

재조합 대장균에서 수크로스로부터의 젖산을 모노머로 함유한 폴리하이드록시알칸산 생산 연구

오영훈¹, 강경희¹, 신지훈¹, 송봉근¹, 이승환², 이상엽^{3*}, 박시재^{4*}

Biosynthesis of Lactate-containing Polyhydroxyalkanoates in Recombinant *Escherichia coli* from Sucrose

Young Hoon Oh¹, Kyoung-Hee Kang¹, Jihoon Shin¹, Bong Keun Song¹, Seung Hwan Lee², Sang Yup Lee^{3*}, and Si Jae Park^{4*}

Received: 5 December 2014 / Accepted: 26 December 2014

© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Biosynthesis of lactate-containing polyhydroxyalkanoates (PHAs) was examined in recombinant *Escherichia coli* W strain from sucrose. The *Pseudomonas* sp. MBEL 6-19 *phaC1437* gene and the *Clostridium propionicum* *pct540* gene, which encode engineered *Pseudomonas* sp. MBEL 6-19 PHA synthase 1 (PhaC1_{P₅₆₋₁₉}) and engineered *C. propionicum* propionyl-CoA transferase (Pct_{C_p}), respectively, were expressed in *E. coli* W to construct key metabolic pathway to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate) [P(3HB-co-LA)].

The recombinant *E. coli* W expressing the *phaC1437* gene and the *pct540* gene could synthesize P(3HB-co-13mol%LA) up to the polymer content of 31.3 wt% when it was cultured in chemically defined MR medium containing 20 g/L of sucrose and 2 g/L of sodium 3-hydroxybutyrate. When *Ralstonia eutropha* *phaAB* genes were additionally expressed to provide 3-hydroxybutyrate-CoA (3HB-CoA) from sucrose, P(3HB-co-16mol%LA) could be synthesized from sucrose as a sole carbon source without supplement of sodium 3-hydroxybutyrate in culture medium, but the PHA content was decreased to 12.2 wt%. The molecular weight of P(3HB-co-16 mol%LA) synthesized in *E. coli* W using sucrose as carbon source were 1.53×10^4 (M_n) and 2.78×10^4 (M_w), respectively, which are not different from those that have previously been reported by other recombinant *E. coli* strains. Engineered *E. coli* strains developed in this study should be useful for the production of lactate-containing PHAs from sucrose, one of the most abundant and least expensive carbon sources.

¹한국화학연구원 바이오화학연구센터

¹Industrial Biochemicals Research Group, Research Center for Bio-based Chemistry, Division of Convergence Chemistry, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-600, Korea

²전남대학교 생물공학과

²Department of Biotechnology and Bioengineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

³한국과학기술원 생명화학공학과

³Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory, Department of Chemical and Biomolecular Engineering (BK21 Plus Program), Center for Systems and Synthetic Biotechnology, and Institute for the BioCentury, KAIST, Daejeon 305-701, Korea
Tel: +82-42-350-3930, Fax: +82-42-350-8800
e-mail: leesy@kaist.ac.kr

⁴명지대학교 환경에너지공학과

⁴Department of Environmental Engineering and Energy, Myongji University, Yongin 449-728, Korea
Tel: +82-31-324-1337, Fax: +82-31-336-6336
e-mail: parksj93@mju.ac.kr

Keywords: *Escherichia coli*, Sucrose, Polyhydroxyalkanoate (PHA), Lactate-containing PHA

1. INTRODUCTION

석유자원의 고갈과 사용으로 인한 환경오염문제로 인해, 기존의 석유화학 기반 공정에서 생산하던 다양한 종류의 케미

칼, 연료, 고분자 물질들을 미생물 발효공정에 기반을 둔 바이오화학 공정으로 대체하여 생산하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 또한, 바이오화학 공정을 개발함에 있어, 제품의 생산 단가가 그 제품의 경쟁력을 결정하는 가장 중요한 요소 중의 하나이기 때문에, 기질을 제공하는 단계에서 시작하여, 발효 공정, 분리·정제공정을 거쳐 최종적으로 제품을 만들어내는 전 단계의 공정을 종합적으로 고려하여 합리적인 가격경쟁력을 지닌 바이오화학 제품을 생산하기 위해 많은 연구가 이뤄지고 있다.

