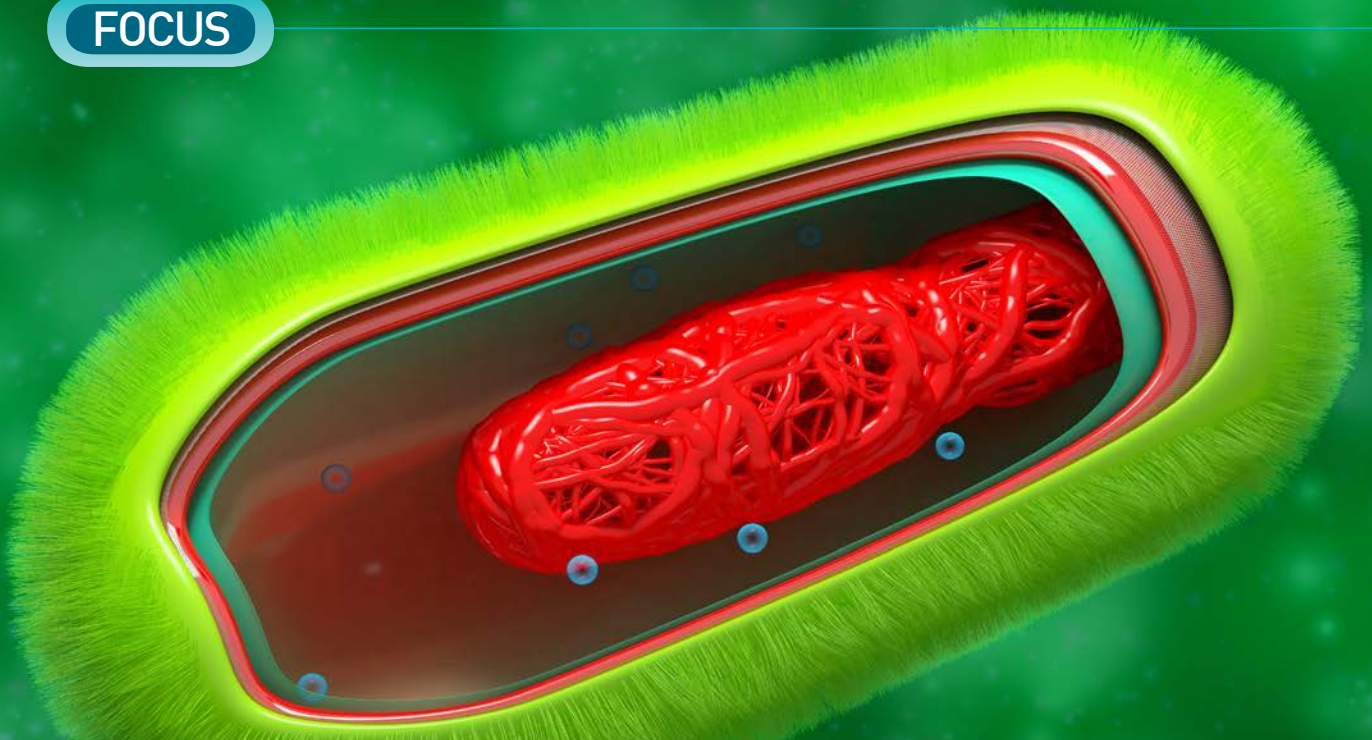


미세조류부터 바이오플라스틱 원료인 숙신산 세계최초 생산

글_우한민

한국과학기술연구원
청정에너지연구센터 선임연구원
hmwoo@kist.re.kr

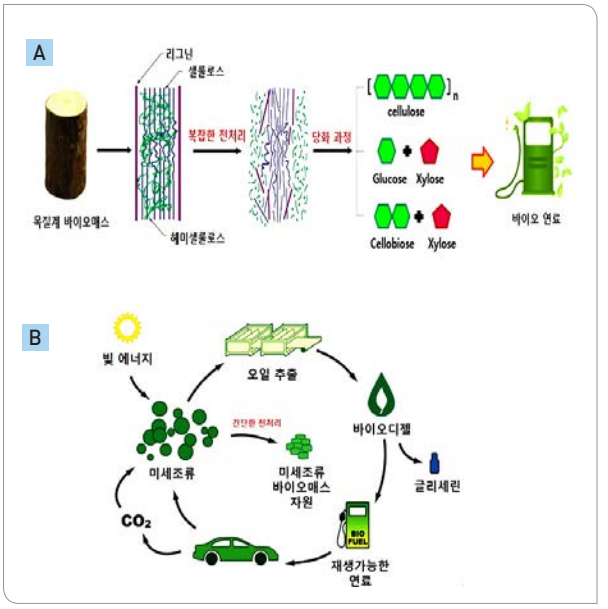
글쓴이는 고려대학교 화공생명공학과 졸업 후 한국과학기술원에서 석사학위를, 독일 뒤셀도르프대학교에서 박사학위를 받았다. 현재 고려대학교 그린스쿨대학원 겸임교수, 과학기술연합대학원대학교 청정연료 화학공학 겸임교수 등을 맡고 있다.

화석 연료 사용으로 인한 지구 온난화 및 환경 오염문제가 심각해짐에 따라 환경친화적 바이오연료 및 화학제품의 생산에 대한 관심이 증가하면서, 바이오매스에 대한 관심 또한 증가하고 있다. 이러한 바이오매스로부터 생산되는 바이오연료 또는 바이오화학제품은 온실가스인 이산화탄소를 배출하지만, 이것을 다시 바이오매스가 흡수하는 순환 구조(카본 뉴트럴; Carbon Neutral)이기 때문에 실제로 대기 중에 배출되는 이산화탄소는 큰 영향을 끼치지 않는다. 따라서, 대사공학을 통해 미생물의 대사경로를 원하는 바이오화학물질을 생산하도록 조작할 수 있다면, 석유기반 화학산업을 바이오 중심의 사회로 변화시킬 수 있을 것이다.

