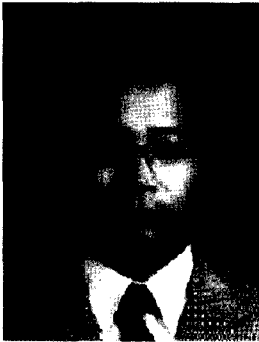


# 대사공학을 이용한 효모균주의 육종



남 수 완  
(동의대학교 생명공학과)

## I. 서론

대사공학(Metabolic Engineering)이란 유기화합물질의 생산, 대체기질의 사용 또는 유독 폐기물의 분해 등의 목적으로 유전공학적 방법들을 이용해 세포에 인위적으로 새로운 또는 증대된 대사경로를 제공하는 학문이다(1).

대사공학기술을 이용하면, 특이한 대사경로를 도입할 수 있고, 대사경로 상의 특정 효소를 대량으로 증폭할 수 있으며, 한 종류 이상에서 나온 효소들을 이용하여 여러 개의 경로를 한 개의 세포에 도입할 수 있고, 또는 생장이 나쁜 세포의 경로를 배양이 쉬운(생장이 빠른) 세포로 이동시킬 수 있는 등 대사경로에 다양한 변화를 줄 수 있다. 즉, 알콜발효 효모세포에 대사공학기술을 응용하면, 알콜 수율의 증대, 알콜 생산성의 증대, 이때까지 사용되지 않던 다양한 기질의 사용, 새로운 향기 성분의 생성, 특정 향기 성분의 강화, 악취나 불순물의 효율적인 제거 등의 잠재적 장점들을 얻을 수 있다.

본 고에서는 대사공학기술의 최근 응용 예를, 1) 새로운 기질(원료)의 사용, 2) 표면발현을 통한 알콜 생성능의 증대, 3) 특정 향기 성분의 선택적 생산 등의 측면에서 살펴보고자 한다.

## ■ 目 次 ■

- I. 서론
- II. 대사공학기술의 응용 사례
  - 1. 새로운 기질(원료)의 사용
  - 2. 표면발현을 통한 알콜 생산성의 증대
  - 3. 특정 향기 성분의 선택적 생산
- III. 결 론
- IV. 참고문헌

## II. 대사공학기법의 응용 사례

### 1. 새로운 기질(원료)의 사용

내병성, 내병성 및 번식력이 강하고 특별한 비료도 필요없어 세계적으로 재배되고 있는 돼지감자(뽕단지; *Jerusalem artichoke*; *Helianthus tuberosus*)는 농작물 중 가장 높은 탄수화물 함량을 가지며 그 괴경(tuber) 고형물의 85%가 inulin이라는 탄수화물이다. 그외 다알리아, 치커리, 우영의 주된 저장 탄수화물이기도 한 inulin은 약 35개의 fructose가  $\beta$ -2,1 결합으로, 말단에는 glucose가 한 분자 연결된 fructan 계열 탄수화물의 일종이다. 현재까지 돼지감자 등은 산업적으로 제대로 활용되지 못해 버려지거나 방치되고 있는 실정이다. Inulin을 가수분해하여 glucose를 생산하는 효소는 exoinulinase이며 현재까지 알려진 exoinulinase 생산 효모로는 *Kluyveromyces fragilis*와 *K. marxianus*가 가장 널리 알려져 있다. 1991년에 *K. marxianus*로부터 처음 cloning된 exoinulinase 유전자(INU1)는 그 유전자 산물인 exoinulinase는 세포외로 분비되는 효소(Extracellular Enzyme)이다. *K. marxianus* exoinulinase 유전자를 *Saccharomyces cerevisiae*에서 균체의 배지로 발현·분비·생산하면 돼지감자의 동시당화발효를 통한 알콜생산 공정을 개발할 수 있다. INU1 유전자를 구성적으로 발현·생산하는 재조합 *S. cerevisiae* 균주를 제작하여 돼지감자, 치커리, 다알리아 유래의 inulin (2%)을 기질로 사용하여 발효시킨 결과, 24시간만에 에탄올 생성농도는 각각 9 g/l, 6 g/l, 5 g/l에 달했고, 에탄올 수율은 각각 0.45, 0.32, 0.26 g/g-inulin 값을 보였다. 따라서, 돼지감자 inulin이 에탄올 생산에 가장 우수한 기질이 되며, 이러한 재조합 효모의 고

정화를 통해 연속적 에탄올 생산공정 개발 가능성이 제시되었다(2).

