

유전자 조작한 *Klebsiella pneumoniae*로부터 L-트립토판 생산을 위한 발효배지 조건

김천규 · 정용섭¹ · 홍석인*

고려대학교 화학공학과, ¹전북대학교 식품공학과

Media Optimization for L-tryptophan Production by Genetically Engineered *Klebsiella pneumoniae*

Kim, Cheon-Gyu, Yong-Seob Jeong¹ and Suk-In Hong*

Department of Chemical Engineering, Korea University

¹Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University

Abstract — The optimum medium composition for the production of L-tryptophan with *Klebsiella pneumoniae pheA tyrA trpE trpR/pSC 101-trp⁺* and the effect of precursors in the optimum medium were studied. The specific growth rate in the optimum medium was almost the same as that in the basal medium, the former showing 1.01 and the latter 1.07 hr⁻¹, but the produced tryptophan was increased 45% in the optimum medium. The maximum amount of produced tryptophan was 159 mg/l within 14 hours. Tryptophan production was ceased by casamino acid addition over 4 g/l in medium, but cell mass increased with its addition. Indole and anthranilate as precursors had toxic effect on growth and tryptophan production at experimented concentration range (over 20 mg/l), but L-serine had good effect on tryptophan production, resulting in 175 mg/l tryptophan within 14 hours.

아미노산은 단백질의 구성성분을 이루고 있는 필수 영양소이다. 따라서 아미노산은 주로 의약품, 식품 및 사료첨가제로서 사용되고 있다. 식품과 사료첨가제로서 아미노산에 대한 수요의 잠재력은 크지만 주로 L-lysine과 D,L-methionine 같은 필수아미노산에 한정되어 왔으며, 의약분야에서는 경구약품이나 주사약품으로 아미노산의 혼합물이 영양성분으로 이용되고 있다. 또 몇가지 아미노산은 정상적인 대사과정 중에서 호르몬같은 생리적 활성물질로 작용한다. 따라서 특수아미노산의 대사장애로 일어난 질병은 아미노산이나 아미노산 대사물의 투입을 필요로 한다(1).

L-트립토판은 발육, 성장, 체중유지, 체지방유지, 혈구성분조성, 유즙분비 등에 중요한 역할을 하는 생명유지에 빠질 수 없는 필수아미노산의 하나로서, 다른 아미노산과 마찬가지로 의약품, 사료, 식품의 첨가제로서 주로 이용되고 있다. 예를 들어, 식품 또는 사료로서 이용되는 옥수수중에는 L-트립토판이 특히 부족하기 때문에 이를 계속 섭취할 경우 생기는

영양 불균형을 해소시키는 중요한 첨가제가 되고 있다(2, 3).

이와같이 L-트립토판의 광범위한 유용성으로 인하여, 생산 비용을 절감하기 위한 트립토판 균주 개발 및 생산 공정에 여러 연구자들의 관심이 계속되고 있다. L-트립토판 제조는 화학적 방법, 효소에 의한 방법, 미생물에 의한 발효 방법이 있으며, 현재 L-트립토판 산업적 제조에는 화학적 합성 공정이 주로 사용되고 있다.

화학적 방법에 의한 D,L-트립토판을 제조하는 20여 방법이 현재까지 알려 졌으며, 장단점으로서 수율은 높은 반면, 고온 및 고압의 반응 조건으로 인한 많은 에너지가 필요하며, 생물학적으로 활성이 있는 L-형으로의 광학적 분리가 요구되며, 또한 D-트립토판의 라세미화(racemization) 반응을 필요로 한다. 그러므로 최근에는 화학적 방법의 단점을 보완하기 위하여 효소 및 미생물에 의한 방법이 꾸준히 연구되고 있다(4-7).

