단순배지에서 Filamentation 억제 재조합 대장균에 의한 Poly(3-hydroxybutyrate)의 생산 증대

이 영, 이 상엽
한국과학기술원 화학공학과, 생물공정 연구센터

Enhancement of Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by Using Filamentation-Suppressed Recombinant *Escherichia coli* in a Defined Medium

Young Lee, Sang Yup Lee
Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center, KAIST

서론

현대 산업사회의 발전과 더불어 그 수요가 지속적으로 증가해온 플라스틱 물질은 썩지 않는 성질로 인해 환경 오염, 특히 토양 오염의 주범이 되었다. 또한 주원료인 석유, 석탄등의 광물 자원이 한정되어 있어 다가오는 원료 고갈에 대한 우려도 일고 있다. 환경 오염의 문제를 해결하고자 전세계적으로 재활용 등의 정부 차원의 관리 프로그램이 시작되었다. 그러나 늘어나는 수요로 인해 문제 해결의 한계성이 있어 보다 근본적으로 생분해성 플라스틱을 개발하려는 노력이 여러 연구자들에 의해 지속되어 왔다.

Polyhydroxyalkanoate (PHA)는 많은 미생물들이 탄소원은 충분하나 다른 필수 성장요소가 부족한 불균형적인 환경에 처하면 세포 내에 에너지 및 탄소 저장을 위해 축적하는 polyester 물질이다 [1,2]. PHA는 뛰어난 생분해성을 가지고 원료의 재생산이 가능한 원료를 사용하며, 기존 합성 고분자와 유사한 구조를 가지고 있으며 기질에 따라 다양한 물성을 갖게 할 수 있어 기존의 플라스틱을 대체할 후보로서 가장 많은 관심을 끌어 왔다. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)는 자연환경에서 가장 많이 발견되는 PHA로서 가장 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 bulk 플라스틱 물질로 사용하기엔 생산가가 아직 너무 비싼 형편이다. PHA의 가격을 낮추기 위해 여러 다른 박테리아 균주를 사용하고 값싼 배지에서 발효조건을 최적화 하여 생산성을 높이려는 노력이 여러 연구자들에 의해 계속되어 왔다 [3,4].

*Alcaligenes eutrophus*는 PHB 생산에 있어서 가장 많이 사용되어온 균주이다 [4]. 최근 *A. eutrophus* PHA 생합성 관여 유전자들이 대장균에 클로닝 되어 발현되었다 [5-7]. PHB는 *A. eutrophus* PHA 생합성 관여 유전자를 갖는 높은 복제수의 안정한 플라스미드를 갖는 재조합 대장균에 의해 효과적으로 생산될 수 있다 [8-10]. 이 재조합 대장균을 복합, 또는 유사 단순배지에서 pH-stat 유가식 배양함으로써 80 g/L 이상의 PHB를 생산할 수 있다 [9-11]. 반면에 단순배지에서 동일한 조건으로 유가식 배양을 수행하면 단지 16 g/L의 PHB가 생산되었다 [10].

재조합 대장균에서 PHB를 합성할 때 filamentation에 의해 심각하게 길어지는 현상이 발견되었다 [12, 14]. Filamentation이 일어나는 정도는 단순배지에서 훨씬 더 두드러지게 나타났다. 균체의 filamentation은 성장속도를 둔화시키거나 더 이상 성장하지 못하게 하기 때문에 이를 방지함으로써 PHB 생산성을 향상시킬 수 있다. 세포 분열에 관여하는 다양한 단백질들 중에 격막의 circumferential vagination 중에 cytoskeletal 요소로 작용하는 FtsZ는 가장 중요한 기능을 하는 것 중 하나이다 [13]. 이전 연구에서 PHB 합성중 대장균의 *ftsZ* 유전자를 함께 과잉발현함으로써 filamentation을 억제할 수 있음을 보고한 바 있다 [14]. 이번 연구에서 단순배지에서의 유가식 배양시 filamentation이 억제된 재조합 균주에 의해

PHB가 효과적으로 생산됨을 보였다.

