

바이오플라스틱 생산 미생물 플랫폼 제작을 위한 대사공학 전략 개발

박시재 · 요킴이코 데이비드 · 메리 그레이스 베일런 · 홍순호* · 오영훈** · 양정은*** · 최소영***
이승환**,† · 이상엽***,†

명지대학교 환경에너지공학과, *울산대학교 화학공학부, **한국화학연구원 바이오화학연구센터,
***한국과학기술원 생명화학공학과
(2014년 3월 24일 접수)

Development of Metabolic Engineering Strategies for Microbial Platform to Produce Bioplastics

Si Jae Park, Yokimiko David, Mary Grace Baylon, Soon Ho Hong*, Young Hoon Oh**, Jung Eun Yang***,
So Young Choi***, Seung Hwan Lee**,†, and Sang Yup Lee***,†

Department of Environmental Engineering and Energy, Myongji University, 116 Myongji-ro, Cheoin-gu, Yongin, Gyeonggido 449-728, Republic of Korea

*Department of Chemical Engineering, University of Ulsan, 93 Daehakro, Nam-gu, Ulsan 680-749, Republic of Korea

**Industrial Biochemicals Research Group, Research Center for Biobased Chemistry, Division of Convergence Chemistry, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, 141 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-600, Republic of Korea

***Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory, Department of Chemical and Biomolecular Engineering (BK21 Program), Center for Systems and Synthetic Biotechnology, and Institute for the BioCentury, KAIST, 291 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 305-701, Republic of Korea

(Received March 24, 2014)

환경오염, 기후변화, 고갈되어가는 화석원료에 대한 문제를 해결하기 위해 재생가능한 자원으로부터 케미칼 및 고분자 등의 산업자원을 생산하는 친환경 공정개발에 많은 연구가 진행되고 있다. 최근에 재생가능한 바이오매스로부터 다양한 케미칼 및 고분자 등을 생산하는 바이오피라이너리 공정이 많은 관심을 받고 있으며, 석유화학기반산업을 보완 혹은 대체할 가능성이 매우 높은 친환경공정으로 생각되고 있다. 본 총설에서는 바이오피라이너리 공정에 핵심적인 촉매로 사용되고 있는 재조합 미생물의 개발의 최근 동향을 바이오피라이너리, 바이오폴리에스터의 생산을 위하여 개발되고 있는 재조합 미생물의 대사공학전략을 중심으로 살펴보고자 한다.

As the concerns about environmental problems, climate change and limited fossil resources increase, bio-based production of chemicals and polymers from renewable resources gains much attention as one of the promising solutions to deal with these problems. To solve these problems, much effort has been devoted to the development of sustainable process using renewable resources. Recently, many chemicals and polymers have been synthesized by biorefinery process and these bio-based chemicals and plastics have been suggested as strong candidates to substitute petroleum-based products. In this review, we discuss current advances on the development of metabolically engineered microorganisms for the efficient production of bio-based chemicals and polymers.

Keywords: Biorefinery, metabolic engineering, recombinant microorganism, biochemical, bioplastic

1. 서 론

지구온난화를 비롯한 전 지구적인 환경문제와 고갈되고 있는 석유 자원문제를 해결하기 위하여 다양한 연구가 진행되고 있는 가운데, 재생가능한 자원인 바이오매스를 이용하여 석유화학유래의 화학물질 및 고분자 등을 대체하는 바이오피라이너리 혹은 바이오화학산업이 현재 큰 관심을 받고 있다[1]. 바이오화학산업은 밸류체인의 구성이 석유화학산업과 매우 비슷하며, 바이오연료 등의 에너지산업의 플랫폼

† Corresponding Author: S. H. Lee, Korea Research Institute of Chemical Technology, Yuseong-Gu, Daejeon 305-600, Korea / S. Y. Lee, KAIST, Yuseong-Gu, Daejeon 305-701, Korea
Tel: +82-42-860-7646, +82-42-350-3970
e-mail: hwanlee@kriict.re.kr, leesy@kaist.ac.kr

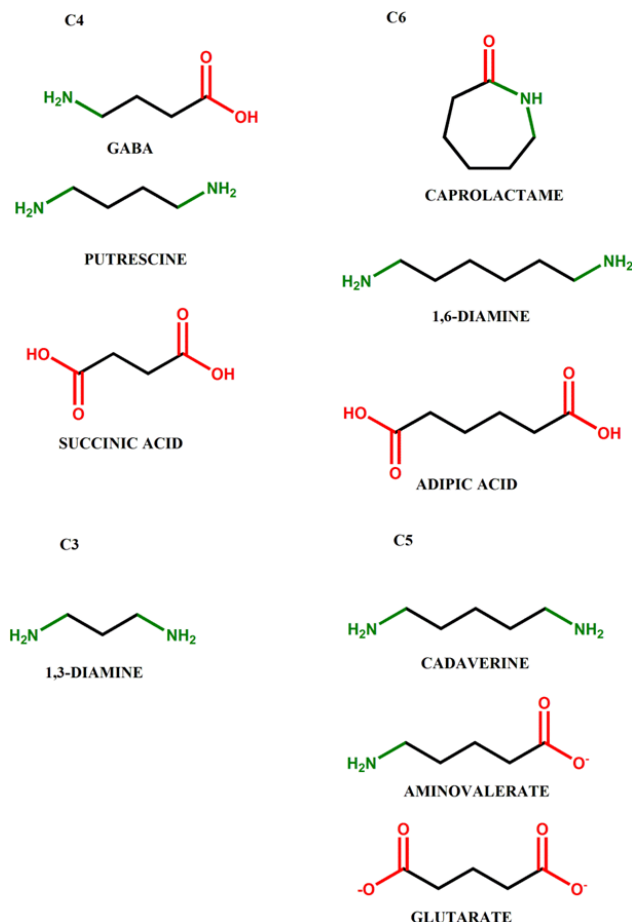


Figure 1. C3–C6 diamines, aminocarboxylic acids, diacids used for the synthesis bio-based nylons.

