

유산균 대사공학 기술의 개발 현황

한남수* · 조승기 · 김유진

충북대학교 식품공학과

Current Strategies for Metabolic Engineering of Lactic Acid Bacteria

Nam Soo Han*, Seung Kee Cho, and Yujin Kim

Department of Food Science and Technology, Research Center for Bioresource and Health,
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract Lactic acid bacteria display a relatively simple metabolism wherein the sugar is converted mainly to lactic acid. The extensive knowledge of metabolic pathways and the increasing information of the genes involved allows for the rerouting of natural metabolic pathways by genetic and physiological engineering. In this contribution, the lactic acid bacteria as an efficient cell factory for different (food) ingredients will be presented. The emphasis will be on some successful examples of metabolic engineering and on the physiology of these bacteria, which makes them so suitable as a cell factory.

Keywords: lactic acid bacteria, metabolic engineering, *Lactococcus lactis*, NICE system

서 론

유산균 (젖산균, lactic acid bacteria)은 다양한 식품산업에 이용되고 있는 산업적으로 중요한 미생물이다. 식품에서 이들의 가장 큰 역할은 다양한 탄소원을 이용하여 빠른 속도로 젖산을 생성하고 이로 인해 식품의 저장기간을 연장시키는 것이다. 이외에도 유산균의 역할은 식품에 있어 향기, 물성, 그리고 영양적 측면에서 유익한 측면이 많다. 많이 이용되는 분야는 치즈나 유산균 발효유로 대표되는 유가공 산업이나 이외에도 김치 등의 채소발효산업에도 흔히 이용된다. 유산균의 대사 경로는 다른 생물공학용 미생물에 비해 단순하여 합성능력과 대사물질 다양성이 제한되는 반면 단순한 대사경로는 본 미생물을 대사공학 용도로 개발할 수 있는 장점으로 평가되기도 한다. 더욱이 에너지 대사경로와 생합성 경로가 거의 완벽하게 분리되어 있어 서로 간에 영향을 미치지 않는 점은 큰 장점으로 간주된다. 지금까지 유산균을 이용한 대사공학 연구가 활발히 진행되었는데 대표적인 것이 *Lactococcus lactis*이고 본 균주를

이용하여 다양한 대사공학적 시도들이 성공적으로 수행되었다. 그리고 이러한 연구들이 가능하였던 것은 효과적인 유전자 조작 tool들이 개발되었기 때문이었다. 본 연구에서는 유산균에서 개발된 유전자 재조합 기술들을 소개하고 이들을 이용하여 현재까지 수행된 대사공학적 연구의 사례를 정리하였다.

유산균 대사공학을 위한 유전자 재조합 툴 (tools)

박테리아의 대사공학을 위해서는 다양한 유전자 재조합 도구 (tools)가 필요하다. 이러한 재조합 도구들은 유산균 세포에서 이형/동형 유전자를 발현할 뿐만 아니라 결손 (delete), 제거 (remove), 연결 (combine)하거나 교체 (replace)하는데 사용된다. 전통적으로 유산균 개량을 위해서 돌연변이 (random mutagenesis) 후 표현형으로 선별하는 기술이 이용되었으나 [1], 최근 20년간 특정 유전자에 대해 조작할 수 있는 다양하고 효과적인 기술들이 개발되었다.

임의 돌연변이 (Random mutagenesis)

임의 돌연변이는 DNA 사실의 특정부위에서 염기서열을

*Corresponding author

Tel: +82-43-261-2567, Fax: +82-43-271-4412

e-mail: namsoo@cbnu.ac.kr

변화시키는 일련의 과정으로, 접 돌연변이, 결손, 교체, 재배열 등과 같은 경우가 있다. 분자수준에서의 적절한 정보가 제공되지 않는다면, 전통적인 돌연변이 기술이 아직도 실질적으로 활용될 수 있다 [2]. 돌연변이 기술은 유전자 재조합 기술과 같이 특정 유전자를 타게팅하는 기술과 비교할 때, 쉽고 빨리 결과를 얻을 수도 있다는 점에서 유리하나 희망하는 돌연변이주의 선별하는 방법의 선택이 본 기술의 성패를 결정짓는 경우가 많다.

유산균 돌연변이를 위해 사용된 방법으로는 알킬화합물인 methyl methanesulfonate (MMS)나 N-methyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidine (MNNG)를 처리하거나 [3], 자외선을 조사하였다 [2]. 임의 돌연변이를 위해 IS element를 포함하는 transposon의 염색체 내부로 임의적으로 삽입하는 기술도 사용될 수 있다 [4].

유전자 형질 전환 기술

유전자 재조합은 형질전환 (transformation), 형질도입 (transduction), 또는 접합 (conjugation)과 같은 과정을 거쳐 일어나는데 이를 위해 유전자 전달시스템을 필요로 한다. 이 중에서 전기천공법 (electroporation) 이나 원형질체 형질전환 (protoplast transformation)과 같은 *in vitro* 유전자 전달기술이 유산균 형질전환에 가장 많이 이용되었다 [5].

