

Inducible System을 이용한 재조합 대장균으로부터 광학적으로 순수한 (R)-3-Hydroxybutyric acid 생산

¹이 영 · ²최 종 일 · † ^{2,3}이 상 업

¹ChiroBio Inc., ²한국과학기술원 생명화학공학과 및 생물공정연구센터, ³한국과학기술원 바이오시스템학과
(접수 : 2004. 2. 14., 게재승인 : 2004. 8. 26.)

Production of Enantiomerically Pure (R)-3-Hydroxybutyric acid by Metabolically Engineered *Escherichia coli* with Inducible System

Young Lee¹, Jong-Il Choi², and Sang Yup Lee^{2,3†}

¹ChiroBio Inc., #6103, KAIST Alumni Venture Hall, 400 Guseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-338, Korea

²Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory, Department of Chemical & Biomolecular Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology

³Department of BioSystems and Bioinformatics Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejeon 305-701, Korea

(Received : 2004. 2. 14., Accepted : 2004. 8. 26.)

An inducible expression system of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] (PHB) depolymerization was established in metabolically engineered *Escherichia coli* with the PHB biosynthesis genes. The *Ralstonia eutropha* PHB depolymerase gene was cloned in a vector system containing the PHB biosynthesis genes and expressed under inducible promoter. Recombinant *E. coli* harboring the PHB biosynthesis genes and depolymerase gene was first cultured for the accumulation of PHB, and then the depolymerase was expressed resulting in the degradation of accumulated PHB into (R)-3-hydroxybutyric acid (R3HB). R3HB could be produced with the concentration of 7.6 g/L in flask culture. Two different PHB biosynthesis genes from *Alcaligenes latus* and *R. eutropha* were compared for the production of R3HB. This strategy can be used for the production of enantiomerically pure (R)-hydroxycarboxylic acids with high concentration.

Key Words : (R)-3-hydroxybutyric acid, inducible depolymerization, recombinant *E. coli*, PHB

서 론

Polyhydroxyalkanoate (PHA)는 많은 미생물에 의하여 세포내에 합성되어지고 축적되는 생분해성 polyester 구조의 물질이다(1-3). 현재까지 약 150 종류 이상의 3-, 4-, 5- 또는 6- 위치에서 수산기를 갖는 carboxylic acid들이 단량체로 알려져 있다

(4). 이러한 PHAs의 단량체들은 PHA 생합성 효소의 입체 특이성에 기인하여 수산기를 갖는 위치가 chiral 중심일 경우에는 모두 (R)-configuration을 갖고 중합된다. 이러한 이유에서 광학적으로 순수한 (R)-hydroxycarboxylic acids (RHAs)를 생물 고분자 PHAs를 분해시켜 얻으려는 연구가 시도되었다(5).

RHAs는 한 분자 내에 두 개의 기능기들을 갖고 있기 때문에 향생제, vitamins, perfumes, pheromones 등의 정밀화학 제품과 같은 chiral 화합물의 합성에 응용되고 있다(1, 6-8). 특히 (R)-3-hydroxybutyric acid (R3HB)는 carbapenem 항생제의 원료가 되는 4-acetoxycarboxylic acid의 주요한 전구체 물질로서 10억 불에 이르는 시장성을 가지고 있다. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] (PHB)는 가장 널리 알려져 있는 PHA로서 R3HB 단량체로만 이루어져있다(1). 때문에, PHB를 화학적으로 분해하여 R3HB를 생산하려는 연구들이 보고가 되어있다(5, 9). 하지만, 이러한 방법들은 모두 다량의 유기 용매를 사용하고, 복잡한 공정으로 낮은 생산 수율을 갖고 있다.