효소에 의한 L-트립토판 생산은 미생물의 L-트립토판 대사경로중에 관여하는 효소인 tryptophanase (TPase)와 tryptophan synthetase(TSase)를 주로 이

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, L-tryptophan, culture conditions

*Corresponding author

용하여 생산하고 있다. Sano 등(8)은 *Flavobacterium aminogens*를 토양에서 분리하여, 10 g/l의 DL-5-indolymethylhydantoin에서 7 g/l의 L-트립토판을 생산했다. Nakazawa 등(9)은 *Proteus rettgeri*에서 인돌과 pyruvate를 기질로 하여 65.6%의 수율로 L-트립토판을 얻었고, Bang 등(10)은 Triton-100을 사용해서 인돌과 L-세린으로부터 93.2%의 수율로 L-트립토판을 얻었음을 발표했다. 그러나 산업적으로는 원료로 사용되고 있는 인돌, pyruvate, L-세린 등의 가격이 비싸다는 단점이 있다.

미생물에 의한 트립토판의 직접 생산시 방향족 아미노산의 생합성 경로의 제어기작은 매우 복잡한 것으로 알려지고 있다(11-13). 그리고 방향족 아미노산의 생합성 경로는 미생물에 따라 차이가 있지만 *Escherichia coli*와 *Klebsiella pneumoniae*는 거의 비슷한 대사경로를 갖는다. 수행된 대부분의 연구들은 트립토판의 과잉생산(overproduction)을 위해 돌연변이 변이원(mutagen)으로 처리하여 유전적인 억제가 해제된 변이주를 분리하거나, 또는 유전자 재조합에 의해 재조합 *trp* 유전자가 증폭된 형질전환체들을 선별해 내는 방법을 이용하였다.

재래적인 방법의 한 예로, Shio 등(14, 15)은 anthranilate의 amino group donor인 glutamine에 대한 억제를 막기 위해서 analog인 azaserine에 저항성 있는 균을 분리해서 10.3 g/l까지 트립토판을 생산해 냈다. 유전자 조작에 의한 방법의 예로서는, Tribe와 Pittard(16)는 형질도입(transduction)에 의해 트립토판 생합성 경로에 관여하는 유전자들의 변화에 의한 영향을 실험하여, 트립토판 생산을 위한 구체적인 방향을 제시해 주었다. 이들이 개발한 균주는 생산성이 우수한 것으로 알려지고 있다. 한편 Aiba 등(17-19)은 트립토판 저해에서 해제된 *trp* 오페론을 갖고 있는 재조합 *trp* 플라스미드를 이용한 균주를 사용하여 0.229 g/l-hr의 트립토판 생산이 가능했음을 발표했다. 이들이 개발한 균주는 pSC101 plasmid vector에 야생형 *trp* 오페론을 재조합 한 후, 재조합 *trp* 오페론 플라스미드에 mutagen을 처리하여 feed back inhibition에 대한 저항성을 높였다는 특징이 있다. Ebihara 등(20)은 *Hansenula anomala*의 anthranilate auxotroph를 이용하여 0.054 g/l-hr의 트립토판을 생산했으며, 그리고 Sanchez와 Demain(21)은 *Hansenula polymorph*를 이용하여 메탄올로부터 소량의 트립토판 생산이 가능함을 발표했다.

본 연구에서는 유전자 재조합된 변이주를 이용하여 트립토판 최적 생산을 위한 예비단계로서, 기본배지에서 casamino acid의 농도 변화에 따른 영향 조

사를 토대로 최적 배지를 확립하였으며, 트립토판 생산성 및 균체 성장에 관해 기본배지와 비교해 보았다. 그리고 최적배지에서의 다양한 precursors 영향을 조사하여 트립토판 생산을 위한 최종 발효배지를 확립하고자 한다.

균주 및 분석방법

사용된 균주는 고려대학교 농화학과 이세영교수가 개발 제공한 *Klebsiella pneumoniae pheA tyrA trpE trpR/pSC101-trp⁺*이며, pSC101의 copy number는 5~6개이다.