폼을 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 현재 인프라가 구성되어 있는 화학 산업 전반에 사용될 수 있는 플랫폼 케미칼, 고분자 등 응용제품 등을 생산할 수 있어 기존 석유화학산업의 보완, 대체가 가능한 산업분야로 생각되고 있다. 또한 탄소순환이 가능한 바이오화학산업을 통해 현재 지구온난화에 가장 큰 영향을 미치는 요소로 지목받고 있는 온실가스 중 75% 이상 차지하고 있는 이산화탄소를 효과적으로 감축할 수 있을 뿐 아니라 대기로의 방출을 최소화할 수 있기 때문에, 지구온난화 문제 해결에 바이오화학산업이 더욱 긍정적인 역할을 할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 더욱이, 화석연료 사용에 따른 이산화탄소 배출량은 56%에 다다르고 있는 것을 생각하면, 바이오화학산업이 석유화학 산업을 보완 혹은 대체함으로써 누릴 수 있는 이산화탄소 감축효과는 더욱 크다고 할 수 있다. 탄소발자국(carbon footprint) 관점에서, 탄소순환이 가능한 바이오화학산업을 탄소발자국의 값은 0일 뿐만 아니라 바이오화학산업으로부터 생산되고 제공되는 산업용품 및 에너지의 재활용이 활성화되면 탄소발자국의 값을 마이너스로 만들 수 있기 때문에 바이오화학산업을 온실가스저감의 긍정적 효과는 배가될 수 있다.

바이오매스의 효율적인 이용을 위하여 바이오리파이너리를 구성하고 있는 4개의 플랫폼 기술은 세계경제포럼의 정의에 따르면 다음과 같이 바이오케미컬 플랫폼(biochemical platform), 열화학 플랫폼(thermochemical platform), 미생물 플랫폼(Microorganism platform), 열과 에너지 융합 플랫폼(Combined Heat & Power platform)이며[1], 본 총

설에서는 이 4가지 플랫폼 중 바이오케미컬 및 미생물 플랫폼을 다루려고 한다. 바이오케미컬 및 미생물 플랫폼 기술의 기반이 되는 산업 바이오화학기술(Industrial Biotechnology) 또는 화이트바이오테크놀로지(White Biotechnology)는 대사공학 및 시스템생물공학 등의 발전을 통해 최근 활발히 연구되고 있는 분야이며, 바이오공정에 촉매로 사용되고 있는 미생물 혹은 효소의 개량을 위하여 적용되고 있다. 바이오리파이너리 중 바이오케미컬 및 미생물 플랫폼 공정에는 미생물 혹은 효소 등의 바이오촉매가 공정의 핵심촉매로 투입되기 때문에, 바이오화학산업의 성공을 위해서는 공정에 투입되는 핵심적인 촉매인 미생물 호스트의 목적산물을 생산하는 능력이 매우 중요하고, 미생물 호스트의 목적산물을 생산하는 효율 및 성능이 전체공정의 산업적 타당성 및 효율성에 가장 큰 영향을 미친다. 하지만 자연적인 미생물은 산업의 목적산물의 생산에는 대부분 최적화되어 있지 않고 환경에 적응하여 성장하는 것을 목적으로 하기 때문에, 미생물을 목적산물을 효율적으로 생산하도록 개량하는 것이 필수적이다[2,3]. 이를 위하여 미생물의 대사회로를 목적산물을 생산하는데 최적화할 수 있도록 대사공학적 기술을 도입하여 개량한 후 바이오리파이너리공정에 도입하는 것이 일반적이다[2,3]. 확보된 우수한 미생물 호스트의 공정적용을 통해서 산업화에 가장 핵심적인 요소 중의 하나인 가격경쟁력을 확보해야만 바이오화학산업의 산업경쟁력을 유지할 수 있으며, 이를 통해 기존의 석유화학기반산업을 보완 혹은 대체할 수 있을 것이다.

바이오리파이너리를 통해 생산될 수 있는 대표적인 제품분야는 크게 바이오케미칼, 바이오연료, 바이오플라스틱이다. Dupont와 Tate & Lyle이 성공적으로 1,3-propanediol을 상용화한 이후에 다양한 미생물 대사공학 기술이 바이오연료, 바이오케미칼, 바이오플라스틱을 생산하기 위하여 개발되고 있다. 대표적인 연구성과로 바이오연료 분야에 butanol[4-6], higher alcohol[7], 바이오케미칼 분야에 diamines[8,9], aminocarboxylic acids[10,11], 1,4-butanediol[12], 3-hydroxypropionic acid[13], succinic acid[14-16] 바이오플라스틱 분야에 polylactic acid (PLA)[17-19], polyhydroxyalkanoates (PHAs)[20-23], nylon4[10]와 같은 bionylon 등을 들 수 있다. 본 총설은 이 세가지 분야 중 바이오플라스틱 분야에 적용되고 있는 미생물 플랫폼 개발을 위한 대사공학 전략의 최신동향을 현재 큰 관심을 받고 있는 bionylon과 PLA의 생산공정에 핵심적인 촉매로 적용되고 있는 미생물 호스트의 개량을 중심으로 논의하고자 한다.

2. 바이오나일론

나일론4와 같은 aminocarboxylic acid를 모노머로 사용하거나 퓨트레신(putrescine)이나 카다베린(cadaverine)등의 다이아민(diamine)을 모노머로 사용하는 바이오나일론 합성공정은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫째는 나일론 모노머로 사용될 수 있는 aminocarboxylic acid와 다이아민을 생산하는 미생물공정, 둘째는 미생물공정으로부터 생산된 aminocarboxylic acid와 다이아민을 모노머로 사용하여 나일론을 합성하는 화학공정이다. 효율적인 바이오나일론 생산공정을 개발하기 위해서는 나일론의 모노머를 생산하는 미생물공정 생산공정과 바이오나일론을 합성하는 화학공정의 유기적 연계가 필수적이며, 근본적으로는 미생물공정으로 생산된 aminocarboxylic acid가 화학공정에 성공적으로 적용될 수 있도록 공정을 디자인해야 한다. Figure 1에 나일론 합성에 사용되는 다양한 모노머를 나타내었다.