† Corresponding Author : Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory, Department of Chemical & Biomolecular Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Department of BioSystems and Bioinformatics Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejeon 305-701, South Korea

Tel : +82-42-869-3930, Fax : +82-42-869-3910

E-mail : leesy@kaist.ac.kr

PHB는 미생물 내에서 영양분 제한 조건에서 에너지 및 탄소원 저장 물질로서 축적되기 때문에, PHB를 분해하여 다시 대사물질로 사용할 수 있는 depolymerization system이 존재한다(10). 이러한 미생물 내의 depolymerization system을 이용하여 고농도로 PHB를 생산하는 wild-type 균주로부터 R3HB를 생산하는 연구 결과가 발표되었다(11). 또한 최근에는 PHB 생합성 유전자와 depolymerase 유전자를 동시에 이용하여 RHAs를 발효에 의하여 생산할 수 있는 재조합 대장균이 개발되었다(12). 개발된 재조합 대장균은 *Ralstonia eutropha*에서 유래한 PHA 생합성 유전자들, β -ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase, PHA synthase과 *R. eutropha*에서 유래한 depolymerase 유전자를 자체 constitutive promoter를 이용하여 발현시킴으로써 세포 내에 PHB를 축적시키지 않고 바로 배지내로 R3HB를 분비하여 생산하였다(12). 하지만, 이렇게 제작된 재조합 대장균은 균체의 성장과 함께 R3HB를 분비하기 때문에 고농도로 R3HB를 얻기 어려운 문제점을 가지고 있다.

따라서 본 논문에서는 PHB depolymerase 유전자를 inducible promoter를 이용하여 발현시켜 고농도로 PHB를 축적한 이후에 R3HB를 분비할 수 있는 재조합 대장균을 개발하는 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmids

본 연구에서 사용된 균주와 plasmids들은 Table 1에 표시하였다. 유전자 조작을 위한 재조합 대장균의 배양은 Luria-Bertani 배지 (LB, 10 g of Bacto-tryptone, 5 g of Bacto-yeast extract, 10 g of NaCl per liter)를 사용하였다. *R. eutropha*에서 유래한 PHB depolymerase의 coding region (*phaZ_{re}*)을 증폭하기 위하여 Table 1의 fs와 bs primers를 사용하였다. 유전자 조작의 일반적인 방법은 이전의 문헌을 참조하였다(15). Polymerase chain reaction (PCR)은 ExpandTM High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하여 PCR Thermal Cycler MP (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)로 수행하였다. DNA sequencing은 Bigdye terminator cycle sequencing kit (Perkin-Elmer Co., Boston, MA, USA)과 Taq polymerase를 사용하여 ABI PrismTM 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer Co.)로 분석하였다.

배양 조건

재조합 대장균으로부터 R3HB를 생산하기 위하여 단순 배지를 사용하였다. 배지의 조성은 다음과 같다(12). 13.5 g KH₂PO₄, 4 g (NH₄)₂HPO₄, 1.4 g MgSO₄·7H₂O, 1.7 g citric acid, 그리고 5 mL trace metal solution을 배지 1 L에 녹였으며 배지의 pH는 6.9로 조절하였다. 사용된 trace metal solution의 조성은 5 M HCl 1 L에 10 g FeSO₄·7H₂O, 2 g CaCl₂, 2.2 g ZnSO₄·7H₂O, 0.5 g MnSO₄·4H₂O, 1 g CuSO₄·5H₂O, 0.1 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 그리고 0.02 g Na₂B₄O₇·10H₂O로 이루어졌다. 탄소원으로는 20 g/L의 glucose를 사용하였으며, 첨가된 thiamine의 농도는 20 mg/L였다. 필요할 경우 항생제를 사용하였으며, 항생제의 농도는 100 µg/mL ampicillin, 50 µg/mL

chloramphenicol이었다. 대장균은 37°C, 250 rpm에서 250 mL Erlenmeyer flask에 100 mL의 배지에서 배양하였다. 배양 48시간 이후에 배지 내에 1 mM의 isopropyl-thiogalactoside (IPTG)가 되게 첨가하여 depolymerase를 발현시켰다.

