

Lactic Acid Bacteria의 동역학 네트워크 모델을 이용한 *in Silico* 모사방법 연구

정의섭, 이해원, 이진원
서강대학교 화공생명공학과

1. 서론

현재 생물 관련 연구들이 해외뿐만 아니라 국내에서도 활발하게 진행 중에 있으며, 생물 관련 연구들 중에는 게놈(genome), 프로테오믹스(proteome), 트랜스크립토믹스(transcriptome), 생물정보학(bioinformatics), 그리고 메타볼로믹스(metabolome) 등이 있다. 이러한 연구들 중 메타볼로믹스(metabolome)를 응용한 학문인 대사공학(metabolic engineering)은 생체현상의 일부에 국한되는 성질이 아닌 생체대사의 전체적인 면을 강조하여 생물 내의 대사 흐름(flux)을 측정, 해석, 조절하는 방법을 다루는 학문이다.

본 연구에서는 식품발효 공정에 많이 이용되는 유산균(lactic acid bacteria)인 *Lactococcus lactis*를 이용하여 기질인 포도당(glucose)으로부터 시작되는 해당과정(glycolysis)과 피루빈산(pyruvate)으로부터 여러 대사물질로 대사되는 발효과정(fermentative metabolism)의 동역학 네트워크 모델을 구축하였다. 새롭게 구축한 모델을 가지고 각 단계에 해당하는 효소들의 반응 속도식을 모사(simulation) 프로그램에 대입하여 컴퓨터상에서 세포내의 대사흐름 및 대사조절에 관한 정보 그리고 각각의 대사물질(metabolite)들의 시간대별 농도변화를 파악할 수 있었다.

2. 모델링

발효식품 산업에서 많이 사용하는 유산균(lactic acid bacteria)은 포도당 또는 유당과 같은 탄수화물을 분해하여 젖산이나 초산과 같은 유기산을 생성하는 균이다. 또한 유산균은 혐기적인 조건에서의 발효는 거의 젖산에서 거의 95%이상 젖산(lactic acid)으로 전환되는 동종발효(homofermentation)가 일어나고, 호기적인 발효의 경우 피루빈산(pyruvate)에서 젖산이외의 부산물인 여러 대사 물질로 전환되는 이종발효(heterofermentation)가 일어난다.

본 연구에서는 *Lactococcus lactis*의 호기적인 조건에서의 이종발효를 모델로 하여 새로운 대사네트워크를 구축하였으며, 이 동역학적 모델을 이용하여 컴퓨터상에서 세포 내 동역학적인 변화를 모사(simulation)하였다. 모델에 사용된 세포 내 효소

반응식들은 여러 문헌상에 보고된 것을 이용하였으며 각 반응식에 포함되어 있는 파라미터는 문헌이나 웹상에서 제시되어진 값들을 이용하였다.

2.1. *Lactococcus lactis*의 대사 네트워크 구축

*Lactococcus lactis*의 경우 혐기와 호기적인 조건에서 모두 잘 자라는 미생물로 알려져 있다. 본 균주의 대사정보는 여러 연구팀에서 연구되어진 자료들을 문헌을 통해 얻었고, 대사회로에 적용되는 네트워크 및 효소에 관련된 정보(KEGG, Biocyc, EMP project, BRENDA)는 문헌과 웹(web)을 통해 얻었다(그림 1).

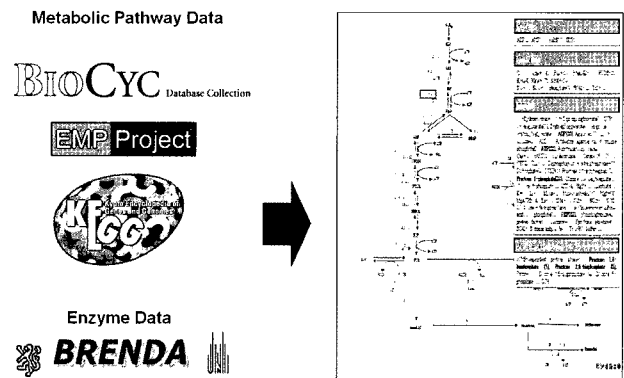


그림 1. *Lactococcus lactis*의 동역학 모델링 구축 방법.

일반적인 미생물에서 중심 대사 네트워크 (central metabolic network)는 크게 해당과정(glycolysis), TCA 회로(tricarboxylic acid cycle), 발효(fermentation) 3가지로 구분할 수 있다. 일반적으로 미생물 생장이 주요 생명활동인 경우 TCA 회로의 중요도가 크나, 본 연구에서는 미생물의 배양이 주목적이 아니기에 해당과정(glycolysis)과 발효 대사과정(fermentation metabolism)을 포함하는 대사 네트워크를 구축하였고 TCA 회로의 대사량은 거의 적다고 가정하였다.