박테리아-미세조류의 바이오리파이너리 개발 주목

바이오매스 중 목질계 바이오매스를 이용하여 미생물을 발효해 원하는 화학물질로 생산하기 위해서는 '당화 과정'이 필요하다. '당화 과정'은 뜨거운 물, 산, 알칼리 등을 이용해 목제의 구조를 느슨하게 하여 결정형 셀룰로오스 구조를 분해하고, 결정형 셀룰로오스를 단당류로 분해하는 것이다〈그림 1A〉. 하지만, 전처리과정이 복잡하고 해외독점복합효소를 이용해야 하는 단점이 있다.

최근, 대기중의 이산화탄소 농도를 줄이기 위한 방법 중 하나로 미세조류를 이용하는 방법이 세계적으로 주목받고 있다. 이산화탄소를 독립 영양원으로 성장하는 광합성미생물로, 단순한 화학구조로 이루어져 있어 전처리가 용



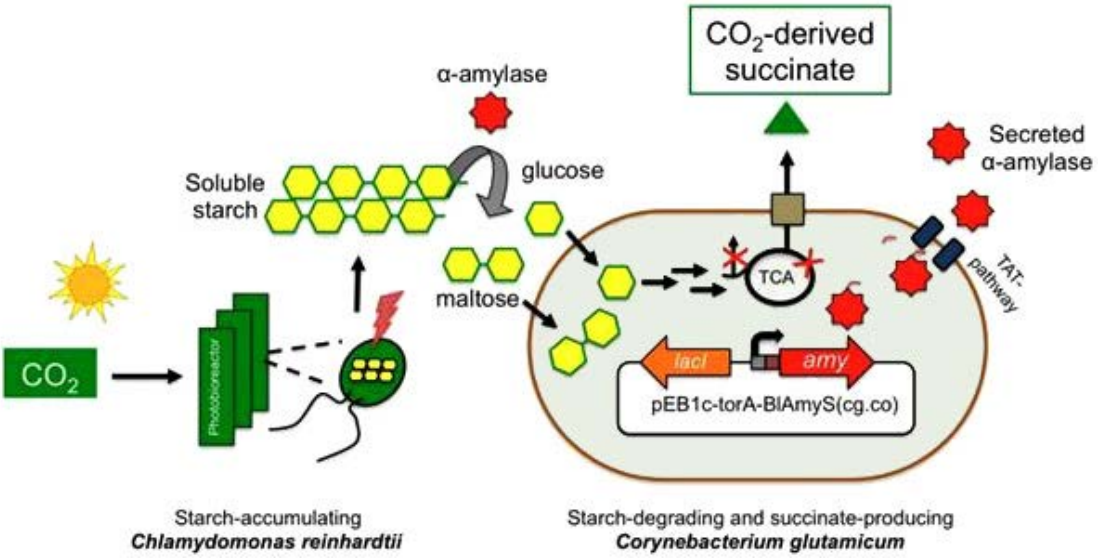
▸▸ 1. A) 목질계 바이오매스를 이용한 바이오연료 생산 과정 모식도, B) 미세조류를 이용한 바이오연료 및 바이오매스 자원 생산 과정 모식도