미생물 발효공정에서는 미생물의 기질로 쓰이는 원료인 탄소원 가격이 전체 공정비용 중에 가장 큰 비중을 차지하는데, 따라서 합리적인 가격의 바이오화학 제품을 생산하기 위해서는 값싼 탄소원을 기질로 효율적으로 활용할 수 있는 미생물 호스트 균주를 개발하는 것이 중요하다. 이를 위해 일반적으로 두 가지 접근방법이 사용되는데, 첫째는 목적하는 케미칼을 생산할 수 있는 균주를 선정하여 값싼 기질을 효율적으로 활용할 수 있도록 개량하는 것이고, 둘째는 값싼 기질을 활용할 수 있는 균주를 선정하여 목적하는 케미칼을 효율적으로 생산하도록 개량하는 것이다.

한편, 바이오화학 공정을 통해 생산되는 바이오폴리머 중, 폴리하이드록시알칸산 (polyhydroxyalkanoates, PHA), 폴리락틱산 (polylactic acid, PLA), 폴리부틸렌숙신산 (polybutylene succinate, PBS)이 바이오폴리머를 포함한 전체의 바이오화학 산업 제품 시장에서 매우 큰 비중을 차지하고 있다. PLA와 PBS의 경우, 발효공정을 통해 생산한 모노머를 화학공정을 통해 고분자로 합성하여 생산하는 반면, PHA는 모노머의 합성부터 PHA의 생산까지 전 과정이 미생물 내에 존재하는 대사회로에 의해 이뤄지는 천연 폴리에스테르이다. PHA는 PHA 생산능이 있는 미생물이 과량의 탄소원이 있지만 생장에 적합하지 않은 환경에 놓였을 때 생산하는 에너지 및 환원력을 저장하기 위해 미생물 내에 축적하는 저장물질이며, 100% 생분해성특성을 지닌 천연폴리에스테르이다. 현재까지 150종 이상의 다양한 작용기를 갖는 하이드록시카르복실산이 PHA의 모노머로서 규명되었고, 따라서 이러한 모노머들의 조합을 통해 다양한 물성을 갖는 PHA를 합성하는 것이 가능해졌다 [1-3]. 3-하이드록시부티레이트 (3-hydroxybutyrate, 3HB), 3-하이드록시헥사노에이트 (3-hydroxyhexanoate, 3HHx), 3-하이드록시옥타노에이트 (3-hydroxyoctanoate, 3HO), 3-하이드록시데카노에이트 (3-hydroxydecanoate, 3HD), 3-하이드록시도데카노에이트 (3-hydroxydodecanoate, 3HDD) 등의 3-하이드록시카르복실산 (3-hydroxycarboxyate)이 PHA의 합성에 있어 가장 많이 연구되고 있는 모노머이며, 이 중에서도 3HB의 호모폴리머인 폴리-3-하이드록시부티레이트 [P(3HB)]는 PHA의 합성과 분해, 생산, 그리고 물성의 개량에 있어 가장 많이 연구된 PHA라고 할 수 있다 [1-3]. 최근에는 일반적으로 PHA의 모노머로 쓰이던 3-하이드록시카르복실산과 4,5,6-하이드록시카르복실산 이외에 2-하이드록시부티레이트 (2-hydroxybutyrate, 2HB), 락테이트 (lactate, LA)와 같은 2-하이드록시카르복실산을 모노머로 포함하는

PHA를 생산하는 연구도 수행되고 있는데, 이로 인해 PLA와 PLA 공중합체를 락테이트를 분리정제한 후 락타이드를 중합하고 분리정제하는 화학공정과 락타이드를 ring opening polymerization (ROP)를 통해 PLA를 중합하는 공정없이 글루코스를 비롯한 재생가능한 탄소원으로부터 미생물 내에서 직접합성하는 것이 가능해졌다 [4-11]. 또한 이러한 기술 개발을 통해 보다 다양한 종류의 조성과 물성을 갖는 PHA공중합체의 합성이 가능해졌다.