유산균 유전자 조작에 가장 흔히 사용하는 기술로 전기천공법이 있는데, 이는 유산균 세포를 배양한 후 세척하여 완충용액에 희석하고 전류를 펄스로 흘려주어 플라스미드 벡터와 같은 DNA가 세포 내부로 도입되도록 하는 방법이다. 전기펄스를 가한 후 세포 희석액을 incubation medium에서 회복시키고 선택배지에 도말하여 형질전환주를 선별한다. 전기천공 조건은 이미 *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, 그리고 *Leuconostoc*과 같이 다양한 유산균속에서 표준화 연구가 수행되었으나 그 형질전환 효율이 $10^1 \sim 10^7$ (transformants/ μg DNA)으로 균주에 따라 큰 차이가 나고 앞으로 효율 개선의 여지가 높다 [6]. 전기천공법의 형질전환 효율은 미생물 속에 의존적이어서 새로운 유산균 속에 대해 전기천공법을 최적화하는 실험이 필요하다. 최적화하기 위한 변수로는 생육 단계, 생육 배지, 전기천공법 버퍼와 세척버퍼의 조성, 전기 펄스, 그리고 플라스미드 DNA의 근원과 양이 작용된다. 그람양성 미생물은 두꺼운 세포벽을 가지고 있어 형질전환의 효율이 낮다 [7]. 그러므로 세포벽의 침투성을 높이기 위해 몇가지 처리를 해준다. 생장배지에 glycine, threonine, 그리고 penicillin 첨가, 세포벽에 lysozyme 처리, 그리고 자가분해 (autolysis)를 유도하기 위한 열처리가 있다 [8,7,9]. 일반적으로 생장배지에 0.1-1%의 glycine 첨가하여 여러 유산균주의 형질전환 효율을 개선할 수 있었다 [9]. 생장과정에서 세포벽이 단단하고 두꺼워지므로 세포 생장 대수기와 정지기 초기단계의 박테리아 세포를 이용을 한다.

클로닝 벡터

클로닝 벡터는 원핵세포와 진핵세포에 존재하는 비염색체 DNA, 독립적인 DNA 그리고 자기복제 DNA 요소의 플라스미드로부터 구축된다. 구축된 여러 플라스미드 벡터는 다양한 유산균주의 짧고 간결한 플라스미드 (small cryptic plasmids) 이거나 크고 접합된 플라스미드 (large conjugative plasmids)를 기초로 하고 있다 [10]. 전형적인 클로닝 벡터는 복제기원, 형질전환 세포를 구별하기 위한 선택마커 (주로 항생제 마커사용)와 DNA 절편의 삽입을 위한 제한효소로 구성이 되어있다. 그리고 벡터의 구조적 안정성 향상을 위해 작은 사이즈로 구축하는 것이 바람직하다 [11]. 유산균의 클로닝 벡터는 두가지 유형으로 구분된다. 첫번째 유형은 theta type 메카니즘으로 복제가 이루어지는 pIP501 (30.2 kb)와 pAM β 1 (26.5 kb)같은 large conjugative plasmids이다. 이 플라스미드들은 세포분열 (segregational)과 구조면에서 안정성 (structural stability)을 가지고 있으며 *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. 그리고 *Pediococcus* spp.와 같은 유산균주와 다양한 그람 양성균에서 복제가 가능하다 [11]. 두번째 유형은 rolling circle 방법으로 복제를 하는 pSH71 (2.1 kb)와 pWV01 (2.2 kb)는 cryptic lactococcal plasmids이다. 본 방법은 세포분열과 구조면에서 불안정하므로 사이즈가 큰 DNA 단편을 유지하는데 문제가 될 수 있다 [11].

Integration 벡터

Integration 벡터는 유전자의 녹아웃 (knock-out), 증폭 (amplification), 교체 (replacement) 그리고 삽입 (insertion)에 사용되고 있다. 삽입서열의 전위 (transposition via IS-elements), att/integrase systems을 이용한 특정부분의 재조합, suicide 또는 temperature sensitive vectors를 이용한 homologous recombination 방법을 흔히 사용한다 [11].

온도민감형 플라스미드 (Temperature-sensitive plasmids)

염색체 내부로 유전자를 삽입하기 위해 조건/비조건적으로 복제하는 플라스미드의 원리를 이용한다. Integration 벡터인 pG⁺ 시리즈는 조건부 플라스미드로 temperature-sensitive replicon을 가지고 있다. Temperature-sensitive 벡터는 permissive temperature (예 28°C)에서 그람 양성균과 그람 음성균에서 복제가 되지만 생장온도를 높이면 (35°C 이상) 복제개시단백질 (RepA)이 불활성화되어 벡터의 복제와 숙주 염색체 안에 삽입되는 능력을 잃게된다. RepA⁺ temperature sensitive helper plasmid인 pVE6007 [12]와 RepA⁻ vector인 pORI280 [13]는 또 다른 homologous recombination 시스템으로 사용된다. 이 둘 두개의 플라스미드는 permissive temperature에서는 유지하지만 생장온도가 높아지면 pVE6007 helper plasmid에서는 RepA가 불활

성화되고, RepA가 존재하지 않는 pORI280에서는 복제와 chromosome안으로 삽입을 할 수 없게 된다 [11].

Russell and Klaenhammer [14]는 thermophilic lactobacilli의 pWV01 replicon을 기초로 한 temperature-sensitive helper plasmid인 pTRK669를 개발하였고, Neu and Henrich [15]는 thermophilic lactobacilli를 위한 pTN1 vector를 기초로 둔 integration 벡터를 개발하였다. 이 플라스미드는 *Lb. curvatus*의 rolling-circle 플라스미드인 tpLC2에서 유래하여 42°C 이하에서 복제 능력을 불활성화 시킨다.

