최신 연구동향

바이오 셀룰로오스 생산을 위한 미생물 개량 연구 동향

KAIST 정기준 교수, 허동훈 박사과정

1. 개요

셀룰로오스(cellulose)는 전세계적으로 가장 많이 생산되는 바이오폴리머이다. 셀룰로오스는 포도당(glucose)를 단위체로 하는 선형 고분자이며, 주로 식물체 내에서 생산된다고 알려져있다. 식물계 셀룰로오스는 높은 인장강도와 탄성계수를 갖고 있어 다양한 산업분야에 응용되고자 연구가 진행되고 있으나, 식물 유래 셀룰로오스는 식물체 내에 존재하는 리그닌(lignin)과 헤미셀룰로오스(hemicellulose)등과 복잡한 구조로 얽혀있어 정제과정에서 상대적으로 많은 비용과 에너지를 필요로 한다는 단점이 있다.

셀룰로오스는 식물뿐만 아니라 박테리아, 조류, 진균류 등 다양한 미생물 내에서도 생성되며, 이를 미생물 셀룰로오스(microbial cellulose)라고 부른다. 그 중 박테리아 셀룰로오스(bacterial cellulose)는 나노섬유(nanofiber) 형태로 생산되기 때문에 식물 유래 셀룰로오스보다 높은 결정화도, 수분 흡수율, 인장강도 등의 특징을 보이며, 리그닌과 헤미셀룰로오스와 같은 불순물들을 포함하지 않아 정제과정이 비교적 간편하다는 장점이 있다. 특히 생체적합성이 우수하여 의료산업과 화장품산업 분야에서도 많은 응용이 되고있다.

박테리아 셀룰로오스는 현재까지 코마가테이박터(*Komagataeibacter*) 속 균주에 의해 주로 생산되어 왔으며, 코마가테이박터를 모델 균주로 하여 많은 연구가 진행되고 있다. 코마가테이박터 균주는 포도당과 일부 당류를 탄소원으로 사용하며 셀룰로오스를 생산할 수 있다. 하지만 미생물은 세포 성장

및 부산물 생성 등에도 상당한 탄소원과 에너지원을 사용하기 때문에 산업분야에 직접적으로 적용되기 위해서는 야생형 균주보다 더 높은 셀룰로오스 생산성과 수율을 갖도록 균주를 개량하여야 한다. 따라서 합성생물학적 방법을 이용해 셀룰로오스를 대량 생산할 수 있는 기술의 개발이 필요하며, 본 보고서에서는 박테리아를 기반으로 하는 셀룰로오스 대량 생산을 위한 합생생물학적 연구 동향에 대해서 고찰해 보고자 한다.

2. 셀룰로오스 생산 미생물 개량 동향

현 균주 개량은 크게 random mutagenesis와 rational metabolic engineering으로 나눠진다. 박테리아 셀룰로오스에 대한 연구는 1930년대부터 시작되어왔으며, 전통적으로는 X-ray등을 이용한 셀룰로오스의 구조분석과 셀룰로오스 생산균주에 대한 생리학적 연구, 그리고 생산성을 향상시키기 위한 배양최적화 등이 이어졌다. 이후 합성생물학(synthetic biology), 생물정보학(bioinformatics), 단백질공학(protein engineering), 시스템 생물학(systems biology) 등의 발전으로 유전자 수준에서 보다 정교한 균주 개량이 가능하게 되면서 유전자 조작 및 대사경로 최적화를 통한 생산량 증가 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