### 2. 표면발현을 통한 알콜 생산성의 증대

표면발현(Surface Expression) 또는 표층공학(Surface Engineering)이란 미생물 세포 표면에 원하는 유전자를 발현시키는 기술로서, 효모세포 표면에 전분 분해효소 등을 발현시킬 경우, 그 효모의 고정화나 반복 재사용에 의해 연속적 알콜생산이 가능하고 전분 가수분해 효율도 증가(알콜 생산능 증가)시킬 수 있다. 응집효모 세포표면에 *Rhizopus oryzae* 유래의 glucoamylase와  $\alpha$ -agglutinin 융합단백질을 발현시킨 예에서(3), 형질전환 응집효모 세포는 수용성 감자전분으로부터 혐기적 조건에서 지연기(Time lag)없이 0.71 g/l·hr 속도로 에탄올을 생산하였고, 반복 사용을 통해 이와 같은 높은 생산성은 300 시간까지 유지되었다. 또한 유가배양에서는 에탄올 농도가 50 g/l에 달하였다.

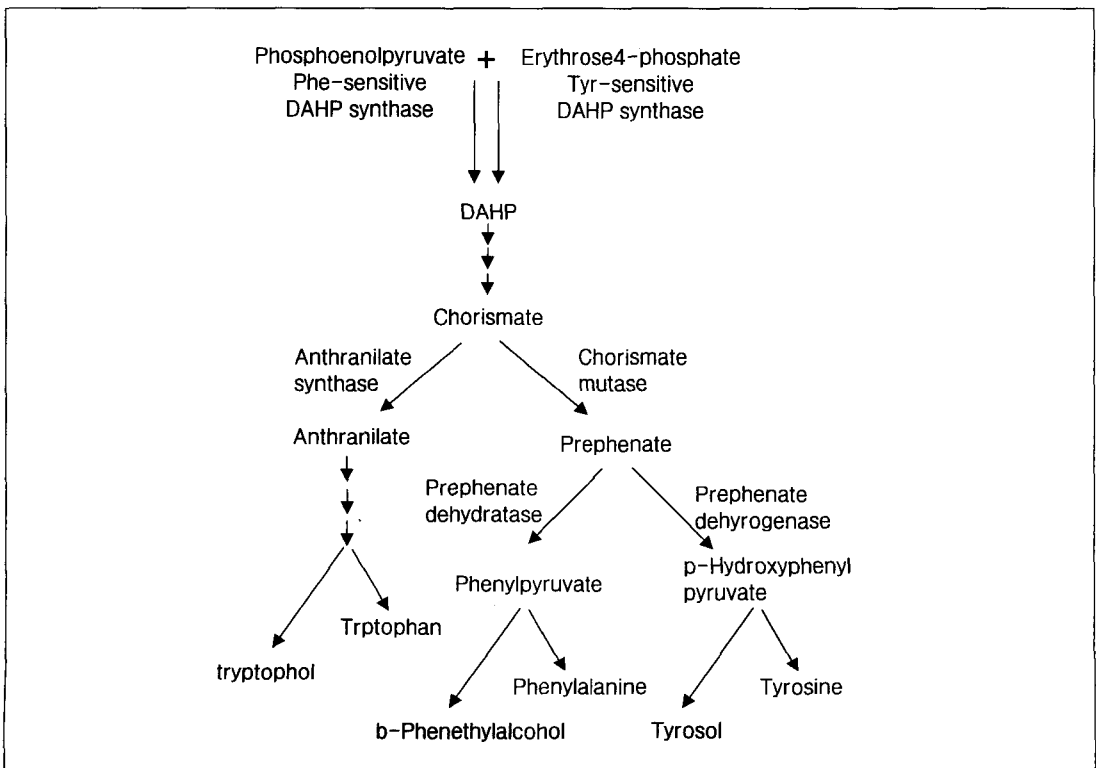
### 3. 특정 향기 성분의 선택적 생산

효모는 발효과정에서 에탄올과 함께 여러 가지 향기성분을 생산하지만 이러한 물질들은 효모에게 반드시 필요한 물질은 아니다. 그러나, 향기성분은 기호성 강한 물질로 양조음료나 양조식품의 차별화와 개성화에 결정적인 중요 요소이다. 효모가 생산하는 향기 성분 중 고급 alcohol 류와 초산 ester가 주성분이며, 향기 특성에의 기여율이 가장 높다. 고급 alcohol의 생성경로는 두 가지로 알려져 있으며, 어느 경로나 효모의 아미노산 대사와 관련이 깊다. 첫째는 pyruvate를 거쳐 keto acid가 탈탄산되어 aldehyde가 된 후 환원되어 고급 알콜류가