발현벡터-ON/OFF 유도시스템 (NICE 시스템)

유산균에서 동형유전자와 이형유전자를 발현하기 위해서는 발현벡터가 필요하다. 발현벡터에는 복제될 유전자의 전사를 조절하기 위해서 적절한 프로모터가 존재한다. 주로 transcription terminator는 복제될 유전자의 downstream에 위치하고 있어 벡터의 유전자 전사를 종결하고 불필요한 전사를 막아준다. Signal sequences는 생성된 단백질을 분비시키기 위해 사용이 되고 있고 생성된 단백질의 정제를 용이하게 하기 위해 His-tag 이나 다른 인공적인 태그를 붙여 사용한다.

만일 프로모터가 강하고 유전자 발현이 매우 높으면, 생성된 단백질은 세포질 (cytoplasm)안에 축적되고 생물학적 활성이 없는 inclusion bodies를 생성한다. 또한 몇몇의 생성된 유전자가 고농도로 생성이 되면 세포에 독성을 가진다 [5]. 그러므로 발현수준을 조절할 수 있는 여러가지 유도 프로모터 (inducible promoters)가 개발되었다. 유도 프로모터에는 sugar와 NaCl 조절 프로모터, pH 의 감소, 온도의 변화와 파아지 감염 프로모터가 있다 [11]. 지금까지는 NICE라 불리는 nisin 유도 프로모터가 유산균주에 널리 사용이 되고 있으며 특히 *Lc. lactis*에 사용이 되고 있다.

Nisin은 nisin cluster에 의해 조절되어 유산균에서 생합성되는 항균성을 가진 펩타이드이다. NICE 시스템은 *Lc. lactis*의 nisin gene cluster에서 histidine kinase를 코딩하는 NisK 유전자와 response regulator 역할을 하는 NisR 유전자로 구성되어 두 개의 유전자의 조절에 의해 신호변화를 주는 원리를 가지고 있다 [16]. NICE시스템은 *nisA* 프로모터에 의해 유전자를 조절하는 플라스미드이다. NICE 플라스미드는 nisin을 생성하지 않고 NisR와 NisK 단백질을 생성하는 균주에서 소개되었다. 세포가 성장하는 대수기때 배지에 nisin을 첨가하여 *nisA* 프로모터의 조절에 의해 주로 *Lc. lactis* [16]와 thermophilic *Lb. gasseri* [15]에서 발현하였다. 발현수준은 첨가된 nisin양과 비례하였고 세포안에 다양한 단백질의 생성 수준은 총 생산soluble 단백질의 10%에서 60%까지 증가율을 보였다 [16].

Nisin 유도 시스템은 *Lc. lactis*보다 다른 유산균에서 숙주 세포와 유도 효율에 의한 내성으로 *nisR*와 *nisK*의 발현수준에서 문제가 될 수 있으나, nisin은 food-grade요소로 값이 저렴하고 적은 양 (0.05-5 ng/mL)으로 정확하게 on/off 유도

할 수가 있어 단백질 생산시스템으로 많은 장점을 가지고 있다.

합성 프로모터 (synthetic promoters)

Jensen and Hammer [17]은 목표유전자 (targeted gene)의 발현수준을 높이고 매우 안정된 발현 시스템을 얻고자 *Lc. lactis*에서 합성프로모터의 라이브러리를 기초로 한 시스템을 개발하였다. 프로모터 부분에서 -35와 -10의 일치하는 염기서열 (consensus sequences)을 일정하게 유지하고 염기서열간에 일치하지 않는 spacer sequences부분은 랜덤하게 하였다. 랜덤하게 존재하는 spacer sequences의 프로모터는 degenerated single-stranded promoter oligonucleotide에 의해 합성하였고 β -galactosidase 유전자 (*lacL* and *lacM*)를 가지고 있는 벡터에 클로닝 하였다. 합성프로모터는 단백질 발현량을 10-1000배로 다양하게 조절하는데 사용되고 유산균 뿐 만 아니라 다른 미생물에서도 유용하게 이용되는 방법이다 [18].

유산균 대사경로 가상모델

오늘날 다양한 생명체의 유전체 해독연구를 통해서 수많은 생물의 유전적 정보가 분석되고 있다. 특히, genomics, proteomics 등 omics에 관한 연구가 많이 이루어지면서 생명체에 대한 유전적 정보가 더 빨리, 더 많이 확보되고 있다. 이러한 유전체 분석을 통해 확보되는 많은 양의 데이터를 분석하고, 예측 가능한 수학적 모델링 및 시뮬레이션을 통해 총체적으로 분석함으로써 복잡한 생물학적 과정의 원리를 수학적으로 이해하고 컴퓨터 가상 모델을 구축하게 된다. 즉, 유전적 정보를 전체적으로 분석하여 컴퓨터상에 미생물의 가상 세포를 구성하면, 이것을 활용하여 다양한 성장조건에서의 미생물의 대사경로를 분석하고, 대사산물의 생산적 특성 등을 실제로 실험을 시작하기 전에 컴퓨터 시뮬레이션을 통해 예측하여, 실제 실험설계에 도움을 주어 실험 시간의 절약 및 예상 되는 실험결과를 확인 할 수가 있다. 또한 가상 모델은 미생물의 유전자와 기능의 관계를 확인하는데 도움을 주며, 대사과정 전체를 시각화시켜 미생물 내에서 일어나는 대사과정을 우리의 눈으로 확인 할 수 있게 한다. 유산균의 경우, 전체 유전자의 크기가 보통 2.3-3.4 Mb 크기이며 *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. johnsonii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. sakei*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, 그리고 *Streptococcus thermophilus* 등의 전체 유전자 서열이 밝혀졌다. 그리고 이 중에서 *Lc. lactis* [19], *Lb. plantarum* [20], *St. thermophilus* [21] 등 3종류의 유산균에 대해서 컴퓨터 가상 모델이 개발 되었다.