Table 1. Strains, plasmids and PCR primers

Strain, plasmid or primer	Relevant features	Source or reference
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac</i> F'[<i>proAB⁺ lacI^f lacZΔM15</i> Tn10(<i>tet^r</i>)]	Stratagene ^a
Plasmids		
pTrc99a	Cloning vector; Ap ^r	Pharmacia ^b
pJC4	Expression vector containing <i>A. latus phaC_{Al}</i> , 13 <i>phaA_{Al}</i> and <i>phaB_{Al}</i> ; <i>hok/sok</i> locus; Ap ^r	
pSYL105	Expression vector containing <i>R. eutropha phaC_{re}</i> , <i>phaA_{re}</i> and <i>phaB_{re}</i> ; <i>hok/sok</i> locus; Ap ^r	14
pTrc99aRed	pTrc99a containing <i>phaZ_{re}</i>	This study
pJC4Red_trc	pJC4 containing <i>phaZ_{re}</i> expressed by <i>trc</i>	This study promoter
pSYL105Red_trc	pSYL105 containing <i>phaZ_{re}</i> expressed by <i>trc</i>	This study promoter
Primers		
fp2	GCAAGCTTCGACTGCACGGTGCACC	
fs	GCTACGTAGGTCTCGCATGCTCTACCAATTGCATG	
bs	CGGGATCCAAGCTTACCTGGTGGCCGAGGC	

^aStratagene Cloning Systems, La Jolla, CA.

^bAmersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.

분석 조건

균체 농도와 PHB 농도는 이전에 보고된 문헌에 사용된 방법을 사용하였다(12). PHB 함량은 균체 농도에 대한 PHB 농도의 백분율로 표시하였다. R3HB의 농도는 high-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 결정하였다(12). PHB가 세포내 depolymerase에 의해서 분해가 될 때 대부분이 dimer나 oligomer 형태로 R3HB monomer와 함께 배지내로 분비된다. R3HB dimer와 같은 oligomer는 alkaline 조건에서의 온화한 열처리로 R3HB monomer 형태로 수화되어진다(12).

결과 및 고찰

Plasmids pJC4Red_trc 및 pSYL105Red_trc 제작

Plasmid pTrc99aRed는 *R. eutropha*의 chromosomal DNA를 template로 그리고 fs와 bs를 primers로 사용하여 PCR에 의하여 얻어진 DNA 단편을 *BsaI-HindIII*로 절단하고, 같은 제한 효소들로 절단된 pTrc99a를 ligation하여 제작하였다(Fig. 1). Trc promoter와 연결된 *phaZ_{re}*는 pTrc99aRed를 template로 사용하여 fp2와 bs primers를 이용하여 증폭하였다. Plasmids pJC4Red_trc와 pSYL105Red_trc는 각각 pJC4와 pSYL105를 *HindIII*로 절단하고 pTrc99aRed로부터 증폭된 DNA 단편 (*phaZ_{re}*)을 마찬가지로 *HindIII*로 절단한 후 ligation하여 제작되었다(Fig. 1).