2.1. Gamma aminobutyric acid (GABA)의 생산

GABA는 단백질 합성에 사용되지 않는 탄소수 4개인 아미노산으로서 사람의 뇌, 눈, 신경계, 혈액에 많이 분포하고 있다고 밝혀져 있다 [24, 25]. GABA는 신경전달물질의 증가시키고, 뇌의 활성을 향상시키는 등의 생리활성물질로서 사용될 수 있기 때문에 신경의 긴장완화 등을 유도하는 식품이나 의약품에 첨가되어 사용되고 있다. 생리활성 물질로서의 응용을 위한 GABA는 인체 내의 독성을 일으킬 수 있는 화학적 생산방법보다는 생물학적 생산방법으로 생산되고 있으며, 미생물을 이용하여 글루코스로부터 직접 GABA를 생산하는 방법은 비교적 비효율적이기 때문에, 아미노산인 글루탐산(*glutamic acid*) 혹은 글루탐산의 염형태인 글루탐산나트륨(*Glutamate sodium salt*, MSG)를 GABA생산의 직접적인 전구체로 사용하는 기술이 활발하게 개발되고 있다. 글루탐산을 GABA로 전환하는데 핵심적인 효소는 글루탐산 탈산화효소(*Glutamate decarboxylase*, GAD)로서 글루탐산에서 이산화탄소를 제거하여 GABA를 만든다. GAD를 이용한 글루탐산의 효소적 전환을 통한 GABA의 생산은 많은 연구자에 의해 보고되고 있다 [26, 27]. GAD의 최적의 반응 pH는 4.5 근처이며, 글루탐산이 GABA로 전환되면서 반응액의 pH가 상승하기 때문에 최적의 pH인 4.5 근처로 유지하기 위해서는 일반적으로 염산, 황산, 초산 등과 같은 산을 반응액에 투입한다. 이러한 반응에서 생성된 염을 제거하기 위하여 이온교환수지 공정, 재결정과 같은 정제공정이 필요하며, GABA 생산단가를 높이는 주원인으로 생각되고 있다. 한국의 바이오벤처기업인 엠에이치투 바이오케미칼(MH2)은 국내특허 10-0857215를 통해 GAD를 이용한 글루탐산의 효율적 전환에 대한 보고를 하였다 [28]. 본 특허에서는 MSG를 GABA의 전구체로 사용하는 대신에 글루탐산을 기질로 사용하여, 반응액의 pH 또한 글루탐산으로 조절하는 방법을 적용하여 염의 발생을 최소화하면서 GABA를 생산하는 기술을 보고하였다. MSG를 사용하여 GABA를 생산하였을 때에는 GABA 단위 중량당 투입된 염산의 양이 0.35로 매우 높았으나, 글루탐산을 사용하였을 때에는 그 값이 0.018로 매우 낮아졌으며, 이 방법으로 생산된 GABA의 최종농도는 240 g/L에 달했다. 양이온교환수지를 이용하여 GABA 생성 반응에서 염을 제거하려는 시도가 최근에 보고되었다. Dinh 등은 0.2 M sodium acetate buffer (pH 4.6)에서 1M의 MSG를 GAD를 이용하여 GABA로 전환하는 반응 중에 양이온교환수지를 교체산으로 직접 반응액에 투입하여 염의 생성을 억제하며 MSG의 GABA로의 전환율을 13%에서 67%로 향상시킨 결과를 발표하였다 [29]. 또한 sodium acetate buffer 대신 물을 반응액으로 사용하였을 때에도 MSG의 전환율이 크게 향상됨을 보여 acidic resin이 반응도중의 pH향상을 억제하여 반응수율을 향상시키는 것을 확인하였다 [29].

GAD를 이용한 효소반응은 효소의 분리정제가 어렵고, 효소의 생산가격이 비교적 높으며, 반응에 피리독살 5'-포스페이트(*pyridoxal 5'-phosphate*, PLP)와 같은 조효소가 필요하기 때문에 이러한 점을 보완하기 위해서 GAD를 발현하는 자연 미생물이나 재조합 미생물을 이용하여 MSG를 전환하여 GABA를 생산하는 기술이 개발되고 있다. *Lactobacillus brevis*를 비롯한 Lactic acid bacteria (LAB)가 효율적으로 MSG를 GABA로 전환하는 것으로 알려져 있으며, *L. brevis* NCL912 균주의 경우에는 유가식 배양을 통해 1 m의 GABA를 생산하는 것으로 보고되었다 [30]. LAB 이외에 GABA 생산을 위해서 GAD를 발현하는 재조합 대장균이 활발하게 연구되고 있다. Le Vo 등은 대장균 유래 GAD, glutamate/GABA antiporter (GadC), GABA aminotransferase (GabT) 등이 GABA 생산시 어떤 영향을 미치는지에 대해 재조합 대장균을 이용하여 규명하였다 [31]. GadC의 경우 배지에 존재하는 MSG의 셀 내부로의 흡수 및 셀 내부에서 생성된 GABA의 배지로의 분비에 영향을 끼치기 때문에 GAD와 동시에 과발현하

여 그것의 영향을 알아보고, GabT는 생성된 GABA를 이용하여 succinic semialdehyde를 만드는 효소이기 때문에 셀에서 제거하여 제거효과를 알아 보았다. gabT 뮤턴트 균주에서 GAD와 GadC를 동시에 발현하였을 때 10 g/L의 MSG로부터 5.46 g/L의 GABA가 생성되었으며 MSG의 GABA로의 전환수율은 89.5%에 달했다 [31]. 또한 protein-protein interaction을 이용하여 제작된 GAD와 GadC의 synthetic protein complex를 통하여 5.65 g/L의 GABA를 10 g/L의 MSG로부터 93%의 전환수율로 생산할 수 있었으며, 특히 초기배양단계에서 2.5배 높은 GABA 전환율을 얻을 수 있었다 [32]. 대장균 유래의 GAD 이외에도 *Neurospora crassa* OR74A 유래 GAD를 발현하는 재조합 대장균 또한 5.25 g/L의 GABA를 10 g/L의 MSG로부터 86.2%의 전환수율로 생성되는 것이 보고되었으며, 이러한 보고를 통해 다양한 유래의 GAD가 GABA전환 재조합 균주 개발에 이용될 수 있음을 알 수 있다 [33].

재조합 미생물을 이용하여 생산된 GABA가 생리활성물질이 아닌 바이오화학산업의 케미칼로서 사용되기 위해서는 화학합성공정에 성공적으로 적용되어야 하며, 효율적인 바이오폴리머 생산공정 개발을 위해서는 효율적인 고분자 모노머 생산공정이 개발되어야 한다. 또한, 바이오공정을 통해 생산된 고분자 모노머가 성공적으로 화학공정에 적용될 수 있어야 한다. Park 등은 재조합 대장균을 이용하여 대량생산된 GABA가 내열성플라스틱인 나일론4의 모노머로 사용될 수 있음을 보고하였다 [10]. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II1403 GadB를 발현하는 재조합 대장균을 유가식 배양을 통해서 고농도로 배양한 다음 생축매로 사용하여 고농도의 MSG를 GABA로 전환하는 기술을 개발하였다. *L. lactis* subsp. *lactis* II1403 GadB를 발현하는 재조합 대장균 XL1-Blue를 유가식 배양을 통해 OD₆₀₀에서 100까지 배양한 다음 200 g/L의 MSG를 전환한 결과 76.2 g/L의 GABA를 62.4%의 전환율로 생산할 수 있었고, 이렇게 생산된 GABA는 Al₂O₃를 촉매로 사용하여 톨루엔에서 화학반응을 이용하여 96%의 전환율로 2-피롤리돈 (2-pyrrolidone)으로 전환될 수 있었다. 최종적으로 GABA를 이용하여 생산된 2-피롤리돈을 이용하여 분자량이 200,000 ~ 330,000인 나일론4를 합성할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 바이오공정과 화학공정이 융합된 하이브리드 공정을 이용하여 석유화학유래 고분자를 대체할 수 있는 바이오매스 유래 고분자를 생산할 수 있는 가능성이 제시되었다. 또한 GABA로부터 생산된 2-피롤리돈은 석유화학산업의 중요한 플랫폼 케미칼로서 NMP, GBL 등의 C4케미칼의 전구체로 사용될 수 있기 때문에 바이오리파이너리의 산업적 가능성을 볼 수 있다.