한편, 현재 PHA의 상용화 공정을 개발하는데 있어 가장 큰 장애물이 높은 생산단가인데, 앞에서 언급했듯이 탄소원의 가격이 생산단가를 결정하는 가장 큰 요인 중의 하나이다. 따라서 풍부하고 값싼 탄소원을 기질로 사용하는 PHA 생산 공정을 개발하는 것이 매우 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 사탕수수나 사탕무에서 추출되는 가장 풍부하고 값싼 탄소원 중의 하나인 수크로스를 기질로 활용할 수 있는 *Escherichia coli* W 균주를 사용하여 락테이트를 포함하는 PHA인 poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate) [P(3HB-co-LA)]를 생산할 수 있는 재조합 대장균 균주를 개발하고, 그 균주의 P(3HB-co-LA)의 생산능을 확인하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 균주와 플라스미드를 Table 1에 정리하였다. 플라스미드 제작을 위하여 대장균 XL1-Blue를 호스트 균주로 이용하였다. 수크로스로부터 P(3HB-co-LA)를 생산하기 위하여 대장균 W를 호스트 균주로 사용하였다. 플라스미드 p619C1437-pct540는 E130D, S325T, S477G, Q481K의 총 4개의 아미노산의 변이가 가해진 *Pseudomonas* sp. 6-19 PHA synthase 유전자 *phaC1437*와 V193A의 아미노산 변이와 T78C, T669C, A1125G, T1158C의 총 4개의 침묵염기변이 (silent nucleotide mutation)가 가해진 *Clostridium propionicum* propionyl-CoA transferase 유전자 *pct540*을 *Ralstonia eutropha* PHA biosynthesis operon promoter로 발현하는 벡터이다 [9]. 플라스미드 pCnCAB는 *R. eutropha* PHA 합성유전자 오페론을 발현하는 벡터이다 [9]. 플라스미드 pKM212-MCS는 *tac* promoter를 함유하는 broad-host-range vector이다 [7]. 플라스미드 pKM212-ReAB는 *SbfI*과 *HindIII*로 pCnCAB를 절단하여 수득한 *R. eutropha* *phaAB* 유전자를 *SbfI*와 *HindIII*로 절단한 pKM212-MCS에 삽입하여 제작하였다.

2.2. 배양조건

대장균 XL1-Blue는 Luria-Bertani (LB) medium (리터당: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl 함유)에서 37°C로 배양하였다. P(3HB-co-LA)의 생산을 위하여, p619C1437-pct540를 함유한 재조합 대장균 W를 100 mL의 MR medium을 함유하고 있는 250 mL 플라스크에서 96시간 동안 배양하였다. 이때, 2 g/L의 sodium 3-hydroxybutyrate (3HB sodium salt, Acros or-

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or Plasmids	Relevant Characteristics	Reference or Source
Strains		
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, suppE44, relA1, t, lac^c, F'[proAB lac^f lacZΔM15, Tn10 (tet)^r]</i>	Stratagene ^a
<i>E. coli</i> W	<i>F mcrA mcrB IN(rrnD'rrnE)1λ</i>	KCTC ^b
Plasmids		
pCnCAB	<i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes; Ap ^r	9
pKM212-MCS	Expression vector; <i>tac</i> promoter, <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator; Km ^r	7
pKM212-ReAB	pKM212-MCS derivative; <i>tac</i> promoter, <i>R. eutropha phaAB</i> genes, <i>R. eutropha</i> PHA biosynthesis genes transcription terminator; Km ^r	This study

^aStratagene Cloning System, La Jolla, CA, USA

^bKorean Collection for Type Cultures, Daejeon, Republic of Korea

ganics, Geel, Belgium)를 3-hydroxybutyryl-CoA (3HB-CoA)의 기질로 제공하기 위해 MR medium에 첨가하였다. 탄소원으로는 20 g/L의 수크로스를 사용하였다. 또한 p619C1437-pct540와 pKM212-ReAB를 동시에 함유한 재조합 대장균 W를 100 mL의 MR medium을 함유하고 있는 250 mL 플라스크에서 30°C에서 96시간 동안 배양하였다. 이때에는, 3HB sodium salt의 첨가없이, 탄소원으로 20 g/L의 수크로스만 사용하였다.

