

Sucrose를 탄소원으로 재조합 대장균에 의한 Poly(3-Hydroxybutyric Acid) 합성시 복합질소원이 미치는 영향

†이 상 업 · 장 호 남

한국과학기술원 화학공학과 생물공정연구센터

Effect of Complex Nitrogen Sources on Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Synthesis by Recombinant *Escherichia coli* Using Sucrose as a Carbon Source

Sang-Yup Lee[†] and Ho-Nam Chang

Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center,
KAIST, Taejon 305-701, Korea

ABSTRACT

When *Escherichia coli* W, which is able to utilize sucrose as a carbon source, harboring a high-copy-number plasmid(pSYL105) containing the *Alcaligenes eutrophus* polyhydroxyalkanoate(PHA) biosynthetic genes was cultured in a defined medium, the final poly(3-hydroxybutyric acid), PHB, concentration obtained was as low as 0.21g/ℓ. Ten different complex nitrogen sources were, therefore, examined for their ability to enhance PHB synthesis when supplemented to a defined medium. Addition of tryptone, casamino acids, casein hydrolysate, or soy bean hydrolysate enhanced PHB synthesis most significantly, resulting in more than 10 times higher PHB concentration compared with that obtained in a defined medium. Furthermore, PHB yield on sucrose was also increased by more than a 10 fold by the addition of these complex nitrogen sources, which suggested that PHB might be efficiently produced by the recombinant *E. coli* W(pSYL105) using sucrose as a carbon source.

서 론

석유화학공업의 꽃이라 불리우며 다양한 물성을 가져 일회용 소모품으로부터 고기능 산업재료에 이르기까지 널리 사용되어온 플라스틱은 자연환경에서 분해가 되지않는 성질로 인해 인류사회의 큰 문제로 대두되고 있다. 이에 세계 각국은 일정기간 사용 후 분해되어 없어지는 생분해성 플라스틱의 개발에 박

차를 가하고 있다. 이 대상으로 많은 연구가 되고 있는 polyhydroxyalkanoate(PHA)는 다양한 미생물이 질소·인·산소 등이 부족한 성장조건에서 여분의 탄소원으로부터 합성하여 균체내에 입자상으로 축적하는 폴리에스터 물질이다(1, 2). 여러 종류의 PHA 중 가장 많이 연구가 된 poly(3-hydroxybutyric acid), PHB와 이의 3-hydroxyvaleric acid와의 공중합체인 P(3HB-co-3HV)는 영국의 ZENECA BioProducts(예전의 ICI, UK)에서 포도당을 이용할 수 있는 *Alcaligenes eutrophus* 변이주를

† Corresponding Author

이용하여 각각 포도당과 포도당/propionic acid를 기질로 하여 생산하고 있다(3). 그러나 Biopol(P (3HB-co-3HV)의 상품명)의 가격이 현재 약 \$17/kg(ZENECA, personal communication)으로 4년 전의 \$30/kg이었던 것에 비해 많이 내렸지만 이와 물성이 비슷한 polypropylene은 \$2/kg 인 것에서 알 수 있듯이 전반적으로 PHA는 기존의 플라스틱에 비해 생산단가가 높아 사용이 제한되고 있다. 따라서, 최근에는 세계 각국 많은 연구진들이 배양 방법 최적화에 의한 PHA 생산성 향상과 분리정제 공정의 최적화에 주력하고 있다(4). Kim 등(5, 6)은 PHA의 생산 균주로 가장 널리 사용된 *A. eutrophus*를 이용하여 포도당 농도 자동 제어에 의한 유가식 배양을 하여 50시간에 121g/l PHB와 46시간에 117g/l P(3HB-co-3HV)라는 이제까지 보고된 것 중 가장 높은 농도의 PHA를 2.4g/l-h 보다 높은 productivity로 생산할 수 있었다.