2.2. 5-Aminovaleric acid (5AVA)의 생산

5AVA는 탄소수가 5개인 aminocarboxylic acid로서 *Pseudomonas putida*의 라이신(L-lysine) 분해 대사회로의 중간 대사산물이다. 5AVA는 glutarate, 5-hydroxyvalerate, 1,5-pentanediol, valerolactam 등의 다양한 C5 케미칼의 플랫폼 케미칼로서 사용될 수 있기 때문에 최근 관심을 받고 있으며, 나일론5와 같은 바이오나일론의 모노머로도 사용이 가능하다. *P. putida*에서 5AVA는 lysine 2-monooxygenase (DavB)와 delta-aminovaleamidase (DavA)의 두 효소에 의해서 L-lysine으로부터 만들어지지만, *P. putida*의 aminovaleate 대사회로에 의해 5AVA는 glutarate로 전환되어 최종적으로는 TCA cycle에 사용되기 때문에 자연적인 *P. putida* 균주에서의 5AVA 생성은 미미한 편이다. 최근 Park 등은 5AVA의 생산을 위한 재조합 대장균 균주개발에 대한 보고를 한 바 있다 [11]. 이 연구에서 *P. putida* 유래 lysine 2-monooxygenase (DavB) and delta-aminovaleamidase (DavA)를 발현하는 재조합 대장균 WL31-10을 개발하였으며, 이 재조합 대장균은 10 g/L의 L-lysine으로부터 3.6

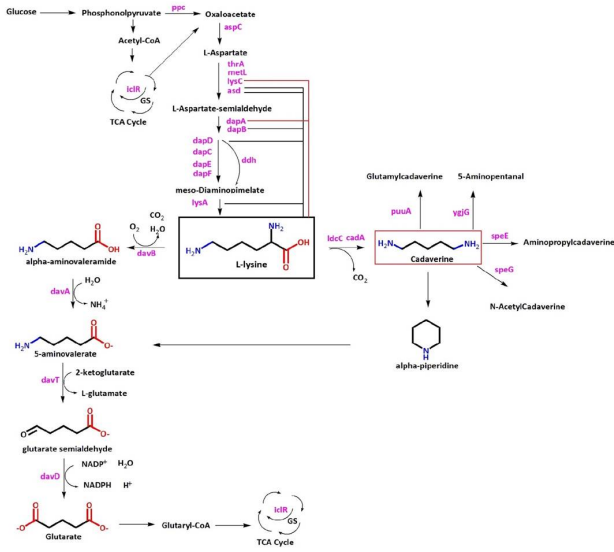


Figure 2. Metabolic pathways engineered to produce 5AVA, glutarate, and cadaverine using L-lysine as a precursor in recombinant *Escherichia coli*[9,11].

g/L의 5AVA를 생산하였다. 5AVA aminotransferase (GabT), glutarate semialdehyde dehydrogenase (GabD)를 DavA, DavB와 동시에 발현한 결과 10 g/L의 L-lysine으로부터 1.7 g/L의 glutarate를 생산할 수 있었다. 또한 L-lysine의 생산회로가 강화되어 글루코스로부터 L-lysine 생산 능력이 강화된 재조합 대장균 균주 XQ56에 DavA와 DavB를 발현한 결과 0.27 g/L와 0.5 g/L의 5AVA가 회분식 배양과 유가식 배양을 통해 글루코스로부터 생산될 수 있었다[11].

이 결과에서 보듯이 글루코스로부터의 5AVA 생산은 아직까지는 효율적이지 않은 상태이고 균주의 대사공학적 개량을 통해 효율의 향상을 이루어야 하는 상태이다. 특히 글루코스로부터 5AVA의 전구체인 L-lysine 생산 대사회로를 강화해서 L-lysine의 효율적인 생산이 이루어져야만, 5AVA의 효율적인 생산이 가능할 것으로 생각된다. Figure 2에 라이신으로부터 5AVA, 카다베린, C5케미칼을 생산하기 위해 재조합 대장균에서 개발된 대사회로를 나타내었다.

5AVA는 L-lysine으로부터 효율적으로 생산될 수 있기 때문에 GABA의 대량생산방법과 비슷한 기술을 개발한다면 5AVA의 대량생산 또한 가능할 것으로 생각된다. 이를 통해 효율적인 바이오매스 유래 나일론 5합성공정의 개발을 이룰 수 있을 것으로 기대한다.

3. 바이오플리에스터

3.1. Polylactic acid (PLA)

Polylactic acid (PLA)는 lactic acid를 생산하는 바이오공정과 lactic acid를 lactide로 전환하여 Ring opening polymerization (ROP)을 통해 고분자량 PLA를 합성하는 화학합성공정으로 이루어진 하이브리드공정으로 생산되고 있으며, 현재 상용화되어 있는 바이오플라스틱 중 시장성이 가장 높다. 카길의 자회사인 네이처웍스에 의해 상용화된 PLA 합성공정은 개략적으로 바이오공정인 미생물발효공정 1단계와 화학공정 2단계인 총3단계로 구성되어 있다[19](Figure 3). 첫째, LAB의 발효를 통한 calcium lactate, sodium lactate, ammonium lactate 등과 같은 lactate salt 생산 미생물 공정, 둘째, 생산된 lactate salt를