기본배지(MI)로서 증류수 1리터에 KH_2PO_4 3 g, K_2HPO_4 7 g, NH_4Cl 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, casamino acid 1 g, glucose 30 g, phenylalanine 20 mg, tyrosine 20 mg이 사용되었으며 트립토판 생산시 사용된 최적배지(MII)는 증류수 1리터에 KH_2PO_4 4 g, K_2HPO_4 9.3 g, NH_4Cl 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, casamino acid 1 g, glucose 30 g, Na-citrate 5 g, phenylalanine 20 mg, tyrosine 20 mg이 사용되었다. 고형배지의 경우는 1.5% 한천을 첨가하였고, 각 배지의 초기 pH는 2N NaOH로 7.0으로 조절하여 사용하였다.

균체량(cell mass) 측정은 배양액을 0.9% saline으로 10~20배로 희석하여, Spectronic 20(Bausch and Lomb co.)로 600 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다. 건조균체량(dry cell weight)은 배양물 20 ml을 기공 직경이 0.2 μm 인 micromembrane 필터(Gelman co.)를 이용하여 여과한 후 100~105°C에서 항량이 될 때까지 건조시켜 측정하였다.

포도당은 DNS 방법(22)에 의해 측정했으며, 트립토판은 Udenfriend와 Peterson(23)이 제안한 방법에 따라 정량했다. Indole은 Smith와 Yanofsky(24)이 제안한 방법을 이용하여, Anthranilate는 Tamir와 Srivivasan(25)이 제안한 방법에 의해 각각 측정했다. 그리고 tryptophan, phenylalanine, tyrosine, valine을 정성 분석하기 위해 thin layer chromatography를 이용했다.

접종용 균체로 사용한 *K. pneumoniae*는 casamino acid, phenylalanine, tyrosine이 없는 MI 및 MII의 고체배지로 tryptophan, phenylalanine, tyrosine triple auxotroph를 확인 후 사용하였다. 종균 배양을 위해서 MI배지 10 ml에 MI agar plate에서 하나의 균락(colony)를 접종하여 37°C incubator에서 하룻밤 배양한 후 사용하였다. 플라스크 배양을 위해 500 ml 삼각플라스크에 100 ml MI배지를 넣고 종균배양물 1 ml을 접종하여 회전식 진동기(B. Braun co.)를 사

