

## PCA를 이용한 유전자 재조합 대장균의 ALA 생산공정의 해석

강태형<sup>1</sup>, 정상윤<sup>2,4</sup>, 임용식<sup>2,4</sup>, 김춘광<sup>2,4</sup>, 정상욱<sup>1</sup>, 이종일<sup>3,4</sup>  
전남대학교, 산업공학과<sup>1</sup>, 물질·생물화학공학과<sup>2</sup>, 응용화학공학부<sup>3</sup>,  
생물공정기술연구실<sup>4</sup>  
전화 (062)530-0847, FAX (062)530-1847

### 초록

ALA is an intermediate in the tetrapyrrole biosynthesis pathway and has extensive applications as a biodegradable herbicide and insecticide as well as medical applications including photodynamic therapy of cancers. For the development of mass production process of ALA it is necessary to on-line monitor some metabolites such as glycine, succinate, LA and ALA. In this study, medium compositions and fermentation conditions were investigated for enhancement of ALA production by recombinant *E. coli*. A 2-dimensional fluorescence sensor was employed to monitor the bioprocess of ALA production. The monitored data is analyzed using principal component analysis, a powerful tool for multivariate statistical analysis.

### 서론

5-aminolevulinic acid(ALA)은 tetrapyrrole 생합성(e.g., porphyrin, heme and vitamin B12)에서 발견되는 중간물질로 생분해성 제초제나 살충제로 사용될 뿐 아니라 환경친화적 식물 성장 촉진제나 광역학적 암치료제로도 주목받고 있다(1). ALA의 대량 생산을 위해서는 생물반응기내의 미생물의 성장이나 대사공정을 온라인 모니터링하는 것이 중요하다. 특히, ALA의 전구체로 사용되는 glycine과 succinate 농도나 ALA의 생합성 효소인 ALAS와 분해효소인 ALAD의 활성 그리고 ALAD의 경쟁적 저해제로 사용되는 levulinic acid(LA) 농도 및 ALA 농도 등을 모니터링하는 것은 ALA 생산공정을 최적화하는데 필수적이다. 최근에는 생물공정을 온라인 모니터링하는데 in-situ 모니터링이 가능한 형광센서를 사용하여 생물공정내 중요 변수를 모니터링하는 연구가 많이 이루어지고 있다(2). 그러나 발효공정에서 얻은 2차원 형광스펙트럼 등의 각종 자료들은 공정상의 각종 변수들에 의해 분석이 쉽지 않게 된다. 따라서 형광스펙트럼의 변화에 대한 요소들을 변수로 생각하여 p-차원의 다변량 자료가 얻은 후 얻어

진 다변량 자료를 알기쉬운 소수개의 새로운 변수로 자료를 축소, 단순화시켜 분석할 수 있게 주성분 분석(principal component analysis, PCA)방법을 이용할 수 있다. 본 연구에서는 *egfp*(enhanced green fluorescence protein) 유전자를 *Hem A* 유전자와 융합한 플라스미드 pFLS45를 도입한 재조합 대장균을 이용하여 ALA를 생산하였고 모든 생산 공정은 2차원 형광센서를 이용하여 온라인 모니터링하였다. 각종 실험 조건 즉, 배지조성, 배양조건을 다르게 하여 얻은 2차원 형광 스펙트럼은 PCA를 이용하여 분석하였고 공정개발에 사용하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 실험에서는 ALA의 대량 생산 및 모니터링 기술을 개발하기 위해 *egfp* 유전자를 *Hem A* 유전자와 융합하여 재조합 플라스미드 pFLS45를 제조하였다. 제조된 재조합 플라스미드 pFLS45는 *E. coli* BL21(DE3) pLysS에 삽입하여 사용하였다. 균주의 활성화 및 전배양에는 ampicillin 50 µg/L이 포함된 LB 배지가 사용되었으며 본배양에는 LB 배지나 MS8 배지를 사용하였다(3).

### 배양 방법

균주는 본배양 실험 전 ampicillin을 포함한 LB agar plate에 도말하여 사용하였다. Plate에서 얻은 colony를 진탕배양기에서 37 °C, 180 rpm으로 12 시간 활성화시킨 후 1% 전배양하였다. 생물반응기내 본배양배지(working vol. 1L)에 전배양액의 1%를 접종하였다. 생물반응기의 운전 조건은 37 °C 또는 30 °C, 400 rpm 및 통기량 1 vvm으로 하였으며, pH 조절에는 3N의 NaOH와 HCl을 사용하였다. 배양 배지에 따른 ALA 생산량을 조사하기 위해 본배양 배지로 최소 배지인 MS8 배지에 ALA의 전구체로 사용되는 glycine과 succinate를 첨가한 배지와 복합 배지인 LB 배지 또는 glycine과 succinate를 첨가한 LB 배지를 비교하였다. 그리고 배양 pH에 따른 ALA의 생산성 비교를 위해 pH 5, 6, 7 및 pH를 조절하지 않은 조건으로 배양하였다. 또한 pET system의 유도 발현물질인 IPTG의 첨가에 따른 ALA의 생산성과 ALAD의 저해제로 사용되는 LA 첨가에 따른 ALA의 생산성 변화를 조사하였다.

