

## 재조합 대장균에 의한 유청으로부터 Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) 합성

† 김 범 수 · <sup>1</sup>이 상 업

충북대학교 화학공학부, <sup>1</sup>한국과학기술원 생명화학공학과  
(접수 : 2003. 7. 15. 게재승인 : 2003. 10. 25.)

## Synthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Recombinant *Escherichia coli* from Whey

Beom Soo Kim<sup>†</sup> and Sang Yup Lee<sup>1</sup>

Department of Chemical Engineering, Chungbuk National University

<sup>1</sup>Department of Chemical and Biomolecular Engineering,  
Korea Advanced Institute of Science and Technology

(Received : 2003. 7. 15. Accepted : 2003. 10. 25.)

Two recombinant *Escherichia coli* strains, GCSC6576 harboring a plasmid pSYL107 containing the *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis genes and a *fadR atoC* mutant LS5218 harboring a plasmid pJC4 containing the *Alcaligenes latus* PHA biosynthesis genes were compared for their ability to synthesize poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] from whey. The 3HV fraction could be increased by acetic acid induction and oleic acid supplementation in flask cultures of recombinant *E. coli* GCSC6576. With the pH-stat fed-batch culture of recombinant *E. coli* LS5218, we obtained a cell concentration, a P(3HB-co-3HV) concentration, a P(3HB-co-3HV) content, and a 3HV fraction of 31.8 g/L, 10.6 g/L, 33.4%, and 6.26 mol%, respectively in 39 h.

**Key Words** : Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), recombinant *Escherichia coli*, whey, fed-batch culture

### 서 론

Polyhydroxyalkanoates (PHA)는 많은 미생물들이 체내에 축적하는 생분해성 폴리에스테르로 산업, 농업, 의약 등 다양한 응용분야로 인해 산업계와 학계로부터 상당한 관심을 끌어들였다(1). PHA의 생산단가 중 약 40%를 원료비가 차지하므로, 유청과 같은 폐기물을 기질로 사용하는 것은 PHA의 높은 생산단가를 낮추는데 기여할 수 있다(2-4). 유청은 치즈산업을 비롯한 낙농업 및 유제품 산업에서 양산되는 부산물로 대략 4.5% 유당, 0.8% 단백질, 1% 무기염류, 0.1-0.8% 유산으로 구성되어 있다. 미국에서 생산되는 연간 260억 kg의 유청 중 절반만이 제품으로 이용되고 나머지는 높은 생화학적 산소요구량 (BOD = 40 g/L) 때문에 오염물질로 분류되어 상당한 비용을 들여 처리해야 하는 것으로 알려져 있다. 최근 호주

의 한 유제품업체는 유청처리를 위해 건조공정에 호주\$ 18 million을 투자하였다(5). 만일 건조공정 대신 PHA 생산공정을 건설한다면 이의 절반정도 비용으로 건설이 가능할 것으로 예측되고 단순히 유청폐기물을 처리할 뿐만 아니라 부가가치가 높은 생분해성 고분자를 생산하는 잇점도 있다.

PHA 생합성 유전자를 포함하는 재조합 대장균은 다른 wild-type 균주들에 비해 PHA 생산에 있어서 몇 가지 장점을 가지고 있다. 그 중의 하나가 sucrose, lactose, xylose 등 값싼 탄소원을 이용할 수 있는 점이다. Lee 등(6-7)은 유청을 기질로 poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)]를 생산할 수 있는 재조합 대장균을 개발하고, 발효도중 배양액을 제거하는 유가식 배양을 수행하였다. Ahn 등(8-9)은 유청으로부터 P(3HB) 생산시 발효조 내의 배양액 부피를 일정하게 유지하기 위해 280 g/L 유당농도에 해당하는 고농도 유청농축액을 공급기질로 이용하는 방법과 세포 재순환 배양에 의하여 막을 통해 여액을 제거하는 방법을 제안하였다. Kim 등(5)은 유가식 발효도중 배양액을 제거하지 않고 균체내 P(3HB) 함량을 70-80% 얻을 수 있는 조업조건을 구하고, 발효조의 교반속도(산소전달속도)를 제한함으로써 재조합 대장균의 P(3HB) 생합성 시기를 조절할 수 있는 방법을 개발하였다.