앞서 언급한 바와 같이 셀룰로오스는 코마가테이박터 균주 내에서 생산된다. 포도당으로부터 셀룰로오스가 생산되기까지 포도당을 glucose-6-phosphate로 전환하는 클루코키나아제(glucokinase; GK), glucose-6-phsophate를 glucose-1-phosphate로 전환하는 포스포글루코뮤타아제(phosphoglucomutase; PGM), glucose-1-phosphate를 UDP-glucose로 전환하는 UTP–glucose-1-phosphate uridylyltransferase(UGP), 그리고 셀룰로오스 신타아제(cellulose synthase; CS)로 구성된 4단계의 효소반응을 거치게 된다 [그림 1]. 그 중 첫번째 반응 산물인 glucose-1-phosphate의 경우 phosphoglucoisomerase(PGI)와 glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)에 의해 각각 해당과정(glycolysis)와 오탄당 인산경로(pentose phosphate pathway)로 대사 경로가 나뉘어질 수 있다. 셀룰로오스 생산능과 수율 향상을 위해서는 glucose-6-phosphate의 셀룰로오스 방향으로의 대사를 강화시키고, 오탄당 인산경로와 해당과정으로의 유출을 줄이는 전략을 생각할 수 있다.

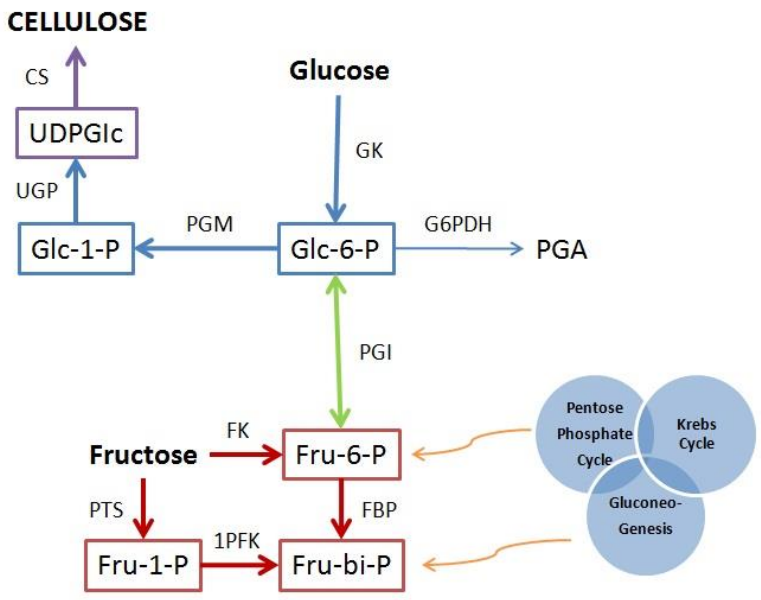

그림 1 박테리아 셀룰로오스 생합성 경로

박테리아 셀룰로오스 생산에 있어서 가장 주요한 효소는 셀룰로오스 신타아제(cellulose synthase)이다. 셀룰로오스 신타아제의 경우 다양한 단위체가 밝혀져있는데, 코마가테이박터의 경우 BcsA, BcsB, BcsC, BcsD의 네가지 단위체로 구성되어있다 [그림 2]. BcsA의 경우 세포 내막의 원형질 방향으로 배치되어있으며, 실질적으로 셀룰로오스가 합성되는 촉매작용부로, 셀룰로오스 사슬을 신장시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 때문에 합성생물학적 균주 개량에 사용되는 전형적인 유전자 조작 타겟이며, 실제로 BcsA가 과발현 되었을 경우에 셀룰로오스 생산량이 증가한다고 보고되었다. 하지만, BcsA 뿐만 아니라 BcsB와 BcsC, BcsD 등 다른 단위체 역시 발현되었을 때에 셀룰로오스 생산성 향상 효과는 훨씬 두드러지며, 이렇게 다수의 유전자를 발현함에 있어서 필요한 만큼 유전자를 정량적으로 발현할 수 있는 fine-tunable expression system의 필요성 역시 중요시되는 부분이다.