### 생물반응기 배양 및 모니터링

운전조건과 생물반응기 내의 공정변수 즉, pH (pH electrode, METTLER Co.), 용존

산소 농도 ( $O_2$  sensor, METTLER Co.) 및 배가스( $O_2/CO_2$  gas analyzer, LOKAS Co.)는 모두 Labview software ver. 6.1(National instrument Co.)를 이용하여 실시간으로 온라인 모니터링 하였다. 또한, 생물반응기 내의 형광특성 변화를 온라인 모니터링하기 위해 스테인리스 생물반응기(KoBiotech Co., 2.5 L) 벽에 설치된 석영창에 2 m-bifurcated 액체 광학 전도관(liquid light conductor, Lumatek, Germany)을 이용하여 2차원 형광분광광도계(Model F-4500, Hitachi Co.)로 직접 연결하여 모니터링하였다.

### PCA를 이용한 공정 분석

다차원 형태의 모니터된 자료를 분석하기 위해 주성분 분석은 변수들이 평균, 공분산을 갖는 다변량 정규분포를 가정 한다(8). p차원의 모니터된 자료에서 주성분을 구하기 위해 변수들의 가능한 p개의 선형결합으로 표현한다. 여기서 주성분(principal component, PC)은 분산이 가장 크고, 서로 독립이 되는 다변량들의 선형결합이 된다. 따라서 1번째 주성분부터 최대 p개의 주성분까지 표현될 수 있다. 이렇게 구한 주성분 중에서 전체 자료에 대한 설명비율과 scree plot을 이용하여 보유할 주성분의 수(보통 2~3개)를 정하고 보유된 주성분에 따른 주성분 점수를 계산하여 공정제어에 필요한 정보를 얻는다(6,7,8).

### 분석 방법

상등액내 포도당 농도분석에는 GOD/POD와  $ABT_{red}$ 를 이용한 비색법을 이용하였다. 세포농도 및 건조균체량(g/L) 측정을 위해 600 nm 파장에서 흡광도( $OD_{600}$ )를 측정하였으며,  $OD_{600}$ 값과 상관관계식을 구하였다. 상등액내 ALA 농도와 세포내 ALAS를 효소 활성측정은 Mauzerall & Granick의 방법(4)을 사용하였고, ALAD의 활성은 Sato의 방법(5)으로 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### pH에 따른 영향

최적 pH 조건을 조사하고 필수 자료를 선별하기위해 pH에 따른 2차원 형광 스펙트럼을 PCA 분석을 이용하여 해석하고 비교 고찰 하였다.

#### 배양배지에 따른 영향

LB 배지와 MS8 배지 및 전구체 등의 첨가에 따른 생산성 변화 및 각종 공정 변수

즉, ALA이나 glycine, succinate 농도 및 ALAS, ALAD 활성을 예측하고 생산공정에 적용하였다.

### 요약 및 전망

본 연구에서는 교반형 생물반응기에서 재조합 대장균을 이용한 ALA의 회분식 생산을 고찰하였고 이를 2차원 형광센서를 이용하여 공정을 온라인 모니터링하였다. 효과적인 공정 최적화 및 각종 모니터링 자료해석을 위해 PCA 분석법을 이용하였다. 또한 ALA 생산성의 증대를 위해 유가/연속식 공정 및 각종 온라인 모니터링 기술을 개발하고, 생산공정을 예측하고 모델화하기 위해 인공신경망원리를 개발하고자 한다.

### 감사

본 연구는 2002년 과학재단 특정기초연구 (과제번호 R01-2002-000-00027-0)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Sasikala, K., M. Watanabe, T. Tanaka and T. Tanaka, Biosynthesis, bio technological production and applications of 5-Aminolevulinic acid, (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 23-29
2. Skibsted, E., C. Lindemann, C. Roca, L. Olsson, On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration, *Journ. Biotechnol.*, (2001), **88**, 47-57
3. Seo, K.H., J.I. Rhee, 재조합 *Escherichia coli*에 의한 5-Aminolevulinic acid (ALA) 생산 연구, *한국생물공학회 추계발표대회*, (2001), 서울, 715-718
4. Mauzerall, D. and S. Granick, "The Occurrence and Determination of  $\delta$ -Aminolevulinic acid and Porphobilinogen in Urine" (1956), *J. Biol. Chem.*, **219**, 435-466.
5. Sato, K., K. Ishida, T. Kuno, A. Mizuno, and S. Shimizu, "Regulation of Vitamin B12 and Bacteriochlorophyll Biosynthesis in a Facultative Methylophile, *Protaminbacter ruber*" (1981), *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **27**, 439-447.
6. Tomita, R. K., S. W. Park and Oscar A.Z. Sotomayor, "Analysis of activated sludge process using multivariate statistical tools-a PCA approach" (2002), *Chem. Eng. Journ.*, **90**, 283-290.
7. Chen, J., K. C. Liu, "On-line batch process monitoring using dynamic PCA and dynamic PLS models" (2002), *Chem. Eng. Sci.*, **57**, 63-75.
8. Johnson, R. A., D. W. Wichern, "Applied Multivariate Statistical Analysis", *Prentice Hall*, 458-513.