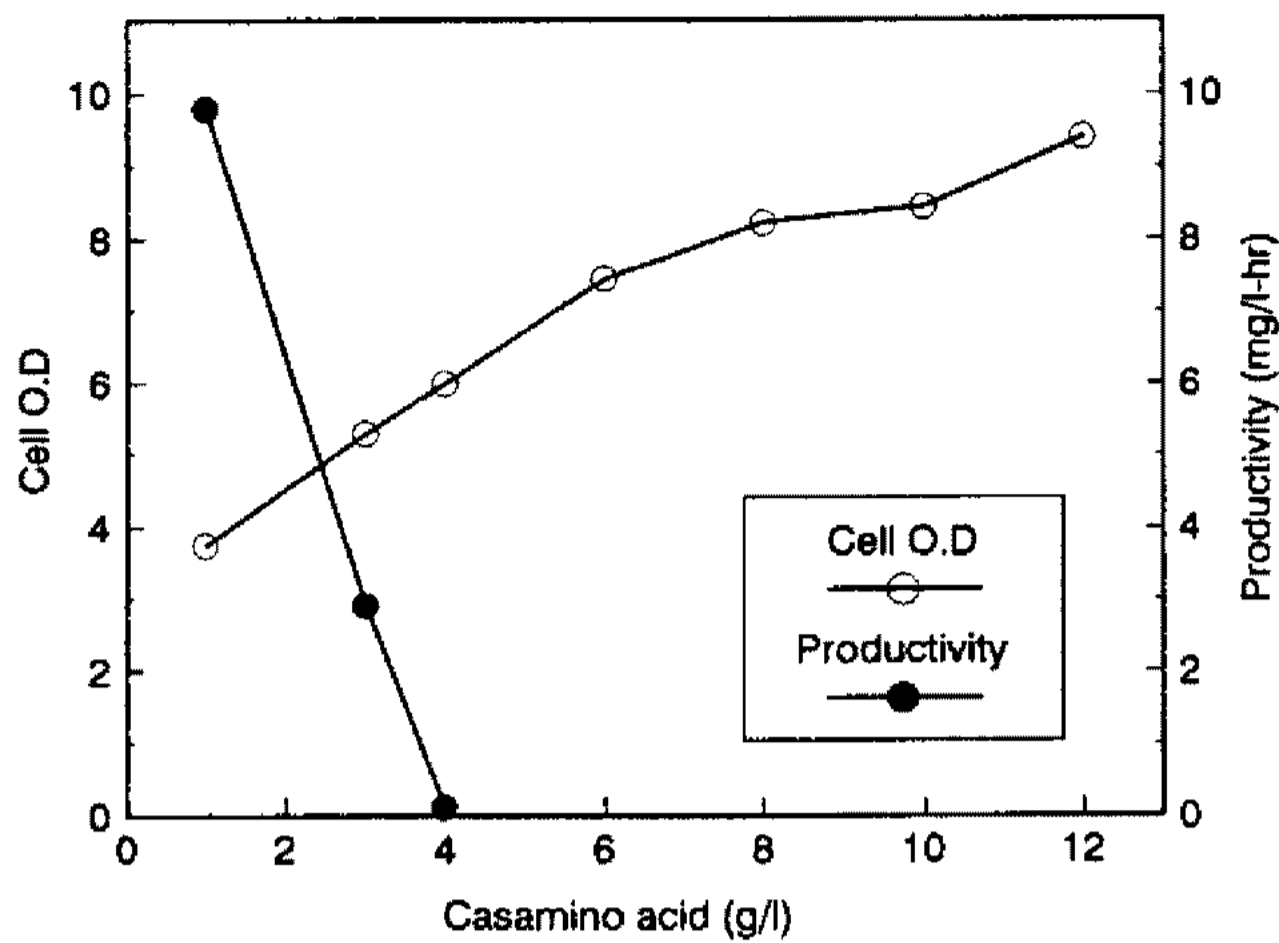


Fig. 1. The effect of casamino acid concentration on growth and productivity.

용하여 37°C, 200 rpm, 초기 pH 7의 배양조건에서 48 시간 배양했다.

Casamino acid의 영향

Casamino acid 농도가 미생물 증식과 트립토판 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 농도를 0~12 g/l까지 변화하였으며, 실험결과는 Fig. 1과 같다. 최소배지에 casamino acid를 첨가했을 경우, 농도가 증가함에 따라 균체량은 거의 비례하여 증가하였으나 트립토판 생산성은 비례하여 증가하지는 않았다. 트립토판 생산성은 casamino acid 농도가 1 g/l일 때 최대치를 나타냈고, 이 농도 이상에서는 급격히 감소하였다. 이처럼 casamino acid 농도가 증가할 때 증식속도는 상승하지만 트립토판 생산량이 감소하게 되는 현상은 Rose와 Yanofsky(26)의 결과와 일치하는 것이었다. 이들의 발표에 의하면 숙주 *E-coli*의 genotype이 *trpR*⁻인 유전적 특성을 갖고 있음에도 불구하고 최소배지에 casamino acid가 5 g/l 첨가되면 ASase 활성과 TSase 활성이 50% 이상 감소하는 것으로 밝혀졌다. 이들은 이러한 결과를 RNA 합성속도가 급격히 증가하여 *trp* operon의 mRNA 합성에 이용할 수 있는 RNA polymerase 분자의 숫자가 감소하기 때문이라고 설명했다. 결과적으로 트립토판 생산을 위한 casamino acid 농도는 1 g/l가 최적임을 알 수 있었다.