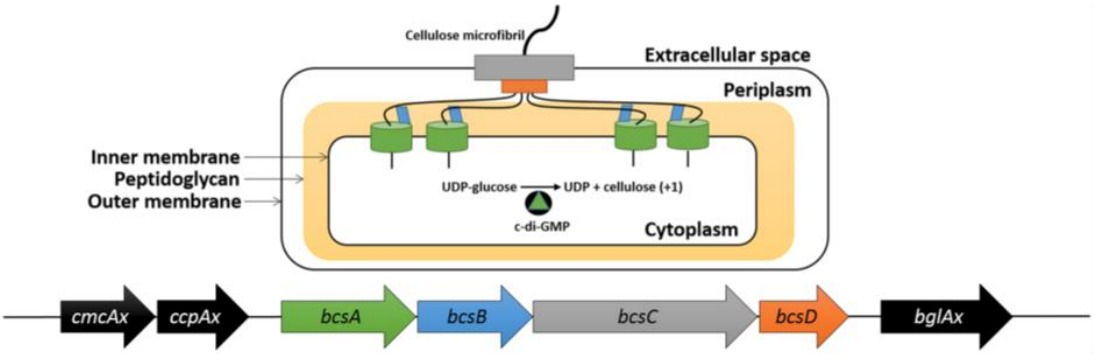

그림 2. 셀룰로오스 신타아제 단위체와 bcs 오페론. 출처 [6]

3. 셀룰로오스 생산 균주 합성생물학 연구 동향

앞 단락에서 기술한 바와 같이, 균주 개량에 있어서 필수적으로 유전자 조작을 수행하게 되며, 그를 위한 합성생물학적 도구의 개발에 대한 필요성이 대두되고 있다. 코마가테이박터 균주에서 유전자를 정량적으로 발현하기 위한 합성생물학적 연구를 진행한 경우는 현재까지 대표적인 연구 사례 두가지가 거의 전부다. 첫번째로, 영국의 Ellis 교수 연구팀은 2016년도에 신규 코마가테이박터 속 래티쿠스(rhaeticus) 종 균주를 분리하고, 이에 적용 가능한 유전자 발현 시스템을 개발하였다고 보고하였다 [그림 3]. 연구팀은 다양한 constitutive 프로모터와 inducible 프로모터의 세기를 형광단백질을 이용하여 측정하였고, 효율적인 유전자 정량적 발현 시스템을 구축할 수 있었다. 뿐만 아니라, 얻어진 정량적 발현 시스템에 sRNA를 적용하여 셀룰로오스 생산량을 정량적 조절할 수 있었다 [그림 3].