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763,  
Korea

Tel : +82-43-261-2372 Fax : +82-43-269-2370

E-mail : bskim@chungbuk.ac.kr

Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)]는 P(3HB)보다 유연하고 강해서 pilot 규모로 생산되어 왔으나, 제조합 대장균을 이용하여 유청으로부터 P(3HB-co-3HV)를 생산하는 연구는 아직까지 수행되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 유청과 propionic acid로부터 P(3HB-co-3HV)를 합성하기 위한 제조합 대장균의 종류 및 배양조건의 영향에 대해 알아보고 유가식 배양을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

*Escherichia coli* GCSC6576은 *Ralstonia eutropha* PHA 생합성 오페론과 *E. coli* *ftsZ* 유전자를 포함하는 플라스미드 pSYL107(10)을 함유하고 있다. *E. coli* LS5218은 지방산 이용 효소가 발현되는 *fadR atoC* 돌연변이주이며, *Alcaligenes latus* PHA 생합성 유전자를 포함하는 플라스미드 pJC4(11)를 함유하고 있다.

### 배양

플라스크 배양은 250 ml 플라스크 50 ml 배지에서, 유가식 배양은 2.5 L 발효조 (코바이오텍)를 이용, 초기배양액 부피 0.8 L에서 수행하였다. 플라스크 배양 및 유가식 배양의 초기배지 조성은 다음과 같다.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  13.3 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4 g/L, citric acid 1.7 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.2 g/L, 미량원소용액 10 ml/L(12). 위의 배지에 공급배지용액을 전체 배양액 부피의 10% (v/v) 되도록 첨가하여 초기 유당농도가 약 20 g/L가 되도록 하였다. 공급배지용액의 제조방법은 다음과 같다. 유청분말 (74% 유당, 11.5% 단백질 포함, 삼익사) 310 g과 0.36 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 증류수 1 L에 녹인 후 20 min간 멸균시켰다. 상온까지 식힌 후 멸균된 병에 넣고 원심분리시켜 단백질 침전물을 제거하였다. 상등액을 공급배지용액으로 사용하였다. 접종 전 ampicillin을 100 mg/L로 첨가하였다. Propionic acid 농도의 영향을 알아보기 위한 실험에서는 유청을 포함한 위의 배지에 0 - 80 mM이 되도록 propionic acid를 첨가하였다. Acetic acid induction의 경우는 유청과 propionic acid를 제외한 위의 배지에 acetic acid를 10 mM 되도록 첨가하여 배양을 시작한 후, 600 nm에서의 흡광도가 0.8이 되었을 때 유청과 propionic acid를 각각 유당농도 20 g/L, propionic acid 농도 20 mM이 되도록 첨가하였다. Oleic acid를 첨가하는 경우는 1 g/L 되도록 첨가하였다. 배양온도는 30°C, 초기 pH는 NaOH를 이용, 7.0으로 맞춘 후, 배양도중  $\text{NH}_4\text{OH}$ 를 이용 7.0으로 제어하였다. 유가식 배양의 기질 공급은 high limit를 이용한 pH-stat 방식을 이용하였다. 배양액의 유당이 모두 소모되어 pH가 7.1 이상 올라가면 유청과 propionic acid를 함께 공급하여 유당농도 20 g/L, propionic acid 농도 20 mM이 되도록 하였다.

### 분석

균체성장은 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 평가하였으며, 건조균체무게를 측정하여 균체농도를 구하였다. P(3HB-co-3HV) 농도는 기체 크로마토그래피법으로 결정하였다(13).

## 결과 및 고찰

PHA 생합성 유전자를 포함하는 제조합 대장균으로부터 P(3HB-co-3HV) 합성에 관해 Slater 등(14)은 짧은 사슬 ( $\text{C}_4 - \text{C}_6$ ) 지방산의 이용에 관련된 효소를 항속적으로 발현할 수 있는 *fadR atoC* 돌연변이주가 P(3HB-co-3HV) 합성에 필수적임을 제안하였다. 그 이유는 non-*fadR atoC* 균주의 경우 3HV 합성 기질인 propionic acid를 효율적으로 섭취, 이용할 수 없기 때문으로 보았다. 반면 Yim 등(15)은 대장균에서의 propionate 섭취 시스템은 valerate와 같은 짧은 사슬 지방산보다는 acetate 섭취 시스템과 비슷하며 acetate의 수송과 활성화화를 촉진하는 조건이 propionate 대사를 촉진한다고 보았다. 즉, acetate 유도 기작이 propionate에도 적용된다면 non-*fadR atoC* 균주로도 P(3HB-co-3HV)를 합성할 수 있음을 제안하였다. 또한 acetate나 oleate로 induction 시킴으로써 PHA 농도와 3HV 함량을 증가시킬 수 있음을 보였다. 이는 acetate나 oleate가 propionate의 섭취 및 분해에 필요한 효소들과 관련되기 때문으로 보았다.