만들어지는 경로이다. 두 번째는 배지내 아미노산이 세포내로 흡수되어 탈아미노 및 탈탄산 반응을 거쳐 고급 알콜이 생성되는 경로이다. 이렇게 생성된 고급알콜은 alcoholacetyltransferase에 의해 acetyl co-A와의 축합반응으로 초산 ester로 된다. 효모의 아미노산 생합성 경로는 최종산물인 아미노산에 의해 feedback 저해와 억제를 받아 과잉의 아미노산이 생성되지 않도록 조절된다. 고급알콜과 초산 ester의 생성능력을 증가시키기 위해 방향족 아미노산 및 분지쇄(Branched-chain) 아미노산의 생합성계를 증강시킨 청주효모 육종법(4)은 다음과 같다(일본 協和發酵(株)에서 개발).

1) 방향족 아미노산 생합성계의 대사제어  
 방향족 아미노산인 phenylalanine(Phe), tyrosine(Tyr), tryptophan(Trp)의 생합성경로로부터 각각 방향족 알콜인  $\beta$ -phenethyl alcohol, tyrosol, tryptophol이 생성된다 [Fig. 1].  $\beta$ -Phenethyl alcohol은 장미꽃 향기물질로 청주의 기초향이고, 그 초산 ester인 초산  $\beta$ -phenethyl는 복숭아꽃 방향을 나타낸다. Tyrosol 및 tryptophol은 쓴맛 물질로서 알려져 있고, 청주의 중요한 맛성분이다. 이들 향기성분의 생산성을 높이기 위해 방향족 아미노산 생합성 경로의 증강을 시도했다. 즉, 방향족 아미노산 아날로그 내성주를 얻기 위해 *S. cerevisiae* 協會 9號 (K-9)을 다양한 방향족 아미노산 아

[Fig. 1] Biosynthetic pathway of aromatic amino acids and higher alcohols in *S. cerevisiae*. Abbreviations. DAHP, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; Phe-sensitive DAHP synthase, DAHP synthase inhibited by phenylalanine; Tyr-sensitive DAHP synthase, DAHP synthase inhibited by tyrosine.



<Table 1> Properties of fresh sake made using fluoro-DL-phenylalanine-resistant mutants and their parent strain K-9

Component	Strain		
	K-9	OFP-3	PFP-26
Sake meter	-0.5	-1.0	-1.0
Ethanol (%)	17.1	17.0	16.9
Total acid (ml)	2.4	2.5	2.5
Amino acid (ml)	1.8	1.9	1.8
Isobutyl alcohol (ppm)	115	123	124
Isoamyl alcohol (ppm)	237	227	250
Isoamyl acetate (ppm)	5.5	5.2	8.2
Ethyl caproate (ppm)	1.1	1.0	1.2
$\beta$ -Phenethyl alcohol (ppm)	181	701	814
$\beta$ -Phenethyl acetate (ppm)	5.0	20.6	24.5

OFP-3 and PFP-26 are mutants resistant to *o*-fluoro-DL-phenylalanine and *p*-fluoro-DL-phenylalanine, respectively.

날로그에 대한 감수성 시험을 행했다. 그 결과 K-9주는 *m*-fluoro-DL-phenylalanine (MFP, 5 mg/ml), *o*-fluoro-DL-phenylalanine (OFP, 2 mg/ml) 및 *p*-fluoro-DL-phenylalanine (PEP, 1 mg/ml)에서 생육이 저지되며 Phe 첨가에 의해 해제된다. 각 아날로그 내성주 40주씩을 최소배지에서 30°C, 2일간 진탕배양하여 높은  $\beta$ -phenethyl alcohol 생성을 보이는 변이주 OFP-3 및 PEP-26를 선별하였다. 이들 변이주를 쌀 200g으로 청주를 소량 빚어 시험한 결과,  $\beta$ -phenethyl alcohol과 그 초산 ester 함량은 모균주(K-9)에 비해 약 4배 이상 증가하였다 <Table 1>. 더욱이 OFP-3은 tyrosol을, PEP-26은 tryptophol를 각각 고농도로 축적하였다.