또한 실제 미생물의 대사에는 여러 기질(substrate)들이 사용되나 본 연구에서는 대사에 필요한 기질을 포도당(glucose)으로 제한하였다.

위의 가정들을 바탕으로 호기적인 조건에서의 이종발효(heterofermentation), 즉 젖산(lactate)이외에 아세트산

(acetate), 에탄올(ethanol), 아세트인(actoin), 부탄디올(butanediol)으로 대사되는 총 24개의 중요 반응단계를 선택하여 다음의 대사 네트워크를 구축하였고, 가역반응 16개와 비가역반응 8개, 그리고 분기점(branch point) 4개를 확인할 수 있었다.

본 연구에서 새롭게 구축한 대사 네트워크는 피루빈산(pyruvate)을 중심으로 해당과정(glycolysis) 부분과 발효대사(fermentative metabolism) 부분으로 나누어질 수 있다. 해당과정 부분은 일반적인 미생물의 대사경로를 참고하였고, 발효대사 부분은 Hofnagel이 제시한 대사경로를 기본으로 하였다.

2.2. *Lactococcus lactis* 대사 네트워크에 대한 양론식 구성

본 연구를 통해 구축한 *Lactococcus lactis*균의 호기조건에서의 대사 네트워크 모델을 이용하여 양론식(stoichiometry)을 구성하였다. 앞서 말했듯이 총 24개의 중요 반응단계를 선택하여 대사 네트워크를 구축하였고, 가역반응 16개와 비가역반응 8개 양론식을 구성하였다.

표 1. *Lactococcus lactis* 대사네트워크에 대한 양론식.

Reaction name	Stoichiometry
GLCT	$GLC_6 \rightleftharpoons GLC_5$
HK	$GLC_5 + PEP \rightleftharpoons G6P + PYR$
PGI	$G6P \rightleftharpoons F6P$
PFK	$F6P + ATP \rightleftharpoons F16P + ADP$
ALD	$F16P \rightleftharpoons GAP + DHAP$
GAPDH	$GAP + NADH \rightleftharpoons BPG + NAD$
PGK	$BPG + ADP \rightleftharpoons P3G + ATP$
PGM	$P3G \rightleftharpoons P2G$
ENO	$P2G \rightleftharpoons PEP$
PYK	$PEP + ADP \rightleftharpoons PYR + ATP$
ATPase	$ATP \rightleftharpoons ADP$
TIM	$DHAP \rightleftharpoons GAP$
LDH	$PYR + NAD \rightleftharpoons NADH + LAC$
PDH	$PYR + NAD + COA \rightleftharpoons NADH + ACCOA$
PTA	$ACCOA + P \rightleftharpoons ACP + COA$
ACK	$ACP + ADP \rightleftharpoons AC + ATP$
ACALDH	$ACCOA + NADH \rightleftharpoons ACAL + NAD$
ADH	$ACAL + NADH \rightleftharpoons ETOH + NAD$
ALS	$PYR \rightleftharpoons ACLAC$
ALDC	$ACLAC \rightleftharpoons ACET_1$
ACETDH	$ACET_1 + NAD \rightleftharpoons BUT + NADH$
NOX	$NADH + O_2 \rightleftharpoons NAD$
NEALC	$ACLAC \rightleftharpoons ACET_1$
ACETEFFF	$ACET_1 \rightleftharpoons ACET$

2.3. *Lactococcus lactis*의 효소 반응식과 파라미터 연구

본 연구에서는 가역(reversible)과 비가역(irreversible) Michaelis-Menten equation을 사용하여 모델을 구성하였으며, 이들 대부분은 문헌과 웹을 통하여 수집하였다. 몇 개의 특이적 저해반응을 갖는 특정효소(specific enzyme)의 경우는 각 효소특성에 맞는 반응식을 찾고자 노력하였다. 이들 효소 중에 NEALC의 경우 효소 반응에 의하여 이루어지는 반응이 아니기 때문에 Mass action형태를 통하여 나타내었다.

또한 사용한 효소 반응식들의 파라미터 값들도 역시 문헌을 통해 얻었으며 앞에서 언급한 LDH, PDH, PTA 효소에 대한 파라미터 값들은 모사 프로그램인 GEPASI를 이용하여 구하였다.