유산균 대사공학

유산균은 에너지와 당대사 메카니즘이 상대적으로 간단하고 에너지 경로가 일반적으로 생합성경로와 독립적이기

때문에 당대사경로와 별도로 대사물 합성이 이루어질 수 있어 대사공학적 측면에서 유리하다 [22]. 유산균을 이용한 대사공학 전략은 산업적 중요 최종생산물 (sweeteners, flavors and aroma components)을 생성하기 위해서 대부분 pyruvate 대사작용 경로에 초점을 두고 있다 [1].

젖산 (lactic acid)

Lactic acid (또는 lactate)는 식품보존제나 향미증진제, 화장품의 보습제, 유화제, 또는 제약품의 합성에 사용된다. Lactic acid은 D-와 L-의 isomers인 두 개의 광학거울이성질체를 가지고 있다. L-lactate는 포유동물의 중간대사물 이므로 식품이나 제약분야에 우선적으로 사용된다. 그러나 D-lactate는 갓난아기와 환자에 short-bowel syndrome와 intestinal failure의 원인이 되는 이성질체로 여겨지고 있다 [23]. L-lactate는 산업적으로 고가의 합성 바이오폴리머생산에 재료로 사용되고 있다 [2]. 화학적합성법으로는 D-와 L-의 두 개의 광학이성질체의 라세믹 혼합물이 생성이 된다. 그러나 젖산 발효법으로는 D-나 L-lactic acid 각각 또는 둘 다 합성이 가능하다. 유산균주는 lactic acid 이성질체를 생성하기 위해 D-와 L-lactate dehydrogenases 효소를 사용하고, 몇몇 균주 (e.g. *Lb. plantarum*와 *Lb. sakei*)들은 D-lactate에서 L-lactate로 전환하기 위한 racemase 활성을 가지고 있다 [24]. 많은 유산균들은 자연적으로 lactic acid 생성하는 안성맛춤 균주이다. 따라서 lactic acid의 생산을 위해 유산균계량은 발효공정의 개선과 lactic acid생성 균주의 선발 및 스크리닝에 초점을 두고 있다. 반면에, 대사공학연구는 이형젖산발효에서 순수 L-lactic acid생성에 초점을 두고 있다. 예를 들면 Bhowmik and Steele [25]는 *Lb. helveticus*에서 D-lactate dehydrogenase gene (LDHD)을 불활성화하여 순수 L-lactate를 생산하였다. Kylä-Nikkilä et al. [26]는 chromosomal integrations에 의해 *ldhD*-negative strains을 구축한 *L. helveticus*에서 오직 L-lactic acid만 생산한 연구를 하였다. *Lb. johnsonii*에서 *ldhD*의 불활성화한 결과는 순수 L-lactic acid을 생성하였지만 pyruvate가 다른 최종생산물 (e.g. diacetyl과 acetoin)로 전환 되었다 [23]. *Lb. plantarum ldhD* gene의 불활성화는 lactate의 racemic mixture가 생성되었지만 [27], *ldhL* gene의 불활성화는 오로지 D-lactate만을 생성하였다 [28]. *Lb. helveticus*와 *Lb. plantarum*에서 *ldhL*의 대량발현은 L-와 D-lactate 생성에 거의 영향을 주지 않았다 [27].

Diacetyl 생산

Diacetyl은 낙농식품에 전형적인 버터향을 제공한다. α -acetolactate로부터 oxidative decarboxylation를 거쳐 생성된다. 특히 *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*는 lactose와 cometabolic fermentation으로 citrate로부터 diacetyl을 생성한다 [29]. 그러나 낙농식품에서 citrate은 극소수로 존재하여 citrate를 대신해 lactose로부터 diacetyl을 생성하는

다양한 전략이 *Lc. lactis*의 대사공학연구가 진행되었다 [30]. *Lc. lactis*에서 diacetyl생성을 증가시키기 위한 첫번째 방법으로 *ldhD* 유전자를 제거하였는데, 그 결과 혐기적 조건에서 높은 양의 formate와 ethanol이 생성되었으나, 호기적조건에서는 최종생성물이 pyruvate에서 acetate와 acetone을 생성하였다 [29]. 동시에, pyruvate를 α -acetolactate로 전환해주는 α -acetolactate synthase (ALS) 또는 acetohydroxy acid synthase enzymes (ILVBN)를 증가시켰지만, 호기적 조건에서 pyruvate에서 오직 acetoin 생성만을 증가시켰다. LDH유전자가 결핍된 돌연변이균주에 ALS를 발현시켰을 때 낮은 양의 α -acetolactate와 높은 양의 acetoin을 생성하였다 [29]. α -Acetolactate을 acetoin으로 전환시키는 α -acetolactate decarboxylase (ALDB)효소의 불활성화는 호기적 조건에서 적은 양의 diacetyl을 생성하였다. ALDB가 손실된 돌연변이균주에 ILVBN 유전자를 과대발현 시켰을 때 diacetyl의 생성량을 증가시켰다. 세포 속에서 산화환원 균형 (NAD^+ / $NADH$)은 다양한 발효패턴에서 중요한 역할을 한다 [31]. *Lc. lactis*의 산화환원 균형은 NICE시스템을 사용하여 *St. mutans nox* gene을 이용하여 조절하였다 [32]. 산소가 존재할 때 NOX유전자의 발현은 세포안의 NADH를 감소시키고 ($1/2 O_2 + H^+ + NADH \rightarrow H_2O + NAD^+$), pyruvate가 oxidative나 NADH-independent한 경로로 변환된다 [29,30]. ALDB유전자가 결핍된 *Lc. lactis*균주에 NOX유전자를 발현시키면 호기적 조건에서 정지기일 때 pyruvate의 80%가 α -acetolactate와 diacetyl로 성공적으로 전환하였다 [30].