모균주와 변이주간의 대사경로 효소들을 비교·분석한 결과, 두 변이주 모두 방향족 아미노산 생합성계의 변이에 의해 Phe 생합성 경로가 증가되어  $\beta$ -phenethyl alcohol이 고생산되는 것이 판명됐다. 그러나 그 변이양상은 두

변이주에서 서로 다르기 때문에 OFP-3에서는 Tyr 및 tyrosol 생성이, PEP-26에서는 Trp 및 tryptophol 생성이 각각 증가하였다. PEP-26은 prephenate dehydrogenase 활성의 감소에 의해 prephenate 산이 축적되어, 그 결과 Phe와 Trp의 합성경로가 증가되었다고 보여진다. 더욱이, 이 효소활성의 감소가 균체내 Tyr 생성의 저하를 야기해, DAHP synthase의 feedback 저해를 해제하는 것으로 추정되었다.

야생형주와의 교잡에 의한 우성열성시험, 4분자 포자해석 및 내성변이 유전자좌의 결정 시험 등을 통해  $\beta$ -phenethyl alcohol 고생산에는 ARO4 유전자(DAHP synthase)와 Tyr1 유전자(prephenate dehydrogenase)에 발생한 변이 때문임이 밝혀졌다. 즉, ARO4 변이유전자(ARO4-OFP)의 전체염기배열을 결정하고 ARO4 유전자와 비교한 결과, 구조유전자내 496번째의 C가 A로 치환되어 있어 (DAHP synthase 내 166번째의 glutamine이 lysine으

로 치환), 하나의 아미노산 변이가 Tyr에 의한 feedback 저해를 해제시키는 것으로 판명되었다.

변이 유전자 *ARO4-OFP*가 포함되어 있는 pKF101 plasmid를 제작하여 청주효모 K-9의 haploid 및 uracil 요구성 K-9 H14-U7 균주에 형질전환시켰다. 형질전환체와 쌀 600g 으로 청주를 시험생산한 결과, 숙주세포에 비해  $\beta$ -phenethyl alcohol은 4배,  $\beta$ -phenethyl acetate는 약 8배 정도 증가되었다(Table 2).

## 2) 분지쇄 아미노산 생합성계의 대사제어

분지쇄 아미노산인 leucine (Leu), valine (Val) 및 isoleucine(Ile)의 생합성 경로로부터 각각의 분지쇄 알콜인 isoamyl alcohol, isobutyl alcohol 및 활성 amyl alcohol이 생성된다 (Fig. 2). Threonine(Thr)의 생합성 경로로부터는 *n*-propanol이 생성된다. 이들 알콜의 초산 ester들도 청주 특유의 향기성분이다.