**Table 1.** Effects of initial propionic acid concentration on specific growth rate and final cell concentration (after 3 days) of recombinant *E. coli* GCSC6576(pSYL107)

Initial propionic acid concentration (mM)	Specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ )	Cell concentration (g/L)
0	0.251	6.91
10	0.197	4.49
20	0.148	2.81
40	0.0771	1.79
80	0.0289	1.00

**Table 2.** Comparison of flask culture results (after 3 days) with recombinant *E. coli* strains and culture methods from whey (lactose 20 g/L) and propionic acid (20 mM)

Strain and culture method	Cell concentration (g/L)	PHA concentration (g/L)	PHA content (%)	3HV fraction (mol%)
GCSC6576(pSYL107) no acetic acid induction	3.18	2.21	69.4	trace amounts
GCSC6576(pSYL107) acetic acid induction (10 mM)	4.08	2.14	52.5	2.6
GCSC6576(pSYL107) acetic acid induction (10 mM) + oleic acid supplementation (1 g/L)	3.8	2.37	62.4	3.03
LS5218(pJC4) no acetic acid induction	3.7	1.37	37.1	7.18

본 연구에서는 저가의 기질인 유청으로부터 P(3HB-co-3HV)를 생산하기 위해 먼저 non-*fadR atoC* 균주인 제조합 대장균 GCSC6576(pSYL107)을 유청과 propionic acid를 포함하는 초기배지에서 플라스크 배양을 수행하였다. 배지 중 초기 propionic acid 농도가 증가할수록 비성장속도 및 최종균체농도가 감소하였다(Table 1). Propionic acid가 균체성장을 저해하여 균체 및 PHA 농도를 감소시킴은 몇가지 wild-type

균주들 (16)과 재조합 대장균 (15)에 대해서 관찰된 바 있다. Table 2에는 몇가지 배양방식에 따른 P(3HB-co-3HV) 합성 결과를 정리하였다. Acetic acid induction을 하지 않은 경우의 PHA 내 최종 3HV 함량은 미량에 머물렀으며, 69.4%의 PHA를 포함하는 균체농도 3.18 g/L를 얻었다. 10 mM의 acetic acid로 induction시킨 경우, 3HV 함량은 2.6 mol%, 균체농도는 4.08 g/L로 증가하였다. Acetic acid induction과 oleic acid 첨가를 함께 한 경우, 3HV 함량은 3.03 mol%로 acetic acid induction만 시킨 경우보다 더 증가하였다. *A. latus*의 PHA 생합성 유전자를 포함한 *fadR atoC* 돌연변이주 LS5218(pJC4)를 이용한 경우, acetic acid induction 없이도 7.18 mol%의 높은 3HV를 포함하는 공중합체와 3.7 g/L의 균체를 합성할 수 있었다.

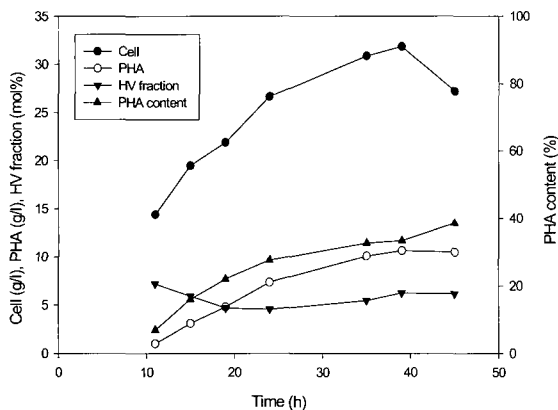


Figure 1. pH-stat fed-batch culture of recombinant *E. coli* LS5218(pJC4).