실험

사용균주 및 플라스미드 벡터 : 대장균 균주로는 Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA)에서 구입한 XL1-Blue (supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac F'[proAB+ lacIq lacZDM15 Tn10(tetr)])를 사용하였다. 플라스미드 벡터로 pSYL105 [12]와 pSYL107 [14]를 사용했다. 플라스미드 pSYL105는 A. eutrophus의 PHA 생합성 유전자를 갖는 높은 복제수의 안정한 플라스미드이다 [12]. 플라스미드 pSYL107는 대장균의 ftsZ 유전자를 포함하는 2.1 kb 크기의 HindIII-ClaI 영역을 같은 제한효소로 자른 pSYL105에 클로닝하여 만들었다 [14]. Electroporation에 의해 이 플라스미드들을 XL1-Blue에 형질전환하였다.

균주 보관 및 사용 배지 : 균주들은 Luria-Bertani (LB) 배지에서 배양 후 20% (vol/vol) glycerol stock으로 -80℃에서 보관하였다. 단순배지로는 유가식 배양에 적합한 것으로 알려진 R 배지에 20 g/L glucose와 10 mg/L thiamine을 첨가하여 사용하였다. R 배지 [16]는 다음의 구성물로 이루어졌다 (per liter): KH_2PO_4, 13.5 g; $(NH_4)_2HPO_4$, 4.0 g; $MgSO_47H_2O$, 1.4 g; citric acid, 1.7 g; trace metal solution, 10.0 mL. The trace metal solution consisted of the following (per liter of 5 M HCl): $FeSO_47H_2O$, 10.0 g; $CaCl_22H_2O$, 2.0 g; $ZnSO_47H_2O$, 2.2 g; $MnSO_44H_2O$, 0.5 g; $CuSO_45H_2O$, 1.0 g; $(NH_4)_6Mo_7O_244H_2O$, 0.1 g; $Na_2B_4O_710H_2O$, 0.02 g.

분석방법 : 균체 성장은 600 nm에서의 광학밀도를 측정하여 관측하였다. 균체량 (Cell mass)은 배양액 1 리터당 건조균체 중량으로 정의하였으며 측정법은 이전에 기술한 바와 같다 [11]. PHB 농도 (PHB concentration)는 n-butyric acid를 internal standard로 하여 gas chromatography (Varian 3300, Palo Alto, CA)로 측정하였다 [17]. 포도당 농도는 glucose oxidase-peroxidase method (Glucose-E kit, Yeongdong Pharm., Seoul, Korea)에 의해 효소적으로 정량하였다. 잉여 균체량 (Residual cell mass)는 균체량에서 PHB 농도를 제한 것으로 정의했다. PHB 함유율 (PHB content, %)은 건조 균체 중량에 대한 PHB 질량의 비의 백분율로 정의했다. PHB 수율 (yield of PHB)은 포도당 1 g으로부터 합성된 PHB의 질량으로 정의했으며, 균체량 (잉여 균체량 + PHB 농도) 수율 (yield of cell mass)은 포도당 1 g으로부터 형성된 균체량으로 정의했다.

유가식 배양 : 유가식 배양은 jar fermentor (2.5 L, Korea Fermentor Company, Incheon, Korea)에서 2 g/L 포도당과 10 mg/L thiamine을 첨가한 0.8 L의 R 배지 (pH 6.8)로 수행하였다. 배지를 준비하는 방법은 이전에 기술한 바와 같다 [11]. Seed culture는 2 g/L 포도당과 10 mg/L thiamine을 첨가한 100 mL의 R 배지에서 균체를 배양하여 준비하였다. 기질 공급 전략은 탄소원 고갈시 pH가 급격히 상승하는 현상에 기초하여 상한가를 이용한 pH-stat을 사용하였다 [10,11]. 기질 공급액은 700 g/L glucose + 20 g/L $MgSO_4$ $7H_2O$ + 0.15 g/L thiamine을 사용하였다. pH가 6.9를 넘어서면 20 g의 포도당 (28.6 mL의 기질 공급액)을 pulse로 첨가하였다. pH가 6.8 밑으로 떨어지면 암모니아수 (28 %, vol/vol)를 공급하여 질소원으로 사용하였다. 용존 산소량은 교반속도를 1100 rpm 까지 증가하고 필요시 순수 산소를 공급하여 공기 포화시의 10 % 이상이 되도록 유지하였다. Seed culture를 제외하고는 유가식 배양 중 항생제 (100 mg/L ampicillin)를 첨가하지 않았다. XL1-Blue(pSYL105)와 XL1-Blue (pSYL107)의 pH-stat 유가식 배양은 XL1-Blue (pSYL107)의 minicell 형성을 방지하기 위해 30℃에서 수행하였다.