청주효모를 모균주로 하여 5,5,5-trifluoro-

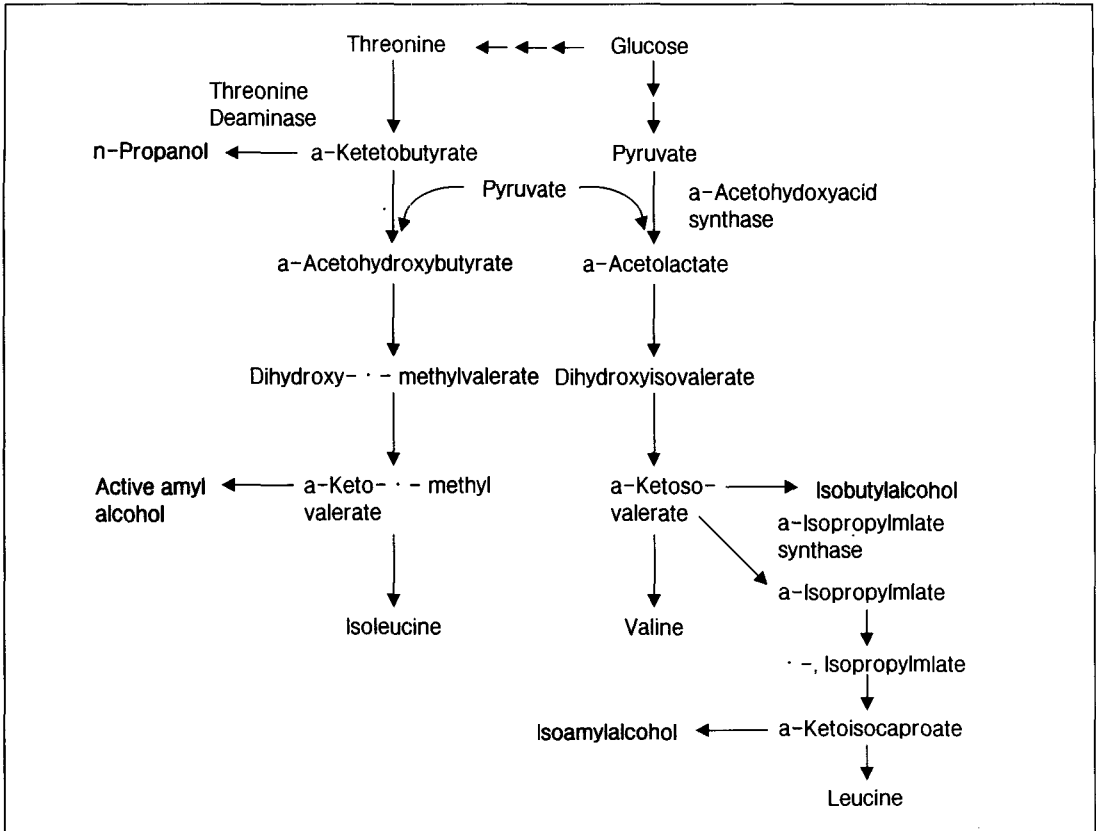
ucine 내성변이주 중에서 Leu 생합성계 주효소인  $\alpha$ -isopropylmalate synthase의 Leu feedback 저해가 해제된 변이주를 취득하고 그 균주가 isoamyl alcohol과 그 초산 ester를 과생산함을 확인하였다. Azaleucine 내성변이주의 향기 생산을 검사한 결과, 변이주에 2종류의 생산 패턴이 있었다. 하나는  $\alpha$ -isopropylmalate synthase의 Leu feedback 저해가 해제되어, isoamyl alcohol과 그 초산 ester를 고생산하는 패턴이고, 다른 하나는 Val 생합성계의 주효소인  $\alpha$ -acetoxy acid synthase의 Val feedback 저해가 해제되어 isobutyl alcohol과 그 초산 ester를 고생산하는 패턴이었다.

청주효모, *S. cerevisiae* 協會7號를 모균주로 하여 2-thiazolylalanine 내성변이주 중에서 isoamyl alcohol과 isobutyl alcohol을 동시에 고생산하는 변이주를 취득했다. 이 변이주를 사용하여 청주, 소주 및 제빵시험을 행한 결과, 분지쇄 alcohol과 그 초산 ester를 모균주에 비교해서 2배 이상 함유하였고, 관능적으로도 특

<Table 2> Properties of fresh sake made using transformants

Component	Strain	
	K-9H14-U7	K-9H14-U7/pKF101
Sake meter	-15.8	-0.4
Ethanol (%)	14.7	17.9
Total acid (ml)	5.5	2.4
Amino acid (ml)	2.7	2.4
Isobutyl alcohol (ppm)	122.8	166.2
Isobutyl acetate (ppm)	0.4	0.5
Isoamyl alcohol (ppm)	302.0	313.7
Isoamyl acetate (ppm)	1.7	3.7
$\beta$ -Phenethyl alcohol (ppm)	249.0	1025.2
$\beta$ -Phenethyl acetate (ppm)	3.2	23.0

OFP-3 and PFP-26 are mutants resistant to *o*-fluoro-DL-phenylalanine and *p*-fluoro-DL-phenylalanine, respectively.

[Fig. 2] Biosynthetic pathway of branched-chain amino acids and higher alcohols in *S. cerevisiae*.

유의 풍미를 확인하였다.