이와 같이 *A. eutrophus*에 의한 효과적인 PHA의 생산에도 불구하고 *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Methylotrophs*, *Pseudomonads* 등도 생산 균주로 검토되고 있으며(4) 재조합 균주에 의한 PHA의 생산도 이미 기술한 바와 같은 여러 이유로 고려되고 있다(7). 특히 *A. eutrophus* PHA 합성 유전자가 cloning된 재조합 대장균에 의한 PHB 생산은 빠른 성장 속도, 고농도의 PHB 축적능(8), 다양한 탄소원의 이용가능(9), 분리정제의 용이(10) 등 여러 장점이 있으며, 본 연구진은 복합 배지에서 재조합 대장균 XL1-Blue(pSK2665) 혹은 XL1-Blue(pSYL104)의 pH-stat 방식 유가식 배양에 의해 포도당을 탄소원으로 하여 40시간에 약 80g/l의 PHB를 생산할 수 있었다(8, 11). 이때 효과적인 PHB의 합성 축적을 위해 high gene dosage와 plasmid 안정화가 매우 중요한 것으로 나타났다(11). 또한 PHB의 합성능이 가장 뛰어난 host의 선별을 위해 K12, B, W, XL1-Blue, DH5 α , RR1, C600, HB101, JM109 등 20여 가지 대장균을 높은 복제수의 안정한 plasmid pSYL105로 형질전환하여 PHB 합성속도 및 축적능을 비교하였다(12, unpublished results). 포도당이 20g/l 첨가된 복합배지에서 플라스크 배양시 48시간 후 XL1-Blue와 B는 6~7g/l의 높은 농도로 PHB를 축적하였다(12). 그러나 K12와 W는 포도당을 탄소원으로 했을 때 복합배지에서도 약 0.5g/l 이하의 낮은 농도의 PHB를 축적하였다(12). PHB 생산 단가를 좌우하는 배지의 비용을 낮추기 위해 단순배지에서의

유가식 배양을 행한 결과 16g/l의 낮은 농도의 PHB를 얻었으며(13), 이때 소량의 다양한 복합 질소원을 첨가함으로써 PHB 합성능을 두 배 이상 증가시킬 수 있었다(14). 실제로는 PHB의 합성에 사용되는 탄소원이 생산단가에 많은 영향을 미치므로 당밀(molasses)과 같은 저가의 배지로부터 PHB를 합성할 수 있으면 더욱 바람직할 것이다. 그러나 널리 사용되는 대장균 K12와 그의 수많은 변이주들은 sucrose를 탄소원으로 이용할 수 없다. 따라서 본 연구진은 *Bacillus subtilis*의 levanase 유전자를(15) 대장균 K12 변이주에 도입하여 sucrose를 이용가능하게 하려 했으나, sucrose의 uptake 문제와 합성된 levanase의 분비 문제 등으로 효과적이지 못함을 발견하였다(unpublished results). 따라서 K12가 아닌 다른 종류의 대장균 중 sucrose 이용가능한 균주를 선별한 바, 대장균 W가 sucrose를 탄소원으로 매우 잘 자라는 것을 알았다. 이에 대장균 W를 단순배지에서 sucrose를 탄소원으로 pH-stat 유가식 배양하여 36시간에 건조균체농도로 105g/l를 얻는 고농도 배양법을 확립하였다(16). 또한 같은 단순배지에서 *A. eutrophus* PHA 합성 유전자를 함유한 W를 배양하여 PHB 생산도 도모하였다. 그러나 이때는 48시간 후 건조균체 농도는 125g/l로 매우 높았으나 PHB는 34.3g/l를 얻어 많은 향상이 필요함을 알았다(16). 따라서 본 연구에서는 단순배지에 여러 종류의 복합질소원을 소량 첨가하여 배양시 최종건조균체 농도, PHB 농도, 건조균체 및 PHB 수율 등의 변화를 살펴 보고 대장균 W를 이용하여 sucrose로부터 효과적으로 PHB를 생산하는 가능성을 타진하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 Plasmid

Sucrose를 유일한 탄소원으로 성장할 수 있는 대장균으로 본 실험에 사용한 균주는 W(ATCC 9637)이었다. 사용된 plasmid는 *A. eutrophus* PHA 합성 유전자가 cloning된 높은 복제수의 안정한 plasmid pSYL105이었다(12). 형질전환은 BioRad사(Richmond, CA, USA)의 Gene Pulser를 이용하여 electroporation(17)으로 행하였다.