결과 및 고찰

그림 1에 XL1-Blue(pSYL105)의 유가식 배양시 관측된 결과를 보였다. 세포 성장전에 긴 지연시간을 보였고, 균체는 이전에 보고된 것과 마찬가지로 심각한 filamentation을 보였다. 최종 균체량은 102 g/L에 달했지만 PHB 농도는 22.5 g/L에 불과했다. PHB 함유율도 복합배지나 유사 단순배지 [9,11]에 훨씬 못미치는 22.1 %에 불과했다. 포도당에 대한 균체수율과 PHB 수율은 각각 0.32 g cell mass/g glucose와 0.07 g PHB/g glucose로 얻어졌다.

그림 2에 XL1-Blue(pSYL107)의 유가식 배양 결과를 보였다. 12시간의 지연시간 후 약 0.2 h^{-1}의 비성장 속도로 균체성장이 시작되었고 19시간 이후로 PHB가 급격히 합성, 축적되기 시작하였다. 40시간 후 최종 균체량과 PHB 농도는 각각 127.5 g/L과 48.2 g/L로 얻어졌고 PHB 함유율은 37.8%였다. 포도당에 대한 균체량과 PHB의 최종 수율은 각각 0.33 g cell mass/g glucose와 0.13 g PHB/g glucose로 얻어졌다.

XL1-Blue(pSYL107)는 XL1-Blue(pSYL105)에 비교할 때 성장속도 뿐 아니라 더 많은 PHB를 더 높은 함유율로 축적하였다. PHB 농도는 filamentation의 억제로 2배 이상 증가하였다. 더 높은 PHB 농도 및 함유율을 얻기 위해 기질 공급 전략의 미세조정이 필요하지만 단순배지에서 filamentation 억제 재조합 대장균의 유가식 배양으로 얻을 수 있는 최적 균체량과 PHB 농도는 각각 대략 130 g/L, 50 g/L 정도이다. 이는 값싼 단순배지에서 재조합 대장균을 이용하여 PHB의 효과적 생산이 가능함을 보여준다. 또한 이전 연구에서 본 바와 같이 소량의 복합질소원의 첨가로 PHB 생산이 크게 증가될 수 있음을 감안할 때 더욱 PHB 생산성을 증가시킬 수 있을 것으로 예측된다.

References

1. A.J. Anderson and E.A. Dawes (1990) *Microbiol. Rev.* **54,** 450-472.
2. Y. Poirier, C. Nawrath, and C. Somerville (1995) *Bio/Technology* **13,** 142-150.
3. S.Y. Lee (1996) *Biotechnol. Bioeng.* **49,** 1-14.
4. S.Y. Lee and H.N. Chang (1995) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **52,** 27-58.
5. O.P. Peoples and A.J. Sinskey (1989) *J. Biol. Chem.* **264,** 15298-15303.
6. P. Schubert, A. Steinbuchel, and H.G. Schlegel (1988) *J. Bacteriol.* **170,** 5837-5847.
7. S.C. Slater, W.H. Voige, and D.E. Dennis (1988) *J. Bacteriol.* **170,** 4431-4436.
8. S.Y. Lee and H.N. Chang (1995) *Can. J. Microbiol.* **41(Suppl. 1),** 207-215.
9. S.Y. Lee, K.S. Yim, H.N. Chang, and Y.K. Chang (1994) *J. Biotechnol.* **32,** 203-211.
10. S.Y. Lee, H.N. Chang, and Y.K. Chang (1994) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **721,** 43-53.
11. S.Y. Lee and H.N. Chang (1994) *J. Environ. Polymer Degrad.* **2,** 169-176.
12. S.Y. Lee, K.M. Lee, H.N. Chang, and A. Steinbuchel (1994) *Biotechnol. Bioeng.* **44,** 1337-1347.
13. J. Lutkenhaus (1993) *Curr. Opin. Genet. Develop.* **3,** 783-788.
14. S.Y. Lee (1994) *Biotechnol. Lett.* **16,** 1247-1252.
15. W.J. Dower, J.F. Miller, and C.W. Ragsdale (1988) *Nucleic Acids Res.* **16,** 6127-6145.
16. S.Y. Lee and H.N. Chang (1993) *Biotechnol. Lett.* **15,** 971-974.
17. G. Braunegg, B. Sonnleitner, and R.M. Lafferty (1978) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6,** 29-37.