이하여 바이오디젤 생산, 화장품의 원료 및 의약품과 같은 기능성 물질 생산 등 다양하게 활용된다〈그림 1B〉. 또한 이산화탄소를 적극적으로 사용하기 때문에 탄소순환의 긍정적인 면(카본 파지티브; Carbon Positive)이 있다.

특히, 바이오오일을 축적하는 미세조류의 종에 대해서는 바이오디젤 생산을 위한 지질 추출연구가 활발하다. 하지만, 아직 미세조류에 대한 유전자 조작 기술의 한계로 인해 다양한 바이오화학물질 생산을 이루기 위한 바이오리파이너리 기술을 적용하기에는 아직 시기상조이다.

한편, 특이 미세조류의 종에 대해서는 세포 생장시 전분을 비롯한 다양한 탄수화물을 50% 이상 세포 내에 축적하게 된다. 따라서, 본 연구팀은 이 특징에 착안하여 바이오리파이너리 기술을 위한 박테리아-미세조류 시스템 개발 가능성에 주목하였다.

본 연구에서는 기존의 바이오리파이너리 기술에 사용되는 박테리아인 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)을 선정하였다. 이 균주는 다양한 아미노산과 핵산 등을 생산하는데 널리 이용되는 산업용 미생물 균주로 알려져 있으며, CJ나 대상과 같은 발효기업에서 실제 사용하고 있어 그 산업적용도가 높다. 따라서, 박테리아-미세조류의 바이오리파이너리 시스템 개발을 위해 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)을 합성생물학 기법을 통해, 미세조류 바이오매스로부터 바이오플라스틱의 원료물질인 숙신산을 생산하고자 하였다〈그림 2〉.