L-alanine 생산

L-alanine은 식품감미료와 제약분야에 사용된다. *Lc. lactis* 균주에서 NICE시스템을 이용하여 *Bacillus sphaericus*에서 유래한 L-alanine dehydrogenase (L-AlaDH) 유전자를 발현시켜 L-alanine을 생산하였다 [33]. L-AlaDH와 L-LDH는 pyruvate를 기질로 NADH를 cofactor로 이용한다. Pyruvate와 NADH에 대한 *B. sphaericus* L-AlaDH의 K_m 값은 *Lc. lactis* L-LDH의 K_m 값과 유사하다. *B. sphaericus* L-AlaDH 유전자를 발현시킨 *Lc. lactis*균주가 ammonium농도가 과다하게 존재 시 glucose fermentation에 의해 최종생성물의 35% 수준의 alanine을 생성하였다. 그리고 L-LDH 결핍 *Lc. lactis* 균주에서 L-AlaDH 유전자 발현으로 glucose를 alanine으로 완전히 전환시켰다. 그러나 D-와 L-alanine의 거울이성질체의 혼합물이 생성되고 L-alanine은 alanine racemase에 의해 D-alanine으로 전환되었다. 따라서 오직 L-alanine만을 얻기 위해 L-LDH 결핍 *Lc. lactis*균주에 alanine racemase (ALR)을 코딩하는 유전자를 결핍시켜 순수한 L-alanine을 대량생산을 할 수 있었다 [31].

Acetaldehyde 생산

Acetaldehyde는 요거트와 같은 낙농제품에서 중요한 향기

성분이다. 요거트에서 acetaldehyde를 생성하는 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*와 *St. thermophilus*를 선발하였다 [34]. 또한, *St. thermophilus*에서 *glyA* 유전자에 의해 코딩되는 serine hydroxymethyltransferase (SHMT)를 발현한 결과 acetaldehyde가 대량 생성되었다 [35]. SHMT효소는 threonine을 acetaldehyde와 glycine로 전환하는 threonine aldolase 활성을 갖는다. *glyA* 유전자를 발현시킨 균주는 acetaldehyde 생성이 80-90% 증가 되었다. *Lc. lactis*에 그람음성균인 *Zymomonas mobilis*에서 유래한 pyruvate decarboxylase (pdc) 발현은 pyruvate에서 acetaldehyde로 전환시켜준다. Pyruvate 이용을 증가시켜 acetaldehyde생성을 높이기 위해 NADH oxidase (*nox*) 유전자를 발현시킨 결과, 혐기적조건하에서 50%의 glucose를 소비하여 acetaldehyde로 전환한다 [34].

Mannitol 생산

Mannitol은 여섯개의 탄소로 이루어진 sugar alcohol로써 bacteria, fungi, algae, lichens 그리고 higher plants와 같은 다양한 유기체에서 합성된다. Mannitol은 저칼로리 sugar alcohol로써 식품산업에서 sucrose, lactose, fructose 또는 glucose의 대체제로 사용되고, 생물의 세포에서 항산화제 역할을 하며, 사람의 장에서 short-chain fatty acids로 전환되어 대장암을 예방한다. 산업적으로 mannitol은 glucose-fructose syrup 또는 inverted sugar의 촉매수소화 반응에 의해 sorbitol과 함께 생산되나, sorbitol과의 분리정제가 어렵고 mannitol의 생성량이 적은 것이 문제점이다. 반면, 효모, 곰팡이 그리고 유산균들은 sorbitol 생산 없이 mannitol을 순수하게 합성할 수 있는 장점이 있다. 이형젖산발효를 하는 유산균들은 mannitol dehydrogenase (MDH)를 이용하여 fructose에서 mannitol로 전환 할 수 있다. 일부분의 fructose는 heterofermentative pathway을 거쳐 에너지 대사를 거치고, 다른 일부분은 electron acceptor로써 작용하여 mannitol로 환원된다. 이 반응에서 fructose와 glucose를 함께 탄소원으로 이용 할 경우 mannitol의 생성이 증가하였다 [36]. 특히, *Leuc. mesenteroides*는 resting state fermentation에서 fructose로부터 97%의 mannitol수율과 $26.2 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 의 생산성을 보였다. 동형젖산발효 유산균 또한 예외적인 조건에서 mannitol 생성에 대한 보고가 있다. *Lb. plantarum*과 *Lc. lactis*의 lactate dehydrogenases (LDH) 유전자를 억제한 결과 mannitol과 다른 최종생성물을 생산할 수 있었다 [27,36]. 동형젖산발효 유산균의 mannitol생성 수율이 이형젖산발효 유산균과 비교하면 낮지만, Gaspar et al. [37]는 높은 수율의 mannitol을 생산하는 *Lc. lactis*균주 구축에 성공하였다. 이들은 LDH가 결핍된 균주의 mannitol transport system의 EIICB^{Mtl}와 EIIA^{Mtl}를 인코딩하는 *mtlA* 또는 *mtlF* 유전자를 각각 억제시켰고, 이 돌연변이 균주는 30%의 glucose를 mannitol로 전환했다. 그리고 Wisselink et al. [38]은 *Lb. plantarum*에서 유래된 mannitol 1-phosphate dehydrogenase gene (*mtlD*)을 발현시킨 LDH가 결핍된 *Lc. lactis*균주를 개발하였다.