배 양

균주의 보존은 Luria-Bertani(LB) 배지(18)에서 배양 후 20%(v/v) glycerol stock으로 -80°C에

보관하였다. PHB 생산을 위해 사용된 단순배지는 Lee and Chang(16)의 R 배지를 사용하였다. Sucrose는 최종 농도로 20g/l 가 되도록 하였다(16). PHB 합성 향상 효과를 보기 위해 사용한 복합 질소원은 tryptone, peptone, yeast extract, casamino acids와 beef extract(이상 Difco Laboratoires, Detroit, MI, USA), cotton seed hydrolysate와 casein hydrolysate(이상 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), collagen hydrolysate(DGF Stoess, Eberbach/Baden, Germany), corn steep liquor(미원, 서울), 그리고 soy bean hydrolysate(Ajinomoto Co., Tokyo, Japan)이었다. Lee 등(13, 14)의 방법으로 준비된 50ml의 배지가 담긴 250ml 삼각플라스크를 0.2ml의 glycerol stock으로 접종한 뒤 37°C, 300rpm에서 60시간 배양 후 분석하였다. 이때 ampicillin은 100mg/l 로 첨가하였다. 모든 배양 실험은 3회 반복하였다.

분 석

건조균체, PHB 및 sucrose의 농도는 Lee 등(11, 13, 14)이 보고한 방법에 따라 측정하였다. PHB 함량(PHB content)은 PHB 농도 대 건조균체 농도비의 백분율(%)로 정의하였다. 잉여건조균체 농도(residual cell mass concentration)는 건조균체 농도에서 PHB농도를 뺀 것으로 정의하였다. 건조균체수율, PHB 수율 그리고 잉여건조균체 수율은 각각 gram sucrose로부터 생성된 gram 건조균체, PHB 및 잉여건조균체로 정의하였다.

결과 및 고찰

복합질소원이 균체성장과 PHB 합성에 미치는 영향 우선은 첨가될 복합질소원 농도의 최적화를 위하여 이미 보고한 것(14)과 같은 방법으로 열 가지 복합질소원의 농도를 0.5~5g/l 로 변화시키면서 R+ sucrose 20g/l 의 배지에 첨가하여 균체성장과 PHB 축적을 비교하였다. 그 결과 casamino acids, peptone, collagen hydrolysate를 제외한 나머지 7개 복합질소원의 최적 첨가 농도는 XL1-Blue(pSYL105)의 PHB 축적을 최대로 증대시킨 농도(14)와 일치하였다(data not shown). 따라서 10가지 복합질소원은 이 최적농도로 첨가하여 실험하였으며, 그 농도는 아래의 결과 그래프에 나타내고 별도로 보이지는 않았다.

복합질소원의 첨가에 따른 최종 건조균체 · PHB · 잉여건조균체 농도를 Fig. 1~3에 나타내었다. Fig.