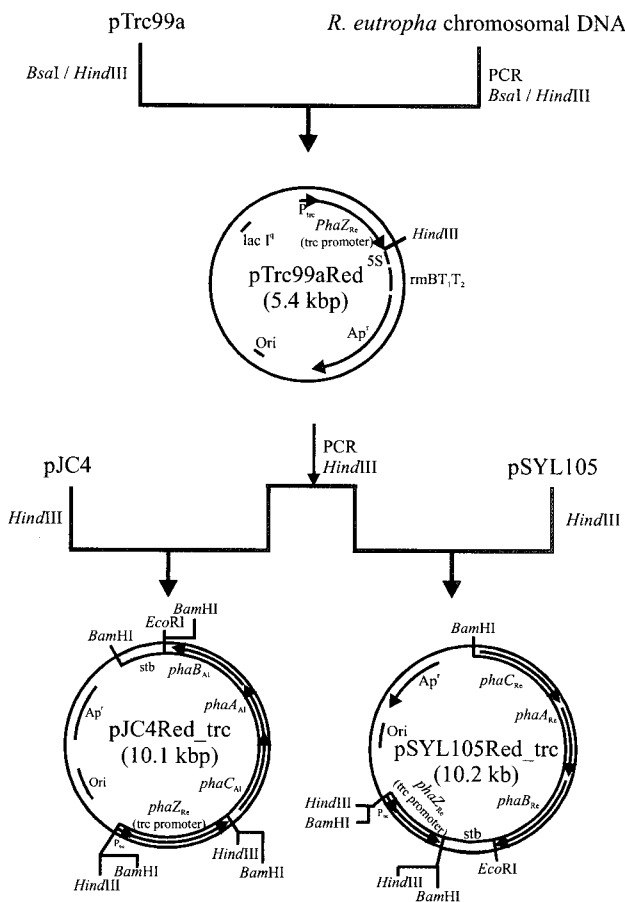


Figure 1. Construction of plasmids pJC4Red_trc and pSYL105Red_trc.

Inducible system을 이용한 R3HB의 생산

Inducible system을 이용하여 R3HB의 생산 가능성을 확인하기 위하여, 제작된 *A. latus*에서 유래한 PHB 생합성 유전자, PHB synthase (*phaC_{Al}*), β-ketothiolase (*phaA_{Al}*), acetoacetyl-CoA reductase (*phaB_{Al}*),와 *R. eutropha*에서 유래한 PHB depolymerase (*phaZ_{Re}*)를 갖는 재조합 대장균 XL1-Blue (pJC4Red_trc)를 flask에서 배양하였다. 재조합 대장균들은 먼저 PHB를 축적시키기 위하여 단순배지에서 glucose를 탄소원으로 사용하여 37°C에서 배양하였다. *A. latus*의 PHB 생합

성 유전자는 자체 constitutive promoter에 의하여 발현이 되었으며(13), 시간에 따라 축적된 PHB의 양은 증가하였다. 단순 배지에서 48시간 배양 이후 XL1-Blue (pJC4Red_trc)의 PHB 농도와 PHB 함량은 각각 3.26 g/L과 68%를 가졌다. 48 시간 배양 이후 IPTG를 배지 내에 1 mM의 농도가 되도록 첨가함으로써 depolymerase를 발현시켰다. Induction 이후의 배양 시간에 따른 세포 농도, PHB 농도, R3HB 농도는 Table 2에서 보여진다. Depolymerase에 의하여 분해된 PHB는 R3HB의 monomer 형태로 뿐만 아니라 dimer나 oligomer의 형태로 분비되어 나온다. 이러한 oligomer는 온화한 열처리로 monomer 형태의 R3HB로 수화한 후 농도를 계산하였다(12). XL1-Blue (pJC4Red_trc)의 배양에서 IPTG induction 이후 2 시간에 배지로 분비된 R3HB의 농도는 1.5 g/L였지만, 열처리 이후 R3HB의 농도는 4.6 g/L가 배지 내에 분비되었다. 이 때, 대장균 내의 PHB 농도는 0.21 g/L로 감소하였다. 배양이 진행되어 induction 이후 6시간에서 배지내의 R3HB의 농도는 1.3 g/L, 열처리 후 배지내 R3HB 농도는 7.6 g/L로 증가하였다. 이 때 재조합 대장균 내의 PHB 농도는 0.09 g/L로 감소하였다. Induction 이후 6시간에 분해된 PHB의 수율은 20 g/L의 glucose에 대해서 38%로 계산되었다.