MI배지와 MII배지에서의 배양비교

기본배지(MI)와 최적배지(MII)에서 배양시간에 따른 균체의 증식, 트립토판 생산 및 포도당 소모곡선은 각각 Fig. 2, 3과 같았다. MI배지에서의 트립토판 생산성은 9.7 mg/l-hr이었고, 최대생산농도는 110 mg/l

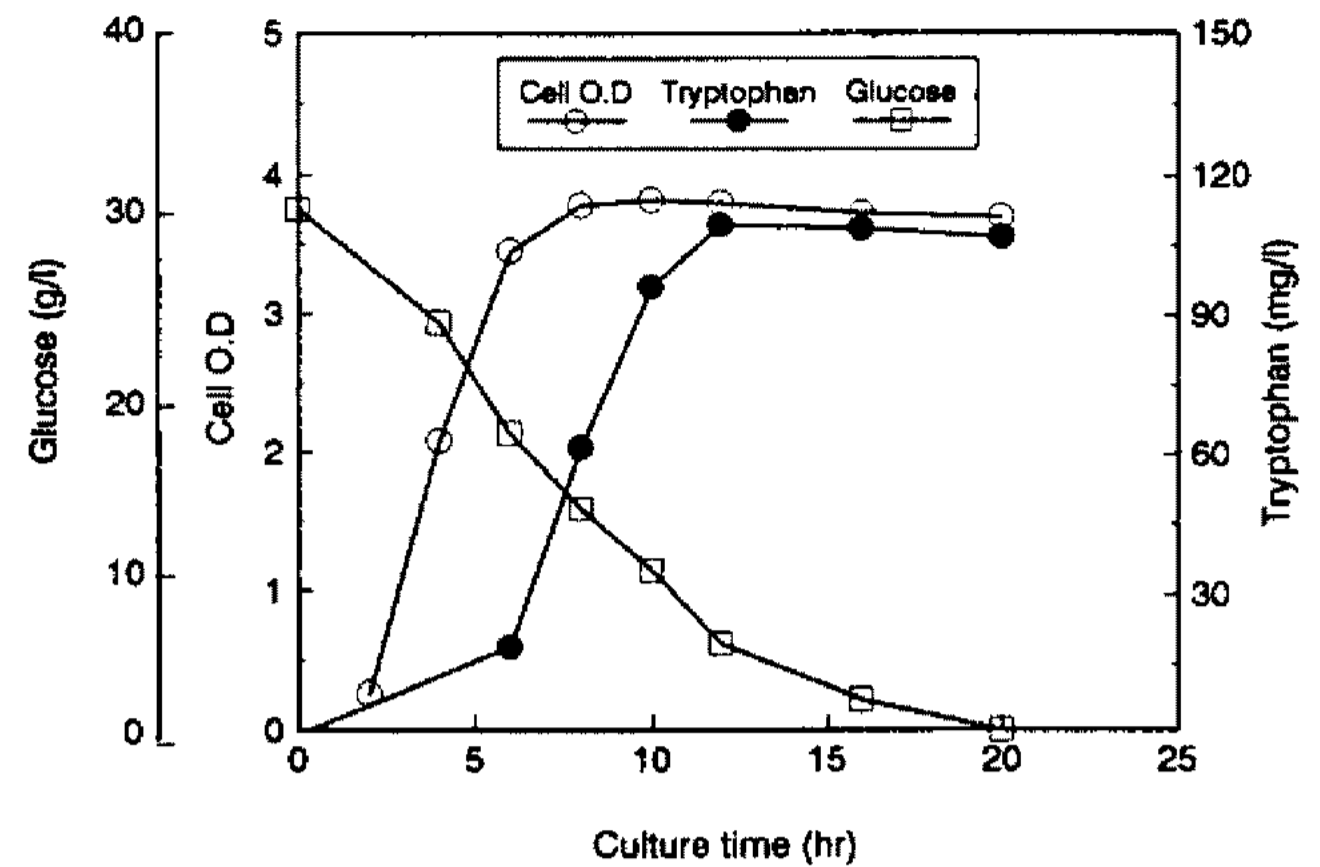


Fig. 2. The growth and tryptophan production in MI medium.