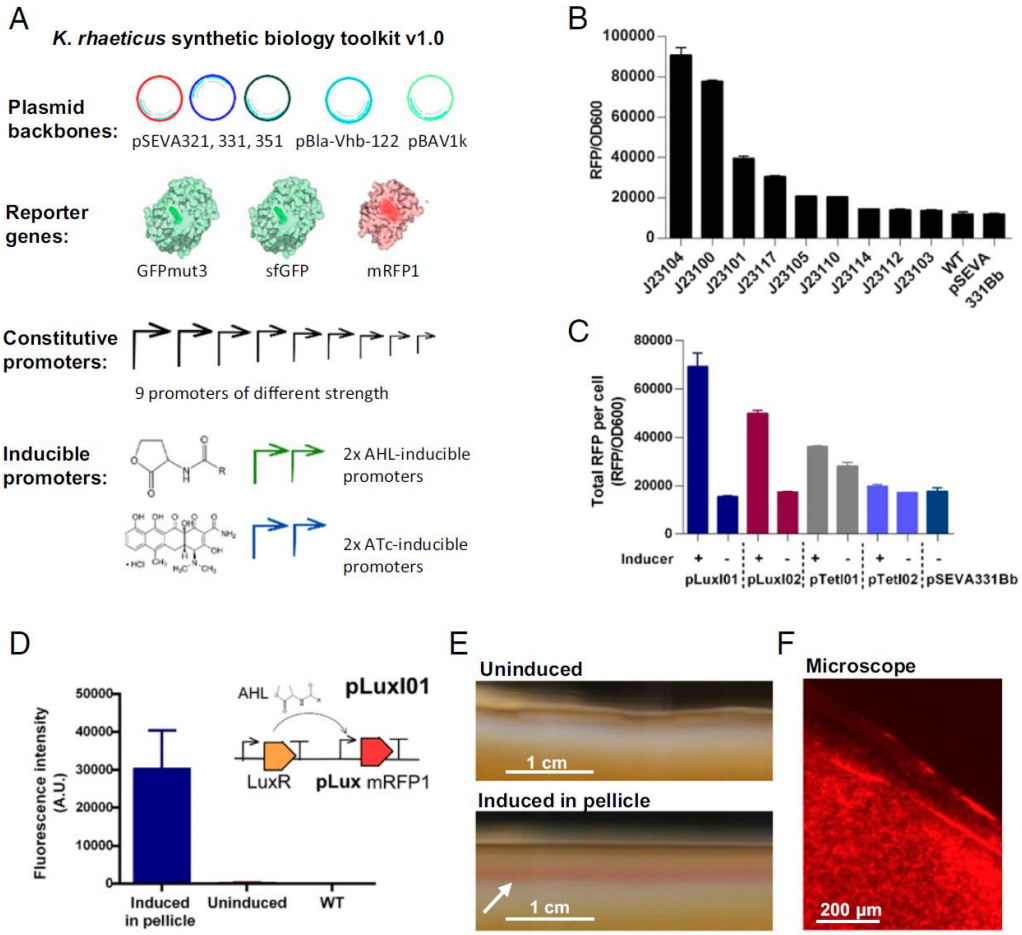

그림 3. *K. rhaeticus* 균주의 합성 생물학 도구 개발 연구. A, 유전자 발현 시스템의개요. B, constitutive 프로모터 별 유전자 발현 세기. C, inducible 프로모터 별 유전자 발현 세기. D와 E, F, 셀룰로오스 막에서의 inducible 프로모터에 의한 유전자 발현. 출처 [7]