자체의 constitutive promoter를 갖고 있는 *R. eutropha*에서 유래한 PHB synthesis genes(14), PHB synthase (*phaC_{Re}*), β-ketothiolase (*phaA_{Re}*), acetoacetyl-CoA reductase (*phaB_{Re}*),와 depolymerase gene (*phaZ_{Re}*)을 갖는 XL1-Blue (pSYL105Red_trc)는 48시간 배양 이후 2.06 g/L의 PHB 농도와 62%의 PHB 함량을 가졌다. IPTG induction 이후 2시간에 PHB 농도는 0.16 g/L로 감소하였으며, R3HB의 농도와 열처리 후 R3HB의 농도는 각각 2.0 g/L와 4.9 g/L였다. 6시간 경과 후에는 1.2 g/L의 monomer R3HB와 열처리 후 7.0 g/L의 R3HB 농도를 가졌다. Glucose에 대한 수율은 35%로 계산되었다.

Table 2의 결과로부터, *A. latus*에서 유래한 PHB 생합성 유전자를 갖는 재조합 대장균을 이용할 경우가 *R. eutropha*에서 유래한 PHB 생합성 유전자를 갖는 경우보다 더 높은 PHB 함량과 분해된 R3HB 농도와 수율을 나타내었다. 또한 induction 이후에 R3HB의 농도는 시간에 따라 증가하였으며, 이러한 결과로부터 제작된 재조합 대장균은 induction 이후에도 계속해서 PHB를 합성하며, 합성되어진 PHB는 균체 내에 축적되지 않고 바로 분해되어 배지로 분비된다는 사실을

Table 2. Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by recombinant *E. coli* harboring plasmids containing PHB biosynthesis genes from *Alcaligenes latus* or *Ralstonia eutropha* and the *R. eutropha* intracellular PHB depolymerase expressed by using *trc* promoter in a defined medium^a

Plasmid	Time after induction (h)	Cell concentration (g/L)	Residual cell concentration (g/L)	Concentration (g)			Yield (%)
				PHB	R3HB	R3HB Heat treated	
pJC4Red_trc	0	4.8(±0.8)	1.54	3.26(±0.5)	0	0	0
	2	1.6(±0.4)	1.39	0.21(±0.05)	1.5(±0.2)	4.6(±0.4)	23
	4	1.5(±0.3)	1.35	0.15(±0.08)	1.9(±0.3)	4.9(±0.3)	25
	6	1.5(±0.3)	1.41	0.09(±0.03)	1.3(±0.2)	7.6(±0.2)	38
pSYL105Red_trc	0	3.3(±0.9)	1.24	2.06(±0.8)	0	0	0
	2	1.8(±0.3)	1.84	0.16(±0.04)	2.0(±0.3)	4.9(±0.3)	25
	4	1.8(±0.2)	1.66	0.14(±0.03)	1.7(±0.2)	5.1(±0.4)	26
	6	1.7(±0.3)	1.62	0.08(±0.03)	1.2(±0.3)	7.0(±0.2)	35

^aCultures were carried out in triplicate.

알 수 있었다. 또한 세포 농도에서 PHB 농도를 뺀 잔여 세포 농도 (residual cell concentration)는 induction 이후에 거의 일정한 값을 가지고 있으며, 이것은 세포가 더 이상 성장하지 않고 PHB를 합성하고 바로 분해한다는 사실을 뒷받침해 준다.

이러한 flask 배양의 결과는 세포 내에서 PHB가 고분자 형태로 얻어질 수 있는 농도 (3-8 g/L)만큼 R3HB가 배지 내로 분비된다는 사실을 보여준다. 따라서 고농도의 PHB를 얻을 수 있는 유가식 배양에 본 연구에서 제작된 inducible system을 이용한 재조합 대장균을 사용한다면 고농도의 R3HB를 생산할 수 있을 것이다. 또한, 지금까지의 재조합 대장균을 이용한 PHA의 생산 연구로부터 다양한 단량체 RHAs로 이루어진 PHA들이 재조합 대장균으로부터 생산되어지고 있다. 따라서 PHB depolymerase와는 다른 PHA 기질 특이성을 갖는 depolymerase genes이 PHA 생산 재조합 대장균에 cloning 되어진다면, 다양한 RHAs가 재조합 대장균의 발효에 의하여 경제적으로 생산되어질 것이다.