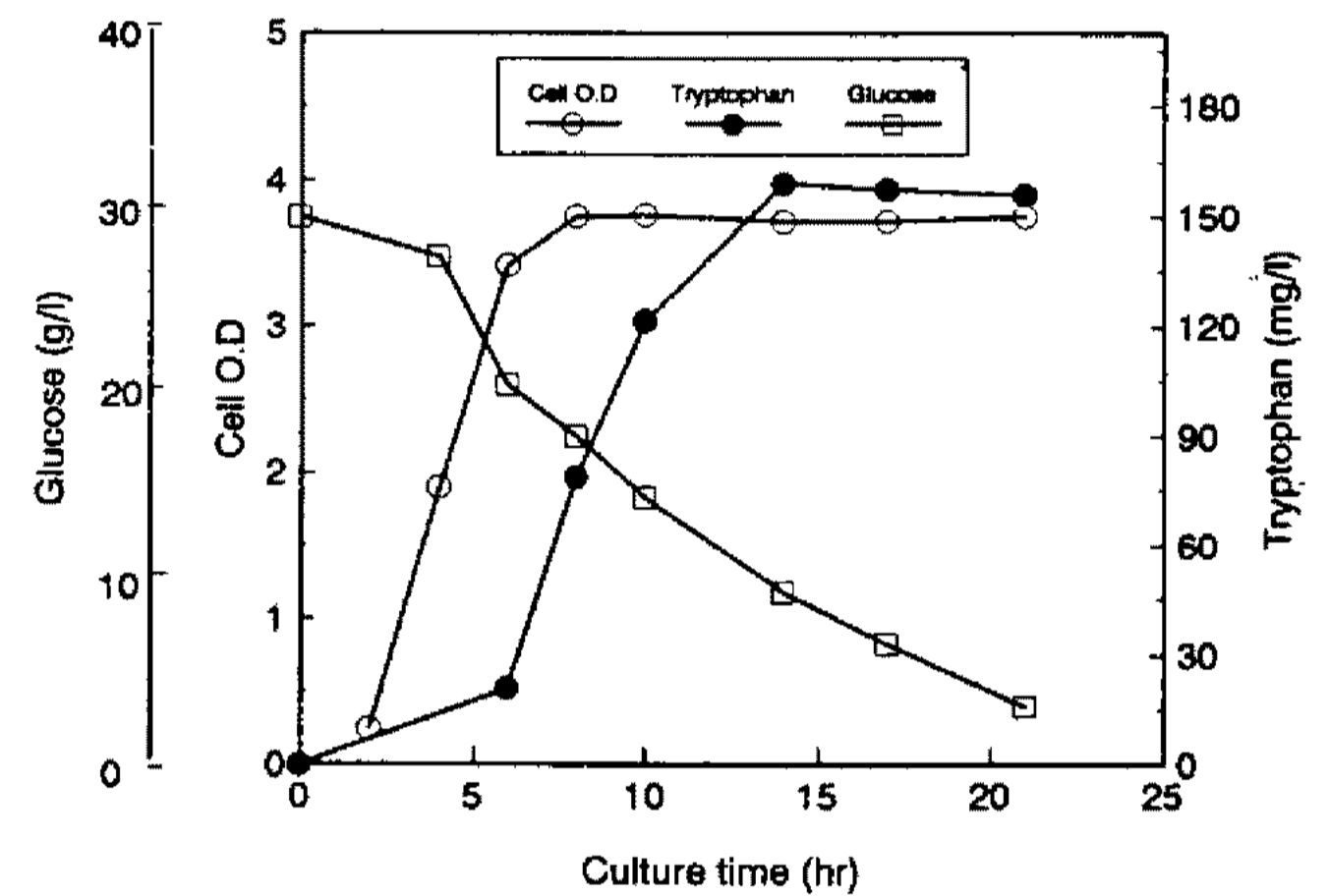


Fig. 3. The growth and tryptophan production in MII medium.

이었다. 그리고 MII배지를 이용하여 배양 10시간 후에 트립토판 생산성은 12.2 mg/l-hr이었고, 최대생산농도는 배양 14시간 후에 159 mg/l이었다. MI배지에서의 배양 결과와 비교한 결과, 트립토판 생산성과 트립토판 생산량은 각각 26%, 45% 증가하였다. 그러나 MI배지와 MII배지에서의 비증식속도는 각각 1.07과 1.01 hr⁻¹이었다. 비증식속도는 최적배지와 기본배지가 거의 비슷했으나 최적배지에서의 트립토판 생산량이 45% 증가함으로써, 발효시 배지로 최적배지가 기본배지보다 적절함을 알 수 있었다.