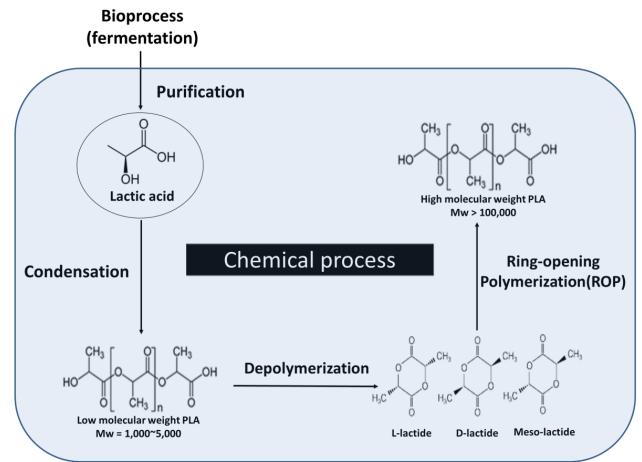


Figure 3. Hybrid process consisting of bio and chemical processes for the synthesis of high molecular weight PLA. Lactic acid derived from microbial fermentation is used for the synthesis of lactides that is finally used for ROP to produce PLA. The chemical process is composed of mainly three steps; condensation, depolymerization and ROP[17-19].

polymer-grade lactic acid의 형태로 분리 정제한 후, 이것을 이용한 lactide 제조공정, 셋째, lactide의 ROP를 통한 분자량이 100,000 이상인 high-molecular-weight PLA를 합성공정으로 구성되어 있다. 미생물 발효공정에 호스트균주로 이용되는 LAB이 주로 약간의 D-lactic acid가 포함된 L-lactic acid를 생산하기 때문에 네이처웍스에 의해 상용화된 PLA는 L-PLA이다.

3.2. In vivo synthesis of lactate containing polyester in recombinant microorganisms

3.2.1. 재조합 대장균에서 lactate containing polyester 생산을 위한 기본대사회로 구축

네이처웍스에 의해 상용화된 PLA 공정은 바이오공정과 화학공정의 하이브리드공정으로서 미생물발효에 의해 생산된 lactic acid를 화학공정에 이용하여 PLA를 합성한다. 최근 이러한 공정과는 다르게 미생물 내부에 PLA를 비롯한 lactate를 모노머로 함유한 폴리에스터를 축적하는 대사공학적으로 개량된 재조합 미생물이 보고되었다. 미생물 내부에 축적되는 대표적인 폴리에스터는 폴리하이드록시알칸산 (polyhydroxyalkanoates, PHAs)으로 연구가 가장 많이 된 PHA는 poly-(3-hydroxybutyrate)[P(3HB)]이다[20-23]. PHA는 미생물이 질소, 산소, 인 등의 성장에 필요한 원소가 부족하면서 탄소원이 풍부할 때 에너지 및 환원력의 저장을 위하여 미생물 내부에 축적하는 자연적인 폴리에스터 물질이다[20-23]. PHA의 모노머로 알려진 것은 현재까지 150종 이상이며, 대부분의 모노머들은 3,4,5,6-hydroxyalkanoate (HA)들이다[34]. 대표적인 PHA의 모노머로 활발히 연구되고 있는 것들은 3-hydroxybutyrate (3HB), 4-hydroxybutyrate (4HB), 3-hydroxypropionate (3HP), 탄소수가 6개에서 12개 사이인 중간사슬길이의 3-hydroxyalkanoate들이 있다[34]. PHA를 합성하는 대사회로는 크게 두 가지로 구성되어 있다[20-23]. PHA를 합성하는데 가장 핵심적인 역할을 하는 효소는 PHA synthase로서 다양한 hydroxyacyl-CoA (HA-CoA)를 기질로 받아들여서 해당모노머를 함유한 폴리에스터를 합성한다. 따라서 PHA를 합성하기 위해서는 PHA synthase의 HA-CoA를 이용한 고분자 합성공정과 PHA synthase의 기질로 사용될 수 있는 다양한

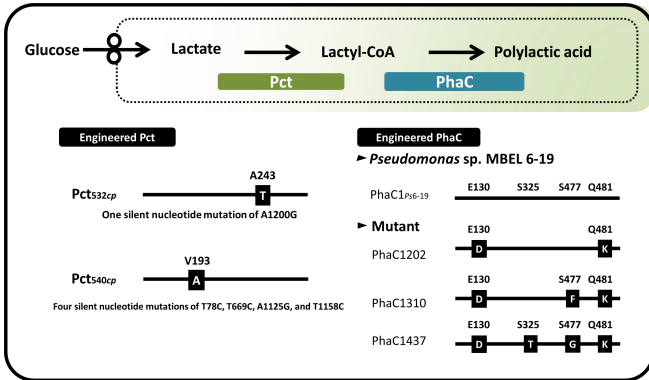


Figure 4. Key enzymes, engineered *C. propionicum* Pct and *Pseudomonas sp. MBEL 6-19* PhaC1 for biosynthesis of lactate containing polyesters. Pct532_{cp}, Pct540_{cp} are mutants derived from propionate CoA transferase of *C. propionicum*. The black boxes represent modifications of amino acid. Pct532_{cp} has a change of amino acid at A243 and one silent mutation of A1200. Pct540_{cp} has a change of amino acid at V193A and four silent mutations of T78C, T669C, A1125G, and T1158C [35,36,46]. Figure was adopted and modified from ref. 46.

HA-CoA를 합성하고 제공하는 대사회로가 필요하다. 또한 PHA synthase는 다양한 HA-CoA들 중 기질특이성에 적합한 HA-CoA만 기질로 받아들이기 때문에 고분자의 모노머 조성 또한 PHA synthase에 의해 조절되며, 특히 HA-CoA 중 만약에 하이드록시기 있는 탄소가 광학적인 성질을 보유할 때에는 오직 (R)형의 HA-CoA만 기질로 받아들이는 특징을 보유한다. 따라서 PHA 모노머는 모두 (R)형이다.

미생물 내부에 PLA를 비롯한 lactate-containing polyester를 합성하여 축적하는 대사회로는 PHA 생산 대사회로를 개량하여 제작되었다 [35,36]. Lactate containing polyester를 합성하기 위해서는 위에서 언급했듯이 두 가지 필수적인 대사회로가 필요하다. 첫째는 lactyl-CoA를 합성하는 대사회로이며, 둘째는 lactyl-CoA를 기질로 사용할 수 있는 PHA synthase이다. 현재까지 알려진 PHA synthase들은 lactyl-CoA와 같이 2-hydroxyacyl-CoA를 기질로 받아들일 수 없기 때문에 [37, 38], lactate containing polyester를 합성하기 위해서는 PHA synthase의 개량이 필수적이었다 [35,36].