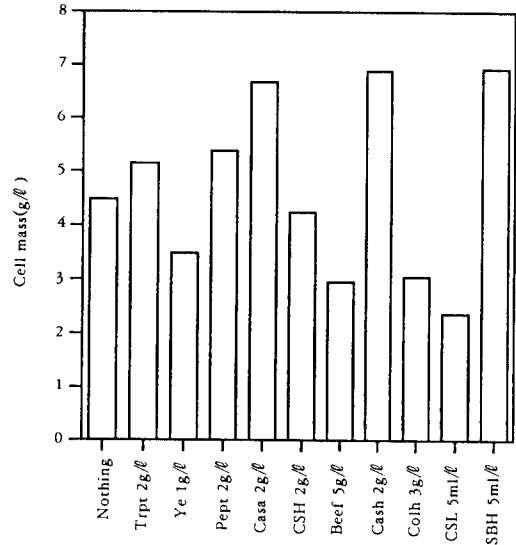


Fig. 1. Effect of supplementing various complex nitrogen sources on cell mass concentration in the flask culture of W(pSYL105) in a defined medium containing sucrose as a carbon source. Abbreviations are: Trprt, tryptone; Ye, yeast extract; Pept, peptone; Casa, casamino acids; CSH, cotton seed hydrolysate; Beef, beef extract; Cash, casein hydrolysate; Colh, collagen hydrolysate; CSL, corn steep liquor; SBH, soy bean hydrolysate. 'Nothing' indicates that no complex nitrogen source was added to the defined medium.

1에서 볼 수 있듯이 복합 질소원을 첨가했다고 해서 최종 건조 균체농도가 반드시 증가하는 것은 아님을 알 수 있다. 이는 Fig. 2, 3에 보여진 PHB 축적 농도와 잉여건조균체 농도를 살펴 봄으로써 설명될 수 있다. 복합질소원이 첨가되지 않은 단순배지에서의 W(pSYL105)에 의한 PHB 축적은 0.21g/l 에 불과했으나 소량의 복합질소원 첨가에 의해 PHB 축적이 상당히 증가하였다(Fig. 2). 특히 tryptone, casamino acids, casein hydrolysate, 혹은 soy bean hydrolysate 첨가시 최종 PHB 농도가 2.1g/l 보다 높아서 PHB 축적이 10배 이상 증가했음을 알 수 있다. 이는 포도당으로부터 XL1-Blue(pSYL105)에 의한 PHB 생산시 복합 질소원 첨가에 의해 PHB 축적이 2~5배 향상되었던 것과 비교하면

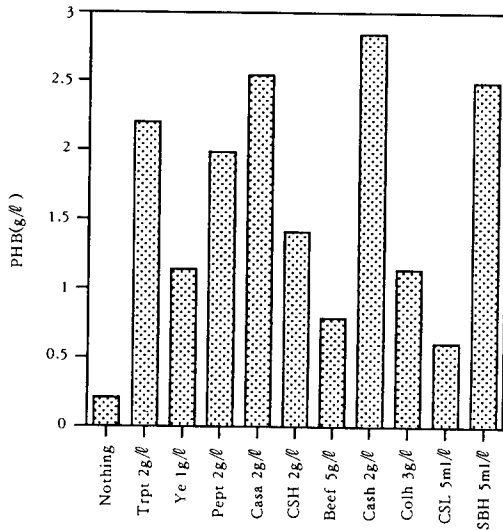


Fig. 2. Effect of supplementing various complex nitrogen sources on PHB concentration in the flask culture of W(pSYL105) in a defined medium containing sucrose as a carbon source.

(14) W(pSYL105)에 의한 PHB 합성시 복합질소원의 향상 효과가 훨씬 큼을 알 수 있다. 전체의 건조균체농도에서 PHB 농도를 뺀 잉여건조균체 농도를 비교하면 복합 질소원 첨가가 균체 성장에 미치는 영향을 알 수 있다(Fig. 3). 60시간 배양 후 잉여건조균체 농도는 어떠한 복합 질소원 첨가에도 증가하지 않았으며 beef extract, collagen hydrolysate, 혹은 corn steep liquor 첨가시에는 첨가하지 않은 단순배지에서 얻어진 것보다 반 이하로 감소했다(Fig. 3). 그러므로 PHB와 잉여건조균체 농도를 더한 건조균체농도는 다른 종류의 복합질소원 첨가에 따라 증가하기도 감소하기도 하였다(Fig. 1).