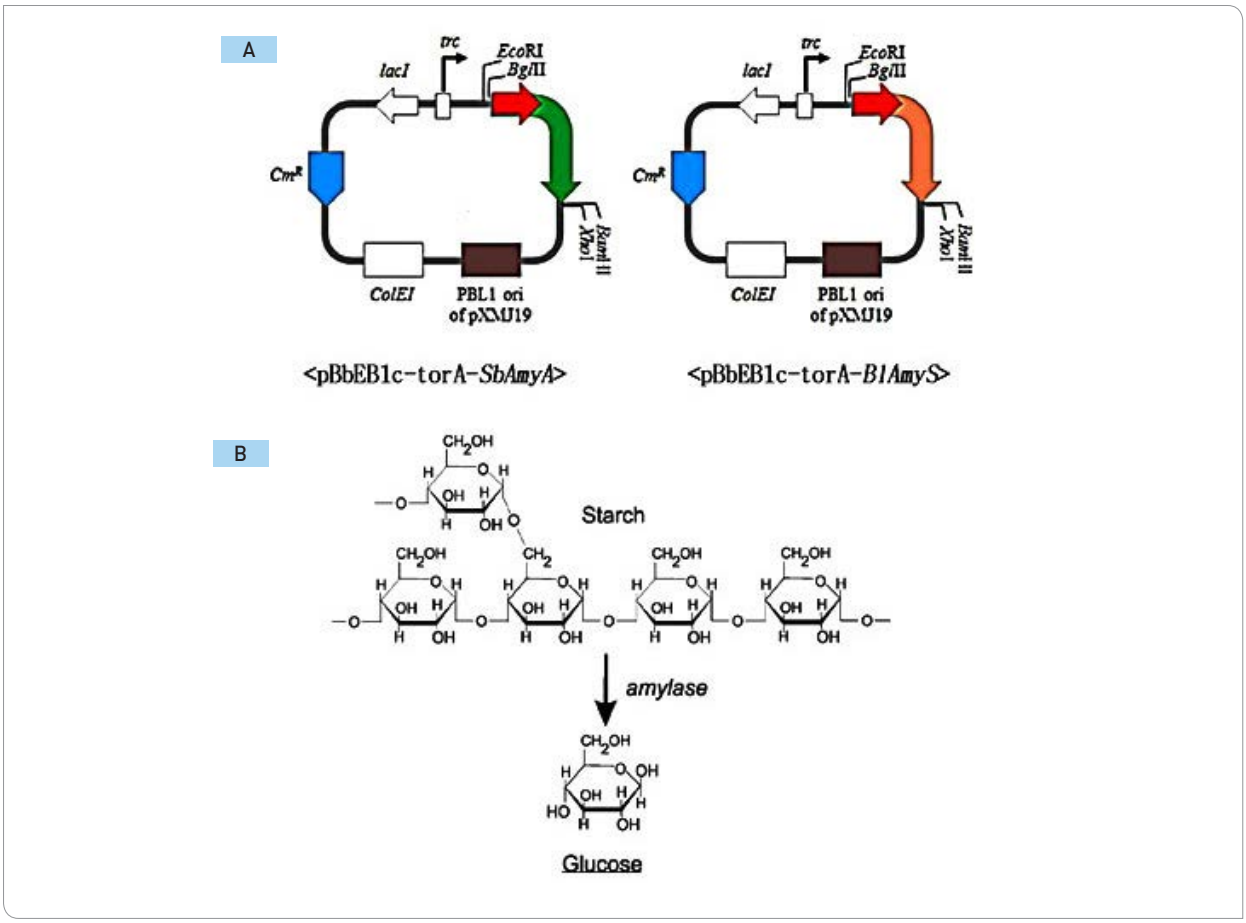
▸▸ 2. CO_2유래 미세조류 바이오매스로부터 개발 균주를 이용하여 숙신산을 생산하는 통합바이오공정 모식도

유전자 조작 및 균주 개량

우선 미세조류 내 탄수화물의 50%가 전분의 형태로 이루어져 있어, 효율적 바이오매스 이용과 바이오화학제품 생산을 위해서는 전분분해가 필수적이다. 반면, 본 연구에서 사용한 코리네박테리움 글루타미쿰 야생형 균주는 탄소원으로 전분을 이용하지 못하는 것으로 알려져 있다.

전분을 글루코오스(glucose)와 말토오즈(maltose)로 가수분해하는 알파-아밀라아제 효소의 발현은 필수적이다. 또한 전분은 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 세포 내로 수송되지 못하기 때문에 발현시킨 알파-아밀라아제 효소를 세포 밖으로 분비시켜야 한다. 따라서 본 연구팀은 이를 위해, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에서 발현된 단백질이 세포막을 통과할 수 있도록 TorA Signal peptide를 이용하였다. 단백질 발현의 최적화를 위해서 코돈-최적화 과정을 거쳐서 아밀라아제 발현 유전자[스텝토코코스 보비스(*Streptococcus bovis*)유래의 BbAmyA유전자/바실러스 린체니포미스[(*Bacillus licheniformis*)유래의 BlAmyS]를 합성하고, 발현 벡터에 도입하였다 〈그림 3〉.

본 연구팀은 코리네박테리움 글루타미쿰 균주가 전분을 이용할 수 있도록 〈그림3A〉의 2가지 플라스미드를 도입, 형질전환(Transformation) 하였다. pBbEB1c-torA-*SbAmyA* 플라스미드가 도입된 균주를 *Cg-pSbAmyA*로, pBbEB1c-torA-*BlAmyS* 플라스미드가 도입된 균주를 *Cg-pBlAmyS*로 명명하였고, 아밀라아제 유전자가 들어가지 않은 pBbEB1c 플라미드가 도입된 균주를 *Cg-pBbEB1c*로 명명하여 본 실험의 대조군으로 사용하였다. 형질 전환된 균주를 최소배지에 독립영양탄소원으로 0.5%(*w*/*v*) 전분을 첨가하여 배양실험을 진행하였다.