Yang 등은 lactate containing polyester를 합성하는 재조합 미생물을 제작하기 위해서 위의 두가지 대사회로를 재조합 대장균을 통해 검증하였다 [36]. Lactyl-CoA를 합성하기 위해서 *Clostridium propionicum* propionyl-CoA transferase (Pct)를 도입하였다. Pct는 propionyl-CoA로부터 CoA를 떼어서 lactate에 전달하여 lactyl-CoA를 합성하는 역할을 하는 효소로 *Clostridium propionicum*에서는 alanine fermentation 대사회로에서 중요한 역할을 한다 [39]. 자연적으로는 propionyl-CoA를 CoA 공여체로 사용하지만 재조합 대장균에서는 주로 acetyl-CoA를 CoA 공여체로 사용하는 것으로 알려져 있다 [39]. 또한 lactyl-CoA를 기질로 사용하는 PHA synthase의 개발을 위하여 *Pseudomonas sp. MBEL 6-19* 유래 PHA synthase I (PhaC1)을 아미노산 치환을 통해 개량하였고, 다양한 *Pseudomonas sp. MBEL 6-19* PhaC1의 돌연변이체를 제작하였다 [36].

이러한 두 효소를 재조합 대장균 XL1-Blue에서 발현하였을 때 lactate를 모노머로 함유한 poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate)[P(3HB-co-LA)]를 합성할 수 있었고, lactate의 모노머 조성은 배양조건 및 도

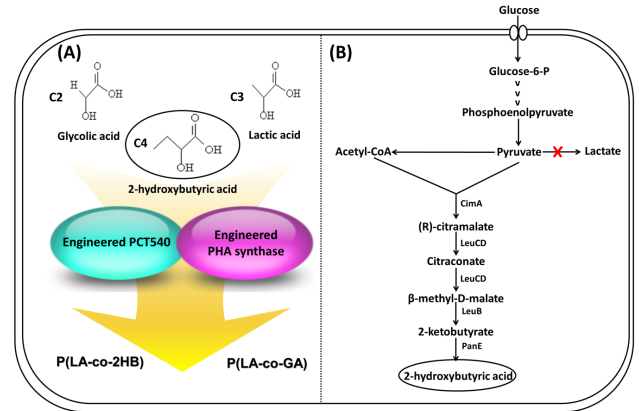


Figure 5. Broadened carbon numbers of 2-hydroxyacids that are used for the synthesis of 2HA containing polyesters by metabolic engineering of recombinant *Escherichia coli*. (A) C2; Glycolic acid, C3; lactic acid and C4; 2-hydroxybutyric acid monomer used in the lactate based copolymer. (B) Metabolic pathways for the production of PHAs containing 2HB monomer [42]. Cross marks represent blocked pathway.

입된 PhaC1의 돌연변이 종류에 따라 다른 것으로 밝혀졌다 [36]. 또한 Pct는 발현되었을 때 미생물 대사의 핵심적인 대사물질인 acetyl-CoA를 CoA 공여체로 사용하기 때문에 미생물의 성장을 저해하는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 연구에서는 Pct의 개량을 통해 P(3HB-co-LA) 생산성을 향상시켰다 [36] (Figure 4). PhaC1의 돌연변이를 제작할 때 돌연변이의 대상이 되는 아미노산은 E130, S325, S477, Q481로서 Yang 등은 이 네 가지 아미노산이 *Pseudomonas* 유래 PHA synthase가 lactyl-CoA에 대한 기질특이성을 보유하는데 큰 영향을 미치는 것으로 보고하였다 [40] (Figure 4).

재조합 대장균에서 PLA 호모폴리머를 생산하기 위해서는 PLA의 모노머인 lactate가 효율적으로 생산되어야 하며, 생산된 lactate가 lactyl-CoA를 통해 효율적으로 lactyl-CoA를 기질로 사용하는 PHA synthase에 제공되어야만 한다. Jung 등은 재조합 대장균 XL1-Blue의 대사회로를 lactate를 효율적으로 생산하도록 개량함으로써 PLA 호모폴리머를 합성하는 대사회로를 구축할 수 있었다 [35,41]. Lactate의 생산을 강화하기 위하여 lactate를 합성하는데 필수적인 lactate dehydrogenase (LdhA) 유전자의 프로모터를 크로모솜 상에서 강한 프로모터인 trc 프로모터로 치환하였다. 또한 lactate 생산대사회로의 경쟁회로인 아세트산, 에탄올, 숙신산 생산대사회로를 제거하기 위하여 ackA, pflB, frdABCD, adhE 등의 유전자를 크로모솜 상에서 제거하였으며, CoA 공여체의 증가를 위하여 acetate를 이용하여 acetyl-CoA를 합성하는 acs 유전자의 프로모터를 trc 프로모터로 치환하였다. 이러한 재조합 균주의 개발을 통해 PLA 호모폴리머를 성공적으로 셀 내부에 축적하여 생산할 수 있었다 [35,41].

3.2.2. 재조합 대장균에서 2-hydroxyacid를 함유한 polyester 생산을 위한 대사회로 구축

PHA synthase는 기본적으로 매우 넓은 기질특이성을 보유하고 있기 때문에, lactate 이외에 다른 2-hydroxyacid를 모노머로 함유하는 폴리에스터를 생산할 가능성이 매우 높다 (Figure 5). Park 등은 lactate-containing PHA를 생산하는 재조합 대장균에서 2-hydroxybutyryl-CoA

(2HB-CoA)를 생산하는 대사회로를 제작함으로써 2HB를 모노머로 함유하는 폴리에스터를 합성하는 재조합 대장균을 제작하였다[42,43] (Figure 5). 2HB의 전구체로 2-ketobutyrate를 이용할 수 있는데, 이 연구에서 2-ketobutyrate를 2HB로 전환하기 위해서 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Il1403 D-2-hydroxyacid dehydrogenase (PanE)를 이용하였고, 글루코스로부터 2-ketobutyrate를 합성하기 위해서 citramalate pathway를 구성하는 *Methanococcus jannaschii* citramalate synthase (CimA)와 *E. coli* LeuBCD를 발현하였다[42]. CimA, LeuBCD, PanE를 통해 생산된 2HB는 Pct에 의해 2HB-CoA로 전환된 후 PHA synthase에 의해 기질로 이용되어 2HB가 모노머로 함유된 폴리에스터를 합성할 수 있었다. CimA, LeuBCD, PanE, Pct, PhaC1437을 동시에 발현하는 재조합 대장균 XL1-Blue를 20 g/L의 글루코스와 2 g/L의 sodium 3-hydroxybutyrate를 함유하고 있는 제한배지에서 배양하였을 때 2HB, 3HB, lactate를 모노머로 함유하는 고분자를 성공적으로 합성할 수 있었다 [42]. Citramalate pathway를 이용하는 것과는 별도로 Park 등은 propionyl-CoA를 2-ketobutyrate의 전구체로 이용하는 대사회로를 구축하였고, propionate를 이용한 2HB containing PHA를 합성하는 재조합 대장균을 제작하였다[43]. Propionyl-CoA synthase (PrpE), PanE, Pct, PhaC-1437을 동시에 발현하는 재조합 대장균 XL1-Blue를 20 g/L의 글루코스, 2 g/L의 sodium 3-hydroxybutyrate, 1 g/L의 sodium propionate를 함유하고 있는 제한배지에서 배양하였을 때 2HB, 3HB, lactate를 모노머로 함유하는 고분자를 성공적으로 합성할 수 있었다.