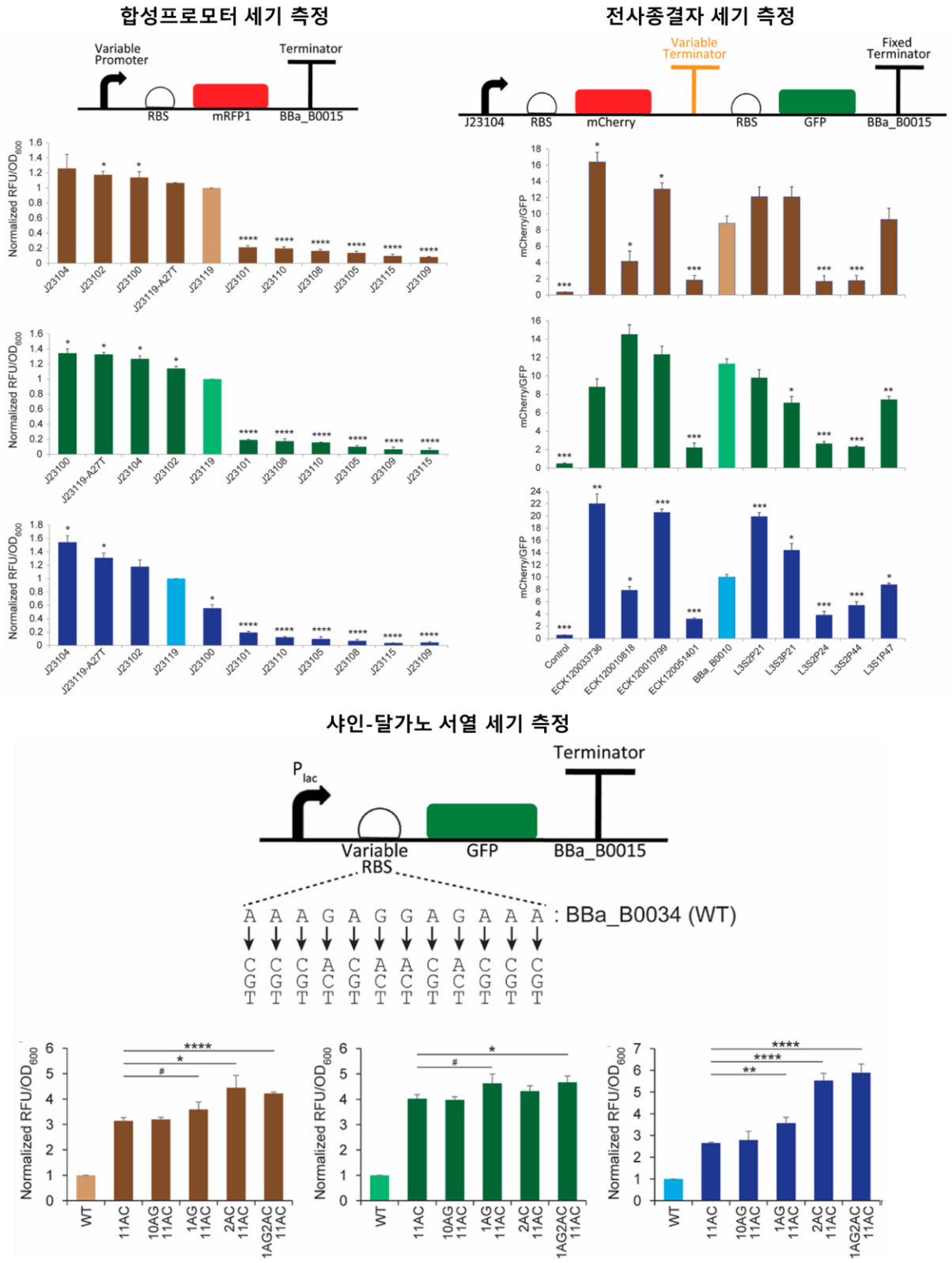

그림 4. ***K. xylinus*** **(갈색),** ***K. hansenii*** **(초록색),** ***K. rhaeticus*** **(파란색) 사용 가능한 합성생물학적 유전자 발현 도구의 개발 모식도. 출처 [11]**

두번째로는 싱가폴 Tan 교수 연구팀을 예로 들 수 있다. 연구팀은 2019년도에 *K. xylinus* 700178, *K. hansenii* ATCC 53583, *K. rhaeticus* iGEM 세가지 코마가테이박터 속 균주에서 작동하는 11개의 constitutive 프로모터, 2개의 inducible 프로모터, 5개의 자연전사종결부위(natural terminator), 5개의 합성전사종결부위(synthetic terminator), 36개의 샤인-달가노 서열(Shine-Dalgarno sequence), 5개의 열화 태그(degradation tag)를 전부 실험하고, 유전자를 정량적으로 발현시킬 수 있는 시스템을 구축하였다 [그림 4]. 개발된 유전자 정량 발현 시스템을 이용하여 성공적으로 유전자를 정량적으로 발현할 수 있었다. 획득한 프로모터, 샤인-달가노 서열, 터미네이터의 정보를 바탕으로 코마가테이박터 자일리누스 균주 내에서 키틴 생산에 필수적인 유전자 N-acetylglucosamine kinase, phosphoacetylglucosamine mutase, UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 세가지 유전자의 발현 수준을 성공적으로 조절할 수 있었고, 이를 통해 셀룰로오스-키틴 공중합체 생산량을 2배 가량 향상시킬 수 있었다 (0.76 - 1.47 mg/ml) [그림 5].