▸▸ 3. A) 본 실험에서 사용한 2개의 타깃 유전자가 삽입된 플라스미드 모식도. B) 세포 밖으로 분비된 아밀라아제 효소 작용 모식도

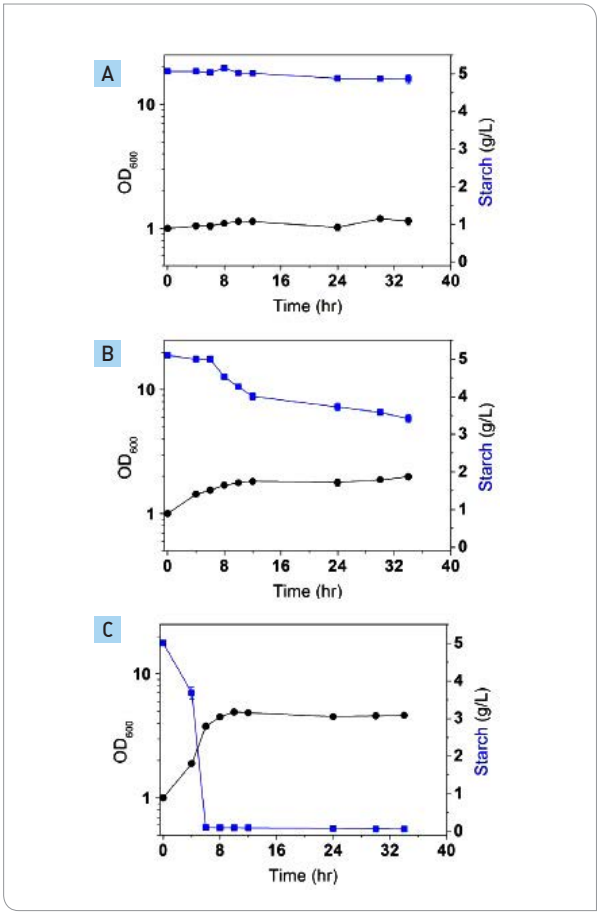
배양실험 진행 결과, 대조군인 *Cg-pBbEB1c* 균주는 전분을 탄소원으로 이용하지 못해 세포 성장이 관찰되지 않았다. 반면, *Cg-pSbAmyA* 균주의 경우 0.5%(*w/v*) 전분을 완전히 소모하지 못했으나 일정량 이용한 것을 확인하였고, 전분을 이용해 성장한 최대 바이오매스량이 0.5 *g*DCW/L였다. 그러나, *Cg-pBlAmyS* 균주는 앞의 두 균주와 달리 0.5%(*w/v*) 전분을 완전히 소모하였고, 최대 바이오매스량이 1.23gDCW/L로 *Cg-pSbAmyA*의 약 2.5배 더 성장한 것을 확인하였다〈그림 4〉.

전분 이용 숙신산 생산 균주 개량

숙신산은 C_4-디카복실산으로 바이오화학물질의 핵심 전구체로서 플라스틱, 코팅소재, 합성가소제, 우레탄, 솔벤트 등의 원료로 사용되며 화학, 식품, 제약업계 등에 널리 활용되는 물질이다. 특히, 1,4-부탄다이올(1,4-Butanediol)과 같이 중합하여 폴리부틸렌숙시네이트(PBS)라고 불리는 열적 특성이 높은 플라스틱의 원료물질로 사용된다.

본 연구팀은 우선, 숙신산을 생산할 수 있는 기존의 코리네박테리움 글루타미쿰 BL-1 균주(1)를 이용해 앞서 개발한 시스템을 적용하여 전분으로부터 숙신산이 생산되는지 실험을 통해 확인하였다. pBbEB1c-torA-*SbAmyA* 플라스미드가 도입된 균주를 BL-1-*pSbAmyA*로, pBbEB1c-torA-*BlAmyS* 플라스미드가 도입된 균주를 BL-1-*pBlAmyS*로 명명하였고, 아밀라아제 유전자가 들어가지 않은 pBbEB1c 플라미드가 도입된 균주를 BL-1-*pBbEB1c*로 명명하여 본 실험의 대조군으로 사용하였다.