MR medium (pH 7.0)은 다음의 조성으로 구성된다. 6.67 g/L KH₂PO₄, 4 g/L (NH₄)₂HPO₄, 0.8 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.8 g/L citric acid, 5 ml/L trace metal solution. 그리고 trace metal solution은 0.5 M HCl 용액에서 다음의 조성으로 구성된다. 10 g/L FeSO₄·7H₂O, 2 g/L CaCl₂, 2.2 g/L ZnSO₄·7H₂O, 0.5 g/L MnSO₄·4H₂O, 1 g/L CuSO₄·5H₂O, 0.1 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.02 g/L Na₂B₄O₇·10H₂O. 수크로스, MgSO₄·7H₂O, 3HB sodium salt는 개별적으로 멸균하였다. 플라스크 배양은 진탕배양기에서 250 rpm과 30°C에서 수행하였다. 결과는 세 번 반복하여 평균값을 구하였다. Ampicillin (Ap, 50 µg/mL)과 kanamycin (Km, 30 µg/mL)을 균주의 플라스미드의 안정성을 위하여 antibiotic marker에 따라서 첨가하였다.

2.3. 분석조건

PHA의 농도와 PHA 모노머의 조성을 fused silica capillary column (Supelco SPBTM-5, 30 m × 0.32 mm ID 0.25 mm film, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 gas chromatography (6890N GC System, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)로 benzoic acid methyl ester를 internal standard로 사용하여 분석하였다 [12]. 건조균체중량 (dry cell weight per liter of culture broth)은 기준에 보고된 방법으로 측정하였다 [13]. PHA content (wt%)는 건조균체중량과 PHA 농도의 비율로 정의된다.

P(3HB-co-LA) 고분자는 solvent extraction method로 대장균으로부터 추출하였다 [14]. 고분자의 분자량은 gel permeation chromatography (GPC)를 이용하여 측정하였다 [4,9].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. P(3HB-co-LA) 합성 대사회로 구축

수크로스를 이용한 P(3HB-co-LA) 합성대사회로 구축을 확인하기 위하여, p619C1437-pct540로 *E. coli* W를 형질전환하여 재조합 대장균을 제작하였다 (Fig. 1). 제작된 재조합 대장균 W (p619C1437-pct540)를 2 g/L의 sodium 3-hydroxybutyrate가 함유된 MR medium에서 20 g/L의 수크로스를 탄소원으로 이용하여 30°C에서 96시간 동안 배양하였다 (Table 2). 이러한 배양조건에서 PHA synthase의 기질인 3HB-CoA는 배양액에 첨가된 3HB가 propionyl-CoA transferase에 의해 3HB-CoA로 전환되어 생성되며, 또 다른 기질인 lactyl-CoA는 자연적인 lactate 합성회로를 이용하여 수크로스로부터 생산된 lactate가 propionyl-CoA transferase에 의해 lactyl-CoA로 전환되어 생성된다 (Fig. 1). 재조합 대장균 W (p619C1437-pct540)는 이러한 배양조건에서 P(3HB-co-LA)를 합성하였으며, 고분자 내의 lactate 모노머 분율을 13 mol%였다. 또한 고분자의 축적률 (PHA content)는 31.3 wt%였다 (Table 2).

3.2. 수크로스로부터 P(3HB-co-LA) 합성

배양액에 3HB-CoA의 합성을 위하여 첨가된 3HB sodium salt를 첨가하지 않기 위하여 3HB-CoA를 수크로스로부터 합성하기 위한 대사회로를 구축하였다 (Fig. 1). *R. eutropha*의 *phaAB* 유전자를 발현하는 플라스미드인 pKM212-ReAB를 제작하여 재조합 대장균을 형질전환함으로써, 수크로스로부

Table 2. Biosynthesis of P(3HB-co-LA) by flask cultures of recombinant *E. coli* W from sucrose