2.4. MFA와 MCA 분석 방법

대사 과정에 있어서 세포의 생리적 상태를 측정하는 인자로는 대사 흐름(metabolic flux)을 사용한다. 대사 경로의 흐름을 결정하는 방법에는 대사 흐름 분석(Metabolic Flux Analysis: MFA)이 있다. 대사 흐름 분석에서는 세포 내의 흐름은 세포 내 대사 물질 주위의 물질 수지(material balance)와 주요한 세포 내의 반응들에 대한 양론(stoichiometry)을 사용하여 계산한다. 세포 외의 흐름은 기질의 흡착 속도와 대사 물질의 분비 속도로부터 계산한다. 본 연구에서 MFA를 이용하여 *Lactococcus lactis* 대사 흐름 분석을 계산하여 대사 경로에서의 대사 속도값을 나타낸 대사 흐름 지도를 완성하였다. 또한 미생물을 분석하는 다른 방법으로는 MCA(Metabolic Control Analysis)가 있다. 원하는 대사 물질의 합성 속도를 증가시키고 흐름을 변형하기 위해서는 흐름 조절을 파악하는 것이 중요하다. 흐름 조절을 정량적으로 알기 위해서 도입된 것이 대사 조절 분석(MCA)이다.

대사 조절 분석은 Kacser, Burns 및 Heinrich와 Rapoport에 의해서 개발된 것으로 흐름 조절 계수(Flux Control Coefficient : FCC)에 근거하고 있다. 흐름 조절 계수는 정상상태(steady state)에서 흐름의 변화를 효소 활성의 변화로 나누는 것으로 정의한다. 즉, 효소의 흐름 조절 계수가 클수록 전체 대사에서 효소가 맡고 있는 기여 정도가 크고 이 효소의 활성을 선택적으로 증가시키면 전체 대사가 크게 증폭된다. 본 연구에서는 *Lactococcus lactis* 대사 경로에서 포함된 효소들의 FCC값을 계산하여 대사 흐름 중의 중요 효소(key enzyme)들이 무엇인지 알아내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 정상상태에서 *Lactococcus lactis*의 대사 흐름 분석

본 연구에서는 문헌 조사를 통해 얻은 파라미터를 통해 모사 프로그램인 GEPASI의 time course simulation을 이용하여 포도당(glucose)과 피루빈산(pyruvate)의 10분 간격의 데이터를 얻어낸 후, 이것을 바탕으로 하여 값이 불분명한 상수 값에 대한 조정된 값을 얻어내었다.

평형상태에 도달하기 위한 값을 구하기 위하여 우선 초기 포도당(glucose)의 농도를 2mM을 시작점으로 하여, 문헌에 나온 값과 이미 알려진 값들에 기초로 하고, 몇몇 내부 대사물질의 초기치는 알 수 없으므로, 반응 속도식을 중심으로 바로 앞 단계의 반응 속도의 값과 지나치게 크지 않은 값을 초기값으로 선정하였다. 선정된 초기치를 기반으로 가 정상상태를 구성한 수에 유효숫자 2자리를 기점으로 하여 정상상태(steady state)가 구해지는 초기농도를 결정하였다. 대부분의 파라미터는 문헌과 웹을 통하여 수집 하였으며, 효소들 중 LDH, PDH, PTA에 대한 파라미터의 경우 GEPASI를 통하여 자체적으로 추정된 것을 사용하였다.

3.2. *Lactococcus lactis*의 대사물질의 농도변화

본 연구를 통하여 *Lactococcus lactis* 대사 흐름에 대한 실질적인 세포내 동적 거동의 경우 모사(simulation) 연구를 통하여 알아 볼 수 있었다. 모사(simulation) 프로그램인 GEPASI를 이용하여 세포내 대사물질 중 산업적으로 많이 사용되는 젖산(lactate)의 시간대별 농도변화를 총 1000분 동안 알아보았다. 그림 2는 1000분 동안의 젖산(lactate)농도 변화를 나타내었으며, 그림에서 알 수 있듯이 젖산의 최저 농도는 0.1094mM 이고 최고 젖산의 농도는 0.1135mM인 것으로 나타났으며, 모사를 시작하고 100분 정도가 지나면 젖산의 생산이 일정한 농도를 유지하는 것으로 나타났다.

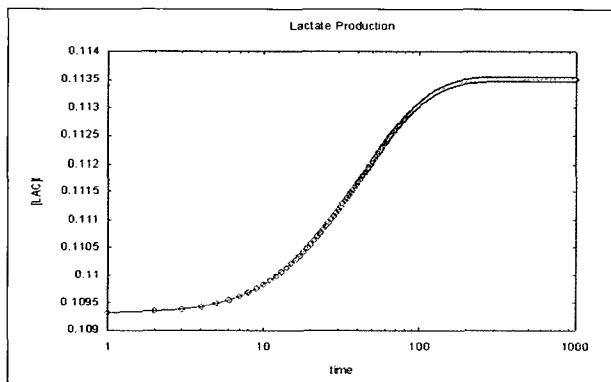


그림 2. 젖산의 시간대별 농도변화 (포도당 20mM일 때).