3.2.3. 재조합 *Ralstonia eutropha*에서 2-hydroxyacid를 함유한 polyester 생산을 위한 대사회로 구축

*Ralstonia eutropha*는 PHA를 효율적으로 합성하는 균주 중의 하나로 PHA 합성을 위하여 많은 연구가 진행되고 있는 균주이다. Park 등은 *R. eutropha*를 lactyl-CoA를 기질로 사용하는 PhaC1과 lactyl-CoA를 합성하는 Pct를 발현하도록 대사공학적으로 개량함으로써 lactate 및 2HB를 모노머로 함유하는 PHA를 합성하는 재조합 *R. eutropha*를 제작할 수 있었다[44-46]. 재조합 *R. eutropha*를 2HB 및 lactate가 함유된 배지에서 배양하였을 때 2HB 및 lactate가 모노머로 함유된 고분자를 생산할 수 있었으며, 대장균 유래의 lactate dehydrogenase (ldhA)의 발현을 통해 lactate를 배지에 첨가하지 않고도 글루코스로부터 직접 lactate를 합성하여 lactate-containing PHA를 합성할 수 있도록 하였다 [45].

4. 맺음말

본 총설에서는 바이오리파이너리 및 바이오화학산업의 핵심적인 생산물질 중의 하나인 바이오 플라스틱 생산기술에 적용되는 미생물의 대사공학적 개량을 위한 전략 등에 대해서 살펴보았다. 바이오리파이너리의 성공적인 산업화를 위해서는 기존 석유화학산업의 인프라에 효율적으로 적용되어야 할 뿐 아니라, 생산물질의 생산성, 물성 등이 석유화학산업 유래의 물질들과 동등하거나 우수해야 함은 당연하다. 이를 위해서는 바이오공정에 핵심축매로 사용되는 미생물 호스트 균주의 우수성이 확보되어야만 하며, 시스템 생물공학 기반의 대사공학 전략 개발이 핵심적인 역할을 할 것으로 기대한다. 또한 바이오공정만을 단독으로 개발하는 것이 아니라 기술개발 초기부터 석유화학산업의 니즈를 파악하고, 석유화학산업의 인프라에 어떻게 적용할 지를 고민하면서 목적산물의 생산공정을 개발해야 할 것이다[1-3].

본 총설에서 살펴보았듯이, 대사공학적으로 개량된 우수한 미생물

호스트 균주들이 석유화학산업과 성공적으로 융합된 바이오리파이너리 공정 개발에 핵심적인 역할을 할 것은 자명하고, 이를 위한 대사공학 전략개발연구에 집중해야 할 것이다.

감 사

This work was supported by the Technology Development Program to Solve Climate Changes (Systems Metabolic Engineering for Biorefineries) from the Ministry of Science, ICT and Future Planning (MS-IP) through the National Research Foundation (NRF) of Korea (NRF-2012-C1AAA001-2012M1A2A2026556) and Industrial Strategic Technology Development Program (10047910, Production of biobased cadaverine and polymerization of Bio-polyamide 510) funded by the Ministry of Trade, Industry & Energy (MOTEL, Korea).

참 고 문 헌

1. The future of industrial biorefineries, World Economic Forum report (2010).
2. J. W. Lee, D. Na, J. M. Park, J. Lee, S. Choi, and S. Y. Lee, Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 536-546 (2012).
3. J. H. Park, S. Y. Lee, T. Y. Kim, and H. U. Kim, Application of systems biology for bioprocess development, *Trends Biotechnol.*, **26**, 404-412 (2008).
4. S. Atsumi and J. C. Liao, Directed evolution of *Methanococcus jannaschii* citramalate synthase for biosynthesis of 1-propanol and 1-butanol by *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 7802-7808 (2008).
5. Y. S. Jang, J. Lee, A. Malaviya, D. Y. Seung, J. H. Cho, and S. Y. Lee, Butanol production from renewable biomass: Rediscovery of metabolic pathways and metabolic engineering, *Biotechnol. J.*, **7**, 186-198 (2012).
6. Y. S. Jang, J. Y. Lee, J. Lee, J. H. Park, J. A. Im, M. H. Eom et al. Enhanced butanol production obtained by reinforcing the direct butanol-forming route in *Clostridium acetobutylicum*, *MBio.*, **3**, 00314-12 (2012).
7. K. Zhang, M. R. Sawaya, D. S. Eisenberg, and J. C. Liao, Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 20653-20658 (2008).
8. Z. G. Qian, X. X. Xia, and S. Y. Lee, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of putrescine: a four carbon diamine, *Biotechnol. Bioeng.*, **104**, 651-662 (2009).
9. Z. G. Qian, X. X. Xia, and S. Y. Lee, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine: a five carbon diamine, *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 93-103 (2011).
10. S. J. Park, E. Y. Kim, W. Noh, Y. H. Oh, H. Y. Kim, and B. K. Song, Synthesis of nylon 4 from gamma-aminobutyrate (GABA) produced by recombinant *Escherichia coli*, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **36**, 885-892 (2013).
11. S. J. Park, E. Y. Kim, W. Noh, H. M. Park, Y. H. Oh, and S. H. Lee, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 5-aminovalerate and glutarate as C5 platform chemicals, *Metab. Eng.*, **16**, 42-47 (2013).

