

Biosynthesis of Poly(3HB-3HV) and Poly(3HB-4HB) Copolymers
in Recombinant *Ralstonia eutropha* Enforced *zwf*

최재철, 신현동, 이용현

경북대학교 유전공학과

전화 (053) 950-5384, FAX (053) 959-8314

Abstract

NADPH has been known as a regulating factor the biosynthesis of polyhydroxyalkanoate(PHA), and the flux of NADPH for PHA biosynthesis could be enforced by the amplification of *zwf* gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase. The recombinant plasmid pCZWF harboring PHA synthase, *phbC* from *R. eutropha* and *zwf* from *E. coli* were constructed, and were transformed to *R. eutropha* by electroporation. The biosynthesis of P(3HB-3HV) copolymer were carried out in transformant *R. eutropha* through the two-stage cultivation method using valerate as a precursor. The biosynthesis rate and PHA content of transformant *R. eutropha* harboring pCZWF were increased compared with transformant *R. eutropha* harboring only *phbC*. Especially, the molar fraction of 3HV was increased from 68% to 74% due to amplification of *zwf* gene. And the biosynthesis P(3HB-3HV) and P(3HB-4HB) carried out using propionate and γ -butyrolactone as a precursor, respectively. But the rate, content, and molar fraction of biosynthesis copolymers were not influenced appreciably. This may be due to the reduced availability of NADPH.

서론

Polyhydroxybutyrate (PHB)는 질소, 산소, 인, 황 등 특정 영양분이 제한되고 다량의 탄소원 존재 하에서 미생물 내에 축적되는 생물고분자 물질이다.¹⁾ 하지만 PHB는 높은 결정성과 견고함의 단점을 가지고 있어 이를 개선하기 위해 poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate)와 같은 다양한 공중합체의 합성을 위한 연구들이 수행되어져 왔다. P(3HB-3HV)와 P(3HB-4HV)는 3-hydroxybutyrate의 사슬에 3-hydroxyvalerate와 4-hydroxybutyrate의 단량체가 각각 임의로 공중합된 것으로, 3HV와 4HB의 중합도에 따라 다양한 물리적 성질을 나타내게 된다. P(3HB-3HV)는 전구물질로 propionate와 valerate가 이용되어 3HB 단량체에 3HV가 중합되게 된다. P(3HB-4HB)의 생합성은 γ -butyrolactone, 1,4-butaendiol 등의 전구물질이 대사과정을 거쳐 PHA synthase에 의해 3HB와 4HB가 중합되어진다.

PHA 생합성 과정 중 reductase의 cofactor로 이용되어지는 NADPH는 탄소원의 흐름을 PHA 생합성 방향으로 유도하는 중요한 조절 인자로 알려져 있다.²⁾ 여러 연구자들에 의해 NADPH가 형질전환 *E. coli*와 *R. eutropha*에서 PHA 생합성을 조절하는 인자임을 규명하였으며, 산화제를 첨가하여 세포내 환원력을 공급하는 효소인 glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)의 활성을 증가시키고 이로 인하여 세포내 NADPH flux를 변화시켜 PHA 생합성능을 향상시켰다.³⁾ 또한 G6PDH를 발현하는 *zuf* 유전자를 *E. coli*로부터 cloning하여 PHA 생합성 유전자와 함께 *E. coli*에 도입하여 PHA 생합성 향상을 보였다. 이번 연구에서는 PHA 생합성 경로로 NADPH의 공급을 증가시키기 위해 *E. coli*로부터 G6PDH를 발현하는 *zuf* 유전자를 *R. eutropha*에서 증폭시킴으로서 P(3HB-3HV) 및 P(3HB-4HB)의 생합성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

사용한 균주는 모균주인 *Ralstonia eutropha* H16과 *R. eutropha* 유래의 *phbC* 유전자를 모균주에 도입시킨 형질전환 균주 *R. eutropha* AER5, *E. coli* 유래의 *zuf* 유전자를 *R. eutropha*에 도입시킨 형질전환 균주 *R. eutropha* ZWF, 그리고 *R. eutropha* 유래의 *phbC* 유전자와 *E. coli* 유래의 *zuf* 유전자가 혼성된 플라스미드가 도입된 형질전환 균주 *R. eutropha* Z525를 사용하였다.

균주의 배양

*Ralstonia eutropha*의 균체생육을 위한 1단계 회분배양은 복합배지에서 온도 30°C, 200 rpm의 교반속도에서 36시간 flask shaker에서 행하였다. PHA 생합성 유도를 위한 회분배양은 복합배지에서 1단계로 배양한 균체를 탄소원은 풍부하고 질소원이 제한된 최소배지로 옮겨 2단계 배양을 수행하였다.

P(3HB-3HV), P(3HB-4HB)의 정량 및 조성 분석

P(3HB-3HV)의 정량 및 단량체 조성은 methanolysis시켜 gas chromatography로 분석하였다. Methanolysis는 acidified methanol에 P(3HB-3HV)를 첨가하여 100°C에서 3시간 동안 행하였다. Methyl ester의 분석을 위해 사용된 column은 Carbowax 20M(Hwelett-Packard Co., Palo Alto, Calif.)였고, 이동상인 N₂의 유속은 30 mL/min였으며, 그리고 flame ionization detector로 검출하였다. Injector와 detector 온도는 각각 125°C, 200°C였으며, column의 초기온도는 100°C로서 2분간 유지시키고, 5°C/min의 속도로 150°C까지 증가시킨 후 3분간 유지하였다. P(3HB-3HV)의 농도 및 단량체의 함량비는 분리된 단량체의 peak 면적의 상대비로서 나타내었다. 표준물질로는 *R. eutropha*에서 추출, 정제된 Sigma사의 제품인 β -hydroxybutyrate와 P(3HB-3HV) 분말을 사용하였다.