Resting state에서 nisin-inducible system을 이용하여 25%의 glucose를 mannitol로 전환하였고, *Lb. plantarum*에서 유래된 *mtlD*과 *Eimeria tenella* (a protozoan parasite)에서 유래된 *mtlD*을 발현시킨 LDH가 결핍된 *Lc. lactis*균주를 이용하여 glucose에서 mannitol의 전환을 50%로 높였다. 얻어진 50%의 수율은 세포를 성장하며 얻어진 값이며 *Lc. lactis*의 이론적 mannitol 생성 수율인 67%와 가까운 결과이다 [39].

Sorbitol 생산

Sorbitol은 mannitol과 같은 sugar alcohols로 여러 과일에 존재한다. Sorbitol은 식품산업에서 감미료 (sweetener), 습윤제 (humectants), 조직개선제 (texturizer)로 이용되거나, 다양한 제약품이나 vitamin C 합성에 사용된다. Sorbitol은 전통적으로 glucose를 catalytic hydrogenation하여 생산하였다. Mannitol 파트에서 언급한 특징대로 glucose-fructose syrup의 catalytic hydrogenation에서 mannitol과 같이 생산되는 주요생성물이다. *Candida boidinii*, *C. famata*, 그리고 *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 소수의 미생물은 sorbitol을 생산하지만 이와 같은 yeast를 이용하여 sorbitol을 생물공학적으로 생산한 연구는 드물다. 유산균에서는 *Lb. plantarum* 균주에서 sorbitol dehydrogenase gene (*stlDH*)을 발현시키고, mannitol phosphate dehydrogenase (MPDH)와 lactate dehydrogenase (LDH)을 불활성화시킨 결과, 다량의 sorbitol이 생성되었다 [36]. Nissen et al. [40]는 chromosomal lactose operon (*lac*)안에 sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene (*gutF*)을 삽입시킨 *Lb. casei*를 구축하였다. 그 결과 *lac* operon에 의해 glucose에 억제되고 lactose에 유도되어, lactose배지에서 전배양 한 재조합 미생물은 glucose로부터 sorbitol을 생성 할 수 있었다. 그리고 LDH유전자가 불활성화 된 *Lb. casei* 재조합 미생물은 높은 NADH 환경에서 glucose에서 sorbitol전환율을 2.4%에서 4.3%로 증가시킬 수 있었다. 그러나 *Z. mobilis*균주는 fructose에서 sorbitol로 91-100% 전환 할 수 있다.

Xylitol 생산

Xylitol은 탄소원자 다섯개로 이루어진 sugar alcohol로써 자연, 식물, 채소와 과일에 소량 존재하고 있다. Xylitol은 식품산업에서 감미료와 설탕대체제로 사용이 되고 있다. 그리고 항충치 기능으로 치아제품에 사용되고 있다. 현재 xylitol은 니켈촉매를 이용한 xylose를 화학적으로 환원시켜 생산하고 있는데, 높은 온도와 압력이 필요하고 D-xylose의 높은 순도를 요구하기 때문에 비용이 비싼 단점이 있다. Yeasts, fungi 그리고 bacteria와 같은 미생물들은 xylose reductase에 의해 D-xylose를 xylitol로 환원 시킬 수 있다. 현재 yeast에 속하는 *Candida* 속은 효과적인 xylitol 생성 균주이다. *St. avium*와 *Lb. casei*에서 xylitol을 대사하고

있지만 자연적 유산균에서는 xylitol을 생성하는 사례가 보고 되지 않았다. 그러나 Nyysölä et al. [41]는 sugar 기질로써 glucose-xylose 혼합물을 이용하여 xylitol을 생성할 수 있는 새로운 재조합 *Lc. lactis* 균주를 개발하였다. 이 균주는 yeast *Pichia stipitis*에서 유래한 xylose reductase와 *Lb. brevis*에서 유래한 xylose transporter를 과대발현시켜, fed-batch 발효에서 34%의 xylose가 xylitol로 전환되어 2.7 g/L·h의 생성량을 보였다. 이 생성량은 yeast의 생성량 4-5 g/L·h 보다는 적은 양이다.

엽산 (folate) 생산

엽산 (folic acid)는 사람의 음식 섭취에 꼭 필요한 성분으로 많은 대사반응에 cofactor로 작용하며 특히 nucleotides, DNA와 RNA의 building blocks의 생합성에 관여한다. Folic acid는 여러 종류의 암을 예방한다고 보고되고 있고, 식품에 아주 적게 함유되어 있기 때문에 정상적인 식단에 필수적으로 첨가하여야 할 성분으로 여러 종류의 (녹색) 식물과 미생물들에 의해 합성된다. Folate는 비특이적 개념으로서 비타민 활성을 가진 folate 복합물을 가리키는 반면, folic acid는 화학적으로 합성된 비타민을 가리킨다. Folate는 미생물의 대사과정에 꼭 필요한 cofactor이며 대부분 박테리아에 존재한다. 요거트에 들어 있는 유산균인 *St. thermophilus*가 folate를 생성한다는 사실이 보고되었는데, 이후 *Propionibacterium*을 포함한 다른 food-grade 박테리아들도 우유발효에서 folate를 생성하는 것이 관찰되었다. 일부 strain들은 folate를 세포 내에 함유하나, 일부는 거의 전부를 세포 외로 분비하기도 한다. *Lc. lactis* MG1363에서 folate의 생합성과 관련된 유전자가 최근에 보고되었고 [36], folate의 생합성과 연관되는 gene cluster의 구성에 관한 정보들은 유전공학기법을 이용하여 *Lc. lactis*에서 folate의 생합성 양을 높일 수 있도록 하였다. NICE 시스템을 이용하였을 때 *Lc. lactis* NZ9000에서 folate의 생합성에 관여하는 유전자들이 단독 혹은 동시에 과다 발현된 것을 확인하였고, folate 생합성의 첫번째 효소인 GTP cyclohydrolase를 과다 발현하여 folate의 생산량을 세배 증가할 수 있었다. 장차 이런 미생물들을 우유발효제품에 스타터로 함께 이용함으로써 현재 folate 일일 수요량의 15~20%밖에 충족시키지 못하는 것을 100% 공급할 수 있을 것으로 기대한다.