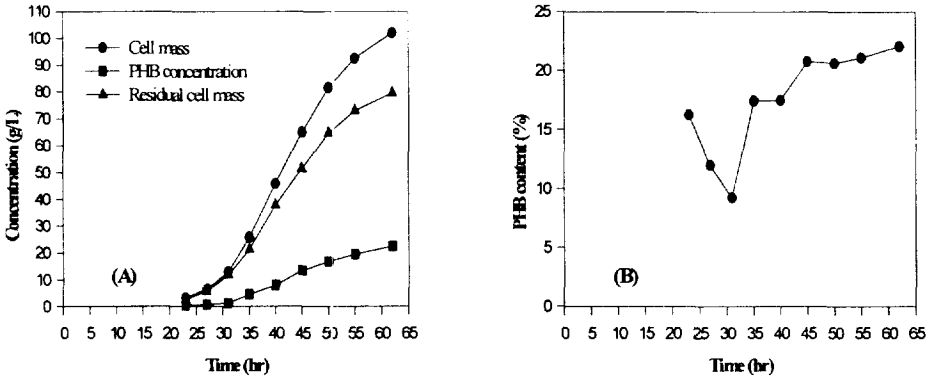

그림 1. The pH-stat fed-batch culture of XL1-Blue(pSYL105) in a defined medium at 30℃ : (A) Time profiles of cell mass, PHB concentration, and residual cell mass; (B) PHB content (%). The initial medium was 0.8 L of R medium supplemented with 20 g/L glucose and 10 mg/L thiamine. The feeding solution contained per liter: 700 g glucose + 20 g MgSO4 7H2O + 0.15 g thiamine. Upon the pH rise, 20 g glucose equivalent was added as a pulse.

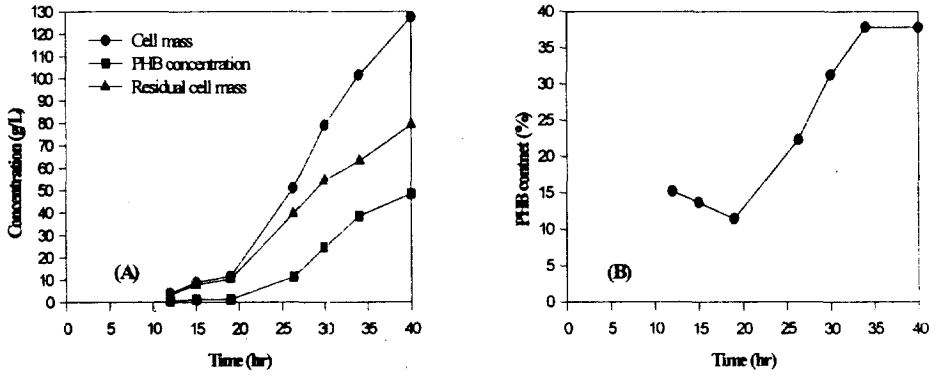

그림 2. The pH-stat fed-batch culture of XL1-Blue(pSYL107) in a defined medium at 30℃ : (A) Time profiles of cell mass, PHB concentration, and residual cell mass; (B) PHB content (%). Cultivation conditions are the same as described in Fig. 1.