Fig. 4에는 복합 질소원 첨가에 따른 PHB 함량 변화를 나타내었다. 균체내에 PHB가 얼마나 축적되었는가를 나타내는 PHB 함량은 분리정제의 측면에서 높을수록 좋다. W(pSYL105)를 단순 배지에서 배양시 PHB 함량은 건조균체의 4.7%로 매우 낮았으나 소량의 복합 질소원 첨가에 의해 25~43%로 증가하였다(Fig. 4). 그러나 최적의 조건에서도 포도당으로부터 XL1-Blue(pSYL105)가 축적할 수 있었던 60~80%의 높은 PHB 함량(14)에는 미치

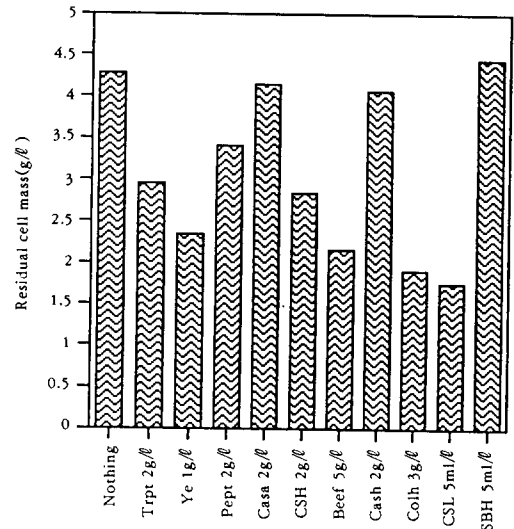


Fig. 3. Effect of supplementing various complex nitrogen sources on residual cell mass concentration in the flask culture of W(pSYL105) in a defined medium containing sucrose as a carbon source.

지 못하였고, 이는 유가식 배양에 의해서 증가될 수 있을 것으로 보이며, 예비실험 결과 실제 2배 이상 증대됨을 알 수 있었다(data not shown).

복합질소원이 건조균체 수율과 PHB 수율에 미치는 영향

PHB 수율은 사용된 탄소원이 다른 곳으로 낭비되지 않고 PHB 합성에 사용되었는지를 가늠할 수 있는 지표로서 경제성 검토에서 중요한 인자이다. 따라서 배양후 남아 있는 sucrose의 농도를 측정하여 사용된 sucrose의 농도를 Fig. 5에 나타내었다. Beef extract나 corn steep liquor 첨가시에만 12g/l의 sucrose가 소모되었고 그 나머지는 모두 14~17g/l로 비슷한 양의 sucrose를 소모하였다. 이 소모된 sucrose의 양을 기준으로 gram sucrose 당의 건조균체, PHB 및 잉여건조균체 수율을 구하여 Fig. 6에 나타내었다. 단순배지에서 얻어진 0.013g PHB/g sucrose의 낮은 PHB 수율은 소량의 복합질소원 첨가에 의해 5배 이상 증가하였다. 가장 높은 PHB 수율은 casein hydrolysate 첨가시였으며 이때는 13배 증가하여 0.17g PHB/g sucrose이었다.

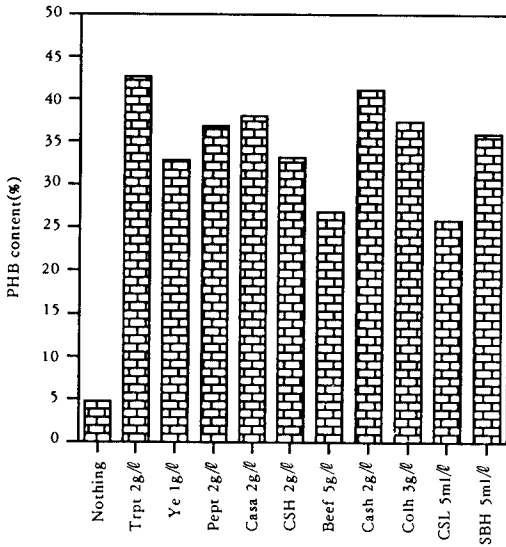


Fig. 4. Effect of supplementing various complex nitrogen sources on PHB content in the flask culture of W(pSYL105) in a defined medium containing sucrose as a carbon source.