보다 높은 농도의 PHA를 얻기 위해 pH-stat 유가식 배양을 시도하였다. 재조합 대장균 GCSC6576(pSYL107)의 유가식 배양의 경우 균체농도는 61.9 g/L, PHA 함량은 66.1%까지 증가하였으나 (data not shown), acetic acid induction이나 oleic acid 첨가 등에도 불구하고 플라스크 배양과 마찬가지로 3HV 함량이 2~3 mol% 정도로 너무 낮아 P(3HB-co-3HV)의 생산에 적합하지 않았다. Choi와 Lee(17)는 non-*fadR atoC* 균주인 XL1-Blue(pJC4)를 이용하여 포도당과 propionic acid로부터 고농도의 P(3HB-co-3HV)를 생산하였다. 따라서 non-*fadR atoC* 균주로부터 P(3HB-co-3HV)를 합성할 경우 acetic acid induction이나 oleic acid 첨가 외에도 대장균 strain의 종류 및 탄소원의 차이 등이 P(3HB-co-3HV) 합성에 영향을 주는 것으로 생각된다. *fadR atoC* 돌연변이주인 재조합 대장균 LS5218(pJC4)의 pH-stat 유가식 배양 결과, 39시간에 균체농도 31.8 g/L와 3HV 함량 6.26 mol%를 포함하는 공중합체를 합성할 수 있었다(Fig. 1). PHA 함량은 33.4%로 재조합 대장균 GCSC6576(pSYL107)의 경우보다 낮았다. 균체농도 및 PHA 함량 등이 낮은 이유는 Yim 등(15)이 지적했듯이 재조합 대장균 LS5218의 고유 특성으로 보이며, 향후 유청과 propionic acid로부터 P(3HB-co-3HV) 합성 특성이 우수한 재조합 대장균의 개발이 요구된다. 이상과 같이 유청으로

부터 P(3HB-co-3HV) 생산을 위한 균주 및 배양조건의 영향에 대해 알아보았으며, 유청과 같은 폐기물을 기질로 사용함으로써 PHA의 높은 생산단가를 낮추는데 기여할 수 있을 것이다.

## 요약

*R. eutropha*의 PHA 생합성 유전자를 포함하는 플라스미드 pSYL107을 가진 재조합 대장균 GCSC6576과 *A. latus* PHA 생합성 유전자를 포함하는 플라스미드 pJC4를 가진 *fadR atoC* 돌연변이주 재조합 대장균 LS5218의 유청으로부터 P(3HB-co-3HV) 합성을 비교하였다. 재조합 대장균 GCSC6576(pSYL107)의 플라스크 배양에서 acetic acid induction과 oleic acid의 첨가는 3HV 함량을 증가시켰다. 재조합 대장균 LS5218의 pH-stat 유가식 배양결과, 39시간에 균체농도 31.8 g/L, P(3HB-co-3HV) 농도 10.6 g/L, P(3HB-co-3HV) 함량 33.4%, 3HV 함량 6.26 mol%를 얻을 수 있었다.

## 감사

본 연구는 과학기술부 및 한국과학재단 목적기초연구(R05-2001-000-01196-0) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Lee, S. Y. (1996), Bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 1-14.
- Choi, J. and S. Y. Lee (1997), Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation, *Bioprocess Eng.* **17**, 335-342.
- Kim, B. S. and H. N. Chang (1998), Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*, *Biotechnol. Lett.* **20**, 109-112.
- Kim, B. S. (2000), Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates, *Enz. Microb. Technol.* **27**, 774-777.
- Kim, B. S., B. K. O'Neill, and S. Y. Lee (2000), Increased poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in recombinant *Escherichia coli* from whey by agitation speed control, *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 628-631.
- Lee, S. Y., A. P. J. Middelberg, and Y. K. Lee (1997), Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.* **19**, 1033-1035.
- Wong, H. H. and S. Y. Lee (1998), Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey by high density cultivation of recombinant *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 30-33.
- Ahn, W. S., S. J. Park, and S. Y. Lee (2000), Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3624-3627.
- Ahn, W. S., S. J. Park, and S. Y. Lee (2001), Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.* **23**, 235-240.
- Lee, S. Y. (1994), Suppression of filamentation in recombinant

- Escherichia coli* by amplified FtsZ activity, *Biotechnol. Lett.* **16**, 1247-1252.
11. Choi, J., S. Y. Lee, and K. Han (1998), Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4897-4903.
  12. Kim, B. S., S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, and S. I. Woo (1994), Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control, *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 892-898.
  13. Braunegg, G. B., B. Sonnleitner, and R. M. Lafferty (1978), A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 29-37.
  14. Slater, S. C., T. Gallaher, and D. E. Dennis (1992), Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *E. coli* strain, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1089-1094.
  15. Yim, K. S., S. Y. Lee, and H. N. Chang (1996), Synthesis of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 495-503.
  16. Ramsay, B. A., K. Lomaliza, C. Chavarie, B. Dube, P. Bataille, and J. A. Ramsay (1990), Production of poly-( $\beta$ -hydroxybutyric-co- $\beta$ -hydroxyvaleric) acids, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2093-2098.
  17. Choi, J. and S. Y. Lee (1999), High level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4363-4368.