Plasmids	DCW (g/L)	PHA conc. (g/L)	LA fraction (mol%)	PHA content (wt%)
p619C1437-pct540	1.39±0.01	0.43±0.03	13.0±0.2	31.3±0.2
p619C1437-pct540+ pKM212-ReAB	1.41±0.01	0.17±0.03	16.0±0.2	12.2±0.3

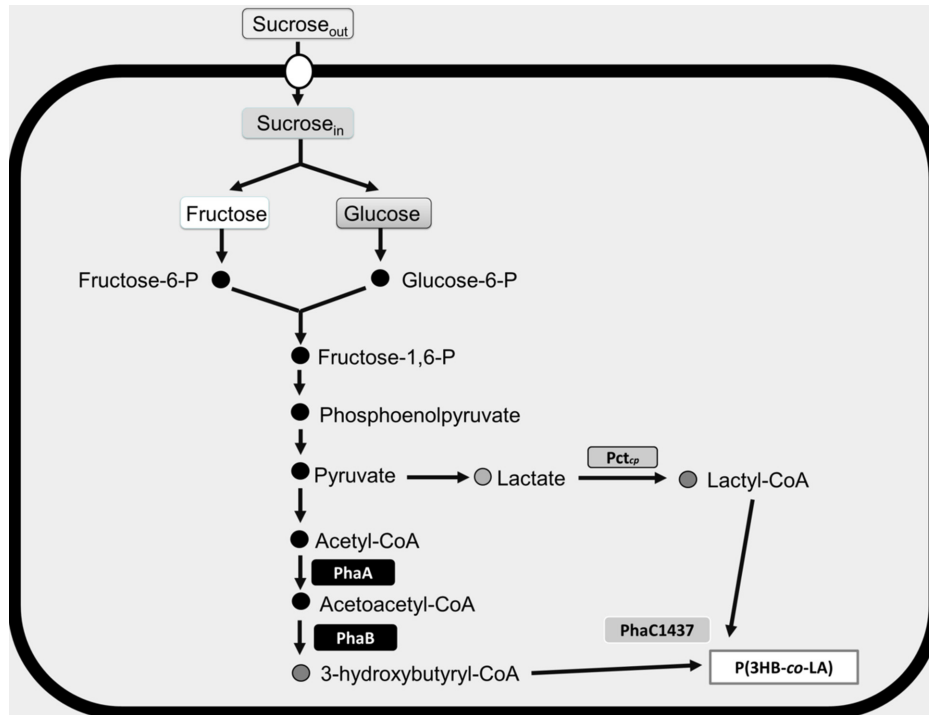


Fig. 1. Metabolic pathways for P(3HB-co-LA) biosynthesis in recombinant *E. coli* W from sucrose developed in this study. The overall metabolic pathway is shown together with the introduced metabolic pathways for the production of PHAs. Lactyl-CoA and 3HB-CoA are utilized by PHA synthase for the polymerization to produce P(3HB-co-LA). *Pseudomonas* sp. 6-19 PHA synthase (PhaC1437), containing quadruple mutations E130D, S325T, S477G, and Q481K, and an evolved *C. propionicum* propionyl-CoA transferase (Pctcp), containing V193A mutation and the four silent nucleotide changes T78C, T669C, A1125G, and T1158C have been employed to synthesize P(3HB-co-LA) and to supply 3HB-CoA and lactyl-CoA, respectively. For the synthesis of 3HB-CoA from glucose, *R. eutropha* β -ketothiolase (PhaA) and acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) have been employed.

터 생성된 acetyl-CoA를 acetoacetyl-CoA를 통해 3HB-CoA로 전환하는 대사회로를 구축하였다. 재조합 대장균 W (p619C1437-pct540 + pKM212-ReAB)를 20 g/L의 수크로스가 탄소 원료로 함유된 MR medium에서 30°C에서 96시간 동안 배양한 결과 P(3HB-co-LA)를 12.2 wt%의 PHA content로 생산할 수 있었으며 이때의 고분자내의 lactate 모노머 비율은 16 mol%였다 (Table 2). 생산된 고분자의 분자량을 측정된 결과, 수평균분자량이 1.53×10^4 (M_n), 질량평균분자량이 2.78×10^4 (M_w)로서 글루코스를 이용하여 생산된 P(3HB-co-LA)의 분자량과 비슷한 수치를 얻을 수 있었다.