전구체들의 영향

MII배지에서 indole, anthranilate, L-serine이 트립토판 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. L-serine만이 증식과 트립토판 생산에 증가효과가 있었으며, 40 mg/l 첨가되었을 때 175 mg/l의 트립토판을 생산하였으며, 이 값은 첨가하지 않은 경우의 159 mg/l에 비하여 10% 정도 증가한 값이다.

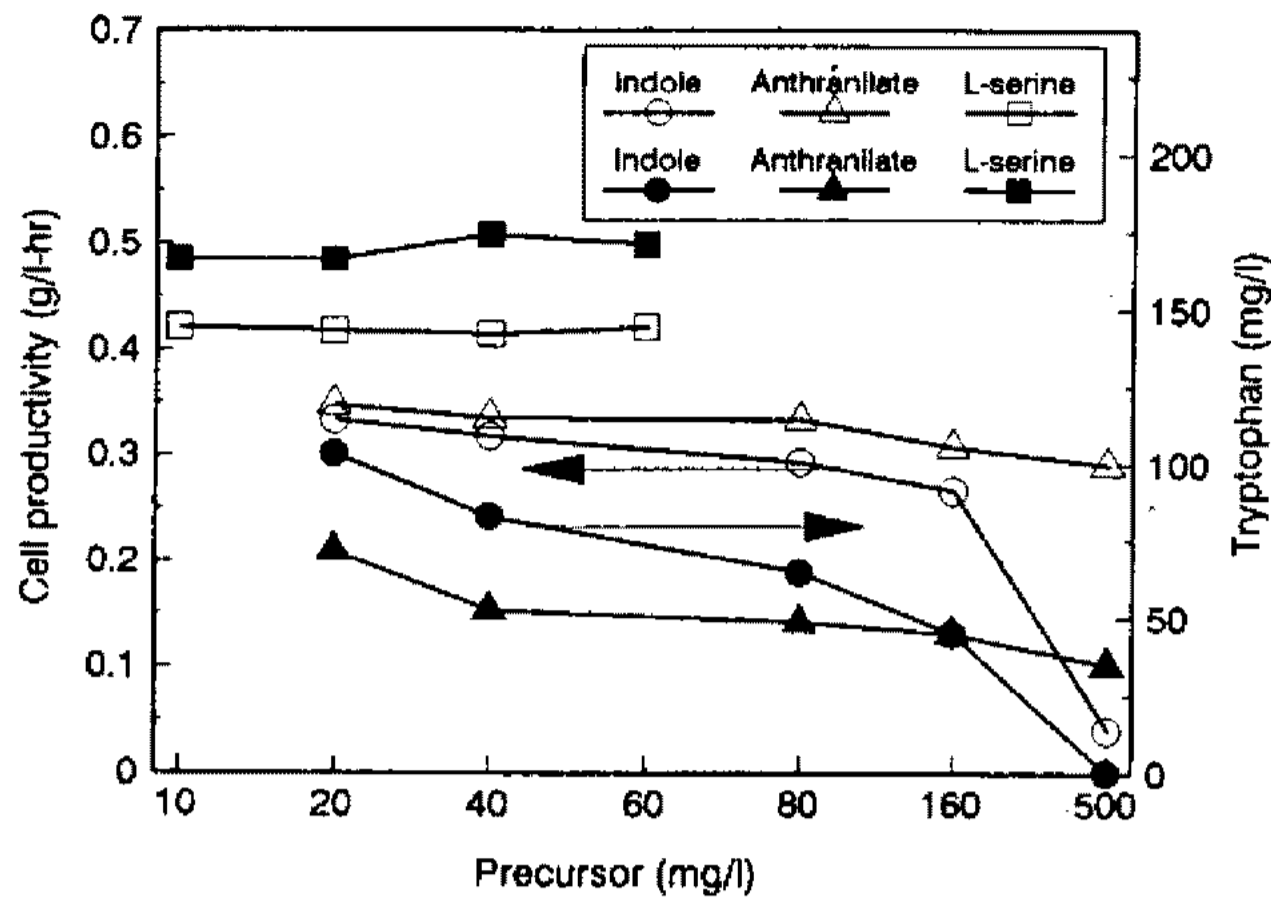


Fig. 4. The effect of precursors on cell productivity and tryptophan production.