결과 및 고찰

P(3HB-3HV)의 생합성

NADPH 공급을 증대시키기 위한 *zwf* 유전자의 증폭이 P(3HB-3HV)의 생합성에 미치는 영향을 검토하기 위해 일차적으로 복합배지에서 배양한 각종 *R. eutropha* 형질전환균주들을 전구물질들을 첨가한 질소원이 없는 최소배지에서 42시간 배양하였다. Fig. 1은 valerate를 전구물질로 하여 배양시간에 따른 균체 농도, P(3HB-3HV)의 농도와 content, 그리고 3-hydroxyvalerate의 분율을 조사하였다. *zwf* 유전자의 증폭으로 인하여 세포내 NADPH/NADP ratio가 증가하게 되면 TCA 회로의 활성이 감소하게 된다. 그리하여 균체생육이 저해를 받게 되는 결과가 나타났다. 하지만 배양 후기에는 농도가 증가한 NADPH가 PHA 생합성 경로에 유입되게 되어 균체생육의 저해가 다소 완화되는 경향을 보였다. 그리고 *phbC* 유전자만이 증폭된 형질전환균주에서는 3HV 분율의 증가에 기인하여 모균주에 비해 P(3HB-3HV)의 축적속도 및 축적량이 낮은 것으로 나타났지만, *zwf* 유전자와 *phbC* 유전자가 같이 증폭된 형질전환균주에서는 *phbC* 유전자만 증폭된 균주에 비해 축적속도 및 농도가 증가하였다. 이는 P(3HB-3HV)의 content에서도 나타나듯이 물분율을 증가시키는 요인인 PHA synthase의 증폭과 3HB 및 3HV 단량체들의 합성단계에서 요구되어지는 NADPH의 공급이 증가하여 중합되어지는 단량체들의 전구체 농도가 증가한데 기인함을 나타낸다.

여러 형질전환균주들의 propionate를 전구체로 한 P(3HB-3HV)의 생합성 양상을 살펴본 결과 *zwf* 유전자의 증폭으로 인한 변화는 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 공급해 준 valerate의 경우 3HV의 전구체인 hydroxyvaleryl-CoA로 직접 합성되지만 propionate의 공급에 의한 경우는 ketothiolase에 의해 ketovaleryl-CoA가 만들어진 후 hydroxyvaleryl-CoA로 합성되어지는 두 과정을 거쳐야 한다. 그리고 ketothiolase가 propionyl-CoA와 acetyl-CoA가 경쟁적인 관계에서 반응이 이루어지기 때문에 3HV의 전구체가 되는 ketovaleryl-CoA의 농도가 acetoacetyl-CoA에 비해 증가되지 못한다. 그리하여 NADPH의 공급에 의한 reductase의 활성이 영향을 받지 못하게 되어 valerate를 기질로 하였을 경우보다 PHA 생합성이 이용되는 NADPH의 유용성이 다소 감소하므로 *zwf* 유전자의 증폭이 P(3HB-3HV)의 생합성에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

P(3HB-4HB)의 생합성

zwf 유전자의 증폭이 P(3HB-4HB)의 생합성에 미치는 영향을 조사하기 위해 P(3HB-4HB)의 합성 전구체로 이용되는 γ -butyrolactone을 사용하여 배양하였다. 그 결과 형질전환균주들의 균체생육은 영향을 받지 않았으며, 4HB 분율은 *zwf* 유전자의 증폭으로 인하여 다소 감소하는 것으로 나타났다. 이는 P(3HB-4HB) 합성에 있어서 4-hydroxybutyryl-CoA에 대한 PHA synthase와 acetyl-CoA로 분해시

키는 catabolic enzyme간의 경쟁이 일어나는데, *zwf* 유전자의 증폭으로 인한 TCA 회로의 저해를 완화시키기 위해 4-hydroxybutyryl-CoA가 acetyl-CoA로의 분해가 더 활발히 일어난 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Anderson, A. J., and Dawes, E. A. "Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates" (1990), *Microbiol. Rev.*, **54**, 450-472.
2. Lee, I. Y., M. K. Kim, H. N. Chang, Y. H. Park, "Regulation of poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*" (1995), *FEMS Microbiology Letters*, **131**, 35-39
3. Jung, Y. M., Y. H. Lee, "Utilization of oxidative pressure for enhanced production of poly- β -hydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) in *Ralstonia eutropha*" (2000), *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 266-270.

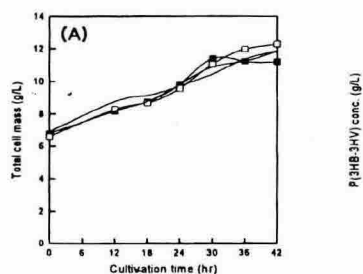


Fig. 1. Change of total cell mass(A), P(3HB-3HV) concentration(B), P(3HB-3HV) content(C), and 3-hydroxyvalerate fraction(D) of transformants *R. eutropha*.

○: *R. eutropha* H16, ●: *R. eutropha* enforced *zwf*, □: *R. eutropha* AER5 enforced *phbC*, ■: *R. eutropha* enforced *zwf* and *phbC*.