청주효모 *S. cerevisiae* 協會901號 (K-901), 빵효모 SW-39 및 실험실효모 X2180-1A를 모균주로 하여 thiaisoleucine 내성변이주를 취득한 결과, 활성 amyl alcohol과 n-propanol의 생산성이 증가되었으며, 이들의 고생산은 Ile 생합성계의 주효소인 threonine deaminase의 Ile feedback 저해가 해제됨에 따른 Ile 생합성계의 증강에 기인하였다.

Thr analog인 hydroxynorvaline 내성변이주를 K-901로부터 취득해 향기생성을 조사한 결과, 활성 amyl alcohol과 n-propanol을 약 2배 고생산하는 변이주를 얻었다. 이 변이주는 Thr 생합성계의 주효소인 aspartokinase의 Thr feedback 저해가 해제되어 Thr 생합성계가 증

강되어져 있었다. 이들 변이주와 쌀 200 g으로 청주를 시험·생산한 결과<Table 3>, 활성 amyl alcohol과 n-propanol를 모균주에 비해 2배이상 포함하고, 관능적으로도 우수하였다.

### 3) 방향족 및 분지쇄 알코올을 동시에 고생산하는 변이

청주효모 *S. cerevisiae* 協會701號 (K-701) 및 協會901 (K-901)로부터 tyrosine analog인 3-aminotyrosine (2 mg/ml) 내성 변이주 K-701-A2 및 K-901-A5를 얻었다. 이들 변이주를 사용하여 청주 시험·생산한 결과,  $\beta$ -penethyl alcohol, isoamyl alcohol, isobutyl alcohol, 활성 amyl alcohol, n-propanol 및 그 초산 ester류를 모균주에 비해 각각 2배 이상 축

〈Table 3〉 Properties of fresh sake made by mutants and their parent strain K-901

Component	Strain		
	K-901	K-901-T112	K-901-H55
Sake meter	-5.4	-8.5	-6.2
Ethanol(%)	16.2	14.9	15.9
Total acid (ml)	2.5	2.5	2.9
Amino acid (ml)	2.5	2.3	2.6
n-Propanol (ppm)	317	808	591
Isobutyl alcohol (ppm)	179	136	154
Active amyl alcohol (ppm)	129	292	274
Isoamyl alcohol (ppm)	281	279	290
Active amyl acetate plus			
Isoamyl acetate (ppm)	5.5	8.2	9.0
Ethyl caproate (ppm)	1.0	1.1	1.2

K-701-A2 and K-901-A5 are 3-aminotyrosine-resistant mutants derived from K-701 and K-901, respectively.

〈Table 4〉 Properties of fresh sake made by 3-aminotyrosine-resistant mutants and their parent strains

Component	Strain			
	K-701	K-701-A2	K-901	K-901-A5
Sake meter	+9.6	+8.4	+10.9	+9.4
Ethanol (%)	17.7	17.3	17.7	17.7
Total acid (ml)	2.8	3.3	2.6	3.1
Amino acid (ml)	2.0	2.3	2.0	2.1
n-Propanol (ppm)	98	188	85	191
Isobutyl alcohol (ppm)	125	212	175	225
Active amyl alcohol (ppm)	88	265	98	145
Isoamyl alcohol (ppm)	285	625	302	447
Isoamyl acetate (ppm)	7.0	10.3	7.0	13.0
$\beta$ -Phenethyl alcohol (ppm)	321	618	256	400
$\beta$ -Phenethyl acetate (ppm)	8.2	13.1	7.4	12.2