12. H. Yim, R. Haselbeck, W. Niu, C. Pujol-Baxley, A. Burgard, and J. Boldt, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 445-452 (2011).
13. C. Rathnasingh, S. M. Raj, J. E. Jo, and S. Park, Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol, *Biotechnol. Bioeng.*, **104**, 729-739 (2009).
14. S. H. Hong, J. S. Kim, S. Y. Lee, Y. H. In, S. S. Choi, J. K. Rih, C. H. Kim, H. Jeong, C. G. Hur, and J. J. Kim, The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*, *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1275-1281 (2004).
15. S. J. Lee, H. Song, and S. Y. Lee, Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production, *Appl. Environ. Microb.*, **72**, 1939-1948 (2006).
16. H. Song and S. Y. Lee, Production of succinic acid by bacterial fermentation, *Enzyme Microb. Technol.*, **39**, 352-361 (2006).
17. R. E. Drumright, P. R. Gruber, and D. E. Henton, Polylactic acid technology, *Adv. Mater.*, **12**, 1841-1846 (2000).
18. R. Mehta, V. Kumar, H. Bhunia, and S. N. Upadhyay, Synthesis of poly(lactic acid): a review, *Polym. Rev.*, **45**, 325-349 (2005).
19. E. T. H. Vink, K. R. Rabago, D. Glassner, and P. R. Gruber, Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide(PLA) production, *Polym. Degrad. Stab.*, **80**, 403-419 (2003).
20. S. Y. Lee, Bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 1-14 (1996).
21. X. Gao, J. C. Chen, Q. Wu, and G. Q. Chen, Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 768-774 (2011).
22. L. L. Madison and G. W. Huisman, Metabolic engineering of poly-(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 21-53 (1999).
23. S. J. Park, T. W. Kim, M. K. Kim, S. Y. Lee, and S. C. Lim, Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters, *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1196-1206 (2012).
24. E. Roberts and S. Frankel, Glutamic acid decarboxylase in brain, *J. Biol. Chem.*, **188**, 789-795 (1951).
25. H. C. Stanton, Mode of action of gamma aminobutyric acid on the cardiovascular system, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **143**, 195-204 (1963).
26. S. H. Kim, B. H. Shin, Y. H. Kim, S. W. Nam, and S. Y. Jeon, Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus brevis* BH2, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **12**, 707-712 (2007).
27. Q. Wang, Y. Xin, F. Zhang, Z. Feng, J. Fu, L. Luo, and Z. Yin, Enhanced γ -aminobutyric acid-forming activity of recombinant glutamate decarboxylase (gadA) from *Escherichia coli*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 693-700 (2011).
28. 김민홍, 효소를 이용한 고순도 감마 아미노 부틸산의 제조방법 국내등록특허 10-0857215 (2008).
29. T. H. Dinh, N. A. T. Ho, T. J. Kang, K. A. McDonald, and K. Won, Salt-free production of γ -aminobutyric acid from glutamate using glutamate decarboxylase separated from *Escherichia coli*, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, DOI: 10.1002/jctb.4251 (2013).
30. H. Li, T. Qiu, G. Huang, and Y. Cao, Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation, *Microb. Cell. Fact.*, **9**, 85-92 (2010).
31. T. D. Le Vo, T. W. Kim, and S. H. Hong, Effects of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter on the bioconversion of GABA in engineered *Escherichia coli*, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **35**, 645-650 (2012).
32. T. D. Le Vo, J. S. Ko, S. J. Park, S. H. Lee, and S. H. Hong, Efficient gamma-aminobutyric acid bioconversion by employing synthetic complex between glutamate decarboxylase and glutamate/GABA antiporter in engineered *Escherichia coli*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 927-933 (2013).
33. T. D. Le Vo, J. S. Ko, S. H. Lee, S. J. Park, and S. H. Hong, Overexpression of *Neurospora crassa* OR74A glutamate decarboxylase in *Escherichia coli* for efficient GABA production, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **18**, 1062-1066 (2013).
34. A. Steinbuchel and H. E. Valentin, Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids, *FEMS Microbiol. Lett.*, **128**, 219-228 (1995).
35. Y. K. Jung, T. Y. Kim, S. J. Park, and S. Y. Lee, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers, *Biotechnol. Bioeng.*, **105**, 161-171 (2010).
36. T. H. Yang, T. W. Kim, H. O. Kang, S. H. Lee, E. J. Lee, S. C. Lim, S. O. Oh, A. J. Song, S. J. Park, and S. Y. Lee, Biosynthesis of polylactic acid and its copolymers using evolved propionate CoA transferase and PHA synthase, *Biotechnol. Bioeng.*, **105**, 150-160 (2010).
37. W. Yuan, Y. Jia, J. Tian, K. D. Snell, U. Muh, A. J. Sinskey, R. H. Lambalot, C. T. Walsh, and J. Stubbe, Class I and III polyhydroxyalkanoate synthases from *Ralstonia eutropha* and *Allochromatium vinosum*: characterization and substrate specificity studies, *Arch. Biochem. Biophys.*, **394**, 87-98 (2001).
38. S. Zhang, M. Kamachi, Y. Takagi, R. W. Lenz, and S. Goodwin, Comparative study of the relationship between monomer structure and reactivity for two polyhydroxyalkanoate synthases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 131-136 (2001).
39. T. Selmer, A. Willanzheimer, and M. Hetzel, Propionate CoA-transferase from *Clostridium propionicum*. Cloning of gene and identification of glutamate 324 at the active site, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 372-380 (2002).
40. T. H. Yang, Y. K. Jung, H. O. Kang, T. W. Kim, S. J. Park, and S. Y. Lee, Tailor-made type II *Pseudomonas* PHA synthases and their use for the biosynthesis of polylactic acid and its copolymer in recombinant *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 603-614 (2011).
41. Y. K. Jung and S. Y. Lee, Efficient production of polylactic acid and its copolymers by metabolically engineered *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, **151**, 94-101 (2011).
42. S. J. Park, T. W. Lee, S. C. Lim, T. W. Kim, H. Lee, M. K. Kim, S. H. Lee, B. K. Song, and S. Y. Lee, Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing 2-hydroxybutyrate from unrelated carbon source by metabolically engineered *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 273-283 (2012).
43. S. J. Park, K. H. Kang, H. Lee, A. R. Park, J. E. Yang, Y. H. Oh, B. K. Song, J. Jegal, S. H. Lee, and S. Y. Lee, Propionyl-CoA dependent biosynthesis of 2-hydroxybutyrate containing polyhydroxyalkanoates in metabolically engineered *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, **165**, 93-98 (2013).
44. S. J. Park, S. Y. Lee, T. W. Kim, Y. K. Jung, and T. H. Yang, Biosynthesis of lactate-containing polyesters by metabolically engineered bacteria, *Biotechnol. J.*, **7**, 199-212 (2012).
45. S. J. Park, J. A. Jang, H. Lee, A. R. Park, J. E. Yang, J. Shin, Y. H. Oh, B. K. Song, J. Jegal, S. H. Lee, and S. Y. Lee, Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the biosynthesis of 2-hy-

- droxyacid containing polyhydroxyalkanoates (PHAs), *Metab. Eng.*, **20**, 20-28 (2013).
46. J. E. Yang, S. Y. Choi, J. H. Shin, S. J. Park, and S. Y. Lee, Microbial production of lactate-containing polyesters, *Microb. Biotechnol.*, **6**, 621-636 (2013).