다당류

많은 유산균들이 다양한 exopolysaccharides (EPS)을 생산하는데, 특히 dextran, mutan과 levan 같은 homopolysaccharide들은 유산균들 중 *Lactobacillus*, *Streptococcus*와 *Leuconostoc*에 의해 생산된다. 그 밖에 *Lc. lactis*는 다양한 조성의 EPS를 생산한다 [42]. 유산균에 의해 생산된 다당류는 'food-grade' 첨가제로 고안되고, 유제품에 조직과 미각의 특성을 부여하는 등의 용도로 인해 많은 관심을 받고 있다. *Lactococcus*

EPS는 콜레스테롤 저하 효과, 면역조절능 그리고 항암효과를 보여 nutraceuticals로써 제조하는 연구가 수행되었다. 이후 exopolysaccharides 생합성 메커니즘이 밝혀지면서 관련된 유전학, 동역학 그리고 물리학에 있어 중요한 진보를 보였다 [43].

감 사

본 연구는 2010 충북대학교 연구재단 지원 연구비에 의해 수행되었습니다.

접수 : 2010년 7월 21일, 게재승인 : 2010년 8월 22일

REFERENCES

1. Smid, E. J., D. Molenaar, J. Hugenholtz, W. M. de Vos, and B. Teusink (2005) Functional ingredient production: application of global metabolic models. *Curr. Opin. Biotech.* 16: 190-197.
2. Bai, D. M., X. M. Zhao, X. G. Li, and S. M. Xu (2004) Strain improvement and metabolic flux analysis in the wild-type and a mutant *Lactobacillus lactis* strain for L(+)-lactic acid production. *Biotechnol. Bioeng.* 88: 681-689.
3. von Wright, A. and M. Sibakov (1998) Genetic modification of lactic acid bacteria. pp. 161-210. In: S. Salminen, and A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 2nd ed., Marcel and Dekker, Inc., NY, USA.
4. Mills, D. A. (2001) Mutagenesis in the post genomics era: tools for generating insertional mutations in the lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 503-509.
5. Morelli, L., F. K. Vogensen, and A. von Wright (2004) Genetics of lactic acid bacteria. pp. 249-293. In: S. Salminen, A. von Wright, and A. Ouwehand (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 3rd rev. and exp. ed. Marcel Dekker, Inc., NY, USA.
6. Serror, P., T. Sasaki, S. D. Ehrlich, and E. Maguin (2002) Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. *Appl. Environ. Microb.* 68: 46-52.
7. Kim, Y. H., K. S. Han, S. Oh, S. You, and S. H. Kim (2005) Optimization of technical conditions for the transformation of *Lactobacillus acidophilus* strains by electroporation. *J. Appl. Microbiol.* 99: 167-174.
8. Berthier, F., M. Zagorec, M. Champomier-Vergès, S. D. Ehrlich, and F. Morel-Deville (1996) Efficient transformation of *Lactobacillus sake* by electroporation.