독립영양탄소원으로 0.5%(*w/v*) 전분 + 0.5%(*w/v*) 글루코오스가 첨가된 최소배지에서 세포의 생장과 탄소원의 농도변화 및 숙신산 생산량을 측정하였다. 글루코오스를 추가로 첨가한 것은 본 실험의 주 바이오매스인 미세조류의 탄소원 함량 모델과 비슷하게 맞추기 위한 것이다. BL-1-*pBbEB1c* 균주는 아밀라아제 효소가 발현되지 않았기 때문에 글루코오스만을 이용하여 최대 1.78*g*DCW/L의 바이오매스량과 약 0.5*g/L*의 숙신산 생산을 확인하였다. 반면, BL-1-*pSbAmyA* 균주와 BL-1-*pBlAmyS* 균주의 경우 탄소원으로 첨가된 전분과 글루코오스를 모두 소비하여



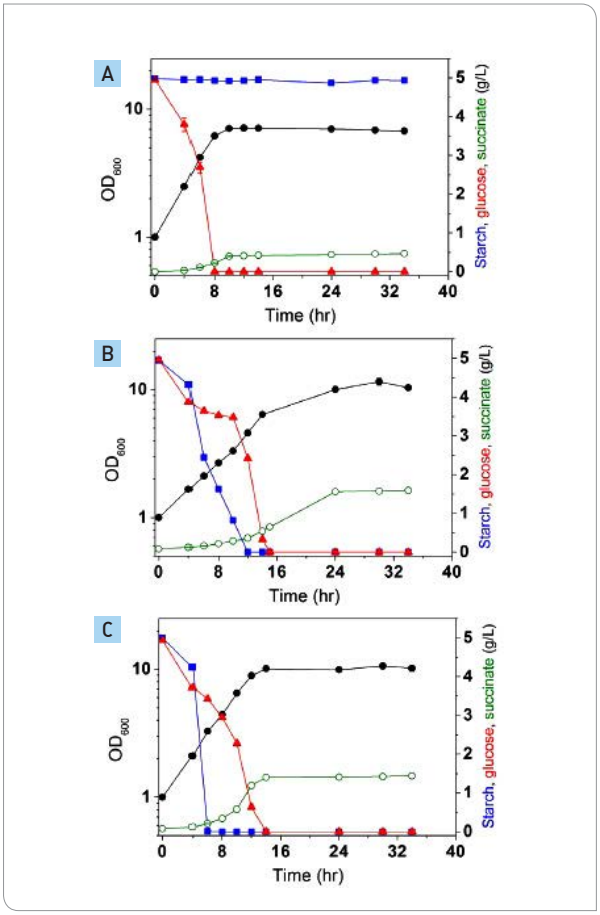
▸▸ 4. 형질전환된 코리네박테리움 글루타미쿰 균주의 생장 및 배양액 내 전분 농도 분석. A) *Cg-pBbEB1c*, B) *Cg-pSbAmyA*, C) *Cg-pBlAmyS*

각 2.89*g*DCW/L, 2.64*g*DCW/L의 바이오매스량과 약 1.56*g/L*의 높은 농도의 숙신산 생산(대조군 대비)을 확인하였다〈그림 5〉.