4. CONCLUSION

본 연구진은 수크로스로부터 락테이트가 모노머로 함유된 P(3HB-co-LA)를 합성하는 대사회로를 제작하였고, 이를 이용하여 수크로스로부터 P(3HB-co-LA)를 합성하는 재조합 대장균 시스템을 개발하였다. 본 연구진이 개발한 수크로스를 이용한 P(3HB-co-LA) 생산시스템을 활용한다면, 다양한 모노머 조성을 지닌 락테이트가 함유된 고분자를 수크로스로부터 효율적으로 생산할 수 있어, 다양한 물성을 지닌 락테

이트 모노머 함유 고분자를 합성할 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgements

본 연구는 한국연구재단을 통한 미래창조과학부 기후변화대응 바이오피아니너리를 위한 시스템대사공학 원천기술개발사업 (NRF-2012-C1AAA001-2012M1A2A2026556)과 교육부 일반연구자사업 연구비(NRF-2013R1A1A2058379)의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Lee, S. Y. (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 1-14.
2. 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.
3. Steinbüchel, A. and H. E. Valentin (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 219-228.
4. Jung, Y. K., T. Y. Kim, S. J. Park, and S. Y. Lee (2010) Metabolic

- engineering of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers. *Biotechnol. Bioeng.* 105: 161-171.
5. Park, S. J., S. Y. Lee, T. W. Kim, Y. K. Jung, and T. H. Yang (2012) Biosynthesis of lactate containing polyesters by metabolically engineered bacteria. *Biotechnol. J.* 7:199-212.
 6. Park, S. J., T. W. Lee, S. C. Lim, T. W. Kim, H. Lee, M. K. Kim, S. H. Lee, B. K. Song, and S. Y. Lee (2012) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing 2-hydroxybutyrate from unrelated carbon source by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 93:273-283.
 7. Park, S. J., Y. A. Jang, H. Lee, A. R. Park, J. E. Yang, J. Shin, Y. H. Oh, B. K. Song, J. Jegal, S. H. Lee, and S. Y. Lee (2013) Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the biosynthesis of 2-hydroxyacid containing polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Metab. Eng.* 20: 20-28.
 8. Park, S. J., K. H. Kang, H. Lee, A. R. Park, J. E. Yang, Y. H. Oh, B. K. Song, J. Jegal, S. H. Lee, and S. Y. Lee (2013) Propionyl-CoA dependent biosynthesis of 2-hydroxybutyrate containing polyhydroxyalkanoates in metabolically engineered *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 165: 93-98.
 9. Yang, T. H., T. W. Kim, H. O. Kang, S. H. Lee, E. J. Lee, S. C. Lim, S. O. Oh, A. J. Song, S. J. Park, and S. Y. Lee (2010) Biosynthesis of polylactic acid and its copolymers using evolved propionate CoA transferase and PHA synthase. *Biotechnol. Bioeng.* 105: 150-160.
 10. Yang, T. H., Y. K. Jung, H. O. Kang, T. W. Kim, S. J. Park, and S. Y. Lee (2011) Tailor-made type II *Pseudomonas* PHA synthases and their use for the biosynthesis of polylactic acid and its copolymer in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 603-614.
 11. Yang, J. E., S. Y. Choi, J. H. Shin, S. J. Park, S. Y. Lee (2013) Microbial production of lactate-containing polyesters. *Microb. Biotechnol.* 6: 621-636.
 12. Braunegg, G., B. Sonnleitner, and R. M. Lafferty (1978) A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-b-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6: 29-37.
 13. Choi, J., S. Y. Lee, K. Shin, W. G. Lee, S. J. Park, H. N. Chang, and Y. K. Chang (2002) Pilot scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7: 371-374.
 14. Jacquelin, N, C. W. Lo, Y. H. Wei, H. S. Wu, and S. S. Wang (2008) Isolation and purification of bacterial poly (3-hydroxyalkanoates). *Biochem. Eng. J.* 39: 15-27.