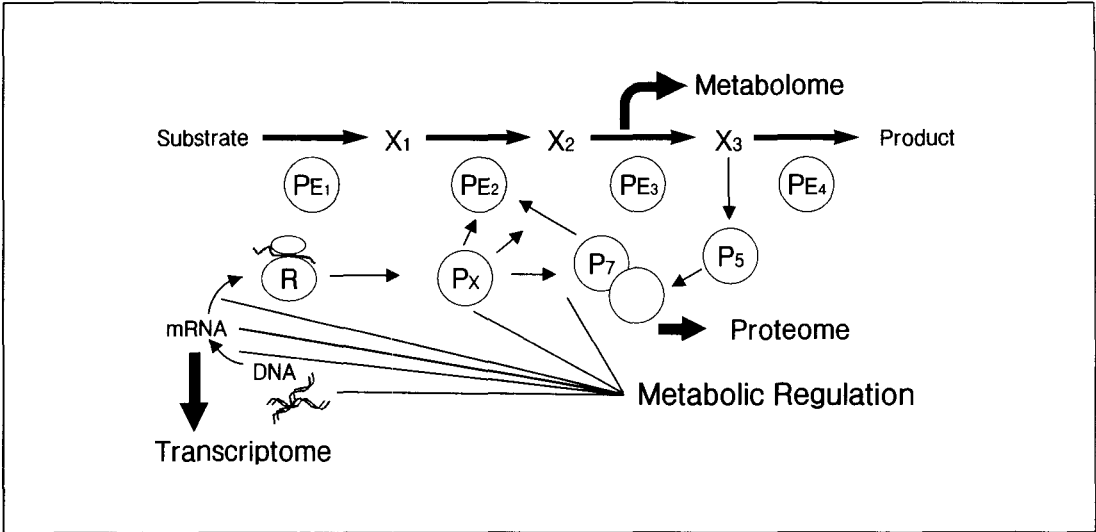
K-701-A2 and K-901-A5 are 3-aminotyrosine-resistant mutants derived from K-701 and K-901, respectively.

적하였으며〈Table 4〉, 관능면에서도 종래의 효모를 사용한 것에 비해서 화려한 향미를 가져 차별화된 제품을 얻을 수 있었다.

### III. 결론

본 고에서 살펴본 응용 사례 외에도 대사공

[Fig. 3] Metabolic control of flux at different levels. The intracellular pool of mRNAs, proteins, and metabolites are named as transcriptome, proteome, and metabolome, respectively. The biochemical reactions ( $PE_i$ ) and regulatory proteins ( $P_x$ ) are shown. R is ribosome. X1, X2, and X3 are metabolic intermediates.



하기법은 더욱 다양한 알콜발효에 확대·적용할 수 있다. 즉, 알콜 수율의 증가, 알콜 생산 속도의 증가, 부산물 또는 off-flavor의 제거, 고농도 포도당에 대한 민감도 개선, 응집성 증가, 저산소에 대한 내성 증가, 호기적 조건에서의 에탄올 생산 증대 등의 분야가 해당된다. 효모 유전자의 기능해석이 DNA chip을 이용한 transcriptome, 2D gel 전기영동을 이용한 proteome, 다양한 분석기술을 이용한 metabolome 측정 등 신 분석기술의 도입으로 빠르게 발전하고 있는 상황을 감안하면(Fig. 3), 대사공학적으로 여러 가지 기능이 개선(부가)된 알콜발효 효모가 출현(기능성 강화주류의 등장)할 것으로 예상된다. 특히, 이러한 대사공학기법이 공업적 양조 효모(diploid 또는 polyploid 균주)에 용이하게 적용되어야만 실용화를 앞당길 것이다. 본 고에서 살펴본 아미노산 대사제어를 도입한 효모(과잉의 keto acid을 탈탄산시켜 고급 알콜로 바꿔 균체 외로 배출하는 효모)를 사용해 제조한 청

주는 고급알코올과 그 초산 ester의 함유량이 크게 증대되었으므로 풍미가 크게 증강된 소주와 빵 등 양조 음식·식품의 다양하고 개성적인 상품화도 조만간 가능할 것으로 예상된다.

#### IV. 참고문헌

1. Nielsen J. Metabolic Engineering. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55 : 263-283 (2001)
2. Kim Y.H., Nam S.W., and Chung B.H. Simultaneous saccharification of inulin and ethanol fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* secreting inulinase. Biotechnol. Bioprocess Eng. 3 (2): 55-60 (1998)
3. Kondo A, Shigechi H, Abe M, Uyama K, Matsumoto T, Takahashi S, Ueda M, Tanaka A, Kishimoto M, and Fukuda H. High-level ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae*



strain displaying cell-surface glucoamylase.  
Appl. Microbiol. Biotechnol. 58 (3): 291-  
296 (2002)

4. 福田和郎. 代謝制御を導入した酵母による  
清酒の多様化. 生物工學會誌. 75 (2):  
111-124 (1997)

Passion is the quickest to develop, and the quickest to fade. Intimacy develops more slowly, and commitment more gradually still.

정열은 순간적으로 타오르고 순간적으로 꺼져버린다. 깊은 애정은 서서히 발전하고, 결혼서약은 더욱 서서히 진행된다.

- Robert Sternberg -