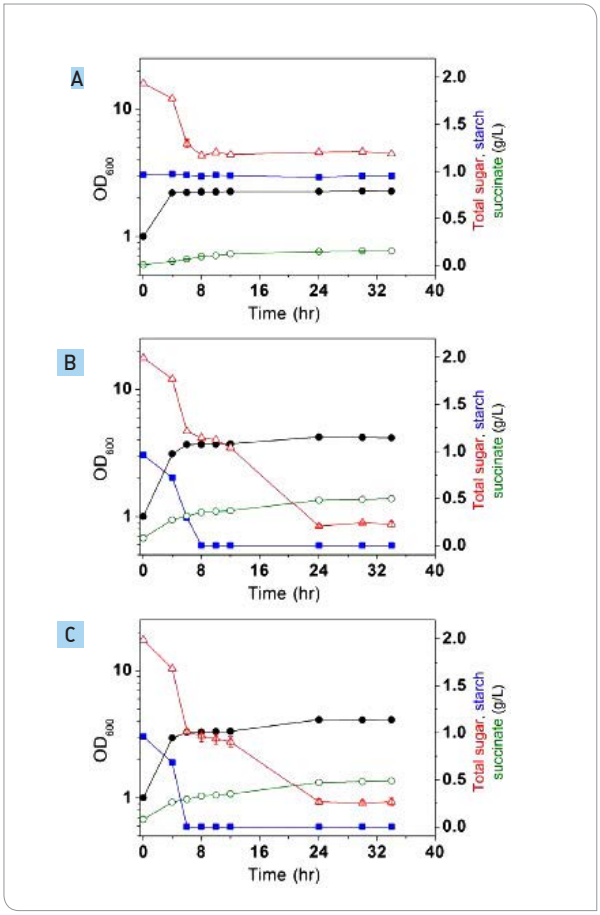
미세조류 바이오매스를 이용한 숙신산 생산

본 연구팀은 전분과 포도당의 혼합배지에서 숙신산을 성공적으로 생산한 시스템을 활용, 전분을 이용할 수 있도록 개량된 숙신산 생산 균주를 사용하여 CO_2유래 미세조류 바이오매스로부터 숙신산을 생산하고자 하였다. 본 실험에서는 고농도의 이산화탄소 배양을 통해 전분 및 탄수화물을 세포 내에 축적하는 미세조류인 클라미도모나스 레인하드티(*Chlamydomonas reinhardtii*)를 사용하였다.

간단한 전처리를 통해 미세조류 바이오매스세의 탄수화물을 추출하고 최소 배지에 탄소원으로 첨가



▸▸ 5. 형질전환된 BL-1 균주의 생장 및 배양액 내 전분, 글루코오스, 숙신산 농도 관찰. A) BL-1-*pBbEB1c*, B) BL-1-*pSbAmyA*, C) BL-1-*pBlAmyS*



▸▸ 6. 미세조류 바이오매스가 첨가된 배지에서 형질전환된 BL-1 균주의 생장 및 전분, 총 당량, 숙신산 농도 관찰. A) BL-1-*pBbEB1c*, B) BL-1-*pSbAmyA*, C) BL-1-*pBlAmyS*

한 후 세가지 BL-1-*pBbEB1c*, BL-1-*pSbAmyA*, BL-1-*pBlAmyS* 균주의 배양실험을 진행하였다. 첨가된 당의 양을 측정한 결과, 0.2%(w/v) 총탄수화물(total sugars)이 배지 내에 첨가되었음을 확인하였고 총탄수화물 중 50%가 전분임을 확인하였다.

배양 실험 결과, BL-1-*pBbEB1c* 균주는 미세조류 바이오매스가 첨가된 최소 배지에서 최대 0.56*g*DCW/L의 바이오매스량과 0.15*g*/*L*의 숙신산 생산을 확인하였다. 이전 실험 결과와 마찬가지로 BL-1-*pBbEB1c* 균주는 전분을 이용하지 못했으나, 미세조류 바이오매스 외의 다른 탄소원을 일정량 이용하여 생장하는 것을 확인하였다.

BL-1-*pSbAmyA* 균주와 BL-1-*pBlAmyS* 균주는 미세조류 바이오매스가 첨가된 최소 배지에서 각 1.05*g*DCW/L, 1.02*g*DCW/L의 바이오매스량과 0.5*g*/*L*의 동일한 숙신산 생산을 확인하였다. 두 균주는 미세조류 바이오매스의 탄소원 중 하나인 전분을 모두 소비하였고, 남은 미세조류 바이오매스 탄소원을 천천히 소비하는 것을 본 실험을 통해 확인하였다〈그림 6〉. 최종적으로 대조군 균주의 숙신산 생산 수율(0.2*g*/*g*)보다 높은 숙신산 최종생산 균주의 수율(0.28*g*/*g*)의 결과를 미세조류로부터 얻을 수 있었다.

본 연구에서 개발한 CO_2유래 미세조류 바이오매스로부터 코리네박테리움 글루타미쿰 산업 균주를 이용하여 추가 효소없이 숙신산을 세계 최초로 생산할 수 있음을 보여 주었다. 이는 박테리아-미세조류 시스템을 이용하는 새로운 바이오리파이너리 기술을 제안했다는 의의가 있다. 향후, 대량생산이 가능한 박테리아-미세조류 시스템의 구축을 위해 스케일업 공정 및 단계별 최적화 연구가 필수적이다. ST