복합 질소원 첨가에 의해 PHB 수율은 이와 같이 많이 향상된 반면 균체의 성장수율을 나타내는 잉여건조균체 수율은 오히려 감소하였다(Fig. 6). 그리하여 두 수율의 합인 건조균체수율은 복합질소원의 종류에 따라 증가하기도 감소하기도 하였다. 특히 soy bean hydrolysate와 casein hydrolysate 첨가시는 건조균체수율이 각각 0.4와 0.41g cell mass/g sucrose로 매우 높아서 sucrose가 효율적으로 이용되었음을 알 수 있다.

복합질소원의 선택

이렇게 얻어진 결과를 토대로 PHB 생산을 최대 로 향상시킬 수 있는 복합질소원을 선택하기 위하여 잉여건조균체농도와 PHB 농도의 관계를 수율과 연관지어 살펴 보았다. Yeast extract, beef extract, collagen hydrolysate와 corn steep liquor는 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 다른 복합질소원에 비해 PHB 합성을 그다지 향상시키지 못하였으므로 선택대상에서 우선적으로 제외하였다. 나머지 6개의 복합질소원은 첨가시 PHB 농도가 최소한 7배 이상 증가하였으므로 잉여건조균체 농도도 같이 살펴 보았는데 이 이

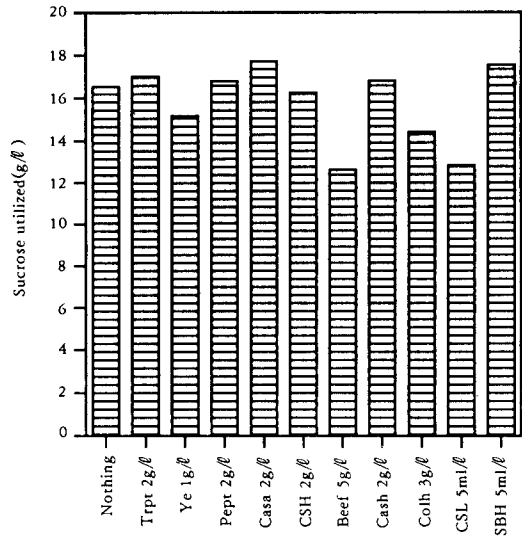


Fig. 5. Sucrose utilized by W(pSYL105) in a defined medium with or without supplementing various complex nitrogen sources.

유는 다음과 같다. 잉여건조균체농도가 너무 높으면 탄소원이 우리가 원하는 PHB로 가지 않고 낭비된 것임을 자명하다. 그러나 PHB는 입자상으로 균체 내부에서 합성 축적되는 것임을 상기할 때 비슷한 수준의 PHB 함량에서는 잉여건조균체 농도가 낮으면 최종 PHB 농도도 낮게 되어 생산성을 낮추게 되므로 역시 바람직하지 못하다. 특히 본 연구의 최종 목표인 유가식 배양에 의한 PHB 생산성 증대시는 이 현상이 더욱 중요하게 된다. 이것을 고려할 때 tryptone, casamino acids, casein hydrolysate, 그리고 soy bean hydrolysate 첨가시 PHB와 잉여건조균체 농도가 각각 2.1과 2.9g/l 이상이 되어 가장 적합한 것으로 나타났다. 또한 Fig. 6에 보여진 수율을 살펴 보면 이 네 가지 복합질소원 첨가에 의해 PHB 수율은 10배 이상 증가하여 경제적인 측면에서도 바람직한 것으로 나타났다. 따라서 이상의 네 가지 복합 질소원을 소량 첨가하여 sucrose로부터 (따라서 저가의 탄소원인 당밀로부터) 효과적인 PHB 생산이 가능할 것으로 보이며, 포도당으로부터 XL1-Blue(pSYL105)를 이용하여 얻었던 것보다 상대적으로 낮은 PHB 농도는 유가식 배양시 적절한 feeding 방법 개발에 의해 높일 수 있을 것이다.