요 약

Inducible system을 이용하여 (R)-hydroxybutyric acid (R3HB)를 생산하는 재조합 대장균을 개발하였다. *Ralstonia eutropha*에서 유래한 PHB depolymerase 유전자를 inducible promoter에 의하여 발현되게 만들고, PHB 생합성 유전자가 있는 vector에 cloning하였다. PHB 생합성 유전자와 depolymerase 유전자를 가지고 있는 재조합 대장균을 배양하여 먼저 PHB를 축적시킨 후에 depolymerase를 발현시켜 배지 내로 분비된 R3HB를 확인하였다. 그 결과 축적된 PHB의 대부분은 발현된 depolymerase에 의하여 분해되었으며, depolymerase의 발현 이후에도 재조합 대장균은 PHB를 축적하고 분해하여 R3HB의 농도는 배양시간에 따라 증가하였다. 이러한 결과는 inducible depolymerase를 갖는 재조합 대장균을 이용하여 높은 농도의 R3HB를 얻을 수 있다는 것을 보여준다.

감 사

이 연구는 과학기술부 국가지정연구소 (National Research Laboratory) 사업과 한국과학재단 초미세화학공정연구센터 및 BK21 program의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Lee, S. Y. (1996), Bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 1-14.
- Madison, L. L., and G. W. Huisman (1999), Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 21-53.
- Steinbüchel, A. and B. Fuchtenbusch (1998), Bacterial and other biological systems for polyester production, *Trends Biotechnol.* **16**, 419-427.
- Steinbüchel, A. and H. E. Valentin (1995), Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids, *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 219-228.
- Seebach, D., A. K. Beck, R. Breitschuh, and K. Job (1992), Direct degradation of the biopolymer poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] to (R)-3-hydroxybutanoic acid and its methyl ester, *Org. Synth.* **71**, 39-47.
- Chiba, T. and T. Nakai (1985), A synthetic approach to (+)-thienamycin from methylene (R)-3-hydroxybutanoate, *Chem. Lett.* **1985**, 651-654.
- Schnurrenberger, P., E. Hungerbühler, and D. Seebach (1987), Total synthesis of (+)-colletodiol from (S,S)-tartarate and (R)-3-hydroxybutanoate, *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 733-744.
- Miltenberger, K. and H. Aktiengesellschaft (1985-1996), Hydroxycarboxylic acid, aliphatic, In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, H.-J. Arpe, E. Biekert, H. T. Davis, W. Gerharz, H. Gerrens, W. Keim, J. L. McGuire, A. Mitsutani, H. Pilat, Sir C. Reece, D. P. Sheetz, H. E. Simmons, E. Weise, R. Wirtz, and H.-R. Wüthrich, Eds., 5th ed. p. 507-517, Wiley-VCH, Weinheim, Berlin, Germany.
- Lee, Y., S. H. Park, I. T. Lim, K. Han, and S. Y. Lee (2000), Preparation of alkyl (R)-(-)-3-hydroxybutyrate by acidic alcoholysis of poly-(R)-(-)-3-hydroxybutyrate, *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 33-36.
- Saegusa, H., M. Shiraki, C. Kanai, and T. Saito (2001), Cloning of an intracellular poly[d(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product, *J. Bacteriol.* **183**, 94-100.
- Lee, S. Y., Y. Lee, and F. Wang (1999), Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals, *Biotechnol. Bioeng.* **65**, 363-368.
- Lee, S. Y. and Y. Lee (2003), Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of enantiomerically pure (R)-(-)-hydroxycarboxylic acids, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3421-3426.
- 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.
- Lee, S. Y., K. M. Lee, H. N. Chang, and A. Steinbüchel (1994), Comparison of recombinant *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly-(3-hydroxybutyric acid), and morphological changes, *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 1337-1347.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), Molecular cloning, *A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.