.

대사분석과 대사공학

지금까지 미생물의 대사산물 과생산에 필요한 limiting-substrate와 metabolic balance 계산 등을 논의하였지만 남는 질문이 있다. 그것은 최대대사속도를 결정하는 요인이 무엇이나 하는 것이다. 즉, 대사과정내의 어떤 효소단계일때는 그 rate-limiting step을 어떻게 규명하느냐 하는 것이다. 에탄올의 경우로 다시 생각하면 산소제한 조건은 알아내고 energy-linked product여서 에너지가 최대로 소모되도록 한후 에탄올을 합성하는 대사효소 중 어느 단계가 제한이 될 것 같은 단계까지 왔는데 그 다음은? 이 질문은 단순하지 않다. 그 답을 위해서는 어느단계가 rate-limiting step인가를 밝히는 대사속도조절 이론과 그 결과인 양론(stoichiometry) 분석이 필요하다.

Kinetics or stoichiometry?

대사속도는 대사조절의 과정이고 대사양론은 대사조절의 결과이다. 대사조절속도론은 많은 얘기가 있지만 1973년 두 그룹의 연구자에 의해 각각 제안된 MCA(Metabolic Control Analysis) 이론이 대표적이다(Fell 1992). MCA에 의한 Metabolic flux 조절 이론은 아주 간단하다. 기존의 rate-limiting step은 하나라는 단순한 생각보다는 전체 metabolic flux를 많은 대사단계 효소가 각각의 flux control coefficient에 의해 나누어 조절(distributive control)하고 있다는 것이다. Flux control coefficient는 일종의 sensitivity 개념으로서 "특정단계의 효소역가를 변화시킨데 대한 전체대사의 변화폭"을 나타낸다. 그리고 각 단계의 flux control coefficient의 합은 1이어서 만약 어떤 단계의 flux control coefficient가 1이라면 그 효소 혼자서 전체 flux를 조절하고 있는 것이고 0에 가깝다면 전혀 조절에 가담하지 못하는 것으로 해석한다. 결국 우리가 변화시키고자 하는 전체대사의 속도를 가장 크게 변화시킬수 있는 효소단계를 알아낼 수 있는 방법을 제공한다. 이 방법은 단순하지만 대사과정을 들여다볼 수 있는 좋은 분석적인 창을 제공한다. 하지만 직접 관여하는 대사효소들을 선택적으로 *in vivo* modulation하는 방법이 쉽지 않아서 실제 응용에 있어서는 큰 역할을 하지 못하고 있다. 중요한 사실은 MCA의 주요 rate-limiting step 분석이 미생물의 배양조건에 크게 의존되는 등 대사분석의 예측과 실험적인 입증을 어렵게 하는 여러 요인이 있다는 것이다(Table 3). 결국 이러한 문제들은 정확한 분석 방법과 미생물 생리상태를 규명하는 실험적인 방법 및 반복적인 실험을 필요로 하게 된다.

미생물 대사의 속도론이 MCA라면 미생물 대사의 결과를 물질수지식인 stoichiometry이다. Metabolic stoichiometry의 분석이 속도면에서 아무런 정보를 제공하지 않지만 우리가 실험적으로 측정할 수 있는 변수들과 연결지어 설명할 수 있다는 점에서 장점이 있다(Holms, 1986; Vallino, 1990). Metabolic

Table 3. 대사공학에 의한 균주 디자인과 발효 최적화 분석을 복잡하게 하는 요인들.

- Metabolic steps are usually channelled
- Shift of flux control step to other steps by amplification of one enzyme
- Calculation of major flux control coefficient; condition-specific
- Complex physiological response to genetic modification

stoichiometry를 계산하여 전체대사과정의 상대적인 분포도를 보여 주는 'metabolic flux map'은 여러가지 제한점이 있지만 대사과정의 진행 설명 방법으로는 좋은 방법이다. 이런 계산을 미리 해보는 것은 적어도 완전히 잘못된 실험디자인과 해석은 되지 않으리라는 점에서 자기교육적인 면이 있다. 즉 반복적인 실험의 횟수를 줄이는데 도움이 된다.