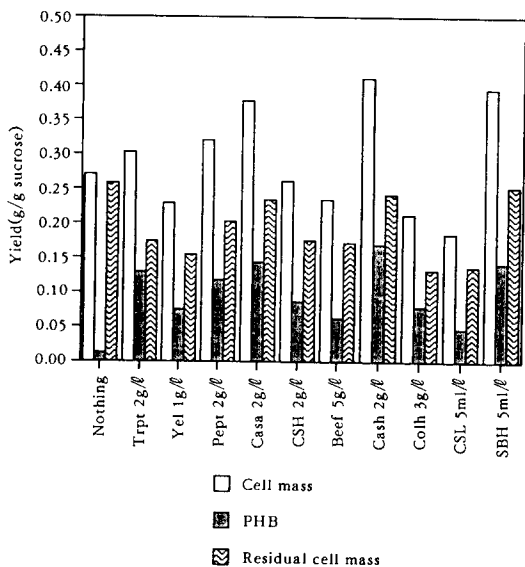


Fig. 6. Effect of supplementing various complex nitrogen sources on the yields of cell mass, PHB, and residual cell mass in the flask culture of W(pSYL105) in a defined medium containing sucrose as a carbon source.

요 약

Sucrose를 탄소원으로 이용할 수 있는 대장균 W를 *A. eutrophus* PHA 합성 유전자가 cloning된 높은 복제수의 plasmid pSYL105로 형질전환하여 단순배지에서 배양시 0.21g/l의 낮은 PHB 농도를 얻었다. 이에 10가지의 복합질소원을 소량 첨가하여 PHB 합성에 미치는 영향을 살펴 보았다. Tryptone, casamino acids, casein hydrolysate, 혹은 soy bean hydrolysate의 첨가시 PHB 합성이 10배 이상 증대되었다. 또한 이때 sucrose로부터의 PHB 수율도 10배 이상 증가하여 이 네 가지 복합질소원을 적정 농도로 첨가함으로써 sucrose로부터 효과적인 PHB 생산이 가능함을 알았다.

감 사

본 연구는 한국과학기술원과 한국과학재단에서 지원받았으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. A. J. Anderson and E. A. Dawes(1990), *Microbiol. Rev.*, **54**, 450.
2. Y. Doi(1990), *Microbial Polyesters*, VCH, New York, NY.
3. D. Byrom(1987), *Trends Biotechnol.*, **5**, 246.
4. S. Y. Lee and H. N. Chang(1995), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, In press.
5. B. S. Kim, S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang and S. I. Woo(1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 892.
6. B. S. Kim, S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang and S. I. Woo(1994), *Enzyme Microbiol. Technol.*, **16**, 556.
7. 이상엽(1994), *생명공학동향*, **2**, 78.
8. B. S. Kim, S. Y. Lee and H. N. Chang(1992), *Biotechnol. Lett.*, **14**, 811.
9. S. Dills, A. Apperson, M. Schmidt and M. Saier(1980), *Microbiol. Rev.*, **44**, 385.
10. 한세광, 장용근, 이상엽(1994), *생물공학 News*, **1**, 45.
11. S. Y. Lee, K. S. Yim, H. N. Chang and Y. K. Chang(1994), *J. Biotechnol.*, **32**, 203.
12. S. Y. Lee, K. M. Lee, H. N. Chang and A. Steinbuchel(1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1337.
13. S. Y. Lee, H. N. Chang and Y. K. Chang (1994), *Ann. NY Acad. Sci.*, **721**, 43.
14. S. Y. Lee and Chang, H. N.(1994), *J. Environ. Polymer Degrad.*, **2**, 169.
15. K. Friehs, K. Schorgendorfer, H. Schwab and R. Lafferty(1986), *J. Biotechnol.*, **3**, 333.
16. S. Y. Lee and H. N. Chang(1993), *Biotechnol. Lett.*, **15**, 971.
17. W. J. Dower, J. F. Miller and C. W. Ragsdale (1988), *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127.
18. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989), *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.