3.3. *Lactococcus lactis*의 대사 조절 분석

본 연구를 통하여 *Lactococcus lactis* 대사흐름을 분석하는 한편 *Lactococcus lactis* 대사 흐름에 핵심적으로 조절 작용

하는 중요 효소(key enzyme)에 관한 연구도 실시하였다. 중요 효소(key enzyme)의 경우 FCC (flux control coefficient) 값을 구해봄으로써 쉽게 알 수 있었다. 표 3은 본 연구를 통하여 알아본 FCC값을 나타내었다. 그 결과 젖산(lactate)생산에 있어 중요 효소(key enzyme)로 LDH (1.0E-00), PDH (1.0E-00)인 것으로 나타났다.

3. 결론

본 연구에서는 컴퓨터상의 시뮬레이션 접근방법을 통하여 *Lactococcus lactis* 대사 흐름을 분석해 봄으로써 실질적인 lactate 대사흐름에 대하여 분석해 보고자 하였다. 본 연구 수행을 위하여 기존에 보고되고 있는 *Lactococcus lactis* 대사네트워크에 대하여 보다 효과적인 대사 네트워크를 구축 하였다. 본 연구를 통하여, 총 29개의 대사물질, 총 24개의 효소 반응식 (16개의 가역반응과 8개의 비가역반응), 그리고 4개의 분기점으로 구성된 해당과정(glycolysis)과 발효 대사과정(fermentative metabolism)을 기본 바탕으로 하는 *Lactococcus lactis* 대사네트워크를 새롭게 구성하였다. 또한 모사(simulation) 연구 수행을 위하여 효소 반응식과 파라미터에 관한 연구도 함께 수행하였다. 특히 효소 반응식의 경우 문헌자료를 통해 각각의 반응식을 찾아냈으며 문헌상에 나오지 않은 효소의 반응식의 경우 가장 많이 연구되어지고 있는 대장균의 효소 반응식을 참고하였다. 파라미터의 경우에는 문헌상에 나온 파라미터를 참고했으며 Lactate Dehydrogenase (LDH), Pyruvate Dehydrogenase(PDH), Phosphotransacetylase (PTA) 경우엔 자체 fitting작업을 수행함으로써 최적의 모사 시스템 구축에 많은 도움을 주었다.

모사 결과를 통하여 *Lactococcus lactis* 대사 네트워크상에서의 흐름(flux)경향과 분기점(branch point)상에서의 흐름 비율(flux ratio), 대사물질(metabolites)의 농도 변화에 대하여 알아 볼 수 있었다. 대사조절분석(metabolic control analysis) 기법을 통한 중요 효소 반응 단계를 알아본 경우, FCC 값이 1로 예측된 LDH 반응 단계와 PDH 반응 단계가 본 연구의 중요 효소 반응 단계인 것으로 예측 되었다.

본 연구 결과 시뮬레이션의 세부적 흐름 경향과 대사물질 농도 변화 결과를 얻었지만, 이는 미생물의 전체적인 lactate 대사 흐름에 대한 경향을 볼 때 정확한 대사흐름이라 보기가 어렵다. 그러나 이를 보완하기 위해 보다 엄밀한 웹 experiment 수행을 통하여 실질적인 *Lactococcus lactis* 대사 흐름에 대한 정밀도 높은 information을 얻게 될 경우 최적의 *Lactococcus lactis* 대사 시스템을 구축할 수 있을 것으로 보여 진다.

..... 저자약력



《이진원》

- 1987년 서울대학교 공과대학 화학공학과 졸업.
- 1989년 서울대학교 공과대학 화학공학과 공학석사.

- 1993년 미국 Carnegie Mellon University 공학박사.
- 1994년~2005년 02월 광운대학교 화학공학과 교수.
- 2005년 03월~현재 서강대학교 화공생명공학과 부교수.
- 관심분야 : 대사공학, 생물공정공학, 환경미생물학.

• 연락처 : Tel: +82-2-705-8919

Fax: +82-2-702-7926

E-mail: jinwonlee@sogang.ac.kr



《정의섭》

- 2004년 2월 광운대학교 화학공학과 졸업.
- 2004년~현재 서강대학교 석사과정.
- 관심분야 : 대사공학, 생물공정공학, 환경미생물학.

• 연락처 : Tel: +82-2-705-8919

Fax: +82-2-702-7926

E-mail: jara016@sogang.ac.kr



《이혜원》

- 2004년 8월 광운대학교 화학공학과 졸업.
- 2004년~현재 서강대학교 석사과정.
- 관심분야 : 대사공학, 생물공정공학, 환경미생물학.

• 연락처 : Tel: +82-2-705-8919

Fax: +82-2-702-7926

E-mail: heywon80@sogang.ac.kr