발효생리 실험

실험적인 입증방법은 물론 정밀한 분석방법이 우선되어야 한다. 중요한 것은 정확한 physiological state를 규명하여 미생물의 성장 단계와 대사산물 과생산 단계로 나눌 수 있는 metabolic transition 조건을 실험적으로 입증하는 것이다(Lee, 1995). 정확한 생리학에서의 실험은 대사공학이 필요한 효소 단계를 예측하는 데도 결정적인 역할을 한다. 잘못된 예측으로 시작된 실험은 의외로 많아서 오랜 기간의 유전자조작의 결과로 얻는 것은 그 단계가 조작 수율에 관여하지 않는다는 단순한 결론으로 될 가능성이 많다. 때로는 정확한 단 효소를 대사공학적으로 조절하였어도 정확히 그 단계의 효소활성이 전체적인 대사과정에서 중요한 조절역할을 하고 있는 그런 과생산 생리 상태를 찾지 못하여 문제가 되는 경우도 있다.

미생물 대사의 가속(acceleration)과 최적화는 단순한 문제가 아니다. 여기에는 대사를 전체로 보는 눈이 필요하다. 그래도 나누어 생각해 보고자 한다면 transport, carbon과 cofactor flux, secretion 단계별 속도 요인을 검토하여야 한다고 본다. 물론 발효최적화와 균주디자인은 복합적으로 생각해야 하는 문제가 되었다(Sahm, 1993; Pan, 1995).

참고문헌

1. Fell, D. A. 1992. "Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development." *Biochem. J.* **286**, 313-330.
2. Fiechter, A. 1984. Physical and Chemical Parameters of Microbial Growth. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* vol.30 Ed. A. Fiechter. Berlin, Springer-Verlag.
3. Greasham, R. and E. Inamine 1986. Nutritional Improvement of Processes. in *Manual of Industrial Mi-*

- crobiology and Biotechnology, Eds. A. L. Demain and N. A. Solomon. Washington, D.C., ASM.
4. Hahm, D. H. and et al. 1995. "Maximum yield of foreign lipase in *Escherichia coli* HB101 limited by duration of protein expression." *Journal of Fermentation and Bioengineering* **79**, 236-41.
 5. Holms, W. H. 1986. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: Relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current Topics in Cellular Regulation* **28**, 69-105.
 6. Lee, H. W., J. G. Pan, J. M. Lebeault. 1995. Characterisation of kinetic parameters and metabolic transition of *Corynebacterium glutamicum* on L-lysine production in continuous culture. *Applied Microbiology Biotechnology* **43**, 1019-1027.
 7. Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham, et al. 1990. *Physiology of the Bacterial Cell*. Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.
 8. Neijssel, O. M., M. J. T. d. Mattos, et al., 1993. 4 Overproduction of metabolites. in *Biotechnology 1. Biological Fundamentals*. Ed. Sahn, H. pp. 163-187 VCH.
 9. Pan, J. G., J. M. Lebeault, J.S. Rhee 1995. Integrated approach in physiological and genetic designs for the overproduction of microbial metabolites. *International Symposium on Functional Biomaterials*, Seoul, 한국산업미생물학회.
 10. Sahn, H. 1993. Metabolic design. in *Biotechnology 1. Biological Fundamentals*. Ed. Sahn, H., pp. 189 VCH.
 11. Vallino, J. J. and G. Stephanopoulos, Eds. 1990. Flux determination in cellular bioreaction networks: applications to lysine fermentations. in *Frontiers in bioprocessing*. pp. 205-219 Boca Raton, FL., CRC Press.
 12. 반재구 1992. 미생물 대사분석을 응용한 생물공정 최적화. *생물화학* **6**(2), 2-11.
 13. 반재구 1994. 대장균의 배양생리와 대사공학. *생명공학동향* **2**(4), 66-77.