Indole과 anthranilate의 경우에는 농도가 20 mg/l 이상일 때 증식이 저해되었으며 트립토판 생성도 급격히 감소하였다. 결과적으로 최적배지에 L-serine 40 mg/l을 첨가한 배지가 트립토판 생산을 위한 적절한 발효배지임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구에 사용된 균주를 제공하여 주신 고려대학교 농화학과 이세영 교수께 감사드립니다.

참고문헌

- Kaneko, T., Y. Izumi, I. Chibata, and T. Itoh. 1974. *Synthetic Production and Utilization of Amino Acids*, Pp. 243. Kodansha Ltd., Japan.
- Howe, E.E., G.R. Jansen, and G.W. Gelfillan. 1965. *Am. J. Clin. Nutr.* **16**: 315.
- Cullison, A.E. 1982. *Feeds and Feeding*, Reston Co., 3rd ed., 69-81.
- Greenstein, J.P. and M. Winitz. 1961. *Chemistry of the Amino Acids*, John Wiley & Sons Inc, New York, Vol. 3, 2316-2347.
- Soda, K., H. Tanaka, and N. Esaki. 1983. *Biotechnology*, Vol. 3, 479-530.

- Terui, G. 1972. *The Microbial Production of Amino Acids*, Pp. 515-531. Kodansha Ltd.
- Nyeste, L., M. Pecs, B. Sevela, and J. Hollo. 1983. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Pp. 175-202, Vol. 26.
- Sano, K., K. Yokozeki, C. Eguchi, T. Kagawa, I. Noda, and K. Mitsugi. 1977. *Agri. Biol. Chem.* **41**: 819.
- Nakazawa, H., H. Enei, S. Okumura, and H. Yamada. 1972. *Agri. Biol. Chem.* **36**: 2523.
- Bang, W., S. Lang, H. Shame, and F. Wagner. 1983. *Biotech. Bioeng.* **25**: 999.
- Gibson, F. and J. Pittard. 1968. *Bacteriol. Rev.* **32**: 465.
- Margolin, P. 1971. *Metabolic Pathways*, Vogel, H.J. ed., Academic Press, New York, 3rd ed., Vol. 5, 389.
- Umberger, H.E. 1977. *Ann. Rev. Bioeng.* **19**: 1563.
- Shiio, I., S. Sugimoto, and M. Nakagawa. 1975. *Agri. Biol. Chem.* **39**: 627.
- Shiio, I., S. Sugimoto, and M. Nakagawa. 1982. *Agri. Biol. Chem.* **46**: 1849.
- Tribe, D.E. and J. Pittard. 1979. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 181.
- Aiba, S., T. Imanaka, and H. Tsunekawa. 1980. *Biotech. Lett.* **2**: 525.
- Aiba, S., T. Imanaka, and H. Tsunekawa. 1982. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 289.
- Aiba, S., T. Imanaka, and H. Tsunekawa. 1982. *JP* 57-80398.
- Ebihara, Y., H. Niitsu, and G. Terui. 1969. *J. Ferment. Technol.* **47**: 733.
- Sanchez, S. and A.L. Demain. 1978. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 459.
- Miler, G.L. 1959. *Anal. Chem.* **31**: 426.
- Udenfriend, S. and R.E. Peterson. 1962. *Methods in Enzymology*, Pp. 613. Vol. 3.
- Smith, O.H. and C. Yanofsky. 1962. *Methods in Enzymology*, Pp. 794. Vol. 5.
- Tamir, H. and P.R. Srivivasan. 1970. *Methods in Enzymology*, Pp. 401. Vol. 17.
- Rose, J.K. and C. Yanofsky. 1972. *J. Mol. Biol.* **69**: 103.

(Received April 4, 1994)