- Microbiology* 142: 1273-1279.
9. Wei, M.-Q., C. M. Rush, J. M. Norman, L. M. Hafner, R. J. Epping, and P. Timms (1995) An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation. *J. Microbiol. Meth.* 21: 97-109.
 10. Perez-Arellano, I., M. Zuniga, and G. Perez-Martinez (2001) Construction of compatible wide host-range shuttle vectors for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Plasmid* 46: 106-116.
 11. Shareck, J., Y. Choi, B. Lee, and C. B. Miguez (2004) Cloning vectors based on cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential applications in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24: 155-208.
 12. Maguin, E., P. Duwat, T. Hege, D. Ehrlich, and A. Gruss (1992) New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 5633-5638.
 13. Leenhouts, K., G. Buist, A. Bolhuis, A. Berge, J. Kiel, I. Mierau, M. Dabrowska, G. Venema, and J. Kok (1996) A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. *Mol. Gen. Genet.* 253: 217-224.
 14. Russell, W. M. and T. R. Klaenhammer (2001) Efficient system for directed integration into the *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri* chromosomes via homologous recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4361-4364.
 15. Neu, T. and B. Henrich (2003) New thermosensitive delivery vector and its use to enable nisin controlled gene expression in *Lactobacillus gasseri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1377-1382.
 16. Kuipers, O. P., P. G. de Ruyter, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos (1997) Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* 15: 135-140.
 17. Jensen, P. R. and K. Hammer (1998) The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 82-87.
 18. Solem, C. and P. R. Jensen (2002) Modulation of gene expression made easy. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2397-2403.
 19. Oliveira, A. P., J. Nielsen, and J. Förster (2005) Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiol.* 5: 39.
 20. Teusink, B., F. H. van Enkevort, C. Francke, A. Wiersma, A. Wegkamp, E. J., Smid, and R. J. Siezen (2005) In silico reconstruction of the metabolic pathways of *Lactobacillus plantarum*: comparing predictions of nutrient requirements with those from growth experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7253-7262.
 21. Pastink, M. I., B. Teusink, P. Hols, S. Visser, W. M. de Vos, and J. Hugenholtz (2009) Genome-scale model of *Streptococcus thermophilus* LMG18311 for metabolic comparison of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3627-3633.
 22. Kleerebezem, M. and J. Hugenholtz (2003) Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotech.* 14: 232-237.
 23. Lapiere, L., J. E. Germond, A. Ott, M. Delley, and B. Mollet (1999) D-Lactate dehydrogenase gene (*ldhD*) inactivation and resulting metabolic effects in the *Lactobacillus johnsonii* strains La1 and N312. *Appl. Environ. Microb.* 65: 4002-4007.
 24. Goffin, P., M. Deghorain, J. L. Mainardi, I. Tytgat, M. C. Champomier-Verges, M. Kleerebezem, and P. Hols (2005) Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D-lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 187: 6750-6761.
 25. Bhowmik, T. and J. L. Steele (1994) Cloning, characterization and insertional inactivation of the *Lactobacillus helveticus* D(-) lactate dehydrogenase gene. *Appl. Microbiol. Biot.* 41: 432-439.
 26. Kylä-Nikkilä, K., M. Hujanen, M. Leisola, and A. Palva (2000) Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid. *Appl. Environ. Microb.* 66: 3835-3841.
 27. Ferain, T., J. N. Hobbs Jr., J. Richardson, N. Bernard, D. Garmyn, P. Hols, N. E. Allen, and J. Delcour (1996) Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 178: 5431-5437.
 28. Ferain, T., D. Garmyn, N. Bernard, P. Hols, and J. Delcour (1994) *Lactobacillus plantarum* *ldhL* gene: overexpression and deletion. *J. Bacteriol.* 176: 596-601.
 29. Kleerebezem, M., P. Hols, and J. Hugenholtz (2000) Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme Microb. Tech.* 26: 840-848.
 30. Hugenholtz, J., M. Kleerebezem, M. Starrenburg, J. Delcour, W. de Vos, and P. Hols (2000) *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl production. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4112-4114.
 31. Hols, P., A. Ramos, J. Hugenholtz, J. Delcour, W. M. de Vos, H. Santos, and M. Kleerebezem (1999) Acetate utilization in *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase: a rescue pathway for maintaining redox balance. *J. Bacteriol.* 181: 5521-5526.
 32. Lopez de Felipe, F., M. Kleerebezem, W. M. de Vos, and J. Hugenholtz (1998) Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *J. Bacteriol.* 180: 3804-3808.
 33. Hols, P., M. Kleerebezem, A. N. Schanck, T. Ferain, J. Hugenholtz, J. Delcour, and W. M. de Vos (1999) Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to

- homoalanine fermentation through metabolic engineering. *Nat. Biotechnol.* 17: 588-592.
34. Bongers, R. S., M. H. Hoefnagel, and M. Kleerebezem (2005) High-level acetaldehyde production in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Appl. Environ. Microb.* 71: 1109-1113.
 35. Chaves, A. C., M. Fernandez, A. L. Lerayer, I. Mierau, M. Kleerebezem, and J. Hugenholtz (2002) Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microb.* 68: 5656-5662.
 36. Hugenholtz, J., W. Sybesma, M. N. Groot, W. Wisselink, V. Ladero, K. Burgess, D. van Sinderen, J. C. Piard, G. Eggink, E. J. Smid, G. Savoy, F. Sesma, T. Jansen, P. Hols, and M. Kleerebezem (2002) Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie. Van Leeuwenhoek* 82: 217-235.
 37. Gaspar, P., A. R. Neves, A. Ramos, M. J. Gasson, C. A. Shearman, and H. Santos (2004) Engineering *Lactococcus lactis* for production of mannitol: high yields from food-grade strains deficient in lactate dehydrogenase and the mannitol transport system. *Appl. Environ. Microb.* 70: 1466-1474.
 38. Wisselink, H. W., A. E. Mars, P. van der Meer, G. Eggink, and J. Hugenholtz (2004) Metabolic engineering of mannitol production in *Lactococcus lactis*: influence of overexpression of mannitol 1-phosphate dehydrogenase in different genetic backgrounds. *Appl. Environ. Microb.* 70: 4286-4292.
 39. Wisselink, H. W., A. P. Moers, A. E. Mars, M. H. Hoefnagel, W. M. de Vos, and J. Hugenholtz (2005) Overproduction of heterologous mannitol 1-phosphatase: a key factor for engineering mannitol production by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microb.* 71: 1507-1514.
 40. Nissen, L., G. Perez-Martinez, and M. J. Yebra (2005) Sorbitol synthesis by an engineered *Lactobacillus casei* strain expressing a sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene within the lactose operon. *FEMS Microbiol. Lett.* 249: 177-183.
 41. Nyssölä, A. and M. Leisola (2005) Production of sugar alcohols by lactic acid bacteria. *Recent Res. Devel. Biotech. Bioeng.* 7: 19-39.
 42. van Casteren, W. H., P. de Waard, C. Dijkema, H. A. Schols, and A. G. Voragen (2000) Structural characterisation and enzymic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891. *Carbohydr. Res.* 327: 411-422.
 43. Boels, I. C., R. van Kranenburg, J. Hugenholtz, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos (2001) Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11: 723-732.