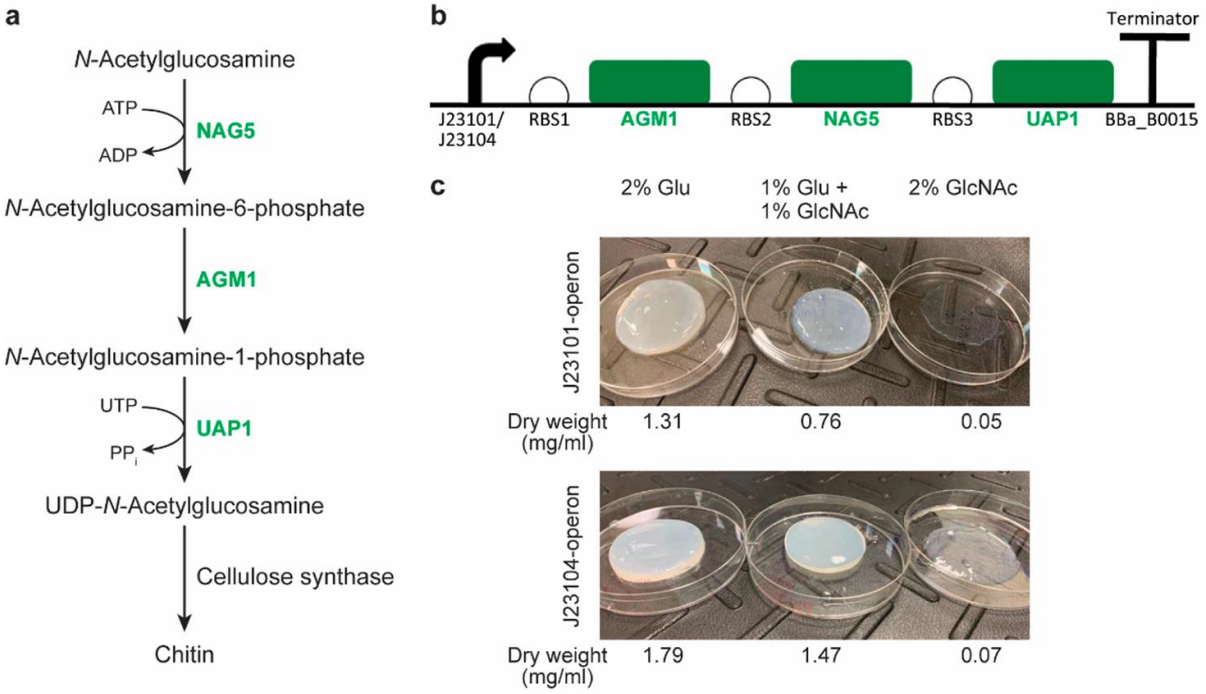

그림 5. a, 키틴의 생합성 경로. b, 키틴 생합성 유전자 발현 시스템. c, 제공한 탄소원에 따라 생산된 셀룰로오스-키틴 공중합체.

위 단락들에서는 경쟁적 대사 경로의 제거 혹은 억제와 타겟 대사 경로의 강화 등에 대해서만 언급하였다. 하지만 단순히 경로를 제거 및 강화하는 것 만이 생산성을 향상시킬 수 있는 것이 아니다. 예를 들어 셀룰로오스 생산 경로 중 UGP의 활성이 CS와 PGM에 비하여 현저히 떨어질 경우에는 물질대사에 있어서 병목현상이 야기될 수 있고, 중간 물질(intermediate)의 축적이 미생물에 부정적인 영향을 미칠 수도 있다. 또한, 경쟁 대사 경로의 경우 성장에 반드시 필요한 경로이기 때문에 제거할 수 없을 가능성 또한 존재한다. 따라서 최근에는 모듈의 조절과 combinatorial engineering을 통해 효율을 높이는 방법 또한 사용되고 있다. 합성 프로모터와 합성 RBS, 합성 terminator 등을 사용하거나 biosensor, riboswitch, CRIPSRi, sRNA 등을 사용하여 특정 유전자의 발현을 ON/OFF, 또는 up/down-regulation을 하는 방법을 통해 fine-tuning 등이 이에 해당한다.

4. 고찰

이렇듯 합성생물학을 기반으로 박테리아 셀룰로오스의 생산성을 향상시키는 여러 연구가 성공적으로 진행되고 있다. 하지만 미생물 기반의 화합물 생산의 가장 큰 쟁점은 가격 경쟁력이다. 초기 연구 사례들은 주로 미생물 내에서 고부가가치산물을 생산하는 것 자체에 큰 의미를 두어 왔으나, 기존 식물계 유래 셀룰로오스 생산 시스템을 대체하고자 한다면 추가적인 생산성 증대 및 원가 절감에 대한 고려가 필요하다. 따라서 글리세롤(glycerol), 리그노셀룰로오스(lignocellulose) 혹은 미세조류(microalgae) 등의 가수분해물(hydrolysate) 등을 포함한 값싼 원료 물질을 탄소원으로써 공급하고, 이를 이용한 고부가가치 물질을 생산함으로써 상용화에 한 걸음 더 다가갈 수 있을 것으로 보인다.

참고문헌

[1] Reiniati, I., Hrymak, A. N., & Margaritis, A. (2017). Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. Critical reviews in biotechnology, 37(4), 510-524.

[2] Uzyol, H. K., & Saçan, M. T. (2017). Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii*

using algae-based glucose. Environmental Science and Pollution Research, 24(12), 11154-11162.

[3] Trache, D., Hussin, M. H., Haafiz, M. M., & Thakur, V. K. (2017). Recent progress in cellulose nanocrystals: sources and production. Nanoscale, 9(5), 1763-1786.

[4] Mohite, B. V., & Patil, S. V. (2014). A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. Biotechnology and Applied Biochemistry, 61(2), 101-110.

[5] Siró, I., & Plackett, D. (2010). Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. Cellulose, 17(3), 459-494.

[6] Augimeri, R. V., & Strap, J. L. (2015). The phytohormone ethylene enhances cellulose production, regulates CRP/FNRKx transcription and causes differential gene expression within the bacterial cellulose synthesis operon of *Komagataeibacter* (*Gluconacetobacter*) *xylinus* ATCC 53582. Frontiers in microbiology, 6, 1459.

[7] Florea, M., Hagemann, H., Santosa, G., Abbott, J., Micklem, C. N., Spencer-Milnes, X., ... & Chughtai, H. (2016). Engineering control of bacterial cellulose production using a genetic toolkit and a new cellulose-producing strain. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(24), E3431-E3440.

[8] Römling, U., & Galperin, M. Y. (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. Trends in microbiology, 23(9), 545-557.

[9] Zhang, H., Ye, C., Xu, N., Chen, C., Chen, X., Yuan, F., ... & Sun, D. (2017). Reconstruction of a genome-scale metabolic network of *Komagataeibacter nataicola* RZS01 for cellulose production. Scientific reports, 7(1), 7911.

[10] Mangayil, R., Rajala, S., Pammo, A., Sarlin, E., Luo, J., Santala, V., ... & Tuukkanen, S. (2017). Engineering and characterization of bacterial nanocellulose films as low cost and flexible sensor material. ACS applied materials & interfaces, 9(22), 19048-19056.

[11] Teh, M. Y., Ooi, K. H., Danny Teo, S. X., Bin Mansoor, M. E., Shaun Lim, W. Z., & Tan, M. H. (2019).

An expanded synthetic biology toolkit for gene expression control in Acetobacteraceae. ACS synthetic biology, 8(4), 708-723.

[12] Chaudhary, A. K., Na, D., & Lee, E. Y. (2015). Rapid and high-throughput construction of microbial cell-factories with regulatory noncoding RNAs. Biotechnology advances, 33(6), 914-930.

[13] Santos, C. N. S. (2010). Combinatorial search strategies for the metabolic engineering of microorganisms (Doctoral dissertation, Massachusetts Institute of Technology).

[14] Yadav, V. G., De Mey, M., Lim, C. G., Ajikumar, P. K., & Stephanopoulos, G. (2012). The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice. Metabolic engineering, 14(3), 233-241.

[15] Noh, M., Yoo, S. M., Kim, W. J., & Lee, S. Y. (2017). Gene expression knockdown by modulating synthetic small RNA expression in Escherichia coli. Cell systems, 5(4), 418-426.

[16] Michener, J. K., Thodey, K., Liang, J. C., & Smolke, C. D. (2012). Applications of genetically-encoded biosensors for the construction and control of biosynthetic pathways. Metabolic engineering, 14(3), 212-222.